

ras基因与人类肿瘤

北京市肿瘤研究所 甄珠、郭征、邓国仁、安捷、李廷钧

自1982年从人膀胱癌细胞系分离克隆出第一个人癌基因EJ—Ha—ras后,迄今已发现了几十种人癌基因。在这些研究中,ras基因家族几乎占用转染技术发现的人类转化基因的90%。本文拟就ras基因的特性及功能等做一简要介绍。

一、ras基因家族

ras基因首先发现于Harvey和Kirsten大鼠肉瘤(ratsarcoma)中。在诱变此两瘤的逆转病毒中,找到了能引起细胞癌变的核苷酸序列,分别称为V-Ha-ras和V-Ki-ras。在哺乳动物基因组内已发现除Ha-ras₁和Ki-ras₂外尚有N-ras。这三种有功能的ras基因已从至少二种哺乳动物中分离克隆出,并进行了测序和染色体定位(见表1)。

表1 ras基因染色体定位

染色体定位 种属	Ha— ras ₁	Ha— ras ₂	Ki— ras ₁	Ki— ras ₂	N— ras
人	11P15— P16.5	×	6P12— P23	12P— Pt r	P22— P8.2
小鼠				6	3
大鼠	1	×		4	

哺乳类ras外显子序列相同,证明它们可能起源于同一祖先基因。但其内含子变化极大,如Ha-ras₁为4.5kb; Ki-ras₂为50kb。三种有活性的ras基因均编码分子量为21,000道尔顿,188-189个氨基酸的蛋白质(P21)。

P21蛋白有四个区域:(1)高度保守区:为氨基末端的35个氨基酸;(2)紧接(1)区后的30个氨基酸;(3)高度可变区:除(4)区外的其它区域;(4)羧基末端的最后4个氨基酸(ras家族均相同)。

ras基因在进化上高度保守,鸡、果蝇、软体动物、细菌、植物甚至酵母中都有ras。而且氨基酸顺序与哺乳类P21也高度同源。

二、ras基因的特性及其功能

ras基因产物P21存在于细胞膜内面,可与鸟嘌呤核苷酸结合,并具有GTP酸活性,其生化特性和跨膜信号系统中与信号传导调节相关的G蛋白十

分相似。实际上P21蛋白的某些区域与G蛋白的α亚单位有着重要的同源顺序。此外,与其它一些核苷酸结合蛋白也有部分同源。

细菌延长因子(EF—Tu)第12位密码子周围的氨基酸残基形成鸟嘌呤结合位点的一部分,因ras蛋白与G蛋白和EF—Tu的同源区在氨基酸的5—22和109—120区内,故ras蛋白第12位氨基酸残基也应位于这一磷酸结合位点。当Gly¹²(甘)被任一其它氨基酸取代都会导致P₂₁氨基末端α螺旋结构的破坏,使其不能与GTP分子的酰基相互作用,从而减低了ras蛋白的GTP酸活性。

ras蛋白的生化及生物学特性通过信号传导系实现,正常情况下细胞ras蛋白的大多数与GTP结合,以非激活态存在。当被通路上方某一蛋白质激活后,可使GDP转变为GTP,同时与效应分子发生作用,其后立即失活又回到非激活态。而ras基因的突变可扰乱这种正常的平衡,引起细胞的转化表型。同理,正常ras基因的过度表达也能引起细胞转化。

酵母细胞的ras蛋白参与腺苷酸环化酸信号的传导,通过调节C—AMP影响细胞增殖。哺乳动物ras基因也对细胞功能起一定作用。用显微注射法将P₂₁单抗先于血清注入培养细胞浆内,可导致细胞摄取³H-腺嘌呤明显减少,意味着阻断了血清生长因子刺激G₀期细胞进入S期,提示ras蛋白可能参与促有丝分裂信号的传递。

