·综 述·

p53与MDM2及MDMX的相互作用和研究进展

李小龙 综述 高 明 审校

摘要 p53是重要的抑癌基因，在细胞周期阻滞、DNA损伤修复及细胞凋亡等生物过程中发挥重要作用，并已成为潜在的肿瘤治疗靶点。MDM2（Mdm2 p53 binding protein homolog）及MDMX（Mdm4 p53 binding protein homolog）是p53的主要抑制因子，两者相互协同并通过不同的信号途径抑制p53的活性。MDM2是p53的E3连接酶，介导p53的泛素化从而降低p53的稳定性。MDMX则主要通过与p53的转录活性区结合，抑制p53对其下游基因的转录活性，但并不介导p53的降解。MDM2与MDMX通过不同机制协同对p53产生抑制作用，其具体分子过程及作用机制繁多且复杂。本文就p53、MDM2及MDMX的相互作用及各蛋白的功能进行综述。

关键词 p53 MDM2 MDMX 泛素化

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.15.032

Interplay among p53, MDM2, and MDMX and Progress in Related Studies

Xiaolong LI, Ming GAO

Correspondence to: Ming GAO; E-mail: law.li@tom.com

Department of Thyroid Surgery and Neck, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin Ciyt, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

Abstract P53 is one of the most important tumor suppressors. The resukts from functional analysis revealed that p53 is a potent stress responder that regulates cell-cycle arrest, DNA repair, cell senescence, and apoptosis. P53 is also recognized as a potential therapy target. MDM2 and MDMX are two major p53 suppressors, which can both inhibit p53 activity via different mechanisms. MDM2 is an E3 ligase of p53, which can promote p53 ubiquitination and can regulate p53 degradation and stabilization. MDMX does not have E3 ligase activity, but can directly bind to the N terminus of p53 and can inhibit p53 transactivation. Studies have shown that MDM2 and MDMX could work together to regulate p53 activity in a more complicated mechanism. The present work reviews the interplay among p53, MDM2, and MDMX.

Keywords p53; MDM2; MDMX; Ubiquitination

p53是重要的抑癌基因，在细胞周期阻滞、DNA损伤修复及细胞凋亡等生物过程中发挥重要作用。MDM2及MDMX是p53最重要的抑制因子，两者通过不同的分子机制共同调控p53的稳定性及生物功能，其过程及具体机制繁多且复杂。本文就近年来对p53、MDM2及MDMX三者之间的相互作用机制的研究结果进行总结及分析。

1 p53

早在1979年，研究者就发现P53蛋白可以与SV40病毒的大T抗原结合并在肿瘤细胞中有累积现象，但当时p53只被认定为一个很弱的抑癌基因[1]。另有研究发现，突变的p53具有新的功能并与肿瘤生成有关，突变型p53通过与野生型p53形成四聚体从而抑制野生型p53的正常生理功能[2]。1990年有研究发现，人乳头瘤病毒编码的E6癌蛋白可以促进p53的降解[3]。病毒利用癌蛋白特异性地降解p53这个现象表明，p53的失活对病毒的生成及增殖非常重要。目前，p53已经被公认为是最经典的肿瘤抑制因子。有50%以上的人类肿瘤都与p53功能缺失有关[4-5]。其功能性研究已经揭示了p53的主要生物学功能，即在各种应激情况下诱导细胞周期停滞，DNA修复，细胞衰老及凋亡。

从蛋白结构上分析，p53具有典型的转录因子结构[6]。其N端为反式激活区，中部区域为序列特异性DNA结合区。DNA结合区存在很多肿瘤细胞的突变热点，说明p53的肿瘤抑制功能主要依赖于其转录活性。p53通过与启动子结合，诱导无数蛋白的转录及过表达，从而发挥各种的生理功能。虽然受p53调控的基因数目仍在增加，但这些靶基因均可归为以下五类：(1)细胞周期停滞基因，(2)凋亡基因，(3)DNA修复基因，(4)血管生成及转移抑制基因，(5)细胞衰老基因。

在正常生理情况下，细胞内p53的半衰期很短，从而将p53维持在较低的水平。p53在抑制肿瘤生成过程中最重要的功能之一就是在细胞应激的情况下引发细胞周期停滞或凋亡。通过此途径，受损的细

