

抗增殖蛋白在肝脏疾病中的研究进展

孙明珠, 党双锁 (西安交通大学医学院第二附属医院 感染科, 西安 710004)

抗增殖蛋白(Prohibitin, 抑制素)是一种高度保守的蛋白质, 广泛分布于细菌、酵母、原虫、植物和哺乳动物等真核生物细胞中, 具有高度的同源性。人抗增殖蛋白基因(phb)位于人染色体17q21, 编码分子量为32 kD的抗增殖蛋白。抗增殖蛋白作为重要的细胞膜蛋白超家族成员之一, 主要存在于线粒体内膜上, 发挥着分子伴侣的作用, 目前抗增殖蛋白最为确定的功能是作为分子伴侣参与稳定细胞线粒体蛋白。同时还存在于细胞核内, 起到调控转录的作用。此外, 质膜、细胞浆也有少量表达, 可能参与调控细胞周期、调节细胞信号转导、抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抗衰老、维持细胞内稳态等诸多细胞生命活动, 但其功能还存在许多争议之处, 其具体作用机制亦不是非常清楚。而抗增殖蛋白在肝脏疾病如肝炎、肝硬化、肝细胞癌等的发生发展过程中具体充当怎样的角色, 一直为学者们孜孜探索, 为此本文就目前抗增殖蛋白在肝脏疾病中的研究进展进行综述。

1 抗增殖蛋白的发现

1989年McClung等^[1]首次从大鼠肝脏细胞中分离出抗增殖蛋白cDNA, 发现抗增殖蛋白在正常肝脏中的表达量远远高于其在再生肝脏中的表达量。随后1991年Nuell等^[2]将抗增殖蛋白基因显微注射进入正常人的成纤维细胞, 发现抗增殖蛋白mRNA抑制DNA的合成, 并鉴定出抗增殖蛋白具有抗细胞增殖的功能, 故名抗增殖蛋白。后来又发现抗增殖蛋白抗增殖的功能归因于抗增殖蛋白基因的3'-UTR。但其3'-UTR抗增殖的机制

一直倍受争议。直到2009年Liu等^[3]使用特异性针对抗增殖蛋白3'-UTR的微小RNA进行RNA干扰实验, 发现低分化胃腺癌中的抗增殖蛋白表达下调, 这才证明微小RNA通过抑制抗增殖蛋白的表达而促进癌细胞增殖。

1991年White等^[4]鉴定出抗增殖蛋白的氨基酸序列, 并发现其主要存在于仓鼠肾脏细胞的线粒体中。1992年Sato等^[5]发现抗增殖蛋白基因位于染色体17q12-q21, 而17q12-q21区域当时从遗传学角度来讲与乳腺癌的早期发生发展密切相关。而同样定位于17q12-q21、与细胞增殖和癌症密切相关的还有其他基因, 例如DNA拓扑异构酶II、ERBB2、促胃液素、神经生长因子受体等。而17q21位点亦是自身免疫性疾病的易感基因位点如I型糖尿病。进一步研究发现, 17q21.1位点影响腹部囤积脂肪的倾向性、调节食物摄入和性激素水平。有趣的是, 抗增殖蛋白具有阻遏雄激素和雌激素的功能。综上所述, 这些研究发现高度揭示了抗增殖蛋白在新陈代谢、细胞增殖、免疫调节及其相关疾病中发挥着作用。新近报道显示, 抗增殖蛋白在多种癌细胞中均表达上调, 而抗增殖蛋白在不同代谢状态下的抗增殖的功能则与其位于易感基因17q12-q21位点相吻合。

2 抗增殖蛋白在肝脏疾病中的研究进展

2.1 抗增殖蛋白在丙型肝炎病毒中的研究进展

2009年, Tsutsumi等^[6]研究发现抗增殖蛋白不仅在丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)核心蛋白表达细胞模型中表达上调, 而且在HCV全基因组复制细胞模型中和核心蛋白转基因鼠模型的肝脏中表达上调。众所周知, HCV核心蛋白与HCV的发病机制密切相关, HCV核心蛋白可以诱导氧化

