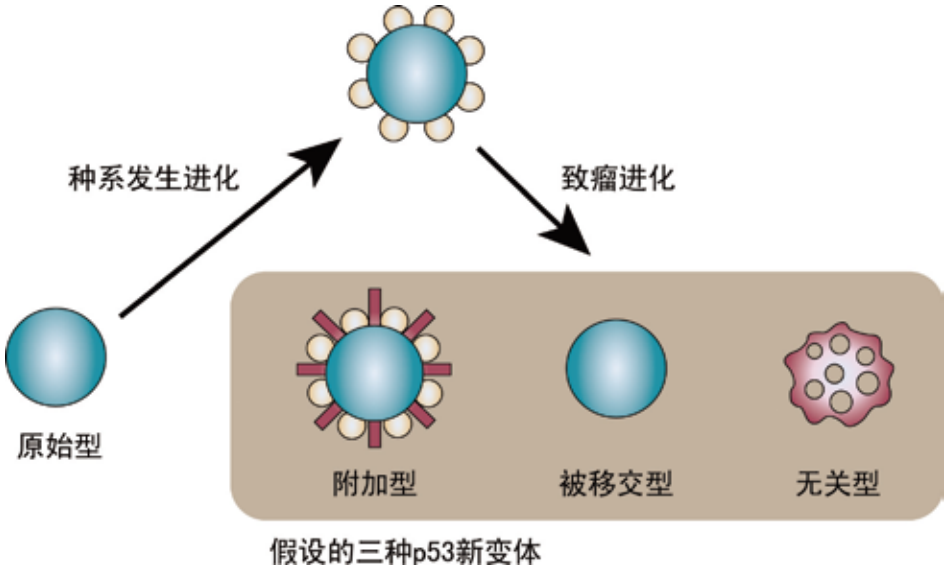


图3 在p53基因进行种系发生进化和致瘤进化过程中可能出现的几种变化情况。数据表明，至少在某些情况下，对p53突变型等位基因进行严格的显性负相分类是不正确的。数据还表明细胞出现完全转化状态与p53错意突变基因的功能获得活动有关。图中列举了几种可能出现的p53新变体。与野生型等位基因相比，这些p53新变体等位基因能编码附加功能、被移交功能和完全无关功能。其中在种系发生进化时获得的有些功能在致瘤进化时会丢失，比如p21调控作用。因此，发生错意突变的p53基因既可能是被移交型突变体也可能是无关突变体。

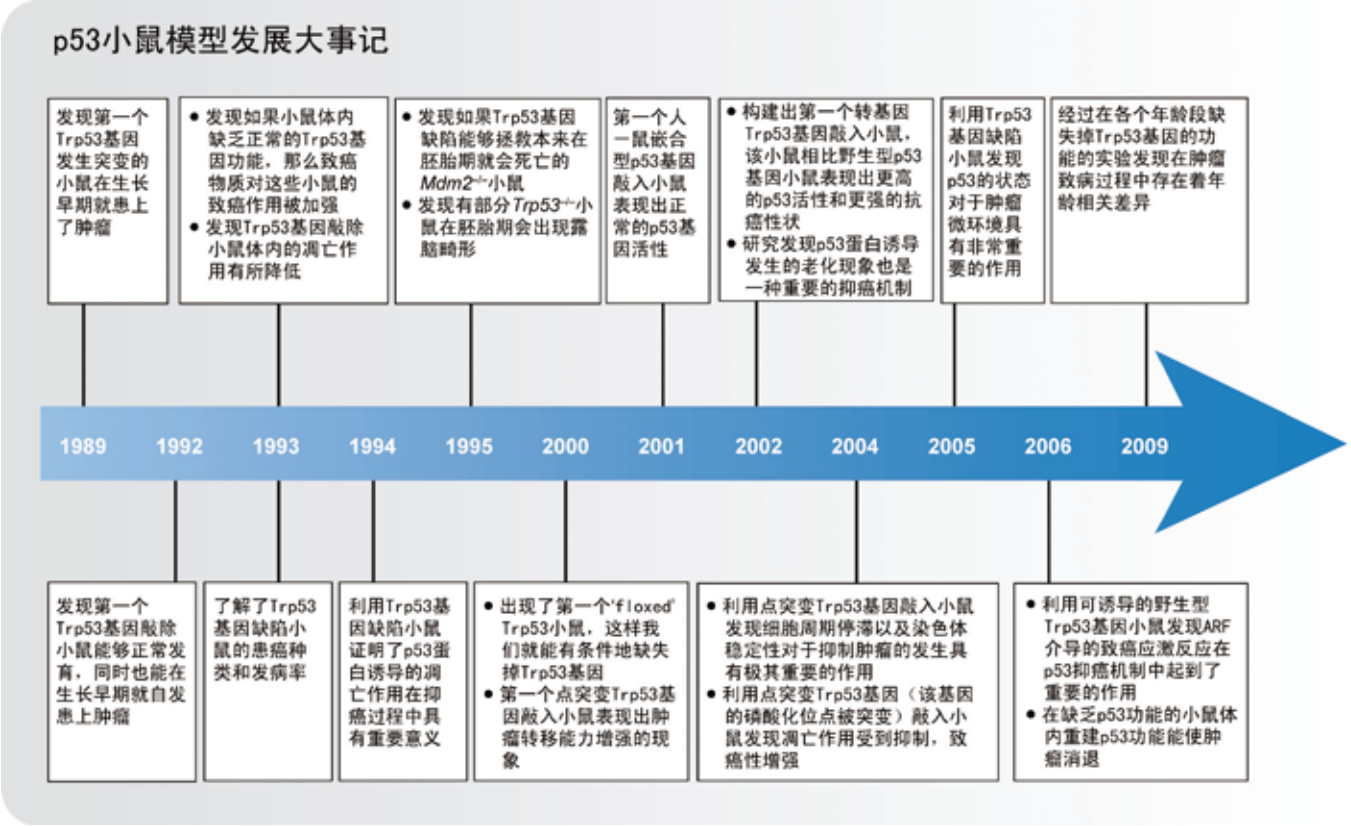
原文检索：

Wan-Jin Lu, James F. Amatruda and John M. Abrams. (2009) p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens. *Nature Reviews CanCer*, 9:758-762.

筱玥/编译

三、运用基因工程小鼠研究p53功能20年记

运用细胞和分子生物学方法对p53基因的功能开展研究至今已有30多年了，使用基因工程小鼠对p53基因的功能开展研究至今也已经20多年了。与我们的预期一致，p53基因发生突变的小鼠相比p53基因未发生突变的小鼠，在任何时间段发生各种肿瘤的速度都要快得多。这些基因工程小鼠为我们揭示了很多重要的p53基因的抑癌功能。随着基因工程技术手段的不断发展，研究越来越深入，我们得以对哺乳动物模型体内p53的结构与功能做更精确的研究。



在发现p53基因后的第一个十年，即1979–1989年间，人们主要用改变胞内TP53基因（或小鼠细胞的Trp53基因）或p53蛋白的方法来研究p53的功能。最初，我们认为TP53基因是一种癌基因。不过到了1989年，我们发现p53基因其实是一种抑癌基因，只不过在癌症患者体内它通常都会发生突变。自此，学界掀起了一股研究p53基因的热潮。这段时间出现了一些新型基因工程技术，比如转基因技术和胚胎干细胞技术等。借助这些技术，科学家得以对小鼠的生殖细胞进行遗传改造。1989年，Bernstein等人成功构建出第一个Trp53基因发生突变的小鼠。随后又出现了两种携带有不同Trp53基因突变的小鼠Tg pL53-3和Tg p53-2。它们分别能表达突变p53蛋白A135V和R193P。这些小鼠平均有大约20%的个体在18月龄时会患上肿瘤，即它们的肿瘤发病率相比对照组有明显增加。而且所患的肿瘤类型非常广泛，其中以肺腺癌、骨肉瘤和淋巴瘤最为多见。

鉴于Trp53基因发生突变的小鼠模型能罹患种类如此繁多的肿瘤，我们猜测家族性利弗劳梅尼综合症（Li–Fraumeni syndrome, LFS）可能也与p53基因发生突变有关。1990年，Malkin与Friend等人利用候选基因法发现了LFS的致病基因。他们发现Trp53基因发生突变的小鼠和LFS患者都非常容易患上骨肿瘤、肺癌和淋巴系统肿瘤，所以Malkin等人对LFS患者体内的TP53基因进行了测序。结果发现在大部分LFS患者体内都存在失活的突变TP53基因。此后，大量研究表明，在大部分但不是全部家族性LFS患者体内都存在着胚系TP53基因发生突变的情况。

