

文章编号 1006-8147(2021)05-0545-04

综述

中国宫颈癌 DNA 甲基化标志物的研究进展

赵敬¹, 杨金豪² 综述, 常艳敏³, 王蓉² 审校

(1. 天津医科大学总医院妇产科, 天津 300052; 天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 天津市南开医院检验科, 天津 300100)

摘要 DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传学机制参与了宫颈癌的发生和发展, 可用于临床宫颈癌和癌前病变的早期诊断和筛查。因此, 近年来, 宫颈癌 DNA 甲基化标志物的报道越来越多, 但是由于种族、生存环境的不同, 各国的报道差异显著, 本文就我国已报道的中国妇女群体宫颈癌相关的高甲基化和低甲基化基因的研究现状进行综述, 以利于未来我国宫颈癌甲基化标志物的深入研究和宫颈癌的临床筛查, 早期预防、诊断和治疗。

关键词 宫颈癌; 中国; DNA 甲基化; 标志物

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

我国每年宫颈癌新发病例数为 13.3 万以上, 其中约有 2 万~3 万死亡病例, 且近年来我国年轻妇女宫颈癌的发病率、死亡率均呈上升趋势^[1]。目前研究证实宫颈癌的发生、发展与 DNA 甲基化相关^[2]。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的作用下, 以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为底物, 将其提供的甲基基团加在胞嘧啶的第 5 位碳原子上, 发生甲基化修饰, 基于 GC 配对的机制, mCpG 会在双链中对称出现。DNA 甲基化对于基因的表达有重要的调节作用^[3]。某些抑癌基因的启动子区域发生甲基化, 可降低其转录活性, 使抑癌基因表达沉默, 导致细胞增殖异常而产生恶性肿瘤。随着对甲基化认识的不断深入, 研究者发现基因启动子区异常甲基化是肿瘤发生的一个早期事件, 是肿瘤早期诊断的非常有效的分子标志。此外, 在肿瘤的发展过程中, DNA 甲基化的动态改变还可以反映肿瘤的严重程度分级、侵袭转移及提示患者的预后。然而, 由于种族、生存环境的不同, 各国报道的宫颈癌 DNA 甲基化标志物差异显著。因此, 本文对在中国妇女群体进行实验验证的宫颈癌 DNA 甲基化标志物做一总结分析, 以期对后续的研究有所帮助。

1 宫颈癌高甲基化标志物

细胞信号转导通路的异常往往影响细胞增殖和分化的正常调控, 导致肿瘤的发生。因此可以把信号途径相关的甲基化基因作为宫颈癌治疗的重要靶点, 通过对细胞信号途径的干预, 调整靶基因

表达, 使其恢复正常, 以达到抑制肿瘤生长, 治疗肿瘤的目的。从我国近几年报道的宫颈癌甲基化基因的生物学功能来看, 主要集中在 p53 通路、凋亡相关、DNA 修复、Ras 信号通路、细胞循环(细胞周期)、细胞黏附、转移和侵袭、Wnt 通路等与癌症发生、发展相关的信号通路。

1.1 DNA 修复 DNA 修复是细胞对其 DNA 受损后的一种反应。MGMT(O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶)是一种高效的 DNA 直接修复酶, 能修复 DNA 序列中的 6 氧甲基鸟嘌呤的损伤, 是人类细胞中迄今发现的唯一一种修复该损伤的甲基转移酶。简生燕等^[4]研究显示, 宫颈癌组织 MGMT 甲基化率可达 71.15%; 且与组织分化程度呈负相关, 并影响其基因的 mRNA 的表达。

1.2 细胞周期 p16(INK4A)是周期依赖性激酶抑制因子, 人类许多肿瘤存在 p16 基因和蛋白的改变。在宫颈癌组织中 p16 甲基化率(26%)显著高于癌旁正常组织, 且随病变程度加重呈现升高趋势。此外, p16 基因启动子甲基化与宫颈癌的临床病理特征有关联, 甲基化更多发生在年龄小于 40 岁、低分化的宫颈鳞癌患者; p16 甲基化的发生是独立于 HPV 感染的事件, 它们在宫颈癌的致病过程中有可能是选择性的作用于不同的时期。

