

文章编号: 1001-098X(2003)05-0228-04

p16 负向调控通路 with 辐射诱导的 G₁ 期阻滞

王晓梅^①, 鞠桂芝^②

摘要: 辐射诱导细胞发生 G₁ 期阻滞, 其分子调控机制尚不十分清楚。近期文献报道, 独立于 p53 基因之外的 p16-Cyclins-CDKs (细胞周期素依赖性激酶) 细胞周期负向调控通路在紫外线和电离辐射照射后发生改变, 提示此通路可能在辐射诱导的 G₁ 期阻滞中发挥至关重要的作用。

关键词: p16; 辐射; G₁ 期阻滞

中图分类号: R818.03 **文献标识码:** A

p16 negative control pathway and G₁ arrest induced by radiation

WANG Xiao-mei^①, JU Gui-zhi^②

(^①Department of Biology, Shantou University Medical College, Guangdong Shantou 515031; ^②Department of Radiobiology, Jilin University, Jilin Changchun 130021, China)

Abstract: The molecular mechanism of G₁ arrest induced by radiation was not very clearly. However, the changes of p16-Cyclins-CDKs were observed after UV or ionizing radiation. This negative regulated pathway is not depended on p53. The present report suggests that p16 pathway may play an important role in G₁ arrest induced by radiation.

Key words: p16; radiation; G₁ arrest

近年来, 可以与 p53 基因相匹敌的 p16 基因家族的发现, 为细胞周期调控研究点亮又一盏明灯, 并成为细胞生物学、分子生物学、肿瘤治疗学等多个生命科学领域的研究热点之一。随着新基因的不断发现和分子生物技术手段的提高, 人们对 p16 基因介导的细胞周期负向调控机制有了初步了解。目前, 人们发现 p16 基因(Ink4a/ARF 基因)主要通过两条途径发挥调控作用: 一条是 p16^{Ink4a} 基因表达产物 P16 蛋白, 经由 p16-Cyclin D-CDK4(细胞周期素依赖性激酶 4)/CDK6-Rb (视网膜母细胞瘤基因)蛋白通路抑制细胞增殖进程, 此通路不依

赖 p53, 是一条独立的负向调节途径; 另一条是 p16^{Ink4a} 基因的转换阅读框架 (alternative reading frame, ARF) 转录表达产物—P19^{ARF} 蛋白, 通过 P19^{ARF}-mdm2(小鼠双微-2)-p53-p21 通路使细胞阻滞在 G₁ 期和 G₂ 期^[1]。本文重点阐述非 p53 依赖的 p16 负向调控通路 p16-CyclinD-CDK4/CDK6-Rb 蛋白及其在辐射诱导 G₁ 期阻滞中的作用。

1 p16 基因及结构

1992 年, Cannon-Albright LA 等在研究黑色素瘤易感基因时发现 9 号染色体长臂 2 区 1 带有一个频发缺失与突变的抑癌基因位点。1993 年, Serrano M 等人利用酵母双杂交蛋白相关性筛选法研究 CDK4 相关蛋白时, 首次发现了 p16 基因并克隆了 p16 基因的 cDNA。p16 基因全长 8.5kb, 由 2 个内含子分隔成 3 个外显子, 其中 5'端的 126 个 bp 编码第 1 个外显子 E1, 中间部分 307 个 bp 编码第二外显子 E2, 3'端 11 个 bp 编码第三外显子

收稿日期: 2003-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770193)

作者简介: ①王晓梅 (1967-), 女, 汕头大学医学院生物教研室 (汕头, 515031) 副教授, 在读博士, 主要从事辐射分子生物学和细胞生物学研究。

②鞠桂芝 (1942-), 女, 吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室(长春, 130021)教授, 主要从事电离辐射生物效应研究。

