

维甲酸诱导早幼粒白血病细胞 分化的分子机制研究

陈 竺 陈赛娟

(上海第二医科大学附属瑞金医院, 上海血液学研究所)

[摘要] 恶性细胞的表型是否可能逆转? 长期以来, 科学家们一直在研究一种肿瘤治疗的新途径, 即通过启动恶性细胞的成熟和程序化死亡达到分化治疗。急性早幼粒细胞白血病(APL) 是应用分化诱导剂——全反式维甲酸(ATRA)治疗成功的第一个人类肿瘤。该病的另一特点是有特异染色体易位 $t(15;17)$ 。在研究 APL 细胞对 ATRA 的应答机理中, 我们和其他作者阐明了 $t(15;17)$ 的分子生物学, 发现它使维甲酸受体 α 基因(RARA)与 15 号染色体上的一个位点 PML 发生融合。功能研究显示 PML-RARA 的行为不同于野生型 RARA。这一白血病标志的直接临床应用是发展了一种针对 PML-RARA 融合转录本的逆转录酶/PCR 分析。最近, 我们又发现了一种新的变异型易位 $t(11;17)$, 该易位使 RARA 与 11q23 上一个被称之为早幼粒白血病锌指蛋白(PLZF)的基因发生融合。PLZF 编码一个含有 9 个锌指的蛋白, 可能是一个转录因子。在 $t(15;17)$ 和 $t(11;17)$ 两种易位中, RARA 是共同靶子的事实提示 RARA 在 APL 发病原理中起着重要作用, 应用转染试验, 我们显示 PLZF-RARA 和 PML-RARA 一样, 对野生型 RARA 具有“显性负”作用。近来在白种人 APL 中发现了具有 $t(11;17)$ 的病例。虽然伴 $t(15;17)$ 的 APL 患者对 ATRA 均有良好疗效, 伴 $t(11;17)$ 的患者则反应不佳, 提示可能是 APL 中的一种新的临床综合征。对 PML-RARA 和 PLZF-RARA 的比较研究必将有助于理解 ATRA 诱导 APL 细胞分化的机理。

白血病和癌肿细胞的诱导分化既是一个细胞生物学和分子生物学研究的理论问题, 又是一个关系到未来癌肿治疗的实际问题。用分化诱导剂使恶性细胞发生逆转, “改邪归正”, 是癌肿工作者多年来梦寐以求的目标。这种疗法有别于经典的杀伤疗法(化疗、放疗和其他细胞毒疗法), 而是企图从根本上扭转肿瘤细胞的特征。

众所周知, 肿瘤细胞具有两个最基本的特征: 一是细胞分化受阻, 二是细胞增殖失控, 也就是说细胞的增殖开关始终是拨向增殖。近年来发现, 细胞内存在着一种生理性死亡的调节机制, 称为程序化死亡或凋亡。某些肿瘤就是由于凋亡发生紊乱而引起的。有没有可能改变开关方向, 使恶性细胞重新恢复分化的能力, 从而达到治疗癌肿的目的呢? 回答是肯定的。用分化诱导剂维甲酸治疗急性早幼粒细胞性白血病, 就为此种全新的疗法提供了一个极有意义的模式。

让我们回顾一下历史。60 年代, 以色列学者 Leo Sachs 在小鼠的实验证明, 白血病细胞在一定的条件下能够发生“逆转”, 分化成熟为表型类似正常的细胞。70 年代以来, 国外投入大量人力、物力筛选可能的恶性细胞分化诱导剂, 发现了若干有希望的分子。1980 年, 美国的 Breit-

本文工作得到国家自然科学基金资助。

本文于 1993 年 12 月 24 日收到。

man 等学者在一株人的早幼粒细胞株 HL-60 进行了体外研究,证实维生素 A 的衍生物——维生素 A 酸(以下简称维甲酸)能诱导早幼粒白血病细胞分化成熟,这是一个重要的开端。1983—1984 年间,国外学者曾尝试用维甲酸治疗早幼粒白血病,但当时使用的是在化学上被称为 13 顺式的维甲酸,此种维甲酸在体内的疗效不尽理想,影响了临床治疗的进展。

1986 年,上海第二医科大学附属瑞金医院和上海血液学研究所王振义教授指导下,在国际上首次使用全反式维甲酸(是 13 顺式维甲酸的同分异构体)治疗急性早幼粒细胞白血病获得了极大成功。在上海地区迄今累积的 120 例患者中,单用全反式维甲酸的完全缓解率达到 85%,首例治疗的患者目前已健康存活 7 年以上。这一成果迅速在国内得到推广,据 1991 年全国维甲酸治疗白血病协作组会议资料,当时全国接受维甲酸治疗的早幼粒白血病患者已达 500 余例。

