

· 综 述 ·

石棉致癌与抑癌基因突变

袁素波 (综述) 杨 青 翟朝阳 (审校)

石棉是国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 确认的肺和恶性间皮瘤致癌原, 其致癌机制是目前粉尘毒理的重要研究内容。抑癌基因是较癌基因之后人类发现的与肿瘤发病有密切关系的一类重要基因。1987年抑癌基因理论提出, 1989年 Finlay 确认了野生型 p53 基因为抑癌基因, 继而发现了其在人类肿瘤中的广泛突变, 特征性的突变谱还为肿瘤病因和分子病理的研究提供了线索。p16 基因于 1993 年发现, 由于其基因长度较短, 并且直接参与了细胞周期的调控, 在多种肿瘤细胞株和肿瘤组织中发生缺失和突变, 是又一重要的抑癌基因。进入 90 年代, 石棉致癌与抑癌基因突变之间的关系受到关注和研究, 但所见报道不多, 本文就此作一扼要综述。

1 p53 基因的主要研究轨迹

1979 年 Lane 和 Crawford 首先在 SV-40 的转化细胞中观察到, 一个 53KD 的蛋白能与 SV-40DNA 病毒发生共沉淀^[1], 恶转的啮齿类动物细胞核内出现 p53 蛋白积聚^[2]。与此同时, 对其在肿瘤发生机制中的作用进行了研究, 发现被克隆的 p53 基因在恶转的啮齿类动物细胞和人类细胞中有微弱的癌基因样作用^[3]。80 年代后期研究者才发现具有癌基因样作用的原来是突变型而非野生型的 p53 基因^[4]。

多种 p53 突变体显示具有显性癌基因样作用, 而野生型在体外实验中则具有抑制啮齿类动物纤维细胞恶性转化的作用, 在体内外均显示抑制肿瘤生长的效应^[5]。1989 年以后, p53 基因被发现在多种人类肿瘤中频繁突变, 此后, 有关 p53 基因突变的文献报道剧增, 突变数据积累呈指数上升^[6]。

近期的研究主要致力于了解 p53 蛋白相关的基因转录激活、DNA 合成与修复、衰老、基因组可塑性 and 介导程序化细胞死亡。这些生化机制是以 p53 蛋白为主的一组复杂的细胞蛋白相互协作共同完成的。一些病毒癌蛋白等即通过这一途径同 p53 蛋白结合而干扰其生理功能的正常发挥。正在进行的研究, 力图阐明

p53 相关蛋白的三维结构, 但其中精确的调节机制尚未明了^[7]。

近年来, 有关人类肿瘤 p53 基因突变的数据积累呈指数增长。为便于进一步对 p53 基因进行深入研究和对以往的研究数据的对照比较, 国际癌症研究机构构建了 p53 基因突变数据库, 两年更新一次, 1996 年更新时含有文献报道的细胞株点突变、原发肿瘤、恶性和癌前组织的 p53 基因突变共 5 097 次, 1997 年再次更新时突变次数将超过 6 000 次^[8], 由此可见, p53 基因突变在肿瘤分子机制研究中的重要地位。

2 p53 的主要失活部位及突变热点分析

p53 基因定位于人 17 号染色体短臂 17p13, 跨度 20kb, 含 11 个外显子和 10 个内含子, 其转录产物为 2.5kb mRNA, 编码一个 53kd 由 393 个氨基酸组成的核磷蛋白。p53 蛋白的主要功能涉及基因转录激活、监视 DNA 合成、修复和基因组可塑性、调节细胞稳态、负性生长抑制和介导程序化细胞死亡, 这是一组多组分蛋白共同完成的复杂调控机制, 因此 p53 蛋白能同多种细胞蛋白结合, 包括一些病毒癌蛋白亦可通过同 p53 的结合而阻碍 p53 蛋白功能的正常发挥。

