

DNA 甲基化在肺癌发生及预后中作用的研究进展

薛剑超¹, 王亚东¹, 李博文¹, 刘新宇², 梁乃新^{1*}, 李单青¹

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 胸外科, 北京 100730;

2. 北京协和医学院 临床医学八年制 2016 级, 北京 100730

摘要:肺癌是中国发病率和病死率第一的肿瘤,早期复发是预后不良的主要原因。现存的预后指标不足以满足临床需要,亟需寻找可靠的预后指标。DNA 甲基化是肺癌发生发展中最主要的表观遗传学改变,随着高通量测序技术的进展,其稳定易检测的特质在肺癌患者的预后预测中有着极大的临床应用价值。

关键词:肺癌;DNA 甲基化;预后;表观遗传学

中图分类号:R734.2 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.03.514

Research progress on the role of DNA methylation in the occurrence and prognosis of lung cancer

XUE Jianchao¹, WANG Yadong¹, LI Bowen¹, LIU Xinyu², LIANG Naixin^{1*}, LI Shanqing¹

1. Department of Thoracic Surgery, Peking Union Medical College Hospital, CAMS & PUMC, Beijing 100730;

2. Grade 2016, Eight-year Program of Clinical Medicine, PUMC, Beijing 100730, China

Abstract: Lung cancer is a leading cause of cancer-related morbidity and mortality in China. Early recurrence is the main cause of poor prognosis. The existing prognostic indicators are insufficient. Thus, it is urgent to find reliable prognostic indicators. DNA methylation is the most important epigenetic change in the development of lung cancer. With the development of high-throughput sequencing technology, DNA methylation has shown its great clinical value in the prognosis prediction of lung cancer patients due to its stable and detectable features.

Key words: lung cancer; DNA methylation; prognosis; epigenetics

随着全世界的人口增长和老龄化,肺癌(lung cancer)的发病率和病死率在全球范围内快速增长。2020 年报道全球范围内新发肺癌病例约 220 万例,死亡病例达180 万,占总恶性肿瘤诊断病例的 11.4%和其总死亡的 18.0%^[1]。国家癌症中心最新公布的数据显示,2016 年中国新发肺癌病例 82.8 万,病死病例 65.7 万,是中国人群众发病率和病死率最高的恶性肿瘤^[2]。IA~IIIA期非小细胞肺癌患者即使接受根治性

手术切除,仍有很高的复发和死亡风险,5 年生存率从IA1 期 90%骤降至IIIA 期 41%。即使 TNM 同分期的患者之间,5 年生存率也存在很大差异,现有的分期系统不足以预测个体患者的治疗结果和预后。因此,寻找能够对肺癌患者进行复发风险评估的预后标志物,对不同风险的患者采取个性化治疗,将有助于提高肺癌患者的生存率。在过去的 20 年中,越来越多的 DNA 甲基化改变在肺癌中被报道。

DNA 甲基化在肺癌的发生发展过程中扮演着重要的角色,其性质稳定且易于检测,在肺癌的预后预测中有巨大潜力。本文就 DNA 甲基化在肺癌发生及预后方面的相关进展进行总结。

1 DNA 甲基化机制概述

DNA 甲基化是人类认识最早、研究最多的表观遗传学改变,是指由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)以 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)作为甲基供体,与 CpG 二核苷酸中 5'端胞嘧啶以共价键结合。经甲基化修饰后 5'端胞嘧啶在离体状态表现出更强的惰性;在活体状态则表现为基因表达活性降低。DNMTs 主要分为两个家族, DNMT1 家族在 DNA 复制和修复中维持其甲基化;而 DNMT3 家族则催化 CpG 从头甲基化(*de novo* methylation)^[3-4]。

2 DNA 异常甲基化与肺癌的发生

肺癌的发生是一系列的基因组和表观遗传组改变的累积,如抑癌基因的沉默、原癌基因的激活和管家基因的功能异常。表观遗传组改变通常表现为全基因组的 DNA 低甲基化和特定基因的 DNA 高甲基化。一般情况下,原癌基因处于抑制状态, DNA 低甲基化可促使这些原癌基因及其转录因子发生活化,导致基因组的不稳定性和染色体的结构改变,同时基因组中正常沉默区域的转录激活可能导致插入的病毒基因和正常沉默基因(如印记基因和不活跃的 X 染色体上的基因)的表达,最后导致肺癌的发生。同时,抑癌基因的启动子区域会出现异常的高甲基化,导致这部分抑癌基因沉默,使肺癌发生的概率大大增加。

