

B-RAF 基因和肿瘤

付浩 孙开来

【摘要】 *B-RAF* 基因在肿瘤细胞增殖、分化和凋亡等方面发挥重要作用。现就 *B-RAF* 基因作为 RAF-MEK-ERK 信号转导通路中的重要成员在肿瘤中的作用进行阐述。

【关键词】 信号转导； B-RAF 蛋白； 有丝分裂原； 蛋白激酶

B-RAF Gene and Tumor FU Hao, SUN Kai-lai. (Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Corresponding author: SUN Kai-lai. E-mail: klsn@vip.sina.com

【Abstract】 *B-RAF* gene plays an important role in proliferation, differentiation and apoptosis of tumor cells. Here we elucidate the effect of *B-RAF* gene in tumor as an important member of RAF-MEK-ERK signal transduction

【Key words】 Signal transduction; B-RAF protein; Mitogen; Protein kinase

RAF 基因最初是作为逆转病毒癌基因 (*v-RAF*) 被识别的^[1], 这种逆转病毒在鼠和鸡的体内可诱发肿瘤。*RAF* 基因与人类肿瘤没有一致的相关性。然而, 研究的主要动力在于发现 *RAF* 蛋白是 *RAS* 蛋白的主要效应器, 在许多肿瘤中检测到 *RAS* 突变。*RAF* 蛋白在保守的 *RAS/RAF/MEK/ERK* 途径中发挥中心作用, *RAF* 将来自于活化 *RAS* 蛋白的信号经 *MAPK/ERK* 激酶传递到 *P42/P44 MAP* 激酶或 *ERK1/2, ERK1/2* 是这条途径的主要效应器。

有研究证实, 人恶性黑色素瘤的 66% 及结肠癌的 15% 存在 *B-RAF* 基因突变^[2]。这一新发现首次确切地表明 *B-RAF* 蛋白在肿瘤发生中可以不依赖 *RAS* 蛋白而独自发挥作用。*B-RAF* 突变本身可能不是肿瘤发生的真正原因, 但 *B-RAF* 突变与恶性黑色素瘤的高度相关性提示 *B-RAF* 突变的获得可能是这些肿瘤发展的前提。愈来愈多的证据显示与 *A-RAF* 和 *RAF-1* 相比, *B-RAF* 有许多与众不同的特性与肿瘤发生与发展相关。现就 *B-RAF* 的性质、结构、表达、调节及研究热点, 尤其是与肿瘤发生的关系加以阐述。

1 B-RAF 基因及其家族

在高等和低至真核生物中如果蝇、鸡、鼠、大鼠

和人类中均发现 *RAF* 基因^[3]。在哺乳动物中, *RAF* 基因家族有 3 个相关基因, 分别命名为 *A-RAF*、*B-RAF* 和 *C-RAF* (*RAF-1*)。 *B-RAF* 基因位于染色体 7q34, 有 18 个外显子, 与鸟类的 *c-Rnil* 原癌基因同源, 编码相对分子质量为 67 ~ 99 kDa 的丝氨酸/苏氨酸激酶。*RAF* 基因家族的 3 个成员的编码产物均存在于细胞质中, 其中 *RAF-1* 蛋白在人体中广泛分布, *B-RAF* 主要位于神经及睾丸组织中, *A-RAF* 主要位于泌尿生殖器官。

RAF 基因家族成员编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[2], 所有 *RAF* 蛋白激酶有 3 个保守结构域, 从 N 端至 C 端依次是调节域 *CR1*、*CR2* 和激酶域 *CR3*。其中, *CR1* 由两个域组成: *RAS* 结合域 (*RBD*) 和富含半胱氨酸域 (*CRD*), 这两个域都可与 *RAS* 结合; *CR2* 富含丝氨酸/苏氨酸, 为 *RAF* 激酶活性的磷酸化调节区; *CR3* 为激酶域 (*kinase domain*), 含有酪氨酸和丝氨酸残基, 它们的磷酸化修饰同样也改变了 *RAF* 的激酶活性。*BRAF* 的 *CR3* 激酶域分成 N 末端叶和 C 末端叶, *ATP* 结合位点的相交处。N 末端叶有对集中 *ATP* 磷酸化非常重要的甘氨酸残基, C 末端叶有底物识别序列。其中 598 位苏氨酸和 601 位丝氨酸的磷酸化在 *B-RAF* 激活方面起关键作用^[3] (见图 1)。

