

合成致死策略在 DNA 损伤修复缺陷肿瘤中的研究进展

余倩云 张瑞娟 陈 奇 李 鳌 许建华

摘 要 合成致死(synthetic lethality)指两个非致死性的非等位基因同时突变导致细胞死亡的现象,目前成为抗肿瘤新药物研究的一个热点。有 DNA 修复缺陷的肿瘤通过辅助 DNA 修复途径存活,因此靶向修复缺陷基因可极大提高肿瘤的治疗效果。如同源重组(HR)缺陷的肿瘤可以有效地针对目标使用 DNA 双链断裂剂。然而,并非所有同源重组修复缺陷的肿瘤的反应都相同,在此类型的治疗上,肿瘤细胞可能通过调用生化机制外排作用等降低药物作用或选择 DNA 损伤反应中的另一条通路而获得耐药性。本文针对有 DNA 损伤修复缺陷的肿瘤,从合成致死影响 p53、周期检查及修复抑制敏感度的角度来进行概述,因此了解不同机制以应对可能出现的耐药,更有助于合成致死策略的新靶向疗法的制定。

关键词 DNA 损伤反应 同源重组 耐药 合成致死

[中图分类号] R979.1

[文献标识码] A

癌症治疗包括手术结合放疗、化疗、中医药治疗。DNA 修复途径对化疗药物反应的调控是一个关键因素。DNA 损伤通过直接作用杀伤肿瘤细胞或者通过在细胞周期的 S 期干扰 DNA 复制导致细胞周期停止和细胞的死亡,其中 DNA 损伤修复中双链断裂修复(DSB)是重要的修复机制之一。在正常细胞中,DNA 损伤很快就识别 DNA 损伤反应(DDR)的刺激因子,从而激活细胞周期检查点和 DNA 直接修复。根据不同的损害,涉及不同的 DNA 修复途径,它们共同形成一个高度复杂相互作用的基因毒性损害的防御机制。

合成致死是指两个非等位基因中,若其中的某一基因发生了变异,那么细胞仍然会存活,如果这两个非等位基因同时发生了变异,则将引起细胞死亡。其机制是通过破坏肿瘤细胞的 DNA 合成,最终引起细胞死亡。DNA 修复过程不只是肿瘤对化疗药物重要的内在反应,他们也是在治疗期间获得耐药机制的目标。在这方面,DDR 缺陷的肿瘤有可能朝着两个相反方向发展。例如,同源重组(HR)的缺失赋予肿瘤细胞对 DSB 诱导剂的敏感度,但同时会导致基因组的不稳定,促使额外的遗传变异,最终可能导致治疗抵抗。本文讨论 DNA 损伤信号、治疗反应及关于

DDR 如何调节增加或降低肿瘤对化疗的敏感度,后来指导合成致死策略的靶向用药。

一、靶向治疗 DNA 损伤反应的敏感度

DDR 靶向疗法应用于固有的 DNA 修复缺陷的肿瘤。这些药物通过提高有 DNA 修复能力肿瘤的化疗敏感度,往往通过恢复细胞周期检查点进而促进 DNA 损伤诱导的细胞凋亡或其他不可逆的损伤,增加化疗的治疗窗口。

1. 影响 p53 的敏感度:严谨的细胞周期调节确保在 G₁/S 和 G₂/M 期检查点的 DNA 损伤修复。正常的细胞通过严格的 DNA 损伤修复反应,进入衰老或细胞凋亡,但基因组不稳定的癌细胞绕过这些调控机制得以继续增殖。因为他们已获得的基因突变,导致抑癌基因 p53 的功能失活,和取消 G₁/S 期细胞周期检查点。因此推测活化的 p53 可以是一种治疗策略。事实证明,恢复 p53 的表达不能成功建立小鼠肿瘤模型^[1]。最近的研究表明诱导 KRAS 突变的非小细胞肺癌的小鼠模型里,只有在晚期腺癌中,p53 调节蛋白 ARF 的高表达,才能对活化的 p53 敏感^[2]。ARF 表达阴性的早期腺癌对 p53 基因难以活化^[3]。因此,活化的 p53 晚期肿瘤患者可以通过化学增敏来进行用药。

p53 信号通路的激活剂,如 Nutlin,选择性 MDM2 拮抗剂或 RITA 使突变 p53 肿瘤基因恢复活性^[4,5]。另外使用 5'-氮杂胞苷等甲基化的化合物使 G₁/S 期细胞周期检查点的沉默子可能被重新激活。靶向

