

DNA 错配修复基因与胶质瘤化疗耐药相关性研究进展

盛汉松 尤朝国 张 弩

摘 要 DNA 错配修复(MMR)基因是人体细胞内一种能识别并修复 DNA 碱基错配的保护系统。近年来研究发现,MMR 相关基因功能缺陷与恶性胶质瘤对替莫唑胺(TMZ)化疗抵抗相关。本文就 DNA 错配修复基因与胶质瘤耐药性相关性的研究进展做一综述。

关键词 错配修复 胶质瘤 耐药性 替莫唑胺

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.004

胶质瘤是颅内最常见恶性肿瘤之一,居成人恶性肿瘤发生率前 10 位,高级别胶质瘤预后很差,平均生存期只有 1~2 年,严重危害国民健康^[1]。高级别胶质瘤的治疗一直是重大的医学难题:常规手术不能全切,传统化疗药普遍不敏感,放疗也只有低度或中度敏感。新型烷化剂替莫唑胺(temozolomide, TMZ)的问世一定程度上改变了这种局面,约 47.7% 新诊断的高级别胶质瘤对 TMZ 初始敏感^[2]。因此 TMZ 化疗已经成为恶性胶质瘤手术后的标准治疗方案。许多研究报道在 TMZ 初始敏感的胶质瘤患者中出现 DNA 错配修复(DNA mismatch repair, MMR)系统相关基因突变,导致 TMZ 化疗期间出现肿瘤快速复发,复发胶质瘤的恶性程度进一步增高^[3~5]。据笔者所知,目前国内外学者对该领域的研究仍较少,现就 MMR 系统及其在胶质瘤化疗耐药方面的研究进展做一综述。

一、MMR 系统的组成和功能

DNAMMR 系统是机体内 DNA 修复机制的一种重要形式,由多种基因与蛋白质构成,广泛存在于生物体中。在大肠杆菌属中,MutH、MutL、MutS 及 UvrD 基因构成了 MMR 系统。在酵母菌中,MMR 系统即是细菌 MutS、MutL 同源物。目前为止,已从人类体内分离克隆出 9 种 MMR 相关基因,分别为 hMSH2、hMSH3、hMSH4、hMSH5、hMSH6、hMLH1、hMLH3、hPMS1 和 hPMS2。MMR 系统的基本功能是去除 DNA 复制过程中的核苷酸碱基错配及 DNA 聚合酶滑链造成的插入/缺失环,校正非同源染色体重组而

保持整个基因组的稳定。错配修复过程主要包括 3 个步骤:错配碱基的识别、含错配碱基的 DNA 区段的剪切以及剪切后 DNA 再合成。

DNA MMR 系统由一系列能特异性识别、双向切除并修复错配碱基的酶分子组成,主要通过 MutS 和 MutL 复合物对错配的碱基进行识别和修复。MutS 包含 MutS α 和 MutS β 两亚型;其中 hMSH2 - hMSH6 形成 MutS α 复合物,主要识别修复单碱基错配,较短片段的插入/缺失环;少数也可由 hMSH2 - hMSH3 形成的 MutS β 复合物识别修复;较长片段的插入/缺失环则主要由 hMSH2 - hMSH3 复合物(MutS β)识别修复,少数由 hMSH2 - hMSH6 复合物(MutS α)识别, MutS α 和 MutS β 这两种 MMR 复合物的识别功能是重叠但不完全相同^[6]。MutS 复合物从属于 MutL 复合物(hMLH1 - hPMS2),其为 DNA 损伤的主要位点^[7,8]。

二、MMR 基因与胶质瘤化疗耐药性

TMZ 的出现在当今恶性胶质瘤的化疗药物中具有里程碑的意义,可是普遍存在对烷化剂治疗抵抗仍然是遏制肿瘤进展的一大主要障碍^[9]。TMZ 的治疗作用主要依赖于具有完整功能的 MMR 系统。正常 MMR 系统能够识别 TMZ 所致 DNA 链上的 O⁶-甲基鸟嘌呤:胸腺嘌呤(O⁶-mG:T)错配,并导致无意义修复,最终使肿瘤细胞周期中止,进入凋亡程序而死亡见图 1。

