

- repair proteins MLH1, MSH2 and MSH6 correlates with the Ki67 proliferation index and survival in patients with recurrent glioblastoma [J]. Neurol Res, 2010, 32(8):816–820
- 15 Rodríguez – Hernández I, García JL, Santos – Briz A, et al. Integrated analysis of mismatch repair system in malignant astrocytomas [J]. PLoS One, 2013, 8(9):e76401
- 16 Pei C, Chen H, Jia X, et al. A high frequency of MSH6 G268A polymorphism and survival association in glioblastoma [J]. Int J Neurosci, 2013, 123(2):114–120
- 17 Johannesma PC, van der Klijf HM, van Grieken NC, et al. Childhood brain tumours due to germline bi-allelic mismatch repair gene mutations [J]. Clin Genet, 2011, 80(3):243–255
- 18 TCGA Consortium. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways [J]. Nature, 2008, 455: 1061–1068
- 19 Hinke F, van Thuijl, H FMazor, et al. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolamide treatment [J]. Acta neuropathologica, 2015, 129(4):597–607
- 20 McFadie – Figueroa JL, Braun CJ, Stanciu M, et al. Minor changes in expression of the mismatch repair protein MSH2 exert a major impact on glioblastoma response to temozolamide [J]. Cancer Res, 2015, 75(15):3127–3138
- 21 Ramirez YP, Mladek AC, Phillips RM, et al. Evaluation of novel imidazotetrazine analogues designed to overcome temozolamide resistance and glioblastoma regrowth [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(1):111–119
- 22 Zhang J, Hummersone M, Matthews CS, et al. N3–substituted temozolamide analogs overcome methylguanine–DNA methyltransferase and mismatch repair precipitating apoptotic and autophagic cancer cell death [J]. Oncology, 2015, 88(1):28–48
- 23 Huang BY, Zhan YP, Zong WJ, et al. The PD-1/B7-H1 pathway modulates the natural killer cells versus mouse glioma stem cells [J]. PLoS One, 2015, 10(8):e0134715

(收稿日期:2016-07-19)

(修回日期:2016-07-31)

## 乳腺癌相关基因 DNA 甲基化的研究进展

张微 韩翠翠 岳丽玲

**摘要** 乳腺癌是女性发生率较高的恶性肿瘤之一,其产生与发展是一个复杂的生物学过程,而 DNA 甲基化是促使乳腺癌发生的重要方式。DNA 甲基化可介导乳腺癌致病基因的异常表达。随着人们对乳腺癌认识的不断深入,通过基因组水平筛选出乳腺癌主要致病基因,对进一步诊断及治疗乳腺癌有重要意义。本文对乳腺癌 DNA 甲基化及相关基因的研究进展进行综述与评价。

**关键词** 乳腺癌 DNA 甲基化 抑癌基因

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.005

乳腺癌是全球女性恶性肿瘤死亡的主要原因,也是女性死于癌症的主要疾病。乳腺癌的产生是一个复杂生物学过程,是由于遗传性和非遗传性两种因素相互作用引起的。乳腺癌较多发生在女性中,与患者年龄以及家族遗传有关,综合激素水平、生活习惯等因素,每个乳腺癌患者的预测准确率也只有 58%~59%<sup>[1]</sup>。随着表观遗传学的发展,人们发现 DNA、组蛋白、染色质水平的转变会影响基因表达的变化。乳腺癌的发生是由于环境和基因因素共同作用的结果。随着乳腺癌发生率的不断增加,乳腺癌逐渐成为威胁

女性健康的主要疾病,人们对于乳腺癌发病机制和致病基因的研究手段也在不断提高。一直以来乳腺癌的患病率、风险预测和早期检测都具有一定的挑战性,尽管肿瘤 X 线钼靶法已经成为一种较为有效的乳腺癌筛查的检查方式,但射线辐射、主观判断以及对于检测年轻女性乳腺增生缺乏敏感度,导致这种方法的实用性受到了局限。大量研究表明乳腺癌发生时,基因的异常甲基化起主要作用。在乳腺正常细胞向肿瘤细胞不断转化的过程中,基因的异常甲基化导致染色体不稳定,基因异常表达,引起肿瘤的发生。乳腺癌相关因子的研究日趋成熟,这将对乳腺癌诊断与治疗的细化指导有重要意义<sup>[2]</sup>。

### 一、DNA 甲基化

DNA 甲基化是基因组常见的表观遗传修饰,在细胞分化、增殖、防御外源物质入侵等方面发挥重要

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(H2014100)

作者单位:154007 佳木斯大学基础医学院(张微);161006 齐齐哈尔医学院医药科学研究院(张微、韩翠翠、岳丽玲)

