

胃癌前病变中 DNA 甲基化状态与叶酸

刘丽华, 张方信

刘丽华, 张方信, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院消化科 甘肃省兰州市 730050
甘肃省中青年科学技术基金资助项目, No.YS031-A21-023
通讯作者: 刘丽华, 730050, 甘肃省兰州市小西湖西街98号, 兰州军区兰州总医院消化科. LLH487726@163.com
收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-11-12

摘要

DNA甲基化异常是胃癌发生的重要机制之一, 为了能尽早发现并纠正DNA甲基化异常, 阻止胃癌的发生, 胃黏膜癌前病变中DNA甲基化状态的研究日益受到重视. 众多研究表明, 胃黏膜癌前病变中多种基因中存在甲基化异常, 而且基因的甲基化异常程度与年龄、性别有关, 还与胃黏膜上皮细胞是否存在活动性炎症、肠化及幽门螺杆菌感染有关. 叶酸缺乏可导致DNA甲基化的紊乱和DNA修复机制效率的减弱, 叶酸摄入量不足患胃癌的相对危险度增高; 胃黏膜癌前病变患者体内叶酸不足, 黏膜细胞总基因组DNA甲基化水平下降; 经叶酸治疗后, 体内叶酸升高, 黏膜细胞总基因组DNA甲基化水平上升, 异型增生、肠上皮化生明显改善. 因此, 叶酸缺乏与胃黏膜癌前病变的发生、发展有关, 及时纠正叶酸不足, 可逆转胃黏膜的病理改变, 减少胃癌的发生.

关键词: 胃癌前病变; DNA甲基化; 叶酸

刘丽华, 张方信. 胃癌前病变中DNA甲基化状态与叶酸. 世界华人消化杂志 2005;13(23):2770-2772
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2770.asp>

0 引言

DNA甲基化 (DNA methylation) 是哺乳动物DNA复制后调节方式之一, 也是脊椎动物DNA唯一的自然化学修饰方式. DNA甲基化的生物学功能是影响蛋白质和DNA的特异性结合作用, 在基因表达调控中起重要作用. 肿瘤中DNA甲基化状态的研究颇多, 对肿瘤组织中甲基化异常现象的解释是: (1)致癌物与DNA相互作用形成加合物阻碍了酶活性甲基化作用, 使DNA甲基丢失; (2)致癌物又可激发DNA的再甲基化作用, 使一些未受致癌物影响的CpG(胞嘧啶-鸟嘌呤)序列出现新的甲基化; (3)甲基转移酶活性增高, 导致抑癌基因启动子区域高甲基化, 抑制抑癌基因的表达, 导致肿瘤的发生. 为了能尽早发现并纠正DNA甲基化异常, 阻止胃癌的发生, 胃黏膜癌前病变中DNA甲基化状态的研究日益受到重视. 胃黏膜是人体中较早与各种有害物质直接接触的部位, 而且黏膜上皮细胞对损害因素的反应快而强烈. 因此, 研究胃癌前病变如萎缩、肠化、中-重度不典型增生、息肉等组织细胞中

DNA甲基化状态的变化, 也许可以找到肿瘤发生的早期原因, 可为胃黏膜癌前病变的逆转和胃癌的防治找到措施. 但就在胃黏膜癌前病变中DNA的甲基化状态目前尚不十分清楚. 人们发现叶酸等维生素缺乏可引起DNA甲基化异常. 叶酸是甲基基团的最终来源之一, 在维持DNA甲基化中起着重要的作用^[1]. 我们就近年来对于胃黏膜癌前病变中DNA甲基化状态、蛋白表达及与叶酸的相关性的研究情况进行简要概述.

