

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0151-03

## DNA 甲基化与肺癌关系研究进展

夏 辉<sup>1</sup>综述; 张叔人<sup>2</sup>, 马 洁<sup>1</sup>审阅(1. 中国协和医科大学 中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室; 2. 中国医学科学院肿瘤医院免疫学研究室, 北京 100021)

[摘要] DNA 异常甲基化是一种表观遗传改变,常发生在启动子区的 CpG 岛。某些基因甲基化与肺癌发生密切相关,且是肺癌发生中的早期事件。可能发生在肺癌早期,可以通过去甲基化药物发生逆转。

[关键词] 肺癌; 甲基化; 去甲基化药物

[中图分类号] R730.2; R734.2 [文献标识码] A

在许多国家肺癌是最常见的致死性肿瘤。全世界范围内,每年因肺癌而死亡的人数超过 100 万。肺癌死亡率之所以很高很大程度是由于缺乏有效的早期诊断方法,临床诊断肺癌多为进展期肺癌,而目前对进展期肺癌的疗效都不理想所致。到目前为止人们对肺癌的分子与细胞生物学研究已经取得了很大进展,如肺癌特异的基因突变、基因插入、基因缺失以及基因的异常甲基化等。这些为肺癌的早期诊断提供了可能性。许多研究表明,抑癌基因的失活在肺癌发生中起了重要作用。当抑癌基因的两个等位基因都失活后,它才能失去其原有的抑癌作用参与癌症发生。其中一个等位基因的失活常由于基因缺失,而另一个等位基因的失活可能有多种原因:点突变、同源性丢失及异常甲基化等。DNA 异常甲基化是一种表观遗传(epigenetic)改变而非基因水平改变。在脊椎动物中,DNA 甲基化局限于 CpG 二核苷酸,且 CpG 二核苷酸并不是随机分布的,它经常分布于富含 CpG 二核苷酸的 CpG 岛。在人类基因组大约有 29 000 个 CpG 岛。越来越多研究表明基因启动子区异常甲基化是抑癌基因去表达的主要机理<sup>[1]</sup>。发生异常甲基化的基因与甲基化结合蛋白(如 MeCP1, MeCP2)及相关因子(如组蛋白去乙酰化酶 HDAC)结合,造成染色质重塑和转录关闭使抑癌基因去表达。重要基因启动子区的异常甲基化成为抑癌基因及其他基因失去功能的最常见机制之一。

### 1 影响基因发生异常甲基化的可能因素

#### 1.1 吸烟

吸烟是肺癌发生的危险因素。近年来人们对吸烟与甲基化的关系做了大量研究。Soria 等<sup>[2]</sup>对有吸烟史(大于 20 包/年)人群的支气管刷标本进行检测发现,32% 的标本至少有一个基因发生异常甲基化,8% 的标本有 2 个基因发生甲基化,这些人群被认为是肺癌发生的高危人群。Kersting 等<sup>[3]</sup>对 25 例长期吸烟者检测发现,28% 被检测者的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A(CDKN2A, p16)基因发生了甲基化。另外, Palmisano 及 Belinsky 等<sup>[4,5]</sup>报道约 20% 临床未诊断为肺癌的吸烟者的痰标本 p16 基因发生了甲基化。这

些与 Soria 报道的结果基本一致。以上这些实验结果都证实了吸烟与甲基化有相关性。曾有报道 p16 基因甲基化与非小细胞肺癌(NSCLC)患者的吸烟特征(如吸烟量,吸烟持续时间等)有关,而与其戒烟时间长短无关<sup>[6]</sup>。但也有人认为基因的异常甲基化与吸烟特征无关<sup>[2,7]</sup>。

#### 1.2 其他可能影响基因发生甲基化的因素

1.2.1 有癌症史的吸烟者 p16 基因发生异常甲基化频率高于无癌症史的吸烟者。

Lamy 等<sup>[8]</sup>报道 9/19 例(19 例标本中有 9 例,下同)(47.4%)有癌症史的病例检测到了某一基因发生异常甲基化,而只有 3/18 例(16.7%)无癌症史对照组检测到了基因发生异常甲基化。

