

## 脱氧核糖核酸甲基化分析方法在肿瘤诊断和治疗中的应用

刘姝娜 屠蕴秋 李文 吴萍\* 张卉 蔡称心

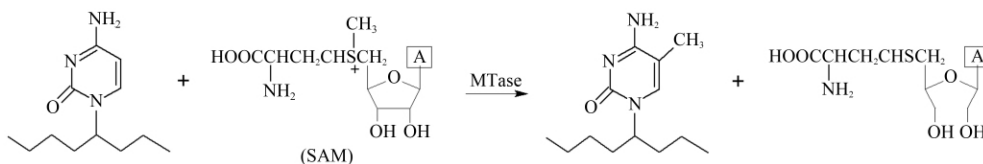
(南京师范大学化学与材料科学学院,江苏省新型动力电池重点实验室,  
江苏省生物功能材料重点实验室,电化学实验室,南京 210046)

**摘要** 脱氧核糖核酸(DNA)甲基化是表观遗传改变的主要作用方式,在基因表达调控、基因组印迹、胚胎发育、维持正常细胞功能等过程中起着极其重要的作用;异常甲基化可以导致肿瘤的发生、发展。因此,探讨甲基化形成与改变的可能机制,建立准确性好、灵敏度高、操作简单的DNA甲基化分析方法,可为某些肿瘤的早期诊断提供重要依据。本文综述了DNA甲基化的几种重要分析方法,着重介绍了直接测序法、甲基化特异性PCR方法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、荧光法、电化学方法以及光度分析法的原理及优缺点;并介绍了DNA甲基化在肿瘤诊断和治疗中的应用;最后展望了DNA甲基化分析检测方法的研究前景及应用。

**关键词** 脱氧核糖核酸;甲基化;肿瘤诊断;肿瘤治疗;评述

## 1 引言

脱氧核糖核酸(DNA)甲基化是指在DNA甲基转移酶(MTase)的作用下,以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基转移到DNA链中特定碱基上的过程。DNA甲基化是最早发现的基因表观遗传修饰方式之一,常发生在细胞的癌变过程中,是研究最为深入的一种表观遗传学调控机制<sup>[1]</sup>,是后天性基因沉默的一种重要决定性因素,与染色体结构、转录调节、外源DNA侵袭时细胞的自我保护密切相关<sup>[2]</sup>。甲基化的主要形式有5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤和7-甲基鸟嘌呤等。在原核生物中,甲基化常发生在GATC和CCATGG碱基序列中;在哺乳动物中,甲基化主要发生在胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(5'-CpG-3')的胞嘧啶(C)上,即在MTase作用下,CpG二核苷酸的C转变为5-甲基胞嘧啶(5mC)<sup>[3]</sup>,反应如下:



高等生物的DNA链中有两种形式的CpG位点:一种CpG位点分散于DNA链中,另一种CpG位点在DNA链的某些区域高度聚集,可达均值的5倍以上,通常含有20~30个CpG位点,成为C和G的富集区,这个区域称作CpG岛<sup>[4]</sup>。在哺乳动物基因组中约有4万个CpG岛。健康人类基因组中,CpG岛中的CpG位点通常是处于非甲基化状态,而在岛外的CpG位点则是甲基化的,这种甲基化的形式在细胞分裂过程中能够得到保留<sup>[5,6]</sup>。大量研究表明,非正常DNA甲基化常发生在CpG岛,能引起染色体结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互作用方式的改变,从而控制基因表达;还可使DNA失去限制性内切酶的切割位点及DNA酶的敏感位点,使染色体高度螺旋化、凝缩成团、失去转录活性。另外,甲基化的C可脱氨基生成胸腺嘧啶(T),导致基因置换突变,发生碱基错配;如果在细胞分裂过程中不被纠正,就会诱发遗传病或癌症。CpG岛是幼体突变及肿瘤抑制基因失活突变中重要的发生位点,在人类癌症中,约有25%的p53基因突变发生在CpG岛<sup>[7,8]</sup>;当肿瘤发生时,抑癌基因CpG岛以外的CpG序列非甲基化程度增加,而CpG岛中的CpG则呈高度甲基化状态,导致抑癌基因表达丢失<sup>[9]</sup>。因

2011-01-17 收稿;2011-05-03 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20833006),江苏省高校自然科学基金项目(Nos. 09KJA150001,10KJB150009),江苏省国土资源利用重点实验室开放课题(No. HPK201005),江苏省普通高校研究生科研创新计划(No. CX09B\_307Z)和江苏省高校优势学科建设工程资助项目

\* E-mail: wuping@njnu.edu.cn

此,研究甲基化形成与改变机制,建立准确性好、灵敏度高、操作简单的 DNA 甲基化分析方法,不仅可为某些肿瘤的早期诊断提供线索,还有助于治疗甲基化相关肿瘤新药物的发现及筛选<sup>[10-12]</sup>。本文综述几种重要的 DNA 甲基化分析方法,着重介绍它们的原理及在肿瘤诊断和治疗中的应用。

## 2 DNA 甲基化分析方法

根据分析原理的不同,甲基化分析方法可分为直接测序法、甲基化特异性 PCR 方法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、荧光法、电化学方法以及光度分析法等,这些方法可用于检测基因组整体甲基化水平、分析基因特异位点甲基化程度以及寻找新的甲基化位点等。

