

表观遗传学与子宫内膜癌的研究进展

徐 铮¹ 林嘉盈^{2△} 凌定文¹ 刘桂英¹

(1 江苏省高邮市人民医院妇产科 江苏 高邮 225600 2 德国柏林洪堡大学 Charite 医院妇科 德国 柏林 12200)

摘要 :长期以来人们一直认为基因突变或缺失参与肿瘤的形成 ,近来越来越多证据表明 ,表观遗传修饰在肿瘤进展中同样具有非常重要的作用。DNA 甲基化、组蛋白修饰及 micro RNA 表达调控等表观遗传机制是子宫内膜癌发生、发展的重要原因之一。表观遗传学的研究进展不仅有助于子宫内膜癌的早期诊断 ,对分子靶向治疗子宫内膜癌亦显示出良好的应用前景。

关键词 :子宫内膜癌 ;表观遗传修饰 ;DNA 甲基化 ;组蛋白修饰

中图分类号 :R737.33 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)18-3592-03

Epigenetics and Endometrial Cancer

XU Zheng¹, LIN Jia-ying^{2△}, LING Ding-wen¹, LIU Gui-ying¹

(1 Department of Gynaecology and Obstetrics, Gaoyou city People's Hospital, Jiangsu Province 225600

2 Department of Gynecology and Gynecologic Oncology, Universitätsmedizin Berlin, Charité, Berlin, Germany 12200)

ABSTRACT: Although the importance of genetic mutation or deficiency in cancer has long been recognized ,the role of epigenetic modification has been suggested more recently. DNA methylation, histone modifications and deregulation of microRNA expression, are important in the formation and progression of human endometrial carcinoma. Progress in epigenetics is not only helpful for early diagnosis of endometrial cancer, molecular targeted therapy for endometrial cancer also shows a good prospect.

Key words: Endometrial carcinoma; Epigenetics; DNA; methylation; Histone modification

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)18-3592-03

前言

子宫内膜癌(endometrial carcinoma)是常见的、发病率逐渐上升的女性生殖系统恶性肿瘤。既往报道其发生率约居女性生殖系统恶性肿瘤第 3 位。传统的观点认为肿瘤形成的主要机制是由于致癌因素造成 DNA 序列变异而导致细胞生长、分化失控。自 Waddington 提出 "表观遗传学(epigenetics)" 后,人们逐渐认识到肿瘤形成过程涉及各种基因如何适应外环境的变化,从而实现在时间和空间上表达的调控^[1]。表观遗传学的研究对于进一步了解子宫内膜癌的各种特性,优化肿瘤的早期诊断,丰富肿瘤的治疗方式,改善肿瘤的预后提供新的策略,具有重要的临床治疗意义。本文对子宫内膜癌表观遗传学的研究进展做一综述。

1 表观遗传学与子宫内膜癌

1.1 DNA 甲基化

1.1.1 DNA 甲基化 近年来将表观遗传学定义为基因功能的改变凡未牵涉到 DNA 的序列又可通过细胞的有丝分裂而遗传者。研究最多的两种表观遗传学改变是 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶作用下,将 S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基基团共价结合到 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位上生成 5- 甲基胞嘧啶(5-mC)从而影响基因表达的

过程。基因调控序列中如果含有大量 5mC ,可以阻碍转录因子与 DNA 结合 影响基因的转录 ,因此甲基化的 DNA 往往与基因转录活性下降或基因沉默相关^[2]。相反 ,非甲基化状态与基因活化有关 ,体内管家基因的启动子部位多处于非甲基化状态 ,保证了相关基因的持续稳定的表达。基因由甲基化状态转化为非甲基化状态往往预示着沉默的基因被重新活化。

