

## DNA 甲基化在甲状腺肿瘤中的研究进展

宋现运<sup>1</sup> 尚小领<sup>2△</sup> 张玉妥<sup>1</sup>

[关键词] 甲基化;表观遗传学;甲状腺肿瘤

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.06.028

[中图分类号] R736.1 [文献标志码] A

### DNA methylation in thyroid carcinoma

**Summary** Cancer has become clear that not merely gene variations but also epigenetic modifications may contribute to it. Epigenetic changes refer to stable alterations in gene expression with unrelated to changes in the underlying genetic sequence, resulting in heritable. DNA methylation is one of the common epigenetic changes. It control the gene expression through changing DNA conformation and stability, chromatin structure, DNA-protein interaction. The reversal of dysregulated DNA methylation has emerged as a potential strategy for the treatment of thyroid carcinoma. The article will provide an overview of how DNA methylation contribute to thyroid carcinoma dissemination, invasion and metastasis and we will summarize the latest epigenetic therapies for thyroid carcinoma.

**Key words** methylation; epigenetic; thyroid carcinoma

甲状腺肿瘤是内分泌系统最常见的肿瘤之一,而甲状腺癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,占人类所有恶性肿瘤的 1%~5%,且发病呈逐年递增趋势,已成为内分泌系统肿瘤领域的研究重点。临床上分为可分化癌和未分化癌,以可分化癌中的乳头状甲状腺癌多见,占有所有甲状腺癌的 80%~85%;其次是滤泡状癌,占有所有甲状腺癌的 10%~15%;未分化癌发病率很低,占全部甲状腺癌的 1%~2%,但致死率很高。来自滤泡旁 C 细胞的甲状腺髓样癌占有所有甲状腺癌 3%~5%<sup>[1]</sup>。肿瘤的发生、发展是遗传调控和表观遗传调控紊乱导致基因异常表达及功能失调的结果。表观遗传学是可遗传的但不伴有基因序列改变的基因表达的改变。主要内容包括:DNA 甲基化作用、组蛋白修饰作用、染色质重塑、遗传印记、随机染色体(X)失活、非编码 RNA 等<sup>[2-4]</sup>。细胞癌变过程中,最常见的表观遗传学改变是 DNA 甲基化,包括原癌基因启动子区的去甲基化和抑癌基因启动子区过度甲基化<sup>[5]</sup>。其中,大量研究表明,抑癌基因启动子区过度甲基化是癌细胞转录失活的主要机制,而原癌基因的激活是启动子区发生去甲基化的结果。

#### 1 DNA 甲基化

DNA 甲基化是由 S-腺苷甲硫氨酸提供甲基,在 DNA 甲基转移酶的催化下,使胞嘧啶的第 5 位碳原子甲基化,从而将胞嘧啶转化为 5-甲基胞嘧啶

的过程<sup>[6]</sup>。许多研究表明,DNA 甲基化在染色体完整性的维护、基因表达的调控和重组 DNA 某些环节的调节等方面有重要的生物学作用。肿瘤发生的一个重要原因是抑癌基因启动子区甲基化导致的基因失活,在转录水平上抑制基因表达。基因组 DNA 甲基化是近年来表观遗传修饰研究的热点,它可调控多种重要细胞的信号传导,比如 DNA 损伤的修复、细胞周期的调控、细胞的黏附和迁移、细胞的炎症反应和凋亡等<sup>[7-11]</sup>。

#### 1.1 CpG 岛高甲基化

在肿瘤患者的血液、尿液、痰液等脱落细胞学检查中均能检测到肿瘤 CpG 岛甲基化谱(CIMP),CIMP 是由多基因启动子区 CpG 岛甲基化的差异构成,因此研究 DNA 异常甲基化及调控机制,有望在未来开发出防治肿瘤的新药物<sup>[12]</sup>。另外,经研究已证实 CpG 岛高甲基化是导致肿瘤发生基因表达沉默的主要机制,尤其是抑癌基因 DNA 启动子区 CpG 岛的高甲基化<sup>[13-14]</sup>。在不同类型肿瘤中由于存在抑癌基因 DNA 启动子区频繁发生甲基化并导致其基因沉默的现象,DNA 甲基化与基因印记、X 染色体失活、个体发育等关系密切,一些重要抑癌基因启动子区 CpG 岛高甲基化与肿瘤的发生、发展更为重要<sup>[15-18]</sup>。

