

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.021

卵巢上皮癌中 ING4 基因启动子的甲基化状态及其临床意义 *

柳英兰¹ 王英炜² 吴迪¹ 袁晶¹ 郑建华¹

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院妇产科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学附属第一医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨卵巢上皮癌中 ING4 基因启动子的甲基化状态及其临床意义。**方法:**收集 2005 年 7 月至 2012 年 6 月哈尔滨医科大学附属第一医院行全面分期手术并经病理检查确诊的 150 例卵巢上皮癌组织标本,并以同期因子宫肌瘤或子宫腺肌症行子宫全切除术或次全切除术并经病理检查确诊为正常卵巢组织的 150 例标本作为对照组。采用甲基化特异性 PCR(MSP)技术检测卵巢上皮癌组织与正常卵巢组织中 ING4 基因启动子的甲基化状态,蛋白印迹法检测 ING4 蛋白的表达,并分析 ING4 基因启动子的甲基化状态与卵巢上皮癌临床病例特征的关系。**结果:**卵巢上皮癌组织中 ING4 基因启动子的甲基化阳性率为 42.7%(64/150),明显高于正常卵巢组织(4%,6/150),差异有统计学意义($P<0.05$)。ING4 基因启动子甲基化阳性的卵巢上皮癌组织中 ING4 蛋白表达阴性或弱阳性;ING4 基因启动子甲基化阴性的卵巢上皮癌和正常卵巢组织中 ING4 蛋白表达阳性;在 64 例 ING4 基因启动子甲基化的卵巢上皮癌组织中,ING4 蛋白表达强度与 ING4 基因启动子的甲基化程度呈负相关($r=-0.435, P<0.05$)。卵巢上皮癌组织中,ING4 基因甲基化的阳性率随着手术病理分期和组织学分级的增加而增加($P<0.05$);卵巢透明细胞癌(55.6%, 10/18)和卵巢子宫内膜样癌(59.3%, 16/27)中 ING4 基因甲基化的阳性率显著高于浆液性囊腺癌(33.9%, 20/59)和粘液性囊腺癌(39.1%, 18/46)($P<0.05$);ING4 基因启动子的甲基化状态与患者的年龄、有无腹水及淋巴结转移均无显著相关性($P>0.05$)。**结论:**ING4 基因启动子的甲基化可能促进了其在卵巢上皮癌组织中的表达失活,进而促进了卵巢上皮癌的生长和分化。

关键词:卵巢上皮癌;肿瘤生长抑制因子 4;甲基化;临床意义

中图分类号:R737.31 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)04-688-06

Analysis of the Significance of Status of ING4 Gene Promoter Methylation in Ovarian Epithelial Cancer Tissue*

LIU Ying-lan¹, WANG Ying-wei², WU Di¹, YUAN Jing¹, ZHENG Jian-hua¹

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2 Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the status of ING4 gene promoter methylation and its clinical significance in epithelial ovarian cancer. **Methods:** 150 cases of ovarian epithelial cancer tissues that were diagnosed by pathological examination after the comprehensive staging operation by the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University from July 2005 to June 2012 were collected, and 150 cases of normal ovary tissues which were diagnosed through the pathological examination after the womb total resection caused by the uterine fibroid or adenomyosis in the same period were used as the control group. The methylation specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of ING4 gene promoter, western blot detection was used to investigate the presentation of ING4 protein, the relationship between the methylation status of ING4 gene promoters and clinical features of the ovarian epithelial cancer was also analyzed. **Results:** The positive methylation rate of ING4 gene promoter in epithelial ovarian cancer tissue was 42.7% (64/150), which was obviously higher than that in the normal ovarian tissue (4%, 6/150)($P<0.05$). The ING4 protein of the positive methylation ING4 gene promoter in epithelial ovarian cancer tissue presented negative or weakly positive; however, the ING4 protein of the negative methylation ING4 gene promoters of epithelial ovarian cancer tissue and normal ovarian tissue presented positive; in 64 cases of methylated ING4 gene promoter of epithelial ovarian cancer, the ING4 protein presentation intensity of the ING4 gene promoter was negatively correlated with methylation level ($r=-0.435, P=0.002$). ING4 gene methylation positive rate increased along with the growth of surgery pathological staging ($P<0.05$) as well as increase with histopathological grade ($P<0.05$); among the different pathological types, ovarian clear cell carcinoma (55.6%, 10/18) and ovarian endometrioid carcinoma ING4 gene in epithelial ovarian cancer methylation-positive rate (59.3% 16/27) was obviously higher than serous adenocarcinoma (33.9%, 20/59) and mucinous cystadenocarcinoma (39.1%, 18/46) ($P<0.05$); ING4 gene promoter methylation status is unrelated with the patient's age, clinical stage, and lymph node metastasis ($P>0.05$). **Conclusion:** The methylation of ING4 gene promoter may result in the loss of ING4 protein