人工构建的在各种组织里过表达突变Trp53蛋白的转基因动物模型对于我们研究p53的功能给予了极大的帮助。这些动物模型尤其适用于研究各种不同的突变体蛋白在某些特定组织器官内的作用，比如我们经常给突变Trp53基因“装上”各种不同的组织特异性启动子。不过，我们构建的这些转基因动物模型通常采用的都是随机整合的操作方法，这样得到的动物模型的Trp53基

因表达水平和蛋白活性都不能够精确地模拟我们在人体肿瘤细胞中观察到的内源基因的真实状况。为了解决这个问题，自1990年起，有科学家试图采用另一种全新的转基因动物模型构建方法，即小鼠胚胎干细胞基因靶向操作技术（ESC gene targeting）构建动物模型。由此而得的动物模型能够更加精确地模拟各种遗传性和后天性肿瘤的TP53基因突变情况。另外，对Trp53等位基因中的一个或两个等位基因的突变失活情况进行研究，能够让我们更加精确地了解p53基因的抑癌作用及其它功能。在此，我们将向读者介绍几种重要的TP53基因改造动物模型，这些模型都曾经在帮助我们发现p53蛋白抑癌作用的研究工作中立下汗马功劳。不过，我们只列举出这些模型并不表示其它模型不重要，我们在表1对其它动物模型做了简要的介绍。

表1 人工构建的有关p53的小鼠模型

模型名称或突变位点	突变类型	突变组织	动物模型所患肿瘤	动物模型表型
内含子4以及外显子5	基因敲除	所有组织	淋巴瘤及肉瘤	$Trp53^{+/-}$及$Trp53^{-/-}$小鼠会患上肿瘤，说明p53基因是一个重要的抑癌基因
外显子2	基因敲除	所有组织	淋巴瘤及肉瘤	$Trp53^{+/-}$及$Trp53^{-/-}$小鼠会患上肿瘤
外显子2–6	基因敲除	所有组织	淋巴瘤及肉瘤	$Trp53^{+/-}$及$Trp53^{-/-}$小鼠会患上肿瘤
外显子2–6	基因敲除	所有组织	淋巴瘤及肉瘤	$Trp53^{+/-}$及$Trp53^{-/-}$小鼠会患上肿瘤
外显子2–6（Balb/c小鼠）	基因敲除	所有组织	淋巴瘤、肉瘤及乳腺癌	改变小鼠模型的遗传背景（小鼠种类）会在模型上发现新的患病肿瘤类型
内含子4以及外显子5（129/Sv小鼠）	基因敲除	所有组织	淋巴瘤、肉瘤及畸胎瘤	改变小鼠模型的遗传背景（小鼠种类）会在模型上发现新的患病肿瘤类型
将p53蛋白第172位的精氨酸突变为组氨酸（肿瘤相关突变）	基因敲入	所有组织	淋巴瘤、肉瘤及癌	动物模型体内出现转移性肿瘤，说明该突变赋予p53蛋白新的功能
将p53蛋白第172位的精氨酸突变为脯氨酸（凋亡作用缺陷相关突变）	基因敲入	所有组织	淋巴瘤及肉瘤	p53蛋白的细胞凋亡作用受到影响，但是p53蛋白的细胞周期阻滞作用没有受到影响；肿瘤发病时间延后；发现了p53蛋白对细胞周期的调控作用在抑癌过程中发挥了重要作用
将p53蛋白第18位的丝氨酸突变为丙氨酸（将磷酸化位点给突变掉）	基因敲入	所有组织	无	凋亡反应减弱，模型表现出迟发淋巴瘤的现象
将p53蛋白第23位的丝氨酸突变为丙氨酸（将磷酸化位点给突变掉）	基因敲入	所有组织	原发性B细胞淋巴瘤	p53蛋白介导的凋亡作用丧失，模型表现出早发B细胞淋巴瘤的现象
将p53蛋白第18位和第23位的丝氨酸突变为丙氨酸	基因敲入	所有组织	淋巴瘤和其它恶性肿瘤	p53蛋白依赖的凋亡途径完全丧失
将p53蛋白第389位的丝氨酸突变为丙氨酸（将磷酸化位点给突变掉）	基因敲入	所有组织	无	没有自发形成肿瘤，模型容易患上紫外线诱导的皮肤癌
将p53蛋白第25位的亮氨酸突变为谷氨酰胺，同时将第26位的色氨酸突变为丝氨酸（转录缺失突变）	基因敲入	所有组织	未见患病报道	反式激活途径出现各种缺陷，模型可被诱导出现凋亡和G1期阻滞
将p53蛋白第25位的亮氨酸突变为谷氨酰胺，同时将第26位的色氨酸突变为丝氨酸	基因敲入	所有组织	淋巴瘤及肉瘤	与$Trp53^{-/-}$小鼠的肿瘤表型相似
将p53蛋白第317位的赖氨酸突变为精氨酸（将乙酰化位点给突变掉）	基因敲入	所有组织	未见患病报道	在某些组织中可见放射性损伤诱导的凋亡途径活性有增强
将Trp53基因C末端第七个赖氨酸突变为精氨酸	基因敲入	所有组织	未见患病报道	发现将Trp53基因C末端第七个赖氨酸突变为精氨酸对表型不会造成任何明显的影响

Hupki小鼠（即敲入了人p53基因的小鼠）	野生型嵌合体	所有组织	无	将人p53 DNA结合结构域替换了小鼠的同类结构域，成功构建了一个在检测诱变效果和治疗效果方面非常有用的动物模型
将Hupki小鼠p53蛋白第248位精氨酸突变为色氨酸（肿瘤相关突变）	突变型嵌合体	所有组织	淋巴瘤及肉瘤	纯合子小鼠很快就患上肿瘤，G2/M期细胞周期检查点功能受损
将Hupki小鼠p53蛋白第273位精氨酸突变为组氨酸（肿瘤相关突变）	突变型嵌合体	所有组织	未见患病报道	G2/M期细胞周期检查点功能受损，ATM信号通路受损
LSL-p53-vP16	嵌合体	很多组织	未见患病报道	将疱疹病毒VP16的反式激活结构域替换P53蛋白的反式激活结构域
Trp53+/m (Δ外显子1–6)	基因敲入	所有组织	肿瘤抵抗	这个p53蛋白的C末端可以导致野生型p53蛋白组成型激活，使小鼠对肿瘤产生抵抗和早衰现象
Flox 2–10	Floxed trp53条件等位基因	各种组织	缺乏Brca2基因的小鼠能够加快乳腺癌的发生	很方便地就能利用Cre系统对该动物模型进行组织特异性的p53基因敲除操作
LSL-R172H	Floxed trp53条件等位基因	各种组织	按照$Trp53^{+/-}$和$Trp53^{-/-}$基因型不同，会患上各种不同的肿瘤	经Cre处理后能表达突变型p53蛋白，突变型p53蛋白具有功能获得效应
LSL-R270H	Floxed trp53条件等位基因	各种组织	按照$Trp53^{+/-}$和$Trp53^{-/-}$基因型不同，会患上各种不同的肿瘤	经Cre处理后能表达肿瘤相关突变型p53蛋白，突变型p53蛋白具有功能获得效应
野生型LSL-p53	Floxed trp53条件野生型等位基因	各种组织	Cre表达后肿瘤会消退	LSL位点位于Trp53基因的内含子1当中，Cre蛋白能够激活野生型p53蛋白从而发挥抑癌作用
p53ER（雌激素受体）-TAM（他莫昔芬）	Floxed trp53条件野生型等位基因	大部分组织	经他莫昔芬处理后能延缓肿瘤发展	p53蛋白与他莫昔芬的受体雌激素受体相融合，使用他莫昔芬后能激活p53蛋白
将p53蛋白第135位的丙氨酸突变为缬氨酸	转基因突变技术	很多组织	淋巴瘤和肉瘤	过表达该蛋白后发现突变型p53蛋白具有显性负相作用
将p53蛋白第193位的精氨酸突变为脯氨酸	转基因突变技术	很多组织	淋巴瘤和肉瘤	过表达该蛋白后发现突变型p53蛋白具有显性负相作用
将p53蛋白第246位的精氨酸突变为丝氨酸	转基因突变技术	肝脏	肝癌	能增强黄曲霉毒素的致肝癌发病率
将p53蛋白第172位的精氨酸突变为组氨酸	转基因突变技术	乳腺组织	在Erbb2转基因小鼠模型能加快乳腺癌的扩散	证明p53突变蛋白能与其它致癌基因协同发挥致癌作用
将p53蛋白第172位的精氨酸突变为亮氨酸	转基因突变技术	乳腺组织	对能诱导发生乳腺癌的致癌物质具有抵抗性	发现了超等位Trp53突变基因
将p53蛋白第172位的精氨酸突变为亮氨酸	转基因突变技术	前列腺组织	不会患上前列腺癌	发现了超等位Trp53突变基因
将p53蛋白第273位的精氨酸突变为组氨酸	转基因突变技术	肺组织	肺腺癌	发现异位表达突变p53蛋白能促进肺癌发生
p53Δ236	转基因突变技术	脑组织	加速脑肿瘤的扩散	发现脑中突变p53蛋白具有显性负相作用
p44 TG	转基因突变技术	多种组织	肿瘤抵抗	表达p53蛋白N末端截短体，表现出早衰现象
超级p53	转基因突变技术	所有组织	肿瘤抵抗	增强野生型p53蛋白的表达具有抗癌效用，没有早衰现象发生
超级ARF（急性肾功能衰竭）和p53	转基因突变技术	所有组织	肿瘤抵抗，延缓衰老	增强野生型p53蛋白和ARF蛋白的表达具有抗癌效用，并能延缓衰老
MMTV（小鼠乳腺瘤病毒）-野生型p53	转基因突变技术	肾组织	无	过表达野生型p53蛋白能抑制正常器官的发育
AT3（抗凝血酶III）-p53	转基因突变技术	肾组织和肝组织	无	过表达野生型p53蛋白对于肝脏发育没有影响

