

· 综述 ·

tbx3 基因对乳腺发育及乳腺癌发生作用的研究进展

刘志洋 张瑾

1 tbx3 与乳腺发育

乳腺发育是通过上皮-间质相互作用以及分枝形态的产生而进行的。在人胚胎发育五六周时,乳腺间质在胚胎腹面从颈部到腹股沟诱导生成了一对索状的原始乳线。而这条乳线在胸部形成了所谓的乳脊。在男性胚胎中,由于睾酮的表达导致乳腺芽被破坏。而在女性胚胎中,乳腺芽的尖部向上分化形成乳头,向下分化为条索状输乳管原基;原始乳腺呈锥体状,在顶端的间质细胞分化为乳头、乳晕内的平滑肌细胞,当胚胎 6 个月时再进一步发育成 15 ~ 25 个条索状上皮性分支结构。小鼠乳腺发育的过程大致与此类似。Chapman^[1]和 Eblaghie 等^[2]证实,在小鼠胚胎 11.5 ~ 12.5 d 时,上皮开始表达 tbx3。tbx3 和 tbx2 属于 T-box 家族中的 tbx2 亚家族。它们结构类似,共同在人及鼠的乳腺发育中起作用。T-box 基因是一组同族的在 DNA 结合区域高度保守的转录因子,其表达产物为真核生物的转录调控因子。它们以具有高度保守的 DNA 结合区域(T 区)为特征,都能和靶基因启动子的特定序列相结合。在 DNA 结合区域 tbx3 和 tbx2 有 90% 的序列是相同的。Chapman^[1]和 Gibson Brown 等^[3]证实,在胚胎时期,tbx3 和 tbx2 在很多组织中重叠表达。

在怀孕期间,如果一个无功能的等位基因 tbx3 引发纯合子突变,则在胚胎死亡时,会发现其发生的很多变化。这些胚胎的卵黄囊及肢体异常,乳腺缺失。乳腺基板的诱导生成也几乎完全缺失,仅能在几个个例中发现发生纯合子突变的胚胎有一二个乳腺基板生成。而在成年的 tbx3 杂合的雌性中,能发现有第四乳腺的发育^[4]。

tbx3 和 tbx2 作为转录抑制因子相互联系共同作用于细胞周期。它们是在功能性衰老的研究中作为细胞周期控制基因 CDKN2a(也被称为 INK4A-ARF)的负性调节因子而被识别^[5]。这段基因序列通过两个部分重叠的密码子和两个独立的启动子,编码两个强力的抑制因子。p16Ink4a 通过抑制细胞周期蛋白 D 依赖性激酶的酶性活动,p19Arf(人类为 p14ARF)通过抑制 p53 负性调节因子 Mdm2,而诱导 p53 转录程序,致使细胞周期停止或细胞凋亡^[6-8]。tbx3 和 tbx2 通过与可变的 T 区结合点的结合而抑制 Arf 启动子,继而抑制 Arf 而影响 p53 活动。

tbx2 可通过编码细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子而直接调节 CDKN1a 的表达^[9], 这是由 p53 或其他刺激因素诱导的。然而这些相互作用在胚胎发育时期可能并无关联。Harrelson 等^[10]证实发生纯合子突变胚胎的心脏异常与细胞增生的减少并无关系, 并且在 p53 无效的情况下纯合子突变仍然可导致胚胎死亡。Harrelson 等^[10]还发现 tbx2 对胚胎时期 Ink4b、Ink4a、Arf 或 Cdkn1a 等细胞周期基因的表达并无影响。然而发生 tbx3 纯合子突变的胚胎则显示出高水平的卵黄囊细胞凋亡。这可能与 tbx3 通过抑制 arf 来调节 p19Arf/Mdm2/p53 旁路有关^[11]。在最近的一项报道中, Platonova 等^[12]的实验证实 TBX3 并不通过 p53 通路抑制 ARF 转录和刺激细胞增殖。由于 tbx3 在乳腺导管和小叶-腺泡系统上皮细胞的表达^[13], 以及其突变时在活体中的主要作用靶点为肢体芽、顶浆分泌腺和乳腺, 因此, 其作为乳腺上皮细胞生长调节转录因子所起的作用也进一步明确。Platonova 等^[12]设计实验通过改变 tbx3 的表达, 来观测 TBX3 和乳腺上皮细胞生长的关系。他们第一次提出了 TBX3 确实是乳腺上皮细胞生长的调节因子之一。