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目资助(12521233)

作者简介:柳英兰(1975-),女,医学博士,硕士生导师,研究方向:妇科肿瘤与优生遗传,

E-mail: liuyinglan1975@163.com

(收稿日期:2013-05-20 接受日期:2013-06-14)

expression in epithelial ovarian cancer, which thus promotes the growth and differentiation of epithelial ovarian cancer.

Key words: Epithelial ovarian cancer; Tumor growth inhibitory factor 4; Methylation; Clinical significance

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-688-06

前言

卵巢癌的发生、发展是多基因参与的、多阶段、多步骤的演变过程,肿瘤生长抑制基因 ING4 与其关系密切。随着卵巢癌恶性程度的增加,ING4 基因的表达下降,但其具体原因尚不明确,可能与 DNA 启动子甲基化修饰参与调控抑癌基因的表达等因素有关。基因甲基化是一种可遗传的、酶诱导的、对基因结构的特殊碱基序列起稳定作用、负责编码正常基因的化学修饰,哺乳动物基因甲基化对胚胎发育、细胞增殖和分化、基因表达的调节、表型遗传和肿瘤发生等都具有十分重要的意义^[1,2]。目前,通过对抑癌基因启动子的甲基化研究发现,抑癌基因启动子的过程甲基化是抑癌基因失活的重要机制^[3-5]。既往的研究发现,ING4 蛋白在卵巢上皮癌组织中表达下调^[6],但 ING4 基因失活的分子生物学机制尚未明确。本研究检测了卵巢上皮癌组织中 ING4 基因启动子甲基化状态,并分析其与卵巢上皮癌临床病理学特征的关系及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 资料来源

选取哈尔滨医科大学附属第一医院 2005 年 7 月至 2012 年 6 月经病理检查证实的卵巢上皮癌患者 150 例,行全面手术分期,取新鲜癌组织,一部分液氮保存,一部分用 10%甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,其中一张行 HE 染色复诊。患者年龄 27~79 岁,平均 53.4 岁;病理组织学分级:G1 48 例,G2 65 例,G3 37 例;手术病理分期:根据 2009 年国际妇产科联盟(FIGO)分期标准,I 期 18 例,II 期 43 例,III 期 58 例,IV 期 31 例;病理类型:浆液性囊腺癌 59 例,粘液性囊腺癌 46 例,子宫内膜样癌 27 例,透明细胞癌 18 例;淋巴结转移:有转移 36 例,无转移 114 例。所有卵巢上皮癌患者术前均未接受手术、化疗或激素治疗。另取同期因子宫肌瘤或子宫腺肌症行子宫全切或子宫次全切除患者,经病理确诊为正常卵巢组织 150 例作为对照组。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者均已签署知情同意书。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒和蛋白酶 K 购自美国 Sigma 公司,亚硫酸氢钠和对苯二酚(Sigma 公司) Wizard DNA Clean-Up System 试剂盒 (Promega 公司),DNA 甲基化试剂盒购自英国 New England Biolabs 公司,兔抗人多克隆 ING4 抗体为美国 Abcam 公司产品。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体购自哈尔滨弘博生物技术公司,应用 primer5.0 软件进行 ING4 基因引物设计,选择 ING4 基因转录起始位点上游 1000 bp 至第一外显子区富含 CG 位点密集的基因区 935~1109 为研究序列,基因长度 174 bp,包含 13 个 CG 位点。ING4 基因甲基化引物序列:上游:5-TAGGCGGGAAGTGTATAAAGGTAC,下游 5-AACTTCTAAAAACCTAAACGCC;非甲基化引物序列:上游 5-TAGGTGGGAAGTGTATAAAGGTATGA (扩增片段大小为

