

# DNA 异常甲基化与上皮性卵巢癌研究进展

复旦大学附属妇产科医院(200011) 谷晓鸿综述 刘惜时审校

**摘要** 上皮性卵巢癌是死亡率最高的妇科恶性肿瘤,对其发生、发展、转移、耐药和复发等相关机制的研究具有重要的意义。DNA 甲基化作为表观遗传的一种主要方式,协助调控基因表达。多种基因的异常和/或低甲基化显示出与卵巢癌发生、发展、治疗和预后有密切的关系,深入研究其作用机制将有助于卵巢癌早期诊断、辅助治疗和预后判断。综述 DNA 甲基化及其生物学功能、DNA 异常甲基化在恶性肿瘤发生中的作用及其在卵巢癌方面的最新研究进展。

**关键词** DNA 甲基化 CpG 岛 恶性肿瘤 上皮性卵巢癌

卵巢恶性肿瘤是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,其中 90%是上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC),死亡率始终位于妇科恶性肿瘤首位,因此对上皮性卵巢癌发生、转移、耐药和复发等相关机制的研究具有重要的意义。近年的研究表明,肿瘤的发生不仅与遗传改变有关,表观遗传异常也是肿瘤发生发展的原动力之一。DNA 甲基化作为表观遗传的主要方式之一,显示出与卵巢癌的发生、发展、治疗和预后有密切关系,深入研究其作用机制将有助于卵巢癌早期诊断、辅助治疗和预后判断,因此是目前国内外学者关注的热点。

## DNA 甲基化的产生及其生物学功能

表观遗传是指不改变 DNA 序列,而是通过对核苷酸或染色体的可逆性修饰调节基因的表达,这种修饰又是可遗传的。DNA 甲基化是目前已知的哺乳动物 DNA 唯一的自然化学修饰方式,是表观遗传的主要方式之一,是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用下,以 S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)为甲基供体,将甲基转移到胞嘧啶的 5 位碳原子上,生成 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5<sup>m</sup>C)。

DNA 甲基化通常发生在 CpG 位点的 C 上。CpG 岛(CpG island, CGI)为长度 200bp, C 加 G 含量 50%, CG 观测值/期望值 0.6 的 DNA 序列,也就是 CpG 位点较为密集的区域,一半以上位于管家基因和一些组织特异性基因的 5'端,覆盖基因的启动子区和第一外显子,有时延伸到第一或第二内含子<sup>[1]</sup>。人类 60%以上的基因含有 CGI。CpG 位点在人类基因组中只占不足 1%,其中 70%~80%以甲基化形式存在,主要是多数的 DNA 重复序列和异染色质,而大

多数 CGI 正常情况下处在完全非甲基化状态。

DNA 甲基化与基因表达调控、女性单 X 染色体失活、某些特定基因基因组印迹、染色体稳定性有关,在哺乳动物胚胎发育和以后的细胞分化中起重要的调节作用,并能抑制重复及寄生的 DNA 序列(如转座子和逆转录病毒)的有害表达。其主要是通过直接抑制某些转录因子与基因调控区的结合,或与组蛋白去乙酰化协同抑制转录而使基因表达沉默。

目前发现的 DNMT 有多种亚型,其中研究较多的有 DNMT1, 3a 和 3b 等。受精卵植入前,基因组发生去甲基化,消除来自母体 DNA 的大多数预先存在的甲基化位点。植入后的胚胎在早期发育过程中,在 DNMT3a 和 3b 的从头甲基化(de novo methylation)的作用下, DNA 产生新的甲基化位点,基因组甲基化程度逐渐升高。此时若发生程序外从头甲基化作用(多为 DNMT3b 催化),则会使某些功能基因的表达关闭或降低,导致疾病的发生。一旦 DNA 甲基化模式建立起来,在 DNA 复制后,在 DNMT1 的维持甲基化(maintenance methylation)作用下,其新生链保持与模板链相同的甲基化状态。这是因为 DNMT1 对于半甲基化的 DNA 链的催化活性远高于未甲基化 DNA 链<sup>[2]</sup>。

## DNA 异常甲基化与恶性肿瘤

近年研究表明,肿瘤的发生不仅与遗传改变有关,表观遗传异常也是肿瘤发生发展的原动力之一。DNA 异常甲基化与肿瘤的发生有密切的联系,其机制主要有: 基因组范围的低甲基化。如启动子 CGI 低甲基化激活癌基因和逆转录转座子; 异染色质低甲基化导致基因组不稳定性增加而最终通过遗传性改变导致肿瘤的发生。局部高甲基化。抑癌基因启动子 CGI 高甲基化,是除杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)和基因突变之外,导致肿瘤抑制

