

DNA 甲基化与脑肿瘤

马杰 赵阳

【关键词】 表观遗传学; DNA 甲基化; 脑肿瘤; CpG 岛; 启动子

【中图分类号】 R739.41 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-8925(2009)04-0416-03

DNA methylation and brain tumors MA Jie, ZHAO Yang. Department of Pediatric Neurosurgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

【Key words】 Epigenetics; DNA methylation; Brain tumor; CpG island; Promoter

随着人类对肿瘤研究的日益深入,许多学者已经清楚地认识到,肿瘤的发生、发展不仅与细胞内基因突变、缺失等因核苷酸序列改变所导致的遗传调控紊乱有关,还与表观遗传调控异常有着密切的联系^[1]。所谓表观遗传,是指通过 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化和甲基化、染色质构型变化等所导致的在基因表达水平的改变,它只影响基因的转录活性而不影响核苷酸序列的改变^[2]。其中,DNA 甲基化作为常见的表观遗传学修饰模式,在哺乳动物基因表达调控中起着重要的作用。异常甲基化可导致癌基因的活化、非必需重复序列的转录、抑癌基因及 DNA 修复基因的沉默等,并能以半保留的方式高保真地传递到子代细胞的基因组中,最终引发肿瘤^[3]。

脑肿瘤是人类常见的实体肿瘤,尤其在儿童中,其发病率仅次于白血病,位居第二。由于基因的甲基化水平可作为肿瘤早期诊断、恶性程度评估、疗效监测的潜在且敏感分子生物学指标,因此,深入研究脑肿瘤的 DNA 甲基化,能为临床研究和应用奠定基础。本文结合相关文献,就 DNA 甲基化与脑肿瘤的研究做一综述。

一、DNA 甲基化的基本介绍

(一)DNA 甲基化的概念

DNA 甲基化是哺乳动物 DNA 上唯一发生的共价修饰方式,其功能是在不改变核苷酸序列的前提下,调控特定区域基因的转录活性和表达,维持染色体的完整性,以确保正常的细胞发育、基因表达模式和基因组的稳定性。在 DNA 甲基化过程中,CpG 双核苷酸中胞嘧啶处的 DNA 双螺旋结构突出进入与酶结合部位的裂隙,在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的催化下,活性甲基从 S-腺苷甲硫氨酸转移至胞嘧啶的第 5 位碳原子上,从而使胞嘧啶转化为 5-甲基胞嘧啶^[4]。在哺乳动物基因组中,DNA 甲基化只发生在 CpG 双核苷酸中的胞嘧啶碱基上。由于 CpG 双核苷酸在基因组中非随机分布,在某些区域其含量要高出平均水平的 10 倍以上,因此这些富含 CpG 双核苷酸重复序列的短

DNA 片段(约 0.5~4 kb)被称为 CpG 岛。人类基因组中约包含 30 000 个 CpG 岛,它在半数基因中位于接近结构基因的启动子和第一外显子区域。正常细胞的 CpG 岛多处于非甲基化状态。

(二)与 DNA 甲基化相关的酶

DNA 甲基化的启动与维护与 DNMTs 密切相关。DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 是目前研究较多的 DNMTs。DNMT1 作为半甲基化酶,可将半甲基化的 DNA 分子中一条未甲基化的 DNA 子链发生甲基化,以确保 DNA 双链复制后的子链与亲链有着相同的甲基化模式。DNMT3a 和 DNMT3b 为 DNA 重新甲基化酶,能使原本未发生甲基化的 DNA 重新甲基化。Rhee 等^[5]实验发现,单独破坏 *DNMT1* 或 *DNMT3b* 基因并不能明显影响结肠癌细胞株的染色体甲基化水平,但如果同时破坏这两种基因,可使染色体甲基化水平减少 95%以上,说明 DNMT1 和 DNMT3b 这两种酶的相互协同作用在肿瘤的发生发展中起着关键作用。

(三)DNA 甲基化与基因表达调控

基因的表达受到 DNA 甲基化的调控。一般来讲,DNA 甲基化和基因的表达呈负性相关,即基因启动子区域的高甲基化可抑制其转录的活性。研究发现,如果在体外将甲基化序列转入细胞后可明显抑制该基因的表达,但若经去甲基化试剂 5'-乙酰唑胺-2'-脱氧胞苷酸处理后其转录活性又能被激活^[6]。其机制可能是 CpG 岛发生甲基化后,甲基基团从 DNA 分子双螺旋结构的主沟中向外突出,干扰了转录因子与基因调控区的结合,进而影响该基因的表达。此外,DNA 甲基化亦可改变染色质的结构而间接抑制转录。

