

CDC7 MCM2 在弥漫大B细胞淋巴瘤预后和 治疗中的作用

侯芸 付凯 综述 王华庆 审校

摘要 弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤,占成人淋巴瘤发病率的30%~40%。由于受预后危险因素和生物学特性的影响,不同患者的5年生存率差异很大。DLBCL的发病率呈逐年上升趋势,仅40%~45%的患者可经CHOP方案治愈,美罗华联合CHOP方案可以显著延长患者的生存期。临床工作中发现IPI评分不能准确预测DLBCL患者的预后,所以急需找到能反映其生物学行为的特异性分子指标来准确预测患者的预后并指导个体化治疗方案的制定。CDC7是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,最早在酵母中发现,与DNA复制有关。人CDC7通过磷酸化微小染色体维持蛋白2(MCM2)来启动DNA的复制。许多恶性肿瘤细胞中存在CDC7的高表达,包括DLBCL。CDC7高表达是DLBCL患者的预后不良因素之一,可作为DLBCL的特异性预后指标指导患者预后;靶向抑制CDC7基因通路可以诱导DLBCL细胞的凋亡,与美罗华联合有协同增效作用。CDC7和MCM2在指导DLBCL的预后及临床治疗方面具有重要的临床意义。CDC7基因通路可以成为治疗DLBCL患者的新的治疗靶点。CDC7抑制剂与美罗华联合可以有效提高难治性DLBCL患者的疗效。

关键词 细胞分裂周期相关蛋白激酶7 微小染色体维持蛋白2 弥漫大B细胞淋巴瘤 预后

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.11.015

CDC7 and MCM2 in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma

Yun HOU, Kai FU, Huaqing WANG

Correspondence to: Huaqing WANG; E-mail: huaqingw@163.com

Department of Lymphoma, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin 300060, China.

Abstract Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common form of lymphoma that accounts for 30% to 40% of all lymphomas among adults. The clinical outcomes are extremely varied, with five-year survival rates between 30% and 80%, which are widely dependent on clinical risk factors and biological heterogeneity. Based on biological heterogeneities, DLBCL can be divided into different subgroups, such as germinal center B-cell-like (GCB) DLBCL, activated B-cell-like (ABC) DLBCL, and primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). The five-year survival rates of GCB-DLBCL and ABC-DLBCL are 59% and 30%, respectively. The rituximab-combined CHOP (RCHOP) regimen has significantly improved the overall survival of DLBCL patients. However, a number of patients remain resistant to rituximab or undergo relapse after rituximab treatment. We studied the relationship between the expression level of cell division cycle 7 (CDC7) protein and the survival rate of 60 DLBCL patients in a previous study. After they received RCHOP chemotherapy, the median survival time of patients with low CDC7 expression was higher than those with high CDC7 expression ($P=0.027$). Higher expression of CDC7 was observed among ABC-DLBCL patients (21/28, 75.0%). Overall, we speculate that the CDC7/ phosphorylated minute chromosome maintenance protein 2 (pMCM2) signal pathway has an important role in chemotherapy resistance. CDC7 can also be a potential therapeutic target in DLBCL, especially for ABC-DLBCL. The in vitro culture system and tumor-transplanted nude mice model are used in this study to examine CDC7 gene expression. CDC7 gene expression are inhibited and enhanced in this study to clearly identify the relationship between the CDC7/pMCM2 signal pathway and the survival of DLBCL cells. Furthermore, we explore relevant clinical significance focused on the potential use of novel molecular targeting strategies against DLBCL, especially for ABC-DLBCL.

