

基因的异常甲基化在胰腺癌发生发展中作用的研究进展

金 桐, 张晓云, 郝建宇

金桐, 张晓云, 郝建宇, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科 北京市 100020

郝建宇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事胰腺疾病、消化系肿瘤的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81172319

作者贡献分布: 郝建宇提出研究思路、论文出发点、主要研究方向及后期修改工作; 金桐与张晓云负责文献收集整理及论文写作。

通讯作者: 郝建宇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100020, 北京市朝阳区工体南路8号, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科. haojianyu@medmail.com.cn
电话: 010-85231714

收稿日期: 2015-04-29

修回日期: 2015-06-12

接受日期: 2015-09-18

在线出版日期: 2015-12-18

Abnormal methylation in pancreatic cancer

Tong Jin, Xiao-Yun Zhang, Jian-Yu Hao

Tong Jin, Xiao-Yun Zhang, Jian-Yu Hao, Department of Gastroenterology, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81172319

Correspondence to: Jian-Yu Hao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, 8 Gongti South Road, Beijing 100020, China. haojianyu@medmail.com.cn

Received: 2015-04-29

Revised: 2015-06-12

Accepted: 2015-09-18

Published online: 2015-12-18

Abstract

Pancreatic cancer is one of the most aggressive

malignancies in the world and has a poor prognosis. Since most cases have already had local invasion or distant metastasis at diagnosis, they usually lost the opportunity for effective surgical resection. Thus, early detection and treatment are of great clinical significance for reducing mortality. Epigenetic changes play an important role in the occurrence of cancers. Abnormal methylation is an important part of epigenetic theory. Here we discuss abnormal methylation of multiple genes in pancreatic cancer, with an aim to find methods of early diagnosis and treatment for this devastating disease.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Methylation; Epigenetic changes; Pancreatic cancer

Jin T, Zhang XY, Hao JY. Abnormal methylation in pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(35): 5581-5590 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/5581.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i35.5581>

摘要

胰腺癌是侵袭性最高的恶性肿瘤之一, 其恶性程度高, 预后极差, 通常在诊断同时已伴有局部侵袭或者远处转移的症状, 失去了进行有效手术切除的机会. 其较高的病死率和逐步上升的发病率迫使我们对其发病机制进行更为深入的探索, 以达到早诊早治的目的. 表观遗传学改变在恶性肿瘤发生发展过程中起着重要作用, 其中基因的异常甲基化改变便是表观遗传学理论的重要组成部分, 本文探讨胰腺癌发病过程中涉及到多个基

背景资料

胰腺癌相关流行病学调查显示, 欧洲发达国家及我国的胰腺癌均呈逐年上升趋势, 但目前尚缺乏早期诊断及治疗的有效措施, 近年来随着表观遗传学的发展及研究的不断深入, 发现胰腺癌的发生除涉及多种基因的功能异常, 如基因的突变、缺失, 同时还存在表观遗传学改变. DNA的甲基化是表观遗传学理论的重要组成部分之一, 与胰腺癌发生、进展、诊断、治疗及预后均有密切联系。

同行评议者

王铮, 副研究员, 西安交通大学医学院第一附属医院肝胆病医院肝胆外科

■ 研究前沿

许多人将胰腺癌成为“癌中之王”, 关于胰腺癌的发病机制、早期诊断及治疗等问题一直以来是该领域的研究热点及重点。人类表观基因组计划(HEP)大规模检测人类基因组中的甲基化位点, 绘制人类基因组中甲基化可变位点; 高通量测序技术的开展, 使得更多胰腺癌相关异常甲基化基因被发现。但基因异常甲基化的启动与调节的具体分子机制尚不清楚, 如何将其应用于临床患者早期诊断及治疗中尚缺乏大样本的临床研究。

因的异常甲基化改变, 旨在为胰腺癌的早期诊断及治疗提供新的思路。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 甲基化; 表观遗传学改变; 胰腺癌

核心提示: 胰腺癌恶性程度、预后极差。近年研究发现基因异常甲基化改变在胰腺癌的发生发展过程中起重要作用。本文就胰腺癌发病过程中涉及多个基因的异常甲基化改变进行阐释, 为胰腺癌早期诊断、治疗提供新思路。

金桐, 张晓云, 郝建宇. 基因的异常甲基化在胰腺癌发生发展中作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2015; 23(35): 5581-5590 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/5581.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i35.5581>

0 引言

胰腺癌是世界上侵袭性最高的恶性肿瘤之一, 位列世界范围内常见肿瘤死亡原因第5位^[1,2], 其诊断后中位生存期不足6 mo, 且预后极差, 5年生存率<6%。接近80%的患者在诊断同时已伴有局部侵袭或者远处转移症状, 失去了进行有效手术切除的机会^[3]。在我国, 胰腺癌发病率相较于过去的几十年有显著提高^[4], 究其原因, 其一与人们生活方式的改变、环境的变化有密切关系, 二是胰腺癌作为一种老龄化疾病, 其发病率随着我国老龄化群体的增加而增加, 三是随着医疗技术的不断发展, 新的诊断技术能帮助我们发现不同临床分期的肿瘤, 从而从另一个侧面导致胰腺癌发病率的增加^[5]。然而, 近期的流行病学调查结果提示, 在我国上海, 目前胰腺癌每年的死亡人数几乎与其发病人数持平^[5], 其较高的病死率和逐步增加的发病率迫使我们对其发生及进展的机制进行更进一步的探索, 寻求敏感性更高、特异性更强的诊断方法, 以及更有针对性的治疗手段, 达到早期预防、早期诊断和治疗的目的。胰腺癌的发生涉及多种基因的功能异常, 如基因的突变、缺失及表观遗传学改变等, DNA的甲基化是表观遗传学理论的重要组成部分之一, 与胰腺癌发生、进展、诊断、治疗及预后均有密切联系, 成为当前胰腺癌诊断及治疗领域的研究热点, 目前正引起国内外学者的广泛关注及探讨。

