

黑色素瘤的生物标志物：从基因组学到表观遗传学

吴海竞¹, 付思祺¹, 李倩文¹, 张慧明¹, 陆前进¹, 郭重^{1,2,3}

¹中南大学湘雅二医院皮肤科 湖南省表观遗传重点实验室, 长沙 410011

哈佛大学布莱根妇女医院 ²皮肤病理科 ³病理科, 波士顿, 美国 02115

通信作者: 陆前进 电话: 0731-85292184, E-mail: qianlu5860@csu.edu.cn, qianlu5860@gmail.com

郭重 电话: 617-495-1212, E-mail: CGLIAN@BWH.HARVARD.EDU

【摘要】黑色素瘤是一种发病率极高、极难治愈的皮肤恶性肿瘤, 其中转移性黑色素瘤的5年生存率几乎为零。虽然化疗和免疫疗法(如抗PD-1/PD-L1单克隆抗体生物制剂)发展迅速, 药物抵抗的高发生率仍是治愈率低的主要问题。因此, 目前研究热点逐渐转移至“运用生物标志物进行早期辅助诊断和药物反应预测”。随着检测技术的日新月异, 很多新型生物标志物被发现, 甚至已作为治疗靶点。本文从基因水平和表观遗传学水平总结黑色素瘤的生物标志物研究进展, 并讨论其对疾病诊断、发展和治疗反应的预测价值, 为寻找潜在治疗靶点提供新的思路。

【关键词】黑色素瘤; PD-1; 5-羟甲基化胞嘧啶; 微小RNA; 长链非编码RNA

【中图分类号】 R751 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2018)01-0060-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2018.01.012

Biomarkers of Melanoma: from Genetics to Epigenetics

WU Hai-jing¹, FU Si-qi¹, LI Qian-wen¹, ZHANG Hui-ming¹, LU Qian-jin¹, GUO Zhong^{1,2,3}

¹Department of Dermatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Key Laboratory of Medical Epigenomics, Changsha 410011, China

²Program in Dermatopathology, ³Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, 02115

Corresponding authors: LU Qian-jin Tel: 0731-85292184, E-mail: qianlu5869@csu.edu.cn, qianlu5860@gmail.com

GUO Zhong Tel: 617-495-1212, E-mail: CGLIAN@BWH.HARVARD.EDU

【Abstract】 Melanoma is one of the most aggressive cutaneous malignancies with an increasing incidence in recent decades, especially in western countries. It is considered to be an incurable disease, and patients with metastatic melanoma survive no more than 5 years. Despite rapid improvement in chemotherapy and immunotherapy, such as anti-PD-1/PD-L1 treatment, the high frequency of drug resistance remains a difficult problem. Thus, recent research has shifted slightly to the field of biomarkers to achieve the more urgent goal of aiding in the diagnosis and predicting response and resistance to therapy. With the development of fascinating technologies in laboratory testing, numerous novel biomarkers have been identified, and some of them exhibit potential as therapeutic targets. In this review, we summarize the latest genetic and epigenetic biomarkers, discuss their role in the prediction of disease progression and response to therapies, and provide insights into potential targets for future therapies.

【Key words】 melanoma; PD-1; 5-hydroxymethylated cytosine; micro-RNA; long non-coding RNA

Med J PUMCH, 2018, 9(1): 60-68

黑色素瘤是一种恶性程度高且生存率低的皮肤肿瘤，发病速度快且容易转移至脑、肝脏和肺等人体重要器官。目前对于黑色素瘤的临床诊断主要基于组织病理学标准，包括肿瘤深度、侵袭水平、是否有溃疡和淋巴结转移。但组织病理学标准无法区分从良性黑色素痣转变为黑色素瘤的亚型，亦无法预判哪些患者容易发生转移，因此，目前研究重点为尽快找到一种可用于黑色素瘤早期诊断和预测转移可能性的新型且有效的生物标志物。此外，虽然目前化学疗法和免疫疗法发展迅速，如威罗菲尼/拉菲尼（BRAF 抑制剂）^[1-4]，纳武单抗（PD-1 抗体）^[5]，易普利姆玛（CTLA-4 抗体）^[6]以及派姆单抗^[7]等药物，可延长患者生存期，但大多数患者最终发生耐药，预后不佳。因此，可预测药物反应性的生物标志物可能实现针对黑色素瘤的个体化和靶向治疗，为黑色素瘤的有效控制带来曙光。

迄今为止，已发现一系列新的生物标志物，其中一些可预测黑色素瘤转移、药物反应性等，甚至有些可作为治疗靶点。本文将从基因组学到表观遗传学水平，对新发现的生物标志物进行全面系统总结，讨论生物标志物临床应用的可行性，为改善患者生活质量、延长患者生存期等提供潜在的实验室指标和治疗靶点。

1 黑色素瘤的基因生物标志物

二代测序技术（next-generation sequencing, NGS）的发展成功帮助科学家们发现疾病新的潜在致病基因。事实上，目前基因分析已投入临床应用。例如，在应用抑制 BRAF 药物治疗之前，医生会应用基因分析确定肿瘤细胞的 BRAF 基因是否发生突变。一项来自 TCGA 的研究从 331 例患者 333 份黑色素瘤标本中

