

汇聚一堂，只为探讨这一个基因和蛋白。我们现在都知道，p53蛋白是人体内主要抗癌蛋白，也是机体抵抗癌症的主要防线，但是我们当初对p53蛋白真实面目的了解过程却并非一帆风顺。在30年前第一次发现p53蛋白时，大家认为它不过只是一个新发现的蛋白而已，并没有人觉得它有多么了不起，值得花费多大的精力和时间去研究它。p53蛋白与其它“表里如一”的癌蛋白不同，其它癌蛋白被发现之后马上就会成为研究的热点，但p53蛋白被发现之后却并没有受到多么大的关注。p53蛋白成为“大腕”的道路是一条充满艰辛与曲折的坎坷之路，大家对它的看法几经改变，有时甚至是完全将以往的结论推倒重来。透过p53蛋白30年来的发展史我们又一次看到了知识是如何发展、积累起来的；又一次看到了在科学发展史中屡屡出现的偶然事件的重要作用；看到了随着时代的发展，新的科研方法和技术的突破给科研带来的巨大推动作用。这30年来的科研历程还告诉我们，对一个基因和蛋白的深入研究也能够带给我们巨大的回报。

1. 病毒、癌蛋白和p53蛋白

在上世纪70年代，大部分肿瘤研究工作者的注意力都集中在致癌病毒研究领域。尤其是在发现很多病毒携带癌蛋白之后，大家的研究热情变得更为高涨。当时最大的成就就是第一次发现了RNA致癌病毒。研究表明，病毒可以“绑架”宿主细胞的基因，然后通过病毒感染将这个基因带入其它的细胞当中，这样，这个基因就会在宿主细胞中过表达，有时这些基因还会发生修饰，最终就可能导致宿主细胞发生转化。与此同时，科学家通过研究这些能够在动物体内过表达某些基因并诱使肿瘤发生的逆转录病毒基因组中基因整合位点附近的基因发现了很多癌基因。

之后的15年里，我们发现了很多癌基因，也知道了这些癌基因就是导致动物患上肿瘤的罪魁祸首。因此，我们自然而然地联想到DNA病毒也会通过同样的方式（即从宿主细胞中“窃取”癌基因或者自己编码癌基因）致使人或动物患上肿瘤。随即很快就发现DNA致癌病毒也携带有癌基因，不过这些癌基因和RNA致癌病毒里携带的癌基因不同，它们并不是宿主细胞来源的癌基因。那么这些病毒癌基因又是如何转换宿主细胞，致使肿瘤发生的呢？有人提出，这些由病毒编码的病毒癌基因可以间接导致宿主细胞癌基因过表达，从而导致癌症发生。正是基于这种理论，p53蛋白才第一次被发现。

动物试验中发现，很多小DNA病毒，例如猿猴空泡病毒40（simian virus 40, SV40）等都能致使动物患上肿瘤，而这些病毒自身编码的蛋白数量都非常少。这些病毒蛋白能够被动物的机体免疫系统所识别，诱导产生抗体中和这些病毒蛋白。到上世纪70年代中期，使用这些针对病毒蛋白的抗体来开展研究已经成为了非常常见的“流行”方法了。人们可以利用这些抗体来检测并监测病毒蛋白在转换细胞中的表达情况。由于大家使用的是这种以抗原与抗体反应为基础的检测方法，因此也就会被检测的病毒蛋白称为病毒致癌抗原（viral tumour antigen）。后来通过遗传学分析发现，编码这些病毒致癌抗原的基因就是那些编码病毒癌蛋白，致使宿主细胞发生转化的基因。比如在SV40病毒中，我们就通过这种抗原与抗体反应发现了两种病毒癌蛋白，分别被称为大T抗原（large T-antigen）和小T抗原（small T-antigen）。

1979年，在大家都在研究SV40病毒的癌蛋白时，好几个科研小组都无意中分别独立发现了p53蛋白。当时在英国皇家癌症研究基金（Imperial Cancer Research Fund），现名为伦敦癌症研究所（London Research Institute）工作的David Lane和Lionel Crawford发现，用感染了SV40病毒的动物血清与SV40大T抗原发生免疫沉淀反应时能共沉淀下来一个分子量约为53kDa的宿主细胞蛋白。进一步分析表明，这个宿主蛋白能够与SV40大T抗原形成复合物。因此我们得出结论，一直被认为具有宿主细胞转化作用，能够促使宿主形成肿瘤的SV40大T抗原，是通过一种直接的、特异性的相互作用“选择”了这个我们迄今为止仍然没能完全了解清楚的宿主细胞蛋白一起共同发挥作用的。与此同时，美国普林斯顿大学（Princeton University）的Daniel Linzer和Arnold Levine也使用类似的免疫方法得到了和David等人同样的结论。另外三个科研小组也都在1979年同时发表文章报道了同样的结论，他们分别是法国的Pierre May科研小组、美国纽约的Robert Carroll科研小组和英国的Alan Smith科研小组。

有意思的是，Linzer 和 Levine还发现用感染了SV40病毒的动物血清也能从畸胎瘤（teratocarcinoma）细胞中沉淀得到同样分子量为53 kDa的蛋白质，但是这些细胞并没有被SV40病毒感染。这说明这种动物血清中可能有一类抗体能够直接与这种分子量为53 kDa的蛋白质发生相互作用。Lloyd Old等人也发现，使用不是由病毒感染产生的转化细胞免疫动物后得到的血清，同样能够与这种分子量为53 kDa的蛋白质发生免疫反应。这些实验证据都表明，这种分子量为53 kDa的蛋白质就是一种细胞来源的肿瘤抗原。此外，在戴维·巴尔的摩实验室（laboratory of David Baltimore，戴维·巴尔的摩是美国生物学的领袖人物，上世纪70年代，巴尔的摩因发现肿瘤病毒与细胞遗传物质的相互作用，用新的分子生物学理论说明了肿瘤和艾滋病病毒破坏正常细胞的过程，这使他在1975年获得诺贝尔生理和医学奖，获奖时年仅37岁）工作的Varda Rotter也发现了这种分子量为53 kDa的蛋白质，他发现在感染了爱柏森鼠类白血病病毒（Abelson murine leukaemia virus）这种逆转录病毒后形成的转化细胞中，这种蛋白质的表达量大为增加。随后又发现在感染了SV40病毒的肿瘤细胞以及其它一些肿瘤细胞中这种分子量为53 kDa的蛋白质的表达量都明显增高，但是在非转化细胞中它们的表达量却很低，甚至不表达。