1 DNA的甲基化

DNA甲基化是在DNA甲基化转移酶家族(DNA methyltransferases, DNMTs)的催化下, 以S2腺苷蛋氨酸(S2 adenosylmethionine, SAM)作为甲基供体, 将活化的甲基引入DNA双链中胞嘧啶的5位碳原子上, 形成5甲基胞嘧啶的过程。研究已经证实, CpG二核苷酸区域是DNA甲基化发生的主要位点, 在基因的转录调控区常成簇存在着富含CpG的DNA片段, 在此区域内约每10 bp就出现一个CpG位点, 长度通常在1-2 kb左右, 称为CpG岛。约40%的基因启动子区域都含有CpG岛^[6], 在健康人基因组中CpG岛中的CpG位点通常处于非甲基化状态, 而在CpG岛外的CpG位点则通常是甲基化的。

根据结构和功能的差异, 通常将甲基转移酶分为3种, 以DNMT1和DNMT3为代表, 前者主要作用是维持基因的甲基化状态, 同时参与非CpG位点从头甲基化过程, 并与甲基化状态的延伸相关; 后者包括DNMT3A、DNMT3B以及DNMT3L等, 是主要的从头甲基化酶, 而DNMT2的功能与属性尚不明确。

DNA甲基化状态并未改变核苷酸的顺序及组成, 但其在基因表达的调控方面起着重要作用, 尤其是在转录起始阶段, 发挥其生物学作用。基因启动子区域内CpG岛甲基化导致众多基因下调, 此种作用是通过阻碍转录因子与启动子结合, 降低基因转录, 同时结合转录抑制子, 进而引起基因沉默。近年来的研究^[7]表明, DNA甲基化还可以改变染色质结构, 也可间接介导转录抑制。

2 基因的异常甲基化与肿瘤

DNA甲基化与癌症的发生及进展有着密切的联系, DNA的异常甲基化改变通常包括异常高甲基化(hypermethylation)和低甲基化(hypomethylation)两种不同状态。目前普遍认为, 基因启动子区及其附近的DNA异常高甲基化意味着基因的沉默, 而低甲基化则意味着基因的激活。对于不同肿瘤细胞的DNA分析表明, 癌细胞中出现基因突变的概率低于预期^[8], 而在转录范围内检测结直肠癌中由启动子区域高甲基化引起的基因沉默, 最终得出结论高达5%的已知抑癌基因在癌细胞中发生了异常的启动子区域高甲基化^[9], 由此推测, 相较基因

突变, DNA的异常甲基化改变在细胞恶变过程中可能发挥了更为重要的作用。

相较于正常细胞, 肿瘤细胞基因组的甲基化水平发生了很大的改变, 具体表现为, 整个基因组DNA的低甲基化和局部启动子区域CpG岛异常高甲基化。

3 DNA的异常高甲基化与胰腺肿瘤

对于癌细胞基因组DNA的异常甲基化改变, 特别是DNA高甲基化导致的抑癌基因表达沉默于胰腺癌的关系已经进行了大量的研究。研究证实, DNA的高甲基化与肿瘤细胞逃避凋亡、获得持续增殖信号、对生长抑制信号不敏感、组织浸润和转移、获得无限复制潜能等方面均密切相关。

3.1 逃避细胞凋亡 一般情况下, 细胞在接触抑制、辐射、凋亡信号分子等刺激时会发生凋亡, 但是癌细胞却可以不受凋亡的控制, 而大量分裂增殖。

RAS相关区域家族1(RAS association domain family 1, RASSF1), 其一种转录本*RASSF1A*已被确认为是一种候选肿瘤抑制基因, 研究^[10]认为, *RASSF1A*基因主要具有促进细胞凋亡和衰老的功能, 进一步分析表明, 这种作用可能是通过抑制Ras途径得以实现的。Dammann等^[11]的研究发现, 在45例胰腺癌组织样本中, 29例(64%)检测出了*RASSF1A*基因启动子甲基化以及*K-ras*的突变, 甲基化的发生与否同肿瘤的分期无明显相关性; 同时在其培养的8种人类胰腺癌细胞系中, 7种(88%)检测出了*RASSF1A*基因通过甲基化失活以及*K-ras*的异常激活, 从而得出结论, *RASSF1A*基因通过抑制Ras系统激活而起到其抑制细胞生长、促进细胞凋亡的作用, 而其启动子区域的异常甲基化使*RASSF1A*基因失活, 削弱了其Ras系统抑制作用, 进而导致细胞逃避死亡, 诱导肿瘤的发生。有趣的是, Agathangelou等^[10]、Dammann等^[11]通过对慢性胰腺炎组织*RASSF1A*表达及*K-ras*突变的分析, 推断*RASSF1A*基因的甲基化与否, 是胰腺炎症和衰老进展的一部分, 并且预示着胰腺慢性病向胰腺恶性肿瘤进展的可能。

分泌型凋亡相关蛋白2(secreted apoptosis-related protein 2, *SARP2*)目前被认为是胰腺癌异常甲基化的靶基因之一, 作为SARP家族成