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81073105);上海市普陀区卫生系统自主创新项目

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院

通讯作者:许建华,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:xujianhua50@126.com

治疗目标包括 p53 家族成员和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制基因 (CDKN2A) 的甲基化,它编码 INK4A 和 ARF。几项临床试验已经启动 MDM2 蛋白抑制剂和 PRIMA1 的模拟物 APR-246。

2. 影响细胞周期检查点抑制的敏感度:肿瘤细胞可能是通过重要的细胞周期检查点对 DNA 损伤剂敏感。复制损伤的 DNA 可能会导致有丝分裂的变动和细胞死亡。在细胞周期检查点之前有几种潜在的方法,包括直接抑制 DNA 损伤信号共济失调毛细血管扩张性突变蛋白激酶(ATM),共济失调毛细血管扩张症 RAD3 相关蛋白(ATR)或 p53 - MAPK 的活化蛋白激酶 2(MK2)和抑制细胞周期检查点的 CHK1、CHK2 或 WEE1^[6]。

非选择性激酶抑制剂 UCN-01 为 DNA 损伤检验点抑制剂,针对细胞周期检查点的多种新型化合物激酶而被开发出来。主要是针对 CHK1,因为它是核心作用,维护基因组的完整性,而 CHK2 主要是一个激酶放大器,需要在复制压力的条件下活化。Takai 等^[7,8]证明,CHEK1 在老鼠胎盘发育过程中必不可少的,而突变的 CHK2 老鼠胎盘是可以存活的。另外,Bao 等^[9]在体外实验中,CHK1/CHK2 的抑制剂 DBH 克服了 CD133⁺ 胶质瘤干细胞抗辐射的作用。然而在体内实验中,仅 CHK2 基因缺失有相反的效果^[10]。这有可能会认为复合物是由特定的 CHK1 形成。但事实上,CHEK1 + / - CHEK2 - / - 复合老鼠最容易出现肿瘤,然而单突变体不发展为自发性肿瘤^[11]。

检查点激酶抑制剂疗效依赖于肿瘤生物学特性。但有时检查点抑制剂对肿瘤细胞化疗的敏感度甚至可以有相反的影响,这取决于其遗传组合编程。Hermann 等^[12]已经发现这一现象,ATM 抑制剂对化疗敏感度依赖于 p53 状态。ATM 药物抑制剂使 p53 缺失的细胞 DNA 嵌入阿霉素更敏感,而在 p53 依赖的细胞中,可诱导耐阿霉素。不同细胞反应大不相同,是因为 ATM 抑制剂降低 p53 依赖的细胞凋亡,而一个不正常的 G₁/S 期检查点,促进 p53 缺陷细胞的有丝分裂受损。由于 p53 通路的缺陷许多癌症缺乏 G₁/S 期检查点这一功能,通过 ATM 或其他 DNA 损伤检验点蛋白 WEE1 的抑制使他们在原本敏感的 G₂/M 期失活^[13]。

3. 影响 DNA 修复抑制的敏感度:DNA 修复缺陷的肿瘤也可以利用肿瘤对化疗敏感来进行综合致死治疗。在 BRCA 基因缺陷的肿瘤模型中,PARP 抑制剂结合 DNA 烷化剂组合治疗,具有增强或协同作

用^[14]。除 PARP 之外,其他的 BER 的蛋白质,例如 DNA 聚合酶 β 、O-6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT),N-甲基嘌呤-DNA 糖基化酶(MPG)、嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 1(APE1)或皮瓣内切酶 1(FEN1)的烷基化,可提高对肿瘤细胞化疗的敏感度^[15]。此外,其他 DNA 修复途径可能是针对肿瘤对化疗药物的敏感度。例如通过 REV3L 抑制剂来抑制容易出错的跨损伤 DNA 合成途径,使耐顺铂肺腺癌小鼠敏感度增加^[16]。

