

乳腺癌相关基因异常甲基化研究进展及其临床应用

吴 亮 王建明

摘 要 乳腺癌是世界范围内女性常见的恶性肿瘤。由于发病机制复杂,目前还缺乏有效的一级预防措施,早发现、早诊断、早治疗有助于改善预后并提高生存质量。抑癌基因启动子区 DNA 异常甲基化是乳腺癌发生过程中的早期事件,及时识别乳腺组织及外周血循环 DNA 甲基化模式的变化是最有前景的早期诊断手段之一。本文重点介绍乳腺癌抑癌基因 DNA 甲基化研究进展及其临床应用。

关键词 乳腺癌 基因 DNA 甲基化

[中图分类号] R737 [文献标识码] A

乳腺癌是世界范围内女性最常见的恶性肿瘤之一,目前关于乳腺癌生物标志物的研究很多,如 ER、PR、HER-2 等已广泛应用于治疗方案筛选,但用于特异性诊断的生物标志物还很匮乏。尽管国内外研究者正积极探索新的蛋白类生物标志物,但难以突破发展和应用中的瓶颈,即特异性抗体制备和定量检测困难。因此,寻找新型的特异性生物标志物是实现包括乳腺癌在内的多种肿瘤早期诊断的当务之急。

随着分子生物学领域研究的深入,人们发现 DNA 序列以外的调控异常在肿瘤发生、发展过程中更为普遍,这种不依赖于 DNA 序列变化的可遗传的调控称为表观遗传改变,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、基因印迹以及 microRNA 调控等^[1]。与遗传因素不同的是,表观遗传受环境因素控制,其改变是可逆的。作为一种潜在分子生物标志物和药物靶点,表观遗传学在肿瘤防治领域日益受到重视,其主要形式之一即 DNA 甲基化。

DNA 甲基化是肿瘤发生的早期事件,在肿瘤发生发展中起着重要作用^[2]。DNA 甲基化是指生物体在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基转移到特定碱基上的过程。DNA 甲基化可以发生在胞嘧啶的 C-5 位、腺嘌呤的 N-6 位、胞嘧啶的 N-4 位或鸟嘌呤的 N-7 位等。在哺乳动物中 DNA 甲基化主要发生在富含 CpG 岛的基因启动子区^[3]。该区的 CpG 岛发生

甲基化后可导致基因转录受抑,蛋白表达减少,相应的生物学功能下降甚至丧失。肿瘤发生时,一般呈现全基因组低甲基化而特异基因超甲基化的现象。现已确认的超甲基化基因大多是抑癌基因,如乳腺癌中常见的超甲基化基因包括细胞周期调节、细胞凋亡、DNA 修复、激素调节、细胞黏附和侵袭、血管生成等基因。

一、乳腺癌特异性位点 DNA 异常甲基化

近年来研究发现,多种基因在乳腺癌组织发生了异常甲基化。

1. BRCA1 基因:1990 年 Hall 等研究发现,染色体 17q21 与早期发生的家族性乳腺癌有关,1994 年 Miki 等成功克隆了第 1 个与家族性乳腺癌和卵巢癌相关的基因,命名为 BRCA1。BRCA1 基因的可遗传性突变是约 50% 遗传性乳腺癌的主要分子机制,但在散发性乳腺癌中 BRCA1 基因的突变频率并不高。目前已证实 DNA 甲基化所致的 BRCA1 基因失活是乳腺癌发生中的一个重要事件,而且与患者预后有关^[4, 5]。

2. Cyclin D2 基因:Cyclin D2 是 D 型细胞周期素的成员之一,在细胞周期中通过调控细胞周期素依赖蛋白激酶 Cdk4 和 Cdk6 的活性参与 G₁ 期到 S 期的过渡。Evron 等(2001 年)观察到近半数的原发性乳腺癌病例组织中检测到该基因启动子区呈高甲基化,且与 Cyclin D2 mRNA 和蛋白表达缺失。

