

# DNA 甲基化与肿瘤诊断

吴仲南, 周向军, 王永祥

上海交通大学药学院分子药理学实验室, 上海 200030

**摘要** DNA 甲基化异常是人类肿瘤中常见的表现遗传变化之一, 伴随着肿瘤的发生和发展, 且该异常现象在肿瘤患者的外周循环血清、血浆和尿液等体液中都可检测到。因此, 利用 DNA 甲基化分析技术检测体液中特定分子 DNA 甲基化水平是肿瘤早期诊断、病程监控和疗效评估的潜在手段, 对临床肿瘤的诊治意义重大。

**关键词** DNA 甲基化; 二核苷酸胞嘧啶岛; 表观遗传; DNA 甲基转移酶; 肿瘤诊断

中图分类号: R730.49

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2006)02-0131-05

随着人类基因组测序工作的基本完成, 深入研究生命过程中基因表达的调控及其在疾病发生中的异常, 已成为这一领域的关键课题之一。在这一背景下, 以不改变基因组的碱基序列只改变基因组的修饰为研究内容的表观遗传学(epigenetics)已成为生命学科的研究前沿, 而 DNA 甲基化修饰是基因组表观遗传调控中主要的方式, 它在胚胎发育、转录、染色体结构、X 性染色体失活、基因组印迹和染色体稳定性中起着重要的调控作用。近年越来越多的研究显示人类肿瘤的发生、发展与 DNA 甲基化的异常有关, 而且早在肿瘤临床确诊之前就可检测出特异基因的甲基化异常现象。因此特异基因的甲基化可以作为癌症早期诊断的分子标记物、治疗的靶点和判断预后手段, 这对临床肿瘤的诊治将起着重要的

意义。

## 1 DNA 甲基化及其意义

在哺乳动物中, DNA 甲基化主要发生在二核苷酸胞嘧啶(CpG)第 5 位碳原子上, 即 5-甲基胞嘧啶(5-mC)。人类基因组中的 CpG 以两种形式存在, 一种是分散于 DNA 中, 另一种是 CpG 结构高度聚集的 CpG 岛。虽然目前对 DNA 甲基化的起源和生理功能不是很清楚, 但已有的研究表明, 在哺乳动物进化过程中大部分 CpG 位点被丢失, 仅存留 1% 人类 DNA 中的 CpG 未丢失<sup>[1,2]</sup>, 大部分存留的 CpG 在成人组织细胞中是被甲基化的。人类基因组中将近一半基因的启动子区域富含 CpG 岛, 但在正常组织里, 不管基因是否表达, 其启动子区域的 CpG 岛通常都是未甲基化的。然而在基因组沉默区域, 如女性的一条缢缩 X 染色体及其它印记失活基因, 它们启动子中 CpG 岛普遍的被甲基化, 且甲基化是维持该区域转录失活状态的必要因素。在不同组织或同一类型细胞的不同发育阶段, 基因组 DNA 上各 CpG 位点甲基化状态的差异构成基因组 DNA 甲基化谱, 基因 DNA 异常甲基化会导致人类多种疾病的发生和发展<sup>[3]</sup>。

一般来说, DNA 甲基化程度越高, 这段 DNA 被转录成 RNA 并翻译成有功能蛋白质的可能性越小。推测甲基化沉默基因的主要机制是, 甲基化的 CpG 能结合甲基-CpG 结合(Methylated DNA Binding Domain, MBD)蛋白, 再募集组蛋白脱乙酰化酶形成复合物, 使核心组蛋白尾区去乙酰化, 发生局部区域的染色质重塑(Chromatin remodeling), 导致形成更紧密的 DNA 包装, 限制了转录因子到达相应结合部位, 从而抑制该基因的表达<sup>[4]</sup>。DNA 甲基化不仅可影响基因的表达, 而且这种影响还可随细胞分裂而遗传持续下去, 或受某种影响而改变, 所以 DNA 甲基化是一种不同于基因序列突变的表观基因表达调控机

