

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00525

锌指蛋白 ZBTB20 生物学功能的研究进展

刘 滢¹, 陈李斌¹, 谢志芳², 章卫平^{1*}

1. 第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部细胞生物学教研室, 上海 200433

[摘要] 锌指蛋白 ZBTB20 是 ZBTB 锌指蛋白亚家族的新成员, 与已知的 BCL6 和 PLZF 同源。通过基因打靶小鼠和疾病人群研究, 学者们发现 ZBTB20 在肝脏、胰岛、神经系统和免疫系统等多个器官与系统中具有重要生理学功能, 是个体发育、学习记忆、痛觉感受、糖脂代谢等正常生理过程所必需的调节分子。ZBTB20 表达或功能异常可导致个体发育障碍, 与智障、肿瘤和代谢性疾病等多种重大疾病的病理生理过程密切相关。作为甲胎蛋白基因的主要转录抑制因子, ZBTB20 在出生后肝脏甲胎蛋白基因的表达失活中发挥了关键性作用, 且与肝癌预后密切相关。人群中 ZBTB20 基因的缺失与多种肿瘤有关, 其点突变可导致 Primrose 综合征。本文就 ZBTB20 的生物学功能研究进展作一综述。

[关键词] 锌指蛋白; ZBTB20; 转录因子; 生理与病理生理; 基因打靶

[中图分类号] R 363 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0525-05

Biological functions of zinc finger protein ZBTB20: recent advance

LIU Gan¹, CHENLI Bin¹, XIE Zhi-fang², ZHANG Wei-ping^{1*}

1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Zinc finger protein ZBTB20 is a novel member of the ZBTB zinc finger protein family and shares closest homology with BCL-6 and PLZF. Recent studies on genetically modified mice and patient cohort have revealed that ZBTB20 plays indispensable roles in multiple organs and systems, including the nervous system, liver, pancreatic islets, and immune system. ZBTB20 is an essential regulatory factor in a variety of physiological processes, such as ontogenesis, pain sensation, learning and memory, as well as glucose and lipid metabolism. Meanwhile, recent researches have also showed a close relationship between the abnormality or dysfunction of ZBTB20 and pathophysiological procedures of diseases, such as maldevelopment, mental retardation, tumors and metabolic disorders. As a key repressor governing AFP gene transcription, ZBTB20 exerts a great influence on the gene inactivation of liver AFP after birth and is closely related to the prognosis of hepatocellular carcinogenesis. In humans, the deletion of ZBTB20 is detected in diverse tumors and its point mutation leads to Primrose syndrome. This review summarizes the current knowledge concerning the biological functions of ZBTB20.

[Key words] zinc finger proteins; ZBTB20; transcriptional factors; physiology and pathophysiology; gene targeting

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5): 525-529]

锌指蛋白家族是真核生物中重要的转录因子家族之一, 包含多个亚家族。ZBTB (zinc finger and BTB domain-containing protein) 属于其中的 POK (POZ and Krüppel) 蛋白家族。该亚家族成员在 N 端有一个 BTB/POZ (Broad-complex, Tramtrack, Bric-a-brac/Poxvirus and zinc fingers) 结构域, 介导

蛋白-蛋白间的相互作用; 在 C 端有数个 C2H2 锌指结构域, 介导蛋白与 DNA 序列间的识别、结合作用。目前已经报道的 POK 亚家族成员超过 50 个, 除 BTB 和 C2H2 锌指结构域外, 各成员间 DNA 序列的同源性较低, 但在进化过程中高度保守^[1] (图 1A、1B)。ZBTB 亚家族成员主要具有转录抑制功

[收稿日期] 2015-03-12 **[接受日期]** 2015-04-08

[基金项目] 国家杰出青年科学基金 (31025013), 国家自然科学基金重点项目 (81130084), 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) (2012CB524904)。Supported by National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (31025013), Key Program of National Natural Science Foundation of China (81130084), and National Program on Key Basic Research Project (“973” Program) (2012CB524904).

