

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01049

癌基因 p28^{GANK} 突变体的构建及其对 p53 的调控

任一彬, 付 静, 陈 瑶, 王红阳*

第二军医大学东方肝胆外科医院信号转导实验室, 上海 200438

[摘要] **目的** 构建癌基因 p28^{GANK} 缺失不同 ankyrin 序列的突变体, 进一步研究 p28^{GANK} 的功能及在肝癌发生发展中的作用。**方法** 利用 QuikChang Site-Directed Mutagenesis Kit 构建 p28^{GANK} 5 个 ankyrin 缺失突变体并检测各个突变体对 p53 的影响。**结果** 构建出分别缺失第 1 个 ankyrin(39~71aa)、第 2 个 ankyrin(72~104aa)、第 3 个 ankyrin(105~137aa)、第 4 个 ankyrin(138~170aa) 和第 5 个 ankyrin(171~203aa) 的突变体, 琼脂糖凝胶电泳及蛋白免疫印迹法验证正确。野生型 p28^{GANK} 可促进 p53 降解, 其他突变体对 p53 的表达无明显影响。**结论** 成功构建了 p28^{GANK} 的 5 个突变体, 证实 p28^{GANK} 对 p53 的调控需要全部的 ankyrin 序列, 为 ankyrin 的研究和 p28^{GANK} 对肝癌的调控作用研究奠定了基础。

[关键词] 癌基因蛋白质 p28^{GANK}; 突变体; p53 基因

[中图分类号] R 730.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1049-04

Construction of oncogene p28^{GANK} mutants and their regulating effects on p53

REN Yi-bin, FU Jing, CHEN Yao, WANG Hong-yang*

International Co-operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To construct the mutants of oncogene p28^{GANK} with different ankyrin repeats deleted, so as to further study the potential role of p28^{GANK} in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** QuikChang Site-Directed Mutagenesis Kit was used to construct five p28^{GANK} mutants with different ankyrin repeats deleted and their influences on p53 were also investigated. **Results** Five deletion mutants of p28^{GANK} were as follows: 39-71aa, 72-104aa, 105-137aa, 138-170aa, and 171-203aa. Agarose gel electrophoresis and Western blotting analysis confirmed the correct construction of these mutants. Wild type p28^{GANK} promoted degradation of p53, but the 5 mutants had no noticeable effects on expression of p53. **Conclusion** We have successfully constructed five p28^{GANK} ankyrin repeat-deleted mutants. It is confirmed that the regulation of p53 needs the complete ankyrin repeats of p28^{GANK}, which paves a way for further research on ankyrin and the role of p28^{GANK} in HCC.

[Key words] oncogene protein p28^{GANK}; mutants; p53 gene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1049-1052]

肝细胞性肝癌(简称肝癌, hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的高发肿瘤之一。目前研究认为: 肝炎病毒感染和肝特异性致癌物是肝癌发生的主要外因; 同时肝癌和其他恶性肿瘤一样, 其发生和发展也是体内多基因参与、多步骤协同的复杂过程^[1-3]。至今, 已有超过 20 种基因被鉴定出在肝细胞癌内表达异常, 如 ras、c-myc、c-fos、c-jun、rho、TGF- α ^[4-6]等, 这些基因的突变、杂合性缺失、甲基化状态的改变或表达量的异常使它们的蛋白产物参与的肿瘤细胞内信号转导和细胞周期进展发生异常改变, 进而逐渐导致肿瘤细胞的恶性增殖。它们

在基因水平改变的累积效应以及它们之间可能发生的相互协同作用, 共同促进了肿瘤的发展。然而, 这些基因的改变也常见于除肝癌外的其他肿瘤, 因此, 肝癌中特异性高表达癌基因的发现及其功能研究就显得非常重要。

2000 年日本科学家^[7]应用消减杂交法从人肝细胞癌组织高表达的基因中筛选出 1 条编码重复 ankyrin (ANK) 序列的新基因, 命名为 gankyrin。Gankyrin 基因序列与从 26S 蛋白酶体 PA700 复合物中发现的 1 个非 ATP 酶亚单位 p28 蛋白的基因序列完全一致, 因此我们将它们合并命名为 p28^{GANK}

