

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.19.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 19-0028-06

临床研究 · 论著

尼洛替尼和伊马替尼对慢性粒细胞白血病表达谱的影响*

荆凌华, 刘松年, 马利敏, 杨海平

(河南科技大学第一附属医院 血液科, 河南 洛阳 471023)

摘要: **目的** 探索尼洛替尼和伊马替尼对慢性粒细胞白血病 (CML) 细胞基因表达谱的影响, 阐明酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 抑制白血病的分子机制。 **方法** 从在线基因表达数据库中下载表达谱数据集 GSE19567, 利用 BRB-ArrayTools 软件进行质量控制并筛选差异表达基因 (DEGs), 然后分别对差异基因进行 GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析、pathway 互作网络和基因互作网络分析。 **结果** 共筛选出差异基因 519 个, 其中 177 个上调表达, 342 个下调表达。GO 富集分析发现 DEGs 主要涉及小分子代谢、血液凝固、转录调控、细胞增殖与凋亡调控等生物过程, 发挥的分子功能集中在蛋白结合、蛋白二聚化、序列特异性 DNA 结合和 ATP 结合等。KEGG 富集分析发现代谢通路、PI3K-Akt 信号通路、Jak-STAT 信号通路和 HIF-1 信号通路等 pathway 显著富集。网络分析挖掘出的核心基因有 SHMT2、CBS、CTH、HK2, 核心 pathway 包括 MAPK 信号通路、细胞周期和细胞凋亡等。 **结论** 酪氨酸激酶抑制剂影响了 CML 细胞代谢通路和信号转导通路的相关基因, 通过细胞周期阻滞和诱导凋亡等机制抑制白血病, 为白血病的靶向治疗提供了基础。

关键词: 白血病; 酪氨酸激酶抑制剂; 尼洛替尼; 伊马替尼; 细胞凋亡

中图分类号: R733.7; R551

文献标识码: A

Effect of Nilotinib and Imatinib on expression profile of chronic myelocytic leukemia*

Ling-hua Jing, Song-nian Liu, Li-min Ma, Hai-ping Yang

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Nilotinib and Imatinib on gene expression profile of chronic myelocytic leukemia (CML) cells and clarify the molecular mechanism underlying the suppression of tyrosine kinase inhibitors against leukemia. **Methods** The expression profiling dataset GSE19567 was downloaded from the online Gene Expression Omnibus database. The BRB-ArrayTools software was applied to control quality and identify the differentially-expressed genes (DEGs), then the GO function enrichment, KEGG pathway enrichment, pathway relation network, and gene interaction network analyses were performed based on these differential genes. **Results** In total, 519 differential genes were screened out, of which 177 genes were up-regulated and 342 genes were down-regulated. GO enrichment analysis revealed that DEGs were mainly involved in biological processes of small molecule metabolism, blood coagulation, transcriptional regulation, regulation of cell proliferation and apoptosis, and performed the molecular functions of protein binding, protein dimerization activity, sequence-specific DNA binding and ATP binding. KEGG analysis showed that DEGs were mostly enriched in metabolic pathway, PI3K-Akt signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway, and HIF-1 signaling pathway. The network analyses identified the

收稿日期: 2017-10-15

* 基金项目: 河南省洛阳市科技计划项目 (No: 1503007A-4)

hub genes such as SHMT2, CBS, CTH and HK2, and core pathways including MAPK signaling pathway, cell cycle and apoptosis. **Conclusions** Tyrosine kinase inhibitors affect the genes involved in metabolic and signal transduction pathways, and the mechanism of suppression of CML cells may include cell cycle arrest and induction of apoptosis, which provides the foundation for further developing targeted treatments for leukemia.

