

DOI: 10.13376/j.cblls/2017015

文章编号: 1004-0374(2017)02-0122-09

DBC1的蛋白质结构与生物学功能的研究进展

窦剑明, 艾乐飞拉·艾合买提, 谢文娟, 乔守怡*, 吴燕华*

(复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘要: 乳腺癌缺失因子 1 (deleted in breast cancer 1, DBC1) 编码一个含有多个功能结构域的核蛋白, 能够与染色质修饰蛋白、核受体等多种蛋白互作, 参与调节基因转录与信号转导, 在代谢、衰老、炎症和肿瘤等方面发挥重要作用。现从蛋白质结构与功能、互作蛋白与信号途径、肿瘤表达谱等 3 个方面对 DBC1 的研究进展进行简要阐述。

关键词: 乳腺癌缺失因子 1; 染色质修饰; 核受体; 基因转录; 蛋白质互作

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A

Research progress on the protein structure and biological function of DBC1

DOU Jian-Ming, ELPHIRE Ehmed, XIE Wen-Juan, QIAO Shou-Yi*, WU Yan-Hua*

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Deleted in breast cancer 1 (DBC1) encodes a nuclear protein with multiple functional domains. DBC1 protein is able to regulate gene transcription and intracellular signal transduction through interacting with chromatin epigenetic modifiers, nuclear receptors and many others. It is demonstrated that DBC1 is involved in metabolism, aging, inflammation and cancer. In this review, we will briefly discuss the new development and findings in DBC1, its protein structure, interacting proteins, signaling pathway and its expression pattern in cancer.

Key words: deleted in breast cancer 1; chromatin modification; nuclear receptor; gene transcription; protein interaction

乳腺癌缺失因子 1 (deleted in breast cancer 1, DBC1), 也被命名为 KIAA1967 和 CCAR2 (cell division cycle and apoptosis regulator protein 2)。2002 年, Hamaguchi 等^[1]在 3.5% (7/200) 的乳腺癌患者的细胞内检测到染色体 8p21 区段的同源性缺失, 并利用代表性差异分析 (representational difference analysis, RDA) 的方法在染色体缺失区域内克隆到了 *DBC1*。*DBC1* 基因由 22 个外显子和 21 个内含子组成, 全长 15 840 bp。其中, 编码区 (coding regions, CDs) 全长为 2 772 bp, 编码含有 923 个氨基酸的 DBC1 蛋白。*DBC1* 的基因序列与氨基酸序列在不同物种之间同源性很高, 提示了 DBC1 在进化过程中的保守性以及 DBC1 在细胞生命活动中的重要作用^[2]。由于 *DBC1* 是从乳腺癌细胞中克隆得到的, 部分研究者认为, *DBC1* 很可能是一个重要的肿瘤抑制基

因^[3], 但是, 综合现有的研究发现, 我们认为 DBC1 在肿瘤发生发展中的角色与地位还存在很多争议, 但 DBC1 确实能通过不同蛋白质相互作用从而参与到物质代谢、基因转录、细胞凋亡等重要环节中^[4]。为此, 本文将从蛋白质结构与功能、互作蛋白与信号途径、肿瘤表达谱等 3 个方面对 DBC1 的研究进展进行回顾与总结。

1 蛋白质结构与功能

DBC1 蛋白的相对分子质量为 1.50×10^5 , 包

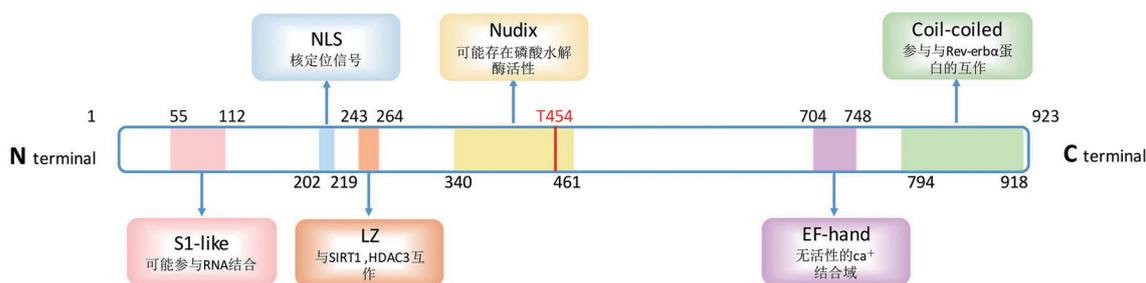
收稿日期: 2016-06-17; 修回日期: 2016-07-19

基金项目: 上海市教委“晨光”计划(2012年); 复旦大学“卓学”计划(2015年)

*通信作者: E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn (吴燕华); syqiao@fudan.edu.cn (乔守怡)

含多个功能性结构域和基序, 如 N 端的 S1-like RNA 结合结构域 (S1-like RNA binding domain)、核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)、亮氨酸

拉链结构域 (leucine zipper domain, LZ)、中部的 Nudix 结构域 (nucleoside diphosphate linked to X, Nudix)、C 端的 EF-hand 结构域 (E 和 F α helices of parvalbumin)



人 DBC1 全长 923 个 aa, 从 N 端至 C 端依次为 S1-like、NLS、LZ、Nudix、EF-hand 和 CC 结构域。数字表示氨基酸序号。

图1 人 DBC1 的结构示意图

和卷曲卷曲结构域 (coiled-coiled domain, CC)(图 1)^[4]。

位于 55~112 aa 的 S1-like RNA 结合结构域与核糖体 S1 蛋白同源, 有潜在的 RNA 结合作用。在 2014 年的一项研究中, 研究者意外地发现 DBC1 是信使核糖核蛋白体 (messenger ribonucleoprotein, mRNP) 的重要组分^[5]。深入的生化分析工作提示, DBC1 可与锌指蛋白 ZNF326 (zinc finger-containing protein 326, 又称为 ZIRD, ZNF-protein interacting with nuclear mRNPs and DBC1) 互作, 并与其他 mRNP 组分共同构成 DBIRD 复合物 (DBC1-ZIRD complex)。这一复合物可与 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 互作, 调节基因转录的延伸速率以及 mRNA 前体的剪接过程^[5]。尽管目前尚无直接证据, 但我们有理由猜测 S1-like RNA 结合结构域可能是 DBC1 参与 mRNA 延伸与剪接的重要功能元件。

