

舌黏膜癌变基因组甲基化分析

刘华¹ 岳万远¹ 邵帅¹ 孙家平¹ 杨莹² 代晓明³

1. 云南大学附属医院口腔颌面外科, 昆明 650021;

2. 昆明医科大学第一附属医院病理科, 昆明 650031;

3. 昆明医科大学第一附属医院整形外科颌面组, 昆明 650031

[摘要] 目的 研究舌黏膜癌变过程中基因组甲基化特征, 探讨舌癌中DNA甲基化的规律。方法 用50 mg/L的4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)饮水诱导C57BL/6J小鼠舌黏膜癌变, 分别取第0、12、28周的舌黏膜(分别代表正常、癌前病变和癌变)进行基因芯片检测和甲基化DNA免疫沉淀测序(MeDIP-Seq), 在人舌黏膜组织和人舌癌细胞系中, 用实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和飞行质谱检测验证转化生长因子β信号蛋白1(SMAD1)的表达和启动子的甲基化。结果 28周较12周和0周舌黏膜的胞嘧啶鸟嘌呤岛(CGI)甲基化水平均升高, 12周时启动子甲基化水平高于0周。在0、12和28周期间, 208个差异表达基因与启动子中的差异甲基化呈负相关。与正常黏膜相比, 细胞系中SMAD1的mRNA上调, 同时启动子甲基化水平降低。结论 舌黏膜癌变中伴随DNA甲基化修饰异常, 舌癌中SMAD1高表达伴启动子低甲基化。

[关键词] 舌癌; 发病机制; 甲基化; 动物模型; 甲基化DNA免疫沉淀测序; 差异表达基因

[中图分类号] R739.86 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023416



本文链接 开放科学标识码

Global analysis of DNA methylation changes during experimented lingual carcinogenesis

Liu Hua¹, Yue Wanyuan¹, Shao Shuai¹, Sun Jiaping¹, Yang Ying², Dai Xiaoming³

1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming 650021, China; 2. Dept. of Pathology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, China; 3. Maxillofacial Service of Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, China

Supported by: Joint Special Project of KUM by Yunnan Provincial Science and Technology Department [202001AY07-0001-253, 2018FE001(-216)]

Correspondence: Liu Hua, E-mail: liu-eileen@163.com

[Abstract] **Objective** This study aims to assess the role of DNA methylation changes in tongue cancer through a comprehensive analysis of global DNA methylation alterations during experimental lingual carcinogenesis. **Methods** C57BL/6J mice were subjected to 16-week oral administration of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO, 50 mg/L). Lingual mucosa samples, being representative of normal tissue (week 0) and early (week 12) and advanced (week 28) tumorigenesis, were harvested for microarray and methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-Seq). The mRNA and promoter methylation of transforming growth factor-beta-signaling protein 1 (SMAD1) were evaluated with real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and Massarray in human lingual mucosa and tongue cancer cell lines. **Results** The cytosine guanine island (CGI) methylation level observed at 28 weeks surpassed that of

both 12 weeks and 0 weeks. The promoter methylation level at 12 weeks exceeded that at 0 weeks. Notably, 208 differentially expressed genes were negatively correlated to differential methylation in promoters among 0, 12, and 28 weeks. The mRNA of SMAD1 was upregulated, con-

[收稿日期] 2023-12-01; **[修回日期]** 2024-04-05

[基金项目] 云南省科技厅-昆医联合专项 [202001AY070001-253, 2018FE001 (-216)]

[作者简介] 刘华, 副主任医师, 博士, E-mail: liu-eileen@163.com

[通信作者] 刘华, 副主任医师, 博士, E-mail: liu-eileen@163.com

current with a decrease in promoter methylation levels in cell lines compared to normal mucosa. **Conclusion** DNA methylation changed during lingual carcinogenesis. Overexpression of SMAD1 was correlated to promoter hypomethylation in tongue cancer cell lines.

[Key words] tongue cancer; pathogenesis; methylation; animal model; methylated DNA immunoprecipitation sequencing; differentially expressed genes

2019年全世界超过37万例口腔和唇癌新病例被确诊,病例数在恶性肿瘤中排第13位^[1],舌部是口腔癌高发部位^[2]。因解剖屏障薄弱、丰富的淋巴引流和对侧扩散等因素,舌癌的局部控制较其他口腔癌困难。为提高舌癌疗效,必须寻找可靠的治疗靶点。

本研究用4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 4NQO)诱导C57BL/6小鼠舌黏膜发生癌变,实验的12周和28周可作为研究舌黏膜癌变的早期和中晚期的时间点^[3]。哺乳动物DNA中胞嘧啶鸟嘌呤(cytosine guanine, CpG)二核酸的胞嘧啶环C5共价连接甲基基团形成5-甲基胞嘧啶,该甲基化修饰在基因组中广泛存在,抑制基因表达。基因启动子区DNA甲基化会抑制相关基因的表达,在肿瘤发生过程中,甲基化的异常与抑癌基因和癌基因的表达异常相关^[4]。Towle等^[5]用患者正常黏膜、异常增生和肿瘤标本研究口腔癌中不同阶段病变的DNA甲基化变化,发现口腔癌中多个基因存在甲基化异常,这些基因在无翼型小鼠乳腺癌病毒整合位点家族成员(wingless-type MMTV integration site family member, WNT)和微管相关蛋白激酶激活蛋白激酶(microtubule-associated protein kinase-activated protein kinase, MAPK)信号通路中富集。Lai等^[6]应用4NQO及槟榔碱诱导小鼠发生舌癌,用非商业化的鼠胞嘧啶鸟嘌呤岛(cytosine guanine island, CGI)芯片检测后,发现了34个高甲基化的基因。转化生长因子β1(transforming growth factor-beta-signaling protein 1, SMAD1)是转录调节因子,参与转化生长因子-β信号通路、肿瘤异常转录、Hippo信号通路,在发育、分化和组织稳态中发挥重要作用^[7]。

本实验对舌黏膜癌变过程中的不同组织,采用检测通量更高的甲基化DNA免疫沉淀测序(methylated DNA immunoprecipitation sequencing, MeDIP-Seq)技术来检测DNA甲基化的变化,以探讨DNA甲基化在舌癌发病机制中的作用。前期研究^[8]发现,SMAD1是舌癌发病的核心基因之一,SMAD1表达在癌变黏膜较正常黏膜中升高,且

