

p16^{INK4a}基因的功能及其调控*

龚振明^{1,2)} 傅继梁¹⁾**

(¹⁾第二军医大学医学遗传教研室, 上海 200433; ²⁾上海交通大学动物科学系, 上海 201101)

摘要 p16^{INK4a}蛋白能抑制 CDK4 和 CDK6 的活性, 使 pRb 处于非磷酸化或低磷酸化状态而能与转录因子 E2Fs 结合, 从而抑制 DNA 的合成, 阻止细胞由 G1 期进入 S 期. p16^{INK4a}的表达受 Ets1 和 Ets2 的正调控, 受 Bmi-1 的负调控. p16^{INK4a}基因缺失、突变、甲基化、RNA 剪接加工错误可导致细胞周期失控和癌变. 应用 p16^{INK4a}对某些肿瘤进行基因治疗的研究正在进行中.

关键词 p16^{INK4a}, 功能, 调控, 肿瘤

学科分类号 Q78

INK4a/ARF 基因位点结构非常特殊, 是高等动物中迄今已知的唯一通过基因重叠编码 2 个多肽的实例, 其中外显子 1 α 、2、3 编码 p16^{INK4a}, 外显子 1 β 、2、3 编码 p19^{ARF}.

1 p16^{INK4a}蛋白的结构

小鼠 p16^{INK4a}蛋白由 168 个氨基酸残基构成, 其一级结构如下 (划线部分为 4 个锚蛋白重复): MESAADRLARAAAQGRVHDVRALEAGVSPNAPNS FGRTPIQVMMGNVHVAALLNLYGADSNCEDPTTFSRPVHDAAREGFDTLVVLHCGSARLDV RDA WGRPLDLAQERGHQDIVRYLRSAGCSLCS AGWSLCTAGNVAQTGDHSFSSSTPRALELRGQSSEQS. 人 p16^{INK4a}蛋白由 156 个氨基酸残基构成, 其一级结构如下 (划线部分为 4 个锚蛋白重复): MEPAAGSSMEPSADWLATAAARGRVEEVRALLEAGALPNAPNSYGRRIQVMMMGSAARVAELLLLHGAEPNC ADPA TLTRPVHDAAREGFDTLVVLHHRAGARLDV RDA WGRLPVDLAEELGHRDVARYLRAAAGGTRGSNHARIDAAEGPSDIPD, 其中第 3 个锚蛋白重复中的一段由 20 个氨基酸残基构成的肽段“DAAREGFDTLVVLHHRAGAR”具有与全长 p16^{INK4a}蛋白相似的功能: 能与 CDK4 和 CDK6 结合并抑制它们的激酶活性, 抑制细胞由 G1 期进入 S 期. 将全长 p16^{INK4a}蛋白中的两个缬氨酸用丙氨酸替代 (V95A, V96A) 后, 其与 CDK4 和 CDK6 的结合能力以及抑制细胞周期的能力下降; 而用丙氨酸替代 92 位上的天冬氨酸后 (D92A), 其与 CDK4 和 CDK6 的结合能力上升, 激酶抑制活性和抑制细胞周期的能力增强. 将上述

二十肽作系列删除发现: 在 N 端或 C 端删去 2 个氨基酸残基会使该片段与 CDK 的结合能力和激酶抑制活性下降. 但若在 N 端或 C 端删去 4 个氨基酸残基则其与 CDK 的结合能力和激酶抑制活性仍与原二十肽相似. 这表明: 被删去的氨基酸残基在维持 p16^{INK4a}蛋白的空间结构上有重要作用. 对上述二十肽进行系列删除试验还发现: 其中的一段十肽“FLDTLVVLHR”仍具有抑制 CDK4/cyc D1 激酶活性和抑制细胞周期的能力^[1].

2 p16^{INK4a}的功能

p16^{INK4a}具有两方面的功能: a. 它是细胞分裂次数的计数器 (generation clock), 其表达水平随细胞分裂次数的增加而提高, 当表达水平足够高时就能抑制细胞分裂, 诱导细胞老化, 防止细胞无限分裂. b. 它是细胞生理状态的监视器 (surveillance). 当细胞处于恶劣环境或 DNA 受到损伤时, p16^{INK4a}的表达水平上升, 进而引发细胞分裂抑制或细胞凋亡, 防止异常细胞进入细胞周期.

大多数正常细胞中 p16^{INK4a}的表达水平极低, 小鼠中只有成年组织用 RT-PCR 才能检测到其表达^[2]. 胚胎期和新生小鼠细胞内都检测不到的 p16^{INK4a}表达. 胚胎期和初生小鼠细胞中 p16^{INK4a}虽然不表达, 但该基因一直处在警戒状态, 一旦细胞内外环境发生大的变化, p16^{INK4a}的表达就会启动.

