

文章编号: 1007-4627(2013)02-0190-05

## PML 功能及其在细胞辐射应激响应中的作用

姚斌<sup>1,2</sup>, 裴海龙<sup>1,2</sup>, 高笑菲<sup>1</sup>, 王菊芳<sup>1</sup>, 周光明<sup>1</sup>

(1. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 早幼粒细胞白血病 (PML) 蛋白通过异构体聚合形成核体 (PML-NBs), 在自然免疫、血管生成和转录调节等过程中发挥作用, 并参与细胞凋亡和辐射应激响应。实验结果表明, 在受到电离辐射等外界刺激后, PML 蛋白的表达随着照射剂量的增加而增加, 随着照射后的时间延长而上调; PML-NBs 的数量与照射剂量呈正相关, 但 PML-NBs 的荧光强度却与照射剂量呈负相关。同时还发现, PML 的表达水平呈细胞周期依赖性, 在 G1 期和 S 期细胞中的表达高, 在 G2 期和 M 期细胞中的表达相对低。鉴于 PML 功能的重要性和多样性, 结合 PML 在电离辐照后的显著变化, 推测 PML 在细胞辐射应激过程中发挥重要的调节作用, 深入研究 PML 功能有助于揭示细胞辐射生物效应的分子机理。

**关键词:** PML; PML-NBs; 电离辐射; 放疗; 生物学效应

**中图分类号:** Q691   **文献标志码:** A   **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.02.190

### 1 引言

早幼粒细胞白血病基因 (Promyelocytic Leukemia, 简称 PML) 位于人的第 15 号染色体, 该基因发生染色体易位与 17 号染色体上的维甲酸受体  $\alpha$  (Retinoic Acid Receptor  $\alpha$ , 简称 RAR $\alpha$ ) 基因融合, 表达产生融合蛋白 PML-RAR $\alpha$ 。PML-RAR $\alpha$  融合蛋白丧失 PML 蛋白的功能并干扰 RAR $\alpha$  行使信号转导作用, 因而引起急性早幼粒细胞白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia, 简称 APL) 的发生<sup>[1]</sup>。除此之外, PML 还有调节基因表达、自然免疫、血管生成和促进细胞凋亡等功能<sup>[2]</sup>。

### 2 PML 蛋白的结构与表达

PML 拥有一个庞大的蛋白家族。PML 基因长约 35 kb, 含有 9 个外显子<sup>[3]</sup>, 转录后通过剪接形成不同的 mRNA 分子, 翻译产生不同的 PML 亚型。到目前为止, 已经发现 20 多种不同的剪接方式, Jensen 等<sup>[4]</sup>发现这些剪接产物可以分为 7 个类型。所有的 PML 蛋白亚型都含有相同的 N 末端结构, 即一

个“环指”结构域、两个锌指样 B-box 和一个卷曲螺旋结构域构成的 RBCC (Ring finger, B-box, Coiled-Coiled motif) 结构, 或称 TRIM (TRIPartite Motif) 结构域。除 PML-VIIb 亚型外, 其他的 PML 分子都具有核定位信号, 而且研究证实 PML 蛋白主要定位在细胞核内。然而, 不同亚型的 PML 蛋白有不同的 C 末端结构, 因此赋予 PML 异构体特异性的蛋白与蛋白相互作用<sup>[2]</sup>。大多数 PML 蛋白亚型均含有 3 个 SUMO-1 (Small Ubiquitin-related Modifier) 修饰位点, 分别在环指结构、B-box 和 NLS (Nuclear Localization Signal) 的赖氨酸残基上, 这 3 个修饰位点与 PML-NBs 的定位密切相关<sup>[5]</sup>。

在正常细胞中, PML 借助 N 端带锌指结构的 RBCC 结构自身寡聚化或募集其他蛋白形成 PML 核体 (PML-nuclear Bodies, 简称 PML-NBs), 以不连续的斑点状方式分布于细胞核内。近期的研究中, 越来越多的蛋白被发现与 PML-NBs 共定位, 而且其中一部分直接与 PML 相互作用, 比如: p53, Rb, Daxx (Death Associated Protein), CBP (cAMP Response

收稿日期: 2012-07-26; 修改日期: 2013-01-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973计划)(2010CB834201); 国家自然科学基金资助项目(10979062)

作者简介: 姚斌(1987-), 男, 山西忻州人, 硕士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: yaobin@impcas.ac.cn.