位于 202~219 aa 的 NLS 负责 DBC1 的细胞核定位。由于 DBC1 的主要互作蛋白均分布在核内, 因此, NLS 对于 DBC1 的生物学功能至关重要。Hubbard 等^[6]进一步发现, NLS 内部的 K215 位点受到乙酰化的调节。DBC1-K215Q 突变体不能正常入核, 提示 NLS 区是 DBC1 重要的转录后修饰位点。

多项工作证明, DBC1 的 N 端是介导蛋白质互作的重要区域。其中, 1~240 aa 负责 DBC1 与甲基转移酶 SUV39H1 结合^[7], 243~264 aa 的 LZ 负责 DBC1 与去乙酰化酶 SIRT1^[8] 和 HDAC3 结合^[9]。值得指出的是, DBC1 利用其 N 端直接与这些染色质修饰蛋白的激酶域结合, 从而抑制了它们的酶活。我室新近报道了另一个新颖的 DBC1 互作蛋白——乳腺癌转移抑制因子 1 (breast cancer metastasis

suppressor 1, BRMS1)^[10]。DBC1 同样利用其 N 端与 BRMS1 相互作用。已知 BRMS1 是 Sin3•HDAC 复合物的组分之一, 同样参与了染色质的乙酰化水平的动态调节^[11]。

DBC1 的中部区域包含一个 Nudix 结构域 (340~461 aa)。Nudix 结构域通常出现在 Nudix 蛋白家族中, 这是一类磷酸水解酶, 可以水解核苷酸链、磷脂酰二磷酸肌醇、mRNA 的 5' 帽等多种底物^[12]。但是, Anantharaman 和 Aravind^[13] 认为由于 DBC1 的 Nudix 结构域内部丢失了关键的氨基酸残基, 因此这一结构域可能是无功能的。2013 年, Zheng 等^[14] 通过质谱分析揭示 Nudix 结构域内部的 T454 是 DBC1 的重要磷酸化位点和关键活性调节位点, 这一工作提示了 Nudix 结构域的潜在功能。

EF-hand 是出现在多数 Ca^{2+} 结合蛋白中的结构域, 具有特殊的结构——两端各有一个 α 螺旋, 内部是一个较短的 loop, 用于结合 Ca^{2+} ^[15]。DBC1 内部的 EF-hand 位于 704~748 aa, 但并没有证据显示它具有 Ca^{2+} 结合能力。

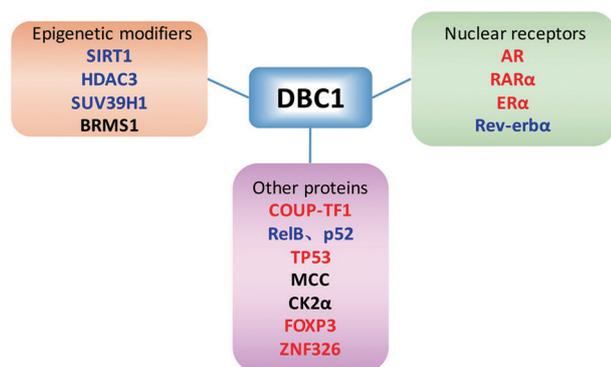
位于 DBC1 C 端的 CC 结构域 (794~918 aa) 是负责 DBC1 与非染色质修饰蛋白互作的另一个重要结构域。例如, DBC1 利用 CC 结构域与核受体 Rev-erba 等互作并调节后者的稳定性^[16]。

在人类基因组中, 细胞核周围蛋白 CCAR1 (1 150 aa) 是 DBC1 的同源蛋白, 两者含有一些同源的结构域, 如 N 端的 NLS、LZ, 中部的 Nudix, C 端的 EF-hand 区。相比于 DBC1, CCAR1 蛋白的 N 端中部多出了 SAP 结构域 (scaffold attachment factor, 与一些核蛋白的 DNA 结合结构域同源), C

端多出了 CC 结构域。研究认为 DBC1 与 CCAR1 共同起源于线虫的 LST-3 蛋白 (nematode protein lateral signaling target 3)。但是, 从水生动物到两栖动物, DBC1 的 S1-like、LZ 功能域与 CCAR1 的相比, 结构的多变性降低, 提示 DBC1 比 CCAR1 在演化过程中更加保守, 功能上可能也更加重要^[3]。

2 DBC1的互作蛋白与信号途径

从 DBC1 蛋白的结构分析中可以发现, DBC1 具有多个蛋白质 - 蛋白质互作结构域, 后续的功能研究中进一步证明, DBC1 能够与染色质修饰蛋白、核受体蛋白等相互作用 (图 2)。更重要的是, DBC1 能够调节这些互作蛋白的活性, 从而参与到基因表达与信号转导中, 并在代谢、衰老、炎症与



受到 DBC1 负调控的互作蛋白用蓝色字体表示, 受到 DBC1 正调控的互作蛋白用红色字体表示。其他互作蛋白或不确定调控性质的蛋白用黑色字体表示。

图2 DBC1互作蛋白分类

肿瘤中发挥重要作用^[4]。

2.1 DBC1与染色质修饰蛋白的相互作用

能够与 DBC1 相互作用的染色质修饰蛋白, 包括 SIRT1、HDAC3、SUV39H1 和 BRMS1。这些蛋白直接或间接参与了组蛋白的乙酰化、甲基化修饰, 提示 DBC1 在动态调节染色质状态中的重要作用。

