

TET家族DNA羟化酶与5-hmC在肿瘤中的作用机制的研究进展

吴怡晨^{1,2} 凌志强^{1*}

(¹浙江省肿瘤医院浙江省肿瘤研究所, 杭州 310022; ²温州医科大学检验医学院生命科学学院, 温州 325035)

摘要 DNA甲基化失调引起基因表达异常是表观遗传学的一个显著特点。目前已知, 由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)催化DNA甲基化, 其酶基因突变或表达异常引起DNA甲基化水平的改变。近期研究发现了一种DNA去甲基化酶——TET(Ten-Eleven translocation)家族DNA羟化酶, 能通过多种途径催化5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)去甲基化, 从而调控DNA甲基化的平衡。5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)作为DNA去甲基化多重步骤中重要的中间产物, 其水平在肿瘤的发生和发展时期发生显著变化。该文从TET家族蛋白展开, 介绍TET蛋白的结构、功能及作用机制以及多种人类肿瘤中TET家族基因与5-hmC水平的相关性及其对肿瘤发生发展、诊断预后等临床意义的研究进展。

关键词 TET家族DNA羟化酶; 5-hmC; 肿瘤; α -KG

Research Advance of TET Family DNA Hydroxylase and 5-hmC in Neoplasm

Wu Yichen^{1,2}, Ling Zhiqiang^{1*}

(¹Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Province Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China;

²School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Dysregulated DNA methylation followed by abnormal gene expression is an epigenetic feature in neoplasm. It is well known that DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases, and the mutation of DNA methyltransferase gene and the aberrant expression influence the balance of DNA methylation. Recently, the enzyme for demethylating 5-methylcytosine were identified. TET (Ten-Eleven translocation) protein regulates the DNA demethylation pathway via various mechanisms. As a important intermediate product of DNA demethylation, the level of 5-hydroxymethylcytosine floats significantly in the period of tumor development. This review will detail the TET proteins from their structure, function, mechanism and introduce recent advances in researches on the relation between the biology significance of TET protein and 5-hmC regulation in various cancers. We also summarize the clinical significance of TET gene and 5-hmC in tumorigenesis and development.

Key words TET family DNA hydroxylase; 5-hmC; neoplasm; α -KG

早在1953年, 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)就被发现于T-even噬菌体中, 然而或许基于其生理功能的未知性和检测技术的局限

性, 5-hmC一直未被重视。直至近年, 随着TET蛋白去甲基化功能的发现, 5-hmC的产生机制成为研究热点。与5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)一样,

收稿日期: 2013-06-08 接受日期: 2013-09-05

浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ13H160002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88122587, E-mail: lingzq@hotmail.com

Received: June 8, 2013 Accepted: September 5, 2013

This work was supported by a Key Program from the Zhejiang Natural Sciences Foundation of China (Grant No.LZ13H160002)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88122587, E-mail: lingzq@hotmail.com

网络出版时间: 2013-11-25 10:22

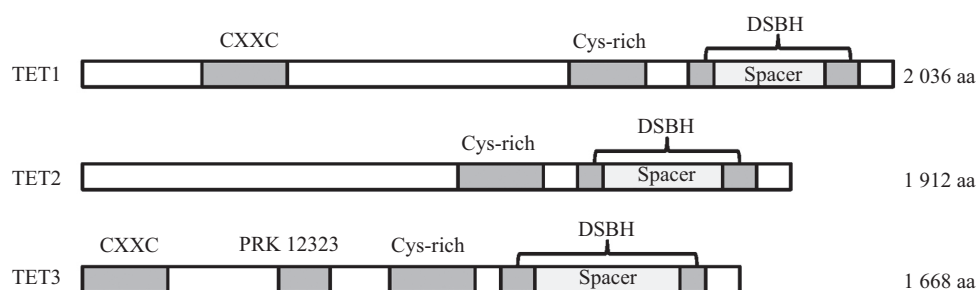
URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131125.1022.005.html>

