

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00988

## 黑素瘤细胞表观遗传学研究进展

王冬<sup>1,2</sup>, 赵华<sup>1</sup>, 董梅<sup>2\*</sup>, 李恒进<sup>1\*</sup>

1. 解放军总医院皮肤科, 北京 100853
2. 解放军 309 医院检验科, 北京 100091

**[摘要]** 黑素瘤是由表皮黑素细胞转化而来的恶性皮肤肿瘤, 极易发生转移, 具有高度的致死性。黑素瘤表观遗传学研究是目前发展较为迅速的领域, 近年来在基因启动子区甲基化、组蛋白修饰、miRNA 对靶基因的抑制作用以及 lncRNA 对染色质结构调节等方面取得了许多新的研究成果, 同时, 由于表观遗传学改变先于临床诊断和可药物逆转的特性, 为人类最终攻克黑素瘤提供了新的思路。本文综述了近年来在黑素瘤表观遗传学研究方面的进展, 以细胞周期、细胞凋亡、侵袭迁移、克隆形成、信号通路等细胞功能分析为重点, 阐述黑素瘤表观遗传学改变对肿瘤发生、发展以及转移的影响, 并展望了表观遗传学方法在黑素瘤预防、诊断、治疗、进展以及预后监测等方面的应用。

**[关键词]** 黑素瘤; 表观遗传学; DNA 甲基化; 微 RNAs; 组蛋白修饰

**[中图分类号]** R 739.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)09-0988-09

### Research progress in melanoma epigenetics

WANG Dong<sup>1,2</sup>, ZHAO Hua<sup>1</sup>, DONG Mei<sup>2\*</sup>, LI Heng-jin<sup>1\*</sup>

1. Department of Dermatology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
2. Department of Clinical Laboratory, No. 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China

**[Abstract]** Melanoma is a malignant cutaneous cancer derived from the epidermal melanocytes, with high potency of metastasis and high lethal rate. Melanoma epigenetics research is gaining fast progress and many new achievements have been made in areas such as gene promoter methylation, histone modification, miRNA inhibiting target gene and lncRNA regulating the structure of chromatin. As the alteration of epigenetics may cast new light on cure of melanoma since it can contribute to clinic diagnosis and drug development. This paper reviewed the progression in melanoma epigenetics, with special attention on cell function analysis such as cell cycle, cell apoptosis, invasion and migration, clone formation, signal pathway, and elaborated how the change of melanoma epigenetics influences tumor cell genesis, progression and metastasis. We also discussed the prospect of epigenetics research in melanoma precaution, diagnosis, therapy, progression and the prognosis monitoring.

**[Key words]** melanomas; epigenetics; DNA methylation; microRNAs; histone modification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(9): 988-996]

黑素瘤是由表皮黑素细胞转化而来, 具有高侵袭性、高转移性和高致命性的恶性皮肤肿瘤。同大多数肿瘤不同的是, 黑素瘤在中年甚至青年群体中的发病率很高, 因此对家庭和社会产生较重的经济负担。在过去的几十年中, 美国和世界其他地区黑素瘤的发病率持续增加, 据世界卫生组织估算全世界每年有超过 65 000 例患者死于黑素瘤, 而在美国人一生当中, 将会有 2% 的人罹患恶性黑素瘤<sup>[1]</sup>。近年来, 有关黑素瘤细胞通路调控和表观遗传学的

研究进展迅速, 为黑素瘤发生、发展的机制研究提供了新的思路。表观遗传学修饰包括 DNA 甲基化、非编码 RNA 对基因的调节、蛋白水平的组蛋白修饰和染色质重塑, 在黑素瘤发生、发展和转移过程中, 表观遗传学修饰相比基因突变发生的概率更高, 发挥着更为重要的作用。另外由于其功能特性, 表观遗传学修饰可以通过药物处理所逆转, 这将给黑素瘤治疗带来全新的思路。

**[收稿日期]** 2015-03-21 **[接受日期]** 2015-05-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31471236)。Supported by National Natural Science Foundation of China (31471236)。

**[作者简介]** 王冬, 博士生, 主治医师。E-mail: wdsmmu@163.com

\* 通信作者 (Corresponding authors)。Tel: 010-66775937, E-mail: dongmei0659@sina.com; Tel: 010-66939314, E-mail: Lhengjin@163.com

## 1 DNA 甲基化和黑色素瘤

在哺乳动物基因组,胚胎形成和细胞分化过程中离不开甲基化作用,甲基化修饰通常发生在5'-CpG-3'序列的胞嘧啶,在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)催化下将甲基加到CG二核苷酸胞嘧啶的嘧啶环上。CpG位点主要以两种形式存在于基因组中,一种是CpG位点高度聚集在一起,称为CpG岛,CpG岛通常位于基因5'UTR的启动子区,甚至有时可延伸至基因的外显子区;另一种分散在DNA中,多以甲基化形式存在。在肿瘤表观遗传学研究发现,异常的甲基化往往导致肿瘤的发生<sup>[2]</sup>,主要表现以下方面:抑癌基因的高甲基化导致基因表达沉默,使基因表达下调,导致肿瘤发生;反之,癌基因的低甲基化活化癌基因的反转录转座子,诱导基因不稳定,激活原癌基因的表达,导致肿瘤的形成<sup>[3]</sup>。

