P.O.Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@public.bta.net.cn www.wjgnet.com

World Chin J Digestol, 2003 January;11(1):65-71
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

• 文献综述 REVIEW •

CpG 岛甲基化与胃肠道肿瘤

周永宁,徐采朴,房殿春

周永宁,徐采朴,房殿春,中国人民解放军第三军医大学西南医院消化科全军消化专科中心 重庆市 400038
项目负责人:徐采朴,400038,重庆市沙坪坝区,中国人民解放军第三军医大学西南医院消化科. yongningzhou@sina.com.cn
收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-27

摘要

基因和表遗传性改变是恶性肿瘤发生的主要机制. 表遗传性修饰-DNA甲基化在胃肠道恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用. 细胞周期、DNA修复、血管生成和凋亡等都涉及到相关基因的CpG岛甲基化. CpG岛甲基化导致基因失活的分子机制包括DNA甲基转移酶(DNMTs)、CpG甲基化结合蛋白(MBDs)以及组蛋白去乙酰化酶(HDACs)等相关蛋白.MBD可直接抑制转录，并与HDAC形成复合体. DNMT催化甲基化生成，并与HDAC协同作用导致基因转录失活.与衰老相关的甲基化可影响众多基因CpG岛，是老年人恶性肿瘤发生的主要危险因素;甲基化的另一种方式CpG岛甲基化表型(CIMP)具有肿瘤独特性，P16、hMLH1、E-cadherin等重要肿瘤抑制基因失活与此有关. DNA甲基化的相关深入研究将对揭示包括消化道等恶性肿瘤的发生机制以及未来临床诊断和治疗展示了广阔前景.

周永宁,徐采朴,房殿春.CpG岛甲基化与胃肠道肿瘤.世界华人消化杂志 2003;11(1):65-71

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/65.htm

0 引言

恶性肿瘤的生物学特征表现为浸润性生长和转移,其发生机制在于细胞内部基因结构和功能发生了异常改变. 现代肿瘤理论认为恶性肿瘤是由遗传基因缺陷以及基因表遗传性(epigenetic)改变而引起. 基因缺陷如突变、缺失会导致编码区结构和功能破坏. 表遗传性改变尽管不存在DNA序列改变，但通过DNA自身化学修饰方式从转录水平可影响基因的表达，调控DNA功能. 表遗传性修饰主要包含两个层面：DNA甲基化和组蛋白去乙酰化[1,2]. 最近[3-6]发现肿瘤抑制基因失活与其启动子区域CpG岛高甲基化状态直接关联. 更为重要的是DNA甲基化与组蛋白去乙酰化在导致基因转录抑制方面具有协同作用[7-9]. 因此CpG岛甲基化在肿瘤发生、发展过程中可能发挥着关键作用.

1 转录、CpG岛与DNA甲基化

真核细胞染色质分为常染色质和异染色质，前者具有转录能力. 染色质的基本单位是一系列紧密排列的核小体，每个核小体由146 bp的DNA片段围绕8聚体组蛋白构成. 正常生理条件下基因组部分基因适当转录表达，部分则保持“沉默”(silencing),其调控机制与核小体组蛋白及DNA的化学修饰关联.这种化学修饰称为表遗传性或后生调控模式. 组蛋白乙酰化状态是所有真核生物基因转录的调控方式[10]，与此相关的酶分别是组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase，HATs)和组蛋白去乙酰基酶（histone deacetylase，HDACs). DNA甲基化是哺乳动物遗传外基因转录的重要调控方式[11]，在基因转录抑制方面可能起关键作用. 曾认为DNA甲基化是脊椎动物DNA惟一的自然化学修饰方式,研究[12-14]证明果蝇亦具有与脊椎动物同源的DNA甲基化模式. 迄今已证实[15-17]有三种与DNA甲基化相关的酶,并已被分别克隆,他们是DNMT1(DNA methyltransferase DNA,甲基转移酶1)、DNMT3a和DNMT3b.生物学甲基化方式可分为新生甲基化(de novo methylation)和持续甲基化(maintenance methylation)，据认为[17-19]，DNMT3a和DNMT3b可以催化新生甲基化形成，DNMT1主要在DNA复制时维持其持续甲基化状态. DNMT2也已被克隆，但体外胚胎干细胞实验证明DNMT 2不具有甲基转移酶活性[17,20,21].

