

基因体甲基化在舌粘膜癌变中的变化

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, 云南 昆明 650021; 2) 昆明医科大学第一附属医院病理科;
3) 整形外科, 云南 昆明 650031)

[摘要] **目的** 了解舌粘膜癌变中基因体甲基化的差异表达基因。**方法** 用浓度 50 mg/L 的 4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)诱导 C57BL/6 小鼠舌癌。基因芯片和甲基化 DNA 免疫沉淀测序(MeDIP-Seq)检测 0 周、12 周、28 周(代表正常、癌前、癌变)的舌粘膜的基因表达和基因组 DNA 甲基化。在人正常舌粘膜和癌前病变组织中用 qRT-PCR 和飞行质谱检测泛素羧基水解酶 CYLD 的 mRNA 表达和基因体甲基化。**结果** 正常、癌前和舌癌 3 组间基因体 MeDIP-score($mean \pm s$) 分别是(5.58 ± 14.80)、(5.79 ± 13.35)、(5.83 ± 17.25), 差异无统计学意义($H = 100.75, P > 0.05$)。3 组间 145 个差异表达基因伴基因体甲基化改变。CYLD 在人癌前病变组织中表达降低伴有基因体甲基化降低($P < 0.05$)。**结论** 舌粘膜癌变有多个基因体甲基化异常的差异表达基因, CYLD 在人癌前病变中低表达可能与基因体甲基化有关。

[关键词] 舌癌; 动物模型; 甲基化; 基因体; 差异表达基因

[中图分类号] R622.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)07-0023-07

Changes of Genebody Methylation in Lingual Carcinogenesis

LIU Hua¹⁾, YUE Wanyuan¹⁾, SHAO Shuai¹⁾, SUN Jiaping¹⁾, YANG Ying²⁾, DAI Xiaoming³⁾

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

[Abstract] **Objective** To evaluate differentially expressed genes with correlation of gene body methylation. **Methods** The lingual carcinogenesis was induced through the delivery of drinking water of 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO) with a density of 50 mg/L. The lingual mucosae specimens were harvested at 0, 12, 28 weeks, which represented normal, pre-cancer, and cancer individually. The microarray and methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-Seq) were used for the evaluation of gene expression and global DNA methylation in these specimens. The mRNA expression of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD was tested with qRT-PCR in human normal and dysplasia mucosa. **Results** There were no statistical differences in gene body methylation among normal (C), pre-cancer (M), and cancer (E) ($mean \pm sofMeDIP-score$ were 5.58 ± 14.80, 5.79 ± 13.35, 5.83 ± 17.25 individually, $H = 100.75, P > 0.05$) There presented 145 differentially expressed genes with positive correlation to gene body methylation changes. The expression of CYLD mRNA was decreased in human dysplasia compared to normal mucosa with downregulation of gene body methylation. **Conclusions** There are many differentially expressed genes with a positive correlation to gene body methylations. The expression of CYLD is downregulated with the downregulation of gene body methylation in earlier stage during tongue

[收稿日期] 2023-12-22

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 [202001AY070001-253; 2018FE001(-216)]

[作者简介] 刘华(1975~), 女, 四川绵竹人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事口腔肿瘤和唇腭裂防治研究工作。

carcinogenesis.

[**Key words**] Tongue cancer; Animal model; Methylation; Gene body; Differentially expressed gene

舌癌占口腔癌 40%~60%，吸烟、饮酒、咀嚼槟榔是舌癌的诱因，但具体的机制不清^[1]。舌癌 5 a 生存率不高，寻找可靠的治疗靶点是提高舌癌疗效的关键。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。有研究应用 4NQO 及槟榔碱诱导小鼠舌癌，用非商业化的鼠 CpG 岛芯片检测，发现 34 个高甲基化的基因^[2]。

