

细胞周期监测点激酶 2 突变与乳腺癌相关的研究进展

王一然 王 宁 王雅杰

摘 要 细胞周期检测点激酶 2 (checkpoint kinase 2, CHEK2) 是由 CHEK2 基因编码的 DNA 双链断裂损伤的重要信号转导蛋白, 参与 G_1 期、S 期和 G_2/M 期的阻滞。CHEK2 基因突变和乳腺癌病理特征与预后相关, 是乳腺癌重要的易感基因。CHEK2 有 1100delC、Y390C 以及 I157T 等多种突变形式, 通过多条不同通路, 如 SDF-1 和 IL-6、BRCA1/2 等影响细胞周期监测点的功能。在化疗方面, 寻找 CHEK2 抑制剂以增强化疗或放疗对肿瘤细胞的杀伤效果也是当前的研究热点之一。本文针对乳腺癌中 CHEK2 突变的形式、机制以及可能的治疗靶点做一综述。

关键词 细胞周期监测点激酶 2 细胞周期 乳腺癌

中图分类号 R737.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.002

近年来乳腺癌是西方国家女性中发生率最高的恶性肿瘤, 在美国女性中乳腺癌占有所有肿瘤的 29%, 在中国女性的肿瘤中乳腺癌占比也达到 15%^[1,2]。研究发现表明, 乳腺癌的发生和发展与细胞周期的异常相关。CHEK2 基因属于抑癌基因, 其编码的蛋白是 DNA 双链断裂后做出反应的重要信号转导蛋白, 参与细胞周期 G_1 期、S 期和 G_2/M 期的阻滞, 促进细胞对损伤进行修复^[3]。如果 CHEK2 基因发生突变, 则无法阻滞突变的基因复制, 导致大量异常基因积累, 增加患乳腺癌的风险, 尤其是家族性早发性乳腺癌的风险^[4,5]。

一、CHEK2 的结构和功能

1. CHEK2 的结构: CHEK2 基因位于染色体 22q12.1, 包含 14 个外显子。CHEK2 mRNA 在正常组织中广泛表达, 并且可见于细胞周期的各个阶段。其编码的蛋白质由 543 个氨基酸构成, 包括 3 个结构域: N 端的丝氨酸-谷氨酸/丝氨酸-谷氨酰胺氨基酸对 (SQ/TQ) 富含区 (第 20 ~ 75 位氨基酸)、叉头相关 (forkhead-associated, FHA) 区域 (第 115 ~ 165 位氨基酸) 和 C 端的激酶活性区 (第 225 ~ 490 位氨基酸)^[6]。

2. CHEK2 的功能: CHEK2 在多种 DNA 损伤, 特别是 DNA 双链断裂损伤 (DNA double strand break, DSB) 的应答中发挥关键作用。细胞在 G_1 期发生 DSB 损伤时, 会激活蛋白激酶 ATM, ATM 磷酸化蛋白激酶 CHEK2。活化的 CHEK2 激酶可使 p53 的第 20 位丝氨酸 (Ser20) 磷酸化, 阻断鼠双微体 2 (MDM2) 蛋白与 p53 的结合及其对 p53 的降解作用, 提高 p53 在细胞内的稳定性, 激活 p21CIP1/WAP1 基因转录, 后者抑制周期素依赖性 cyclin E - Cdk2 复合物活性, 从而引起 G_1/S 期阻滞^[7]。此外, 激活后的 CHEK2 可以磷酸化 Cdc25A, 从而增强 Cdc25A 的泛素化并导致其降解, 这样 Cdc25A 不能去除 Cdk2 上抑制其活性位点的磷酸集团, 使得 Cdk2 没有活性, 不能推动细胞从 G_1 期向 S 期的转换^[8]。当细胞在 G_2 期发生 DNA 损伤时, G_2 期检测点就被激活。CHEK2 可以使 Cdc25C 第 216 位的丝氨酸磷酸化, 导致 Cdc2 磷酸化, 继而形成 Cyclin B - Cdc2 激酶复合物, 从而阻滞 G_2/M 期转换。而 CHEK2 基因发生变异后, 无法发挥检查点的功能^[9]。

二、CHEK2 突变具有异质性

1. CHEK2 1100delC 突变多见于欧洲北部: 最先认识到 CHEK2 的突变是在研究 p53 胚系突变在 Li - Fraumeni 综合征中的致病作用时发现的。随着研究的深入发现很多 Li - Fraumeni 综合征和 p53 的突变无关, 而是和 CHEK2 基因的移码突变 1100delC (1100 位的单个胞嘧啶碱基缺失) 有关。Schmidt 等^[10]在 1479 例 < 50 岁的浸润性乳腺癌中检测到 3.7% CHEK2 1100delC 的突变, 10 年的临床随访发现, 携带该位点突变人群乳腺第 2 原发癌和同侧乳腺

