

· 综 述 ·

# 原癌基因 *c-maf* 在多发性骨髓瘤中的研究进展

屈 强, 胡维新\*

(中南大学 生物科学与技术学院 分子生物学研究中心, 中国湖南 长沙 410078)

**摘 要:** 人类多发性骨髓瘤是一种难以治愈的 B 淋巴细胞恶性分化的疾病, 其细胞遗传学特征表现在染色体异常. 原癌基因 *c-maf* 在多发性骨髓瘤细胞中高水平表达, 其编码的 c-Maf 蛋白作为转录因子, 通过作用于 5 个下游靶基因 *CCND2*、*ITGB7*、*CCR1*、*SPPI* 和 *ARK5*, 与细胞周期调控、肿瘤细胞的黏附性、肿瘤侵袭和转移、血管发生等方面有关. 原癌基因 *c-maf* 和 / 或 c-Maf 蛋白有可能作为治疗多发性骨髓瘤的新靶点.

**关键词:** 原癌基因; *c-maf*; c-Maf 蛋白; 多发性骨髓瘤

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)06-0554-04

## Advances on the *c-maf* Proto-oncogene in Multiple Myeloma

QU Qiang, HU Wei-xin\*

(Molecular Biology Research Center, College of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

**Abstract:** Human multiple myeloma is an incurable disease of malignant differentiated B lymphocytes. Its cytogenetics is characterised by chromosomal abnormalities. The *c-maf* proto-oncogene is expressed at high level in multiple myeloma cells. As a transcription factor, the c-Maf protein through the five downstream target genes: *CCND2*, *ITGB7*, *CCR1*, *SPPI* and *ARK5*, is involved in cell cycle regulation, adhesion of tumor cells, tumor invasion and metastasis, angiogenesis and other aspects. The *c-maf* proto-oncogene and / or c-Maf protein may be a novel therapeutic target in multiple myeloma.

**Key words:** proto-oncogene; *c-maf*; c-Maf protein; multiple myeloma

(Life Science Research, 2009, 13(6): 554~557)

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是 B 淋巴细胞恶性分化的疾病, 其特征是恶变浆细胞在骨髓中恶性增殖, 产生单克隆免疫球蛋白, 侵犯骨髓, 产生溶骨性病变<sup>[1]</sup>. 细胞遗传学研究发现, 几乎所有的 MM 患者均有染色体异常改变, 其检出率高达 90% 以上. MM 细胞中, 染色体异常又分为染色体数目异常和结构异常两种, 染色体数目异常有超二倍体、亚二倍体、假二倍体等; 染色体结构上的异常则包括插入、缺失、重排、易位等<sup>[2]</sup>. 其中, 约 73.9% 的 MM 患者和 80%

的 MM 细胞系, 可以检测到染色体 14q32 的免疫球蛋白重链 (IgH) 基因位点发生易位, 由此累及的基因众多, 如 *CCND1* (11q13)、*CCND3* (6p21)、*c-myc* (8q24) 等<sup>[3,4]</sup>. 这些基因的异常表达可以引发或参与多种信号转导途径, 影响细胞增殖与凋亡, 促使细胞持续分裂, 最终导致 MM 的发生、发展. 已知在 5%~10% 的 MM 病人中, 位于 16q23 的原癌基因 *c-maf* 也是由于 14q32 的 IgH 基因易位而出现异常表达, 但 Hurt 等<sup>[5]</sup>发现, 在 50% 的 MM 病人骨髓样本中可以检测到 *c-maf* 高

收稿日期: 2009-04-10; 修回日期: 2009-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30770906)

作者简介: 屈强 (1983-), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事多发性骨髓瘤分子机制的研究, E-mail: quqiang1983@sina.com; \* 通讯

作者: 胡维新 (1950-), 男, 湖南汝城人, 中南大学教授, 博士生导师, 主要从事白血病和多发性骨髓瘤分子机制研究, Tel: 0731-

23552801, E-mail: weixinhu@yahoo.com.cn or weixinhu@hotmail.com

水平表达。原癌基因 *c-maf* 在 MM 细胞中的异常高表达,可能与 MM 的发生和发展密切相关。因此,了解原癌基因 *c-maf* 的分子结构及其在 MM 中作用机制的研究,对于探寻 MM 的病因和合理治疗方案具有十分重要的意义。

