

细胞周期蛋白 D1 基因多态性与肿瘤相关性的研究进展

刘耀煌¹, 方志军¹, 周虹¹综述, 李艳²审校(1. 湖北省黄石市第四医院医学检验科 435006; 2. 武汉大学人民医院医学检验科, 武汉 430060)

【关键词】 细胞周期蛋白 D1; 基因多态性; 肿瘤

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.19.056

中图分类号:R341;R73

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)19-2141-03

目前研究认为,肿瘤的发生与细胞周期调控失常有着密切联系,细胞增殖失控被认为是肿瘤形成的重要特征^[1]。近来有学者发现,细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)作为细胞周期重要的正性调控因子,在肿瘤的发生发展中起重要作用^[2]。现已知 Cyclin D1 基因第 4 外显子最后一个碱基(第 870 核苷酸)存在 A 或 G 单核苷酸多态性(A870G),该多态性虽不导致氨基酸残基变化(均为脯氨酸),但影响 Cyclin D1 mRNA 剪切转录子的种类及特性^[3]。分子流行病学研究显示,Cyclin D1 A870G 与多种恶性肿瘤的遗传易感性有关^[4-5]。本文旨在对 Cyclin D1 基因多态性与肿瘤关系的研究作一综述。

1 Cyclin D1 基因的结构及其调控

Cyclin D1 基因是 Motkura 等^[6]于 1991 年从甲状旁腺腺瘤中克隆和鉴定出来的。Cyclin D1 是 G1 周期素家族最重要的成员,定位于人染色体 11q13,基因编码区内有较高的 GC 含量,末端有一个 Poly-A 区(包括 69 个腺苷酸残基),全长 120 kb,基因跨距约 15 kb,有 5 个外显子,4 个内含子,编码的蛋白含 295 个氨基酸残基,相对分子质量 34×10^3 ,其中第 56~141 位氨基酸序列为保守序列,称 Cyclin box。D1 蛋白 N 末端含有能与 PRB 的 C 末端口袋蛋白相结合的 Leu-X-cys-X-E 序列;其 C 末端含有与蛋白降解有关的“PEST”序列。D1 蛋白半衰期约 20 min。正常情况下,D1 蛋白只是在 G1 期早期呈一过性表达,是细胞周期启动因子,也是生长因子感受器,体外实验表明在生长因子刺激下,D1 是 G1 期合成的第一个细胞周期素,并于早期合成达到高峰,它的合成以及与 cdk4、cdk6 的结合均依赖丝裂原的刺激,且在丝裂原刺激下 D1 在整个细胞周期均可表达。表达的 Cyclin D1 蛋白与 CDK4、CDK6 结合后,形成二元复合物,控制 CDK 对蛋白磷酸化作用的能力,使视网膜母细胞瘤易感产物 pRB 磷酸化,磷酸化的 pRB 即释放与之结合的 E2F-1 及其他转录因子,触发 mRNA 转录,使细胞由 G1 期进入 S 期而进入增殖状态。因此,Cyclin D1 控制着 G1-S 期进程速度,Cyclin D1 过度表达导致 G1 期缩短,减少细胞对外源性有丝分裂的依赖性,细胞开始转录^[7]。

Cyclin D1 表达有转录水平及转录后水平的调控。转录水平上诸如 P38/MAPK(有丝分裂原激活蛋白),C-JUN N-terminal kinase/ SAPK(C-JUN N 末端酶/压力激活蛋白酶)通道传递外源性生长信号上调 Cyclin D1。同样,AKT/PKB 通道激活也能通过转录或转录后机制增加 Cyclin D1 表达^[8]。但是,Cyclin D1 调节有极大的组织特异性,且不同细胞 Cyclin D1 通过这些通道表达的效果不同。此外,许多研究表明 Cyclin D1 的表达还可能受其他多种因素控制,如 PRb、雌激素、生长因子可调控 Cyclin D1 的表达,糖皮质激素抑制 Cyclin D1 表达,过度 Cyclin D1 表达 E2F-1 能降低 Cyclin D1 蛋白的水平,而 NF- κ B 则刺激 Cyclin D1 转录和表达^[9-10]。

