

ERK1/2 通路基因突变对低级浆液性卵巢癌发生发展的影响

张 晶, 孙文靖, 于 咏, 傅松滨

(哈尔滨医科大学, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘 要: 卵巢癌是女性生殖器官中常见的恶性肿瘤之一, 是女性生殖系统肿瘤中的最大杀手。随着分子遗传学和肿瘤生物学研究的深入发展, 基因诊断已成为治疗恶性肿瘤的重要手段。因此, 研究卵巢癌的分子遗传学机制进而了解其生物学效应对卵巢癌的发生发展、治疗及预后等方面有重要意义。大量临床病理学和分子遗传学实验证明 ERK1/2 通路异常活动与低级浆液性卵巢癌的发生发展关系密切。文章将针对 ERK1/2 通路的异常持续活化(KRAS 或 BRAF 突变次级效应)与低级浆液性卵巢癌发生发展的关联性研究作一简要综述。

主题词: 低级浆液性卵巢癌; ERK1/2 通路; KRAS/BRAF 突变

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)08-0585-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.08.B001

Gene Mutation of ERK1/2 Pathway in the Low-grade Ovarian Serous Cancer

ZHANG Jing, SUN Wen-jing, YU Yang, et al.

(Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: Ovarian cancer is one of the common neoplasms of female reproductive organs. The mortality topped the list of all kinds of reproductive neoplasm. With the development of molecular genetics and cancer genetics, the genetic diagnosis has become the important approach of malignancy cure. Thus, learning the molecular genetics mechanism of ovarian cancer is of great meaning for the disease, including the portent, the treatment and the prognosis of disease. A large number of clinical pathology and molecular genetics experiments proved that there was close correlation between the abnormal activities of ERK1/2 pathway and the cancer development. This review summarizes the latest study on ERK1/2 pathway, mainly about the KRAS or BRAF mutation, and the development of ERK1/2 pathway in low-grade ovarian serous tumors.

Subject words: low-grade ovarian serous neoplasms; ERK1/2 pathway; KRAS/BRAF mutation

卵巢癌是对女性生命造成严重威胁的生殖系统肿瘤之一, 虽然其发病率低于宫颈癌和子宫体癌, 但其致死率却占各类妇科肿瘤的首位。浆液性卵巢癌是最常见的卵巢恶性肿瘤, 按其分子生物学差异可分为低级浆液性卵巢癌和高级浆液性卵巢癌^[1]。低级浆液性卵巢癌细胞核低级, 表现为不频发的有丝分裂; 高级浆液性卵巢癌细胞核高级, 表现为有丝分裂旺盛^[2]。低级浆液性卵巢肿瘤约有 2/3 患者合并腹

水, 由于卵巢位于盆腔深处, 肿瘤早期体积不大导致诊断困难。一旦出现临床常见的症状如腹水、腹胀和盆腹部包块, 患者才到医院就诊, 往往在确诊时已是晚期。因此, 疾病早期症状模糊进而诊断困难是卵巢癌致死率高的直接原因。

大多数人类恶性肿瘤是抑癌基因和原癌基因突变累积的结果, 也可能是由于特殊的单个基因在抗凋亡蛋白清除方面调节异常引起^[3,4]。因此, 癌基因与抑癌基因在肿瘤研究领域愈发重要, 常见的癌基因家族、抑癌基因家族有 Src 癌基因家族、ras 癌基因家族、myc 癌基因家族、myb 癌基因家族和 p53 抑癌基因^[5]。研究表明, 不同分级的浆液性卵巢癌存在不同的形态学和遗传学特征: 低级浆液性卵巢癌起

基金项目: 国家国际科技合作专项项目(2013DFA31610); 教育部创新团队(IRT1230); 国家自然科学基金(31000626、31271347); 教育部新世纪优秀人才计划(NCET-10-0149、NCET-11-0954)

通讯作者: 傅松滨, 主任, 教授, 博士; 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号(150081); E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