2.1.1 DBC1与SIRT1

SIRT1 是酵母沉默信息调节因子 Sir2 (silence information regulator 2) 在哺乳动物细胞中的同源体, 属于 NAD⁺ 依赖性的去乙酰化酶蛋白家族, 也是 III 型组蛋白去乙酰化酶蛋白。已知的 SIRT1 底物包括组蛋白、p53、FOXO、E2F1 等。SIRT1 能够通过调节不同底物蛋白的去乙酰化水平控制蛋白活性、稳定性或亚细胞定位而发挥作用, 从而参与调节哺乳动物的胚胎发育、细胞分化、代谢、细胞凋亡、

衰老等^[17]。更重要的是, 异常 SIRT1 的表达或活化与多种代谢相关疾病的发生相关, 如糖尿病、肝脏脂肪变性、心血管疾病、神经退行性疾病, 以及多种类型的肿瘤^[18]。

肿瘤抑制基因 p53 是 SIRT1 的重要底物。SIRT1 能够与肿瘤抑制基因 p53 相互作用, 促进 p53 赖氨酸 382 位点去乙酰化, 从而抑制 p53 的转录激活活性^[19-20]。但是, 多项 SIRT1 小鼠模型的工作支持 SIRT1 是一个潜在的肿瘤转移抑制基因^[18], 提示 SIRT1 在肿瘤发生发展中扮演了异常复杂的角色。

2008 年, 两个研究小组同时发现, DBC1 是 SIRT1 的重要负调控因子^[8,21]。研究者首先利用串联亲和纯化耦联质谱分析的方法, 从 SIRT1 的免疫沉淀复合物中鉴定到了 DBC1, 随后他们发现, DBC1 不仅能够利用 LZ 区域与 SIRT1 的催化结构域相互作用, 而且这一结合导致 SIRT1 去乙酰化酶的活性被抑制, DNA 损伤诱导下的 p53 乙酰化水平降低, 凋亡细胞的比例减少^[8,21]。在 SIRT1 的 C 端有一个 25 个氨基酸残基构成的 ESA (essential for Sirt1 deacetylase activity) 区, 是 SIRT1 的去乙酰化酶活性的开关。Kang 等^[22]发现 DBC1 的 LZ 区可以与 ESA 区竞争性结合 SIRT1 的催化活性中心, 这是 DBC1 抑制 SIRT1 活性的主要分子机制。在无外界刺激条件下, SIRT1 维持 p53 的高度去乙酰化失活状态, 但在遗传毒性的压力刺激下, ATM/ATR (ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad3-related) 激酶可以通过两条通路激活 p53 的活性: 一条通路是 ATM/ATR 直接磷酸化 p53 的 Ser15 位点, 促进 p53 进一步乙酰化; 另一条通路则是 DBC1 依赖性的, 即 ATM/ATR 首先磷酸化 DBC1 的 Thr454 位点, 磷酸化的 DBC1 增强了它对 SIRT1 的抑制作用, 阻碍 SIRT1 去乙酰化 p53, 维持了 p53 的高乙酰化水平。Zannini 等^[23]在实验中还发现, DBC1 被磷酸化后, 并不会影响 DBC1 的细胞内定位以及其蛋白稳定性, 只是增强了其与 SIRT1 的相互作用。同时 Park 等^[24]发现, DNA 损伤刺激诱导的 DBC1 的磷酸化还增强了 DBC1 的 SUMO 化 (Small ubiquitin-like modifier), SUMO 化后的 DBC1 蛋白与 SIRT1 的 SIM-like 区 (Sumo-interacting motif) 结合, 阻断了 SIRT1 与 p53 的结合, 正调控下游 p53 转录激活, 诱导细胞凋亡。DBC1 还受到磷酸酯酶 PP4 (protein phosphatase 4) 的调节, PP4 可以促进 DBC1 Thr454 位点的去磷酸化。敲除细胞内的 PP4 能够维持较高的 DBC1 磷酸化水平, 促进 p53

乙酰化以及细胞凋亡^[25]。

在 DNA 损伤应答途径中, DBC1 结合并抑制 SIRT1 的生物学作用还依赖于另一个激酶蛋白 Chk2 (checkpoint kinase 2), 抑制 Chk2 的激酶活性可以抑制 DBC1-SIRT1 结合。其中的分子机制是, 在 DNA 损伤诱导下, ATM/ATR 分别磷酸化 DBC1 与 Chk2, 被激活的 Chk2 会进一步磷酸化下游的 11S 蛋白酶体激活因子 REG γ 的 Ser247 位点, 促进 REG γ -DBC1 的结合, 从而增强了 DBC1 对 SIRT1 的抑制作用^[26]。DBC1-Chk2 的互作还在异染色质的缺失修复中发挥了重要作用^[27]。

除了磷酸化, DBC1 的活性还受到乙酰化修饰的调控。人源 MOF (hMOF) 是 MYST 组蛋白乙酰基转移酶家族成员之一, 主要负责乙酰化组蛋白 H4 的 Lys16 位点^[28]。在 DNA 损伤刺激下, hMOF 乙酰化 H4 能够促进 DNA 修复^[29]。除了组蛋白, hMOF 也有其他底物蛋白, 包括 p53 等^[30]。2013 年, Zheng 等^[14]发现, DBC1 的 Lys112 和 Lys215 位点受到乙酰化修饰的调控, 而 hMOF 正是负责这一乙酰化过程的酶。被乙酰化修饰的 DBC1 降低了与 SIRT1 结合的能力, 间接提高了 SIRT1 的去乙酰化酶活性。有趣的是, DBC1 还受到 SIRT1 的去乙酰化调节, SIRT1 与 DBC1 之间的这一负反馈调节机制被认为是维持 SIRT1 活性的重要保障。而在 DNA 损伤条件下, 由于 DBC1 被磷酸化, 阻断了 hMOF 介导的 DBC1 乙酰化修饰作用, 从而促进了 DBC1 与 SIRT1 的结合^[14]。

