

IDH1/2 突变诱导脑胶质瘤基因组高甲基化及肿瘤细胞分化阻滞

唐军海,徐庆福,朱潇鹏 综述 吕胜青* 审校

第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037

摘要:目前异柠檬酸脱氢酶 1/2 (isocitrate dehydrogenase 1/2, IDH1/2) 基因突变在脑胶质瘤的致瘤机制还未彻底阐明,但一系列研究提示突变 IDH1/2 能诱导脑胶质瘤基因组和组蛋白高甲基化,这些表观遗传改变会影响分化相关基因的表达,导致肿瘤细胞分化程度降低,出现恶性表型。同时以突变 IDH1/2 为抑制靶点的小分子药物能促进肿瘤细胞分化,表现出一定的治疗作用。本文对该方向上的研究进展作一系统综述,期望能为脑胶质瘤的治疗提供一条新思路。

关键词:IDH1/2 突变;脑胶质瘤;甲基化;细胞分化

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性肿瘤, IDH1/2 基因点突变在 WHO II 和 III 级胶质瘤,继发性多形性胶质母细胞瘤 (secondary glioblastoma multiforme, sGBM), 原发性多形性胶质母细胞瘤 (pGBM)^[1-3] 以及急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML)^[4] 等肿瘤中均有不同频率的发生。

1 IDH 突变与脑胶质瘤基因组高甲基化

1.1 IDH 突变与脑胶质瘤细胞 DNA 甲基化紧密联系

现在普遍认为 IDH 突变是胶质瘤发生发展过程中的早期分子事件, IDH 突变的有无提示着不同的肿瘤发生机制^[5], IDH 突变的肿瘤往往具有更好的预后,因此 IDH 突变可作为一个有用的指标对胶质瘤进行分类和预后判断^[6-7]。同时, DNA 甲基化的改变在胶质瘤中得到广泛研究,发现基因启动子相关 CpG 岛的高度甲基化在某些亚型中普遍存在,部分研究说明特殊 DNA 甲基化特征对肿瘤的分类和预后判断具有一定的生物指标作用^[8]。

CpG 岛甲基化表型 (CpG Island Methylator phenotype, CIMP) 最早在人类结直肠癌中提出,指一部分肿瘤的某些特定基因的 CpG 岛出现高度甲基化^[9]。通过对来源于 TCGA (The Cancer Genome Atlas) 的 272 份 GBM 样本的甲基化特征进行分析, Nounshmehr 等^[10]将这些 GBM 的甲基化状况分成三类,其中第一类的特征与结直肠癌的 CIMP 极为相似,因此具有第一类甲基化特征的 GBM 被视为表现出“胶质瘤特有的 CpG 岛甲基化表型” (Glioma-

CpG Island Methylator Phenotype, G-CIMP)。这类 G-CIMP 阳性的 GBM (G-CIMP + GBM) 共有 24 例,占全部标本的 8.8%。进一步对 IDH1 突变与 G-CIMP 之间相关性进行分析发现,检测到的 18 例 IDH1 突变全部来源于 G-CIMP + GBM (18/23), 184 例无 G-CIMP 的 GBM 中则没有出现一例 IDH1 突变。在另外一组 100 例胶质瘤 (WHO II, III, IV) 的独立实验中, 48 例 IDH1 突变胶质瘤有 35 例为 G-CIMP 阳性,而在 52 例没有 IDH1 突变的胶质瘤中,仅有 3 例为 G-CIMP 阳性。具有 G-CIMP 的胶质瘤其最初诊断时的平均年龄更小,患者平均生存时间则更长。这点与 IDH1 突变胶质瘤十分相似^[2,11]。Turcan 等^[12]发现在低级别 (WHO I 和 II 级) 胶质瘤 (Low Grade Gliomas, LGGs) 中, IDH 突变和 G-CIMP 之间的相关性更加明显。

在整个胶质瘤群体里, G-CIMP 与 IDH 突变在不同级别和亚型间的分布特征高度相似。Nounshmehr^[10]对 60 例 WHO II 级和 92 例 WHO III 级胶质瘤的 G-CIMP 发生情况进行了分析,发现在 WHO II 级胶质瘤中 G-CIMP 发生率是 GBM 的十几倍, WHO III 级胶质瘤中 G-CIMP 发生率则稍低于 WHO II 级胶质瘤。IDH 突变在 WHO II 和 III 级胶质瘤和继发性胶质母细胞瘤中突变率远远高于在原发性多形性胶质母细胞瘤 (pGBM) 中的发生频率^[13],这与 G-CIMP 的分布特征具有很高的一致性。Lafaire^[14]等对包括 33 例低级别胶质瘤、36 例 GBMs 在内的一系列胶质瘤样本的 807 个基因