2 Cyclin D1 基因多态性

Cyclin D1 基因有两种转录产物,即 Cyclin D1a 及 Cyclin D1b mRNA,它们同时存在于正常及肿瘤组织中^[11]。Rydzanicz 等^[12]发现,两种亚型 Cyclin D1 mRNA 的产生是由于 Cyclin D1 基因第 4 外显子最后一个碱基(第 870 核苷酸)的 A/G 多态性(A870G)所致。Cyclin D1 的 A 等位基因并不影响其所编码的氨基酸,但却造成了其转录产物的异常剪切,从而产生了 Cyclin D1 的另一变异性转录产物 Cyclin D1b mRNA。成熟的 Cyclin D1b mRNA 具有 Cyclin D1 的外显子 1~4 及部分内含子 4 的序列,而正常的 Cyclin D1 基因转录产物 Cyclin D1a mRNA 却包含有 5 个外显子。因此,Cyclin D1b 从外显子 1~4 与 Cyclin D1a 完全相同,只是 C 末端原有的 55 个由 5 号外显子编码的氨基酸缺失,转由 4 号内含子编码的氨基酸的肽端所取代。由核苷酸序列预测,Cyclin D1a mRNA 对应的蛋白产物为 295 个氨基酸,相对分子质量 34×10^3 ;而 Cyclin D1b mRNA 对应的蛋白产物为 274 个氨基酸,相对分子质量 31×10^3 。

由于 Cyclin D1 基因第 5 外显子编码的富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸的 C 末端富含 PEST 序列与蛋白质快速降解有关,Cyclin D1b mRNA 对应的蛋白因缺失该序列,于是造成了 Cyclin D1 蛋白代谢过程紊乱,具有了更长久的半衰期,因而 Cyclin D1 基因表达的微小变化可以使细胞逃脱细胞周期检查点的调控^[13-14]。同时,C 末端还是 Cyclin D1 蛋白最具抗原性和亲水性的片段。因此,该片段的改变对 Cyclin D1 的功能影响具有重要意义。Hosokawa 等^[15]克隆了 Cyclin D1b mRNA 的全长 cDNA,并证实了上述观点。Sawa 等^[16]则指出,Cyclin D1a mRNA 或 Cyclin D1b mRNA 过度表达时,均可阻断细胞增殖,但两者以不同的方式调节 G0-G1 的转换,Cyclin D1a mRNA 对应的蛋白质主要促使细胞由 G0 期进入 G1 期,而 Cyclin D1b mRNA 对应的蛋白质则促进细胞从细胞周期中退出。

3 Cyclin D1 基因多态性与肿瘤的关系

随着对 Cyclin D1 基因多态性研究的逐步深入,人们开始认识到 Cyclin D1 基因多态性(A870G)对细胞周期进程的影响乃至在肿瘤发生发展中可能扮演着非常重要的角色^[17-18]。

目前不少研究将 Cyclin D1 基因分为 AA、AG、GG 3 种基因型。Betticher 等^[19]将非小细胞肺癌的患者按 Cyclin D1 基因型分为 GG 型与 AG/AA 型两组进行比较,发现基因型为 GG 型的患者其术后生存期较基因型为 AG/AA 的患者长,其中最显著的差别表现为 GG 组的患者局部复发率降低了 5 倍。提示 Cyclin D1 AA/AG 基因型可能参与了非小细胞肺癌的发生和发展。Zheng 等^[20]报道,在头颈鳞癌中,Cyclin D1 AA 基因型与肿瘤的发生密切相关,使肿瘤发生增加 3 倍以上,而 AG 基因型却无任何意义。Simpson 等^[21]在散发性垂体腺瘤患者中,发现 A 等位基因型及 AA 基因型频率与肿瘤的病理

