

一种新的基因灭活工具——甲基化寡核苷酸技术

翟荣林, 王国斌, 蔡开琳

背景资料
DNA甲基化与人类胚胎发育和恶性肿瘤有密切的关系。研究DNA甲基化与肿瘤的关系成为当前分子生物学的热点之一。

翟荣林, 王国斌, 蔡开琳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
国家自然科学基金资助课题, No. 30500488
通讯作者: 翟荣林, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. zhaironglin@yahoo.com.cn
电话: 027-85351661
收稿日期: 2007-08-30 修回日期: 2007-09-28

Application of methylated oligonucleotides: A new strategy for gene inactivation

Rong-Lin Zhai, Guo-Bin Wang, Kai-Lin Cai

Rong-Lin Zhai, Guo-Bin Wang, Kai-Lin Cai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500488

Correspondence to: Rong-Lin Zhai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zhaironglin@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-30 Revised: 2007-09-28

Abstract

The study of gene functions, including activation and inactivation, has become a hotspot in molecular biology since entering the postgenomic phase. To achieve gene inactivation, there are four methods: gene knock out, antisense oligonucleotides, RNA interference and methylated oligonucleotides. Here, we emphasize the technology of methylated oligonucleotides via backgrounds, mechanism, method, current status and perspective.

Key Words: Methylation; Methylated oligonucleotides; Gene inactivation

Zhai RL, Wang GB, Cai KL. Application of methylated oligonucleotides: A new strategy for gene inactivation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3332-3337

摘要

后基因组时代的分子生物学研究重点转向了基因功能的研究。基因功能研究中涉及到对过度表达的基因进行抑制或者灭活。本文简要回

顾和评价了基因敲除、反义寡核苷酸技术和RNA干扰技术等常用的基因灭活工具,着重对有可能成为第四代基因灭活工具的甲基化寡核苷酸技术,从产生背景、作用机制、技术路线、应用现状及前景等方面进行了详细的论述,以期引起注意和重视。

关键词: 甲基化; 甲基化寡核苷酸; 基因灭活

翟荣林, 王国斌, 蔡开琳. 一种新的基因灭活工具——甲基化寡核苷酸技术. *世界华人消化杂志* 2007; 15(31): 3332-3337
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3332.asp>

0 引言

肿瘤和遗传性疾病往往涉及多个基因功能的改变。进入后基因组时代,分子生物学研究的重点转向了基因的功能以及与相关疾病的关系上。基因功能的研究包括两个方面:表达激活和表达灭活。尤其是对肿瘤原癌基因和某些胚胎发育过程中的关键基因来说,通过抑制或灭活他们的表达,可以了解这些基因在肿瘤和遗传性疾病发病过程中所扮演的角色。灭活基因的方法有很多,本文简要回顾了基因功能研究中的常见工具,如基因敲除(gene knock out)、反义寡核苷酸技术和RNA干扰技术,着重对新近出现的甲基化寡核苷酸技术,从产生背景、作用机制、技术路线、应用现状和存在的问题等方面进行了详细的阐述。

1 基因灭活手段

基因功能研究中出现最早最成熟的技术就是基因敲除。他是根据同源重组的原理,利用分子生物学技术增强和减弱甚至灭活某特定靶基因表达水平,然后观察实验动物整体功能状态的变化,推测靶基因的功能^[1]。基因敲除技术可在整体动物水平研究基因功能,但是完全基因敲除使小鼠所有细胞基因组上都存在基因的缺失或突变,有些重要的靶基因敲除或导入会严重影响动物胚胎的发育,导致胚胎早期死亡或严重的发育缺陷,使得突变无法传代,不利于在小鼠

各个发育阶段进行该基因功能的分析. 条件基因敲除技术(conditional gene knock out)的建立为此难题找到了解决的办法. 1994年, Gu *et al*^[2]应用Cre/loxP重组酶系统实现了外源基因的时间特异性表达, 在此基础上条件基因敲除技术得以形成. 条件基因敲除技术是在基因敲除基础上结合Cre/loxP系统而形成的, 他可以在特定时间, 组织, 细胞中将靶基因敲除, 从而可以真实的反映特定组织或细胞中靶基因被敲除或修饰后的结果, 避免在发育早期所有细胞和组织中完全敲除目的基因后可能产生的胚胎早期死亡或严重的发育障碍^[3-5]. 基因敲除的优点是基因灭活效果确切可靠, 缺点是技术复杂, 费时费力.