一些 I 类和 II 类组蛋白脱乙酰基转移酶(HDACs)(HDAC1-4)同样也能够促进 DNA 修复^[17]。因此,HDAC 抑制剂如伏立诺他可能被用来作为化疗增敏剂。同样 III 类 HDACs 或去乙酰化酶 sirtuin 蛋白家族,其中 SIRT1 和 SIRT6 与 DNA 修复有关联^[18,19]。最近已表明 SIRT6 通过 CTBP 脱乙酰蛋白相互作用,耗竭 SIRT6 敏感细胞的 DNA 损伤剂来促进同源重组修复^[19]。综上所述,利用这些特点使患者有针对性地得到 HDAC 抑制剂治疗。但目前大多数外生修饰抑制剂缺乏特异性和基因的广泛性。内在的变动可能形成不利影响或使不良反应增加。选择一个更好的机制,不管抑制剂或与化疗药相结合使用,利用这些化合物识别相关的靶基因从而提高化疗药的敏感度,产生更多的选择性综合治疗策略。

4. 对 HR 修复活跃肿瘤的敏感度:HR 修复活跃肿瘤对 PARP 抑制剂敏感,通过阻断 DSB 时修复蛋白的招募从而抑制同源重组。在某些情况下有可能专门针对肿瘤细胞,从而产生治疗窗口。失活的细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)降低 BRCA1 在 DNA 损伤位点的聚集形成,使 BRCA1 活跃的肿瘤细胞对 PARP 抑制剂敏感^[20,21]。与此相反,在非转录细胞中失活的 CDK1 在细胞周期 G₂/M 活动中受到保护,防止在 S 期被 ARP 抑制剂诱导 DNA 损伤^[20]。

同源重组的全身性抑制也使正常细胞对 PARP 抑制剂敏感,从而增加 PARP 抑制剂的细胞毒性。为了避免此问题,可能通过使用非系统性的方法减少同源重组修复,通过局部热处理,可能通过 BRCA2 的失活使肿瘤细胞对 PARP 抑制剂 olaparib 敏感^[22]。

二、与 DDR 相关的化疗耐药

治疗癌症时,遇到的主要问题是耐药和化疗的不良反应。患者由于缺乏对肿瘤细胞的特异性和疗效性,因内在或后天获得性耐药。特别是 DNA 修复缺陷的肿瘤,其特点是高度的基因组不稳定性,可随时获得基因突变,对治疗产生耐药。在许多情况下,由

于在药物代谢的变化或运输来减少药物的作用从而获得化疗耐药^[23]。在治疗 DDR 缺陷肿瘤耐药时也可能引起 DNA 损伤通路以外的改变。下面我们描述几种不同的机制。

1. 通过遗传回归恢复同源重组: 尽管铂类药物的敏感度高, 在大多数情况下, 当经过反复多次的治疗, BRCA 高表达的卵巢癌变得耐药。用 BRCA2 突变的胰腺癌细胞系 APAN1 实验表明, 耐铂类药物或 PARP 抑制剂可能驱使遗传复归^[24]。在体外使药物浓度增加, 筛选 BRCA2 的第 2 次突变形成的耐药克隆产物, 从而导致蛋白质的功能恢复, 使 HR 修复缺陷复原。

DDR 缺陷的遗传回归现象之前已被观察到, 在急性髓系白血病(AML) 范可尼贫血症患者引起的双等位基因 BRCA2 的突变(其中强调的范可尼贫血症 FANCD1 亚型突变)^[25]。在范可尼贫血症的基因中双等位基因突变失活, 包括几个已知的相互作用的 BRCA1、BRCA2, 不仅导致再生障碍性贫血和早期儿童癌症, 而且对交联剂如丝裂霉素 C 也极端敏感度, 在 BRCA2 基因相关 AML 和^[26]患其他范可尼贫血症的癌症患者中, 范可尼贫血症基因高效的股间交联修复可能会引发遗传回归。遗传复归, DDR 因素是一种常见的人类癌症中的耐药机制, 它是否存在于基因 BRCA1、BRCA2 和范可尼贫血症以外基因仍有待确定。可以预料遗传的复归突变将是一个普遍的耐药机制, 通过抑癌基因针对疗法来联合致死。可以想象, 抑癌基因主要属于 DNA 的功能修复这一类。

