

抑癌基因甲基化在肾细胞癌研究中的新进展

张 骞¹, 金 杰¹, 陶 谦²

Aberrant Methylation of Tumor Suppressor Genes in Renal Cell Carcinoma

ZHANG Qian¹, JIN Jie¹, TAO Qian²

1. 北京大学第一医院
泌尿外科,
北京大学泌尿外科研究所
北京 100034

2. 香港中文大学医学院肿瘤学系
及华南肿瘤学国家重点实验室
肿瘤拟遗传学实验室

1. Department of Urology,
Institute of Urology,
The First Hospital,
Peking University,
Beijing, 100034,
P. R. China
2. Cancer Epigenetics Laboratory,
State Key Laboratory in Oncology
in South China,
Sir YK Pao Center for Cancer,
Department of Clinical Oncology,
Hong Kong Cancer Institute and Li
Ka Shing Institute of Health
Sciences,
Chinese University of Hong Kong,
Hong Kong

通讯作者: 陶 谦

Correspondence to: TAO Qian

Tel: 86-852-26321340

Fax: 86-852-24688842

E-mail: qtao@clo.cuhk.edu.hk

基金项目: 国家自然科学基金
(No. 30600612)

Grants: National Natural Science
Foundation of China (No.
30600612)

收稿日期: 2007-01-08

修回日期: 2007-07-13

[ABSTRACT] Promoter CpG methylation is a major epigenetic mechanism to inactivate the functions of tumor suppressor genes (TSG), in addition to genetic mechanism (point mutation and deletion), plays important roles in the pathogenesis of various tumors. Renal cell carcinoma (RCC) is a malignant tumor with poor prognosis, in which aberrant methylation of TSGs has also been widely reported. Most RCC patients are presented with advanced disease because early stage RCC does not have apparent symptoms. The detection of TSG methylation might provide new specific biomarkers for early non-invasive diagnosis of this disease. Because RCC is generally insensitive to conventional chemotherapy and radiotherapy, using epigenetic agents, such as azacytidine, to modulate the activities of DNA methyltransferases and reverse the methylation status of TSGs might be an attractive strategy for future treatment of RCC, which could be combined with conventional therapies. We reviewed recent advances in the research on TSG methylation in RCC, summarized the methylation profile of RCC-related genes, including HOXB13, HAI2/SPINT2, CDH1 and CTNNG/JUP, and discussed the clinical significance of aberrant CpG methylation for the diagnosis and treatment of RCC.

KEYWORDS: Renal neoplasm; Tumor suppressor gene; Methylation; Epigenetics

【摘 要】抑癌基因启动子高度甲基化被认为是除突变和缺失以外的抑癌基因功能失活的关键机制,在肿瘤的发生和发展中起重要作用,已成为目前肿瘤病因学基础研究的热点。肾细胞癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,近年来也有许多文献报道了肾细胞癌中抑癌基因的异常甲基化情况。肾细胞癌临床发病隐匿,出现症状时多为晚期,肾细胞癌相关基因异常甲基化检测有望为肾癌的早期无创诊断提供新的途径。针对肾癌对放、化疗效果均不敏感的特点,改变 DNA 甲基转移酶活性和抑癌基因甲基化状况可作为肾细胞癌辅助治疗的一种新思路。本文对抑癌基因甲基化与肾细胞癌关系的研究进展作一综述,介绍 DNA 甲基化在肿瘤发生过程中的作用及机理;总结近 7 年来肾细胞癌中抑癌基因甲基化的研究情况和肾细胞癌独特的甲基化谱,并着重介绍了新近报道的 HOXB13, HAI2/SPINT2, CDH1, CTNNG/JUP 四个基因启动子异常甲基化与肾细胞癌的关系;阐述 DNA 甲基化研究对肾细胞癌的临床意义。

关键词: 肾肿瘤; 抑癌基因; 甲基化; 表观遗传学

中图分类号: R737.11 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2007)11-1276-05

肾细胞癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,发病率居泌尿系统肿瘤的第二位,约占全身恶性肿瘤的 2%~3%。流行病学研究发现,上海、北京等大城市近 10 年来肾癌的发病率上升

一倍以上,且发病呈年轻化趋势。肾癌的发病机制不详,除遗传因素外,已知的危险因素还包括吸烟、肥胖、工业及水污染、射线等等。由于起病隐匿,约四分之一的肾癌患者在发现时已发生

