

• 综述 •

结直肠锯齿状病变中基因启动子异常 DNA 甲基化状态的研究现状

许春伟 葛畅 王鲁平

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 作为常见的恶性消化系统肿瘤之一,在世界范围内,其发病率居第三位,美国等发达国家 CRC 居第二位,我国 CRC 发病率呈逐年上升趋势,已经跃居常见恶性肿瘤的第五位^[1]。既往认为几乎所有 CRC 都来自管状腺瘤(TA)。但据最新报道,来自 APC 基因突变的管状腺瘤占 CRC 的 60%,另外来自 CpG 岛甲基化表型(CIMP)的结直肠锯齿状腺瘤(SA)占 35%左右,剩余 5% CRC 来自 Lynch 综合征突变基因^[2]。Makinen 等^[3]2007 年报道 10~15% CRC 来自结直肠锯齿状病变,而到 2011 年结直肠锯齿状病变的发现率明显提高,美国 Minnesota 大学 Snover 教授明确提出其中 35% CRC 来自结直肠锯齿状病变通路。近年来, DNA 甲基化与肿瘤的相关性研究成为热点。一系列研究表明,在结直肠锯齿状病变的发生发展过程中存在许多特异性的 DNA 异常甲基化。

一、表观遗传学与 DNA 甲基化

表观遗传学修饰(epigenetic)是指不涉及 DNA 序列改变,但基因表达却发生可遗传的改变, DNA 甲基化和组蛋白修饰,染色体重塑等是表观遗传学修饰的主要形式。DNA 甲基化修饰是在人类等真核生物体内普遍存在的一种基因内源修饰作用,指 DNA 双螺旋在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)提供甲基团将胞嘧啶核苷酸的嘧啶环第 5 位碳原子甲基化,并与其 3' 端的鸟嘌呤形成甲基化的 CpG(mCpG),且在双链中对称出现^[4]。在人类等高等真核生物中,正常 DNA 甲基化修饰对基因正常表达调控、胚胎发育、基因组印记和 X 染色体灭活等起着重要的调节作用。在脊椎动物中, DNA 甲基化主要发生在 G/C 含量丰富的 CpG 二核苷酸位点(CpG 岛), CpG 岛对基因的表达起着调控作用且具有特殊的意义^[5]。人类的 CpG 以两种形式存在,一种是分散于 DNA 中,另一种是 CpG 结构高度聚集的 CpG 岛。CpG 岛常在表达基因的 5' 端启动子区域,并且人类基因启动子 60% 以上包含在 GPS 内,基因启动子区域 GPS 岛异常甲基化导致基因沉默,并通过有丝分裂传递这种后生性改变, CpG 岛甲基化在肿瘤发生发展过程中扮演着重要角色。而在正常组织里, 70%~90% 散在的 CpG 是被甲基修饰的,而 CpG 岛则是非甲基化修饰^[6]。正常情况下,体内甲基化状态三种方式:持续的低甲基化状态,如管家基因;诱导的去甲基化状态,如发育阶段中的一些基因;高度甲基化状态,如女性的一条缢缩的 X 染色体。哺乳动物的甲基化修饰会在胚胎早期发育过程中发生剧烈变化,但在成体细胞中却保持不变,据统计在整个人类基因组的 CpG 岛中, 70%~80% 为 mCpG^[7]。而且在基因印记或肿瘤发生等情况时, DNA 上的这些 CpG 岛也常常会发生甲基化。