Keywords: CDC7, MCM2, DLBCL, prognosis

弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL),约占成人NHL的30%~40%^[1],是一种侵袭性淋巴瘤,20年来CHOP方案一直是其标

准的一线化疗方案,但仅约40%~45%的患者可治愈。最近10年来其治疗取得了巨大进步,主要体现在剂量密度/剂量强度化疗和利妥昔单抗(Rituximab, MabThera,美罗华)等单克隆抗体应用于临床^[2],使患

者的生存率有了进一步提高,但部分患者仍可出现复发。目前,临床上有效预测疗效或复发的指标是国际预后指数(International Prognostic Index, IPI)^[3],但临床工作中发现,很多IPI评分相同的DLBCL患者,其预后却大不相同。DLBCL根据基因表型不同,又分为三个亚型,生发中心型(GCB)、活化B细胞型(ABC)和原发纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL),其中GCB型DLBCL患者的5年生存率为59%,而ABC型仅为30%^[4]。所以寻找能反映DLBCL生物学行为的特异性分子指标,为临床治疗及预后评价提供依据,一直是多年来临床肿瘤学和病理学研究的重要课题。Obermann等^[5]研究发现微小染色体维持蛋白2(MCM2)与DLBCL患者的预后相关。研究发现细胞分裂周期相关蛋白激酶7(CDC7)与DLBCL患者的预后相关。本课题组研究发现CDC7、MCM2可以作为DLBCL的特异性预后指标^[6],且靶向调控CDC7基因通路可以有效治疗DLBCL^[7]。现对CDC7及MCM2的表达与DLBCL预后之间的关系以及在靶向治疗方面的作用进行综述。

1 细胞分裂周期相关蛋白激酶7(CDC7)

1.1 CDC7的结构

CDC7是丝氨酸/苏氨酸激酶,最早在酿酒酵母中被发现^[8]。其基因全长是一个1 722 bp并能编码574个氨基酸长度蛋白的开放阅读框,包含4个保守区,N端尾巴。另外研究发现^[9]由于huCDC7外显子可变剪接作用,huCDC7还存在有3种转录子:3.5 kb转录子、4.4 kb转录子和2.4 kb转录子。

1.2 CDC7在细胞周期中的作用机制

CDC7是在核内完成对细胞周期中DNA复制的调控,在细胞核内CDC7-ASK形成复合体后就开始磷酸化激活结合在染色体上的MCM(minichromosome maintenance complex)家族的多个成员,如MCM2、MCM4、MCM6,尤其是对MCM2的磷酸化作用最强^[10]。激活后的MCM2可能是通过空间构象的改变来解除对解旋酶的抑制,从而进一步促进DNA复制的起始(图1)。

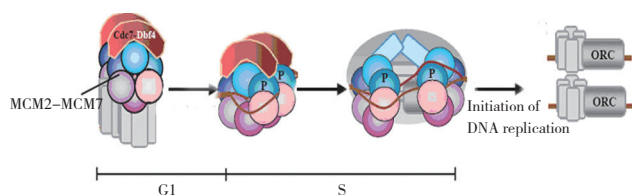


图1 CDC7磷酸化MCM2启动DNA复制

Figure 1 CDC7-phosphorylated MCM2 for initiating DNA replication

1.3 CDC7蛋白过表达

CDC7及其调节蛋白Dbf4在人类许多肿瘤细胞

系中过表达,CDC7在卵巢癌细胞中过表达提示肿瘤分期晚,预后差^[11]。CDC7和Dbf4在恶性黑色素瘤中过表达,且表达水平越高,患者的无复发生存时间越短^[12]。在人类许多恶性肿瘤细胞中都发现磷酸化的MCM2过表达,提示CDC7激酶活性增加,包括DLBCL和霍奇金淋巴瘤^[13]。

由于CDC7是DNA复制所必需,所以CDC7表达增加与肿瘤细胞增殖活性呈正相关。但CDC7表达水平与细胞增殖状态无关,而与S期细胞所占比例有关。CDC7与Dbf4过表达导致细胞周期阻滞在S期,参与DNA损伤的修复,从而促进了肿瘤细胞的存活。人类胃癌及结肠癌细胞中已发现CDC7基因的突变,CDC7/Dbf4过表达导致肿瘤细胞的大量存活,这为CDC7基因成为抗癌药物的靶点提供了理论依据^[14]。