通讯作者:岳丽玲,教授,电子信箱:yuell1025@126.com

作用,在哺乳动物繁殖或疾病等特殊时期,细胞会通过 DNA 甲基化来调节基因表达<sup>[3]</sup>。正常状态下的 DNA 甲基化在基因表达、胚胎发育等方面起到重要作用。而异常 DNA 甲基化则与肿瘤发生和发展密切相关。DNA 甲基化是指在 DNA 甲级转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 的作用下将硫腺苷甲硫氨酸 (adenosine methionine sulfur, SAM) 上的甲基转移到胞嘧啶的第 5 位碳原子上,形成 5 - 甲基胞嘧啶 (5mc)。DNA 甲基化主要通过 DNMT 催化实现。DNMT 家族包括 DNMT1、DNMT2 和 DNMT3 3 种,其中 DNMT2 虽然具有催化区域,但没有完整的调节区域,所以 DNMT2 具有微弱的甲级转移酶活性,因此,DNMT1 和 DNMT3 起主要催化作用。DNMT1 在 DNA 复制和修复中使其甲基化,并维持 DNA 的甲基化状态与形式<sup>[4]</sup>。DNMT3 包括 DNMT3a、DNMT3b 和 DNMT3L 3 种形式,前两者是从头甲基化酶,DNMT3L 主要功能是巩固 DNMT3a、DNMT3b 与 DNA 的结合,增强从头甲基化,但其本身没有催化 DNA 甲基化的活性。目前已经上市的 DNA 甲级转移酶抑制剂包括 5 - 氮杂胞苷和地西他滨等,用于临床血液系统疾病。DNA 甲基化大多数发生在 DNA 序列中的胞嘧啶上,一般来说 DNA 胞嘧啶的甲基化在 CpG 岛处高发。总的来说,肿瘤细胞 DNA 甲基化水平通常低于正常细胞,这种状态可导致原癌基因激活,肿瘤细胞异常增殖分化,促进癌症形成。但有些启动子区域的 CpG 岛处于高甲基化状态,这种情况下,抑癌基因表达失活,导致肿瘤的发展。正常细胞基因的启动子区处于非甲基化或低甲基化状态,染色质疏松,有利于转录因子与启动子区结合,从而启动转录。启动子区的胞嘧啶甲基化是通过阻止特异转录因子与启动子结合或者促使核染色质重塑来抑制基因表达。

DNA 甲基化参与转录活性调控引起表观遗传学性改变,通过抑制特定基因表达导致基因沉默,进而使基因组功能减弱甚至丧失,对维持基因组完整性、X 染色体失活、基因表达以及干细胞分化有重要作用。DNA 甲基化与基因沉默有关,甲基化的胞嘧啶抑制了转录因子与 RNA 聚合酶 II 的结合,引起核小体重新定位和染色质重塑,形成异常染色质造成基因表达沉默<sup>[5]</sup>。DNA 甲基化通过含有保守 DNA 结合序列的甲基化 CpG 结合域,特异性识别二核苷酸并结合后引起转录抑制,导致基因沉默。甲基化 CpG 结合蛋白 (methyl - CpG - binding domain, MBD) 包括 MeCP2、MBD1、MBD2、MBD3 和 MBD4 4 种核蛋白<sup>[6]</sup>。

MBD 与胞嘧啶甲基化的 DNA 相互作用维持或者改变核小体的结构和基因表达程序。MBD 蛋白不仅可以抑制转录调控机制,还可以招募组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC),在 GC 富集的启动子区域调控基因组造成染色质重塑,介导基因表达沉默。DNA 甲基化在恶性肿瘤细胞内尤为明显,在基因特定区域发生高度甲基化或基因组低甲基化。Kar 等<sup>[7]</sup>认为全基因组去甲基化可导致原癌基因的激活和染色质不稳定,启动子区域 CpG 岛发生超甲基化可使基因表达沉默、抑癌基因失活,因此,维持甲基化状态稳定才能防止肿瘤的恶性转化。MBD 蛋白在甲基化过程中被认为起到桥梁作用,它能够特异性识别甲基化启动子区结合诱导抑癌基因表达沉默,抑制转录活性。

