

靶向白血病特异性转录调节因子融合蛋白 siRNA 的研究进展

赵午莉 邵荣光

白血病是血液系统的恶性疾病。在各种致癌因子的作用下,血细胞分化受阻且增生能力增强,导致血细胞无限增生且替代了原有的正常细胞,诱发了白血病。与大多数实体瘤不同,超过 50% 的白血病病例有明显的特异染色体改变,比如染色体异位和翻转,而且白血病和实体瘤相比具有更强的变异基因稳定性。以上两点表明,靶向特异肿瘤基因的分子治疗对白血病来讲比实体瘤更有前景。由于 RNA 干扰技术能使特异基因降解,高效抑制特异基因的表达,而不影响正常基因的功能,因此采用 siRNA 对血液肿瘤的研究已有不少报道。同时,针对肿瘤发病关键基因的 RNA 干扰治疗已经成为一种基因治疗的新措施。

白血病基因异位后产生的融合蛋白是白血病特异的分子标记。融合前各蛋白均在血细胞的正常代谢或分化中起一定的作用,异位融合后所形成的异位融合蛋白多具有促增生或抑制分化的作用。白细胞的一些转录因子在融合前,对血系干细胞分化为正常白细胞具有重要的作用,在异位融合后,所形成的白血病特异性转录调节因子融合蛋白大多具有促增生和抑分化作用。融合蛋白从生物学功能来分主要有两类:一类是具有酪氨酸激酶作用的异位融合蛋白,如 BCR-ABL、TEL-PDGFR、NPM-ALK、FLT3-LYN 等异位融合蛋白;另一类是具有抑制造血转录调控作用的异位融合蛋白(白血病特异性转录调节因子融合蛋白),如 AML1/MTG8、MLL-AF4、PML/RAR α 和 TEL/AML1、E2A-PBX1、CBF β /MYH11、MLL/AF10、MLL/AF6 和 MLL/AF1q 等融合蛋白。研究表明针对具有酪氨酸激酶作用的异位融合蛋白干扰可降低白血病细胞的增生;对白血病特异性转录调节因子融合蛋白干扰可降低白血病细胞的增生并促其分化,如针

对 BCR-ABL mRNA 的 siRNA 可以显著地降低白血病细胞的增生,促进白血病细胞的凋亡^[1];针对 TEL-PDGFR 的 siRNA 可以降低白血病细胞的增生能力,增强对抗癌药物的敏感性用^[2];针对 Lyn 融合基因的 siRNA 对白血病细胞作用 48h 后可引起白血病细胞凋亡^[3];针对 AML1/MTG8 的 siRNA 能够增强诱导剂 TGF1/vitamin D3 对白血病细胞的分化作用^[4]。目前 siRNA 的靶向研究多集中在针对酪氨酸融合蛋白方面,但由于靶向白血病特异性转录调节因子融合蛋白不仅可以抑制白血病细胞的增生,而且还能促其分化,因此针对转录调节因子融合蛋白的靶向研究越来越受到重视,本文着重就 4 种对分化具有调节作用的融合蛋白在靶向治疗方面的最新进展进行阐述。

一、靶向 AML1/MTG8 融合基因

在所有类型的急性淋巴细胞白血病(AML)病例中,t(8;21)(q22;q22)染色体异位是 AML 中最常见的异位,发生率大约为 10%~15%^[5]。分子结构为转录因子 AML1 的 DNA 结合区融合到了另一转录因子 MTG8 的开放阅读框中,从而形成了新的融合基因——AML1/MTG8 融合基因。AML1 基因的表达产物是转录核心结合因子(CBF)的亚单位,其功能与造血相关。AML1/MTG8 融合基因产物可竞争性抑制野生型 AML1 与 DNA 的结合,从而影响野生型 AML1 对造血的作用,推测这种作用可能与白血病的发生有关。MTG8 基因产物具有与细胞凋亡相关的基元和转录因子的结构特征,由于在 AML1/MTG8 融合基因的产物中几乎包含全长的 MTG8 结构,MTG8 的蛋白结合位点未受影响,提示 AML1/MTG8 在潜在的致白血病作用中除了抑制野生型 AML1 的作用外,也影响 MTG8 对血细胞转录的调控^[6]。Heidenreich 等采用针对 AML1/MTG8 融合位点的 siRNA 与诱导剂 TGF1/vitamin D3 联合作用后,与单独诱导相比形态不规则的白血病细胞增多,CD11b 和 CD14 阳性的细胞增多 40%,克隆形成率显著降低^[4]。Dunne 等采用 siRNA 干扰 AML1/MTG8 的融合位点后,发现与粒