三、ras基因的激活机制

点突变是ras基因的主要激活形式。突变大多发生在第12位和第61位密码子即第一和第二外显子上。突变可导致蛋白结构异常而扰乱质膜信号传导,最终使细胞恶变。

此外还有基因扩增或基因调节紊乱的ras激活形式。小鼠肾上腺皮质瘤细胞系、人胚胎组织和结肠癌中均检出了ras基因的明显扩增。

正常的ras原癌基因表达升高可引起细胞的某些恶性表型。ras原癌基因连接病毒的转录启动子LTR后,能转化NIH3T3细胞。该原癌基因的多拷贝导入受体细胞,也可转化细胞。

四、ras癌基因的体外转化特性

ras癌基因以显性方式转化受体细胞。细胞内源性ras原癌基因或与ras癌基因的正常等位基因的共转染均不影响其转化能力。但ras癌基因的表达水平似乎与其转化效能有关,且该癌基因的存在对受体细胞恶变的产生和恶性表型的维持都是必要的(37)。

ras癌基因可转化啮齿类细胞系。但欲转化初代大鼠胚胎细胞(REF)则需与C-myc或腺病毒EIA,多瘤病毒大T、N-myc和P53等癌基因协同作用。推测这些基因的导入可使细胞获得无限生长能力。ras癌基因在转化细胞中的主要作用是使细胞失去接触抑制、降低对血清生长因子的需求、失去锚地依赖性而使细胞形态改变等。

单独ras基因经过同病毒的转录增强系或与LTR连接后,再与G418抗性基因neo共转染,也可得到REF转化集落。其原因一是重组后的ras癌基因表达大大增强;二是G418可杀死转化细胞周围的其它细胞,去除了正常成纤维细胞对转化细胞的抑制作用。综合众多的实验资料证明,ras转化细胞的必要条件是保证细胞“不死”或至少使细胞处于不断增殖状态。

对正常人的成纤维细胞还未获得稳定转化。1985年有人用克隆化的Harvey-Msv的V-ras转化了人支气管上皮细胞,获得了具有全部恶性特征的转化细胞。但效率极低,且要长期培养才能获得。

五、动物肿瘤模型与ras基因

体外转化系统能极好地显示ras癌基因的转化特性。但整体中肿瘤的发生机制很复杂,建立致癌剂诱发动物肿瘤模型,对了解肿瘤发生机制十分有利。为研究环境有害理化因素如何启动细胞恶变,且与细胞中的癌基因有何联系,Barbacid等人用致癌剂诱发了动物肿瘤并发现了其中ras基因发生点突变而被激活。

相当一部分化学致癌剂可与DNA碱基形成加合物,导致发生密码错编性点突变。在NMU诱发的大鼠乳癌中,每一个Ha-ras癌基因均由于发生了第12位密码子G35→A的转换而被激活。此外其它致癌剂可引起第61位密码子C180→A的转换。可见ras基因是许多化学致癌剂的靶位点,其突变易发点即为致癌剂的直接作用位点。

六、ras基因与多步骤癌变

癌的发生是多阶段、多因素的发病过程。实验肿瘤的产生至少经历启动和促进两个阶段。ras癌基因的体外转化及动物肿瘤模型实验都提供了一定论证。

正常二倍体细胞的体外转化至少需二种功能上互补的癌基因共同作用。这在分子水平上解释了癌变的多因素、多阶段学说。

促癌剂TPA等局部处理后,致癌剂DMBA可使大鼠和小鼠产生皮肤乳头状瘤,两者都有ras的基活,但极少发展成恶性。经TPA处理后,Harvey—MSV才能使小鼠表皮细胞发生恶性转化。说明ras基因在肿瘤发生早期阶段即被激活,尚需许多其它因素或继发损害的参与和辅助才引起癌变。

