

- involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*[J]. Mol Microbiol, 2009, 71(4):1055-1069.
- [26] Preeti MT, Arto SB, Nathan S. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *enterococcus faecalis*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(6):2063-2072.
- [27] Nakayama J, Chen S, Oyama N, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* fsr quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD[J]. J Bac-

teriol, 2006, 188(23):8321-8326.

- [28] Nishiguchi K, Nagata K, Tanokura M, et al. Structure activity relationship of gelatinase biosynthesis activating pheromone of *Enterococcus faecalis*[J]. J Bacteriol, 2009, 91(2):641-650.
- [29] Ahn SJ, Burne RA. The *atIA* operon of *Streptococcus mutans*: role in autolysin maturation and cell surface biogenesis[J]. J Bacteriol, 2006, 188(19):6877-6888.

(收稿日期:2012-02-15)

• 综 述 •

DNA 修复基因甲基化修饰与肿瘤研究进展

周俊峰 综述, 杨 劲 审核

(第三军医大学基础部细胞生物教研室, 重庆 400038)

关键词: DNA 修复; DNA 甲基化; 肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)08-0951-03

真核生物 DNA 修复的主要途径包括错配修复 (mismatch repair, MMR)、碱基切除修复 (base excision repair, BER)、核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER)、直接修复及重组修复等, 共同构成维持遗传信息稳定的保护机制。DNA 修复相关基因的表达缺陷可能导致遗传物质损伤积累, 在多种疾病, 特别是肿瘤的发生中具有重要作用。

甲基化是哺乳动物基因组 DNA 常见的修饰方式, 甲基化修饰大多存在于磷酸胞苷酰 (CpG) 二核苷酸中。基因组中转录调控区中富含 CpG 二核苷酸的 CpG 岛的甲基化状态, 与基因组编码基因表达水平密切相关。CpG 岛的甲基化可阻碍蛋白与 DNA 的相互作用, 从而影响基因转录过程中模板与 RNA 聚合酶的结合, 降低其转录活性。因此甲基化是基因表达调控的重要机制之一。

基因组 DNA 甲基化修饰与肿瘤的发生、侵袭、转移、耐药等生物学行为的关系密切, 其主要机制可能与 DNA 修复基因、抑癌基因、细胞周期调控基因、肿瘤侵袭相关基因等多种基因的甲基化修饰导致其表达异常有关^[1]。其中 DNA 修复基因异常甲基化可导致基因突变频率增加, 可能是肿瘤发生过程中的一个早期事件。而另一方面, DNA 修复基因直接影响细胞对 DNA 损伤物质的敏感性, 因此其甲基化修饰还影响肿瘤对于放、化疗的敏感性与耐药性^[2]。

1 BER 途径基因甲基化修饰

BER 途径能识别 DNA 中异常或错配的碱基, 并通过糖苷酶将其切除, 是最普遍的 DNA 修复方式。X 射线交叉互补修复基因 1 (X-ray repair cross-complementing gene1, XRCC1) 广泛参与因电离辐射和氧化损伤引起的 DNA 损伤的碱基切除修复和单链断裂修复^[3]。Wang 等^[4]发现在胃癌组织中 XRCC1 基因启动子区域 (-959~-714) 的甲基化水平显著高于癌旁正常组织 (76.4% 和 20.5%, $P < 0.05$), 且与胃癌组织中 XRCC1 在 mRNA 及蛋白水平的表达缺失相一致, 证实 XRCC1 是一个甲基化敏感的肿瘤相关基因。由于 XRCC1 的甲基化修饰仅存在于癌变组织中, 故推测该基因的甲基化修饰可能直接参与了肿瘤的发生过程。然而其小样本的研究并未

就 XRCC1 甲基化修饰与胃癌的关联性得出确切结论, 该基因是否可作为胃癌的一个表观遗传学标志还需要大样本的研究证实。

片状核酸内切酶 1 (Flap endonuclease 1, FEN1) 参与了长补丁碱基的切除修复, 在 DNA 氧化损伤的 BER 修复中具有重要的作用。研究表明在乳腺癌、食管鳞状细胞癌、子宫内膜癌等多种肿瘤组织中存在 FEN1 的异常高表达, 且其表达水平随肿瘤的进展而逐渐增加^[5]。而在乳腺癌细胞中, FEN1 启动子核心区域 CpG 岛的异常去甲基化可能是其表达增高的原因之一。通常认为, DNA 修复基因表达下降或表达缺失是肿瘤发生的原因之一, 而 FEN1 在肿瘤组织中高表达似乎与其 DNA 修复功能不相符。但 FEN1 基因还参与了 DNA 复制过程, 因此 FEN1 在肿瘤细胞中的高表达可能还与肿瘤细胞增殖率增加有关^[6]。由于 FEN1 作用的广泛性, 其在肿瘤发生中的具体作用机制尚待进一步研究阐明。