2005-11-07 收稿 2005-12-22 修回

上海市科委重大科技攻关项目资助课题(No04DZ19211)

吴仲南, 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 分子药理学。

Tel: 021-34202772 E-mail: zhwnu@sjtu.edu.cn

王永祥, 通讯作者, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 系统药理学。

Tel: 021-34202763 E-mail: yxwang@sjtu.edu.cn

制。DNA 的甲基化对维持染色体的结构、X 染色体的失活、基因印记和肿瘤的发生发展都起重要的作用。

目前已知有两类 DNA 甲基转移酶(DNA methyl-transferase, DNMT)参与 DNA 甲基化的建立和调节,一类是重新甲基化的 DNA 甲基转移酶 DNMT3a 和 DNMT3b; 另一类是维持甲基化的 DNA 甲基转移酶 DNMT1。哺乳动物生殖细胞的基因组在前囊胚期早期经历了去甲基化,而在胚胎植入期经历一个重新甲基化的过程,此时大部分 CpG 岛在 DNMT3a 和 DNMT3b 的作用下被甲基化,在以后的发育阶段,组织特异性基因通过选择性的去甲基化而形成特异的细胞表达类型。最近研究表明两类 DNMTs 有可能共同作用参与维持 DNA 的甲基化状态,细胞在单独缺失 DNMT1 或 DNMT3b 的情况下,会引起总的 DNMT 活性的降低,但对基因组总体 DNA 甲基化水平和启动子区域的甲基化都几乎没有影响,但同时缺

失 DNMT1 和 DNMT3b 时,细胞会失去大部分 DNMT 的活性和 95% 基因组的甲基化<sup>[5,9]</sup>。至于 DNMTs 是如何共同作用,如何识别特异 DNA 位点使其甲基化的确切机制还待继续深入研究。

2 肿瘤中异常的 DNA 甲基化

肿瘤的形成最终源于基因的异常表达,而近年研究表明 DNA 甲基化这一表观遗传机制是影响基因表达的重要因素,毫无疑问, DNA 甲基化异常在肿瘤生成中起着重要作用,事实上自 1983 年 Feinberg 等首次发现在癌细胞中基因组甲基化水平偏低后,越来越多的实验表明,在肿瘤的发生和发展中存在 DNA 甲基化水平和模式的混乱,包括基因组总体甲基化水平过低和某些基因启动子区域甲基化过高(表 1),而且不同的肿瘤表型甲基化异常状况也不相同。最近利用细胞核转移技术证实了改编受精卵的表观遗传信息会逆转肿瘤的表型<sup>[7]</sup>。

表 1 几种肿瘤中 DNA 异常甲基化状况

肿瘤表型	异常高甲基化基因	异常低甲基化基因
乳腺癌 <sup>[8]</sup>	抑癌基因	p16(INK4a), Line1 repetitive sequence
	修复相关基因	BRCA1, hMLH1, hMSH2 Pericentromeric DNA
	激素反应相关基因	Estrogen receptor, RAR $\beta$ 2, Global hypomethylation, Progesteronereceptor, MAG, SYNUCLEIN
	细胞粘连相关基因	E-cadherin, TIMP-3, uPA, etc.
前列腺癌 <sup>[9,10]</sup>	细胞周期相关基因	CDKN2A, RASSF1 A Global hypomethylation
	肿瘤细胞转移/侵入相关基因	CDH1, CD44, APC, CYP11B1(Cytochrome P450 11B1)
	激素反应相关基因	AR, ESR1, ESR2, RARRES1, RAR, EGR1
	抑癌基因	KAI1, CAV1, DAB2IP
	修复相关基因	GSTP1
肺癌 <sup>[11]</sup>	DNA 修复基因	MGMT, BRCA1, hMLH1, hMSH2 Global hypomethylation
	细胞周期相关基因	p15(INK4b), p16(INK4a), RB, p53
	生长相关基因	Estrogen receptor, SOCS-3, ETBR
	抑癌基因	hSRBC, RAR- $\beta$ , TS1C1, MYO18B, RASSF1A
	凋亡基因	Caspase8, TMS1, DAPK