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB521807);国家自然科学基金基金项目(30772583);教育部博士点基金(20070023017)

作者单位:100050 中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所

系分化相关的基因如 AZU1、BPI、CTSG、LYZ 和 RNASE2 的表达增加,与抗增生相关的基因如 IGFBP7、MS4A3 和 SLA 表达也增加,而且删除此基因后耐药性相关基因的表达量也下降,该结果可能有助于染色体异位 t(8;21) 病人克服耐药性^[7]。Kasashima 等研究发现,下敲白血病细胞 Kasumi-1 中 AML1/MTG8 后,可以激活和巨系分化相关的 p14 启动子,并增加分化相关因子 CD41 的表达^[8]。

二、靶向 MLL-AF4 融合基因

MLL-AF4 融合蛋白是人 4 号染色体长臂 2 区 1 带的基因与 11 号染色体长臂 2 区 3 带(4;11)(q21;q23) 的基因融合产生的。不同年龄段的融合发生率不同,婴儿 ALL 中最多见,发生率为 50%~70%,在儿童和成人中较低,分别为 2% 和 3%~6%^[9]。1991 年,Ziemin-van der Poel 等克隆出 MLL(mixed-lineage leukemia) 基因,MLL 是 HOX 基因上游转录调控因子,HOX 基因在造血生成中发挥关键的作用^[10]。当 MLL 蛋白功能异常时,HOX 基因表达下调,进而影响了正常造血。MLL 可被融合到 40 多个不同的基因中,产生很多不同的二聚体融合蛋白^[11]。和 MLL 相融合的基因如 AF1 或 GAS7 能引起其融合蛋白的寡聚化^[12],另一类基因如 AF4、AF9 和 ENL 可能只是融合蛋白的一部分^[13,14]。一般而言,融合后的基因和融合前的基因并不具有相同的特性,因此融合蛋白可能会影响 HOX 基因的表达,从而影响造血,导致白血病的发生。

最近,Thomas 等采用 siRNA 瞬时干扰 MLL-AF4 后,抑制了白血病 SEM 和 RS4 细胞的增生和克隆形成率^[15]。降低 MLL-AF4 的蛋白水平可引起和 Caspase-3 激活相关的凋亡,并降低抗凋亡因子 BCL-XL 表达。MLL-AF4 水平的降低伴随有基因 HOXA87、HOXA9 和 MEIS1 表达水平的降低。而且,MLL-AF4 水平降低后引起造血干细胞表面标志 CD133 表达水平的降低,表明血细胞的分化。采用针对 MLL-AF4 的 siRNA 转染白血病细胞后,降低了荷白血病裸鼠的致死率和发病率。这些研究表明,MLL-AF4 在进展性强的白血病克隆形成率和肿瘤异体移植中发挥很重要的作用。到目前为止,有 MLL 基因重组的患者临床治疗效果较差,部分是由于缺乏特殊的靶向抑制剂^[16]。因此,采用 siRNA 靶向抑制 MLL 的融合蛋白可能在进展性白血病治疗方面会有所建树。

