

## • 综述 •

## DNA 甲基化与乳腺癌的早期诊断

汤铜 李佳 钱波

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,WHO 估计每年超过 100 万的女性被诊断为乳腺癌,约 40 万人会死于此病<sup>[1]</sup>。近年来,乳腺癌的发病率上升,而在一些发达国家乳腺癌病死率却逐渐降低,早期筛查的高诊断率是乳腺癌病死率降低的主要原因。对 50 岁以上的女性和部分年轻女性进行定期的乳房 X 线检查可降低乳腺癌病死率<sup>[2-4]</sup>。然而影像学检查并不能区分肿瘤的良恶性,需活检进一步确诊,而病理确诊时往往已经错过了最佳治疗时机,导致不少患者虽然做了乳腺全切和放射治疗及化疗,最后仍然死于肿瘤复发或转移。因此,乳腺癌早期诊断技术显得尤为重要。启动子区域甲基化是乳腺癌中常见的表观遗传学改变,是癌症发生发展过程的重要因子。DNA 甲基化是癌症发展的早期事件,可能是一个预测癌症风险的潜在因子。乳腺癌肿瘤样本和血液中游离肿瘤细胞 DNA 的甲基化模式相似,因此基于血液的甲基化检测是一个很好的手段。本文就 DNA 甲基化在乳腺癌早期诊断中的研究作一综述。

## 1 DNA 甲基化与肿瘤

DNA 甲基化是一种在甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体将甲基转移到特定碱基上的共价修饰过程,是主要的且具有遗传性的、可逆的表观遗传修饰形式,在不改变基因序列的情况下,甲基化可影响基因的表达量。在肿瘤组织和相应的正常组织中,DNA 甲基化模式具有较大差异且普遍存在<sup>[5]</sup>,一般表现为三种情况:(1)持续的低甲基化,与染色体不稳定性和基因重新激活相关,可导致染色体失活、癌基因转录上调或过表达,从而促使肿瘤发生;(2)诱导去甲基化,分为主动去甲基化和与复制相关的去甲基化<sup>[6-8]</sup>,如发育阶段的一

些基因;(3)区域性的高甲基化状态,可导致抑癌基因和 DNA 修复基因表达抑制、染色质凝聚。肿瘤中分子标志物的检测越来越被认可,肿瘤早期癌变筛查是分子标志物检测的终极目标。DNA 甲基化是恶性肿瘤普遍存在的分子生物学改变,与肿瘤的发生、发展密切相关。每种肿瘤中约 600~1000 个基因存在异常甲基化<sup>[9-10]</sup>。DNA 甲基化的变化比另外一种癌症的早期标志性变化即基因突变来得更早一些,高甲基化是肿瘤发生的早期事件,能导致细胞易于向恶性转化,癌前病变通常显示有异常的甲基化,因此 DNA 高甲基化是癌症早期的预示性标志物。

癌症患者血清中普遍存在肿瘤特异性 DNA 改变,有超过 90% 的循环游离 DNA(circulating free DNA, cfDNA)源自肿瘤组织。因此针对乳腺癌患者血浆中异常的 DNA 浓度检测已经成为一个新的研究领域,表明对于癌症的非侵入性诊断、预后和随访监测等,血液中游离肿瘤细胞 DNA 可能是一个合适的指标。Fang 等<sup>[11]</sup>报道乳腺癌中存在一个 CpG 岛甲基化表型(CpG island methylation phenotype, CIMP)。近年来随着乳腺癌表观基因组学(DNA 甲基化和组蛋白修饰)的发展,越来越多乳腺癌发生的关键基因被鉴定,这些基因调节着几乎所有的细胞功能,如细胞周期、DNA 损伤修复、细胞粘附和入侵等。

