



分化和适应相关表观遗传与胃癌转化研究进展

邓大君, 陆哲明

北京市肿瘤防治研究所暨北京大学肿瘤医院病因研究室, 教育部恶性肿瘤发病机制及转化研究重点实验室, 北京 100142
E-mail: dengdajun@bjmu.edu.cn

2012-06-04 收稿, 2012-09-20 接受

国家自然科学基金 A3 重大国际合作项目(30921140311)、国家自然科学基金重大研究计划(90919015)和国家重点基础研究发展计划(2010CB529300, 2011CB504201)资助

摘要 表观遗传修饰在人体细胞分化和适应环境上均发挥重要调控作用。一方面, 细胞分化相关表观遗传非常稳定, 具有明显的组织器官和细胞类型特异性; 另一方面, 机体对环境的适应性表观遗传则因环境因素不同而异, 稳定性较低。这两类不同的表观遗传修饰在医学上具有不同的转化应用范围。恶性转化是机体组织中少数干细胞对环境致癌因素暴露做出的病理性适应反应的结果——细胞通过去分化重编程, 获得无限制增殖和运动侵袭能力, 同时拥有分化和适应性表观遗传变化特征。DNA 甲基化变异的分析方法极其灵敏, 可准确检出组织中少数细胞存在的变化, 在识别癌前病变组织中的恶性转化细胞和肿瘤组织中的转移干细胞方面有重要应用前景。在前期研究中, 我们已经证明肿瘤抑制基因 *p16* 甲基化失活可用作胃等器官上皮异型增生癌变的早期标志物。通过对胃癌发生发展相关 DNA 甲基化组扫描获得的 90 余个基因的 DHPLC 大规模验证, 发现 *GFRA1* 的去甲基化激活、*SRF* 和 *ZNF382* 的甲基化失活可用作胃癌等恶性肿瘤的转移标志物, 已经在中、日、韩三国验证队列中得到证明; 通过人群研究还发现血浆 *miR-221* 等含量的进行性升高可能是胃癌发生的预警信号。

关键词

表观遗传
细胞分化
适应
胃癌
DNA 甲基化
miRNA
标志物

1 分化性和适应性表观遗传修饰

细胞通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA (ncRNA) 等表观遗传网络, 稳定地调节基因组的有序表达, 控制细胞分化和胚胎发育^[1]。与基因 DNA 序列比较, 表观遗传网络有较高的可塑性。正是在表观遗传网络精确、稳定的调控下, 受精卵按照固有的时空程序, 发育成了人体不同的组织和器官, 分化成了基因组完全相同而形态和功能则各异的不同细胞群体。如果该过程发生紊乱, 不仅直接导致停育、流产、畸胎、神经管畸形、心血管畸形等先天性疾病, 还可能影响许多后天性疾病的发生。

表观遗传网络在后天性环境适应和个体老化等正常生命活动过程中也发挥着关键作用^[2]。在营养素、环境因素、心理和精神因素等的长期影响下, 机体将发生一系列的营养素消化/吸收、组分代谢、生

物转化、内分泌、记忆等方面的适应性改变。其中稳定性的长期变化主要通过表观遗传修饰来维持。这种适应性表观遗传变化不仅能够体细胞分裂过程中稳定保持, 甚至可通过生殖细胞跨代传递。当这种变化的程度超出细胞的生理范围时, 即导致疾病的发生, 甚至进展为去分化、过分化、转分化等细胞分化异常。恶性肿瘤、高血压、糖尿病、神经精神疾病, 均与体细胞表观遗传病理性适应反应关系密切。

表观遗传修饰及其组合复杂多样^[3], 不仅为胚胎发育和细胞分化提供了动力, 而且赋予了机体灵活有效地适应各种生存环境的能力。表观遗传网络的复杂性使得有待阐明的问题无穷无尽, 同时也为我们认识肿瘤等疾病的发生/发展规律, 分子分型, 建立新疗法和开发新药物提供了丰富的路径和分子靶标。尽管现代表观遗传研究的历史迄今只有 15 年左