目前多项研究发现,TMZ 化疗后的复发胶质瘤出现 MMR 功能异常,将影响细胞识别 DNA 损伤和激活凋亡的能力,从而使肿瘤细胞对化疗药物产生耐药^[3,5]。此外,在复发胶质瘤中,TMZ 等烷化剂治疗后非但没有延长生存期,反而进一步促进肿瘤的恶性进展^[3,5,10,11]。MMR 系统在胶质瘤化疗耐药性产生

基金项目:浙江省科技厅基金资助项目(2016C33SA300055)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院神经外科

通讯作者:张弩,主任医师,电子信箱:zhangnu65@163.com

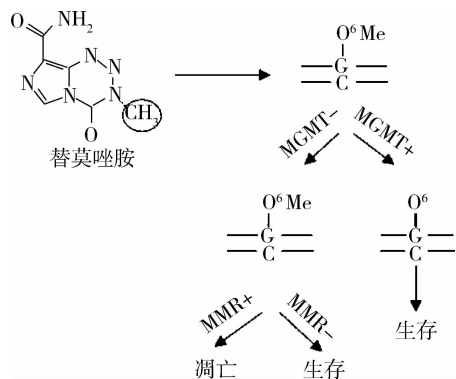


图1 替莫唑胺与DNA错配修复机制

TMZ. 替莫唑胺;MGMT. O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;

MMR. DNA错配修复

中的作用,目前主要集中于对hMSH6、hMLH1基因的研究,也有少数对其他MMR相关基因的研究,但MMR系统中何种基因起最关键作用尚不完全清楚^[12]。

1. hMLH1基因在胶质瘤化疗耐药性中研究:MMR基因突变造成功能丧失主要由于hMLH1基因启动子甲基化造成的,hMLH1缺失占MMR系统缺失的大部分,因此在MMR中起着重要的作用。hMLH1定位于3号染色体短臂上,Shinsato等^[13]研究发现体外U251细胞株在TMZ诱导下出现hMLH1蛋白表达降低,同时在TMZ治疗过程后复发胶质瘤组织中也检测发现hMLH1蛋白表达降低。与此同时,Stark等^[14]研究也证实多数复发胶质瘤患者肿瘤组织中检测发现hMLH1蛋白表达显著性降低,并且提示与预后相关。此外,Felsberg等^[12]研究发现另一种现象,对比原发和复发胶质瘤患者肿瘤组织时未发现hMLH1蛋白表达有所降低,而出现hMSH6和hMSH2蛋白表达明显下降。以上多项研究结果表明,并非所有复发胶质瘤都会出现hMLH1功能缺失及蛋白表达下降,其他MMR相关基因也参与胶质瘤获得性耐药的发生机制,究竟何种MMR基因在化疗耐药中起决定作用仍有待深入研究。

2. hMSH6基因在胶质瘤化疗耐药性中研究:近几年来,越来越多研究者关注对hMSH6基因突变的研究,hMSH6定位于2号染色体短臂上,化疗后肿瘤组织中的hMSH6基因表达缺失率升高,提示hMSH6参与胶质瘤获得性耐药的发生机制^[3-5]。Hunter等^[5]首次报道在两例复发胶质瘤通过DNA测序发现hMSH6基因突变。近年Louis等多个实验室报道了TMZ化疗后出现的复发胶质瘤基因组超突变现象,

