

甲基化CpG结合域蛋白MBD2对胰腺癌细胞增殖和迁移的影响

张尤历¹ 王 桢¹ 何俊波¹ 魏 虹¹ 葛 璐¹ 李 杰¹ 龚爱华^{2,3} 徐 岷^{1*}

(¹江苏大学附属医院, 镇江 212000; ²癌基因及相关基因国家重点实验室, 镇江 212000;

³江苏大学医学院基础医学系, 镇江 212013)

摘要 该文探讨甲基化CpG结合域蛋白2(methyl-CpG-binding domain protein 2, MBD2)对胰腺癌细胞增殖和迁移的影响。将干扰质粒*MBD2* shRNA转染入MBD2高表达的PaTu8988细胞和SW1990细胞中, 运用CCK-8法检测细胞的增殖活性并绘制生长曲线, 克隆形成实验检测细胞克隆形成率, Transwell检测细胞迁移率。结果显示, 下调*MBD2*后, PaTu8988细胞中*MBD2*基因的表达量明显降低, 细胞增殖减慢, 克隆形成率降低, 细胞迁移率减少; 在SW1990细胞中下调*MBD2*基因后, 得到类似结果。由此说明, 沉默*MBD2*基因可以抑制胰腺癌细胞PaTu8988和SW1990的增殖和迁移, 为进一步研究MBD2在胰腺癌细胞增殖与迁移中的作用机制奠定了基础。

关键词 甲基化CpG结合域蛋白2; 胰腺癌; 克隆形成; 细胞增殖; 细胞迁移

Effects of MBD2 on Proliferation and Migration of Human Pancreatic Cancer Cells

Zhang Youli¹, Wang Zhen¹, He Junbo¹, Wei Hong¹, Ge Lu¹, Li jie¹, Gong Aihua^{2,3}, Xu Min^{1*}

(¹Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China; ²State Key Laboratory of Oncogenes and Related Gene, Zhenjiang 212000, China; ³School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract This paper aimed at investigating the effects of methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) expression on proliferation and migration of human pancreatic cancer cells. The specific MBD2-shRNA was transiently transfected into the pancreatic cancer cells PaTu8988 and SW1990, respectively. Then, CCK-8 assay, colony formation assay and Transwell assay were performed to detect the cell proliferation, colony formation and migration rates in PaTu8988 and SW1990 cells, respectively. It was found that the expression of MBD2 was efficiently inhibited at both mRNA and protein levels in sh-MBD2 cells compared with control group ($P < 0.05$). CCK-8, colony formation and Transwell assay revealed that MBD2 depletion decreased cell proliferation, colony formation and migration rates in PaTu8988 and SW1990 cells ($P < 0.05$). Taken together, our results suggested that *MBD2* gene silencing could inhibit the abilities of proliferation and migration in pancreatic cancer cell lines PaTu8988 and SW1990, which might provide an experimental basis for further study in the mechanism of MBD2 in pancreatic cancer.

Keywords MBD2; pancreatic cancer; colony formation; cell proliferation; cell migration

收稿日期: 2015-10-13 接受日期: 2015-12-22

国家自然科学基金(批准号: 81472333)、江苏省自然科学基金(批准号: BK20131247)、江苏省重点开放课题(批准号: 90-13-05)和江苏大学高级人才启动基金(批准号: 1281270058)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0511-85026370, E-mail: peterxu1974@163.com

Received: October 13, 2015 Accepted: December 22, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472333), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK20131247), the Open Foundation of Key Laboratory (Grant No.90-13-05) and Advanced Talent Foundation of Jiangsu University (Grant No.1281270058)

*Corresponding author. Tel: +86-511-85026370, E-mail: peterxu1974@163.com

网络出版时间: 2016-02-18 17:25:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160218.1725.002.html>

胰腺癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率高、预后差。它在欧洲和美国癌症相关死亡原因中排名第四^[1-2]。因此, 从分子水平研究胰腺癌的发病机理, 寻找重要的作用分子, 对指导临床治疗以提高患者生存率具有重要意义。

MBD(methyl-CpG-binding domain)家族蛋白是最早发现的甲基化DNA结合蛋白, 它的家族成员包括MeCP2、MBD1、MBD2、MBD3和MBD4, 通过招募不同的共抑制复合体到目标基因的甲基化位点, 抑制目标基因的表达^[3-4]。有研究表明, MBD2通过结合到甲基化调控区参与抑制异常甲基化的肿瘤抑制基因, 揭示了MBD2在肿瘤发生发展中的作用^[5]。近年来, 关于MBD2在其他肿瘤中的表达及作用陆续有报道。研究发现, MBD2在乳腺癌、脑神经胶质瘤、肝门部胆管癌、胃肠道间质瘤等肿瘤中表达明显高于正常组织, 并通过不同机制促进肿瘤的发生、发展^[6-9]。然而, 目前关于MBD2在胰腺癌发生、发展中的生物学功能和分子调控的研究鲜有报道。

