

· 综 述 ·

RASAL1 表达及 ras 活性与胃肠道肿瘤临床关系的研究进展

吕成余^{1*}, 谢洪虎¹, 樊 红²

(¹南京医科大学附属南京第一医院普外科, 南京 210006; ²东南大学基础医学院遗传与发育生物学系发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 南京 210009)

【摘 要】 大约有 20% 的人类肿瘤与 ras 的突变有关。ras 蛋白调控细胞的一系列生物学行为, 包括细胞增殖、分化、生存及凋亡等。ras 蛋白属于小 GTP 结合蛋白, 通过响应细胞外信号产生活性。RASAL1 是一种 ras GTP 酶激活蛋白, 可以抑制 ras 的活性。调节 ras 以及 RASAL1 的活性, 可能是肿瘤靶向治疗的方向之一。检测 ras 以及 RASAL1 的活性有助于胃肠道肿瘤的早期诊断以及预后的判断。本文从 ras 的结构、功能及突变与肿瘤的关系, RASAL1 作为 ras 的效应分子抑制 ras 的活性, ras、RASAL1 与胃肠道肿瘤的关系三方面来综述了 RASAL1 表达及 ras 活性与胃肠道肿瘤临床关系的研究进展。

【关键词】 ras GTP 酶激活蛋白质类; ras, 基因; 肿瘤; 诊断; 预后

【中图分类号】 R735; R730

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00020

RASAL1 expression and ras activity with gastrointestinal tumors: a review

LÜ Chengyu^{1*}, XIE Honghu¹, FAN Hong²

(¹Department of General Surgery, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China; ²Key Laboratory of Developmental Genes and Human Diseases, Ministry of Education, College of Basic Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China)

【Abstract】 Approximately 20% of human tumors are associated with mutations of ras genes. Ras proteins control cellular signaling pathways responsible for cell proliferation, differentiation, survival and apoptosis. Ras proteins belong to the large family of small GTPases, which are activated in response to various extracellular stimuli. RASAL1, as a ras GTPase activating protein, inhibits ras activation. Regulation of ras and RASAL1 activities may lead the direction of target treatment of tumors. Detection of ras and RASAL1 activities can provide more relevant information about diagnosis and prognosis of gastrointestinal tumors. In this paper, we reviewed the structure, the biochemical properties of ras proteins, and the role of its mutations in tumors. We further discussed the inhibitive effects of RASAL1 on ras activities. Finally, we commented the correlation of ras and RASAL1 with gastrointestinal tumors.

【Key words】 RASAL1; ras, gene; tumor; diagnosis; prognosis

This work was supported by Medical Science and Technology Development Foundation of Nanjing City (YKK09066)

人类肿瘤的发生是由于控制正常细胞增殖、分化和凋亡的多个基因突变的结果。大约有 20% 的人类肿瘤与 ras 的突变有关。ras 蛋白调控细胞的一系列生物学行为, 包括细胞增殖、分化、生存及凋亡等。ras 蛋白属于小 GTP 结合蛋白, 通过响应细胞外信号产生活性。RASAL1 (ras protein activator like 1) 是一种 ras GTP 酶激活蛋白, 可以抑制 ras 的活性, 当 RASAL1 的表达水平低时, ras 容易产生突变。RASAL1 表达变化发生于 ras 活性改变之前。调节 ras 以及 RASAL1 的活性, 可能是肿瘤靶向治疗的方向

之一。检测 ras 以及 RASAL1 的活性有助于胃肠道肿瘤的早期诊断以及预后的判断。

1 ras 的结构、功能及突变与肿瘤的关系

1.1 ras 的结构及功能

在哺乳动物, ras 超家族包含 100 多种小 GTP 结合蛋白, 根据其序列同源性以及生物学特性, 可以分成 6 个家族, 即 ras、Rho、Rab、Arf、Ran 和 Rad 等^[1]。ras 基因家族有 3 个成员, 分别是 H (Harvey) -ras, N (Neuroblastoma) -ras 和 K (Kirsten) -ras, 其中