174bp);下游 5-AACTTCTAAAAACCTAAACACC,由上海生物技术工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 标本基因组 DNA 的提取 应用基因组 DNA 提取试剂盒提取液氮保存的标本组织基因组 DNA,具体的操作按说明书进行。置紫外线分光光度计测定其在波长 260nm 和 280nm 处的吸光度(A)值,用于测定 DNA 浓度。

1.3.2 MSP 技术检测 ING4 基因启动子的甲基化状态 定量后取 2 μ g DNA,采用 DNA 甲基化修饰试剂盒对基因组 DNA 进行甲基化特异性修饰,具体的操作按说明书进行。修饰后 DNA 用 Wizard DNA Clean-Up System 试剂盒纯化,并回收 DNA,溶于 20 μ L 灭菌去离子水,-20℃ 保存备用,用于 MSP 技术检测。PCR 反应体系 25 μ L,修饰后 DNA 3 μ L(100 ng/ μ L),PCR 缓冲液 5 μ L,DNA 聚合酶(10 $\times$ Taq 酶,5 U/ μ L)2 μ L,上下游引物各 1 μ L,dNTP 0.5 μ L(10 mmol/L),蒸馏水补至 25 μ L。反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,72℃ 延伸 7 min。取 5 μ L PCR 产物加入 2 μ L 6 $\times$ 上样缓冲液,于质量分数 2%琼脂糖凝胶上电泳,自动电泳凝胶成像分析系统扫描分析。在每批 PCR 扩增时均设置甲基化阳性对照(CpG 甲基化酶 M.Sss I 修饰后新鲜胎盘组织 DNA 为模板)、甲基化阴性对照(胎盘组织 DNA 为模板)和阴性对照(H₂O 为模板)。结果判定标准:如甲基化引物扩增阳性、非甲基化引物扩增阴性,即该基因完全甲基化,计为甲基化阳性;如甲基化引物和非甲基化引物均为阳性,即该基因部分甲基化,也计为甲基化阳性;如甲基化引物扩增阴性,非甲基化引物扩增阳性,即该基因未甲基化,计为甲基化阴性。如甲基化引物和非甲基化引物均为阴性,则实验失败,重做。计算甲基化阳性率:计划阳性率(%)=甲基化阳性率标本数/总标本数 $\times$ 100%。

1.3.3 蛋白印迹法检测 ING4 蛋白的表达 常规方法提取组织总蛋白,考马斯亮蓝法测蛋白浓度。100 μ g 总蛋白上样,1 $\times$ 十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate,SDS)缓冲液变性、电泳、低温转至硝酸纤维素膜,然后用 5%脱脂奶粉封闭,4 度过夜,再分别加 1:2000 的抗兔抗人多克隆 ING4 抗体及 1:750 抗 β -actin 抗体,室温、摇床 1 h,洗膜 3 次,加入二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体,稀释比例为 1:2000),室温、摇床 1 h。0.05%含吐温的三氨基甲烷缓冲盐溶液(tris-buffered saline with Tween,TBST)洗膜 2 次,ECL 试剂盒显色,暗室显影。灰度扫描用 KS400 图像分析系统,目的条带的光密度与相应的内参照 μ -actin 的光密度比值即为目的蛋白表达的相对表达值,进行荧光强度的分析,数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示,以 ING4 抗体说明书中推荐的宫颈癌细胞系 Hela 细胞为阳性对照。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,基因甲基化状态阳性率采用比较采用 χ^2 检验;免疫印迹检测的荧光强度比较采用两样本均数的 t 检验。卵巢上皮癌组织中 ING4 蛋白表达

与 ING4 基因启动子甲基化状态之间的相关性分析,采用 Pearson 相关分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢上皮癌组织与正常卵巢组织中 ING4 基因启动子的甲

基化状态

MSP 检测结果显示,150 例卵巢上皮癌组织中,64 例组织 ING4 基因启动子甲基化呈阳性(甲基化阳性率为 42.7%);150 例正常卵巢组织中仅 6 例组织 ING4 基因启动子甲基化呈阳性(甲基化阳性率 4%),两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