本研究首先检测了MBD2在三种常见的胰腺癌细胞株中差异性表达, 然后研究了MBD2对胰腺癌细胞增殖和迁移的影响, 为后续研究MBD2在胰腺癌发展过程中的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺癌SW1990细胞、PaTu8988细胞、BxPC-3细胞和pLKO.1-puro载体由本实验室保存。胎牛血清(FBS)购自Gibco公司; DMEM培养基购自HyClone公司; 转染试剂Lipo-fectamine 2000购自Invitrogen公司; 限制性内切核酸酶EcoR I和Age I购自Fermentas公司; 兔抗人MBD2抗体购自Cell Signaling公司; 鼠抗人 β -tubulin抗体购自Bioworld公司; CCK-8溶液购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Transwell小室购自Corning公司; dsDNA oligos由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量PCR检测三种胰腺癌细胞MBD2 mRNA水平 MBD2上游引物序列: 5'-CAA GCC TCA GTT GGC AAG GT-3', 下游引物序列: 5'-AGC TGA CGT GGC TGT TCA TT-3'。GAPDH上游引物序列: 5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG G-3', 下游引物序列: 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG A-3'。

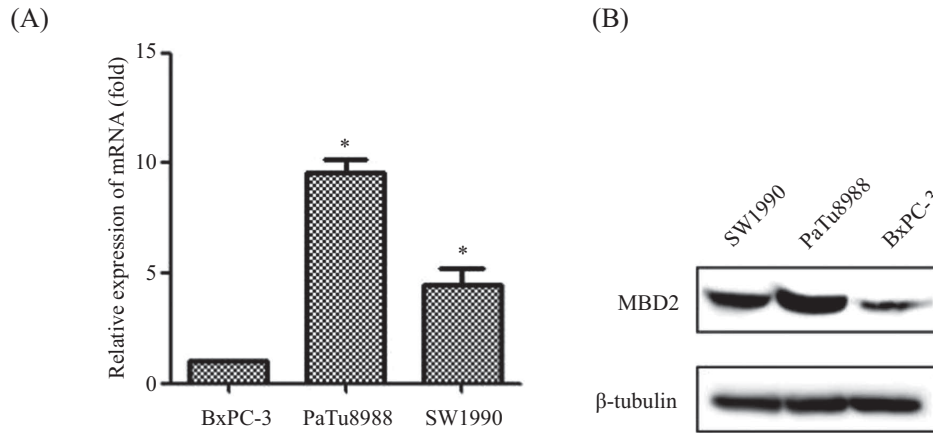
1.2.2 Western blot检测MBD2蛋白质水平 提取蛋白质, 加入细胞裂解液, 4 °C 12 000 \times g离心15 min, 取上清, 测蛋白质浓度, 加入上样缓冲液, 100 °C加热变性10 min, SDS-PAGE, 湿转法转至PVDF膜。5%脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h, 加入一抗, 于4 °C孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 于室温孵育1 h, TBST洗膜后, ECL化学发光检测显影, 在凝胶成像系统上拍照并分析。

1.2.3 MBD2干扰质粒的构建 在Sigma公司官网搜索MBD2 shRNA的序列。MBD2 shRNA上游引物序列: 5'-CCG GGT AGC AAT GAT GAG ACC CTT TCT CGA GAA AGG GTC TCA TCA TTG CTA CTT TTT G-3', 下游引物序列: 5'-AAT TCA AAA AGT AGC AAT GAT GAG ACC CTT TCT CGA GAA AGG GTC TCA TCA TTG CTA C-3'。对照组EGFP shRNA上游引物序列: 5'-CCG GTA CAA CAG CCA CAA CGT CTA TCT CGA GAT AGA CGT TGT GGC TGT TGT ATT TTT G-3', 下游引物序列: 5'-AAT TCA AAA ATA CAA CAGCCA CAA CGT CTA TCT CGA GAT AGA CGT TGT GGC TGT TGT A-3'。引物退火后形成带黏性末端的双链DNA, 然后与EcoR I及Age I双酶切pLKO.1-puro的载体连接, 转化感受态细胞, 挑取单克隆进行菌液PCR鉴定后, 摇菌提质粒质送测序, 测序正确后用于细胞转染实验。

