

• 综 述 •

RASSF2A 基因启动子甲基化与肿瘤关系的研究进展*

马腾飞¹, 韦 达²综述, 赵建华^{1△} 审核

(南京医科大学附属江苏省肿瘤医院: 1. 江苏临床检验中心; 2. 普外科, 江苏南京 210009)

关键词: RASSF2A; 肿瘤抑制基因; 甲基化; 肿瘤

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 12. 031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)12-1595-03

肿瘤抑制基因(TSG)的失活是癌症发病机制的关键因素。TSG 失活可能是不可逆的, 比如基因缺失或突变; TSG 失活也可能通过表观遗传的机制, 是可逆的, 这为寻找更合适的治疗方法或治疗药物提供了理论基础。CpG 双核苷酸很少出现在人类基因中, 但在某些基因的启动子区发现 CpG 保持或高于正常概率, 即 CpG 岛, 其甲基化在基因表达的调控上起关键作用。RAS 相关区域家族 2A(RASSF2A)位于染色体 3p21. 3, 这个区域被证实实在一些肿瘤中频繁缺失; 其中 RASSF2A 的表观遗传失活是重要的分子改变。最近的一些研究已陆续阐明了 RASSF2A 启动子甲基化在肿瘤诊断和预后中的潜在意义, 本文对其研究进展综述如下。

特定基因的甲基化是一种可很早检测到的分子改变, 在某些情况下甚至先于肿瘤形成。肿瘤的甲基化通常发生在基因启动子区 CpG 岛, 相比涉及多个外显子的突变筛查, 可减少分析的区域。DNA 甲基化还与肿瘤的发展演变密切相关, 可提供预后信息。此外, 还有一个重要的优势是, 甲基化分析适合多种类型的标本; 如血流中存在肿瘤衍生的 DNA 早已被证实^[1], 肿瘤 DNA 也可在重要器官排出的各种分泌物中找到, 如尿液、支气管肺泡灌洗液、乳头溢液、口腔和咽喉冲洗液、鼻咽拭子和脑脊液等标本; 这些标本可以轻松获得, 不需要通过有创侵入的方式获取。

1 RASSF2 的同系物

人类基因组同源性搜索已经确定了几个包含 *Ras* 相关区域的 RASSF 基因家族的成员, 包括 RASSF1 (3p21. 3)、RASSF2 (20p13)、RASSF3 (12q14. 1)、AD037 (即 RASSF4, 10q11. 21)、NORE (1q32. 1)、RASSF6 (4q21. 21)。在对肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤进行等位基因杂合性缺失的研究中发现, 3p21. 3 上存在一个狭窄的纯合性缺失区域即 RASSF1。在各种成人和儿童肿瘤中, 随着基因启动子区的甲基化, RASSF1A 的表达经常缺失。目前 RASSF1A 被认为在促进微管稳定性中起重要作用^[2], 同时还参与了细胞的周期调控、凋亡和转移。研究发现 RASSF1A 基因被敲除的老鼠很容易发生自发性肿瘤或者致癌物诱发性肿瘤^[3]。

与 RASSF1A 一样, RASSF2A、RASSF4 和 NORE1A 在肿瘤中也常表现为表观遗传失活, 而 RASSF3 和 RASSF6 尚未报道存在这一现象。Hesson 等^[4]发现 RASSF2A 在结直肠癌中频繁被甲基化并与 K-Ras 水平呈负相关, RASSF2A 可能是癌症特异性分子标志物, 可用于结直肠癌的早期诊断和监测; Clark 等^[5]和 Coper 等^[6]也发现在肺癌、尤其是非小细胞肺癌(NSCLC)中 RASSF2 启动子甲基化与其表达的缺失密切相关, 去甲基化治疗可有效恢复该基因的表达水平。

