

Rho小G蛋白信号通路在癌细胞生物学中的多样功能

曹雪敏¹ 刘 祎² 勿呢尔¹ 周 玲¹ 范丽菲^{1*}

(¹内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021; ²内蒙古包头市第四医院, 包头 014030)

摘要 癌症的产生是由于细胞正常行为的多个方面发生改变, 例如基因突变的积累、失去控制的细胞增殖、细胞的异常迁移和侵染、染色体的不稳定性等。Rho小G蛋白相关信号通路涉及癌症发展进程的多个方面, 例如细胞周期进程、细胞极性的调控、细胞骨架重排、细胞与细胞或细胞与基质相互作用调控的细胞迁移和侵染等。该文总结了近年来Rho小G蛋白在癌症的发生发展过程中相关作用的研究进展, 重点阐述其家族成员在癌细胞的增殖、存活、侵染、转移等过程中的作用, 并对以Rho小G蛋白信号通路作为癌症治疗靶点的研究进展进行概括总结。

关键词 Rho小G蛋白; 信号通路; 癌细胞生物学

The Diverse Roles of Small Rho GTPases in Cancer Cell Biology

Cao Xuemin¹, Liu Yi², Wunier¹, Zhou Ling¹, Fan Lifei^{1*}

(¹School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China;

²No.4 Hospital of Baotou in the Inner Mongolia, Baotou 014030, China)

Abstract Primary tumors generally arose as a consequence of perturbing many of the characteristics of normal cell behavior. Such as, multiple mutations and epigenetic changes affecting key genes that ultimately affected cell proliferation and survival, the acquisition of inappropriate characteristics in migration and invasion, and abnormal mitosis and cytokinesis that led to chromosomal instability. The small Rho GTPases contributed to multiple cellular processes that could affect cancer progression, including cell cycle progression, cell polarity, cell cytoskeletal rearrangement and cell-cell or cell-matrix contact regulated cell migration and invasion. Here, we summarized the recent research outcomes of the roles of small Rho GTPases in cancer cell progression, especially in cancer cell proliferation, survival, invasion, and migration; and in particular, we listed the potential possibilities of members in the Rho GTPases signaling pathway as new targets of cancer therapeutics.

Keywords small Rho GTPases; signaling pathway; cancer cell biology

1 Rho小G蛋白家族简介

1.1 Rho小G蛋白家族成员及调控机制

人类基因组的1%编码与Rho小G蛋白家族有直接相互作用的蛋白质, 这些蛋白或者调控Rho小G蛋白的功能, 或者被Rho小G蛋白所调控^[1]。Rho小G蛋

白在真核生物的进化过程中高度保守, 从低等的单细胞阿米巴原虫到高等的哺乳动物都具有Rho小G蛋白^[1]。线虫可能具有10个Rho小G蛋白; 果蝇可能具有11个Rho小G蛋白; 人类的Rho小G蛋白家族包含20个成员, 分别属于8个不同的亚家族, 包括Rho、

收稿日期: 2015-01-31 接受日期: 2015-03-26

内蒙古自然科学基金(批准号: 2013MS0505)、内蒙古大学高层次人才科研任务启动费(批准号: 30105-125128)、中国博士后科学基金第7批特别资助(批准号: 2014T10237)和内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJZY14005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992971, E-mail: lifei.fan@imu.edu.cn

Received: January 31, 2015 Accepted: March 26, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2013MS0505), Program of Higher-level Talents of Inner Mongolia University (Grant No.30105-125128), China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (Grant No.2014T10237) and Higher Scientific Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJZY14005)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992971, E-mail: lifei.fan@imu.edu.cn

网络出版时间: 2015-06-01 15:46 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1546.007.html>

Rac、Cdc42、Rnd、RhoBTB、Rif/RhoD、Wrch和RhoH^[2]。大多数的Rho小G蛋白作为分子开关可以在GTP结合的激活形式和GDP结合的非激活形式之间转换, 激活与非激活之间的转换通过三种调节因子调控, 鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide-exchange factors, GEFs)可以促进GDP解离和GTP结合; GTP酶激活蛋白(GTPase activating proteins, GAPs)可以促进GTP的水解; 鸟苷酸解离抑制因子(guanine nucleotide-dissociation inhibitors, GDIs)可以与Rho小G蛋白C端的异戊烯化结构域结合, 从而防止其与细胞膜的结合, 达到抑制Rho小G蛋白与下游效应蛋白相互作用的目的, 抑制Rho小G蛋白的活性。其他非经典的家族成员, 例如Rnd、RhoBTB亚家族以及RhoH, 由于在GTP结合部位存在关键氨基酸的替换, 缺乏GTP水解功能, 只能持续地与GTP结合, 它们的调控则是通过蛋白表达水平、细胞内定位、磷酸化水平等作用来实现的^[3]。

