

• 综 述 •

DNA 甲基化在胃癌诊治中的应用*

余江流 综述, 凌志强[△] 审校

(浙江省肿瘤医院/浙江省肿瘤研究所, 杭州 310022)

关键词: 胃肿瘤; DNA 甲基化; 诊断; 治疗; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)12-1459-03

胃癌是世界性的高发癌症,其发病率和致死率都排在各大癌症前列。胃癌的致病因素很多,遗传和饮食习惯对胃癌有重要的影响^[1]。研究表明,表遗传在胃癌的发生、发展中起着重要作用。表遗传指不因 DNA 序列改变而引起的基因表达改变,包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和微小 RNA 调控等。其中 DNA 甲基化修饰主要发生在基因启动子富含 CG 的区域——CpG 岛。DNA 甲基化是在甲基转移酶作用下由 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)作为甲基供体将甲基转移到 CpG 岛胞嘧啶第五位碳原子上^[2-3]。甲基化后的 DNA 构象发生改变,从而影响基因表达。DNA 甲基化也可以影响 RNA 合成酶和其他转录因子对 DNA 的亲性和而引起基因转录水平的改变。不同基因的甲基化改变参与了包括胃癌在内的癌症的发生和发展,并且影响患者的治疗敏感性。因此,肿瘤相关基因甲基化检测可以应用于胃癌的诊断、治疗敏感性评估和预后评估。

1 DNA 甲基化在早期胃癌诊断中的应用

与其他肿瘤一样,早期胃癌的治愈率很高,但是目前胃癌的病死率居高不下,其主要原因就是缺乏简单有效的早期诊断方法,从而导致大多数胃癌患者在晚期或转移后才被确诊,这大大增加了治疗难度,降低了胃癌患者的生存率^[4]。因此若能找到有效的早期胃癌诊断的方法,将会大大改善胃癌的治疗效果。

1.1 腹水和胃洗液中脱落胃癌细胞 DNA 甲基化与胃癌的诊断 以前胃癌的诊断主要依靠病理学检测,最近有报道将肿瘤相关基因甲基化状态检测应用到胃癌的早期诊断。Muretto 等^[5]用甲基化特异性 PCR (MSP) 检测腹水内脱落细胞中 CDH1 基因的启动子甲基化状态。甲基化结果显示健康对照、癌前病变和低分化散发型胃癌之间 CDH1 基因启动子甲基化水平有显著差异。Nagasaka 等^[6]检测胃鳞片状脱落细胞 RASSF2 和 SFRP2 基因甲基化状态,实验结果显示,57.1% 的胃癌患者胃片状脱落细胞内 RASSF2 和 SFRP2 基因甲基化,而健康对照者只有 10.6%,并且这两个基因的甲基化水平随肿瘤发展逐渐增高。在早期无创性诊断方面,Watanabe 等^[7]从胃洗液中同样检测到 GDNF 和 MINT25 基因的甲基化与胃癌的发生有明显的相关性,尤其 MINT25 基因甲基化对早期胃癌的特异度和敏感度分别为 96% 和 90%。从这些研究结果可看出来自鳞片状脱落细胞的肿瘤相关基因的检测可以应用到胃癌的初步诊断。

1.2 血浆中游离 DNA 甲基化与胃癌诊断 除胃癌脱落细胞内 DNA 甲基化状态可应用于胃癌的早期诊断外,血浆中游离 DNA 也可应用于胃癌的早期无创性诊断。Chen 等^[8]用 MSP 法对血浆游离 DNA 中 HSulf-1 基因启动子甲基化水平进行检

测,结果显示胃癌患者血浆中游离 DNA HSulf-1 基因启动子甲基化率是 76.2%,健康对照是 19.0%,差异显著。Bernal 等^[9]对胃癌患者血浆游离 DNA 中 24 个基因甲基化状态进行筛查,得到 7 个基因 (APC、SHP1、E-cadherin、ER、Reprimo、SEMA3B、3OST2) 甲基化与健康对照之间存在差异,然后在早期胃癌患者血浆中进行验证检测,结果发现血浆中游离 DNA 中 Reprimo 基因甲基化与早期胃癌有显著相关性。

