

## 原癌基因 Ras 诱导的衰老与逃逸衰老 机制的研究进展\*

郭雨声 张如意 贾舒婷 罗 瑛\*\*

(昆明理工大学医学院衰老与肿瘤分子遗传学实验室, 昆明 650500)

**摘要** 在体内和细胞内由癌基因诱导的衰老(oncogene-induced senescence, OIS)是一种重要的癌症抑制机制。原癌基因 Ras 是人类癌症中最易突变的癌基因之一, 尽管有 OIS 的存在, 但是 Ras 诱导的恶性转化还是时有发生, 这提示 Ras 基因可能存在着能够逃逸衰老的机制。本文以 Ras 的信号通路为线索, 着重阐述和总结了 Ras 是如何激活一些 OIS 过程中的关键分子从而诱导衰老的, 并且描述了几种 Ras 通过抑制 OIS 的关键因子从而逃逸衰老的机制。

**关键词** Ras, p53, Rb, OIS, MAPK, 原癌基因诱导的衰老

**学科分类号** Q7, Q5

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2016.0095

导致细胞衰老的方式主要有两种, 复制型衰老和癌基因诱导衰老。通常人们所说的细胞衰老是由复制型衰老(replicative senescence)引起的。所谓复制型衰老, 就是体外培养的细胞经过有限次的分裂后, 渐渐失去分裂能力, 直到形成无法逆转的细胞周期阻滞的过程<sup>[1]</sup>。然而, 癌基因诱导的衰老(oncogene-induced senescence, OIS)却与复制型衰老有所不同, 它能够诱导年轻细胞提前衰老。OIS 最早由 Serrano 等<sup>[2]</sup>发现原癌基因 Ras(rat sarcoma viral oncogene homolog)的激活会引起野生型细胞的异常增生, 随后出现不可逆转的生长阻滞现象, 并且其表型同复制型的衰老相似, 因此, 将这种由癌基因诱导的早衰称为癌基因诱导的衰老 OIS。长期以来的研究表明, OIS 是一种肿瘤抑制机制, 它能够在体外细胞培养时抑制癌基因的转化, 且必须有额外的突变产生才能使癌基因激活的细胞逃逸衰老<sup>[3]</sup>, 它存在于多种人类肿瘤和小鼠癌症模型中, 并且能够作为天然屏障阻止活体向着癌症发展<sup>[4]</sup>。

随着近年来研究的进展, 调控 OIS 的信号通路以及诱导 OIS 产生的分子机制逐渐被揭示<sup>[4]</sup>。大多数的 OIS 都会通过某种途径引发 p53 的表达, 比如癌基因信号的过度激活会带来复制压力, 引起 DNA 损伤<sup>[5-6]</sup>, 随后, DNA 损伤信号被 p53 接受,

p53 会转录激活 p21<sup>WAF1</sup> 或者增强 p16<sup>INK4a</sup> 的表达, 并激活视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma, Rb)使细胞周期停滞并产生衰老的表型<sup>[2]</sup>。此外, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生同样是 OIS 过程中的关键因素。癌基因可以通过 ROS 的产生来诱导 DNA 损伤, 从而产生衰老的表型<sup>[7]</sup>, 如一项研究表明 Ras 可以调控 Nox1(NADPH Oxidase 1)和 Nox4(NADPH Oxidase 4)并产生 ROS, 敲除 Nox1 和 Nox4 会降低 ROS 的水平并使 DNA 损伤应激反应消失<sup>[8]</sup>。此外, ROS 还会通过氧化失活 PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B), 使得 AGO2(argonaute 2)过磷酸化, 并使沉默 p21<sup>WAF1</sup> 的 miRNA 失活, 从而诱导衰老<sup>[9]</sup>。值得一提的是, OIS 的诱导经常伴随着衰老相关的异染色质灶(senescence-associated heterochromatic foci, SAHFs)的生成, SAHFs 可以招募 Rb 和异染色质蛋白来沉默 E2F(E2F transcription factor)靶基因的表达<sup>[10]</sup>。这种 SAHF 的形成带来的染色质的改变被认为是 OIS

\* 国家自然科学基金资助项目(31170735, 81460457)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0871-65920753, E-mail: luoyingabc@yahoo.com

收稿日期: 2016-04-22, 接受日期: 2016-05-16

不可逆转的原因之一。需要注意的是, OIS 同复制型衰老一样都会产生衰老相关的分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP), 即衰老细胞会表达以及分泌炎症细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白酶等<sup>[11]</sup>。SASP 以一种细胞自

主进行的方式来起始并维持着衰老<sup>[12-14]</sup>, 并且其中一些 SASP 信号还能激活活体内的免疫系统来清除衰老细胞<sup>[15-16]</sup>。一些 SASP 因子的表达和 NF- $\kappa$ B<sup>[17]</sup> 以及 CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  (CCAAT/ enhancer binding protein beta, C/EBP $\beta$ ) 有关<sup>[12-13, 18]</sup> (图 1)。

