

表遗传修饰对多药耐药基因 1 调控的研究进展

刘丽丽 综述 郭文君 审校
(潍坊医学院病理教研室, 山东 潍坊 261042)

[摘要] 多药耐药基因 1 (multidrug resistance gene 1, MDR1) 的耐药机制与药物的泵出有关。过去的十年里, 在有关耐药基因的调控方面已经做了大量的研究。MDR1 基因表达受许多因素的影响。最近研究证实, 表遗传修饰在调控 MDR1 基因表达中起重要作用。表遗传通过对 DNA 的甲基化和组蛋白脱乙酰化的修饰来调节 MDR1 基因的表达。应用化学物质可以逆转 MDR1 基因依赖性多药耐药, 提高化疗敏感性, 这将为癌症治疗提供新策略。

[关键词] 表遗传学; DNA 甲基化; 多药耐药基因 1; 组蛋白修饰

[中图分类号] R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2007)03-0245-04

Progression about epigenetic regulation of multidrug resistance gene 1

LIU Li-li, GUO Wen-jun

(Department of Pathology, Weifang Medical College, Weifang Shandong 261042, China)

[Abstract] Multidrug resistance genes 1 (MDR1) is involved in drug efflux, and their regulation have been the subject of intense research efforts in the past 10 years. Many factors and cellular signaling pathways play a role in the regulation of MDR1 gene expression. Recent evidence points to an important role for the epigenetic regulation of MDR1 gene expression. Epigenetics can regulate the transcription of MDR1 gene through the DNA methylation and histone modification, which lead to the high expression of P-gp, causing drug resistance. Using chemical factors to intervene in the epigenetic modification can reverse the MDR1 gene dependent multidrug resistance, and improve the sensitivity of chemotherapy. It provides the novel strategy for treatment of malignant tumors.

[Key words] epigenetics; DNA methylation; drug resistance genes 1 (MDR1); histone modification

[Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(3):0245-04]

肿瘤的耐药机制有多种, 包括 DNA 的修复改变, 清除酶的改变及药物泵出的增加等, 了解这些不同的机制或许能从中找到药物治疗改进的新思路。目前研究最深入的耐药机制是多药耐药基因 1 (multidrug resistance gene 1, MDR1) 及其产物 P-糖蛋白 (P-gp) 的过表达^[1-2]。P-gp 是依赖 ATP 的药物外排泵, 能将细胞内化疗药物逆浓度泵至细胞外, 使细胞内化疗药物达不到有效杀伤剂量而产生耐药。近年来, 表遗传调控研究发现, MDR1 基因启动子区的修

饰 (如甲基化或组蛋白去乙酰化) 会影响正常的转录水平, 介导肿瘤的多药耐药性。

1 表遗传调控机制

表遗传是一种由非 DNA 序列的改变引起的、可遗传的基因表达水平的变化。所涉及的机制包括 DNA 甲基化、组蛋白脱乙酰化修饰和染色质重塑。

1.1 DNA 甲基化 DNA 甲基化是指基因组中 CpG 岛的胞嘧啶环上的第 5 位碳原子的甲基化。CpG 岛指基因组中富含 CpG 二核苷酸重复序列的

①收稿日期: 2006-12-02 修回日期: 2007-01-09

作者简介: 刘丽丽 (1981-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤病理方面的研究。

DNA 片段。一般位于结构基因的启动子区及起始部位,长约数百到 2 000 bp。DNA 甲基化受甲基转移酶(DNMT)的严格调节,甲基转移酶可将 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的甲基转移至胞嘧啶的第 5 位碳原子,目前已知甲基转移酶中,研究最多的是 DNMT1, DNMT3a 和 DNMT3b。DNMT1 负责半甲基化 DNA (hemimethylated DNA) 的维持甲基化(maintenance methylation);DNMT3a 以及 DNMT3b 负责未甲基化的 DNA 双链被甲基化的重新甲基化(denovo methylation)。DNMT1 主要与复制后形成的半甲基化 DNA 发生反应,根据亲本链的甲基位点,在复制链对称回文结构相应的胞嘧啶上进行甲基化,这样就获得了与亲本 DNA 完全相同的甲基化形式,构成了表遗传学信息在细胞和个体世代间传递的机制。DNMT1 另一重要的功能是能与许多活性蛋白如组蛋白去乙酰化酶(HDAC)1 和 2、甲基化 CpG 结合蛋白(MBD)1-3、RB 蛋白以及增殖细胞核抗原(PCNA)等结合,参与转录控制和染色质的修饰^[3]。