基金项目:国家自然科学基金面上项目: IDH1 基因突变与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活在脑胶质瘤肿瘤发生中的作用机理研究, 编号 (81272783)

收稿日期: 2014-04-08; 修回日期: 2014-06-22

作者简介: 唐军海 (1990-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事脑胶质瘤的相关研究。

通讯作者: 吕胜青 (1971-), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 医学博士, 主要从事神经系统肿瘤的基础与临床研究。E-mail: lvsg0518@gmail.com

(1536 CpGs) 的甲基化特征进行了分析, 他们的结果提示分别按 IDH 突变和基因甲基化状态 (G-CIMP) 对胶质瘤进行分类, 得到的结果具有高度一致性。

1.2 突变 IDH 的表达直接引起脑胶质瘤 DNA 甲基化改变

通过对胶质瘤 DNA 甲基化和 IDH 突变进行全基因组的检测, 可观察到两者之间存在统计学上的高度相关性。不仅如此, 近年来的许多研究表明在细胞和动物模型中表达外源突变 IDH 可引起同样的 DNA 甲基化改变, 获得胶质瘤特有的 CpG 岛甲基化表型 (G-CIMP)。Turcan 等^[12] 通过实验找到了 IDH1/2 基因突变导致 G-CIMP 的直接证据。他们将野生型 IDH1 基因和突变 IDH1 基因分别转入人类永生星形胶质细胞之中, 考虑到出现明显的甲基化改变需要一定时间的积累, 所以处理后的星形胶质细胞经过超过 50 代的培养, 实验结果显示只有转入了突变 IDH1 基因的永生星形胶质细胞形成了 G-CIMP, 并且与具有内源 IDH1 突变的低级别胶质瘤细胞相比, 它们的基因组甲基化特征极为相似。这说明单纯的 IDH1/2 基因突变就能引起这种高甲基化的表现。

1.3 IDH 突变与脑胶质瘤组蛋白甲基化改变

IDH 突变不仅能导致肿瘤 DNA 甲基化的改变, 它对肿瘤组蛋白的甲基化修饰同样有着重要影响^[15]。在人类永生星形胶质细胞中转入突变 IDH1 后, Turcan 等^[12] 观察到细胞组蛋白上 H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 的水平显著升高, 提示突变 IDH1 能使组蛋白转录后修饰发生改变, 这种改变主要发生在某些组蛋白的几个特殊氨基酸位点上, 且在特定位点上的具有一定的修饰形式 (如单、双或三甲基化)。Lu 等^[15] 报导在一组少突胶质瘤样本中, 相对于表达野生型 IDH1 的胶质瘤细胞, IDH1 基因突变的胶质瘤细胞具有更高的组蛋白甲基化程度, H3K27me3 和 H3K9 的双或三甲基化水平明显高于对照组, 而 H3K4me3 的水平没有明显改变, 这提示 IDH 突变更倾向于提高组蛋白的抑制性甲基化修饰。另外在 293T 细胞中异位表达突变 IDH1 使组蛋白甲基化程度明显提高, 且这种改变与胞内 2-HG 的水平密切相关。

1.4 IDH 突变与急性髓性白血病基因组甲基化改变

同样在 AML 中, Figueroa 等^[15-17] 的实验证实基

因组的高甲基化与 IDH1/2 基因突变密切相关。为了证实 IDH1/2 突变与髓系白血病细胞基因组甲基化之间的关系, Sasaki 等^[17] 使用 lox-stop-lox (LSL) 系统将 IDH1 (R132H) 引入到小鼠 IDH 基因位点, 建立突变 IDH1 基因敲入小鼠 (Idh1 LSL/WT)。再通过与 LysMCre 小鼠交配繁殖, 得到了生长发育良好, 具有正常的生命周期和繁殖能力的 LysM-KI 小鼠, 这也是第一个 IDH1 (R132H) 基因敲入小鼠模型。在 LysM-KI 小鼠中发现突变 IDH 的表达引起早期造血细胞的数量升高, 髓系血细胞的组蛋白明显高甲基化, DNA 甲基化状态与含突变 IDH1/2 的 AML 细胞基因甲基化状态极为相似。该动物模型实验说明 IDH 突变与基因组高度甲基化有直接的关系, 而这种表观遗传学改变对造血细胞的分化产生了影响。

1.5 IDH 突变致肿瘤基因组高甲基化的机制

突变 IDH 催化合成 2-羟基戊二酸 (2-hydroxyglutarate, 2-HG)^[18], 2-HG 能作为 α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG) 的拮抗剂, 竞争性抑制 α -KG 依赖的双加氧酶类^[19]。因此在 IDH1/2 突变的肿瘤细胞中, DNA 和组蛋白的高甲基化很可能是因为大量积聚的 2-HG 抑制了 TET (ten-eleven translocation) 家族的 DNA 甲基双加氧酶 TET2 和组蛋白脱甲基酶 JHDMs (Jumonji-C domain histone demethylases) 家族等的酶活性^[12,15]。而 2-HG 也正是通过抑制体内多个重要双加氧酶的活性来改变细胞的增殖和生长方式, 进而诱发肿瘤。

