

DNA 甲基化与肿瘤个体化治疗

高佳 韩晓红

近年来,随着肿瘤病因学的深入研究以及基因组学、蛋白质组学等高通量技术的出现,通过新型技术手段检测肿瘤细胞的遗传学改变,用于肿瘤的辅助诊断、化疗药物选择、预后判断,使肿瘤个体化诊疗成为可能。DNA 甲基化检测是其中的一项热点。DNA 甲基化是基因表观修饰的重要方式之一,是一种由 DNA 甲基转移酶介导的,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶的反应。DNA 异常甲基化包括全基因组的低甲基化和启动子 CpG 岛的高甲基化,而后者是近年来研究的热点。研究表明,在肿瘤细胞中,启动子区的甲基化修饰导致的基因沉默是一种常见现象,可引起细胞增殖、DNA 损伤修复等多种基因表达异常,并与肿瘤细胞对化疗药物的耐药性有高度相关性^[1]。本文主要从 DNA 异常甲基化与肿瘤的辅助诊断、化疗药物的个性化选择和疗效监测、预后,以及甲基化的检测技术等方面进行阐述。

一、DNA 异常甲基化与肿瘤的辅助诊断

DNA 甲基化作为一种新型分子标志,在肿瘤诊断中的重要性日益受到重视,其优势主要为:其一,在肿瘤形成过程中,启动子超甲基化的发生频率很高,甚至高于基因突变,其中不乏与肿瘤形成有关的重要基因;其二,甲基化是肿瘤发生早期的重要事件;其三,DNA 甲基化稳定存在,可通过 PCR 放大效应进行检测。因此,甲基化检测对肿瘤早期诊断有潜在的应用价值。

血液是临床诊疗过程中应用最广泛的体液。Hsu 等检测 63 例肺癌血浆中 H 钙黏蛋白(H-cadherin, CDH13)、脆性组氨酸三联体(ragile histidine triad, FHIT)、生物矿化蛋白 SpP16(biomineralization protein SpP16, P16)、视黄酸受体 β (retinoic acid receptor, beta, RAR β)和 RAS 相关区域家族 1A(Ras association domain family member 1, RASSF1A)基因的甲基化水平,与相应肿瘤组织的符合率为 75%~87%。多项研究表明,对 DNA 甲基化状态进行单独或联合检测,有助于多种肿瘤的辅助诊断。矮小同源盒基因 2(short stature homeobox 2, SHOX2)单基因超甲基化诊断肺癌的敏感度为

60%,特异度为 90%^[2],与结肠腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC)、激肽释放酶相关肽酶 10(kallikrein-related peptidase 10, KLK10)、肺癌与食管癌缺失基因 1(deleted in lung and esophageal cancer 1, DLEC1)、RASSF1A 与 CDH13 联合检测对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)诊断的敏感度和特异度分别为 84%和 74%^[3]。联合检测乳腺癌患者血浆中谷胱甘肽 S-转移酶 1(glutathione S-transferase pi 1, GSTP1)、APC、RASSF1、RAR β 的甲基化状态的敏感度为 62%,特异度为 87%^[4];联合检测血清中雌激素受体 1(estrogen receptor 1, ESR1)和 14-3-3 σ 的甲基化状态的敏感度为 81%,特异度为 88%^[5]。Lee 等检测 243 例结直肠癌及 276 名健康人血浆中 10 种基因的甲基化水平,其中与 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene, MGMT)、WNT 抑制因子(WNT inhibitory factor 1, Wif-1)、APC、RASSF2A 联合检测对结直肠癌的早期诊断效能最高,特异度为 92.1%,敏感度为 86.5%,受试者工作曲线(receiver operating characteristics, ROC)曲线下面积为 0.927^[6]。