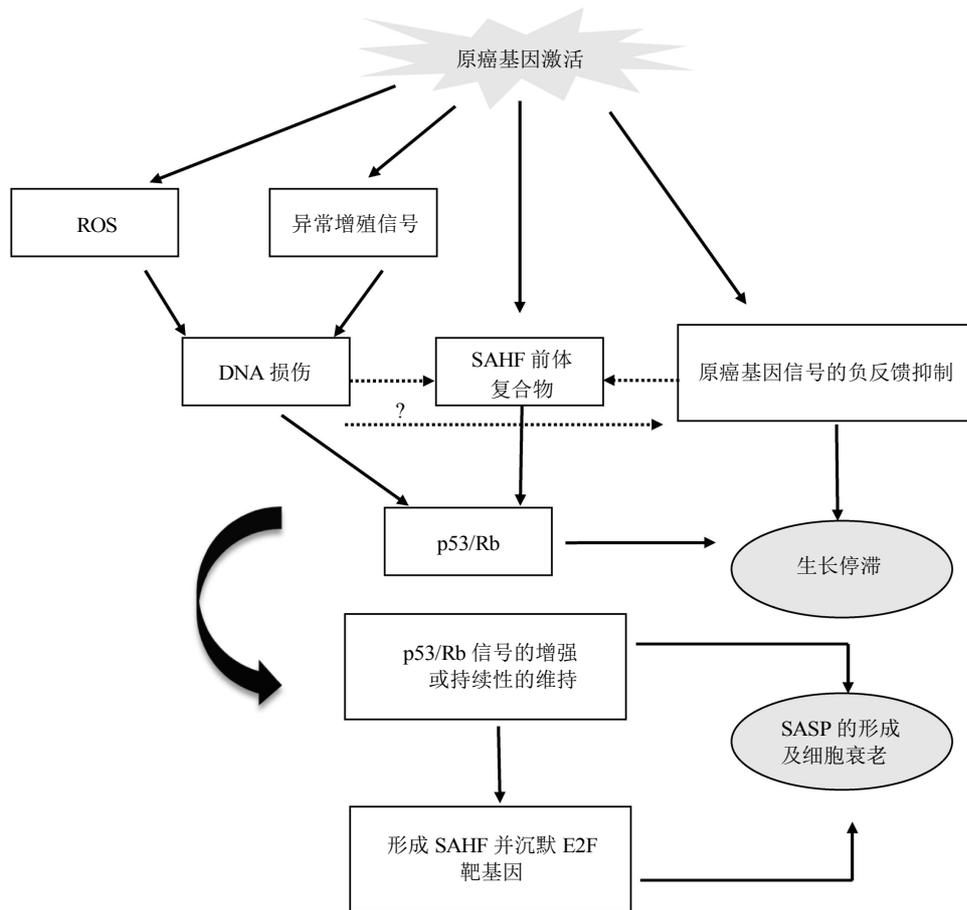


Fig. 1 Basic mechanism of OIS

图 1 OIS 发生的基本机制

通常, 原癌基因的激活会导致增殖异常或者产生大量的 ROS, 从而引发 DNA 损伤应激, 还会形成 SAHF 的前体, 从而激活 p53/Rb, 使得细胞进入生长阻滞状态。此外, 原癌基因过度激活后会在翻译后水平上受到负反馈调节的抑制, 被抑制的癌基因信号也会使细胞进入生长阻滞状态。当 p53/Rb 的信号持续维持时, 细胞会逐渐形成 SAHF 并沉默 E2F 及其靶基因, 使得细胞进入无法逆转的衰老状态, 并通过 SASP 表型的形成维持衰老的状态。

在 OIS 的研究中, 原癌基因 Ras 的 OIS 一直是其中的热点。Ras 家族是一类编码小 GDP 结合蛋白的原癌基因, 它能够转导受体酪氨酸激酶接受的有丝分裂信号, 通过激活其下游通路, 推进细胞周期的进展, 引起细胞增殖等生物学效应。正常情况下, Ras 蛋白的活性受到鸟苷转化因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 和 GTP 酶激活蛋白 (GTPase-activating protein, GAP) 的调控, 使 Ras

蛋白在其 GTP 活化态和 GDP 失活态之间相互转化<sup>[19]</sup>。然而, Ras 蛋白突变 (通常为单个氨基酸的取代突变, 如 G12、G13、Q61 等) 往往能够阻止 Ras-GTP 向 Ras-GDP 的转化<sup>[20-21]</sup>, 从而使 Ras 持续性激活下游的信号通路, 引起细胞的增殖失控等一系列生物学效应, 引起恶性转化的过程。Ras 家族成员包括 K-, N-, H-Ras, 有近 1/3 的人类癌症中含有 Ras 的持续性激活突变<sup>[22]</sup>。尽管体内存在 OIS

这种保护机制, 但 Ras 激活突变的恶性肿瘤仍然时有发生, 这说明 Ras 必然有着可以逃逸衰老的机制. 了解原癌基因 Ras 通过何种机制诱导衰老的产生, 为我们提供了 Ras 逃逸衰老可能机制的相关思路, 也为研究其他癌基因衰老和衰老逃逸的机制提供了思路. 本文将从 Ras 依赖 p53 和不依赖 p53 这两种途径来阐释近年来 Ras 诱导衰老的研究进展, 以及近期研究中发现的几种可能逃逸 OIS 的方式.

## 1 Ras 通过下游通路激活 p53 从而诱导衰老

p53 被称作基因组的“守卫者”, 原因就在于它能够应激各种压力信号, 如辐射、DNA 损伤、营养失调、热休克等, 并通过其下游的通路, 将受到损伤的细胞进行 DNA 修复, 并诱导不能进行修复的细胞进入细胞凋亡或者周期阻滞, 从而维持了基因组的稳定, 抑制肿瘤的发生发展<sup>[23]</sup>. p14/p19<sup>Arf</sup> (人类为 p14, 小鼠中为 p19) 可以抑制 p53 的负调节因子 MDM2 (MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase) 从而稳定 p53<sup>[24]</sup>, 因此 Arf 也是十分重要的抑癌基因, 在各种人类肿瘤中经常沉默或者缺失. 对原癌基因 Ras 来说, Ras-Raf-MEK-ERK 信号通路以及 Ras-p38MAPK 通路激活 Arf 或者直接激活 p53 是其引发 OIS 的主要方式.