肿瘤局部或远处转移, 目前的治疗仍以根治性手术为主, 但术后复发率达20%以上, 且放、化疗效果不佳, 因此迫切需要早期诊断方法和其他有效的治疗手段。近年来拟遗传学(或表观遗传学, epigenetics)的研究为解决以上问题提供了可能性^[1]。目前已知, 在肾细胞癌发生的分子过程中, 遗传和拟遗传机制均起着重要的作用。拟遗传调控指影响基因转录活性进而影响表型但不涉及DNA序列改变的基因表达调控方式, 包括改变基因的DNA甲基化状况, 组蛋白修饰和染色质重塑及小RNA分子干扰等, 其中以DNA甲基化研究得最为详尽。作为肿瘤“二次打击”经典学说的重要补充, 启动子高度甲基化被认为是除突变和缺失以外的抑癌基因功能失活的关键机制, 已成为新的研究热点之一^[2]。本文就近年来DNA甲基化与肾细胞癌关系的研究进展作一综述。

1 DNA甲基化与肿瘤发生

肿瘤的发生发展是一个渐进的过程, 是多因素相互影响、相互作用的结果。研究表明, 肿瘤相关基因DNA异常甲基化是细胞癌变过程中的一个早期、频发事件, 在肿瘤的发生和发展中起重要作用。

人类基因组DNA存在广泛的甲基化修饰, 通常基因组70%~80%的CpG序列发生这种甲基化修饰。CpG二核苷酸在基因组中常呈非随机分布, 但在基因的5'端启动子及某些基因的第一外显子区常有富含CpG区域, 长度为0.5~4 kb不等, 这种区域被称为CpG岛(CpG island)。哺乳类动物基因组中至少一半基因的启动子区存在CpG岛, 通常情况下这一部分CpG序列不发生甲基化修饰, 但肿瘤发生时的拟遗传学改变导致CpG岛异常甲基化。DNA异常甲基化包括基因启动子区域高甲基化(hypermethylation)及某些癌基因的低甲基化(hypomethylation), 前者占甲基化异常的大多数, 是指未甲基化的基因启动子区CpG岛被甲基化致使许多抑癌基因沉默失活; 低甲基化较少见, 是指正常情况下不表达的甲基化基因去甲基化。两者都能破坏基因组的正常甲基

化情况, 进而影响基因的正常表达, 导致细胞的增殖失控, 促进肿瘤的发生和发展^[1]。

DNA甲基化是发生在CpG二核苷酸上对胞嘧啶的共价修饰, 这种调控对基因的转录具有重要影响, 其具体过程是DNA双螺旋在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)介导下, 由S-腺苷甲硫氨酸提供甲基团, 将胞嘧啶核苷酸的嘧啶环第5位碳原子甲基化, 并与其3'端的鸟嘌呤形成甲基化的CpG (mCpG) (如图1)。启动子DNA甲基化可通过以下途径抑制基因在体内的转录: (1)甲基化DNA阻碍特定转录因子与其识别位点的结合, 如C-Myc/Myn、CREB、NF- κ B、NF-Y、E2F等转录因子的结合位点都含有CpG位点, CpG位点甲基化能抑制其与转录因子的结合。(2)甲基化DNA直接结合特定的转录抑制蛋白, 如甲基化CpG位点结合蛋白MeCP1、MeCP2和MBD1-4都能结合甲基化CpG位点, 使发生该结合的基因转录失活。(3)甲基化还可以通过直接改变染色质结构影响基因转录。高度甲基化可导致染色质构象改变, 结构更加紧密, 进而导致转录失活^[3]。抑癌基因的高甲基化作为基因失活的机制在人类散发性视网膜母细胞瘤RB1基因中得到证实, RB1基因启动子区的高

甲基化直接抑制了其启动子的活性。此后的研究表明抑癌基因DNA异常甲基化在几乎所有的人类肿瘤包括食管癌, 鼻咽癌, 肺癌, 前列腺癌, 肠癌, 肝癌, 胃癌, 乳腺癌, 卵巢癌及脑肿瘤等^[1-4]的发病过程中均起到重要作用。

