

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0397-03

p27 的功能调控及其在乳腺肿瘤治疗中的应用

Role of p27 in functional regulation and its application in breast cancer therapy

张丰综述;李楠审阅(1. 第二军医大学学员队;2. 第二军医大学免疫学研究所,上海 200433)

[摘要] P27 蛋白属于细胞周期调控蛋白 Cip/kip 家族,是细胞周期负性调节因子,在人体多种恶性肿瘤细胞增殖、分化以及细胞凋亡调控中起着非常重要的作用。MAPK 和 PI3K/PKB 信号途径均能够介导 P27 的降解或失活,其表达的下调与乳腺癌的发生及进展密切相关,故可能是一种新的肿瘤标志物及肿瘤预后指标。P27 在乳腺癌的化学疗法、放射治疗以及激素治疗中具有一定的应用价值。通过人工调节 p27 表达水平及外部干涉 p27 作用通路可能在乳腺癌的基因疗法中具有广阔的应用前景。

[关键词] p27^{Kip-1}; 乳腺癌; 基因治疗; 预后

[中图分类号] R730.2 [文献标识码] A

细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitors,CKI)通过与 Cyclin-CDK 复合物结合抑制了 CDK(cyclin-dependent kinase)的活性,阻止细胞周期的正常进程,对细胞周期起负性调节作用。P27^{Kip-1}(P27)是 CKI 家族的一员,1994 年在 TGF- β 诱导和接触抑制导致的生长阻滞细胞提取物中发现了该蛋白,并认为它是 Cyclin E-CDK2 和 Cyclin A-CDK2 的抑制物。p27 是一种新型抑癌基因,在人体多种恶性肿瘤细胞增殖和分化的调控中起着非常重要的作用,它的过度表达可使细胞停止在 G₁ 中期,抑制肿瘤的生长,因此成为近年来的研究热点。

1 p27 的细胞功能

1.1 p27 与细胞分化发育

p27 在细胞的分化发育中起着重要作用。p27 基因外源性高表达可使细胞 DNA 合成强烈受抑制,细胞阻滞于 G₁ 期而停止增殖,因此 p27 在细胞生长中起着重要的抗增殖作用。p27 敲除的小鼠甲状腺腺瘤和前列腺腺瘤的生长明显加快,而仅缺失 p27 的小鼠也表现出对 γ 辐照等各种致癌因素的易感^[1]。这提示 p27 的缺失和减少而导致的细胞异常增生和分化与肿瘤生长密切相关。不论是组织培养还是在体内,分化的多种细胞中都有 p27 的升高。中枢胶质前体细胞、造血前体细胞的分化过程中,p27 基因量增加能加速少突神经胶质前体细胞的增殖和分化,提示 p27 可能对停止细胞分裂、启动细胞分化有一定的作用^[2],但也有研究发现 p27 不能促使成熟细胞的衰老。1,25-二羟维生素 D 通过诱导细胞 p27 的高表达,使细胞终止于 G₁ 期,而促使 HL60 细胞分化为单核细胞。另外,外源性 p27 基因导入可以抑制 U937 细胞的细胞周期,并可诱导其向巨噬细胞分化,或出现代表细胞分化的巨噬细胞特异性标志。p27 亦可诱导肿瘤细胞的分化,有报道 p27 表达的增加能明显提高 HT29 结肠癌细胞系对分化的敏感性。

1.2 p27 与细胞凋亡

p27 作为 G₁/S 的调控因子,其活性的改变与细胞凋亡之间存在相关性。最近一项对人乳腺癌和其他肿瘤细胞的研究

表明^[3],过表达的 p27 不仅诱导细胞周期阻滞和 Cyclin-CDK 活性下降,还促进细胞凋亡发生。p27 的凋亡调节作用在正常细胞和肿瘤细胞中有所不同,蛋白酶体抑制物诱导的凋亡和 p27 的上调只发生在肉瘤病毒 40(SV40)转化的成纤维细胞中,而在野生型细胞中没有这种作用。高表达 p27 的肿瘤细胞,其自发凋亡程度比低表达者更显著。p27 对于各种癌细胞系的 G₁ 阻滞和凋亡的联合效应使携带 p27 的腺病毒载体成为有意义的基因治疗工具。最近研究发现,通过腺病毒载体介导的 p27 基因的高水平表达可导致肺癌、肾癌等肿瘤细胞凋亡^[4]。和上述的研究相反,一些试验结果显示 p27 有抗凋亡作用。在一些癌细胞和白血病细胞系中发现 p27 拮抗了药物诱导的凋亡^[5]。p27 缺陷小鼠的正常成纤维细胞,在生长因子去除及 CyclinA/CDK2 激活后其凋亡程度增加。而外源表达的 p27 可抑制血清撤除诱导的凋亡^[6]。在血清撤除后的内皮细胞中,p27 和 p21 可被 CPP32 和/或 CPP32 样 caspases 特异切割,切割的 p27 和 p21 不能与 CDK2 结合,显著地增强了 CyclinA/CDK2 的活性,从而导致细胞凋亡,抑制 p21 切割和 CDK2 的活性可在一定程度上抑制上述介导的细胞凋亡。因此,p27 和 p21 切割及诱导的 CyclinA/CDK2 的激活是内皮细胞凋亡的必要步骤。营养学研究还发现^[7]蔬菜和水果中富含的查耳酮(chalcone)能上调 p27 的表达水平,促使细胞周期停滞,诱导人乳腺癌细胞凋亡,对乳腺癌的预防有很好的功效。

