

DNA 修复与自噬在胶质瘤替莫唑胺耐药中的作用机制研究进展

马晓东¹, 马世泽¹, 张祎年²

1. 兰州大学第二医院/第二临床医学院, 甘肃 兰州 730030

2. 兰州大学第二医院神经外科/神经外科实验室/兰州大学神经病学研究所, 甘肃 兰州 730030

摘要:替莫唑胺(TMZ)作为一种新型的口服烷化剂,是现今胶质瘤化学治疗的一线用药。TMZ 耐药性涉及多种机制。包括 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(MGMT)、错配修复(MMR)及碱基切除修复(BER)等在内的 DNA 修复机制可以修复 TMZ 引起的 DNA 损伤,从而降低 TMZ 敏感性。此外,自噬对于 TMZ 耐药性也有着复杂的作用。该文对 TMZ 耐药机制以及为改善耐药性而开发的一些治疗策略的最新研究进展进行综述。

关键词:替莫唑胺;耐药性;胶质瘤;自噬;DNA 修复

中图分类号:R739.41

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2020.05.013

Research progress in the mechanisms of DNA repair and autophagy in resistance of gliomas to temozolomide

MA Xiao-Dong¹, MA Shi-Ze¹, ZHANG Yi-Nian². 1. Department of Neurosurgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China; 2. Department of Neurosurgery and Laboratory of Neurosurgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China

Corresponding author: ZHANG Yi-Nian (1982 -), male, deputy chief physician, associate professor, Ph. D. Tutor, mainly engaged in basic and clinical research on brain tumors and epilepsy. Email: ery_zhangyinian@lzu.edu.cn

Abstract: Temozolomide (TMZ), as a new oral alkylating agent, is a first-line drug for glioma chemotherapy nowadays. The drug resistance to TMZ involves multiple mechanisms, among which the DNA repair mechanism, including O6-methylguanine-DNA methyltransferase, mismatch repair, and base excision repair, can repair DNA damage caused by TMZ, thereby reducing the sensitivity to TMZ; in addition, autophagy also has a complicated effect on the drug resistance to TMZ. This article reviews the latest research progress in the mechanisms of drug resistance to TMZ and various therapeutic strategies developed to reverse the resistance.

Key words: temozolomide; drug resistance; glioma; autophagy; DNA repair

胶质瘤是中枢神经系统最常见的致死性原发性肿瘤, 占所有脑原发性肿瘤的 28%, 并占脑恶性肿瘤的 80%。胶质瘤起源于神经胶质干细胞或祖细胞, 具有极强的侵袭性。WHO 依其恶性程度将其分为 I ~ IV 级^[1]。胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是弥漫性神经胶质瘤的一种高级形式, 以弥漫浸润性、高度侵袭性为特征, 是成年人中最常见的中枢神经系统恶性肿瘤, 约占 46.6%^[2]。

成人 GBM 的发病率随年龄增长而增加, 诊断中位年龄为 64 岁^[2]。一经诊断无法完全治愈, 即使经过手术全切除及术后规律放、化疗, 其中位总生存期也只有约 14 个月, 5 年生存率仅为 5.5%^[2]。近年来研究发现, 化疗药物对治疗恶性胶质瘤具有一定的效果。2005—2009 年, 一项针对替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)的随机 III 期临床研究表明, 在 GBM 开始治疗时, 通过 TMZ 联合同步放疗组

基金项目: 兰州大学第二医院引进人才科研专项(2015-4-02); 兰州大学第二医院萃英科技创新计划(CY2017-MS04)

收稿日期: 2020-05-09; 修回日期: 2020-07-31

作者简介: 马晓东(1998-), 男, 回族, 硕士研究生, 主要从事颅脑肿瘤、颅脑外伤的基础与临床研究。Email: maxd13@lzu.edu.cn。

通信作者: 张祎年(1982-), 男, 副主任医师, 副教授, 博士生导师, 主要从事颅脑肿瘤及癫痫等的基础与临床研究。Email: ery_zhangyinian@lzu.edu.cn。

