

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年9月15日 第11卷 第9期

(Volume 11 Number 9)



9/2003

ISSN 1009-3079



9 771009 307001

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003年9月15日 第11卷 第9期 (总第113期)

述 评	1269 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升, 尚克中 1273 胃食管反流病的内镜缝合治疗 杨云生, 令狐恩强
胃 癌	1275 α -连接素表达与胃癌生物学行为的关系 徐采朴, 周永宁, 陈渝 1279 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访 王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本伊, 尤纬缔 1282 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗 潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田 1286 PKC β 1 和 PKC β 2 在早期胃癌中的表达 冯瑞娥, 陈杰, 崔全才, 詹阳, 王振宇 1290 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响 张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 梁晓秋 1294 胃黏膜癌变过程中 PTEN 基因编码产物的表达及意义 李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东琰, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉 1297 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系 黄海力, 吴本伊, 尤纬缔, 申明识 1302 雌激素诱导基因 PS2/TFF1 在胃癌及癌前病变中的表达 李俊美, 罗和生, 姚宏昌 1306 GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联 张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆 1310 基质金属蛋白酶-7 表达与胃癌临床病理生物学行为的关系 孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌 1314 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联 叶梅, 刘君炎, 邓长生 1318 胃癌中医证型相关基因的表达谱 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平
肝 癌	1322 MUC1 基因免疫抑制 H22 肝癌生长的实验研究 袁时芳, 王岭, 李开宗, 颜真, 韩苇, 张英起 1326 纺锤体组装关卡基因 hsMAD2 在人肝细胞肝癌中的表达及其意义 李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟 1329 GnRH 类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究 刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙岚, 黄鲁豫, 张远强 1333 bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控 于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧 1337 经肝动脉注射 5-FU 白苕微球治疗兔 VX ₂ 移植性肝癌 李欣, 冯敦生, 郑传胜, 柳曦, 孔健 1341 KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平 1345 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化 赵海磊, 刘成, 赵爱光 1349 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究 代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁 1353 复方中药 99- 克星超声介入治疗肝癌裸鼠移植瘤凋亡与增生 林晓东, 林礼务, 何以救, 高上达, 杨发端, 薛恩生 1357 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建 刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超 1362 β -catenin 和 Cyclin D1 在肝癌肝内转移中的作用 苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 石明 1365 DC 负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德 1369 TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用 李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平
大 肠 癌	1372 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究 吴正蓉, 申洪 1375 IL-4 增强 IL-2 活化的 A-NK 细胞对人直肠癌 CC95 的抗肿瘤作用 王志华, 申宝忠, 史历 1378 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选 刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰 1382 直肠癌组织 CD44v6, DNA 含量的联合检测及临床意义 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍 1385 胃泌素拮抗剂增加 CD 自杀基因对结直肠癌细胞的杀伤作用 王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李奎茂, 武永忠, 王青 1389 aFGF 和 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 PKC 及 ERK 活性的影响 尚海, 张颐, 单吉贤
基础 研究	1392 牛磺酸对 CCl ₄ 诱导的太鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究 梁健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海锋, 梁劲松, 黄仁彬, 韦新, 韦明 1396 胰腺移植 ICAM-1 的表达及信号转导的因素 梁健, 王凤山, 刘永锋, 刘利民, 刘树荣, 崔宏, 邵春泉, 何三光

临床研究	1399 聚乙二醇 4 000 治疗老年人功能性便秘 85 例 张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其
焦点论坛	1402 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升 1402 胃肠道肿瘤的 X 线诊断 尚克中, 程英升, 吴春根 1404 胃肠道肿瘤 CT 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1406 胃肠道肿瘤 MRI 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1408 胃肠道肿瘤超声诊断 胡兵, 周进祝 1410 胃肠道肿瘤核素诊断 陆汉魁 1413 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗 程英升, 尚克中
治疗指南	1416 肝细胞癌的诊断和治疗 陆嵘, 房静远
文献综述	1420 DNA 高甲基化与抑癌基因 刘仲敏, 刘芝华, 吴旻 1425 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展 沈波, 朱金水 1429 腹膜粘连的分子机制及药物防治 曾健, 李晓辉 1433 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展 姚学清, 林锋 1436 肽转运载体的分子特征 韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽 1443 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展 蒋业贵, 李兆申 1447 环氧化酶-2 与结直肠癌 姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟 1451 幽门螺杆菌疫苗的研究进展 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1457 脂肪酸结合蛋白研究进展 冯爱娟, 陈东风 1460 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展 王永刚, 王宇明
读者来信	1352 陈祖林 1368 汤伟
消息	1301 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1332 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1424 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1450 WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 1464 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
封面故事	巴松湖又名错宗湖, 在藏文里又是绿色湖水的意思, 位于西藏林芝地区工布江达县境内, 该湖湖面海拔 3464 m, 是川藏东部最大的淡水堰塞湖之一。湖水清澈见底, 四周雪山倒映其中, 湖周原始森林密布, 群山环绕, 美景如画。湖中央飘着一座秀丽的湖心小岛, 湖心岛上有一座错宗寺, 建于唐代末年。(马俐 马娜 摄影)。