FHIT 基因属于组氨酸家族, 吴庆华^[5]首次在宫颈癌组织中揭示了 FHIT 基因 5'端 CpG 岛甲基化及其与基因失活的相关性。同期, 史惠蓉等^[6]又对宫颈癌及正常宫颈组织标本进行了检测, 结果宫颈癌标本中 40% 出现 FHIT 基因甲基化而正常宫颈上皮标本中未发现。任力群等^[7]亦发现 FHIT 甲基化在宫颈癌组织(56.7%)中显著高于宫颈上皮内瘤样变

基金项目 国家自然科学基金青年基金(81601836); 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(12JCYBJC33700)

作者简介 赵敬(1973-), 女, 主治医师, 博士, 研究方向: 妇科肿瘤; 通信作者: 王蓉, E-mail: wangrong825@126.com。

(CIN)组(14.3%)及慢性宫颈炎组(0)。鉴于 FHIT 甲基化在肿瘤组织的显著性,研究者们期待将其转化为临床可应用的肿瘤标志物,对临床获取血清样本的检测发现,血浆 FHIT 甲基化的发生率与组织具有良好的相关性^[8-9]。

SEPT9 基因是 GTP 结合蛋白家族成员,参与细胞骨架的形成、细胞分裂和肿瘤的发生等。其基因启动子的高甲基化已经做为大肠癌的标志物,最近研究显示其亦可促进宫颈癌细胞的增殖、侵袭和转移,影响细胞周期的调控。其基因的甲基化对宫颈癌的诊断也具有有良好的敏感性和特异性(AUC=0.854, $P<0.001$)^[10]。

1.3 细胞凋亡 相关蛋白激酶 1(DAPK1)是细胞凋亡正调控因子,是一种抑癌基因。我国 Yang 等^[11]发现在 60%宫颈癌组织、40%宫颈癌患者血浆中 DAPK1 启动子区存在异常甲基化。而且还发现 DAPK1 基因启动子区甲基化的程度与临床病理学分级相关,且对于鳞癌细胞的检出更敏感^[12]。花敏慧^[13]也得出了 DAPK1 甲基化在筛查宫颈癌和癌前病变的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 46.43%、97.92%、96.30%和 61.04%。

1.4 细胞黏附、转移和侵袭 CDH1 基因编码 E-钙黏蛋白,属于细胞黏附分子家族,介导相邻的上皮细胞间依赖钙的细胞连接,对于维持细胞分化、极性和正常组织结构起重要作用。Chen 等^[14]发现在 75%的宫颈癌组织中 CDH1 蛋白表达缺失,且 40%的宫颈癌组织中呈现高甲基化,此外,CDH1 基因高甲基化与 DNMT1 的增加相关。Ren 等^[15]研究了宫颈癌血清样本与组织标本一致率达 76.66%。陈勇等^[16]还发现 CDH1 基因甲基化率与临床病理特征相关。其甲基化率鳞癌组比腺癌组高,随肿块增大及 FIGO 分期升高而增高。

研究发现 CADM1/TSLC1(细胞黏附分子 1)在宫颈癌组织中异常甲基化率达 66.2%,其中鳞癌 67.8%,腺癌 55.5%,宫颈上皮内瘤变组织 43.3%。此外,hrHPV 感染的 CIN 2/3 到宫颈癌的演进过程中经常发现由于启动子甲基化引起的 CADM1 基因表达沉默,但是 CADM1/TSLC1 mRNA 在非瘤性 HPV 永生化细胞株中表达丰富,提示 CADM1/TSLC1 基因表达沉默可能与 HPV 永生化到致癌性表型的转化有关^[17]。

EZRIN 蛋白编码细胞质外周膜蛋白,主要是微绒毛的蛋白酪氨酸激酶底物作为 ERM 蛋白家族的一员,该蛋白主要在质膜和肌动蛋白细胞骨架之间起作用。其在细胞表面的黏附、迁移和组织中起着关键作用,并与多种人类癌症有关。

1.5 Ras 信号通路 宫颈癌组织中 RASSF1A 基因的甲基化首先是在小细胞肺癌组织中被发现的,常处于失活状态。最近也有研究显示,RASSF1A 基因在宫颈癌组织甲基化阳性率为 35%,其甲基化率随着临床分期呈逐渐升高趋势。同时,宫颈鳞癌的 RASSF1A 基因甲基化率明显高于宫颈腺癌,但 RASSF1A 基因甲基化与宫颈癌的组织学分级和淋巴结转移无关^[18]。

