新抑癌基因 $p15^{MTS2/INK4B}$ 的研究进展

童迎凯 柳惠图

(北京师范大学生物系, 细胞增殖及调控生物学开放实验室, 北京 100875)

摘要 近年来发现, 细胞中抑制肿瘤发生、发展的机制除了有 *Rb*、*p53* 等抑癌基因发挥作用外, 一类 CKI 分子(cyclin-dependent kinase inhibitor, 细胞周期引擎分子的抑制剂) 也具有非常重要的作用. 在已知的 CKI *p21* 和 *p16* 两大家族中, *p15* 是与 *p16* 同源性很高的一个 CKI 分子, 大量肿瘤以及多种癌细胞系中的调查表明, *p15* 基因的异常表达(如缺失、突变和重排等) 在许多肿瘤及癌细胞系中存在, 并与其中一些肿瘤的发展密切相关, 这为确定 *p15* 作为一个新的抑癌基因提供了证据. 在此基础上, 进一步对 *p15* 在细胞周期中调控细胞增殖和分化机理的研究发现: *p15* 能抑制一些肿瘤细胞的增殖, 并可作为细胞生长抑制因子 TGF- β 发挥作用的中介者, 另外在某些类型细胞的分化过程中, *p15* 水平的上升与细胞分化表型的出现具有相关性. 这些关于 *p15* 的研究进展为进一步阐明细胞周期调控及细胞癌变的分子机制提供了线索, 并可能为 *p15* 运用于肿瘤的临床治疗提供理论与实验依据.

关键词 *p15* CKI 抑癌基因 细胞周期 诱导分化

细胞的增殖是通过细胞周期来实现的, 准确、有序地出入各个周期时相成为细胞正常生长、代谢的关键. 这种精细的调控一旦失败, 就意味着增殖的失控. 动物肿瘤的发生原因, 从根本上说是由于某种细胞周期的失控, 使之不能正常运转, 引起增殖分化异常, 最终导致癌化. 因此, 研究细胞周期的调控机理是研究肿瘤发生并最终治愈肿瘤的基础和关键.

众所周知, 细胞周期运行的核心是细胞周期引擎分子如 CDK(cyclin dependent kinase) 等, 它一经开动, 就使得细胞周期按时间、空间的顺序自动地完成, 有人称之为细胞周期时钟(cell cycle clock), 或者“细胞周期自动程控机器”. 细胞周期有序进行和转换点的顺利通过主要是依赖于引擎分子 CDKs/cyclins 有序地激活与失活, 并通过细胞周期依赖的各种底物蛋白的磷酸化/去磷酸化和泛素介导的蛋白水解系统来实现的.

近几年来, 利用双杂交体系及经典的生物化学方法先后在哺乳动物中发现了各种 CDK 的抑制剂, 称为 CKI, 是 CDKs 的负调控因子, 在细胞周期的负调控过程中扮演重要角色. 由 CDKs, CKIs 及 CDKs 的正调控因子-cyclins 组成的全酶复合物, 即所谓的“驱动器”, 推动着细胞周期的进程及各个时间的过渡. CKIs 的发现使我们对于细胞周期调控和检查点的功能有了更为全面、深刻的了解, 同时, 在阐明细胞癌变的分子机制方面也为我们提供了重要的线索.

哺乳动物中的 CKIs 根据其分子量的不同命名为 *p15*, *p16*, *p18*, *p19*, *p21*, *p27* 等, 并根据其结构、功能的特点分为 2 个家族: 即 *p21/p27* 家族和 *p15~p20* 家族.

p21 是第 1 个被分离的哺乳动物的 CKI, 它是 CDK 和增殖细胞核抗原(PCNA) 的抑制因子^[1]. *p21* 的作用可被 *p53* 激活^[2], 但后来的研究又表明它也可以不依赖于 *p53* 而被激活^[3]. *p27* 是与 *p21* 有部分同源性的另一个 CKI, 它是作为 cyclinE/CDK2 的抑制因子并在 TGF- β 的诱导下与 cyclinE/CDK2 结合使 Mvllu mink 细胞强烈抑制在 G1 期被发现的^[4]. *p57* 是 *p21* 家族的另一新成员^[5], 它在终端分化细胞里表达, 表明在某些特殊类型细胞的细胞周期中存在这一抑