2 RASSF2A 的生物学特征和功能

RASSF2 基因位于 20p13, 目前已发现有 3 种亚型: RASSF2A、RASSF2B 和 RASSF2C, 三者均包含 *Ras* 相关区域; 其中仅 RASSF2A 基因启动子区有 CpG 岛。RASSF2A 以 GTP 依赖的方式直接结合 K-Ras, 而与 H-Ras 的作用却很微弱^[7]。因此, 它很可能是通过与 K-Ras 的相互作用发挥多种功能, 如促进凋亡和细胞周期停滞、抑制细胞生长^[5]; 抑制 NF-κB 的转录活性和炎性因子的表达, 从而阻断肿瘤新血管的生成和细胞浸润; 抑制 *Ras-Rho* 通路^[8-9], 如 RNA 干扰实验使 RASSF2A 失活, 可增加靶细胞 MAPK 的磷酸化水平, 抑制 *Ras* 的下游信号通路^[10]。新近发现, 除了与 K-Ras 作用以外, RASSF2A 还与 microRNA 相互作用。研究发现在人和小鼠的白血病细胞系 MLL-ELL 和 MLL-ENL 中可检测到 mir-17-92 表达的上调, 同时发现 RASSF2 是 mir-17-92 作用的靶基因^[11]。可见 RASSF2A 作为抑癌基因在体内的作用路径和调节通路都是比较复杂的, 需要深入剖析。

RASSF2A 是 RASSF2 唯一具有相关 CpG 岛的转录异构体, CpG 岛的甲基化程度直接影响其表达水平及功能。已有文献报道在结肠癌、胃癌、肺癌、鼻咽癌、口腔鳞状细胞癌、乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌中均检测到 RASSF2A 启动子的甲基^[6, 12-17]。

3 RASSF2A 甲基化与肿瘤发生的关系

启动子甲基化是抑癌基因 RASSF2A 失活的关键环节。文献^[4]报道在结肠癌细胞系、临床患者结肠癌和结肠腺瘤组织中 RASSF2A 启动子甲基化现象均很常见, 分别是 70%~89%、42%~72. 6%、43%~100%, 而正常结肠黏膜没有检测到 DNA 甲基化。Noshio 等^[18]报道 307 例早期结肠癌中有 44. 3% 发生 RASSF2A 启动子甲基化, RASSF2A 启动子甲基化是预测 pT1 结肠癌是否具有潜在浸润性的生物学指标。进一步研究证实结直肠癌(CRC)中 RASSF2A 启动子 CpG 岛的甲基化与 RASSF2A 的表达缺失相对应, 用去甲基药物 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC) 处理后, 可重新激活了 RASSF2A 的表达。

RASSF2A 启动子甲基化与鼻咽癌的发生发展相关^[14]。RASSF2A 表达缺失的鼻咽癌细胞系以及 50. 9%(27/53) 的原发性鼻咽癌患者癌组织中, 可检测到 RASSF2A 启动子的甲基化, 而在正常鼻咽上皮中没有检测到其甲基化。体外实验证明, 鼻咽癌细胞系 RASSF2A 的甲基化可导致该基因表达沉默, 进而阻碍细胞周期进程、集落形成和细胞迁移; 而用甲基化转移酶抑制剂 5-aza-dC 处理鼻咽癌细胞系可完全修复 RASSF2A 的缺失表达, 细胞凋亡活性也明显提高; 这些发现

* 基金项目: 江苏省六大人才高峰资助项目(2010-WS-075)。 作者简介: 马腾飞, 男, 临床检验诊断学研究生, 主要从事乳腺癌分子生物学的研究。 △ 通讯作者, E-mail: jhzhao2838@sina. com。

表明 RASSF2A 也是鼻咽癌的一个重要抑癌基因,其启动子甲基化是导致该基因失活的关键因素。

RASSF2A 在乳腺癌细胞系中甲基化率为 65% (13/20),对这些甲基化的乳腺癌细胞系用 5-aza-2dC 进行去甲基化处理,可重新开启 RASSF2A 的表达,而未甲基化的乳腺癌细胞系没能观察到这些改变。Cooper 等^[6]报道在一些原发性乳腺癌患者组织中也能检测到 RASSF2A 的甲基化(38%, 15/40),从而表明 RASSF2A 可能为乳腺癌新的甲基化标志物,具有良好的应用前景。

