

砷甲基转移酶与亚砷酸治疗急性早幼粒细胞白血病关系研究进展

沈盼丽 张 卓 周 晋

摘 要 急性早幼粒细胞白血病曾经是预后最差的急性髓细胞白血病中的一种,应用亚砷酸治疗初发及复发难治急性早幼粒细胞白血病均已经取得了非常好的效果,且得到了国内外学者的认可,越来越多的学者开始研究亚砷酸在人体内的代谢过程、代谢相关酶——砷甲基转移酶及砷甲基转移酶与亚砷酸疗效和不良反应的关系,本文将对目前这些研究进展进行综述。

关键词 亚砷酸 急性早幼粒细胞白血病 砷甲基转移酶 砷代谢

中图分类号 R5

文献标识码

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.043

急性早幼粒细胞白血病 (APL) 是急性髓细胞白血病 (AML) 的一种,约占有 AML 的 10%, 它的特点在于 15 号染色体上的 PML (早幼粒白血病基因) 与 17 号染色体上的 RARA (维 A 酸受体基因) 形成 PML-RARA 融合基因^[1,2]。在亚砷酸及维甲酸出现之前,APL 是最致命的 AML 之一,预后非常差,现在 APL 的完全缓解率可以达到 90%, 在低风险患者中甚至更高^[1,3]。该疾病现在被认为是成人 AML 中最可治愈的类型。从张亭栋教授世界上首次应用砷霜治疗 APL 并取得了举世瞩目的效果,到今天亚砷酸治疗 APL 的历史已经有近 40 年的历史。目前世界各国已经广泛认可亚砷酸治疗 APL 的疗效,最新的研究也不断出现^[4]。随着人们对亚砷酸代谢研究的深入砷甲基转移酶 (AS3MT) 进入了人们的视野,逐渐引起了人们的重视,人们对其的研究也正逐渐增加,AS3MT 决定甲基化产物的多少,甲基化产物决定亚砷酸毒性不良反应,本文通过查阅相关文献对目前 AS3MT 的相关研究进行了综述。

一、亚砷酸甲基化代谢过程

自从 20 世纪 70 年代中期,已经有越来越多的人研究探索砷的代谢,主要包括无机砷甲基化为一甲基 (MMA) 和二甲基 (DMA) 形式。砷的甲基化被认为是一个无机砷的解毒过程,尽管目前的研究已经表明甲基化代谢产物与砷暴露引起的毒性相关^[5,6]。目前

的文献研究表明,亚砷酸在人体内具体的甲基化代谢过程主要有 3 种方式。

1. 第 1 种途径:3 价无机形态的砷 (iAs III) 能够以 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 作为甲基供体,在 AS3MT 催化下生成 5 价一甲基砷 (MMA V),这是砷的第 1 步甲基化反应。而后,MMA V 再被还原为 3 价一甲基砷 (MMA III),然后在 AS3MT 的作用下生成 5 价二甲基砷 (DMA V),这是砷的第 2 步甲基化反应^[7]。砷作为酶结合的中间体经历了氧化还原过程。

2. 第 2 种途径:在此种途径中,谷胱甘肽先结合 iAs III,然后谷胱甘肽和 iAs III 的复合物在 AS3MT 的催化下甲基化产生一甲基砷谷胱甘肽,且连续进行甲基化反应,中间不涉及价态的变化^[8,9]。

3. 第 3 种途径:在前面两种学说的基础上有研究者提出,iAs III 的甲基化过程遵循连续甲基化机制,中间过程没有价态的变化,不同的是 iAs III 不需要与谷胱甘肽先结合作为底物,谷胱甘肽在甲基化反应结束之后才与 AS3MT 相结合,还原 AS3MT 活性位点在催化过程中形成的二硫键,从而恢复 AS3MT 的活性状态^[10]。

二、砷甲基转移酶

在 2002 年,AS3MT 被人们发现,它是一种负责砷甲基化代谢的酶^[11]。砷毒性表现由其在器官和细胞积累量决定的,AS3MT 催化砷甲基化,其表达和功能在砷代谢和毒性方面起着重要的作用。然而目前尚无太多关于 AS3MT 与砷代谢和毒性的研究报道,更多的是关于 AS3MT 功能、结构及其基因多态性的研究,所有这些都有助于砷代谢和毒性的研究。