笔者前期建立 4NQO 诱导 C57BL/6 小鼠舌癌模型，发现在实验的 12 周和 28 周黏膜病变主要为不典型增生和高分化鳞癌，因此，上述时间点可以作为研究舌粘膜癌变的早期和晚期的时间点^[3]。哺乳动物的 CpG 二核苷酸胞嘧啶环的 C5 被甲基化修饰后改变染色体结构和稳定性，影响基因的表达。

本实验对小鼠舌粘膜癌变组织，采用检测通量更高的甲基化 DNA 免疫沉淀测序检测 DNA 甲基化变化，探讨基因体甲基化在舌癌发病中相关基因的变化，在人舌黏膜中验证 CYLD 表达和甲基化变化，进而找寻舌癌防治的新靶点。

1 材料与方法

本研究动物实验及人体标本采集遵循赫尔辛基宣言^[4]的规定，获得云南大学附属医院及昆明医科大学第一附属伦理委员会审批(KMMU2020101, 2022008)。

1.1 实验动物

25 只雌性 C57BL/6 小鼠，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 病例资料

正常舌粘膜与异常增生病例各 5 例，取自云南大学附属医院口腔颌面外科。正常舌粘膜组中位年龄 42 岁。男：女为 4：1，异常增生组中位年龄 48 岁，均为男性。异常增生均为轻、中度异常增生。根据伦理审查要求，患者均签署知情同意书。

1.3 实验试剂及设备

4NQO 购自美国 Sigma 公司，1, 2 丙二醇分析纯自中国西陇化工股份有限公司，NaHSO₃ 自美国 Zymo，TRIzol 自美国 Invitrogen，小鼠全基因组芯片自美国 Agilent，Genomic DNA Sample Kit

自美国 Illumina，抗 5-甲基胞嘧啶抗体自美国 Diagenode，2× QuantiFast® SYBR® Green PCR Master Mix 自德国 Qiagen，384-well SpectroCHIP® bioarray 芯片、EpiTYPER™ Reagent Kit、MassARRAY EpiTYPER™ 软件自美国 Agena。Bioruptor 超声波粉碎仪自美国 Diagenode。GeneAmp® PCR System 9700 自美国 Applied Biosystems，Light-Cycler® 480 II Real-time PCR Instrument 自瑞士 Roche，MassARRAY Analyzer 4.0 质谱仪自美国 Agena。

1.4 小鼠舌癌诱导

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 4NQO 溶于 1, 2 丙二醇，用蒸馏水稀释至终浓度为 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。分别在 0、12、28 周处死实验组动物各 5 只，至 28 周时处死对照组动物^[3]。

1.5 HE 染色

舌粘膜 10% 甲醛固定，梯度酒精脱水，二甲苯透明，浸蜡包埋。切片厚度 5 μm，脱蜡，Mayer 氏苏木素和 1% 水溶性伊红分别染色 5 min。经脱水、透明后封片。

1.6 基因芯片检测

将 0、12、28 周小鼠舌粘膜样品各 3 份，TRIzol 提取总 RNA，取 1 μg 总 RNA 扩增后标记，与小鼠全基因组芯片杂交。在至少 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 2 组间差异为 2 倍 ($\log_2 \geq 2.0$) 并且 $P \leq 0.05$ 。

1.7 甲基化 DNA 免疫沉淀测序

Qiagen Dneasy 试剂盒提纯基因组 DNA。用 Bioruptor 超声破碎仪将 DNA 分解为 200~900 bp 片段。根据 Genomic DNA Sample 试剂盒指示进行操作，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 (MeDIP-score) 表示，定义为每千碱基对扩展读数的值。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。