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名

(月刊)
创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-09-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元
社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 王先林
排版 李少华
校对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wjcd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

电话 (010)85381892
传真 (010)85381893

印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话: (010)85381892
传真: (010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PЖ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262
国外代号 M 4481

国内定价 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证
1401004000050

DNA 高甲基化与抑癌基因

刘仲敏, 刘芝华, 吴 旻

刘仲敏, 刘芝华, 吴旻, 中国医学科学院, 中国协和医科大学肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
国家“973”重点基础研究项目资助, No. G1998051021
项目负责人: 刘芝华, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院, 中国协和医科大学肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室.
liuzh@pubem.cicams.ac.cn
电话: 010-67723789 传真: 010-67715058
收稿日期: 2002-12-05 接受日期: 2002-12-16

摘要

哺乳动物基因组中, DNA 甲基化是指 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶第5位碳原子被甲基化. DNA 甲基化是一种基因外修饰, 不改变 DNA 的一级结构; 他在细胞正常发育、基因表达模式以及基因组稳定性中起着至关重要的作用. 全基因组低甲基化, 维持甲基化模式酶的调节失控和正常非甲基化 CpG 岛的高甲基化是人类肿瘤中普遍存在的现象. DNA 高甲基化是导致抑癌基因失活的又一个机制. 本文综述了抑癌基因的高甲基化、DNA 修复基因的高甲基化、甲基化与转录的关系以及导致转录失活可能存在的作用机制、寻找甲基化相关基因的依据原则、甲基化的检测方法、肿瘤甲基化图谱的特征、甲基化与突变的相互作用、导致甲基化产生的原因、及其广泛的应用前景.

刘仲敏, 刘芝华, 吴旻. DNA 高甲基化与抑癌基因. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1420-1424

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1420.asp>

0 引言

在哺乳动物基因组中, 胞嘧啶的第 5 位碳原子可以被的胞嘧啶^[1]. DNA 甲基化是一种基因外(epigenetic)修饰, 他不改变 DNA 的一级结构并且在细胞正常发育、基因表达模式以及基因组的稳定性中起着至关重要的作用. DNA 甲基化模式是动态的. 例如, 在早期发育阶段, 受精后发育的特征是在全基因组范围内发生去甲基化, 接下来又发生区域性的甲基化, 这种基因组范围的 DNA 甲基化改变使甲基化模式得以建立. 甲基化模式的混乱与异常发育有关, 包括癌症.

DNA 甲基化的改变, 与遗传因素改变一样都是人类肿瘤的特点之一. 许多基因, 尤其是管家基因的启动子区富含 CpG 二核苷酸, 诸如此类启动子区定义为 CpG 岛. 除定位于失活 X 染色体上的基因和印迹基因外, 正常细胞的 CpG 岛由于被保护而处于非甲基化状态. 全基因组低甲基化, 维持甲基化模式酶的调节失控和正常非甲基化 CpG 岛的高甲基化是人类肿瘤中普遍存在的现象. 以往的研究证明启动子区的高甲基化导致

抑癌基因失活是人类肿瘤所具有的共同特征之一, 而且这种高甲基化是导致抑癌基因失活的又一个机制. 1986 年, 有文章报道在肺癌和淋巴瘤中发现了位于 11 号染色体短臂的 calcitonin 基因存在高甲基化现象. 这一发现使更多的学者致力于 CpG 岛异常甲基化的研究中.