虽然肿瘤相关基因甲基化在肿瘤中十分常见,但最近有报道称部分基因甲基化和年龄有关^[10]。Waki 等^[11]研究了死亡相关蛋白激酶(DAPK)和 RUNX3 基因甲基化与年龄和胃癌的关系。结果显示 DAPK 基因甲基化和年龄相关,而 RUNX3 基因健康人在 77 岁以上才出现甲基化,在胃癌组织和癌旁组织中 RUNX3 基因甲基化率分别是 42% 和 7%,差异显著,因此,RUNX3 基因可以作为胃癌特异性的诊断标志物。

端粒是 DNA 末端保护 DNA 完整性、独立性的重要元件。端粒的长度和肿瘤的发生有紧密联系,研究表明端粒酶在多数肿瘤中异常活跃^[12-13]。人端粒酶反转录酶(hTERT)是端粒酶的一个亚基,是端粒酶活性的限制因子。Wang 等^[14]研究了 hTERT 基因甲基化和胃癌的关系。结果显示 hTERT 基因甲基化水平在正常组织、癌前病变和胃癌组织中逐渐增加。PCR 结果显示该基因表达量也逐渐增加,这与通常情况下甲基化抑制基因表达相反,因为该基因功能元件 E-box 甲基化阻碍了转录抑制子 Mad1 与启动子的结合,从而增加了基因的表达。hTERT 基因甲基化在胃正常黏膜、癌前病变和癌组织中逐渐增加预示着该基因甲基化可以作为一种胃癌的早期诊断标志物。另外该研究指出甲基化与基因表达水平不一定是简单的负相关,基因的甲基化水平改变不仅是简单地改变 RNA 聚合酶与启动子的结合能力,同样改变了其他转录因子与 DNA 结合的能力,因此甲基化对于不同基因可能有着不同甚至相反的作用,具体的机制还要进行进一步的实验研究。

2 DNA 甲基化在胃癌治疗中的应用

启动子区域甲基化改变了基因的表达水平,而这些基因参与细胞的增殖、生长和凋亡等细胞进程,因此不同基因的甲基化影响治疗的效果。

2.1 DNA 甲基化与胃癌化疗敏感性 细胞内信号通路相关基因的甲基化修饰而导致信号通路失活是引发肿瘤的重要事件,同时信号通路失活也会影响患者对化疗药物的敏感性^[15]。Sugita 等^[16]对 80 例胃癌患者术后 5-氟尿嘧啶(5-Fu)化疗效果分析发现 BNIP3 和 DAPK 基因甲基化的患者对 5-Fu 化疗不敏感,而且术后生存率明显低于未甲基化的患者。同样在胃癌 5-Fu 化疗敏感性方面 Mitsuno 等^[10]研究了 p16INK4a 基因

甲基化和 5-Fu 化疗敏感性以及术后复发的关系。结果发现 p16INK4a 基因甲基化的胃癌患者对 5-Fu 化疗更为敏感,术后生存率优于未甲基化患者。

解毒作用的机制在肿瘤细胞对铂类化疗药物的反应中起关键作用。谷胱甘肽转移酶(GSTP1)是解毒酶基因超家族成员,其作用是防止 DNA 损伤和增加癌细胞对铂类药物的抗性。Zhang 等^[17]实验发现胃癌细胞株 MGC803 比 BGC823 和 SGC7901 对顺铂的敏感性高。进一步研究发现 MGC803 中 GSTP1 缺失表达,另两个细胞株正常表达 GSTP1,并且 MGC803 细胞 GSTP1 基因甲基化水平明显高于 BGC823 和 SGC7901,用去甲基化试剂可以恢复 MGC803 细胞 GSTP1 的表达,使该细胞对顺铂敏感性显著增强,由此可知 GSTP1 基因甲基化是造成顺铂化疗敏感性差异的原因。