2 tbx3 与尺骨-乳腺综合征(UMS)

UMS 是一种具有各种各样临床表现的常染色体显性疾病。该病是以肢体、顶浆分泌腺、毛发、生殖器以及牙齿等缺陷为主的综合征。临床表现为四肢发育异常, 指(趾)骨数目异常, 指(趾)骨形态发育异常, 以及腕骨融合, 乳头数目异常及位置异常, 乳腺发育障碍等。其中乳腺异常包括发育不全和不发育^[14]。通过连锁分析发现: 这种疾病的病变基因是 tbx3; tbx3 包括一个 N 末端, 一个 DNA 结合区域, 一个 COOH 末端, 其功能是抑制基因表达, 抑制区域在羧基末端侧 567 ~ 623 个氨基酸, 核定位信号位于 292 到 297 个氨基酸^[15,16]。在 1.7 Å 分辨率下观察到的人 TBX3 转录因子晶体结构上的点突变, 是发生 UMS 的结构基础^[17]。由于 TBX3 蛋白的功能结构域主要位于 C 端, 因此发生在 C-端尤其是编码 DNA 连接结构域的突变, 更容易导致 TBX3 蛋白的功能障碍。Carlson 等^[18]发现, 在大多数 UMS 患者中, 由于 TBX3 蛋白 C-端的抑制结构域(RD1)缺失, 其转录抑制活性也因之丧失。

Davenport 等^[19]的研究表明, tbx3 基因的突变, 导致胚胎发育中乳腺基板的数目减少。他们发现在 tbx3 变异的小鼠体内, 乳腺仅存在 3 个基板, 而正常情况下为 5 个, 基板的减少进而影响胚胎乳腺的发育, 表现为更小的乳腺胚芽。有学者推测: TBX3 转录因子可能是通过参与成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和 WNT 信号传导途径来发挥其对胚胎乳腺等顶浆分泌腺体发育的调控作用; 该基因突变所致的表达下调或缺失, 会导致乳腺发育障碍。

3 tbx3 与乳腺癌

乳腺发育和肿瘤形成有几个共同的特征^[20], 两个过程皆发生细胞增殖, 凋

亡,侵入周围组织,以及新生血管形成。在器官形成中细胞通常处于未分化状态。与之相似,在肿瘤的演进过程中参与形成肿瘤的细胞也通常处于未分化或脱分化状态。在乳腺癌中,乳腺组织异常细胞的失控性增长提示 *tbx3* 参与了疾病的发生^[21]。最新的研究证实了 *tbx3* 在乳腺发育和肿瘤演进过程中的重要地位。*tbx3* 能够使鼠胚胎成纤维细胞永生化。鼠双微体 2 的选择性读框蛋白 p19ARF 的表达受 *tbx3* 的抑制。鼠 p19 通过与鼠双微体相互作用而阻止 p53 穿梭至细胞质,鼠 p19 与人的 p14 相对应,因此使得 p53 不稳定。人 *tbx3* 通过直接与 p14 启动子区结合而抑制它的表达。这个旁路在增生和老化中起了重要作用。野生型 *tbx3*(不是因发生错义突变而引起 UMS 的 *tbx3*)可抑制人 p14 启动子。*tbx3* 通过抑制凋亡,易化细胞转化,阻断肌源性分化而抑制 p53 旁路。通过与 *myc* 和 *ras* 的共转导,*tbx3* 能转化 MEF 细胞与它抑制 p19 表达的能力有关^[19]。

由于 *tbx3* 在乳腺发育中作用的阐明,以及它与 UMS 的关系,一些学者对其与乳腺癌发生是否有关产生了兴趣。

Fan^[22] 率先对此领域进行了研究,对 28 例乳腺癌患者以及 1 例非乳癌患者用 RT-PCR 技术对 *tbx3* 及其另一种亚体 *tbx3 + 2a* 进行了定量分析,发现有三分之一的乳腺癌患者的细胞中 *tbx3* 过表达,并且 *tbx3* 和 *tbx3 + 2a* 的比例也出现了异常。对 7 例 *tbx3* 过表达的患者,1 例对照患者,2 例 *tbx3* 正常表达的患者进行 Southern 印记分析,结果与实时 PCR 的结果相一致。上述实验说明 *tbx3* 很有可能在乳腺癌的发生中起作用。

