

胰腺神经内分泌瘤基因组学和表观遗传学的研究进展

韩序 楼文晖

【摘要】 目前大量研究发现对染色质结构起调控作用的 ATRX-DAXX 和多发性内分泌肿瘤 1 型 (MEN-1) 基因, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路相关基因的突变共同参与了胰腺神经内分泌肿瘤 (pNETs) 的发生和发展。这些突变基因主要通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体重塑和替代性端粒延长机制激活等表观遗传学的异常改变使染色质变异以及 pNETs 相关信号通路的异常激活协同引起 pNETs 肿瘤形成和侵袭。这些证据表明基因组学和表观遗传学的异常改变共同激活了 pNETs 的肿瘤生物学行为。这些发现对胰腺神经内分泌肿瘤的临床诊治及预后判断有重要的现实意义, 并可据此研究出特异性靶向治疗的新策略。分子靶向药物与根治性手术治疗联合应用将是未来针对 pNETs 主要的治疗手段。

【关键词】 胰腺; 神经内分泌肿瘤; 基因突变; 表观遗传学

Updates on the research of genetics and epigenetics of pancreatic neuroendocrine tumors Han Xu, Lou Wenhui. Department of General Surgery, Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China
Corresponding author: Lou Wenhui, Email: lou.wenhui@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Mounting evidences suggest that the ATRX (α -thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked) and DAXX (death-domain associated protein) which encode 2 subunits of a chromatin remodelling complex required for H3.3 incorporation at pericentric heterochromatin and telomeres, and multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1) genes are significantly mutated in most patients with pancreatic neuroendocrine tumors (pNETs), as are genes encoding key molecules of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. These mutated genes promote deregulation of epigenetic processes such as chromatin remodeling, histone modification and activation of alternative lengthening of telomeres, and thus combined alteration of these genes may contribute to drive tumorigenesis and metastasis of pNETs which are characterized by complex

patterns of phenotypes. These findings may have great significance in the diagnosis and treatment of pNETs and predicting the prognosis, as well as providing clinical implications for targeted cancer therapy.

【Key words】 Pancreas; Neuroendocrine neoplasms; Genetic mutation; Epigenetics

胰腺神经内分泌瘤 (pancreatic neuroendocrine tumors, pNETs) 源于胰腺多能神经内分泌干细胞, 占胃肠胰神经内分泌瘤 (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, GEP-NETs) 的 38%^[1-2]。近 10 年来, pNETs 的临床与基础相关研究逐渐成为热点。目前对 pNETs 的发病机制尚不明确。部分新发现的与 pNETs 相关的基因突变, DNA 甲基化、组蛋白修饰和染色体重塑等表观遗传学改变及相关信号通路的异常激活具有重要价值。这些证据均表明基因组学和表观遗传学的异常改变共同参与了 pNETs 的发生, 对 pNETs 的临床诊断与治疗及预后判断有重要的现实意义。笔者对最新的研究进展进行如下阐述。

1 ATRX-DAXX 基因

全外显子测序 (针对人基因组所有蛋白编码序列) 在全面检测散发性、遗传学发病原因不明肿瘤具有明显优势。Jiao 等^[3]的一项大规模全外显子组测序研究证实 60% 以上 pNETs 患者存在 1~3 个参与染色质修饰的基因序列的体细胞突变, 其中包含 ATRX 死亡结构域相关蛋白 (death domain-associated protein, DAXX) 和多发性内分泌肿瘤 1 型 (multiple endocrine neoplasia 1, MEN-1) 基因。该研究中没有发现在同一患者同时发生 ATRX 和 DAXX 基因突变, 而发现 ATRX 或 DAXX 可以同时与 MEN-1 发生基因突变; 与编码传统意义上的肿瘤抑制因子的基因比较, ATRX、DAXX 和 MEN-1 这 3 个基因突变与患者生存时间延长存在明显相关性。

哺乳动物组蛋白 H3.3 是组蛋白 H3 家族的一

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2014.10.019

基金项目: 卫生公益性行业科研专项 (201202007); 国家自然科学基金 (81071740); Novartis China GEP/NET Registry (CSMS955 ACN11)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学附属中山医院普通外科