DNA甲基化是指由DNMTs介导,在胞嘧啶(C)的第五位碳原子上加上一甲基基团,使之变成5-甲基胞嘧啶(5-mC)的化学修饰过程.这种修饰反应主要发生在CpG二核苷酸的胞嘧啶. 哺乳动物基因组中的大部分(70 %)CpG二核苷酸存在于重复子(repetitive elements)中，正常情况下这些CpG二核苷酸甲基化是作为一种宿主基因的保护机制[19-21]，因为他会抑制重复子转录以及重复子同源性重组. CpG二核苷酸聚集区域称为CpG岛(CpG island). CpG岛长约0.5-2.0 Kb,呈不连续分布. 理论上讲，CpG二核苷酸含量应有1/16，但由于生物学上的C-G抑制现象，实际上哺乳动物细胞基因组中C-G含量仅为1 %，但C-G抑制现象并不适用于CpG岛. 整个基因组中，CpG岛通常位于基因的启动子区域(promoter region) [22]，故亦称5’-CpG岛. 与其他CpG二核苷酸不同，正常情况下，CpG岛是以非甲基化形式存在的. CpG岛如此丰富的胞嘧啶，何以未被甲基化，原因尚不清楚. 对腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Apart)的研究[23,24]发现,可能存在的“反作用因子”(trans-acting factor)与DNA的Sp1位点结合，保护Apart基因CpG岛免遭甲基化. CpG岛非甲基化状态的生物学意义非常重要，启动子非甲基化状态是相关基因转录或待转录的先决条件[11]，并通过有丝分裂得以继承和维持,

同时也是恶性肿瘤发生的关键环节. 与大多数CpG岛非甲基化状态不同,某些生理性的CpG岛甲基化亦具有重要的生物学意义:(1)哺乳动物胚胎发育时期，DNA甲基化又再更新，以此调节相关基因表达[17];(2)X-染色体失活；(3)印迹基因(imprinted gene)转录抑制；(4)防御外来入侵的寄生DNA(parasitic DNA)[19];(5)维护染色体的完整性[25];(6)控制组织特异性基因表达[26];(7)调控DNA重组的某些环节[27].

正常DNA甲基化模式改变，包括DNA过低甲基化和CpG岛高甲基化，他们在肿瘤的发生中都具有重要的意义[25,28]. 以往对CpG岛甲基化作用的认识仅限于在细胞有丝分裂时其能抑制基因重组和/或有助于染色体分离[29]. 相反对DNA过低甲基化与肿瘤的研究较多. 基因组DNA过低甲基化可促进杂和性丢失(LOH)[30]，导致基因组有害基因转录表达，例如激活原癌基因，使癌基因或相关因子得以表达[31]. 胚胎干细胞[29,32]在缺乏DNMT1时基因组过低甲基化，宿主保护机制削弱，有利于基因组重复子同源性重组，从而导致整个基因组不稳定性增加. 免疫缺陷性着丝粒不稳定性面部异常综合征(immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies, ICF)与DMNT3b基因突变[33,34]造成基因组不稳有关. 此外，在细胞染色体中心粒周围存在高度密集甲基化区域，如果失去致密的甲基，可导致基因损伤和突变[35,36].

1980年代发现了结肠肿瘤降钙素基因的5’-CpG岛高甲基化，并由此拓宽了认识肿瘤与CpG岛甲基化研究的广阔视野. 随着研究的不断深入，CpG岛甲基化对肿瘤抑制基因失活的关键作用凸现出来，成为当今肿瘤学研究的新热点. 如果说胚胎发育时期DNA甲基化的调控能有效阻止有害基因的表达，那么肿瘤抑制基因CpG岛非甲基化状态就能保护体细胞避免发生恶性转化.

2 CpG岛甲基化与转录抑制

CpG岛甲基化导致相关基因失活是不争的事实. 最近认为CpG岛甲基化导致基因失活、转录抑制的机制可能有以下几点.

基因启动子区域（包含转录因子结合位点）高甲基化状态，直接阻止基因转录因子与启动子结合[37,38].