## 1 原癌基因 *c-maf* 与 c-Maf 蛋白的结构与功能

原癌基因 *c-maf* 是病毒癌基因 *v-maf* (musculo aponeurotic fibrosarcoma) 在细胞内的同源基因。*v-maf* 是禽类逆转录病毒 AS42 的转化基因,从鸡纤维肉瘤中分离得来<sup>[6]</sup>。采用 *v-maf* 特异性 DNA 探针,筛选到人和鸡的基因组中与 *v-maf* 同源的基因,命名为 *c-maf*。*c-maf* 基因编码的 c-Maf 蛋白是碱性亮氨酸拉链 (Basic Leucine Zipper, bZIP) 转录因子超家族中的成员。Maf 家族蛋白有两类,一类是大 Maf 蛋白 (>200 个氨基酸),如 c-Maf、MafA、MafB、NRL、L-Maf。另一类为

小 Maf 蛋白 (<200 个氨基酸),如 MafF、MafG、MafK 等<sup>[7-9]</sup>。

c-Maf 蛋白具有 4 个结构域:反式激活作用域 (Transactivation Domain, TAD)、组氨酸/甘氨酸重复域 (Histidine/Glycine Repeats Domain)、延伸同源区 (Extended Homology Region, EHR) 和碱性亮氨酸拉链 (bZIP) 结构 (图 1)。反式激活作用域位于 c-Maf 蛋白 N 端,具有由丰富的脯氨酸、丝氨酸和色氨酸残基组成的 P/S/T 酸性结构,有促进转录激活的功能。组氨酸/甘氨酸重复域其功能还不甚明了。延伸同源区由疏水氨基酸形成,能与 DNA 特异性结合,是 Maf 蛋白区别于其他 bZip 超家族成员的特殊结构。位于 C 端的碱性亮氨酸拉链 (bZIP) 结构是 Maf 蛋白家族与其他 bZip 家族同源性最高的区域,c-Maf 通过该结构可以形成同源二聚体或与其他 bZip 家族成员形成异源二聚体,再与 DNA 结合<sup>[6]</sup>。

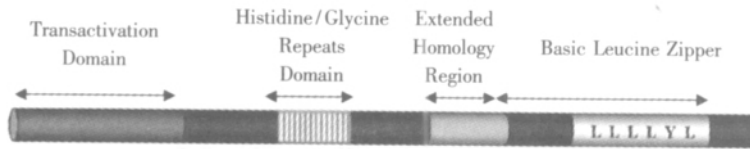


图 1 c-Maf 蛋白基本结构<sup>[8]</sup>

Fig.1 Basic structure c-Maf protein<sup>[8]</sup>

c-Maf 形成的二聚体主要通过 Maf 反应元件 (Maf responsive element, MARE) 结合而发挥转录激活的功能。MARE 包括 TRE (TPA responsive element, T-MARE) 和 CRE (cAMP responsive element, C-MARE)。TRE 是由 13 个碱基组成的回文序列 (TGCTGACTCAGCA), Maf 蛋白通过 bZIP 结构中的碱性结构结合到 TRE 两翼的 GC 序列,中间的核心序列能被 AP-1 家族蛋白 c-Jun 或 c-Fos 等识别。CRE 则是由 14 个碱基组成的回文序列 (TGCTGACGTCAGCA), Maf 蛋白通过 bZIP 结构中的碱性结构结合到 CRE 两翼的 GC 序列,中间的核心序列能被 CREB 等蛋白识别<sup>[6]</sup>。

## 2 原癌基因 *c-maf* 在多发性骨髓瘤中的作用机制

如前所述,原癌基因 *c-maf* 在 50% 的 MM 病人骨髓标本中出现异常高表达。已知仅有 5%~10% 的 MM 病例,是由于易位 t(14;16)(q32;q23) 的发生,使得位于 16q23 的 *c-maf* 基因获得

了位于 14q32 的 IgH 基因 3' 端转录增强子,从而导致 *c-maf* 出现高表达<sup>[4]</sup>。另外没有发生 IgH 易位的 MM 细胞中存在其它的因子对 *c-maf* 的表达调控。Moreaux 等<sup>[10]</sup> 研究发现,在 MM 细胞系 LP1 和 OPM2 中,由 B 细胞激活因子 (BAFF) 或增殖诱导配体 (APRIL) 激活的 TNF 超家族 13B (TNFSF13B/TACI) 对 *c-maf* 有转录激活作用,导致 *c-maf* 表达增高。Carrascod 等<sup>[11]</sup> 发现在 XBP-1 (X-box binding protein-1) 转基因鼠的淋巴细胞中,c-Maf 和 MAFB 也都出现高表达。提示 XBP-1 高表达对 *c-maf* 基因表达有促进作用。

