

乳腺癌相关基因 p16、PTEN、ATM 的研究进展

殷发祥 综述,许培权 审校

[关键词] 乳腺肿瘤;p16 基因;PTEN 基因;ATM 基因;综述

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.02.048

乳腺癌已经超过肺癌成为全世界女性最常见的恶性肿瘤,据统计,2008 年乳腺癌新发病例达 138 万,在欧美国家乳腺癌的发病率占女性恶性肿瘤发病的首位。目前我国虽属乳腺癌低发国家,但随着社会经济水平发展及人们生活方式西方化改变,其发病率增长迅猛,同时我国人口基数大,而且发病高峰年龄较欧美国家偏低,这些因素促使我国乳腺癌发病例数快速增加,严重威胁着广大女性的健康和生命。现有研究提示绝大部分肿瘤在分子水平上都会有基因异常变化,包括某些癌基因的激活、抑癌基因的失活及相关凋亡蛋白的异常,导致细胞的增殖分化异常,最终累积而导致肿瘤的发生。和其他类型肿瘤一样,乳腺癌基因相关性研究很多,但机制尚未完全阐述明确,应用到临床的也为数不多。但随着分子生物学的发展及国内外实验室技术水平的提高,通过对乳腺癌患者及易感人群的基因分析、治疗及预后相关基因的多态性研究,已经有了不少发现和成果。现对 p16、PTEN、ATM 3 种抑癌基因的结构、作用机制及其与乳腺癌的相关性作一综述,以期对乳腺癌的基因研究提供一定帮助。

1 p16 基因

1.1 p16 基因的结构和生物学功能 p16 基因在 1992 年由 TRAVIS 等^[1]在研究黑素瘤基因时发现,可在乳腺、肺、骨、脑、膀胱等多种恶性肿瘤中出现异常表达。定位于染色体 9p21,包含 2 个内含子和 3 个外显子,长度 8.5 kb,其包含 1 个由 148 个氨基酸残基构成的读码框架,编码 p16 蛋白。p16 蛋白的 N 末端有 1 个由 4 个重复的锚蛋白构成的空间结构,为其重要的结构域,主要通过抑制细胞周期蛋白依赖激酶 4(CDK4)而发挥抑制肿瘤无限增殖作用^[2]。细胞周期循环有序进行依赖细胞周期调控体系,其包括细胞分裂周期基因和细胞周期相关调节蛋白,CDK4 是一种重要的细胞周期蛋白依赖激酶(CDKs),属于细胞周期调节蛋白范畴,对细胞循环周期起正向调节作用,是细胞周期监测点的重要作用元素。目前广泛认为细胞周期能够准确进行,在于存在的多个监测点的调节,主要包括 G₁/S 监测点、S 期监测点和 G₂/M 监测点,G₁/S 监测点决定细胞能否通过 G₁ 期进入 S 期并进行 DNA 复制,S 期监测点启动 DNA 的复制及保证过程顺利完成,而 G₂/M 监测点控制细胞能否通过 G₂ 期进入

M 期并完成细胞的有丝分裂。其中 G₁/S 的调节最为重要,称为细胞周期的限制点(R 点)。cyclinD-CDK4/6 和 cyclinE-CDK2 驱动细胞周期通过 R 点,对 G₁/S 时相转换具有决定作用。活化的 CDK4 作用于 Rb 蛋白,使之发生磷酸化作用,从而释放转录因子 E2F 启动 DNA 复制,驱动细胞顺利进入 S 期。细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白(CIKs)对细胞循环周期起负向调节作用,有 Cip/Kip 和 INK4 两个重要家族,p16 即后者的主要成员。p16 蛋白通过与 cyclinD 竞争结合 CDK4/6,引起 Rb 蛋白脱磷酸化而失活,阻断细胞周期通过 R 点而停留在 G₁ 期,起到重要的细胞周期调控因子作用,达到对肿瘤生长增殖的抑制作用。

