

TIGAR 基因在恶性血液疾病中表达的机制研究进展

潘良琴 钱思轩

Expression and significance of TIGAR in hematological malignancies Pan Liangqin, Qian Sixuan

Corresponding author: Qian Sixuan, Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China. Email: qiansx@medmail.com.cn

TP53 诱导的糖酵解和凋亡的调控子 (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator gene, TIGAR) 是 p53 调节线粒体呼吸的靶基因, 通过一系列途径介导肿瘤细胞的分化, 与多种实体肿瘤的发生发展密切相关。同样, TIGAR 在多种血液恶性肿瘤中也均有表达, 但作用机制未完全阐明, 本文我们就 TIGAR 的结构、功能以及血液肿瘤中的表达等作一综述。

一、TIGAR 的分子生物学特性

TIGAR 基因位于 12 号染色体短臂 1 区 3 带 3 亚带, 脊椎动物从人类到鱼都有高度保守序列, 包含有 6 个可能编码外显子的区域和 2 个 p53 的结合区域。其中一个结合区域 (BS1) 位于第 1 个外显子上游区域, 另一个结合区域 (BS2) 位于第 1 个内含子内部, 而 p53 与第 2 个结合区域 (BS2) 结合后, 发挥类似于 p53 结合在 P21WAF1/CIP1 启动子上的生物学效应, 启动下游反应。Li 和 Jogl^[1] 利用布鲁克海文国家实验室国家同步辐射光源产生的强 X 射线, 对由 TIGAR 酶组成的样品晶体进行了分析和成像, 确定了其三维结构。他们通过重组人类、小鼠、斑马鱼的 TIGAR 蛋白分析显示, 人类 TIGAR 蛋白 (蛋白数据库编码 3DCY) 属于组氨酸磷酸酶超家族的一名成员, 整体包含 257 个氨基酸残基, 以组氨酸为核心, 分子间没有二硫键, 形似“三明治”样空间结构组氨酸磷酸酶折叠区, 其区别于组氨酸磷酸酶超家族其他成员的是包含一个额外的覆盖中层长环插入区, 整体结构结合了带正电荷的底物结合口袋, 在溶解状态下的结构呈单体, 其内包含了磷酸酶容易接近的活性部位, 功能与 PFK-2/FBPase-2 [6-磷酸果糖激酶-2/2,6-二磷酸果糖酶 (F-2,6-P)] 双功能酶类似, 能够催化 F-2,6-P 和 1,6-二磷酸果糖 (F-1,6-P)。F-2,6-P 由 PFK-2 催化 6-磷酸果糖的磷酸化生成, 是有氧糖酵解最重要限速酶——磷酸果糖激酶-1 (PFK-1) 的一个强大变构激活剂。现已证实有 4 个编码 PFK-2/FBPase 基因: PFKFB1、

PFKFB2、PFKFB3 和 PFKFB4, 其中 PFKFB3 的激酶/磷酸酶活性比最高^[2], 故 TIGAR 在后续的反应过程中被磷酸化发挥作用。

二、TIGAR 在基础方面的研究

1. TIGAR 的功能: TIGAR 是 p53 调节线粒体呼吸的靶基因, 与肿瘤的异常代谢密切相关。而肿瘤细胞的糖代谢状态与肿瘤细胞生存和抗凋亡能力密切相关^[3]。肿瘤细胞异常代谢的提出起源于 1924 年 Warburg 发现肝癌细胞存在异常代谢方式, 即通过有氧糖酵解而不是三羧酸循环产生 ATP, 这种现象称为 Warburg 效应。同样始终暴露在常氧下的气道的肺肿瘤^[4]、血流中的白血病细胞在肿瘤形成过程中也呈现出高度有氧糖酵解状态^[5-6], 证实了大多数肿瘤细胞在非缺氧状态下也以糖酵解这种代谢方式获取能量^[7-10], 抑制糖酵解途径为血液肿瘤开辟了新的治疗策略^[11]。