通信作者: 周光明, E-mail: zhougmg@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

Element-binding Protein) 及 eIF4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4E) 等<sup>[7]</sup>。PML-NBs 与多种蛋白结合, 然后和 ssDNA (Single-stranded DNA)、特定染色体位点、病毒 RNA 及质粒 DNA 形成复合体<sup>[8-9]</sup>, 从而调节许多生物学过程, 诸如细胞凋亡、衰老、蛋白更新及基因表达等。

图 1 给出了 PML 剪切产物的 7 种类型。在不同的组织中或者处于不同时相的细胞中, PML 所形成的亚

型不同, 各个亚型的表达量也不同, 说明 PML 功能的特异性。PML-I/II 在多种细胞中都有表达且表达量最高, 其功能主要是负责转运蛋白出核; PML-III 表达量较低, 且只在 S 期出现, 与中心粒结合在一起<sup>[10]</sup>。在前期研究中, 我们采用同步化细胞检测了不同周期时相中 PML 的表达 (如图 2), 发现 G1 期细胞和 S 期细胞中 PML 的总表达量相对较高, G2 期细胞中的表达量相对较低, M 期细胞最少。

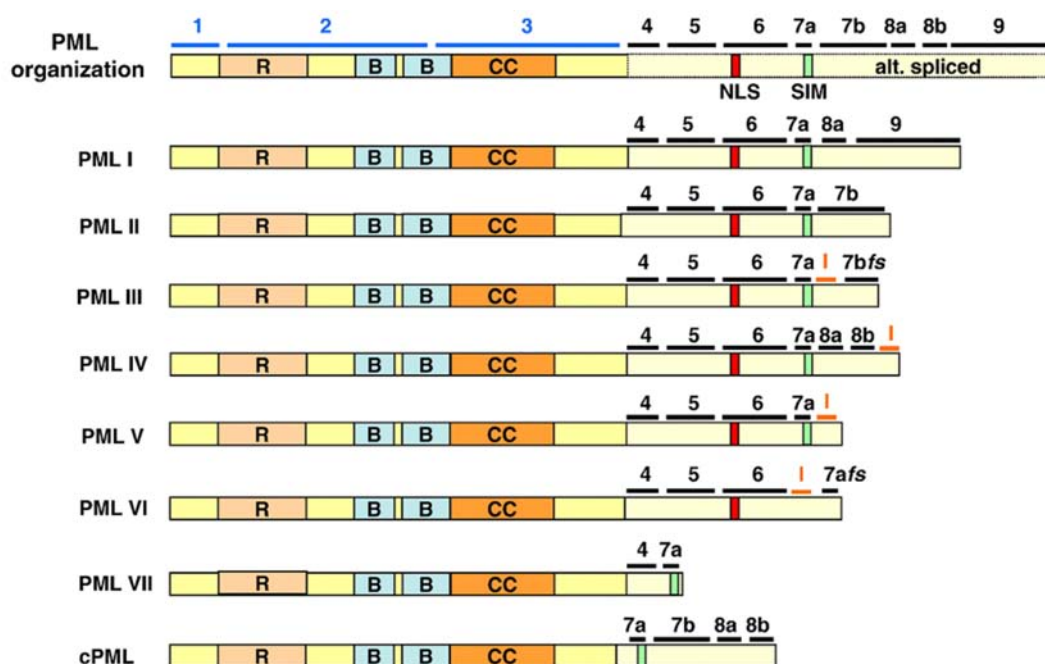


图 1 (在线彩图) PML 的 7 种亚型<sup>[6]</sup>

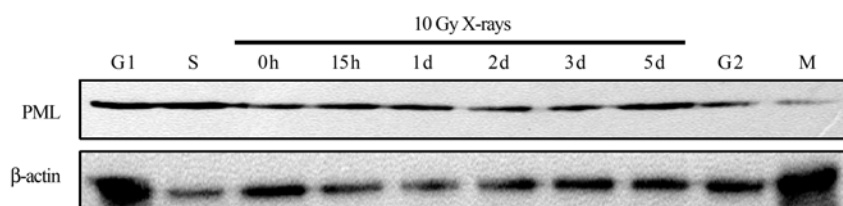


图 2 PML 蛋白表达的周期依赖性以及 X 射线照射后黑色素瘤细胞内 PML 蛋白的时间依赖性表达

### 3 PML 的功能

#### 3.1 PML 与自然免疫

研究表明, 对于 PML 野生型小鼠, LPS (Lipopolysaccharide) 与 TLR-4 (Toll-like Receptors-4) 结合使其活化, 并引起与 NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) 依赖的诱导反应, 诱导细胞因子 IL1 (Interleukin-1) 和 TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) 的过度表达。高水平 LPS 引起的细胞因子过量表达可诱发感染性休克综合症。然