二、结直肠锯齿状病变

1970 年 Goldman 等^[8]在少量的结肠绒毛状腺瘤的腺体中发现具有增生性息肉样的结构。1984 年 Urbanski 等^[9]曾报道过 1 例起源于混合性息肉的结直肠腺瘤,这种息肉的形态学特征同时具有增生性息肉和管状腺瘤两种结构,并且还具不同程度的异型增生,他指出这部分增生性息肉可能属于癌前病变。1990 年 Longacre 等^[10]定义同时具有增生性息肉的锯齿状结构和传统腺瘤异型性上皮特征的一种新的腺瘤类型为锯齿状腺瘤(Serrated adenoma, SA)。而且他们又对这种新发现类型腺瘤的组织形态特征进行了详细描述,指出这类结直肠锯齿状病变具有增生性息肉的锯齿状结构和腺瘤的异型性细胞学特征,主要在盲肠、直肠和乙状结肠分布,一般多为单发,直径 5~10 mm,黏膜内癌的发生率占 10%。2005 年 Snover 等^[11]对结直肠锯齿状病变又作了进一步的分类,分为四大类:(1)增生性息肉(HP);(2)传统锯齿状腺瘤(TSA);(3)广基锯齿状腺瘤(SSA);(4)混合型锯齿状腺瘤/息肉。WHO(2010)消化系统肿瘤分类将锯齿状病变明确分为增生性息肉(hyperplastic polyps, HPs)、广基锯齿状腺瘤/息肉(sessile serrated adenoma/polyp, SSA/P)和传统锯齿状腺瘤(traditional serrated adenoma, TSA)3 种类型。其中 HP 根据黏液类型不同又分为微小泡状型 HP(microvesicular HP, MVHP)、杯状细胞型 HP(goblet cellric HP, GCHP)和黏液缺乏型 HP(mucin poor HP, MPHP),而且又把结直肠锯齿状腺瘤(serrated adenocarcinoma, SAC)首次作为一种新的独立的 CRC 亚型出现。SAC 最早由 Jass 等在 1992 年提出^[12],2001 年 Makinen 等^[13]首次对 SAC 做了系统性阐述。

三、基因启动子异常 DNA 甲基化与结直肠锯齿状病变的发生发展

正常情况下, CpG 岛是以非甲基化形式存在的。大量研究证实,启动子区 CpG 岛一旦发生甲基化,可抑制 DNA 修复基因、信号转导基因、肿瘤抑制基因、管家基因和细胞周期调控基因等的表达,在肿瘤发生发展中发挥重要作用^[14]。那么在结直肠锯齿状病变的演变过程中异常基因 DNA 甲基化及其表达到底是什么样的情况?这成为医学科研工作者们研究关注的问题。现将近年来这方面相关研究综述如下。

1. RUNX3 启动子甲基化与结直肠锯齿状病变: RUNX3 基因定位于人染色体 1p36.1 上,全长约 67 kb,含有 P1、P2 两个启动子,6 个外显子和 1290 bp 的开放阅读框,两个启动子区域均含数个分离的转录起始点^[15]。RUNX3 作为重要的抑癌基因,是 TGF- β 转导通路上皮细胞生长起负性调控作用的一个重要环节。Ku 等^[16]运用了反转录 PCR(reverse transcription PCR)、聚合酶链反应-单链构象多态性分析(Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction Products, PCR-SSCP)和甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific PCR, MSP)技术,分别检测 32 种结直肠癌细胞系和 87 例癌组织中 RUNX3 基因的突变杂合性缺失以及启动子甲基化状态,结果发现其中 16 种癌细胞系存在 RUNX3 蛋白表达缺失或下调,其中 12

