

肿瘤转移相关 DNA 甲基化标志物研究进展

刘兆君 邓大君

肿瘤转移和复发是肿瘤患者死亡的主要原因。尽管目前对其分子生物学机制已有深入的研究,但是对临床诊断和治疗的帮助不大,目前临床上仍然缺乏针对肿瘤转移和复发的有效对策。利用分子标志物预测肿瘤患者转移/复发的潜能,对制定有效的个体化治疗方案有决定性作用,同时对提高患者的生存率和生活质量也有重要意义^[1]。

DNA 甲基化是表观遗传的一个重要方面,基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态深刻影响基因表达,并且可稳定遗传给子代细胞。当机体细胞与环境因素的互动发生改变时,DNA 甲基化发生异常从而引起各种疾病。DNA 甲基化影响肿瘤的发生和发展,可用作肿瘤分子标志物^[2]。目前 DNA 甲基化作为一种分子标志物在癌前病变的诊断、化疗敏感性以及肿瘤患者预后预测方面已有很多的研究和应用,在肿瘤转移和复发方面也展示出良好的应用前景。本文主要综述肿瘤转移相关甲基化标志物的研究进展^[3~6]。

一、DNA 甲基化标志物的优点

DNA 甲基化作为分子标志物应用和研究有其自身的优势。首先,其研究对象基因组 DNA 较 mRNA 和蛋白质稳定,因此对研究材料的要求较低,很多石蜡组织标本都可以用来分析,有资源优势;其次,同 mRNA 和蛋白质检测主要反应细胞群体变化的分析不同,各种高灵敏技术(如 MSP, DHPLC 和 Methylight)的应用,使 DNA 甲基化能够检测到肿瘤组织内少数细胞中存在的变化,特别适合测定癌前病变中的恶性转化细胞、肿瘤组织耐药/复发相关干细胞和转移相关细胞的存在;另外,DNA 甲基化模式比较稳定,不会像基因的表达谱式一样,随着外界刺激的变化而在短期内发生改变,在时间上提供了研究的优势。鉴于上述优点,目前 DNA 甲基化标志物的研究受到了广泛关注。

二、DNA 甲基化与肿瘤转移

肿瘤转移是一个多阶段多步骤的过程,包括肿瘤

血管生成、肿瘤细胞间以及肿瘤细胞与细胞外基质间的黏附与脱黏附、细胞外基质的降解及肿瘤细胞迁移侵入基质、进入血管或淋巴管内并在循环系统内存活、与特定部位的血管内皮细胞结合并穿出血管壁,在远端器官的存活和增生等^[7,8]。与这些功能及过程相关的基因的甲基化变化可以影响其表达,从而影响肿瘤的转移,对于预测和判断肿瘤的转移能力有重要意义。目前与肿瘤转移相关的甲基化标志物的研究模式较多,主要有单基因和多基因研究,研究对象多为已有功能报道的基因,也有基因组的重复序列以及 miRNA 等。

1. 细胞凋亡相关基因甲基化:肿瘤组织中存在具有转移能力的细胞可能是转移发生的前提,这些细胞往往具有抗凋亡、侵袭和迁移及定植增生的能力。因此,与其功能相应的基因在转移相关标志物研究中备受关注。抑癌基因 p16 位于染色体 9p21 上,编码细胞周期蛋白 P16 蛋白,对细胞周期依赖激酶(CDKs)起负平衡的调节作用。该基因的主要失活机制是启动子高甲基化和纯合性缺失,而基因突变比较少见^[9]。其甲基化在胃癌、食管癌、肺癌、口腔癌、宫颈癌中均有报道,影响肿瘤的转移和预后^[3,10~15]。Seike 等^[13]利用 MSP 方法分析了 29 例具有远处转移的非小细胞肺癌组织及其相应正常组织和远处转移灶,发现有 37% 的肿瘤组织或远处转移灶发生了 p16 甲基化,在没有 p53 突变的肺癌中,p16 甲基化预测转移的能力更高。另外一项 36 例乳腺浸润性导管癌的研究显示,肿瘤组织中 p16 甲基化与肿瘤的分期、大小和淋巴结转移显著相关,血浆 DNA p16 甲基化也与淋巴结转移相关^[16]。同样,p16 甲基化与转移的关系在胃癌中也有体现。我们利用 DHPLC 技术分析了 82 对胃癌组织样品,不仅发现肿瘤组织中 p16 甲基化含量高于癌旁组织(12.90% : 0.63%; $P = 0.005$),而且转移组的甲基化含量高于非转移组的甲基化含量(14.76% : 2.61%, $P = 0.014$),p16 甲基化的阳性率随着胃癌浸润深度增加而增加^[17]。

