

# Progress in Methylation of the Promoter Region of the WIF-1 Gene in Tumors

Yiha Jia Jian Chen\*

Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China

## Abstract

The abnormal activation of Wnt signaling pathway is closely related to the occurrence and development of malignant tumors. WIF-1 gene is a suppressor of Wnt signaling pathway, which can directly bind to Wnt protein receptor to inhibit the abnormal activation of Wnt pathway, thus inhibiting the growth and differentiation of tumors. Domestic and foreign studies have proved that there is silencing of WIF-1 gene expression in various malignant tumors, and this silencing is closely related with methylation of CpG sites in the Wif-1 promoter region, which further leads to low expression of WIF-1 gene, making it unable to effectively block the aberrant activation of Wnt /  $\beta$ -catenin signaling pathway. In this paper, we review the progress of the methylation of Wif-1 gene in cancer at home and abroad, aiming to provide a more effective method for the treatment of diseases.

## Keywords

Wif-1; DNA methylation; tumor

## Wif-1 基因启动子区甲基化在肿瘤中的研究进展

贾依晗 陈健\*

承德医学院附属医院, 中国·河北承德 067000

## 摘要

Wnt信号通路异常激活和恶性肿瘤的发生发展关系密切, WIF-1基因是Wnt信号通路的抑制因子, 能和Wnt蛋白受体直接结合从而抑制Wnt通路的异常激活, 从而抑制肿瘤的生长和分化。国内外研究证明, 在多种恶性肿瘤中存在WIF-1基因的表达沉默, 而这种沉默与WIF-1启动子区域CpG位点的甲基化密切相关, 进一步导致WIF-1基因出现低表达, 使其无法有效阻断Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的异常激活。论文就目前国内外对Wif-1基因启动子区甲基化在肿瘤中的研究进展作一综述, 旨在为疾病的治疗提供更有效的方法。

## 关键词

Wif-1; DNA甲基化; 肿瘤

## 1 引言

Wnt 信号转导通路在细胞增殖、分化、凋亡等方面有着极其重要的作用, 它由 19 个分泌型糖蛋白组成, 而这些糖蛋白之间的相互作用可能涉及到肿瘤的形成和发展。Wnt 抑制因子 1 (WIF-1) 是 Wnt 信号途径中关键的抑癌基因<sup>[1]</sup>, 属于一种高度保守的分泌蛋白型 Wnt 拮抗剂, 能在细胞外与 Wnt 蛋白结合使 Wnt 信号通路转导受到抑制, 从而抑制肿瘤的发生和发展。目前研究证明 Wnt 信号通路的异常激活或调控基因的失调在多种恶性肿瘤的发生与转移中起到重要作用<sup>[2]</sup>。而沉默抑癌基因为主的基因启动子甲基化是表

观遗传学机制中的主要表现形态, 在人体内发挥着调控基因表达的重要作用。

## 2 WIF-1 的甲基化与肿瘤

### 2.1 鼻咽癌

鼻咽癌好发于中国南部地区, 属于头颈部恶性肿瘤, 在鼻咽癌的表现遗传学研究中, 通常以肿瘤抑制基因甲基化状态作为研究对象<sup>[3]</sup>。Yu-Ching Lin 等<sup>[4]</sup>的研究发现在鼻咽癌细胞株中, 存在 Wnt 信号通路的激活和 WIF-1 基因的下调, 进一步在鼻咽癌细胞株试验中采用甲基化特异性 PCR (MSP) 和测序分析, 结果表明在鼻咽癌细胞株中 WIF-1 的下调与 WIF-1 启动子区域的 CpG 甲基化有关。Chan SL 等<sup>[5]</sup>通过对鼻咽癌肿瘤细胞系及正常上皮细胞系进行研究, 在鼻咽癌肿瘤细胞系中 WIF-1 因高甲基化而表达沉默, 正常上皮细胞系中 WIF-1 广泛表达。同时通过对 65 例鼻咽癌肿瘤样本进行分析, 其中 55 例提示 WIF-1 甲基化, 而在正

