

象,结果发现 4 株均发生了 *gyrA* 83Ser→Leu,另 1 株发生了 Glu 87→Lys;未发现 *GyrB* 突变。认为检测临床分离株对喹诺酮类药物耐药基因与体外诱导所得到的耐药基因突变基本一致。詹惠英糜祖煌^[15]于 2002 年对 2 株耐环丙沙星临床分离株的 *gyrA* 进行序列分析,结果发现临床分离株与诱导耐药株的耐药机制一致。陈志和等^[16]于 2003 年选取 3 株对氧氟沙星和左氧氟沙星均耐药的临床分离株进行基因测定,结果发现临床分离株也存在与体外诱导耐药一致的耐药机制。

孟冬娅等^[17]于 2009 年对泌尿生殖道分泌物中分离出的 10 株 Mh 的耐药基因进行检测,结果显示对斯帕沙星耐药的 7 株均检测出了 *gyrA* Ser83→Leu,而对斯帕沙星敏感菌株均没有此变化。表明 Mh 对斯帕沙星的耐药性可能与 Ser83→Leu 有关,自然界流行菌株与体外诱导实验耐药机制一致。此外还发现了 *gyrA* 基因非热点突变 Ser56→Ile。

3 小 结

综上所述,临床分离株与次抑菌浓度药物体外诱导耐药株的耐药机制一致。通过诱导耐药可以发现不同喹诺酮类药物的首要作用靶位不同:氧氟沙星的首要作用靶位是拓扑异构酶 IV,斯帕沙星的首要作用靶位是 DNA 旋转酶。短时间诱导所致的耐药或交叉耐药水平较低,而长时间诱导所致耐药水平较高。耐药株 *gyrA* 基因的热点突变是 Ser83→Leu,非热点突变有 Ser83→Trp、Ser84→Trp、Glu87→Lys、Ala119→Glu 和 *gyrA* Ser56→Ile;*gyrB* 基因目前尚未发现突变;*parC* 的热点突变是 Glu84→Lys 和 Ser80→Ile,非热点突变有 Asp69→Tyr 和 Arg73→His;*parE* 的热点突变是 Asp426→Asn 和 Ser80→Ile,非热点突变有 Leu440。目前,体外诱导实验研究 Mh 对喹诺酮类药物的耐药机制较为透彻,但临床分离株虽然存在与诱导株相同的机制,但是从上述研究表明临床分离耐药株存在着与诱导株不同的突变位点,因此,为了指导临床合理利用喹诺酮类药物治疗 Mh 感染,对临床分离株的耐药机制还有待进一步的研究。

参考文献

[1] 费成英. 泌尿生殖道支原体感染情况及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(4):329-333.
 [2] 刘厚明,詹能勇,罗凯,等. 女性泌尿生殖道支原体感染及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(5):653-656.
 [3] Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, et al. Mycoplasma hominis in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome[J]. J Perinat Med, 2004, 32(4): 323-326.
 [4] Judlin P. Genital mycoplasmas[J]. Gynecol Obstet Fertil, 2003, 31

(11):954-959.
 [5] Baezyska A, Svenstrup HF, Fedder J. Development of real-time PCR for detection of mycoplasma hominis[J]. BMC Microbiol, 2004, 4(1):35.
 [6] 孟冬娅,薛文成,陈瑜宁,等. 2003~2007 年沈阳地区泌尿生殖道支原体感染流行病学及耐药性变异[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(2):237-240.
 [7] Bebear CM, Bove JM, Bebear C, et al. Characterization of mycoplasma hominis mutations involved in resistance to fluoroquinolones[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(2):269-273.
 [8] Bebear CM, Renaudin H, Charron A, et al. Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of mycoplasma hominis obtained in vitro[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(9):2304-2311.
 [9] Kenny GE, Young PA, Cartwright FD, et al. Sparfloxacin selects *gyrA* mutation in first-step mycoplasma hominis mutants, whereas ofloxacin selects topoisomerase IV mutation[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(10):2493-2496.
 [10] Bebear CM, Grau JA, Charron K, et al. Cloning and nucleotide sequence of the DNA *gyrA*(*gyrA*) gene from mycoplasma hominis and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(10):2719-2727.
 [11] 张冉,吴移谋,陈丽丽,等. 次抑菌浓度喹诺酮类药物体外诱导人型支原体 *parE* 基因突变的研究[J]. 衡阳医学院学报, 2000, 28(1):8-10.
 [12] 张冉,吴移谋,向斌,等. 喹诺酮类药物诱导人型支原体耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(5):273-275.
 [13] 叶萍,邓超干,王辉,等. 体外获得性人型支原体喹诺酮耐药株 *gyrA* 基因研究[J]. 中国热带医学, 2009, 9(3):435-437.
 [14] Bebear CM, Bove JM, Charron A, et al. Mutations in *gyrA*, *parC*, and *parE* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of mycoplasma hominis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(4):954-956.
 [15] 詹惠英,糜祖煌. 人型支原体 *gyrA* 基因突变与喹诺酮耐药的关系研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(6):38-39.
 [16] 陈志和,黄澎杰,吴志周,等. 人型支原体对 8 种药物的敏感性及其喹诺酮类药物耐药基因 *gyrA* 突变的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2003, 19(5):424-425.
 [17] 孟冬娅,王璐,马均,等. 人型支原体对喹诺酮类药物耐药机制的初步研究[J]. 中国皮肤性病性病学杂志, 2010, 24(11):997-999.