[收稿日期] 2010-08-02 **[接受日期]** 2010-09-12

[基金项目] 上海市自然科学基金(08ZR1405500)。Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (08ZR1405500)。

[作者简介] 任一彬, 实习研究员。E-mail: yibinren@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.cn

基因。p28^{GANK}基因 cDNA 全长约 1.5 kb,开放阅读框编码1个226氨基酸组成的25 000大小的蛋白质,其中含有5个重复 ankyrin 序列,加上分别向 N 端和 C 端延伸的38个和22个氨基酸组成。其保守的 ankyrin 序列介导蛋白与蛋白间的相互作用。

研究发现癌蛋白 p28^{GANK}参与 CDK4/CyclinD₁/p16INK4a/Rb1/E2F-1 信号转导通路的调节^[8],此通路的失调在肝癌的发生发展过程中具有相当重要的作用,在肝癌细胞增殖和凋亡调控中具有重要意义。

抑癌基因 p53 的过度降解将导致细胞异常增生、基因组不稳定及肿瘤发生。p53 的降解由泛素蛋白酶体系统调节,MDM2 是一种泛素连接酶 E3,5%~10%的肿瘤中过表达 MDM2^[9],MDM2 与 p53 结合加强 p53 的降解,而 gankyrin 可与 MDM2 的环指区域(411~438aa)结合,增强 MDM2 的 E3 酶的活性,从而增强 MDM2 介导的 p53 泛素化^[10];并

与 26S 蛋白酶体的 S6 ATP 酶相互作用,降解 p53。在斑马鱼体内过表达 p28^{GANK}将下调 p53 表达、促进细胞增殖^[11]。下调 gankyrin 可减少 MDM2-p53-26S 蛋白酶体复合物的形成,诱导具有野生型 p53 基因的肿瘤细胞凋亡。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 质粒 3.1A-p28^{GANK}由第二军医大学东方肝胆外科医院信号转导实验室构建;人胚肾 293T 细胞有第二军医大学东方肝胆外科医院信号转导实验室保存备用;人胚肾 293T 细胞参照细胞株培养说明采用贴壁细胞培养法,在 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,细胞用培养基购自 Gibco 公司。突变体构建过程中所需的物质见表 1。

1.2 引物设计及合成 引物序列见表 2,均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 突变体构建所需的材料

Tab 1 Materials needed for construction of the mutants

<i>PfuTurbo</i> [®] DNA polymerase (2.5 U/ μ l)	25 U
10 \times reaction buffer	500 μ l
<i>Dpn</i> I restriction enzyme (10 U/ μ l)	100 U
Oligonucleotide control primer #1 [34-mer (100 ng/ μ l)] 5'-CCA TGA TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA CCC TCA C-3'	750 ng
Oligonucleotide control primer #2 [34-mer (100 ng/ μ l)] 5'-GTG AGG GTT AAT TGC GCG CTT GGC GTA ATC ATG G-3'	750 ng
pWhitescript [™] 4.5-kb control plasmid (5 ng/ μ l)	50 ng
dNTP mix	10 μ l
XL1-Blue supercompetent cells (blue tubes)	3 \times 200 μ l
pUC18 control plasmid (0.1 ng/ μ l in TE buffer)	10 μ l

表 2 合成引物的序列

Tab 2 Sequence of primers

Deletion mutant	Primer sequences (5'→3')
p28 ^{GANK} dA1	GCT ACT AGA ACT GAC CAG GCA GGT TGG TCT CCT CTT CGA AGA GGA GAC CAA CCT GCC TGG TCA GTT CTA GTA GC
p28 ^{GANK} dA2	GTG AAT GAT AAA GAC GAT AAT GGC TGT ACT CCC TTA CGT AAG GGA GTA CAG CCA TTA TCG TCT TTA TCA TTC AC
p28 ^{GANK} dA3	GTG AAT GCT GTC AAT CAA TAT GAG GCT ACA GCA ATG GCA TTG CTG TAG CCT CAT ATT GAT TGA CAG CAT TCA C
p28 ^{GANK} dA4	CCA GAT GCT GCT AAG GAC CAT GAG GGT AAC ACT CCT CTA CGT AGA GGA GTG TTA CCC TCA TGG TCC TTA GCA TCT GG
p28 ^{GANK} dA5	CAC AAA CAT CCA AGA CAC TGA AAA GAC ACC CCT GCA GGG GTG TCT TTT CTT CAG TGT CTT GGA TGT TTG TG

