

35.
Hoffman, M. 1993, *Science*, 259: 1257—1259.
- [14] Travis, J. 1993, *Science*, 259: 1258.
- [15] Xing, Y., et al., 1993, *Science*, 259: 1326—1330.
- [16] Carter, K. C., et al., 1993, *Science*, 259: 1330—1335.
- [17] 汪开顺等, 1992, 《中国细胞生物学学会第五次学术会议论文摘要汇编》, 86页.
- [18] Nüsslein-Volhard, C. 1991, *Development* (Supplement 1) 1—10.
- [19] Scott, M. P. 1992, *Cell*, 71: 551—553.
- [20] Kuo, C. J., et al., 1992, *Nature*, 355, 458—461.
- [21] Hemmati-Brivanlou, A. & D. A. Melton, 1992, *Nature*, 359: 609—614.
- [22] Blumberg, B. et al., 1991, *Science*, 253: 194—196.
- [23] Smith, W. C. & R. M. Harland, 1992 *Cell*, 70, 829—840.
- [24] Smith, W. C., et al., 1993, *Nature*, 361: 547—549.
- [25] Gething, M. -J. & J. Sambrook, 1992, *Nature*, 355: 33—45.
- [26] Langer, T. et al. 1962, *Nature*, 356: 683—689.
- [27] Landry, S. J. et al., 1992, *Nature*, 355: 455—457.
- [28] Radford, S. E., et al., 1992, *Nature*, 358: 302—307.
- [29] Craig, E. A. 1993, *Science*, 260: 1902—1903.
- [30] Agard, D. A. 1992, *Science*, 260: 1903—1904.
- [31] Raff, M. C. 1992, *Nature*, 356: 397—400.
- [32] Hengartner, M. O., et al., 1992, *Nature*, 356: 494—499.
- [33] Smeyne, R. J. et al., 1993, *Nature*, 363: 166—169.
- [34] Bissonette, R. P. et al., 1992, *Nature*, 359: 552—554.
- [35] Finidi, A. et al., 1992, *Nature*, 359: 554—.
- [36] Vaux, D. L. et al., 1992, *Science*, 258: 1955—1957.
- [37] Lowe, S. W. et al., 1993, *Nature*, 362: 847—849.
- [38] Clarke, A. R. et al., 1993, *Nature*, 362: 849—852.
- [39] Oliner, J. D. et al. 1993, *Nature*, 362: 857—860.
- [40] Lane, D. P. 1993, *Nature*, 362: 786—787.
- [41] McCormick, F. 1993, *Nature*, 363: 15—16.
- [42] Egan, S. E. et al., 1993, *Nature*, 363: 45—51.
- [43] Feing, L. A. 1993, *Science*, 260: 767—768.
- [44] Brugge, J. S., et al., 1993, *Science*, 260: 918—919.

p 53 肿瘤抑制基因

李 晓 澄

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

正常细胞的增殖常取决于促进生长的原癌基因和抑制生长的肿瘤抑制基因的平衡调节。原癌基因的激活或者肿瘤抑制基因的失活都能导致细胞生长的失控。事实上,许多肿瘤的发生需要基因组中这两类基因的同时突变。虽然人们对肿瘤抑制基因的认识较细胞癌基因晚了近10年,但当今它已成为了解肿瘤起源分子

基础的研究热点。在至今已克隆到的六个肿瘤抑制基因中, p53便是其中之一。

P 53是一种细胞核磷蛋白, 1979年发现于SV 40转化细胞的抽提物中^[1], 它能与SV 40大T抗原紧密地形成复合物, 从而可以被抗T抗体共沉淀。随后在多种肿瘤细胞及体外转化的细胞系中也先后检测到含量高于正

常细胞 5—100 倍的 p53 蛋白^[1], 具有较长的半衰期^[2]。还发现 p53 cDNA 或基因组 DNA 克隆能够使体外培养细胞永生 (immortalization)^[3], 并能与激活的 ras 癌基因协同转化胚胎成纤维细胞^[4]。这些特征与细胞内某些已知的癌基因很相似。然而, 近 3、4 年的研究表明 p53 并非是核内癌基因, 而是一种肿瘤抑制基因。首先, 已证实当初所有用于转化实验的 p53 基因克隆实际上是 p53 的各种突变型^[5]; 第二, 野生型 p53 基因非但不能与 ras 合作转化细胞, 而且还抑制其他癌基因转化细胞^[6]; 第三, 已经在人和动物的多种肿瘤中检测到 p53 的缺失或点突变。本文简要介绍对 p53 的认识现状。