1.2 Rho小G蛋白的生物学功能

激活的Rho小G蛋白可以通过与下游效应蛋白的相互作用激发一系列的信号通路调控细胞水平的应答。这个高度保守的蛋白质家族控制着真核生物细胞一些最基础的生命现象, 其中的一些与癌症的发生发展密切相关, 例如: 细胞的形态发生与维持、细胞周期调控和细胞迁移等。

细胞形态与细胞的功能之间有密切的联系, 在外源刺激下Rho小G蛋白通过调节细胞骨架及建立细胞极性促进细胞形态的形成、维持及变化。在高等真核生物的发育过程中, 多细胞的组织和器官的形成发挥着基础性的作用, 细胞-细胞之间黏着复合物的形成以及细胞极性的建立是许多类型的细胞形态建立的驱动力。例如在表皮细胞中, E-钙黏着蛋白(钙依赖型的反式膜蛋白家族成员)募集细胞内蛋白质如联蛋白以及细胞骨架, 参与同种蛋白互作形成稳定的黏着斑。Rho、Rac、Cdc42在黏着斑的形成过程中都发挥着作用。有研究证实, 由Rho小G蛋白Cdc42及Rac介导的filopodia和lamellipodia等突起结构先于黏着斑形成, 它们最早介导相邻细胞的细胞膜之间的联系^[4]。Rho通过它的效应蛋白Rho相关激酶(Rho-associated kinase, ROCK)介导的肌动蛋白纤维聚集作用参与黏着斑形成, ROCK也可以直接和黏着蛋白发生相互作用^[5]。表皮细胞的形态发生还需要细胞极性的建立来形成顶部和基底部, 顶部

和基底部之间通过紧密连接(tight junction)进行分离, 紧密连接作为细胞之间直接的相互作用位点发挥着阻止脂类和蛋白质在细胞之间自由扩散的屏障作用。研究发现, 三种蛋白质复合物在表皮细胞的形态发生尤其是顶部和基底部的极性建立过程中发挥重要的作用, 它们分别是Par6/PKC/Par3、Dlg/Lgl/scribble和Crumbs/PALS1/PATJ^[6]。Par6是Cdc42的直接底物, Cdc42依赖的PKC激活是黏着斑形成所必需的, Cdc42调控Par6/PKC/Par3复合物在细胞的顶部定位^[7]。复合物Dlg/Lgl/scribble在细胞顶部的定位以及Crumbs/PALS1/PATJ在细胞基底部的定位也在细胞极性的建立过程中发挥协同的作用。伴随着细胞极性的建立, 细胞形态的维持还可以通过极性的囊泡运输得到加强。Rho小G蛋白通过调控微管细胞骨架结构调控囊泡的运输, 微管的状态在细胞形态发生过程中会发生显著的重排^[1]。

Rho小G蛋白及其效应蛋白对于细胞周期的调控主要存在于G₁/S转化期以及有丝分裂期。Rho小G蛋白及其效应分子对于G₁/S转化期的调控主要通过调节细胞周期的正调控因子(cyclin D1)和负调控因子(p21^{cip1}和p27^{kip1})进行^[8]。Rho、Rac和Cdc42都可以促进cyclin D1的转录, Rac还可以促进cyclin D1信使RNA的翻译^[9]。过表达激活的Rho可以促进促有丝分裂原刺激下的G₁期细胞中p27^{kip1}的降解^[10]。在有丝分裂初期, 小G蛋白Rho及其下游激酶ROCK通过介导细胞表面的收缩而促使细胞趋圆化; 有丝分裂早期, RhoA/mDai1或Cdc42/mDia3信号通路对于纺锤体组装以及微管与着丝点的附着是必要的; 在有丝分裂后期, Rho小G蛋白直接调控收缩环的形成, 促进姐妹细胞分离^[8]。

Rho小G蛋白及其效应蛋白在细胞迁移过程中也发挥重要的作用。传统的观点认为, Rac在迁移的细胞前端通过下游效应蛋白WAVE(WASP-family verprolin homology protein)和Arp2/3介导肌动蛋白的成核作用, 产生可以向前伸展的结构lamellipodia, 为迁移细胞提供向前运动的牵拉力; Rho在迁移细胞的末端通过下游效应蛋白ROCK介导肌球蛋白-肌动蛋白纤维之间相互作用产生收缩力, 使迁移的细胞的尾部随前部一起向前运动^[1]。这样的迁移模型在某些情况下显得太过简单, 不同的细胞类型往往以不同的方式迁移。同样的细胞类型在不同的微环境中也会以不同的方式迁移, 例如, 一些癌细胞在