## 二、乳腺癌相关基因甲基化

1. CHST11 基因: CHST11 位于人染色体 12q23.3, 在全身组织广泛性表达,能够选择性将硫酸基团转移给软骨素,参与蛋白质形成。当肿瘤形成时,体内硫酸软骨素失衡,影响肿瘤细胞特异性<sup>[8]</sup>。CHST11 基因甲基化状态通过亚硫酸氢钠基因组测序法分析,实时荧光定量 PCR 和流式细胞术确定 CHST11 在乳腺癌细胞系中的表达情况。结果表明,与管腔细胞系相比,CHST11 在基底细胞和 HER2 扩增细胞系中的表达明显增高,CHST11 在癌症组织中表达高于正常组织<sup>[9,10]</sup>。MCF7 细胞经 5 - 氮杂 - 2' - 脱氧胞苷 (5 - Aza - 2' - deoxycytidine, 5 - Aza-Dc) 处理后,CHST11 表达增高。这些结果表明,CHST11 在乳腺癌发展过程中发挥重要作用,其表达受 DNA 甲基化调控。CHST11 的表达水平可以预测乳腺癌进展以及侵袭性表型,CHST11 甲基化状态与基因表达缺失有关,在 CpG 岛发生高甲基化<sup>[11~13]</sup>。因此,除 CHST11 的 mRNA 表达情况影响乳腺癌发生,基因的甲基化状态也可作为乳腺癌预后的生物学标志物。

2. Runx3 基因: Runx3 基因是近年来发现的一种新的抑癌基因,位于人染色体 1p36.1 区域,基因全长 76kb, 属于 Runx 转录因子家族<sup>[14]</sup>。Runx3 基因含有 P1 和 P2 两个启动子,其中 P2 中 GC 含量较高,因此 DNA 甲基化主要发生在 P2 启动子上。乳腺癌组织 Runx3 基因高甲基化,引起转录阻遏,从而导致基因表达缺失。乔丽等<sup>[15]</sup>研究显示,Runx3 基因启动子区甲基化率为 58.33%, 明显高于癌旁组织,说明 Runx3 启动子区异常甲基化在乳腺癌中具有肿瘤特

异性。Jiang 等<sup>[16]</sup>在对 5 种乳腺癌细胞系的 RT - PCR 检测结果发现, Runx3 基因 mRNA 表达水平与 Runx3 蛋白是有相关性的, 其中 3 种细胞系在 mRNA 水平没有表达。Runx3 基因启动子区甲基化, 抑制细胞增殖、凋亡和分化受到抑制, 促进乳腺癌肿瘤的形成, Runx3 基因表达不仅与肿瘤发生与发展具有相关性, 而且与肿瘤的预后密切相关<sup>[17,18]</sup>。Runx3 甲基化程度对乳腺癌的早期诊断有一定的特异性, 因此上调 Runx3 基因表达也将为乳腺癌诊断与治疗提供新思路, 也将为乳腺癌诊断提供新的途径。

3. PCDH10 基因: PCDH10 位于人染色体 4p28.3 处, 全长 5.3kb, 属于原型钙黏蛋白家族。PCDH10 表达缺失在人类多种肿瘤发生过程中存在, 而且与肿瘤预后相关, 是一种新型的抑癌基因<sup>[19]</sup>。PCDH10 如何抑制肿瘤细胞生长的机制还不是很清楚, PCDH10 具有微弱的介导细胞聚集的能力, 表明细胞黏附并不是其主要功能。PCDH10 在中枢神经系统中丰富表达, 对中枢神经系统的发育和功能起到重要作用<sup>[20]</sup>。PCDH10 在卵巢中也能够正常表达, 但是在其他组织中表达水平较低。最近研究表明, PCDH10 在多种人类肿瘤组织中发生高甲基化, 基因启动子区甲基化或纯和缺失造成 PCDH10 基因表达部分甚至完全沉没<sup>[21]</sup>。Yu 等发现 PCDH10 在胃癌组织中表达下调, 同时 PCDH10 基因表达可以抑制胃癌细胞增殖、侵袭和转移, 并且可诱导胃癌细胞凋亡<sup>[11]</sup>。邱婵等证实 PCDH10 在胰腺癌细胞中同样可以抑制癌症细胞增殖, 诱导其凋亡, 减弱细胞侵袭能力<sup>[22]</sup>。综上所述, PCDH10 基因可诱导细胞周期阻滞、细胞凋亡以及减弱细胞迁移能力<sup>[23]</sup>。因此 PCDH10 有望成为乳腺癌治疗的新型手段, 为乳腺癌的早期诊断以及治疗提供的新的潜在靶点。

