

乳腺癌与卵巢癌易感基因 BRCA1 和 BRCA2

周纪东 郑婵颖* 李永泉

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012 *浙江大学医学院 杭州 310031)

乳腺癌是妇女中常见的三大高发性癌症之一,其发病率在许多国家和地区中居女性恶性肿瘤的首位,而致死率极高的卵巢癌则是第四大女性癌症,这两大癌症严重危害着妇女的健康和生命。流行病学研究发现,约有 5% - 10% 的乳腺癌患者具有家族史,3% - 13% 卵巢癌病例是遗传性的。1984 年癌症学家首次提出染色体缺陷与遗传性卵巢癌密切相关,并揭示卵巢癌与乳腺癌之间存在着密切的基因联系。1990 年 Hall 等发现 17 号染色体长臂与遗传性乳腺癌具有极大的相关性,1994 年 Miki 等^[1]在此位置上首次定位克隆 BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) 基因,次年 Wooster 等^[2]又发现另一个易感基因 BRCA2 (breast cancer susceptibility gene 2)。近年来,大量研究表明 BRCA1 和 BRCA2 基因结构、功能的异常与约 80% 的遗传性乳腺癌、50% 的遗传性卵巢癌和部分散发性乳腺癌的发生具有密切的关系。由此,BRCA 基因研究已成为乳腺癌和卵巢癌研究领域的主导方向和重要突破口。

一、BRCA1 和 BRCA2 基因的结构和表达产物

1. BRCA1 和 BRCA2 基因的定位和结构^[1,2]

BRCA1 基因位于 17 号染色体长臂 12 - 21 区,基因组 DNA 长约 80kb,编码区 5711bp,共有 24 个外显子,其中 22 个转录为 7.8kb 长的 mRNA,编码蛋白含有 1863 个氨基酸。BRCA2 基因位于 13 号染色体长臂 12 - 13 区,基因组 DNA 长约 70kb,编码区 10987bp,共有 27 个外显子,mRNA 长约 10kb,编码蛋白含有 3418 个氨基酸。BRCA1 和 BRCA2 的第 11 外显子都非常大,前者的外显子 11 长 3426bp,后者的外显子 11 长 4932bp。两者的翻译起始点均都在第 2 外显子上,且编码区均富含 AT 碱基,前者约含 59%,后者约含 64%。

2. BRCA1 和 BRCA2 蛋白的特征性结构域

BRCA1 蛋白约有 190kD,其 N 端含有一个富含半胱氨酸和组氨酸的环指域(RING finger domain),是蛋白质-蛋白质或蛋白质-DNA 相互作用的主要作用域(图 1)。该结构域具有典型的 C3HC4 锌指

结构,即含有 3 个半胱氨酸残基、1 个组氨酸残基、4 个半胱氨酸残基^[1]。小鼠 Brca1 的环指域在泛素接合酶(ubiquitin conjugating enzyme)参与下,能在体外进行遍在蛋白化(ubiquitination)。因此,BRCA1 的环指域可能具有泛素蛋白连接酶(ubiquitin protein ligase)功能,由蛋白体(proteasome)连接靶蛋白来进行降解^[3]。另外,该环指域还能结合泛素水解酶 BAP1 (BRCA1-associated protein 1) 和 BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1) 蛋白。在遗传性乳腺癌和散发性卵巢癌中发现造成环指域第 61、64 半胱氨酸置换的错义突变,这暗示环指域对于 BRCA1 功能的重要性。BRCA1 外显子 11 上编码有两个核定位信号(NLS1 和 NLS2),其中 NLS1 能与核转运信号受体亚基 importin- α 相互作用,是 BRCA1 核转运所需的^[4]。此外,外显子 11 所编码的氨基酸残基 758 - 1064 还参与 BRCA1 与 DNA 损伤修复蛋白 RAD51 的结合。BRCA1 蛋白 C 端含有两个长约 95 个氨基酸残基的 BRCT(BRCA1 C-terminal)基元序列。在一些参与应答 DNA 损伤和具有细胞周期检验点功能的蛋白 C 端均发现 BRCT,如 53BP1(p53 binding protein 1)、DNA 修复蛋白 XRCC1(X-ray cross-complementing 1)等^[4],这暗示 BRCA1 蛋白也可能具有上述功能。

