

DOI: 10.13376/j.cblls/2020019

文章编号: 1004-0374(2020)02-0143-06

## RASSF1A基因及其在结直肠癌中的研究进展

胡斐<sup>1</sup>, 陈丽<sup>1</sup>, 毕明瑜<sup>1</sup>, 唐文如<sup>1</sup>, 盛苗苗<sup>1,2\*</sup>

(1 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;

2 云南省第一人民医院消化疾病内科研究所, 昆明 650032)

**摘要:** 结直肠癌发展的分子机制之一是抑癌基因 CpG 岛甲基化。*RASSF1A* 位于 3p21.3, 参与了包括细胞周期调控、凋亡、微管稳定在内的多种生物进程, 被认为是抑癌基因, 在包括结直肠癌在内的多种肿瘤中因甲基化失活。近来研究发现, *RASSF1A* 的甲基化可能作为结直肠癌分子诊断的标志。本文就 *RASSF1A* 功能及其与结直肠癌的关系进行综述。

**关键词:** *RASSF1A*; 甲基化; 结直肠癌

中图分类号: Q75; R735 文献标志码: A

## Role of the Ras-association domain family 1 isoform A in colorectal cancer

HU Fei<sup>1</sup>, CHEN Li<sup>1</sup>, BI Ming-Yu<sup>1</sup>, TANG Wen-Ru<sup>1</sup>, SHENG Miao-Miao<sup>1,2\*</sup>

(1 Laboratory of Molecular Genetics of Aging & Tumor, Medical School, Kunming University of Science

and Technology, Kunming 650500, China; 2 Yunnan Provincial Institute of Digestive Medicine,

The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650500, China)

**Abstract:** One of the molecular mechanisms of colorectal cancer is the methylation of the tumor suppressor gene CpG island. Ras-association domain family 1 isoform A (*RASSF1A*) is a tumor suppressor gene located within a segment on chromosome 3p21.3, involving in cell cycle regulation, apoptosis and microtubule stability, and is inactivated by hypermethylation in various tumors including colorectal cancer. Recently, studies have found that methylation of *RASSF1A* may be a marker for molecular diagnosis of colorectal cancer. This article reviewed the function of *RASSF1A* and the relationship between *RASSF1A* and colorectal cancer.

**Key words:** *RASSF1A*; hypermethylation; colorectal cancer

中国不同地区恶性肿瘤发病和死亡分析的统计数据显示, 2014 年我国结直肠癌在全部恶性肿瘤中发病率居第三位, 死亡率居第五位<sup>[1]</sup>。根据结直肠癌发展的分子机制可以将结直肠癌分为三类: 染色体不稳定 (chromosomal instability, CIN)、微卫星不稳定 (microsatellite instability, MSI) 和 CpG 岛甲基化 (CpG island methylator phenotype, CIMP), 它们分别占到了结直肠癌的 65%~85%、12%~15% 和 10%~20%<sup>[2]</sup>。*RASSF1A* (Ras-association domain family 1, isoform A) 是抑癌基因, 位于 3p21.3 染色体区域, 参与了微管动态、细胞运动、周期调控和细胞凋亡, 常因启动子甲基化而失活, 其失活与包括结直肠癌在内的多种肿瘤的发生发展相关。本文对 *RASSF1A* 基

因进行介绍, 并就其甲基化与结直肠癌关系进行综述。

### 1 *RASSF1A* 结构及介绍

*RASSF1* (Ras-association domain family 1) 位于 3p21.3 染色体区域, 大约 12 kb, 其编码蛋白的 C 端与 Ras 效应蛋白 NORE1 (novel Ras effector 1) 同源, 含有 Ras 结合结构域, 能够与 Ras 和其他小型 GTP 酶结合。*RASSF1* 包含 8 个外显子 (1 $\alpha$ 、1 $\beta$ 、2 $\alpha\beta$ 、2 $\gamma$ 、3、4、5、6)(图 1a), 有 2 个启动子区域, 由

收稿日期: 2019-11-18; 修回日期: 2019-12-30

基金项目: 云南省卫生科技计划项目(2016N228)