### 1.1 Ras 通过 Raf-MEK-ERK 诱导 OIS 的产生

Ras-Raf-MEK-ERK 信号作为原癌基因 Ras 激活后细胞获得增殖信号的主要途径<sup>[25]</sup>, 在 Ras 诱导的 OIS 中占有十分重要的地位. 研究表明, MEK (ERK activator kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase) 通路的持续异常激活对于维持 Ras 诱导的细胞衰老是十分重要的<sup>[26]</sup>, 这暗示 MEK/ERK 可能是一种自动防故障机制, 能够感受原癌基因 Ras 激活带来的异常细胞增殖信号, 从而在引起细胞增殖和衰老的效应上做出改变.

为了研究 MEK/ERK 在引起细胞增殖和衰老效应上转变的机制, 以及 ERK 的两种高度同源分型 ERK1 和 ERK2 在诱导衰老过程中的不同作用, Shin 等<sup>[27]</sup>发现, 敲低 ERK2 而不是 ERK1 能使表达 H-Ras<sup>V12</sup> 的小鼠 MEF (mouse embryo fibroblast) 细胞逃逸衰老, 并在转录和翻译两种水平上引起两种关键的衰老诱导因子 p19<sup>Arf</sup> 和 p16<sup>INK4a</sup> 表达水平的降低, 也会引起关键的肿瘤抑制因子 p53 和 pRb 的激活减少. 从结果上而言, ERK2 的敲低使 Ras 通过 p16<sup>INK4a</sup> 引起的细胞衰老过程被解除. 由以上研究结果不难看出, 在 Ras-Raf-MEK-ERK 信号通路

中, ERK2 对于衰老信号的激活和控制是至关重要的, 这也暗示 ERK1 有可能着重控制 Ras 激活细胞增殖的信号, 而 ERK2 主要作为一种防故障机制在调节 Ras 诱导的细胞衰老.

### 1.2 Ras 通过 p38MAPK 通路诱导 OIS 的产生

尽管 MEK-ERK 通路一直是 OIS 过程中的研究热点, 近年来, p38MAPK (mitogen-activated protein kinase P38) 通路在 Ras 的 OIS 过程中起到的作用越来越被研究人员所重视. 早期研究表明, 由活化的 H-Ras<sup>V12</sup> 或者 Raf-1 会在人类和小鼠的成纤维细胞中激活 p38 的上游 MKK3/6 (MAPK kinase3/6), 并且突变的 MKK3/6 所导致的 p38 持续激活会引起衰老<sup>[28]</sup>, 但是当使用 p38 抑制剂 SB203580 或者使用 shRNA 敲低 p38 表达时, 会使 Ras 诱导的衰老表型有所恢复<sup>[29-30]</sup>, 这项研究提示了 p38 在 Ras 诱导衰老过程中的重要作用. 随着研究的深入, p38 蛋白的各个亚型以及 p38 的下游 PRAK (P38-Regulated/Activated protein kinase) 在 Ras 诱导衰老过程中的重要作用逐渐被揭示, 并且对于 p38, PRAK 翻译后修饰对 OIS 的影响有了初步的了解.

哺乳动物基因组主要编码 4 种 p38 的亚型蛋白, 分别为 p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、p38 $\gamma$ 、p38 $\delta$ . Kwong 等<sup>[29-30]</sup>通过多年研究发现, 这些不同的 p38 蛋白亚型在 Ras 的 OIS 过程中起着不同的作用<sup>[29-30]</sup>. p38 $\alpha$ 、p38 $\gamma$ 、p38 $\delta$  与 Ras 诱导的衰老有关, 而 p38 $\beta$  则没有此效应. 更进一步的研究发现, p38 $\alpha$ 、p38 $\gamma$  和 p38 $\delta$  似乎通过不同的机制来调节 OIS 的过程. 在细胞水平的研究中, p38 $\gamma$  可以直接磷酸化 p53 的 Ser33 位点, 随后提高 p53 的转录活性并且提高了 p21<sup>WAF1</sup> 在细胞中的表达水平, 而沉默 p38 $\gamma$  的表达会极大地降低 p53 的转录活性. p38 $\alpha$  蛋白虽然不参与 Ras 诱导的 p53 激活所引起的细胞衰老, 但是它对于 Ras 诱导的另一个关键衰老效应器 p16<sup>INK4a</sup> 的表达至关重要<sup>[29]</sup>. 另一项研究表明, p38 (具体蛋白分型未知) 可以磷酸化并稳定 HBP1 (high mobility group box-containing protein 1) 引起 p16<sup>INK4a</sup> 的表达升高<sup>[31]</sup>, 并且在 Ras 诱导衰老的过程中 HBP1 可以直接结合于 p16<sup>INK4a</sup> 的启动子上并上调 p16<sup>INK4a</sup> 的转录水平<sup>[32]</sup>. 结合上文 p38 $\alpha$  对于 p16<sup>INK4a</sup> 表达的诱导, 我们猜测 p38 $\alpha$  能够特异性地磷酸化 HBP1 并诱导 p16<sup>INK4a</sup> 的产生, 这需要进一步的研究验证. 最后, p38 $\delta$  虽然也参与 Ras 的 OIS 过程, 但目前的研究还没有找到其与 p53、p16<sup>INK4a</sup> 的直接

联系. 有趣的是, p38 $\delta$  的 shRNA 会大大降低 Ras 诱导的检查点激酶 CHK1/2(checkpoint kinase1/2)的磷酸化水平, 提示 p38 $\delta$  与 Ras 诱导的 DNA 损伤应激之间应当有所关联<sup>[30]</sup>.