作者单位：天津医科大学附属肿瘤医院甲状腺颈部肿瘤科，天津市肿瘤防治重点实验室（天津市300060）

通信作者：高明 law.li@tom.com

胞可以修复其受损DNA或通过凋亡直接由体内清除。这种由DNA损伤而激发的p53活化机制有效地避免了肿瘤的生成。

在体内，最主要的DNA损伤为DNA双链断裂。双链断裂可由离子辐射、化学药物或基因毒性引起。共济失调微血管扩张症候群（ataxia telangiectasia）是一种常染色体隐形遗传性疾病，主要表现为神经退变、免疫缺陷及肿瘤易感性[7]。在基因水平上，共济失调微血管扩张症候群是由ATM（ataxia telangiectasia mutated）缺乏或失活引起。在DNA出现损伤时，ATM可以磷酸化P53蛋白位点S15[8-9]。同时，ATM还磷酸化并活化Chk2（Chk2 checkpoint homolog）。后者同样是一个磷酸化激酶，可以磷酸化P53蛋白的位点S20[10]。ATM的另一个底物是MDM2。ATM可以激发MDM2蛋白S395位点的磷酸化，该位点的磷酸化可以抑制P53由细胞核内转运到胞浆中[11]。MDM2既影响p53的功能，又影响其稳定性。为维持p53在正常细胞内的低水平，MDM2通过与P53具有反式激活活性的N端结合，抑制p53的转录因子活性。另一方面，MDM2还是p53的泛素化E3连接酶，调控p53的泛素化及蛋白酶体降解。此外，MDM2蛋白分子上的出核信号区（NES）也可以增强MDM2介导的p53泛素化及降解。然而，p53自身的磷酸化可以明显抑制MDM2与p53结合，因此p53的磷酸化可明显增加其蛋白稳定性及转录因子活性。

作为肿瘤抑制因子，p53可以抑制正常细胞的生长及增殖。动物模型显示，p53缺乏的小鼠具有极高的成瘤性，说明了p53在抑制肿瘤生成方面的重要性[12]。p53的稳定性及活性主要受MDM2调控。MDM2自身是p53的下游靶基因。p53活化后，MDM2的表达也明显增加[13]。MDM2是p53的E3泛素连接酶，介导p53的泛素化及降解，维持p53的正常生理低水平[14]。p53与MDM2之间形成了一个经典的负反馈回路。p53活化刺激MDM2表达，而MDM2又反过来抑制p53[15]。MDM2敲除的小鼠胚胎在其发育的第84小时即发生死亡，其原因是p53过度活化导致广泛的凋亡。此结果表明MDM2是p53重要的抑制因子[16-18]。

除了MDM2之外，MDMX是p53另一个重要的抑制因子。与MDM2相同，MDMX也可以与p53相结合。与MDM2不同，p53并不能作用于MDMX的启动子，因此MDMX与p53两者间并不具有负反馈环路。此外，MDMX也不具备E3连接酶活性，因此无法直接调控p53的稳定性。然而，MDMX仍然是p53重要的抑制因子。MDMX敲除的小鼠胚胎同样由于p53介导的广泛凋亡死于胚胎发育的第7天，与MDM2敲除小鼠相似，MDMX敲除的小鼠也可以通过敲除p53来拯救[19-20]。这些现象表明，MDMX与MDM2在对p53的调控及胚胎发育中的功能并不重叠。

DNA损伤后，p53磷酸化是其活化的关键。P53的N端至少可被3种不同的激酶磷酸化：ATM，ATR及DNA-PK[21]。当p53发生磷酸化后，MDM2将无法有效与p53结合。同时，MDM2自身的磷酸化也会抑制其与p53相互作用。

乙酰化同样可以调控p53的活性及其与其他蛋白间的相互作用。研究表明，N端的磷酸化可以加强CBP/P300及PCAF对p53的乙酰化，从而增强p53的转录活性及稳定性。同时，去乙酰化对已修复的细胞恢复p53正常的活性至关重要。作为p53的抑制因子，MDM2在体内及体外均可以明显抑制p53的乙酰化，从而抑制p53的功能[22]。

p53的稳定性主要通过泛素化进行调控。MDM2介导的p53泛素化可将p53定位到26S蛋白酶体从而介导其降解。因此，正常生理情况下p53的半衰期很短。概括一下p53的负调控，可以发现除MDM2外有多个不同的蛋白都与p53负调控有关，说明正常生理情况下维持p53在相对较低的水平对细胞的生长至关重要。因此，去泛素化将增加p53的稳定性。HAUSP（ubiquitin specific peptidase 7）是去泛素化酶，可以通过抑制MDM2介导的p53泛素化增加p53的蛋白半衰期[17]。