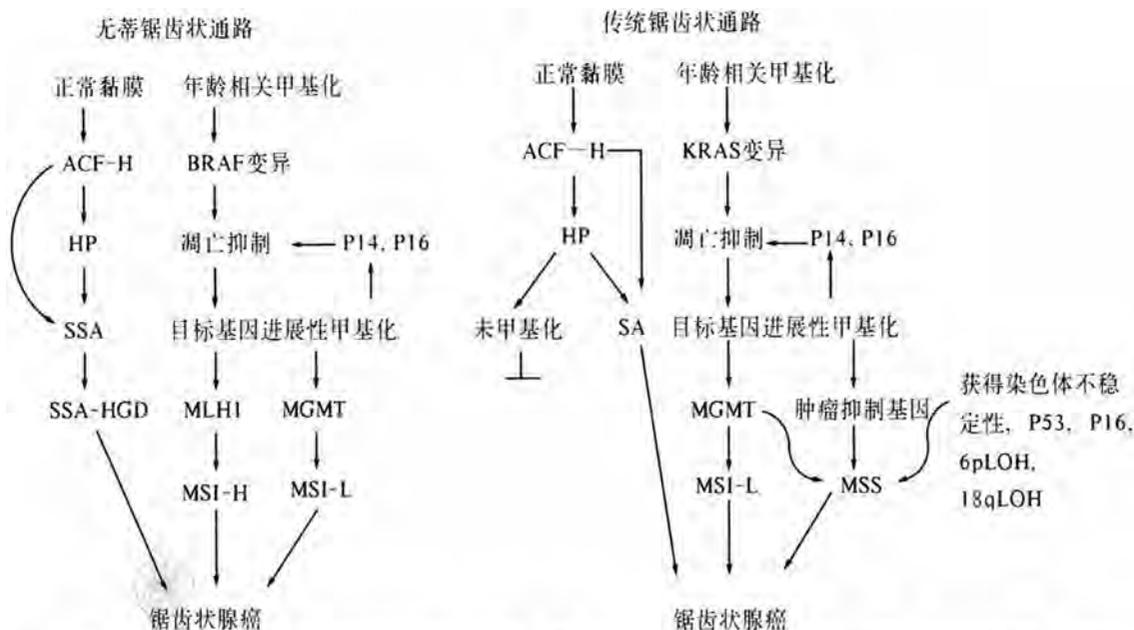


图1 两条结直肠锯齿状通路具体流程示意图。ACF-H: 增生型的畸形隐窝灶; HP: 增生性息肉; SSA: 无蒂锯齿状腺瘤; LOH: 杂合子丢失; MGMT: O6 甲基鸟嘌呤DNA 转甲基酶; MSI: 微卫星不稳定性; MSI-H: 高度微卫星不稳定性; MSI-L: 低度微卫星不稳定性; MSS: 微卫星稳定

例(75%)存在启动子的高甲基化;87例癌组织中16例(18.4%)发现有RUNX3基因的甲基化,而对照的正常组织中却均未检测到。Subramaniam等^[17]运用免疫组化比较19例HP、14例TSA、17例TA中RUNX3的表达,并应用MSP来检测RUNX3启动子的异常高度甲基化,并以12例正常肠组织黏膜作对照组,结果显示,SA(包括HP和TSA)较TA的表达显著增高,因此推论,RUNX3的失活作为SA恶变进展过程中的一个早期事件。

2. WIF-1启动子甲基化与结直肠锯齿状病变:WIF-1基因定位于人类染色体12q14.3上,由10个外显子组成,全长约200 kb,是Wnt/ β -Catenin信号通路的下游区基因,WIF-1基因的高甲基化在多种肿瘤中都证实是存在的,它作为一种肿瘤抑制基因,其启动子的高甲基化参与了肿瘤的发生发展。与之对应的WIF-1蛋白全长有379个氨基酸残基,其结构包括N端信号序列、WIF结构域(WIF domain)、5个EGF重复序列和C端亲水序列^[18],是一种Wnt/ β -Catenin信号通路上的拮抗物之一,可以阻断Wnt/ β -Catenin的经典通路和非经典通路。目前有关结直肠锯齿状病变与WIF-1基因甲基化直接关系的研究国内外文献尚未见报告,但结直肠腺瘤和结直肠癌与WIF-1基因甲基化的研究比较多。Lee等^[19]在243例的结直肠癌组织中,运用MSP检测基因p14、p16、APC、DAPK、HLTF、h-MLH-1、MGMT、RAR β 2、RASFF2A和WIF-1启动子的甲基化率,结果分别为18%、34%、27%、34%、32%、21%、39%、24%、58%和74%出现甲基化。Taniguchi等^[20]检测大肠腺瘤组织中发现32/44(72.7%)及黏膜和黏膜下癌组织中18/23(78.2%)显示WIF-1表达降低;转染WIF-1基因的SW480结肠癌细胞株中显示细胞增殖受到显著的抑制。TOPflash实验显示WIF-1抑制SW480细胞株Wnt信号传导。他们认为WIF-1对肿瘤的抑制功能是由于其具有阻止Wnt/ β -Catenin信号通路的能力,结果提示WIF-1基因由于启动子超甲基化使Wnt/ β -Catenin信号通路失活沉默是消化道癌变的重要机制。本文认为CpG岛启动子甲基化使该基因表达沉默,是该蛋白表达下调的关键因素,与结直肠锯齿状病变的发生、发展关系密切,但有待更多实验验证。

3. CDX2启动子甲基化与结直肠锯齿状病变:CDX2是胃肠胚胎遗传通路中的一种特异性的核转录因子,基因定位于人类染色体13q12~13,全长22~23 kb,由3个外显子和2个内含子构成,与之对应的CDX2蛋白包含311个单氨基酸,通过螺旋-环-螺旋的方式结合于DNA的相应区域,以转录因子的形式调节DNA的表达。目前研究认为CDX2可能是一种肿瘤抑制基因。Dhir等^[21]研究发现,从HP到SSA的演变的过程中,可以通过DNA甲基化来确认锯齿状病变的“息肉→腺瘤”进展。他们运用MSP检测CpG岛甲基化状态有关的17个基因及其引物,发现伴有和(或)不伴有异型增生的SSA检测到CDX2、h-MLH-1和TLR2甲基化,但HP没有检测到上述基因甲基化。他们在实验中发现所有的癌前胃肠道腺瘤中包括管状腺瘤,绒毛状腺瘤,伴有及不伴有异型增生的SSA甲基化出现频繁,但HP甲基化出现不频繁,所以他们认为CDX2、h-MLH-1和TLR2的甲基化可作为检测早期胃肠道癌前病变的有用标志物。