二维的细胞基质中采取Rac依赖型的间叶状细胞的迁移模式,但是在三维的细胞基质中采取Rho依赖而非Rac依赖的阿米巴原虫型的迁移模式^[11]。Cdc42通过建立迁移细胞内细胞骨架的极性促进细胞的迁移,通过稳定微管的结构使它的方向从中心体起始并向细胞迁移的方向延伸,使得囊泡运输从高尔基体向细胞迁移前端(leading edge)进行。新的研究证据显示,Rho可能在细胞迁移的过程中发挥着统领全局的先导作用。Rho及其效应蛋白mDia1(也称为Drf1, Diaphanous-related formin 1)在迁移的细胞前端聚集,Rho在细胞的前端被激活,其下游的效应蛋白mDia1既可以加强微管的稳定性及重排,募集Cdc42及促后期复合物(anaphase promoting complex, APC)到迁移细胞的前端,促进细胞极性的建立从而促进迁移;另外,也可以激活Rac,进而介导lamellipodia结构的产生以及黏着斑的解聚,促进细胞产生向前移动的牵引力^[12]。

2 Rho小G蛋白在癌症发生发展的不同阶段中的作用

Rho小G蛋白通过影响细胞行为的多个方面影响癌症发生发展的进程,包括:细胞获得失去控制的异常增殖的能力、细胞通过避免凋亡而继续存活、癌细胞的组织侵染以及扩散等(图1)。体外实验证实,一些Rho小G蛋白编码基因有原癌基因活性,它

们的过表达和激活可以促进癌细胞的侵染和转移,例如RhoA、RhoC、Rac1/2/3和Cdc42;而另一些Rho小G蛋白家族成员编码基因是抑癌基因,例如RhoB、RhoBTB等。在一些癌症中,这些基因或者缺失,或者突变,或者表达水平下调^[3]。一些Rho小G蛋白的下游效应蛋白编码基因也是原癌基因,例如,小G蛋白Rac和Cdc42下游激酶PAK1(p21 activated kinase 1)的编码基因是直肠癌和乳腺癌的原癌基因,它的过表达会促进直肠癌和乳腺癌细胞的增殖^[13-14]。

2.1 Rho小G蛋白与癌细胞的增殖与存活

癌细胞的一个重要特征是细胞获得了失去控制的增殖能力,细胞逃脱凋亡,最终导致癌细胞的增殖。Rho小G蛋白通过调节细胞周期相关基因(例如G₁期主要的信号调节蛋白cyclin D1以及细胞周期依赖性激酶抑制剂p21^{cip1}和p27^{kip1})促进细胞周期进程,Rho小G蛋白RhoA、Rac、Cdc42与原癌基因Ras介导的细胞周期调控有密切的内在联系,可以促进Ras介导的癌化转化。另外,生长因子及细胞外基质所诱导的Rac1和Cdc42激活可以激活c-Jun激酶(Jun NH2-terminal kinase, JNK),诱导G₁早期cyclin D1的表达。但同时,这种诱导作用又被Rho抑制,以防止G₁早期细胞持续地合成cyclin D1。另一方面,激活的Rho可以通过激活下游激酶ROCK而促进有丝分裂激活蛋白激酶p42/p44(mitogen activated protein kinase, MAPK)的持续产生,进而在G₁中期诱导cyclin

