

# 癌基因与抗癌基因

邓 国 仁

(北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034)

## 提 要

本文从癌基因和抗癌基因两个领域概述了目前国内外的研究成果和方向。癌基因的研究不但可使人们从分子水平认识肿瘤多阶段发展的机理以及细胞生长、分化调节的机制,而且还有可能对肿瘤的诊断、预后判断及生物化学治疗起推动作用。抗癌基因(或称抑癌基因)则是参与维持细胞正常功能的另一组基因。虽然目前识别、克隆出的抗癌基因不多,它们的生物功能也不十分清楚,但是可以预见抗癌基因的研究必将极大地促进细胞功能调控及肿瘤基因治疗研究的发展。

**关键词** 肿瘤,癌基因,抗癌基因

1982 年,美国麻省理工学院 Weingberg 和国立癌症研究所 Barbacid 等人首次从人膀胱癌细胞中克隆出活化的癌基因 c-Ha-ras<sup>[1,2]</sup>,这引起了人们对癌基因研究的普遍关注。几年来,越来越多的实验室加入了癌基因研究的行

列。随着研究的深入开展,人们对癌基因的激活与肿瘤形成、进展的关系,对细胞生长分化的调控有了进一步的认识。更重要的是在这一研究进程中,人们开始认识到机体内部还存在着另一套抑制细胞生长,抑制肿瘤形成的基因。从

螺旋-转折-螺旋作为与 DNA 相互作用的蛋白质结构单位广泛存在于原核生物和真核生物。这些调控蛋白大多数与发育有关。如原核生物的  $\lambda$  抑制子、 $\lambda$  Cro 蛋白等是噬菌体选择不同的生活周期的重要调节蛋白;真核生物中的 MAT $\alpha$  2 是调控酵母生活周期的主要因子;众多的 homeo 盒(homeo box)蛋白家族与高等生物的发育分化有关。锌指结构则可能是一种最原始的核酸-蛋白质相互作用形式。如 TFIIIA 既能结合 DNA;又能结合 RNA。从理论上讲,重复出现的锌指结构和 DNA 链的相互作用是一种简单的形式。亮氨酸拉链结构存在于癌基因 jun, fos, myc 中是一个很有意义的发现。已知 jun 和 fos 蛋白是通过亮氨酸拉链形成异源二聚体与 DNA 结合并发挥转化细胞的作用。对亮氨酸拉链蛋白的研究将是很

- ### 参 考 文 献
- 1 Bushman A *et al.* *Cell*, 1988; 54: 191
  - 2 Ma J *et al.* *Cell*, 1987; 48: 847
  - 3 Brent R *et al.* *Cell*, 1985; 43: 729
  - 4 Hope I A *et al.* *Cell*, 1986; 46: 885
  - 5 Webster N *et al.* *Cell*, 1988; 52: 169
  - 6 Robin P W *et al.* *TIBS*, 1986; 11: 71
  - 7 Porter M *et al.* *Nature*, 1986; 320: 766
  - 8 Hon-sum Ko *et al.* *Cell*, 1988; 55: 135
  - 9 Miller *et al.* *EMBO*, 1985; 4: 1609
  - 10 Berg. *PNAS*, 1988; 85: 99
  - 11 Huckaby *et al.* *PNAS*, 1987; 84: 8380
  - 12 Johnston *et al.* *PNAS*, 1987; 84: 2401
  - 13 Green, Chambon. *Nature*, 1987; 325: 75
  - 14 Landschaltz *et al.* *Science*, 1988; 240: 1759
  - 15 Schuermann M *et al.* *Cell*, 1988; 56: 507
  - 16 Lewis A C *et al.* *Cell*, 1988; 53: 11
  - 17 Gill G, Ptashne M. *Nature*, 1988; 334: 721
  - 18 Giniger E, Ptashne M. *Nature*, 1987; 330: 670
  - 19 Lech K *et al.* *Cell*, 1988; 52: 179
  - 20 Ronald M *et al.* *Cell*, 1988; 52: 1
  - 21 Paul B S. *Nature*, 1988; 333: 216