Keywords: leukemia; tyrosine kinase inhibitor; Nilotinib; Imatinib; apoptosis

慢性粒细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML) 是一种起源于造血干细胞的恶性增殖性疾病, 以 t(9:22)(q34:q11) 染色体易位形成的 BCR-ABL 融合基因为主要特征, 该基因编码的 BCR-ABL 融合蛋白可以持续性活化酪氨酸激酶活性。酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 伊马替尼作为首个上市的分子靶向药物, 能够抑制 BCR-ABL 蛋白激酶, 在 CML 的靶向治疗方面取得很好的效果。然而随着临床的广泛应用, 部分患者出现耐药性。伊马替尼耐药性是由多种机制引起的, 其中 BCR-ABL 激酶的点突变是最常见的耐药机制^[1-2]。第 2 代 TKIs 尼洛替尼和达沙替尼等能够克服大部分突变体产生的耐药性, 但对 T315I 突变型 BCR-ABL 激酶引起的耐药无效, 已有多项研究表明, 尼洛替尼能够安全有效地治疗伊马替尼耐药或不耐受的 CML 患者, 表现出很好的应用前景^[3-5]。本研究从基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中下载尼洛替尼和伊马替尼处理后 CML 细胞的基因表达谱数据, 筛选出因 TKIs 处理而改变的差异基因并进行生物信息学挖掘, 阐明 TKIs 对 CML 基因表达和功能的影响以及分子机制, 为白血病的靶向治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

从在线 GEO 数据库中下载 GSE19567 数据集, 该数据集由 Bruennert D 和 Neumann F 提交, 包含 12 个样品的表达谱芯片数据 (GSM487683-GSM487694)。实验设计方案为 CML 细胞系 K562 以 0.05 μmol 尼洛替尼或 0.50 μmol 伊马替尼处理 24 h, 对照组以 DMSO 处理, 分别提取处理后 K562 细胞的总 RNA, 采用 GPL571 检测平台, 即 Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array 进行芯片检测, 各有 4 个生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 差异表达基因筛选 将下载的 GSE19567 数据集 CEL 文件输入 BRB-ArrayTools 软件, 进行基因芯片信号值的预处理、标准化和过滤, 然后采用 SAM 方法统计各个样品中每个基因的显著水平 P 值和误

判率 Q 值, 筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的标准为 $P < 0.05$, $Q < 0.05$, 差异倍数 ≥ 2 倍。同时计算基因与样本间的相关性, 按照先基因、后样本的顺序将 DEGs 表达数据进行层次聚类分析, 连接方法为 Average Link。

1.2.2 GO 功能富集分析 基因本体 (gene ontology, GO) 是标准化的基因功能分类体系, 包括细胞组分、分子功能和生物过程 3 个类别。本研究把筛选的 DEGs 向 GO 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 映射, 计算每个 GO 条目映射到的差异基因数目, 采用 Fisher 检验统计 GO 富集的概率值, 并用 Benjamini-Hochberg 法进行调整以控制错误发现率 (false discovery rate, FDR), 显著富集 GO 条目的标准为 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$ 。

1.2.3 KEGG 通路富集分析 KEGG 数据库有助于把基因及其表达情况以整体网络形式进行全面研究, 能够从大规模分子水平信息注解生物系统的高级功能。本研究基于 KEGG 数据库, 采用 Fisher 精确检验统计 DEGs 在 Pathway 中的富集程度, $P < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$ 的 pathway 定义为显著富集的 pathway。

1.2.4 互作网络分析 基于 KEGG 数据库中基因表达产物之间的相互作用, 在 Pathway 数据库内搜索 DEGs 的正向和反向基因, 再依据差异基因与其正反向作用关系描绘基因间的连接线, 圆圈表示基因, 线段表示相互作用, 从而构建基因互作网络。以 Pathway 为单位, 利用图论的方法将显著富集的 Pathway 根据 KEGG 数据库中的相互关系构建 pathway 互作网络, 进而分析显著性 Pathway 之间的传导关系^[6]。

2 结果

2.1 差异基因筛选结果

下载 GEO 数据库中的 GSE19567 数据集, 以 DMSO 处理的 K562 细胞为对照组, 尼洛替尼或伊马替尼处理的 K562 细胞为实验组, 根据筛选标准, 从尼洛替尼处理的 CML 细胞表达谱芯片数据中筛选出 1 517 个 DEGs, 包括上调基因 328 个, 下调基因 1 189 个, 层次聚类图见图 1; 从伊马替尼处理的 CML 细胞

表达谱数据中筛选出 692 个 *DEGs*, 包括上调基因 250 个, 下调基因 442 个, 层次聚类图见图 2。取交集后共得到 519 个 *DGEs*, 包括上调基因 177 个, 下调基因 342 个, 部分差异基因见表 1。