#### 1.2 基因组广泛低甲基化

基因组广泛低甲基化是肿瘤细胞的一个普遍特征,大肠癌、乳腺癌及肝癌等研究证实 DNA 低甲基化导致反转录转座子和癌基因活化,进而使基因转录改变和基因组不稳定。而基因组的不稳定是肿瘤发生的原因之一<sup>[19]</sup>。基因组低甲基化程度与肿瘤恶性程度呈正相关<sup>[20]</sup>。

<sup>1</sup>河北北方学院病原微生物与免疫学研究所(河北张家口,075000)

<sup>2</sup>河北北方学院附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科

△ 审校者

通信作者:尚小领, E-mail: xiaolingshang66@sina.com

### 1.3 甲状腺肿瘤相关基因甲基化

一些重要生物活性物质如细胞黏附分子、肿瘤抑制因子、DNA 损伤修复因子等基因位点高甲基化,导致这些基因沉默而无法表达,进而导致肿瘤的发生。与遗传学中的基因突变不同,这种基因水平的改变可以被 DNMT 抑制因子逆转,恢复正常甲基化状态。在甲状腺肿瘤的研究中发现一些基因经常出现甲基化现象,比如 TIMP3、MLH1、CDH1、RASSF1A、ESR 等基因。这种现象与基因的转录失活有关,并可能通过对多种基因的转录调控影响甲状腺肿瘤的发生发展。

**1.3.1 CDH1** 细胞黏附基因,编码钙依赖性跨膜糖蛋白——E-cadherin,E-cad 介导细胞之间相互黏附,在胚胎发育、维持上皮细胞极性和完整性、形态发生及抑制细胞的迁移等方面起重要作用<sup>[21-22]</sup>。E-cadherin 低表达导致 CDH1 基因启动子区域 CpG 甲基化,研究认为,肿瘤的浸润和转移与这种表观遗传学改变密切相关。Groff 等<sup>[23]</sup>从人甲状腺癌细胞系的研究中发现 CDH1 的蛋白表达缺失与其 5'末端 CpG 岛的高甲基化相互伴随,其中在 83%的甲状腺乳头样癌、11%的滤泡样癌、21%的髓样癌及 40%的细胞 Hurthle 癌组织中发现这种异常甲基化。编码 CDH1 基因高甲基化可能是使甲状腺肿瘤细胞功能性沉默的一种表现。

**1.3.2 MLH1** DNA 损伤修复基因,一般情况下正常细胞中 MLH1 蛋白在细胞核中发挥 DNA 损伤修复功能,而对甲状腺癌细胞研究发现,蛋白质在细胞质合成后出现向细胞核转运的障碍,MLH1 不能到达发挥功能的场所,在细胞质中表达,细胞发生异常,进而增加了甲状腺肿瘤发生的机率。

**1.3.3 RASSF1A** 一种新型候选抑癌基因,RASSF1A 失活的主要机制是 RASSF1 基因的高甲基化,在肿瘤发生的早期即可发生,为恶性肿瘤的分子诊断及预后评估提供了新的生物标志物。RASSF1A 通过参与 Ras/RASSF1/ERK 通路的信号传导,抑制 Ras 激活生长效应信号的传导途径,进而抑制细胞的生长、促进细胞凋亡和衰老来发挥抑癌的作用。Xing 等<sup>[24]</sup>应用适时定量甲基化 PCR 研究各种甲状腺肿瘤中 RASSF1A 的甲基化状况,证实 RASSF1A 基因的转录失活是其启动子区 CpG 岛的高甲基化所致的,这种失活是甲状腺肿瘤发生的早期事件。

**1.3.4 TIMP3** 一种基质金属蛋白酶组织抑制剂,TIMP3 抑制 MMPs 活性的重要功能区是 N 末端,形成 TIMP3·MMPs 复合体,这种复合体能抑制 MMPs 的活性产生,从而阻断 MMPs 与底物结合,此是转录后调节机制。国外研究表明,许多常见的肿瘤(包括甲状腺肿瘤)中都出现 TIMP3 基因缺失,5'端 CpG 的甲基化,使基因的转录、翻译受到