E3。cDNA 全长 444bp, 编码一个由 148 个氨基酸组成的、分子质量为 15.845ku 的蛋白质。p16 基因外显子 E1 分为 E1 α 和 E1 β 二种不同形式, 分别由二个启动子控制, 转录为 p16^{inkb} 和 p19^{ARF} mRNA, 产生两种不同的蛋白产物 P16 和 P19。E1 α mRNA 编码 CDK4 和 CDK6 的抑制剂 P16 蛋白, 1 β 位于 1 α 上游 18~20 个碱基(13kb)处, E1 β 和 E2 共同翻译 P19 蛋白, E3 则不被翻译^[2]。而且, 由于 1 β 改变了 E2 的阅读框架, 使 P16 和 P19 二者的氨基酸序列完全不同, 它们的转录相对独立, 互不依赖, 通过不同的调控途径起作用。

2 P16 蛋白的生物学功能

P16 蛋白主要参与细胞周期调控与细胞凋亡, 同时具有部分调节细胞衰老的功能。人成纤维细胞进入衰老状态时, pRb 蛋白处于磷酸化形式, p16 的 mRNA 水平和蛋白水平明显增加, 使 P16 蛋白随细胞生长发育而累积^[3]。若 p16 基因丢失, 可导致细胞永生化。在后天发育中, P16 蛋白的作用与其在细胞衰老中的作用一致。在出生后的小鼠组织中, 用 RT-PCR(逆转录聚合酶链式反应)方法检测到 p19^{ARF} 基因和 p15^{inkd} 基因转录水平很低, 而 p16^{inkb} 基因转录水平未被检出; 但老龄鼠脾和肺组织中可检测到 p16^{inkb} 转录和蛋白表达, 而且随着鼠龄的增加而明显增多, 提示 P16 蛋白与衰老密切相关^[4]。研究发现, p16 基因剔除鼠可以正常发育到成年, 说明 p16 基因对鼠的存活与器官发育不是必需的。p16⁻鼠在早期即产生自发性肿瘤, 并且对致癌剂处理高度敏感, 直接证明 p16 基因具有抑制肿瘤生长作用。p16 基因表达的激发点和稳定 p16 基因的关键调节因子目前尚不太清楚, 有实验发现, 促细胞分裂剂可以不同程度调节 p16 基因表达。ras 基因的转导可以使早熟的成纤维细胞衰老和 P16 蛋白堆积^[5]。因此, P16 蛋白在细胞周期中起慢刹车作用。当细胞发育时, P16 蛋白随着细胞衰老而开始积累, 或诱导细胞进入终末分化状态; 在细胞生长过程中, 当受到高水平 DNA 损伤时, 可通过 p53 基因应答途径设法修复; 而对低水平 DNA 损伤, 随应激反应的积累, 细胞中 P16 蛋白水平也逐渐上升, 并使细胞停滞在 G₁ 期, 以便修复已发生的微小损伤; 若损伤积累到一定程度, P16 蛋白可使细胞进入凋亡途径^[6]。

3 p16 负向调控通路

p16 基因调控的 p16-CyclinD-CDK4/CDK6-Rb 蛋白通路: p16 基因被激活→表达 P16 蛋白→P16 蛋白特异抑制 G₁ 期 CDK4/CDK6 活性→Rb 蛋白处于非磷酸化状态(不能释放 E2F 等因子)→参与 DNA 合成靶基因不能表达→细胞无法通过 G₁ 到 S 期调控点, 停滞在 G₁ 期。