而, 缺失 PML 的小鼠在受细菌感染时有异常免疫反应, 其巨噬细胞功能紊乱。PML 缺失型小鼠对发生在野生型老鼠身上的急性 LPS 调控的致死有抗性, 在 LPS 刺激后 IL6 反应明显下降。由此可知, PML 不仅在自然免疫和急性炎症反应中起重要作用, 在 TLR-4/NF- $\kappa$ B 途径中也扮演着很重要的角色<sup>[11]</sup>。

#### 3.2 PML 与基因转录调节

PML 的结构特点显示它可能参与转录调控, 因为 PML 有抑制转录所必需的卷曲螺结构域和部分

丝氨酸/脯氨酸富集区。PML通过其卷曲螺旋结构域和 Sp1(Stimulatory protein 1)的C末端区(DNA结合区)结合,特异性地破坏 Sp1和DNA的结合,从而抑制 Sp1依赖的启动子活化,如参与表皮生长因子受体(EGFR)的转录<sup>[12]</sup>。研究发现,染色体组蛋白是否乙酰化与基因的转录密切相关,乙酰化有利于基因转录,而去乙酰化抑制基因转录。PML-NBs临近高度乙酰化的染色质,并且许多转录因子和转录调控子都动态地定位到PML-NBs。因此,PML蛋白可能是通过募集组蛋白乙酰化酶或去乙酰化酶到染色质,从而参与调节转录。PML蛋白不能直接与DNA结合,它通过辅助因子与DNA连接后,其RBCC结构表现出潜在的反式激活功能。由上可知PML蛋白抑制或激活转录,因此,PML蛋白所处的环境或PML蛋白与其他蛋白间的相互作用决定它调控的转录活性<sup>[13-14]</sup>。

### 3.3 PML蛋白与血管生成

PML-NBs可以在缺血和肿瘤形成的情况下调节血管的生成。PML蛋白通过AKT(又名PKB, Protein kinase B)同源的磷酸酶和张力蛋白以及哺乳动物的雷帕霉素靶点的信号通路调节肿瘤血管生成,控制前血管生成因子——缺氧诱导因子1 $\alpha$ 和血管内皮生长因子<sup>[15]</sup>。另外,研究发现,PML缺失型小鼠外周血的成熟细胞数远远低于正常鼠,骨髓和脾脏等处的成熟粒细胞水平也很低。由此可见,PML蛋白还参与造血细

胞的终端分化<sup>[16]</sup>。

## 4 PML-NB对细胞辐射生物效应的调控作用

### 4.1 PML-NB对辐射的应激响应

在前期研究中发现,受到X射线照射后,人黑色素瘤细胞内PML的表达量显著上升,并与辐照剂量(如图3)和辐照后的时间(如图2)呈正相关。

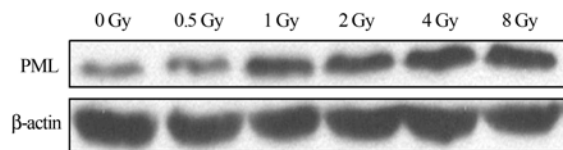


图3 X射线照射后,黑色素瘤细胞内PML蛋白的剂量依赖性表达

在经过 $\gamma$ 射线辐照后PML-NBs仍定位在细胞核内,但是可以看到明显的NBs碎裂,NBs体积变小和数量增加,且NPM1(nucleophosmin)和PML存在明显的共定位。这说明PML可能参与介导辐射反应中NPM1调控细胞G2/M期阻滞及凋亡的信号转导<sup>[17]</sup>。我们在前期工作中对辐射引起的PML-NBs数量和大小进行了研究,发现PML-NBs数量与辐照剂量呈正相关,与荧光强度呈负相关(如图4),为定量研究PML在辐射生物效应中的作用奠定了基础。