一、p53 基因结构和 P53 蛋白

至今只发现 p53 基因存在于脊椎动物中, 在人类它位于 17 号染色体短臂上(17 P 13-1)^[7,8]。不同物种的 p53 基因结构有很大的相似性(图 1)^[9], 都包含 11 个外显子和 10 个内含子。尽管人、鼠、爪蟾内含子的长度有差异, 但它们间断外显子的部位有很高同源性。

不同物种的 p53 mRNA 长度为 2—3 kb,

3' 非编码区从小鼠的 800 bp 到非洲爪蟾的 1800 bp, 长度不等。人的 P53 mRNA 还包含一段 Alu 顺序^[10]。虽然至今还没有系统地研究过 p53 mRNA 的稳定性, 但已经发现在某些肿瘤、未分化的干细胞、胚胎癌细胞株 F9、鼠胚的器官发生期(9—10 天)、鸡的胚胎发育期^[11] 以及非洲爪蟾的卵子发生和早期发育阶段^[12] 都有高水平的 mRNA 表达。这些结果提示 p53 的高表达可能与细胞未分化状态有关。

不同物种的 p53 基因有五个高度保守区域(结构域 I 到 V), 人类的 P53 蛋白对应氨基酸序列分别是: I .13—19; II .117—142; III .171—181; IV .234—258; V .270—286。在人癌细胞中发现其中 II—V 结构域是 P53 基因的突变热点^[9]。P53 蛋白的二级结构也是高度保守的, 氨基端包含大量的酸性残基, 可形成 α -螺旋结构; 羧基端为带强电荷的碱性氨基酸富集区, 可形成螺旋-无规卷曲-螺旋结构; 其中间部位有 3 处高度疏水区, 分别对应于结构域 II, IV 和 V^[9]。

野生型 P53 蛋白能与其自身、细胞内的其他蛋白质(如 MDM 2)^[13] 及多种病毒癌基

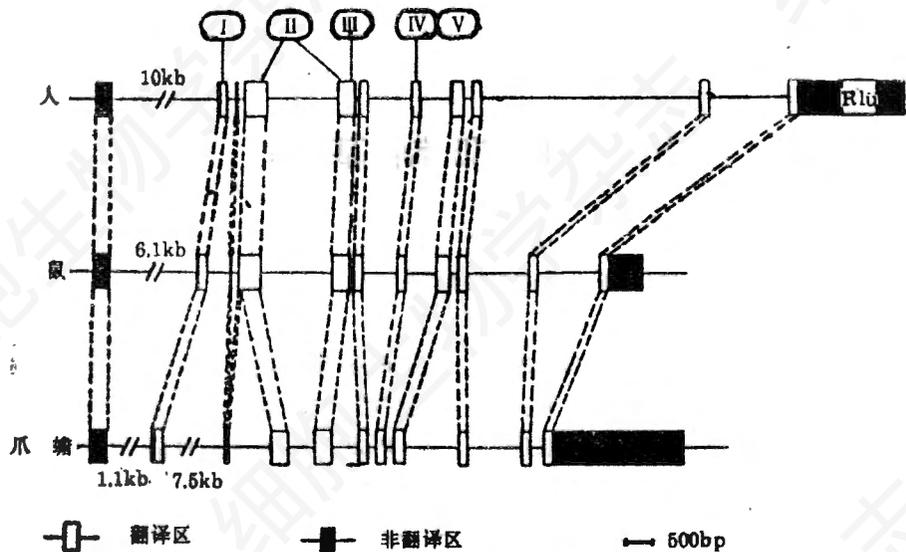


图 1 P53 基因级结构
I 到 V 代表不同外显子中的保守区域 (右上黑框内字母为 Alu)

因产物形成复合物。目前已知 SV 40 大 T 抗原, 腺病毒 E1A 和 E1B55Kd 蛋白, 人乳头瘤病毒 E6 和 E7 蛋白均能与 P53 蛋白作用形成复合物^[14]。还发现 P53 蛋白上存在两处磷酸化激酶的结合部位, 可分别被 cdc2 激酶和酪蛋白激酶 II 磷酸化, 推测可能与调节 P53 蛋白活性有关^[15,16]。