制因子。

p15~ p20 家族成员有 p15, p16, p18, p19, 还有人报道 p14, p15. 5, 后者有待于进一步确认。在这个家族中, p16 是最先发现的, 它是 1992 年由 Beach 等人在美国长岛冷泉港实验室研究黑色素瘤细胞中与 CDK4 结合的调控蛋白时发现的, 它定位于染色体 9p21^[6]。染色体 9p21 区域是易发生缺失、突变, 产生恶性肿瘤的区域。目前, p16 被认为是主要的抑癌基因 (multiple tumor suppressor gene 1), 即 MTS1, 这是由于在已普查过的 300 多种癌细胞株中, MTS1 发生纯合缺失的比例较高。但不久之后, Beach 等人发现的 *p15^{MTS2/INK4B}* 说明了染色体的 9p21 区域除了 *p16^{MTS1/INK4A}* 以外, 还存在着其他重要的抑癌基因。

另外, 在 p15~ p20 家族中, p18^{INK4C} 最初是由 Guan 等人克隆出的, 定位于人 1 号染色体^[7]。p19^{INK4D} 是由 Chan 等人克隆出的, 定位于人 19 号染色体^[8]。它们与 p16 有 40% 的氨基酸同源性。p18, p19 的确切功能还有待于进一步研究确认。

p15/p16 与 p21/p27 相比, 除基因序列上无同源性以外, 在对 CDKs 活性的抑制上还有 2 个重要的区别: 1) p15/p16 仅作用于 CDK4/CDK6 两种 D 型 CDK, 而 p21, p27 可结合并广泛抑制 CDKs, 这说明两个家族对不同 CDKs 的亲合力不同。2) p15/p16 通过与 CDK 催化亚基形成二聚体的方式起作用, 而 p21, p27 则与 CDKs 形成 CKI/CDK/cyclin/PCNA 四聚体, 即两家族与 CDKs 的作用方式不同。

p15 基因由 MTS2 基因编码^[9], Beach 小组用 p16 cDNA 为探针, 从 TGF- β 阻断的 HaCaT 细胞 cDNA 文库中克隆了一个编码 137 个氨基酸分子量为 14.7 ku 的 p16 的同类物, 定名为 p15^{INK4B}。(图 1) p15 与 p16 的结构十分相似, 它们的前 50 个氨基酸残基有 44% 的同源性, 接下来的 81 个氨基酸区域有 97% 的同源性。并且 2 分子中均有 4 个锚蛋白基序。在已发现的 CDKs 中, p15 与 p16 一样, 可以选择性地抑制 CDK4 和 CDK6 而不与 CDK2 作用。与 p16 不同的是, p15 的作用可被细胞因子 TGF- β 诱导, 经 TGF- β 处理的 HaCaT 细胞, 其中 p15 mRNA 和蛋白质水平增加 30 倍^[9]。因此, p15 可在胞外信号 TGF- β 的作用下, 将细胞阻断于 G1 期。