抑制,致使 MMPs 的功能性蛋白受到拮抗而无法表达,最终导致抑制肿瘤生长、血管形成、侵袭和转移的作用消失,促进了肿瘤的发生发展,甲状腺乳头状癌早期的淋巴结转移与此有密切关系<sup>[25]</sup>。

**1.3.5 ESR** 雌激素受体,分为 ESR1 和 ESR2 两种亚型。Dalla 等<sup>[26]</sup>研究发现甲状腺有 2 种分泌雌激素能力:胞内分泌和旁分泌,这种能力女性较男性强,这或许能部分解释甲状腺肿瘤的性别差异。雌激素可以凭借对甲状腺组织中的自身受体的上调,来影响甲状腺细胞的增值。研究还发现甲状腺肿瘤中 ESR 的表达水平与组织类型、临床分期、患者淋巴结的转移情况及预后指数关系密切。甲状腺肿瘤中 ESR 低表达或不表达可能提示该患者预后不良<sup>[27]</sup>,阻断其作用环节可能为甲状腺肿瘤的治疗提供新的方向和策略。

## 2 DNA 甲基化研究在甲状腺肿瘤的临床应用

随着对甲状腺肿瘤 DNA 异常甲基化认识的逐步深入,DNA 甲基化检测可作为甲状腺肿瘤早期诊断、疗效预测、抗癌剂筛选等分子生物标志。与遗传学不同,表观遗传修饰可逆性的特点使其成为潜在的疾病治疗靶点。同时,大量研究已经证实在肿瘤的形成过程中 DNA 的异常甲基化是可逆的,这成为在表观遗传方面治疗肿瘤提供了理论依据<sup>[28]</sup>。

### 2.1 DNA 异常甲基化在甲状腺肿瘤早期诊断中发挥重要作用

肿瘤相关基因启动子区高甲基化是甲状腺肿瘤形成的重要机制之一,是甲状腺肿瘤发生过程中频发的早期事件。根据 2010 年 6 月美国第 92 届内分泌年会已有数据显示,DNA 甲基化的不同程度可以鉴别甲状腺肿瘤的腺瘤和腺癌<sup>[29]</sup>。对于甲状腺肿瘤相关基因的 DNA 甲基化研究近年来已有相关报道,Boltze 等<sup>[30]</sup>利用 MSP 检测正常甲状腺组织和甲状腺肿瘤中 p16 启动子区甲基化状态,结果显示正常组织仅有 13%发生高甲基化,而甲状腺肿瘤组织超过 40%发生高甲基化,同时还伴有启动子区的高甲基化导致 p16 蛋白表达缺失。这表明 p16 启动子区高甲基化是甲状腺肿瘤的早发事件,与肿瘤分化与进展有关。另外,有文献报道 p53 基因、DNA 修复基因、肿瘤分子侵袭转移相关基因、RASSF1A 基因、促甲状腺激素受体基因等在甲状腺肿瘤组织中都表现出不同比例的高甲基化,在正常甲状腺组织中高甲基化发生比例很低或者不发生<sup>[31-34]</sup>。

当前对肿瘤高危人群的普查已被提上议事日程,通过痰、血清或尿中脱落细胞及固态排泄物进行甲基化谱式分析,可以在无创或微创的条件下进行 DNA 甲基化的检测。廖萍等研究发现甲状腺癌的发生发展与血液中甲基化修饰异常的基因密切

相关,其有望成为甲状腺肿瘤血液诊断的分子标志物。甲状腺肿瘤中,抑癌基因 GPX3、TFPI-2 基因、XNF1 基因等均证实启动子区高甲基化,因此可以通过多种甲基化标志物检测进行甲状腺肿瘤的早期诊断,基因的联合检测可以极大的提高肿瘤的阳性检测率。

## 2.2 抑制 DNA 异常甲基化,恢复抑癌基表达

在甲状腺肿瘤发生过程中,DNA 高甲基化可在多个基因位点发生,导致抑癌因子等肿瘤重要基因失活。因此,可以用 DNA 甲基抑制剂来抑制特定基因位点的甲基化,使该过程逆转,从而使基因表达恢复,肿瘤的发生发展得到抑制<sup>[35]</sup>。研究发现 DKK3 基因失活的重要机制是 DKK3 基因启动子区域的甲基化,该机制在乳头状甲状腺癌的发生发展中起着重要作用。体外经甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷处理 PTC 细胞后发现,氮杂胞苷能有效逆转 PTC 细胞中 DKK3 基因的异常甲基化,从而增强 DKK3 基因的表达,抑制肿瘤细胞生长。甲基化抑制剂针对的不是特定的基因而是整个基因组,通过同时恢复多个抑癌基因的表达,降低基因突变的发生率,提高基因组的稳定性,这可能为开发肿瘤药物提供新靶点。