抑癌基因在细胞的生长和发育中起着重要的调节作用, 能够抑制细胞周期于静止期, 并使复制不完全或受损伤的DNA不能进入分裂期, 从而避免细胞的恶变^[4]。随着肿瘤发病机制研究深入到基因水平, 肿瘤相关基因特别是抑癌基因的异常甲基化, 已成为肿瘤发病机制研究中的热点, 并且在肿瘤的早期诊断、病情监测、治疗、预后判断及预防等方面取得了相当的进展。

2 肾细胞癌中抑癌基因甲基化的情况

近年来, 人们已经开始关注抑癌基因甲基化与肾癌发生和发展的关系。VHL基因失活是公认的肾癌发生发展的重要遗传学因素, 但其拟遗传学异常并非其主要机制。Banks等^[5]通过研究115例肾癌(其中包括96例散发型肾癌)患者, 发现VHL基因的遗传学改变在散发型肾癌中十分常见, 有78%的病例发生杂合子缺失(Loss of heterozygosity, LOH), 71%的病例发现

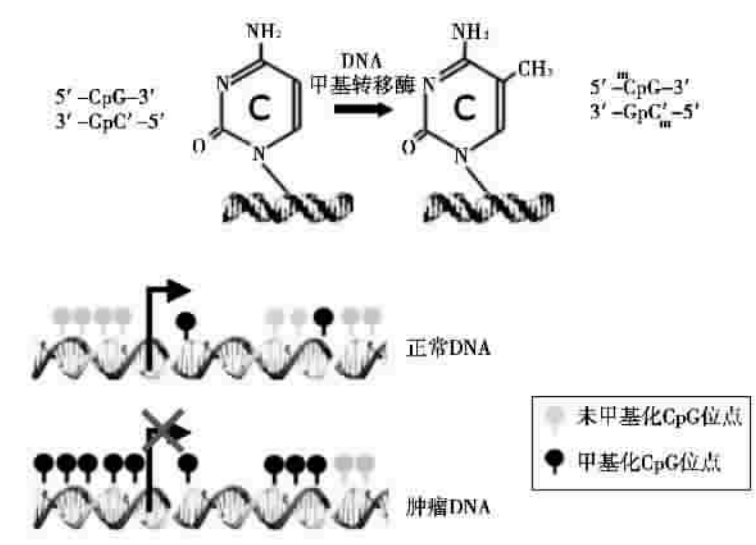


图1 DNA甲基化发生过程及对肿瘤发生发展的影响

Figure 1 Process of DNA methylation and its role in carcinogenesis

A: Methylation occurs at CpG sites through the action of DNA methyltransferases.

B: Tumor DNA thus cannot transcribe due to promoter methylation, which results in the silencing of tumor suppressor genes.

VHL基因突变, 但仅有不到 10%的患者发现启动子甲基化。

一般说来,肾细胞癌组织中存在多种肿瘤相关基因的甲基化,导致其表达失活,进而通过拟遗传学机制促进肾细胞癌的发生及发展。虽然不同种类的肿

瘤都可能存在某一基因的启动子异常甲基化,但发生频率是不同的,存在着明显的基因-肿瘤类型相关性,每种肿瘤都可能有一个独特的基因甲基化谱。

2.1 肾细胞癌相关基因的甲基化

肾细胞癌相关基因的甲基化构成

其独特的甲基化谱, 成为肾细胞癌的拟遗传标志。目前已经研究过的肾细胞癌相关基因甲基化谱见表 1,越来越多新的肿瘤相关基因甲基化会不断被发现。

表 1 肾细胞癌相关基因甲基化谱
Table 1 Methylation profile of renal cell carcinoma (RCC)-related genes