员, 通过作用于Wnt-卷曲蛋白信号通路, 调节细胞的凋亡。其启动子区域的异常高甲基化导致基因的失活, 抑制细胞的凋亡, 进而促进胰腺恶性肿瘤的发生及进展^[12,13]。有研究报道, *SARP2*基因在体外培养的胰腺癌细胞系中甲基化率为91%(20/22), 而在原发胰腺癌组织样本中的甲基化率达95%(40/42)^[14], 胰液中该基因的甲基化率为79%^[13]。

抑癌基因泛素羧基末端水解酶1(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, *UCHL1*)启动子区域内存在49个甲基化位点, 作为泛素蛋白酶体成员, 能控制细胞内的蛋白质的稳定性, 直接转印泛素蛋白底物和释放从串联共轭的单体泛素^[15,16]。*UCHL1*在多种肿瘤中可被确定为肿瘤特异性的甲基化基因, 包括启动子甲基化沉默的鼻咽癌^[17,18]、食管鳞状细胞癌^[19,20]、胃癌^[21]、肝细胞癌^[21]、结直肠癌^[21]、肾细胞癌^[22]、卵巢癌^[23]等。*UCHL1*基因的抑癌机制目前尚不十分明确, 而近期的研究表明*UCHL1*通过延长p53和p14ARF的半衰期, 减少MDM2的半衰期, 进而激活p53通路引起细胞凋亡。Sato等^[14]研究发现, 在其纳入研究的原发胰腺癌组织及体外培养的胰腺癌细胞系中, 100%检测出了*UCHL1*基因异常甲基化, 而在正常胰腺组织样本中则未见其甲基化, 进一步运用RT-PCR方法检测该基因的表达, 得出结论在胰腺癌组织中该基因并不表达, 而去甲基化药物(5-Aza-dC)作用后*UCHL1*表达增加, 从而得出结论, 在胰腺癌细胞中, 异常的高甲基化使抑癌基因*UCHL1*失活, Sato等^[14]认为包括该基因在内的5个基因(*UCHL1*、*NTPX2*、*SARP2*、*CLDN5*以及*reprimin*)的异常甲基化可以用于早期胰腺癌筛查的新手段之一。Kato等^[24]针对*UCHL1*基因的研究得出结论, 如若作为独立的检测指标, 胰液及胆汁引流中*UCHL1*基因的异常甲基化在诊断胰腺导管恶性肿瘤的敏感性约为70%(胰液引流67%, 胆汁引流70%), 而其特异性为100%。而与*RUNX3*基因的异常甲基化共同检测, 可将敏感性提高至90%(胰液引流87%, 胆汁引流97%), 因此作者认为可以将胰液及胆汁引流中*UCHL1*联合*RUNX3*异常甲基化检测作为早期胰腺胆道恶性肿瘤筛查的有效指标。

3.2 对生长抑制信号不敏感 细胞生长抑制因

■创新盘点

本文对近十年有关基因异常甲基化与胰腺癌发生、发展分子机制的研究进行了综述, 并阐述了基因甲基化在早期诊断及去甲基化药物在治疗中的作用, 体现转化医学的思维方式。

应用要点

如何对胰腺癌进行早期诊断和给予特异性的治疗, 目前仍是一个临床难题. 该文章从表观遗传学相关概念、胰腺癌相关甲基化基础研究到应用组织相关特异性基因异常甲基化进行早期诊断、去甲基化药物的研发, 对表观遗传学在临床中的应用前景进行展望, 为胰腺癌的早期诊断及治疗提供新的思路.

子对细胞生长的调控存在多种机制, 其中由pRb参与的G₁/S检测点调控尤其重要. 未磷酸化的pRb与E2F结合, 阻止细胞从G₁期进入S期. 通常情况下p16蛋白与CDK4/6结合, 阻止CDK复合物与周期蛋白D结合, 使pRb不能磷酸化. *p16*基因的启动子区域甲基化后, 其表达被抑制, 使得p16蛋白依赖的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)生长抑制信号通路失去作用^[25]. 20世纪末的研究证实了约95%的胰腺癌组织检测出*K-ras*突变和P16INK4a失活^[26], Ueki等^[27]对45例胰腺癌组织进行了多基因的甲基化研究, 并发现其中18%的组织样本可以检测出*p16*基因的甲基化, 并在其随后的研究中证实了该基因在原发胰腺癌及体外培养的胰腺癌细胞系中均检测出启动子甲基化, 并进一步推测可将*p16*基因甲基化作为早期胰癌筛查指标之一, 以期提高早期胰腺癌检出率^[28]. Fukushima等^[29]收集了不同分期的胰腺导管上皮内瘤变(pancreatic intraductal neoplasia, PanIN)病例118例, 在其组织样本中检测*p16*基因的甲基化, 随着PanIN分级水平的增高, *p16*基因的甲基化水平也逐步升高, 进而得出结论, *p16*基因甲基化提示着胰腺导管上皮细胞恶变的可能.

NPTX2(neuronal pentraxin II)基因是神经元五聚蛋白(neuronal pentraxin, NP)家族成员, 位于7号染色体长臂(7q21.3-q22.1), 此家族目前由*NPTX1*、*NPTX2*、*NPTR*(neuronal pentraxin receptor)三个成员组成^[30]. NP家族与C反应蛋白等急性反应蛋白同源, 并且与神经突触的重塑相关^[31]. 研究证实了*NPTX2*具有抑制肿瘤细胞增殖、侵袭及远处转移的作用, 其通过阻滞细胞于G₀/G₁期发挥其诱导凋亡作用, 机制可能涉及p53的激活, 细胞周期蛋白D的下调等^[32]. 而在针对恶性胶质瘤的研究中, 进一步证实*NPTX2*抑制细胞生长的作用是通过*NPTX2*-p53-PTEN信号通路、并联合核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路得以实现的, 而该基因的甲基化使其沉默而促进肿瘤的发生及进展^[33]. 实验证明, 在体外培养的胰腺癌细胞系及原发胰腺癌组织样本中, *NPTX2*通常是以甲基化形式存在的, 因此导致了该基因的失活, 而在正常胰腺组织却未检测出甲基

