维普资讯 http://www.cqvip.com

肿瘤抑制基因

生化教研室 曾昭淳 综述 王征泰 审校

中国分类号：R730.231

1969年Heubner和 Todaro 提出了癌基因的假说[1]。1970年mantin首先观察到癌基因的作用[2]。癌基因是能转化正常细胞而诱发肿瘤的病毒或肿瘤细胞的DNA。在正常动物细胞中存在着癌基因的付本[3][4]，即原癌基因。在适当的条件下原癌基因被激活、导致出现某些与肿瘤细胞有关的表型，引起肿瘤。八十年代另一类与肿瘤有关的基因已被发现[5][6]，它们的产物有控制细胞增殖的功能。失去这类基因的功能可能和正常细胞转化为肿瘤细胞有关。失去功能导致肿瘤的基因称抗癌基因（Anti-Oncogene）或肿瘤抑制基因（Tumor Suppressor Gene）。目前研究比较深入的是视网膜母细胞瘤，结肠癌，肾母细胞瘤和有关的抑制基因。

一、视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma，Rb)和Rb基因

视网膜母细胞瘤是一种好发于1—5岁儿童的肿瘤，受害器官为眼。其临床表现为视

参考文献

[1] Willey AM. Nucleic acid probes in diagnosis of human genetic diseases. Alan R. Liss, Inc. New York, U.S.A. 1988

[2] Hans-Peter Vosboerg. Hum Genet 1989; 83:1

[3] Goelz, SE,et al. Biochem Biophys Res Commun 1985; 100:118

[4] Steel, CM. Lanect 1984; 15:908

[5] Hackett, PB, et al. An introduction to recombinant DNA techniques. 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co.Inc. California. 1988

[6] Langer-Safer, PR, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:6633

[7] Southern, FM. J Mol Biol 1975; 89: 503

[8] McDougall, JK, et al. In Fenoglio, CM. ed. Progress in surgical pathology.NY. Masson Publishers USA Inc. 1982; Vol.4

[9] McKusick, VA. Mendelian inheritance in man:catalogues of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. 8th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1988

[10] Orkin, SH. Cell 1986; 47:845

[11] Hall, JG. JAMA 1985; 254:2296

[12] Jeanpierre, M, et al. Ann Genet 1984; 27:134

[13] Landry,ML,et al.Clin Lab Med 1985; 5:513

[14] Pelicci, PG, et al. J Exp Med 1985; 162:1015

[15] Tomasi, TB. In Fenoglio-Preiser, CM. ed.New concepts in neoplasia as applied to diagnostic pathology. Baltimore, Williams and Wilkins, 1986; 59

[16] Harper, ME, et al. New Engl J Med 1986; 315:1073

（收稿日期1990-05-29）

维普资讯 http://www.cqvip.com

力下降，失明，视网膜出现肿瘤等。在美国的发病率是1/20000。该病有两种临床类型；遗传型和散发型。遗传型有家族倾向，发病年龄早，肿瘤为多发，双眼都受害，常患继发性肿瘤如骨肉瘤。散发型发病年龄较晚，只损害单侧眼睛，肿瘤常为单个。Knudson[7]根据流行病学的统计资料提出“两次突变”的假说，每次突变灭活 Rb 等位基因中的一个，当两个等位基因灭活以后，正常的体细胞将转化成肿瘤细胞。在遗传型视网膜母细胞瘤，第一次突变是通过父或母的生殖细胞遗传下来。存在于所有的视网膜细胞，第二次突变则直接发生于视网膜细胞。而在散发型两次突变先后发生于同一视网膜细胞。

1978年 Yunis 和 Ramsay[8]分析视网膜母细胞瘤的核型时，偶然观察到一小组病人的瘤细胞有第十三号染色体的等位缺失或部分等位缺失。部份等位缺失常出现在染色体13q14区域。推测定位于这个区域的某个基因和视网膜母细胞瘤的发病有密切的关系，被命名为Rb基因，八十年代，用cDNA探针和DNA限制性片断多态性的方法证实了Rb基因的两个等位基因在染色体的13q14区域[9]。这些方法克服了观察核型的局限性，能发现许多更细小的、发生机率更高的染色体变化。

Fund[10] 等人分析了40例视网膜用细胞瘤和同一病人肿瘤组织周围成纤维细胞的DNA，大约 40% 的肿瘤在Rb基因位点有可鉴定的变化，包括缺失、部分缺失。60% 未见 Rb 基因结构的变化。但所有肿瘤细胞都有异常的Rb基因转录物：包括完全缺失基Rb因的 mRNA；缩短的Rb基因的mRNA；或mRNA正常，但其量显著减少。在遗传型肿瘤内，两个等位基因都已缺失，而其成纤维细胞内却含一正常的Rb基因。在一些散发型的肿瘤细胞内两个Rb等位基因都已缺失，而成纤维细胞的两个Rb等位基因完全正常，提供了支持“两次突变”假说的证据。