1. AS3MT 的结构:2012 年宋晓丽等的研究表明,

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81430088);

黑龙江省自然科学基金资助项目 (面上项目) (H201435)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第一医院血液内科

通讯作者:周晋,教授,博士生导师,电子信箱:zhoujin1111@126.

com

AS3MT 的序列长度一般是在 348 ~ 382 个氨基酸残基,并且都含有多个 Cys 残基,其中 5 个 Cys 残基绝对保守。以人类 AS3MT 中的 375 个氨基酸残基为例,5 个保守 Cys 残基分别是 Cys32、Cys61、Cys85、Cys156 和 Cys206^[10]。Fomenko 等^[12]发现重组老鼠 AS3MT 中 Cys157 和 Cys207 为其活性位点,通过模型拓扑结构推测在催化循环过程中 Cys157 和 Cys207 形成了分子内二硫键。宋晓丽等的研究还发现 AS3MT C 端具有多个 Cys 残基且 Cys 残基具有稳定酶结构的作用,研究者通过定点突变的方法对人砷甲基转移酶(hAS3MT)多个保守残基进行了研究发现 C156S、C206S、C72S、C250S 都失去了活性^[10]。根据蛋白同源性推测 Cy156 和 Cy206 是 hAS3MT 的活性位点;通过酶二级结构研究推测,Cys72 和 Cys250 可能形成二硫键,在维持 hAS3MT 空间结构方面起着重要作用;Cy334 和 Cy360 为 hAS3MT 的特有 Cys 残基对 hAS3MT 有一定的影响,可能形成了比较重要的氢键,能够在一定程度上影响酶结构和活性^[13,14]。2014 年 Dheeman 等^[9]的研究表明 hAS3MT 中的 Cys156 和 Cys206 还有 Cys32 和 Cys61 在催化方面起着不同的作用,Cys156 和 Cys206 形成 iAsⅢ的结合位点,Cys32 和 Cys61 形成二硫键。

2. AS3MT 基因多态性:研究发现砷代谢具有明显的个体差异,检测健康供者捐献的原始肝细胞表明,8 个供者 iAsⅢ砷甲基化率有高达 7 倍的差别。遗传因素与砷代谢的个体差异性相关,为了弄清楚 AS3MT 的遗传变异和砷代谢之间的关系研究者们进行了一系列关于 AS3MT 基因多态性的研究。

研究者对 AS3MT 的基因多态性进行了一系列研究表明,儿童(7 ~ 11 岁)尿的 DMA/MMA 的比率明显与 3 个 AS3MT 的内含子(rs12767543、rs3740393、rs11191453)的基因多态性相关,但与谷胱甘肽 s 转移酶(GSTO)和嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)的基因多态性无关^[15]。AS3MT 的 3 个内含子(rs3740393、rs3740390、rs10748835)的多态性与尿砷代谢产物中 MMA 比率的减少和 DMA 比例的增加有明显的关系,表明这 3 个内含子的多态性与砷第 2 步甲基化相关^[16]。除了内含子基因多态性,AS3MT 基因外显子(rs11191439)的基因多态性也已经被检测,因为这个基因多态性导致了氨基酸的转换,使 AS3MT 的 287 位点的蛋氨酸(Met)转换为苏氨酸(Thr)(Met287Thr)。Met287Thr 的 AS3MT 转染的 COS-1 细胞的甲基转移酶活性比野生型 AS3MT 转染细胞的

高。Met287Thr 的 AS3MT 的个体尿砷代谢产物比野生型 AS3MT 个体表现出更高比例的 MMA,这表明 Met287Thr 的 AS3MT 能导致第一步甲基化能力的增强,同时也表明外显子(rs11191439)的多态性与砷第 1 步甲基化相关^[17]。CYP17A1 的基因多态性可能与砷代谢在性别方面的差异相关^[18,19]。2 个内含子(rs3740400 和 rs1046778)的多态性和 AS3MT 基因表达具有紧密联系^[20]。

2015 年,Agusa 等^[21]的研究表明,AS3MT 的内含子 12390(rs3740393)和外显子 14458(rs11191439)与砷甲基化相关,且不受人群众变化的影响,AS3MT 的 12390(rs3740393)影响第 2 步砷甲基化,然而,14458(rs11191439)影响第 1 步砷甲基化。