2 NER 途径基因甲基化修饰

NER 途径主要修复由嘧啶二聚体、DNA 加合物或 DNA 链间交联所导致的 DNA 双螺旋结构的改变。此外, 电离辐射和铂类药物导致的 DNA 损伤也主要通过 NER 途径修复。因此 NER 途径相关基因的表达异常对于多种肿瘤的发生, 以及肿瘤对放、化疗的敏感性均有重要影响。

着色性干皮病基因组 C (xeroderma pigmentosum group C, XPC) 是 NER 途径中负责识别 DNA 双链异常变形的重要分子。XPC 基因的突变、表达异常与肿瘤的发生关系密切^[7]。在膀胱癌、肺癌组织中, XPC 基因上游转录调节区域 (-175~-186) CpG 岛甲基化水平显著升高, 并导致 XPC 基因在癌组织中表达缺失^[8-9]。XPC 甲基化及表达缺失可引起肿瘤组织中 p53 等原癌基因的突变频率增加, 且与膀胱癌的恶性程度关系密切^[10]。提示 XPC 基因的甲基化修饰可能是肿瘤发生及演变过程中的一个重要因素。

切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementing1, ERCC1) 参与了 NER 途径中 DNA 解旋及损伤单链的切除, 是 NER 途径中的关键分子之一。研究证实 ERCC1

的表达受上游调节区-5751~-5282 约 500 bp 范围内 CpG 岛的甲基化修饰调控^[11]。临床研究显示 ERCC1 基因的甲基化缺失预示发生小细胞肺癌的风险增加($OR=3.9, P<0.05$),且与肺癌患者的预后相关^[12-13]。ERCC1 甲基化修饰还可影响肿瘤对放、化疗的敏感性。在不同胶质瘤细胞系对顺铂敏感性的体外实验中,顺铂抵抗组的胶质瘤细胞 ERCC1 甲基化水平显著低于顺铂敏感组($P=0.04$)^[11]。相反 ERCC1 甲基化缺失的胶质瘤细胞对放疗的敏感性降低^[14]。因此 ERCC1 甲基化修饰可能作为一个重要的表观遗传学标志,指导临床选择治疗方案。

3 直接修复途径基因甲基化修饰

O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT)是一种高效的 DNA 直接修复酶,能直接移除 DNA 序列中由于烷化剂产生的 O6-烷基鸟嘌呤,从而保护细胞免受烷化剂损害。因此 MGMT 基因启动子甲基化修饰导致的 MGMT 失活可能影响机体对烷化剂类抗肿瘤药物的敏感性。Kreth 等^[15]进行神经胶质瘤患者对于替莫唑胺化疗反应的临床研究显示,MGMT 基因甲基化组患者在治疗反应、肿瘤进展速度及生存时间等指标上均显著优于未甲基化组,证实该基因甲基化可导致细胞对烷化剂的敏感性升高。此外,在神经胶质瘤、结肠癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤等多种肿瘤组织均存在 MGMT 基因高甲基化^[16]。在结肠癌中,原癌基因 k-ras 的突变频率被证实与 MGMT 的甲基化具有显著相关性($P=0.002$)^[17]。提示 MGMT 甲基化修饰引起的 DNA 错配累积,可能会导致肿瘤相关基因的突变频率升高,从而导致肿瘤的发生。