和其它很多同时被多个实验室发现的蛋白质一样，每个实验室也分别给这种分子量为53 kDa的蛋白质取了各自的名字，并且使用这些名字发表了很多论文，这样就造成极大的混乱。1983年在英国牛津举办的第一届国际p53蛋白研讨会上，来自各国的代表专门就这个蛋白的命名进行了讨论。经过一番激烈争论之后，大家一致认为，p53这个名字最为合适，自此被保留下来一直沿用至今（详见背景知识1）。

其实p53这个名字根本就不是一个名字，只是因为这个蛋白在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳试验中表现出的分子量大约为53 kDa才因此而得名。后来大家才发现，这个表现分子量其实也只是一个大致的估计，因为该蛋白富含脯氨酸，所以在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳试验中的迁移率偏慢，表现出来的分子量要比它实际的分子量大。该蛋白的实际分子量只有43.7 kDa，而小鼠体内p53蛋白的分子量会更小。但是谁又能够更改得了这个被大家使用已久的名字呢？



背景知识1：第一届国际p53蛋白研讨会

1983年5月7日至5月10日，在英国玛丽居里研究院（Marie Curie Research Institute）举办了第一届国际p53蛋白研讨会。整个会议议程并没有安排任何演讲报告，大家关注的最大热点就是第一次发表的鼠p53基因cDNA序列和有关人p53基因克隆工作的报告。下表中列举了与会代表，这些人几乎都是当年参与研究p53蛋白的科研工作者，不过有些重量级人物并没有列出，比如David Lane。本表资料由Varda Rotter提供。

与会代表名称	所属单位
Ettore Appella博士	美国国立健康研究院国家癌症研究所
Albert DeLeo博士	美国斯隆凯德琳研究所
Peter Mora博士	美国国立健康研究院国家癌症研究所
Renato Baserga教授	美国坦普尔大学
Ed Mercer博士	美国坦普尔大学
Ed Harlow博士	美国冷泉港实验室
Arnold Levine博士	美国纽约州立大学石溪分校
Nancy reich博士	美国纽约州立大学石溪分校
Walter Fiers教授	比利时
Frans van roy博士	比利时
Pierre May博士	法国巴黎犹太城
Krish chandrasekeran博士	法国巴黎犹太城
Lars sternas博士	瑞典卡罗林斯卡学院
Jo Milner博士	英国剑桥Addenbrookes医院
Moshe Oren博士	以色列魏兹曼研究所
Varda Rotter博士	以色列魏兹曼研究所
Peter Chumakov博士	俄罗斯莫斯科
John Jenkins博士	英国玛丽居里研究院
Lionel V. Crawford博士	英国皇家癌症研究基金会
Sam Benchimol博士	英国皇家癌症研究基金会
Peter rigby博士	英国皇家癌症研究基金会

2.最初的观点：p53基因是一个癌基因吗？

正如前文所述，1979年时大家普遍认为逆转录病毒可以通过“劫持”细胞癌基因并使它们在感染细胞中以过表达的方式来促使感染细胞癌变。在这种理论背景之下，科研工作者观察到SV40病毒能促使被感染细胞大量表达p53蛋白。鉴于此，大家当然会认为p53基因是一个癌基因。但值得注意的是，有人发现有一种SV40病毒的温度敏感突变株的大T抗原能够以温度依赖的方式调控p53蛋白的表达水平，即在有T抗原时p53蛋白表达增多，没有T抗原时p53蛋白表达降低，这说明p53蛋白的含量与细胞转化之间具有正相关关系。这些现象都表明p53蛋白是

一种癌蛋白。还有一些实验结论也支持这个观点。比如，Levine实验室的Peter Sarnow就发现了由一种小DNA病毒——腺病毒编码的分子量为55 kDa的肿瘤抗原E1B，也能与p53蛋白相结合并促使胞内p53蛋白大量积聚。另外，Rotter还发现很多肿瘤细胞内都会大量表达p53蛋白，但是在正常组织细胞中却观察不到这种现象。这些实验结果都支持了DeLeo等人的实验结果，即p53蛋白只会在转化细胞而不是非转化细胞中大量表达。

基于此结论，大家都开始将研究重点放在了研究p53蛋白的致癌作用方面。要进行这方面的研究首先必须获得p53基因，接着才能进行后续的体内、体外实验。于是，世界各地展开了一场p53基因克隆竞赛。当时世界上好几个实验室几乎同时都参加了这场竞赛。在上世纪80年代初，基因克隆技术还不像今天这么成熟，因此克隆一个基因也并非易事。实际上，在当时进行基因克隆操作是一项非常麻烦、极易出错的实验工作，需要花费很多时间、精力和智慧，还需要一些运气才能获得成功。不过最终有好几个实验室都取得了成功。随后又有人获得了小鼠和人p53基因的cDNA和基因组克隆。值得一提的是，当时基因克隆技术的成功率非常低，有人为此专门设计了一些方法来筛选p53蛋白表达量高的细胞。这些细胞中编码p53蛋白的mRNA分子含量比较高，有利于获得p53基因的克隆。由于p53蛋白在肿瘤细胞中的含量非常丰富，因此大家自然而然就会想到利用肿瘤细胞而不是正常组织的RNA来进行克隆操作，当然也有人成功了。这就决定了p53蛋白研究历程中最初10年的研究方向和结论。直到几年之后，大家才充分意识到这一点。