合,患者中位生存期达到 14.6 个月,而仅接受放疗的患者中位生存期为 12 个月。该项研究具有里程碑式的意义,奠定了 TMZ 在胶质瘤治疗中的重要地位。然而, TMZ 治疗 GBM 的效果受到许多方面的影响。 TMZ 主要通过使胶质瘤细胞 DNA 甲基化而发挥作用。但存在多种 DNA 修复机制可以修复 TMZ 引起的 DNA 损伤,包括肿瘤细胞中 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT)、碱基切除修复(base excision repair, BER)、错配修复(mismatch repair, MMR)等,均在胶质瘤对 TMZ 耐药中扮演重要角色。此外,自噬作为一种依赖溶酶体的蛋白降解途径,与 TMZ 耐药也有着复杂的关系^[3]。目前已有一些针对以上机制的研究药物对改善耐药性有一定的作用,但对于延长 GBM 患者生存期并无明显的作用。本文主要针对近年来关于胶质瘤对 TMZ 产生耐药的 DNA 修复机制以及自噬在 TMZ 耐药中的作用进行整理和综述。

1 TMZ 的结构及作用机制

TMZ 是咪唑四嗪家族的烷基化剂,仅在酸性环境下稳定。 TMZ 可以口服给药,其生物利用度接近 100%,进入体内后可以部分透过血脑屏障进入脑脊液中,从而在颅内达到有效的药物浓度,同时 TMZ 还具有广谱的抗肿瘤活性^[4-5]。 TMZ 本身没有直接的抗癌活性,但 TMZ 可在生理条件下迅速转化为具有活性的代谢化合物 5-(13-甲基三嗪-1-基)咪唑-4-酰胺(MTIC), MTIC 进一步降解为 5-氨基-咪唑-4-酰胺(AIC)与高反应性甲基重氮阳离子,这种不稳定的阳离子可以通过使 DNA 甲基化,形成 O6 和 N7 烷基鸟嘌呤,造成 DNA 复制受阻,使细胞凋亡^[6]。

2 TMZ 耐药机制

目前研究表明多种机制参与 TMZ 耐药性的形成,其中 DNA 修复机制发挥着关键作用。主要包括 MGMT、MMR 及 BER 等。

2.1 MGMT

MGMT 是一种相对分子质量为 22 kDa 的蛋白质,主要通过去除鸟嘌呤 O6 位的甲基来直接修复由 TMZ 引起的病变^[7]。此外还可以去除其他烷基,例如乙基、丁基等,但其去除甲基的速度更快。 MGMT 在鸟嘌呤去甲基的过程中自身被甲基化从而立即失活,不能循环利用并会被蛋白酶体降解,因此被称为“自杀酶”。 MGMT 的高表达抵消了

TMZ 诱导的细胞毒性,并且还和患者短生存时间的不良预后有关^[8]。在 30%~60% 的 GBM 患者中, MGMT 的启动子是甲基化的,即不产生或降低产生的蛋白质水平^[9]。先前研究表明, MGMT 甲基化的患者在接受了 TMZ 化疗和放疗后有更长的平均总生存时间。 MGMT 启动子的甲基化状态已经成为临床上预测 TMZ 化疗敏感性的有效指标^[10]。 MGMT 表达的调节非常复杂。 MGMT 表达上调的机制包括翻译后组蛋白乙酰化、组蛋白 3 去甲基化以及特定的染色质修饰复合物引起的染色质结构的改变^[11]。证据表明,代谢酶和特定的 microRNA 在 MGMT 调节中具有重要作用。药物或 microRNA-101 介导的对丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶糖原合酶激酶 3 β (GSK3 β)的抑制作用可以抑制 MGMT 的表达,使 TMZ 敏感性的增强^[12]。目前一些针对 MGMT 的分子已用于联合 TMZ 的临床试验中,比如可以抑制 MGMT 的 O6-苄基鸟嘌呤(O6-BG)和 O6-(4-溴噻吩)鸟嘌呤。它们通过使 MGMT 发生甲基化从而失活,尽管这些物质能有效增强 TMZ 的敏感性,但其对正常细胞,尤其是骨髓细胞有很高的细胞毒性,其使用受到了极大的限制。