4 MMR 途径基因甲基化修饰

MMR 是细胞纠正复制错误的重要手段,常出现在增殖过程中以维持基因的准确性。MutL 同源基因 1(MutL homolog 1, MLH1)是 MMR 启动过程中的重要基因之一,其表达缺陷可导致细胞自发突变率显著升高^[18]。MLH1 基因启动子区异常的高度甲基化修饰可导致其表达缺损,影响遗传稳定性。在 Ramirez 等^[19]进行的一项临床病例对照研究中,口腔鳞状细胞癌患者组 MLH1 基因甲基化比例达 76%,在癌症早期组甲基化比例增加尤其显著($OR=16.54, P=0.016$),而在对照组中未检出 MLH1 甲基化修饰,故该基因的甲基化修饰可能是肿瘤发生过程中的一个早期事件。此外,研究表明胃、大肠黏膜上皮细胞 MLH1 基因启动子区 CpG 岛的甲基化可随年龄增长而不断积累,从而导致老年人群中该基因的表达水平显著降低,致使胃癌、大肠癌的发生风险增加,提示该基因的甲基化可能还与衰老密切相关,而具体的调控机制尚待进一步研究^[20]。

5 重组修复途径基因甲基化修饰

乳腺癌易感基因 1(breast cancer 1, BRCA1)是一个最初在遗传性乳腺癌中发现的抑癌基因,该基因参与了 DNA 双链断裂损伤(double strand break, DSB)的重组修复。BRCA1 启动子区域中 CREB 转录因子结合位点的甲基化对该基因的表达有显著的抑制作用^[21]。在正常细胞中,BRCA1 启动子区的甲基化率极低,而在卵巢癌、乳腺癌中 BRCA1 的甲基化率显著升高,分别达 5% 和 11%^[22]。在甲胆蒽及二乙基亚硝胺诱导肺癌发生的动物实验中,BRCA1 基因甲基化修饰仅出现在浸润性肺癌组织中,在正常肺组织、不典型增生组织及鳞状上皮组织中则未见甲基化;在浸润癌及原位癌组织中,BRCA1 表

达水平较正常组织显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 BRCA1 启动子 CpG 岛甲基化修饰可能与多种肿瘤的发生及演变有关^[23]。

由于 BRCA1 在修复由铂类导致的 DNA 损伤过程中的重要作用,该基因的表达下降可导致卵巢癌细胞对铂类等化疗药物的敏感性升高^[24]。此外,因 BRCA1 与多聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)在 DSB 修复中存在协同作用,BRCA1 甲基化修饰还可使肿瘤细胞对 PARP 抑制剂的敏感性显著增加^[25]。因此 BRCA1 有可能作为一个药物基因组学分子标志物,指导临床肿瘤治疗。

6 总 结

目前已经发现多个 DNA 修复基因的甲基化修饰状态与肿瘤的发生、治疗及预后关系密切。其中一部分 DNA 修复基因的甲基化修饰是肿瘤特异性的,因此这些基因的甲基化可以作为一种生物学标志物,对于肿瘤的早期发现、高危人群的鉴别以及辅助诊断具有重要意义。甲基化敏感的聚合酶链式反应、高分辨溶解曲线分析等甲基化检测方法均具有高敏感性和特异性及检测通量大的优势,较采用 RT-PCR 或 Western-Blot 在 mRNA 或蛋白水平检测相关基因的表达改变更为简单易用,故具有很高的临床应用价值^[26]。

但由于肿瘤的多样性,不同的 DNA 修复途径在不同组织来源的肿瘤中的作用及重要性不尽相同。目前尚未在 DNA 修复基因中发现一个广泛适用于各种类型肿瘤的遗传学标志物。对于不同类型的肿瘤,同一个 DNA 修复基因的甲基化对放、化疗敏感性的影响也不完全一致。此外,生物的基因表达调控存在甲基化修饰以外的多种其他途径,采用甲基化特异性 PCR 检测启动子区 CpG 岛甲基化修饰并不能完全反映该基因在 mRNA 及蛋白水平的表达情况,故该方法也存在一定的局限性。

DNA 甲基化的调控机制尚不完全清楚,该过程可能涉及甲基化、去甲基化以及甲基化状态维持的动态平衡。DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移到胞嘧啶第 5 位碳原子上,是 DNA 甲基化过程中的重要调控分子。其中 DNMT3 可在 DNA 上形成新的甲基化位点,而 DNMT1 主要参与甲基化的维持^[27]。然而目前对于 DNA 的去甲基化过程还缺乏了解,尽管 He 等^[28]研究发现 Tet 双加氧酶可能参与了 DNA 的主动去甲基化过程,但其具体机制尚不明确。系统研究 DNA 甲基化的调控机制对于理解甲基化的平衡,以及针对特定途径开发 DNA 甲基化调节药物具有重要意义。