1.8 qRT-PCR

TRIzol 提取总 RNA。2 步法：逆转录和聚合

酶连反应。逆转录：0.5 μg RNA, 2 μL 的 4 \times gDNA wiper Mix, 加蒸馏水至 8 μL 。在 GeneAmp[®] PCR System 9700 中 42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 反应。第二步加入 2 μL 的 5 \times HiScript II Q RT SuperMix IIa, 按条件：25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。产物稀释 10 倍-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。聚合酶连反应在 LightCycler[®] 480 II Real-time PCR 仪中进行。反应：1 μL 的 cDNA, 5 μL 的 2 \times QuantiFast[®] SYBR[®] Green PCR Master Mix, 正、反向引物各 0.2 μL , 3.6 μL 蒸馏水。按条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 随后 40 循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。重复 3 次。CYLD 引物：正向 GTTCTTTCTCCATCACTTGCT, 反向 TGTA-CCGCTTATCCAACACTACAT。mRNA 表达量与内参 GAPDH 标准化, 引物：正向 TCATCCCAGAGC-TGAACG, 反向 TCATACTTGGCAGGTTTCTCC。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。将人正常粘膜组织中 CYLD 表达设定为 1, 不典型增生组织表达量大于 1 为高表达, 反之则低表达。

1.9 飞行质谱

CYLD 引物正向 TTTAAGTTTTGTGGTGTAGG-AGTTT, 反向 ATCTATTACAAAAAACCCAATC-AAA。提取纯化基因组 DNA, NaHSO₃ 处理, 低速离心备用。PCR 反应: ddH₂O 4.90 μL , 10 \times PCR Buffer 0.80 μL , dNTPs 0.80 μL , PCR Enzyme 0.10 μL , 正反向引物各 0.20 μL , DNA template 1.00 μL 。条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 45 个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。虾碱性磷酸酶 (SAP) 反应: 蒸馏水 1.70 μL , SAP 0.30 μL , PCR 产物 5.00 μL 。每个孔中加入 7 μL SAP 反应液, SAP 反应: 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。T 切/核酸酶 A 消化反应体系: 蒸馏水 3.21 μL , 缓冲液 0.89 μL , T Cleavage Mix 0.22 μL , DTT 0.22 μL , T7 RNA & DNA 聚合酶 0.40 μL , 核酸酶 A 0.06 μL , PCR/SAP mix 2.00 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 3 h。在 384/6 MG Dimple 板里均匀填充树脂

使其晾干, 每个孔中加 16 μL 水, Dimple 板翻转后轻敲使树脂使之落入样本板的孔中, 样本板密封后置于翻板离心机中室温旋转混匀 30 min, 将纯化后的产物移至 SpectroCHIP 芯片上。将点样后的芯片使用 MALDI-TOF 分析。检测结果使用 EpiTYPER[™] 软件获取原始数据和圆点图。

1.10 统计学处理

使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 差异表达基因和差异甲基化分析采用 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。实验动物正常、癌前、癌变基因体 MeDIP-score 数据进行 *Kruskal-Wallis* 检验。人正常与异常增生舌粘膜基因体 MeDIP-score 数据进行 *Mann-Whitney* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功诱导小鼠舌黏膜癌变模型

在 12、28 周成功诱导了小鼠舌粘膜不典型增生和鳞癌, 见图 1。正常人舌粘膜和异常增生组织, 见图 2。正常人舌粘膜为复层角化上皮, 表面为角化层, 细胞排列规则, 基底膜连续, 见图 1A。12 周时上皮层次紊乱, 细胞核浓染, 细胞多行性, 见图 1B。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, 见图 1C。

2.2 基因体甲基化构成情况

MeDIP-Seq 和基因芯片结果上传至 GEO (GSE102488, GSE101469)。本研究检测 21, 627 个基因体甲基化。0、12、28 周时基因体甲基化构成见图 3, MeDIP-score 的 $mean \pm s$ 分别为 (5.58 \pm 14.80)、(5.79 \pm 13.35)、(5.83 \pm 17.25)。三者间两两比较差异无统计学意义 ($H = 100.75$, $P > 0.05$)。