BRCA2 外显子 3 所编码的第 23 - 105 氨基酸残基与转录因子 c-Jun 的转录活性区域序列相似,由此推测 BRCA2 可能具有相似的功能^[5]。BRCA2 外显子 11 编码有 8 个含有 30 - 80 个氨基酸残基的 BRC 基元序列。BRC 重复序列在哺乳类 BRCA2 蛋白间是保守的,也是 BRCA2 蛋白结合 RAD51 的主要位点,对于这两个蛋白发挥其正常功能至关重要^[6]。此外,在小鼠 Brca2 蛋白 C 端还发现一个次要的 RAD51 结合位点。BRCA2 蛋白近 C 端也含有一个 NLS,可帮助 RAD51 转运到细胞核中并定位于 DNA 损伤位点。

3. BRCA1 和 BRCA2 基因的时空表达模式

BRCA1 和 BRCA2 在人的多数组织中均有不同程度的表达,通常在胸腺和睾丸中表达量最高,乳腺和卵巢中表达中等^[1]。在小鼠胚胎发育过程中,两

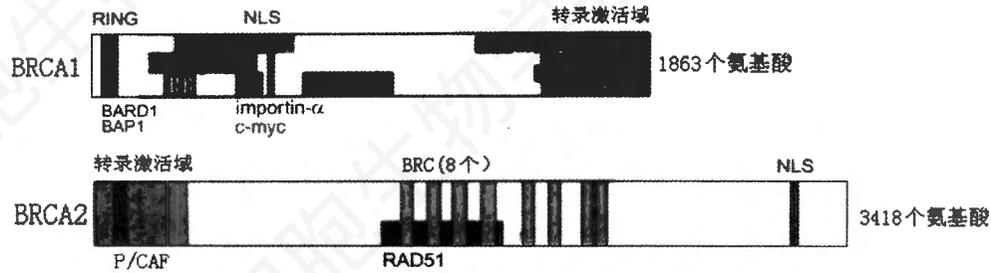


图1 BRCA1 和 BRCA2 蛋白的结构及其特异性作用域

者在快速增殖的组织尤其是乳腺上皮细胞的增殖分化过程中表达量最高。在乳腺发育过程中,两者的表达在青春期和怀孕期中受到诱导而增强,而在分娩后哺乳期中则降低^[7]。两者表达的空间模式也基本相似,主要集中在上皮组织,只有在脑组织中 BRCA2 表达而 BRCA1 不表达。

二、BRCA1 和 BRCA2 蛋白 与细胞周期调控

细胞周期的运转是按照 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ 的顺序周而复始地进行。 G_1/S 过渡期中 BRCA1 通过转录因子 E_2F 的作用和细胞周期蛋白-CDK_s 复合物的磷酸化来参与细胞周期调控,抑制细胞进入增殖周期,进而阻止细胞分裂,促使其终末分化,诱发细胞凋亡^[8]。另外, BRCA1 也可通过控制有丝分裂中纺锤体组装及染色体准确分配给子细胞,来调控 G_2/M 检验点。当小鼠胚胎成纤维细胞在删除 *Brca1* 外显子 11 后,仍含有完好的 G_1/S 检验点,但 G_2/M 检验点失效。有丝分裂细胞中 BRCA1 与 G_2/M 检验点蛋白成视网膜细胞瘤蛋白(RB)共同定位于中心体上,并与中心体的 γ 微管蛋白(γ tubulin)相互作用。由此推测,缺陷的 BRCA1 蛋白可能通过使中心体复制失控来造成染色体分配不均衡和异倍化,从而阻滞细胞正常的周期进程^[9]。此外, BRCA2 突变也可能导致有丝分裂检验点的失效。*Brca2*^{-/-} 小鼠的肿瘤细胞不仅丧失纺锤体组装检验点,而且其他有丝分裂检验点基因 p53、Bub1 和 Mad3L 等也发生突变。这些检验点基因是用来检测着丝粒的活性,以监控染色体是否与纺锤体正确排列^[10]。

Brca1^{-/-} 或 *Brca2*^{-/-} 小鼠胚胎在原肠胚形成前即已死亡,表现出细胞增殖缺陷和依赖 p53 调控的细胞周期负调控子 p21 的激活。通过基因打靶实验发现 p21 和 p53 缺陷可部分地回复 *Brca1* 或 *Brca2* 突变表型。由此推测,当细胞中 *Brca1* 或 *Brca2* 发生突变,其表达的缺陷产物就丧失修复 DNA 损