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072175, 81202096, 81372854, 81572591); 上海市科委基金资助项目 (06DZ19505, 114119a7500)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学附属长海医院肿瘤内科 (王一然、王宁、王雅杰); 学员大队本科生临床医学八年制 2010 级 (王一然)

通讯作者: 王雅杰, 教授, 博士生导师, 电子信箱: yajiewa0459@163.com

局部复发的风险较非携带者均增高 2 倍以上^[10]。此后,陆续发现瑞典、爱尔兰、北美洲以及波兰等欧洲北部国家的早发乳腺癌人群中有 CHEK2 1100delC 的突变^[8, 11-14]。但是欧洲北部之外的国家并未发现和如此高比例的 1100delC 突变。Apostolou 等^[15]检测 2408 例 50 岁之前发病的女性乳腺癌患者的 CHEK2 基因,发现 4 例有 CHEK2 1100delC 突变,比例为率为 0.16%。Marouf 等^[16]检测了 134 例乳腺癌患者的 CHEK2 基因,包括 59 例 <40 岁的早发性乳腺癌患者,10 例双侧乳腺癌患者和 6 例卵巢癌患者,均没有发现 CHEK2 1100delC 突变。还有马来西亚、韩国和中国的研究均未发现大量 1100delC 突变^[17]。

2. CHEK2 突变还有 Y390C、I157T、H371Y、D438Y 以及 C283T 突变等:Wang 等^[18]在中国的早发性乳腺癌人群中发现了新的错义突变 CHEK2 Y390C,第 390 位酪氨酸突变成半胱氨酸,该突变在早发性乳腺癌与非早发人群中的分布存在显著性差异($P=0.011$),提示该突变与早发性乳腺癌的遗传易感性可能相关。推断 CHEK2Y390C 突变可能是中国早发性乳腺癌特有的多态性。此外,Han 等^[19]指出 CHEK2 I157T 突变和乳腺癌相关($OR=1.58$, 95% $CI:1.42 \sim 1.75$, $P=0.000$),而且 Liu 等^[20]发现该突变和小叶型乳腺癌有更显著的关联性($OR=4.17$, 95% $CI:2.89 \sim 6.03$, $P=0.000$)。Tedaldi 等^[6]报道了 1 个乳腺癌高发的谱系,发现了 CHEK2 第 5~13 内含子长度为 23kb 的重复突变。由此可见,CHEK2 基因突变的形式多种多样。Baloch 等^[21]2 例乳腺癌患者中发现了 CHEK2 的外显子 10 和外显子 11 突变(p. H371Y, p. D438Y),而在非乳腺癌患者中并没有发现此突变。Liu 等的进一步研究表明,CHEK2 H371Y 突变的患者对以蒽环类为主的化疗药物较为敏感,预后较好。2016 年,Knappskog 报道了挪威两名局部晚期乳腺癌患者在 CHEK2 基因有早期终止密码子的无义突变(C283T; R95*),与 Liu 等研究结果相反,2 例患者都对蒽环类药物不敏感,说明 CHEK2 突变可能与癌症患者对蒽环类化疗药的敏感度相关。

三、CHEK2 基因突变后,通过多条通路影响细胞周期阻滞

1. CHEK2 Y390C 突变的半胱氨酸影响二聚体的相互作用和磷酸化:CHEK2 所表达蛋白的 390 位的酪氨酸是 1 个疏水性比较强的残基,由酪氨酸突变为半胱氨酸之后,则是亲水性相对比较强的残基,这对

于二聚体形成的疏水区域可能有较大的影响,Y390C 可能导致 CHEK2 部分空间构象改变;而且该位置的酪氨酸还位于 CHEK2 二聚体相互作用的表面,对二聚体的形成可能非常重要,因为 CHEK2 的同源二聚体是激酶活化的前提;除此之外,另有研究表明 Y390 也是 CHEK2 自磷酸化的一个残基,并且体外实验表明 Y390 的磷酸化对于 CHEK2 的激酶活性是不可缺少的。DNA 双链损伤断裂后,突变的 CHEK2 基因表达的产物不能磷酸化 p53 和 CDC25A,而 p53 下游负责细胞周期阻滞和细胞凋亡的 p21 和 PUMA 的表达量也明显降低,导致细胞 S 期细胞比率增多,G₂ 期比率减少,细胞生长加快^[18, 22]。