1.种系Trp53基因突变小鼠模型

1.1 Trp53基因缺失小鼠模型

Trp53基因是利用胚胎干细胞技术进行改造的第一个抑癌基因。1992年，Donehower和Bradley等人就成功构建出了第一个Trp53基因敲除小鼠模型。不久，其它实验室相继报告成功构建出了Trp53基因敲除小鼠模型及其它抑癌基因敲除模型，比如Rb1基因敲除模型和Inha基因敲除模型等。所有这些早期的利用胚胎干细胞技术构建的Trp53基因缺失小鼠模型都缺失了大段的Trp53基因，因此能非常有效地形成无效等位基因，这样每一个动物模型表现出来的发育表型和所患肿瘤都差不多。

背景知识1：TP53基因突变小鼠模型的其它表型：发育表型和生育表型

发育表型　正如正文所述，完全缺失TP53基因功能的小鼠通常都能正常发育，不过有20%~30%的雌性Trp53$^{-/-}$小鼠胚胎会表现出露脑畸形的情况，这主要是由于胚胎发育过程当中神经管闭合障碍所致。在饲料中添加叶酸能够降低发生露脑畸形的比例。还有研究表明p53能降低胚胎发育过程中的致畸率。比如对发育到第9.5天的Trp53$^{-/-}$小鼠胚胎施以电离辐射伤害，会造成70%的胚胎出现发育异常以及7%的胚胎死亡；然而对Trp53$^{+/+}$小鼠胚胎施以同样伤害则只有20%的胚胎会出现发育异常，同时却有60%的胚胎会死亡。p53蛋白在胚胎发育过程中面临DNA损伤时表现出来的这种促凋亡作用能导致胚胎组织损坏和死亡，从而有效避免各种先天性胚胎异常情况的出现。不过如果p53蛋白组成型激活，比如在缺失了Mdm2基因或者Mdm4基因作用的情况下，也会造成胚胎在发育早期出现各种缺陷。

生育表型　我们很早以前就注意到雌性Trp53$^{-/-}$小鼠的生育能力会降低。最近，Levine实验室发现白血病抑制因子（LIF）是p53蛋白的作用靶标。LIF对于胚胎植入过程非常重要，p53蛋白对于LIF基因的基础转录和诱导转录过程都具有调控作用。雌性Trp53$^{-/-}$小鼠体内的LIF蛋白含量很低，尤其是在怀孕后第四天即胚胎植入时期情况更为严重。如果给这些孕鼠使用LIF能有效地改善胚胎植入情况。有趣的是，Trp53蛋白第72位脯氨酸密码子的多态性现象（该位点突变与p53促凋亡作用降低有关）与胚胎植入失败密切相关，这也说明p53与生育过程密切相关。

第一个出乎我们意料的结果是，我们发现这些缺失了Trp53等位基因的小鼠不论是在胚胎发育期还是在出生后的发育过程中竟然都没有表现出异常。不过，Clarke和Jacks科研团队在1995年对p53缺失的胚胎进行了仔细研究，结果发现有部分雌性胚胎具有致死性的露脑畸形（这种畸形是由于神经管闭合缺陷，结果导致中脑部位的神经组织过度发育所形成的一种畸形）。Clarke

等人的这项研究成果表明，至少在某些情况下p53是能够影响动物发育的（背景知识1）。同年，所属的实验室也发现p53蛋白的异常表达能够影响Mdm2基因敲除小鼠的发育。MDM2蛋白是一种E3泛素连接酶，它能够促进p53蛋白经泛素化途径降解。Mdm2$^{-/-}$小鼠在胚胎发育极早期就会夭折，而这是由于p53蛋白的高活性造成的。Mdm2$^{-/-}$ Trp53$^{-/-}$小鼠的发育就完全正常，没有问题，这说明MDM2蛋白在胚胎发育过程中所起的作用就是对p53蛋白水平进行调控。不过，p53蛋白在发育过程中不起作用的理论也非常符合它本身作为抑癌蛋白的身份。p53蛋白最主要的功能本来就是对DNA损失和致癌刺激作出反应，而这在胚胎发育期是很难发挥作用的。

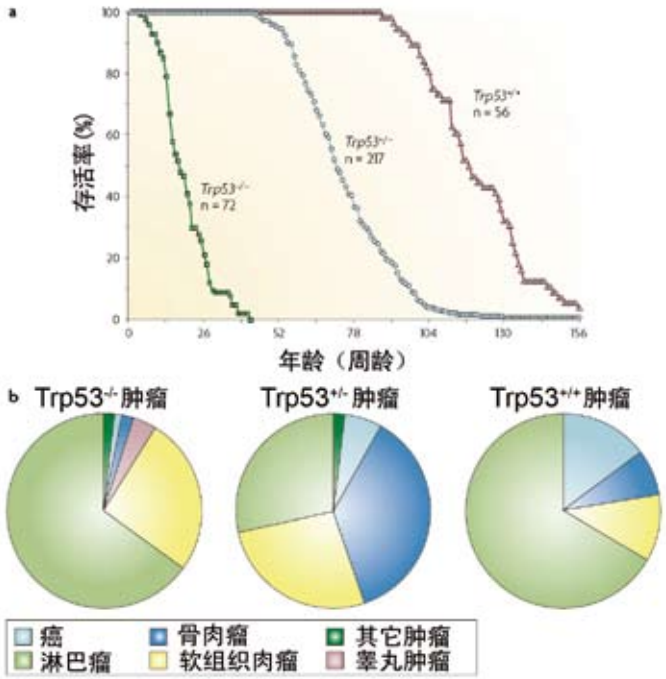


图1 p53缺陷小鼠模型表现出的肿瘤表型。a：图中展示的是各种C57BL/6 × 129Sv杂交小鼠模型（Trp53$^{+/+}$小鼠、Trp53$^{+/-}$小鼠与Trp53$^{-/-}$小鼠）的无瘤存活率。图中n表示每一组实验小鼠的数目；b：在上述实验小鼠体内观察到的各种患病肿瘤类型，以饼形图表示各种肿瘤的发病率。

与我们的预计一样，Trp53$^{-/-}$小鼠很早就会患上肿瘤，它们的平均患病年龄是4.5个月，到了10月龄时所有的Trp53$^{-/-}$小鼠都会死于癌症（图1a）。而同样的没有Trp53基因缺陷的小鼠的寿命一般都在24个月至36个月之间。和转基因Trp53小鼠一样，p53无效小鼠所患的肿瘤类型也是多种多样的，比如有T细胞淋巴瘤和各种不同组织来源的肉瘤等（图1b）。相比野生型小鼠，Trp53$^{+/-}$小鼠也表现出了肿瘤扩散更快的现象，不过Trp53$^{+/-}$小鼠的肿瘤患病年龄还是没有Trp53$^{-/-}$小鼠早。杂合型p53基因携带小鼠的平均患癌年龄在18个月。另外，Trp53$^{+/-}$小鼠所患的肿瘤类型也与Trp53$^{-/-}$小鼠有非常明显的差异。比如Trp53$^{+/-}$小鼠常患的肿瘤包括原发性B细胞淋巴瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤以及各种癌症（图1）。我们目前还不清楚是什么原因导致了这种疾病谱方面的差异。由于Trp53$^{+/-}$小鼠和人LFS患者都非常容易患上软组织肉瘤、骨肉瘤和淋巴瘤，因此Trp53$^{+/-}$小鼠非常适合用做LFS疾病的病理模型（背景知识2）。