1.4 CDC7与DLBCL预后的关系

CDC7在正常细胞周期中表达水平是不变的,但在肿瘤细胞里由于细胞周期发生紊乱,CDC7处于异常表达和过度激活状态。2009年ASH美国大会报道Janusz等应用免疫组化法检测了78例患者组织蜡块中CDC7蛋白的表达,其中男性43例,女性35例,在IPI低危组、中低危组、中高危组、高危组患者CDC7的表达分别为10%、37%、24%、28%。全组累积总生存期为50个月的患者在CDC7低表达组和高表达组分别为57%和37%($P=0.26$)。虽然差异无统计学意义,但结果表明了CDC7激酶的表达增强与DLBCL患者预后不良相关。本课题组应用免疫组化方法分析了60例DLBCL患者的病理蜡块,CDC7低表达者34例,高表达者26例,CDC7低表达组中位生存期明显高于高表达组($P=0.027$)^[6]。

2 微小染色体维持蛋白2(MCM2)

2.1 MCM2蛋白及其生物学功能

微小染色体维持蛋白(minichromosome maintenance proteins, MCMs)是重要的DNA复制启动因子。MCM2基因是影响微染色体有丝分裂稳定性的主要基因,其编码的MCM2蛋白是一种启动DNA复制的蛋白家族中的一员,在G₁期装配到复制前体复合物后启动DNA的复制,使细胞进入S期,在维持S期基因稳定性中起重要的作用,目前已将它视为S期细胞的标志物,即仅在增殖细胞中表达,被认为是特异性增殖相关因子,且被认为是癌前标志^[15]。

2.2 MCM2与DLBCL预后的关系

Obermann等^[5]应用组织芯片法检测了112例初治DLBCL患者组织标本的MCM2蛋白表达。中位随访时间为23.5个月(1~177个月)。结果显示,MCM2蛋白阳性表达者较阴性表达者的生存期(OS)明显缩短。经单因素分析显示,MCM2蛋白表达水平是影响

患者生存的不良因素之一。然而,经多因素分析显示,MCM2蛋白表达水平不是影响患者生存的独立预后因素。本课题组采用荧光定量PCR法检测60例DLBCL患者外周血及骨髓中CDC7、MCM2基因的表达,研究结果显示,CDC7、MCM2低表达组患者的2年生存率明显高于高表达组($P<0.01$),CDC7、MCM2可以成为DLBCL的特异性预后指标,较IPI评分更准确^[15]。

3 CDC7与MCM2的关系

CDC7可通过磷酸化MCM2调控DNA复制的顺利进行,见图1。

4 CDC7基因抑制

目前许多研究应用shRNA技术抑制CDC7基因的表达,使肿瘤细胞阻滞在S期,继而细胞核损伤,介导p53非依赖性细胞凋亡^[16]。CDC7基因抑制是通过激活p38 MAP激酶诱导细胞凋亡的^[17]。下调CDC7基因可以导致肿瘤细胞凋亡,但仅可导致正常细胞发生细胞周期阻滞,而不影响其生存。正是由于这种选择性杀伤作用,使CDC7基因通路成为癌症治疗的有效靶点。本课题组应用shRNA技术下调DLBCL细胞系中CDC7基因的表达,结果显示,与未干扰组比较,CDC7基因抑制可以显著提高细胞凋亡($P<0.05$),CDC7基因抑制组与美罗华联合作用,更能显著诱导细胞凋亡,说明CDC7基因抑制与美罗华联合有协同增效作用。所以CDC7基因通路可成为治疗DLBCL的新的靶点,尤其针对美罗华耐药的患者,CDC7抑制剂与美罗华联合可以有效治疗难治性DLBCL^[7]。