反义寡核苷酸技术是指采用一类经人工合成或构建的反义表达载体表达的寡核苷酸片段, 长度多为15-30个核苷酸, 导入细胞或者个体体内, 根据碱基互补原理, 通过与靶DNA或者mRNA结合形成双链杂交体激活核酸酶H, 裂解靶mRNA阻断蛋白质的翻译, 或者与DNA结合成三链结构或与单链DNA结合成双链结构以阻止靶基因的复制或转录, 以及与mRNA AP位点结合干扰其剪接、加工和运输, 在mRNA水平上发挥作用, 从而干扰其表达, 阻止其翻译成蛋白质^[6]. 具体的作用机制目前尚未完全清楚. 反义寡核苷酸因为是针对特定的靶mRNA(DNA)的序列设计合成, 因此具有极高的特异性, 并且容易设计和体外大量合成. 另外反义寡核苷酸不含病毒序列, 不会产生免疫反应, 也不会整合入宿主染色体, 这都为其作为药物应用于临床提供了可能. 1998年, 第1个反义药物Vitravene(Fomivirsen)被美国FDA批准通过, 用以治疗由巨细胞病毒(cytomegalovirus)引起的艾滋患者的视网膜炎^[7]. 目前反义寡核苷酸技术在动物体内外的应用已经非常普遍^[8-9]. 今后要注意的是, 如何对反义寡核苷酸进行更加有效的化学修饰以提高其稳定性, 延长其半衰期, 增加其作用时间和如何定点作用于特定部位, 使靶组织最大效率地吸收反义核酸, 提高其作用效果, 减轻毒副作用^[10].

RNA干扰(RNA interference, RNAi)为第3代抑制哺乳动物细胞基因表达的有效方法. 他主要是指由外源或内源性的双链RNA(double strand RNA, dsRNA)导入细胞而引起的与dsRNA同源的mRNA降解, 进而抑制相应的基因表达. dsRNA前体进入细胞后, 由核酸酶III

-Dicer处理为21-23个碱基的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA). 这些小干扰RNA分子能与解螺旋酶、核酸酶等结合形成RNA诱导的沉默复合物(RNA inducing silencing complex, RISC), 并与靶基因的互补mRNA结合, 将mRNA降解, 在转录后水平抑制靶基因的表达, 因而又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[11-12]. RNA干扰出现的时间不长, 从1998年的初次报道开始^[13], 短短几年中, RNAi的研究取得了突飞猛进的发展^[14-15], 并被美国科学界评为2002年度最重要的科技成果之一. 2006年Andrew Fire和Craig Mello也正是凭借在RNA干扰领域所做出的杰出贡献而被授予诺贝尔医学奖^[16]. 目前正在进行的基因组siRNA文库的建立必将为从全基因组水平对高等动物基因功能进行高通量RNAi研究打下坚实的基础^[17]. 相对基因敲除, 反义寡核苷酸技术, RNA干扰技术在操作上相对简单, 基因沉默灭活效果可靠, 有望开发出新药应用于临床^[18], 尤其是在肝炎和艾滋病等顽固性病毒性疾病的治疗中有可喜的应用前景^[19-22]. 缺点是无法局限作用于特定组织和细胞, 这有赖于载体靶向系统研究的进展.

2 甲基化寡核苷酸技术

2.1 产生的背景 表观遗传学(epigenetics)是与遗传学(genetics)相对应的概念. 遗传学是指基于基因序列改变所致基因表达水平变化, 包括基因突变、基因杂合丢失和微卫星不稳定性等; 而表观遗传学则是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化, 包括DNA甲基化、组蛋白脱乙酰化和染色质构象变化等; 表观基因组学(epigenomics)则是在基因组水平上对表观遗传学改变的研究, 以抑癌基因为代表的CpG岛甲基化所致基因转录失活已经成为肿瘤表观基因组学研究的重点内容^[23-25]. 所谓DNA甲基化是指在DNA甲基化转移酶的作用下, 基因组5'端CpG二核苷酸的胞嘧啶第5位碳原子上共价结合一个甲基基团. 由于DNA甲基化与人类发育和肿瘤疾病的密切关系, 特别是CpG岛甲基化所致抑癌基因转录失活, DNA甲基化已经成为表观遗传学和表观基因组学的重要研究内容, 研究DNA甲基化与肿瘤的关系成为当前分子生物学的热点之一. 目前的研究已经表明: 肿瘤细胞和组织中存在异常的DNA甲基化状态, 表现为基因组整体甲基化水平降低, 导致遗传不稳定性增加;

研发前沿
目前甲基化寡核苷酸技术的应用主要集中在体外肿瘤细胞株的研究上, 国内外相关的文献报道不多, 尚未引起研究者的注意和重视.