尽管 *RAF* 3 个亚型之间的序列、结构都高度相似, 但细胞培养实验以及 *RAF* 基因敲除等实验揭示了这 3 个 *RAF* 亚型既有结构重叠、也有独特的功能, 他们的调节均有差异^[3], *RAF* 是多蛋白复合体的一

基金项目: 国家“973”项目 (2001CB510301)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学医学遗传学教研室

通讯作者: 孙开来 (E-mail: klsn@vip.sina.com)

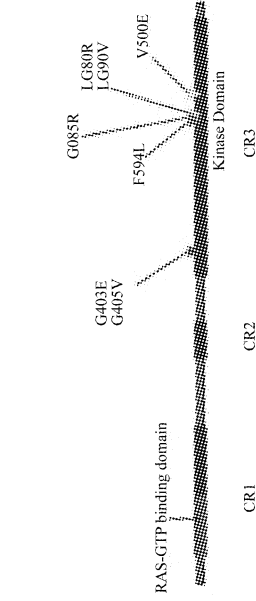


图1 编码3个保守结构域的B-Raf基因结构

Fig. 1 Structure of the B-Raf gene, denoting

the three conserved regions

部分,并且蛋白-蛋白相互作用对于RAF信号来说是至关重要的。而这些亚型特异性的功能是如何在细胞中发生的尚不清楚^[4]。

2 B-RAF在RAS/RAF/MEK/ERK信号通路中的作用

2.1 RAF蛋白是癌基因RAS的效应器:RAS基因编码相对分子质量为21 kDa的RAS蛋白,属于小GTP结合蛋白。RAS蛋白是前体蛋白,必须经一系列翻译后的修饰过程,才能定位于细胞膜的内侧并获得生物学活性。RAS蛋白对二磷酸鸟苷(GDP)和三磷酸鸟苷(GTP)都有较高的亲和力,其本身具有GTP酶活性。RAS-GTP为RAS的活性形式,RAS-GDP为RAS的非活性形式,二者在一定条件下相互转变,从而调节细胞分化、增殖和凋亡的过程^[5]。

当生长因子与靶细胞膜表面的酪氨酸蛋白激酶受体结合时,两个酪氨酸蛋白激酶受体发生二聚化作用,同时它们的酪氨酸残基被磷酸化。此磷酸化位点可以锚定下游的接头蛋白,形成Ghb2-SOS复合体,由此受体所获得的细胞外信息被转导入细胞内。SOS接着活化下游的RAS蛋白,转变为有活性的RAS-GTP形式^[4]。然后RAS-GTP与其下游效应器RAF的氨基端结合使其发生磷酸化并激活RAF,进而激活RAF下游信号转导途径即MAPK有丝分裂原激活蛋白激酶级联^[6](见图2)。

2.2 有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联:MAPK级联是细胞膜到细胞核的信号转导组件,从酵母到脊椎动物高度保守,涉及多个生理过程。细胞外有丝分裂和分化信号引起级联激活是通过RAS GTPase介导的。在此级联,RAF家族成员作为MAPKKK发挥作用。RAF蛋白磷酸化并激活下游底物MEK(MAPKK/ERKK),MEK具有磷酸化苏氨酸/酪氨酸残基的双特异功能,MEK磷酸化并激活下游底物ERK(也叫细胞外信号调节激酶, extracellular signal-regulated

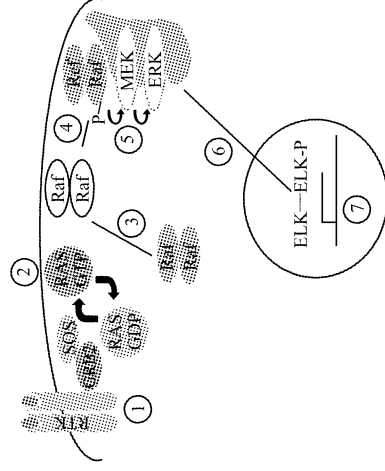


图2 Raf/MEK/ERK MAP 激酶级联的激活

Fig. 2 Activation of Raf/MEK/ERK MAP kinase cascade

kinase, ERK), ERK为富含脯氨酸的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可磷酸化与脯氨酸相邻的丝氨酸/苏氨酸。当细胞外信号分子,如生长因子(GF)和激素等激活RAS,由无活性的RAS-GDP转变为有活性的RAS-GTP形式,进而磷酸化RAF蛋白,使其激活,然后经MAPK信号转导途径经激活ERK,活化的ERK能够磷酸化许多底物,包括转录因子、核糖体蛋白、酶以及细胞骨架蛋白,影响细胞的增殖、分化和生长^[7]。