5 针对CDC7基因的抗肿瘤治疗

随着生物制药领域技术的不断进步,针对CDC7激酶的小分子抑制剂相继问世。Montagnoli等^[18]研制的CDC7激酶抑制剂—PHA-767491,具有分子量低,可溶性好,血浆蛋白结合率低的特点,CDC7基因抑制率高达65%。临床前研究显示,PHA-767491通过抑制CDC7基因,有效减少MCM2蛋白磷酸化。体外试验表明,PHA-767491还可以抑制Cdk9及RNA多聚酶II的磷酸化^[19]。Cdk9抑制通过下调抗凋亡蛋白Mcl-1和Xiap的表达诱导肿瘤细胞凋亡,与CDC7基因抑制有协同作用^[20]。PHA-767491在人类多种肿瘤细胞系中均显示出对CDC7和Cdk9的联合抑制作用^[21]。PHA-767491作用于人皮肤纤维母细胞并不影响细胞活性,说明PHA-767491具有选择性杀伤作用,仅作用于肿瘤细胞而对正常细胞无害。研究表明,PHA-767491是通过p53非依赖途径诱导细胞凋亡。Nerviano研制的另一种CDC7抑制剂—NMS-354可通过p53非依赖途径诱导多种肿瘤细胞的凋亡。在卵巢癌、结肠癌及白血病模型中,NMS-354的肿瘤抑制率高达80%^[22]。NMS-354通过下调CDC7基因有效抑

制MCM2蛋白磷酸化。基于PHA-767491和NMS-354在临床前试验的结果,这两种药物顺利地进入到临床试验阶段。BMS-863233为一种CDC7抑制剂,也可交叉抑制PIM-1激酶的活性,2009年进入I期临床试验,用于治疗实体瘤及血液系统肿瘤,口服7~14天,21~28天为1个疗程。BMS-863233通过抑制DNA复制及MCM2磷酸化影响肿瘤细胞的存活,提示此药对结肠癌有效。

6 展望

鉴于CDC7基因对肿瘤细胞的生存及选择性杀伤方面的重要作用,CDC7已成为目前抗肿瘤治疗的重要靶点之一。研究表明,羟基脲、依托泊甙与CDC7抑制剂联合使用,可促进细胞的凋亡。体外试验表明,DNA损伤剂与CDC7抑制剂在诱导细胞死亡方面有协同增效作用^[23]。基于以上结果,临床前试验将DNA损伤剂与CDC7抑制剂联合应用到敏感人群,使治疗效果大幅提高。MCM2高表达已成为多种恶性肿瘤的预后不良因素,尤其是实体瘤。有报道称,急性白血病患者MCM2高表达提示复发风险较高^[24]。基于以上研究结果,CDC7/MCM2通路已成为指导多种实体瘤及血液系统肿瘤预后及治疗的重要靶点。

综上所述,临床前研究显示,CDC7/MCM2基因通路是治疗DLBCL的新型有效靶点,正在进行的临床试验试图说明,CDC7抑制剂在影响DNA复制方面较传统药物更加高效低毒。

参考文献

- Cultrera JL, Dalia SM. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions[J]. *Cancer Control*, 2012, 19(3): 204-213.
- Yamaguchi H, Hirakawa T, Inokuchi K. Importance of relative dose intensity in chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Clin Exp Hematop*, 2011, 51(1):1-5.
- Perry AM, Mitrovic Z, Chan WC. Biological prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Cancer Control*, 2012, 19(3): 214-226.
- Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5494-5502.
- Obermann EC, Went P, Zimpfer A, et al. Expression of minichromosome maintenance protein 2 as a marker for proliferation and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a tissue microarray and clinico-pathological analysis[J]. *BMC Cancer*, 2005, 5:162.
- Hou Y, Wang HQ, Ba Y. High expression of cell division cycle 7 protein correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29:3498-3503.
- Hou Y, Wang HQ, Ba Y. Effects of CDC7 gene silencing and Rituximab on apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138:2027-2034.