分级呈显著正相关。Kong 等^[22]的研究则首次将 Cyclin D1 基因多态性与肿瘤的发病年龄联系起来,在遗传性非息肉性结直肠癌中发现,基因型为 AA 的患者比基因型为 GG 的患者发病年龄提早 11 岁,基因型为 AG 者较基因型为 GG 者发病年龄提早 9.5 岁。对此,Kong 等认为,Cyclin D1 A 或 AG 基因型患者可产生较多的 Cyclin D1b mRNA,与 Cyclin D1a mRNA 不同的是,前者对应的蛋白质缺乏 C 末端富含的 PEST 序列,因而半衰期较长,稳定性较高,使具有错配修复基因缺陷这一遗传背景的细胞在受损后仍可通过 G1-S 期限制点,继续增殖而不进入凋亡,从而促进了肿瘤的发生。但在某些肿瘤中亦有研究表明,Cyclin D1b mRNA 可能不具有重要作用。Hosokawa 等^[15]应用 RT-PCR 的方法,在原发性乳腺癌及乳腺癌细胞系中,虽然同时检测到 Cyclin D1b mRNA 和 Cyclin D1a mRNA 的存在,但前者比后者少 20-40 倍。提示 Cyclin D1b mRNA 对乳腺癌的发生发展可能不具有重要作用。

有关 CyclinD1 基因多态性(A870G)与胃癌相关性的研究报道尚不多见,且结果不一。Geddert 等^[23]对德国高加索人群认为等位基因 A 或 G 与食管癌、贲门癌及远端胃癌发生均无关系。Song 等^[24]研究了韩国人群 CyclinD1 基因多态性与胃癌的关系,其仅在男性人群中发现 CyclinD1 GG 基因型更易感胃癌,该研究未将贲门癌和非贲门癌分别研究。最近 Tahara 等^[25]发现,携带 Cyclin D1 AA 基因型个体患胃黏膜癌前病变—肠上皮化生的危险性是非携带 Cyclin D1 AA 基因型个体的 1.8 倍,因而推测,Cyclin D1 AA 基因型可能是胃黏膜癌变的危险因素。刘耀煌等^[26]对来自中国湖北地区汉族的非贲门胃癌患者的研究结果表明,Cyclin D1 A/G 多态性与胃癌的发生密切相关,具有 AA 基因型的个体患胃癌的危险性增加了 1.60 倍,而具有 A 等位基因个体患胃癌的危险性增加了 1.20 倍。以上研究结果不尽相同,可能与各自研究的人群、研究的方法以及组织特异性有关。

综上所述,Cyclin D1 是一种细胞周期重要的调控因子,其基因结构及调控机制正不断被人们所认识。随着研究的逐步深入,人们不仅观察到 Cyclin D1 存在基因多态性,而且发现其基因多态性与多种肿瘤的发生和进展相关。但有关 Cyclin D1 基因多态性与肿瘤关系的研究还存在一些不解之处,如 Cyclin D1 基因多态性是怎样通过对细胞周期的影响,进而改变了肿瘤行为的分子机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Wang L, Cao XX, Chen Q, et al. DIXDC1 targets p21 and cyclin D1 via PI3K pathway activation to promote colon cancer cell proliferation[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1801-1808.
- [2] Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, et al. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 2599-2609.
- [3] Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, et al. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: a key driver of malignant transformation[J]. *Lung Cancer*, 2007, 55(1): 1-14.
- [4] Pabalan N, Bapat B, Sung L, et al. Cyclin D1 PrO₂41Pro (CCND1-G870A) polymorphism is associated with increased cancer risk in human populations: a meta-analysis [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(10): 2773-2781.
- [5] Lu C, Dong J, Ma H, et al. CCND1 G870A polymorphism contributes to breast cancer susceptibility: a meta-analysis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 116(3): 571-575.
- [6] Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene [J]. *Nature*, 1991, 350(6318): 512-515.
- [7] Wu J, Wu SH, Bollig A, et al. Identification of the cyclin D1b mRNA variant in mouse [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(5): 953-957.
- [8] Nieves D, Moreno JJ. Enantioselective effect of 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid on 3T6 fibroblast growth through ERK 1/2 and p38 MAPK pathways and cyclin D1 activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(5): 654-661.
- [9] Cho EY, Choi YL, Han JJ, et al. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization [J]. *Pathol Int*, 2008, 58(1): 17-25.
- [10] Dahlman JM, Wang J, Bakkar N, et al. The RelA/p65 subunit of NF-kappaB specifically regulates cyclin D1 protein stability; implications for cell cycle withdrawal and skeletal myogenesis [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(1): 42-51.
- [11] Marzec M, Kasprzycka M, Lai R, et al. Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity [J]. *Blood*, 2006, 108(5): 1744-1750.
- [12] Rydzanicz M, Golusinski P, Mielcarek-Kuchta D, et al. Cyclin D1 gene (CCND1) polymorphism and the risk of squamous cell carcinoma of the larynx [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2006, 263(1): 43-48.
- [13] Wang Y, Dean JL, Millar EK, et al. Cyclin D1b is aberrantly regulated in response to therapeutic challenge and promotes resistance to estrogen antagonists [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5628-5638.
- [14] Millar EK, Dean JL, McNeil CM, et al. Cyclin D1b protein expression in breast cancer is independent of cyclin D1a and associated with poor disease outcome [J]. *Oncogene*, 2009, 28(15): 1812-1820.
- [15] Hosokawa Y, Gadd M, Smith AP, et al. Cyclin D1 (PRAD1) alternative transcript b: full-length cDNA cloning and expression in breast cancers [J]. *Cancer Lett*, 1997, 113(1-2): 123-130.
- [16] Sawa H, Ohshima TA, Ukita H, et al. Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into the cell cycle in an inverse manner [J]. *Oncogene*, 1998, 16(13): 1701-1712.
- [17] Satinder K, Chander SR, Pushpinder K, et al. Cyclin D1 (G870A) polymorphism and risk of cervix cancer: a case control study in north Indian population [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 315(1-2): 151-157.
- [18] Yaylim-Eraltan I, Ergen AG, Rmüs U, et al. Breast cancer and cyclin D1 gene polymorphism in Turkish women [J].