【作者简介】贾依晗 (1996-), 女, 中国天津人, 在读硕士, 从事胃肠病学研究。

【通讯作者】陈健 (1979-), 女, 硕士, 副教授、主任医师, 从事胃肠病学研究。

常组织中，WIF-1 存在表达且未甲基化。进一步的研究证实 WIF-1 通过下调  $\beta$ -catenin 蛋白水平和抑制 Wnt 信号通路在鼻咽癌中发挥抑癌作用。Fendri 等<sup>[6]</sup>通过对 68 例鼻咽癌组织和 10 例正常粘膜组织中 WIF-1 启动子甲基化状态进行研究，发现正常组织中并未发生甲基化改变，而 89.7% 的鼻咽癌组织中却呈现高甲基化状态。此外，WIF-1 启动子的高甲基化与年龄、肿瘤晚期和淋巴结转移有关，可作为鼻咽癌侵袭性临床表现的指标。

## 2.2 口腔癌

口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 是头颈部最常见的癌症之一<sup>[7]</sup>，相关研究表明，通过 DNA 甲基化对癌症相关基因进行表观遗传沉默也在 OSCC 癌变过程中发挥了重要作用<sup>[8,9]</sup>，但确切的分子机制尚不完全清楚。Pannone G 等<sup>[10]</sup>通过对 37 例口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 及其对应正常口腔粘膜中 WIF-1 基因进行甲基化特异性 PCR (MSP) 分析，发现 WIF-1 基因的甲基化是口腔癌的重要表观遗传学改变。

## 2.3 喉癌

头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 是全球第六大癌症<sup>[11]</sup>，而喉鳞状细胞癌 (LSCC) 是头颈部最常见的肿瘤<sup>[12]</sup>。研究表明，WNT/ $\beta$ -catenin 通路失调在头颈部癌变中也起着作用<sup>[13]</sup>。Paluszczak J 等<sup>[14]</sup>人研究分析了 26 个喉鳞状细胞癌细胞系和 28 名原发性喉鳞状细胞癌患者的样本，采用甲基化特异性 PCR (MSP) 方法评估了 DKK1、LKB1、PPP2R2B、RUNX3、SFRP1、SFRP2 和 WIF-1 的甲基化状态。检测发现 DKK1、PPP2R2B、SFRP1、SFRP2 和 WIF-1 基因频繁高甲基化，所分析的半数细胞系和 70% 的原发性喉癌病例均存在至少四个基因的甲基化，并且 PPP2R2B 或 WIF-1 的高甲基化与喉癌细胞系的存活期延长有关。

## 2.4 食管癌

食管癌与 DNA 甲基化之间存在密切的关系，特别是抑癌基因的高甲基化和癌基因的低甲基化，这些改变可能导致基因沉默或激活，从而影响细胞的增殖、分化和凋亡等过程<sup>[15]</sup>。Chan SL 等<sup>[5]</sup>人研究发现，在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 细胞系中，WIF-1 基因的表达水平常降低，并且这种表达降低与基因的甲基化状态密切相关。在 92 例 ESCC 原发性肿瘤样本中，有 25 例 (约占 27%) 出现了 WIF-1 基因的甲基化，而在正常组织样本中则没有观察到 WIF-1 的甲基化现象。研究指出，WIF-1 基因的甲基化在 ESCC 中可作为疾病的一个特异性生物标志物，有助于疾病的诊断或预后评估。Yang SH 等<sup>[16]</sup>研究分析了 50 例 ESCC 组织及 4 种 ESCC 细胞系，检测后发现其 WIF-1 启动子区甲基化率分别为 46% 和 50%。在使用去甲基化剂 5-氮杂胞苷 (DAC) 处理后可恢复 WIF-1 的表达，重新表达的 WIF-1 可显著抑制 ESCC 细胞的增殖与迁移，提示 WIF-1 的表达降低或沉默是 ESCC 癌变的重要机制。