#### 1.2.2 年龄

有报道死亡相关蛋白激酶基因(dapk)甲基化在年龄较高的吸烟者发生率较高<sup>[2]</sup>。但 Zochbauer-Muller<sup>[9]</sup>在研究 I ~ III 期 NSCLC 患者时未发现该基因甲基化与年龄因素有关。

1.2.3 基因异常甲基化也可能与肺癌的组织类型及病变进展阶段有关。

### 2 肺癌发生中易发生甲基化的基因

在肺癌发生过程中,基因启动子区 CpG 岛发生异常甲基化是一种常见现象。目前已从肺癌肿瘤组织标本、细胞系、支气管上皮标本、痰液标本及血液标本检测到多种基因发生了甲基化。其中在肺癌发生中甲基化发生率较高的基因如(表 1)所列<sup>[1]</sup>。

#### 2.1 apc 基因(adenomatous polyposis coli gene)

apc 基因位于染色体 5q,是家族性或散发性结肠癌相关抑癌基因。Brabender 等<sup>[10]</sup>报道,在 86/91 例(94%)NSCLC 肿瘤组织标本,80/91 例(88%)肺癌患者正常肺组织标本,2/10 例(20%)正常对照人群肺组织标本检测到 apc 基因启动子区发生甲基化。他们还发现 apc 基因启动子区高水平甲基化与患者低生存率有关。Virmani 等<sup>[11]</sup>检测到 34/58 株(58.6%)NSCLC 细胞系,13/50 株 SCLC 细胞系(26%)apc 基因发生甲基化。

表1 肺癌肿瘤组织及吸烟者痰标本中基因发生甲基化的频率

基因	非小细胞肺癌( NSCLC )标本	小细胞肺癌( SCLC )标本	痰标本
apc	46% ~ 96%	15%	ND <sup>▲</sup>
cdh13	43% ~ 45%	15%	ND
rar	40% ~ 43%	45%	27%
fhit	37%	64%	17%
rassfla	30% ~ 40%	79% ~ 85%	ND
timp-3	30% ~ 40%	ND	ND
p16	25% ~ 41%	5%	16% ~ 19%
cdh1	18% ~ 33%	60%	ND
dapk	16% ~ 44%	ND	17%
mgmt	16% ~ 27%	16%	16%
gstp	17% ~ 12%	16%	6%
p14	6% ~ 8%	ND	ND

ND<sup>▲</sup>表示未做相关实验

## 2.2 fhit 基因( fragile histidine triad gene )

fhit 基因是位于染色体 3p14.2。Zochbauer-Muller<sup>[12]</sup>报道,40/107 例( 37% )NSCLC 肿瘤组织标本,9/107 例( 9% )NSCLC 患者正常肺组织标本,32/39 株( 65% )肺癌细胞系 fhit 基因发生了异常甲基化。fhit 基因异常甲基化与通过 Northern 印迹分析得到的 fhit mRNA 去表达以及通过免疫印迹分析得到的 FHIT 蛋白低表达或不表达呈显著相关。

## 2.3 rassfla 基因( Ras effector homologue gene )

rassfla 基因是位于染色体 3p21.3。Agathangelou 等<sup>[13]</sup>报道,22/58 例( 38% )NSCLC 肿瘤组织标本,4/11 株( 36% )NSCLC 细胞系,18/25 株( 72% )SCLC 细胞系检测到了 rassfla 基因发生甲基化。

## 2.4 CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup>( cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, p16<sup>INK4A</sup> )基因

CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup> 是肺癌早期易发生甲基化的基因之一。Lamy 等<sup>[8]</sup>报道,13/70 例( 18.6% )处于癌前病变的支气管标本检测到了 p16 基因甲基化,并且该基因的甲基化状态与免疫组织化学得到的 p16 蛋白低表达或不表达呈相关性,其甲基化频率随着病变的进展而增高。Esteller 等<sup>[14]</sup>报道,14/33 例( 42% )NSCLC 肿瘤组织标本的 p16 基因发生了甲基化。

