

- [2] Lee S, et al., 1993, *Current Opinion in Cell Biology*, 5: 286—291.
- [3] Cohen JJ and Duke RC., 1984, *J. Immunol.*, 132: 38—42.
- [4] Lam M, et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 6569—6573.
- [5] Baffy G, et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 6511—6519.
- [6] Lennon SV, et al., 1992, *Clin. Exp. Immunol.*, 87: 465—471.
- [7] McConkey DJ, et al., 1990, *J. Immunol.*, 145: 1227—1230.
- [8] Larotte M, et al., 1991, *J. Cell Physiol.*, 146: 73—80.
- [9] Edwards SN, et al., 1991, *J. Neuro Chem.*, 57: 2140—2143.
- [10] Dive C, et al., 1992, *Seminars on Cancer Biology*, 3: 417—427.
- [11] Fath I, et al., 1994, *Science*, 264: 971—974.
- [12] Kinoshita T, et al., 1995, *EMBO J.*, 14: 266—275.
- [13] Yao R and Cooper GM., 1995, *Science*, 267: 2003—2006.
- [14] Nagata S and Golstein P., 1995, *Science*, 267: 1449—1456.
- [15] Gill BM, et al., 1994, *Immunol. Rev.*, 142: 113—125.
- [16] Enari M, et al., 1995, *Nature*, 375: 78—81.
- [17] Cleveland JL and Ihle JN., 1995, *Cell*, 81: 479—482.
- [18] Oshimi Y and Miyaziki S., 1995, *J. Immunol.*, 154: 599—609.
- [19] Oltvai ZN and Korsmeyer SJ., 1994, *Cell*, 79: 189—192.

p16^{INK4} 失活与肿瘤的发生

吴国祥

(第二军医大学长海医院消化科 上海 200433)

李伯良

(中国科学院上海生物化学研究所 200031)

肿瘤的发生是多步骤、多基因事件的结果。癌基因(oncogene)的激活或高表达及肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene)的缺失或失活是细胞癌变的分子基础。目前已发现的癌基因已100有余,肿瘤抑制基因也不少于10个^[1]。最近克隆了一种新的肿瘤抑制基因p16^{INK4},其编码产物p16是CDK4的抑制因子,直接负向调控细胞增殖周期^[2]。p16^{INK4}的缺失或失活与许多肿瘤的形成关系密切^[3]。因而,对p16^{INK4}结构、功能、失活机制等的研究对癌变机理的阐明和肿瘤的诊治大有裨益。

p16^{INK4} 的结构及转译

人类染色体9号短臂是一“是非”之地,在黑色素瘤、急性白血病、肺癌、神经胶质细胞瘤等都发现有染色体9p21的缺失^[3],因而人们推测这一区域存在着肿瘤抑制基因。通过对

大量癌细胞株谱查及物理图谱、染色体步行、序列分析,终于在染色体9p21克隆出两个相关基因并分别命名为多瘤抑制基因(Multiple Tumor Suppressor)1(MTS₁)和2(MTS₂)^[1]。由于MTS₁和MTS₂正好是编码CDK4抑制因子p16和p15的基因,因而通常又把MTS₁和MTS₂分别称为p16^{INK4}和p15^{INK4B}。

p16^{INK4}由三个外显子和两个内含子组成。外显子1为126bp、外显子2为307bp,外显子3为11bp。最近在外显子1上游约20kb处发现268bp的外显子1_β。在p16^{INK4}近端存在一与其高度同源的p15^{INK4B},p15^{INK4B}由两个外显子组成^[4]。

p16^{INK4}有两种不同的转录方式,分别由启动子(promoter)P_α和P_β调控。P_α启动的转录物由外显子1、外显子2和外显子3组成,翻译的产物即为CDK4的抑制因子p16。P_β启