应激和干扰脂类代谢。为阐明核心蛋白对线粒体的影响,他们通过双向聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法在HCV核心蛋白表达细胞中分析线粒体蛋白质的表达模式。通过质谱法鉴定出若干与线粒体呼吸链、蛋白伴侣相关的蛋白质。在这些具有连续差异表达的鉴定出的蛋白质中,抗增殖蛋白表达上调。通过与核心蛋白的相互作用,抗增殖蛋白的稳定性得到了提高。进一步研究证明,核心蛋白干扰了抗增殖蛋白与线粒体DNA编码的细胞色素C氧化酶(COX)亚基的相互作用,导致COX活性显著下降。综上所述,HCV核心蛋白影响了包括抗增殖蛋白在内的线粒体蛋白的稳态水平,而这可能导致线粒体呼吸链功能不全、肝细胞氧化应激损伤。2010年,Zhao等^[7]研究发现HCV高变区1(hypervariable region 1, HVR1)类似物7氨基酸肽(7-P)通过减少大鼠关键性致炎因子的表达而保护肝脏免于损伤,而抗增殖蛋白在7-P保护肝细胞机制中发挥关键作用。针对HCV HVR1的研究中,在HVR1 N-末端发现一种由7个氨基酸组成的肽,此肽可以保护大鼠肝脏免于受猪血清引起的损伤。7-P不仅能使血清转氨酶(ALT、AST)、碱性磷酸酶、胆红素水平降低,而且可以有效逆转猪血清所致的慢性肝损伤等病理组织学改变,而Western blot也验证了此生物信息学结果。他们使用基因芯片技术分析此保护机制,进一步研究显示抗增殖蛋白等蛋白质在7-P保护肝细胞机制中发挥着关键作用,7-P可能是丙型肝炎的潜在治疗方法。

笔者的课题组已经在转染全长HCV RNA的Huh-7和Huh-7.5细胞中,通过实时PCR和免疫印迹的实验方法验证了抗增殖蛋白在Huh-7-HCV细胞和Huh-7.5-HCV细胞中的高表达。Huh-7-HCV细胞中抗增殖蛋白在mRNA水平和蛋白质水平表达上调倍数分别为2.094倍和2.380倍,Huh-7.5-HCV细胞中抗增殖蛋白在mRNA水平和蛋白质水平表达上调倍数分别为2.252倍和2.289倍。

2.2 抗增殖蛋白在酒精性肝病、脂肪肝中的研究进展 在肝脏疾病中,抗增殖蛋白功能丧失与非酒精性脂肪肝和肥胖症进展关系密切。SAM是治

疗酒精性肝病的潜在靶点,可以减少氧化应激、减少致炎因子的产生,减轻肝脏脂肪变性。因线粒体产生活性氧(氮),是氧化损伤的靶点,故2006年Bailey等^[8]假定在慢性酒精性肝病中针对SAM进行治疗可以维持细胞器的功能,而且他们对此进行了实验。他们用含SAM和不含SAM乙醇饲养大鼠5周后,从肝脏中抽提出线粒体,发现不含SAM乙醇饲养的大鼠肝脏线粒体呼吸链发生显著损伤,而含SAM乙醇饲养的大鼠肝脏线粒体并没有发生损伤,肝脏SAM维持在正常水平。进一步免疫印迹实验显示SAM使得线粒体蛋白伴侣抗增殖蛋白的表达上调倍数减少。2008年,Cayon等^[9]对非酒精性脂肪肝肥胖者的基因表达进行了分析研究,针对非酒精性脂肪肝和酒精性脂肪肝肥胖者肝脏中细胞因子、趋化因子、细胞受体、生长因子、细胞内传感器和细胞外信号转导蛋白进行了鉴定,且着重检测肝脏组织学严重病变的非酒精性脂肪肝肥胖者肝内蛋白质基因表达谱。分析38例做过减肥手术的肥胖者,其BMI(body mass index)均>35。肝活检组织保存于液氮中,分为3组进行检测:①无非酒精性脂肪肝的肥胖者(n=12);②无肝纤维化的非酒精性脂肪肝肥胖者(n=13);③有肝纤维化的非酒精性脂肪肝肥胖者(n=13)。发现非酒精性脂肪肝肥胖者有14种基因表达差异,10种表达上调,4种表达下调。其中表达上调显著的有抗增殖蛋白。抗增殖蛋白表达上调表明非酒精性脂肪肝肥胖者中存在肝脏线粒体功能障碍。

