

细胞增殖周期失控与胃癌

梁卫江综述 张万岱审校

肿瘤的恶性增生从生物学角度看，主要表现在两个方面：一是肿瘤细胞的“不灭性”，即细胞凋亡障碍；二是细胞增殖失控，程序发生紊乱，致使增殖速度超常加快。这两方面均已成为肿瘤发生发展研究的热点。对肿瘤细胞增殖调控系统 cyclins（细胞周期素）-CDKs（细胞周期素依赖性激酶）-CKIs（细胞周期素依赖性激酶抑制物）的研究也取得了突破性进展，在胃癌方面的研究正不断深入。

1 细胞增殖周期及其调控

细胞增殖周期由严格有序的四个时期组成，即 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ 。它们受细胞信号传导和胞内多种基因活化或关闭的精细调节。在完成有丝分裂后，细胞可退出周期，进入被称为 G_0 的静止期。 G_0 期细胞若经历终末分化，就停止于该期；若被预定增殖，那它又进入 G_1 期，细胞体积增大，作好 DNA 合成的准备。在 G_1 期，细胞对环境因素敏感。如果条件不适宜，细胞就停滞于 G_1 期。 $G_1 \rightarrow S$ 转换中有一个限制点 (restriction point, R 点)，细胞越过 R 点就可完成有丝分裂而不顾环境条件如何。 S 期预示着 DNA 的合成。在 G_2 期，细胞检查 DNA 复制是否完成或有否发生错误。 $G_2 \rightarrow M$ 转换中也有一个检查点 (checkpoint)，检查 DNA 复制的准确性。 M 期，双倍的 DNA 物质被平均分配到有等量胞浆的两个子细胞中。如果纺锤体装置与染色体着丝点的连接不合适，有丝分裂检查点将使细胞停滞于 G_2 期^[1]。

细胞周期的进程由 cyclins-CDKs-CKIs 系统所调节。CDKs 是这个调控网络的中心环节。Cyclins 是正调节因子，与 CDKs 结合成 cyclins-CDKs 复合物而激活 CDKs。后者使其底物磷酸化，这为细胞周期的进展所必须。CKIs 则通过与 CDKs 结合而抑制其活性，对细胞周期起负调作用。由于 G_1 期细胞能接受生长因子及外界的刺激，故目前对该期的研究较多。在 G_1 期，cyclins 激活 CDKs 使 Rb 磷酸化，

Rb 从与转录因子 E2F 的结合中脱离出来，解除对 E2F 的抑制。E2F 的家族成员有五种 (E2F1-5)，能与多种 DNA 合成基因和细胞生长促进基因的启动子结合，直接活化这些基因，启动 DNA 合成，使细胞进入 S 期^[2]。

2 细胞周期的相关分子

2.1 CDKs：是一类蛋白激酶分子。已发现 7 种 CDKs，命名为 CDK1-7，基因序列同源性在 40% 以上，分子量为 35-40KD。它们的活性由以下几种方式调节：① cyclins 结合激活；② 磷酸化激活或抑制；③ CKIs 结合抑制。CDKs 须与 cyclins 结合，且分子中 Thr 残基磷酸化和 Tyr 残基去磷酸化，才具有活性^[3]。

2.2 Cyclins 是一组具有细胞周期特异性的蛋白质。目前发现有 cyclinA、B (B1-2)、C、D (D1-3)、E、F、G 及 H 等。当受到生长因子等刺激时，细胞即由静止的 G_0 期进入 G_1 期^[4]。此时 cyclinD 及 E 表达增加，称为 G_1 期 cyclins。cyclin D1-3 有组织特异性。在不同的细胞中，可互相替代，只要一种亚型达到一定水平，即可激活相当量的 CDKs。使细胞通过 G_1 期 R 点为 cyclinD-CDKs 的作用为主，同时 cyclinE-CDK2 积聚，使 DNA 复制子磷酸化而被激活，细胞由 $G_1 \rightarrow S$ ^[5~6]。随后 cyclinD 及 E 降解，cyclinA 增高，谓 S 期 cyclin。CyclinB 是 G_2 期 cyclin，并持续到 M 期初始达最高水平^[4]。其他 cyclins 的功能还不太清楚。各型 cyclin 与不同的 CDKs 有特殊亲和力 (表 1)^[7]，它们通过激活 CDKs 而促使细胞周期向前进展，起正调节作用。因而，cyclins 被认为是候选的原癌基因 (cyclin D1 已被认为是最强的原癌基因)^[1]。