三、靶向 TEL/AML1 融合基因

t(12;21)(p13;q22) 异位是儿童 ALL 最常见的染色体异位,约占儿童 ALL 的 20%~25%。t(12;21) 异位是 12p13 上的 TEL(translocation EST leukemia) 基因与 21q22 上的 AML1 基因交互易位,分别在 12 和 21 号染色体上形成 TEL-AML1 融合基因和 AML1-TEL 融合基因^[17~19]。TEL 含有一个 ETS 结构,属于 ETS 转录因子家族的成员。ETS 家族蛋白能与基因启动子核心序列 5'-GGA(A/T)-3' 结合,调节与细胞分化和增生有关的靶基因的转录,是强的转录抑制因子,可与 N-CoR 和 mSin3 等核辅助抑制因子结合。而 N-CoR 和 mSin3 均可独立募集组蛋白去乙酰化酶(HDAC) 组成核辅助抑制复合物,使染色体组蛋白上的赖氨酸残基脱乙酰化,增加组蛋白的阳性电荷,使其与带负电的 DNA 磷酸骨架紧密结合,从而使转录所需的其他转录因子、转录调节复合物和 RNA 聚合酶不能靠近,抑制靶基因的转录^[20]。AML1 又称 CBFa2,主要表达于造血组织,是早期造血必需的转录因子。其是核心结合因子 CBF 的亚基,与 CBFβ 异二聚化形成 CBF,对造血形成至关重要。可与增强子核心序列的 5'-TGT/cGGT-3' 结合,调节很多和造血相关的靶基因(如 M-CSFR、TCRα/13、MPO、NP-3、IL-3、GM-CSF 及 Cyclin D2 的表达转录,而这些靶基因多为造血特异基因。

融合蛋白 TEL-AML1 结构上保留了 TEL 的 H1H 和中间结构域,缺失了 ETS 结构域,并拥有 AML1 的几乎所有功能结构域。TEL-AML1 融合蛋白能募集 NCoR、mSin3 和 SMRT 等核辅助抑制因子,与 TEL 蛋白形成异二聚体而干扰野生 TEL 蛋白的功能。TEL-AML1 还可与野生型 AML1 竞争 DNA 结合位点,显著性地抑制野生型 AML1 的功能,使 AML1 调节的靶基因(M-CSF 受体、IL-3 和 G-CSF 受体基因等)的表达受抑,这两种作用使得造血过程中与分化有关的基因表达受到抑制,促成了白血病的发生。实验研究表明 TEL-AML1 融合基因的表达可诱导动物发生急性白血病^[20]。Diakos 等采用 siRNA 对白血病细胞株 REH 靶向干扰 TEL-AML1 基因后,发现细胞的增生能力下降且凋亡增加,说明 TEL-AML1 具有抗凋亡促增生作用。对其机制研究后发现,干扰 TEL-AML1 后热休克蛋白 HSP90 和 survivin 的表达降低,而 HSP90 和 survivin 是 IAP 家族中最强有力的抑制凋亡的分子。这些研究提示,TEL-AML 和 HSP90 是白血病治疗的很重要的一个靶点。

四、靶向 PML/RARα 融合基因

人染色体 t(15;17)(q22;q21) 异位是 15 号染色体长臂 2 区 2 带的早幼粒性细胞白血病 (PML) 基因和第 17 号染色体长臂 2 区 1 带的维甲酸受体 (RARα) 基因融合形成 PML/RARα 融合基因, 约 95% 的急性早幼粒细胞性白血病 (APL) 具有这类异位染色体。分子生物学研究表明, 该融合基因是 APL 特异性标志, 也是 APL 患者发病的重要基础。

RARα 基因位于染色体 17 长臂 21 区带, 其功能是核激素受体, 维甲酸与 RARα 受体元件结合后, 通过调节与造血分化相关的基因来抑制细胞生长并诱导细胞分化。PML 是一核蛋白, 正常位于一个称为 POD (PML oncogenic domain) 的结构中。POD 在核中呈斑点状约有 15 ~ 20 个。PML 的功能尚未完全阐明, 近来的研究认为 PML 通过转录激活下游基因的作用来抑制肿瘤细胞生长; PML 基因灭活后, 细胞生长加快, 周期缩短, 并丧失了接触抑制的特性; 在多种凋亡途径中, PML 也起着重要的作用。PML/RARα 融合后, 所编码的融合蛋白不具有正常 RARα 和 PML 等位基因编码的蛋白作用。野生型维甲酸受体和 PML 相互易位所形成的融合蛋白导致了以下结

