

· 综述 ·

乳腺癌相关 DNA 甲基化生物标记的研究进展

苏怡 任泽舫

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤。据估计 2002 年全球每年新发病例 115 万(占有新发癌症病例数的 23%),已成为除肺癌外最常见的恶性肿瘤^[1]。表观遗传改变被证明在乳腺癌的发生、发展中起着至关重要的作用^[2-4],其留下的可以被检测的表观遗传痕迹(尤其是 DNA 的甲基化)为乳腺癌的早期诊断和临床治疗反应及预后评价带来有价值的应用前景。笔者将综述表观遗传机制中最重要的 DNA 甲基化在乳腺癌诊断、治疗和预后康复中的研究和应用现状,以期 DNA 甲基化标记的临床应用提供相关证据和进一步的思路。

1 DNA 甲基化机制概述

表观遗传学的概念最早由 Waddington 于 1942 年提出,其主要研究在不改变 DNA 序列的情况下影响基因表达的可遗传性改变^[5]。目前研究较多的表观遗传机制主要有 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体构型及非编码 RNA 调控^[6]。其中,以 DNA 甲基化研究较为成熟。在人类及其他大多数哺乳动物, DNA 甲基化是指在 DNA 链鸟嘌呤前的胞嘧啶通过酶介导的化学修饰作用接上一个甲基团^[7]。当肿瘤发生时,一些肿瘤相关基因(如抑癌基因等)因启动子鸟嘌呤前的胞嘧啶(CpG)岛的高度甲基化而失活,正常抑癌功能受到抑制^[8];某些癌基因启动子区和 DNA 重复序列(如异染色质 DNA 重复区域和反转录转座子等)将出现显著的低甲基化,此现象被认为与癌基因激活及基因结构的不稳定性增加有关^[9-10]。这些 DNA 甲基化改变现象都已在有关乳腺癌发生、发展、治疗及预后的相关研究中被证实^[11-12]。此外, DNA 甲基化标记的较强稳定性和临床取材的广泛适用性,以及如前述 DNA 甲基化发生位置的相对特异性^[13],均提示其可作为乳腺癌相关分子标记。

2 乳腺癌相关 DNA 甲基化标记及其应用

实验室细胞学及分子流行病学的大量研究为乳腺癌相关甲基化标记提供

基金项目:国家自然科学基金项目(81072383)

作者单位:510080 广州,中山大学公共卫生学院医学统计与流行病学系

通信作者:任泽舫, E-mail: renzef@mail.sysu.edu.cn

了一系列的候选基因。至今在细胞实验或人群检测中确证的乳腺肿瘤相关甲基化基因包括细胞周期调控基因、细胞凋亡基因、DNA 修复基因、激素调节基因、细胞黏附和侵袭基因、血管生成相关基因、细胞生长抑制信号基因、细胞分化相关基因以及药物代谢相关基因等^[13-16]。这些研究证据为乳腺癌相关基因甲基化标记的进一步选取提供了基础支持。而其中一些基因作为乳腺癌危险评估、早期检测、药物反应及预后估计的相关甲基化标记的研究已获得较为明确的证据。

2.1 乳腺癌的危险评估和早期检测

RAS 相关区域家族 1A 基因(RAS association domain family member 1A, RASSF1A)被认为是最常发生过甲基化的人类肿瘤相关基因之一。RASSF1A 基因的甲基化在肿瘤细胞中检出率较高且很少在正常组织中发生^[17-18]。有研究在 70% 的乳腺癌高危妇女的样本中观察到 RASSF1A 基因启动子的甲基化,而这种现象只发生在 29% 的乳腺癌低风险妇女^[19]。因此,检测 RASSF1A 基因的过甲基化状况将有利于乳腺癌的综合风险评估和早期检出。目前已有大量的研究对 RASSF1A 基因甲基化状况与乳腺癌的关系进行了探讨,认为 RASSF1A 基因的过甲基化状况可以成为乳腺癌的早期诊断指标^[20-22]。

Widschwendter 等^[16]在一项病例对照研究中发现,某些雌激素受体基因(ER- α target gene, ERT)能够预测雌激素受体(ER)阳性的乳腺癌,其中外周血细胞中锌指基因(zinc finger gene217, ZNF217)DNA 的低甲基化状态可以在调整年龄和家族史的基础上预测乳腺癌的发生($OR = 1.49, CI: 1.12 \sim 1.97$),成为乳腺癌可能的早期检测标志。

2.2 乳腺癌疗效预测及药物反应评估

乳腺癌患者对药物及化疗等的反应与疾病预后息息相关。然而,有研究表明约 30% 的乳腺肿瘤患者缺乏 ER α 基因的表达并对内分泌治疗产生抵抗^[14]。更早的研究发现 ER α 基因的表达缺失往往与其启动子过甲基化有关^[23]。由此提示 ER α 基因启动子甲基化状态对患者内分泌治疗反应性有预测作用。

