

RHO 蛋白家族与细胞极性

王继英 饶青*

(中国医学科学院、中国协和医科大学, 血液学研究所、血液病医院, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 细胞的极性形成对细胞发育、分化及其功能的发挥起着举足轻重的作用, 细胞极性的丧失与肿瘤的发生发展密切相关。小 G 蛋白 Rho 家族是肌动蛋白细胞骨架重新组装的主要调节因子之一, 在协调细胞极性和正常的形态形成过程中起重要作用。现就 Rho 蛋白家族与细胞极性及其二者的关系作一综述。

关键词 Rho; 细胞极性; 细胞骨架

多细胞有机体起始于单细胞, 发育过程中该单细胞的子代分化成多种类型的细胞, 以形成机体不同的系统、器官、组织。一个为大家所普遍认同的多种细胞类型有机体形成的机制是细胞不对称分裂, 而细胞极化是细胞不对称分裂的首要条件。细胞极化相关的细胞生物学功能包括细胞不对称分裂和细胞迁移, 这些都与肿瘤的发生、转移和浸润有关^[1-3]。Rho GTP 酶在细胞极性中的作用日益受到人们的关注, 本文就这一方面的研究进展作一综述。

1 细胞极性

细胞极性是指细胞中, 某些胞质成分按一定空间顺序不均等分布, 从而形成各种细胞内容物的浓度梯度。正是由于细胞极性的存在导致了细胞的不对称分裂(asymmetric cell division)^[4]。哺乳动物上皮细胞是高度极化的细胞, 一个上皮细胞具有不同的顶-侧-基底区域, 这些区域以不同的膜脂、跨膜蛋白和相关的皮质蛋白为标志, 细胞通过这些区域与相邻细胞或细胞外基质接触逐步形成紧密连接(tight junction)、黏粒连接(adherent junction), 进而形成胞质内分子的不对称分布^[4]。上皮细胞与细胞的接触主要是由钙黏素超家族跨膜蛋白分子介导的, 而细胞与细胞外基质的接触主要是由跨膜蛋白受体整合素超家族介导的。E-钙黏素介导的细胞间接触和整合素介导的细胞与细胞外基质的接触引起了肌动蛋白细胞骨架的特异性组装、紧密连接处信号分子和受体信号途径的激活以及胞内蛋白质的重新分布。目前的研究主要集中于紧密连接处的组成分子及细胞骨架系统的再组装, 而在这两种事件中 RHO 家族蛋白均发挥了重要作用。当在培养上皮细胞的培养基

中加入钙离子时(钙离子可使钙黏素受体在细胞-细胞接触部位相互作用, 并可使细胞获得极性的上皮细胞表型), Rac 可促进有功能的紧密连接形成并募集肌动蛋白至连接处; Cdc42 参与肌动蛋白的聚合并确保分泌囊泡的准确运输; Rho 使肌动-肌球蛋白丝聚集成应力纤维, 还可使整合素以及相关蛋白质在局部形成黏着斑复合物, 从而使细胞形态发生变化^[5]。上皮细胞极化可以产生许多特异性的细胞类型^[4], 同时, 上皮细胞去极化可导致肿瘤发生。

神经细胞亦是高度极化的细胞, 细胞内外的信号可使神经细胞形成一个细长的轴突和多个短而逐渐变细的树突。一般而言, 轴突发出信息, 树突接受信息。细胞骨架决定了树突和轴突的形状并对神经细胞的信息传递过程起重要作用。神经细胞极化与树突和轴突的形态形成密切相关, Rho GTP 酶在外界环境因素调节轴突和树突的细胞骨架中起着关键的整合器作用, 其中 Cdc42 在培养的大鼠海马神经细胞 Rap1B GTP 酶下游轴突形成的早期阶段起着关键性作用, 剔除 Cdc42 后轴突形成明显减少^[6]。

Rho GTP 酶发挥作用主要是作用于细胞骨架, 细胞骨架(cytoskeleton)是胞浆中一组由纤维状结构组成的网架, 具有支撑和维持细胞形态及细胞运动的功能。细胞骨架主要包括微丝、微管和中间丝。微丝(microfilament, MF)即肌动蛋白纤维(actin microfilament), 是由肌动蛋白(actin)组成的骨架纤维, 参与应力纤维的形成。应力纤维、黏着斑复合结构

收稿日期: 2007-06-26 接受日期: 2007-09-26

国家自然科学基金资助项目(No.30671096)