5-hmC在基因组中的存在也表现出普遍性和动态性,并且参与重要的细胞功能调控。目前的研究范围主要涉及干细胞的多能性、细胞发育分化等,而与肿瘤相关的研究较少。已有一些研究证实, *TET*基因常突变于骨髓恶性肿瘤并影响着5-hmC水平,在人类实体肿瘤中5-hmC水平与肿瘤的发生、发展、预后有着显著相关性,然而*TET*基因和5-hmC在肿瘤中的调控机制仍未知。因此,深入研究*TET*基因与5-hmC在肿瘤中的调控机制将有助于我们更进一步地认识DNA甲基化失调在促进肿瘤发生发展中发挥的作用。

1 TET家族DNA羟化酶的结构与功能

TET家族蛋白是一种依赖 α -酮戊二酸(α -keto-glutarate, α -KG)和 Fe^{2+} 而发挥催化活性的双加氧酶。 α -KG和 O_2 作为协同底物,将一个氧原子连接到底物上形成羟基,另一个氧原子加到 α -KG上使得 α -KG脱羧生成 CO_2 和琥珀酸盐^[1]。哺乳动物的TET家族有三个成员: TET1、TET2、TET3, 相对应的编码基因分别位于10q21、4q24、2p13, 彼此在羧基末端催化域享有高度同源性^[2]。所有TET蛋白都含有一个具催化活性的羧基末端CD域(含Cys-rich域和DSBH域), 属于似Cupin双加氧酶超家族且显示出对 α -KG和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶活性。TET蛋白通过这些CD域氧化5-mC为5-hmC, 并依赖 α -KG作为酶活性的共底物^[3]。此外, TET蛋白的氨基末端含有锌指结构(CXXC), 其中TET1和TET3含有锌指结构(CXXC), 而TET2不含有(图1)^[4]。有研究表

明, *TET2*基因在进化的过程中经历一系列的染色体倒置, 最终分裂为一个编码催化域的片段和一个编码CXXC结构域的片段。*TET2*的祖先CXXC结构域片段已演化为一个单独的基因——*IDAX*, *IDAX*能结合未甲基化的CpG二核苷酸, 定位于启动子和CpG岛, 直接与*TET2*的催化域相互作用。然而有研究显示, *IDAX*的表达致使TET2蛋白下调^[5]。我们推测, TET2在介导DNA去甲基化的过程中需要其他蛋白的协助, 从而识别结合基因组的特定功能区域, 调控基因组的表观遗传状态。目前为止, TET蛋白的锌指结构域的功能还未完全阐明。有研究显示, TET1的锌指结构能够识别未修饰的胞嘧啶、5-mC和5-hmC, 并且更易结合在CpG含量高的区域^[6]。除了以上两个功能性结构域参与TET蛋白的活性外, TET蛋白还含有一个间隔区域和断裂的DSBH结构域, DSBH结构域具有DNA双加氧酶活性并能结合金属离子, 而间隔区域连接了断裂的DSBH区域的两个部分。这种独特的间隔区域在TET家族成员中是常见的, 不同TET蛋白的间隔区域长度各异。虽然这种间隔区域的功能还没有完全研究透彻, 但Upadhyay等^[7]研究表明, TET1的间隔区域和酿酒酵母RNA聚合酶II的CTD域具有显著的序列相似性, 而在与*TET2*突变相关的MDS中, 发现约1/4的突变对应于TET2的间隔区域, 强调了此区域的重要性^[8]。Dawlaty等^[9]双敲除胚胎干细胞和小鼠的*TET1*和*TET2*基因, 结果表明TET1和TET2蛋白的联合缺损会使5-hmC水平显著降低且促进全基因组高甲基化, 同时说明TET3在TET1



所有TET蛋白都含有一个CD结构域(包括Cys-rich结构域和DSBH结构域), 这些结构域显示出TET蛋白对2-OG和 Fe^{2+} 依赖性的双加氧酶活性。间隔区域连接了断裂的DSBH结构域。除了TET2蛋白, TET1和TET3蛋白均含有能与CpG岛结合的CXXC结构域。此外, TET3还含有一个特殊的PRK12323域。a.a: 氨基酸。

All TET contain a C-terminal CD domain (Cys-rich and DSBH regions) which exhibits 2-oxoglutarate(2-OG) and iron(II)-dependent dioxygenase activity and the spacer region bridges two parts of the disconnected DSBH region. TET1 and TET3, but not TET2 contain a CXXC domain which can bind CpG islands. TET3 also has a unique PRK12323 domain. a.a: amino acids.