4. p16启动子甲基化与结直肠锯齿状病变:细胞周期调节因子p16又称CDKN2A,基因定位于人类染色体9p21,由2个内含子和3个外显子组成,全长8.57 kb,其中外显子2由307 bp构成,编码p16蛋白,即细胞周期蛋白和抑制蛋白,对细胞周期依赖激酶(CDKs)起正常负平衡的调节作用^[22]。Kim等^[23]运用MS-PCR检测45例HP(包括30例MVHP,11例GCHP和4例MDHP)中p16基因启动子区甲基化的情况,结果甲基化率为60%。其中p16在MVHP中的甲基化率比在HP的其他类型中更高。HP约占锯齿状病变的75%。Dong等^[24]重读了40例散发、经典的SA的病理切片,并依照病理分级,将40例标本分为4组,采用适合各基因的引物行MSP检测。发现p16基因启动子CpG岛甲基化现象,并且病理分级越高的腺瘤以及癌其异常甲基化范围越广泛。由此作者得出结论:广泛的CpG岛甲基化是随SA组织学异型程度加重而增加。Chan等^[25]报道散发性结直肠癌中约50%无异型增生的畸形隐窝灶中可以发现p16的甲基化。所以,在无异型增生的畸形隐窝灶-增生性息肉/锯齿状腺瘤-癌变通路中,p16基因CpG岛甲基化也可能是一个早期事件。

5. h-MLH-1 启动子甲基化与结直肠锯齿状病变:错配修复基因 h-MLH-1 定位于人类染色体 3p21.3~23, 含 19 个外显子, 全长约 58 kb, 其开放读码框(ORF)长 2268 bp, 编码含 756 个氨基酸的蛋白质, 是错配修复系统中最为重要的基因, 其功能为调节细胞周期, 使之阻滞于 G2 期, 从而在染色体分离前, 纠正错配的碱基, 使 DNA 得以正确复制^[26]。该基因缺陷可导致细胞在增殖过程中的错误掺入和缺失不能修复, 造成高度微卫星不稳定(MSI-H), 随机突变率增高, 引起一系列涉及细胞生长、分化、凋亡及癌转移的相关靶基因(如 TGF- β II R, IGF II 和 BAX 等)继发性的突变改变, 从而导致肿瘤的发生或转移^[27]。研究发现, h-MLH-1 启动子区高甲基化状态可能是此基因失活的一种重要机制^[28]。Hawkins 等^[29]选取了 29 例 MSI 结直肠锯齿状腺癌和 29 例 MSS 结直肠锯齿状腺癌患者进行对比研究。结果显示 MSI 结直肠锯齿状腺癌多合并锯齿状息肉, 且 h-MLH-1 基因的甲基化在 MSI 结直肠锯齿状腺癌中的比率较高(10/13), 而在 MSS 结直肠锯齿状腺癌中则均无 h-MLH-1 基因甲基化(图 1)。

6. MGMT 启动子甲基化与结直肠锯齿状病变:DNA 损伤修复基因 MGMT 为单肽结构, 定位于人类染色体 10q26, 全长 170 kb, 含 5 个外显子, 4 个内含子。启动子富含 GC 碱基, 顺式作用元件有 CpG 岛中的 6 个 Sp1 位点, 2 个糖皮质激素反应元件(GRE), AP-1 元件等。cDNA 长约 769 bp, 编码 207 个氨基酸组成的蛋白质。MGMT 序列具有相对稳定性, 从结肠杆菌到哺乳动物均含有结构一致的“-异亮氨酸-脯氨酸-半胱氨酸-组氨酸-精氨酸-缬氨酸-”(IPCHRV)活性基序, 活性位点在 145 位半胱氨酸残基上^[30]。Makinen 等^[3]运用 MSP 检测的 56 例 SSA/P(包括 20 例不伴异型增生和 36 例伴异型增生)中 MGMT、h-MLH-1、APC、p16、MINT1、MINT2 和 MINT31 基因启动子区甲基化率分别为 69.9%、73.2%、37.5%、76.8%、71.4%、58.9% 和 71.4%。由上可见, SSA/P 中 MGMT、h-MLH-1、p16 基因甲基化表达率比较高。Whitehall 等^[31]选取 31 例结直肠锯齿状息肉(包括 HP、HP/AD 和 SA), 其中 29% 9 例出现 MGMT 的蛋白表达下降, 这些蛋白表达下降由 MGMT 的启动子甲基化引起。MGMT 蛋白表达下降的 9 例中, 7 例呈现 MSI, 其中 5 例呈现 MSI-L, 2 例呈现 MSI-H, 因此可推断 MGMT 甲基化与 MSI-L 相关(图 1)。