提取了 DNA、RNA 和蛋白质，并绘制出癌症基因图谱，构建了不同突变基因（BRAF、NRAS、KIT、GNAQ/GNA11、TP53/CDKN2A 和 NF1）的分类体系^[8]，可指导治疗策略的制定（表 1）。从全基因组测序（whole-genome sequencing, WGS）和全外显子测序（whole-exome sequencing, WES）的研究中发现，黑色素瘤患者存在高突变率及高紫外线暴露率的特征，而紫外线照射正是黑色素瘤的高危风险因素^[8-10]。通过 Bonferroni 统计学方法检验（ $P < 0.05$ ），癌症基因图谱研究新发现了 13 个黑色素瘤致病基因，分别为 BRAF、NRAS、TP53、NF1、CDKN2A、ARID2、PTEN、PPP6C、RAC1、IDH1、DDX3X、MAP2K1 和 RB1^[8]，然而，一些经典的导致其他部位癌症的致病基因如 PREX2、GRIN2A、ERBB4、ADAMTS18、BCL2L12、SOX10、MITF 和 KIT，却未在此癌症基因图谱中出现，可能由不同的统计学方法差异所导致^[11]。

基因除了可作为生物标志物用于肿瘤诊断，基因突变还可预测其转移可能性及对靶向药物治疗抵抗的概率。例如，NMDAR2 和 EGFR4 突变、MET 和 MITF 表达增加以及 PTEN 表达丢失预示转移可能性大，而 MITF 和 BRAF 表达增加及 PTEN 表达丢失则预示可能对靶向治疗抵抗。NRAS 突变是目前发现的唯一一个可预测免疫治疗敏感性的基因标志物^[23]。这些证据表明基因分析对监控疾病进展和指导个体化治疗具有重要作用。

除了这些研究较多的基因外，其他候选基因也有可能作为生物标志物。如在既往研究中，有学者试图将整合素信号通路基因的单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms, SNPs）与皮肤黑色素瘤存活率相关联。德克萨斯大学 M. D. 安德森癌症中心的全基因组相关性研究发现，整合素基因通路中 3 个独立的 SNPs：DOCK1 rs11018104 T>A、rs35748949 C>T 和

表 1 黑色素瘤靶向治疗的基因生物标志物

基因生物标志物	发生率	治疗干预	参考文献
BRAF (V600 E/K)	40%~60%	维洛菲尼或达拉菲尼（联合 MEK 抑制剂，称为曲美替尼）	[12-15]
BRAF (非 V600E/K)	5%	BRAF 抑制物联合维洛菲尼或达拉菲尼联合或不联合 MEK 抑制剂，临床试验中	[16-17]
NRAS	20%	MEK 抑制物 CDK4/6 抑制物的临床试验	[18]
NF1	46% 野生型 BRAF 和 NRAS	MAPK 抑制物，尚处在评估中	[19]
KIT	28%~39% 黏膜、肢端或慢性光损伤皮肤	伊马替尼、尼洛替尼或其他 KIT-靶向抑制物	[20]
TP53/CDKN2A	11%	CDK4/6 抑制物，早期临床试验中	[21]
基因表达图谱	—	预示着对白细胞介素-2 应答	[22]

PAK2 rs1718404 C>T 有望成为预测黑色素瘤预后的生物标志物^[24]；在肢端雀斑样黑色素瘤中发现 TERT 变异，TERT 抑制物可能成为潜在治疗策略，使得 TERT 变异成为制定黑色素瘤个体化治疗策略的潜在生物标志物^[25]；从 33 例葡萄膜黑色素瘤患者中的 WGS 研究发现，葡萄膜黑色素瘤的可能致病基因为 GNAQ、GNA11、BAP1、EIF1AX 和 SF3B1，并发现了体细胞突变中的其他基因如 TP53BP1、CSMD1、TTC28DLK2 及 KTN1^[26]，但仍需进一步扩大样本量确定这些基因突变是否与葡萄膜黑色素瘤的发生发展具有紧密联系。

2 黑色素瘤的表观遗传学生物标志物

表观遗传学是指在基因表达和功能中不涉及 DNA 核苷酸原始序列改变的潜在遗传学改变，可最终决定基因表达或沉默，因此在细胞分化、生长、发育、老化和免疫反应等生命过程中发挥了关键作用。表观遗传学为环境因素如何决定个体表型差异提供了除遗传学以外的解释，同时也为一些疾病如黑色素瘤除遗传易感性以外的发病机制提供了证据。随着表观遗传学时代的到来，已发现越来越多表观遗传学生物标志物涉及 DNA 甲基化/羟甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA [微小 RNA (micro-RNA, miRNA) 和长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)]。对比靶向治疗的基因生物标志物，表观遗传学治疗具有可控、可逆等优点。