### 2.1 直接测序法

直接测序法是由 Frommer 等<sup>[13]</sup>提出的一种 DNA 甲基化分析方法,其原理是在亚硫酸氢盐(Bisulfite)作用下,将 DNA 中未甲基化的 C 脱氨基转化为尿嘧啶(U),再经 PCR 扩增转变成胸腺嘧啶(T),但甲基化的 C 不发生脱氨基转化;经过处理后,DNA 链包含的甲基化信息就可转化为 DNA 序列的差异;最后对 PCR 产物进行测序并与未处理的序列比较,判断 DNA 甲基化水平。Hiltunen 等<sup>[14]</sup>应用该方法分析了人类结肠癌基因中 APC 基因启动子区域的甲基化情况,结果表明,结肠癌患者在 APC 基因启动子区域的 CpG 位点呈现高甲基化状态。Liu 等<sup>[15]</sup>应用该方法对宫颈癌标本中的人乳头瘤病毒(HPV) DNA L1 区序列的甲基化进行了研究,由此发现并检测到了 HPV 少见的特殊类型,因此,该方法不仅可以测定甲基化程度,还可提供 HPV 型别的突变信息。该方法准确性好、可靠性高,能检测出目标片段中每一个 CpG 位点的甲基化状态;但需要大量的克隆测序,过程较为繁琐,且耗时。

### 2.2 甲基化特异性 PCR 方法

甲基化特异性 PCR(Methylation-specific PCR)技术是 Herman 等<sup>[16]</sup>在直接测序法基础上发展的一种方法。该方法以亚硫酸氢盐处理后的 DNA 产物作模板,加入甲基化特异性的引物或未甲基化的引物进行特异性的扩增检测。两对引物都具有很高的特异性,若用甲基化特异性引物能扩增出片段,说明该检测位点发生了甲基化;若用未甲基化引物能扩增出片段,说明该检测位点未甲基化。该方法是一种高效、特异、灵敏的 DNA 甲基化分析检测方法,并且所需 DNA 量很少,但不能反映出整个 CpG 岛甲基化程度。

### 2.3 高效液相色谱及高效毛细管电泳法

高效液相色谱法(HPLC)和高效毛细管电泳法(HPEC)是分析 DNA 甲基化的常用方法,它们都能准确地定量测定整体 DNA 甲基化水平。Kuo 等<sup>[17]</sup>首先报道了 HPLC 方法在测定 DNA 甲基化方面的应用,将 DNA 样品经酸或酶裂解为碱基,再经 HPLC 分离出各种碱基,通过计算  $5mC/(5mC+5C)$  的面积比可得到整体 DNA 的甲基化水平。该方法已成为检测 DNA 甲基化的标准方法。

邓大君等<sup>[18]</sup>对该方法作了进一步发展,他们将变性高效液相色谱技术(DHPLC)<sup>[19]</sup>与 PCR 技术联用,发展了 DHPLC 方法用于 DNA 甲基化的分析。将亚硫酸氢盐处理的 DNA 产物进行差异性扩增,处理后的样品注入到色谱柱中,进行梯度洗脱。在合适的变性温度下,甲基化的 DNA 在色谱柱中保留的时间比未甲基化的明显延长,通过比较和分析它们的保留时间可以得到 DNA 甲基化程度。该方法特别适用于分析构成复杂、同时存在甲基化和非甲基化模板的组织样品;该方法可获得 DNA 一级结构变异的信息,可用于高通量混合样本检测,能够测定整个扩增区域内 CpG 位点的甲基化,但不能对甲基化 CpG 位点进行精确定位。

与 HPLC 相比,HPEC 方法具有简便、快速、经济等优点。Fraga 等<sup>[20]</sup>用 HPEC 测定了 DNA 中 5 mC 的水平;张敏等<sup>[21]</sup>用该法检测了系统性红斑狼疮(SLE)患者的 DNA 甲基化水平,结果显示,SLE 患者 DNA 甲基化水平低于正常对照组,差异有统计学意义。

### 2.4 荧光检测法

荧光检测法是由 Dennis 等<sup>[22]</sup>提出,并应用于 p16 基因的甲基化水平分析的一种方法。该方法也是先用亚硫酸氢盐处理待测 DNA,然后设计一个与待检测区域互补的探针 DNA,探针的 5'端连接荧光报告基团,3'端连接荧光猝灭基团,随后进行实时定量 PCR;在反应过程中若标记的探针 DNA 与待测 DNA

杂交,利用 TaqDNA 聚合酶的 5'到 3'端外切酶活性使荧光报告基团和猝灭基团分离,开始发出荧光,测定每个循环报告荧光的强度即可得到该位点的甲基化情况及程度;若标记的探针 DNA 不能与待测 DNA 杂交,则引物延伸不能跳过未甲基化位点,荧光报告基团未受到切割,则不发荧光。根据同样的原理,也可对引物进行荧光标记,并通过不同标记的组合,检测多个位点的甲基化水平。Eads 等<sup>[23]</sup>用该方法研究了人类结肠癌 MLH1 错配基因组的甲基化程度,结果表明,该方法能区分该基因组中单等位基因和双等位基因的甲基化情况。杨晓菲等<sup>[24]</sup>应用该方法对原发性肝癌(HCC)的潜在肿瘤标志物 MAGE-A1、A3 基因异常甲基化改变进行了临床血浆标本的检测,证明了该方法可用于临床检测。荧光分析法具有灵敏度高、准确性好、重复性好、分析速率快、所需样品量少、PCR 产物污染少、能实时监测并可对大量的样本进行测定等优点<sup>[25]</sup>,而且可以做多样本、多基因位点的快速分析;但需要特定荧光探针,测定每个位点都需要一对引物及一条荧光双标记的寡核苷酸探针 DNA,且影响因素较多。