Lian等<sup>[4]</sup>通过免疫组化方法研究5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC)发现,5-hmC表达量在黑色素瘤中比较低,而生理性黑色素细胞和良性色素痣中表达量高;异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)以及3种10、11位转位酶(TET1、TET2、TET3)与5-hmC一样在黑色素瘤中低表达,在斑马鱼黑色素瘤模型中过表达野生型的IDH2能够增加5-hmC的表达水平且延长斑马鱼无瘤生存期;另外发现色素痣中TET2的表达水平明显比浅表扩散型和皮肤转移型黑色素瘤高,在黑色素瘤细胞系中过表达野生型的TET2基因能使黑色素瘤体相比突变型小。总的来说,TET家族的功能异常总是伴随着5-hmC的缺失以及表观遗传异常,因此可以认为5-hmC的缺失是TET家族功能异常的直接反映。Larson等<sup>[5]</sup>发现发育不良色素痣的形态异型性以及直径增加与5-hmC持续减少紧密相关。5-hmC表达缺失还与黑色素瘤诸多不良预后因素紧密相关,如表皮浸润深度、有丝分裂细胞数、溃疡等,因此5-hmC表达减少可以作为黑色素瘤预后不良的潜在指标<sup>[4, 6]</sup>。

Tellez等<sup>[7]</sup>应用焦磷酸测序技术分析了16个黑色素瘤细胞系的15个癌相关基因,除MLH1外,其他14个抑癌基因启动子区甲基化程度较高,基因表达受到抑制。这15个基因分别是Era、MGMT、RARb2、RIL、RASSF1A、PAX7、PGRb、PAX2、

NKX2-3、OLIG2、HAND1、ECAD、CDH13、MLH1和p16,涉及的细胞功能有细胞周期、细胞凋亡、细胞黏附和DNA修复。2个主要的重复元件(LINE1和Alu)和2个单拷贝基因(MAGEA1、maspin)的甲基化状态同正常表皮黑色素细胞相比,重复元件LINE1和Alu相比正常色素细胞呈低甲基化,MAGEA1和maspin启动子区呈现出去甲基化状态。可以得出黑色素瘤细胞系中抑癌基因启动子区CpG岛的高甲基化与基因转录下调紧密相关,而重复元件的低甲基化和癌基因的去甲基化是肿瘤恶化的重要标志。

Sigalotti等<sup>[8]</sup>对45例Ⅲ期黑色素瘤病例进行短期自体细胞培养,应用Illumina Human Methylation BeadChip芯片检测技术检测了14 495个基因的27 578个CpG位点,得出每个细胞培养的甲基化密度评分,应用K-Means聚类算法得到高甲基化和低甲基化两个亚群,低甲基化亚群和高甲基化亚群的总体生存中位数分别为31.5和10.4个月,5年生存率分别为41.2%和0%,经过Kaplan-Meier分析得出低甲基化亚群相比高甲基化亚群具有明显的生存优势。该研究表明甲基化异常对黑色素瘤患者具有很高的预后判断和进展监测价值,而更深入的研究需要阐明黑色素瘤甲基化异常为何会造成不同甲基化亚群黑色素瘤患者生存时间的差别,并且需要制定针对性治疗策略来应对。

Conway等<sup>[9]</sup>应用高通量DNA甲基化基因芯片和甲基化肿瘤芯片,检查22例不同病理亚型的侵袭性黑色素瘤和27例良性色素痣样本,分析807个肿瘤相关基因调节区和启动子区的1 505个CpG位点,发现与色素痣相比,黑色素瘤中22个基因的26个CpG位点甲基化异常,其中有包括19个低甲基化位点,7个高甲基化位点。功能分析表明甲基化异常的基因主要与细胞凋亡、细胞周期、细胞增殖、细胞黏附、细胞通讯、信号通路以及免疫应答相关。De Carvalho等<sup>[10]</sup>应用大样本量、多基因位点的甲基化分析产生大量的甲基化数据,经过生物信息学分析发现甲基化事件可以分为“驱动”甲基化事件和“伴随”甲基化事件,驱动甲基化事件在肿瘤发生中起启动作用,与肿瘤发生密切相关,而伴随甲基化事件则出现在疾病发生的过程中,因此不同的甲基化事件可以作为疾病诊断、治疗、预后以及早期组织监测的