3. SFRP1 基因:分泌型卷曲相关蛋白 1(SFRP1)基因是 Wnt 信号通路的抑制剂,通过干扰配体-受体间的相互作用而阻断 Wnt 信号通路。Jeong 等^[6]利用焦磷酸测序技术分析 60 例乳腺癌组织,发现基底细胞样亚型乳腺癌 SFRP1 甲基化水平显著降低,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172268);江苏省高校自然科学研究重大项目(12KJA330001)

作者单位:211166 南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

通讯作者:王建明,电子邮箱:jmwang@njmu.edu.cn

提示该基因异常甲基化可作为表观遗传标志物和乳腺癌预后因子。

4. CDH1 基因: 又称 E - 钙黏蛋白基因, 编码的 E - 钙黏蛋白(E - cadherin) 是一种跨膜糖蛋白, 属于细胞黏附分子家族, 介导相邻的上皮细胞间依赖钙的细胞连接, 对于维持细胞分化、极性和正常组织结构起重要作用。Caldeira 等^[7]应用 MSP 技术发现浸润性乳腺癌患者 CDH1 基因高甲基化与雌激素受体 ER 低表达有关。Sebova 等^[8]发现 CDH1 基因甲基化水平的差异在不同淋巴结状态亚组 and 不同免疫组化亚组中均有统计学意义, 提示高甲基化的 CDH1 基因可以为识别潜在转移性肿瘤提供依据。

5. APC 基因: 结肠癌瘤性息肉病基因(APC) 由 Herrera 于 1986 年在 1 例格德纳综合征患者中发现。正常情况下具有多种功能, 如抑制细胞生长及促进细胞凋亡、调节细胞迁移和 Wnt 信号转导等。Swift - Scanlan 等^[9]发现 APC 甲基化频率随乳腺癌分期和肿瘤大小增长而增加, 与不良预后结局有关, 同时也发现 APC 甲基化与 ER + 、HER - 2 + 乳腺癌有关, 有望作为区分 ER 阳性与否以及癌细胞侵袭性强弱的标志。

6. RASSF1A 基因: Dammann 等(2000 年) 用酵母双杂交筛选方法从染色体 3p21.3 克隆出与 RAS 效应蛋白 Maxp1、Nore1 高度同源的基因 RASSF1, 命名为 RAS 相关结构域家族 1 基因, 其中 RASSF1A 是主要的转录本之一。Xu 等^[10]通过焦磷酸测序法发现 RASSF1A 启动子甲基化与肿瘤复发和总生存期有关。Jiang 等^[11]发现 RASSF1A 基因启动子高甲基化使乳腺癌患者癌症复发及预后不良的风险增高, 提示 RASSF1A 启动子甲基化可能是乳腺癌的潜在预后指标。

二、乳腺癌全基因组异常甲基化

随着研究的深入, 科学家们致力于发现全基因组范围内未知的甲基化位点。与特异性位点甲基化检测相比, 全基因组甲基化分析可以帮助我们广泛、深入地寻找异常甲基化位点并探索其临床应用价值。在单个基因甲基化没有或者只有较弱的临床预后意义的情况下, 多基因甲基化标志物的联合应用则可有效预测患者治疗后的生存期长短。

Toyota 等(1999 年) 在大肠癌的研究中发现, 一些病例同时存在多个基因的异常甲基化, 称为 CpG 岛甲基化表型(CIMP)。CIMP 涉及多个基因启动子同时甲基化, 具有肿瘤特异性, 与多种肿瘤的发生或

预后相关。Fang 等^[12]通过 DNA 微阵列杂交技术在乳腺癌研究中发现 CIMP + 肿瘤发生转移的可能性低于 CIMP - 肿瘤, 并且有较好的临床结局。