右,目前在其临床转化应用上已经展现出诱人的前景,如不仅有包括 DNA 甲基化阻断剂 5'氮杂脱氧胞苷和多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂在内的表观遗传临床治疗药物的出现,而且包括 *Septin9* 和 *p16* 及 *MGMT* 甲基化在内的几个 DNA 甲基化标志物也在临床实验中^[3]. 笔者认为,如果以转化医学研究为目标,将疾病相关的表观遗传变异从体内复杂的表观遗传修饰中提炼出来,进行适当的分类,可大幅度减少选择研究靶点的盲目性,加速表观遗传转化研究进程.

机体大部分体细胞的分化状态将维持终生,决定其分化状态的表观遗传网络也终身不变. 换言之,控制细胞分化状态的分化性表观遗传修饰不易受环境因素影响,具有极高的稳定性和严格的组织/细胞特异性. 机体适应环境的表观遗传变化则不然,易被环境因素左右,可能是局部的或者全身性的适应反应. 显然,这两类表观遗传网络不论是在生物学功能还是在稳定性和基因组中的分布位置方面均存在重要的差别. 在不同性质的疾病中发生变异的表观遗传修饰类型也不同. 分化性表观遗传修饰异常可用作各种细胞分化障碍性疾病的诊断标志物和治疗靶点. 这类疾病包括细胞去分化性疾病(如肿瘤和癌前病变)、细胞过度分化性疾病(如牛皮癣、老年性痴呆、骨质增生)、细胞转分化性疾病(如肠上皮化生、鳞状上皮化生、子宫内膜异位症)及细胞退行性疾病(如糖尿病、白内障、白癜风、再生障碍性贫血). 适应性表观遗传修饰则可用于营养状态和环境因素的长期影响评估、疾病易感性预测、放化疗敏感性和耐药性预测、新型药物设计等. 尽管国际 ENCODE 研究计划的完成为认识细胞分化相关的表观遗传修饰提供了宝贵资料^[3],目前,对机体细胞中哪些基因位点上的哪些表观遗传修饰是细胞分化相关的稳定性修饰,哪些是与机体适应环境相关的表观遗传修饰的认识仍然非常不足,选择不同类型表观遗传修饰来研究不同疾病诊治标志物的观念还有待形成.

此外,因为分化性表观遗传修饰组合具有组织细胞特异性,所以测定组织/细胞的表观遗传学修饰需要使用相应的组织标本. 越来越多的证据显示,肿瘤的发生、复发/耐药和转移均与癌前病灶或肿瘤组织中存在的数目很少的肿瘤干细胞有关. 由于众多非干细胞的稀释/淹没,使用传统的蛋白质印迹或免疫组化染色技术分析蛋白和使用 RT-PCR 或原位杂交技术测定 mRNA 均存在灵敏度不足,难以检出数

目有限的干细胞中发生的基因表达变化. 相反, DNA 甲基化状态不仅是可塑性最小的表观遗传修饰,能与 DNA 一起在各种方法保存标本中稳定保持,而且甲基化和非甲基化的 CpG 岛能够互不稀释/淹没地分别检测,即使组织细胞群体中只有 0.1%的细胞发生异常甲基化也能被准确检出^[4]. 我们认为, DNA 甲基化变异的这些特征使得其可能在恶性肿瘤预防和治疗领域中发挥独到的作用,并且已经在癌前病变恶变能力预测方面取得了突破. 我们发现控制细胞周期 G1→S 转换的抑癌基因 *p16* 甲基化失活可用于预测上皮异型增生的癌变潜能^[5,6],国际同行随后也反复观察到了类似的现象^[7-9]. 目前我们已经建立了符合诊断试剂注册要求的 *p16* 甲基化荧光定量分析技术^[10],诊断试剂盒的开发已经进入临床实验.