* 国家自然科学基金重点项目 (39830360) 和上海联合利华科技发展基金资助项目 (9808).

** 通讯联系人.

Tel: 021-25070027, E-mail: jifu@guomai.sh.cn

收稿日期: 2001-07-24, 接受日期: 2001-09-12

DNA 损伤可以通过 p16^{INK4a} 的表达来抑制细胞分裂和诱导细胞凋亡。例如: Calu-1 是一种非小细胞性肺癌细胞, 其 pRb 基因正常, p53 基因缺失, p16^{INK4a} 基因因过甲基化而不表达。外源 p16^{INK4a} 的高水平表达可使这种细胞表现出 G1 期细胞周期抑制。对这种细胞用 γ 射线照射, 使其 DNA 受损伤后细胞不表现出细胞分裂抑制。若先用受四环素控制的 p16^{INK4a} 逆转录病毒表达载体感染 Calu-1 细胞, 再用 γ 射线使 DNA 受损伤则细胞表现出分裂抑制^[3]。

3 p16^{INK4a} 的作用机理

p16^{INK4a} 蛋白可以抑制 CDK4/cyc D1 和 CDK6/cyc D1 对 pRb 的磷酸化激酶活性, 使 pRb 处于非磷酸化或低磷酸化状态, 从而抑制 E2Fs 的活性, 抑制细胞分裂^[4]。已知, 在 C-myc、B-myb、Cdc2、二氢叶酸还原酶、胸苷激酶和 E2F-1 等调控细胞生长的基因启动子中存在“TTTCGCGC”或其相似序列。E2Fs 的 5 个成员能特异性地与这些元件相结合, 从而控制这些基因的表达^[5]。

仅 pRb 本身可能不足以抑制细胞分裂^[6,7], 将 pRb 家族的另外二个成员 p107 和 p130 分子中的可磷酸化位点用丙氨酸进行替换改造, 使它们不能被磷酸化, 但仍具有与 E2F 和细胞周期蛋白结合的能力。经过改造的 p107 和 p130 在 p16^{INK4a} 缺陷、细胞周期蛋白 D-CDK4/6 失活的细胞内能抑制细胞分裂, 而野生型 p107 和 p130 则不能抑制上述细胞的分裂。这表明 p107 和 p130 在抑制细胞分裂的 p16^{INK4a}/pRb 途径中起着重要的作用。

4 p16^{INK4a} 表达的调控

p16^{INK4a} 的表达受 Ets1 和 Ets2 的正调控: Ets1 和 Ets2 与 p16^{INK4a} 启动子上的 ETS 位点结合, 促进 p16^{INK4a} 的转录。Ras-Raf-MEK 级联放大系统可以增强这种促转录作用, helix-loop-helix 蛋白 Id1 则通过直接作用而抑制 Ets2 的促转录作用。在衰老细胞中, 虽然 Ets2 水平和 MEK 信号降低, 但 Ets1 水平上升和 Id1 水平下降仍使 p16^{INK4a} 的表达显著增加^[8]。

p16^{INK4a} 的表达还受 Bmi-1 的负调控^[9], bmi-1 失活小鼠的胚胎成纤维细胞周期异常, G1/S 受阻并提早衰老。在这些细胞中, p16^{INK4a} 蛋白和 p19^{ARF} 蛋白水平明显上升。bmi-1 表达过量则会引起小鼠患白血病, 其成纤维细胞永生化, 若与

H-ras 协同可使细胞恶性转化。在 bmi-1 过量表达的细胞中, p16^{INK4a} 蛋白和 p19^{ARF} 蛋白水平明显下降。bmi-1 缺陷的小鼠成纤维细胞中, p16^{INK4a} 表达水平提高并提前衰老。bmi-1 和 p16^{INK4a} 双缺陷的小鼠成纤维细胞则没有出现提前衰老现象。敲除了 bmi-1 基因的小鼠神经系统缺陷, 淋巴细胞分裂受阻。bmi-1 和 p16^{INK4a} 双敲除小鼠的神经系统缺陷和淋巴细胞分裂受阻现象显著缓解。