## 2 乳腺癌中相关的甲基化基因

## 2.1 BRCA1 基因

目前,大量研究证实乳腺癌中存在的多个癌症相关基因发生甲基化,且已被证明是乳腺癌发生的早期事件<sup>[12-14]</sup>。Hall 等<sup>[15]</sup>早在 1990 年就发现了乳腺癌易感基因 BRCA1,该基因具有转录调控活性和 DNA 损伤修复的功能,在乳腺癌中的突变频率较高且发生较早,可以有效的预测遗传性乳腺癌。随后陆续有研究报道该基因也存在甲基化现象。杨海捷等<sup>[16]</sup>报道,乳腺癌不典型导管增

生组织均发生 BRCA1 甲基化,甲基化率分别为 65.22% (15/23) 和 33.33% (2/6),认为 BRCA1 基因甲基化是散发性乳腺癌发生过程中的早期事件,可能在乳腺癌发生和乳腺增生癌变过程中起重要的生物学作用。麻小圆等<sup>[17]</sup>对 32 例散发性乳腺癌患者和 32 例健康志愿者进行外周血 BRCA1 基因 C 区域甲基化检测,病例组甲基化率明显高于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示该基因对预测早发性乳腺癌有潜在价值。2011 年,Al-Moghrabi 等<sup>[18]</sup>报道早发性乳腺癌患者的外周血中 BRCA1 甲基化率为 28.5%,对照组的 BRCA1 甲基化率为 10.9%,而且两组 CpG 岛甲基化模式极其相似,暗示早发性乳腺癌中 BRCA1 甲基化存在的可能性,同时建议将 BRCA1 甲基化作为乳腺癌发生风险的有利预测指标。

## 2.2 RASSF1A 基因

RASSF1A 基因作为抑癌基因与多数肿瘤关系密切,编码基因不同程度的甲基化导致了该基因表达降低或缺失。据文献报道,约 60%~77% 的乳腺癌中发生 RASSF1A 基因 CpG 岛甲基化<sup>[19-20]</sup>,是乳腺癌重要的检测标志物。Lewis 等<sup>[21]</sup>研究发现,高危患者中 RASSF1A 基因甲基化率(70%)显著高于中低危患者(29%),而良性肿瘤中没有甲基化表现。这提示了 RASSF1A 基因甲基化参与了乳腺癌的发生和发展,这有助于预测良性乳腺肿瘤发展为乳腺癌的风险,亦提示了乳腺癌早期该基因已发生遗传学改变,可作为乳腺癌早期筛查的指标。Krassenstein 等<sup>[22]</sup>对乳腺癌患者的乳头抽吸液进行 DNA 检测,检测 6 种包括 RASSF1A 在内的甲基化基因,甚至可以发现 I 期乳腺癌。因此,该基因可能在乳腺癌的早期诊断、预后判断中发挥重大作用。

## 2.3 ATM 基因

ATM 基因属于磷酸肌醇激酶-3(phosphoinositide kinase 3, PI3K)基因家族成员,可直接或间接参与 DNA 损伤修复,最初是在共济失调毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia, AT)中发现的<sup>[23]</sup>,被认为是一个肿瘤抑制基因。近年来,学者对 AT 病例流行病学调查发现,女性 AT 患者乳腺癌发病率较高,因此 ATM 基因与乳腺癌的关系受到广泛关注。研究发现,在 30%~50% 的扩散性乳腺肿瘤上皮细胞中,ATM 表达降低或缺失,可能与 ATM 基因启动子区甲基化有关<sup>[24]</sup>。Flanagan

等<sup>[25]</sup>对病理对照组 190 例(双侧乳腺癌和单侧乳腺癌患者)的外周血进行 ATM 基因检测,发现患者血液中 ATM 基因甲基化水平明显高于对照组,提示该基因甲基化与乳腺癌的发生发展相关,对预测患病风险可能有一定的帮助。2012 年,这一结论再次得到证实,Brennan 等<sup>[26]</sup>筛查了 640 位乳腺癌患者和 741 位健康女性(对照组),其中部分患者在确诊乳腺癌之前每 3 年捐献一次血液样本,检测 ATM 基因甲基化水平,发现 ATM 基因高甲基化水平的妇女发生乳腺癌的风险是相对最低水平 ATM 基因甲基化率或者无甲基化妇女的 2 倍。这种风险在 60 岁以上的女性中体现的更加明显。因此他们认为,白细胞内 ATM 基因的甲基化水平可能是乳腺癌发生的一个标志,可提前数年预测乳腺癌的患病风险。