通信作者: 楼文晖, Email: lou.wenhui@zs-hospital.sh.cn

员,是经典 H3.1 的变异体。它们在果蝇、人类和植物中都高度保守,主要通过一些分子伴侣如 ATRX、DAXX、HIRA 和 DEK 等作用,从而代替 H3.1 与转录活化的染色质结合,在生殖细胞的发育、表观遗传记忆和染色质重塑等方面发挥重要的作用^[4]。Liu 等^[5]的研究结果证实:DAXX 为特异性组蛋白伴侣,可引导 H3.3 沉积在臂间和端粒异染色质上;ATRX 是 SWI2/SNF2 家族中染色质重塑三磷酸腺苷酶,现阶段有超过 100 种不同 ATRX-DAXX 突变被发现可影响编码蛋白,但依然保持部分活性^[6]。相反,Jiao 等^[3]发现大部分 pNETs 中的移码突变和无义突变均可导致 ATRX 和 DAXX 蛋白的完全缺失;并在基因组绘图的基础上发现了一些与端粒替代延长相关的基因。这些基因 DNA 的染色体末端的端粒结构与其他一些活性基因附件富含鸟嘌呤的重复序列,结合后将进一步抑制基因表达^[7]。ATRX 和 DAXX 复合体有可能通过不依赖复制的方式组建含有 H3.3 的核小体,这些有缺陷的核小体可能导致 DNA 损伤以及基因组不稳定性增加;同时在染色体末端的端粒处,需要 ATRX-DAXX 复合体抑制缺陷 DNA 的修复。ATRX 基因突变形成的复合体不能抑制缺陷 DNA 的修复,这样会造成端粒融合的发生。ATRX 基因突变导致染色体有丝分裂过程中染色质中板集合、染色质凝聚和着丝粒功能异常,都有可能导致染色体变异引起 pNETs 形成。

一项 149 例临床大样本研究通过免疫组织化学和端粒荧光原位杂交检测 ATRX 基因的研究结果证实:ATRX-DAXX 的表达缺失和替代性端粒延长机制的激活与 pNETs 患者复发转移和生存时间缩短有关,并和临床病理学特征有相关性^[8]。该项研究结果提示:ATRX 和 DAXX 的基因突变与患者生存时间和无复发生存时间缩短存在明显相关性,这与 Jiao 等^[3]的研究结果相矛盾。这样的结果也许与文献^[3]患者样本量偏少有关。这些研究结果均显示 pNETs 患者存在端粒替代延长的特征性标记和端粒 DNA 的大量积聚,进一步验证了表观遗传学调控因子 ATRX-DAXX 的重要性^[3,8]。上海交通大学附属瑞金医院进行了一项对 42 例散发 pNETs 患者进行 MEN-1 基因和 ATRX-DAXX、MEN-1 基因全部外显子直接测序的研究。但是,结果提示中国人群中 ATRX-DAXX 和 MEN-1 基因突变频率低于国外报道,ATRX-DAXX 和 MEN-1 基因突变组患者手术年龄低于无突变组,两组患者生存时间比较,差异无统

计学意义^[9]。笔者认为:造成国内外结果差异的可能原因是样本的选择偏倚,因为上海交通大学附属瑞金医院内分泌科样本绝大部分的胰岛素瘤是功能性 pNETs,通常为 G1 级,这类患者较国外着重研究的非功能性 pNETs 患者的临床生物学行为和预后更好。

2 MEN-1 基因

MEN-1 基因定位于染色体 11q13,其在进化过程中高度保守。MEN-1 基因突变是家族遗传型的多发性内分泌腺瘤病 1 型和部分散发型 pNETs 的关键致病因素之一。MEN-1 为常染色体显性遗传的肿瘤综合征,具有外显率高和临床表现多样化的特点,一级亲属中至少 1 人患有 1 个上述肿瘤就可诊断为 MEN-1 家系。Jiao 等^[3]的研究结果表明:43% 的 pNETs 患者存在该基因的突变。MEN-1 基因突变导致的编码蛋白 menin 表达或核转位异常将引起一系列信号通路紊乱,进而引起内分泌系统疾病如 MEN-1 和 (或) pNETs。将 MEN-1 基因敲除的小鼠模型会自发形成 pNETs^[10]。menin 在细胞核中与混合谱系淋巴瘤基因 (mixed lineage leukemia, MLL) 等大量关键转录因子相互作用,直接参与组蛋白甲基化修饰和染色质结构等表观遗传调控过程,对靶基因转录和细胞表型的维持起关键的调控作用。MLL 作为染色质结合蛋白,通过自身的结构域募集酵母交换型转换/蔗糖不发酵复合物 (Yeast mating-type switching/sucrose non-fermenting, SWI/SNF) 复合物,改变核小体的结构,维持染色质的开放构象,有助于基因转录。肿瘤染色体易位产生的 MLL 融合蛋白丢失了重要的结构域,导致它募集 SWI/SNF 复合物的能力丧失,从而使 MLL 作为基因表达调控蛋白的功能受到破坏^[11]。

在 MEN-1 伴发的 pNETs 中,menin 可能通过编码 cyclin B2 启动区的组蛋白修饰,降低组蛋白 H3 乙酰化及 H3K4me3 的甲基化水平来起调控作用^[12]。menin 也可招募精氨酸甲基转移酶至 Hedgehog 信号通路关键因子 Gas1 基因的启动子,强化对组蛋白精氨酸甲基化的抑制作用,从而达到抑制 Hedgehog 信号通路来负性调节基因转录抑制肿瘤形成^[13]。