标记。

## 2 非编码 RNA 和黑素瘤

在人类基因组中,编码蛋白的基因序列不到2%,至少90%的基因被转录成非编码RNA(ncRNA)。ncRNA依照其序列长度可分为2种:(1)小分子非编码RNA(sncRNA),其长度小于200 bp。其中微小RNA(miRNA)是研究最多的一部分,miRNA可以结合到目标mRNA转录本,招募RNA诱导沉默复合体,通过降解或者抑制目标mRNA表达,负调控目标基因。在人类基因组中,超过200种miRNA发挥着癌基因或者抑癌基因的功能<sup>[11]</sup>。通过这种方式,miRNA调节多种复杂的细胞功能,包括基因沉默、基因转录、DNA去甲基化、染色质结构调节以及RNA干扰等。(2)长链非编码RNA(lncRNA),其长度从200 bp到100 kb不等。lncRNA可以绑定到蛋白复合体形成二级结构,调控基因的转录。lncRNA涉及到一系列基因功能调控,包括染色体剂量补偿、基因组印迹、表观遗传调控、细胞周期调控、胞核胞质转运、转录、剪切、翻译以及细胞分化等<sup>[12]</sup>。

**2.1 miRNAs在黑素瘤中的作用** 许多miRNA通过多种分子通路促进或抑制癌细胞转移恶化,在黑素瘤发展中起到抑癌基因或者癌基因的作用(表1)。miRNA的肿瘤抑制功能部分地是通过PcG蛋白介导实现的。多个研究发现,相比良性色素痣,miR200c、miR200s、miR9在早期和转移黑素瘤中表达下调。miR200家族成员miR200s(还包括miR200a、miR200b、miR200c、miR141、miR429)已被证明是控制肿瘤上皮-间质转化(EMT)的抑制因子,通过直接调控E钙黏素的转录抑制子Zeb1和Zeb2调控肿瘤的干细胞特性以及转移能力<sup>[13]</sup>。而且在黑素瘤细胞系中过表达miR200c能明显地降低细胞增殖、迁移能力以及减少抗药性转运体的表达。Bmi-1是PcG蛋白的组成部分,作用于Ink4a/Arf基因座起转录抑制子的功能。Ink4a/Arf编码2种基因产物P16和P19,P16抑制CDK活性从而阻滞细胞周期,P19能够维持P53的稳定性,延缓细胞周期的进程并促进细胞凋亡。有趣的是,过表达miR200c能够使Bmi-1表达下调,表现出Bmi-1基因敲除细胞系相同的表型,即抑制黑素瘤异体移植

的生长和转移<sup>[14]</sup>。在侵袭型黑素瘤病例中,miR200c和E钙黏素低水平表达,往往伴随着瘤体增大和病程加快的风险<sup>[15]</sup>。总之,miR200c通过抑制目的基因Bmi-1的表达,上调肿瘤抑制因子和细胞黏附分子表达来抑制肿瘤生长。miR-9是另外一种具有抑制肿瘤细胞生物学活性的miRNA,敲除miR-9表达能明显增强黑素瘤细胞的增殖和迁移能力,而在转移黑素瘤细胞系过表达miR-9能诱导NF- $\kappa$ B1-Snai1通路下调同时伴随着E钙黏素表达的升高<sup>[16]</sup>。

Liu等<sup>[17]</sup>通过miRNA芯片检查发现,miR-205低表达与黑素瘤患者较短的生存期有关,而与患者的肿瘤分型、性别、年龄和布勒斯洛深度无关;而高表达miR-205的患者样本中Zeb2表达低,E钙黏素表达量增高,表明miR-205参与抑制黑素瘤EMT的过程且能够降低黑素瘤的迁移和侵袭能力。另外分析发现从良性色素痣到发育不良性色素痣再到黑素瘤,miR-205表达逐步降低。Nguyen等<sup>[18]</sup>发现,miR-29c在4期黑素瘤患者样本中表达下降,过表达miR-29c能显著提高黑素瘤患者的生存时间。相似的肿瘤抑制功能也存在于miR-31<sup>[19]</sup>和miR-137<sup>[20]</sup>中,该2个miRNA通过调节下游组蛋白甲基转移酶EZH2的表达来抑制成瘤途径。因此深入研究上述miRNA在黑素瘤发生过程中的功能及作用机制,对阐明黑素瘤的发病机制、疾病的进展监测以及黑素瘤生物治疗具有重要的应用价值。

miR-149在转移黑素瘤中表达上调,miR-149靶向糖原合成激酶3 $\alpha$ 降低其表达水平,从而增加Bcl-2家族抗凋亡蛋白成员Mcl-1的合成<sup>[21]</sup>。miR-21也同样在恶性黑素瘤中过表达,且有明显的促进细胞增殖和抑制凋亡的作用<sup>[22]</sup>。研究发现,X染色体上一簇集14个miRNA(miR506-514)在黑素瘤患者活体组织中高表达,在细胞系中抑制该簇集miRNA的表达,能导致细胞生长减缓、凋亡增加、侵袭能力降低、克隆形成下降<sup>[23]</sup>。另一组miRNA(miR-1908、miR-199a-5p、miR-199a-3p)相互协同,内源性促进黑素瘤恶性侵袭、血管生成和克隆形成,这些miRNA能共同作用于载脂蛋白E,而载脂蛋白E能抑制肿瘤的侵袭和转移。高表达miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-1908的患者无瘤存活时间比低表达患者明显缩短。应用核酸鸡尾酒疗法能