我国学者的这一成就,一开始并不为国际科学界所承认。王振义教授等于 1987 年寄往国际血液学权威性刊物《Blood》的论文,几经周折,最后终于在 1988 年 8 月才得到发表。以后,这篇论文成为该领域经典之作,被《自然》、《科学》、《细胞》、《欧洲分子生物学杂志》、《美国科学院学报》等最前沿杂志所发表的大量论文所引证,在国际上引起了巨大反响和广泛兴趣。法国巴黎圣·路易医院血液病研究所的 Degos 教授从 1988 年开始使用中国学者提供的全反式维甲酸治疗早幼粒细胞白血病,结果与中国学者报道完全相同。美国纽约 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心的 Warrell 等,也从 1989 年起开展了类似的研究。

维甲酸治疗早幼粒白血病获得成功,使癌肿细胞逆转的设想从理论走向实践,被国外学者称为是一次革命性的突破,开辟了肿瘤治疗的全新途径,这可以称为维甲酸诱导早幼粒细胞分化研究第二阶段的里程碑。

现在,第三阶段的竞争已经拉开了序幕,其主要内容是弄清维甲酸诱导早幼粒白血病分化的分子机制。因为只有说清道理,才能使人信服,并使分化诱导疗法扩展到其他类型的白血病和实体瘤的治疗。

我们知道,维甲酸在进入细胞后,首先要与胞浆的维甲酸结合蛋白结合,然后进入细胞核,通过其核内受体而发挥生理、药理作用。1987 年以来,法国的 Chambon 实验室和美国的 Evans 实验室相继发现了三种不同的维甲酸受体,称为 α 、 β 和 γ 受体。研究表明,在造血系统中,维甲酸受体 α (retinoic acid receptor α , 以下简称 RARA)基因有高度的表达,有趣的是, RARA 基因在人类染色体的定位是 17 号染色体长臂的 2 区 1 带(17q21)。

无独有偶,早在 70 年代细胞遗传学家就发现早幼粒白血病细胞中有一种特异的染色体异常,就是第 15 号和 17 号染色体之间的交互易位 t(15;17)。由于易位的结果,15 号和 17 号染色体的部分遗传物质发生了交换,这种易位存在于大多数早幼粒白血病患者,但是不存在于正常个体,也不存在于其他类型的白血病。

既然 RARA 基因定位于 17 号染色体 17q21,而该处恰好又是 t(15;17)的染色体断裂点,人们立即想到,会不会维甲酸受体 α 的基因由于染色体易位而发生改变? 如果有改变的话,是何种类型的改变? 是基因的表达异常还是结构的变化?

1990 年英国皇家癌症基金会的 Solomon 小组、意大利的 Pellici 小组、法国的巴士斯研究所的 de The 和 Dejean 小组、美国 MD Aderson 癌症中心的 Chang 小组,几乎与我们同时发现,急性早幼粒细胞白血病中 RARA 基因确实有异常,而且已经肯定这种异常的罪魁祸首就是染

染色体易位 t(15;17)。

科学家还不知道何种原因(物理、化学、生物因素?)造成 t(15;17),但其后果是由来自 15 号染色体的一个基因与来自 17 号染色体的 RARA 基因融合,形成融合基因。正常细胞内不存在这种融合基因。15 号染色体的这个基因,开始有人把它命名为 Myl-1(意指粒细胞性白血病基因-1),也有命名为 APL(指急性早幼粒细胞白血病基因),从 1991 年开始,国际上统一命名为 PML(Promyelocytic Leukemia 的缩写)基因。

为了研究 t(15;17)中 RARA 基因结构的异常,我们用分子克隆的方法得到了这个基因的全部顺序。这个基因有 8 个外显子(存在于成熟 mRNA 中的顺序)。在外显子 2、3 之间有一大个内含子(不存在于成熟 mRNA 中的顺序),长度为 1 万 7 千个碱基,或 17 个千碱基(17kb),我们自行研制了一系列的分子探针,能覆盖基因的全部区域,发现 25 例中国人早幼粒细胞白血病中的 23 例有基因重排,而且这种重排的位置几乎无例外地都在基因的内含子 2 中。