目前,该方法得到了进一步的发展。如 Worm 等<sup>[26]</sup>提出了甲基化敏感性解链曲线分析法(Methylation-specific melting curve analysis),将 DNA 经亚硫酸氢盐处理后再用荧光探针标记,用热循环仪进行检测;根据 DNA 各解链区域对应的解链温度不同进行检测,检测结果与标准曲线对照,判断并分析 DNA 序列中甲基化的水平。一般来说,序列中 CG 含量越高,对应的解链温度越高,而未甲基化序列经亚硫酸氢盐处理后 CG 含量降低,热稳定性降低,解链温度降低。Clément 等<sup>[27]</sup>报道了甲基化敏感性斑点分析的新方法(Methylation sensitive dot blot assay),用于定量或半定量分析甲基化水平。该方法是先用亚硫酸氢盐处理待测 DNA 片段,随后以非 CG 区的引物进行 PCR 扩增,将扩增产物变性后转移到尼龙膜上,用 3'端地高辛(DIG)标记的含 2 个 CG(或 TG)的双核苷酸探针与 DNA 杂交,随后用带有荧光标记的 DIG 抗体与之反应,能与双 CG 探针杂交的标本是甲基化的,能与 TG 探针杂交的标本是未被甲基化的。因此,可通过比较斑点上荧光的强度分析甲基化水平。文献[28-29]报道了一种荧光共振能量转移(FRET)技术检测 DNA 甲基化的方法。该方法以荧光标记的脱氧鸟苷三磷酸(dGTP-FI)为能量供体,阳离子共轭聚电解质(CCP-I)为能量受体(CCP-I 通过静电作用与 DNA 结合),通过供体与受体的荧光强度比检测 DNA 的甲基化水平。他们用该方法分析了从人结肠癌 HT29 细胞中提取的基因组 DNA 的甲基化水平,DNA 用亚硫酸氢盐处理后进行 PCR 扩增,再将探针 DNA、引物 DNA、Taq 酶及荧光标记的 dGTP-FI 混合,进行延伸反应。如果待测位点被甲基化,则 dGTP-FI 会在反应延伸时连结在引物末端,发生荧光共振能量转移,供体的荧光强度减弱,而受体的荧光强度增强,再通过分析荧光能量转移率判断 DNA 甲基化水平。他们将该方法用于结肠癌抑癌基因启动子甲基化水平的分析,为一些癌症的早期诊断提供了新手段。

## 2.5 电化学分析法

由于 DNA 链中的 C 和 mC 能发生电化学氧化,因此,可以用电化学方法判断 DNA 是否被甲基化及分析 DNA 甲基化程度。但由于 C 和 mC 在结构上很相似,它们的氧化电位很接近,而且 T 的氧化电位与 C 及 mC 的氧化电位也十分接近<sup>[30]</sup>,这些都给电化学方法检测 DNA 甲基化带来困难。Kato 等<sup>[31]</sup>选择了一个特殊 DNA 片段,用电子回旋共振纳米碳膜电极(Electron cyclotron resonance nanocarbon film electrode)研究了电化学方法检测 DNA 甲基化的可能性,发现这种电极能使 C 及 mC 的氧化峰电位分离达 140 mV 之多,并且,由于选择了一个特殊 DNA 片段,从而避免了 T 的氧化干扰;但在 DNA 序列未知的情况下,这种方法就不能避免 T 的干扰。最近,Wang 等<sup>[32]</sup>发现氯化胆碱修饰的多壁碳纳米管能催化 C 及 mC 的电化学氧化,并能使 C 和 mC 的氧化峰电位分离达 170 mV。根据碱基配对原则,一条双链 DNA 中 T 和腺嘌呤(A)的量是相同的,因此 T 的电化学信号可以通过等量 A 的电化学加以扣去。据此,Wang 等<sup>[32]</sup>提出了一种背景扣除法用以消除 T 的氧化干扰。

还可利用一些电化学探针分子的电化学信号变化分析 DNA 的甲基化。Hou 等<sup>[33]</sup>以典型的抑癌基因 p16 为研究对象,该基因上包含甲基化敏感性内切酶 BstU I 的酶切位点(5'-CG/CG-3')。处理后的 DNA(提取健康人血清 DNA 等分两份(一份经甲基化转移酶修饰,将全部 CpG 位点甲基化作为阳性样本;一份不做任何处理作为阴性样本)经该内切酶作用后,未甲基化的 DNA 被消化成短片段,PCR 扩增后得不到产物;而甲基化的 DNA 则保持不变,经 PCR 扩增后能得到产物。PCR 产物与固定在金电极表

面的探针 DNA 杂交后与电化学探针分子  $[\text{Co}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_3$  发生嵌入作用,该探针分子只能与双链 DNA 发生嵌入作用,不能与单链 DNA 发生嵌入作用。通过比较该探针分子与 DNA 作用后的电化学信号强弱判断 DNA 的甲基化程度。该方法结合 PCR 技术能有效快速检测 DNA 甲基化,且灵敏度很高,避免了放射性同位素及印记等带来的麻烦,成本低且结果可靠。