伤的能力。同时, DNA 损伤诱导 G_1/S 检验点基因 p53 表达,进而诱导 p21 表达,使细胞周期停滞以便修复 DNA 损伤,如无法修复则诱发细胞凋亡,表现在 *Brca1*^{-/-} 或 *Brca2*^{-/-} 小鼠胚胎不能存活。而一旦 p53 和 p21 等检验点基因也因突变而失效,细胞就会容忍 DNA 损伤的积累而继续细胞周期,任由缺陷细胞大量增殖转化,从而可能导致肿瘤发生^[11]。

三、BRCA1 和 BRCA2 基因 与小鼠发育

Brca1^{+/-} 和 *Brca2*^{+/-} 杂合小鼠发育正常,能够生育,未发生乳腺癌和卵巢癌。反之, 8.5 天的 *Brca1*^{-/-} 胚胎与正常胚胎相比显得发育不全, 9.5 天的 *Brca1*^{-/-} 胚胎发育已明显滞后或停滞, 10.5 天的 *Brca1*^{-/-} 胚胎已没有跳动的心脏, 而且在 9.5 - 10.5 天期间多数表现出神经管完全没有闭合以及不同程度的无脑或脊柱裂。*Brca1*^{-/-} 胚胎的畸形和致死表明 *Brca1* 在发育早期影响着生长和分化, 而且可能在神经管道形成中为引导神经上皮细胞的分化提供信号^[12]。

同样, *Brca2*^{-/-} 胚胎在 6.5 天时是正常的, 在 7.5 天时有 25% 的胚胎表现出缺少羊膜、尿囊、绒毛膜, 且体壁的中胚层和内脏的体积均缩小, 并在胚胎经历细胞增殖最快之时出现发育完全停滞。相对而言, *Brca2*^{-/-} 胚胎表现得没有 *Brca1*^{-/-} 胚胎那样严重, *Brca2* 突变更能为小鼠发育所容忍, 少数纯合突变小鼠可存活至成年, 但其在 12 - 14 周时也发生胸腺淋巴瘤。因此, *Brca1* 和 *Brca2* 是小鼠正常发育所必不可少的^[13]。但对于人类而言, 两者似乎并不是必需的, 因为已发现一个 *Brca1* 纯合缺失的妇女, 其发育正常, 直到 32 岁才被诊断为乳腺癌^[14]。

四、BRCA1 和 BRCA2 蛋白 与 DNA 损伤修复

BRCA1 和 BRCA2 蛋白在 DNA 损伤修复和同

源重组中的功能,体现在两者与已知参与这些过程的蛋白间的相互作用。其中研究最为透彻的就是两者与 DNA 修复蛋白 RAD51 的关联。RAD51 是细菌 RecA 蛋白和酵母 ScRad51 蛋白的同源蛋白,是有丝分裂及减数分裂中 DNA 重组和双链 DNA 损伤修复(double-strand break repair, DSBR)所必需的^[15]。在有丝分裂细胞的 S 期中, BRCA1、BRCA2 和 RAD51 以点状模式共同定位于细胞核的转化灶中。而在减数分裂中,三者则在联会复合体形成之前就与未联会的轴向分子(axial element)相结合。如同 *Brc1*^{-/-} 或 *Brc2*^{-/-} 小鼠胚胎, *Rad51*^{-/-} 小鼠胚胎在发育早期中也已致死,而且具有相似的表现和发育停滞时间。另外, *Rad51*^{-/-} 小鼠胚胎与 *Brc2*^{-/-} 小鼠胚胎相似,对 γ 射线高度敏感。综上所述, BRCA1、BRCA2 蛋白与 RAD51 可能在同一途径中发挥作用,共同参与 DNA 损伤修复^[16]。

哺乳类细胞中有两个完全不同的 DNA 损伤修复途径^[17]: 同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)。其中, NHEJ 是哺乳类细胞中参与 DSBR 的主要途径。如上所述, RAD51 是同源重组中的关键蛋白。因此,可以确定 BRCA1 和 BRCA2 是通过 HR 途径来发挥其 DNA 损伤修复功能。少数存活的 *Brc1*^{-/-} 小鼠胚胎干细胞,表现出 HR 的衰减和应答特异位点损伤的单链退火(single-strand annealing)。而依赖 HR 的基因打靶却能在相同干细胞中因外源野生型 *Brc1* 的表达而增强^[18]。此外, BRCA1 还与另一 DNA 修复蛋白复合物 RAD50-MRE11-NBS1 相互作用,共同定位在不含 RAD51 的核转化灶中。由于该复合物与 HR 和 NHEJ 均有关,故推测 BRCA1 还可能参与 NHEJ 途径^[19]。