其启动子区甲基化水平降低。为验证上述结果,本研究在临床正常舌黏膜和舌癌细胞系中检测了SMAD1的mRNA表达和启动子区甲基化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

25只雌性C57BL/6小鼠,无特定病原体动物(specific pathogen free, SPF)级,体质量为18~20 g,鼠龄30~50 d,购自广东省医学实验动物中心。

1.2 舌黏膜组织及细胞系

人正常舌黏膜组织3例,其中2例来自舌炎性溃疡活检取材组织,1例来自外伤后外离体舌黏膜,男女比2:1,取自云南大学附属医院口腔颌面外科和昆明医科大学第一附属医院整形外科。舌癌细胞系CAL27、UCSF-OT-1109、SCC-9购自美国典型培养物保藏中心。

1.3 实验试剂及设备

4NQO(Sigma公司,美国),用1,2丙二醇配置成500 mg/L,避光保存于4℃冰箱备用。1,2丙二醇分析纯(汕头市西陇化工股份有限公司),光学显微镜(Nikon公司,日本),TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国),小鼠全基因组芯片、GeneSpring GX软件包(Agilent公司,美国),凯杰DNA提取试剂盒、绿色荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)混合液(Qiagen公司,德国),基因组DNA样本试剂盒、HiSeq 2000测序仪(Illumina公司,美国),Bioruptor超声波粉碎仪、抗5-甲基胞嘧啶抗体(Diagenode公司,美国),NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific公司,美国),GeneAmp® PCR仪(Applied Biosystems公司,美国),LightCycler®480 II实时荧光定量PCR仪、384孔光学板(Roche公司,瑞士),低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),核酸自动提取仪(北京百泰克生物技术有限公司),ABI veriti-384型实时定量PCR仪(ABI公司,美国),384-well SpectroCHIP® bioarray芯片、MassARRAY Nanodispenser RS 1000型点

样机、MassARRAY Analyzer 4.0 质谱仪、EpiTYPER™ 试剂盒、MassARRAY EpiTYPER™ 软件 (Agena 公司, 美国), NaHSO₃ (Zymo 公司, 美国)。

1.4 小鼠舌癌诱导

将 25 只 C57BL/6 小鼠分为 3 组: 蒸馏水对照组 ($n=5$), 1,2 丙二醇对照组 ($n=5$), 实验组 ($n=15$), 实验组用蒸馏水稀释 1,2 丙二醇配置的 4N-QO 至终浓度 50 mg/L 作为饮用水, 供自由饮用至 16 周, 16 周后换为蒸馏水继续喂养, 参考文献[3] 建立小鼠舌癌模型, 在饲养 0、12、28 周分别处死实验组动物各 5 只。对照组均于 28 周处死所有小鼠, 苏木精-伊红染色后镜下观察所有小鼠舌黏膜细胞形态, 观察舌癌诱导结果。

1.5 小鼠舌癌黏膜的基因芯片检测和 MeDIP-Seq

实验组 0、12、28 周处死小鼠各 3 只, 取舌黏膜样品共 9 份, TRIzol 试剂提取总 RNA, 1 μg 总 RNA 扩增标记后与小鼠全基因组芯片杂交。结果经软件处理, 在 9 个样本的至少 6 个样本中被检测到的基因进行下一步分析, 差异表达基因定义为基因表达在两组间差异为 2 倍 ($\log_2 \geq 2.0$) 并且 $P \leq 0.05$ 。将基因芯片检测结果上传基因表达综合 (gene expression omnibus, GEO) 数据库 (GSE101469) 进行聚类分析。

同时在 0、12、28 周时取这 3 只小鼠的舌黏膜样品共 9 份, 检测舌黏膜 CGI、基因启动子区和基因体 DNA 的甲基化情况。按以下步骤进行: Qiagen Dneasy 试剂盒提取纯化基因组 DNA, 超声破碎仪将 DNA 分解为 200~900 bp 片段。根据 Genomic DNA Sample 试剂盒操作, 将 DNA 片段接上接头。连接接头的 DNA 片段与抗-5 甲基胞嘧啶的抗体进行免疫沉淀, 测序。甲基化评估用甲基化 DNA 免疫沉淀评分 (methylated DNA immunoprecipitation score, MeDIP-score) 的均数 \pm 标准差表示, 定义为每千个碱基对扩展读数的值, MeDIP-score 小于 4.19 定义为未甲基化, 介于 4.19~41.01 定义为部分甲基化, 大于 41.01 为甲基化, 不同区域的评分倍数变化 ≥ 1.5 并且 $P \leq 0.05$ 认为甲基化修饰存在差异。将以上 MeDIP-Seq 结果上传 GEO 数据库 (GSE102488) 进行聚类分析。启动子区根据 CpG 密度分为高、中、低 CpG 密度启动子。高 CpG 密度启动子是指在 -700~200 bp 的 DNA 区间包含 500 bp 的片段, 此片段 (G+C) 占比 ≥ 0.55 , CpG 的观察/预期比率 ≥ 0.6 ; 低 CpG 密度启动子是指在 -700~200 bp 的 DNA 区间没有 500 bp 的片段, 其 CpG 的观察/预期比率 ≥ 0.4 。中 CpG 密度启动子

是指不能被归入上述两类的启动子。

1.6 人正常舌黏膜和舌癌细胞系中 SMAD1 mRNA 表达和启动子区甲基化飞行质谱检测

在人正常舌黏膜和舌癌细胞系 CAL27、UCSF-OT-1109 和 SCC-9 中检测 SMAD1 mRNA 的表达。操作步骤如下: TRIzol 试剂提取总 RNA, 定量采用两步法 (逆转录和聚合酶链反应)。逆转录体系包括 0.5 μg RNA, 2 μL 的基因组 DNA 去除混合液, 加无核酸酶的蒸馏水至 8 μL , 在 GeneAmp® PCR 仪中 42 °C 反应 2 min; 第二步加入 2 μL 的 5 \times HiScript® II Q RT SuperMix II a 依照下述条件继续进行: 25 °C 10 min、50 °C 30 min、85 °C 5 min。产物用无核酸酶的蒸馏水稀释 10 倍-20 °C 保存。实时 PCR 在 LightCycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 仪中进行, 反应体系包括: 1 μL 的互补 DNA (complementary DNA, cDNA), 5 μL 的绿色荧光定量 PCR 混合液, 正、反向引物各 0.2 μL , 3.6 μL 无核酸酶的蒸馏水; 反应条件: 95 °C 5 min, 随后 40 个循环 95 °C 10 s, 60 °C 30 s。每 1 个样本重复 3 次。每次反应后, 分析溶解曲线确定目的 PCR 产物的产生。SMAD1 引物: 正向 CAACCAAGAGT-TTGCTCAGCTA, 反向 TTCACGAAGCTCATCC-GAAT。mRNA 表达量与内参三磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 标准化, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。将正常黏膜 SMAD1 表达设定为 1, 舌癌细胞表达量大于 1 为高表达, 反之则低表达。