1 胃癌前病变中DNA甲基化状态及蛋白表达

近年来的研究发现, 胃黏膜癌前病变中p16、hMLh1、E-cadherin、COX-2、DAP-kinase、GSTP1、MGMT、p14、THBS1、TIMP3、RASSF1A等多种基因中存在CpG岛的甲基化异常. Jang *et al*^[2]研究发现胃癌组织周围的非肿瘤组织中黏膜存在腺体萎缩和慢性炎症时, 检测发现该部位黏膜细胞中p16基因启动子区域呈高甲基化和p16蛋白的低表达, 并认为前者可能是胃黏膜癌前病变中很早发生且非常普遍的现象, 根据其严重程度对判断胃黏膜癌前病变的预后以及预测其发生癌变的危险程度具有积极意义. Rocco *et al*^[3]研究发现在胃黏膜癌前病变的肠化细胞中和弥漫性生长的胃癌细胞中p16蛋白过度表达, 同样地, 在分化低的胃癌细胞中p16蛋白的表达低, 这可能反映出细胞增殖分裂中选择正确分裂增殖的压力增大, 而发生异型增殖, 同时这样的细胞具有了一定的侵袭性. 因此, 认为p16蛋白的表达高低与胃黏膜癌前病变中细胞的分化程度呈正相关. To *et al*^[4]在对胃黏膜肠化细胞中肿瘤相关基因的启动子区域甲基化状态的研究中发现: (1)DAP-kinase、p14、p15和p16基因的启动子区域高甲基化非常普遍; (2)E-cadherin和hMLH1基因的启动子区域高甲基化也时常发生; (3)GSTP1基因的启动子区域不存在高甲基化. 因此, 认为肿瘤相关基因的甲基化异常是胃黏膜上皮细胞肠化并向癌变发生、发展过程中普遍存在的现象. 为找到在胃癌发生、发展过程中始终存在基因CpG岛的甲基化异常, Kang *et al*^[5]进行了79例胃息肉、57例胃黏膜肠化、74例慢性胃炎、80例原发性胃癌的研究, 结果发现: (1)只在胃癌中存在GSTP1和RASSF1A基因甲基化异常; (2)在胃炎、黏膜肠化和息肉中显示COX-2、hMLH1和p16基因低甲基化状态, 而在慢性胃炎中这些基因呈现明显的甲基化异常; (3)MGMT基因在胃黏膜的四种损伤中均呈现相似的较低(8.8-21.3%)的甲基化异常; (4)APC和E-cadherin基因在胃黏膜的四种损伤中

均呈现程度相似的较高比例 (53-85%) 的甲基化异常; (5) DAP-kinase、p14、THBS1和TIMP3基因在胃癌发生、发展的过程中其甲基化异常程度呈现逐渐明显的趋势。通过上述结果, 作者提出在胃癌发生、发展的过程中基因的甲基化异常始终存在且呈逐渐加重的趋势, 基因甲基化异常累积的结果导致了肿瘤的发生。

不仅胃黏膜病变中存在DNA甲基化异常, 蛋白表达异常, 而且研究发现这种异常与年龄、性别有关。Waki *et al*^[6]研究了胃黏膜癌前病变中E-cadherin、hMLH1、p16基因的甲基化状态, 发现22岁以下的尸解测试者胃黏膜癌前病变的细胞中E-cadherin、hMLH1、p16基因启动子区域未被甲基化, 而45岁以上的尸解测试者胃黏膜癌前病变的细胞中E-cadherin、p16基因启动子区域被甲基化修饰的分别占86%和29%。手术切除后的胃癌旁组织癌前病变细胞中E-cadherin基因被甲基化修饰的占47-67%, hMLH1占47-67%, p16占22-44%。在尸解测试者中无论年龄大小均未发现hMLH1被甲基化修饰, 而手术切除后的胃癌旁组织癌前病变细胞中能检测到被甲基化修饰, 说明测定hMLH1甲基化状态可用于胃黏膜癌前病变严重程度的判断, 以及是否已是早癌的判断。Kang *et al*^[7]对慢性胃炎胃黏膜上皮细胞中COX-2、DAP-kinase、E-cadherin、GSTP1、MGMT、hMLH1、p14、p16、THBS1、TIMP3和RASSF1A 11个基因进行研究, 发现基因CpG岛的甲基化异常与患者的年龄、性别有关, 还与胃黏膜上皮细胞是否存在肠化、活动性炎症有关。随着年龄的增加, 基因的甲基化异常程度增加, 尤其在男性患者, 以及合并有胃黏膜上皮细胞有肠化和活动性炎症的情况下, 这类现象更为严重。Tamura *et al*^[8]对慢性胃炎、胃癌和癌旁组织细胞中APC、DAP-kinase、DCC、E-cadherin、GSTP1、hMLH1、p16、PTEN、RASSF1A、RUNX3和TSLC1基因的甲基化状态进行研究, 除RUNX3和TSLC1基因外, 其他的基因启动子区域的甲基化异常在慢性胃炎和肿瘤组织中有明显的差异。因而, 认为RUNX3和TSLC1基因甲基化异常始于胃黏膜上皮细胞中, 且随着患者年龄的增加而加重, 最终导致该基因的表达缺失, 使黏膜上皮细胞发生癌变。RUNX3和TSLC1基因表达在正常胃黏膜上皮细胞中存在, 而在胃癌和癌旁组织细胞中均缺失, 因此, 认为临床上可通过检测RUNX3和TSLC1基因是否表达来作为胃癌的一种分子生物学诊断方法。还提出通过检测hMLH1和p16基因的甲基化状态可预知胃癌的转移侵袭能力的大小。

