

p16 基因与乳腺癌关系的研究进展

华 晶 王雅杰

乳腺癌是女性最常见恶性肿瘤,其发生率呈上升趋势,目前也是全球女性肿瘤患者主要的死亡原因之一^[1]。据 2008 年统计,每年约有 138 万新病例发生,乳腺癌患者占全部女性恶性肿瘤总数的 23%,每年约有 45.84 万患者死亡,占全部女性恶性肿瘤总数的 14%^[2]。尽管乳腺癌发病与发展的机制仍未完全明确,然而伴随分子生物学的高速发展,关于乳腺癌的发病机制及预后在分子水平上的研究更为深入,并亦有所成果。某些癌基因,如 Neu、IGF、mTOR 等,以及抑癌基因,如 BRCA1、Rb、p53、PTEN 在乳腺癌中异常表达的研究,表明了这些基因与乳腺癌的相关性。目前,人们对 p16 抑癌基因的研究主要关注在细胞周期调控对肿瘤发生、发展及预后的影响。

一、p16 基因发现

1992 年美国的 Travis^[3] 在研究黑色素瘤基因时,发现其存在某些蛋白能够与细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs) 及对应细胞周期蛋白(cyclins) 相结合;起初他们的研究主要集中于 3 个基因,即 1 号、9 号染色体长臂和 6 号染色体短臂。后期更加关注于对 9 号染色体的研究,并且发现有 3 条证据支持 9 号染色体短臂中段的 21 区存在一个等位基因丢失以及另一个保留等位基因突变,因此推测 p21 区域存在黑色素瘤的易感基因。

两年以后, Kamb 等^[4] 进一步研究,通过黑色素瘤细胞系纯合性缺失的方法发现,推测的肿瘤抑制基因位于 9 号染色体短臂上一个 4 万碱基不到的区域,最终定位 9p21,这个基因就是多肿瘤抑制基因 MTS1 (multiple tumor suppressor1), 即 p16 基因,它编码 CDK4 的抑制子 p16;除黑色素瘤外,p16 还可在源于肺、乳腺、脑、骨、皮肤、膀胱、肾、卵巢、淋巴细胞的肿瘤中被检测到,提示 p16 基因的缺失与突变与大范围、多种类的肿瘤发生有关。这一发现引发了学术界的广泛关注,其抑癌的地位甚至被认为高于 p53,从

而成为研究的热点。

二、p16 基因结构

该基因全长 8.5kb,定位于 9p21,包含 3 个外显子和 2 个内含子;p16 的 N 末端由 4 个重复的锚蛋白结构组成,该空间结构为重要的结构域,主要抑制细胞周期蛋白依赖激酶 4(CDK4);p16 基因包含 1 个 148 个氨基酸构成的开放性阅读框架,编码的蛋白质相对分子质量为 15.845kDa^[5]。

三、p16 基因生物学特性与细胞周期调节

细胞周期调控体系主要包括细胞分裂周期(cell division cycle, CDC) 基因、细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖激酶(CDKs)、细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs)。cyclins 和 CDKs 在细胞周期调节中起促进作用,而 CKIs 则起抑制作用。细胞周期调节的关键作用在检查点(checkpoint),现今认为存在两个重要检查点——G₁/S 检查点和 G₂/M 检查点,前者控制 DNA 复制,而后者控制细胞有丝分裂。细胞通过 G₁/S 检查点进入 S 期,则完成 DNA 复制,并易于通过剩余检查点而完成有丝分裂,因此 G₁/S 的调节更为重要。

CDK4 和 CDK6 是参与细胞周期 G₁/S 过渡调节中起关键作用的细胞周期蛋白依赖激酶,cyclin D 和 cyclin E 为参与该检查点调节的周期素,其中 cyclin D1 更重要。Cyclin D1 与 CDK4 或 CDK6 形成复合物使其激活,促使 Rb 蛋白磷酸化,继而释放与其结合的 E2F,从而使关键的细胞周期调控因子得以转录,导致 DNA 合成开始,细胞从 G₁ 期进入 S 期。作为重要的细胞周期调控因子,p16 与 cyclin D1 竞争性结合 CDK4 或 CDK6,并对 CDK4 有特异地抑制作用,导致 Rb 蛋白脱磷酸化,阻止细胞周期的进展,因此 p16 与 cyclin D 一同参与细胞从 G₁ 期向 S 期转换的调节。