2.3 抗增殖蛋白在肝脏肿瘤、肝细胞癌、肝脏转移癌中的研究进展 2008年,Martin等^[10]为揭示乳腺癌患者肝转移的分子机制和寻求转移过程的潜在标记物,分析了从高转移性乳腺癌细胞株MDA-MB435到裸鼠转移体内逐步选择的变异。质谱法鉴定出12种蛋白质之间存在相互作用关系。其中GRP75与4种蛋白质抗增殖蛋白、HSP27、延伸蛋白B、macropain δ 链关系密切,亦与细胞增殖、肿瘤形成、应激关系密切,其通过在肝转移中增加信号转导而发挥作用。2008年Xu等^[11]研究了人

肝癌细胞株SMMC7721分化过程中抗增殖蛋白在细胞中的分布和表达的变化。他们应用Western blot、免疫荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜观察的方法,发现抗增殖蛋白存在于细胞核基质中,并在六亚甲基双乙酰胺的影响下表达下调、在细胞内的分布也发生了变化,抗增殖蛋白和致癌基因、肿瘤抑制基因(c-fos, c-myc, p53 和 Rb)存在共区域化。故抗增殖蛋白是一种核基质蛋白,其分布、表达和与致癌基因、肿瘤抑制基因之间的关系可能在人肝癌细胞株SMMC7721分化过程中发挥着重要的作用。2009年Yoo等^[12]在经过毛地黄黄酮处理后的人肝癌细胞株Huh-7中通过蛋白质组学方法研究了抗癌蛋白。毛地黄黄酮在众多人类癌症(尤其是肝细胞癌)中发挥着抗癌作用。大量体外实验证明毛地黄黄酮具有抗氧化作用,且毛地黄黄酮在人肝癌细胞株Huh-7中发挥抗癌作用是通过增加细胞内活性氧水平的机制来实现的。为了鉴定与这个机制密切相关的蛋白质,研究人员采用了双向电泳的实验方法,结果显示有若干蛋白质与毛地黄黄酮的抗癌作用密切相关。有趣的是,这些蛋白质中的抗增殖蛋白和过氧化氢酶6与活性氧代谢和细胞凋亡关系密切。而Western blot实验亦证实了这些蛋白质的表达。因此,他们认为抗增殖蛋白和过氧化氢酶6是毛地黄黄酮引起Huh-7细胞凋亡机制中最重要的靶点,其通过引起细胞内活性氧的产生而发挥作用。

2010年, Sanchez-Quiles等^[13]发现抗增殖蛋白基因缺失抑制人肝癌细胞株细胞增殖、引起细胞凋亡。他们综合利用转录组学和蛋白质组学技术研究抗增殖蛋白基因沉默对人肝癌细胞株PLC/PRF/5的影响,进一步探讨肝脏中抗增殖蛋白的生物学功能,明确依赖抗增殖蛋白的分子机制。抗增殖蛋白依赖于核因子 κ B发挥抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。他们的实验研究为证明抗增殖蛋白在维持人肝癌细胞株表型转化和侵袭中发挥着主导作用提供了证据,而且进一步支持了以往的研究成果——抗增殖蛋白是潜在的临床治疗靶点。