此外,研究发现发生于家族性癌中抑癌基因的胚系(germ-line)突变,在散发性(sporadic cancer)癌中这些基因被异常的高甲基化,如以前认为 BRCA1 基因只与家族性乳腺癌有关(通过 BRCA1 的胚系突变),后来发现在散发性乳腺癌中该基因启动子区被异常高甲基化,且在两类癌中的 BRCA1 表达量相似<sup>[12,13]</sup>;最近 Marcella 等<sup>[14,15]</sup>也发现,在散发性人类眼癌和肺癌中,Rb2/p130 基因启动子区的异常甲基化是除 Rb2 外显子 1 纯合子变异外第二个致癌因素。

虽然目前对 DNA 异常甲基化发生的机理以及 DNA 异常甲基化是否是肿瘤形成的起始因素还是肿瘤导致的一个副产物等问题都还未阐明,但肿瘤中存在异常的 DNA 甲基化已是不争的事实,这有望给临床肿瘤的诊断提供新的方法和指标。

3 DNA 甲基化在肿瘤诊断上的应用前景

癌症的早期发现对癌症患者的有效治疗是非常重要的。目前对癌症的诊断主要依据临床症状、直接接触疹、图象信号检测(visual detection)和组织病理

学检查等, 但有许多癌症临床症状出现较晚, 并且活体取样检测也困难, 严重影响了癌症的早期诊断和病人的愈后。然而随着在癌症的发生和发展中 DNA 甲基化异常现象的发现, 且此现象在确诊前就能被检测出<sup>[16]</sup>, 提示某些基因的 DNA 甲基化水平有望成为肿瘤早期诊断的潜在指标, 甚至可以作为患病风险预测、临床病程监控和疗效评估的指标。

**3.1 DNA 甲基化检测方法** 由于甲基化的胞嘧啶并不影响 C: G 核苷酸的配对, 且在聚合酶链反应 (PCR) 过程中, 胞嘧啶上的甲基通常会被丢失, 所以检测 DNA 甲基化比检测 DNA 碱基序列相对困难。随着技术的进步, 现在不仅可以探测某段 DNA 序列的甲基化分布, 而且还能大量地了解整个基因组甲基化的程度。常用的方法是<sup>[17]</sup>通过亚硫酸氢钠修饰, 将目的序列中未甲基化状态的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶, 但 5-甲基胞嘧啶不发生转变, 之后样品经 PCR、测序、Southern blot 和电泳等分子生物学技术, 达到检测甲基化胞嘧啶的目的, 如亚硫酸钠依赖的基因测序法、亚硫酸钠联合限制性内切酶分析法 (COBRA) 和甲基化特异性 PCR (MSP) 等, 此外还有甲基化敏感的限制性内切酶法 (如 RLGS、DMH 和 MCA 等) 和单核苷酸鉴定法及基因表达列阵法等。其中, MSP 是目前在研究 CpG 岛甲基化中, 应用最广泛的一种技术, 它利用亚硫酸氢盐修饰造成甲基化和非甲基化 DNA 序列差异, 设计出各自特异性引物, 再根据 PCR 和电泳结果来判断原始序列是否甲基化, 该技术的极高灵敏度允许它对少量样本的 DNA 进行甲基化研究, 包括来自石蜡包埋样品或显微切割组织的 DNA。由于 MSP 方法的多种优点, 它被认为在人类肿瘤甲基化分析中是一种快速、高效临床研究手段。

**3.2 肿瘤诊断分子标记物** 肿瘤诊断分子标记物的确定取决于标记物的灵敏度和特异性, 灵敏度是指标记物在癌症患者中能被检出阳性的百分比, 而特异性是指在健康对照者中标记物检出阴性的百分比<sup>[18]</sup>。灵敏度高特异性好的分子是较理想的肿瘤诊断标记物。目前研究者一般通过甲基化检测方法, 将患者肿瘤组织、其平行的正常组织和处于不同肿瘤期的同一组织的甲基化水平进行对比, 而从基因组众多基因的甲基化中筛选出可用于临床肿瘤诊断的特异 DNA 甲基化分子标记物。