(收稿日期:2011-05-27)

• 综 述 •

DNA 甲基化在卵巢癌研究中的进展

马 敏 综述,曹兴建 审校

(南通大学附属第二医院检验科,江苏 226001)

关键词:DNA 甲基化; 阿片肽结合蛋白基因; 卵巢肿瘤; 循环 DNA

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 19. 028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)19-2227-03

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,严重威胁着女性的健康。由于缺少有效的早期诊断方法,其死亡率一直居妇科肿瘤之首。随着对卵巢癌发病机制的深入研究,人们认识到肿瘤的发生不仅与遗传学机制有关,表观遗传异常也是肿瘤发

生、发展的原动力之一,DNA 甲基化作为表观遗传的主要方式之一,显示出与卵巢癌的发生、发展、治疗和预后密切相关,深入研究其作用机制将有助于卵巢癌早期诊断、辅助治疗和预后判断。

表观遗传与传统意义上的遗传不同,是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化,主要体现在可逆性、位置效应和高频率的突变。表观遗传修饰不仅与细胞、组织的正常发育有关,而且与肿瘤的发生也密切相关。在肿瘤的形成过程中包含基因机制和表观基因机制两大机制,表观基因机制是表观遗传学的重要内容,该机制主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 的调控,其中 DNA 甲基化是表观遗传学的重要研究内容之一。现对 DNA 甲基化在卵巢癌研究中的进展作进一步的综述。

1 DNA 甲基化与卵巢癌

DNA 甲基化是最早发现的基因表观修饰方式,是指在 DNA 甲基转移酶的催化下,以 S-腺苷-L-甲硫氨酸作为甲基供体将甲基转移到胞嘧啶的 5 位碳原子上,生成 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)。这种 DNA 修饰方式并没有改变基因序列,但是其调控了基因的表达。DNA 甲基化通常发生在 CpG 位点的 C 上。CpG 岛(CpG island, CGI)为长度大于或等于 200 bp, C 加 G 含量大于或等于 50%, CG 观测值/期望值大于或等于 0.6 的 DNA 序列,也就是 CpG 位点较为密集的区域,一半以上位于管家基因和一些组织特异性基因的 5' 端,覆盖基因的启动子区和第 1 外显子,有时延伸到第 1 或第 2 内含子^[1]。人类 60% 以上的基因含有 CGI。CpG 位点在人类基因组中不足 1%, 其中 70%~80% 以甲基化形式存在,主要是多数的 DNA 重复序列和异染色质,而大多数 CGI 正常情况下处在完全非甲基化状态。

DNA 异常甲基化与肿瘤的发生有密切的联系,其机制主要有:(1)基因组范围的低甲基化。如启动子 CGI 低甲基化激活癌基因和逆转录转座子;异染色质低甲基化导致基因组不稳定性增加而最终通过遗传性改变导致肿瘤的发生。(2)局部高甲基化。抑癌基因启动子 CGI 高甲基化,是除杂合性缺失和基因突变之外,导致肿瘤抑制基因 CGI 的第 3 种机制。(3)体内突变热点。甲基化的胞嘧啶易自发脱氨基生成胸腺嘧啶(thymine, T),随着年龄的增加,CGI 的甲基化不断增加,使得年龄成为一些肿瘤发病的危险因素。