2. DDR 调节的改变: 肿瘤细胞也可能改变 DNA 修复途径, 以应付干预治疗。同源重组修复和非同源末端连接(NHEJ)之间的平衡改变可能会改变 DNA 修复缺陷的肿瘤细胞对 DSB 诱导剂的反应。最近的报告显示 DNA 修复缺陷和范可尼贫血细胞对交联剂超敏反应, 可通过 NHEJ 抑制剂来缓解。这种表型依赖于灭活基因的组合, 而 FANCC 突变鸡的 DT40 细胞通过删除 Ku70 的(也称为 XRCC6)而得以存活, 连接酶 4(LIG4)失活并无影响。NHEJ 都需要 Ku70 和 LIG4, 执行着不同的功能。而 DNA-PKcs 的调节亚基 Ku70 的和 Ku80 的(也被称为 XRCC5)识别 DNA 双链断裂, 并控制的 NHEJ 途径的选择, LIG4 执行实际的 DNA 连接。事实上, 存活的 FANCC 缺陷 DT40 细胞缺失 Ku70 似乎将主要由同源重组来修复, 而不是通过减少 DNA 末端连接, 同样是 DT40 细胞, 交联修复缺陷的线虫突变 FCD-2(FANCD2 人类同源),

通过 LIG-4 的失活来得以存活^[23]。这可能反映了不同的范可尼贫血症和 NHEJ 蛋白的作用参与, 但也可以归因于物种或细胞类型的差异, 因此肿瘤内在同源重组的缺陷可能会抵消治疗敏感度, 通过 DNA 修复通路的重新布线, 从而产生化学耐药。

利用化疗结合其他靶向药物在肿瘤的发生、发展过程中对 DDR 途径进行干预, 同源重组缺陷靶向治疗可以考虑细分治疗人群, 将相同类型的患者进行同类综合治疗。否则, 可能无法达到预期的效果, 即使是证实有确切疗效的化疗药物, 如 PARP 抑制剂 olaparib 可能对另一类患者无效甚至增加不良反应。在同源重组缺陷的肿瘤患者中可利用某些生物标志物来观察 DDR 途径之间的相互作用和对化疗的反应。虽然如上所述可以增加患者治疗效果, 但这同时治疗期间抗肿瘤的风险仍没有消除。同源重组缺陷的肿瘤, 由于其内在的基因组不稳定性, 这个过程可能会更加突出。

最近的研究数据表明, 合成致死疗法受限可能不仅涉及原来 DDR 的缺陷, 也与重新布线通路相关的突变基因逆转有关。因此, 像其他获得性耐药机制一样, DDR 相关的治疗抵抗因素比以前认为的更加多。基因组不稳定的肿瘤细胞仍可以容易地适应于合成致死方法, 间接导致不可挽回的 DNA 损伤, 而不是直接对化疗药物诱导 DNA 双链断裂或触发有丝分裂损伤。相反, 特异性的 DDR 缺陷肿瘤使用综合治疗可能增加细胞毒性药物治疗时间窗口。肿瘤可能通过点、线、面等多个环节, 来应对化学损伤, 是机体和肿瘤细胞及肿瘤生长微环境在不同的生理病理状态下共同作用的结果。因此, 最好的治疗方法是在耐药形成前用化疗药物或靶向药结合治疗来消除肿瘤。

参考文献

- 1 Xue W, Menzel T, Nahse - Kumpf V, *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas [J]. *Nature*, 2007, 445(7128): 656 - 660
- 2 Junttila MR, Karnezis AN, Garcia D, *et al.* Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours [J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 567 - 571
- 3 Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, *et al.* The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression [J]. *Nature*, 2006, 443(7108): 214 - 217
- 4 Vassilev LT, Vu BT, Graves B, *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 [J]. *Science*, 2004, 303(5659): 844 - 848
- 5 Issaeva N, Issaeva N, Bozko P, *et al.* Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in

