

NIPBL 调控肿瘤细胞分化的可能机制研究

单丽红 徐伟珍 毛伟敏

cohesin 是从果蝇到人类都有的高保守性蛋白复合体,最早发现它的功能是在细胞有丝分裂和减数分裂周期中的 S 期将姐妹染色单体聚合到一起,分裂后期及时断开,使聚合在一起的姐妹染色单体分离,分别分布到两个子细胞中^[1]。最近研究发现 cohesin 复合体可以和染色体特异性结合,参与 DNA 损伤后修复及基因表达的调控,与肿瘤的发生有关^[2,3]。NIPBL 是 cohesin 的装载因子,与 cohesin 和染色体的特异性结合、DNA 损伤修复、基因的转录调控有关^[4-6]。另有研究也证实了 NIPBL 与肿瘤细胞的分化有关,本文将对此进行总结。

一、NIPBL 与 cohesin

在增殖细胞中,cohesin 复合物的核心成分是由两个大分子蛋白 SMC1 和 SMC3 以及两个小分子蛋白 SCC1 (Rad21) 和 SCC3 组成的一个指环状结构。目前发现,cohesin 复合体核心成分的功能受到很多相关蛋白的调节,如 cohesin 复合体定位于染色体上所需的 SCC2 (NIPBL)/SCC4 装载复合体;乙酰基转移酶 ECO1 蛋白家族,cohesin 与染色体结合的相关蛋白 PDS5 等^[7]。cohesin 在调节姐妹染色单体分离过程中的作用是毋庸置疑的,但最近研究发现 cohesin 在基因表达调控,细胞周期调控及 DNA 损伤修复中也起到重要的作用^[8,9]。如果 cohesin 缺失,细胞将会表现出基因的不稳定性、损伤后 DNA 的修复反应及相关基因表达的异常现象^[10]。在人类肿瘤中也已经证实有 cohesin 组成元件、调控及被调控基因表达的异常,如 RAD21、SMC3、NIPBL 等在前列腺癌、口腔癌、结肠癌、乳腺癌中有表达异常的现象^[11-13]。

SCC2 (NIPBL)/SCC4 装载复合体可以帮助 cohesin 与染色体的特异性结合。cohesin 先被装载到 NIPBL 结合位点,随转录延伸推动 cohesin 滑行,继而沿染色体臂滑行到更加稳定的位点^[4]。近十几年

来,对于 NIPBL 的研究很多。1990 年发现果蝇的 Nipped - B 蛋白 (NIPBL 的同源物)能够促进增强子与启动子的远距离作用,进而激活在细胞增殖中起重要作用的 cut 和 Ultrabithorax 基因的转录^[5]。1994 年研究发现 Cornelia de Lange (先天性多系统器官发育障碍综合征)与 NIPBL 突变有关。随后几年证实,60% 的 CdLS 病例有 NIPBL 基因的突变及 NIPBL 蛋白表达的减少。小鼠动物模型实验研究发现,减少 30% 的 NIPBL 蛋白表达量就可以导致小鼠出现典型的 CdLS 形体特征。除此之外,几乎所有的 CdLS 病例报道都认为 CdLS 病人无肿瘤易感性的发现^[14],且在 2007 年 Porkka 等^[12]在研究人类结直肠肿瘤时,发现有 NIPBL 突变的现象。最近几年发现 NIPBL 可以通过对 cohesin 募集的调控,进而参与 DNA 损伤修复过程,这也进一步证实 NIPBL 与肿瘤之间有着密切的关系^[6]。

肿瘤细胞常具有类似干细胞样的无限增殖及低分化能力。参与干细胞分化的基因及调控途径有很多种,肿瘤细胞的类干细胞功能,很有可能与这些基因及调控途径有关。

二、NIPBL/cohesion 在干细胞分化中的作用

胚胎干细胞 (ES cells) 是来源于着床前胚胎囊胚时期的内细胞团,在体外可以无限扩增,并具有分化为各种成熟体细胞的能力^[15]。有研究证实对于这种能力的调控主要是 NANOG、OCT4 和 SOX2 cMYC、Mediator 及 TAF3 等进行维持的。