1.2.4 细胞转染 分别将对数生长期的PaTu8988细胞、SW1990细胞以 4×10^5 /孔铺于6孔板上, 24 h内转染质粒EGFP shRNA和MBD2 shRNA, 转染前1 h更换无血清培养基, 每孔转质粒2.5 μ g, 质粒与Lipo-fectamine 2000质量体积比为1:3, 溶于DMEM中, 转染4~6 h后更换完全培养基。

1.2.5 荧光定量PCR和Western blot方法检测MBD2干扰效率 将转染48 h后的细胞用Trizol提取细胞总RNA并逆转录成cDNA, Real-time PCR检测细胞内MBD2的mRNA水平。用RIPA裂解液提取转染72 h后的细胞总蛋白, Western blot法检测细胞内MBD2的蛋白质水平。

1.2.6 CCK-8法检测细胞增殖能力 将转染12 h后的细胞用0.25%胰蛋白酶消化后, 以 2.5×10^3 /孔的细胞密度接种于96孔板中, 分两组, 每组设5个复孔。同时设空白对照组(不加细胞), 分别于1、2、3、4、5 d移去培养基, 每孔加入含10% CCK-8无血清培养基, 避光孵育2 h后在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光度(D)值。重复3次取平均值, 绘制生长曲线。



A: 荧光定量PCR检测MBD2基因的mRNA水平; * $P < 0.05$, 与BxPC-3组比较。B: Western blot检测MBD2蛋白质水平。

A: determination of *MBD2* mRNA level by Real-time PCR; * $P < 0.05$ vs BxPC-3 group. B: determination of *MBD2* protein level by Western blot.

图1 MBD2在三种胰腺癌细胞中的表达

Fig.1 Expression of *MBD2* in three pancreatic cancer cells

1.2.7 克隆形成实验检测克隆形成能力 将转染24 h后的细胞, 消化后按 2.5×10^3 /孔的细胞密度接种于6孔板中, 每组设3个平行样品, 静置培养10 d, 当孔板中出现肉眼可见的克隆时终止培养。采用4%多聚甲醛溶液固定细胞, 风干后, 结晶紫染色, 观察并计数细胞克隆数, 结果取平均值。

1.2.8 Transwell实验检测细胞迁移能力 细胞转染48 h后, 消化细胞后用无血清DMEM重悬, 细胞计数, 将 4×10^5 细胞种入不含基质胶的侵袭小室(Transwell)上层(100 μ L/孔), 下层加入含有10% FBS的DMEM溶液, 24 h后用4%多聚甲醛溶液固定, 结晶紫染色并于显微镜下观察、拍照。

1.2.9 统计学处理 采用SPSS 19.0统计软件分析。实验结果用均数 \pm 标准差表示, 组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MBD2在三种胰腺癌细胞中的表达

荧光定量PCR与Western blot结果均显示, 三种胰腺癌细胞株中, MBD2在PaTu8988与SW1990细胞中表达量明显高于BxPC-3细胞, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

2.2 比较三种胰腺癌细胞株的增殖和迁移能力

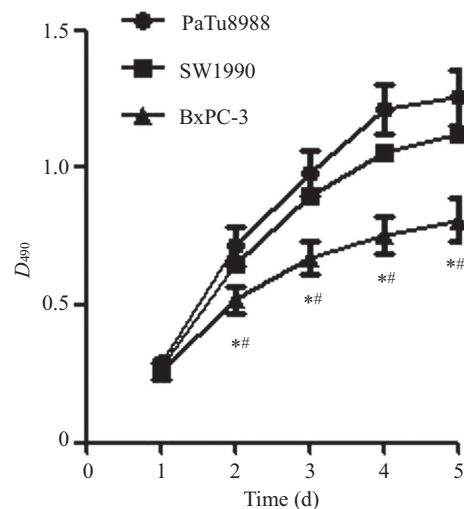
2.2.1 三种胰腺癌细胞增殖能力的比较 CCK-8结果显示, BxPC-3细胞的增殖率明显低于PaTu8988和SW1990细胞增殖率, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。PaTu8988和SW1990细胞增殖速率差异无明显变化(图2)。

2.2.2 三种胰腺癌细胞克隆形成能力的比较 克隆形成实验结果显示, PaTu8988、SW1990和BxPC3细胞克隆形成数分别为 410 ± 8 、 276 ± 20 和 108 ± 14 。BxPC-3细胞克隆形成能力明显弱于PaTu8988和SW1990细胞, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图3)。