项目基金: 国家自然科学基金(编号: 30571952)

收稿日期: 2006-09-05 修回日期: 2007-05-31

基因失活的第 3 种机制<sup>[3]</sup>。体内突变热点。甲基化的胞嘧啶易自发脱氨基生成胸腺嘧啶 (thymine, T), 随着年龄的增加, CGI 的甲基化不断增加, 使得年龄成为一些肿瘤发病的危险因素。

Knudson's 的两次打击学说认为, 肿瘤的形成要有包括 LOH、基因突变和甲基化改变在内的 3 种因素对双等位表达的基因的 2 次“打击”才能形成。许多印迹基因具有原癌或抑癌基因的功能, 而甲基化形成的印迹基因相当于功能上的单倍体, 仅需 1 次打击就可使该基因失活, 更易增加肿瘤的易感性。另一方面, DNA 甲基化程度异常升高或降低, 改变细胞中 DNA 的印迹功能, 使原癌基因或抑癌基因表达异常, 也能导致肿瘤的发生。

### DNA 异常甲基化与卵巢癌

#### 一、DNA 异常甲基化促进卵巢癌的发生

近年的研究表明, DNA 异常甲基化与卵巢癌的发生有密切的关系。卵巢癌中因启动子低甲基化而表达上调的基因多是细胞增殖、DNA 修复、血管生成和细胞迁移相关的基因, 如环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)、范可尼贫血基因 F(Fanconi anemia gene F, FANCF)、紧密连接蛋白-4(Claudin-4, CLDN4)<sup>[4]</sup>、尿素酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)、乙酰肝素酶(heparanase, HPA)和多药耐药基因 1(multidrug resistance 1, MDR1)<sup>[5]</sup>等。而因启动子过甲基化而表达减少的基因则多是细胞黏附、促细胞凋亡、抗细胞增殖和 DNA 错配修复相关的基因, 如 ras 同源基因 (aplysia ras homolog I, ARHI/NOEY2)<sup>[6]</sup>、细胞周期蛋白 D2(Cyclin D2)<sup>[7]</sup>、死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase, DAPK)<sup>[8]</sup>、甲基化调控 J 蛋白(methylation-controlled J protein, MCJ)<sup>[9]</sup>、阿片样结合蛋白/细胞黏附分子样基因(opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like gene, OPCML)和 RAS 相关区域家族 1A(RAS association domain family 1A, RASSF1A)等。下面以 CLDN4 和 ARHI 两个基因为例, 介绍一下此领域目前的研究成果及其对致癌机制的阐释。

Claudin 蛋白家族成员之间相互作用, 在上皮或内皮细胞间形成封闭索, 是细胞紧密连接的重要组成部分。Babak 等<sup>[4]</sup>的研究显示, 79 例卵巢浆液性囊腺癌经激光显微切割获得的癌细胞与人正常卵巢上皮细胞(HOSE)比较, Claudin-4 的 mRNA 水平显著升高; 76 例各型上皮性卵巢癌的免疫组化也显示其表达明显升高。对 Claudin-4 mRNA 水平显著升高的 9 例卵巢癌进行甲基化特异性 PCR(methylation-

specific PCR, MSP)检测, 均见 CLDN4 基因存在非甲基化; 7 个存在非甲基化的卵巢癌细胞株均表达该蛋白, 而完全甲基化的 4 个细胞株则不表达。用去甲基化剂 5-氮-2'-脱氧胞苷处理完全甲基化而蛋白表达阴性的细胞株后, MSP 均重现非甲基化, mRNA 及蛋白表达重新激活。说明 CLDN4 甲基化在 mRNA 和蛋白水平都调节 Claudin-4 的表达, 低甲基化诱导的 Claudin-4 过表达通过影响细胞间连接在卵巢癌的发生中起重要的作用。

