

子生物学水平逐步研究至对临床治疗起指导作用的意义。

参考文献

- Oh KS, Bustin M, Mazur SJ, *et al.* UV - induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair - deficient XP - B cells[J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(1): 5 - 15
- Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double - strand break repair in somatic mammalian cells[J]. Biochem J, 2009, 423(2): 157 - 168
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double - strand break repair pathway choice[J]. Cell Res, 2008, 18(1): 134 - 147
- San FJ, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination[J]. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 229 - 257
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, *et al.* ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation - induced DNA double - strand breaks in G2[J]. EMBO J, 2009, 28(21): 3413 - 3427
- Lieber MR. The mechanism of double - strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end - joining pathway[J]. Annu Rev Biochem, 2010, 79: 181 - 211
- Gu J, Lu H, Tiffin B, *et al.* XRCC4: DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps[J]. EMBO J, 2007, 26(4): 1010 - 1023
- Yano K, Morotomi - Yano K, Wang SY, *et al.* Ku recruits XLF to DNA double - strand breaks[J]. EMBO Rep, 2008, 9(1): 91 - 96
- Boboila C, Jankovic M, Yan CT, *et al.* Alternative end - joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(7): 3034 - 3039
- Wang M, Wu W, Wu W, *et al.* PARP - 1 and Ku compete for repair

- of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6170 - 6182
- Mariet PO, Florea BI, Persengiev SP, *et al.* Dynamic assembly of end - joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(49): 18597 - 18602
- Ribalto E, Kuhne M, Rief N, *et al.* A pathway of double - strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma - H2AX foci[J]. Mol Cell, 2004, 16(5): 715 - 724
- Downs JA, Jackson SP. A means to a DNA end: the many roles of Ku[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(5): 367 - 378
- Douglas P, Cui X, Block WD, *et al.* The DNA - dependent protein kinase catalytic subunit is phosphorylated in vivo on threonine 3950, a highly conserved amino acid in the protein kinase domain[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(5): 1581 - 1591
- Uematsu N, Weterings E, Yano K, *et al.* Autophosphorylation of DNA - PKCS regulates its dynamics at DNA double - strand breaks[J]. J Cell Biol, 2007, 177(2): 219 - 229
- Berg E, Christensen MO, Dalla RI, *et al.* XRCC4 controls nuclear import and distribution of Ligase IV and exchanges faster at damaged DNA in complex with Ligase IV[J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(12): 1232 - 1242
- Van HD, Brugmans L, Verkaik NS, *et al.* End - joining of blunt DNA double - strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA - PK and XRCC4[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(1): 43 - 50
- Enders A, Fisch P, Schwarz K, *et al.* A severe form of human combined immunodeficiency due to mutations in DNA ligase IV[J]. J Immunol, 2006, 176(8): 5060 - 5068

(收稿日期: 2012 - 04 - 29)

(修回日期: 2012 - 05 - 22)

乳腺癌脑转移的表观遗传学研究进展

应明真 王雅杰

乳腺癌是我国乃至全球范围内女性最常见的恶性肿瘤,发病率呈逐年增高和年轻化趋势。虽然总体治疗方法较多,但仍有约 50% 的患者在首次治疗后的 5 年内出现复发转移,包括脑转移在内的远处转移是乳腺癌致死的主要原因。在脑转移的治疗中,传

统手术的价值有限,虽然根治剂量的放疗可以达到治疗目的,但是由此产生的对脑组织的高损伤及致残性,极大程度限制了该手段的应用。相对而言,内科治疗(包括化疗、内分泌治疗和生物靶向治疗)是预防和治疗脑转移的重要手段^[1]。

一、乳腺癌脑转移的临床及分子病理学特征

研究表明,中枢神经系统的转移本身具有较强的侵袭性,约 50% ~ 75% 的脑转移患者为多发性颅内转移灶,缺乏像内脏和骨转移一样有效的治疗手段,往往预后不良^[2]。Dawood 等^[3] 研究结果显示以脑转移为首发部位的乳腺癌其中位生存时间为 5.8 个月,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072175, 81102010);上海市科委基金资助项目(06DZ19505, 114119a7500);上海市卫生局科研项目(2009113, 2011198);上海市重点学科建设项目(B905)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,教授,博士生导师,主任医师,电子信箱: yajiewa0459@163.com