1. NIPBL 与多潜能因子:多潜能转录因子是用来维持干细胞的多潜能性及自我更新能力的,因此 oct4、nanog 及 Sox2 等这些多潜能转录因子应该只会在干细胞中出现,在分化成熟的细胞中往往是沉默不表达的。虽然这些转录因子的功能已经证实,但是具体如何被调控,被什么调控? 目前仍然不是很清楚。但有研究发现,在胚胎干细胞中 cohesin 和 NIPBL 能与 oct4、nanog 及 Sox2 这些多潜能因子的启动子区域进行结合,并且上调这些基因的表达,但是在已经分化成熟的成纤维细胞中,并没有发现 cohesin 和 NIPBL 与这些多潜能转录因子的结合^[16]。因此笔者猜

基金项目:浙江省钱江人才计划项目 (2010R10063)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学 (单丽红);310022 杭州,浙江省肿瘤医院 (毛伟敏、徐伟珍)

通讯作者:毛伟敏,电子信箱: MaoWM@163.com

测 cohesin 和 NIPBL 很有可能是这些多潜能因子的上游调控者,在干细胞的分化过程中起了重要的作用。

2. cohesin 与 Mediator: cohesin 与 Mediator 缺陷均会引起神经及发育异常。cohesin 缺陷的 Cornelia de Lange 综合征的患者存在大量的发育缺陷包括:生长和精神发育迟滞、上肢缺陷、身材矮小及胃肠功能紊乱等^[14]。Mediator 在过去的研究中被证实在基因激活中发挥作用,存在 Mediator 缺陷的患者常有各种各样的神经系统缺陷。

有学者发现 Mediator 和 cohesin 可在细胞特异性基因的起始端形成一个 DNA loop 的特殊基因组结构来调控基因的表达。调控因子和基因表达元件分别与 DNA 启动子和增强子结合,激活基因的表达。Mediator 和 cohesin 形成一种新型复合物促进和维持这种接触。Mediator 和 cohesin 突变可以影响细胞特异性基因 DNA loop 形成,导致各种发育综合征和疾病。当胚胎干细胞中敲除 Mediator 或 cohesin,细胞就会丧失它的干细胞特性,开始转化为其他细胞类型^[16]。Mediator 和 cohesin 均参与了干细胞的分化过程,他们的突变或缺失,都有可能引起不适当的细胞分化进而促使肿瘤的产生。

3. cohesin 与 TAF3: 基础转录因子 TFIID 复合体是由 TATA 盒结合蛋白(TBP)及近 14 个 TBP 相关因子(TAFs)组成。在人类胚胎干细胞仅包含了 TAFs (2、3、5、6、7 和 11),而大部分活性基因只结合了 TAF3、TAF5 及 TBP。TAF3 是基础转录因子相关的核心启动子,在 ES 细胞中表达丰富。研究发现,在转录初始,TAF3 识别并结合 H3K4me3 位点,促使 TFIID 复合体间接与 H3K4me3 位点结合,调控相关基因的表达^[17],进而参与胚胎干细胞的分化过程。

TAF3 能够促进内胚层的分化,抑制中胚层及外胚层的分化。研究证实,用 siRNA 敲除 ES 细胞中的 TAF3,内胚层相关标志基因表达水平降低。上调 ES 细胞中 TAF3 的表达水平,能够抑制 ES 细胞向中、外胚层方向分化,并促使其向内胚层方向分化。进一步的研究结果表明:CTCF 可以直接招募 TAF3 与 cohesin 绑定在一起形成 TAF3/CTCF/Cohesin 复合物,结合到启动子远端位点,共同调节基因的表达。TAF3 须依赖这个复合物来实现相关基因的表达调控,促使 ES 细胞向内胚层方向分化^[18]。cohesin 与锌指转录因子 CTCF 在哺乳动物基因组中共定位,在 CTCF 执行其功能中起了重要的作用。因此 cohesin 是否有可能通过 TAF3/CTCF/Cohesin 这一途径对干细胞的分