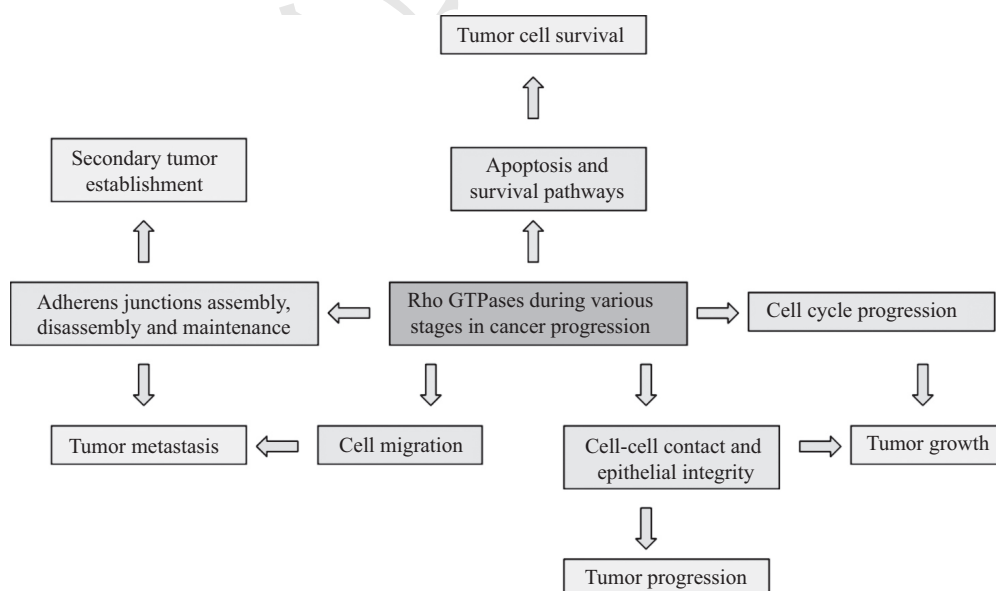


图1 Rho小G蛋白对于癌症发生发展的重要分子过程的调控

Fig.1 Small Rho GTPases-mediated regulation of various important cellular processes which may contribute to multiple stages of cancer development

D1的表达和推进细胞周期进程。因此, Rho小G蛋白RhoA、Cdc42、Rac在G₁期对于cyclin D1的适时表达起到了至关重要的调节作用^[8-9,15]。

癌细胞的增大离不开癌组织中血管的生成, 恶性增殖的细胞会分泌细胞因子促进周围的血管组织产生新生的血管供给癌组织的生长。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最重要的一种促血管生成因子。炎症因子、生长因子、组织缺氧等都会增加VEGF的表达^[16]。VEGF可以通过受体酪氨酸激酶, 如VEGF受体1, 2, 3(VEGF receptor 1, 2, 3, VEGFR1, 2, 3)传导信号。Rho小G蛋白信号通路可以被VEGF激活, 研究显示, Rho小G蛋白可能会调控促血管生成因子的分泌从而促进新血管生成。Rho小G蛋白在新血管生成过程中的多个方面调控血管内皮细胞, 例如, 血管的通透性、内皮细胞外基质的降解、内皮细胞迁移及增殖、血管内腔的形成等^[17]。VEGF通过与VEGFR2结合, 继而激活Rho小G蛋白RhoA、Cdc42、Rac参与上述的过程^[18-19]。癌细胞分泌的VEGF激活内皮细胞中的Rho小G蛋白RhoA及Rac, 通过破坏内皮细胞之间的黏着连结, 促进还原氧的产生, 降低内皮细胞层的刚性, 增加内皮细胞的通透性^[20]。Cdc42活性的增加会提高基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)的活性, 降解内皮细胞的基底膜, 促进内皮细胞的迁移及侵染细胞外基质^[21]。Rho小G蛋白在内皮细胞迁移过程中的作用方式与在上皮细胞中类似, Rac介导产生的lamellopodia结构在迁移细胞的前端产生牵引力, Rho介导产生的stress fiber结构在迁移细胞的尾端促进细胞收缩, Cdc42介导产生filopodia结构感知外界环境, 介导细胞-细胞之间的相互作用, 并调控迁移细胞的极性。Rho小G蛋白通过调控内皮细胞周期的G₁/S期进程促进血管的生成和分支。血管生成的最后一步是血管内腔的形成, 有两种机制促进血管内腔的形成, 一种是形成细胞空鼓(cell hollowing), 另一种是形成脊髓空鼓(cord hollowing)。细胞空鼓的形成涉及细胞空泡的形成以及空泡融合成内皮血管腔。VEGF介导的Rho-ROCK激活参与内皮细胞形态的改变, 最终形成血管内腔^[22]。

