

RASSF1A 基因在乳腺癌发生、发展中的作用

王玉才 综述 于正洪 审校

(南京军区南京总医院 肿瘤内科 江苏 南京 210002)

摘要: RASSF1A 基因是新近发现的新型候选抑癌基因,其正常表达能够抑制肿瘤的发生。启动子区域 CpG 岛异常甲基化可以导致其失活,并在乳腺癌的发生、发展起着重要作用。RASSF1A 的甲基化状态检测具有重要的临床意义,有望为乳腺癌的早期诊断、疗效监测、预后判断提供新的参考指标,而逆转 RASSF1A 的甲基化则可能为乳腺癌治疗提供新的方向。

关键词: RASSF1A, 抑癌基因; 乳腺癌; 甲基化

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A

RASSF1A Gene Plays an Important Role in the Genesis and Development of Breast Cancer

WANG Yu-cai, YU Zheng-hong

(Department of Oncology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

ABSTRACT: RASSF1A gene was a novel candidate tumor suppressor gene discovered recently and its normal expression could inhibit carcinogenesis. The aberrant methylation of CpG islands could lead to the inactivation of RASSF1A, which played an important role in the genesis and development of breast cancer. RASSF1A methylation status examination was clinically significant, and could serve as a new technique for early diagnosis, curative effect monitoring and prognosis of breast cancer, while reversing the methylation of RASSF1A would be a promising idea for breast cancer therapy.

Key words: RASSF1A; Tumor suppressor gene; Breast cancer; Methylation

0 引言

Ras 相关区域家族 1A(Ras association domain family 1 A, RASSF1A) 是 2000 年发现的一种新型候选抑癌基因(tumor suppressor gene, TSG)。近年来的大量研究表明, RASSF1A 的失活在肺癌、乳腺癌、胃肠道肿瘤等多种实体瘤的发生、发展中起着重要作用。本文就 RASSF1A 基因在乳腺癌中的最新研究进展综述如下。

1 RASSF1 基因的发现及其结构

3 号染色体短臂(short arm of chromosome 3, 3p)的缺失是肺癌发生中最常见的早期分子遗传学改变, 其中比较明确的缺失区域包括 3p12、3p14、3p21 和 3p24-25^[1]。已有不少研究^[2-4]发现在肺癌细胞株和肿瘤组织中 3p21.3 区域的纯和性丢失(homozygous deletion)。由于 3p21.3 区域等位基因缺失(allelic loss)的现象并非仅仅局限于肺癌,提示这一区域可能含有抑癌基因,对多种肿瘤的发生都能起到抑制作用。1998 年 Sekido 等^[5]通过对肺癌及乳腺癌细胞株的研究,首次确定 3p21.3 上最重要的缺失区域局限于一段长 120kb 的最小缺失

区域(minimal deletion region)。2000 年 Dammann 等^[6]使用酵母双杂交筛选(two-hybrid screen)的方法克隆出了一个新的基因,其互补 DNA(complement DNA, cDNA)与上述最小缺失区域的序列相吻合。由于其转录本编码的蛋白多肽 C 端与小鼠 Ras 效应蛋白 Nore1 有高度同源性,因此将其命名为 Ras 相关区域家族 1(Ras Association Domain Family 1, RASSF1)。同年 Lerman 等^[7]对 3p21.3 区域上一段长 630kb 的肺癌纯和性丢失片段进行了较为系统的研究,并在上述最小缺失区域内分离出了 8 个候选抑癌基因,其中也包括 RASSF1。

RASSF1 全长 7.6kb, 内含 8 个外显子(1 α 、1 β 、2 α 、2 γ 、3-6),因所使用的启动子及剪接方式的不同,目前已发现 7 种不同的转录本(RASSF1A~G),其中 RASSF1A、C、F 是三种主要的形式[5-8]。RASSF1A 的 cDNA 全长 1 873bp, 含有 6 个外显子, 即 1 α 、2 α 、3-6, 其开放阅读框架(open reading frame, ORF)编码 340 个氨基酸残基, 产物分子量为 38 800D。该产物的 C 端为 Ras 相关区域(Ras association domain, RA),由外显子 3-6 所编码。N 端与富含半胱氨酸的甘油二酯/佛波酯结合区高度同源,也被称作蛋白激酶 C 保守区 1(protein kinase C conserved region 1, C1)^[9]。现有的 7 种不同转录本的基本信息如表 1 所示。