1 抑癌基因的高甲基化

人类肿瘤中, 抑癌基因 CpG 岛高甲基化 1989 年首次在视网膜母细胞瘤(Rb)基因中发现, 继首次在 H-ras 基因中发现突变之后. 后来证明 Rb 基因启动子的高甲基化可以显著下调体外报告基因的表达. 除了视网膜母细胞瘤中未发现该基因的甲基化.

直到 1994 年发现 VHL 基因的失活也与甲基化相关, 才确定肿瘤中启动子 CpG 岛高甲基化是基因失活的一个作用机制. 但是, 肿瘤中基因外失活现阶段的研究是始于 Stephen Baylin et al 发现抑癌基因 p16 的失活通常都采用 CpG 岛高甲基化的作用机制. p16 基因, 即 CDKN2A 基因, 一种细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白, 他可以抑制通过磷酸化使 Rb 蛋白失活细胞周期素 D 依赖性激酶的活性. p16 基因的失活将导致细胞丧失激活 Rb 基因的能力进而使细胞生长失去控制. p16 基因位于染色体 9p 的区域内, 许多肿瘤中该区段经常发生缺失、纯合性缺失和一些点突变, 这一现象提示该基因在肿瘤形成中发挥重要作用. 但是, 大量的研究表明在很多类型原位癌中很少能检测到该基因的纯合性缺失, 且在肿瘤中也很少能检测到 p16 基因的点突变. 事实上, 与 p16 基因失活相关的高甲基化是肿瘤中经常发生的事件之一. 最初有关 p16 基因甲基化的报道主要存在于肺癌、头颈癌、神经胶质瘤、结直肠癌和乳腺癌中. 后来这些研究几乎涉及所有上皮来源的癌, 但 p16 基因的甲基化不存在于小细胞肺癌和部分血癌中.

与 p16 基因相邻的 p15 基因, 在 Rb 基因的磷酸化调节中具有与其相似的结构和功能. p15 基因与 p16 基因经常同时缺失. 但是, 上述涉及的肿瘤中 p15 基因很少通过甲基化失活. 在许多血癌中可以检测到 p15 基因的高甲基化频繁发生.

乳腺癌散发性病例的乳腺癌易感基因 BRCA1 中没有检测到体细胞突变, 这一点提示可能是甲基化导致该基因的失活. 近来的研究工作已经证明在一小部分乳腺癌和乳腺癌细胞系的 CpG 岛中存在甲基化^[2-4]. 但没有发现 BRCA2 基因存在甲基化^[5].

p73 基因, p53 基因的同源基因, 定位于 1 号染色体. 大量的报道表明, 与 p53 基因不同, 在该基因中很少能检测到突变. 近来的两篇报道已经发现在急性淋巴细胞白血病和淋巴瘤中 p73 基因表达失活与甲基化有关^[6, 7]. p14^{ARF} 基因具有调节 p53 蛋白稳定性的作用, 在部分结直肠癌细胞系中发生甲基化^[8].

2 DNA 修复基因的高甲基化

在肿瘤中, 可以发现参与 DNA 修复的基因经常由于启动子区高甲基化而失活. 第一个在前列腺癌中被证明的此类基因是谷胱甘肽转移酶(GST π), 实验证明甲基化异常发生在大多数前列腺癌中, 并且他还是导致该基因失活的原因. 同时也在乳腺癌和肾癌中发现这一基因被甲基化, 但在其他的肿瘤中很少发现这一现象^[9].

第二个具有肿瘤特异性甲基化的 DNA 修复基因是 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(MGMT). 近来的研究证明存在于该基因启动子区或第一外显子内的 CpG 岛甲基化与其转录失活有关^[10], 而且这种变化可以使染色质进入关闭状态, 进而导致核小体定位异常^[11]. 该变化不仅存在于细胞系中, 也发生在原位癌中. MGMT 基因的甲基化异常多见于结直肠癌、部分淋巴瘤、肺癌以及脑肿瘤^[12, 13].

最后一个 DNA 修复基因是 MLH1. 许多工作发现存在于散发性结直肠癌、子宫内膜癌和胃癌中的微卫星不稳定性经常是该基因被甲基化后造成的^[14-16].