高甲基化的CpG岛通过特异的甲基化结合蛋白(methyl-cpg-binding protein，MeCP),与HDAC协同作用，导致基因失活. 目前认为这一间接途径是基因失活的主要机制. MeCP复合体[39,40]包含MeCP1和MeCP2. MeCP2由甲基化CpG岛结合区(methyl-CpG-bindind domain，MBD)和转录抑制区(transcriptional repression domain，TRD)构成[41]. MBDs家族[42,43]包括MBD1、MBD2、MBD3和MBD4. MBD1[39,44]为单一蛋白质，可选择性与甲基化DNA结合而抑制转录. MBD2[45]可能具有去甲基化酶活性.MBD3和/或MBD2以及HDAC与Mi-2/NuRD(nucleosome remoleling histone deacetylase)构成复合体[46,47],Mi-2是ATP酶的SWI2/SNF2超家族成员，通过相关蛋白RbAp48增强去乙酰化酶的活性，从而影响组蛋白-DNA的相互作用，使染色质聚集,基因失活. 最近[48,49]发现HDAC和Sin3A直接相互作用与MeCP2构成复合体，Sin3A(一种基因转录抑制因子)活性得到增强. MBD4[50]与hMLH1关联，参与DNA修复. MBD2和HDAC也是MeCP1复合体的构成部分,MeCP1复合体具有甲基结合活性,至少能与12个对称的甲基化CpG岛结合[45]. HDACs和HATs通过调节组蛋白乙酰化状态[10]，进而调控DNA活性. 组蛋白H_3或H_4的氨基末端经HATs催化而乙酰化；在组蛋白去乙酰基酶HDACs催化下去乙酰化. 乙酰化时，组蛋白与DNA结合能力降低，基因转录因子容易进入启动子区域；反之基因转录因子就不易进入启动子. CpG岛甲基化，通过MeCP可增强HDAC去乙酰化活性，从而导致基因转录抑制. 不难发现MeCP作为“纽带”将DNA甲基化和组蛋白去乙酰化这两种表遗传性化学修饰模式有机地结合起来，较合理的解释了CpG岛甲基化与基因转录抑制之间的因果关系.

DNMTs除具有甲基转移酶活性外，还有抑制基因转录作用. DNMT1的C-端为甲基转移酶催化区，能将S-腺苷甲硫氨酸的甲基基团转移至胞嘧啶[51]. N-端为功能调节区，能将酶靶向于复制位点，并且对半甲基化CpG(hemi-methylated CpGs)二核苷酸有高亲和力，约是非甲基化CpG(unmethylated CpGs)的10-40倍[52]. DNMT1可能通过他的N-端与HDAC相互作用抑制转录,并且这种抑制作用与其本身的催化活性无关. 此外，某些因子可能与N-端构成复合体,使DNMT1的转录抑制和/或酶活性具有调控性和靶向性. Robertson et al [53]发现DNMT1结合pRB(retinoblastoma protein),通过E2F/pRB复合体抑制转录，这种转录抑制似乎也与甲基化无关，因为在启动子未发现甲基化. Rountree et al [54]证实了一种被称为DNMT1相关蛋白（DNMT1 associated protein 1，DNMP1）的因子与DNMT1的N-端结合，再与TSG101（Tumor Susceptibility Gene 101）结合，后者是一种肿瘤抑制基因，具有强大的转录抑制作用. 有关DNMT1/DNMP1相互作用的机制及其功能尚需深入研究. 有人[54,55]认为，DNMT3a和DNMT3b亦具有转录抑制功能，且与HDAC活性有关. 这种转录抑制及其与HDAC的相关性主要由N-端类似于ATRX的区域介导.

3 CpG岛甲基化与肿瘤发生

根据经典肿瘤发生的“二次打击理论”(two-hit hypothesis)，肿瘤抑制基因失活可因基因突变或缺失引起. 但某些恶性肿瘤其DNA序列完整，并未有突变、缺失，“二次打击理论”无法解释肿瘤抑制基

因何以失活. 错配修复系统(MMR)突变导致微卫星不稳(MSI)频繁出现在遗传性非息肉结肠癌(HNPCC)，MMR突变主要涉及hMLH1和hMSH2基因. 但发现[56]10-15 %的散发性结肠癌尽管无 MMR 突变，但亦表现 MSI. 这就表明 MMR 相关基因失活存在另外一种机制或途径. 基于下列事实：散发性结肠癌特别是 MSI$^+$结肠癌出现大量 hMLH1 基因 CpG 岛甲基化；p16-^{INK4a} 失活的惟一机制[57]在于CpG岛甲基化;某些致癌剂影响DNA甲基化方式[58];故普遍认为DNA甲基化是肿瘤发生的第三种机制,称之为“启动子高甲基化”(promoter hypermethylation)[59]. Costello et al [60] 证实，目前已发现的肿瘤细胞基因组中有 45 000 个 CpG 岛，各类癌细胞有近 600 个 CpG 岛异常甲基化. 重要的是，CpG 岛甲基化异常不是随机事件，而是具有基因特异性和肿瘤特异性.