2.1.2 DBC1与HDAC3

HDAC3 属于 I 型组蛋白去乙酰化酶家族蛋白。HDAC3 在细胞质和细胞核中均有表达, 可以通过去乙酰化组蛋白和非组蛋白调控染色质结构以及转录起始前复合物活性, 从而调节基因表达^[31]。

HDAC3 可以通过去乙酰化 MEF2D (myocyte enhancer factor 2D) 转录因子参与到多个细胞通路中, 如细胞分化等^[32]。Chini 等^[9]发现, DBC1 可以与该 HDAC3 的底物蛋白 MEF2D (myocyte enhancer factor 2) 竞争结合 HDAC3, 从而抑制 HDAC3 对 MEF2D 的去乙酰化作用。进一步的实验还发现, DBC1 不仅可以抑制 HDAC3 的去乙酰化作用, 还能改变 HDAC3 在细胞内的定位。单独过表达 HDAC3 时, HDAC3 主要聚集在细胞质中, 而当 HDAC3 与 DBC1 共同过表达时, HDAC3 则主要分布在细胞核中。Escande 等^[33]认为, DBC1 对于 HDAC3 的抑制作用在脂肪细胞的衰老中扮演了重

要角色。他们在 DBC1 敲除小鼠的脂肪细胞中发现 DBC1 可以通过结合并抑制 HDAC3 诱导细胞衰老, 并带来一系列下游细胞炎症反应。

2.1.3 DBC1与BRMS1

肿瘤转移抑制基因 *BRMS1* 能够特异性抑制肿瘤转移而对原发肿瘤生长没有作用^[34]。在裸鼠移植瘤实验中发现, *BRMS1* 可以抑制黑色素瘤、非小细胞肺癌、鼻咽癌、卵巢癌等多种肿瘤的转移, 是一个广谱的肿瘤转移抑制基因^[35]。我室近年来利用串联亲和纯化及质谱技术筛选到了 *BRMS1* 的互作蛋白 DBC1, 并发现 *BRMS1* 在体内外均能与 DBC1 互作, 互作的关键区域位于 DBC1 的 N 端和 *BRMS1* 的亮氨酸拉链区。敲除 *BRMS1* 后, 内源 DBC1 与 SIRT1 的互作增强, SIRT1 底物 p53 的乙酰化水平提高。这项工作初步提示 *BRMS1* 可以通过与 DBC1 的互作参与调节 SIRT1 依赖性的 p53 乙酰化水平^[36]。

2.1.4 DBC1与甲基转移酶SUV39H1

SUV39H1 是组蛋白 H3 的 Lys9 位特异性甲基转移酶, 主要参与异染色质的形成、基因表达的调控以及早期肿瘤细胞的衰老的诱导过程。SIRT1 可以与 SUV39H1 的 Chromo 结构域互作, 诱导 Lys266 位点的去乙酰化, 进而激活它的甲基转移酶活性^[37]。Li 等^[7]发现 DBC1 的表达抑制了 SIRT1 与 SUV39H1 复合体的形成, 阻止了 SIRT1 对 SUV39H1 的去乙酰化作用。同时, DBC1 与 SUV39H1 的催化结构域结合, 直接抑制了 SUV39H1 的体外体内甲基转移酶活性。因此, 在 DBC1 敲除细胞中 H3 的甲基化修饰水平显著提高, 这一工作提示了 DBC1 在调节染色质结构中的又一重要分子机制。

2.2 DBC1与核受体的相互作用

细胞核受体 (nuclear receptor, NR) 是指位于胞质溶胶中或者核内的一大类受体, 属于配体活化的转录因子。核受体与相应配体结合后由胞浆转到细胞核内, 与 DNA 结合而发挥转录因子的功能。细胞核受体均属于转录因子超家族, 基本结构上同源性很高, 包括转录激活功能元件 (activation function, AF)、DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD)、配体结合域 (ligand binding domain, LBD) 等。

核受体是另一大类与 DBC1 存在相互调节关系的蛋白质。已报道的与 DBC1 有互作的核受体有雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、雄激素受体 (androgen receptor, AR) 和昼夜周期调节因子 Rev-erba (又名 NR1D1, nuclear receptor subfamily 1 group D

member 1)。DBC1 与这些核受体结合能够调节它们的转录活性和 (或) 稳定性。此外, DBC1 还可以间接性地调节 RAR (retinoic acid receptor, 维甲酸受体) 的转录活性。DBC1 利用这些不同的核受体广泛参与到基因转录与细胞活性调节中。

2.2.1 DBC1与ER

ER 是能够与雌激素结合并被活化的重要核受体, 在性别发育与成熟过程中具有重要作用。ER 包括 ER α 和 ER β 两种, 分别位于 6 号染色体和 14 号染色体上, 由不同的基因编码, 通过形成异源二聚体或同源二聚体发挥作用。受雌激素活化的 ER 二聚体能够识别靶基因转录调控区域的激素应答元件 (estrogen response elements, ERE), 提高靶基因的转录表达活性^[38]。

DBC1 的同源蛋白 CCAR1 是雌激素诱导的基因表达的共激活因子, 在雌激素依赖性的乳腺癌细胞生长过程中发挥关键作用^[39]。Yu 等^[40]发现, DBC1 可以与 CCAR1 协同作用, 与 SIRT1 竞争性结合 ER α , 维持 ER α 乙酰化作用, 促进 ER α 结合到靶基因的 HRE 上, 增强 ER α 的转录激活作用, 促进增殖相关基因的表达以及乳腺癌细胞的增殖。值得注意的是, 在这一调节途径中, SIRT1 亦能反过来抑制 DBC1-CCAR1 的互作, 促进 ER α 的去乙酰化, 提示了 DBC1 与 SIRT1 之间的双向调节关系。