在高表达 *c-maf* 的 MM 细胞中,作为转录因子的 c-Maf 蛋白通过上调其下游 *CCND2* 等靶基因的表达,参与 MM 的细胞周期调控、肿瘤细胞的黏附、肿瘤侵袭和转移、新血管发生等过程,从而在 MM 发生和发展中起重要作用。

### 2.1 c-Maf 与 *CCND2* 基因

Cyclin D 可分为 Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3,分别由 11q13 的 *CCND1*、12p13 的

*CCND2* 和 6p21 的 *CCND3* 基因编码。Hurt 等<sup>[5]</sup> 研究发现, *CCND2* 基因启动子区存在 MARE 序列。通过构建携带 *c-maf* 基因的表达载体瞬时转染 MM 细胞系 LP-1 和 H929, 发现 *c-Maf* 能反式激活 *CCND2* 基因, 促进 *CCND2* 的表达。将 MARE 的中间序列突变, *c-Maf* 蛋白反式激活 *CCND2* 基因启动子受阻。将 *c-maf* 通过逆转录病毒转导至无 *c-maf* 表达的 MM 细胞系 L363 和 KMS12 中, 细胞分裂和 DNA 的合成增加。由此可知, *c-Maf* 能调控下游靶基因 *CCND2* 的表达。

浆细胞恶性转化形式有两类, 一类是以细胞自主形式增强 MM 细胞增殖。浆细胞分化伴随着周期依赖性激酶抑制因子 p18 的正调节。p18 纯合缺失及骨髓瘤细胞二次突变累及 *CCND1*、*CCND3* 基因, 影响 MM 细胞周期<sup>[12]</sup>。另一类是 *c-Maf* 反式激活 *CCND2* 基因表达, Cyclin D 2 与 CDK 蛋白结合形成复合体, 促使细胞从 G1 向 S 期转换。*c-Maf* 蛋白诱导细胞增殖是通过促进细胞周期而不是通过抑制细胞凋亡。3 种细胞周期蛋白 D 在 MM 细胞中都高表达, 表明细胞 G1/S 转换在 MM 的发生中是重要而常见的致癌步骤。肿瘤是一类细胞周期疾病, *c-Maf* 对下游靶基因 *CCND2* 的表达调控, 提示原癌基因 *c-maf* 对细胞周期具有调控作用。

## 2.2 *c-Maf* 与 *ITGB7* 基因

整合素(integrin)是一类细胞表面糖蛋白, 由  $\alpha$ 、 $\beta$  两条肽链通过非共价键连接成的异源二聚体, 其中  $\alpha$ 、 $\beta$  链均为 类跨膜蛋白。已知整合素  $\alpha E\beta 7$  能与 E-钙黏蛋白(E-cadherin)结合<sup>[13]</sup>。Monterio 等<sup>[14]</sup> 研究发现高水平表达的 *c-Maf* 能结合整合素  $\beta 7$ (*integrin* $\beta 7$ , *ITGB7*)基因启动子区的 MARE 序列, 促进 *ITGB7* 表达。Hurt 等<sup>[5]</sup> 发现表达 *c-maf* 的 MM 细胞系 H929 和 LP-1 能结合到涂有 E-cadherin 的平板, 而缺少 *c-maf* 表达的 MM 细胞系 L363 和 KMS12 不能结合。采用逆转录病毒将 *c-maf* 导入 L363 和 KMS12, 这些细胞系又能和涂有 E-cadherin 的平板结合。MM 细胞生长依赖骨髓基质细胞, 而 *c-Maf* 通过调节整合素  $\alpha E\beta 7$  和 E-钙黏蛋白的结合增强了 MM 细胞和骨髓基质细胞的黏合, *ITGB7* 与配体特异性结合后还可通过蛋白激酶 C(PKC)、局灶黏附激酶(FAK)等途径传递信号<sup>[13]</sup>, 影响细胞运动, 改变细胞形态、迁移、增殖和凋亡, 这些对探索 MM 肿瘤侵袭和转移机制有重要意义。*c-Maf* 通过调