2 p27 细胞功能的调控

2.1 MAPK 介导的 P27 降解

在多种人类肿瘤中都出现 P27 蛋白的降解。Ras 介导的 MAPK 信号可加快 P27 的降解,导致细胞非锚定生长。体外研究也证明 Ras 基因的转染与 p27 的增长成负性相关。MAP 激酶(MEK1)转染可加速 P27 的降解,MEK1 的抑制剂

[作者简介] 张丰(1986-),男,上海人,本科,主要从事生物技术方面的研究

[通讯作者] 李楠,E-mail:linan@immunol.org

PD98059 则可消除 Ras 介导的 P27 降解效应^[8]。Her2 高表达于一些原发性的乳腺癌和其它的一些肿瘤,与肿瘤的转移和预后有关联。有研究表明乳腺癌细胞内的 Her2/ErbB2 和 EGFR 可通过 MEK/MAPK 途径调控 P27 降解^[9]。此外,人们发现在 Her2 过表达的原发性乳腺癌细胞中经常会出现 P27 表达下调。这可能与 p27 在人乳腺癌细胞和前列腺肿瘤细胞中蛋白水解的加速有潜在联系。P27 蛋白中含有许多 MAPK 结合作用位点,MAPK 能促使 P27 蛋白水解,同时降低其对 CDK2 的结合力。从 MEK 转染的细胞中分离出的 P27 可表现出异常磷酸化,对 CyclinE-CDK2 的结合和抑制活性都明显降低^[10]。当然,P27 可能并不是 MAPK 在体内的直接靶点^[11]。Ras 和 RTK 依赖性信号对 P27 的作用会随着不同的细胞类型而改变。在上皮细胞中,Ras 的激活作用可使 P27 错误定位至胞质同时加强 P27 对 CDK6 的结合^[12]。在一些其它的细胞株中,RhoA 的激活作用也可调控的 P27 蛋白水解。

2.2 PI3K 途径导致的 P27 失活

Ras 介导的 PI3K/PKB 激活作用可导致 P27 功能的失活,在不同的细胞类型中其效应也是不同的。PI3K 介导的 PKB 激活作用能导致 P27 在人类乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞胞质中的积聚^[13]。研究表明,PKB 能磷酸化 P27 核定位信号区的 T157。在 PTEN 的缺失和 Her2 高表达的细胞中,PKB 介导的磷酸化可抑制 P27 的核转位。PI3K 还调节着 P27 的稳定性,PI3K 途径的激活会导致 P27 在特定细胞中的表达下调。在表达 BCR/AB1 的造血细胞,前列腺癌细胞和 PTEN 缺陷的胚胎干细胞中,PI3K 的激活会促进 P27 蛋白水解。PTEN 可能会通过对 SKP2 的阻遏作用来抑制 P27 的蛋白水解^[14]。在 PTEN 缺陷小鼠的 ES 细胞中发现 P27 表达下调并伴随着 SKP2 表达上调;恢复 PTEN 的表达或用 LY294002 处理导致 PI3K 抑制,可使 SKP2 的表达下调,而 SKP2 可通过降解 P27 抑制肿瘤细胞的生长。PKB 依赖的 P27 磷酸化导致其定位错误在一定程度上是由于核输入的降低,使部分 P27 被阻滞在胞质中,从而阻碍了 Cyclin E-CDK2 依赖的 P27 蛋白水解。因此在具有 PKB 活性的胞质中,P27 不会受核相关蛋白水解的影响,所以在这些肿瘤细胞胞质中的 P27 相对较稳定。PI3K 途径对于 P27 稳定性的调控在活体内可能更复杂一些。值得一提的是,受体酪氨酸激酶(RTK)和 Ras 的激活在不同的细胞群和肿瘤中有着不同的结果。例如在同一乳腺上皮细胞模型中,RTK 信号的抑制效应也会出现较大的差异。因此,明确其他信号分子对受体酪氨酸和 RAS 的作用机制是一项极具意义的工作。

