

APE1/Ref-1 基因结构及功能的研究进展

刘 传 应明真 王雅杰

APE1/Ref-1 (又称 APEX1 或 Ref-1, 本文统称 APE1), 是大肠杆菌 Xth (Exo III) 哺乳类同源物、细胞对氧化应激主要反应因子, DNA 在各种内源性或外源性物质包括化疗药物引起损伤后, APE1 通过 DNA 碱基切除修复通路中脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶发挥重要的作用。当受损的碱基去除后, APE1 主要切断脱碱基位点以利于修复功能^[1]。

另外, APE1 还可发挥其他细胞功能, 它可以作为氧化还原蛋白在一些转录因子参与促进 DNA 连接活动影响肿瘤发生和发展, 转录因子主要包括: 核因子 NF- κ B, 早期生长反应蛋白-1 (Egr-1)、P53、HIF-1 α 、CREB、AP-1、Pax 等^[2]。APE1 的这些功能主要发生在 Cys65 残端。最近研究表明通过氧化还原介导的 NF- κ B 依赖的 IL-8 的表达, APE1 在炎症反应过程中发挥作用^[3]。APE1 最主要的两个活动即氧化还原作用和碱基切除修复通路作用是相互独立: N 末端主要参与氧化还原介导的转录共刺激作用, C 末端主要在脱碱基位点 H309 催化残端发挥内切酶的作用。本文主要从 APE1 的结构和功能进行综述。

一、APE1 结构和结构域

APE1 基因定位于 14 号染色体长臂 (14q11.2 ~ 12), 基因长度约 3.0kb, 包含 4 个内含子和 5 个外显子, 其中第 1 个外显子为非编码区。开放阅读区有 954bp 组成, 编码 318 个氨基酸。主要包括 3 个功能域: 第 1 个结构域位于 33 ~ 35N 末端组织片段, 主要参与蛋白-蛋白连接, 在蛋白的 RNA 连接和调节脱碱基 DNA 催化活动中发挥重要的作用; 第 2 个为氧化还原结构域, 主要位于 35 ~ 127 氨基酸; 第 3 个为 DNA 修复域, 主要在 APE1 蛋白 C 末端第 161 位氨基酸以后的区域^[4]。研究表明, APE1 起始段 33 ~ 35 个

氨基酸区域为独立的功能域。通过体外研究表明, N-末端 43 ~ 65 氨基酸残端为发挥氧化还原作用的必须区域, 诱导氧化反应蛋白乳 P53、AP-1、Myb 和 Cys65 参与 APE1 氧化还原作用, 定位在 β 1 链上, 侧链连接在疏水口袋远离中央 β 链。Cys65 不能和其他蛋白残基直接相连, 此时 APE1 发生构型变化, 暴露 Cys65 与不同转录因子形成连接, 有待于以后研究进一步证实^[5]。APE1 主要定位在细胞核内, 然而在肿瘤细胞中、细胞质、细胞核内均有表达, 可能与肿瘤的侵袭能力和预后有关。

二、APE1 的功能

1. APE1 在 DNA 碱基切除修复中的作用: 碱基切除修复 (BER) 是一个分子通路, 主要清除那些小的、非螺旋化的可能在复制过程中发生突变或导致单链断裂的低分子。BER 损伤可能导致肿瘤的发生和神经退化紊乱, BER 转化不同的碱基损伤为一常见的中间体的脱嘌呤/嘧啶 (AP) 位点, 然后 APE1 通过特有的短补丁或长补丁 DNA 修复通路发挥作用^[6]。

在哺乳动物细胞中, APE1 水解 AP 位点 5' 磷酸二酯键产生一个含有 3' 羟基和 5' 脱氧核糖磷酸末端的单链 DNA 中间体^[7]。APE1 是切除 AP 位点和形成 3' 羟基重要的酶, 3' 羟基是 Pol β 重要的引物, BER 还参与很多非直接作用 DNA 的蛋白的活动, 如 XRCC1、PCNA、PARP1, 结合在切除的 AP 位点, 促进整个通路的进行。APE1 可以直接或间接地结合 BER 相关的酶和其他修复通路, 还可以通过不同的糖基化酶, 如 OGG-1、MYH、MPG 等作用依次结合 Pol β , XRCC1 发挥 APE1 核酸内切酶活性, 或者结合棒状内切酶 (FEN1) 直接发挥活性^[8]。综上所述, APE1 可以被认为是 DNA “修复工厂” 中一个主要的成员。