科学家们发现,维甲酸受体的结构类似于甾体类激素、甲状腺素和维生素 D₃ 受体。这些受体由于在结构上类似,被认为是由一个共同的祖先基因在进化过程中演变而来,目前被纳入“核受体超家族”的范畴。这些受体的基本结构有三部分,其羧基端含有与激素相结合的功能区域,处于羧基端和氨基端中间的部位含有能与 DNA 结合的被称为“锌指”(zinc finger)结构的功能区域,而其氨基端含有调节功能区域。与膜受体不同,细胞核受体在与激素结合后,不需要第二信使,就可直接作用于靶基因,使其表达增强或减弱。维甲酸受体靶基因上有被受体识别的元件,称为维甲酸反应元件(retinoic acid response element, RARE),而受体对靶基因表达的这种调节方式则被称为反式作用(trans-acting)。RARA 上的激素结合部位(羧基端)含有激素依赖的反式作用,而其氨基端的反式作用调节区是不依赖于激素的。

有趣的是,在急性早幼粒细胞白血病中的融合 RARA 基因,其与激素结合的功能段和与 DNA 结合的功能段保持完整,但氨基端不依赖激素的反式调节功能区域发生异常,一部分的顺序被 15 号染色体的 PML 基因顺序所取代,形成 PML-RARA 融合基因。在部分患者中,还存在着 RARA-PML 融合基因。对 PML 基因 DNA 顺序的分析表明,该基因编码的蛋白质,很可能是一个核内蛋白因子。最近 de The 小组等证实,PML 蛋白是核体(nuclear body)的结构蛋白之一。完全可以想象,反式作用调节区的结构变异将使得维甲酸受体与 RARE 的相互作用发生异常,改变受体的靶基因谱,从而打乱细胞活动的正常程序,使得分化增殖的开关拨向增殖,从而可能在急性早幼粒白血病的发病原理中发挥重要的作用。

经过艰苦的努力,依靠自己的力量,我们于 1992 年初完成了 PML 全基因的克隆。对一大组早幼粒白血病患者 PML 基因结构异常的研究,显示存在着分子的不均一性:约 2/3 患者 15 号染色体的断裂点位于该基因的外显子 3 以下区域,而约 1/3 患者 PML 基因结构改变处于外显子 6 的下游。这样,在不同的患者就形成 PML 基因 6 个外显子与 RARA 外显子 3 的融合(我们称之为长型融合基因)或 PML 基因 3 个外显子与 RARA 外显子 3 融合(短型融合基因)两种嵌合基因。接着,我们又将聚合酶链反应(PCR)这一技术应用到融合基因转录产物的检测,即以 mRNA 为模板,运用反转录酶合成 cDNA,然后再进行 PCR 体外扩增(简称 RT/PCR)。用此法证明 PML-RARA 融合基因确实能够转录成为长型或短型的 PML-RARA 融合转录本,从而编码两种不同的融合受体。那么,上述分子病理学的改变是否具有临床意义?最近我们对一组早幼粒白血病的临床和分子生物学研究提示,具短型融合基因的患者临床转归

差于长型,因为缓解率略低,而复发率较高。

PML-RARA 融合基因的发现,第一次为早幼粒白血病找到了一个特异的分子标记。有意义的是,凡是有这种融合基因者,用全反式维甲酸治疗均能取得良好疗效,而如没有此种融合基因,即使患者的细胞形态学类似于早幼粒细胞,对维甲酸还是没有反应。更为重要的是,上述 RT/PCR 法检测 PML-RARA 融合 mRNA,具有极高的灵敏度:将一个 PML-RARA 阳性细胞的 RNA 放入 10,000—100,000 个正常细胞的 RNA 中再进行检测,还能捕捉到白血病细胞的标志,因此,就可以用此种方法来指导患者在疾病临床缓解后的进一步治疗。最近我们对一大组早幼粒白血病缓解后的残余病变进行了检测,发现在用全反式维甲酸取得临床缓解后,80%患者的 RT/PCR 结果仍为阳性,如仍只用维甲酸维持治疗,疾病很易复发,而在用化疗巩固后,绝大多数患者的 RT/PCR 都可转阴,缓解期可明显延长。进而,我们又检测了一组处于较长期临床缓解(大于2年)的早幼粒白血病病例,发现少数患者的 PML-RARA 呈阳性结果,且其中大多数在1—6个月后又出现临床复发。因此,PML-RARA 的检测为预报疾病复发提供了灵敏的指标,具有重要的临床价值。