胃黏膜癌前病变中蛋白表达异常还与幽门螺杆菌感染有关。Shirin *et al*^[9]研究发现合并幽门螺杆菌感染的慢性胃炎中p16基因蛋白呈过度表达, 并促使胃黏膜上皮细胞的凋亡。

因此, DNA的甲基化异常存在于非肿瘤细胞中, 存在于细胞的衰老过程中, 存在于胃癌发生、发展的早期阶段, 而且非常常见^[10,11]。

2 叶酸与胃癌前病变中DNA甲基化异常的相关性

叶酸为B族维生素, 主要存在于蔬菜和水果, 人体自身不能合成叶酸, 必须从膳食获取, 若蔬菜和水果摄入不足, 极易造成叶酸缺乏。人们最初认识叶酸与疾病的关系是因为缺乏叶酸能引起巨幼细胞性贫血, 随后发现, 叶酸缺乏还可以引起先天性缺陷和心血管系统疾病。最近研究表明, 在人体细胞中, 为消除因体内、外各种因素导致的DNA损伤, 修复机制必不可少, 叶酸缺乏导致DNA甲基化的紊乱和DNA修复机制效率减弱。体内、外实验都证实, 叶酸缺乏还可致DNA低甲基化和染色体损害^[12]。如叶酸缺乏可导致P53编码区域的低甲基化, 相反, 补充叶酸又可恢复这个区域的甲基化状态^[13], 因此, 认为叶酸缺乏将给人体健康带来潜在的危险, 可能与人类肿瘤的发生有关。

那么, 叶酸是如何维护基因甲基化状态和蛋白表达的呢? 叶酸通过提供或接受一碳单位在许多生化反应中发挥其辅助因子的作用, 以5-甲基-THF形式存在的叶酸在蛋白质转变为S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 中起重要作用。SAM是DNA甲基化作用的直接甲基提供者。亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 在S-腺苷甲硫氨酸形成过程中起关键作用, 该基因有两个常见多态即C677T和A1298C, 前者位于催化区而后者位于活化调节区。已有许多分子流行病学研究探讨MTHFR基因多态与肿瘤发病风险的关系。Ma *et al*^[14]报道一个随访了12 a的研究, 其中含有202例结肠癌和326例正常对照, 结果发现C677T变异显著降低, 结肠癌的发病风险同样显著降低。而C677T变异显著降低受到叶酸摄入量的影响。他们提出, 叶酸充足时, MTHFR基因型变异降低, 肿瘤发病风险也降低, 是因为在这种情况下既有足够的甲基供体保证正常甲基化, 又由于MTHFR活性降低而抑制了5-甲基四氢叶酸通路, 使DNA正常合成和修复得以加强。然而, 当叶酸摄入不足时变异基因型携带者可能既有DNA甲基化异常又有DNA合成/修复异常, 从而导致细胞癌变风险增加。Mayne *et al*^[15]在美国进行的一项关于饮食营养素摄入与食管癌及胃癌发病风险的研究中发现, 叶酸摄入量最低的人群患食管腺癌、食管鳞癌、贲门癌及胃癌的相对危险度比叶酸摄入量最高的人群分别高出2.08倍、1.72倍、1.37倍和1.49倍。Fang *et al*^[16,17]研究发现, 人胃癌灶总基因组DNA甲基化水平降低, 也发现低甲基化的胃癌患者, 血浆叶酸水平较低, 这证实叶酸维持的甲基化作用的降低, 是人胃癌发生的机制之一。

为进一步明确人胃癌发生中维生素含量和DNA甲基化水平与模式的变化及维生素对癌前疾病的干预作用, 房静远 *et al*^[18](1) 以微量生化法检测了56例慢性萎缩性胃炎(CAG)、6例胃溃疡和27例胃癌及45例健康成人的血浆叶酸及部分检测了供应病灶的动脉和所属静脉血中叶酸及胃手术标本不同部位和活检胃黏膜细胞内叶酸的变化。(2)分别采用甲基化酶孵育、³H-SAM掺入法

及Southern blot法观察了慢性胃炎、胃癌患者总基因组DNA、c-myc、c-Ha-ras癌基因的DNA甲基化水平的改变等。(3)分别以叶酸对中重度慢性胃炎行临床干预。结果表明,胃癌患者血浆、胃黏膜细胞的叶酸水平明显低于正常人;其总基因组DNA甲基化水平下降,癌区和癌旁区的c-myc、c-Ha-ras癌基因片段DNA甲基化水平下降,且甲基化水平降低情况与血浆叶酸降低有关。慢性胃炎经叶酸干预半年后,血及胃黏膜组织和细胞内相应的叶酸升高及总基因组DNA甲基化水平上升,异型增生、肠上皮化生改善明显。朱舜时^{et al}^[19,20]就叶酸对胃癌和其他胃肠道癌发生的干预作用进行了7 a随访,证实叶酸对胃肠道癌的发生有干预作用,叶酸可治疗萎缩性胃炎,改善胃黏膜病理。他认为补充叶酸可以影响胃黏膜基因调控,减轻损伤,抑制增殖,使萎缩、肠化及异型增生明显改善,从而阻断胃癌癌前病变的进展。