此外,包括 Lu 等^[6] 及 Seoung 等^[7] 均提出 p16 还可能会促进人类乳腺癌细胞的凋亡,尽管其机制尚不明确,但在诱导乳腺癌细胞衰亡方面很有帮助。

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,教授,博士生导师,电子信箱:yajiewa0459@

163.com

四、p16 与乳腺癌

乳腺癌的发生及转移与多种抑癌基因异常有关,乳腺癌细胞系 p16 也有较高的缺失率。p16 基因灭活机制主要为缺失、突变和甲基化。

1. 缺失、突变:在肿瘤细胞中出现高频的缺失和突变,被认为是肿瘤抑制基因的 1 个重要特征。既往曾认为 p16 基因异常的主要表现特点是以基因缺失为优势,且多为纯合性缺失,而点突变并非原发性乳腺癌的关键基因变化。Lin 等^[8]的研究表明 5 个乳腺癌细胞系有 2 个检测出 p16 基因的纯合性缺失,但在 37 例原发性乳腺癌及 5 种肿瘤细胞系中未发现原发性乳腺癌中存在基因突变,提示 p16 的基因突变并非原发性乳腺癌基因改变的主要形式。与之形成对比的是,Mori 等^[9]检测了 27 例食管鳞状上皮癌,发现 14 例存在基因突变,其突变率超过 50%。表明 p16 突变频率随肿瘤类型的不同而改变,且差异很大。Yoshimi 等^[10]研究指出,因 p16 缺失导致在三阴乳腺癌中的低表达与新辅助化疗抵抗相关。

2. 过表达:p16 在人类乳腺癌的发展与演进过程中作用明显,此外,国外研究表明 p16 的过表达在侵袭力更强的肿瘤中作用明显^[7]。研究发现乳腺癌频繁出现过表达(69.4%),而且与肿瘤边缘相关。其他一些报道^[11,12]称乳腺癌中会出现 p16 下调,伴随发生的是 p16 免疫反应性的过表达及肿瘤的侵袭性。

p16 过表达已在人类一些恶性肿瘤中发现,例如乳腺癌、小细胞肺癌、唾液腺多形性腺瘤、卵巢癌。不同肿瘤 p16 过表达的部位有所不同,但多数存在于细胞质或细胞核,或同时存在于两者,乳腺癌中多数情况为细胞核、细胞质内同时表达,或仅在细胞质中表达。目前 p16 过表达的机制还未明确,尚未发现 p16 过表达同时存在基因突变或缺失,Hu 等^[13]通过对唾液腺多形性腺瘤的研究发现,细胞核及细胞质 p16 的过表达与 p16 基因启动子甲基化无关。因此,p16 基因过表达可能不只是与基因本身改变这个层面相关,还与基因表达后修饰或其他路径相关。

之前的研究发现 p16 过表达不仅与细胞癌变相关,而且与浸润性肿瘤的预后相关联,如乳腺、前列腺^[11,14]。正常人体组织只表达低度的 p16,或是无法检测到 p16 蛋白。因此,p16 在乳腺癌中的高表达可能会是肿瘤发展、演进的重要因素。一些研究还认为 p16 具有包括乳腺癌在内的独立预后因子的特征。这些发现提示 p16 可能成为肿瘤演进、预后及诊断的标志物^[12,14,15]。

国内学者研究发现雌激素受体(ER)的缺失与 p16 的异常表达相关,在乳腺癌中 p16 异常表达表现为:失去了正常核定位,出现细胞质或全细胞的弥漫表达。p16 异常表达在低分化的癌组织阳性率高,与 ER 的表达呈负相关,与 Ki-67 的表达正相关^[16]。