动的转录物由外显子 1 β 取代了外显子 1, 编译产物为截短了的 p 16。对这种 β 型转译形式的意义尚无深入的研究, 可能是 p 16^{INK4} 甲基化失活的一种方式^[6]。

p 16 蛋白由 156 个氨基酸残基组成。第 12 位至 141 位氨基酸残基形成结合 CDK₄ 所必须的锚蛋白重复序列(ankyrin repeats), 锚蛋白通用序列(ankyrin consensus)的缺失将使蛋白失活, 而氨基端 8 个残基和羧基端 20 个残基对蛋白活性无影响。与 p 16 有着类似功能的 p 15 由 137 个氨基酸残基组成, 含有四个锚蛋白重复序列且与 p 16 高度同源, 但其氨基端及羟基端与 p 16 同源性很低^[9]。

p 16^{INK4} 与细胞周期调控

细胞作为生命活动的基本单位处于增殖和抑制增殖的动态平衡之中, 细胞癌变是因细胞增殖负向调控因子的缺失和正向调控因子异常活性所致。有人形象地把负向调控因子比喻为高速公路上行驶的列车的“刹车”, 而把正向调控因子比喻为“加速器”。肿瘤抑制基因如 p 53 基因、p 16^{INK4}、p 21^{WAF1} 等就是细胞增殖的“刹车”, 而致癌基因如 RAS、细胞周期蛋白 D₁ (CyclinD1) 即为细胞增殖的“加速器”^[7]。

p 53、p 16 及 CyclinD1 均作用于细胞增殖周期的 G₁期至 S 期的转换过程。哺乳动物细胞在 G₁晚期有一称为“检查点”(checkpoint)的控制点, 细胞必须通过这一“检查点”才能实现 G₁—S 转换并进而进入 G₂期、M 期完成细胞增殖。CDK₄ 为这一“检查点”的调节中心。当 CDK₄ 与 CyclinD1 结合形成复合物时, CDK₄ 的苏氨酸残基(Thr)磷酸化、酪氨酸残基(Tyr)去磷酸化而处于活性状态。激活的 CDK₄ 继而作用于其底物 Rb 蛋白(视网膜母细胞瘤基因编码的蛋白), Rb 蛋白磷酸化失活并释放转录因子 E2F, E2F 启动进入 S 期必需的酶蛋白基因的转录从而完成 G₁—S 过渡^[8]。

人类有近 50% 的肿瘤有抗癌基因 p 53 的突变失活, p 53 蛋白的抗癌作用已为人们熟

知, 其作用途径为调控 MDM-2 基因和促使 p 21^{WAF1} 基因的表达^[7,9]。p 21 蛋白能与 CDK₄-CyclinD 复合物结合而抑制 CDK₄ 活性, 从而使细胞受阻于 G₁期; p 21 也能与 PCNA (增殖细胞核抗原)结合而阻止 PCNA 依赖的 DNA 复制^[10]。p 53 失活的结果为细胞过早地进入 S 期而使基因组不稳定性增加。

p 16^{INK4} 编码产物 p 16 对正常细胞周期的调控作用是其抗癌作用的基础。p 16 蛋白能与 CyclinD1 竞争结合 CDK₄ 而使 CDK₄ 失活, G₁—S 期过渡取决于 CyclinD1 与 p 16 蛋白的相对活性^[2]。正常细胞需要 p 16 与 CyclinD1 保持平衡, 无论是 CyclinD1 (具有癌基因特性)的高表达还是 p 16 的缺失或失活都将促使细胞的癌变^[11]。与 p 53 不同, p 16 对细胞周期直接进行调控、作用对象更专一, 因而 p 16^{INK4} 的缺失或失活作为肿瘤发生的原因更具说服力。

肿瘤细胞 p 16^{INK4} 失活机制

p 16^{INK4} 基因是由其编码产物执行其抗癌功能, 从基因结构、转录过程到翻译任何环节上的异常均可使之失去抗癌作用即失活。人类染色体 9 号短臂不到 40 kb 的范围是一缺失多发区。在黑色素瘤细胞系的普查中, 有近 50% 的细胞系有 p 16^{INK4} 基因的纯合缺失 (homozygous deletion)^[4]。在乳腺癌、肺癌、胰腺癌、星状细胞瘤细胞系和星状细胞瘤、胰腺腺癌、恶性间皮瘤癌组织中都检测到了高频率的纯合缺失^[12]。

p 16^{INK4} 等位基因一份的缺失称为杂合缺失 (Loss of heterozygosity, LOH)。在杂合缺失基础上几个碱基或一个碱基的缺失或突变是 p 16^{INK4} 基因失活的另一种方式。在编码区的突变分析中, 胰腺癌、食道磷状细胞癌、恶性黑色素瘤和胆道癌具有很高的突变率^[12,13]。p 16^{INK4} 基因常出现无义突变 (nonsense)、错义突变 (missense) 和移码突变 (frame shift)。用酵母双杂交系统对突变体功能进行分析, 发现大多数突变致使 p 16 失活, 如胰腺癌的 H