最近,本研究组提出了一种直接将电化学探针分子标记在探针 DNA 分子上的电化学方法用以检测 DNA 的甲基化<sup>[34]</sup>。以羧基二茂铁(FcA)作为电化学探针分子,将其通过酰胺键与固定在电极表面的探针 DNA 连接;以抑癌基因 p53 为研究对象,该基因中含 Hpa II 限制性内切酶的作用位点(5'-C/CGG-3'),该内切酶能剪切未甲基化的双链 DNA。剪切后,固定在 DNA 上的 FcA 分子则脱离电极,导致电化学响应电流减小;甲基化的 DNA 则不能被剪切,电化学信号无改变(图 1),因此通过比较 Hpa II 限制性内切酶剪切前后 FcA 的电化学响应电流即可判断 DNA 的甲基化程度。由于 FcA 的氧化电位接近 0 V(vs. SCE),因而可以避免其它氧化物质的干扰;该方法还能用于分析甲基化酶的活性以及筛选某些抗癌药物。

## 2.6 分光光度分析法

纳米材料由于具有独特的物理化学性能以及良好的生物相容性等特点,可作为标记物形成生物探针应用于生物分析领域,如金纳米粒子(AuNPs)的吸光度与其聚集状态有关,这一特性已被应用于 DNA 的甲基化分析<sup>[35~41]</sup>。

Liu 等<sup>[42]</sup>通过 Au-S 将双链 DNA 修饰到 AuNPs 上,由于带负电荷的 DNA 之间的相互排斥作用,能使 AuNPs 均匀分散在溶液中,此时溶液呈红色;若 DNA 在 MTase 作用下被甲基化,再被甲基化敏感性限制性内切酶 Dpn I 在特定位点 5'-GmATC-3'处剪切,导致固定在 AuNPs 表面的 DNA 链变短,负电荷减少,在  $\text{Mg}^{2+}$  作用下发生聚集,聚集后的 AuNPs 呈蓝色(图 2),同时 AuNPs 的吸光度也随着状态的变化而发生变化。通过 AuNPs 颜色及吸光度的变化能有效地判断 DNA 是否甲基化及分析甲基化的水平,而且也能分析 MTase 的活性。该方法具有简单、快速、无需标记、检出限低等特点,可用于甲基化抑制药物及某些抗癌药物的高通量筛选。

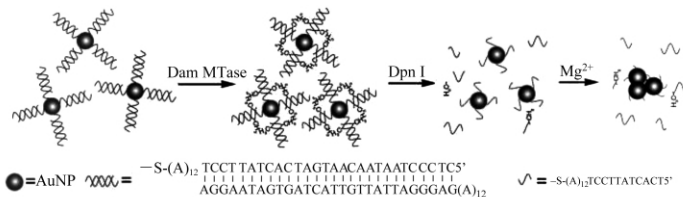


图 2 基于金纳米粒子颜色变化的 DNA 甲基化分析方法示意图<sup>[42]</sup>

Fig. 2 Schematic illustration of strategy for methylation detection based on color changes of Au nanoparticles<sup>[42]</sup>

## 2.7 其它分析方法

分析 DNA 甲基化的方法还有同位素标记法<sup>[43~44]</sup>,如 Gonzalgo 等<sup>[43]</sup>将亚硫酸氢盐处理 DNA 并以 PCR 扩增的产物作为 Ms-SnuPE 延伸模板,于反应体系中加入同位素标记的 dGTP 进行甲基化特异的单核苷酸引物延伸,分离后测定同位素放射活性,确定甲基化水平。该方法由于使用放射性的同位素,因而在使用过程中应注意放射性防护。凝胶电泳法<sup>[45~46]</sup>,该方法利用甲基化和非甲基化的单链 DNA 具

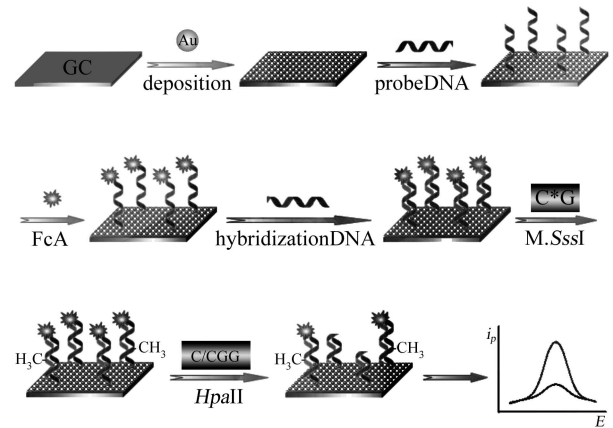


图 1 电化学方法检测 DNA 甲基化示意图<sup>[34]</sup>

Fig. 1 Schematic representation of electrochemical method for detection of DNA methylation<sup>[34]</sup>

有不同的空间构象,在电泳中移动速率不同,出现的位置不同,从而判定待测 DNA 片段的甲基化水平;高分辨的熔点分析法(High-resolution melting analysis)<sup>[47]</sup>,由于 DNA 甲基化后能显著提高热稳定性,根据这一特性,Rodríguez López 等<sup>[47]</sup>提出了 DNA 甲基化的熔点分析方法,该方法能灵敏地区分出只有 1 个碱基错配的甲基化 DNA;另外,激光诱导荧光偏振联合毛细管电泳免疫分析法(Laser-induced fluorescence polarization combined capillary electrophoresis immunoassay)<sup>[48]</sup>以及序列可控的 DNA 甲基酶分析法(Sequence-enabled DNA methylase)<sup>[49]</sup>也已见报道。