TIGAR 作为 p53 下游的靶基因, 其功能序列与 PFK 中 FBPase 结构域类似, 能降低细胞内 F-2,6-P; Gerin 等^[12] 和 Bolaños 等^[13] 研究还发现, TIGAR 重组体还是类似磷酸乙醇酸依赖的 2,3-BPG (2,3-bisphosphoglycerate) 磷酸酶, 在阳离子交换色谱中, 2,3-BPG 特异存在于小鼠骨骼肌蛋白质提取物的片段中, 抑制细胞内 TIGAR 重组体可以导致细胞内 2,3-BPG 的大幅上升, 其根据细胞内环境的不同微弱地降低 F-2,6-P。F-2,6-P 通过抑制糖酵解的限速酶 6-磷酸果糖激酶-1, 在肿瘤中抑制糖酵解, 直接致葡萄糖转向磷酸戊糖途径, 产生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH), 增加还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平, 从而裂解细胞内活性氧 (ROS), 从而减少细胞凋亡, 使细胞向过度增殖的方向发展, 有利于肿瘤细胞的生长。TIGAR 抗氧化效应不仅与 F-2,6-P 活性相关, 还与己糖激酶 2 (HK2) 相关^[14]。去除 FBPase-2 活性的突变 TIGAR 蛋白, 保留了 HK2 的绑定和催化活性, 低氧状态下, TIGAR 的一小部分蛋白定位于线粒体, 导致 HK2 的活性增强, 降低了线粒体膜电位, ROS 生成减少, 仍然起到抗氧化作用。综上所述, TIGAR 通过降低 F-2,6-P 水平或者增强 HK2 活性来调控细胞氧化还原水平, 使细胞在应激中免于 ROS 引起的凋亡。

2. TIGAR 与 ROS: TIGAR 的功能与其保护细胞不发生与活性氧相关凋亡的能力相对应。很多抗肿瘤药物通过诱导产生大量的 ROS, 杀伤肿瘤细胞, 而肿瘤细胞常通过上调氧化清除能力适应这种药物氧化应激, 促进细胞增殖。Bensaad 等^[15] 在骨肉瘤细胞 U2OS 和结肠癌 RKO 细胞中证实了 TIGAR 抑制糖酵解和通过降低 ROS、提高 GSH 水平达到抗凋亡的作用, 沉默 TIGAR 基因可使骨肉瘤 U2OS 和结肠癌 RKO 细胞的凋亡增加。再将细胞进行饥饿培养 24 h 处理

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.01.022

基金项目: 国家自然科学基金 (81070437、81270614、81300379)

作者单位: 210029 南京医科大学附属第一医院、江苏省人民医院血液科

通信作者: 钱思轩, Email: qiansx@medmail.com.cn

及低氧环境培养使得ROS升高,发现细胞株对应时间点的TIGAR也逐渐上升,提示ROS对TIGAR也存在反馈调节^[16]。因此TIGAR作为癌基因,能防止p53相关的ROS和DNA氧化损伤的凋亡。p53为抑癌基因,有11个外显子,转录2.8 kb的mRNA,在细胞接受多种应激(如DNA损伤药物、射线、癌基因等)信号后,激活下游TIGAR表达,降低F-2,6-P的水平,抑制糖酵解,转而使糖代谢进入磷酸戊糖途径,产生核糖、NADPH供DNA修复,并增加GSH水平,降低ROS水平,从而发挥抑制肿瘤的作用。因此,细胞在面对温和或可逆转、修复的瞬间压力信号时,降低TIGAR表达的水平、提高ROS会使细胞发生p53诱导的死亡。比如去甲氧柔红霉素^[17]、伊马替尼^[18]、三氧化二砷^[19]等抗癌药物通过提高胞内ROS浓度恢复耐药的白血病细胞对药物的敏感性,促进抗肿瘤药物诱导的细胞凋亡。综上,TIGAR导致的细胞内ROS水平的降低可能与p53保护基因组损伤的累积功能有关。