肿瘤细胞中 DNA 甲基化异常主要有 3 种情况 :启动子 CpG 岛高甲基化、基因组普遍的低甲基化和特定基因的低甲基化^[3]。其中 CpG 岛异常超甲基化所致抑癌基因转录失活及异常去甲基化所致原癌基因的激活已成为肿瘤研究的热点问题 ,尤其是抑癌基因启动子区域 CpG 岛异常超甲基导致的转录沉默从而引发肿瘤更是备受关注 ,它被认为是除突变和缺失以外的导致抑癌基因功能失活的关键机制。在同一种肿瘤中一定数量的抑癌基因的启动子高甲基化具有特性 ,形成 CpG 岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype ,CIHP) ,如胃癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌和白血病等均报道存在 CIHP^[4]。

1.1.2 雌孕激素受体(ER/PR)甲基化与子宫内膜癌 ER、PR 均属于类固醇受体超家族,各与雌孕激素结合后以二聚体的形式与 DNA 激素反应元件相结合,通过募集共激活因子(coactivators)和普通转录因子(general transcription factors)与激素反应基因的启动子相结合而启动转录,ER、PR 两种受体表达水平的差异反映了细胞对雌激素敏感性的不同。ER 有 ERα 和 ERβ 两种亚型 ,分别由不同的基因编码。ERα 基因位于 6 号染色体的 6q25.1 区 ,由 140kb 碱基构成 ,启动子和 1 号外显子上分布有 CpG 岛 ,主要参与多种组织细胞的增殖、分化和发育。ERβ 位于 14 号染色体的 14q22~24 区 ,由 40kb 碱基组成 ,编码 530 个氨基酸。ERα / ERβ 比例失衡在子宫内膜癌形成中有重要的

作者简介 徐铮(1972-), 大学本科,主治医生 研究方向 妇科肿瘤

△通讯作者: 林嘉盈,女,博士,研究方向 妇科肿瘤。

Email: tiancheng15@live.cn

(收稿日期 2010-12-12 接受日期 2011-01-06)

意义。Hori 等^[9]研究结果显示,将 ERa 启动子区分为位于外显子 1' 的远端区域启动子 (DPR) 和外显子 1' 近端区域启动子 (PPR),在子宫内膜正常月经周期的增殖期中。由于 PPR 常被高度甲基化,DPR 引导的 ERa 的表达占主导地位。而在不典型增生和子宫内膜癌中,由于 DPR 被高度甲基化,ERa 的表达常由 PPR 引导,而且随着肿瘤的发展,ERa 的两个启动子区甲基化程度会发生变化,即由 DPR 引导的 ERa 基因转录会逐渐减少。Sasaki 等^[6]对子宫内膜癌细胞系和病理标本中 ER 甲基化情况进行了研究。结果发现在 ERa-A、-B、和 -c 和 ER13 中,只有 ERa-C 表达沉默,加入 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷(5-aza-dC)后,可恢复 ERa-C 的表达。证明 ERa-C 的表达沉默是由甲基化造成的。研究显示 ERa-C 与雌激素结合通道在子宫内膜癌的发生和发展中起重要作用。在对 PR 的研究显示:在子宫内膜癌细胞系中 PR-A 呈活性状态,而 PR-B 均呈失活状态,体外将细胞株经去甲基化试剂 5- 氮杂胞苷(5-aza-C)处理后,PR-B 复活,PRB 基因的启动子区被甲基化且失活从而导致 PRB 蛋白表达下降或消失,但 PRA 基因无论在正常内膜还是癌性内膜都呈有活性状态而未被甲基化,说明 PRB 异常甲基化可能参与子宫内膜癌的发生发展过程。

1.2 组蛋白修饰

1.2.1 组蛋白修饰 组蛋白修饰包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化、多聚 ADP- 核糖基化、羧基化、赖氨酸残基(Lys)的生物素(酰)化等^[7]。在真核生物中基因组 DNA 与组蛋白和非组蛋白共同装配形成核小体。核心组蛋白的 N- 端尾部暴露在核小体的表面并可发生共价修饰,这些修饰方式共同构成 " 组蛋白密码 ", 从而对基因表达发挥调控作用。在组蛋白的修饰中,研究最多的是乙酰化修饰。乙酰化、磷酸化、ADP 核糖基化是可逆性修饰。而人们一直都认为甲基化作用是一种不可逆的过程。

