

抑癌基因 DLC-1 与结肠癌的关系*

刘 洪,王春毅 综述,傅仲学[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 400016)

关键词:抑癌基因;DLC-1;结肠癌;综述

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.038

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)17-1766-03

结肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,其发生、发展和演进是一个多步骤、多因素综合作用的复杂生物学过程,涉及到许多基因表达的异常。目前研究发现,某些抑癌基因的表达抑制是触发结肠癌的重要机制。肿瘤抑癌基因已成为分子生物学研究的热点和前沿。这一领域的研究对最终揭开结肠癌发生、发展的机制,实现结肠癌的基因靶向治疗,具有重大的理论和临床意义。寻找结肠癌相关的特异性抑癌基因,可进一步从分子水平阐明结肠癌的发病机制,为结肠癌的诊断和治疗等提供新的依据。DLC-1 即是一种近几年研究较多的抑癌基因,涉及了结肠癌等多种恶性肿瘤的发病机制。本文就 DLC-1 的结构、生物学功能、在结肠癌中的失活机制和在结肠癌发生、发展中的作用作一综述。

1 DLC-1 的结构及生物学功能

DLC-1 (deleted in liver cancer-1) 又名 ARHGAP7 或 STARD12, 全称为肝癌缺失基因。1998 年, Yuan^[1] 等在对多个肝癌细胞系的 8 号染色体的研究中, 采用以 PCR 为基础的减除杂交技术-再现差异分析法 (representational difference analysis, RDA) 首次在人肝细胞癌 (HCC) 和 HCC 细胞株中发现 OLC-1。随后研究发现, DLC-1 在结肠癌等多种肿瘤中也存在表达缺失^[2]。

人类 DLC-1 位于染色体 8p21.3~22.0 区, 这一区域在结肠癌等多种恶性肿瘤中经常发生基因表达的缺失或下调。DLC-1 cDNA 全长 3 850 bp, 含有 14 个外显子, 表达蛋白由 1 091 个氨基酸组成, 蛋白相对分子质量为 123×10^3 ^[1], DLC-1 蛋白主要定位于细胞质中。DLC-1 基因序列与鼠 p122 RhoGTP 酶激活蛋白 (p122RhoGAP) 基因序列有 86% 相同, 表达蛋白有 92.5% 相同, 故被认为二者具有同源性, 这一点也在一定程度上为研究 DLC-1 基因提供了佐证。随后 DLC-1 的两种同源分子 DLC-2 和 DLC-3 被发现, 它们同 DLC-1 一样也有抑制肿瘤的作用。

DLC-1 蛋白具有的 3 个重要的功能结构域: Rho GAP 酶激活蛋白 (Rho GTPase activating protein, RhoGAP)、类固醇急性调节相关脂质转移域 (steroidogenic acute regulatory related lipid transfer domains, START) 和山姆结构域 (sterile alpha motif, SAM)。除此之外, 在 SAM 和 RhoGAP 结构域之间含有一段富含丝氨酸的区域, 存在一个黏着斑定位序列 (focal adhesion targeting sequence)^[3], 见图 1。

图 1 DLC-1 基因的功能结构域^[4]

1.1 RhoGAP 结构域 RhoGAP 能通过特异性增强 Rho 家族蛋白自身内源性的 GTP 酶水解活性, 促进无活性的 RhoG-

DP 生成, 因此扮演了 Rho 家族蛋白负调控因子的角色, 在 DLC-1 的肿瘤抑制功能中发挥重要作用, 故 DLC-1 又被称为 ARHGAP7。RhoGAP 结构域可能是 DLC-1 基因抗肿瘤的主要机制^[5], 人类对 DLC-1 的抑癌功能猜测最初也是源于该结构域。

Rho 家族蛋白是 Ras 超家族的小 G 蛋白, 其下游效应分子包括 70 多种蛋白激酶、磷脂酶以及支架蛋白^[6]。基于其效应分子的多样性, Rho 家族蛋白成为细胞内多条信号转导通路的关键成分, 对细胞的多种生物学行为起调控作用, 可参与调节细胞骨架, 维持细胞形态、极性、细胞运动, 并在细胞增殖、分化、凋亡中起关键作用, 与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移密切相关, 是 Ras 通路介导的致瘤性转化的重要成员之一^[7]。