收稿日期: 2013-05-31; **修回日期:** 2013-07-20

源于腺纤维瘤或交界瘤,肿瘤的发展是一个缓慢递进的过程且伴有 *KRAS*、*BRAF* 和 *ERBB2* 等基因频发性突变;高级浆液性卵巢癌起源于上皮内瘤变且肿瘤发展迅速,与低级浆液性卵巢癌显著不同的是 *p53* 基因突变在高级浆液性卵巢癌中频频发生^[1,6,7]。据此提出了浆液性卵巢癌发生发展的二元论模型,即低级浆液性卵巢癌发生存在多步骤过程,有前体病变;高级浆液性卵巢癌则直接起源于卵巢表面上皮或包涵囊肿,缺乏前体病变^[3]。普遍认为低级浆液性卵巢癌的发展过程是由卵巢浆液性交界性肿瘤(SBTs)发展到非侵袭性微乳头型浆液性癌(iMP-SC),再进一步发展成为侵袭性微乳头型浆液性(MPSC,即低级浆液性卵巢癌)。卵巢浆液性交界性肿瘤和非侵袭性微乳头型浆液性癌是低级浆液性卵巢癌的前体病变^[6-9]。因此,了解低级浆液性卵巢癌演进过程中多步骤病变的分子遗传学改变,尤其是贯穿于疾病整个发展过程的改变,对于疾病的研究和治疗意义重大。

1 ERK1/2 信号转导通路与肿瘤发生

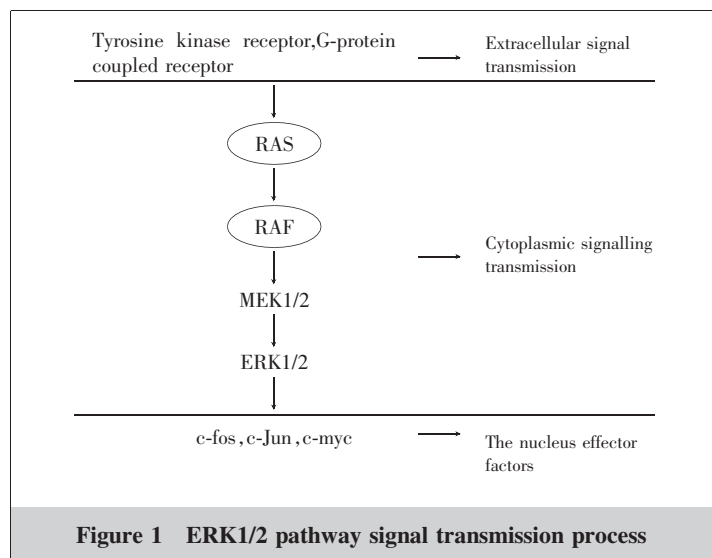
细胞信号转导是指细胞通过位于胞膜或胞内的受体受信息分子的刺激,经细胞内信号转导系统转换,从而干预某些基因的转录或表达,最终影响其生物学功能的过程。研究认为细胞内存在着多条信号转导通路,各种通路间又有多个层次的交叉调控,是一个十分复杂的网络系统。细胞信号转导过程发生障碍或异常将导致细胞生长、增殖、分化及凋亡等一系列生物学行为异常,从而引起机体疾病甚至肿瘤的发生^[10-13]。MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号转导通路是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它是真核生物信号传递网络中的重要途径之一,在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用。现已发现在低等原核细胞和高等哺乳类细胞中存在着多条并行的 MAPK 信号通路,包括 ERK1/2 通路、JNK 通路、p38 通路、ERK5/BMK1 通路等。不同的细胞外刺激作用于不同的 MAPK 信号通路,通过其相互调控而介导不同的细胞生物学反应,例如 ERK1/2 信号转导通路调控细胞增殖和分化,JNK、p38 和 MAPK 信号转导通路在炎症与细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用。其中,ERK1/2 通路被认为

是经典的 MAPK 信号转导途径,目前对其激活过程及生物学意义已有了较深入的认识。

ERK1/2 通路的激活是一系列的蛋白激酶级联反应,其信号传递过程是:细胞外信号-RAS-RAF-MEK-ERK(Figure 1)。首先,RAS 是由一条多肽链组成的单体蛋白,受体酪氨酸激酶、G 蛋白偶联的受体和部分细胞因子受体均可激活 RAS 引发 ERK 通路的活化。然后,激活的 RAS 进一步磷酸化激活 RAF,RAF 有三种同工酶,即 ARAF、BRAF、CRAF;RAF 进而活化 MEK,MEK 存在 MEK1、MEK2 两种亚型;MEKs 为双特异性激酶,可以高度选择性地激活 ERK1/2。ERKs 接受上游的级联反应信号,是 RAS 丝裂原信号转导下游核心元件,它介导的生物学效应与其活化持续时间密切相关。持久活化的 ERK 可部分转入核内,而短暂活化的 ERK 不能进入核内,转位进入细胞核聚集的 ERK 可以磷酸化一些核内的转录因子如 c-fos、c-Jun、c-myc 等,从而参与细胞增殖与分化的调控。ERK1、ERK2 的酪氨酸残基先于苏氨酸残基被磷酸化,仅有酪氨酸磷酸化的 ERK 激酶不具有活性,当其积聚起来达到阈值使苏氨酸磷酸化后则激酶迅速转为活性状态。ERK1/2 通路通过反馈调控其活化强度和从而稳定机体内环境^[14]。有研究显示,细胞信号转导通路中丝裂原活化蛋白激酶家族在肿瘤中表现出的各种异常尤为突出^[15-17]。此外,诸多研究也表明 ERK1/2 通路与多种肿瘤的发生密切相关,例如卵巢癌、结直肠癌、乳腺癌等^[1,8,18-20]。持续异常激活的 ERK1/2 通路促进低级浆液性卵巢癌的肿瘤发展进程^[8,9],这一分子遗传学特征为低级浆液性卵巢癌的治疗提供切入点。研究显示,ERK1/2 持续活化对于一系列抗肿瘤药物在抑制癌细胞增殖和诱导癌细胞凋亡等方面疗效的发挥至关重要^[1]。近年来,多种 ERK1/2 通路抑制剂被广泛研究应用于治疗低级浆液性卵巢癌中^[21]。