组蛋白乙酰化常见于组蛋白 H3 的 Lys9、14、18、23 和 H4 的 Lys5、8、12、16 等位点,乙酰化通常与基因激活以及 DNA 复制相关,而组蛋白的去乙酰化和基因的失活相关。乙酰化作用是通过组蛋白乙酰基转移酶 (histone acetyltransferase,HAT)实现的。HAT 将乙酰辅酶 A(乙酰 CoA)乙酰基部分转移到核心组蛋白氨基末端上特定 Lys 残基的氨基基团。使核小体的结构变得松弛,促进了转录因子和协同转录因子与 DNA 分子的接触,因此激活特定基因的转录过程。而组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)作用则相反,使启动子不易接近转录调控元件。从而抑制转录。近年来许多研究已证实了组蛋白乙酰化在肿瘤发生中起重要作用。乙酰化转移酶家族中 CBP、EP300 等蛋白可以使一些转录因子乙酰化,抑制肿瘤形成。现已报道在肺癌、胃肠道肿瘤、皮肤癌、白血病等多种类型肿瘤中发现 P300 和 CBP 基因突变的现象^[8]。

1.2.2 子宫内膜癌组蛋白修饰 组蛋白乙酰转移酶和去乙酰转移酶 HDACs 可以调节核心核小体组蛋白乙酰化作用,HDACs 催化核心核小体组蛋白赖氨酸残基 NH₂ 尾上的乙酰基的脱去,这个脱乙酰基的过程与转录抑制相关从而维持基因的正常表达和正常的细胞周期。因此 HDACs 对染色质重建和基因转录的调控是必需的。一些病理因素导致基因表达异常使细胞周期失控而使细胞恶性增殖或产生病理性代谢紊乱,又可通过

干扰组蛋白的乙酰化状态达到治疗的目的,HDACs 抑制剂的发现正是这种机制的应用。HDACs 抑制剂可防止细胞的增殖和诱导变异细胞的分化,这一机制已经在乳腺癌、前列腺癌、肺癌、宫颈癌等肿瘤研究中得到证实。Terao^[9]等研究发现无论 P53 基因状态如何,一种 HDACs 抑制剂丁酸钠 (sodium butyrate,NaB) 对于子宫内膜癌以及卵巢癌都有明显生长抑制效应。Takai^[10]等检测了一组 HDACs 抑制剂对于六种表达变异的无功能 P53 蛋白的子宫内膜癌细胞株 (Ishikawa, Hec-1B, Hec59, RL95-2, KLE, 和 AN3CA)的作用,结果发现 HDACs 抑制剂可以明显缩短细胞 S 期并增加细胞周期 G0-G1 期或(和) G2 期细胞的比例。由此可见 HDACs 抑制剂能有效抑制子宫内膜癌细胞的生长,为进一步临床实验奠定了基础。

1.2.3 微小 RNA 调控

1.2.3.1 微小 RNA 调控 微小 RNA(microRNAs,miRNAs)是新近发现的一类在动植物及病毒中广泛存在的单链非编码 RNA,它由内源性的转录本形成前体,经过 Dicer 酶剪切形成成熟的 miRNA,与转录产物 mRNA 互补结合。当互补的程度高时,对 mRNA 直接破坏,不完全互补时则使 mRNA 水平下降的同时,抑制翻译的蛋白质的累积,参与众基因的表达调控。鉴于其作用机制,有学者^[11]将其归入表观遗传学的范畴。内源性的 miRNAs 能调控互补 mRNA 的表达,同时也能诱导目的基因失活的染色质结构的形成。研究发现,在小鼠和人多能性的胚胎干细胞中 miRNAs 特异性地表达,说明 miRNAs 具有维持干细胞未分化状态的功能^[12]。此外,大量 miRNAs 或作为原癌基因或者是抑癌基因在恶性肿瘤的发生发展中也起着至关重要的作用。其中著名的抑癌基因 miRNAs 如 let-7 可靶向调控 RAS 致癌基因。人类的 Ras 基因含有多个潜在的 let-7 结合的位点使得 let-7 能够调控 Ras 的表达。而 mir-15 / 16 的调控目标是凋亡抑制基因 Bcl-2;相反原癌基因 miRNAs 包括 miR-372 / 373 可抑制 p53 肿瘤抑制通路以及 miR17-92 集落与 Myc 原癌基因一起诱发细胞增殖。