2.2 Rho小G蛋白与癌细胞的侵染与转移

2.2.1 细胞迁移模型 细胞在二维细胞外基质及三维细胞外基质中的迁移遵循五步迁移模型^[23]。第一步: 在迁移细胞的前端产生突起。这一过程涉及

Rho小G蛋白RhoA、Cdc42、Rac调控肌动蛋白纤维的生成, 肌动蛋白纤维与一些配体蛋白结合, 不断生长的肌动蛋白纤维将细胞膜推向细胞向前迁移的方向。第二步: 细胞与细胞外基质发生互作并形成新的黏着连结。整联蛋白与细胞外基质发生相互作用并在细胞膜上聚集成簇。整联蛋白的细胞内部分可以直接与辅肌动蛋白(actinin)、踝蛋白(talin)、黏着斑激酶(focal adhesion kinase)相互作用, 募集肌动蛋白结合蛋白(vinculin、paxillin和actinin)和调控分子[磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)和Rho小G蛋白]到黏着斑。黏着斑的形成受多条信号通路调控, 如磷脂酰肌醇3激酶、PKC以及Rho小G蛋白激酶通路。第三步: 募集表面蛋白酶到细胞外基质并促进蛋白酶介导的细胞外基质降解。第四步: 肌动蛋白-肌球蛋白相互作用介导的细胞收缩。Rho激活肌球蛋白II, 并与肌动蛋白纤维相互作用, 产生迁移细胞向前运动的收缩力。第五步: 迁移细胞尾部与细胞外基质脱离。迁移细胞尾部黏着斑的解聚涉及几种机制, 一种是肌动蛋白结合/分离蛋白(如gelsolin及cofilin)为肌动蛋白纤维加帽, 促进肌动纤维解聚; 一种是磷酸酶抑制细胞骨架蛋白的聚合; 还有一种是蛋白酶降解黏着斑, 黏着斑解聚后整联蛋白从细胞外基质解离, 内在化回收到迁移细胞的前端进行再利用或者在细胞外基质中囤积备用。

2.2.2 Rho小G蛋白与癌细胞的侵染与转移 癌细胞的迁移分为单细胞迁移(individual cell migration)和集体细胞迁移(collective migration)。白血病、淋巴瘤和基质瘤的转移采取单细胞迁移的方式, 表皮细胞癌常采取集体细胞迁移的方式, 在许多癌症中单细胞迁移和集体细胞迁移的方式同时存在。

根据迁移的癌细胞的类型、整联蛋白的参与情况、细胞骨架的结构以及蛋白酶产物的不同划分不同的细胞迁移类型。单细胞迁移根据形态差异分为间叶状细胞类型(mesenchymal type)及阿米巴细胞类型(amoeboid type)。以间叶状细胞类型迁移的癌症包括恶性胶质瘤癌、纤维肉瘤癌、间变性肿瘤等, 这类癌细胞的迁移采用经典的五步迁移模型, 依赖于整联蛋白以及金属蛋白酶对细胞外基质的降解作用。以阿米巴细胞类型迁移的癌症包括白血病、淋巴瘤以及小细胞肺癌, 它们与细胞外基质的黏附性较低, 这类癌细胞的迁移不依赖于整联蛋白及金属蛋白酶, 而依赖于小G蛋白RhoA介导的细胞收缩。

集体细胞类型迁移的癌症主要是表皮细胞癌及黑色素瘤,这类细胞迁移的特征是在迁移的过程中保持着细胞-细胞外基质的相互作用及细胞-细胞间的相互作用,并且依赖整联蛋白以及金属蛋白酶对细胞外基质的降解作用,只有迁移细胞群前端的一个细胞会产生向前的迁移力,中间和后段的细胞被前端的细胞牵拉着前进。一般来说,分化程度越低的癌细胞越偏向于采用单细胞迁移的方式进行转移^[23-24]。

癌细胞的迁移方式具有高度的可塑性,即不同的迁移方式之间会由于癌细胞微环境的改变或受到外界抑制因子的刺激而相互转化。癌细胞会对丧失了某种迁移能力进行补偿而发展成采用其他方式进行迁移。在癌症的自然发生过程中,蛋白质表达水平及功能的变化(如黏着蛋白编码基因的突变)会改变癌细胞的迁移过程,在用药物治疗癌症的过程中也会发生迁移模式的变化,由于抑制某些迁移过程中必需的蛋白质的作用,会使癌细胞的迁移产生“药物诱导的可塑性”。比如,在癌细胞发展及去分化的过程中,表皮样的癌细胞会经历由集体细胞迁移向单细胞迁移模式的转变,称为表皮-间叶转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。在EMT中伴随着细胞-细胞间黏着的消失,但是细胞还保持着促迁移因子表达的能力(例如表达整联蛋白的能力)。EMT是癌细胞侵染过程中标志性的一步,一旦癌细胞获得了单细胞扩散的能力,癌症转移的速度将大大增加,癌症病人的预后将变差^[23-25]。在另一些条件下,例如使用蛋白酶抑制剂、削弱细胞与细胞外基质之间的联系等,会使癌细胞经历从间叶样细胞迁移向阿米巴样细胞迁移的转变,称为间叶-阿米巴转变(mesenchymal-amoeboid transition, MAT)。在MAT中伴随着细胞形态由长到圆的改变,伴随着整联蛋白分布的分散化、细胞骨架中stress fiber结构的缺失。MAT代表一种抗药机制,是癌细胞在抗癌药物使用过程中使自身的迁移状态发生变化,产生出新的抗药性的迁移方式,因此,蛋白酶抑制剂等药物对于晚期癌症的发展和扩散的治疗效果甚微。