表观遗传学调控因子 ATRX-DAXX 和 MEN-1 基因能够通过对染色质结构的调控作用促进体细胞基因组维持完整性和稳定性,如果这些调控机制出现问题,pNETs 就有可能发生。

3 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路相关基因

mTOR 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, mTOR 通路可调节细胞的生长、增殖, 血管发生和生存。mTOR 信号通路相关基因突变导致其过度活化与 pNETs 的发生、发展密切相关。它主要通过 PI3K/Akt/mTOR 途径来实现对细胞生长、细胞周期等多种生理功能的调控作用。作为 mTOR 的活化产物, p-mTOR 的过度表达往往标志着 mTOR 通路的激活。活化的 p-mTOR 通过磷酸化调控其下游的两个重要因子 P70S6K 和 4EBP-1 来影响细胞生长及细胞周期, 调节细胞凋亡。P70S6K 是核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶, 磷酸化的 P70S6K 可激活 s6 从而使核糖体 40S 小亚基易于结合翻译复合物, 促进蛋白质合成。而磷酸化的 4EBP-1 为功能失活状态, 起到对选择性翻译抑制的去阻遏作用^[14]。磷酸酶张力蛋白同源物 PTEN 基因是位于染色体 10q23 的抑癌基因。与其他多数抑癌蛋白控制细胞周期进程和基因组稳定性的作用不同, PTEN 的主要作用是一个酯类的磷酸酶。PTEN 的主要靶分子是磷脂酰肌醇 3, 它将细胞膜磷脂酰肌醇 3' 位点去磷酸化, 这个相同位点被受体酪氨酸激酶和 Ras 下游核心靶分子磷脂酰肌醇 3 激酶催化磷酸化, 因此 PTEN 起到拮抗 AKT-mTOR 信号通路激活的作用。通过 PI3K-AKT-mTOR 信号通路进而调控细胞的生长与凋亡, 让 PTEN 成为重要调节因素^[15]。

Jiao 等^[3]的研究结果表明: 15% 的 pNETs 患者存在 mTOR 信号通路相关基因的突变, PTEN、TSC2 和 PIK3CA 分别为 7.3%、8.8% 和 1.4%。笔者前期的研究结果表明: pNETs 患者通常存在 mTOR 通路的激活, 即 p-mTOR 表达激活, 并伴有 PTEN 的表达缺失或下调, 这两者通常和 pNETs 患者恶性生物学行为和不良预后有着紧密联系^[16]。这些研究结果均表明 mTOR 相关信号通路将是 pNETs 治疗的一个关键靶点。mTOR 抑制剂有依维莫司和替西罗莫司。依维莫司已应用到临床上治疗晚期 NETs 患者。在大型安慰剂对照、Ⅲ期临床研究 (RADIANT-2) 中, 与服用安慰剂联合长效奥曲肽比较, 服用依维莫司联合长效奥曲肽使有分泌症状的晚期 NETs 患者中位无进展生存时间延长了 5.1 个月^[17]。因此, 对于 GEP-NETs 进展期患者应考虑选择依维莫司联合奥曲肽治疗。在安慰剂对照 Ⅲ期临床试验 (RADIANT-3) 中, 相对安慰剂组晚期 pNETs, 服用依维莫

司组的患者中位无进展生存时间延长了 6.4 个月^[18]。生长抑素类似物即长效奥曲肽在治疗 GEP-NETs 方面也显示了良好的效能。生长抑素类似物作用于生长抑素受体, 特别是亚型 2, 从而抑制激素、生物活性胺类和多肽分泌过多^[19]。有研究结果表明生长抑素信号通过作用于 IGF/PI3K/mTOR 通路, 从而抑制分泌和增殖活性^[20-21]。在 PROMID 临床试验中, 长效奥曲肽能延长初治、中肠 (小肠和阑尾) NETs 患者无进展生存时间达 14.3 个月^[22]。

总之, 依维莫司和奥曲肽均能通过 mTOR 信号传导通路抑制肿瘤生长。依维莫司和奥曲肽联合应用的原理与依维莫司抑制 mTOR, 奥曲肽下调促生长因子 IGF-1 (胰岛素样生长因子-1, 是一种 PI3K/AKT/mTOR 途径的上游激活剂) 有关^[21]。