### 3 DNA 甲基化分析在肿瘤的诊断和治疗中的应用

癌症的早期发现对癌症患者的有效治疗是非常重要的。研究发现,在恶性肿瘤中,抑癌基因 CpG 岛发生高甲基化是基因失活并引发肿瘤发生的重要机制<sup>[50~52]</sup>。因此,检测这些基因的甲基化状态可以为相关肿瘤诊断、治疗和预后评估提供重要参考<sup>[53~56]</sup>。基因的甲基化状态有望成为肿瘤早期诊断的潜在指标,甚至可以作为患病风险预测、临床病程监控和疗效评估的指标。研究表明,卵巢肿瘤 RASSF1A 和 BRCA1 基因甲基化是卵巢肿瘤早期预兆<sup>[57,58]</sup>;Widschwendter 等<sup>[59]</sup>检测了 115 例卵巢癌及 26 例正常卵巢组织标本中 1 号染色体着丝粒及着丝粒旁的卫星 DNA 序列,发现在卵巢癌中该区域的卫星 DNA 的甲基化程度增高,且与肿瘤分期、分级及预后呈正相关,提示卫星 DNA 甲基化可作为监测卵巢肿瘤预后的独立标志物。

DNA 甲基化检测还能以血液、尿液、粪便等为标本进行,做到早期、非侵入性、无(或低)创伤性的检查<sup>[60,61]</sup>。Chan 等<sup>[62]</sup>应用甲基化特异性 PCR 方法在 40 例膀胱癌组织标本中检测 RASSF1A 基因启动子的甲基化率为 47.5% (19/40),并发现基因甲基化率与病理分级为正相关关系,而且 RASSF1A 基因启动子甲基化与患者的累积存活率相关,但与临床病理分级参数无显著相关性,揭示 RASSF1A 基因甲基化与膀胱细胞的癌变有一定关系。他们还分析了这些患者的尿液脱落细胞的 RASSF1A 基因的甲基化状态,其中 14 例膀胱癌患者尿液脱落细胞中的 RASSF1A 甲基化阳性,检测阳性率为 46.7%,而对照组正常人尿液未见阳性。因此,在尿液中检测 RASSF1A 甲基化可能是简便、无创性、非侵袭性的膀胱癌筛选方法。朱景德<sup>[63]</sup>对肺癌、卵巢癌、恶性神经胶质瘤、膀胱癌、肝癌和结肠直肠癌进行了涉及 31 个以上基因启动子区域 CGI 的甲基化特异性 PCR 分析(每种肿瘤不少于 69 例样本),发现 19 个以上与癌症分期相关联的基因高甲基化状态异常<sup>[64~67]</sup>;CDH13, MYOD1, MGMT, p16 INK4a 和 RASSF1A 等基因的高甲基化频率呈现明显的肿瘤类型特异性,这为以血浆等体液为样本进行甲基化特异性 PCR 分析,进而判断肿瘤组织类型提供了理论依据<sup>[68]</sup>。

DNA 甲基化状态是可被逆转的。因此,在肿瘤和癌前病变中通过去甲基化试剂使甲基化的基因去甲基化并重新表达,可以恢复某些关键性抑癌基因的功能,从而起到预防和治疗肿瘤的作用<sup>[69~72]</sup>。去甲基化药物 5-氮胞嘧啶和 5-氮-2'-脱氧胞嘧啶可以抑制甲基转移酶活性,在一些难治疗的肿瘤,特别是白血病治疗方面已取得了较好的疗效<sup>[73]</sup>。目前丙戊酸与 5-氮杂-2'-脱氧胞苷联合用药治疗急性髓系白血病已进入临床试验阶段。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是砒霜中的主要成分,Cui 等<sup>[74]</sup>的研究表明,低剂量的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 能够抑制 DNA 甲基化转移酶的活性,恢复肝癌细胞系中 p16INK4s、RASSF1A、E-cadherin 和 GSTP1 基因启动子区 CpG 岛的部分或全部活性,起到治疗肝癌的目的。Uhm 等<sup>[75]</sup>用甲基化特异性 PCR 法检测胆管癌、周边非肿瘤组织、正常肝组织中 ID4, DLC21 和 SFRP1 基因的甲基化状态,结果在 3 种胆管癌细胞株中检测到这些基因高甲基化状态,而在非肿瘤组织中这些基因检查率低,并且这些细胞用 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶处理后基因表达下调,说明 DNA 甲基化异常可能导致胆管癌的发生,而且 DNA 甲基化抑制剂可以用于肿瘤的治疗。此外,还有抗高血压药胍苯哒嗪、抗心律失常药普鲁卡因胺、局部麻醉药普鲁卡因等均可用于 DNA 去甲基化抗肿瘤的治疗。DNA 去甲基化药物将在肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用。

### 4 结束语

DNA 甲基化分析技术的不断发展和完善为深一步研究和阐明基因的表达调控、细胞增殖、分化发育和基因组印迹以及肿瘤的发病机制等提供了有力的工具,对功能基因组学的研究产生积极而深远的

影响。典型的 DNA 甲基化分析技术主要集中于已知基因序列的甲基化分析,而在基因组水平分析未知序列的甲基化状态并寻找与之相关的新基因是当前 DNA 甲基化分析中的研究热点。这种研究对于寻找与疾病表观遗传学异常机制相关的新的基因及以新的疾病标志物都具有重要的应用价值。近年来,有研究者提出了以限制性标记基因组扫描的全基因组序列特异性甲基化分析新技术用于未知序列 DNA 甲基化分析<sup>[76]</sup>;另外,甲基化敏感的限制性指纹谱<sup>[77]</sup>、甲基化区间位点扩增<sup>[78]</sup>等新技术的出现为 DNA 甲基化分析在胚胎发育、肿瘤细胞异常基因印记等深层次研究提供了可能。