3. AS3MT 在亚砷酸治疗中的作用:(1) AS3MT 与亚砷酸治疗机制间的关系:2014 年,Khaleghian 等通过实时 PCR 研究了 AS3MT 和 DNA 甲基转移酶的表达水平。目前的研究表明,随着 APL 细胞内甲基化代谢物的连续生成,DNA 甲基转移酶表达水平会受到抑制,SAH 水平增加,这说明亚砷酸的生物转化会影响 DNA 甲基转移酶水平,从而影响 DNA 甲基化的程度。亚砷酸代谢过程中,细胞内的甲基化代谢物的产生和 DNA 甲基化的改变,可能有助于它对 APL 的治疗效果。最近的研究表明,亚砷酸的抗肿瘤机制不仅是先前报道的诱导凋亡,还有通过 DNA 低甲基化,激活沉默的肿瘤抑制基因。亚砷酸通过 AS3MT 转化为砷甲基化代谢产物,利用 SAM——一种 DNA 甲基转移酶的必要辅助因子,并产生 SAH,导致 DNA 低甲基化。此次研究首次发现,亚砷酸在 NB4 细胞系代谢为甲基化代谢物,这些细胞内形成的甲基化代谢物可能诱导 DNA 低甲基化,并有助于亚砷酸对 APL 的治疗效果^[22]。同时还有一些研究表明,AS3MT 催化的甲基化及产生的甲基化产物对亚砷酸治疗 APL 有重要的影响。2003 年 Chen 等^[23]的研究表明甲基化的 3 价代谢产物是有效的细胞毒素、基因毒素和酶抑制剂,有助于体内 iAsⅢ的治疗效果。2008 年,Yoshino 等^[24]对于处于巩固治疗阶段的 APL 患者不同时间点的血样进行检测发现,在停药期,3 价砷的原始血浆浓度下降较其甲基化代谢产物快;在巩固治疗阶段总砷和砷的甲基化代谢产物的血浆浓度随时间增加。这些结果可能支持亚砷酸的甲基化代谢产物在砷治疗 APL 中起主要作用这一想法。2013 年,笔者研究发现,在第 1 个亚砷酸治疗的过程中,砷甲基化代谢产物逐渐增加,并且这些代谢物可

能会因此扮演着越来越重要的作用^[25]。2014 年笔者研究发现影响亚砷酸治疗 APL 的因素除了谷胱甘肽浓度、基因突变以外还有甲基化程度,稳定的 5 价砷甲基化产物减弱亚砷酸在白血病细胞凋亡的作用。

(2) AS3MT 与亚砷酸治疗毒性不良反应间的关系: 2005 年, Zuzana Drobna 等通过细胞实验发现, AS3MT 转染的 UROtsa 细胞(缺乏内源性 AS3MT 表达)更耐受 iAsⅢ和 MMA(Ⅲ)的毒性。2009 年, Zuzana Drobna 等又通过动物实验来研究 AS3MT 在砷化合物的分布、代谢和排泄方面的作用,发现小鼠单次口服 As(V)后砷在 AS3MT 敲除的小鼠器官比如肝、肾脏、肺脏的浓度比在野生型小鼠中更高,且砷的全身清除率比野生型小鼠要慢得多。2010 年, Yokohira 等将 AS3MT 敲除的小鼠通过饮食暴露于(100 ~ 150ppm) iAsⅢ,在第 1 周表现出严重和致命的全身毒性,含砷颗粒在 AS3MT 敲除的小鼠的尿路上皮浅层比野生型小鼠更丰富更大。还有其他关于 AS3MT 敲除导致 iAsⅢ毒性改变的报道,2011 年, Yokohira 等又通过饮水给小鼠 50ppm iAsⅢ连续 4 周后, AS3MT 敲除的小鼠膀胱单纯性增长比野生型小鼠更为明显。同时通过饮用水给药 25ppm iAsⅢ4 周后,在 AS3MT 敲除的小鼠身上发现了轻度的肝炎和肾盂积液,但是在野生型小鼠身上未发现这些改变,相关研究表明, AS3MT 在保护细胞及小鼠各脏器包括肝、肾、膀胱免于砷中毒方面发挥着重要的作用。