近年来，恶性肿瘤死亡率逐年增加。目前为止，恶性肿瘤的治疗仍然以化疗及放疗为主，而有效的放化疗取决于p53的功能及活性。为逃避p53对肿瘤的抑制，约50%的同类肿瘤都具有p53突变。而其他的肿瘤中，虽然p53本身无异常，但都伴有其通路中其他组分的异常，如MDM2的扩增或ARF（alternate reading frame）缺失。

鉴于p53在肿瘤抑制机制中的中心作用，研究者已经开始致力于针对p53的靶向治疗方法，方法主要分为两类。第一种方法是针对p53发生突变的恶性肿瘤，其出发点是恢复突变型p53的正常生理功能。恢复P53功能的方法包括：消除p53突变的细胞，例如使用Onyx-015；或恢复突变型p53的正常生理功能，如PRIMA-1。第二种方法是加强野生型p53的活性。有相当比例的肿瘤细胞拥有野生型p53，但这些肿瘤细胞中MDM2都有异常扩增或过表达。MDM2是p53最重要的抑制因子，可以抑制其稳定性及活性。基于此，研究者正致力于研发MDM2的抑制剂。这些抑制剂多为生物肽或小分子化合物，可以抑制MDM2与p53的结合，从而减少MDM2对p53的抑制[23]。

2 MDM2

MDM2基因最早是从被称为double minute的异

常染色体上克隆出来的[24]。这些染色体通常都带有异常扩增的基因，从而引起机体细胞异常增生及肿瘤生成。MDM2的异常扩增可导致小鼠肿瘤易感性，因此MDM2被认为是一个癌基因。MDM2与p53一同被纯化出来后，被发现可以降低p53的稳定性及转录活性。这个现象同样支持MDM2的癌基因特性。

p53敲除的小鼠可以顺利存活，但在出生后具有明显的成瘤倾向，而MDM2敲除的小鼠则无法存活。如果MDM2敲除小鼠的死亡是由于p53失去了MDM2的抑制而过度活化所致，则理论上在MDM2敲除的基础上再敲除p53就可以避免小鼠胚胎过早死亡。在后续的研究中，此假设被证实是正确的[25]。此外，MDM2敲除的小鼠与MDM2/p53双敲除的小鼠都具有相似的成瘤倾向性，再次证明了MDM2是一个癌基因并且是p53的抑制因子。

根据上述研究结果，无论是p53功能缺失还是MDM2异常扩增，都会导致肿瘤生成。实际在临床上，p53基因的突变与MDM2基因扩增很少同时存在。MDM2的异常扩增最早在骨肉瘤及软组织肿瘤中被检测出来，其发生率可达7%。此外，在一些具有正常p53功能及MDM2水平的肿瘤中，多伴有抑癌基因ARF的缺失，从而导致MDM2活性相对增高。ARF是MDM2的主要抑制因子，其在人类恶性肿瘤中的突变率极高。

虽然p53可以直接介导细胞凋亡，但其抑癌作用主要是依赖其转录因子活性来实现的。在基因毒性应激过程中，p53可以诱导细胞凋亡、细胞周期停滞、DNA损伤修复及抑制血管生成。p53的下游效应基因包括p21、GADD45、14-3-3 σ、Bax、PUMA及MDM2。与其他效应基因不同，MDM2可以与p53的转录活性区，即N端结合，从而抑制p53对其下游基因的转录促进功能。这种功能在p53与MDM2间建立了一个负反馈环。但在DNA损伤时，机体需要p53的临时活化来抑制异常或受损细胞的进一步增殖，并诱导受损及异常细胞的DNA修复或凋亡。此时，p53会发生明显的磷酸化，使MDM2与p53的结合力降低，从而降低MDM2对p53的抑制作用。当p53失去了MDM2对其的抑制作用后，就可以有效地增加下游基因转录，诱导细胞周期停滞或凋亡。因此，当MDM2对p53的抑制过强时，DNA损伤的细胞就可以继续增殖从而导致肿瘤生成。

在泛素化过程中，E3连接酶是一组可以催化泛素与蛋白底物结合的酶。目前为止，已被发现的E3连接酶可分为两类。一类是含有HECT区的E3，这类连接酶通过形成中间体催化E2与底物之间的结合。另一类是含有RING功能区的E3，MDM2属于此类。