## References

- 1 Baylin S B, Herman J G. *Trends Genet.*, **2000**, 16(4): 168 ~ 174
- 2 Bird A. *Genes Dev.*, **2002**, 16(1): 6 ~ 21
- 3 Wu C T, Morris J R. *Science*, **2001**, 293(5532): 1103 ~ 1105
- 4 Bird A P. *Nature*, **1986**, 321(6067): 209 ~ 213
- 5 Jones P A, Takai D. *Science*, **2001**, 293(5532): 1068 ~ 1070
- 6 Yamada Y, Watanabe H, Miura F, Soejima H, Uchiyama M, Iwasaka T, Mukai T, Sakaki Y, Ito T. *Genome Res.*, **2004**, 14(2): 247 ~ 266
- 7 Greenblatt M S, Bennett W P, Hollstein M, Harris C C. *Cancer Res.*, **1994**, 54(18): 4855 ~ 4878
- 8 Kimmins S, Sassone-Corsi P. *Nature*, **2005**, 434(7033): 583 ~ 589
- 9 Dario L S, Rosa M A, Mariela E, Roberto G, Caterina C. *Rev. Recent Clin. Trials*, **2008**, 3(3): 192 ~ 203
- 10 Egger G, Liang G N, Aparicio A, Jones P A. *Nature*, **2004**, 429(6990): 457 ~ 463
- 11 Carvalho A L, Jerenimo C, Kim M M, Henrique R, Zhang Z, Hoque M O, Chang S, Brait M, Nayak C S, Jiang W W, Claybourne Q, Tokumaru Y, Lee J, Goldenberg D, Garrett-Mayer E, Goodman S, Moon C, Koch W, Westra W H, Sidransky D, Califano J A. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14(1): 97 ~ 107
- 12 Wilson A S, Power B E, Molloy P L. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1775(1): 138 ~ 162
- 13 Frommer M, McDonald L E, Millar D S, Collis C M, Watt F, Grigg G W, Molloy P L, Paul C L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89(5): 1827 ~ 1831
- 14 Hiltunen M O, Alhonen L, Koistinaho J, Myöhänen S, Pääkkönen M, Marin S, Kosma V M, Jänne J. *Int. J. Cancer.*, **1997**, 70(6): 644 ~ 648
- 15 Liu X, Clements A, Zhao K H, Marmorstein R. *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281(1): 578 ~ 586
- 16 Herman J G, Graff J R, Myöhänen S, Nelkin B D, Baylin S B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93(18): 9821 ~ 9826
- 17 Kuo K C, McCune R A, Gehrke C W, Midgett R, Ehrlich M. *Nucl. Acids Res.*, **1980**, 8(20): 4763 ~ 4776
- 18 DENG Da-Jun, DENG Guo-Ren, LÜ You-Yong, ZHOU Jing, XIN Hui-Jun (邓大君, 邓国仁, 吕有勇, 周静, 辛慧君). *National Medical Journal of China (中华医学杂志)*, **2001**, 80(3): 158 ~ 161
- 19 Oefner P J, Bonn G K, Huber C G, Nathakarnkitkool S. *J. Chromatogr. A*, **1992**, 625(2): 331 ~ 340
- 20 Fraga M F, Uriol E, Borja Diego L, Berdasco M, Esteller M, Cañal M J, Rodríguez R. *Electrophoresis*, **2002**, 23(11): 1677 ~ 1681
- 21 ZHANG Min, WANG Guo-Sheng, CHEN Wei, WANG Yun-Min, LI Xiang-Pei, KAN Ming, HE Xiao-Dong (张敏, 汪国生, 陈伟, 汪云敏, 李向培, 阚明, 何晓东). *The Journal of Practical Medicine (实用医学杂志)*, **2009**, 25(6): 889 ~ 891
- 22 Dennis Lo Y M, Wong I H N, Zhang J, Tein M S C, Ng M H L, Hjelm N M. *Cancer Res.*, **1999**, 59(16): 3899 ~ 3903
- 23 Eads C A, Danenberg K D, Kawakami K, Saltz L B, Blake C, Shibata D, Danenberg P V, Laird P W. *Nucl. Acids Res.*, **2000**, 28(8): e32
- 24 YANG Xiao-Fei, QIU Geng, YE Song-Shan, DING Xiao-Hua, OU Zhi-Ying, WANG Wei-Yi, HE Yun-Shao (杨晓菲, 邱耕, 叶松山, 丁肖华, 欧志英, 王伟毅, 何蕴韶). *Chinese J. Lab. Medicine (中华检验医学杂志)*, **2007**, 30(4): 433 ~ 434
- 25 Dabl C, Guldberg P. *Biogerontology*, **2003**, 4(4): 233 ~ 250
- 26 Worm J, Aggerholm A, Guldberg P. *Clin. Chem.*, **2001**, 47(7): 1183 ~ 1189
- 27 Clément G, Benhattar J. *J. Clin. Pathol.*, **2005**, 58(2): 155 ~ 158