已发现的人类 Rho 家族蛋白共有 23 种, 最具代表性的是 RhoA、Rac1 和 Cdc42, 这 3 种蛋白在细胞运动、转移和细胞骨架形成过程中起十分关键的作用。研究证明 DLC-1 能明显提高 RhoA 和 Cdc42 的内在 GTP 酶活性, 但并不使 Rac1 的 GTP 酶活性增加^[8]。Healy^[9] 等发现 DLC-1 对该家族成员 RhoB 和 RhoC 的 GTP 酶活性也有增强作用。

Rho 家族蛋白受 RhoGAP、鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEFs)、鸟嘌呤核苷酸解离抑制因子 (GDIs) 3 种调节蛋白调控。RhoGAP 使 GTP 水解成 GDP 而失活; GEFs 催化 Rho 蛋白的 GDP/GTP 交换而正相调控 Rho 蛋白活性; GDIs 能与 GDP-Rho 复合物结合使之稳定, 二者结合后定位于胞浆, 以抑制 GDP/GTP 交换^[10]。GEFs 和 RhoGAP 的动态平衡是 Rho 蛋白向细胞内传递正常生长信号的前提, 如果 Rho 家族信号通路发生改变, 如 DLC-1 基因失活将使 Rho 蛋白的表达异常, 从而激活一系列肿瘤信号, 这可能是肿瘤发病的主要机制之一。

1.2 START 结构域 START 结构域存在于 StAR、HD-ZIP 和其他信号蛋白, 是蛋白质的脂质结合域, 在细胞器之间起运输脂类的作用。DLC-1 的 START 结构域位于其 C-端, 故 DLC-1 又被称为 STARD12。研究发现, DLC-1 的 START 结构域抑制动蛋白应力纤维形成和成长, 在调解细胞的形变及运动中起重要作用^[3]。另外, DLC-1 的 START 结构域可能参细胞内部脂质运输和代谢^[11], 其功能有待进一步研究证实。

1.3 SAM 结构域 SAM 结构域位于 DLC-1 的 N-端, 相互作用能形成同源二聚体或多聚体, 也可以结合其他不含 SAM 结构域的蛋白、DNA 或 RNA。研究发现, SAM 结构域参与调解细胞形变及运动^[12], 也可能抑制自身 RhoGAP 结构域的活动^[9], 其具体功能尚不清楚。

1.4 黏着斑定位序列 黏着斑定位序列使 DLC-1 蛋白可以结合张力蛋白和肌动蛋白上的 SH2 结构域, 在黏着斑定位以及肿瘤抑制中起重要作用。SH2 是磷酸酪氨酸的结合基序,

* 基金项目:重庆市卫生局医学科计划项目(No. 2010-2-048)。

△ 通讯作者, Tel: (023)67706399; E-mail: fzx990521@sina.com。

然而通过酵母双杂交、亚细胞定位、免疫共沉淀等方法分析发现, DLC-1 和 SH2 结构之间的相互作用不需要 DLC-1 的酪氨酸磷酸化^[13]。黏着斑参与细胞与细胞外基质的黏附, 提示 DLC-1 在肿瘤的转移中起作用。同时, 黏着斑定位序列对 RhoGAP 活性有重要的调节作用^[3]。

1.5 DLC-1 的 C 端 鼠 DLC-1 的 C-端和 PLC δ 1 作用, 增强 PLC δ 1 的磷酸肌醇二磷酸(PIP2)的水解活性, PIP2 水解可生成二酯酰基甘油和三磷酸肌醇, 分别激活细胞内的蛋白激酶 C 和触发细胞内钙离子的释放, 后二者是肌动蛋白细胞骨架的调节者, 从而调节肌动蛋白的细胞骨架^[13]。但在对人类非小细胞肺癌(NSCLC)进行研究时发现, 人的 DLC-1 蛋白不具有激活 PLC δ 1 的水解活性^[9]。