除上述基因外, 还发现其他一些基因, 如细胞因子信号抑制子(SOCS1)^[17]、骨形成蛋白(BMP3B)^[18]、RAS 效应同源物(RASSF1)^[19]、E-钙黏素、胆固醇受体、雌激素受体、雄激素受体、维甲酸受体 β 、CD44、FHIT 等基因在不同肿瘤中存在着甲基化现象.

3 甲基化与转录

现在已知 DNA 甲基化参与了基因的转录调节. 一些具有 CpG 二核苷酸结合位点转录因子间的相互作用属于甲基化敏感型. 但是甲基化 DNA 对转录的影响更多情况下是通过与甲基化 CpG 结合蛋白和改变染色质结构的相关因子之间的相互作用实现的.

MeCP1 和 MeCP2 是首先鉴定出的两个甲基化 CpG 结合蛋白. MeCP2 是单一多肽链, 包含一个与甲基化 CpG 结合的结构域(MBD)和一个转录抑制结构域(TRD)^[20]. 另外四个甲基化 CpG 结合蛋白也具有 MBD(MBD1, MBD2, MBD3, MBD4), 并且 MBD2 具有使 MeCP1 复合物更易结合甲基化 DNA 的作用; 这些甲基化 CpG 结合蛋白具有直接抑制转录的作用, 也能够与转录共抑制子形成复合物; 后来发现 DNA 甲基转移酶(DNMTs)也具有这两种功能. 具有甲基化 CpG 结合活性蛋白抑制转录的机制有待于研究. 有证据表明这一过程是由许多复杂机制完成的. 一个主要机制包括甲基化 DNA 在 MBD 介导下与 Sin3 或 Mi-2/NuRD 形成共抑制复合物, 他们

反过来再与 HDAC1、HDAC2、两个 Rb 相关的组蛋白结合蛋白、RbAP46 和 RbAP48 组成核心组蛋白去乙酰化复合物^[21-24]. 此外还存在其他共抑制复合物, 但是还没有证明他们在转录失活机制中的扮演什么样的角色. HDACs 可以使组蛋白 H3 和 H4 的 N 末端赖氨酸残基去乙酰化^[25], 从而导致组蛋白所带正电荷增加. 该组蛋白与带负电荷的 DNA 相互作用造成染色质结构压缩, 进一步可能通过限制转录因子的结合抑制转录作用. Mi-2/NuRD 共抑制复合物也包含通过 ATP 依赖机制重新包装染色质的因子. 上述活动可以使核小体在 DNA 上的定位发生改变, 进而可能限制 DNA 和转录因子之间的相互作用.

这一描述可能是比较简单. 首先, 染色质的重包装和组蛋白的去乙酰化是相互依赖的. 其次, DNA 甲基化可能需要 HDAC 的活动或染色质的重包装中的成分的参与. 第三, 事实上, HDACs 产生序列特异性的转录抑制因子导致基因失活, 因而通过 HDACs 发挥作用的转录抑制因子可能不仅仅作用于甲基化相关的位点. 类似地, 乙酰化和甲基化介导的抑制作用也可能单独发挥功能. 综合起来, 这些现象进一步体现了抑制基因的表达是 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、染色质的重包装和序列特异的失活机制彼此之间复杂的相互作用所导致的.

尽管甲基化通常与转录失活有关, 但在印迹座位中至少有两个例子是例外的, 他们的甲基化可以使转录激活.

4 甲基化的检测方法

科研工作者的首要目标应该是对通常情况下认为 CpG 岛的甲基化与转录失活相关的甲基化进行研究. 图 1 列出在肿瘤中寻找甲基化相关基因的一个依据原则.

有关特定基因 RNA 转录起始位点的描述为发现 DNA 甲基化可能在哪里发挥作用提供了线索. 如果 GenBank 中没有此方面的报道, 可以参考其他物种如老鼠启动子的相关信息. 同时也要考虑假基因的影响, 以便避免产生假阳性结果. 最后是以往研究发现并没有确凿的证据证明在体外利用去甲基化抑制剂使细胞系中失活的基因恢复表达, 该基因的失活就一定与甲基化有关. 原因在于该药可能间接地诱导基因表达. 获得确凿的证据的唯一方法是分析 CpG 岛的甲基化状态.