近年来的研究表明,DNA 异常甲基化与卵巢癌的发生有密切的关系。卵巢癌中因启动子低甲基化而表达上调的基因多是与细胞增殖、DNA 修复、血管生成和细胞迁移相关的基因;而因启动子过甲基化使表达减少的基因则多是细胞黏附、促细胞凋亡、抗细胞增殖和 DNA 错配修复相关的基因。

2 与卵巢癌相关的抑癌基因甲基化

2.1 rassf1A 基因 rassf1A 定位于人类染色体 3p21.3,是 ras 相关领域家族基因 1(ras associated domain family genes, RASSF)的 A 转录产物,编码一组 RAS 效应蛋白。通过阻断 CyclinD1 累积及控制细胞 G₁/S 期进展而抑制肿瘤细胞生长,rassf1A 在正常组织中 100% 表达,而在肺癌、胃癌、乳腺癌等多种实体瘤中均存在甲基化导致的表达失活。有学者检测卵巢癌组织中 rassf1A 甲基化发生率分别为 50%、52.5% 和 40.3%^[2-4]。认为 rassf1A 启动子区甲基化与卵巢癌发生、发展密切相关,可作为一种分子生物学指标,用于监测肿瘤的发生、发展和预后。

2.2 死亡相关蛋白激酶基因 死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase, DAPK)基因定位于人类染色体 9q34.1,是一种钙离子/钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有调节细胞的生存和凋亡以及抑制肿瘤的作用。dapk 基因启动子区 CpG 岛的甲基化,会导致 dapk 表达的沉默,使一些凋亡

信号不能通过 dapk 诱导细胞凋亡,而使细胞有发展成肿瘤的可能性,这被认为是肿瘤发生的早期事件。研究者们发现卵巢癌细胞中 dapk 发生甲基化,提示 dapk 甲基化引起的基因沉默可能与卵巢癌的发生有关,通过检测 dapk 甲基化,有助于部分卵巢癌的早期诊断^[5-6]。

2.3 cdh1 基因 cdh1 基因定位于染色体 16q22.1,编码细胞表面跨膜糖蛋白 E 钙黏蛋白(E-cadherin)。E-cadherin 可介导相邻的上皮细胞间依赖钙的细胞连接,由于 E-cadherin 的低水平有助于肿瘤细胞浸润生长和由原发灶脱落转移,与肿瘤细胞的浸润性增加有关,cdh1 基因被认为是一种重要的肿瘤转移抑制基因,是多种肿瘤侵袭及转移的抑制因素,包括卵巢癌在内。沈文静等^[7]检测上皮性卵巢癌原发灶及盆腹腔转移灶中 cdh1 启动子异常甲基化的发生率分别为 28.6% 和 39.0%,并与上皮性卵巢癌临床分期和细胞分化程度有关。

此外还有 brca1、brca2、ccbe1、med1/med4、igfbp-3 等肿瘤相关基因^[8-12]。以下以 opcm1 基因为例,说明其甲基化在卵巢癌研究中的应用。

3 opcm1 基因与卵巢癌的相关性

2003 年 Sellar 等^[13]发现阿片肽结合蛋白基因(opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like gene, OPCML)是上皮性卵巢癌的另一个抑癌基因。OPCML 也称为阿片肽结合细胞黏附分子(opioid-binding cell adhesion molecule, OB-CAM),位于染色体 11q25,由 7 个外显子构成。正常情况下 OPCML 在卵巢的表面上皮和大脑中表达,在心脏、胎盘、肝脏、肾脏、胰腺、睾丸和结肠中少量表达。OPCML(OBCAM)蛋白属于免疫球蛋白超家族中糖基磷脂酰肌醇(glycophosphatidylinositol, GPI)锚定细胞黏附分子中的 IgLON 家族,该家族还包括 LSAMP 和 neurotrimin^[13]。OPCML 蛋白有 3 个 Ig 样结构域,通过 GPI 锚定在细胞膜上。OPCML 蛋白有 2 种同系物,分别由 345 和 338 个氨基酸构成。OPCML 蛋白作为一个阿片受体类细胞黏附因子,可以使体内的腺苷酸环化酶(AC)活性增高,AC 可以水解 ATP 产生 cAMP, cAMP 可以抑制 DNA 合成,促进细胞分化以及改变细胞膜性质。OPCML 蛋白还参与细胞的识别、黏附、信号转导以及轴突的生长。由于等位基因的杂合性缺失和 CpG 岛的甲基化,OPCML 在上皮性卵巢癌中经常失活,证明其低表达与启动子区域的高甲基化有关^[14]。