1.2 p16 基因与乳腺癌 在正常乳腺组织演变成癌的过程中,多种抑癌基因的失活发挥了作用。从肿瘤病理分型、恶性程度分级、疗效和预后相关性等多角度分析中得出 p16 也起到很重要的作用。研究^[3]表明,在乳腺癌细胞系中 p16 存在较高的缺失率,主要的失活方式有缺失、点突变、异常表达、启动子区 CpG 岛甲基化。在肿瘤细胞中,抑癌基因多表现出高频的缺失和突变的特征。以前认为 p16 基因异常改变以基因缺失为主导,而点突变并非基因变化的主要方式,华晶等^[3]综合分析表明,p16 突变方式和肿瘤类型相关,且差异很大,在乳腺癌中出现纯合缺失较高,点突变不是主要形式,而在食管上皮鳞癌中则出现点突变概率更高。异常表达可表现为过表达和表达下调,有研究^[4]提出在 p16 的过表达率在恶性程度高的肿瘤中作用更突出,乳腺癌中可较多的出现过表达。亦有报道^[5]称在乳腺癌中会出现 p16 下调。p16 基因在正常人体组织细胞中往往低度表达,一般无法检测出 p16 蛋白,p16 的高表达可能与乳腺癌发生、发展具有一定的相关性,但能否成为乳腺癌的独立预后因子或特异性较高的标志物还有待进一步的大宗临床分析和前瞻性研究来证实。近年国内外研究指出 p16 启动子区 CpG 岛甲基化较点突变及纯合缺失的发生率更高,可能对 p16 甲基化诱发及逆转机制更具价值。据国外 HERMAN 等^[6]报道,在乳腺癌中 p16 基因的甲基化率达 31%,国内胡锐^[7]等研究表明 p16 基因甲基化率为 31.6%,两者基本相符,同时提出乳腺癌组织甲基化率明显高于正常组织,且与淋巴结转移有相关性,差异有统计学意义,但和乳腺癌的分化程度无明显相关。这些研究表明,p16 基因较高的甲基化率对乳腺癌有重要指向意义,通过检测 p16 基因的甲基化率可能对乳腺癌的早期诊断具有较高的临床价值。另外,p16 基因抑制肿瘤的生长,除了通过介导对细胞增殖周期的阻滞功能外,还可能在诱导肿

[收稿日期] 2015-08-15

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 肿瘤外科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 殷发祥(1984-),男,硕士研究生。