* 通讯作者。Tel: 022-23909169, Fax: 022-23909032, E-mail: raoqing@gmail.com

使细胞有力量作用于细胞外基质,并使细胞形态发生改变。微管(microtubule)是细胞质中细长而具有一定硬性的圆管状结构(中空圆筒状),组成微管的化学成分主要是微管蛋白(tubulin)和微管关联蛋白,微管和微丝的主要功能是构成细胞形态支架和细胞运动。中间纤维(丝)(intermediate filament, IF)亦称中等纤维或居间纤维,细胞骨架中的中间丝化学性质各异,在不同细胞由不同的蛋白质和多肽组成。肌动蛋白细胞骨架的聚合、解聚和重新组装,受 Rho 蛋白的调节。

2 RHO 蛋白家族

RHO 蛋白家族是 Ras 超家族中小分子量 G 蛋白的成员之一,是一类分子量为 20~30 kDa 的 GTP 结合蛋白。在人类已发现该家族有 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^[7]。

Rho 蛋白作为分子开关控制细胞信号转导途径,当 Rho 蛋白与 GTP 结合时呈激活状态,与 GDP 结合时呈失活状态。鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF)控制 Rho 小 G 蛋白与 GTP 结合,催化 Rho 向有活性的 GTP 结合状态转换;GTP 酶活化蛋白(GAP)负性调节 Rho 的活性,使 Rho 结合 GDP 进而失活;一些 Rho 家族蛋白在细胞浆内也结合鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂(GDI)呈失活状态^[8,9]。细胞外信号能对上述 3 种调节蛋白进行修饰调节,但主要是通过 GEF 发挥作用。此外 Rho 蛋白受到转录翻译水平^[10]及降解的调控。当 Rho 呈激活状态时,作用于其下游靶蛋白发挥作用。其中,研究最多的是 RhoA (Ras homologous member A)、Rac1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)和 Cdc42 (cell division cycle 42) 3 个亚族。在成纤维细胞中,活化的 RhoA、Rac1 和 Cdc42 可使肌动蛋白细胞骨架重新组装分别形成不同的细胞结构,即应力纤维和黏着斑、片层伪足、细胞膜褶皱。此外 Rho GTP 酶还有转录活性,胞膜运输,调节微管的作用,这些可控制细胞生长,胞质分裂,细胞迁移,细胞-细胞和细胞-胞外基质的黏附,细胞的转化和侵袭等。

