

文章编号: 1001-098X(2002)02-0076-04

· 综述 ·

Egr-1基因的辐射生物学效应研究进展

许建华

摘要: Egr-1 (early growth response-1) 基因是一系列“立即早期基因 (immediate early gene)”之一, 参与细胞的多重辐射生物效应。研究表明, Egr-1在多种正常细胞和肿瘤细胞受到电离辐射后的早期就能被激活, 它的激活表达与辐射后细胞的生长、周期、凋亡等的改变密切相关。另外, Egr-1基因调控序列具有辐射可诱导特性, 这一特点使其具有潜在的临床和基因工程生产应用前景。

关键词: Egr-1; 细胞凋亡; 细胞周期; 辐射敏感性

中图分类号: Q503; Q274 **文献标识码:** A

Advances in the research of the role of Egr-1 gene in cells' response to ionizing radiation

XU Jian-hua

(Nuclear Medicine School, Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215007, China)

Abstract: Egr-1 (early growth response-1) gene is an important member of the "Immediate Early Growth" gene family, participating in multiple radiation biological effects of the irradiated cells. Studies have shown that after ionizing radiation, Egr-1 gene can be activated at an early stage in many types of tumor and normal cells. Its activation and the consequent expression is believed to have a close relation to the change in cell growth, cell cycle and apoptosis of the irradiated cells. Additionally, the radiation-inducible property of the Egr-1 gene regulating sequence confers potential clinical and genetic engineering uses.

Key words: early growth response-1; apoptosis; cell cycle; radiation sensitivity

1 Egr-1 基因及其产物 Egr-1 蛋白的结构特点

Egr-1 (early growth response-1) 基因是“立即早期基因”家族中的一个, 同类的还有 c-jun、NF- κ B、c-fos、Egr-2、Egr-3、Egr-4 等。Shimizu N 等^[1]于 1992 年在研究人 HL-60 细胞分化时首次发现人 Egr-1 基因。该基因定位于 5q31, mRNA 全长 3110bp^[1], 编码 533 个氨基酸。Egr-1 基因的调控序列中含有 6 个保守的 CC(A/T)₆GG 结构域, 这些结构域可感受胞内外的理化刺激如自由基、电离辐射等, 继而诱导基因表达^[2]。Egr-1 基因的表达产物为一具有三个 Cys₂-His₂ 锌指结构 (zinc finger) 的转录因子, 在锌离子的存在下, 锌指结构与 DNA 序列中富含 GC

(CGCCCCGC) 的启动子区域结合, 发挥转录调控作用^[2]。

2 Egr-1 基因的辐射生物学特性

2.1 Egr-1 基因与辐射敏感性

研究表明, Egr-1 基因参与了细胞的多重辐射生物学效应。

Egr-1 基因对于辐射所致的细胞生长抑制有重要作用, Ahmed MM 等^[3]用 ³H-TdR (³H-胸腺嘧啶脱氧核苷) 掺入法, 以“生长抑制率”为指标, 研究了 X 射线对人黑素瘤细胞株 A375-C6 生长的影响, 结果发现辐射可以显著抑制 A375-C6 细胞的生长, 再用一段反义寡核苷酸阻断辐射所诱导的 Egr-1 基因表达, 发现这种辐射所致的细胞生长抑制作用明显减小。为了进一步阐明 Egr-1 基因的作用机制, 他们用 WT1-Egr-1 的嵌合基因, 其中的 WT1 (Wilm's Tumor) 域 (domain) 具有转录抑制作用, 他们把该嵌合基因

收稿日期: 2001-10-15

作者简介: 许建华 (1975-), 男, 江苏昆山人, 苏州大学核医学院放射毒理学系 (江苏苏州, 215007) 硕士研究生, 主要从事电离辐射毒理学相关研究。

审校者: 苏州大学核医学院放射毒理学系 杨占山

接到 CMV(cytomegalovirus)启动子的下游,然后装入 pCB6⁺质粒,形成 pCMV-WT1-Egr-1 的载体质粒,将该质粒转入 A375-C6 后发现被转染的细胞株 X 射线所致的生长抑制减弱,他们认为这是 WT1-Egr-1 嵌合蛋白与 Egr-1 蛋白竞争同一转录调控位点的结果。Hallahan DE 等^[4]的研究则认为,X 射线介导的 Egr-1 转录因子的表达可能诱导了其下游的 TNF(肿瘤坏死因子)表达,而 TNF 最终导致了肿瘤生长抑制,其根据是 TNF 基因含有一段与转录因子 Egr-1 的靶序列相似的序列。上述研究表明,Egr-1 的正常表达有助于提高肿瘤细胞的辐射敏感性。但是,Huang RP 等^[5]在研究紫外线照射 NIH3T3 细胞时发现,照后 Egr-1 迅速表达对细胞有保护作用,阻断 Egr-1 基因的正常表达,使 NIH3T3 细胞生长速度比未阻断的受照细胞慢 26%,比非受照、未阻断的细胞慢 36%。

很早就发现辐射可以引起细胞周期紊乱,如 G₁ 期阻滞、S 期延迟、G₂ 期延迟,但直到发现细胞周期“检查站”(checkpoint),才对辐射引起的周期紊乱有了更深的认识。Dennis E 等^[6]研究发现,Egr-1 和 c-jun 等“立即早期生长效应”基因参与了细胞周期调控,他们观察到人肿瘤细胞 SQ20B、正常的纤维母细胞和 AT(共济失调性毛细血管扩张症)病人的纤维母细胞在接受 X 射线后的 5 小时内,20% 细胞进入了 S 期,而 WT1/Egr-1 转基因细胞克隆在接受同样的辐射后,滞留在 G₁ 期的比例增高,且生存率下降,这表明 Egr-1 的正常表达可能有助于细胞进程。Yan YX 等^[7]发现,Egr-1 蛋白是周期素 D₁ 及其他周期相关因子 p53、p21、p15 基因的转录激活因子。周期素 D's 和周期素 E 是重要的 G₁ 期周期素,它们通过与周期素依赖的蛋白激酶(cyclin dependent kinase,主要是 CDK2、CDK4、CDK6)结合激活后者,有促进细胞进程的作用。野生型 p53 基因在细胞周期中起着“检查站”的作用,其产物是一种转录因子,调控其下游的 p21 基因,而 p21 基因的产物是周期素 E/CDK2 复合物的抑制剂,负调控 CDK2,从而抑制细胞周期的进程。由此可见,Egr-1 基因对周期进程的影响可能是各种因子影响的综合结果。

辐射诱导细胞凋亡的机制现在比较成熟的观点是 p53 介导和 caspase3 介导作用。Ahmed MM 等人^[8]提出了一种 Egr-1 基因参与的由 TNF- α (肿瘤坏

死因子- α)介导的辐射致细胞凋亡机制,他们在 p53 蛋白功能缺陷的人前列腺细胞株 PC-3 中发现,尽管 p53 功能缺陷,但辐射仍能诱导 PC-3 细胞凋亡;进一步的研究表明:辐射诱导了 Egr-1 的表达,Egr-1 蛋白结合到 TNF- α 基因的富含 GC 的启动子区域,促进了后者的转录和翻译,上调的 TNF- α 蛋白启动了细胞凋亡程序。另外,在对含野生型 p53 基因的人黑色素瘤细胞的研究中也发现,尽管野生型 p53 可以介导细胞凋亡,但阻断 Egr-1 基因的表达后,细胞获得了辐射抗性^[9]。Anindita D 等人^[9]对 p53^{-/-} 鼠胚胎纤维母细胞的研究发现,Egr-1 一过性的过表达可介导辐射诱导的细胞凋亡,但凋亡细胞比例较 p53^{-/-} 小,据此他们认为 Egr-1 和 p53 对辐射诱导的细胞凋亡都至关重要。Dinkel A 等^[10]发现,Egr-1 基因表达上调可激活 Fas 的转录、翻译。Li-Weber M 等^[11]则发现,Egr-1 基因的表达上调可转录激活 Fas 配体(Fas ligand)基因。细胞膜上的 Fas 与 Fas 配体相互作用可以直接启动细胞的凋亡,而无需细胞核的存在。这些研究表明,Egr-1 基因对于辐射诱导的细胞凋亡有重要意义。然而,也有 Egr-1 表达上调具有抗凋亡作用的报告。Huang RP 等^[12]的研究发现,在 Egr-1 可诱导的 NIH3T3 细胞和 Egr-1 表达较恒定的 HT1080 H4E9 细胞中,紫外线的照射都可上调 Egr-1 的水平,而且上调水平与 Egr-1 的磷酸化相关,进一步利用 PKC(蛋白激酶 C)和 TK(酪氨酸激酶)的阻滞剂的研究表明,PKC 和 TK 参与了 Egr-1 的抗凋亡作用。以上研究表明,Egr-1 基因参与的辐射诱导细胞凋亡机制可能是多种的,并且,究竟是具有诱导凋亡还是抗凋亡的作用可能与细胞特异性有关。

2.2 Egr-1 基因调控序列的辐射可调控特性

Egr-1 基因的调控序列的辐射可诱导特性是 Egr-1 的另一个特点。在人和小鼠的 Egr-1 基因的调控区,都有一些高度保守的结构域,这些结构域能感受多种刺激而诱导 Egr-1 或其他一些与之相连的下游基因表达^[2]。比如,电离辐射、氧自由基、促有丝分裂的因子(如血清、血小板源性生长因子、成纤维细胞生长因子)等均能诱导 BALB/c 小鼠 3T3 细胞的 Egr-1 表达。1994 年,Weichselbaum RR 等人^[13]将 Egr-1 的调控序列和 TNF 的 cDNA 连接,用射线成功地诱导了 TNF 表达,这表明 Egr-1 基因的调控序列可用来启动外源基因。

3 基于 Egr-1 基因调控序列辐射可诱导特性的临床前研究进展

Egr-1 基因的调控序列与下游的具有肿瘤杀伤效应基因组成嵌合基因后,能赋予后者以辐射可诱导的特性,因而在肿瘤的基因治疗中有着很好的应用前景。Weichselbaum RR 等^[4]在 1992 年首先提出了肿瘤基因-放射治疗的新思路,并于 1994 年将 Egr-1 基因的调控序列和 TNF 的 cDNA 相连,用辐射成功地诱导了 TNF 的表达^[5]。在对具有辐射抗性的肿瘤进行基因治疗的过程中,Seung LP 等^[5]发现可用放射线来增强基因治疗的疗效。他们把 Egr-1 基因调控区(包含启动子和增强子)的辐射可诱导元件 CARGs 接在人 TNF cDNA(pE425-TNF)序列的上游,并用阳离子脂质装载后转染 P4L 细胞系(一种具有辐射抗性和 TNF 抗性的变异的鼠纤维肉瘤细胞系),在瘤内单次给予含 10mg pE425-TNF 的阳离子脂质载体后,接受 2 次总量各为 20Gy 的辐照,结果发现:既接受 pE425-TNF 又接受辐照组平均瘤体积缩小较单纯接受 pE425-TNF 或单纯受照缩小组远为明显。同时,转染 pE425-TNF 且接受辐照组的 TNF 表达量是对照组的 29 倍,并且在受照后的 14 天内都可以测得 TNF 水平。Kawashita Y 等^[6]将 Egr-1 的启动子接在“自杀基因”HSV-tk(herpes simplex virus thymidine kinase)的上游,再用脂质载体转染肝癌细胞株,发现感染成功的肝癌细胞株在辐照后对 GCV(更昔洛韦)的敏感性显著增强,未辐照者对 GCV 不敏感,他们进而提出了“HSV-tk/GCV 和辐射”的联合治疗肝癌的可能模式,这种治疗模式在移植了人肝癌细胞的裸鼠上得到了验证。

以上研究提示:局部输注具有肿瘤杀伤效应的由 Egr-1 基因调控序列启动的外源性基因表达载体,再利用局部放疗来诱导表达,可能提供了一种既减少放疗剂量又提高疗效的新方法,也为克服肿瘤放疗不敏感、降低放疗副作用提供了新思路。局部放射诱导的方法既可以是外照射,也可以利用一些放射性核素的亲组织分布来进行。⁶⁷Ga 标记的柠檬酸盐易于在肿瘤组织积聚,可被用于肿瘤显像,Takahashi T 等人^[7]研究了利用 ⁶⁷Ga 的射线来诱导转染有荧光素酶报告基因质粒的胰腺癌细胞株 As-Pc1,启动荧光素酶表达的启动子是 Egr-1 的启动子,结果发现照射后的荧光素酶活性是对照的 100

~300 倍。这可能对胰腺癌的治疗方法提供了某些启示。

4 Egr-1 基因调控序列辐射可诱导特性的生产应用前景

在基因工程生产上,原核表达系统产量低,真核表达系统调控复杂,生物反应器的外源基因的表达定位较难,而 Egr-1 调控序列的辐射可诱导特性和辐照后具有的较强启动性使基因工程生产具有了时间和空间上的可操作性,且能保证一定的产量,因而可能具有某种程度的生产应用前景。

参考文献:

- [1] Shimizu N, Ohta M, Fujiwara C, et al. A gene coding for a zinc finger protein is induced during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acet-ate-stimulated HL-60 differentiation [J]. *J Biol Chem*, 1992, 111(2): 272-277.
- [2] Datta R, Rubin E, Sukhatme V, et al. Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CARC elements [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10149-10153.
- [3] Ahmed MM, Kolaparathi V, Sana MF, et al. Egr-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(46): 29231-29237.
- [4] Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML, et al. Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(6): 2156-2160.
- [5] Huang RP, Adamson ED. A biological role for Egr-1 in cell survival following ultra-violet irradiation [J]. *Oncogene*, 1995, 10(3): 467-475.
- [6] Dennis E, Hallahan DE, Edward D, et al. c-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(51): 30303-30309.
- [7] Yan YX, Nakawa H, Lee MH, et al. Transforming growth factor- α enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D1 promoter [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(52): 33181-33190.
- [8] Ahmed MM, Stephen FS, Kolaparathi V, et al. Ionizing radiation-induced apoptosis in the absence of p53 linked to transcription factor Egr-1 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(52): 33056-33061.
- [9] Anindita D, Damodaran C, Swatee D, et al. Ionizing radiation down-regulates p53 protein in primary Egr-1^{-/-} mouse embryonic fibroblast cells causing enhanced resistance to apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3279-3286.

- [10] Dinkel A, Aicher W, Haas C, et al. Transcription factor Egr-1 activity down-regulates Fas and CD23 expression in B cells[J]. *J Imm-unol*, 1997, 159(6): 2678-2684.
- [11] Li-Weber M, Laur O, Krammer PH. Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas)ligand promoter in response to T cell stimulation [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(9): 3017-3027.
- [12] Huang RP, Fan Y, de Belle I, et al. Egr-1 inhibits apoptosis during the UV response: correlation of cell survival with Egr-1 phosphorylation[J]. *Cell Death Differ*, 1998, 5(1): 96-106.
- [13] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4266-4269.
- [14] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme VP, et al. Gene therapy targeted by ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992, 24(3): 565-567.
- [15] Seung LP, Mauceri HJ, Beckett MA, et al. Genetic radiotherapy overcomes tumor resistance to cytotoxic agents [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23): 5561-5565.
- [16] Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, et al. Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(9): 1509-1519.
- [17] Takahashi T, Namiki Y, Ohno T. Induction of the suicide HSV-TK gene by activation of the Egr-1 promoter with radioisotopes[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(7): 827-833.

文章编号: 1001-098X(2002)02-0079-05

p53在调节细胞周期阻滞和细胞凋亡中的作用及其机制

杜 华

摘要: p53 作为抑癌基因, 在各种应激情况下(包括电离辐射所致 DNA 损伤、核苷酸缺失、低氧或癌基因激活)调控细胞周期进程和细胞凋亡过程。本文综述了 p53 及其下游分子在细胞周期和细胞凋亡中的作用, 在此基础上探讨 p53 在选择细胞周期阻滞和细胞凋亡中的影响因素。

关键词: p53; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: Q756 **文献标识码:** A

The regulating mechanism of p53 during cell cycle arrest and apoptosis

DU Hua

(Laboratory of Nuclear Analysis Techniques, Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: p53, acting as a tumour suppressor gene, regulates the system of cell cycle and apoptosis when cells confront a variety of stress including DNA damage responding to ionizing radiation, nucleotide depletion, hypoxia or oncogene activation. In this article, the role and targets of p53 during cell cycle and apoptosis are reviewed. On the basis of it, we question factors of the decision to undergo growth arrest versus apoptosis in response to p53 expression.

Key words: p53; cell cycle; apoptosis

p53 是第一个被证实的肿瘤抑制基因, 其产物

p53 蛋白存在于正常细胞内, 但由于半衰期短(20~30 min)且极不稳定, 因而在非应激细胞内几乎检测不到^[1,2]。p53 参与细胞生长、分化与死亡, 与肿瘤的发生、发展密切相关, 是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因之一。

收稿日期: 2002-02-07

作者简介: 杜华(1976-), 女, 安徽合肥人, 第一军医大学热卫系放射医学教研室(广州, 510515)硕士研究生, 主要从事放射生物学研究

审校者: 第一军医大学热卫系放射医学教研室 丁振华