1.3 突变体的构建 分别将 p28^{GANK} 的第 1 个 ankyrin(39~71aa),第 2 个 ankyrin(72~104aa),第 3 个 ankyrin(105~137aa),第 4 个 ankyrin(138~170aa),第 5 个 ankyrin(171~203aa)进行缺失,具体方法和流程见 QuikChang Site-Directed Mutagenesis Kit 说明书。

1.4 突变体的鉴定 取对数生长期的人胚肾 293T 细胞铺 12 孔板,37℃、5% CO₂ 孵箱内培养 12 h;分别转染 myc-p28^{GANK}、p28^{GANK} dA1、p28^{GANK} dA2、p28^{GANK} dA3、p28^{GANK} dA4、p28^{GANK} dA5 质粒,蛋白质

免疫印迹法检测其蛋白表达水平。

2 结果

2.1 突变体质粒的鉴定 构建的 p28^{GANK} 突变体结构见图 1。DNA 凝胶电泳结果如图 2,质粒条带位置正确,经测序检测,结果一致。

2.2 野生型 p28^{GANK} 及不同突变体的蛋白电泳鉴定 蛋白质印迹法检测结果显示,野生型 p28^{GANK} 的蛋白电泳条带位于 26 000 左右,而各个突变体的蛋白条带位于 24 000 左右(图 3)。

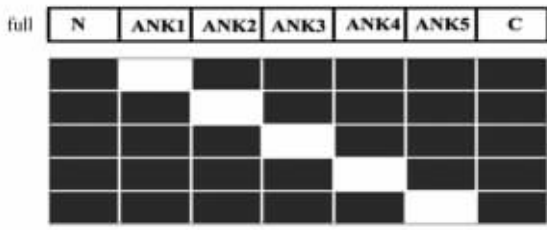
图 1 癌基因 p28^{GANK} 突变体结构示意图

Fig 1 Schematic representation of p28^{GANK} and its mutants
ANK1, ANK2, ANK3, ANK4, ANK5 represent p28^{GANK} dA1, p28^{GANK} dA2, p28^{GANK} dA3, p28^{GANK} dA4, p28^{GANK} dA5, respectively

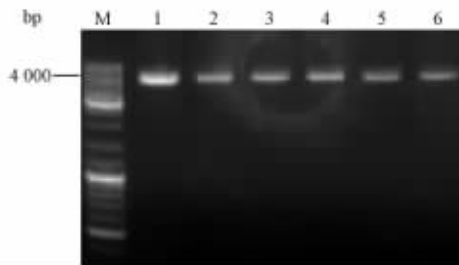
图 2 质粒 p28^{GANK} 的鉴定

Fig 2 Identification of plasmid p28^{GANK}

M: Marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6 represent p28^{GANK}, p28^{GANK} dA1, p28^{GANK} dA2, p28^{GANK} dA3, p28^{GANK} dA4, and p28^{GANK} dA5, respectively

图 3 p28^{GANK} 及突变体的蛋白表达水平鉴定

Fig 3 Identification of p28^{GANK} and mutant expression

1: p28^{GANK}; 2: p28^{GANK} dA1; 3: p28^{GANK} dA2; 4: p28^{GANK} dA3; 5: p28^{GANK} dA4; 6: p28^{GANK} dA5

2.3 野生型 p28^{GANK} 及不同突变体对 p53 的调控作用
实验结果显示在 adriamycin 作用下, 野生型 p28^{GANK} 明显下调 p53 蛋白表达水平, 每个突变体对 p53 的影响相对于野生型则没有明显变化。