2. APE1 介导转录因子氧化还原调节: 氧化应激对于需氧的有机体是一个重要的损伤和威胁。任何可以代谢氧气的酶都可以产生活性氧 (ROS), 如负氧离子, 过氧化氢 (H_2O_2) 和羟自由基 (hydroxyl radical), 体内产生的活性氧在某种程度上不能很好地对

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072175; 81102010); 上海市卫生局科研项目资助 (2009113); 上海市科委基金资助项目 (06DZ19505, 11411997500); 上海市重点学科建设项目 (B905)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者: 王雅杰, 博士生导师, 教授, 电子信箱: yajiewa0459@163.com

抗外源性的抗氧化体系,导致体液、蛋白、糖和核酸受损,从而导致功能被抑制^[9]。因此,细胞水平的氧化还原的平衡需要多种酶如催化酶,过氧化物酶,超氧化剂歧化酶,和非酶类如 glutathione, L - ascorbic acid, α - tocopherol 共同作用^[10]。通过直接调节转录因子氧化还原活动可以影响基因的表达,当一些转录因子暴露半胱氨酸残基后,可作为氧化还原调节反应的靶点。APE1 作为一种具有氧化还原功能的蛋白,通过决定半胱氨酸残基在 DNA 中的定位,可以调节很多转录因子连接功能,如 AP - 1、NF - κ B、Myb、Egr - 1、p53、Pax 蛋白等^[11]。APE1 通过第 3 还原分子如 GSH 和硫氧还蛋白还原半胱氨酸残基调节不同转录因子的 DNA 连接活动而作为一种“氧化还原伴侣”,这种活性主要通过 APE1 和目的转录因子直接作用,并不需要很高浓度的 APE1^[12]。通过 APE1 氧化还原和具有氧化还原活性这两种主要的功能,可以保护细胞避免受到高浓度活性氧的损伤。

3. APE1 的核外功能: APE1 可以通过调节 Rac1 介导的 NADPH 氧化酶抑制内皮细胞胞内活性氧产物, NADPH 是一种由吞噬细胞参与先天免疫反应的具有多种亚单位的酶,这种酶激活产生活性氧,是宿主抵御感染的重要的屏障,同时也是血管细胞发挥功能的重要的调节因子,可以对血管紧张素 II、VEGF、EGF、PDGF、内皮素 I 的产生反应^[13,14]。Rac 是一种分子质量为 21kDa 的 GTP 连接蛋白,属于 Ras 家族,研究证实 Rac1 在聚集和激活 NADPH 氧化酶方面发挥重要的作用, Rac1 循环主要是把无活性的 GDP 连接形式通过激活转化为有活性的 GTP 连接形式,主要由 GDP 转化酶 (GEF) 和 GTP 转化酶激活蛋白 (GAP) 调节。Rac1 激活血管外的 NADPH 氧化酶有可能和氧化酶复合体亚单位 p40phox 隐匿结合的 p67phox 有关,通过 Rac1 依赖的 NADPH 氧化酶的激活,内皮细胞可对肿瘤坏死因子 - α (TNF - α) 治疗或乏氧/再氧合 (H/R) 敏感。Angkeow 等^[13]发现内皮细胞内 APE1 过表达可以使细胞不受 TNF - α 或 H/R 诱导的氧化应激影响,可能是 APE1 干扰了 Rac1 中活性 GEF 或失活 GAP 的激活,通过控制细胞内 APE1 局部分布调节细胞内蛋白运输并对细胞存活产生重要的影响。最近,一种针对 APE1 氧化还原活性的抑制剂 E3330 被发现可以增加胰腺癌 PANC1 细胞系中活性氧水平,这种细胞系表达 NADPH 氧化酶,从而推测 E3330 可能通过两种方式影响 Rac1 参与的途径:一是 E3330 抑制 APE1 的功能从而阻断