1.6 Wnt 信号通路 正常的 APC 蛋白与 Axin、Gsk-3 β 形成复合物可降解 β -catenin,保证 Wnt 信号途径对细胞特化、增殖以及迁移的正常调节^[19]。APC 基因表达异常使游离 β -catenin 增多,引起基因不正常表达,将导致细胞黏附、生长、分化等方面的重要改变,使细胞发生癌变。宋银宏和张昌菊^[20]研究发现 APC 启动子区 CpG 岛在 Hela 细胞中全甲基化,在 Siha 细胞中无甲基化。

SFRP1 是 Wnt 信号通路的负调控因子,主要与 FZ 受体竞争结合 Wnt 蛋白,阻断 Wnt 信号的转导,调节细胞的增殖、凋亡。胡丹尼等^[21]探讨了 SFRP1 基因启动子区甲基化与宫颈癌进展的相关性。结果显示,甲基化率大于 80%的 CpG 多分布于 CIN2/3 和宫颈癌组织之中。Chung 等^[22]研究也证实 SFRP1 基因高甲基化与宫颈癌的进展相关。

1.7 转录因子 SOX 家族基因参与性别决定、骨组织发育、血细胞形成、神经系统发育及晶状体发育等多种组织器官的发育过程。目前,SOX1 和 SOX9 甲基化与宫颈癌的关系在我国已有报道。张秀茹等^[23]报道了宫颈癌组织中 SOX1 CpG 岛的甲基化率大于 50%,且与正常对照差异有统计学意义。巫剑红等^[24]则鉴定了 SOX9 基因的甲基化,发现宫颈癌组平均甲基化分值高于正常宫颈组,鳞癌高于腺癌,G3 高于 G1/G2,有淋巴结转移和脉管癌栓的高于无淋巴结转移和脉管癌栓的。

PAX1 也是一种重要的转录因子,参与骨骼发育形成。Pax1 的基因突变会导致严重的脊柱缺陷。分别采用 MSP、QMSP 和测序等多种方法对宫颈癌及宫颈癌前病变的 PAX1 甲基化率进行了检测和临床评价,结果显示 Pax1 基因甲基化率显著高于正常组织,且随着病变加重而增高,可应用于临床宫颈癌的筛查。

2 HPV 基因组的 DNA 甲基化

DNA 甲基化也可以调节 HPV 的基因表达。胡元晶^[25]对 HPV16 L1 基因 3'端和 LCR 基因进行了测序。结果位于 E6/E7 启动子的 5 个位点存在随病情进展甲基化水平逐渐降低的趋势,宫颈癌组患者的甲基化水平最低。位于 L1 基因 3'端的 3 个位点

的甲基化水平在携带组、CIN 组与宫颈癌组患者间比较有差异。由此推断, HPV16 甲基化状况可能预测宫颈癌前病变或宫颈癌的发生。

3 地区及种族特异性报道的甲基化基因

新疆是我国宫颈癌高发区之一,维吾尔族妇女宫颈癌患病率,病死率在全国少数民族中占第1位^[29]。目前,报道过的和宫颈癌发生相关的甲基化基因包括 DAPKTFPI-2CALCACADM1、SFRP1、P16、MDR1、CCNA1、APM、EGFR、hRFT2、IFITM1 和 HS3ST2 等,与新疆维吾尔族妇女宫颈癌的发生、发展密切相关。玛依拉·卡米力江等^[27]认为 RAR 基因高甲基化是维吾尔族宫颈癌演进过程中的重要标志。

此外,除了中国大陆,中国台湾地区关于宫颈癌甲基化标志物的研究也方兴未艾。其中, LAI 等^[28-29]研究发现宫颈癌 DNA 甲基化基因包括 SOX1、PAX1、LMX1A、NKX6-1、WT1 和 ONECUT1 等。近期研究显示 LMX1A、NKX6-1、PAX1、PTPRR、SOX1 和 ZNF582 也是宫颈腺癌中出现的高甲基化基因^[30]。