当正常的哺乳类细胞受到电离辐射如紫外线或 γ 射线和化疗如羟基脲(hydroxyurea)的作用,可能会造成胞内双链 DNA 损伤和复制停滞所致的单链 DNA 损伤,从而激活 S 期检验点蛋白 ATM(ataxia telangiectasia mutated)和 ATR(ataxia telangiectasis Rad3-related)。这两个激酶是 HR、NHEJ 途径和细胞周期调控中多个检验点激活的“传感器”^[19]。在该 DNA 损伤应答途径中,传感蛋白 ATM 和 ATR 首先促使 BRCA1 高磷酸化,然后磷酸化的 BRCA1 与 RAD51、BRCA2 和 BARD1 形成蛋白复合物,从转化灶中快速转运并定位到染色体上 DNA 损伤区域,由此开始修复 DNA 损伤的 HR 途径^[3]。

五、BRCA1 和 BRCA2 蛋白与转录调控

BRCA1 能与 RNA 解旋酶 A(RNA helicase A, RHA)、转录阻遏蛋白 CtIP(C-terminal interacting protein)和含有 SWI/SNF 的染色质重塑复合物相互作用^[3,6],表明其可能是一个转录调控子。当 BRCA1 的 3' 端发生突变,可降低 BRCA1-RHA 的结合度。当 BRCA1 与 GAL4 蛋白的 DNA 结合域融合,其 C 端可诱发哺乳类和酵母细胞中报告质粒的转录。此外, BRCA1 还是转录的激发子:当其与 p53 共同转染,可诱发从 p21 和 MDM2 启动子下游克隆而来的报告基因的转录^[20]。反之, BRCA1 因发生截短突变而使其蛋白丧失转录激活域 C 端,就不能诱发报告基因的转录。此外,在酵母和哺乳类细胞中 BRCA1 能通过结合促进细胞增殖的转录因子 c-MYC 来阻遏 c-MYC 介导的转录,这揭示 BRCA1 转录调控功能与肿瘤抑制间的某种关联^[4]。目前还尚未确定 BRCA2 是否是转录调控子。BRCA2 外显子 3 的编码产物,与 LexA 蛋白的 DNA 结合域融合,可在酵母中激活转录。自然发生的 BRCA2 错义突变可降低其转录激活能力。另外,来自瑞典患有遗传性乳腺癌-卵巢癌综合症的家族中所发现 BRCA2 外显子 3 被天然敲除的事实^[21],进一步证实 BRCA2 外显子 3 的重要性,同时也暗示推测中外显子 3 所编码的转录激活域丧失,可能与肿瘤发生有关。

设想 BRCA1 和(或)BRCA2 是转录调控子,那么其作用机理又是什么? 研究表明 BRCA1 可能抑制依赖雌激素的启动子转录^[22]。然而尚不清楚 BRCA1 是否直接抑制依赖雌激素的转录,或者仅是作为一个非特异转录阻遏蛋白。同时, BRCA1 与组蛋白脱乙酰基酶复合物和具有组蛋白脱乙酰基转移酶功能的 CBP(CREB-binding protein)相互作用的事实^[4,23],表明其可能具有另一转录调控机理。BRCA1 将组蛋白脱乙酰基酶复合物招募到特异启动子上,酶复合物对核心组蛋白进行脱乙酰基作用,以调整染色质的结构,使 DNA 更少地接近转录酶,从而抑制 DNA 转录。反之, BRCA1 从激活的启动子上不断地运走组蛋白脱乙酰基酶复合物来帮助激活 DNA 转录。同样地, BRCA2 也是通过调整组蛋白的乙酰基来激活 DNA 转录。另外, BRCA2 还能与具有组蛋白乙酰基化酶功能的转录辅激活蛋白 P/CAF(p300/CBP-associated factor)相互作用^[24]。综上所述

述, BRCA1 和 BRCA2(可能)具有转录调控功能,且该功能可能是肿瘤抑制机制的重要环节。因此,对 BRCA1 或 BRCA2 介导的转录调控下游靶标的鉴定,将有助于阐明 BRCA1 和 BRCA2 的肿瘤抑制功能。