收稿日期: 2010-07-14; 修回日期: 2011-03-15

基金项目: 南京市医学科技发展基金 (YKK09066)

通讯作者: 吕成余, Tel: 025-52271071, E-mail: lcy_1234@yahoo.com.cn

*K-ras*的第四个外显子有A, B两种变异体^[2,3]。各种*ras*基因具有相似的结构, 均由四个外显子组成, 分布于全长约30kb的DNA上。它们的编码产物为相对分子质量21ku的蛋白质, 故称为P21蛋白。*ras*蛋白为膜结合型的GTP/GDP结合蛋白, 定位于细胞膜内侧, 属于三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白, 通过GTP与二磷酸鸟苷(GDP)的相互转化来调节信息的传递, 调控细胞的一系列生物学行为, 包括细胞增殖、分化、生存及凋亡等^[4]。

P21蛋白与GTP和GDP有很强的亲和性, 而且有较弱的GTP酶活性。正常情况下P21蛋白与GDP结合并没有活性, 当细胞外的生长分化因子将信号传导到细胞膜内侧的P21蛋白时, 可增强P21蛋白与GTP结合活性, 使P21与GTP结合成为激活状态, 信号系统开放。因为P21蛋白有GTP酶活性, 可使GTP水解成GDP, P21蛋白与GDP结合后P21蛋白失活, 信号系统关闭。正常情况下P21的GTP酶活性很弱, 当与GTP酶激活蛋白(GAP)结合后其水解速度可提高 10^4 倍而使P21蛋白失活^[5]。P21蛋白和GDP结合后可以激活鸟苷酸释放蛋白(GNRP), GNRP使P21蛋白释放GDP结合GTP, 因此通过GTP和GDP的相互转化可以有节制地调节P21蛋白对信号系统的开启和关闭, 完成生长分化信号传入细胞内的过程^[6]。

1.2 *ras* 突变与肿瘤发生的关系

在人类的肿瘤中, 有大约15%~20%肿瘤的发生与*ras*的突变有关^[7]。在胰腺癌中*ras*突变率为60%~100%, 结肠癌32%~47%, 肺癌17%~33%, 胃癌18.5%~61.8%^[7-15]。

作为原癌基因的*ras*基因被激活以后就变成有致癌活性的癌基因。*ras*基因激活的方式有3种: 基因点突变、基因大量表达、基因插入及易位。其中*ras*基因被激活最常见的方式就是点突变, 多发生在N端第12, 13和61位密码子, 其中又以第12位密码子突变最常见, 而且多为GGT突变成GTT。不同突变位点对P21的活化机制不同, 第12位密码子突变可以减弱P21内在的GTP酶活性, 并使细胞凋亡减少、细胞间接触抑制减弱^[15]; 第61位密码子突变可削弱GAP对P21的内在GTP酶活性, 并可减弱GAP与P21结合的稳定性^[16]。

*ras*基因激活构成癌基因, 其表达产物*ras*蛋白发生构型改变, 功能也随之改变, 与GDP的结合能力减弱, 和GTP结合后不需外界生长信号的刺激便自身活化。此时*ras*蛋白内在的GTP酶活性降低, 或影响了GAP的活性, 使*ras*蛋白和GTP解离减少, 失

去了GTP与GDP的有节制的调节, 活化状态的*ras*蛋白持续地激活磷脂酶C产生第二信使, 造成细胞不可控制地增殖、恶变。同时细胞凋亡减少, 细胞间接触抑制增强也加速了这一过程^[17, 18]。

2 RASAL1 是 *ras* 的效应分子, 抑制 *ras* 进入活化状态。

RASAL1, 是一种*ras* GTP酶激活蛋白(*ras*-GAP), 具有*ras*-GAP活性, 能抑制*ras*的活性。其作用机制与GAP相似, *ras*AL与*ras*蛋白结合后, 能快速将GTP水解成GDP, 从而使*ras*蛋白失活^[19, 20]。