飞行质谱检测人正常舌黏膜和舌癌细胞系 CAL27、UCSF-OT-1109 和 SCC-9 中 SMAD1 启动子区甲基化, 操作步骤如下。根据 SMAD1 序列用 Epi-Designer 软件进行引物设计: 正向 AGGTTTTGG-AATTTGATTGGTAGTT, 反向 CCCCTAAACTA-ATCCCTATCCC。Qiagen Dneasy 试剂盒提取纯化基因组 DNA, NaHSO₃ 处理待检测 DNA 样品, 低速短暂离心备用。PCR 反应体系: ddH₂O 4.90 μL , 10 \times PCR 缓冲液 0.80 μL , 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) 0.80 μL , PCR 酶 0.10 μL , 正向引物反向引物各 0.20 μL , DNA 模板 1.00 μL 。按以下条件: 94 °C 4 min, 之后 45 个循环 94 °C 20 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min。随后 72 °C 3 min, 4 °C 储存。虾碱性磷酸酶 (shrimp alkaline phosphatase, SAP) 反应体系如下: 无核酸酶的蒸馏水 1.70 μL , SAP 酶 0.30 μL , PCR 产物 5.00 μL 。384 孔反应板的每个孔中加入 7 μL SAP 反应液, SAP 反应程序如下: 37 °C 20 min,

85 °C 5 min, 4 °C 储存。T 切/核酸酶 A 消化反应体系如下: 无核酸酶的蒸馏水 3.21 μL , 5 倍 T7 聚合酶缓冲液 0.89 μL , T Cleavage Mix 0.22 μL , 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 0.22 μL , T7 RNA & DNA 聚合酶 0.40 μL , 核酸酶 A 0.06 μL , PCR/SAP 混合物 2.00 μL 。37 °C 孵育 3 h。在 384 孔 6 mg 浅板里均匀填充树脂并放置 10 min 使其晾干, 向 384 孔板的每个孔中加 16 μL 水, 将 384 孔板轻扣在 Dimple 板上, 翻转后轻敲使树脂落入样本板的每个孔中, 将 384 孔板用封口膜密封后置于翻板离心机中室温旋转混匀 30 min。飞行质谱 Nanodispenser RS 1000 型点样仪将纯化后的产物移至 384 孔 SpectroCHIP 芯片上, 将点样后的芯片使用基质辅助激光解吸电离-飞行时间 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 质

谱仪分析, 检测结果使用 EpiTYPER™ 软件获取原始数据和圆点图。

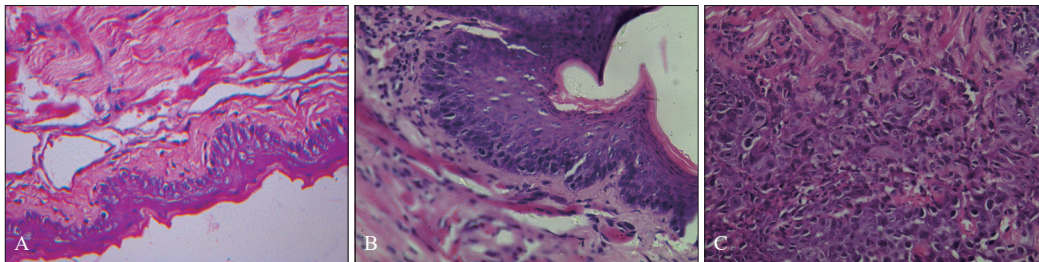
1.7 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 数据进行 u 检验。

2 结果

2.1 4NQO 诱导结果

用 4NQO 诱导了小鼠 12、28 周时, 舌黏膜出现了不典型增生和鳞癌变化 (图 1)。正常黏膜为复层角化上皮, 表面为角化层, 细胞排列规则, 基底膜连续。12 周时上皮层次紊乱, 细胞核浓染, 细胞多行性。28 周时可见鳞状上皮增生, 侵入肌肉组织, 癌细胞呈团块或条索状排列。



A: 0 周; B: 12 周; C: 28 周。

图 1 4NQO 诱导 C57BL/6 小鼠舌黏膜癌变 苏木精-伊红染色 $\times 200$

Fig 1 Lingual carcinogenesis in C57BL/6 mice by 4NQO hematoxylin and eosin staining $\times 200$

2.2 小鼠舌癌黏膜基因芯片检测和 MeDIP-Seq 结果

聚类分析结果表明, 饲养 0、12、28 周小鼠舌黏膜组织甲基化展现出不同的类型, 三者间展示了不同的甲基化的方式 (图 2)。MeDIP-Seq 共检测到 16 023 个 CGI, 基因内岛 1 474 个, 启动子岛 11 220 个, 基因间岛 3 315 个 (图 3)。饲养 0、12、28 周时, 小鼠舌黏膜 CGI 的 MeDIP-score 的均值 \pm 标准差分别为 11.57 \pm 38.18、11.76 \pm 35.38、12.67 \pm 45.60。28 周较 0、12 周时 CGI 的 MeDIP-score 升高, 差异有统计学意义 (28 周对比 0 周, $\mu=2.34$, $P<0.02$; 28 周对比 12 周, $\mu=1.995 6$, $P<0.05$)。12 周较 0 周 CGI 的 MeDIP-score 的差别无统计学意义 ($\mu=0.462 3$, $P>0.50$) (图 4)。