## 2.5 肺癌

肺癌是全球范围内发病率与病死率最高的恶性肿瘤<sup>[17]</sup>。在肺癌的分子病理学研究中，WIF-1 甲基化状态是一个关键的表观遗传学改变。Julien Mazieres 等<sup>[18]</sup>研究发现，在非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系中，Wnt 通路的异常激活与 WIF-1 启动子区域的 CpG 岛超甲基化状态密切相关。同时，研究选取 18 例新鲜肺癌组织中，15 例出现 WIF-1 的表达下调，且与启动子区甲基化相关。研究结果显示，WIF-1 的表达下调在肺癌中是一种常见的现象，且与启动子区域的超甲基化密切相关。TangM 等<sup>[19]</sup>对原发性肺腺癌及原发性结直肠癌肺转移癌进行了 12 种基因的甲基化检测，结果显示 APC、CDH1、sFRP1 和 WIF-1 基因的启动子高甲基化可能有助于区分肺原发性腺癌和结直肠癌肺转移癌，同时提示 Wnt 信号通路相关基因的启动子甲基化可能在癌变中发挥重要作用。ZhengY 等<sup>[20]</sup>通过对 626 例肺癌患者和 512 例对照的 WIF-1 启动子超甲基化情况进行系统性荟萃分析，结果显示肺癌患者的 WIF-1 启动子超甲基化显著高于对照组，且与吸烟行为相关。然而，WIF-1 启动子超甲基化与性别、年龄、肿瘤阶段、病理类型及无复发生存和总体生存率无显著关联。

## 2.6 乳腺癌

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一，其中 Wnt 信号通路在乳腺癌的发生发展中起重要作用。研究表明 DNA 超甲基化是导致乳腺癌 Wnt 通路异常的主要原因。Ai L 等<sup>[21]</sup>通过对人类乳腺肿瘤细胞系进行 MSP 和亚硫酸盐基因组测序发现细胞中的 WIF-1 启动子异常高甲基化，利用 DNA 去甲基化试剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷对乳腺癌细胞系去甲基化后，WIF-1 表达上调。对 24 例原发性乳腺肿瘤分析显示，其中 67% 的肿瘤出现 WIF-1 启动子异常甲基化，研究结果表明 WIF-1 基因是乳腺癌中表观遗传沉默的一个靶点，并且揭示了 Wnt 信号通路的失调与乳腺肿瘤形成之间存在的机制联系。Veeck J 等<sup>[22]</sup>对 150 例原发性乳腺癌样本进行 MSP 检测，结果表明 WIF-1 基因启动子甲基化率为 63.3%，而在 19 例正常乳腺组织中未检测到 WIF-1 基因启动子甲基化。

## 2.7 结直肠癌

根据全球癌症统计数据，结直肠癌在癌症相关死亡中排名第二。近年表观遗传学的研究发现，Wnt 信号通路抑制因子 WIF-1、SFRPs 等基因的启动子区域高甲基化与结直肠癌的发病及进展紧密相关。Bo Bin Lee 等<sup>[23]</sup>为明确早期结直肠癌患者血浆中的表观遗传分子标志物，回顾性分析了 243 名 I 期和 II 期散发性结直肠癌患者的新鲜冷冻组织和相应血浆样本，以及 276 名健康人和 64 名结直肠腺瘤患者血浆中 10 个基因的甲基化状态，结果提示 APC、MGMT、RASSF2A 和 WIF-1 基因的甲基化评分模型在癌症患者中灵敏度为 86.5%，特异性为 92.1%，提示这些基因的肿瘤特异性甲基化可能作为早期结直肠癌的生物标志物。Maria

Dobre 等<sup>[24]</sup>研究评估了 18 名经手术切除的结直肠癌患者的粘膜肿瘤组织、10 名 CRC 患者的正常邻近组织以及 6 名结肠镜检查正常的对照组个体的组织中 22 个候选基因的 DNA 甲基化水平。结果显示, 肿瘤组织中 WIF-1 等 9 个基因的甲基化水平显著高于正常组织。