在正常细胞增殖过程中, 生长因子结合相应的受体, 通过信号传递促进系列周期素(cyclins)基因表达, CDK4/CDK6 与 CyclinD 结合, 激活 CDK4/CDK6, 使之具有蛋白激酶活性, 作用于 Rb 蛋白使其磷酸化, 释放转录因子 E2F 等。E2F 能活化 DNA 聚合酶、胸苷激酶、二氢叶酸还原酶等与 DNA 合成密切相关的重要酶类基因转录, 实现细胞 G₁→S 期转换。P16 蛋白通过与 CyclinD 竞争性结合 G₁ 期激酶 CDK4/CDK6 来抑制其对 Rb 蛋白的磷酸化作用, 使游离的 E2F-1 与未磷酸化的 Rb 蛋白结合, 依赖于 E2F-1 转录的基因不能转录, 间接抑制包括 DNA 合成在内的多种生化反应, 从而抑制细胞周期进程。p16 基因在正常细胞中起负反馈作用, 当 Rb 蛋白磷酸化而失活时, p16 基因可使 CDK4 表达下降, 当细胞 Rb 蛋白量下降时, 伴随 P16 蛋白表达水平上升, 结果抑制 CDK4, p16 基因在 Rb 基因上游起负反馈作用, 从而影响 Rb 基因在细胞增殖中的调节作用。结合细胞周期的研究发现, 在 G₁→S 期转化过程中, 活化的 CyclinD1-CDK4 复合物渐趋失活, 而 P16 蛋白在此时的表达到达顶峰; 进入 S 期过程中, Rb 蛋白由于磷酸化而失活, 失活的 Rb 蛋白一方面促进细胞进入 S 期, 另外, Rb 蛋白通过转录因子 E2F, 促进 p16 基因的转录, 反过来又抑制 CyclinD-CDK4 激酶中间的反馈作用, 而达到对细胞从 G₁ 期到 S 期转变过程的调控。p16 基因通过 p16-CyclinD-CDK4/CDK6-Rb 蛋白通路直接调控细胞停滞在 G₁ 期。同时, CyclinE-CDK2 亦可使 pRb 蛋白磷酸化, P16 蛋白和 CyclinD 竞争性与 CDK4/CDK6 结合, CyclinD 因无法与 CDK4/CDK6 结合而被降解, CyclinD 缺乏使 P27 蛋白或 P21 蛋白无法从 CyclinE-CDK2-P27 (或 P21)复合物中被释放, 结果导致 CyclinE-CDK2 活性受抑, Rb 蛋白处于低磷酸化状态, 间接抑制细胞周期进程^[7]。

4 p16 负向调控通路与 UV 辐射诱导的 G₁ 期阻滞

日前研究证实, UV 照射后诱导细胞发生生长阻滞, P16 蛋白表达增高和 CyclinD 功能下调及其与 CDK4 结合受抑是阻滞形成的重要机制之一。

Piepkorn M^[9]用亚致死剂量范围的 UVB 照射体外培养的人正常黑色素细胞, 采用 Western blot 和 Northern blot 方法分别检测 p16 mRNA 水平和蛋白水平变化, 结果发现, 与假照射组相比, UVB 照射后 P16 蛋白表达显著增加, p16 基因的 mRNA 水平亦随照射剂量增加而增加, 提示 p16 可介导黑色素细胞发生生长阻滞, 这一短暂的生长阻滞可在细胞进入分裂前修复 UVB 诱导的 DNA 损伤。Pavey S 等^[9,10]采用红斑剂量 UV 照射皮肤后发现, 正常皮肤黑色素细胞和角质细胞在照后 16 h, P16 蛋白表达明显提高, 24 h 达到峰值, 72 h 恢复, 且依赖于 UV 的穿透性: UV 穿透性越强, P16 蛋白表达越高。Ahmed NU 等^[11]利用免疫组化和 Western blot 方法分别检测 UVB 照后人表皮和角质细胞中 P16、P21、PCNA(增殖细胞核抗原)的蛋白表达情况, 发现正常细胞 P16 蛋白表达极低, UV 照后 24~48 h P16 蛋白表达明显增多, 72~120 h 达到峰值。P21 蛋白比 P16 蛋白表达早, 24~48 h 已达到高峰, PCNA 在照后 48~168 h 明显增加, 峰值在 72 h。结果表明, p16 和 p21 可能在 UV 照后的皮肤保护性反应中起十分重要作用。Gabielli BG 等^[12]用低剂量 UV 照射 HeLa 细胞, 结果 P16 蛋白与 CDK4/CDK6 亲和性增加, P16 蛋白表达增高, CyclinD 与 CDK4 结合受抑; 咖啡因可以减轻 G₂ 期阻滞, 降低 P16 蛋白-CDK4 水平, 且 CDK4 突变体过度表达也可导致 G₂ 期阻滞。结果表明, CyclinD-CDK4 活性是细胞增殖所必需, UV 照射后, P16-CDK4 结合活性的增加阻止 CyclinD-CDK4 活性, 使细胞发生生长停滞。Chan J 等^[13]发现, 在 UV 诱导负鼠黑色素细胞增生和癌变细胞中, 转移瘤细胞内表达 P16 蛋白, 非转移瘤中不表达 P16 蛋白, 而其转换阅读框架 P19^{ANF}蛋白在所有黑色素瘤细胞和增生细胞中均表达, 提示 P16 与 P19^{ANF}表达的改变和二者基因结构缺陷在负鼠黑色素瘤形成和进展中起很大作用。可见, 无论是正常细胞还是肿瘤细胞, 多数细胞 UV 照射后 P16 蛋白表达增加, 发挥其在细胞周期进程中的“闸”作用。