3 p27 在乳腺癌治疗中的应用

3.1 p27 与乳腺癌的预后

近期研究显示,在 202 例直径 < 1 cm 的浸润性乳腺癌中,p27 表达水平与淋巴结转移和乳腺癌生存率显著相关;而在 168 例原发性乳腺癌中,p27 高表达者组织学分级低,浸润性癌分化好,腋淋巴结转移少或无;生存率多因素分析显示,p27 高表达者无病生存率高于 p27 低表达者。以上两项研究

表明 P27 蛋白水平是一个新的有独立预后价值的指标,有助于临床选择高危复发病例。对于浸润性小叶癌和浸润性导管癌的研究发现,P27 低表达和 Her2 高表达、无病生存率降低有关。许多后续的研究发现 P27 的表达下调与患者的不良预后有密切的关系。近几年有研究表明 P27 的低表达与 Ki-67(反应肿瘤增殖的标记物)和细胞 S 期组分的高表达有关^[15]。Leivonen 等^[16]认为 p27 只能预测 5 年内的存活率,而对于 10 年以上的乳腺癌存活率预测价值很低。该研究 1 057 例预测为腋淋巴结转移阴性的乳腺癌患者进行了长达 9 年的追踪观察。结果发现 p27 的低水平表达始终与雌激素受体水平低、组织学分级高有着密切的关系,这为 p27 对于乳腺癌的预后价值提供了有力的证明。国内金东岭等^[17]对 96 例乳腺癌和 18 例癌旁正常乳腺组织石蜡切片进行检测,结果发现 p27 表达明显缺失,提示 p27 基因在乳腺癌的进展过程中逐渐丧失了抑癌作用,从而影响乳腺癌的生物学行为,使癌细胞具有了更高的恶性程度和侵袭能力。最近,Traub 等^[18]对 138 例乳腺癌病例进行了检测,通过多变量分析法证明 p27 和 SKP2 的表达水平具有明显的相关性,p27 高表达 SKP2 低表达患者的肿瘤恶性程度明显增高。提示 p27/SKP2 指数能反应肿瘤的侵袭性。此外,p27/SKP2 指数还可作为靶标 SKP2 分子治疗的预后指标。

3.2 p27 与化学疗法和放射治疗

在关于乳腺癌的研究中发现,p27 的低表达预示着对环磷酰胺等药物的不敏感。在 198 例随机接受无辅助治疗或单纯的术间化疗(服用环磷酰胺、甲氨喋呤、氟尿嘧啶等药物)的腋淋巴结转移阴性的乳腺癌患者进行的研究中发现,p27 表达下调和细胞的增殖有密切关系,肿瘤细胞生长越快,对于周期活性的化疗药物的初始反应就越剧烈,但是部分肿瘤细胞很快对这些治疗产生耐药性,因此辅助治疗的疗效在 p27 低表达的患者中受到抑制^[19]。在人、小鼠肿瘤细胞的多细胞球体化立体培养中,发现持续上调 P27 蛋白表达,对细胞周期依赖性化疗药物和放疗诱导的细胞凋亡产生抵抗。目前 Kodach^[20]等使用紫色杆菌素抑制氟尿嘧啶的抗药性,在结肠直肠癌的治疗中取得了良好的疗效。Wang 等^[21]利用反义寡核苷酸基因下调 p27,使癌细胞重新对化疗制剂易感,说明 p27 是癌细胞抗药性调节者。p27 是机体对于化疗反应的一个重要预测指标,如何通过 p27 的效应检测出患乳腺癌的各类人群的最适疗法很有必要。

3.3 p27 与激素疗法

抗雌激素药在乳腺癌的防治中起着重要的作用。然而,只有 2/3 的雌激素受体有助于乳腺癌细胞对他莫昔芬等抗肿瘤激素类药物敏感。但即使是敏感的肿瘤细胞,也常常会对这类药物逐步产生拮抗。近来有研究表明,P27 在乳腺癌细胞中的反常可能是由于对抗雌激素的抗药性而产生的^[22]。在乳腺癌细胞株中,他莫昔芬通过 P27 的媒介作用使细胞停止于 G₁ 期。许多研究表明对抗雌激素药的抗药性与 MAPK 激活作用密切相关。在乳腺癌中常会观察到 MEK 活化,增强了 P27 的磷酸化使 P27 的表达下调,继而导致了