原则上首先可以利用亚硫酸氢盐和非亚硫酸氢盐的方法在肿瘤细胞系详细地研究 CpG 岛的甲基化. 亚硫酸氢盐测序的研究有利于设计出区别甲基化和非甲基化模式的引物. 细胞系也允许利用去甲基化抑制剂对其进行处理, 以便研究基因去甲基化和恢复表达的情况. 对于原位癌, 诸如甲基化特异性 PCR(MSP)的方法可进行大量标本的筛查.

要对 CpG 岛的 DNA 甲基化模式进行较深入的了解, 必须利用亚硫酸氢盐修饰过的 DNA 进行研究. 亚

硫酸氢盐可以使非甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶不发生改变. 这种方法造成甲基化和非甲基化 DNA 序列的差异. 该方法中 DNA 的完全变性以及胞嘧啶完全转变为尿嘧啶均可避免产生假阳性结果.

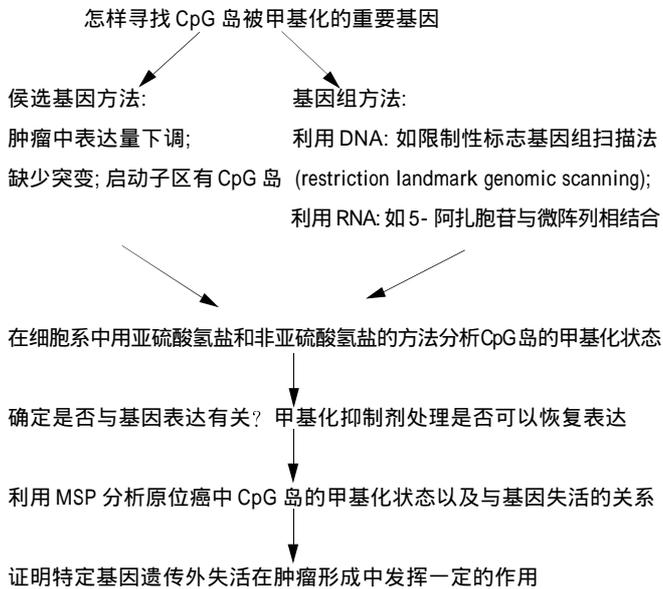


图 1 寻找与转录失活相关甲基化的方法.

以亚硫酸氢盐修饰为基础, 用于 CpG 岛甲基化分析的研究方法包括以下两种: (1)测序. 测定亚硫酸氢盐修饰过 DNA 的序列是检测胞嘧啶甲基化最直接的方法. 利用 PCR 反应扩增修饰过的 DNA, 获得目的基因双链 DNA. 可以对该产物直接进行序列分析; 也可以将其克隆测序获得单链 DNA 的甲基化图谱. (2)MSP. 在研究 CpG 岛甲基化中, MSP 是应用最广泛的一种技术. 利用亚硫酸氢盐修饰造成甲基化和非甲基化 DNA 序列差异, 可以设计出各自特异性引物. 该技术的极高灵敏度允许他对小量样本的 DNA 进行甲基化研究, 包括来自石蜡包埋样品或显微切割组织的 DNA. 由于 MSP 方法的多种优点, 他被认为是人类肿瘤甲基化分析中是一种快速、高效临床研究手段. 最后, 另外一种 MSP 是“Methylight”, 他利用荧光标记的时 PCR 技术进行检测^[26], 荧光检测大大提高了该方法的灵敏度. 别的方法包括结合亚硫酸氢盐的限制性分析; 甲基化敏感的单核苷酸引物延伸法; 甲基化敏感的单链构象分析.

5 基因甲基化信号通路、图谱及意义

肿瘤是涉及多重信号通路和遗传损伤的一种疾病, 他们在肿瘤的形成中是必不可少的. 基因外损伤也同样如此. CpG 岛甲基化所涉及的基因分别参与了细胞周期 (p16^{INK4a}, Rb), DNA 修复 (MGMT, hMLH1), 细胞黏附 (CDH1) 等过程. 过去的 3 a 中, 肿瘤中启动子发生甲基化的基因数量增加的相当快. 这种不断发现可能导致研究者相信所有他们感兴趣的基因均可能发生异常甲基化, 并且在肿瘤形成中具有同等重要的作用. Esteller