2.1 DNA 甲基化/羟甲基化

在许多真核物种中，DNA 甲基化是相对稳定并可遗传的表观遗传学标志物，其是指甲基添加到腺嘌呤或胞嘧啶中嘧啶环的第 5 个位置，使得胞嘧啶成为甲基胞嘧啶。DNA 高甲基化代表基因表达受到抑制，因此涉及很多生命过程，如细胞分化与增殖。DNA 甲基化由甲基化转移酶如 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 等介导。每一种甲基化转移酶的功能有所差异，如 DNMT1 在细胞复制过程中维持甲基化状态，而 DNMT3a 和 DNMT3b 常常诱导甲基化的初始化过程。相反，DNA 去甲基化是甲基化修饰丢失的过程。DNA 甲基化消除主要涉及两种途径：一是 DNA 被动去甲基化，即在 DNA 复制时，DNA 甲基化模式的维持受到干扰，未保留原有甲基化模式，随着复制的进行，甲基化的 CpG 被“稀释”，导致 DNA 去甲基化；二是 DNA 主动去甲基化，这一过程不依赖于 DNA 复制，而受酶的催化，使 5-甲基化胞嘧啶 (5-methylated cytosine, 5mC) 转化为未甲基化的胞嘧啶。DNA 羟甲基

化介导的主动去甲基化途径主要包括两种：(1) 氧化去甲基化途径：5-羟甲基化胞嘧啶 (5-hydroxymethylated cytosine, 5-hmC) 先被 TET 蛋白催化转变为 5-氟胞嘧啶 (5-formylcytosine, 5fC)，后者继续在 TET 蛋白的催化作用下转变为 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxylcytosine, 5caC)，然后被胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶 (thymine DNA glycosylase, TDG) 脱羧还原为胞嘧啶^[27]；(2) 另外一条途径为 5fC 直接被 TDG 脱羧还原为胞嘧啶。这个过程中，5mC 氧化成 5-hmC 是反应的第一步也是关键一步，这一步由 TET 家族 (TET1、TET2、TET3) 加双氧酶调节^[28]。5-hmC 是活性 DNA 去甲基化最丰富的中间媒介物，在正常发育和癌症发生中发挥正转录调控作用^[29]，其含量直接与人体各个组织器官的分化水平相关^[30]。

在早期研究中，肿瘤发生发展过程中发现全基因组 DNA 低甲基化^[31]。有研究认为 DNA 低甲基化可促进早期肿瘤细胞增殖和后期转移，使其具有生存优势^[32]，且在着丝粒序列和重复序列方面与染色体不稳定相关^[33]。另一方面，在启动子区 CpG 岛的 DNA 甲基化被认为通过沉默抑癌基因促进肿瘤发生。许多高甲基化的抑癌基因，参与生物学过程，包括细胞周期调控、DNA 修复、细胞信号传导、基因转录和细胞凋亡，如已报道的其在黑色素瘤中作为生物标志物的潜在可能性^[34]。

除 CDKN2A, RAR-b2, RASSF1A 和 IDH1^[35] 等已被其他学者广泛研究的基因外，黑色素瘤中还发现其他高甲基化的基因。如在几项癌症研究中发现 LINE-1 是全基因组甲基化的临床试验替代标志物，并在巴西的黑色素瘤患者中发现 LINE-1 高甲基化，可能成为皮肤黑色素瘤的生物标志物^[36]。在不同肿瘤类型中还发现 LINE-1 甲基化状态与癌症风险因素相关^[37]。此外，Claudin11 被认为是潜在的诊断黑色素瘤的表观遗传学生物标志物^[38]，Claudin 基因家族包含 27 个成员，其编码细胞间紧密连接的膜蛋白。肿瘤转移灶的位置与甲基化频率显著相关，表明原发性黑色素瘤的甲基化水平可能有助于判断黑色素瘤转移能力的差异。因此，研究 Claudin11 失活分析功能改变很有意义。此外，MGMT 编码一种修复蛋白，鸟嘌呤残基的 O6 位置去除烷基，其启动子区甲基化状态已被提议作为胶质瘤^[39]、大肠癌^[40]和黑色素瘤^[41]的生物标志物。在黑色素瘤患者的肿瘤和血清中发现 MGMT 基因的表观遗传沉默^[42]，提示其在肿瘤发生发展中的重要作用。MITF 是另一个 DNA 高甲基化基因，一种控

制细胞周期和黑色素生成的转录因子^[43]。在不止一例肿瘤皮损和黑色素瘤患者外周血中发现 MITF 启动子区高甲基化。有趣的是，不同黑色素瘤标本和肿瘤^[44]中 MITF 表达存在变化，其高表达代表高度增殖和分化，而相对低表达可能表明侵袭能力增强^[45]，提示 MITF 基因启动子高甲基化水平可能与疾病严重程度有关（表 2）。当然，仍需更多研究进一步明确高甲基化基因在黑色素瘤中的作用，深入探索利用这些甲基化生物标志物和治疗靶点来治疗黑色素瘤。

事实上，运用定量甲基化特异性 PCR 检测黑色素瘤患者外周血中肿瘤相关基因的甲基化水平已在临床应用。例如，与对生物化学疗法不敏感的肿瘤相比，循环中较少甲基化的 RASSF1A 与生物化学疗法的敏感性相关，RASSF1A 的甲基化水平与总体生存率相关^[68]；黑色素瘤基因组整体表现为低甲基化，更重要的是，5-hmC 缺失可作为生物标志物来区分黑色素瘤