约26%对TMZ初始敏感的高级别胶质瘤患者,在TMZ化疗期间出现肿瘤快速复发,复发胶质瘤的恶性程度进一步增高^[3-5]。复发肿瘤经DNA测序发现,错配修复基因MSH6突变^[3-5,15-17]。MMR基因突变以后,其功能丧失,携带O⁶-甲基鸟嘌呤的肿瘤细胞非但不会死亡,反而将G:T错配传递给子代细胞,形成G:C>T:A突变,因此子代肿瘤细胞中出现大量的点突变(77 mutations perMb),称为超突变(hypermutation)^[17]。这一发现随后被TCGA(the cancer genome atlas)的大样本研究进一步证实^[18]。TCGA研究指出这一现象有以下3个特点:①主要发生在O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)阴性的肿瘤,初始对TMZ敏感,在术后TMZ化疗期间出现耐药,导致快速复发;②关键环节是hMSH6突变,已经证实hMSH6突变只存在于接受TMZ化疗的复发胶质母细胞瘤,而未见于初次手术的原发肿瘤,亦未见于单独放疗的复发肿瘤;所以hMSH6突变直接来源于对TMZ化疗的反应^[18];③hMSH6突变,错配修复机制丧失,TMZ产生的G:T错配不能得到纠正,从而在子代细胞中形成大量G:C>T:A点突变,因此超突变的发生依赖于TMZ的甲基化作用。超突变涉及大量与增殖分化相关的功能基因(如蛋白激酶类),甚至癌基因或抑癌基因,从而使肿瘤恶性程度进一步增高^[3-5,18]。与此同时,Hinke等^[19]研究显示在6例高级别复发胶质瘤患者中发现超突变现象,同时伴有多种MMR相关基因突变,表明MMR系统多种基因可能都参与胶质瘤获得性耐药的发生机制。然而,也有少数研究并不支持上述主流观点,认为hMSH6基因缺失并非只出现在TMZ化疗后的复发胶质瘤中。Maxwell等^[11]研究发现在两例初发和复发配对的胶质瘤组织中均识别hMSH6突变。近来Nguyen等^[9]研究也发现在少数未经TMZ治疗的初发胶质瘤患者也出现hMSH6基因突变,这可能提示hMSH6基因突变并非完全来源于烷化剂处理后的获得性基因突变。

MMR系统功能缺失常常伴发微卫星不稳定,故微卫星不稳定的出现是MMR基因缺失的特征性标志。但Hunter等^[5]研究指出在伴有hMSH6突变的所有复发胶质瘤中未发现微卫星不稳定,同时Yip等^[3]研究也证明了该现象。此外,McFaline等^[20]在多种胶质瘤耐药株中通过Western blot法检测发现hMSH2和hMSH6蛋白表达水平下降,但同时未检测出微卫星不稳定。这说明MMR系统基因与微卫星

不稳定在复发胶质瘤对 TMZ 耐药机制中作用可能存在于部分交叉关系。总之,MMR 系统功能异常并非是胶质瘤的原发性耐药机制,而是 TMZ 诱发了 MMR 基因发生突变,这有可能就是 TMZ 治疗后胶质瘤化疗耐药的机制之一。

众所周知,几乎所有肿瘤的化疗耐药都是多因素,多基因参与影响的。不同胶质瘤细胞系,以及不同病理级别的胶质瘤对同一种药物的反应也不同,可能存在不同的耐药机制,并且各个机制间存在着相互联系相互依赖的关系。近年来对 DNA 修复机制在恶性胶质瘤的耐药研究主要集中在 MGMT、MMR 和 BER(base excision repair)等修复途径。不断探索发现 MMR 基因在化疗耐药中确切机制,明确这些基因的相互关系和作用机制将有利于解决胶质瘤耐药的难题,可以预防和逆转耐药性的发生。

三、新型药物的研究

目前针对 MMR 系统功能缺陷导致 TMZ 化疗耐药的发生,少数学者研发新型药物克服对 TMZ 耐药的胶质瘤治疗。Ramirez 等^[21]在 TMZ 的基础上进行设计两种新型的 TMZ 类似物,即 DP68 和 DP86;通过体外肿瘤细胞株实验证明这两类 TMZ 类似物明显改善对 TMZ 耐药胶质瘤的疗效。同时,Zhang 等^[22]通过对 TMZ 化学分子式的重新构建形成新型类似物,能使耐药的肿瘤细胞发生凋亡和自噬性死亡,从而改善肿瘤化疗抵抗。近期,Huang 等^[23]研究通过免疫疗法的方式治疗 TMZ 抵抗的胶质瘤细胞,主要利用 PD-1 抑制剂通过刺激 NK 细胞杀伤肿瘤细胞,从而解决 TMZ 化疗耐药的难题。