创新盘点
本文简要回顾了基因敲除等常规基因灭活手段,着重介绍了新近出现的尚未引起重视的甲基化寡核苷酸技术,并指出其不可被替代的独特之处。

组织特异性基因的启动子区域出现从头甲基化从而导致基因被关闭;原癌基因多为低甲基化或不充分甲基化,低甲基化使原癌基因活化,导致重新开放或异常表达,形成突变热点,增加染色体的不稳定性;抑癌基因多为过度甲基化,过度甲基化导致表达失活^[26-27]。这些因素综合起来导致基因表达异常,引起细胞恶变,最终导致肿瘤的发生^[28-30]。

2.2 作用机制 在哺乳动物中,甲基化仅影响DNA链上鸟嘌呤前的胞嘧啶(CpG)。通常细胞中CpG二核苷酸的甲基化分布并不是均一的,大约50%的基因在启动子区域有CpG二核苷酸的富集现象,一般该区域的长度从0.5-2 kb不等。该区域与基因的转录有密切的关系,通常处于非甲基化状态。处于非甲基化状态的启动子,环绕的染色质呈现为开放的构象,允许转录因子和其他的激活物靠近。此外,转录因子的占据也使其他的转录抑制因子和染色质重塑蛋白等难以接近启动子,最终表现为启动基因表达^[31-33]。相反,CpG岛高甲基化的启动子则呈现为关闭的构象,不但使转录因子无法靠近,而且还有助于甲基胞嘧啶结合蛋白、转录辅阻遏蛋白、DNA甲基转移酶等对转录有抑制作用的蛋白结合于启动子区,启动子失去功能,结果基因转录灭活而沉默^[34-35]。很多资料表明,基因启动子异常高甲基化可以导致其转录灭活^[36-39]。Zhu *et al*^[40]通过甲基化寡核苷酸诱导ER β 基因启动子区和外显子区CpG岛特异性甲基化发现,在前列腺癌细胞中,是ER β 基因启动子区(而不是外显子区)CpG岛的高甲基化导致了ER β 基因转录失活。去甲基化试剂作用前列腺癌细胞后,ER β mRNA恢复表达。

甲基化寡核苷酸技术是利用针对靶基因合成的甲基化寡核苷酸片段(methylated oligonucleotides, MON)与基因的其中一条链互补结合形成半甲基化DNA。半甲基化DNA表现为复制叉样结构,为DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase-1, DNMT1)的优先底物, DNMT1使第1链迅速甲基化。MON与结合点分离,甲基化的第一链与未甲基化的互补链退火形成第2个半甲基化DNA底物,同样表现为复制叉样结构,为DNMT1作用的优先底物。结果两条链均发生甲基化,随后,同样的道理,甲基化扩布到邻近的CpG二核苷酸中,最后整个基因的靶位点(如启动子)发生完全甲基化^[41]。如上所述,基因启动子甲基化可以导致其转录失活,因此通过甲基化

寡核苷酸技术,我们就可以对所要研究的目的基因进行特异的灭活^[42-43]。此外,尚有资料表明,CpG岛甲基化表型(CIMP)能够改变染色体的构象,产生微卫星不稳定性(MSI)现象,引起靶基因突变失活^[44-49]。这种有趣的现象使遗传学和表观遗传学之间建立起了桥梁,为研究两者之间的联系提供了思路^[50]。基因CpG岛的这种甲基化修饰具有可遗传性,能够对发育、生理、环境、病理等不同的信号作出反映,使遗传信息的表达按一定程序发生变化,参与完成细胞的时空调控和适应调控,在胚胎发育障碍等先天性疾病以及恶性肿瘤发病机制中起至关重要的作用。