4 小结

pNETs 是一种起病隐匿、发病较晚 (一般指无功能性 pNETs)、病程较长、生物学行为较惰性但容易复发和转移的真正意义上的恶性肿瘤。高龄、大血管侵犯和 Ki-67 增殖指数是影响患者术后生存的独立危险因素^[23]。晚期 pNETs 患者的治疗和术后监测及预后评估仍是一个难题。鉴于 ATRX-DAXX 和 MEN-1 基因突变在 pNETs 中的普遍性, 笔者假设 ATRX-DAXX 和 MEN-1 基因两个中的任何一个或同时失活是肿瘤发生的必要条件之一。如果端粒替代延长与 ATRX-DAXX 突变存在相关性, 研究者也许可利用它来判断生物学行为和评估预后, 并据此研究出特异性靶向的治疗新策略。另外 mTOR 信号通路相关基因的突变也促进了肿瘤的进展和转移, 为此出现的手术治疗联合生物靶向治疗逐渐成为 pNETs 的主要治疗模式。

参考文献

- [1] Yao JC, Hassan M, Phan A, et al. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(18):3063-3072.
- [2] Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors[J]. Cancer, 2003, 97(4):934-959.
- [3] Jiao Y, Shi C, Edil BH, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors[J]. Science, 2011, 331(6021):1199-1203.
- [4] Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, et al. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions[J]. Cell, 2010, 140(5):678-691.
- [5] Liu CP, Xiong C, Wang M, et al. Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX[J].

Nat Struct Mol Biol,2012,19(12):1287-1292.

[6] Gibbons R. Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked[J]. Orphanet J Rare Dis,2006,1:15.

[7] Elsässer SJ, Allis CD, Lewis PW. Cancer. New epigenetic drivers of cancers[J]. Science,2011,331(6021):1145-1146.

[8] Marinoni I, Kurrer AS, Vassella E, et al. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors[J]. Gastroenterology,2014,146(2):453-460. e5.

[9] 蔡洁,姜晓华,曹亚南,等. 散发胰腺神经内分泌肿瘤 DAXX/ATRX、MEN1 基因突变分析[A]. 中华医学会第十次全国内分泌学学术会议论文汇编[C]. 中华医学会、中华医学会内分泌学分会,2011:1.

[10] Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, et al. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2001,98(3):1118-1123.

[11] Parsons DW, Li M, Zhang X, et al. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma [J]. Science, 2011, 331(6016):435-439.

[12] 吴婷,黄小花. MEN1 胰岛素瘤中细胞周期蛋白 cyclin B2 高表达的作用和机制[J]. 生理学报,2011,63(6):555-564.

[13] Gurung B, Feng Z, Iwamoto DV, et al. Menin epigenetically represses Hedgehog signaling in MEN1 tumor syndrome[J]. Cancer Res,2013,73(8):2650-2658.

[14] Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy[J]. J Clin Oncol,2009,27(13):2278-2287.

[15] Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2003,100(13):7491-7496.

[16] Han X, Ji Y, Zhao J, et al. Expression of PTEN and mTOR in pancreatic neuroendocrine tumors [J]. Tumour Biol, 2013, 34(5):2871-2879.

[17] Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, et al. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study[J]. Lancet,2011,378(9808):2005-2012.

[18] Yao JC, Shah MH, Ito T, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors[J]. N Engl J Med,2011,364(6):514-523.

[19] Oberg K, Kvols L, Caplin M, et al. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system[J]. Ann Oncol,2004,15(6):966-973.

[20] Cerovac V, Monteserin-Garcia J, Rubinfeld H, et al. The somatostatin analogue octreotide confers sensitivity to rapamycin treatment on pituitary tumor cells[J]. Cancer Res,2010,70(2):666-674.

[21] Susini C, Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents[J]. Ann Oncol,2006,17(12):1733-1742.

[22] Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group[J]. J Clin Oncol,2009,27(28):4656-4663.

[23] 韩序,赵婧,方圆,等. 年龄对胰腺神经内分泌肿瘤患者术后生存的影响[J]. 中华消化外科杂志,2012,11(4):346-350.

(收稿日期: 2014-07-11)

(本文编辑: 张玉琳)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对表格的要求

根据中华医学会杂志社的要求,表按统计学的制表原则设计,要求采用三线表。

(1)横、纵标目应有逻辑上的主谓语关系,主语一般置表的左侧,谓语一般置表的右侧。本刊采用三横线表,如有合计行或表达统计学处理结果的行,则在该行上再加 1 条分界横线。

(2)表中所用参数须注明单位。若表中所有参数的单位相同,可标注在表的右上方,或表题之后(加括号)。

(3)表中不用“同上”、“同左”等类似词,一律填入具体数字或文字。若使用符号表示未测或未发现,应在表格底线的下方以简练文字注释。

三线表

表序(表 1) 表题		
主语纵标目	谓语纵标目	谓语纵标目
主语横标目		
主语横标目		
合计或统计学内容		
注:		