表 1 人 cyclins-CDKs-CKIs 相互作用的搭档分子

CDKs	cyclins	CKIs
CDK1	A, B, E	p21, p57
CDK2	A, E, D	p21, p27, p57
CDK3	—	—
CDK4	D	p15, p16, p21, p27, p18, p19, p52
CDK5	D	—
CDK6	D	p15, p16, p21, p27, p18, 19
CDK7	H	—

2.3 CKIs 细胞增殖由刺激和抑制细胞生长的两组作用相反的基因表达平衡来调控。除正调因子(cyclins 和 CDKs)外,也有负调因子CKIs家族。它们是一组能与 CDKs 特异结合(表 1)而抑制其活性的蛋白质,在细胞周期中起制动器作用。它们是确定的或候选的抑癌基因。根据结构同源性、CDK 靶分子及其抑制机制,可分为^[8]:①p21^{Cip1} 家族,包括 p27^{Kip1} 和 p57^{Kip2},它们优先结合于 cyclins-CDKs 复合物;②p16^{INK4A} 家族,包括 p15^{INK4K}、p18^{INK4C} 和 p19^{INK4D},它们优先结合于 CDKs 单体,主要抑制 G₁ 期 CDK4/6 活性。研究较清楚的是 p53 诱导 p21^{Cip1} 介导的细胞周期抑制^[9]、p27^{Kip1} 介导的细胞间接触抑制及 TGF β 诱导的细胞周期抑制^[10]。另外,CKIs 也可能与细胞终末分化、DNA 复制、凋亡诱导和细胞衰老等过程有关^[11]。CKIs 表达缺失,可使细胞出现严重后果。例如, p16^{INK4A} 缺失,与人类多种肿瘤的发生有关。

3 细胞周期与肿瘤

人们越来越清楚地认识到,肿瘤细胞共同的特征之一是取消了细胞周期检查点,不再对抑制其生长的信号作出反应^[11]。如果细胞周期正调因子(cyclins-CDKs)过表达,就可使细胞增殖不依赖于促生长因素的作用;或负调因子(CKIs)表达下降乃至不表达,减弱或失去制动器作用,就会使增殖周期不断进行下去并可导致肿瘤发生。例如,在对药物或射线引起的 DNA 损伤的反应中,内部信号引起 p53 表达增加,其诱导 p21^{Cip1} 介导的 G₁ 期停滞,以修复损伤的 DNA 或通过凋亡来清除受损细胞^[9]。如果 p21^{Cip1} 表达下降或不表达,损伤的 DNA 未能修复而细胞却继续增殖,细胞将隐含恶变的潜能。p21^{Cip1} 除有抑制 cyclins-CDKs 复合物的作用外,也能抑制增殖细胞核抗原(PCNA)的活性。PCNA 作为 DNA 多聚酶 δ 的重要成分,若失去 p21^{Cip1} 的调控,将可能导致突变 DNA 的复制,发生基因改变,从而出现细胞的恶性表型。

正常情况下,细胞可因接触抑制或 TGF β 处理而停滞于 G₁ 期。该过程由 p27^{Kip1} 或 p¹⁵INK4B 介导,它们分别抑制 cyclin E-CDK2 或 cyclin D-CDK4/6 复合物的活性。这条途径的阻断,将导致细胞出现另一个恶性表型,即失去生长的接触性抑制^[12]。