3. 启动子甲基化:近年的研究发现,p16 基因启动子甲基化较纯合性缺失及突变发生率更高,因此研究 p16 基因甲基化状况可能具有更重要的意义。DNA 甲基化是在胞嘧啶 5'位羟基上加上一个甲基基团,据报道,p16 启动子甲基化频率大概在 17% ~ 50%^[17]。

Radpour 等^[18]通过观察 p16 表达和端粒酶长度的关系,发现 p16/Rb 通路由于甲基化失活可能导致严重的端粒缩短,从而引起基因不稳定以及最终向恶性转化。在端粒酶关键时期出现严重的基因组不稳定,会促进肿瘤的基因改变。他们所做的 52 组配对样本中,41 对正常组织样本的端粒酶长度明显长于肿瘤端粒酶长度。乳腺癌组织中端粒酶缩短与年龄、肿瘤类型、肿瘤大小、淋巴结转移情况、雌激素、孕激素受体情况、Her-2 扩增无关,但却与组织学分级和远处转移相关。Svenson 等^[19]也发现乳腺癌患者外周血端粒酶长度与对照组外周血端粒酶长度不同,端粒酶长度可以作为一个重要的预后生物标志。因此,相关基因端粒酶的缩短及启动子的甲基化均有可能成为乳腺癌的生物标志。

Xu 等研究认为乳腺癌患者病死率与 p16 启动子甲基化高度相关,且甲基化基因数目增加,乳腺癌患者的病死率也呈数量依赖性增长。即使将结果按激素受体状态分层,p16、ApC、BRCA1 3 个基因的甲基化状态仍可预测病死率。同样,Yoon 等也证明 p16 启动子甲基化,尤其是一组基因甲基化,很有可能成为预测乳腺癌预后的生物标志。

Feng 等也发现将 BRCA1 及 p16 基因甲基化检测并结合 CA153 对乳腺癌的复发风险有预测价值。Zeinab 等通过对乳腺癌及淋巴结转移灶的研究证实 p16 基因出现异常的肿瘤特异性甲基化表现,在肿瘤的原发病灶和转移病灶之间存在甲基化异质性,认为 BRCA1 及 p16 有可能成为预测转移的生物标志。国内学者赵英芳等通过对乳腺癌组织、癌旁增生组织及正常乳腺组织中 p16 基因甲基化与临床病理指标关系的分析显示,癌旁增生组织中 P16 蛋白表达虽然高于癌组织,但二者差异无统计学意义,提示 P16 蛋白表达可能不宜作为乳腺癌早期诊断的指标。但是浸

润性导管癌中 p16 蛋白表达较导管内癌有明显降低,而且随着组织学级别的升高,p16 蛋白表达显著下降,这一现象在一定程度上提示由于 p16 基因的抑癌功能下降而导致肿瘤的恶性度增高。因此认为 p16 基因异常甲基化可能在乳腺癌发生过程中作用有限,但在肿瘤的演进中发挥作用。

4. 抗血管:p16 介导的肿瘤细胞增殖抑制已经有研究,共识是 p16 的细胞周期阻滞功能起了关键作用,同时还可能存在诱导凋亡的作用。Lu 等^[6]通过 AdRSVp16 和乳腺肿瘤细胞系 MDA - MB - 231 建立模型,同时分析 p16 的所有抗肿瘤效应,结果显示此模型在体外情况下表现出持续的多重抗肿瘤效应,而在体内情况下表现出抗血管及诱导衰老、凋亡效应。而且,在体内的抗血管效应较抗增殖效应更为明显。这是首次提出存在抗血管效应的多重抗肿瘤效应。这也提示,p16 具有不同抗肿瘤功能的多模块平台。

