

Rho 亚家族在肿瘤侵袭中的作用研究进展

郁玲玲(综述) 顾建英[△](审校)

(复旦大学附属中山医院整形外科 上海 200032)

【摘要】 Rho 家族是 Ras 超家族中小分子量 G 蛋白的成员之一。Rho 亚家族成员 RhoA、RhoB、RhoC 在多种恶性肿瘤中异常表达,参与肿瘤的发生和发展,它们通过调节肌动蛋白微丝骨架的聚合,影响细胞的极性和形态,从而在细胞运动、细胞-细胞间及细胞-基质间黏附和细胞外基质重建方面参与肿瘤细胞的侵袭。深入研究 Rho 亚家族将有助于加深对肿瘤侵袭的了解,为预防肿瘤转移提供特异性、多靶位的治疗方法。

【关键词】 Rho 蛋白; 肿瘤; 侵袭

【中图分类号】 R 730.2 **【文献标志码】** B

Advances in the role of Rho sub-family in tumor invasion

YU Ling-ling, GU Jian-ying[△]

(Department of Plastic Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Rho family is a member of small G protein in Ras superfamily. Rho subfamily members RhoA, RhoB, and RhoC are abnormally expressed in a variety of malignant tumors, and involved in the occurrence and development of tumors. Through regulating the actin cytoskeleton polymerization, cell polarity and morphology, they affect cell movement, cell-cell and cell-matrix adhesion and reconstruction of extracellular matrix, and are involved in the process of the invasion of malignant cells. Further study on Rho subfamily may deepen our understanding on tumor invasion, which provide specific and multi-target therapy to the prevention of tumor metastasis.

【Key words】 Rho protein; tumor; invasion

肿瘤转移是一个多步骤的过程,涉及肿瘤细胞自身运动能力、肿瘤细胞-宿主细胞及细胞-基质间的联系。肿瘤细胞的侵袭性是肿瘤转移的一个重要因素。近年来研究发现,Rho 家族成员在多种肿瘤组织中异常表达,并且与肿瘤的侵袭转移密切相关,提示 Rho 家族成员可能成为新的肿瘤标志物,在判断肿瘤的恶性程度及肿瘤的治疗方面发挥重要作用。

Rho 亚家族的结构和生物学特点 Rho(Ras homologous)蛋白家族是 Ras 超家族中小分子量 G 蛋白成员之一,是一类相对分子质量为 20 000~30 000 的 GTP 结合蛋白。人类中已发现该家族有 26 种蛋白质成员,分别由 23 个基因编码产生,根据其氨基酸顺序的同源性,这些蛋白质分为 6 个亚家族:Rho、Rac、Cdc42、Rnd、RhoBTB 和 RhoT/Miro。Rho 亚家族成员 RhoA、RhoB、RhoC 具有高度同源性,蛋白的氨基序列结构约有 85% 相同,其差异主要位于 C 末端,而 N 末端多数含有与 GTP 结合及水解有关的氨基酸。RhoA、RhoB、RhoC 在众多组织和细胞中均有表达,但不同组织和细胞中其表达水平有明显差异,RhoA 和 RhoC 主要表达于胞质和胞膜,而 RhoB 主要位于次级内体和溶酶体^[1]。

Rho 蛋白在细胞内通过结合 GTP 的激活型和结合 GDP 的失活型两者之间的转换来执行其分子开关功能。这种与 GTP 和 GDP 结合状态间的平衡主要受 3 类上游调控因子的

调节:(1)鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor,GEF),促进 GDP 和活性 GTP 交换;(2)GTP 酶活化蛋白(GTPase activating protein,GAP),提高 Rho 蛋白内在 GTP 酶活性,加速 GTP 水解;(3)GDP 分离抑制因子(GDP dissociation inhibitor,GDI),阻抑 GDP 从 GTP 酶上分离,调节 Rho 蛋白在细胞内的定位。其中,GEF 是 Rho 蛋白的正调控因子,而 GAP 和 GDI 是 Rho 蛋白的负调控因子。

研究发现,RhoA 和 RhoC 在胰腺癌、大肠癌、乳腺癌、胃癌、黑色素瘤及肝癌等多种恶性肿瘤细胞中表达增高,参与肿瘤的侵袭性发展及转移^[2-6]。它们主要通过 Rho 激酶(Rho-associated coil-containing protein kinase,ROCK)和 Dia 信号转导通路调节肌动蛋白微丝骨架的聚合,影响细胞的极性和形态^[7],从而在控制细胞生长、胞质分裂、细胞迁移、细胞-细胞和细胞-胞外基质的黏附、细胞的转化和侵袭方面发挥作用。