2 低级浆液性卵巢癌与 ERK1/2 通路基因突变的相关性

随着人们对丝裂原活化蛋白激酶家族在肿瘤发生发展中的各种异常表现的深入认知,ERK1/2 通路已成为肿瘤发生发展相关因素的研究热点。*KRAS* 和 *BRAF* 是这一通路的两个重要成员,分别属于



ras 家族和 *raf* 家族, 它们的突变在 ERK 通路参与肿瘤形成的过程中发挥关键作用。有文献报道, *KRAS* 或者 *BRAF* 突变会导致这一通路的下游靶基因, 即细胞外调节蛋白激酶 ERK 持续磷酸化激活, 活化的 ERK1/2 激活下游蛋白激酶、核蛋白和转录因子等^[22], 这可能促进肿瘤的发生^[23,24]。

KRAS 基因定位于 7 号染色体, 含有 189 个密码子; *BRAF* 基因定位于 12 号染色体, 含有 767 个密码子。突变存在多个位点, 但 *KRAS* 基因第 12、13 个密码子和 *BRAF* 基因第 15 个密码子是其突变热点^[8,25,26]。这些基因位点突变导致的 ERK 持续磷酸化激活与多种癌症的病理学改变密切相关。研究表明, *BRAF* 基因第 1799 位核苷酸上 T 突变为 A 使其第 15 个密码子编码的缬氨酸由谷氨酸取代^[25], 突变后酶的活性比野生型 *BRAF* 提高 500 倍。Singer 等^[8]研究显示 *KRAS* 的第 12、13 个密码子突变或者 *BRAF* 的第 15 个密码子突变在 68% 的低级浆液性卵巢癌和 61% 的卵巢浆液性交界性肿瘤中发生。这符合低级浆液性卵巢癌“腺瘤—肿瘤交界瘤—癌”的逐步递进理论模型, 提示 RAS-RAF 信号通路异常活动(*KRAS* 或者 *BRAF* 突变的次级效应)促进典型微乳头型交界瘤向低级侵袭性浆液性癌的转变^[9], 同时表明 *KRAS* 和 *BRAF* 对低级浆液性卵巢癌的发生具有“看门人”的作用。由此分析得出, 在低级浆液性卵巢癌中 *KRAS* 和 *BRAF* 等上游信号分子突变导致 ERK1/2 通路分子构成的持续激活, 持续活化的 ERK 转运至细胞核内, 促使核内许多转录因子如

Jun、fos、myc 的氨基酸残基磷酸化而使核内转录因子活化, 促进和调节与细胞生长和分化有关的基因表达。*KRAS* 和 *BRAF* 突变在低级浆液性卵巢癌前体病变中频发促使疾病向低级浆液性卵巢癌的转变。有趣的是在低级浆液性卵巢癌中同时发生 *KRAS* 和 *BRAF* 突变未见报道, 这提示 *KRAS* 和 *BRAF* 突变相互间具有排他性, 两者对于肿瘤发生的作用是相互独立的^[7]。目前已有成品试剂盒用于检测 *KRAS* 和 *BRAF* 基因的突变。

3 *KRAS* 和 *BRAF* 突变对低级浆液性卵巢癌的影响

肿瘤发展起始阶段的分子遗传学改变对于肿瘤发生学至关重要^[27], 低级浆液性卵巢癌的演进过程符合这一理论。因此, 研究 *KRAS* 和 *BRAF* 突变对低级浆液性卵巢癌的影响具有非常重要的意义。

