

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0749-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250319

## 子宫颈癌患者 *MSX1* 基因甲基化与临床病理特征及预后的 关联性分析

黄遐龄, 张丹丹, 张雪梅

(武汉科技大学附属普仁医院妇产科, 湖北 武汉 430080)

**[摘要]** **目的:** 探讨 Msh 同源框 1 (*MSX1*) 基因甲基化与子宫颈癌 (CC) 患者临床病理特征及预后的关系, 分析 *MSX1* 基因甲基化在 CC 诊治过程的应用前景。**方法:** 收集 2019 年 1 月—2020 年 6 月期间行 CC 手术 120 例患者的临床资料和癌组织及癌旁正常组织, 并对全部 CC 患者进行为期 3 年的随访。采用甲基化特异性 PCR (MSP) 法检测 CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因甲基化状态, 分为 *MSX1* 基因低甲基化组 ( $n=50$ ) 和 *MSX1* 基因高甲基化组 ( $n=70$ ), MSP 法检测 CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因甲基化水平, 分析 *MSX1* 基因甲基化状态与 CC 患者临床病理特征和预后的关系, Western blotting 法检测 CC 患者癌组织和癌旁正常组织中 *MSX1* 蛋白表达水平。设计靶向 *MSX1* mRNA 的小干扰 RNA (siRNA), 将 CC 细胞分为对照组 (转染空白载体) 和 si*MSX1* 组 (转染 *MSX1* siRNA), 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法验证细胞转染效率, 细胞划痕实验检测 2 组 CC 细胞迁移活性, Logistic 回归分析 CC 患者预后的影响因素。**结果:** CC 患者癌组织中甲基化发生率为 58.33%, 明显高于癌旁正常组织甲基化发生率 (11.67%,  $\chi^2=42.725$ ,  $P<0.01$ )。CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因高甲基化状态与患者高危型人类乳头状瘤病毒 (HR-HPV) DNA、淋巴结转移和 TNM 分期有关联 ( $P<0.05$ ), 与患者年龄、病理类型和肿瘤大小无关联 ( $P>0.05$ )。Western blotting 法, 与癌旁正常组织比较, CC 患者癌组织中 *MSX1* 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ )。细胞划痕实验, 与对照组比较, si*MSX1* 组细胞 *MSX1* mRNA 表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), 提示 *MSX1* 基因成功敲除; 与对照组比较, si*MSX1* 组细胞迁移活性明显升高 ( $P<0.01$ )。 *MSX1* 基因甲基化者 3 年累积生存率为 54.29%, 明显低于 *MSX1* 基因未甲基化者 (80.00%,  $\chi^2=9.717$ ,  $P=0.002$ )。Logistic 回归分析, 阳性 HR-HPV DNA、淋巴结转移、TNM 分期 III-IV 期和 *MSX1* 基因高甲基化是 CC 预后的独立危险因素 ( $P<0.05$ )。**结论:** *MSX1* 基因甲基化与 CC 患者较差的临床病理特征及不良预后具有一定关联性, 提示其可作为宫颈癌潜在生物标志物。

**[关键词]** 子宫颈癌; *MSX1* 基因; 甲基化; 预后; 小干扰 RNA

**[中图分类号]** R737.33 **[文献标志码]** A

## Analysis on relationship between methylation of *MSX1* gene and clinical pathological features and prognosis of patients with cervical cancer

HUANG Xialing, ZHANG Dandan, ZHANG Xuemei

(Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Puren Hospital, Wuhan University of Science and

[收稿日期] 2024-06-05 [录用日期] 2024-08-06

[基金项目] 湖北省卫健委科研计划项目 (WJ2022F033)

[作者简介] 黄遐龄 (1989—), 女, 湖北省武汉市人, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤基础和临床方面的研究。

[通信作者] 张雪梅, 副主任医师 (E-mail: 529824756@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Technology, Wuhan 430080, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the relationship between Msh homeobox 1 (*MSX1*) gene methylation and the clinicopathological characteristics and prognosis of the patients with cervical cancer (CC), and to analyze the application prospect of *MSX1* gene methylation in the diagnosis and treatment of CC.