Fiegl 等^[24]于 2005 年发现乳腺癌患者血清中 RASSF1A 基因的高甲基化预示着患者对他莫西芬治疗的抵抗,其在 2008 年的研究又发现 ER 阴性乳腺癌患者的神经分化因子-1 基因(NEUROD1)呈高度过甲基化,有此特性的患者对于新辅助化疗的反应性会更高^[25]。

最近的一项研究显示,在接受蒽环类辅助化疗的淋巴结和 ER 均阳性的乳腺癌患者中,半胱氨酸双加氧酶-1(cysteine dioxygenase 1, CDO1)基因启动

子 DNA 的甲基化为此类患者治疗后发生转移的预测指标^[26]。

2.3 乳腺癌预后评价

同源结构域转录因子-2 基因 (paired-like homeo-domain transcription factor 2, PITX2) 是目前乳腺癌甲基化人群研究靶基因中研究证据较为充分的基因。一系列的病例-对照及大型多中心队列研究结果显示, PITX2 的甲基化状况可以独立作为临床激素受体阳性而淋巴结转移阴性乳腺癌患者接受辅助化疗的预后评价指标^[13]。

RASSF1A 基因的甲基化状况不仅对乳腺癌的早期诊断和治疗反应有重要的检测价值, 而且有研究表明乳腺癌患者乳房血清中 RASSF1A 和结肠腺瘤性息肉病基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 的高甲基化与肿瘤大小、癌症转移及死亡危险紧密相关^[17], 而乳腺癌组织中 RASSF1A 的高甲基化则提示预后不良^[27]。

作为已被广泛接受的乳腺癌抑癌基因, 乳腺癌易感基因 BRCA1 表达降低被认为可引发细胞的恶性增殖^[28]。最近的研究表明 BRCA1 的甲基化状态也可作为乳腺癌预后的重要标志^[29-30]。患者血清中 BRCA1 和(或)抑癌基因 p16 过甲基化预示着患者的死亡风险将提高 5 倍^[31]。

此外, Sharma 等^[15]的研究表明, 多药抗药性基因-1 (multidrug resistance, MDR1) 启动子的低甲基化与肿瘤的生长及进展阶段显著相关, 且此预测有很高的特异性和较高的灵敏性, 能够为乳腺癌预后提供有价值的评价依据。

2.4 多基因甲基化标记的联合应用

鉴于单个基因甲基化状态预测乳腺癌的局限性, 多基因甲基化联合筛检在乳腺癌早期诊断中也得到应用。早在 2001 年, Evron 等^[32]就用细胞周期 D2 蛋白基因 (Cyclin D2)、维甲酸受体 β 基因 (RAR β) 和转录调节因子 TWIST 基因三者甲基化状态的联合检测结果成功鉴定乳腺癌患者乳腺导管液中的肿瘤细胞; 之后, Fackler 等^[33]也发现 RASSF1A、TWIST、HIN1 和 Cyclin D2 基因的累积过甲基化状态比健康妇女更常在浸润性乳腺癌患者的临床组织样本中检出。作者采用 9 种基因 (RASSF1A、TWIST、HIN1、Cyclin D2、RAR β 、APC、BRCA1、BRCA2 和 p16) 联合检测, 结果证明多基因甲基化联合检测的灵敏性为细胞学诊断的 2 倍^[34]。最近的一项病例对照研究表明 RASSF1A 和死亡相关蛋白酶-1 基因 (death-associated protein kinase 1, DAPK1) 的甲基化与乳腺导管癌有较强的相关性^[21], 提示多种基因甲基化联合检测可进一步用于乳腺癌的组织学分型。

CpG 岛甲基化表型 (CpG island methylator phenotype, CIMP) 的提出标志

着多基因甲基化联合检测的日趋成熟。Jing 等^[35]进行的一项研究显示, CIMP 与 RASSF1A、BRCA1、p16、CDH1、ER、RARbeta2、APC 和 DAPK 多种基因的甲基化状况密切相关, CIMP 阳性可作为散发性乳腺癌的诊断指标。当然, 甲基化联合检测中基因选取标准的最终确定仍依赖于更多单种及多种有效乳腺癌相关甲基化基因组合的确证。

3 结语

乳腺癌相关 DNA 甲基化标记的研究已从多个层面铺开, 各实验室对大量不同标本来源的乳腺癌相关基因的甲基化状态进行了初步探索或验证研究, 而实验室的差异及研究使用的标本来源变异较大导致研究可重复性低, 大大降低了各项研究结果的临床应用价值^[36]。甲基化检测方法日新月异的发展也造成了各独立研究的检测方法差异较大, 加之各研究者不同科研角度、目的要求和切入点选取的不同乳腺癌相关基因(组)及相同基因不同 CpG 位点的不一致性, 统一规范的相关乳腺癌甲基化标记仍无法有效的应用于临床。众多初筛得到的结果有待更全面、统一的可重复性确证, 依赖于各地区各研究组在相对统一的标准下进行的实验室研究和高质量的流行病学研究将极大推动乳腺癌相关基因甲基化标记研究的发展。相关基因甲基化水平作为乳腺癌患病危险评估、诊断、治疗反应观察及疾病转归、预后评价的生物标记将有着很乐观的应用前景。