[本文于1989年10月12日收到,1990年3月2日修回]

而一个研究机体抗癌(或抑癌)作用的分子生物学基础的新方向又诞生了。

### 一、癌基因的激活

癌基因最早发现于可引起动物肿瘤的逆转录病毒中,是可使细胞发生恶性转化的基因。癌基因不仅存在于肿瘤病毒中,还存在于正常细胞中<sup>[3]</sup>,人们将存在于病毒中和细胞中的癌基因分别称为病毒癌基因(v-oncogene)和细胞癌基因(c-oncogene)。细胞癌基因(或称原癌基因 proto-oncogene)对维持细胞正常的生长分化起调节作用。在肿瘤细胞中,可发现一种或多种癌基因发生质或量的变化。发生变化的癌基因可获得转化细胞的能力,所以称这种变化为激活。研究肿瘤中某些癌基因的激活是探讨肿瘤发病机理的重要内容。

原癌基因的激活是通过以下途径完成的:

#### 1. 点突变

原癌基因在编码顺序的特定位置上发生一个核苷酸的突变,可使相应蛋白质一个氨基酸改变,从而改变了蛋白质的空间构型和生物功能。如:癌基因 c-Ha-ras, c-Ki-ras 和 N-ras 在 12,13 或 61 位密码子发生点突变,可见于膀胱癌、乳癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌和白血病等肿瘤。本实验室也在胃癌细胞株中发现 c-Ha-ras 在 12 位密码子的突变<sup>[4]</sup>。此外,人们还在 Burkitt 氏淋巴瘤及乳癌中发现癌基因 c-myc 等一内含子和 c-mos 3' 端的点突变。

#### 2. 扩增和高表达

一些癌基因通过不明机制复制成多个拷贝,然后脱离染色体,形成双微粒染色体,有时它们又再次整合入染色体中,形成均染区。癌基因拷贝数的增加会导致其产物的增加,使细胞正常功能受到干扰,从而发生转化。有时癌基因的拷贝数并没有增加,但由于其调控区的变化(如:正调节的增强或负调节的去除),也可以使产物增加。癌基因 c-myc 的扩增与高表达可见于小细胞肺癌<sup>[6]</sup>和前髓细胞白血病等;N-myc 的扩增可见于神经母细胞瘤<sup>[7]</sup>,视网膜母细胞瘤,小细胞肺癌;L-myc 的扩增可

见于小细胞肺癌;c-erbB-2 的扩增和高表达可见于乳腺癌,卵巢癌等<sup>[8]</sup>。

#### 3. 易位

癌基因从染色体的正常位置上转移到另外染色体的某个位置上,使它的调控环境发生了改变,导致它的激活。如:在 Burkitt 氏淋巴瘤中, c-myc 从 8 号易位到 14 号染色体免疫球蛋白重链基因旁,在慢性和急性粒细胞白血病中 c-abl 从 9 号易位到 22 号染色体,在不同位置上与 bcr 的 s' 区相连,产生一种获得酪氨酸激酶活性的融合蛋白质。

### 二、肿瘤诊断、预后的分子探针

在肿瘤组织中不但发现了一些癌基因的激活,而且激活程度往往与肿瘤的病程有关。这就提供了一个用癌基因作为分子探针,协助临床进行肿瘤诊断及预后判断的可能性。

#### 1. ras 点突变的检测

用多聚酶 DNA 链延伸反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和 RNA 酶 A 错配断裂分析法可分别在 41% 和 39% 的结肠癌样品中发现 Ki-ras 等 12 位的点突变<sup>[9,10]</sup>。而且同一病人的腺瘤和癌组织中都可检出 ras 基因同一位点的突变,这表明 ras 点突变发生在细胞瘤变过程的早期。在急性粒细胞白血病中可以发现 27% 的 ras 点突变,而在缓解期病人中则不能检出这种突变,这说明 ras 点突变可能与病情有关。本实验室用 PCR 法发现 38% 的胃癌样品中存在 Ha-ras 等 12 位的点突变<sup>[11]</sup>。并且,经过 5 年随访,发现点突变与病人术后生存期有明显的相关性。