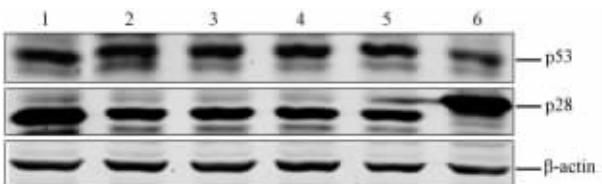
图 4 p28^{GANK} 及突变体对 p53 表达的影响

Fig 4 Effect of p28^{GANK} and its mutants on p53 protein expression

1: myc-p28^{GANK} dA1; 2: myc-p28^{GANK} dA2; 3: myc-p28^{GANK} dA3; 4: myc-p28^{GANK} dA4; 5: myc-p28^{GANK} dA5; 6: myc-p28^{GANK}

3 讨论

目前已证实癌基因 p28^{GANK} 编码的蛋白是人

26S 蛋白酶体调节亚单位 19S/PA700 复合物的一种非 ATP 酶亚基, 其核酸序列中还有 5 个串联排列的 ANK 重复单位, 其保守的 ankyrin 序列介导蛋白与蛋白间的相互作用。目前尚不清楚癌蛋白 p28^{GANK} 在 26S 蛋白酶体降解蛋白过程中的具体分子作用机制。前期研究^[7] 发现癌蛋白 p28^{GANK} 与 CDK4 竞争结合 RB1, 从而参与 E2F-1 信号转导通路的调节, 此通路的失调在肝癌的发生发展过程中具有相当重要的作用。然而 p28^{GANK} 与 RB 结合的位点和序列仍没有报道和研究。p28^{GANK} 基因在肝细胞癌中呈特异性的高表达状态, 本实验室前期对 p28^{GANK} 基因进行了大量的研究工作, 包括对 64 例国人 HCC 样本 Northern 印迹的检测, 结果显示, p28^{GANK} 基因 mRNA 在人肝细胞肝癌中的表达上调, 其在肝硬化组织中也有一定程度的表达, 不表达于正常组织; 在 4 种肝癌细胞系 (HepG2、Hun-7、SK-Hep-1、Hep3B) 中 p28^{GANK} 也呈高表达状态^[12]。我们早期实验结果表明在肝癌细胞中利用腺病毒介导的 siRNA (Adsip28^{GANK}) 下调 p28^{GANK} 的表达可明显抑制肿瘤细胞的生长, 并可在体内、体外诱发肿瘤细胞凋亡^[13]。本实验小组前期研究表明癌蛋白 p28^{GANK} 抑制 NF- κ B 的转录活性, 并促使 NF- κ B 的出核, 实验结果发现 p28^{GANK} 结合 RelA, 免疫共沉淀发现 p28^{GANK} 结合 RelA 需要 5 个 ankyrin 片段共同参与, 说明 ankyrin 序列在 p28^{GANK} 的功能作用上有重要的作用^[14]。研究发现 p28^{GANK} 能与泛素蛋白连接酶 MDM2 相互作用, 介导野生型 p53 蛋白的泛素化及降解, 说明在肝细胞癌中存在着癌蛋白 p28^{GANK} 负调控野生型 p53 的抗凋亡机制。本研究分别对 p28^{GANK} 的 5 个 ANK 序列进行突变, 构建其突变质粒, 检测其不同的突变体对抑癌基因 p53 的蛋白表达水平的差异。结果表明各个突变体对 p53 的表达水平相对于野生型是没有调控作用的, 也说明野生型 p28^{GANK} 对 p53 的调控是整体结构参与的, 其中的 ankyrin 序列缺一不可。

要使肝癌患者的诊治率和生存率提高, 加强肝癌分子病理机制的研究、寻找肝癌治疗的有效靶基因和探讨肝癌生物治疗新途径就成为了一个迫在眉睫的问题^[15-16]。构建 p28^{GANK} 的结构突变体是研究 p28^{GANK} 功能的基础, 有助于进一步阐明 p28 调节肝细胞癌发生发展中的精细分子机制, 并为以 p28^{GANK} 为靶点的生物治疗提供理论依据。