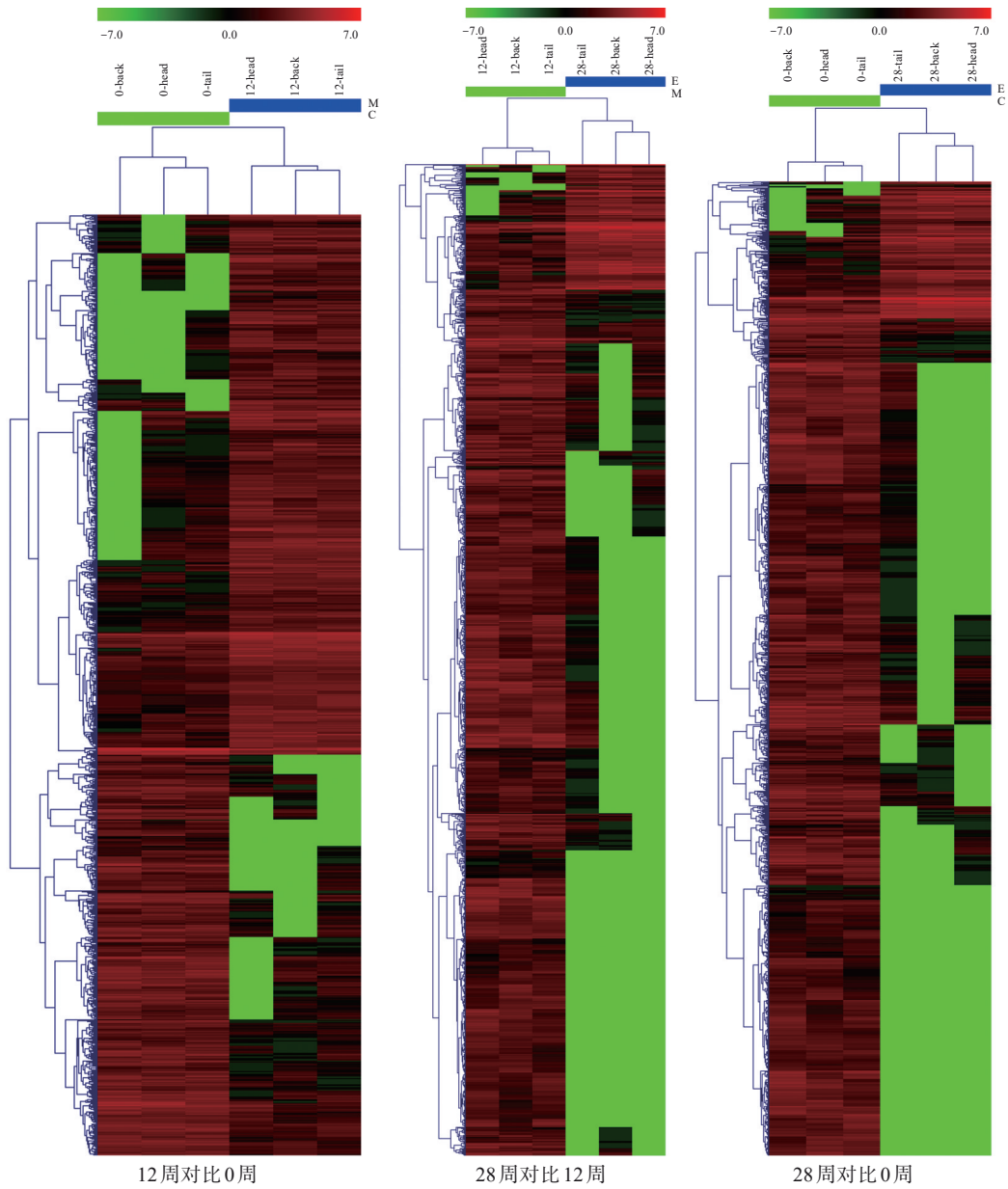
本研究检测到了小鼠 26 601 个启动子的甲基化 (图 5), 其中高、低和中 CpG 密度启动子分别为 9 581、6 005 和 11 015 个。饲养 0、12、28 周时, 小鼠舌黏膜 DNA 启动子 MeDIP-score 的均值 \pm 标准差分别为 5.32 \pm 16.98、5.65 \pm 15.65、5.37 \pm 17.52, 12 周较 0 周启动子的 MeDIP-score 升高, 差异有统计学意义 ($\mu=2.3451$, $P<0.02$) (图 6)。

本研究检测到小鼠舌黏膜 21 625 个基因体甲基化, 高、低和中 CpG 密度基因体分别为 8 852、5 278 和 7 495。饲养 0、12、28 周时小鼠舌黏膜 DNA 基因体的 MeDIP-score 分别为 5.58 \pm 14.80、5.79 \pm 13.35、5.83 \pm 17.25, 三者间差异无统计学意义。

12 周比 0 周 74 个基因上调, 其启动子区甲基化降低; 17 个基因下调, 其启动子区甲基化升高。28 周比 0 周 66 个基因上调, 其启动子区甲基化降低; 3 个基因下调, 其启动子区甲基化升高。28 周比 12 周 43 个基因上调, 其启动子区甲基化降低; 5 个基因下调, 其启动子区甲基化升高 (表 1)。

2.3 人正常舌黏膜和舌癌细胞系中 SMAD1 mRNA 表达和启动子区甲基化飞行质谱检测结果

与正常舌黏膜 (SMAD1 的 mRNA 表达量为 1) 相比, 舌癌细胞系中 SMAD1 的 mRNA 表达为 2.69 (图 7)。正常黏膜和舌癌细胞启动子区甲基化飞行质谱检测结果显示, 其甲基化程度分别为 0.082 1 \pm 0.089 4 和 0.055 5 \pm 0.080 0 (图 8), 二者间差异存在统计学意义 ($\mu=2.66$, $P<0.01$) (图 9)。



饲养0、12、28周小鼠舌黏膜各3个标本的CGI甲基化进行两两比较,标本名称显示在图上方;红色为高甲基化,绿色为低甲基化。

图2 饲养0、12、28周9个舌黏膜样本中16 023个CGI甲基化聚类分析结果

Fig 2 Methylation patterns of nine samples fed at the 0, 12, and 28 weeks that were analyzed using hierarchical clustering of results from 16 023 CGI