够降低黑素瘤细胞系中该 miRNA 的表达,并在尾静脉注射小鼠成瘤实验中显著降低远端器官的肿瘤转移能力<sup>[24]</sup>。

Mazar 等<sup>[25]</sup>研究发现,黑素瘤中 miR-211 高表达,其靶向负调节 *MITF* 基因,肿瘤抑制基因 *MITF* 绑定在 TRPM1 启动子区,*MITF* 低表达引起 TRPM1 的表达减少。色素痣中 TRPM1 的低表达怀疑是其恶化成瘤的一个标志。在黑素瘤样本中 miR-221、miR-222 表达上调,能够靶向下调 P27Kip1/CDKN1B 和 c-KIT 受体,增强黑素瘤细胞

增殖,阻止分化,发挥癌基因的作用。体内及体外实验均证实,miR-221、miR-222 在促进黑素瘤发展中起关键作用,因此针对 miR-221、miR-222 的抑制制剂能够有效延缓黑素瘤进展<sup>[26]</sup>。

Levati 等<sup>[27]</sup>比较黑素瘤和正常色素痣细胞系发现,在黑素瘤中 miR-17-5p、miR-18a、miR-20a 和 miR-92a 表达增高,而 miR-146a、miR-146b 和 miR-155 表达下降,过表达 miR-155 能明显抑制黑素瘤细胞增殖以及诱导其凋亡。

表 1 黑素瘤中发挥癌基因和抑癌基因作用的 miRNAs

Tab 1 Oncogenic and tumor-suppressive miRNAs implicated in melanoma

miRNA	Target/function	Expression	Sample/source	Clinical utility	Reference
Tumor suppressive					
miR-9	NF- $\kappa$ B1	Downregulated	Cell lines	Prognosis	[16]
miR-29c	CIMP	Downregulated	Tissue	Prognosis	[18]
miR-31	EZH2	Downregulated	Tissue	Prognosis	[19]
miR-137	MITF, EZH2	Downregulated	Tissue	Prognosis	[20]
miR-141	ZEB1, ZEB2	Downregulated	Tissue	Prognosis	[13]
miR-146a, 146b		Downregulated	Cell lines	Prognosis	[27]
miR-155	SKI	Downregulated	Tissue	Prognosis	[27]
miR-200a/b/c	ZEB1, ZEB2	Downregulated	Tissue	Prognosis	[15]
miR-205	E2F	Downregulated	Tissue	Therapeutic	[17]
miR-429	EMT	Downregulated	Tissue	Prognosis	[13]
Oncogenic or prometastatic					
miR-17-5p	E2F, CDKN1A, BIM	Upregulated	Tissue/cell lines	Prognosis	[27]
miR-20a		Upregulated	Tissue	Prognosis	[27]
miR-21		Upregulated	Tissue	Prognosis	[22]
miR-92a	c-MYC	Upregulated	Tissue	Prognosis	[27]
miR-149	Glycogen synthase kinase 3 $\alpha$	Upregulated	Tissue	Prognosis	[21]
miR-199a	ApoE, MET	Upregulated	Cell lines	Prognosis	[24]
miR-211	<i>MITF</i>	Upregulated	Tissue	Prognosis	[25]
miR-221-222	P27/c-KIT	Upregulated	Cell lines/serum	Detection	[26]
miR-506-514		Upregulated	Tissue/cell lines	Prognosis	[23]
miR-1908	ApoE	Upregulated	Tissue	Prognosis	[24]

2.2 lncRNA 在黑素瘤中的作用 有研究发现 lncRNA HOTAIR 在黑素瘤转移淋巴结中表达增高,细胞系中敲除 HOTAIR 能抑制黑素瘤细胞的运动、侵袭和细胞外基质的降解能力;HOTAIR 脚手架通过与组蛋白修饰酶相互作用,能够调节染色质结构的变化<sup>[28]</sup>。类似的 lncRNA 还有 Xist, Xist 能够通过改变染色体的三维结构来沉默 X 染色体的

表达<sup>[29]</sup>。其他在黑素瘤中起到癌基因或者抑癌基因角色的 lncRNA 还包括 SPRY4-IT1<sup>[30]</sup> 和 Llinc23<sup>[31]</sup> 等。当前 lncRNA 在黑素瘤转移恶化过程中的确切调节机制还不明确,需要后续进行深入的研究和探讨,但是至少为当前黑素瘤发病机制的研究以及治疗开辟了一个新的宝贵领域。

### 3 组蛋白修饰和黑素瘤

相比黑素瘤甲基化异常,组蛋白转录后修饰异常研究由于其机制复杂而进展缓慢。组蛋白的转录后修饰是肿瘤发生中较常见的表观遗传学改变形式之一,通过招募或者排斥不同类型的组蛋白修饰酶,来改变染色质结构和调节基因表达。核小体是由4种组蛋白H2A、H2B、H3和H4各2个构成的8聚体,其外面缠绕147 bp的DNA。组蛋白多肽的N端可以通过转录后修饰,如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、糖基化、羧基化等多种方式来改变染色质结构。例如,H3K9ac、H3K27ac乙酰化及H3K4me、H3K36me甲基化与转录激活有关,而H3K9me、H3K27me、H3K79me和H4K20me甲基化与转录抑制相关。有趣的是,研究发现在染色质结构的基因调控区, DNMT与组蛋白去乙酰酶空间距离相互靠近,在细胞分裂过程中能够共同作用,使得基因沉默状态得以延续<sup>[32]</sup>。