Koyama 等^[41]报道, DBC1 还可以与 ER β 相互作用, 但这一互作抑制了 ER β 配体依赖性的转录激活活性, 并进一步抑制 ER β 对下游细胞凋亡相关基因 Bcl-2 的转录激活作用, 初步提示了 DBC1 还可以通过 ER 受体参与细胞存活的调节。

2.2.2 DBC1与AR

AR (androgen receptor) 是能够与雄激素结合并被活化的另一重要核受体, 同样在性别发育与成熟过程中具有重要作用。Fu 等^[42]在利用免疫沉淀偶联质谱分析的方法分析 AR 的转录共激活因子时首次发现, DBC1 特异性地出现在有配体结合的 AR 的免疫复合物中, 提示了 AR 能够以配体依赖性的方式与 DBC1 结合。DBC1 利用包括 NLS 和 LZ 在内的 N 端结构域与 AR 的 LBD 结构域互作。这一互作增强了 AR 与靶基因启动子序列的结合, 提高了 AR 复合物的转录激活作用。因此, DBC1 是一个 AR 的共激活因子, 可以通过 AR 调节包括 PSA (prostate specific antigen) 等在内的靶基因表达。Wagle 等^[43]在骨肉瘤细胞 U2OS 中进一步发现, 消减内源 DBC1 提高了 AR 的多泛素化水平, 促进

AR 的降解, 提示了 DBC1 在稳定 AR 蛋白中的潜在作用。

2.2.3 DBC1与RAR

NIF1 被称为核受体共调节因子 (nuclear receptor coregulator, NRC) 结合蛋白 1 (NRC interacting factor 1), 能够提高核激素受体如 RAR α 的转录活性, 但并不与这些受体分子直接相互作用^[44]。Garapaty 等^[45]研究发现, DBC1 也是 NIF-1 免疫沉淀复合物中的重要组分, 而消减乳腺癌细胞内源 NIF-1 的表达显著降低了维甲酸诱导的 RAR α 靶基因 (如 Sox9、HoxA1 等) 的转录水平。

2.2.4 DBC1与Rev-erba

Rev-erba 与其同源蛋白 Rev-erb β 是另一类重要的核受体, 参与昼夜节律、物质和能量代谢、个体发育等^[46]。亚铁血红素 (heme) 是 Rev-erba 的天然配体, heme 和 Rev-erba 结合后可以增强 Rev-erba 的转录调节作用^[47]。但与 AR、ER 等不同, Rev-erba 属于抑制型转录因子, 能够转录抑制生物钟相关基因 (如 BMAL1 和 CLOCK) 的表达, 但这一调控过程还依赖于其他转录调节蛋白, 如 Ncor1 (nuclear receptor corepressor 1)、HDAC3 等的协同作用^[48-49]。Chini 等^[16]发现, DBC1 是能够与 Rev-erba 互作的另一个新颖蛋白。DBC1 利用 C 端与 Rev-erba 互作, 通过调节 Rev-erba 的泛素化修饰增强其蛋白稳定性。由于缺失 N 端的 DBC1 亦丧失了稳定 Rev-erba 的作用, DBC1 可能利用 N 端招募其他蛋白 (例如 HDAC3) 共同维持 Rev-erba 的蛋白稳定性。过量表达 DBC1 还可以增强 Rev-erba 对下游靶基因 (如 BMAL1 等) 的转录抑制作用, 提示了 DBC1 在昼夜节律中的潜在调节功能。

2.3 其他互作蛋白

除了染色质修饰蛋白与核受体蛋白, 还有一些研究工作报道了其他 DBC1 互作蛋白, 提示 DBC1 在细胞内扮演了多种角色。

首先, DBC1 能与其他非核受体的转录因子相互作用, 调节基因转录, 如 DBC1 可以与特异性转录因子 COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promoter transcriptional factor 1) 相互作用, 这种互作稳定了 COUP-TF1 与 NCoR (nuclear receptor corepressor) 等其他蛋白构成的转录起始复合物的稳定性, 参与调节 TNF α 诱导的凋亡抑制蛋白 TNFAIP8 (TNF α -induced protein 8) 的转录表达^[50]。此外, DBC1 还可以在 IKK α 的磷酸化作用下增强与 NF- κ B 亚基 RelB、p52 的互作, 抑制它们的转录活性并参与调

节 B 细胞的活化过程^[51]。

其次, DBC1 能与多种肿瘤相关蛋白互作, 参与肿瘤发生发展的调控。明星基因 *TP53* 是一个关键的肿瘤抑制基因, 它不仅参与调节多种信号转导途径, 自身的稳定性也受到严格的调控。泛素化连接酶 MDM2 (murine double minute 2) 能够特异性识别 TP53, 是 TP53 泛素化降解的重要调节分子^[52]。Qin 等^[53]发现, DBC1 敲除的细胞株中 p53 的泛素化降解信号比 DBC1 野生型细胞更强, 提示了 DBC1 可以调节 p53 的蛋白酶体降解途径。随后他们证明 DBC1 可以利用其 N 端与 TP53 直接互作, 这一互作抑制了 DBC1 与 MDM2 的结合, 从而稳定了 TP53 的蛋白水平。除了 TP53, DBC1 还能与 MCC (mutated in colorectal cancer)、CK2 α 等其他肿瘤相关蛋白相互作用^[54-55]。

再次, DBC1 可以与 FOXP3 (forkhead box P3) 结合, 参与免疫调节^[56]。Treg (regulatory T cells, 调节型 T 细胞) 是控制体内自身免疫反应性的 T 细胞亚群, Treg 的免疫功能损伤或者内稳态受到破坏都会诱导自身免疫疾病的发生^[57-59]。FOXP3 既是 Treg 的重要细胞表面分子, 又是调节 Treg 功能的重要因子, 但是, 一些细胞炎症因子, 如 TNF- α 和 IL-6, 可能诱导 FOXP3 的降解^[60-61]。Gao 等^[56]发现, DBC1 是 FOXP3 复合物的重要组分之一, 在炎症条件下, DBC1 的表达下调可以阻止 caspase8 介导的 FOXP3 降解过程, 并维持 Treg 的功能。这项研究工作首次揭示了 DBC1 与自身免疫调节的重要潜在联系。