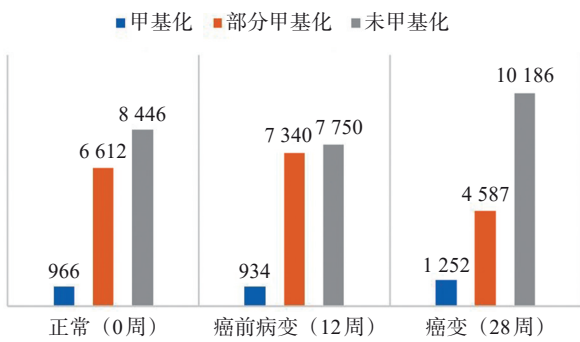


图3 舌癌黏膜癌变CGI甲基化构成

Fig 3 Numbers of methylated, partially methylated and unmethylated CGI

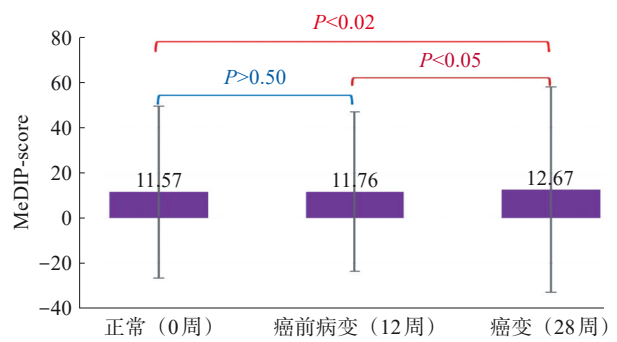


图4 饲养0、12和28周小鼠舌黏膜DNA CGI的MeDIP-score

Fig 4 MeDIP-score of CGIs among mucosal DNA of mice fed at the 0, 12 and 28 weeks

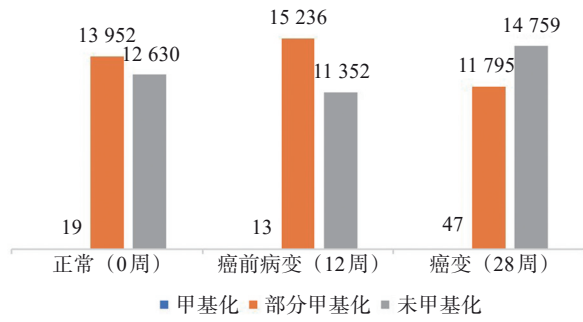


图 5 舌黏膜癌变启动子区甲基化构成

Fig 5 Numbers of methylated, partially methylated and unmethylated promoters

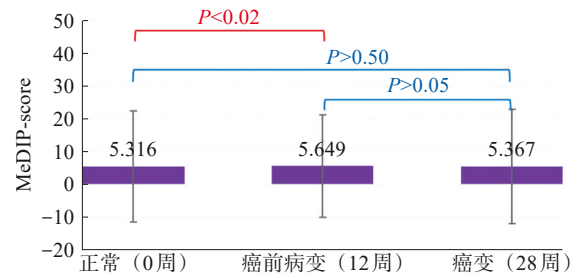


图 6 饲养0、12和28周小鼠舌黏膜样本启动子区的 MeDIP-score

Fig 6 MeDIP-score of promoters among samples of mice fed at the 0, 12 and 28 weeks

表 1 饲养0、12和28周小鼠舌黏膜存在208个启动子区差异甲基化的差异表达基因

Tab 1 208 differentially expressed genes were negatively correlated to differential methylation in promoters among lingual mucosae of mice fed at the 0, 12 and 28 weeks

序号	12周对比0周		28周对比0周		28周对比12周	
	上调基因	下调基因	上调基因	下调基因	上调基因	下调基因
1	Cul4a (-3.4/0.049)	Ghrl (1.6/0.049)	Oip5 (-5.8/0.049)	Trim34a (3/0.04)	Rbbp4 (-4.8/0.047)	Trim34a (2.8/0.03)
2	Ppie (-8.4/0.048)	Rhox8 (2.3/0.044)	Rcn2 (-11.2/0.048)	Ddx26b (2.8/0.009)	Pla2g7 (-3.9/0.047)	Dmbt1 (19.9/0.03)
3	Olfir533 (-3.1/0.048)	Kend3 (4.5/0.03)	Gpc4 (-4.2/0.048)	Tmem143 (49.8/0.001)	Cwh43 (-47.8/0.046)	F5 (2.8/0.03)
4	Baz1a (-10.9/0.047)	Lig1 (1.5/0.04)	Sgk2 (-25/0.047)		Olfir312 (-14/0.044)	Nipal3 (5.9/0.027)
5	Cyhr1 (-100/0.045)	Mapt (29/0.04)	Tbp (-5.2/0.046)		Sprr2j-ps (-4.8/0.04)	Akap6 (2.1/0.018)
6	Rnf181 (-4.3/0.044)	Gal3st2 (4.4/0.04)	Elov11 (-33.7/0.018)		Mcm8 (-12.8/0.04)	
7	Hist1h2aa (-5.2/0.044)	Tbc1d12 (4/0.03)	Tiparp (-10.2/0.044)		Ifitm1 (-21.7/0.04)	
8	Gcc1 (-2.0/0.043)	Rabgap1 (9/0.03)	Cenpm (-100/0.043)		Hist1h3g (-100/0.04)	
9	Lrba (-2.7/0.041)	Vmn2r88 (20.8/0.027)	Ube2c (-4.9/0.043)		Gpatch4 (-13/0.034)	
10	Heph (-4.1/0.039)	Mirg (4/0.027)	Rpa3 (-12.1/0.043)		Tmprss11g (-8.2/0.034)	
11	Gm7120 (-1.7/0.038)	Fndc5 (1.9/0.025)	Psmc6 (-100/0.043)		Fam213a (-100/0.034)	
12	Ikbkg (-17.5/0.013)	Gm10487 (3.1/0.02)	Ranbp6 (-100/0.042)		Spp1 (-6.4/0.034)	
13	Dsc3 (-1.8/0.032)	1700047M11Rik (6.6/0.018)	Hip1r (-100/0.042)		Cxcl13 (-38.9/0.033)	
14	2810403A07Rik (-5.9/0.032)	Fgf17 (2.6/0.015)	Golga7 (-100/0.02)		Alg10b (-53.4/0.033)	
15	Taf1b (-11.8/0.031)	Lsm6 (3.7/0.01)	Hist1h3g (-100/0.038)		Ska1 (-2.5/0.02)	
16	Cdc40 (-41/0.03)	Ciita (6.4/0.009)	Ifitm1 (-27/0.006)		Snord116 (-2.9/0.02)	
17	Zfand1 (-100/0.029)	Cdh2 (8.9/0.001)	Gnal (-100/0.032)		Npm1 (-53/0.019)	
18	Pknox1 (-10/0.026)		Acot10 (-49.5/0.035)		Mrpl47 (-12/0.019)	
19	Phkb (-10.6/0.026)		Vprbp (-41.7/0.035)		Nhlrc3 (-17.6/0.019)	
20	Slc26a6 (-100/0.025)		Tuba1c (-51.8/0.034)		Lpin2 (-7.3/0.016)	
21	Gria3 (-2.1/0.022)		Ap1ar (-16.5/0.033)		Sult1b1 (-54.5/0.015)	
22	Ufd11 (-4.6/0.022)		Gm21944 (-14/0.033)		Ip6k3 (-100/0.014)	
23	Wipf1 (-7.7/0.021)		Cdk7 (-100/0.032)		Gmnn (-3.3/0.014)	
24	Trim2 (-4.6/0.017)		Ttc9 (-11.6/0.032)		Rnu12 (-16/0.011)	
25	Atad3a (-41.9/0.011)		Atxn3 (-100/0.027)		Fcf1 (-7.2/0.01)	
26	Mkl2 (-10.2/0.01)		Prkrir (-100/0.026)		Bok (-100/0.01)	
27	Zfp808 (-4.2/0.009)		Ii19 (-8.6/0.026)		Tekt1 (-14.3/0.009)	
28	Gpr39 (-17.2/0.008)		Ube2j1 (-100/0.025)		4932412D23Rik (-100/0.008)	
29	Zfp759 (-4.3/0.006)		Sdcbp2 (-100/0.024)		Gal3st2 (-100/0.007)	