图1 鼠TET家族蛋白结构域(根据参考文献[4]修改)

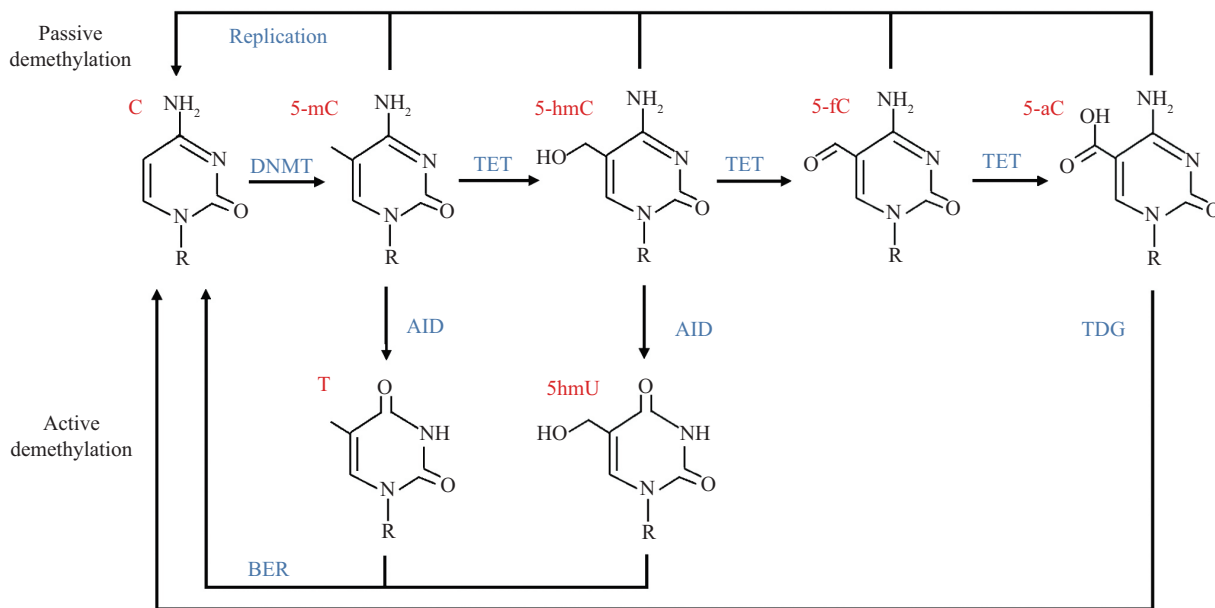
Fig.1 The domain structure of mouse TET family proteins (modified from reference [4])

和TET2缺损的情况下成为去DNA甲基化的主要贡献者。TET3还含有一个特殊的结构PRK12323域,此结构域不属于任何超家族且功能未知。

2 TET家族的催化机制

胞嘧啶5'碳端残基的甲基化作为一种稳定的表遗传学修饰已经被研究了数十年,5-mC在基因表达、基因组印迹和转座因子抑制中发挥着重要作用^[10]。传统上认为,DNA氧化会导致DNA损伤,并能被DNA修复途径移除。然而,最近的研究表明,5-mC转化为5-hmC的酶致氧化作用是一种稳定的DNA修饰^[11],且TET蛋白催化5-mC去甲基化可能存在多种途径和机制(图2)。5-mC和5-hmC能被活化诱导胞嘧啶脱氨酶(activation-induced cytosine deaminase, AID/AICD)催化而脱氨基,分别形成T和5-hmU。其中,5-hmC比5-mC对AID酶活性更敏感,这些脱氨基产物继而激活了碱基切除修复(base-excision repair, BER)途径从而介导DNA去甲基化^[12]。此外,TET蛋白不仅能氧化5-mC为5-hmC,还能继续氧化5-hmC为5-胞嘧啶甲酰(5-formylcytosine, 5-fC)和5-胞嘧啶