二、p53 基因突变和人体肿瘤

目前检测 p53 基因突变的方法很多, 基本上都结合了多聚酶链式反应(PCR)。PCR 先扩增出 p53 基因的待测片段, 扩增产物纯化后, 可进行 DNA 序列分析, 或限制片段长度多态分析(RFLP)。另外 PCR 结合单链构象多态分析(SSCP)还可同时检测出 p53 等位基因的缺失和突变, 为快速检测突变又提供了一个有效的手段^[17]。

在多种遗传或自发突变引起的人类恶性肿瘤中, p53 基因突变是至今已知的与癌症相关的最普遍的基因变化。表 1 列举了在部分人癌中发现的 p53 基因碱基置换突变^[18]。所列 280 例突变分布在 90 个密码子中, 98% 集中在保守结构域 II—V 内, 即外显子 5—8 区域。不同肿瘤中 p53 突变的部位和形式不同, 可能是由于各种组织和细胞处于不同的内环境, 包括接触的外源和内源致变剂, 代谢功能, DNA 修复酶活性以及 DNA 甲基化程度等等原因。

南非和中国启东的肝癌患者 p53 基因 249 位密码子的突变非常显著, 表现出特定的位点专一性, 即 AGG→AGT^[19]。黄曲霉素 BI 和乙肝病毒(HBV)很可能与这两个地区的肿瘤发生有关。体外和体内实验都已表明黄曲霉 BI 可导致 G→T 颠换, 且倾向于发生在特定的 DNA 序列处^[20]。在其他肿瘤中 249 位 Arg→Ser 的突变很罕见, 说明该突变可能对肝细胞有特殊效应。HBV 的整合可使染色体发生大片段的缺失或重排, 并改变邻近细胞基因的表达, 已发现在某些肝癌病例中 HBV 的整合导致 p53 等位基因缺失^[21]。

我们对人鼻咽癌细胞中 p53 基因作了分析, 发现鼻咽癌细胞系 CNEI 中 p53 基因第 297 位密码子的第二位碱基发生了 A→G 的转换, 使该位编码的 His 变为 Arg。相同的突变还存在于 1 例原发鼻咽癌组织细胞中(结果待发表)。鼻咽癌在我国南方地区发病率较高, 与当地居民长期食用咸鱼密切相关。咸鱼中含有亚硝胺, 在体内可引起 DNA 上 A→G 的转换。

尽管 p53 基因的绝大部分致癌突变发生在外显子区域, 但也有一些是内含子突变。例如在小细胞肺癌和非小细胞肺癌细胞系中, 内含子 3 和内含子 7 中的剪切位点分别发生了突变, 影响了 p53 mRNA 的正常加工, 细胞中检测不到 P53 蛋白^[22,23]。

大多数肿瘤患者的 p53 突变是体细胞自发突变, 即患者正常组织中的 p53 是野生型。p53 突变还存在于遗传性肿瘤——Li-Fraumeni 综合症中^[24]。这是一种罕见的常染色体显性综合症, 患者机体的许多不同部位可产生赘生物, 有较高的肿瘤发生率。迄今研究的六例患者中, p53 突变集中在密码子 245 到 258 位之间, 至少有两处是遗传性突变。这些遗传性突变以杂合状态存在于 Li-Fraumeni 家族成员的正常细胞中, 不影响个体的发育和细胞正常功能, 但个体有较高的生瘤倾向。由此推测, p53 的一个等位基因突变使基因不稳定, 随着另一个野生型等位基因的缺失或突变, 导致了细胞癌变。这种 LOH (loss of heterozygosity) 特性已成为检测肿瘤抑制基因的依据之一。

肿瘤中 p53 基因突变结果要么是不表达 P53 蛋白, 要么出现高表达的突变型蛋白。突变型 P53 蛋白与其野生型相比, 差异主要表现在: (1) 野生型半衰期为 5—20 分钟, 突变型则增至 2—12 小时^[25]; (2) 如前所述, 野生型能与一些病毒的癌蛋白形成复合物, 而几乎所有的突变型与病毒蛋白的结合则很弱或不结合^[26]; (3) 转化细胞中, 大多数具转化活性的突变型与热休克蛋白 hsc 70 形成复合物, 野生