Gene	Chromosomal location	Frequency of methylation (%)		Function	Reference
		Tumor tissue	Cell line		
HOXB13	17q21.2	30	73	Homeobox B13, transcriptional factor	[6]
HAI2/SPINT2	19q13.1	30	45	Serine protease inhibitor, Kunitz type 2; HGF activator inhibitor type 2	[7]
CDH1	16q22.1	16	64	Ca ²⁺ -dependent cell-cell adhesion	[8]
CTNNG/JUP	17q21	91	83	Cell adhesion	[9]
DALI/EPB41L3	18p11.3	45	47	Actin-binding protein, involved in actin cytoskeleton organization and biogenesis	[10]
RARB	3p24	12	—	Retinoic acid receptor beta, signal transduction	[11]
RASSF1A	3p21.3	64	84	Restrain cyclin D1 accumulation, involved in cell cycle arrest and apoptosis	[12]
CX32/GJB1	Xq13.1	23	—	Gap junction connexin	[13]
SLIT2	4p15.2	25	—	Actin cytoskeleton organization, signal transduction	[14]
LSAMP	3q13.31	26	56	Neuronal surface glycoprotein, growth suppression	[15]
BHD/FLCN	17p11.2	28	33	Birt-Hogg-Dube syndrome gene	[16]
DAPK1	9q34.1	24	—	Apoptosis-related protein kinase	[17]
MT1G	16q13	20	—	Metallothionein1G	[17]
RASSF5/ NORE1	1q32.1	19	—	Ras association domain family 5, cell cycle arrest and apoptosis	[17]
MGMT	10q26	50	—	O-6- methyl guanine-DNA methyltransferase	[17]
CDKN2A/p16	9p21	20	14	Cell cycle-dependent kinase inhibitor	[18]
ROBO1/DUTTI	3p12	18	—	NCAM family receptor	[19]
APC	5q21	14	—	Signal transduction, cell adhesion	[20]
CDKN2A/p14ARF	9p21	17	—	Negative regulator of cell cycle	[20]
GSTP1	11q13	12	—	Glutathione S-transferase	[20]
TIMP3	22q12.3	58	—	Tissue inhibitor of metalloproteinase	[20]
CA9	9p13-p12	69	—	Carbonic anhydrase IX, hypomethylated in RCC	[21]
DLC1	8p21-22	35	14	Rho GTPase activating protein	[22]

2.2 新近发现的异常甲基化抑癌基因

HOXB13 (homeo-box gene B13): HOXB13 编码转录因子, 定位于 17q21.2, 其产物对脊椎动物的生长发育起重要作用。1996 年 Zeltser 等发现其表达在鼠胚胎后肠及脊索末端尾芽分化为泌尿系统的位置。Economides 等^[23]发现 HOXB13 纯合子突变的裸鼠尾表型异常生长, 导致尾部细胞异常增生及凋亡减少, 提示 HOXB13 在大鼠中有抑制细胞生长及激活细胞程序性死亡的作用。Okuda 等^[6]发现在肾细胞癌及肾癌细胞系中有较高频率的 HOXB13 基因异常甲基化。通过检测 56 例肾癌标本和 17 株肾癌细胞系, 他们发现 HOXB13 基因启动子甲基化率分别为 30%和 73%。而且, 肾癌组织及细胞系的 HOXB13 基因表达水平与启动子甲基化呈负相关性。用甲基转移

酶抑制剂处理 HOXB13 阴性的肾癌细胞系后, HOXB13 随即恢复表达。提示 HOXB13 表达受启动子甲基化调控。该实验还将外源性 HOXB13 导入基因表达阴性的肾癌细胞系中, 结果发现其可抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡, 提示 HOXB13 是人肾细胞癌的抑癌基因之一, 该基因启动子异常甲基化在肾癌的发病中起重要作用。

HAI2 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2) 基因: 定位于 19q13.1, 编码丝氨酸蛋白酶抑制剂, 作用是调节肝细胞生长因子(HGF), 可抑制纤维蛋白溶酶, 胰岛素, 血浆激肽释放酶等多种丝氨酸蛋白酶。Yamauchi 等^[24]发现 HAI2 mRNA 在正常肾组织中表达丰富, 而在晚期肾细胞癌中表达减少。Morris 等^[7]发现在许多肾癌细胞系和散发性肾细胞癌病例中 HAI2

表达减少或沉寂。他们研究了 102 例散发性肾细胞癌及 11 株肾癌细胞系, 肾细胞癌包括 64 例透明细胞癌和 38 例乳头状细胞癌。结果发现有 30%的透明细胞癌和 40%的乳头状细胞癌有 HAI2 基因启动子异常甲基化。在 11 株肾癌细胞系中有 5 株发现有该基因启动子异常甲基化。HAI2 基因突变可降低肾癌细胞系的肿瘤抑制功能, 但他们未发现存在 HAI2 基因的突变。体外实验用去甲基化药物处理后, 11 株肾癌细胞系中的 5 株 HAI2 表达增多, 并可抑制肿瘤细胞集落形成。以上结果提示 HAI2 基因的拟遗传学改变导致其在肾癌中表达下降, 进而可促进肾癌的发生和发展。