#### 2. erbB-2 的扩增和高表达

在乳癌病人中,erbB-2 扩增 5 个拷贝以上的病人极易复发,其生存期比没有扩增的病人显著缩短<sup>[12]</sup>。最近发现卵巢癌病人的预后也与 erbB-2 的扩增有关。在乳癌和卵巢癌病人中,erbB-2 的扩增与其产物表达的提高往往是一致的。

#### 3. N-myc 的扩增

N-myc 的扩增多见于神经母细胞瘤和小

细胞肺癌的晚期病人<sup>[7]</sup>。

#### 4. abl 的易位

癌基因 *abl* 从 9 号染色体易位到 22 号上, 形成了费城染色体 (*Ph'*)。90% 以上的慢性粒细胞白血病中可发现 *Ph'* 染色体, 而且缓解期时 *Ph'* 的再度出现往往预示着疾病的复发。由于目前已认清 *abl* 易位的分子机制, 人们可以利用与易位的 *abl* 相连的 *bcr* 作探针, 或用 PCR 法更敏感地检测 *abl* 的易位方式, 发现不同易位方式与疾病分型和病程的关系。

### 三、癌基因的功能

原癌基因存在于正常细胞中, 对维持细胞正常功能, 调节细胞生长分化起重要作用。当它们被激活时, 细胞生长分化就会偏离正常轨道。据统计, 目前已发现了近 100 种癌基因。按照它们产物的功能, 可分为以下几组:

#### 1. 酪氨酸激酶类

这类癌基因的产物具有蛋白激酶活性, 它可使酪氨酸磷酸化。它们一般位于细胞浆膜内侧或横跨膜内外两侧, 与生长因子有关, 如: *src*, *erbB-1*, *erbB-2*, *abl* 等。

#### 2. ras 家族

*ras* 家族包括 *Ha-ras*, *Ki-ras*, *N-ras*, 它们的产物 p 21 蛋白结构相似, 都位于细胞内侧。p 21 为 GTP 结合蛋白, 有 GTP 酶活性。p 21 通过磷酸脂酶 C 的作用调节细胞第二信使磷酸肌醇的代谢, 所以 p 21 可能参与生长因子自受体到细胞核内的传递、加工作用。

#### 3. 核内蛋白类

这类癌基因的产物都在核内, 与 DNA 结合。细胞处于静止期时它们不表达, 但在生长因子刺激下, 它们中的一部分开始表达。这类基因产物直接参与某些基因的转录调控, 是目前已知的生长信号传递途径的最后一站, 如: *myc*, *fos*, *jun* 等。