DNA 甲基化异常在肿瘤形成机制中的确切作用尚不清楚，然而众多证据表明肿瘤抑制基因 CpG 岛甲基化、导致基因失活和转录抑制是肿瘤发生的重要机制之一. 肿瘤细胞 DNA 总体甲基化水平低于正常细胞，但某些特定基因（如肿瘤抑制基因）CpG岛却处于高甲基化状态，可能的机制与以下因素有关.

3.1 CpG 岛保护因子缺乏　对胚胎细胞 Apart 基因的研究中发现[24],Apart 基因 CpG 岛未被甲基化可能与“反作用因子”有关. 故推测，可能存在如“反作用因子”的保护因素使正常细胞 DNA 的 CpG 岛非甲基化. 肿瘤细胞由于某种原因缺乏相应的保护因子,CpG 岛被甲基化. 这种推测也得到另一项实验支持[61]:在E-cadherin基因启动子甲基化的癌细胞株中，导入外源性非甲基化启动子，其 E-cadherin 的表达明显小于启动子非甲基化的癌细胞株，表明 E-cadherin 的完全表达需要 CpG 岛保护因子.

3.2 DNMT 高表达　关于 DNMT 高表达与 CpG 岛甲基化之间的关系，目前尚有争议. Belinsky et al [4,62]认为，在恶性肿瘤细胞中 DNMT1 的表达上调. 但也有报告[63]指出 CpG 岛甲基化与 DNMT1 水平无关. 在人成纤维细胞，持续DNMT1表达可导致众多基因CpG岛呈时间依赖的高甲基化[64]. Fos 过度表达可使 DNMT1 表达上调，在 Fos 导致的细胞转化中具有某种作用[65]，如 Min 小鼠(结肠息肉易感小鼠)在 DNMT1 杂和性背景下极少发生息肉病变[66]. 研究发现癌细胞株 DNMT1 高表达，并可与 p21^{-WAF1} 竞争性结合 PCNA，造成 p21^{-WAF1} 表达上调，进而影响细胞周期依赖激酶（CDK）活性，使 Rb 蛋白磷酸化受到影响,结果又通过正反馈调节 p21^{-WAF1} 的表达，最终导致细胞恶性生长[67，68]. 大肠癌细胞株 HDT116 在 Dnmt1 基因缺失时，基因组甲基化水平仅少量减低(20%)[69]，但 CpG 岛仍然高甲基化提示可能其他甲基化转移酶维持着这种状态. 有迹象表明 DNMT3a 和 DNMT3b 在癌细胞中也少量表达，由此推测[70]这三种甲基化转移酶之间的平衡与协调可能具有重要意义. 有学者[71,72]进一步指出 甲基化模式的维持是由甲基化和去甲基化与组蛋白乙酰化状态之间的动态平衡所决定.

3.3 DNMT 复合体调控障碍　DNMT 调控障碍或靶向错误可能归咎于 DNMT 复合体一种或多种因子的缺乏，如 pRB、DMNP1 和 TSG101 等. 几乎所有恶性肿瘤的 Rb 通路（调控细胞周期）都受到破坏，所以有理由相信癌细胞CpG岛甲基化与DNMT1/pRB相互作用障碍有关联[55]. 此外，Dmnp1 基因的甲基化修饰位点(methylation modifier locus 1,MEMO1) [73]位于 1 号染色体的短臂,而许多恶性肿瘤频繁发生的LOH就位于这个区域. MEMO1 位点的 LOH 与成神经细胞瘤细胞株的异常甲基化有关[73]. 目前尚不知DMAP1是否就是MEMO1的位点；恶性肿瘤细胞异常甲基化是否与 LOH 有关联.

