

# p53的祖先是谁？ ——从进化角度研究p53基因

进化模式表明，最初的p53基因是先于肿瘤出现的。由于野生型p53基因具有肿瘤抑制功能而突变型p53基因又具有致瘤功能，因此p53基因名声大噪。这种双向功能可能是由与肿瘤无关的原始事件共选择造成的。我们可能能够推测出这些早期功能是从何而来的，了解这些知识有助于我们开发出新的治疗方法和药物。

在大约50%的肿瘤患者人群中都会发现p53基因突变的情况，这几乎已经成为了肿瘤研究领域里众人皆知的常识，但大家好像都对这种现象习以为常了，反而忽略了这样一个问题，为什么p53基因会有这么高的突变率呢？野生型的p53基因在应激反应网络中起到了举重轻重的作用，此时p53基因主要表现的是它的适应性反应功能，从而限制了它的致瘤作用。当细胞接受基因毒性物质、放射线损伤、缺氧或其它损伤信号时，p53蛋白会使细胞周期停滞，阻止细胞继续生长，促使DNA修复、细胞老化或者凋亡。与传统肿瘤抑制基因的突变方式（这些基因主要发生的都是无意突变或者框移突变）不同，至少80%的突变p53基因发生的是错意突变。这些突变体能够编码与野生型p53基因完全不同的致瘤因子，也会编码出显性负相突变体。但是尽管经过了大量研究，我们仍然不清楚这些突变体为什么能够转化细胞。因此，虽然众多的论文都在试图解释p53基因是如何发挥正常功能的，但是关于p53基因突变体是如何形成致瘤作用的仍然存在争议。为什么在肿瘤细胞中p53基因突变现象会如此多见呢？是否存在某些性质参与了p53基因或p53蛋白具有这一特别活性的形成呢？或者p53蛋白是否只是一个普通的蛋白，只不过它碰巧在胞内复杂的调控网络中占据了重要的限速位置呢？本文我们将从进化的角度对上述问题以及其它相关问题进行讨论。首先，我们将回顾一下这个古老基因家族的进化历程，从中发掘出最新的基因序列信息以及模式系统研究信息。然后，我们将p53调控网络的基本特点与衍生特点进行比较，看看这样是否能发现一些与肿瘤相关的新线索。

## 1. p53的祖先

目前在人体中已经发现了三个p53家族成员，它们分别是p53、p63和p73。正如图1所示，这三个家族成员都含有一个氨基末端的反式激活结构域、一个中间DNA结合结构域以及一个羧基末端的寡聚化结构域。其中反式激活结构域和寡聚化结构域似乎变异程度比较大，而DNA结合结构域则比较保守。值得注意的是，在p63蛋白和p73蛋白的C末端均含有一个不育 $\alpha$ 基序（SAM）。这个基序的作用可能是促进蛋白间的相互作用。对于p73蛋白来说，该基序还与蛋白的转归有关。不过，p53蛋白不含该SAM基序。因此，单从蛋白结构上来说，p63蛋白与p73蛋白可能源自同一个“近代”祖先。根据目前掌握的信息，我们还无法弄清楚各个p53亚家族之间的进化关系。为了简化问题，我们在此只考虑各种全长序列的异构体。我们将p53家族中编码SAM基序的蛋白统称为p63和p73样蛋白，将缺乏SAM基序的统称为p53样蛋白。