Kolfschoten等^[21]阐述了RASAL1的作用机制, 通过研究前列腺肿瘤、膀胱肿瘤以及结肠肿瘤中的抑癌基因PITX1时发现, PITX1的抑癌作用通过RASAL1调控*ras*通路实现, 其抑制*ras*基因的表达, 从而产生抑癌作用; 并且, 在体外培养的肿瘤细胞系中, 阻止RASAL1基因的表达可以有效地诱导出人原始细胞的癌变, 因此, 认为RASAL1可能具有抑癌的作用。

Ohta等^[22]的研究发现, *ras*在结直肠癌中突变较常见, 异常的*ras*激活是导致结直肠癌细胞癌变的重要因素。RASAL1在结直肠癌中表达的减少, 减弱了对*ras*的抑制作用, 导致*ras*激活信号的增加, 从而诱导结直肠癌的发生, 以及加快结直肠癌的进展。在体外培养的结直肠癌细胞系中, RASAL1表达减少, 同时*ras*-GTP的表达水平提高。另外, 在野生型*K-ras*的结直肠癌细胞系中, 使用RNA干扰技术降低RASAL1的表达, 也出现*ras*-GTP的表达水平提高, 将其异种移植到小鼠体内, 检测相对应的细胞发现具有增强肿瘤细胞生长的能力。这些发现说明RASAL1为结直肠肿瘤中野生型*K-ras*的调控者, RASAL1的表达促进*ras*基因的失活。

3 *ras*, RASAL1 与胃肠道肿瘤的关系

3.1 *ras* 的临床意义

*ras*胃肠道肿瘤中出现异常激活, 检测突变型或异常活化的*ras*, 可以应用于胃肠道肿瘤的早期诊断, 并判断患者的预后。通过阻止*ras*突变, 或对突变后的*ras*失活, 有助于开发肿瘤靶向治疗方法。

Li等^[23]分析89例胃癌标本, 发现*K-ras*阳性表达率为61.8% (55/89), *K-ras*的表达率在浸润型胃癌中显著高于隆起型胃癌 ($P < 0.01$), 有淋巴结转移者*K-ras*表达显著高于无转移者 ($P < 0.05$), *K-ras*可能与胃癌的进展与转移相关, 抑制*K-ras*可能有助于抑制肿瘤的生长和浸润。Yashiro等^[14]的研究表明,

胃癌中 *K-ras* 的突变率为 18.5% (20/108)。Borrmann 型和 Borrmann 型的胃癌中 *K-ras* 突变率显著高于 Borrmann 型及 Borrmann 型, 表明 *ras* 基因在进展期胃癌的发病早期起着重要的作用。基质溶解因子 (MMP-7) 在胃肠肿瘤的侵袭与转移中起重要作用, *K-ras* 的突变影响 MMP-7 的 mRNA 的表达, 进而诱导 matrilysin 的表达, 使其高表达, 最终产生致癌作用^[24]。Hiyama 等^[25] 发现在胃癌患者中, 所有肠型的胃癌中均能检测到 *K-ras* 的突变, 但在所有弥漫型胃癌中都能检测到 (Lauren 分类)。幽门螺杆菌感染的胃癌患者与非胃癌患者相比, 前者的 *K-ras* 突变显著高于后者 (10.9% vs 3.0%, $P=0.044$)。表明肠型与弥漫型的胃癌在发病机制上不同, *K-ras* 的突变可能与肠型胃癌的早期致癌发生相关^[26]。

基于 *K-ras* 在肿瘤中的重要作用, 通过不同的途径下调 *K-ras*, 并使其失活可以尝试应用于肿瘤的治疗。以突变型 *K-ras* 为靶向的治疗策略, 其中一个明显的优势就是其仅对突变型的 *K-ras* 起作用, 而对包含野生型 *K-ras* 的正常细胞仅有微弱的毒性作用。