与生理性黑色素细胞及良性增殖^[69]，且 5-hmC 缺失与黑色素瘤预后差具有很强相关性，预示 5-hmC 水平可作为潜在的预测预后的生物标志物，随后几年中的其他研究也进一步证实了该发现^[70-74]；虽然在黑色素瘤中发现 IDH2 和 TET 蛋白水平降低，然而这种改变的上游和下游机制尚不清楚，TET 蛋白已用于癌症临床前研究^[75]，如沉默 TET2 和 TET3 在上皮细胞向间质细胞转变过程和黑色素瘤转移中发挥重要作用^[76]。

2.2 组蛋白修饰

组蛋白修饰是调控基因表达的另一重要表观遗传机制。DNA 被包装成细胞核作为染色质，核小体是染色质的基本亚单位。每个核小体由 146 个碱基对的 DNA 形成两圈缠绕在组蛋白核心及两对 H2A、H2B、H3 和 H4 上。组蛋白修饰表现为从核小体凸出的小蛋白尾巴被修饰，包括甲基化、乙酰化和泛素化。每个修饰均有其独特的功能，例如组蛋白 H3K9 乙酰化增

表 2 黑色素瘤中高甲基化的基因

基因	与黑色素瘤的相关性	文献
LINE-1	与转移相关	[36]
CLDN11	导致肿瘤相关基因失活	[38]
TERT, MGMT, KIT, TNF, MITF	与临床特征相关	[42-43]
RASSF6, RASSF10	转移性黑色素瘤中可看到，抑制肿瘤细胞的侵袭	[46-47]
GPX3	与黑色素瘤的发生相关	[48]
MMP-9	肿瘤中过表达	[49]
SYNPO2	肿瘤中表达降低	[50]
CDKN1C	通过抑制细胞周期蛋白 CDK 阻止细胞周期的 G1 期	[51-52]
LXN	抑制细胞增生	[51]
ASC/PYCARD/PCYCARD	通过减少 IKK α/β 磷酸化抑制肿瘤产生	[53]
SOCS1	降低细胞因子相关反应，阻止细胞周期 G1/S 和 G1/M 期，与 CDH1 相关	[54]
Caspase 8	与镉刺激细胞生长相关并抑制死亡通路	[55]
CDH1	肿瘤分期越高，预后越差，表达越低	[56-57]
MGMT	预示肿瘤细胞抵抗	[56]
RAR-b2	肿瘤抑制基因	[56]
CIITA-PIV	作用于 IFN- γ 通路	[57]
SOCS2	减弱细胞因子相关反应	[57]
TNFRSF10C (DeR1/2)	促使细胞保护性受体产生，免受 TRAIL 介导的细胞凋亡	[57]
TPM1	调控 actin 介导的细胞移动	[57]
TIMP3	主要负向调控血管生成	[57-58]
CDKN2A	抑制 CDK4 和 CDK6，活化 pR8，阻止细胞周期 G1 期	[59]
DPPIV	肿瘤患者血清中降低	[60-61]
FRZB	转移抑制因子，阻止 Wnt5a 信号通路	[62-63]
SOCS3	抑制白细胞介素-17/Stat3 通路，在老鼠模型中抑制肿瘤生长	[64-65]
THBS1	介导细胞与细胞以及细胞与基质相互作用，与血小板聚集和血管生成密切相关	[66]
TM	与转化、进展相关，表达下降	[67]

强转录，而甲基化则抑制该过程。在这些修饰中，乙酰化和脱乙酰作用得到了深入研究，分别由组蛋白乙酰化转移酶（histone acetyltransferase, HAT）和组蛋白脱乙酰化酶（histone deacetylase, HDAC）催化。HAT 将乙酰基转移至赖氨酸，导致基因活化；HDAC 去除乙酰基，导致基因沉默。与乙酰化不同，组蛋白甲基化发生在精氨酸和赖氨酸残基并受组蛋白甲基转移酶（histone methyltransferase, HMT）和其他酶的调节，且甲基化的影响受修饰后残基位置和甲基基团数目的调节，如 H3K4me3 增加基因表达，而 H3K9me3 和 H3K27me3 则导致基因表达下降。

组蛋白的改变与黑色素瘤免疫逃逸具有一定关系。研究发现组蛋白修饰蛋白和组蛋白修饰酶的异常表达与黑色素瘤的异常增殖相关^[77]。例如，组蛋白低乙酰化已被证明可减少黑色素瘤 PI3K/Akt 信号通路肿瘤抑制基因的表达^[78]，异常的组蛋白乙酰化调控肿瘤细胞和肿瘤浸润免疫细胞中凋亡途径 TRAIL/Apo2L^[79] 和 Bcl-2 家族成员（Bim、Bax 和 Bak）^[80] 的表达，均提示组蛋白修饰可作为生物标志物预测免疫疗法的反应或作为 HDAC 抑制剂的治疗靶点。