总之,叶酸在基因甲基化修饰和保持基因组稳定性方面具有重要作用。因此,对于癌症发生的高危人群在明确其DNA甲基化情况的前提下,补充叶酸是一种明智的选择,对于胃癌前病变采用叶酸治疗,不仅有使萎缩、肠化及异型增生改善的作用,更有可能预防胃癌的发生。由于这方面的研究工作较少,尤其叶酸缺乏如何导致DNA甲基化异常?补充叶酸治疗后DNA甲基化状态是否得到改善?哪些基因的甲基化状态更易受到叶酸缺乏的影响?能否在其中选择一种基因,通过检测其甲基化状态和血液中叶酸水平作为临床诊断、治疗、预后判断的依据?等等,有许多理论有待完善,因此,深入的研究DNA甲基化、叶酸与癌前病变的关系对于逆转癌前病变,预防肿瘤的发生有重要意义。

3 参考文献

- 1 Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 998-1003
- 2 Jang TJ, Kim DI, Shin YM, Chang HK, Yang CH. p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation. *Int J Cancer* 2001; 93: 629-34
- 3 Rocco A, Schandl L, Nardone G, Tulassay Z, Staibano S, Malfertheiner P, Ebert MP. Loss of expression of tumor suppressor P16(INK4) protein in human primary gastric cancer is related to the grade of differentiation. *Dig Dis* 2002; 20: 102-105
- 4 To KF, Leung WK, Lee TL, Yu J, Tong JH, Chan MW, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer. *Int J Cancer* 2002; 102: 623-628
- 5 Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 1551-1556
- 6 Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol* 2002; 161: 399-403
- 7 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-641
- 8 Tamura G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumor-related genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Histol Histopathol* 2004; 19: 221-228
- 9 Shirin H, Hibshoosh H, Kawabata Y, Weinstein IB, Moss SF. p16Ink4a is overexpressed in H pylori-associated gastritis and is correlated with increased epithelial apoptosis. *Helicobacter* 2003; 8: 66-71
- 10 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
- 11 Lee JH, Park SJ, Abraham SC, Seo JS, Nam jH, Choi C, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene* 2004; 23: 4646-4654
- 12 Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001; 475: 57-67
- 13 Kim YI, Pogribny IP, Salomon RN, Choi SW, Smith DE, James SJ, Mason JB. Exon-specific DNA hypomethylation of P53 gene of rat colon induced by dimethylhydrazine. Modulation by dietary folate. *Am J Pathol* 1996; 149: 1129-1137
- 14 Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-1102
- 15 Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Gammon MD, Vaughan TL, Farrow DC, Schoenberg JB, Stanford JL, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Blot WJ, Fraumeni JF. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1055-1062
- 16 Fang JY, Zhu S, Xiao S, Shi Y, Jiang S, Zhou X, Qian L. Alterations of level of total genomic DNA methylation and pattern of c-myc, c-Ha-ras oncogene methylation in human gastric cancerogenesis. *Chin Med J* 1996; 109: 787-791
- 17 Fang JY, Xiao SD, Zhu SS, Yuao JM, Qiu DK, Jiang SJ. Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. *J Gastroenterol* 1997; 32: 171-175
- 18 房静远, 朱舜时, 萧树东, 李蓉蓉, 施尧, 江绍基, 周怡和, 夏德凰, 金冠球, 谢宇野. 叶酸阻断胃癌机理的初步研究. *中华医学杂志* 1997; 77: 546-548
- 19 朱舜时, Joel Mason, 施尧, 胡运彪, 李蓉蓉, 汪敏, 周怡和, 金冠球, 谢宇野, 郭桂泉, 夏德凰, 钱珍华, 宋海连, 屠伯强, 张丽冬, Robert Russell, 萧树东. 叶酸对胃癌和其他胃肠道癌发生的干预作用—临床试验七年随访. *胃肠病学* 2002; 7: 73-78
- 20 朱舜时, 夏书军, 陈晓宇, 汪敏, 彭延申, 施尧. 叶酸治疗萎缩性胃炎并干预胃癌生成的分子生物学机制. *胃肠病学* 2002; 7: 86-89