2 分化性和适应性表观遗传修饰研究进展

各种高通量组学研究平台的出现为医学生物学研究提供了有力的工具,借助生物信息学的分析手段和系统生物学的观念,这些平台的使用克服了既往分子生物学研究仅局限于某个分子靶点的缺陷^[3]. 然而,面对这些平台产生的海量初始数据,由于人力和财力的限制,几乎不可能开展仔细的核实验证,常见的只是在对所获组学数据进行一番信息分析后,从中挑选几个靶基因验证,总结发表了事. 人类基因组中 2%的序列编码蛋白,包括看家基因、组织特异性表达基因、生物转化和环境适应基因. 哪些基因表达属于细胞分化特异性的? 哪些属于环境适应性的? 哪些变化是疾病发生相关的? 哪些具有临床诊断和治疗应用价值? 尽管还有大量的研究有待开展,人们已经开始用更宽的视野来审视表观遗传等各种生命活动.

目前在全基因组水平的高分辨率表观遗传组学(包括 DNA 甲基化、各种组蛋白修饰、ncRNA 转录、染色质构象等)和疾病相关的表观遗传修饰差异筛选方面已经取得了一定的进展. 例如利用第二代深度测序技术,人们已经完成了包括人胚胎干细胞和人胚肺成纤维母细胞在内的全基因组高分辨率 DNA 甲基化组亚硫酸氢钠测序分析^[11,12],全基因组染色质核小体分布与 DNA 甲基化关系分析^[13],以染色质共沉淀为基础的全基因组多种蛋白修饰等表观遗传组学分析^[14],为分析这些细胞分化过程中表观遗传网络的具体构成及其变化规律提供了宝贵的资源. 全

基因组水平的高分辨率表观遗传组学研究格局正在发生剧烈变化,已经从对个别代表性的单克隆培养细胞进行测定^[15,16],转变为对人体众多类型细胞进行高分辨率的表观遗传组和转录组分析数据进行分析的时代^[3],以揭示基因内和基因间非编码 DNA 区域的不同类型的表观遗传修饰组合及其功能。

正常组织和病变组织比较表观遗传组学分析对转化医学研究也有重要价值。DNA 甲基化是各种表观遗传修饰中稳定性最高的。新近有研究提示某些基因区域的 DNA 甲基化状态可能是甲基化与羟甲基化/去甲基化动态平衡的结果^[17-19]。在不同组织中,许多基因在生理条件下的表达不是全或无的差别,而是转录水平的差异,其 DNA 甲基化的差别多存在于 CpG 岛的周围(CpG island shores),而不是在转录起始点附近的 CpG 岛核心区域^[20,21]。在细胞分化和正常环境适应等生理条件下,这种非核心 CpG 岛区的 DNA 甲基化差异与基因的转录活性差异一致。我们和其他人的研究表明,肿瘤抑制基因从头甲基化的建立可能是从 CpG 岛的一侧向核心区扩展的过程^[22-24]。在组织和细胞系中,CpG 岛甲基化和去甲基化的扩展过程可能是以核小体为基本单元,脉冲式地推进的过程^[24,25]。在肿瘤等病理条件下,尤其是在筛选 DNA 甲基化标志物时,人们更关心的则是能够导致基因转录完全沉默/激活的 CpG 岛核心区域 CpG 位点的甲基化/去甲基化。因此,在 DNA 甲基化标志物试剂盒开发过程中,建议尽量选择包括连接区 DNA 在内的 CpG 岛核心区域 2 个核小体 DNA 来设计引物。

特别要指出的是,肿瘤组织中的 DNA 甲基化稳定性因基因不同而异。例如,肿瘤细胞中 *p16* 基因甲基化失活,即使是在用 DNA 甲基化阻断剂暂时去除后,仍然能够在 2 周后逐渐恢复,联合使用组蛋白去乙酰化抑制剂也不例外^[26]。我们发现,将 *p16* 甲基化的 AGS 细胞与非甲基化的 MGC803 细胞融合后,在融合细胞中 *p16* 基因位点主要维持其母细胞的甲基化状态,即 AGS 细胞来源的位点甲基化和 MGC803 来源的位点非甲基化,与 *p16* 在 HCT116 细胞中长期维持半甲基化状态极为相似;相反,*Spint2/Bikunin* 基因在 AGS 细胞中为非甲基化,而在 MGC803 细胞中为完全甲基化,在两者的融合细胞中则呈现出 MGC803 细胞来源等位基因第一外显子编码区核小体 DNA 仍然甲基化,而启动子区和 5'UTR 区 2 个核