化, 并且进一步证实, 去甲基化药物(5-Aza-dC)可以引起该基因的表达上调^[34]. Brune等^[35]通过研究发现, *KRAS2*基因的突变、TP53和SMAD4的失活以及包括*NPTX2*在内的7中特定基因的异常甲基化[*FoxE1*、*NPTX2*、*CLDN5*、*p16*、*TFPI-2*、*SPARC*、前脑啡肽原(preproenkephalin, *ppENK*)]既可以作为早期诊断散发胰腺癌的指标, 又可以用于筛查家族遗传性胰腺癌, 联合基因的遗传学及表观遗传学改变, 有助于早期胰腺癌的检出. Park等^[36]认为, 可以将*NPTX2*基因异常甲基化作为可靠的诊断胰腺癌的血清学指标, 并可作为慢性胰腺炎向胰腺癌进展的有效的筛查指标.

大部分的癌细胞不需要外界的生长刺激因子的作用就可以完成增殖, 原因是细胞内的信号转导通路发生了变化, 导致促增殖因子作用的增强.

*ppENK*是重要的内源性阿片肽前体, 而内源性阿片肽系统是一个庞大而复杂的系统, 阿片肽类物质对机体所有的生理系统都有影响, 起着神经递质、调质或激素样作用. *ppENK*基因产物蛋氨酸脑啡肽(methionine-enkephalin, Met-ENK), 也称阿片类生长因子(opioid growth factor, OGF)联系着神经、免疫两大系统, 具有独特的生物学活性, Zagon等^[37,38]使用多种癌细胞系, 通过一系列体外、体内实验证明, 蛋氨酸脑啡肽能够抑制肿瘤细胞增殖. 蛋氨酸脑啡肽抗肿瘤功能已被大量的体内、体外实验所证实. Smith等^[39]在进行了胰腺癌细胞体外培养、裸鼠移植实验的基础上, 对不能进行手术切除的晚期胰腺癌患者采用蛋氨酸脑啡肽进行了I期临床实验, 取得了良好效果. Ueki等^[40]运用甲基化特异性扩增的方法7个CpG岛在胰腺癌细胞株和正常胰腺组织中甲基化是不同的, 其中*ppENK*基因是93%甲基化, 而在正常胰腺中则无甲基化, 作者认为*ppENK*的异常甲基化及其转录抑制是胰腺癌发生的普通事件. 另有研究^[29,41]显示, 在侵袭性导管腺癌, 15例中有14例表现为*ppENK*甲基化, 非肿瘤胰腺上皮不表现甲基化, 并且随着PanIN分级升高, *ppENK*甲基化比例增加. 一项对胰液的研究^[42]通过插管获得并避免十二指肠分泌的纯胰液, 如检测到甲基化, 意味着胰腺腺癌的存在.

3.3 诱导新血管生成 新血管的生成是恶性肿瘤发生中重要的步骤, 新血管生成首先需要金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)分解细胞外基质, 继而通过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导血管生成. 组织金属蛋白酶抑制剂3(metalloproteinase inhibitor 3, TIMP3)可抑制金属蛋白酶的活性, 同时与VEGFR2结合阻止血管生成^[43], 肿瘤细胞中TIMP3的下调有一部分原因是由于启动子区域的甲基化引起的^[44,45]. Ueki等^[40]的研究发现, 11%的胰腺癌组织以及体外培养的胰腺癌细胞系中检测出TIMP3基因甲基化, 而在正常胰腺组织中未检测出该基因甲基化, 提示着基因的异常高甲基化参与肿瘤新生血管的生成, 进而促进的胰腺恶性肿瘤的生长及进展.

3.4 组织的浸润和转移 组织浸润和转移是细胞恶变的重要特征, 近年来这方面的研究进展迅速. 细胞骨架的异常调节与肿瘤转移密切相关. 正常情况下, 由 α -连环蛋白(α -catenin)把 β -连环蛋白(β -catenin)和E-cadherin固定到胞内肌动蛋白纤维上来加固细胞连接^[46]. 转移的癌细胞E-cadherin普遍表达下降. 研究发现, E-cadherin表达下降是通过启动子区域的甲基化来实现的, 而氮胞苷(DNA甲基化酶抑制剂)可以上调E-cadherin的表达. Winter等^[47]研究表明, 部分胰腺癌组织检测出E-cadherin基因下调, 并进一步证实与该基因启动子区域甲基化相关.

富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)曾被称作骨连接蛋白(osteonectin, ON)、基底膜-40(BM-40)或43 kDa蛋白. 与肿瘤的发生和进展密切相关, 同时与肿瘤的侵袭和转移关系密切. 在体外细胞培养中, 外源性的SPARC可以诱导细胞形态改变、减少细胞间的黏附、使细胞骨架重排, 进而促进肿瘤细胞局部侵袭及转出转移, 同时抑制细胞基质蛋白质的合成, 诱导多种蛋白酶(如胶原酶、间质降解酶和明胶酶等)的合成来降解细胞基质蛋白质. 不仅如此, SPARC还可以增加内皮细胞的通透性, 损害其屏障功能^[48]. 有研究发现, SPARC能促进基底膜的溶解和内皮细胞的移动. 其水解产物M钙离子结合肽, 能刺激血管生成和细胞生长. 外源性的SPARC还可以降

低血管生成抑制剂的浓度, 促进血管生成^[49]. Sato等^[50]通过研究发现, 在体外培养的胰腺癌细胞系中, 94%(16/17)检测出了该基因的异常甲基化, 在正常胰腺导管上皮细胞及成纤维母细胞中则未检出, 而在收集的24例胰腺组织样本中, 88%(21/24)检测出了该基因的异常甲基化.

