

甲基鸟嘌呤甲基转移酶表达调节 在肿瘤发生和治疗中的作用

陈玮莹* 沈忠英

(汕头大学医学院生物化学教研室, 汕头 515031)

摘要 甲基鸟嘌呤甲基转移酶 (O^6 -methylguanine DNA methyltransferase, MGMT) 是从细菌到哺乳类机体中存在的一种独特的 DNA 修复蛋白, 其作用是在 DNA 损伤的修复过程, 催化 DNA 分子鸟嘌呤 O^6 位上的烷基从鸟嘌呤碱基转移至 MGMT 蛋白的半胱氨酸残基上, 而使 DNA 分子鸟嘌呤复原. 因此, 机体中 MGMT 适当的表达有利于修复由烷化剂诱导而形成的 O^6 烷基鸟嘌呤 DNA 加合物. MGMT 蛋白的含量和活性不但在基因水平受到各种因素的调控, 并且与某些药物的直接作用有关. 调节 MGMT 在细胞内的活性, 对于防御肿瘤的发生及某些肿瘤的治疗过程中克服肿瘤耐药性和克服骨髓毒性具有重要的意义.

关键词 甲基鸟嘌呤甲基转移酶, 调控, 肿瘤, 耐药性, 骨髓毒性

学科分类号 R73-3

烷化剂可以引起 DNA 分子中鸟嘌呤 O^6 位形成加合物, 从而发挥致癌、细胞毒和骨髓抑制作用. 甲基鸟嘌呤甲基转移酶 (MGMT) 是从细菌到哺乳类机体中存在的一种独特 DNA 修复蛋白, 它可以通过修复过程去除烷化剂诱导而形成的 O^6 烷基鸟嘌呤 DNA 加合物. MGMT 蛋白的含量变化与肿瘤细胞的生成及其对于亚硝基脲类化疗药物产生耐药性和药物对于骨髓的毒性均有着密切的关系, 并受到某些因素的调节.

1 MGMT 的基因定位及其作用

正常情况下, 细胞内的 MGMT 具有双重的作用: 一是解除烷化剂对于细胞的致癌作用; 二是消除烷化类药物对于细胞的毒性作用. 人类 MGMT 蛋白是由 MGMT 基因编码的, 而在细菌中, 则由 *ada* 和 *ogt* 基因编码. 目前已知, 人 MGMT 基因定位于染色体 10q26, 全长约为 170 kb, 含有 5 个外显子和 4 个内含子, 可以在正常细胞和组织表达成为 DNA 修复蛋白 MGMT, 它是含有 207 个氨基酸的单链, 分子质量为 20~25 ku. MGMT 蛋白在不需任何辅助因子或其他蛋白质的条件下, 可以催化 DNA 分子中鸟嘌呤 O^6 位上的烷基转移至 MGMT 本身第 145 位的半胱氨酸残基上, 而使鸟嘌呤得以复原, 使 DNA 的结构和功能得以恢复. 但是, 由于这种催化作用是一种不可逆的反应, MGMT 作用后由于获得烷基而失活. 因此, 这种

修复过程是以 MGMT 自杀为代价的修复过程. 有关研究表明, 细胞对于 DNA 鸟嘌呤 O^6 位上烷基化修复能力的大小通常取决于 MGMT 在细胞内的含量和合成的速率.

2 MGMT 的分布及其活性的调节

2.1 MGMT 的分布

从细菌到哺乳类动物机体中普遍存在着 MGMT, 哺乳类组织中 MGMT 的表达随着种属和组织的不同而变化, 人 MGMT 基因稳定地存在于所有正常组织细胞内, 免疫组化研究结果提示 MGMT 主要分布于活性基因转录的部位^[1], 肝脏 MGMT 蛋白的活性最高^[2]; 而在人、大鼠、小鼠的骨髓细胞中 MGMT 活性很低, 在脑组织中, MGMT 的含量最低^[3]. 人类的肿瘤细胞中 MGMT 的表达水平与组织的起源无关, 而且约有 20% 的肿瘤细胞中没有 MGMT 蛋白的存在^[4]. 肿瘤细胞不能表达 MGMT 的机制目前尚未明了. 但是, 肿瘤细胞 MGMT 的表达水平与细胞对于亚硝基脲类的耐药之间却存在着一定的相关关系. 因此, 根据肿瘤细胞是否存在 MGMT 的活性, 将其分为具有 MGMT 活性的 Mer^+ 表型细胞和缺乏活性的 Mer^- 细胞.