除了总体组蛋白修饰状态外，组蛋白修饰酶也与黑色素瘤的发展相关，并有潜力成为生物标志物和治疗靶点。例如，EZH2 是多梳蛋白抑制复合体上的 H3K27 甲基转移酶催化亚单位。EZH2 的表达与黑色素瘤中高增殖率和高侵袭性的肿瘤亚型相关，其通过催化 H3K27 的转录从而抑制甲基化^[81]。此外，48% 的 EZH2 基因高表达患者具有 5 年总生存期，而 71% 的 EZH2 基因低表达患者具有 5 年总生存期^[81]，说明 EZH2 基因可预测黑色素瘤患者的生存期。此外，通过 CDKN1A 基因乙酰化和去乙酰化，EZH2 耗尽与黑色素瘤细胞促凋亡作用相关^[82]。基于黑色素瘤高发和易转移的特性，EZH2 抑制剂可作为其治疗的评估方法^[83]。最近一项研究中一种新的定量质谱分析确定了伴随 EZH2 高表达，出现组蛋白翻译后修饰 H3K27me3。人类晚期黑色素瘤组织中已发现 EZH2 介导的 RUNX3 基因和肿瘤抑制基因 E-cadherin 的沉默^[84]。另一个例子是 SETDB1，在黑色素瘤斑马鱼模型中发现甲基化组蛋白 H3 赖氨酸 9，可加速黑色素瘤的形成^[85]，半数以上的黑色素瘤患者样本中检测出 SETDB1 的过表达^[86] 及其表达与抑制肿瘤抑制基因 p16 的表达相关^[87]。

2.3 微小 RNA

miRNA 是 21~25 个碱基对的非编码 RNA，其通

过结合靶基因信使 RNA 3' 未翻译区，使信使 RNA 裂解，抑制翻译或使翻译受阻。研究表明黑色素瘤不同类型细胞和组织中 miRNA 表达异常，因而可能辅助诊断、判断预后，甚至作为潜在的治疗靶点。与其他标志物不同，细胞死亡裂解后会释放 miRNA 进入循环，肿瘤细胞也可通过外泌体释放进入循环。

越来越多的证据表明，miRNA 通过调节重要的通路或基因发挥癌基因或抑癌基因作用，这种通路或基因涉及细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭，药物抵抗和血管生成，如 miRNA-29c 和 miRNA-324-3p 在转移性黑色素瘤中不表达，但具有预测黑色素瘤转移的作用。事实上，已发现许多 miRNA 在黑色素瘤的病理生理过程中发挥重要作用，如 miRNA-15b、miRNA-99a、miRNA-137、miRNA-148、miRNA-149、miRNA-193b、miRNA-211、miRNA-221 和 miRNA-506-514 参与细胞增殖和生长，miRNA-18b、miRNA-26a、miRNA-34a、miRNA-34b/c、miRNA-137、miRNA-203 和 miRNA-205 参与细胞凋亡，miRNA-214、miRNA30b/30d、miRNA-182、let-7a、miRNA-126、miRNA-145、miRNA-137、miRNA-18b、miRNA-34a/c、miRNA-211、miRNA-9 和 miRNA-31 参与细胞侵袭和转移，miRNA-1908、miRNA-199a-5p 和 miRNA-199a-3 参与血管生成，miRNA-200c 则参与药物抗性。

黑色素瘤中研究较多并具有诊断和治疗潜能的 miRNA 包括 miRNA-21、miRNA-125b、miRNA-155、miRNA-205、miRNA-211 等。miRNA-21 在黑色素瘤中表达增加，通过靶向调节 TIMP3、PDCD4、BCL-2 和 PTEN，在黑色素瘤的发生发展中发挥重要作用^[88-89]；miRNA-21 升高预示患者 5 年非进展生存期和总生存期下降，故 miRNA-21 可帮助判断预后^[88]。miRNA-125b 在黑色素瘤中表达下降，通过靶向 c-jun、MLK3 和 MKK7 抑制肿瘤细胞增殖、周期、凋亡和迁移发挥抑癌基因作用^[89]，此外还参与了威罗非尼耐药^[90]。miRNA-155 在黑色素瘤组织中表达增加，靶向调节 SK1，促进凋亡抑制增殖^[91]。而 miR-205 和 miR-211 在黑色素瘤组织中表达下降，分别靶向调节 E-cadherin^[92] 和 NFAT3^[93] 促进肿瘤侵袭。这些 miRNA 可能作为预测黑色素瘤分期及进展的生物标志物。

2.4 长链非编码 RNA

lncRNA 是长度大于 200 个碱基对的非编码 RNA。目前，仅有少数 lncRNA 进行了功能鉴定。根据其编码蛋白基因组的接近程度，lncRNA 分为正义、反义、内含子、基因间和双向 5 大类。与 miRNA 不同，

lncRNA可正向或负向调节基因表达，并在lncRNA与RNA、lncRNA与蛋白、lncRNA与染色质间形成许多功能。lncRNA是目前的研究热点，因为大量研究证据表明通过改变lncRNA的原始结构、继发结构和表达水平，将导致从神经退化到癌症的一系列疾病。虽然目前尚无直接证据表明lncRNA是黑色素瘤的生物标志物，但越来越多的研究表明某些lncRNA的异常表达与黑色素瘤患者的生存、侵袭和转移息息相关^[94]。例如BANCR与黑色素瘤的生存期相关，其在原发和转移黑色素瘤患者中高表达，并随肿瘤分级增加而表达增加，表明在疾病发展过程中发挥肿瘤基因功能^[95-96]，更重要的是，BANCR高表达与低生存期相关，表明BANCR是预后差的生物标志物^[97]；SPRY4-IT1是移植MAPK通路中的肿瘤抑制因子，其在局部黑色素瘤，远处转移灶淋巴结转移的黑色素瘤中表达增加，预示了其在黑色素瘤分期和早期诊断的潜在功能^[98]；此外，HOTAIR^[99]、CASC15^[100]、MALAT-1和UCA1^[101]在黑色素瘤中高表达，可能预示着黑色素瘤的侵袭性和转移性。但lncRNA是否可成为黑色素瘤诊断和预后的生物标志物，尚需进一步研究证实。

