

- Chem*, 258: 11689.
- [23] Moolenaar W. H., et al., 1984, *ibid*, 259: 8066.
- [24] Chambard J. C., et al., 1983, *ibid*, 258: 1706.
- [25] Ciemmons D. R., et al., 1981, *J. Clin. Invest*, 67:10.
- [26] Habenicht A. J. R., et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1344.
- [27] Coughlin S. R. et al., 1981, *ibid*, 78: 7134.
- [28] Rozengurt E., et al., 1983, *Cell*, 34: 265.
- [29] Chua C. C., et al., 1985, *J. Biol. Chem*, 260: 5213.
- [30] Heldin C. -H., et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6611.
- [31] Keating M. T. and Williams L. T., 1988, *Science*, 239: 914.
- [32] Grotendorst G., et al., 1982, *J. Cell. Physiol*, 113:261.
- [33] Pledger W. J., et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2839.
- [34] Smith J. C., et al., 1981, *ibid*, 78:4365.
- [35] Singh J. P., et al., 1983, *J. Cell. Biol*, 96: 1497.
- [36] Wharton W., et al., 1982, *J. Cell. Physiol*, 111: 201.
- [37] Betsholtz C., et al., 1984, *ibid*, 113: 203.

erbB 族癌基因的结构和功能

陈 汉 源

(第一军医大学生物教研室)

癌基因研究加深对细胞转化和动物致癌的理解,并在肿瘤临床有广阔的应用前景。

一、v-erbB 的结构和表达

将鸟成红细胞增多症病毒(AEV)注射到雏鸡静脉内,诱发生成红细胞增多症(红白血病)、注射到肌肉中引起纤维肉瘤,也能在体外转化鸡骨髓的成红细胞和鸡胚的成纤维细胞。这是复制缺陷型病毒,含有 erbB 癌基因。AEV-R (同 AEV-ES 4) 的基因组全长 5.5 kb, 5'- Δ gag-erbA-erbB- Δ env-3', 其中 erbB 顺序长 1900 bp。转化细胞表达^[1,2]: (1) 由 5.4 kb mRNA 转译成融合蛋白 p74 ^{Δ gag-erbA}, 含有残留的 gag 蛋白的 N 端部分和 crbA 蛋白 p50。(2) 由 3.5 kb mRNA 转译 p61^{erbB- Δ env}。在转化细胞中, v-erbB 最初合成 p61, 经过葡萄糖化和磷酸化成为 p66, p68 和 p74, 并从细胞质转输到质膜内。在体外则由此转录本的断片合成 p41^{erbB}(图 1)。其次, AEV-H 基因组为 5'-gag-pol-erbB-3', 其中 erbB 顺序长 1812 bp, 推定编码 p68 蛋白^[3]。在转化细胞中, AEV-H 前病毒 DNA 长 7.8 kb, 合成 p41、

p45 和 p60, 为不含 gag 的 erbB 蛋白。在 AEV-H td 130 突变体中, erbB 的 3' 端缺失 169 n(核苷酸), 能诱发鸡肉瘤, 但不引起成红细胞增多症。这是由于 erbB 蛋白的 N 端部分能转化成纤维细胞, 而其 C 端 1/3 部分为转化成红细胞所必需^[2]。Frykberg(1983)^[4]构建成 AEV-erbA⁻B⁺ 突变体, 其中 erbA 缺失 0.5 kb。这能在体外转化成纤维细胞, 并使骨髓细胞形成红细胞样小群落, 诱发鸡肉瘤和不典型的红白血病。所构建的 AEV-erbA⁺B⁻ 突变体