2.3 实施路线 甲基化寡核苷酸技术的实施路线包括: (1)MON的设计与合成: MON是包含20余个碱基的一小段寡核苷酸片段,与目的基因启动子区对应位置的碱基序列完全相同,不同的是MON片段中的5'端CpG二核苷酸中的胞嘧啶环5位碳原子发生甲基化(m5CpG)。而GenBank数据库中原有的目的基因启动子区的CpG二核苷酸并未发生甲基化修饰(CpG)。MON片段设计时应注意至少包含3个CpG二核苷酸,理论上MON片段中所含的m5CpG越多越好,这样才能达到更好的甲基化诱导效果。为了防止在细胞中被酶降解,寡核苷酸片段还需进行硫代磷酸化等修饰,此外还可以标记荧光来示踪,同时还需要设计非甲基化寡核苷酸片段(unmethylated oligonucleotides, UMON)作为对照。UMON碱基序列与MON完全相同,不过没有进行CpG二核苷酸甲基化修饰。MON的合成与引物合成一样,可由DNA自动合成仪来完成,价格比较低廉。(2)MON的作用: 针对体外细胞的应用,通常采用的是脂质体介导的基因转染,体内实验的资料目前不多。目前把MON导入体内外的基因转染方法主要有两大类: 一类为病毒介导法,即利用去掉了致病基因的病毒序列作为载体,将外源靶基因导入靶细胞内,常用的有逆转录病毒、疱疹和腺病毒等改建的病毒载体; 另一类为非病毒介导法,包括物理法(显微注射、气溶胶、基因枪和缝线等)、化学法(磷酸钙沉淀法、脂质体法和葡聚糖法等)和生物学法(细胞融合法和受体法等)。(3)效果评价: 提取基因组DNA和总RNA以及蛋白质,采用甲基化特异性PCR(MSP)、亚硫酸氢盐测序(BSP)、RT-PCR、Western blot等手段进行相关的分析。其中, MSP法可以了解是否发生了特异性的甲基化诱导, BSP可以对那些发生了甲基化的CpG进行精确

定位^[51-53]. RT-PCR、Western blot则可以从不同分子水平判断基因灭活的效果及其他相关分析.

2.4 应用现状和前景 特别要指出的是, 我们所说的“甲基化寡核苷酸”和国内外某些同行已经报道的“甲基化寡核苷酸”名称虽一样, 但却有着本质的区别^[54-56]. 这些研究者报道的甲基化寡核苷酸本质上是一种修饰的反义RNA片段, 所说的甲基是指用甲基取代核苷酸间的磷酸酯上的氧原子, 目的是为了保持在细胞内稳定性, 不被核酸酶降解. 而我们所说的甲基化寡核苷酸中的甲基, 是指在寡核苷酸的5'端CpG二核苷酸的胞嘧啶第5位碳原子上共价结合一个甲基基团, 目的是为了特异性地诱导同源靶基因启动子甲基化致转录沉默^[57-59]. 两者的甲基锚着位点和作用原理是不同的.

目前甲基化寡核苷酸技术的应用多集中在肿瘤细胞系^[60-61], 这实际上就是把他作为一种基因沉默的工具应用到过度表达的肿瘤相关基因的研究中, 借此观察这些靶基因的功能. 甲基化寡核苷酸技术在此所起的作用可以用前述的其他基因沉默工具代替. 然而, 甲基化寡核苷酸技术尚具有基因敲除等技术所不能代替的优点. 例如, 针对肿瘤细胞中抑癌基因启动子发生甲基化而失活, 我们就可以将正常的组织细胞或动物模型作为研究对象, 采用甲基化寡核苷酸技术来诱导其发生甲基化而失活, 模拟肿瘤细胞和组织中该基因的甲基化行为, 从而生动地再现肿瘤细胞和组织中抑癌基因甲基化灭活的过程, 达到相关研究的目的. 这主要是基于甲基化寡核苷酸技术的作用机制和肿瘤细胞中的抑癌基因的基因型. 实际上肿瘤相关基因启动子高甲基化导致转录沉默, 甚至发生MSI突变方面的文献数不胜数^[44-49]. 因此, 甲基化寡核苷酸技术的应用大有前景, 而这正是其他基因沉默工具所不能比拟的. 目前甲基化寡核苷酸技术应用于体内实验的资料不多, 毒副作用的研究很少, 和反义寡核苷酸技术以及干扰RNA技术等其他基因治疗手段存在的问题一样. 如何高效、靶向、安全地把这种神奇的甲基化寡核苷酸片段应用到个体体内是目前存在的问题之一, 这有赖于靶向载体研究的进展.

