

白血病干细胞自我更新信号通路相关基因表达与白血病复发*

褚雨霆 陈信义[△] 王荣华 王 婧

(北京中医药大学东直门医院 北京 100700)

摘要 除骨髓移植外,以化疗为主的急性白血病治愈率很低,尤其因耐药复发的难治性急性白血病不能治愈的原因是患者体内存在一群具有自我更新能力的白血病干细胞。虽然这些细胞数量极少,但可自我更新,具有很强的增殖潜能,在白血病发生和复发过程中起着关键性作用。白血病干细胞的存在和增殖受细胞表面分子、细胞调控信号通路、细胞自我更新信号通路与骨髓微环境等多因素影响,其中,细胞自我更新信号通路及其相关基因表达在维系白血病干细胞生物学特征方面发挥着重要作用

关键词 急性白血病;白血病干细胞;信号通路

中图分类号:R733.71 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)11-2195-03

The Gene Expression of Self-renewal Signal Pathways in Leukaemia Stem Cells and Leukemia Relapse*

CHU Yu-ting, CHEN Xin-yi[△], WANG Rong-hua, WANG Jing

(Oncology and Hematology Department of Dongzhimeng Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

ABSTRACT: In addition to the bone marrow transplantation, the cure rate of acute leukemia mainly with chemotherapy is very low. Especially because of the acute leukemia of drug resistance relapsing refractorily cannot be cured is existing self-renewal ability of leukaemia stem cells of a group of patients. Although these very few number of cells can self-renewal, and have a strong potential proliferation in leukemia relapse, and play a key role in the process. The existing and proliferation of Leukaemia stem cells are due to surface molecules, cellular control signal pathways, cell self-renewal signal pathways and bone marrow micro environment factors. Among these factors, the cell self-renewal signal pathways and its gene expression in maintaining leukaemia stem cell biology characteristics play a major role.

Key words: Acute leukemia; Leukaemia stem cells; Signal pathway

Chinese Library Classification(CLC): R733.71 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2195-03

除骨髓移植外,以化疗为主的急性白血病(Acute Leukemia, AL)治愈率很低,尤其因耐药复发的难治性急性白血病(Refractory acute Leukemia, RAL)不能治愈的原因是患者体内存在一群具有自我更新能力的白血病干细胞(Leukemia stem cell, LSC)。虽然这些细胞数量极少,但可自我更新,具有很强的增殖潜能,在白血病发生和复发过程中起着关键性作用。目前研究证实,LSC既保持有正常造血干细胞(Hemopoietic stem cell, HSC)的生物学特征,但又不同于增生能力有限的原始白血病细胞,有95%以上处于G₀期静止状态的LSC对化疗药物极不敏感,容易对多种化疗药物产生交叉性耐药。当化疗药物抑制快速增殖的白血病细胞和HSC时,位于骨髓区域及处于G₀期的LSC确逃逸了化疗药物的损伤,为白血病复发种下了祸根。对于白血病复发一直认为与微小残留白血病细胞有关,近年来的研究发现,白血病的复发与LSC密切相关。LSC的存在和增殖受细胞表面分子、细胞调控信号通路、细胞自我更新信号通路与骨髓微环境等多因素影响,其中,细胞自我更

新信号通路及其相关基因表达在维系LSC生物学特征方面发挥着重要作用。

1 HOX 基因

HOX基因(Hox genes)是同源基因(homeotic genes)或称同源异型基因。人类Hox基因可分成4个基因群集,分别位于7号、17号、12号与2号染色体上。此外,Hox基因又可分成13个平行同源家族(paralogous family)。HOX基因是生物体中专门调控生物形体的基因,一旦HOX基因发生突变,就会使身体的一部分变形。其作用机制主要是调控细胞分裂、纺锤体以及硬毛、附肢等部位发育。近些年的研究表明,HOX基因也是细胞增殖分化的正性和负性调节基因,不仅调控胚胎细胞的增殖和分化,而且也在成人组织细胞中具有同样的调节功能。通过对白血病细胞遗传学及分子生物学研究发现,HOX基因表达紊乱与白血病发生具有相关性,尤其是HOXA和HOXB族基因,与急性髓系白血病(Acute myeloblastic leukemia, AML)关