续表

序号	12周对比0周		28周对比0周		28周对比12周	
	上调基因	下调基因	上调基因	下调基因	上调基因	下调基因
30	Tgm7 (-5.3/0.006)		Pdpk1 (-4.4/0.024)		Gm14326 (-6.3/0.007)	
31	Ptprb (-3.7/0.004)		Mcm8 (-12.3/0.024)		Stfa1 (-15/0.007)	
32	Pibfl (-7.2/0.002)		Myo1b (-35.3/0.022)		Gm5878 (-8.7/0.005)	
33	Wdr54 (-4.1/0.002)		Cyhr1 (-6.6/0.021)		Gm3285 (-100/0.005)	
34	Tubgcp5 (-52.8/0.002)		Glrx (-25/0.021)		Cd80 (-20/0.004)	
35	Farsa (-12.6/0.05)		2810403A07Rik (-13.6/0.021)		Fzd3 (-9.7/0.003)	
36	Golga5 (-5.1/0.05)		Vstm5 (-100/0.021)		Wdr91 (-25.6/0.003)	
37	Gsdmc (-2.8/0.05)		Kif2c (-31/0.02)		Ifi202b (-34/0.002)	
38	Rbl1 (-32.7/0.04)		Dsg3 (-34/0.019)		Fam81a (-7.5/0.002)	
39	Map3k3 (-100/0.04)		Eogt (-100/0.019)		A630089N07Rik (-100/0.001)	
40	Gm14920 (-2.8/0.04)		Tmem242 (-100/0.018)		Mmp3 (-10.6/0.001)	
41	Tyk2 (-16.3/0.04)		Mapk9 (-100/0.017)		Ptar1 (-100/0.001)	
42	Ror1 (-2.5/0.04)		Mars2 (-17/0.017)		Mybl2 (-16/0.001)	
43	Esd (-3/0.04)		Klrc1 (-100/0.015)		Atp2b2 (-100/0.001)	
44	Ccpg1 (-4.2/0.04)		Snx24 (-100/0.015)			
45	2510003E04Rik (-8.5/0.03)		Sowahc (-13.3/0.013)			
46	Tspan32 (-2.5/0.03)		Gcc1 (-5.9/0.012)			
47	Pawr (-6.8/0.03)		Ikzf5 (-3.9/0.011)			
48	Atp8b1 (-8.8/0.03)		Slc26a3 (-10.9/0.011)			
49	Tiam1 (-1.9/0.03)		Vps35 (-100/0.01)			
50	Igtp (-4/0.028)		Sp8 (-22.9/0.01)			
51	Suv39h2 (-8.9/0.027)		Strbp (-5.7/0.009)			
52	Pabpc4 (-1.8/0.026)		Steap4 (-100/0.009)			
53	Elov11 (-2/0.024)		Smad1 (-5.4/0.009)			
54	Mageh1 (-4.9/0.021)		Thbs1 (-5/0.008)			
55	Ywhag (-9/0.021)		Lrba (-7.2/0.007)			
56	Nhs11 (-4.9/0.02)		Slc2a1 (-47.9/0.006)			
57	Gfod1 (-11.9/0.018)		Trmt61b (-100/0.006)			
58	Ppp1r131 (-15.1/0.016)		Camk2a (-7.9/0.005)			
59	Ube2d3 (-4.9/0.014)		Tubgcp5 (-6.2/0.005)			
60	Tomm40 (-100/0.014)		Crhr1 (-13.5/0.002)			
61	Net1 (-21.3/0.014)		Olfir920 (-100/0.002)			
62	Ispd (-5.9/0.013)		Rassf3 (-6.3/0.001)			
63	Fuca2 (-4.1/0.013)		Scoc (-100/0.001)			
64	Idi2 (-2.4/0.012)		Trim2 (-54/0.001)			
65	Nid1 (-12.4/0.011)		Smad4 (-100/0.001)			
66	Tnpo1 (-4.7/0.008)		Tnfaip6 (-100/0)			
67	Ap3s1 (-5.8/0.006)					
68	Fcrl5 (-4.1/0.006)					
69	Cav1 (-37.9/0.006)					
70	Eif4a2 (-7.6/0.004)					
71	Thpo (-40.8/0.002)					
72	Ddx60 (-100/0.002)					
73	Serpib12 (-46/0.002)					
74	F3 (-3/0.001)					

