

· 综 述 ·

WIG-1 表达的调控及其在肿瘤和干细胞中的作用*

李 坤 综述, 郭 伟, 王如文[△] 审校

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心, 重庆 400042)

关键词: WIG-1; p53; 肿瘤; 干细胞

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.036

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)17-1761-03

约 50% 的人上皮细胞肿瘤中能检测到 TP53 突变, 因此全面阐释 p53 的功能是肿瘤学研究的核心问题之一^[1]。在 DNA 损伤、癌基因活化、核苷酸耗竭和缺氧等多种应激因素刺激下, p53 稳定性增高, 并被转录后修饰作用所激活, 从而介导细胞发生 G₁/G₂ 期停滞或凋亡, 并参与细胞衰老、分化、DNA 修复和基因组稳定性的维持等过程^[1-2]。作为转录因子, p53 可与其下游靶基因启动子的特异性位点结合, 发挥正调节作用, 如介导细胞周期阻滞的 p21、Gadd45、14-3-3 σ 和 Reprimo 等, 以及介导细胞凋亡的 Bax、Fas、PIG、PERP、Noxa、MCG-10、p53AIP1 和 PIDD 等。此外, p53 还能对凋亡抑制因子 Bcl-2、IGF-1R 和 MAP4 等发挥负调节作用^[3]。目前已知 TP53 中的 DNA 结合区发生突变, 是肿瘤异常增殖的重要原因。进一步发掘 p53 在肿瘤中其他作用机制及其相关下游信号分子可能会对肿瘤的治疗产生深远的影响。

野生型 p53 诱导基因 1 (wild-type p53-induced gene 1, WIG-1) 又被称为 PAG608 或 ZMAT3, 是受 p53 直接调控的下游靶基因^[3]。WIG-1 基因定位于人类 3 号染色体长臂的 26.3 ~ 27.0 区(3q26.3 ~ 27.0)^[3]; 其开放阅读框(ORF) 编码的蛋白包括两种不同的转录本, 分别含 288 或 289 个氨基酸; 其 3' 非翻译区(3' UTR) 较长, 并含有 3 个 PolyA 位点。WIG-1 蛋白相对分子质量为 32 × 10³, 主要定位于胞核, 也可表达于胞浆^[4-5], 在成人的脑组织中高表达, 肾和睾丸组织中中度表达; 而在胎儿的脑、心脏、胰腺、肾上腺、肝和小肠组织中未检测到表达^[5]。WIG-1 蛋白含有 3 个 C2H2 型锌指结构, 锌指间存在特殊的空间结构, 使 WIG-1 蛋白对各种长度的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA), 以及 miRNA 样 RNA (miRNA-like RNA) 具有高度的亲和力^[6]。

1 WIG-1 的结构和功能

WIG-1 蛋白最显著的特点是其含有 3 个 C2H2 型锌指结构, 该锌指结构在从鱼到人的多个物种间高度保守^[7]。C2H2 型锌指蛋白(Cys2His2 zinc finger proteins) 的主要功能是识别特定的 DNA 片段, 也可结合 dsRNA、单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)、DNA-RNA 杂合物、miRNA 样 RNA 和其他蛋白^[6]。WIG-1 的 3 个 C2H2 型锌指间连接序列较长(54 ~ 75 个氨基酸), 锌指内组氨酸间距较宽(5 个氨基酸), 其空间构型与 JAZ 和 dsRBP-Zfa 相似, 具有典型的 dsRNA 结合蛋白的特点^[3]。外源性 WIG-1 主要通过锌指 1 和锌指 2 与长链(50 ~ 100 bp) dsRNA 的 5' 突出部相结合, 还可与短链(21 bp) dsRNA (如 siRNA 和 miRNA 样 dsRNA) 的 3' 突出部相结合, 这说明 WIG-1 对各种长度的 dsRNA 均有高度的亲和力^[6], 并可能参与 dsRNA 和 miRNA 介导的调控作用。WIG-1 能通过