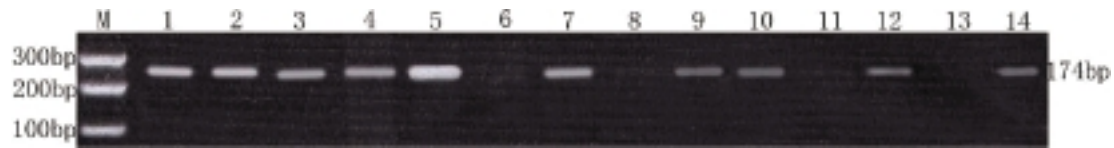


Fig.1 The methylation status of the ING4 promoter in Ovarian Epithelial Cancer and Normal Ovary tissue detected by MSP technology

1 methylating sample methylating primer amplification

2 unmethylating sample unmethylating primer amplification

3-8 Epithelial Ovarian Cancer Tissues(3 parts); 9-14 Normal Ovary Tissues(3 parts)

2.2 卵巢上皮癌组织及正常卵巢组织中 ING4 蛋白的表达及其与 ING4 基因启动子甲基化状态的相关性

蛋白印迹法检测结果显示,ING4 基因启动子甲基化阳性的卵巢上皮癌组织中 ING4 蛋白的阳性表达率及 ING4/ β -actin 平均灰度值均明显低于 ING4 基因启动子甲基化阴性的卵巢上皮癌组织和正常卵巢组织,图 2($P<0.05$)。ING4 基因启动子甲基化阴性的正常卵巢组织中 ING4 蛋白的含量显著高于 ING4 基因启动子甲基化阴性的卵巢上皮癌组织 ($P<0.05$),见表 1。在 64 例 ING4 基因启动子甲基化阳性的卵巢上皮癌组织中,ING4 蛋白表达强度与 ING4 基因启动子甲基化程度呈显著负相关($r=-0.435, P=0.002$)。

2.3 卵巢上皮癌中 ING4 基因启动子的甲基化状态与其临床病理特征的相关性

卵巢上皮癌组织中,ING4 基因甲基化的阳性率随着手术病理分期和组织学分级的增加而升高($P<0.05$);卵巢透明细胞癌(55.6%,10/18)和卵巢子宫内膜样癌中 ING4 基因的甲基化

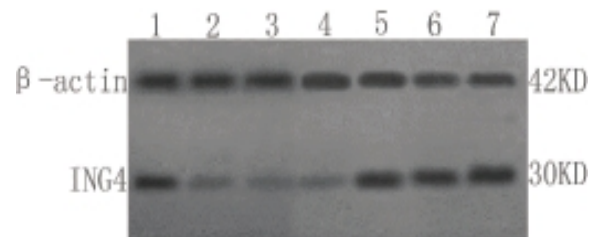


Fig.2 The expression of the ING4 Protein both in the Tissues of Ovarian Epithelial Cancer and Normal Ovary tissue detected by Estern Blot Method

1 Represents Positive Control HeLa cell

2-4 Represent Epithelial Ovarian Cancer

5-7 Represent Normal Ovarian Tissue

阳性率(59.3%,16/27)显著高于浆液性囊腺癌(33.9%,20/59)和粘液性囊腺癌(39.1%,18/46)($P<0.05$);ING4 基因启动子的甲基化状态与患者的年龄、有无腹水及有无淋巴结转移均无显著相关性($P>0.05$),见表 2。

表 1 卵巢上皮癌组织和正常卵巢组织中 ING4 基因启动子的甲基化状态与 ING4 蛋白表达的相关性

Table 1 The correlation of Methylation Status of ING4 Gene Promoters with ING4 protein expression in Ovarian Epithelial Cancer and Normal Ovary tissue