- tumors[J]. Nat Med, 2004, 10(12):1321-1328
- 6 Reinhardt HC, Reinhardt HC, Hasskamp P, *et al.* DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell - cycle checkpoint network controlled by MK2 - mediated RNA stabilization[J]. Mol Cell, 2010, 40(1):34-49
 - 7 Takai H, Tominaga K, Motoyama N, *et al.* Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice[J]. Genes Dev, 2000, 14(12):1439-1447
 - 8 Takai H, Naka K, Okada Y, *et al.* Chk2 - deficient mice exhibit radioresistance and defective p53 - mediated transcription[J]. EMBO J, 2002, 21(19):5195-5205
 - 9 Bao SD, Wu QL, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. Nature, 2006, 444(7120):756-760
 - 10 Jiang H, Reinhardt HC, Bartkova J, *et al.* The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response[J]. Genes & Development, 2009, 23(16):1895-1909
 - 11 Squatrito M, Brennan CW, Helmy K, *et al.* Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas[J]. Cancer Cell, 2010, 18(6):619-629
 - 12 Hemann J, Reinhardt HC, Bartkova J, *et al.* The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response[J]. Genes Dev, 2009, 23(16):1895-1909
 - 13 Mir SE, Hamer PC, Krawczyk PM, *et al.* In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma[J]. Cancer Cell, 2010, 18(3):244-257
 - 14 Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, *et al.* High sensitivity of BRCA1 - deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(44):17079-17084
 - 15 Adhikari S, Choudhury S, Mitra PS, *et al.* Targeting base excision repair for chemosensitization[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2008, 8(4):351-357
 - 16 Xie K, Doles J, Hemann MT, *et al.* Error - prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(48):20792-20797
 - 17 Miller KM, Tjeertes JV, Coates J, *et al.* Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA - damage response to promote DNA nonhomologous end - joining [J]. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17(9):1144-1151
 - 18 Ming M, Shea CR, Guo X, *et al.* Regulation of global genome nucleotide excision repair by SIRT1 through xeroderma pigmentosum C[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(52):22623-22628
 - 19 Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C, *et al.* Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation[J]. Science, 2010, 329(5997):1348-1353
 - 20 Johnson N, Cai D, Kennedy RD, *et al.* Cdk1 participates in BRCA1 - dependent S phase checkpoint control in response to DNA damage [J]. Mol Cell, 2009, 35(3):327-339
 - 21 Johnson N, Li YC, Walton ZE, *et al.* Compromised CDK1 activity sensitizes BRCA - proficient cancers to PARP inhibition[J]. Nat Med, 2011, 17(7):875-882
 - 22 Krawczyk PM, Eppink B, Essers J, *et al.* Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP - ribose) polymerase - 1 inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(24):9851-9856
 - 23 Gottesman MM, Fojo T, Bates SE, Multidrug resistance in cancer: role of ATP - dependent transporters[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1):48-58
 - 24 Edwards SL, Brough R, Lord CJ, *et al.* Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2[J]. Nature, 2008, 451(7182):1111-1115
 - 25 Ikeda H, Matsushita M, Waisfisz Q, *et al.* Genetic reversion in an acute myelogenous leukemia cell line from a Fanconi anemia patient with bi-allelic mutations in BRCA2[J]. Cancer Res, 2003, 63(10):2688-2694
 - 26 Zhang F, Fan Q, Ren K, *et al.* PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2 [J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(7):1110-1118

(收稿日期:2014-01-04)

(修回日期:2014-01-14)

(上接第 3 页)

- 14 Ke S, Ding XM, Qian XJ, *et al.* Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma sized > 3 and ≤ 5 cm: is ablative margin of more than 1 cm justified[J]? World J Gastroenterol, 2013, 19(42):7389-7398
- 15 Taniguchi K, Yamada T, Sasaki Y, *et al.* Genetic and epigenetic characteristics of human multiple hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2010, 10:530
- 16 孙文兵. 重视病理学完全消融, 提高肝癌射频消融疗效[J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(3):182-185
- 17 Kong QF, Jiao JB, Chen QQ, *et al.* Comparative effectiveness of radiofrequency ablation with or without transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2013, 35(3):2655-2659
- 18 Cho YK, Rhim H, Noh S. Radiofrequency ablation versus surgical resection as primary treatment of hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria: a systematic review[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(9):1354-1360
- 19 Fan SY, Eiser C, Ho MC, *et al.* Health - related quality of life in patients with hepatocellular carcinoma: the mediation effects of illness perceptions and coping[J]. Psychooncology, 2013, 22(6):1353-1360
- 20 孙文兵, 丁雪梅, 柯山, 等. 用哲学思维引领肝癌的现代治疗理念[J]. 医学与哲学, 2011, 32(2):1-3

(收稿日期:2014-02-11)

(修回日期:2014-02-14)