RNA 依赖的方式与 RHA 和 hnRNP A2/B1 相互作用形成蛋白-RNA 复合物, 并参与 mRNA 的加工和翻译^[8]。WIG-1 也是一种 ARE 结合蛋白(ARE-binding protein, AUBP), 可调节包括 TP53 在内的靶 mRNA 的稳定性。AREs 介导的调控作用发生在胞浆, 而 WIG-1 主要定位于胞核, 并可在胞核和胞浆间穿梭, 这与另一种 AUBP-HuR 相似^[4]。因此 WIG-1 可能还具有 mRNA 运输、加工和剪接等与 HuR 相似的胞核功能。

2 WIG-1 表达的调控

WIG-1 是受 p53 直接调控的靶基因, 其诱导上调具有 wt-p53 依赖性, 但可能还存在其他多样化的调节方式。

1997 年, Israeli 等^[9]以 LTR6 细胞作为研究对象, 寻找受 p53 调节的下游靶因子。LTR6 细胞来源于 p53 缺陷的小鼠髓样白血病 M1 细胞, 由 M1 细胞稳定转染温度敏感性 p53 突变体 p53val135 形成。其特点是, 在 37 °C 条件下, p53val135 蛋白主要表现为突变型, 不具备 wt-p53 的生物学活性。当温度降至 32 °C 时, p53val135 蛋白可恢复 wt-p53 构象, 并引起大量 wt-p53 依赖的细胞凋亡。Israeli 等^[9]分别提取经 32 °C 降温培养和 37 °C 正常培养的 LTR6 细胞的 RNA 进行比较, 通过差异显示实验获得 3 种表达明显增高的转录物, WIG-1 即是其中之一。

WIG-1 对 p53 活性改变的反应迅速、持久而灵敏。p53 活化 2 h 后, WIG-1 表达即接近最大值; 活化 16 h 后, WIG-1 表达仍明显增高; 活化 4 h 后, WIG-1 表达可增高 10 ~ 20 倍^[9]。这些现象提示 WIG-1 可能是受 p53 直接调控的靶因子。Wilhelm 等^[10]对小鼠 WIG-1 mRNA 的部分启动子序列进行克隆, 通过凝胶电泳迁移率转换实验(EMSA) 发现 3 个潜在的 p53 结合位点, 并进一步通过荧光素酶报告基因实验证实其中 2 个位点可与 p53 结合形成 DNA-蛋白复合物, 并驱动 p53 依赖的转录调控作用, 说明 WIG-1 确实是 p53 的直接靶基因。

组织和细胞中 WIG-1 虽存在一定程度的固有表达, 但其诱导上调需依赖具有正常功能的 p53。多种 p53val135 细胞株(LTR6、C16、DP16) 和 p53 沉默的 H1299 细胞须经 p53 活化或质粒转染方能诱导 WIG-1 表达^[9]; 电离辐射后 wt-p53 小鼠胸腺组织中 WIG-1 mRNA 含量较辐射前增高数倍, 而 p53 敲除小鼠胸腺组织中 WIG-1 mRNA 含量辐射前后未见明显改变^[9]; 表达 wt-p53 的 HCT116 和 LoVo 细胞经 X 射线辐射后 WIG-1 表达明显增高, 而表达 wt-p53 的 DLD1 细胞 WIG-1 表达辐射前后未见明显改变^[5]。

p53 是 WIG-1 目前已证实, 而非惟一的转录激活因子。“Pscan”数据库分析显示, WIG-1 的启动子序列可能存在多种转录因子的结合位点, 如诱导成纤维细胞分化为肌细胞的