表 1 不同人癌中的 p53 基因碱基置换突变

癌症部位	总突变数	突变在 G ₁ C 处			CpG 处 转换	突变在 A ₁ T 处		
		→A ₁ T	→T ₁ A	→C ₁ G		→T ₁ A	→G ₁ C	→C ₁ G
肺: SCLC	13	6(46) ⁻	2(15)	2(15)	4(31)	1(8)	0(0)	2(15)
non-SCLC	30	6(20)	17(57) ⁺	4(13)	3(10)	2(7)	1(3)	0(0)
乳腺	31	13(40)	7(23)	6(20)	4(13)	0(0)	3(10)	2(6)
结肠	39	31(79) ⁺	0(0)	1(3)	26(67) ⁺	1(3)	6(15)	0(0)
食管	37	16(43)	9(24)	0(0)	7(19)	5(14) ⁺	4(11)	3(8)
肝	19	3(18)	14(74) ⁺	1(5)	0(0) ⁺	0(0)	1(5)	0(0)
膀胱	15	7(47)	2(13)	3(20)	5(33)	0(0)	2(13)	1(7)
卵巢	11	4(36)	1(9)	3(27)	0(0)	0(0)	1(9)	2(18)
肉瘤	12	8(66)	2(17)	2(17)	7(53)	0(0)	0(0)	0(0)
脑	20	15(75)	1(5)	1(5)	9(45)	0(0)	3(15)	0(0)
上述实体瘤总数	227	109(48)	55(24)	23(10)	65(29)	9(4)	21(9)	10(4)
淋巴瘤和白血病	53	30(57)	2(4) ⁺	2(4)	25(47) ⁺	3(6)	10(19)	6(11)
肿瘤总数	280	136(50)	57(20)	25(9)	90(32)	12(4)	31(11)	16(8)

表注: 括号内的数字是突变百分率; ⁺这个值与其他肿瘤相应数值的差异是显著的 (X^2 , $P < 0.01$ 或更少); SCLC: 小细胞肿瘤。

型却不能与之结合^[7]; (4) 某些抗野生型构象依赖的抗原决定簇的单抗不能与突变型结合,ⁿ 表明致癌的 P53 突变蛋白的构象发生了变化。

突变型 P53 蛋白除上述共性外, 还具有不同的生物学特性。至少可将它们分成两类, 即丢失功能突变和获得功能突变^[14]。两种类型在转染分析中都失去了抑制肿瘤的功能, 但获得功能突变型同时还具有显性的类似癌蛋白的特点。

显性的丢失功能突变现象很可能是因为突变型蛋白与野生型形成寡聚复合物, 使野生型 P53 蛋白不能穿越核膜行使功能。显然, 突变型和野生型量的比例是调节细胞生长、分裂的重要因素。有报道表明, 当突变型的量是野生型的 10 倍时, 细胞还表现为正常, 大于这个倍数细胞便发生转化^[28]。存在获得功能突变是 p53 基因的一个显著特点, 也是它与最早确认的肿瘤抑制基因——RB 基因区别之处。将突变型 p53 cDNA 转入一种不表达 P53 蛋白的细胞中, 突变型蛋白的表达增强了该类细胞在动物体内的致瘤能力^[29], 所以突变型 p53 很可能是刺激了细胞的异常生长(肿瘤生成)。获得功能突变的作用机制目前还在探讨之中。

三、p53 基因调节细胞周期

关于 p53 的生化功能目前有两种假说。第一种假说认为 p53 可能调节 DNA 复制起始复合物的组装和功能。证据之一来自单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)DNA 复制的研究。真核生物病毒的 DNA 复制与真核细胞的 DNA 复制一样, 都是高度结构化的过程, 复制起始点发生在 DNA 的特定区域。通过抗体跟踪, 发现 HSV-1 感染细胞后, 参与复制的蛋白质移向病毒 DNA 的复制起始处, 形成大的复合物, 其中包括 P53 蛋白。而不参与复制的蛋白质则没有这种“复制分室”现象, 揭示 p53 可能与正常、未感染细胞的 DNA 复制复合物有关^[30]。另一证据是 P53 蛋白能结合 SV40 大 T 抗原, 大 T 抗原是 SV40 DNA 复制起始和延伸所必需的, 它结合在 SV40 DNA 复制起始区, 作为解旋酶启动 DNA 复制; 它也能结合细胞的 α DNA 聚合酶, 使之参与 SV40 DNA 合成。大 T 抗原一旦与野生型 p53 结合, 便失去了原有的功能, 提示 P53 蛋白可能与细胞中一种大 T 抗原的类似物作用, 而后者又能起始细胞 DNA 复制, 使细胞进入 S 期。p53