Schagdarsurengin 等^[19]报道 RASSF2A 在甲状腺癌细胞系中甲基化率为 85% (7/8),在原发性甲状腺癌中甲基化率 63% (19/30);与正常甲状腺(0%)、甲状腺肿(12%)和滤泡状腺瘤(0%)相比较,RASSF2A 在原发性甲状腺癌患者的甲基化率有显著提高,且 60 岁以上的甲状腺癌患者的 RASSF2A 甲基化率明显高于 40 岁以下者。RASSF2A 启动子的高甲基化与它的低表达相关,用 DNA 甲基化抑制剂处理后可重新激活 RASSF2A 的转录,降低甲状腺癌细胞的集落形成。原发性肝细胞癌组织也存在 RASSF2A 启动子区甲基化的现象,Ren 等^[20]报道肝癌组织 RASSF2A 甲基化率为 68.9% (31/45),而癌旁正常组织的甲基化率为 40% (12/30);RASSF2A 的甲基化状态与其表达缺失密切相关。Gharane 等^[21]用实时定量甲基化技术分析骨肉瘤中 RASSF2 甲基化状态,甲基化率为 42.5%,甲基化的细胞系在用 5-aza-2dC 处理后,RASSF2 表达上调,瘤细胞集落形成能力降低;RASSF2 的甲基化也与低的总体生存率相关,尤其与 18 岁以下的人群相关性更强。这些研究表明,对骨肉瘤患者进行 RASSF2A 甲基化检测能为临床疾病监测和预后评估提供重要信息。

4 RASSF2A 甲基化与肿瘤治疗的关系

抑癌基因的表达沉默是导致多种肿瘤发生的重要事件之一,基因沉默的主要原因是其启动子 CpG 岛的过度甲基化;改善其甲基化状态完全有可能使基因恢复其表达及功能,这也为癌症的治疗提供了新的选择。已进入临床使用的核苷类去甲基化药物如 5-氮胞嘧啶核苷和 5-氮-2'-脱氧胞嘧啶核苷,主要通过 DNA 甲基转移酶共价结合使其失活,达到去除启动子甲基化,重新激活抑癌基因的目的。使用甲基化抑制剂 5-Aza-CdR 处理 RASSF2A 表达缺失的乳腺癌、鼻咽癌、甲状腺癌、鳞状宫颈癌等癌细胞株,均观察到 RASSF2A 的重新表达^[6,14,19,22]。一些尚处于临床试验阶段的核苷类去甲基化药物如 1-(β-D-呋喃核糖基)-1,2-二氢嘧啶-2-酮和 5-氟-2'-脱氧胞嘧啶核苷,以及新发现的非核苷类去甲基化药物如普鲁卡因和普鲁卡因胺等也均表现出对皮肤癌、白血病和肺癌等的抑瘤作用。去甲基化药物的研发会将肿瘤的治疗带到一个新的高度。

5 RASSF2A 甲基化与肿瘤预后的关系

对于某些癌症,RASSF2A 甲基化已被发现与患者的存活率相关。Luo 等^[12]发现胃腺癌患者 RASSF2 阴性表达者平均存活时间为 21 个月,与阳性表达者(55 个月)相比,存活期明显缩短;RASSF2 阴性表达者,第 1 年和第 3 年成活率分别为 79.5% 和 14.2%,也显著低于阳性表达者(98.7% 和 89.3%),提示 RASSF2 表达缺失与胃癌患者不良预后有关。进一步比较这些患者处于不同 TNM 分期状态时的预后情况,结果显示,RASSF2 表达缺失对早期患者的影响更显著;在早期患者中 RASSF2A 阴性者与阳性者相比,3 年存活率降低了 50.9%,而在晚期患者中,RASSF2A 阴性者与阳性者相比,3 年存活率仅降低了 35.3%,表明 RASSF2 的异常表达发生越

早对患者的影响可能越大,早期检查及动态监测至关重要。有研究报道在宫颈鳞状细胞癌中,RASSF2A 高甲基化提示预后不良,对这些患者应考虑严格的随访和后续治疗^[22]。另外,在鼻咽癌中 RASSF2A 甲基化也被发现与淋巴结转移密切相关,表达缺失者有更高的转移倾向和更差的预后^[14]。至于其他类型癌症,RASSF2A 甲基化与其预后的关系,尚需进一步的研究。

6 总 结

RASSF2A 作为一种肿瘤抑制基因已受到广泛关注。虽然 RASSF2A 的功能和作用机制尚未完全明确,但其甲基化失活与肿瘤发生发展的密切关系是毋庸置疑的,进一步研究将不仅有助于肿瘤的早期诊断,而且还极有可能为肿瘤治疗提供重要的新靶标。