在 p38 的下游蛋白中, p38 激活 / 调节的蛋白激酶 PRAK 在 Ras 的 OIS 过程中十分重要. 在小鼠中, PRAK 的缺陷会使 DMBA (dimethoxy benzaldehyde)诱导的 Ras 激活产生皮肤乳头状瘤的衰老现象得到缓解<sup>[33]</sup>. 进一步的研究发现, 在 Ras-p38 信号通路中, PRAK 可以被激活并且直接磷酸化 p53 的 Ser37 位点, 还可以通过某种未知的途径抑制转录因子 E2F 的释放来造成周期阻滞的效果<sup>[33]</sup>. 此外, Zheng 等<sup>[34]</sup>发现乙酰转移酶家族蛋白 Tip60 (HIV-1 tat interactive protein, 60 ku) 与 p38、PRAK 的翻译后修饰以及参与 Ras 诱导的细胞衰老相关. 更加深入的研究发现, p38 在被 Ras 激活之后会通过磷酸化 Tip60 的 Thr158 位点激活其乙酰转移酶的活性, 随后 Tip60 和 PRAK 发生相互作用, 乙酰化 PRAK 的 Lys364 位点并且提高 PRAK 的激酶活性<sup>[34]</sup>.

## 2 Ras 可以通过非依赖 p53 的途径产生 OIS

尽管 Ras 的 OIS 主要是通过其下游的 MAPK 信号通路引起 p53 的激活从而产生细胞衰老, 但有时候 Ras 会通过其他途径来诱导细胞衰老的产生, 如上文中提到的 Ras 激活 p16<sup>Ink4a</sup> 从而引起 OIS 就是其中的一种. 归根结底, 这种诱导衰老的方式与 Ras-MAPK-p53 通路有着千丝万缕的密切关联. 然而, 近期研究表明, Ras 可能存在新型的与上述通路关联较小的诱导衰老方式, 我们将其归纳为非依赖 p53 途径产生的 OIS.

### 2.1 Ras 通过 C/EBP $\beta$ 相关途径产生 OIS

Ras 非依赖 p53 途径产生 OIS 的方式, 主要与转录因子 CCAAT/Enhancer 结合蛋白  $\beta$ (C/EBP $\beta$ )相关. 早在 2008 年, Kuilman 等<sup>[12]</sup>发现, OIS 的产生总是伴随着炎症因子转录组的激活, 并且衰老细胞会以旁分泌的方式释放出炎症因子 IL-6(Interleukin 6). IL-6 的敲除会废除炎症因子的信号网络并且使 OIS 的细胞失去维持衰老表型的能力. 进一步的研究发现, IL-6 在 OIS 过程中的表达是受到 C/EBP $\beta$  调控的, 并且 IL-6 能够和 C/EBP $\beta$  协同, 进一步放大炎症因子的信号. 随后, 人们又发现 C/EBP $\beta$  的不同蛋白分型会在 OIS 的过程中作用不同. Atwood 和 Sealy<sup>[35]</sup>发现, 能够上调 IL-6 的主要

C/EBP $\beta$  亚型是 C/EBP $\beta$ 1, 并且如果在初级细胞中过表达 H-Ras<sup>V12</sup>, 细胞会出现衰老的表型, 但是在永生化的 MCF10A 细胞中过表达 H-Ras<sup>V12</sup>, 细胞会发生转化并且伴随着 C/EBP $\beta$  的降解. 这两项研究都在暗示 C/EBP $\beta$  在 Ras 的 OIS 过程中的重要作用.

近年来, 研究人员发现一条 Arf-Egr-C/EBP $\beta$  通路 with Ras 诱导的衰老相关. Salotti 等<sup>[36]</sup>发现, 在缺失 Arf 的永生化的细胞系 NIH3T3 细胞中, 表达 H-Ras<sup>V12</sup> 后会引起 C/EBP $\beta$  的下调, 并且细胞会进行转化而不会发生 OIS 过程. 在这种细胞(3T3<sup>Ras</sup>)中重新表达 Arf 会恢复 C/EBP $\beta$  的表达水平. 进一步的研究发现, 血清诱导的早期生长应激蛋白 Egr (early growth response)家族的成员同样会在 3T3<sup>Ras</sup> 中的表达有所下调, 并且 Egr 的亚型蛋白 Egr1/2/3 会识别 C/EBP $\beta$  启动子上的不同位点, 并在血清刺激后与这些位点产生短暂的相互作用并调控诱导 C/EBP $\beta$  转录和产生. 更加有趣的是, Ras 在 p19Arf<sup>-/-</sup> 的 MEF 细胞中表达既能降低 Egr 蛋白的表达水平, 又减少了其与 C/EBP $\beta$  启动子结合的活性, 使得 C/EBP $\beta$  的表达水平下调, 从而不能产生 OIS, 但是在 WT 的 MEF 细胞中并没有发生该现象<sup>[36]</sup>. 以上的研究说明, Arf 的存在对于 Egr 诱导 C/EBP $\beta$  表达进而诱导 OIS 至关重要. 当 Arf 缺失或者沉默时, 这种诱导 OIS 的途径便不复存在, 从而使得 Ras 可以对细胞进行转化作用. 以目前的研究现状来看, Arf-Egr-C/EBP $\beta$  诱导产生 OIS 的途径, 与 Arf 抑制 MDM2 从而稳定 p53 的研究结论有着较大的区别, 并且还没有发现其中的直接关联.

### 2.2 Ras 通过 ROS-PKD1-炎症因子通路形成 SASP 维持衰老表型

在前言中, 我们曾经提到了 ROS 对于 Ras 诱导衰老的作用. ROS 的下游信号十分复杂, 人们对于其在 OIS 过程中的具体作用所知甚少. 主流观点认为, ROS 通常通过 DNA 损伤激活 p53 从而参与到 Ras 的 OIS 过程中, 然而, 一项最新的研究表明, ROS 同样有着 p53 非依赖的途径参与到 Ras 的 OIS 过程中. Wang 等<sup>[37]</sup>发现, Ras 的 OIS 过程会激活 PKD1(protein kinase D1), 活化的 PKD1 通过调节 NF- $\kappa$ B 的活性诱导炎症因子 IL-6、IL-8 的产生, 这一过程与 SASP 的形成密切相关. 进一步的研究表明, Ras 是通过 ROS- PKC $\delta$ (protein kinase C $\delta$ )通路来激活 PKD1 的. 上述研究展示了 ROS 在

Ras 诱导衰老过程中作用的新机制，并暗示通过 ROS 的非依赖 p53 的途径入手进行 OIS 研究可能

会有更多的新发现.

