

DNA 甲基化与食管癌的研究进展*

白剑综述,杜振宗,宋剑非[△]审校

(桂林医学院第二附属医院胸心血管外科,桂林 541199)

[关键词] 食管肿瘤;表观遗传学;DNA 甲基化

[中图分类号] R655.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)24-3436-03

表观遗传学是当今生物医学研究领域最具有前景的领域之一。表观遗传学是指基因在表达水平的可遗传性改变(并非 DNA 序列改变引起),包括 DNA 甲基化,组蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化,染色质构型改变等,其中最主要的是 DNA 甲基化^[1]。DNA 甲基化是指胞嘧啶核苷酸(C)由 S-甲基硫氨酸供应甲基,在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的催化下将其第 5 位碳原子变为 5'-甲基胞嘧啶(5C'-mC)的一种反应^[2]。人类基因的 50% 其 5' 端可发现 CpG 岛, CpG 岛的甲基化能抑制转录。健康人的 CpG 位点位于 CpG 岛内者常为非甲基化,位于 CpG 岛外者常为甲基化;而患肿瘤者其 CpG 岛为区域性高甲基化, CpG 岛外为广泛低甲基化^[3]。如果抑癌基因 CpG 岛内的 CpG 序列发生高甲基化,该抑癌基因的旋转程度会增加,使其不能表达,进而诱发肿瘤。

1 食管癌与 DNA 甲基化

食管癌是我国一种常见的恶性肿瘤,其发病诱因和影响因素较多,近年来研究发现,表观遗传学在食管癌的发生发展过程中起到重要作用。目前,表观遗传学修饰方式中被研究得最多的就是甲基化。抑癌基因启动子区 CpG 岛的高甲基化在食管癌患者体内非常常见^[4]。

1.1 食管癌中相关抑癌基因与 DNA 甲基化 研究发现,食管癌的发生发展与抑癌基因启动子区的 CpG 岛异常甲基化密切相关,它已成为近年研究热点。多种基因甲基化出现在食管癌患者体内:腺瘤样结肠息肉易感基因(APC)、周期依赖性激酶蛋白(p16INK4a)、细胞黏附相关基因(CDH1、CDH13)、脆性组氨酸三联体基因(FHIT)等^[5]。

1.1.1 P16 p16 基因作为人类肿瘤中最常见的抑癌基因,属于 INK4I(cyclin-dependent kinase 4 inhibitors)家族。定位于人类染色体 9p21 上,全长 85 kb,由 3 个外显子和 2 个内含子组成。大量的肿瘤组织相关研究结果证明,p16 基因启动子甲基化在食管鳞状细胞癌和腺癌中存在较高的频率^[6]。Forghanifard 等^[7]研究认为 p16 基因是在食管癌高风险家系中具有很高价值的早期肿瘤诊断标志物。Hardie 等^[8]研究结果表明食管癌早期就会出现 p16 启动子区高甲基化,而国内学者宋长山等^[9]发现 p16 基因的甲基化对食管癌的分期和淋巴结转移有很大影响。综上,p16 基因甲基化与食管癌的发展密切相关,并且在食管癌早期就已出现。

1.1.2 脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)

FHIT 基因是一个位于人类染色体 3p14.2 上的抑癌基因^[5]。

大多数正常组织中都有 FHIT,而食管癌组织中却出现了 FHIT 表达降低或丢失。在某些因素作用下,FHIT 基因启动子区 CpG 岛发生甲基化,导致无法表达相应蛋白,因此不能发挥抑制肿瘤生长的正常作用,从而促进肿瘤发生发展。Silveira 等^[10]的研究测得一组食管癌组织的 FHIT 甲基化率为 88%。张江兰等^[11]采用甲基化特异性 PCR(MSP)方法进行了一系列研究,其结果显示在食管轻中、重度不典型增生、鳞状细胞原位癌、浸润癌组织中 FHIT 基因的甲基化频率分别为 22.73%、45.45%、64.29%、65.77%,可以说明 FHIT 基因的甲基化与食管癌的发生发展有着密切关系。