4 细胞周期与胃癌

细胞周期失控与胃癌发生发展关系的研究在不断深入。有关生长因子的促癌作用、细胞周期相关因子表达异常等方面的研究,已取得很大进展。

4.1 生长因子及其受体的促癌作用

生长因子是一类微量生物活性物质,属多肽或蛋白质。它们既可促进细胞的正常生长,在异常表达与功能失调时,又存在诱发癌变的潜能。现发现的生长因子有 50 多种,大多数基因定位和结构已清楚,生物学功能是作用于细胞的 G₁ 期,促进或抑制细胞增殖。它们与胞膜上特异性受体结合,激活受体胞内区的蛋白酪氨酸激酶,将信号传入胞内,经级联式放大,调控细胞的生命活动。如果生长因子或其受体的结构、蛋白表达及功能发生异常,就会出现细胞增殖失控,导致或促使肿瘤的发生^[13]。

已有许多研究报告,EGF/TGF α 及它们的受体 EGFR 在调控胃肠道上皮细胞增殖与分化中起重要作用,它们表达异常与胃癌的发生密切相关。Filip M 等^[14]从胃癌前病变到癌的研究中发现:①TGF α 在胃癌患者肠化和正常胃粘膜高于非癌对照组;②EGFR 在胃癌的肠化组织高于非癌对照组;③EGF 在正常胃粘膜阴性,而在肠化中弱阳性;④TGF α /EGFR 或 EGF/EGFR 联合表达在胃癌的肠化组织高于非癌对照组。从而得出结论:TGF α 表达增加是胃癌非常早期的事件,并伴随 EGFR 上调;TGF α /EGFR 与胃癌的病理形态改变相关。另外的研究显示,在 TGF α /EGF 高表达的胃癌及肠化组织,cyclinD1 及 PCNA 表达增加并与 TGF α /EGF 水平存在相关性。

大多数的肿瘤细胞由于 Rb 基因突变及表达低亲和力受体而逃逸 TGF β 的细胞增殖负调控作用。Akagi M 等^[15]发现,多数胃癌细胞株对 TGF β 不起反应,而 TNK-1 细胞(含 p53 突变基因)起反应,表现为不依赖于 p53 的 p21 表达增加,随后 CDK2 活性受到抑制及 Rb 肿瘤抑制基因产物磷酸化减少;进一步 cyclinA 蛋白表达减少。

4.2 细胞周期相关因子与胃癌

已有大量研究显示,细胞周期正调及负调因子表达紊乱,与人类胃癌的发生、发展密切相关。Akama Y 等^[16]报道 45 例胃癌组织中,有 15.6% (7/45) cyclinE 基因扩增了 3~10%,且 mRNA 和蛋白过表达,其中 6 例为进展期胃癌。有 cyclinE 基因扩增的胃癌均发生淋巴结转移。在 8 个胃癌细胞系中,发现一系 MKN-7 有 cyclinE 基因扩增,而 8 个系其 mRNA 和蛋白均高表达。在全部胃癌组织和细胞系中,未发现 cyclinA 基因扩增。Nakamura M 等^[17]用 RT-PCR 方法,对胃镜活检标本进行检测,

发现有淋巴结转移者 cyclinD1 和 cyclinE 的 mRNA 转录增加。

Akama Y 等^[18] 又研究了 8 个胃癌细胞系 CDK2 和 CKIs 的基因状况和表达情况发现, 除含 p53 突变基因的 MKN-28 外, 均不正常地表达非常低或检测不到的低水平 p21 mRNA。而含野生型 p53 基因的 MKN-45 和 MKN-74 表达高水平 p21 mRNA。同时发现, p21 mRNA 与 CDK2 和 G1 期 cyclins 的 mRNA 水平成反比。MKN-28 例外, 其含突变型 p53 基因, 且表达 p21、CDK2 和 G1 期 cyclins 均在高水平。在 MKN-45 和 HSC-39 两系, p15 和 p16 基因纯合性缺失。在另三个系 MKN-28、MKN-74 和 KATO-III 没有测到 p16 蛋白表达。在 TMK-1 系, 发现 p15 基因重排。在 MKN-45 系, p27 基因重排。p53 基因状态与 p27 和 p16 表达之间无明显相关性。提示: cyclins-CDK2-CKIs 的异常调节与胃癌细胞的无节制生长有关。