Holm 等^[13]使用 Illumina Golden Gate Methylation Cancer Panel 检测了 807 个基因的 CpG 位点, 发现甲基化状态与腺腔 A 型、腺腔 B 型、基底细胞样型乳腺癌有关联, 其中腺腔 B 型乳腺癌的甲基化程度最高, 而基底细胞样型最低, 提示不同乳腺癌分子亚型与乳腺组织中特异 DNA 甲基化存在关联。

全基因组甲基化研究还发现谱系特异性甲基化现象。Sproul 等^[14]使用 27k Infinium arrays 研究了 19 个乳腺癌细胞系和 49 例原发性乳腺癌患者的 14000 多个基因, 他提出乳腺癌 DNA 甲基化是细胞谱系而不是肿瘤进展的标志, 同时也强调识别肿瘤特异性甲基化对未来乳腺癌的诊断和治疗至关重要。

三、外周血游离 DNA 甲基化检测

大多数 DNA 甲基化检测需要组织标本, 在临床应用上具有一定困难。作为早期诊断或预后的潜在标志物, 需要一种简单、可靠、非侵袭性的检测手段。20 世纪 40 年代后期, Mandel 和 Metais 首先在体循环中发现游离核酸。怀孕、外伤和器官移植后的健康人和癌症患者体循环中游离 DNA 量较大, 其分子大小在 500bp ~ 30kb 之间。早在 1977 年 Leon 等就发现肿瘤患者血液循环中游离 DNA 的水平显著高于正常人, 且可检测到肿瘤特异性 DNA 改变。之后在肺癌患者的痰液、膀胱癌和前列腺癌患者的尿液、众多类型癌症患者的血浆/血清中均发现 DNA 异常甲基化。循环 DNA 的遗传及表观遗传学改变模式与同一个体癌灶组织细胞的 DNA 基本一致, 且血清比血浆含量更多^[15,16]。游离 DNA 简便、微创的取材方式及其与疾病的高度相关性使其具有广泛的临床应用价值。人外周血循环 DNA 量和质的改变与疾病发生发展关系密切, 有望成为疾病诊断、疗效评估及预后预测的一种重要分子标志物。但由于游离 DNA 的含量较低, 提取比较困难, 游离 DNA 的检测方法不一, 各自敏感度差异较大, 特异性低, 易发生假阴性, 检测方法还需进一步改进。

越来越多的研究证实肿瘤患者血清中有高水平的肿瘤特异性 DNA 改变, 其中 90% 以上为来源于肿瘤组织的游离循环 DNA, 但血清中 DNA 含量很少, 需要非常灵敏的检验方法^[17-19]。Radpour 等利用 SEQUENOM's Epi TYPER 技术分析了 10 个候选基因(APC、BIN1、BMP6、BRCA1、CST6、ESR - b、GSTP1、

P16、P21、TIMP3) 甲基化谱, 结果发现, 患者外周血循环 DNA 的甲基化模式与乳腺癌组织的甲基化模式高度一致, 采用其中 8 个基因构建的 DNA 甲基化文库已足以区分正常乳腺组织与乳腺癌组织, 敏感度和特异性均达 90% 以上^[16]。其他实验方法, 如基于限制性内切酶的方法 (RLGS、Ms-AC-PCR 等)、基于免疫的方法 (MeDIP)、基于亚硫酸氢盐转化的方法 (MSP、MS-HRM、Methylight) 等已被用于游离 DNA 甲基化检测。

四、针对 DNA 异常甲基化的临床治疗应用

过去几十年间, 乳腺癌分子生物疗法有了迅速发展, 对于雌激素受体阳性患者可采用选择性雌激素受体调节剂 (SERMs) 如他莫昔芬, 芳香酶抑制剂 (AIs) 如阿那曲唑, 选择性雌激素受体下调剂 (SERDs) 如氟维司群。针对雌激素受体阴性乳腺癌患者则可先恢复其 ESR1 (雌激素受体 α) 基因表达, 重建雌激素对肿瘤细胞生长的调控, 再使用抗雌激素药物治疗^[20]。