化进行调节值得关注。

三、NIPBL 与 CTCF 共同调控细胞分化过程

CTCF 是广泛表达且在进化上高度保守的多锌指 DNA 结合蛋白,并且已经证实其在 X 染色体的失活和基因组的构建等发育过程中起了重要的作用。在人类胚胎干细胞中 CTCF 与一些重要的多潜能因子 NANOG、SOX2、cMYC 和 LIN28 有关,在人类 ESC 的复制过程中起关键性作用。CTCF 的缺失会影响这些多潜能因子的表达。在诱导分化过程中 CTCF 的缺失加速了多潜能因子标志物的消失,但是并不会导致细胞的自分化。除此之外,研究发现 CTCF 与 NANOG - DPPA3 - GDF3 的关键位点有关,cohesin 作为 CTCF 的辅助因子与其绑定后共同结合于 NANOG 区域^[19]。

CTCF 不仅调控胚胎干细胞的分化,在其他细胞中也参与了细胞的分化过程。原癌基因 c - myc 与生长、分化、凋亡和肿瘤发生有关。CTCF 是人 c - myc 基因主要启动子 P2 的转录因子,可以负性调控 c - myc 的表达,是候选的抑癌基因。研究发现在精原细胞中表达 CTCF,精母细胞中 CTCF 表达下调,在精子细胞中 CTCF 表达上调。进一步提示 CTCF 参与调控细胞的分化过程^[20]。

研究发现 cohesin 与锌指转录因子 CTCF 在哺乳动物基因组中共定位,其中的一些位点已经证明可以增强转录绝缘子的隔离作用,而这一功能的实现必须依靠 cohesin 才能完成。在诱导分化过程中,cohesin 与 NIPBL 跟激活分化过程的特殊目的球蛋白,可以通过相同的方式结合到 CTCF 调控区域。NIPBL/cohesin 动态结合在染色质重塑过程中起关键作用,而染色质可以远距离调控 CTCF 绝缘子及增强子区域。NIPBL 与 cohesin 很有可能直接或通过染色质间接对 CTCF 进行调控,进而参与细胞的分化过程。

四、NIPBL 在 EMT 中的作用

EMT(epithelial - mesenchymal transition)即上皮间质转化,是指上皮细胞转化为间充质细胞的现象。而这些细胞重新分化为上皮细胞表型的过程即为间质上皮转化(MET)。EMT 既参与了哺乳动物胚胎发育过程也参与了上皮细胞癌的浸润及转移。上皮细胞具有顶和底两个极性,在某些因素的影响下,细胞的极性消失,使细胞间的黏附连接减弱,细胞的运动能力增强,进而使细胞具有浸润及迁移的能力。在肿瘤组织中,它可以帮助癌细胞向周围或远端组织转移。目前很多肿瘤中都发现有 EMT 的现象,如乳腺

癌、前列腺癌、结肠癌等。

原癌基因 *c - myc* 与生长、分化、凋亡和肿瘤发生有关。有研究表明, *c - myc* 可以引发上皮细胞 EMT 及纤维细胞的 MET 过程。CTCF 是人 *c - myc* 基因主要启动子 P2 的转录因子, 可以负性调控 *c - myc* 的表达。CTCF 可能通过调控 *c - myc* 的表达, 进一步调节 EMT 的发生

Wt1 被认为是一种抑癌基因且可以在心外膜调控 EMT, 在肾间质调控 MET 的过程。研究发现, Wt1 一方面可以直接调控标志 EMT 发生的 *snail* 及 *E - cadherin* 这两个基因的表达。另一方面, 可以直接和间接调控 Wnt4 的表达及分布来调控 EMT 的发生。进一步研究揭示 Wt1 可以维持 CTCF 和 cohesin 装载, 调节染色质的卷曲, 而 CTCF 与 cohesin 可以阻隔 Wnt4 与位点的结合, 从而起到抑制或激活的作用, 提示 Wt1 可以通过 CTCF 对染色质的调控来激活或抑制其转录因子 Wnt4 的表达, 进而来调控 EMT 和 MET 的过程。NIPBL 对 CTCF 及 cohesin 具有调控作用, 因此猜测在肿瘤细胞中 NIPBL 可能通过影响 CTCF 和 cohesin 来调节 *c - myc* 及 Wnt4 的表达, 进一步参与 EMT 及肿瘤细胞的分化的过程。