2 RASSF1A 失活在乳腺癌发生中的作用

Dammann 等^[10]应用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)分析了 MCF7、MDAMB157、MDAMB231、T47D 和 ZR75-1 等 5 种

作者简介:王玉才(1981-),男,江苏泰州人,医师,硕士研究生,从事肿瘤学专业。

通讯作者:于正洪(1968-),女,江苏盐城人,副主任医师,医学硕士,从事肿瘤学专业。

手机:13327800182. E-mail:fish@e165.com

(收稿日期:2006-08-23 接受日期:2006-09-21)

乳腺癌细胞株中 **RASSF1A** 基因的表达情况,结果发现所有这 5 种细胞株中 **RASSF1A** 都几乎不表达。而在对乳腺癌组织的分析中,肿瘤组织中 **RASSF1A** 的表达水平也较正常乳腺组织低 3-10 倍。这一结果提示,**RASSF1A** 基因的正常表达能够抑制乳腺癌的发生。

他们同时分析了 **RASSF1A** 在乳腺癌细胞株中的失活机制。通过甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation specific PCR, MSP) 分析,发现 5 种细胞株中 **RASSF1A** 基因均发生了启动子区域 CpG 岛的异常甲基化,而突变分析则未发现 **RASSF1A** 基因的突变。应用适当浓度的甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)处

理上述细胞株,4 天后可以观察到 **RASSF1A** 的重新表达,提示异常甲基化是乳腺癌中 **RASSF1A** 失活的重要机制。

Burbee 等^[9]的研究也取得了类似的结果和结论。他们发现 **RASSF1A** 在正常乳腺上皮细胞中 100%表达,而在 60%(15/25)的 HTB 和 HCC 系列乳腺癌细胞株中则表达缺失。进一步的 **RASSF1A** 甲基化分析发现乳腺癌组织和细胞株中分别存在 49%(19/39)和 64%(14/22)的异常甲基化,并且 **RASSF1A** 的异常甲基化与其表达缺失之间存在显著相关性。可见,异常甲基化导致的 **RASSF1A** 基因失活在乳腺癌的发生中起着重要作用。

表 1 **RASSF1** 基因七种转录本的基本信息
Table1 Basic information of the seven transcripts of **RASSF1** gene

转录本	外显子	ORF 编码的 氨基酸残基数目	产物相关区域有无	
			RA	C1
RASSF1A	1α,2αβ,3-6	340	有	有
RASSF1B	1β,2αβ,3-6	189	有	无
RASSF1C	2γ,3-6	270	有	无
RASSF1D*	1α,2αβ,3-6	344	有	有
RASSF1E**	1α,2αβ,3-6	344	有	有
RASSF1F	1α,3-6	92	无	有
RASSF1G	1α,4-6	152	无	有

* 心肌特异 ** 胰腺特异;
*cardiac muscle specificity, **pancreas specificity.

3 乳腺癌中 **RASSF1A** 异常甲基化检测的临床意义

3.1 **RASSF1A** 异常甲基化检测在乳腺癌诊断中的价值

乳腺癌组织中较高频率的 **RASSF1A** 异常甲基化为乳腺癌的临床诊断提供了新的思路。手术标本中 **RASSF1A** 异常甲基化的分析固然可能成为乳腺癌诊断的辅助手段,但是血清及乳头分泌物中 **RASSF1A** 异常甲基化的检测对于乳腺癌的诊断显然具有更重要的意义。

Dulaimi 等^[10]对照研究了 34 例乳腺癌患者手术标本及术前血清 DNA 中 **RASSF1A** 异常甲基化的情况,结果发现 22 例(65%)手术标本中存在 **RASSF1A** 异常甲基化,其中 19 例(56%)同时存在血清 DNA 的 **RASSF1A** 异常甲基化,而手术标本中 **RASSF1A** 未甲基化的病例其血清 DNA 也都未发生 **RASSF1A** 异常甲基化,两者之间存在显著相关性。而在乳腺良性病变及健康正常对照中均未检测到 **RASSF1A** 异常甲基化。由于血清 DNA 中存在着较高频率的 **RASSF1A** 异常甲基化,并且与肿瘤组织的异常甲基化相关性显著,可以通过检测血清 DNA 中 **RASSF1A** 的异常甲基化来协助乳腺癌的临床诊断。