小体完全非甲基化的特征(陆哲明等,未发表)。显然,明确肿瘤组织中哪些基因甲基化变异是稳定的和哪些是不稳定的及其与分化性和适应性表观遗传分类的关系,对肿瘤表观遗传标志物等转化医学研究至关重要。

在组织的组蛋白修饰方面,目前还停留在某种组蛋白修饰的总体水平变化与疾病的转归关系研究上。种种迹象表明,组蛋白修饰变化可能也与肿瘤的转归密切相关。利用组蛋白修饰特异性抗体来共沉淀组织染色质,借助寡核苷酸芯片或者 DNA 深度测序技术来显示存在明显修饰差别的基因位点/染色质区段,将有助于阐明这些组蛋白修饰变化通过何种基因通路来影响肿瘤的生物行为^[27]。

以筛选疾病相关 DNA 甲基化差异位点为目标的各种微阵列芯片杂交和甲基化敏感酶切扫描技术(restriction landmark genomic scanning, RLGS)是最早出现的 DNA 甲基化组分析技术。以目的 CpG 岛为靶标,定制个性化的甲基化组测定芯片也已经非常便利。这类技术在确定 DNA 甲基化具有组织细胞和肿瘤类型特异性等方面发挥了关键作用^[20,28],常用于与肿瘤发生发展相关的 DNA 甲基化差异位点的筛选^[29-31]。然而,基于芯片的全基因组扫描研究,对于肿瘤干细胞等少量细胞,由于敏感性不足,容易造成漏检;使用亚硫酸氢钠克隆测序技术对待核 CpG 岛甲基化进行分析仍受人力和财力成本的限制难以大规模展开;由于甲基化分布位点未知,使用各种位点特异性甲基化分析技术(如 MSP, COBRA, MethylLight 等)开展核实验可行性很差。其结果是,虽然利用这些芯片平台产出了大量的数据,但是开展了进一步核实验验证的甲基化基因/CpG 岛非常少。下面将介绍我们用变性高效液相色谱(DHPLC)法对胃癌 DNA 甲基化组进行大规模验证和表观遗传流行病学方面的研究进展。

3 转移性胃癌 DNA 甲基化标志物研究

肿瘤是一种细胞去分化性疾病,本质上是环境致癌物激发了细胞非生理性极端适应反应。癌变细胞不仅本身发生了深刻的不可逆的表观遗传学重编程和基因组稳定性降低,还诱导其周围间质细胞发生如血管生成和细胞外基质降解等有利于癌细胞增殖和运动等表观遗传学改变。同时,机体也会对肿瘤细胞的出现做出局部和全身的防御反应。

癌前病变进展和肿瘤侵袭、转移、治疗敏感性和

耐药性等均为癌细胞的生物学特征,理论上有用表观遗传等生物学手段进行识别的可能.肿瘤细胞运动侵袭能力的获得及其周围间质限制肿瘤细胞迁移运动能力的丧失,均是肿瘤细胞摆脱原位组织束缚,侵入脉管或远处种植实现转移的关键性步骤.肿瘤细胞群体中只有少数肿瘤干细胞兼具运动、侵袭和定植成瘤的多能性,特称为肿瘤转移干细胞.鉴于组织中少量细胞的DNA甲基化变化也可被灵敏地检出,我们推测DNA甲基化标志物在恶性肿瘤转移潜能预测上亦可发挥特殊作用.因此,我们在研究胃癌DNA甲基化组时,将重点放在了发现胃癌转移DNA甲基化标志物上.

