

肿瘤抑制基因; 迷惑和希望

RUTH SAGER

肿瘤抑制基因为野生型等位基因, 它们在细胞增殖、分化和其他细胞与系统的过程中起着调节作用。这些基因的丢失或失去活性, 可导致肿瘤的发生。肿瘤抑制基因是 70 年代早期提出的, 但只是在最近的几年中, 大量新的信息才证明了这些基因的重要性。在同一种肿瘤中可以有二种或更多种抑制基因失活, 而相同的抑制基因又可在不同肿瘤中表现活力丧失。**肿瘤抑制基因的检测:**

正常和肿瘤杂交细胞(NXT)中肿瘤形成被抑制
NXT 杂种可用来识别携带了有效的抑制基因的染色体。如在致瘤的 BHK 细胞和正常人成纤维细胞融合的杂种细胞中, 因血管生成受阻所引起肿瘤的抑制是与 1 号染色体有关。NXT 杂种还可用于研究反映亲代差异的标记基因的表达。如人正常的和恶性的乳腺上皮细胞的融合杂种, 已用于证明源于正常细胞的多种基因的表达和肿瘤形成的抑制。

微细胞转移改进了细胞融合的方法, 使一个或几个染色体通过融合导入到肿瘤细胞内。当肿瘤出现抑制时, 借助遗传学的方法可鉴别出载有抑制基因的单个供体染色体。

表 1 由染色体转移产生的肿瘤抑制

肿瘤细胞受体	转移的染色体	
	抑制	非抑制
Hela(宫颈)	11	X
wilms'(肾)	11	X, 13
SiHa(宫颈)	11	NR*
A 204(横纹肌肉瘤)	11	NR*
HHUA(子宫内膜)	1, 6, 9	11
YCR-1(肾)	3p	11
SK-N-MY(成神经细胞瘤)	1	11

* NR 无报道。

表 1 列出用微细胞转移实验识别的携带抑制基因的人类染色体。目前多数研究集中在 11 号染色体。因有证据表明 11 号染色体是 Hela 细胞在裸鼠体内致瘤的有效抑制因素。在 wilms' 肿瘤中也发现有 11p 丢失。1 号染色体也载有肿瘤抑制基因, 细胞遗传学实

验还证明小细胞肺癌、肾癌、宫颈癌有 3p 丢失。

在遗传性肿瘤中识别抑制基因 70 年代, Knudson 和其他人曾经强调遗传性肿瘤对寻找与肿瘤相关基因的用途。1977 年 Mulvihill 曾列出约 200 个基因, 它们在家系分析中被示为常染色体显性或隐性基因。这方面成功的范例是视网膜母细胞瘤基因(RB)。在家系分析中为显性的 RB 突变, 在细胞水平却转变为隐性。该基因功能的丧失导致肿瘤的发生。

在非遗传的结肠直肠癌的研究中, 已发现五种不同的遗传改变, 这些改变是依次发生的, 支持肿瘤发展的累积性和多阶段性。家族性腺瘤样息肉病(FAP), 病变早期就有染色体 5q 的缺失, FAP 形成的多发息肉是良性的, 但某些息肉较易转为恶性。在良性腺瘤中可见到胞嘧啶残基的去甲基化和 K-ras 的激活。转变为恶性时有 17p(17P13)和 18q 的缺失。估计这些缺失中包含有抑制肿瘤的基因, 一个位于 17p13 可能是 P53 基因, 另外两个尚未被确定。

肺癌中特殊的遗传变化包括二个区域的缺失, 染色体 3p12-22, 13q14 和 17p13, 同时还有一种 myc 基因(c-myc, N-myc 或 L-Myc)的过表达以及其它一些原癌基因如 C-K-ras, C-raf 的激活。在这些肺肿瘤中经常发现三个单独位点同时丢失或发生突变。在大多数小细胞肺癌和 50% 非小细胞肺癌中已发现有染色体 3p 的改变, 70% 的小细胞肺癌和 60% 非小细胞肺癌有 13q14(RB)异常变化, 保守估计约有 60% 在 17p 携有突变或 P53 的缺失。

在家族性恶性黑色素瘤和其前期症候(表现痣的发展异常)的研究中, 家系分析表明位于 1p36 的基因(CMM)在黑色素瘤发展晚期丢失。另一些基因突变一定发生得很早, 同时已有报告 1、6、7 和 9 号染色体核型的异常改变。因此黑色素瘤同结肠、直肠癌, 肺癌一样, 含有几个与癌有关的突变基因, 其中包括未肯定的肿瘤抑制基因。