DLC-1 的 C-端还含有小窝蛋白 1(caveolin-1)的结合基序, 与具有同样结合基序的张力蛋白 2 一起, 通过结合小窝蛋白 1 而定位于细胞膜穴样凹陷及黏着斑等处^[14]。DLC-1 和张力蛋白 2 还可相互作用形成复合物, 共同抑制 Ras 信号系统, 若 DLC-1 的小窝蛋白 1 结合基序发生突变, 抑制活性便丧失。DLC-1、张力蛋白 2、小窝蛋白 1 三者之间的相互作用, 可能是 DLC-1 抗癌的另一种机制。

DLC-1 尚参与调节胰岛素信号转导通路。Hers 等^[15]研究发现, 鼠 DLC-1(p122RhoGAP)是蛋白激酶 B 的作用底物, 胰岛素刺激可使 p122RhoGAP 的丝氨酸-322(人 DLC-1 色氨酸-329)被蛋白激酶 B 和核糖体 S6 激酶磷酸化, 从而参与细胞内一系列信号传导。

2 DLC-1 基因在结肠癌中失活机制的研究

Yuan 和 Durkin^[16]发现 DLC-1 mRNA 在人体各正常组织中正常表达, 但在结肠癌等多种肿瘤组织中常发生表达缺失。Ullmannova 和 Popescu^[17]通过癌症阵列分析也发现 DLC-1 在结肠癌中发生表达缺失或下调。目前关于 DLC-1 基因失活机制的研究主要包括启动子区域甲基化、杂合性丢失。

2.1 杂合性丢失 杂合性丢失是一种常用于检测等位基因缺失的方法。Yuan 等^[1]发现肝癌组织和细胞系的染色体 8p21.3~22.0 区域存在杂合性丢失, 并据此命名了 DLC-1。随后在结肠癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌等肿瘤中也发现 DLC-1 基因不同程度的杂合性丢失。

2.2 点突变 DLC-1 基因的序列点突变在结肠癌中较为罕见。Wilson 等^[18]用基于 PCR 的单链构象多肽性分析(SSCP-PCR)技术研究发现, 结直肠癌 DLC-1 基因只存在个别位点的错义突变, 所占比例非常小。通过突变分析发现结直肠癌 DLC-1 含有许多单核苷酸多态性(SNP)位点, 而这些 SNP 位点中已有部分被证实与肿瘤发生的易感性无关。其他肿瘤中 DLC-1 基因的点突变也极为罕见, 提示点突变不是 DLC-1 失活的主要机制。

2.3 启动子区域甲基化 基因调控表遗传学说认为, 基因序列启动子区域高度甲基化可使抑癌基因转录沉默, 从而促进细胞恶性转化。目前的研究显示, 结肠癌 DLC-1 的失活主要与启动子甲基化有关。Wilson 等^[18]研究发现 DLC-1 基因在正常组织中广泛表达, 而在结直肠癌等多种肿瘤中呈现表达缺失或表达下调, 而且这种异常表达与启动子区异常甲基化有关。Yuan 和 Durkin^[16]采用 Southern 杂交技术对结肠癌等肿瘤细胞系的启动子区域甲基化状态进行研究, 发现所有的肿瘤细胞系启动子区域都有不同程度的甲基化, 显示 DLC-1 基因可通过启动子区域甲基化而发生失活。金月玲等^[19]应用甲基化特异性 PCR(MSP)方法和亚硫酸氢盐修饰 DNA 测序检测 3 种结肠癌细胞株 DLC-1 启动子区域甲基化状态, 发现 CaCo-2 和

LoVo 细胞中 DLC-1 mRNA 呈阳性表达, 启动子区域未发生甲基化, HT-29 细胞中 DLC-1 mRNA 表达呈阴性, 启动子区域高度甲基化; 经 5 氮杂胞苷药物干预后, HT-29 细胞的 DLC-1 基因表达明显增强。提示结肠癌细胞株 HT-29 中 DLC-1 基因表达沉默与启动子区高甲基化状态有关。伍健等^[20]在对不表达 DLC-1 mRNA 的结直肠癌细胞系 SW480、HT-29 细胞的研究中也有类似的结论。给予去甲基化药物 5'-氮杂 2'-脱氧胞嘧啶后能使细胞系恢复 DLC-1 mRNA 的表达, 观察发现细胞的增殖力、克隆形成能力、细胞侵袭能力都明显下降。