背景知识2：Trp53基因缺陷小鼠模型真能成功模拟利弗劳梅尼综合症（LFS）吗？

从遗传学角度来讲，LFS患者与$TP53^{+/-}$人群非常类似，但是这就意味着Trp53基因缺陷小鼠模型真能成功模拟LFS吗？携带Trp53无效等位基因的$TP53^{+/-}$小鼠大约能够模拟LFS患者体内20%的基因突变情况，比如框移突变、缺失突变、剪接位点突变等各种会造成无效等位基因的突变。其它的LFS突变主要都是DNA结合结构域相关的热点突变。LFS患者体内有两种热点突变，即R175H和R273H已经成功构建并植入小鼠模型中。

大约有50%的Trp53基因突变小鼠在18月龄时会患上肿瘤，这种发病情况与Trp53基因发生点突变和缺失突变时的情况相类似。LFS患者到30岁时有一半人会患上癌症。按照预期寿命计算（即小鼠的预期寿命是3岁，人的预期寿命是80岁），Trp53基因缺陷小鼠模型与LFS患者的发病情况是一样的。不过，Trp53基因缺陷小鼠模型所患肿瘤的疾病谱与LFS患者的疾病谱只有部分重合。Trp53基因缺陷小鼠模型最常患的肿瘤是骨肉瘤、软组织肉瘤和淋巴瘤，这些也都是LFS患者常见的肿瘤。不过各种癌症，尤其是乳腺癌却只常见于LFS患者而在Trp53基因缺陷小鼠模型中并不常见。Jacks和Lozano实验室构建了$Trp53^{R172H}$和$Trp53^{R270H}$这两个对应于LFS患者体内非常常见的R175和R273热点突变的动物模型。这两个动物模型的癌症发病率要比$Trp53^{+/-}$小鼠模型高得多，但是它们的乳腺癌发病率仍然不高。不过有趣的是，如果使用乳腺癌易感的Balb/c小鼠而不是不易患乳腺癌的C57BL/6小鼠来构建$Trp53^{+/-}$小鼠模型，那么就会有55%的模型患上乳腺癌，而且这种模型的患病谱会更加接近LFS患者的患病谱。Varley注意到遗传了致癌点突变的LFS患者家族相比遗传了失活点突变的LFS家族要更容易（更快）患上更多种类的肿瘤。携带一个致癌热点突变基因（R172H或R270H）的杂合型小鼠与$Trp53^{+/-}$小鼠的发病率是一样的，但是杂合型小鼠体内的肿瘤更容易发生转移。综上所述，各种杂合型Trp53基因突变小鼠模型都能从某一个或某一些方面模拟LFS疾病，但是不能从各个方面来模拟LFS疾病。

p53基因作为一个典型的抑癌基因应该遵从Knudson提出的“二次打击”学说，即这些抑癌基因都属于阴性基因，只有当两个等位基因都失去活性才会导致肿瘤形成。根据对$Trp53^{+/-}$小鼠肿瘤组织中野生型Trp53等位基因的分析，我们得以对上述“二次打击”学说进行检验。在上述被检肿瘤组织中有大约一半组织的野生型Trp53等位基因出现缺失，这也支持了“二次打击”学说。但是与此同时，仍然有近一半的野生型Trp53等位基因具有功能。这种仍然有半数肿瘤细胞保留了野生型p53基因的现象同时也支持了另一种“单一不足（haploinsufficient）理论”的观点。该理论认为只有一半的等位基因是不足以发挥p53的抑癌功用的，如果TP53基因的表达量降低一半，那么p53蛋白的表达和活性就能够促使肿瘤发生。不过，在Balb/c小鼠模型中有超过90%的肿瘤都表现出了Trp53等位基因杂合型缺失的现象，这表明单一不足理论也会受到动物遗传背景的影响。有趣的是，大部分LFS患者所患的肿瘤组织中都携带有失活的TP53等位基因，因此无法表达p53蛋白，这些患者同时也丢失了“幸存”的野生型TP53等位基因，这种现象也符合二次打击学说。

Trp53基因敲除小鼠被广泛用于各种肿瘤和非肿瘤研究领域。将各种易患肿瘤的小鼠进行杂交通常都能得到对肿瘤高度易感的后代，在某些情况下还会改变其生物属性。Trp53$^{-/-}$小鼠最近被用来研究肿瘤微环境对肿瘤扩散具有何种作用，这方面的研究发现与肿瘤相关的间质中p53的状态也具有非常重要的作用。前列腺上皮组织中Rb通路的失活会导致组织大范围发育异常，结果形成微小浸润性癌（minimally invasive carcinomas）。在上皮肿瘤组织和间质组织中转染SV40大T抗原截短体能够使Rb通路失活，然后诱导p53蛋白表达。Trp53杂合体能加快患上腺癌的速度，也能促进腺癌转变成恶性肿瘤。还有一个重大发现，那就是将正常的间质组织与肿瘤组织一起培养后能抑制肿瘤扩散。虽然肿瘤上皮细胞仍然会有p53蛋白表达，但如果缺失了一个Trp53等位基因，那么间质成纤维细胞的生长和肿瘤细胞的增殖都会加快。这些结果表明非细胞自主机制在抑癌过程中也发挥了重要的作用，而p53蛋白也参与了这个过程。

背景知识3：Trp53基因突变小鼠模型的其它表型：老化和组织稳态

老化　本文中介绍过的大部分的Trp53基因突变小鼠模型体内p53蛋白的活性都有缺失或者降低。不过也有几个模型的情况恰好相反，这些模型都是通过基因敲入技术或转基因技术构建而成，因此它们体内p53蛋白的活性反而有所升高，模型相比野生型小鼠对肿瘤具有更强的“抵抗力”。不过有趣的是，这些抗癌小鼠的寿命通常也都与野生小鼠不太一样，有的模型小鼠的寿命会延长，而另一些模型小鼠的寿命却会缩短。有两种超等位基因的p53模型能表达部分的p53蛋白，即缺失了氨基端部分序列的p53蛋白，这些模型小鼠就表现为寿命缩短和衰老速度加快。Serrano实验室构建的另外3种超等位基因的p53模型。该模型含有额外的完整Trp53基因拷贝。这种p53模型包括超Trp53基因模型，超ARF-Trp53模型（即通过ARF来激活p53蛋白），还有通过ARF、INK4A以及端粒酶共同激活p53蛋白的模型。其中只有超Trp53基因模型表现出了抗癌表型，其它另外两个模型小鼠的寿命都有所延长，衰老的速度也有所减缓。同样，Mdm2基因次形态突变（Hypomorphic mutations，该突变会使基因的活性减弱但不会消失）也能提高p53蛋白的活性，增强细胞的抗癌性，但是不会影响到小鼠的寿命。Trp53基因截短突变体和超等位基因Trp53小鼠表现出来的相反表型被认为是p53调控机制方面的差异所造成的。在Trp53基因截短突变体模型中，p53蛋白是被慢慢上调的，但是在超等位基因Trp53模型中p53蛋白面对各种应激刺激的反应会迅速增强。

干细胞和组织稳态　许多研究发现p53蛋白还能够调控干细胞的功能。研究发现，Trp53基因缺失模型小鼠的干细胞增殖能力明显增强，自我更新能力及其它功能与普通小鼠干细胞差别不大。根据对这种小鼠模型来源的造血干细胞的研究发现，p53蛋白能调控维持造血干细胞沉默状态的细胞因子。最近对Trp53基因缺失模型小鼠的研究还发现，如果还同时缺失了ARF和INK4A，那么血液系统的补充速度会减缓10倍。另一项研究表明，如果同时缺失了Trp53基因和抑癌基因PTEN，那么会增强神经干细胞的增殖能力和自我更新能力。Trp53$^{-/-}$ Pten$^{-/-}$神经干细胞很难发生分化，同时细胞MYC的表达量会上调，这也解释了为什么这些细胞容易形成神经胶质瘤。正常干细胞形成肿瘤干细胞的过程可能就是部分因为Trp53基因和其它抑癌基因发生突变所致。Trp53基因缺失小鼠模型的出现进一步方便了这方面研究的开展。