羧基(5-carboxylcytosine, 5-aC),5-fC和5-aC随即被胸腺嘧啶DNA糖基化酶(thymine DNA glycosylase, TDG)识别并切除,最终去除甲基^[13]。另外有研究证实,与父本基因相关联的5-hmC、5-fC和5-aC在受精卵早期发育过程中渐渐地丢失,这一过程提示了被动的DNA去甲基化是受精卵早期发育过程中的重要机制^[14]。TET蛋白介导DNA主动或被动去甲基化的机制提示DNA去甲基化的途径并非单一,且其过程涉及多种蛋白的参与。然而无论后续步骤是经过脱氨基途径、碱基切除修复途径,还是胸腺嘧啶糖基化酶切除途径,都需氧化5-mC生成5-hmC进而完成一个完整的DNA去甲基化循环。可见,TET蛋白氧化5-mC生成5-hmC是整个DNA去甲基化过程的必需步骤。5-hmC作为去甲基化的中间产物参与DNA去甲基化的过程,而TET蛋白则是调控DNA去甲基化的限制因子。有研究证实,5-hmC能抑制DNA甲基结合蛋白的结合^[15],且5-hmC不能被DNMT1识别,致使甲基化标志通过随后的DNA复制循环中逐渐丢失,在子链中形成新的未甲基化的胞嘧啶衍生物^[16]。此外,DNA去甲基的机制仍存在着



TET蛋白不仅能将5-mC氧化为5-hmC,还能将5-hmC继续氧化为5-fC和5-aC,5-aC能被TDG识别和切除进而形成无甲基化修饰的胞嘧啶。AID催化5-mC和5-hmC脱氨基形成胸腺嘧啶和5-hmU,这些脱氨基产物能激活BER途径介导的去甲基化反应,且5-hmC比5-mC对AID催化的脱氨基反应更敏感。5-mC和它的一系列氧化衍生物可能介导DNA复制依赖的被动去甲基化途径。

TET proteins not only oxidize 5-mC into 5-hmC, but also further oxidize 5-hmC into 5-fC and 5-aC which can be recognized and excised to produce an unmethylated cytosine by TDG. 5-mC and 5-hmC are deaminated to T and 5-hmU by AID. These deamination product activates BER pathway-mediated demethylation. 5-hmC is more sensitive than 5-mC to be deaminated by AID. 5-mC and its oxidative derivatives may undergo a passive demethylation pathway that is replication-dependent.

图2 DNA去甲基化途径和机制

Fig.2 DNA demethylation pathway in potential mechanisms

大量疑问,例如: TET蛋白各种结构域的具体功能、识别5-hmC的特异结合蛋白有哪些、是否存在5-fC脱甲酰基酶和5-aC脱羧酶介导DNA去甲基化、TET家族与DNMTs间对DNA甲基化水平的调控、5-hmC和TET家族在肿瘤发生发展中的作用等。

3 TET家族的突变与骨髓恶性肿瘤

3.1 TET1与骨髓恶性肿瘤

TET1蛋白的发现依赖于急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者中与编码组蛋白甲基转移酶的*MLL*(mixed lineage leukemia)基因易位形成的t(10;11)(q22;q23)融合体。*TET1*基因在各种组织包括造血细胞中表达。Burmeister等^[17]最近发现,*MLL-TET1*易位除了在AML中发生,也在急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)中发生。易位产生融合蛋白失去以往的功能或获得一个新的功能,这一特性是否导致癌变有待确定。目前为止,*TET1*基因在骨髓恶性肿瘤中的突变类型只发现易位突变。

3.2 TET2与骨髓恶性肿瘤

*TET2*基因突变已经在多种骨髓恶性肿瘤中被发现,包括急性髓细胞样白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、真性红细胞增多症、原发性骨髓纤维化、特发性血小板增多症、肥大细胞增多症等。Langemeijer等^[18]通过检测mRNA水平发现*TET2*基因在多种组织中表达,其中在造血细胞中表达最高,尤其是粒细胞。Gaidzik等^[19]采集了783例年轻的成年AML患者标本,发现其中60例标本含有*TET2*突变,包含66个突变、37个错义、16个移码、13个无义,除1例外,其余均为杂合突变。在大多数白血病中*TET2*突变是杂合的,野生型等位基因的表达仍存在,提示在大部分病患中,*TET2*或许起着抑癌基因的作用。Itzykson等^[20]测序了86例用阿扎胞苷(Azacitidine, AZA)处理的MDS和AML患者的*TET2*基因,有13例病患(15%)携带*TET2*突变。缓解率(包括血液学改善)在突变型为82%,在野生型为45%。*TET2*突变和细胞遗传学风险可独立地预测高缓解率,然而缓解持续时间和总生存率在突变型和野生型两组中不相上下。在高风险且伴低细胞计数的MDS和AML中,*TET2*状态可能是一个应答AZA的遗传学预测。*TET2*突变可以是骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPN)的早期事件^[21],

