



RASSF1A 在细胞自噬及凋亡中的功能*

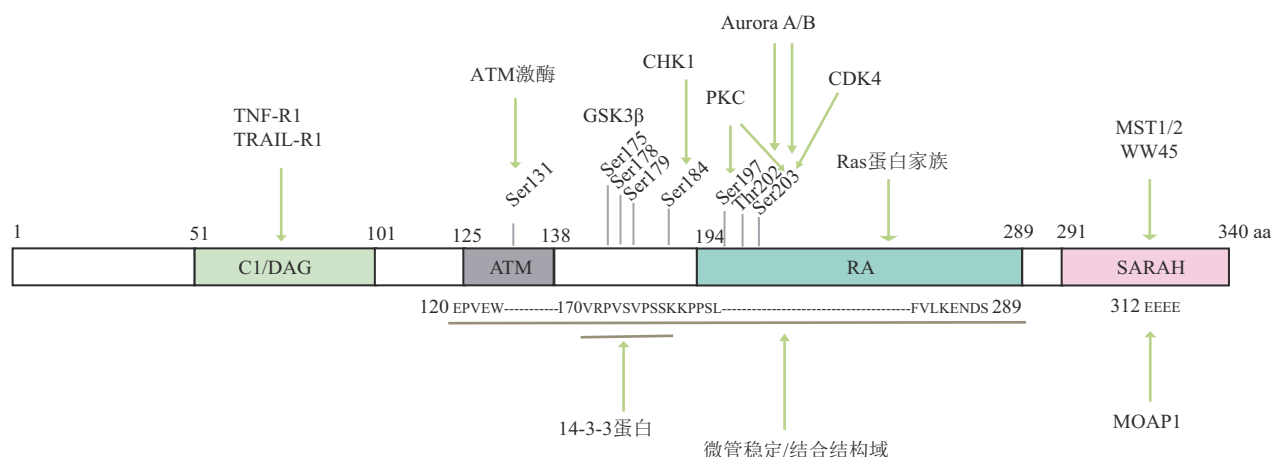
唐 榆^{1,2,3,4)} 周紫娟^{1,2,3,4)} 周快乐⁵⁾ 刘 蕾^{1,2,3,4)} 周策凡^{1,2,3,4)**} 唐景峰^{1,2,3,4)**}⁽¹⁾ 湖北工业大学科技部/教育部细胞调控与分子药物学科“111”引智基地, 武汉 430068;⁽²⁾ 湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室, 武汉 430068; ⁽³⁾ 湖北工业大学工业发酵省部共建协同创新中心, 武汉430068;⁽⁴⁾ 湖北工业大学工业微生物湖北省重点实验室, 武汉 430068; ⁽⁵⁾ 江西贵溪市人民医院外一科, 贵溪 335400)

摘要 肿瘤抑制因子Ras相关结构域家族成员1A (Ras association domain family 1A, RASSF1A) 是Ras超家族蛋白重要的下游效应因子, 具有调控自噬及凋亡的作用。自噬及凋亡是影响机体生存发育的重要生命过程, 其调节紊乱与肿瘤的发生发展密切相关。本文针对RASSF1A对自噬及凋亡的调节机制及其与肿瘤发生发展之间的关系展开综述, 分析翻译后修饰对于RASSF1A调节自噬及凋亡过程中功能切换的作用, 探讨自噬及凋亡在肿瘤发生中的调节作用, 以期RASSF1A启动子高甲基化型肿瘤的治疗提供新思路。

关键词 RASSF1A, 凋亡, 自噬, 肿瘤**中图分类号** Q291, R73**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0560

Ras超家族蛋白是细胞内一类重要的小GTP酶, 其家族成员在细胞凋亡、衰老、增殖等方面都发挥着重要的调节作用。RASSF家族蛋白是Ras超家族重要的下游效应因子, 其由RASSF1~RASSF10等含有RA结构域的蛋白质组成^[1]。根据RA结构域分布的位置差异, 可以将该家族划分为C端

(RASSF1~RASSF6)和N端(RASSF7~RASSF10)两类, 其中RASSF1(图1)是该家族主要的研究重点之一^[2]。RASSF1基因共可编码8种不同的转录本, 其中RASSF1A研究最多、且功能阐述最为清晰, 具有影响自噬及细胞凋亡等生理功能。

**Fig. 1 The schematic representation of the domains of RASSF1A protein****图1 RASSF1A结构示意图**

* 国家自然科学基金(32000523, 32070726)资助项目。

** 通讯联系人。

周策凡 Tel: 15072499253, E-mail: cefan@whu.edu.cn

唐景峰 Tel: 15327240105, E-mail: tangjingfeng@hbut.edu.cn

收稿日期: 2022-12-07, 接受日期: 2023-02-09

自噬是细胞内物质降解再利用的过程,可以有效清除细胞内受损细胞器及错误蛋白质,其与细胞凋亡都是细胞内重要的生物学现象。细胞凋亡是影响机体发育的I型细胞死亡方式,其在清除非必要细胞、维持机体等方面发挥至关重要的作用。与凋亡等细胞死亡方式不同,自噬是细胞在条件刺激下开展的自我拯救、维持生存的方式。自噬及凋亡与肿瘤的关系密切。人们认为自噬可以清除细胞内有害组分防止癌症的发生。但相反,一旦癌症形成,自噬的发生通常会促进肿瘤细胞生长。凋亡对肿瘤的关系也是双面的:一方面,凋亡可以杀死癌变的细胞,抑制肿瘤的发展;另一方面,肿瘤细胞群中的有限细胞凋亡也有可能通过调节肿瘤微环境而促进肿瘤的发展^[3]。目前,肿瘤已是导致中国居民死亡的主要因素之一,探究自噬及凋亡在肿瘤治疗中的作用已被众多研究人员所关注,而国内外尚未有关于RASSF1A调节自噬及凋亡影响肿瘤进展的报道。因此,本文以RASSF1A对自噬及凋亡的调节机制为基础(图2),探讨了其在肿瘤发生中的调节作用,为开发有效的肿瘤治疗手段提供新思路。