5 p16^{INK4a} 失活的种类

p16^{INK4a} 失活主要有如下 4 种: a. 纯合性缺失, 约占人类肿瘤的 14%。通常是整个 INK4a/ARF 位点缺失, 与其邻近的 INK4b 位点也经常同时缺失。b. 基因内突变, 约占人类肿瘤的 5%。多数点突变发生于 p16^{INK4a} 和 p19^{ARF} 共用的第 2 外显子, 少量发生于外显子 1a, 只参与 p19^{ARF} 编码的外显子 1B 上的突变则极少有报道^[10]。c. 启动子的甲基化, 主要发生在 p16^{INK4a} 的启动子上, 导致 p16^{INK4a} 转录活性完全丧失, 约占人类肿瘤的 19%^[11]。d. RNA 剪接加工错误。

目前对 p16^{INK4a} 基因缺失的原因所知甚少, 龚振明等^[12] 克隆了 14.5 kb 小鼠 p16^{INK4a} 基因组 DNA 片段并进行了全序列测定, 发现该片段中的非编码区分布着大量短散布元件、长散布元件和简单重复序列, 推测这些结构可以为转座、同源重组和基因缺失提供结构基础。

p16^{INK4a} 可结合于 CDK6 的催化裂隙 (catalytic cleft) 的 ATP 结合位点附近、cyclin 结合区的对面, 通过改变 CDK6 的空间结构阻止 cyclin 与 CDK6 结合, 同时使催化裂隙扭曲而干扰其与 ATP 的结合, 从而抑制 CDK6 对 pRb 的磷酸化^[13]。人 p16^{INK4a} 基因至少存在 140 种错义突变和几乎相同数量的无义、插入、缺失、移码突变。对家族性黑色素细胞瘤患者中常出现的 7 种错义突变蛋白质产物进行功能分析表明: 这些蛋白质完全或部分丧失了与 CDK4 和 CDK6 结合及抑制其激酶活性的能力^[14]。

肿瘤细胞中 p16^{INK4a} 基因的甲基化现象较为普遍。Herman 等^[15] 的研究显示: 乳腺癌、前列腺癌、肾癌、结肠癌细胞系 p16^{INK4a} 基因甲基化失活率分别可达 33%、60%、23%、92%; 乳腺癌、结肠癌原发癌中 p16^{INK4a} 基因甲基化失活率分别为 31%、40%。p16^{INK4a} 基因的甲基化失活是可逆的。Suh 等^[16] 用 5-氮胞苷对 p16^{INK4a} 启动子已被甲基化

的肝细胞性肝癌细胞系进行处理, 结果异常 p16^{INK4a} 转录产物减少、正常 p16^{INK4a} 蛋白显著增加、出现 G1 期细胞周期抑制、衰老相关蛋白 β -半乳糖苷酶的表达水平提高。Garcia 等^[17] 用 p16 单克隆抗体对何杰金氏病进行免疫染色检测, 37 例中有 30 例无 p16^{INK4a} 蛋白表达。用甲基化特异性 PCR 技术检测到 23 个病例中有 14 例存在 p16^{INK4a} 基因第一外显子的高度甲基化, 所有有 p16^{INK4a} 蛋白表达的病例均未发现 p16^{INK4a} 基因第一外显子的高度甲基化。

RNA 剪接加工错误也能引起 p16^{INK4a} 蛋白失活, Suh 等^[18] 用 PCR, PCR-SSCP 和测序技术研究 20 例卵巢癌细胞的 p16^{INK4a} 基因, 发现有些病例 p16^{INK4a} 基因的转录产物缺少外显子 1 和 2 的部分序列, 因而不能编码出有功能的 p16^{INK4a} 蛋白。对异常 mRNA 进行测序后发现在缺失区域的前后有 4~7 个核苷酸的一致序列, 提示可能存在 RNA 剪接加工错误。

一种肿瘤通常只存在上述 4 种 p16^{INK4a} 失活中的一种, 但是这并非规律。Rahman 等^[19] 对印度次大陆 61 例食管鳞状细胞癌组织和相应的正常组织切片用免疫组织化学技术进行研究后发现 97% (59/61) 的病例存在 p16^{INK4a} 和/或 pRb 蛋白缺失。其中 84% (51/61) 的病例存在 pRb 蛋白缺失, 57% (35/61) 的病例存在 p16^{INK4a} 蛋白缺失。pRb 蛋白缺失与肿瘤细胞的去分化和肿瘤的淋巴转移显著相关。p16^{INK4a} 蛋白缺失与肿瘤细胞的去分化也显著相关。