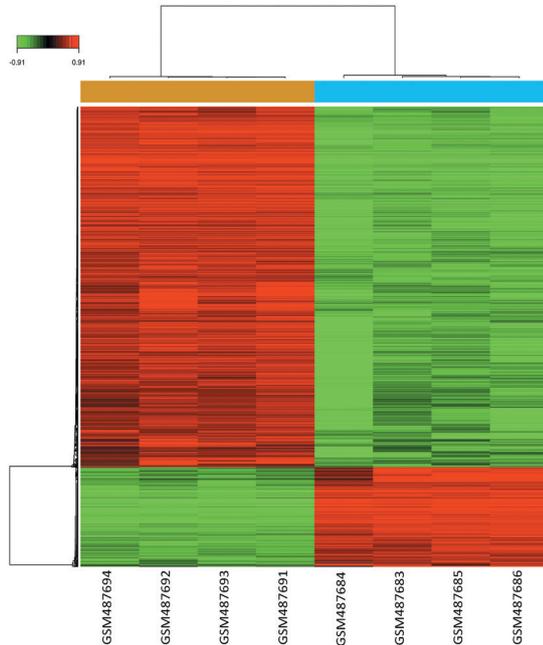


图 1 尼洛替尼影响的差异基因聚类分析

2.2 GO 功能富集分析

将筛选出的 *DEGs* 进行 GO 功能注释后发现, 显著富集的生物过程类别共 264 个 GO 条目, 主要涉及小分子代谢、血液凝固、转录调控、细胞增殖与凋亡

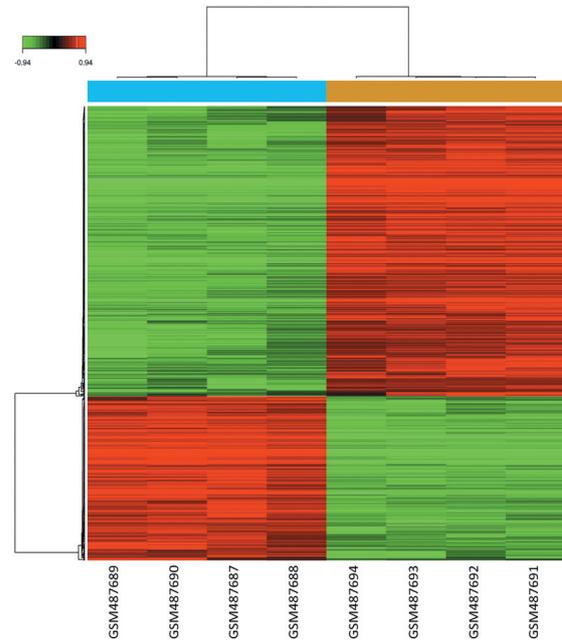


图 2 伊马替尼影响的差异基因聚类分析

表 1 部分差异表达基因列表

探针编号	基因名称	存取号	基因描述
202431_s_at	<i>MYC</i>	NM_002467	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
207957_s_at	<i>PRKCB</i>	NM_002738	protein kinase C, beta
214095_at	<i>SHMT2</i>	NM_001166356	serine hydroxymethyltransferase 2
203685_at	<i>BCL2</i>	NM_000633	B-cell CLL/lymphoma 2
200951_s_at	<i>CCND2</i>	NM_001759	cyclin D2
200690_at	<i>HSPA9</i>	NM_004134	heat shock 70kDa protein 9
202934_at	<i>HK2</i>	NM_000189	hexokinase 2
207106_s_at	<i>LTK</i>	NM_001135685	leukocyte receptor tyrosine kinase
212816_s_at	<i>CBS</i>	NM_000071	cystathionine-beta-synthase
203394_s_at	<i>HES1</i>	NM_005524	hairy and enhancer of split 1

调控等; 显著富集的分子功能类别共 80 个 GO 条目, 主要集中在蛋白结合、蛋白二聚化活性、序列特异性 DNA 结合和 ATP 结合等。GO 富集分析中生物过程类别和分子功能类别富集水平最显著的前 10 个 GO 条目见表 2、3。