* 基金项目:教育部高等学校博士点专项基金(20100013110008),北京中医药大学自主创新课题(2010YYBZZ-XS071)

作者简介:褚雨霆(1986-),男,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治白血病应用研究

[△]通讯作者:陈信义(1954-),男,教授,主任医师,电话:010-84779220 E-mail: chenxinyi0729@126.com

(收稿日期:2011-09-28 接受日期:2011-10-24)

系极为密切。有研究证明,在 24 个白血细胞系中,除人早幼粒急性白血细胞(HL60)外,在 8 个髓系白血细胞系中,均可检测到 HOXA9、HOXA10 的表达,且转染 HOXA10 的 CD34⁺ 造血干细胞其增殖能力明显增强^[1]。研究还发现,HOXB3 在正常骨髓组织中无法检测到,而在 AML 患者骨髓或血液中可见到高水平表达。通过对 HOXB3 与 HOXA9 骨髓移植小鼠模型研究发现,两者在诱导白血病发生过程中,可能具有共同的信号通路^[2]。与正常人相比,AML 患者的骨髓中有 HOXB6 的高表达。HOXB6 和 HOXA9 同时高表达的 AML 患者多伴有 2D-EH 染色体缺失,提示 HOXB6 与 HOXA9 在白血病发生过程中,具有相似的遗传学改变。

2 BMI-1 基因

BMI-1 基因是多梳基因(Polycomb group genes)家族重要的调节基因,也是一种癌基因,并调节同源盒基因的转录。Bmi-1 基因在维持 HSC 自我更新和多向分化方面起重要作用,具有促进 LSC 和乳腺癌干细胞的增殖能力。BMI-1 基因参与 HOX 基因的转录调节。HOX 基因的表达受 PcG(Polycomb-group)和 TrxC(Trithorax group)蛋白的共同作用,PcG 与 TrxC 分别维持靶基因的转录抑制与激活状态,从而使得 HOX 基因在机体发育过程中保持稳定。BMI-1 基因在机体发育过程中控制基因活性,调节染色质的改造,充当转录抑制物,并与 HSC 功能和肿瘤干细胞增殖有关^[3,4]。Lessard 等研究发现,将小鼠骨髓细胞经 BMI-1 转染后再移植小鼠,即可发生 AML。再将白血病细胞进行体外培养发现,10 d 后白血病细胞数较对照组明显下降,细胞阻滞于 G₁ 期且凋亡细胞增加,集落形成能力也有所下降。提示 BMI-1 对 LSC 的增殖与导致白血病的机会具有决定性作用^[5]。Jacobs 等采用鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts,MEFs)研究了 BMI-1 在细胞增殖中的作用,结果发现,BMI-1 基因表达缺失的 MEFs 很难进入 S 期,表现为细胞早熟并进而老化。而野生型的 MEFs 由于过度表达 BMI-1 基因,从而能进入缓慢生长状态并进而永生,其增殖速度及细胞密度均高于 BMI-1 基因缺失的 MEFs^[6]。Bmi-1^{-/-} 小鼠在胚胎期(胎肝)HSC 数量正常,但小鼠出生后,骨髓 HSC 数量迅速下降,体外培养二次集落形成明显减少,移植 Bmi-1^{-/-} 小鼠骨髓给同基因受体小鼠只能短暂支持造血,没有观测到成年期 HSC 的自我更新,标志着 Bmi-1^{-/-} 小鼠造血干细胞存在自身缺陷,不能持续到成年期^[7]。增加 Bmi-1 的表达能促进 HSC 自我更新,Bmi-1 表达能增强 HSC 的对称分裂并通过干细胞分裂调高遗传概率。重新转染 Bmi-1 能导致体内祖细胞多种潜能的扩增并使 HSC 在体内再植入能力显著增加,因此 Bmi-1 是 HSC 自我更新的一个中心角色^[8,9]。