利用实验得到的p53克隆，科研工作者在各种实验中对p53蛋白过表达会促使细胞癌变这样一个观点进行了验证。当然结论令大家非常满意。John Jenkins实验室、Moshe Oren实验室、Rotter和Robert Weinberg实验室等都陆续发现p53基因和一些已经证明的癌基因，比如HRAS基因等转染细胞能够有效地转化体外培养的原代细胞。如果过表达p53蛋白会促使这些细胞永生化。在这些试验中，p53蛋白的作用就和MYC癌蛋白的作用一样。研究还发现，克隆的p53蛋白能增强现有细胞系的转化能力，相比p53-null细胞，转染了p53基因的细胞系在体内试验中表现出了更强的致癌性。总而言之，在上世纪80年代中期以前，大家普遍认为p53基因是一种癌基因，只是不清楚它的作用机制和各种功能。

3. 重新认识p53基因：p53基因是抑癌基因

数年之后，人们才对p53基因有了新的认识。大家发现p53基因其实并非癌基因。恰恰相反，它是抑癌基因。实际上，早就有各种线索显示p53基因可能是抑癌基因。回顾往事，第一条线索是由David Wolf和Rotter在1984年发现的。当时他们发现编码小鼠p53蛋白的Trp53基因如果借助逆转录病毒插入经爱伯森鼠类白血病病毒感染而转化的细胞系之后会失活。Sam Benchimol和Alan Bernstein等人在研究由弗里德红白血病病毒（Friend erythroleukaemia virus）诱发的小鼠白血病时也都观察到了类似的现象。另外，Rotter等人还发现Trp53基因重排的现象非常普遍，而且还发现在人白血病细胞系HL60细胞中Trp53基因的编码序列实际上是缺失的，因此HL60细胞根本无法表达p53蛋白。以上这些实验结果表明，缺失p53蛋白与癌症有关，

意即p53蛋白应该是阻止癌症发生的。不过，在当时并没有得出这种结论。当时有大量明白无误的证据确凿表明p53蛋白是一种癌蛋白，所以大家都认为上述实验结果可能只是一些例外而已。当大多数人都持某一种观点时，哪怕有证据能够反驳这种观点，大家都会很容易无视这些证据的存在。

不过，当Levine实验室的Cathy Finlay 和Phil Hinds得到了另一个p53 cDNA克隆结果时，大家再也无法无视反对的意见了。这是因为Cathy他们得到的克隆居然无法像早先试验中得到的克隆（比如Oren实验室得到的克隆）那样成功地转化细胞。于是，Cathy等人将多种p53基因的克隆序列进行了比对。结果他们惊奇地发现，竟然没有两个克隆的序列是一致的。这说明以前使用的p53克隆即使不是全部，但至少有一部分克隆肯定是突变基因克隆。在与来自小鼠正常组织的野生型Trp53基因序列进行比对后更加验证了上述结论的正确性。现在人们明白到，利用鼠来源的肿瘤细胞系获得的p53基因克隆通常都是发生了突变的克隆，也只有这些突变的克隆才能在试验中表现出细胞转化活性。于是，大家开始意识到肿瘤细胞来源的p53基因突变体能够促使细胞发生转化，而野生型的p53基因则不具备这项功能。

那么，野生型p53基因与肿瘤之间又存在一种什么样的关系呢？经过对人体肿瘤组织样品DNA的深入研究以及各种体外功能性实验的研究，我们最终揭开了p53基因的真实面目。Bert Vogelstein等人研究发现，在人体结肠癌肿瘤细胞中，野生型的Trp53等位基因经常会因为发生突变或缺失而失活，也就是说肿瘤细胞里根本就无法表达正常的野生型p53蛋白，这也就意味着p53基因很有可能就是一个抑癌基因。与此同时，Levine和Oren也分别各自对p53基因展开了功能学研究。实验结果非常出人意料，与以往表达肿瘤细胞来源的p53基因结果不同，在细胞内过表达野生型的p53基因不仅不能使细胞转化，反而能够有效地抑制MYC基因和HRAS基因等这些癌基因对细胞施加的转化作用。综合早前观察到的小鼠肿瘤细胞和人体肿瘤细胞中p53蛋白缺失的现象，加之后来发现的因为p53基因有突变所导致的李弗劳明综合征以及Trp53基因敲除小鼠的表现等证据，大家一致认为p53基因一定是一个如假包换的抑癌基因。

后来没过多久人们就发现，TP53基因突变的现象不仅在结肠癌中非常常见，在其它各种人体常见肿瘤细胞中也是屡见不鲜。至少在某些种类的肿瘤细胞中TP53基因突变发生得比较晚，这可能意味着TP53基因突变与肿瘤的扩散有关。有人综合了数千项有关TP53基因的研究数据，结果发现TP53基因突变现象与我们目前已知的过半肿瘤都有关联。TP53基因毫无争议地成为人体肿瘤研究领域里关注度最高的一个基因，它也是人体肿瘤细胞中发生突变最频繁的一个基因。有关p53基因的专门数据库也已经建立，比如国际癌症研究会的TP53基因突变数据库（International Agency for Cancer Research TP53 Mutation Database）、TP53基因网站（TP53 Website）以及p53基因数据库（p53 Knowledgebase）等。这些数据库还是世界上第一个只为一个基因建立的数据库，它们的数据规模都非常大，一经建立就迅速成为p53基因研究领域和其它癌症研究领域里的重要资源。值得一提的是，在发现了野生型p53基因是抑癌基因以及它们在肿瘤细胞中经常表现为突变型这一真实情况之后，以前那些支持p53基因是癌基因的实验结果仍然可以得到圆满的解释。因为过去能得到这些“错误的”实验数据都是因为使用了来源于肿瘤细胞的“错误的”（突变的）TP53基因或TP53基因。这些突变体的确具有促癌作用，这可能是因为内源性的野生型p53基因

