

Raf 蛋白激酶与细胞信号传导

何 琪 杨

(海军医学研究所 上海 200433)

细胞外的信号如何向细胞内传递,然后引起细胞相应的反应,历来是细胞生物学的一个重要研究课题。目前已知的有 Ras 蛋白、G 蛋白、磷脂酰肌醇等多条信号通路,各信号通路之间的协同和抑制作用组成了细胞内信号调控的复杂网络,从而实现细胞各种各样的功能。与细胞增殖、癌变关系较为密切的是 Ras 蛋白信号通路^[1],近年来获得了该通路所有的联系蛋白,Raf-1 蛋白激酶位于 Ras 蛋白的下游,不仅传递 Ras 蛋白有关的信号,同时还与胞内其他蛋白相互作用,实现信号的分选和调控。

Raf 蛋白激酶分为 A-Raf、B-Raf、C-Raf-1 三种亚类,与细胞多种功能关系最为密切的是 C-Raf-1。C-Raf-1 蛋白由 648 个氨基酸组成,分子量为 70 kDa,活化后具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性,氨基端为调节区,含锌指结构,羧基端为激酶区。为叙述方便,下面分专题介绍 Raf 蛋白激酶的不同功能。

一、Raf 蛋白激酶与细胞增殖

表皮生长因子(EGF),血小板衍生生长因子(PDGF)刺激细胞增殖的第一步,是引起生长因子受体的酪氨酸蛋白激酶(Tyrosine protein kinase, TPK)活化,增殖信号通过中间蛋白,到达 Ras, Ras 与 Raf-1 N 端结合^[2],使 Raf-1 蛋白 Ser、Thr 磷酸化。磷酸化的 Raf-1 蛋白具有 Ser/Thr 激酶活性,磷酸化 MEK (MAPKK),使信号向下游传递。不同生长因子活化 Raf-1 蛋白激酶时,被磷酸化的氨基酸不同。EGF、胰岛素使 Raf-1 蛋白 Ser 磷酸化而激活^[3,4],而 PDGF 使 Ser、Tyr 磷酸化,在 NIH 3 T 3 和 CHO 细胞中,PDGF β 受体还能直接磷酸化 Tyr 而激活 Raf-1 蛋白激酶^[5]。

无论正常或肿瘤细胞,很难检测到 C-raf-1 基因突变,说明该基因所编码 Raf-1 蛋白激酶在细胞功能调控中比 Ras 作用更为重要。Ras 蛋白是 TPK 信号的汇合点,而 Raf-1 蛋白激酶可能是一个更为重要的汇合点,能整合蛋白激酶 C(PKC)的信号。对不同的细胞研究,未能解决 Ras 与 PKC 的信号传递关系。从 NIH 3 T 3 和 rat-1 细胞中发现,Ras 仅介导胰岛素和 PDGF 引起的丝裂原蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)活性,而与佛波脂(PMA)引起 MAP 激酶活性无关^[6]。基因转染实验发现,NIH 3 T 3 细胞在 PMA 刺激下,PKC α 能直接激活 Raf-1 蛋白激酶,激活作用是通过磷酸化 499 位的 Ser 实现的,将 499 或 259 的 Ser 突变成 Ala, PKC α 就不能激活 Raf-1 蛋白激酶,但 ras、lck 仍能激活突变的 Raf-1 蛋白激酶^[7]。利用重组蛋白,进行体外磷酸化实验,也直接证实 PMA 激活 MAPK 需 PKC 和 Raf-1^[8]。以上实验表明:细胞内存在由 PKC \rightarrow Raf-1 \rightarrow MAPKK 的信号通路。cAMP 调控作用也与 Raf 蛋白激酶有关,在神经嗜铬细胞瘤(PC 12)细胞中,B-Raf 蛋白激酶能活化 MEK-1(MAPKK),cAMP 通过抑制 B-Raf 蛋白激酶,阻止其与 Ras 蛋白结合而抑制 MAPK 的活化^[9]。

一般情况下,Raf-1 蛋白在细胞溶质中,用 ras 和腺病毒 EcA 基因转化人胚胎性视网膜细胞,被转化的细胞膜上含 Raf-1 蛋白,用 0.5 mmol/L NaCl 抽提后 Raf-1 蛋白激酶活性仍存在,且不受磷酸酶 1、2 A 影响^[10]。对与细胞膜结合的 Raf-1 蛋白激酶的研究,有助于进一步阐明细胞内各种信号的调控关系。