除了内源性的主动去甲基化酶,5-氮杂胞苷等甲基化抑制剂也可通过替代细胞内的胞嘧啶与 DNA 甲基化转移酶共价结合,导致 DNMT 失活,最终引起 DNA 去甲基化。Soengas 等^[29]成功地通过 5-氮杂胞苷开放黑色素瘤中失活的 Apaf-1 基因的表达,抑制了肿瘤的转移。目前甲基化抑制剂地西他滨(Decitabine)已经被用于非小细胞肺癌、骨髓瘤及白血病的临床治疗。但由于 5-氮杂胞苷甲基化抑制剂的非选择性作用,可能发生致畸、致突变及致癌作用,而开发基因特异性的 DNA 去甲基化药物则有可能为肿瘤的治疗开辟一条新的途径。

参考文献

[1] 刘静. DNA 修复基因高甲基化与肿瘤[J]. 国外医学卫生学分册,

- 2005, 30(6):370-375.
- [2] Lewandowska J, Bartoszek A. DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy—multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators [J]. *Mutagenesis*, 2011, 26(12):475-87.
- [3] Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded[J]. *Mutat Res*, 2000, 459(56):1-18.
- [4] Wang P, Tang JT, Peng YS, et al. XRCC1 downregulated through promoter hypermethylation is involved in human gastric carcinogenesis[J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(2):343-351.
- [5] Zheng L, Jia J, Finger LD, et al. Functional regulation of FEN1 nuclease and its link to cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16):781-794.
- [6] 杨明. FEN1 基因的遗传学和表观遗传学调控及其与多种肿瘤发生发展的关系[D]. 北京:中国协和医科大学, 2008.
- [7] Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer[J]. *Mutat Res*, 2003, 544(71):107-114.
- [8] Wu YH, Chang JHT, Cheng YW, et al. Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9):4761-4773.
- [9] Yang J, Xu Z, Li J, et al. XPC epigenetic silence coupled with p53 alteration has a significant impact on bladder cancer outcome[J]. *J Urol*, 2010, 184(24):336-343.
- [10] Chen Z, Yang J, Wang G, et al. Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group C is associated with critical events in human bladder cancer carcinogenesis and progression [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21):4578-4585.
- [11] Chen HY, Shao CJ, Chen FR, et al. Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(18):1944-1954.
- [12] Wang L, Aakre JA, Jiang R, et al. Methylation markers for small cell lung cancer in peripheral blood leukocyte DNA[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(2):778-785.
- [13] Ota S, Ishii G, Goto K, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy [J]. *Lung Cancer*, 2009, 64(21):98-104.
- [14] Liu ZG, Chen HY, Cheng JJ, et al. Relationship between methylation status of ERCC1 promoter and radiosensitivity in glioma cell lines[J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(7):1111-1117.
- [15] Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, et al. O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):171-176.
- [16] Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(15):793-797.
- [17] Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(18):2368-2371.
- [18] Prolla TA, Christie DM, Liskay RM. Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial mutL gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(2):407-415.
- [19] Ramirez I, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, et al. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer[J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(22):22-26.
- [20] Arai T, Kasahara I, Sawabe M, et al. Role of methylation of the hMLH1 gene promoter in the development of gastric and colorectal carcinoma in the elderly[J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2010, 10(1):207-212.
- [21] Nardo DN, Butcher DT, Robinson DP, et al. Functional analysis of CpG methylation in the BRCA1 promoter region[J]. *Oncogene*, 2001, 20(18):5331-5340.
- [22] Catteau A, Harris WH, Xu CF, et al. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics [J]. *Oncogene*, 1999, 18(9):1957-1965.
- [23] Liu WB, Ao L, Cui ZH, et al. Molecular analysis of DNA repair gene methylation and protein expression during chemical-induced rat lung carcinogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(43):595-601.
- [24] Paige AJ, Brown R. Pharmacogenomics in ovarian cancer [J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(10):1825-1834.
- [25] Ibragimova I, Cairns P. Assays for hypermethylation of the BRCA1 gene promoter in tumor cells to predict sensitivity to PARP-inhibitor therapy[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 780(56):277-291.
- [26] Kristensen LS, Hansen LL. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics prognostics and response to treatment[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(16):1471-1483.
- [27] Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(94):18347-1853.
- [28] He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA[J]. *Science*, 2011, 333(85):1303-1307.
- [29] Soengas MS, Capodici P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma[J]. *Nature*, 2001, 409(40):207-211.

(收稿日期:2012-01-26)