

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.043

抑癌基因 P16 在肺癌中的研究进展*

高 越¹ 叶磊光¹ 李 娜² 关雪晴¹ 刘宝刚^{1△}

(1 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 黑龙江 哈尔滨 150081; 2 辽宁医学院附属三院 辽宁 锦州 121000)

摘要:抑癌基因 P16 与细胞周期调控密切相关,其主要作用是参与细胞周期过程,它通过细胞周期与其它癌基因及肿瘤抑制基因相互作用成为正常细胞增殖的调控因子。P16 基因主要通过基因缺失、点突变及甲基化而失活,已证实该基因的失活与多种肿瘤的形成与转移密切相关。通过各种分子生物学技术检测出它在肿瘤中的表达,将有助于判断肿瘤的恶性程度、浸润深度及预后,为制定合理的治疗方案提供依据。P16 是已知的抑癌基因中唯一通过直接抑制细胞周期而抑制细胞生长的基因,在肿瘤治疗方面有很大的应用前景。P16 基因突变在人类恶性肿瘤中普遍存在,因此,有关 p16 基因的研究已经成为当前分子生物学和分子遗传学研究的重要课题。本文就 p16 基因的分子生物学特性及它与肺癌的关系作一综述。

关键词:肺癌;抑癌基因;p16;甲基化

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)20-3964-03

Progress of Tumor Suppressor Gene P16 in Lung Cancer*

GAO Yue¹, YE Lei-guang¹, LI Na², GUAN Xue-qing¹, LIU Bao-gang^{1△}

(1 Department of Internal Medicine, The Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Helongjiang, 150081, China;

2 The Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning, 121000, China)

ABSTRACT: Tumor suppressor gene p16 is closely related to cell cycle regulate, its main action is participate in the process of cell cycle. It is become regulatory factor of normal cell multiplication by means of interaction with cell cycle and oncogene and tumor suppressor gene. P16 is mainly deactivated through gene deletion, point mutation and methylation. It has proved that p16 deactivation is closely related to formation and metastasis of multi-tumor. Detecting the expression of p16 in tumor by all kinds of molecular biological techniques will contribute to identify grademalignancy, invasion depth and prognosis which provide reasonable basics for treatment plan. P16 is known as the only anti-oncogene which through suppression cell cycle directly to depression cell growth. It has a tremendous application prospect in oncotherapy. Gene p16 mutation generally exists in human malignant tumor. Thus, research on gene p16 has already been important subject of molecular biology and molecular genetics. This general is about the relationship between molecular biology of gene p16 and lung cancer.

Key words: Lung cancer; Anti-oncogene; p16; Methylation

Chinese Library Classification(CLC): R734.2A **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)20-3964-03

肺癌是当今世界最常见的恶性肿瘤之一,尤其是在发展中国家,其发生率及死亡率逐年上升。在 1975 年-2005 年 30 年间,我国的肺癌死亡率从 7.1/10 万增长到 30.8/10 万,2005 年肺癌死亡已经占癌症相关死亡的 23%,高居各种癌症相关死亡的首位^[1]。原发性肺癌中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer NSCLC)约占 80-85%,小细胞肺癌(small cell lung cancer SCLC)约占 15-20%。由于缺乏有效的早期诊断方法,超过 40% 的患者诊断时已发生转移,经过传统的化疗后其生存期也不尽人意,非小细胞肺癌患者的 5 年生存率约为 15%,而小细胞肺癌患者 5 年生存率不足 5%^[2],因此,寻找早期诊断肺癌的方法对于提高生存率至关重要。

近年来,随着分子遗传学的发展,人们发现肺癌的发生与某些癌基因的活化剂抑癌基因的失活密切相关,已经证明几个

癌基因家族在肺癌中均有异常,包括引起突变的 ras 族,放大基因的 myc 族,C-erbB2 等。抑癌基因 P53, P16, RB 的改变作为肺癌的发病机制受到越来越多学者的重视。有研究表明,p16 基因在多种肿瘤中高频率失活,不但促进肿瘤细胞增殖,抑制凋亡,而且与肿瘤患者的预后有关,又称为多肿瘤抑制基因^[3]。本文着重就 P16 基因及其在肺癌中的研究进展作一综述。