六、结束语

乳腺癌和卵巢癌易感基因 BRCA1 和 BRCA2 的发现和对于阐明乳腺癌和卵巢癌的发病机制有着极其重要的意义。迄今所知,两者与细胞周期调控、胚胎生长发育、DNA 损伤修复和转录调控等生命活动有关。尽管如此,目前在该研究领域中仍有一些有关 BRCA1 和 BRCA2 的生物学疑问困扰着研究人员:①当 BRCA1 和 BRCA2 发生突变后,为什么如此普遍表达和参与细胞中普遍途径的基因却会特异地导致乳腺癌和卵巢癌的发生?②为什么 BRCA1 和 BRCA2 无效的小鼠在胚胎早期即已死亡,而 BRCA1 和 BRCA2 无效的乳腺和卵巢细胞却会发育成肿瘤?③为什么一些完全丧失 BRCA1 或 BRCA2 功能的乳腺和卵巢上皮细胞能存活下来,而同样丧失 BRCA1 或 BRCA2 功能的胚胎细胞却完全死亡?④鉴于发现 BRCA1 纯合缺失的乳腺癌患者,由此猜测以小鼠为模型的功能研究所获得的结果能否完全反映在人类中的真实情况?总之,随着该领域研究的进一步深入以及 BRCA1 和 BRCA2 肿瘤抑制功能的阐明,上述疑问必将迎刃而解,从而能早期诊断和基因治疗乳腺癌和卵巢癌患者。

摘要

BRCA1 和 BRCA2 是近年来发现的遗传性乳腺癌和卵巢癌易感基因,分别位于第 17 号和第 13 号染色体上。目前所知,两者与细胞周期调控、胚胎生

长发育、DNA 损伤修复和转录调控等生命活动有关。随着 BRCA1 和 BRCA2 研究的不断深入和其确切生物学功能的阐明,将在临床上帮助早期诊断和有效治疗乳腺癌和卵巢癌患者。

参考文献

- [1] Miki, Y. et al., 1994, *Science*, **266**:66-71.
- [2] Wooster, R. et al., 1995, *Nature*, **378**:789-792.
- [3] Welsh, P. L. et al., 2000, *Trends. Genet.*, **16**:69-74.
- [4] Schuyer, M. et al., 1999, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **155**:143-152.
- [5] Milner, J. et al., 1997, *Nature*, **386**:772-773.
- [6] Wong, A. K. C. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:31941-31944.
- [7] Rajan, J. V. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**:13078-13083.
- [8] Wang, H. et al., 1997, *Oncogene*, **15**:143-157.
- [9] Hsu, L. C. et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**:12983-12988.
- [10] Lee, H. et al., 1999, *Mol. Cell*, **4**:1-10.
- [11] Brugarolas, J. et al., 1997, *Nat. Med.*, **3**:721-722.
- [12] Gowen, L. C. et al., 1996, *Nat. Genet.*, **12**:191-194.
- [13] Sharan, S. K. et al., 1997, *Nature*, **386**:804-810.
- [14] Feunteun, J. et al., 1998, *Molecular Medicine Today*, **4**:263-267.
- [15] Shinohara, A. et al., 1992, *Cell*, **69**:457-470.
- [16] Hakem, R. et al., 1997, *Nature Genetics*, **16**:298-302.
- [17] Lorick, K. L. et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:11364-11369.
- [18] Scully, R. et al., 2000, *Nature*, **408**:429-432.
- [19] Khanna, K. K. et al., 2001, *Nature Genetics*, **27**:247-253.
- [20] Chen, C. F. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:32863-32868.
- [21] Nordling, M. et al., 1998, *Cancer Res.*, **58**:1372-1375.
- [22] Ruffner, H. et al., 1999, *Mol. Cell. Biol.*, **19**:4843-4854.
- [23] Yarden, R. I. et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:4983-4988.
- [24] Fuks, F. et al., 1998, *Oncogene*, **17**:2531-2534.

转基因动物乳腺生物反应器与基因工程药物

杨帆 吴文彦* 杨红

(广东药学院 广州 510224 *中山大学生命科学学院 广州 510275)

转基因技术研究始于 80 年代, Palmiter 等人把大鼠的生长激素基因通过显微注射法导入小鼠受精卵内, 培育出比正常小鼠大一倍的“超级”转基因小鼠, 并提出可以从转基因动物中提取有价值的药用蛋白^[1]。很快人们就意识到转基因技术在制药工业的巨大的应用价值, 到 90 年代人们开始利用某些

转基因动物作为一种生物反应器来生产各种药用蛋白。

乳腺生物反应器(Mammary Gland Bioreactor)是利用转基因动物的乳腺组织生产基因工程人类药用蛋白。由于哺乳动物的乳房是一种天然的高效合成蛋白质的器官, 并具有良好的渗透屏障, 能有效地