显性负相失活或者是突变细胞真的获得了致癌活性。也就是说，野生型的P53基因的确是抑癌基因，突变型的p53基因的确是“癌基因”。

对于抑癌基因来说还必须符合两条标准，即携带有该基因突变型基因的人类个体应该表现出较高的癌变倾向；在动物实验中如果动物缺失该基因，也应该表现出较高的癌变倾向。不出所料，p53基因完全符合上述两条标准。实际上，p53基因突变就是李弗劳明综合征的致病原因。另外，最早由Donehower等人于1992年构建的Trp53基因敲除小鼠也极易患上肿瘤（主要是淋巴瘤）。

对p53基因的重新认识促使我们认真思考DNA致癌病毒的病毒癌基因是如何发挥致癌作用的。研究发现，SV40 T抗原和各种不同血清型腺病毒的E1A蛋白能够与视网膜母细胞瘤蛋白RB蛋白相结合，激活E2f转录因子，促使细胞进入S期。小DNA致癌病毒通过这种方式能够获取它们自身复制所需要的各种酶和底物。不过，细胞通过这种不寻常的方式进入S期会被p53蛋白检测到，随即p53蛋白会诱导细胞凋亡，以阻止病毒复制。但是病毒也不会束手待毙，它们会通过大T抗原或E1B蛋白等病毒蛋白与p53蛋白相结合的方式抑制p53蛋白的抑癌作用。这种情况就和人体肿瘤细胞中的p53基因发生突变时一样。因此，病毒转化细胞中失活的p53蛋白大量积聚。重要的是，还有一些DNA致癌病毒，比如包括有能诱发宫颈癌的HPV16和HPV18病毒的人乳头瘤病毒属（human papillomaviruses）病毒也能表达两种病毒蛋白——E7和E6。E7蛋白能与RB蛋白相结合，激活E2f信号通路；E6蛋白能和p53蛋白相结合，促进其降解、失活。此处，还需要提及的是HPV E6蛋白帮助我们发现了p53蛋白的泛素化降解调节途径。

在20世纪最后10年的头几年里，p53基因成为了最受瞩目的抑癌基因，也成为了全球研究的焦点，这股热潮一直延续至今。

4. p53基因是如何发挥作用的？

认识到p53蛋白在DNA致癌病毒生活周期和人体肿瘤细胞周期中所发挥的重要作用之后，大家开始对p53蛋白的作用机制展开了研究。

对p53蛋白作用机制的研究分为两部分

弄清楚p53蛋白抑制肿瘤形成的生理学过程

弄清楚这个过程背后的分子学机制。

4.1 p53蛋白的生物学活性

我们是在已转化细胞里重建了p53蛋白的正常功能之后，才对p53蛋白的生物学活性有了真正的了解。由于20世纪80年代末90年代初基因操作技术的发展突飞猛进，我们才建立了多种方法可以在细胞内重建p53蛋白的功能。其中有一个应用非常广泛的系统就是p53基因温度敏感突变体。这个突变体是在一次试验中由于培养箱的温度设置错误而偶然获得的。在培养温度为32℃

时，该突变体具有野生型p53基因的活性，但是当培养温度上升至37℃及以上时，它就会失活。利用该突变体大家发现，重建野生型p53基因的活性之后能够使细胞生长停滞，既可以停滞在G1期，也可以停滞在G2/M期。利用其它一些方法也可以得到类似的结论。值得注意的是，在其它一些已转化细胞，比如M1白血病细胞里，重建p53基因的活性后会得到比较惊人的不同结果——几天之内所有细胞全部死亡。经过进一步的观察，人们发现所有细胞都表现出凋亡的典型特征。该研究结果与Shaw等人获得的类似研究结果一起表明，p53蛋白也是介导细胞凋亡的一个重要因子，同时也表明，p53蛋白可能是通过介导细胞凋亡来发挥抑癌作用的。最近，人们又发现p53蛋白可以诱导细胞老化，这已经成为它发挥抑癌作用的一大主要机制。不过无论如何，诱导细胞凋亡还是衰老最终都是阻止细胞恶变。综上所述，不论p53蛋白发挥何种作用，它都能阻止正常细胞演变成肿瘤细胞。

4.2 p53蛋白作用的分子机制

对于p53蛋白的生理作用我们已经研究得很多了，也积累了不少的资料，对此不再赘述。p53蛋白作为一个蛋白的最突出特点就是它是一个转录因子。好些研究都发现p53蛋白含有一个反式激活结构域（transactivation domain，但我们现在知道其实是两个反式激活结构域），p53蛋白可以通过这些结构域与某一段特定的DNA序列紧密结合。是否具有这种直接与DNA结合并激活临近基因转录的特点是野生型p53蛋白和其它具有“致癌”作用的突变型蛋白之间的差别。

上述这些研究第一次发现了p53蛋白保守的结合序列，这样我们就能籍此对全基因组进行探索，找出所有p53蛋白的潜在结合位点。这些实验证据表明，p53蛋白是一个序列特异性的转录因子。