2.2 BER

TMZ 诱导 DNA 损伤,从而激活特定的 DNA 损伤修复途径。既往研究发现,大部分(>90%) TMZ 诱导的非大面积 N-甲基化 DNA 损伤(N7 和 N3)被碱基切除修复途径识别和修复^[13]。此途径中的脱氨、氧化或 DNA 碱基甲基化是通过一组协调的 BER 酶促步骤完成的,由特定的酶识别并切除 TMZ 诱导的单个碱基烷基化损伤,并由互补的核苷酸碱基填充其缺口。该过程中涉及到的分子有聚合酶-B(Pol-B)、干细胞因子高迁移率族 A2(HMGA2)、BER 成员 MPG、聚(ADP)-核糖聚合酶 1(PARP1)^[14]等。当 BER 的一种或多种成分发生突变或被抑制时, TMZ 毒性作用就会增加。研究表明,酪氨酸激酶抑制剂多韦替尼可以下调患者 GBM 细胞中的 HMGA2、BER 成员、PARP1 和 MGMT,从而增高 TMZ 的敏感性^[15]。 TMZ 与 PARP1 抑制剂维利帕尼联合治疗即使在高度 TMZ 耐药的 GBM 细胞中也可以发挥协同治疗作用^[16]。

2.3 MMR

除了 BER 和 MGMT 外,其他 DNA 修复机制,包括 MMR、核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)和同源重组(homologous recombination, HR),

也对 TMZ 耐药性产生了重要贡献^[17]。其中以 MMR 最为重要,主要体现在:①MMR 修复了 MGMT 未修复的 O6-MG 病变;②MMR 与 TMZ 突变和治疗耐药性有关^[18];③正常的 MMR 功能对于 O6meG 诱导的细胞毒性很重要,而无功能的 MMR 会引起 TMZ 耐药^[3]。如果 MGMT 无法修复 O6meG,则由 MMR 修复由此产生的不匹配(O6meG/C 或 O6meG/T)。MMR 蛋白复合物突变可以引起 MMR 通路受损,会使胶质瘤细胞无法识别和修复 TMZ 引起的 O6-MG 复合物,从而增加 TMZ 耐药性。已有研究发现在 TMZ 治疗后会发生上述复合物的突变或丢失,因此 MMR 已被提议作为患者 TMZ 反应/生存不良的预测因子^[19]。有趣的是,据报道 GBM 细胞系中 MGMT 和 MMR 成员的表达呈负相关,这表明 MGMT 和 MMR 之间存在复杂的关系。

3 自噬与 TMZ 耐药

3.1 自噬对肿瘤细胞的双重作用

自噬是细胞通过溶酶体途径降解受损细胞器以及错误折叠和功能失调的蛋白质并为细胞提供能量的机制^[20]。自噬在细胞和组织的体内平衡以及新陈代谢、发育、免疫力和病原体清除中起着至关重要的作用。越来越多的证据表明自噬在肿瘤发生的各个阶段起着重要的作用。自噬对于肿瘤具有促进和抑制的双重作用,取决于肿瘤的类型和背景^[21]。一方面,通过消除致癌底物、未折叠蛋白和无用的细胞器,自噬可以抑制肿瘤的发生。另一方面,在生理或应激情况下,它可以通过降解无用的蛋白来为肿瘤细胞的代谢提供底物及能量从而促进肿瘤的生长。