也可以是MPN向AML转化的晚期事件^[22]。Abdel-Wahab等^[21]分析63例MPN继发AML病患的几种涉及白血病转化的基因突变情况,发现*TET2*、*ASXL1*、*IDH1*突变在继发性急性髓系白血病(secondary acute myeloid leukemia, sAML)是常见的,且在MPN发生突变。虽然*TET2/ASXL1*突变在MPN克隆时发生,可能先于*JAK2*突变,但是*TET2*突变也经常发生在白血病转化的时候。研究认为,MPN和sAML的突变事件顺序因不同患者而异,*TET2*和*ASXL1*突变在MPN发病机制和白血病转化中具有特异角色。虽然理论上TET蛋白的酶活性的丧失会导致5-mC水平升高和5-hmC水平降低,但是*TET2*突变对DNA甲基化和5-hmC水平的影响在部分患者样本中出现了相反的结果。Ko等^[8]同时用HELP试验和LC-MS检测*TET2*突变的AML患者样本的全基因甲基化水平,揭示了高甲基化水平且伴低5-hmC水平。相反地,用Illumina Infinium 27k甲基化分析来检测*TET2*突变的MDS样本和其他慢性骨髓恶性肿瘤样本,发现DNA甲基化水平在高5-hmC水平的病患样本和正常对照中并无显著的差异,低5-hmC水平的病患样本相对于正常对照在差异甲基化CpG位点显示出低甲基化。目前,还不清楚这种差异是否来源于不同疾病间的差异或是不同检测方法对区分5-mC和5-hmC能力的差异。Chou等^[23]分析486例原发性AML成年患者中*TET2*的突变的情况。序列分析发现,在诊断时检测到含*TET2*突变的病例常常在复发时发生*TET2*突变丢失,在诊断时*TET2*没有突变的病例在复发时很少会获得*TET2*突变。*TET2*突变在疾病的演变过程中表现出不稳定性。Patel等^[24]分析398例AML病患中18个突变基因的预后相关性,发现*TET2*的突变与*IDH1*和*IDH2*的突变相互排斥,且在中等风险程度的AML中,*TET2*的突变与降低的总生存率显著相关,联合*FLT3-ITD*(internal tandem duplication)、*CEBPA*、*trisomy8*、*DNMT3A*、*MLL-PTD*(partial tandem duplication)的突变,可将中等风险程度的AML进一步细分,更准确地预测病患的预后。已有大量遗传学证据表明,TET蛋白是*IDH1/2*突变及致癌代谢产物羟戊二酸(2-hydroxyglutarate, 2-HG)的主要病理靶向。*IDH1/2*突变后产生的2-HG抑制TET蛋白介导的羟甲基化反应,*TET2*的功能失活突变与*IDH1/2*的突变最终都将导致全基因组高甲基化,*TET2*的突变与*IDH1/2*的突变相排斥。这

些现象预示着*TET2*基因与*IDH1/2*基因在造血转化的过程中可能共享相同的机制。然而, *IDH-TET*通路的假设还未被证实。虽然*TET2*的突变与*IDH1/2*的突变在AML中显示出一些相同的生物学效应, 但是*TET2*与*IDH1/2*突变的病患间存在许多不同的临床特点。*TET2*的突变与*IDH1/2*的突变对AML病患的生存影响也截然相反^[24]。因此, *TET2*的突变和*IDH1/2*的突变可能存在其他生物学效应还有待深入研究。

3.3 *TET3*与骨髓增生性疾病

至今, 关于*TET3*基因异常的报道仅有1例。这例难治性贫血伴环形铁粒幼细胞(RARS)和特发性骨髓纤维化的患者携带了2p23的缺失(*TET3*基因位于2p13)。目前, 对*TET3*是否在骨髓增生性疾病中拥有和*TET1*和*TET2*相似的角色有待研究。