(四)肿瘤细胞 DNA 甲基化特点

肿瘤细胞 DNA 甲基化可分为三类:全基因组水平 DNA 的低甲基化、肿瘤相关基因启动子 CpG 岛的高甲基化和印记丢失^[2,6,7]。

1. 全基因组水平 DNA 的低甲基化:全基因组 DNA 的低甲基化在肿瘤细胞中普遍存在,可导致肿瘤基因组和染色体的不稳定。DNA 的低甲基化导致癌基因异常活化,多药耐药基因(如 *MDR1*)高表达而降低个体对化疗药物的敏感性,还可降低基因组的稳定性,增加基因重组的几率,从而促进

肿瘤的发生^[8]。

2. 肿瘤相关基因启动子 CpG 岛的高甲基化: 正常生理条件下, 大部分基因 CpG 岛均处于低甲基化状态, 但肿瘤组织中一些管家基因(如肿瘤抑制基因、DNA 损伤修复基因等)容易发生高甲基化。基因启动子区域的高甲基化可改变染色质结构并抑制基因转录, 导致该基因表达沉默, 细胞出现无节制的生长而引发肿瘤^[9]。与基因突变等遗传学机制异常相比, DNA 甲基化导致的基因失活不但多见, 而且是可以逆转的。应用 5- 氮胞苷和地西他滨等 DNA 甲基转移酶抑制剂, 可抑制甲基转移酶的活性而发生去甲基化, 恢复关键抑癌基因的功能, 从而起到预防和治疗肿瘤的作用^[9]。

3. 基因的印记丢失: 在人类亲本染色体上, 许多基因的两个等位基因中只有一个是表达的, 哪个等位基因最终表达取决于其遗传来自父系还是母系, 这些基因往往因高甲基化状态而沉默, 被称作印记基因。当这些印记基因由于去甲基化被活化表达时, 则称为印记丢失^[10]。印记丢失可引发肿瘤, 如胰岛素样生长因子 II (insulin-like growth factor II, IGF-2) 基因的印记丢失就与结直肠癌、肾母细胞瘤等肿瘤的发生相关^[11,12]。

二、脑肿瘤 DNA 甲基化研究

(一) 胶质瘤

胶质瘤是人类最常见的颅内肿瘤, 对其 DNA 甲基化研究也最为深入。其中, 研究较多的要属抑癌基因和 DNA 修复基因启动子区的高甲基化。

p16 基因位于 9p21 区, 是多肿瘤抑制基因 1(multiple tumor suppressor1, *MTS1*), 表达细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 P16, 可以抑制细胞周期素 D 依赖性激酶, 使 Rb 蛋白不能有效磷酸化而失去推动分裂期细胞从 G 期向 S 期转化的活性, 从而在细胞周期蛋白调节中起到负性作用, 可防止细胞过度增殖^[13]。*p16* 基因 CpG 岛的高甲基化可导致其转录受到抑制而蛋白表达下降, 细胞生长失去控制而引发肿瘤。研究发现, 胶质瘤细胞中 *p16* 基因的异常甲基化是导致其转录失活、P16 蛋白丢失的一个重要机制^[14]。若采用去甲基化药物 5- 氮 -2- 脱氧胞嘧啶核苷处理胶质瘤细胞系, P16 蛋白表达会增加, 进一步证实了 CpG 岛的甲基化与 P16 蛋白丢失密切相关^[15]。通过分别检测原发性星形细胞瘤和不同级别胶质瘤中 Ki-67 抗原的增殖指数, 发现异常甲基化造成 *p16* 基因失活对胶质瘤的生长增殖有促进作用^[16,17]。有学者通过研究胶质瘤组织 *p16* 基因的甲基化与临床病理特征的关系, 发现 *p16* 基因的 CpG 区甲基化与肿瘤级别、浸润程度相关, 肿瘤恶性程度越高, *p16* 基因的 CpG 区的甲基化就越显著^[18]。因此, *p16* 基因启动子区 CpG 岛的甲基化可作为一项判断胶质瘤恶性程度的有效指标。由于肿瘤细胞可释放 DNA 到外周血和肿瘤累及器官的体液中, 有学者则通过研究胶质瘤患者的血浆标本后发现, 胶质瘤患者血浆中 *p16* 基因 CpG 岛的甲基化与肿瘤组织甲基化状态呈平行关系^[19]。因此, 检测人体血浆中 *p16* 基因甲基化水平, 可为胶质瘤早期诊断、疗效监测和预后评估提供有用的信息。