2.2.3 三种胰腺癌细胞迁移能力的比较 Transwell实验结果显示, PaTu8988、SW1990和BxPC3细胞穿膜细胞数分别为 296 ± 9 、 223 ± 9 和 53 ± 5 。BxPC-3细胞穿膜能力明显弱于PaTu8988和SW1990细胞, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图4)。

2.3 检测MBD2干扰效果

在高表达MBD2的PaTu8988和SW1990细胞进

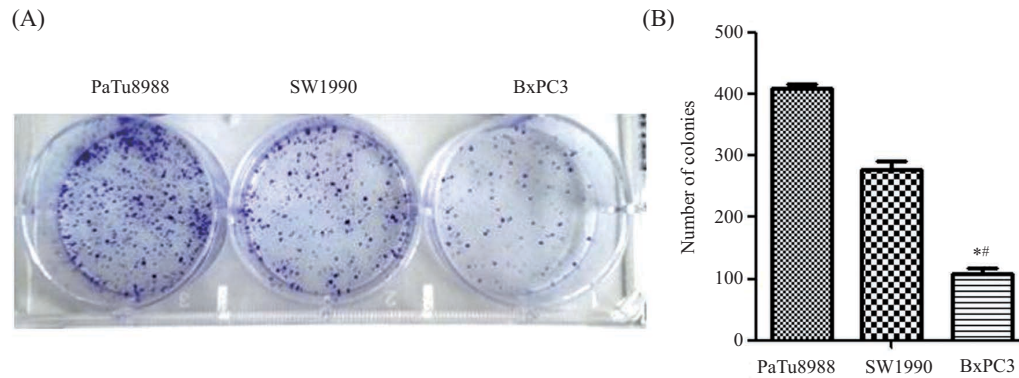


* $P < 0.05$, 与PaTu8988组比较; # $P < 0.05$, 与PaTu8988组比较。

* $P < 0.05$ vs PaTu8988 group; # $P < 0.05$ vs SW1990 group.

图2 三种胰腺癌细胞株生长曲线

Fig.2 Growth curves of three pancreatic cancer cell lines

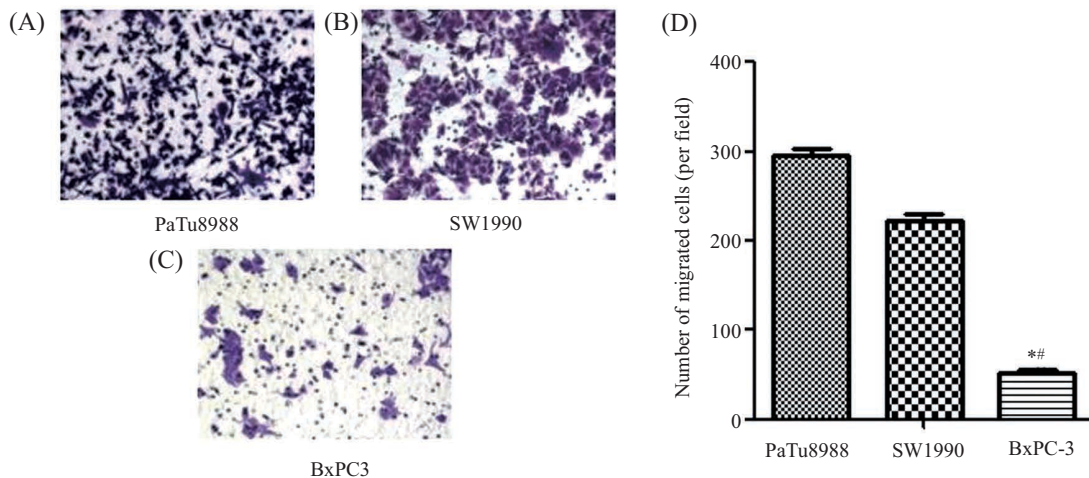


A: PaTu8988、SW1990和BxPC3细胞克隆形成实验; B: PaTu8988、SW1990和BxPC3细胞形成的克隆计数和分析。* $P < 0.05$, 与PaTu8988组比较; # $P < 0.05$, 与SW1990组比较。

A: PaTu8988, SW1990 and BxPC3 cells were subjected to colony formation assays; B: PaTu8988, SW1990 and BxPC3 cells colony formation were counted and analyzed. * $P < 0.05$ vs PaTu8988 group; # $P < 0.05$ vs SW1990 group.