生物体 DNA 经常受到外源性致癌物和内源性生化过程的干扰而导致突变, 引起突变的 DNA 损伤包括缺失、插入、碱基置换 (包括转换和颠换)。p53 基因 79% 的点突变发生在保守区的中间区域, 少数 (23%) 见于羧基和氨基端, 基因的两端则是非错义突变的主要发生部位, 非错义突变 (无义、移框、拼接和无声突变) 和发生在两端的极少数错义突变和个别氨基酸的替代, 对这些区域的蛋白构型和功能的完整性并无影响^[9]。

值得提出的是 p53 蛋白的高度保守区是氨基酸 97 ~ 292 次保守区域 324 ~ 392, 前者是序列特异性的 DNA 结合位点, 后者与转录激活和寡聚化功能相关, 其 97 ~ 292 亦即 p53 第 II ~ V 高保区, 是突变密集的区域^[10]。在 97 ~ 292 位密码子的区段内, 其中的 130 ~ 286 位密码子之间的一段氨基酸是突变更为集中的区域, 可以看出位于 130 ~ 286 位密码子之间的氨基酸序列是决定 p53 蛋白构象的关键部位, 这一跨度比体外及进化研究中提出的决定 DNA 结合特异性的区段要短。

作者单位: 61004 成都 华西医科大学公共卫生学院 (袁素波、杨青), 华西医科大学基础医学院 (翟朝阳)

即位于该区域以外的突变对 p53 构象的改变不一定产生明显的作用。位于热点区域内的氨基酸较其他部位的氨基酸更易受到影响,但其中保守性更高的氨基酸

则极少发生突变,如 II 区的氨基酸中只有 3 个 (132lys, 135cys, 141cys) 是相对的突变热点^[11]。p53 蛋白分子结构见图 1

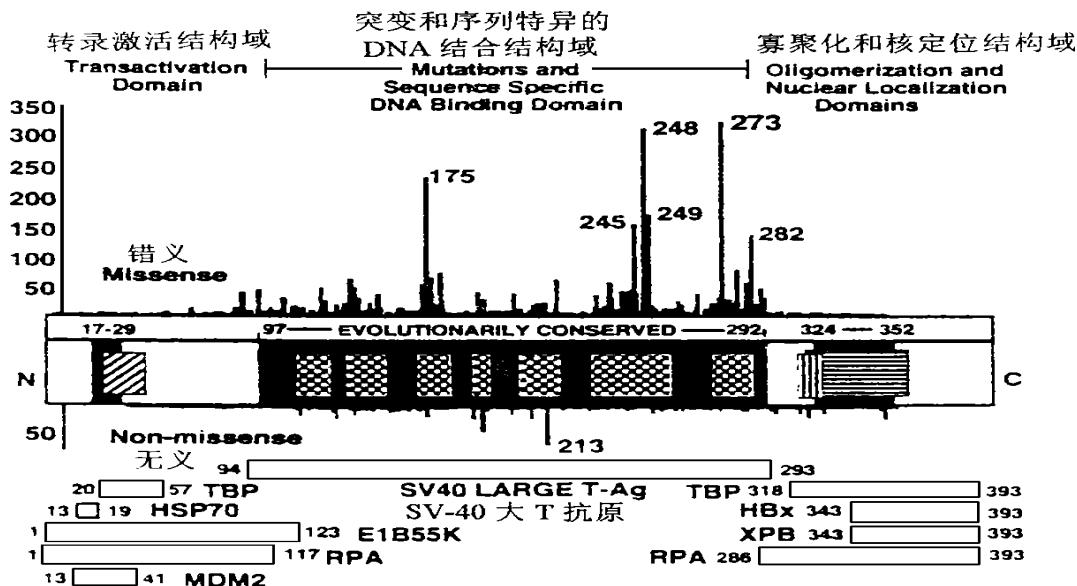


图 1 p53 分子结构示意图^[7]

Fig1 Schematic representation of p53 molecular

基于以上观察可以认为: (1) 极高度的保守区域通常是与 p53 序列特异性 DNA 结合功能相关联的 (如 97 ~ 292) 区域; (2) 转录激活, 核定位和寡聚结构域中度保守, 其中个别氨基酸的置换不至于明显影响其功能; (3) 第 II ~ V 区中的特定保守残基是突变的好发部位。