3.5 无限的复制潜能 癌细胞无限的复制潜能主要与端粒酶活性的升高有关. 端粒酶可在转录水平解决DNA复制时末端缺失的问题. 正常情况下端粒酶只有在受精卵和干细胞中才有活性, 而肿瘤细胞大多具有高活性的端粒酶. 端粒酶的重要组成部分-人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的活性与端粒酶活性高度相关^[51]. 普遍认为hTERT启动子区域异常高甲基化可以激活该基因, hTERT基因启动子区域包含原癌基因c-myc及转录因子E2F1结合位点及CpG岛, 意味着该基因由遗传因素及包括甲基化在内的表观遗传学作用共同调控. Kumari等^[52]研究了去甲基化药物5-Aza对于体外培养的胰腺癌细胞端粒酶活性的影响, 最终得出结论, 去甲基化作用协同c-myc及E2F1基因的沉默可以抑制hTERT基因表达, 认为在胰腺癌的发生发展中, 该基因的甲基化在一定程度上提高了端粒酶的活性, 从而使癌细胞获得了无限复制的潜能, 且作者认为去甲基化药物联合相关基因的沉默可以作为胰腺癌治疗的新的靶点.

■名词解释

CpG岛: 许多基因, 尤其在管家基因的启动子区, 基因末端通常存在一些富含双核苷酸“CG”的区域, 称为“CpG岛”(CpG island). 在人类基因组内GC的含量大约为40%; 但并非平均分布在基因组内, 其含量的差别在基因表达的调控和基因突变上起重要作用. 除定位于失活X染色体上的基因和印记基因外, 正常细胞的CpG岛由于被保护而处于非甲基化状态. 全基因组低甲基化、维持甲基化模式酶的调节失控和正常非甲基化CpG岛的高甲基化是人类肿瘤中普遍存在的现象.

4 DNA去(低)甲基化与胰腺肿瘤

与恶性肿瘤发生过程中DNA的异常高甲基化不同, DNA的去甲基化既包括以原癌基因为主的特定的低甲基化, 还包括基因组范围内DNA整体水平的低甲基化. 而近期研究充分证明, 在胰腺癌发生及进展过程中, 特定原癌基因的异常低甲基化同样发挥了重要作用.

癌基因Vav属Dbl癌基因家族成员之一, 是一种鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF), 也是Rho家族小GTP激酶的激活物, 对RhoA、Rac1及Cdc42等有激活作用. 哺乳动物Vav蛋白有Vav1、Vav2以及Vav3. Vav1主要在造血干细胞表达, Vav2、Vav3则分布相当广泛^[53]. Fernandez-Zapico等^[54]研究发现, Vav基因阳性的胰腺癌

同行评价

文章从热点出发, 研究胰腺癌和甲基化的关系, 将表观遗传学相关基础研究进展与临床实际应用相结合, 为胰腺癌的早期诊断与治疗提供了新思路, 对临床有重要意义。

患者预后相对于*Vav*基因阴性者差, 证实*Vav*基因与EGF受体协同作用, 在胰腺癌的发生过程中起到刺激肿瘤细胞增殖的作用, 而这种癌基因的异常表达是通过*Vav1*基因启动子低甲基化诱导产生的, 因此Martin认为, *Vav1*基因诱导肿瘤发生的途径可以作为胰腺癌治疗的新靶点。

黏蛋白(mucins, MUC)是一类高度糖基化的大分子蛋白, 与多种肿瘤的发生及进展密切相关^[55]。研究^[56-61]证明, MUC4在胰腺癌的发生、进展及远处转移过程中均起到重要作用, 并能逃避机体的免疫监视, 在胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)、PanINs中均有异常表达, 而在正常胰腺细胞中则不表达, 故以将MUC4的异常表达作为胰腺癌早期诊断、干预以及评估预后的指标之一。Vincent等^[62]证明, 包括DNA异常低甲基化以及组蛋白修饰介导的表观遗传学调控, 是MUC4诱导上皮细胞癌发生及进展的主要原因。而另一项研究^[63]表明, *MUC4*的异常低甲基化与胰腺导管腺癌的发生密切相关, 并且认为可以通过定量检测的方法, 早期诊断并评估胰腺癌的发生及发展。

5 DNA的甲基化与胰腺癌的早期诊断

以DNA的甲基化为主的表观遗传学的改变是细胞向恶性肿瘤基因进展的重要特征之一, 因此, 细胞DNA甲基化的变化可以作为癌症早期诊断的重要依据。欧洲学者正在进行的表观遗传学图谱(epigenomics roadmap program)的绘制可以预期将会发现更多的细胞癌变甲基化标记。甲基化特异的PCR技术(methylation-specific PCR, MSP)的出现, 使得细胞DNA甲基化水平的检测变得十分简单可行。同时由于甲基化特异性PCR具有高敏感性, 可以帮助我们进行胰腺癌早期诊断。日本学者收集了胰腺癌、慢性胰腺炎及正常患者的胰液, 运用定量甲基化特异性PCR(quantitative methylation-specific PCR, QMSP)以及荧光实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)等方法检测包括*p16*、*Cyclin D2*等在内的6个基因的甲基化程度, 实验证明, 通过对胰液中特定基因异常甲基化的测定, 可以更加准确区分胰腺癌变, 可以作为胰腺癌早期筛查的有效手段^[64]。