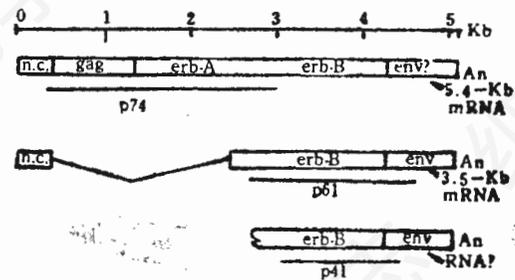


图 1 AEV-R 基因组及其表达图解

横线代表合成的多肽, n. c. 代表 5' 端不编码的前导顺序。

中 *erbB* 缺失 0.5 kb, 不能转化成纤维细胞和骨髓细胞, 说明 *erbB* 对细胞转化起主要作用, 而 *erbA* 能够加强前者的转化效果。

二、c-*erbB* 的结构和表达

以 v-*erbB* 为探针, 从鸡红细胞 DNA 中分离 c-*erb* 克隆, 全长 25-30 kb, 含有 c-*erbA* 和 c-*erbB*, 两者相距 12 kb, 各自表达^[5], 其中 c-*erbA* 长 6.4 kb, 含有 4 个外显子, c-*erbB* 长 21 kb, 所含的 12 个外显子顺序共长 2.1 kb (图 2、3)。在鸡胚胎中, c-*erbA* 表达 4.5 kb 和 3.0 kb mRNA, 其产物 p 46 为甲状腺激素受体。c-*erbB* 表达 12.0 kb 和 9.0 kb mRNA。已证明鸡 c-*erbB* 位点相当于鸡 EGFR (表皮生长因子受体) 基因的 3' 区域^[6]。人 c-*erbB* 原癌基因编码 EGFR^[7]。人 EGFR cDNA 顺序长 4058 bp (图 4), 推定编码 1210 氨基酸(aa)^[8]。以人 EGFR cDNA 为探针, 在胎盘和表皮样癌细胞株 (A 431) 中, 检测到 5.8 kb 和 10.5 kb mRNA。应用单抗分离的 EGFR 为蛋白 p 175, 其中含糖支链(37 kd)和肽链(1250 aa)。人 EGFR 的细胞外区有 621 aa, 这能与人 EGF 和 TGF α (转化生长因子) 结合。穿膜区有 23 aa, 细胞内区由 545 aa 组成^[9], 具有蛋白激酶活性。至于 AEV-H 的 v-*erbB* 转化蛋白含有 604 aa, 为截短的 EGFR 分子, 只包含穿膜区 (23 aa) 和细胞内区 (516 aa)^[9], 还有残留的细胞外区 (65 aa)。这转化蛋白与人 EGFR 的 C 端 631 aa 比较表明, 其中的 376 aa 部分有 95% 同源性, 其侧翼部分相差较大^[8]。

三、c-*erbB* 2 的结构和表达

现已发现多种与 v-*erbB* 相关的细胞癌基因。

(1) 乙基亚硝胺诱发的大鼠成胶质细胞瘤

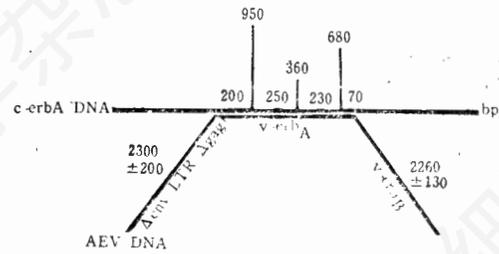


图 2 c-*erbA* DNA 和 AEV DNA 形成异质双体

直线代表 c-*erbA* 内含子, 横线代表其外显子, Δ 示缺失部分顺序, LTR 示长的末端重复顺序

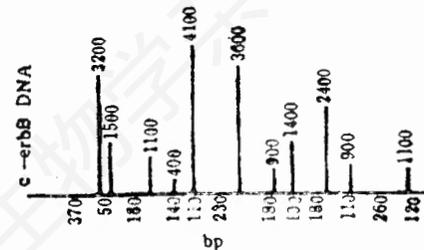


图 3 c-*erbB* 的编码顺序和插入顺序

直线代表内含子, 横线示外显子

DNA 能够转染 NIH 3 T 3 细胞, 后者接种于小鼠体内长成纤维肉瘤, 并表达肿瘤抗原 p 185。这与大鼠 EGFR p 170 的电泳速度和免疫性不同。从转化细胞 DNA 中分离能与 v-*erbB* 探针杂交的 *neu* 基因克隆, 其中顺序最短的为 4.5 kb, 编码 p 185^[10]。从人基因库中分离能与 v-*erbB* 探针杂交的 *neu* 基因克隆, 顺序长 34 kb^[11]。以人 c-*erbB* cDNA 的不同片段为探针表明, 人 *neu* 顺序和 c-*erbB* (c-*erbB* 1) 的同源性限于细胞内区的蛋白激酶部分 *neu* DNA 探针不能与 c-*erbB* 的穿膜区或细胞内区的其余部分杂交^[11]。