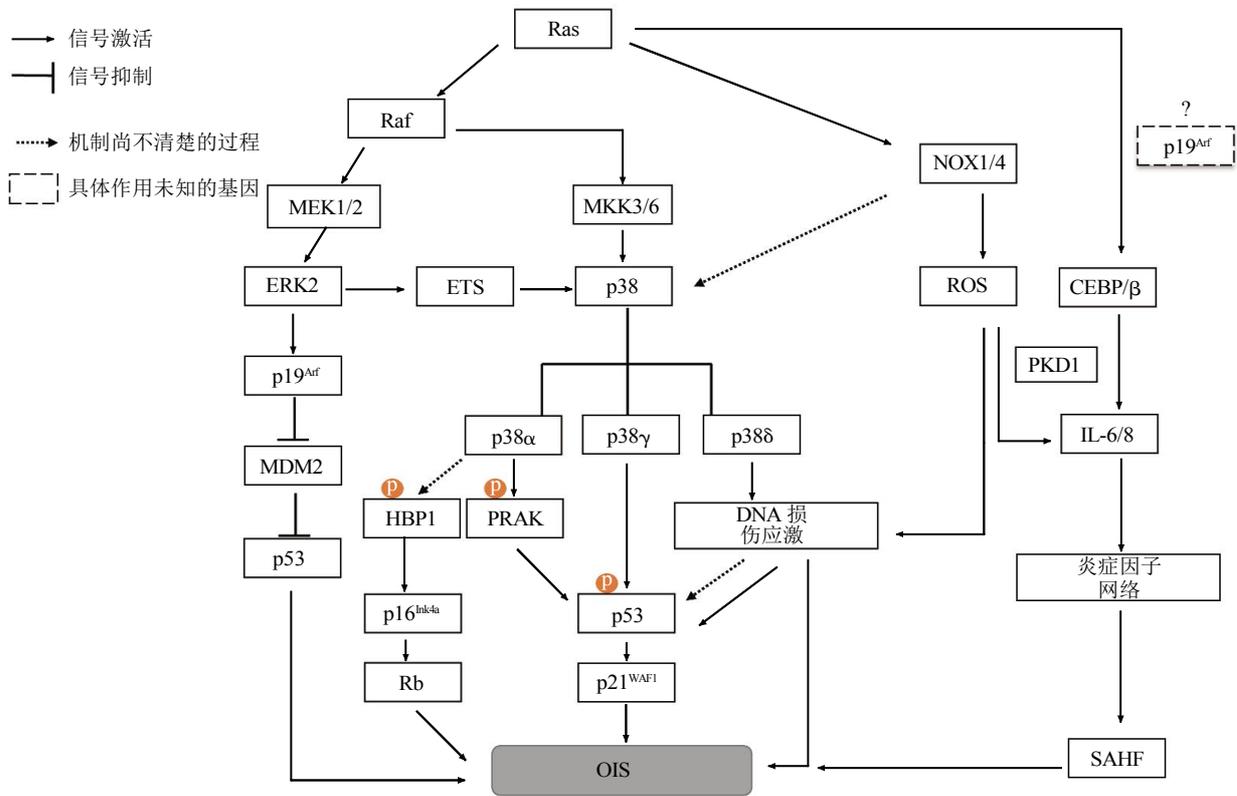


Fig. 2 Pathway of oncogene Ras induced cell senescence

图 2 原癌基因 Ras 诱导的 OIS 通路

原癌基因 Ras 主要通过下游的 Raf-MEK-ERK 通路以及 Ras-p38MAPK 通路激活 p53(有时候也激活 p16<sup>Ink4a</sup>)来诱导衰老。其中，p38 蛋白的不同亚型通过磷酸化并激活下游信号分子(HBPI、PRAK、p53)来诱导衰老。另外，Ras 通过 C/EBP $\beta$ -炎症因子、Arf-Egr-C/EBP $\beta$  途径也可以引起 OIS 的产生。需要注意的是，Ras-ROS 同样是诱导衰老产生的重要途径。由于 p38 $\delta$  引起的 DNA 损伤应激与 p53 的关系未知，故将其同 ROS 引起的 DNA 损伤应激区分标注。

### 3 Ras 激活的细胞逃逸衰老的方式简介

尽管细胞内有着 OIS 这样的抑制肿瘤的天然防御屏障的存在，一些细胞仍然能够完成恶性转化过程，导致肿瘤时有发生。提示在肿瘤细胞形成和发展过程中，原癌基因可以通过抑制诱发 OIS 的关键因子，如 p53、Arf、Rb 等，来使细胞逃逸 OIS 的过程。下文介绍几种 Ras 激活的细胞逃逸衰老的方式。

#### 3.1 K-Ras 通过抑制 p53 的活性逃逸衰老

在野生型的 p53 具有活性的情况下，Ras 的激活并不能够诱导细胞的转化过程<sup>[2, 38]</sup>。但是在人类癌症组织和细胞系中，K-Ras 常常能够同野生型的

p53 共存<sup>[39-40]</sup>，甚至在小鼠模型中，生理水平上的 K-Ras 表达在完整的 p53 系统存在的情况下依然能够引起腺癌的发生<sup>[41]</sup>。这些现象暗示 K-Ras 与其他 Ras 分型(N-, H-Ras)相比具有独特的功能。然而，三种 Ras 的分型在激活 MAPK- 信号通路或者促进细胞转化的能力上并没有太大区别<sup>[42]</sup>，这说明 K-Ras 可能是通过一些尚未明确的通路来抑制 p53 完成细胞转化过程。

