

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.044

# DNA 甲基化与肝癌临床关系的研究进展<sup>\*</sup>

叶 婷 综述,刘新波<sup>△</sup> 审核

(泸州医学院附属医院检验科,四川 泸州 646000)

**关键词:** DNA 甲基化;肝肿瘤;表观遗传学;临床关系

**中图分类号:** R735.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2014)25-3374-03

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要类型,是最常见的恶性肿瘤之一,在全球消化系统肿瘤病死率中占第三位,其发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。肝癌最主要的病因是慢性肝炎病毒感染(HBV 和 HCV),肝硬化以及营养不良因素,毒素侵袭和代谢紊乱等。目前肝癌的诊治有了很大进步,但其发病机制仍未完全阐明。随着近年的研究发现,肝癌的发生发展除与基因突变有关外,表观遗传学异常亦起着重要作用,其中 DNA 甲基化是表观遗传学研究最为深入和广泛的机制,在此对 DNA 甲基化与肝癌发生发展的关系及甲基化在肝癌临床诊断与治疗中的意义进行综述。

## 1 DNA 甲基化概述

DNA 甲基化是典型的表观遗传学标志<sup>[2]</sup>。在甲基转移酶的催化下,DNA 中 CG 两个核苷酸的胞嘧啶被选择性的添加甲基基团,形成 5-甲基胞嘧啶。在人类基因组中,DNA 甲基化通常发生在基因的 5'端启动子和第 1 外显子“CpG 岛”区域,可引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用的改变,抑制基因转录和表达<sup>[3-4]</sup>。肿瘤的甲基化异常体现在广泛的低甲基化、个别基因低甲基化、区域性高甲基化和印记丢失等。其中,普遍性低甲基化和区域高甲基化是基因异常表达的常见机制。DNA 甲基化水平的整体减低影响 CpG 双核苷酸的重复序列(如长散步核元件 1)以及某些基因特异性启动子 CpG 岛<sup>[5]</sup>。DNA 低甲基化会造成基因组的不稳定,激活原癌基因(如 ras、myc)及其他肿瘤促进基因的表达而诱发肿瘤。在 CpG 岛中常见的 DNA 高甲基化常引起基因转录沉默,使某些抑癌基因、DNA 修复基因等失活,导致正常细胞调控失常及 DNA 损伤不可逆,从而促进肿瘤的形成。

## 2 DNA 甲基化与肝癌的发生发展

**2.1 DNA 甲基化与肝癌的发生** 肿瘤基因 DNA 甲基化是细胞癌变过程中一个早期、频发事件,在肿瘤的发生发展中起重要作用,肝癌也不例外。尽管肝癌发生的分子机制尚不十分清楚,但越来越多的研究表明启动子 CpG 岛的异常甲基化导致的抑癌基因失活与肝癌的发生发展有关。有报道指出,肝脏线粒体内尿素循环特异性的限速酶氨甲酰磷酸合酶 I 型(carbamoyl phosphate synthetase 1, CPS1)在肝癌组织与癌细胞株中低表达,用甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷处理肝癌细胞,CPS1 表达恢复<sup>[6]</sup>。DNA 甲基化是沉默肝癌 CPS1 表达的关键机制,CPS1 基因的高甲基化与肝癌的发生密切相关。Goeppert 等<sup>[7]</sup>采用定量甲基化技术分别对肝硬化、癌前病变、肝细胞癌和正常肝组织中的 A 型激酶锚定蛋白 12(A kinase anchor protein 12, AKAP12)进行了分析,发现抑癌基因 AKAP12 在