3. TIGAR与自噬:TIGAR的功能与自噬的调控也密切相关,且TIGAR可以通过自噬调控细胞的凋亡^[20]。Ye等^[21]用RNA干扰方法在mRNA和蛋白水平下调HepG2人肝癌细胞的TIGAR的表达,引起自噬过程中的特定标志物泛素样-脂类样蛋白(LC-3II)表达的升高,从而促进自噬小体的产生,自噬促进蛋白(Beclin-1)的表达水平也上升,从而凋亡增加,细胞的生长受到抑制。Bensaad等^[20]指出TIGAR通过降低ROS水平调控自噬。当用抗氧化剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、维生素C和双氧水处理细胞,清除ROS效应,TIGAR的功能受到抑制。总之,TIGAR通过调控自噬引起ROS相关的细胞凋亡。

三、TIGAR的表达与非血液系统肿瘤的关系

在人类肝脏、结肠、胃和乳腺等实体肿瘤中,TIGAR通过抑制糖酵解,降低p53相关的ROS和DNA氧化损伤的凋亡。Cheung等^[22]的研究表明,在小鼠肠道腺瘤模型中,TIGAR对于肠道再生起到非常重要的作用。TIGAR的缺失降低了肿瘤负荷,提高了小鼠的生存率。同样,在人类结肠肿瘤中,TIGAR高表达促进肿瘤的进展。Kimata等^[23]发现,TIGAR能抑制缺氧心肌细胞的糖酵解,干扰TIGAR,心肌细胞糖酵解水平增高且细胞凋亡降低。相反,过表达TIGAR,糖的利用减少,缺氧心肌细胞的凋亡增加。在鼻咽癌中,核苷类似物抗肿瘤药Ecyd通过降低TIGAR-NADPH通路,增加c-Met的酪氨酸抑制剂的抗肿瘤效果^[24]。Bensaad等^[16]在骨肉瘤细胞U2OS中证实了TIGAR抑制糖酵解和通过降低ROS、提高GSH水平达到抗凋亡的作用。综上,TIGAR在实体肿瘤中具有两面性,一方面,TIGAR被激活后能减缓所有细胞中的生命过程,为修复细胞的损伤提供了时间保障;另一方面,激活的TIGAR这种原本为防止细胞进一步受损的作用也能导致人体发生癌变。这均使得TIGAR作为潜在的治疗靶标成为可能^[14]。

四、TIGAR的表达与恶性血液疾病的关系

1. TIGAR表达与急性髓系白血病(AML)的关系:AML

是造血系统的髓系原始细胞克隆性恶性增殖性疾病,是一个具有高度异质性的疾病群。研究还发现通过药物抑制脂肪酸氧化增加AML祖细胞凋亡的易感性^[25]。Herst等^[26]对19例初诊AML和4例复发AML患者骨髓样本糖酵解的代谢水平进行研究,较高水平糖酵解AML患者对于化疗有更高的耐受性,同时延长了持续完全缓解的时间与总体生存时间,提示糖酵解水平的高低与AML预后相关。Federzoni等^[27]报道己糖激酶3(HK3)与细胞分化和细胞活力明显相关,与正常粒细胞相比,HK3在AML尤其是急性早幼粒细胞白血病(APL)中明显下调,而在APL细胞分化过程中迅速上调。敲除PU.1使HK3受抑,从而导致APL细胞的分化与生存严重受抑。以上研究均提示AML的发生发展与糖酵解状态密切相关,而TIGAR基因通过降低2,6-二磷酸果糖的水平来抑制糖酵解,故TIGAR基因对AML的发病机制有重要的调控作用。