3 抗增殖蛋白在其他疾病的肝脏蛋白质组学研究进展

2007年Grider等^[14]进行了遗传性致死性肢端皮炎的牛头梗犬肝脏可溶性蛋白质组学分析实验。致死性肢端皮炎(Lethal acrodermatitis, LAD)是牛头梗犬所患的一种基因病。其基因型与人类肠病性肢端皮炎类似,尚无有效治疗手段。他们研究目的是通过蛋白质组学的方法检测LAD生化指标异常。14周大的1只LAD公牛头梗犬、1只LAD母牛头梗犬、1只正常公牛头梗犬均在安乐死后,取其肝脏裂解,进行双向电泳实验和光密度测定。研究人员鉴定出大约200种蛋白质,发现LAD公/母牛头梗犬的可溶性蛋白质与正常牛头梗犬不同。将这些差异蛋白质进行质谱分析,鉴定出13种蛋白质,其中主要蛋白质有抗增殖蛋白、结合珠蛋白、谷氨酰胺合成酶和角蛋白10,其差异表达倍数至少为4倍。研究数据展示了LAD基因突变的第一手蛋白质组学分析资料。鉴定这些差异表达蛋白质可能对于掌握LAD的病因至关重要,并可能有助于发现牛头梗犬LAD的诊断方法。2010年Manivannan等^[15]构建类似于人类血吸虫病的小鼠模型,研究20周后高度脾肿大(类似于人肝脾性血吸虫病)/中度脾肿大综合征(类似于人肠血吸虫病)的小鼠肝脏蛋白质表达,以期揭示这两种疾病的分子机制。他们通过凝胶电泳的方法鉴定出小鼠肝脏中80种蛋白质在血吸虫感染后表达差异,35种蛋白质在病情严重时特异性表达差异。尤其是抗增殖蛋白等蛋白质在高度脾肿大小鼠肝脏中表达显著变化。以上结果表明高度脾肿大和中度脾肿大综合征小鼠肝脏蛋白质丰度是不同的,而这可能成为肝脾性血吸虫病早期诊断的标志物。

敲除甲硫氨酸腺苷转移酶1A(methionine adenosyltransferase1A, MAT1A)的小鼠抗增殖蛋白表达减少、线粒体功能受损、进而进展为肝细胞癌。为了证明抗增殖蛋白表达减少是否能够引起敲除MAT1A的表现型,2010年Ko等^[16]构建了特异性敲除肝脏抗增殖蛋白的小鼠模型。从mRNA

水平和蛋白质水平检测了抗增殖蛋白的表达,并通过小干扰RNA和过表达改变抗增殖蛋白在细胞内的表达。第3周,特异性敲除肝脏抗增殖蛋白的小鼠出现生化上和组织学上的肝脏损伤变化,免疫组织化学结果显示细胞凋亡、细胞增殖、氧化应激、肝纤维化、胆管上皮化生、肝细胞异常增生、干细胞增生和癌前标记物增多;线粒体肿大、嵴消失。基因表达差异揭示了与细胞增殖、恶变和肝纤维化密切相关的基因表达显著上调。从第20周开始,特异性敲除肝脏抗增殖蛋白的小鼠肝脏出现多发性结节。从第35到46周,38%的小鼠出现多发性肝细胞癌。与人肝癌细胞株Huh-7和HepG2相比,正常人肝细胞中的抗增殖蛋白水平较高。敲除正常小鼠肝细胞株AML12抗增殖蛋白后,细胞周期蛋白D1、转录因子E2F、细胞周期蛋白D1启动子表达上调,且细胞增殖加剧。而抗增殖蛋白过表达后的结果与上述恰恰相反。在Huh-7中敲除抗增殖蛋白或者抗增殖蛋白过表达,不会显著影响细胞增殖和凋亡。综上所述,特异性敲除小鼠肝脏抗增殖蛋白会出现显著的自发性肝脏损伤、氧化应激、肝纤维化、甚至进展为肝细胞癌。这些结果有力地证明了抗增殖蛋白在肝细胞中发挥着肿瘤抑制物的作用。