p15 作为 p15~ p20 家族中的重要成员, 继 p16 被发现和研究以来, 各实验室也投入了大量的精力

10	30	50
GAGGACTCCGCGACGGTCCGCACCCCTGCGGCCAGAGCGGCTTTGAGCTCGGCTGCTTCCG		
70	90	110
CGCTAGGCGCTTTTCCAGAAAGCAATCCAGGCGCGCCGCTGGTCTTCTGAGCGCCAGGA		
130	150	170
AAAGCCCGAGCTAACGACCGCGCGCTCGGCACTGCACGGGGCCCAAGCGCAGAAAGAA		
190	210	230
GGACGACGGGAGGGTAATGAAGCTGAGCCAGGTCTCCTAGGAAGGAGAGAGTGCGCCGG		
250	270	290
AGCAGCGTGGGAAAGAAGGGAAGAGTGTCTGTTAAGTTTACGGCCAACGGTGGATTATCCG		
310	330	350
GGCCGCTGCGCGTCTGGGGGCTGCGGAATGCGCGAGGAGAAACAGGGCATGCCAGTGGG		
	M R E E N K G M P S G	
370	390	410
GGCGGCAGCGATGAGGGTCTGGCCACGCGCGCGGGGACTAGTGGAGAAGGTGCGACAC		
G G S D E G L A T P A R G L V E K V R H		
430	450	470
TCCTGGGAAGCGCGCGGATCCCAACGGAGTCAACCGTTTCGGGAGGCGCGGATCCAG		
S W E A G A D P N G V N R F G R R A I Q		
490	510	530
GTCATGATGATGGCAGCGCCCGCGTGGCGGAGCTGCTGCTGCCAGCGCGGAGCCC		
V M M M G S A R V A E L L L L H G A E P		
550	570	590
AACTGCGCAGACCTGCCACTCTCACCCGACCGGTGCATGATGCTGCCCGGGAGGGCTTC		
N C A D P A T L T R P V H D A A R E G F		
610	630	650
CTGGACACGCTGGTGGTGTGCTGCACCGGGCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGG		
L D T L V V L H R A G A R L D V R D A W		
670	690	710
GGTCGTCTGCCCCTGGACTTGGCCGAGGAGCGGGGCCACCGGACGTTGCAGGGTACCTG		
G R L P V D L A E E R G H R D V A G Y L		
730	750	770
CGCACAGCCACGGGGGACTGACGCCAGGTTCGCCAGCGCCCAACGACTTTATTTCT		
R T A T G D		
790	810	830
TACCCAATTTCCACCCCCACCCACCTAATTCGATGAAGGCTGCCAACGGGGAGCGG		

图 1 p15 基因的 cDNA 序列及相应蛋白的氨基酸序列

对其进行了广泛研究,力求揭示它与 *p16* 的共性,以及它作为一个独立的细胞周期调控因子在调控细胞增殖和细胞癌化中的作用.近几年来,对 *p15* 的研究工作主要集中于以下几个方面:

1 *p15* 基因在肿瘤细胞系和肿瘤组织中的改变及其作为抑癌基因探讨

在已调查的一些肿瘤细胞系和肿瘤组织中,发现伴随 *p16* 基因的改变也常常有 *p15* 基因的改变,因此人们一直将 *p15* 作为抑癌基因的候选者.以后的研究人员调查了更多肿瘤细胞系,收集了更为广泛的临床原发性肿瘤中的情况,发现 *p15* 的失活在多种肿瘤组织、细胞系中存在.不同细胞类型 *p15* 失活频率有所不同.同时, *p15* 失活有缺失(deletion)、重排(rearrangement)、突变(mutation)等一些不同的机制,这也随着肿瘤细胞类型的不同而有所差异.

大量的工作集中于血液系统的恶性肿瘤和细胞系中,包括白血病和淋巴瘤等.研究发现, *p15* 在血液系统的肿瘤、细胞系中的缺失是一种十分频繁的现象,甚至于在某些类型的肿瘤中 *p15* 的缺失可作为一个诊断与指导治疗方案的指标.据报道, *p15* 在 T-细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)原发性肿瘤中纯合缺失比例较高^[10],与此类似的情况还有儿童前体 B 细胞急性淋巴母细胞白血病(pre-B ALL)^[11]、儿童 ALL^[12]、成人 T 细胞白血病(ATL)^[13],以及 pre-B ALL 细胞系 JKB2^[14]和多种恶性 T-细胞系^[15].这些缺失也常常伴随有 *p16* 的基因改变.其中,在成人 T-细胞白血病和儿童 ALL 中,还发现 *p15/p16* 缺失与肿瘤病人的不良预后之间有着统计学的重要联系,可以将这种缺失作为预测病情复发和生存期长短的可靠因子^[12, 13].在某些淋巴瘤及其细胞中, *p15* 的纯合缺失也较为普遍,例如:原发恶性淋巴瘤^[16], B-细胞非何杰金氏淋巴瘤 B-NHL 细胞系^[17].