从正常肺组织到原位癌和侵袭性肺癌的过程中,涉及多种基因启动子甲基化的频率和水平增加,如 *p16*、*DAPK*、*MGMT* 和 *RASSF1A* 等。基因 *p16* 负责编码 p16INK4a 和 p14arf, p16INK4a 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,在 G₁/S 期细胞周期停滞中起关键作用。*RASSF1A* 是一个重要的抑癌基因,通过 Ras 信号通路参与肿瘤的发生。*RASSF1A* 启动子的高甲基化通过 *HOXB3* 介导 DNMT3b 表达,导致 *RASSF1A* 基因沉默。Wnt 通路相关拮抗基因 *APC*、*Dkk1*、*DKK3*、*LKB1*、*WIF1*、*RUNX3*

表 1 常见基因的 DNA 甲基化及其在肺癌发生发展中的作用

Table 1 DNA methylation of common genes and its role in the occurrence and development of lung cancer

甲基化改变	基因	作用	肿瘤类型
高甲基化	<i>p16</i>	调控细胞周期	NSCLC
	<i>RASSF1A</i>	参与 Ras 信号通路传导	NSCLC, SCLC
	<i>APC</i>	参与 Wnt/ β -catenin 信号通路	NSCLC, SCLC
	<i>TGFBR2</i>	抑制上皮细胞增殖	NSCLC
	<i>DAPK</i>	诱导细胞凋亡;自噬作用	NSCLC, SCLC
	<i>MGMT</i>	参与 DNA 修复	NSCLC
	<i>FHIT</i>	调节细胞增殖;诱导细胞凋亡	NSCLC
低甲基化	<i>MAGE</i>	原癌基因;调控转录	NSCLC
	<i>SNCG</i>	促进细胞迁移和侵袭	NSCLC, SCLC
	<i>GPC5</i>	促进细胞增殖和迁移	NSCLC

NSCLC. 非小细胞肺癌; SCLC. 小细胞肺癌。

和 *SFRP1/2/4/5* 通过 DNA 高甲基化被沉默,从而促进 Wnt 信号通路的功能,导致肿瘤的发生, *APC* 甲基化发生率在非小细胞肺癌中高达 94%,而在正常组织对照组中为 20%。*TGFBR2* 是上皮细胞增殖的主要抑制因子,它的异常甲基化与非小细胞肺癌中 *TGFBR2* 在转录水平的表达下调有关。启动子高甲基化是 *FHIT* 表达缺失的主要机制,在癌前病变中即可检测到, *FHIT* 缺失促进肺癌细胞获得过度增殖、抗凋亡、侵袭性和上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等表型^[5-6]。

肺癌相关基因调控区域的低甲基化可导致其转录活性增加,从而促进肿瘤的发生^[7]。70%-85%的非小细胞肺癌中发现 *MAGE* 的异常激活,这一现象与低甲基化有关, *MAGE* 的过表达与肺癌的发生和转移有关,是预后不良的危险因素。编码 γ -突触核蛋白的 *SNCG* 的低甲基化与肺癌的进展和转移相关。在 NSCLC 中 *GPC5* 的低甲基化程度比正常肺组织明显增高,导致表达激活,促进肺癌细胞的增殖迁移,与不良的预后相关^[6]。

在肺癌的发生过程中,低甲基化和高甲基化途径之间存在相互作用。DNA 低甲基化可能是正常细胞的一种表观遗传修复,试图代偿与肿瘤抑制基因或靶基因启动子的 CpG 岛的异常甲基化。但是

相较于传统的 DNA 修复途径,这种表观遗传修复途径并不精准有效,可能除修复异常甲基化的 CpG 岛外,还会对更多的 DNA 序列进行去甲基化。DNA 低甲基化发生在肺癌的早期,随后导致高甲基化的发生,这可能是基因组低甲基化导致的一种代偿性的高甲基化^[8-9]。