肝癌发生过程中分阶段下调。不同的表观遗传学机制表明,在肝硬化与癌前病变阶段 miR-183 与 miR-186 上调靶标 AKAP12,使其降低;肝癌时 AKAP12 $\alpha$  启动子特异性的高甲基化导致抑癌基因 AKAP12 显著性下调。肝癌中 SOX1 基因及分泌型卷曲相关蛋白启动子区的高甲基化会导致 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的失活。Tsao 等<sup>[8]</sup>采用甲基化特异性 PCR 检测到 SOX1 在 Hep3B 肝癌细胞株与癌组织中因启动子区高甲基化导致下调,SOX1 过表达将抑制肝癌细胞增殖、集落形成与侵袭的能力;另外运用荧光素酶报告分析与蛋白印迹分析证实 SOX1 能够抑制细胞外因子 Wnt 下游基因的表达,通过干扰 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路发挥抑癌基因作用,影响肝癌的发生。Nishida 等<sup>[9]</sup>通过分析 179 例肝癌组织,178 例配对非癌肝组织以及正常肝脏得出全基因组 DNA 低甲基化是肝癌形成的重要机制,在非丙肝性肝癌中较早发生;同时是引起肝癌形成早期染色体不稳定的重要原因,尤其是非肝硬化演变的肝癌。因此,研究表明多种分子路径机制与肝癌的发生相关,其中 CpG 岛甲基化路径(CpG island methylator pathway, CIMP)、泛低甲基化与染色体不稳定型路径都被认为普遍存在,采用肝癌甲基化谱的分析是研究的主要技术手段。

**2.2 DNA 甲基化与肝癌的分期** 肝细胞癌分期系统地提供了患者评价与治疗措施的指南,是预测肝癌患者预后及临床研究中根据预后变量进行疾病分类的主要依据。DNA 甲基化异常在肝癌不同临床分期有不同的特点及表现。Piao 等<sup>[10]</sup>采用甲基化特异性 PCR 及标记 P704 的杂合性缺失研究等方法,检测了 39 例肝细胞癌中抑癌基因 RIZ1 启动子甲基化状态,并对其甲基化状态与临床病理特征、肿瘤大小分化及片段等位基因缺失(fractional allelic loss, FAL)之间相关性作了评估。研究表明,RIZ1 基因启动子在晚期肝癌( $>3$  cm)与早期肝癌( $<3$  cm)中都出现异常甲基化,分别是 58.0%(18/31)与 50.0%(4/8);22 例表现出高甲基化,在低分化(低 FAL 组)与高分化(高 FAL 组)肿瘤中甲基化率分别为 54.6%和 45.5%,其中,4 例 RIZ1 双等位基因高甲基化失活。Li 等<sup>[11]</sup>采用甲基化特异性 PCR 研究 10 种抑癌基因与 CIMP 在 115 例肝癌组织与 48 例非癌肝组织甲基化状态,抑癌基因甲基化率 P14 为 40.0%,P15 为 60.9%,P16 为 70.4%,P73 为 34.8%,GSTP1 为 70.4%,MGMT 为 64.3%,hMLH1 为 13.0%,RARbeta 为 59.1%,SOCS-1 为 82.6%,OPCML 为 80.9%;CIMP 阳性(包含至少 6 个甲基化基因)检出率为 59.1%(68/115)。进一步研究证实,TNM 分期 I 期 CIMP 阳性的肝癌患者总生存期与无瘤生存期相比 CIMP 阴性的肝癌患者显著性降低,并且多变

<sup>\*</sup> 基金项目:四川省教育厅科研项目重点项目(12ZA243,09ZA045)。 作者简介:叶婷(1982—),硕士研究生,主管技师,主要从事肿瘤分子的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel:(0830)3165730;E-mail:Liujb7203@163.com。

量分析表明 CIMP 阳性在 TNM 分期 I 期的肝癌患者中可作为总生存期 ( $HR=12.266, P=0.015$ ) 和无瘤生存期 ( $HR=20.275, P=0.032$ ) 的独立预后因素。因此, CIMP 阳性可以明确解释在 TNM 分期 I 期疗效不佳的肝癌患者, CIMP 的检测对早期肝癌患者预后分析与复发风险评估起着指导研究作用。