2. 细胞黏附相关基因甲基化:肿瘤细胞与细胞外

基质间的黏附与脱黏附是肿瘤转移中的重要步骤,其相关分子变化势必会影响到此过程。其中最受关注的是黏附分子家族中的 E-cadherin。E-cadherin 为钙依赖性的跨膜黏附分子,主要参与同源细胞间的连接,是上皮细胞间相互黏附和维持组织结构稳定的重要蛋白,E-cadherin 基因表达降低或缺失,与肿瘤的分化、侵袭及远处转移密切相关^[18]。对胃癌、结直肠癌、乳腺癌及前列腺癌的研究均表明,E-cadherin 启动子区 CpG 岛的甲基化与该基因的表达降低有关^[18,19]。Tai 等人^[20]的细胞实验发现在侵袭能力低的细胞中 E-cadherin 启动子区不发生甲基化,而在侵袭能力较高的细胞系中,E-cadherin 的启动子区高甲基化。同样,临床资料研究也支持上述发现。Hiraki 等人^[21]对 80 例浸润深度不同的胃癌患者腹腔积液 DNA 利用定量 PCR 方法检测,发现 E-cadherin 的甲基化程度随着浸润深度的增加而增加(T_1 20%, T_2 45%, T_3 50%; $P < 0.05$)。通过检测腹腔积液 E-cadherin 甲基化变化,可以发现细胞学和组织学所未能检测到的隐性肿瘤细胞,因此可用来预测腹膜转移的危险度。同样,在另一项研究中 Kim 等^[22]发现,E-cadherin 的甲基化影响了早期胃癌的转移。利用 MSP 方法,他们分析了 60 例早期胃癌患者标本(其中 30 例为淋巴结转移患者)及其转移部位标本 E-cadherin 的甲基化情况,原发肿瘤标本分析表明,其甲基化在存在淋巴结转移和不存在淋巴结转移的患者之间有显著性差异,转移组的甲基化阳性率要高于非转移组的阳性率(60%:30%, $P = 0.016$);对肿瘤转移灶 E-cadherin 甲基化分析发现,其阳性率要高于原发肿瘤的甲基化阳性率(70%:45%, $P = 0.021$)。因此,E-cadherin 甲基化不仅是胃癌进展的早期标志物,而且也影响胃癌的转移。E-cadherin 甲基化发生在肿瘤进展和浸润的早期,在转移发生过程中起作用,其甲基化随着外界环境对细胞侵袭能力要求的变化而变化。

3. 细胞外基质降解相关基因甲基化:肿瘤从原位增生到侵袭转移的演变过程中,肿瘤细胞必须具备降解细胞外基质、突破组织屏障的能力。细胞外基质的降解主要依靠各种蛋白水解酶,其中基质金属蛋白酶(MMPs)是基质降解代谢的主要酶类。MMPs 及其组织抑制因子 TIMPs 两者的平衡决定了细胞外基质(ECM)的降解程度,所以探讨两者甲基化对转移的作用,对于肿瘤的诊断治疗,预后等都有重要的意义。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是