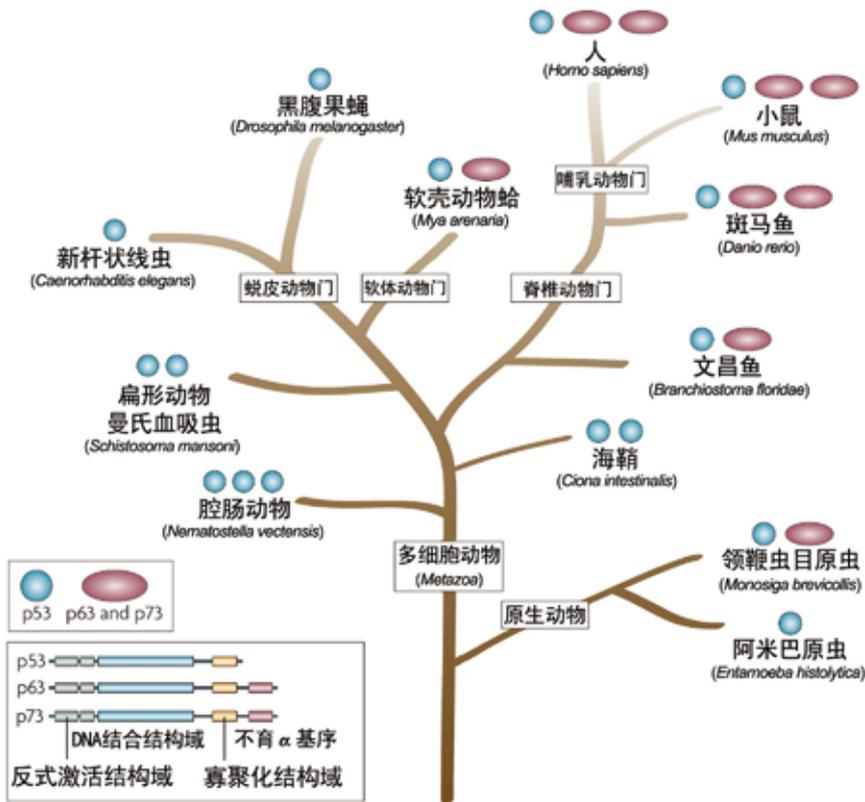


图1 简化的p53进化树。图中包含了所有含有p53家族的且已经进行过基因组测序的物种。此图只是依据在p63、p73亚家族中才有，而在p53亚家族中没有的SAM对这些物种来进行分类。此图只是根据现有的已经公布的数据和基因注释信息来判断某个物种中是否含有p53家族基因，在有些物种中还没有对这些基因进行功能确认。

## 1.1 新的基因组数据发掘出了更古老的祖先

p53家族成员广泛分布于各种动物体内，包括许多无脊椎动物，比如海鞘类动物（ascidians, sea squirts）、刺胞动物（cnidarians）、扁形动物（platyhelminths）及其它一些无脊椎动物（图1）。因为酵母基因组中不含p53基因，所以早期的传统观点认为p53基因家族起源于动物界。这可能是早期多细胞生物为了应对选择压力进化而来的。不过，最近公布的单细胞原生动物领鞭毛虫（choanoflagellate, *Monosiga brevicollis*）的基因组数据打破了上述观点。在领鞭毛虫的基因组中既包含有p53样序列，也包含有p63、p73样序列。同样，我们在另一种原生动物——阿米巴原虫（amoeba, *Entamoeba histolytica*）中也发现了p53样蛋白。这些发现使我们需至少从两个方面对以前的p53进化树做出修订。首先，p53基因家族的出现时间必须提前，应该是在多细胞动物出现之前就已经出现了；其次，p53样基因与p63及p73样基因可能源自多细胞动物和原生动物的共同祖先。

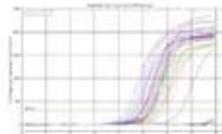
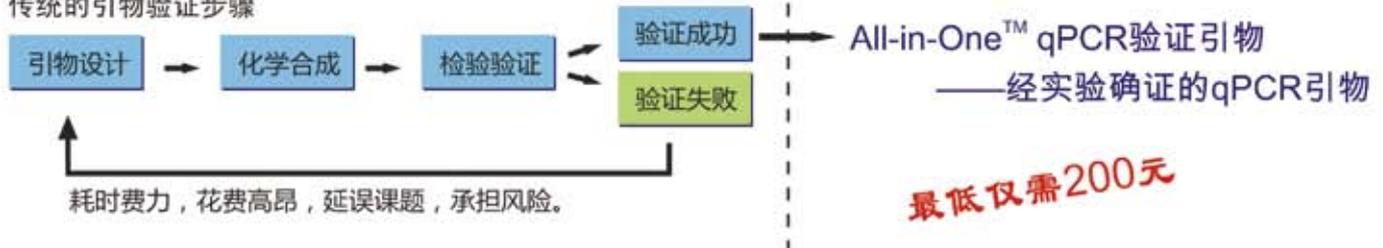
在好几个物种谱系（比如蝇、线虫和刺胞动物）中都只有p53样基因而没有p63与p73样基因。另外，在无脊椎动物和脊索动物中，与p63和p73样基因相比，p53样基因似乎具有更广泛的多样性。现有的证据还无法清楚判断p53基因家族的起源，有些证据彼此之间甚至是相互矛盾的。不过，值得注意的是，在现有的已经测序过的包含有p53家族的基因组数据中可以发现，这些基因组中通常都会含有p53样基因，但是通常都会缺乏p63、p73样基因。同样，虽然我们已经在小鼠模型中发现p63和p73基因具有抑制肿瘤的作用，但是在人体肿瘤细胞中通常仍是p53基因发生突变，而不是p63或p73基因。这难道只是巧合，还是说明了什么问题？下面，我们将就这个问题进行讨论，我们主要研究的是p53调控网络中进化保守的部分。

