

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2012.01.020

· 专题综述 ·

Wip1 对肿瘤发生及免疫系统的调节作用^①

史建峰 胡雪莲 刘光伟 赵 勇

(中国科学院动物研究所 生物膜与膜生物工程国家重点实验室移植生物学研究组 北京 100101)

中国图书分类号 R73 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2012)01-0085-03

1 Wip1 基因和蛋白结构

Wip1 (Wild type p53-induced phosphatase 1) 是于 1997 年由 Fiscella 等在寻找 γ 射线照射下 p53 基因的靶基因时发现, 为一种依赖于 p53 高表达的原癌基因。Wip1 属于丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 主要定位于胞核内, 由 PPM1D (Protein phosphatase magnesium-dependent 1 delta) 基因编码。PPM1D 位于人染色体 17q23/q24 区域, 在小鼠中位于 11 号染色体与 p53 基因邻近, 共有 6 个编码区。小鼠与人 PPM1D 基因有 83% 的同源性。人 Wip1 有 605 个氨基酸, 分子量 61 kD, 小鼠 Wip1 包括 598 个氨基酸, 分子量为 66 kD。人 Wip1 序列可分为两个主要区域, N 端第 1~375 位氨基酸为高度保守的磷酸酶区, 第 376~605 位氨基酸为低保守无催化区, 第 65~368 位氨基酸与 PP2C 蛋白酶家族有高度同源性, 其中 N 端有 3 个区域完全相同, 第 100~108 位氨基酸是 PP2C 蛋白酶家族的标签, 且 Wip1 激活依赖于二价阳离子和对冈田酸的不敏感, 使之区别于 PP1 (Protein phosphatase type 1)、PP2A (Protein phosphatase type 2A) 和 PP2B (Protein phosphatase type 2B) 家族磷酸蛋白酶, 因此将 Wip1 归属于 PP2C (Protein phosphatase type 2C) 蛋白酶家族^[1,2]。PPM1D 的 mRNA 在成年鼠和胚胎鼠的各种器官中均有表达, 在雄鼠睾丸中表达水平最高^[3]。

2 Wip1 与 DNA 修复和肿瘤发生

对 Wip1 的研究主要集中于其对 DNA 修复及肿

瘤发生的调控。2000 年, 小鼠 PPM1D 基因被克隆并测序, 证实其在 p53 诱导细胞凋亡通路中发挥极其重要的负调节作用。它使 p53 蛋白去磷酸化而失活, 导致其诱导细胞凋亡的通路中断, 从而实现其抗凋亡功能^[2]。Wip1 对 p53 的调控作用具有多样性而且参与许多重要生命活动调节。外界环境压力 (如离子辐射、紫外光、化学试剂等) 引起 DNA 损伤, 机体存在一套精密的调节机制使 DNA 自我修复或者促进病变细胞发生凋亡。研究表明, Wip1 蛋白可以对机体的 DNA 损伤修复产生负调控作用, Wip1 蛋白表达依赖于 p53 蛋白^[1,4]。Wip1 可以通过负调控 p38、p53、ATM (Ataxia-telangiectasia mutated)、Chk1/Chk2 等激酶来影响真核细胞 DNA 损伤修复功能: p38 基因是第一个被确定的 PPM1D 靶基因, 在紫外线或 γ 射线照射下, p38 蛋白 Thr¹⁸⁰ 和 Tyr¹⁸² 位点迅速发生磷酸化, p38 蛋白激活后进一步磷酸化其下游 p53 蛋白 Ser¹⁵、Ser³³、Ser⁴⁶ 和 Ser³⁹² 位点, 从而激活 p53 蛋白导致细胞周期阻滞或细胞凋亡^[5,6]。而 Wip1 是 p38-MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) /p53 途径中的负反馈调节因子, Wip1 蛋白既可以通过去磷酸化 p38 蛋白 (Thr¹⁸⁰) 蛋白激酶抑制 p38 通路下游分子 p53 蛋白的活性, 也可以通过直接使 p53 蛋白 (Ser¹⁵) 去磷酸化而抑制其活性并终止其信号通路 (图 1)^[4]。

ATM 具有调控 DNA 修复和细胞周期关卡、维持染色体稳定等生物功能。DNA 损伤导致 PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases) 激酶诱导 ATM/ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3-related) 等活化, ATR 激酶使 Chk1 蛋白 Ser³¹⁷ 和 Ser³⁴⁵ 位点发生磷酸化而被激活。ATM 磷酸化引起 Chk2 的 Ser⁵¹⁶ 和 Thr³⁸⁷ 发生自身磷酸化, 使 Chk2 获得激酶活性。Chk1 和 Chk2 使下游 p53 蛋白和 Cdc25 (Cell division cyclin 25) 家族成员和其他底物发生磷酸化, 将损伤信号传递至下游, 引发细胞周期阻滞及 DNA

