

# Ret: 一种受体酪氨酸激酶及其基因突变与疾病

毛建平 孙志贤

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要** RET 是一个在转化中发生重排的原癌基因, 且因此行为而得名. 它编码细胞膜受体酪氨酸激酶, 初步研究表明它介导的信号转导途径较为独特. RET 基因突变与人类 4 种癌症的发生相关: 甲状腺乳头状腺癌存在 RET 基因与其他基因多种重排; 多发性内分泌腺瘤 2 型, 家族遗传甲状腺髓样癌等存在 7 个位点突变; 先天巨结肠疾病与 RET 基因缺失相关. 因此近年来备受关注. 对 Ret 蛋白的结构功能, RET 基因突变对 Ret 蛋白功能的影响及与人类相关疾病的关系作一综述.

**关键词** 受体酪氨酸激酶, RET 原癌基因, 突变, 疾病

**学科分类号** Q78

1985 年 Takahashi 利用人淋巴瘤细胞 DNA 转化 NIH3T3 细胞, 分析转化子细胞, 发现一个新基因, 它因与其他基因重排而活化<sup>[1]</sup>. 因为在转化中发生重排 (rearranged during transfection), 将它命名为 RET 基因. 研究表明, RET 原癌基因编码细胞跨膜糖蛋白 Ret, Ret 是受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 家族的一个新成员. 本文对 RET 基因结构, Ret 蛋白介导的信号转导途径及可能的生理功能, RET 基因突变与人类几种疾病的关系, 及近年在研究 RET 与辐射所致甲状腺癌发生相关的分子机理作一介绍.

## 1 RET 原癌基因和 Ret 蛋白

RET 原癌基因位于常染色体 10q11.2, 含 20 个外显子, 全长约 60kb<sup>[2]</sup>, 其内含子 1 序列长 24 kb. 人神经瘤细胞转录 RNA 在外显子 20 可变剪接后, 产生 5 种 mRNA 分子, 分别为 7.0、6.0、4.6、4.5 和 3.9 kb. 其中 7.0、4.5 和 3.9 kbRNA 编码 1 072 个氨基酸的 Ret 肽链, 而 6.0 和 4.6 kb 的 RNA 编码 1 114 个氨基酸的 Ret 多肽, 分子质量分别为

117 ku, 122 ku; 两个蛋白质部分糖基化后分子质量为 150 和 155 ku, 不能整合到细胞膜; 完全糖基化后分子质量为 170 和 175 ku, 则具备细胞膜受体功能<sup>[3]</sup>. 迄今发现 3 种 Ret 同型蛋白, 它们的 N 端 1 063 个氨基酸均相同, C 端各有 9 个、43 个或 51 个氨基酸 (图 1), 因此分别命名为 RET9, RET43 和 RET51<sup>[4]</sup>.

Ret 蛋白的信号肽由 28 个氨基酸组成, 成熟蛋白 N 端的疏水序列结合受体分子; 胞外区含 608 个氨基酸, 第 636~657 位 22 个氨基酸组成跨膜结构, 此区域富含 Cys, 它在配体结合后介导 Ret 二聚体化. 第 713 位氨基酸的编码位点是基因重排位点; 胞内第 726~999 位氨基酸组成酪氨酸激酶结构, 为典型 TK 结构 (图 1).

Ret 胞外区与 RTK 分子如 EGF、PDGF 等无同源性, 且在胞外中段有独特的类钙粘着蛋白 (cadherin-like) 结构, 由 110 个氨基酸组成, 与钙粘着蛋白有 30% 的同源性 (图 1); 钙粘着蛋白是依赖  $\text{Ca}^{2+}$  介导细胞相互作用的粘附分子, 目前对 Ret 此结构的功能还不了解<sup>[5]</sup>.

