

DNA甲基化对细胞周期的调控

董锁花¹ 王芳² 包金凤^{1*}

(¹内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010110; ²山东省枣庄市山亭区人民医院药剂科, 枣庄 277200)

摘要 细胞周期(cell cycle)是一种非常复杂和精细的调节过程, 该过程是连续而不可逆的。细胞周期紊乱与很多疾病的发生发展有关, 如肿瘤等。目前的研究发现, 表观遗传学(epigenetics)可以通过影响细胞周期关键性调控因素而调控细胞周期。DNA甲基化(DNA methylation)是最常见的表观遗传修饰方式, 其在基因的转录、基因组的稳定性和细胞周期的调控中发挥重要的作用。因此, 该文重点对近年来DNA甲基化在细胞周期调控中的研究进展作一综述, 以期为提高肿瘤等疾病的临床诊断和治疗水平提供理论依据。

关键词 表观遗传学; DNA甲基化; 细胞周期

Effects of DNA Methylation on the Cell Cycle

Dong Suohua¹, Wang Fang², Bao Jinfeng^{1*}

(¹Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010110, China;

²Department of Pharmacy, the People's Hospital of Shanting District, Zaozhuang 277200, China)

Abstract Cell cycle is a very complex and precise regulation process, which is continuous and irreversible. Cell cycle disorder is an important pathology for cancer and age-related diseases. Recently, epigenetics may be changed through cell division and proliferation and stable genetic phenomenon. DNA methylation is the most common epigenetic modification. DNA methylation plays a critical role in the regulation of gene transcription, genome stability, cell cycle and so on. The data found that epigenetic pattern abnormal caused the cell cycle disorder is an important mechanism for cancer and age-related diseases. DNA methylation can affect cell cycle by regulating the key factors of cell cycle regulation. In this paper, the effects of DNA methylation on the cell cycle are reviewed, in order to provide a theoretical basis for improving the clinical diagnosis and treatment of tumors and other diseases in the future.

Keywords epigenetics; DNA methylation; cell cycle

表观遗传学(epigenetics)修饰是指在DNA序列没有发生变化的情况下, 基因功能发生可遗传变化, 并最终导致了表型的变化。表观遗传学修饰的方式主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA、染色质重塑及基因组蛋白印记。DNA甲基化(DNA

methylation)是最早发现的表观遗传修饰之一^[1], 它在调控基因转录水平、染色体结构的稳定性、基因印记和染色体失活等方面发挥重要的作用^[2]。近年来的研究发现, DNA甲基化异常会导致细胞周期紊乱, 从而引起疾病的发生, 如肿瘤等。

收稿日期: 2018-07-12 接受日期: 2018-09-12

国家自然科学基金(批准号: 81541160)、内蒙古自然科学基金(批准号: 2015MS0312)和内蒙古医科大学百万工程基金(批准号: YKD2014KJB002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-6657564, E-mail: jinfengbao66@126.com

Received: July 12, 2018 Accepted: September 12, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81541160), Inner Mongolia Natural Science Foundation (Grant No.2015MS0312) and the Millions Projects of Inner Mongolia Medical University (Grant No.YKD2014KJB002)

*Corresponding author. Tel: +86-471-6657564, E-mail: jinfengbao66@126.com

网络出版时间: 2018-11-26 16:59:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181126.1659.006.html>

1 DNA甲基化

DNA甲基化是哺乳动物基因组主要的表观遗传学调节机制。DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNMTs)的催化作用下,将S-腺苷甲硫氨酸(SAM)中的甲基转移到胞嘧啶的第5位碳原子上,形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)^[4]。已知哺乳动物体内共有5种DNMTs家族成员: DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B和DNMT3L。其中, DNMT1是维持甲基化酶, DNMT3A和DNMT3B是重新甲基化酶。研究发现, DNMT1、DNMT3A和DNMT3B除了能识别5-mC的生物功能外,还参与了基因组中5-mC的维持和产生机制^[5]。在脊椎动物中, CpG二核苷酸是DNA甲基化发生的主要位点。其中, CpG岛(CpG island)是指基因上富含CpG的序列,常位于转录调控区附近。