①本文受中国科技部“973”项目(2010CB945301, Y. Z.)、国家自然科学基金面上项目(C81072396, Y. Z.)和中科院优秀青年基金项目(KSCX2-EW-Q-7, G. L.)资助

作者简介:史建峰(1986年-),男,在读硕士,主要从事免疫生物效应方面的研究, E-mail: rilordharrt@163.com;

通讯作者及指导教师:赵 勇(1964年-),男,研究员,博士生导师,主要从事移植免疫生物效应的研究, E-mail: zhaoy@ioz.ac.cn。

损伤修复等生物学效应^[7-10], ATM 还可以磷酸化 MDM2(Murine double minute-2) Ser³⁹⁵ 位点, MDM2 是 E3 泛素连接酶, 作为 p53 蛋白的抑制子 MDM2 与 p53 蛋白结合, 促进 p53 蛋白泛素化修饰和降解及其出核移位过程, 从而抑制 p53 蛋白的转录活性。同时 p53 蛋白也控制 MDM2 蛋白表达水平以保证细胞正常生命周期^[11]。DNA 损伤因素诱导 p53 蛋白/MDM2 磷酸化修饰, ATM 磷酸化 MDM2 的 Ser³⁹⁵ 位点, 其酸性保守区域 II(氨基酸 237 ~ 260) 高度磷酸化, 从而抑制 p53/MDM2 复合体的形成, 减弱 MDM2 对 p53 的降解作用^[12, 13]。Wip1 可以负调节 ATM(Ser¹⁹⁸¹)、MDM2(Ser³⁹⁵)、Chk2(Thr⁶⁸) 的磷酸化从而抑制 ATM 和 p53 功能(图 1)。研究表明 Wip1 缺失导致 ATM 激酶的激活, 过表达则明显减少 ATM 的激活^[14]。

Wip1 负调控 DNA 损伤修复从而抑制细胞凋亡, 使机体易于发生肿瘤, 因此, Wip1 表现出原癌基因特性。但是 Wip1 的致癌机制目前还未完全阐述清楚。Wip1 在人乳腺癌、恶性脑瘤、卵巢癌中高表达^[1, 6, 15-18]。研究表明, 肿瘤发生时常会伴随 p53 蛋白编码基因 TP53 的突变, 而 Wip1 过表达的乳腺癌病例中却很少发现 TP53 基因发生突变^[6, 19, 20], 有人推测 Wip1 并不是诱发 TP53 基因突变引起肿瘤, 而是通过抑制 p53 蛋白的功能促进肿瘤发生。Wip1 不仅可以通过调节 ATM、MDM2、Chk1、Chk2 和 p38MAPK 间接负调控 p53 蛋白, 还可以直接作用于 p53 使其 N 端(Ser¹⁵) 去磷酸化导致失活^[5]。但是, 这些通路在肿瘤发生中的作用需要更多的癌症模型佐证。

3 Wip1 对免疫系统的调控作用

Wip1 基因的表达受一些非 p53 依赖的因子调控, 如 CREB(cAMP-response element binding protein) 和 NF-κB^[21-23]。NF-κB 在细胞炎症反应中发挥重要作用, 它可以激活 WIP1 基因的表达。Wip1 基因有一段保守的 κB 结合位点, 并且上调和抑制 NF-κB