1 RASSF1A对自噬及凋亡的影响

1.1 RASSF1A对自噬的调控作用

巨自噬(macroautophagy,下文均统称为自噬)是3种细胞自噬类型之一,主要由Unc-51样自噬活性激酶1(unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)复合体(主要由ULK1-ATG13-FIP200组成)磷酸化下游自噬相关蛋白而启动,而ULK1的激酶活性又受哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)的调节^[4]。自噬启动后,ATG13等蛋白质先聚集形成自噬体前结构,进而招募、组装形成ULK1复合体,而后ATG9等蛋白质激活为吞噬泡的形成提供膜来源,含Beclin-1(哺乳动物中酵母ATG6蛋白的同源物)的第三类磷脂酰肌醇3激酶(PI3 kinase class III, PI3KC3/Vps34)复合物I调节自噬体膜的成核,Beclin-1正向调节PI3KC3的活性,生成磷脂酰肌醇3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P),进而招募更多的自噬相关蛋白用于自噬体生物生成,接着通过两种泛素样偶联途径ATG12-ATG5和ATG8/LC3介导吞噬泡延伸并包裹待降解物^[5],最后吞噬泡向溶酶体转移融合,并进行进一步的降解^[6]。

1.1.1 RASSF1A通过mTORC1通路调节自噬

mTOR是细胞中最主要的丝/苏氨酸激酶之一,可形成mTORC1和mTORC2两种不同的复合体^[7]。mTORC1可被Ras同源物(Ras homolog enriched in brain, Rheb)和蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)等激酶激活^[8]。有研究发现,在RASSF1A敲除的小鼠肝组织以及HeLa细胞中,RASSF1A可以介导哺乳动物STE20样蛋白激酶1(mammalian sterile 20-like kinase 1, MST1)与Akt结合,抑制Akt-mTORC1通路,促进自噬的发生^[9]。Rheb是Ras超家族蛋白中一种小GTP酶,其可以通过调节mTOR丝氨酸残基Ser2448的磷酸化来响应生长因子和营养供应的压力刺激,介导mTORC1的活化^[10-11]。RASSF1A可以与GTP结合态的Rheb结合并抑制Rheb对mTORC1的激活,进而抑制mTORC1的活性,从而激活自噬^[12]。综上所述,RASSF1A可以通过多条途径抑制mTORC1促进自噬的发生。

1.1.2 RASSF1A通过稳定微管运输促进自噬

自噬、细胞信号传导和囊泡运输等细胞功能的实现都涉及与微管相关的货物运输过程。将自噬体转运至溶酶体旁是自噬体清除的重要步骤。微管运输在此过程中占据着不可或缺的地位。研究发现^[9],RASSF1A表达缺失的小鼠其肝组织及其衍生肝细胞中 α 微管蛋白的乙酰化修饰减少,稳定性降低。这说明RASSF1A具有稳定微管的功能。微管相关蛋白1S(microtubule-associated protein 1S, MAP1S)除了可以提高微管稳定性、影响有丝分裂外,还参与调节微管与胞内其他成分的结合^[13]。研究表明,RASSF1A与MAP1S结合,继而通过MAP1S与自噬体膜上微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)的结合招募自噬体到微管上以协助转运,促进自噬的发生^[9]。此外,RASSF1A还可通过MAP1S下调Keap1-Nrf2途径增强A549细胞的自噬水平和化疗敏感性^[14]。虽然这两项研究结果都说明,RASSF1A是可以通过MAP1S促进自噬的发生,但是这两者提出的机制截然不同,这也进一步丰富了RASSF1A所介导的自噬调控通路。

1.1.3 RASSF1A抑制Rho亚家族蛋白影响自噬

Rho家族蛋白是一类重要的与细胞迁移相关的小GTP酶,人类基因组中已知有20种Rho GTP酶基因。Rho亚家族是真核生物中研究最多的Rho家族蛋白之一,其由Ras同源基因家族成员A(Ras

homolog family member A, RhoA)、Ras 同源基因家族成员 B (Ras homolog family member B, RhoB) 和 Ras 同源基因家族成员 C (Ras homolog family member C, RhoC) 组成^[15]。肉毒梭状芽胞杆菌的外切酶 C3 转移酶 (exoenzymec3transferase, C3) 是 RhoA、RhoB 及 RhoC 的特异性抑制剂^[16-17]。有研究表明, 无论是 C3 处理, 还是干扰 HeLa 细胞中 RhoA 的表达, 都可以降低 LC3-II (自噬水平的重要指标) 的蛋白质水平及斑点数量, 抑制自噬^[18]。这说明 Rho 亚家族蛋白都有潜在的自噬调控作用。

RASSF1A 参与 Rho 亚家族蛋白活性的调节, 协调控制其下游信号组件。目前已知关于 RASSF1A 对 RhoA 活性的调控可以通过以下两种不同的途径实现: a. RASSF1A 通过介导 RhoA 的泛素化降解, 抑制其活性; b. RASSF1A 竞争性阻碍 RhoA 效应因子 Rhotekin 与之结合, 从而抑制 RhoA 的活性^[19]。有研究表明, RhoB 可被细胞周期检测点激酶 1 (checkpoint kinase 1, CHK1) 磷酸化^[20], 且该磷酸化修饰可促使 RhoB 从细胞质膜上解离进入细胞质中, 而发生 SUMO 化修饰。SUMO 化修饰后的 RhoB 会与 TSC2 形成复合物, 并将 TSC2 复合物带到溶酶体上, 抑制 Rheb/mTORC1 途径, 引起细胞自噬的发生^[20]。RASSF1A 可以通过抑制人支气管上皮细胞中鸟苷酸交换因子 H1 (GMP exchange factor H1, GEF-H1) (RhoB 的 GDP/GTP 交换因子) 的活性, 导致 RhoB 失活^[21]。因此, RASSF1A 或许可以通过抑制 RhoA 或 RhoB 的活性发挥调控自噬的功能。

1.2 RASSF1A 对细胞凋亡的影响

细胞凋亡是由凋亡基因控制的细胞程序性死亡方式之一。细胞凋亡主要由内在和外在两条“经典”凋亡信号通路组成。内在信号通路可被 DNA 损伤、存活因子缺失等激活, 由 BH3 结构域蛋白, 如 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, BAX)、Bcl-2 同源拮抗剂 (Bcl-2 homologous antagonist/killer, BAK) 等启动。它们在线粒体外膜上形成孔。孔隙的形成导致线粒体功能障碍以及凋亡相关因子的释放^[22], 促进细胞凋亡。外源性凋亡途径由胞外死亡受体接收刺激而启动激活。无论是内源还是外源性凋亡途径, 最终都将激活半胱天冬氨酸水解酶 (cysteine aspartate-specific protease, caspase) 对细胞内蛋白质进行降解, 导致细胞凋亡^[23]。相较于 caspase 介导的细胞凋亡,

