

抑癌基因 DLC-1 的研究进展

张培文 官成浓

肿瘤抑制基因又称抑癌基因或抗癌基因,是能够抑制细胞的恶性转化,对正常细胞的增生起负性调节作用的基因。肿瘤抑制基因失活后,正常细胞增生失控,转化成肿瘤细胞。目前,肿瘤抑制基因已成为肿瘤遗传学和分子生物学研究的前沿和热点。这一领域的研究对最终揭开细胞增生、分化和癌变的奥秘,实现肿瘤的有效基因治疗,具有重大理论和现实意义。寻找肿瘤相关的特异性抑癌基因,可进一步从分子水平阐明肿瘤发病的原因,为肿瘤的诊断、转归、预后和疗效等提供依据。DLC-1(deleted in liver cancer 1)即为近期发现的一种重要抑癌基因,有望成为今后研究的靶基因。本文就抑癌基因 DLC1 的研究进展综述如下。

一、DLC-1 蛋白发现和结构

DLC-1(deleted in liver cancer-1)全称为肝癌缺失基因,是 Homma Y 等^[1]于 1995 年在鼠脑组织中以磷脂酶结合蛋白的方式被发现的。1998 年,Yuan 等^[2]在对多个肝癌细胞系的 8 号染色体的研究中,用再现差异分析法(RDA)发现的一种重要抑癌基因。人类 DLC-1 位于 8p21.3~22 区,Yuan BZ^[2,3]研究发现,DLC-1 的 cDNA 全长 3850bp,含有 14 个外显子,表达蛋白由 1091 个氨基酸组成,蛋白相对分子质量为 123kDa,Zhou^[4]等用免疫组织化学染色法发现 DLC-1 蛋白主要存在于细胞质中。DLC-1 蛋白作为一种 GAPs 蛋白,通常情况下 GTP 酶处于活性较低状态,GAPs 可使其活性明显增强^[5]。与小鼠 p122 RhoGAP 基因有 86% 的同源,表达蛋白有 92.5% 相同^[6]。随后 DLC1 的两种同源分子也被分离得到^[7],DLC-2 和 DLC-3,它们也可以抑制肿瘤的生长。DLC2 基因位于人类染色体 13q12 区,DLC3 位于人染色体 xq13 区。DLC-1 又被称为 ARHGAP7 或者 STARD12,因为它依次含有 RhoGAP 结构域和 START 结构域,另外,在靠近 DLC-1 的 N-端还发现 SAM 结构域,在这个结构域中,SAM 是以二聚体形式存在

的,也有可能与其他蛋白、DNA、RNA 结合^[8]。START 结构域和脂类连接,单这一点在 DLC-1 中需要鉴别^[9]。DLC-1 的 N-末端区域含有与病灶粘连蛋白(弹力蛋白),而 SH2 结构域绑定的病灶粘连靶序列,所以这些结构要一起被删除。这个粘连就是 DLC-1 发挥抑制作用的关键^[10]。通过酵母双杂交、免疫、沉淀、亚细胞定位等方法分析得出,DLC-1 和弹力蛋白 SH2 结构之间的相互作用不是依靠 DLC-1 络氨酸磷酸化酶。通过诱变作用可知,关键的删除残基包括 DLC-1 下游 440 位的丝氨酸和下游的 442 位的络氨酸,还有 SH2 结构域的精氨酸^[11]。DLC-1 的 C-末端和 PLC81 作用,从而提高 PLC81 的磷脂酰肌醇 4-5 之间的二磷酸水解活性^[1]。这种提高很可能对 DLC-1 调节肌动蛋白纤维有帮助。DLC-1 的 C-末端通过绑定多中蛋白和小窝蛋白-1 作用,可以引起细胞膜内陷^[11,12]。但目前这种机制还不太清楚。