3 展望

NGS的普及和表观遗传时代的到来，为探索黑色素瘤生物标志物提供了强有力的工具。随着癌基因组学时代的到来，加之各种先进技术和计算机模型用于大数据分析，联合基因组学、表观遗传组学、蛋白质组学的生物标志物可能辅助黑色素瘤和其他良性肿瘤相鉴别。黑色素瘤容易转移，是致死的重要原因，因此发现器官特异性的生物标志物迫在眉睫。此外，血液中的生物标志物能帮助早期发现黑色素瘤、精准监测疾病进展和预测治疗效果，从而让患者受益。因此，开发新的可用于早期诊断、预测药物敏感性、分析转移可能性和判断预后的标志物，将为黑色素瘤乃至其他恶性肿瘤的治疗和预后提供实验室指导。

参 考 文 献

[1] Alcalá AM, Flaherty KT. BRAF inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: clinical trials and mechanisms of resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 33-39.

[2] McArthur GA, Chapman PB, Robert C, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF (V600E) and BRAF (V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up

of a phase 3, randomised, open-label study [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 323-332.

[3] Queirolo P, Spagnolo F. BRAF plus MEK-targeted drugs: a new standard of treatment for BRAF-mutant advanced melanoma [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36: 35-42.

[4] Desvignes C, Abirached H, Templier C, et al. BRAF inhibitor discontinuation and rechallenge in advanced melanoma patients with a complete initial treatment response [J]. *Melanoma Res*, 2017, 27: 281-287.

[5] Beaver JA, Theoret MR, Mushti S, et al. FDA approval of nivolumab for the first-line treatment of patients with BRAFV600 wild-type unresectable or metastatic melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 3479-3483.

[6] Meerveld-Eggink A, Rozeman EA, Lalezari F, et al. Short-term CTLA-4 blockade directly followed by PD-1 blockade in advanced melanoma patients - a single center experience [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28: 862-867.

[7] Chuk MK, Chang JT, Theoret MR, et al. FDA approval summary: accelerated approval of pembrolizumab for second-line treatment of metastatic melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 5666-5670.

[8] Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma [J]. *Cell*, 2015, 161: 1681-1696.

[9] Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44: 1006-1014.

[10] Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes [J]. *Nature*, 2013, 499: 214-218.

[11] Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, et al. The genomic landscape of cutaneous melanoma [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2016, 29: 266-283.

[12] Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF (V600E) [J]. *Nature*, 2011, 480: 387-390.

[13] Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367: 107-114.

[14] Long GV, Weber JS, Infante JR, et al. Overall survival and durable responses in patients with BRAF V600-mutant metastatic melanoma receiving dabrafenib combined with trametinib [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34: 871-878.

[15] Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 30-39.

[16] Bahadoran P, Allegra M, Le Duff F, et al. Major clinical response to a BRAF inhibitor in a patient with a BRAF L597R-mutated melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31: e324-e326.

[17] Marconcini R, Galli L, Antonuzzo A, et al. Metastatic BRAF K601E-mutated melanoma reaches complete response to MEK