通过在晚 G₁ 期调节 DNA 复制起始复合物的组装, 对细胞进入 S 期进行负调控^[14]。

另一种假说认为, p53 可能是某些抑制细胞增殖的基因的反式激活因子。P53 蛋白的 N 端区域可能是激活转录的功能部位。GAL 4 的 DNA 结合片段与 P53 N 端区域构成的融合蛋白能够激活位于 GAL 4 DNA 结合位点下游的 CAT 基因转录。P53 C 端区域可能是结合 DNA 的部位。最近有报道, 分析了 18 个在体外能与 P53 结合的人基因组克隆, 发现结合位点序列有共同的特性, 都包含一个中间由 0—13 个碱基对隔开的对称结构, 每个结构单元由 10 个碱基组成, 序列为 5'-PuPuPuC(A/T(T/A)GPyPyPy-3'。结构单元的减少、增多, 甚至微小的改变均影响 P53 的亲合性。人癌细胞中的突变型 P53 蛋白都不能与该对称结构结合。该现象提示体内的 P53 蛋白可能是通过与 DNA 的特异序列结合而行使功能的^[31]。

作为一个肿瘤抑制基因, p53 基因的生物学功能又是什么呢? 早在 1984 年就发现, 紫外光或拟辐射药物可以通过一个翻译后的稳定机制诱导细胞内正常 P53 蛋白的积累^[32]。γ-辐射和一些损伤 DNA 的癌症化疗药物也有这种显著的效应^[33]。P53 蛋白的累积介导了细胞周期停滞在 G₁ 期, 与高水平的野生型 P53 蛋白的生长抑制特性相一致。由此便提出了一种 p53 功能模型(图 2)^[34], 使人想起细菌的 SOS 应答反应。正常 p53 行使“分子警察”的功能, 监测基因组的完善。如果 DNA 受到损伤, p53 便累积, 关闭 DNA 复制, 使之有额外的时间得到修复。如果修复失败, p53 便可以通过“apoptosis”诱发细胞自杀^[35]。肿瘤细胞中, 如果 p53 因突变或与病毒蛋白结合而失活, 便没有这种细胞周期的停滞, 因此它们的基因稳定性降低, 突变和染色体重排以较高的速度发生, 导致恶性克隆的出现。该模型解释了为什么 DNA 病毒必须使 p53 失活(病毒 DNA 必须在细胞核内复制, 便需要细胞维持

在 S 期, 而不能诱发其损伤反应); 它也解释了带 p53 缺陷型基因的转基因小鼠, 能够正常发育, 但具有高的肿瘤发生率, 而且肿瘤内非整倍体和突变事件的发生频率增加^[36]; 另外, 它还解释了 Li-Fraumeni 患者成纤维细胞的基因不稳定性, 以及传统的放射治疗和化疗的相对成功和冒险性。

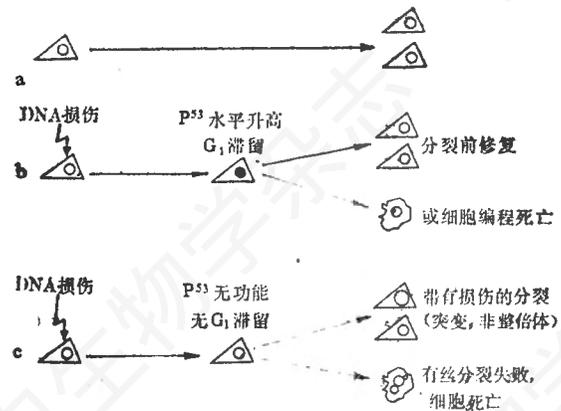


图 2 p53 生物学功能的一个模型

a. 细胞的正常分裂过程中不需要 p53 参与;
b. 细胞 DNA 受到损伤, 诱导了 p53 的基因组——防卫功能;c. 细胞中的 P53 蛋白因突变或与病毒癌蛋白结合而失活, 导致突变, 核组型异常、有丝分裂失败和细胞死亡。恶性克隆产生这些基因受损的细胞。