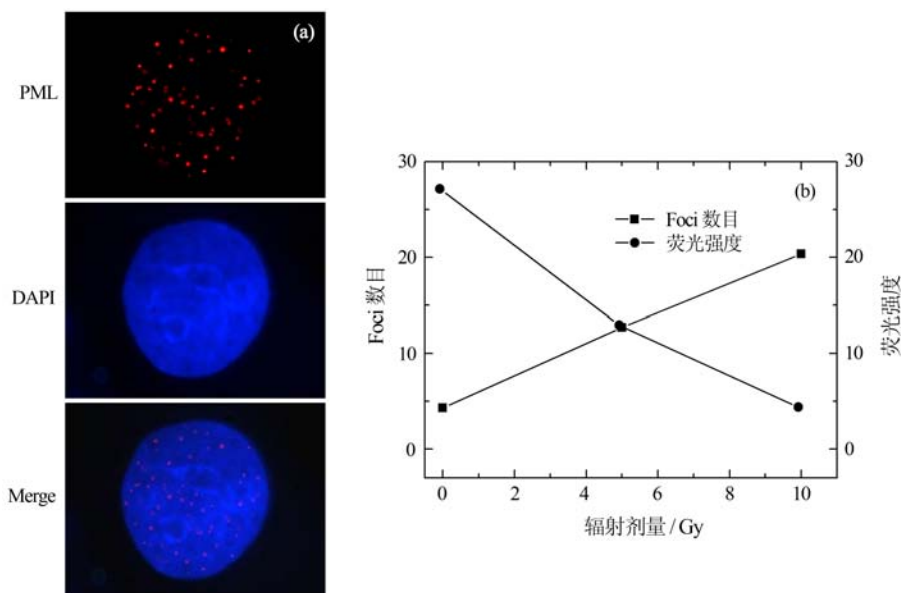


图4 (在线彩图)X射线辐照黑色素瘤细胞诱导PML-NBs的剂量效应

## 4.2 PML与细胞凋亡

有报道表明, PML 缺失的细胞对电离辐射导致的凋亡有抗性<sup>[18-20]</sup>。PML 在 p53 依赖和非依赖的凋亡途径中发挥着重要作用<sup>[21]</sup>。PML 募集 p53 到 PML-NBs 促进其乙酰化和磷酸化; 也可以与 Mdm2 (Murine double minute 2) 结合抑制其活性。在 p53 非依赖的细胞凋亡过程中, PML 可以通过介导 CHK2 (checkpoint kinase 2) 的自磷酸化激活来诱导凋亡<sup>[6]</sup>, 在非损伤细胞中, CHK2 可定位到 PML-NB 中, 受到损伤时 CHK2 即释放出来。另一种和 PML 蛋白共定位于 NB 的蛋白 Daxx 也有促进凋亡的作用。Zhong 等<sup>[22]</sup>认为 Daxx 是 Fas 诱导凋亡的衔接子, 也是 ASK (apoptosis signal-regulating kinase) 的激活剂。通过 Fas-Daxx-JNK-Jun 信号转导途径最终激活 Caspase 而引起细胞凋亡。Daxx 定位到 PML-NBs 时可受刀豆蛋白 A 调节表达量增加, 从而促进 Fas 诱导的凋亡。PML-NBs 被破坏后, Daxx 散布于核基质中, 刀豆蛋白 A 不能促进 Fas 诱导的凋亡。因此, Daxx 的促凋亡作用有赖于 PML 蛋白的存在及 NB 在核内的定位。

## 5 结论与展望

PML 的表达与肿瘤的发生有密切关系, 很可能作为抑癌基因发挥作用, 可以作为治疗癌症的靶点<sup>[23]</sup>。研究发现, PML 对电离辐射也非常敏感, 细胞受到辐照后, PML 的表达量随着辐照剂量的增加和辐照后培养时间延长而上升; PML-NBs 的大小和数量都呈明显的剂量依赖性变化, 表明 PML 在细胞辐射效应中发挥重要作用, 并可以作为显示细胞效应的生物学终点。深入研究 PML 在细胞辐射效应中的作用, 有助于揭示细胞辐射效应机理, 并有可能在靶向性重离子治癌等肿瘤治疗方面中发挥重要作用。