1.2.3.2 子宫内膜癌微小 RNA 基因调控 微小 RNA 调控也常见于子宫内膜癌:在一项对 74 份子宫内膜癌病例的基因芯片筛查发现肿瘤基因 SOX4 过度表达,SOX4 基因是微小基因 miR-129-2 的靶基因。早期子宫内膜癌中 miR-129-2 表达缺失,SOX4 表达存在。这个现象与 miR-129-2 CpG 岛超甲基化有关。肿瘤组织中 miR-129-2 基因的再活化需要用药物诱导组蛋白乙酰化和 DNA 脱甲基从而导致 SOX4 表达下降,所以可以推测子宫内膜癌 SOX4 的过表达是由于 miR-129-2 的表观遗传性抑制,甲基化介导的微小 RNA 的沉默能使子宫内膜癌的肿瘤基因得到表达。

2 表观遗传修饰异常标志物对子宫内膜癌的诊断价值

DNA 甲基化分析是对于早期诊断肿瘤具有巨大的潜力。目前多个研究中心已经成功从肿瘤样本中获得超甲基化基因。如肺癌临床诊断前 3 年就能在痰中检测到异常的 p16 与 MGMT 基因的甲基化,并且能用甲基化特异性 PCR 检测甲基化程度。从血清及血浆内检测肿瘤 DNA 从而早期诊断肿瘤的方法已经在众多肿瘤如胃癌、非小细胞型肺癌、食管癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌、肾癌中证实是可行的。在 42-76%的肿瘤病例

的血清中能检测到异常甲基化状态 99-100。异常的基因甲基化亦能在肺癌病人痰液、膀胱癌、前列腺癌、肾癌病人的尿液、乳腺癌病人的乳腺导管灌洗液以及结肠直肠癌病人的粪便中检测^[13-16]，这些研究结果表明表观遗传修饰异常标志物对于多种实体恶性肿瘤的早期特异性诊断具有巨大的应用前景。

有学者从最初诊断为子宫内膜癌病人的阴道分泌物中分析 CCh13, HSPA1, hMLH1, RASSF1A, SOCS2 5 个基因的甲基化程度,发现其甲基化程度与对照组中获得的分析结果有很大差异,100%的内膜癌患者有 3 个以上甲基化基因,而 91%的非子宫内膜癌的对照患者病例中含有 3 个以下甲基化基因。在这 5 个基因中, hMLH1 和 RASSF1A 基因是更为常用的诊断标志物, CCh13, HSPA1, SOCS2 这 3 个基因是子宫内膜癌特异性标记。应用 DNA 甲基化分析相比目前最常用的诊断子宫内膜癌方法诊断性刮宫能最大限度降低医源性创伤,尤其当发生子宫内膜活检取材困难时, DNA 甲基化分析可作为早期诊断子宫内膜癌有效替代方法。对于子宫内膜复杂性增生过长、非典型性增生或者早期内膜癌选择孕激素治疗的患者,对于 PR-B 基因甲基化状态能评估孕激素治疗效果以及指导妇产科医生进一步的治疗方案。对于选择手术治疗子宫内膜癌的患者,亦可通过分子生物学方法检测诸如阴道分泌物或者血液中 DNA 甲基化程度来评估治愈和复发,并且一些研究者发现这种方法可能比身体检查以及影像学检查具有更高的敏感性。然而要使血清甲基化分析成、为诊断子宫内膜癌有效方法仍然需要更进一步的研究。