4 宫颈癌低甲基化标志物

基因启动子区异常甲基化是肿瘤发生的一个早期事件,是肿瘤早期诊断的非常有效的分子标志。然而,目前大多数研究集中在高甲基化基因,而低甲基化基因报道较少。有报道 STK31 基因在 HPV16/18 阳性宫颈癌细胞系中,其启动子/外显子 1 呈现低甲基化,从而诱导 HPV16E7/E6 的整合^[31]。也有报道长链非编码 RNA (lncRNA) SOX21-AS1 低甲基化在宫颈癌中有着临床预后价值, lncRNA SOX21-AS1 在宫颈癌中参与的生物过程如表皮发展、脱皮周期、皮肤表皮及分子功能等, lncRNA SOX21-AS1 作为一种肿瘤抑制因子,是一种良好的宫颈癌预后指标^[32]。

5 小结

DNA 甲基化肿瘤标志物由于其样本来源广泛,检测方法简便稳定,并且可以实现高通量检测,易于临床转化等优点,而日益成为研究热点。每年,欧美国家都有一些宫颈癌相关的新的甲基化标志物不断涌现,如荷兰报道 6 个标志物的联合检测法(AS-CL1、LHX8、ST6GALNAC5、GHSR、SST、ZIC1)^[33]。同时,欧美国家在积极推进宫颈癌甲基化标志物的临床转化。目前,荷兰、德国已经推出了商业化的宫颈癌甲基化的检测试剂盒,包括 PreCursor-M[®]、QIA-sureMethylation Test[®]、GynTect、Oncnostics[®] 等^[34]。相对于世界的研究水平,我国宫颈癌 DNA 甲基化的研究相对滞后很多,首先,缺少具有独立知识产权的、针对中国妇女群体的宫颈癌甲基化标志物;其次,目标分散,缺少系统的大样本群研究;再次,严

重缺乏临床转化研究,缺乏在特殊人群如孕妇、人类免疫缺陷病毒感染患者群体的评价等,缺少对自检样本的检测结果的评价,缺少随访研究等。最后, DNA 甲基化标志物要想真正进入临床,还需在方法学上进行改善优化,开发即时检验(POCT)产品;而持续深入研究这些甲基化基因的功能也是必不可少的;当然,深入调查启动子低甲基化的基因亦是未来的重要研究方向之一。

参考文献:

- [1] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2893
- [2] STEENBERGEN R D, SNIJDERS P J, DA H M, et al. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(6):395
- [3] JONES P A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(7):484
- [4] 简生燕, 徐燕, 刘寿, 等. DNA 修复因子 MGMT 甲基化与子宫颈癌的相关性研究[J]. 青海医学院学报, 2012, 33(2):90
- [5] 吴庆华. 宫颈癌组织中 FHIT 基因 5'端 CpG 岛甲基化及其与基因失活的关系研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2003
- [6] 史惠蓉, 吴庆华, 索振河, 等. 宫颈癌组织中 FHIT 基因 5'端 CpG 岛甲基化及其与基因失活的关系[J]. 癌症, 2005, 24(1):7
- [7] 任力群, 刘萍, 张银汉, 等. P16 和 FHIT 基因联合高危 HPV 检测在宫颈癌诊断中的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(11):13
- [8] 任晨春, 苗绪红, 杨斌, 等. 宫颈癌患者血浆和组织中 FHIT 基因 5'端 CpG 岛甲基化状态的研究[J]. 遗传, 2006, 28(9):1061
- [9] 刘瑾, 魏琼. 宫颈癌中 FHIT 基因 CpG 岛甲基化检测意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(4):358
- [10] JIAO X, ZHANG S, JIAO J, et al. Promoter methylation of SEPT9 as a potential biomarker for early detection of cervical cancer and its overexpression predicts radioresistance[J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1):120
- [11] YANG B, YANG Z G, GAO B, et al. 5-Aza-CdR can reverse gefitinib resistance caused by DAPK gene promoter methylation in lung adenocarcinoma cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10):12961
- [12] 党艳丽, 马晓旗, 毕红梅, 等. 5-氮胞苷对宫颈癌细胞系 DAPK1 异常甲基化的影响[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2005, 26(1):48
- [13] 花敏慧. DAPK I、RAR β 甲基化联合高危型 HPV 检测对宫颈癌前病变及宫颈癌筛查的研究[D]. 南通: 南通大学, 2009
- [14] CHEN CL, LIU SS, IP SM, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours [J]. Eur J Cancer, 2003, 39(4):517
- [15] REN Y, WANG H, LU D, et al. Expression of serum amyloid A in uterine cervical cancer[J]. Diagn Pathol, 2014, 9(9:16):16
- [16] 陈勇, 郑蓉, 曹桂荣, 等. CDH1 基因启动子甲基化与宫颈癌临床病理特征的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(7):1394
- [17] DE STROOPER L A, HESSELINK A T, BERKHOF J, et al. Combined CADM1/MAL methylation and cytology testing for colposcopy triage of high-risk HPV-positive women [J]. Cancer Epid Biom Prev, 2014, 23(9):1933
- [18] 王琳. 宫颈癌组织中 RASSF1A 基因的甲基化状态及其临床意