DNA甲基化对基因表达的调节主要通过两种途径完成,一是通过甲基化的CpG二核苷酸来影响DNA结构,进而直接阻碍转录因子与靶基因的结合;二是甲基化结合蛋白(如MeCP2)与基因中甲基化的CpG二核苷酸相结合,诱导染色体的状态改变,从而抑制基因的转录。DNA甲基化模式是动态的,以适应环境等的变化^[6]。研究表明,肿瘤等疾病是细胞周期异常性疾病,异常甲基化影响细胞分裂的生物学稳定性^[7]。CpG岛的高甲基化可导致抑癌基因(如参与细胞周期的调控、DNA修复和细胞凋亡等的基因)沉默; CpG低甲基化可导致癌基因活化^[8]。另外,在肿瘤细胞中DNMTs的活性增高可导致未甲基化的抑癌基因启动子CpG岛的甲基化程度增高^[9]。

2 细胞周期及其调控

细胞周期(cell cycle)是指正常连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂结束的过程。根据各个时期的特点不同,它可以将遗传信息DNA精确地复制并通过有丝分裂的方式分配到子代细胞中。细胞周期包括静止期(G₀期)、DNA合成前期(G₁期)、DNA合成期(S期)、DNA合成后期(G₂期)和有丝分裂期(M期)。真核细胞经常受各种不利环境因素(如电离辐射、化学毒物、紫外线等)的影响而导致DNA突变,从而引起肿瘤及其他疾病的发生。为确保细胞周期的正常运行和遗传信息的稳定遗传,细胞在长期的进化过程中逐渐形成了一整套细胞周期正常运行的机制,其中最重要的是细胞周

期检测点,也被称为DNA损伤检测点。数据显示,研究最多的是G₁/S期检测点、G₂/M期检查点、中/后期检查点(又称纺锤体组装检查点)。这些检测点使细胞周期进程减慢或阻滞细胞周期进程,以提供给细胞充足的时间用于修复受损的DNA,从而保证细胞周期有序运行,以应对不利因素的影响。然而,不利的环境等可能引起检测点调控异常,从而导致肿瘤^[10]、帕金森病^[11]、阿尔茨海默病^[12]等疾病的发生。

3 DNA甲基化对细胞周期检测点的调控

3.1 DNA甲基化对G₁/S检测点的调控

细胞周期中G₁时程的长短与细胞增殖分化状态密切相关^[13]。G₁期检查点是细胞周期调控的关键, G₁期细胞周期蛋白的异常表达很可能引起细胞周期失调,从而促进疾病的发生。细胞周期的调控是通过有正向调节作用的细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)与负向调节作用的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin dependent kinase inhibitions, CDKI)相互作用来实现的。CDK使抑癌基因*Rb*的蛋白产物磷酸化,使细胞进入S期;而CDKI则抑制CDK活性,阻断*Rb*磷酸化,使细胞停滞于G₁期,进而发生分化、凋亡或进入静止期。*p16*、*p27*、*p21*、*p57*、*p53*、*PEN1*等基因是细胞生长周期中的负调节因子,主要参与G₁/S检测点的调控。它们与细胞周期的调控、细胞凋亡、DNA修复、细胞分化等重要的生物学功能有关。

3.1.1 *p16* *p16*是一种抑癌基因,位于人类第9号染色体21号短臂上,包含2个内含子和3个外显子。*pRb*是遗传性视网膜母细胞瘤中发现的抑癌产物,当CyclinD与相应CDK结合为激酶复合物时可对*pRb*磷酸化,磷酸化的*pRb*可释放其结合的转录因子E2F, E2F因子控制并参与细胞增生、生长、分化、凋亡基因的表达,这些基因的产物促进细胞进入S期, *p16*与cyclinD竞争结合CDK4/6使其失活,从而抑制*Rb*蛋白磷酸化,进而阻止细胞周期由G₁期进入S期^[14]。研究发现, *p16*基因的主要失活机制是*p16*基因启动子区的超甲基化, CpG岛的超甲基化抑制*p16*转录,进而导致其表达产物*p16*蛋白的缺失^[15]。相反, CPG岛低甲基化可使*p16*基因回复正常的转录^[16]。研究表明, *p16*基因超甲基化使cyclinD依赖性蛋白激酶的活性增高,导致*Rb*蛋白异常磷酸化,从而使细胞绕过正常细胞周期检查点增加细胞增殖和基因组的

不稳定性;同时,*p16*基因超甲基化可激活cyclinD1-CDK4/CDK6-PRb-E2F的环路,使其无限制反复进行,使细胞周期由G₁期进入S期,最终导致细胞过度增殖及肿瘤的发生^[17-18]。Umamura等^[19]的研究表明,血浆中*p16*基因启动子甲基化可在早期肺癌中被发现,提示抑癌基因甲基化是肿瘤发生的早期事件。