3.4 复制周期时间错误　细胞分裂增生周期是基因组复制并且表遗传性得以继承的过程. 简言之，细胞复制时染色体要将遗传信息正确传代,包括基因组甲基化方式、核小体的装配和定位、组蛋白修饰状态的重建以及其他保证正常转录的相关因子. 为此，细胞在空间和时间调控基因组的复制以保证染色体正确遗传[74]. 已证实[75]增生细胞核抗原(PCNA)对异染色质遗传具有关键作用,推测[75,76] PCNA可能给其他相关蛋白结合提供了一个平台,并且伴随复制再建适宜的表遗传性状态. DNMT1 通过与 PCNA 直接作用而进入细胞复制机制[76,77],并维持子代细胞 DNA 适宜的甲基化方式. 有证据表明 DNMT1 与相关蛋白在 S 期形成复合体. Rountree et al [54]证实在整个 S 期，DNMP1 与 DNMT1 在复制位点形成复合体. 发现[78]在 S 期末期,HDAC2 又与 DNMT1/DMAP1 构成复合体，这一点非常重要，因为此时正处于转录“休眠”的异染色质复制阶段 ，因而也可解释 DNA 复制后，新合成的核小体去乙酰化的机制. 最近[79]研究发现 DNMT1 在复制启动阶段发挥重要作用，当细胞开始进入 S 期时，pRB 和 E2F 定位于复制位点，也许 pRB 和 DNMT1 在这个时期相互作用对于 DNA 复制启动的时机恰到好处. 已发现[79]“永生”细胞在 S 期早期并不存在 pRB-SWI/SNF 复制位点，很可能癌细胞有同样缺陷.

如上所述,基因组复制在 S 期具有时空性. DNMT1 及其相关复合体在 S 期不同阶段的调控作用是 DNA 复制正常的重要因素之一，也是恶性肿瘤发生的重要环节. 由于复制时间错误，某些基因 CpG 岛不被甲基化而失去转录抑制(癌基因);而另一些基因则发生不恰当的甲基化(肿瘤抑制基因). 可以说，肿瘤抑制基因 CpG 岛在 S 期末期甲基化导致基因失活是在错误的时间所发生的错误事件.

4　CpG 岛甲基化与胃肠道肿瘤

DNA 甲基化方式改变涉及染色体结构、DNA 复制以及

基因表达. CpG岛甲基化与某些遗传性疾病[80](如fragile-X syndrom)、衰老[81]以及恶性肿瘤[4]有关.近50%的人类家族性恶性肿瘤细胞发现有肿瘤抑制基因突变[4];但仍有部分癌细胞虽无编码区突变的证据，肿瘤抑制基因却因CpG岛甲基化处于失活状态,表明CpG岛甲基化是癌细胞相关基因失活的重要机制之一.最近[82-87]发现众多恶性肿瘤不同程度的存在一个或多个肿瘤抑制基因CpG岛甲基化,如乳腺癌、舌癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、胃癌和结肠癌等. 这些相关的肿瘤抑制基因失活涉及多个环节,从而导致肿瘤的发生和进展[55](表1).

表1 Fundamental pathways altered by DNA methylation in cancer

Pathway affected	Genes silenced by CpG island methylation
Cell cycle control	Rb, p16(INK4a), p15, p14(ARF), p73
DNA damage repair	MLH1, O^6MGMT,GSTπ, BRCA1
Inhibiting apoptosis	DAP-kinase, Caspase-8, TMS1
Invasion tumor architecture	E-cadherin, VHL, APC, LKB1, TIMP3, Thrombospondin1
Growth factor response	ER, RARβ,Androgen Receptor, Endothelin B Receptor,RASSF1A

CpG岛甲基化是胃肠道恶性肿瘤发生的早期事件,在早癌及癌前病变就存在CpG岛甲基化[88]. 对食管癌检测[89]发现除食管癌外,反流性食管炎、Barrett's食管也出现ER(雌激素受体)、APC和p16基因CpG岛甲基化. Esteller et al [90]的研究也发现结肠腺瘤p16和p14基因CpG岛甲基化. Kang et al [91]则证实DAP-kinase、hMLH1、THBS1 (thromobospondin-1)、TIMP-3(金属蛋白酶-3)在胃癌及癌前病变组织CpG岛甲基化，且THBS1和TIMP-3的CpG岛甲基化频率随胃炎→肠化生→腺瘤→胃癌的不同阶段显著上升. 此外也发现肝硬变时染色体16q22.1高甲基化[92].