1 P16 基因的发现

1992 年,Travis J^[4]发现在恶性黑色素瘤患者的第 9 号染色体可能存在黑色素瘤易感基因,并发现该区不到 100kb 范围有缺失。随后,研究者又在很多人人类肿瘤中发现 9 号染色体短臂 2 区存在缺失或突变,由此推测此区域有肿瘤抑制基因存在。1993 年,Serrano^[5]等学者克隆出此抑制基因的 cDNA,因其

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D201238)

作者简介:高越(1987-),女,硕士研究生,从事肺癌的内科治疗及靶向治疗,电话:86298691, E-mail:pigouag@qq.com

△ 通讯作者:刘宝刚, E-mail:liubaogang@sina.com

(收稿日期:2013-10-25 接受日期:2013-11-24)

编码相对分子质量为 16kd 的蛋白质,所以命名为 P16 基因,又称为多肿瘤抑制基因(MST1)。抑癌基因 P16 定位于 9 号染色体短臂 2 区 1 带(9p21),由三个外显子和两个内含子组成,其中第一和第二外显子构成 97%的编码序列,第三外显子只有 11pb。P16 基因编码由 148 个氨基酸组成的核结合蛋白,称为 P16 蛋白。研究报道,P16 蛋白缺乏时肿瘤细胞出现持续的增殖能力,由此证实 P16 蛋白为一种抑癌蛋白。

2 细胞周期及其调控

细胞周期是连续分裂的细胞从上一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个过程,包括 G1 期,S 期,G2 期,M 期四个阶段。细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细胞在细胞周期的变化中经历着增殖,分化,衰老和死亡等生理过程。

参与细胞周期调控的分子主要有:1.细胞周期蛋白(cyclin)主要有 cyclinA-H 八个成员,它们可以与细胞周期蛋白依赖酶形成复合体,在细胞周期的不同阶段发挥作用。其中 CyclinD 过度表达可造成细胞异常增殖,相当于一种癌基因^[6];2.细胞周期蛋白依赖酶(CDK) 目前发现 7 个成员(CDK1-7),可以与 cyclin 结合,促进细胞的增殖,同时也可以与细胞周期蛋白依赖酶抑制因子结合,阻断正常的细胞周期,阻止细胞分裂;3.细胞周期蛋白依赖酶抑制因子(CKI)通过抑制细胞周期蛋白依赖酶的活性对细胞周期起负调节作用,主要分为 CIP/Kip 家族(p21,p27,p57)和 ink4 家族(p15,p16,p18),后者特异性抑制 cyclin/CDK4 的磷酸化激酶活性,可视 CKI 为一类肿瘤抑制因子^[7]。

细胞周期调控因子通过精密的调控机制调节细胞的增殖和分化,如果细胞周期调控发生异常,细胞即进入病理状态,进而有可能发生肿瘤。

3 P16 的抑癌机制

真核细胞有丝分裂须两个决定性转变:一是 G1→S 期的转变,DNA 合成开始;二是 G2→M 期的转变,有丝分裂开始。不同的细胞周期素和细胞周期素依赖酶对二期间转变进行自控调节。cyclinD 是细胞进入 S 期所必需的,在 G1 期合成,其与 CDK4 或 CDK6 形成复合物,激活后导致一系列关键底物磷酸化,如 Rb 的磷酸化,允许关键调控因子的转录,DNA 合成开始,进入 G1→S 转变。生物学证据表明 P16 是一个很重要的细胞周期调控因子。CyclinD 与 CDK4 结合时,刺激细胞分裂,P16 蛋白与 cyclinD 竞争性结合 CDK4,特异性抑制 CDK4 的活性,使 Rb 蛋白脱磷酸化,从而阻止细胞从 G1 期向 S 期的过渡,抑制细胞增殖。当 p16 发生变异时,cyclinD 与 CDK4 的结合增多,刺激细胞持续,过度分裂,使细胞呈失控性生长而形成肿瘤。