Huang[11]等人将含有正常 Rb 基因的质粒导入培养的有Rb基因缺陷的Rb 细胞和骨肉瘤细胞内，观察到肿瘤细胞发生了逆转。(1)肿瘤细胞出现了Rb基因的产物、它的分子量，磷酸化，在细胞内的定位等性质与天然Rb基因的产物无异。(2)逆转后的细胞生长趋向正常。(3)将已逆转的细胞和肿瘤细胞注入同一裸鼠的对称部位，逆转后的肿瘤细胞则不能发展成肿瘤，而对照部位则出现肿瘤。该实验支持Rb 基因是一个肿瘤抑制基因，它的灭活是Rb发生的是键。将正常Rb基因导入肿瘤细胞内可使瘤细胞发生逆转无疑为从基因水平治疗Rb展示了美好的前景。

Rb基因已被分离和克隆[12]。Rb 基因约含200,000硷基对，这段DNA共编码27个外显子。最小的外显子只含31对硷基，最大的含1889对硷基。最小的内含子含80对硷基，最大的含有6000对硷基。缺失外显子13—17常在不同的肿瘤观察到，提示这个区域是突变的热点。Rb基因含有多个转录起源，其周围 C+G 含量较高，常缺少真核细胞转录起源部位常有的 TATA 盒顺序，从外显子1的5′侧－300到＋400 的顺序中，－203 至－163，＋64至＋107常可形成干襻结构。整个Rb基因5′侧含有一些重复顺序。大多数重复顺序含 7—8个碱基对，也有含较多硷基的，如从－54到—28；＋6到＋32位即属此例。在某些部位存在类似增强子 (enhancer) 的结构，它们的硷基顺序和对干扰素、对热休克起反应的硷基顺序相似，可能对环境变化起反应而对转录进行调节。Sp1 转录因子结合顺序出现在－291；＋27；＋123位，＋13到＋83 的70个硷基对是增加转录的关键结构，缺少这段顺序，Rb基因就完全失去转录活性。这段顺序含两个转录起源。多个直接重复顺序和GGGCGG 顺序定位在这段顺序内。表明＋13到＋83足以提供起动子(promoter)的活性。Rb基因是一个结构相当复杂的基因，目前尚不清楚基因内的各种顺序是如何与有关的转录因子作用使Rb基因持久地转录、表达的。

Rb基因的产物是一个定位于细胞核的

维普资讯 http://www.cqvip.com

蛋白质[18]，分子量约为105kd，命名为p105-RB[14]。根据cDNA顺序分析，p105-RB含有一个结合金属离子的结构，它具有与DNA结合的特征[15]。p105-RB可能是和转录因子相似的蛋白质。但在细胞内它是否与DNA结合尚待证实。该蛋白质的确切功能尚不清楚，但推测是调节与细胞生长有关基因的转录。该蛋白质可被磷酸化[16]，磷酸化和去磷酸化可能是调节它生物学活性的方式。

某些病毒癌基因的产物；它包括腺病毒的EIA蛋白[17]；SV40病毒大T抗原[18]；HPV-16E7蛋白[19]等均可和p105-RB结合。推测这些病毒通过一个共同的机制参与正常细胞的转化，即病毒的蛋白质与p105-RB结合，形成复合物，复合物中的p105-RB被灭活，细胞生长失去控制。这也许是这些病毒致癌的原因之一。

动物的许多组织都有Rb基因的表达[20]，在人类当Rb基因灭活时一些组织可出现肿瘤，如小细胞肺癌[21]，乳腺癌[22]，膀胱癌[23]。但是在这些肿瘤并非都有Rb基因的变化，可能Rb基因在这些肿瘤的发生过程中没有决定性的作用。

二、肾母细胞瘤（Wilms' Tumor）及其抑制基因

肾母细胞瘤也是一种儿童时期的肿瘤。发病率（美国）为1/8000。主要危害肾脏。临床上也可分成遗传型和散发型。在肾母细胞瘤，常可观察到染色体11p13区域的缺失[24]。推测在该区域存在一肿瘤抑制基因。

