

# DNA 甲基化作为宫颈病变潜在生物学标志物的研究进展

王淑玲 赵卫红

**摘要** 宫颈癌是最常见的妇科肿瘤之一,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染是宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌的首要原因。但持续高危型 HPV 感染风险的存在并不足以使宿主上皮细胞永生化和转化,随着表观遗传学研究的深入,越来越多证据表明, DNA 甲基化在宫颈病变中发挥重要作用。无论是宿主 DNA 还是 HPV - DNA 均可发生甲基化,且 HPV 感染与 DNA 甲基化可相互调控,共同促进宫颈癌的发展。本文综述宿主 DNA 和 HPV - DNA 甲基化在宫颈癌发生、发展中的机制及其在宫颈病变筛查分流中的作用。

**关键词** 宫颈肿瘤 宫颈上皮内瘤样病变 DNA 甲基化 乳头状瘤病毒科 基因

**中图分类号** R71 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.11.037

在女性恶性肿瘤中,宫颈癌的发生率和病死率位居第四,严重危害女性健康。2018 年,全球宫颈癌新发病例约 57 万例,死亡病例约 31.1 万例,且大部分发生在发展中国家<sup>[1]</sup>。可以确定的是,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染是宫颈癌前病变和宫颈癌的首要原因,但其具体发病机制尚不清楚。临床上现行的宫颈病变筛查手段存在局限性,仍需有效的分流策略避免无病女性的不必要转诊和 HR - HPV 阳性女性的过度治疗。因此,有必要阐明导致宫颈病变恶性进展的机制并开发新的筛查和治疗方案。

越来越多的研究表明,宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和宫颈癌的发生、发展离不开表观遗传学的参与。表观遗传修饰(epigenetic modification)是指在不干扰有丝分裂或减数分裂的情况下对表观基因组基因表达的调节,如 DNA 甲基化(DNA methylation)、羟甲基化、组蛋白修饰、去甲基化、非编码 RNA 的调节等<sup>[2]</sup>。目前 DNA 甲基化是研究得最透彻的表观遗传修饰,也是最重要的化学修饰形式。在 HPV 感染期间,宿主基因和 HPV 的异常甲基化促使相应基因表达异常,进而影响宫颈癌细胞增

殖、凋亡和宿主免疫反应,推动肿瘤病情进展<sup>[3]</sup>。HPV 感染与宿主 DNA 甲基化可互相调控, DNA 甲基化异常可影响 HPV 感染, HPV 感染也与 DNA 甲基化异常有关。异常的 DNA 甲基化可能有助于区分非渐进性 HPV 感染以及癌变等级,在宫颈病变筛查中表现出极大的应用价值。

## 一、宿主 DNA 甲基化

DNA 甲基化通常发生在肿瘤抑制因子、转录因子和细胞周期调节因子基因的 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶上,通过启动子沉默抑制基因表达导致整体低甲基化和基因特异性高甲基化,在包括宫颈癌在内的致癌机制中起关键作用<sup>[4]</sup>。目前在宫颈组织中已检测出超过 100 种甲基化标志物,近 20 种在文献中被报道,其中约有 10 种基因的甲基化水平在宫颈高级别病变(high - grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)和宫颈癌中升高<sup>[5]</sup>。同时由于 DNA 甲基化有较高的特异性,故现阶段也正被研究作为宫颈病变筛查的潜在标志物。

1. CADM1 甲基化:细胞黏附分子 1(cell adhesion molecule 1, CADM1),最初也称为肺癌抑制基因 1(lung cancer tumor inhibitor 1, TSLC1),是编码免疫球蛋白家族的一种跨膜蛋白,参与上皮细胞黏附<sup>[6]</sup>。Yanatsanejit 等<sup>[7]</sup>通过体外细胞实验发现, CADM1 在转染 HPV16 E7 的人宫颈癌细胞系 C33a 细胞中因甲基化而失活,并进一步证明了 E7 癌蛋白与内源性 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)结合形成复合体诱导 CADM1 启动子甲基化,引起肿

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81702583);中国博士后科学基金资助项目(2019M651072);山西省应用基础研究计划项目(201901D211506)