周峰等^[15]研究显示,用巢式 MSP 检测卵巢癌组织中 opcm1 基因的甲基化率为 83.3% (20/24);姚德生等^[16]研究显示,正常 opcm1 能够抑制 A2780 细胞的增殖,使 A2780 细胞周期滞留于 G₀~G₁ 期;使注射 A2780-OPCML 细胞的裸鼠体内成瘤率明显下降,肿瘤生长速度明显变慢;能增强细胞的聚合力和黏附力。以上的体内外实验结果进一步证实了以往对 opcm1 基因作为抑癌基因的推测,表明 opcm1 基因在卵巢癌的生长、浸润和转移中发挥重要的抑制作用。

4 循环 DNA 在卵巢癌研究中的作用

循环 DNA 即存在于人血清或血浆中的游离 DNA。近年来研究表明,增殖旺盛的肿瘤细胞能持续释放 DNA 进入血液循环,使肿瘤患者循环 DNA 含量增高且发生与原发肿瘤组织相一致的分子遗传学改变(如基因突变、抑癌基因启动子高甲基化、微卫星不稳定和杂合性丢失等)。肿瘤循环 DNA 来源的确切发生机制目前尚未阐明,但一般认为主要有以下 4 种机制:(1)增殖旺盛的肿瘤细胞持续释放 DNA 进入血液循环,成为血液循环中游离 DNA 的主要来源。(2)肿瘤细胞的坏死在

瘤体较大或发生转移的患者血液中,出现较高水平的 DNA,说明血循环 DNA 有部分来自肿瘤细胞的坏死。(3)循环肿瘤细胞或微转移灶的裂解,肿瘤患者血浆中的循环 DNA 也可能来自循环肿瘤细胞或者微转移灶的裂解。(4)肿瘤细胞的凋亡,血循环 DNA 电泳后,可表现出凋亡细胞所特有的梯度条带,由此提出循环 DNA 还可来源于肿瘤细胞的凋亡。

现有资料表明,无论采用血浆还是血清标本,均可以得出一个相同的结论,即肿瘤患者血液循环 DNA 的平均含量高于健康人群。Teschendorff 等^[17]应用 DNA 甲基化相关标记分子检测卵巢癌患者血清中 DNA 甲基化状态,说明卵巢癌患者的循环 DNA 中可以检测到基因的甲基化,并且其甲基化与卵巢癌的早期诊断及预后密切相关。Levenson^[18]也提到运用循环 DNA 分析 DNA 甲基化可以促进肿瘤相关生物标志在肿瘤中检测、诊断、治疗的预期效果及预后的发展。目前循环肿瘤 DNA 已经用于检测乳腺癌、结肠癌、肺癌和头颈癌血液、痰液和分泌物中某些肿瘤标志物的改变,如微卫星不稳定、杂合性缺失、基因突变和甲基化等。因此,如果能够在手术前发现肿瘤重要相关基因的改变,对卵巢癌的诊断特别是对高危人群的筛查将有重要的临床应用价值。