图3 三种胰腺癌细胞株克隆形成能力的比较

Fig.3 Comparison of the cell colony formation force in three pancreatic cancer cell lines



A~C: PaTu8988、SW1990和BxPC3细胞迁移实验, 迁移的细胞用结晶紫染色30 min(200 \times)。D: PaTu8988、SW1990和BxPC3细胞计数和分析; * $P < 0.05$, 与PaTu8988组比较; # $P < 0.05$, 与SW1990组比较。

A~C: PaTu8988, SW1990 and BxPC3 cells were subjected to migration assays, respectively. The migrated cells were stained with crystal violet for 30 min (200 \times). D: PaTu8988, SW1990 and BxPC3 cells were counted and analyzed. * $P < 0.05$ vs PaTu8988 group; # $P < 0.05$ vs SW1990 group.

图4 三种胰腺癌细胞株迁移能力的比较

Fig.4 Comparison of the migration force in three pancreatic cancer cell lines

行基因沉默实验。转染72 h后, 荧光定量PCR结果表明, 与对照组(*EGFP* shRNA)相比, 实验组(*MBD2* shRNA)中*MBD2*的mRNA水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图5A)。Western blot检测结果表明, 实验组*MBD2*的蛋白质水平也明显降低(图5B)。因此证实, 本实验所构建的*MBD2* shRNA质粒能够有效地抑制胰腺癌PaTu8988和SW1990细胞中*MBD2*基因的表达。

2.4 下调*MBD2*基因对PaTu8988和SW1990细胞增殖的影响

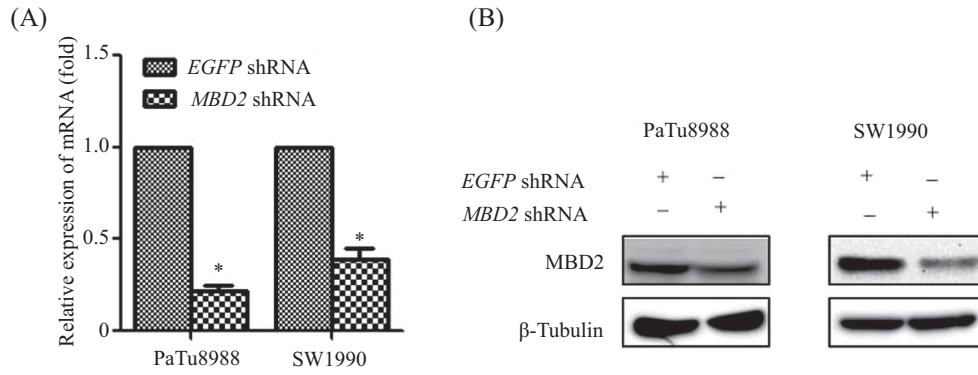
2.4.1 下调*MBD2*对细胞生长能力的影响 CCK-8结果显示, 与对照组相比, 实验组细胞的生长增殖减

慢, 并且随着时间的延长, 抑制作用越明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图6)。

2.4.2 下调*MBD2*对细胞克隆形成能力的影响 克隆形成实验结果显示, PaTu8988细胞中, 对照组与实验组克隆形成数分别为 124 ± 2 、 36 ± 6 ; SW1990细胞中, 对照组与实验组克隆形成数分别为 113 ± 4 、 47 ± 4 。实验组(*MBD2* shRNA组)细胞克隆形成能力明显弱于对照组(*EGFP* shRNA组), 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图7)。

2.5 下调*MBD2*基因对PaTu8988和SW1990细胞迁移的影响

Transwell实验结果显示, 在PaTu8988细胞中,

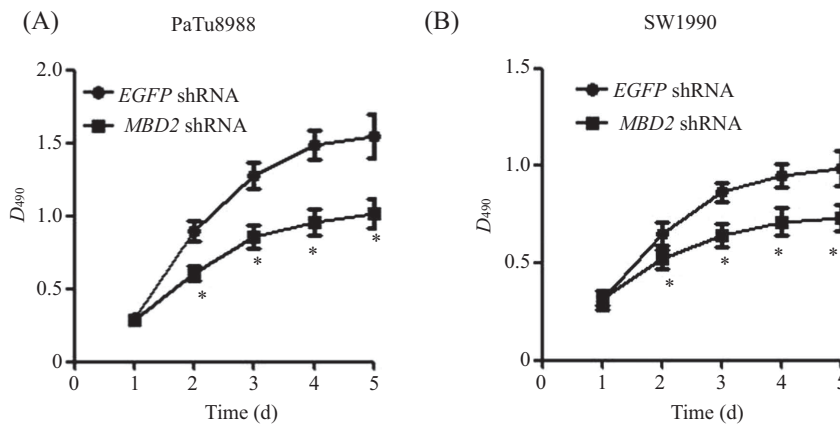


A: *MBD2* shRNA 分别转染 PaTu8988 和 SW1990 细胞后 *MBD2* mRNA 水平; * $P < 0.05$, 与 *EGFP* shRNA 组比较。B: *MBD2* shRNA 分别转染 PaTu8988 和 SW1990 细胞后 *MBD2* 蛋白质水平。

A: *MBD2* mRNA levels in PaTu8988 and SW1990 cells transfected by *MBD2* shRNA; * $P < 0.05$ vs *EGFP* shRNA group. B: *MBD2* protein levels in PaTu8988 and SW1990 cells transfected by *MBD2* shRNA.