- inhibitor trametinib administered for over 36 months [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2017, 6; 6.
- [18] Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14; 249-256.
- [19] Krauthammer M, Kong Y, Bacchicocchi A, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas [J]. *Nat Genet*, 2015, 47; 996-1002.
- [20] Young RJ, Waldeck K, Martin C, et al. Loss of CDKN2A expression is a frequent event in primary invasive melanoma and correlates with sensitivity to the CDK4/6 inhibitor PD0332991 in melanoma cell lines [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014, 27; 590-600.
- [21] Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, et al. Complete response to high-dose IL-2 and enhanced IFN γ + Th17; TREG ratio in a melanoma patient [J]. *Melanoma Res*, 2016, 26; 535-539.
- [22] Timar J, Vizkeleti L, Doma V, et al. Genetic progression of malignant melanoma [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35; 93-107.
- [23] Li H, Wang Y, Liu H, et al. Genetic variants in the integrin signaling pathway genes predict cutaneous melanoma survival [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140; 1270-1279.
- [24] Liang WS, Hendricks W, Kiefer J, et al. Integrated genomic analyses reveal frequent TERT aberrations in acral melanoma [J]. *Genome Res*, 2017, 27; 524-532.
- [25] Royer-Bertrand B, Torsello M, Rimoldi D, et al. Comprehensive genetic landscape of uveal melanoma by whole-genome sequencing [J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 99; 1190-1198.
- [26] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation [J]. *Nature*, 2013, 502; 472-479.
- [27] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET [J]. *Science*, 2009, 324; 930-935.
- [28] Cortellino S, Xu J, Sannai M, et al. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair [J]. *Cell*, 2011, 146; 67-79.
- [29] Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers [J]. *Oncotarget*, 2011, 2; 627-637.
- [30] Kim YI, Giuliano A, Hatch KD, et al. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma [J]. *Cancer*, 1994, 74; 893-899.
- [31] Lee JJ, Murphy GF, Lian CG. Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines [J]. *Lab Invest*, 2014, 94; 822-838.
- [32] Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65; 8635-8639.
- [33] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96; 8681-8686.
- [34] Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, et al. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future [J]. *Epigenetics*, 2015, 10; 103-121.
- [35] De Araujo ES, Kashiwabara AY, Achatz MI, et al. LINE-1 hypermethylation in peripheral blood of cutaneous melanoma patients is associated with metastasis [J]. *Melanoma Res*, 2015, 25; 173-177.
- [36] Di JZ, Han XD, Gu WY, et al. Association of hypomethylation of LINE-1 repetitive element in blood leukocyte DNA with an increased risk of hepatocellular carcinoma [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, 12; 805-811.
- [37] Walesch SK, Richter AM, Helmbold P, et al. Claudin11 promoter hypermethylation is frequent in malignant melanoma of the skin, but uncommon in nevus Cell [J]. *Nevi Cancers*, 2015, 7; 1233-1243.
- [38] Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, et al. The role of MGMT testing in clinical practice: a report of the association for molecular pathology [J]. *J Mol Diagn*, 2013, 15; 539-555.
- [39] Inno A, Fanetti G, Di Bartolomeo M, et al. Role of MGMT as biomarker in colorectal cancer [J]. *World J Clin Cases*, 2014, 2; 835-839.
- [40] de Araujo ES, Pramio DT, Kashiwabara AY, et al. DNA methylation levels of melanoma risk genes are associated with clinical characteristics of melanoma patients [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015; 376423.
- [41] Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, et al. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23; 27-40.
- [42] Ennen M, Keime C, Kobi D, et al. Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity [J]. *Oncogene*, 2015, 34; 3251-3263.
- [43] Hartman ML, Czyn M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72; 1249-1260.
- [44] Mezzanotte JJ, Hill V, Schmidt ML, et al. RASSF6 exhibits promoter hypermethylation in metastatic melanoma and inhibits invasion in melanoma cells [J]. *Epigenetics*, 2014, 9; 1496-1503.
- [45] Helmbold P, Richter AM, Walesch S, et al. RASSF10 promoter hypermethylation is frequent in malignant melanoma of the skin but uncommon in nevus cell nevi [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132; 687-694.
- [46] Chen H, Zheng Z, Kim KY, et al. Hypermethylation and

- downregulation of glutathione peroxidase 3 are related to pathogenesis of melanoma [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36: 2737-2744.
- [47] Falzone L, Salemi R, Travali S, et al. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8: 933-944.
- [48] Gao L, van den Hurk K, Nsengimana J, et al. Prognostic significance of promoter hypermethylation and diminished gene expression of SYNPO2 in melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135: 2328-2331.
- [49] Muthusamy V, Duraisamy S, Bradbury CM, et al. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 11187-11193.
- [50] Curry JL, Richards HW, Huttenbach YT, et al. Different expression patterns of p27 and p57 proteins in benign and malignant melanocytic neoplasms and in cultured human melanocytes [J]. *J Cutan Pathol*, 2009, 36: 197-205.
- [51] Liu W, Luo Y, Dunn JH, et al. Dual role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in tumorigenesis of human melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133: 518-527.
- [52] Koga Y, Pelizzola M, Cheng E, et al. Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma [J]. *Genome Res*, 2009, 19: 1462-1470.
- [53] Venza M, Visalli M, Biondo C, et al. Epigenetic marks responsible for cadmium-induced melanoma cell overgrowth [J]. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29: 242-250.
- [54] Furuta J, Umabayashi Y, Miyamoto K, et al. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95: 962-968.
- [55] Liu S, Ren S, Howell P, et al. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21: 545-558.
- [56] Das AM, Seynhaeve AL, Rens JA, et al. Differential TIMP3 expression affects tumor progression and angiogenesis in melanomas through regulation of directionally persistent endothelial cell migration [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17: 163-177.
- [57] Schinke C, Mo Y, Yu Y, et al. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2010, 20: 253-265.
- [58] McGuinness C, Wesley UV. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), a candidate tumor suppressor gene in melanomas is silenced by promoter methylation [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2435-2443.
- [59] Matic IZ, Ethordic M, Grozdanic N, et al. Serum activity of DPPIV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma and in people with vitiligo [J]. *BMC Immunol*, 2012, 13: 48.
- [60] Conway K, Edmiston SN, Khondker ZS, et al. DNA-methylation profiling distinguishes malignant melanomas from benign nevi [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24: 352-360.
- [61] Ekstrom EJ, Sherwood V, Andersson T. Methylation and loss of Secreted Frizzled-Related Protein 3 enhances melanoma cell migration and invasion [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18674.
- [62] Tokita T, Maesawa C, Kimura T, et al. Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas [J]. *Int J Oncol*, 2007, 30: 689-694.
- [63] Fang S, Liu B, Sun Q, et al. Platelet factor 4 inhibits IL-17/Stat3 pathway via upregulation of SOCS3 expression in melanoma [J]. *Inflammation*, 2014, 37: 1744-1750.
- [64] Bonazzi VF, Nancarrow DJ, Stark MS, et al. Cross-platform array screening identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e26121.
- [65] Furuta J, Kaneda A, Umabayashi Y, et al. Silencing of the thrombomodulin gene in human malignant melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2005, 15: 15-20.
- [66] Mori T, O'Day SJ, Umetani N, et al. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 9351-9358.
- [67] Lian CG, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma [J]. *Cell*, 2012, 150: 1135-1146.
- [68] 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.
- [69] Lee JJ, Cook M, Mihm MC, et al. Loss of the epigenetic mark, 5-Hydroxymethylcytosine, correlates with small cell/nevoid subpopulations and assists in microstaging of human melanoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 37995-38004.
- [70] Lee JJ, Granter SR, Laga AC, et al. 5-Hydroxymethylcytosine expression in metastatic melanoma versus nodal nevus in sentinel lymph node biopsies [J]. *Mod Pathol*, 2015, 28: 218-229.
- [71] Pavlova O, Fraitag S, Hohl D. 5-hydroxymethylcytosine expression in proliferative nodules arising within congenital nevi allows differentiation from malignant melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2016, 136: 2453-2461.
- [72] Saldanha G, Joshi K, Lawes K, et al. 5-Hydroxymethylcytosine is an independent predictor of survival in malignant melanoma [J]. *Mod Pathol*, 2017, 30: 60-68.
- [73] Thienpont B, Galle E, Lambrechts D. TET enzymes as oxygen-dependent tumor suppressors: exciting new avenues for cancer management [J]. *Epigenomics*, 2016, 8: 1445-1448.
- [74] Gong F, Guo Y, Niu Y, et al. Epigenetic silencing of TET2 and TET3 induces an EMT-like process in melanoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 315-328.
- [75] Sigalotti L, Covre A, Fratta E, et al. Epigenetics of human