五、p16 的意义及前景

p16 在细胞周期中直接对 CDK4 产生抑制作用,影响了细胞周期的进程,即对细胞周期起负调控作用。在许多肿瘤中存在着 p16 基因的高频缺失,这一切表明,它在肿瘤形成中起着重要抑癌作用。p16 基因具有 CDK4 这一专一作用靶点,是相对理想的靶向药物研究对象。p16 基因片段较小,为 444bp,作为基因治疗的靶基因易于操作。因此,p16 有着广泛的应用前景,极有可能成为新的靶基因。

国内外学者对 p16 基因的深入研究也从各个角度提出 p16 表达在肿瘤分级、恶性程度、临床预后、临床病理等方面的应用前景。尤其是 p16 异常表达能否成为三阴性乳腺癌的检测指标值得期待。肿瘤治疗是研究基因的最终目的,Andrew 等已提出 p16 基因治疗在鼻咽癌中的可行性,Lu 等^[6]通过建立乳腺癌模型也提示 p16 具有不同抗肿瘤功能的多模块平台。随着研究的进一步深入,必将为肿瘤的预防、诊断和治疗提供新的策略。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225 - 249
- Ahmedin J, Freddie B, Melissa M, *et al.* Global cancer statistics [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011, 61(2):69 - 90
- Travis J. Closing in on melanoma susceptibility gene(s) [J]. Science, 1992, 258(5085):1080 - 1081
- Kamb A, Gruis NA, Weaver - Feldhaus J, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 264(5157):436 - 660
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell - cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. Nature, 1993, 366:704 - 707
- Lu Y, Zhang X, Zhang J. Inhibition of breast tumor cell growth by ectopic expression of p16/INK4A via combined effects of cell cycle arrest, senescence and apoptotic induction, and angiogenesis inhibition [J]. Cancer, 2012, 3: 333 - 344
- Seoung WC, Sohn JH, Kim DH. Overexpressions of cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(3): 445 - 453
- Lin X, Dennis S, Christopher J. Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/p16^{ink4}) in human breast carcinomas [J]. Cancer Res, 1994, 54:5262 - 5264
- Mori T, Miura L, Aoki T, *et al.* Frequent somatic mutation of the CDKN2/CDK4I(multiple tumor suppressor/cyclin - dependent kinase 4 inhibitor)gene in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1994, 54:3396 - 3397
- Yoshimi Y, Hayashi N, Hayashi H. Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor - negative breast cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 130:2568 - 2579
- Dublin EA, Gillett CE, Smith P, *et al.* Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters[J]. Int J Cancer 1998, 79:71 - 75
- Vallian S, Sedaghat M, Nassiri I, *et al.* Methylation status of p16 INK4A tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135:991 - 996
- Hu YH, Zhang CY, Li J. Aberrant protein expression and promoter methylation of p16 gene are correlated with malignant transformation of salivary pleomorphic denoma[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(7):882 - 889
- Halvorsen OJ, Høstmark J, Haukaas S, *et al.* Prognostic significance of p16 and CDK4 proteins in localized prostate carcinoma[J]. Cancer, 2000, 88:416 - 424
- Aaltonen K, Amini RM, Heikkilä P, *et al.* High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer [J]. Br J Cancer 2009, 100:1055 - 1060
- Cui SP, Wang HL, Peng W, *et al.* Aberrant expression and correlative analysis of p16 in breast cancers[J]. Journal of Peking University:Health Sciences, 2012, 44, 5:755 - 759
- Li S, Rong M, Iacopetta B, *et al.* DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features[J]. Cancer Lett, 2006, 237(2):272 - 280
- Radpour R, Barekati Z, Haqhihi MM, *et al.* Correlation of telomere length shortening with promoter methylation profile of p16/Rb and p53/p21 pathways in breast cancer [J]. Modern Pathology, 2010, 23:763 - 772
- Svenson U, Nordfjall K, Stegmayr B, *et al.* Breast cancer survival is associated with telomere length in peripheral blood cells[J]. Cancer Res, 2008, 68:3618 - 3623 (收稿日期:2013 - 03 - 09)

(修回日期:2013 - 03 - 21)