[作者简介] 刘 滢, 硕士生。E-mail: wz_liugan@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871018, E-mail: wzhang@smmu.edu.cn

能,如已知的 BCL-6 和 PLZF 在造血、免疫应答和肿瘤发生发展过程中发挥了重要的调节作用,因此,该

亚家族成员的生物学作用一直受到广泛关注^[1]。

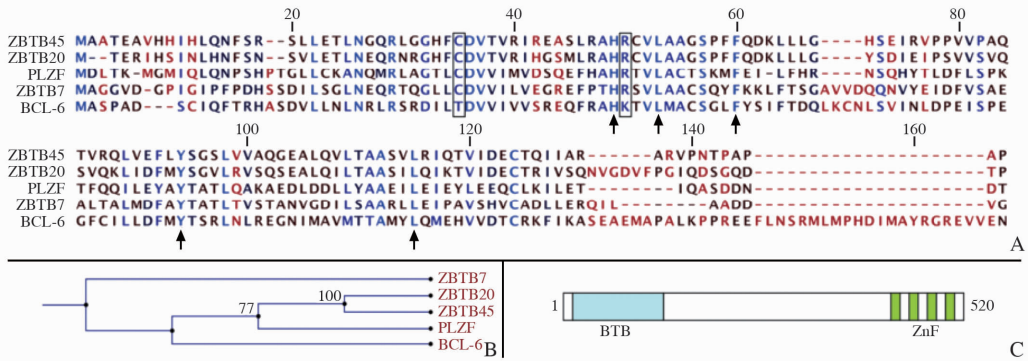


图1 与 ZBTB20 同源的 ZBTB 家族主要成员的蛋白结构特征

Fig 1 Protein structure of the main members of ZBTB family sharing homogeneity with ZBTB20

A: Sequence homology of ZBTB20, ZBTB45, PLZF, ZBTB7, and BCL-6 protein; B: Evolutionary relationship among POK family members; C: Conservative BTB, C2H2 structure of POK family

ZBTB20 是曹雪涛院士实验室最初从人树突状细胞中发现的 ZBTB 亚家族新成员^[2], 又被称为 DPZF、HOF 或 ZNF288。笔者所在实验室在国际上首次建立了 ZBTB20 的全身性和多种组织特异性基因敲除小鼠模型^[3-4], 研究揭示该分子参与调控神经发育、糖脂代谢以及免疫应答等重要生理过程^[3,5-6]。疾病人群研究显示, 该基因的突变与人类先天性遗传病 Primrose 综合征直接相关^[7]。本文就其最新研究进展进行综述。

1 ZBTB20 基因及其蛋白的结构特点

人 ZBTB20 基因定位于染色体 3q13, 至少有 2 种长短不同的 mRNA, 其 cDNA 长度分别约为 3.0 和 2.7 kb, 分别编码 2 种长短不同的蛋白亚型。这两种蛋白亚型除 N 端外其余序列相同, 长型的蛋白含 741 个氨基酸残基, 其 N 端比短型的蛋白多了 49 个氨基酸残基。ZBTB20 蛋白具有典型的 POK 蛋白家族的结构特征(图 1C), 即其 N 端有 1 个 BTB 结构域, C 端有 5 个 C2H2 锌指结构域, 其中的 4 个锌指结构域成簇排列, 中间隔着保守的 7 个氨基酸残基(His-Cys link)。体外实验证实该蛋白的 BTB 结构域能介导该分子形成同源二聚体, 而 C2H2 锌指结构域能与 DNA 序列结合。ZBTB20 的蛋白序列在不同种属间具有高度同源性, 如: ZBTB20 蛋白在人与小鼠间的同源性高达 97%^[1]。

2 ZBTB20 在神经系统中的生物学功能

2.1 ZBTB20 调节海马神经元的发育与功能

ZBTB20 在神经系统中广泛表达。原位杂交结果显示: ZBTB20 mRNA 从小鼠胚胎(E) 12.5 d 开始在端脑腹侧(海马原基)的脑室层和脑室下层细胞中表达, 并在分裂后的新生海马神经细胞中高表达, 在成熟的海马神经元中表达下调; E14.5 d 后, 端脑背侧的脑室层和脑室下层细胞也开始表达 ZBTB20, 但表达量比腹侧低。此外, ZBTB20 还在小脑颗粒细胞和胶质细胞中特异性表达^[8-10]。