ING4 蛋白阳性表 达 Positive Express-ion of ING4 Protein	卵巢上皮癌组织 ING4 基因启动子 甲基化状态 The Methylation Statues of ING4 Gene Promoter of Epithelial Ovarian Cancer Tissue				正常卵巢组织 ING4 基因启动子 甲基化状态 The Methylation Statues of ING4 Gene Promoter of Normal Ovarian Tissue				P 值 P Value	
	阳性 Positive		阴性 Negative		阳性 Positive		阴性 Negative			
	例(率) Case (Rate)	ING4/ β -actin 平 均 灰度值 Average Grey Value	例(率) Case (Rate)	ING4/ β -actin 平均灰度值 Average Grey Value	例(率) Case (Rate)	ING4/ β -actin 平均 灰度值 Average Grey Value	例(率) Case (Rate)	ING4/ β -actin 平 均灰度值 Average Grey Value		
	阳性 Positive	5 (7.8%)	0.536± 0.132	53(61.6%)	1.327± 0.276	3(50%)	1.425± 0.198	142(98.6%)		1.896± 0.318
	阴性 Negative 或弱阳性 Weak Positive	59 (92.2 %)	0.067± 0.012	33(38.4%)	0.082± 0.014	3(50%)	0.079± 0.011	2(1.4%)		0.074± 0.012
合计 Total	64	0.104± 0.021	86	0.849± 0.176	6	0.752± 0.104	144	1.871± 0.314	<0.05	

表 2 卵巢上皮癌中 ING4 基因启动子的甲基化状态与其临床病理特征的相关性

Table 2 Correlation of the methylation status of ING4 Gene Promoters with clinicopathological features in ovarian epithelial cancer

临床病理特征 Clinical Pathological Characteristics	总例数 Total Case Number	甲基化阳性 Methylation Positive		X ² 值 X ² Value	P 值 P Value
		例数 Case Number	百分率(%) Percentage (%)		
年龄 Age				1.35	0.317
< 55 岁	52	18	34.6		
≥ 55 岁	98	46	46.9		
手术病理分期 Surgical pathological Stages				8.26	0.015
I Stage	18	4	22.2		
II Stage	43	14	32.6		
III Stage	58	25	43.1		
IV Stage	31	21	67.7		
病理组织学分级 Histopathological Grade				6.57	0.032
G1	48	16	33.3		
G2	65	28	43.1		
G3	37	20	54.1		
病理类型 Pathological Type				7.38	0.025
浆液性囊腺癌 Serous cystadenocarcinoma	59	20	33.9		
粘液性囊腺癌 Mucinous cystadenocarcinoma	46	18	39.1		
子宫内膜样癌 endometrioid carcinoma	27	16	59.3		
透明细胞癌 clear cell tumor	18	10	55.6		
有无腹水 Ascites				0.08	0.791
有 Yes	118	56	47.6		
无 No	32	8	25.0		
有无淋巴结转移 Lymph node metastasis				0.19	0.686
有 Yes	36	11	30.6		
无 No	114	53	46.5		

3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统中病死率最高的一种恶性肿瘤。Masciullo 等^[7]证实,卵巢癌的发生与多种原癌基因和或抑癌基因突变引起的卵巢上皮细胞的生长与分化过程失控有关。深入研究卵巢癌相关的致病基因,有助于探讨卵巢癌的发生机制。目前,ING4 作为重要的候选抑癌基因,已成为学者们的研究热点。

3.1 ING4 基因启动子的甲基化与卵巢癌的关系

DNA 甲基化是指 DNA 序列不发生变化,基因表达却因碱基修饰发生了变化,是基因组表观遗传调控的主要方式之一,其重要特征是广泛的癌基因低甲基化和部分区域的抑癌基因高甲基化共存,参与肿瘤的发生、发展^[8,9]。研究已发现一些基因的甲基化状态与肿瘤的化疗耐药相关,包括细胞周期调控基因、细胞侵袭及黏附基因、凋亡调节基因、DNA 损伤修复基因及生长因子基因等。抑癌基因甲基化是基因失活的一种重要机

制,目前发现多种抑癌基因启动子区域超甲基化与卵巢癌关系密切^[10]。

生长抑制因子家族(inhibitor of growth family, ING)成员,最早发现有 ING1、ING2 和 ING3,这些基因涉及细胞周期和凋亡。如 ING1 和 ING2 能以 P53 依赖的方式抑制细胞增殖,诱导细胞 G1 期阻滞及细胞凋亡^[11,12]。ING3 能增强 P53 下游基因如 P21 及 bax 的表达^[13],同时介导细胞周期阻滞和细胞凋亡。2004 年, Garkavtsev 等^[14]又发现了 ING4,并认为 ING4 可以在肿瘤发展期间抑制血管形成进而抑制肿瘤的生长。近年来的研究证实,ING 在许多恶性肿瘤中表达下降如胃癌^[15]、肺癌^[16]、骨肉瘤^[8]及恶性神经胶质细胞瘤^[17]、黑色素瘤^[18]等,并通过体外实验证实 ING4 可能通过活化凋亡通路,影响多种凋亡相关基因促进肿瘤细胞凋亡,而转染 ING4 基因不仅能抑制胶质瘤细胞生长而且能抑制胶质瘤组织的血管生成^[19,20]。因此,ING4 基因被认为是一重要的候选抑癌基因。