现已初步确定,有如下的表遗传学途径可沉寂基因的表达:(1)5-mc 伸进 DNA 双螺旋的主沟,干扰转录因子与启动子的结合。例如,视网膜母细胞瘤(RB)基因启动子甲基化干扰 RB 基因反式活化因子与其结合;乳腺癌和卵巢癌 BRCA1 基因启动子甲基化干扰 cAMP 一反应因子结合位点(CREB)与其转录因子结合。然而这不是普遍的机制,因为大部分转录因子并没有 CpG 的结合域。最近有实验表明, DNMT1 抑制转录与其甲基化功能无关,部分是通过与组蛋白脱乙酰酶(HDAC)结合形成复合物,使组蛋白去乙酰化的结果;(2)甲基化-CpG 结合(MBD)蛋白选择性地与甲基化启动子结合形成复合物,阻断了转录因子结合部位;(3)启动子区甲基化的 CpG 与 MBD 蛋白特异性结合,后者能与 HDAC 结合形成复合物,结果使核心组蛋白尾部去乙酰化,形成更紧密的 DNA 包装,减小了转录因子到达它们结合部位的通道^[4]。

1.2 组蛋白修饰 组蛋白核小体由 4 种组蛋白形成八聚体核心,组蛋白修饰主要指核心组蛋白尾端的共价修饰,包括位于组蛋白尾端的赖氨酸的乙酰化、赖氨酸和精氨酸的甲基化、赖氨酸的泛素化、丝氨酸和苏氨酸的磷酸化以及组蛋白的 ADP-核糖化(ADP-ribosylation)。组蛋白修饰可为染色质重塑

复合物和转录因子等提供结合部位^[5]。如组蛋白乙酰化后会招募酵母交配型转换/蔗糖不发酵复合物(yeast mating type switch/sucrose non-fermenting, SWI/SNF)。复合物 SPT-ADA-GCN5 乙酰转移酶(SPT-ada-Gcn5-acetyltransferase, SAGA)和 TATA 结合蛋白(TBP)的结合使基因表达,去乙酰化则会招募转录沉默复合物,引起基因沉默^[6]。不过,最近已经有组蛋白去乙酰化与基因活化有关的报道。DNA 通过组蛋白 H1 压缩成染色质,组蛋白与 DNA 结合使染色质结构紧密,基因表达受抑。组蛋白的乙酰化和磷酸化修饰会导致蛋白正电荷减少,与 DNA 结合能力降低,染色质疏松利于转录。紧密型染色质在核小体连接处松解,暴露基因转录启动子区,为转录因子的结合提供可接近(accessibility)状态。这一过程包括染色质结构和位置的改变,即染色质重塑(remodeling)^[7]。最近 Frsga 等^[8]研究指出,90% 结肠癌患者的疾病进展与其组蛋白的甲基化和脱乙酰化有关。

DNA 的甲基化、组蛋白的去乙酰化、染色质的紧密结构和 DNA 的不可接近性常使基因转录抑制,处于静息状态。DNA 去甲基化、组蛋白的乙酰化、染色质疏松,与转录的启动和基因活化有关。说明不需改变基因的结构,只改变基因转录的微环境就可激活或静息基因的表达。癌基因的低甲基化、抑癌基因高甲基化和组蛋白的脱乙酰化导致基因的异常表达与肿瘤形成有关。

2 表遗传修饰对 MDR1 的基因调控

近几年表遗传研究表明,MDR1 启动子区基因的变化会影响正常的转录水平,介导多药耐药性。对 400 例术前未接受化疗的大肠癌患者进行分析,发现 MDR1 在肿瘤体细胞中自然存在,并非仅在化疗后产生,其中仅有 5 例体细胞和 12 例生殖细胞 MDR1 基因突变,而 80 例患者的 MDR1 启动子 CpG 位点低甲基化。说明多药耐药与 MDR1 突变关系不大,而 MDR1 低甲基化、肿瘤高表达 P-gp 蛋白,可导致细胞对化疗药物的敏感性显著降低,预后较差^[9]。Dayid 等^[10]研究 MCF-7 乳腺癌细胞上 MDR1 转录调控区附近 DNA 高甲基化的作用,发现 MCF-7 细胞 MDR1 转录率极低,但相应的 MDR1 启动子在转染细胞中表现出转激活活性,这表明顺式因子可能是引起 MDR 转录差异的因素。亚硫酸钠处理 DNA 后基