4 DBC1在肿瘤中的表达谱分析

由于 *DBC1* 是从乳腺癌中克隆得到的基因, 而 *DBC1* 又能与许多肿瘤相关基因 (如 *SIRT1*、*TP53* 等) 互作, 因此, 许多研究者将视角放在了 DBC1 的肿瘤表达谱中。但是, 他们的研究工作并没有直接证明 *DBC1* 是一个在肿瘤中表达抑制的肿瘤抑制基因, 而是描绘出了一个复杂的, 甚至存在一定矛盾的 DBC1 表达图谱, 即 DBC1 在不同类型肿瘤的不同发展阶段呈现不同的表达水平, 在实验室之间、样本之间, 甚至实验方法之间存在着互不相同的报道。

首先, 一部分表达研究工作认为 DBC1 可能在肿瘤发生及转移等过程中发挥了正向调控作用——高水平的 DBC1 与较高的肿瘤恶性程度、较差的预后之间存在统计学相关性。Lee 等^[62]利用 122 例乳腺癌样本进行免疫组化分析发现, 在 71% 的肿

瘤样本中都有 DBC1 的表达信号, 而且高水平的 DBC1 与肿瘤的远端转移 (distant metastatic relapse, DMR) 和较短的存活时间相关联。Hiraïke 等^[63]分析了 48 例早期乳腺癌女性患者的穿刺活检样本, 也发现在 85% 的样本中存在 DBC1 的表达, 且其表达水平与肿瘤的核型分级之间存在正相关, 且与 HER2 (human epidermal growth factor receptor-2, 人表皮生长因子受体) 的表达呈负相关 ($P = 0.026$)。

Zhang 等^[64]利用免疫组化分析方法检测了 186 例结肠癌样本的 DBC1 表达水平, 发现 DBC1 在结肠癌组织的表达水平远高于相应的非肿瘤组织样本, 进一步分析结果显示 DBC1 的表达与肿瘤病理等级、TNM (tumor node metastasis) 分级、肿瘤转移水平以及细胞总体存活率 (overall survival) 相关 ($P < 0.01$)。多变量 Cox 回归分析显示 DBC1 是独立的预后影响因子 ($P < 0.01$)。

Kim 等^[65]利用免疫组化方法分析了 104 例软组织肉瘤中 DBC1 的表达, 发现 DBC1 在 74% 的肿瘤组织样本中表达水平较高, DBC1 的表达与较高的临床分期 ($P = 0.019$) 和病理等级 ($P = 0.013$)、肿瘤远端转移 ($P = 0.003$) 显著相关。单因子 Cox 回归分析发现, DBC1 的表达与较短的总体生存率 ($P = 0.029$) 和较低的无复发生存率 ($P = 0.005$) 也存在统计学关联。研究者同时检测了其他肿瘤相关蛋白在这些样本中的表达变化, 发现 DBC1 与 Ki-67 ($P = 0.032$)、cyclin D1 ($P < 0.001$)、 β -catenin ($P < 0.001$)、p53 ($P = 0.005$) 的表达亦显著相关, 提示 DBC1 可能与这些蛋白协同作用, 共同参与调节软组织肉瘤的发生发展^[65]。

此外, DBC1 在食管癌^[66]、肾透明细胞癌^[67]、B 淋巴细胞瘤^[68]等其他肿瘤类型中也都有较高的表达, 且 DBC1 的表达与不良预后之间存在相关性。这些肿瘤样本的分析结果提示 DBC1 很可能扮演了癌基因的角色。

但是, 在胃癌、胆囊癌等研究报告中, DBC1 的表达谱检测呈现了完全不同的结果。DBC1 在正常组织或者早期肿瘤中的表达要高于癌变或远处转移的肿瘤, 这一变化提示 DBC1 可能发挥了抑制肿瘤细胞生长和转移的作用。Kang 等^[69]对 452 例接受胃切除的胃癌患者的组织样本进行了免疫组化实验, 发现 DBC1 的表达与较低的病理等级 ($P < 0.001$)、临床分期 ($P < 0.001$)、淋巴结转移分期 ($P = 0.002$) 等相关。多变量 Cox 回归分析提示 DBC1 表达是一个独立的良好预后影响因子。同时, Noguchi

等^[70]收集了557例胃癌组织样本进行DBC1的免疫组化分析,取得了一致的结果。他们发现DBC1的高表达与肿瘤分级($P = 0.001$)、淋巴浸润($P = 0.028$)、血管浸润($P = 0.008$)、淋巴结转移($P = 0.002$)、远端转移($P = 0.043$)之间呈现负相关关系,DBC1的表达是预后良好的指示因子。

在对104例胆囊癌样本进行DBC1的免疫组化分析时也发现,DBC1高表达的样本中,淋巴结转移较少($P = 0.040$),TNM临床分期较低($P = 0.040$),且总体生存率较高($P = 0.0278$)。多变量回归分析显示DBC1的表达也是胆囊癌预后良好的独立影响因素^[71]。Yu等^[72]在用免疫组化分析成对的咽下癌(hypopharyngeal squamous cell carcinoma, HSCC)和喉癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)病理样本时也发现,肿瘤组织中的DBC1的蛋白水平相对癌旁正常组织显著下调($P < 0.001$),而且DBC1的表达与肿瘤分化程度($P = 0.026$)、淋巴结转移($P = 0.013$)之间存在负相关。值得注意的是,Yu等^[72]还同时检测了DBC1的mRNA水平并意外得到了相反的结果,DBC1在肿瘤样本中的mRNA水平与癌旁组织相比是上调的($P = 0.001$),提示DBC1的表达很可能还受到蛋白质翻译和降解的调节。