四、总结

DNA 甲基化在结直肠锯齿状癌前病变发展为 CRC 过程中起着重要作用。启动子区的高甲基化使得抑癌基因、DNA 修复基因、信号转导基因等多个基因失活和功能障碍, 对肿瘤形成过程意义重大。随着检测方法的建立, 可通过检测明确与结直肠锯齿状病变发生发展相关的各基因甲基化状态, 以早期发现癌前期病变, 并加深对癌变机制的认识理解, 为阻断异常甲基化提供理论依据。

参 考 文 献

[1] 赖少清, 鞠凤环, 王贵齐, 等. 2004~2008 年 704 例大肠癌临床流行特征. 中国肿瘤, 2010(2):111-113.
 [2] Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. Hum Pathol, 2011, 42:1-10.
 [3] Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. Histopathology, 2007, 50:131-150.
 [4] Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res, 1982, 10:2709-2721.
 [5] Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. J Mol Biol, 1987, 196:261-282.

[6] Ehrlich M, Wang RY. 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. Science, 1981, 212:1350-1357.
 [7] Kerr KM, Galler JS, Hagen JA, et al. The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma. Dis Markers, 2007, 23:5-30.
 [8] Goldman H, Ming S, Hickock DF. Nature and significance of hyperplastic polyps of the human colon. Arch Pathol, 1970, 89:349-354.
 [9] Urbanski SJ, Kossakowska AE, Marcon N, et al. Mixed hyperplastic adenomatous polyps--an underdiagnosed entity. Report of a case of adenocarcinoma arising within a mixed hyperplastic adenomatous polyp. Am J Surg Pathol, 1984, 8:551-556.
 [10] Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. Am J Surg Pathol, 1990, 14:524-537.
 [11] Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, et al. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. Am J Clin Pathol, 2005, 124:380-391.
 [12] Jass JR, Smith M. Sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer--a morphological, mucin and lectin histochemical study. Pathology, 1992, 24:233-242.
 [13] Makinen MJ, George SM, Jernvall P, et al. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. J Pathol, 2001, 193:286-294.
 [14] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med, 2003, 349:2042-2054.
 [15] Bangsow C, Rubins N, Glusman G, et al. The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. Gene, 2001, 279:221-232.
 [16] Ku JL, Kang SB, Shin YK, et al. Promoter hypermethylation downregulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines. Oncogene, 2004, 23:6736-6742.
 [17] Subramaniam MM, Chan JY, Soong R, et al. RUNX3 inactivation in colorectal polyps arising through different pathways of colonic carcinogenesis. Am J Gastroenterol, 2009, 104:426-436.
 [18] Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebert ML, et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. Nature, 1999, 398:431-436.
 [19] 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.
 [20] Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. Oncogene, 2005, 24:7946-7952.
 [21] Dhir M, Yachida S, Van Neste L, et al. Sessile serrated adenomas and classical adenomas: an epigenetic perspective on premalignant neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. Int J Cancer, 2011, 129:1889-1898.
 [22] Serrano M, Hannon G, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature, 1993, 366:704-707.
 [23] Kim KM, Lee EJ, Ha S, et al. Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea. Am J Surg Pathol, 2011, 35:1274-1286.
 [24] Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, et al. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. Mod Pathol, 2005, 18:170-178.
 [25] Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, et al. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. Am J Pathol, 2002, 160:1823-1830.
 [26] Davis TW, Wilson-Van PC, Meyers M, et al. Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. Cancer Res, 1998, 58:767-778.

[27] Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair; a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*, 2001, 10:735-740.

[28] Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*, 1998, 58:3455-3460.

[29] Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93:1307-1313.

[30] Harris LC, Potter PM, Tano K, et al. Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19:6163-6167.

[31] Whitehall VL, Walsh MD, Young J, et al. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res*, 2001, 61:827-830.

(收稿日期:2013-03-25)

(本文编辑:马超)

许春伟,葛畅,王鲁平. 结直肠锯齿状病变中基因启动子异常 DNA 甲基化状态的研究现状[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(12):5537-5540.



中华医学会