* 通讯联系人.

Tel: 0754-8900439, E-mail: g-wychen@stu.edu.cn

收稿日期: 2001-04-28, 接受日期: 2001-06-28

2.2 MGMT 基因的甲基化与表达

Mer⁻ 细胞没有 MGMT 的表达, 这类细胞中既不含有 MGMT 蛋白, 也没有 MGMT mRNA, 但是, 其基因并没有出现缺失或重排^[5]. 因此, Mer⁻ 细胞中缺乏 MGMT mRNA 应是由于 MGMT 基因处于静息状态没有进行转录而引起. MGMT 基因的结构与很多看家基因相似, 其启动子区域缺乏 TATA 和 CAAT 序列 (TATA 和 CAAT 盒), 而含有 CpG 二核苷酸的丰富区域. 报告基因实验结果表明, Mer⁻ 细胞并不缺乏必需的反式作用因子, 因此提示 MGMT 处于静息状态与顺式作用因子如 CpG 序列的作用有关. DNA 分子 5' 端调节区是 CpG 二核苷酸丰富区域. 正常情况下, 多种肿瘤抑制基因的 CpG 区域呈非甲基化状态, 但在肿瘤形成过程该区域成为潜在的高度甲基化部位. 如果这个区域出现高度的甲基化, 可以抑制肿瘤抑制基因和某些修复基因的转录^[6]. 利用甲基化特异的 PCR (MSP) 方法研究分析了 45 例胰腺肿瘤和 14 例正常的胰腺组织, 发现 60% 的恶性肿瘤的基因有一处或一处以上的部位发生了异常的甲基化改变, 这种改变涉及 p16, E-cad 等几个肿瘤抑制基因和肿瘤相关基因及修复基因, 但未检出 MGMT 基因的异常甲基化修饰.

但是, Qian 等^[7] 用重亚硫酸盐修饰 DNA 后通过测序分析 HT29 细胞 (Mer⁺) 和 BE 或 HeLa S3 细胞 (Mer⁻), 提示 HT29 细胞 (Mer⁺) 的转录起始部位在序列为 -249~ +259 的区域实际上没有甲基化, 而 BE 或 HeLa S3 细胞 (Mer⁻) 93% CpG 却出现完全的甲基化, 高度甲基化的部位出现于 -249~-103 和 +107~ +196 区域, 通过用 5-azacitidine 诱导 HeLa S3 细胞增加 MGMT 表达时伴随有 CpG 的脱甲基或完全去甲基化. Carbone 等^[8] 分析了从 HIV 阳性并患有原发性渗出性淋巴瘤病人的胸腔渗出液中分离到的原发性渗出性淋巴瘤细胞 CRO-AP/6, 结果表明这种淋巴瘤细胞由于其启动子的甲基化导致 MGMT 双等位基因的失活. 对于结肠直肠癌标本的研究也提示 MGMT 的失活与启动子的高度甲基化有关^[9]. 根据实验结果推测, 特定区域的甲基化对于 MGMT 基因静息状态的维持和基因的失活过程具有重要的作用.