5 结语

DBC1克隆至今已有10余年,但DBC1是否是一个肿瘤抑制基因尚无定论,DBC1能够通过不同种类的蛋白质相互作用正向(与核受体结合促进细胞增殖)或负向(与肿瘤抑制基因p53结合促进细胞凋亡)调节肿瘤细胞。与此一致的是,在不同类型、不同临床分级的肿瘤样本中,DBC1也表现出不同趋势的表达变化;但另一方面,大量的证据证明DBC1能够在染色质修饰与基因表达方面发挥重要的调控作用。作为一个核蛋白,DBC1可以抑制去乙酰化酶SIRT1、HDAC3及甲基转移酶SUV39H1的活性,并参与多种核受体和转录因子的激活。

表观遗传变化与肿瘤在内的多种疾病的发生具有密切的联系,肿瘤细胞的基因组内常出现DNA和组蛋白修饰水平的特征性变化^[73]。例如,肿瘤抑制基因上游CpG岛的超甲基化是关闭肿瘤抑制基因表达的重要机制之一,它的发生同时伴随了H3K9me3和H3K27me3等组蛋白超甲基化修饰。此外,组蛋白H3K9、H4K5、H4K8、H4K12和H4K16的去乙酰化也被认为是肿瘤细胞与正常细胞间的常

见差异。DBC1在调节组蛋白修饰方面的重要作用强烈提示,DBC1很可能通过动态调节组蛋白的修饰和基因的表达活性参与维持细胞稳态,调节代谢、分化、衰老与肿瘤等。因此,使用某些肿瘤分化模型,如乳腺癌分化模型,对DBC1的功能进行研究,可能会对阐明DBC1的生物学功能起促进作用。

[参 考 文 献]

- [1] Hamaguchi M, Meth JL, von Klitzing C, et al. DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 13647-52
- [2] Kim JE, Chen J, Lou Z. p30 DBC is a potential regulator of tumorigenesis. Cell Cycle, 2009, 8: 2932-5
- [3] Brunquell J, Yuan J, Erwin A, et al. DBC1/CCAR2 and CCAR1 are largely disordered proteins that have evolved from one common ancestor. Biomed Res Int, 2014, 2014: 418458
- [4] Chini EN, Chini CC, Nin V, et al. Deleted in breast cancer-1 (DBC-1) in the interface between metabolism, aging and cancer. Biosci Rep, 2013, 33: 637-43
- [5] Close P, East P, Dirac-Svejstrup AB, et al. DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. Nature, 2012, 484: 386-9
- [6] Hubbard BP, Loh C, Gomes AP, et al. Carboxamide SIRT1 inhibitors block DBC1 binding via an acetylation-independent mechanism. Cell Cycle, 2013, 12: 2233-40
- [7] Li Z, Chen L, Kabra N, et al. Inhibition of SUV39H1 methyltransferase activity by DBC1. J Biol Chem, 2009, 284: 10361-6
- [8] Kim JE, Chen J, Lou Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. Nature, 2008, 451: 583-6
- [9] Chini CC, Escande C, Nin V, et al. HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. J Biol Chem, 2010, 285: 40830-7
- [10] 刘雪妮, 田恬, 乔晓京, 等. 肿瘤转移抑制基因BRMS1的表达分析及机制研究进展. 生命科学, 2014, 26: 1057-66
- [11] Laherty CD, Yang WM, Sun JM, et al. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. Cell, 1997, 89: 349-56
- [12] McLennan AG. The Nudix hydrolase superfamily. Cell Mol Life Sci, 2006, 63: 123-43
- [13] Anantharaman V, Aravind L. Analysis of DBC1 and its homologs suggests a potential mechanism for regulation of sirtuin domain deacetylases by NAD metabolites. Cell Cycle, 2008, 7: 1467-72
- [14] Zheng H, Yang L, Peng L, et al. hMOF acetylation of DBC1/CCAR2 prevents binding and inhibition of SirT1. Mol Cell Biol, 2013, 33: 4960-70
- [15] Nelson MR, Thulin E, Fagan PA, et al. The EF-hand domain: a globally cooperative structural unit. Protein Sci, 2002, 11: 198-205
- [16] Chini CC, Escande C, Nin V, et al. DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of