## 2.8 其他肿瘤

倪晓辰等<sup>[25]</sup>对比分析了 56 例肾细胞癌 (RCC) 组织及其邻近正常肾组织中 WIF-1 基因的甲基化状态和蛋白表达水平, 结果表明 RCC 组织中 WIF-1 基因的甲基化率明显高于癌旁正常组织, 而 WIF-1 基因蛋白的表达率低于癌旁组织, 表明 WIF-1 可能成为肾细胞癌的新型分子标志物, 对临床早期诊断和治疗具有潜在指导意义。Bin Lin 等<sup>[26]</sup>研究探讨了 cJun 在胆囊癌 (GBC) 中通过转录调控和与 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 相互作用抑制 WIF-1 表达的机制。研究发现, GBC 细胞中 WIF-1 的表达降低, 且与 DNA 超甲基化相关。通过免疫组化分析 50 个 GBC 样本, 发现 cJun 与 WIF-1 蛋白表达呈负相关, 干扰 cJun 的表达可使 WIF-1 去甲基化并重新表达, 同时下调 DNMT1 的表达。Alshareef A 等<sup>[27]</sup>研究表明, Wnt 信号通路在大多数套细胞淋巴瘤 (MCL) 中持续激活, 且 WIF-1 基因的甲基化可能是导致这一现象的原因。实验发现, WIF-1 在 MCL 细胞系和肿瘤样本中的表达受到抑制, 且与 Wnt 信号通路的激活和细胞生长有关。通过去甲基化处理和基因转染, 可以恢复 WIF-1 的表达并抑制细胞生长, 表明 WIF-1 的沉默可能与 MCL 的发展有关, 为未来治疗提供了潜在靶点。Zhang B 等<sup>[28]</sup>对子宫内膜癌的实验研究表明, 与正常细胞相比, 癌细胞中 WIF-1 启动子甲基化水平显著升高, 而 WIF-1 的 mRNA 和蛋白水平降低。通过 5-aza-2'-脱氧胞苷 (5-Aza) 处理可显著提高 WIF-1 表达并抑制子宫内膜癌细胞增殖。研究推测 WIF-1 启动子超甲基化可能通过下调 WIF-1 表达、激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路、促进增殖和抑制凋亡来促进子宫内膜癌的进展。WIF-1 可能成为子宫内膜癌治疗中基因治疗和药物开发的潜在生物靶点。Ying Wang 等<sup>[29]</sup>对宫颈癌研究发现, 癌组织中 WIF-1 的表达低于相邻的正常宫颈组织。在宫颈癌 SiHa 细胞系中, WIF-1 启动子发生了甲基化, 而在正常宫颈上皮细胞系 Ect1 中则没有。并且 SiHa 细胞中的 WIF-1 mRNA 水平和蛋白水平显著低于 Ect1 细胞。结果表明, WIF-1 启动子的甲基化导致 WIF-1 下调, 并激活宫颈癌细胞中的 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路。Shen CH 等<sup>[30]</sup>研究探讨了 WIF-1 基因在膀胱癌中的表观遗传调控, 结果显示 WIF-1 mRNA 表达与膀胱癌患者生存率正相关。使用 DNA 去甲基化药物 5-aza-2'-deoxycytidine 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 trichostatin A 可增强 WIF-1 基因表达, 证实其作为肿瘤抑制基因的作用。

## 3 结语

WIF-1 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的拮抗基因, 其启动子区的高甲基化状态在多种肿瘤中已被检出, 并且 WIF-1 作为一种肿瘤抑制基因, 其启动子区的高甲基化参与了肿瘤的发生发展。目前研究表明, 启动子区 CpG 岛甲基化是导致抑癌基因表达下调或沉默的重要原因。甲基化的 WIF-1 在经过去甲基化剂处理后可恢复 WIF-1 的表达, 抑制肿瘤的发生发展, 为未来肿瘤的临床诊疗提供新的思路与方法。