因测序法结果揭示 MCF-7/ADR 的 MDR1 启动子甲基化范围较小,表明 CpG 二核苷酸甲基化可能是 MDR1 转录差异的原因。El-Osta 等^[11]研究表明,MDR1 转录水平通常与 DNA 甲基化密切相关。应用甲基化抑制剂 5-氮胞苷(5-aza-C)和组蛋白去乙酰化酶抑制剂制滴菌素 A (TSA) 来检测基因转录,启动子甲基化及 MDR1 启动子相关染色质决定子,发现甲基化 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) 与甲基化依赖 MDR1 基因转录沉默有关。还发现被抑制的 MDR1 基因的启动子是甲基化的并且相关的染色质富含 MeCP2 和乙酰化的组蛋白。TSA 能诱导组蛋白的 H3 和 H4 的乙酰化但不能活化转录;用 5-aza-C 诱导 DNA 去甲基化可以释放 MeCP2,并使启动子乙酰化,从而部分的缓解转录抑制。如果同时应用 DNA 甲基化抑制剂和组蛋白去乙酰化抑制剂,MDR1 表达会明显增加。Kantharidis 等^[12]应用亚硫酸盐基因组测序发现,在 T 细胞性白血病细胞株 CEM-CCRF (药物敏感株)中,MDR1 启动子的 CpG 处于超甲基化状态,MDR1 转录是失活的,而在 CEM-A7R (耐药株),MDR1 启动子是低甲基化,活化 MDR1 基因过度表达 P-gp 蛋白。从而说明 MDR1 基因表达与启动子甲基化状态的不同有关。

Grady^[13]研究发现 CpG 的 DNA 甲基化在正常细胞中能抑制 MDR 基因的转录,但在大肠癌细胞中 CpG 的 DNA 会出现过度甲基化或突变,这些超甲基化的基因不但可能是大肠癌的致病因素,而且或许可以用来作为大肠癌的特殊分子标记。但 Fryxell 等^[14]研究急性粒细胞白血病发现,CpG 富含区的甲基化状态并不是调整 MDR1 基因表达的“开关”。Chen 等^[15]证明肿瘤细胞的抗药性与 H3 的乙酰化引起 ABCB1 基因上游启动子区的染色质的重塑致该基因活化有关。

3 化学物质干预表遗传修饰对 MDR1 表达的影响

DNA 甲基化酶(DNMT)抑制剂 5-氮胞苷和去乙酰化酶(HDAC)抑制剂 TSA,可以调节 MDR1 的表达。

3.1 甲基化抑制剂 甲基化抑制剂包括胞苷类似物如 5-氮胞苷(5-aza-C)和 5-氮脱氧胞苷(5-aza-dC)和 SAM 类似物如 Sinefungin。5-aza-C 和 5-aza-dC 的抗肿瘤作用机制包括:①直接与 DNA 或 RNA 结合引起细胞毒作用;②与 DNMT 共价结合抑制其

活性使 DNA 低甲基化从而使被抑制的抑癌基因重新表达。研究显示 5-aza-dC 能减少家族性腺瘤样息肉(familial adenomatous polyposis, FAP)小鼠肠道腺瘤的形成^[16-17]。Plumb 等^[18]的动物实验研究发现,用 5-aza-C 处理可以逆转结肠癌对顺铂、卡铂、替莫唑胺和表柔比星(表阿霉素)的耐药性。5-aza-C 和 5-aza-dC 这两种药物在肿瘤中的应用在欧洲和美国已处于临床试验阶段。SAM 类似物模拟甲基化酶的辅助因子 SAM,竞争性抑制甲基化酶。

3.2 HDAC 抑制剂 HDAC 抑制剂包括制滴菌素 A (trichostatin A, TSA), SAHA (suberoyl anilide hydroxamic acid) 和 TPX (trapoxin) 等。Kantharidis 等^[11]研究发现,TSA 是激活 MDR1 转录的必要而充分条件。它与甲基化抑制剂协同改变 MDR1 的 CpG 甲基化状态。