# All-in-One qPCR验证引物——提供验证报告

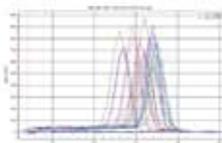
All-in-One™ qPCR Primer是由GeneCopoeia, Inc. 采用独特的算法设计, 适合基于SYBR Green I 的qPCR分析应用的引物。

**还在为您的研究做繁琐的前期准备吗?**

传统的引物验证步骤



图a. 45对引物以单链cDNA为模板进行qPCR的扩增曲线示意图(同时检测NTC)



图b. qPCR扩增后进行融解曲线分析的结果示意图



图c. qPCR扩增后进行电泳检测的示意图, 其中奇数号泳道为含cDNA样品测试结果, 偶数号泳道为对应的NTC(No Template Control)

**检验验证:** 经以cDNA为模板的qPCR实验验证。提供的产品包含有详细验证流程及验证结果的质检报告。无需再次验证, 仅需参考验证报告即可进行实验。

**方便经济:** 经实验验证确认的All-in-One™ qPCR Primer节约了研究者设计和验证引物的时间和成本, 价格合理。

**无需等待:** 提供人、小鼠、大鼠mRNA及全部人、小鼠miRNA验证引物, 有现货或一周内出货。

## 验证引物产品目录

All-in-One™ qPCR验证引物产品列表

从即日起至2010年7月31日, 所有验证引物特价促销。

产品类型	产品描述	促销价格
All-in-One™ qPCR Primer (200次反应量)	产品为人、小鼠、大鼠源基因上游和下游引物的混合液, 一周可取。	¥ 300
All-in-One™ qPCR Primer 内参引物(200次反应量)	人、小鼠、大鼠源各三个持家基因的qPCR 引物, 一周可取。	¥ 200
All-in-One™ miRNA qPCR Primer (200次反应量)	为人、小鼠特异的miRNA检测上游引物, 需配合All-in-One™ miRNA qPCR Detection Kit使用, 现货。	¥ 400
All-in-One™ miRNA qPCR 内参引物 (200次反应量)	人、小鼠或大鼠源snRNA U6的特异检测上游引物, 需配合All-in-One™ miRNA qPCR Detection Kit使用, 现货。	¥ 300

登录www.fulengen.com 选定你所需要的Array产品, 请按页面下方联系方式与我们的技术人员联系!

## 2. 上游调控因子

在哺乳动物中，p53调控网络包括复杂的上游调控因子和下游效应元件。据我们现有的资料显示，p53蛋白在这个调控网络中处于非常重要的中枢位置，它能够整合各种信息，帮助细胞对应激刺激及时做出适应性反应。p53调控网络的上游调控模块主要分为三大类，分别是稳定调控模块（stabilization）、抗阻抑调控模块（anti-repression）和启动子特异性激活模块（promoter-specific activation）。我们还不清楚非哺乳动物中这些调控模块的情况。不过结合一些非哺乳动物的基因组数据以及对黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫的研究结果，我们还是得到了一些令人惊奇的实验性结论。比如稳定调控模块和抗阻抑调控模块都使用Mdm蛋白作为主要调控因子（图2）。这个发现也得到了一些其它实验数据的支持，比如在小鼠和鱼类试验中发现，致命性的Mdm2基因缺失和Mdm4基因缺失表型可以通过去除p53蛋白的作用而得到拯救。不过无脊椎动物中缺乏编码MDM2样蛋白的基因以及对黑腹果蝇的研究表明，如果不改变p53蛋白的水平，也能出现因基因损伤而导致的p53基因激活的现象。综上所述，将DNA损伤和p53蛋白激活联系起来古老调控途径早在MDM2调控途径出现之前就已经有了。因此，无脊椎动物的p53调控网络为我们提供了一个绝好的材料，能够在没有MDM2蛋白的失稳作用的情况下研究p53蛋白是如何被激活的。