3 p53 基因与石棉致癌机制的研究

石棉主要导致人类的恶性间皮瘤和肺癌, 肺癌可以由多种致癌因素所引起而较少作为石棉致癌的特征性肿瘤来研究。恶性间皮瘤普通人群罕发, 与石棉接触存在明显的相关性 (80% ~ 85%), 常作为石棉致癌的特征性肿瘤而受到关注。这一领域对 p53 基因的研究较之常见肿瘤明显滞后。

3.1 恶性间皮瘤与 p53 蛋白免疫组化染色

有关恶性间皮瘤 p53 蛋白免疫组化研究报道中比较一致的结论是恶性间皮瘤 p53 蛋白与对照相比差异呈显著的阳性, 阳性率分别为单抗 25% (9/36) 和 59% (11/20); 多抗 43% (21/47) 和 70% (14/20), 其中的 3 个对照组均为良性或反应性胸膜病变, 呈一致性的阴性^[12-14]。报道使用的组化技术相似, 抗体不一, 单抗较多抗特异性高而阳性率稍低。但在非恶性细胞中呈可

重复的阳性反应。因此, 在病理诊断上, 当恶性间皮瘤病灶缺乏特征性改变时, p53 蛋白可作为分辨良性或恶性病变的敏感标志物之一。

从以上实验 p53 蛋白的染色情况看, 呈强阳性的少, 弱阳性或低表达的多, 部分瘤组织 p53 蛋白染色呈阴性。目前 p53 蛋白同基因突变关系的理论尚不够完善, 对此尚不能作出较为满意的解释, 但至少可以认为蛋白染色呈明显阳性在一定程度上同基因突变相关联。一般认为基因突变使蛋白质构象改变, 稳定性增加, 半衰期由数分钟延至几小时乃至十几小时而在细胞内积聚, 或由于氨基酸替代使原来隐蔽的抗原决定簇暴露, 易被抗体识别呈阳性反应。在对恶性间皮瘤细胞 p53 蛋白表达研究时亦发现, 部分病例蛋白染色呈低水平或阴性, 而基因突变确实存在。目前只能认为 p53 蛋白低表达并不能表明 p53 功能的正常, 对此部分机制将有待于 p53 基因和蛋白的基础研究进展来解释。

3.2 p53 基因突变与恶性间皮瘤的发生

恶性间皮瘤的染色体畸变中存在 17p 缺失, 其对 p53 基因会产生什么样的影响? 基于此, Cote 于 1999 年报道了对 4 株恶性间皮瘤细胞株进行的较系统的 DNA

分析结果: 研究所用的4株细胞建株于原代手术标本, 其中3例有石棉接触史。染色体核型: 2例有17p缺失和重排, 2例17p正常; 基因组DNA 17p探针杂交2例呈现17p的杂合性丢失; Northern blot结果1例无p53 mRNA表达; 运用RT-PCR扩增p53基因的全部编码序列并进行序列分析, 在p53的进化保守区内的第175和245位密码子均出现G→A转换, 导致编码氨基酸发生精氨酸→组氨酸、甘氨酸→门冬氨酸的置换。这次实验从染色体核型到cDNA全长序列, 对p53基因的分析研究较为系统。实验结果显示, 4例中3例有石棉史者1例无mRNA表达, 2例有点突变, 均呈现p53基因异常, 据此Cote等认为p53基因异常是恶性间皮瘤的特征性改变^[15]。值得提出的是该次实验仅采用了4个细胞株, 株数过少, 且经体外建株传代, 存在自发突变的可能, 从四株细胞株的研究所作的结论还需更多的实验结果的充实。稍后, Metcalf等对来自17个手术标本建株的20个细胞系进行了p53的研究, 结果显示: p53蛋白免疫组化, 强阳性4例, 其余全为低水平表达; 在裸鼠体内有1株细胞成瘤; p53基因第2~11外显子全长测序, 第8外显子245位密码子G→A转换, GGG→AGC, 编码氨基酸由甘氨酸→丝氨酸; 第8外显子278位密码子C→T转换, CCT→TCT, 导致编码氨基酸由脯氨酸→丝氨酸。此次实验共发现p53基因点突变3例(2/20 10%), 据此Metcalf等认为p53基因突变并不是恶性间皮瘤发病过程中的重要事件^[16]。对人恶性间皮瘤细胞株的研究以高突变率来自小样品组, 低突变率来自实验组样品数稍多, 因而似较可信, 但总的看来p53在人恶性间皮瘤中确实存在一定程度的突变。