同时对以往有关甲基化的部分工作进行了分析, 发现如下规律: (1)根据肿瘤类型可以建立 CpG 岛甲基化图谱. Esteller et al^[27]已经证明这种甲基化的特定模式同样存在于肿瘤起源的组织中. 参考以往报道的文献, 可以发现有些类型的肿瘤比别的肿瘤更易发生甲基化: 例如最容易甲基化的肿瘤主要起源于胃肠道, 而诸如卵巢癌一类的肿瘤则很少发生甲基化^[27]. 另外一个结论是具有不同程度 CpG 岛甲基化的肿瘤呈梯度分布. 因而, 不大可能存在一种所有 CpG 岛均甲基化的肿瘤. (2)染色体上是否存在异常甲基化的热点? 核内是否有控制甲基化的因子? 许多最近发表的文章已经报道出通过甲基化导致转录失活的基因都位于 3 号染色体短臂附近的同一区域^[28, 29]. 该区段在许多肿瘤中存在很高频率的杂合性丢失, 尤其在非小细胞肺癌中. 许多学者对该区段进行突变检测, 但一无所获. 答案似乎是一些基因的失活可能与甲基化有关. 但还无法确定这一区域是否属于异常甲基化热点. (3)大量 CpG 岛发生甲基化基因的基因组结构具有如下特征: 他们通常具有两个不同的启动子, 且都有 CpG 岛. 主要转录产物来自于强启动子, 而弱启动子则是少量转录产物起始处. 如 APC、ER 等基因均属于上述类型.

6 甲基化与突变的比较

过去一直认为许多肿瘤的形成主要是基因突变引起的. 但 20 年后只发现癌基因 K-ras 和抑癌基因 p53 在许多不同类型的肿瘤中存在较高频率的突变. 现在已发现越来越多基因的失活可能与甲基化有关. 但是, 赋予他在肿瘤发生及发展过程中扮演着关键性的角色最重要的发现是甲基化导致特定基因失活的证实. 如 DNA 修复基因, 他们由于甲基化失活可能改变细胞的整个遗传环境. 甲基化相关 MGMT 的失活可以引起参与结直肠癌形成过程的癌基因 K-ras 中 G 到 A 的转换^[30], 即外基因损伤可以引起在肿瘤发展中起关键性作用基因的遗传损伤^[30, 31]. 由于启动子甲基化而失活的其他一些基因可能与 DNA 损伤相关.

遗传外损伤与遗传损伤可能是相互作用的. 遗传改变同样也影响参与甲基化模式建立和维持过程中基因作用. 如 DNMT3b 基因生殖细胞中的突变与异常甲基化有关, 但与肿瘤无关^[32].

CpG 岛甲基化经常发生在缺乏基因突变的情况下, 说明二者在导致基因失活的过程中发挥同等重要的作用. 另一个证明基因启动子甲基化在肿瘤细胞中发挥重要作用的途径是研究其恢复表达的效应. 例如通过去甲基化或转基因的方法都可以恢复由于甲基化失活基因的表达.

7 甲基化产生的原因

导致肿瘤甲基化模式改变的机制尚不清楚, 其可能原因有以下几种: (1)保护 CpG 岛免受甲基化因子的丢失.

从以往的研究可知, Aprt 基因胚胎细胞的 CpG 岛通过一个尚未证实的保护顺式作用元件与 CpG 岛边缘的 Sp1 位点相结合, 而使其处于去甲基化状态^[33]. (2) 肿瘤中 DNA methyltransferase (DNMT) 的过度表达. 大量证据表明, DNMT1 在肿瘤中的表达是上调的^[34]. 但也有报道显示 CpG 岛的高甲基化与 DNMT1 的表达水平无关. (3) DNMT 复合物受到破坏. 另一个潜在的因素可能与 DNMT 水平升高有关, 即指这些酶的酶相关或抑制成分的调节失控. 该失控可能由于与 DNMTs 形成复合物的 一种或几种因子(例如 pRb, DMAP1-DNMT 结合蛋白) 的丢失所致. (4) 复制时序性的破坏. 基因组的复制在细胞周期 S 期通过空间和短暂模式得以实现. 在此过程中的变化使复制区域和染色质构成的区域无法正常地相互作用. CpG 岛可能通过复制时序紊乱发生异常甲基化. 有证据表明, 肿瘤细胞具有一个比较不同步的复制时序.