Rho小G蛋白参与癌细胞侵染与迁移的多个环节。表皮细胞类癌症的发生开始于表皮细胞层基底膜被破坏以及恶性癌细胞侵染进入细胞的基底层,这伴随着细胞与细胞间的连接被破坏,细胞转变为运动性更强的间叶型细胞,也就是表皮-间叶转变的发生。

RhoA在阿米巴迁移以及间叶状迁移过程中都

很重要,RhoA激活其下游效应蛋白ROCK,调控肌动蛋白与肌球蛋白之间的相互作用产生收缩力,这为依赖出泡过程进行的阿米巴迁移提供收缩力,也为间叶样迁移过程中细胞尾部的收缩提供动力。在集体细胞迁移过程中,处于迁移细胞群前端的一个细胞会产生向前运动的动力。研究显示,RhoA首先在前端细胞被激活,之后Cdc42被激活,RhoA还会调节基质金属蛋白酶的产生,分解细胞外基质,促进细胞的迁移。在间叶状细胞迁移过程中,Rac介导产生迁移细胞前端的lamellipodia突起结构,同时Rac还可以调节基质金属蛋白酶以及他们的天然抑制剂,即组织特异性的金属蛋白酶抑制剂(tissue-specific inhibitors of MMP, TIMPs)的产生^[23,26]。Cdc42通过与Par6/PKC/Par3复合物的相互作用调控间叶样细胞的迁移以及侵染^[23,27];在集体细胞迁移过程及侵染过程中,Rac通过与下游效应蛋白MRCK(myotonic dystrophy kinase-related cdc42-binding kinase)的相互作用调控肌动蛋白与肌球蛋白相互作用介导的细胞收缩,而Cdc42可以调节基质金属蛋白酶的产生^[28]。Cdc42还可以作为中间分子介导原癌基因Ras及EGFR诱发的癌变。研究证明,Cdc42确实可以抑制Ras介导的癌化,这可能是由于Cdc42可以与Ras下游的PI3K、Raf信号通路发生相互作用^[29]。Cdc42还可以与蛋白质泛素化酶c-Cbl结合,避免其与EGFR结合而降解EGFR,从而促进EGFR介导的癌化^[29]。Cdc42还有潜在的癌症抑制因子的活性,通过维持细胞的极性以及细胞间黏着抑制癌症的发生,说明Cdc42对于癌症发生发展的调控作用是细胞类型依赖的^[29]。

3 Rho小G蛋白信号通路作为协同抗癌药物的研究

Rho小G蛋白家族异常会通过影响细胞内正常信号通路促进癌症的发生和发展,因此,Rho小G蛋白家族成员及其调控蛋白和下游效应蛋白是开发抗癌药物的潜在靶点。传统的抗癌化疗药物,例如可以抑制血管生成的药物,在使用的过程中会逐步发展出抗药性,还有可能筛选出具有更强侵袭性和转移性的癌症类型,因此,联合用药是今后抗癌化疗药物的发展趋势^[30-31]。Rho小G蛋白是VEGF介导的血管生成过程中必要的调控蛋白,因此,将抑制血管生成的靶向药物与抑制细胞迁移与浸润的靶向药物联合用药会改善癌症化学疗法的治疗效果。

针对Rho小G蛋白家族成员及其调控蛋白的抗癌靶向药物开发主要可以从以下几个方面入手。(1)使用特异的Rho小G蛋白及其调控蛋白和下游效应蛋白抑制剂;(2)小分子RNA干扰技术;(3)Rho小G蛋白翻译后异戊烯化修饰抑制剂。

由于RhoA、Cdc42、Rac参与大量的细胞功能调控,直接抑制它们的功能会导致显著的细胞毒性,因此,用小分子抑制剂抑制调控蛋白GEF以及下游的效应蛋白更有实际的应用价值。迄今使用较多的是Rho小G蛋白下游激酶抑制剂,这类抑制剂可以与激酶蛋白竞争ATP从而阻断激酶的活性。最常用的化学药品类抑制剂是一类能够抑制Rho信号通路下游激酶ROCK和PAK的小分子物质,例如Y27632、Y32885、HA1077和H1152P,它们可以抑制ROCK的活性^[32];PAK4抑制剂PF-3758309能抑制细胞独立锚定生长和增殖,诱导细胞凋亡和细胞骨架重排;化学抑制剂SP600125可以间接减弱PAK1对结肠直肠癌增殖的影响;变构抑制剂IPA-3可以通过阻碍PAK1自抑制结构域的失活以及激活的单体的自磷酸化作用抑制PAK1的活性,这种通过抑制激酶的自我调节结构域的方法能够提供比与激酶蛋白竞争ATP结合的方法更高的特异性,因此降低了药物效果不佳的可能性以及对细胞的毒性^[33-35]。还有一些抑制剂通过抑制GTP或GEF与Rho小G蛋白结合来阻止后者激活,例如,ITX3可以抑制RhoGEF蛋白Trio的N端结构域的活性,进而抑制其对于Rac1及RhoG的激活作用^[36-37]。MLS000532223是通过高通量的药物筛选得到的一种可以抑制GTP结合到Rho小G蛋白的化合物,它可以剂量依赖性地抑制GTP与Rho小G蛋白的结合,是Rho小G蛋白的一种广谱抑制剂^[36]。