3.1.2 p27 *p27*基因定位于染色体12p12~13.1,其编码的蛋白质含有198个氨基酸,由2个外显子和2个内含子组成。研究表明,G₁期是其作用点,具有阻止细胞通过G₁/S期转化的“关卡”作用。*p27*对CDK的抑制作用表现为三方面:即*p27*可抑制CDK的激活过程、*p27*也可抑制已经激活的cyclin/Cdk的激酶活性、*p27*还可通过阻止Rb蛋白磷酸化控制细胞周期G₁/S转变的进程。DNA甲基调控主要通过DNMTs,该酶作用于*p27*甲基化酶位点Sma I、Hha I、Ava I。三个酶的作用位点位于DNA的胞嘧啶鸟嘌呤富含区,该区域与RNA聚合酶II转录基因的启动子有60%的一致性,甲基化DNA的胞嘧啶干扰了反式作用因子,使*p27*的转录产生障碍^[20],抑制了*p27*蛋白和mRNA的表达,导致*p27*基因沉默,使细胞大量分化和增生。

3.1.3 p21 *p21*蛋白是CIP家族中的一员,人类的*p21*基因位于6p21.2,全长约11 Kb,含有3个外显子和2个内含子。它是位于*p53*基因下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子。当DNA损伤发生在G₁期时,*p21*可通过抑制CDK活性来阻止细胞进入S期,从而抑制DNA复制;当DNA损伤发生在S期时,*p21*可通过使DNA聚合酶的相关因子失活而抑制DNA合成,从而使细胞修复,保证遗传物质准确地传递给子代,从而避免了由于DNA损伤的累积而导致的肿瘤发生的可能性^[21]。研究表明,DNA甲基化和组蛋白乙酰化可使*p21*基因失活^[22]。其中,由于在转录起始位点周围*p21*启动子含有高密度的甲基化CpG二核苷酸聚集^[23],因此易发生甲基化。此外,*p21*与Cyclin、CDK和PCNA以四聚体形式存在,其中*p21*蛋白在其第144~151氨基酸上存在PCNA结合区域。PCNA是一种分子量为36 kDa的蛋白质,为DNA聚合酶的辅助蛋白。*p21*影响PCNA的功能主要依赖于其抑制了PCNA和其他功能蛋白的结合。目前发现至少有两种DNA代谢酶可以与*p21*竞争PCNA的结合,其中包括DNMT1。DNMT1可以直接和PCNA结合,它们的结合会被*p21*蛋白第141~160位氨基酸残基阻断,

因此,DNA复制过程中*p21*蛋白可以调控DNA甲基化的水平。所以通常认为,在哺乳动物细胞中*p21*对DNMT1与PCNA结合是负调控^[24-25],*p21*从PCNA复合物中的丢失可引起DNA损伤修复期间甲基化的异常增加^[26]。

3.1.4 p57 人类的*p57*基因定位于11p15.15上,含有4个外显子和3个内含子,其中,2个外显子位于编码区内。*p57*与*p21*、*p27*蛋白同源性在40%以上,*p57*、*p21*、*p27*共享一个N末端区,以此结合并抑制周期蛋白-CDK复合物的激酶活性。它主要抑制CCNE-CDK2、CCNE-CDK3、CCNA-CDK2、CCND-CDK2等。G₁期和S期激酶复合物^[27]阻止DNA合成和细胞进入S期来抑制细胞增殖。异常的启动子甲基化修饰,能导致*p57*基因沉默。研究表明,与基因沉默相关的不是CpG岛的边缘区域,而是转录起始位点周围的区域(300~400 bp)密集甲基化^[28]。Kuang和他的同事^[29]进行的一项研究发现,在不同的白血病细胞系中,有不同的启动子甲基化状态。在*p57*基因启动子甲基化的白血病细胞系中,*p57*过表达导致细胞生长显著停滞和明显的细胞凋亡,*p57*部分甲基化只导致细胞生长的适度抑制而对细胞凋亡没有影响。这表明,*p57*的抑癌特性与其细胞的甲基化状态相关。