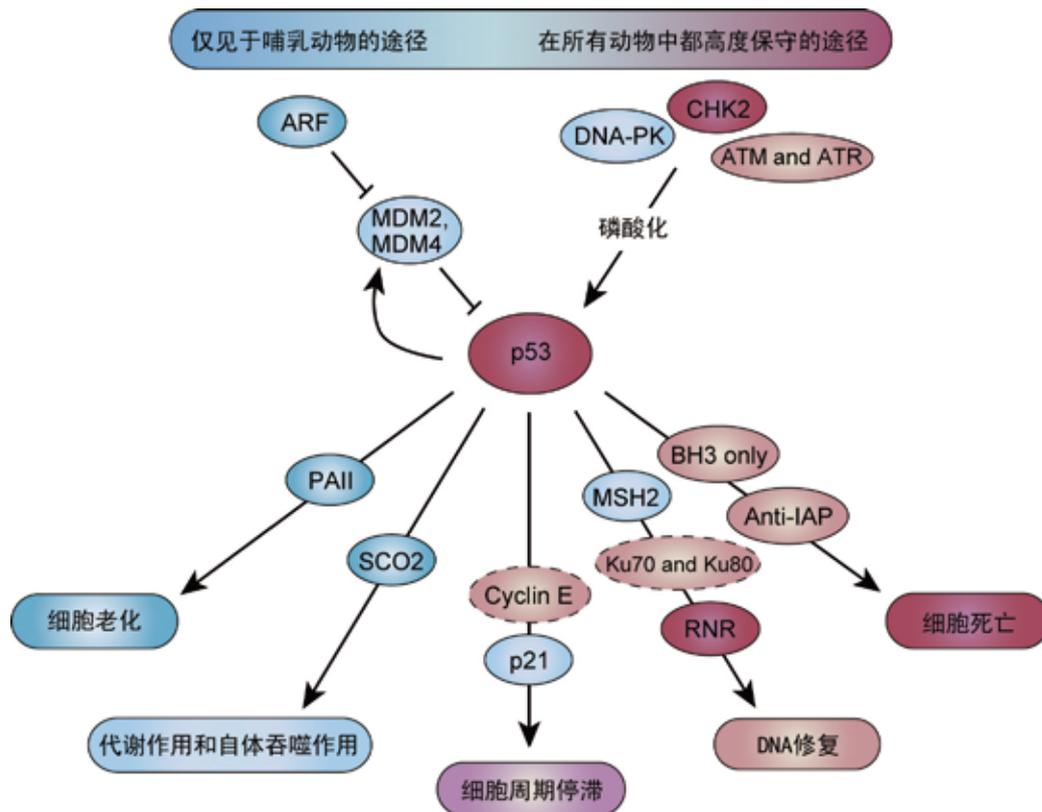


图2 p53调控网络的简单进化示意图。图中每个方框内的颜色由蓝到红代表了这些调控因子、效应元件以及最终的调控作用在各个物种间的保守程度。我们是根据现有的基因组数据和脊椎动物（小鼠和斑马鱼）以及无脊椎动物（黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫）的功能研究资料来判断保守程度的。图中蓝色表示仅限于哺乳动物体内的调控途径和相关因子，比如ARF。红色表示广泛见于哺乳动物和无脊椎模式生物体内的高度保守的途径和因子。图中实线框表示的都是经过验证的与p53有关的调控途径，虚线框表示的是只是推测的、尚未经过试验验证的调控途径。有些下游靶标，比如SCO2和纤溶酶原激活物抑制因子1（PAI1）也没有在非哺乳动物中经过验证。

那么哪些上游调控机制被保留下来了呢？最有可能的是检查点激酶2（CHK2）。黑腹果蝇的CHK2与哺乳动物的CHK2一样，都能直接磷酸化p53蛋白，这也是细胞遭受电离辐射之后诱发凋亡的必要途径。我们还不知道CHK2蛋白是不是能够直接调控秀丽隐杆线虫体内的p53蛋白同系物CEP-1蛋白，但是CHK2蛋白与ATM、毛细血管扩张性共济失调综合症、Rad3相关蛋白（ATR）以及秀丽隐杆线虫体内的ATR同系物ATL-1蛋白一起，都是细胞遭受紫外线照射损伤之后诱导细胞死亡不可缺少的调控因子。CHK2蛋白在多个物种间都具有的这种相似的调控作用说明，它就是一个高度保守的p53调控因子，同时也说明古老的p53调控途径可能就是通过磷酸化或其它翻译后修饰途径修饰p53蛋白后直接激活p53蛋白的（图2）。