\*通信作者: E-mail: miaomiaosheng156@163.com

于外显子的选择性剪接, 其存在着 8 个转录本, *RASSF1A-H*, 其中 *RASSF1A* 的研究最为广泛。转录本 *RASSF1A*、*RASSF1D*、*RASSF1E*、*RASSF1F*、*RASSF1G* 和 *RASSF1H* 从第一个启动子区转录, *RASSF1B* 和 *RASSF1C* 从第二个启动子区开始转录。这些转录本中, 除 *RASSF1A* 和 *RASSF1C* 广泛存在外, 其他转录本具有组织特异性。*RASSF1D* 表达于心脏, *RASSF1E* 表达于胰腺, 其余转录本研究的较少<sup>[3]</sup>。*RASSF1A* 包含 6 个外显子 (1 $\alpha$ 、2 $\alpha\beta$ 、3、4、5、6), 编码包含 340 个氨基酸的蛋白质, 其主要功能区域包括位于 N 端的蛋白激酶 C (PKC) 保守结构域 (C1)、共济失调毛细血管扩张突变基因 (ataxia telagectasia mutant, ATM) 磷酸化位点、Ras 结合 / 泛素样 (RA) 结构域和 C 端的 Sav/Rassf/Hpo (SARAH) 结构域 (图 1b)。其中, C1 结构域在 PKC 中为甘油二酯和佛波酯的结合位点<sup>[4]</sup>。ATM 磷酸化位点存在 ATM 激酶磷酸化共同序列, *RASSF1* 在此位点的 WETPDL-SQAEIEQK 序列同 P53 中 ATM 磷酸化序列一致<sup>[5]</sup>。Ras 结合结构域位于 C 端, 是 RASSF 家族共有的区域, 其结构与 Raf1 相似, 可以介导 *RASSF1A* 同 Ras 及其他小 GTP 酶的相互作用<sup>[3]</sup>。SARAH 结构域也存在于 WW45 (WW domain containing adaptor 45, 与果蝇中 Salvador 同源) 和丝氨酸 / 苏氨酸激酶 STK3 (serine/threonine kinase 3) 和 STK4 (与果蝇中 Hippo 同源) 中, STK3 和 STK4 又分别称为 MST1 和 MST2 (mammalian STE20-like protein kinase)。通过 SARAH 结构域, *RASSF1A* 能够与 MST1/2 结合, 激活 MST1/2, 引起凋亡<sup>[6]</sup>。同 RASSF 家族其他成员一样, 其主要是作为接头蛋白发挥抑癌作用<sup>[7]</sup>。

## 2 RASSF1A 功能及抑癌机制

### 2.1 RASSF1A 与微管、细胞黏附和迁移

作为骨架蛋白, *RASSF1A* 在细胞中的分布随着细胞进程的改变而发生变化: 在分裂间期, 其与细胞基质的微管结合; 在前期, *RASSF1A* 定位于

分离的中心体; 在中期和后期, 定位于纺锤丝和极体; 在胞质分裂时定位于中心体<sup>[3]</sup>。*RASSF1A* 能够通过和 MAP1A、C19ORF15 和 MAP4 等微管结合蛋白直接结合而稳定微管<sup>[8]</sup>, 也能够通过阻止微管的解聚促进微管稳定<sup>[4]</sup>。*RASSF1A* 能够使微管从放射状结构诱导为稳定的圆环状结构, 进而使细胞对使微管解聚的噻氨酯哒唑 (nocodazole) 耐药。*RASSF1A* 还能够增加  $\alpha$ -tubulin 水平, 稳定微管。*RASSF1A* 引起的微管稳定还参与了细胞黏连和运动。*RASSF1A* 的过表达能够增加原肌球蛋白 (tropomyosin) 和钙黏蛋白 (cadherin 2) 等细胞黏连和运动相关的基因表达<sup>[3]</sup>。