4 展望

抗增殖蛋白参与众多必要的生物过程,如新陈代谢、细胞增殖、细胞凋亡等,这暗示着它是一种极其重要的多功能蛋白质。抗增殖蛋白在多种疾病,尤其是肝脏疾病的发生发展中起关键作用,近年来受到越来越多的关注。通过对其功能的研究将有助于进一步认识肝脏疾病的发病机制,从而为临床治疗提供一个新的靶点。目前,抗增殖蛋白的临床价值已经被越来越多的学者所肯定,但其确切的功能调节机制还存在很多争议,尤其是在介导细胞凋亡、细胞分化增殖等方面有待于进一步研究和完善。

参考文献

- [1] McClung JK, Danner DB, Stewart DA, et al. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1989,164:1316-1322.
- [2] Nuell MJ, Stewart DA, Walker L, et al. Prohibitin, an

- evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells[J]. *Mol Cell Biol*,1991,11:1372-1381.
- [3] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin[J]. *Cancer Lett*,2009,273:233-242.
- [4] White JJ, Ledbetter DH, Eddy RL Jr, et al. Assignment of the human prohibitin gene(PHB) to chromosome 17 and identification of a DNA polymorphism[J]. *Genomics*,1991,11:228-230.
- [5] Sato T, Saito H, Swensen J, et al. The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer[J]. *Cancer Res*,1992,52:1643-1646.
- [6] Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, et al. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein[J]. *Hepatology*,2009,50:378-386.
- [7] Zhao W, Wang L, Chen P, et al. 7-aa peptide mimic from HVR1 of HCV protects hepatic injury in rats by reduced expression of key pro-inflammatory factors[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*,2010,9:135-145.
- [8] Bailey SM, Robinson G, Pinner A, et al. S-adenosylmethionine prevents chronic alcohol-induced mitochondrial dysfunction in the rat liver[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2006,291:G857-867.
- [9] Cayon A, Crespo J, Guerra AR, et al. Gene expression in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Rev Esp Enferm Dig*,2008,100:212-218.
- [10] Martin B, Sanz R, Araques R, et al. Functional clustering of metastasis proteins describes plastic adaptation resources of breast-cancer cells to new microenvironments[J]. *J Proteome Res*,2008,7:3242-3253.
- [11] Xu DH, Tang J, Li QF, et al. Positional and expressive alteration of prohibitin during the induced differentiation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells[J]. *World J Gastroenterol*,2008,14:5008-5014.
- [12] Yoo DR, Jang YH, Jeon YK, et al. Proteomic identification of anti-cancer proteins in luteolin-treated human hepatoma Huh-7 cells[J]. *Cancer Lett*,2009,282:48-54.
- [13] Sanchez-Quiles V, Santamaria E, Sequera V, et al. Prohibitin deficiency blocks proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells: molecular mechanisms and functional implications[J]. *Proteomics*,2010,10:1609-1620.
- [14] Grider A, Mouat MF, Mauldin EA, et al. Analysis of the liver soluble proteome from bull terriers affected with inherited lethal acrodermatitis[J]. *Mol Genet Metab*,2007,92:249-257.
- [15] Manivannan B, Rawson P, Jordan TW, et al. Differential patterns of liver proteins in experimental murine hepatosplenic schistosomiasis[J]. *Infect Immun*,2010,78:618-628.
- [16] Ko KS, Tomasi ML, Iqlesias-Ara A, et al. Liver-specific deletion of prohibitin 1 results in spontaneous liver injury, fibrosis, and hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Hepatology*,2010,52:2096-2108.

收稿日期: 2011-02-14