2013 年 Wang 等的研究结果证明,亚砷酸治疗 APL 的过程中,随着砷甲基化能力下降发生了短暂的肝损伤,这表明砷甲基化能力下降增加了亚砷酸治疗不良反应的发生。

虽然以上的研究表明 AS3MT 能够减少治疗过程中的毒性不良反应,仍然有研究持有相反的观点,认为 AS3MT 积累更多的甲基化产物,反而产生更多的不良反应。

2011 年 Watanabe 等研究表明,应用亚砷酸后,经过四环素处理的中国仓鼠卵巢细胞[tet(+)细胞]能够对四环素做出反应持续过表达 AS3MT, tet(+)细胞活性减少比未经四环素处理的细胞[tet(-)细胞]更多。这项研究表明, AS3MT 表达增加能够提高亚砷酸在 tet(+)细胞中的毒性作用,因为这些细胞比 tet(-)的细胞积累了更多的亚砷酸代谢产物。因此, tet(+)细胞比 tet(-)细胞对亚砷酸更敏感。2013 年,徐石等通过实验研究表明, AS3MT 在治疗 APL 过程中产生的毒性较大的甲基化代谢产物有利

于诱导癌细胞凋亡,同时体内过多生成甲基化代谢产物也是导致患者产生毒性不良反应的重要因素之一。

综上所述, AS3MT 的相关研究表明,其在亚砷酸治疗 APL 中有着重要的作用,但是目前关于 AS3MT 检测的大样本研究尚未见到,关于 AS3MT 与亚砷酸治疗 APL 不良反应的关系也鲜有研究及报道。AS3MT 决定甲基化产物的多少,甲基化产物决定亚砷酸毒性不良反应,寻找它们与亚砷酸治疗过程中毒不良反应的关系,为毒性不良反应的预测提供可能,能有效地减少毒性不良反应的发生率。

参考文献

- Lococo F, Di DL, Schlenk RF. Targeted therapy alone for acute promyelocytic leukemia[J]. *New Eng J Med*, 2016, 374(12):1197 - 1198
- Kumar S, Yedjou CG, Tchounwou PB. Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL - 60) cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1):1 - 12
- Coombs CC, Tavakkoli M, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future[J]. *Blood Cancer J*, 2015, 5(4):e304
- Coutre SE, Othus M, Powell B, *et al.* Arsenic trioxide during consolidation for patients with previously untreated low/intermediate risk acute promyelocytic leukaemia may eliminate the need for maintenance therapy[J]. *British J Haematol*, 2014, 165(4):497 - 503
- Rehman K, Fu YJ, Zhang YF, *et al.* Trivalent methylated arsenic metabolites induce apoptosis in human myeloid leukemic HL - 60 cells through generation of reactive oxygen species[J]. *Metallomics*, 2014, 6(8):1502 - 1512
- Mccoy CR, Stadelman BS, Brumaghim JL, *et al.* Arsenic and its methylated metabolites inhibit the differentiation of neural plate border specifier cells[J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(7):1409 - 1421
- Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, *et al.* A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 198(198):327 - 335
- Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, *et al.* A new metabolic pathway of arsenite: arsenic - glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19[J]. *Arch Toxicol*, 2004, 79(4):183 - 191
- Dheeman DS, Packianathan C, Pillai JK, *et al.* Pathway of human AS3MT arsenic methylation[J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(11):1979 - 1989
- 宋晓丽, 耿志荣, 王志林. 无机砷甲基化研究进展[J]. *无机化学学报*, 2012, 28(10):2025 - 2035
- Lin S, Shi Q, Nix FB, *et al.* A novel S - adenosyl - L - methionine: arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(13):10795 - 10803
- Fomenko DE, Xing W, Adair BM, *et al.* High - throughput identifi-