组蛋白甲基化异常与黑素瘤的发生密切相关,一些组蛋白修饰的甲基转移酶在此过程中起重要作用(表2)。研究发现组蛋白甲基转移酶SETDB1在黑素瘤中表达增高,且在含有BRAF(V600E)突变体的黑素瘤斑马鱼模型中能够加速肿瘤的发展。SETDB1催化组蛋白H3K9的甲基化,抑制目的基因的表达。SETDB1过表达还能引起发育调节同源框(HOX)的下调,已知HOX基因的调控异常与恶性血液肿瘤和白血病细胞永生相关<sup>[33]</sup>。另外SETDB1过表达会增加黑素瘤细胞对抗肿瘤药物光辉霉素的抗药性,光辉霉素可以绑定到DNA双螺旋结构的特定区域,来抑制SETDB1启动子区活性<sup>[34]</sup>。

近来Cannuyer等<sup>[35]</sup>分析MAGEA1在5个黑素瘤细胞系中的表达状态,发现在2个细胞系中没有MAGEA1基因的表达,MAGEA1的5'端有组蛋白抑制标记H3K9me2的富集;而在另外3个细胞系,有组蛋白活化标记H3K9ac和H3K4me2的聚集,MAGEA1基因表达较高。对2个不表达MAGEA1细胞系用组蛋白去乙酰酶抑制剂TSA处理,经qRT-PCR和MS-PCR分析发现,mRNA表达短暂升高,但启动子区的甲基化状态并未发生改变。而用去甲基化试剂5-Aza-CdR处理后,mRNA

表达水平持续增高,且伴随着启动子区低甲基化。为了证实上述结果,Cannuyer等<sup>[35]</sup>构建了MAGEA1转基因黑素瘤细胞系,其转基因序列中包含了甲基化的启动子区以及抗潮霉素片段(MAGEA1/hph),对该转基因细胞系用TSA处理,并未改变启动子区的甲基化状态,也没有表现出抗潮霉素活性。当5-Aza-CdR处理后,MAGEA1转基因重新激活,且启动子区呈现低甲基化,组蛋白标志呈活性构型,同时出现抗潮霉素细胞群。该研究证实表观遗传修饰药物能够逆转黑素瘤细胞的甲基化异常。

表2 影响黑素瘤组蛋白修饰的甲基转移酶

Tab 2 Histone methyltransferases implicated in melanoma

Histone methyltransferase	Histone modification	Transcriptional activation or repression	Reference
CARM1/PRMT6	H3R2	Repression	[36]
PRMT5	H3R8	Repression	[37]
SETDB1	H3K9	Repression	[33]
RIZ1	H3K9	Repression	[38]
EZH2	H3K27	Repression	[19]
NSD1	H4K20	Repression	[39]
JARID1B	H3K4	Activation	[40]

### 4 黑素瘤的表观遗传学治疗

黑素瘤在发展早期是可治愈的,但20%的黑素瘤病例被发现时已经发展到难治愈的晚期,早诊早治是延长黑素瘤生存期和提高治疗效果的关键<sup>[41]</sup>。以遗传学 and 环境保护为主的传统应对策略在黑素瘤治疗和预防当中取得的效果不尽人意;近年来随着黑素瘤表观遗传学研究的进展,表观遗传学治疗为当前黑素瘤治疗带来了新的希望。

黑素瘤主要发生于皮肤,易于切除,便于进行表观遗传学特征监测,且表观遗传学治疗后疗效明显,并发症和不良反应较系统治疗小,因此在黑素瘤中应用表观遗传学治疗表现出良好的应用前景。随着DNA甲基化检测技术的发展,应用单基因分析技术、基因芯片技术和新一代测序技术,从黑素瘤患者组织和细胞系获得了大量候选基因及基因组甲基化异常数据,相关的细胞特征、临床病例特点也得到证实,因此获得了大量临床诊断、治疗和预后相关的甲

基化标记,使得黑素瘤表观遗传学研究得到迅速发展。另外由于肿瘤生物学中表观遗传学改变常发生在肿瘤形成早期,早于临床诊断,且贯穿肿瘤发展、侵袭的全过程,应用表观遗传学标记进行早期检测能大大提前黑素瘤发病的检出率。加之表观遗传治疗药物的可逆性和可调节性,共同为当前恶性黑素瘤的预防、早期检测、治疗和预后判断提供了良好的应用前景。而以表观遗传学改变为目标,对黑素瘤患者进行个体化及分子靶点治疗,为人类彻底攻克黑素瘤提供了新的可选的途径<sup>[42]</sup>。