Rho小G蛋白家族的大部分蛋白在C端都含有一个CAAX基序(C:半胱氨酸;A:任意脂肪族的氨基酸;X:任意氨基酸),CAAX基序在翻译后都会经历异戊烯化修饰,定位于内质网。在内质网上,AAX部分会被RAS转化酶-1(RAS-converting enzyme-1)切割,半胱氨酸的碳基团被甲基化。翻译后,修饰过的Rho小G蛋白定位于细胞膜,接受上游刺激而激活行使正常的生理功能,因此,参与翻译后修饰的法尼基转移酶(farnesyl transferase)、牛儿基转移酶(geranylgeranyl transferase)等都是潜在的抗癌治疗靶点。法尼基转移酶及牛儿基转移酶的抑制剂竞争性地结合CAAX底物,或者类异戊二烯焦磷

酸盐供体,这类抑制剂有些已经进入临床试验阶段,例如:Zarnestra[®](Tipifarnib/R115777; Phase III)、Sarasar[®](Lonafarnib/SCH66336; Phase II)、L-778123(Phase II)和BMS-214662(Phase I)^[38-39]。Rho小G蛋白的异戊烯化还可以被甲羟戊酸抑制剂抑制,例如他汀类药物或者二磷酸酯。他汀类药物是临床上广泛应用的降血脂药物,因此是比较安全的。研究证实,他汀类药物有抗血管生成的作用,还可以抑制某些黑色素瘤的迁移和侵袭^[40-41]。二磷酸酯类抑制剂会抑制血管表皮生长因子介导的内皮细胞迁移、脉管系统的形成以及抑制Rho小G蛋白的活性^[42]。

4 问题与展望

Rho小G蛋白涉及癌症发生及发展过程中多方面的调控,包括基因表达、细胞周期、细胞内信号分子的运输、细胞的迁移与侵袭、癌细胞与周围基质细胞相互作用的修饰^[43-45]。这使得研究Rho小G蛋白在癌症发生进程中的作用变得复杂而困难,但也说明了Rho小G蛋白作为潜在的癌症治疗靶点的广阔应用前景。迄今为止的大多数研究都是针对经典的Rho小G蛋白家族成员RhoA、Rac和Cdc42,其他的家族成员对细胞骨架的调控作用已经明确,未来对于它们在癌症的发生发展过程中发挥作用的研究十分必要。

由于Rho小G蛋白调控的信号通路既存在于癌细胞中也存在于正常的细胞中,因此,抑制Rho小G蛋白的活性必然会带来一些副作用。在以后的研究过程中,如果能得到Rho小G蛋白与其激活蛋白及下游调控蛋白的晶体结构将非常有利于我们进行高通量地筛选特异的Rho小G蛋白信号通路抑制剂。在特定的某种癌症中确定不同Rho小G蛋白的特异化功能,也是进行靶向治疗的一个研究方向。同时,将传统的抗癌药物与Rho小G蛋白信号通路抑制剂联合用药也会改进或增强癌症治疗的效果,是当下抗癌药物的研究热点。现今的研究中面临的挑战是确定某一个Rho小G蛋白或某些Rho小G蛋白的组合是抗癌药物最好的靶标,并且确定抑制某个或某些Rho小G蛋白与传统的抗癌药物联合用药后的特异性和药效。

参考文献 (References)

- 1 Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 247-69.
- 2 Vlahou G, Rivero F. Rho GTPase signaling in *Dictyostelium discoideum*: Insights from the genome. *Eur J Cell Biol* 2006;