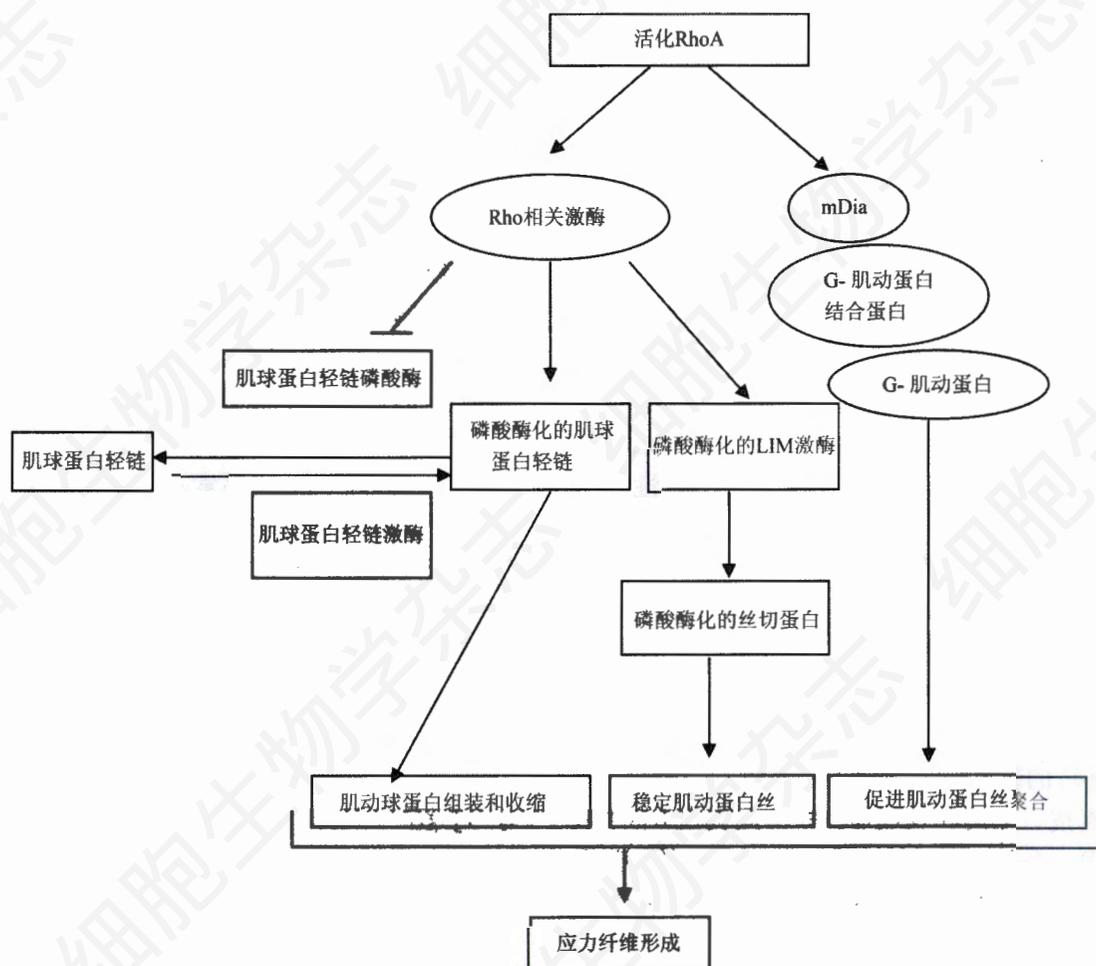
3 RHO 蛋白家族与细胞极性

3.1 RhoA 与细胞极性

Rho 亚家族包括有 RhoA、RhoB、RhoC、RhoD

和 RhoE 等。RhoA 主要通过 Rho 相关激酶(Rho associated kinase, ROCK) 信号转导通路调节肌动蛋白微丝骨架的聚合,进而影响细胞的极性和形态。RhoA 作用于下游靶分子 ROCK,使其多个氨基酸位点发生磷酸化而激活,肌球蛋白磷酸酶结合亚单位(myosin phosphatase binding subunit, MBS)是活化 ROCK 的底物,当接受上游活化信号后发生磷酸化而失活,失活的肌球蛋白磷酸酶不能将肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)去磷酸化,使胞浆内磷酸化的肌球蛋白轻链水平升高,肌动-肌球蛋白交联增加,促进肌动蛋白微丝骨架的聚合,从而使细胞收缩^[11]。RhoA 的另一下游底物是 Dia (Diaphanous-related formins),可与活化的 RhoA 相互作用。与 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白(Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP)和 p21 激活激酶(p21 activated kinase, PAK)的作用机制相似,活化的 RhoA 可作用于 Dia 蛋白的氨基端和羧基端,通过破坏二者的相互作用而解除对其自体的抑制,从而可使 Dia 的 FH1 区连于 G 肌动蛋白结合蛋白(profilin),在哺乳动物细胞中,很大比例的肌动蛋白单体连于 G 肌动蛋白结合蛋白,从而使肌动蛋白单体连于特定的肌动蛋白末端,促进肌动蛋白的聚合^[12]。另有研究表明, Dia 与活化的 RhoA 相互作用能促进应力纤维的形成^[13],这种作用好像是通过微管的排列实现的^[14](图 1)。

在许多侵袭性肿瘤中可观察到 Rho 蛋白与上皮极性的丧失有关,在上皮-间质转分化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)中起重要作用。上皮-间质转分化是多细胞有机体发育过程中指导形态形成的基本途径,此途径在肿瘤形成中被再次激活。在正常和肿瘤上皮细胞中高表达的 RhoA 通过活化 ROCK 使细胞紧密连接破裂,从而导致细胞获得间充质细胞的特性,RhoC 亦可诱导 ROCK 活化。而正常表达的 RhoA 则主要通过 Dia 途径增多钙黏素-连环蛋白复合物的形成来增强与肌动蛋白丝的接合稳定紧密连接。此外, RhoA 还可活化血清反应因子(serum response factor, SRF)和 Stat5 促进上皮-间质转分化的发生^[15]。RhoA 在起始上皮-间质转分化中起到了重要作用,然而在侵袭性肿瘤中 RhoA 的活性却是降低的,而且 RhoA 与 RhoC 之间存在一定的相关性,RhoA 活性的降低与 RhoC 活性的升高经常同时发生。Bellocin 等^[16]证实 RhoC 在结肠癌的上皮-间质转分化细胞中被诱导表达并活化,在结肠癌细胞 LIM 1863 可以观察到 RhoC 的表达和活化,并伴随着 E-钙