的功能分别导致 Wip1 表达升高和降低。研究证实, NF-κB 的 p65 亚基可以直接结合到 Wip1 基因上游启动子从而调控其生物学活性^[22]; 反之 Wip1 对 NF-κB 具有负调控作用, 通过基因组水平的 siRNA 筛选发现抑制 Wip1 可以使 NF-κB 的活化能力增强。Wip1^{-/-}小鼠 Hela 细胞中 NF-κB 目标基因如 TNF-α 的 mRNA 表达升高, Wip1^{-/-}小鼠脾细胞分泌 NF-κB 依赖的炎症因子上调, CD80⁺、MHC II⁺ 和 CD40⁺ 脾细胞比率也有相应的升高, 而 Wip1 过表达的小鼠 Hela 细胞中 TNF-α 等 NF-κB 依赖的细胞因子分泌量明显降低^[3]。研究表明, Wip1 对 NF-κB 的调控发生在其与 DNA 结合的上游。Wip1 通过使 NF-κB 的 P65(Ser⁵³⁶) 去磷酸化使 NF-κB 不能招募共转录因子 p300, 导致其不能有效激活下游通路。Wip1 也可以通过负调节 p38 来抑制 NF-κB 功能, 使 NF-κB 依赖的炎症因子如 IL-1、6、8 表达量降低^[24]。此外, 研究发现, Wip1^{-/-}小鼠脾脏、淋巴结和骨髓都会发生不同程度的肿大并伴随巨噬细胞和粒细胞增多, 5% Wip1^{-/-}小鼠发生皮肤溃疡, Wip1^{-/-}的小鼠在外界抗原刺激表现出免疫缺陷更容易受到感染。以上结果提示, Wip1 具有抑制炎症反应的作用^[3, 24]。Wip1 对 NF-κB 具有负调作用, 肿瘤发生会促进炎症反应, NF-κB 作为一个炎症反应的重要调节因子, 在调控肿瘤发生中也发挥了作用, 但目前 NF-κB 对肿瘤发生的正负调控还存在争议, 所以 Wip1 是否可以通过调节 NF-κB 的功能间接调控肿瘤发生还有待更深层的研究。

Wip1 对淋巴免疫细胞发育和功能具有调节功能, Wip1^{-/-}幼年小鼠胸腺变小, 胸腺髓质区相对于正常小鼠显著变小, TCR-β⁺ 的胸腺细胞数量显著降低, TCR-γδ⁺ 细胞数却不受影响。Wip1^{-/-}小鼠 SP 期(CD4⁺ 或 CD8⁺) 和 DP 期(CD4⁺ CD8⁺) 细胞比率正常, 但是细胞数目下降。DN 期(CD4⁻ CD8⁻) 细胞数目正常, 但是细胞比率增加。说明 Wip1^{-/-}小鼠胸腺细胞从 DN 期到 SP 期发育过程中存在缺陷。进一步研究发现, Wip1^{-/-}小鼠 DN3(CD44⁻ CD25⁺) 期细胞比率升高而 DN4(CD44⁻ CD25⁻) 期比率和数量都发生下降, 这是因为 Wip1 mRNA 在 DN3 期向 DN4 期发育过程中表达升高, Wip1^{-/-}小鼠胸腺细胞失去对 p53 蛋白活性负调功能, 导致胸腺细胞由 DN3 期向 DN4 期发育时 p53 蛋白表达上调至使细胞周期阻滞, 使更多的细胞处于 S/G₂/M 期, 从而引起 Wip1^{-/-}小鼠 DN4 期、DP 期和 SP 期细胞数目减少^[25]。

Wip1^{-/-}小鼠外周免疫器官也有组织病理学表征, 如脾脏白髓缩小、白髓与红髓界限不清, 并伴随

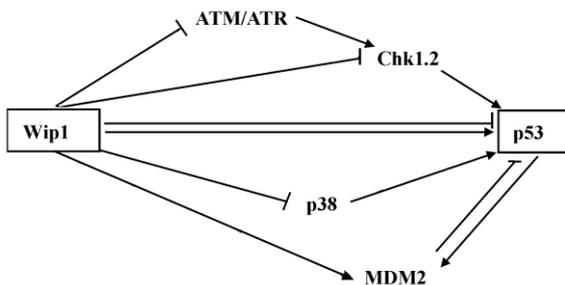


图 1 Wip1 调控 p53 的信号途径简图
Fig. 1 The Wip1-p53 regulating pathway

其他细胞浸润。Wip1^{-/-}小鼠脾脏 T、B 细胞数目相对于正常鼠没有改变,但是 CD4⁺ 细胞数增加,CD8⁺ 细胞数减少。T 细胞和 B 细胞在外界抗原和丝裂原刺激后,表现出的增殖能力相比正常小鼠显著下降^[26]。Wip1 可以影响淋巴细胞的发育分化及其功能,Wip1 在免疫监视和机体稳态平衡调解中可能发挥功能,对免疫细胞杀伤癌变细胞保持机体稳态具有一定的调节作用。

4 结束语

虽然 Wip1 早在 1997 年就已发现,其在肿瘤发生、免疫系统发育等方面发挥重要调节作用。但目前我们对 Wip1 的研究仍不够全面。在肿瘤和免疫疾病模型中 Wip1 调控分子机制有待探究。Wip1 对免疫器官的发育及免疫细胞各亚群的增殖、分化和细胞因子分泌的调节机制仍需要深入研究。