#### 4. 生长因子类

*sis* 属于这一类, 它的产物与血小板生长因子 (PDGF) 相似。

以上可以看出不同癌基因产物组成了生长

信号在细胞中的传递链。在任何一个环节上的癌基因产物发生改变, 都有可能使生长信号的最终效应器接受异常信号, 使细胞脱离正常生长分化轨道, 导致恶性转化。

### 四、癌基因表达的阻断与细胞的逆转

美国 Cetus 公司和冷泉港实验室将特异抗点突变 p 21 抗体微量注射到已发生转化的细胞中, 可以使转化细胞发生部分表型的逆转。这使人们看到了通过阻断癌基因的表达使恶性细胞逆转的希望。1987 年美国陆军医院和约翰·霍普金斯大学使用与 *c-Ha-ras* 序列互补的甲基化寡核苷酸明显地抑制 p 21 蛋白的体外合成。而且, 这种抑制效应具有显著的序列依赖性。也就是说, 寡核苷酸中若有一个核苷酸不与 *c-Ha-ras* 序列匹配, 抑制率就会明显下降<sup>[13]</sup>。本实验室使用与 *c-Ha-ras* 起始密码子以及第一内含子与第二外显子连结处这两个位点附近的序列互补的反义寡核苷酸研究它们对 *Ha-ras* 转化细胞的影响, 发现它们不但抑制了 p 21 的细胞内合成, 而且对细胞增殖和细胞中 DNA 合成有抑制作用<sup>[14]</sup>。本实验室还构建了可表达与点突变 *Ha-ras* 互补的反义 RNA 的重组质粒, 并用其转染转化细胞, 发现转染后的细胞在生长速度、形态、停泊依赖性、致癌性和转移能力上都有逆转的趋势, 而且细胞中 p 21 的合成也明显地降低了<sup>[15]</sup>。上海肿瘤所顾建人将 *N-ras* 反向插入逆转录病毒载体中, 制成可表达 *N-ras* 反义 RNA 的假性病毒, 将其转染人肝癌细胞, 发现细胞的增殖被显著地抑制了。

最近, 美国乔治城大学用表达 *raf* 反义 RNA 的质粒转染人鳞状上皮细胞, 可降低它的致癌性和对放射性的耐受能力<sup>[16]</sup>。在 1989 年美国细胞生物学及分子生物学联合年会和第 5 届癌基因年会上, 用反义寡核苷酸阻断癌基因表达的工作均有报道。如: *c-myc* 反义寡核苷酸可抑制 Barkitt 氏淋巴瘤和早幼粒细胞的增殖; *TGF-β* 反义寡核苷酸可抑制人骨髓细胞的 DNA 合成等。

更令人感兴趣的是会上还有报道：用 *fos* 反义寡核苷酸可抑制 *ras* 转化细胞的生长；用 *N-myc* 反义寡核苷酸可抑制细胞抗原 Ki 67 的合成。本所董志伟等人的工作还证明用 *Ha-ras* 寡核苷酸不但抑制了转化细胞中 p 21 的合成，还可抑制转化细胞膜上肿瘤相关抗原的表达(赵晓航等，转化相关蛋白 p 86 的鉴定，待发表)。以上结果表明癌基因产物之间可能存在着一个信号传递的序贯(cascade)作用，也使人们推想癌基因激活后可通过某些目前尚不清楚的机制影响细胞膜上肿瘤相关抗原的表达。

总之，癌基因表达阻断的研究不但能从反面证实癌基因激活在肿瘤形成中的作用和癌基因之间的相互关系，而且这种细胞逆转的研究将为肿瘤的基因治疗打下理论和方法学上的基础。

## 五、肿瘤发生的多阶段性及其启示

单一癌基因的激活就能导致肿瘤这一概念早就被人们所怀疑。Weinberg 发现必须有两组癌基因(胞浆癌基因，如 *ras*，和胞核癌基因，如 *myc*) 共同的参与，才能使初代大鼠胚胎细胞完全转化<sup>[17]</sup>。这在一定程度上解释了肿瘤发生的多阶段性和细胞在漫长的癌变过程中的基因改变机理，但人们仍嫌这一解释过于简单，过于模式化。

用单纯点突变的 *Ha-ras* 转染大鼠胚胎初代细胞，一般是不能得到细胞转化灶的。但如果将 *Ha-ras* 与 *neomycin* 抗性基因(*neo*) 共同转染初代细胞，再用药物将未接受 *Ha-ras* 和抗性基因的细胞筛选掉，所形成的细胞集落就表现出恶性的表型。用含 *Ha-ras* 的 Harvey 肉瘤病毒转染初代细胞，也发现转化后的细胞具有致癌性。如何解释这一现象？人们推测，若单独用 *ras* 转染初代细胞，在已接受 *ras* 的细胞周围有大量未接受 *ras* 的正常细胞，它们通过某种机制(如缝隙连结，gap junction) 对少数接受 *ras* 的细胞施加影响，使它们不能生长到肉眼可见的转化灶。而当用 *Ha-ras* 与 *neo* 基因共转染细胞时，通过药物筛选，接受了