Lee 等<sup>[43]</sup>通过研究发现，突变 K-Ras 通过诱导 ATR(ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related)的产生来稳定转录抑制剂 Snail，Snail 可以和 p53 结合从而降低 p53 表达，使 p53 失去功能。但是 Snail 的这种功能目前来看是通过一种转录非依赖

的机制实现的. 随后 Lee 等还对能够抑制 Snail-p53 结合的抑制剂进行了筛选, 并找出了槲皮素(querctetin)等 3 种化合物. 当使用 Snail-p53 结合的抑制剂时, p53 的表达水平和转录活性都有明显的上升<sup>[43]</sup>. 这一研究结果在一定程度上解释了为什么在一些癌症中突变的 K-Ras 可以同野生型的 p53 共存, 并且 Snail-p53 的结合可能作为治疗此种类型癌症的一个新型靶点去研究.

当前研究的主流观点认为, Ras 有 3 条主要的下游信号通路, 分别是 Ras-Raf-MAPK 信号通路、Ras-PI3K-AKT 通路和 Ras-Ral (ras related GTP binding protein) 信号通路. 在这 3 条通路中, Ras-PI3K-AKT 通路对有 Ras 的 OIS 有抑制作用<sup>[44]</sup>, Ras-Raf-MAPK 通路是 Ras 产生 OIS 的主要通路, 然而对于 Ras-Ral 信号通路在 OIS 中的作用所知甚少. 那么突变的 K-Ras 抑制 p53 的功能是否有可能通过 Ras-Ral 通路来执行呢? Tecleab 等<sup>[45]</sup>研究发现, 在同时含有突变的 K-Ras 和野生型 p53 的人类癌细胞中, K-Ras 和 RalB(在一小部分细胞中是 RalA)的表达对于维持 p53 蛋白处于较低水平是必需的. 并且 RalB(某些情况下是 RalA)对于突变的 K-Ras 引起的转化以及对 p53 功能的抑制都具有十分重要的作用. 然而, 对于 RalB 抑制 p53 功能的具体机制仍然有很多疑问, 需要进一步的研究解决.

### 3.2 Ras 通过失活 C/EBP $\beta$ 逃逸衰老

Ras 除了通过抑制 p53 的功能和表达来逃逸衰老, 使 C/EBP $\beta$  失活也是一种很有可能存在的 Ras 逃逸衰老的方式. 在上文 2.1 中已经提到过 C/EBP $\beta$  与炎症因子和 Arf-Egr-C/EBP $\beta$  与 OIS 之间密切相关, 并且有证据表明, 在小鼠的 MEF 细胞和人类的成纤维细胞中 H-Ras<sup>V12</sup> 的表达会引起 C/EBP $\beta$  的上调并引起衰老, 而在经过 Ras 转化的 NIH 3T3 细胞中 H-Ras<sup>V12</sup> 的表达会在蛋白质和 mRNA 水平上下调 C/EBP $\beta$ <sup>[46]</sup>, 并且在人类乳腺上皮系 MCF10A 中引入 Ras<sup>V12</sup> 的表达时, 也会引起 C/EBP $\beta$ 1 的降解<sup>[35]</sup>. 这些结果暗示下调蛋白质水平或者抑制 C/EBP $\beta$  的功能也是一种可能的 Ras 逃逸 OIS 的方式.

## 4 讨论与展望

Ras 作为在人类癌症中最常突变的原癌基因之一, 自从被发现以来, 一直是研究热点. 多年来的研究证据表明, OIS 是一种重要的肿瘤抑制机制, 它能够在活体中恶性转化的起始阶段抑制肿瘤进展

的发生<sup>[4]</sup>. 在大多数的 OIS 过程中, 癌基因的信号会最终通过 p53/p21<sup>WAF1</sup> 或是 p16<sup>Ink4a</sup> 来诱导细胞的衰老. 在本文中, 我们详细介绍了 Ras 通过 Ras-Raf-MEK-ERK 通路以及 Ras-p38MAPK 通路激活 p53(有时候也激活 p16<sup>Ink4a</sup>)来诱导衰老的分子机制. 当然, Ras 激活 p53 的新效应分子也不断被发现, 如 Ras 会诱导 NORE1A(也称 RASSF5, Ras association RalGDS/AF-6 domain family member 5) 和 HIPK2(homeodomain interacting protein kinase 2) 复合体的产生, 通过减少 p53 的磷酸化并增加 p53 的乙酰化来放大 p53 促衰老的功能, 并抑制 p53 促凋亡的功能<sup>[47]</sup>. 同时, p53/p16<sup>Ink4a</sup> 并不是 Ras 诱导衰老永恒不变的途径. Ras 通过 C/EBP $\beta$ -炎症因子<sup>[12]</sup>、Arf-Egr-C/EBP $\beta$  途径也可以引起 OIS 的产生<sup>[36]</sup>(图 2). 值得注意的是, 仅仅激活这些衰老的效应分子有时候并不足以引起不可逆转的衰老表型, 这些衰老表型的维持可能需要一些额外的机制, 如 DNA 损伤应激反应<sup>[5-7]</sup>、衰老相关的异染色质灶(SAHF)所引起的染色质的重塑<sup>[10-11]</sup>、衰老相关的分泌表型(SASP)<sup>[10-14]</sup>等机制都与不可逆转的周期阻滞以及 OIS 表型的维持相关联. 从以上研究结论中不难发现, OIS 并非是一个简单的、线性的过程, 而是一种十分复杂的信号网络, 并且非常依赖于所处的环境. 利用不同的细胞系进行研究时, 得到的结果也大为不同. 尽管如此, 逐步揭示 Ras 诱导 OIS 的分子机制, 有助于人们更加深入地理解这一肿瘤抑制途径的本质, 并且在研究过程中, 可能会发现一些新型的靶点并且为相关癌症的治疗提供便利. 例如, Schick 等<sup>[48]</sup>通过使用 MEK 抑制剂曲美替尼(trametinib)与放疗结合的方式, 发现曲美替尼可以通过 G1 期阻滞以及诱导衰老的方式, 来增强含有 Ras 或者 BRAF 突变的黑色素瘤细胞放疗的敏感性. 这一研究成果对于癌基因诱导的衰老在临床治疗上的应用提高了新的思路.