4 5-hmC水平与人类实体肿瘤

至今为止, *TET*基因突变阻碍DNA去甲基化的现象仅在骨髓恶性肿瘤中发现, 并未在人类实体肿瘤中发现, 但大量相关研究揭示, 与正常组织相比, 实体肿瘤组织中5-hmC水平有所降低^[25]。

4.1 5-hmC与消化系统肿瘤

Kudo等^[26]先用免疫印迹对人结肠、肝、脑、肾、骨骼肌和肺的肿瘤组织与相应的正常组织进行对照分析, 发现肿瘤组织中5-hmC的荧光信号显著降低, 进而用斑点杂交对22例结肠直肠癌(CRCs)和12例胃癌(GC)样本进行分析, 发现5-hmC在72.7%(16/22) CRCs和75%(9/12) GC中是降低的。这些结果表明, 人类实体肿瘤中存在着某种机制导致5-hmC水平降低。检测发现, 5-mC水平在CRCs中高频地降低, 推测是否5-hmC的降低与5-mC的减少有关。通过用抗5-mC抗体斑点杂交分析, 发现5-hmC的降低并不总是对应5-mC减少, 提示5-hmC降低可能通过多种机制调节而不是5-mC减少后的继发反应。*TET*家族基因和*DNMT*家族基因分别能催化DNA去甲基化和甲基化反应, 因此*TET*家族和*DNMT*家族的基因表达对5-hmC水平有着至关重要的影响。通过对两个家族的基因表达分析, 与正常对照相比, 约50%(11/22) CRCs样本的*TET1*表达降低, 这些*TET1*低表达的样本中有73%(8/11)伴5-hmC降低, 再对5-hmC降低的样本进行*DNMT*表达的检测, 发现这些样本中约88%(7/8) *DNMT*表达升高。*TET2*表达在肿瘤样本和

正常对照中都非常低, 而*TET1*低表达与*TET3* mRNA降低密切相关。上调*DNMT*表达会导致5-hmC降低的原因仍未知, 推测可能有多种机制参与, 例如*DNMT*上调对*TET*基因表达有抑制作用。

4.2 5-hmC与脑肿瘤

*TET*家族蛋白是依赖 α -KG和 Fe^{2+} 双重辅因子而发挥催化活性的双加氧酶。其中, α -KG参与多种代谢途径包括三羧酸循环、蛋白质和核苷酸的羟化反应、补复作用、脂肪酸合成。人类细胞中有四种酶: 异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenase, *IDH1*)、*IDH2*、*IDH3*、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, *GDH*)可以催化产生 α -KG, α -KG水平的高低往往会影响*TET*蛋白的催化活性^[27]。编码*IDH1*、*IDH2*的基因高频突变于人类各种肿瘤, *IDH1*和*IDH2*的突变不仅失去正常的酶催化活性, 降低了 α -KG的产量, 并且获得了一个新的功能, 产生羟戊二酸(2-HG)。2-HG是一种在结构上类似于 α -KG的分子, 能拮抗 α -KG, 竞争性抑制多种 α -KG依赖性的双加氧酶, 包括组蛋白羟化酶和*TET*家族DNA羟化酶。

2008, 年癌基因组计划系统测序22例人多形性胶质母细胞瘤样本20 661个基因, 首次发现了*IDH1*的突变(R132H)^[28]。随后, 在多种肿瘤中检测到*IDH1*、*IDH2*的突变, 包括神经胶质瘤、星形胶质瘤、急性髓细胞样白血病、软骨瘤、甲状腺癌、胆管癌、前列腺癌、急性B淋巴细胞白血病、结肠直肠癌等。