Rac1 介导的 NADPH 氧化酶活性;另一种是 APE1 在细胞质产生一个氧化还原样活性或者抑制 Rac1 促使 APE1 的氧化还原活性^[15]。

4. 通过连接 nCaRE 发挥转录抑制作用: APE1 通过连接负性钙反应原件 A 和 B (nCaREA/B) 发生反式作用, nCaREA/B 首先在人甲状旁腺基因启动子发现,后在 APE1 启动子区域被发现。研究发现 APE1 可能下调自身基因,这种自身负反馈表现在 DNA 修复酶转录自我调节,但 APE1 不能直接连接在 nCaRE 上,增加细胞外钙离子可以诱导 p300 依赖的 APE1 在赖氨酸 6 和 7 位点发生乙酰化,从而加强和 nCaRE 的结合^[16]。

5. APE1 在 RNA 代谢方面的作用: Berquist 等^[17]提出了 APE1 参与 RNA 代谢可能的作用:受到 APE1 可以在含有单链的 DNA 分子的 AP 位点发挥内切酶活性的启发,他们发现在单链 RNA 分子 APE1 具有同样的作用,其作用主要依赖于分子的构象。APE1 可以从内在的部分移去受损的 RNA 片段,从而影响最终的蛋白合成。有研究表明 APE1 是促生长因子, APE1 的表达降低时,细胞发生凋亡, APE1 基因沉默可诱导细胞凋亡,在很多肿瘤中, APE1 往往过高表达,从而使肿瘤细胞对化疗药物敏感性降低,尤其是烷化剂类^[18]。但是在有些情况下, APE1 通过其氧化还原功能作用于转录因子如 P53 或 Egr - 1 发挥促凋亡的“负性因子”作用,或刺激转录因子如 AP - 1、NF - κ B 或 NF - Y 促进细胞周期启动。这些矛盾的作用可能是由于 APE1 发挥着分子转换的作用,可以结合不同的信号转录级联反应而发挥促生存或促凋亡作用,在这过程中, PTMs 可能发挥着重要的作用。

6. APE1 不同功能的调节: APE1 不同功能活动的调节主要通过 3 种方式:①增加转录活动后 APE1 的表达水平;②APE1 从细胞质到细胞核重新定位;③调节 APE1 的 PTMs。到目前仍没有发现可以替代 APE1 的片段,也没发现能通过 miRNA 介导或依赖保持 mRNA 稳定的报道,关于 APE1 mRNA 水平的调节主要是通过抑制转录的方式^[19]。过去关于 PTMs 影响 APE1 的基础研究主要集中在以下 6 个方面:乙酰化、磷酸化、泛素化、S - nitrosation 亚硝化、蛋白水解、断裂 N 末端 33 氨基酸域和氧化还原调节^[20]。APE1 和 PTMs 结合可能产生特殊的生物学效应,但是由于技术敏感性方面的影响,目前这方面实验数据相对较少。