除血液系统癌症之外,还有其他类型的肿瘤或细胞系被报道存在 *p15* 的普遍缺失,例如:黑色素瘤^[18]、食道扁平细胞瘤^[19]、神经胶质瘤^[20]、鼠肺癌^[21],以及人乳腺表皮细胞系^[22]等.这些肿瘤和癌细胞系中, *p15* 也经常与 *p16* 共同缺失,并且在神经胶质瘤中,还发现了 *p53*, *Rb* 这 2 个重要的抑癌基因的缺失.

以上结果显示, *p15* 在很多种类型的肿瘤发生、发展中起到重要作用,在一定范围内可视为抑癌基因的新成员.同时 *p16* 等的共同缺失也提示了 *p15* 在细胞癌化中的作用可能是与其他抑癌基因及其他因子协同作用的结果.

另外一些肿瘤和细胞系也发现有 *p15* 的缺失或者重排、突变,但其机率较小.例如:原发性胃癌及其细胞系^[23],人头颈扁平细胞系^[24],人卵巢瘤及其细胞系^[25],骨髓发育不良症(MDS)^[26],人垂体腺瘤^[27],多重骨髓瘤^[28],人非星形细胞脑瘤^[29],婴儿 ALL^[30],人急性白血病^[31].也有报道称在一些肿瘤中没有发现 *p15* 的基因改变,它们是:人甲状旁腺瘤^[32]、人星状细胞瘤^[33]、原发型非小细胞肺癌^[34]等.

除上述的 *p15* 基因改变的情况之外,还有一种 *p15* 基因失去转录活性而不影响其一级结构的是在 5'-CpG 岛区域发生大面积的甲基化.这在 T-ALL^[10, 35]、神经胶质瘤^[35]、骨髓发育不良症(MDS)^[36]中均有发现.尤其是在 MDS 病人中,发生甲基化的比例高达 50%,并且高度甲基化在高危病人中的数量明显多于低危病人,甲基化程度也随着 MDS 的发展而加剧.与之有意义的比较是:MDS 病人并没有显示出 *p16* 的高度甲基化.这表明 *p15* 基因的高度甲基化与 MDS 密切相关,并且是 MDS 发展进程中的重要晚期事件.

除了以上这些来自于人类临床的调查结果,另有最新的报道称在化学药物如 2', 3'-双脱

氧胸苷或1,3-丁二烯诱导的鼠淋巴瘤中,伴有 *p16*, *p15* 基因的缺失、突变和甲基化,这表明包括 *p15* 在内的 CKI 基因可能在化学药物诱导的鼠淋巴瘤中起到重要作用^[37]。

2 *p15* 基因在细胞周期进程及细胞增殖调控中发挥作用的机理

以往的研究表明, *p15/p16* 不同于 *p21/p27*, 后者是结合 cyclin 发挥作用, 前者是通过与 CDK4/CDK6 发生特异性结合而下降其活性的发挥^[38], 那么能引起这种作用的胞外信号是什么呢? 早期的研究曾指出, 在经 TGF- β 处理的 HaCaT 细胞中, 其 *p15* 的 mRNA 和蛋白水平可增加 30 倍^[9], 并将细胞周期阻止在 G1。后来也有发现在人乳腺表皮细胞及水貂肺表皮细胞中, TGF- β 可诱导 *p15* mRNA 水平上升, 使 *p15* 蛋白的稳定性显著增加, 并能增加 *p15*-CDK4/CDK6 复合物, 抑制 CDK4/CDK6 与 cyclinD 结合, 同时使 *p27* 与 cyclinD-CDK4/CDK6 的结合减少, 而与 cyclinE/CDK2 的结合增多^[39]。关于 *p15* 促进 *p27* 转位问题, 有人提出这与 *p15*, *p27* 的亚细胞定位不同有关^[40]。细胞中, *p15* 主要位于胞浆而 *p27* 位于细胞核, 这保证了 *p15* 先于 *p27* 与 CDK4 结合。当 *p15*, *p27* 被放至同一类亚细胞位置——胞浆或核时, *p15* 不再阻止 *p27* 结合 CDK4。