- 28 Feng F , Wang H Z , Han L L , Wang S. *J. Am. Chem. Soc.* , **2008** , 130( 34) : 11338 ~ 11343
- 29 Duan X R , Liu L B , Feng F D , Wang S. *Acc. Chem. Res.* , **2010** , 43( 2) : 260 ~ 270
- 30 Tanaka K , Tainaka K , Kamei T , Okamoto A. *J. Am. Chem. Soc.* , **2007** , 129( 17) : 5612 ~ 5620
- 31 Kato D , Sekioka N , Ueda A , Kurita R , Hirono S , Suzuki K , Niwa O. *J. Am. Chem. Soc.* , **2008** , 130( 12) : 3716 ~ 3717
- 32 Wang P , Mai Z B , Dai Z , Zou X Y. *Chem. Commun.* , **2010** , 46( 41) : 7781 ~ 7783
- 33 Hou P , Ji M J , Ge C W , Shen J Y , Li S , He N Y , Lu Z H. *Nucl. Acids Res.* , **2003** , 31( 16) : e92
- 34 Liu S N , Wu P , Li W , Zhang H , Cai C X. *Chem. Commun.* , **2011** , 47( 10) : 2844 ~ 2846
- 35 Chen C , Song G T , Ren J S , Qu X G. *Chem. Commun.* , **2008** , ( 46) : 6149 ~ 6151
- 36 Geng J , Qu K G , Ren J S , Qu X G. *Mol. Biosyst.* , **2010** , 6( 12) : 2389 ~ 2391
- 37 Chen C , Song G T , Yang X J , Ren J S , Qu X G. *Biochimie* , **2010** , 92( 10) : 1416 ~ 1421
- 38 Zhua X L , Liu Y X , Yang J H , Liang Z Q , Li G X. *Biosens. Bioelectron.* , **2010** , 25( 9) : 2135 ~ 2139
- 39 Li W , Liu Z L , Lin H , Nie Z , Chen J H , Xu X H , Yao S Z. *Anal. Chem.* , **2010** , 82( 5) : 1935 ~ 1941
- 40 Xu X Y , Han M S , Mirkin C A. *Angew. Chem. Int. Ed.* , **2007** , 46( 19) : 3468 ~ 3470
- 41 Xu W , Xue X J , Li T H , Zeng H Q , Liu X G. *Angew. Chem. Int. Ed.* , **2009** , 48( 37) : 6849 ~ 6852
- 42 Liu T , Zhao J , Zhang D M , Li G X. *Anal. Chem.* , **2010** , 82( 1) : 229 ~ 233
- 43 Gonzalgo M L , Jones P A. *Nucl. Acids Res.* , **1997** , 25( 12) : 2529 ~ 2531
- 44 Bergerat A , Guschlbauer W , Fazakerley G V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* , **1991** , 88( 15) : 6394 ~ 6397
- 45 Maekawa M , Sugano K , Kashiwabara H , Ushiamo M , Fujita S , Yoshimori M , Kakizoe T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **1999** , 262( 3) : 671 ~ 676
- 46 Aggerholm A , Guldberg P , Hokland M , Hokland P. *Cancer Res.* , **1999** , 59( 2) : 436 ~ 441
- 47 Rodríguez López C M , Asenjo B G , Lioyd A J , Wilkinson M J. *Anal. Chem.* , **2010** , 82( 21) : 9100 ~ 9108
- 48 Wang X L , Song Y L , Song M Y , Wang Z X , Li T , Wang H L. *Anal. Chem.* , **2009** , 81( 19) : 7885 ~ 7891
- 49 Nomura W , Barbas C F. *J. Am. Chem. Soc.* , **2007** , 129( 28) : 8676 ~ 8677
- 50 Mathers J C. *Gut* , **2005** , 54: 5792 ~ 5811
- 51 Ehrlich M , Turner J , Gibbs P , Lipton L , Giovanneti M , Cantor C , van den Boom D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* , **2008** , 105( 12) : 4844 ~ 4849
- 52 Trasler J M. *Reproduction Fertility and Development* , **2006** , 18( 1-2) : 63 ~ 69
- 53 Esteller M , Corn P G , Baylin S B , Herman J G. *Cancer Res.* , **2001** , 61( 8) : 3225 ~ 3229
- 54 ZHANG Jing , LAi Mao-De , CHEN Jian ( 张 静 , 来茂德 , 陈 俭) . *Chinese J. Pathol.* ( 中华病理学杂志) , **2000** , 29( 2) : 95 ~ 98
- 55 Henrique R , Ribeiro F R , Fonseca D , Hoque M O , Carvalho A L , Costa V L , Pinto M , Oliveira J , Teixeira M R , Sidransky D , Jerónimo C. *Clin. Cancer Res.* , **2007** , 13( 20) : 6122 ~ 6129
- 56 Abbaszadegan M R , Moaven O , Sima H R , Ghafarzadegan K , A' rabi A , Forghani M N , Raziee H R , Mashhadinejad A , Jafarzadeh M , Esmaili-Shandiz E , Dadkhah E. *World J. Gastroenterol.* , **2008** , 14( 13) : 2055 ~ 2060
- 57 Wilcox C B , Baysal B E , Gallion H H , Strange M A , DeLoia J A. *Cancer Genet. Cytogenet.* , **2005** , 159( 2) : 114 ~ 122
- 58 Choi Y L , Kang S Y , Shin Y K , Choi J S , Kim S H , Lee S J , Bae D S , Ahn G. *Virchows Arch.* , **2006** , 448( 3) : 331 ~ 336
- 59 Widschwendter M , Jiang G C , Woods C , Müller H M , Fiegl H , Goebel G , Marth C , Müller-Holzner E , Zeimet A G , Laird P W , Ehrlich M. *Cancer Res.* , **2004** , 64( 13) : 4472 ~ 4480
- 60 El-Maarri O , Herbiniaux U , Walter J , Oldenburg J. *Nucl. Acids Res.* , **2002** , 30( 6) : e25
- 61 Rand K , Qu W J , Ho T , Clark S J , Molloy P. *Methods* , **2002** , 27( 2) : 114 ~ 120
- 62 Chan M W Y , Chan L W , Tang N L S , Lo K W , Tong J H M , Chan A W H , Cheung H Y , Wong W S , Chan P S F , Lai F M M , To K F. *Int. J. Cancer* , **2003** , 104( 5) : 611 ~ 616
- 63 ZHU Jing-De ( 朱景德) . *Journal of Diagnostics Concepts & Practice* ( 诊断学理论与实践) , **2009** , 8( 1) : 15 ~ 19