目前 DNA 去甲基化试剂和组蛋白去乙酰酶抑制剂已经获得 FDA 批准投入临床使用,针对恶性血液肿瘤和实体瘤目前已有十多个甲基转移酶抑制剂和组蛋白去乙酰酶抑制剂投入前期临床研究。在临床治疗当中,甲基转移酶抑制剂主要分为两类,一类是胞嘧啶模拟物,如地西他滨和阿扎胞苷,通过绑定并整合到 DNA 链消耗甲基转移酶,引起细胞脱甲基并阻止 S 期细胞复制甲基化的母链。另外一类是非核苷酸类抑制剂如普鲁卡因胺 MG98 和 RG108,能够直接作用于甲基转移酶的活性位点,减少 DNA 甲基化<sup>[43]</sup>。脱乙酰酶抑制剂依据其化学结构的不同,主要有伏立诺他、罗咪酯肽、帕比司他和苯甲酰胺类等,由于机制复杂,其具体的作用机制还不是很清楚,但可以肯定的是通过其共同的作用位点组蛋白去乙酰酶锌指结构域来发挥抑癌活性。组蛋白甲基转移酶 EZH2 在多种肿瘤中过表达,EPZ-6438 是一种新型的 EZH2 小分子抑制剂,在恶性杆状瘤中 SMARCB1 突变失活,EZH2 活性增加,经过 EPZ-6438 处理后能明显降低 EZH2 的活性,促进肿瘤细胞凋亡和分化,抑制肿瘤细胞在小鼠体内的异体移植。目前 EPZ-6438 是唯一投入临床试验的 EZH2 抑制剂<sup>[44]</sup>。

甲基转移酶和组蛋白脱乙酰酶抑制剂除了有酶的抑制作用,而且还具有免疫调节活性,能够诱导多种肿瘤细胞表面分子如组织相容性复合体、共刺激分子和黑素瘤细胞表面抗原基因 *MAGE-1* 的表达。细胞毒性 T 淋巴细胞能够识别以上细胞表面分子,产生高滴度的抗肿瘤抗体来发挥抗肿瘤活性<sup>[45]</sup>。另外表观遗传治疗结合干扰素  $\alpha$ 、IL-12、伊匹单抗和黑素瘤多肽疫苗等免疫疗法进行联合治疗也是当前颇具前景的治疗方法<sup>[46]</sup>。除了免疫治疗,表观遗传

药物能够支持并增强化疗和放疗的疗效,烷化剂通过破坏肿瘤细胞 DNA 双链或者使双链交联发挥抗癌活性,DNA 修复蛋白 MGMT 能够修复烷基病变,抑制烷化剂的细胞毒作用。在黑素瘤中 MGMT 表达增高诱导黑素瘤细胞对烷化剂产生药物抗性,导致烷化剂的抗肿瘤活性降低,在临床治疗中联合应用甲基转移酶抑制剂能够抑制黑素瘤 MGMT 的表达,增加烷化剂的抗肿瘤活性,目前在转移黑素瘤治疗中表现出积极的治疗效果<sup>[47]</sup>。甲基转移酶和组蛋白脱乙酰酶抑制剂还能够上调表观沉默效应因子 Apaf-1、caspase-8 和 P16 表达,修复细胞凋亡能力,提高化疗药物多柔比星、顺铂、依托泊苷等的化疗敏感性。同时结合放射治疗,破坏黑素瘤细胞修复放疗损伤 DNA 的能力,诱导细胞凋亡,在一期和二期临床试验中得到非常理想的治疗效果<sup>[48-49]</sup>。抑制肿瘤血管生成是肿瘤治疗中一个富有成效的治疗策略,表观遗传药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷、曲古柳菌素和小分子甲基化抑制剂 zebularine 能够抵消血管生成刺激因子的血管生成能力<sup>[50]</sup>。因此,甲基转移酶和组蛋白脱乙酰酶抑制剂联合传统的化疗、放疗和免疫疗法不仅发挥其肿瘤甲基转移酶和组蛋白脱乙酰酶的抑制作用,而且在肿瘤细胞凋亡、基因调控和免疫刺激中发挥着重要的作用,是当前黑素瘤治疗中最具发展前景的治疗领域。另外在动物模型实验中,几个 miRNA 在治疗黑素瘤中也表现出积极的治疗效果<sup>[51]</sup>。当前随着对表观遗传学治疗机制研究的深入和肿瘤生物学的发展,将会有更多的组蛋白修饰、DNA 甲基化标记和表观遗传药物被发现,这必然会提高肿瘤表观治疗的效果,同时为提高黑素瘤治疗的靶向性、减少不良反应提供更为便利的条件。

从目前黑素瘤表观治疗现状来看,提高黑素瘤的治疗效果还应立足以下方面的进步:(1)药物治疗的方法应只阻断促进黑素瘤发展的通路,而不影响正常细胞通路调节。(2)提高黑素瘤治疗水平和预后判断非常重要,但提高预防水平和早期检测灵敏度更为迫切。(3)将表观治疗应用于临床实体瘤治疗目前仍面临着严峻的挑战,需依赖于表观遗传学机制的深入研究并取得突破。(4)在黑素瘤发生和发展过程中,表观遗传、基因决定因素和环境因素之间的相互影响使得黑素瘤发病机制研究相对复杂,