在基因组较为完整的细胞系中, Ras 的表达会引起 OIS 进而阻止 Ras 对细胞的转化过程. 然而, Ras 也存在一些方式可以逃逸(bypass)衰老, 从而发生恶性转化和肿瘤生成的过程. 从理论上讲逃逸衰老过程中一些引发 OIS 的分子需要被抑制, 如 p53/p16<sup>Ink4a</sup>、C/EBP $\beta$  等. 一些文章中阐述了几种可能的 Ras 激活细胞逃逸衰老的方式, 其中有 p53 相关的衰老逃逸方式, 如 Ras 通过 Snail 与 p53 结合并抑制 p53 的活性<sup>[43]</sup>, Ras 通过下游的 Ral 信号通路来抑制 p53 来逃逸衰老<sup>[45]</sup>. 也有与 p53 没有密切

关联而与 C/EBP $\beta$  的降解相关的克服衰老表型的机制<sup>[35-36]</sup>。尽管如此, 以上大部分逃逸衰老的研究成果都与 K-Ras 的突变相关, 而 Ras 蛋白的另外 2 种亚型 N-, H-Ras 逃逸衰老的相关机制研究较少。这暗示, 虽然 3 种 Ras 的亚型蛋白在激活其 MAPK 等下游信号的强度上差别不明显<sup>[42]</sup>, 但是在对细胞进行恶性转化的过程中, 所起的作用以及所需要的细胞环境还是有差别的。这说明逃逸衰老也是一个依赖于细胞遗传背景以及原癌基因类型的机制。

需要指出的是, 除了本文描述的几种途径之外, Ras 还有其他方式可以诱导 OIS 的产生以及逃逸衰老。例如, 有文献报道, PPAR $\beta/\delta$ (peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$ ) 也与 H-Ras 诱导的 OIS 相关<sup>[49-50]</sup>。再比如, 研究发现 BRG1(BRM/SWI2-related gene)对于 Ras 的 OIS 过程中 SAHF 的产生和衰老表型的维持是必需的<sup>[51]</sup>。通过本文的描述, 我们不难看出, 癌基因逃逸衰老的方式和引发 OIS 的机制息息相关, 甚至有可能是同一条通路的激活和抑制所产生的。通过研究转化细胞逃逸 OIS 的方式, 不仅能够从相反的层面上让我们对 OIS 的过程有更加深入的理解, 而且有助于新型癌症治疗方法的产生。设想, 如果我们能够重新抑制癌细胞逃逸 OIS 的机制, 是否意味着癌细胞会重新被生长抑制从而获得衰老的表型? 诚然, 不论是 Ras 的 OIS 机制, 还是 Ras 激活细胞逃逸衰老的机制, 目前还有很多空白处未能填补, 例如上文提到的 p38 $\delta$  与 DNA 损伤应激是否与 p53 有所联系, RalB 是否通过某种途径与 Snail 产生关联从而抑制 p53 等。而填补这些空缺可能会极大地丰富人们对于癌症发生以及天然抑制肿瘤机制的认识, 也能够为 Ras 突变肿瘤的治疗提供更多的靶点。

### 参 考 文 献

- [1] Hayflick L. Living forever and dying in the attempt. *Experimental Gerontology*, 2003, **38**(11-12): 1231-1241
- [2] Serrano M. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997, **88**(5): 593-602
- [3] Athena W, Lin L V A. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & Development*, 1998, **12**(19): 3008-3019
- [4] Courtois-Cox S, Jones S L, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 2008, **27**(20): 2801-2809
- [5] Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 2006, **444**(7119): 633-637
- [6] Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 2006, **444**(7119): 638-642
- [7] Lee A C, Fenster B E, Ito H, *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274** (Issue of March 19): 7936-7940
- [8] Kodama R, Kato M, Furuta S, *et al.* ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2013, **18**(1): 32-41
- [9] Yang M, Haase A D, Huang F K, *et al.* Dephosphorylation of tyrosine 393 in argonaute 2 by protein tyrosine phosphatase 1B regulates gene silencing in oncogenic RAS-induced senescence. *Molecular Cell*, 2014, **55**(5): 782-790
- [10] Adams P D. Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene*, 2007, **397**(1-2): 84-93
- [11] Freund A, Orjalo A V, Desprez P Y, *et al.* Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*, 2010, **16**(5): 238-246
- [12] Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld L C, *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 2008, **133**(6): 1019-1031
- [13] Acosta J C, O'loghlen A, Banito A, *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 2008, **133** (6): 1006-1018
- [14] Wajapeyee N, Serra R W, Zhu X, *et al.* Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*, 2008, **132**(3): 363-374
- [15] Xue W, Zender L, Miething C, *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 2007, **445**(7128): 656-660
- [16] Krizhanovsky V, Yon M, Dickins R A, *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 2008, **134** (4): 657-667
- [17] Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*, 2012, **24** (4): 835-845
- [18] Freund A, Patil C K, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO Journal*, 2011, **30**(8): 1536-1548
- [19] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 2011, **11**(11): 761-774
- [20] Buhman G, Holzapfel G, Fetis S, *et al.* Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(11): 4931-4936
- [21] Scheffzek K, Ahmadian M R, Kabsch W, *et al.* The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, 1997, **277**(5324): 333-338