Issa et al [58]首先报告，在正常老年人结肠黏膜细胞ER基因CpG岛甲基化. Toyota et al [93,94]采用MCA (Methylation CpG island amplification)技术(同时进行甲基化分析和克隆基因组不同的甲基化DNA)对26个DNA序列的CpG岛甲基化与结肠癌的关系作了较为系统的研究. 根据结肠癌不同的CpG岛甲基化状况而分为两型：A型和C型. A型甲基化(19/26，73%)在结肠癌频繁发生(30-100%),部分正常结肠黏膜尤其是老年人也存在,称之为“衰老独特性甲基化”(aging-specific methylation). 由此表明[81,93,94]老年化是结肠癌等恶性肿瘤发生的主要危险因素,在衰老进程中,由于基因组DNA的CpG岛甲基化发生和不断积累，可引起细胞周期、分化及凋亡调控机制障碍. C型甲基化(7/26，27%)在结肠癌的发生频率较低(30-50%),但明显不同于A型，仅出现在癌组织，亦称“癌独特性甲基化”(cancer-specific methylation). 由于两型甲基化同时都有新生甲基化异常，故推测[94] C型甲基化机制可能主要在于抗甲基化的保护因子如“反作用因子”的缺乏.

进一步对50例结肠癌研究[94]发现，CpG岛甲基化状况在两组间明显不同：第一组C型极少见，平均每个标本0.3个位点，癌肿主要发生在远端；第二组C型甲基化高频率，平均5.1个位点，且癌肿主要在近端；两组之间A型甲基化无明显差异. 第二组结肠癌因以C型甲基化为特征而称为CpG岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype，CIMP). 推测$CIMP^+$和$CIMP^-$结肠癌的发生机制可能不同. 对于多数的$CIMP^-$结肠癌而言，伴随着年龄进展，结肠黏膜细胞基因组众多基因甲基化，并不断积累，影响相关基因表达. 由于细胞周期、分化及凋亡调控机制障碍,导致细胞处于高增生状态,最终可能细胞恶性转化. 在此过程中,环境因素如炎症、病毒感染等也可参与其中.$CIMP^+$的发生则与细胞转化过程中肿瘤抑制基因失活密切相关,如p16-INK4a [95]、THBS1 [91]、E-cadherin [96]、hMLH1 [97,98]及Cox-2 [99]等. 已报告胰腺癌[100]、胃癌[101]及乳腺癌[102]等亦存在CIMP.

晚近[59,103]认为,在肿瘤演进过程中,常伴随基因和表遗传性分子复杂交错的多样性改变,故称“表遗传性-突变表型”(epi-mutator phenotype)较CIMP更为贴切.

Grady et al [104]发现家族性弥漫型胃癌生殖细胞突变的E-cadherin基因存在启动子CpG岛甲基化. Machado et al [105]随后对23例散发性胃癌的研究中证实，16例弥漫型胃癌中有9例存在E-cadherin基因突变，同时免疫组化检测均表达异常. 9例中仅1例LOH，即符合经典的“二次打击理论”模式；但6例CpG岛甲基化的事实表明在E-cadherin基因突变的基础上，其CpG岛甲基化是散发性弥漫型胃癌的“第二次打击”. 这项研究展示出CpG岛甲基化在恶性肿瘤发病机制中另一个重要途径或模式.

5 CpG岛甲基化与临床意义

恶性肿瘤DNA甲基化异常具有鲜明特征[60,106]:肿瘤特异性,基因和组织特异性以及可逆性. 因此DNA甲基化检测作为一种新的分子生物学手段将会广泛应用于临床诊断、病情监测以及疗效评价. 甲基化检测技术的高敏感性和特异性，使其优于如微卫星不稳定性及LOH等检测方法. PCR技术更适用于检测标本量较少的组织切片、痰及尿液等，并能定量分析以此进行临床随访.

DNA甲基化的可逆性特征为临床抗肿瘤治疗提供了一种新途径. 5-氮-2-脱氧胞苷（DAC或5aza-dc）是有效的甲基转移酶抑制剂,大剂量使用时因其细胞毒性而具有抗肿瘤作用,小剂量DAC导致细胞分化可能与去甲基化和调控分化的特异性基因再表达有关[107,108]. 通过对ICF的治疗，证明DAC可增加染色体转录[36]. 此外，DAC与组蛋白去乙酰化抑制剂TSA协同作用值得

关注. Cameron et al [109]证实去甲基化药物协同HDAC抑制剂可诱导失活的基因再表达；Zhu et al [110]亦发现去甲基化药物协同 HDAC 抑制剂可导致肺癌细胞大量凋亡，提示与凋亡关联的甲基化基因在去甲基化后，该基因被激活. 最近 Kim et al [111]报告对胃 MALT 淋巴瘤抗幽门螺杆菌(Hp)治疗后平均随访 28mo,发现 3 例(3/7) p16 的 CpG 岛甲基化消失，提示 Hp 感染与 DNA 甲基化的关系如何？ DNA 甲基化检测能否作为胃 MALT 淋巴瘤 Hp 根除治疗的分子生物学指标？

DNA 甲基化是当今肿瘤研究的热点，其中许多内在机制尚待深入研究，如甲基化与细胞复制周期、恶性肿瘤 DNA 甲基化和染色质异常改变方式等. 相信对甲基化机制的不断研究将会为认识肿瘤发病机制以及未来临床诊断和治疗展示广阔前景.