图5 shRNA介导的PaTu8988和SW1990细胞MBD2表达抑制

Fig.5 shRNA-mediated *MBD2* depletion in PaTu8988 and SW1990 cells

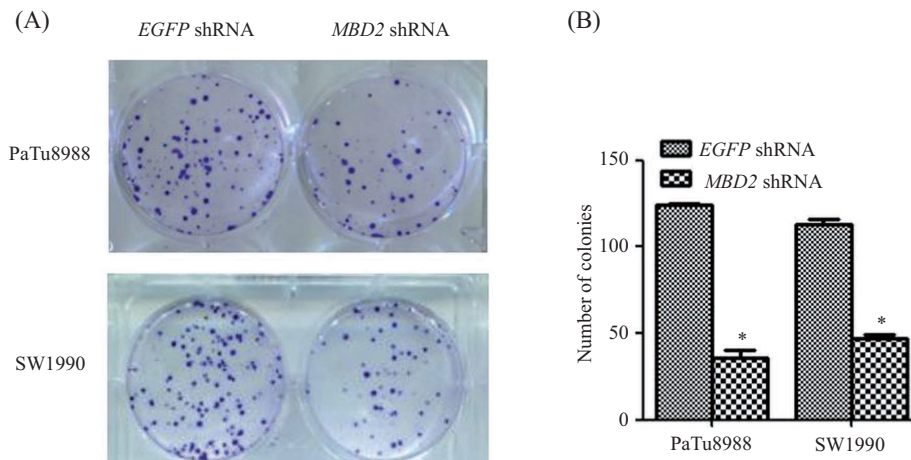


* $P < 0.05$, 与 *EGFP* shRNA 组比较。

* $P < 0.05$ vs *EGFP* shRNA group.

图6 下调*MBD2*基因对PaTu8988和SW1990细胞生长的影响

Fig.6 The effect of *MBD2* knockdown on cell growth of PaTu8988 and SW1990 cells

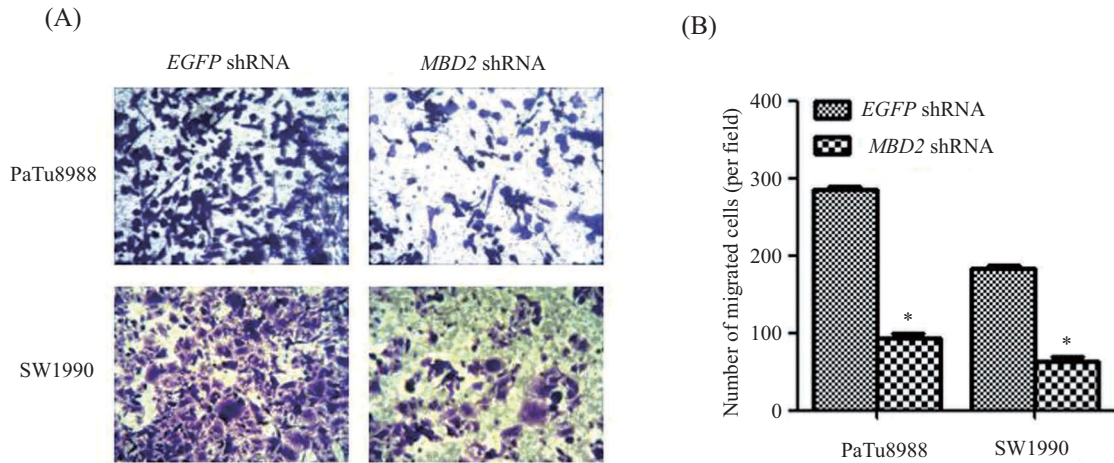


A: PaTu8988 和 SW1990 细胞转染 *EGFP* shRNA 或 *MBD2* shRNA 后, 进行细胞克隆形成实验; B: PaTu8988 和 SW1990 细胞形成的克隆计数和分析; * $P < 0.05$, 与 *EGFP* shRNA 组比较。

A: PaTu8988 and SW1990 cells transfected with the *EGFP* shRNA or *MBD2* shRNA were subjected to colony formation assays; B: PaTu8988 and SW1990 cells colony formation were counted and analyzed. * $P < 0.05$ vs *EGFP* shRNA group.