利用甲基化CpG岛扩增与芯片组合分析(methylated CpG island amplification, MCAM)^[31]和甲基化敏感酶切基因组扫描技术,我们分别测定了4对转移性胃癌和4对配对的非转移性胃癌及其切缘非癌组织CpG岛的甲基化信号.对所筛选出的90余个转移和发生相关候选基因CpG岛开展了DHPLC验证研究^[32].

众所周知,CpG岛中各个CpG位点的甲基化状态影响基因转录的作用并不相同,一般将其甲基化与基因转录完全沉默密切相关区域的那些CpG位点称为关键性CpG位点,多数关键性CpG位点位于转录起始点上、下游2个核小体范围内.由于基因组中大部分基因CpG岛中的关键性CpG位点的具体分布位置未知,为了筛选出与基因转录功能相关的DNA甲基化变异,我们采用自行创建的DHPLC定性和定量快速测定DNA甲基化方法^[33,34],对候选探针(群)所在的整个CpG岛或者转录起始点附近的2~4个核小体区域的甲基化状态进行分析.与CpG位点依赖性的甲基化分析方法不同,因为是对整个CpG岛的总甲基化差别进行比较,所以用DHPLC法时不需预知关键性CpG位点信息.此外,该方法使用与亚硫酸氢钠-测序法完全相同的无CpG位点引物对和PCR扩增条件,很容易对测定结果进行克隆测序验证.通过比较一组基因转录状态和CpG岛甲基化不同的细胞系或组织样品的甲基化CpG位点差异,可确定关键性CpG位点的位置.

我们分别为上述90余个基因转录起始点附近CpG岛的甲基化状态建立了DHPLC测定方法,发现在胃癌与切缘(及非癌对照)之间,15个基因(*BMP3*, *BNIP3*, *ECEL1*, *ELK1*, *GFRA1*, *HOXD10*, *KCNH1*, *p16*,

PSMD10, *PTPRT*, *SIGIRR*, *SRF*, *TBX5*, *TFPI2*, *ZNF382*)存在有统计学显著性的甲基化明显差别,提示这些基因甲基化变异与胃癌发生相关.其中,*GFRA1*的去甲基化激活和*SRF*以及*ZNF382*的甲基化失活均与胃癌的转移和患者总生存时间存在明显相关性,并且在中、日、韩三国胃癌患者验证队列中反复得到验证.事实上,它们在结肠癌和肝癌上也有相似的作用.这些病例对照研究结果说明,这3个基因在早期测定胃癌等恶性肿瘤转移状态方面可能有重要应用价值,以前未见类似报道(分别申报了国际发明专利)^[35-37].目前我们正筹划通过在手术时未见转移的胃癌患者中开展前瞻队列研究,来确证这些转移标志物在预测肿瘤转移复发上的价值.此外,我们还发现9个miR CpG岛(*miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-34b/c*, *miR-137*, *miR-193b/365a*, *miR-200b/200c/429*, *miR-210*, *miR-375*, *miR-663*)的甲基化变化与胃癌发生存在明显的相关性,其中*miR-9-1*和*miR-137*甲基化主要存在于胃癌组织中,提示可用作胃癌特异性标志物;*miR-9-1*的甲基化还与胃癌转移和患者生存期存在弱相关性.与蛋白编码基因功能的完全甲基化沉默不同,miRNA主要对目的mRNA的含量进行细调,对miR CpG岛甲基化状态分析的临床应用价值还有待进一步研究.在培养细胞系中,我们还发现这些CpG岛的甲基化均与相应的miRNA转录水平存在明显的负相关关系;在胃组织中*miR-9-1*, *miR-9-3*, *miR-137*, *miR-200b*的转录与甲基化也呈负相关,提示基因组中miR的转录可能普遍受5'端CpG岛甲基化的影响^[38].