收稿日期: 1997-08-25, 修回日期: 1997-12-29

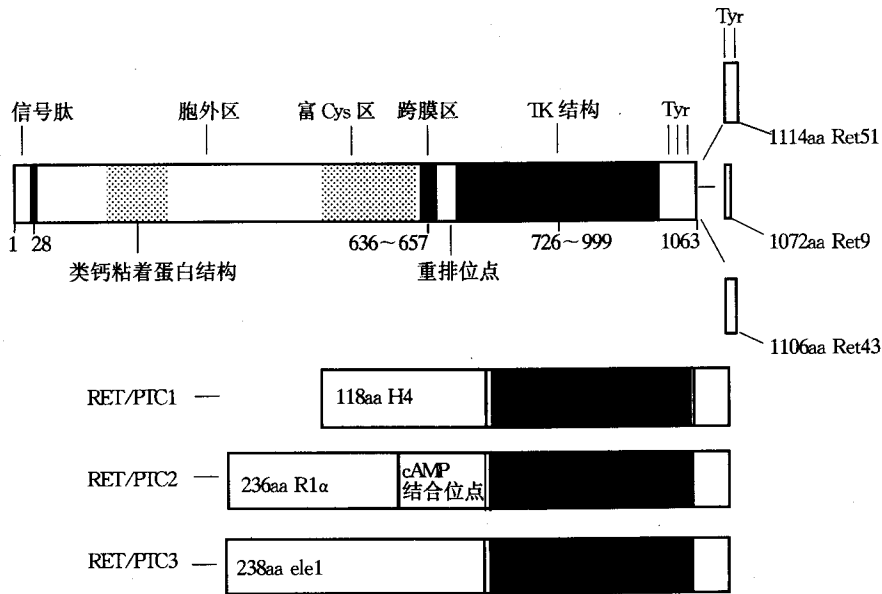


图 1 三种 Ret 蛋白结构和三种 RET 基因重排蛋白产物<sup>[6,7]</sup>

## 2 Ret 蛋白的功能

### 2.1 Ret 介导的信号转导

与许多单一跨膜受体一样, Ret 蛋白调节细胞的生长、分化. 在配体诱导下二聚体化, 两单体交叉使各自的酪氨酸残基磷酸化, 而后磷酸酪氨酸序列结合含 SH<sub>2</sub> 结构的底物分子, 使底物分子磷酸化, 将信号传导至下游, 进一步诱导细胞反应. Ret 高度保守的 TK 区 Gly-X-Gly-X-X-Gly-X- (Lys) 序列作为结合 ATP 分子-酪氨酸残基磷酸化的磷酸基团供体. Ret 被激活后结合 RAS 调节途径的适配子 SHC 并使之磷酸化; 使 RAS-GAP-相关蛋白质 P62 和 P190 磷酸化, GTP-RAS 复合物增加, 也导致 RAS 活化. 但是, Ret 能使 PLC $\gamma$  磷酸化和激活, 使磷酸酰肌醇二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 降解, 不导致磷脂酰肌醇-3-激酶活化.

通常 RTKs 的转导途径中 GTP-RAS 复合物增多常常导致 MAP 激酶活化, 然而, 在 Ret 引发的途径中, RAS 和 MAP 激酶的活化之间无相关性. 表明 Ret 介导的信号转导途径较为独特<sup>[5]</sup>.

Ret 蛋白是否结合另一细胞的 Ret 分子,

发生细胞间识别? 其配体是一个其他膜受体或可溶性配体? 目前还不清楚. 三种 Ret 蛋白 C 端结构提供不同的蛋白质磷酸化和底物结合位点, 可能与分子适配子的结合方式略有区别.

最近, Treanor 和 Moore<sup>[8]</sup> 认为 Ret 蛋白的配体可能是胶质细胞衍生神经营养因子 (GDNF), 因为 RET 纯合缺失小鼠与 GDNF 缺失小鼠的表型相同, 这一说法尚待进一步证明.

### 2.2 Ret 的生理功能

在不知道 Ret 配体的情况下, 人们从小鼠和大鼠的胚胎发育和分化组织研究 RET 基因的表达, 以期了解它的受体功能.