### 2.2 RASSF1A 与凋亡诱导

作为抑癌基因, *RASSF1A* 的表达能够促进肿瘤细胞凋亡。MST 激酶的激活能够诱导凋亡, 而促癌基因 RAF-1 能够与 *RASSF1A* 竞争结合 MST2, 阻止 MST2 的激活并抑制凋亡。*RASSF1A* 能够破坏 RAF1-MST2 复合物并增强 MST2 与 LATS1/2 (large tumor suppressor kinase 1) 的结合, 激活的 MST2 能够磷酸化激活 LATS1/2。LATS1 使 YAP1 (Yes-associated protein) 磷酸化, 磷酸化的 YAP1 不能入核, 抑制了 YAP1 的促癌作用<sup>[9]</sup>。也有文献表明, YAP1 入核后会促癌, 其入核后与 P73 结合<sup>[10]</sup>, 引起前凋亡因子 PUMA 转录<sup>[11]</sup>。同时, LATS2 对 YAP2 的丝氨酸 127 位点的磷酸化, 也会促进 YAP2 入核与 P73 结合, 引起 PUMA 的转录<sup>[12]</sup>。*RASSF1A* 还可与 MST1 结合, 阻止 MST1 与 Raf 的骨架蛋白 CNK1 结合, 对 CNK1 进行去抑制, 从而促进 CNK1 介导的凋亡<sup>[3]</sup>。RAF-1 与 MST2 的结合抑制 MST2 的同时, 也会妨碍 RAF-1 与 Ras 的结合<sup>[13]</sup>。因此, 甲基化引起的 *RASSF1A* 缺失也会增强 MST2 和 RAF-1 的相互作用, 从而抑制 Raf/MAPK 通路。

在 Hippo 通路中, *RASSF1A* 能抑制 PP2A 对 MST1/2 的去磷酸化, 从而激活 MST1/2 的自磷酸化并稳定 MST2<sup>[14]</sup>, MST 的磷酸化能激活 LATS1/2



图1 RASSF1 (a)和RASSF1A (b)结构示意图

激酶,使得 YAP (Yes associated protein) 和 TAZ (tafazzin) 转录因子磷酸化<sup>[15]</sup>。激活的 MST1 还可以使 Bcl-x1 磷酸化,促进其从 Bax 解离<sup>[16]</sup>。

此外, RASSF1A 能够和 MDM2 形成复合物促进 MDM2 (MDM2 proto-oncogene) 的自泛素化,从而增强了 P53 的稳定性和活性,促进了凋亡的发生<sup>[17]</sup>。RASSF1A 还通过与 MAP-1 (modulator of apoptosis-1) 结合激活凋亡执行者 Bax,使其向线粒体运动并介导凋亡<sup>[14]</sup>。

### 2.3 RASSF1A与周期阻滞

Donninger 等<sup>[18]</sup>对 RASSF1A 与微管结合的区域进行了点突变后发现, RASSF1A 不能与微管结合蛋白 MAPs 结合,同时也丧失了对周期的调控作用。RASSF1A 的表达能够降解 MDM2,稳定 p53,使 p21<sup>WAF1</sup> 表达增加,抑制细胞周期从 G<sub>1</sub> 期向 S 期转换<sup>[19]</sup>。RASSF1A 还可通过 AKT 途径上调 p21<sup>Cip1/Waf1</sup>,并促进其入核,将细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期<sup>[20]</sup>。RASSF1A 还可与 p120<sup>E4F</sup> 结合将细胞周期抑制在 G<sub>1</sub> 期<sup>[3]</sup>。RASSF1A 与 Cdc20 的结合,能够阻碍 APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome, A) 在有丝分裂的前中期与 Cdc20 形成复合物,从而抑制其激活,降低了 APC/C 的泛素酶活性,抑制了 APC/C 对周期蛋白的泛素化降解,导致在前中期周期蛋白 A 和 B 水平升高,将细胞周期阻滞在分裂中期<sup>[3]</sup>。

RASSF1A 还能够在有丝分裂中与纺锤体和中心体结合,调控有丝分裂进程。RASSF1A 能够参与 Rb 家族的细胞周期检验点,从而诱导细胞周期阻滞。此外, RASSF1A 能够通过降低周期蛋白 D1 和 D3 的水平参与细胞周期的调控<sup>[3]</sup>。

除了调控周期蛋白外, RASSF1A 还能够通过其他途径调控细胞周期。通过阻碍 SCF (betaTrCP) 对 REST (repressor element 1 silencing transcription factor) 的抑制, RASSF1A 能够促进 REST 的积累,进而下调 miR-21,使细胞周期阻滞<sup>[21]</sup>。RASSF1A 能够诱导 ANKRD1 (ankyrin repeat domain 1) 的表达,进而诱导 TP53、BAX (BCL2-associated X) 和 CDKN1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A) 的表达,同时调控细胞周期和凋亡<sup>[22]</sup>。