2.3 KEGG 通路富集分析

以 KEGG 数据库中的 Pathway 为单位, 将筛选出的 *DEGs* 向整个背景基因组映射, 结果发现代谢通路、氨基酸合成、PI3K-Akt 通路和 Jak-STAT 通路等 60 个 Pathway 显著富集, 其中富集水平最显著的前 10 个 Pathway 见表 4。

表 2 差异基因 GO 富集分析 (生物过程类别)

GO 索引号	GO 名称	差异基因数 / 个	P 值	错误发现率 /%
0044281	小分子代谢	71	1.68E-25	3.47E-22
0007596	血液凝固	32	3.72E-15	3.85E-12
0000122	转录负性调控	33	7.45E-15	5.14E-12
0043066	凋亡负性调控	31	7.17E-14	3.71E-11
0045893	转录正性调控	31	1.05E-13	4.36E-11
0008285	细胞增殖负性调控	24	2.22E-11	7.66E-09
0045892	DNA 依赖的转录负性调控	26	6.88E-11	2.03E-08
0034641	细胞内含氮复合物代谢	17	1.82E-10	4.70E-08
0006915	凋亡过程	30	7.34E-10	1.38E-07
0001666	缺氧反应	15	1.13E-09	1.94E-07

表 3 差异基因 GO 富集分析 (分子功能类别)

GO 索引号	GO 名称	差异基因数 / 个	P 值	错误发现率 /%
0005515	蛋白结合	219	1.24E-70	7.77E-68
0042803	蛋白同源二聚化活性	37	1.17E-16	3.65E-14
0003700	序列特异性 DNA 结合转录因子活性	42	2.24E-13	4.68E-11
0005524	ATP 结合	52	6.90E-12	1.08E-09
0030170	吡哆醛磷酸盐结合	10	1.69E-09	2.12E-07
0005344	氧运输活性	6	2.35E-08	2.45E-06
0043565	序列特异性 DNA 结合	24	4.75E-08	4.24E-06
0020037	血红素结合	12	1.42E-07	1.11E-05
0046982	蛋白同源二聚化活性	19	1.76E-07	1.22E-05
0019825	氧结合	7	3.03E-07	1.89E-05

表 4 差异基因 pathway 富集分析

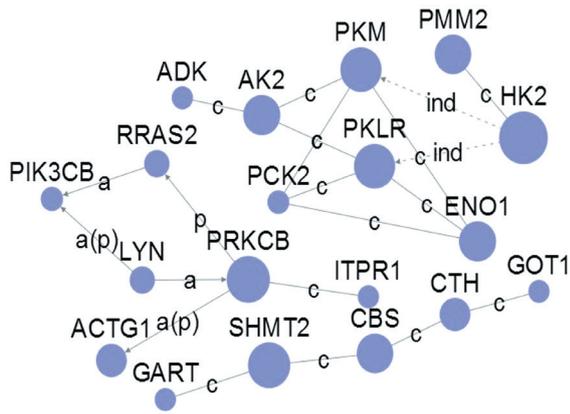
Pathway 索引号	Pathway 名称	差异基因数 / 个	P 值	错误发现率 /%
01100	代谢通路	64	9.43E-24	2.01E-21
01230	氨基酸生物合成	16	2.95E-16	3.14E-14
04066	HIF-1 信号通路	11	1.09E-07	5.94E-06
04630	Jak-STAT 信号通路	13	1.12E-07	5.94E-06
04151	PI3K-Akt 信号通路	18	4.20E-07	1.61E-05
00260	甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢	7	4.54E-07	1.61E-05
05205	肿瘤蛋白多糖	14	1.22E-06	3.56E-05
00860	卟啉和叶绿素代谢	7	1.34E-06	3.56E-05
00970	氨酰-tRNA 生物合成	8	1.52E-06	3.61E-05
05202	肿瘤转录失调	12	3.44E-06	6.96E-05