- 8 Vaziri C, Masai H. Integrating DNA replication with trans-lesion synthesis via Cdc7[J]. Cell Cycle, 2010, 9(24):4818-4823.
- 9 Woo RA, Poon RY. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells[J]. Cell Cycle, 2003, 2(4):316-324.
- 10 Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 8):1447-1454.
- 11 Kulkarni AA, Kingsbury SR, Tudzarova S, et al. Cdc7 kinase is a predictor of survival and a novel therapeutic target in epithelial ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15:2417-2425.
- 12 Clarke LE, Fountaine TJ, Hennessy J, et al. Cdc7 expression in melanomas, spitz tumors and melanocytic nevi[J]. J Cutan Pathol, 2009, 36:433-438.
- 13 Tenca P, Brotherton D, Montagnoli A, et al. Cdc7 is an active kinase in human cancer cells undergoing replication stress[J]. J Biol Chem, 2007, 282(1): 208-215.
- 14 Kitamura R, Fukatsu R, Kakusho N, et al. Molecular mechanism of activation of human Cdc7 kinase: bipartite interaction with Dbf4/activator of S phase kinase (ASK) activation subunit stimulates ATP binding and substrate recognition[J]. J Biol Chem, 2011, 286(26): 23031-23043.
- 15 侯芸,王华庆,付凯,等.细胞分裂周期相关蛋白激酶7和微小染色体维持蛋白2的表达与弥漫大B细胞淋巴瘤患者预后的关系[J].中华肿瘤杂志,2011,12(33):911-915.
- 16 Rodriguez-Acebes S, Proctor I, Loddo M, et al. Targeting DNA replication before it starts: Cdc7 as a therapeutic target in p53-mutant breast cancers[J]. Am J Pathol, 2010, 177(4):2034-2045.
- 17 Im JS, Lee JK. ATR-dependent activation of p38 MAP kinase is responsible for apoptotic cell death in cells depleted of Cdc7[J]. J Biol Chem, 2008, 283(37):25171-25177.
- 18 Montagnoli A, Moll J, Colotta F. Targeting cell division cycle 7 kinase: a new approach for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(18):4503-4508.
- 19 Malumbres M. Physiological relevance of cell cycle kinases [J]. Physiol Rev, 2011, 91(3):973-1007.
- 20 Natori A, Murillo LS, Kliszczak AE, et al. Mechanisms of action of a dual Cdc7/Cdk9 kinase inhibitor against quiescent and proliferating CLL cells[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(9):1624-1634.
- 21 Petermann E, Woodcock M, Helleday T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(37):16090-16095.
- 22 Shafer CM, Lindvall M, Bellamacina C, et al. 4-(1H-indazol-5-yl)-6-phenylpyrimidin-2(1H)-one analogs as potent CDC7 inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(16):4482-4485.
- 23 Vaziri C, Hill C. Linking Cdc7 with the replication checkpoint[J]. Cell Cycle, 2010, 9 (24):4787.
- 24 Wei Q, Li Y, Chen L, et al. Genes differentially expressed in responsive and refractory acute leukemia[J]. Front Biosci, 2006, 11:977-982.

(2012-10-15 收稿)

(2013-02-05 修回)

(本文编辑:杨红欣)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

“临床病例讨论”栏目简介

临床病例讨论为本刊特色栏目之一,重点报道疑难与典型肿瘤病例的诊疗过程,旨在鼓励临床工作者相互交流易误诊、误治或少见、罕见肿瘤和并发症的处理经验,使肿瘤临床医师从中得到启示与借鉴,提高对疑难病例的辨别与治疗水平。

来稿将以论著形式刊登。稿件内容具体要求如下:1)应有完整的病历摘要和详细的检查结果;2)临床讨论部分要有参加讨论的医师发言,就所讨论病例提出各自的看法;3)能提供有说服力的图片或病理检查结果,并结合本例患者的特点进行讨论;4)最后的分析要能总结经验教训,为临床工作提供借鉴与参考。

质量优秀的稿件将优先刊登。欢迎踊跃投稿!