越来越多证据表明内分泌疗法相关的雌激素受体通路与表观遗传机制有关^[21]。与基因突变不同, 表观遗传修饰是可逆的, 因此该领域的研究有望拓展乳腺癌治疗方法。对乳腺癌细胞系研究发现, DNA 甲基转移酶抑制剂可恢复 ESR1 的表达^[22]。也有研究发现组蛋白去乙酰化酶抑制剂也可以再活化雌激素受体阴性细胞系的受体表达^[21]。Michaud 等在 1994 年研究小鼠 A^{vy} 等位基因时发现, 营养成分可以调节哺乳动物细胞表观遗传状态, 利用植物以及一些植物的天然产物来预防及治疗各种癌症引起了人们极大的兴趣^[23]。

目前可用于治疗乳腺癌的甲基化转移酶抑制剂如阿扎胞苷、地西他滨等尚存在诸多不足, 它们大部分具有高毒性且缺乏基因特异性, 非特异性的脱甲基还具有引起抑癌基因沉默的风险。食物的生物活性成分制剂也有缺点, 例如从绿茶中提取的生物活性物质——表没食子儿茶素没食子酸酯 (简称 EGCG) 在生理条件下非常不稳定, 姜黄中的姜黄素几乎不溶于水, 很难被胃肠道吸收^[4]。尽管存在这些问题, 利用天然膳食中的生物活性成分来预防和治疗肿瘤仍具有广阔的应用前景。

DNA 甲基化作为一个新兴研究领域, 在临床应用方面的价值日益受到重视, 但缺乏简便、灵敏、特异的检测方法, 仍是制约其广泛应用的瓶颈^[24]。DNA 甲基化仅是表观遗传学改变的一部分, 我们期待能更深入地了解乳腺癌表观遗传学改变, 如组蛋白修饰、

MicroRNA 等。现阶段乳腺癌表观遗传学研究虽然未能完全解释乳腺癌的发生机制, 但随着研究深入和分子生物学技术的发展, 必将涌现出更多、更完善的检测和分析方法, 为表观遗传学研究提供强有力的技术支持。

参考文献

- Biddie SC, Lightman SL. Epigenetics: a lasting impression? [J]. *Neuroendocrinol*, 2011, 23(2):194-195
- Bergman Y, Cedar H. DNA methylation dynamics in health and disease[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(3):274-281
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(10):1057-1068
- Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, *et al*. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome[J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25(1):61-73
- Hsu NC, Huang YF, Yokoyama KK, *et al*. Methylation of BRCA1 promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early-stage breast cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56256
- Jeong YJ, Jeong HY, Bong JG, *et al*. Low methylation levels of the SFRP1 gene are associated with the basal-like subtype of breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(5):1946-1954
- Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, *et al*. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6:48
- Sebova K, Zmetakova I, Bella V, *et al*. RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2011, 10(1):13-26
- Swift-Scanlan T, Vang R, Blackford A, *et al*. Methylated genes in breast cancer: associations with clinical and histopathological features in a familial breast cancer cohort[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(10):853-865
- Xu J, Shetty PB, Feng W, *et al*. Methylation of HIN-1, RASSF1A, RIL and CDH13 in breast cancer is associated with clinical characteristics, but only RASSF1A methylation is associated with outcome[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:243
- Jiang Y, Cui L, Chen WD, *et al*. The prognostic role of RASSF1A promoter methylation in breast cancer: a meta-analysis of published data[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e36780
- Fang F, Turcan S, Rimner A, *et al*. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(75):75ra25
- Holm K, Hegardt C, Staaf J, *et al*. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(3):R36
- Sproul D, Nestor C, Culley J, *et al*. Transcriptionally repressed genes become aberrantly methylated and distinguish tumors of different lineages in breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(11):4364-4369
- Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers[J]. *Curr Mol Med*, 2010,