然而, 来自黑色素瘤细胞系 WM135 的研究对上述结果进行了补充^[41]: WM135 缺乏 *p15* 基因, TGF- β 也能够诱导 cyclinD, cyclinA, CDK 的减少和 CDK 活性的下降, 同时引起 *p21*, *p27* 含量增加。这与已往的认识即 TGF- β 上调 *p15*, 促进 *p27* 与 CDK4/cyclinD 结合失稳而转向 cyclinE/CDK2 有所不同。由于 WM135 中 *p15* 基因缺失使我们认识到 *p15* 不是 TGF- β 引起周期阻止的唯一机制。在这个细胞系中, *p21* 的上升可能行使了与 *p15* 类似的功能。

另一个缺乏 *p15* 基因的细胞——人乳腺表皮细胞系 MCF-10A 中的初级结果也说明 TGF- β 在缺乏 *p15* 时可通过其他途径行使其生长抑制功能: 在这个细胞系中, TGF- β 可引起 *cdc25* 表达的下降, 从而使 CDK 分子上抑制性 Tyr 磷酸化水平相对提高, 使 CDK 活性降低^[22]。

因此, *p15* 应答并不是 TGF- β 引起的唯一下游事件。而能引起 *p15* 应答的其他信号目前还知之甚少。只有少数报道发现一种病毒癌蛋白 E1A, 可抑制 TGF- β 引起的 *p21*, *p15* 应答, 促进细胞增殖^[42]。

我们实验室在自行构建的 *p15* 高表达的人黑色素瘤细胞和人肝癌细胞 SMMC-7721 中均表明, 与对照组相比, 细胞增殖被抑制, *p15* 不仅阻抑了细胞 G1/S 的过渡, 更令人注目的是 *p15* 的过表达也作用于 G2/M 转移的被阻滞。并且表现出与周期蛋白 CyclinD 和 E 及癌基因 *c-myc*, *c-Ha-ras* 的表达被抑制密切相关(待发表资料)。

总之, 对 *p15* 在细胞周期中发挥调控作用的机理的研究还是刚刚开始, 很多问题还不清楚, 还有待于我们做更深入、更广泛的探讨。

3 初步探讨 *p15* 基因在癌细胞诱导分化中的作用

在 G1 期 CKIs 基因的结构改变被广泛调查的血液系统恶性肿瘤中, 有学者认为 *p15*~*p20* 家族 CKIs 不仅仅作为抑癌基因起作用, 也可能对癌细胞诱导分化十分重要。在佛波脂诱导的 HL-60 细胞单核细胞分化过程中, 特定 G1-CKIs 的表达是被不同调节的。 *p15* 水平上调, 而 *p18*, *p19* 则下降, 这一过程与大部分细胞(≥80%)的生长抑制相关。相比较而言, 在 DMSO 诱导的粒细胞分化中, 只伴随有 *p18*, *p19* 的上升。通过 nuclear-run-on 分析和 mRNA 半衰期研究可知, *p15*, *p18* 的不同调节依赖于中间蛋白的合成并发生在转录后水平^[43]。另外, 对神经系统

肿瘤的研究发现:在畸胎瘤细胞系 NT2 向分裂期后神经元的分化过程中,伴随有 p15 和 p16 蛋白表达的上升^[44],这说明 p15/p16 对维持细胞静止状态起一定作用,它们的缺失可能会加剧细胞增殖的失控. 我室构建的 p15 高表达的人肝癌细胞 SMMC-7721 中观察到裸鼠致瘤率下降和出现部分分化特征(待发表资料). 上述结果不仅显示出 p15 等 CKIs 可能在癌细胞诱导分化中发挥作用,而且 p15 与其他 CKIs 表达调节的不同也表明它们之间行使功能的差异性以及在细胞调控中的复杂性.