四、结 语

p53 是迄今克隆到的 6 个肿瘤抑制基因之一, 其余五个分别是 RB, NF-1, WT-1, DLL 和 erbA 基因。因为 p53 和 erbA 的某些突变具有明显的癌基因的特点, 所以最初都被归为原癌基因, 这是它们与其他四种肿瘤抑制基因的不同之处。从大量的肿瘤抑制基因突变分析结果来看, 同一种肿瘤中往往发现同时存在两个或更多的肿瘤抑制基因突变。这些肿瘤抑制基因之间通过什么方式相互协调作用以及与细胞癌基因的关系都是了解肿瘤发生机制的关键。p53 在人类肿瘤中存在的普遍性给了我们一些启示。研究工作已经证明, 野生型 p53 基因导入体外转化细胞能够抑制其恶性表型和生长, 虽然这距离体内肿瘤的基因治疗还

有一段漫长的路程,但确实为我们提供了一条可供探索的途径。

参 考 文 献

- [1] Linzer, D. I. H. et al., 1979, *Cell*, 17: 43—52.
- [2] Oren M. et al., 1981, *Mol. Cell. Biol.*, 1: 101—110.
- [3] Jenkins, J. R., 1984, *Nature*, 312: 651—654.
- [4] Eliyahu, D. et al., 1984, *Nature*, 312: 646—649.
- [5] Baker, S. J. et al., 1990, *Science*, 249: 912—915.
- [6] Hinds, P. W. et al., 1989, *J. Virol.*, 63: 739—746.
- [7] Isode, M. et al., 1986, *Nature*, 320: 84—85.
- [8] Czosnek, H. H. et al., 1984, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 1636—1640.
- [9] Soussi, T. et al., 1990, *Oncogene*, 5: 945—952.
- [10] Matlashewski, G. et al., 1984, *EMBO J.*, 3: 3257—3262.
- [11] Rogel, A. et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 2851—2855.
- [12] Louis, J. M., 1988, *Biochim. Biophys. Acta*, 950: 395—402.
- [13] Oliner, J. D., et al., 1992, *Nature*, 358: 80—83.
- [14] Kevine, A. J. et al., 1991, *Nature*, 351: 453—456.
- [15] Bischoff, J. R. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87: 4766—4770.
- [16] Meek, D. W. et al., 1990, *EMBO J.*, 9: 3253—3260.
- [17] Murakami, Y. et al., 1991, *Cancer Res.*, 51: 3356—3361.
- [18] Molistein, M. et al., 1991, *Science*, 253: 49—53.
- [19] Hsu, I. C. et al., & Bressae, B. et al., 1991, *Nature*, 350: 427—431.
- [20] McMahon, G. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87: 1104—1108.
- [21] Slagle, B. L. et al., 1991, *Cancer Res.*, 51: 49—54.
- [22] Sameshima, Y. et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172(2): 697—703.
- [23] Takahashi, T. et al., 1990, *J. Clin. Invest.*, 86(1): 363—369.
- [24] Malkin, D. et al., 1990, *Science*, 250: 1233—1238.
- [25] Hinds, P. W. et al., 1990, *Cell Growth Different.*, 1: 571—580.
- [26] Tan, T. H. et al., 1986, *J. Virol.*, 59: 574—583.
- [27] Finlay, C. A. et al., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 531—539.
- [28] Chem, P. L. et al., 1990, *Science*, 250: 1576—1580.
- [29] Wolf, D. et al., 1984, *Cell*, 38: 119—126.
- [30] Wilcock, D. et al., 1991, *Nature*, 349: 429—431.
- [31] El-Deiry, W. S. et al., 1992, *Nature Genetics*, 1: 45—49.
- [32] Maltzman, W. et al., 1984, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 1689—1694.
- [33] Kastan, M. B., et al., 1991, *Cancer Res.*, 51: 6304—6311.
- [34] Lane, D. P. 1992, *Nature*, 358: 15—16.
- [35] Yonish, R. E. et al., 1991, *Nature*, 352: 345—347.
- [36] Donehower, L. A. et al., 1992, *Nature*, 356: 215—221.

欢迎订阅《实验生物学报》(季刊,国内、外发行,邮发代号4-156)、《细胞生物学杂志》(季刊,国内发行,邮发代号4-296)。各地邮局均办理订阅。