自从Trp53$^{-/-}$小鼠模型被成功构建后，它们就一直被广泛用于研究p53蛋白在各种肿瘤和非肿瘤组织中的作用（背景知识1、3）。此外，研究人员还利用Trp53$^{-/-}$小鼠模型与其它有相关抑癌基因或致癌基因突变的动物模型杂交的方法研究了p53信号通路与其它抑癌和致癌信号通路之间的相互关系。完全缺失p53基因功能的细胞的建立又带给我们极大的帮助，从而发现了多条p53信号通路以及p53调控因子、与p53发生相互作用的因子以及p53的靶因子等等。这类研究最早开展于1993年，当时在放射线诱导凋亡试验中发现的Trp53$^{-/-}$淋巴细胞相比p53基因野生型淋巴细胞发生凋亡的现象明显减少，这进一步证明了p53在DNA损伤和凋亡反应当中具有重要作用。这也表明Trp53$^{-/-}$小鼠模型及其相关细胞在有关p53的各种细胞过程和信号通路的研究中非常实用，而且它们也一直被广泛应用于各个相关领域。

1.2 Trp53癌基因错意突变小鼠模型

很明显，p53基因缺失小鼠将在p53信号通路体内研究当中继续发挥重要作用。不过大约有80%的人体体细胞肿瘤组织或LFS患者肿瘤组织中发生的TP53基因突变是错意突变。大量的组织培养实验表明，p53突变蛋白为肿瘤细胞提供了额外的生长优势。很有可能是p53突变蛋白与其它细胞因子间的相互作用，以及p53突变蛋白所发挥的转录活性赋予了肿瘤细胞这种生长优势。这些体外实验结果促使我们构建了突变型TP53癌基因敲入小鼠模型，希望用这种模型来研究错义突变TP53基因在体内的功能，以及比较错意突变TP53基因和缺失TP53基因会给小鼠造成什么影响。

我们已经在人体肿瘤组织中发现了数以万计的TP53错意突变基因，登录IARC TP53错意突变数据库（http://www-p53.iarc.fr/）可以了解更多相关信息。TP53基因中的突变热点毫无疑问地成为了大家在动物模型中的研究热点。p53-R172H突变（相当于人体p53蛋白中第175位氨基酸位点突变）能破坏p53蛋白的DNA结合结构域，该突变也是目前为止在细胞培养中发现的最具“侵袭性”的突变。p53-R270H（相当于人体p53蛋白中第273位氨基酸位点突变）具有野生型p53蛋白的构象，但是由于该位点是p53蛋白直接与DNA相接触的位点，因此该突变体不能与DNA相结合。这两种突变体在各种组织培养试验中都表现出了明显的功能获得表型。比如，在缺乏TP53基因的细胞内表达人源性p53-R175H蛋白和p53-R273H蛋白会增强细胞在软琼脂上的生长活力，也能增强这些细胞在裸鼠体内的致瘤性。我们也在小鼠生殖细胞系里构建了上述突变基因的敲入模型，其中第一个模型是由Lozano实验室于2000年构建成功的p53-R172H基因敲入模型。

出人意料的是，R172H–R270H杂合型基因敲入小鼠模型在生存特征方面与Trp53$^{+/-}$小鼠相比并没有表现出明显的统计学差异。另外，我们还发现纯合型Trp53基因突变小鼠与Trp53$^{+/-}$小鼠相比在生存情况方面也没有表现出明显差异。不过，与Trp53$^{+/-}$小鼠相比，杂合型Trp53基因突变小鼠体内的肿瘤则具有很强的转移能力（图2）。在Trp53$^{R172H/+}$小鼠体内，大约有23%的骨肉瘤和67%的腺癌会发生转移。在Trp53$^{R270H/R270H}$小鼠体内，29%的肺腺癌会表现出转移征象。这种肿瘤转移能力在129/Sv×C57BL/6杂交体里会增强，而在上述杂交体与C57BL/6小鼠的回交体里这些肿瘤的转移能力又会降低。我们目前还不清楚上述这些遗传背景的差异对肿瘤转移能力的影响，但是可以肯定遗传背景对肿瘤的转移能力的确是存在影响的。

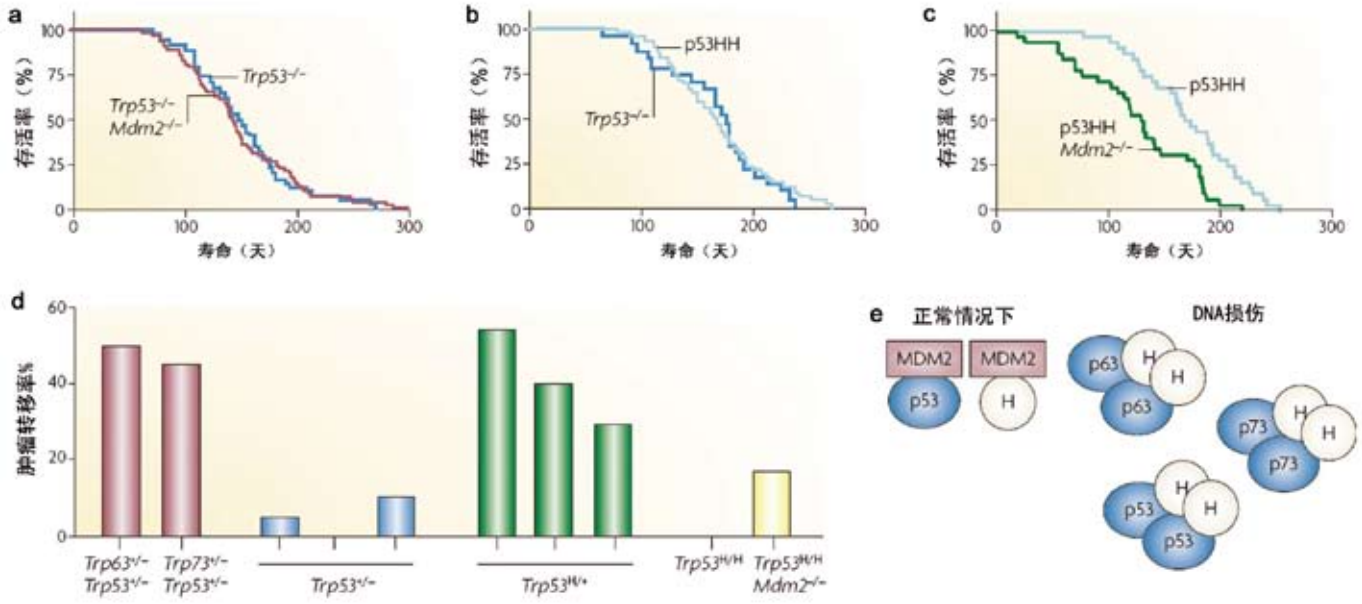


图2 突变p53蛋白赋予细胞的新活性以及它们所带来的显性负相活性。a：Trp53$^{-/-}$小鼠和Trp53$^{-/-}$ Mdm2$^{-/-}$小鼠的生存动力学以及患病谱都非常相似；b：容易罹患淋巴瘤、肉瘤和癌症的纯合型p53-R172H（p53HH）小鼠的生存动力学与Trp53$^{-/-}$小鼠非常相似；c：p53HH Mdm2$^{-/-}$小鼠的发病速度相比p53HH小鼠明显加快。该数据来自不止一个实验室，而且时间跨度长达14年，因此没有内参，不能结合起来分析；d：各种基因型小鼠模型的肿瘤转移情况。数据来源于各个已发表的癌症和肉瘤研究论文。红色表示Trp63$^{+/-}$ Trp53$^{+/-}$和Trp73$^{+/-}$ Trp53$^{+/-}$小鼠情况，还包括一些较罕见的肿瘤类型情况；蓝色表示源自三个不同研究项目的Trp53$^{+/-}$小鼠情况，其中两项研究都发现了微小转移灶；绿色表示Trp53$^{R172H/+}$杂合型小鼠情况；黄色表示Trp53$^{H/H}$和Trp53$^{H/H}$Mdm2$^{-/-}$小鼠情况；e：该模型表示在正常情况下，即细胞未受到应激刺激时，正常水平的MDM2蛋白足以将野生型p53蛋白和突变p53蛋白（H）维持在较低水平。在DNA发生损伤之后，野生型p53蛋白和突变p53蛋白都变稳定。突变p53蛋白在胞内持续存在的时间会更长，能够抑制p63和p73的作用，即赋予细胞新的表型，还能抑制野生型p53蛋白的活性，即具有显性负相活性。