### 2.4 RASSF1A的其他功能

RASSF1A 能够通过 144 到 193 位的氨基酸与质膜钙调蛋白依赖的钙 ATP 酶 (plasma membrane calmodulin-dependent calcium ATPase, PMCA4b) 的催化结构域结合,下调表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 依赖的 Erk 的激活<sup>[3]</sup>。RASSF1A 还能

够抑制 AKT473 位点的磷酸化激活,进而解除 AKT 对 Raf-1 S259 位点的磷酸化抑制作用,增强 Raf-MEK-ERK 通路<sup>[20]</sup>。

RASSF1A 通过 BRCA2 维持了复制叉的稳定性<sup>[23]</sup>。ATM/ATR 激酶能够磷酸化 RASSF1A,维持复制叉的完整性,调控核酸的剪切修复<sup>[8]</sup>。RASSF1A 还能抑制激活的 K-ras 诱导的 DNA 氧化应激损伤<sup>[24]</sup>。

RASSF1A 还能够促进自噬的发生和成熟<sup>[25]</sup>,引起衰老发生<sup>[20]</sup>。RASSF1A 的缺失还与炎症反应相关, RASSF1A 缺失后不能抑制 TLR (Toll like receptor) 对 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) 的激活,使得炎症反应增强<sup>[26]</sup>。在肝转移的结直肠癌中, RASSF1A 与核内和胞内的  $\beta$ -catenin 都正相关, RASSF1A 失活能够增强  $\beta$ -catenin 的致癌作用<sup>[27]</sup>。

### 2.5 RASSF1A的甲基化与去甲基化

病毒感染会使 RASSF1A 发生甲基化。SV40 感染间皮细胞会引起 RASSF1A 的启动子甲基化,并使得 RASSF1A 表达下调<sup>[3]</sup>。EBV 感染也会增加 RASSF1A 的甲基化。EBV 潜伏抗原 3C (EBV latent antigen 3C, EBNA3C) 能够直接与 RASSF1A 结合,介导 DNA 甲基化转移酶 (DNMTs) 对 RASSF1A 进行甲基化<sup>[28]</sup>。

RASSF1A 的甲基化还可能与 RNA 干扰相关。在用小干扰 RNA (siRNA) 靶向启动子的 CpG 岛下调基因转录时,会诱导序列特异性甲基化的发生。在前列腺癌中进行芯片分析显示,生成 siRNA 的内源性翻译转录本是从包括 RASSF1A 在内的基因内的启动子合成的,因此, RNA 干扰可能对 RASSF1A 和其他基因的甲基化起重要作用<sup>[3]</sup>。

RASSF1A 的甲基化还可能与衰老相关。正常的人乳房上皮细胞随着传代, RASSF1A 启动子会发生甲基化<sup>[29]</sup>。

RASSF1A 基因组结构的特点,也使其易于甲基化。RASSF1A 启动子与其串联的上游 ZMYND10 最后一个外显子的距离只有 200 bp。有研究发现,当转录起始位点与上游转录结束位点小于 1 kb 时,下游基因易发生甲基化<sup>[30]</sup>。

RASSF1A 的甲基化还会受一些药物的影响。胞苷类似物,如地西他滨处理细胞能够使新合成的链不被甲基化,恢复 RASSF1A 的表达。除药物外,一些天然化合物,如蛋氨酸、姜黄素、大黄素等能够靶向 DNA 甲基转移酶,从而下调 RASSF1A 的甲基化,使其表达<sup>[29]</sup>。穿心莲内酯 (andrographolide, AGP) 则能通过抑制血管生成通路和降低 p-AKT

活性诱导 RASSF1A 的表达<sup>[31]</sup>。同时,也有报道称二甲双胍处理 CaCo-2 细胞会增加 RASSF1A 的甲基化<sup>[32]</sup>。