2008 年, 笔者所在实验室等^[3]通过对海马 ZBTB20 过表达和基因缺陷小鼠模型的研究, 发现该分子是调控海马发育的关键分子。ZBTB20 分子的缺失导致海马发育严重障碍, 海马 CA3 区和齿状回结构紊乱, CA1 区在结构、分子表型等方面呈现出类似邻近移行皮质的分化特性。而移行皮质过表达 ZBTB20 则会呈现海马样结构, 说明该分子对海马 CA1 区神经元的分化命运具有不可或缺的调控作用。进一步的研究表明, ZBTB20 分子的缺失不仅导致海马 CA1 区的分化命运改变, 还导致整个端脑腹侧结构内移。说明该分子对整个腹侧结构的发育具有重要的调控作用。其具体的调控机制还不甚清楚, 而 ZBTB20 基因缺陷会导致 Wnt 表达下调, 提示可能与 Wnt 信号通路相关^[11]。

除了调控海马发育外, ZBTB20 还参与调控成

熟海马神经元的学习和记忆功能。在成熟海马锥体神经元中特异性敲除该分子后,小鼠表现出海马依赖的空间记忆和情景相关的恐惧记忆功能受损、长时程增强效应减弱等现象^[12]。

2.2 ZBTB20 调节伤害感受性神经元的分化 最近,ZBTB20 被报道参与调控小鼠痛觉的形成。从小鼠 E13.5 d 开始,ZBTB20 在脊髓背根神经节痛觉感受神经元中高表达,将该分子在背根神经节的小神经元中特异性地敲除后,小鼠表现出对热刺激、化学刺激和炎症刺激的敏感性显著下降。进一步的研究表明 ZBTB20 能通过调控与痛觉相关的瞬时感受器电位通道家族的 TRPV1、TRPA1 和 TRPM8 等成员的表达来调节痛觉的产生^[13]。

3 ZBTB20 调控糖脂代谢

ZBTB20 基因全身性敲除小鼠模型表现出出生后异常死亡、生长发育障碍和严重低血糖等表型,提示该分子参与调控糖代谢。通过转基因手段将该小鼠模型肝脏 ZBTB20 的表达水平恢复后,可短暂地改善其血糖水平并使得小鼠的存活期延长(其中位数从 45 d 延长至 80 d)^[4]。提示肝脏特异性表达的 ZBTB20 在能量代谢调控中发挥重要作用,而其他器官如肌肉、脂肪等表达的 ZBTB20 同样参与维持机体正常的能量代谢过程。

胰腺作为调控血糖代谢的重要外周器官,其内分泌细胞 α 、 β 和 δ 细胞均表达 ZBTB20。我室将 ZBTB20 基因在小鼠胰岛 β 细胞中特异性敲除后,发现该模型小鼠具有葡萄糖刺激的胰岛素分泌障碍、糖耐量受损和高血糖等表型。离体实验发现胰岛素分泌障碍发生在 K^+ 通道前;机制研究发现 ZBTB20 通过直接抑制果糖-2,6-二磷酸酶同工酶 1 (Fbp1) 的转录来调控胰岛素的分泌^[6]。

ZBTB20 基因全身性和 β 细胞特异性敲除小鼠模型在血糖表现上的差异^[4,6] 提示该基因还可能参与调控其他中枢和(或)外周能量代谢调节器官的功能,如中枢的下丘脑、外周的肌肉组织和脂肪组织等。