有研究报道,卵巢癌组织中 ING4 mRNA 的表达水平明显

低于正常卵巢组织^[21]。ING4 可能通过抑制细胞生长,增强其化学敏感性、增强 P53 的活性、抑制 HIF 活性、抑制肿瘤血管增生等途径抑制肿瘤的生长。ING4 基因在正常组织中表达丰富,而在肿瘤组织中表达异常或发生突变,但在肿瘤发生、发展过程中的甲基化状态并不清楚。本研究结果显示,卵巢上皮癌组织中 ING4 基因启动子的甲基化阳性率明显高于正常卵巢组织,说明 ING4 基因异常甲基化在卵巢上皮癌的发生中起重要作用。此外,ING4 蛋白的表达与 ING4 基因启动子的甲基化程度呈明显的负相关,ING4 基因在卵巢上皮癌组织中的低表达或者表达缺失可能与 ING4 基因的甲基化相关,ING4 在正常卵巢上皮组织中表达,但在卵巢癌中不表达。基因高甲基化是可能是引起 ING4 表达缺失的机制之一,符合抑癌基因启动子相关的染色体的甲基化可导致抑癌基因染色体的改变从而丧失抑制卵巢肿瘤生长的能力,通过甲基化途径引起相关抑癌基因的沉默与卵巢癌发生和浸润有关的理论。因此,将 ING4 超甲基化引起基因表达的改变作为监测肿瘤发生发展的有效手段^[22]。

3.2 卵巢上皮癌组织中 ING4 基因启动子甲基化的意义

本研究结果显示,ING4 基因启动子甲基化状态与患者年龄、有无腹水及有无淋巴结转移等无关,与手术病理分期、病理组织学分级、病理类型密切相关,多发生在临床晚期和组织分化差及恶性度较高的病理类型的患者,因此 ING4 启动子甲基化可作为一种分子生物学指标监测卵巢癌的发生和发展。在卵巢透明细胞癌及子宫内膜样细胞癌中 ING4 基因启动子甲基化状态高于浆液性囊腺癌和粘液性囊腺癌,提示进一步通过研究对有恶性倾向的交界性卵巢上皮肿瘤和癌旁非肿瘤组织中 ING4 基因甲基化状态的检测,可证实 ING4 基因甲基化是否为卵巢癌变(尤其是特殊类型的卵巢癌)的早期事件,有助于卵巢癌的早期诊断的研究。但其是否是一种良好的判断预后的指标,尚有待进一步研究。本研究提示 ING4 基因甲基化位点的检测可作为卵巢上皮癌尤其是卵巢上皮特殊类型恶性肿瘤生物学标记^[23]。

不同于基因突变和缺失,基因甲基化改变具有可逆性,由此可以解释检测到 ING4 基因甲基化的标本仍有 ING4 基因蛋白表达的现象,这种可逆性特征为临床抗肿瘤治疗提供了一种新途径,通过改变卵巢癌中 ING4 基因启动子的甲基化状态或程度,使 ING4 基因重新表达,很可能对肿瘤的治疗发挥积极的作用。5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)是有效的 DNMTs 抑制剂,已广泛用于临床实验^[24-26]。D'Andrea^[27]研究发现,FanconiAnemia/BRCA(FA/BRCA)信号通路的紊乱,即 FA 基因(FANCF)的甲基化和沉默,能够产生对铂类抗药的分子表型。FANCF 去甲基化可使这种通路紊乱恢复,从而对铂类药物再次敏感。因此,针对 ING4 基因启动子的去甲基化治疗,可作为治疗卵巢上皮癌特别是特殊类型的卵巢上皮癌的一个有效靶点。