8 甲基化的应用

尽管基因启动子的高甲基化和基因表达失活之间的关系有待于进一步阐明, 但是人们日益重视 DNA 甲基化在肿瘤早期诊断和预后分析中, 以及在肿瘤的预防和治疗中可能具有的重要作用. 以 DNA 甲基化为基础的标志物可以应用于肿瘤细胞的检测、肿瘤类型的识别和肿瘤治疗三个主要临床领域中.

与基因突变不同, CpG 岛启动子甲基化位点在一个基因中是恒定的. 对于所有的患者来说, 在某一个已知基因中只需单一类型的引物, 利用甲基化特异性 PCR 便可检测肿瘤特异性甲基化的变化情况. 且与杂合性缺失不同, 该 PCR 产物呈阳性, 这一特点为上述检测提供方便.

与基因改变不同, 遗传外改变是可逆的. 恢复启动子甲基化所引起失活关键基因的表达有助于逆转肿瘤细胞的表型. 人们可以为 DNA 去甲基化设计出象 5-Aza C (5-aza-2-deoxycytidine) 一样更为特异的药品用于肿瘤治疗. 近期的研究发现, 用 HDAC (histone deacetylase) 抑制子使高甲基化基因发生部分去甲基化可以恢复其表达活性, 这一实验结果在临床上具有广泛的应用前景.

遗传外改变已经成为肿瘤中最重要的分子事件之一. 某些抑癌基因 CpG 岛甲基化的发现将 DNA 甲基化与破坏多种信号通路的遗传改变联系起来. 启动子的高甲基化现在被认为是基因失活的真正的作用机制之一. 但是, 还有许多重要问题有待解决, 如保护 CpG 岛免受甲基化因子的鉴定; 甲基化通过什么途径导致基因失活等. 最后, 甲基化在肿瘤患者的分子治疗中有广泛的用途, 而且可能成为未来治疗方法的作用靶点.

9 参考文献

1 Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5237-5242

2 Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997;57:3347-3350

3 Mancini DN, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, O' Malley FP, Singh SM, Xing W, Archer TK. CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene* 1998;16:1161-1169

4 Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 1998;17:1807-1812

5 Collins N, Wooster R, Stratton MR. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Cancer* 1997;76:1150-1156

6 Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A, Said J, Tatsumi E, Koeffler HP. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 1999;94:1113-1120

7 Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 1999;59:3352-3356

8 Robertson KD, Jones PA. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol* 1998;18:6457-6473

9 Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998;58:4515-4518

10 Qian XC, Brent TP. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the 06-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 1997;57:3672-3677

11 Patel SA, Graunke DM, Pieper RO. Aberrant silencing of the CpG island-containing human 06-methylguanine DNA methyltransferase gene is associated with the loss of nucleosome-like positioning. *Mol Cell Biol* 1997;17:5813-5822

12 Herfarth KK, Brent TP, Danam RP, Remack JS, Kodner JJ, Wells SA Jr, Goodfellow PJ. A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Mol Carcinog* 1999;24:90-98

13 Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene 06-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793-797

14 Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-6875

15 Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:462-466

16 Yamamoto H, Perez-Piteira J, Yoshida T, Terada M, Itoh F, Imai K, Peruchio M. Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology* 1999;116:1348-1357

17 Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth suppression activity. *Nat Genet* 2001;28:29-35

18 Dai Z, Lakshmanan RR, Zhu WG, Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Brena RM, Li B, Wright FA, Ross P, Otterson GA, Plass C. Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes. *Neoplasia* 2001;3:314-323

- 19 Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000;25: 315-319
- 20 Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-389
- 21 Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 1997; 89:349-356
- 22 Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 1997; 89:373-380
- 23 Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O' Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 2000;24:368-371
- 24 Knoepfler PS, Eisenman RN. Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 1999;99:447-450
- 25 Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998;20:615-626
- 26 Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32
- 27 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-3229
- 28 Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:3581-3585
- 29 Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13954-13959
- 30 Esteller M, Gonzalez S, Riques RA, Marcuello E, Mangués R, Germa JR, Herman JG, Capella G, Peinado MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:299-304
- 31 Esteller M, Riques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61:4689-4692
- 32 Xu GL, Bestor TH, Bourc' his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999;402:187-191
- 33 Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3156-3165
- 34 Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72:141-196

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号.

(世界胃肠病学杂志 2002-12-18)



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