## 2.5 dapk 基因( death associated protein kinase gene )

Kim 等<sup>[15]</sup>报道,47/185 例( 25% )NSCLC 肿瘤组织标本检测到了 dapk 基因启动子区发生了异常甲基化。

## 2.6 mgmt 基因( O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase gene )

启动子区甲基化是 mgmt 基因去表达的最重要机制,而基因突变、基因缺失及基因重排并不是主要原因。Esteller 等<sup>[16]</sup>报道,27/92 例( 29% )NSCLC 肿瘤组织标本 mgmt 基因发生了甲基化。

## 3 基因甲基化可能发生在肺癌早期

Belinsky 等<sup>[5]</sup>首次报道了在肺癌动物模型与人类鳞状细胞肺癌中 p16 基因发生甲基化的时间。在小鼠肺癌模型的癌前病变中,经常可以检测到 p16 基因发生甲基化。在人类,75% 的鳞癌组织可检测到 p16 基因发生甲基化。而且 p16 基因发生甲基化的频率随着病变进展( 从细胞异常增生到鳞状细胞化生再到原位癌 )而增高。有研究表明:支气管上皮中 p16 基因发生异常甲基化比 dapk 基因更常见,而且未检测到 rassfla 基因发生甲基化。这个发现可能反映了在肺癌发生中,不同基因的作用以及发挥作用的时间各不相同。p16 基因可以在鳞癌与腺癌最早的细胞学阶段检测到。有人提出 p16 的失活使细胞通过死亡关卡,是细胞无限增殖的早期步骤<sup>[7]</sup>。Kersting 等<sup>[3]</sup>在 4/25 例( 16% )临床未诊断为肺癌的长期吸烟者的痰标本中检测到了 p16 基因发生甲基化。同时他们还检测到 12% 的支气管上皮脱落细胞,8% 的支气管刷标本 p16 基因发生了甲基化。Palmisano 等<sup>[4]</sup>发现在 3 年后才确诊为肺癌的患者的痰标本中,100% 可检测到 p16 和/或 mgmt 基因发生异常甲基化。这些实验结果都表明,基因发生异常甲基化可能是肺癌发生过程中的早期事件,因此某些基因的异常甲基化可以用来作为评估肺癌发生危险性的一个有用的分子标志物,用以早期诊断肺癌,并且可以用来检测化疗药物的治疗效果。

## 4 基因甲基化可以通过去甲基化药物发生逆转

许多研究表明由于基因启动子区发生甲基化而去表达的基因,经去甲基化药物( 如 5-AZA-CdR )处理后可以重新表达。5-AZA-CdR 是 DNA 甲基化的抑制剂,并可以诱导细胞分化。Otterson 等<sup>[17]</sup>用 5-AZA-CdR 处理 33 株肿瘤细胞系至少 4 h 后,发现每个标本 p16 基因都发生了再表达,并有延迟

效应,这种延迟效应发生在 24~48 h 之后。Momparder 等<sup>[18]</sup>对 7 例未经任何化疗药物治疗的 IV 期 NSCLC 患者用 5-AZA-CdR 进行周期性治疗,6 位患者的生存时间随着治疗周期的增多而延长,其中一位患者经过 5 个周期的治疗后生存了 6 年多。他们还发现 5-AZA - CdR 对肿瘤的生长抑制有延迟效应,这种延迟效应发生在一次或多次细胞分裂以后。尽管有许多药物可以阻止哺乳动物 DNA 发生甲基化,但目前人们只对 5-AZA-CR(5-氮胞嘧啶),5-AZA-CdR(5-氮-2'-脱氧胞嘧啶,Decitabine)等 DNA 甲基转移酶抑制剂进行了进一步的临床试验。自从 20 世纪 60 年代就已经开始了 5-AZA-CR 用于癌症治疗的临床试验,到目前为止已进行了 71 次。现在还有 4 个 I、II 期临床试验正在进行,包括 5-AZA-CR 单独用药或与其他药物的联合用药。另外,到目前已经完成了 13 个 5-AZA-CdR 的临床试验,还有 3 个正在进行。这些试验涉及的疾病范围很广,但对实体性肿瘤进行的临床试验较少,而且据报道甲基转移酶抑制剂对实体性肿瘤所产生的效应一般较低,然而最近在对转移性肺癌进行的一项 I/II 期临床试验中,此类药物却表现出活性。