PML-RARA 融合基因的发现,也提出了一个重要的理论问题:融合基因可能拮抗野生型的 PML,也可能拮抗野生型的 RARA,其中哪一个可能更为重要?一个看来是偶然的机,使得我国学者在早幼粒白血病分子生物学研究中实现了一个新的突破。我们在1990年初,与上海铁路中心医院余怀勤教授合作,发现了一例全反式维甲酸疗效欠佳的少见早幼粒白血病患者,其白血病细胞形态具有典型的早幼粒白血病细胞特征,但没有 t(15;17),而存在着一种新的变异型易位 t(11;17)。分子生物学研究证明,该例中 RARA 基因发生了重排,而 PML 基因结构并无异常,提示前者很可能与来自于11号染色体的一个新基因发生了融合。通过与美国纽约西奈山医学中心内科肿瘤实验室 Waxman 教授和 Zelent 博士的合作,我们应用分子生物学中的一个新技术——挂靠 PCR,很快克隆到了一段新的 cDNA,其中 RARA 与一个 DNA 数据库中前所未有的顺序发生融合。应用这一段顺序作为探针与法国国立健康和医学研究院 301 单位 Berger 博士合作,进行了染色体原位杂交研究,发现这段顺序定位于11号染色体长臂2区3带(11q23),正好与我们最初报道的染色体断裂部位相一致。接着我们又克隆了该新基因的全部开放框架,其核酸顺序分析表明编码一个极其有意义的蛋白质,因为它含有9个“锌指”结构,很可能是一个调控基因转录表达的 DNA 结合蛋白。我们将该基因命名为 PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger, 早幼粒白血病锌指蛋白)基因。该基因与 RARA 融合的结果,是形成 PLZF-RARA 和 RARA-PLZF 两种融合基因。在我们最初的报道之后,国内外开始注意 t(11;17)。在不到一年的时间里,美、法科学家在白种人中发现了四例。有意义的是,具有 t(11;17)的早幼粒白血病患者,对于全反式维甲酸没有治疗反应,或反应很差,这些结果都证实了我们最初的报道,并揭示了这样一个事实,在经典的 t(15;17)易位与变异型的 t(11;17)之间,存在一个共同点,即 RARA 的受累。这说明 RARA 基因的异常对于早幼粒白血病的发病可能是一个决定性的因素。然而,这两种易位的患者,在临床上对全反式维甲酸却有着截然不同的治疗反应,提示融合基因的性质可能决定着细胞能否在维甲酸诱导下发生分化的能力。虽然这方面的研究还需要花费很大的气力,但我们已经拥用两个不同的模型,它们之间的比较研究,必将对最终阐明维甲酸的疗效作出贡献。

近年来,Chambon 和 Evans 实验室又相继发现,在细胞核内,RARA 是与另一种新发现的

维甲酸受体 RXR 以异二聚体的形式存在的。RARA-RXR 是受体的活性形式,因其能与 RARE 结合并兴奋靶基因。RXR 是一个家族,亦包括 α , β 和 γ 三个成员。问题在于, PML-RARA 和 PLZF-RARA 对于野生型的 RARA 和 RXR 功能有何影响? 最近我们与法国巴黎圣·路易医院血液病研究所的 Chomienne 博士等合作,将克隆的 PML-RARA 和 PLZF-RARA 与野生型 RARA 和 RXRA 一起转染进 COS 细胞或者人的造血细胞系,结果发现 PML-RARA 和 PLZF-RARA 均能拮抗 RAR-RXR 异二聚体的生物学活性。在我们的体系中,融合受体的作用对于野生型受体占据优势,但结果不是使受体功能增强,而是功能抑制,此种效应称为“显性负”(dominant negative)效应。已知维甲酸受体调节的途径在粒细胞的分化中具有极其重要的作用,故融合受体很可能是通过其“显性负”作用而阻断粒细胞分化,并诱发恶性增殖的。

全反式维甲酸诱导分化在细胞和分子生物学水平研究的进展,给临床研究以深刻的启示。一个饶有兴趣的问题是,融合基因的产物以及融合的维甲酸受体 α ,在白血病细胞对全反式维甲酸的特异反应中又扮演了何种角色? 它是只能起细胞分化成熟的拌脚石作用,还是在一定条件下可能转化为分化的触发因子? 这两者似乎是矛盾的,但也并非不可能,因为到目前为止,除了早幼粒细胞白血病,还没有证明其它类型的白血病细胞对维甲酸产生治疗反应,而恰恰是在早幼粒细胞白血病中,发现了上述的融合 RARA。一个大胆的假设是,融合受体在细胞分化增殖程序中占据了中心的位置,在没有与维甲酸结合之前的空载受体,使细胞分化增殖开关拨向增殖,而融合受体一旦与维甲酸,特别是全反式维甲酸结合形成复合物后,就使得细胞的分化增殖开关拨向分化,看来融合受体的研究可能是揭开维甲酸诱导早幼粒白血病细胞分化奥秘的一条重要线索。人们也在思索:为什么一部分早幼粒细胞白血病患者,在用维甲酸取得完全缓解又会复发,甚至在使用维甲酸时疾病复发,是不是在融合受体内发生了新的结构变异,改变了它的生物功能,抑或是发生了融合受体以外的机制,比如维甲酸代谢的变化、细胞中其它癌基因的活化或抗癌基因的失活,使得细胞逃脱了维甲酸的作用?