这些p53突变基因小鼠模型的发展也加深了我们对p53突变蛋白体内稳定性调控机制的了解。由于这些突变蛋白在体内非常稳定，因此我们可以利用免疫组化技术在人体肿瘤组织中经常发现这些突变蛋白。这一点与野生型p53蛋白的情况恰好相反。在正常细胞里野生型p53蛋白的含量都非常低。不过在纯合型或杂合型Trp53突变小鼠体内的肿瘤组织中，不论Trp53基因发生了何种突变，这些p53突变蛋白也并不稳定（虽然我们还无法判断肿瘤组织中的野生p53蛋白和突变p53蛋白的稳定性差异）。根据对Trp53$^{R172H/R172H}$小鼠和Trp53$^{R270H/R270H}$小鼠体内正常组织的研究，我们发现突变p53蛋白缺乏稳定性。这说明将野生型p53蛋白维持在低水平的机制同样也能对p53突变蛋白发挥调控作用。这些数据表明还存在其它的肿瘤特异性事件来稳定p53蛋白。

各种信号通路，比如DNA损伤通路、癌基因激活通路、化疗药物作用通路以及核糖体应激通路等都能起到稳定野生型p53蛋白的作用。我们已经知道上述信号通路中有些能起到稳定突变p53蛋白的作用，我们估计上述通路中其它的通路也能起到相同的作用（图2）。细胞内缺乏Mdm2蛋白会导致p53依赖性细胞死亡事件的发生，这也支持了上述观点。Trp53$^{-/-}$ Mdm2$^{-/-}$双重基因敲除小鼠模型的存活率非常高，也表现出与缺乏Trp53基因的小鼠模型相同的肿瘤表型。Trp53$^{R172H/R172H}$突变模型表达的是缺乏功能的Trp53等位基因，它也能拯救Mdm2$^{-/-}$表型。在各种

正常组织中如果缺失了Mdm2基因也能够稳定p53-R172H蛋白。

那么这些突变的p53蛋白稳定之后会给体内带来什么样的后果呢？Trp53$^{R172H/R172H}$ Mdm2$^{-/-}$小鼠相比Trp53$^{-/-}$ Mdm2$^{-/-}$小鼠罹患肿瘤的时间更早，而且肿瘤的转移能力更强。缺乏Mdm2基因的Trp53$^{R172H/R172H}$小鼠平均存活期只有130天，而Trp53$^{R172H/R172H}$小鼠以及Trp53$^{-/-}$ Mdm2$^{-/-}$小鼠的平均存活期有170天。不过，Mdm2基因缺失并不是一个肿瘤特异性的事件，这是一个非常简单而又有用的模型，可以帮助我们了解突变p53蛋白在体内的稳定情况以及该突变蛋白赋予细胞的新表型。另一个肿瘤特异性的事件是缺失了细胞周期抑制蛋白——INK4A蛋白（该蛋白由Cdkn2a基因座编码）。缺失该蛋白能够上调体内的p53通路活性。Cdkn2a^{INK4A}缺失会导致细胞周期蛋白D——细胞周期蛋白依赖的激酶复合体（cyclin D–cyclin-dependent kinase complexes）释放，然后该复合体能够磷酸化RB蛋白。RB蛋白磷酸化之后又会释放转录因子E2F1，继而激活ARF。ARF会抑制MDM2活性从而稳定并激活p53蛋白。这样我们就可以利用突变的Trp53蛋白来选择肿瘤细胞。为了验证INK4A蛋白对突变p53蛋白起到的稳定作用是否具有重要意义，我们构建了Trp53$^{R172H/R172H}$ Cdkn2a$^{INK4A-/-}$小鼠模型。这些小鼠模型体内的很多细胞（但不是所有细胞）都表现出能够稳定胞内突变的p53蛋白的现象，而且与Cdkn2a$^{INK4A-/-}$小鼠模型相比，这些模型的存活时间都有所缩短，肿瘤转移现象也都有所增加。因此，我们在缺失了Trp53基因和有一个Trp53等位基因发生突变的小鼠模型上观察到的相似的无瘤存活时间的情况，可能是因为需要额外的基因组损伤来稳定突变p53蛋白这是一个限速步骤。

因为细胞的培养条件中充满了各种应激因素，所以我们在两个Trp53等位基因都发生突变的小鼠模型的胚胎成纤维细胞中也观察到了突变p53蛋白的稳定现象以及该蛋白给细胞带来的新表型。相比Trp53$^{-/-}$细胞，携带了一个或两个突变Trp53等位基因的小鼠胚胎成纤维细胞的增殖能力都有所增强，转化能力也有所提高。由于突变p53蛋白能够与p53家族成员p63和p73相结合并抑制它们的活性，因此我们也经常在这些新增表型实验当中研究p63和p73的作用（背景知识4）。实际上，突变p53蛋白表达下调能增强p63和p73的转录活性，反之，p63和p73表达下调能增强Trp53缺失细胞（但不是Trp53突变细胞）的转化活性。另外，缺失了一个Trp63或Trp73等位基因的Trp53$^{+/-}$小鼠体内所患肿瘤的转移能力要比Trp53$^{+/-}$小鼠肿瘤的转移能力强。这些试验证据都表明，体

内如果缺失了p53家族蛋白会对肿瘤的转移能力造成很大的影响。体内突变p53蛋白的不稳定现象可能削弱了它对p63和p73的抑制作用，因此Trp53突变小鼠出生之后能够正常发育。另外，如果突变p53蛋白能够稳定存在（比如在缺失了Mdm2或Cdkn2a^{INK4A}的情况下），但也不可能在所有种类细胞中都稳定存在，这样就只能部分影响p63和p73的活性，而这同样能够避免由于缺失了Trp63和Trp73会出现的胚胎发育夭折表型出现。于是问题来了，在肿瘤形成过程中是否有足够的突变p53蛋白来抑制p63和p73蛋白的功能呢？究竟需要抑制掉多少p63和p73蛋白的功能呢？通过对Trp63$^{+/-}$ Trp73$^{+/-}$小鼠模型的研究发现，只要将p63或p73蛋白中的任何一个蛋白抑制掉一半就足以表现出转移瘤的表型。可能只要随机影响一两个细胞中的p63或p73蛋白功能就足以促使转移瘤的发生。因此，上述这些体内试验结果证实了如果突变p53蛋白抑制了p63或p73蛋白的功能，那么就能造成肿瘤转移性增强的表型。不过我们也不能排除还有其它机制参与其中共同发挥作用，因为突变p53蛋白还能够与其它很多蛋白相结合。

总而言之，这些体内试验结果让我们了解到p53蛋白稳定性调控机制也具有非常重要的意义；了解到稳定野生型p53蛋白的机制同样也能够稳定突变p53蛋白；了解到突变p53蛋白一旦被稳定就能长时间稳定存在；还能了解到突变p53蛋白的稳定对于细胞获得新功能以及带来显性负相活性都是必须的（图2）。这些模型在帮助我们了解哪些细胞种类特异性事件以及肿瘤特异性事件能够稳定p53蛋白的研究工作中具有非常重要的价值，同时也能帮助我们了解肿瘤转移的分子机制。

背景知识4：p63和p73突变小鼠模型

p53家族共有三个成员，分别是p53、p63和p73，其中p63和p73具有很高的序列相似性和结构域保守性。虽然毫无疑问，p53蛋白是一个抑癌因子，但是p63和p73是否也是抑癌因子还存有争议。争议的部分的起因是因为Trp63基因和Trp73基因都能形成多种RNA同工型。这些同工型之间的区别就在于是否含有N末端的反式激活结构域，其中含有这些结构域的被称为TAp63和TAp73，不含的被称为Δp63和Δp73。现有的证据表明Δp63和Δp73具有致癌活性，而TAp63和TAp73具有抑癌活性。缺失了Trp63基因的小鼠模型发育会出现异常，四肢和皮肤不能发育。Trp63$^{+/-}$小鼠的寿命会缩短，老化会加速，不过不容易罹患癌症。但是另一项研究发现Trp63$^{+/-}$ Trp53$^{+/-}$小鼠的患癌率明显高于Trp53$^{+/-}$小鼠，这说明在p53表达降低的情况下p63能起到抑癌的作用。弄清楚各个组织中各种p63同工型的作用将有助于我们判断p63的“真实身份”。

早期对完全缺失了Trp73基因的小鼠模型的研究未能证明该基因的抑癌功能。该小鼠模型表现出明显的发育缺陷，但是能存活到出生以后，而且在15月龄之前都不会患上各种肿瘤。但是研究发现Trp73$^{+/-}$ Trp63$^{+/-}$ Trp53$^{+/-}$小鼠的肿瘤发病率有明显增高。为了弄清楚p73的作用，Mak等人进行了深入研究，他们发现表达Δp73蛋白同时缺乏TAp73蛋白的小鼠的致癌率相比野生型小鼠有一定程度的增加，这说明TAp73蛋白具有一定程度的抑癌作用。