较非脑转移为首发部位组的 13 个月明显缩短 ($P < 0.001$)。值得关注的是,在乳腺癌新的分子亚型中,三阴性乳腺癌的脑转移发生率尤其多见,三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)均为阴性的乳腺癌,约占所有乳腺癌的 10.0%~20.8%,具有与分子分型中基底细胞样(basal-like)癌高度类似的生物学行为和临床特征,即:患病年龄轻,遗传倾向高,恶性程度高、侵袭性强、易发生局部复发及远处转移,尤其是脑转移的发生率明显高于非三阴性乳腺癌^[4]。该类型乳腺癌对化疗有较高的近期缓解率,术前新辅助治疗的病理缓解率可以高达 54.6%,但 2 年复发和转移率明显高于其他类型,脑转移发生率可高达 30% 以上,而 HER-2 阳性的患者仅为 4.8%^[5,6]。研究显示 14% 的 TNBC 以中枢神经系统转移为其首发部位,至死亡时有近一半(46%, 56/116)患者存在中枢神经系统的转移。以中枢神经系统为首发转移部位组的中位生存期只有 4.9 个月,1 年和 2 年生存率分别 18.8% 和 0;而非中枢神经系统为首发转移部位组则为 13.1 个月,1 年和 2 年生存率分别 61.6% 和 21.0% ($P < 0.001$)。然而迄今为止,乳腺癌这种因有无脑转移而出现临床预后显著差异的分子机制还不为我们所知。

二、乳腺癌脑转移与表观遗传学研究

近年来,随着肿瘤转移研究的不断深入,各类乳腺癌脑转移相关基因的报道层出不穷,涉及各种细胞黏附分子、基质金属蛋白酶、细胞周期相关基因等。尽管这些基因在肿瘤转移过程中存在表达异常,但其遗传学改变发生的频率却极低,而表观遗传学作为后基因组时代的领舞者,将生命科学的发展推向了新的前沿,因而受到越来越多的关注。在针对乳腺癌脑转移的文献回顾中,其特殊分子亚型的脑转移研究有关研究极为有限。Palmieri 等^[7]研究了乳腺癌脑转移患者的基因表达微阵列,发现 BMP1、PEDF、LAMγ3、SIAH、STHMN3 和 TSPD2 等基因在脑转移性乳腺癌和非脑转移性乳腺癌的表达具有明显差异,尤其引人注目的是 Hexokinase 2 在乳腺癌脑转移病例中的表达显著高于病例组,其高表达与开颅手术后患者的不良预后有关。新近研究表明,在乳腺癌脑转移中存在 PI₃K-PTEN 通路的活化,在三阴性乳腺癌脑转移中,PTEN 与 TNBC 的不良预后有关^[8]。另有研究认

为乳腺癌脑转移的发生率与其基因表型有关,CK5/6⁺ 和 CK14 较两者均为阴性的患者更容易发生脑转移。近年来,有关于乳腺癌脑转移的体内、体外模型也取得了一定进展,目前常用的三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的亚型,BR1、BR2、BR3 与 MDA-MB-231 相比,3 株细胞释放更多的 VEGF-A 和 IL-8 按其所构建的荷瘤裸鼠生存期明显缩短,脑转移部位也拥有更为丰富的血供。此外,随着肿瘤转移研究的不断深入,学界对于转移抑制基因有了更多的认识:这类基因往往不影响原发肿瘤的生长,但却能抑制肿瘤转移的进程。Stark 在脑转移性乳腺浸润性导管癌的研究中发现,相对于原发灶 Kiss1、KAI1、BRMS1 和 Mkk4 等在转移灶的转录和蛋白水平的表达明显减少^[9]。另有研究发现:人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 能诱导乳腺癌的脑转移过程,MDA-MB-435 BR1 源于此细胞株,且表现出与星形胶质细胞较强的黏附能力,这种能力能够被 IL-6、TGF-β 和 IGF-1 抗体部分逆转,而神经胶质细胞释放的趋化因子及生长因子以旁分泌的形式促进特定的乳腺癌细胞在脑实质中的种植和生长^[10]。这类生长因子除去 IL-6、TGF-β 外,还包括 INF-γ 和 PDGF 等^[11]。此外脑神经细胞与肿瘤细胞形成神经-肿瘤突触,突触所含多种信号转导神经递质能侵犯中枢神经系统并影响转移的进展^[12]。既往有关转移相关基因的阐释多为单个差异基因的功能学研究,其研究缺乏系统性,且目前国内外针对乳腺癌脑转移的表观遗传学差异表达的系统研究尚刚刚起步。