注: 括号里的数值为甲基化变化倍数/*P*值, 差异倍数为负数表示甲基化降低, 正数为甲基化升高。

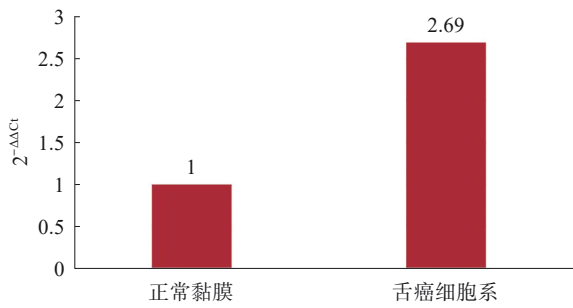


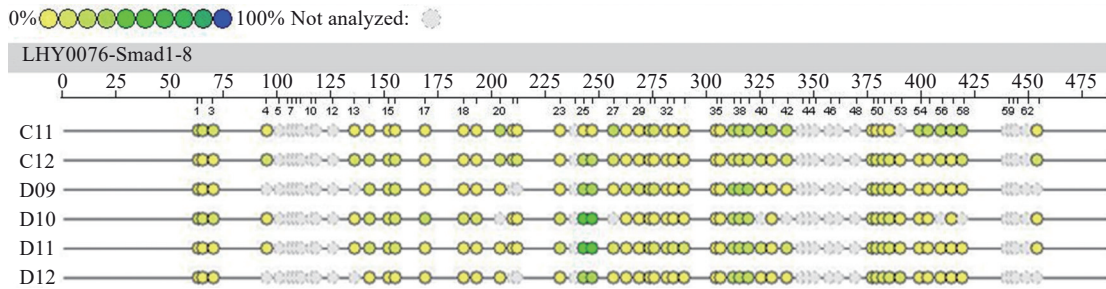
图 7 人舌黏膜、舌癌细胞 SMAD1 mRNA 表达

Fig 7 Expression of SMAD1 mRNA in human normal mucosa and tongue cancer lines

3 讨论

DNA 甲基化是最常见的表观修饰，主要存在

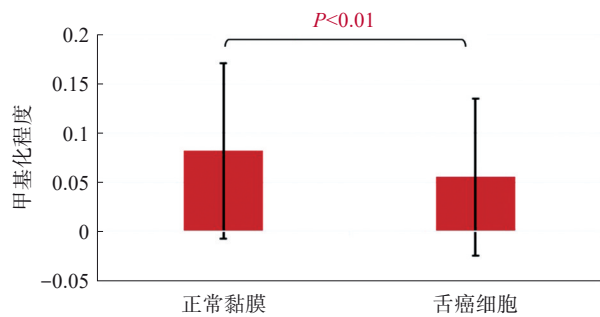
以下的功能：防止异常转录起始；抑制转录的延伸；调节可变剪切；增强子甲基化^[9]。本实验通过 4NQO 诱导小鼠舌黏膜癌变，研究正常、癌前、癌变 3 个阶段 CGI、启动子和基因体甲基化和相关基因表达变化。聚类分析结果显示正常、癌前、癌变舌黏膜 DNA 甲基化修饰的方式不同，结果与其他学者^[5]研究相似，说明 DNA 甲基化修饰可能是癌变机制的组成部分，从一定程度上反映了癌变的进程。癌前病变与正常黏膜甲基化聚类差异展现了甲基化修饰变化出现在黏膜癌变的早期阶段，与 Foy 等^[10]的结果相似。本研究发现，舌癌 CGI 的甲基化较正常组织和癌前病变升高，这说明在舌黏膜癌变的过程中，DNA 甲基化的修饰不仅存在类别的差异，还存在程度的变化。DNA 甲基化修饰变化也出现在其他疾病和病理生理过程中。



C11、C12、D09 分别为舌癌细胞系 CAL27、UCSF-OT-1109、SCC-9；D10、D11、D12 为人正常舌黏膜。甲基化圆点图标尺颜色越浅代表甲基化程度越低。基因的序列标尺上方是碱基位置，下方是 CpG 的标识及大致位置。

图 8 人舌黏膜、舌癌细胞 SMAD1 启动子区甲基化飞行质谱检测结果

Fig 8 MassARRAY results of SMAD1 promoter methylation of human normal mucosa and tongue cancer lines



检测数据为相对定量比值。

图 9 舌癌细胞 SMAD1 启动子区甲基化较正常黏膜降低

Fig 9 Methylation of SMAD1 promoter in tongue cancer cell lines was lower than that in human normal mucosa

在哺乳动物发育中，DNA 甲基化会经历 2 次较大波动，第一次是在生殖细胞期，从原始生殖细胞的去甲基化到出现具有性别特征的甲基化生殖细胞；第二次是在受精后，甲基化消失到出现具有胚胎特征的甲基化修饰^[11]。健康人群基因组甲基化总体上随年龄降低，这种降低存在个体差

异^[12]。因此 DNA 甲基化在生命进程中又被称为甲基化迁移或甲基化钟^[13]。在肠癌、乳腺癌、胶质瘤、子宫内膜癌、胃癌及肾癌^[14-15]等肿瘤中，特定 CGI 甲基化被认为是肿瘤表观遗传标志，与肿瘤侵袭及预后有关。与舌癌中 CGI 甲基化升高不同，Rechache 等^[16]发现，肾上腺皮质恶性肿瘤中甲基化较良性肿瘤及正常组织降低，这反映了肾上腺皮质恶性肿瘤与舌癌间 CGI 甲基化修饰的差异。CGI 甲基化变化在不同肿瘤中的差异，说明不同肿瘤中 CGI 甲基化可能存在特异性，CGI 甲基化修饰变化与舌癌发病机制间的内在关系还需进一步研究。

本研究发现，癌前病变启动子区甲基化较正常组织升高，癌前病变的部分甲基化启动子的数量较正常组织增加，说明在癌前病变阶段存在基因表达的抑制。肿瘤的发生是抑癌基因的表达抑制和癌基因的表达上调共同变化，进而复杂演进的结果，癌前病变舌黏膜启动子区甲基化的升高，提示抑癌基因表达的抑制可能是舌癌早期的重要