6 参考文献

1 Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M.Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 2000;408: 495-498
2 Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:255-259
3 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352
4 Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-196
5 Jones PA, Laird PW.Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-167
6 朱卫国. DNA 甲基化,基因调控和癌症. 世界华人消化杂志 2002; 10: 680-683
7 Leonhardt H, Cardoso MC. DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J Cell Biochem* 2000; 35: 78-83
8 Fang JY, Lu YY. Effects of histone acethylation and DNA methylation on $p21^{WAF1}$ regulation. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 400-405
9 Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234: 10-20
10 Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 339-347
11 Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; 70: 5-8
12 Roder K, Hung MS, Lee TL, Lin TY, Xiao H, Isobe KI, Juang JL, Shen CJ.Transcriptional repression by Drosophila methyl-CpG-binding proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7401-7409
13 Lyko F, Whittaker AJ, Orr-Weaver TL, Jaenisch R.The putative Drosophila methyltransferase gene dDnmt2 is contained in a transposon-like element and is expressed specifically in ovaries. *Mech Dev* 2000; 95: 215-217
14 Gowher H, Leismann O, Jeltsch A.DNA of Drosophila melanogaster contains 5-methylcytosine. *EMBO J* 2000; 19: 6918-6923
15 Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 1997; 270: 385-395
16 Yoder JA. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 279-284
17 Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E.DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257
18 Margot JB, Aguirre-Arteta AM, Di-Giacco BV, Pradhan S, Roberts RJ, Cardoso MC, Leonhardt H. Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure. *J Mol Biol* 2000; 297: 293-300
19 Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; 13: 335-340
20 Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH.Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 1998; 20: 116-117
21 Bird AP.Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 1995; 11: 94-100
22 Antequera F, Bird A.Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11995-11999
23 Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP.Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 1994; 8: 2282-2292
24 Mummaneni P, Yates P, Simpson J, Rose J, Turker MS.The primary function of a redundant Sp1 binding site in the mouse aprt gene promoter is to block epigenetic gene inactivation. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5163-5169
25 Baylin SB, Herman JG.DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168-174
26 Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA.DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 1999; 80: 1312-1321
27 Bender J.Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 252-256
28 Robertson KD, Wolffe AP.DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 11-19
29 Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395: 89-93
30 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2545-2550
31 Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG.Aberrant methylation of gene promoters in cancer—concepts, misconcepts, and promise. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1460-1461
32 Colot V, Rossignol JL.Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 1999; 21: 402-411
33 Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM.The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14412-14417
34 Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E.Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402: 187-191
35 Ji W, Hernandez R, Zhang XY, Qu GZ, Frady A, Varela M, Ehrlich M.DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* 1997; 379: 33-41
36 Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, Ehrlich M.DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89: 121-128
37 Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* 2001; 276: 32282-32287
38 Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 226-231
39 Hendrich B, Bird A.Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6538-6547
40 Bird AP, Wolffe AP.Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-454
41 Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A.Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992; 69: 905-914
42 Cross SH, Meehan RR, Nan X, Bird A.A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* 1997; 16: 256-259
43 Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A.Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 2001; 15: 710-723
44 Ng HH, Jeppesen P, Bird A.Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1394-1406

45 Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A.MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999; 23: 58-61

46 Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D.Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 1999; 13: 1924-1935

47 Wade PA, Gegonne A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP.Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23: 62-66

48 Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP.Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187-191

49 Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A.Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389

50 Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A.The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 1999; 401: 301-304

51 Bestor TH.The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-2402

52 Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ.Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 33002-33010

53 Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000; 25: 338-342

54 Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB.DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25: 269-277

55 Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB.DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3156-3165

56 Cunningham JM,Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, RochePC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-3460

57 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-4530

58 Issa JP, Baylin SB, Belinsky SA. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res* 1996; 56: 3655-3658

59 Jubb AM, Bell SM, Quirke P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol* 2001; 195: 111-134

60 Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su-Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C.Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; 24: 132-138

61 Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB.E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5195-5199