图1 RhoA 的信号转导通路^[19]

黏素的缺失和间充质细胞特性的获得,说明 RhoC 在结肠癌的上皮-间质转分化中起到重要作用。结合临床结果和免疫组化方法,发现 RhoC 高表达的直肠癌患者预后不良,因此认为 RhoC 可以作为直肠癌预后的一个判断指标。同时在结肠癌细胞 LIM 1863 还可检测到 RhoA 活性降低,应用短发夹环 RNA 干扰方法证实了 RhoA 抑制上皮-间质转分化后细胞(post-EMT)的迁移, RhoC 促进上皮-间质转分化后细胞的迁移。Simpson 等^[17]应用逆转录病毒载体稳定转染侵袭性乳腺癌细胞系(SUM-159 细胞)并应用 RNA 干扰的方法,亦证实了 RhoA 抑制乳腺癌细胞的侵袭,而 RhoC 促进侵袭。Rho 在肿瘤侵袭中的作用日益受到关注,而且已有望将其作为新的抗癌药物的靶点^[118]。

3.2 Rac 与细胞极性

Rac 亚家族包括 Rac 和 RhoG。Didsbury 等^[20]于 1989 年首次发现并命名了 Rac (ras-related C3 botulinum toxin substrate),分为 Rac1 和 Rac2 两种。

Rac 的激活途径有两种,一是通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)通路, PI3K 和脂质代谢产物 PI (3,4,5) P3 在控制细胞极性和细胞迁移中发挥重要作用^[21]。PI (3,4,5) P3 作用于富含 Dbl 癌基因同源结构域(DH1 homology domain, DH)的鸟嘌呤核苷酸交换因子,激活 Rac, 活化的 Rac 反过来作用于 PI3K, 形成一个正反馈通路;另一激活 Rac 通路是 DOCK180 (downstream of Crk), 后者分子量为 180 kDa 的蛋白质,它是一种新的磷脂酰肌醇-3-激酶,通过作用于 Crk 相关底物(Crk-associated substrate, p130CAS)等蛋白质使 Rac 活化。活化的 Rac 作用于下游底物,调节细胞前缘片状伪足丝状肌动蛋白的聚合, Rac 可通过与胰岛素受体底物 P53 (insulin receptor substrate P53, IRS P53)和 WAVE(又名 Scar)相互作用激活它的下游物质 Arp2/3 复合体来诱导肌动蛋白聚合; Rac 也能通过局部产生 4,5 二磷酸磷脂酰肌醇使肌动蛋白丝去帽,产生肌动蛋白聚合的额外位点;此外, Rac 还可作用于下游靶分子 PAK,

激活 LIM 激酶(LIM kinase, LIMK), 抑制丝切蛋白(cofilin)诱导的肌动蛋白解聚, 在细胞前沿使聚合态的肌动蛋白增加。通过胰岛素受体底物和 PAK, Rac 和 Cdc42 之间的相互作用也会影响 Rac 信号转导水平。活化的 Rac1 和 Cdc42 通过 mPar6 与 mPar3/mPar6/aPKC (atypical protein kinase C) 蛋白质复合物相互作用, 这种作用在线虫胚胎早期的前-后极产生, 果蝇上皮细胞和神经母细胞的顶-底极形成中都是必需的。因为 Rac1 和 Cdc42 可增强磷脂酰肌醇-3-激酶的活性并刺激 Par 复合物的形成, 所以推测 Rac1 和 Cdc42 组成一个正反馈环, 放大了破坏 mPar 蛋白质对称分裂的生长信号, 从而促进神经细胞极化^[6]。

Benitah 等^[22]证实在 Rac1 缺失的小鼠中, 其真皮干细胞不能分化成滤泡间真皮、毛囊和皮脂腺, 其原理是在真皮干细胞中 Rac1 通过 PAK2 磷酸化负性调节 c-Myc, 而当 Rac1 缺失时, c-Myc 被活化, 活化的 c-Myc 可使整合素和肌动蛋白细胞骨架成分表达减少, 而且可破坏真皮干细胞之间及真皮干细胞与其周围微环境的黏附作用, 从而真皮干细胞不能分化成滤泡间真皮、毛囊和皮脂腺, 并由此提出 Rac1 和 Myc 组成一个干细胞调节轴的概念。Lavy 等^[23]发现 ROPs 1 (ICR1) 是 ROP/RAC 的一个新的效应蛋白, ROPs 1 的功能与细胞极化, 根分裂组织的维持和囊泡运输有关。