3 DNA 甲基化在肺癌预后方面的应用

3.1 现有的肺癌预后预测指标

目前临床主要根据肺癌的病理亚型、淋巴结侵犯和转移等来粗略判断患者的预后,但因缺乏特异性,即使是相同分期的患者预后差异也较大,预测效力差。其他方式如 PET/CT 的标准摄取值 (standard uptake value, SUV) 等也被证明是肺癌预后的独立风险因素,但其价格高昂、对患者有辐射损伤,无法多次、长期预测。分子标志物可以提供病理分期之外的预后预测信息,已有许多研究对非小细胞肺癌预后预测因子进行探索:1) DNA 层面:已有数种基于多基因组组合的预测标志物,可以区分不同肺癌患者组的复发风险。血液中循环肿瘤细胞 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 的检出与复发相关。2) RNA 层面:MicroRNA (miRNA) 通过靶向作用于癌基因或肿瘤抑制基因,参与调节肿瘤的增殖、侵袭和转移过程,miRNA 多个位点改变与患者术后复发及总生存率相关。3) 蛋白质层面:CHRNA 蛋白阳性表达与患者更短的中位无复发生存期 (recurrence-free survival, RFS) 和总生存期 (overall survival, OS) 相关。神经加压素受体符合物具有促进 NSCLC 细胞增殖和迁移的能力,与更差的预后相关。尽管有大量涉及 NSCLC 预后预测因子的研究,但其预测价值和临床转化潜力仍存在较大争议,真正走向应用仍需更全面的验证。

3.2 DNA 甲基化在肺癌预后方面的研究进展

DNA 甲基化稳定且易于在组织或体液中检测,并且随着高通量的表观遗传学筛选及检测技术的发展,DNA 甲基化改变作为肺癌预后的分子标志物有着巨大的潜力。既往多项研究发现肺癌组织中许多抑癌基因的异常甲基化与较差的预后有关:在对 163 例受试者 (包括 30 例 I 期,29 例 II 期,26 例 III 期和 68 例 IV 期肺癌患者) 血浆中异常甲基化的 *SHOX2* 水平进行检测,发现肺癌大小与血浆

mSHOX2 水平之间存在线性关系。根据治疗反应将患者分为部分缓解 (partial response, PR) 组和疾病稳定 (stable disease, SD) 组后,发现 *mSHOX2* 水平的变化是治疗是否有效的敏感标志物。通过对 31 位患者进行 871 d 的随访后,发现治疗前 *mSHOX2* 水平低的患者比治疗前 *mSHOX2* 高的患者具有更好的生存率水平,表明治疗前血浆 *mSHOX2* 水平是患者长期生存的预测因素^[10]。转化生长因子 β 诱导蛋白 (TGFB1) 是一种分泌的细胞外基质成分,在肿瘤生长和转移中起着至关重要的作用。通过检测 138 例 NSCLC 患者的肿瘤组织中转化生长因子- β -诱导蛋白 (TGFB1) 基因启动子区域的甲基化状态,发现在淋巴结转移患者的 TGFB1 甲基化频率高于无转移患者,其发生率具有临床意义,同时在肺腺癌患者中, TGFB1 甲基化与较差的 OS 显著相关^[11]。在 I 期肺癌患者中,跨膜蛋白酶丝氨酸 4 (*TPRSS4*) 基因启动子低甲基化引起的蛋白高表达,与更差的预后显著相关^[12]。*TPRSS4* 在实体瘤中 (包括肺癌) 被高度上调,促进癌细胞的增殖和转移扩散。*TPRSS4* 是 NSCLC 的独立预后标志物,尤其是在非常早期的阶段就可以显著区分高复发风险的患者。研究者们发现,在 107 例非小细胞肺癌患者中,与正常组织配对的肺癌组织相比,肺癌组织中 *FBP1* 启动子的甲基化率显著较高,同时高分化的肿瘤的 *FBP1* 甲基化水平在统计学上显著较低;肺癌组织中 *FBP1* 的甲基化程度较低与肺癌患者的总体生存期有关, *FBP1* 启动子的甲基化水平有可能作为新的预后指标^[13];在一项对 155 例肺癌患者和 50 例非肿瘤患者的研究中,发现 *TMEM196* 高甲基化患者的生存率明显低于肺癌基因组图谱中低水平患者,多变量模型显示 *TMEM196* 甲基化是肺癌的独立预后指标^[14];在对 142 例接受免疫治疗的患者的回顾性研究中,发现 *FOXP1* 基因的甲基化状态与患者是否能通过 PD-1 抑制剂治疗得到临床获益相关, *FOXP1* 基因甲基化有巨大的预后预测价值,但仍需要通过前瞻性的研究来确定^[15];通过对 13 项研究共 1 056 例患者进行的 Meta 分析显示,肺癌组织的 *hMLH1* 甲基化率与正常肺组织相比明显较高。晚期阶段的 *hMLH1* 基因甲基化水平较高,具有 *hMLH1* 基因甲基化的 NSCLC 患者预后较差^[16]。