我们发现了很多p53蛋白的靶基因。p53蛋白通过与这些基因内部或上游的p53反应元件相结合的方式反式激活这些基因的转录。这些靶基因中有很多都与细胞凋亡或细胞周期调控过程有关，比如编码细胞周期依赖性蛋白激酶抑制蛋白的p21基因和凋亡前体蛋白BAX的编码基因等。因此也就能解释为什么p53基因活化后能够促进细胞死亡或生长停滞。还值得一提的是，世界上第一个用来检验能受到某些可诱导的特定（比如DNA损伤事件）转录因子调控的基因表达情况的芯片就是使用p53蛋白来作为检测靶标的。我们现在仍然在继续开展研究，期望弄清楚p53蛋白面对众多刺激信号是如何做出反应的。同时也在继续寻找其它的p53靶基因，这些靶基因中有很多都是细胞特异性或者是阶段特异性的。最近，人们又发现microRNA也是受到p53调控的底物之一，其中最重要的就是miR-34家族成员。由此看来，这份p53调控靶点的名单似乎永远也写不完。与此同时，研究还发现p53蛋白也能起到抑制转录的作用。p53蛋白可以通过多种不同的作用方式来达到抑制基因转录的目的，不过几乎没有通过直接与DNA相结合这种方式来发挥抑制作用的。p53蛋白能够同时调控数百个基因的转录活性足以说明它为什么能对细胞产生如此巨大的影响作用。

后来又发现p53蛋白也能起到转录因子之外的作用。这些非转录因子的作用也是多种多样的，不仅有胞内的作用，也有胞质中的作用。这些非转录因子作用中最值得一提的就是p53蛋白能够与胞质中的Bcl2家族蛋白发生相互作用，从而介导凋亡途径，使得线粒体外膜通透性增高，释放出细胞色素C，使细胞发生凋亡。不过，这些非转录因子的作用不是本文介绍的重点。

4.3 p53-MDM2环路

要研究某个蛋白的生化活性有一种最为常用的方法，那就是寻找能够与该蛋白发生相互作用的其它蛋白。这个方法在p53蛋白的研究当中被应用得最为广泛，也找到了非常多的能够与p53蛋白发生相互作用的其它蛋白。p53蛋白也是第一个被用于酵母双杂交筛查实验的哺乳动物蛋白。经过酵母双杂交实验也发现了两个新的能够与p53蛋白发生相互作用的蛋白——53BP1和53BP2，不过我们至今还不清楚它们的功能。

迄今为止，在众多p53蛋白的“伴侣”蛋白中最为著名，也最为重要的蛋白就是在1992年发现的MDM2蛋白。研究发现，MDM2蛋白能够与p53蛋白紧密结合，并抑制其生物学活性。从那以后，MDM2蛋白（人体的MDM2蛋白也被称为HDM2蛋白）就被认为可能是最重要的p53蛋白调控因子，并且是最有效的p53蛋白的“把关人”。MDM2蛋白可以通过多种方式抑制p53蛋白的作用。比如，它可以与p53蛋白的反式激活结构域相结合并抑制其活性。另外，MDM2蛋白还能起到E3泛素连接酶的作用，特异性地催化p53蛋白经泛素化途径降解。

后来的研究又发现MDM2基因居然是受p53蛋白调控的靶基因。p53蛋白和MDM2蛋白之间形成了一个负反馈环路。p53蛋白诱导MDM2蛋白表达，然后MDM2蛋白促进p53蛋白降解，从而限制胞内p53蛋白活性。经过多年的深入研究，我们了解到在非应激细胞中，p53蛋白的活性一直维持在一个较低的基础水平。这主要得益于p53-MDM2负反馈环路的作用。不过，在细胞受到各种应激信号的刺激时，p53蛋白就会迅速被激活。最早发现p53蛋白的这种可诱导特性的是Warren Maltzman，他发现细胞经紫外线照射后，胞内p53蛋白的含量会升高。随后，Michael Kastan得到的实验结果也进一步证实了Warren的结论。在这些实验数据的支持下，p53蛋白当之无愧地被誉为“细胞基因组的卫兵”。后来的研究也进一步证实了这个观点。p53蛋白具有的这种能够被应激信号所激活的开关是p53蛋白发挥各种抑癌作用的关键（图1）。MDM2蛋白就是控制这个开关的主要调控因子，MDM2蛋白能够保证p53蛋白不会被错误激活。当细胞面临各种致癌刺激信号时，MDM2蛋白的含量就会减少，抑制作用就会被取消，p53蛋白就会被活化（图1）。Chuck Sherr等人的研究结果就支持了上述观点。他们发现ARF这种抑癌因子主要就是通过与MDM2蛋白相结合，从而“解放”p53蛋白，使p53蛋白发挥抑癌作用。

1996年，MDM2蛋白家族又“诞生了”一名新成员——MDMX，又名MDM4。MDMX蛋白与MDM2蛋白一样，也能与p53蛋白的N末端相结合，并抑制其活性。虽然没有发现MDMX蛋白具备E3连接酶活性，但是它也能够促进p53蛋白的降解。MDM2蛋白与MDMX蛋白形成二聚体之后能够增强其E3连接酶的活性。而且在小鼠试验中还发现，如果抑制MDM2蛋白或者MDMX蛋白的活性就会促使胚胎在较早时期夭折，这主要就是因为p53蛋白的活性没有受到约束。但是，如果同时敲除掉p53基因，那么胚胎就不会夭折了，这说明MDM2蛋白和MDMX蛋白都是p53蛋白的重要调控因子。根据上述结论我们不难看出这样的推