目前已有多种功能不同的蛋白质被发现是MDM2的泛素化底物，其中包括p53，MDM2自身，MDMX，b-arrestin，PCAF及IGF1R[26-27]。MDM2介导的泛素化可通过蛋白酶体快速有效地降解这些底物。

3 MDMX

1996年，1个新的P53结合蛋白被分离出来，由于其结构与MDM2相似，即被命名为MDMX。MDMX在结构上与MDM2同源。MDM2由491个氨基酸组成，而MDMX则由490个氨基酸组成，两个蛋白都具有相似的功能区。MDMX与MDM2在3个保守区域的结构上极其相似。第一个区域为P53的结合区，此功能区的结构在MDM2及MDMX蛋白上严格保守[28]。该区的功能是与P53的N端结合并抑制P53的转录活性。第二个保守域位于两个蛋白的中央区，由第301至329个氨基酸构成。该区域包含有锌指结构，其功能仍然未知。第三个保守区由第444至483个氨基酸构成，位于C末端。该区域为RING结构区，MDMX与MDM2在该区域具有53.2%的一致性，使两个蛋白可以形成同源或异源二聚体。通过酵母双杂交实验，现已证实MDMX-MDM2异源二聚体较两者的同源二聚体更加稳定。MDM2的RING功能区具有足够的E3泛素连接酶活性，然而MDMX却无此功能。

MDMX与MDM2蛋白结构具有差异的区域位于中央酸性区。MDM2的酸性区可以与ARF结合，而ARF可以抑制MDM2的E3连接酶活性从而稳定MDM2及P53[25]。ARF/MDM2复合体还可以将MDM2由核内重新定位至核仁，从而在空间上使MDM2与P53分离。

然而，ARF是否与MDMX结合仍不明确。研究发现MDM2的中央酸性区对其E3连接酶活性至关重要，同时也有力的说明了MDMX缺乏E3活性的原因，其他结构上的差异包括MDM2的核定位信号(NLS)及出核信号(NES)，而MDMX蛋白上则缺乏这两个结构[29]。

为逃避抑癌基因p53，肿瘤细胞选择性地突变或删除p53基因。此外，p53的抑制因子也会发生相应的扩增。小鼠模型证实了MDMX与MDM2对p53的调控功能并不重复[19]。恶性神经胶质瘤中常伴有MDMX基因扩增。与MDM2的情况类似，MDMX异常扩增并未伴随p53突变，表明MDMX的过表达已经足够使p53失活。此外，在MDMX异常扩增时也不会出现MDM2的扩增，该现象证明了MDMX与MDM2对p53的调控作用并不重叠。

综上所述，MDM2与p53之间存在负反馈调控，即p53可以激活MDM2的转录，而MDM2又通过抑制

p53的转录活性及降低p53稳定性抑制其生物活性。动物模型表明MDMX是体内除MDM2之外的另一个p53的抑制因子。与MDM2相似，MDMX同样通过与p53的N端结合抑制其转录因子活性。此外，MDM2也可以介导MDMX的泛素化降解。因此，MDMX与MDM2在调控p53的功能上既可以相互协同，又可以相互拮抗[30-31]。针对以上机制，临床有望开发出MDM2及MDMX的小分子抑制剂，从而充分活化p53，为临床恶性肿瘤的内科治疗带来新的曙光。

参考文献

1 Badciong JC, Haas AL. MdmX is a RING finger ubiquitin ligase capable of synergistically enhancing Mdm2 ubiquitination[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49668–49675.

2 Chen D, Shan J, Zhu WG, et al. Transcription–independent ARF regulation in oncogenic stress–mediated p53 responses[J]. Nature, 2010, 464(7288): 624–627.

3 Chen J, Marechal V, Levine AJ. Mapping of the p53 and mdm–2 interaction domains[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(7): 4107–4114.

4 Chen L, Gilkes DM, Pan Y, et al. ATM and Chk2–dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage[J]. EMBO J, 2005, 24(19): 3411–3422.

5 Cheng Q, Chen L, Li Z, et al. ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity[J]. EMBO J, 2009, 28(24): 3857–3867.

6 Cross B, Chen L, Cheng Q, et al. Inhibition of p53 DNA binding function by the MDM2 protein acidic domain[J]. J Biol Chem, 2011, 286(18): 16018–16029.