首先, 卵巢癌患者中 *KRAS* 和 *BRAF* 突变与临床病理学因素关联密切, 例如 FIGO 分期、病理学分级、组织学类型、年龄等。Nakayama 等^[28]人研究表明 *KRAS* 或者 *BRAF* 突变与浆液性卵巢癌 FIGO 分期早期 (I 期、II 期), 病理学低分级显著相关, 说明突变对疾病的进程有促进作用, 这一影响是通过突变的次级效应即 ERK1/2 通路的持续激活而发挥作用的。这与结直肠癌的实验研究所得出的结论一致, 即 *BRAF* 突变与 Duke 分期早期显著相关^[18]。低级浆液性卵巢癌的前体病变卵巢浆液性交界性肿瘤高频率发生 *KRAS* 或者 *BRAF* 突变也提示伴有 *KRAS* 或者 *BRAF* 突变的低级浆液性卵巢癌的临床惰性发展^[7], 这可以作为疾病评估和早期诊断的指标, 明确疾病分期对疾病的治疗和预后具有重要意义。

其次, 卵巢癌细胞中 *KRAS* 或 *BRAF* 突变会导致这一通路的下游靶基因, 即细胞外调节蛋白激酶 ERK 持续磷酸化激活^[28,29]。针对这一异常情况, CI-1040 (MEK 抑制剂, 可阻断 ERK-MAPK 活化) 被应用于诱导体外卵巢癌细胞 ERK1/2 失活, 进而通过一系列表型和基因表达情况的变化研究 ERK1/2 通路活化与癌细胞特性的关联。Pohl 等^[29]研究表明 *KRAS* 或者 *BRAF* 突变与 MEK 抑制剂 CI-1040 的

生长抑制和凋亡诱导作用相关联。Nakayama 等^[28]人的研究与这一结论一致,提示伴有 *KRAS* 或 *BRAF* 突变的卵巢癌细胞相比于含有野生型的癌细胞对 CI-1040 的生长抑制和凋亡诱导作用更为敏感。此外,CI-1040 作用于伴有 *KRAS* 或 *BRAF* 突变的卵巢癌细胞还会引起强烈的 G₁ 期阻滞以及 cyclin D1 表达显著下调^[28]。cyclin D1 作为细胞周期调节因子之一,其过度表达是多种人类原发性肿瘤的特征,对肿瘤的诊断和预后判断具有重要意义。与此同时,CI-1040 作用后相比于 DMSO 对照组使裸鼠体内形成的肿瘤结节较小^[28]。这些研究结果提示 CI-1040 的潜在治疗意义,将有助于临床上对传统细胞毒性治疗难奏效的伴 *KRAS* 或 *BRAF* 突变的低级别浆液性卵巢癌患者的治疗。

4 小结与展望

不同分级的浆液性卵巢癌在分子遗传学改变和肿瘤发展模式上差异显著,检测卵巢癌患者基因突变情况,明确突变的次级效应对肿瘤细胞的影响,对选用适合的 ERK1/2 通路抑制剂进行治疗和预后具有重要意义。*KRAS* 或 *BRAF* 突变在低级别浆液性卵巢癌中的频发性 and 突变对 ERK1/2 通路及肿瘤演进过程的影响,为卵巢癌患者的治疗带来前景,阻断 ERK1/2 通路对临床治疗低级别浆液性卵巢癌将是一项重大突破。

参考文献:

- [1] Hsu CY, Bristow R, Cha MS, et al. Characterization of active mitogen-activated protein kinase in ovarian serous carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(19):6432-6436.
- [2] Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems[J]. Adv Anat Pathol, 2009, 16(5):267-282.
- [3] Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Kowalczyk O, et al. Mutations in the *KRAS* gene in ovarian tumors[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2009, 47(2):221-224.
- [4] Zeng Z, Wang M, He YN, et al. Expression of twist in ovarian serous cystadenocarcinoma and its significance[J]. Journal of Chinese Oncology, 2013, 19(2):102-105. [曾志, 王敏, 何旖旎, 等. Twist 蛋白在卵巢浆液性囊腺癌中的表达及临床意义[J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19(2):102-105.]
- [5] Wang X, Deng SS, Chen LJ, et al. Expressions of E6 protein, UBE3A and p53 protein in 38 cases with breast cancer[J]. Journal of Chinese Oncology, 2010, 16(3):168-170. [王燮, 邓世山, 陈利军, 等. E6 蛋白、UBE3A 和 p53 蛋白在 38 例乳腺癌中的表达[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(3):168-170.]
- [6] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer[J]. Nature, 2002, 417(6892):949-954.
- [7] Ho CL, Kurman RJ, Dehari R, et al. Mutations of *BRAF* and *KRAS* precede the development of ovarian serous borderline tumors[J]. Cancer Res, 2004, 64(19):6915-6918.
- [8] Singer G, Kurman RJ, Chang HW, et al. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma[J]. Am J Pathol, 2002, 160(4):1223-1228.
- [9] Singer G, Shih IeM, Truskinovsky A, et al. Mutational analysis of K-ras segregates ovarian serous carcinomas into two types: invasive MPSC (low-grade tumor) and conventional serous carcinoma (high-grade tumor)[J]. Int J Gynecol Pathol, 2003, 22(1):37-41.
- [10] Chen Q, Gao G, Luo S. Hedgehog signaling pathway and ovarian cancer[J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(3):346-353.
- [11] Davidson B, Givant-Horwitz V, Lazarovici P, et al. Matrix metalloproteinases (MMP), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases (MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(7):621-631.
- [12] Givant-Horwitz V, Davidson B, Lazarovici P, et al. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) as predictors of clinical outcome in serous ovarian carcinoma in effusions[J]. Gynecol Oncol, 2003, 91(1):160-172.
- [13] El-Habr EA, Tsiorva P, Theodorou M, et al. Analysis of PIK3CA and B-RAF gene mutations in human astrocytomas: association with activation of ERK and AKT[J]. Clin Neuropathol, 2010, 29(4):239-245.
- [14] Zhao MZ, Liu JH, Li YH, et al. Regulatory mechanisms of ERK signal transduction pathway[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2009, 29(1):15-19. [赵明哲, 刘靖华, 李玉花, 等. ERK 信号通路的信号转导调控机制[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(1):15-19.]
- [15] Fan HY, Liu Z, Mullany LK, et al. Consequences of RAS and MAPK activation in the ovary: the good, the bad and the ugly[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 366(1-2):74-79.

- [16] Dahlman KB, Xia J, Hutchinson K, et al. BRAF(L597) mutations in melanoma are associated with sensitivity to MEK inhibitors[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(9):791–797.
- [17] Steelman LS, Abrams SL, Shelton JG, et al. Dominant roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell cycle progression, prevention of apoptosis and sensitivity to chemotherapeutic drugs[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(8):1629–1638.
- [18] Zhao Y, Guo KJ, Zhang Y, et al. The expression and clinical significance of ERK in ovarian cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2006, 33(17):978–981. [赵杨, 郭科军, 张颐, 等. 细胞外信号调节激酶在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(17):978–981.]
- [19] Yuen ST, Davies H, Chan TL, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with braf and kras mutations in colorectal neoplasia[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6451–6455.
- [20] Wan F, Zhong G, He FX, et al. The relationship between the activation of ERK/ MAPK signal transduction pathway and the invasive growth of breast cancer cells [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2004, 17(6):490–492. [万芳, 钟刚, 何福仙, 等. ERK/ MAPK 信号通路激活与乳腺癌细胞浸润性生长的关系[J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(6):490–492.]
- [21] Ripple MO, Kim N, Springett R. Acute mitochondrial inhibition by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK) 1/2 inhibitors regulates proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (5):2933–2940.
- [22] Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation[J]. *Biol Cell*, 2001, 93(1–2):53–62.
- [23] Krueger JS, Keshamouni VG, Atanaskova N, et al. Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion[J]. *Oncogene*, 2001, 20(31):4209–4218.
- [24] Wei SQ, Sui LH, Lian YL. Expression of extracellular signal-regulated kinase in epithelial ovarian cancer [J]. *China Cancer*, 2003, 12(11):682–684. [韦淑琴, 隋丽华, 廉玉兰. 细胞外信号调节激酶在卵巢肿瘤的表达[J]. *中国肿瘤*, 2003, 12(11):682–684.]
- [25] Guan J, Tang T. The BRAF mutation in colorectal cancer [J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2010, 26(3):356–359. [关剑, 唐涛. 结直肠癌中的 BRAF 基因突变[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(3):356–359.]
- [26] Liu W, Wang L, Yu YH, et al. Detection of k-ras gene mutations in Chinese patients with colorectal cancer [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2011, 19 (13):1367–1374. [刘伟, 王丽, 余英豪, 等. k-ras 基因在中国结直肠癌患者中的突变状态[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(13):1367–1374.]
- [27] Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(6):484–486.
- [28] Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, et al. KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(12):2020–2028.
- [29] Pohl G, Ho CL, Kurman RJ, et al. inactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway as a potential target-based therapy in ovarian serous tumors with KRAS or BRAF mutations[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(5):1994–2000.