- 义[D]. 郑州:郑州大学,2011
- [19] MOHAMMED M K, SHAO C, WANG J, et al. Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance[J]. *Genes Dis*, 2016, 3(1):11
- [20] 宋银宏, 张昌菊. 胍苯哒嗪对宫颈癌细胞系 APC 基因异常甲基化的影响[J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(9):981
- [21] 胡丹妮, 贾薇, 谭秋芬, 等. SFRP1 基因启动子区甲基化与宫颈癌及癌前病变的相关性研究[J]. *石河子大学学报:自然科学版*, 2010, 28(3):325
- [22] CHUNG M T, LAI H C, SYTWU H K, et al. SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112(3):646
- [23] 张秀茹, 陈迪, 田晓怡, 等. 抑癌基因甲基化位点定量检测在宫颈癌早期诊断中的意义探讨[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(24):8025
- [24] 巫剑红, 梁学爱, 代荫梅. 宫颈癌 SOX9 基因甲基化水平的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(19):1513
- [25] 胡元晶. 宫颈癌进展中人乳头瘤病毒甲基化的研究[J]. *国际妇产科学杂志*, 2013, 40(5):443
- [26] 拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康, 等. 新疆不同民族子宫颈癌发病趋势分析[J]. *新疆医科大学学报*, 2006(07):569
- [27] 玛依拉·卡米力江, 阿比达·阿布都卡德尔, 希尔扎提江·苏来曼. 维吾尔族妇女宫颈病变与 RAR β 基因启动子甲基化的关系[J]. *新疆医科大学学报*, 2013(2):181
- [28] LAI H C, LIN Y W, CHANG C C, et al. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, BLU and RASSF1A, located at 3p21.3 in cervical neoplasias[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104(3):629
- [29] LAI H C, LIN Y W, HUANG T H, et al. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(1):161
- [30] CHANG C C, HUANG R L, WANG H C, et al. High methylation rate of LMX1A, NKX6-1, PAX1, PTPRR, SOX1, and ZNF582 genes in cervical adenocarcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2014, 24(2):201
- [31] YIN F F, WANG N, BIX N, et al. Serine/threonine kinases 31(STK31) may be a novel cellular target gene for the HPV16 oncogene E7 with potential as a DNA hypomethylation biomarker in cervical cancer[J]. *Virology*, 2016, 13(1):60
- [32] WANG R J, LI Y, DU P, et al. Hypomethylation of the lncRNA SOX21-AS1 has clinical prognostic value in cervical cancer[J]. *Life Sci*, 2019, 233:116708
- [33] Dick S, Verhoef L, De Strooper L M, et al. Evaluation of six methylation markers derived from genome-wide screens for detection of cervical precancer and cancer[J]. *Epigenomics*, 2020, 12(18):1569
- [34] KREMER W W, STEENBERGEN R, HEIDEMAN D, et al. The use of host cell DNA methylation analysis in the detection and management of women with advanced cervical intraepithelial neoplasia: a review[J]. *BJOG*, 2021, 128(3):504

(2020-12-17 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语,文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语,请按照如下规则进行缩写:原词过长且在文中出现 3 次以上者,可在第一次出现时写出全称,并在括号内写出缩略语。不超过 5 个汉字的名称不宜使用缩略语,以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机体层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA1c	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织

本刊编辑部