2.4 互作网络分析

根据 KEGG 数据库中蛋白质之间的作用关系而

构建的基因互作网络图见图 3, 圆点为差异基因, 连线表示 2 个差异基因间的作用关系。圆点的大小代

表 betweenness 值，圆点越大，表明该差异基因在互作网络中越重要，网络中的核心基因包括 SHMT2 (betweenness=142)、CBS (betweenness=108)、CTH (betweenness=108)、HK2 (betweenness=64)。基于 KEGG 数据库中信号通路的正反向关系，构建 pathway 之间的互作关系网络图 (见图 4)，圆点表示通路，带箭头的实线表示两个通路之间的上下游关系。圆点



a: 激活 activation; c: 代谢作用 compound; p: 磷酸化 phosphorylation; ind: 间接作用 indirect

图 3 差异基因相互作用网络分析

3 讨论

BCR-ABL 激酶能够活化 PI3K、Ras、Jak-STAT 等信号通路，干扰正常的细胞周期和增殖分化，促进白血病的发生和发展。伊马替尼高度特异地占据 BCR-ABL 激酶非活化构象上的 ATP 结合位点，阻碍 ATP 的鸟嘌呤与 BCR-ABL 结合和 ATP 磷酸化，进而显著抑制 ABL 酪氨酸激酶的催化活性，特异地抑制 BCR-ABL 细胞的增殖。以甲基咪唑环置换伊马替尼的 N-甲基哌嗪基团，并在苯环上连接三氟甲基，得到新型高亲和力和 ATP 竞争性抑制剂尼洛替尼。尼洛替尼也是结合非活化构象的 ABL 激酶，使 P-环折叠覆盖 ATP 结合位点，形成 BCR-ABL 激酶的无活性构象^[7]。有研究表明，伊马替尼和尼洛替尼也能够有效抑制血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和 c-Kit 受体的酪氨酸激酶^[8-9]。BCR-ABL 激酶抑制剂从单靶点发展到多靶点，不断提高其有效性和选择性，以克服各种突变型激酶引起的耐药。

为进一步探索尼洛替尼与伊马替尼在治疗 CML 时对基因表达和功能的影响，本研究从 GEO 数据库中下载 GSE19567 数据集，对 TKIs 处理后 CML 细胞的表达谱进行分析，共筛选出 519 个差异基因。GO 功

大小代表 degree 值，圆点越大，表明与之有正反向关系的通路数目越多，在网络中的作用也越重要，核心 pathway 包括 MAPK 信号通路 (degree=18)、细胞凋亡 (degree=15)、细胞周期 (degree=14) 和肿瘤通路 (degree=14)，其中肿瘤通路是上游调控通路，MAPK 信号通路、细胞凋亡和细胞周期主要作为反向效应通路。

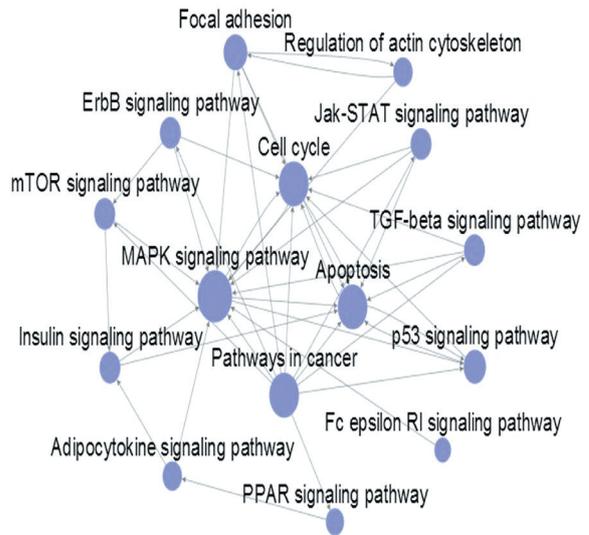


图 4 Pathway 相互作用网络分析

能和 KEGG 通路富集分析发现该差异基因主要涉及小分子代谢、血液凝固、转录调控、细胞增殖与凋亡调控等生物学过程，主要参与代谢通路、氨基酸合成、PI3K-Akt 通路和 Jak-STAT 通路等 Pathway。基因互作网络分析筛选的核心基因包括 SHMT2、CBS、CTH、HK2、MAPK 信号通路、细胞凋亡、细胞周期和肿瘤通路等核心 Pathway 在 Pathway 互作网络中发挥主要作用，该基因和通路可能是 TKIs 抑制白血病的潜在靶点。SHMT2 基因编码丝氨酸羟甲基转移酶 2，主要催化甘氨酸合成，也参与一碳代谢、细胞增殖调控等过程。CBS 基因编码胱硫醚 β 合酶，涉及同型半胱氨酸、胱氨酸、丝氨酸等氨基酸代谢过程。有研究发现^[10]，CBS 表达水平与巨核细胞白血病中骨髓细胞对阿糖胞苷的敏感性密切相关。胱硫醚-γ-裂解酶 CTH 催化胱硫醚转变为半胱氨酸，涉及含硫氨基酸代谢、促进 NF-κB 转录因子活性、抑制凋亡信号通路等过程。HK2 在葡萄糖稳态、缺血反应、凋亡线粒体改变、线粒体膜通透性调控等过程发挥作用，在急性髓系白血病 FLT3/ITD 突变通过上调线粒体中 HK2 的表达引起有氧糖酵解增加，使得白血病细胞高度依赖于糖酵解；另外三氧化二砷能够抑制 HK2，而 HK2