国内也有学者进行了类似的实验。邓军等^[13] 收取了 44 例乳腺癌患者的新鲜癌组织并取癌旁组织作为对照,以 Tripure 试剂提取细胞总 RNA,用 RT-PCR 法检测两种组织中 *tbx3* 的表达水平,并比较了其表达状况与乳腺癌相关临床病理因素之间的关系。结果发现:*tbx3* 基因在乳腺癌组织中的表达显著强于癌旁组织 ($P < 0.01$),与患者年龄、肿瘤大小无关,但随着临床分期的进展,出现腋窝淋巴结转移、肿瘤浸润程度增加和组织学级别增高,该基因的表达明显增强。于是他们得出结论,高表达的 *tbx3* 可能在乳腺癌的发生中起促进作用,并可能是乳腺癌进展中关键的转变标志基因之一。

Lomnytska 等^[23] 进行了另一项实验。他们收录了 79 例乳癌患者、39 例卵巢癌患者和 31 例正常人,用 western blot 方法对入组者血清 *tbx3* 的表达情况进行检测。结果显示:31 例正常人中仅 30% 有 *tbx3* 弱表达,而全部 I 期卵巢癌患者均有表达,并且 80% 的乳腺癌患者也有表达(其中全部晚期乳腺癌患者都有表达);乳腺癌 *tbx3* 表达的特异性为 68%,敏感性为 98%。这将使 *tbx3* 可能成为乳腺癌的监测因子。

4 结语

乳腺的发育要经历胚胎期、青春前期、青春期、妊娠期、泌乳期和退化期。在

青春期, 在一些激素的作用下乳腺细胞发生增殖, 导管开始延伸, 分支开始形成。最终在妊娠期乳腺发育达到成熟状态。而在胚胎期和青春前期, 乳腺的发育并不依赖激素^[24,25]。在这些过程中上皮细胞和周围实质、间质之间的信号传导非常重要。在胚胎期, 一些分子如 Wnt 家族成员和一些成纤维细胞生长因子传递信号使得基板形成和变厚, 继而发生导管延伸和分支形成^[26]。此期间间质也不断膨胀, 这些过程累加起来最终形成了乳腺。转录因子和其他一些因子如 LEF、Msx、Hox 等一些家族成员共同发挥作用, 通过调节目标基因的表达而影响乳腺上皮细胞对细胞外信号的反应^[25-27]。但目前学者们对调节乳腺上皮细胞表达的转录因子的了解还很少。以乳腺不发育或发育不全为特征之一的 UMS 综合症最终被发现是由于 tbx3 基因突变所致。于是, 有些学者迅速将 TBX3 与乳腺上皮细胞的表达联系起来。Davenport 等^[18]对小鼠进行了实验, 发现纯合子动物 UMS 相关的缺陷非常严重, 而杂合子动物则正常。最近, Majewska 等^[11]对 tbx3 表达减弱与导管分支减少的关系作了详尽的分析, 并提出 TBX3 并不是通过 p53 通路来影响乳腺的发育。然而之前所有的实验均是在小鼠身上进行的。2007 年 1 月 Platonova 等^[12]发表论文, 第一次在人乳腺上皮细胞中验证了 TBX3 对乳腺上皮细胞生长的调节作用, 并证明 TBX3 可以在启动子水平上抑制 p19ARF 而影响乳腺发育, 且不需要通过 p53 通路。

人们对 TBX3 与乳腺发育关系的认识大致经历了上述过程。在此期间也有学者对 tbx3 的表达与乳腺癌的关系发生了兴趣, 先后在国内外共有三项试验进行了有关研究, 都得出结论认为乳腺癌患者的癌组织或血液中 TBX3 高表达。然而三项试验的样本量都比较小, 尚有待大规模试验给出结论。