2 IDH 突变导致细胞分化阻滞

近年来的大量研究结果提示 IDH 突变抑制了肿瘤细胞的分化功能, 使肿瘤细胞保持在低分化状态, 干性特征增强^[12,15-16]。IDH 突变胶质瘤细胞与突变阴性肿瘤细胞或正常组织相比, 其基因的差异性表达主要体现在分化相关基因上, 如 GATA1 和 GATA2 及它们的直接靶基因^[10,16]。

Lu 等^[15] 利用逆转录病毒转染技术使来源于 p16/p19-/- 小鼠脑组织的神经细胞球表达突变 IDH, 在促使细胞向星型胶质细胞分化的培养条件下, IDH 突变的神经干细胞未表达星型胶质细胞标志蛋白 GFAP, 而是持续表达神经干细胞标志物 B3-tubulin。Sasaki 等^[17] 在其建立的 LysM-KI 小鼠模型中, 观察到突变 IDH 的表达阻滞了造血细胞的正常分化。Losman 等^[20] 报导在红细胞白血病肿瘤细胞系 TF-1 的培养中加入 R-2-HG 或在基因组

外表达突变 IDH, 可以使肿瘤细胞的表现遗传特征发生改变, 细胞的分化能力降低, 总体上恶性特征增强。另外他们还进一步验证了在肿瘤治疗中以突变 IDH 为抑制靶点的可行性。

关于突变 IDH 影响细胞分化的具体分子机制目前还不是很清楚, 但可以肯定的是, 基因组甲基化的改变是其中十分重要的途径之一。值得注意的是, 突变 IDH 引起 DNA 的 CIMP 和组蛋白的抑制性甲基化标记水平升高, 这两种表现遗传学的改变均能使大量基因的表达异常, 包括一系列分化调节基因。例如 Lu 等^[21]进一步对 IDH1/2 突变软骨肉瘤标本中的启动子表现高度甲基化的基因进行 DAVID 分析发现, 甲基化最显著的基因包括 RARA, PDGFRA, BCOR 等分化相关的重要调节基因, 说明 IDH1/2 突变在软骨肉瘤中可能通过改变基因的表现遗传特征, 对肿瘤细胞的干性维持有着重要作用。因此可以推测 IDH 突变导致的直接病理结局是: 阻滞细胞的分化功能, 促使细胞转化和肿瘤发生。另外需要指出的是, IDH 突变的存在提示更好的预后, 这种临床现象是 IDH 突变后对脑胶质瘤细胞各种作用的综合体现, 而阻滞分化的效果只是其多种作用的一个方面, 因此这两种现象并不矛盾。

3 靶向抑制突变 IDH 可促进肿瘤细胞分化

AGI-5198 是经筛选得到的一种 IDH1 R132H 突变型的小分子抑制剂, Rohle 等人^[22]以一个含有内源性 IDH1 R132H 突变的少突胶质细胞瘤细胞系为实验对象探索 AGI-5198 的作用。他们发现在体外培养条件下, 加入 AGI-5198 能使培养的少突胶质细胞瘤细胞减少 40% ~ 60%。在该肿瘤细胞系的异位移植小鼠模型上, AGI-5198 同样能表现出对植入肿瘤的生长抑制作用。对模型中经过 AGI-5198 治疗的胶质瘤细胞进行分析发现细胞中增殖标志物的表达水平明显降低, 而凋亡特征没有改变, 这提示 AGI-5198 抑制 IDH1 (R132H) 后的作用主要是抑制了肿瘤细胞的生长而非诱导其凋亡。进一步对基因组分析发现, 几个参与细胞分化的基因表达上调, 这些基因启动子区域组蛋白上 H3K9me3 和 H3K27me3 等抑制性标记明显减少, 说明 AGI-5198 能引起肿瘤细胞组蛋白修饰的改变, 从而改变基因表达。Rohle 的实验表明针对突变 IDH 1 的靶向抑制在体内和体外都能阻碍胶质瘤细胞的生长, 并且这种增殖抑制作用很可能是通

过促进肿瘤细胞分化来实现的^[22]。另外在该实验中有一个现象值得注意, 那就是使用低剂量抑制剂处理肿瘤时细胞的生长被抑制, 但其 DNA 的甲基化状态并未改变。这提示肿瘤的生长抑制可能不是来源于有关基因的重新去甲基化, 或者基因去甲基化只是诱导生长抑制的因素之一, 从而针对突变 IDH 的抑制和特异针对甲基化调节酶的抑制, 其结果可能会有所不同。