CyclinD 是 G₁ 期周期素的重要成员, 它包括 CyclinD₁、CyclinD₂ 和 CyclinD₃ 三个亚型, 这三个亚型具有较高的同源性, 在某些细胞中特异表达。CyclinD₁、CyclinD₂ 和 CyclinD₃ 均可作为 CDK4 的调节亚基, 与 CDK4 形成 CyclinD-CDK4 复合物, 调节细胞周期的正向进程。UV 诱导的 P16 蛋白增加可抑制此正向进程。Miyakawa Y 等^[14]发现, 小鼠巨噬细胞 UV 照后数分钟 CyclinD₁ 便快速下降, 此时 CDK4 尚无任何变化, 并观察到在 p53⁺和 p53⁻鼠的巨噬细胞中均有 CyclinD₁ mRNA 水平和蛋白水平的快速下降, 说明 CyclinD₁ 此种改变与 p53 通路无关, 提示 CyclinD₁ 在辐射诱导的 G₁ 期阻滞中独自起一定作用。

研究发现, 正常人纤维母细胞和永生化纤维母细胞 UV 照射后, CDK2 和 CDK4 活性受抑, P21 和 P53 蛋白表达增多, 而且 CDK2 和 CDK4 抑制程度与 P21 蛋白同二者的结合量呈良好相关性, 认为 UV 照射后 CDK4 功能下调机制为增加的 P21 蛋白与 CDK4 结合, 直接抑制 CDK4 活性, 另外, UV 照射还可以使 CDK4 蛋白 Thr14 和 Tyr15 的磷酸化, 使其活性丧失。

可见, UV 照射后 p16 基因及其蛋白表达增强, CyclinD 和 CDK4 表达下降, 表明 p16 负向调控通路在 UV 辐射诱导细胞生长阻滞中起着十分重要的作用。

5 p16 负向调控通路与电离辐射诱导的 G₁ 期阻滞

中等剂量电离辐射诱导细胞发生 G₁ 期阻滞, 其分子调控机制与 p53 调控通路相关^[15]。近年的研究发现, 不依赖于 p53 的 p16 通路在电离辐射诱导的 G₁ 期阻滞中具有重要的生物学作用。

Ramsamooj P 等^[16]首次报道体外培养的正常前列腺细胞受电离辐射(6Gy)照后 P16、Rb 蛋白水平未见明显改变, 而前列腺肿瘤细胞受照后 P16 与 P21 蛋白并行性增加, Rb 蛋白未见明显改变。用 X 射线照射体外培养的鼠胸腺瘤细胞(EL-4 细胞)后, p16 mRNA 水平和蛋白表达明显增高, CyclinD 和 CDK4 mRNA 水平及蛋白水平明显减低, 提示 P16 蛋白和 CyclinD 竞争性 CDK4 结合过程中, 由于 P16 蛋白与 CDK4 的亲合力远大于 CyclinD 与 CDK4 的亲合力, 加上照射后 P16 蛋白数量增多, P16-CDK4 复合物占据优势, 发挥其负向调控作