### 3 RASSF1A与结直肠癌的关系

#### 3.1 RASSF1A作为诊断标志物

RASSF1A 的表达下调主要是由启动子的甲基化引起的。RASSF1A 启动子在多种肿瘤中发生高甲基化<sup>[3-4,33]</sup>。在结直肠癌中,RASSF1A 的甲基化率为 12%~81%<sup>[34]</sup>。RASSF1A 启动子甲基化在正常组织中不常见,具有肿瘤特异性,与肿瘤的发生相关。RASSF1A 甲基化率在结直肠癌中比健康的对照组高<sup>[35]</sup>。通过检测 RASSF1A 的甲基化可以辅助结直肠癌的诊断。一项包括 1 736 例结直肠癌和 811 例非肿瘤受试者的 meta 分析显示,RASSF1A 甲基化预示着 6 倍的患癌风险(OR = 6.02, 95% CI = 4.57~7.93)<sup>[36]</sup>。

RASSF1A 联合其他基因共同检测,可以提高灵敏度和特异性。在一项由 240 名结直肠癌患者和 50 名非恶性的结直肠黏膜患者的诊断研究中,由 MGMT/RASSF1A/SEPT9 三个基因组成的组合对于结直肠癌的诊断达到了 96.6% 的灵敏度、74.0% 的准确性和 91.5% 的阳性率(AUC 达到 0.97)<sup>[37]</sup>。

对结肠癌患者血液中游离 DNA 进行检测,发现 RASSF1A 的甲基化率为 11%~28.3%<sup>[38-39]</sup>。通过检测血液 RASSF1A 甲基化为结直肠癌的诊断提供了新的方法。与内镜相比,可以减轻患者的痛苦,也比较方便。

#### 3.2 RASSF1A与结直肠癌的发生发展

对 CRC 和周围正常黏膜中与肿瘤相关的 DNA 甲基化水平分析发现,RASSF1A 甲基化在 CRC 中高于周围正常黏膜<sup>[36]</sup>。且随着癌变程度增加,RASSF1A 的甲基化程度升高。在正常黏膜、腺瘤和腺癌组织中,RASSF1A 表达依次降低,且在肿瘤中不表达<sup>[22]</sup>。RASSF1A 甲基化在结直肠癌中高于腺瘤和正常组织<sup>[37]</sup>,提示 RASSF1A 在良性生长和增生性病变中的高甲基化往往预示着癌变风险。RASSF1A 甲基化程度也随肿瘤的恶性程度增加,在侧向传播肿瘤中高于息肉性腺瘤中,低于结直肠癌;相应地,RASSF1A 的表达在侧向传播肿瘤中低于息肉性腺瘤,高于结直肠癌<sup>[37]</sup>。

RASSF1A 甲基化还与病理特征相关。RASSF1A 表达缺失在结肠癌中高于直肠癌,男性中高于女性<sup>[22]</sup>。然而,也有研究显示,RASSF1A 甲基化在女性中高于男性<sup>[38]</sup>,其差别可能是由于人种不同所

致。RASSF1A 甲基化水平在肝转移的结直肠癌中高(85% vs. 35%,  $P = 0.015$ )<sup>[39]</sup>,且表达水平在肝转移中低<sup>[25]</sup>。

在可手术的结直肠癌中,RASSF1A 甲基化与肿瘤分期相关;在转移性的结直肠癌中,RASSF1A 高甲基化与中度分化、癌胚抗原的高表达和 APC (adenomatous polyposis coli tumor suppressor) 甲基化状态相关<sup>[40]</sup>。除与肿瘤分期相关外,RASSF1A 甲基化还与远处转移和淋巴转移相关<sup>[41]</sup>。另外,RASSF1A 甲基化在肿瘤Ⅲ期中高于肿瘤Ⅱ期,在分化较差的患者中高于中度分化和良好分化的,提示 RASSF1A 可能影响了结直肠癌的进展<sup>[33]</sup>。RASSF1A 与 Ras 状态也相关,RASSF1A 表达缺失主要发生在 K-ras 野生型中(63% vs. 32%,  $P = 0.011$ )<sup>[22]</sup>。

#### 3.3 RASSF1A与结直肠癌的治疗和预后

RASSF1A 已被证明能够影响肿瘤的化疗效果。用奥沙利铂对Ⅱ期和Ⅲ期结直肠癌患者治疗显示,甲基化组的客观反应率低<sup>[34]</sup>。该研究还发现,化疗药物对 RASSF1A 的甲基化也有影响,在治疗两个周期后 RASSF1A 的甲基化下降了 21.3%,提示可以根据 RASSF1A 的甲基化情况进行化疗的监测。