(2) 以 v-*erbB* 为探针, 从人基因库中分



图 4 人 EGFR cDNA 克隆图解

横线示不转译顺序, 长方盒示编码顺序, 白盒示信号顺序
黑盒示穿膜区, 斜线示成熟受体区域, 交叉线示富半胱氨酸区域

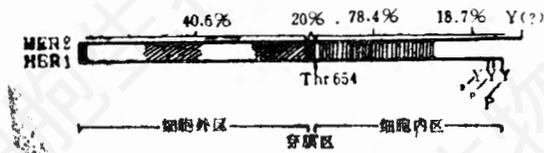


图5 比较HER1和HER2编码蛋白的同源性

前部黑盒示信号多肽，中部黑盒示穿膜区，斜线为富半胱氨酸区，直线为酪氨酸激酶区，Y示酪氨酸磷酸化，箭头为654位苏氨酸Thr

离到HER2基因克隆^[11]为1838 bp片段，含有4个外显子。以此为探针检测到4.8 kb mRNA，这与EGFR 5.8 kb和10.5 kb mRNA不同。HER2 cDNA顺序长3765 bp，推定编码蛋白1255 aa，而EGFR基因(即HER1)编码1210 aa，两种蛋白的同源性如图5：细胞外区40.6%，穿膜区20.0%，细胞内区中ATP结合部位和蛋白激酶部分78.4%，最C端部分18.7%^[12]。

(3) 从人基因库中分离与v-erbB相关的c-erbB2基因克隆，以此为探针，可检测到4.8 kb mRNA，但不能与EGFR基因(c-erbB1)转录的10.0 kb和5.6 kb mRNA杂交。c-erbB2克隆至少有7个推定的外显子，编码顺序长885 bp，与EGFR cDNA的相对区域有74%同源性，两者的蛋白激酶区有82%同源^[13]。现已证明人neu，c-erbB2和HER2三者实为同一基因，均定位于人染色体17q21，转录4.8 kb mRNA，转译p185蛋白^[14]，具有酪氨酸激酶活性，为一未知配体的受体。而人EGFR基因(即c-erbB1和HER1)定位于人染色体7p11-p13，转录5.8 kb和10.5 kb mRNA，合成p170蛋白。两种蛋白均包含细胞外区，穿膜区和细胞内区，其中蛋白激酶区互相近似。

四、c-erbB族基因扩增和过度表达

在多种人体肿瘤细胞中，c-erbB族基因扩增，而且过度表达，这与肿瘤生物学行为相关。可作临床诊断分型的指标和复发死亡的预示因子。以HER2/neu cDNA为探针检测到

27%或30%例人原发性乳腺癌基因扩增^[15,16]，后者与肿瘤的演进密切相关。以此作为病人的预后参数，要比激素受体水平和淋巴结转移更有价值^[17]。以人EGFR cDNA为探针检测到4/10例人成胶质细胞瘤的5.8 kb和10.5 kb mRNA水平提高，同时基因扩增0-60倍^[18]，并有DNA重排。而脑膜瘤，少突神经胶质瘤和II级星状细胞瘤则否。1例人唾液腺癌中c-erbB2基因扩增30倍^[13]，但无EGFR基因扩增，成神经细胞瘤和表皮样癌则否。在带不平衡染色体易位t(1:7)的3例骨髓发育不良综合症的骨髓和外周血单核细胞中，c-erbB mRNA水平增高10-30倍，同时癌基因扩增^[19]，而急性淋巴白血病则否。表皮样癌细胞株(A431)过度表达5.6 kb和10.0 kb正常mRNA，其EGFR cDNA长4058 bp，另外表达2.9 kb畸变mRNA，其cDNA为2670 bp。后者只编码细胞外区，推定合成615 aa的蛋白p70^[8]，其糖蛋白为p115^[8]。两种cDNA的5'端2079 bp部分完全相同，而3'端600 bp各异。两种EGFR基因均定位于人染色体7，并在A431细胞中扩增20-30倍，推测畸变mRNA来源于染色体7易位。在人乳腺癌细胞株(MAC117)中，能与v-erbB探针杂交的6 kb片段DNA扩增5-10倍，这与正常EGFR基因不同。同样，在人口腔鳞癌细胞株(SCC15)中，EGFR基因扩增4-5倍，所表达的5.6 kb和10.0 kb mRNA也比正常角质细胞较高^[20]。在30例人癌细胞株中，发现胃癌细胞株(MKN7)的c-erbB2基因扩增30倍，而且过度表达4.6 kb mRNA^[14]。

另一方面，应用标记抗体技术检测c-erbB2蛋白表明，91%有c-erbB2基因扩增的乳腺癌为正反应，只有48%单拷贝c-erbB2的乳腺癌如此^[21]。应用标记的EGF或EGFR抗体测定EGFR，以人胎盘和肝为正对照，发现32%原发性乳腺癌为正反应，其中71%淋巴结转移癌如此^[22]。在人膀胱过渡型细胞癌中，有87.5%浸润性癌为EGFR正反应，只有29%