3.2 自噬在 TMZ 耐药机制中的作用

自噬在肿瘤发生中的作用及其对化学疗法的反应是正在进行的研究的重点。目前的研究表明,自噬会抑制肿瘤的发生,但会增强肿瘤的进展和对化疗的抵抗力^[22]。在用治疗剂处理 GBM 细胞后,自噬作用一种应激反应被激活。TMZ 和电离辐射等刺激均可以诱导 GBM 细胞产生自噬。TMZ 诱导了几种胶质瘤细胞系中与 ATP 产生相关的自噬,而自噬抑制剂(3-MA 或针对 Beclin1 的 siRNA)可以阻断 TMZ 诱导的 ATP 增加。TMZ 诱导的自噬相关的 ATP 激增是一种可能导致耐药性的细胞保护机制。在人和大鼠胶质瘤细胞中,TMZ 可以诱导自噬的增加^[23]。但在不同的细胞系中,其结果可能会因培养条件与 TMZ 的浓度不同而有所变化^[24]。

目前研究已经发现多种与 TMZ 激活自噬相关的通路,包括 AKT/mTOR 途径、ATM/AMPK/ULK1 途径、ERK 途径等^[25-26]。因此在 GBM 中,不同的应激刺激可以通过不同的信号通路诱导自噬的产生。

3.3 调节自噬可以改善 TMZ 耐药性

为了克服由自噬引起的这种抗性,自噬基因的敲低或自噬的药理学抑制作用可作为提高化学治疗药物功效的策略。自噬抑制剂与化学疗法的结合可以提高 GBM 的治疗效果^[27]。自噬抑制剂(巴氟霉素 A1、CQ 等)目前已经用于改善 GBM 中 TMZ 耐药性的研究中^[23]。研究还发现参与自噬过程的一些酶的表达水平的高低也可以影响 GBM 对 TMZ 的敏感性^[28]。此外还有基础研究表明包括 miRNA 在内的一些分子均可以通过影响自噬来调节 TMZ 耐药性^[29]。总之,不同的自噬调节剂可以改善 GBM 细胞的 TMZ 耐药性。

4 展望

TMZ 在胶质瘤的综合治疗中起着不可替代的作用,然而接近一半的患者对 TMZ 表现出耐药性。TMZ 耐药受到多种因素的影响,除了以上提到的 DNA 修复机制,表皮生长因子受体的过表达、半乳糖凝集素-1、抑癌基因 p53 突变等多个机制也参与了 TMZ 的耐药^[30]。对于这些机制的研究以及制定相应的措施,可以有效预见和改善 TMZ 的耐药性,从而改善胶质瘤患者预后。然而目前的研究结果仍不尽如人意,仍需要大量的研究来解决这些问题。

自噬与肿瘤之间存在双重的关系,而自噬在 TMZ 耐药中起着重要作用。目前已发现多种与之相关的信号通路。对于这些信号通路的进一步研究将有助于我们通过调节自噬来改善 TMZ 耐药性,从而提高 TMZ 的疗效,为胶质瘤的治疗提供新的思路与方案。

参 考 文 献

- [1] Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15017.
- [2] Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013 [J]. Neuro Oncol, 2016, 18 (suppl_5): v1-v75.
- [3] Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, et al. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response [J]. Pharmacol Ther, 2018, 184: 13-41.
- [4] Jakubowicz-Gil J, Bałdziul D, Langner E, et al. Temozolo-

- amide and sorafenib as programmed cell death inducers of human glioma cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69 (4) : 779-787.
- [5] Kanemura Y, Sumida M, Okita Y, et al. Systemic intravenous adoptive transfer of autologous lymphokine-activated $\alpha\beta$ T-cells improves temozolomide-induced lymphopenia in patients with glioma [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37 (7) : 3921-3932.
- [6] Chuang JY, Lo WL, Ko CY, et al. Upregulation of CYP17A1 by Sp1-mediated DNA demethylation confers temozolomide resistance through DHEA-mediated protection in glioma [J]. *Oncogenesis*, 2017, 6 (5) : e339.
- [7] Christmann M, Kaina B. Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy [J]. *Mutat Res*, 2019, 780 : 15-28.
- [8] Sun GH, Zhao LJ, Zhong RG, et al. The specific role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase inhibitors in cancer chemotherapy [J]. *Future Med Chem*, 2018, 10 (16) : 1971-1996.
- [9] Annovazzi L, Mellai M, Schiffer D. Chemotherapeutic drugs : DNA damage and repair in glioblastoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9 (6) : 57.
- [10] Mathur R, Zhang Y, Grimmer MR, et al. MGMT promoter methylation level in newly diagnosed low-grade glioma is a predictor of hypermutation at recurrence [J]. *Neuro Oncol*, 2020, noaa059. DOI: 10. 1093/neuonc/ noaa059. Epub ahead of print.
- [11] Kitange GJ, Mladek AC, Schroeder MA, et al. Retinoblastoma binding protein 4 modulates temozolomide sensitivity in glioblastoma by regulating DNA repair proteins [J]. *Cell Rep*, 2016, 14 (11) : 2587-2598.
- [12] Tian T, Ma MY, Xia Q, et al. MicroRNA-101 reverses temozolomide resistance by inhibition of GSK3 β in glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (48) : 79584-79595.
- [13] Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, et al. Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma [J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2018, 58 (10) : 405-421.
- [14] Higuchi F, Nagashima H, Ning J, et al. Restoration of temozolomide sensitivity by PARP inhibitors in mismatch repair deficient glioblastoma is Independent of base excision repair [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26 (7) : 1690-1699.
- [15] Thanasupawat T, Natarajan S, Rommel A, et al. Dovitinib enhances temozolomide efficacy in glioblastoma cells [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11 (8) : 1078-1098.
- [16] Gupta SK, Kizilbash SH, Carlson BL, et al. Delineation of MGMT hypermethylation as a biomarker for veliparib-mediated temozolomide-sensitizing therapy of glioblastoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108 (5) : djv369.
- [17] Nagel ZD, Kitange GJ, Gupta SK, et al. DNA repair capacity in multiple pathways predicts chemoresistance in glioblastoma multiforme [J]. *Cancer Res*, 2017, 77 (1) : 198-206.
- [18] Touat M, Li YY, Boynton AN, et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas [J]. *Nature*, 2020, 580 (7804) : 517-523.
- [19] McFaline-Figueroa JL, Braun CJ, Stanciu M, et al. Minor changes in expression of the mismatch repair protein MSH2 exert a major impact on glioblastoma response to temozolomide [J]. *Cancer Res*, 2015, 75 (15) : 3127-3138.
- [20] Mokarram P, Albokashy M, Zarghooni M, et al. New frontiers in the treatment of colorectal cancer: autophagy and the unfolded protein response as promising targets [J]. *Autophagy*, 2017, 13 (5) : 781-819.
- [21] Ulasov I, Fares J, Timashev P, et al. Editing cytoprotective autophagy in glioma: an unfulfilled potential for therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26 (3) : 252-262.
- [22] Wojton J, Meisen WH, Kaur B. How to train glioma cells to die: molecular challenges in cell death [J]. *J Neurooncol*, 2016, 126 (3) : 377-384.
- [23] Hori YS, Hosoda R, Akiyama Y, et al. Chloroquine potentiates temozolomide cytotoxicity by inhibiting mitochondrial autophagy in glioma cells [J]. *J Neurooncol*, 2015, 122 (1) : 11-20.
- [24] Gratas C, Séry Q, Rabé M, et al. Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (9) : 2428-2435.
- [25] Chen WL, Wang DH, Du XW, et al. Glioma cells escaped from cytotoxicity of temozolomide and vincristine by communicating with human astrocytes [J]. *Med Oncol*, 2015, 32 (3) : 43.
- [26] Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP, et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage [J]. *Autophagy*, 2015, 11 (7) : 1099-1113.
- [27] Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22 (3) : 367-376.
- [28] Wen ZP, Zeng WJ, Chen YH, et al. Knockdown ATG4C inhibits gliomas progression and promotes temozolomide chemosensitivity by suppressing autophagic flux [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38 (1) : 298.
- [29] Li H, Chen L, Li JJ, et al. miR-519a enhances chemosensitivity and promotes autophagy in glioblastoma by targeting STAT3/Bcl2 signaling pathway [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11 (1) : 70.
- [30] Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20 (7) : 899-905.