2. TIGAR表达与慢性髓性白血病(CML)的关系:CML是骨髓造血干细胞克隆性增殖形成的恶性肿瘤,其标志性改变为特征性Ph染色体和BCR-ABL融合基因,BCR-ABL融合蛋白具有很强的酪氨酸蛋白激酶(PTK)活性。Kominsky等^[6]采用核磁共振和质谱技术发现,初诊时BCR-ABL阳性细胞的葡萄糖摄取率增高,葡萄糖运转蛋白-1(GLU-1)亲和性增加,乳酸盐产物增高,有氧糖酵解水平增高;而经酪氨酸激酶抑制剂甲磺酸伊马替尼治疗后,BCR-ABL细胞糖酵解水平受到抑制,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)和己糖激酶水平降低,三羧酸循环增加,从而促进白血病细胞凋亡。Gottschalk等^[5]运用核磁共振光谱技术研究发现伊马替尼逆转CML细胞有氧糖酵解,恢复线粒体有氧呼吸;而耐药时糖酵解水平又增高。这与国内我们用飞行质谱分析法(GC/TOF-MS)对CML患者进行代谢组学检测的结果一致^[28]。以上研究提示,BCR-ABL阳性细胞利用有氧糖酵解进行增殖、生存。另一方面,PI3K/Akt/mTOR信号途径在BCR-ABL介导的CML中起到重要作用^[29-30]。如硼替佐米通过抑制PI3K/Akt信号通路诱导BCR-ABL细胞及耐伊马替尼的T315I CML细胞凋亡^[31]。mTOR抑制剂雷帕霉素^[32]和Akt信号抑制剂OSU-0301223^[31]能抑制BCR-ABL细胞增殖。而DeBerardinis等^[33]研究结果显示PI3K/Akt/mTOR信号通路又与有氧糖酵解密切相关,可以使磷酸果糖激酶和己糖激酶活性增加,从而抑制肿瘤细胞增殖。综上,BCR-ABL阳性细胞利用有氧糖酵解和信号通路进行增殖、生存。TIGAR基因通过抑制糖酵解,增加GSH水平,降低ROS水平起到抗凋亡作用,Zhang等^[34]通过药物提高胞内ROS水平,增加CML及T315I阳性的BCR-ABL的凋亡。所以,TIGAR的表达会阻止BCR-ABL细胞的凋亡,TIGAR在CML的发病机制中起重要作用。

3. TIGAR表达与淋巴系统肿瘤的关系:慢性淋巴细胞白血病(CLL)中,López-Guerra等^[35]报道运用基因芯片表达谱研究CLL患者氟达拉滨疗效的差异性,氟达拉滨是具有细胞毒性的DNA损伤剂,能够引发p53介导的CLL细胞的

死亡,并且还可以通过p53非依赖性的方式诱导细胞凋亡。他们利用核苷类似物氟达拉滨处理体内来源的CML细胞,结果发现TIGAR表达水平与氟达拉滨的疗效显著相关。多发性骨髓瘤(MM)中,癌基因MUC1-C高表达。Yin等^[36]研究发现,使用MUC1-C抑制剂可降低TIGAR表达,进而降低NADPH、GSH,促进ROS介导的MM肿瘤细胞凋亡。同时,进一步研究还发现,靶向作用于MUC1-C蛋白的GO-203可协同硼替佐米通过降低TIGAR表达引起ROS介导的MM细胞凋亡^[37],这均提示MM也存在TIGAR基因表达异常的现象。综上,TIGAR在淋巴系统肿瘤中也扮演重要角色,推测其同样可以阻断p53介导的凋亡。

综上,TIGAR在血液系统恶性肿瘤中的表达具有普遍性,可以通过抑制糖酵解增加核苷和抗氧化剂的形成,阻断p53介导的凋亡,而且TIGAR也可能参与了白血病发病机制中的PI3K/Akt信号通路。进一步深入研究TIGAR在白血病中的作用有助于阐明白血病的发病机制。同样,其表达水平检测在预后中的价值及其作为抗肿瘤治疗靶标的可能性仍有待进一步研究和探讨。