5 参考文献

- Fiscella M, Zhang H, Fan S *et al.* Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94(12): 6048-6053.
- Choi J, Appella E, Donehower L A. The structure and expression of the murine wildtype p53-induced phosphatase 1 (Wip1) gene [J]. *Genomics* 2000; 64(3): 298-306.
- Choi J, Nannenga B, Demidov O N *et al.* Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function and cell cycle control [J]. *Mol Cell Biol* 2002; 22(4): 1094-1105.
- Lu X, Nannenga B, Donehower L A. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints [J]. *Mol Cell* 2005; 19(10): 1162-1174.
- Takekawa M, Adachi M, Nakahata A *et al.* p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation [J]. *EMBO J* 2000; 19(23): 6517-6526.
- Bulavin D V, Demidov O N, Saito S *et al.* Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity [J]. *Nat Genet*, 2002; 31(2): 210-215.
- Lu X, Nguyen T A, Donehower L A. Reversal of the ATM/ATR-mediated DNA damage response by the oncogenic phosphatase PPM1D [J]. *Cell Cycle* 2005; 4(8): 1060-1064.
- Abraham R T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases [J]. *Gene Dev* 2001; 15(17): 2177-2196.
- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity [J]. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(3): 155-168.
- Kastan M B, Lim D S. The many substrates and functions of ATM [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2000; 1(3): 179-186.
- Lu X, Ma O, Nguyen T A *et al.* The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop [J]. *Cancer Cell* 2007; 12(4): 342-354.
- Batchelor E, Mock C S, Bhan I *et al.* Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage [J]. *Mol Cell* 2008; 30(3): 277-289.
- Batchelor E, Loewer A, Lahav G. The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells [J]. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(5): 371-377.
- Shreeram S, Demidov O N, Hee W K *et al.* Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways [J]. *Mol Cell*, 2006; 23(5): 757-764.
- Harrison M, Li J, Degenhardt Y *et al.* Wip1-deficient mice are resistant to common cancer genes [J]. *Trends Mol Med* 2004; 10(8): 359-361.
- Castellino R C, De Bortoli M, Lu X *et al.* Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D [J]. *J Neurooncol* 2008; 86(3): 245-256.
- Chaffin C L, Brogan R S, Stouffer R L *et al.* Dynamics of Myc/Max/Mad expression during luteinization of primate granulosa cells in vitro: association with periovulatory proliferation [J]. *Endocrinology*, 2003; 144(4): 1249-1256.
- Bang J, Yamaguchi H, Durell S R *et al.* A small molecular scaffold for selective inhibition of Wip1 phosphatase [J]. *Chem Med Chem*, 2008; 3(2): 230-232.
- Rauta J, Alarimo E L, Kauraniemi P *et al.* The serine-threonine protein phosphatase PPM1D is frequently activated through amplification in aggressive primary breast tumours [J]. *Breast Cancer Res TR*, 2006; 95(3): 257-263.
- Yu E, Ahn Y S, Jang S J *et al.* Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers [J]. *Breast Cancer Res TR* 2007; 101(3): 269-278.
- Hershko T, Korotayev K, Polager S *et al.* E2F1 modulates p38 MAPK phosphorylation via transcriptional regulation of ASK1 and Wip1 [J]. *J Biol Chem* 2006; 281(42): 31309-31316.
- Lowe J M, Cha H, Yang Q *et al.* Nuclear factor- κ B (NF- κ B) is a novel positive transcriptional regulator of the oncogenic Wip1 phosphatase [J]. *J Biol Chem* 2009; 285(8): 5249-5257.
- Rossi M, Demidov O N, Anderson C W *et al.* Induction of PPM1D following DNA-damaging treatments through a conserved p53 response element coincides with a shift in the use of transcription initiation sites [J]. *Nucleic Acids Research* 2008; 36(22): 7168-7180.
- Chew J, Biswas S, Shreeram S *et al.* WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF- κ B signalling [J]. *Nat Cell Biol* 2009; 11(5): 659-666.
- Schito M L, Demidov O N, Saito S *et al.* Wip1 phosphatase-deficient mice exhibit defective T cell maturation due to sustained p53 activation [J]. *J Immunol* 2006; 176(8): 4818-4825.
- Choi J, Nannenga B, Demidov O N *et al.* Mice deficient for the Wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function and cell cycle control [J]. *Mol Cell Biol* 2002; 22(4): 1094-1105.

[收稿 2011-06-29 修回 2011-08-11]

(编辑 张晓舟)