随着高通量测序技术的发展,越来越多的研究通过组合不同位点基因的甲基化,提高 DNA 甲基化预测肺癌预后的效能。使用高通量 450 k 芯片 DNA 甲基化分析,检测了 444 例非小细胞肺癌患者组织及 25 例癌旁组织的甲基化水平,发现 5 个基因(包括 *HIST1H4F*、*NPBWR1*、*PCDHGB6*、*ALX1* 和 *HOXA9*)的高甲基化与 I 期非小细胞肺癌无复发生存期缩短显著相关,因此完善了预后评估^[17]。在对 51 例接受根治性切除但在 40 个月内复发的 I 期 NSCLC 患者与 116 例接受根治性切除且 40 个月内无复发的患者进行差异性分析,发现 I 期 NSCLC 患者中 4 个基因(*p16*、*CDH13*、*APC* 和 *RASSF1A*)启动子区甲基化与早期复发相关^[18]。

此外,有多项研究基于对公共肿瘤数据库的挖掘分析,筛选出不同的甲基化位点组合,进一步完善肺癌患者的预后预测。以 TCGA 数据库中 370 份肺鳞癌和 42 份健康 DNA 为样本,发现低甲基化和高表达水平为特征的 *PMPCAP1* 和 *SOWAHC* 与肺鳞癌患者的预后不良有关,而以高甲基化和低表达水平为特征的 *ZNF454* 与较好的预后相关^[19]。基于对 475 例肺腺癌组织及 32 例癌旁组织进行的差异甲基化分析,构建的以 *CCDC181*、*PLAU*、*SIPRI*、*ELF3* 和 *KLHDC9* 的 5 个基因甲基化水平的风向预测模型,可将患者分为高风险组和低风险组^[20]。通过 GEO 数据库分析特发性纤维化与肺癌的差异表达基因,发现高补体蛋白 C1q 基因是特发性纤维化与肺癌的共驱基

因,C1q 的低甲基化水平与肺癌患者的不良预后相关^[21]。使用 LASSO Cox 回归模型对 TCGA 数据库中 446 例非小细胞肺癌患者进行分析,筛选出 16 个 CpG 位点与患者预后显著相关,该模型的 ROC > 0.7,预测效力较强^[22]。在 TCGA 和 GEO 数据库中,采用机器学习算法筛选出 4 个预测复发风险的甲基化位点(*cg0.0253681/ART4*、*cg0.0111503/KCNK9*、*cg0.27156.29/FAM83A*、*cg0.3282991/C6orf10*),构建预测 NSCLC 患者无复发生存和预后的风险评分模型,并进一步探讨 DNA 甲基化与免疫治疗相关反应性的关系^[23]。