作者单位:030000 太原,山西医科大学公共卫生学院

通信作者:赵卫红,硕士生导师,副主任医师,电子信箱:sydeyzwh@sxmu.edu.cn

瘤抑制基因表达沉默,导致下游基因表达水平发生变化,诱发肿瘤。Steenbergen 等<sup>[8]</sup>早在 2004 年提出 CADM1 基因超甲基化与宫颈病变的进展有关。CADM1 的甲基化水平可随着宫颈病变的严重程度而增加,也就是说,CADM1 有区分各级宫颈病变的潜力<sup>[9]</sup>。而且 Dankai 等<sup>[10]</sup>在对 3 种肿瘤抑制基因(CADM1、FAM19A4 和 MAL)的甲基化水平进行评估时,发现在区分 HSIL 与低度鳞状上皮内病变( $\leq$  LSIL)时 CADM1 基因甲基化的诊断效能最高,其受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)下的面积(area under curve, AUC)为 0.684。CADM1 不仅是宫颈筛查的高效生物学标志物,而且血浆 CADM1 甲基化和 D-二聚体(D-dimer)联合检测有望成为宫颈癌的转移标志物。Rong 等<sup>[11]</sup>在预测宫颈癌转移时,血浆 CADM1 甲基化和 D-dimer 联合的 AUC 为 0.903 (95% CI: 0.845 ~ 0.961,  $P < 0.001$ ),敏感度为 80.4%,特异性为 90.5%。因此,CADM1 甲基化可作为宫颈病变筛查、诊断及宫颈癌转移潜在生物学标志物。

2. FAM19A4/miR124-2 甲基化:具有序列相似性的 19 家族[趋化因子(c-motif)-样]成员 A4 (family with sequence similarity 19 member A4, FAM19A4),又名 TAFA4,是编码小分泌蛋白的 5 个高度同源基因 TAFA 家族成员。FAM19A4 在正常组织中表达水平较低,在巨噬细胞和单核细胞中呈高水平表达,对巨噬细胞的吞噬和迁移起促进作用,并调控炎症感染和应激反应。伍恒英等<sup>[12]</sup>推测,FAM19A4 基因甲基化诊断宫颈癌的的检测方法能够不受 HPV 的干扰,尤其是在 HR-HPV 阴性宫颈癌的诊断中优势更加突出。同样,Vink 等<sup>[13]</sup>的一项全球性研究发现,FAM19A4 的甲基化水平与宫颈病理组织类型、宫颈癌临床分期、HPV 状态及 HPV 基因型均无关。该团队在荷兰筛查队列中将 FAM19A4/miR124-2 基因甲基化与细胞学相结合,检测 CIN3+ 的敏感度达 84.6% (95% CI: 78.3% ~ 90.8%),特异性为 69.6% (95% CI: 66.5% ~ 72.7%),展现出良好的分诊效能<sup>[14]</sup>。Bu 等<sup>[15]</sup>研究发现,FAM19A4 与细胞学分级呈正相关,甲基化率由低到高依次为正常宫颈组织、LSIL、HSIL、宫颈癌(10.61%、35.48%、56.14%和 93.44%)。De Strooper 等<sup>[16]</sup>对 FAM19A4/miR124-2 甲基化测试细胞学阴性(< ASC-US)女性的癌症风险进行了纵向分析,结果表明与细胞学阴性比较,FAM19A4/miR124-2 甲基化试验阴性的 HR-HPV

阳性女性宫颈癌发病风险较低(RD = 0.71%, 95% CI: 0.16% ~ 1.40%)。但是关于 DNA 甲基化的研究大多仍为回顾性研究,无法评估 FAM19A4 作为宫颈癌生物学标志物的潜力。

3. PAX1 甲基化:配对盒家族基因 1 (paired box1, PAX1)是 PAX 家族的成员,位于人染色体 20p11.2,在胚胎发育和调控细胞分裂和增殖方面发挥重要作用<sup>[17]</sup>。它参与肿瘤的发生与发展,在宫颈癌的筛查、诊断、治疗及预后中发挥着重要的作用。PAX1 基因主要负责维持宫颈上皮内激酶和磷酸酶之间的开关稳态。PAX1 基因通过激活蛋白酪氨酸磷酸酶受体 R (protein tyrosine phosphatase, receptor type R, PT-PRR)抑制 ERK1/2 磷酸化,抑制致癌激酶的活性。同样,在 SET1B 和 WDR5 作用下 PAX1 基因诱导组蛋白 H3 第 4 号赖氨酸(histone H3 lysine 4, H3K4)甲基化,激活了一系列的磷酸酶。然而,HPV 感染可能会使 PAX1 发生甲基化,引起 PAX1 蛋白表达缺失,抑制致癌激酶级联,破坏这种平衡<sup>[18]</sup>。Lai 等<sup>[19]</sup>报道了 PAX1 异常甲基化与宫颈癌有关,PAX1 发生高甲基化抑制其表达,经去甲基化处理后基因重新表达,发挥其抑癌作用。李碧军等<sup>[20]</sup>研究发现,PAX1 基因的甲基化具有较高的敏感度和特异性,在细胞学异常(ASC-US、LSIL、ASC-H)女性中通过 PAX1 甲基化检测分流可提高对 HSIL+ 的检出率,而且使用 PAX1 甲基化代替 HPV 检测对细胞学进行分流时,阴道镜转诊率可降至 34.91%。当宫颈恶性与非恶性病变的临界值( $\Delta$ Cp 值)为 13.28 时,PAX1 甲基化检测的敏感度、特异性和 AUC 分别可达 92.30%、78.60%和 0.902,其阳性预测值为 80.00%,阴性预测值为 91.67%<sup>[21]</sup>。

