

线粒体融合蛋白 2 及 Ras-MAPK 信号通路 与乳腺癌的研究进展

063000 河北唐山 河北联合大学附属唐山市人民医院乳腺外科

单系金 综述, 张景华, 李玉凤, 刘岩 审校

【摘要】 线粒体融合蛋白 2(Mfn2)是一种高度保守的跨膜 GTP 酶,由新鉴定的抑癌基因 Mfn2 编码,它的抗肿瘤作用跟丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路有关。MAPK 是 Ras 信号通路下游的一个主要支路,在细胞恶变和肿瘤浸润、转移过程中起着重要作用。本文对 Mfn2 的分子结构、调控机制及其在乳腺癌中与 Ras-MAPK 信号通路关系的最新研究进展作一综述。

【关键词】 线粒体融合蛋白 2; Ras; 丝裂原活化蛋白激酶; 信号通路; 乳腺癌

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)04-0371-04

Progress on correlation between Mfn2 and Ras-MAPK signal pathway in breast cancer

SHAN Xijin, ZHANG Jinghua, LI Yufeng, LIU Yan. Department of Breast Surgery, Hebei United University Affiliated Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China

【Abstract】 Mitochondrial fusion protein 2(Mfn2) is a highly conserved transmembrane GTP enzyme, which is encoded by a newly identified tumor suppressor gene Mfn2. The anti-tumor effect of Mfn2 is associated with the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. MAPK is a major downstream tributary of Ras signaling pathway, which plays an important role in the malignant cells, leading to the tumor invasion and metastasis. In this review, we focus on the recent discoveries on the mechanisms involved in the regulation of Mfn2 and the relationship between Mfn2 and Ras-MAPK signaling pathway in breast cancer.

【Key Words】 Mitofusin-2(Mfn2); Ras; Mitogen-activated protein kinase(MAPK); Signal pathway; Breast cancer

线粒体融合蛋白 2(mitofusin-2, Mfn2)定位于人的 1 号染色体短臂 36.22 位点,此位点为多种恶性肿瘤的突变高发区,许多肿瘤患者染色体的该区域会出现缺失或易位,因此推测该基因为肿瘤相关基因,其表达异常或功能缺失可能是肿瘤发生的原因。后续研究表明 Mfn2 确实有抑癌功能,而且与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路密切相关^[1]。MAPK 信号通路是连接细胞膜表面受体与基因表达之间的通路,是 Ras 通路下游重要支路之一。本文就 Mfn2 和 Ras-MAPK 信号通路在乳腺癌中的研究进展作一综述。

1 Mfn2

1.1 Mfn2 结构

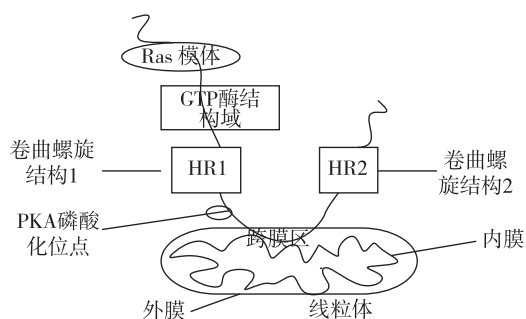
1.1.1 Mfn2 结构特征 Mfn2 是在研究大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)进行 cDNA 文库筛选克隆时鉴定的,研究证明其能抑制细胞增殖,因此曾命名为增殖抑制基因(hyperplasia suppressor gene, HSG)^[2],后来发

现该基因可促进线粒体正常融合,基因库将该基因更名为线粒体融合蛋白 2。

Mfn2 基因在脊椎动物的进化中高度保守,人 Mfn2 分别与大鼠和小鼠的基因序列有 95% 和 94% 的同源性,其开放阅读框均编码含有 757 个氨基酸残基的线粒体跨膜蛋白。N 端的 GTP 酶结构域、C 端的跨膜区和卷曲螺旋结构共同构成了 Mfn2 及其同源物的基本结构^[2](图 1)。

1.1.2 Mfn2 基因调控 有研究发现 Mfn2 基因启动子某段序列能与 p53 相结合,Mfn2 是 p53 发挥抗癌作用的直接靶点^[3]。最近有研究发现,转录因子 Sp1 增强人 Mfn2 启动子活性,提高 Mfn2 蛋白在细胞中的表达水平^[4]。随后有研究通过生物信息学方法对人 Mfn2 基因调控区进行详细分析,发现基因上游 5' 端-400bp 以内可能存在着核心启动子,并且含有一些重要的与功能相关的转录因子结合位点,而且该区存在着大量单核苷酸多态性位点,可能会影响基因的转录调控^[5]。