的基因学变化。有研究表明,肿瘤中启动子区甲基化升高不仅与肿瘤发生有关,还会影响肿瘤的化疗耐药。Chang等^[17]发现,在伴EB病毒感染的胃癌中,启动子区甲基化升高,体现了该型肿瘤的特征。Geli等^[18]发现,副神经节肿瘤中启动子甲基化升高与恶性表型有关。Fazal等^[19]发现,睾丸生殖细胞肿瘤的DNA甲基化与顺铂耐药相关。

相关研究^[20]表明,基因体的甲基化和基因表达正相关,但其功能尚待进一步明确。Huang等^[21]发现,小肠上皮细胞在癌变早期基因体甲基化升高,而在癌变时表现为低甲基化,表明基因体甲基化对肿瘤进展有重要作用。在高表达B细胞淋巴瘤6蛋白(B-cell lymphoma 6 protein, BCL6)的淋巴瘤中,BCL6第一个内含子CGI甲基化,阻止转录因子CTCF的结合,解除对增强子的抑制,促进BCL6表达导致肿瘤形成^[22]。肾癌和肺腺癌中淋巴瘤特异基因CARD11基因体甲基化与其高表达相关,CARD11激活mTOR通路,抑制自噬,促进肿瘤发展^[23]。本研究基因体甲基化在正常、癌前病变和舌癌中无明显差别,说明不同肿瘤基因体甲基化存在差异。

本研究在正常(0周)、癌前病变(12周)、舌癌(28周)三组间,获得了183个基因表达上调同时其启动子区甲基化降低,25个基因表达下调同时其启动子区甲基化升高。本研究采用差异基因和启动子区甲基化差异表达的交集筛选目标基因,与其他研究标准不同,因此结果也并非一致^[24-25]。本研究的筛选方法有助于缩小目标基因的范围,获得更加可靠的目标基因。

综上,舌黏膜癌变基因启动子区甲基化与基因表达相关性研究,为寻找与舌黏膜癌变的发病机制相关基因提供了新的视野。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Global Burden of Disease 2019 Cancer Collaboration, Kocarnik JM, Compton K, et al. Cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. JAMA Oncol, 2022, 8(3): 420-444.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [3] 代晓明,刘华,左志斌,等. 4-硝基喹啉-1-氧化物诱导 C57BL/6 小鼠舌黏膜癌变的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2015, 33(4): 357-360.
Dai XM, Liu H, Zuo ZB, et al. Study on lingual mucosa carcinogenesis of C57BL/6 mice induced by 4-nitroquinoline 1-oxide[J]. West China J Stomatol, 2015, 33(4): 357-360.
- [4] Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics[J]. Annu Rev Genet, 1996, 30: 441-464.
- [5] Towle R, Truong D, Hogg K, et al. Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer[J]. Oral Oncol, 2013, 49(11): 1033-1042.
- [6] Lai ZL, Tsou YA, Fan SR, et al. Methylation-associated gene silencing of RARB in areca carcinogens induced mouse oral squamous cell carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 378358.
- [7] Kretzschmar M, Doody J, Massagué J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1[J]. Nature, 1997, 389(6651): 618-622.
- [8] Liu H, Li J, Yang Y, et al. Alterations of 63 hub genes during lingual carcinogenesis in C57BL/6J mice[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12626.
- [9] Wang Q, Xiong F, Wu G, et al. Gene body methylation in cancer: molecular mechanisms and clinical applications[J]. Clin Epigenetics, 2022, 14(1): 154.
- [10] Foy JP, Pickering CR, Papadimitrakopoulou VA, et al. New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2015, 8(11): 1027-1035.
- [11] Zeng Y, Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development[J]. Genes (Basel), 2019, 10(4): 257.
- [12] Martino D, Loke YJ, Gordon L, et al. Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance [J]. Genome Biol, 2013, 14(5): R42.
- [13] Teschendorff AE, West J, Beck S. Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift [J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(R1): R7-R15.
- [14] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(15): 8681-8686.

- [15] Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers[J]. *Epigenetics*, 2017, 12(6): 416-432.
- [16] Rechache NS, Wang Y, Stevenson HS, et al. DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(6): E1004-E1013.
- [17] Chang MS, Uozaki H, Chong JM, et al. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(10): 2995-3002.
- [18] Geli J, Kiss N, Karimi M, et al. Global and regional CpG methylation in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas: association to malignant behavior[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2551-2559.
- [19] Fazal Z, Singh R, Fang F, et al. Hypermethylation and global remodelling of DNA methylation is associated with acquired cisplatin resistance in testicular germ cell tumours[J]. *Epigenetics*, 2021, 16(10): 1071-1084.
- [20] Yang X, Han H, De Carvalho DD, et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(4): 577-590.
- [21] Huang KK, Ramnarayanan K, Zhu F, et al. Genomic and epigenomic profiling of high-risk intestinal metaplasia reveals molecular determinants of progression to gastric cancer[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(1): 137-150.e5.
- [22] Lai AY, Fatemi M, Dhasarathy A, et al. DNA methylation prevents CTCF-mediated silencing of the oncogene BCL6 in B cell lymphomas[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(9): 1939-1950.
- [23] McGuire MH, Dasari SK, Yao H, et al. Gene body methylation of the lymphocyte-specific gene *card11* results in its overexpression and regulates cancer mTOR signaling [J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(11): 1917-1928.
- [24] Inchanalkar M, Srivatsa S, Ambatipudi S, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of HPV-negative leukoplakia and gingivobuccal complex cancers[J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1): 93.
- [25] Basu B, Chakraborty J, Chandra A, et al. Genome-wide DNA methylation profile identified a unique set of differentially methylated immune genes in oral squamous cell carcinoma patients in India[J]. *Clin Epigenetics*, 2017, 9: 13.

(本文编辑 张玉楠)

《数字引导式显微修复学》出版发行

书籍名称：数字引导式显微修复学

主编：于海洋

出版日期：2023年12月

出版社：人民卫生出版社

内容简介：本书共4个章节，主要包括显微口腔历史、口腔显微器械、显微修复临床技术和显微修复工艺技术。内容涵盖了新兴的边缘学科，并介绍了国内外显微修复文献资源和相关知识。本书力求达到帮助和指导口腔医生在口腔临床工作中对于显微治疗方法的思考、选择和操作实施的目的，以呈现出一本代表我国显微修复领域较高水准的完整、规范和科学客观的参考书，进一步推动和促进显微修复事业的深入发展。