该基因已被分离和克隆[25]。分析其顺序表明，该基因的产物含有一个“锌指”的结构，很可能是一个能与DNA结合的转录因子，并可在肾脏胚胎发育中起重要作用。

肾母细胞瘤也有染色体13q14区域的变化，对此的研究结果表明。第二次突变不一定发生。Joguchida等人指出[26][27]；在某些情况下，突变发生于来自父系或母系的基因，这是由于来自母或父系基因打上了某种遗传印记：例如甲基化而失活。这样一个细胞内有了一个打上印记而失活的基因，只需突变灭活另一等位基因即可造成肿瘤抑制基因失去功能。在这些例子虽然两个等位基因已失去功能，但第二次突变实际上没有发生。

三、结肠癌及有关的肿瘤抑制基因

结肠癌可被分成为几种临床亚型。各型有独特的组织学特征，极易把它们加以区别。最近Stanbride提出结肠癌是多个不同的突变累积于一个细胞的结果[28]。这些突变以一定的顺序先后发生。影响不同的染色体以及在染色体上的基因。不但有癌基因的激活，而且也有一个或几个肿瘤抑制基因失去功能。他提出的结肠癌发生的多阶段假说如下：

正常结肠粘膜细胞 —染色体5变化→ 增生型结肠粘膜细胞 —DNA失去甲基→

Ⅰ型结肠腺瘤 —ras基因激活→ Ⅱ型结肠腺瘤 —染色体18缺失→

Ⅲ型结肠腺瘤 —染色体17缺失→ 结肠癌 —其它染色体缺失→ 转移

这是比“两次突变”远为复杂的假说，染色体17和18缺失提示在这两个染色体上存在肿瘤抑制基因，是这个假说的重要组成部份。

Vogelestein用等位分析法[29]分析了56例外科手术切除的原发结肠癌。他们分离纯化癌细胞，提取DNA，把它和同一病人癌周围正常结肠粘膜细胞提取的DNA加以比较。从分析的39个染色体看，这些切除的结肠癌都有几个染色体的等位缺失。缺失的机率如下：染色体17p和染色体18q占75%；9个染色体（1q；4p；5q；6p；6q；8p；9q；18p和22q）缺失占25—50%；剩余28个染色体缺失频率为7—24%。在结肠癌出现的多种遗传变化中，染色体17p和18q的变化是机率最高的。

Baker[30]等人用20个和染色体17p区域有关的DNA探针分析结肠癌的遗传变化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

这些探针可以确定染色体17p上的7个区域。正常结肠粘膜细胞的染色体17p上的每一个等位基因至少可被20个探针中的5个所辨认。58个结肠癌标本和癌附近正常粘膜组织的分析显示77%结肠癌标本至少失去了该区域的两个基因，研究染色体17p上仍保留某些标志的杂合性的结肠癌标本后发现最小共有缺失区在染色体17p12至17p13.3之间。

Fearon[31]等人分析了34个结肠癌标本，其中3个仍可辨认出残余的结肠腺瘤细胞。分别提取癌细胞和腺瘤细胞的DNA，加以比较，其中两个癌内残余腺瘤细胞DNA没有染色体17p的缺失，另一个癌内残余腺瘤细胞则有染色体17p的缺失和周围的结肠癌细胞一样。说明染色体17p缺失可能是结肠腺瘤进一步恶化成结肠癌的关键事件。

目前已经得知，编码一个分子量为53000道尔顿的核蛋白（命名为p53）的基因[32]，定位于染色体17p区域。该基因很可能是一个肿瘤抑制基因。

两个肿瘤标本，有染色体17p上一个p53等位基因的缺失，但仍有p53mRNA的正常量。说明余下的一个等位基因仍可转录。分离、克隆余下的p53基因，测定其顺序、发现余下的p53等位基因都有点突变[30]，在一个肿瘤标本密码143是GUG(为缬氨酸）被GCG(丙氨酸）取代，第一个肿瘤标本密码175是CGC(精氨酸)，被组氨酸CAC取代。两个都是点突变，发生于p53基因高度保守的区域。由此可以看出除了缺失而外，其它的突变也可灭活肿瘤抑制基因。

Fearon[33]等克隆了染色体18q上一个长370000碱基对片段。这个片段上被疑有另一个肿瘤抑制基因(DCC基因，deleted in colorectal carcinoma）他们首先辨认了这370Kd DNA上的外显子序列、用聚合酶链反应(PCR)放大，并以此作探针扫描了建立的克隆，获得了部分DCC基因。DCC基因在大多数正常组织包括结肠粘膜都有表达，但在大多数结肠癌，DCC基因或未表达或表达其产物的量极少。已观察到损害DCC基因的突变包括纯合缺失该基因5′端；内含子之一发生点突变，以及在外显子之一的插入突变等。

p53基因的产物p53以二聚体形式发挥效力[34]。当p53基因突变后，其产物仍可和正常p53形成二聚体。一般认为一个突变的p53基因产物和一个正常的p53形成的二聚体则失去了正常二聚体所具有的功能。

p53和p105-RB相似，也能和一些DNA肿瘤病毒产生的蛋白质结合，包括腺病毒E1B蛋白[35]、SV40大T抗原[36]和HPV-16E6[37]蛋白质。p53和这些病毒蛋白质形成复合物后也失去了正常生理功能。