### 参考文献(References):

- [1] ZHANG Xiaowei, YAN Xiaojing, ZHOU Ziren, *et al.* Science, 2010, **328**(5975): 184.
- [2] SALOMONI P, FERGUSON B J, WYLLIE A H, *et al.* Cell Research. 2008, **18**: 622.
- [3] SHEN Yuqing, XIA Mei, MIAO Fengqing, *et al.* Journal of Nanjing Normal University, 2009, **32**(3): 88. (in Chinese)  
(沈宇清, 夏梅, 缪风琴, 等. 南京师大学报, 2009, **32**(3): 88.)
- [4] JENSEN K, SHIELS C, FREEMONT P S. Oncogene, 2001, **20**(49): 7223.
- [5] MOHAMED A M, SABRINA K A, FATEN E A, *et al.* Plos One, 2012, **7**(9): e44949.
- [6] ZHENG Xiaomin, ANITA S, BRIGITTE R, *et al.* Haematol, 2007, **92**(3): 323.
- [7] ERIN L R, KAO H Y. Int J Biol Sci. 2009, **5**(4): 366.
- [8] EVERETT RD, CHELBI-ALIX M K. Biomedicine, 2007, **89**(6/7): 819.
- [9] BLOCK G J, ESKIW C H, DELLAIRE G, *et al.* Mol Cell Biol, 2006, **26**: 8814.
- [10] WILFRIED C, YUKI T, ZHU Jun, *et al.* Cancer Res, 2006, **66**: 6192.
- [11] ANDREA L, MIRELLA G. Genes&Cancer, 2011, **2**(1): 10.
- [12] KLANRIT P, TAEBUNPAKUL P, FLINTERMAN M B, *et al.* Oncogene, 2009, **28**(39): 3499.
- [13] BLOCK G J, ESKIW C H, DELLAIRE G, *et al.* Mol Cell Biol, 2006, **26**(23): 8814.
- [14] WU Wensen, VALLIAN S, SETO E, *et al.* Mol Cell Biol, 2001, **21**(7): 2259.
- [15] SEAGNO D M, MENDEZ-BERMUDEZ A, FOXON J L, *et al.* J Cell Biol, 2007, **179**(5): 855.
- [16] BERNARDI R, PAPA A, PANDOLFI P P. Oncogene, 2008, **27**: 6299.
- [17] LIU Jinfeng. Identification of Novel PML-NB Localized Proteins and Its Involvement and Mechanism in Regulation of DNA Damage Responses[D]. Beijing: The Academy of Military Medical Sciences of the Chinese People's Liberation Army, 2010: 1. (in Chinese)  
(刘金凤. PML NBs 新组分子鉴定及其在DNA损伤反炎中的功能机制研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010: 1.)
- [18] YANG S, JEONG J H, BROWN A L, *et al.* J Biol Chem, 2006, **281**: 26645.
- [19] BARDOS J I, ASHCROFT M. BioEssays, 2004, **26**: 262.
- [20] YANG Shutong, JAE-HOON J, ALEXANDRA L B, *et al.* J Biol Chem, 2006, **281**: 26645.
- [21] CHENG Xiwen, LIU Yu, HAO Chu, *et al.* J Biol Chem, 2012, **287**(28): 23356.
- [22] ZHONG Sue, SALOMONI P, RONCHETTI S, *et al.* J Exp Med, 2000, **191**(4): 631.
- [23] SCHRECK K C, GAIANO N. Nat Neurosci, 2009, **12**(2): 108.

## Functions of PML in Responding to Ionizing Radiation

YAO Bin<sup>1, 2</sup>, PEI Hailong<sup>1, 2</sup>, GAO Xiaofei<sup>1</sup>, WANG Jufang<sup>1</sup>, ZHOU Guangming<sup>1</sup>

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Promyelocytic leukemia (PML) plays an important role in natural immune, angiogenesis, and transcriptional regulation. It also participates in apoptosis and other radiobiological effects. We confirm that the PML expression in G1 and S phase cells is relatively higher than that in M and G2 phase cells. We also demonstrate that the expression of PML protein is up-regulated in both dose- and time-dependent manner after cells are exposed to ionizing radiation. The size and amount of PML-nuclear bodies (PML-NBs) increase in a dose-dependent manner whereas the fluorescence intensity of PML-NBs decreases. Taken together, PML is sensitive to ionizing radiation and its functional studies are facilitated to reveal the mechanisms underlying radiobiological effects.

**Key words:** PML; PML-NBs; ionizing radiation; radiotherapy; biological effect

---

**Received date:** 26 Jul. 2012; **Revised date:** 1 Jan. 2013

**Foundation item:** National Basic Research Program of China(973 Program) (2010CB834201); National Natural Science Fundation of China (10979062)

**Corresponding author:** ZHOU Guangming, Email: zhougm@impcas.ac.cn.

<http://www.npr.ac.cn>