## 二、HPV-DNA 甲基化

除宿主 DNA 甲基化与宫颈病变有关外,HPV-DNA 甲基化也与宫颈病变进展有关,HPV-DNA 甲基化正被用作宫颈病变筛查的重要标志物。HPV 基因组有 3 个功能域,即早期转录区(E1~E7)、晚期转录区(L1 和 L2)、以及一个控制区(long control region, LCR),这些区域中的甲基化与 CIN 和宫颈癌的发生有着密切的关系。其中,研究最多的有 E6、E7、L1、L2 和 LCR 区 CpG 位点甲基化。研究表明,L1 和 L2 区的甲基化程度随着疾病的严重程度而增加<sup>[22]</sup>。关于 LCR 区的甲基化研究结果尚不一致。Bowden 等<sup>[22]</sup>对 44 项 HPV DNA 甲基化研究进行系统回顾和 Meta 分析,发现 HPV LCR 区的甲基化与疾病严重程

度无关,15 项研究报告在 HSIL 中 LCR 区甲基化程度较高,另 6 项研究的结果却与之相反。

在 12 种致癌 HPV 类型中,HPV16、HPV18 与 HPV45 甲基化水平与 CIN3 和宫颈原位腺癌(cervical adenocarcinoma in situ, AIS)相关性最强<sup>[23]</sup>。有研究表明,HPV16L1、L2、E2 和 E4 区的高甲基化与 CIN3 和 HPV 持续感染的风险增加有关,E6 基因的高甲基化提示发生高级别宫颈病变的风险降低<sup>[24,25]</sup>。在一项基于 10 年随访宫颈癌筛查队列中,评估了 HPV16 单独甲基化或联合 E6 癌蛋白对 CIN3+ 的预测能力。Dong 等<sup>[26]</sup>研究发现,在 HPV16 阳性女性中,甲基化组结合 E6 癌蛋白表现出明显的优势,AUC 值为 0.72~0.82,明显优于细胞学。

### 三、HPV 与宿主 DNA 甲基化相互作用

虽说 HPV 感染与 DNA 甲基化间的关系尚未研究透彻,但可以确定的是,二者间相互作用共同促进宫颈癌的恶性病变。Yang 等<sup>[27]</sup>研究发现,HPV 感染与宫颈癌中 DNA 甲基化的调控相关。Huang 等<sup>[28]</sup>探讨基因启动子甲基化与 HR-HPV 感染的相互作用,发现在宫颈癌前病变中 HR-HPV 感染与基因启动子环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)和线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)的甲基化水平之间有协同作用。高危型 HPV16 和 HPV18 感染与 APC( $P=0.008$  和  $P=0.007$ )、SFRP1( $P=0.003$  和  $P=0.0067$ )和 PTEN( $P=0.049$  和  $P=0.008$ )启动子甲基化呈显著正相关<sup>[29]</sup>。Nedjai 等<sup>[30]</sup>提出红细胞膜蛋白配体 4.1 样 3 (EPB41L3) 甲基化可能发生在 HR-HPV 感染之前,并与病毒基因组扩增和遗传不稳定有关,使宫颈病变进展加快。

HPV 基因组不仅自身会发生甲基化,HPV 蛋白还可诱导宿主基因甲基化,影响相关基因的表达。在宫颈病变恶性转化过程中,HPV 感染会引起宿主细胞的表现遗传重新编码,随后导致相应的 HPV 基因组表型变异<sup>[27]</sup>。特别是 HPVE6 E7 蛋白基因在感染 HR-HPV 到发展为宫颈癌中有着至关重要的作用。它们可诱导 DNMT 过表达,该酶可催化蛋白质编码基因和 miRNA 的异常甲基化<sup>[31]</sup>。HPV16 E6 通过直接结合宫颈癌细胞中载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽 3B (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B, APOBEC3B) 的启动子上调 APOBEC3B,这与细胞周期蛋白 D1 (cyclinD1, CCND1) 低甲基化和宫颈癌细胞增殖有关<sup>[32]</sup>。同样,HPV16 E7