62 Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4045-4050

63 Nass SJ, Ferguson AT, El-Ashry D, Nelson WG, Davidson NE. Expression of DNA methyl-transferase (DMT) and the cell cycle in human breast cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 7453-7461

64 Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB.De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4555-4565

65 Bakin AV, Curran T.Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* 1999; 283: 387-390

66 Laird PW.Mouse models in DNA-methylation research. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 119-134

67 Szyf M, Knox DJ, Milutinovic S, Slack AD, Araujo FD.How does DNA methyltransferase cause oncogenic transformation? *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 156-174

68 Milutinovic S, Knox JD, Szyf M.DNA methyltransferase inhibition induces the transcription of the tumor suppressor p21 (WAF1/CIP1/sdi1). *J Biol Chem* 2000; 275: 6353-6359

69 Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE.CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 2000;404: 1003-1007

70 Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E.Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999; 236:87-95

71 Cervoni N, Szyf M.Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 2001; 276: 40778-40787

72 Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002;416:552-556

73 Cheng NC, Beitsma M, Chan A, Op-den-Camp I, Westerveld A, Pronk J, Versteeg R. Lack of class I HLA expression in neuroblastoma is associated with high N-myc expression and hypomethylation due to loss of the MEMO-1 locus. *Oncogene* 1996; 13: 1737-1744

74 Leonhardt H, Rahn HP, Weinzierl P, Sporbert A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC.Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 2000; 149: 271-280

75 Zhang Z, Shibahara K, Stillman B.PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 2000; 408: 221-225

76 Shibahara K, Stillman B.Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 1999; 96: 575-585

77 Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 1997; 277: 1996-2000

78 Knox JD, Araujo FD, Bigey P, Slack AD, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M, Szyf M.Inhibition of DNA methyltransferase inhibits DNA replication. *J Biol Chem* 2000; 275: 17986-17990

79 Kennedy BK, Barbie DA, Classon M, Dyson N, Harlow E. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* 2000; 14: 2855-2868

80 Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen SH, Laird CD.Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 571-578

81 Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP.Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5489-5494

82 Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, Graff JR.Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4346-4348

83 Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, Go MY, Chung SC, Sung JJ.Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001; 91: 2294-2301

84 Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M.Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 8540-8546

85 Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR.Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 136-139

86 Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Wing-Yuen AP. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002; 94: 386-392

87 Soria JC, Rodriguez M, Liu DD, Lee J, Hong WK, Mao L. Aberrant promoter methylation of multiple genes in bronchial brush samples from former cigarette smokers. *Cancer Res* 2002; 62: 351-355

88 Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours.*J Pathol* 2002;196:1-7

89 Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI, Peters JH, DeMeester TR, Danenberg KD, Danenberg PV, Laird PW, Skinner KA.Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 5021-5026

90 Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG.Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366-4371

91 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG.CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851

92 Kanai Y, Ushijima S, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S.Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett* 2000; 148: 73-80

93 Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP.Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999; 59: 2307-2312

94 Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP.CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-8686

95 Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. P16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duck's staging. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 722-725

96 Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM. Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ.E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 569-573

97 Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ.Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 2001; 20: 329-335

98 房殿春, 罗元辉, 李小安, 凌贤龙, 杨仕明, 方丽, 汪荣泉.胃癌错配修复基因hMLH1突变和启动子甲基化与基因不稳的关系.中华消化杂志 2002; 22: 327-330

99 Kikuchi T, Iton F, Toyota M, Suzuki H, Yamamoto H, Fujita M, Hosokawa M, Imai K. Aberrant methylation and histone deacetylation of cyclooxygenase 2 in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 97: 272-277

100 Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M.Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 1835-1839

101 Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP.Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 5438-5442

102 Huang TH, Perry MR, Laux DE.Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 459-470

103 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-649

104 Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S.Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000; 26: 16-17

105 Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M.E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 1525-1528

106 Toyota M, Itoh F, Imai K.DNA methylation and gastrointestinal malignancies: functional consequences and clinical implications. *J Gastroenterol* 2000; 35: 727-734

107 Liu LH, Xiao WH, Liu WW.Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 131-135

108 Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A.Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 956-962

109 Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB.Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21: 103-107

110 Zhu WG, Dai Z, Ding H, Srinivasan K, Hall J, Duan W, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA.Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2'-deoxycytidine in human lung cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 7787-7796

111 Kim YS, Kim JS, Jung HC, Lee CH, Kim CW, Song IS, Kim CY. Regression of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma after eradication of Helicobacter pylori: possible association with p16 hypermethylation. *J Gastroenterol* 2002; 37: 17-22