2. CHEK2 基因突变,导致 SDF-1 和 IL-6 增多,促进肿瘤细胞的增殖和转移:Al-Rakan 等^[3]研究表明,使用 siRNA 下调基质成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)的 CHEK2 基因表达,可导致促进肿瘤细胞生长的细胞因子 SDF-1 和 IL-6 表达上调,并且促进基质成纤维细胞向肌成纤维细胞转化。这些细胞可以促进非肿瘤上皮细胞的增殖,而且 SDF-1/IL-6 可以促进乳腺癌细胞的迁移和浸润。如果外源导入 CHEK2 基因,可使细胞转变为正常状态,并且削弱细胞的迁移和浸润能力。

3. CHEK2 突变不能磷酸化 BRCA1 和 BRCA2 蛋白,影响 DNA 同源重组修复:CHEK2 在 DNA 损伤早期对 BRCA1 和 BRCA2 进行磷酸化,促进同源介导的双链 DNA 修复。一方面,在 DNA 损伤后,被 CHEK2 磷酸化的 BRCA1 可以募集重组酶 Rad51 到损伤部位促进同源介导的双链 DNA 修复,并抑制核酸外切酶 Mre11 的非同源末端结合作用。此外,CHEK2 磷酸化 BRCA2 之后,促使 Rad51-BRCA2 复合物解离,以便 Rad51 结合到 DNA 损伤位点。由于 Rad51 发挥作用需要 CHEK2 激酶的磷酸化为前提,所以如果 CHEK2 突变,将导致双链 DNA 的同源修复发生障碍^[23]。

4. CHEK2 突变影响 BRCA1 的泛素化:BRCA1 抑癌基因在 DNA 损伤修复中扮演重要角色,其发挥作用离不开 CHEK2 激酶的磷酸化。SCFSkp2 (Skp1-Cull1-F-box protein S-phase kinase-interacting protein)在 G₁ 末期出现,在 S/G₂ 期达到高峰,可以泛素化磷酸化的 BRCA1。BRCA1 泛素化之后,就可以解除对 Mre11 的抑制作用,使得 Mre11 完成末端切除,并且向 S/G₂ 期转换。如果没有 CHEK2 激酶的对 BRCA1 的磷酸化,就不能被 SCFSkp2 泛素化,Mre11 核酸酶的活性就会受到 BRCA1 的抑制,DNA

修复时的末端切除和 BRCA1 的解离就会受到影响,向 S/G₂ 期转换也会受到影响^[24]。

四、CHEK2 是多种治疗手段的靶点

目前,研究已知化疗药物或者放疗在杀伤肿瘤细胞时,也会激活其内在的检测点机制,阻碍细胞周期进程,修复自身损伤,产生耐药性,增强肿瘤细胞对治疗的抵抗。因此,寻找 CHEK2 抑制剂以增强化疗或放疗对肿瘤细胞的杀伤效果,特别是在 p53 基因缺陷的个体中,已正成为防治肿瘤的重要研究方向。有研究观察到,阿霉素耐药的乳腺癌细胞株与敏感细胞株相比,可以更迅速修复由阿霉素造成的 DNA 损伤,并且伴有 CHEK2 的异常激活,如果干预 CHEK2 的激活,则可以降低原来耐药细胞株的 DNA 修复能力,增加凋亡比例。这证明抑制 CHEK2 的表达,可以增加化疗的敏感度。此外,抑制 CHEK2 的功能,应用 DNA 损伤药物如顺铂和替莫唑胺,可以增加治疗效果。应用 PARP1 抑制剂时,抑制 CHEK2 的功能,也能观察到类似的效果,发挥合成致死效应。已经有多种合成的抑制剂,见诸报道,如 2-芳香基-苯并咪唑类化合物对抑制 CHEK2 有较好效果。PV1019 可以增强 DNA 损伤药物,如拓扑替康和喜树碱类药物在 OVCAR-4 和 OVCAR-5 类肿瘤细胞的杀伤作用,CCT241533 并不会增强 DNA 毒性药物的作用,但是会增强 PARP 抑制剂在 p53 缺陷的细胞中的作用。CHEK1/2 抑制剂 LY2606368 正在进行招募临床 II 期试验的志愿者,主要针对乳腺癌或卵巢癌患者等 (NCT02203513),其结果将会进一步指导 CHEK2 抑制剂在临床中的应用。