除了启动子调节作用, MGMT 基因的表达可能还与其他区域的调节有关. Bearzatto 等^[10] 在实验中观察到变异的 RajiMex⁻ 细胞可对于 N-methyl-N-nitrosourea 产生耐药性, 这种耐药性的产生是由

于静息状态的 MGMT 基因恢复表达的结果. 他们分析 DNA 的碱基序列以及对于 MGMT mRNA 水平和 MGMT 蛋白含量测定, 结果表明 MGMT 的活性与启动子的甲基化无关, 而应用去甲基药物 5-azadeoxy cytidine 后可以降低 MGMT mRNA 水平和酶蛋白含量, 说明 MGMT 基因的表达可能需要部分非启动子的序列的甲基化. Wang 等^[4] 通过 Southern 印迹分析了 6 个 Mer⁺ 和 12 个 Mer⁻ 细胞系, 发现所有的 Mer⁺ 细胞在外显子序列区域有高度的甲基化, 但 mer⁻ 细胞在这些区域均没有甲基化.

上述各种实验结果表明, 甲基化作用可以引起 MGMT 基因表达的激活或抑制, 这可能与 MGMT 基因甲基化部位的不同有关; 另外, 人类细胞中 MGMT 基因的调节可能不仅通过基因甲基化而进行, 而且还存在更为复杂的调节机制, 有关研究目前正在进行中.

2.3 p53 对 MGMT 活性的调节

近几年来, 有些学者认为 p53 对于 MGMT 的活性具有一定的调节作用. 例如, Nutt 等^[11] 发现野生型 p53 蛋白, 可引起新生小鼠大脑中的解毒和屏障细胞——星形胶质细胞产生对于 1,3-2 氯乙基-1-亚硝基脲 (1,3-bis-2-chloroethyl-1-nitrosourea, BCNU) 的耐药性, 这种作用与 p53 蛋白对于细胞周期调节和介导凋亡的作用互不相关, 而是由于 p53 蛋白对于 MGMT 活性的调节而引起. 为了进一步研究 p53 基因的状态与 MGMT 活性的关系及其对于 BCNU 耐药性的影响, Nutt 等分别测定了含纯合子野生型 p53、杂合子 p53 或 p53 剔除后的小鼠星形胶质细胞中 MGMT 的活性, 发现野生型星形胶质细胞 MGMT 活性最高, 比 p53 剔除的星形胶质细胞要高出 5 倍之多, 同时, 野生型 p53 星形胶质细胞 MGMT mRNA 的表达也高于 p53 剔除的星形胶质细胞, 此结果表明 p53 具有增强新生小鼠星形胶质细胞 MGMT 活性的作用^[12].

不同的小鼠纤维母细胞和大鼠肝癌细胞经电离照射后, 分析其野生型 p53 和突变型 p53 的存在和细胞内 MGMT 的表达水平, 发现有诱导 MGMT 表达的细胞存在 p53, 而那些没有野生型 p53 表达的细胞, 也没有 MGMT 的表达^[13]. 另外, 将克隆的 MGMT 启动子转染含有 p53 的细胞, 电离照射后可有 MGMT 启动子的诱导激活, 而 p53 缺乏的细胞则 MGMT 不表达. 提示 MGMT mRNA 和 MGMT 蛋白的诱导生成必需有野生型 p53 的表达,

表明 p53 是引发 MGMT 表达的一种可能因素, 但也有学者认为两者之间存在着相反的因果关系, MGMT 的低表达可以促进 p53 的突变^[14].

Hengstler^[15]对于 140 例原发性卵巢癌 MGMT 的表达和 p53 的状态进行分析, 发现不同的原发性卵巢癌细胞中 MGMT 蛋白的含量变化较大, 而且, 含有野生型 p53 的细胞中 MGMT 蛋白活性低于含有突变型 p53 肿瘤细胞, 肿瘤的组织学分级随着突变型 p53 的增加而提高, 而突变型 p53 的增加则伴有 MGMT 活性的增加. 他们发现在 MGMT 表达较低的肿瘤细胞较少含有突变型 p53, 这些结果却支持野生型 p53 可以降低 MGMT 启动子活性的观点.

p53 对于 MGMT 活性存在的不同调节作用, 是由于不同肿瘤细胞系对于 MGMT 表达的差异所引起, 或是 p53 对于不同的肿瘤细胞存在着不同的调节作用, 有关机制值得进一步的研究并加以阐明.