7 Allende–Vega N, Sparks A, Lane DP, et al. MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a[J]. Oncogene, 2010, 29(3): 432–441.

8 Herman AG, Hayano M, Poyurovsky MV, et al. Discovery of Mdm2–MdmX E3 ligase inhibitors using a cell–based ubiquitination assay[J]. Cancer Discov, 2011, 1(4): 312–325.

9 Gilkes DM, Chen L, Chen J. MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress[J]. EMBO J, 2006, 25(23): 5614–5625.

10 Waning DL, Lehman JA, Batuello CN, et al. Controlling the Mdm2–Mdmx–p53 Circuit[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2010, 3(5): 1576–1593.

11 Hu B, Gilkes DM, Farooqi B, et al. MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin[J]. J Biol Chem, 2006, 281(44): 33030–33035.

12 Jones SN, Roe AE, Donehower LA, et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm2–deficient mice by absence of p53[J]. Nature, 1995, 378(6553): 206–208.

13 Waning DL, Lehman JA, Batuello CN, et al. c–Abl phosphorylation of Mdm2 facilitates Mdm2–Mdmx complex formation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(1): 216–222.

14 Li B, Cheng Q, Li Z, et al. p53 inactivation by MDM2 and MDMX negative feedback loops in testicular germ cell tumors[J]. Cell Cycle, 2010, 9(7): 1411–1420.

15 Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, et al. HdmX stimulates Hdm2–mediated ubiquitination and degradation of p53[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(21): 12009–12014.

16 Poyurovsky MV. Length matters: C–terminal tails regulate Mdm2–MdmX complexes[J]. Cell Cycle, 2012, 11(8): 1485.

17 Barakat K, Mane J, Friesen D, et al. Ensemble–based virtual screening reveals dual–inhibitors for the p53–MDM2/MDMX interactions[J]. J Mol Graph Model, 2010, 28(6): 555–568.

18 Millard M, Pathania D, Grande F, et al. Small–molecule inhibitors of p53–MDM2 interaction: the 2006–2010 update[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(6): 536–559.

19 Clegg HV, Itahana Y, Itahana K, et al. Mdm2 RING Mutation Enhances p53 Transcriptional Activity and p53–p300 Interaction[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38212.

20 Wang X, Jiang X. Mdm2 and MdmX partner to regulate p53[J]. FEBS Lett, 2012, 586(10): 1390–1396.

21 Phillips A, Teunisse A, Lam S, et al. HDMX–L is expressed from a functional p53–responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity[J]. J Biol Chem, 2010, 285(38): 29111–29127.

22 Shangary S, Qin D, McEachern D, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(10): 3933–3938.

23 Wang L, He G, Zhang P, et al. Interplay between MDM2, MDMX, Pirh2 and COP1: the negative regulators of p53[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(1): 229–236.

24 Ji H, Ding Z, Hawke D, et al. AKT–dependent phosphorylation of Niban regulates nucleophosmin–and MDM2–mediated p53 stability and cell apoptosis[J]. EMBO Rep, 2012, 13(6): 554–560.

25 Ohtsubo C, Shiokawa D, Kodama M, et al. Cytoplasmic tethering is involved in synergistic inhibition of p53 by Mdmx and Mdm2[J]. Cancer Sci, 2009, 100(7): 1291–1299.

26 Reed D, Shen Y, Shelat AA, et al. Identification and characterization of the first small molecule inhibitor of MDMX[J]. J Biol Chem, 2010, 285(14): 10786–10796.

27 Wang YV, Leblanc M, Wade M, et al. Increased radioresistance and accelerated B cell lymphomas in mice with Mdmx mutations that prevent modifications by DNA–damage–activated kinases[J]. Cancer Cell, 2009, 16(1): 33–43.

28 Wang X, Wang J, Jiang X. MdmX protein is essential for Mdm2 protein–mediated p53 polyubiquitination[J]. J Biol Chem, 2011, 286(27): 23725–23734.

29 Xiong S, Van Pelt CS, Elizondo–Fraire AC, et al. Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(9): 3226–3231.

30 Xiong S, Pant V, Suh YA, et al. Spontaneous tumorigenesis in mice overexpressing the p53–negative regulator Mdm4[J]. Cancer Res, 2010, 70(18): 7148–7154.

31 Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way[J]. Cancer Cell, 2009, 16(5): 369–377.

（2012–06–24收稿）
（2012–07–30修回）
（本文编辑：张伲）