1.1.3 APC 腺瘤样结肠息肉易感基因(adenoma tous Polypsosis Coli, APC)是一种抑癌基因,位于人类染色体 5q21 上。Wang 等^[12]研究表明了食管癌与 APC 的关系:食管癌的发生与 APC 启动子区甲基化密切相关,而与 APC 基因突变、APC 基因缺失无明显联系。Kawakami 等^[13]研究发现不同食管肿瘤组织中的 APC 启动子区高甲基化频率不同:食管腺癌 92.00%,食管鳞癌 50.00%,Barrett's 食管 39.59%。因此 APC 可以作为评估食管腺癌生物学行为的标志物和食管癌组织细胞分型的参考。有研究发现,27 例食管腺癌患者组织中 25 例为 APC 基因高甲基化,甲基化频率为 93%;12 例发展为腺癌的 Barrett's 食管黏膜组织全部为 APC 高甲基化^[6],因此 APC 基因可作为食管腺癌发生风险预测标志物。

1.1.4 CDH1 CDH1 基因位于人类染色体 16q22.1 上,能编码出一种钙依赖跨膜糖蛋白-上皮钙黏附蛋白(E-Cadherin),用来介导细胞间同质黏附,维持组织结构完整性。最近研究表明,在很多肿瘤中出现由于该基因启动子区 CpG 岛甲基化而导致的基因失活现象^[14]。章金强等^[15]发现在检测的 50 例食管鳞癌组织中 CDH1 基因启动子区甲基化率为 58%;CDH1 基因甲基化能导致 E-cadherin 表达减少,进而影响肿瘤分期和淋巴结转移。由此可以说明,CDH1 的异常甲基化可以增强肿瘤细胞的侵袭能力,进而发生肿瘤的转移。

1.1.5 Ras 相关区家族 1A(RAS association domain family gene-1A, RASSF1A) RASSF1A 是位于人类染色体 3p21.3 上的抑癌基因,在多种肿瘤发生、发展中起着重要作用^[16]。Guo 等^[17]发现食管癌组织中出现了 RASSF1A 高甲基化--检测的 66 例食管癌患者癌组织中 RASSF1A 甲基化率为 48.5%,其癌旁正常组织 RASSF1A 甲基化率仅为 6.1%;RASSF1A 高甲基化与肿瘤分期和淋巴结转移密切相关。Mao 等^[16]研究发

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160273)。 作者简介:白剑(1989-),在读硕士研究生,医师,主要从事胸部肿瘤表观遗传学的研究。 [△] 通讯作者, Tel:13807836006; E-mail: guilinsjf@163.com。

现在食管鳞状细胞癌中 RASSF1A 甲基化具有流行病学差异。王巍伟等^[18]的研究结果表明在食管鳞癌中 RASSF1A 启动子区甲基化频繁发生。丁士刚等^[19]研究发现原发性食管鳞癌组织中出现与年龄有关的 RASSF1A 启动子甲基化,此甲基化源于 RASSF1A 在食管鳞癌细胞系株中的表达。

1.2 DNA 错配修复基因与 DNA 甲基化 人类错配修复系统(mismatch repair system, MMR)是一类新发现的肿瘤相关基因,目前已知 9 个:hMSH2、hMSH6、hMSH5、hM2SH4、hM-SH3、hMLH1、hPMS1、hPMS2、hMLH3,作用于 DNA 复制和修复过程,保证基因组的稳定性^[20]。近期研究发现 hMLH1、hPMS2 基因启动子区的异常甲基化与食管癌密切相关。

hMLH1 基因是 MMR 的核心成员,与 hPMS2 蛋白协同可以解螺旋并切开错配碱基。Vasavi 等^[21]研究表明 hMLH1 甲基化与食管癌发生发展密切相关。

hMLH2 基因位于人类染色体 2p1~p22,其基因组 DNA 全长约 73 kb。张功员等^[22]研究发现食管癌组织中 hMLH2 基因启动子区甲基化阳性率为 34.4%,而正常黏膜未发现甲基化,表明 Hmlh2 甲基化导致的表达缺失与食管癌发生密切相关。

1.3 DNA 修复基因与 DNA 甲基化 6-氧-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT)定位于人类染色体 10q26 上,全长 170 kb,是一种高效的 DNA 直接修复酶,其修复甲基化 DNA 的机制是将甲基化 DNA 的 O6-mG 甲基转移到 MGMT 的半胱氨酸残基上。一旦 MGMT 因甲基化而失活,它将不能发挥修复 DNA 的正常功能,进而诱发肿瘤。据现有文献,食管鳞癌组织的 MGMT 启动子区甲基化的发生率为 27%~72%^[23]。Brock 等^[24]报道了食管腺癌中 MGMT 基因甲基化率达 56%。Fang 等^[25]检测到 13/18(72%)的食管鳞状细胞癌存在 MGMT 甲基化,且食管癌病变越重,MGMT 启动子区甲基化越严重,MGMT 转录的 mRNA 和翻译的蛋白就越少。