- 85(9/10): 947-59.
- 3 Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 2008; 582(14): 2093-101.
- 4 Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* 2002; 3(2): 259-70.
- 5 Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1/2): 65-76.
- 6 Gibson MC, Perrimon N. Apicobasal polarization: Epithelial form and function. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 747-52.
- 7 Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 5): 891-5.
- 8 David M, Petit D, Bertoglio J. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. *Cell Cycle* 2012; 11(16): 3003-10.
- 9 Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett* 2001; 171(2001): 1-10.
- 10 Croft DR, Olson MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2006; 26(12): 4612-27.
- 11 Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003; 5(8): 711-9.
- 12 Yamana N, Arakawa Y, Nishino T, Kurokawa K, Tanji M, Itoh RE, *et al.* The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Mol Cell Biol* 2006; 26(18): 6844-58.
- 13 Qing H, Gong W, Che Y, Wang X, Peng L, Liang Y, *et al.* PAK1-dependent MAPK pathway activation is required for colorectal cancer cell proliferation. *Tumour Biol* 2012; 33(4): 985-94.
- 14 Shrestha Y, Schafer EJ, Boehm JS, Thomas SR, He F, Du J, *et al.* PAK1 is a breast cancer oncogene that coordinately activates MAPK and MET signaling. *Oncogene* 2012; 31(29): 3397-408.
- 15 Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G₁-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(5): 355-66.
- 16 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25(4): 581-611.
- 17 Bryan BA, D'Amore PA. What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(16): 2053-65.
- 18 Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling-in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(5): 359-71.
- 19 Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 2007; 100(6): 782-94.
- 20 Beckers CM, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity. *Thromb Haemost* 2010; 103(1): 40-55.
- 21 Ispanovic E, Serio D, Haas TL. Cdc42 and RhoA have opposing roles in regulating membrane type 1-matrix metalloproteinase localization and matrix metalloproteinase-2 activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(3): C600-10.
- 22 Strilic B, Kucera T, Eglinger J, Hughes MR, McNagny KM, Tsukita S, *et al.* The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell* 2009; 17(4): 505-15.
- 23 Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5): 362-374.
- 24 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442-54.
- 25 Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143(6): 1731-42.
- 26 Lozano E, Betson M, Braga VM. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* 2003; 25(5): 452-63.
- 27 Pinner S, Sahai E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol* 2008; 10(2): 127-37.
- 28 Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(12): 1392-400.
- 29 Stengel K, Zheng Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal* 2011; 23(9): 1415-23.
- 30 Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(8): 592-603.
- 31 Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009; 15(3): 232-9.
- 32 van der Meel R, Symons MH, Kudernatsch R, Kok RJ, Schiffelers RM, Storm G, *et al.* The VEGF/Rho GTPase signalling pathway: A promising target for anti-angiogenic/anti-invasion therapy. *Drug Discov Today* 2011; 16(5/6): 219-28.
- 33 Deacon SW, Beeser A, Fukui JA, Rennefahrt UE, Myers C, Chernoff J, *et al.* An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chem Biol* 2008; 15(4): 322-31.
- 34 Cui JJ. Targeting receptor tyrosine kinase MET in cancer: Small molecule inhibitors and clinical progress. *J Med Chem* 2014; 57(11): 4427-53.
- 35 Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1): 28-39.
- 36 Surviladze Z, Waller A, Wu Y, Romero E, Edwards BS, Wandering-Ness A, *et al.* Identification of a small GTPase inhibitor using a high-throughput flow cytometry bead-based multiplex assay. *J Biomol Screen* 2010; 15(1): 10-20.
- 37 Bouquier N, Vignal E, Charrasse S, Weill M, Schmidt S, Leonetti JP, *et al.* A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chem Biol* 2009; 16(6): 657-66.
- 38 Kaklamani V, O'Regan RM. New targeted therapies in breast cancer. *Semin Oncol* 2004; 31(2 Suppl 4): 20-5.
- 39 Sebtli SM, Adjei AA. Farnesyltransferase inhibitors. *Semin Oncol* 2004; 31(1 Suppl 1): 28-39.
- 40 Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(7): 541-55.
- 41 Glynn SA, O'Sullivan D, Eustace AJ, Clynes M, O'Donovan N. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC Cancer* 2008; 8: 9.
- 42 Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Shimizu S, Ogata S, *et al.* Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(2): 478-84.
- 43 Fan L, Mellor H. The small Rho GTPase Rif and actin cytoskeletal remodelling. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(1): 268-72.
- 44 Fan L, Pellegrin S, Scott A, Mellor H. The small GTPase Rif is an alternative trigger for the formation of actin stress fibers in epithelial cells. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 8): 1247-52.
- 45 Fan L, Yan H, Pellegrin S, Morigen, Mellor H. The Rif GTPase regulates cytoskeletal signaling from plexinA4 to promote neurite retraction. *Neurosci Lett* 2015; 590: 178-83.