### 3. 下游效应因子

我们将利用能够区别p53基本功能与衍生功能的无脊椎动物模型的数据做叙述。非哺乳动物的p53蛋白和哺乳动物的p53蛋白一样，都能参与细胞在面对基因毒性应激反应时应该被激活的凋亡途径。正如图2中所示，脊椎动物和无脊椎动物均能招募非常保守的效应因子参与到凋亡调控途径当中，比如BH3-only Bcl-2亚家族和凋亡拮抗剂抑制因子等。另外，在哺乳动物和果蝇中还发现了与DNA修复有关的XRCC5蛋白（又名Ku80蛋白）、核糖核苷酸还原酶蛋白（RNR）以及MutS同系物蛋白（MSH）等效应因子。相比之下，p21介导的细胞周期停滞途径似乎就不如p53途径这么保守，因为p21途径只限于脊椎动物。比如，斑马鱼中编码p21蛋白的基因可能是p53的靶标，但是在果蝇体内的p21基因却不是p53蛋白的靶基因。

有趣的是，p53蛋白还能调控蠕虫和果蝇细胞的细胞周期，不过蠕虫和果蝇体内的靶标与脊椎动物体内的有所不同。在黑腹果蝇体内丧失能量的细胞中，p53蛋白能够不依赖p21途径而是通过细胞周期蛋白E途径，使细胞周期停滞在G1/S期。同样，CEP-1蛋白能通过靶标PHG-1蛋白（该蛋白是人生长停滞特异性蛋白1 GAS1的同系物）介导紫外线照射诱发的生殖细胞增殖停滞现象发生。我们最近还发现p53蛋白能对自体吞噬作用和代谢作用进行调控，这可能也是p53蛋白非常保守的一项功能。因为我们发现p53蛋白在小鼠体内和蠕虫体内都能对自体吞噬作用进行调控。

p53调控网络的其它作用，比如促使细胞老化等作用可能只限于哺乳动物体内，当然我们也能认为有些作用只限于无脊椎动物体内，但这一观点尚待证实。总而言之，p53调控网络的某些调控作用是非常保守的，比如DNA修复作用和促凋亡作用等可见于各门动物，但其它一些调控作用就没有那么保守，只可见于某一类动物。还有一些有意思的现象，虽然有些p53调控途径是高度保守的，但是参与该途径的效应因子在各个物种间却会有差异，比如RNR蛋白参与的调控途径就是非常典型的例子。在哺乳动物和果蝇体内，RNR蛋白是非常重要的p53效应因子，但是在不同的物种中使用的是不同的亚基。

### 4. 小插曲——肿瘤抑制作用

那么究竟是什么进化压力迫使p53的功能发生进化的呢？虽然我们目前还无法做出肯定的回答，但我们能够肯定地说阻止肿瘤形成绝不是p53基因原本的功能。主要原因包括以下两点：首



先，如图1所示，p53家族成员可见于简单的、寿命很短的生物体和原生动，这说明远古的p53基因根本不需要承担抑制某些组织细胞生长失控的责任；另外，长期以来，人类的期望寿命都不超过29岁，因此，肿瘤这种发病年龄较晚的疾病也不太可能会对p53基因的进化造成选择压力。而且缺乏p53基因的小鼠和斑马鱼通常都会比野生型的同类寿命更长，并且也没有死于癌症。因此从进化的角度来说，肿瘤并不能对物种繁殖造成任何影响。综上所述，p53基因的抑癌活性很可能源自其它更原始的功能。在脊椎动物中出现得相对较晚的ARF基因同系物（斑马鱼与河豚鱼基因组中都缺乏这些同系物）似乎符合上述推论，因为ARF蛋白能够将p53途径与致癌应激信号联系起来。