通过抑制 *ras* 的激活、抑制 *ras* 蛋白的表达、抑制 *ras* 的突变、抑制突变 *ras* 蛋白的表达等各种途径, 均可以达到抑制肿瘤生长的目的。以抑制突变型 *ras* 蛋白为例, 其治疗依据是野生型及突变型 *K-ras* 之间存在免疫学差异, 根据突变型 *K-ras* 表达的蛋白具有的肿瘤特异性, 可以诱导出其具有高度特异性的细胞毒性 T 细胞, 从而达到对其灭活的作用^[27]。通过接种含有突变型 *ras* 肽的疫苗, 在肿瘤患者及正常个体中均可以刺激机体产生特异性的细胞毒性 T 细胞。在离体实验中, T 细胞能够有效识别包含突变型 *K-ras* 的人类肿瘤细胞, 并抑制其生长。在包含突变型 *K-ras* 结肠肿瘤细胞系中, 克隆出的 T 细胞显示出其特异性的细胞毒性。T 细胞的完全激活需要多种信号, 在未接种的肿瘤患者中, 其突变型 *K-ras* 没有足够的免疫原性, 因此其免疫反应发生的频率较低^[28,29]。Khleif 等^[30] 的研究发现, 在 43 例实体瘤患者中, 产生特异性免疫反应的有 25 例 (58%)。产生免疫应答者与未产生应答者相比, 生存期延长 (148 d vs 61 d)。并且发现, T 细胞的毒性只作用于突变型的 *K-ras*, 而对野生型的 *K-ras* 没有作用。

Li 等^[23] 研究 89 例胃癌标本, 使用免疫组化的方法分析发现, 61.8% (55/89) 的标本 *K-ras* 过度表达, 其阳性率与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移相关 ($P < 0.001$)。相对于 *K-ras* 正常表达的胃癌患者, *K-ras* 过度表达者预后较差, 两者存在显著差异 ($P=0.0825$),

并且与环氧化酶-2 的过度表达存在协同效应。

3.2 RASAL1 的临床意义

RASAL1 表达变化发生于 *ras* 活性改变之前^[22], 可以作为胃肠道肿瘤的早期诊断指标; 调节 RASAL1 的活性状态可能有助于肿瘤的靶向治疗, 检测 RASAL1 的活性有助于判断肿瘤患者的预后。

Ohta 等^[22] 对 152 个不同病理等级的结直肠癌标本分析发现, RASAL1 的表达水平与野生型 *K-ras* ($P=0.0010$), 肿瘤位置 ($P=0.0066$), 以及 P53 蛋白的异常表达 ($P=0.208$) 相关。RASAL1 的表达水平在腺癌中减少 47%, 在进展期腺癌中减少 17%, 但在小腺癌中并没有发现有表达差异。这些发现表明, RASAL1 表达在结直肠肿瘤的早期即有下降, 并且与结直肠癌的进展相关, 减少的程度随着肿瘤从早期腺癌到腺癌的进展而增加。因此, 检测 RASAL1 的活性有助于胃肠道肿瘤的早期诊断。

4 结 语

ras 对肿瘤的发生、进展以及预后起着重要的作用, 因此抑制 *ras* 的活性有助于胃肠道肿瘤的预防和治疗。鉴于 RASAL1 对 *ras* 的抑制作用, 检测 RASAL1 的表达活性可以应用于胃肠道肿瘤的早期诊断; 并有助于判断 *ras* 的突变率, 从而有可能应用于胃肠道肿瘤预后的判断。增加 RASAL1 的表达, 能使调低 *ras* 的表达, 减少突变型 *ras* 的蛋白, 从而达到靶向治疗肿瘤的目的。

ras 在胃肠肿瘤中的突变率较高, *ras* 的突变与 RASAL1 的异常表达有关, 且在肿瘤发生的早期就有 RASAL1 的变化, 因此, 通过检测 RASAL1 的表达水平, 可以为胃肠道肿瘤的早期诊断、治疗以及判断预后提供重要依据。

【参考文献】

- [1] Colicelli J. Human *ras* superfamily proteins and related GTPases [J]. Sci STKE 2004, 2004(250): RE13.
- [2] Marte BM, Rodriguez-Viciana P, Wennström S, et al. R-ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the *ras* effector pathways [J]. Curr Biol, 1997, 7(1): 63-70.
- [3] Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ, et al. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate *ras* oncogenesis [J]? Trends Cell Biol, 2004, 14(11): 639-647.
- [4] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins [J]. Physiol Rev, 2001, 81(1): 153-208.
- [5] Gideon P, John J, Frech M, et al. Mutational and kinetic