5 展 望

卵巢恶性肿瘤由于早期缺乏明显的自觉症状而不易被发现,多数患者就诊时已进入晚期,5 年存活率很低,所以及时有效的诊断手段对卵巢的癌治疗及预后判断十分重要。以往对卵巢癌基因水平的研究均局限于肿瘤原发组织,而癌组织的获取一般均来源于手术后切除的标本,很难在患者进行手术前检测到某些基因的改变。因此,如果能够寻找到卵巢癌特异肿瘤标志物,这对于卵巢癌的早期诊断和治疗将具有重要的意义。当前研究表明,多种肿瘤患者血清可检测到基因启动子区高甲基化修饰,一些研究者在肝细胞癌患者血清中检测出了甲基化的 *rassf1A* 基因^[19];在神经母细胞瘤中检测到了甲基化的 *dcr2* 基因等^[20]。随着对卵巢癌发病机制的深入研究,基因甲基化在卵巢癌中的作用已受到广泛的关注。循环肿瘤 DNA 提供了通过血液检测卵巢癌分子遗传学改变的方法,通过收集血液标本,检测循环肿瘤 DNA 的甲基化,有助于卵巢癌患者的术前诊断,特别是联合应用多种肿瘤相关基因对高危人群的筛查,将更有助于早期发现卵巢癌患者。所以寻求一种卵巢癌特异的肿瘤标志物,结合 DNA 甲基化和循环 DNA 与卵巢癌的关系,期待一种新型的、简单的、可靠的检测手段,从而可以做到早期发现、早期诊断、早期治疗,进而提高疗效,提高生存率。

参考文献

- [1] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(6): 415-428.
- [2] Caceres I, Battagli C, Esteller M, et al. Tumor cells specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6476-6481.
- [3] 马琳, 张军航, 刘芙蓉, 等. 卵巢上皮性恶性肿瘤组织 *rassf1A* 基因启动子区甲基化的研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(11): 657-659.
- [4] 李其荣, 刘培淑, 张艳. 卵巢癌组织和血清中 *rassf1A* 基因甲基化

- 的检测及临床意义 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2007, 45(10): 1047-1049.
- [5] Collins Y, Dicioccio R, Keitz B, et al. Methylation of death associated protein kinase in ovarian carcinomas [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(1): 195-199.
- [6] Bai T, Tanaka T, Yukawa K, et al. Reduced expression of death associated protein kinase in human uterine and ovarian carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(3): 661-665.
- [7] 沈文静, 郭科军, 戴冬秋, 等. *cdh1* 基因异常甲基化在上皮性卵巢癌中的检测及临床意义 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2007, 23(7): 520-522.
- [8] Pradhan M, Risberg BA, Tropé CG, et al. Gross genomic alterations and gene expression profiles of high-grade serous carcinoma of the ovary with and without BRCA1 inactivation [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(8): 493.
- [9] Swisher EM, Gonzalez RM, Taniguchi T, et al. Methylation and protein expression of DNA repair genes; association with chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas [J]. *Mol Cancer*, 2009, 8(7): 48.
- [10] Barton CA, Gloss BS, Qu W, et al. Collagen and calcium-binding EGF domains 1 is frequently inactivated in ovarian cancer by aberrant promoter hypermethylation and modulates cell migration and survival [J]. *British J Cancer*, 2010, 102(62): 87-96.
- [11] Howard JH, Frolov A, Tzeng CW, et al. Epigenetic downregulation of the DNA repair gene *MED1/MBD4* in colorectal and ovarian cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(1): 1-7.
- [12] Torng PL, Lin CW, Chan MW, et al. Promoter methylation of *IGFBP-3* and *p53* expression in ovarian endometrioid carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2009, 8(4): 120-127.
- [13] Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, et al. *OPCML* at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer [J]. *Nature Genet*, 2003, 34(3): 337-343.
- [14] Czekierdowski A, Czekierdowska S, Szymanski M, et al. Opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like (*OPCML*) gene and promoter methylation status in women with ovarian cancer [J]. *N euroendocrinol Lett*, 2006, 27(5): 609-613.
- [15] 周峰, 曹兴建, 刘曼华, 等. 巢式 MSP 检查卵巢癌组织 *opcml* 基因甲基化 [J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(2): 102-103.
- [16] 姚德生, 李力, 王峰, 等. *opcml* 对卵巢癌细胞抑制的体内外实验研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(2): 121-124.
- [17] Teschendorff AE, Menon U, Gentry MA, et al. An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): 274-281.
- [18] Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(4): 481-488.
- [19] Chan KC, Lai PB, Mok TS, et al. Quantitative analysis of circulating methylated DNA as a biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(9): 1528-1536.
- [20] Yagyu S, Gotoh T, Iehara T, et al. Circulating methylated-*DCR2* gene in serum as an indicator of prognosis and therapeutic efficacy in patients with *MYCN* nonamplified neuroblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21): 7011-7019.

(收稿日期: 2011-04-18)