5-AZA-CR 和 5-AZA-CdR 会引起某些共同的副作用:如恶心,呕吐,腹泻,骨髓抑制及引起基因突变等,可能是由于该类药物的特异性较差或剂量大时引起的对正常细胞的毒性作用而致。这些副作用限制了去甲基化药物的临床应用。但有报道:低剂量的 5-AZA-CR 与 HDAC(组蛋白去乙酰化酶)抑制剂的联合应用可以重新激活抑癌基因<sup>[19]</sup>,这个发现令人鼓舞。因此,去甲基化药物单独或与其他药物联合应用有可能在肺癌治疗史中掀开新的篇章。

## 5 结 语

DNA 异常甲基化不仅可以在原发性肺癌的肿瘤组织、癌前病变组织中检测到,而且可以在长期吸烟者的痰标本、支气管表皮脱落细胞及支气管刷标本检测到。因此,构建“甲基化基因组”可鉴别肺癌发生高危人群。由于基因的异常甲基化不仅是肺癌发生的早期事件,还可通过 5-AZA-CdR 等药物将其逆转,使去表达的基因重新表达。因此,更深入地了解基因发生异常甲基化的机理,不但有助于肺癌的早期诊断,而且有可能为肺癌的防治提供一条新的思路。

## [参 考 文 献]

[1] Zochbauer-Muller S, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant DNA methylation in lung cancer: Biological and clinical implications[J]. *Oncologist*, 2002, 7: 451-457.

[2] Soria JC, Rodriguez M, Liu DD, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in bronchial brush samples from former cigarette smokers[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 351-355.

[3] Kersting M, Friedl C, Kraus A, et al. Differential frequencies of p16<sup>INK4A</sup> promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18: 3221-3229.

[4] Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung

cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 5954-5958.

- [5] Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16<sup>INK4A</sup> is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 11891-11896.
- [6] Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, et al. p16<sup>INK4A</sup> and histology specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 3419-3424.
- [7] Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 2370-2377.
- [8] Lamy A, Sesboue R, Bourguignon J, et al. Aberrant methylation of the CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup> gene promoter region in preinvasive bronchial lesions: A prospective study in high-risk patients without invasive cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 100: 189-193.
- [9] Zochbauer-muller S, Fong KM, Virmani AK, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 249-255.
- [10] Brabender J, Usadel H, Danenberg KD, et al. Adenomatous polyposis coli gene hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 3528-3532.
- [11] Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, et al. Aberrant methylation of the Adenomatous Polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 1998-2004.
- [12] Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, et al. 5' CpG Island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung cancer and breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 3581-3585.
- [13] Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumors[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 1509-1518.
- [14] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 67-70.
- [15] Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, et al. Promoter methylation of DAP-kinase: Association with advanced stage in non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 1765-1770.
- [16] Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, et al. Inactivation of DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 793-797.
- [17] Otterson GA, Khleif SN, Chen WD, et al. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16<sup>INK4</sup> protein induction by 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Oncogene*, 1995, 11: 1211-1216.
- [18] Momparder RL, Eliopoulos N, Ayoub J. Evaluation of an inhibitor of DNA methylation, 5-aza-2'-deoxycytidine, for the treatment of lung cancer and the future role of gene therapy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 465: 433-466.
- [19] Christman JK. 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 5483-5495.