四、展望

MMR 的功能就像监视系统,能够识别 DNA 错配的碱基对或错配基因,启动细胞凋亡途径。TMZ 是当前治疗恶性胶质瘤的一线药物,它的治疗作用主要依赖于具有完整功能的 MMR 系统。一旦监视系统功能缺失,就无法检测存在于 DNA 上损伤,凋亡的级联反应不能激活;主要表现为肿瘤的发生、进展或产生化疗抵抗等。目前仍有许多问题亟待解决,如 MMR 系统的确切作用机制,MMR 功能异常与胶质瘤化疗耐药及复发的具体机制,肿瘤基因组超突变与 TMZ 导致 MMR 基因突变的确切关系,如何在 TMZ 化疗过程中及早发现 MMR 相关基因突变,防止肿瘤的恶性进展,以及 MMR 系统功能丧失后采取何种有效的治疗方案等,还有待于进一步深入研究。但随着基因芯片和蛋白组学等技术发展,对 MMR 基因与胶

质瘤的化疗耐药的关系深入研究有望取得新进展,另外分子影像学技术的提高,新型化疗药物的研发,将为胶质瘤的诊治提供更好的前景。

参考文献

- 1 Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, *et al.* Brain tumor epidemiology: consensus from the brain tumor epidemiology consortium [J]. Cancer, 2008,113:1953-1968
- 2 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005,352:987-996
- 3 Yip S, Miao J, Cahill DP, *et al.* MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance [J]. Clin Cancer Res, 2009,15(14):4622-4629
- 4 Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, *et al.* Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment [J]. Clin Cancer Res, 2007,13(7):2038-2045
- 5 Hunter C, Smith R, Cahill DP, *et al.* A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy [J]. Cancer Res, 2006,66(8):3987-3991
- 6 Casorelli I, Russo MT, Bignami M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2008,8:368-380
- 7 Giraldo A, Gomez A, Salguero G, *et al.* MLH1 and MSH2 mutations in Colombian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) - description of four novel mutations [J]. Fam Cancer, 2005,4:285-290
- 8 Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruiter M, *et al.* Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas [J]. Int J Cancer, 2007,121:2458-2464
- 9 Nguyen SA, Stechishin OD, Luchman HA, *et al.* Novel MSH6 mutations in treatment-naïve glioblastoma and anaplastic oligodendroglioma contribute to temozolomide resistance independently of MGMT promoter methylation [J]. Clin Cancer Res, 2014,20(18):4894-4903
- 10 Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, *et al.* Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment [J]. Clin Cancer Res, 2007,13:2038-2045
- 11 Maxwell JA, Johnson SP, McLendon RE, *et al.* Mismatch repair deficiency does not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma [J]. Clin Cancer Res, 2008,14:4859-4868
- 12 Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, *et al.* Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSI-12, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas [J]. Int J Cancer, 2011,129:659-670
- 13 Shinsato Y, Furukawa T, Yunoue S, *et al.* Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma [J]. Oncotarget, 2013,4(12):2261-2270
- 14 Stark AM, Doukas A, Hugo HH, *et al.* The expression of mismatch

- repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma [J]. *Neurol Res*, 2010, 32(8):816-820
- 15 Rodríguez - Hernández I, Garcia JL, Santos - Briz A, *et al.* Integrated analysis of mismatch repair system in malignant astrocytomas[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e76401
 - 16 Pei C, Chen H, Jia X, *et al.* A high frequency of MSH6 G268A polymorphism and survival association in glioblastoma[J]. *Int J Neurosci*, 2013, 123(2):114-120
 - 17 Johannesma PC, van der Klift HM, van Grieken NC, *et al.* Childhood brain tumours due to germline bi - allelic mismatch repair gene mutations[J]. *Clin Genet*, 2011, 80(3):243-255
 - 18 TCGA Consortium. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. *Nature*, 2008, 455:1061-1068
 - 19 Hinke F, van Thuijl, H FMazor, *et al.* Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low - grade gliomas after temozolomide treatment [J]. *Acta neuropathologica*, 2015, 129(4):597-607
 - 20 McFaline - Figueroa JL, Braun CJ, Stanciu M, *et al.* Minor changes in expression of the mismatch repair protein MSH2 exert a major impact on glioblastoma response to temozolomide[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15):3127-3138
 - 21 Ramirez YP, Mladek AC, Phillips RM, *et al.* Evaluation of novel imidazotetrazine analogues designed to overcome temozolomide resistance and glioblastoma regrowth[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(1):111-119
 - 22 Zhang J, Hummersone M, Matthews CS, *et al.* N3 - substituted temozolomide analogs overcome methylguanine - DNA methyltransferase and mismatch repair precipitating apoptotic and autophagic cancer cell death[J]. *Oncology*, 2015, 88(1):28-48
 - 23 Huang BY, Zhan YP, Zong WJ, *et al.* The PD - 1/B7 - H1 pathway modulates the natural killer cells versus mouse glioma stem cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0134715
- (收稿日期:2016-07-19)
(修回日期:2016-07-31)

乳腺癌相关基因 DNA 甲基化的研究进展

张 微 韩翠翠 岳丽玲

摘 要 乳腺癌是女性发生率较高的恶性肿瘤之一,其产生与发展是一个复杂的生物学过程,而 DNA 甲基化是促使乳腺癌发生的重要方式。DNA 甲基化可介导乳腺癌致病基因的异常表达。随着人们对乳腺癌认识的不断深入,通过基因组水平筛选出乳腺癌主要致病基因,对进一步诊断及治疗乳腺癌有重要意义。本文对乳腺癌 DNA 甲基化及相关基因的研究进展进行综述与评价。

关键词 乳腺癌 DNA 甲基化 抑癌基因

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.005

乳腺癌是全球女性恶性肿瘤死亡的主要原因,也是女性死于癌症的主要疾病。乳腺癌的产生是一个复杂生物学过程,是由于遗传性和非遗传性两种因素相互作用引起的。乳腺癌较多发生在女性中,与患者年龄以及家族遗传有关,综合激素水平、生活习惯等因素,每个乳腺癌患者的预测准确率也只有 58% ~ 59%^[1]。随着表观遗传学的发展,人们发现 DNA、组蛋白、染色质水平的转变会影响基因表达的变化。乳腺癌的发生是由于环境和基因因素共同作用的结果。随着乳腺癌发生率的不断增加,乳腺癌逐渐成为威胁

女性健康的主要疾病,人们对于乳腺癌发病机制和致病基因的研究手段也在不断提高。一直以来乳腺癌的患病率、风险预测和早期检测都具有一定的挑战性,尽管肿瘤 X 线钼靶法已经成为一种较为有效的乳腺癌筛查的检查方式,但射线辐射、主观判断以及对于检测年轻女性乳腺增生缺乏敏感度,导致这种方法的实用性受到了局限。大量研究表明乳腺癌发生时,基因的异常甲基化起主要作用。在乳腺正常细胞向肿瘤细胞不断转化的过程中,基因的异常甲基化导致染色体不稳定,基因异常表达,引起肿瘤的发生。乳腺癌相关因子的研究日趋成熟,这将对乳腺癌诊断与治疗的细化指导有重要意义^[2]。

一、DNA 甲基化

DNA 甲基化是基因组常见的表观遗传修饰,在细胞分化、增殖、防御外源物质入侵等方面发挥重要

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(H2014100)

作者单位:154007 佳木斯大学基础医学院(张微);161006 齐齐哈尔医学院医药科学研究院(张微、韩翠翠、岳丽玲)

通讯作者:岳丽玲,教授,电子信箱:yuell1025@126.com