图7 下调*MBD2*基因对PaTu8988和SW1990细胞克隆形成的影响

Fig.7 The effect of *MBD2* knockdown on cell colony formation of PaTu8988 and SW1990 cells



A: PaTu8988和SW1990细胞转染EGFP shRNA或MBD2 shRNA后进行迁移实验, 迁移的细胞用结晶紫染色30 min(200×)。B: PaTu8988和SW1990细胞计数和分析; * $P < 0.05$, 与EGFP shRNA组比较。

A: PaTu8988 and SW1990 cells transfected with the EGFP shRNA or MBD2 shRNA were subjected to migration assays. The migrated cells were stained with crystal violet for 30 min (200×). B: PaTu8988 and SW1990 cells were counted and analyzed; * $P < 0.05$ vs EGFP shRNA group.

图8 下调MBD2基因对PaTu8988和SW1990细胞迁移的影响

Fig.8 The effect of MBD2 knockdown on cell migration of PaTu8988 and SW1990 cells

实验组与对照组穿膜细胞数分别为 285 ± 4 、 94 ± 5 , 两组差异有统计学意义($P < 0.05$); 在SW1990细胞中, 实验组与对照组穿膜细胞数分别为 182 ± 4 、 63 ± 5 , 两组差异有统计学意义($P < 0.05$)(图8)。由此说明, 下调MBD2基因使PaTu8988和SW1990细胞迁移能力减弱。

综上所述, 下调MBD2基因后, 胰腺癌细胞PaTu8988和SW1990细胞增殖和迁移能力明显受到抑制。

3 讨论

DNA甲基化是最重要的表观遗传修饰之一, 分子遗传学研究表明, DNA胞嘧啶甲基化修饰通常与沉默基因表达有密切联系^[10]。而甲基化水平过高或过低与肿瘤的发生、发展有重要相关性, 几乎所有的人类肿瘤中都存在肿瘤相关基因的异常甲基化^[11]。在癌症中, 肿瘤抑制基因启动子区CpG岛的高甲基化作为一个普遍的失活机制介导抑癌基因沉默, 与癌症的发生、发展密切相关^[12-14]。目前认为, 高甲基化的CpG岛通过特异的甲基化结合蛋白(MBD家族)与组蛋白去乙酰化酶(HDAC)协同作用, 导致基因失活。这一间接途径是基因失活的主要机制^[15]。可见, MBD家族在肿瘤相关异常DNA甲基化这一过程中具有重要的桥梁作用。

MBD2作为MBD家族的成员之一, 同样具有特异性识别并结合甲基化DNA的能力并抑制基因转

录功能^[16]。MBD2这一甲基化依赖的转录抑制子, 在NurD复合物的形成中起重要作用, 通过募集核小体重塑和HDAC至甲基化位点使组蛋白去乙酰化从而引发基因沉默^[15]。早在2004年, Campbell等^[17]发现, 在敲除MBD2基因的裸鼠体内注射肺癌或结肠癌细胞形成肿瘤不成功, 而且在建立小鼠肠肿瘤模型过程中, 显示出缺失MBD2基因能够降低肿瘤发生率。研究表明, 在许多疾病中, 包括神经系统疾病和癌症, MBD家族蛋白域内突变发生, 导致MBD特异性结合的甲基化位点缺失和基因失调^[18]。由此更说明, MBD家族在肿瘤的发生、发展中具有重要作用。

鉴于MBD家族在胰腺癌演化过程中的作用尚不清楚, 尤其是MBD2的作用鲜有报道。本文研究了MBD2对胰腺癌细胞增殖和迁移作用的影响。结果发现, MBD2在三种胰腺癌株中差异性表达, 在PaTu8988和SW1990细胞的表达量明显高于细胞BxPC-3; 同时发现, PaTu8988和SW1990细胞的增殖能力和迁移能力均比BxPC3细胞强, 于是本实验分别选择MBD2高表达的PaTu8988和SW1990细胞进行基因沉默实验, 来研究MBD2对胰腺癌细胞增殖和迁移的影响。

本研究构建了特异性干扰MBD2的shRNA载体, 分别瞬转入PaTu8988和SW1990细胞中。转染72 h后, 荧光定量PCR和Western blot检测结果表明, MBD2基因在mRNA及蛋白质水平均被明显抑制, 说明本实验设计的干扰载体是有效的。在此基础