细胞膜运输蛋白,如 MDR1 基因产物糖蛋白 P 与化疗效果相关。Lee 等^[18]实验发现 90% 的 MDR1 mRNA 缺失表达的胃癌细胞株内 MDR1 基因甲基化,5-杂氮胞苷处理后,MDR1 mRNA 表达水平增加 60%,曲古菌素 A(TSA)处理后,MDR1 mRNA 表达水平增加 70%,并且二者之间存在协同作用。这一实验结果对 MDR1 基因甲基化与治疗效果之间的关系给出了很好的解释,由于不同肿瘤患者该基因甲基化状态不同,从而其表达量也有很大差别,因此对药物的敏感性就会不一样,造成了不同的治疗效果。

由于目前针对甲基化的化疗药物可同时影响抑癌基因和癌基因的甲基化状态,Luo 等^[19]实验研究 SAM 对癌基因 c-myc、H-ras 和抑癌基因 P16 启动子甲基化状态的改变情况,同时检测 SAM 对癌细胞的抑制效应。结果显示 SAM 显著增高胃癌细胞 c-myc、H-ras 基因启动子甲基化水平,下调这两个基因的表达量。而 SAM 处理对 P16 基因甲基化和表达量都没有太大影响。由此可知 SAM 可以抑制因低甲基化而激活的原癌基因,而对抑癌基因(P16)没有太大影响,可以应用于胃癌的靶向治疗。

2.2 DNA 甲基化应用于手术评价 血浆中游离 DNA 来自于组织细胞的破碎,肿瘤细胞较容易发生破碎而向血浆释放 DNA 片段。Sakakura 等^[20]用 MSP 检测外周血中 RUNX3 基因和肌动蛋白(actin)基因的甲基化状态,RUNX3 基因与 actin 基因的相对甲基化定义为甲基化指数。对 65 例胃癌患者实验结果显示 29% 的患者甲基化指数偏高,并且高甲基化指数与癌症分期、组织学、淋巴管和血管浸润相关,是一个比癌胚抗原更灵敏的标志物。胃癌患者术前术后血浆中游离 DNA 中 RUNX3 基因甲基化指数显著降低,因此可以应用于评价手术切除程度,监测胃癌的进展。

3 DNA 甲基化在胃癌进展和预后中的应用

3.1 DNA 甲基化与胃癌进展 肿瘤相关基因甲基化是肿瘤中的频发事件,并且甲基化程度可能与肿瘤进展相关。Hiraki 等^[21]将 80 例胃癌患者分为三组,未浸润肌肉的 A 组 35 例,浸润肌肉的 B 组 31 例和淋巴结转移浸润腹膜的 C 组 14 例,用 MSP 检测腹水内细胞中 CHFR, P16, RUNX3, E-cadherin, Hmlh1, ABCG2 和 BNIP3 基因的甲基化状态。实验结果显示 CHFR、E-cadherin 和 BNIP3 基因甲基化率在 A、B 和 C 组中均逐渐升高。多基因甲基化的患者术后复发率高,而没有甲基化或者单基因甲基化患者没有复发。Gong 等^[22]对胃癌细胞株以及胃癌组织、癌旁组织和正常组织的实验结果显示细胞株中 HLN1 蛋白基因甲基化的细胞 HLN1 缺失表达或者表达量下降,57.8% 的胃癌组织、42.1% 的癌旁组织 HLN1 基因甲基

化,而在正常胃黏膜中没有检测到 HLN1 基因甲基化。可以看出这些基因的甲基化和胃癌的进展有紧密的联系。

3.2 DNA 甲基化和胃癌分化程度相关 Gao 等^[23]研究了 CHFR 基因甲基化和胃癌分化程度之间的关系,冰冻新鲜标本实验结果显示正常对照标本 CHFR 基因没有甲基化,低分化胃癌患者的 DNA 甲基化率明显高于高分化患者。石蜡标本的免疫组化结果同样表明甲基化率与分化程度相关。同样的 HLN1 基因甲基化和胃癌分化程度也有显著的相关性^[22]。