3 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路因其启动蛋白 Wnt 得名,包括:①Wnt 经典信号转导通路-Wnt/ β -catenin 信号转导途径;②Wnt-Ca²⁺ 途径。Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,对于维持多种干细胞的稳定增值起着重要作用。目前,已经在人类胚胎干细胞、肠道干

细胞、造血干细胞、皮肤干细胞、神经干细胞内观察到该信号通路具有维持干细胞自我更新及抑制其分化的效能。Naveed 等对急性淋巴细胞白血病(Acute Lymphocytic Leukemia, ALL)的研究发现, β 细胞白血病的祖细胞与正常祖细胞相比,表达 Wnt 分泌蛋白及通路的受体蛋白的范围更广(Wnt 蛋白,LRP,FZD 等)。用 Wnt3a 重组蛋白激活 Wnt 信号转导途径后,细胞增殖能力在不同 ALL 细胞系中增加了 1.7-5.3 倍。同时,细胞的抗凋亡能力及在无血清培养液中形成肿瘤球的能力也明显增强。在 Wnt 信号通路被激活后,与细胞增殖及凋亡相关的基因也发生了变化,并且这种变化在不同的细胞系中也有差异^[10]。Ysebaert 等在 61%病理标本中检测到 β -catenin 表达, β -catenin 的高表达提示与白血病不良预后关系极为密切。体外研究表明,Wnt 通路的活化与 AML 细胞的自我更新和克隆形成能力的增强明显相关^[11]。Kawaguchi-Ihara 等在对 ALL 中研究发现,Wnt3a 可以增强 LSC 的自我更新能力,在某些 AML 和 T-ALL 细胞系中,Wnt3a 不是促进整个细胞群的增殖,而是促进 LSC 或祖细胞的自我更新^[12]。Wnt5a 信号能活化经典的 Wnt/ β -catenin 通路和非经典的 Wnt/Ca²⁺ 通路。在对 10 例 ALL(CD19⁺ 或 CD4⁺)和 10 例 AML(CD13⁺/CD33⁺)的标本检测时发现,在所有的 AML 样本中,Wnt5a 表达水平降低或完全缺失,在 ALL 标本中有 8 例前 B 细胞 ALL(CD19⁺)也存在着 Wnt5a 表达缺失^[13]。在 CLL 细胞和 CML 细胞中的 Wnt5a 表达也缺乏^[14,15]。在对白血病细胞系如人红白血病细胞系(K562)和 HL-60 的研究中发现,Wnt5a 表达缺乏,提示 Wnt5a 表达异常与人类造血组织的恶性肿瘤有明显的相关性^[15]。Wnt5a 功能缺失小鼠发展成 B 细胞淋巴瘤和慢性髓性白血病可能性很大,证明 Wnt5a 参与了白血病的发病过程。在 Wnt5a 缺乏或者缺失的样本中,用 RT-PCR 法测得 cyclinD1 是正常的 4.7 倍^[13]。可以看出当 Wnt5a 减少时,通过 Wnt/Ca²⁺ 对 B 细胞增殖的负调控减弱,导致 B 祖细胞分化增殖失控,而凋亡却没有随之增加,这可能与 B 细胞白血病发病机制有关。在 T 细胞,CD4⁺ALL 和混合前 B/髓细胞 ALL,Wnt5a 表达阳性^[13]。在 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 中,Wnt5a 也有阳性表达。提示 Wnt5a 对造血细胞的作用机制可能不同。