**2.3 DNA 甲基化与肝癌的转移** 肝癌的转移是一个涉及多个基因、多步骤的变化过程, 其关键机制的阐明将为预测和防止肝癌的转移复发提供更坚实的基础。有研究指出, 主要分布于细胞膜上的 CD44v6 基因在转移性肝细胞癌样本中表达高于非转移组, 且在肝癌细胞系 Hep3B 中 CD44v6 基因完全甲基化, 在具有转移潜能的癌细胞株 MHCC97H 与 MHCC97L 则不完全甲基化<sup>[12]</sup>; 因此 DNA 启动子区的甲基化影响 CD44v6 的表达, 并与肝癌的转移潜能呈正相关。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 及其受体 c-Met 调节正常肝细胞的生长和分化, HGF 和 c-Met 在肝癌中的上调与其发展和转移息息相关。最近 Ogunwobi 等<sup>[13]</sup>分离和建立来自鼠肝癌模型外周血的循环肿瘤细胞株, 循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTCs) 显著增高了转移性肝癌致瘤与转移的潜能; 其中 HGF 和 c-Met 在 CTCs 中表达高于原发性肝癌细胞, HGF 和 c-Met 过表达与 c-Met 启动子区 6 个特异性 CpG 位点去甲基化相关。Lv 等<sup>[14]</sup>检测了 HepG2 与 MHCC 97H 肝癌细胞株 B 细胞易位基因 3 (B-cell translocation gene 3, BTG3) 启动子甲基化状态, BTG3 可抑制肝癌细胞增殖、浸润且诱导体外肝癌细胞 G<sub>1</sub>/S 周期阻滞。研究表明 BTG3 在 LO2 肝细胞株与肝癌组织中低表达, 是由于 BTG3 基因启动区高甲基化; BTG3 的表达水平与肝癌分化及远端转移呈正相关, 低 BTG3 表达的患者总生存期缩短。

### 3 DNA 甲基化与肝癌的诊治

**3.1 DNA 甲基化与肝癌的诊断** 相较于基因突变, DNA 甲基化改变是细胞癌变过程中更为早期的事件, 肿瘤组织坏死后分解的 DNA 进入外周血 (血浆或血清) 或其他体液 (如唾液或痰等), 因此检测体液或组织中肿瘤相关基因甲基化状态可应用于肿瘤的早期诊断。Tränkenschuh 等<sup>[15]</sup>采用定量高分辨率焦磷酸测序, 研究了 15 例纤维板层型肝癌 (fibrolame carcinoma of liver, FLC) 及配对正常肝脏组织中 APC、CDH1、cyclinD2、GST $\pi$ 1、has-mir-9-1、has-mir-9-2 及 RASSF1A 基因的甲基化状态指出, cyclinD2、RASSF1A、mir-9-1 及 mir-9-2 基因在 FLC 中甲基化频率分别为 19%、38%、13% 和 33%; 而基因 APC 与 CDH1 在 FLC 中未发现其甲基化及全基因组低甲基化的依据, 这将为肝癌诊断的进一步分型提供分子依据。Nagashio 等<sup>[16]</sup>建立了以 DNA 甲基化谱为基础的肝癌癌前诊断评估标准, 结合 DNA 甲基化谱的诊断标准在受试组中诊断高致瘤风险的敏感性为 95.6%, 特异性为 100%。近来有学者提出, 游离的肿瘤特异性 DNA 异常甲基化分析为肝癌的早期诊断, 开辟了又一无创检测的最新技术手段。Sun 等<sup>[17]</sup>运用甲基化特异性 PCR 检测血清中组织因子途径抑制物 2 (tissue factor pathway inhibitor 2, TFPI2) 在肝癌组、慢性乙型肝炎组与正常对照组中的甲基化状态, 结果显示肝癌组血清 TFPI2 启动子甲基化率为 46.5%, 明显高于慢性乙型肝炎组 (16.7%) 和正常对照组 (19.2%); 血清 TFPI2 甲基化的检测率为 46.5%, 非常接近有关报道的甲胎蛋白 (AFP) 的检测率 54%, 联合 TFPI2 启动子甲基化和 AFP 标记物的检测率为 61.0%。因此, 血清 TFPI2 的甲基化可能成为肝癌诊断的无创性生物分子标记物。另外 Li 等<sup>[18]</sup>研究血清胰岛素样生长