CDH1 (E-cadherin, 钙粘素 E): CDH1 是原型钙粘素家族成员, 定位于 16q22, 表达产物主要分布在人和动物

的上皮组织,对维护上皮细胞的形态和结构完整起着重要作用。CDH1 表达水平下调或缺失,细胞粘附力即下降,使肿瘤细胞易分散而向外周呈浸润性生长,一旦获得转移的条件,即可脱离原发灶而发生转移^[25]。研究发现该基因失活的主要机制是启动子 CpG 岛的异常甲基化,肾细胞癌中存在高频率的 CDH1 基因甲基化,并与癌的分化差及高进展相关。Nojima 等^[8]用 RT-PCR 法检测了 34 例肾细胞癌显微切割标本及 5 株肾癌细胞系,发现 34 例中的 23 例患者 E-cadherin 表达较正常组织减少,相应的 CDH1 基因启动子甲基化增多。5 株肾癌细胞系均发现 CDH1 基因启动子甲基化,并出现 CDH1 基因及蛋白表达缺失。在用去甲基化药物处理后,肾癌细胞系重新恢复表达 E-cadherin,该结果提示 CDH1 基因异常甲基化对肾癌发生有促进作用。

CTNNG(γ -Catenin, γ 连环蛋白)基因;定位于 17q21,编码细胞粘附蛋白,是哺乳动物细胞胞桥小体和粘着接头的组成部分。它包含了一个高度保守的中央区,易于与 E-cadherin, α -Catenin 及腺瘤性结肠息肉癌抑制因子(APC)等多种蛋白结合^[26]。 γ -Catenin 作为细胞粘附分子通过与胞质内 E-cadherin 直接作用,对维持细胞极性起到关键作用。在肿瘤组织中,细胞粘附逃逸是肿瘤发病的重要步骤,肿瘤细胞因此得以浸润和转移。 γ -Catenin 功能丧失可导致肿瘤细胞间交互作用破坏,使得肿瘤细胞向周围组织浸润,临床预后往往较差。Breault 等^[9]研究发现 CTNNG 基因在肾细胞癌和肾癌细胞系中表达下调。他们用免疫组化染色观察到正常肾组织中 γ -Catenin 表达很明显,而在肾细胞癌中则表达很弱。进而选取 54 例肾癌患者标本,甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR)检测发现该基因启动子甲基化比例高达 83%,其甲基化程度与基因表达成负相关性。经过统计学多因素分析,结果发现 CTNNG 基因甲基化是一个肾癌预后及生存率的独立预测因子,其与预后的相关程度甚至优于肿瘤的分级和 Robson 分期。

除了上述基因外,肾细胞癌中发

生高甲基化的基因还有 RASSF1A, TIMP3,APC 和 GSTP1 等较经典的抑癌基因^[20],另外还有 CA9 甲基化不足也可能参与肾细胞癌的发生过程^[21]。由此可见,与其他肿瘤相似,肾细胞癌发生是一个多步骤多因素参与的复杂生物学过程,涉及到许多基因包括抑癌基因的异常。鉴定这些基因的甲基化将有助于肾癌的早期诊断,预后预测乃至为将来的基因治疗提供科学依据。

3 DNA 甲基化对肾细胞癌的临床意义

肾细胞癌由于其解剖特点,发病隐匿,出现临床症状时多已晚期,而且肾癌对放、化疗效果均不敏感,手术根治是唯一有效的方法,但术后复发率可达 20%,因此早期诊断对于改善肾癌预后至关重要。肿瘤相关基因启动子异常甲基化是细胞癌变过程中的一个早期、频发事件,可以作为肿瘤发生的敏感生物标志物^[1-4]。由于外周血血清、血浆、肿瘤累及器官相关的体液(如唾液、痰、尿液等)都可以作为检测异常甲基化的标本,这将给肿瘤分子检测带来极大的便利,因此检测肿瘤相关基因启动子甲基化状态是一种非常具有前途的生物标志物。