参考文献

- [1] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff D Met al. free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Res, 1977, 37 (3): 646-650.
- [2] Song SJ, Kim SJ, Song MS, et al. Aurora B-mediated phosphorylation of RASSF1A maintains proper cytokinesis by recruiting Syn-taxin16 to the midzone and midbody[J]. Cancer Res, 2009, 69 (22): 8540-8544.
- [3] van der Weyden L, Papaspyropoulos a, poulogiannis get al. loss of RASSF1A synergizes with deregulated RUNX2 signaling in tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2012, 72(15): 3817-3827.
- [4] Hesson LB, Wilson R, Morton D, et al. CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations[J]. Oncogene, 2005, 24(24): 3987-3994.
- [5] Clark J, Freeman J, Donninger H. Loss of RASSF2 enhances tumorigenicity of lung cancer cells and confers resistance to chemotherapy[J]. Mol Biol Int, 2012; 705948.
- [6] Cooper WN, Dickinson RE, Dallol A, et al. Epigenetic regulation of the ras effector/tumour suppressor RASSF2 in breast and lung cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(12): 1805-1811.
- [7] Ren JH, He WS, Zhang RG, et al. RASSF2A promoter methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinogenesis and its correlation with elevated serum alpha-fetoprotein level[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(3): 309-312.
- [8] Maruyama R, Akino K, Toyota MA. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(7): 1312-1318.
- [9] Imai T, Toyota M, Suzuki H, et al. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2008, 99 (5): 958-966.
- [10] Kumari G, Mahalingam S. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) mediated phosphorylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling and cell growth control of Ras-associated tumor suppressor protein, RASSF2[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(16): 2775-2790.
- [11] Li Z, Luo RT, Mi S, et al. Consistent deregulation of gene expression between human and murine MLL rearrangement leukemias [J]. Cancer Res, 2009, 69(3): 1109-1116.
- [12] Luo D, Ye T, Li TQ, et al. Ectopic expression of RASSF2 and its prognostic role for gastric adenocarcinoma patients[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(3): 391-396.
- [13] Imai T, Toyota M, Suzuki H, et al. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2008, 99 (5): 958-966.

- [14] Zhang Z, Sun D, Van D N, et al. Inactivation of RASSF2A by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Cancer, 2007, 120(1): 32-38.
- [15] Liao X, Siu MK, Chan KY, et al. Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis[J]. Int J Cancer, 2008, 123(2): 296-302.
- [16] Qu Y, Dang S, Hou P. Gene methylation in gastric cancer[J]. Clin Chim Acta, 2013, 424(1): 53-65.
- [17] Liu G, Yin B, Song YS. Methylation and protein expression of RASSF2 in prostate cancer[J]. Zhonghua Nan Ke Xue, 2013, 19(2): 107-110.
- [18] Nosho K, Yamamoto H, Takahashi TA. Genetic and epigenetic profiling in early colorectal tumors and prediction of invasive potential in pT1(early invasive) colorectal cancers[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(6): 1364-1370.
- [19] Schagdarsurengin U, Richter AM, Hornung J, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF2 in thyroid cancer and functional consequences[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 264.
- [20] Ren JH, He WS, Zhang RG, et al. RASSF2A promoter methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinogenesis and its correlation with elevated serum alpha-Fetoprotein level[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(3): 309-312.
- [21] Gharanei S, Brini AT, Vaiyapuri S, et al. RASSF2 methylation is a strong prognostic marker in younger age patients with Ewing sarcoma[J]. Epigenetics, 2013, 8(9): 893-898.
- [22] Guerrero-Setas D, Pérez-Janices N, Blanco-Fernandez L, et al. RASSF2 hypermethylation is present and related to shorter survival in squamous cervical cancer[J]. Mod Pathol, 2013, 26(8): 1111-1122.
- (收稿日期: 2013-12-28)
- 综 述 •

鲍曼不动杆菌耐药性分析及治疗应对策略

郑卫东¹, 陈 娟¹, 郭 亮¹, 田彩霞¹综述, 郑 颖^{2△}审校

(1. 湖北医药学院附属人民医院检验部, 湖北十堰 442000; 2. 南京市疾病预防控制中心, 江苏南京 210003)

关键词: 鲍曼不动杆菌; 耐药性; 治疗策略

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 12. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)12-1597-03

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要病原菌, 近年来其耐药性日益严重, 已引起临床和微生物学者的严重关注^[1]。鲍曼不动杆菌主要引起呼吸道感染, 也可引发败血症、泌尿系统感染、继发性脑膜炎等。鲍曼不动杆菌在医院的环境中分布很广且可长期存活, 对危重患者、CCU 及 ICU 中的患者威胁很大。本文主要对鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类、多粘菌素类、碳青霉烯类等抗菌药物的耐药性进行综述, 并在此基础上提出相应的治疗应对策略, 为临床治疗提供参考。