**Methods:** The clinical data, cancer tissues, and adjacent normal tissues were collected from 120 CC patients who underwent surgery between January 2019 and June 2020, and all CC patients were followed up for 3 years; methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of the *MSX1* gene in cancer tissues of the CC patients, who were divided into *MSX1* gene hypo-methylation group ( $n=50$ ) and *MSX1* gene hyper-methylation group ( $n=70$ ); MSP was used to detect the methylation level of the *MSX1* gene in cancer tissues of the CC patients, and the relationship between *MSX1* gene methylation status and clinicopathological characteristics and prognosis of the CC patients was analyzed; Western blotting method was used to detect the expression level of *MSX1* protein in cancer tissues and adjacent normal tissues of the CC patients; small interfering RNA (siRNA) targeting *MSX1* mRNA was designed; the CC cells were divided into control group (transfected with blank vector) and si*MSX1* group (transfected with *MSX1* siRNA); real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to verify the cell transfection efficiency; cell scratch assay was used to detect the migration activity of the cells in two groups; Logistic regression was used to analyze the influencing factors of prognosis in the CC patients.

**Results:** The methylation rate in cancer tissues of the CC patients was 58.33%, which was significantly higher than that in adjacent normal tissues (11.67%,  $\chi^2=42.725$ ,  $P<0.01$ ); the Western blotting results showed that compared with adjacent normal tissue, the expression level of *MSX1* protein in cancer tissue of the CC patients was significantly decreased ( $P<0.01$ ); high methylation status of the *MSX1* gene in cancer tissue of the CC patients was associated with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) DNA, lymph node metastasis, and TNM stage ( $P<0.05$ ), but not associated with patient age, pathological type, and tumor size ( $P>0.05$ ); the cell scratch assay results showed that compared with control group, the expression level of *MSX1* mRNA in the cells in si*MSX1* group was significantly decreased ( $P<0.01$ ), suggesting successful knockout of the *MSX1* gene; the cell scratch assay results showed that compared with control group, the migration activity of the cells in si*MSX1* group was significantly increased ( $P<0.01$ ); the 3-year cumulative survival rate of patients with *MSX1* gene methylation was 54.29%, which was significantly lower than that of patients without *MSX1* gene methylation (80.00%,  $\chi^2=9.717$ ,  $P=0.002$ ); the Logistic regression results showed that positive HR-HPV DNA, lymph node metastasis, TNM stage III-IV and *MSX1* gene high methylation were independent risk factors for prognosis in CC patients ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** *MSX1* gene methylation is associated with poorer clinicopathological characteristics and adverse prognosis in the CC patients, suggesting its potential as a biomarker for cervical cancer.

**KEYWORDS** Cervical cancer; *MSX1* gene; Methylation; Prognosis; Small interfering RNA

子宫颈癌 (cervical cancer, CC) 是全球女性发病率排名第4位的常见恶性肿瘤, 其作为妇科肿瘤中的高发疾病一直备受关注<sup>[1]</sup>。CC患者病情进展得以诊断, 治疗难度大, 病死率居高不下。因此, 需要寻找可用于预测CC病理变化及评估预后的可靠指标, 以便为个体制定精准的治疗方案。

CC的发生和发展是由多种因素联合作用的结果, 包括人类乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染<sup>[1]</sup>、机体免疫紊乱<sup>[2]</sup>、遗传因素改变

和DNA甲基化等<sup>[3-4]</sup>。基因甲基化事件也被证实与多种肿瘤进展有关。研究<sup>[5-6]</sup>显示: Msh同源框1 (Msh homeobox 1, *MSX1*) 基因是重要的肿瘤相关基因, 调节抑癌基因p53, 诱导细胞凋亡, 参与多种上皮-间质相互作用, 提示*MSX1*基因甲基化在不同类型中发挥重要作用。研究<sup>[7]</sup>显示: *MSX1*基因在CC中出现异常甲基化, 下调*MSX1*基因表达, 促进肿瘤发生。*MSX1*基因联合损伤特异性DNA结合蛋白1 (damage-specific DNA binding protein 1,

DDB1) 和 Cullin 家族成员 4 (Cullin family member 4, CUL4) 相关因子 12 样蛋白 1 (DDB1-and CUL4-associated factor 12-like protein 1, DCAF12L1) 的甲基化检测结果可用于诊断子宫内膜癌<sup>[8]</sup>; 此外, *MSX1* 基因在结直肠癌的病理发展中可能发挥重要作用<sup>[9]</sup>。但 *MSX1* 基因甲基化与 CC 患者临床病理特征和预后的关系尚未完全阐明。因此, 本研究通过甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 法检测 CC 患者肿瘤组织中 *MSX1* 基因的甲基化状态<sup>[10]</sup>, 探讨 *MSX1* 基因甲基化与 CC 患者临床病理特征和预后的关联, 为 CC 的诊断和治疗提供新的线索, 也为进一步探索其发病机制和为患者提供更为精确的医疗干预提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 收集本院 2019 年 1 月—2020 年 6 月期间 120 例 CC 手术患者的一般资料和样本 (癌组织和癌旁正常组织)。患者年龄为 36~72 岁, 平均年龄为 (51.56±12.86) 岁。纳入标准: ①符合 CC 临床诊治指南的判定标准<sup>[11]</sup> 和病理确诊; ②术前未接受过放化疗, 且术后预计存活期超过 3 个月; ③临床资料保存完整。排除标准: ①失访者或病理诊断不确切; ②并发肝肾功能不全或其他妇科疾病; ③同时患有其他肿瘤。所有参与本研究的患者或其家属均对研究目的和过程进行充分了解, 并且知情同意。本研究获得本院伦理委员会批准, 伦理审批号: 2020-0317。