4. NOEY2 基因: NOEY2 基因是一个肿瘤抑制基因, 位于人染色体 1p31, 基因组全长 8kb, NOEY2 基因包括两个 CpG 岛, 每个长度约 300bp。基因本身含有 1 个启动子区、1 个内含子和两个外显子, 其等位缺失、染色体丢失以及启动子区甲基化与多种肿瘤的发生有关。NOEY2 基因可抑制细胞的增长、转移和侵袭, 在乳腺正常细胞中高表达, 而在乳腺癌组织细胞中呈现低表达状态。因此, NOEY2 表达于乳腺正常细胞, 而在乳腺癌肿瘤组织中则出现表达下调现象。已有研究表明在 60% ~ 70% 的乳腺癌和卵巢癌中, NOEY2 基因表达缺失或者下调, 这说明 NOEY2 基因表达活性降低导致了肿瘤的形成。人类 NOEY2

基因异常甲基化已在乳腺癌以及相应的癌旁组织中发现, 主要的突变位点是 NOEY2 基因的启动子区域和第 2 个外显子, 这种变化可使 NOEY2 基因的表达下调, 证明 NOEY2 基因的异常甲基化与肿瘤的发生有关。

5. HYAL2 基因: HYAL2 是透明质酸酶(hyaluronidase, Hyase)的一种, 能够分解细胞外基质中的透明质酸, 影响细胞增殖、迁移能力, 细胞外基质与肿瘤侵袭转移有密切联系。HYAL2 基因位于染色体 3p21.3 上, 具有抑制肿瘤发展的作用。HYAL2 是一种抑癌基因, 参与细胞黏附、细胞迁移、癌症发展、血管生成以及新陈代谢。抑癌基因 HYAL2 在乳腺癌恶性肿瘤中甲基化程度高于良性肿瘤。Yang 等研究发现, 乳腺癌的发生与外周血液 T 细胞中 HYAL2 基因的甲基化有关, 甲基化模式受生活方式、环境因素等的影响, 血液中 HYAL2 甲基化可以检测乳腺癌的早期阶段。HYAL2 基因的表达与甲基化程度呈负相关。因此, 血液 HYAL2 基因甲基化的检测可作为乳腺癌初筛方法, 为进一步诊断提供帮助。

### 三、展望

乳腺癌是全球女性死亡的主要原因。乳腺癌发展过程涉及到多个基因的异常表达, DNA 甲基化在基因调控、蛋白质表达以及个体发育过程中起到重要作用, 因此 DNA 甲基化是基因异常表达过程中的关键因素。随着对 DNA 甲基化检测技术的不断发展, 人们对于癌症基因组学领域研究的注意力越来越多的转移到肿瘤的表观遗传学方面, 靶向 DNA、DNA 甲基化机制及意义逐渐成为肿瘤研究领域的方向。通过基因治疗恢复抑癌基因的抑癌作用来抑制肿瘤生长已成为一种新的治疗手段。掌握乳腺癌基因甲基化修饰水平与基因表达的联系, 将有助于深入了解乳腺癌的发展机制。CHST11、Runx3、NOEY2、PCDH10 和 HYAL2 基因均属于抑癌基因, 都能够抑制肿瘤形成, 可以想象, 恢复其活性可有效阻止恶性肿瘤的形成和转移。随着研究的进一步深入, 新型基因的发现必将为肿瘤治疗的新靶点, 为乳腺癌的预防、诊断和治疗提供新的思路。

### 参考文献

- Wacholder S, Ph. D., Hartge P, et al. Performance of common genetic variants in breast - cancer risk models[J]. New Eng J Med, 2010, 362(11):986 - 993
- 戴保秀, 徐国萍. 乳腺癌相关基因 DNA 甲基化的研究进展[J]. 世界临床医学, 2016, 10(7):114 - 116
- Greer EL, Blanco MA, Gu L, et al. DNA Methylation on N 6 - Ade-