除血液外,支气管肺泡灌洗液、痰等体液中也可检测 DNA 甲基化。1999 年,首次发现肺癌患者支气管肺泡灌洗液中 p16 超甲基化,随后的研究发现,p16、RASSF1、H-钙黏蛋白、RAR β 、APC 等多种基因启动子均可检测到超甲基化^[7-8]。对于支气管细胞学阴性的肺癌患者,支气管肺泡灌洗液中 SHOX2 和 RASSF1A 超甲基化的频率分别为 63%和 29%(表 1),提示二者可作为细胞学检测的有效补充^[9-10]。联合检测 APC、ESR1、p16 和 RAR β 启动子的甲基化状态,诊断肺癌的敏感度和特异度可达到 74.1%和 96.9%^[11]。

与支气管肺泡灌洗液相比,痰标本以其无创、易得的特点被广泛应用于临床。异常 DNA 甲基化状态在痰液标本中也可检测到,如死亡相关蛋白激酶(death associated protein kinase, DAPK)、GATA 结合蛋白 5(GATA binding protein 5, GATA5)、MGMT、p16 和 RASSF1 等。然而,由于痰标本中肿瘤细胞的含量差异较大,其阳性率往往低于肿瘤组织。Shivapurkar 等^[12]检测肺癌组织和痰液中转录因子 21(transcription factor 21, TCF21)的甲基化水平,发现肺癌组织中 TCF21 超甲基化频率可达 75%,而痰液中仅为 54%。说明采用正确方法获取痰标本、多次送检有助于提高检出率。

二、DNA 异常甲基化与化疗药物的个性化选择和疗效监测

随着新抗肿瘤药物不断研发和用药模式不断完善,预测肿瘤细胞对治疗的敏感度显得尤为重要。DNA 甲基化是基

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2012.12.040

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”计划资助项目(2011AA02A110);国家重大新药创制科技重大专项(2012ZX09303012);卫生部医药卫生科技发展基金资助项目(WKJ2007-3-001);首都临床特色应用研究资助课题

作者单位:100021 北京协和医学院 中国医学科学院肿瘤医院检验科

通信作者:韩晓红,电子邮箱:xiaohonghan@hotmail.com

因表观修饰的重要方式,肿瘤细胞中某些 DNA 甲基化状态可能影响到肿瘤细胞对特定化疗药物的敏感性。

乳腺癌患者血清中 RASSF1A 甲基化状态的检测可以作为三苯氧胺治疗的疗效监测指标。在治疗过程中,若 RASSF1A 甲基化状态消失,提示三苯氧胺治疗有效,若甲基化状态持续存在或消失后再次出现,则提示患者对三苯氧胺抵抗,预后较差。Fiegl 等^[13]检测 148 例乳腺癌患者治疗前及手术治疗 1 年后(术后接受三苯氧胺治疗至少 6 个月)的血清 RASSF1A 甲基化水平,结果显示治疗前及术后 1 年时,乳腺癌患者血清 RASSF1A 甲基化的阳性率分别为 19.6% 和 22.3%,其中后者是独立的预后影响因素——术后并接受三苯氧胺治疗后,血清 RASSF1A 甲基化阳性患者预后较差(表 1)。

MGMT 是一种重要的 DNA 修复酶,在修复烷化剂造成的 DNA 损伤中发挥重要作用,其启动子区的甲基化水平与烷化剂的疗效密切相关,超甲基化可导致 MGMT 功能丧失,使肿瘤细胞无法修复烷化剂引起的细胞损伤,而致细胞死亡^[14]。有研究证实,对 MGMT 启动子超甲基化的神经胶质瘤患者,应用烷化剂类药物替莫唑胺的治疗效果明显优于 MGMT 低甲基化水平者,可获得较高的生存率和较长的生存期^[15]。Wick 等^[16]进行的一项 III 期临床试验发现,MGMT 启动子超甲基化的患者,接受替莫唑胺治疗组无病生存期显著高于接受放射治疗组(8.4 个月比 4.6 个月),提示 MGMT 超甲基化的恶性胶质瘤患者,替莫唑胺治疗可使其获益。