3 B-RAF与RAS/RAF/MEK/ERK信号途径

正常细胞需要通过跨膜受体将有丝分裂生长信号传递进入细胞周期^[86]。有丝分裂原激活蛋白激酶级联的RAF/MEK/ERK组件是细胞内主要的有丝分裂生长信号的调节器。膜结合受体的级联下游激活的发生是通过RAF蛋白与RAS-GTP的相互作用。B-RAF是RAS下游的效应器。RAS基因突变与肿瘤的发生有关。人类肿瘤约15%有RAS基因突变。其结果会使RAS-GTP酶活性降低,RAS-GTP突变型增加,引起RAS-RAF-MEK-ERK信号转导系统的紊乱,导致肿瘤的发生。

RAF-1蛋白在大多数细胞类型和组织中高表达,A-RAF蛋白主要在生殖系统高表达,而B-RAF则在神经系统高水平表达。但在睾丸和脾脏中也可检测到此蛋白。尽管在许多组织中很少检测到B-RAF蛋白,但却可检测到该基因的mRNA转录产物^[9]。然而,研究显示即使B-RAF蛋白低水平表达,但却有重要的MEK活性。

对鼠胚胎纤维母细胞的研究,很少检测到B-RAF蛋白,而A-RAF和RAF-1却高水平表达,但B-RAF比其他两种RAF蛋白却有相当高水平的生化活性,并且似乎是MEK/ERK在生长因子刺激后最重要的激活剂。现已知B-RAF在黑色素细胞和黑

色素瘤细胞有活性并且是这些细胞中重要的激活剂^[10]。

研究发现^[11],在COS细胞,癌基因RAS可以独自最大限度激活B-RAF,而C-RAF的活化则需要RAS激活和酪氨酸磷酸化两者共同起作用。3种RAF蛋白不仅在上游激活剂的调节上有区别,而且,他们激活下游效应器的能力方面也有所不同。B-RAF和C-RAF活化后,强烈激活MEK和P42/P44MAPK;而A-RAF活化后却仅使MEK和P42/P44MAPK出现弱激活。免疫复合物激酶检测发现,B-RAF磷酸化MEK1和MEK2要比C-RAF高出近10倍,比A-RAF高出近500倍。B-RAF似乎是MEK激活的主要效应器^[4],3种蛋白体内激活MEK的差异至少部分原因是体外磷酸化MEK的能力不同,Papin用酵母双杂交和免疫共沉淀实验的定量分析表明,尽管3种RAF与激活的RAS的相互作用相似,与其他两种RAF相比,B-RAF不仅展示了不同细胞背景中的较高的基础酶活性,而且,与MEK有较强的亲和力^[10]。

迄今为止,545例肿瘤标本包括黑色素瘤、结肠癌、卵巢癌和肺癌均显示RAF-1基因没有突变^[12]。但在肿瘤标本中检测到的却是B-RAF而不是他的同源物RAF-1,因为一般观念认为在介导RAS作用和激活MEK/ERK方面RAF-1比B-RAF更重要^[4]。两个最近的研究结果或许能解释这些:首先,鼠的RAF基因的靶向突变显示RAF-1并非对于MEK/ERK激活是必不可少的;在大多数组织和细胞,B-RAF似乎是MEK/ERK的主要激活剂^[14]。其次,B-RAF激活调节机制研究已经表明B-RAF发生的磷酸化事件易于使他比RAF-1对MEK有较高的活性。携带有V599E突变的B-RAF比野生型B-RAF的激酶活性高12.5倍。这个突变也刺激内源性ERK磷酸化并诱导NIH3T3细胞体外转化^[11]。这些结果提示B-RAF与其他两种RAF蛋白相比,更有可能在RAS/RAF/MEK/ERK信号转导途径中发挥重要作用。