3.3 Cdc42 与细胞极性

Shinjo 等^[24]从人的胎盘 cDNA 中分离鉴定出了分子量为 25 kDa, 与酵母的 CDC42 (cell-division-cycle protein) 为同系物的 GTP 结合蛋白, 命名为 CDC42Hs, 亦名 G25K。

Cdc42 在把握细胞极性中起重要作用。活化的 Cdc42 直接连于 WASP 家族成员的 WAVE1~WAVE3, 这种连接可使 WASP 的结构发生变化, 使 WASP VCA 区的自我抑制状态得以解除, 并可活化 Arp2/3 复合物促进新的肌动蛋白丝形成^[25]。Cdc42 亦可通过 PAK 途径增加肌动蛋白的聚合(与 Rac1 的 PAK 途径相同)。Cdc42 作用于下游底物 Par6/PKCzeta, 对微管细胞骨架重新组装进行调节来把握细胞迁移方向^[26]。Cdc42 在神经细胞极化中的作用与 Rac 相同。在秀丽隐杆线虫的胚胎发育过程中, 活化的 Cdc42 参与前-后极的产生及已确立的前皮质区的维持^[27]。Rojas 等^[28]利用 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 细胞证实 Cdc42 具有调节 MDCK 细胞紧密连接的功能, Cdc42V12 突变可减慢细胞内吞作用和生物合成

运输, Cdc42N17 突变可减慢细胞顶端的内吞作用和基底侧向顶端的转胞吞作用, 但可刺激生物合成的运输。这些研究结果表明 Cdc42 在维持上皮细胞的细胞极化过程中发挥着调控多种细胞途径的功能。Yang 等^[29]在对比正常和 Cdc42 剔除的小鼠的造血干细胞的研究中发现, Cdc42 剔除的小鼠 F-肌动蛋白结构重组缺陷, 其黏附及定向迁移的能力严重受损。在神经原始细胞的不对称分裂过程中, Cdc42 调节顶极原始细胞的有丝分裂位置和细胞命运^[30]。在缺失 Cdc42 的端脑神经原始细胞的小鼠胚胎中, 由于 Cdc42 的缺失导致了在端脑神经上皮细胞顶端没有 PAR6、aPKC、E-钙黏素、 β 连环蛋白和 Numb 蛋白, 这严重影响了巢蛋白阳性放射纤维(nestin-positive radial fiber)的延伸, Cdc42 缺失的端脑不能分成两个大脑半球, 最终导致了前脑无裂畸形, 此研究表明 Cdc42 对于端脑神经上皮细胞顶-底极的建立是必需的, 而端脑神经上皮细胞对于大脑半球的分裂是必需的^[31]。

4 小结

Rho 蛋白家族生物活性十分广泛, 在细胞极性形成过程中发挥重要作用, 而极性的丧失与肿瘤的发生发展密切相关。在多种实体瘤中, 如胃癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌、直肠癌等可检测到 Rac1、RhoA 和 Cdc42 中的一种或多种蛋白质的表达上调及活性升高^[32-38]。Rho 家族蛋白表达上调及活性的升高与患者预后不良关系密切相关^[16,38]。然而 Rho 家族是维持细胞极性所必需的, 为何高表达反而会与肿瘤的发生发展有关呢? 如文中所述 RhoA 高表达和正常表达时的主要活化途径不同: 高表达时主要是激活 ROCK 破坏细胞的紧密连接和细胞极性, 正常表达时则主要是激活 Dia 稳定紧密连接。此外, RhoA 和 RhoC 还可通过调节基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metallo-proteinase, TIMP)的水平来调节细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解和重建, 促进局部的浸润。RhoA 和 RhoC 通过 ROCK 信号转导通路可促进肿瘤血管生成, 同时协助肿瘤细胞穿越脉管内皮向远处转移^[18]。可见, RhoA 在肿瘤的起始及转移和侵袭中均有重要作用。Rac1 和 Cdc42 也可能与 RhoA 相似, 表达水平不同, 其调节途径也不相同, 也可能存在其他的调节方式, 但目前尚不清楚。Rho 家族的网络调节错综复杂, 该家族已知有 60 多个鸟