In Vivo, 2009, 23(5):767-772.

- [19] Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, et al. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript[J]. *Oncogene*, 1995, 11(5):1005-1011.
- [20] Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, et al. Cyclin D1 polymorphism and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck; a case-control study[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(8):1195-1199.
- [21] Simpson DJ, Fryer AA, Grossman AB, et al. Cyclin D1 (CCND1) genotype is associated with tumour grade in sporadic pituitary adenomas[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(11):1801-1807.
- [22] Kong S, Amos CI, Luthra R, et al. Effects of cyclin D1 polymorphism on age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2):249-252.
- [23] Gedert H, Kiel S, Zotz RB, et al. Polymorphism of p16

INK4A and cyclin D1 in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(12):803-808.

- [24] Song JH, Kim CJ, Cho YG, et al. Association of cyclin D1 G870A polymorphism with susceptibility to gastric cancers in Korean male patients[J]. *Neoplasma*, 2007, 54(3):235-239.
- [25] Tahara T, Shibata T, Yamashita H, et al. Effect of cyclin D1(CCND1) polymorphism on gastric premalignant condition[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2008, 46(12):1696-1701.
- [26] 刘耀煌, 方向明, 彭威, 等. 细胞周期素 D1 基因多态性及幽门螺杆菌感染与胃癌易感性的关系[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2009, 30(3):369-371.

(收稿日期:2010-04-17)

S100B 在颅脑损伤中的研究进展

黄承乐 综述, 李廷阳 审校(广西壮族自治区百色市人民医院检验科 533000)

【关键词】 S100B; 颅脑损伤; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.19.057

中图分类号:R341;R651.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)19-2143-02

S100B 是 S100 蛋白家族成员之一,是一种主要存在于神经胶质细胞中的特异性蛋白。近年的研究提示,S100B 不仅与肿瘤、精神障碍、癫痫有关,而且与脑损伤有密切的关系。脑损伤是当前严重危及青壮年健康和生命的最主要问题,而临床上仍缺乏较简便快捷且可靠的客观评判方法。近年的研究^[1]表明,S100B 对脑损伤的诊疗评价具有一定的价值或前景,认为 S100B 能反映脑损伤的程度以及对预后进行评估。本文就 S100B 与脑损伤的研究进展综述如下。