DCC基因的转录物约为10-12Kb[30]。分析其cDNA的碱基顺序、推测DCC基因的产物含有4个类似免疫球蛋白G_2的结构，一个与Ⅱ型Fibronectin有关的结构。表明此蛋白质含有和天然细胞表面着床分子相似的氨基酸顺序以及其它的细胞表面糖蛋白分子的氨基酸顺序。推测该产物是细胞表面糖蛋白，细胞表面糖蛋白分子负责细胞与细胞、细胞和间质之间的相互作用。如果DCC基因失去功能、则影响细胞之间的相互作用，进一步影响细胞的生长和增殖：DCC基因的产物与p105-RB和p53是完全不同的。

目前已经分离，克隆了4个不同的肿瘤抑制基因；Rb基因；p53基因；DCC基因和肾母细胞瘤基因。可能存在更多的肿瘤抑制基因有待于发现。Rb基因和肾母细胞瘤基因与肿瘤的发生有一定的关系，而p53基因和DCC基因则在肿瘤从良性发展到恶性起重要作用。Rb基因，p53基因，肾母细胞瘤基因的产物定位于细胞核，很可能是转录因子；而DCC基因的产物则可能是一个细胞膜蛋白。关于肿瘤发生的“二次突变”假说和包括癌基因激活、肿瘤抑制基因丧失功能在内的多种遗传损害积累的假说对肿瘤起因都能作出一定的说明，但后者更能反映肿瘤发生发展的多样性和复杂性。肿瘤抑制基因反

维普资讯 http://www.cqvip.com

映了一种自身保护性质，抑制肿瘤的天然机制。发现更多的肿瘤抑制基因，找出其中最有效的，在蛋白质水平甚至基因水平对肿瘤进行治疗，无疑会给肿瘤患者带来福音。

参 考 文 献

[1] Heuener, R. J. & Todaro, G. J, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1969, 64:1087

[2] Martin, G. S, Nature 1970; 227:1021

[3] Stehelin, D. H, et al Nature 1976; 260:170

[4] Spector, D. H, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75:4102

[5] Klein, G, Science 1987; 238:1593

[6] Knudson, A. G, Jr. Cancer Research 1985; 45:1437

[7] Knudson. A. G, Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971; 68:820

[8] Yunis, J. J. & Ramsay, N, Amer. J. Dis. Child. 1978; 132:161

[9] Dryja, T P., et al N. Engl. J. Med. 1984; 310:550

[10] Fund, Y. K. T, et al.Science 1987; 236:1657

[11] Huang, H. J. S, et al.Science 1988; 243:1563

[12] Hong, F. d, et al.Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989:86:5502

[13] Lee, W. H, et al.Nature 1986; 329: 642

[14] Whyte, P, et al Nature 1988; 334:124

[15] Lee, W. H, et al.Science 1987; 235: 1394

[16] Ludlow, J. W, et al. Cell 1989; 56: 57

[17] Whyte, P, et al Cell 1989; 56:67

[18] Decaprono, J. A, et al.Cell 1988; 54 275

[19] Dyson, N, et al Science 1989; 243: 934

[20] Bernards, R, et al. Proc. Natl. Acad, Sci. USA 1989; 86:6474

[21] Harbour, J. W, et al. Science 1988; 241:353

[22] Lee, E. Y. H. P, et al. Science 1988; 241:218

[23] T'Ang, A, et al. Science 1988; 242: 263

[24] Riccardi, V. M,et al.Pediatrice 1978; 61:604

[25] Gessler, M, et al Nature 1990; 343: 794

[26] Toguchida, J, et al N.ature 1989; 338:156

[27] Wolf, R. & Surani. A, Nature 1989; 338:112

[28] Stanbride, E. J, et al. Science 1990; 247:12

[29] Vogelestein, B, et al. Science 1989; 244:207

[30] Barker, S. J, et al. Science 1989; 244:217

[31] Fearon, E. R, et al. Science 1987; 238:193

[32] Finlay, C. A, et al. Cell 1989; 57: 1083

[33] Fearon, E. R, et al. Science 1990; 247:49

[34] Kraiss, S, et al J. Virol. 1988; 62: 4737

[35] Sarnow, P, et al. Cell 1982; 28:387

[36] Jane, D. P. & Crawford, L. V. Nature 1979; 278:261

[37] Bruce, A, et al.Science 1990; 248:76

(收稿日期1990-10-05)