果: ①PML/RARα 融合蛋白与 RARα 受体结合后, 通过竞争作用抑制了 RARα 受体元件的正常促分化作用, 抑制了早幼粒细胞的分化成熟; ②PML/RARα 融合蛋白能够与 PML 蛋白受体结合, 干扰后者对肿瘤的抑制功能, PML 的正常抑增生和促凋亡功能发生障碍后, 就导致了细胞增生, 凋亡减少; ③RARα 正常时能与转录共抑制复合物结合。在生理剂量维甲酸的作用下, RARα 可以与共抑制复合物解离, 激活所调节的靶基因来促进血细胞的分化。PML/RARα 可促进 RARα 与共抑制复合物的结合, 抑制 RARα 所调节靶基因的促分化作用, 从而使得早幼粒细胞分化受抑, 细胞增生, 引起 AML。

Hiroaki 等也采用 siRNA 干扰 PML/RARα 基因融合位点的连接处后, 发现细胞凋亡增加、分化增强。Kathryn Nason - Burchenal 等靶向对维甲酸具有抗性的白血病细胞 NB4 中的 PML/RARα 后, 增强了这些细胞对维甲酸分化诱导的敏感性, 细胞增生减慢, 凋亡增加 10%, 说明对维甲酸具有抗性的细胞在增生时需要 PML/RARα 的持续表达, 采用靶向此类基因的治疗是白血病治疗的研究方向之一。

表 1 白血病特异转录调节因子融合蛋白

融合基因	基因来源	蛋白功能	siRNA 干扰效应
AML1/MTG8 融合基因	t(8;21)(q22;q22) 人 8 号染色体长臂 2 区 2 带基因与 21 号染色体长臂 2 区 2 带的基因融合产生	融合蛋白可竞争性抑制野生型 AML1 与 DNA 的结合, 影响野生型 AML1 的作用	干扰剂与诱导剂联合作用后形态不规则的细胞增多, CD11b 和 CD14 阳性的细胞增多, 克隆形成率显著降低
MLL - AF4 融合基因	(4;11)(q21;q23) 人 4 号染色体长臂 2 区 1 带的基因与 11 号染色体长臂 2 区 3 带的基因融合产生	融合蛋白可能会影响 HOX 基因的表达, 从而影响造血, 导致白血病的发生	瞬时干扰后抑制白血病细胞 SEM 和 RS4 的增生和克隆形成率; 降低了荷白血病裸鼠的致死率和发病率
TEL/AML1 融合基因	t(12;21), 12p13 上的 TEL 基因与 21q22 上的 AML1 基因交互易位在 12 和 21 号染色体上形成	融合蛋白能干扰 TEL 蛋白对转录的抑制作用, 抑 AMIL1 的功能, 促成了白血病的发生	干扰剂使白血病 REH 细胞中 HSP90 和 survivin 的表达降低, 增生能力下降, 细胞凋亡增加
PML/RARα 融合基因	t(15;17)(q22;q21) 人 15 号染色体长臂 2 区 2 带的 PML 基因和第 17 号染色体长臂 2 区 1 带的 RARα 基因融合形成	融合蛋白能够抑制凋亡的发生, 结合干扰 PML 和 RARα 基因对肿瘤的抑制功能, 使细胞分化受阻, 导致 APL 的发生	用 siRNA 靶向对维甲酸具有抗性的白血病细胞 NB4 中 PML/RARα 后, 这些细胞对维甲酸诱导的分化更加敏感, 细胞增生减慢, 凋亡增加

五、展 望

20 世纪 80 年代, 各国学者应用维甲酸和异构体维甲酸处理 HL - 60 和 U937 细胞株细胞, 出现了诱导分化作用。1986 年中国上海王振义教授应用全反式维甲酸 (ATRA) 治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL) 获得了 72% 的完全缓解, 开创了临床应用诱导分化剂治疗白血病的先河。1996 ~ 2007 年全世界共召开了 8 次国际诱导分化会议, 制定了肿瘤诱导

分化的地位和研究方向。而 RNAi 是最近几年发现和发展起来的新兴的基因阻断技术, 应用 RNAi 技术对肿瘤的某个相关基因或变异基因沉默后可抑制其增生并促进其分化, 对白血病的分化治疗有着重要的意义; 与以往的基因阻断技术如基因敲除及 DNA 陷阱、反义技术、核酶等不同, RNAi 具有快速、有效、容易操作和序列特异性强等优点。但由于 RNAi 技术还不够成熟, 仍存在着一些问题, 如 siRNA 递送、安