4 其他方面的研究

除了以上几个方面的研究,目前在检测 *p15* 基因缺失的方法中也有所进展. 有实验室发现鼠 4 号染色体 *Cdhn2B*(*p15*^{INK4B}) 下游的 700 bp 处存在着特异性的 AC 重复序列. 这个 DNA 重复序列位于 *Cdhn2B*(*p15*^{INK4B}) 与 *Cdhn2A*(*p16*^{INK4A}) 之间,它相当于一个特异性的基因 Marker,能定位出用其他小卫星 DNA 发现不了的等位缺失^[45].

最近还有实验室报道,他们在人的胎盘中克隆出了 p15 的另一个剪切形式 p10. p10 普遍性地在正常及肿瘤组织中表达. 与 p15 相类似的是, *TGF-β1* 也可引起 p10 的表达,同时在某些细胞种类中 p10 表现出与 p15 在细胞定位上的相似性. 两者都对细胞生长有抑制作用,而在 COS-7 细胞系中, *CDK4/CDK6* 不与 p10 发生免疫共沉淀^[46]. 这一结果使得 CKI 和它的剪切形式在细胞周期中的调节显得更为复杂.

总之,以上所述基本上概括了近年来有关 *p15* 的研究进展. 这些实验结果使我们看到,大量关于 *p15* 基因改变的研究为确定 *p15* 作为抑癌基因新成员提供了证据,为基础肿瘤医学在分子水平上积累了数据,同时也能对实际肿瘤组织和肿瘤细胞系中的结果加以比较,探讨其中的异同. 对 *p15* 抑制增殖、参与诱导癌细胞分化的分子机理的研究有助于揭示 CKIs 在细胞周期中的调控作用,为阐明细胞增殖、分化、癌变等过程提供线索,并可能为肿瘤的临床治疗提供理论依据.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39780014,39430080)和北京市自然科学基金(批准号:7961001)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Waga S, Hamon G J, Beach D. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 1994, 369: 574~ 578
- 2 EL-Deiry D W, Tokino T, Velculescu V E, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993, 75: 817~ 825
- 3 Michieli P, Chedid M, Lin D, et al. Induction of WAF1/CIP1 by p53-independent pathway. *Cancer Research*, 1994, 54: 3 391~ 3 395
- 4 Polyak K, Kato T Y, Solomon M J, et al. p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, 1994, 8: 9~ 22
- 5 Lee M H, Reynisdottir I, Massague J, et al. Cloning of p57^{KIP2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*, 1995, 9: 639~ 649
- 6 Serrano M, Hannon G J, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of CyclinD/CDK4. *Nature*, 1993, 366: 704~ 707
- 7 Guan K, Jenkins C W, Li Yan, et al. Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1} and p14^{INK4/NTS2}-related CKD6 inhibitor, correlates
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-8-793>