三、展 望

肿瘤的多功能治疗是未来治疗新的趋势所在,即 DNA 损伤的药物(如烷化剂,离子放射拟辐射治疗)结合抑制 DNA 修复酶活动联合治疗肿瘤。因此,充分了解 DNA 修复酶中分子调节机制是发现新的肿瘤治疗策略的基础。目前研究表明 APE1 在细胞内表达、分布和转运是受到高度调控的过程,对 APE1 的研究要从从单一研究分子转移到这个高度协同的分子过程。我们相信对 APE1 转录后修饰和各种功能间协同作用的机制的研究可能为我们最终理解这个独特的生物大分子解开未解之谜。APE1 是影响真核生物基因表达和氧化还原活性相关碱基修复和多功能蛋白的关键酶。对 APE1 变异体进行深入的分子生物学及遗传流行病学研究将会有助于阐明该基因多态性的病因学意义。在肿瘤靶向治疗中 APE1 是一个非常重要的靶标,它对于细胞的存活及放化疗后细胞效应都极为重要,如果能够特异性的调控肿瘤组织中的 APE1 的表达,将能有效杀伤肿瘤细胞并改善肿瘤放化疗敏感性。了解 APE1 分子基础有利于开发新的针对 APE1 分子靶向药物,联合目前治疗手段为肿瘤治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 Fung H, Demple B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells [J]. *Mol Cell*, 2005, 17(3): 463 - 470
- 2 Tell G, Damante G, Caldwell D, *et al.* The intracellular localization of APE1/Ref - 1: more than a passive phenomenon? [J] *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(3 - 4): 367 - 384
- 3 O'Hara AM, Bhattacharyya A, Bai J, *et al.* Tumor necrosis factor (TNF) - α induced IL - 8 expression in gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and AP endonuclease - 1 /redox factor (Ref) - 1 [J]. *Cytokine*, 2009, 46(3): 359 - 369
- 4 Yu E, Gaucher SP, Hadi MZ. Probing conformational changes in Ape1 during the progression of base excision repair [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(18): 3786 - 3796
- 5 Georgiadis MM, Luo M, Gaur RK, *et al.* Evolution of the redox function in mammalian apurinic/aprimidinic endonuclease [J]. *Mutat Res*, 2008, 643(1 - 2): 54 - 63
- 6 Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, *et al.* The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility [J]. *Biochimie*, 2003, 85(11): 1053 - 1071
- 7 Flaherty DM, Monick MM, Carter AB, *et al.* Oxidant - mediated increases in redox factor - 1 nuclear protein and activator protein - 1

- DNA binding in asbestos - treated macrophages [J]. *J Immunol*, 2002, 168(11): 5675 - 5681
- 8 Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, *et al.* XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP - ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick - sensor' in vitro [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(22): 4387 - 4394
- 9 Liu H, Colavitti R, Rovira II, *et al.* Redox - dependent transcriptional regulation [J]. *Circ Res*, 2005, 97(10): 967 - 974
- 10 Moran LK, Gutteridge JM, Quinlan GJ. Thiols in cellular redox signalling and control [J]. *Curr Med Chem*, 2001, 8(7): 763 - 772
- 11 Nishi T, Shimizu N, Hiramoto M, *et al.* Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF - κ B in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 44548 - 44556
- 12 Ando K, Hirao S, Kabe Y, *et al.* A new APE1/Ref - 1 - dependent pathway leading to reduction of NF - κ B and AP - 1, and activation of their DNA - binding activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(13): 4327 - 4336
- 13 Angkeow P, Deshpande SS, Qi B, *et al.* Redox factor - 1: an extra - nuclear role in the regulation of endothelial oxidative stress and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(7): 717 - 725
- 14 Ushio - Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 264(1 - 2): 85 - 97
- 15 Fishel ML, Kelley MR. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref - 1 as a therapeutic and chemopreventive target [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(3 - 4): 375 - 395
- 16 Bhakat KK, Izumi T, Yang SH, *et al.* Role of acetylated human AP - endonuclease (APE1/Ref - 1) in regulation of the parathyroid hormone gene [J]. *EMBO J*, 2003, 22(23): 6299 - 6309
- 17 Berquist BR, McNeill DR, Wilson DM III. Characterization of abasic endonuclease activity of human Ape1 on alternative substrates, as well as effects of ATP and sequence context on AP site incision [J]. *J Mol Biol*, 2008, 379(1): 17 - 27
- 18 Al - Attar A, Gossage L, Fareed KR, *et al.* Human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastroesophageal and pancreatico - biliary cancers [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(4): 704 - 709
- 19 Zaky A, Busso C, Izumi T, *et al.* Regulation of the human AP - endonuclease (APE1/Ref - 1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(5): 1555 - 1566
- 20 Heo JY, Jing K, Song KS, *et al.* Downregulation of APE1/Ref - 1 is involved in the senescence of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1455 - 1462

(收稿日期:2012 - 05 - 24)

(修回日期:2012 - 06 - 14)