三、DNA 甲基化与预后

对患者进行危险分层和预后判断是选择个体化治疗方案的重要依据。目前的临床和病理分期对治疗的指导作用有限,人们希望通过分子标志检测对现有的 TNM 分期标准(TNM-classification tumor, nodes, metastasis-classification, TNM)进行进一步补充。研究发现,DNA 甲基化改变与肿瘤预后显著相关,其作用机制主要包括:其一,DNA 甲基化改变与肿瘤的侵袭性有关。如乳腺癌血液中 BCRA1 启动子超甲基化与肿瘤侵袭性较强有关,RAR、RASSF1A 和 HIN1 基因甲基化改变与肿瘤远处转移有关^[17]。其二,甲基化是肿瘤复发的独立预测因子。对于手术治疗后的 I 期或 II 期 NSCLC 患者,DAPK、RASSF1A、RASSF5、PTEN 超甲基化者术后复发的间隔较短^[18]。RASSF1A 超甲基化的乳腺癌患者,治疗后复发的危险性是 RASSF1A 低甲基化者的 5.1 倍^[13](表 1)。其三,甲基化状态与肿瘤患者生存率有关。组织因子通道抑制剂 2(tissue factor pathway inhibitor 2, TFPI-2)的甲基化状态是 NSCLC 的独立预后影响因素^[19],对于无远处转移的 NSCLC 患者而言,TFPI-2 超甲基化患者预后较差(5 年无病生存率为 6.1% 比 35.5%)。因此,DNA 甲基化检测将有助于判断预后,从而为临床病情的监控和风险评估提供依据。

四、DNA 甲基化的检测

DNA 甲基化的检测方法很多,目前主要的分析方法是基于重亚硫酸盐修饰 DNA 的 PCR 法,其原理是以重亚硫酸

盐处理 DNA,将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变,被修饰的 DNA 作为模板进行 PCR,产物可通过序列分析、熔解曲线、高效液相色谱、限制性内切酶消化等方式进一步检测序列上的差异。

表 1 常见 DNA 甲基化标志的临床意义

基因名称	肿瘤类型	甲基化形式	功能
SHOX2	肺癌	超甲基化	辅助诊断的敏感度为 60%,特异性可达 90% ^[2]
ESR1 + 14-3-3σ	乳腺癌	-	辅助诊断的敏感度为 81%,特异性为 88% ^[5]
MGMT	神经胶质瘤	超甲基化	对烷化剂敏感 ^[15-16]
RASSF1A	乳腺癌	超甲基化	对三苯氧胺耐药,治疗后复发的危险性高,预后较差 ^[13]
BRCA1	乳腺癌	超甲基化	肿瘤的侵袭性较强
DAPK、RASSF1A、I/II 期 NSCLC RASSF5、PTEN		超甲基化	术后复发的间隔较短 ^[18]
TFPI-2	无远处转移的 NSCLC	超甲基化	预后较差 ^[19]

注:“-”为无信息

其中,甲基化特异性 PCR 法(methylation-specific PCR, MSP)是目前最常用的 1 种定量检测法,该法利用亚硫酸氢钠处理后 DNA 序列的差异,设计 2 对引物,即用甲基化的特异性 PCR 引物和未甲基化的特异性 PCR 引物进行检测。MSP 的优点是:能有效地将甲基化的模板从非甲基化模板的背景中检测出来,可用于微量 DNA 样品的甲基化检测,且避免了由不完全酶切引起的假阳性。但检测过程中,应尽量减少假阳性的发生。因此,应注意:进行 PCR 之前,DNA 应完全转化,避免因 DNA 修饰不完全导致假阳性;PCR 中,应维持稳定的 PCR 条件,选择特异性引物,减少非特异性扩增。PCR 后,应对产物进行鉴定。

五、展望

在诸多的表观遗传学标志物中 DNA 甲基化日益得到重视,然而其在真正应用于临床之前仍有较多问题有待解决。首先,检测方法的选择。现有的检测方法多样,各有优劣,在实际应用中,应根据研究目的、客观条件综合判断,选择合适的检测方法。第二,研究之间存在异质性。单个研究难以提供大量的标本用于建立模型之后的验证,而不同研究间,由于标本采集、甲基化检测方法、待测基因的选择等方面存在显著差异,其结果难以进行比较、综合。第三,现有的甲基化与化疗药物的相关研究多以肿瘤细胞株进行体外实验来验证不同甲基化状态的肿瘤细胞对化疗药物的反应性;其临床应用价值还有待大样本、多中心的临床研究加以证实。

