

白血病细胞的定向诱导分化及 PADI4 在诱导分化中的作用

Directional differentiation of leukemia cells and the role of PADI4 in leukemia cells differentiation

赵 钰, 林 玮*

ZHAO Yu, LIN Wei*

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东 济南 250062)

摘要: 白血病是血液系统的常见病和多发病, 定向诱导白血病细胞分化是治疗白血病的重要策略之一。肽酰基精氨酸脱亚胺酶(PAD/PADI)是催化精氨酸转化为瓜氨酸的关键酶, 在白血病诱导分化过程中起关键作用。国内外学者在白血病诱导分化的机制及策略方面开展了众多研究。本文对诱导白血病细胞定向分化为粒细胞、树突状细胞及巨噬细胞的研究概况及 PADI4 在白血病细胞定向分化中的机制研究进展作一综述。

关键词: 白血病; 诱导分化; 肽酰基精氨酸脱亚胺酶(PADI4); 全反式维甲酸

Key words: leukemia; differentiation induction; peptidylarginine deiminase 4 (PAD/PADI4); all-trans retinoic acid

中图分类号: R730.3

文献标识码: A

白血病是血液系统的常见病和多发病, 其发生的主要机制是由于造血细胞在某一分化阶段出现了分化障碍, 不能继续终末分化, 而保留其恶性增殖的能力。通过药物将白血病细胞定向诱导分化为成熟细胞或诱导细胞凋亡, 从而达到治疗的目的, 是治疗白血病的重要策略之一。这种疗法的主要特点是选择性诱导肿瘤细胞分化成熟后自然死亡, 而对正常组织细胞没有明显毒副作用, 因而定向诱导分化将成为白血病治疗的重要手段或途径。自恶性肿瘤细胞可以转化为较成熟细胞的方法提出以来, 肿瘤诱导分化疗法引起了国内外学者的广泛关注。国内外学者进行了大量的体外诱导分化实验, 建立诱导分化治疗模式, 研究白血病定向诱导分化关键机制, 并在粒系细胞、单核-巨噬细胞、红系细胞、淋巴细胞、以及树突状细胞(dendritic cell, DC)等定向诱导分化相关基础与临床研究方面都取得了较大的进展^[1-3]。现将白血病细胞诱导分化研究及肽酰基精氨酸脱亚胺酶(peptidylarginine deiminase, PAD/PADI)在白血病细胞诱导分化中的作用机制综述如下。

1 白血病细胞诱导分化

我国学者在体外实验研究的基础上, 分别首创全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)和三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的方法, 并获得成功^[1], 开创了临床诱导分化白血病细胞成功治疗白血病的先例。ATRA 成为目前国内治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)、骨髓异常增生等血液恶性疾病的临床首选药物。除此以外, 有关其他类型白血病的治疗至今没有取得明显的突破, 主要原因在于缺乏相对特异的新型终末分化诱导剂, 或者某些类型的白血病细胞难以发生终末分化^[2]。因此, 目前国内外学者把肿瘤诱导分化的研究重点转移到了新型终末分化诱导剂的发掘和白血病分化关键机制的研究。诱导白血病细胞向粒系细胞、DC 和巨噬细胞分化对白血病治疗有重要意义, 其诱导方法和机制是白血病治疗研究的热点。

1.1 诱导白血病细胞向粒系细胞分化

诱导白血病细胞向粒系细胞分化是临床诱导分化治疗的主要措施。ATRA 通过与维甲酸受体结合, 引起维甲酸受体低磷酸化, 导致受体融合蛋白的快速降解, 从而诱导抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)分化和促进急性早幼粒细胞白血病细胞结构、功能的恢复^[3], 是目前公认的诱导治

收稿日期: 2018-09-04; 修回日期: 2018-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(8150070); 山东省自然科学基金(ZR2016HP40); 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程。

* 通信作者, E-mail: linw1978@163.com.