目前研究显示 GSTP1 (Glutathione S-transferase) 的甲基化可以作为前列腺癌早期诊断的潜在分子标记物, GSTP1 甲基化存在于 90% 的前列腺癌患者

中<sup>[19]</sup>, 且在不同肿瘤临床分期中甲基化程度各异<sup>[20]</sup>, 良性前列腺增生中为 2%, 前列腺上皮内瘤变为 29%, 早期癌症患者为 68%, 局部进展和全身性扩展癌为 78%。Liu 等<sup>[21]</sup>在多种肿瘤里比较 PR 基因和 ER $\alpha$  基因启动子区的甲基化状态后, 认为 PR 基因启动子的甲基化可以作为多种肿瘤诊断的标记物, 而 ER $\alpha$  具有特异性。有的标记物还可以鉴别诊断出早期难以判断的肿瘤类型, 如发生于胸膜的恶性间皮瘤 (Malignant mesothelioma, MM) 与肺腺癌形成方式类似, 较难区别, 尤其是在缺少足够检测样本原料情况下, 但以 14 染色体位点上的甲基化作为诊断标记物, 就能容易区别<sup>[22]</sup>。

除可进行诊断外, 某些标记物甲基化的状态还可预测患者治疗的预后情况, 如 APC (Adenomatous polyposis coli) 基因启动子的甲基化可预示宫颈癌的转移和复发, 并提示肿瘤处于高危状态<sup>[23]</sup>; 肿瘤中若伴随诱导凋亡的基因发生甲基化, 如死亡相关蛋白 (DAP) 基因甲基化则预后往往不佳。此外, Yegnasubramanian 等<sup>[24]</sup>研究结果显示联合用多个标记物作为诊断指标, 可以极大地提高灵敏度和特异性。

**3.3 检测样本** 由于肿瘤组织会释放 DNA 进入血液循环, 成为血浆或血清游离 DNA, 因此某些肿瘤 DNA 甲基化分子标记物除在肿瘤组织中存在外, 在外循环体液中也能检测到。事实上研究发现, 与肿瘤有关的基因突变和表观遗传变化如 Ras 和 p53 的突变、微卫星不稳定现象、某些基因的异常甲基化和线粒体 DNA 变异等都能在肿瘤患者的血浆和血清中检测到<sup>[25]</sup>。由于实体肿瘤取材困难, 体液循环 DNA 容易获得, 因此在体液中寻找更多的肿瘤特异 DNA 甲基化分子标记物的研究也备受关注。已有研究显示某些 DNA 甲基化标记物在体液中的检测也能达到较高的灵敏度和特异性, 如检测膀胱癌患者尿液中 RARB 的甲基化灵敏度可达 68%, 特异性达 76%<sup>[26]</sup>; 检测前列腺癌患者血清中 GSTP1 的甲基化, 灵敏度达 70%, 特异性达 100%<sup>[27]</sup>。然而由于体液中除了肿瘤组织释放的 DNA 外, 淋巴细胞、白细胞裂解也会释放 DNA, 如果标记物在这些细胞中也是甲基化的就会造成诊断中的假阳性, 因此如何排除外来 DNA 对诊断的影响也是个待解决的问题。

## 4 展望

利用有效灵敏的甲基化检测技术, 检测血浆、血清、尿液和唾液等体液中肿瘤分子标记物的甲基化水平是方便、快捷、特异和无创的分子生物学检测手

段,跨越了由于获取肿瘤组织不便所引起的障碍,有利于肿瘤的早期诊断、预后监测及跟踪随访,然而将其应用于大规模的临床还有待于认真评估这些样本中DNA标记物的检测结果与大宗的、随机的、前瞻性的临床资料间的吻合程度。同时也需要提高精确分析肿瘤分子标记物的敏感性及特异性,以期建立能够用于临床的明确的诊断标准和随访指标。总之,对这些领域的进一步探讨研究,对于阐明肿瘤发生的机制、肿瘤的早期预防、早期诊治以及正确评估预后等都具有重要意义。