除了游离 DNA 之外,外周血循环 DNA 还存在于血细胞表面,通过 PBS 洗涤可以获得这一部分循环 DNA 用于基因甲基化检测。Rykova^[11]和 Skvortsova^[12]等正是采用这一方法,研究了乳腺癌患者循环 DNA 中基因的异常甲基化,结果发现细胞表面结合的 DNA 比游离 DNA 在甲基化检测方面具有

更高的阳性率,其中后者的研究中 **RASSF1A** 甲基化的检出率可以由 15%提高到 65%。

乳头分泌物的检查是非侵袭性的,由于其中含有乳腺上皮细胞,故也有可能应用于基因甲基化的检测。基于这一考虑,Krassenstein 等^[13]尝试了在 22 例乳腺分泌物标本中检测一组抑癌基因的异常甲基化,结果发现导管癌患者的乳腺分泌物中可以检测到 **RASSF1A** 等基因的甲基化,这为临床乳腺癌 **RASSF1A** 甲基化的检测提供了新的思路,但仍需更大样本的研究证实。

Pu 等^[14]联合检测了乳腺癌细针穿刺活检标本中 **RARβ2**、**RASSF1A** 和 **cyclin D2** 等 3 个基因的异常甲基化,并与相应肿瘤组织进行了对照研究。结果表明,3 种基因甲基化的联合检测阳性率高达 96%,显著高于任一基因的单独检测,并且穿刺标本的检测与手术标本结果高度一致。这一研究一方面提示细针穿刺活检用于基因甲基化检测的可行性,另一方面也提示,多种基因甲基化的联合检测可以提高阳性率,有助于乳腺癌的临床诊断。

Honorio^[15]等发现,在乳腺导管原位癌中也存在着一定程度的 **RASSF1A** 异常甲基化,但是在正常组织中则不存在,提示 **RASSF1A** 异常甲基化是乳腺癌发生中的一个早期事件。Lewis^[17]等则发现,在乳腺良性肿瘤中也可以检测到一定比例的 **RASSF1A** 甲基化,但是乳腺癌高风险患者(根据 Gail 模型界定)的阳性率显著高于中低风险患者。这些研究均提示,

RASSF1A 的甲基化检测有助于乳腺癌的早期诊断。

3.2 RASSF1A 异常甲基化与乳腺癌临床特点之间的关系

许多学者在分析乳腺癌 RASSF1A 异常甲基化状态的同时研究了 RASSF1A 甲基化频率与临床特点之间的关系,但是结果报道并不尽相同,可能与样本含量差异有一定关系。

Chen 等^[10]发现 RASSF1A 甲基化频率在不同年龄、组织分型、临床分期的患者之间均无显著差异,并且与雌激素受体(estrogen receptor, ER)和孕激素受体(progesterone receptor, ER)的表达也无明显相关性。Fackler 等^[11]比较了浸润性小叶癌、浸润性导管癌及相应原位癌的 RASSF1A 甲基化阳性率,发现并无统计学差异。Mehrotra 等^[12]比较了不同年龄、不同种族以及 ER/PR 表达差异组之间 RASSF1A 的甲基化频率,结果较为复杂。在 ER+/PR+组和 ER-/PR-、50 岁以上组,黑人和白人患者 RASSF1A 甲基化阳性率无显著差异,但在 ER-/PR-、50 岁以下组,黑人患者的 RASSF1A 甲基化阳性率显著高于白人患者;而在 50 岁以上组及 50 岁以下白人组,ER+/PR+者均比 ER-/PR-者 RASSF1A 甲基化阳性率高,但 50 岁以下黑人组中两者则无显著差别。Mehrotra 等^[12]在其另一研究中发现,在乳腺癌的远处转移组织中,RASSF1A 甲基化阳性率比原发肿瘤组织高,其中肺转移组织的阳性率高达 100%,与原发组织间存在显著差异。