【关键词】 乳腺肿瘤; DNA 甲基化; 生物标记物

【中图分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74-108.
- [2] Veeck J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(1):5-17.
- [3] Korkola J, Gray JW. Breast cancer genomes--form and function[J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20(1):4-14.
- [4] Jovanovic J, Ronneberg JA, Tost J, et al. The epigenetics of breast cancer[J]. Mol Oncol, 2010, 4(3):242-254.
- [5] Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: Regulation through repression[J]. Science, 1999, 286(5439):481-486.
- [6] Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs[J]. Pediatric Research, 2007, 61(5):24-29.
- [7] Hinshelwood RA, Clark SJ. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system[J]. J Mol Med, 2008, 86(12):1315-1328.
- [8] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer[J]. Cell, 2007, 128(4):683-692.
- [9] Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation[J]. Science, 2003, 300(5618):455.
- [10] Ehrlich M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements[J]. J Nutr, 2002, 132(8 Suppl): S2424-S2429.

- [11] Pakneshan P, Szyf M, Farias Eisner R, et al. Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(30):31735-3144.
- [12] Fan M, Yan PS, Hartman Frey C, et al. Diverse gene expression and DNA methylation profiles correlate with differential adaptation of breast cancer cells to the antiestrogens tamoxifen and fulvestrant [J]. *Cancer Res*, 2006,66(24):11954-1166.
- [13] Martens JWM, Margossian AL, Schmitt M, et al. DNA methylation as a biomarker in breast cancer[J]. *Future Oncol*, 2009,5(8):1245-1256.
- [14] Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharma-cogenomics*, 2008,9(12):1879-1902.
- [15] Sharma G, Mirza S, Parshad R, et al. CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients[J]. *Clin Biochem*, 2010,43(4/5):373-379.
- [16] Widschwendter M, Apostolidou S, Raum E, et al. Epigenotyping in peripheral blood cell DNA and breast cancer risk: a proof of principle study[J]. *PLoS One*, 2008,3(7):e2656.
- [17] Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker[J]. *Cancer Res*, 2003,63(22):7641-7645.
- [18] Li Y, Wei Q, Cao F, et al. Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women[J]. *Oncol Rep*, 2008,19(5):1149-1153.
- [19] Lewis CM, Cler LR, Bu DW, et al. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(1):166-172.
- [20] Kim JH, Shin MH, Kweon SS, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in serum as a diagnostic tool for breast carcinoma in Korean women[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 118(2):176-181.
- [21] Ahmed IA, Pusch CM, Hamed T, et al. Epigenetic alterations by methylation of RASSF1A and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010,199(2):96-100.
- [22] Van der Auwera I, Bovie C, Svensson C, et al. Quantitative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:97.
- [23] Wilson ME, Westberry JM. Regulation of oestrogen receptor gene expression: new insights and novel mechanisms [J]. *J Neuroendocrinol*, 2009,21(4):238-242.
- [24] Fiegl H, Millinger S, Mueller Holzner E, et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2005,65(4):1141-1145.
- [25] Fiegl H, Jones A, Hauser Kronberger C, et al. Methylated NEUROD1 promoter is a marker for chemosensitivity in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008,14(11):3494-3502.
- [26] Dietrich D, Krispin M, Dietrich J, et al. CD01 promoter methylation is a biomarker for outcome prediction of anthracycline treated, estrogen receptor-positive, lymph node-positive breast cancer patients[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:247.
- [27] Karray Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, et al. Aberrant methylation of RASSF1A is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(2):203-210.
- [28] Campan M, Weisenberger DJ, Laird PW. DNA methylation profiles of female steroid hormone-driven human malignancies[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006,310:141-178.
- [29] Dworkin AM, Huang THM, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19(3):165-171.
- [30] Sharma G, Mirza S, Parshad R, et al. Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients[J]. *Life Sci*, 2010,87(3/4):83-91.
- [31] Jing F, Jun L, Yong Z, et al. Multigene methylation in serum of sporadic Chinese female breast cancer patients as a prognostic biomarker[J]. *Oncology*, 2008,75(1/2):60-66.
- [32] Evron E, Dooley WC, Umbrecht CB, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR [J]. *Lancet*, 2001,357(9265):1335-1336.

- [33] Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(13):4442-4452.
- [34] Fackler MJ, Malone K, Zhang Z, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR analysis doubles detection of tumor cells in breast ductal fluid[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(11 Pt 1):3306-3310.
- [35] Jing F, Yuping W, Yong C, et al. CpG island methylator phenotype of multigene in serum of sporadic breast carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2010, 31(4):321-331.
- [36] Brooks J, Cairns P, Zeleniuch Jacquotte A. Promoter methylation and the detection of breast cancer[J]. *Cancer Causes Control*, 2009, 20(9):1539-1550.

(收稿日期:2010-05-10)

(本文编辑:陈莉)

苏怡,任泽舫. 乳腺癌相关 DNA 甲基化生物标记的研究进展[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2011, 5(2):209-214.