- 64 Huang J , Zhang X , Zhang M , Zhu J D , Zhang Y L , Lin Y , Wang K S , Qi X F , Zhang Q , Liu G Z , Yu J , Cui Y , Yang P Y , Wang Z Q , Han Z G. *Carcinogenesis* , **2007** , 28( 5) : 1094 ~ 1103
- 65 Zhu J D. *Cell Res.* , **2005** , 15( 4) : 272 ~ 280
- 66 Zhu J D. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* , **2006** , 13( 4) : 265 ~ 273
- 67 Zhu J D , Yao X B. *J. Biochem. Mol. Biol.* , **2007** , 40( 2) : 135 ~ 141
- 68 Paz M F , Fraga M F , Avila S , Guo M Z , Pollan M , Herman J G , Esteller M. *Cancer Res.* , **2003** , 63( 5) : 1114 ~ 1121
- 69 Mann B S , Johnson J R , Cohen M H , Justice R , Pazdur R. *Oncologist* , **2007** , 12( 10) : 1247 ~ 1252
- 70 Karam J A , Fan J H , Stanfield J , Richer E , Benaim E A , Frenkel E , Antich P , Sagalowsky A I , Mason R P , Hsieh J T. *Int. J. Cancer* , **2007** , 120( 8) : 1795 ~ 1802
- 71 Kasai H , Kawai K. *Chem. Res. Toxicol.* , **2009** , 22( 6) : 984 ~ 989
- 72 Siedlecki P , Boy R G , Musch T , Brueckner B , Suhai S , Lyko F , Zielenkiewicz P. *J. Med. Chem.* , **2006** , 49( 2) : 678 ~ 683
- 73 Miki K , Shimizu E , Yano S , Tani K , Sone S. *Oncol. Res.* , **2000** , 12( 8) : 335 ~ 342
- 74 Cui X , Wakai T , Shirai Y , Yokoyama N , Hatakeyama K , Hirano S. *Hum. Pathol.* , **2006** , 37( 3) : 298 ~ 311
- 75 Uhm K O , Lee E S , Lee Y M , Kim H S , Park Y N , Park S H. *Oncol. Res.* , **2008** , 17( 4) : 151 ~ 157
- 76 Weber M , Hellmann I , Stadler M B , Ramos L , Pääbo S , Rebhan M , Schübeler D. *Nat. Genet.* , **2007** , 39( 4) : 457 ~ 466
- 77 Costello J F , Frühwald M C , Smiraglia D J , Rush L J , Robertson G P , Gao X , Wright F A , Feramisco J D , Peltomäki P , Lang J C , Schuller D E , Yu L , Bloomfield C D , Caligiuri M A , Yates A , Nishikawa R , Su Huang H J , Petrelli N J , Zhang X L , O'Dorisio M S , Held W A , Cavenee W K , Plass C. *Nat. Genet.* , **2000** , 24( 2) : 132 ~ 138
- 78 Huang T H M , Laux D E , Hamlin B C , Tran P , Tran H , Lubahn D B. *Cancer Res.* , **1997** , 57( 6) : 1030 ~ 1034

## Assay Methods of DNA Methylation and Their Applications in Cancer Diagnosis and Therapy

LIU Shu-Na , TU Yun-Qiu , LI Wen , WU Ping\* , ZHANG Hui , CAI Chen-Xin

( Jiangsu Key Laboratory of New Power Batteries , Jiangsu Key Laboratory of Biofunctional Materials ,  
Laboratory of Electrochemistry , College of Chemical and Materials Science ,  
Nanjing Normal University , Nanjing 210046)

**Abstract** DNA methylation catalyzed by DNA methyltransferase is an important epigenetic event that plays crucial roles in gene transcription and expression , genomic imprinting , embryogenesis , and maintaining normal cell function. Aberrant DNA methylation can lead to the development of cancer. Therefore , an approach for the rapid , facile , and sensitive detection DNA methylation could provide a powerful tool for early cancer diagnosis. This paper reviews the assay methods of DNA methylation. Specifically , direct sequencing , methylation-specific PCR , high performance liquid chromatographic method , capillary electrophoresis , fluorescence approach , electrochemical approach , and colorimetric approach are presented. In addition , the application of the assay of DNA methylation in cancer diagnosis and therapy is summarized. Finally , the further development on the assay methods of DNA methylation and their applications are briefly introduced.

**Keywords** Deoxyribonucleic acid; Deoxyribonucleic acid methylation; Cancer diagnosis; Cancer therapy; Review

( Received 17 January 2011; accepted 3 May 2011)