*ras* 和 *neo* 的细胞周围的正常细胞已被杀死，它们就可不受限制地生长。用 Harvey 病毒转染细胞也是类似的道理：病毒可有效地感染单层贴壁细胞，这些细胞周围不存在正常细胞。这一现象给人们一重要启示：在研究细胞恶变机理时不要忽视转化细胞周围的正常细胞对前者生长的抑制作用。

既然肿瘤的发生一般需要两个以上癌基因的参与，肿瘤的扩大需要恶变细胞不断地克服周围正常细胞的限制作用，那么这些作用之间的相互关系是什么？多阶段癌变的分子基础又是什么？在人、鼠癌前病变中都发现了 *ras* 的点突变，说明 *ras* 激活(一般是在致癌剂的作用下)发生在肿瘤形成的早期(起动阶段，initiation)。而为什么在大多数情况下获得了 *ras* 的细胞不能形成肿瘤呢？上述的体外细胞转染实验可以证明这是由于周围正常细胞的抑制作用。当使用促癌剂 TPA 时，转化细胞与周围细胞之间的缝隙连结被破坏，大大减低了正常细胞对转化细胞发出的抑制信号的传递。从而使后者迅速增殖。这就是促癌剂在促动阶段(promotion)的作用。肿瘤的进一步发展还需要第二种遗传学上的改变，细胞一旦获得了这种变化，它就不再依靠促癌剂而可以自身发展了。核内癌基因 *myc* 的激活可能就属于进展阶段(progression)的这一改变。以上的起动、促动和进展阶段中 *ras* 的激活、TPA 对周围正常细胞信号的阻断和 *myc* 类的激活这一模式是否完全反映客观，还有待于证实。

## 六、抗癌基因

抗癌基因(anti-oncogene)，或称抑癌基因(suppressor gene)的概念最初来自正常细胞与肿瘤细胞的融合实验。在细胞融合后可发现一些肿瘤细胞由于接受了正常细胞的某个染色体，发生了恶性表型的逆转<sup>[18]</sup>。人们推测这些来自正常细胞的染色体含有调节细胞正常生长，抑制肿瘤形成的基因，即抗癌基因或抑癌基因。它们的缺失或失活会导致细胞增殖的失控和癌变。

抑癌基因作用的直接证据来自视网膜母细胞瘤 Rb 基因的研究。根据视网膜母细胞瘤病人的遗传学统计和遗传型, 双侧视网膜母细胞瘤中往往出现染色体 13 q 14 区的缺失, Knudson 提出视网膜母细胞瘤中基因两次突变的假说<sup>[19]</sup>。位于染色体 13 q 14 区的 Rb 基因有抑制细胞恶变的作用, 它的突变或缺失, 可导致其失活。但一个 Rb 失活另一个 Rb 正常的杂合子不会导致肿瘤。当另一个正常的 Rb 也失活时, 细胞就会恶变。1986 至 1987 年, 美国三个实验室相继独立完成 Rb 基因的克隆<sup>[20-22]</sup>。此后, 一些实验室还报道了 Rb 基因在视网膜母细胞瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤、乳癌、小细胞肺癌和膀胱癌中的缺失, 异常表达或失活, 从而 Rb 基因对肿瘤形成的抑制作用又得到了更多的证明。最近有报道称: 将正常 Rb 基因重组到逆转录病毒载体中, 将它形成的假性病毒感染视网膜母细胞瘤和骨肉瘤细胞株, 可使它们的增殖受到抑制<sup>[23]</sup>。这就直接证明了 Rb 基因对细胞生长有调节作用。

Rb 基因如何行使它的调节功能呢? 实验证明, Rb 基因的产物是一个分子量为 105 kD 的蛋白质, 称为 p105-Rb。它可能被磷酸化, 位于细胞核内, 与 DNA 相结合。现已证明, p105-Rb 可与属细胞癌基因的 Ad5 E1A, SV40 LT, HPV-E7 等的产物相结合。上述这些癌基因产物与 p105-Rb 蛋白的结合, 可能会使后者失去抑癌的作用。