二、Raf 蛋白激酶与细胞转化

正常细胞转化变成恶性增殖的肿瘤细胞,从某种意义上说,是细胞信号通路脱调节的结果。虽然 *ras* 癌基因的点突变就足以导致肿瘤细胞的出现, *Raf-1* 蛋白激酶作用可能更为重要。磷脂酶 $C\gamma$ (*PLC\gamma*), *PKC-\gamma*, *C-raf-1* 基因共转染 NIH 3 T 3 细胞不能使细胞发生转化, *H-ras* 与 *PLC\gamma*, *PKC-\gamma* 共转染,也不能使 NIH 3 T 3 细胞转化,只有 *H-ras* 与 *raf-1* 基因共转染,才出现转化细胞^[11],说明 *Ras* 与 *Raf* 并不仅仅是信号通路的上下游关系。*raf* 与 *src* 基因之间可能有协同作用, *H-ras* 和 *src* 基因单独和 *raf-1* 基因转染昆虫 Sf 9 细胞,仅有较低的 *Raf-1* 蛋白激酶活性,只有 *H-ras* 和 *src* 同时转染细胞, *Raf-1* 蛋白激酶才完全活化,出现 p 74 kDa 磷酸化的 *Raf-1*^[12]。

肿瘤细胞和能长期增殖的细胞, *raf-1* mRNA 在细胞周期中的表达没有变化,而正常细胞 *raf-1* mRNA 表达能随外界信号而变化。处 G_0 期的正常人 T 淋巴细胞,检测不到 *raf-1* mRNA 和 *Raf-1* 蛋白;在 CD 3 抗原刺激 6 小时下, *raf-1* mRNA 增加 4 倍;当细胞表达 IL-2 后, *raf-1* mRNA 继续增加到 5-10 倍;在 $G_1 \rightarrow S$ 转变期仍能检测到 *raf-1* mRNA 和 *Raf-1* 蛋白的表达增加;当洗去 CD 3 后, *Raf-1* 蛋白表达下降^[13]。

三、Raf 蛋白激酶与发育、 细胞分化

从鼠 36 个不同组织中提取 RNA,检测到所有组织均表达 *raf-1* mRNA,其中以横纹肌、大脑、胎脑表达最高,表皮、小肠、甲状腺、胰腺表达最低^[14]。在小鼠睾丸组织中,早粗线期的精原细胞 *C-raf-1* mRNA 表达最高,然后逐渐下降; *A-raf* 只在睾丸间质细胞中表达,在精细胞发生时逐渐上升; *B-raf* 表达 4.0 和 2.6 kb 的 mRNA, 4.0 kb mRNA 在粗

线期精原细胞开始低水平表达,在减数分裂末期精子细胞中, 2.6 kb mRNA 表达大量增加^[15]。*raf* 基因的不同亚类在精子发生过程中不同表达,可能有独特的调控作用。果蝇胚胎前后体轴决定中,需 *Torso* 蛋白和 *D-Raf* 两种蛋白激酶。*Torso* 是内源性 TPK, *D-raf* 基因和人 *C-raf-1* 基因有 65% 同源性,也含有三个保守区域,在正常胚胎发育中自卵产出 1-2 h, *D-Raf* 蛋白就高度磷酸化;缺乏 *Torso* 蛋白激酶活性的胚胎, *D-Raf* 蛋白明显降低,但不改变其磷酸化状态^[16]。在前脂肪纤维细胞分化成脂肪细胞过程中, *C-raf-1* 和 *A-raf* mRNA 增加 3-6 倍^[17]。

四、Raf 蛋白激酶与细胞 编程死亡

细胞编程死亡(programmed cell death, PCD)是生物实现其正常功能所必需的重要事件,淋巴细胞发育分化、肿瘤发生以及许多药物作用机理都与 PCD 有关。细胞中不仅存在诱导 PCD 的基因如 p 53、*myc*,也存在抗 PCD 的基因如 *bcl-2*。*Bcl-2* 蛋白分布在线粒体外膜,内质网和核膜上,通过抗脂质过氧化作用而抑制 PCD^[18]。*bcl-2* 和 *raf-1* 基因能协同作用,抑制 PCD,该作用不影响 *Raf* 蛋白激酶活性^[19]。在 IL-3 刺激 Ba/F 3 细胞增殖过程中, *Raf-1* 蛋白激酶活性升高,加 TPK 抑制剂 genistein (20 μ g/ml) 能抑制细胞增殖,但不发生 PCD, *Bcl-2* 蛋白表达也不受影响。Genistein 对 *Raf-1* 蛋白磷酸化没有影响^[20],有可能通过抑制 *Raf-1* 蛋白下游通路起作用。