1 鲍曼不动杆菌耐药性分析

1.1 对 β -内酰胺类抗菌药物耐药 这些药物包括青霉素类、头孢菌素类、单环 β -内酰胺类, 由于它们结构中都包含 β -内酰胺环, 所以被统称为 β -内酰胺类抗菌药物, 这些药物主要是通过结合细菌的 PBP 造成细菌的形态和功能的变化, 从而引起细菌死亡。目前对 β -内酰胺类抗菌药物的研究侧重于细菌产生 β -内酰胺酶的机制方面。鲍曼不动杆菌主要产生 4 类 β -内酰胺酶: 质粒介导的 TEM-1 广谱型 β -内酰胺酶, 金属 β -内酰胺酶 IMP, 染色体介导的头孢菌素酶 AmpC 型的 β -内酰胺酶, 碳青霉烯类抗菌药物水解酶即丝氨酸苯唑西林酶。根据这 4 种酶的分子生物学特性(即 Ambler 分类)分为 A、B、C、D 四个类别, A 类为超广谱 β -内酰胺类, B 类为金属 β -内酰胺类, C 类为头孢菌素类, D 类为碳青霉烯类^[2]。细菌 *bla*_{IMP} 等位基因主要介导的碳青霉烯类耐药, 地域主要在韩国和太平洋地区^[3], *bla*_{VIM} 等位基因介导的只在韩国出现过^[4], *bla*_{SIM} 等位基因介导的也是在韩国首次发现^[5]。同样, 目前的研究发现, D 类酶包括 OXA23、OXA24、OXA58 三种^[6], 其中 OXA23 的影响最为广泛。吕美艳等^[7]研究发现 OXA23 阳性组鲍曼不动杆菌菌株, 对头孢哌酮/舒巴坦、环丙沙星和米诺环素的耐药率分别为

78.3%、86.9% 和 87.5%, 而对其他常用药物的耐药率高达 95% 以上。周铁丽等^[8]研究还发现, 对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌菌株的耐药机制, 很可能与染色体介导的头孢菌素酶 AmpC 型的 β -内酰胺酶和缺少外膜蛋白等方面有关, 使得越来越多的鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南产生耐药性。

1.2 对氨基糖苷类抗菌药物耐药 对氨基糖苷类的耐药机制可以分为以下 3 个方面: (1) 产生氨基糖苷修饰酶(AME), 即乙酰转移酶(AAC)、磷酸转移酶(APH)、核苷转移酶(ANT), 核苷转移酶是目前研究最多的。Turton 等^[9]通过试验分离出了编码 AMEs 的 *aacA4*、*aadA1*、*aadB*、*aadAla*、*aacC1* 等基因。钱小毛等^[10]在分离出了 ICU 来源的 27 株鲍曼不动杆菌菌株, 其中 AME 基因阳性的菌株 23 株, 检出率高达 85.1%, 表明 AME 基因对于鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类的耐药起到了很关键的作用。(2) 鲍曼不动杆菌产生甲基化酶, 降低与药物的亲和力。到目前为止, 已经发现了 16S rRNA 甲基化酶基因 *armA* 阳性的菌株^[11]。16S rRNA 甲基化酶能使细菌内药物作用的靶位出现甲基化, 导致药物与靶位点的结合功能丧失, 药物亲和力下降, 从而降低药物的杀菌能力, 从而提高细菌对氨基糖苷类药物的耐药性。

1.3 对喹诺酮类抗菌药物耐药 对喹诺酮类抗菌药物的耐药机制: (1) 细菌编码拓扑异构酶基因出现突变, 主要是 *gyrA* 和 *parE* 两个基因^[12-13]。细菌拓扑异构酶和抗菌药物结合并形成抗菌药物-靶酶复合物, 阻碍细菌 RNA 聚合酶的移动, 从而防止细菌进行复制、转录、修复和合成等, 最终造成细菌细胞死亡。这种机制也是喹诺酮类药物发挥抗菌作用的主要机制。但是, 一旦编码拓扑异构酶的基因发生突变时, 这种机制不复存在, 就会导致细菌对喹诺酮类药物出现耐药性^[14]。(2) 由于细菌内部主动外排机制对药物的作用。Heinemann 等^[15]经过