

## · 综述 ·

## 基因甲基化与 mTOR 在成人急性淋巴细胞白血病中的研究进展

任翠翠 李英花

基因甲基化是引起基因沉默的一种方式,甲基化修饰是表观遗传修饰中一种最为重要并且常见的 DNA 修饰,也是脊椎动物唯一的 DNA 自然修饰方式。DNA 的高甲基化可以使肿瘤抑制基因以及编码细胞黏附分子和生长调控蛋白的基因失活。在基因表达的调控、基因结构稳定等方面有着十分重要的作用,与肿瘤的发生发展关系密切<sup>[1]</sup>。与此同时,随着医学的不断进步,信号传导系统的缺陷和异常活化与肿瘤发生、发展及预后的关系已成为肿瘤分子生物学的研究热点,同时通过干预信号传导途径治疗肿瘤也成为生物治疗的新兴领域。哺乳动物西罗莫司靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是细胞内多种重要信号传导通路的枢纽,具有调控翻译起始、转录、蛋白合成和降解,调节细胞的生存、增殖和细胞凋亡等细胞重要生理功能。该信号通路激活程度也是判断肿瘤患者预后的重要指标之一。因此抑制该信号通路已成为肿瘤预防和肿瘤靶向治疗的热点<sup>[2]</sup>,有报道, mTOR 通路与多基因甲基化之间存在一定关系,两者的结合有可能为肿瘤患者的诊疗提供新的思路。

## 一、急性淋巴细胞白血病研究状况

成人急性淋巴细胞白血病(ALL)是一种恶性程度高,进展迅速,预后极差的恶性肿瘤,尤其是 B-ALL。主要以发热、贫血、出血等症状为主,患者主要死于感染及脑出血,目前骨髓象检查是确诊和评定疗效的重要依据,细胞形态学(morphology)、免疫学(immunology)、细胞遗传学(cytogenetics)和分子遗传学(molecular)(MICM)可分各种亚型,治疗不同,成人 ALL 疗效差与染色体的异常高发有关系。遗憾的是,目前对 ALL 的发生及进展的分子生物学机制仍不十分清楚,主要以联合化疗及造血干细胞移植治疗为主,如果能找到与其密切相关的基因表达改变,不仅有助于正确的判断预后,而且将为患者确定个体化治疗方案提供重要的参考依据。

## 二、细胞周期相关基因甲基化与 mTOR 的研究

相关研究显示, p15, p16, p21, p57, p73, MDR1, THBS2, MYF3, ER, THBS1, CD10, C-ABL PTEN<sup>[3-4]</sup>等基因,在成人 ALL 中至少存在一个基因的甲基化,并且据调查证实存在一个以上基因甲基化的成人 ALL 患者预后更差, p15, p16, p21 等大部分基因与细胞周期的形成有关,即细胞周期相关基因,表明细胞周期相关基因的甲基化在成人 ALL 的发生、发展中起着重要作用,并影响临床预后。

DNA 甲基化是在 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)的催化作用下,以 S2 腺苷蛋氨酸(S2 adenosylmethionine, SAM)作为供体将活化的甲基引入 DNA 链中。DNA 的甲基化本身并不改变基因的碱基序列,但可以改变基因的表达。是真核细胞 DNA 正常的表观遗传学修饰方式,哺乳动物中 DNA 甲基化主要发生在 5'-CpG-3'上生成 5-甲基胞嘧啶,启动子区甲

基化可在转录水平抑制基因表达,进而导致肿瘤的发生。有研究发现在肿瘤中, DNA 甲基转移酶表达增高,故认为 DNA 甲基转移酶活性增高导致基因岛高度甲基化可能是肿瘤发病机制之一。同时有报道,白血病的发生并不是严格的受单一基因甲基化状态的影响,而是多基因甲基化的结果<sup>[5]</sup>。并发现这些基因大部分是启动子中细胞周期相关基因和凋亡蛋白相关基因,有研究发现在白血病中主要是启动子区域细胞周期相关基因的多甲基化,而不是修复基因<sup>[6]</sup>。