二、DLC-1 蛋白的抑癌机制

DLC-1 在许多组织如脑、心、肝、肺、前列腺、乳腺等中表达^[13]。DLC-1 被认为是一种肿瘤抑制因子,在肝癌、肺癌、前列腺癌等癌组织中基因杂合丢失或 DNA 甲基化而发生 DLC-1 的表达下降或不表达^[14~17]。许多研究发现 DLC-1 在肝癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌等细胞中能抑制癌细胞生长^[18,19],这些抑制作用包括:影响细胞骨架形成,细胞骨架不仅能维持细胞形态,在细胞运动中也发挥重要作用。还在细胞的各种生物活动如增生、接触抑制、生长和凋亡中起关键作用。DLC-1 蛋白通过 RhoA 调节肌动蛋白对细胞外信号的反应,使单体肌动蛋白形成丝状体肌动蛋白,并聚合形成应力纤维(stress fiber)和黏着斑(focal adhesion)。使细胞形态改变和细胞凋亡^[20]。小鼠中 DLC-1 和 PLC81 的绑定可以提高 PIP2 的水解作用,这种作用可以通过多种途径调节肌动蛋白的细胞骨架^[14]。PIP2 的水解作用可以导致二酰基甘油和 IP3 的生成。二酰基甘油和 IP3 可以依次激动 PKC,诱导体内 Ca^{2+} 的释放。PKC 和 Ca^{2+} 是肌动蛋白细胞骨架的调解者。另外,许多肌动蛋白调节蛋白如抑制蛋白,凝溶蛋白等可以结合到 PIP2

作者单位:524001 湛江,广东医学院附属医院肿瘤防治中心

通讯作者:官成浓,电子信箱:guanchengnong@163.com

上,PIP2 的水解又可以把这些蛋白释放,否则就绑定在 G-肌动蛋白或者肌动蛋白丝末端,然后就加速肌动蛋白的降解。DLC-1 提高 PLC δ 1 活性的功能和提高 RhoGAP 活性具有协同性,它们共同诱导细胞发生细胞学和形态学方面的变化。先前的研究表明 PLC δ 1 包含有 RhoGAP 活性和 START 结构域,这些对抑制肿瘤组织细胞生长,肌动蛋白和病灶黏着斑形成都是必须的。实际上,最近的研究表明 RhoGAP 活性和 START 结构域以及弹力蛋白结合活性,最重要的功能是把 DLC-1 引到病灶应力纤维和黏着斑域(focal adhesion)。维持细胞的形态并赋予细胞韧性和强度,进而影响细胞骨架,并且参与细胞运动和迁移的调节。和弹力蛋白断开的 DLC-1 突变体没有获得粘连的功能,而不能发挥肿瘤抑制作用。研究者还发现 DLC-1 调节细胞转录、增生和凋亡。DLC-1 通过 Cdc42 和 RhoA 在细胞外因子刺激细胞引起的转录过程中发挥较重要作用。Cdc42 能使 JNK(c-Jun-NH2-terminal kinase)和 P38 活性增加并激活 SRF 和 NF κ B 转录因子。RhoA 通过 c-fos 血清效应元件(SRE)刺激基因表达。RhoA 通过 PI3K 间接控制细胞增生、细胞生存、细胞代谢与细胞凋亡。异常活化的 Rho 家族能启动肿瘤细胞无限增生、浸润和转移的特性,且 Cdc42 和 Rac1 能阻断上皮细胞的正常生成,促进细胞的迁移和侵入。DLC-1 蛋白可使降解 Cdc42 和 RhoA 的酶活性增强,从而抑制肿瘤的发生。

另外,Yuan 等^[3]将 DLC-1 转染到两个 DLC-1 阴性的乳腺癌细胞系后,细胞增生率明显下降,进一步将 DLC-1 阴性的细胞与 DLC-1 转染后的细胞分别注射入裸鼠体内 3 周后,前者逐渐发展成肿瘤,其组织病理学与乳腺癌相同,后者则无肿瘤的形成,因此,推测 DLC-1 在乳腺癌的形成中起重要的抑制作用。Goodison 等也对乳腺癌细胞系 MDA-MB-435 转移非转移比较,结果发现 DLC-1 在转移亚系中表达降低。裸鼠培养试验中在乳腺癌转移亚系中恢复 DLC-1 表达,乳腺癌的转移和侵袭都大大减少。Durkin 等基因剔除小鼠实验表明 DLC-1 在小鼠胚胎发育中有重要作用。纯合突变小鼠胚胎在交配后 10.5 天内就会因神经管、大脑、心脏和胎盘的缺陷而死亡。从 DLC-1 突变体胚胎中分离的成纤维细胞含有少量的肌动蛋白丝和少量黏着斑。胚胎成纤维细胞研究印证了 DLC-1 对肌动蛋白细胞骨架和黏着斑结构的调控作用。但是,早期 DLC-1 缺失胚胎的致死性限制了其作为肿瘤抑制因子的进一步研究。