在转化基因小鼠的研究中,将Ha-ras连接了小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)的LTR后导入小鼠胚胎细胞,小鼠生后要经较长的潜伏期才产生乳腺肿瘤,即经历一个接触环境致突变因素导致新的遗传损害的过程。但将有MMTV-ras的小鼠和带有MMTV-myc的小鼠交配,子鼠绝大多数很快发生乳腺恶性肿瘤(48)。多癌基因存在前是多阶段致癌变所需发生的遗传损害,它们互补协同完成了恶变。

七、人类肿瘤中的ras基因

ras癌基因存在于人类各恶性肿瘤中。现有手段仅在25%的人肿瘤中检出癌基因,其中ras占10~15%。ras检出率高的原因:一、可能ras对NIH3T3检测系统较敏感;二、提示ras在肿瘤中普遍存在。综合大量资料可见,ras(1)在人类肿瘤中占有重要的百分比;(2)与肿瘤特异性无关;(3)与肿瘤组织病理类型无关(13)。

ras基因在人肿瘤组织中的表达水平相对正常组织常常增高。在ras转录水平的定量实验及P21表达的免疫印迹分析中得到证实。

正常个体与癌患者的Ha-ras₁等位基因频率的群体调查表明,癌患者与某些Ha-ras的罕见等位基因有统计学相关性,且罕见等位基因在患者正常组织与肿瘤组织之间无差异,说明频率的增加来源于个体遗传学特性。

目前对人肿瘤的检测有以下方法:(1)寡聚核苷酸探针检测基因组DNA中点突变;(2)32P标记的RNA探针通过RNA:RNA和RNA:DNA杂交检测分子中单一碱基对的情况;(3)应用一基因组特异的序列为引物介导的PCR作用进行检测

(下转183页)

由表2可见, 卵巢癌瘤组织分裂相数增多, 分散良好, 长度增加, 本例患者分裂相总数为95, 众数在55~61 (53.68%), De曾提出染色体数目在60以上的高异倍体, 可考虑作为癌的诊断指标之一, 本例高于60以上者达76.84%, 染色体数目畸变特点与病理诊断具有一定相关性。同样也见到染色体结构异常(如巨大亚中部着丝粒染色体等)。

Trent⁴⁾ (1985年) 在美国召开的第一届实体瘤染色体国际会议上作了有关实体瘤细胞遗传学方法的专题报告, 他提出要在瘤组织分散, 体外培养, 细胞收获等方面不断改进方法使之完善, 并建议采用两种以上

的培养方法, 尽可能既用直接法又用短期培养法, 采用细胞同步化方法, 特别是对收获不成功的肿瘤标本运用该法。我们认为尽管许多技术性困难仍然存在, 这些建议是值得借鉴的。

参考文献

1. 李申德, 国外医学遗传学分册 4: 177, 1981.
2. 周宏远, 等. 四川医学院学报 15: 304, 1984.
3. Kasyk, C.J. et al. J. Natl. Cancer Inst 63: 1199, 1979.
4. 毛新. 国外医学遗传学分册 9: 296, 1986.

A METHOD OF PREPARING CHROMOSOMES FOR HUMAN SOLID TUMOR

Zhou Hong-Yuan et al

Cancer Institute, West China University of Medical Science

The effects of direct scraping method and collagenase treated with short term cultured method for preparing the chromosomes are compared in this paper. The result showed that human solid tumor cells after treated by collagenase then cultured in free serum medium for 48 hours may obtained an adequate numbers and well scattered metaphase of chromosomes. These expressions may favourable to explain the mechanism of chromosome in the period of oncogenesis.

(上接187页)

测, 此反应过程可自动完成, 有可能成为临床检测 RNA:DNA 错配的常规方法。核酸杂交的方法需多种不同探针及足够的标本以提取大量核酸, 故广泛应用还受限制。

未来的研究如能掌握 ras 扰乱细胞正常增值的

分子和生化机制及找出快速可靠的诊断方法, 将为揭示 ras 与人肿瘤的潜在联系和拮抗 ras 致恶变展开美好的前景。

(本文参考文献56篇从略)