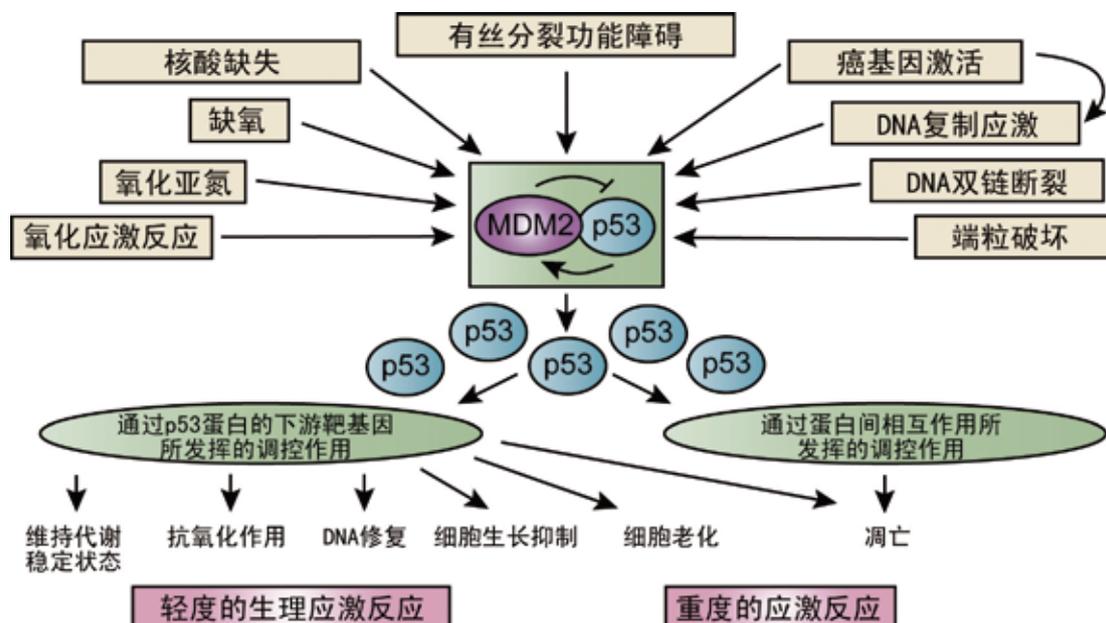


图1 p53信号通路简略图。p53-MDM2反馈环路是整个p53蛋白信号通路的中心。在正常条件下，细胞内p53蛋白的含量和活性会长期维持在一个较低的水平。在图中所示的各种具有致癌作用的应激反应（图中只是列举了一部分应激事件）发生时，p53-MDM2反馈环路被扰动，p53蛋白含量上升，活性增强，促使细胞发生多种表型改变。众多能够激活p53蛋白的信号彼此之间相互联系，彼此交叉。比如图中列举的癌基因信号之所以能够激活p53蛋白途径，部分是因为它能够诱发DNA复制应激反应。p53蛋白能够发挥多种下游作用主要是因为它能够反式激活或者抑制多个靶基因，但是至少在凋亡途径方面来说，蛋白间的相互作用途径（此处主要是p53蛋白与Bcl2家族蛋白间的相互作用）也起到了重要作用。不过通常都认为，p53蛋白活化后之所以能够产生各种表型改变，其本质至少部分是对各种活化信号的特性、幅度和持续时间的适应。严重的应激刺激会导致更加严重，通常是不可逆的反应，比如细胞凋亡和衰老。而较轻度的应激反应可能只是导致细胞暂时生长停滞，随后细胞对应激刺激做出相应的反应，修复相关细胞损伤。最近的研究证据表明p53蛋白还具有一项重要功能，就是能够调节细胞的代谢途径，使细胞能够适应正常情况下的轻度生理波动现象，比如血糖水平波动和其它营养素的波动，以及氧气供应和活性氧簇的水平波动等等。

论：如果过量表达MDMX蛋白那么就会导致癌症发生，就好像过量表达MDM2蛋白一样。后来的研究又发现了一个MDM2基因SNP位点，这更进一步突出了MDM2-p53环路的临床意义。因为携带某一种MDM2等位基因的个体会表达大量的MDM2蛋白，因而更易较早地罹患癌症。这也说明p53蛋白活性哪怕只是发生了一点点的改变也足以改变一个人罹患肿瘤的风险。虽然有大量的独立研究表明，这个SNP位点与癌症有着明显的关联，但同时也有一些实验结果不支持这个观点，尤其是有关乳腺癌的研究结果。这可能是由于这个SNP位点能够与绝经前妇女的雌激素受体（ER）共同发挥作用，因此无法利用关联分析将雌激素阳性患者和雌激素阴性患者区分开来，也就无法真正评价SNP对乳腺癌的作用。

MDM2-p53负反馈环路自然而然也成为了众多系统生物学家和计算机生物学家关注的热点。该环路已经成为研究信号通路内调控途径的经典模型。在实用研究领域该环路也是众多大有希望的抗癌药物的作用靶点。自从该环路被发现之后，我们又发现了其它许多有p53蛋白参与的反馈调控环路，而且这些调控途径的数量还在不断增加，这进一步说明p53蛋白拥有一个网络化的调控系统。

4.4 p53与癌症治疗

p53蛋白在人体肿瘤当中所具有的重要作用，理所当然地使它成为了癌症治疗研究当中大家共同关注的靶点。因此这么多年针对p53开展了无数的研究也就不足为奇了。不论是医药企业还是科研界都开发出了众多以p53为基础的抗癌药物和疗法。不过要想获得成功也绝非易事，p53蛋白既不是细胞表面蛋白也不是典型意义上的酶蛋白，因为我们无法针对p53蛋白开发近来非常流行，疗效也非常好的抗体类药物和小分子量的酶抑制剂类药物，只能另谋良策。

4.4.1 p53基因疗法.....

大家最初都主要将注意力放到了各种各样的基因疗法上，其中最直接的方法就是将p53基因导入癌症患者体内。实际上，世界各地有好多机构都曾经开展过这方面的研究，其中美国Introgen Therapeutics公司曾经在1996年得到过非常好的临床实验结果。

虽然这类实验开展得最早，但是它们获得最终成功并进入临床却来得非常晚。直到2004年，使用腺病毒载体治疗头颈部肿瘤的p53基因疗法才在中国获得批准，这也是迄今为止第一个获批的能够常规用于人体临床治疗的基因治疗方法。但是我们仍然需要时间对这种疗法做出最终的抉择。与此同时，众多的患者和科学家也都在热切期盼Introgen Therapeutics公司开发的新型腺病毒p53基因治疗产品Advexin的III期临床实验结果。