## 参考文献

- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression; how the genome integrates intrinsic and environmental signals [J]. *Nature Genet*, 2003; 33: 245—54
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. *Genes Dev*, 2002; 16: 6—21
- Robertson KD. DNA methylation and human disease [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005; 6: 597—610
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D. The methyl CpG binding protein MeCP links DNA methylation to histone methylation [J]. *J Biol Chem*, 2003; 278: 4035—40
- Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Hemman JG, Kinzler KW, *et al.* CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1 [J]. *Nature*, 2000; 404: 1003—7
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, *et al.* DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells [J]. *Nature*, 2002; 416: 552—6
- Hochedlinger K, Blüthner R, Brennan C, Yamada Y, Kim M, Chin L, *et al.* Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation [J]. *Genes Dev*, 2004; 18: 1875—85
- Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004; 68: 1187—97
- Takashi T, Hiroaki S, Mikio I, Hideki E, Shinji U, Toshifumi K, *et al.* Cytochrome P450 1B1 Is Overexpressed and Regulated by Hypomethylation in Prostate Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 5793—801
- Li LC, Okino ST, Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1704: 87—102
- Digel W, Lubbert M. DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: Preclinical and clinical results [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005; 55: 1—11
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guix X, Lema E, *et al.* Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92: 564—9
- Van't Veer LJ, Dair H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer [J]. *Nature*, 2002; 415: 530—6
- Tosi GM, Trimarchi C, Macaluso M, La Sala D, Ciccodicola A, Lazzi S, *et al.* Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implication for pathogenesis and therapeutic approach [J]. *Oncogene*, 2005; 24: 5827—36
- Cinti G, Macaluso M, Giordano A. Tumor-specific exon 1 mutations could be the hit event predisposing Rb2/p130 gene to epigenetic silencing in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2005; 24: 5821—6
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, *et al.* Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum [J]. *Cancer Res*, 2000; 60: 5954—8
- Ze-jun liu, Masato Mackawa. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003; 317: 259—65
- Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, *et al.* Phases of biomarker development for early detection of cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001; 93: 1054—61
- Jerónimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, *et al.* Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001; 93: 1747—52
- Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Straub B, Schrader M, *et al.* DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage [J]. *Urology*, 2001; 58: 335—8
- Liu ZJ, Masato M, Motoki M. The multiple promoter methylation profile of RP gene and ER gene in tumor cells [J]. *Life Sci*, 2003; 73: 1963—72
- Tsou JA, Shen LY, Siegmund KD, Long TL, Laird PW, Seneviratne CK, *et al.* Distinct DNA methylation profiles in malignant mesothelioma lung adenocarcinoma, and non-tumor lung [J]. *Lung Cancer*, 2005; 47: 193—204
- Widschwendter A, Muller HM, Fiegl H, Ivarsson L, Wiedemair A, Muller-Holzner E, *et al.* DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 565—71
- Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, *et al.* Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2004; 64: 1975—86
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1999; 18: 65—73
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, *et al.* Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2002; 8: 464—70
- Goessl C, Krause H, Muller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J, *et al.* Fluorescent methylation specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids [J]. *Cancer Res*, 2000; 60: 5941—5

## DNA methylation and tumor disease

WU Zhong-nan, ZHOU Xiang-jun, WANG Yong-xiang

*Laboratory of Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*

**ABSTRACT** Abnormal methylation of DNA in certain genomic regions is a frequent epigenetic alteration that is involved in Human tumorigenesis and development. Various studies have shown that this aberrant DNA modification can be detected in body fluids of tumor patients, e. g. circulating blood, sputum, urine. So the evaluation of DNA methylation in these body fluids by methylation de-

tection methods can be utilized as a potential biomarker for early cancer detection and accurately clinical assess. This plays a significant role in cancer diagnosis and treatment.

**KEY WORDS** DNA methylation; CpG island; epigenetics; DNA methyl-transferase; tumor diagnose