**1.2 研究方法** 收集 CC 患者癌组织和癌旁正常组织, 采用 MSP 法检测 CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因甲基化状态。采集研究对象的临床病理特征信息, 对 *MSX1* 基因甲基化水平与 CC 患者临床病理特征进行相关性分析。对 120 例 CC 患者进行为期 3 年的随访, 随访方式包括门诊和电话询问。随访

起始日期为患者手术日, 结束日期为患者的死亡日期或随访截止日期, 随访截止日期为 2023 年 6 月 30 日。随访过程无失访者。

**1.3 样本收集** 收集患者在手术中被切除的癌组织和距离肿瘤组织超过 5 cm 的癌旁正常组织。所有患者的部分手术切除组织样本经过生理盐水清洗, 液氮冷冻过夜后, 移至 -80 °C 冰箱中储存, 以备后续研究使用。其余的组织样本经过甲醛处理后, 进行石蜡包埋以供病理检查。

**1.4 细胞、主要试剂和仪器** HeLa 细胞 (美国 ATCC 公司)。geneDNA 提取试剂盒、实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒 (北京 Tiangen 公司), BisulFlashDNA 甲基化修饰试剂盒 (美国艾美捷科技有限公司), *MSX1* 抗体 (英国 Abcam 公司), 脂质体 (美国赛默飞世尔科技公司)。PCR 扩增仪和 RT-qPCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), LAS-4000 mini 型发光成像分析仪 (日本富士公司)。

**1.5 MSP 法检测 CC 患者癌组织 *MSX1* 基因甲基化状态** 取 CC 患者癌组织和癌旁正常组织, 研磨后采用 geneDNA 提取试剂盒提取 *MSX1* 基因 DNA, 亚硫酸氢盐修饰 *MSX1* 基因 DNA, 以修饰后的 DNA 为模板, Meth Primer 设计甲基化和非甲基化引物<sup>[12]</sup>, 引物序列见表 1。分别采用 2 种引物进行 PCR 实验, MSP 反应体系及 PCR 反应条件参考 BisulFlashDNA 甲基化修饰试剂盒说明书。仅甲基化引物扩增出条带, 非甲基化引物无产物者为高甲基化状态样本; 仅非甲基化引物有条带, 或二者均无条带者为低甲基化状态样本。根据 CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因甲基化状态分为 *MSX1* 基因低甲基化组 (Low-methylated) 和 *MSX1* 基因高甲基化组 (High-methylated)。见图 1。

表 1 *MSX1* 基因引物序列  
Tab. 1 Primers of *MSX1* gene

Primer sequence	Forward	Reverse
Methylation primer	5'-CGTTTATGGTCGATTATAGGAAGTC-3'	5'-GAAACTCTCGACTTTAACGAACG-3'
Unmethylated primer	5'-GGTGTTTATGGTTGATTATAGGAAGTT-3'	5'-TCAAACTCTCAACTTTAACAAACAC-3'

**1.6 Western blotting 法检测 CC 患者癌组织和癌旁正常组织中 *MSX1* 蛋白表达水平** 收集 CC 患者癌组织和癌旁正常组织, 制备蛋白样本, 采用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳、转膜、封闭后, *MSX1* 抗

体 (1:1000) 4 °C 过夜孵育。隔日二抗孵育后, 采用增强化学发光法曝光显影。Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度