Jin等^[29]用液相色谱/串联质谱LC/MS-MS评估5-hmC和5-mC在人脑肿瘤的水平。他们分析了6例正常脑组织DNA样本和33例二期/三期星形胶质瘤及2例胶质母细胞瘤DNA样本。正常人额前皮质DNA内5-hmC的水平介于0.82%~1.18% dG, 其中星形胶质细胞内5-hmC水平高达0.23% dG, 而脑肿瘤组织中5-hmC水平大幅度降低, 一些星形胶质瘤细胞内的5-hmC水平只有0.03%~0.04% dG, 降低了约30余倍。测定5-mC的水平发现, 只有部分脑肿瘤小幅度地降低, 推测5-hmC与5-mC之间没有明确的关联性。鉴定了16例含典型*IDH1*^{R132H}突变的二期/三期肿瘤, 17例不含*IDH1*突变的二期/三期肿瘤, 令人惊讶的是, 无论在低分化或高分化, *IDH1*突变或*IDH1*野生型的肿瘤组织内, 5-hmC水平没有明显差异。此结果的发现, 与先前报道*IDH1*突变生成2-HG抑制*TET*蛋白氧化作用导致5-hmC降低的结果相反, 并且

5-mC的水平在*IDH1*野生型和突变型的样本中也没有明显的区别。

Kraus等^[30]用免疫组化和同位素液相色谱质谱来检测5-hmC在人类脑组织和脑肿瘤组织内的存在与分布。他们发现在正常成人脑组织内,免疫组化显示,5-hmC阳性在皮质区内占61.5%,白质区占32.4%。而肿瘤组织阳性细胞率显著降低,介于1.1%(WHOIV级胶质母细胞瘤)至8.9%(WHOI级神经胶质瘤)之间。在正常成人脑组织中,液相色谱同样显示了皮质区的5-hmC水平最高,为1.17% dG,白质区的5-hmC水平为0.70% dG。而肿瘤组织的5hmC水平介于0.078% dG(WHOIV级胶质母细胞瘤)至0.24% dG(WHOII级弥漫性星形胶质瘤)之间。以上结果阐述了5-hmC水平在脑肿瘤中显著降低且与肿瘤分化程度相关。

Orr等^[31]用免疫组化评估5-hmC在神经胶质瘤中的分布($n=225$),发现在人脑瘤中,5-hmC水平在低度恶性肿瘤中较高,在恶性胶质瘤中显著减少。此外,还发现了恶性胶质瘤中低水平5-hmC和降低的存活率有显著相关性。In silico分析进一步支持这个结果,显示了侵袭性胶质母细胞瘤中基因差异表达参与了5-hmC的稳态。多种参与调节5-hmC水平的基因对恶性胶质瘤有预测性。这些结果表明,恶性胶质瘤中5-hmC可能是肿瘤的分化、侵袭能力和潜在的治疗靶点的一个重要的决定因素。

4.3 5-hmC与其他实体肿瘤

Lian等^[32]通过全基因组扩增技术发现,5-hmC水平在黑色素瘤中显著降低,重新引入活性TET2和*IDH2*重建黑色素瘤细胞中的5-hmC背景能抑制黑色素瘤的生长,且能增加动物模型的无瘤生存期。由此推测5-hmC参与黑色素瘤的发展,*IDH2*和TET蛋白的下调是致使5-hmC水平降低的机制之一。

Chen等^[33]用毛细管亲水相互作用液相色谱/四极杆-飞行时间串联质谱cHILIC/qTOFMS对肝癌组织和癌旁组织中的5-mC和5-hmC定量分析,结果表明肝癌组织中的5-hmC含量高于癌旁组织4~5倍,且5-hmC的含量与肿瘤分期高度相关。5-hmC水平降低有望成为一个肝癌早期诊断和预后的潜在标志物。

5-hmC作为TET氧化5-mC过程中的中间产物,其降低与多种肿瘤的发生发展有着一定的相关性。综上所述,5-hmC水平的降低可能通过以下几种机制: TET家族基因本身结构改变包括基因突变影响

了TET基因的表达,如TET2无义突变或染色体突变、*MLL-TET1*易位等,导致TET蛋白的活性降低和数量减少; *IDH1/IDH2*基因突变,不仅减少了 α -KG的数量,还生成了能与 α -KG竞争结合TET蛋白的2-HG,2-HG抑制TET蛋白的催化活性,导致虽然TET基因表达正常,但5-hmC水平却降低; DNMT蛋白功能性地与TET蛋白竞争结合DNA链, DNMT家族表达上调可能对TET家族表达有一定的抑制作用; BER和AID/APOBEC家族也介导5-hmC的去甲基化过程,因此, *APEX1*基因过表达可致使5-hmC减少; 癌细胞高水平增殖导致5-hmC被动地减少, DNA胞嘧啶的羟甲基化类似氧化损伤能阻止DNMT对目标胞嘧啶甲基化。