五、Raf 蛋白激酶与不良因素 的应激反应

从某种意义上说,可以认为肿瘤细胞抗药性的出现,是细胞对抗肿瘤药物的不良刺激的应激反应。多药抗性(multidrug resistance)的一个重要机制是抗药基因 *mdrl* 的超表达,其

编码的P糖蛋白能将抗肿瘤药物泵出细胞外。P糖蛋白在正常人体肝、肾、血脑屏障等部位均有分布,说明其正常的生理机能是解除有害物质对细胞可能造成的伤害。另外紫外线,γ射线照射也能激活mdr-1启动子^[21,22],表明细胞中存在一种共同的信号机制调控mdr-1基因活化。Raf-1蛋白激酶与mdr-1基因活化有关,v-raf基因转染鼠肝正常细胞,使mdr-1 mRNA表达明显升高^[23]。利用荧光脂酶报告基因,证实NIH 3T3转染细胞的mdr-1启动子活化需C-Raf-1蛋白激酶活性。人肝癌HepG 2细胞有高内源性的Raf-1蛋白激酶,mdr-1启动子基因与Raf显性隐性突变C-raf-C 4(能阻止raf基因功能)基因共转染HepG 2细胞,mdr 1启动子活性降低了20倍^[24]。

紫外线照射引起DNA分子中的嘌呤核苷酸形成二聚体,导致体细胞突变和皮肤癌的出现。紫外线照射HeLaS 3、HeLa tk⁻细胞,Src TPK活性升高,Raf-1蛋白激酶活性也升高,引起核结合蛋白AP1的磷酸化,这种作用不需要新蛋白合成^[25,26]。反义raf cDNA转染人扁平癌SQ-20 B细胞,阻断C-raf-1基因功能,被转染细胞不仅对裸鼠的致癌性降低,同时对γ射线照射更为敏感^[27]。综上所述,药物、射线等不良因素刺激下,细胞的应激反应是激活与Raf-1蛋白激酶有关的信号通路,协调细胞进行下一步的行动。

摘 要

Ras蛋白信号通路的信号传递蛋白Raf-1蛋白激酶,不仅在该通路中起重要作用,也能整合PKC的信号。Raf-1蛋白激酶活化后参与细胞增殖和转化、细胞编程死亡、发育和分化,以及细胞对不良因素的应激反应,是细胞内重要的、进化上十分保守的信号分子。

参 考 文 献

[1] 杜宪兴等,1994,细胞生物学杂志,16: 171—174,

- [2] Zhang, X-F. et al., 1993, *Nature*, 364, 308—313.
- [3] App, H. et al., 1991, *Mol. cell. Biol.*, 11: 913—919.
- [4] Kovacina, K. S. et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265: 12115—12118.
- [5] Morrison, D. K. et al., 1989, *cell*, 58: 649—657.
- [6] de Vries-Smits, A. M. M. et al., 1992, *Nature*, 357: 602—604.
- [7] Kolch, W. et al., 1993, *Nature*, 364, 249—252.
- [8] Marquardt, B. et al., 1994, *Oncogene*, 9: 3213—3218.
- [9] Peraldi, P. et al., 1995, *FEBS Letters*, 357: 290—296.
- [10] Traverse, S. et al., 1993, *Oncogene*, 8, 3175—3181.
- [11] Cuadrado, A. et al., 1993, *Oncogene*, 8: 2443—2448.
- [12] Williams, N. G. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 2922—2926.
- [13] Zmuidzinas, A. et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 2794—2803.
- [14] Storm, S. M. et al., 1990, *Oncogene*, 5: 345—351.
- [15] Wadewitz, A. G. et al., 1993, *Oncogene*, 8: 1055—1062.
- [16] Sprenger, F. et al., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13: 1163—1172.
- [17] Zmuidzinas, A. et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 162: 1180—1187.
- [18] Reed, J. C. et al., 1994, *J. Cell Biol.*, 124: 1—6.
- [19] Wang, H-G. et al., 1994, *Oncogene*, 9: 2751—2756.
- [20] Kinoshita, T. et al., 1995, *EMBO J.*, 14: 266—275.
- [21] McClean, S. et al., 1993, *Int. J. Radiat Biol.*, 63: 765—773.
- [22] Uchiumi, T. et al., 1993, *FEBS*, 326: 11—16.
- [23] Burt R. K. et al. 1988, *Carcinogenesis*, 9: 2329—2332.
- [24] Cornwell, M. M. et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268: 15347—15350.
- [25] Devary, Y. et al., 1992, *Cell*, 71: 1081—1091.
- [26] Radler-Pohl, A. et al., 1993, *EMBO J.*, 12: 1005—1012.
- [27] Kasid, U. et al., 1989, *Science*, 243: 1354—1356,