相应地，如果p53家族不具备与肿瘤相关的功能，那么在进化选择过程中，又是为其安排了怎样的功能角色呢？它选择了哪种古老的功能呢？凋亡调控功能是一种可能，因为现有的证据表明，凋亡调控途径的出现要早于p21调控途径（图2）。不过这还不能解释为什么p53基因会出现在单细胞动物基因组中。p53的其它作用，比如DNA修复和代谢调控等作用也很有可能是在长期进化过程中被保留下来的p53功能。我们只有对其它还不清楚的p53功能和相关的p63及p73的功能有了进一步了解之后才能圆满地解答这个谜题。在这个方面最有前途的是干细胞以及种系组织的发育研究领域以及生理学研究领域。同样神秘也相关的问题是哪些种类的应激刺激是原始p53会做出反应的刺激，需要指出的是，大部分用于激活p53途径的实验方法其实都没有深入到“原始”的p53世界当中。因此，现在我们在研究p53家族进化过程中遭受过哪些选择压力时，已经知道的这些刺激信号只能向我们提供部分线索。复制修复信号可能是一种参与p53调控途径形成及选择的适应性压力。不过能够支持这一观点的实验证据目前还没获得，体内自然情况下究竟有多少复制修复信号我们也不清楚。

## 5. 结论及展望

如果机体选择编码p53样蛋白的基因并不是为了防止肿瘤发生，那么我们想知道，p53的原始功能和保守的p53调控网络真能起到一些与肿瘤相关的作用吗？虽然要回答这个问题还需要一些时日，不过我们推测，答案会来自那些过去被我们忽视的模型，而且我们相信，谜底很快就会水落石出。我们之所以如此乐观是因为首先，我们对p53的认识还存在重大的缺陷，很有可能p53还有一些我们尚未发现的功能。基于这个前提，在肿瘤细胞中出现的与突变型p53基因相关的致癌表型还没有被完全了解清楚，也不知道有哪些下游效应因子发生了突变；其次，像前面介绍过的那样，DNA损伤能够在不需要MDM2蛋白参与或者稳定p53蛋白的情况下激活p53蛋

白。因此，可能存在我们还不知道的能够激活p53蛋白的上游调控途径，这些途径也有可能成为我们抗癌治疗的靶点；第三，p63和p73样基因只见于某些动物体内，但是它们也是动物存活所必需的基因。相比之下，p53样亚家族的分布就广泛得多，不过奇怪的是，p53样基因却不是动物存活所必需的（背景知识1）。这说明p53家族中缺乏SAM基序的那些成员具有某种独特的重要作用。最后一点让我们如此乐观的原因是因为在不会自发形成肿瘤的模式生物中研究与肿瘤相关的分子，比如Wnt蛋白和hedgehog的实际研究工作当中，总是会有一些不可预计的，但很多时候又是非常重要的现象出现。因此我们相信，如果将来使用初级动物或者原生动动物来研究p53的功能，可能会得到一些新发现。

### 背景知识1：p53在发育过程中的作用

动物可以在没有p53基因的情况下生存。缺失了p53基因的小鼠、线虫、果蝇等都能存活，而且都能达到某种程度上的生育水平。不过有趣的是虽然p53基因可见于大部分的真核生物，但是它在发育过程中不是必需的，只能起到一些非必需作用。比如在小鼠胚胎发生期，p53能参与神经管闭合；在青蛙胚胎发生期，p53能参与中胚层分化；在果蝇胚胎发生期，p53能参与细胞程序性死亡。值得一提的是，p53的这种在动物发育过程中的作用也有p63和p73的一份功劳，从理论上来说，p63和p73能补偿p53基因敲除后的功能缺失。另外，在脊椎动物中，p63和p73基因似乎还在发育过程中起到了必需的作用，比如缺失了p63或p73基因的小鼠在胚胎期就会夭折。这看起来似乎是令人困惑、违背直觉的，因为非必需的p53样亚家族在各个物种间的分布要更广。最近的研究表明p53家族成员在种系组织发育和妊娠过程中也发挥了作用。因此，可能是胚胎发育或者种系组织发育过程决定了p53基因的进化历程。