综上所述,ING4 有望成为一种新型肿瘤分子标记物,有助于卵巢上皮癌的诊断,并可能成为新的药物靶点。恶性肿瘤相关基因启动子区高甲基化分析的表现遗传学研究,将揭示更多的尚未所知的表观调控变化,为表观治疗在癌症中的应用开辟新的天地。但本研究仍需扩大样本以进一步验证,同时可结合蛋白组学进一步探讨 ING4 基因在卵巢上皮癌发生、发展中的

作用。

参考文献(References)

- [1] Shiga K, Ogawa T, Katagiri K, et al. Differences between oral cancer and cancers of the pharynx and larynx on a molecular level [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(1): 238-243
- [2] Madi T, Balamurugan K, Bombardi R, et al. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(12): 1736-1745
- [3] Oing C, Jost E, Dahl E, et al. Aberrant DNA hypermethylation of the ITIH5 tumor suppressor gene in acute myeloid leukemia[J]. *Clin Epigenetics*, 2011, 2(2): 419-423
- [4] Zhang W, Qu L, Xu G, et al. Hypomethylation upregulates the expression of CD30 in lymphoma induced by Marek's disease virus [J]. *Poult Sci*, 2012, 91(7): 1610-1618
- [5] Simkin M, Abdalla M, El-Mogy M, et al. Differences in the quantity of DNA found in the urine and saliva of smokers versus nonsmokers: implications for the timing of epigenetic events[J]. *Epigenomics*, 2012, 4(3): 343-352
- [6] Liu Y, Yu L, Wang Y, et al. Expression of tumor suppressor gene ING4 in ovarian carcinoma is correlated with microvessel density[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(4): 647-655
- [7] Masciullo V, Ferrandina G, Pucci B, et al. p27Kip1 expression is associated with clinical outcome in advanced epithelial ovarian cancer: multivariate analysis[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(12): 4816-4822
- [8] Kwon YR, Son MJ, Kim HJ, et al. Reactivation of Silenced WT1 Transgene by Hypomethylating Agents - Implications for in vitro Modeling of Chemoimmunotherapy[J]. *Immune Netw*, 2012, 12(2): 58-65
- [9] Suzuki T, Nohara K. Long-term arsenic exposure induces histone H3 Lys9 dimethylation without altering DNA methylation in the promoter region of p16(INK4a) and down-regulates its expression in the liver of mice[J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 25: 1-8
- [10] Staub J, Chien J, Pan Y, et al. Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance[J]. *Oncogene*, 2007, 26(34): 4969-4978
- [11] Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, et al. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control[J]. *Nature*, 1998, 391(6664): 295-298
- [12] Nagashima M, Shiseki M, Miura K, et al. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17): 9671-9676
- [13] Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, et al. Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers[J]. *Oncogene*, 2002, 21(28): 4462-4470
- [14] Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis[J]. *Nature*, 2004, 428(6980): 328-332
- [15] 陆向东, 杨吉成, 谭洁, 等. 腺病毒介导的 ING4 基因抑制胃癌细胞生长及其分子机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, 10(10): 1221-1229

Lu Xiang-dong, Yang Ji-cheng, Tan Jie, et al. Adenovirus-mediated ING4 gene suppresses gastric carcinoma cell growth and its molecu-