节 *ITGB7* 的表达, 还刺激了血管内皮细胞生长因子(VEGF)的分泌。MM 和基质细胞以自分泌和旁分泌的形式分泌 VEGF, 能促进血管的生成, 维持肿瘤细胞的生存和增殖<sup>[15]</sup>。

## 2.3 *c-Maf* 与 *CCR1* 基因

*CCR1* 和 *CCR5* 基因, 表达产物是趋化因子单核细胞炎性蛋白  $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) 的受体。MIP-1 $\alpha$  与其受体 *CCR1*、*CCR5* 结合, 促进破骨细胞的生成和 MM 细胞与骨髓基质细胞黏附<sup>[16]</sup>。MM 细胞中高表达的 *c-maf* 可上调 *CCR1* 基因表达水平, 增加 MM 细胞对 MIP-1 $\alpha$  的敏感性。MIP-1 $\alpha$  通过上调 p16 基因的表达, 使细胞阻滞于 G<sub>0</sub> 期, 提高细胞对周期特异性化疗药的耐受性。MM 患者的肿瘤细胞中发现了高水平的 MIP-1 $\alpha$ , *c-Maf* 是否通过上调 *CCR1* 基因表达来刺激自分泌 MIP-1 $\alpha$ , 有待进一步研究。这对于揭示 MM 对周期特异性化疗药的耐药性机制有重要作用。

## 2.4 *c-Maf* 与 *SPP1* 基因

SPP1(secreted phosphoprotein 1)又称为骨桥蛋白(osteopontin, OPN), 是一种分泌性钙结合糖磷酸化蛋白, 分子中含有特征性的与细胞黏附有关的 Arg-Gly-Asp(RGD)序列。OPN 是由破骨细胞、成骨细胞和免疫细胞产生的, 对 MM 细胞生长、存活都起到关键性作用。Robbiani 等<sup>[17]</sup> 发现, 在 *c-maf* 高表达的 MM 细胞系中, OPN 表达水平高。将 OPN 基因的部分启动子区克隆并构建荧光素酶报告基因表达载体, 细胞仅转染报告基因载体后检测发现其荧光强度很微弱, 而共转染携带有 *c-maf* 基因的表达载体后, 荧光强度是以前的 14.8 倍。*c-Maf* 可上调 MM 细胞中 OPN 的转录水平, 增强 OPN 与 IL-6 的联合作用, 促进 MM 细胞生长、存活, 促进肿瘤细胞的黏附、迁移和血管发生等。由于 MM 细胞获得自分泌 OPN 的能力, 减少了 MM 细胞对富含 OPN 的骨髓微环境的依赖和破骨细胞的激活作用。因此, 在高表达 OPN 的 MM 病人中, 骨溶现象反而减少。

## 2.5 *c-Maf* 与 *ARK5* 基因

AMP 激活蛋白酶 5(ARK5)是 AMP 激活蛋白酶(AMPK)家族第 5 个成员。ARK5 能激活基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和基质金属蛋白酶 9(MMP-9), 并刺激其共分泌。基质金属蛋白酶(MMP)不但具有基质降解活性, 在肿瘤侵袭转移中起关键性作用, 而且是一种很强的血管新生和骨吸收的诱导因子。Suzuki 等<sup>[18]</sup> 发现在 MM 细胞系中,

ARK5 表达增高,同时 *c-Maf* 和 *MAFB* 也出现高表达. 采用基因表达谱分析发现 351 例 MM 临床样本中也出现 *ARK5* 和 *c-Maf* 表达同时增高. *ARK5* 基因启动子区有两个 MARE 序列,染色质免疫沉淀(ChIP)发现 *c-Maf* 能结合 *ARK5* 基因启动子区的 MARE 序列. 将构建好的 *Maf* 表达载体转入无 *ARK5* 表达的结肠癌细胞系 HCT-116 和 DLT-1,能导致 *ARK5* 表达增高;使 *ARK5* 基因启动子区 MARE 序列突变或使其缺失,*ARK5* 表达降低. 上述结果表明,*ARK5* 基因是 *c-Maf* 的下游靶基因.