在乳腺和卵巢癌细胞中也观察到 ARHI 基因启动子甲基化状态对其表达水平的调节作用<sup>[6]</sup>。ARHI 和 Ras 有相似的 GTP/GDP 结合域, 却发挥相反的功能, 通过钙蛋白酶(calpain)而非胱天蛋白酶(caspase)通路诱导细胞凋亡。而 ARHI 就属前文所述的印迹基因, 其母源等位基因的 3 个 CGI 发生甲基化而表达沉默。正常情况下, 这种印迹表达就使该基因在功能上相当于单等位基因, 只需 1 次打击即可失活, 从而增加了肿瘤的易感性; 如果同时该基因的甲基化状态发生了改变, 则不仅可通过使其印迹状态发生改变, 还可通过影响单表达的父亲等位基因而导致肿瘤的发生。

对基因启动子甲基化的上游调节机制也进行了探索。在 Mei 等<sup>[10]</sup>用 RAS(V12)致癌性转化的人卵巢上皮细胞株 T29H 进行的研究中, RAS 信号通路活性升高, 包括 HER-2/neu 的过表达和 RAS, BRAF 的突变, 可诱导 OPCML 启动子过甲基化而表达沉默。而 DNMT 抑制剂 DAC 和针对 RAS(V12)的稳定的小干扰 RNA(siRNA)诱导的 RAS 活性的抑制都可促进 OPCML 启动子去甲基化并恢复其表达, 表明 RAS 通路在调节 DNA 甲基化方面发挥一定的作用。

肿瘤的发生和进展是多种基因受多种因素影响发生的多阶段改变, 是通过多种途径的作用积累导致的。DNA 异常甲基化导致肿瘤发生方面也表现出这种特点。Makarla 等<sup>[11]</sup>用 MSP 分析了上皮性卵巢肿瘤中 8 个肿瘤相关基因启动子的甲基化状态。结果显示, 良性囊腺瘤中只有 p16(13%)和 E-钙粘素(13%)2 个基因发生启动子过甲基化, 低度潜在恶性肿瘤除 p16(22%)和 E-钙粘素(17%)外, 维甲酸受体(ratinoic acid receptor, RAR, 9%)和 H-钙粘素(4%)也存在甲基化。而在浸润癌中, 全部 8 个基因均发生过甲基化, 其中 RASSF1A(30%)、H-钙粘素(22%)和腺瘤型结肠息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC, 22%)3 个基因甲基化频率较高。此研究表明, 基因启动子过甲基化与上皮性卵巢

癌的发生相关,多个特定基因事件的积累可能引发一些良性囊腺瘤和低度潜在恶性肿瘤的恶性转化。

## 二、检测 DNA 异常甲基化助于卵巢癌早期诊断

DNA 甲基化改变在肿瘤发生初期即可出现,可早于其表达产物的改变<sup>[12]</sup>。近来又发现肿瘤患者血清/血浆等体液中细胞外游离 DNA 明显升高,且具有肿瘤源性<sup>[13]</sup>。这些都使血清 DNA 甲基化状态成为一种极有潜力的分子生物学的肿瘤标记物,微创、简便而有效,对肿瘤的早期诊断,甚至更早期患癌危险性预测及大规模筛查具有极大的临床应用价值。Ibanez de Caceres 等<sup>[14]</sup>用 MSP 检测卵巢癌患者血浆 DNA,结果显示 68% (34/50) BRCA1 和 RASSF1A 基因启动子至少有一个处于过甲基化状态;对余下的 16 例则检测 APC, DAPK, p14ARF 和 p16INK4a 基因,全部病例至少有一个显示甲基化阳性,即联合检测这 6 种基因的甲基化状态可使卵巢癌诊断的敏感性达到 100%。而 20 例正常女性外周血 DNA 中此 6 种基因全部甲基化阴性,即诊断的特异性也是 100%。可见 DNA 甲基化状态的检测,尤其是血浆 DNA 的检测在卵巢癌诊断中的应用是非常有研究前景的。

在多种肿瘤研究中都发现,一些病例同时存在多个(3)基因 CpG 岛甲基化,即 CpG 岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype, CIMP)阳性。卵巢癌也是 CIMP 阳性,而且同样具有一定的肿瘤特异性。Teodoridis 等<sup>[15]</sup>检测了 106 例晚期卵巢癌患者肿瘤组织中 24 个基因的 CGI 甲基化状态,确定其 CIMP 包括 OPCML, DCR1, RASSF1A, MINT25, HIC1 和 SFRP1,联合检测这几种基因可明显提高卵巢癌诊断的敏感性。

另外, DNMT 活性升高也是癌细胞的一个特征性的早期分子改变<sup>[16]</sup>。通过检测 DNMT 的表达水平或活性状态也有助于卵巢癌的早期诊断。

## 三、应用去甲基化制剂增加卵巢癌化疗敏感性

通过各种方法逆转并恢复 DNA 的正常甲基化状态,对卵巢癌进行治疗,对此进行广泛尝试,也取得可喜成果。目前研究最多的 DNA 甲基化抑制剂是胞嘧啶类似物,如 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza-C)及其衍生物 5-氮-2'-脱氧胞苷。其与 DNMTs 活性部位不可逆地共价结合,使细胞内此酶系功能缺失,从而降低基因组甲基化程度。此类抑制剂主要作用于 DNMT1,因而其去甲基化活性依赖于细胞复制,即需经几次细胞分裂才能使 DNA 双链完全去甲基

化。有研究显示,应用 5-氮-2'-脱氧胞苷治疗对肿瘤细胞的生长无影响,但可恢复 hMLH1 的表达,增加肿瘤细胞对顺铂、卡铂和表阿霉素等化疗药物的敏感性,因此可以将其与这些常规化疗药物联合使用,改善治疗效果,减少常规化疗药物的用量和毒副作用,现已进入临床期实验阶段。另一种可口服的胞嘧啶类似物 zebularine 的毒副作用更小,也已进入了临床前实验阶段<sup>[17]</sup>。其他去甲基化制剂如 EGFR 抑制剂 PD153035<sup>[18]</sup>、普鲁卡因、胍苯哒嗪和 DNMT1 的反义寡核苷酸 MG98 等的研究有的也达到临床 I 期阶段。

另外, Jovenot 等<sup>[19]</sup>研究设计了一类锌指转录蛋白(zinc-finger transcription proteins, ZFPs),成功地以区域依赖性方式特异性激活 IGF2 和 H19 等位基因的表达,通过控制基因印迹的自然机制,确立一种全新的转录治疗方法。

## 四、DNA 甲基化状态检测有助于预后判断

临床上常可见到期别和病理类型都相同的卵巢癌患者,对同一化疗方案的敏感性大为不同,其复发和转移等预后指标也相差很大。而研究表明许多基因启动子的异常甲基化往往与肿瘤的生物行为及患者的预后存在相关性,提示如果以肿瘤的生物特征为基础进行分子分型,可作为对传统组织病理分型的补充,将有助于解决肿瘤的异质性,指导合理设计个体化的治疗方案,提高患者生存率和准确估计预后。

研究表明,凋亡相关基因包括 DNA 错配修复(mismatch repair, MMR)基因 hMLH1 的甲基化状态与卵巢癌患者获得性化疗耐药相关。Gifford 等<sup>[13]</sup>选取 138 例卡铂/紫杉烷化疗后复发的患者,检测其化疗前和复发时血浆 DNA hMLH1 基因甲基化状态。结果发现复发时 hMLH1 的甲基化程度升高,其中 25% 复发病例化疗前未曾检出血浆 hMLH1 的甲基化。因而认为,化疗后血浆 DNA 可见 hMLH1 甲基化和伴随的 DNA MMR 缺失,预示患者生存率的降低,是不依赖年龄与复发时间的独立预测因子。Wei 等<sup>[20]</sup>按照无进展生存期(progression-free survival, PFS)长短将 40 例晚期卵巢癌患者分成两组,用基于基因芯片的差异甲基化杂交(differential methylation hybridization, DMH)方法,筛选出 220 个可用于提示患者预后的候选甲基化位点,其中 112 个位点预测准确率达 95%。

FANCF 通过 FA/BRCA 通路修复 DNA 链间交联(interstrand cross-link, ICL)。研究表明,过甲基化

诱导的 FANCF 失活通过 FA/BRCA 传导通路中断在卵巢癌的发生中起重要的作用; 而 FANCF 异常低甲基化则可使该通路活性异常升高, 产生获得性耐药, 包括对顺铂 (cisplatin)、美法仑 (melphalan) 等 DNA 交联剂 (cross-linker) 和烷化剂的耐药。可见, FANCF 基因启动子的甲基化程度应处于适当水平, 过高或过低均可导致其表达水平的异常, 进而引起功能的异常。

另外还有多种基因的甲基化状态与肿瘤耐药性也有密切的关系, 可通过检测其甲基化状态, 选择耐药相关基因甲基化阴性的患者试行新型的表观遗传疗法, 提高此疗法的有效性, 降低不必要的毒副作用; 同时, 血浆 DNA 甲基化状态检测还为监测化疗期间肿瘤耐药性的变化, 进而评价疗效和提示预后提供了可能。

目前 DNA 异常甲基化在卵巢癌的应用方面还有很多问题有待解决。如确立卵巢癌特有的异常甲基化谱; 如何联合检测多种基因的甲基化状态以提高对卵巢癌的早诊率; 建立有效的卵巢癌甲基化的分子分型, 指导治疗及判断预后; 应用甲基化抑制剂治疗的同时, 正确处理其对正常情况下因甲基化而不表达的原癌基因激活的问题等。

#### 参 考 文 献

[1] Huang Z, Wen Y, Shandilya R, et al. High throughput detection of M6P/IGF2R intronic hypermethylation and LOH in ovarian cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): 555-563.

[2] Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(4): 1182-1188.

[3] Azhikina TL, Sverdlov ED. Study of tissue-specific CpG methylation of DNA in extended genomic loci [J]. *Biochemistry(Mosc)*, 2005, 70(5): 596-603.

[4] Babak L, Joseph K, Chun-Min L, et al. Claudin-4 overexpression in epithelial ovarian cancer is associated with hypomethylation and is a potential target for modulation of tight junction barrier function using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin [J]. *Neoplasia*, 2007, 9(4): 304-314.

[5] Yatouji S, El-Khoury V, Trentesaux C, et al. Differential modulation of nuclear texture, histone acetylation, and MDR1 gene expression

in human drug-sensitive and -resistant OV1 cell lines [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(4): 1003-1009.

[6] Yuan J, Luo RZ, Fujii S, et al. Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 4174-4180.

[7] Sakuma M, Akahira J, Ito K, et al. Promoter methylation status of the Cyclin D2 gene is associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(3): 380-386.

[8] Collins Y, Diciocco R, Keitz B, et al. Methylation of death-associated protein kinase (DAPK) in ovarian carcinomas [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16[Suppl 1]: 195-199.

[9] Hatle KM, Neveu W, Dienz O, et al. Methylation-controlled J protein promotes c-Jun degradation to prevent ABCB1 transporter expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(8): 2952-2966.

[10] Mei FC, Young TW, Liu J, et al. RAS-mediated epigenetic inactivation of OPCML in oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells [J]. *FASEB J*, 2006, 20(3): 497-499.

[11] Makarla PB, Saboorian MH, Ashfaq R, et al. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(15): 5365-5369.

[12] Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 5954-5958.

[13] Gifford G, Paul J, Vasey PA, et al. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(13): 4420-4426.

[14] Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, et al. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6476-6481.

[15] Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, et al. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8961-8967.

[16] Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, et al. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(2): 689-699.

[17] Balch C, Yan P, Craft T, et al. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(10): 1505-1514.

[18] Grunt TW, Puckmair K, Tomek K, et al. An EGF receptor inhibitor induces RAR-beta expression in breast and ovarian cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(4): 1253-1259.

[19] Jouvenot Y, Ginjala V, Zhang L, et al. Targeted regulation of imprinted genes by synthetic zinc-finger transcription factors [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(6): 513-522.

[20] Wei SH, Balch C, Paik HH, et al. Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(9): 2788-2794.

### 《国际肿瘤学杂志》2008 年征订启事

《国际肿瘤学杂志》(原刊名: 国外医学肿瘤学分册)是由中华人民共和国卫生部主管、中华医学会、山东省医学科学院主办的肿瘤专业性学术性期刊, 是中华医学会国际医学系列杂志之一。主要报道国内外肿瘤学领域的新动态、新进展和新技术, 反映国内外肿瘤学科临床、科研、防治工作的重大进展, 促进国内外肿瘤学科学术交流。

《国际肿瘤学杂志》1974 年创刊, 月刊, 大 16 开, 80 页, 每月 8 日出版, 每期定价 12 元, 全年 144 元。刊号 CN37-1439/R, ISSN1673-422X。邮发代号 24-64, 欢迎在各地邮局订阅, 漏订者可汇款至济南市经十路 89 号 国际肿瘤学杂志编辑部补订, 编辑部地址: 济南市经十路 89 号, 邮编: 250062, 电话(传真): 0531-82949227, 82919917, E-mail: gjzxjn@126.com, gwyxjn@sina.com。