- the nuclear receptor Rev-erba. *Biochem J*, 2013, 451: 453-61
- [17] Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 123-8
- [18] Herranz D, Serrano M. SIRT1: recent lessons from mouse models. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 819-23
- [19] Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2a promotes cell survival under stress. *Cell*, 2001, 107: 137-48
- [20] Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 2001, 107: 149-59
- [21] Zhao W, Kruse JP, Tang Y, et al. Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature*, 2008, 451: 587-90
- [22] Kang H, Suh JY, Jung YS, et al. Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity. *Mol Cell*, 2011, 44: 203-13
- [23] Zannini L, Buscemi G, Kim JE, et al. DBC1 phosphorylation by ATM/ATR inhibits SIRT1 deacetylase in response to DNA damage. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4: 294-303
- [24] Park JH, Lee SW, Yang SW, et al. Modification of DBC1 by SUMO2/3 is crucial for p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Nat Commun*, 2014, 5: 5483
- [25] Lee J, Adelmant G, Marto JA, et al. Dephosphorylation of DBC1 by protein phosphatase 4 is important for p53-mediated cellular functions. *Mol Cells*, 2015, 38: 697-704
- [26] Magni M, Ruscica V, Buscemi G, et al. Chk2 and REGγ-dependent DBC1 regulation in DNA damage induced apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 13150-60
- [27] Magni M, Ruscica V, Restelli M, et al. CCAR2/DBC1 is required for Chk2-dependent KAP1 phosphorylation and repair of DNA damage. *Oncotarget*, 2015, 6: 17817-31
- [28] Taipale M, Rea S, Richter K, et al. hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 6798-810
- [29] Gupta A, Sharma GG, Young CS, et al. Involvement of human MOF in ATM function. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 5292-305
- [30] Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, et al. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell*, 2006, 24: 841-51
- [31] Yang WM, Tsai SC, Wen YD, et al. Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem*, 2002, 277: 9447-54
- [32] Gregoire S, Xiao L, Nie J, et al. Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 1280-95
- [33] Escande C, Nin V, Pirtskhalava T, et al. Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell*, 2014, 13: 951-3
- [34] Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, et al. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res*, 2000, 60: 2764-9
- [35] Kodura MA, Souchelnytskyi S. Breast carcinoma metastasis suppressor gene 1 (BRMS1): update on its role as the suppressor of cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34: 611-8
- [36] Liu XN, Ehmed E, Li BY, et al. Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 modulates SIRT1-dependent p53 deacetylation through interacting with DBC1. *Am J Cancer Res*, 2016, 6:1441-9
- [37] Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, et al. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*, 2007, 450: 440-4
- [38] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5925-30
- [39] Kim JH, Yang CK, Heo K, et al. CCAR1, a key regulator of mediator complex recruitment to nuclear receptor transcription complexes. *Mol Cell*, 2008, 31: 510-9
- [40] Yu EJ, Kim SH, Heo K, et al. Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor α activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 6932-43
- [41] Koyama S, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, et al. Repression of estrogen receptor β function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 392: 357-62
- [42] Fu J, Jiang J, Li J, et al. Deleted in breast cancer 1, a novel androgen receptor (AR) coactivator that promotes AR DNA-binding activity. *J Biol Chem*, 2009, 284: 6832-40
- [43] Wagle S, Park SH, Kim KM, et al. DBC1/CCAR2 is involved in the stabilization of androgen receptor and the progression of osteosarcoma. *Sci Rep*, 2015, 5: 13144
- [44] Mahajan MA, Murray A, Samuels HH. NRC-interacting factor 1 is a novel cotransducer that interacts with and regulates the activity of the nuclear hormone receptor coactivator NRC. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 6883-94
- [45] Garapaty S, Xu CF, Trojer P, et al. Identification and characterization of a novel nuclear protein complex involved in nuclear hormone receptor-mediated gene regulation. *J Biol Chem*, 2009, 284: 7542-52
- [46] Bugge A, Feng D, Everett LJ, et al. Rev-erba and Rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev*, 2012, 26: 657-67
- [47] Yin L, Wu N, Curtin JC, et al. Rev-erba, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science*, 2007, 318: 1786-9
- [48] Yin L, Lazar MA. The orphan nuclear receptor Rev-erba recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene. *Mol Endocrinol*, 2005, 19: 1452-9
- [49] Crumbley C, Burris TP. Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PLoS One*, 2011, 6: e17290
- [50] Zhang LJ, Liu X, Gafken PR, et al. A chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI) complex represses expression of the gene encoding tumor necrosis factor α -induced protein 8 (TNFAIP8). *J Biol Chem*, 2009, 284: 6156-68
- [51] Kong S, Dong H, Song J, et al. Deleted in Breast Cancer 1 Suppresses B cell activation through RelB and is regulated by IKK α phosphorylation. *J Immunol*, 2015, 195: 3685-93

- [52] Haupt Y, Maya R, Kazaz A, et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997, 387: 296-9
- [53] Qin B, Minter-Dykhouse K, Yu J, et al. DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. *Cell Rep*, 2015, 10: 1324-34
- [54] Bae JS, Park SH, Kim KM, et al. CK2 α phosphorylates DBC1 and is involved in the progression of gastric carcinoma and predicts poor survival of gastric carcinoma patients. *Int J Cancer*, 2015, 136: 797-809
- [55] Pango L, Mladenova D, Watkins L, et al. MCC inhibits β -catenin transcriptional activity by sequestering DBC1 in the cytoplasm. *Int J Cancer*, 2015, 136: 55-64
- [56] Gao Y, Tang J, Chen W, et al. Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E3246-54
- [57] Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 531-64
- [58] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 2010, 140: 845-58
- [59] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008, 133: 775-87
- [60] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD⁴ T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 445-89
- [61] Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, et al. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*, 2006, 108: 253-61
- [62] Lee H, Kim KR, Noh SJ, et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Hum Pathol*, 2011, 42: 204-13
- [63] Hiraike H, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, et al. Expression of DBC1 is associated with nuclear grade and HER2 expression in breast cancer. *Exp Ther Med*, 2011, 2: 1105-9
- [64] Zhang Y, Gu Y, Sha S, et al. DBC1 is over-expressed and associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*, 2014, 19: 106-12
- [65] Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, et al. Expression of SIRT1 and DBC1 is associated with poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One*, 2013, 8: e74738
- [66] Kim SH, Kim JH, Yu EJ, et al. The overexpression of DBC1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *Histol Histopathol*, 2012, 27: 49-58
- [67] Noh SJ, Kang MJ, Kim KM, et al. Acetylation status of P53 and the expression of DBC1, SIRT1, and androgen receptor are associated with survival in clear cell renal cell carcinoma patients. *Pathology*, 2013, 45: 574-80
- [68] Park HS, Bae JS, Noh SJ, et al. Expression of DBC1 and androgen receptor predict poor prognosis in diffuse large B cell lymphoma. *Transl Oncol*, 2013, 6: 370-81
- [69] Kang Y, Jung WY, Lee H, et al. Expression of SIRT1 and DBC1 in gastric adenocarcinoma. *Korean J Pathol*, 2012, 46: 523-31
- [70] Noguchi A, Kikuchi K, Zheng H, et al. SIRT1 expression is associated with a poor prognosis, whereas DBC1 is associated with favorable outcomes in gastric cancer. *Cancer Med*, 2014, 3: 1553-61
- [71] Won KY, Cho H, Kim GY, et al. High DBC1 (CCAR2) expression in gallbladder carcinoma is associated with favorable clinicopathological factors. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 11440-5
- [72] Yu XM, Liu Y, Jin T, et al. The expression of SIRT1 and DBC1 in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *PLoS One*, 2013, 8: e66975
- [73] Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 286-98