2.3 基因体甲基化异常情况

正常粘膜、癌前病变和癌变 3 组间比较, 发现癌前病变与正常粘膜间, 癌变与正常粘膜间以

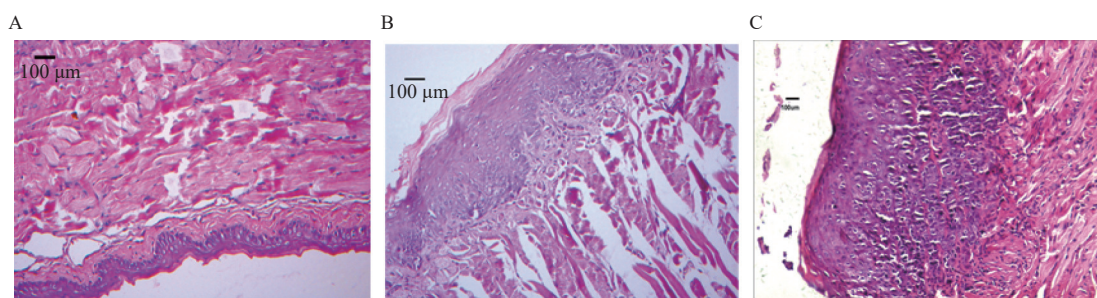


图 1 4NQO 诱导 C57BL/6 舌粘膜癌变 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 The lingual carcinogenesis in C57BL/6 mice induced by 4NQO (HE, $\times 200$)

A: 0 周, 正常粘膜; B: 12 周, 中度不典型增生; C: 28 周, 鳞癌。

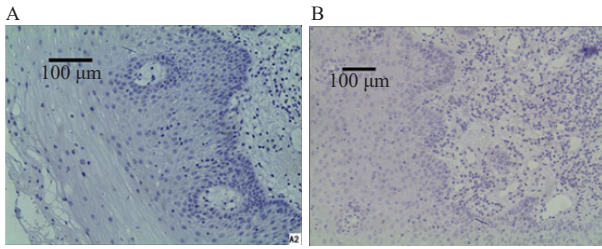


图 2 人正常舌黏膜和异常增生(×200)

Fig. 2 Human normal tongue mucosa and moderate dysplasia. magnification of (×200)

A: 正常舌黏膜; B: 舌黏膜异常增生。

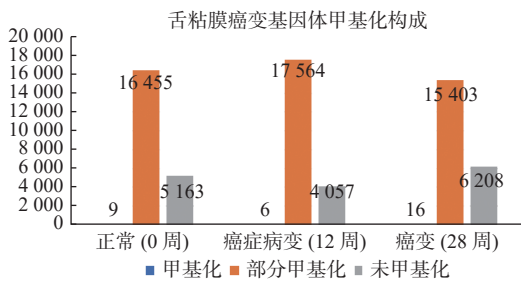


图 3 舌黏膜癌变基因体甲基化构成

Fig. 3 Numbers of methylated, partially methylated and unmethylated gene bodies

MeDIP-score < 4.19 定义为未甲基化, 介于 4.19 ~ 41.01 定义为部分甲基化, > 41.01 为甲基化。

及癌变与癌前病变间上调和下调的基因数分别为 41、10 个, 33、12 个以及 14、35 个。上调基因伴基因体甲基化升高, 下调基因伴基因体甲基化降低, 见表 1。

145 个基因体甲基化异常的差异表达基因中, 3 个基因同时伴有启动子区的甲基化异常(启动子区甲基化异常的差异表达基因本文未显示)。其中 Tnpol 在癌前病变较正常粘膜中表达升高, Spp1, Fam81a 在舌癌较癌前病变中表达升高。CYLD 通过调节核因子 κ B(NFKB)活性参与细胞生存、增生和分化等多个过程。在人异常增生组织中, CYLD 表达较人正常粘膜中降低($2^{-\Delta\Delta Ct}=0.678$), 见图 4。基因体甲基化较正常粘膜降低($u=1.99, P<0.025$), 见图 5。