瘤细胞凋亡方面起到了一定作用。LU 等^[8]通过乳腺癌模型首次提出 p16 基因的抗血管生成、诱导细胞凋亡等效应。这可能为今后的乳腺癌治疗提供新的思路。

2 PTEN 基因

2.1 PTEN 基因的结构和生物学功能 1997 年,LI 等^[9]发现并成功克隆出具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶双重活性的抑癌基因,命名为 PTEN 基因,是目前发现的唯一具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因,也是继 p53、Rb 之后的又一重大发现。其染色体定位于 10q23.3,长度 200 kb,包含 9 个外显子和 8 个内含子,基因表达具有重要抑癌功能的 PTEN 蛋白。大量报道^[10-11]称在乳腺癌、恶性神经胶质瘤、前列腺癌、肾癌、子宫内膜癌、黑色素瘤、甲状腺癌等多种恶性肿瘤中存在 PTEN 基因的缺失或突变。PTEN 基因一般通过以下 3 个作用机制发生抑癌功能:(1)通过对细胞膜上 PI3K/Akt 传导通路的阻滞,抑制肿瘤细胞周期的进展,诱导肿瘤细胞凋亡。在 PI3K/Akt 传导通路中,质膜上的 PIP2 通过磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase,PI3K)的磷酸化作用,获得一个磷酸基团后生成 PIP3,PIP3 作为细胞内的信号转导中的一种第二信使,通过对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B(Akt)的磷酸化作用而使之激活,从而完成 PI3K/Akt 传导通路。PTEN 基因通过对 PI3K/Akt 信号通路的负性调控作用,实现抑制肿瘤细胞生长、增殖和转移的作用。当 PTEN 基因因突变或缺失而失活时,对 PI3K/Akt 传导通路阻滞作用丧失,从而导致细胞过度分裂增殖、凋亡阻滞和肿瘤血管生成^[12]。(2)通过降低灶性黏连酶(focal adhesion kinase,FAK)磷酸化水平,进而抑制细胞与细胞外基质的黏附,达到抑制肿瘤黏附和迁移。FAK 位于细胞膜上,在整合素介导的细胞信号转导通路中起到重要作用,细胞外基质与整合素作用而使之活化,引起 FAK 酪氨酸磷酸化水平升高,使 FAK 的磷酸激酶活性增强,最终影响肌动蛋白骨架重构和黏着斑复合体的形成,介导细胞与细胞外基质的黏附,促进肿瘤细胞的生长及转移。PTEN 基因的蛋白磷酸酶活性可使 FAK 去磷酸化,降低 FAK 的磷酸化水平,减少肿瘤细胞和胞外基质的黏附,进而抑制肿瘤的局部浸润及远处转移^[13]。(3)阻滞 MAPK/ERK 介导的细胞信号转导途径,抑制肿瘤的生长及转移。PTEN 蛋白主要通过拮抗整合素和生长因子的作用,抑制细胞外信号转导激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)的活性,进而负性调节 MAPK/ERK 转导途径。阻滞细胞的有丝分裂信号向细胞核内的转导,抑制细胞的生长及迁移。

2.2 PTEN 基因与乳腺癌 PTEN 基因是一种重要的抑癌基因,在乳腺癌也具有非常重要的作用。STAMBOLIC 等^[14]研究发现有 49% 的雌性小鼠在 PTEN 基因被条件性敲除(PTEN + / -)6 月后发生了乳腺癌。李祥勇等^[15]通过研究外源性 PTEN 稳定转染对内源性 PTEN 缺失的人乳腺癌细胞增殖的影响,证实 PTEN 可明显抑制乳腺癌细胞的增殖。由此我们可以考虑是否可以在乳腺癌的细胞系中通过人工导

入 PTEN 基因抑制肿瘤细胞的增殖,开辟治疗乳腺癌的新思路。有研究^[16]运用高分辨荧光微卫星分析方法,发现乳腺癌患者中,Akt 的活化与 PTEN 基因的缺失和 Her-2 的过表达呈正相关,与孕激素受体(PR)呈负相关;当 PTEN 基因的缺失和 Her-2 过表达同时,Akt 活化作用增强,可能导致 PR 阴性表达。孙丽梅等^[17]研究表明,在乳腺癌中 PTEN 基因的总阳性率 69.23%,在浸润性乳腺癌中表达程度明显低于乳腺原位癌和良性增生病变,PTEN 的阳性表达率随着肿瘤进展而在逐渐下降。LI 等^[9]研究提出在 PTEN 蛋白下调的乳腺癌,肿瘤的侵袭性较强,较易出现浸润和转移,PTEN 基因的检测可作为一个潜在的预后评价指标。在肿瘤耐药性方面,有研究^[18]显示 PTEN 基因的表达可明显提高乳腺癌对化疗药物阿霉素的敏感性,这在乳腺癌的治疗中也有很重要的临床价值。