4 B-RAF与肿瘤

肿瘤发生的主要原因之一是重要的癌基因激活。癌基因控制着机体细胞的生长和分化。近年来研究发现许多肿瘤存在B-RAF基因点突变。B-RAF的持续激活可引起MEK/ERK信号转导紊乱,导致细胞过度增殖,出现恶性转化。Ciampi等^[13]发现甲状腺肿瘤的40%为B-RAF基因V599E突变。Davies等^[12]对923例肿瘤标本进行测序筛查,在人

恶性黑色素瘤约70%,结肠直肠癌15%检测到B-RAF基因突变;Trovisco等^[14]在51.4%的甲状腺癌中检测到B-RAF基因突变。所有突变存在于激酶结构域,其中突变的80%为单碱基替代,即在B-RAF基因核苷酸1796位的胸苷酸被腺苷酸替代TT1796A,引起相应氨基酸改变,B-RAF蛋白的599位氨基酸由原来的缬氨酸转变为谷氨酸。突变的B-RAF蛋白激酶活性增加并使NIH3T3细胞发生恶性转化。上述的研究表明B-RAF突变与肿瘤的发生有关。

Rajagopalan等^[15]对330例结肠直肠癌的研究显示:10%(32/330)肿瘤有B-RAF突变,K-RAS突变为51%(169/330)。B-RAF和K-RAS突变没有同时在肿瘤中出现,表现为彼此排斥。Yuen等^[17]筛查了结肠直肠癌的B-RAF突变。结果发现B-RAF突变为结肠直肠癌5.1%(11/215)、散发腺瘤2.8%(3/108)、家族性瘤样息肉肉腺瘤(FAP)1.6%(1/63)、增生息肉33%(1/3)。16个BRAF突变中有8个为V599E,同时发现8个新的非V599E突变:G595R、T598I、D593V、D593G、N80S、G468E、F467C。V599E是结肠直肠癌最常见的突变,占有突变的50%。携带V599E突变的任何肿瘤没有观察到RAS突变,说明携带有V599E突变的肿瘤细胞的生长不依赖RAS功能。而8个新的B-RAF突变,与KRAS突变有关系。Ciampi^[13]的研究进一步证实BRAF突变与KRAS突变没有交叠。学者们的研究结果表明,两种基因突变似乎是在肿瘤发生的相似阶段,即始动后恶性转化前。B-RAF和K-RAS突变在结肠直肠癌的发生中作用可能是等同的,B-RAF基因有可能以依赖RAS和不依赖RAS的两种方式在肿瘤的信号转导途径中发挥重要作用。

Brose等^[17]在非小细胞肺癌鉴别出3%B-RAF突变,其中89%是非-V599E突变,这种现象提示非小细胞肺癌的B-RAF突变从本质上与黑色素瘤不同。肿瘤的发生存在异质性。所有突变均位于激酶激活片段内。已经有实验显示,B-RAF的V599E、L596V、G463A和G468A突变引起COS细胞活性增加^[8]。原因可能是,V599E突变位于活化片段,被认为引入一负电荷,模仿发生在598位苏氨酸和601位丝氨酸的磷酸化事件。由于V599E的突变导致B-RAF激酶活化,进而引起下游信号传导途径的激活。

Calipel^[8]的重组实验发现V599E突变增加了B-RAF激酶活性并诱导NIH3T3细胞转化。携带V599E突变的脉络膜黑色素瘤细胞显示内生性的B-

RAF^{V599E} 激酶活性增加了 10 倍, 并且激活了不依赖 RAS 的 MEK/ERK 途径。siRNA 介导的突变型 B-RAF 蛋白的敲除显著的减少脉絡膜黑色素瘤细胞的增殖。通过不同实验封闭 *B-RAF*^{V599E} 诱导的 ERK 激活有意义的减少了细胞的增殖。Calipel 的实验表明 B-RAFV599E/MEK/ERK 途径是作为脉絡膜黑色素瘤细胞增殖的重要成分。