通过 RFLP 分析检测等位基因的缺失(LOH)

RFLP 分析可以用来证实等位基因缺失是否与某种特定的临床症候有关。为了确定某个 LOH 是否与一种遗传性疾病相关, 研究者们用家系分析检测家族中至少三代人的 DNA, 这些人在所选择的染色体区域中

的标记物都呈多态性。为要测定纯合子在寻找肿瘤发生中存在的体细胞变化时,只要比较同一病人的正常和肿瘤来源的细胞DNA就够了。

然而,在LOH实验中家系分析能够确定缺失等位基因是来自非感染的亲代还是来自遗传易感的亲代,而缺少家系分析就没有证据证明是否有生殖细胞的突变。

表2列出一些有杂合子丢失的肿瘤类型。实际上它们与Mulvihills 1977年列出的遗传性肿瘤是一致的。然而表2的资料大部分是根据正常的和肿瘤DNA的RFLP分析所得到的,而不是家系分析。这一平行关系出乎意料的为Knudson强调过的设想提供了佐证,即不论是一个等位基因在合子形成之前发生了突变的遗传易感性肿瘤,还是在体细胞中一对等位基因于合子形成后发生突变的散发性肿瘤,都涉及同一个突变基因。

表2 人类肿瘤中杂合子的缺失(LOH)

染色体	肿瘤类型
1 P	黑色素瘤,成神经细胞瘤,髓质甲状腺瘤, MEN 2,嗜铬细胞瘤,乳腺导管癌
1 q	乳腺癌
3 P	小细胞肺癌、肾细胞癌、宫颈癌、视网膜血管病
5 q	家族性腺上皮增生息肉,散发性结肠直肠癌
11 p	Wilms瘤,横纹肌肉瘤,乳腺癌,肝胚细胞瘤膀胱移行细胞癌
11 q	MEN-1
13 q	视网膜母细胞瘤,成骨肉瘤,小细胞肺癌,乳腺导管癌,胃癌
17 p	小细胞肺癌,结肠直肠癌,乳腺癌,成骨肉瘤
18 q	结肠直肠癌
22	脑膜瘤,听觉神经瘤,嗜铬细胞瘤

用分子克隆技术检测肿瘤抑制基因 在已经克隆的基因中,有影响核功能的RB、P53基因和影响细胞质中信号传递的Krev-1基因。

对视网膜母细胞瘤基因不仅完成了cDNA克隆,也完成了基因组水平的克隆,确定该基因有27个外显子,相当于全长4.7 kb cDNA。外显子大小范围从第24外显子的31 bp到3'端第27外显子的1889 bp。根据突变RB基因的RFLP分析,估计从13—17外显子为一个重排热点。

用Northern和Southern印迹分析表明,大多数视

网膜母细胞瘤表达一个全长的mRNA转录本,没有基因重排。需要了解cDNA序列和结构以确定视网膜母细胞瘤中RB的突变。有些以前尚未确定的突变通过核糖核酸酶保护确认了其可能的突变位置,接着又用多聚酶链反应进行放大,再做突变区的顺序分析。

在一些小细胞肺癌和肺炎细胞瘤的样品中发现了RB DNA有大的缺失和重排,同时还有RB mRNA丢失。而在各种类型的非小细胞肿瘤中RB的DNA和RNA的表达均无改变。要最终搞清楚足以导致功能失活的突变事件的幅度,还有待于对RB突变进行充分的分子水平的分析。

识别肿瘤抑制基因的关键实验,是通过野生型基因移入靶肿瘤细胞而产生抑制表型的传递。最近报道用反转录病毒介导基因转移的方法,将克隆的4.7 kb cDNA导入缺失RB基因,无mRNA和蛋白表达的视网膜母细胞瘤细胞系中。从转化细胞中发现形状扁平的细胞集落,其中多数集落随后恢复到与未受感染的亲代相似的小细胞形态,但最终仍收集到少数稳定的扁平细胞克隆。这些细胞在培养中生长缓慢,在裸鼠和软琼脂中不能生长。它们有RB mRNA和蛋白的表达。因此转染RB基因的表达可导致有调控的生长以及肿瘤形成能力的丧失。