3.3 RASSF1A 异常甲基化检测及甲基化抑制剂在乳腺癌治疗方面的价值

Fiegl^[13]等通过监测术前及术后辅助化疗过程中血清 RASSF1A 甲基化状态,并通过与临床康复状况的比较,指出 RASSF1A 甲基化检测可以为临床辅助化疗提供疗效判断依据。在他莫昔芬(tamoxifen)治疗过程中,如果血清 DNA 的 RASSF1A 甲基化状态被逆转,提示治疗有效;而如果甲基化状态持续或者新发,则提示耐药。

RASSF1A 基因启动子 CpG 岛过度甲基化后其核苷酸序列并没有发生变化,逆转其甲基化状态就有可能使基因恢复表达,这也为乳腺癌的治疗提供了新的思路。5-Aza-CdR 是一种特异性 DNA 甲基转移酶抑制剂,主要通过 DNA 甲基转移酶共价结合使其失活,能部分去除肿瘤细胞的甲基化,重新激活甲基化的基因。前文已经叙述到 Dammann 等^[14]使用甲基化抑制剂 5-Aza-CdR 处理 RASSF1A 表达缺失的乳腺癌细胞株后可以观察到 RASSF1A 的重新表达,提示甲基化抑制剂可望成为乳腺癌治疗的新选择。

Suzuki^[15]等利用 RNA 干扰技术下调 DNA 甲基化酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)的表达之后,发现乳腺癌细胞株 HCC1954 中 RASSF1A 启动子甲基化程度降低了 80%以上,并且可以观察到 RASSF1A 的重新表达。这一研究也证实,抑制或逆转基因的异常甲基化,有望成为乳腺癌药物治疗的新方向。

3.4 RASSF1A 异常甲基化作为乳腺癌预后判断的价值

Muller 等^[16, 20]研究了基因异常甲基化与乳腺癌患者预后

之间的关系,指出 RASSF1A 基因的甲基化可以作为乳腺癌的一个独立的预后判断因素。他们对多个样本的分析均表明,血清 RASSF1A 异常甲基化阳性的患者预后较差;与其他基因的联合分析则表明,RASSF1A 和/或 APC 异常甲基化的患者预后最差。上述研究提示,血清 RASSF1A 甲基化的检测可以为乳腺癌的预后判断提供依据。

4 RASSF1A 可能的抑癌机制

RASSF1A 作为候选抑癌基因的具体作用机制尚未完全明确,目前的观点主要包括对细胞增殖的抑制和对凋亡的促进两个方面。

Shivakumar 等^[20]发现,RASSF1A 的正常表达可以将细胞周期被阻断在 G1/S 期。该阻断作用是通过 Rb 基因家族的细胞周期检测点(cell cycle checkpoint)机制实现的,而内源性 Cyclin D1 的累积可以使细胞避开该检测点的作用而促进细胞增殖。RASSF1A 则可以在翻译控制水平抑制 Cyclin D1 的累积而阻断细胞周期,抑制细胞增殖。Liu 等^[21]的研究表明,RASSF1A 是一种微管结合蛋白,能够调节有丝分裂的过程。在有丝分裂间期它可以与微管结合,对其解聚具有很强的保护作用,而在分裂期可修饰纺锤体和中心粒。Rong 等^[22]也指出,RASSF1A 能调节微管的稳定性,并可以诱导细胞周期于 G2/M 期中止。

Dammann 等^[14]指出,Ras 相关区域的存在以及其与 Nore1 的高度同源性提示,RASSF1A 可能在 Ras 传导通路或相关通路中起着重要作用,可能与细胞生长的负调节有关。Ortiz 等^[23]研究发现,RASSF1A 能与 Ras 效应蛋白 Nore1 以其非同源区域结合形成异源二聚体,再通过 Nore1 与 Ras 或 Ras 相似的 GTP 酶(Ras-like GTPase)相互作用,介导相关效应而发挥抑癌作用。Khokhlatchev 等^[19]发现,Nore1 和 RASSF1A 能与凋亡前蛋白激酶 MST1 相互作用,介导 Ras 调节的凋亡通路。具体的作用机制^[19]可能是 Nore1 和 RASSF1A 能抑制磷酸化,从而抑制 MST1 的自我活化。