1.3 缺失了部分功能的Trp53突变小鼠模型

科研人员还利用小鼠模型对各种p53突变体进行了更加精细的研究。比如R172P突变体就是一个功能分离突变蛋白。该蛋白能使细胞周期阻滞，能部分激活p21蛋白，但是不能有效诱导凋亡发生。不过令人吃惊的是，Trp53$^{R172P/R172P}$小鼠却发育正常，而且相比Trp53$^{-/-}$小鼠，Trp53$^{R172P/R172P}$小鼠发生肿瘤的速度更慢，这说明p53蛋白阻滞细胞周期的作用在p53蛋白的抑癌活性中也是非常重要的一个组成部分。这些在Trp53$^{R172P/R172P}$小鼠体内形成的肿瘤还有一个重要特征，那就是它们还都具有倍性（ploidy），这说明维持基因组的稳定性也是一条重要的抑癌机制。由于p21蛋白在p53介导的细胞周期调控途径和细胞老化途径中具有绝对的“领导作用”，因此有人将Trp53$^{R172P/R172P}$小鼠与缺失了p21编码基因的Cdkn1a缺失小鼠杂交，来研究p21蛋白对于维持染色体稳定以及推迟肿瘤发病是不是必须的。我们在Trp53$^{R172P/R172P}$ Cdkn1a$^{-/-}$小鼠模型中发现，缺失了Cdkn1a基因能够让p53-R172P细胞完全丧失细胞周期阻滞功能，并且会加快肿瘤形成。对Trp53$^{R172P/R172P}$ Cdkn1a$^{-/-}$肉瘤和Trp53$^{R172P/R172P}$ Cdkn1a$^{-/-}$淋巴瘤进行细胞遗传学检测发现，它们都具有非整倍性（aneuploidy）和染色体畸变现象，这种情况在Trp53$^{R172P/R172P}$肿瘤中是观察不到的。因此，体内p21蛋白在细胞周期阻滞和维持染色体稳定性方面的作用与p53蛋白的促凋亡作用是相辅相成的，它们共同起到抑制肿瘤形成的作用。上述研究结果表明，p53蛋白促使细胞周期停滞与诱导细胞老化或凋亡这几项功能共同发挥作用，相互协作，使得p53蛋白能够抑制肿瘤发生和扩散。

p53蛋白其它氨基酸位点，比如各种翻译后的磷酸化修饰位点、泛素化修饰位点以及苏素化修饰位点等发生突变的小鼠模型也已构建成功。重要的是，虽然这些突变都破坏了p53蛋白的翻译后修饰途径，但是并没有对p53蛋白的功能造成什么影响。这些小鼠模型通常都只会表现出轻微的肿瘤抑制功能缺陷，这说明还存在一些上游信号通路来发挥修饰并激活p53蛋白的功能。有一个极佳的例子非常能够说明这种翻译后修饰状态的改变会对p53蛋白抑癌功能能造成轻微的影响。Trp53$^{S18A/S18A}$突变小鼠体内p53蛋白的关键丝氨酸磷酸化位点被突变成了丙氨酸。该磷酸化位点能够在DNA发生损伤时被ATM激酶所磷酸化。这种突变小鼠细胞在面对DNA损伤时所能发挥的诱导细胞凋亡的功能的确会有所减弱，但在DNA损伤检查点的激活和细胞增殖方面的作用都没有受到任何影响。不过1至2岁的小鼠会表现出致瘤率略微增加的情况，这说明哪怕p53蛋白只是发生了一点点突变，比如第18位的丝氨酸突变为丙氨酸，也会给p53蛋白的抑癌功能带来影响。p53-S23A突变小鼠也会表现出患癌率略微升高的现象，这种两个等位基因都发生S23A突变的小鼠与Trp53$^{+/-}$小鼠在致瘤表型方面非常相似。同时将S18和S23位点都突变掉并没有带来累加效应，这种双位点突变小鼠的致瘤表型与单位点的纯合型p53-S23A突变小鼠是一样的。实际观察到的在p53蛋白翻译后修饰位点中缺乏与致瘤表型相关的突变这一现象也非常符合上述实验结果，不过我们还需要对这些位点进行更深入的研究。

2. p53条件突变小鼠模型

2.1 p53条件突变小鼠模型

前面介绍的这些p53小鼠模型都是Trp53基因发生了种系突变的动物模型。这种动物体内每一个细胞和组织都会表达同样的突变体等位基因。不过随着基因靶向技术越来越富有“弹性”，即可操纵性，科研人员们又构建出了p53条件突变小鼠模型。我们可以对这种模型动物体内的Trp53基因进行时、空调控。我们可以对某个特定组织里的p53基因进行缺失或突变，可以使小鼠的p53基因只在发育阶段、青春期或者成年后发生突变，也可以使其一生都发生突变。同样，野生型p53基因也能够用同样的方法进行调控，可以使它们在某些特定组织里激活，也可以被广泛激活。我们将在下文中对这类方法进行介绍。随着这方面技术和模型构建工作的进展，我们对p53蛋白的抑癌作用又有了更深一步的了解。

早在2000年，Berns实验室就报道了第一例野生型Trp53等位基因条件控制小鼠模型Trp53$^{flox/flox}$。Berns等人将LoxP重组位点构建到了Trp53基因的第2个内含子和第10个内含子当中，这样就能利用Cre重组酶对这种‘floxed’ Trp53基因进行重组操作或者缺失操作，从而在特定组织中抑制p53蛋白的表达。有时还会一起抑制掉‘floxed’ Rb1基因，由此获得许多组织肿瘤动物模型。多种肿瘤动物模型，例如成神经管细胞瘤（medulloblastoma）、骨肉瘤（osteosarcoma）、皮肤鳞状细胞癌（skin squamous cell carcinoma）以及乳腺癌模型等都是利用这种方法构建成功的，因为这种方法能快速构建出我们所需要的肿瘤模型。

虽然floxed p53基因小鼠模型最初是用来研究在特定组织中缺失了p53蛋白会给动物造成何种影响的，但是Donehower等人还利用这种模型用更整体的方法研究了后天缺失Trp53基因之后会造成什么后果。Donehower等人将floxed p53基因小鼠与另一种小鼠（这种小鼠模型体内的广泛表达Rosa26的基因座中被敲入了雌激素受体基因CreERT2，该受体基因对他莫昔芬非常敏感，同时还融合了Cre）进行杂交，这样得到的子代小鼠如果注射他莫昔芬，那么小鼠体内大部分组织中的Trp53基因都会发生缺失。在小鼠3月龄、6月龄和12月龄时分别注射他莫昔芬就会发现Trp53基因缺失之后所形成肿瘤的潜伏期具有年龄相关差异。如果在小鼠12月龄时缺失掉Trp53基因，那么发生肿瘤的速度要比在小鼠3月龄时缺失掉Trp53基因时快得多，这种情况也非常符合另一种模型的理论。该模型认为组织会随着年龄的增长不断积累发生了癌变的细胞，只不过这些细胞都被野生型的p53蛋白的检查点功能阻滞了而已。

在众多后天失活野生型p53蛋白的方法当中还有一种方法是由Jacks实验室构建的。Jacks等人构建了一种双Cre激活的突变p53小鼠模型。该模型含有一个Lox-SToP-Lox（LSL）盒结构。LSL盒被放置于敲入基因Trp53^{R172H}或Trp53^{R270H}的上游，在单倍体精子细胞中表达Cre酶就能形成种系p53突变后代。另一种方法就是将该模型与某些组织特异性Cre小鼠模型杂交，这样就能得到仅在该组织中发生p53突变被激活的子代小鼠。比如乳腺组织特异性的Wap-Cre小鼠与LSL-Trp53^{R270H}小鼠杂交产生的后代就能很快患上乳腺癌。不过，需要在此提醒的是，这类小鼠模型有一个特点，那就是在Cre介导切除LSL盒之前这些突变的等位基因是不能表达p53蛋白的，因此在不表达Cre酶的组织里可能会形成肿瘤。我们在分析这些小鼠模型的实验数据时要注意上述特点。