83Y 突变, 家族性黑色素瘤的 G 101 W 突变, 这类突变一个共同的特点是突变发生在保守的锚蛋白通用序列。但也有些突变如非小细胞肺癌的 E 120 K 突变对 p 16 活性无影响, 很可能是一种多态性 (polymorphism)^[6]。

编码区突变结果为产物构象改变, 从而影响产物活性, 而基因调控区的突变或甲基化将使转录失活。p 16^{INK4} 的上游序列有 CpG 岛 (CpG island), CpG 岛的过度甲基化将使基因关闭^[14]。在 HeLa 细胞系及头颈部磷状细胞癌细胞系中都发现了因 CpG 甲基化而引起的全长 p 16 基因的转录失活^[5]。黑色素瘤、脑胶质细胞瘤等肿瘤组织的表达水平检测中也提示有甲基化失活的存在^[15,16]。这种因 CpG 岛甲基化而关闭的基因在给予抗甲基化药后可以重新开放, 因而这是一种可以逆转的基因失活。

p 16^{INK4} 的研究意义和前景

对 p 16^{INK4} 基因的研究可追溯到 1992 年, 当时在恶性黑色素瘤、胶质瘤和白血病细胞中均发现了染色体 9 p 21 的缺失, 说明这一区域存在一抑瘤基因。1994 年 4 月《Science》和《Nature》均报道了 9 p 21 区域多瘤抑制基因 (p 16^{INK4} 基因) 的克隆。自此 p 16^{INK4} 基因在肿瘤研究领域受到了广泛的关注。对 p 16^{INK4} 的结构、功能、失活机制进行了大量的研究。现已有大量的资料说明 p 16^{INK4} 失活与多种肿瘤密切相关, 各种肿瘤缺失或突变率差异较大^[12]。细胞株 p 16^{INK4} 失活率明显高于相应的肿瘤组织, 转移灶肿瘤细胞 p 16^{INK4} 失活率高于原位肿瘤组织如非小细胞肺癌。晚期肿瘤组织 p 16^{INK4} 失活率高于早期肿瘤组织如 III 期以上脑胶质细胞瘤失活率达 50% 而 II 期瘤组织却未检测到 p 16^{INK4} 失活。以上差异提示 p 16^{INK4} 失活发生在肿瘤的后期、与肿瘤的浸润 (invasion) 和转移 (metastasis) 有关^[16,17]。目前对 p 16^{INK4} 基因的表达调控、甲基化失活的意义、非编码区突变、突变体的功能及抗原性等尚无深入的研究。

p 16^{INK4} 失活涉及肿瘤之广、突变及缺失率之高目前尚未发现能与之匹敌的肿瘤抑制基因, p 16^{INK4} 的研究将为肿瘤的治疗提供新的途径。(1) p 16^{INK4} 基因小, 其 cDNA 只有 450 bp 左右, 因而易于操作, 是肿瘤基因治疗的理想对象。目前已有资料表明野生型 p 16^{INK4} 能抑制 Ras 致癌基因诱导的恶性增殖和恶性转化作用^[18]。p 16^{INK4} 缺失的肿瘤细胞株导入野生型 p 16^{INK4} 基因后, 肿瘤细胞株增殖能力明显受抑制^[19]。随着基因治疗技术的进步, p 16^{INK4} 基因治疗进入临床是很有可能的。(2) p 16^{INK4} 是一种突变率很高的基因, 在某些肿瘤如食道磷状细胞癌突变率达 60%^[20]。因此, 突变体 p 16 免疫原性的研究, 对肿瘤的免疫治疗甚至抗癌疫苗治疗具有一定的实用价值。(3) p 16 只作用于 CDK4, 特异性强。可以模仿其作用原理设计出直接调控细胞周期的抗癌药。

p 16^{INK4} 的研究对于肿瘤的诊断、鉴别诊断、预后的判断同样具有广阔的前景。各种肿瘤突变谱的建立可用于临床和病理难以区分的肿瘤的鉴别, 分析转移灶的突变类型可以推断原发肿瘤的类型及部位。某些肿瘤 p 16^{INK4} 失活发生于晚期或浸润转移灶^[17], 肿瘤组织 p 16 蛋白或信使核糖核酸的检测用以肿瘤恶性程度和转移可能性的判定是一有效、客观的指标。