因子结合蛋白 7 (insulin-like growth factor binding protein-7, IGFBP7) 启动子甲基化在乙型肝炎病毒相关肝癌中的诊断价值。研究中检测 136 例肝癌患者、46 例乙型肝炎患者及 45 例健康对照人群的血清 IGFBP7 启动子甲基化状态, 肝癌组甲基化率为 65% (89/136) 明显高于乙型肝炎组的 17% (8/46) 及健康对照组的 14% (5/35), 血清 IGFBP7 甲基化与 AFP 的检测敏感性分别为 65% 和 57%, 联合检测敏感性达 85%。

**3.2 DNA 甲基化与肝癌的治疗** DNA 甲基化由甲基转移酶介导, 针对 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 活性及 DNA 甲基化模式改变, 以此为基础探讨肝癌治疗策略, 可能成为肝癌治疗领域的新思路。DNA 甲基化抑制剂都是抗代谢药物, 主要包括: 以 DNMT 作用底物为靶点的药物, 如胞苷类似物 5-氮杂胞苷 (5-azacytidine, 5-Aza-CR)、5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 等; 以 DNMT 辅助因子 SAM 为靶点的药物, 如 SAM 类似物西奈芬净, 抗 SAM 代谢物 Neplanosin 等; 以及其他如甲氨蝶呤及其类似物、普鲁卡因胺等。其中以 5-Aza-CdR 为代表的抑制剂已广泛应用于逆转肿瘤细胞的异常甲基化, 使失活的基因重新表达。5-Aza-CdR 被整合到处于分裂期细胞核内的核酸中形成共价键, 从而抑制甲基化转移酶活性, 不断减弱细胞 DNA 甲基化的能力, 使甲基化的抑癌基因重新活化。近来 Tao 等<sup>[19]</sup>研究 5-Aza-CdR 通过抑制肝癌细胞中端粒酶活性发挥抗肿瘤的作用。分别采用 RT-PCR 及 Western-blot 检测 SMMC-7721 和 HepG2 肝癌细胞株相关基因 (如 c-myc、p15、p16、p21、E2F1、WT1) 的活性, 端粒重复扩增酶联免疫吸附法测定端粒酶的活性及 DNA 甲基化特异性 PCR 测定 DNA 甲基化状态, 发现端粒酶活性在用 5-Aza-CdR 处理过的两种肝细胞癌中明显降低, 随着端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 的下调, hTERT 启动子的甲基化状态在作用过 5-Aza-CdR 的 SMMC-7721 肝癌细胞株中可逆转, HepG2 肝癌细胞株却无此现象。因此 5-Aza-CdR 可增强对化疗药物的敏感性 (如顺铂) 诱导肝癌细胞的凋亡。此外, Venturelli 等<sup>[20]</sup>研究指出, 5-氮杂胞苷具有双重抗肿瘤的作用, 即既可恢复恶性肿瘤相关表型的表观遗传状态, 又可使肿瘤对凋亡诱导物质 [如肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)] 进行有效的复敏。另一种非竞争性非核苷酸类甲基转移酶抑制剂如普鲁卡因酰胺, 作用机制可能是通过影响酶的活性使胞嘧啶残基甲基化受阻, 而非直接聚合到 DNA 链, 临床试验研究结果显示普鲁卡因酰胺不良反应小, 具有临床靶向生物治疗肿瘤的潜力<sup>[21]</sup>。这些研究说明 DNA 甲基化转移酶抑制剂不失为肝癌化疗的一种手段, 对其应用价值的进一步探讨将会对肝细胞癌的综合治疗起到重要的推动作用。

### 4 展望

近来肝癌表观遗传学的研究进展迅速, 多种基因的甲基化与肝癌的早期诊断、疗效观察及预后判断等临床关系已逐渐明确, 但肝癌的发生是多因素参与的复杂过程, 仍有诸多问题尚待研究, 如 DNA 甲基化及组蛋白乙酰化、甲基化和磷酸化与肝癌的关系、甲基化与染色体重构的关系等。此外, 虽然 DNA 甲基化抑制剂在临床试验中显示出良好的前景, 但药物使用的种类、途径及时间等还不够成熟, 在疗效和不良反应方面还不令人满意。因此, 在临床上需要选择特异性更强, 敏感性更高的甲基化基因应用于肝癌患者, 实现肝癌的分子靶向治疗。