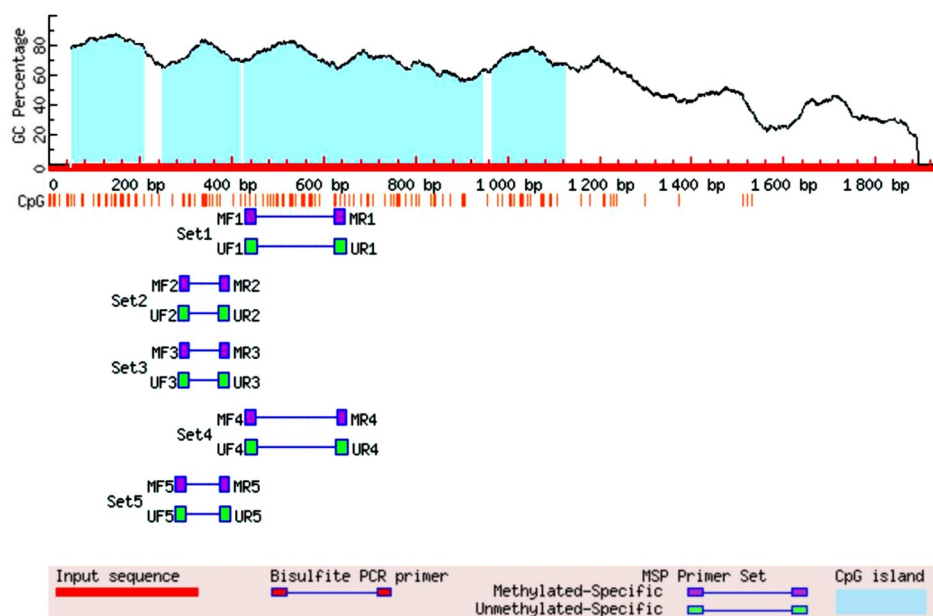


图1 *MSX1*基因甲基化和非甲基化引物设计结果

Fig. 1 Design results of methylated and unmethylated primers of *MSX1* gene

值/内参蛋白条带灰度值。

### 1.7 细胞划痕实验检测CC患者CC细胞迁移活性

本研究设计靶向*MSX1* mRNA的小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)。于6孔细胞培养板上接种人CC细胞系HeLa细胞,待细胞密度达80%后分为对照组(转染空白载体)和si*MSX1*组(转染*MSX1* siRNA),采用RT-qPCR法验证细胞转染效率。采用*MSX1* siRNA和对照载体对HeLa细胞进行脂质体Lipofectamine™ 2000转染,优化复合物配比为脂质体:siRNA质量比为3:1,动态光散射法检测复合物平均粒径为180 nm,离子交换柱法测定包封率为92.3%,确保siRNA高效递送。在细胞100%融合后采用200  $\mu$ L枪头进行细胞划痕,清洗。拍照记录不同时间点各组细胞的迁移距离,计算细胞迁移活性。细胞迁移活性=细胞迁移距离/初始划痕距离。

### 1.8 分析*MSX1*基因甲基化状态与CC患者临床病理特征和预后的关系

对CC患者进行为期3年的随访,计算患者生存率。以随访期内CC患者是否发生死亡为因变量,其中死亡赋值为1,未死亡赋值为0;CC患者临床病理特征、*MSX1*基因甲基化等二分类变量作为自变量,根据阴性与阳性比值或大小顺序分别赋值为0或1,逐一进行单因素分析。分析患者生存率与*MSX1*基因甲基化状态的关联,采用Logistic回归分析CC患者生存率的影响

因素。患者生存率=存活人数/总人数 $\times$ 100%。

**1.9 统计学分析** 采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。CC患者临床资料中的分类变量(有无HPV感染、组织类型和淋巴结转移等)以例数(百分率)[ $n$ (%)]表示,组间率的比较采用 $\chi^2$ 检验;连续变量(患者年龄、肿瘤大小,CC患者癌组织和癌旁正常组织中*MSX1* mRNA表达水平和*MSX1*蛋白表达水平及细胞迁移活性均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本 $t$ 检验,并采用Kaplan-Meier曲线分析*MSX1*基因甲基化状态与患者预后之间的关系,Logistic回归分析CC患者预后的影响因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CC患者癌组织和癌旁正常组织中*MSX1*基因甲基化状态及与临床病理特征的关联性

CC组织中有70例患者发生*MSX1*基因甲基化,甲基化发生率为58.33%,明显高于癌旁组织(11.67%, $\chi^2=42.725$ , $P<0.01$ )。根据甲基化状态检测结果,分为*MSX1*基因低甲基化组( $n=50$ )和*MSX1*基因高甲基化组( $n=70$ )。CC患者癌组织中*MSX1*基因高甲基化状态与患者HR-HPV DNA、淋巴结转移和TNM分期有关联( $P<0.05$ ),与患者年龄、病理类型和肿瘤大小无关( $P>0.05$ )。见表2。

表2 CC患者 *MSX1* 基因甲基化状态与临床病理特征相关性  
Tab. 2 Correlation between *MSX1* methylation and clinicopathological features of CC patients