表观遗传学(epigenetics)通常被定义为基因表达通过有丝分裂或减数分裂发生遗传性改变,而 DNA 序列不发生改变,其机制主要包括 DNA 甲基化(DNA methylation)、组蛋白修饰(histone modifications)及非编码 RNA(non-coding RNAs)。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA-methyl transferases, DNMTs)的催化下,CpG 二核苷酸中的胞嘧啶被选择性地添加甲基,形成 5-甲基胞嘧啶,往往与基因沉默相关,而去甲基化现象往往包含在基因活化的过程中^[13]。组蛋白修饰是指组蛋白的基础氨基末端尾部突出于核小体,常在转录后发生变化,包括甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化等翻译后的修饰,通过这些修饰形成的“组蛋白密码”(histone code)能影响染色质的松紧,在基因的表达调控中发挥着重要作用^[14]。非编码 RNA 是指不能翻译为蛋白的功能性 RNA 分子,分为管家非编码 RNA(house keeping non-coding RNA)

和调控非编码 RNA (regulatory non - coding RNA), 其中具有调控作用的非编码 RNA 按其大小主要分为两类: 短链非编码 RNA (包括 siRNA、miRNA、piRNA) 和长链非编码 RNA (long non - coding RNA, lncRNA)。这些非编码 RNA 以及它们所对应的 DNA 既往在学界曾被认为是垃圾或“暗物质”。人类基因组测序证实: 能编码蛋白的 DNA 仅占整个人基因组的不足 5%, 多数 DNA 仅能转录成 RNA, 而不编码蛋白质, 都属于非编码 RNA, 其数量远远大于编码蛋白质的 mRNA, 在基因组和染色体水平调控基因表达并决定细胞分化, 因而在表观遗传学修饰中扮演重要角色^[15]。此外, 上皮间充质转化、肿瘤微环境等也因表观遗传机制的不同而在肿瘤转移中发挥重要作用。

1. DNA 甲基化变化在乳腺癌脑转移中的作用: 人类肿瘤中一些已确认的超甲基化基因都是经典的肿瘤抑制基因。乳腺肿瘤中, 确认的超甲基化基因功能包括细胞周期调节 (p16INK4a、p14ARF 和 14 - 3 - 3 等)、细胞凋亡 (APC、DAPK1 和 HIC1)、DNA 修复、激素调节 (ER、PR)、细胞黏附和侵袭、血管生成等。研究表明, 以脑转移高发为主要征象的三阴性乳腺癌有其特殊的分子表达谱, 其中最为引人瞩目的当属 BRCA1 的异常。三阴性乳腺癌中大约有 30% 伴 BRCA1 基因突变, 而伴 BRCA1 基因突变的乳腺癌中三阴性乳腺癌占 90%。三阴性乳腺癌与 BRCA1 突变乳腺癌在表型特征和分子水平上也有许多相似之处, 如 ER 阴性, CK5/6、EGFR 和 Ki - 67 阳性, p53 突变, 核分级较高, 预后较差等。Birgisdottir 等应用 MS - PCR 技术发现有 9.1% (13/143) 的散发性乳腺癌 BRCA1 发生甲基化, 并通过 FISH 和免疫组化检测发现 9 例有明显的表达下降或缺失, 并与 ER 的表达呈负相关, 但与 PR 无相关性。可见甲基化改变是 BRCA1 基因失活的重要机制之一。DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 抑制剂如 5 - 氮 - 2 - 脱氧胞苷, 可以与 DNMT1 发生不可逆的共价结合, 导致 DNMT1 降解, 有效的清除 DNA CpG 岛的甲基化, 恢复抑癌基因和转移抑制基因的表达, 达到治疗肿瘤的作用。

研究 DNA 甲基化变化在乳腺癌脑转移中的作用可以通过筛选乳腺癌脑转移细胞中高甲基化并失活的基因并分析其启动子区域组蛋白的修饰状况, 探讨 DNA 甲基化与组蛋白修饰的先后关系。筛选出影响 DNA 甲基化酶和 DNA 结合的关键性因子或蛋白; 明确相关关键性因子或蛋白与 DNA 甲基化酶及 DNA 结合蛋白作用的分子机制, 进一步明确特定基因发生