肿瘤细胞对抗雌激素药的抗药性。P27 与抗雌激素药的治疗效果有关, 而 RTK 通过 PI3K 和 MAPK 的活化作用消除 P27 的作用, 因此将抗雌激素药和抗 RTK 活性的分子抑制剂结合使用可能会有利于抑制抗药性。此外, Yang 等^[23]发现 P27 经改良后能使 HER2 过表达的肿瘤体积显著减小, 这预示着 P27 对于 HER2 过表达的癌症具有一定的治疗价值。

自 1994 年发现以来, 国内外学者对 p27 的性质、生物学特点进行了大量的研究, 特别是在其与肿瘤关系方面倾注了大量心血, 并取得了令人鼓舞的成果, 使人们看到了肿瘤诊断及治疗的新希望。然而 p27 对肿瘤抑制作用的机制如何? 其蛋白表达下降的原因有哪些? p27 与其他癌基因、抑癌基因的关系又是怎样的? 以上问题的解决, 将使 p27 的作用机制及失活机制更加明了, 从而使人工调节 p27 表达水平及外部干涉 p27 作用通路成为可能, 这将为乳腺癌的基因治疗特别是联合多项基因治疗提供广阔的前景。

[参 考 文 献]

- [1] Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, *et al.* Distinct altered patterns of p27 KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(17): 1284-1291.
- [2] Tokumoto YM, Apperly JA, Gao FB, *et al.* Posttranscriptional regulation of p18 and p27 Cdk inhibitor proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation[J]. *Dev Biol*, 2002, 245(1): 224-234.
- [3] Tsuzuki H, Fujieda S, Sunaga H, *et al.* Expression of p27 and apoptosis in oral leukoplakia[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2B): 1265-1270.
- [4] Zhu JS, Wang L, Cheng GQ, *et al.* Apoptosis mechanisms of human gastric cancer cell line MKN-45 infected with human mutant p27 [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(47): 7536-7540.
- [5] Eymin B, Haugg M, Droin N, *et al.* p27 Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells[J]. *Oncogene*, 1999, 18(7): 1411-1418.
- [6] Hiromura K, Pippin JW, Fero ML, *et al.* Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(5): 597-604.
- [7] Hsu YL, Kuo PL, Tzeng WS, *et al.* Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(5): 704-713.
- [8] Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, *et al.* Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27 (Kip1) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2686-2692.
- [9] Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, *et al.* ErbB2/neu kinase modulates cellular p27 (Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(17): 6583-6591.
- [10] Donovan JC, Milic A, Slingerland JM. Constitutive MEK/MAPK activation leads to p27(Kip1) deregulation and antiestrogen resistance in human breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(44): 40888-40895.
- [11] Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, *et al.* Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25146-25154.
- [12] Liu X, Sun Y, Ehrlich M, *et al.* Disruption of TGF-beta growth inhibition by oncogenic ras is linked to p27Kip1 mislocalization[J]. *Oncogene*, 2000, 19(51): 5926-5935.
- [13] Shin I, Yakes FM, Rojo F, *et al.* PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization[J]. *Nat Med*, 2002, 8(10): 1145-1152.
- [14] Forti FL, Schwindt TT, Moraes MS, *et al.* ACTH promotion of p27 (Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(31): 10133-10140.
- [15] Barbareschi M, van Tinteren H, Mauri FA, *et al.* p27(kip1) expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study on 512 patients with long-term follow-up[J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(3): 236-241.
- [16] Leivonen M, Nordling S, Lundin J, *et al.* p27 expression correlates with short-term, but not with long-term prognosis in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 67(1): 15-22.
- [17] 金东岭, 田珂, 康美玉, 等. 细胞周期因子对乳腺癌生物学行为和预后判定的影响[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(6): 102-104.
- [18] Traub F, Mengel M, Luck HJ, *et al.* Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 99(2): 185-191.
- [19] Newman L, Xia W, Yang HY, *et al.* Correlation of p27 protein expression with HER-2/neu expression in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2001, 30(3): 169-175.
- [20] Kodach LL, Bos CL, Duran N, *et al.* Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(3): 508-516.
- [21] Xing H, Wang S, Hu K, *et al.* Effect of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 on resistance of ovarian cancer multicellular spheroids to anticancer chemotherapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(8): 511-519.
- [22] Cariou S, Donovan JC, Flanagan WM, *et al.* Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27 Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(16): 9042-9046.
- [23] Yang HY, Yang H, Zhao R, *et al.* Modified p27 Kip1 is efficient in suppressing HER2-mediated tumorigenicity[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(1): 128-138.