从而使黑素瘤的表观治疗研究变得更加复杂。

总的来说,黑素瘤预防、早期检测、治疗和疾病进展监控需要多学科相互协同,共同努力,既有基因操控、表观遗传治疗,又需减少环境危险因素暴露,同时还应当结合其他治疗方式,如免疫调节疗法、基本化疗和放射治疗来保证肿瘤对各种治疗方法的敏感性,减少药物抗性,从而真正达到控制黑素瘤的发病率、降低死亡率、提高无瘤存活时间甚至完全治愈的目标。

## [参考文献]

- [1] Little E G, Eide M J. Update on the current state of melanoma incidence[J]. *Dermatol Clin*, 2012, 30:355-361.
- [2] Baylin S B, Jones P A. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11:726-734.
- [3] Wilson A S, Power B E, Molloy P L. DNA hypomethylation and human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775:138-162.
- [4] Lian C G, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma[J]. *Cell*, 2012, 150:1135-1146.
- [5] Larson A R, Dresser K A, Zhan Q, Lezcano C, Woda B A, Yosufi B, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine correlates with increasing morphologic dysplasia in melanocytic tumors[J]. *Mod Pathol*, 2014, 27:936-944.
- [6] Gambichler T, Sand M, Skrygan M. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2013, 23:218-220.
- [7] Tellez C S, Shen L, Estecio M R, Jelinek J, Gershenwald J E, Issa J P. CpG island methylation profiling in human melanoma cell lines[J]. *Melanoma Res*, 2009, 19:146-155.
- [8] Sigalotti L, Covre A, Fratta E, Parisi G, Sonogo P, Colizzi F, et al. Whole genome methylation profiles as independent markers of survival in stage IIIC melanoma patients[J]. *J Transl Med*, 2012,10:185.
- [9] Conway K, Edmiston S N, Khondker Z S, Groben P A, Zhou X, Chu H, et al. DNA-methylation profiling distinguishes malignant melanomas from benign nevi [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24:352-360.
- [10] De Carvalho D D, Sharma S, You J S, Su S F, Taberlay P C, Kelly T K, et al. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21:655-667.
- [11] He L, Thomson J M, Hemann M T, Hernandez-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. *Nature*, 2005, 435:828-833.
- [12] Wapinski O, Chang H Y. Long noncoding RNAs and human disease[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21:354-361.
- [13] Park S M, Gaur A B, Lengyel E, Peter M E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2[J]. *Genes Dev*, 2008, 22:894-907.
- [14] Liu S, Tetzlaff M T, Cui R, Xu X. MiR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1 [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181:1823-1835.
- [15] van Kempen L C, van den Hurk K, Lazar V, Michiels S, Winpenninckx V, Stas M, et al. Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is associated with increased thickness and disease progression[J]. *Virchows Arch*, 2012, 461:441-448.
- [16] Liu S, Kumar S M, Lu H, Liu A, Yang R, Pushparajan A, et al. MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF-kappaB1-Snail1 pathway in melanoma[J]. *J Pathol*, 2012, 226:61-72.
- [17] Liu S, Tetzlaff M T, Liu A, Liegl-Atzwanger B, Guo J, Xu X. Loss of microRNA-205 expression is associated with melanoma progression[J]. *Lab Invest*, 2012, 92:1084-1096.
- [18] Nguyen T, Kuo C, Nicholl M B, Sim M S, Turner R R, Morton D L, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma[J]. *Epigenetics*, 2011, 6:388-394.
- [19] Asangani I A, Harms P W, Dodson L, Pandhi M, Kunju L P, Maher C A, et al. Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma[J]. *Oncotarget*, 2012, 3:1011-1025.
- [20] Luo C, Tetteh P W, Merz P R, Dickes E, Abukiwan