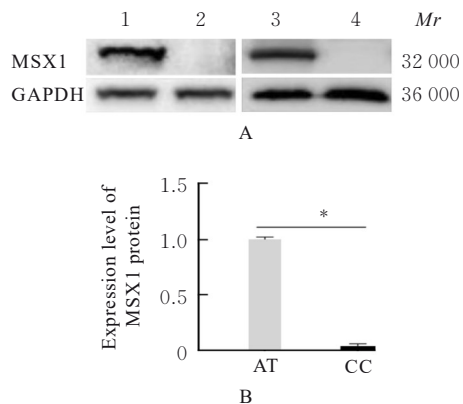
Parameter	Number	<i>MSX1</i> gene [n(η/%)]		$\chi^2$	P
		Hypo-methylation(n=50)	Hyper-methylation(n=70)		
Age					
<50	58	24(41.38)	34(58.62)	0.009	0.974
≥50	62	26(41.94)	36(58.06)		
Tumor size(cm)					
<4	72	32(44.44)	40(55.56)	0.632	0.415
≥4	48	18(37.50)	30(63.50)		
HR-HPV DNA					
Positive	96	34(35.41)	62(64.58)	8.692	0.003
Negative	24	16(66.67)	8(33.33)		
Histological type					
Squamous carcinoma	81	33(40.74)	48(59.26)	0.212	0.612
Adenocarcinoma	39	17(43.59)	22(56.41)		
Lymphnode metastasis					
Yes	33	8(24.24)	25(75.76)	6.912	0.005
No	87	42(48.28)	45(51.72)		
TNM phase					
I - II	89	42(47.19)	47(52.81)	6.343	0.005
III - IV	31	8(25.81)	23(74.19)		

2.2 CC患者癌组织和癌旁正常组织中 *MSX1* 蛋白表达水平 与癌旁正常组织比较, CC患者癌组织中 *MSX1* 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图2。

2.3 2组细胞中 *MSX1* mRNA 表达水平和细胞迁移活性 与对照组比较, si*MSX1*组 *MSX1* mRNA

表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), 提示 *MSX1* 基因成功敲除。24和48 h时, 与对照组比较, si*MSX1*组细胞迁移活性明显升高 ( $P < 0.01$ )。见图3、4和5。

2.4 CC患者癌组织中 *MSX1* 基因甲基化状态与患者预后的关系 对全部入组患者随访3年, 结果显



Lane 1, 3: Adjacent normal tissue; Lane 2, 4: CC tissue. \* $P < 0.01$  compared with adjacent normal tissue.

图2 Western blotting法检测CC患者癌组织和癌旁正常组织中 *MSX1* 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of *MSX1* protein in CC tissue and adjacent normal tissue of CC patients detected by Western blotting method

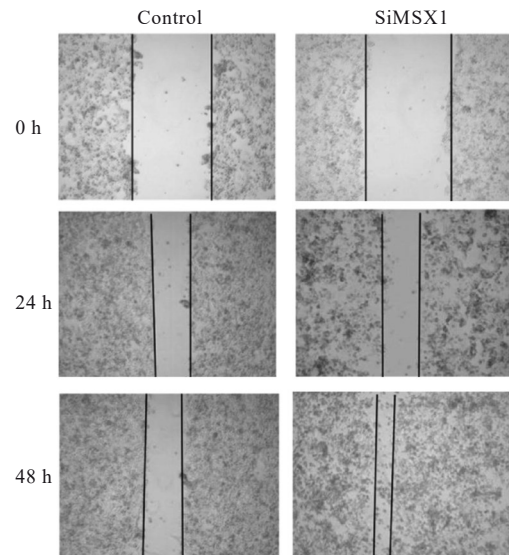
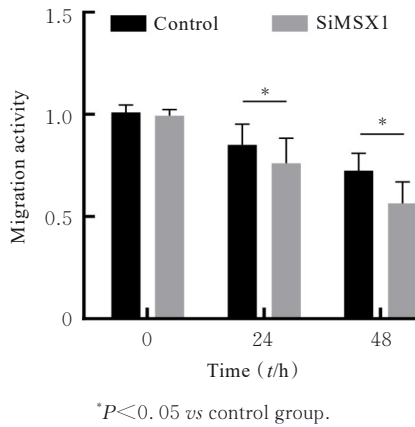


图3 细胞划痕实验检测2组细胞迁移情况( $\times 100$ )

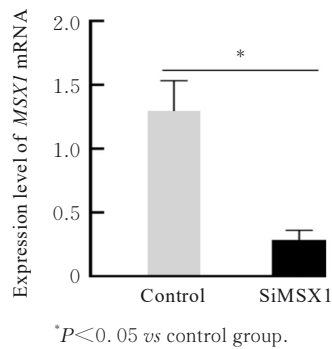
Fig. 3 Migration of cells in two groups detected by cell scratch assay ( $\times 100$ )



\* $P < 0.05$  vs control group.