1.4 其他基因与 DNA 甲基化 死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase, DAPK),定位于 9q34.1 上。DAPK 基因的异常甲基化与许多包括食管癌在内的恶性肿瘤相关^[26]。Hoffmann 等^[27]对 50 例晚期食管癌组织和其周围正常组织进行检测,发现肿瘤组织中的 DAPK 基因甲基化检出率(78%)远远高于正常食管组织(10%),表明 DAPK 基因甲基化在食管癌变中的参与作用。B 型内皮素受体基因(EDNRB)和表皮生长因子和卵泡抑素结构域跨膜蛋白基因(TPEF)定位于 13q22。Zhao 等^[28]研究发现 EDNRB 基因启动子区高甲基化与 EDNRB mRNA 表达缺失具有相关性,并在食管鳞癌发生中起作用,并反复实验证明 TPEF 基因启动子区甲基化与食管鳞癌的发生存在相关性。速激肽 1(tachykinin-1, TAC1)定位 7q21.22。TAC1 在食管腺癌中常常表现为杂合性丢失(LOH)。Jin 等^[29]研究认为 TAC1 启动子甲基化是食管癌早期、常见的事件,可以作为食管癌诊断、分型、分期的生物学标志。

2 DNA 甲基化作为治疗新靶点

DNA 甲基化与基因突变、缺失不同,它是以可逆的方式去抑制基因表达的,因此能够通过去甲基化而恢复 DNA 的正常表达,恢复对细胞生长的正常调控,进而抑制肿瘤发展。DNA

甲基化依靠 DNA 甲基转移酶(DNMT)实现,因此可将 DNMT 作为 DNA 去甲基化的靶点。对 DNA 去甲基化药物的研究中,抑制 DNMT 的药物(DNMT 抑制剂)被研究得最多,并取得了极大进展^[30]。其中,竞争性核苷酸类甲基转移酶抑制剂,代表药为 5'氮杂脱氧胞苷(5'Aza Cd R),已经得到了临床应用,使肿瘤细胞中的基因甲基化得到逆转,基因重新开始表达。白血病及骨髓增生异常综合征的治疗中有应用 5'Aza Cd R 的先例,但目前其他肿瘤尚未应用此药,是由于其毒副反应比较严重,有明显的骨髓抑制,可能导致基因突变。因此,5'Aza Cd R 想要广泛应用于临床,还需要大量的后续研究。在治疗食管癌方面,已证实 DNA 甲基转移酶抑制剂在食管癌细胞系中能够恢复甲基化沉默的肿瘤相关基因的表达,但是尚未有足够相关临床研究先例。

3 展 望

表观遗传学是一个在生物学和肿瘤研究中迅速发展的领域,在食管癌的防治过程中存在着潜在的作用价值。表观遗传学领域中目前研究较多的就是 DNA 甲基化,已有证据表明其与食管癌的发生发展密切相关,但其机理尚在探索当中。笔者总结了食管癌中主要的 DNA 甲基化改变。与传统的不可逆遗传改变相比,表观遗传学的变化可能作为肿瘤治疗的潜在分子靶点,也同样可用于肿瘤的预防。为了更加深入全面地了解食管癌的发生发展过程以及肿瘤治疗的新策略,这一领域将需要更进一步的研究。

参考文献

- [1] Gut P, Verdin E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism[J]. *Nature*, 2013, 502(7472): 489-498.
- [2] Helin K, Dhanak D. Chromatin proteins and modifications as drug targets[J]. *Nature*, 2013, 502(7472): 480-488.
- [3] Baba Y, Watanabe M, Baba H. Review of the alterations in DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Surg Today*, 2013, 43(12): 1355-1364.
- [4] Chen C, Yin N, Yin B, et al. DNA methylation in thoracic neoplasms[J]. *Cancer Lett*, 2011, 301(1): 7-16.
- [5] Brock MV, Gou M, Akiyama Y, et al. Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(8): 2912-2919.
- [6] Chen W, Yang C, Yang L, et al. Association of roasting meat intake with the risk of esophageal squamous cell carcinoma of Kazakh Chinese via affecting promoter methylation of p16 gene[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2014, 23(3): 488-497.
- [7] Forghanifard MM, Gholamin M, Moaven O, et al. Neoantigen in esophageal squamous cell carcinoma for dendritic cell-based cancer vaccine development[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(10): 191.
- [8] Hardie LJ, Darnton SJ, Wallis YL, et al. p16 expression in barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: association with genetic and epigenetic alterations[J]. *Cancer*