在对血液中 cf-DNA 的甲基化进行多变量分析后发现,RASSF1A 的甲基化预示着较差的总生存期(HR = 3.35, 95% CI = 1.76~6.38)<sup>[38]</sup>。RASSF1A 与其他基因共同作为标志物进行检测时,其甲基化也预示着较差的预后,并与肿瘤分级和分化无关<sup>[40]</sup>。Sun 等<sup>[35]</sup>也发现,甲基化组的无进展生存期和总生存期都比未甲基化组差,且甲基化组的客观反应率较差。

类似于甲基化导致的 RASSF1A 表达缺失,RASSF1A 的多态性也会影响化疗的效果<sup>[41-42]</sup>。

## 4 结语和展望

启动子甲基化导致的抑癌基因失活是肿瘤发生发展的机制之一,RASSF1A 作为抑癌基因之一,其甲基化失活可通过血液和粪便检测到,这为结直肠癌的诊断带来了便利。但 RASSF1A 的甲基化机制、基因表达调控机制及在结直肠癌发生发展中的作用还有待进一步研究,其作为检测标志的灵敏性还需同其他基因一同检测进一步提高。

### [参 考 文 献]

- [1] 陈万青,孙可欣,张思维,等. 2014年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤, 2018, 27: 1-14

- [2] Wang W, Kandimalla R, Huang H, et al. Molecular subtyping of colorectal cancer: recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol*, 2018, 55: 37-52
- [3] Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res*, 2005, 65: 3497-508
- [4] Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry*, 2005, 70: 576-83
- [5] Kim ST, Lim DS, Canman CE, et al. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem*, 1999, 274: 37538-43
- [6] Fallahi E, O'Driscoll NA, Matallanas D. The MST/Hippo pathway and cell death: a non-canonical affair. *Genes: Basel*, 2016, 7: E28
- [7] Gordon M, Baksh S. RASSF1A: not a prototypical Ras effector. *Small GTPases*, 2011, 2: 148-57
- [8] Donninger H, Schmidt ML, Mezzanotte J, et al. Ras signaling through RASSF proteins. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 58: 86-95
- [9] Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*, 2007, 21: 2747-61
- [10] Van Der Weyden L, Papaspyropoulos A, Pouligiannis G, et al. Loss of *Rassf1a* synergizes with deregulated Runx2 signaling in tumorigenesis. *Cancer Res*, 2012, 72: 3817-27
- [11] Yee KS, Grochola L, Hamilton G, et al. A *RASSF1A* polymorphism restricts p53/p73 activation and associates with poor survival and accelerated age of onset of soft tissue sarcoma. *Cancer Res*, 2012, 72: 2206-17
- [12] Kawahara M, Hori T, Chonabayashi K, et al. Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. *Blood*, 2008, 112: 3856-66
- [13] Romano D, Nguyen L K, Matallanas D, et al. Protein interaction switches coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 673-84.
- [14] Guo C, Zhang X, Pfeifer GP. The tumor suppressor *RASSF1A* prevents dephosphorylation of the mammalian STE20-like kinases MST1 and MST2. *J Biol Chem*, 2011, 286: 6253-61
- [15] Pan D. The Hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell*, 2010, 19: 491-505
- [16] Del Re DP, Matsuda T, Zhai P, et al. Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bel-xL. *Mol Cell*, 2014, 54: 639-50
- [17] Song MS, Song SJ, Kim SY, et al. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J*, 2008, 27: 1863-74
- [18] Donninger H, Clark JA, Monaghan MK, et al. Cell cycle restriction is more important than apoptosis induction for RASSF1A protein tumor suppression. *J Biol Chem*, 2014, 289: 31287-95
- [19] Oh SJ, Lee MG, Moon JR, et al. Ras association domain family 1 isoform A suppresses colonic tumor cell growth through p21(WAF1) activation in a p53-dependent manner. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 8: 88437-52
- [20] Thaler S, Hähnel PS, Schad A, et al. RASSF1A mediates p21cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of AKT. *Cancer Res*, 2009, 69: 1748-57
- [21] Ram RR, Mendiratta S, Bodemann BO, et al. RASSF1A inactivation unleashes a tumor suppressor/oncogene cascade with context-dependent consequences on cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, 2014, 34: 2350-8
- [22] Jiménez AP, Traum A, Boettger T, et al. The tumor suppressor RASSF1A induces the YAP1 target gene *ANKRD1* that is epigenetically inactivated in human cancers and inhibits tumor growth. *Oncotarget*, 2017, 8: 88437-52