但是在小鼠中,DLC-1 在组织中的特异性删除将会对其在各种肿瘤中的作用提供更多信息,并有可能为人类相关肿瘤提供良好的动物模型。Hers 等研究发现 DLC-1 可能与胰岛素信号有关,胰岛素诱导 DLC-1 第 322 位丝氨酸磷酸化,这种诱导可以通过 PI3 激酶 AKT 通路 MEK/ERK 核蛋白体 S6 激酶途径,哪种途径由细胞类型决定。虽然目前这些丝氨酸磷酸化还不是很清楚,但发现它不调节 DLC-1 的病灶黏着斑域。而一些研究证明在癌症中黄体可以使 DLC-1 的表达得到恢复,这可能成为治疗 DLC-1 相关癌症的一条潜在方法。

三、DLC-1 与肿瘤的研究

研究证明除抑癌基因的杂合性丢失和点突变外,启动子区域 CpG 岛异常甲基化也可以使抑癌基因的功能丧失而失活。最近对多种原发肿瘤和细胞系的研究发现^[18],DLC-1 蛋白表达阳性组织中无 DLC-1 异常甲基化,而阴性表达组织有启动子过甲基化情况出现,两组间存在明显差异性。另外发现在 DLC-1 甲基化的组织中,DLC-1 的 DNA 与正常胃组织 DNA 序列无明显差异性,说明基因缺失和突变不是 mRNA 表达缺失的主要原因。在体外分析研究中发现,DLC-1 蛋白表达阴性的细胞系中 CpG 岛的 CpG 区几乎全部甲基化,可见启动子区的甲基化可以使 DLC-1mRNA 表达降低或不表达。Yuan BZ 等^[3]认为肿瘤抑制基因或者肿瘤相关基因在启动子区域 CpG 岛甲基化是静止基因表达最普遍的机制。研究者运用甲基化敏感酶 Hpa II 研究了 12 例 DLC-1 表达低下的肝癌、乳腺癌、肠癌和前列腺癌。结果发现在 DLC-1 表达杂乱的所有细胞系中,其启动子出现了不同程度的过甲基化。研究者认为过甲基化是在肝癌、乳腺癌、肠癌和前列腺癌中 DLC-1 表达低下的原因。随后 Kim 等^[15]研究发现 77.78% 胃癌细胞中无 DLC-1mRNA 的表达,但没有 DLC-1 基因杂合性丢失,用甲基化特异性 PCR(MSP)对无 DLC-1mRNA 胃癌细胞系的 DLC-1 的 CPG 岛分析显示 5/7 的胃癌细胞系存在 CPG 岛的甲基化。而没有表达 DLC-1mRNA 的细胞系给予去甲基化药物 5-氮杂胞苷后,可以恢复 DLC-1mRNA 的表达。说明甲基化是导致 DLC-1 基因表达沉默的主要机制。Liu T 等用半定量反转录 2 聚合酶链反应方法检测 34 例原发性胃癌及癌旁正常组织中 DLC-1mRNA 表达;甲基化特异聚合酶链反应法(MSP)检测启动子甲基化。结果正常组织中 DLC-1mRNA 均正常表达,胃

癌组织 DLC-1 mRNA 低表达或表达缺失;正常组织中未发现 DLC-1 基因启动子甲基化;胃癌组织中 DLC-1 启动子甲基化阳性 12 例,甲基化率 35.3%。启动子甲基化与无甲基化患者间 DLC-1 mRNA 表达差异,进一步说明启动子甲基化与 DLC-1 mRNA 表达抑制密切相关。