美国Onyx公司的McCormick等人也开发出了一种基因治疗方法，不过他们使用的仍然是重组腺病毒。不同的是，他们不是往细胞内转染TP53基因，而是使用了一种缺失了E1B蛋白（E1B蛋白能够与p53蛋白结合并使其失活，同时自身得以复制）的重组病毒。因此这种新型的溶瘤病毒被注入患者体内之后，能够在缺乏正常p53蛋白的肿瘤细胞内复制，杀灭肿瘤细胞。但是，由于这种溶瘤病毒缺失E1B蛋白，所以不会对正常细胞产生伤害。虽然该产品在临床实验中的结果非常好，但是要获批进入临床治疗还需要进一步评估。与此同时，另一种作用机制类似的相关溶瘤病毒也已经在中国获得了批准，可以用于癌症治疗。只有今后的临床实践才能告诉我们这种p53基因疗法是否真的能产生我们预期的抗癌疗效。

4.4.2 重建p53蛋白的活性.....

还有一种完全不同的方法就是开发出一种能够在肿瘤细胞内重建p53蛋白功能的小分子量复合物类药物。其中有一种策略就是开发出一种小分子物质，通过它可以与肿瘤细胞内突变的p53蛋白发生相互作用，促使该突变蛋白改变构象，恢复其正常功能。该类药物的代表——PRIMA1的临床实验结果将在近几年之内得到。这类药物可以用于携带有p53突变基因的患者，从理论上来说，这类患者的数量在所有肿瘤患者当中占到了50%。

第二种方法就是针对剩下的那一半患者了。这一部分患者并没有发生p53基因突变。目前已经开发出了能够破坏MDM2-p53间相互作用的药物，这样就能释放出p53蛋白，恢复其活性。其中最为成功的结果是美国Hoffmann-La Roche公司的研究团队获得的。随后，就诞生了大名鼎鼎的Nutlin。Nutlin能够与MDM2蛋白的p53结合结构域发生相互作用，有效促使p53蛋白与

MDM2蛋白解离。它在动物实验中能够有效缩小肿瘤体积。与Nutlin法互补的方法就是小分子抑制剂RITA，即激活p53蛋白诱导肿瘤细胞凋亡（RITA）的小分子抑制剂。与Nutlin不同，RITA能够与p53蛋白相结合，抑制p53蛋白与MDM2蛋白间的相互作用。RITA的效果肯定很好，因为它对肿瘤细胞具有非常强的促凋亡杀灭作用，这一点比Nutlin更好。不过，我们现在还无法判断Nutlins和RITA或者最近才出现的针对p53蛋白与MDMX蛋白间相互作用的药物中究竟谁能够最终走向临床。尽管目前还不能应用于临床治疗，但是这些药物都已经成为了非常常用的研究手段，它们已经是研究工作中最常用的p53蛋白激活剂，而且是一种非常“干净”（特异性）的激动剂，它们不会给细胞造成非常广泛的应激刺激。这些药物最适用于大量表达MDM2蛋白的肿瘤患者。还有一些其它的化合物能够促进MDM2蛋白的降解，或者抑制MDM2蛋白的作用。我们相信，很快就会有新的基于p53蛋白的药物出现。

4.4.3 预后

我们发现p53蛋白在很多临床上常规使用的化疗药物——DNA损伤剂引发的细胞杀伤作用中起到关键作用这一现象之后，就想到是否可以利用TP53基因是否发生突变来判断药物的治疗效果以及患者的预后情况。不过，我们的这一设想还没有变成现实，这也反映了基因的复杂本质和每位肿瘤患者个体的多样性情况。同时，还因为TP53基因没有发生突变时，p53信号通路也经常失活。但是的确有报道表明TP53基因的状态能够预测患者的预后。如果我们能够对各类肿瘤进行更好、更细致的分类，对各种患者也能进行更细致的分类，那么TP53基因一定会在癌症患者预后判断工作中发挥更加重要的作用。

5. 前景展望

再过10年，p53蛋白能给我们带来些什么呢？当然我们肯定需要弄清楚各种p53蛋白亚型在器官和个体发育中的作用。我们现在已经有了一点头绪，那就是p53蛋白、p63蛋白和p73蛋白（详见背景知识2）之间的比例关系，它们之间的作用是彼此拮抗的，有的是转录促进因子，有的又是转录抑制因子，但是它们对于细胞功能来说都是必不可少的。当然还有一些其它的线索帮助我们深入研究，比如p53蛋白单体或者二聚体能够和p63蛋白或p73蛋白一起形成异源四聚体（heterotetramers）。这三种转录因子结合在一起或许能够产生一种新的作用，使得p53蛋白的功能更加复杂多样。