蛋白可以操控宿主细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平引起乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 入核,入核后的 LDHA 获得一种非典型酶活性,产生  $\alpha$ -羟基丁酸,并触发 DOT1L 介导的组蛋白 H3 赖氨酸 79 (histone H3 lysine 79, H3K79) 高甲基化,导致抗氧化反应和 Wnt 信号通路的激活,Wnt 通路异常活化,促进肿瘤细胞的增殖和转移<sup>[33]</sup>。此外,E7 癌蛋白还可诱导组蛋白去甲基化酶(lysine-specific demethylase 5A, KDM5A)上调,而 KDM5A 与 miR-424-5p 的启动子结合,并通过去除 H3K4 的三甲基和二甲基来抑制 miR-424-5p 表达,进而影响宫颈癌细胞的增殖和迁移<sup>[34]</sup>。Na 等<sup>[35]</sup>研究表明,HPV E7 蛋白会引起 C1QBP、BCAP31、CDKN2A 和 PTMS 4 个基因启动子的异常甲基化,从而促进宫颈癌的发生和发展,但其具体的机制还有待研究。从这些研究可以看出,与 HPV16 E6 比较,E7 癌蛋白在肿瘤的进展中似乎发挥更强大的作用。

### 四、展 望

鉴于 DNA 甲基化在宫颈病变中的关键作用,已有研究提出 DNA 甲基化有望成为宫颈癌筛查的生物学标志物,有助于探索病毒基因组与宿主基因组的整合,更深入了解宫颈癌的发病机制、更准确地筛查癌前病变,减少不必要的阴道镜转诊。而且联合甲基化检测可以获得更高的敏感度和特异性,展现出广阔的研究前景。但是目前的研究尚不充分,如各研究尚没有统一的标准导致不少研究结果不一致,关于甲基化的前瞻性研究较少等。因此,仍需深入探寻甲基化在宫颈癌发生、发展中作用,寻找最佳的生物学标志物,为宫颈癌的筛查和治疗提供新靶点。

### 参考文献

- Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, *et al.* Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis[J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2): e191-e203
- Xie N, Zhou Y, Sun Q, *et al.* Novel epigenetic techniques provided by the CRISPR/Cas9 system[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 7834175
- Durzynska J, Lesniewicz K, Poreba E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017, 772: 36-50
- Yadav N, Parveen S, Banerjee M. Potential of nano-phytochemicals in cervical cancer therapy[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 505: 60-72
- 李明珠, 魏丽惠. 甲基化检测在宫颈癌诊治中的意义[J]. *现代妇产科进展*, 2019, 28(9): 704-705
- Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, *et al.* The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 31014-31019