Rho 蛋白与肿瘤细胞的侵袭性的关系

RhoA Wang 等^[2]通过实时定量 PCR 检测 RhoA 在结肠癌手术标本中的表达,发现 RhoA 表达明显高于正常组织,且表达水平与淋巴结和肝脏转移、肿瘤组织病理学分级密切相关,提示 RhoA 可能参与结肠癌的发生、发展、侵袭及转移。Pan 等^[8]研究蛋白激酶 C ϵ (protein kinase C ϵ ,PKC ϵ)

[△]Corresponding author E-mail:gu.jianying@zs-hospital.sh.cn

在头颈部鳞癌进展中的作用,通过 RNA 干扰敲除 PKC ϵ 后,肿瘤细胞迁移和侵袭力明显下降,同时发现 RhoA 的表达水平降低;而使 RhoA 过表达可逆转敲除 PKC ϵ 后的迁移和侵袭力缺陷,提示 RhoA 参与头颈部鳞癌的迁移和侵袭力的调节。

RhoB RhoB 是 Rho 家族中一个较为独特的分子,虽然与同家族 RhoA、RhoC 碱基序列同源性很高,但在细胞内定位、调控及功能等方面都存在着较大差异,在许多方面发挥着与 RhoA、RhoC 不同的作用,现在认为它是一个肿瘤的负性调节基因。Bousquet 等^[9]通过 RNA 干扰敲除支气管非肿瘤细胞中的 RhoB 基因,发现 RhoB 表达降低并不改变细胞生长特性,但可促进细胞迁移和侵袭。Couderc 等^[10]在体外用腺病毒转染 RhoB 至内源性 RhoB 低表达的卵巢癌细胞,发现 RhoB 可通过激活内在凋亡级联反应诱导细胞凋亡;他们又将编码 RhoB 的腺病毒载体注射入卵巢癌荷瘤小鼠腹腔内,发现可抑制卵巢癌移植瘤的生长。

RhoC RhoC 是一个亲转移性基因,伴有肝内转移的肝细胞癌病例较无肝内转移的病例有 19 种基因高表达,RhoC 是其中之一^[11]。Boone 等^[5]分别对侵袭性高与侵袭性低的 2 种黑色素瘤细胞系中 RhoC 的表达进行比较,发现前者 RhoC 蛋白和 mRNA 水平明显高于后者。对原发性皮肤黑色素瘤病例的免疫组化研究发现,RhoC 蛋白高表达与患者淋巴结转移、临床潜伏期短、总生存率低密切相关。miRNA 参与调节多种细胞通路,Ma 等^[12]发现 miR-10b 过表达可诱发乳腺癌细胞迁移和侵袭,其通过抑制 mRNA 编码同源异型框 D10 的翻译导致乳腺癌细胞中 RhoC 升高,从而促进肿瘤细胞侵袭。Sun 等^[4]用 RNA 干扰 RhoC 后,胃癌 SGC7901 细胞 RhoC 蛋白和 mRNA 表达下降,细胞凋亡率增高,增殖力和侵袭力下降,将 SGC7901 细胞注射至裸鼠背部的肿瘤模型中,待瘤体长至一定程度时将 RhoC-siRNA 注入瘤体内,可见肿瘤生长被抑制。

随着 Rho 亚家族与肿瘤侵袭性研究的深入,目前普遍认为,RhoC 对 ROCK 具有更高的亲和力,与肿瘤的侵袭相关性更高;而 RhoA 在促进肿瘤细胞生长、增殖方面的作用更大^[13]。Dietrich 等^[14]发现,RhoC 高表达可增强胰腺癌细胞的运动和侵袭性,而 RhoA 表达增强却降低这些能力。体外 GTP/GDP 结合分析表明,相对于 RhoA,RhoC 对 GTP 亲和力更高,GEF 刺激引起 GDP/GTP 转化的效率也更高。

Rho 蛋白参与肿瘤细胞侵袭的机制 肿瘤细胞侵袭过程包括细胞运动、细胞-细胞间及细胞-基质间黏附、细胞外基质重建,Rho 通过调节这 3 个阶段参与肿瘤细胞的侵袭过程。