6 DNA的异常甲基化与胰腺癌的治疗进展

与基因的突变不同, 表观遗传学的改变大都是可逆的, 因此, 针对细胞的表观遗传学改变, 利用甲基化相关药物改变其基因组的甲基化状态, 可能成为治疗恶性肿瘤的新思路。目前主要有两种逆转方法: 一为DNA甲基转移酶的反义寡核苷酸, 其能抑制DNA甲基转移酶活性, 使甲基化的基因再表达; 二为胞苷类似物, 其能与DNA甲基化酶共价结合, 降低酶的生物活性, 从而激活被甲基化失活的基因。目前临床较为常用的胞苷类似物包括5-氮杂胞苷与地西他滨(decitabine), 针对体外培养的不同胰腺癌细胞系所进行的研究证实, 5-氮杂胞苷通过其去甲基化作用, 改变肿瘤细胞基因组的甲基化状态, 进而抑制肿瘤细胞增殖, 促进其凋亡^[65]。临床试验方面, 针对骨髓异常增生综合征以及急性粒细胞白血病的研 究已证实, 5-氮杂胞苷可以将患者CR率提高10%-17%, 并且有效延长患者生存期^[66,67]。但在胰腺癌领域, 5-氮杂胞苷与地西他滨等胞苷类似物疗效的研究尚处于I、II期临床研究阶段, 尚未得到切实的实验结论。而近期研究显示, 5-氮杂胞苷可以通过抑制的Wnt/ β -catenin^[68]及MEK^[69]信号通路抑制胰腺癌细胞的增殖, 这些信号通路可能为胰腺癌的治疗提供潜在新靶点。Zebularine(Zeb)目前作为临床前研发的去甲基化药物, 已经在相关实验中被证实为较为有效治疗胰腺癌的手段^[70,71]。甲基化抑制剂的研究才刚刚起步, 但已表现出巨大的潜力, 可以预想在将来会成为癌症治疗的一个重要方面。

7 结论

通过对胰腺癌发病机制的不断探索, 普遍认可了DNA的异常甲基化和胰腺癌的发生发展有着密切的关系。无论是异常的DNA高甲基化还是低甲基化都会导致基因的表达异常, 促进了正常细胞向恶性肿瘤的转化。与此同时, DNA的甲基化改变也为胰腺恶性肿瘤的诊断和治疗提供了一条新的思路。通过检测目的DNA的甲基化状态, 早期诊断胰腺癌的存在, 进而通过纠正DNA甲基化异常改变, 进一步阻止甚至逆转细胞的癌变。进一步阐明肿瘤细胞特异DNA甲基化改变的机制及与肿瘤发生发展的

关系, 将为最终攻克胰腺癌治疗难题提供新的思路.

8 参考文献

- 1 Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46: 765-781 [PMID: 20116997 DOI: 10.1016/j.ejca.2009.12.014]
- 2 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29 [PMID: 22237781 DOI: 10.3322/caac.20138]
- 3 Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011; 378: 607-620 [PMID: 21620466 DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0]
- 4 Guo X, Cui Z. Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in China. *Pancreas* 2005; 31: 13-22 [PMID: 15968242]
- 5 Long J, Luo GP, Xiao ZW, Liu ZQ, Guo M, Liu L, Liu C, Xu J, Gao YT, Zheng Y, Wu C, Ni QX, Li M, Yu X. Cancer statistics: current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in Shanghai, China. *Cancer Lett* 2014; 346: 273-277 [PMID: 24462819 DOI: 10.1016/j.canlet.2014.01.004]
- 6 Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 465-476 [PMID: 18463664 DOI: 10.1038/nrg2341]
- 7 Cvekl A, Duncan MK. Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26: 555-597 [PMID: 17905638]
- 8 Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, Winckler W, Laframboise T, Lin WM, Wang M, Feng W, Zander T, MacConaill L, Lee JC, Nicoletti R, Hatton C, Goyette M, Girard L, Majumdar K, Ziaugra L, Wong KK, Gabriel S, Beroukhim R, Peyton M, Barretina J, Dutt A, Emery C, Greulich H, Shah K, Sasaki H, Gazdar A, Minna J, Armstrong SA, Mellinghoff IK, Hodi FS, Dranoff G, Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF, Liao LM, Mertz K, Rubin MA, Moch H, Loda M, Catalona W, Fletcher J, Signoretti S, Kaye F, Anderson KC, Demetri GD, Dummer R, Wagner S, Herlyn M, Sellers WR, Meyerson M, Garraway LA. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 347-351 [PMID: 17293865]
- 9 Schuebel KE, Chen W, Cope L, Glöckner SC, Suzuki H, Yi JM, Chan TA, Van Neste L, Van Criekinge W, van den Bosch S, van Engeland M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG, Baylin SB. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet* 2007; 3: 1709-1723 [PMID: 17892325]
- 10 Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER, Latif F. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 2001; 20: 1509-1518 [PMID: 11313894]
- 11 Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812 [PMID: 12802288]
- 12 Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR. SARP: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13636-13641 [PMID: 9391078]
- 13 Watanabe H, Okada G, Ohtsubo K, Yao F, Jiang PH, Mouri H, Wakabayashi T, Sawabu N. Aberrant methylation of secreted apoptosis-related protein 2 (SARP2) in pure pancreatic juice in diagnosis of pancreatic neoplasms. *Pancreas* 2006; 32: 382-389 [PMID: 16670620]
- 14 Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003; 63: 3735-3742 [PMID: 12839967]
- 15 Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111: 209-218 [PMID: 12408865]
- 16 Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsue R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1945-1958 [PMID: 12913066]
- 17 Li L, Tao Q, Jin H, van Hasselt A, Poon FF, Wang X, Zeng MS, Jia WH, Zeng YX, Chan AT, Cao Y. The tumor suppressor UCHL1 forms a complex with p53/MDM2/ARF to promote p53 signaling and is frequently silenced in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2949-2958 [PMID: 20395212 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3178]
- 18 Loyo M, Brait M, Kim MS, Ostrow KL, Jie CC, Chuang AY, Califano JA, Liégeois NJ, Begum S, Westra WH, Hoque MO, Tao Q, Sidransky D. A survey of methylated candidate tumor suppressor genes in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128: 1393-1403 [PMID: 20473931 DOI: 10.1002/ijc.25443]
- 19 Mandelker DL, Yamashita K, Tokumaru Y, Mimori K, Howard DL, Tanaka Y, Carvalho AL, Jiang WW, Park HL, Kim MS, Osada M, Mori M, Sidransky D. PGP9.5 promoter methylation is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 4963-4968 [PMID: 15930319]
- 20 Oka D, Yamashita S, Tomioka T, Nakanishi Y, Kato H, Kaminishi M, Ushijima T. The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous

- esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer* 2009; 115: 3412-3426 [PMID: 19472401 DOI: 10.1002/cncr.24394]
- 21 Yu J, Tao Q, Cheung KF, Jin H, Poon FF, Wang X, Li H, Cheng YY, Röcken C, Ebert MP, Chan AT, Sung JJ. Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology* 2008; 48: 508-518 [PMID: 18666234 DOI: 10.1002/hep.22343]
 - 22 Seliger B, Handke D, Schabel E, Bukur J, Lichtenfels R, Dammann R. Epigenetic control of the ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 1 in renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2009; 7: 90 [PMID: 19857250 DOI: 10.1186/1479-5876-7-90]
 - 23 Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Yasugi T, Ushijima T. Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. *Int J Cancer* 2006; 119: 1338-1344 [PMID: 16642472]
 - 24 Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, Taniguchi H, Suzuki H, Nakazawa M, Kaneto H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreatobiliary fluids. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 1718-1727 [PMID: 23555160 DOI: 10.3748/wjg.v19.i11.1718]
 - 25 Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549-554 [PMID: 2453289]
 - 26 Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 22 [PMID: 15985168]
 - 27 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 [PMID: 10766168]
 - 28 Ueki T, Walter KM, Skinner H, Jaffee E, Hruban RH, Goggins M. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from which they were derived. *Oncogene* 2002; 21: 2114-2117 [PMID: 11960385]
 - 29 Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 1573-1581 [PMID: 12000709]
 - 30 Dodds DC, Omeis IA, Cushman SJ, Helms JA, Perin MS. Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. *J Biol Chem* 1997; 272: 21488-21494 [PMID: 9261167]
 - 31 Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Rentería RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS. Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 2006; 26: 6269-6281 [PMID: 16763034]
 - 32 Zhang L, Gao J, Li L, Li Z, Du Y, Gong Y. The neuronal pentraxin II gene (NPTX2) inhibit proliferation and invasion of pancreatic cancer cells in vitro. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 4903-4911 [PMID: 21161403 DOI: 10.1007/s11033-010-0632-y]
 - 33 Shukla S, Pia Patric IR, Thinagararajan S, Srinivasan S, Mondal B, Hegde AS, Chandramouli BA, Santosh V, Arivazhagan A, Somasundaram K. A DNA methylation prognostic signature of glioblastoma: identification of NPTX2-PTEN-NF- κ B nexus. *Cancer Res* 2013; 73: 6563-6573 [PMID: 24078801 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0298]
 - 34 Zhang L, Gao J, Li Z, Gong Y. Neuronal pentraxin II (NPTX2) is frequently down-regulated by promoter hypermethylation in pancreatic cancers. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 2608-2614 [PMID: 22806544]
 - 35 Brune K, Hong SM, Li A, Yachida S, Abe T, Griffith M, Yang D, Omura N, Eshleman J, Canto M, Schulick R, Klein AP, Hruban RH, Iacobuzio-Donohue C, Goggins M. Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3536-3542 [PMID: 19064568]
 - 36 Park JK, Ryu JK, Yoon WJ, Lee SH, Lee GY, Jeong KS, Kim YT, Yoon YB. The role of quantitative NPTX2 hypermethylation as a novel serum diagnostic marker in pancreatic cancer. *Pancreas* 2012; 41: 95-101 [PMID: 21778928 DOI: 10.1097/MPA.0b013e318]
 - 37 Zagon IS, Hytrek SD, Smith JP, McLaughlin PJ. Opioid growth factor (OGF) inhibits human pancreatic cancer transplanted into nude mice. *Cancer Lett* 1997; 112: 167-175 [PMID: 9066724]
 - 38 Zagon IS, Smith JP, McLaughlin PJ. Human pancreatic cancer cell proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *Int J Oncol* 1999; 14: 577-584 [PMID: 10024694]
 - 39 Smith JP, Conter RL, Bingaman SI, Harvey HA, Mauger DT, Ahmad M, Demers LM, Stanley WB, McLaughlin PJ, Zagon IS. Treatment of advanced pancreatic cancer with opioid growth factor: phase I. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 203-209 [PMID: 15014352]
 - 40 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 [PMID: 11731440]
 - 41 Sato N, Ueki T, Fukushima N, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of CpG islands in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 2002; 123: 365-372 [PMID: 12105864]
 - 42 Fukushima N, Walter KM, Ueki T, Sato N, Matsubayashi H, Cameron JL, Hruban RH, Canto M, Yeo CJ, Goggins M. Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 78-83