- with wild-type pRb function. *Genes Dev*, 1994, 8: 2 939~ 2 952
- 8 Chan F K M, Zhang J, Cheng L, et al. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{INK4}. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 2 682~ 2 688
- 9 Hannon C J, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994, 371: 257~ 261
- 10 Batova A, Diccianni M B, Yu J C, et al. Frequent and selective methylation of p15 and deletions of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*, 1997, 57(5): 832~ 836
- 11 Ohnishi H, Hanada R, Horibe K. Homozygous deletions of p16/MTS1 and p15/MTS2 genes are frequent in t(1;19)-negative but not in t(1;19)-positive B precursor acute lymphoblastic in childhood. *Leukemia*, 1996, 10(7): 1104~ 1110
- 12 Heyman M, Moreno T C, Liu Y, et al. Prognostic importance of p15^{INK4B} and p16^{INK4A} genes inactivation in childhood acute lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 1996, 14(5): 1512~ 1520
- 13 Yamada Y, Hatta Y, Murata K, et al. Deletions of p15 and/or p16 genes as a poor-prognosis factor in adult T-cell leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 1996, 15(5): 1778~ 1785
- 14 Urashima M, Hoshi Y, Sugimoto Y, et al. A novel pre-B acute lymphoblastic leukemia cell line with chromosomal translocation between p16INK4A/p15INK4B tumor suppressor and immunoglobulin heavy chain genes: TGF Beta/IL-7 inhibitory signaling mechanism. *Leukemia*, 1996, 10(10): 1576~ 1583
- 15 Brandt L B, Heyman M, Rasool O, et al. p16INK4A/p15INK4B genes inactivation is a frequent event in malignant T-cell lines. *European Journal of Haematology*, 1996, 56(5): 313~ 318
- 16 Hangais I A, Ogawa S, Imamura N, et al. Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16INK4A/CDKN2, MTS2/p15INK4B, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies. *Blood*, 1996, 87(12): 4949~ 4958
- 17 Jadayel D M, Lukas J, Nacheva E, et al. Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas: Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia*, 1997, 11(1): 64~ 72
- 18 Flores J F, Walker, G J, Glendening J M, et al. Loss of the p16(INK4a) and p15(INK4b) genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Research*, 1996, 56(21): 5023~ 5032
- 19 Tanaka H, Shimada Y, Imamura M, et al. Multiple types of aberrations in the p16(INK4a) and p15(INK4b) genes in 30 esophageal squamous-cell carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 1997, 70(4): 437~ 442
- 20 Zhang S J, Endo S, Koga H, et al. A comparative study of glioma cell lines for p16, p15, p53 and p21 gene alterations. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1996, 87(9): 900~ 907
- 21 Herzog C R, Soloff E V, McDoniels A L, et al. Homozygous codeletion and differential decreased expression of p15INK4b, p16INK4a α and p16INK4a β in mouse lung tumor cells. *Oncogene*, 1996, 13(9): 1885~ 1891
- 22 Iavarone A, Massague J. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF- β in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*, 1997, 387(6631): 417~ 422
- 23 Lee Y Y, Kang S H, Seo J Y, et al. Alterations of p16INK4A and p15INK4B genes in gastric carcinomas. *Cancer*, 1997, 80(10): 1889~ 1896
- 24 Gonzalez M V, Pello M F, Lopez-Larrea C, et al. Deletion and methylation of the tumor suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J of Clinical Pathology*, 1997, 50(6): 509~ 512
- 25 Ichikawa Y, Yoshida S, Koyama Y, et al. Inactivation of p16/CDKN2 and p15/MTS2 genes in different histological types and clinical stages of primary ovarian tumors. *International Journal of Cancer*, 1996, 69(6): 466~ 470
- 26 Nakamaki T, Miller C W, Koeffler H P. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes, p15, p16, p18 and p19 in the myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, 1997, 21(3): 235~ 240
- 27 Yoshimoto K, Tanaka C, Yamada S, et al. Infrequent mutations of p16INK4A and p15INK4B genes in human pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology*, 1997, 136(1): 74~ 80
- 28 Tasaka T, Berenson J, Vescio R, et al. Analysis of the p16INK4A, p15INK4B and p18INK4C genes in multiple myeloma. *British*