1.2 Mfn2 功能 Mfn2 在调控线粒体融合、维持线粒体正常



注: p21ras 共有模体 aa77~92、GTP 酶结构域 aa103~309、1 个 442 位的 PKA/PKG 磷酸化位点、卷曲螺旋结构 1 aa366-422、1 个疏水性跨膜区 aa615~648、卷曲螺旋结构 2 aa693-747

图 1 Mfn2 结构示意图

形态等众多细胞生物学过程中的作用已比较明确。最新研究发现, Mfn2 在内质网上也有分布, 并参与线粒体和内质网之间的连接, 而且此连接能通过胰岛素信号来维持正常葡萄糖稳态^[6], 但此连接作用与 Ras 信号通路无关^[7]。人类免疫缺陷病毒 1 型蛋白 R 也是通过削弱 Mfn2 介导的线粒体和内质网相互作用来引起细胞线粒体破坏, 进而引起人体免疫功能下降^[8]。

Mfn2 除基本生理作用, 国内研究发现它还能抑制多种细胞增殖并促进凋亡。高血压病是一种 VSMC 异常增殖性疾病, 患者平滑肌细胞内 Mfn2 表达较健康人群显著降低。一项病例对照研究发现, 高血压患者可伴有 Mfn2 基因遗传变异^[9]。过表达 Mfn2 后细胞增殖能力明显下降, 细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期^[2]。高血压药缬沙坦^[10]、调脂药物瑞舒伐他汀^[11]都能通过上调 Mfn2 表达来抑制 VSMC 增殖。在慢性阻塞性肺疾病中, 外源性 Mfn2 还能抑制气道成纤维细胞增殖并诱导其凋亡^[12]。以上研究结果均表明 Mfn2 基因是一种增殖抑制相关因子, 调控 Mfn2 表达可能是治疗异常增殖性疾病的潜在方法。

1.3 Mfn2 与乳腺癌 Mfn2 在肾脏、肝脏和脑组织中含量高, 最近几年国人开始探索其对肿瘤是否有类似抑制细胞增殖的作用。据报道, Mfn2 在不同肿瘤组织中都有不同程度的表达, 在肺腺癌、胃癌和肝癌等细胞中表达较低, 而在肺鳞癌、卵巢癌中表达较高。

研究发现 Mfn2 对乳腺癌细胞也有抗增殖的作用^[13], 令人惊喜的是其抗增殖作用明显大于 p53^[2]。有文献报道 Mfn2 在乳腺癌组织中的表达水平较正常组织降低, 且在肥胖乳腺癌患者组织中的表达水平更低, 提示 Mfn2 低表达与乳腺癌的发生有关, 且可能通过下调 Mfn2 表达量增加肥胖患者患乳腺癌的患病风险^[14]。而且 Mfn2 在裸鼠模型体内可以明显抑制乳腺癌细胞的成瘤, 并且可用于人乳腺癌成瘤后的治疗^[1]。有研究发现 Mfn2 低表达的乳腺癌患者更易发生淋巴结转移, 提示 Mfn2 不仅与乳腺癌的发生发展有关, 而且与浸润和转移密切相关^[15]。虽然发现了 Mfn2 的抑癌作用, 但其在癌组织中表达降低的调控机制尚未见报道, 期待进一

步研究。

2 Ras-MAPK 信号通路

2.1 Ras 蛋白 ras 基因编码 4 种高度保守的 Ras 蛋白, 同源性达 85%。Ras 蛋白活性通过与 GTP 或 GDP 的结合进行调节。Ras 是调节细胞生长和增殖信号通路的重要蛋白, 其下游主要有 3 条信号通路: Ras/Raf/ERK、Ras/PI3K/AKT、RalGEF, 其中第一条与细胞增殖功能最密切。当 Ras 突变或被上游信号激活, 处于持续活化状态时, 它可激活下游效应蛋白, 引起细胞异常增殖, 甚至导致肿瘤发生。

最近有学者发现一种 p53 凋亡刺激蛋白 2 (apoptosis-stimulating protein of p53, ASPP2) 在肿瘤细胞中与 Ras 合作, 能增强 p53 的转录和促细胞凋亡的功能, 产生抑癌作用; ASPP2 在人类癌细胞中的损失可能有助于 ras 癌基因的完全激活, 由此推测 ras 致癌基因和 ASPP2 活动之间的平衡, 可能是决定肿瘤是否被激发的关键^[16]。