2.2 p53条件型野生小鼠模型

正如前文所述，用来条件失活野生型p53基因或者条件激活突变型p53基因的方法具有相当的可操控性。因此也有人利用相应的方法来构建条件激活的野生型p53基因模型，利用这些模型可以很方便地检验在肿瘤细胞里重建p53活性是否能够推迟甚至逆转肿瘤的发生。如果真是这样，那么我们对p53的抑癌活性又会有新的了解。另外，这种方法也具有非常重要的临床实用价值。Evan实验室曾经进行过这方面的研究。他们构建了一个野生型p53基因敲入模型——Trp53ER（TAM）。该敲入p53基因上融合了一个雌激素受体片段，它能够被雌激素类似物4羟基他莫昔芬（4-OHT）所激活。在纯合型Trp53ER（TAM）小鼠体内，不论有无应激信号刺激，p53基因都处于失活状态，不过4-OHT能够激活该p53基因。Evan等人借助该模型发现电离辐射诱导实验小鼠患上淋巴瘤的时间在使用了6天4-OHT的实验组要比对照组推后了8天。有趣的是，如果在辐射照射时激活p53蛋白那么就可以观察到明显的由p53蛋白诱导的凋亡现象发生，但是不能推迟淋巴瘤的产生。该结果表明p53介导的DNA损伤应答反应与其抑癌作用无关。另外，还发现这种依赖p53激活的淋巴瘤抵抗现象是完全依赖ARF蛋白的，该蛋白也由Cdkn2a基因座编码，是p53蛋白的活化因子，能够对致瘤应激刺激作出反应。因此，至少在这种情况下p53蛋白所发挥的主要抑癌作用并不是立即清除掉发生了DNA损伤的细胞，而是通过ARF介导的途径来抑制少数癌基因被激活的细胞克隆的增殖。不过在分析这些实验数据时有一点要特别注意，那是因为Trp53ER等位基因并不是无效等位基因，Trp53ER纯合体不能拯救Mdm2-表型。因此这种推迟肿瘤形成的表型可能是因为残存的p53活性足以杀灭异常细胞所致。

Evan、Jacks以及Lowe实验室还使用这类条件激活的野生型p53动物模型发现了恢复p53功能能够使肿瘤明显消退的现象。不过，他们每一个实验室使用的动物模型和激活p53的方法都各不相同。每一个实验室都发现由于缺乏p53活性而出现的肿瘤细胞里还都包含有完整的p53信号通路，当有野生型p53蛋白存在时这些通路又都可以马上被激活。Evan实验室使用的是Trp53ER（TAM）模型来激活Eμ-Myc淋巴瘤模型体内的p53蛋白；Jacks实验室使用的是LSL-Cre方法来抑制自然发生的淋巴瘤和肉瘤；Lowe实验室使用的是可被多西霉素抑制的shRNA技术来激活肝癌小鼠模型体内的野生型p53蛋白。有趣的是，虽然每一个模型在激活了野生型p53蛋白之后都表现出了非常明显的抑癌作用，但是p53蛋白的抑癌机制还是因“癌”而异的。在淋巴瘤中起主要作用的是细胞凋亡作用，而在肝癌和肉瘤中起主要作用的则是促进细胞老化机制。在肝癌模型中，p53诱导的细胞老化过程能产生炎性因子，激活先天免疫反应，以此来清除肿瘤细胞。因此很明显，这些体内试验证据都表明p53依赖的凋亡反应、细胞周期停滞反应和肿瘤细胞老化反应都是细胞类型特异性的抑癌反应。这些激动人心的研究成果让我们相信，在肿瘤细胞里重建p53的功能也许可以起到意想不到的治疗作用。不过，Evan等人的动物模型在激活了p53之后肿瘤出现了复发现象，这可能是由于细胞缺乏ARF或者是可诱导的Trp53基因本身的原因。另外，还需要注意的是，大部分人体肿瘤都含有突变p53基因，我们还不清楚在这些细胞内重建野生型p53蛋白功能是否能够起到明显的抑癌作用，因为同时还存在着大量稳定的突变p53蛋白。

3. 结论及展望

能够在完整的哺乳动物模型体内操控并研究Trp53基因，这种技术上的进步极大地加深了我们对p53蛋白各种功能（包括与肿瘤相关的功能和不与肿瘤相关的功能）的了解。尤其是观察到将各种类型的突变Trp53基因敲入小鼠基因组之后能够决定“继发”的肿瘤类型。我们在图3中详细介绍了各种肿瘤易感性。图中还展示了各种Trp53基因代表突变模型里p53蛋白的活性曲线。p53蛋白的突变本质决定了最终形成的

肿瘤类型。需要注意的是，热点突变模型Trp53$^{R172H/R172H}$小鼠相比Trp53$^{-/-}$小鼠更容易罹患肿瘤，这不是因为它们形成肿瘤更早，而是因为Trp53$^{R172H/R172H}$小鼠体内的肿瘤经常发生转移。这种差异说明各种p53突变体可能会赋予细胞新功能，而不仅仅只是丧失p53的功能。另外，诸如R172P和S18A等多种p53突变体都还部分保留了野生型p53蛋白的功能，因此携带这些突变基因的小鼠模型相比Trp53$^{-/-}$小鼠来说，致瘤率会相应地有所降低。最后，各种Trp53基因超等位基因突变体小鼠，例如超Trp53基因小鼠和Trp53$^{+/m}$小鼠等都有明显的抗癌表型，而且寿命也会有所变化（超Trp53基因小鼠的寿命没有变化）。因此可以得出结论，超过正常水平的p53蛋白活性能够增强抗癌效果，而这种超常的p53活性对于小鼠寿命的影响则视p53的调控情况而各有差异（背景知识3）。尽管小鼠能够耐受高水平的野生型p53蛋白活性，但这种耐受并不是毫无止境的，而是存在一个上限的，比如Mdm2$^{-/-}$小鼠和Mdm4$^{-/-}$小鼠都具有非常高水平的野生型p53活性，因此它们在胚胎发育早期就会夭折。

图3中所示的各种p53小鼠模型都是种系模型。这些模型正逐渐被各种新出现的可对p53表达及活性进行后天时、空调控的p53模型所替代。随着这些新模型以及将来可能出现的更加先进的技术的问世，我们将能够了解更多、更重要的信息，这将帮助我们解答更多有关p53抑癌机制的问题。比如p53诱导的细胞凋亡、细胞周期停滞、细胞老化等机制对于特定组织中的抑癌效果究竟是重要还是不那么重要呢？有没有其它的重要机制参与p53介导的抑癌作用？在各种情况下，p53介导的DNA损伤反应是否总是没有p53介导的致瘤应激反应重要吗？这些抗癌p53应答反应是暂时发挥作用还是持续发挥作用？p53蛋白对细胞的新增功能和显性负相作用的本质是什么？各种不同热点突变是否真的能导致机体形成不同的肿瘤？p53蛋白究竟是主要起到“看门人”的作用（阻止肿瘤发生）还是主要起到“管理者”的作用（防止基因组失稳）？在将来会有越来越多的动物模型出现，我们也会渐渐揭开上述谜题的答案，还将发现更多出乎我们意料的新信息。

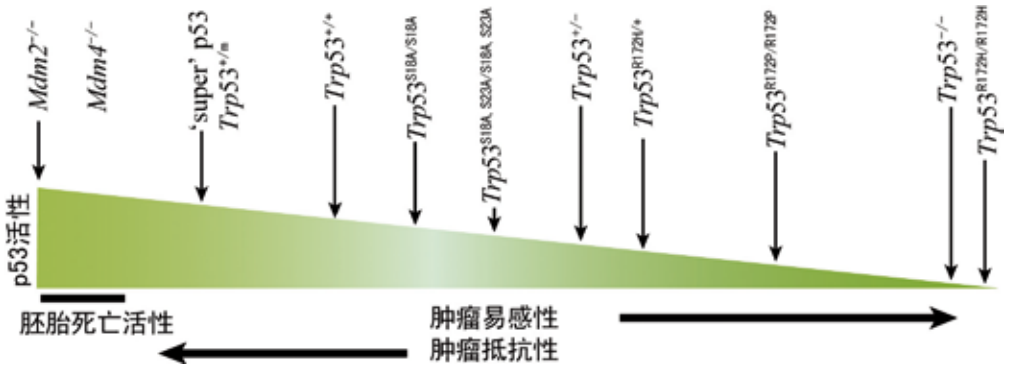


图3 各种不同p53突变动物模型的抑癌表型差异。图中介绍了各种代表性的p53突变动物模型中p53蛋白的相对抑癌活性（由左至右p53蛋白的活性由高至低顺序递减）和动物的抑癌表型。图中最左侧的是Mdm2$^{-/-}$小鼠和Mdm4$^{-/-}$小鼠，它们的p53活性最高，因而小鼠在胚胎期就出现死亡。Trp53$^{+/m}$小鼠表达的是p53蛋白的C末端片段。

原文检索：

Lawrence A. Donehower and Guillermina Lozano. (2009) 20 years studying p53 functions in genetically engineered mice. *Nature Reviews CanCer*, 9:831-841.

YORK/编译

注：更多关于p53的内容，请登录生命奥秘网页www.lifeomics.com阅读。