Sumimoto^[18] 用对 *B-RAF* 野生型和突变型 (V599E) 特异的 siRNA (HIV lentiviral vector) 转染黑色素瘤细胞系。结果发现 RNAi 在体内和体外抑制了大多数黑色素瘤细胞的生长, 伴随 BRAF 蛋白和 ERK 磷酸化的降低; *BRAF* (V599E) 特异的 siRNA 抑制了只有携带这种突变的黑色素瘤细胞系的生长和 MAPK 活性, 并且抑制了黑色素瘤细胞对基质的侵袭, 同时伴随基质金属蛋白酶 (MMP2) 活性的降低以及整合素表达的减少。SCID 鼠皮下接种黑色素瘤细胞系 A375mel 细胞, 接种 24 d 后, 与对照组比较, *BRAF* 特异的 siRNA 转导的 A375mel 细胞显示肿瘤生长显著降低, 这表明黑色素瘤细胞在体内的生长高度依赖 BRAF/ERK MAPK 信号途径。基质金属蛋白酶活性的降低以及整合素表达减少, 说明 *B-RAF* 不仅与黑色素瘤的发生、发展有关, 而且可能与黑色素瘤的侵袭和转移相关。

5 展望

最近的研究显示在大多数人恶性黑色素瘤、甲状腺肿瘤和部分结肠癌, *B-RAF* 的激活突变是 1 796 位单核苷酸变化 T→A, 导致 *B-RAF* 的激活片段内 599 位缬氨酸变成谷氨酸, 这个新发现是第一次报道 *B-RAF* 与人类肿瘤的直接关系。B-RAF 蛋白作为活化的 RAS 蛋白的效应器。无论何种原因诱发 *B-RAF* 激活, 都可以激活其下游信号传导途径, 导致肿瘤细胞增殖。如果选择针对 B-RAF 激酶特异的拮抗剂, 抑制 MEK/ERK 信号传导途径, 既可只针对异肿瘤细胞, 又可减少药物毒性, 并可以避免目前肿瘤化疗药物的副作用。因此有关 *B-RAF* 及其下游信号传导途径的研究, 为临床上真正有效治疗肿瘤提供了新的靶目标。

参 考 文 献

- 1 Storm SM, Brennscheidt U, Sithandam G, Raf oncogenes in carcinogenesis. Crit Rev Oncog, 1990, 2:1-8
- 2 Tuveson DA, Weber BL, Henlyn M, et al. BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. Cancer Cell,

2003, 4: 95-98

- 3 Chong H, Vikis HC, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. Cell Signal, 2003, 15: 463-469
- 4 Emuss V, Garnett M, Mason C, et al. Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. Cancer Res, 2005, 65: 9719-9726.
- 5 Goel VK, Lazar AJ, Wameke CL, et al. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. J Invest Dermatol, 2006; 126: 154-160.
- 6 Naoki K, Chen TH, Richards WC, et al. Missense mutation of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. Cancer Res, 2002, 62: 7001-7003
- 7 Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu ZZ, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res, 2003, 63: 1454-1457
- 8 Calipel A, Lefevre G, Pouppnot C, et al. Mutation of B-Raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and transformation through the MEK/ERK pathway. J Biol Chem, 2003, 278: 42409-42418
- 9 Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, et al. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. Oncogene, 2004, 23: 5968-5977
- 10 Hingrani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, et al. Suppression of BRAFV599E in human melanoma abrogates transformation. Cancer Res, 2003, 63: 5198-5202
- 11 Tran NH, Wu X, Frost JA. B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. J Biol Chem. 2005, 280: 16244-16253.
- 12 Davies H, Bignell GR, Cox G, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature, 2002, 417: 949-953
- 13 Ciampi R, Knauf JA, Rabfies HM. BRAF kinase activation via chromosomal rearrangement in radiation-induced and sporadic thyroid cancer. Cell Cycle, 2005, 4: 547-548.
- 14 Trovisco V, Soares P, Soares R, et al. A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. Hum Pathol. 2005, 36: 694-697.
- 15 Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes abd mismatch-repair atatus, Nature, 2002, 418: 934.
- 16 Yuen ST, Davies H, Chan TL. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. Cancer Res, 2002, 62: 6451-6455
- 17 Brose MS, Volpe P, Feldman M, BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res, 2002, 62: 6997-7000.
- 18 Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. Oncogene, 2004, 23: 6031-6039.

(收稿日期: 2006-03-24)

(本文编辑: 孙岩伟)