6 p16^{INK4a} 与肿瘤治疗

根据肿瘤发生的原因, 联合使用基因治疗与放疗和化疗可以取得较好的效果。Frizelle 等^[20] 用能表达 p16^{INK4a} 的重组腺病毒治疗移植于小鼠的人间皮瘤, 使小鼠的存活时间延长。Kawabe 等^[21] 对三个 p16^{INK4a} 缺失的非小细胞肺癌细胞系 A549 (- p16^{INK4a}/+ pRb/wt - p53), H322 (- p16^{INK4a}/+ pRb/mt - p53) 和 H1299 (- p16^{INK4a}/+ pRb/deleted - p53) 用腺病毒介导的 p16^{INK4a} (Ad/p16) 进行处理, 发现 A549 对放射性治疗的敏感性提高, 而 H322 和 H1299 则无类似反应。对 H1299 用 Ad/p53 和 Ad/p16 处理后, 其对放射性治疗的敏感性也会提高。这一结果提示: 腺病毒介导 p16^{INK4a} 和放射性治疗联合诱导的细胞凋亡依赖于癌细胞中内源性 p53, 联合使用 Ad/p16 和放射性治疗对无功

能性 p16^{INK4a} 而有野生型 p53 的肿瘤有良好的效果。Chow 等^[22] 将人的全长 p16^{INK4a} 基因导入鼻咽癌细胞系后可诱发 G0/G1 细胞周期阻滞和细胞生长抑制。然而, 细胞的生长速度与细胞内 p16^{INK4a} 蛋白的表达水平无明显相关。导入了人全长 p16^{INK4a} 基因的 4 个鼻咽癌细胞系细胞对 5-氟尿嘧啶的敏感性提高约 2 倍, 4 个细胞系中的 3 个对顺铂的敏感性提高 1.5~1.8 倍, 但这些细胞系对放疗的敏感性未见提高。

Bandyopadhyay 等^[23] 发现: α -黑素细胞刺激素 (alpha-MSH) 或霍乱毒素 (CT) 可以通过激活某种 cAMP 途径, 引发正常人黑色素细胞的细胞周期抑制和衰老。这一衰老过程和 p16^{INK4a} 与 CDK4 的结合力提高及与 E2F 结合能力丧失有关。黑色素细胞用霍乱毒素处理可以诱导黑色素生成。对来自深肤色 (dark-skinned) 人的黑色素细胞用霍乱毒素处理后可以提高细胞中 p16^{INK4a} 蛋白和低磷酸化 pRb 蛋白的水平, 降低 cyclin E 和 E2F1 的表达, 停止 E2F 调控的 S 期基因的表达。相比之下, 浅肤色 (light-skinned) 人的黑色素细胞用霍乱毒素处理后 p16^{INK4a} 蛋白的水平较低, 经霍乱毒素处理后细胞仍会分裂数次。用 α -黑素细胞刺激素 (alpha-MSH) 和霍乱毒素 (CT) 治疗肿瘤的可行性尚待探索。

p16^{INK4a}/pRb 和 p19^{ARF}/p53 两条途径是否具有正常功能与肿瘤患者的预后有密切的联系。Gronbaek 等^[24] 对 123 例非何杰金氏淋巴瘤的研究发现: 有一条或二条途径能正常表达的病人其 5 年生存率为 38%, 而两条途径都不能正常表达的病人其 5 年生存率仅为 7%。

7 展 望

目前有关 p16^{INK4a} 基因的基础研究相对滞后, 制约了有关的临床应用研究。建立 p16^{INK4a} 外显子 1a 特异性缺失的动物模型, 研究 p16^{INK4a} 和 p19^{ARF} 重叠编码的生物学意义, 探明 p16^{INK4a} 的调控网络和 p16^{INK4a} 失活的原因 (而不是仅仅了解其失活的种类) 将有助于进一步提高对肿瘤进行预防、诊断和治疗的水平。

参 考 文 献

- 1 Fahraeus R, Lain S, Ball K L, et al. Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a synthetic tumour suppressor molecule. *Oncogene*, 1998, 16 (5): 587~596