细胞内还存在非 caspase 依赖的细胞凋亡途径, 其主要由 Ca^{2+} 、活性氧等诱导, 促进凋亡的发生。

1.2.1 RASSF1A 通过 Hippo 通路调节细胞凋亡

Hippo 通路最初是在黑腹果蝇中被发现, 是一种进化上保守的信号级联反应, 调节包括细胞生长、器官大小控制和凋亡等多个生命过程。RASSF1A 通过调节 MST1/2 的活化驱动细胞发生凋亡。在基础条件下, RASSF1A 使 MST1 保持非活性状态, 而死亡受体的刺激导致 MST1 通过自身磷酸化或支架蛋白 Ras 激酶抑制剂增强器 1 (connector enhancer of kinase suppressor of ras 1, CNKR1) 与 RASSF1A/MST1 复合物的结合而激活, 从而导致 Caspase-3 的激活和凋亡^[24]。激活的 Caspase-3 去除 MST1 的自抑制结构域, 并增加其活性^[25]。剪切后的 MST1 转移到细胞核, 激活 C-Jun N 端激酶 (C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 1, JNK), 并将组蛋白 2B (histone H2B, H2B) 的丝氨酸残基 Ser14 磷酸化, 从而导致染色体凝聚和 DNA 断裂^[26], 这是细胞凋亡最突出的形态学表现。RASSF1A 还可通过另一信号途径促进凋亡。脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, Fas) 是肿瘤坏死因子家族成员之一, 在其刺激下 RASSF1A 解除 Raf-1 对 MST2 的抑制, 增强其 MST2 的激酶活性。同时, RASSF1A 还可以促进 MST2 与其下游激酶大肿瘤抑制基因 1 蛋白 (large tumor suppressor homolog 1, LATS1) 的结合^[27]。但是这种结合的促进并未增加对下游效应因子 YES 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP) 的活化。在 MCF-7 细胞系中, RASSF1A 会阻碍 LATS1 与 YAP 的结合, 并促进 YAP 与 p73/p53 形成复合体, 促进促凋亡基因如 BAX 和 Bcl-2 结合组分 3 (Bcl-2-binding component 3, PUMA) 的转录, 启动凋亡^[27-28]。但 RASSF1A 表达增加并非都促进 YAP 的核定位发生。在 K-Ras 激活突变的小鼠肿瘤中, RASSF1A 表达下调阻断了 K-Ras 对 MST2 的激活, 而促进了 YAP 的核转运^[29]。说明在不同细胞环境下, RASSF1A 通过 Hippo 通路调节细胞凋亡的机制是不一样的。

1.2.2 RASSF1A 结合 MOAP1 促进细胞凋亡

凋亡调节剂 1 (modulator of apoptosis 1, MOAP1) 是一种受泛素-蛋白酶体系统严格调节的 BAX 结合蛋白, 在自噬或细胞凋亡中起关键作用^[30-31]。在细胞外信号刺激下, RASSF1A 可以通过 MOAP1 介导凋亡的发生^[32-33]。在正常条件下,

14-3-3蛋白阻碍RASSF1A与MOAP1的结合。受到肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 等刺激后, RASSF1A与14-3-3蛋白的结合被破坏, MOAP1的C端区域与肿瘤坏死因子- α 受体1 (TNF- α receptor 1, TNF-R1) 的死亡结构域结合, 并招募RASSF1A到复合物中, 进而激活BAX, 促进细胞凋亡^[34]。此外, 在一些癌症中, MOAP1 mRNA表达水平与RASSF1A的表达呈现正相关^[35]。这也进一步说明, MOAP1是RASSF1A调控凋亡通路活性的关键效应因子, RASSF1A和MOAP1的结合可以促进细胞凋亡, 抑制肿瘤形成。

1.2.3 RASSF1A参与DNA损伤介导的细胞凋亡

当DNA损伤时, 细胞启动包括DNA依赖性蛋白激酶及共济失调毛细血管扩张突变蛋白 (ataxia telangiectasia mutated, ATM) 等在内的多种途径来

激活DNA修复、细胞周期阻滞甚至凋亡^[36-38]。有研究发现, DNA损伤发生时, RASSF1A被ATM磷酸化, 并参与MST2和LATS1的激活, 稳定p73蛋白, 促进细胞凋亡^[27, 39-40]。RASSF1A亦可通过增强p53的稳定性调节DNA损伤介导的细胞凋亡。双微体2蛋白 (double minute 2 protein, MDM2) 是一种促进p53降解的E3泛素连接酶。DNA损伤后, RASSF1A通过促进MDM2的自泛素化而阻止p53的降解, 促进凋亡的发生^[41]。有趣的是, RASSF1A的表达又受到p53和死亡域相关蛋白6 (death-domain-associated protein 6, DAXX) 的调节^[42]。p53与RASSF1A启动子结合, 招募DAXX以及DNA甲基转移酶1对其进行DNA甲基化修饰使其表达减低, 由此形成负反馈调节回路, 避免p53的过度激活, 维持细胞内稳定^[42]。