国内, 1996年刘云岗用云南姚安青石棉诱导了BALB/c3T3细胞的恶性转化, 并在裸鼠体内成瘤。林凡对8株恶性转化细胞株p53基因11个外显子的PCR-SSCP分析结果, 7株存在p53基因点突变, 5个点突变位于外显子9~11, 2个位于外显子4~6^[17]。1997年罗素琼等报道, 云南省大姚县青石棉自然污染区12例恶性间皮瘤, p53第5~8外显子PCR-SSCP结果, 4例出现p53基因点突变, 3例位于第5外显子, 3例位于第6外显子^[18]。以上结果表明, 在这一领域我国根据自己的石棉危害情况, 从细胞至分子水平进行了有特色的研究工作, 实验结论对于从理论上阐释石棉的致癌机制起到了积极作用。

4 石棉致癌与p16基因

从首次接触石棉到恶性间皮瘤发病其间有着长达

数十年的潜伏期, 这提示石棉的致癌机制有可能涉及多个基因的突变。因此癌基因和其他抑癌基因的改变也可能是石棉的致癌机制之一。

p16(基因又名MTS1(多肿瘤抑制基因)), 位于9号染色体9p21, 全长8.5kb, 由2个内含子和3个外显子组成, 第1外显子长126bp, 第2外显子长307bp, 第3外显子长11bp, 编码产物是由148个氨基酸残基组成的15.8kD的蛋白质^[19]。

p16基因产物功能的实现是通过细胞周期而与多种癌基因和抑癌基因发生作用, 成为细胞增殖的负性调控因子。当它发生基因缺失或突变时, 便成为许多肿瘤发生的直接原因。p16主要通过cdk4的转导作用而实现对细胞周期的调节, cdk4磷酸化的底物常常是一些与细胞周期调控有关的癌基因或肿瘤抑制基因的产物, 其中Rb基因产物pRb为其重要底物之一。低磷酸化的pRb为其活化状态, 可与转录因子或其他肿瘤蛋白结合而使之失活, 当cyclin D与cdk4结合时可促使pRb磷酸化而失活, 受制于pRb的一组下游效应物可因此摆脱pRb的束缚而活化, 促使细胞增殖进入S期。相反当p16与cdk4结合时, 可使cdk4活性受抑而阻止细胞生长分裂, 正常情况下p16和cycD是竞争性地与cdk4结合并保持一种动态平衡^[20]。

p16基因的调控与p53和Rb密切相关, Tam等在转化细胞的p16表达水平研究中发现, 有p16过度表达的细胞系无一例外的有Rb或p53蛋白的失活, 其中以Rb蛋白的失活对p16更有直接作用^[21]。

对肿瘤细胞系及原代肿瘤组织中p16基因异常的研究提示, 在肿瘤细胞株, p16基因的缺失率从肺癌的25%到星形胶质瘤的82%不等, 平均纯合缺失率为46%。但对34例非小细胞肺癌组织和9例非小细胞肺癌细胞株进行p16测定时发现细胞株中p16异常为67%(6/9), 而癌组织为22%^[22]。1997年, Cheng等报道了对建株于42个恶性间皮瘤病例的40个细胞株及2例肿瘤组织p16基因的研究结果: 83%(34/40)的细胞株有p16基因的纯合缺失, 其余的细胞株中有4例表达降低, 瘤组织基因纯合缺失率22%(5/23)^[23], 与其他肿瘤的研究结果相似均出现基因异常率在细胞株明显高于肿瘤组织的倾向。就恶性间皮瘤细胞株而言p16基因异常, 无疑是一种常见事件, 但有关肿瘤组织p16基因的异常情况尚待更多的研究资料来证实。