4 问题与展望

近 20 多年来,表观遗传学领域的研究蓬勃发展。表观遗传改变在肺癌发生和发展中的作用的已经逐步加深。尽管有许多学者投入研究并发表了约 14 000 篇论文,但最后具有临床转化价值的生物标志物却寥寥无几^[24]。迄今仍有许多问题亟待解决:如 DNA 甲基化的检测方法众多,但均存在局限性,难以在临床工作中普及;绝大多数研究均为回顾性分析,发现的甲基化位点尚缺乏前瞻性的临床验证。但是,随着高通量技术的高速发展,越来越多的组织 DNA 甲基化标志物被发现且应用于肺癌患者的预后预测之中。同时,随着液体活检技术的兴起,无创性监测肺癌患者 DNA 甲基化标志物的动态变化成为可能。DNA 甲基化有望在将来成为 NSCLC 预后预测的有效工具。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71: 209-249.
- [2] Zheng R, Zhang S, Zeng H, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. JNCC, 2022, 2: 1-9.
- [3] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. Genes Dev, 2002, 16: 6-21.
- [4] Brzezińska E, Dutkowska A, Antczak A. The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40: 309-325.
- [5] Shi YX, Sheng DQ, Cheng L, *et al.* Current landscape of epigenetics in lung cancer: focus on the mechanism and application[J]. J Oncol, 2019. doi: 10.1155/2019/8107318.
- [6] Hoang PH, Landi MT. DNA methylation in lung cancer: mechanisms and associations with histological subtypes, molecular alterations, and major epidemiological factors[J]. Cancers (Basel), 2022, 14: 961. doi: 10.3390/cancers14040961.
- [7] Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little[J]. Oncogene, 2002, 21: 5400-5413.

- [8] Soozangar N, Sadeghi MR, Jeddi F, *et al.* Comparison of genome-wide analysis techniques to DNA methylation analysis in human cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 3968-3981.
- [9] Duruisseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 116-128.
- [10] Peng X, Liu X, Xu L, *et al.* The mSHOX2 is capable of assessing the therapeutic effect and predicting the prognosis of stage IV lung cancer[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11: 2458-2469.
- [11] Seok Y, Lee WK, Park JY, *et al.* TGFBI promoter methylation is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma patients[J]. *Mol Cells*, 2019, 42: 161-165.
- [12] Villalba M, Exposito F, Pajares MJ, *et al.* TMRSS4: a novel tumor prognostic indicator for the stratification of stage IA tumors and a liquid biopsy biomarker for NSCLC patients[J]. *J Clin Med*, 2019, 8: 2134. doi: 10.3390/jcm8122134.
- [13] Dong Y, Huaying S, Danying W, *et al.* Significance of methylation of FBP1 gene in non-small cell lung cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2018. doi: 10.1155/2018/3726091.
- [14] Liu WB, Han F, Huang YS, *et al.* TMEM196 hypermethylation as a novel diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58: 474-487.
- [15] Duruisseaux M, Martínez-Cardús A, Calleja-Cervantes ME, *et al.* Epigenetic prediction of response to anti-PD-1 treatment in non-small-cell lung cancer: a multicentre, retrospective analysis[J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6: 771-781.
- [16] Han Y, Shi K, Zhou SJ, *et al.* The clinicopathological significance of hMLH1 hypermethylation in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and literature review[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 5081-5090.
- [17] Sandoval J, Mendez-Gonzalez J, Nadal E, *et al.* A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 4140-4147.
- [18] Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, *et al.* DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358: 1118-1128.
- [19] Zhu Q, Wang J, Zhang Q, *et al.* Methylation driven genes PMPCAP1, SOWAHC and ZNF454 as potential prognostic biomarkers in lung squamous cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21: 1285-1295.
- [20] Gao C, Zhuang J, Li H, *et al.* Exploration of methylation-driven genes for monitoring and prognosis of patients with lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 194. doi: 10.1186/s12935-018-0691-z.
- [21] Kou W, Li B, Shi Y, *et al.* High complement protein C1q levels in pulmonary fibrosis and non-small cell lung cancer associated with poor prognosis[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22: 110. doi: 10.1186/s12885-021-08912-3.
- [22] Wang Y, Deng H, Xin S, *et al.* Prognostic and predictive value of three DNA methylation signatures in lung adenocarcinoma[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 349. doi: 10.3389/fgene.2019.00349.
- [23] Luo R, Song J, Xiao X, *et al.* Identifying CpG methylation signature as a promising biomarker for recurrence and immunotherapy in non-small-cell lung carcinoma[J]. *Aging (Albany N Y)*, 2020, 12: 14649-14676.
- [24] Koch A, Joosten SC, Feng Z, *et al.* Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15: 459-466.