## 2.4 其他相关的甲基化基因

Lui 等<sup>[27]</sup>研究了 173 例浸润性乳腺癌中金属蛋白酶组织抑制因子 3(tissue inhibitor 3 of metalloproteinase, TIMP3)基因的甲基化,发现 20.81% 的样本发生甲基化,正常样本中无该基因甲基化现象,并且基因甲基化与肿瘤分级相关。p16 基因启动子甲基化在肿瘤中较常见,曹新等<sup>[28]</sup>检测 39 例乳腺癌患者,有 11 例发生 p16 甲基化,其中 I 期患者甲基化明显高于 II、III 期患者,提示该基因甲基化在乳腺癌早期存在。结肠腺瘤样息肉(adenomatous polyposis coli, APC)基因是与肿瘤发生发展相关的致癌基因,约 6% 的原发性乳腺癌有 APC 基因突变,而 APC 启动子甲基化频率则达到了 40%<sup>[29]</sup>。如 RASSF1A 基因甲基化情况一样,高风险乳腺癌患者中 APC 甲基化频率(56%)明显高于低风险乳腺癌患者(20%)<sup>[30]</sup>。还有 14-3-3 $\sigma$ <sup>[31]</sup>、Cyclin D2<sup>[32]</sup>、CDH1<sup>[33]</sup>、RAR- $\beta$ <sup>[34]</sup>、GSTP1<sup>[35]</sup>、RUNX3<sup>[36]</sup>等基因,均在乳腺癌中呈现不同程度的甲基化现象,表现出与乳腺癌的发生发展、患病风险等具有明显的相关性。

## 3 甲基化基因在乳腺癌早期诊断中的应用

2001 年,Evron 等<sup>[37]</sup>通过乳腺癌导管洗液细胞研究了 Cyclin D2 和 RAR- $\beta$  启动子的甲基化,除在导管原位癌中检测到特异的基因甲基化外,从一些正常但是以后发展为乳腺癌的妇女中也检测到了基因的异常甲基化,第一次提供了直接证

据表明基因异常甲基化检测可用于无症状个体乳腺癌的筛查。2011 年, Suijkerbuijk 等<sup>[38]</sup>报道一位 32 岁正常女性携带 BRCA1 胚系突变, 后检测基因甲基化情况, 发现检测的 10 个基因中有 3 个发生甲基化, 患者自愿做了乳房切除术, 在切下的右侧乳房发现小的导管原位癌病灶。可见, 血液 DNA 的甲基化检测对乳腺癌早期诊断具有重要意义。目前陆续报道的乳腺癌相关甲基化基因已超过 40 个<sup>[39-40]</sup>, 但目前还未发现能独立预测乳腺癌发生的特异指标, 而且血液中的异常基因来源于肿瘤, 含量相对较少, 单个的基因检测灵敏度和特异性均较低。因此目前对于乳腺癌早期诊断均是多个基因组合筛查, 以期提高检测的灵敏度和特异性。据统计, 2 个标志物组合筛查中, RASSF1A 和 RAR- $\beta$  甲基化的联合检测, 特异性和灵敏度分别为 100%、75%<sup>[41]</sup>, BRCA1 和 RASSF1A 甲基化的联合检测, 特异性和灵敏度分别为 94%、82%<sup>[42]</sup>; 3 个标志物组合筛查中, BRCA1、p16INK4A 及 14-3-3 $\sigma$  联合检测的特异性和灵敏度分别为 100%、71%<sup>[43]</sup>, BRCA1、RASSF1A 及 RAR- $\beta$  联合检测的特异性为和灵敏度分别为 94%、84%<sup>[42]</sup>; 3 个以上的标志物组合筛查灵敏度和特异性相对要好些。Sharma 等<sup>[44]</sup>筛查了 36 例乳腺癌患者, p16INK4A、p14ARF、Cyclin D2 及 Slit2 联合检测, 特异性达到 100%, 灵敏度达到 83%, 且肿瘤和血清情况符合。BRCA1、APC、RAR- $\beta$ 、p16INK4A、DAPK 联合检测的特异性和灵敏度分别为 96% 和 84%。Radpour 等<sup>[35]</sup>以乳腺癌患者的外周血为检测样本, 选择 8 个与细胞周期和 DNA 修复(p16、p21、BRCA1)、侵入和转移(CST6、TIMP3)、信号传导(APC、BIN1)和细胞解毒(GSTP1)相关的基因进行检测, 结果显示灵敏度和特异性均达到 90% 以上。由此可见, 多个甲基化指标联合应用, 可以明显提高乳腺癌的诊断率。但这也不意味着指标越多越好, 具体还需要分析每个基因的敏感性等, 筛选出最佳的组合, 这样才能使得筛查更为准确。