已有多项研究通过收集肾癌患者的体液标本,了解相应基因的甲基化状况,探求拟遗传学改变对肾癌诊断的作用及意义。Hoque 等^[27]收集了 26 例肾癌患者的术前血清及尿液,同时收集其手术标本,与 91 例和 30 例无泌尿系统肿瘤的尿液和血清做对照,检测了 CDH1、APC、MGMT、RASSF1A、GSTP1、p16、RARF 和 ARF 等 9 个基因的甲基化情况。结果发现肿瘤标本同时存在 2 个基因甲基化异常者占 94%,同时有 3 个基因甲基化异常者占 76%。相应的尿液标本检测发现 88% 的患者 9 个基因中有 1 个基因异常甲基化。91 例对照者尿液沉渣标本中 p16、MGMT、GSTP1 和 ARF 未发现甲基化改变,而 CDH1、RASSF1A、TIMP3、RARF 和 APC 在少数几例标本中有甲基化改变。血清标本中 67% 的患者有 1 个基因发现异常甲基化,对照组上述基因甲基化改变很少,如 p16、RARF、

TIMP3 和 GSTP1 基因未发现甲基化改变。统计分析发现尿液标本检测 APC、CDH1 基因甲基化异常的临床敏感性为 38%,特异性为 96%;RASSF1A 的临床敏感性为 65%,特异性为 89%;TIMP3 临床敏感性为 46%,特异性为 91%。RARF 的临床敏感性为 31%,特异性为 91%。血清标本检测 APC、p16 和 RASSF1A 甲基化阳性的临床敏感性为 6%~33%,特异性为 93%~100%。虽然上述基因的敏感性仍有待改善,应用于临床还有一定的距离,但该方法为肾癌的创新早期诊断提供了一个很好的思路。

如上所述,人们对肾细胞癌中某些抑癌基因的甲基化状态和肾细胞癌的临床、病理诊断作了相关研究,结果发现肾细胞癌不同抑癌基因的启动子甲基化有其独特的模式。越来越多证据表明异常的 DNA 甲基化是一种有用的分子标记物^[28],有望通过拟遗传学分子标记物来区别在组织学上相似但其临床表现为多种多样的肿瘤。同一病理类型和临床分期的肿瘤患者,有些对放疗、化疗不敏感,易复发、转移,预后差,这可能是由于肿瘤细胞特殊的生物学行为所致。通过组织病理,组织化学和细胞遗传学等方法对肿瘤进行正确及可靠的分类,可使癌症的治疗疗效达到最佳,毒性减到最低。通过检测基因启动子甲基化等分子生物标记物,将有助于肿瘤的早期诊断,肿瘤分型,预测肿瘤复发、转移和判断预后^[29]。临床应用方面,针对 DNA 甲基转移酶活性和 DNA 甲基化状况改变来探索肿瘤防治策略已成为一种新的思路。以 5-氮杂脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, Decitabine, Aza)为代表的类核苷甲基转移酶抑制剂,已广泛应用于逆转肿瘤细胞的异常甲基化,使失活的基因重新表达,从而达到杀伤肿瘤细胞的效应。临床上已有应用 Aza 治疗白血病、骨髓增生异常综合征、前列腺癌及鼻咽癌的报道^[30-32]。最近,此药已正式被美国 FDA 批准用于临床使用。尽管目前只在肾癌细胞系中证实 DNA 甲基转移酶抑制剂可恢复甲基化沉默的肿瘤相关基因的表达,抑制肿瘤细胞生长,尚未见到动物和临床试验方面的报道,但相信随着

研究的进一步深入,拟遗传学研究进展必将对肾细胞癌的综合治疗起到推动作用。

关于肾细胞癌中抑癌基因的 DNA 甲基化,还有很多问题有待于进一步研究。如诱导甲基化发生的相关因素;特殊的 CpG 位点容易发生甲基化的原因;以及完整全面的肾细胞癌甲基化谱等等。随着甲基化检测技术的提高及研究的不断发展,肾癌组织中的抑癌基因甲基化谱将进一步被精确的描述,这将会有助于人们进一步了解肾细胞癌的分子发病机制,有望更好的对其进行临床治疗和预后判断。

[参 考 文 献]