## 2.3 基因启动子区甲基化对改善甲状腺肿瘤的预后具有重要影响

与其他肿瘤相比,甲状腺肿瘤具有年轻化的趋势,且女性发病率高于男性,统计显示,乳头状甲状腺癌是美国女性发病率增长最快的恶性肿瘤<sup>[36]</sup>,目前生物标记物得到长足的发展,它可对肿瘤的诊断和预后提示作用。另外,由 DNA 异常甲基化导致的癌症相关基因的沉默也取得较大进展。研究表明,DNA 甲基化能直接影响恶性肿瘤的发生发展,并且对预后产生重要的影响。沈樑等<sup>[37]</sup>研究表明 MGMT 基因启动子区甲基化是乳头状甲状腺癌重要的早期事件,乳头状甲状腺癌患者 MGMT 基因启动子区甲基化对其较差的预后提示作用,临床病理参数和 MGMT 基因甲基化联合使用可对肿瘤的诊断、预后作出更准确的判断。

## 3 展望

随着科技的进步,人们在基因组学,蛋白质组学等相关学科研究的深入,人类基因组图谱的完成,科研人员发现了许多肿瘤发生的分子机制,并用于指导肿瘤的诊断和治疗,而表观遗传学的发展为我们研究肿瘤的发生机理及诊断治疗提供了一个新的方向。大量资料表明,DNA 甲基化是一个很有前途的肿瘤生物学标志物,在甲状腺肿瘤形成过程中肿瘤的相关基因的表观遗传学的深入研究,早期甲状腺肿瘤表观遗传学生物标记物的发现及可逆转表观遗传异常的化学药物的研究,其他原因对甲状腺肿瘤中抑癌基因的影响的研

究,甲基化标志物和基因突变等的联合使用将给甲状腺肿瘤的早期诊断、治疗及风险评估、预后等带来新的前景。

## 参考文献

- [1] YIN D T, WANG L, SUN J, et al. Homozygous deletion but not mutation of Exons 5 and 8 of the fragile histidine triad (FHIT) gene is associated with features of differentiated thyroid carcinoma [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2010, 40: 267-272.
- [2] STARK L. Epigenetics online: multimedia teaching resources [J]. *CBE Life Sci Educ*, 2010, 9: 6-9.
- [3] SHARMA S, KELLY T, JONES P. Epigenetics in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 27-36.
- [4] KANWAL R, GUPTA S. Epigenetics and cancer [J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109: 598-605.
- [5] JOVANOVIĆ J, RONNEBERG J A, TOST J, et al. The epigenetics of breast cancer [J]. *Mol Oncol*, 2010, 4: 242-254.
- [6] STARK L. Epigenetics online: multimedia teaching resources [J]. *CBE Life Sci Educ*, 2010, 9: 6-9.
- [7] ZANG J J, XIE F, XU J F, et al. P16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17: 3043-3048.
- [8] OLEINIK N V, KRUPENKO N I, KRUPENKO S A. Epigenetic silencing of ALDH1L1, a metabolic regulator of cellular proliferation, in Cancers [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2: 130-139.
- [9] CHEN M, ZHANG J, LI N, et al. Promoter hypermethylation mediated downregulation of FBP1 in human hepatocellular carcinoma and colon cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e25564.
- [10] BRACONI C, KOGURE T, VALERI N, et al. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer [J]. *Oncogene*, 2011, 30: 4750-4756.
- [11] ACUN T, OZTAS E, YAGCI T, et al. SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 223-223.
- [12] DAS P M, SINGLE R. DNA methylation and cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 4632-4642.
- [13] 殷德涛, 陈国, 李红强, 等. 甲状腺乳头状癌中 XAF 1 基因启动子甲基化及其蛋白表达的相关性 [J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(28): 1967-1970.
- [14] YIN D T, WANG L, SUN J, et al. Association of the promoter methylation and protein expression of Fragile Histidine Triad (FHIT) gene with the progression of differentiated thyroid carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 3: 3482-3491.
- [15] SHARMA S, KELLY T, JONES P. Epigenetics in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 27-36.
- [16] HO D, BURGGREN W. Epigenetics and transgener-