RASSF1A 基因是肿瘤中较易失活的候选抑癌基因。研究

发现, 该基因启动子区 CpG 岛的甲基化是导致其在胶质瘤中表达水平下调或缺失的一种机制, 用 5- 氮 -2- 脱氧胞嘧啶核苷处理肿瘤细胞株后, 其表达可恢复^[20]。Yu 等^[21]通过对 53 例星形细胞瘤患者肿瘤细胞中 34 个基因启动子 CpG 岛的甲基化水平检测, 发现 *RASSF1A* 基因的甲基化水平最高, 可作为星形细胞瘤诊断和预后评估的重要指标。

与中枢神经系统密切相关的另两种候选抑癌基因是 *SLC5A8* 和 *TMS1/ASC*。有学者通过检测 88 例星形细胞瘤手术标本中 *SLC5A8* 和 *TMS1/ASC* 两种基因启动子区的甲基化水平, 发现 *SLC5A8* 启动子区的甲基化发生率为 70.45%, 其甲基化率随胶质瘤恶性程度的增加而增高; *TMS1/ASC* 启动子区的甲基化发生率为 57.95%, 其甲基化率随胶质瘤恶性程度的增加而降低, 用去甲基化试剂处理后的胶质瘤细胞株中这两种基因均可恢复表达^[22]。故 *SLC5A8* 和 *TMS1/ASC* 基因启动子区甲基化异常不仅与其静息失活有关, 还为临床上判断胶质瘤的恶性程度提供了新的检测指标。

O6- 氧甲基鸟嘌呤 -DNA- 甲基转移酶 (*MGMT*) 是 DNA 损伤修复基因, 可修复烷基损伤而保护正常组织, 同时也对烷化剂类化疗药物产生抗药性。陈忠平等^[23]通过实验发现 *MGMT* 的表达在 mRNA 水平、蛋白水平与其酶活性呈正相关, 且 *MGMT* 的修复能力取决于其在细胞内的含量及合成速率^[24]。研究发现, *MGMT* 启动子在近 40% 的胶质瘤中呈高甲基化 / 转录静息化状态, 其甲基化程度与肿瘤的发展、预后及化疗药物敏感性密切相关^[25,26]。胶质瘤组织 *MGMT* 启动子区甲基化程度越高, 对烷化剂类化疗药物(如替莫唑胺)的敏感性越强。因此, 临床上可根据 *MGMT* 基因启动子 CpG 岛甲基化状态来预测恶性胶质瘤对化疗药物的敏感性。此外, 测定胶质瘤患者血清中 *MGMT* 基因启动子区的甲基化状态, 能有效反应肿瘤组织本身该基因的甲基化状态, 为临床上应用微创手段预测胶质瘤患者对烷化剂类化疗药物的敏感性和判断预后提供了可靠的前期基础^[27]。

除上述基因外, 胶质瘤中 *RBI*、*P73*、*LATS1*、*LATS2* 等基因启动子区 CpG 的高甲基化也被认为与胶质瘤的发生和发展相关^[28-30]。

(二) 原始神经外胚层肿瘤

颅内原始神经外胚层肿瘤是儿童中常见的恶性脑肿瘤, 约占儿童脑肿瘤的 20%。髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB) 和幕上原始神经外胚层肿瘤 (supratentorial primitive neuroectodermal tumor, SPNET) 是原始神经外胚层肿瘤中两个常见的亚型。研究显示, *RASSF1A* 甲基化与原始神经外胚层肿瘤的发生有关, 且不同亚型的原始神经外胚层肿瘤之间 *RASSF1A* 基因的甲基化状态不同, 提示 MB 和 SPNET 是表观遗传学上存在差异的两类肿瘤^[29], 这也为根据基因 DNA 甲基化水平鉴别不同类型的脑肿瘤提供了新的思路。Grotzer 等^[30]研究 8 种人类原始神经外胚层肿瘤细胞株后, 认为导致儿童原始神经外胚层肿瘤细胞耐受 TRAIL 诱导凋亡的重要原因是凋亡相关基因 *Caspase-8* 的高甲基化, 导致该基因无法正常转录和表达, 从而阻断了细胞凋亡的进程, 有利于肿瘤的生长。另 *MCJ*、*TSG*、*HIC1*、*SGNE1/7B2*、*p18(INK4c)* 等基因异常甲基化也与原始神经外胚层肿瘤发生发展相关^[31-33],

这种特征性的基因甲基化状态为原始神经外胚层肿瘤的早期诊断、鉴别诊断乃至预后评估奠定了基础。

(三)脑膜瘤

尽管脑膜瘤也是较常见的颅内肿瘤,但其 DNA 甲基化研究相对较少。研究发现,*p16*、*RB*、*p73*、*RASSF1A*、*MGMT* 和死亡相关蛋白激酶 1 等基因的异常甲基化与非典型和间变性脑膜瘤的发生、恶性进展相关^[32-34]。