最初认为核蛋白p53是一种细胞的编码基因产物,该产物同SV₄₀转化的啮齿类细胞的SV₄₀T抗原形成复合物。后来克隆了这种产物。p53蛋白在转化的啮齿类细胞和肿瘤细胞中过度表达的发现,产生这样一种见解,即p53基因是作为肿瘤形成的正效基因。然而现在遗传证据表明,受调控的野生型基因是一种肿瘤抑制基因。野生型P53在对抗Friend红白血病病毒转化效力方面也起到保护作用。

在ras转染的细胞中,突变的p53蛋白具有促肿瘤的活性,这表明它对原代大鼠细胞有转化效力。相反野生型p53同突变p53、ras一起转染,却使转化受到抑制。已经发现在杂合二聚体中突变p53蛋白同野生型结合。这使人们想到突变子可能通过削弱野生纯合二聚体而发挥其显性效力。而与此相反野生型通过同样过程也可抑制突变蛋白的转化功能。此外突变蛋白除了削弱野生型基因外,可能还有其他功能。例如,携有p53突变子的转基因小鼠发生肺肿瘤。这种p53蛋白的独特性在于它的野生型等位基因是一个抑制物,而某些突变子等位基因又起着肿瘤促进因子的作用。

Noda等人从成纤维细胞cDNA表达库中分离了

一种称为 *Krev-1* 的基因, 用这个基因再转染 *V-K-ras* 转化的 NIH 3 T 3 细胞, 得到几个转染细胞克隆。这些细胞在裸鼠中失去成瘤性, 在软琼脂和低血清培养液中生长不良, 不过它们含有几个 *K-ras* 拷贝并表达 *K-ras p21* 蛋白产物。因此, *K-ras p21* 肿瘤蛋白的转化活性是在转译后水平上被抑制, 从一个转化子中克隆的人 *Rrev-1* cDNA 的序列分析表明, 它在结构上属于 *ras* 家族。含有 *Krev-1* 的 R 16 细胞能抵抗 *V-K-ras* 的再转化, 但却能被 *V-src*, *V-mos*, *V-raf* 或 *V-fos* 再转化。这些实验和其他结果提示, *Krev-1* 可同 P 21 竞争, 而不能抑制其他癌基因诱导 NIH 3 T 3 细胞的转化。

近来从牛脑膜分离纯化了一类三磷酸鸟苷 (GTP) 结合蛋白, 并做了性质研究。其中之一与 *Krev-1* 的产物相同。这类蛋白包括组织特异的 *ras* 样蛋白, 是一类错综复杂的, 在不同组织中调节 GTP 相关事件的因子。

Schaefer 等用人胎盘来源的基因组 DNA, 同含有选择标记(抗潮霉素)的质粒共转染一种曾用人 *H-ras* (*EJ-ras*) 基因转染过的癌前大鼠细胞。挑选有扁平形态的转染克隆, 它们仍含有 *EJ-ras* 基因并且产生 P21 蛋白。从中克隆了一个 *BamHI* 消化的 18 kb 片段, 该片段在再转染中与细胞的扁平形状, 贴壁依赖和成瘤性下降有关。

Kuchino 等发现在 Rous 肉瘤病毒感染的大鼠细胞中有 *C-myc* 转录的激活。对这种病毒感染的细胞进一步研究发现一个与 *myc* 有关的新的基因 *S-myc*。*S-myc* 编码与小鼠 *N-myc* 蛋白有关的 47 KD 蛋白质, 但在 N 端缺少酸性结构域。克隆的 *S-myc* 基因表达的蛋白能够抑制大鼠 RT4-AC 肿瘤细胞在裸鼠中的成瘤性。

差异杂交 (Subtractive hybridization) 为发现那些在正常细胞表达, 而在密切相关的肿瘤细胞中不表达的基因, 提供一种常用的方法。正常细胞单链 cDNA 同过量的肿瘤 mRNA 杂交, 使在两种细胞中都有的遗传信息形成 DNA-RNA 杂交双链。用羟基磷灰石柱结合杂交分子, 分离回收没有配对的 cDNA, 再以这种 cDNA 作探针可在相应的库中钓出全长 c-DNA。尽管发现罕见的转录本需要特殊技术, 从原理上讲, 用这种方法可以找到任何表达的基因。差异杂交对发现抑制基因是一种相对简单的方法, 不过问题的关键在于如何选择密切相关的正常细胞和肿瘤细胞群体。