1993 年 10 月,在上海召开了“维甲类药物在恶性血液病中的应用”国际研讨会,来自中、法、美、以色列、日、瑞士等国家的专家对从中国开始的维甲酸和早幼粒白血病的研究给予了高度的评价。然而,对于早幼粒细胞白血病的发病机制以及维甲酸诱导早幼粒白血病细胞分化的作用原理,还有许多问题有待于回答。在各国科学家合作攻关的同时,竞争也日趋激烈,摆在我们面前的任务是很重的。分化诱导疗法治疗早幼粒白血病的研究还必须不断地深入,这不仅是为了保持我国在这一领域内的国际领先地位,更重要的是要寻找到完全缓解后的最佳治疗方案,如强化化疗和维甲酸交替给药,以及骨髓移植,从而尽可能地减少体内残存白血病细胞,提高患者的长期生存率;而对疾病复发机理的研究也将有助于制定相应的治疗对策。在基础研究方面,一些深层次的问题也在提出:例如,维甲酸在早幼粒细胞内是如何转运并与受体相结合的? 这就涉及到胞浆维甲酸结合蛋白及 RARA 蛋白的直接测定;维甲酸是如何影响早幼粒白血病细胞生物学行为的? 这就要在细胞周期动力学、多能和定向造血干细胞的增殖分化、细胞生长因子的合成和分泌等多个方面进行研究。人们还可进一步问:维甲酸与正常融合 RARA 结合后的信号传导是如何进行的? 受 RARA 调节的靶基因是什么? 既然这些基因很可能是分化-增殖的开关基因,有无可能绕过受体而直接调控其表达? 维甲酸诱导后的白血病细胞,其最后的转归又是如何? 是否在分化成熟后最终进入凋亡的过程? 细胞分化与凋亡这两个过程之

间是如何联系的?PML-RARA 与 PLZF-RARA 是否具有直接诱导白血病的能力?相信随着研究的进展,我们对分化诱导机理的认识也会不断深入,而对维甲酸诱导早幼粒白血病分化模式的理解,必将对分化疗法推广至其它白血病乃至整个肿瘤,产生不可估量的影响。我们的结论是:肿瘤细胞是可以逆转的,应用分化疗法治疗肿瘤造福于人类的前景是光明的。

**STUDY ON THE MOLECULAR MECHANISM OF
THE DIFFERENTIATION OF ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA
CELLS INDUCED WITH RETINOIC ACID**

Chen Zhu

Chen Saijuan

(Shanghai Institute of Hematology, Rui-Jin Hospital, Shanghai Second Medical University)

Abstract

Is the phenotype of malignant cells reversible? For a long time, scientists have been working on a new approach of cancer treatment, the differentiation therapy, by triggering malignant cells' maturation and programmed cell death. Acute promyelocytic leukemia (APL) has been the first example of human cancer which can be effectively treated with a differentiation inducer—all-trans retinoic acid (ATRA). APL is also characterized by the specific chromosomal translocation t(15;17). In studying the mechanisms responsible for the response of APL cells to ATRA, we and others have been able to characterize the molecular biology of t(15;17) which fuses the retinoic acid receptor α (RARA) gene with a chromosome 15q locus, PML. Functional studies demonstrate that PML-RARA behaves differently from the wild-type RARA. A direct clinical application of this leukemia marker has been the development of the retrotranscriptase/PCR analysis of PML-RARA fusion transcripts which allows the rapid diagnosis of APL. Recently, we have identified a new, variant translocation t(11;17) and showed that RARA is fused with a new gene on chromosome 11q23. This gene named PLZF for promyelocytic leukemia zinc finger encodes a protein containing 9 zinc-finger motifs and is probably a transcription factor. The fact that RARA is the common target in both t(15;17) and t(11;17) suggests its crucial role in the pathogenesis of APL. Using transient transfection systems in COS cells as well as in human myeloid cell lines, we show that the PLZF-RARA, like PML-RARA, has a "dominant negative" effect on the wild-type RARA. Recently, similar cases have also been found in Caucasian APL. It has been shown that although APL patients with t(15;17) have good response to ATRA, those cases bearing t(11;17) respond poorly and could represent a special clinical syndrome within APL. A comparative study on PML-RARA and PLZF-RARA will certainly give new insight for understanding the mechanism underlying the ATRA-induced cell differentiation.