- [PMID: 12673124]
- 43 Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 2003; 9: 407-415 [PMID: 12652295]
 - 44 Feng H, Cheung AN, Xue WC, Wang Y, Wang X, Fu S, Wang Q, Ngan HY, Tsao SW. Down-regulation and promoter methylation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in choriocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 375-382 [PMID: 15297175]
 - 45 Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 798-802 [PMID: 10029065]
 - 46 Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94: 575-581 [PMID: 12841864]
 - 47 Winter JM, Ting AH, Vilardell F, Gallmeier E, Baylin SB, Hruban RH, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA. Absence of E-cadherin expression distinguishes noncohesive from cohesive pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 412-418 [PMID: 18223216 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0487]
 - 48 Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empeireur S, Basset P, Chambon P, Gespach C. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer* 1995; 64: 70-75 [PMID: 7665251]
 - 49 Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Kairiyama C, Bover L, Chernajovsky Y, Mordoh J, Podhajcer OL. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 171-176 [PMID: 9018235]
 - 50 Sato N, Fukushima N, Maehara N, Matsubayashi H, Koopmann J, Su GH, Hruban RH, Goggins M. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2003; 22: 5021-5030 [PMID: 12902985]
 - 51 Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; 277: 955-959 [PMID: 9252327]
 - 52 Kumari A, Srinivasan R, Wig JD. Effect of c-MYC and E2F1 gene silencing and of 5-azacytidine treatment on telomerase activity in pancreatic cancer-derived cell lines. *Pancreatol* 2009; 9: 360-368 [PMID: 19451745 DOI: 10.1159/000212094]
 - 53 Bustelo XR. Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* 2001; 20: 6372-6381 [PMID: 11607839]
 - 54 Fernandez-Zapico ME, Gonzalez-Paz NC, Weiss E, Savoy DN, Molina JR, Fonseca R, Smyrk TC, Chari ST, Urrutia R, Billadeau DD. Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* 2005; 7: 39-49 [PMID: 15652748]
 - 55 Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 45-60 [PMID: 14681689]
 - 56 Hollingsworth MA, Strawhecker JM, Caffrey TC, Mack DR. Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int J Cancer* 1994; 57: 198-203 [PMID: 8157358]
 - 57 Balagué C, Gambús G, Carrato C, Porchet N, Aubert JP, Kim YS, Real FX. Altered expression of MUC2, MUC4, and MUC5 mucin genes in pancreas tissues and cancer cell lines. *Gastroenterology* 1994; 106: 1054-1061 [PMID: 8143972]
 - 58 Balagué C, Audié JP, Porchet N, Real FX. In situ hybridization shows distinct patterns of mucin gene expression in normal, benign, and malignant pancreas tissues. *Gastroenterology* 1995; 109: 953-964 [PMID: 7657125]
 - 59 Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, Büchler MW, Aubert JP, Batra SK. Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4033-4040 [PMID: 11751498]
 - 60 Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, Wilentz RE, Hruban RH, Argani P. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 791-796 [PMID: 12090430]
 - 61 Bhardwaj A, Marsh WL, Nash JW, Barbacioru CC, Jones S, Frankel WL. Double immunohistochemical staining with MUC4/p53 is useful in the distinction of pancreatic adenocarcinoma from chronic pancreatitis: a tissue microarray-based study. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 556-562 [PMID: 17425384]
 - 62 Vincent A, Ducourouble MP, Van Seuning I. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. *FASEB J* 2008; 22: 3035-3045 [PMID: 18492726 DOI: 10.1096/fj.07-103390]
 - 63 Zhu Y, Zhang JJ, Zhu R, Zhu Y, Liang WB, Gao WT, Yu JB, Xu ZK, Miao Y. The increase in the expression and hypomethylation of MUC4 gene with the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Med Oncol* 2011; 28 Suppl 1: S175-S184 [PMID: 20922503 DOI: 10.1007/s12032-010-9683-0]
 - 64 Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein A, Abe T, Yamashita K, Yeo CJ, Kalloo A, Hruban R, Goggins M. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res* 2006; 66: 1208-1217 [PMID: 16424060]

- 65 Missiaglia E, Donadelli M, Palmieri M, Crnogorac-Jurcevic T, Scarpa A, Lemoine NR. Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway. *Oncogene* 2005; 24: 199-211 [PMID: 15637593 DOI: 10.1038/sj.onc.1208018]
- 66 Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, Holland JF, Backstrom JT, Beach CL, Larson RA. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3895-3903 [PMID: 16921040]
- 67 Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009; 10: 223-232 [PMID: 19230772]
- 68 Zhang H, Zhou WC, Li X, Meng WB, Zhang L, Zhu XL, Zhu KX, Bai ZT, Yan J, Liu T, Xu XC, Li YM. 5-Azacitidine suppresses the proliferation of pancreatic cancer cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Genet Mol Res* 2014; 13: 5064-5072 [PMID: 25061731 DOI: 10.4238/2014.July.4.22]
- 69 Wang X, Wang H, Jiang N, Lu W, Zhang XF, Fang JY. Effect of inhibition of MEK pathway on 5-aza-deoxycytidine-suppressed pancreatic cancer cell proliferation. *Genet Mol Res* 2013; 12: 5560-5573 [PMID: 24301926 DOI: 10.4238/2013.November.18.6]
- 70 Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S. DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res* 2013; 33: 2989-2996 [PMID: 23898051]
- 71 Neureiter D, Zopf S, Leu T, Dietze O, Hauser-Kronberger C, Hahn EG, Herold C, Ocker M. Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 103-116 [PMID: 17190770]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍

