

MDM2 基因与肿瘤放射生物效应

林向飞 骆丹

【摘要】 鼠双微体 2(MDM2)基因是电离和紫外线辐射反应中的关键组分, MDM2 表达水平决定辐射诱导的抑癌基因 p53 活性增加程度。MDM2 可以限制 p53 的凋亡功能, 是许多类型细胞的存活因子。另外, DNA 损伤诱导 MDM2 的表达, 一般认为高水平的 MDM2 蛋白可以缩短辐射后 p53 建立的细胞周期阻滞。MDM2 表达的增加似乎可以保证存活细胞中 p53 的活性恢复到较低的基础水平。MDM2 水平的降低增加了细胞对电离辐射的敏感性。因此, MDM2 是介入治疗的潜在靶点。

【关键词】 基因, MDM2; 基因, p53; 辐射效应; 基因表达调控, 肿瘤; 紫外线

【中图分类号】 Q345.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)02-0118-04

MDM2 gene and radiobiological effect in tumors

LIN Xiangfei, LUO Dan

(Department of Dermatology, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Murine double minute 2 (MDM2) gene is a critical component of the responses to both ionizing and UV radiation. The level of MDM2 expression determines the extent to which radiation induces an increase in the activity of the p53 tumor suppressor. MDM2 acts as a survival factor in many cell types by limiting the apoptotic function of p53. In addition, expression of MDM2 is induced in response to DNA damage, and the resulting high levels of MDM2 protein are thought to shorten the length of the cell cycle arrest established by p53 in the radiation response. Increased levels of MDM2 appear to ensure that the activity of p53 returns to its low basal levels in surviving cells. Decreased levels of MDM2 sensitize cells to radiation. Thus, MDM2 is a potential target for therapeutic intervention because its inhibition may radiosensitize the subset of human tumors expressing wild-type p53 such that radiotherapy is more efficacious.

【Key words】 MDM2, gene; p53, gene; Radiation effects; Gene expression regulation; Neoplasms

鼠双微体 2(murine double minute 2, MDM2)是胚胎和成人组织的关键存活因子^[1], 也是最先对 p53 反应的基因之一。人们发现紫外线和电离辐射均可诱导 MDM2 以 p53 依赖性方式表达^[2]。这两种辐射都可使 p53 诱导细胞周期阻滞在 G₁ 期, 或者依赖于细胞辐射类型的凋亡, 而 MDM2 能抑制两种反应。MDM2 通过两种途径抑制 p53: 一种是直接妨碍 p53 诱导基因表达的活性; 另一种是 MDM2 的泛肽作用可以促进 p53 从胞核移到胞质, 失去转录激活因子的作用。MDM2 必须直接结合 p53 才可阻止转录核刺激降解, 因此, MDM2 和它结合 p53 的水平对调节辐射反应很关键。

1 MDM2 基因及其蛋白的结构和功能

MDM2 是癌基因, 对细胞生长有调节作用, 可促进细胞增长及肿瘤的生长。MDM2 基因位于 12q13-14, 长 2372bp, 有 P1 和 P2 两个启动子, 只有 P2 对辐射有反应^[3]。在小鼠和人的细胞中, 紫外线和电离辐射诱导的 MDM2 mRNA 的表达通过 p53 反应性的 P2 启动子产生, 没有上游 P1 启动子的共同参与。不同 MDM2 启动子表达不同形式的 MDM2, P1 启动子指导 mRNA 的合成, 含有 MDM2 的外显子 1, 而 P2 启动子合成的 mRNA 缺乏外显子 1^[3]。而且, P1 启动子产生的 mRNA 外显子结构存在种属差异。因此, 启动子的选择性决定了 MDM2 mRNA 的外显子结构。

启动子的选择性可能影响 MDM2 水平, 因为

作者单位: 南京医科大学第一附属医院江苏省人民医院皮肤科 (林向飞, 骆丹)

通讯作者: 林向飞 (E-mail: xiaoling79@sina.com)

至少在一些细胞系中, P1 启动子产生的全长 mRNA 转录效率低于 P2 产生的 mRNA。来自 P1 启动子产物的 5' 非翻译区阻滞转录的能力源自于外显子 1 的开放读码框, 导致 MDM2 P1 启动子产生的 mRNA 转录效率低于 MDM2 P2 启动子。因此, p53 针对辐射反应诱导的 P2 启动子而不是 P1 启动子的表达可能是导致 MDM2 蛋白快速合成的原因。该调节步骤将限制 p53 功能, 促进辐射后 p53 蛋白和活性回复低水平。

这两种 MDM2 启动子的产物在翻译方面也不同。鼠 P1 和 P2 启动子产生的 mRNA 至少合成两个 MDM2 蛋白^[8], 较大的是 p90 MDM2 蛋白, 它是核蛋白, 有 491 个氨基酸, 相对分子质量 90×10^3 , 为 p53 的抑制物; 较小的是 p76 MDM2 蛋白, 为 p53 的激活物, 缺乏 p90 MDM2 蛋白初始的 49 个氨基酸。p76 MDM2 是 p90 MDM2 显性负相抑制物, 可以稳定 p53^[9]。

MDM2 基因的 mRNA 和蛋白产物的不同功能可能是两种 MDM2 启动子存在的原因。而且, 两种启动子的内在性质很重要。如上所述, DNA 损伤后, p53 不能诱导上游的 P1 启动子, 但可以诱导下游的 P2 启动子。P2 启动子的诱导也可以发生在一些极端条件下, 例如, 对来源于转录修复活性基因缺陷 [Cockayne 综合征 (Cockayne syndrom, CS)] 患者的成纤维细胞中, 紫外线可以导致人 P1 启动子产生的 mRNA 量的减少; 数小时后, p53 诱导 P2 启动子的表达, 虽然来源于 P1 启动子的 mRNA 水平继续下降^[6]。因此, p53 似乎能够在整体转录抑制的情况下刺激转录。简而言之, 对辐射细胞来说, 有两种不同的调控 MDM2 启动子是有许多优点的。

2 紫外线反应中 MDM2 水平对 p53 的调节作用

表皮细胞中的凋亡程度必须小心控制, 因为有限的凋亡抑制肿瘤, 而广泛的凋亡导致皮肤肿瘤形成。p53 诱导暴露于中波紫外线 (ultraviolet B, UVB) 的鼠皮肤产生凋亡, 而缺乏 p53 的小鼠暴露于紫外线后容易发生鳞状细胞癌^[7]。暴露于紫外线的人皮肤中 p53 蛋白水平升高, 特别是在凋亡的晒斑细胞中。人鳞状细胞癌中 p53 基因常突变, 提示 p53 的凋亡功能可以防止人皮肤癌。

在对紫外线反应中, MDM2 水平对 p53 的调节

很关键。紫外线辐射后的鼠皮肤中 MDM2 可以抑制 p53 的凋亡功能。与野生型相比, 携带 MDM2 cDNA 和上皮特异性人角蛋白 14 启动子的转基因小鼠在皮肤基底细胞中表达的 MDM2 蛋白要高 5~10 倍。当暴露于 UVB 时, 这些 MDM2 转基因小鼠的皮肤细胞凋亡水平比野生型显著减少, 而且, p53 反应性 p21 基因的诱导水平也降低^[8]。因此, MDM2 的基础水平可以影响紫外线辐射后 p53 凋亡反应的程度。

紫外线诱导的 MDM2 表达在调节 p53 对紫外线反应中很关键。短波紫外线 (ultraviolet C, UVC) 辐射的人成纤维细胞中 MDM2 的诱导与 p53 低水平的回归及阻止广泛的凋亡相关。某些核苷酸切除修复酶缺陷的成纤维细胞不能诱导 MDM2, 凋亡快速而广泛, 而正常成纤维细胞诱导 MDM2, 对致死剂量的 UVC 敏感性降低^[9]。

培养的人成纤维细胞诱导 MDM2 的能力与它们修复转录基因光损伤的能力相关, 一些 DNA 修复途径, 包括核苷酸切除修复途径, 受刺激后快速修复基因组中的转录基因^[9]。CS 患者的细胞失去这种能力, 着色性干皮病 (xeroderma pigmentosum, XP) 亚群 A (XPA) 患者也失去在全基因组区域中修复紫外线导致的皮肤损伤的能力, 在对紫外线反应中, CS 和 XPA 细胞容易遭受 p53 介导的凋亡, 这些说明 MDM2 的诱导对生存很关键。一些后续研究表明, MDM2 的两个启动子对调节紫外线反应中 MDM2 蛋白积聚是很必要的。Michalowski 等^[6]证实, 在 XPA 和 CS 成纤维细胞中 MDM2 的诱导减少, 在这些 CS 细胞中, 来源于 P2 启动子的转录被诱导, 而来源于 P1 启动子的转录被抑制。因此, 在 DNA 损伤干扰了 P1 启动子转录的情况下, p53 才诱导 P2 启动子。这些结果显示, 虽然 P2 启动子的诱导对于增加 MDM2 的水平很关键, 但 P1 启动子的表达必须被维护, 以使 MDM2 达到最佳水平, 防止细胞死亡。

3 辐射反应中 p53 和 MDM2 相互作用的调节因子

MDM2 对 p53 的抑制作用需要两者蛋白的结合^[7], 因此减少它们之间的相互作用可能是辐射反应中稳定和激活 p53 的主要策略, 也是研究过表达 MDM2 的肿瘤中再活化 p53 药物的策略^[10]。共价键修饰其中任一蛋白可抑制 MDM2 和 p53 之间的相

互作用^[11]。关于辐射反应中 MDM2 和 p53 的共价键修饰的争论是发现建立细胞周期检查点和 (或) 刺激 DNA 修复的激酶可以在体外使 MDM2 和 p53 磷酸化^[12]，但是，这些激酶是否必须磷酸化 p53 或 MDM2 来发挥它们的检查点作用还不清楚。

基因工程小鼠的实验已经获得一些关于调节 p53 对电离辐射反应的机制。辐射诱导 p53 反应的细胞周期阻滞和凋亡在某些磷酸肌醇-3 激酶家族突变的小鼠中可以被抑制。该家族包括 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA dependent protein kinase, DNA-PK)、共济失调性毛细血管扩张症突变蛋白 (ataxia telangiectasia mutata, ATM) 和 ATM 相关蛋白激酶 (ATM related protein kinase, ATR)，其中任一激酶都可以在 MDM2 和 p53 相互作用关键点处使 p53 体外磷酸化^[13]。这些激酶似乎调节 p53 对辐射的反应。

DNA-PK 是在辐射反应中最先激活 p53 的激酶之一，能增强 MDM2 抑制 p53 的转录激活功能的能力^[12]。DNA-PK 使 p53 在 15 和 17 位丝氨酸发生磷酸化，突变为丙氨酸，阻断了 DNA-PK 的激酶作用。DNA-PK 可能是激活 p53 对电离辐射反应的信号级联。ATM 在调节损伤反应中的 p53 作用很关键。ATM 缺陷的 T 细胞不能像野生型 T 细胞经全身电离辐射后经历细胞周期阻滞，提示 ATM 对于介导 p53 依赖的检查点很重要^[13]。另有证据表明，ATM 有助于 p53 介导的凋亡的诱导，但该作用比较微弱。因此，ATM 的一些重要生物学功能可能不是 p53 介导的，可能是 MDM2 介导的。由于 ATR 缺陷的小鼠早期胚胎的死亡，ATR 在 T 细胞凋亡和细胞周期阻滞中的作用还没有确定。但是，一些细胞培养实验已经确定 ATR 在电离辐射和紫外线辐射反应中调节细胞周期检查点的观点^[13]。电离辐射反应中，ATR 似乎对 ATM 起着补充作用，阻止进入有丝分裂期^[14]。在时程上，ATM 早期活化而 ATR 晚期活化^[15]。在紫外线反应中，ATR 似乎对调整检查点的磷酸肌醇-3 激酶最关键，如同 ATM，ATR 可以在 15 位丝氨酸上磷酸化 p53，也是紫外线辐射反应中 p53 最大磷酸化所必须的^[15]。

一些激酶调节 MDM2 可能是因为它能高度磷酸化，并且磷酸化的结构随辐射而改变。MDM2 中心的丝氨酸高度磷酸化，与 MDM2 刺激 p53 降解而不影响它对 p53 泛素化作用的能力下降相关。DNA-PK 和 ATM 都是重要的 MDM2 激酶^[16]。DNA-

PK 可以在 17 位丝氨酸处磷酸化 MDM2，这也是 p53 结合区域，这种修饰作用减少结合 MDM2 的 p53 的量^[16]，ATM 在 395 位丝氨酸处磷酸化 MDM2，这种修饰减少 MDM2 刺激 p53 降解的能力，但不改变两种蛋白结合的能力，c-Abl 酪氨酸激酶使邻近氨基酸 394 位酪氨酸磷酸化，同样抑制 MDM2 刺激 p53 降解的能力，而且，苯丙氨酸替代 394 位酪氨酸可增强 MDM2 抑制 p53 的转录激活和凋亡功能^[17]。

在辐射损伤反应中，p53 和 MDM2 之间的交叉调节很复杂，修饰 p53 和 MDM2 的激酶数量很多，其中一个原因是 p53 蛋白的不同亚群有不同的调节方式。DNA-PK 对于激活辐射前就存在的 p53 亚群的凋亡功能是必须的，但不能激活辐射后合成的 p53。p53 蛋白亚群与不同的细胞周期依赖性调节蛋白相关。p53 的主体在整个细胞周期与 MDM2，p300 和 c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun NH₂-terminal kinase, JNK) 相关；而结合 DNA 的 p53 亚群在 G₀ 和 G₁ 期与 JNK 有关，在 S 和 G₂-M 期与 MDM2 和 p300 相关。一般认为，JNK 在 G₀ 和 G₁ 期控制 p53 的稳定性，而 MDM2 在 S 和 G₂-M 期控制 p53。因此，细胞类型和细胞周期阶段均影响着 p53 的调节途径。MDM2 对 p53 的泛素化作用 (ubiquitination) 对促进 p53 降解是不充分的^[16]。最近研究证明，p53 的转归不仅依赖 p90MDM2，也依赖 p300 蛋白^[18]，p300 增加 p53 的泛素聚体且不能被 MDM2 干预，只有多泛素化的 p53 蛋白分子才对蛋白水解作用敏感。因此，破坏 p300 功能的因素可以促进电离辐射和紫外线辐射反应中 p53 的积聚。该调节步骤的研究才刚开始。

参 考 文 献

- 1 Mendrysa S M, McElwee MK, Michalowski J, et al. Mdm2 is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(2): 462-472.
- 2 Gelis C, Mavon A, Vicendo P. The contribution of calpains in the down-regulation of Mdm2 and p53 proteolysis in reconstructed human epidermis in response to solar irradiation. *Photochem Photobiol*, 2005, 81(4): 975-982.
- 3 Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, et al. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev*, 1994, 8(15): 1739-1749.

·标准和法规·

卫生部通告一批国家职业卫生标准和行业标准

据卫生部“卫通[2006]16号”通告,自2007年4月1日起,13项强制性国家职业卫生标准和6项推荐性国家职业卫生标准予以实施。其中,与放射医学和核医学相关的标准有:

1 强制性国家职业卫生标准:

- GBZ113-2006 核与放射事故干预及医学处理原则 (代替 GBZ113-2002, GBZ/T153-2002)
- GBZ114-2006 密封放射源及密封 γ 放射源容器的放射卫生防护标准 (代替 GBZ114-2002, GBZ135-2002)
- GBZ117-2006 工业 X 射线探伤放射卫生防护标准 (代替 GBZ117-2002, GBZ/T150-2002)
- GBZ119-2006 放射性发光涂料卫生防护标准 (代替 GBZ119-2002)
- GBZ120-2006 临床核医学放射卫生防护标准 (代替 GBZ120-2002)
- GBZ175-2006 γ 射线工业 CT 放射卫生防护标准
- GBZ176-2006 医用诊断 X 射线个人防护材料及用品标准
- GBZ177-2006 便携式 X 射线检查系统放射卫生防护标准

GBZ178-2006 低能 γ 射线粒子源植入治疗的放射卫生防护与质量控制检测规范

GBZ179-2006 医疗照射放射防护基本要求

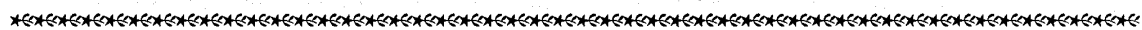
2 推荐性国家职业卫生标准:

- GBZ/T154-2006 两种粒度放射性气溶胶年摄入量限值 (代替 GBZ/T154-2002)
- GBZ/T180-2006 医用 X 射线 CT 机房的辐射屏蔽规范
- GBZ/T181-2006 建设项目职业病危害放射防护评价报告编制规范
- GBZ/T182-2006 室内氡及其衰变产物测量规范
- GBZ/T183-2006 电离辐射与防护常用量和单位
- GBZ/T184-2006 医用诊断 X 射线防护玻璃板标准

另据卫生部“卫通 [2006] 18号”通告,自2007年4月1日起,1项强制性行业标准和1项推荐性行业标准予以实施,其编号和名称如下:

强制性行业标准: WS 262-2006 后装 γ 源治疗的患者防护与质量控制检测规范

推荐性行业标准: WS/T263-2006 医用磁共振成像(MRI)设备影像质量检测与评价规范



4 Jin X, Turcott E, Englehardt S, et al. The two upstream open reading frames of oncogene mdm2 have different translational regulatory properties. *Biol Chem*, 2003, 278(28): 25716-25721.

5 Perry M E, Mendrysa S M, Saucedo L J, et al. p76Mdm2 inhibits the ability of p90 Mdm2 to destabilize p53. *Biol Chem*, 2000, 275(8): 5733-5738.

6 Michalowski J, Seavey SE, Mendrysa SM, et al. Defects in transcription coupled repair interfere with expression of p90Mdm2 in response to ultraviolet light. *Oncogene*, 2001, 20(41): 5856-5864.

7 Zhang H. p53 plays a central role in UVA and UVB induced cell damage and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Lett*. 2006, 244(2): 229-238.

8 Ganguli G, Abecassis J, Wasylyk B. Mdm2 induces hyperplasia and premalignant lesions when expressed in the basal layer of the epidermis. *EMBO J*, 2000, 19(19): 5135-5147.

9 Conforti G, Nardo TD, Incalci M, et al. Proneness to uninduced apoptosis in human fibroblasts defective in transcription coupled repair is associated with the lack of Mdm2 transactivation. *Oncogene*, 2000, 19(22): 2714-2720.

10 Fotouhi N, Graves B. Small molecule inhibitors of p53/MDM2 interaction. *Curr Top Med Chem*, 2005, 5(2): 159-165.

11 Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13(1): 49-58.

12 Shieh S Y, Ikeda M, Taya Y, et al. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by Mdm2. *Cell*, 1997, 91(3): 325-334.

13 Brown E J, Baltimore D. Essential and dispensable roles of Atr in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev*, 2003, 17(5): 615-628.

14 Shiloh Y. Atm and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(3): 155-168.

15 Mayo L D, Turchi J, Berberich SJ. Mdm2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5013-5016.

16 Blattner C, Hay T, Meek D W, et al. Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(17): 6170-6182.

17 Goldberg Z, Vogt Sionov R, Berger M, et al. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J*, 2002, 21(14): 3715-3727.

18 Grossman S R, Deato M E, Brignone C, et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, 2003, 300(5617): 342-344.

(收稿日期: 2006-06-28)