- cation of catalytic redox – active cysteine residues [J]. Science, 2007, 315(5810):387 – 389
- 13 Song X, Geng Z, Zhu J, *et al.* Structure – function roles of four cysteine residues in the human arsenic (+ 3 oxidation state) methyltransferase (hAS3MT) by site – directed mutagenesis[J]. Chemico – bio Interact, 2009, 179(2 – 3):321 – 328
 - 14 Song X, Geng Z, Li X, *et al.* Functional and structural evaluation of cysteine residues in the human arsenic (+ 3 oxidation state) methyltransferase (hAS3MT) [J]. Biochimie, 2010, 93(2):369 – 375
 - 15 Meza MM, Yu L, Rodriguez YY, *et al.* Developmentally restricted genetic determinants of human arsenic metabolism: association between urinary methylated arsenic and CYT19 polymorphisms in children[J]. Environm Health Perspect, 2005, 113(6):775 – 781
 - 16 Schläwicke Engström K, Broberg K, Concha G, *et al.* Genetic polymorphisms influencing arsenic metabolism: evidence from Argentina [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(4):599 – 605
 - 17 Wood TC, Salavagionne OE, Mukherjee B, *et al.* Human arsenic methyltransferase (AS3MT) pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomics studies[J]. J Biol Chem, 2006, 281(11):7364 – 7373
 - 18 Gomez RP, Meza MMSE, Klimecki WT. Genetic association between intronic variants in AS3MT and arsenic methylation efficiency is focused on a large linkage disequilibrium cluster in chromosome 10[J]. J App Toxicol, 2010, 30(3):260 – 270
 - 19 Engström KS, Nermell B, Concha G, *et al.* Arsenic metabolism is influenced by polymorphisms in genes involved in one – carbon metabolism and reduction reactions[J]. Mutation Research/Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2009, 667(1 – 2):4 – 14
 - 20 Engström K, Vahter M, Mlakar SJ, *et al.* Polymorphisms in Arsenic (+ III Oxidation State) methyltransferase (AS3MT) predict gene expression of AS3MT as well as arsenic metabolism[J]. Environ Health Perspec, 2011, 119(2):182 – 188
 - 21 Agusa T, Kunito T, Minh TN, *et al.* Relationship between arsenic (+ 3 Oxidation State) methyltransferase genetic polymorphisms and methylation capacity of inorganic arsenic[J]. Nipponseigaku Zasshi, 2015, 70(3):186 – 196
 - 22 Khaleghian A, Ghaffari SH, Ahmadian S, *et al.* Metabolism of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells [J]. J Cell Biochem, 2014, 115(10):1729 – 1739
 - 23 Chen GQ, Zhou L, Styblo M, *et al.* Methylated metabolites of arsenic trioxide are more potent than arsenic trioxide as apoptotic but not differentiation inducers in leukemia and lymphoma cells [J]. Cancer Res, 2003, 63(8):1853 – 1859
 - 24 Yoshino Y, Yuan B, Miyashita S I, *et al.* Speciation of arsenic trioxide metabolites in blood cells and plasma of a patient with acute promyelocytic leukemia[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 393(2):689 – 697
 - 25 Zhang Z, Chen Y, Meng H, *et al.* The Determination of arsenic metabolites in patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide[J]. Leukemia Lymphoma, 2013, 54(9):2041 – 2046

(收稿日期:2016 – 08 – 08)

(修回日期:2016 – 09 – 09)

肠道菌群与糖尿病关系的研究进展

白宁宁 张 菁 方启晨

摘 要 糖尿病的发生率正在不断上升,已成为威胁人类健康和生活质量的全球性疾病。但对于糖尿病的病因尚未完全明确,目前认为主要是遗传和环境因素共同作用的结果。研究发现,人体肠道菌群的代谢活动与宿主营养、代谢与免疫功能密切相关,是影响糖尿病的一个重要环境因素。本文主要就肠道菌群与糖尿病的关系的最新研究进展进行综述。

关键词 肠道菌群 糖尿病 血糖代谢

中图分类号 R589

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.044

糖尿病已成为当今世界最为严重的健康问题之一,长期疾病导致的并发症使生活质量严重下降。糖尿病的产生是环境和遗传因素共同作用的结果,但是

目前的治疗手段主要针对疾病后果而非代谢紊乱原因,因此从疾病的分子机制出发,寻找新型的预防和治疗方案已然成为研究的热点。近年来,大量研究发现人体肠道菌群与糖尿病的发生、发展密切相关,形成一个特殊的营养、健康和疾病焦点三角形关系,特别是肠道菌群日渐成为最具活力和广泛关注的研究领域。然而,肠道菌群在宿主代谢过程及疾病进展中的精确作用仍有待阐明。

基金项目:上海市自然科学基金资助项目(15ZR1431700)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院糖尿病研究所、上海市糖尿病重点实验室、上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科

通讯作者:方启晨,电子信箱:qcfang@sjtu.edu.cn