五、展望

细胞周期紊乱在乳腺癌的发生、发展过程中发挥了重要作用,而 CHEK2 基因的突变导致细胞周期的紊乱,因此研究 CHEK2 的基因和激酶的作用有重要意义。迄今已在不同地区发现 CHEK2 多种突变类型,不同的 CHEK2 突变对于相同的化疗药物敏感度不同,揭示了寻找突变对于乳腺癌化疗的意义,治疗方法要考虑实际。除了常规治疗的效果不同之外,突变的 CHEK2 还可能是未来治疗乳腺的靶点。但是还有难点尚未突破,CHEK2 也存在于正常细胞,所以 CHEK2 抑制剂在提高杀伤肿瘤细胞效果的同时,也会对正常细胞造成损伤,特异性不高,治疗药物安全剂量的阈值比较窄,但是对于 CHEK2 已经突变的个体,找到干扰异常的 CHEK2 的代谢路径,理论上可以阻止肿瘤细胞增殖,使其对化疗和放疗更为敏感,目

前相关的诸多药物仍处于研究阶段,距临床应用还有一段距离,这将会为乳腺癌等 CHEK2 易感性的肿瘤防治提供新的方法。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132
- 3 Al-Rakan MA, Hendrayani SF, Aboussekhra A. CHEK2 represses breast stromal fibroblasts and their paracrine tumor-promoting effects through suppressing SDF-1 and IL-6 [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1):575
- 4 Huszno J, M Budryk, Z. Kolosza, *et al.* Correlation between CHEK2 mutation and clinicopathological factors in early breast cancer patients [J]. Breast, 2015, 24:S37
- 5 Naslund-Koch C, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Increased risk for other cancers in addition to breast cancer for CHEK2 *1100delC heterozygotes estimated from the Copenhagen general population study [J]. J Clin Oncol, 2016, 34(11):1208-1216
- 6 Tedaldi G, Danesi R, Zampiga V, *et al.* First evidence of a large CHEK2 duplication involved in cancer predisposition in an Italian family with hereditary breast cancer [J]. BMC Cancer, 2014, 14(1):1-5
- 7 Lee HE, Han N, Kim MA, *et al.* DNA damage response-related proteins in gastric Cancer: ATM, Chk2 and p53 expression and their prognostic value [J]. Pathobiology, 2013, 81(1):25-35
- 8 Bak A, Janiszewska H, Junkiert - Czarnecka A, *et al.* A risk of breast cancer in women - carriers of constitutional CHEK2 gene mutations, originating from the North - Central Poland [J]. Hereditary Cancer Clin Prac, 2014, 12(1):1-5
- 9 Naslund-Koch C, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Increased risk for other cancers in addition to breast cancer for CHEK2 (star) 1100delC heterozygotes estimated from the Copenhagen general population study [J]. J Clin Oncol, 2016, 34(11):1208
- 10 Schmidt MK, Tollenaar R, de Kemp SR, *et al.* Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2 *1100delC germline mutation [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(1):64-69
- 11 Colleran GC, Rowan A, Miller N, *et al.* The CHEK2 *1100delC variant: present in the west of Ireland breast cancer population [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 106:S97-S98
- 12 Margolin S, Eiberg H, Lindblom A, *et al.* CHEK2 1100delC is prevalent in Swedish early onset familial breast cancer [J]. Cancer, 2007, 7(1):163
- 13 Martinez-Bouzas C, Beristain E, Guerra I, *et al.* CHEK2 1100delC is present in familial breast cancer cases of the Basque Country [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 103(1):111-113
- 14 Iniesta MD, Gorin MA, Chien LC, *et al.* Absence of CHEK2 *1100delC mutation in families with hereditary breast cancer in North America [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 202(2):136-140

(下转第 10 页)

842 – 846

- 3 Goitea VE, Hallak ME. Calreticulin and arginylated calreticulin have different susceptibilities to proteasomal degradation [J]. Biol chem, 2015, 290(26): 16403 – 16414
- 4 Shi F, Shang L, Pan BQ, *et al.* Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin – 1 expression via STAT5A [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6153 – 6162
- 5 Sheng W, Chen C, Dong M, *et al.* Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer [J]. Cell Physiol, 2014, 229(7): 887 – 897
- 6 Chang HH, Lee H, Hu MK, *et al.* Notch1 expression predicts an unfavorable prognosis and serves as a therapeutic target of patients with neuroblastoma [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17): 4411 – 4420
- 7 金明, 张志伟, 罗招阳. 钙网蛋白与肿瘤的相关研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2015, 21: 3265 – 3268
- 8 Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, *et al.* Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(12): 3100 – 3104
- 9 Verneret M, Tacnet – Delorme P, Osman R, *et al.* Relative contribution of c1q and apoptotic cell – surface calreticulin to macrophage phagocytosis [J]. J Innate Immun, 2014, 6(4): 426 – 434
- 10 Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin [J]. Oncogene, 2010, 29(4): 482 – 491
- 11 Raghavan M, Wijeyesakere SJ, Peters LR, *et al.* Calreticulin in the immune system: ins and outs [J]. Trends Immunol, 2013, 34(1): 13 – 21
- 12 Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM, *et al.* Mechanisms of translocation of ER chaperones to the cell surface and immunomodulatory roles in cancer and autoimmunity [J]. Front Oncol, 2015, 5: 7
- 13 Chao MP, Jaiswal S, Weissman – Tsukamoto R, *et al.* Calreticulin is the dominant pro – phagocytic signal on multiple human cancers and is