参考文献

- [1] Li H, Jogl G. Structural and biochemical studies of TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(3):1748-1754.
- [2] Yalcin A, Telang S, Clem B, et al. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 86(3):174-179.
- [3] Vazquez F, Lim JH, Chim H, et al. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3):287-301.
- [4] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. *Nature*, 2008, 452(7184):230-233.
- [5] Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, et al. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(19):6661-6668.
- [6] Kominsky DJ, Klawitter J, Brown JL, et al. Abnormalities in glucose uptake and metabolism in imatinib-resistant human BCR-ABL-positive cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(10):3442-3450.
- [7] Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers [J]. *J Nucl Med*, 2008, 49 Suppl 2:24S-42S.
- [8] Wang SJ, Gu W. To be, or not to be: functional dilemma of p53 metabolic regulation [J]. *Curr Opin Oncol*, 2014, 26(1):78-85.
- [9] López-Lázaro M. The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(3):305-312.
- [10] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930):1029-1033.
- [11] Samudio I, Fiegl M, Andreeff M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6):2163-2166.
- [12] Gerin I, Noël G, Bolsée J, et al. Identification of TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) as the phosphoglycolate-independent 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase [J]. *Biochem J*, 2014, 458(3):439-448.
- [13] Bolaños JP. TIGAR's promiscuity [J]. *Biochem J*, 2014, 458(3):e5-e7.
- [14] McCarthy N. Metabolism: a TIGAR tale [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(8):522.
- [15] Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis [J]. *Cell*, 2006, 126(1):107-120.
- [16] Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy [J]. *EMBO J*, 2009, 28(19):3015-3026.
- [17] Dai J, Weinberg RS, Waxman S, et al. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system [J]. *Blood*, 1999, 93(1):268-277.
- [18] Koptyra M, Falinski R, Nowicki MO, et al. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance [J]. *Blood*, 2006, 108(1):319-327.
- [19] Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach [J]. *Redox Rep*, 2001, 6(2):77-90.
- [20] Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy [J]. *EMBO J*, 2009, 28(19):3015-3026.
- [21] Ye L, Zhao X, Lu J, et al. Knockdown of TIGAR by RNA interference induces apoptosis and autophagy in HepG2 hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(2):300-306.
- [22] Cheung EC, Athineos D, Lee P, et al. TIGAR is required for efficient intestinal regeneration and tumorigenesis [J]. *Dev Cell*, 2013, 25(5):463-477.
- [23] Kimata M, Matoba S, Iwai-Kanai E, et al. p53 and TIGAR regulate cardiac myocyte energy homeostasis under hypoxic stress [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(6):H1908-H1916.
- [24] Lui VW, Lau CP, Cheung CS, et al. An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(12):1772-1780.
- [25] Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1):142-156.
- [26] Herst PM, Howman RA, Neeson PJ, et al. The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is

- prognostic for clinical outcome[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89(1): 51-55.
- [27] Federzoni EA, Valk PJ, Torbett BE, et al. PU.1 is linking the glycolytic enzyme HK3 in neutrophil differentiation and survival of APL cells[J]. *Blood*, 2012, 119(21):4963-4970.
- [28] A J, Qian S, Wang G, et al. Chronic myeloid leukemia patients sensitive and resistant to imatinib treatment show different metabolic responses[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13186.
- [29] Wendel HG, de Stanchina E, Cepero E, et al. Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(19):7444-7449.
- [30] Jagani Z, Song K, Kutok JL, et al. Proteasome inhibition causes regression of leukemia and abrogates BCR-ABL- induced evasion of apoptosis in part through regulation of forkhead tumor suppressors[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(16):6546-6555.
- [31] Jagani Z, Song K, Kutok JL, et al. Proteasome inhibition causes regression of leukemia and abrogates BCR-ABL- induced evasion of apoptosis in part through regulation of forkhead tumor suppressors[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(16):6546-6555.
- [32] Kharas MG, Janes MR, Scarfone VM, et al. Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL + leukemia cells[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9):3038-3050.
- [33] DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(1):11-20.
- [34] Zhang H, Trachootham D, Lu W, et al. Effective killing of Gleevec-resistant CML cells with T315I mutation by a natural compound PEITC through redox-mediated mechanism [J]. *Leukemia*, 2008, 22(6):1191-1199.
- [35] López-Guerra M, Trigueros-Motos L, Molina-Arcas M, et al. Identification of TIGAR in the equilibrative nucleoside transporter 2-mediated response to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Haematologica*, 2008, 93(12): 1843-1851.
- [36] Yin L, Kosugi M, Kufe D. Inhibition of the MUC1-C oncoprotein induces multiple myeloma cell death by down-regulating TIGAR expression and depleting NADPH [J]. *Blood*, 2012, 119(3):810-816.
- [37] Yin L, Kufe T, Avigan D, et al. Targeting MUC1-C is synergistic with bortezomib in downregulating TIGAR and inducing ROS-mediated myeloma cell death [J]. *Blood*, 2014, 123(19):2997-3006.

(收稿日期:2014-07-14)

(本文编辑:董文革)