

ras 超家族中的肿瘤抑制基因

罗 彬综述,李后文,谢小薰审校

关键词:肿瘤抑制基因;ARHIRERgri g

中图分类号:R730.23 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)04-0246-03

0 引言

ras 超家族是一类重要的功能蛋白。它们介导生长因子、细胞因子和多种细胞外信号的信息通路,对细胞生长、分化、存活、增殖等多种功能的调节发挥重要作用。尽管 ras 超家族各成员之间存在差异,但它们也具有一些共同特征:(1)都是单体小 G 蛋白,拥有高度保守的 GTP 结合域(G1-G5),能与 GTP 和 GDP 结合;(2)都有内源性 GTP 酶活性,能水解 GTP 生成 GDP;(3)多数 ras 超家族成员通过翻译后的脂酰化修饰与膜结合^[1]。ras 超家族在细胞信号转导中可作为信号转换器或分子开关,它们通过与 GTP 结合(激活态)和 GDP 结合(失活态)的转换导致信号的转导或终止^[2]。该家族许多成员是癌基因,当其被异常激活后会导致细胞无限制地增殖,引起肿瘤。近年来,研究发现 ras 超家族中包括一些独特的成员,作为生长负向调节者,具有肿瘤抑制作用,本文现予以概述。

1 ARHI(A pplysiarasHomolo gI)

ARHI 是 ras 超家族中第一个被报道的肿瘤抑制基因,它是美国德克萨斯大学 Anderson 癌症中心于 1999 年利用差异展示 PCR(differential display PCR)发现,又名 NOEY2 或 ras 同源基因家族成员 I(rashomolo g gene,memberI)。人 ARHI 基因定位于 1p31,总长约为 8kb,由两个外显子和一个内含子组成。外显子 I 为 81 个未编码的核苷酸,外显子则包括整个蛋白质的编码区。表达产物为 229 个氨基酸组成的蛋白,分子量约为 26kDa。ARHI 的 N-末端包含 34 个氨基酸残基的独特延伸结构,但从第 35 个氨基酸开始,与 ras、rap 基因有着 50%~60% 的同源性^[3]。

ARHI 是母源性印迹、父源性表达,可能与其 CpG 岛的差异甲基化有关。基因结构分析发现 ARHI 的 3 个 CpG 岛,CpG 岛和 位于启动区,

CpG 岛 则位于编码区内^[4]。据观察,在正常细胞中,ARHI 仅在母亲的等位基因上发生 CpG 岛的甲基化,导致其功能受抑;而来源于父亲的等位基因无甲基化的存在则得以单独表达^[3]。此外,ARHI 通过阻滞 ras/MAPK 通路,激活 JNK 途径,诱导 P21^{WAF1/CIP1} 表达,下调 cyclinD1 启动子活性,从而负向调节细胞生长^[3,5,6]。过量表达的 ARHI 转基因鼠体积减小、重量减轻,催乳素(PRL)的分泌受抑,影响乳腺发育和泌乳^[7]。Bao 等^[8]发现肿瘤细胞株感染含 ARHI 基因的腺病毒 5 天后,30%~45% 的乳腺癌(MDA-MB-231)和 5%~11% 的卵巢癌(SKOV3)细胞发生了凋亡。但 ARHI 的表达似乎并不依赖凋亡蛋白酶(caspase),而是通过需钙蛋白酶(calpain)依赖性途径诱导凋亡。

ARHI 在乳腺、卵巢中存在较高表达,在心、肝、胰、脑等正常人组织也有一定表达,但在乳腺癌、卵巢癌^[4,9]及胰腺癌^[10]中却常存在表达下调,提示着 ARHI 的异常表达与肿瘤的形成、进展有密切关系。研究发现这可能与印迹基因的杂合性丢失,DNA 甲基化和染色体乙酰化修饰等转录水平的调节失常有关。据观察,41% 的乳腺癌、卵巢癌,45% 的胰腺癌中均存在 ARHI 的杂合性丢失(loss of heterozygosity,LOH),染色体 1p31 处于 ARHI 基因缺失频率最高的位点^[4,11]。印迹的 ARHI 基因相当于功能上的单倍体,尽管母源性等位基因不表达,但仍可依靠父源性等位基因转录、翻译具有正常功能的蛋白质;而一旦有一次打击发生在父源性等位基因上,可使功能仅存的等位基因序列丢失,从而导致 ARHI 基因失活,增加了肿瘤的易感性。用 SssICpG 甲基化酶先对 ARHI 甲基化,然后将甲基化的 ARHI 转染入永生性卵巢表面上皮(Immortalized Ovarian Surface Epithelial, IOSE)细胞中,发现 ARHI 启动子的活性大为削减;用去甲基化因子 5-氮杂-2-脱氧胞嘧啶(5-aza-dC)处理 6 例癌细胞标本,其中 4 例 CpG 岛甲基化程度降低,并能部分激活 ARHI 的表达^[3,6]。实验结果提示,ARHI 等位基因上启动子区的甲基化异常,影响了转录因子与调控元件的接近,使转录基因沉默,致使 ARHI 的表达改变。将组蛋