## 参考文献

- [1] Urakami S, Shina H, Enokida H, et al. Combination analysis of hypermethylation Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(7Pt1):2109-2116.
- [2] Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, et al. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process[J]. Gastroenterol Hepatol, 2002; 17(9):994-1000.
- [3] 黄光武. 鼻咽癌的基础研究[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2010(17): 113-115.
- [4] Lin YC, You L, Xu Z, et al. Wnt signaling activation and WIF-1 silencing in nasopharyngeal cancer cell lines[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(2):635-640.
- [5] Chan SL, Cui Y, van Hasselt A, et al. The tumor suppressor Wnt inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas[J]. Lab Invest, 2007, 87(7):644-650.
- [6] Fendri A, Khabir A, Hadri-Guiga B, et al. Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter is common and occurs in advanced stage of Tunisian nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Invest, 2010, 28(9):896-903.
- [7] Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis and treatment[J]. Mayo Clin Proc, 2008(83):489-501.
- [8] Imai T, Toyota M, Suzuki H, et al. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2008(99):958-966.
- [9] Chung YL, Lee MY, Pui NNM. Epigenetic therapy using the histone deacetylase inhibitor for increasing therapeutic gain in oral cancer: prevention of radiation-induced oral mucositis and inhibition of chemical-induced oral carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 2009(30):1387-1397.
- [10] Pannone G, Bufo P, Santoro A, et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors[J]. Oncol Rep, 2010, 24(4):1035-1041.
- [11] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011(61):69-90.

- [12] Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2011(11):9-22.
- [13] Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, et al. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis[J]. *Oral Oncol*, 2009(45):32434.
- [14] Paluszczak J, Hemmerling D, Kostrzewska-Poczekaj M, et al. Frequent hypermethylation of WNT pathway genes in laryngeal squamous cell carcinomas[J]. *Oral Pathol Med*, 2014,43(9):652-657.
- [15] 秦宇,魏文强.DNA甲基化与食管癌发生发展相关性及其临床应用前景[J].*中华肿瘤防治杂志*,2020,27(3):243-250.
- [16] Yang SH, Li SL, Dong ZM, et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Res*,2012,20(2-3):123-130.
- [17] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021,71(3):209-249.
- [18] Julien Mazieres, Biao He, Liang You, et al. Wnt Inhibitory Factor-1 Is Silenced by Promoter Hypermethylation in Human Lung Cancer[J].*Cancer Research*,2004(64):4717-4720.
- [19] Tang M, Torres - Lanzas J, Lopez - Rios F, et al. Wnt signaling promoter hypermethylation distinguishes lung primary adenocarcinomas from colorectal metastasis to the lung [J]. *Int J Cancer*,2006,119(11):2603.
- [20] Zheng Y, Li X, Jiang Y, et al. Promoter hypermethylation of Wnt inhibitory factor-1 in patients with lung cancer:A systematic meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*,2016,95(49):e5433.
- [21] Ai L, Tao Q, Zhong S, et al. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF-1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2006,27(7):1341-1348.
- [22] Veeck J, Wild PJ, Fuchs T, et al. Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF-1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2009(9):217.
- [23] Lee BB, Lee EJ, Jung EH, et al. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and WIF-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009,15(19):6185-6191.
- [24] Dobre M, Salvi A, Pelisenco IA, et al. Crosstalk Between DNA Methylation and Gene Mutations in Colorectal Cancer[J]. *Front Oncol*, 2021(1):697409.
- [25] 倪晓辰,张爱莉,卫书飞.肾细胞癌中WIF-1基因的甲基化状态及表达[J].*实用临床医药杂志*,2017,21(15):74-77.
- [26] Lin B, Hong H, Jiang X, et al. cJun suppresses the expression of WNT inhibitory factor 1 through transcriptional regulation and interaction with DNA methyltransferase 1 in gallbladder cancer[J]. *Mol Med Rep*,2018,17(6):8180-8188.
- [27] Alshareef A, Peters AC, Gélébart P, et al. Gene Methylation and Silencing of WIF-1 Is a Frequent Genetic Abnormality in Mantle Cell Lymphoma[J]. *Int J Mol Sci*,2021,18(2):893.
- [28] Zhang B, Ji J, Hu M, et al. WIF-1 promoter hypermethylation induce endometrial carcinogenesis through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Am J Reprod Immunol*,2023,90(2):e13743.
- [29] Wang Y, Yuan S, Ma J, et al. WIF-1 was downregulated in cervical cancer due to promoter methylation[J]. *Acta Biochim Pol*,2023,12(2):419-423.
- [30] Shen CH, Li PY, Wang SC, et al. Epigenetic regulation of human WIF-1 and DNA methylation situation of WIF-1 and GSTM5 in urothelial carcinoma[J]. *Heliyon*,2023,9(5):e16004.