原位杂交分析表明小鼠 8.5 d 以后的胚胎, 在周围、中枢神经系统, 排泄系统等都有 RET 表达. 免疫组织化学也显示, 大鼠妊娠第 9 和 11 天之间的胚胎组织 RET 基因 mRNA 大量表达. 妊娠中期第 12.5~14.5 天, 在第四菱脑结节神经嵴细胞和胚肾管细胞、排泄系统有 RET 基因表达; 而且在肾上腺嗜铬祖细胞, 甲状旁腺祖细胞同样存在 RET 基因高转录活性. 成年大鼠的脑、胸腺、肺、心、脾、睾丸及小肠中虽有 RET 基因表达, 而在胚胎

中的 mRNA 表达水平高出成年组织约 20~ 50 倍, 从妊娠第 14 天开始降低到成年个体组织的水平.

ret 杂合缺失小鼠后代表现正常, 而其纯合缺失后代出生时表现正常, 但于 16~ 24 h 后死亡, 组织学检查发现肾退化及缺失<sup>[9]</sup>. ret 纯合缺失小鼠的另一个异常是胃肠蠕动缺陷, 吸入的乳汁不能由胃进入小肠, 具有人类巨结肠疾病表型. 组织学分析表明, 从食道至胃、小肠及大肠的肠肌间神经丛的神经元均缺乏.

与动物组织相似, RET 也在人肠神经节细胞、神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤、甲状腺髓样癌、甲状腺 C 细胞和黑素细胞等细胞中表达. 而在其他 25 种人体肿瘤组织中却未检测到, 表明人体组织 RET 基因的表达及其蛋白功能同样具有特异性.

总之, RET 的特异表达及动物实验说明, 作为 RTK, Ret 介导的信号转导, 对调节神经

嵴细胞的增殖、分化、迁移到肠壁, 对肠神经系统的发育, 对肾脏输尿管芽形成及肾组织器官发育, 对神经内分泌系统的发育都起着重要作用. 其功能在 RET 基因突变与人类疾病发生相关的事实中得到了印证.

3 RET 基因突变与人类疾病

3.1 RET 基因重排与甲状腺乳头状腺癌

甲状腺乳头状腺癌 (papillary thyroid carcinomas, PTC) 是典型的甲状腺肿瘤, 占有甲状腺恶性肿瘤的 80%. 1990 年 Grieco 首次报道<sup>[9]</sup>, 初始人乳头状甲状腺瘤和转移淋巴结存在 RET 重排基因, 而病人正常组织却未检测到. 在 4/19 例甲状腺滤泡状腺癌也发现 RET 重排, 而 528 例非甲状腺癌组织无一例发生<sup>[10]</sup>. 意大利、美国、法国和日本的研究分别检出 4/42, 17/101, 8/70 和 2/49 例 PTC 存在 RET 基因重排活化<sup>[5]</sup> (图 1, 表 1).

表 1 RET 基因重排与人类疾病

| RET 重排名称  | RET 重排形式                                        | 人类疾病          |
|-----------|-------------------------------------------------|---------------|
| RET/PTC1  | N 端 118 个氨基酸 (10q21 H4 基因) + RetC 端 400 个氨基酸    | PTC, 辐射诱发 PTC |
| RET/PTC2  | N 端 236 个氨基酸 (17q23 R1a 基因) + RetC 端 400 个氨基酸   | PTC           |
| RET/PTC3  | N 端 238 个氨基酸 (10q11.2E1E1 基因) + RetC 端 400 个氨基酸 | PTC, 辐射诱发 PTC |
| RET/ΔPTC3 | N 端 190 个氨基酸 (10q11.2E1E1 基因) + RetC 端 400 个氨基酸 | 辐射诱发儿童 PTC    |
| RET/PTC4  | N 端 269 个氨基酸 (10q11.2E1E1 基因) + RetC 端 400 个氨基酸 | 辐射诱发 PTC      |

电离辐射诱导 RET 基因重排主要有 RET/PTC1 和 RET/PTC3 形式. 切尔诺贝利核事故辐射尘埃沾染地区甲状腺癌发生呈增长趋势, 年轻 PTC 患者 60% 以上发生 RET 基因重排; 沾染地区儿童甲状腺癌发生, 与此两种形式重排发生成正相关.

体外实验也表明, X 射线照射的人未分化甲状腺细胞株 8505C, 在 50Gy 和 100Gy 照射后, 9 个样品均显示 RET 重排扩增带. X 射线照射纤维瘤细胞 HT1080 也存在类似重排.

RET 重排基因产生的变异 Ret 识别正常 Ret 蛋白的无关配体信号, 引起 Ret 融合蛋白二聚体化, 启动细胞进入有丝分裂, 导致腺细胞无限增殖及恶变.