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30801137, 81071976)。

[△] 通讯作者, Tel: (023)68757981; E-mail: wangrw1953@163.com。

Myf5;特异性表达于中枢神经 5-HT 系统并与某些精神疾病密切相关的 FEV;诱导巨噬细胞或 B 淋巴细胞分化并与造血系统恶性肿瘤密切相关的 SPI1 和 HLF;促进精子发生的 Spz1;维持胚胎干细胞自我更新和多向分化潜能的 Sox2 和 Pou5f1;以及光感受器的特异性核受体 Nr2e3 等。这些转录因子广泛分布于肌肉、脑、晶状体、睾丸等器官组织以及造血细胞和胚胎干细胞等,均可能诱导 WIG-1 表达上调^[11]。因此 p53 可能并非 WIG-1 惟一的 upstream 转录因子,脑可能也并非 WIG-1 惟一高表达的器官。值得注意的是,上述潜在的转录因子中,Spz1、Pou5f1 和 SPI1 具有促进细胞生长和(或)肿瘤发生的作用;而 Pou5f1 和 Sox2 则是胚胎干细胞存活的关键因子。因此各种环境状态下的细胞均有可能发生 WIG-1 表达上调,而非仅限于生长抑制状态。“Pantherdb”数据库(<http://www.pantherdb.org/>)分析显示,WIG-1 可能参与多种信号通路,除了缺氧应激、凋亡和 p53 反馈环等 p53 相关通路外,还包括 Interleukin、Insulin/IGF 蛋白激酶 B、TGF- β 、PI3 激酶、PDGF、Ras、Toll 受体、Wnt 以及炎症趋化因子/细胞因子介导的炎症反应等通路^[11]。进一步说明,p53 对 WIG-1 的诱导作用固然确切和重要,但 WIG-1 可能还存在其他多样化的调节方式。

3 WIG-1 对 p53 的作用

WIG-1 可通过作用于 p53 mRNA 3' UTR 的 AU 富集元件(AU-rich elements,AREs),对 p53 发挥正反馈调节作用。

Asanuma 等^[12]采用 siRNA 抑制 U2OS 等细胞中 WIG-1 的表达后,发现 p53 表达降低;使用化疗药物对 p53 进行活化后,其表达仍低于对照组。p53 的下游因子 p21 表达也显著降低。反之,U2OS 细胞中瞬时转染外源性 WIG-1 可使 p53 表达提高 80% 以上^[4]。抑制大鼠神经中 WIG-1 的表达可减弱甲基苯丙胺介导的 p53 依赖的细胞死亡。以上研究提示,WIG-1 可能对 p53 及其相关生物学效应起正反馈调节作用。进一步研究显示,WIG-1 是一种 AUBP,它可通过结合 AREs 增强 p53 mRNA 的稳定性,并促进 p53 蛋白的合成。

AREs 通常位于某些表达需要精细调节的,特别是与细胞周期密切相关的 mRNA(如 c-myc、c-fos、c-jun、p53 和 p21 等)的 3' 非翻译区(3' UTR),其中含有 AUUUA 序列或 U 富集区(U-rich region)。某些蛋白可直接作用于 AREs,通过调控靶 mRNA 的稳定性和转录活性,参与胚胎发育以及肿瘤、慢性炎症和自身免疫性疾病等病理过程^[13]。p53 mRNA 的 3' UTR 含有 1 段 U 富集区(18 个连续的尿嘧啶)和 1 段额外的 AUUUA 序列。大多数蛋白与靶 mRNA 的 AREs 结合后,对靶 mRNA 的表达起负调节作用,但也有少数蛋白对靶 mRNA 的表达起正调节作用,WIG-1 属于后者。WIG-1 蛋白与 p53 mRNA 3' UTR 的 U 富集区结合后,可阻止 p53 mRNA 的脱腺苷化,防止其降解。这一稳定作用可使 p53 蛋白表达上调,并增强 p53 对 DNA 损伤的应激反应,从而对 p53 发挥正反馈调节作用^[4]。

研究认为 WIG-1 可能通过相同机制对其他携带 AREs 的 mRNA 发挥调控作用。如果这一猜测正确,将揭示一大批通过 WIG-1 介导的受 p53 调节的下游基因^[13]。目前,已发现 3 275 个携带 AREs 的人蛋白编码基因,约占人蛋白编码基因总数的 16%,其中有 711 个已被实验证实是 AUBP 的靶基因,还建立了专用于查找 mRNA 中 AREs 的数据库“AREsite”^[14]。