三、脑肿瘤循环 DNA 甲基化研究

循环 DNA 又称血浆 DNA,是血液中的细胞外游离 DNA,它的甲基化状态的异常是人类肿瘤常见的分子水平改变。国内有学者检测脑肿瘤患者肿瘤组织和血浆 DNA 中 *p16* 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态,发现血浆 DNA 中 *p16* 基因甲基化与脑肿瘤组织中甲基化状态呈平行关系^[33]。国外也有学者通过甲基化特异性 PCR 分别检测 *p16* (*INK4a*)、*MGMT*、*RASSF1A*、*p73*、*DAPK*、*TMS-1* 和 *RARB* 基因启动子在脑肿瘤患者血浆 DNA 和其对应肿瘤组织 DNA 中的启动子甲基化状态,发现这些基因启动子区域的甲基化状态在组织 DNA 和血浆 DNA 之间存在高度的相关性 ($P=0.0001$)^[29,34]。因此,循环 DNA 作为微创性检测指标,将会成为脑肿瘤早期诊断、病情监测及疗效评估的一种重要的分子标志物。

四、总结与展望

上述研究告诉人们,肿瘤相关基因 DNA 的异常甲基化在脑肿瘤的发生、演变过程中起着非常重要的作用。今后需要在更多的脑肿瘤中(如颅咽管瘤、生殖细胞瘤等)寻找特异性甲基化异常标志,并通过人类各种体液或排泄物进行 DNA 甲基化谱式分析,将有利于对脑肿瘤高危人群进行筛查和临床上对脑肿瘤的早期诊断、分型、疗效监测和预后评估。同时,充分利用 DNA 甲基化状态潜在的可逆性,将促使人类开发出通过活化甲基化静息状态的肿瘤抑制基因来抑制脑肿瘤生长的新一代抗癌药物。

参 考 文 献

- [1] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics[J]. Trends Genet, 2000, 16(4):168-174.
- [2] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation[J]. New Engl J Med, 2003, 349(21): 2042-2054.
- [3] Adams RLP, Burdon RH. Molecular Biology of DNA Methylation [M]. New York: Springer-Verlag, 1985: 107-113.
- [4] Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells[J]. Nature, 2002, 416(6880): 552-556.
- [5] Jeong SH, Bae IK, Lee JH, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 2902-2906.
- [6] Macaluso M, Paggi MG, Giardano A. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer [J]. Oncogene, 2003, 22(42): 6472-6478.
- [7] Robertson KD. DNA methylation and human disease[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(8): 597-610.
- [8] Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little [J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5400-5413.
- [9] Leone G, Voso MT, Teofili L, et al. Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS[J]. Clin Immunol, 2003, 109(1): 89-102.
- [10] Callou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic [J]. Diabetes, 2005, 54(7): 1899-1906.
- [11] Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk[J]. Science, 2003, 299(5613): 1753-1755.
- [12] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(2): 143-153.
- [13] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. Nature, 1993, 366(6456): 704-707.
- [14] 焦保华, 浦佩玉, 何瑞荣. 脑胶质瘤 p16 基因 CPG 岛高甲基化与基因失活的研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2001, 27 (3): 170-172.
- [15] Costello JF, Berger MS, Huang HS, et al. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation[J]. Cancer Res, 1996, 56(10): 2045-2410.
- [16] Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, et al. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55(10): 1026-1031.
- [17] 王喆, 曹培成, 张振兴, 等. p16 基因 CpG 岛甲基化与胶质瘤生物学特性的关系 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007, 6(4): 311-314.
- [18] 罗艺, 陈坚, 吕元. p16 基因启动子 CpG 区甲基化与人脑胶质瘤临床病理特征的关系 [J]. 复旦学报 (医学版), 2004, 31 (5): 477-480.
- [19] 王成东, 王瑞丽, 张振兴, 等. 胶质瘤患者血浆与肿瘤组织 p16 基因甲基化的检测及意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34 (17): 992-994.
- [20] Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors[J]. Oncogene, 2003, 22(49): 7862-7865.
- [21] Yu J, Zhang H, Gu J, et al. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma [J]. BMC Cancer, 2004, 14(4): 65.
- [22] 姜政, 李新钢, 胡锦, 等. 脑胶质瘤中 SLC5A8 和 TMS1/ASC 基因启动子区甲基化及 mRNA 表达的研究 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(5): 292-295.
- [23] Chen ZP, Malapetsa A, McQuillan A, et al. Evidence for nucleotide excision repair as a modifying factor of O6-methylguanine-DNA methyltransferase-mediated innate chloroethylnitrosourea resistance in human tumor cell lines[J]. Mol Pharmacol, 1997, 52 (5): 815-820.