用,使 Rb 蛋白无法与 Cyclin D-CDK4 复合物结合而处于非磷酸化状态,细胞停滞在 G₁ 期。可见, p16-CyclinD-CDK4 负向调控通路在电离辐射诱导的 G₁ 期阻滞中发挥重要作用。Suzuki K 等^[17]发现, X 射线照射后诱导正常人二倍体细胞发生永久性衰老型生长阻滞,阻滞细胞中可见 P53、P21 和 P16 蛋白表达增多。在辐射诱导的正常细胞转化过程中, P16 蛋白表达不尽相同。观察全身照射后小鼠正常胸腺和脾脏细胞 p16、CyclinD、CDK4 三者基因转录和蛋白表达的影响发现,假照射组胸腺和脾细胞 p16 基因转录水平很低, 2GyX 射线照射后能诱导 p16 基因表达,而且胸腺细胞明显高于脾细胞,呈现一定的细胞异质性; CyclinD 无论基因转录还是蛋白表达均未见明显改变,仅见降低趋势,而照射后 CDK4 mRNA 水平和蛋白水平均显著降低。说明体内细胞主要通过 p16 基因转录水平增加和 CDK4 锐减来阻止 pRb 蛋白磷酸化,细胞停滞在 G₁ 期^[18]。

综上所述, p16 负向调控通路在辐射诱导的细胞生长阻滞中可能发挥十分重要作用。

参考文献:

- [1] Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signaling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G₁ checkpoint [J]. *Cancer Res*, 1996, 55: 1351.
- [2] Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF [J]. *Cell*, 1997, 91: 649-659.
- [3] Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks leads to p16^{INK4a} enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts [J]. *Oncogene*, 1998, 16(9): 1113-1123.
- [4] Zindy J, Quelle DE, Roussel MF, et al. Expression of p16^{INK4a} tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging [J]. *Oncogene*, 1997, 15: 203-211.
- [5] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a} [J]. *Cell*, 1997, 88(5): 593-602.
- [6] Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, et al. Activation of the E2F transcription factor by cyclinD1 is blocked by p16^{INK4a}, the product of the putative tumor suppressor gene MTS1 [J]. *Oncogene*, 1994, 9(12): 3475-3482.
- [7] Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer [J]. *Oncogene*, 1999, 18: 5311-5317.
- [8] Piepkorn M. The express of p16 (INK4a), the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2000, 42: 741-745.
- [9] Pavey S, Russell T, Gabrielli B. G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (43): 6103-6110.
- [10] Pavey S, Conroy S, Russell T, et al. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin [J]. *Cancer Res*, 1999, 59 (17): 4185-4189.
- [11] Ahmed NU, Ueda M, Ichihashi M. Induced expression of p16 and p21 proteins in UVB-irradiated human epidermis and cultured keratinocytes [J]. *J Dermatol Sci*, 1999, 19 (3): 175-181.
- [12] Gabrielli BG, Sarcevic B, Sinnamon J, et al. A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(20): 13961-13969.
- [13] Chan J, Robinson ES, Atencio J, et al. Characterization of the CDKN2A and ARF genes in UV-induced melanocytic hyperplasias and melanomas of an opossum (*Monodelphis domestica*) [J]. *Mol Carcinog*, 2001, 31:16-26.
- [14] Miyakawa Y, Matsushima H. Rapid downregulation of cyclin D1 mRNA and protein levels by ultraviolet irradiation in murine macrophage cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284 (1): 71-76.
- [15] Ju GZ, Fu HQ, Fu SB, et al. G1 Arrest and relative protein expressions in mouse thymocytes induced by WBI [J]. *Biomed Environ Sci*, 2001, 14: 27-31.
- [16] Ramsamooj P, Kuettel M, Dritschilo A, et al. p53-Independent tumorigenic progression of human prostate cells [J]. *Radiat Oncol Invest*, 1997, 5 (6): 269-274.
- [17] Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, et al. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening [J]. *Radiat Res*, 2001, 155(1 pt 2): 248-253.
- [18] Ju GZ, Wang XM, Fu SB, et al. Effect of ionizing radiation on the expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes and splenocytes [J]. *Biomed Environ Sci*, 2003, 16(1): 47-52.