一组结构相近、功能复杂的蛋白水解酶,因其需要 Zn^{2+} 等金属离子作为辅助因子而得名。MMPs 通过参与细胞表面和细胞外基质蛋白的降解或激活过程来调控细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间的相互作用,是正常细胞与肿瘤细胞微环境的重要调节因子。研究表明,其成员 MMP-2、-7、-9 等表达受甲基化调控,并且影响了肿瘤细胞的转移能力^[23,24]。Shukeird 等^[23]通过体内外实验表明,MMPs 家族成员 MMP2 的甲基化调控其表达,影响了 PC3 细胞的侵袭能力。同样利用前列腺癌细胞系,Sato 等人^[24]发现,5-aza-dC 处理细胞后,MMP-1、-2、-3、-7、-9 和 -14 的表达发生改变,提高了细胞的侵袭能力。金属基质蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)是 MMPs 的天然抑制因子,TIMPs 家族包括 4 种不同的类型分别是 TIMP1、2、3、4。TIMPs 由大部分同时产生 MMPs 的细胞产生和分泌,主要由巨噬细胞和结缔组织产生。其成员之一 TIMP3 是一种抑癌基因^[25],可以抑制肿瘤生长、血管生成和侵袭转移,而且可以促进凋亡^[26]。而 TIMP3 表达降低或缺失往往是肿瘤发生的重要因素。大量的文献表明^[27,28],在胃癌、乳腺癌等肿瘤中,该基因的沉默都与自身甲基化相关。Hoque 等人^[29]研究了 175 个膀胱癌患者的尿沉渣 DNA,利用实时定量 PCR 检测 TIMP3 的甲基化状态,TIMP3 甲基化程度高的患者总生存时间要短于 TIMP3 甲基化程度低的患者($P = 0.005$),是判断患者预后的重要指标。尽管暂时没有其甲基化与肿瘤转移的报道,但是其功能基础为后期研究提供了重要线索。

4. 细胞运动、迁移相关基因甲基化:肿瘤细胞的运动迁移能力是肿瘤发生转移必不可少的能力。其功能相关基因的甲基化很有可能影响肿瘤转移能力。血清反应因子(serum response factor, SRF)是高度保守的磷酸化 DNA 结合蛋白,也是重要的细胞转录调控因子,是一种转移促进基因。它不仅广泛调控细胞增生因子的转录,而且还特异地调节细胞骨架成分(如肌动蛋白)的转录,从而影响了细胞的黏附和迁移。Medjkane 等^[30]研究表明,MRTF-SRF 通路影响肿瘤细胞的浸润和转移。我们近期先后对 102 例存在远处转移和未见转移的胃癌病例队列进行研究,发现转移组胃癌手术切缘组织 SRF 基因的甲基化频率明显低于非转移组(7.8%:31.4%, $P = 0.003$);SRF 甲基化阳性的患者中位生存时间明显的大于 SRF 甲基化阴性的患者(32 个月:23 个月; $P =$

0.006)。对另外 100 例有淋巴结转移但是无远处转移的胃癌病例开展验证研究,再次发现 SRF 的甲基化与这些胃癌患者的术后总生存时间显著相关(49 个月:36 个月 $P=0.045$)。在 78 例日本胃癌患者中开展验证研究也得到了相同的结果。这些结果证明 SRF 甲基化是一个良好的胃癌转移标志物,可用于胃癌患者预后判断,已经申请发明专利(全文待发表)^[31]。