- [23] Pefani DE, Latusek R, Pires I, et al. RASSF1A-LATS1 signalling stabilizes replication forks by restricting CDK2-mediated phosphorylation of BRCA2. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 962-71
- [24] Cao D, Chen Y, Tang Y, et al. Loss of RASSF1A expression in colorectal cancer and its association with K-ras status. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 976765
- [25] Li W, Yue F, Dai Y, et al. Suppressor of hepatocellular carcinoma RASSF1A activates autophagy initiation and maturation. *Cell Death Differ*, 2018, 26: 1379-95
- [26] Gordon M, El-Kalla M, Zhao Y, et al. The tumor suppressor gene, RASSF1A, is essential for protection against inflammation-induced injury. *PLoS One*, 2013, 8: e75483
- [27] Schirosi L, Mazzotta A, Opinto G, et al.  $\beta$ -catenin interaction with NHERF1 and RASSF1A methylation in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 2016, 7: 67841-50
- [28] Zhang S, Pei Y, Lang F, et al. EBNA3C facilitates RASSF1A downregulation through ubiquitin-mediated degradation and promoter hypermethylation to drive B-cell proliferation. *PLoS Pathog*, 2019, 15: e1007514
- [29] Dammann RH, Richter AM, Jim AP, et al. Impact of natural compounds on DNA methylation levels of the tumor suppressor gene RASSF1A in cancer. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: E2160
- [30] Kiehl S, Zimmermann T, Savai R, et al. Epigenetic silencing of downstream genes mediated by tandem orientation in lung cancer. *Sci Rep*, 2017, 7: 3896
- [31] Blanchard TG, Lapidus R, Banerjee V, et al. Upregulation of RASSF1A in colon cancer by suppression of angiogenesis signaling and Akt activation. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48: 1259-73
- [32] Sabit H, Abdel-Ghany SE, M Said OA, et al. Metformin reshapes the methylation profile in breast and colorectal cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19: 2991-9
- [33] Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers*, 2007, 23: 73-87
- [34] Fernandes M S, Carneiro F, Oliveira C, et al. Colorectal cancer and RASSF family-A special emphasis on RASSF1A. *Int J Cancer*, 2013, 132: 251-8
- [35] Sun X, Yuan W, Hao F, et al. Promoter methylation of RASSF1A indicates prognosis for patients with stage II and III colorectal cancer treated with oxaliplatin-based

- chemotherapy. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5389-95
- [36] Hu H, Zhou C, Li B, et al. Diagnostic value of RASSF1A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Pathol Res Pract*, 2018, 214: 1572-8
- [37] Freitas M, Ferreira F, Carvalho S, et al. A novel DNA methylation panel accurately detects colorectal cancer independently of molecular pathway. *J Transl Med*, 2018, 16: 45
- [38] Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, et al. The prognostic efficacy of cell-free DNA hypermethylation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2018, 9: 7010-22
- [39] Kawasaki H, Igawa E, Kohosozawa R, et al. Detection of aberrant methylation of tumor suppressor genes in plasma from cancer patients. *Pers Med Universe*, 2013, 2: 20-4
- [40] Nilsson TK, Löf-Öhlin ZM, Sun XF. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Int J Oncol*, 2013, 42: 127-33
- [41] Sebio A, Matsusaka S, Zhang W, et al. Germline polymorphisms in genes involved in the Hippo pathway as recurrence biomarkers in stages II/III colon cancer. *Pharmacogenomics J*, 2016, 16: 312-9
- [42] Sebio A, Stintzing S, Heinemann V, et al. A genetic variant in *Rassf1a* predicts outcome in mCRC patients treated with cetuximab plus chemotherapy: results from FIRE-3 and JACCRO 05 and 06 trials. *Pharmacogenomics J*, 2018, 18: 43-8