4 ZBTB20 在肝脏中的生物学功能

ZBTB20 在小鼠胎肝中表达水平很低,出生后表达水平快速升高,至 8 周时达到高峰并一直维持

在该水平。甲胎蛋白(AFP)在正常的胎肝中高表达,出生后其表达水平迅速降低。而肝细胞 ZBTB20 基因特异性敲除小鼠模型表现出肝脏 AFP 表达水平持续异常增高。通过染色体免疫共沉淀等实验发现,ZBTB20 在体内和体外都能直接结合 AFP 启动子并抑制其转录表达,是调控 AFP 基因出生后沉默的关键转录抑制因子^[2]。而 ZBTB20 蛋白的表达水平则可能受到其上游调控通路 microRNA122/Cux1/microRNA214 的调控^[14]。AFP 基因会在肝细胞发生癌变时被重新激活,而 AFP 又是临床上诊断肝癌的血清学指标,因此 ZBTB20 在肝癌发生和发展过程中的潜在作用令人关注。王红阳院士实验室^[15] 的一项临床病理学研究发现,在 50 例肝细胞癌标本中,有 76% 的癌组织中 ZBTB20 mRNA 表达水平比癌旁组织高,蛋白检测也得到类似结果。同时,对 102 例肝细胞癌患者的随访研究发现,ZBTB20 表达量与肝癌预后呈负相关关系。这显示了 ZBTB20 在调控肝细胞正常功能及疾病发生过程中的生物学作用具有复杂性。

此外,研究发现与生物转化密切相关的细胞色素 P450 家族成员 (Cyp2f2、1a12 和 2c54) 在 ZBTB20 基因全身性敲除小鼠模型肝脏中表达下调。通过转基因手段将该小鼠模型的肝脏 ZBTB20 的表达水平恢复后,这些分子的表达水平恢复正常,提示 ZBTB20 可以通过调控这些分子的表达来调节肝脏的生物转化功能^[4]。

5 ZBTB20 与免疫调节

ZBTB20 在多种免疫细胞中表达,如树突状细胞(DC)、单核细胞、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞等,提示其具有重要的免疫调节作用^[1]。2014 年,Chevrier 等^[16] 通过研究原始 B 细胞 ZBTB20 特异性敲除小鼠模型,发现 ZBTB20 对于浆细胞的分化和长期存活具有重要调控作用。在获得性免疫中,B 细胞受到抗原刺激后会增殖分化成能分泌抗体的浆细胞和记忆细胞。ZBTB20 在静息的 B 细胞中不表达,但在其分化成浆细胞的过程中表达水平逐渐增高,成熟的浆细胞中表达水平最高。在原始 B 细胞中过表达 ZBTB20 可以促进其向浆细胞分化。然而 ZBTB20 基因缺陷并不会影响浆细胞的分化成熟和早期抗体的产生,但会显著影响浆细胞的寿命,从而

在免疫反应发生后各阶段无法维持血清抗体水平,进而影响体液免疫,机制研究提示该过程可能存在 IRF4-ZBTB20 调节通路^[16]。有意思的是,同年 Bhattacharya 课题组^[17]研究发现,当用微生物佐剂(单磷酸脂质 A 和二棒分枝酸海藻糖乳液)进行抗原免疫时,ZBTB20 缺陷小鼠的抗体水平与野生型小鼠没有差异,浆细胞的生命不受影响,提示长寿命浆细胞的维持机制存在 ZBTB20 依赖和非依赖两种途径。

ZBTB20 除了在获得性免疫过程发挥重要功能外,还参与调节 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)触发的天然免疫过程。ZBTB20 基因髓系细胞特异性敲除小鼠模型表现出对多种 TLR 配体如脂多糖(LPS)、聚肌胞苷酸(poly I:C)和 CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG ODN)等反应性下降,肿瘤坏死因子(TNF)、白介素 6(IL-6)和 β 干扰素(IFN- β)等巨噬细胞产生的细胞因子减少的现象。提示该分子参与调控 TLR 触发的天然免疫。进一步的研究发现 ZBTB20 能抑制 TLR 下游信号通路中的抑制 κ 结合蛋白 α (inhibit κ binding protein α , I κ B α) 基因的转录,从而解除其对 NF- κ B 的抑制效应,使得 NF- κ B 发生核转位启动多种细胞因子的转录。因此 ZBTB20 是 TLR 信号通路完全激活所必需的转录因子^[5]。

6 ZBTB20 与人类疾病的相关性

上述一系列研究表明 ZBTB20 对小鼠多个器官和系统的发育和生理功能具有重要作用。考虑到人与小鼠 ZBTB20 分子具有很高的同源性,该分子很可能在人的多个器官和系统中具有同样重要的生物学作用。