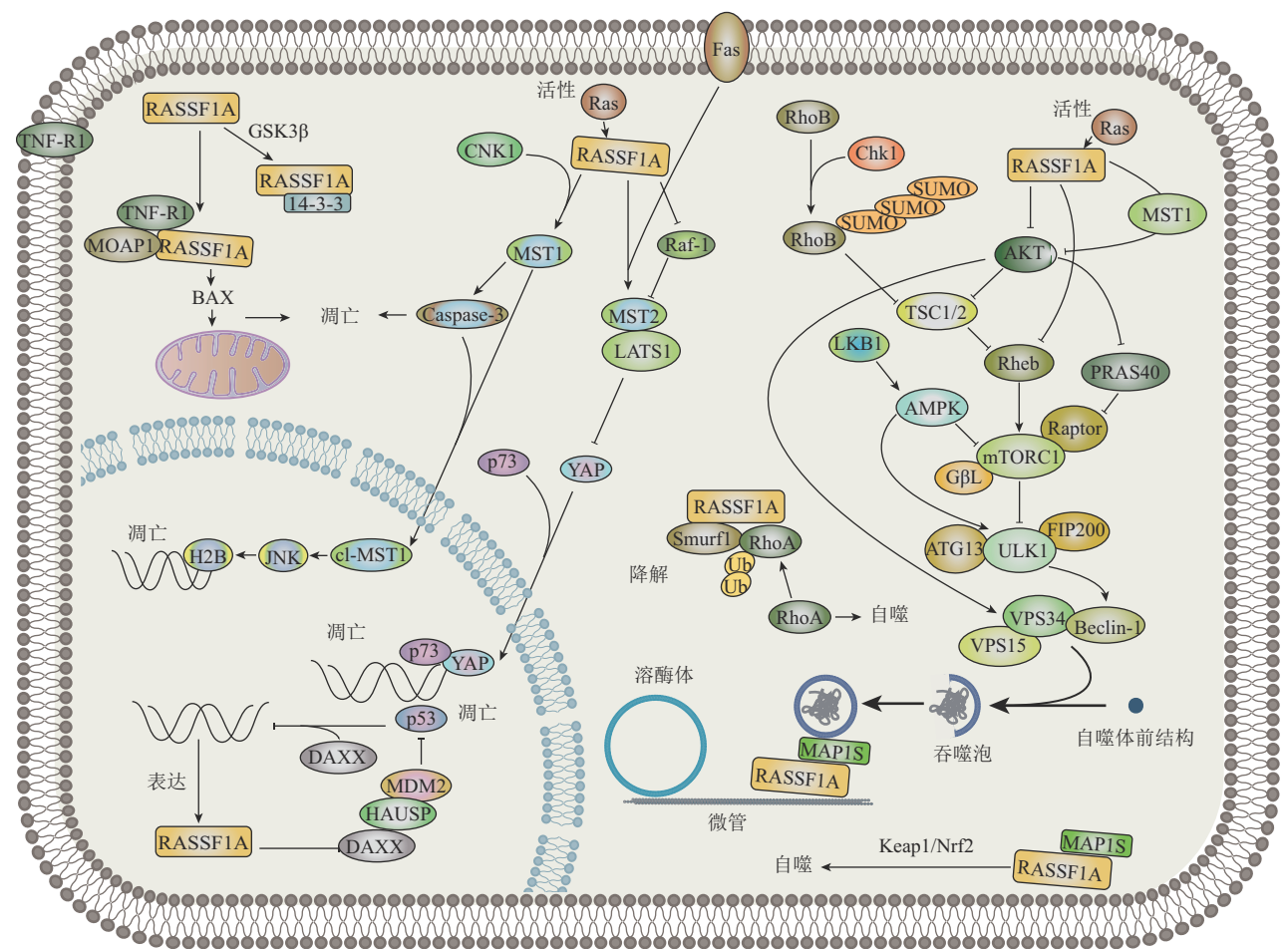


Fig. 2 RASSF1A is involved in the regulation of intracellular autophagy and apoptosis
图2 RASSF1A参与调节细胞内自噬及凋亡

RASSF1A可以通过多条信号途径介导自噬或凋亡的发生。mTORC1途径是RASSF1A调控自噬的关键。此外,其还可以通过介导微管稳定或微管运输以及Rho亚家族蛋白的修饰影响自噬的发生发展。另一方面,RASSF1A可以通过caspase及非caspase依赖等多种方式参与调节细胞凋亡的发生。由此可见,RASSF1A通过自噬及凋亡对细胞的调控至关重要。

1.3 磷酸化修饰是实现自噬及凋亡双向调控的关键

磷酸化是RASSF1A重要的翻译后修饰类型。目前已知其在Thr38、Thr43、Ser131、Ser175、Ser178、Ser179、Ser184、Ser197、Thr202及Ser203等位点均存在磷酸化修饰(表1)。将各位点功能按其对自噬及凋亡的影响可以分为:a.通过微管稳定影响自噬的Ser184、Ser197和Thr202;b.影响凋亡的Ser131、Ser175、Ser178及Ser179;c.对自噬及凋亡都存在影响的Ser203等三类。

Ser184、Ser197、Thr202及Ser203位于RASSF1A上微管蛋白结合结构域中,其磷酸化状态影响了RASSF1A与微管蛋白的结合能力,影响细胞内转运。Ser131与ATM介导的DNA损伤相关,其磷酸化状态影响MST2/LATS1通路的活性,影响凋亡。Ser175、Ser178及Ser179可被糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β)磷酸化,该三位点的磷酸化状态可以影响RASSF1A与14-3-3蛋白的结合,影响由MOAP1所介导的凋亡^[34]。Ser203的磷酸化状态同样与细胞凋亡相关,Richter等^[43]发现,RASSF1A的S203A突变可以减少BAX等诱导的细胞凋亡。研究发现^[9, 24],MST1在RASSF1A调控的自噬及凋亡通路中都发挥了重要的作用。但现有的研究并无MST1影响RASSF1A调节自噬还是凋亡的偏好性的报道,其具体机制还有待进一步的研究。因此,认为不同位点的磷酸化修饰是RASSF1A实现其功能切换的关键。

Table 1 Phosphorylation sites of RASSF1A protein

表1 RASSF1A磷酸化位点及相关信息

位点	激酶	功能	参考文献
Thr38	CHK1	未知*	[44]
Thr43	CHK1	未知*	[44]
Ser131	ATM	影响MST2/LATS1通路活性,影响凋亡	[40]
Ser175	GSK3 β	影响与14-3-3蛋白的结合,影响凋亡	[45]
Ser178	GSK3 β	影响与14-3-3蛋白的结合,影响凋亡	[45]
Ser179	GSK3 β	影响与14-3-3蛋白的结合,影响凋亡	[45]
Ser184	CHK1	微管稳定、有丝分裂	[44]
Ser197	PKC	微管稳定	[46]
Thr202	Aurora A	微管稳定、有丝分裂、细胞周期	[47]
Ser203	PKA、PKC、Aurora A/B、CDK4	微管稳定、细胞周期、凋亡、DNA损伤	[43, 46-49]

*Thr38、Thr43为CHK1磷酸化的RASSF1A质谱分析所得,但并无Thr38、Thr43与CHK1的直接联系的结果来佐证。

2 RASSF1A介导的自噬及凋亡与肿瘤的关系

癌症是全球第二大死因,2020年中国癌症致死人数高达300万,占世界癌症致死人数的30%。肺癌、乳腺癌、肝癌及结直肠癌仍是主流的癌症类型。RASSF1A在许多肿瘤细胞中都存在启动子高甲基化及表达下调的现象,包括非小细胞肺癌、乳腺癌、肾癌、结直肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌^[1]等。以下主要分析和总结RASSF1A介导的自噬和凋亡对肿瘤的影响。

2.1 肺癌

2020年肺癌死亡人数高达180万,是全球致死率第一的癌症类型。在人类肺癌中,K-Ras的激活和RASSF1A的下调往往与最具侵略性和预后最差肿瘤的发生密切相关。YAP是RASSF1A介导凋亡发生的重要效应因子。但是在肺癌细胞中,RASSF1A的缺失会促进YAP的核移位,导致上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)加剧^[29, 50-51],而非促进细胞凋亡。这提示,使用YAP靶向性药物可以有效防止肺癌的转移扩散,而不是诱导细胞死亡。Chen等^[52]研究发现,

RASSF1A的表达增加会抑制肺癌细胞的生长,促进细胞凋亡。另外,RASSF1A介导的自噬可以有效缓解肺癌的顺铂耐药^[14]。综上所述,RASSF1A可能通过调节自噬和凋亡成为应对肺癌耐药的潜在治疗靶点。