- counterbalanced by CD47 [J]. Sci Transl Med, 2010, 2(63): 63 – 94
- 14 Chuang CM, Monie A, Hung CF, *et al.* Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination [J]. J Biomed Sci, 2010, 17: 32
- 15 Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G, *et al.* Tumor – produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen – specific tumor immunity [J]. J Immunol, 2011, 186(7): 4325 – 4330
- 16 Lwin ZM, Guo C, Salim A, *et al.* Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma [J]. Mod Pathol, 2010, 23(12): 1559 – 1566
- 17 Lee HH, Lim CA, Cheong YT, *et al.* Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(3): 353 – 362
- 18 李晓曦, 孟琳, 王天一, 等. 下调钙网蛋白表达对乳腺癌干细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 [J]. 解剖科学进展, 2013, 4: 346 – 350
- 19 Liu R, Gong J, Chen J, *et al.* Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(6): 855 – 864
- 20 Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, *et al.* Calreticulin expression in neuroblastoma – a novel independent prognostic factor [J]. Ann Oncol, 2005, 16(2): 314 – 321
- 21 Minami S, Nagashio R, Ueda J, *et al.* Detection of tumor – associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer [J]. Biomed Res, 2014, 35(1): 25 – 35
- 22 Shi F, Shang L, Pan BQ, *et al.* Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin – 1 expression via STAT5A [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6153 – 6162
- 23 Sheng W, Chen C, Dong M, *et al.* Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer [J]. Cell Physiol, 2014, 229(7): 887 – 897

(收稿日期: 2016 – 09 – 28)

(修回日期: 2016 – 10 – 18)

(上接第 6 页)

- 15 Apostolou P, Fostira F, Papamentzelopoulou M, *et al.* CHEK2 c. 1100delC allele is rarely identified in Greek breast cancer cases [J]. Cancer Genet, 2015, 208(4): 129 – 134
- 16 Marouf C, Hajji O, Diakite B, *et al.* The CHEK2 1100delC allelic variant is not present in familial and sporadic breast cancer cases from Moroccan population [J]. Springerplus, 2015, 4
- 17 Thirthagiri E, Cheong LS, Yip CH, *et al.* CHEK2 * 1100delC does not contribute to risk to breast cancer among Malay, Chinese and Indians in Malaysia [J]. Famil Cancer, 2009, 8(4): 355 – 358
- 18 Wang N, Ding H, Liu C, *et al.* A novel recurrent CHEK2 Y390C mutation identified in high – risk Chinese breast cancer patients impairs its activity and is associated with increased breast cancer risk [J]. Oncogene, 2015, 34(40): 5198 – 5205
- 19 Han FF, Guo CL, Liu LH. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a Meta – analysis [J]. DNA Cell Biol, 2013, 32(6): 329 – 335

- 20 Liu C, Wang Y, Wang QS, *et al.* The CHEK2 I157T variant and breast cancer susceptibility: a systematic review and Meta – analysis [J]. Asian Pac J Cancer Preven, 2012, 13(4): 1355 – 1360
- 21 Baloch AH, Daud S, Raheem N, *et al.* Missense mutations (p. H371Y, p. D438Y) in gene CHEK2 are associated with breast cancer risk in women of Balochistan origin [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(2): 1103 – 1107
- 22 Guo X, Ward MD, Tiedebohl JB, *et al.* Interdependent phosphorylation within the kinase domain T – loop regulates CHK2 activity [J]. J Biol Chem, 2010, 285(43): 33348 – 33357
- 23 Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond [J]. J Mol Cell Biol, 2014, 6(6): 442 – 457
- 24 Parameswaran B, Chiang HC, Lu YZ, *et al.* Damage – induced BRCA1 phosphorylation by Chk2 contributes to the timing of end resection [J]. Cell Cycle, 2015, 14(3): 437 – 448

(收稿日期: 2016 – 10 – 15)

(修回日期: 2016 – 10 – 24)