3 MGMT 的表达与肿瘤发生

Thomale 等^[16]对具有不同修复能力的啮齿动物细胞进行体外实验, 结果提示由于 MGMT 的低活性, 可以引起 DNA 鸟嘌呤 O⁶ 位上的烷基化持续存在而未被修复, 这种情况与肿瘤的发生和发展过程存在着高度的相关关系. 相反, 靶细胞中对于 DNA 鸟嘌呤 O⁶ 位上的烷基化的有效修复具有抑制肿瘤的作用.

Allay^[17]和 Becker 等^[18]分别应用 MeNU 作用于含有人 MGMT 的转基因小鼠的胸腺细胞和小鼠背部皮肤, 以此诱导小鼠胸腺淋巴瘤或皮肤肿瘤的发生, 但发现高度表达 MGMT 的小鼠具有保护作用, 能够减少由于 O⁶ 鸟嘌呤甲基化而介导的致癌性突变.

有学者^[19]将人 MGMT 的转基因小鼠和 A/J 小鼠繁殖生成 B6A/J 小鼠, 这种小鼠肺中 MGMT 的表达量比非转基因小鼠要高出 14 倍之多, 应用 NNK (4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone) 注射小鼠, 可以在动物体内形成 O⁶ 甲基鸟嘌呤-DNA 加合物. 实验结果表明: NNK 注射后, 转基因小鼠肺内的 O⁶mG 含量只有非转基因小鼠的 1/3, 而且人 MGMT 基因在转基因小鼠体内的高表达可以减少 NNK 诱发的肺部肿瘤发生率. 说明机体在 MGMT 高表达的条件下, 可以减少烷化剂对于 DNA 产生的加合作用, 并可降低由

此而诱发肿瘤的发生频率.

4 MGMT 表达与肿瘤治疗

在应用化学药物治疗肿瘤的过程, 亚硝基脲类药物是目前治疗脑恶性肿瘤最重要的药物. 但是, 由于 Mer⁺ 肿瘤细胞内存在着介导 DNA 修复的 MGMT, 而 MGMT 高度活性降低了亚硝基脲类化疗药物对于肿瘤细胞的作用, MGMT 的高度表达也是肿瘤对于亚硝基脲类药物产生耐药性的最重要的机制. 由于人骨髓中 MGMT 的表达远远低于其他组织特别是肿瘤组织, 因此, 亚硝基脲类药物对于骨髓组织更为敏感, 容易引起骨髓抑制. 为了提高亚硝基脲类化疗药物的疗效, 关键问题是如何降低肿瘤组织中 MGMT 蛋白的活性和提高骨髓 MGMT 的表达水平.

目前有关体内和体外实验表明, O⁶ 苄基鸟嘌呤 (O⁶-BG, O⁶-benzylguanine) 具有抑制 MGMT 蛋白活性的作用, 可以提高 Mer⁺ 细胞对于亚硝基脲类的敏感性. 另外, dBG (O⁶-benzyl-2'-deoxyguanosine) 是 O⁶-BG 的核苷酸衍生物, 由于该药物呈水溶性, 其代谢产物易于透过血脑屏障. Kokkinakis 等^[20]应用 dBG 和 BCNU 对于带有对 BCNU 耐药的人成神经管细胞瘤细胞株的荷瘤裸鼠进行实验治疗, 在用药剂量分别是 200 g/L dBG 和 23 g/L BCNU 时, 可以使瘤体消退同时又不产生细胞毒性. Schold 等^[21]曾通过小鼠的实验比较, 提示 dBG 对 BCNU 的增敏作用比 BG 更强, 因此 dBG 可能是一种用于消耗 MGMT, 提高亚硝基脲类药效的较有前途的药物.