那么我们会从p53的进化历程中得到什么重要结论呢？我们曾认为弄清了p53蛋白的最初功能就能够发现某些隐藏的作用，同时也能利用原始的系统（生物）来发现与肿瘤相关的信息。还有一个尚未解决的问题似乎也与突变型TP53等位基因的致瘤特性有关。在人体肿瘤细胞中，TP53等位基因可以一个发生错义突变而另一个发生缺失突变。这样就完全排除了显性负相分类的可能，细胞的完全转化状态是由错意突变体造成的。不过，在发现p53蛋白的30年后，发现p53蛋白有意义突变体20年后的今天，我们仍然不清楚大部分p53突变体是如何发挥致瘤作用的。按照经典遗传学的说法，这些等位基因的转化能力可以被看做是一种新变体活性（neomorphic activity）。如图3中所示，这个类别可以被进一步细分。比如有些新变体等位基因属于“附加”变异体（accessorized variants），它们可以增加一些野生型功能之外的功能。有些新变体等位基因属于“被移交”变异体（devolved variants），它们只保留了部分野生型功能。还有一些变异体会形成一些新的与野生型功能完全不同的功能，它们被称为无关变异体（unrelated variants）。以目前的资料来看，大部分错义突变的TP53等位基因可能都不属于“附加”变异体，因为这些突变体的高表达并不伴有p53靶基因的高表达。因此，这些突变的TP53等位基因可能属于“被移交”变异体或无关变异体。综上所述，如果致瘤进化形成了“被移交”变异体，那么了解p53的原始功能就能够指引我们回答肿瘤研究工作中的很多基本问题。

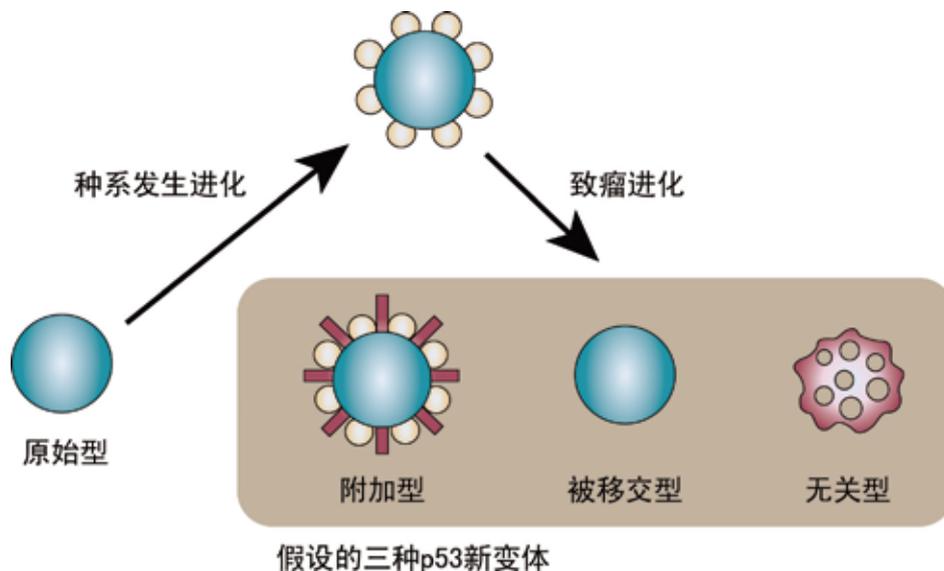


图3 在p53基因进行种系发生进化和致瘤进化过程中可能出现的几种变化情况。数据表明，至少在某些情况下，对p53突变型等位基因进行严格的显性负相分类是不正确的。数据还表明细胞出现完全转化状态与p53错意突变基因的功能获得活动有关。图中列举了几种可能出现的p53新变体。与野生型等位基因相比，这些p53新变体等位基因能编码附加功能、被移交功能和完全无关功能。其中在种系发生进化时获得的有些功能在致瘤进化时会丢失，比如p21调控作用。因此，发生错意突变的p53基因既可能是被移交型突变体也可能是无关突变体。

原文检索：

Wan-Jin Lu, James F. Amatruda and John M. Abrams. (2009) p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens. *Nature Reviews CanCer*, 9:758-762.

筱玥/编译

## 三、运用基因工程小鼠研究p53功能20年记

运用细胞和分子生物学方法对p53基因的功能开展研究至今已有30多年了，使用基因工程小鼠对p53基因的功能开展研究至今也已经20多年了。与我们的预期一致，p53基因发生突变的小鼠相比p53基因未发生突变的小鼠，在任何时间段发生各种肿瘤的速度都要快得多。这些基因工程小鼠为我们揭示了很多重要的p53基因的抑癌功能。随着基因工程技术手段的不断发展，研究越来越深入，我们得以对哺乳动物模型体内p53的结构与功能做更精确的研究。