4 WIG-1 与肿瘤

WIG-1 与肿瘤的关系目前尚存在争议。体外研究表明,转染外源性 WIG-1 的 Saos-2 和 HCT116 细胞集落形成减少

16%~50%^[3,4,6],说明 WIG-1 对肿瘤细胞增殖有一定的抑制作用;而采用 siRNA 干扰 WIG-1 表达同样对 HCT116 细胞增殖有抑制作用^[8]。这说明 WIG-1 表达须维持在适当的水平,表达过度或不足均会对细胞活力产生影响。有趣的是,WIG-1 对细胞周期分布无明显影响^[3,8]。在各类肿瘤中,WIG-1 表达下调和上调均有报道。如在乳腺浸润性小叶癌中,WIG-1 表达是正常乳腺的 79%^[15]。而在肺鳞癌中,WIG-1 表达是正常肺的 2.00 倍^[5];在乳头状甲状腺癌中,WIG-1 表达是正常甲状腺的 3.36 倍(Geoprofiles, GDS1732);此外,WIG-1 所在的染色体区(3q26.3~27.0)扩增频繁出现在多种肿瘤中,包括头颈、乳腺、卵巢、前列腺、食管、鼻咽和肺肿瘤以及急性髓样白血病等,这提示上述部分肿瘤中可能存在 WIG-1 上调。然而,WIG-1 所在的染色体区还含有其他与肿瘤关系密切的基因,如 hTR 和 BCL6 等。因此目前尚不明确 WIG-1 在部分肿瘤中表达上调属于自发性还是协同性。此外,已如上述,多种潜在的上游转录因子均可对 WIG-1 发挥调控作用,其中有抑癌因子,也有促癌因子。因此作为 p53 的直接下游靶基因,目前却难以将 WIG-1 明确的定义为抑癌或促癌因子。

5 WIG-1 与干细胞

WIG-1 在干细胞中表达增高,并对维持干细胞自我更新和多向分化潜能起重要作用。

多项基因表达谱研究表明,WIG-1 可能对干细胞性的维持起重要作用。在小鼠胚胎干细胞(ESCs)、神经干细胞(NSCs)和造血干细胞(HSCs)中,WIG-1 表达均高于其各自对应的分化细胞^[16]。另有研究显示,小鼠 HSCs 中 Bmi-1 的缺失伴随着 WIG-1 的上调。Bmi-1 是维持 HSCs 自我更新能力的重要因子,Bmi-1 缺失的成年小鼠失去造血功能^[17],WIG-1 上调可能对 HSCs 失活起促进作用,也可能是 Bmi-1 缺失后的代偿机制。在红细胞成熟过程中,WIG-1 表达下调^[18]。而在生殖细胞中,WIG-1 可能受生长因子的诱导。如在精原干细胞(SSCs)中,WIG-1 可在神经胶质细胞来源的神经营养因子(GDNF)的刺激下上调,而 GDNF 是抑制 SSCs 分化并维持其自我更新能力的重要生长因子^[19];从卵泡中分离出的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)经人绒毛膜促性腺激素(HCG)处理后,其 WIG-1 表达上调^[20]。基因芯片研究显示,未受精的卵母细胞至 E4.5 胚胎的 WIG-1 表达维持在一定水平并轻度上调^[21];植入前期的胚胎可检测到 WIG-1 表达^[22]。Chia 等^[23]发现,使用短发夹 RNA(shRNA)进行 WIG-1 敲除的 hESCs,其干细胞表型减弱。此外,已如前述,Pou5f1 和 Sox2 这两个 ESCs 的关键转录因子,也是 WIG-1 的潜在调控因子;且 WIG-1 可能参与多种与 ESCs 发育相关的信号通路。以上研究均表明,WIG-1 对干细胞功能的维持起着重要作用。

6 WIG-1 研究展望

随着对 p53 研究的深入,其相关信号传导网络被进一步发掘。目前认为,除了介导应激引起的细胞周期阻滞和凋亡,p53 还参与其他多种生理和病理过程,如自噬、免疫、代谢、衰老、生殖、DNA 修复、干细胞调节、神经变性、缺血再灌注损伤和抑制血管生成等,而基础水平的 p53 有助于细胞存活^[1,2,24]。其中的部分研究结果与过去的观点迥异甚至矛盾,这说明对 p53 的了解还远远不足。WIG-1 是一种受 p53 直接调控的 AUBP,其下游蕴藏着大量潜在的功能各异的靶基因,这将为阐释 p53 生物学功能的多样性开辟新的途径。例如,携带 AREs 的蛋白编码基因中包括大量生长促进因子(如 cyclins、c-Jun、c-Fos 和 c-Myc)^[25],可能解释为何细胞周期阻滞和促进凋亡并非 p53 的