3 表观遗传学在子宫内膜癌治疗中的应用

肿瘤形成的一种分子机制是肿瘤抑制基因表观遗传性沉默。肿瘤表观遗传性模式与不可逆转的基因改变有很大的差异,它可以通过药理学作用达到修饰和局部逆转的结果。这一概念为以表观遗传学为基础的抗肿瘤药物的研制提供了理论基础。目前的表观遗传调控药物主要是针对 DNA 甲基转移酶(DNMT)以及组蛋白去乙酰化酶(HDAC)。这些药物能渗透入胞膜到达靶细胞核,因此使用 DNMT 抑制剂或者 HDAC 抑制剂后能使肿瘤细胞产生异常的基因沉默。目前对于子宫内膜癌的表观遗传治疗方法还处于临床前期,体外实验发现 HDAC 抑制剂包括曲古柳菌素(TSA),组蛋白去乙酰酶抑制剂 SAHA,丁酸钠,丙戊酸等^[17]能抑制子宫内膜癌细胞株肿瘤细胞的增殖,诱导其凋亡并阻碍细胞周期。其中实验证明丙戊酸能明显抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长,通过促进 p21 和 p27 升高从而阻断细胞周期,上调子宫内膜癌中超甲基化基因上皮细胞钙粘蛋白的表达等发挥抑制肿瘤的作用,并且毒理实验亦证实其无副作用^[18]。然而长期用药的不良反应还有待于进一步临床实验的密切监测。

4 结论

子宫内膜癌表观遗传特点的研究为探索子宫内膜癌发生发展的分子机制,早期诊断及治疗靶点提供了新思路。但目前大多数的研究仍处于临床前期,有效筛选表观遗传修饰的技术方法和临床实用性仍需大样本的研究,

参考文献(References)

[1] Brune K, Hong SM, Li A, et al. Genetic and epigenetic alterations of

familial pancreatic cancers [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17: 3536-3542

- [2] Tchufikov NA. Molecular mechanisms of epigenetics [J]. *Biochemistry*, 2005, 70: 406-423
- [3] Ushijima T, Nakajima T, Maekita T. DNA methylation as a marker for the past and future [J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41: 401-407
- [4] Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer [J]. *Nat Genet*, 2006, 38: 787-793
- [5] Hori M, Iwasaki M, Shimazaki J, et al. Assessment of hypermethylated DNA in two promoter regions of the estrogen receptor alpha gene in human endometrial diseases [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 76(1): 89-96
- [6] Sasaki M, Kotcherguina L, Dharia A, et al. Cytosine-phosphoguanine methylation of estrogen receptors in endometrial cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3262-3266
- [7] Linggi B E, Brandt S J, Sun zW, et al. Translating the histone code into leukemia [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 96(5): 938-950
- [8] Kasper LH, Fukuyama T, Biesen MA, et al. Conditional knockout mice reveal distinct functions for the global transcriptional coactivators CBP and p300 in T-cell development [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 789-809
- [9] Terao Y., Nishida J., Horiuchi S., et al. Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells [J]. *Int. J. Cancer*, 2001, 94: 257-267
- [10] N. Takai, T. Ueda, M. Nishida, et al. A novel histone deacetylase inhibitor, Scriptaid, induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells [J]. *Int. J. Mol. Med*, 2006, 17 (2): 323-329
- [11] Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004, 429: 457-463
- [12] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 2257-2261
- [13] M.W. Chan, L.W. Chan, N.L. Tang, et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (2): 464-470
- [14] T.L. Lee, W.K. Leung, M.W. Chan, et al. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma [J]. *Clin. Cancer Res*, 2002, 8(6): 1761-1766
- [15] E. Dulaimi, J. Hillinck, I. Ibanez de Caceres, et al. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 6189-6193
- [16] J.G. Herman and S.B. Baylin, Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation [J]. *N. Engl. J. Med*, 2003, 349 (21): 2042-2054
- [17] N. Takai, T. Ueda, M. Nishida, et al. A novel histone deacetylase inhibitor, Scriptaid, induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 17 (2): 323-329
- [18] N. Takai, J.C. Desmond, T. Kumagai, et al. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (3): 1141-1149