2.2 乳腺癌

乳腺癌是影响女性生命健康的主要杀手。检测RASSF1A启动子甲基化水平已是乳腺癌诊断中重要的生物标志^[53]。虽然RASSF1A在乳腺癌中也可以促进YAP核移位^[54],但其机制却与肺癌不尽相同。在乳腺癌中,RASSF1A表达增加可以促进MST2与LATS1的结合,但其会削减LATS1与YAP的结合能力,增强YAP与p73/p53形成复合体,介导促凋亡基因的转录,启动凋亡^[27-28]。雌激素受体 α (estrogen receptor alpha, ER α)可抑制p53介导的细胞凋亡,对乳腺癌的发展和雌激素依赖的肿瘤生长具有重要意义^[55-56]。RASSF1A通过Hippo通路调节YAP的活性可以抑制ER α 的表达,从而抑制雌激素依赖性乳腺癌细胞的生长^[51, 57],促进细胞凋亡。此外,ER α 同样是一个重要的自噬调节蛋白,可增强许多自噬相关蛋白质的表达^[58]。因此,靶向RASSF1A促进YAP介导的自噬及凋亡可能是应对乳腺癌的一种潜在治疗策略。

2.3 肝细胞癌

肝细胞癌是全世界最常见的人类癌症之一,也是世界上第二大癌症死亡原因。80%以上的肝癌患者存在启动子甲基化和RASSF1A表达下调。Li等^[9]发现,与野生型小鼠相比,RASSF1A敲除小鼠在使用化学致癌剂处理后会更早诱发更多和更大的肿瘤,缩短其生存周期。RASSF1敲除小鼠肝组织癌变的概率(42%)是野生型小鼠(20%)的2倍,且具有更丰富的肝组织癌变类型,但在RASSF1A敲除小鼠的胆管中并未检测到癌变表征^[59]。这说明,RASSF1A的表达与肝癌的发生和进展相关且具有一定的组织特异性。RASSF1A缺失会导致肝细胞自噬抑制已有充分的证据^[9]。在肝癌细胞中过量表达RASSF1A,可通过激活Hippo途径显著抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡^[60]。由此说明,RASSF1A的缺失对于肝癌的发生具有重要的推动作用。RASSF1A是RAS信号通路重要的调节因子,RASSF1A的缺失会激活RAS通路促进肝癌的发展,使用RAS抑制剂及去甲基化剂联合治疗可以显著增加肝癌细胞的凋亡水平^[61]。Newell等^[62]发现,使用索非拉尼(Ras通路抑制剂)和

雷帕霉素(mTOR通路抑制剂)联合处理,可有效地减少肝癌细胞增殖并诱导凋亡,促进肿瘤坏死。这说明,联合使用RAS抑制剂和去甲基化剂或自噬抑制剂用于治疗存在RASSF1A高甲基化的人类肝癌具有一定的可行性。

2.4 结直肠癌

结直肠癌是胃肠道中常见的恶性肿瘤,其发病率均高于消化道其他恶性肿瘤,且病死率也仅次于胃癌和食管癌。K-Ras基因对人类癌症影响重大,近50%的结直肠癌中存在K-Ras突变。Matallanas等^[63]发现,RASSF1A作为K-Ras效应蛋白,能够介导激活MST2-LATS1通路,抑制肿瘤抑制因子p53的降解,促进结直肠癌细胞凋亡。虽然在K-Ras突变的结直肠癌细胞中Hippo通路的核心激酶MST2-LATS1都被激活,但是并未引起YAP蛋白的变化。而在肺癌中,RASSF1A缺失会促使K-Ras突变小鼠肿瘤细胞中YAP的核定位增加,促进EMT^[29]。说明使用YAP靶向药物用于治疗结直肠癌是不可取的。Matallanas等^[63]的研究还发现,K-Ras突变的结直肠癌细胞中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)自分泌激活可以抵消通过RASSF1A介导的细胞凋亡。EGFR可以促进自噬的发生,在结直肠癌的发生发展中起着关键性的作用。使用EGFR靶向抗体药物西妥昔单抗或帕尼单抗治疗结直肠癌,会抑制自噬导致细胞自噬性死亡^[64]。因此,在RASSF1A低表达的结直肠癌中,使用EGFR靶向药物与去甲基化剂或K-Ras抑制剂联合或许可以成为结直肠癌治疗的新策略。

2.5 其他肿瘤

RASSF1A在膀胱癌、小儿髓母细胞瘤等肿瘤中同样存在启动子甲基化修饰的现象。对膀胱癌细胞使用去甲基化剂地西他滨处理,可以增加细胞中RASSF1A的表达水平,激活Hippo通路,加强顺铂和多柔比星(抗肿瘤抗生素)对膀胱癌细胞的细胞毒性,促进肿瘤死亡^[65]。髓母细胞瘤是儿童时期最常发生的恶性脑肿瘤。在髓母细胞瘤中提高RASSF1A的表达,可以增加细胞内由caspase蛋白所介导的细胞凋亡^[66]。异硫氰酸苯乙酯可以提高前列腺癌细胞中RASSF1A的表达,促进细胞凋亡^[67]。虽然肾癌及膀胱癌等也与RASSF1A的甲基化修饰相关,但目前未有关于RASSF1A如何在其中调控自噬及凋亡的报道,具体机制有待进一步的研究。

3 总结与展望

自噬及细胞凋亡在维持机体稳态方面发挥着重要作用,其调节缺陷与肿瘤的发生发展密切相关。RASSF1A被认为是细胞内重要的肿瘤抑制因子,具有调节自噬及凋亡的功能。RASSF1A在多种肿瘤细胞中都存在启动子甲基化修饰,而在不同类型的肿瘤细胞中RASSF1A介导的肿瘤发生发展的机制是不尽相同的。因此,研究RASSF1A在不同肿瘤中发挥的作用,对于实现靶向治疗和精准医疗具有重要的意义。

大量的研究表明,解除RASSF1A在细胞内的抑制状态,可以调整细胞内自噬及凋亡活性而诱发细胞死亡,被认为是治疗癌症的潜在靶点。但现有的研究依旧是立足于泛去甲基化剂治疗来解除RASSF1A在肿瘤细胞内抑制状态,靶向性的治疗方法还有待发现。RASSF1A是Hippo通路重要的调节因子,可通过其SARAH结构域(Salvador/RASSF/Hippo domain)与MST1/2结合^[68]。Li等^[9]研究发现,在HEK293T细胞中外源表达SARAH结构域会减弱内源RASSF1A与MST1的结合。RASSF1A与MST1/2的结合是K-Ras介导Hippo通路活化的关键节点。因此,设计一种SARAH衍生短肽用于阻断Hippo通路的激活、促进YAP的核移位、进而导致YAP介导的细胞凋亡或许可以成为一种新的肿瘤治疗手段。