- ational transfer: a physiological perspective[J]. *J Exp Biol*, 2010, 213: 3-16.
- [17] KRIVORUCHKO A, STOREY K. Epigenetics in anoxia tolerance: a role for histone deacetylases[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342: 151-161.
- [18] ALEQRIA-TOMES J, BACCARELLI A, BOLLATI V. Epigenetics and lifestyle[J]. *Epigenetics*, 2011, 3: 267-277.
- [19] EHRLICH M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little [J]. *Oncogene*, 2002, 21: 5400-5413.
- [20] CROSSEN P E, MORRISON M J. Methylation status of the 3rd exon of the C-myc oncogene in B-cell malignancies[J]. *Leu Res*, 1999, 23: 251-253.
- [21] SLEEMAN J P, THIERY J P. Snapshot: the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell*, 2011, 145: 162-162.
- [22] WELLS A, CHAO Y L, GRAHOVAC J, et al. Epithelial and mesenchymal phenotypic switchings modulate cell motility in metastasis [J]. *Front Biosci*, 2011, 16: 815-837.
- [23] GROFF J R, GREENBERG V E, HERMAN J G, et al. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 2063-2066.
- [24] XING M, COHEN Y, MAMBO E, et al. Early OCU1 Tenee of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumor epigenesis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 1664-1668.
- [25] BRUECKL W M, GROMBACH J, WEIN A, et al. Alterations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) are found frequently in human colorectal tumors displaying either microsatellite stability (MSS) or instability (MSI) [J]. *Cancer Lett*, 2005, 223: 137-142.
- [26] DALLA VALLE L, RAMINA A, VIANELLO S, et al. Potential for estrogen synthesis and action in human normal and neoplastic thyroid tissues [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83: 3702-3709.
- [27] 杨曦, 阿仙姑·哈斯木, 韶峰, 等. 新疆地区甲状腺癌组织中 ESR1 基因表达及其临床意义的探讨 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2010, 35(3): 214-217.
- [28] TAO S F, ZHANG C S, GUO X L, et al. Anti-tumor effect of 5-aza-2'-deoxycytidine by inhibiting telomerase activity in hepatocellular carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18: 2334-2343.
- [29] 曾正陪. 开展内分泌代谢疾病及肾上腺肿瘤的表观遗传学研究 [J]. *中华内分泌代谢志*, 2010, 26(8): 629-629.
- [30] BOLTZE C, ZACK S, QUEDNOW C, et al. Hypermethylation of the CDKN2/p16INK4A promoter in thyroid carcinogenesis [J]. *Pathol Res Pract*, 2003, 199: 399-404.
- [31] 宝荣, 邵华, 成建新, 等. 甲状腺乳头状癌中 DNA 修复基因 hMLH1 的甲基化与 BRAF 突变的关系 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(5): 519-521.
- [32] SMITH J A, FAN C Y, ZOU C, et al. Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 133: 1006-1011.
- [33] SCHAGDARSURENGIN U, GIMM O, DRALLE H, et al. CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma [J]. *Thyroid*, 2006, 16: 633-642.
- [34] 戴亚丽, 张帆, 叶静, 等. 促甲状腺激素受体基因启动子区甲基化与乳头状甲状腺癌的关系研究 [J]. *中国全科医学*, 2009, 12(12): 2194-2196.
- [35] 杨志华, 郭明洲, 李鑫, 等. 启动子区甲基化对肝细胞癌锌指蛋白 331 表达的调控 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(9): 761-765.
- [36] XING M, HAUGEN B R, SCHLUMBERGER M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer [J]. *Lancet*, 2013, 381: 1058-1069.
- [37] 沈樑, 张帅, 古维立, 等. MGMT 基因启动子甲基化与乳头状甲状腺癌预后的关系 [J]. *诊断病理学杂志*, 2014, 21(11): 708-711.

(收稿日期: 2014-10-28)