许多研究提示, p21 肿瘤抑制基因是 CDKs 有效的抑制分子, 并被认为在肿瘤抑制中起关键作用。Ogawa M 等^[19] 用免疫组化方法研究 173 例原发性胃癌的 p21 蛋白表达。发现 p21 表达与临床病理特征之间存在相关性。有 104 例 (60.4%) 为 p21 阴性。随着病理进展, p21 表达阴性的百分率增加; 有淋巴结、肝、腹膜转移者常 p21 表达阴性; 在 p21 阴性的胃癌病人中, 手术切除后复发的危险性明显增高, 且预后明显地较 p21 阳性病人差。提示: p21 表达下降与胃癌的进展相关, 可推测胃癌预后。

5 结语

近年来, 我们对细胞周期 cyclins-CDKs-CKIs 网络调控系统的研究有了突破性进展, 它们的功能及作用机制正逐渐得到阐明。细胞因子或生长因子的作用, 原癌基因激活或抑癌基因丢失, 最终均通过这个调控系统来影响细胞的增殖分化或恶性表型。研究者们在胃癌方面的研究已做了大量工作。由于胃癌发生与其他肿瘤一样, 是个多因素、多步骤的长期演变过程, 其发生、发展机制远未被阐明。在细胞信号传导、效应基因表达顺序及主次、cyclins-CDKs-CKIs 调控网络的研究, 还须做更深入的、不懈的努力。胃癌死亡率仍占肿瘤死亡率的第二位, 对胃癌的深入研究无疑意义重大, 并将为人类攻克肿瘤作出应有的贡献。

参考文献:

- [1] Dirks PB and Rutka MD. Current Concepts in Neuro-Oncology: The cell cycle-review. *Neurosurgery*, 1997, 40 (5): 1000~1015
- [2] Beijersbergen RL and Bernards R. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1287: 103~120
- [3] Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995, 374: 131~134
- [4] Murray A, Hunt A. The cell cycle. New York, W. H. Freeman and Company, 1993
- [5] Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*, 1993, 259: 1908~1912
- [6] Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E: a nuclear protein essential for the G1-S phase transition. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 2612~2624
- [7] 张晓晖, 黄高升, 王文亮. 细胞周期的网络调控系统 cyclins-CDKs-CDKIs 及其与肿瘤的关系. 国外医学肿瘤学分册, 1997, 24 (2): 77~80
- [8] Elledge SJ, Harper JW. CDK inhibitors: On the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol*, 1994, 6: 847~852
- [9] El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 1994, 54: 1169~1174
- [10] Hengst L, Dulic V, Slingerland J, Lees E, Reed SI. A cell cycle regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5219~5295
- [11] Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 1995, 9: 1149~1163
- [12] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer: II-Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 1994, 79: 573~582
- [13] 刘勇, 路名芝, 潘伯荣. 消化系肿瘤细胞增殖调控. 新消化病学杂志, 1997, 5 (8): 532~533
- [14] Filipe MI, Osborn, Linehan J, Sanidas E, Brito MJ and Jankowski J. Expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor in precursor lesions to gastric carcinoma. *Bri J Cancer*, 1995, 71: 30~36
- [15] Akagi M, Yasui W, Akama Y, Yokoraki H, Tahara H, Haruma K, et al. Inhibition of cell growth by transforming growth factor β 1 is associated with p53-independent induction of p21 in gastric carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res*, 1996, 87: 377~384
- [16] Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, et al. Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 1995, 87: 617~621
- [17] Nakamura M, Katano M, Fujimoto K and Morisaki T. A new prognostic strategy for gastric carcinoma. *Ann Surg*, 1997, 226 (1): 35~42
- [18] Akama Y, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Akagi M, Tahara H, et al. Genetic status and expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res*, 1996, 87: 824~830
- [19] Ogawa M, Maeda K, Onoda N, Chung YS and Sowa M. Loss of p21^{WAF1/CIP1} expression correlates with disease progression in gastric carcinoma. *Bri J Cancer*, 1997, 75 (11): 1617~1620