调节细胞运动 Rho 蛋白在肌动蛋白聚合、肌动球蛋白收缩、微管运动等方面调节细胞运动。RhoA 激活 Dia 直接刺激肌动蛋白聚合,形成肌动蛋白压力纤维。ROCK 诱导肌动蛋白连接蛋白和肌球蛋白调节蛋白磷酸化,使肌动球蛋白收缩。肌动球蛋白收缩在细胞运动中十分重要,抑制 ROCK 活性导致细胞回缩障碍,出现“脱尾”^[1]。微管在维持细胞极性和胞外转运过程中发挥非常重要的作用,ROCK 和 Dia 协调作用有利于调节细胞极性和微管组成。Rho 蛋白的上游调控因子在细胞运动中也发挥重要作用。Nalbant 等^[15]将 GEF-H1 基因敲除后,宫颈癌 HeLa 细胞运动力明显下降,同

时细胞前缘肌动蛋白动力学改变,黏着斑形成增加。通过一个活细胞生物传感器发现 GEF-H1 在细胞前缘调节 RhoA 活性。GEF-H1 从微管释放后激活 RhoA,通过 RhoA/ROCK/MLC 调节细胞收缩。Rho 蛋白对细胞运动的影响根据研究的细胞系种类而异。Salhia 等^[16]发现,ROCK 抑制剂 Y-27632 作用于星状细胞瘤反而促进细胞运动和侵袭,这与激活 Rac1 有关。可见,Rho 内部不同亚家族之间也存在相互作用。

调节细胞-细胞和细胞-基质间的黏附 紧密连接和黏附连接作为细胞-细胞间黏附的重要组成结构与细胞骨架密切相关,形成细胞屏障,维持细胞顶-基底部的极性。Riento 等^[17]报道,Rho/ROCK 在内皮细胞中可介导细胞黏附连接及紧密连接的解离,细胞-细胞间黏附的丧失或减弱使得细胞迁移力提高。Popoff 等^[18]发现,位于紧密连接胞质区的扣带素蛋白对于紧密连接的形成至关重要,它是一种肌动球蛋白相关蛋白,与 GEF-H1 结合后抑制 RhoA 活性,从而发挥紧密连接的功能;而活性 RhoA 可导致紧密连接和黏附连接结构破坏,渗透性增强。

整合素是细胞骨架和细胞外基质分子间结构和功能的桥梁。Rho 蛋白通过促使整合素聚集成簇、调节整合素的活性及内吞作用而促进细胞-胞外基质间黏着斑的形成,有利于建立新的连接。而整合素可通过招募 GEF 促进 Rho 活化,从而促进黏着斑形成和肌动蛋白压力纤维聚合,形成正反馈效应^[19]。敲除整合素 $\alpha 8 \beta 1$,可经过 RhoA/ROCK 通路破坏黏着斑-整合素复合体的形成,细胞黏附力下降,运动力增强^[20]。

参与细胞外基质重建 透明质酸(hyaluronic acid, HA)是细胞外基质的重要组成部分,在多种恶性肿瘤中表达明显增高。 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换蛋白 1($\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger 1, NHE1)是一种非常重要的调节胞内外 pH 稳定的蛋白,同时它也是 Rho/ROCK 通路的下游靶蛋白,HA 与配体 CD44 结合后激活 Rho/ROCK 通路,使 NHE1 磷酸化, $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换增加,导致肿瘤细胞微环境酸化,基质降解增强,肿瘤侵袭性增加^[21]。

肿瘤细胞还可分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)降解基底膜和基质,细胞沿基底膜缺损和基质空隙向周围生长。Xue 等^[22]将 RhoC-siRNA 转染至肝细胞癌细胞系,发现 MMP-2 和 MMP-9 表达降低,细胞穿过 Matrigel 胶的能力下降。可见,RhoC 可通过 MMP 介导肿瘤细胞侵袭和转移。

Rho 的 3 种作用机制还集中体现在调节肿瘤细胞的 2 种细胞运动形式。一种细胞运动形式是上皮-间质转化,是指从具有极性的上皮细胞转变成具有活动能力的间充质细胞的一个过程,细胞运动依赖于细胞外基质的降解后形成的通道,运动相对缓慢。Rho 一方面通过活化 ROCK 使细胞间连接破裂,上皮极性丧失,使细胞获得运动力;另一方面通过参与细胞外基质重建间接促进肿瘤细胞侵袭。另一种细胞运动方式是变形虫样运动,其不依赖于细胞外基质的降解。Wyckoff 等^[23]在转移性乳腺癌 MTLn3E 细胞中以基质水解酶抑制剂阻断 MMP,排除细胞产生水解酶对基质的影响因素后,发现细胞可以产生足够的机械力使自身形态改变,使基质胶原纤维变形,从而穿越基质。这种力量与细胞的侵袭性和肌球蛋白轻链结构正确组建有关,而后者依赖于 Rho/ROCK 信号通