4 SHH 基因

Sonic hedgehog(SHH)信号通道由 Shh 配体、2 个跨膜蛋白受体 Patched(Ptc)和 Smoothed(Smo)复合物以及转录因子 Gli 蛋白等组成,在胚胎发育过程中,对细胞的增殖和分化意义重大,通路的功能异常会引起肿瘤发生。SHH 是 SHH 通路中的起始基因。SHH 基因于 1980 年在果蝇中被发现,编码高度保守的分泌性糖蛋白,具有自我催化加工的能力。在哺乳动物中至少发现三种同源基因,即 Sonic HH(SHH)、Indian HH(IHH)和 Desert HH(DHH),分别编码三种相应的蛋白:SHH、IHH 和 DHH^[16]。其中,对 SHH 的研究最广泛,在人、鼠、蛙、鱼和鸡等动物中,存在且高度保守,人、鼠 SHH 同源性有 92%。Bhardwaj 等研究了 SHH 对造血早期细胞增殖影响时发现,SHH 与 Ptc 和 Smo 受体在纯化的脐血 CD34⁺ Lin-CD38⁻ 细胞和骨髓基质细

胞中均有表达,证明 SHH 诱导早期造血细胞的增殖是通过下游的 BMP-4 而发挥作用^[17]。

总之,通过对 LSC 自我更新信号通路的研究,不但可以区分 LSC 与 HSC 的生物学特性,还可以为白血病治疗提供新的作用靶点。如果发现能够影响 LSC 信号通路的抗白血病药物,就有可能治愈白血病或控制复发,同时,也能有效的解决白血病多药耐药问题。

参考文献(References)

- [1] Buske C, Feuring-buske M, Antonchuk J, et al. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomelo-poiesis in vitro and in vivo [J]. *Blood*,2001,97(8):2286
- [2] Thorsteisdottir U, Kroon E, Jerome L, et al. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia [J]. *Mol cell bio*,2001,21(1):224
- [3] Osaka M, Koami K, Sugiyama T. Cloning of the rat proto-oncogene bmi-1 [J]. *Cancer Lett*,1998,133: 57-62
- [4] Van-Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, et al. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging [J]. *Cel*,1991,65: 737-752
- [5] Lessard J, Sauvageau G. BMI-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cell [J]. *Nature*,2003,423(2):255-260
- [6] Jacobs J J, Jacqueline J L, Kieboom C, et al. The oncogene and Polycomb-group gene BMI-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus [J]. *Nature*,1999,397(6715):164-165
- [7] Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells [J]. *Nature*,2003,423(6937): 302-305
- [8] Raaphorst FM. Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1 [J]. *Trends Immunol*,2003,24: 522-524
- [9] Iwama A, Oguro H, Negishi M, et al. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1 [J]. *Immunity*,2004,21: 843-851
- [10] Khan NI, Bradstock KF, Bendall LJ, et al. Activation of Wnt/ β -catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Br J Haematol* 2007,138(3): 338-348
- [11] Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, et al. Expression of β -catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis [J]. *Leukemia*,2006,20(7):1211-1216
- [12] Kawaguchi-Ihara N, Murohashi I, Nara N, et al. Promotion of the self-renewal capacity of human acute leukemia cells by Wnt3A [J]. *Anticancer Res*,2008,28(5A): 2701-2704
- [13] Huiling L, Qin C, Andrew H, et al. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue [J]. *Cancer Cell*,2003,4(8): 349-360
- [14] Tetsuya F, Liguang C, Tomoyuki E, et al. Antisera induced by infusions of Autologous Ad-CD154-leukemia B cells indentify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a [J]. *PNAS*,2008,105(8): 3047-3052
- [15] 李招权, 司维柯, 潘静, 等. Wnt5a 基因在血液病及白血病细胞株中的表达 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(5): 927-930
Li Zhao-quan, Si Wei-ke, Pan Jing, et al. Expression of Wnt5a Gene in Hematologic Diseases and Leukemic Cell Lines [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2007, 15(5): 927-930
- [16] Cohen M M. The hedgehog signaling network [J]. *Am J Med Genet*, 2003,123A(1):5-28
- [17] Bhardwaj G. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation [J]. *Nature Immunol*. 2001,2:172-180