从乳腺细胞的差异杂交发现了三种令人感兴趣的

基因。它们在所有测定的正常细胞有表达, 而在任何原发肿瘤与肿瘤细胞系中表达。其中一种称为 *Keratin 5* (*K5*) 的基因, 编码一种只在正常乳腺上皮细胞中表达的结构蛋白。当这种正常细胞获得永生性时, *K5* 蛋白的表达呈低水平。因此, *K5* 是一种可区别培养的正常细胞和原代肿瘤细胞的重要标志; 同时也产生了这样一个问题, 即 *K5* 是否可能兼有结构功能和调节功能。同样, 在正常细胞中表达而在肿瘤细胞系中不表达的粘连蛋白, 也可作为区分两种细胞的另一种标志。

抑制基因也见于无脊椎动物, 果蝇的一系列调节基因的隐性突变导致细胞增殖失控, 浸润和死亡。已经克隆到的巨蛹致死基因就是其中之一, 该基因功能的缺失导致死亡, 将正常基因再整合到该位点缺损的区段, 肿瘤的发生可被阻抑。

肿瘤抑制基因的功能

染色体的稳定性 染色体异常是肿瘤细胞的特点。基因组内一系列促使肿瘤相关基因表达的改变导致肿瘤的发生。这些改变不仅包括经典的点突变, 更重要的是可使整个基因丢失或调节顺序受到破坏的缺失, 以及易位, 扩增和其他重排。视网膜母细胞瘤 LOH 的分析提示了有丝分裂的染色体不分离和重组以及物质的丢失。典型地见之于许多肿瘤中胞嘧啶甲基化的明显下降, 可能导致许多基因表达的改变。不过 Vogelstein 和他的同事曾推测, 去甲基化还可能通过提高染色体的粘稠性使染色体趋向不稳定。

调节 DNA 修复的基因可能符合肿瘤抑制基因的标准, 染色体的不稳定可能是肿瘤抑制基因功能丢失的直接后果。染色体稳定性可能主要归因于有效正确的 DNA 修复酶。在自发的和环境因素的诱导下, 染色体不断地经历着断裂和修饰事件, 在肿瘤易感的隐性遗传性疾病中(如着色性干皮病, 范可尼贫血, 布卢姆氏综合征), 损伤的 DNA 被错误地修复。在布卢姆氏综合征中发现一种稍有缺陷的 DNA 连接酶, 而且染色体和姐妹单体互换频率增高表明这种控制也处在紊乱之中。尽管哺乳类细胞中与 DNA 修复过程有关的酶很少, 但对细菌和酵母 DNA 修复缺陷的突变种的研究显然表明参与此过程的酶不在少数。

分化和衰老 分化显然是肿瘤抑制的一种方式, 因为终末细胞失去了再分裂的能力。然而, 多数肿瘤仍由部分分化的细胞所组成, 从而使人们能够识别肝脏、胰腺、肺、乳腺等细胞, 但这些细胞还会增殖。问题的症结在于理解分化途径是怎样控制的, 肿瘤中又是怎么被阻抑的。在哪一阶段分裂增殖转变为分化?

由处于不同分化途径的细胞融合产生的抑制的NXT杂种细胞,可能呈现出分化状态的正常细胞的类型而不是肿瘤细胞类型。这种令人感兴趣的观察提示,在正常亲代中的肿瘤抑制基因的表达可能与它们的分化途径相联系,或者甚至说就是一回事。有证据表明RB基因同分化有关,在很多种分化中的细胞,RB基因处于低磷酸化状态。RB周期性的磷酸化也与细胞周期调节有关。

用癌基因如myc基因转染能够阻止处在一定发育阶段的细胞的分化并促进增殖,研究结果说明,在发育中正常有序的相互作用如何被癌基因所干扰,而且还表明癌基因仅在分化途径中的某一特定阶段促进增殖和阻断分化。

衰老的实验研究为解决这个复杂的问题提供了一些新的线索。衰老是一种特殊的分化,在实验中用V-K-ras转化人正常的成纤维细胞,如果这些细胞预先获得永生性,(通过SV₄₀病毒感染和长期在培养中筛选),K-ras转化细胞就可以在裸鼠体内形成大的肿瘤,否则转化细胞只能长出微小的瘤结节,之后衰老消失。