有的学者提出未来对于 Mer⁺ 肿瘤的治疗, 将利用 O⁶-BG 一类药物消耗肿瘤细胞内的 MGMT, 同时应用对 O⁶-BG 耐药的 MGMT 突变基因对于药物敏感的正常组织进行基因修饰, 以保护骨髓造血祖细胞, 克服亚硝基脲类药物的骨髓毒性作用. 实验提示, 利用逆转录病毒为载体将野生型 MGMT 基因转导骨髓造血祖细胞可以增加组织中 MGMT 的活性, 有一定程度保护骨髓细胞的作用. 而 Ragg^[22]利用逆转录病毒介导, 将突变型 MGMT 转导入小鼠骨髓造血祖细胞中, 发现转导入突变型 MGMT 的骨髓细胞对于 6-BG 的耐药性比转导入野生型 MGMT 的细胞提高了 40~1000 倍. 分别将转导入突变 MGMT、野生型 MGMT 小鼠骨髓造血干细胞或假感染细胞移植到小鼠骨髓中, 然后应用 BCNU 40 mg/kg 治疗, 结果提示假感染组和

野生型 MGMT 组具有显著的骨髓毒性和死亡率 (存活概率 < 0.1), MGMT P140K 突变组的存活概率为 0.83, 而且在用药后仅有轻微的外周血细胞减少, 但在继续治疗期间可以逐渐恢复到接近正常的范围. 提示突变型 MGMT 在骨髓中的表达对于小鼠在大剂量用药或是长疗程用药时均有保护的作用. 也表明通过转基因途径调节 MGMT 的表达对于肿瘤治疗具有乐观的前景.

综合上述研究资料, 虽然对于 MGMT 基因表达的有关调控有了一定的了解, 但由于基因调控过程的复杂性, 其表达调控机制仍需通过进一步研究加以阐明. 鉴于 MGMT 蛋白在细胞内的含量对于消除烷化剂致癌作用及其所引起的细胞毒性, 通过基因表达的调控以调节细胞内 MGMT 蛋白的含量对于肿瘤的防治将具有重要的意义. 另外, 大量的研究阐明了 MGMT 与肿瘤细胞对亚硝基脲类化疗药物耐药及其骨髓抑制的相关关系, 随着基因技术的不断成熟和应用, 通过基因水平调节肿瘤细胞内 MGMT 活性和含量也将有可能为肿瘤的治疗开辟新的途径.