收稿日期:2003-04-21;修回日期:2003-05-21

作者单位:530021 南宁,广西医科大学基础医学院组织胚胎学教研室

白脱乙酰基抑制子曲古抑菌素(TSA)作用于肿瘤细胞,可观察到 ARHI 的表达提高。研究乳腺癌细胞 ARHIc pG 岛,发现其乙酰化组蛋白 H3 的水平比正常的乳腺上皮细胞明显降低^[6]。目前已知组蛋白的乙酰化能改变组蛋白的电荷性质,使组蛋白与 DNA 的结合减弱,DNA 解旋,染色质松散,更易与转录装置接近,促进转录的发生。因此推测乙酰化组蛋白的低水平表达,可能影响了 ARHI 的正常转录。

2 RERG(ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor)

2001 年,美国 Finlin^[12]等运用微阵列统计分析(statistical analysis of microarray, SAM)鉴别并命名了一种新颖的肿瘤抑制基因—ras 相关的、雌激素调节的生长抑制子 RERG。该基因定位于人染色体 12p12,由 4 个外显子组成,前两个外显子被一个 95kb 的内含子分隔,编码长约 23kD、199 个氨基酸组成的蛋白。RERG 与部分 ras 超家族成员的同源性可达 40%~50%,也拥有保守的 GTP 结合域,但在 C 末端却缺乏参与脂质修饰的相应基序,这表明它不受翻译后异戊二烯化调节。观察 RERG 在细胞内定位,发现其均匀地散布在胞浆中,也有少量存在于胞核内。

在 MCF-7 人乳腺癌细胞株中,RERG 经雌二醇(estradiol)处理后快速表达,而他莫昔芬(Tamoxifen)却可抑制 RERG 的表达。分析 RERG 的基因序列,发现 5'上游可能存在两个雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合区,进一步证实 RERG 依赖于雌激素调节。

RERG 在多种正常组织中存在表达,尤以心、肾和胰的表达水平较高,但在许多预后较差的乳腺肿瘤中其表达却存在较高比例的丢失或下调。高度表达 RERG 的肿瘤增殖较缓慢,而低表达甚至是无表达 RERG 的肿瘤增殖速率明显加快。基因转染实验肯定了这些观点。野生型 RERG 的导入能使乳腺癌细胞生长受抑,在软琼脂的生长能力降低了 50%~80%,并且丧失了裸鼠体内的成瘤性。

3 rig(ras-related inhibitor of cell growth)

rig 基因与神经肿瘤发生有关,2002 年 Ellis^[13]等运用生物信息学方法,成功地分离出 rig 的 cDNA 克隆,该基因具有生长抑制作用,因此命名为 ras 相关的生长抑制子 rig。rig 定位于染色体 19p13.3,编码 199 个氨基酸的蛋白,与 ras、rap 基因序列相似性超过 50%,与 ARHI 的同源性高达 63%。rig 的

C 末端含有 CAAX 基序,X 为蛋氨酸,表明 rig 可作为法呢基转移酶(Farnesyltransferase, FTase)的底物。

rigmRNA 在正常心脏和神经组织中高水平表达,然而神经肿瘤源性细胞株和原发性人类神经肿瘤中却频繁出现 rig 蛋白表达的丢失或下调。将野生型 rig 和突变型 rig^{S21N}分别引入肿瘤细胞株中,观察耐药性克隆的形成。野生型 rig 转染的细胞株里没有发现耐药性克隆,而突变型 rig^{S21N}转染的细胞株却有多个耐药性克隆的形成。人星形细胞瘤中导入外源性 rig,能够抑制肿瘤细胞的生长。此外,rig 还能与内源性 Raf-1 等效应分子作用,拮抗 ras 介导的多种信号级联反应,负向调控细胞的生长与转化。