3 讨论

3.1 动物模型的优点

本研究应用 4NQO 诱导 C57BL/6 小鼠舌黏膜癌变模型, 研究癌变早期和晚期基因体甲基化变化。上述模型具有以下几个特点: 首先, 模型中早期(12 周)和晚期(28 周)病变的一致性较好。在早期阶段, 舌黏膜病理变化主要表现为轻或中度

异常增生, 而 28 周时舌黏膜的病理变化均为高分化鳞癌, 这样的一致性为后续发病机理的研究提供了可靠的组织基础。其次, 本动物模型采用较低浓度 4NQO 作为诱癌剂, 诱导时间较长。这种诱导方式很好地模仿了人类舌癌发生过程中长期接触低浓度致癌物的场景。最后, 实验周期为 28 周, 跨越实验动物从幼年到成年的过程, 与舌癌在人类中发生的年龄相似^[3]。

3.2 基因体甲基化影响转录机制

DNA 甲基化是最常见的表观遗传修饰之一。启动子区的甲基化抑制相关基因表达, 而基因体的甲基化作用则相反^[5]。基因体甲基化影响转录机制: (1)抑制错误转录的起始。基因体的甲基化通过抑制 RNA 聚合酶 II 与异位转录起始因子的结合维持了基因转录的准确性^[6]; (2)抑制转录的延伸。基因体的甲基化可促进组蛋白氨基端赖氨酸的去乙酰化, 染色质浓缩, 抑制转录因子的结合, 从而抑制了 RNA 聚合酶 II 的转录延伸作用^[6]; (3)调节可变剪切。基因体甲基化调节可变剪切可用动力模型和招募模型 2 个理论解释。动力模型认为甲基化修饰影响转录的速度, 包括剪切位点、调节序列在新前体 mRNA 的出现速率, RNA 聚合酶 II 移动速率和染色质的打开状态。在招募模型中, 剪切调节通过配体蛋白结合到甲基化的位点后招募剪切蛋白完成^[7]; (4)增强子甲基化。在常规增强子区 DNA 高甲基化伴随组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的乙酰化(H3K27ac)可维持 DNA 稳定和转录因子结合区的低甲基化, 而增加基因的转录。增强子富集 CpG 岛(CpG island, CGI), 通常在肿瘤中过甲基化^[8]。

3.3 基因体甲基化异常在其它肿瘤中的表现

小肠上皮癌生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^[9]。在对宫颈癌、肠癌、胃癌、前列腺癌和肝癌的正常、癌前和癌变 3 阶段标本的基因组甲基化研究中, 分别有 362/486 个癌基因/抑癌基因基因体甲基化变化, 在转录起始位点、基因体和非翻译区 3 者中, 基因体甲基化的变化是最常见的^[10]。本研究中正常、癌前、舌癌 3 个阶段粘膜基因体 MeDIP-score 无差别, 与小肠上皮癌生细胞的癌变不同, 说明在不同的肿瘤中, 基因体甲基化变化可能存在差异。

3.4 口腔癌中已知基因体甲基化异常基因与本研究结果不同的原因

在口腔癌中, 多个基因甲基化异常被发现。

表 1 基因组甲基化异常的差异表达基因

Tab. 1 Differentially expressed genes with positive correlation to gene body methylation