抑癌基因 P16 的主要变异方式有基因缺失和点突变及甲基化几种^[8]。(1)基因缺失或突变 基因缺失包括纯合性缺失和杂合性丢失,其中以纯合性缺失为主。纯合性缺失时,mRNA 和蛋白质均无表达。突变以移码突变和点突变为主。绝大多数肿瘤中存在 p16 基因的缺失或突变,且缺失发生的频率高于基因突变,变异主要集中在第二外显子;变异在肿瘤细胞株上的发

生高于对应的原发实体瘤。微卫星标志分析显示,黑色素瘤,胰腺癌,膀胱癌,结肠癌和恶性胶质瘤等很多原发性肿瘤均存在 P16 等位基因的缺失。(2)CpG 岛异常甲基化 CpG 岛是 DNA 的一段区域,在正常组织中没有甲基化。肿瘤抑制基因启动区域 Cp 岛的过渡甲基化与转录丢失有关。临床研究证实,p16 基因的甲基化是 p16 基因失活的最重要机制,而且是癌前的早期改变,它能从分子标志物分辨肿瘤分型及亚型,而且甲基化状态改变通常在组织恶变之前发生,有助于肿瘤的早期诊断^[9]。SEIKE 等^[10]利用 MSP 方法分析了 29 例具有远处转移的非小细胞肺癌组织及其相应正常组织和远处转移灶,发现有 37%的肿瘤组织或远处转移灶检测到 p16 甲基化。国外学者 SHABASHVILI 等^[11]也在关于使用 Zebularine 基因甲基化抑制剂于小鼠乳腺肿瘤获得肿瘤发展的停滞的具有统计学意义的结果。

4 P16 与肺癌

抑癌基因 p16 的异常改变作为肺癌的一种发病机制正受到愈来愈多学者的重视。研究者从不同的研究目的出发进行大量广泛的研究,以其揭示 p16 在肺癌的发生,发展及预后中的作用。

4.1 P16 与肺癌组织类型的关系

Wasgimi^[12]等采用 PCR- 单链构象多态性方法证实了非小细胞肺癌细胞株和原发实体瘤中存在 P16 基因的纯合性缺失,而在小细胞肺癌细胞株中该基因的缺失率为 0,而以 Rb 基因缺失为主。胡颖^[13]等人采用 PCR 的方法检测 140 例不同病理类型及分期的 NSCLC 组织中的 p16 的纯合性丢失情况,结果发现腺癌 p16 丢失为 39.1%,而鳞癌组织中仅为 10.5%,两者间具有明显差异(P<0.05)。由此可见,P16 在肺癌中的缺失及表达情况与组织类型有密切的关系。