- A, Hotz-Wagenblatt A, et al. MiR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133:768-775.
- [21] Jin L, Hu W L, Jiang C C, Wang J X, Han C C, Chu P, et al. MicroRNA-149\*, a p53-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 15840-15845.
- [22] Satzger I, Mattern A, Kuettler U, Weinspach D, Niebuhr M, Kapp A, et al. MicroRNA-21 is upregulated in malignant melanoma and influences apoptosis of melanocytic cells [J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21:509-514.
- [23] Streicher K L, Zhu W, Lehmann K P, Georgantas R W, Morehouse C A, Brohawn P, et al. A novel oncogenic role for the miRNA-506-514 cluster in initiating melanocyte transformation and promoting melanoma growth [J]. *Oncogene*, 2012, 31: 1558-1570.
- [24] Pencheva N, Tran H, Buss C, Huh D, Drobnjak M, Busam K, et al. Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis[J]. *Cell*, 2012, 151:1068-1082.
- [25] Mazar J, DeYoung K, Khaitan D, Meister E, Almodovar A, Goydos J, et al. The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness[J]. *PLoS One*, 2010, 5:e13779.
- [26] Felicetti F, Errico M C, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, et al. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 2745-2754.
- [27] Levati L, Alvino E, Pagani E, Arcelli D, Caporaso P, Bondanza S, et al. Altered expression of selected microRNAs in melanoma: antiproliferative and proapoptotic activity of miRNA-155[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35:393-400.
- [28] Tang L, Zhang W, Su B, Yu B. Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:251098.
- [29] Engreitz J M, Pandya-Jones A, McDonel P, Shishkin A, Sirokman K, Surka C, et al. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome[J]. *Science*, 2013, 341:1237973.
- [30] Khaitan D, Dinger M E, Mazar J, Crawford J, Smith M A, Mattick J S, et al. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion[J]. *Cancer Res*, 2011, 71:3852-3862.
- [31] Wu C F, Tan G H, Ma C C, Li L. The non-coding RNA linc23 drives the malignant property of human melanoma cells[J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40:179-188.
- [32] Feinberg A P, Tycko B. The history of cancer epigenetics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4:143-153.
- [33] Ceol C J, Houvras Y, Jane-Valbuena J, Bilodeau S, Orlando D A, Battisti V, et al. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset[J]. *Nature*, 2011, 471:513-517.
- [34] Rodriguez-Paredes M, Martinez de Paz A, Simo-Riudalbas L, Sayols S, Moutinho C, Moran S, et al. Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2014, 33:2807-2813.
- [35] Cannuyer J, Loriot A, Parvizi G K, De Smet C. Epigenetic hierarchy within the MAGEA1 cancer-germline gene: promoter DNA methylation dictates local histone modifications[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e58743.
- [36] Limm K, Ott C, Wallner S, Mueller D W, Oefner P, Hellerbrand C, et al. Deregulation of protein methylation in melanoma[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49: 1305-1313.
- [37] Nicholas C, Yang J, Peters S B, Bill M A, Baiocchi R A, Yan F, et al. PRMT5 is upregulated in malignant and metastatic melanoma and regulates expression of MITF and p27 (Kip1.) [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e74710.
- [38] Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C. Frameshift mutations of RIZ, but no point mutations in RIZ1 exons in malignant melanomas with deletions in 1p36 [J]. *Oncogene*, 2002, 21:3038-3042.
- [39] de Souza C F, Xander P, Monteiro A C, Silva A G, da Silva D C, Mai S, et al. Mining gene expression signature for the detection of pre-malignant

- melanocytes and early melanomas with risk for metastasis[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e44800.
- [40] Roesch A, Becker B, Meyer S, Wild P, Hafner C, Landthaler M, et al. Retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1: a retinoblastoma-binding protein downregulated in malignant melanomas [J]. *Mod Pathol*, 2005, 18:1249-1257.
- [41] Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy[J]. *Nature*, 2007, 445:851-857.
- [42] Howell P M Jr, Liu S, Ren S, Behlen C, Fodstad O, Riker A I. Epigenetics in human melanoma[J]. *Cancer Control*, 2009, 16:200-218.
- [43] Fratta E, Sigalotti L, Covre A, Parisi G, Coral S, Maio M. Epigenetics of melanoma: implications for immune-based therapies[J]. *Immunotherapy*, 2013, 5: 1103-1116.
- [44] Knutson S K, Warholic N M, Wigle T J, Klaus C R, Allain C J, Raimondi A, et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110:7922-7927.
- [45] Vo D D, Prins R M, Begley J L, Donahue T R, Morris L F, Bruhn K W, et al. Enhanced antitumor activity induced by adoptive T-cell transfer and adjunctive use of the histone deacetylase inhibitor LAQ824[J]. *Cancer Res*, 2009, 69:8693-8699.
- [46] Jazirehi A R, Arle D. Epigenetic regulation of the TRAIL/Apo2L apoptotic pathway by histone deacetylase inhibitors: an attractive approach to bypass melanoma immunotherapy resistance [J]. *Am J Clin Exp Immunol*, 2013, 2:55-74.
- [47] Tawbi H A, Beumer J H, Tarhini A A, Moschos S, Buch S C, Egorin M J, et al. Safety and efficacy of decitabine in combination with temozolomide in metastatic melanoma: a phase I/II study and pharmacokinetic analysis[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24: 1112-1119.
- [48] Daud A I, Dawson J, DeConti R C, Bicaku E, Marchion D, Bastien S, et al. Potentiation of a topoisomerase I inhibitor, karenitecin, by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in melanoma: translational and phase I/II clinical trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:2479-2487.
- [49] Munshi A, Kurland J F, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs M L, Tucker S L, et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11:4912-4922.
- [50] Hellebrekers D M, Jair K W, Vire E, Eguchi S, Hoebbers N T, Fraga M F, et al. Angiostatic activity of DNA methyltransferase inhibitors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5:467-475.
- [51] Killian J K, Kim S Y, Miettinen M, Smith C, Merino M, Tsokos M, et al. Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor [J]. *Cancer Discov*, 2013, 3:648-657.

[本文编辑] 孙岩