图4 2组细胞迁移活性

Fig. 4 Migration activities of cells in two groups



\* $P < 0.05$  vs control group.

图5 2组细胞中MSX1 mRNA表达水平

Fig. 5 Expression levels of MSX1 mRNA of cells in two groups

示：随访终点有78例患者存活，42例患者死亡。Kaplan-Meier生存分析结果显示：发生MSX1基因甲基化者在3年内有38例存活，32例死亡；MSX1基因未甲基化者在同期内有40例存活，10例死亡。MSX1基因甲基化者3年累积生存率为54.29%，明显低于MSX1基因未甲基化者（80.00%， $\chi^2 =$

9.717,  $P = 0.002$ )。见图6。

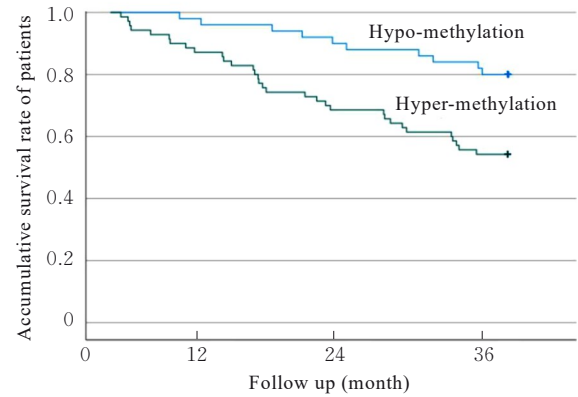


图6 CC患者癌组织中MSX1基因甲基化与患者预后的Kaplan-Meier生存曲线

Fig. 6 Kaplan-Meier survival curve of relationship between MSX1 gene methylation in cancer tissue and prognosis of CC patients

## 2.5 Logistic回归分析CC患者预后的影响因素

多因素Logistic回归分析结果显示：阳性HR-HPV DNA、淋巴结转移、TNM分期Ⅲ-Ⅳ期和MSX1基因高甲基化是CC预后的独立危险因素( $P < 0.05$ )。见表3。

## 3 讨论

CC发病机制复杂，目前已鉴定出部分致癌基因和肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene, TSG)，但仅有少数可用于CC的早期诊断和基因靶向治疗<sup>[13-15]</sup>。

MSX1基因家族的主要功能是编码转录调控因子，在正常人类胚胎发育中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。MSX1基因缺陷小鼠因其颅颌结构缺陷而在早期发

表3 多因素Logistic回归分析CC患者预后的影响因素

Tab. 3 Multivariate factors Logistic regression analysis on influencing factors of prognosis of CC patients

Variable	Univariate model					Multivariate model				
	$\beta$	SE	Z	P	OR(95%CI)	$\beta$	SE	Z	P	OR(95%CI)
Age (<50 vs $\geq 50$ )	-1.05	0.48	-1.64	0.167	0.816-1.332	-	-	-	-	-
Tumor size (<4 cm vs $\geq 4$ cm)	-0.87	0.82	-0.98	0.213	0.853-1.318	-	-	-	-	-
HR-HPV DNA (negative vs positive)	0.06	0.01	4.40	<0.01	1.322-5.131	0.04	0.03	2.71	<0.01	1.265-4.278
Histological type (adenocarcinoma vs squamous carcinoma)	1.07	0.82	0.62	0.458	0.823-1.278	-	-	-	-	-
Lymphnode metastasis (no vs yes)	0.10	0.02	4.74	<0.01	1.554-4.237	0.06	0.02	2.91	<0.01	1.634-3.928
TNM phase (I-II vs III-IV)	0.17	0.04	4.32	<0.01	1.721-5.853	0.18	0.05	3.74	<0.01	1.688-5.538
MSX1 gene (unmethylated vs methylated)	0.06	0.02	4.63	<0.01	1.851-4.869	0.04	0.03	3.12	<0.01	1.722-4.639

“-”: No data.