DNA 甲基化的分子机制, 揭示组蛋白修饰与 DNA 甲基化相互作用的分子机制。

2. 组蛋白修饰异常在乳腺癌脑转移中的作用: DNA 甲基化和组蛋白的修饰等表观遗传学改变是可逆的过程, 这个特征与基因突变不同, 促进了 DNA 甲基化和组蛋白脱乙酰化抑制剂药物的发展, 通过诱导 DNA 去甲基化和抑制组蛋白去乙酰化, 逆转抑癌基因的沉默并激活关键性的肿瘤抑制信号通路。组蛋白修饰异常在乳腺癌脑转移中的研究尚刚刚起步, 新近研究者试图将常规方法和高通量技术相结合, 从筛选乳腺癌脑转移中新的组蛋白修饰调控因子及其复合物出发, 逐步揭示所获得的候选基因对于组蛋白修饰的作用和调控机制, 并进一步阐明这些基因在调控肿瘤侵袭转移中的作用及其机制。以功能基因组学和蛋白质组学的方法筛选乳腺癌脑转移中发生突变或者表达异常的组蛋白修饰酶以及转录因子, 利用各种蛋白质间相互作用方法验证筛选获得的组蛋白修饰复合物中各成员间的相互作用, 通过基因过量表达和敲低/敲除技术、基因突变技术、组蛋白甲基化、磷酸化和乙酰化分析、ChIP - seq 等技术检测分离的组蛋白修饰因子对组蛋白修饰和基因表达的影响及其在基因表达调控中的分子机制。在此基础上, 利用动物模型和临床标本对组蛋白修饰候选因子在肿瘤发生发展及侵袭转移中的作用做深入分析。组蛋白去乙酰化 (HDACs) 抑制剂同样可以用于乳腺癌的抗转移治疗, 由 HDAC 引起的启动子区组蛋白的乙酰化是肿瘤抑癌基因失活的重要机制, HDAC 抑制剂逆转组蛋白乙酰化水平, 恢复某些抑癌基因或转移抑制基因的表达。

3. 非编码 RNA 在乳腺癌脑转移中的作用: 近年来, 有关非编码 RNA 的研究多集中于 micro RNA 在各种类型乳腺癌发生、转移过程中的功能机制, 而近年来学者的兴趣更多地集中在其他非编码 RNA 如: 长链非编码 RNA 上, 长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类转录本长度超过 200nt 的 RNA 分子, 它们并不编码蛋白, 而是以 RNA 的形式在多种层面上 (表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等) 调控基因的表达水平。这种非编码 RNA 在肿瘤生长调控中发挥的重要作用, 相关研究结果将揭示 ncRNA 在乳腺癌细胞转化、侵袭和转移中的功能及作用机制, 最终将为此类型肿瘤的治疗提供药物靶标。以乳腺癌细胞系、肿瘤组织为模型, 利用已有的技术平台系统地发现和鉴定与肿瘤相关蛋白发生相互作用的 ncRNA; 还将

采用不同大小的 ncRNA 的 cDNA 文库 (size - fractionated RNA library) 鉴定肿瘤启动细胞特异的 ncRNA。采用球囊形成实验、二维平皿及三维 Matrigel 培养以及免疫缺陷鼠体内种植和肿瘤组织等研究体系,系统深入地研究 ncRNA 和蛋白间的相互作用以及这些相互作用的生理功能,剖析 ncRNA 调控网络在乳腺癌脑转移进程中的作用与意义。选择其中一些有重要功能的 ncRNA,结合乳腺癌脑转移患者的标本及临床资料,探寻药物靶标或潜在的生物标志物。

4. 上皮 - 间充质转换的机制及乳腺癌脑转移的细胞重编程机制:上皮间充质转化 (EMT) 是指肿瘤细胞通过去分化由具有极性的上皮样形态转变为具有运动能力的间叶性细胞形态表型,它存在于多种病理生理过程。当受到创伤、致癌性转化等外界刺激时,上皮细胞的表型特征可发生不同程度的改变而呈现间充质细胞的特点,如形态扁平细胞黏附分子 (如 E - 钙黏蛋白) 表达减少、角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白为主的细胞骨架等,通过表型的转换降低肿瘤细胞之间的同型黏附,改变细胞极性,引起细胞骨架重排,使之具有穿越基膜游走至间质或远端其他组织的能力,实现迁移和侵袭^[16]。以乳腺癌细胞系、肿瘤组织及癌旁正常组织为模型,探讨 EMT 的细胞重编程作用机制及其在乳腺癌脑转移及化疗药物耐受中的作用具有十分重要的临床意义。