3 DLC-1 基因在结肠癌发生、发展中的作用

目前研究表明 DLC-1 基因对结肠癌有抑制作用, 是结肠癌的一种抑制基因。Jin 等^[21]筛选了 DLC-1 阳性表达的人结肠癌 LoVo 细胞株作为靶细胞, 应用 RNAi 技术沉默 LoVo 细胞株 DLC-1 阳性的表达, 结果观察到干扰后 LoVo 细胞的增殖曲线比干扰前上升, 并随着时间的增加而逐渐明显; 细胞侵袭实验结果亦显示, DLC-1 基因抑制后 LoVo 细胞侵袭到基底膜的能力明显增强; 通过 RNAi 抑制 DLC-1 的表达, 促进 LoVo 细胞的增殖及侵袭, 并引起细胞周期重新分布。商延芳等^[22]同样运用 RNAi 技术沉默 LoVo 细胞株 DLC-1 基因的表达, 得出 DLC-1 的表达水平与结肠癌细胞侵袭转、移有关。田小强等^[23]在对结肠癌细胞 SW480 的研究中得出 DLC-1 基因可影响结肠癌细胞 SW480 的增殖能力和侵袭力, 并使结肠癌细胞 SW480 细胞周期阻滞于 G₂ 期。Wu 等^[24]发现, 转染 DLC-1 基因引起人结肠癌 HT-29 细胞凋亡增加, 细胞周期停滞于 S 期, 细胞的增殖和转移能力受到明显抑制, 并且这种抑制作用可能是通过对 Cyclin D1、p21 表达的调控来实现。吴鹏等^[25]将 DLC-1 基因及 RhoGAP 结构域缺失的 Δ DLC-1 亚克隆至结肠癌 HT-29 细胞株, 结果转染成功后, 全长 DLC-1 基因转染组与野生型及空载组相比, 细胞增殖能力下降, 侵袭能力减弱, 细胞周期 G₁ 期阻滞并诱导凋亡, 而 Δ DLC-1 亚克隆转染组对细胞增殖、侵袭及细胞周期均无明显影响; 证明 DLC-1 基因可能是通过其内在的 RhoGAP 结构域抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增殖和侵袭。

4 展 望

DLC-1 是一个与结肠癌发生发展关系密切的抑癌基因。DLC-1 基因在结肠癌的发生过程中常发生启动子区域甲基化或表达缺失可能是肿瘤发生的早期事件。因此 DLC-1 启动子区域甲基化和基因表达异常可能成为结肠癌早发现、早预测、早治疗的重要指标之一, 并能为结肠癌治疗疗效的评估提供依据。

作为肿瘤抑制基因, 全面掌握 DLC-1 附加结构域的功能、相互之间的作用, 以及其上、下游靶基因信号通路的精确调节机制, 都将对 DLC-1 相关肿瘤的预防和治疗起决定性作用。DLC-1 基因以及其上、下游信号通路相关因子可成为预测和诊断肿瘤的生物标记, 并有望成为肿瘤治疗的新靶点。随着现代生物医学技术的发展, DLC-1 基因更多的生物学功能以及相关的信号通路将被揭示, 从而为结肠癌的治疗提供一条新的途径。

参考文献:

- [1] 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 Res, 1998, 58(10): 2196-2199.