3 ATM 基因

3.1 ATM 基因的结构及生物学功能 ATM 最初是在研究共济失调毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia,AT)患者的遗传信息时发现的,是 AT 的致病基因,ATM 基因同样也是一种重要的抑癌基因。其染色体定位于 11q22.3,包含 66 个外显子,长度 150 kb,编码含有 3 056 个氨基酸残基的核磷蛋白,是 PI3K 家族成员。ATM 基因的主要作用及机制如下:参与细胞损伤的识别和修复,启动细胞周期关卡,并介导相关的损伤修复。细胞周期关卡保证了细胞分裂周期中每一个增殖阶段充分、准确的完成,避免了细胞增殖周期的紊乱,当细胞损伤时,周期关卡就会阻滞细胞周期进程,使受损细胞获得修复。ATM 蛋白是重要的关卡蛋白,是调控 DNA 损伤反应信号转导网络的核心分子,参与 DNA 损伤后多个复杂的细胞周期关卡(G_1/S , $S/S/G_2$),特别是在 DNA 合成期,相关损伤引起 DNA 双链断裂(DSBs)是 DNA 损伤中较为严重的一种类型。ATM 可以感受 DNA 损伤位点,并使其下游多种蛋白磷酸化,例如 Chk2、p53、Mdm2 等,从而阻滞相应的细胞周期时向而停留在相应的检测点,使受损的 DNA 获得修复^[19]。肿瘤细胞往往存在细胞周期相应关卡的缺陷,从而使机体对有害损伤的敏感性增高。在细胞增殖周期 S 期中,DSBs 可以由 ATM 介导的同源重组途径进行修复。另外,ATM 使 p53 蛋白磷酸化而激活,可以诱导受损细胞进入 G_1 期修复,一旦修复失败则可启动凋亡程序使受损细胞发生凋亡,使其免于恶性转变^[20]。

3.2 ATM 基因与乳腺癌 在 SWIFT 等^[21]第一次指出 ATM 杂合子患者更易发生乳腺癌后,对 ATM 基因的研究就成为国内外基因研究的热点,大部分研究也得出 ATM 基因可能成为乳腺癌的易感基因。虽然在纯合子患者中很多研究都无法找到 ATM 基因和肿瘤的联系,但在 ATM 杂合子中这种联系被越来越多的研究证实,特别是 ATM 杂合子和乳腺癌发生之间的联系。这种联系首先在遗传流行病学中发现,AT 患者乳腺癌的发病率明显高于普通人群;在体外研究中发现,ATM 杂合子患者具有更高的放射敏感性;另外在高风险

乳腺癌家族中,患者的 ATM 突变概率明显增高。NATHANSON 等^[22]研究提出西方女性一生中有 10% ~ 12% 的乳腺癌发病风险,发病因素中最主要的是乳腺癌家族史,5% ~ 10% 的乳腺癌患者存在高外显率的种系基因突变,这其中最重要的是乳腺癌易感基因 BRCA1 和 BRCA2,另外 ATM 和 CHK2 也是候选的重要危险因素。RENWICK 等^[23]研究 ATM 基因在家族性乳腺癌中的作用,在排除了已知易感基因 BRCA1、BRCA2 和 CHEK2 的影响下,ATM 基因突变检出率在病例组中为 12/443,而在对照组中为 2/521,提示了 ATM 基因突变可能增加了乳腺癌的发生率。除了对 ATM 基因多态性和基因突变研究,近期 RONDEAU 等^[24]研究提出:在单变量研究中,ATM 基因 mRNA 水平与较低的无转移生存(MFS)存在相关性,ATM 蛋白低水平表达患者具有较短的无转移生存,miR-203 是乳腺癌中 ATM 基因下调的显性指标,ATM 基因 mRNA 和 ATM 蛋白水平是散发性乳腺癌的独立预后因素,对治疗能起到很好的指导作用。所以对 ATM 基因的研究无论在乳腺癌的诊断、治疗和评价预后方面都具有较高的价值,能否像 BRCA1、BRCA2 一样成为乳腺癌易感人群筛选的候选基因也值得期待。

综上所述,p16、PTEN、ATM 基因是继 BRCA1、BRCA2、HER-2、p53 之后与乳腺癌相关性较高的基因,有比较好的应用前景。通过更多的多中心病例对照研究及前瞻性研究,有望使乳腺癌发病机制在分子水平上阐述得更加明确,希望能筛选出一些敏感性和特异性较高的基因应用于临床,为乳腺癌的预防干预、早期诊断、治疗和评价预后提供重要的依据和思路。乳腺癌基因的研究意义重大,可能会给全世界乳腺癌患者带来福音,给全世界从事乳腺癌医疗事业的工作者带来重要利器。