【参考文献】

[1] Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an

- oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas [J]. *Nat Med*,2000,6:96-99.
- [2] Hui A M, Makuuchi M. Molecular basis of multistep hepatocarcinogenesis: genetic and epigenetic events [J]. *Scand J Gastroenterol*,1999,34:737-742.
- [3] Macdonald G A. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Liver Dis*,2001,5:69-85.
- [4] Ogata N, Kamimura T, Asakura H. Point mutation, allelic loss and increased methylation of c-Ha-ras gene in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*,1991,13:31-37.
- [5] Yuen M F, Wu P C, Lai V C, Lau J Y, Lai C L. Expression of c-myc, c-fos, and c-jun in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*,2001,91:106-112.
- [6] Chung Y H, Kim J A, Song B C, Lee G C, Koh M S, Lee Y S. Expression of transforming growth factor-alpha mRNA in livers of patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*,1999,30:1027-1036.
- [7] Dawson S, Higashitsuji H, Wilkinson A T, Fujita J, Mayer R J. Gankyrin: a new oncoprotein and regulator of pRb and p53 [J]. *Trends Cell Biol*,2006,16:229-233.
- [8] Fu X Y, Tan L. A novel diagnostic marker, p28^{GANK} distinguishes hepatocellular carcinoma from potential mimics [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2004,130:514-520.
- [9] Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system [J]. *Semin Cancer Biol*,2003,13:49-58.
- [10] Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Nagao T, Sumitomo H. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53 [J]. *Cancer Cell*,2005,8:76-84.
- [11] Kim S Y, Hur W, Choi J, Kim D, Wang J S, Yoon H. Functional characterization of human oncoprotein gankyrin in Zebrafish [J]. *Exp Mol Med*,2009,41:8-16.
- [12] Fu X Y, Wang H Y, Tan L, Liu S Q, Cao H F, Wu M C. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. *World J Gastroenterol*,2002,8:638-643.
- [13] Li H, Fu X, Chen Y, Hong Y, Tang Y, Cao H, et al. Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28^{GANK} in hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*,2005,128:2029-2041.
- [14] Chen Y, Li H H, Fu J, Ren Y B, Wang X F, Dong L W, Tang S H. Oncoprotein p28^{GANK} binds to RelA and retains NF-kappaB in the cytoplasm through nuclear export [J]. *Cell Res*,2007,17:1020-1029.
- [15] 王红阳. 原发性肝细胞性肝癌分子机理研究的几个热点问题 [J]. *中华实验外科杂志*,2001,18:105-107.
- [16] Thorgeirsson S S, Grisham J W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Genet*,31:339-346.

[本文编辑] 尹 茶

· 消 息 ·

第五届中德军事医学研讨会在我校举行

2010年9月27日,由中德两军卫生部门共同主办的第五届中德军事医学研讨会在上海第二军医大学隆重召开。此次研讨会是中德双边军事医学交流框架的重要内容之一,得到了两国国防部和有关部门的大力支持,总后卫生部部长张雁灵少将、德军卫生总监纳卡特中将出席会议并分别发表了主旨演讲。

此次研讨会的主题是卫勤训练改革及多样化军事行动卫勤保障。来自中德两国从事军队卫勤管理和研究工作的百余位机关领导和代表,围绕“卫生专业训练与实践”、“热带医学”、“传染病防控”、“军民结合医疗救援行动”、“多国行动卫勤指挥与协同”以及“突发公共卫生事件应急处置”等重大问题,进行了深入探讨和交流。

新世纪以来,随着多种安全威胁的增多,执行多样化军事任务已成为各国军队新的历史使命的重要组成部分。卫勤保障工作在执行多样化军事任务中具有不可替代的作用。研究探索非战争军事行动卫勤保障特点规律,提高保障能力,是军队卫勤系统紧迫而重要的任务。会上,中方代表以我军参与非战争军事卫勤行动、执行国际维和任务以及突发事件医学救援为案例,介绍了一些成功的做法和经验;德方代表也在会上就德军多样化军事任务卫勤保障及训练改革、多国行动卫勤指挥与协同机制等课题展开了研究和探讨。

此次会议共交流学术论文18篇,其研究成果客观反映了中德两国军队近年来卫勤训练与实践的现状及未来发展趋势,此次会议的召开为两国两军军事卫勤联合研究构筑了相互学习的平台,对促进两国人民和军队的友谊,进一步推进中德军事医学交流与合作,创新非战争军事行动卫勤理论和训练方法,探索军地一体化灾害医学救援方式方法,将产生积极地推进作用。