- analyses of the GTPase activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity [J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(5): 2050-2056.
- [6] Giehl K. Oncogenic ras in tumour progression and metastasis[J]. *Biol Chem*, 2005, 386(3): 193-205.
- [7] Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(17): 4682-4689.
- [8] Forrester K, Almoguera C, Han K, *et al*. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis[J]. *Nature*, 1987, 327(6120): 298-303.
- [9] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, *et al*. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes[J]. *Cell*, 1988, 53(4): 549-554.
- [10] Rodenhuis S, van de Wetering ML, Mooi WJ, *et al*. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung[J]. *N Engl J Med*, 1987, 317(15): 929-935.
- [11] Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, *et al*. Analysis of ras gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(5): 1629-1633.
- [12] Tada M, Yokosuka O, Omata M, *et al*. Analysis of ras gene mutations in biliary and pancreatic tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing[J]. *Cancer*, 1990, 66(5): 930-935.
- [13] Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(7): 517-531.
- [14] Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K. K-ras mutation influences macroscopic features of gastric carcinoma[J]. *J Surg Res*, 2005, 124(1): 74-78.
- [15] Guerrero I, Casanovall I, Farre L, *et al*. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(23): 6750-6756.
- [16] Glennon TM, Villà J, Warshel A. How does GAP catalyze the GTPase reaction of ras? A computer simulation study[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(32): 9641-9651.
- [17] Ahmadian MR, Zor T, Vogt D, *et al*. Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic ras mutants[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(12): 7065-7070.
- [18] Kosloff M, Selinger Z. Substrate assisted catalysis—application to G proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(3): 161-166.
- [19] Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, *et al*. Identification of a ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca^{2+} oscillations [J]. *EMBO J*, 2004, 23(8): 1749-1760.
- [20] Liu Q, Walker SA, Gao D, *et al*. CAPRI and rasAL impose different modes of information processing on ras due to contrasting temporal filtering of Ca^{2+} [J]. *J Cell Biol*, 2005, 170(2): 183-190.
- [21] Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, *et al*. A genetic screen identifies pitx1 as a suppressor of ras activity and tumorigenicity[J]. *Cell*, 2005, 121(6): 849-858.
- [22] Ohta M, Seto M, Ijichi H, *et al*. Decreased expression of the ras-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 206-216.
- [23] Li M, Liu W, Zhu YF, *et al*. Correlation of COX-2 and K-ras expression to clinical outcome in gastric cancer[J]. *Acta Oncol*, 2006, 45(8): 1115-1119.
- [24] Yamamoto H, Itoh F, Senota A, *et al*. Expression of matrix metalloproteinase matrilysin (MMP-7) was induced by activated K-ras via AP-1 activation in SW1417 colon cancer cells[J]. *J Clin Lab Anal*. 1995, 9(5): 297-301.
- [25] Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, *et al*. K-ras mutation in helicobacter pylori-associated chronic gastritis in patients with and without gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(5): 562-566.
- [26] Hiyama T, Tanaka S, Haruma K, *et al*. The roles of H. pylori infection and K-ras gene mutation in gastric carcinogenesis[J]. *Nippon Rinsho*, 2003, 61(1): 46-49.
- [27] Gjertsen MK, Gaudernack G. Mutated ras peptides as vaccines in immunotherapy of cancer[J]. *Vox Sang*, 1998, 74Suppl 2: 489-495.
- [28] Fossum B, Olsen AC, Thorsby E, *et al*. CD8+ T cells from a patient with colon carcinoma, specific for a mutant p21-ras-derived peptide (Gly13YAsp), are cytotoxic towards a carcinoma, cell line harbouring the same mutation[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1995, 40(3): 165-172.
- [29] Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, *et al*. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2001, 92(3): 441-450.
- [30] Khleif SN, Abrams SI, Hamilton JM, *et al*. A phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors[J]. *J Immunother*, 1999, 22(2): 155-165.

(编辑: 周宇红)