RASSF1A与Hippo通路关系复杂,有关RASSF1A与MST1/2激酶活性的关系还有待进一步研究。相较于对凋亡的影响,有关RASSF1调节自噬的研究尚处于起步阶段。因此,进一步丰富RASSF1A与自噬的关系对于理解RASSF1A在肿瘤进展中的作用以及指导临床用药等具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Agathangelou A, Cooper W N, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res*, 2005, **65**(9): 3497-3508
- [2] Dubois F, Bergot E, Zalcman G, *et al.* RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis-an updated review. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(12): 928
- [3] Morana O, Wood W, Gregory C D. The apoptosis paradox in cancer. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(3): 1328
- [4] Zhou C F, Qian X H, Hu M, *et al.* STYK1 promotes autophagy through enhancing the assembly of autophagy-specific class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I. *Autophagy*, 2020, **16**(10): 1786-1806
- [5] Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2020, **21**(8): 439-458
- [6] Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases. *N Engl J Med*, 2020, **383**(16): 1564-1576
- [7] Butt G, Shahwar D, Qureshi M Z, *et al.* Role of mTORC1 and mTORC2 in breast cancer: therapeutic targeting of mTOR and its partners to overcome metastasis and drug resistance. *Adv Exp Med Biol*, 2019, **1152**: 283-292
- [8] Rogala K B, Gu X, Kedir J F, *et al.* Structural basis for the docking of mTORC1 on the lysosomal surface. *Science*, 2019, **366**(6464): 468-475
- [9] Li W, Yue F, Dai Y, *et al.* Suppressor of hepatocellular carcinoma RASSF1A activates autophagy initiation and maturation. *Cell Death Differ*, 2019, **26**(8): 1379-1395
- [10] Inoki K, Li Y, Xu T, *et al.* Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 2003, **17**(15): 1829-1834
- [11] Bai X, Ma D, Liu A, *et al.* Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science*, 2007, **318**(5852): 977-980
- [12] Nelson N, Clark G J. Rheb may complex with RASSF1A to coordinate Hippo and TOR signaling. *Oncotarget*, 2016, **7**(23): 33821-33831
- [13] Liu P F, De La Vega M R, Dodson M, *et al.* Spermidine confers liver protection by enhancing NRF2 signaling through a MAP1S-mediated noncanonical mechanism. *Hepatology*, 2019, **70**(1): 372-388
- [14] Wang J C, Zhang X F, Yang F, *et al.* RASSF1A enhances chemosensitivity of NSCLC cells through activating autophagy by regulating MAP1S to inactivate Keap1-Nrf2 pathway. *Drug Des Dev Ther*, 2021, **15**: 21-35
- [15] El Masri R, Delon J. RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes. *Nat Rev Immunol*, 2021, **21**(8): 499-513
- [16] Aktories K, Rosener S, Blaschke U, *et al.* Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *Eur J Biochem*, 1988, **172**(2): 445-450
- [17] Rubin E J, Gill D M, Boquet P, *et al.* Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum*. *Mol Cell Biol*, 1988, **8**(1): 418-426
- [18] Aguilera M O, Beron W, Colombo M I. The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy*, 2012, **8**(11): 1590-1603
- [19] Lee M G, Jeong S I, Ko K P, *et al.* RASSF1A directly antagonizes RhoA activity through the assembly of a Smurf1-mediated destruction complex to suppress tumorigenesis. *Cancer Res*, 2016, **76**(7): 1847-1859
- [20] Liu M D, Zeng T L, Zhang X, *et al.* ATR/Chk1 signaling induces autophagy through sumoylated RhoB-mediated lysosomal translocation of TSC2 after DNA damage. *Nat Commun*, 2018, **9**: 4139
- [21] Keller M, Dubois F, Teulier S, *et al.* NDR2 kinase contributes to

- cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, **38**(1): 158
- [22] Spitz A Z, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, **43**(3): 206-220
- [23] Kesavardhana S, Malireddi R K S, Kanneganti T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annu Rev Immunol*, 2020, **38**: 567-595
- [24] Rabizadeh S, Xavier R J, Ishiguro K, *et al*. The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem*, 2004, **279**(28): 29247-29254
- [25] Lee K K, Ohshima T, Yajima N, *et al*. MST, a physiological caspase substrate, highly sensitizes apoptosis both upstream and downstream of caspase activation. *J Biol Chem*, 2001, **276**(22): 19276-19285
- [26] Guo C, Zhang X, Pfeifer G P. The tumor suppressor RASSF1A prevents dephosphorylation of the mammalian STE20-like kinases MST1 and MST2. *J Biol Chem*, 2011, **286**(8): 6253-6261
- [27] Matallanas D, Romano D, Yee K, *et al*. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell*, 2007, **27**(6): 962-975
- [28] Papaspyropoulos A, Bradley L, Thapa A, *et al*. RASSF1A uncouples Wnt from Hippo signalling and promotes YAP mediated differentiation *via* p73. *Nat Commun*, 2018, **9**: 424
- [29] Schmidt M L, Hobbing K R, Donninger H, *et al*. RASSF1A deficiency enhances Ras-driven lung tumorigenesis. *Cancer Res*, 2018, **78**(10): 2614-2623
- [30] Law J, Salla M, Zare A, *et al*. Modulator of apoptosis 1 (MOAP-1) is a tumor suppressor protein linked to the RASSF1A protein. *J Biol Chem*, 2015, **290**(40): 24100-24118
- [31] Chang H C, Tao R N, Tan C T, *et al*. The BAX-binding protein MOAP1 associates with LC3 and promotes closure of the phagophore. *Autophagy*, 2021, **17**(11): 3725-3739
- [32] Vos M D, Dallol A, Eckfeld K, *et al*. The RASSF1A tumor suppressor activates Bax *via* MOAP-1. *J Biol Chem*, 2006, **281**(8): 4557-4563
- [33] Baksh S, Tommasi S, Fenton S, *et al*. The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell*, 2005, **18**(6): 637-650
- [34] Ghazaleh H A, Chow R S, Choo S L, *et al*. 14-3-3 mediated regulation of the tumor suppressor protein, RASSF1A. *Apoptosis*, 2010, **15**(2): 117-127
- [35] Volodko N, Salla M, Zare A, *et al*. RASSF1A site-specific methylation hotspots in cancer and correlation with RASSF1C and MOAP-1. *Cancers (Basel)*, 2016, **8**(6): 55
- [36] Nguyen V N, Park A, Xu A T, *et al*. Substrate specificity characterization for eight putative nudix hydrolases. Evaluation of criteria for substrate identification within the Nudix family. *Proteins*, 2016, **84**(12): 1810-1822
- [37] Roos W P, Thomas A D, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 2016, **16**(1): 20-33
- [38] Zheng P L, Chen Q Z, Tian X Y, *et al*. DNA damage triggers tubular endoplasmic reticulum extension to promote apoptosis by facilitating ER-mitochondria signaling. *Cell Res*, 2018, **28**(8): 833-854
- [39] Pefani D E, O'Neill E. Hippo pathway and protection of genome stability in response to DNA damage. *FEBS J*, 2016, **283**(8): 1392-1403
- [40] Hamilton G, Yee K S, Scrase S, *et al*. ATM regulates a RASSF1A-dependent DNA damage response. *Curr Biol*, 2009, **19**(23): 2020-2025
- [41] Xu C, Fan C D, Wang X. Regulation of Mdm2 protein stability and the p53 response by NEDD4-1 E3 ligase. *Oncogene*, 2015, **34**(3): 342-350
- [42] Zhang H L, He J, Li J S, *et al*. Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX. *FASEB J*, 2013, **27**(1): 232-242
- [43] Richter A M, Schagdarsurengin U, Rastetter M, *et al*. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the RASSF1A tumour suppressor at Serine 203 and regulation of RASSF1A function. *Eur J Cancer*, 2010, **46**(16): 2986-2995
- [44] Jiang L Y, Rong R, Sheikh M S, *et al*. Mitotic arrest by tumor suppressor RASSF1A is regulated *via* CHK1 phosphorylation. *Mol Cancer Res*, 2014, **12**(1): 119-129
- [45] Abu Ghazaleh H, Chow R S, Choo S L, *et al*. 14-3-3 Mediated regulation of the tumor suppressor protein, RASSF1A. *Apoptosis*, 2010, **15**(2): 117-127
- [46] Verma S K, Ganesan T S, Parker P J. The tumour suppressor RASSF1A is a novel substrate of PKC. *FEBS Lett*, 2008, **582**(15): 2270-2276
- [47] Rong R, Jiang L Y, Sheikh M S, *et al*. Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene*, 2007, **26**(55): 7700-7708
- [48] Song S J, Song M S, Kim S J, *et al*. Aurora A regulates prometaphase progression by inhibiting the ability of RASSF1A to suppress APC-Cdc20 activity. *Cancer Res*, 2009, **69**(6): 2314-2323
- [49] Song M S, Song S J, Kim S J, *et al*. Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSF1A *via* ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene*, 2008, **27**(22): 3176-3185
- [50] Dubois F, Keller M, Calvayrac O, *et al*. RASSF1A suppresses the invasion and metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells by inhibiting YAP activation through the GEF-H1/RhoB pathway. *Cancer Res*, 2016, **76**(6): 1627-1640
- [51] Pefani D E, Pankova D, Abraham A G, *et al*. TGF-beta targets the Hippo pathway scaffold RASSF1A to facilitate YAP/SMAD2 nuclear translocation. *Mol Cell*, 2016, **63**(1): 156-166
- [52] Chen T, Yang Z Z, Liu C, *et al*. Circ_0078767 suppresses non-small-cell lung cancer by protecting RASSF1A expression *via* sponging miR-330-3p. *Cell Proliferat*, 2019, **52**(2): e12548