- ar mechanism[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science)*, 2008, 10(10): 1221-1229
- [16] 段光军, 韩志强, 林云霞, 等. 重组人源化 ING4 基因的构建及其对肺癌 NCI-H460 细胞生长抑制作用[J]. *肿瘤*, 2008, 28(11): 942-946
- Duan Guang-jun, Han Zhi-qiang, Lin Yun-xia, et al. Construction of recombinant hING4 gene and its inhibitory effect on the growth of lung cancer NCI-H460 cells[J]. *Tumour*, 2008, 28(11): 942-946
- [17] 井莹莹, 杨吉成, 缪竞诚, 等. 腺病毒载体介导的 ING4 基因对 MG-63 人骨肉瘤细胞的抑制作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(3): 234-240
- Jing Ying-ying, Yang Ji-cheng, Miu Jing-cheng, et al. The growth-inhibitory effect of recombinant ING4-Adenovirus on MG-63 osteosarcoma cells[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2009, 25(3): 234-240
- [18] 赵耀东, 缪竞诚, 张海峰, 等. 腺病毒介导的人 ING4 基因诱导 C6 鼠胶质瘤细胞凋亡[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(7): 33-39
- Zhao Yao-dong, Miu Jing-cheng, Zhang Hai-feng, et al. Cellular Apoptosis of C6 Mouse Glioma Cells Induced by hING4 Mediated by Adenovirus[J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(7): 33-39
- [19] 蔡丽敏, 李海燕, 孙建方. 生长抑制因子 4 对人黑色素瘤细胞株 M14 凋亡的调控[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2008, 22(10): 577-581
- Cai Li-min, Li Hai-yan, Sun Jian-fang. The Regulatory Effect of ING4 on Apoptosis in Melanoma Cell Lines M14 [J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2008, 22(10): 577-581
- [20] Garkavtsev I, Kozin Sv, Chernova O, et al. The candidate tumour suppressor p rotein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis[J]. *Nature*, 2004, 428 (6980): 328-332
- [21] 柳英兰, 王英伟, 张广美. 卵巢癌组织中 ING4 基因的表达及其与微血管密度的关系[J]. *中华妇产科杂志*, 2011, 4(46): 285-287
- Liu Ying-lan, Wang Ying-wei, Zhang Guang-mei. Expression of ING4 gene in microvascular density of ovarian cancer tissues [J]. *Obstetrics and Gynecology*, 2011, 4(46): 285-287
- [22] Menendez L, Walker D, Matyunina LV, et al. Identification of candidate methylation-responsive genes in ovarian cancer [J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 10
- [23] Cai LY, Abe M, Izumi S, et al. Identification of PRTFDC1 silencing and aberrant promoter methylation of GPR150, ITGA8 and HOXD11 in ovarian cancers[J]. *Life Sci*, 2007, 80(16): 1458-1465
- [24] Liu J, Zhang Y, Xie YS, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces cytotoxicity in BGC-823 cells via DNA methyltransferase 1 and 3a independent of p53 status[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(2): 545-552
- [25] Qiu X, Hother C, Ralfki r UM, et al. Equitoxic doses of 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine induce diverse immediate and overlapping heritable changes in the transcriptome [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12994
- [26] Raynal NJ, Momparler LF, Rivard GE, et al. 3-Deazauridine enhances the antileukemic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and targets drug-resistance due to deficiency in deoxycytidine kinase[J]. *Leuk Res*, 2011, 35(1): 110-118
- [27] D'Andrea AD. The Fanconi Anemia /BRCA signaling pathway: disruption in cisplatin-sensitive ovarian cancers[J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(4): 290-292

(上接第 687 页)

- [14] 杨鹏, 李爽, 张莉, 等. 甲型 H1N1 流感密切接触者感染危险因素的病例对照研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16(4): 318-320
- Yang Peng, Li Shuang, Zhang Li, et al. A case-control study on risk factors for 2009 H1N1 influenza infection among close contacts[J]. *Chin J Dis Control Prev*, 2012, 16(4): 318-320
- [15] Victor Jeger, Alexandro Dñ nki, Marco Germanna, et al. H1N1 outbreak in a Swiss military bootcamp-observations and suggestions [J]. *Swiss Med Wkly*, 2011, 141: w13307
- [16] 李增德, 张伟龙, 杨君, 等. 一起甲型 H1N1 流感暴发调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(6): 665
- Li Zeng-de, Zhang Wei-long, Yang Jun, et al. Epidemiological Investigations on an outbreak of novel swine-origin influenza A (H1N1) in a university[J]. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31(6): 665
- [17] Catherine Takacs Witkop, Mark R. Duffy, Elizabeth A. Macias, et al. Novel Influenza A (H1N1) outbreak at the U.S. Air Force Academy: epidemiology and viral shedding duration [J]. *Am J Prev Med*, 2010, 38(2): 121-126
- [18] Koji Takayama, Jin Kuramochi, Takeshi Oinuma, et al. Clinical features of the 2009 swine-origin influenza A (H1N1) outbreak in Japan [J]. *J Infect Chemother*, 2011, 17: 401-406
- [19] Lessler J, Reich NG, Cummings DA, et al. Outbreak of 2009 pandemic influenza A (H1N1) at a New York City school[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(27): 2628-2636