从石棉致癌的遗传学改变看, 由石棉诱导的啮齿类、人类恶转细胞和石棉所致的恶性肿瘤均出现了广泛的染色体畸变, 畸变的结果可能损及多个抑癌基因

的染色体位点, 进而形成等位基因的丢失和抑癌基因的突变、失活, 携带有突变基因的细胞克隆即可能成为最早的恶性转化细胞。p53基因作为与多种肿瘤发病相关性较强的抑癌基因, 常见肿瘤中 p53基因的资料已较丰富, 石棉相关肿瘤 p53的突变数据也正在积累。p16基因作为一个较新的抑癌基因, 其研究资料正在逐步充实。为揭示石棉的致癌机制, 对石棉相关肿瘤进行已知癌基因、抑癌基因及其作用网络和未知相关基因的探索研究是其分子机制研究的重要内容。研究的深度在很大程度上依赖于基因生物学在技术上的进步和本学科对前沿技术的引进以及引进后研究思维的创新。这些研究将对寻找石棉致癌的分子标记物、预测高危人群、发现早期病例和治疗已发病例提供重要的理论线索。

5 参考文献

- Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV-40 transformed cells. *Nature*, 1979, 278: 261
- Kress M, May E, Cassingena R, et al. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, 1979, 31: 472
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 1990, 248: 76
- Chen X, Farmer G, Zhu H, et al. Cooperative DNA binding of p53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation. *Genes Dev*, 1993, 7: 1837
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 1989, 57: 1083
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991, 253: 49
- Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 1996, 17: 1187
- Hainaut P, Soussi T, Shomer B, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (1): 151
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, 362: 709
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 1994, 265: 346
- Greenblatt M S, Bennett WP, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994, 54: 4855
- Mayall FG, Goddard H, Gibbs AR. p53 immunostaining in the distinction between benign and malignant mesothelial proliferations using formalin-fixed paraffin sections. *Journal of pathology*, 1992, 168: 377
- Kafiri G, Thomas DM, Shepherd NA, et al. p53 expression is common in malignant mesothelioma. *Histopathology* 1992, 21: 331
- Ramael M, Lemmens G, Eerdekens C, et al. Immunoreactivity for p53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. *J Pathol*, 1992, 168: 371
- Cote RJ, Jhanwar SC, Novick S, et al. Genetic alterations of the p53 gene are a feature of malignant mesotheliomas. *Cancer Res*, 1991, 51: 5410
- Metcalfe RA, Welsh JA, Bennett W P, et al. p53 and kirsten-ras mutations in human mesothelioma cell lines. *Cancer Res* 1992, 52: 2610
- 林凡, 翟朝阳, 刘玉清, 等. 青石棉诱发的转化细胞中 p53 分析. 癌变·畸变·突变, 1997, 9 (6): 338
- 罗素琼, 孙芝琳, 游乐然, 等. 用 PCR-SSCP方法检测间皮瘤组织中 p53基因点突变. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15 (1): 1
- 侯宇, 赵利金, 林剑. 抑癌基因新发现和致癌机制新观点. 国外医学肿瘤学分册, 1995, 22: 65
- Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase4 inhibitor p16^{ink4}. *Cancer Res*, 1994, 54: 5816
- 陆哲明, 张波. p16抑癌基因的发现及研究. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17 (4): 160
- Vos S, Miller CW, Takeuchi S, et al. Alterations of CDKN2 (p16) in non-small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995, 14: 164
- Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, et al. p16 alterations and detection mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res*, 1994, 54: 5547

(收稿: 1996-11-20 修回: 1997-07-28)