- [2] Durkin ME, Yuan BZ, Zhou X, et al. DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor[J]. *J Cell Mol Med*, 2007, (11): 1185-1207.
- [3] Kawai K, Iwamae Y, Yamaga M, et al. Focal adhesion-localization of START-GAP1/DLC1 is essential for cell motility and morphology[J]. *Genes Cells*, 2009, 14(2): 227-241.
- [4] Liao YC, Lo SH. Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): A tumor suppressor not just for liver[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(5): 843-847.
- [5] Lahoz A, Hall A. DLC1: a significant GAP in the cancer genome[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(13): 1724-1730.
- [6] Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo[J]. *Bioessays*, 2007, 29(4): 356-370.
- [7] Buongiorno P, Bapat B. Rho GTPases and cancer[J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 2005, 40: 29-53.
- [8] Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins[J]. *Cell*, 2007, 129(5): 865-877.
- [9] Healy KD, Hodgson L, Kim TY, et al. DLC-1 suppresses non-small cell lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms[J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(5): 326-337.
- [10] Florence Grise, Aurélien Bidaud, Violaine Moreau. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1795(2): 137-151.
- [11] Alpy F, Tomasetto C. Give lipids a START; the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(13): 2791-2801.
- [12] Zhong D, Zhang J, Yang S, et al. The SAM domain of the RhoGAP DLC1 binds EF1A1 to regulate cell migration[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(3): 414-424.
- [13] 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]. *J Cell Biol*, 2007, 176: 43-49.
- [14] Yam JW, Ko FC, Chan CY, et al. Interaction of deleted in liver cancer 1 with tensin 2 in caveolae and implications in tumor suppression[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8367-8372.
- [15] Hers I, Wherlock M, Homma Y, et al. Identification of p122RhoGAP(deleted in liver cancer-1) Serine322 as a substrate for protein kinase B and ribosomal S6 kinase in insulin-stimulated cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(8): 4762-4770.
- [16] Yuan BZ, Durkin ME. Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 15: 113-117.
- [17] Ullmannova V, Popescu NC. Expression profile of the tumor suppressor genes DLC-1 and DLC-2 in solid tumors[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29: 1127-1132.
- [18] Wilson PJ, McGlinn E, Marsh A, et al. Sequence variants of DLC1 in colorectal and ovarian tumours[J]. *Hum Mutat*, 2000, 15(2): 156-165.
- [19] 金月玲, 田小强, 商延芳, 等. 3 种结肠癌细胞株中 DLC-1 基因的表达及其启动子区的甲基化状态研究[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2008, 27(1): 6-10.
- [20] 伍健, 金月玲, 黄培林. 5-氮杂胞苷对 HT29 细胞 DLC-1 基因表达和细胞增殖活性的影响[J]. *现代医学*, 2005, 33(6): 141-144.
- [21] Jin YL, Tian XQ, Shang YF, et al. Inhibition of DLC-1 gene expression by RNA interference in colon CanCer LoVo cell line[J]. *Oncology Reports*, 2008, 19: 669-674.
- [22] 商延芳, 金月玲, 徐佳佳, 等. DLC-1 基因表达对结肠癌细胞侵袭转移能力的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2008, (1): 19-21, 26.
- [23] 田小强, 金月玲, 商延芳, 等. 抑癌基因 DLC-1 在结肠癌细胞 SW480 中表达的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2007, 2: 169-171.
- [24] Wu PP, Jin YL, Shang YF, et al. Restoration of DLC1 Gene Inhibits Proliferation and Migration of Human Colon Cancer HT29 Cells[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2009, 39(3): 263-269.
- [25] 吴鹏, 吴平平, 金治, 等. RhoGAP 结构域在 DLC-1 基因抑制人结肠癌 HT-29 细胞增殖、侵袭中的作用[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(10): 1383-1388.

(收稿日期: 2011-11-07 修回日期: 2012-02-30)

· 综 述 ·

β 受体阻滞剂预防心力衰竭患者心脏性猝死的研究进展

李 露 综述, 常 静 审校

(重庆医科大学附属第一医院心血管内科 400016)

关键词: β 受体阻滞剂; 心力衰竭; 心脏性猝死

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.039

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)17-1768-04

心力衰竭(心衰)是各种心脏疾病心功能代偿到最后阶段的综合表现,其发病率高。据国外统计,人群中心衰的患病率约为 1.5%~2.0%,65 岁以上可达 6%~10%。我国心衰患病率为 0.9%^[1],有临床症状的患者 5 年存活率与恶性肿瘤相

仿。心衰发生心脏性猝死(sudden cardiac death, SCD)的风险是同龄健康者的 9 倍。心衰的死亡原因依次为:泵衰竭(59%)、心律失常(13%)和猝死(13%)^[2]。猝死的发生具有无法预测的特点,发生心脏骤停的患者能被成功复苏的机会很