### 3 展望

目前,在 MM 细胞中调控 *c-maf* 基因表达的上游分子以及 *c-Maf* 蛋白所调控的下游靶基因仍在深入研究中,这对于完全阐明 *c-maf* 基因在 MM 发生发展中的作用,利用 *c-maf* 进行 MM 的辅助诊断和预后判断,以及将 *c-Maf* 作为一个新的治疗 MM 的药物靶点等,都具有十分重要的意义. 例如, Mao 等<sup>[19]</sup>从 2 400 种药物中经过筛选发现:糖皮质激素能降低表达 *c-Maf* 的 MM 细胞活力,并降低 *c-Maf* 的靶基因 *CCND2* 和 *ITGB7* 的表达水平. 进一步研究表明,糖皮质激素能通过调节泛素水平来促进 *c-Maf* 的降解,进而控制细胞周期,减少 MM 细胞的增殖和生存,降低 MM 细胞的耐药性,干扰 MM 细胞与基质细胞的黏附,减少 VEGF 分泌和新血管的生成. 因此,基于 *c-maf* 基因在 MM 细胞中调控网络的深入研究将为 MM 的临床早期诊断、治疗、预后判断提供一种可靠的分子水平的依据. 针对于 *c-Maf* 蛋白的药物的研究开发将更深入,这些药物将在 MM 的治疗上有着非常广泛的应用前景.

### 参考文献 (References):

- [1] HIDEHISHI T, MITSIADIS C, TONON G, *et al.* Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7 (8): 585-598.
- [2] CHANG H, QI Q, XU W, *et al.* *c-Maf* nuclear oncoprotein is frequently expressed in myeloma[J]. *Leukemia*, 2007, 21: 1572-1574.
- [3] GABREA A, BERGSAGEL P L, KUEHLA W M, *et al.* Distinguishing primary and secondary translocations in multiple myeloma[J]. *DNA Repair*, 2006, 5: 1225-1233.
- [4] MEYER N, PENN L Z. Reflecting on 25 years with MYC[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, (8): 976-990.
- [5] HURT E M, WIESTNER A, ROSENWALD A, *et al.* Overexpression of *c-maf* is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma[J]. *Cancer Cell*, 2004, 5: 191-199.
- [6] NISHIZAWA M, KATAOKA K, GOTO N, *et al.* *v-maf*, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 7711-7715.
- [7] KATAOKA K. Multiple mechanisms and functions of *maf* transcription factors in the regulation of tissue-specific genes [J]. *J Biochem*, 2007, 141(6): 775-781.
- [8] BLANK V. Small *maf* proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators[J]. *J Mol Biol*, 2008, 376: 913-925.
- [9] LI W G, YU S W, LIU T, *et al.* Heterodimerization with small *Maf* proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1783: 1847-1856.
- [10] MOREAUX J, HOSE D, JOURDAN M, *et al.* TAC1 expression is associated with a mature bone marrow plasma cell signature and C-MAF overexpression in human myeloma cell lines[J]. *Haematologica*, 2007, 92(6): 803-811.
- [11] CARRASCO D R, SUKHDEO K, PROTOPOPOVA M, *et al.* The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11: 349-360.
- [12] KULKARNI M S, DAGGETT J L, BENDER T P, *et al.* Frequent inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p18 by homozygous deletion in multiple myeloma cell lines: ectopic p18 expression inhibits growth and induces apoptosis[J]. *Leukemia*, 2002, 16: 127-134.
- [13] HOOD J D, CHERESH D A. Role of integrins in cell invasion and migration[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 91.
- [14] MONTEIRO P, GILOT D, LE F E, *et al.* AhR and *c-maf* dependent induction of beta7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358 (2): 442-448.
- [15] PODAR K, TAI Y T, LIN B K, *et al.* Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin-and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7875-7881.
- [16] MENU E, DE L E, DE R H, *et al.* Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: a study in the 5TMM model[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23 (5-6): 291-300.
- [17] ROBIANNI D F, COLON K, ELY S, *et al.* Osteopontin dysregulation and lytic bone lesions in multiple myeloma[J]. *Hematol Oncol*, 2007, 25: 16-20.
- [18] SUZUKI A, IIDA S, KATO-URANISHI M, *et al.* *ARK5* is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: *ARK5* as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma[J]. *Oncogene*, 2005, 24: 6936-6944.
- [19] MAO X, STEWART A K, HURREN R, *et al.* A chemical biology screen identifies glucocorticoids that regulate *c-maf* expression by increasing its proteasomal degradation through up-regulation of ubiquitin[J]. *Blood*, 2007, 110: 4047-4054.