3.2 RET 基因点突变与 MEN2 和 FMTC

研究发现, 遗传型多发性内分泌腺瘤 2 型 (multiple endocrine neoplasia type 2, MEN2) 包括 MEN2A, MEN2B, 家族遗传甲状腺髓样癌 (familial medullary thyroid carcinomas, FMTC) 组织存在 RET 基因点突变 (表 2).

表 2 几种病例发生胚胎干细胞 RET 基因点突变和缺失举例<sup>[11]</sup>

| (%, 家族数/例数)  |                   |        |                   |                                       |        |        |        |        |                      |
|--------------|-------------------|--------|-------------------|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|----------------------|
| 点突变          | 外显子 10            |        |                   |                                       | 外显子 11 | 外显子 13 | 外显子 14 | 缺失     | 总例数                  |
|              | Cys609            | Cys611 | Cys618            | Cys620                                | Cys634 | Glu768 | Leu804 | Met918 |                      |
| 97% MEN2A 病例 | +                 | +      | +                 | +                                     | +      | -      | -      | -      | -                    |
| MEN2A        | 0.5               | 2      | 9                 | 7                                     | 81     | -      | -      | -      | 205 例                |
| MEN2B        | -                 | -      | -                 | -                                     | -      | -      | -      | 100    | 71 例                 |
| 86% FMTC 病例  | +                 | +      | +                 | +                                     | +      | -      | -      | -      | -                    |
| FMTC         | 3                 | 3      | 44                | 22                                    | 25     | 3      | -      | -      | 32 例                 |
| FMTC         |                   |        |                   |                                       |        | → Asp  | → Val  |        |                      |
| 自发 MTC       | -                 | 4      | -                 | -                                     | -      | 14     |        | 78     | 4 <sup>1)</sup> 28 例 |
| 自发嗜铬细胞瘤      | 17                | -      | -                 | 33                                    | -      | -      | -      | 33     | 17 <sup>2)</sup> 6 例 |
| HSCR         | 3 例 <sup>3)</sup> |        | 5 例 <sup>4)</sup> | 3 例 <sup>3)</sup> / 5 例 <sup>4)</sup> |        |        |        |        | 69 例 289 例           |

+ : 检出; - : 未检出; 1) 含 Cys630 的 6 个密码子缺失; 2) 含 Glu632, Leu633 的 6 个密码子缺失; 3) 无 MEN2, FMTC 并发; 4) 有 MEN2, FMTC 并发.

MEN2 基因约 480 kb 位于 10q11.2 与 RET 原癌基因连锁. RET 基因 Cys 点突变导致 Ret 三维结构破坏, 影响其空间构象; MEN2 的点突变也影响 Ret 的 TK 活性和 Ret 正常信号转导; 或使 Ret 蛋白在无配体介导下直接二聚体化, 引起 TK 活化导致细胞增殖, 癌变. 而存在于 FMTC 的点突变则使 Ret 胞质 TK 结构改变, 降低底物分子结合特异性, 改变信号转导的分子途径, 介导异常底物分子的激活<sup>[6]</sup>.

3.3 RET 基因缺失与先天巨结肠

先天巨结肠 (Hirshsprung, HSCR), 是先天性肠道神经系统疾病. 是在胚胎发育中神经嵴细胞向低位肠道迁移发生障碍造成肠道粘膜下层和后肠肌丛中缺乏副交感神经细胞. HSCR 基因为常染色体显性, 250 kb, 位于 10q11.2, 与 RET 原癌基因连锁. 胚胎干细胞的 RET 基因缺失导致先天巨结肠发生 (表 2), 但也检测到 HSCR 的 RET 在 TK 结构编码区的 3 种点突变, 导致 RetTK 活性丧失. 尽管有人指出 HSCR 发生涉及其他基因, 但与 RET 等位基因纯合缺失小鼠具有人类 HSCR 表型及肾脏发育不全相似, 一个家族发现 HSCR 患者伴有单侧肾脏发育不全. 显然,

Ret 蛋白功能不全影响了肠神经母细胞的增殖、迁移、分化和肾脏发育.