绝对调控方式的原因。然而,目前对 WIG-1 的认识还处于起始阶段,对 WIG-1 的生物学功能及其相应的信号传导途径所知甚微,多数含 WIG-1 的基因芯片的研究结果尚须后续实验进一步验证,其在肿瘤和干细胞中的作用机制更有待于进一步明确。WIG-1 在真核生物中高度保守,其研究将有助于探索细胞生理和病理过程中的普遍规律。总之,相信 WIG-1 能带来更多激动人心的发现。

参考文献:

- [1] Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(10): 691.
- [2] Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light; The Growing Complexity of p53[J]. *Cell*, 2009, 137(3): 413.
- [3] Hellborg F, Qian W, Mendez-Vidal C, et al. Human wig-1, a p53 target gene that encodes a growth inhibitory zinc finger protein[J]. *Oncogene*, 2001, 20(39): 5466.
- [4] Vilborg A, Glahder JA, Wilhelm MT, et al. The p53 target Wig-1 regulates p53 mRNA stability through an AU-rich element[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(37): 15756.
- [5] Varmeh-Ziaie S, Ichimura K, Yang F, et al. Cloning and chromosomal localization of human WIG-1/PAG608 and demonstration of amplification with increased expression in primary squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Cancer Lett*, 2001, 174(2): 179.
- [6] Mendez Vidal C, Prah M, Wiman KG. The p53-induced Wig-1 protein binds double-stranded RNAs with structural characteristics of siRNAs and miRNAs[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(18): 4401.
- [7] Hellborg F, Wiman KG. The p53-induced Wig-1 zinc finger protein is highly conserved from fish to man[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(6): 1559.
- [8] Prah M, Vilborg A, Palmberg C, et al. The p53 target protein Wig-1 binds hnRNP A2/B1 and RNA Helicase A via RNA[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(15): 2173.
- [9] Israeli D, Tessler E, Haupt Y, et al. A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis[J]. *EMBO J*, 1997, 16(14): 4384.
- [10] Wilhelm MT, Mendez-Vidal C, Wiman KG. Identification of functional p53-binding motifs in the mouse wig-1 promoter[J]. *FEBS Lett*, 2002, 524(1-3): 69.
- [11] Vilborg A, Bersani C, Wilhelm MT, et al. The p53 target Wig-1: a regulator of mRNA stability and stem cell fate? [J]. *Cell Death Differ*, 2011.
- [12] Asanuma M, Miyazaki I, Higashi Y, et al. Suppression of p53-activated gene, PAG608, attenuates methamphetamine-induced neurotoxicity[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 414(3): 263.
- [13] Vilborg A, Wilhelm MT, Wiman KG. Regulation of tumor suppressor p53 at the RNA level[J]. *J Mol Med*, 2010, 88(7): 645.
- [14] Gruber AR, Fallmann J, Kratochvill F, et al. AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010.
- [15] Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, et al. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7(55).
- [16] Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, et al. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells[J]. *Science*, 2002, 298(5593): 597.
- [17] Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 302.
- [18] Keller MA, Addya S, Vadigepalli R, et al. Transcriptional regulatory network analysis of developing human erythroid progenitors reveals patterns of coregulation and potential transcriptional regulators[J]. *Physiol Genomics*, 2006, 28(1): 114.
- [19] Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, et al. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(25): 9524.
- [20] Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? [J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(6): 1300.
- [21] Guo G, Huss M, Tong GQ, et al. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst[J]. *Dev Cell*, 2010, 18(4): 675.
- [22] Potireddy S, Vassena R, Patel BG, et al. Analysis of polysomal mRNA populations of mouse oocytes and zygotes: dynamic changes in maternal mRNA utilization and function[J]. *Dev Biol*, 2006, 298(1): 155.
- [23] Chia NY, Chan YS, Feng B, et al. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity[J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 316.
- [24] Janicke RU, Sohn D, Schulze-Osthoff K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53 [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(6): 959.
- [25] Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer[J]. *Biol Cell*, 2004, 96(7): 479.

(收稿日期: 2011-11-09 修回日期: 2011-11-22)