细胞增殖的控制 肿瘤抑制基因的一个关键作用就是抑制细胞的增殖。细胞增殖过程的调节涉及到生长因子受体,信号从膜到核的传递过程,以及与转录和转录后调控有关的核结合蛋白。直到最近,这一领域的研究还是集中在对促进增殖的基因的研究。这些基因(癌基因)大部分已被确定为反转录病毒转化基因的细胞同类突变物。这些突变是功能获得性改变。反转录病毒癌基因的野生型细胞等位基因(原癌基因)通过维持正常调节控制导致细胞内稳定和平衡,但在致癌的突变中失去了这种控制。因为野生型基因产物可以调节细胞的增殖,产物改变或过表达可导致生长失控,所以可以认为这些突变是显性的。

近来克隆的两个基因,RB和p53是肿瘤抑制基因最初例证,它们可能起控制细胞繁殖的作用。因为在许多不同肿瘤都发现这些基因的突变,因此在阐明RB和p53抑制基因功能机制方面是有很大大潜在意义的。

RB蛋白是110KD的磷酸蛋白,在细胞周期中又被再次地磷酸化。在静止期细胞中看不到这种过度磷酸化形式,但是在细胞周期中当细胞接近G₁/S界限时,就出现这种形式,并且存在于整个S和G₂期。RB蛋白总量是不变的,但其磷酸化转换反应迅速。蛋白上许多磷酸化的丝氨酸只有少数参与这种循环。RB蛋白与SV₄₀T抗原腺病毒E1A蛋白以及人乳头状瘤病毒(HPV)的E₇蛋白形成复合物。氨基酸序列比

较已确定有两个区域与RB蛋白的结合有关。还证明其序列与E7和SV₄₀T大T编码的结构域相似。

SV₄₀T抗原与基础蛋白P^{110RB}结合,不与过磷酸化形式的蛋白PP^{113-114RB}结合,而E1A与两者都结合。在病毒转化细胞中RB与T抗原,E1A或E7的结合去除了RB的正常抑制作用,使生长失控。但这些病毒与RB复合物只见于体外研究。在视网膜母细胞瘤RB蛋白不存在或是由于突变而发生变化,这样可能改变它形成复合物的能力,从而干扰了它的抑制功能。基于这些资料和推论,可以假定在多数正常细胞表达的RB基因可能起着细胞周期进程的抑制物的作用。由于在正常细胞中的磷酸化,在病毒感染或肿瘤细胞中抑制P^{110RB}蛋白的竞争结合而干扰了它的正常抑制作用。

最近RB和P53的研究表明在细胞周期调节的协同作用中它们的功能是偶联的。共沉淀研究显示它们有相同的结合方式,RB和P53蛋白都能与SV₄₀T抗原结合,不过是在不同的结构域,同样腺病毒转化蛋白E1A和E1B可以分别与RB和P53蛋白结合。用HPV做类似的研究表明E7同RB结合,E6已被确定是一种病毒癌基因,肯定P53是否是E6的细胞靶子,以及在作用上同E1B和T抗原的相似程度如何都是十分重要的。

这些体外研究资料不是孤立的,它们对从病毒诱发的啮齿动物和人细胞的永生性的研究结果,都是有利的佐证。虽则很多问题仍待探索,但是这些研究与人类肿瘤中RB与P53突变的广泛存在的相关性将更加强化这样的观点,即这些基因在肿瘤的抑制中起着重要作用。

衰老的肿瘤抑制效应已经讨论过了。虽然有关结果报告很少,但实际上SV₄₀或腺病毒使人细胞永生化的结果是不能重复的。相反,HPV却可使培养的人成角化细胞恒定地获得永生性。HPV-16的E6加E7基因对这一过程是必需的,也是足够的。最近研究表明,HPVs与鳞癌有关,特别是宫颈癌。这些肿瘤来源于鳞状上皮细胞如成角化细胞。我们用HPV-16型和18型使正常人乳腺上皮细胞获得永生性。既然HPV还没有与乳腺癌的发生有何联系,这个结果提出了HPV可能与乳腺和其它上皮来源的肿瘤有关的可能性。除HPV外还没有其他相关DNA肿瘤病毒能有效地使人细胞永生性,这提示了病毒蛋白同细胞靶子相互作用细节上的差异。

侯岩摘译自《Science》,Vol.246,p.1406-1412,1989。(徐永华,姚曾序审校)