Yuan 等^[3]在 15 例原发性乳腺癌进行杂合性分析发现有 40% 的标本有 DLC-1 基因的丢失,70% 的标本 DLC-1 基因的表达下降。宋丽杰等收集 51 例复旦大学附属中山医院外科手术切除的肝细胞癌及癌旁正常组织标本,用荧光定量 RT-PCR 方分析组织中 DLC-1 基因的表达。结果显示在 51 对配对的肝细胞癌与癌旁无瘤肝组织中,前者 DLC-1 基因表达水平明显低于后者,且高侵袭性肝细胞癌组明显低于低侵袭性肝细胞癌组。说明 DLC-1 基因在 HCC 组织中呈低表达,其表达水平与其侵袭性高低相关。与 Park 等用 PCR-SSCP 法对 17 例原发性肝癌和 18 例肝癌细胞系 DLC-1 基因进行的点突变分析所得结果点突变发生率非常低相符合。因在许多肿瘤中低表达或表达缺失。Ng 等研究发现,高达 20% 的肝癌组织及 40% 的肝癌细胞系 DLC-1 基因表达缺失。Wong 等研究发现,在原发性肝癌组织中 DLC-1 mRNA 的表达较正常组织中明显下降。本研究显示,癌旁正常组织中 DLC-1 的表达量约为癌组织 2 倍,为癌栓的 3 倍。癌栓中 DLC-1 基因的表达水平低于癌组织中的表达,与国外研究结果相一致。Holleiter G 等利用 RNA 干扰的方法下调 DLC1, DLC2 在乳腺癌细胞表达。沉默的 DLC1 导致应力的稳定和提高纤维和焦粘连在创伤修复细胞运动。证据表明,缺乏 DLC1 增强细胞迁移主。数据表明 DLC1 是参与缺氧的控制信号与肌细胞重构隔离,其细胞丧失足以使肿瘤细胞加速侵袭性和转移。

四、展 望

DLC-1 作为一种新的抑癌基因,在人体各正常组织中均表达,但在多数原发肿瘤和肿瘤细胞系中出现低表达或表达缺失。除了基因的缺失、突变外,也可以通过启动子区域的 CpG 岛过甲基化而失活有关。启动子过甲基化在基因表达调控、DNA 修复、基因稳定及基因抑制方面起着重要作用^[18]。YUAN 等在研究肺癌癌旁正常组织时也发现存在 DLC-1 mRNA 表达的降低,DLC-1 mRNA 正常的肺组织细胞系也有 DNA 甲基化。另有学者用 RT-PCR, Souther-blo 方法对前列腺癌组织,前列腺增生组织,

前列腺癌细胞,癌旁组织进行研究发现 10% 癌旁组织 DLC-1 mRNA 表达降低,27% 的前列腺增生组织 DLC-1 mRNA 表达降低,66.7% 前列腺癌细胞 DLC-1 mRNA 表达降低。两者都说明 DLC-1 基因的异常甲基化和 mRNA 表达降低可能是肿瘤发生的早期事件。Kim 等对胃癌的研究得出没有表达 DLC-1 mRNA 的细胞系给予去甲基化药物 5-氮杂胞苷后,可以恢复 DLC-1 mRNA 的表达。这些都为我们对肿瘤的早期诊断和治疗提供了潜在可能性。

另外,Ullmannova V 等在利用黄酮对乳腺癌细胞系:MDA-MB-361、BT20 MDA-MB-468 以及结肠癌细胞 HT-29 的研究时发现,总黄酮抑制细胞的增生,诱导细胞周期阻滞在 G₂-M,增加 p21(Waf1) 基因表达,并导致细胞凋亡。芯片分析这些侵袭性和乳腺转移癌基因的细胞显示,其中激活的黄酮基因的脱氧核糖核酸(DNA)诱导 GADD 上调和原癌基因,STMN1 和 IGFBP3 被动下调。研究表明单独或联合去甲基化药物、总黄酮可以有效地辅助化疗在预防乳腺癌转移,有效地辅助化疗在预防乳腺癌转移。我们可以对人类各种肿瘤相关的多种动物模型进行去甲基化药物治疗,为临床对肿瘤的治疗提供理论基础。

DLC-1 基因突变,甲基化改变是癌变早期发现,早期预测和癌症风险预后评估的最可能的指标之一,大范围大多数肿瘤中 DLC-1 甲基化的检测是非常有意义的,因此这方面的工作有待进一步的广泛研究。随着分子技术的发展,我们会对 DLC-1 基因和上下游靶基因相互作用信号传导通路更清楚。相信不久的将来 DLC-1 基因在肿瘤的治疗应用上有广阔的前景。

参考文献

- 1 Homma Y, Emori Y. A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C - delta stimulating activities [J]. *Embo J*, 1995, 14: 286 - 291
- 2 Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, *et al*. Cloning, characterization and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP [J]. *Cancer Research*, 1998, 58 (10): 2196 - 2199
- 3 Yuan BZ, Zhou X, Durkin ME, *et al*. DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 445 - 450
- 4 Zhou X, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Restoration of DLC-1 gene expression induces apoptosis and inhibits both cell growth and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 1308 - 1313
- 5 Ching YP, Wong CM, Chan SF, *et al*. Deleted in liver cancer (DLC) 2

- encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma[J]. *J Biol Chem*,2003,278:10824-10830
- 6 Durkin ME. Gene structure, tissue expression and linkage mapping of the mouse DLC21 gene[J]. *Gene*,2002,17:119-127
 - 7 Durkin ME, Ullmannova V, Guan M, *et al*. Deleted in liver cancer 3 (DLC-3), a novel RhoGTPase-activating protein, is downregulated in cancer and inhibits tumor cell growth[J]. *Oncogene*,2007
 - 8 Qiao F, Bowie JU. The many faces of SAM. *Sci STKE*. 2005;re7
 - 9 Iyer LM, Aravind L, Koonin EV. Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *J Virol*,2001,75:1720-1734
 - 10 Liao YC, Si L, Devere White RW, *et al*. The phosphotyrosine-independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1. *J Cell Biol*,2007,176:43-49
 - 11 Yam JW, Ko FC, Chan CY, Jin DY, Ng IO. Interaction of deleted in liver cancer 1 with tensin2 in caveolae and implications in tumor suppression. *Cancer Res*,2006,66:8367-8372
 - 12 Yamaga M, Sekimata M, Fujii M, *et al*. A PLCdelta1-binding protein, p122/RhoGAP, is localized in caveolin-enriched membrane domains and regulates caveolin internalization. *Genes Cells*,2004,9:25-37
 - 13 Durkin ME, Yuan BZ, Thorgeirsson SS, *et al*. Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (Arhgap7). *Gene*,2002,288,119-127
 - 14 Guan M, Zhou X, Soultzis N, *et al*. Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: potential clinical applications. *Clin Cancer Res*,2006,12:1412-1419
 - 15 Kim TY, Jong HS, Song SH, *et al*. Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells. *Oncogene*,2003,22:3943-3951
 - 16 Kim TY, Lee JW, Kim HP, *et al*. GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*,2007,355:72-77
 - 17 Seng TJ, Low JS, Li H, *et al*. The major 8p22 tumor suppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation. *Oncogene*,2007,26:934-944
 - 18 Yuan BZ, Durkin ME, Popescu NC. Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers. *Cancer Genet Cytogenet*,2003,140:113-117
 - 19 Wong CM, Yam JW, Ching YP, Yau TO, Leung TH, Jin DY, Ng IO. Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*,2005,65:8861-8868
 - 20 Sekimata M, Kabuyama Y, Emori Y, Homma Y. Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J Biol Chem*,1999,274:17757-17762

(收稿:2009-08-28)

(修回:2009-12-21)

MCP-1 及 HIF-1 与肿瘤血管生成关系的研究进展

陈宝英 官成浓

一、MCP-1 与肿瘤血管生成的关系

1. MCP-1 的生物学特性:(1)趋化因子及受体:趋化因子(chemokine)是能使细胞向高浓度刺激物方向做定向运动的小分子细胞因子,为一类结构、功能相似,相对分子质量 8~10kDa 小相对分子质量蛋白质。对多种细胞(如白细胞、肿瘤细胞)具有趋化作用(使其作定向运动)。可由多种细胞产生,如淋巴细胞、NK 细胞、中性粒细胞、单核-吞噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞乃至上皮细胞和肿瘤细胞等。自 1987 年发现第 1 个趋化因子 IL-8 至今已发现并克隆出趋化因子达 50 余种^[1]。根据其 4 个保守的半胱氨酸残基中前两个的相对位置不同,可

将它们分成 4 大类:CXC(α)、CC(β)、C(γ)、CX3C(δ)趋化因子。根据配体的不同,趋化因子受体可分为 4 类,CXC 族受体(CXCR)、CC 族受体(CCR)、C 族受体(XCR1)和 CX3C 族受体(CX3CR)。它们属于 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体,目前已鉴定的趋化因子受体至少有 20 种^[2]。趋化因子与趋化因子受体结合后具有广泛的生物学功能,涉及免疫调节、器官形成、调节造血、神经元通讯、白细胞运动、血管生成以及恶性肿瘤的侵袭和转移等^[3]。(2)MCP-1 及受体:单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是趋化因子 CC 亚家族中的一员,于 1989 年首先在人胶质细胞瘤间单核细胞中发现和提纯^[4]。基因定位于 17q11.2~q12,包含了 3 个外显子与 2 个内含子,其中 5'端非翻译区及 23 个氨基酸的信号肽遗传信息和 MCP-1 蛋白的前 2 个氨