- 7 Yanatsanejit P, Chalertpet K, Sukbhattee J, *et al.* Promoter methylation of tumor suppressor genes induced by human papillomavirus in cervical cancer[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 955–961
- 8 Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, *et al.* TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(4): 294–305
- 9 Del PM, Sierra A, Marimon L, *et al.* CADM1, MAL, and miR124 promoter methylation as biomarkers of transforming cervical intraepithelial lesions[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2262
- 10 Dankai W, Khunamornpong S, Siriaunkgul S, *et al.* Role of genomic DNA methylation in detection of cytologic and histologic abnormalities in high risk HPV – infected women[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e210289
- 11 Rong G, Zhang M, Xia W, *et al.* Plasma CADM1 promoter hypermethylation and D – dimer as novel metastasis predictors of cervical cancer[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2019, 45(7): 1251–1259
- 12 伍恒英, 彭苏珺, 布俏雯, 等. FAM19A4 基因启动子甲基化在高危型 HPV 阴性宫颈癌诊断中的作用[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(5): 683–687
- 13 Vink FJ, Meijer C, Clifford GM, *et al.* FAM19A4/miR124 – 2 methylation in invasive cervical cancer: a retrospective cross – sectional worldwide study[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(4): 1215–1221
- 14 Vink FJ, Lissenberg – Witte BI, Meijer C, *et al.* FAM19A4/miR124 – 2 methylation analysis as a triage test for HPV – positive women: cross – sectional and longitudinal data from a Dutch screening cohort [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(1): 121–125
- 15 Bu Q, Wang S, Ma J, *et al.* The clinical significance of FAM19A4 methylation in high – risk HPV – positive cervical samples for the detection of cervical (pre)cancer in Chinese women[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1182
- 16 De Strooper L, Berkhof J, Steenbergen R, *et al.* Cervical cancer risk in HPV – positive women after a negative FAM19A4/miR124 – 2 methylation test: a post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow – up[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(6): 1541–1548
- 17 Fang C, Wang SY, Liou YL, *et al.* The promising role of PAX1 (aliases; HUP48, OFC2) gene methylation in cancer screening[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(3): e506
- 18 Su PH, Lai HC, Huang RL, *et al.* Paired box – 1 (PAX1) activates multiple phosphatases and inhibits kinase cascades in cervical cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9195
- 19 Lai HC, Lin YW, Huang TH, *et al.* Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(1): 161–167
- 20 李碧军, 郭瑞霞, 刘媛媛, 等. PAX1 甲基化检测对细胞学异常 (ASCUS、LSIL 和 ASC – H) 患者的分流作用[J]. *现代妇产科进展*, 2021, 30(3): 184–188
- 21 Liu H, Meng X, Wang J. Real time quantitative methylation detection of PAX1 gene in cervical cancer screening[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2020, 30(10): 1488–1492
- 22 Bowden SJ, Kalliala I, Veroniki AA, *et al.* The use of human papillomavirus DNA methylation in cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and Meta – analysis[J]. *EBioMedicine*, 2019, 50: 246–259
- 23 Clarke MA, Gradissimo A, Schiffman M, *et al.* Human papillomavirus DNA methylation as a biomarker for cervical precancer: consistency across 12 genotypes and potential impact on management of HPV – positive women[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(9): 2194–2202
- 24 Simanaviciene V, Popenkityte V, Gudleviciene Z, *et al.* Different DNA methylation pattern of HPV16, HPV18 and HPV51 genomes in asymptomatic HPV infection as compared to cervical neoplasia[J]. *Virology*, 2015, 484: 227–233
- 25 Piyathilake CJ, Macaluso M, Alvarez RD, *et al.* A higher degree of methylation of the HPV 16 E6 gene is associated with a lower likelihood of being diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Cancer*, 2011, 117(5): 957–963
- 26 Dong L, Zhang L, Hu SY, *et al.* Risk stratification of HPV 16 DNA methylation combined with E6 oncoprotein in cervical cancer screening: a 10 – year prospective cohort study [J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 62
- 27 Yang S, Wu Y, Wang S, *et al.* HPV – related methylation – based reclassification and risk stratification of cervical cancer[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(9): 2124–2141
- 28 Huang S, Li R, Huang X, *et al.* Association study between methylation in the promoter regions of cGAS, MAVS, and TRAF3 genes and the risk of cervical precancerous lesions and cervical cancer in a southern Chinese population[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1123
- 29 Kadian LK, Yadav R, Nanda S, *et al.* High – risk HPV infection modulates the promoter hypermethylation of APC, SFRP1, and PTEN in cervical cancer patients of North India[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(12): 9725–9732
- 30 Nedjai B, Reuter C, Ahmad A, *et al.* Molecular progression to cervical precancer, epigenetic switch or sequential model? [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(7): 1720–1730
- 31 Shen S, Zhang S, Liu P, *et al.* Potential role of microRNAs in the treatment and diagnosis of cervical cancer[J]. *Cancer Genet*, 2020, 248–249: 25–30
- 32 Fan Q, Huang T, Sun X, *et al.* HPV – 16/18 E6 – induced APO – BEC3B expression associates with proliferation of cervical cancer cells and hypomethylation of Cyclin D1[J]. *Mol Carcinog*, 2021, 60(5): 313–330
- 33 Liu Y, Guo JZ, Liu Y, *et al.* Nuclear lactate dehydrogenase senses ROS to produce  $\alpha$  – hydroxybutyrate for HPV – induced cervical tumor growth[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4429
- 34 Liu J, Zhao H, Zhang Q, *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein – induced upregulation of lysine – specific demethylase 5A promotes cervical cancer progression by regulating the microRNA – 424 – 5p/suppressor of zeste 12 pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(1): 112277
- 35 Na RN, Yanatsanejit P, Pisitkun T, *et al.* Host proteome linked to HPV E7 – mediated specific gene hypermethylation in cancer pathways [J]. *Infect Agent Cancer*, 2020, 15: 7

(收稿日期: 2022 – 03 – 21)

(修回日期: 2022 – 03 – 23)