上,进一步采用了CCK-8实验、克隆形成实验检测细胞增殖变化,Transwell实验检测细胞迁移能力变化。结果表明,MBD2的表达被抑制后,PaTu8988和SW1990细胞的增殖和迁移能力明显降低,说明MBD2对于胰腺癌的增殖和迁移作用有明显影响,但对于其在胰腺癌中作用的可能机制仍然不清楚。已有研究表明,肿瘤抑制基因的启动子的甲基化是肿瘤发生事件的表征,因为DNA甲基化局部增强在肿瘤中最常见,与肿瘤关系比较明确,被认为是抑癌基因失活的重要途径^[19-20]。有研究报道,胰腺癌中CpG岛异常甲基化可能是*p15*、*p16*抑癌基因功能失活的重要原因之一,并且可能是早期事件^[21]。本研究认为,MBD2可能是通过特异性结合某些高甲基化CpG岛,抑制其转录,使相关抑癌基因表达下调,进而促进胰腺癌的发生、发展。本研究发现,MBD2的表达被抑制后,PaTu8988和SW1990细胞的增殖和迁移能力明显降低,推测可能是由于*p15*、*p16*抑癌基因表达上调所致,具体机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Siegel R, Ma J, Zou Z, Ahmedin J. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(5): 9-29.
- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol* 2013; 24(3): 792-800.
- Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 1989; 58(3): 499-507.
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99(5): 451-4.
- Berger J, Bird A. Role of MBD2 in gene regulation and tumorigenesis. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(6): 1537-40.
- Alvarado S, Wyglinski J, Suderman M, Andrews SA, Szyf M. Methylated DNA binding domain protein 2 (MBD2) coordinately silences gene expression through activation of the microRNA hsa-mir-496 promoter in breast cancer cell line. *PLoS One* 2013; 8(10): e74009.
- Zhu D, Hunter SB, Vertino PM, van Meir EG. Overexpression of MBD2 in glioblastoma maintains epigenetic silencing and inhibits the antiangiogenic function of the tumor suppressor gene BAI1. *Cancer Res* 2011; 71(17): 5859-70.
- Chen Y, Luo J, Tian R, Sun H, Zou S. miR-373 negatively regulates methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) in hilar cholangiocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2011; 56(6): 1693-701.
- He M, Fan J, Jiang R, Tang WX, Wang ZW. Expression of DNMTs and MBD2 in GIST. *Biomed Rep* 2013; 1(2): 223-7.
- Kandi V, Vadakedath S. Effect of DNA methylation in various diseases and the probable protective role of nutrition: A mini-review. *Cureus* 2015; 7(8): e309.
- Paska AV, Hudler P. Aberrant methylation patterns in cancer: A clinical view. *Biochem Med (Zagreb)* 2015; 25(2): 161-76.
- Kikuchi Y, Tsuji E, Yagi K, Matsusaka K, Tsuji S, Kurebayashi J. Aberrantly methylated genes in human papillary thyroid cancer and their association with BRAF/RAS mutation. *Front Genet* 2013; 4(271): 1-11.
- Zhao X, Yang F, Li S, Liu M, Ying S, Jia X, et al. CpG island methylator phenotype of myelodysplastic syndrome identified through genome-wide profiling DNA methylation and gene expression. *Br J Haematol* 2014; 165(5): 649-58.
- Fetahu IS, Hobaus J, Aggarwal A. Calcium-sensing receptor silencing in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation and loss of acetylation on histone 3. *Int J Cancer* 2014; 135(9): 2014-23.
- 邹丹丹, 王晓利, 汪海林. DNA 甲基化结合蛋白. *环境化学*(Zou Dandan, Wang Xiaoli, Wang Hailin. Methylated DNA binding proteins. *Environmental Chemistry*)2014; 33(10): 1672-80.
- Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: Specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(10): 1509-22.
- Campbell PM, Bovenzi V, Szyf M. Methylated DNA-binding protein 2 antisense inhibitors suppress tumorigenesis of human cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 2004; 25(4): 499-507.
- Du Q, Luu PL, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: Readers of the epigenome. *Epigenomics* 2015; 7(6): 1051-73.
- Li L, Chen BF, Chan WY. An Epigenetic Regulator: Methyl-CpG-binding domain protein 1 (MBD1). *Int J Mol Sci* 2015; 16(3): 5125-40.
- Morris MR, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, et al. Functional epigenomics approach to identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2008; 98(2): 496-501.
- Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, et al. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr Genomics* 2011; 12(1): 15-24.