- Lett, 2005, 217(2):221-230.
- [9] 宋长山,谭家驹,崔金环,等.食管鳞癌中 p16 基因启动子区甲基化及其表达[J].肿瘤防治研究,2008(1):14-17.
- [10] Silveira AP, Da Silva Manoel-Caetano F, Aoki S, et al. Gene mutations and polymorphisms of TP53 and FHIT in chronic esophagitis and esophageal carcinoma[J]. *Anti-cancer Res*, 2011, 31(5):1685-1690.
- [11] 张江兰,杨燕君,张晓丽. DNA 甲基化与食管癌关系研究进展[J].河北北方学院学报(自然科学版),2011(2):98-101.
- [12] Wang CC, Mao WM, Ling ZQ. Expression of DNA methylation of APC in peripheral blood and tumor tissue in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2011, 14(9):719-722.
- [13] Kawakami K, Brabender J, Lord RV, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(22):1805-1811.
- [14] 靳义,刘俊峰.基因甲基化与去甲基化在食管癌中的研究进展[J].食管外科电子杂志,2013(4):173-177.
- [15] 章金强,刘季春. E-钙黏附素基因甲基化及蛋白的表达在食管癌中的研究进展[J].南昌大学学报(医学版),2012(1):93-95,98.
- [16] Mao WM, Li P, Zheng QQ, et al. Hypermethylation-modulated downregulation of RASSF1A expression is associated with the progression of esophageal cancer[J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(3):182-188.
- [17] Guo W, Cui L, Wang C, et al. Decreased expression of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C is associated with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2014, 31(5):521-533.
- [18] 王巍伟,李锋.食管癌相关基因甲基化研究进展[J].临床与实验病理学杂志,2009(6):656-659,663.
- [19] 丁士刚,吴笛,邹检平,等.食管鳞癌 RASSF1A 基因启动子区甲基化研究[J].中国微创外科杂志,2007(12):1213-1216.
- [20] Wang J, Huang S, Xing L, et al. Role of hMLH1 in sterigmatocystin-induced G₂ phase arrest in human esophageal epithelial Het-1A cells in vitro[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 217(3):226-234.
- [21] Vasavi M, Kiran V, Ravishankar B, et al. Microsatellite instability analysis and its correlation with hMLH1 repair gene hypermethylation status in esophageal pathologies including cancers[J]. *Cancer Biomark*, 2010, 7(1):1-10.
- [22] 张功员,刘秋亮,乐晓萍,等.食管癌组织 hMSH2 mRNA 的表达和启动子区甲基化[J].第四军医大学学报,2007(11):1027-1029.
- [23] Ling ZQ, Li P, Ge MH, et al. Aberrant methylation of different DNA repair genes demonstrates distinct prognostic value for esophageal cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(10):2992-3004.
- [24] Brock MV, Gou M, Akiyama Y, et al. Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(8):2912-2919.
- [25] Fang MZ, Jin Z, Wang Y, et al. Promoter hypermethylation and inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in esophageal squamous cell carcinomas and its reactivation in cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(3):615-622.
- [26] Buckingham L, Penfield Faber L, Kim A, et al. PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(7):1630-1639.
- [27] Hoffmann AC, Vallböhmer D, Prenzel K, et al. Methylated DAPK and APC promoter DNA detection in peripheral blood is significantly associated with apparent residual tumor and outcome[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(9):1231-1237.
- [28] Zhao BJ, Sun DG, Zhang M, et al. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis Esophagus*, 2009, 22(1):55-61.
- [29] Jin Z, Oлару A, Yang J, et al. Hypermethylation of tachykinin-1 is a potential biomarker in human esophageal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(21):6293-6300.
- [30] Yang X, Lay F, Han H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(11):536-546.

(收稿日期:2016-03-09 修回日期:2016-05-29)

2016 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://www.cqyxzz.com> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-61965157。

来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!