[参 考 文 献]

- [1] TRAVIS J. Closing in on melanoma susceptibility gene(s) [J]. *Science*,1992,258(5085):1080.
- [2] SERRANO M, HANNON GJ, BEACH D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 [J]. *Nature*,1993,366(6456):704.
- [3] 华晶,王雅杰. p16 基因与乳腺癌关系的研究进展[J]. *医学研究杂志*,2013,42(10):7.
- [4] SEOUNG WC, SOHN JH, KIM DH. Overexpressions of cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications[J]. *Yonsei Med J*,2011,52(3):445.
- [5] VALLIAN S, SEDAGHAT M, NASSIRI I, *et al.* Methylation status of p16 INK4A tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2009,135(8):991.
- [6] HERMAN JG, 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[J]. *Cancer Res*,1995,55(20):4525.
- [7] 胡锐,田超,蒋文军,等. p16 基因甲基化在乳腺癌发展中的作用[J]. *中国普外基础和临床杂志*,2011,18(5):553.

- [8] LU Y, ZHANG X, ZHANG J. Inhibition of breast tumor cell growth by ectopic expression of p16 /INK4A via combined effects of cell cycle arrest, senescence and apoptotic induction, and angiogenesis inhibition[J]. *J Cancer*,2012,3:333.
- [9] LI J, YEN C, LIAW D, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine-phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*,1997,275(5308):1943.
- [10] TATE G, SUZUKI T, MITSUYA T. Mutation of the PTEN gene in a human hepatic angiosarcoma [J]. *Cancer Genet Cytogenet*,2007,178(2):160.
- [11] PETROCELLI T, SLINGERLAND JM. PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis[J]. *Breast Cancer Res*,2001,3(6):356.
- [12] HAMADA K, SASAKI T, KONI PA, *et al.* The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis[J]. *Genes Dev*,2005,19(17):2054.
- [13] TAMUTA M, GU J, TRAN H, *et al.* PTEN gene and integrin signaling in cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*,1999,91(21):1820.
- [14] STAMBOLIC V, TSAO MS, MACPHERSON D, *et al.* High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in PTEN +/- mice[J]. *Cancer Res*,2000,60(13):3605.
- [15] 李祥勇,周克元,林观平. 抑癌基因 PTEN 对乳腺癌细胞生长增殖的影响[J]. *海南医学*,2010,21(3):8.
- [16] TOKUNAGA E, OKI E, KIMURA Y, *et al.* Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2007,101(3):249.
- [17] 孙丽梅,王鲁建,宋敏,等. 乳腺癌组织突变型 p53 和抑癌基因 PTEN 表达及其临床意义的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*,2008,15(6):430.
- [18] 李祥勇,曾今诚,林观平,等. 野生型 PTEN 基因在乳腺癌细胞中对表阿霉素的增敏作用[J]. *肿瘤防治研究*,2011,38(11):1232.
- [19] EASTMAN A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies [J]. *J Cell Biochem*,2004,91(2):223.
- [20] JIANG H, REINHARDT HC, BARTKOVA J, *et al.* The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response[J]. *Genes Dev*,2009,23(16):1895.
- [21] SWIFT M, REITNAUER PJ, MORRELL D, *et al.* Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia[J]. *N Engl J Med*,1987,316:1289.
- [22] NATHANSON KL, WOOSTER R, WEBER BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need [J]. *Nat Med*,2001,7(5):552.
- [23] RENWICK A, THOMPSON D, SEAL S, *et al.* ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles [J]. *Nat Genet*,2006,38(8):873.
- [24] RONDEAU S, VACHER S, DE KONING L, *et al.* ATM has a major role in the double-strand break repair pathway dysregulation in sporadic breast carcinomas and is an independent prognostic marker at both mRNA and protein levels [J]. *Brit J Cancer*,2015,112(6):1059.