嘌呤核苷酸交换因子和 70 多个 GTP 酶活化蛋白^[39], 而且它们之间还有很多串联, 如 Rac 和 Rho 有对抗活性, 而 Rho 又可活化 Rac, Rac 和 Cdc42 又可同时活化。Rho 家族在肿瘤的起始及转移方面的影响已越来越受到人们的关注。因此, 进一步研究探讨 Rho 在细胞极性及其肿瘤发生发展中的作用, 可使 Rho GTP 酶有望成为新的抗癌药物的细胞靶点^[40-43]。

参考文献 (References)

- [1] Clevers H. *Nat Genet*, 2005, **37**: 1027
- [2] Liu H et al. *Cell Cycle*, 2005, **4**: 646
- [3] Caussinus E et al. *Nat Genet*, 2005, **37**: 1125
- [4] Mostov K et al. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 287
- [5] Braga V. *Exp Cell Res*, 2000, **261**: 83
- [6] Watabe-Uchida M. *J Neurosci*, 2006, **26**: 10633
- [7] Bustelo XR et al. *Bioessays*, 2007, **29**: 356
- [8] Rossman KL et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 167
- [9] Peck J et al. *FEBS Lett*, 2002, **528**: 27
- [10] Winter-Vann AM et al. *Nat Rev Cancer*, 2005, **5**: 405
- [11] Maekawa M et al. *Science*, 1999, **285**: 895
- [12] Pollard TD et al. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, **29**: 545
- [13] Ishizaki T et al. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 8
- [14] Maekawa M et al. *Science*, 1999, **285**: 895
- [15] Thiery JP et al. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**: 740
- [16] Bellovin DI et al. *Oncogene*, 2006, **25**: 6959
- [17] Simpson KJ et al. *Cancer Res*, 2004, **64**: 8694
- [18] 郑文建. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, **26**: 286
- [19] Bishop AL et al. *Biochem J*, 2000, **348**: 241
- [20] Didsbury J et al. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 16378
- [21] Stephens L et al. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**: 203
- [22] Benitah SA. *science*, 2005, **309**: 933
- [23] Lavy M et al. *Curr Biol*, 2007, **17**: 947
- [24] Shinjo K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 9853
- [25] Kim AS et al. *Nature*, 2000, **404**: 151
- [26] Etienne-Manneville S et al. *Cell*, 2001, **106**: 489
- [27] Motegi F et al. *Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 978
- [28] Rojas R et al. *Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 2257
- [29] Yang L et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**: 5091
- [30] Cappello S et al. *Nat Neurosci*, 2006, **9**: 1099
- [31] Chen L et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 16520
- [32] 潘 阳等. *解放军医学杂志*, 2003, **28**: 517
- [33] Thériault BL et al. *Carcinogenesis*, 2007, **28**: 1153
- [34] Patel V et al. *Carcinogenesis*, 2007, **28**: 1145
- [35] Pan ZZ et al. *Int J Oncol*, 2006, **29**: 1201
- [36] Merajver SD et al. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005, **10**: 291
- [37] Kamai T et al. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**: 4799
- [38] Fukui K et al. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, **132**: 627
- [39] Etienne-Manneville S et al. *Nature*, 2002, **420**: 629
- [40] Fritz G et al. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006, **6**: 1
- [41] Yamazaki D et al. *Cancer Sci*, 2005, **96**: 379
- [42] Aznar S et al. *Cancer Lett*, 2004, **206**: 181
- [43] Wang L et al. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 44617

The RHO Protein Family and Cell Polarity

Ji-Ying Wang, Qing Rao*

(State Key Lab of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union of Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract The formation of cell polarity significantly influences the development, differentiation and function of the cells. The loss of cell polarity is tightly associated with tumorigenesis. The Rho family of small G protein is one of the important factors regulating the actin cytoskeleton reorganization, and plays an essential role in coordinating the cell polarity and process of normal morphogenesis. Now we review on the relationship between the Rho family and cell polarity.

Key words Rho; cell polarity; cytoskeleton

Received: June 26, 2007 Accepted: September 26, 2007

The work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.30671096)

*Corresponding author. Tel: 86-22-23909169, Fax: 86-22-23909032, E-mail: raoqing@gmail.com