4 讨论与展望

ras 超家族中的肿瘤抑制基因 ARHI、RERG、rig 虽都具有生长抑制功能,但因蛋白结构不同而导致功能差异。首先,ras 超家族 N 端 32-40 位的氨基酸是其效应区,在与它们各自的靶蛋白结合中发挥重要作用。ras 和 rap 效应区的经典序列为 YDP-TIEDSY,而 ARHI 和 RERG 效应区的序列分别为 YLPTIENTY、YDPTLESTY。rig 与 ARHI 的效应区颇为相似,只是在效应区的第二位上以 I 替代了 L。其次,ras 基因编码产物为 p21^{ras}蛋白,研究发现 p21^{ras}的 N 末端 G¹²、A⁵⁹、Q⁶¹是调节 GTP 酶活性的关键位点,也是点突变的主要部位。突变后 p21^{ras}蛋白,其 GTP 结合部位的构型改变,失去与调节蛋白的相互作用,处于持续的 GTP 活化状态,不断向靶细胞传递生长信号,导致细胞恶性增殖。对比基因序列,p21^{ras}相应位置上的氨基酸被 ARHI 的 A⁴⁶、K⁹³、G⁹⁵分别替代。此外,p21^{ras}的 G¹²被 RERG 的 A¹⁵所替代,rig 则以 T⁶³、S⁶⁵分别取代 p21^{ras}的 A⁵⁹、Q⁶¹。

已知细胞内蛋白的定位对其功能有重要影响,部分蛋白需要在翻译中或翻译后进行特殊脂质的共价修饰,不仅为蛋白提供正确的膜定位,而且还可能参与维持蛋白的正常结构、调节生物活性。有学者发现 rasCAAX 基序中的 Cys 如发生突变,则不能被异戊二烯化,即便 ras 处于活化状态也不能表现出对细胞的恶性转化能力。因此,目前的研究热点是以 ras 脂化为靶点的抗肿瘤药物,如寻找高度特异性的法呢基转移酶抑制剂(farnesyltransferase inhibitors, FTIs)^[14]。ARHI、rig 都拥有 CAAX 基序和膜定位序列,都易受脂化调节,所以希望能被加入 FTIs 抗肿瘤复合物中,为肿瘤的治疗提供新的思路。

ARHI 是第一个被报道的与成人肿瘤有关的母源性印迹的肿瘤抑制基因。国内施宗高等^[15] 已用 PCR 克隆技术构建了 ARHI 的真核表达载体,李勤等^[16,17] 利用 GE7 导入系统介导 ARHI 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠腹水瘤、网膜移植瘤,均显示一定的疗效。但目前尚不完全明确 ARHI 发生异常的失活机制,如何鉴别调节因子,从而有效地恢复正常基因印迹,仍需深入研究。

临床研究发现,表达 ER 的乳腺癌患者有较长的缓解期,较之缺乏 ER 表达的乳腺癌患者生存期要长,这种明显的生理、表型的差异可能归因于肿瘤中基因表达的不同^[18]。因此,有必要鉴别乳腺癌的雌激素敏感性基因,认识它们在肿瘤发生、发展中的作用。RERG 依赖于雌激素调节,且在许多预后较差的乳腺肿瘤中其表达却存在较高比例的丢失或下调,说明 RERG 对于乳腺癌的诊疗有重要意义。

参考文献:

- [1] 卢建,余应年,徐仁宝. 受体信号转导系统与疾病[M]. 济南: 山东科学技术出版社,1999.164.
- [2] BourneHR,SandersDA,McCormickF.TheGTPasesu pperfamily conserved structure and molecular mechanism[J].Nature, 1991,349 (6305):117-127.
- [3] YuY,XuF,Pen gH,etal.NOEY2 (ARHI),anim printed putative tumorsu ppressor gene in ovarian and breast carcinomas[J]. Proc Natl Acad Sci,1999,96 (1):214-219.
- [4] LuoRZ,Pen gH,XuF,etal.Genomic structure and promoter characterization of anim printed tumorsu ppressor gene ARHI[J]. Biochim Biophys Acta,2001,1519 (3):216-222.
- [5] 施宗高,许良中,周晓燕,等.NOEY2 基因对人乳腺癌细胞体外生长的影响[J]. 中国癌症杂志,2001,11 (1):29-32.
- [6] YuY,FujiS,YuanJ,etal.E pigenetic regulation of ARHI in breast and ovarian cancer cells[J].Ann NY Acad Sci,2003, 983:268-277.
- [7] XuF,XiaW,LuoRZ,etal.The human ARHI tumorsu ppressor gene inhibits lactation and growth in transgenic mice[J]. Cancer Res,2000,60 (17):4913-4920.
- [8] BaoJ,LeX,Wan gR,etal.Reexpression of the tumorsu ppressor gene ARHI induces a poptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent and pkinase-dependent pathway[J]. Cancer Res,2002,62 (24):7264-7272.
- [9] HisatomiH,Na gaoK,WakitaK,etal.ARHI/NOEY2 inactivation may be important in breast tumor pathogenesis[J]. Oncology,2002,62 (2):136-140.
- [10] 卢朝晖,陈杰,谷丽君,等.ARHI 在胰腺癌组织中 mRNA 水平及蛋白表达[J]. 中国医学科学院学报,2001,23 (4):324-327.
- [11] Peng H,XuF,PerashadR,etal.ARHI is the center of allelic deletion on chromosome 1p31 in ovarian and breast cancers[J]. Int J Cancer,2000,86 (5):690-694.
- [12] FinlinBS,GauCL,Mur phyGA,etal.RERG is a novel estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer[J]. J Biol Chem,2001,276 (45):42259-42267.
- [13] EllisCA,VosMD,HowellIH,etal.ri gisanovelras -related protein and potential neural tumorsu ppressor[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99 (15):9876-9881.
- [14] Kloo gY,CoxAD.RAS inhibitors: potential for cancer therapeutics[J]. Mol Med Today,2000,6 (10):398-402.
- [15] 施宗高,许良中,药锦娟,等.PCR 克隆技术构建抑癌基因 NOEY2 真核表达载体[J]. 癌症,2001,20 (1):99-100.
- [16] 李勤,丰有吉,郁茵华,等.GE7 导入系统介导抑癌基因 NOEY2 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠网膜移植瘤的研究[J]. 现代妇产科进展,2000,9 (5):328-331.
- [17] 李勤,丰有吉,郁茵华,等.GE7 导入系统介导抑癌基因 NOEY2 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠腹水瘤[J]. 复旦学报,2002,29 (5):183-185.
- [18] Knigh tWA,Livin gstonRB,Gre goryEJ,etal.Estro gen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer[J]. Cancer Res,1977,37 (12):4669-4671.

[编辑:安凤;校对:贺文]

(上接第 230 页)

与人类多种肿瘤的浸润和转移有密切的关系。在研究薏苡仁抑制肿瘤形成的机制时发现,它可下调 VEGF、bFGF 蛋白的表达。

由此可见,薏苡仁均具有抑制肿瘤血管形成的作用,其作用机制可能是下调 VEGF、bFGF 的表达。中药含有的成分复杂,药物中究竟是何种成分起主要作用,尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 李凤云,陈浩然,冯晓东,等. 中药薏苡仁抗肿瘤作用的研究[J]. 实用肿瘤学杂志,1994;15 (3):59.
- [2] 姜小玲,张良,徐卓玉,等. 薏苡仁注射液对血管生成的影响[J]. 肿瘤,2000,20 (4):313-314.
- [3] BosarisS,LeeAKC,DelellisRA,etal.Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma[J]. Human Pathology, 1992,23 (5):755-761.
- [4] RahmanA,DharDK,Yama gnchiE,etal.Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX -2 in hepatic cellular carcinoma and surrounding liver, possible involvement of COX -2 in the angiogenesis of the hepatitis C virus positive case[J]. Clin Can Res, 2001,7 (5):1325.
- [5] FolkmanJ.What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?[J]. Journal of the National Cancer Institute,1990,82 (8):4-6.
- [6] FanelliM,LocopoloN,GattusoD,etal.Assessment of tumor vascularization: immunohistochemical and non-invasive methods[J]. Int J Biol Markers,1999,14 (4):218-231.

[编辑:李奇明;校对:刘红武]