- 2 Quelle D E, Ashmun R A, Hannon G J, *et al.* Cloning and characterization of murine p16^{INK4a} and p15^{INK4b} genes. *Oncogene*, 1995, **11** (4): 635~ 645
- 3 Shapiro G I, Edwards C D, Ewen M E, *et al.* p16^{INK4a} participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (1): 378~ 387
- 4 Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 1998, **12** (15): 2245~ 2263
- 5 La Thangue N B. DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends Biochem Sci*, 1994, **19** (3): 108~ 114
- 6 Bruce J L, Hurford R K Jr, Classon M, *et al.* Requirements for cell cycle arrest by p16^{INK4a}. *Mol Cell*, 2000, **6** (3): 737~ 742
- 7 Ashizawa S, Nishizawa H, Yamada M, *et al.* Collective inhibition of pRB family proteins by phosphorylation in cells with p16^{INK4a} loss or cyclin E overexpression. *J Biol Chem*, 2001, **276** (14): 11362 ~ 11370
- 8 Ohtani N, Zebedee Z, Huot T J, *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16^{INK4a} expression during cellular senescence. *Nature*, 2001, **409** (6823): 1067~ 1070
- 9 Jacobs J J, Kieboom K, Marino S, *et al.* The oncogene and polycomb group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 1999, **397** (6715): 164~ 168
- 10 Burri N, Shaw P, Bouzourene H, *et al.* Methylation silencing and mutations of the p14^{ARF} and p16^{INK4a} genes in colon cancer. *Lab Invest*, 2001, **81** (3): 217~ 229
- 11 Ruas M, Peters G. The p16^{INK4a}/CDKN2a tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **14** (2): 115~ 177
- 12 龚振明, 杨 桦, 傅继梁. 小鼠 p16^{INK4a} 基因位点的结构和功能研究. *遗传学报*, 2001, **28** (10): 921~ 925
- 13 Gong Z M, Yang H, Fu J L. *Acta Genetica Sinica*, 2001, **28** (10): 921~ 925
- 14 Russo A A, Tong L, Lee J, *et al.* Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16^{INK4a}. *Nature*, 1998, **395** (6699): 237~ 243
- 15 McDonald N Q, Peters G. Ankyrin for clues about the function of p16^{INK4a}. *Nature Struct Biol*, 1998, **5** (2): 85~ 88
- 15 Herman J G, Merlo A, Mao L, *et al.* Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*, 1995, **55** (20): 4525~ 4530
- 16 Suh S, Pyun H, Cho J, *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16^{INK4a} RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett*, 2000, **160** (1): 81~ 88
- 17 Garcia J F, Villuendas R, Algora P, *et al.* Loss of p16 protein expression associated with methylation of the p16^{INK4a} gene is a frequent finding in Hodgkin's disease. *Lab Invest*, 1999, **79** (12): 1453~ 1459
- 18 Suh S I, Cho J W, Baek W K, *et al.* Lack of mutation at p16^{INK4a} gene but expression of aberrant p16^{INK4a} RNA transcripts in human ovarian carcinoma. *Cancer Lett*, 2000, **153** (1~ 2): 175~ 182
- 19 Ralhan R, Mathew R, Arora S, *et al.* Frequent alterations in the expression of tumor suppressor genes p16^{INK4a} and pRb in esophageal squamous cell carcinoma in the Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, **126** (11): 655~ 660
- 20 Frizelle S P, Rubins J B, Zhou J X, *et al.* Gene therapy of established mesothelioma xenografts with recombinant p16^{INK4a} adenovirus. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7** (11): 1421~ 1425
- 21 Kawabe S, Roth J A, Wilson D R, *et al.* Adenovirus-mediated p16^{INK4a} gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells in a p53-dependent manner. *Oncogene*, 2000, **19** (47): 5359~ 5366
- 22 Chow L S, Wang X, Kwong D L, *et al.* Effect of p16^{INK4a} on chemosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Oncol*, 2000, **17** (1): 135~ 140
- 23 Bandyopadhyay D, Medrano E E. Melanin accumulation accelerates melanocyte senescence by a mechanism involving p16^{INK4a}/CDK4/pRB and E2F1. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **908**: 71~ 84
- 24 Gronbaek K, de Nully Brown P, Moller M B, *et al.* Concurrent disruption of p16^{INK4a} and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 2000, **14** (10): 1727~ 1735

Function and Regulation of p16^{INK4a}*

GONG Zhen-Ming^{1,2)}, FU Ji-Liang^{1)**}

⁽¹⁾ Medical Genetics Department, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

⁽²⁾ Animal Science Department, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

Abstract By binding cyclin D1, functional p16^{INK4a} contributes to the maintenance of the pRb in its unphosphorylated or hypophosphorylated state, which in turn inhibits cell cycle progression. The expression of p16^{INK4a} is up-regulated by Ets and down-regulated by Bmi-1. Inactivation of p16^{INK4a} by deletion, mutation, methylation and aberrant splicing can lead to unlimited cell cycle progression and tumorization. Reasonably, p16^{INK4a} is now selected to treat some kind of tumors, but research in this field remains a long way to go.

Key words p16^{INK4a}, function, regulation, tumor

* This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (39830360) and Shanghai Unilever Research and Development Fund (9808).

** Corresponding author. Tel: 86-21-25070027, E-mail: jifu@guomai.sh.cn

Received: July 24, 2001 Accepted: September 12, 2001