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,属于磷酸肌醇激酶相关蛋白激酶家族(phosphoinositide kinase-related kinase, PIKK), PI3K/PKB(protein kinase B, PKB)信号通路下游的一个效应蛋白<sup>[7]</sup>,是 PI3K/Akt 信号途径中的蛋白激酶,活化的 mTOR 可通过调节下游 3 个在信号转导过程中有重要作用的蛋白质而发挥作用:真核起始因子 4E 结合蛋白 1(4EBP1)、核糖体 40S 小亚基 S6K 蛋白激酶(p70S6K)、真核生物转录延伸因子(eukaryotic elongation factor 2, eEF2),促使细胞从 G1 期向 S 期过渡,进而发挥作用。相关文献报道,在慢性粒细胞白血病(CML)、急性髓系白血病(AML)和 ALL 中均存在 PI3K/Akt/mTOR 的基因质量、蛋白质表达水平和激酶活性的异常改变,即均检测到 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的异常活化。同时,还发现白血病的耐药细胞株较普通白血病细胞株表达高水平的 PIP3 以及活化的 PI3K、Akt、mTOR,所以深入研究该通路 with 白血病的关系具有重要意义。

p15 基因,属于肿瘤抑制基因,定位于染色体 9p21 区域,属于 p15/p20 家族,属于细胞周期相关基因,通过抑制细胞周期素依赖性激酶 4/6(CDK4/6)阻止细胞由 G1 期进入 S 期,从而减少细胞的异常生长及变异,阻止肿瘤发生和发展。很多研究证实, p15 在恶性血液病中处于低表达状态,同时发现其甲基化频率增高,并与疾病的预后成负相关,并且有报道在 p15 基因甲基化转阴的患者,其复发率低于甲基化持续存在的患者<sup>[8]</sup>。Kim 等<sup>[9]</sup>在 B-ALL 研究中发现,含有 p15、p16 甲基化的成人比儿童预后差,在实体瘤细胞中,已有相关报道 mTOR 在一定程度上增加 p15 蛋白的含量,具体的机制仍在探索中,与 PI3K/Akt/mTOR 通路关系密切。

p16 基因又称 CDKN2A 基因,与多种肿瘤的形成与进展有关,又称为多肿瘤抑制基因<sup>[10]</sup>,位于染色体 9p,是细胞周期素(cyclin)依赖性激酶抑制蛋白,可抑制细胞周期素 D 依赖性激酶的活性,可抑制细胞周期素 D 依赖性激酶的活性,通过磷酸化使 Rb(视网膜母细胞瘤)蛋白失活,抑制细胞从 G1 期向 S 期的过渡。在许多肿瘤中存在 p16 基因的失活,使细胞周期阻滞于 G1 晚期,主要与 p16 的缺失、突变、甲基化有关系。很多研究证实, DNA 甲基化是 ALL 发病机制中常见的原因。同样与 p15 基因一样,在某些实体瘤中,已有研究证实, p16 能够抑制 mTOR 通路和下游效应因子<sup>[11]</sup>具体机制仍需进一步研究。

p21 基因是近年来发现的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的重要成员,是位于 p53 基因下游的细胞周期素依赖性

激酶抑制因子,有学者在白血病细胞株的研究中发现 mTOR 抑制剂西罗莫司通过抑制细胞周期,导致 p21 基因表达增强,进而引起 mTOR 通路的激活异常<sup>[12]</sup>。

p73 为凋亡调控基因,即抑癌基因,其高表达,抑制肿瘤的发生、发展。很多文献报道,p73 在肿瘤形成中处于低表达状态,Kawano 等<sup>[13]</sup> 在 ALL 中发现 p73 基因缺失与甲基化有关,并且成高甲基化状态。并且 THORAYA M. 等人研究发现,p73 甲基化的 ALL 患者相比未发现 p73 基因甲基化的患者缓解率较低<sup>[5]</sup>,有研究报道,剩余 p73 基因甲基化多少影响患者第一次完全缓解持续时间的长短<sup>[14]</sup>。