疗急性早幼粒细胞白血病的首选药物。其发挥治疗白血病作用的主要机制是 ATRA 具有促进白血病细胞向粒系分化的功能。基于 ATRA 诱导的人早幼粒急性白血病细胞株 (HL60 细胞) 模型, 有研究发现 ATRA 可以促进 HL60 细胞内肽酰基精氨酸脱亚胺酶 4 (peptidylarginine deiminase, PAD/PADI4) 的表达。PADI4 可转移到细胞核内, 作为转录因子结合 sox4 的启动子促进白血病细胞的粒系分化^[4]。此外, ATRA 诱导人急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞粒系分化, 促进 CD11b 表达, 其作用机制为 ATRA 通过上调 TRIM22 表达, 使其靶向结合 eIF4E 而发挥作用^[5]。通过研究 ATRA 对白血病细胞的诱导分化作用机制及信号通路, 发现 PADI4 和 TRIM22 有望成为治疗急性早幼粒细胞白血病治疗的新靶点。协同 ATRA 作用的效应分子在促进白血病细胞粒系分化中的研究也有一些报道。去泛素酶 USP48 可以促进 ATRA 诱导的急性早幼粒细胞白血病细胞分化^[6]。星形孢菌素可以通过 MEK/ERK 信号通路增强 ATRA 对人白血病 U937 细胞向粒细胞系的分化^[7]。另外, 人类脐带间充质干细胞 (UC-MSCs) 能够诱导 APL 衍生的 NB4 细胞系以及原代 APL 细胞的粒细胞分化, 并且还以协同方式促进 ATRA 对白血病细胞诱导的分化^[8]。通过高通量蛋白质组筛选 ATRA 对白血病细胞粒系诱导分化的作用靶点及其可能作用机制^[9], 寻求新的治疗靶点, 为精准调控诱导白血病细胞的靶向分化奠定基础。

1.2 诱导白血病细胞向树突状细胞分化

树突状细胞 (DC) 是抗原提呈能力最强的一类免疫细胞, 调节固有免疫和适应性免疫应答, 参与肿瘤特异性主动免疫应答。至今已了解有几种可溶性因子如 GM-CSF、白介素-3 (interleukin-3, IL-3)、SCF 和 FLT3L 等与 DC 分化有直接的复杂关系^[10]。用内源的方法可将白血病细胞诱导分化成为 DC。粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF) 联合白介素 4 (IL-4) 是诱导髓源性 DC 的经典方法, 但这种方法在诱导白血病细胞向 DC 分化中的效果尚不满意, 存在诱导效率低、体内转输后不稳定、价格昂贵等缺点。中药与白血病细胞来源的成熟 DC 的关系引起越来越多的学者关注。在 GM-CSF/IL-4 联合适当浓度人参、附子的作用下, 白血病细胞可以诱导分化为 DC, 能明显增强白血病细胞源 DC 表型 (CD1a、CD80、CD83、HLA-DR) 的表达率、提高其刺激 T 淋巴细胞的增殖能力及培养上清液中 IL-12 的含量。人参皂苷 Ro 联合细胞因子 (GM-CSF 与 IL-

4) 促进人单核白血病细胞 (THP-1) 向 DC 分化的作用^[11]。虽然体外可以诱导白血病细胞分化, 但是却只能使一部分白血病细胞分化为 DC。在急性髓系白血病中常见的遗传改变是 FLT3 的内串联重复 (ITD)。FLT3-ITD 突变直接影响 DC 的发育, 间接调节 T 细胞的稳态和调节性 T 细胞的扩增, 这种效应可能会破坏免疫监视, 并促进白血病细胞的发生^[12]。遗传性的变异可能是不能有效全部诱导白血病细胞分化为 DC 的一个重要原因。选择合适有效的诱导因子和方法是促进白血病细胞向 DC 分化的关键。近年来, 源于急性髓细胞白血病患者的同种异体 DC 疫苗治疗白血病取得较好的治疗效果^[13]。因此, 开发有效诱导白血病细胞源 DC 的技术与方法有望在白血病治疗领域取得突破。

1.3 诱导白血病细胞向巨噬细胞分化

白血病细胞尤其是 M0、M1、M2、M3、M4 和 M5 型急性粒细胞性白血病细胞都可向单核-巨噬细胞诱导分化, 并且单核-巨噬细胞具有抗肿瘤功能。因此, 结合诱导分化疗法和巨噬细胞的功能调控, 将白血病细胞向巨噬细胞分化诱导具有重要意义。巨噬细胞是重要的免疫效应细胞, 可极化为 M1 和 M2 型巨噬细胞。M1 型又被称为经典活化的巨噬细胞 (classically activated macrophages), 由干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 或 TLR 激动剂 (如 LPS 等) 诱导, 具有较强的杀伤病原微生物和肿瘤细胞的功能, 可分泌 TNF- α 、白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6、IL-12 等细胞因子, 可诱导 Th1 型免疫应答^[14]。M2 型巨噬细胞, 又被称为替代活化的巨噬细胞 (alternatively activated macrophages), 可分为 M2a、M2b 和 M2c 亚型^[14]。M2a 由 IL-4、IL-13 诱导, 主要发挥促进创伤愈合的功能, 可分泌 CCL18、CCL22 等趋化因子, 高表达精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、Fizz1/Relma 和 YM1 等基因, 可诱导 Th2 型免疫应答。M2b 由免疫复合物和 TLR 或 IL-1R 的激动剂诱导, 主要发挥免疫调节功能, 可分泌 IL-10 等细胞因子。M2c 由 IL-10、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 或糖皮质激素等诱导, 主要发挥免疫调节功能, 可分泌 IL-10 等细胞因子^[14]。佛波酯 PMA 已被证实可通过促进 TGF- β /SMAD 信号的传导诱导白血病细胞株 K562 细胞向单核/巨噬细胞分化^[15]。虽然目前多种细胞分化诱导剂如佛波酯、维甲酸和 hexamethylene bisacetamide (HMBA) 等在细胞水平的实验中有良好的诱导分化作用, 但对机体副作用较多。此外, 中药重楼皂苷 D

能够明显上调慢性粒细胞白血病细胞株 K562 细胞表面分化抗原 CD14 的表达,诱导细胞向单核-巨噬细胞分化^[16]。

2 肽酰基精氨酸脱亚胺酶白血病诱导分化中的研究

以往研究发现肽酰基精氨酸脱亚胺酶(peptidyl-arginine deiminase, PAD/PADI)在白血病诱导分化过程中起关键作用。肽酰基精氨酸脱亚胺酶(peptidylarginine deiminase, PAD/PADI)是催化精氨酸转化为瓜氨酸的关键酶。人类 PAD 分别为 PADI、PAD2、PAD3、PAD4 和 PAD6,簇集在染色体 1P36.13 上。PAD 主要参与蛋白质的翻译后修饰,在 Ca^{2+} 离子存在下能将蛋白多肽链中的精氨酸(Arginine)残基催化成瓜氨酸(Citrulline),在细胞分化、凋亡以及基因调控等方面发挥重要作用。其中,PADI4 主要表达于造血组织,例如骨髓、脾和外周血的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞中。PADI4 的 cDNA 编码 663 个氨基酸,与其它 PADI 有 50% ~ 55% 序列同源性。PADI4 的高表达与细胞凋亡有关,而其低表达则与细胞分化有关。

2.1 PADI4 和肿瘤

PADI4 在白血病、结直肠癌、食管癌、乳腺癌等绝大多数恶性肿瘤患者血液中有特异性的高表达^[17],但在正常和良性肿瘤中不表达或者表达很低,表明 PADI4 与恶性肿瘤的发生、发展有关。PADI4 通过调控细胞的凋亡在肿瘤中发挥作用,其发挥作用的机制主要是:(1)PADI4 能够作为 p53、ELK1、p300、p21 等的协同调节因子^[18-19],调节 H2A、H3、H4 组蛋白的瓜氨酸化^[18]。PADI4 将组蛋白 H3 甲基化位点的精氨酸转变为瓜氨酸从而抑制 H3 甲基化,抑制 p53 对靶基因 OKL38、p21、CIP1、WAF1 等表达的调控,影响细胞凋亡和细胞周期^[19];介导 H4 精氨酸酶 3 的瓜氨酸化,导致 DNA 损伤部位染色质解凝,促进 p53 介导的细胞死亡。(2)PADI4 可将抗凝血酶(antithrombin, AT)瓜氨酸化,抑制了 AT 对凝血酶的抑制活性,而凝血酶活性的升高可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。(3)纤维连接蛋白(Fibronectin, Fn)可与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、整合素受体、生长因子等相互作用,在细胞黏附、迁移、分化及增殖等方面具有重要的作用,PADI4 可将其瓜氨酸化,促进肿瘤细胞的增殖和侵袭。瓜氨酸化的 Fn 与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的

结合增强,而与整合素受体的结合能力下降,且不能诱导 HL-60 细胞凋亡。(4)PADI4 也可通过对肿瘤细胞中细胞角蛋白(cytokeratin, CK)的瓜氨酸化干扰细胞凋亡进程。

2.2 PADI4 参与白血病细胞分化的作用机制及信号通路

在研究 ATRA 诱导的 HL-60 细胞分化过程中发现 PADI4 具有调节造血祖细胞增殖的作用^[20]。PADI4 在白血病细胞 HL-60 粒系分化过程中有促进分化的作用^[20]。调控 PADI4 活性状态,有可能使之成为调节白血病细胞分化的新靶点。在白血病细胞的分化过程中,PADI4 可能通过对下游蛋白或组蛋白 H2、H3、H4 的瓜氨酸化调控了细胞分化的关键基因或蛋白的功能。有研究表明,PADI4 能够催化 H3 组蛋白的瓜氨酸化,并且可以与 c-myc 基因上游的淋巴增强结合因子(lymphoid enhancer-binding factor 1)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase 1)结合,控制 c-myc 的表达,从而调控骨髓中多潜能祖细胞的增殖^[20]。PADI4 作为转录因子结合 sox4 启动子序列,调控其表达。而 sox4 可以靶向 PU.1—ETS 家族转录因子的表达^[4]。PU.1 是调节巨噬和粒系细胞分化中的一种非常重要的转录因子,决定细胞的粒系/巨噬细胞分化。因此,PADI4 可以通过 PADI4-Sox4-PU.1 这个途径发挥调节白血病细胞的粒系/巨噬细胞分化的功能^[4]。此外,PADI4 还可以通过调控 MAPK 信号通路中 p42/44 蛋白磷酸化参与白血病细胞 HL-60 的粒系分化过程。PADI4 有望成为治疗白血病,调控白血病细胞分化的重要靶点。调控 PADI4 的表达水平,促进其在白血病细胞分化中的作用将为治疗白血病提供新的研究思路。但目前调控 PADI4 活化的上游靶分子和信号通路尚不明确。除 ATRA 外,是否还有其他调控 PADI4 促进白血病细胞粒系分化的诱导剂尚待进一步研究。

3 展 望

现阶段白血病分化治疗仍具有挑战性,存在多种问题尚未解决:(1)临床可用药物少、机制尚不完全清楚;(2)实验室研发药物在临床应用中副作用大,效果不理想;(3)造成造血细胞分化功能异常的机制尚不完全清楚,遗传变异是导致造成造血细胞分化异常和治疗失败的重要因素;(4)精准靶向分化特异抗原提呈细胞具有挑战性和局限性。因此,深入研究造血细胞异常分化的机制,寻找靶向调控

造血细胞定向分化的新靶点,寻求适用于临床应用的靶向药物以及诱导白血病细胞定向分化的新靶点将成为未来白血病治疗研究的重点。近年来随着表观遗传学和干细胞技术研究的发展,使寻求新的高效低毒的诱导分化因子用于治疗白血病成为可能。通过调控决定白血病细胞分化的酶或转录因子,诱导白血病细胞特异分化,为精准靶向治疗白血病提供一个重要研究方向。比如是否存在特异调控 PADI4 的上游靶分子,使之成为靶向诱导白血病细胞分化的新诱导分子。此外, microRNA、lncRNA 在白血病细胞分化中的作用和潜在调节机制也逐渐受到关注,转录水平的调控对于精准靶向治疗白血病具有重要意义。再者,改进诱导白血病细胞定向分化的治疗方式方法的研究也将有助于提高白血病治疗的疗效。例如:协同联合治疗以加强诱导分化剂的诱导效果,减少机体对诱导分化剂的抵抗,选择合适有效的诱导方法以提高分化效率等。

参考文献:

- [1] RAVANDI F, STONE R. Acute promyelocytic leukemia: a perspective[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2017, 17(9): 543-4.
- [2] LIU L, LIU L, LEUNG LH, et al. Knockdown of SALL4 protein enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in acute myeloid leukemia cells[J]. J Biol Chem, 2015, 290(17): 10599-609.
- [3] SATO K, SAKAI H, SAIKI Y, et al. Correction to: cell dynamics during differentiation therapy with all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia [J]. Int J Hematol, 2018, 108(3): 274-81.
- [4] SONG G, SHI L, GUO Y, et al. A novel PAD4/SOX4/PU.1 signaling pathway is involved in the committed differentiation of acute promyelocytic leukemia cells into granulocytic cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(3):3144-57.
- [5] 韩杨,宋冠华,田静,等. TRIM22 靶向调控 eIF4E 在 NB4 细胞粒系定向分化过程中的作用与机制[J]. 国际肿瘤学杂志, 2017, V44(4):251-6.
- [6] LI L, WANG Y, ZHANG X, et al. Deubiquitinase USP48 promotes ATRA-induced granulocytic differentiation of acute promyelocytic leukemia cells[J]. Int J Oncol, 2018, 53(2):895-903.
- [7] SHI L, WENG XQ, SHENG Y, et al. Staurosporine enhances ATRA-induced granulocytic differentiation in human leukemia U937 cells via the MEK/ERK signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5):3072.
- [8] CHEN F, ZHOU K, ZHANG L, et al. Mesenchymal stem cells induce granulocytic differentiation of acute promyelocytic leukemic cells via IL-6 and MEK/ERK pathways[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(13):1955.
- [9] VAKRUSHEV IV, NOVIKOVA SE, TSVETKOVA AV, et al. Proteomic profiling of HL-60 cells during ATRA-induced differentiation [J]. Bull Exp Biol Med, 2018, 165(4):530-43.
- [10] CHISTIYAKOV DA, SOBENIN IA, OREKHOV AN, et al. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation [J]. Immunobiology, 2015, 220(6): 833-44.
- [11] 李紫薇,于宁,朱肖肖,等. 人参皂苷 Ro 促进 THP-1 细胞向 DC 分化的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(8):1170-6.
- [12] LAU CM, NISH SA, YOGEV N, et al. Leukemia-associated activating mutation of Flt3 expands dendritic cells and alters T cell responses[J]. J Exp Med, 2016, 213(3):415-31.
- [13] HOFFMANN JM, SCHMITT M, NI M, et al. Next-generation dendritic cell-based vaccines for leukemia patients [J]. Immunotherapy, 2017, 9(2):173-81.
- [14] MILLS CD, LEY K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity [J]. J Innate Immun, 2014, 6(6):716-26.
- [15] 潘素飞,任霞,史美燕,等. PMA 诱导 K562 细胞向单核细胞分化机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(14): 1049-53.
- [16] 蔡虹,杨春辉. 重楼皂苷 D 通过诱导凋亡及分化抑制 K562 细胞的增殖[J]. 国际肿瘤学杂志, 2017, V44(9):647-51.
- [17] WANG W, JI HJ, SUN NB, et al. B-cell specific moloney leukemia virus insert site 1 and peptidyl arginine deiminase IV positively regulate carcinogenesis and progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2017, 13(6):4349-56.
- [18] FAN L, ZONG M, GONG R, et al. PADI4 epigenetically suppresses p21 transcription and inhibits cell apoptosis in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(3):358-66.
- [19] STABER PB, ZHANG P, YE M, et al. The Runx-PU.1 pathway preserves normal and ML/ETO9a leukemic stem cells[J]. Blood, 2014, 124(15):2391-9.
- [20] NAKASHIMA K, ARAI S, SUZUKI A, et al. PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression[J]. Nat Commun, 2013, 4:1836.

(本文编辑:蒋湘莲)