4.2 P16 与肺癌患者临床病理特性及预后的关系

而针对 P16 与肺癌患者预后的关系,国内外也有少量的研究,但是结论不尽相同。童金龙^[14]等人针对 P16 表达对非小细胞肺癌患者的预后的影响进行一项 meta 分析,通过对 1995 位患者临床病理资料进行分析,结果表明 P16 的表达状态是非小细胞肺癌独立的预后因素,这种趋势表现在鳞癌和早期肺癌中,而在腺癌中未发现此种趋势。方艳^[15]等人用 SABC 免疫组化方法检测 72 例原发性肺癌组织中 P16 蛋白的表达,结果发现 p16 的阳性表达率为 55.6%(40/72),其表达与肿瘤的分化程度,大小,淋巴结转移,血道转移和临床分期有关,与性别,年龄,组织学分型无关。Sterlacci W^[16]等用免疫组化和荧光原位杂交技术分析了 383 位术后非小细胞肺癌患者 P16 蛋白的表达及超甲基化情况,结果显示 p16 表达缺失在非小细胞肺癌中是常见事件,64%(232/365)的患者存在 P16 表达缺失,其中鳞癌为 84%(97/115),腺癌为 50%(93/186),亚组分析显示男性,吸烟,年龄小于 65 岁的早期腺癌和大细胞肺癌患者,如果 p16 蛋白表达缺失,预后较差。Buckingham 等^[17]发现,鳞癌中 p16 甲基化检出率要高于腺癌。P16 基因突变和蛋白表达阴性者存在甲基化,而表达阳性者不存在 P16 的甲基化。启动子的超甲基化是一个早期事件,随后出现 P16 的杂合性缺失,这个特殊的亚组人群很有可能在去甲基化治疗中获益。徐锦屏^[18]等人用免疫

组化 ABC 方法检测 P16 蛋白在 59 例原发性非小细胞肺癌中的表达,结果发现 P16 在 NSCLC 中的阳性表达率仅为 47.5%,在非小细胞肺癌中存在高比例的 P16 表达缺失,提示在肿瘤的发生发展过程中,P16 起着重要的作用。P16 在非小细胞肺癌的淋巴结转移阻阳性率为 25%,显著低于淋巴结无转移组 67.7%,提示 P16 的缺失表达是淋巴结转移的促进因素。综上所述,可见在非小细胞肺癌中,p16 基因呈下调表达,并与预后有关。p16 蛋白表达缺失与 NSCLC 的发生及细胞分化不良有关。肺癌中 p16 阳性表明肿瘤分化较好,恶性程度较低,淋巴结转移少,病期愈晚 P16 蛋白缺失越明显。

4.3 P16 在肺癌诊断中的意义

叶玉坤^[9]等用免疫组化,双重原位杂交,PCR,PCR-SSCP 和测序法分析了 106 例肺癌患者肿瘤组织以及癌旁正常组织和 23 例良性肿瘤 P16 的变化,结果发现肺癌组织 P16 的表达率低于癌旁正常组织及良性肿瘤,且表达率与肺癌的病理类型,有无转移及临床分期有关。在 I 期和 II 期肺癌中,P16 的缺失率为 32.6%,主要为非小细胞肺癌。16.9%的病人表现为 CpG 岛的甲基化,另外有 9 例患者存在 P16 外显子的突变。从而得出 P16 可能在肺癌的发生及发展中发挥重要作用,P16 的缺失是肺癌发生的早期信号,对其早期诊断有重要的作用。杜洪^[20]等采用免疫组化 LSAB 法检测了 33 例非小细胞肺癌患者和 20 例正常及炎性组织 P16 的表达情况,结果发现在肺癌组织中,p16 的阴性表达率 58%(19/33),其中鳞癌为 65%(13/20),腺癌为 46%(6/13),而在正常和炎性支气管粘膜肺组织中的缺失表达率为 0,可见 P16 在肺癌的发生发展中可能起重要作用,对肺癌的早期诊断及预后有一定的临床意义。

5 展望

如上所述,肿瘤发生是多因素、多基因、多阶段、多步骤的非常复杂的生物学现象,自 1985 年 Knudson 提出抑癌基因的概念,迄今较明确的抑癌基因大约有 10 个,p16 基因已在多个肿瘤细胞系以及体内原发肿瘤中检测到有不同程度的缺失和突变,已检测到包括肺癌,白血病、膀胱癌、乳腺癌等在内的实体肿瘤中 p16 基因的突变率为 30-80%。P16 基因与 cyclinD 竞争结合 CDK 或 CDK6,从而抑制 cyclinD-CDK4 或 cyclinD-CDK6 复合物形成,阻碍细胞向 S 期的过渡,对细胞周期进行负调控。研究表明 p16 基因比 p53 更直接选择性的抑制 CDK4 的活性,同时由于 p16 分子量较小,在基因治疗中易于操作。因此 P16 基因有望成为肺癌治疗的靶基因之一,例如应用野生型 p16 替代患者体内突变的 p16 基因;逆转 p16 基因甲基化过程;应用单克隆抗体技术等都是未来的研究方向。