Polycomb Group (PcG) 蛋白家族是一类进化上极为保守的转录抑制因子,它们通过形成 3 种不同的蛋白复合物调控众多重要生命活动,其中也包括对肿瘤发生转移的影响。有研究发现 PcG 蛋白家族成员 BMI - 1 在鼻咽癌中可以通过抑制 PTEN 而诱导上皮间充质转化,进而在乳腺癌中发现 BMI - 1 的过表达和进展期乳腺癌的侵袭转移相关,且 BMI - 1 在脑转移三阴性乳腺癌细胞和非脑转移细胞中的表达存在明显差异,那么 BMI - 1 在这一过程中作用的具体机制如何将乳腺癌脑转移表观遗传研究的进一步丰富。

5. 细胞微环境与乳腺癌脑转移:目前,关于脑转移的机制存在多种假说,其中影响最为广泛的是“级联学说”和“种子土壤学说”。“级联学说”即机械论学说,由 20 世纪中叶 Ewing 首先提出,认为肿瘤细胞从原发部位转移到脑组织要经历侵出基膜进入血管、随血流到达脑部并停留在毛细血管床、透过血脑屏障侵袭脑实质、形成血管许多相互关联的步骤等,才能

进一步形成转移灶,该学说认为肿瘤从原发器官到靶器官是逐级分站进行的过程,任一环节的缺失都将破坏脑转移的级联反应。就现象而言,脑转移的分布符合脑血流的分布,但该学说缺乏分子机制的研究支持,也难以解释肿瘤细胞在血流中的随机分布为何会导致其对特殊器官的亲嗜性。而在三阴性乳腺癌中,肿瘤细胞对于脑组织的定向转移恰好验证了 1889 年由 Paget 提出的“种子与土壤”假设,因而受到更为广泛的关注。肿瘤细胞与脑组织微环境的相互作用,调控着肿瘤细胞侵袭并进入脑实质增殖的过程。以乳腺癌为模型,分别从肿瘤细胞微环境中的肿瘤相关成纤维细胞、浸润的免疫细胞 (肿瘤相关性巨噬细胞) 和基质分子 (细胞因子 TGF - β) 入手,研究肿瘤微环境对肿瘤细胞生物学行为尤其是侵袭转移的影响。分离乳腺癌患者组织微环境中的成纤维细胞及肿瘤相关性巨噬细胞,分析基因表达谱;研究这些差异表达的基因或非编码 RNA 对成纤维细胞及肿瘤细胞侵袭转移能力的影响;建立三维细胞培养模型,将肿瘤细胞与基质细胞共培养,模拟体内环境,并应用免疫分子及免疫细胞缺陷小鼠构建小鼠骨髓嵌合体动物模型,研究这些差异表达的基因或非编码 RNA 对共培养后肿瘤细胞侵袭转移能力的影响;采用基因工程小鼠模型,从分子、细胞、动物 3 个层面研究多种重要蛋白动态相互作用及其动态调控的分子机制。在解析这些调控机制的生理病理意义的基础上,通过肿瘤模型研究进一步阐明肿瘤微环境中重要生物学因子对乳腺癌脑转移的决定性作用具有十分重要的意义。

三、结 语

随着表观遗传学研究的不断发展,系统深入地开展乳腺癌脑转移的表观遗传学研究,阐明表观遗传关键机制即 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA 对基因表达调控的影响;明确表观遗传调控在乳腺癌脑转移过程中的作用对于临床控制乳腺癌脑转移具有十分重要的现实意义。在研究的同时揭示 EMT 过程中的表观遗传学变化及细胞重编程机制;阐明细胞微环境在乳腺癌脑转移中的作用及机制,建立和完善表观遗传学研究的新的技术体系,将为乳腺癌脑转移的早期预警、诊断、治疗和药物筛选提供新思路、新途径和新靶标。

参考文献

- 1 Chen G, Davies MA. Emerging insights into the molecular biology of brain metastases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83 (3): 305 - 314

(下转第 68 页)