序号	癌前vs正常		癌变vs正常		癌变vs癌前	
	上调	下调	上调	下调	上调	下调
1	Gm12657	Ddx25	Hps3	Irf3	Odf2	Msln
2	Rnf14	Cyld	Mreg	Zfp939	Uba1	Slc35a5
3	Rsb11	2610507B11Rik	Gm12657	Tesk1	2010012O05Rik	Csprs
4	Celf2	5330434G04Rik	Edaradd	Gab3	Wdyhv1	Ywhaz
5	Mapk3	Dclk2	Gm7120	Ntng1	Cdca5	Ada
6	Rdh9	Ecsit	Pemt	Sema3b	Fbxo24	Bpifb6
7	Ache	Il20	Plekhb2	Ptges31	Tmem37	A730008H23Rik
8	Stard10	AI846148	Nop14	Bace2	Spp1	Stard10
9	Klhl7	Iars2	Hivep1	Gm3086	Plekhg4	Casc4
10	Mfsd1	Gm3086	Fam98b	Kcnn4	Fam81a	Igsf5
11	Arf4		Zfp763	Oas2	a	Fubp1
12	Zbtb18		Pptc7	Tbx22	Ewsr1	Cdk15
13	Kcnj2		Cdc42se2		Mfsd2a	Fut2
14	Ap1s2		Slfn4		Shc4	H2-T9
15	Setd1b		Npl			Tspan32
16	Cyth3		Exoc6			Car4
17	Nek1		Son			Mapkapk2
18	Cpn1		Rsb11			Slc25a39
19	Aqr		Nacad			Eif5a
20	Abca5		Ddx20			Bace2
21	Pomgnt1		Atf1			Hira
22	Nfkb1		Vps37c			Azgp1
23	Kalrn		Nfkbiz			Hmgcl1
24	Dsg1b		Prkaa1			Cfl1
25	Sec62		Pik3c2a			Mamstr
26	Camk2a		Ankfn1			Celf2
27	Ube2q2		Mfsd1			Gfra4
28	Ppp4r2		Cdk1			Papss2
29	Lrrc58		Bcas2			Smurf2
30	Tnpo1		Rad21			Cat
31	Zfp763		Zfand1			Myoz3
32	Il2rg		Mmgt1			Tmed3
33	Slc25a39		Trip13			Prb1
34	Nfe211					Dyrk1b
35	Tob1					Prrt2
36	H2-T10					
37	Gyk					
38	Tmem55b					
39	Zfp386					
40	Akr1b3					
41	Tnfaip6					

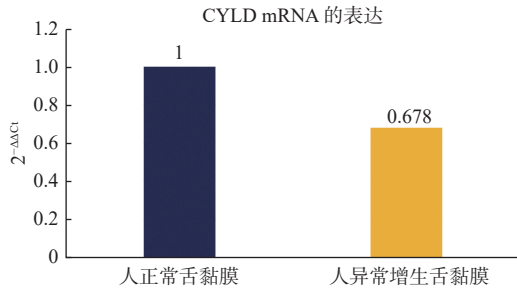


图 4 人异常增生舌组织中 CYLD 的 mRNA 表达较正常粘膜降低

Fig. 4 Expression of CYLD mRNA downregulated in human dysplasia mucosa compared to normal mucosa

在口腔癌的重度吸烟患者中 AHRR, ADAMTS2 基因的 CGI 分别低甲基化和过甲基化。在无肿瘤的重度吸烟者中, FAM184 基因过甲基化^[11]。口腔癌中 DNMT3A 和 TET2 启动子区低和高甲基化, 致 DNMT3A 高表达和 TET2 低表达^[12]。GP1BB, MIR193, ZAP70 在肿瘤和正常组织中甲基化差异表达^[13]。Ccnd2, Chd1, Cdh13, Cdkn1c, Neurog1, Gstp1, 和 Runx3 肿瘤抑制基因在口腔癌中启动子区高甲基化。致基因低表达, 与肿瘤患者生存负相关^[14]。PI3, IFNG, EMR3, AIM2, WT1, TIMP3, TAL1, SOX17, RASSF1, NPY, MME, MLH1, MGMT, HTR1B, HS3ST2, HOXA9, HOXA11, EYA4, EPHA5, DAPK1, CDKN2A, CALCA 等基因在增生性疣状白斑所致口腔癌中甲基化异常, 除 PI3、TAL1 外均存在基因体甲基化异常^[15]。889 个差异甲基化区域在口腔癌中特异表达, 涉及 10 个基因(DAPK1, CDH1, PAX1, CALCA 及 TIMP3 等)^[16]。本研究获得的 3 组间 145 个差异表达基因伴随基因体甲基化变化。在 145 个基因中, 3 个基因的启动子区甲基化异常。