PTEN 为一新发现抑癌基因,通过对细胞周期和细胞生存的阴性调节抑制细胞生长,作为 mTOR 信号通路抑制因子,PTNE 基因在多种肿瘤中呈低表达状态,研究报道 40% -80% 肿瘤低表达与 PTNE 启动子区高甲基化有关,DNA 甲基化抑制剂在一定程度上可恢复 PTNE 基因表达,从而抑制过度活化的信号通路,并诱导抑癌基因的表达<sup>[15]</sup>。表明 mTOR 通路与基因甲基化之间存在一定关系,但仍需进一步研究。

### 三、甲基化及 mTOR 抑制剂的研究进展:

甲基化抑制药物能够逆转基因甲基化,进而抑制肿瘤细胞的生长,尤其是白血病细胞<sup>[16]</sup>。甲基化抑制剂主要包括核苷类和非核苷类,核苷类药物主要有阿扎胞苷(azacitidine)、地西他滨(decitabine)、法扎拉滨(fazarabine)和二氢-5'-胞苷。有研究表明地西他滨(DAC)可以活化一些肿瘤抑制基因,比如 p16 基因,目前已有申请将地西他滨应用于骨髓异常综合征的治疗,在 AML 研究中发现地西他滨激活后能结合 DNA,进而导致甲基转移酶的失活,引起基因低甲基化,或在表观遗传学上,使高甲基化的抑癌基因恢复表达<sup>[17]</sup>。2004 年 5 月 9 日阿扎胞苷被美国食品和药品管理局(FDA)批准用于治疗骨髓异常增生综合征(MDS)<sup>[18]</sup>地西他滨 2006 年被美国 FDA 批准用于 MDS 和 CML 等恶性血液系统疾病的治疗。非核苷类药物主要有:氨基苯甲酸类、邻苯二酰胺类、反义寡核苷酸类、三氧化二砷等,研究显示有去甲基化功能,具体机制目前不清楚,考虑干扰甲基转移酶的作用有关<sup>[19-20]</sup>,甲基化药物虽未应用于成人 ALL 的临床治疗,但其研究已经处于第三实验阶段,表明甲基化抑制在治疗成人 ALL 指日可待,近年来的研究显示,作用于 mTOR 靶点的药物 mTOR 抑制剂西罗莫司(rapamycin, RAP)及其衍生物 CCI2779 (temsirolimus)、RAD001 (everolimus)、AP23573 (defo2rolimus)正处于肿瘤治疗的临床试验阶段<sup>[21]</sup>,Teachey 等<sup>[22]</sup>在细胞系中,证实 mTOR 抑制剂与甲氨蝶呤起协同作用,增强患者对化疗药物的敏感性,目前已有大量随机实验证实,mTOR 抑制剂可以提高肾癌患者的生存率,mTOR 抑制剂主要是通过抑制肿瘤细胞的生长、抑制肿瘤血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡进而发挥作用。

### 四、展望

甲基化研究技术的快速发展,使基因甲基化应用于某些恶性疾病尤其是肿瘤的诊断、治疗成为可能。在临床 ALL 研究中,多基因特别是抑癌基因和细胞信号通路中的关键基因启动子区域的高甲基化,提示 DNA 甲基化在 ALL 的发生、发展中起着不可磨灭的作用。DNA 甲基化抑制剂的研究为 ALL 的治疗提供一个新的平台;mTOR 通路越来越受到医学界的关注,尤其在肿瘤细胞增殖、生长、分化过程中发挥极其重要的作用,但许多机制仍不清楚,临床前试验已证明了 mTOR 抑制剂单用或联合化学治疗,对恶性血液系统肿瘤有着广泛的治疗前景。甲基化及 mTOR 抑制剂联合用药将有可能成为血液肿瘤治疗中的一大亮