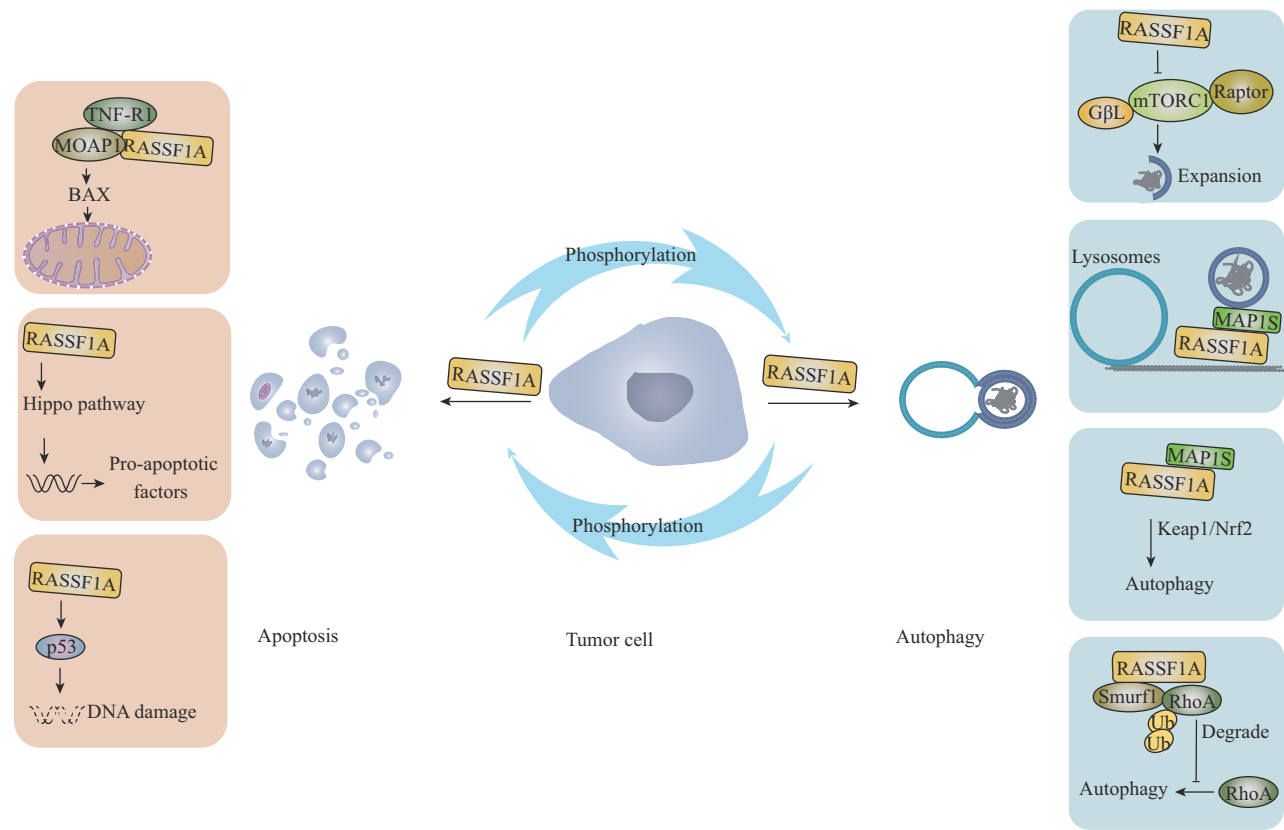
- [53] Benacka R, Szaboova D, Gulasova Z, *et al.* Classic and new markers in diagnostics and classification of breast cancer. *Cancers (Basel)*, 2022, **14**(21): 5444
- [54] Vlahov N, Scrace S, Soto M S, *et al.* Alternate RASSF1 transcripts control SRC activity, E-Cadherin contacts, and YAP-mediated invasion. *Curr Biol*, 2015, **25**(23): 3019-3034
- [55] Hickey T E, Selth L A, Chia K M, *et al.* The androgen receptor is a tumor suppressor in estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Med*, 2021, **27**(2): 310-320
- [56] Park S H, Kim H, Kwak S, *et al.* HDAC3-ERalpha selectively regulates TNF-alpha-induced apoptotic cell death in MCF-7 human breast cancer cells *via* the p53 signaling pathway. *Cells*, 2020, **9**(5): 1280
- [57] Rosswag S, Thiede G, Sleeman J P, *et al.* RASSF1A suppresses estrogen-dependent breast cancer cell growth through inhibition of the yes-associated protein 1 (YAP1), inhibition of the forkhead box protein M1 (FOXO1), and activation of forkhead box transcription factor 3A (FOXO3A). *Cancers (Basel)*, 2020, **12**(9): 2689
- [58] Kim S Y, Yang C S, Lee H M, *et al.* ESRRA (estrogen-related receptor alpha) is a key coordinator of transcriptional and post-translational activation of autophagy to promote innate host defense. *Autophagy*, 2018, **14**(1): 152-168
- [59] Zhang X, Guo C, Wu X, *et al.* Analysis of liver tumor-prone mouse models of the Hippo kinase scaffold proteins RASSF1A and SAV1. *Cancer Res*, 2016, **76**(9): 2824-2835
- [60] Ahn E Y, Kim J S, Kim G J, *et al.* RASSF1A-mediated regulation of AREG *via* the Hippo pathway in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res*, 2013, **11**(7): 748-758
- [61] Agarwal S, Amin K S, Jagadeesh S, *et al.* Mahanine restores RASSF1A expression by down-regulating DNMT1 and DNMT3B in prostate cancer cells. *Mol Cancer*, 2013, **12**(1): 99
- [62] Newell P, Toffanin S, Villanueva A, *et al.* Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin *in vivo*. *J Hepatol*, 2009, **51**(4): 725-733
- [63] Matallanas D, Romano D, Al-Mulla F, *et al.* Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras. *Mol Cell*, 2011, **44**(6): 893-906
- [64] Koustas E, Karamouzis M V, Mihailidou C, *et al.* Co-targeting of EGFR and autophagy signaling is an emerging treatment strategy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2017, **396**: 94-102
- [65] Khandelwal M, Anand V, Appunni S, *et al.* Decitabine augments cytotoxicity of cisplatin and doxorubicin to bladder cancer cells by activating Hippo pathway through RASSF1A. *Mol Cell Biochem*, 2018, **446**(1-2): 105-114
- [66] Levesley J, Lusher M E, Lindsey J C, *et al.* RASSF1A and the BH3-only mimetic ABT-737 promote apoptosis in pediatric medulloblastoma cell lines. *Neuro Oncol*, 2011, **13**(12): 1265-1276
- [67] Boyanapalli S S S, Li W, Fuentes F, *et al.* Epigenetic reactivation of RASSF1A by phenethyl isothiocyanate (PEITC) and promotion of apoptosis in LNCaP cells. *Pharmacol Res*, 2016, **114**: 175-184
- [68] Sanchez-Sanz G, Matallanas D, Nguyen L K, *et al.* MST2-RASSF protein-protein interactions through SARAH domains. *Brief Bioinform*, 2016, **17**(4): 593-602

Function of RASSF1A in Autophagy and Apoptosis*

TANG Yu^{1,2,3,4)}, ZHOU Zi-Juan^{1,2,3,4)}, ZHOU Kuai-Le⁵⁾, LIU Lei^{1,2,3,4)},
ZHOU Ce-Fan^{1,2,3,4)}**, TANG Jing-Feng^{1,2,3,4)}**

(¹⁾“111” Introduction Base of Cell Regulation and Molecular Medicine, Ministry of Science and Technology/Ministry of Education, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;
²⁾Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;
³⁾Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;
⁴⁾Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;
⁵⁾Department of Surgery, Guixi People’s Hospital, Guixi 335400, China)

Graphical abstract



Abstract Autophagy and apoptosis are two important life processes that share similar protein components, play essential role in the survival and development of the organisms and especially cancers. During the development of cancer, the two processes can trigger simultaneously with a delicate and complex relationship. Tumor suppressor

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32000523, 32070726).
** Corresponding author.
ZHOU Ce-Fan. Tel: 86-15072499253, E-mail: cefan@whu.edu.cn
TANG Jing-Feng. Tel: 86-15327240105, E-mail: tangjingfeng@hbut.edu.cn
Received: December 7, 2022 Accepted: February 9, 2023

Ras association domain family 1A (RASSF1A) is an important downstream effector of Ras superfamily proteins. RASSF1A is widely expressed in human tissues but is down-regulated in a variety of tumor cells due to its promoter methylation and transcription inhibition. Recent studies have shown that RASSF1A can regulate both apoptosis and autophagy through multiple pathways upon different cancer cellular state. In this article, we mainly review the regulatory mechanism of RASSF1A on autophagy through the mTORC1 signaling pathway, microtubule stability, and Rho subfamily proteins, and the regulatory mechanism of RASSF1A on apoptosis through MOAP1 proteins, or the Hippo pathway, or DNA damage pathway. As different kinases phosphorylate RASSF1A to convey different “mantras” and thus stimulate different biological functions, we also analyze the role of post-translational modification in the functional switching of RASSF1A in regulating autophagy and apoptosis. Although RASSF1A can alter the nuclear localization of the downstream effector YAP, a core effector of the Hippo signaling, the phenotypes presented are largely distinct in different tumors. These observation further suggest that therapeutic strategies using demethylation alone are not applicable to all RASSF1A-methylated tumors. Therefore, in-depth investigation of the regulatory mechanism of RASSF1A in autophagy, apoptosis and cancer cell fate determination is of great significance in providing more precise and effective treatment strategies for tumor patients.

Key words RASSF1A, apoptosis, autophagy, cancer

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0560