4 胃癌表观遗传流行病学研究进展

幽门螺杆菌感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤的发生密切相关.由于慢性萎缩性胃炎与胃癌发生之间存在密切关系,幽门螺杆菌感染也与肠型的胃腺癌发生可能存在密切的关系.已知幽门螺杆菌感染可通过炎症介质诱发大量的胃黏膜细胞DNA甲基化改变^[39,40],这种炎症介质也会进入血液循环和造血组织中.为了研究幽门螺杆菌感染是否会导致胃黏膜和外周血白细胞DNA甲基化的变化,我们正在与韩国学者合作用高通量甲基化分析平台比较幽门螺杆菌感染者化学清除治疗前、后患者胃黏膜活检组织及其外周血白细胞DNA甲基化谱的变化,以阐明这两种组织来源的细

胞对幽门螺杆菌感染的存在是否有共同的 DNA 甲基化变化规律。

关于中晚期肿瘤患者存在血浆循环性 miRNA 水平变化的报道已经很多,但是早期肿瘤或癌前病变患者中是否也存在类似的变化尚无定论^[4]。有学者认为血浆循环性 miRNA 存在肿瘤组织释放和非肿瘤组织适应性转录上调两种来源。为了了解利用循环性 miRNA 变化来早期诊断胃癌的可行性, Song^[41]等人利用低密度的 miRNA 芯片对胃癌患者和胃炎对照者的混合血清样品中 miRNA 的表达差异进行了初筛和非混合样品验证分析,发现在筛选队列($n=28$)和验证队列($n=136$)的病例和对照患者之间 8 个 miRNA

(*miR-221*, *miR-744*, *miR-376c*, *miR-191*, *miR-27a*, *let-7e*, *miR-27b*, *miR-222*)的表达的确存在差异;胃黏膜上皮异型增生患者血清 *miR-221* 的平均含量已经开始高于对照者;对 20 例胃癌患者胃癌诊断前 3 个时间点(1989, 1992/1994, 1999/2003)采集的血清样品进行动态比较发现, *miR-221*, *miR-744*, *miR-376c* 的含量进行性升高,而在胃炎对照者中无此现象^[41]。与其他器官的肿瘤类似,依靠单次血清 miRNA 测定结果很难将胃炎对照与早期胃癌或非浸润性原位癌(GIN, 重度异型增生)者相区分。动态比较血浆/血清目的 miRNA 含量变化是否可成为早期预测胃癌等恶性肿瘤患病风险的新手段值得研究。

参考文献

- Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: Digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 526–537
- Faulk C, Dolinoy D C. Timing is everything: The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics*, 2011, 6: 791–797
- The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012, 489: 57–74
- Deng D J, Liu Z J, Du Y T. Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers. *Adv Genet*, 2010, 71: 125–176
- Sun Y, Deng D, You W C, et al. Methylation of p16 CpG islands associated with malignant transformation of gastric dysplasia in a population-based study. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 5087–5093
- Cao J, Zhou J, Gao Y, et al. Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: A prospective cohort study. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 5178–5183
- Hall G L, Shaw R J, Field E A, et al. p16 Promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17: 2174–2179
- Belinsky S A, Liechty K C, Gentry F D, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res*, 2006, 66: 3338–3344
- Jin Z, Cheng Y, Gu W, et al. A multicenter, double-blinded validation study of methylation biomarkers for progression prediction in Barrett's esophagus. *Cancer Res*, 2009, 69: 4112–4115
- Zhou J, Cao J, Lu Z M, et al. A 115-bp MethyLight assay for detection of p16 (CDKN2A) methylation as a diagnostic biomarker in human tissues. *BMC Med Genet*, 2011, 12: 67
- Lister R, Pelizzola M, Dowen R H, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462: 315–322
- Laurent L, Wong E, Li G, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*, 2010, 20: 320–331
- Chodavarapu R K, Feng S, Bernatavichute Y V, et al. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature*, 2010, 466: 388–392
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 2007, 129: 823–837
- Statham A L, Robinson M D, Song J Z, et al. Bisulphite-sequencing of chromatin immunoprecipitated DNA (BisChIP-seq) directly informs methylation status of histone-modified DNA. *Genome Res*, 2012, 22: 1120–1127
- Brinkman A B, Gu H, Bartels S J J, et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res*, 2012, 22: 1128–1138
- Bhutani N, Burns D M, Blau H M. DNA demethylation dynamics. *Cell*, 2011, 146: 866–872
- Xu Y, Wu F, Tan L, et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*, 2011, 42: 451–464