表浅层(原位)癌如此,同时,有18/21例未分化癌和10/29例中度分化癌为EGFR正反应^[23]。在11例人肺鳞形细胞癌和2例头和颈表皮样癌中,每细胞的EGFR数目均比正常表皮增高2.5—5倍。7/8例肺腺癌、2/2例肺小细胞癌和4/8例肺未分化癌只有少量EGFR,35例非表皮样癌均不能与EGF结合^[24]。正常神经胶质细胞和胶质瘤均有p170的EGFR蛋白,但大多数胶质瘤另有p190的EGFR蛋白,两者的每细胞EGFR数目却很接近^[25]。4例人胰腺癌细胞株的染色体7不正常,每细胞的EGFR数目均高于正常细胞,但无EGFR基因扩增,可能由染色体7易位激活此基因所致^[21]。总之,c-erbB族基因扩增和过度表达在细胞转化和动物致瘤中起重要作用,可为肿瘤临床提供诊断分型指标和估计预后的参数。

摘 要

AEV病毒诱发鸡成红细胞增多症和肉瘤,并能体外转化成红细胞和成纤维细胞。AEV基因组的erbB对细胞转化和动物致瘤起主要作用,而erbA能加强前者的效果。现已证明EGFR基因是c-erbB原癌基因。v-erbB编码截短的EGFR蛋白。人c-erbB1(HER1)定位于染色体7p11-p13,转录5.8kb和10.5kb mRNA,转译p170 EGFR蛋白。另有c-erbB2(HER2, neu)定位于染色体17q21,转录4.8kb mRNA,转译p185蛋白。在许多人体肿瘤及其细胞株中,c-erbB族基因扩增,而且过度表达,这与肿瘤生物学行为相关。

参 考 文 献

- [1] Privalsky M, Bishop JM. *Proc Natl. Acad Sci* 1982, 79: 3958-3962.
- [2] Maihle NJ, Kung HJ. *Biochem Biophys Acta.*, 1988, 948: 287-304.
- [3] Yamamoto T, et al., *Cell*, 1983, 35: 71-78.
- [4] Frykberg L, et al., *Cell*, 1983, 32: 227-238.
- [5] Vennstrom B, Bishop JM. *Cell*, 1982, 28: 135-143.
- [6] Olofsson B, et al., *Eur J Biochem.*, 1986, 160: 261-266.
- [7] 陈汉源, 第一军医大学学报, 1988, 8: 71-76.
- [8] Ullrich A, et al., *Nature*, 1984, 309: 418-425.
- [9] Downward J, et al., *Nature*, 1984, 307: 521-527.
- [10] Schechter AL, et al., *Nature*, 1984, 312: 513-516.
- [11] Schechter AL, et al., *Science*, 1985, 229: 976-978.
- [12] Coussens L, et al., *Science*, 1985, 230: 1132-1138.
- [13] Sema K, et al., *Proc Natl Acad Sci.*, 1985, 82: 6497-6501.
- [14] Fukushige S, et al., *Mol Cell Biol.*, 1986, 6: 955-958.
- [15] Guerin M, et al., *Int J Cancer.*, 1989, 43: 201-208.
- [16] Slamon DJ, et al., *Science*, 1987, 235: 177-182.
- [17] Seshadri R, et al., *Int J Cancer.*, 1989, 43: 270-272.
- [18] Libermann TA, et al., *Nature*, 1985, 313: 144-147.
- [19] Woloschak GE, et al., 1988, "Cellular and molecular biology of tumors and potential clinical application" ed J Minna, 47-58.
- [20] Merlino GT, et al., *J Clin Invest.*, 1985, 75: 1077-1079.
- [21] Berger MS, et al., *Cancer Res.*, 1988, 48: 1238-1243.
- [22] Sainsbury JRC et al. *Lancet* 1985, 1: 364-366.
- [23] Neal DE, et al., *Lancet*, 1985, 1: 366-368.
- [24] Hencler FJ, Ozanne BW. *J Clin Invest.*, 1984, 74: 647-651.
- [25] Steck PA, et al., 1988, "Cellular and molecular biology of tumors and potential clinical application" ed J Minna. 25-34.
- [26] Korc M, et al., *Proc Natl Acad Sci.*, 1986, 83: 5141-5144.