全性,特异性等。随着 siRNA 和 siRNA 文库的建立和发展,siRNA 的特异性增强,非靶向作用的减少, RNAi 技术最终能突破补充治疗的范畴。综上所述,采用 siRNA 靶向白血病特异转录调节因子融合蛋白终能在对融合蛋白功能认识不断提高,siRNA 技术不断成熟的基础上发展为真正应用于白血病的基因治疗。

参考文献

- Scherr M, *et al.* Specific inhibition of bcr - abl gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 2003, 101(4):1566 - 1569
- Chen J, *et al.* Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL - PDGFBetaR to inhibition with imatinib or rapamycin. *J Clin Invest*, 2004, 113(12):1784 - 1791
- Ptasznik A, *et al.* Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug - resistant, BCR - ABL1 (+) leukemia cells. *Nat Med*, 2004, 10(11):1187 - 1189
- Heidenreich O, *et al.* AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21) - positive leukemic cells. *Blood*, 2003, 101(8):3157 - 3163
- Downing J R. The AML1 - ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br J Haematol*, 1999, 106(2):296 - 308
- Miyoshi H, *et al.* The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1 - MTG8 fusion transcript. *Embo J*, 1993, 12(7):2715 - 2721
- Dunne J, *et al.* siRNA - mediated AML1/MTG8 depletion affects differentiation and proliferation - associated gene expression in t(8;21) - positive cell lines and primary AML blasts. *Oncogene*, 2006, 25(45):6067 - 6078
- Kasashima K, E Sakota, T Kozu. Discrimination of target by siRNA: designing of AML1 - MTG8 fusion mRNA - specific siRNA sequences. *Biochimie*, 2004, 86(9 - 10):713 - 721

- 赵佳炜, MLL 基因重排及其新伙伴基因的检出方法. *国际输血及血液学杂志*, 2007, 30(1):70 - 73
- Ziemin - van der Poel S, *et al.* Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(23):10735 - 10739
- Rowley J D. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol*, 1999, 36(4 Suppl 7):59 - 72
- So C W, *et al.* Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell*, 2003, 4(2):99 - 110
- Srinivasan R S, *et al.* The synthetic peptide PFWT disrupts AF4 - AF9 protein complexes and induces apoptosis in t(4;11) leukemia cells. *Leukemia*, 2004, 18(8):1364 - 1372
- Zeisig D T, *et al.* The eleven - nineteen - leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene*, 2005, 24(35):5525 - 5532
- Thomas M, *et al.* Targeting MLL - AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11) - positive human leukemic cells. *Blood*, 2005, 106(10):3559 - 3566
- Pui CH R M. Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2004, 350:1535 - 1548
- Golub T R, *et al.* Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(11):4917 - 4921
- Maia A T, *et al.* Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. *Blood*, 2001, 98(2):478 - 482
- Golub T R, *et al.* Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets - like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 1994, 77(2):307 - 316
- 林冬. t(12;21) 儿童急性淋巴细胞白血病发病机制的研究进展. *国外医学(输血及血液学分册)*, 2004, 27(2):137 - 140

(收稿:2009 - 10 - 09)

(修回:2009 - 11 - 20)

丝裂原活化蛋白激酶 p38 在调节 T 淋巴细胞增生和分化中的作用

汤鲁明 卢中秋 姚咏明

T 淋巴细胞来源于骨髓的多功能干细胞,具有多

种生物学功能,如直接杀伤靶细胞、辅助或抑制 B 细胞产生抗体、对特异性抗原和促有丝分裂原的应答反应以及产生细胞因子等。T 细胞是介导“细胞免疫”的核心细胞,同时也是免疫反应的调节细胞,当机体受到微生物侵袭后,T 细胞需要维持正常的分化、增生、凋亡和极化平衡,机体内环境才能保持稳定而避免异常反应。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen - activated protein

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602);国家自然科学基金(30872683)资助项目

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院急诊中心(汤鲁明、卢中秋);100048 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所(姚咏明)

通讯作者:卢中秋,电子信箱:lzq640815@163.com;姚咏明,电子信箱:c_ff@sina.com