育中死亡<sup>[17]</sup>。*MSX1* 基因点突变和缺失也会导致人类的肢体发育不良、选择性牙齿发育不良和 Wolf-Hirschhorn 综合征<sup>[18-19]</sup>。肿瘤的发生发展也涉及细胞增殖和分化过程的异常调节, 与发育缺陷中的过程相似。*MSX1* 基因可能在肿瘤的发生发展中起重要作用。

研究<sup>[7]</sup>显示: 位于染色体 4p16.2 上的 *MSX1* 基因甲基化在多种肿瘤中发生。CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因异常甲基化, 降低 *MSX1* 基因表达, 抑制 Notch 信号通路, 促进肿瘤发生发展。本研究在 CC 患者癌组织中检测 *MSX1* 基因的甲基化状态, 结果显示: *MSX1* 蛋白在肿瘤组织中表达水平降低, 而敲除 *MSX1* 基因可促进 CC 细胞的迁移能力, 并且该基因的甲基化状态与 CC 患者的临床病理状态和预后存在关联, 可作为影响 CC 患者预后的独立影响因素。

DNA 甲基化是 DNA 序列修改的一种形式, 是遗传学中最重要机制之一, 可以调节基因组功能而不改变 DNA 的分子结构<sup>[20]</sup>。DNA 甲基化是 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 的催化下, 将甲基由 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 转移至 DNA 分子相应碱基的过程。DNA 甲基化的常见过程涉及将胞嘧啶共价结合到 DNA 链上胞嘧啶的第 5 个碳原子, 并将胞嘧啶修饰为 5-甲基胞嘧啶。DNA 甲基化可以导致某些基因的失活, 去甲基化可以重新激活沉默的基因<sup>[21]</sup>。

在癌症发生过程中, TSG 的 CpG 岛可能会高度甲基化, 导致其失活。TSG 的 DNA 甲基化已在多种不同类型的肿瘤中被检测到, 通常发生在癌前阶段, 因此 DNA 甲基化可作为肿瘤早期诊断的理想标志物<sup>[20]</sup>。本研究中 MSP 实验证实 CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因的高甲基化状态, 导致 *MSX1* 基因表达下调或缺失, 而细胞划痕实验证实敲除 *MSX1* 可提高 CC 细胞的迁移能力。提示 CC 患者癌组织中 *MSX1* 基因甲基化和肿瘤发生存在关联。甲基化药物的作用可以恢复基因表达, 因此, 深入研究 *MSX1* 基因甲基化在 CC 中的作用对于发现新的 CC 预后预测靶点。

细胞信号传导过程包括分子信号和外源性刺激。相关信号可以诱导细胞内信号传导, 由细胞内或细胞膜上的信使分子介导, 最终导致细胞核中目标基因的表达发生变化。正常的分子信号传导在维持细胞生长、分化和凋亡中起重要作用。因外部或

内部因素的刺激, 细胞信号传导过程可能变得异常, 进而导致一系列异常的生物活性变化, 最终导致细胞恶性增殖。Notch 信号通路功能障碍是多种肿瘤发生发展的重要原因<sup>[22]</sup>。Notch 受体通过与相邻细胞中表达配体直接接触而被激活, 随后调控细胞增殖、分化和凋亡。*MSX1* 基因参与调节 Notch 信号通路的表达, 并介导该通路抑制 CC 肿瘤发生<sup>[5, 23]</sup>。本研究将 *MSX1* 基因甲基化与 CC 患者临床病理特征及预后结合分析, 提示 *MSX1* 基因甲基化与 CC 肿瘤的发生发展有关。

研究<sup>[24]</sup>显示: *MSX1* 通过上调细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1, CCND1) 表达抑制肿瘤细胞生长, 进而影响细胞周期和凋亡。CCND1 也是 Notch 信号通路的下游靶基因。CCND1 和 Notch 信号通路的表达与肿瘤发生发展存在密切关联, 可直接影响肿瘤细胞的生长和转移。HU 等<sup>[25]</sup>发现: *MSX1* 转基因小鼠母鼠妊娠期间, 乳腺组织分化受阻, 伴随着 *CCND1* 基因表达水平升高。在卵巢癌细胞中, 外源表达 *MSX1* 可以阻滞卵巢癌细胞的 G<sub>1</sub> 期, 从而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[25]</sup>。CCND1 在细胞周期 G<sub>1</sub> 期向 S 期过渡中发挥重要作用。因此, 后续还需进一步证实甲基化 *MSX1* 基因对 CC 细胞周期的影响。另一方面, 高风险 HPV 与超过 90% 的 CC 的发病有关, 可导致 E6/E7 蛋白的产生。研究<sup>[26]</sup>显示: *MSX1* 蛋白的过表达可提升野生型 p53 并恢复 p53 的促凋亡功能, 即使是在导致野生型内源 p53 表达失活的 HPV-E6 感染中, 进一步证实 *MSX1* 蛋白在肿瘤形成过程中的重要作用。

综上所述, CC 患者肿瘤组织中 *MSX1* 基因甲基化水平较高, *MSX1* 基因甲基化状态与 CC 恶性程度和患者预后有关, *MSX1* 基因可作为潜在的生物学标志物, 具有评估 CC 预后的价值。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

黄遐龄和张丹丹参与实验操作、数据收集、数据分析及论文撰写, 张雪梅参与研究设计、实验质量控制和论文修改。

#### [参考文献]

- [1] BUSKWOFIE A, DAVID-WEST G, CLARE C A. A review of cervical cancer: incidence and disparities[J]. J Natl Med Assoc, 2020, 112(2): 229-232.
- [2] LUVERO D, PLOTTI F, LOPEZ S, et al.