Journal of Hematology, 1997, 96(1): 98~ 102

- 29 Sato K, Schaeuble B, Kleihues P, et al. Infrequent alterations of the p15, p16, CDK4 and cyclinD1 genes in non-astrocytic human brain tumors. International Journal of Cancer, 1996, 66(3): 305~ 308
- 30 Maloney K W, Rubnitz J E, Cleary M L, et al. Lack of ETV6(TEL) gene rearrangements or p16INK4A/p15INK4B homozygous gene deletions in infant acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, 1997, 11(7): 979~ 983
- 31 Sill H, Aguiar R C T, Schmidt H, et al. Mutational analysis of the p15 and p16 genes in acute leukaemias. British Journal of Haematology, 1996, 92(3): 681~ 683
- 32 Tahara H, Smith A P, Gaz R D, et al. Loss of chromosome arm 9p DNA and analysis of the p16 and p15 cyclin dependent kinase inhibitor genes in human parathyroid adenomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1996, 81(10): 3663~ 3667
- 33 Tsuzuki T, Tsunoda S, Sakaki T, et al. Alterations of retinoblastoma, p53, p16(CDKN2), and p15 genes in human astrocytomas. Cancer, 1996, 78(2): 287~ 293
- 34 Rusin M R, Okamoto A, Chorazy M, et al. Intragenic mutations of the p16INK4A, p15INK4B and p18 genes in primary non-small cell lung cancers. I J of Cancer, 1996, 65(6): 734~ 739
- 35 Herman J G, Jen J, Merlo A, et al. Hypermethylation associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. Cancer Research, 1996, 56(4): 722~ 727
- 36 Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. Blood, 1997, 90(4): 1403~ 1409
- 37 Zhuang S M, Schippert A, Haugen-Strano A, et al. Inactivations of p16^{INK4A}- α , p16^{INK4A}- β and p15^{INK4B} genes in 2', 3'-dideoxycytidine and 1, 3-butadiene-induced murine lymphomas. Oncogene, 1998, 16(6): 803~ 808
- 38 Hall M, Bates S, Peters G, et al. Evidence for different modes of cyclin dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. Oncogene, 1995, 11: 1581~ 1588
- 39 Sandhu C, Garbe G J, Bhattacharya N, et al. Transforming growth factor β stabilizes p15^{INK4B} protein, increases p15^{INK4B}-cdk4 complexes, and inhibits cyclinD1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(5): 2458 ~ 2467
- 40 Reynisdottir I, Massague J. The subcellular locations of p15Ink4b and p27Kip1 coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. Genes Dev, 1997, 11(4): 452~ 503
- 41 Florenes V A, Bhattacharya N, Bani M R, et al. TGF- β mediated G1 arrest in a human melanoma cell line lacking p15^{INK4B}: evidence for cooperation between p21^{Cip1/WAF1} and p27^{Kip1}. Oncogene, 1996, 13(11): 2447~ 2457
- 42 Datto M B, Hu P P C, Kowalik T F, et al. The viral oncoprotein E1A blocks Transforming growth factor β -mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 2030~ 2037
- 43 Schwaller J, Pabst T, Koeffler H P, et al. Expression and regulation of G1 cell-cycle inhibitors (p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C, p19INK4D) in human acute myeloid leukemia and normal myeloid cells. Leukemia, 1997, 11(1): 54~ 63
- 44 Lois A F, Cooper L T, Geng Y, et al. Expression of the p16 and p15 cyclin dependent kinase inhibitors in lymphocyte activation and neuronal differentiation. Cancer Res, 1995, 55: 4010~ 4013
- 45 Malumbres M, De Castro I P, Santos J, et al. An AC-repeat adjacent to mouse Cdkn2B allows the detection of specific allelic losses in the p15INK4B and p16INK4A tumor suppressor genes. Mammalian Genome, 1998, 9(3): 183~ 185
- 46 Tsubari M, Tiihonen E, Laiho M, et al. Cloning and characterization of p10, an alternatively spliced form of p15 cyclin dependent kinase inhibitor. Cancer Research, 1997, 57(14): 2966~ 2973

(1998-09-21 收稿, 1998-12-26 收修改稿)