- cutaneous melanoma; setting the stage for new therapeutic strategies [J]. *J Transl Med*, 2010, 8: 56.
- [76] Ye Y, Jin L, Wilmott JS, et al. PI (4, 5) P2 5-phosphatase A regulates PI3K/Akt signalling and has a tumour suppressive role in human melanoma [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1508.
- [77] Jazirehi AR, 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.
- [78] Zhang XD, Gillespie SK, Borrow JM, et al. The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 425-435.
- [79] Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 268-273.
- [80] Fan T, Jiang S, Chung N, et al. EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9: 418-429.
- [81] Mahmoud F, Shields B, Makhoul I, et al. Role of EZH2 histone methyltransferase in melanoma progression and metastasis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17: 579-591.
- [82] Sengupta D, Byrum SD, Avaritt NL, et al. Quantitative histone mass spectrometry identifies elevated histone H3 lysine 27 (Lys27) trimethylation in melanoma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15: 765-775.
- [83] Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, et al. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset [J]. *Nature*, 2011, 471: 513-517.
- [84] Miura S, Maesawa C, Shibasaki M, et al. Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human melanomas [J]. *Am J Dermatopathol*, 2014, 36: 211-216.
- [85] Kostaki M, Manona AD, Stavraka I, et al. High-frequency p16 (INK) (4A) promoter methylation is associated with histone methyltransferase SETDB1 expression in sporadic cutaneous melanoma [J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23: 332-338.
- [86] Jiang L, Lv X, Li J, et al. The status of microRNA-21 expression and its clinical significance in human cutaneous malignant melanoma [J]. *Acta Histochem*, 2012, 114: 582-588.
- [87] Zhang J, Lu L, Xiong Y, et al. MLK3 promotes melanoma proliferation and invasion and is a target of microRNA-125b [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2014, 39: 376-384.
- [88] Vergani E, Di Guardo L, Dugo M, et al. Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 4428-4441.
- [89] Levati L, Pagani E, Romani S, et al. MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24: 538-550.
- [90] Liu S, Tetzlaff MT, Liu A, et al. Loss of microRNA-205 expression is associated with melanoma progression [J]. *Lab Invest*, 2012, 92: 1084-1096.
- [91] Levy C, Khaled M, Iliopoulos D, et al. Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma [J]. *Mol Cell*, 2010, 40: 841-849.
- [92] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 145-166.
- [93] Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 354-361.
- [94] Li Z, Chao TC, Chang KY, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1002-1007.
- [95] Guo L, Yao L, and Jiang Y. A novel integrative approach to identify lncRNAs associated with the survival of melanoma patients [J]. *Gene*, 2016, 585: 216-220.
- [96] Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, et al. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCER to regulate melanoma cell migration [J]. *Genome Res*, 2012, 22: 1006-1014.
- [97] Li R, Zhang L, Jia L, et al. Long non-coding RNA BANCER promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e100893.
- [98] Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, et al. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 3852-3862.
- [99] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. *Nature*, 2010, 464: 1071-1076.
- [100] Lessard L, Liu M, Marzese DM, et al. The CASC15 long intergenic noncoding RNA locus is involved in melanoma progression and phenotype switching [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135: 2464-2474.
- [101] Tian Y, Zhang X, Hao Y, et al. Potential roles of abnormally expressed long noncoding RNA UCA1 and Malat-1 in metastasis of melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2014, 24: 335-341.

(收稿日期: 2017-07-04)