另一个实验组 Wang 等人^[23]用特异性 IDH2 (R140Q) 抑制剂 AGI-6780 处理造血系统肿瘤细胞。Wang 得到了与 Dan Rohle 相似的结果, AGI-6780 能促进 AML 细胞的分化, 分化相关基因的表达同样有明显改变。不管是在红细胞白血病细胞系还是在 AML 细胞, AGI-6780 均能大量减少 2 HG 的含量, 甚至可降至正常生理水平。这与之前提示 IDH 突变合成 2 HG 致细胞分化有关基因表达抑制的研究相符, 说明 IDH 的突变导致了肿瘤细胞分化障碍, 而突变蛋白质的靶向抑制剂可解除阻滞促进分化, 降低肿瘤恶性并抑制生长。

含有 IDH1 基因突变的胶质瘤细胞的动物实验现在只限于异位肿瘤移植小鼠模型, 而原位肿瘤移植模型甚至含有内源性 IDH 1 基因突变且能在大脑形成肿瘤的基因工程小鼠模型会大大帮助我们了解 IDH 1 突变体抑制剂在肿瘤患者的疗效, 因为血脑屏障的存在很可能明显降抑制物的治疗效果。通过 AGI-6780 的 IDH2 (R140Q) 的靶向抑制可以明确地诱导 AML 细胞 (来自具有 IDH 2 (R140Q) 突变的患者) 的分化, 但其他包含 IDH 1/2 基因突变的肿瘤细胞是否会对特异抑制性小分子有同样令人乐观的反应还急需实验来验证。但总的说来, Rohle 和 Wang 等人^[22,23]的实验揭示了用小分子物质靶向抑制 IDH 突变体来控制肿瘤的可能性。特别是突变 IDH 1/2 只存在于肿瘤细胞, 因此正常组织细胞对抑制性药物具有很好的耐受性。

4 小结

IDH 基因的突变能引起细胞代谢、表现遗传和分化特征的改变, 对于突变 IDH1/2 的致瘤机制存在多种理论^[24-25]。本文系统综述了肿瘤表现遗传学改变引起分化阻滞的作用及其相关机制, 为寻找新的治疗靶点提供了新思路。随着进一步在动物模型上完善在体实验及具有更好特异性和效果的药物分子的开发, 选择性抑制突变 IDH1/2 的治疗方法很有希望在不远的将来使大

量肿瘤患者受益。

参 考 文 献

- [1] Parsons D W, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008, 321(5897): 1807-1812.
- [2] Yan H, Parsons D W, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 765-773.
- [3] Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(4): 469-474.
- [4] Green A and Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 369-370.
- [5] Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, et al. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1149-1153.
- [6] Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(25): 4150-4154.
- [7] Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, et al. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(19): 6002-6007.
- [8] Abe M, Ohira M, Kaneda A, et al. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 828-834.
- [9] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(15): 8681-8686.
- [10] Nouchmeh H, Weisenberger DJ, K D, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*, 2010, 17(5): 510-522.
- [11] Houillier C, Wang X, Kaloshi G, et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology*, 2010, 75(17): 1560-1566.
- [12] Turcan S, Daniel Rohle, Anuj Goenka, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 2012, 483(479): 479-485.
- [13] Ichimura K, Pearson D M, Kocialkowski S, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*, 2009, 11(4): 341-347.
- [14] Laffaire J, Everhard S, Idhah A, et al. Methylation profiling identifies 2 groups of gliomas according to their tumorigenesis. *Neuro Oncol*, 2011, 13(1): 84-98.
- [15] Lu C, Ward P S, Kapoor G S, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 2012, 483(7390): 474-478.
- [16] Figueroa M E, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 2010, 18(6): 553-567.
- [17] Sasaki M, Knobbe C B, Munger J C, et al. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*, 2012, 488(7413): 656-659.
- [18] Dang L, White D W, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 2010, 465(7300): 966.
- [19] Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*, 2011, 19(1): 17-30.
- [20] Losman J A, Looper R E, Koivunen P, et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science*, 2013, 339(6127): 1621-1625.
- [21] Lu C, Venneti S, Akalin A, et al. Induction of sarcomas by mutant IDH2. *Genes Dev*, 2013, 27(18): 1986-1998.
- [22] Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, et al. An Inhibitor of Mutant IDH1 Delays Growth and Promotes Differentiation of Glioma Cells. *Science*, 2013, 340(6132): 626-630.
- [23] Wang F, Travins J, DeLaBarre B, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*, 2013, 340(6132): 622-626.
- [24] Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science*, 2009, 324(5924): 261-265.
- [25] Sasaki M, Knobbe C B, Itsumi M, et al. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes & Development*, 2012, 26(18): 2038-2049.