综上所述,尽管多项研究肯定了 DNA 甲基化检测在恶性肿瘤的辅助诊断、疗效监测、预后评价等方面的应用价值,但其作为肿瘤标志应用于临床常规检测的前景还需进行进

一步临床验证。

参 考 文 献

- [1] Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer*, 2003,106:66-73.
- [2] Kneip C, Schmidt B, Seegebarth A, et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *J Thorac Oncol*, 2011,6:1632-1638.
- [3] Zhang Y, Wang R, Song H, et al. Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*, 2011,303:21-28.
- [4] Hoque MO, Feng Q, Toure P, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006,24:4262-4269.
- [5] Martinez-Galan J, Torres B, Del Moral R, et al. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biol Ther*, 2008,7:958-965.
- [6] Lee BB, Lee EJ, Jung EH, et al. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2009,15:6185-6191.
- [7] Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, et al. Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer. *Cancer*, 2006,108:129-134.
- [8] Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, et al. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2004,10:2284-2288.
- [9] van der Drift MA, Prinsen CF, Knuijman GJ, et al. Diagnosing peripheral lung cancer: the additional value of the Ras-association domain family 1A gene methylation and Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog mutation analyses in washings in nondiagnostic bronchoscopy. *Chest*, 2012,141:169-175.
- [10] Dietrich D, Kneip C, Raji O, et al. Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *Int J Oncol*, 2012,40:825-832.
- [11] Yasuda H, Soejima K, Nakayama S, et al. Bronchoscopic microsampling is a useful complementary diagnostic tool for detecting lung cancer. *Lung Cancer*, 2011,72:32-38.
- [12] Shivapurkar N, Stastny V, Xie Y, et al. Differential methylation of a short CpG-rich sequence within exon 1 of TCF21 gene: a promising cancer biomarker assay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008,17:995-1000.
- [13] Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res*, 2005,65:1141-1145.
- [14] Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst*, 2002,94:26-32.
- [15] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005,352:987-996.
- [16] Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2012,13:707-715.
- [17] Mirza S, Sharma G, Prasad CP, et al. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci*, 2007,81:280-287.
- [18] Buckingham L, Penfield FL, Kim A, et al. PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 2010,126:1630-1639.
- [19] Wu D, Xiong L, Wu S, et al. TFPI-2 methylation predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2012,76:106-111.

(收稿日期:2012-09-18)

(本文编辑:李建陵)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

2013 年 VIP 会员通告

为繁荣我国检验医学事业,促进检验医学领域的学术交流,依据中华医学会杂志社关于实施杂志会员制度的相关规定,中华检验医学杂志 2013 年继续实行 VIP 读者会员制。

一、会员权利

1. 免费获得 2013 年中华检验医学杂志。
2. 会员作为第一作者给本刊投稿时,提供 2013 年 VIP 会员号码,免收审稿处理费。稿件经审阅后在符合本刊发表要求的前提下,可优先在中华检验医学杂志上刊登。
3. 参加中华检验医学杂志编辑部主办的各种学术会议,注册费 5 折优惠。

二、入会手续及会费

1. 新会员需填写申请表,提供会员姓名、性别、出生年

月、技术职称、行政职务、工作单位、单位地址、邮编、电子信箱、手机号码等信息,于 2012 年 12 月底前发送至 tangdong@cma.org.cn。

2. 续费会员请注明原 VIP 会员号。

3. 会员费每年 380 元,通过邮局寄至:北京东四邮局 100010-58 信箱,邮编:100010,收款人:出版发行部。汇款时请在附言栏注明“检验 VIP 会员”字样,并注明会员姓名或会员号。

三、联系方式

申请加入会员:010-85158269,电子信箱:tangdong@cma.org.cn。邮寄杂志及缴费查询:010-85158339。

本刊编辑部