3.3 DNA 甲基化和胃癌的预后 Wnt/ β -连环蛋白信号通路的异常激活在消化道肿瘤中较为常见。Yu 等^[15]研究了胃癌中 Dkk-3 基因启动子的甲基化状态以及在预后中的重要性。70.6% 的胃癌细胞株内 Dkk-3 因启动子甲基化而缺失表达,用去甲基化试剂处理后恢复表达。克隆形成实验结果表明高表达的 Dkk-3 可以抑制克隆形成。67.6% 的胃癌组织中 Dkk-3 基因启动子甲基化。多变量分析表明 Dkk-3 甲基化是胃癌的独立预后因子,与不良预后有显著的相关性,Kaplan-Meier 生存曲线显示 Dkk-3 甲基化患者中位生存时间只有 0.76 年,而未甲基化患者中位生存时间是 2.68 年。Buffart 等^[24]用 Q-MSP 分析 201 例胃癌患者和 22 例健康人胃黏膜中 MAL 基因启动子区域 M1 和 M2 两处甲基化状态,结果显示胃癌患者 M1 和 M2 两处甲基化概率分别是 71% 和 80%,正常胃黏膜组织 MAL 基因没有甲基化。单因素和多因素分析结果显示 M2 处甲基化患者预后较好,而 M1 处甲基化和预后没有相关性。同一基因不同位点的甲基化会产生不同的效果,可见基因甲基化对细胞的调控是一个精细的过程。除癌组织内单基因甲基化和预后相关外,Al-Moundhri 等^[25]研究了血浆中游离 DNA 甲基化和胃癌预后的关系,结果显示血浆游离 DNA 中 CDH1、P16 和 P53 基因启动子总体甲基化水平低的胃癌患者预后较好,生存率较高。有趣的是他们发现 P16 基因启动子区域 7 个甲基化位点的高甲基化率与高生存率有显著的相关性,提示这些基因产物之间可能存在相互作用,具体机制还有待研究。

4 结 语

DNA 的异常甲基化普遍存在于人类的各种肿瘤中,并且与肿瘤的发生发展和治疗敏感性紧密相关。最近的研究表明特定基因的甲基化失活或者活化在胃癌的发生发展中起着举足轻重的作用,因此对基因甲基化状态的检测和对异常甲基化的基因的甲基化修复将是胃癌诊治过程中必要而有效的方法。目前对甲基化的检测方法主要是低通量高消耗的 MSP 法和 DNA 测序法,正在发展中的高通量的甲基化检测芯片有望简化检测步骤、提高检测精确度^[26]。将高效甲基化检测方法应用于胃癌等恶性肿瘤的诊断,对异常甲基化的基因进行靶向治疗有望提高胃癌等恶性肿瘤的治愈率。

参考文献

- [1] Hou L, Wang H, Sartori S, et al. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population[J]. Int J Cancer, 2010, 127(8):1866-1874.
- [2] 吕斌斌,彭剑雄. DNA 甲基化与基因沉默及肿瘤[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1):52-55.
- [3] Corvalan AH, Maturana MJ. Recent patents of DNA methylation biomarkers in gastrointestinal oncology[J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2010, 4(3):202-209.
- [4] 凤敏华,姚立军,翁莲英,等. 血清肿瘤标志物的联合检测在胃癌诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(10):950-951.
- [5] Muretto P, Ruzzo A, Pizzagalli F, et al. Endogastric capsule for E-