6.1 ZBTB20 突变与 Primrose 综合征 Primrose 综合征是一种罕见的先天性遗传缺陷综合征,1982 年由英国 Primrose 医生首次报道^[18]。患者的临床表现主要包括外耳骨化、骨骼发育异常、智力障碍、自闭症、特征性异常面容等多系统的症状,且多伴有糖尿病、耳聋、进行性肌萎缩等病变,这些表型与 ZBTB20 基因全身性敲除小鼠模型所具有的表型相似,高度提示 Primrose 综合征与 ZBTB20 基因突变相关^[7]。2014 年,来自欧洲的研究团队通过对 4 例独立病例进行全外显子测序发现,Primrose 综合征

患者间唯一相同的基因变异是 ZBTB20 基因的突变,而且 ZBTB20 基因的突变还在其他 4 例独立的病例中存在。Primrose 综合征各病例中 ZBTB20 基因的突变位点很保守,突变的氨基酸残基位于第 1、2 锌指区以及锌指间的连接区。体外实验表明这些位点的突变使得 ZBTB20 蛋白与其靶 DNA 片段的结合能力下降,转录抑制能力显著下调^[7]。该研究揭示了 ZBTB20 基因突变是 Primrose 综合征的直接致病机制。

6.2 ZBTB20 与人染色体 3q13 微小片段缺失综合征 人 ZBTB20 基因位于染色体 3q13 区段。目前已报道约 30 例因染色体 3q13 微小片段缺失引起的遗传缺陷综合征。这些患者都表现出多系统的发育和功能障碍,如:发育迟缓、出生后过度生长、男性生殖器发育不全、骨骼系统发育异常、典型病容、智障、自闭症等^[19-22]。鉴于 ZBTB20 在小鼠多系统的发育和功能中的重要作用,提示该染色体区段中 ZBTB20 基因的缺失可能是重要的致病因素之一。

6.3 ZBTB20 与神经或精神疾病 Davies 等^[23]通过甲基化 DNA 免疫沉淀结合超深度 DNA 测序法,对比了 50 例重度抑郁症(major depressive disorder, MDD)患者和各自健康的同卵双生姐妹或兄弟之间的 DNA 甲基化程度的差异,发现 ZBTB20 基因超甲基化与 MDD 的发生存在相关性。

7 展望

转录因子 ZBTB20 在神经发育、能量代谢、免疫等方面发挥重要的生物学功能,考虑到 ZBTB20 在其他多个系统中广泛表达以及其全身性基因敲除小鼠模型的复杂表型,提示该分子还可能对骨骼、肌肉、心、肾、内耳等器官的发育及功能维持具有重要的调控作用。目前对该分子的转录抑制机制、下游靶分子和其自身的调控机制了解很少,相信对分子机制的深入研究将会给因 ZBTB20 异常而导致的相关疾病的诊断和治疗带来新的思路。

[参考文献]

- [1] Zhang W, Mi J, Li N, Sui L, Wan T, Zhang J, et al. Identification and characterization of DPZF, a novel human BTB/POZ zinc finger protein sharing homology to BCL-6[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282: 1067-1073.