- Antiangiogenics and immunotherapies in cervical cancer: an update and future's view[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(6): 115.
- [3] PATASOVA K, LUNDBERG I E, HOLMQVIST M. Genetic influences in cancer-associated myositis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2023, 75(2): 153-163.
- [4] VAN DEN HELDER R, STEENBERGEN R D M, VAN SPLUNTER A P, et al. HPV and DNA methylation testing in urine for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(10): 2061-2068.
- [5] LIANG J, VON DEN HOFF J, LANGE J, et al. MSX1 mutations and associated disease phenotypes: genotype-phenotype relations [J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24(12): 1663-1670.
- [6] PARK K, KIM K, RHO S B, et al. Homeobox Msx1 interacts with p53 tumor suppressor and inhibits tumor growth by inducing apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 749-757.
- [7] YUE Y J, ZHOU K, LI J C, et al. MSX1 induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest and apoptosis by suppressing Notch signaling and is frequently methylated in cervical cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 4769-4780.
- [8] LU Y L, TANG W C, WANG X Y, et al. Development of potential prognostic biomarkers based on DNA methylation-driven genes for patients with endometrial cancer [J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 10541-10555.
- [9] LEE Y, DHO S H, LEE J, et al. Hypermethylation of PDX1, EN2, and MSX1 predicts the prognosis of colorectal cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2): 156-168.
- [10] RAMALHO-CARVALHO J, HENRIQUE R, JERÓNIMO C. Methylation-specific PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1708: 447-472.
- [11] KOH W J, ABU-RUSTUM N R, BEAN S, et al. Cervical cancer, version 3.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019, 17(1): 64-84.
- [12] LI L C, DAHIYA R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1427-1431.
- [13] LI L M, XU C, LONG J, et al. E6 and E7 gene silencing results in decreased methylation of tumor suppressor genes and induces phenotype transformation of human cervical carcinoma cell lines [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23930-23943.
- [14] FAN D M, WANG Y, QI P W, et al. microRNA-183 functions as the tumor suppressor *via* inhibiting cellular invasion and metastasis by targeting MMP-9 in cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 141(1): 166-174.
- [15] SENCHENKO V N, KISSELJOVA N P, IVANOVA T A, et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(4): 409-420.
- [16] GARCIA-FERNÁNDEZ J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters[J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(12): 881-892.
- [17] NASSIF A, SENUSSI I, MEARY F, et al. Msx1 role in craniofacial bone morphogenesis[J]. *Bone*, 2014, 66: 96-104.
- [18] LALLEMAND Y, NICOLA M A, RAMOS C, et al. Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development [J]. *Development*, 2005, 132(13): 3003-3014.
- [19] SAADI I, DAS P, ZHAO M L, et al. Msx1 and Tbx2 antagonistically regulate Bmp4 expression during the bud-to-cap stage transition in tooth development [J]. *Development*, 2013, 140(13): 2697-2702.
- [20] DAVALOS V, ESTELLER M. Cancer epigenetics in clinical practice[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(4): 376-424.
- [21] GOSDEN R G, FEINBERG A P. Genetics and epigenetics: nature's pen-and-pencil set [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(7): 731-733.
- [22] ZHOU B H, LIN W L, LONG Y L, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 95.
- [23] REVET I, HUIZENGA G, CHAN A, et al. The MSX1 homeobox transcription factor is a downstream target of PHOX2B and activates the Delta-Notch pathway in neuroblastoma [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(4): 707-719.
- [24] PARK J, PARK K, KIM S, et al. Msx1 gene overexpression induces G1 phase cell arrest in human ovarian cancer cell line OVCAR3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(5): 1234-1240.
- [25] HU G, LEE H, PRICE S M, et al. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1 [J]. *Development*, 2001, 128(12): 2373-2384.
- [26] YUN J, ESPINOZA I, PANNUTI A, et al. p53 modulates Notch signaling in MCF-7 breast cancer cells by associating with the Notch transcriptional complex *via* MAML1 [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(12): 3115-3127.