#### 4 结语

在肿瘤发展过程中, 甲基化现象早于明显的恶性表型出现, 可以为肿瘤的早期诊断提供生物学标记。对血浆进行甲基化检测, 具有早期、无创、快捷、灵敏度高等特点, 应用前景广阔。乳腺

癌发病是多个基因参与, 对单个基因筛查不能准确判断具体病情, 因此改进甲基化检测技术, 提高检测准确性的同时, 对乳腺癌相关基因的甲基化谱进行研究, 有利于筛选出高危险性的个体, 为乳腺癌的早期诊断提供敏感特异的标准评估方法。

【关键词】 乳腺肿瘤; DNA 甲基化

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

#### 参考文献

- [1] Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern [J]. *Cancer Epidemiol*, 2009, 33(5): 315-318.
- [2] Helme S, Perry N, Mokbel K. Screening mammography in women aged 40-49: is it time to change? [J]. *Int Semin Surg Oncol*, 2006, 3:4.
- [3] Moss SM, Cuckle H, Evans A, et al. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality at 10 years' follow-up: a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2006, 368(9552): 2053-2060.
- [4] Norman SA, Russell Localio A, Weber AL, et al. Protection of mammography screening against death from breast cancer in women aged 40-64 years [J]. *Cancer Causes Control*, 2007, 18(9): 909-918.
- [5] Novik KL, Nimmrich I, Genc B, et al. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2002, 4(4): 111-128.
- [6] 蔡京伦. 表观遗传学—原理、技术与实践 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 169-179.
- [7] Niehrs C. Active DNA demethylation and DNA repair [J]. *Differentiation*, 2009, 77(1): 1-11.
- [8] Perini G, Tupler R. Altered gene silencing and human diseases [J]. *Clin Genet*, 2006, 69(1): 1-7.
- [9] Schuebel KE, Chen W, Cope L, et al. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer [J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(9): 1709-1723.
- [10] Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(2): 300-305.
- [11] Fang F, Turcan S, Rimmer A, et al. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(75): 75ra25.
- [12] Hoque MO, Prencipe M, Poeta ML, et al. Changes in CpG islands promoter methylation patterns during ductal breast carcinoma progression [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(10): 2694-2700.
- [13] Lewis CM, Cler LR, Bu DW, et al. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 166-172.
- [14] Pasquali L, Bedeir A, Ringquist S, et al. Quantification of CpG island methylation in progressive breast lesions from normal to invasive carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2007, 257(1): 136-144.
- [15] Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset



- familial breast cancer to chromosome 17q21 [J]. Science, 1990, 250(4988): 1684-1689.
- [16] 杨海捷, 王丽, 魏万里, 等. 散发性乳腺癌及乳腺不典型导管增生组织 BRCA1 基因启动子区甲基化分析 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2008, 24(2): 141-145.
- [17] 麻小圆, 鲁英, 杨晓燕, 等. 检测外周血中 BRCA1 基因甲基化水平对乳腺癌的意义 [J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(3): 325-329.
- [18] Al-Moghrabi N, Al-Qasem AJ, Aboussekhra A. Methylation-related mutations in the BRCA1 promoter in peripheral blood cells from cancer-free women [J]. Int J Oncol, 2011, 39(1): 129-135.
- [19] Vincent-Salomon A, Ganem-Elbaz C, Manie E, et al. X inactive-specific transcript RNA coating and genetic instability of the X chromosome in BRCA1 breast tumors [J]. Cancer Res, 2007, 67(11): 5134-5140.
- [20] Sebova K, Zmetakova I, Bella V, et al. RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer [J]. Cancer Biomark, 2012, 10(1): 13-26.
- [21] Lewis CM, Cler LR, Bu DW, et al. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1): 166-172.
- [22] Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1): 28-32.
- [23] Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase [J]. Science, 1995, 268(5218): 1749-1753.
- [24] Hall J. The Ataxia-telangiectasia mutated gene and breast cancer: gene expression profiles and sequence variants [J]. Cancer Lett, 2005, 227(2): 105-114.
- [25] Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(7): 1332-1342.
- [26] Brennan K, Garcias-Closas M, Orr N, et al. Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk [J]. Cancer Res, 2012, 72(9): 2304-2313.
- [27] Lui EL, Loo WT, Zhu L, et al. DNA hypermethylation of TIMP3 gene in invasive breast ductal carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2005, 59 Suppl 2: S363-S365.
- [28] 曹新, 魏钦俊, 姜玉章, 等. 乳腺癌组织中 p16 基因变异及 CpG 岛甲基化状态的研究 [J]. 肿瘤, 2005, 25(4): 366-369.
- [29] Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, et al. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 1998-2004.
- [30] Jerónimo C, Costa I, Martins MC, et al. Detection of gene promoter hypermethylation in fine needle washings from breast lesions [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(9): 3413-3417.
- [31] Martínez-Galán J, Torres B, Del Moral R, et al. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(6): 958-965.
- [32] Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer [J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4366-4371.
- [33] Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer [J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(5): 499-508.
- [34] Matuschek C, Bölke E, Lammering G, et al. Methylated APC and GSTP1 genes in serum DNA correlate with the presence of circulating blood tumor cells and are associated with a more aggressive and advanced breast cancer disease [J]. Eur J Med Res, 2010, 15: 277-286.
- [35] Radpour R, Barekati Z, Kohler C, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16080.
- [36] Tan SH, Ida H, Lau QC, et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3 [J]. Oncol Rep, 2007, 18(5): 1225-1230.
- [37] Evron E, Dooley WC, Umbrecht CB, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR [J]. Lancet, 2001, 357(9265): 1335-1336.
- [38] Suijkerbuijk KP, van Diest PJ, van der Wall E. Improving early breast cancer detection: focus on methylation [J]. Ann Oncol, 2011, 22(1): 24-29.
- [39] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-428.
- [40] Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis [J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5462-5482.
- [41] Shukla S, Mirza S, Sharma G, et al. Detection of RASSF1A and RARBeta hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients [J]. Epigenetics, 2006, 1(2): 88-93.
- [42] Jing F, Yuping W, Yong C, et al. CpG island methylator phenotype of multigene in serum of sporadic breast carcinoma [J]. Tumour Biol, 2010, 31(4): 321-331.
- [43] Jing F, Zhang J, Tao J, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes BRCA1, p16 and 14-3-3 sigma in serum of sporadic breast cancer patients [J]. Onkologie, 2007, 30(1-2): 14-19.
- [44] Sharma G, Mirza S, Prasad CP, et al. Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients [J]. Life Sci, 2007, 80(20): 1873-1881.

(收稿日期: 2013-01-24)

(本文编辑: 刘军兰)