4 结 语

RET 原癌基因是一个新发现的原癌基因, 尤其是它的重排与甲状腺乳头状腺癌的内在关系, 对了解切尔诺贝利核事故后期甲状腺癌发生的机理有所帮助, 更重要的是它可能介导了一种崭新的信号转导途径, 拓展了我们对细胞 RTK 信号转导、细胞增殖分化及死亡规律, 以及细胞生理活性调节的认识, 而且 RET 原癌基因是研究受体酪氨酸激酶变异导致人类疾病的极好模型, 其点突变与 MEN2, FMTC 及 HSCR 与 RET 缺失的关系, 则不但从另一侧面反映 Ret 功能, 还对临床正确诊断自发和遗传 MEN2A, 早期诊断 MEN2B 等疾病有应用价值.

参 考 文 献

1

Takahashi M, Jerome R, Geoffery M. Activation of a novel human transforming gene RET by DNA rearrangement. *Cell*, 1985, **42** (2): 581~ 584

2

Barbara P, Robert M W, Luo Y, *et al.* The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene*, 1995, **11** (9): 1737~ 1743

3

Bunone G, Borello M G, Picetti R, *et al.* Induction of

- RET proto-oncogene expression in neuroblastoma cells preceded neuronal differentiation and is not mediated by protein synthesis. *Exp Cell Res*, 1995, **217** (1): 92~ 99
- 4 Myers S M, Eng C, Ponder B A, *et al.* Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C terminus for RET. *Oncogene*, 1995, **11** (10): 2039~ 2042
- 5 Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, *et al.* Mechanism of activation of the RET proto-oncogene by Multiple Endocrine Neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (3): 1613~ 1618
- 6 Barbara P, Isabella C, Giovanni R. RET mutation in human disease. *Trends in Genetics*, 1996, **12** (4): 138 ~ 142
- 7 Michele G, Massimo S, Maria T B, *et al.* PTC is a novel rearranged form of the RET proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, 1990, **60** (4): 557~ 563
- 8 Treanor J J, Goodman L, de Sauvage F, *et al.* Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature (London)*, 1996, **382** (6586): 76~ 80
- 9 但 凌, 章静波 (Dan L, Zhang J). 一种基因, 四种综合征. 国外医学 (遗传学分册) (Foreign Medical Sciences—Hereditas), 1995, **18** (3): 161~ 162
- 10 Santoro M, Sabino N, Ishizaki Y, *et al.* Involvement of RET oncogene in human tumors: specificity of RET activation to thyroid tumors. *Br J Cancer*, 1993, **68** (3): 460 ~ 464
- 11 Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik E P, *et al.* A new form of RET rearrangement in thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene*, 1996, **13** (5): 1099~ 1102

**Ret: a Receptor Tyrosine Kinase and Its Mutation and Human Diseases.** MAO Jiar-Ping, SUN Zhi-Xian (Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China).

**Abstract** RET proto-oncogene was rearranged during transformation, and so has the name. It encodes a cell membrane receptor tyrosine kinase. In recent years, the possible correlation between human diseases and Ret activation by mutation, such as rearrangement, point mutation, and deletion were studied. Its rearrangement with other gene fragment was frequently found in thyroid papillary carcinoma tissues. Point mutations were detected in multiple endocrine neoplasia 2 and familial medullary thyroid carcinoma. Hirshsprung syndrom may be resulted from its deletion. The structure and possible function of RET gene, its mutation effects to various human diseases were summarized.

**Key words** receptor tyrosine kinase, RET proto-oncogene, mutation, disease

## 微芯片——生命科学领域的新工具

陈亚利<sup>1)</sup> 陆祖宏<sup>1)</sup>

(东南大学国家教委分子与生物分子电子学开放实验室, 南京 210096)

**摘要** 微芯片 (有人称其为生物芯片 biochip) 是用硅、玻璃等材料, 经光刻、化学合成等技术微加工而成的、大小  $1\text{ cm}^2$  左右的芯片. 它可以用来对生物样品进行分离、制备、预浓缩, 还可以作为微反应池进行 PCR (polymerase chain reaction)、LCR (ligase chain reaction) 等反应. 最为吸引人的是, 芯片上制成多种不同的 DNA 阵列, 即可用于核酸序列的测定及基因突变检测. 对微芯片的制作、作用原理、性能及用途等进行了综述.

**关键词** 微芯片, 探针阵列, 分子诊断, 杂交测序, 杂交突变检测

**学科分类号** Q52

<sup>1)</sup> 通讯地址: 南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002.

收稿日期: 1997-09-01, 修回日期: 1998-01-12