- [22] Forbes S A, Bindal N, Bamford S, *et al.* COSMIC: mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39**(Database issue): D945–950
- [23] Brown C J, Lain S, Verma C S, *et al.* Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nature Reviews Cancer*, 2009, **9**(12): 862–873
- [24] Honda R, Yasuda H. Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO Journal*, 1999, **18**(1): 22–27
- [25] Karnoub A E, Weinberg R A. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2008, **9**(7): 517–531
- [26] Junttila M R, Karnezis A N, Garcia D, *et al.* Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours. *Nature*, 2010, **468**(7323): 567–571
- [27] Shin J, Yang J, Lee J C, *et al.* Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. *Cellular Signalling*, 2013, **25**(12): 2540–2547
- [28] Wang W, Chen J X, Liao R, *et al.* Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, **22**(10): 3389–3403
- [29] Kwong J, Hong L, Liao R, *et al.* p38alpha and p38gamma mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**(17): 11237–11246
- [30] Kwong J, Chen M, Lv D, *et al.* Induction of p38delta expression plays an essential role in oncogenic ras-induced senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, **33**(19): 3780–3794
- [31] Xiu M, Kim J, Sampson E, *et al.* The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, **23**(23): 8890–8901
- [32] Li H, Wang W, Liu X, *et al.* Transcriptional factor HBP1 targets P16 (INK4A), upregulating its expression and consequently is involved in Ras-induced premature senescence. *Oncogene*, 2010, **29**(36): 5083–5094
- [33] Sun P, Yoshizuka N, New L, *et al.* PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*, 2007, **128**(2): 295–308
- [34] Zheng H, Seit-Nebi A, Han X, *et al.* A posttranslational modification cascade involving p38, Tip60, and PRAK mediates oncogene-induced senescence. *Molecular Cell*, 2013, **50** (5): 699–710
- [35] Atwood A A, Sealy L. Regulation of C/EBPbeta1 by Ras in mammary epithelial cells and the role of C/EBPbeta1 in oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 2010, **29**(45): 6004–6015
- [36] Salotti J, Sakchaisri K, Tourtellotte W G, *et al.* An Arf-Egr-C/EBPbeta pathway linked to ras-induced senescence and cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 2015, **35**(5): 866–883
- [37] Wang P, Han L, Shen H, *et al.* Protein kinase D1 is essential for Ras-induced senescence and tumor suppression by regulating senescence-associated inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(21): 7683–7688
- [38] Yaswen P, Campisi J. Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry. *Cell*, 2007, **128**(2): 233–234
- [39] Leslie A, Norman R, Pratt K G, Sales M, *et al.* Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Research*, 2003, **63**(15): 4656–4661
- [40] Tuveson D A, Shaw A T, Willis N A, *et al.* Endogenous oncogenic K-rasG12D stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell*, 2004, **5**(4): 375–387
- [41] Konishi H, Karakas B, Abukhdeir A M, *et al.* Knock-in of mutant K-ras in nontumorigenic human epithelial cells as a new model for studying K-ras mediated transformation. *Cancer Research*, 2007, **67**(18): 8460–8467
- [42] Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1998, **8**(1): 49–54
- [43] Lee S-H, Lee S-J, Jung Y S, *et al.* Blocking of p53-snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia*, 2009, **11**(1): 22–IN26
- [44] Kennedy A L, Morton J P, Manoharan I, *et al.* Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Molecular Cell*, 2011, **42**(1): 36–49
- [45] Tecleab A, Zhang X, Sebti S M. Ral GTPase down-regulation stabilizes and reactivates p53 to inhibit malignant transformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(45): 31296–31309
- [46] Zhu S, Yoon K, Sterneck E, *et al.* CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(1): 207–212
- [47] Donninger H, Calvisi D F, Barnoud T, *et al.* NORE1A is a Ras senescence effector that controls the apoptotic/senescent balance of p53 *via* HIPK2. *The Journal of Cell Biology*, 2015, **208**(6): 777–789
- [48] Schick U, Kyula J, Barker H, *et al.* Trametinib radiosensitises RAS- and BRAF-mutated melanoma by perturbing cell cycle and inducing senescence. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 2015, **117**(2): 364–375
- [49] Zhu B, Ferry C H, Blazanin N, *et al.* PPARbeta/delta promotes HRAS-induced senescence and tumor suppression by potentiating p-ERK and repressing p-AKT signaling. *Oncogene*, 2014, **33**(46): 5348–5359
- [50] Zhu B, Ferry C H, Markell L K, *et al.* The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) promotes oncogene-induced cellular senescence through repression of endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(29): 20102–20119
- [51] Tu Z, Zhuang X, Yao Y G, *et al.* BRG1 is required for formation of senescence-associated heterochromatin foci induced by oncogenic RAS or BRCA1 loss. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, **33**(9): 1819–1829

## Current Advances of Ras Induced Senescence and The Bypass Mechanism\*

GUO Yu-Sheng, ZHANG Ru-Yi, JIA Shu-Ting, LUO Ying\*\*

(Laboratory of Molecular Genetics of Aging & Tumor, Faculty of Medicine,  
Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract** Oncogene induced cell senescence is an important tumor suppressor mechanism *in vivo* and *in vitro*. Ras is one of the most frequently mutant oncogene in human cancers. However, Ras induced cell transformation and malignization happened sometimes even under the supervision of OIS, which implicated Ras may obtained some pathways to bypass OIS. This article took Ras signal pathway as the main clue, to summarize the key molecules involved in OIS progression induced by Ras and some potential OIS overcome mechanism of Ras.

**Key words** Ras, p53, Rb, OIS, MAPK, oncogene-induced senescence

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2016.0095

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31170735, 81460457).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-871-65920753, E-mail: luoyingabc@yahoo.com

Received: April 22, 2016 Accepted: May 16, 2016