参考文献(References)

- [1] Ministry of Health of the People's Republic of China(2008) The cause of death in China: the third retrospective sample survey [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press
- [2] Jemal A, Hao Y, Xu J, et al. (2009) Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 59: 225-249
- [3] Chen M, Voeller D, Marquez VE, et al. Enhanced growth inhibition by combined DNA methylation/HDAC inhibitions in lung tumor cells with silenced CDKN2A[J]. Int J Oncol, 2010, 37(4): 963-971
- [4] Travis J. Closing in on melanoma susceptibility gene (s) [J]. Science, 1992, 258(5085): 1080-1081
- [5] Serrano M, Hannou G T, Reach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD /CDK4 [J]. Nature, 1993, 366(6456): 704-707
- [6] Hiramata T, Koffler H P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer[J]. Blood, 1995, 88(3): 841
- [7] Zhang Qiu-shi, Qi Mu-ge, Su Xiu-lan, et al. Tumor suppressor gene p16 and cell cycle control[J]. Cancer Research And Clinic, 2000, 12(3): 208-210
- [8] Paya A, Alenda C, Perez-Carbonell L, et al. Utility of p16 immunohistochemistry for the identification of Lynch syndrome [J]. Clin Cancer Res, 2009,15(9): 3156-3162
- [9] Zhou Jing, Su Yu-wen. SAM, DNA methylation and tumor[J]. Journal of Modern Oncology, 2008, 16(11):2019-2021
- [10] Seike M, Gemma A, Hosoyay, et al. Increase in the frequency of p16INK4 gene inactivation by hypermethylation in lung cancer during the process of metastasis and its relation to the status of p53 [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(11): 4307-4313
- [11] Shabashvili D, Chen M, Nawab A, et al. DNA methyltransferase inhibitor, zebularine, delays tumor growth and induces apoptosis in a genetically engineered mouse model of breast cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(2):370
- [12] Wasgimi O, Nagatake M, Osada H, et al. In vivo occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alteration preferentially, in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56: 3415
- [13] Hu Ying, Liao Ming-ling. Research on missing both p16(MTS1) of p1 (MTS2) and incidental NSCLC prognosis[J]. Tumor, 2011, 21(6):443-445
- [14] Tong Jin-long, Cheng Hong-yan, Zhao Di, et al. Meta analysis about p16 protein expression and prognosis survival relation in NSCLC[J]. Chinese Clinical Oncology, 2011, 16(6): 514-520
- [15] Fang Yan, Wu Hong-pei, Wang Xiao-ping. Expression and clinic significance of p16 in incidental lung cancer tissue [J]. Journal of Practical Medical Technique, 2008, 15(30): 4286-4287
- [16] Sterlacci W, Tzankov A, Veits L, et al. A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(10): 1649-1657
- [17] Buckingham L, Penfield-Faber L, Kim A, et al. PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II non-small cell lung cancer patients [J]. Int J Cancer, 2010, 126(7): 1630-1639
- [18] Xu Jin-pin. Expression and clinic significance of cancer suppressor gene p16 in non-small cell lung cancer[J]. Henan Journal of Oncology, 2002, 15(6): 415-416
- [19] Ye Y, Su C, Wang D. et al. Relation of tumor suppressor gene p16 and RB to early diagnosis of lung cancer[J]. Chin J Surg, 2000, 38(12): 885-889
- [20] Du Hong, Lou Hui-ling, Zhang Xi-lin. Detection of p53 and p16 protein expression in lung cancer tissue [J]. Guangdong Medical Journal, 2004, 25(6): 648-649