2.2 Ras-MAPK 信号通路 MAPK 是 Ras 下游的一个主要支路, 其介导信号参与多种人类肿瘤发生发展过程。MAPK 信号系统遵循三级酶促级联反应, 即 Ras-Raf-MEK-MAPK 途径。目前 MAPK 通路中发现 4 个亚家族, 其中细胞外信号调节激酶 (extracellular-signal regulated protein kinase, ERK) 是研究的最详细的一条通路。Ras-MAPK/ERK 信号通路目前公认的主要机制是此通路一旦异常活化, 包括自身突变激活、被上游信号持续激活, 则进一步激活下游蛋白, 导致细胞增殖、血管形成、凋亡抑制、组织侵袭, 最终促进肿瘤发生发展。

Ras-MAPK 信号通路除了上述癌基因效应, 最新的观点认为 Ras 通过诱导细胞衰老和凋亡而产生抑癌作用^[16]。国外学者通过对卵巢癌、甲状腺癌等肿瘤细胞的体外研究发现, 肿瘤细胞经白藜芦醇 (Resveratrol) 治疗后, 可以引起 MAPK 传导通路的活化和转录, 继而启动 p53 依赖性凋亡途径, 反而促进肿瘤细胞的凋亡^[17]。还有研究报道在乳腺癌细胞 MCF-7 中活化 ERK/MAPK 途径, 低剂量的电离辐射能抑制阿霉素引发的细胞增殖^[18]。ASPP2 与 Ras 合作, 激活 Ras-MAPK/ERK 通路, 增强 p53 的转录活性和促细胞凋亡功能, 产生抑制肿瘤的功能^[16]。上述研究结果表明 MAPK 信号通路活化后的去向不同会导致促癌或抑癌的不同转归效果, 这将对 MAPK 信号通路在肿瘤中作用的研究提出挑战。

2.3 Ras-MAPK 信号通路与乳腺癌 Ras-MAPK 信号通路参与乳腺癌的发生、发展, ERK 作为 MAPK 亚家族之一, 在乳腺癌细胞内可以检测到异常增高的活性 ERK^[19]; ERK 的异常激活导致乳腺癌细胞增殖、凋亡抑制^[20]。EGFR 在乳腺癌细胞中常过表达, 它的致癌作用也是通过激活 PI3K 和 Ras-MAPK 通路实现的^[21]。有研究发现乳腺癌干细胞中 let-7 (微小 RNAs) 的表达低于普通肿瘤细胞, 而 p-Ras、p-ERK 在乳腺干细胞中的表达高于普通肿瘤细胞, 推测 let-7 的低表达丧失了对 Ras 转录水平的抑制作用, 使信号传导通路激活, 导致乳腺细胞癌变^[22]。

许多针对乳腺癌的药物,例如厄贝沙坦^[23]、多西他赛联合表柔比星都是通过影响 MAPK/ERK 信号通路抑制乳腺癌细胞的生长,后者对 pERK 高表达的患者疗效欠佳,这可能与 MAPK 通路的激活导致多药耐药蛋白的产生等有关^[24]。鉴于细胞内多条信号通路的相互作用,Ras-MAPK 信号通路还参与产生耐药,例如雌激素受体和 MAPK、PI3K/Akt 通路之间的共同通路是三苯氧胺产生耐药的关键^[25]。有研究通过三苯氧胺体外诱导乳腺癌细胞株 MCF-7 耐药证实 MAPK 信号通路参与了产生耐药^[26]。

随着作用于 MAPK 信号传导通路中单靶点的药物的问世,有人开始探索作用于多个靶点的药物疗效。赵娟等^[27]利用 Ras 蛋白活化所需的法尼基转移酶为中心,并选择 Raf-1 激酶为辅助靶点,设计出同时作用于这 2 种酶的多靶点作用药物,实验结果表明此药物对肝癌细胞 HepG-2 和胰腺癌细胞 pcmc-1 都具有较好的抑制作用,为人们研究多靶点抗肿瘤药物提供了思路。

3 Mfn2 与 Ras-MAPK 信号通路

Mfn2 抑癌功能的发挥与 Ras-MAPK 细胞信号通路密切相关,N 端 p21ras 共有模体为 Mfn2 与 Ras 的相互作用提供了结构基础。Chen 等^[2]发现在大鼠 VSMC 中 Mfn2 与 Ras 结合后可抑制 Ras 蛋白活化,进而使下游 Raf 及 ERK1/2 失活;而剔除 p21ras 结构后,Mfn2 丧失了上述效应。在 VSMC 和多种肿瘤中过表达 Mfn2,Raf 磷酸化、ERK1/2 水平下降,上述结果表明 Mfn2 通过 Ras、Raf、ERK1/2 影响细胞增殖。