- [2] Xie Z, Zhang H, Tsai W, Zhang Y, Du Y, Zhong J, et al. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:10859-10864.
- [3] Xie Z, Ma X, Ji W, Zhou G, Lu Y, Xiang Z, et al. Zbtb20 is essential for the specification of CA1 field identity in the developing hippocampus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107:6510-6515.
- [4] Sutherland A P, Zhang H, Zhang Y, Michaud M, Xie Z, Patti M E, et al. Zinc finger protein Zbtb20 is essential for postnatal survival and glucose homeostasis [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29:2804-2815.
- [5] Liu X G, Zhang P, Bao Y, Han Y, Wang Y, Zhang Q, et al. Zinc finger protein ZBTB20 promotes Toll-like receptor-triggered innate immune responses by repressing $I\kappa B\alpha$ gene transcription[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110:11097-11102.
- [6] Zhang Y, Xie Z, Zhou L, Li L, Zhang H, Zhou G, et al. The zinc finger protein ZBTB20 regulates transcription of fructose-1, 6-bisphosphatase 1 and β cell function in mice[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142: 1571-1580.
- [7] Cordeddu V, Redeker B, Stellacci E, Jongejan A, Fragale A, Bradley T E, et al. Mutations in ZBTB20 cause Primrose syndrome [J]. *Nat Genet*, 2014, 46: 815-817.
- [8] Mitchelmore C, Kjaerulf K M, Pedersen H C, Nielsen J V, Rasmussen T E, Fisker M F, et al. Characterization of two novel nuclear BTB/POZ domain zinc finger isoforms. Association with differentiation of hippocampal neurons, cerebellar granule cells, and macroglia[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:7598-7609.
- [9] Nielsen J V, Blom J B, Noraberg J, Jensen N A. Zbtb20-induced CA1 pyramidal neuron development and area enlargement in the cerebral midline cortex of mice[J]. *Cereb Cortex*, 2010, 20:1904-1914.
- [10] Nielsen J V, Nielsen F H, Ismail R, Noraberg J, Jensen N A. Hippocampus-like corticoneurogenesis induced by two isoforms of the BTB-zinc finger gene Zbtb20 in mice [J]. *Development*, 2007, 134: 1133-1140.
- [11] Rosenthal E H, Tonchev A B, Stoykova A, Chowdhury K. Regulation of archicortical arealization by the transcription factor Zbtb20 [J]. *Hippocampus*, 2012, 22:2144-2156.
- [12] Ren A, Zhang H, Xie Z, Ma X, Ji W, He D Z, et al. Regulation of hippocampus-dependent memory by the zinc finger protein Zbtb20 in mature CA1 neurons[J]. *J Physiol*, 2012, 590(Pt 19):4917-4932.
- [13] Ren A J, Wang K, Zhang H, Liu A, Ma X, Liang Q, et al. ZBTB20 regulates nociception and pain sensation by modulating TRP channel expression in nociceptive sensory neurons[J]. *Nat Commun*, 2014, 5:4984.
- [14] Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, et al. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2011, 2:338.
- [15] Wang Q, Tan Y X, Ren Y B, Dong L W, Xie Z F, Tang L, et al. Zinc finger protein ZBTB20 expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11:271.
- [16] Chevrier S, Emslie D, Shi W, Kratina T, Wellard C, Karnowski A, et al. The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity[J]. *J Exp Med*, 2014, 211:827-840.
- [17] Wang Y, Bhattacharya D. Adjuvant-specific regulation of long-term antibody responses by ZBTB20[J]. *J Exp Med*, 2014, 211:841-856.
- [18] Primrose D A. A slowly progressive degenerative condition characterized by mental deficiency, wasting of limb musculature and bone abnormalities, including ossification of the pinnae[J]. *J Ment Defic Res*, 1982, 26 (Pt 2):101-106.
- [19] Karavitakis E, Kitsiou-Tzeli S, Xaidara A, Kosma K, Makrythanasis P, Apazidou E, et al. Microduplication 3q13. 2q13. 31 identified in a male with dysmorphic features and multiple congenital anomalies[J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164A:666-670.
- [20] Molin A M, Andrieux J, Koolen D A, Malan V, Carella M, Colleaux L, et al. A novel microdeletion syndrome at 3q13. 31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features[J]. *J Med Genet*, 2012, 49:104-109.
- [21] Shuvarikov A, Campbell I M, Dittwald P, Neill N J, Bialer M G, Moore C, et al. Recurrent HERV-H-mediated 3q13. 2-q13. 31 deletions cause a syndrome of hypotonia and motor, language, and cognitive delays [J]. *Hum Mutat*, 2013, 34:1415-1423.
- [22] Vuillaume M L, Delrue M A, Naudion S, Toutain J, Fergelot P, Arveiler B, et al. Expanding the clinical phenotype at the 3q13. 31 locus with a new case of microdeletion and first characterization of the reciprocal duplication[J]. *Mol Genet Metab*, 2013, 110(1-2):90-97.
- [23] Davies M N, Krause L, Bell J T, Gao F, Ward K J, Wu H, et al. Hypermethylation in the ZBTB20 gene is associated with major depressive disorder[J]. *Genome Biol*, 2014, 15:R56.