核内癌基因 p53 近年来也被越来越多的实验证明属于抑癌基因。人们首先发现小鼠红白血病细胞内有 p53 基因的缺失。最近 Vogelstein 又发现 75% 以上的大肠癌中有 17 号染色体的缺失, 而缺失位点在 p53 基因附近。经分析还证明结肠癌的 p53 基因存在点突变<sup>[24]</sup>。野生型 p53 基因不能与 ras 相配合使初代细胞转化。而在不同位点发生突变的 p53 基因则获得了转化能力。p53 蛋白作为一种核蛋白, 也可与 SV40LT 蛋白及 AdE1B 蛋白结合, 结合后 p53 蛋白可能也象 p105-Rb 一样失去活性。结直肠癌中还经常发现 18 号染色

体的缺失。最近引起肿瘤研究领域极大兴趣的是 Vogelstein 又在 18 号染色体上 370 kb 的范围内发现一个与细胞粘着分子有关的基因, 它在大部分正常组织中有表达, 而在结直肠癌中发现它存在点突变、缺失或插入并且表达水平大大降低, 这种被称为 DCC 的基因被认为是参与细胞间作用的另一种抑制癌基因<sup>[25]</sup>。

## 七、癌基因、抗癌基因和癌变的多阶段

人们对不同癌基因在癌变各阶段中的作用已有一定的认识, 而由于对抗癌基因的了解刚刚开始, 它们在癌变过程中是如何行使其负调节作用还不清楚。现在人们已找到一些研究癌基因与抗癌基因相互作用的良好模型, 如: 在结肠癌细胞中可同时发现 ras 的突变和 17, 18 号染色体的缺失(抑癌基因的失活)。相信, 人们不久就能更清楚地描绘出癌变过程中癌基因与抗癌基因相互作用的模式图, 为最终通过阻断癌基因的表达或强化抗癌基因的表达, 进行肿瘤的生物治疗打下理论基础。

## 参 考 文 献

- 1 Tabin C J *et al.* *Nature*, 1982; 300: 143
- 2 Reddy E P *et al.* *Nature*, 1982; 300: 149
- 3 Bishop J M. *Ann Rev Biochem*, 1983; 52: 301
- 4 Bos J L. *Mutation Res*, 1988; 195: 255
- 5 Deng G *et al.* *Cancer Res*, 1987; 47: 3195
- 6 Little C D *et al.* *Nature*, 1983; 306: 194
- 7 Brodeur G M *et al.* *Science*, 1984; 224: 1121
- 8 Berger M S *et al.* *Cancer Res*, 1988; 48: 1238
- 9 Bos J L *et al.* *Nature*, 1987; 327: 293
- 10 Forrester K *et al.* *Nature*, 1987; 327: 298
- 11 Deng G. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 6231
- 12 Slamon D J *et al.* *Science*, 1987; 235: 177
- 13 刘景梅. 生物化学与生物物理进展, 1988; 5: 319
- 14 许毅, 邓国仁. 中国科学 B 辑, 1989: 1301
- 15 邓国仁. 中华医学杂志, 1989; 69: 341
- 16 Kasid U *et al.* *Science*, 1989; 243: 1354
- 17 Weinberg R A. *Science*, 1985; 230: 770
- 18 Klinger H P. *Cytogenet Cell*, 1982; 32: 68
- 19 Knudson A G. *Cancer Res*, 1985; 45: 1437
- 20 Friend S H *et al.* *Nature*, 1986; 323: 634
- 21 Lee W H *et al.* *Science*, 1987; 235: 1394
- 22 Fung Y K T *et al.* *Science*, 1987; 236: 1657
- 23 Huang H J *et al.* *Science*, 1988; 242: 1563
- 24 Baker S J *et al.* *Science*, 1989; 244: 217
- 25 Fearon E R *et al.* *Science*, 1990; 247: 49

[本文于1989年10月30日收到, 1990年3月22日修回]