路激活后的肌球蛋白轻链磷酸化,使得肌动蛋白相互作用并在侵袭细胞边缘组织成一个密集收缩的肌动蛋白网。

问题与展望 在肿瘤细胞发生转移过程中,细胞侵袭迁移是其关键环节,从多方面、多途径控制肿瘤细胞转移前的侵袭性成为多年来的研究热点。大量研究表明,Rho 亚家族成员参与了肿瘤的发生和发展,Rho 亚家族成员的异常表达与肿瘤的侵袭和转移密切相关,它们将有可能成为判断肿瘤侵袭性发展的新指征和临床上判断肿瘤患者预后的新指标,并为肿瘤治疗带来新希望。目前抑制 Rho 亚家族成员活性有 3 种方法:(1)Rho 抑制剂 C3 转移酶;其对 Rho 亚家族成员的抑制无特异性,且细胞通透性较差,因而其应用在一定程度上有所限制;(2)ROCK 抑制剂 Y-27632;在多数研究中应用,但因 ROCK 是 RhoA 和 RhoC 共同的下游分子,因此可同时抑制 RhoA 和 RhoC,这不利于两者的独立性作用研究;(3)RNA 干扰技术,在近年来的研究中运用较多,可特异性抑制目的基因的表达,具有良好的运用前景。现阶段对于 Rho 蛋白发挥作用的信号通路及相关通路间的串话(crosstalk)研究较少,有必要对此进行深入的研究,这将有助于加深我们对肿瘤侵袭的了解,为预防肿瘤转移及临床治疗提供特异性、多靶位的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 301(1):43-49.
- [2] Wang HB, Liu XP, Liang J, et al. Expression of RhoA and RhoC in colorectal carcinoma and its relations with clinicopathological parameters[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(7):811-817.
- [3] Pillé JY, Denoyelle C, Varet J, et al. Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mol Ther*, 2005, 11(2):267-274.
- [4] Sun HW, Tong SL, He J, et al. RhoA and RhoC-siRNA inhibit the proliferation and invasiveness activity of human gastric carcinoma by Rho/PI3K/Akt pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(25):3517-3522.
- [5] Boone B, Van Gele M, Lambert J, et al. The role of RhoC in growth and metastatic capacity of melanoma[J]. *J Cutan Pathol*, 2009, 36(6):629-636.
- [6] Wang W, Wu F, Fang F, et al. Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC *in vitro* and *in vivo*[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21):6804-6812.
- [7] Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase[J]. *Science*, 1999, 285(5429):895-898.
- [8] Pan Q, Bao LW, Teknos TN, et al. Targeted disruption of protein kinase C ϵ reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19):9379-9384.
- [9] Bousquet E, Mazières J, Privat M, et al. Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(15):6092-6099.
- [10] Couderc B, Pradines A, Rafii A, et al. *In vivo* restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression[J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(7):456-464.
- [11] Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, et al. Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group I(Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis[J]. *Keio J Med*, 2004, 53(2):90-97.
- [12] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. *Nature*, 2007, 449:682-688.
- [13] Faried A, Faried LS, Kimura H, et al. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(10):1455-1465.
- [14] Dietrich KA, Schwarz R, Liska M, et al. Specific induction of migration and invasion of pancreatic carcinoma cells by RhoC which differs from RhoA in its localisation and activity[J]. *Biol Chem*, 2009, 390(10):1063-1077.
- [15] Nalbant P, Chang YC, Birkenfeld J, et al. GEF-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge[J]. *Mol Biol Cell*, 2009 Jul 22. [Epub ahead of print]
- [16] Salhia B, Rutten F, Nakada M, et al. Inhibition of Rho-Kinase Affects Astrocytoma Morphology, Motility, and Invasion through Activation of Rac1[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19):8792-8800.
- [17] Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6):446-456.
- [18] Popoff MR, Geny B. Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(4):797-812.
- [19] Hall A. The cytoskeleton and cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(1-2):5-14.
- [20] Benoit YD, Lussier C, Ducharme PA, et al. Integrin α 8- β 1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK dependent mechanism[J]. *Biol Cell*, 2009, 101(12):695-708.
- [21] Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression[J]. *Semin Cancer Biol*, 2008, 18(4):251-259.
- [22] Xue F, Takahara T, Yata Y, et al. Blockade of Rho/Rho-associated coiled coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner[J]. *Hepatol Res*, 2008, 38(8):810-817.
- [23] Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, et al. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion *in vivo*[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(15):1515-1523.

(收稿日期:2009-09-21;编辑:段佳)