5 结语

RASSF1A 基因的正常表达能够抑制肿瘤的发生。启动子 CpG 岛异常甲基化是其失活的主要机制,在乳腺癌的发生、发展中起着重要作用。RASSF1A 异常甲基化的检测具有重要的临床意义,有望成为乳腺癌诊断、治疗、预后判断的重要辅助手段。逆转 RASSF1A 的甲基化状态可能成为乳腺癌治疗的新方向。总之,RASSF1A 基因有着较为光明的临床应用前景,但是其具体作用机制尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes [J]. Adv Cancer Res, 1997,71(1):27-92
- [2] Yamakawa K, Takahashi T, Horio Y, et al. Frequent homozygous deletions in lung cancer cell lines detected by a DNA marker located at

- 3p21.3-p22 [J]. *Oncogene*, 1993,8(2):327-330
- [3] Todd S, Franklin WA, Varella-Garcia M, et al. Homozygous deletions of human chromosome 3p in lung tumors. *Cancer Res*, 1997,57(7): 1344-1352
- [4] Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba II, et al. Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene [J]. *Oncogene*, 1998 Jun 18,16(24): 3151-3157
- [5] Dammann R, Li C, Yoon JH, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3 [J]. *Nat Genet*, 2000 Jul,25(3):315-319
- [6] Lerman M. I, Minna J. D. The 630kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumour suppressor genes [J]. *Cancer Res*, 2000,60(21):6116-6133
- [7] Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, et al. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis [J]. *Histol Histopathol*, 2003,18(2):665-677
- [8] Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, et al. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update [J]. *Histol Histopathol*, 2005,20(2):645-663
- [9] Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7):3105-3109
- [10] Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression [J]. *J Natl Cancer Inst*. 2001 May 2, 93(9):691-699
- [11] Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, et al. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10(18 Pt 1):6189-6193
- [12] Rykova EY, Laktionov PP, Skvortsova TE, et al. Extracellular DNA in breast cancer: Cell-surface-bound, tumor-derived extracellular DNA in blood of patients with breast cancer and nonmalignant tumors [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004,1022:217-220
- [13] Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, et al. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation [J]. *Br J Cancer*, 2006,94(10):1492-1495
- [14] Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation [J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10(1 Pt 1):28-32
- [15] Pu RT, Laitala LE, Alli PM, et al. Methylation profiling of benign and malignant breast lesions and its application to cytopathology [J]. *Mod Pathol*, 2003,16(11):1095-1101
- [16] Honorio S, Agathangelou A, Schuermann M, et al. Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients [J]. *Oncogene*, 2003,22(1):147-150
- [17] Lewis CM, Cler LR, Bu DW, et al. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk [J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(1):166-172
- [18] Chen CM, Chen HL, Hsiao TH, et al. Methylation target array for rapid analysis of CpG island hypermethylation in multiple tissue genomes [J]. *Am J Pathol*, 2003,163(1):37-45
- [19] Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2003,107(6): 970-975
- [20] Mehrotra J, Ganpat MM, Kanaan Y, et al. Estrogen receptor/progesterone receptor-negative breast cancers of young African-American women have a higher frequency of methylation of multiple genes than those of Caucasian women [J]. *Clin Cancer Res*, 2004 Mar 15,10(6): 2052-2057
- [21] Mehrotra J, Vali M, McVeigh M, et al. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung [J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10(9):3104-3109
- [22] Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2005,65(4):1141-1145
- [23] Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, et al. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res*, 2004,64(9):3137-3143
- [24] Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker [J]. *Cancer Res*, 2003,63(22):7641-7645
- [25] Muller HM, Fiegl H, Widschwendter A, et al. Prognostic DNA methylation marker in serum of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*, 2004,1022:44-49
- [26] Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation [J]. *Mol Cell Biol*, 2002 Jun,22(12):4309-4318
- [27] Liu L, Tommasi S, Lee DH, et al. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor [J]. *Oncogene*, 2003 Nov 6,22(50): 8125-8136
- [28] Rong R, Jin W, Zhang J, et al. Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G(2)/M arrest. *Oncogene*, 2004,23(50):8216-8230
- [29] Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, et al. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1 [J]. *Oncogene*, 2002,21(9): 1381-1390
- [30] Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, et al. Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(4): 253-65
- [31] Praskova M, Khokhlatchev A, Ortiz-Vega S, et al. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras [J]. *Biochem J*, 2004,381(Pt 2):453-62