1 S100B 分子结构和生物学特性

S100 蛋白由 Moore^[2]于 1965 年在牛脑组织中发现,因该蛋白在中性饱和硫酸铵中 100%溶解而得名。目前已经发现 S100 蛋白家族有 25 个成员^[3]。S100B 由两个亚单位组成,包含 S100 α 和 S100 β 两个亚型。两个亚型都主要位于神经胶质细胞胞质和胞核中,其中 S100 β 占绝大部分。S100B 两个单体形成一个 EF 手形,能够和钙结合,相对分子质量约 21×10^3 ,pH 值约 4.1,编码基因定位 21q22.3,距该染色体末端约 100~140 kb。S100B 通过肾脏代谢和排泄,生物半衰期为 198 min^[4]。S100B 由星形胶质细胞产生,对神经元、神经胶质、小胶质细胞产生自分泌和旁分泌作用,近年来也发现在其他部位的星形细胞、垂体滤泡星状细胞等也参与分泌 S100B。S100B 蛋白被认为是一种钙传感器蛋白,通过钙离子信号转导途径在细胞增殖、分化、肌肉收缩、基因表达及细胞凋亡中发挥重要作用。低浓度 S100B 具有神经营养作用,以促进神经的生长和修复。高浓度的 S100B 具有神经毒性,在体外通过 NO 依赖途径诱导神经元死亡,在钙离子的参与下可以调节依赖 p53 基因细胞的生长抑制和凋亡。

2 S100B 的检测方法

S100B 检测主要采用免疫学方法,常用方法有放射免疫测定法(IRMA),荧光免疫法(IFMA),酶联免疫吸附法

(ELISA),可检测脑脊液、血液、尿、羊水等。各种方法的特异性、敏感性各不相同,IFMA 和 ELISA 敏感性较强,可以检测出 0.002~10 $\mu\text{g/L}$ 的蛋白;IFMA 交叉反应最少,而 ELISA 受其他化合物干扰因素最少,目前最常用的是 ELISA。

3 S100B 的表达与脑损伤

3.1 对脑损伤的早期诊断价值 由于原发性颅脑损伤为急重症,脑损伤通常为不可逆损伤,患者常因延误诊断,处理不当,失去抢救时机。因此,颅脑损伤疾病的早期诊断显得尤为重要。S100B 可较早的反映颅脑损伤后不同的病理生理改变,早于影像学诊断^[5]。Gazzolo 等^[6]的研究证实,S100B 在缺血缺氧性脑病后脑室和/或脑内出血诊断中比一般的临床征象(如头颅 CT 和 TCD 治疗)提早 24 h,提示 S100B 在脑损伤中更有早期诊断意义。Hardmark 等^[7]研究发现,鼠脑损伤后脑脊液 S100B 在伤后 7.5 h 达到高峰。近年来的研究发现^[8-9],颅脑损伤早期(小于 6 h)血清 S100B 明显升高。

3.2 对脑损伤程度判断的诊断价值 血清 S100B 蛋白的浓度依赖以下几种因素^[10]:脑损伤的严重程度及范围,巨噬细胞和/或蛋白酶引起的降解,血脑屏障的破坏程度。S100B 蛋白分子正常情况下不能通过血脑屏障,但颅脑损伤后,脑组织的损伤导致脑细胞和血脑屏障的破坏,使血 S100B 迅速升高,如有继发性损伤,血脑屏障进一步破坏,胶质细胞破坏引起 S100B 蛋白外溢,其含量变化与临床症状、体征及影像学改变密切相关,为判断脑损伤严重程度的良好指标。越来越多的研究表明,轻型脑损伤后,S100B 迅速升高,然后随时间下降;而重型脑损伤后,S100B 迅速升高后,由于继发性损伤的发生,S100B 蛋白浓度不会下降,如果早期 S100B 峰值或继发性升高超过 2 $\mu\text{g/L}$,预示严重脑外伤有较高的死亡率,而 S100B 峰值超过 3.80 $\mu\text{g/L}$ 的患者生存率极少。焦炎等^[11]根据入院时的 GCS 评分,将颅脑损伤患者分为轻中型组(GCS ≥ 8 分)和重型