摘 要

p 16^{INK4} 位于人类染色体 9 p 2.1, 其编码的蛋白为细胞周期蛋白依赖激酶 4 (CDK4) 的抑制因子, 直接调控细胞增殖周期。至今已在许多肿瘤发现有 p 16^{INK4} 的缺失或失活, p 16^{INK4} 是一种多肿瘤抑制基因 (Multiple Tumor Suppressor I, MTS₁), 在不少肿瘤中其缺失或失活高达 80%, 是一种可以与 p 53 基因相匹敌的肿瘤抑制基因。

参 考 文 献

- [1] Kamb A. et al., 1994, *Science*, 264: 436.
- [2] Serrano M. et al., 1993, *Nature*, 366,

- 704.
- [3] Nobori T. et al., 1994, *Nature*, 368: 753.
- [4] Stone S. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 2988.
- [5] Mao L. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 2995.
- [6] Yang R. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 2503.
- [7] Hunter T. 1993, *Cell*, 75: 839.
- [8] Hunter T. et al., 1994, *Cell*, 79: 573.
- [9] Culotta E. et al., 1993, *Science*, 262: 1958.
- [10] Xiong Y. et al., 1993, *Nature*, 366: 701.
- [11] Marx J. 1994, *Science*, 263: 319.
- [12] Otsuki T. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 1436.
- [13] Yoshida S. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 2756.
- [14] Merlo A. et al., *Nature Med.*, 1995, 7: 686.
- [15] Nishikawa R. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 1941.
- [16] Reed J. A. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 2713.
- [17] Okamoto A. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 1448.
- [18] Serrano M. et al., 1995, *Science*, 267: 249.
- [19] Jin X. et al., 1995, *Cancer Research*, 55: 3250.
- [20] Mori T. et al., 1994, *Cancer Research*, 54: 3396.

脊椎动物前脑发育的研究进展

杨岐生 林 卿

(浙江大学生物科学与技术系 杭州 310027)

胚胎早期神经系统的发生包括两个不可分开的阶段,即活化和转化过程。活化过程开始于原肠胚早期,是神经发生的诱导过程。稍晚的转化阶段发生了神经系统局部结构的形成,即区域化过程。活化的关键是原肠胚中胚层产生诱导性信号分子和外胚层对信号的应答,区域化也是诱导的结果,造成中枢神经系统有各种局部结构,即具有不同细胞谱系和功能的神元节(neuromere)。

一、早期胚胎神经发生的诱导作用

早期胚胎发育过程中,原肠胚早期形成三层细胞后,未分化的外胚层背部一片细胞带变厚成神经上皮,并转化成为中枢神经系统原基(primorderm)的神经板。中枢神经系统起源于背侧外胚层与凹陷中胚层之间的相互作用。神

经板经过折叠内卷形成神经管。从神经管进一步发育分化成复杂的中枢神经系统脑泡组织。现在还不清楚最早的神元诱导发生在何时,但形成神经上皮的这部分细胞已具有神经细胞的命运。现在认为,囊胚期结束,原肠胚早期开始的神元诱导存在两条保守的路线(或方向):(1)内陷脊索中胚层向外胚层垂直方向发出信号;(2)中胚层组织者的信号在外胚层内水平方向传播。两条诱导路线相互作用,决定了早期神经细胞的形成和中枢神经系统的发生^[1]。神经管通过头尾(A-P)轴向和背腹(D-V)轴向的诱导,建立了中枢神经系统的基本格局(pattern)。A-P轴向的诱导信号来自背侧中胚层,D-V轴向的诱导信号源是脊索及稍晚的底板。

在诱导模型的研究中,头尾轴向的诱导研究提出了双信号模型,认为最初的信号存在于整个脊索中胚层,外胚层被诱导成神经外胚层。