5. 其他重要相关基因甲基化:CD44 是一个由单一基因编码的糖蛋白家族,定位于染色体 11p13 上。CD44 是黏附分子,广泛分布于多种内皮细胞、造血干细胞、间充质细胞以及肿瘤细胞的表面,与透明质酸等配体结合,发挥细胞黏附、信号传导的作用,参与造血以及肿瘤的生长、转移等多种生理和病理过程。CD44 参与恶性肿瘤的生长和发育具体机制并不十分明确。作为黏附分子,CD44 能够与作为细胞外基质主要成分的透明质酸结合,沿着透明质酸爬行,向远处转移。MMP 能够诱导一些 ECM 成分蛋白质水解,CD44 作为 MMP 的表面受体及底物,可能促进肿瘤转移低阻力通道的形成,促进肿瘤转移。但是 CD44 却是前列腺癌的转移抑制因子,其甲基化能够促进前列腺癌的转移^[32,33]。Kito 等^[33]对 97 例不同分期前列腺癌标本及转移灶进行分析,结果表明 CD44 的甲基化与前列腺癌的分期显著相关($P=0.044$),随着临床分期的增加,甲基化的阳性率也增加,且转移灶的甲基化情况与原发灶不同,因转移灶位于不同位置,其甲基化状态亦不同。在 Lou 等人^[34]的研究中亦看到类似的结果,通过分析 80 对前列腺癌及其癌旁组织,他们发现,40 例癌组织中有 31 例 CD44 甲基化,4 例转移灶中有 3 例 CD44 甲基化。CD44 的甲基化贯穿于前列腺癌的发生发展过程。与普通基因的研究一样,近年来 miRNA 的发现使肿瘤的研究有了新的靶点。miRNA 是指小的,不编码蛋白的 RNA,大约有 22 个碱基的长度^[35]。miRNA 通过调节其他基因的表达来影响细胞的增生、分化和凋亡^[35]。同时,在乳腺癌的研究中发现,miR-10b、miR-373 和 miR-520c 能够促进乳腺癌的转移,miR-126 和 miR-335 能够抑制乳腺癌的转移^[36~38]。miRNA 甲基化同样可影响肿瘤的转移和复发^[39]。通过对 207 例不同类型的肿瘤及 32 例正常组织利用 MSP 方法进行分析,研究者发现 miR-34b/c、miR-148、miR-9-3 的甲基化与结肠癌、肺癌、乳腺癌以及头颈部肿瘤的淋巴结转移显著相关($P=0.002$ 、 $P=0.019$ 、 $P=$

0.0001)^[39]。

三、肿瘤转移甲基化标志物研究面临的问题与展望

随着各种检测甲基化的高灵敏技术(如 MSP, DHPLC, MethyLight)的出现,目前许多灵敏度和特异性较高的肿瘤相关甲基化标志物已被鉴定。然而,对肿瘤转移相关的甲基化标志物的研究相对较少,而且面临很多问题。首先,样本资源少。相对于原发肿瘤研究来说,由于存在远处转移病例往往失去了手术时机,手术的标本数目自然较少,远处转移灶更难获得,使得许多肿瘤转移相关标志物的初筛和核实/验证研究缺乏良好的样品。其次,肿瘤转移是一个复杂、多基因协同的过程,随着各种高通量筛选平台的普及,被初筛出的转移相关候选基因数目太多,选择核实/验证研究靶点较困难^[34]。虽然多基因组合可提高标志物灵敏度,但是也会降低特异性,大幅度增加研究成本。再次,多数标志物缺乏多中心研究验证。

DNA 甲基化测定极其灵敏,可测定组织中少数细胞变化。这是其他现有分子生物学分析技术所不具备的特征。目前已有的研究资料展示,DNA 甲基化标志物为现代肿瘤生物学知识的临床应用架起了又一条通途,在肿瘤转移、耐药/复发、癌前病变癌变能力预测上已经展示出重要应用前景。

参考文献

- Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, *et al.* Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol*, 1998, 160(3 Pt 1): 645-659
- Sidransky D Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 210-219
- Cao J, Zhou J, Gao Y, *et al.* Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5178-5183
- Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(4): 296-307
- Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, *et al.* DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*, 2008, 358(11): 1118-1128
- 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. *Int J Cancer*, 2010, 126(7): 1630-1639
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 453-458
- Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 2006, 127(4): 679-695
- Mund C, Beier V, Bewerunge P, *et al.* Array-based analysis of genomic DNA methylation patterns of the tumour suppressor gene p16INK4A promoter in colon carcinoma cell lines. *Nucleic Acids*

- Res, 2005, 33(8): e73
- 10 Hall GL, Shaw RJ, Field EA, *et al.* p16 Promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(8): 2174 – 2179
- 11 Sun Y, Deng D, You WC, *et al.* Methylation of p16 CpG islands associated with malignant transformation of gastric dysplasia in a population – based study. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5087 – 5093
- 12 Merlo A, Herman JG, Mao L, *et al.* 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*, 1995, 1(7): 686 – 692
- 13 Seike M, Gemma A, Hosoya Y, *et al.* Increase in the frequency of p16INK4 gene inactivation by hypermethylation in lung cancer during the process of metastasis and its relation to the status of p53. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(11): 4307 – 4313
- 14 Queiroz C, Silva TC, Alves VA, *et al.* P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre – neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract*, 2006, 202(2): 77 – 83
- 15 Wang JS, Guo M, Montgomery EA, *et al.* DNA promoter hypermethylation of p16 and APC predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(9): 2153 – 2160
- 16 Hu XC, Wong IH, Chow LW Tumor – derived aberrant methylation in plasma of invasive ductal breast cancer patients: clinical implications. *Oncol Rep*, 2003, 10(6): 1811 – 1815
- 17 Luo D, Zhang B, Lv L, *et al.* Methylation of CpG islands of p16 associated with progression of primary gastric carcinomas. *Lab Invest*, 2006, 86(6): 591 – 598
- 18 Yuecheng Y, Hongmei L, Xiaoyan X Clinical evaluation of E – cadherin expression and its regulation mechanism in epithelial ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23(1): 65 – 74
- 19 Chan AO, Lam SK, *et al.* Promoter methylation of E – cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut*, 2003, 52(4): 502 – 506
- 20 Tai KY, Shiah SG, Shieh YS, *et al.* DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. *Oncogene*, 2007, 26(27): 3989 – 3997
- 21 Hiraki M, Kitajima Y, Sato S, *et al.* Aberrant gene methylation in the peritoneal fluid is a risk factor predicting peritoneal recurrence in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(3): 330 – 338
- 22 Yi Kim D, Kyoong Joo J, Kyu Park Y, *et al.* E – cadherin expression in early gastric carcinoma and correlation with lymph node metastasis. *J Surg Oncol*, 2007, 96(5): 429 – 435
- 23 Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, *et al.* Rabbani SA Alteration of the methylation status of tumor – promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 2006, 66(18): 9202 – 9210
- 24 Sato N, Maehara N, Su GH, *et al.* Effects of 5 – azacytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(4): 327 – 330
- 25 Anand – Apte B, Bao L, Smith R, *et al.* A review of tissue inhibitor of metalloproteinases – 3 (TIMP – 3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol*, 1996, 74(6): 853 – 862
- 26 Ahonen M, Baker AH, Kahari VM. Adenovirus – mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases – 3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res*, 1998, 58(11): 2310 – 2315
- 27 Kang GH, Shim YH, Jung HY, *et al.* CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 2847 – 2851
- 28 Bachman KE, Herman JG, Corn PG, *et al.* Methylation – associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase – 3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 798 – 802
- 29 Hoque MO, Begum S, Brait M, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases – 3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. *J Urol*, 2008, 179(2): 743 – 747
- 30 Medjkane S, Perez – Sanchez C, Gaggioli C, *et al.* Treisman R Myocardin – related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3): 257 – 268
- 31 邓大君,刘兆君. 国家发明专利“体外预测肿瘤转移和侵袭能力的方法及核苷酸片段”,申请号 2010101111380.0
- 32 Gao AC, Lou W, Dong JT, *et al.* CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res*, 1997, 57(5): 846 – 849
- 33 Kito H, Suzuki H, Ichikawa T, *et al.* Hypermethylation of the CD44 gene is correlated with progression and metastasis of human prostate cancer. *Prostate*, 2001, 49(2): 110 – 115
- 34 Lou W, Krill D, Dhir R, *et al.* Methylation of the CD44 metastasis suppressor gene in human prostate cancer. *Cancer Res*, 1999, 59(10): 2329 – 2331
- 35 He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522 – 531
- 36 Ma L, Teruya – Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA – 10b in breast cancer. *Nature*, 2007, 449(7163): 682 – 688
- 37 Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, *et al.* The microRNAs miR – 373 and miR – 520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(2): 202 – 210
- 38 Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 2008, 451(7175): 147 – 152
- 39 Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, *et al.* A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(36): 13556 – 13561

(收稿:2010 – 08 – 23)