- cadherin gene (CDH1) promoter hypermethylation assessment in DNA from gastric juice of diffuse gastric cancer patients[J]. Ann Oncol, 2008, 19(3): 516-519.
- [6] Nagasaka T, Tanaka N, Cullings HM, et al. Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia[J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(18): 1244-1258.
- [7] Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, et al. Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes[J]. Gastroenterology, 2009, 136(7): 2149-2158.
- [8] Chen Z, Fan JQ, Li J, et al. Promoter hypermethylation correlates with the Hsulf-1 silencing in human breast and gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 124(3): 739-744.
- [9] Bernal C, Aguayo F, Villarroel C, et al. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(19): 6264-6269.
- [10] Mitsuno M, Kitajima Y, Ide T, et al. Aberrant methylation of p16 predicts candidates for 5-fluorouracil-based adjuvant therapy in gastric cancer patients[J]. J Gastroenterol, 2007, 42(11): 866-873.
- [11] Waki T, Tamura G, Sato M, et al. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia[J]. Cancer Sci, 2003, 94(4): 360-364.
- [12] Agrawal A, Dang S, Gabrani R. Recent patents on anti-telomerase cancer therapy[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2011, 7(1): 102-117.
- [13] Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S, et al. Telomere length in neoplastic and nonneoplastic tissues of patients with familial and sporadic papillary thyroid cancer[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(11): 1852-1856.
- [14] Wang Z, Xu J, Geng X, et al. Analysis of DNA methylation status of the promoter of human telomerase reverse transcriptase in gastric carcinogenesis[J]. Arch Med Res, 2010, 41(1): 1-6.
- [15] Yu J, Tao Q, Cheng YY, et al. Promoter methylation of the Wnt/beta-catenin signaling antagonist Dkk-3 is associated with poor survival in gastric cancer[J]. Cancer, 2009, 115(1): 49-60.
- [16] Sugita H, Iida S, Inokuchi M, et al. Methylation of BNIP3 and DAPK indicates lower response to chemotherapy and poor prognosis in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2011, 25(2): 513-518.
- [17] Zhang Y, Qu X, Jing W, et al. GSTP1 determines cis-platinum cytotoxicity in gastric adenocarcinoma MGC803 cells; regulation by promoter methylation and extracellular regulated kinase signaling[J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(3): 208-214.
- [18] Lee TB, Park JH, Min YD, et al. Epigenetic mechanisms involved in differential MDR1 mRNA expression between gastric and colon cancer cell lines and rationales for clinical chemotherapy[J]. BMC Gastroenterol, 2008, 8: 33.
- [19] Luo J, Li YN, Wang F, et al. S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer[J]. Int J Biol Sci, 2010, 6(7): 784-795.
- [20] Sakakura C, Hamada T, Miyagawa K, et al. Quantitative analysis of tumor-derived methylated RUNX3 sequences in the serum of gastric cancer patients[J]. Anticancer Res, 2009, 29(7): 2619-2625.
- [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[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(3): 330-338.
- [22] Gong Y, Guo MZ, Ye ZJ, et al. Silence of HIN-1 expression through methylation of its gene promoter in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(4): 526-533.
- [23] Gao YJ, Xin Y, Zhang JJ, et al. Mechanism and pathobiologic implications of CHFR promoter methylation in gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(32): 5000-5007.
- [24] Buffart TE, Overmeer RM, Steenberg RD, et al. MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2008, 99(11): 1802-1807.
- [25] Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Tarantini L, et al. The prognostic significance of whole blood global and specific DNA methylation levels in gastric adenocarcinoma[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15585.
- [26] Tamura G, So K, Miyoshi H, et al. Quantitative assessment of gene methylation in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia using methylation-specific DNA microarray[J]. Pathol Int, 2009, 59(12): 895-899.

(收稿日期: 2011-09-04)

• 综 述 •

Toll 样受体在丙型肝炎慢性化中的作用机制

魏新素 综述, 张平安[△] 审校

(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

关键词: 肝炎, 丙型, 慢性; Toll 样受体; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.024**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)12-1461-03

世界上约有 3% 的人感染了丙型肝炎病毒(HCV), 其中 55%~85% 的感染者发展成为慢性感染^[1]。不同的个体感染后的自然病程和结局存在较大差异。Toll 样受体(TLRs)能够识别病毒的单链 RNA, 在病毒感染中参与病原体的识别和宿主反应。本文就 TLRs 在慢性丙型肝炎(CHC)发病机制中的研究进行综述。

1 HCV 感染

HCV 是黄种病毒科, 单股正链 RNA, 宿主仅局限在人类和黑猩猩。HCV 通过与宿主之间相互作用调节宿主反应来影响 HCV 感染的预后。暴露于 HCV 后, 约 15%~20% 的感染者可以通过 HCV 触发的宿主反应产生干扰素(IFN)或表达 IFN 调节基因而清除病毒; 有 80%~85% 的感染者, 因 HCV

[△] 通讯作者, E-mail: zhangpingan@yahoo.com.cn。