- 10(2):142-165
- 16 Radpour R, Barekati Z, Kohler C, *et al.* Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16080
- 17 Van De Voorde L, Speeckaert R, Van Gestel D, *et al.* DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer[J]. Mutat Res, 2012, 751(2):304-325
- 18 Kohler C, Barekati Z, Radpour R, *et al.* Cell-free DNA in the circulation as a potential cancer biomarker[J]. Anticancer Res, 2011, 31(8):2623-2628
- 19 Suijkerbuijk KP, van Diest PJ, van der Wall E. Improving early breast cancer detection: focus on methylation[J]. Ann Oncol, 2011, 22(1):24-29
- 20 Dworkin AM, Huang TH, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: implications for breast cancer detection, prognosis and treatment[J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19(3):165-171
- 21 Pathiraja TN, Stearns V, Oesterreich S. Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer - role in treatment response[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(1):35-47
- 22 Fan J, Yin WJ, Lu JS, *et al.* ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(8):883-890
- 23 Li Y, Tollefsbol TO. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(20):2141-2151
- 24 Jain S, Wojdacz TK, Su YH. Challenges for the application of DNA methylation biomarkers in molecular diagnostic testing for cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2013, 13(3):283-294
- (收稿日期:2013-10-12)
- (修回日期:2013-10-18)

下颌前磨牙牙根数目变异的相关研究

孔令佳 万 阔

[中图分类号] R782

[文献标识码] A

下颌前磨牙由于具有多样异常的解剖形态而闻名,是根管治疗中最有难度的一类牙齿,Sloewy 教授称下颌前磨牙是“牙体牙髓的一个谜”^[1]。多数的口腔教科书对于下颌前磨牙的解剖形态都有很好的描述,但是没有提供一些牙根及根管变异的细节,而下颌前磨牙牙根的数目变异有一定的发生率。搜索大部分文献报道更多的是根管形态的变异,对于牙根数目的变异研究较少。但下颌前磨牙的牙根数目的解剖变异对于牙体牙髓、口腔外科以及口腔修复学都是一项巨大的挑战。掌握下颌前磨牙的解剖是口腔临床操作的基础。

本文通过检索 Pubmed 以及万方数据知识服务平台,以“下颌第一前磨牙”、“下颌第二前磨牙”、“牙根变异”、“mandibular premolar”、“anomalous”、“root configuration”为关键词搜索论著及病例报告,对下颌前磨牙的牙根数目变异概况做一回顾与综述,以期对临床诊治和科学研究有所帮助。

一、下颌前磨牙牙根数目变异的影响因素

下颌第一前磨牙大部分为单根,扁而细长,近中面的根尖部常有分叉的痕迹。下颌第二前磨牙大部分为单根,扁圆,近中面无分叉痕迹^[2]。影响下颌前磨牙的牙根数目的因素包括生物学因素、种族及性别^[1]。

1. 牙根数目变异的生物学因素:牙根的发育始于最初釉质形成时期。内釉上皮和外釉上皮细胞开始增殖然后形成 Hertwig's 上皮根鞘。上皮根鞘继续生长,离开牙冠向牙髓方向呈 45°角弯曲,形成一盘状结构,弯曲的这一部分上皮称上皮隔。牙根的数量就是由上皮隔和邻近的外胚间叶细胞所决定的。在多根形成时,首先在上皮隔长出 2 个或 3 个舌形突起,这些突起增生伸长,与对侧突起相连,这时上皮隔围成的单一孔,被分隔成 2 个或 3 个孔,将来就形成双根或三根^[3]。

2. 下颌前磨牙牙根数目变异的种族差异:一些学者认为,牙齿解剖结构存在人种差异、不同人种,不同国家地区下颌前磨牙的解剖结构有不同趋势。Trope 等的研究表明下颌前磨牙牙根数目存在着巨大的种族差异,其结果显示美国黑人与高加索白种人下颌第

基金项目:美国中华医学基金会基金资助项目(A350600)

作者单位:100730 中国医学科学院北京协和医院口腔科

通讯作者:万阔,电子信箱:wankuo@126.com