- [1] Jones P A, Baylin S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2002,3(6):415-428.
- [2] Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer [J]. *Nat Genet*, 2003,33 Suppl:238-244.
- [3] Singal R, Ginder G D. DNA methylation [J]. *Blood*, 1999,93(12):4059-4070.
- [4] Lowe S W, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression [J]. *Nature*, 2004,432(7015):307-315.
- [5] Banks R E, Tirukonda P, Taylor C, et al. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer [J]. *Cancer Res*, 2006,66(4):2000-2011.
- [6] Okuda H, Toyota M, Ishida W, et al. Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2006,25(12):1733-1742.
- [7] Morris M R, Gentle D, Abdulrahman M, et al. Tumor suppressor activity and epigenetic inactivation of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2/SPINT2 in papillary and clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2005,65(11):4598-4606.
- [8] Nojima D, Nakajima K, Li L C, et al. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2001,32(1):19-27.
- [9] Breault J E, Shiina H, Igawa M, et al. Methylation of the gamma-catenin gene is associated with poor prognosis of renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(2 Pt 1):557-564.
- [10] Yamada D, Kikuchi S, Williams Y N, et al. Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2006,118(4):916-923.
- [11] Wang X F, Qian D Z, Ren M, et al. Epigenetic modulation of retinoic acid receptor beta2 by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(9):3535-3542.
- [12] Tokinaga K, Okuda H, Nomura A, et al. Hypermethylation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Japanese clear cell renal cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2004,12(4):805-810.
- [13] Hirai A, Yano T, Nishikawa K, et al. Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell [J]. *Am J Nephrol*, 2003,23(3):172-177.
- [14] Astuti D, Da Silva N F, Dallol A, et al. SLIT2 promoter methylation analysis in neuroblastoma, Wilms' tumour and renal cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2004,90(2):515-521.
- [15] Chen J, Lui W O, Vos M D, et al. The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas [J]. *Cancer Cell*, 2003,4(5):405-413.
- [16] Khoo S K, Kahnoski K, Sugimura J, et al. Inactivation of BHD in sporadic renal tumors [J]. *Cancer Res*, 2003,63(15):4583-4587.
- [17] Morris M R, Hesson L B, Wagner K J, et al. Multigene methylation analysis of Wilms' tumour and adult renal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2003,22(43):6794-6801.
- [18] Sanz-Casla M T, Maestro M L, del Barco V, et al. Loss of heterozygosity and methylation of p16 in renal cell carcinoma [J]. *J Urol Res*, 2003,31(3):159-162.
- [19] Dallol A, Forgacs E, Martinez A, et al. Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers [J]. *Oncogene*, 2002,21(19):3020-3028.
- [20] Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo R G, et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004,10(12 Pt 1):3972-3979.
- [21] Cho M, Uemura H, Kim S C, et al. Hypomethylation of the MN/CA9 promoter and upregulated MN/CA9 expression in human renal cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2001,85(4):563-567.
- [22] Zhang Q, Ying J, Zhang K, et al. Aberrant methylation of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2007,249(2):220-226.
- [23] Economides K D, Zeltser L, Capecchi M R. Hoxb13 mutations cause overgrowth of caudal spinal cord and tail vertebrae [J]. *Dev Biol*, 2003,256(2):317-330.
- [24] Yamauchi M, Kataoka H, Itoh H, et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor types 1 and 2 are expressed by tubular epithelium in kidney and down-regulated in renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 2004,171(2 Pt 1):890-896.
- [25] Morton R A Jr, Ewing C M, Watkins J J, et al. The E-cadherin cell-cell adhesion pathway in urologic malignancies [J]. *World J Urol*, 1995,13(6):364-368.
- [26] Sarrio D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability [J]. *Int J Cancer*, 2003,106(2):208-215.
- [27] Hoque M O, Begum S, Topaloglu O, et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer [J]. *Cancer Res*, 2004,64(15):5511-5517.
- [28] Costello J F, Fruhwald M C, Smiraglia D J, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns [J]. *Nat Genet*, 2000,24(2):132-138.
- [29] Costello J F, Plass C. Methylation matters [J]. *J Med Genet*, 2001,38(5):285-303.
- [30] Ruter B, Wijermans P W, Lubbert M. DNA methylation as a therapeutic target in hematologic disorders: recent results in older patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2004,80(2):128-135.
- [31] Chan A T, Tao Q, Robertson K D, et al. Azacitidine induces demethylation of the Epstein-Barr virus genome in tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2004,22(8):1373-1381.
- [32] Tao Q, Young L S, Woodman C B, et al. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers—genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics [J]. *Front Biosci*, 2006,11:2672-2713.

[编辑:钟均行;校对:林志祥]