5 结语

TET基因的突变频繁在骨髓肿瘤中发生,且与骨髓肿瘤的发生和预后有着密切的关系,提示TET基因的突变将成为一个早期诊断标志和预后指标。而5-hmC作为一种新的表遗传学修饰,其水平的降低往往伴随于骨髓肿瘤和实体肿瘤的发生发展。这种紧密的相关性提示5-hmC可能成为一个有价值的肿瘤早期诊断标志物。然而, TET蛋白和5-hmC的功能和作用机制仍未阐明, 5-hmC水平的波动在人类肿瘤中的机制和意义还有待研究。

参考文献 (References)

- 1 Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H, *et al.* Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev* 2012; 26(12): 1326-38.
- 2 Mohr F, Dohner K, Buske C, Rawat VP. TET genes: New players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Exp Hematol* 2011; 39(3): 272-81.
- 3 Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324(5929): 930-5.
- 4 Tan L, Shi YG. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development* 2012; 139(11): 1895-902.
- 5 Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, Aijo T, Pastor WA, *et al.* Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature* 2013; 497(7447): 122-6.
- 6 Xu Y, Wu F, Tan L, Kong L, Xiong L, Deng J, *et al.* Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell* 2011; 42(4): 451-64.

- 7 Upadhyay AK, Horton JR, Zhang X, Cheng X. Coordinated methyl-lysine erasure: Structural and functional linkage of a Jumonji demethylase domain and a reader domain. *Curr Opin Struct Biol* 2011; 21(6): 750-60.
- 8 Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 2010; 468(7325): 839-43.
- 9 Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Barrasa MI, Cheng AW, *et al.* Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell* 2013; 24(3): 310-23.
- 10 Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, *et al.* Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 2011; 333(6047): 1300-3.
- 11 Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: Many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(9): 607-20.
- 12 Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 2011; 145(3): 423-34.
- 13 He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 2011; 333(6047): 1303-7.
- 14 Inoue A, Zhang Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* 2011; 334(6053): 194.
- 15 Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 2004; 32(14): 4100-8.
- 16 Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007; 67(3): 946-50.
- 17 Burmeister T, Meyer C, Schwartz S, Hofmann J, Molkentin M, Kowarz E, *et al.* The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results from the GMALL study group. *Blood* 2009; 113(17): 4011-5.
- 18 Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, *et al.* Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009; 41(7): 838-42.
- 19 Gaidzik VI, Paschka P, Spath D, Habdank M, Kohne CH, Germing U, *et al.* TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): Results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol* 2012; 30(12): 1350-7.
- 20 Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, *et al.* Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2011; 25(7): 1147-52.
- 21 Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, *et al.* Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010; 70(2): 447-52.
- 22 Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, *et al.* Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010; 115(10): 2003-7.
- 23 Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, *et al.* TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood* 2011; 118(14): 3803-10.
- 24 Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366(12): 1079-89.
- 25 Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, Esopi DM, Gerber J, Pellakuru LG, *et al.* Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* 2011; 2(8): 627-37.
- 26 Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, *et al.* Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 670-6.
- 27 Yang H, Ye D, Guan KL, Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: Mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* 2012; 18(20): 5562-71.
- 28 Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321(5897): 1807-12.
- 29 Jin SG, Jiang Y, Qiu R, Rauch TA, Wang Y, Schackert G, *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res* 2011; 71(24): 7360-5.
- 30 Kraus TF, Globisch D, Wagner M, Eigenbrod S, Widmann D, Munzel M, *et al.* Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *Int J Cancer* 2012; 131(7): 1577-90.
- 31 Orr BA, Haffner MC, Nelson WG, Yegnasubramanian S, Eberhart CG. Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PLoS One* 2012; 7(7): e41036.
- 32 Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, *et al.* Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 2012; 150(6): 1135-46.
- 33 Chen ML, Shen F, Huang W, Qi JH, Wang Y, Feng YQ, *et al.* Quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA from hepatocellular carcinoma tissues by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/quadrupole TOF mass spectrometry. *Clin Chem* 2013; 59(5): 824-32.