NIPBL、cohesin 和 CTCF 均通过不同的途径参与了细胞的分化过程, NIPBL 与 cohesin 和 CTCF 联系密切, 在执行他们的功能过程中, NIPBL 起了重要的作用。NIPBL 很有可能直接或间接通过他们调控了细胞的分化过程。肿瘤细胞常存在分化功能异常, 且常有 NIPBL 表达异常现象。在肿瘤细胞中 NIPBL 是否通过以上通路来调控细胞的分化过程, 仍需进一步研究。

参考文献

- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast [J]. *Cell*, 2000, 103 (3): 375 - 386
- Dorsett D. Cohesin, gene expression and development: lessons from *Drosophila* [J]. *Chromo Res*, 2009, 17(2): 185 - 200
- Xu H, Tomaszewski JM, McKay MJ. Can corruption of chromosome cohesion create a conduit to cancer? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11 (3): 199 - 210
- Bermudez VP, Farina A, Higashi TL, *et al.* In vitro loading of human cohesin on DNA by the human *Sec2 - Sec4* loader complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(24): 9366 - 9371
- Rollins RA, Morcillo P, Dorsett D. Nipped - B, a *Drosophila* homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and ultrabithorax genes [J]. *Genetics*, 1999,

- 152(2): 577 - 593
- Unal E, Arber A, Sattler U, *et al.* DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double - strand break - specific cohesion domain [J]. *Mol Cell*, 2004, 16(6): 991 - 1002
- Nasmyth K, Haering CH. Cohesin: its roles and mechanisms [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 525 - 558
- Gause M, Webber HA, Misulovin Z, *et al.* Functional links between *Drosophila* Nipped - B and cohesin in somatic and meiotic cells [J]. *Chromosoma*, 2008, 117(1): 51 - 66
- Misulovin Z, Schwartz YB, Li XY, *et al.* Association of cohesion and Nipped - B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome [J]. *Chromosoma*, 2008, 117(1): 89 - 102
- Xu H, Tomaszewski JM, McKay MJ. Can corruption of chromosome cohesion create a conduit to cancer? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11 (3): 199 - 210
- Barber TD, McManus K, Yuen KW, *et al.* Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(9): 3443 - 3448
- Porkka KP, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. RAD21 and KIAA0196 at 8q24 are amplified and overexpressed in prostate cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, 39(1): 1 - 10
- Mann MB, Hodges CA, Barnes E, *et al.* Defective sister - chromatid cohesion, aneuploidy and cancer predisposition in a mouse model of type II Rothmund - Thomson syndrome [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(6): 813 - 825
- Liua J, Krantz ID. Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond [J]. *Clin Genet*, 2009, 76(4): 303 - 314
- Gabut M, Samavarchi - Tehrani P, Wang X, *et al.* An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming [J]. *Cell*, 2011, 147(1): 132 - 146
- Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, *et al.* Mediator and cohesion connect gene expression and chromatin architecture [J]. *Nature*, 2010, 467(7314): 430 - 435
- Vermeulen M, Mulder KW, Denissov S, *et al.* Selective anchoring of TFIIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4 [J]. *Cell*, 2007, 131 (1): 58 - 69
- Liu Z, Scannell DR, Eisen MB, *et al.* Control of embryonic stem cell Lineage commitment by core promoter factor, TAF3 [J]. *Cell*, 2011, 146 (5): 720 - 731
- Balakrishnan SK, Witcher M, Berggren TW, *et al.* Functional and molecular characterization of the role of CTCF in human embryonic Stem [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e42424
- Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, *et al.* BORIS, a novel male germ - line - specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11 - zinc - finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 6806 - 6811

(收稿日期: 2013 - 06 - 12)

(修回日期: 2013 - 07 - 15)