此外,近年发展起来的 RNAi 技术,能显著降低 MDR1 mRNA 的表达,特异性强且对机体毒副作用少,具有研究和应用前景。

4 展望

表遗传学是正在迅速崛起的一门生气勃勃的新学科,近年来已成为许多学科研究的前沿。表遗传学信息通过控制基因表达的时空顺序和作用方式,调节发育过程和各种生理反应及耐药性的研究越来越受人们的重视。表遗传学改变存在于肿瘤的发生过程中,被认为是肿瘤发生的早期分子事件,DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化都可以引起基因的转录抑制,这种调控机制是可逆的,因而对肿瘤临床治疗来说是非常令人振奋的靶点。目前,DNA 甲基化酶抑制剂和组蛋白去乙酰化酶抑制剂都已经应用于临床^[19-20]。例如,应用 DNA 甲基化酶抑制剂治疗镰状细胞贫血病可使患者的血红蛋白和球蛋白显著增加^[21],在治疗骨髓增生异常综合征方面也取得显著疗效^[22]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂苯丁酸在临床上已用于治疗白血病和一些实体瘤患者^[23-24]。表遗传学改变还可能预示化疗的敏感性,如 6-氧甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(MGMT)基因启动子的过度甲基化可作为预测烷化剂治疗对脑肿瘤患者的有效性的有用标记物。一些研究显示甲基化抑制剂具有逆转某些化疗药物耐药性的作用,甲基化抑制剂和化疗的联合将有望减少由于化疗药物的耐药性导致的肿瘤治疗的失败。随着表遗传学研究的深入,肯

定会对人类生长发育、肿瘤发生以及遗传病的发病机制及其防治做出新的贡献,也必将在其他领域中展示其不可估量的作用和广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Ueda K, Yoshida A, Amachi T. Recent progress in P-glycoprotein research[J]. *Anticancer Drug Des*, 1999, 14(2): 115-121.
- [2] Kantharidis P, El-Osta S, Silva M, et al. Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts[J]. *Drug Resist Updat*, 2000, 3(2): 99-108.
- [3] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development[J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1089-1093.
- [4] Robertson K D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer[J]. *Oncogene*, 2001, 20(24): 3139-3155.
- [5] Bartova E, Pachernik J, Harnicarova A, et al. Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases[J]. *J Ceu Sci*, 2005, 118(Pt 21): 5035-5046.
- [6] Mai A, Massa S, Rotili D, et al. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy[J]. *Med Res Rev*, 2005, 25(3): 261-309.
- [7] Baker E K, El-Osta A. MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling[J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(9): 819-824.
- [8] Frsga M F, Esteller M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4: 1377-1378.
- [9] Ferry D R, Kerr D J. Multidrug resistance in cancer[J]. *BMJ*, 1994, 308(6922): 148-149.
- [10] David G L, Yegnasubramanian S, Kumar A, et al. MDR1 promoter hypermethylation in MCF-7 human breast cancer cell: changes in chromatin structure induced by treatment with 5-Aza-Cytidine[J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(6): 540-548.
- [11] El-Osta A, Kantharidis P, Zalcborg J R, et al. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(6): 1844-1857.
- [12] Kantharidis P, El-Osta A, deSilva M, et al. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance[J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(11): 2025-2032.
- [13] Grady W M. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 4): 684-688.
- [14] Fryxell K B, McGee S B, Simoneaux D K, et al. Methylation analysis of the human multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic hematopoietic cells[J]. *Leukemia*, 1999, 13(6): 910-917.
- [15] Chen K G, Wang Y C, Schaner M E, et al. Genetic and epigenetic modeling of the origins of multidrug-resistant cells in a human sarcoma cell line[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9388-9397.
- [16] Lird P W, Jackson-Grusby L, Fazeli A, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation[J]. *Cell*, 1995, 81(2): 197-205.
- [17] Santini V, Kantarjian H M, Issa J P. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications[J]. *Ann Intern Med*, 2001, 134(7): 573-586.
- [18] Plumb J A, Strathdee G, Sludden J, et al. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 6039-6044.
- [19] Li L C, Carroll P R, Dahiya R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(2): 103-115.
- [20] Digel W, Lubbert M. DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: preclinical and clinical results[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 55(1): 1-11.
- [21] Koshy M, Dorn L, Bressler L, et al. 2-deoxy 5-azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia[J]. *Blood*, 2000, 96(7): 2379-2384.
- [22] Silverman L R, Demakos E P, Peterson B L, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(10): 2429-2440.
- [23] Gore S D, Weng L J, Figg W D, et al. Impact of prolonged infusions of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 963-970.
- [24] Gilbert J, Baker S D, Bowling M K, et al. A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(8): 2292-2300.