- 19 Ficiz G, Branco M R, Seisenberger S, et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 2011, 473: 398–402
- 20 Irizarry R A, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*, 2009, 41: 178–186
- 21 Doi A, Park I H, Wen B, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*, 2009, 41: 1350–1353
- 22 Yang P, Ma J, Zhang B, et al. CpG Site-specific hypermethylation of p16INK4 α in peripheral blood lymphocytes of PAH-exposed workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21: 182–190
- 23 Yan P S, Shi H, Rahmatpanah F, et al. Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer. *Cancer Res*, 2003, 63: 6178–6186
- 24 Lu Z M, Zhou J, Wang X, et al. Nucleosomes correlate with *in vivo* progression pattern of *de novo* methylation of p16 CpG islands in human gastric carcinogenesis. *PLoS One*, 2012, 7: e35928
- 25 Bai H, Zhou J, Deng D J. Nucleosome positions and differential methylation status of various regions within MLH1 CpG island. *Chin J Cancer Res*, 2008, 20: 237–242
- 26 Egger G, Aparicio A M, Escobar S G, et al. Inhibition of histone deacetylation does not block resilencing of p16 after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Cancer Res*, 2007, 67: 346–353
- 27 De Carvalho D D, Sharma S, You J S, et al. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer Cell*, 2012, 21: 655–667
- 28 Costello J F, Frühwald M C, Smiraglia D J, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*, 2000, 24: 132–138
- 29 Gitan R S, Shi H, Chen C M, et al. Methylation-specific oligonucleotide microarray: A new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res*, 2002, 12: 158–164
- 30 Yu L, Liu C, Vandeusen J, et al. Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet*, 2005, 37: 265–274
- 31 Shen L, Kondo Y, Guo Y, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet*, 2007, 3: 2023–2036
- 32 Liu Z J, Gao Y H, Zhang J, et al. DNA methylation markers as predictors of initiation and progression of gastric carcinomas. In: Noh H S, Mok Y J, Yang H K, eds. 9th International Gastric Cancer Congress. Pianoro, Bologna, Italy: MEDIMOND s.r.l., 2011. 13–17
- 33 Deng D J, Deng G R, Smith M F, et al. Simultaneous detection of CpG methylation and single nucleotide polymorphism by denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 13E
- 34 Luo D, Zhang B, Lü L, et al. Methylation of CpG islands of p16 associated with progression of primary gastric carcinomas. *Lab Invest*, 2006, 86: 591–598
- 35 Deng D, Liu Z. Methods and nucleotide fragments of predicting the ability of tumor invasion and metastasis *in vitro* (in Chinese). PCT patent, WO2011095067, 2011-03-30
- 36 Deng D, Gao Y, Zhang B, et al. Methods and nucleotides for assessing tumor metastasis or prognosis *in vitro* (in Chinese). PCT patent, WO2012097477, 2011-01-21
- 37 Deng D, Zhang J, Liu Z, et al. Predicting ability of tumor development, metastasis, and patient's survival, by extracting DNA from biological samples, detecting demethylation degree of cytosine in CpG island of DNA sequence of GFRA1 and determining tested samples (in Chinese). PCT patent, PCT/CN2012/000169, 2011-03-08
- 38 Du Y, Liu Z, Gu L, et al. Characterization of human gastric carcinoma-related methylation of 9 *miR* CpG islands and repression of their expressions *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer*, 2012, 12: 249
- 39 Dong C X, Deng D J, Pan K F, et al. Promoter methylation of p16 associated with *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions: A population-based study. *Int J Cancer*, 2009, 124: 434–439
- 40 Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res*, 2010, 70: 1430–1440
- 41 Song M-Y, Pan K-F, Su H-J, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PLoS One*, 2012, 7: e33608