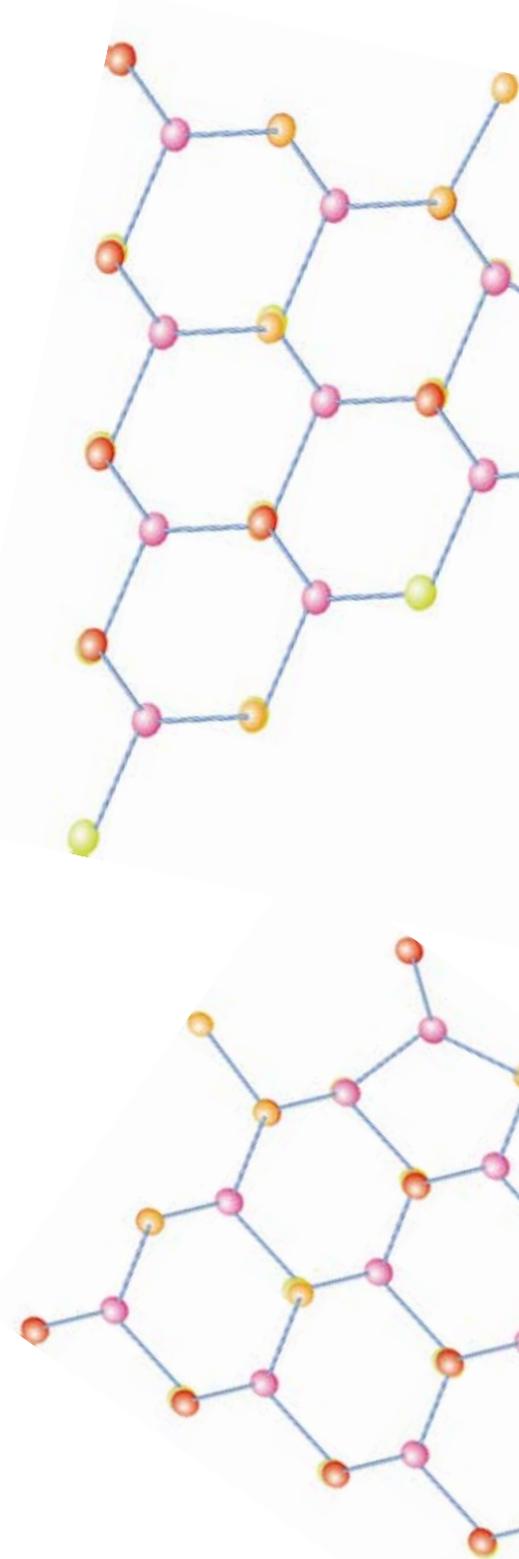


更为复杂的是，p53蛋白（包括各种亚型蛋白）还能发生多种翻译后修饰，比如磷酸化、乙酰化、甲基化、泛素化、苏素化、类泛素化以及N乙酰葡萄糖胺（N-acetyl glucosamine）等。在细胞面临各种应激刺激信号或者发生某些生理改变时，p53蛋白会发生各种相应的翻译后修饰，因此我们认为这些翻译后的修饰机制对于p53蛋白的功能也具有非常重要的作用，但是目前还缺乏实验依据。比如，WIP1磷酸酶（又名PPM1D）是一种癌蛋白，它在多种肿瘤细胞中都会大量表达，它在p53蛋白上游发挥作用，能够使共价失调性毛细血管扩张症突变激酶（ATM）失活，阻止MEK对p53蛋白的磷酸化修饰作用，这样就能使胞内野生型p53蛋白失活，因此也说明了这些翻译后修饰机制的重要意义。也许在这个10年里我们有希望看到WIP1蛋白抑制剂的临床实验结果。

虽然体外培养细胞的实验结果表明这些翻译后修饰机制具有非常重要的作用，但是对Trp53突变基因敲入小鼠进行研究的结果似乎又不能支持上述观点。究竟这些翻译后修饰机制起何种作用，这将是我们在这一10年里研究的一大重点。

对于果蝇、线形动物、斑马鱼、小鼠乃至人体发育的研究将有望解决上述翻译后修饰的问题，也有可能阐明p53蛋白各个亚型的功能。已经有研究表明p53蛋白、p63蛋白和p73蛋白在女性生育系统发育、女性生殖细胞基因组稳定性维持方面具有重要作用。因此我们有信心，在下一个10年里我们一定能够弄清楚p53家族的作用。p53家族的这种性别差异作用（Sexual dimorphism，即只对女性有作用，对男性没有作用）可能部分是因为p53蛋白的靶基因，比如MDM2基因、LIF基因、WIP1基因等同时也受到雌激素和雌激素受体的调控作用。在各种应激刺激下，各种受雄性激素调控的基因以及其它核受体和配体可能也在p53信号通路中发挥了作用。

在这个10年里，我们还将对p53蛋白在代谢、生殖、生育、生殖细胞基因组失稳、肿瘤、生物寿命等众多领域里的作用进行更深入的研究。同时也将利用TP53基因的突变情况来判断患者的预后情况，开发新的治疗药物，以及选择合适的治疗方案等。除了肿瘤之外，p53蛋白可能还在一些其它的疾病当中发挥了重要作用。一定会有更多更大的惊喜在等着我们。如果说这头30年里我们有什么收获的话，那就是通过我们的努力，使得本来无法想到甚至猜到的理论、机制能够有望在下一个十年里阐明。我们今天所认同的一些观点在将来一定会得到一些修正。我们已经研究了30年的这个基因到了2019年一定会告诉我们更多东西，但同时肯定会带给我们更多问题，让我们更加困惑。



背景知识2: p53蛋白大家族

在相当长的一段时间里，大家都认为p53蛋白没有其它“亲戚”。直到发现了p53家族另外两位成员——p63蛋白和p73蛋白后，大家才意识到以前的看法是错误的。p63蛋白和p73蛋白在机体发育，比如皮肤发育、神经系统发育以及女性生殖系统发育过程中都起到了非常重要的作用，在某些情况下也能起到抑癌蛋白的作用。有意思的是，p53蛋白、p63蛋白和p73蛋白都含有一个非常相似的DNA结合结构域，都能与同一段DNA序列相结合，诱导某些相同的基因转录。但是，在某些细胞里它们又会诱导不同的基因转录。

另外，p53蛋白也并非一个单一的蛋白。经过近几年的研究我们逐渐发现，TP53基因可以经由广泛的可变剪接以及改变转录起始位点等方式表达出9种不同的p53蛋白亚型。这些亚型蛋白的主要区别在于蛋白的N端和C端不同。值得注意的是，如果p53蛋白缺失了N末端，那么对于其靶基因来说就会成为显性负相抑制子。有一些p53亚型蛋白会在不同组织的不同发育阶段出现。对于p53蛋白大家族中这些新近发现的成员的具体作用我们还不得而知，但是随着它们真实面目的逐步揭开，我们相信p53蛋白将会迎来新的辉煌。

原文检索:

Arnold J. Levine and Moshe Oren. (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, 9:749-757.

 筱玥/编译

生命世界 无奇不有

www.LifeOmic.com