### 参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J].

- CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(7): 484-492.
  - [3] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in Cancer[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-428.
  - [4] Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours[J]. J Pathol, 2002, 196(1): 1-7.
  - [5] Ehrlich M. DNA hypomethylation in Cancer cells[J]. Epigenomics, 2009, 1(2): 239-259.
  - [6] Liu H, Dong H, Robertson K, et al. DNA methylation suppresses expression of the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1(CPS1) in human hepatocellular carcinoma[J]. Am J Pathol, 2011, 178(2): 652-661.
  - [7] Goeppert B, Schmezer P, Dutruel C, et al. Down-regulation of tumor suppressor A kinase anchor protein 12 in human hepatocarcinogenesis by epigenetic mechanisms[J]. Hepatology, 2010, 52(6): 2023-2033.
  - [8] Tsao CM, Yan MD, Shih YL, et al. SOX1 functions as a tumor suppressor by antagonizing the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2277-2287.
  - [9] Nishida N, Kudo M, Nishimura T, et al. Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e72312.
  - [10] Piao GH, Piao WH, He Y, et al. Hyper-methylation of RIZ1 tumor suppressor gene is involved in the early tumorigenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Histol Histopathol, 2008, 23(10): 1171-1175.
  - [11] Li B, Liu W, Wang L, et al. CpG island methylator phenotype associated with tumor recurrence in tumor-node-metastasis stage I hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(7): 1917-1926.
  - [12] 陈冰琳, 郭坤, 刘银坤. 粘附分子 CD44 的表达及其糖基化与肝癌转移的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(12): 898-903.
  - [13] Ogunwobi OO, Puszyk W, Dong HJ, et al. Epigenetic up-regulation of HGF and c-Met drives metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63765.
  - [14] Lv Z, Zou H, Peng K, et al. The suppressive role and aberrant promoter methylation of BTG3 in the progression of hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77473.
  - [15] Tränkenschuh W, Puls F, Christgen M, et al. Frequent and distinct aberrations of DNA methylation patterns in fibrolamellar carcinoma of the liver[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13688.
  - [16] Nagashio R, Arai E, Ojima H, et al. Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage[J]. Int J Cancer, 2011, 129(5): 1170-1179.
  - [17] Sun FK, Fan YC, Zhao J, et al. Detection of TFPI2 methylation in the serum of hepatocellular carcinoma patients[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(4): 1010-1015.
  - [18] Li F, Fan YC, Gao S, et al. Methylation of serum insulin-like growth factor-binding protein 7 promoter in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2014, 53(1): 90-97.
  - [19] Tao SF, Zhang CS, Guo XL, et al. Anti-tumor effect of 5-aza-2'-deoxycytidine by inhibiting telomerase activity in hepatocellular carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(19): 2334-2343.
  - [20] Venturelli S, Berger A, Weiland T, et al. Dual antitumour effect of 5-azacytidine by inducing a breakdown of resistance-mediating factors and epigenetic modulation[J]. Gut, 2011, 60(2): 156-165.
  - [21] Lin X, Asgari K, Putzi MJ, et al. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase(GSTP1) expression in human prostate Cancer cells by treatment with procainamide[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8611-8616.
- (收稿日期: 2014-04-03 修回日期: 2014-07-01)
- 综 述 •      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.045

## 间充质干细胞通过旁分泌抑制肺纤维化的分子机制<sup>\*</sup>

钟 艺, 舒 畅 综述, 符 州<sup>△</sup>审校

(重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心 400014)

**关键词:** 间充质干细胞; 肺纤维化; 细胞因子; 作用机制

**中图分类号:** R563.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2014)25-3376-04

肺纤维化是以大量的成纤维细胞聚集、细胞外基质沉积并伴有炎症和损伤而导致正常的肺组织结构改变和功能丧失为

特点的一类疾病, 急性肺损伤是其常见病因, 表现为毛细血管内皮细胞与急性弥漫性肺泡上皮细胞的损伤<sup>[1-2]</sup>。多数患者在

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700915)。 作者简介: 钟艺(1989—), 硕士研究生, 主要从事呼吸系统疾病的研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: (023)63622934; E-mail: fu\_zhou79@aliyun.com。