的过表达减少三氧化二砷所诱导细胞凋亡^[11-13]。TKIs 处理后 CML 细胞中 *SHMT2*、*CBS*、*CTH*、*HK2* 等基因表达下调, 引起代谢通路和信号转导通路变化, 活化 MAPK、Jak-STAT 信号通路, 阻滞细胞周期, 最终抑制白血病细胞的增殖和诱导其发生凋亡。

总之, TKIs 影响 CML 细胞代谢通路和信号转导通路的相关基因, 通过激活 MAPK 通路、细胞周期阻滞和诱导凋亡等分子机制抑制白血病, 为白血病的分子靶向治疗提供基础, 对设计和开发新型 BCR-ABL 激酶抑制剂也提供有价值的指导。

参 考 文 献:

- [1] QUINTÁS-CARDAMA A, KANTARJIAN H, CORTES J. Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(10): 834-848.
- [2] 石淙, 万腊根. 慢性粒细胞白血病 bcr/abl 融合基因 T315I 点突变的检测及靶向治疗 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(30): 3700-3702.
- [3] OHANIAN M, CORTES J, KANTARJIAN H, et al. Tyrosine kinase inhibitors in acute and chronic leukemias[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2012, 13(7): 927-938.
- [4] KIM S H, MENON H, JOOTAR S, et al. Efficacy and safety of radotinib in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors[J]. *Haematologica*, 2014, 99(7): 1191-1196.
- [5] 文锋, 李君君, 颜家运. 尼洛替尼治疗耐药或不耐受慢性粒细胞白血病的临床随访研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(27): 97-100.
- [6] ZHUANG Q, MAO W, XU P, et al. Identification of differential genes expression profiles and pathways of bone marrow mesenchymal stem cells of adolescent idiopathic scoliosis patients by microarray and Integrated gene network analysis[J]. *Spine*, 2016, 41(10): 840-855.
- [7] 李琳毅, 徐云根. BCR-ABL 激酶抑制剂的研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(7): 954-962.
- [8] KADIVAR A, KAMALIDEHGHAN B, AKBARI J H, et al. Antiproliferation effect of imatinib mesylate on MCF7, T-47D tumorigenic and MCF 10A nontumorigenic breast cell lines via PDGFR- β , PDGF-BB, c-Kit and SCF genes[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 469-481.
- [9] LLAMAS-VELASCO M, STEEGMANN J L, CARRASCOSA R, et al. Perforating folliculitis in a patient treated with nilotinib: a further evidence of C-kit involvement[J]. *Am J Dermatopathol*, 2014, 36(7): 592-593.
- [10] GE Y, JENSEN T L, MATHERLY L H, et al. Transcriptional regulation of the cystathionine-beta -synthase gene in down syndrome and non-down syndrome megakaryocytic leukemia cell lines[J]. *Blood*, 2003, 101(4): 1551-1557.
- [11] JU H Q, ZHAN G, HUANG A, et al. ITD mutation in FLT3 tyrosine kinase promotes warburg effect and renders therapeutic sensitivity to glycolytic inhibition[J]. *Leukemia*, 2017, 31(10): 2143-2150.
- [12] XIA H G, NAJAFOV A, GENG J, et al. Degradation of HK2 by chaperone-mediated autophagy promotes metabolic catastrophe and cell death[J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(5): 705-716.
- [13] ZHANG H N, YANG L, LING J Y, et al. Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by arsenic[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(49): 15084-15089.

(张蕾 编辑)