【关键词】 tbx3; 乳腺癌; 转录因子; 尺骨-乳腺综合症

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Chapman D L, Garvey N, Hancock S, *et al.* Expression of the T-box family genes, tbx1-tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn*, 1996, 206: 379 - 390.
- [2] Eblaghie M C, Song S J, Kim J Y, *et al.* Interactions between FGF and Wnt signals and tbx3 gene expression in mammary gland initiation in mouse embryos. *J Anat*, 2004, 205: 1 - 13.
- [3] Gibson Brown J J, Agulnik S I, Chapman D L, *et al.* Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev*, 1996, 56: 93 - 101.
- [4] Jerome Majewska L A, Jenkins G P, Ernstoff E, *et al.* Tbx3, the Ulnar-Mammary Syndrome Gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19Arf/p53-independent pathway. *Deve Dynam*, 2005, 234: 922 - 933.
- [5] Jacobs J, Koblussek P, Robanus Maandag E, *et al.* Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19ARF) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet*, 2002, 26: 291 - 299.
- [6] Brummelkamp T, Kortlever R, Lingbeek M, *et al.* TBX-3, the gene mutated in ulnar-mammary syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem*, 2002, 277: 6567 - 6572.
- [7] Camero A, Hudson J D, Price C M, *et al.* p16INK4a and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 148 - 155.

- [8] Stott F J, Bates S, James M C, *et al.* The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*, 1998, 17:5001 – 5014.
- [9] Prince S, Carreira S, Vance K W, *et al.* Tbx2 directly represses the expression of the p21 (WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res*, 2004, 64:1669 – 1674.
- [10] Harrelson Z, Kelly R G, Goldin S N, *et al.* Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Development*, 2004, 131:5041 – 5052.
- [11] Jerome Majewska L, Jenkins G, Ernstoff E, *et al.* Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19ARF/p53-independent pathway. *Dev Dyn*, 2005, 234:922 – 933.
- [12] Platonova N, Scotti M, Babich P, *et al.* TBX3, the gene mutated in ulnar-mammary syndrome, promotes growth of mammary epithelial cells *via* repression of p19ARF, independently of p53. *Cell Tissue Res*, 2007, 328:301 – 316.
- [13] 邓军, 刘友生, 黄涛生, 等. 人乳腺癌组织中 tbx3 基因表达变化及其意义. *解放军医学杂志*, 2005, 6:512 – 514.
- [14] Bamshad M, Lin R C, Law D J, *et al.* Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet*, 1997, 16:311 – 315.
- [15] Carlson H, Ota S, Campbell C, *et al.* Dominant repression domain in TBX3 mediates transcriptional repression and cell immortalization; relevance to mutations in TBX3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum Mol Genet*, 2001, 10:2403.
- [16] Carlson H, Ota S, Song Y, *et al.* Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation. *Oncogene*, 2002, 21:3827 – 3835.
- [17] Coll M, Seidman J G, Muller C W. Structure of the DNA – bound T-box domain of human TBX3, a transcription factor responsible for ulnar-mammary syndrome. *Structure (Camb)*, 2002, 10:343 – 356.
- [18] Carlson H, Ota S, Campbell C E, *et al.* A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization; relevance to mutations in tbx3 that cause ulnar – mammary syndrome. *Hum Mol Genet*, 2001, 10:2403 – 2413.
- [19] Davenport T G, Jerome Majewska L A, Papaionnou V E. Mammary Gland, limb and yolk sac defects in mice lacking tbx3, the gene mutated in human Ulnar Mammary syndrome. *Development*, 2003, 130:2263 – 2273.
- [20] Coleman S, Silberstein G B, Daniel C W. Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev Biol*, 1988, 127:304 – 315.
- [21] Lewis M T. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. *Breast Cancer Res*, 2000, 2:158 – 169.
- [22] Fan W W, Huang X, Huang T S, *et al.* TBX3 and its isoform TBX3-2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 2004, 64: 5132 – 5139.
- [23] Lomnyska M, Dubrovskaya A, Hellman U, *et al.* Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *J Cancer*, 2006, 118:412 – 421.
- [24] Visvader J E, Lindeman G J. Transcriptional regulators in mammary gland development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35:1 034 – 1 051.
- [25] Groner B. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, 23:25 – 32.
- [26] Rowley M, Grothey E, Couch F J. The role of TBX2 and TBX3 in mammary development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2004, 9:109 – 118.
- [27] Coletta R D, Jedlicka P, Gutierrez Hartmann A, *et al.* Transcriptional control of the cell cycle in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2004, 9:39 – 53.

(收稿日期:2007-04-22)

(本文编辑:周艳)