- nine in *C. elegans*[J]. *Cell*, 2015, 161(4):868–878
- 4 Hamidi T, Singh A K, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. [J]. *Epigenomics*, 2015, 7(2):247–265
- 5 Deb M, Kar S, Sengupta D, et al. Chromatin dynamics: H3K4 methylation and H3 variant replacement during development and in cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(18):3439–3463
- 6 邹丹丹,王晓利,汪海林. DNA甲基化结合蛋白[J]. 环境化学, 2014, 1(10):1672–1680
- 7 Kar S, Sengupta D, Deb M, et al. Expression profiling of DNA methylation – mediated epigenetic gene – silencing factors in breast cancer [J]. *Clin Epigenet*, 2014, 6(1):1–13
- 8 李艳平. CHST11 及 CHST13 在肝癌侵袭及药敏性中的作用[D]. 大连:大连医科大学, 2014
- 9 Bardowell SA, Parker J, Fan C, et al. Differential methylation relative to breast cancer subtype and matched normal tissue reveals distinct patterns[J]. *Breast Cancer Res Treatment*, 2013, 142(2):365–380
- 10 Weisenberger D J. Characterizing DNA methylation alterations from The Cancer Genome Atlas[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1):17–23
- 11 Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate[J]. *BBA – Gen Subjects*, 2013, 1830(10):4719–4733
- 12 Vallen MJE, Sophieke CHA. van der Steen, Tilborg A A G V, et al. Sulfated sugars in the extracellular matrix orchestrate ovarian cancer development: ‘When sweet turns sour’[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 135(2):371–381
- 13 Herman D, Leakey TI, Behrens A, et al. CHST11 gene expression and DNA methylation in breast cancer. [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3):1243–1251
- 14 Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, et al. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2009, 1796(2):315–331
- 15 乔丽,杨志勇,刘玮. Runx3 基因启动子甲基化检测对乳腺癌患者早期诊断的临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3):35–37
- 16 Jiang Y, Tong DG, Zhang Y, et al. Expression of RUNX3 gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines. [J]. *Pathobiology*, 2008, 75(4):244–251
- 17 杜金荣,娄阁,姜影. RUNX3 基因启动子甲基化与乳腺癌临床病理特征及预后因素的关系[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2008, 42(1):53–56
- 18 姜影,杜金荣,佟丹丹,等. 人乳腺癌细胞系 RUNX3 基因启动子甲基化状态研究[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(7):1268–1271
- 19 李艳平. CHST11 及 CHST13 在肝癌侵袭及药敏性中的作用[D]. 大连:大连医科大学, 2014
- 20 Bardowell S A, Parker J, Fan C, et al. Differential methylation relative to breast cancer subtype and matched normal tissue reveals distinct patterns[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 142(2):365–380
- 21 Weisenberger DJ. Characterizing DNA methylation alterations from The Cancer Genome Atlas[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1):17–23
- 22 Vallen MJE, Sophieke CHA. van der Steen, Tilborg A A G V, et al. Sulfated sugars in the extracellular matrix orchestrate ovarian cancer development: ‘When sweet turns sour’[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 135(2):371–381
- 23 Herman D, Leakey TI, Behrens A, et al. CHST11 gene expression and DNA methylation in breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3):1243–1251

(收稿日期:2016-07-19)

(修回日期:2016-07-30)

## (上接第 10 页)

- 12 Wang MT, Chen G, An SJ, et al. Prognostic significance of cyclinD1 amplification and the co-alteration of cyclinD2/pRb/PPRb in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis Esophagus*, 2012, 25(7):664–670
- 13 McBride HA, Connolly LE, et al. Uterine leiomyosarcomas are characterized by high P16, P53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential[J]. *Histopathology*, 2007, 50(7):851–858
- 14 Schmid AC, Byrne RD, Vilar R, et al. Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors [J]. *FEBS Lett*, 2004, 21:566 (123):35–38
- 15 Raj D, Liu T, Samadashwily G. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(1):194–201
- 16 Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway – directed drug discovery[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8:61–70
- 17 Khan S, Aspe JR, Asumen MG, et al. Extracellular, cellpermeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100:1073–1086
- 18 范胜军,李学军. 反向分子对接 – 药物靶点和确认的新途径[J]. 生理科学进展, 2012, 43(5):28–30
- 19 李云靖,郝志英,李凤等. 抗肿瘤靶向药物靶点研究进展[J]. 中外健康文摘, 2014(1):93–97
- 20 张瑞红,吴蕾,丁岩等. 米非司酮对子宫肌瘤、内膜组织 ER、PR、Bcl-2、Bax 的影响[J]. 武警医学, 2008, 6(19):502–504
- 21 仇丽丽,徐青,徐昌芬. 左炔诺孕酮下调 survivin 基因促进人子宫肌瘤细胞凋亡[J]. 基础医学和临床, 2012, 8(32):927–928
- 22 Di Lieto A, De Falco M, Pollio F, et al. Clinical response, vascular change, and antiogenesis in gonadotropin – releasing hormone analogue treated women with uterine[J]. *J Soc Gynecol Investigating*, 2005, 12(2):123–128
- 23 Bifumo G, Midle C, Pellicano M, et al. Molecular mechanisms involved in GnRH analogue – related apoptosis for uterine leiomyomas [J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(1):43–48
- 24 许静,杨柳,聂伟. 姜三七对子宫肌瘤患者血清中 Bcl-2 和 Bax 水平影响[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 5(35):118–120
- 25 Chambard JC, Lefloch R, Pouysseur J, et al. ERK implication in cell cycle regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8):1299–1310

(收稿日期:2016-06-27)

(修回日期:2016-07-18)