本研究获得的基因中与上述研究结果无相似性。可能的原因是: 首先, 上述研究中多数研究针对启动子区甲基化和基因表达的反向相关性(启动子区过甲基化, 基因表达抑制, 反之亦然)来研究获得候选基因, 而本研究是从基因体甲基化异常发现候选基因。其次, 上述研究中筛选目标基因标准与本研究不同。本研究筛选的候选基因除与基因体甲基化正向相关(基因表达升高伴基因体高甲基化, 反之表达降低伴基因体低甲基化), 候选基因必需是在两组间差异表达基因。而上述研究中获得的候选基因均不是本研究的差异表达基因。故而本研究获得的目标基因与上述研究存在差别。由于本研究筛选候选基因的条件更为严格, 获得的候选基因在后续的验证中获得阳性结果的可能性更高。

3.5 本研究中同时存在启动子区和基因体甲基化异常基因在口腔癌中表达的意义

Tnpo1 在癌前病变较正常粘膜中表达升高, Spp1, Fam81a 在舌癌较癌前病变中表达升高。3 者的表达异常同时伴随启动子区甲基化和基因体甲基化的异常, 说明 3 者在舌粘膜癌变中表达异常与甲基化异常密切相关。Tnpo1 功能为核蛋白转运受体, 将目标蛋白向核内转入/出: 如 M9 包含蛋白、核糖体蛋白 RPL23A, RPS7 和 RPL5 的核转入, RNP A1/A2 的转出^[17], 该基因表达异常与口腔癌的关系不清。Spp1 特异性脱除鞘氨醇 1 磷酸(S1P), 双羟鞘氨醇 1 磷酸和植物鞘氨醇 1 磷酸的磷酸基团。对神经酰胺 1 磷酸, 溶血磷脂酸或磷脂酸无作用。通过调节 S1P 水平调节多个生物学过程^[18]。在舌癌中高表达, 与预后相关^[19], 参与免疫逃逸^[20]。Fam81a 的功能与舌癌的关系不清。

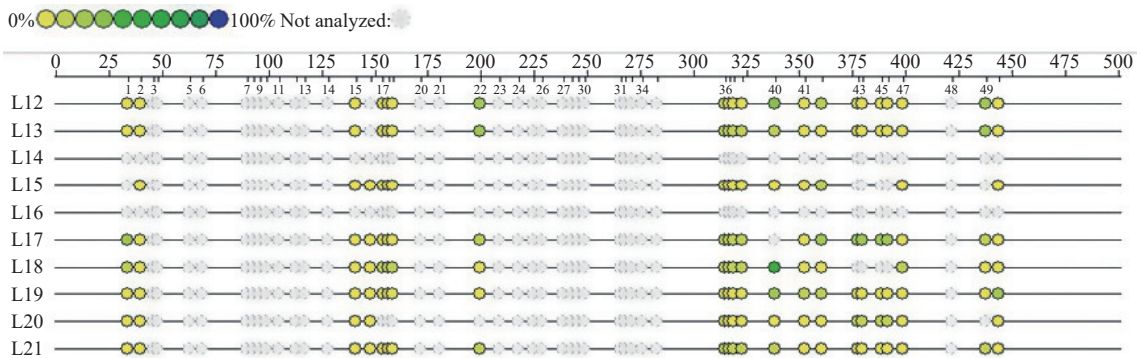


图 5 人舌粘膜、异常增生 CYLD 基因体甲基化飞行质谱检测结果

Fig. 5 The MassaARRAY results of CYLD gene body methylation

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。L12 ~ 16 为异常增生舌黏膜, L17 ~ 21 为人正常舌黏膜。