点。另外,深入研究 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在成人淋巴瘤白血病发生、发展中的作用,寻求针对该通路的更具特异性的靶向治疗药物具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Bergman Y, Cedar H. DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20:274-281.
- [2] Beauchamp EM, Plataniotis LC. The evolution of the TOR pathway and its role in cancer. *Oncogene*, 2012, 10:1-10.
- [3] Sato H, Oka T, Shinnou Y, et al. Multi-step aberrant CpG island hypermethylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am Pathol*, 2010, 176:402-415.
- [4] Wang CC, Huai L, Zhang CP, et al. Study on expression of PTEN gene and its pseudogene PTENP1 in acute leukemia and correlation between them. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2012, 33:896-901.
- [5] Abd El-Hamid TM, Mossallam GI, Sherisher MA. The Clinical Implications of Methylated p15 and p73 Genes in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Egypt Natl Canc Inst*, 2010, 22:175-184.
- [6] Uehara E, Takeuchi S, Yang Y, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Oncol Lett*, 2012, 3:190-192.
- [7] Janes MR, Vu C, Mallya S, et al. Efficacy of the investigational mTOR kinase inhibitor MLN0128/INK128 in models of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2013, 27:586-594.
- [8] Iacobucci I, Ferreri A, Lonetti A, et al. CDKN2A/B alterations impair prognosis in adult BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Cancer Res*, 2011, 17:7413-7423.
- [9] Kim M, Yim SH, Cho NS, et al. Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009, 195:59-65.
- [10] Broude EV, Swift ME, Vivo C, et al. p21 (Waf1/Cip1/Sd1) mediates retinoblastoma protein degradation. *Oncogene*, 2007, 26:6954-6958.
- [11] Al-Ansari MM, Hendrayani SF, Tulbah A, et al. p16 (INK4A) Represses Breast Stromal Fibroblasts Migration/Invasion and Their VEGF-Dependent Promotion of Angiogenesis through Akt Inhibition. *Neoplasia*, 2012, 14:1269-1277.
- [12] Li J, Xue L, Hao H, et al. Rapamycin provides a therapeutic option through inhibition of mTOR signaling in chronic myelogenous leukemia. *Oncol Rep*, 2012, 27:461-466.
- [13] Kawano S, Miller CW, Gombart AF, et al. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood*, 1999, 94:1113-1120.
- [14] Yang H, Kadia T, Xiao L, et al. Residual DNA methylation at remission prognostic in adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009, 113:1892-1898.
- [15] Xu G, Zhang W, Bertrem P, et al. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int oncol*, 2004, 24:893-900.
- [16] Tao SF, Zhang CS, Guo XL, et al. Anti-tumor effect of 5-aza-2'-deoxycytidine by inhibiting telomerase activity in hepatocellular carcinoma cells. *World Gastroenterol*, 2012, 21, 18:2334-2343.
- [17] Wang H, Chen P, Wang J, et al. In Vivo Quantification of Active Decitabine-Triphosphate Metabolite: A Novel Pharmacological Endpoint for Optimization of Hypomethylating Therapy in Acute Myeloid Leukemia. *AAPS*, 2013, 15:242-249.
- [18] Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, et al. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *Oncologist*, 2005, 10:176-182.
- [19] 李培坤, 耿小平, 朱立新. DNA 甲基化抑制剂研究进展. *国际药学研究杂志*, 2010, 3:198-202

- [20] 李空飞, 佟红艳. 以甲基化转移酶抑制剂为基础的联合方案治疗恶性血液病的研究进展. 国际输血及血液学杂志, 2011(6): 546-548. inhibitors and their potential role in therapy in leukaemia and other haematological malignancies. Br Haematol, 2009, 145: 569-580. (收稿日期: 2013-03-22)
- [21] Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. CA Cancer Clin, 2009, 59: 111-137. (本文编辑: 梁雷)
- [22] Teachey DT, Grupp SA, Brown VI. Mammalian target of rapamycin in-

任翠翠, 李英花. 基因甲基化与 mTOR 在成人急性淋巴细胞白血病中的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(12): 5510-5512.