基于 Mfn2 多结构蛋白的特性,学者们进而展开了一系列蛋白结构的功能研究。首先去除 Mfn2 基因的跨膜区碱基,发现基因表达产物更多的游离于胞质中,但抑制细胞增殖和促进凋亡的作用较 Mfn2 更强,提示跨膜区不参与蛋白抑制增殖功能的作用^[28]。然后去除大鼠 Mfn2 第 442 位丝氨酸(Ser442),发现其表达和线粒体上定位均未受影响,但调节细胞增殖的功能消失,对 ERK1/2 信号通路失去抑制作用^[29]。随后构建 Ser442 突变体发现,去磷酸化的蛋白通过 ERK1/2 信号通路抑制细胞增殖的作用显著增强,持续磷酸化的蛋白作用相反。上述结果提示 Ser442 是 Mfn2 蛋白的重要功能位点,其磷酸化状态通过 Ras-MAPK 通路发挥调节作用^[30]。

另外有学者进一步构建包含 Ras 特性结构和 ATP/GTP 结合域的 Mfn2 重组腺病毒,发现此突变体通过抑制 ERK 信号通路明显抑制了细胞增殖,阻滞细胞在 G₀/G₁ 期,而且比全长 Mfn2 基因效果更强^[31]。此结果与前人研究结果相矛盾,Ras 特性结构在没有 Ser442 位点磷酸化的条件下也能抑制细胞增殖,因此 Mfn2 蛋白功能位点在肿瘤中的作用还有待进一步研究证实。本文涉及的 Mfn2 详细机制见图 2。

4 总结与展望

乳腺癌作为一种常见的危害女性健康的恶性肿瘤,其发

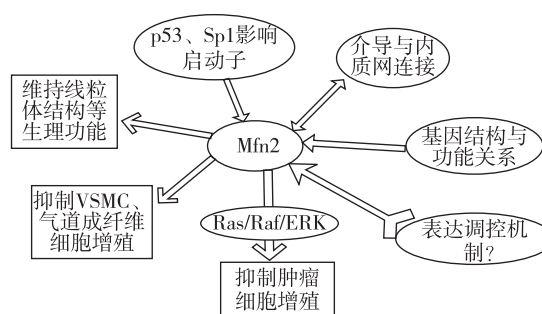


图 2 Mfn2 相关功能机制

生与多种因素有关,但细胞恶性增殖是共同病理特征;而 Mfn2 通过抑制 Ras-MAPK 信号通路有效抑制乳腺癌细胞增殖,阻滞细胞周期,这些结果均提示该基因有望成为治疗乳腺癌等肿瘤的新靶点。

Mfn2 作为一种多功能基因,它不同结构域的功能既有差异也有联系;但目前研究仅限于基本结构,其余部分缺乏系统研究,其表达调控机制也不甚明了,深入研究基因上下游作用因子是十分必要的。Ras-MAPK 信号传导通路已成为重要的抗肿瘤药物靶点,但信号传导机制非常复杂,不同刺激活化的 ERK 会传递不同的信息,发生不同的生物学效应,若未考虑到存在的复杂调控关系,势必会影响到临床治疗的效果。除了 Ras 信号通路外,Mfn2 是否通过其他胞内信号传导通路发挥作用,各系统之间是否有交叉作用? 这些问题将激励学者进一步研究 Mfn2 在肿瘤中的作用机制,为开展该基因的应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 夏 耘,吴亚群,张 林,等. 线粒体融合基因 2 对人乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖与化疗敏感性的影响[J]. 癌症, 2007, 26(8):815-819.
- [2] Chen KH, Guo XM, Ma DL, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 872-883.
- [3] Wang W, Cheng X, Lu J, et al. Mitofusin-2 is a novel direct target of P53[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(4): 587-592.
- [4] Soriano E, Soriano FX, Fernández-Pascual S, et al. The promoter activity of human Mfn2 depends on Sp1 in vascular smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2012, 94(1):38-47.
- [5] 王佐广,牛秋丽,刘 雅,等. 线粒体融合基因 2 启动子的生物信息学研究[J].中国动脉硬化杂志, 2013, 21(2):97-104.
- [6] Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(14): 5523-5528.
- [7] Brito OM, Scorrano L. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras

- [J]. Mitochondrion, 2009, 9(3):222-226.
- [8] Huang CY, Chiang SF, Lin TY, et al. HIV-1 Vpr triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction[J/OL]. PLoS One, 2012[2013-04-20]. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0033657>.
- [9] Wang Z, Liu Y, Liu J, Liu K, et al. HSG/Mfn2 gene polymorphism and essential hypertension: a case-control association study in Chinese[J]. J Atheroscler Thromb, 2011, 18(1):24-31.
- [10] 张文娟, 龚俊荣, 郭小梅. Mfn2 介导缬沙坦抑制血管平滑肌细胞增殖的研究[J]. 华中科技大学学报, 2012, 41(1):7-11.
- [11] 周 炜, 陈曼华. 瑞舒伐他汀对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生及线粒体融合素 2 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 21(5):424-428.
- [12] 葛正行, 李 波, 周 行, 等. rHSG 基因对 COPD 大鼠气道成纤维细胞增殖凋亡的调控[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(10):1549-1551.
- [13] 张景华, 陈晶晶, 胡万宁, 等. 重组 pEGFP-Mfn2 真核表达载体的构建及转染人乳腺癌细胞系 MCF-7[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 8(22):1774-1778.
- [14] 张 玮, 夏 耘, 张彦武, 等. 线粒体融合素基因-2 在正常体重和肥胖乳腺癌患者不同组织中表达的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(4):408-410.
- [15] 付玉环, 夏庆安, 姜广建. 线粒体融合素基因 2 与乳腺癌浸润和转移的相关性[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(12):125-113.
- [16] Wang Y, Godin-Heymann N, Dan Wang X, et al. ASPP1 and ASPP2 bind active RAS, potentiate RAS signalling and enhance p53 activity in cancer cells[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(4):525-534.
- [17] Lin HY, Tang HY, Davis FB, et al. Resveratrol and apoptosis[J]. Ann NY Acad Sci, 2011, 1215(1):79-88.
- [18] Shin JS, Woo SH, Lee HC, et al. Low doses of ionizing radiation suppress doxorubicin-induced senescence-like phenotypes by activation of ERK1/2 and suppression of p38 kinase in MCF7 human breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2010, 36(6):1445-1452.
- [19] Moreno-Aspitia A. Clinical overview of sorafenib in breast cancer[J]. Future Oncol, 2010, 6(5):655-663.
- [20] Yan K, Zhang C, Feng J, et al. Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in bladder cancer cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 661(1/3):1-7.
- [21] Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. Emerging targeted therapies for breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(20):3366-3379.
- [22] 孙 欣, 樊 翀, 胡丽娟, 等. Let-7 维持乳腺癌干细胞的特性及机制的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(8):789-792.
- [23] 胡丽娟, 杜 宁, 孙 欣, 等. 厄贝沙坦通过 MAPK-ERK1/2 信号通路影响乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(6):607-611.
- [24] 曾 峰, 谭永嘉, 曾庆良. 乳腺癌 MAPK 通路中 pERK 蛋白在 TE 方案新辅助治疗中的变化[J]. 重庆医学, 2012, 41(26):25-57.
- [25] Chumsri S, Howes T, Bao T, et al. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011, 125(1/2):13-22.
- [26] 马小俞, 刘哲斌, 喻三见, 等. 三苯氧胺诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞株耐药及自噬的关系研究[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(6):421-426.
- [27] 赵 娟, 朱一婧, 姜凤超. 作用于 FTase 和 Raf-1 激的新型抗肿瘤药物的设计[J]. 药学报, 2011, 46(2):170-178.
- [28] 赵 丽, 王四坤, 周 炜, 等. tMfn2 基因抑制血管平滑肌细胞增殖的作用与机制[J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18(8):805-809.
- [29] 周 炜, 曹文静, 陈莉莉, 等. 去除蛋白激酶 A 磷酸化位点的线粒体融合素 2 基因与血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1322-1326.
- [30] 周 炜, 廖 华, 曹文静, 等. 线粒体融合素 2 基因突变体对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 7(11):885-888.
- [31] 范玉璟, 廖 化, 陈光慧, 等. 线粒体融合素基因 2 突变体 Mfn2-1A 抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖及机制研究[J]. 临床心血管病杂志, 2012, 28(9):714-717.

收稿日期:2013-09-29; 修回日期:2013-12-10