参 考 文 献

- 1 Ali R B, Teo A K, Oh H K, *et al.* Implication of localization of human DNA repair enzyme O⁶-methylguanine DNA methyltransferase at active transcription sites in transcription repair coupling of the mutagenic O⁶-methylguanine lesion. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (3): 1660~1669
- 2 Nakatsuru Y, Matsukuma S, Nemoto N, *et al.* O⁶-methylguanine DNA methyltransferase protects against nitrosamine induced hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (14): 6468~6472
- 3 Belanich M, Randall T, Pastor M A, *et al.* Intracellular localization and intercellular heterogeneity of the human DNA repair protein O⁶-methylguanine DNA methyltransferase. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, **37** (6): 547~555
- 4 Wang Y, Kato T, Ayaki H, *et al.* Correlation between DNA methylation and expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase gene in cultured human tumor cells. *Mutat-Res*, 1992, **273** (2): 221~230
- 5 von Wronski M A, Harris L C, Tano K, *et al.* Cytosine methylation and suppression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and xenografts. *Oncol Res*, 1992, **4** (4-5): 167~174
- 6 Ueki T, Toyota M, Sohn T, *et al.* Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2000, **60** (7): 1835~1839
- 7 Qian X C, Brent T P. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O⁶-methylguanine DNA methyltransferase gene. *Cancer Res*, 1997, **57** (17): 3672~3677
- 8 Carbone A, Cilia A M, Glohini A, *et al.* Characterization of a novel HHV-8-positive cell line reveals implications for the pathogenesis and cell cycle control of primary effusion lymphoma. *Leukemia*, 2000, **14** (7): 1301~1309
- 9 Esteller M, Toyota M, Sanchez C M, *et al.* Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 2000, **60** (9): 2368~2371
- 10 Bearzatto A, Szadkowski M, Macpherson P, *et al.* Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents. *Cancer Res*, 2000, **60** (12): 3262~3270
- 11 Nutt C L, Chambers A F, Cairncross J G. Wild-type p53 renders mouse astrocytes resistant to 1, 3-bis (2-chloroethyl) -nitrosourea despite the absence of a p53-dependent cell cycle arrest. *Cancer Res*, 1996, **56** (12): 2748~2751
- 12 Nutt C L, Loktionova N A, Pegg A E, *et al.* O⁶-methylguanine DNA methyltransferase activity, p53 gene status and BCNU resistance in mouse astrocytes. *Carcinogenesis*, 1999, **20** (12): 2361~2365
- 13 Grombacher T, Eichhorn U, Kaina B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene*, 1998, **17** (7): 845~851
- 14 Rolhion C, Penault L F, Kemeny J L, *et al.* O (6) -methylguanine DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. *Int J Cancer*, 1999, **84** (4): 416~420
- 15 Hengstler J G, Tanner B, Moller L, *et al.* Activity of O (6) -methylguanine DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer. *Int J Cancer*, 1999, **84** (4): 388~395
- 16 Thomale J, Huh N H, Nehls P, *et al.* Repair of O⁶-ethylguanine in DNA protects rat 208F cells from tumorigenic conversion by N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (24): 9883~9887
- 17 Allay E, Velgi M, Gerson S L. Mice over-expressing human O (6) -methylguanine DNA methyltransferase selectively reduce O (6) -methylguanine mediated carcinogenic mutations to threshold levels after N-methyl-N-Nitrosourea. *Oncogene*, 1999, **18** (25): 3383~3387
- 18 Becker K, Dosch J, Gregel C M, *et al.* Targeted expression of human O (6) -methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 1996, **56** (14): 3244~3249
- 19 Liu L L, Qin X S, Stanton L G. Reduced lung tumorigenesis in human methylguanine DNA methyltransferase transgenic mice achieved by expression of transgene within the target cell. *Carcinogenesis*, 1999, **20** (2): 278~284
- 20 Kokkinakis D M, Moschel R C, Pegg A E, *et al.* Eradication of human medulloblastoma tumor xenografts with a combination of O6-benzyl-2'-deoxyguanosine and 1, 3-bis (2-chloroethyl) 1-nitrosourea. *Clin Cancer Res*, 1999, **5** (11): 3676~3681
- 21 Schold S C Jr, Kokkinakis D M, Rudy J L, *et al.* Treatment of human brain tumor xenografts with O6-benzyl-2'-deoxyguanosine and BCNU. *Cancer Res*, 1996, **56** (9): 2076~2081
- 22 Ragg S, Xu W M, Bailey J, *et al.* Direct reversal of DNA damage by mutant methyltransferase protein protects mice against dose-intensified chemotherapy and leads to *in vivo* selection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res*, 2000, **60** (18): 5187~5195

The Action of Regulation on O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase Expression in Tumor-geneses and Tumor Therapy

CHEN Wei-Ying^{*}, SHEN Zhong-Ying

(Medical College, Shantou University, Shantou 515031, China)

Abstract O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is a specific DNA repair protein that exist in cells and tissues from bacteria to mammalias. The function of the repair protein is to catalyzing and transferring the alkyl group from the O⁶ position of guanine of DNA to an internal cysteine residue of MGMT protein which repairs the lesion by reversion the guanine of DNA. Therefore the proper expression of MGMT is useful to repair O⁶-methylguanine-DNA adducts formed by the induction of alkyl agents. The amount and activity of MGMT are not only regulated by various factors at genetic level, but also associated with the directly effects of some drugs. It has important significance to regulate the activity of MGMT in the cells during the prevention of tumor-geneses and overcoming the drug resistance or marrow toxicity.

Key words MGMT, regulation, tumor, drug resistance, marrow toxicity

^{*} Corresponding author. Tel: 86-754-8900439, E-mail: gwychen@stu.edu.cn

Received: April 28, 2001 Accepted: June 28, 2001