3 结论

人类表观基因组协会于2003/01正式宣布开始投资和实施人类表观基因组计划(Human

Epigenome Project, HEP)^[62]. HEP的提出和实施, 标志着与人类发育和肿瘤疾病密切相关的表现遗传学和表观基因组研究又跨上了一个新的台阶^[63-64]. HEP不仅可进一步完善人类基因组注释, 而且对于进一步了解人类发育机制本质, 探寻与人类发育和肿瘤疾病相关的表现遗传学机制具有重要而深远的意义, HEP最终目标就是要确认这些DNA甲基化位点在人类基因组的分布与频率^[65-66]. 利用甲基化寡核苷酸技术, 我们可以有效地灭活特定的靶基因, 便捷地在细胞和动物体内生动地再现抑癌基因甲基化导致转录失活的过程. 因此, 甲基化寡核苷酸技术的出现不仅为基因功能研究提供了一个有力的工具, 而且为表现遗传学和表观基因组学的研究提供了一个非常良好的平台.

4 参考文献

- 1 Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-512
- 2 Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-106
- 3 Schmidt-Suppran M, Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol* 2007; 8: 665-668
- 4 Nolden L, Edenhofer F, Haupt S, Koch P, Wunderlich FT, Siemen H, Brustle O. Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase. *Nat Methods* 2006; 3: 461-467
- 5 Haupt S, Edenhofer F, Peitz M, Leinhaas A, Brustle O. Stage-specific conditional mutagenesis in mouse embryonic stem cell-derived neural cells and postmitotic neurons by direct delivery of biologically active Cre recombinase. *Stem Cells* 2007; 25: 181-188
- 6 Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 347-355
- 7 Roehr B. Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 1998; 4: 14-16
- 8 So A, Rocchi P, Gleave M. Antisense oligonucleotide therapy in the management of bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2005; 15: 320-327
- 9 Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, Lobsiger CS, Ward CM, McAlonis-Downes M, Wei H, Wancewicz EV, Bennett CF, Cleveland DW. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 2290-2296
- 10 Gebiski BL, Errington SJ, Johnsen RD, Fletcher S, Wilton SD. Terminal antisense oligonucleotide modifications can enhance induced exon skipping. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 622-970-973
- 11 Verma NK, Dey CS. RNA-mediated gene silencing: mechanisms and its therapeutic applications. *J Clin Pharm Ther* 2004; 29: 395-404
- 12 Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra

同行评价
本文研究领域新,
论述全面, 文笔流
畅, 值得注意和重
视.

- P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 657-685
- 13 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 14 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002; 418: 38-39
- 15 Lenz G. The RNA interference revolution. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1749-1757
- 16 Bernards R. The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2006 for the discovery of RNA interference. *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150: 2849-2853
- 17 Shah JK, Garner HR, White MA, Shames DS, Minna JD. siR: siRNA Information Resource, a web-based tool for siRNA sequence design and analysis and an open access siRNA database. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 178
- 18 Mamidipalli S, Palakal M, Li S. OligoMatcher: analysis and selection of specific oligonucleotide sequences for gene silencing by antisense or siRNA. *Appl Bioinformatics* 2006; 5: 121-124
- 19 Bagasra O. RNAi as an antiviral therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1463-1474
- 20 Rossi JJ. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques* 2006; Suppl: 25-29
- 21 Watanabe T, Umehara T, Kohara M. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev* 2007
- 22 Ma Y, Chan CY, He ML. RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5169-5179
- 23 Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol* 2002; 4: 111-128
- 24 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-1070
- 25 Kiefer JC. Epigenetics in development. *Dev Dyn* 2007; 236: 1144-1156
- 26 Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 107-116
- 27 Hatada I. Emerging technologies for genome-wide DNA methylation profiling in cancer. *Crit Rev Oncog* 2006; 12: 205-223
- 28 Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol* 2005; 205: 172-180
- 29 Plass C, Smiraglia DJ. Genome-wide analysis of DNA methylation changes in human malignancies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 310: 179-198
- 30 Herman JG. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 329-333
- 31 Ballestar E, Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1103-1109
- 32 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
- 33 Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 2003; 190: 125-133
- 34 Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 687-692
- 35 Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3156-3165
- 36 Maeda G, Chiba T, Aoba T, Imai K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. *Odontology* 2007; 95: 24-29
- 37 Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D, Louis DN. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene* 2007; 26: 583-593
- 38 Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Avino FJ, Dominguez M. Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 2006; 439: 430-436
- 39 Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, Gonzalez-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4116-4121
- 40 Zhu X, Leav I, Leung YK, Wu M, Liu Q, Gao Y, McNeal JE, Ho SM. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2004; 164: 2003-2012
- 41 Szyf M, Detich N. Regulation of the DNA methylation machinery and its role in cellular transformation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 69: 47-79
- 42 Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, Teramoto S, Matsuse T. A methylated oligonucleotide induced methylation of GSTP1 promoter and suppressed its expression in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2004; 212: 211-223
- 43 Yao X, Hu JF, Daniels M, Shiran H, Zhou X, Yan H, Lu H, Zeng Z, Wang Q, Li T, Hoffman AR. A methylated oligonucleotide inhibits IGF2 expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2003; 111: 265-273
- 44 Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Ohnishi M, Fuchs CS. 18q loss of heterozygosity in microsatellite stable colorectal cancer is correlated with CpG island methylator phenotype-negative (CIMP-0) and inversely with CIMP-low and CIMP-high. *BMC Cancer* 2007; 7: 72
- 45 Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, Compton C, Mayer RJ, Goldberg R, Bertagnolli MM, Boland CR. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007; 132: 127-138
- 46 Ogino S, Kawasaki T, Ogawa A, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. TGFBR2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer. *Hum Pathol* 2007; 38: 614-620
- 47 Kang S, Lee JM, Jeon ES, Lee S, Kim H, Kim HS, Seo SS, Park SY, Sidransky D, Dong SM. RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with

- BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 1316-1321
- 48 Noda H, Kato Y, Yoshikawa H, Arai M, Togashi K, Nagai H, Konishi F, Miki Y. Microsatellite instability caused by hMLH1 promoter methylation increases with tumor progression in right-sided sporadic colorectal cancer. *Oncology* 2005; 69: 354-362
- 49 Park HW, Kang HC, Kim IJ, Jang SG, Kim K, Yoon HJ, Jeong SY, Park JG. Correlation between hypermethylation of the RASSF2A promoter and K-ras/BRAF mutations in microsatellite-stable colorectal cancers. *Int J Cancer* 2007; 120: 7-12
- 50 Murrell A, Rakyen VK, Beck S. From genome to epigenome. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R3-R10
- 51 Beier V, Mund C, Hoheisel JD. Monitoring methylation changes in cancer. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007; 104: 1-11
- 52 Yan PS, Wei SH, Huang TH. Methylation-specific oligonucleotide microarray. *Methods Mol Biol* 2004; 287: 251-260
- 53 Kim B, Kim H, Song BJ, Cha SH, Lee MO, Park SH. Oligonucleotide DNA chips are useful adjuncts in epigenetic studies of glioblastomas. *Neuropathology* 2006; 26: 409-416
- 54 廖锦民. 甲基化寡聚核苷酸作为靶基因抑制剂的研究进展. *生命科学* 1993; 5: 17-19
- 55 Miller PS. Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents. *Bio/technology* 1991; 9: 358-362(熊克勇. 用甲基化的寡聚核苷酸做反义制剂. *生物工程进展* 1992; 12: 15-19)
- 56 Hashimoto S, Sakai M, Muramatsu M. 2'-O-methylated oligonucleotides in ribosomal 18S and 28S RNA of a mouse hepatoma, MH 134. *Biochemistry* 1975; 14: 1956-1964
- 57 Butler JS, Lee JH, Skalik DG. PAGE separation of hemi-methylated or unmethylated oligonucleotide substrates to distinguish between maintenance and de novo DNA methyltransferase activity. *J Biochem Biophys Methods* 2006; 68: 195-199
- 58 Gonzalgo ML, Liang G. Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) for quantitative measurement of DNA methylation. *Nat Protoc* 2007; 2: 1931-1936
- 59 Gonzalgo ML, Jones PA. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Methods* 2002; 27: 128-133
- 60 于海文, 吴泰璜, 穆庆龄, 郑海涛, 陈军. HGF甲基化寡核苷酸对肝癌细胞系BEL-7402作用的研究. *中国现代普通外科进展* 2004; 7: 93-97
- 61 李文欢, 崔屹, 朱菊人. 甲基化寡核苷酸抑制MRP2表达逆转人肝癌细胞HepG2多药耐药的研究. *癌症* 2004; 23: 900-904
- 62 Bradbury J. Human epigenome project--up and running. *PLoS Biol* 2003; 1: E82
- 63 Rauscher FJ 3rd. It is time for a Human Epigenome Project. *Cancer Res* 2005; 65: 11229
- 64 Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 2006; 15: R95-101
- 65 Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1121-1125
- 66 Eckhardt F, Beck S, Gut IG, Berlin K. Future potential of the Human Epigenome Project. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 609-618

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定:A级、B级、C级、D级、E级、不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.