本研究发现 CYLD 在舌粘膜异常增生中表达降低可能与基因体甲基化降低有关。并在人标本中验证上述结论, 说明本研究思路比较合理。研究甲基化异常对应的目标基因的方法中, 从基因启动子区甲基化异常寻找目标基因是常规的做法。而基因体甲基化导致基因表达异常也是疾病发生的重要机制。本研究中显示舌粘膜癌变过程中启动子区甲基化和基因体甲基化异常相关的目标基因相同者较少(3/145), 特性的由于基因体甲基化异常相关的基因较多(142/145)。因此, 研究基因体甲基化变化为找寻舌癌防治的新靶点提供了全新的思路。

[参考文献]

- [1] Siegel R L, Giaquinto A N, Jemal A. Cancer statistics, 2024[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12–49.
- [2] 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.
- [3] Lai Z L, Tsou Y A, Fan S R, et al. Methylation-associated gene silencing of RARB in areca carcinogens induced mouse oral squamous cell carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 378358.
- [4] Human D. Declaration of helsinki[J]. *Lancet*, 2001, 357(9251): 236.
- [5] Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes[J]. *Nature*, 2015, 518(7539): 317–330.
- [6] Lorincz M C, Dickerson D R, Schmitt M, et al. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(11): 1068–1075.
- [7] Naftelberg S, Schor I E, Ast G, et al. Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure[J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 165–198.
- [8] Bell J S K, Vertino P M. Orphan CpG islands define a novel class of highly active enhancers[J]. *Epigenetics*, 2017, 12(6): 449–464.
- [9] Huang K K, 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): 137–150e5.
- [10] Zhang F F, Zhang X, Zhang H K, et al. Pan-precancer and cancer DNA methylation profiles revealed significant tissue specificity of interrupted biological processes in tumorigenesis[J]. *Epigenetics*, 2023, 18(1): 2231222.
- [11] Hernández H G, Aranzazu-Moya G C, Pinzón-Reyes E H. Aberrant *AHRR*, *ADAMTS2* and *FAM184* DNA methylation: Candidate biomarkers in the oral rinse of heavy smokers[J]. *Biomedicine*, 2023, 1(7): 1797.
- [12] Li X, Li Z, Gao Q, et al. Correlation of DNA methylation of DNMT3A and TET2 with oral squamous cell carcinoma[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 15.
- [13] Gabusi A, Gissi D B, Grillini S, et al. Shared epigenetic alterations between oral cancer and periodontitis: A preliminary study[J]. *Oral Dis*, 2023, 9(5): 2052–2060.
- [14] Aghiorghiesei O, Irimie AI, Braicu C, et al. Epigenetic methylation changes: Implication as biomarkers in oral and maxillofacial area cancers[J]. *Med Pharm Rep*, 2023, 96(3): 310–317.
- [15] Okoturo E, Green D, Clarke K, et al. Whole genome DNA methylation and mutational profiles identify novel changes in proliferative verrucous leukoplakia[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2023, 135(6): 893–903.
- [16] Rivera-Peña B, Folawiyo O, Turaga N, et al. Promoter DNA methylation patterns in oral, laryngeal and oropharyngeal anatomical regions are associated with tumor differentiation, nodal involvement and survival[J]. *Oncol Lett*, 2024, 27(3): 89.
- [17] Dean K A, von Ahsen O, Görlich D, et al. Signal recognition particle protein 19 is imported into the nucleus by importin 8 (RanBP8) and transportin[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 19): 3479–3485.
- [18] Giussani P, Maceyka M, Le Stunff H, et al. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase regulates endoplasmic reticulum-to-golgi trafficking of ceramide[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(13): 5055–5069.
- [19] Lv X, Yu X. Signatures and prognostic values of related immune targets in tongue cancer[J]. *Front Surg*, 2023, 9: 952389.
- [20] Thakore V P, Patel K D, Vora H H, et al. Up-regulation of extracellular-matrix and inflammation related genes in oral squamous cell carcinoma[J]. *Arch Oral Biol*, 2024, 161: 105925.