3.1.5 p53 哺乳动物细胞在受到DNA损伤后,细胞周期的进程将会停滞于两个关键点,即G₁/S和G₂/M检测点。抑癌基因*p53*主要在G₁检查点上发挥重要作用。*p53*作为重要的转录因子在DNA损伤、癌基因活化、应激等作用下,一方面与下游靶基因的DNA特异性结合来激活靶基因的转录,另一方面激活的*p53*通过细胞周期和诱导细胞凋亡等方式防止肿瘤的发生。转录因子*p53*翻译后要经过一系列复杂的加工与修饰,最近研究发现,甲基化修饰是*p53*的活性调节方式之一,对维持*p53*的活性与稳定性有极其重要的影响^[30]。一个特定的、单一的赖氨酸甲基化就可以决定*p53*的活性,其中,转录因子*p53*羧基末端的K372位点被SET9甲基化可促进*p53*表达,导致细胞周期阻滞甚至引起凋亡。有研究表明,*p53*产生的效应和甲基化位点相关,如*p53*羧基末端K370位点被甲基转移酶Smyd2甲基化后,会阻遏*p53*蛋白与DNA的结合,抑制*p53*的转录^[31]。此外,*p53*的活性还与该位点甲基化程度密切相关。在DNA复制过程中,DNA甲基转移酶抑制剂通过与DNMTs共价

结合,抑制DNMTs的甲基化作用,使沉默基因重新表达^[32]。由于p53高频率的遗传修饰和功能的双重性,因此,成为迄今为止最重要的肿瘤抑制因子。当DNA损伤时,p53负责细胞周期阻滞。当损伤不能被修复时,p53会激活一系列导致细胞凋亡的事件。研究表明,p53基因在所有类型的白血病中高甲基化,因此,p53可能是癌症甲基化的潜在靶标^[33]。

p53基因对维持细胞的周期起重要作用。一方面,p53基因诱导产生的p21和Gadd45可与PCNA结合,修复损伤的DNA;另一方面,p53基因还可以通过与RPA结合而抑制RPA与DNA复制起始点的结合,在G₁后期调节DNA复制起始复合物的合成,在S期对细胞进行负调控。

3.1.6 PTEN 第10号染色体缺失性的磷酸酶及张力蛋白同源(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)基因位于人类染色体10q23.3。*PTEN*是第一个发现具有双特异磷酸酶活性的抑癌基因,它通过对3,4,5-三磷酸肌醇(PIP3)的去磷酸化作用来影响PI3K/Akt信号通道,激活Caspase-9及p27等蛋白活性,抑制CDKs活性,从而使细胞周期停滞在G₁期,引起肿瘤细胞的凋亡,从而发挥其抗肿瘤作用^[34-35]。高表达的PTEN能通过抑制CDK活性使Rb保持去磷酸化并结合E2F的状态,从而抑制细胞增殖。PTEN蛋白功能的缺失可导致PI3K下游信号通路过度激活,引起丝氨酸/苏氨酸激酶和蛋白激酶B(Akt/PKB)堆积。

研究发现,*PTEN*基因的上游区域含有p53蛋白的结合位点,p53通过与该位点的结合上调PTEN的转录^[36]。PTEN的失活与肿瘤细胞的转移密切相关。在PTEN cDNA的5'端的非翻译区富含多个CG的重复序列,为甲基化调节提供了可能。*PTEN*除了突变和缺失外,甲基化是其基因失活的另一途径。*PTEN*基因CpG岛较高的甲基化使其最终沉默^[37]。在北印度妇女的散发性乳腺癌中,启动子甲基化是一种部分导致*PTEN*沉默的机制^[38]。*PTEN*基因CpG岛的甲基化与前列腺癌的复发呈正相关,CpG岛异常甲基化可能介导肿瘤进展^[39]。

PTEN与PI3K之间的平衡也参与了中枢神经系统正常功能的维持^[40]。PTEN广泛分布于成年哺乳动物中枢神经系统中^[41]。神经干细胞增殖和分化受PTEN调节,PTEN通过调节G₀/G₁期细胞周期的进入,负性调控神经干细胞的自我更新^[42]。相反,缺失

PTEN后通过促进从G₀/G₁退出和增强G₁/S转换而促进神经干/祖细胞的自我更新^[43]。许多研究也已证实,在成熟分化的神经元中,PTEN的失活能促进轴突的生长^[44]、异位轴突出现和突触的形成。PTEN的缺失导致神经干细胞来源的肿瘤发生^[45]。*PTEN*基因CpG岛较高的甲基化使其最终失表达,从而增加G₁/S转换使得神经干细胞分化异常。

3.2 DNA甲基化对G₂/M检测点的调控

3.2.1 Gadd45 生长抑制及DNA损伤诱导基因45(growth arrested and DNA damage 45, *Gadd45*)是p53的效应分子之一,是一种广泛表达于多种正常组织中特别是静息期细胞中的细胞核蛋白。在细胞周期调控中,Gadd45蛋白最突出的作用是可以破坏Cdk1/cyclinB1复合物影响G₂/M检查点。Gadd45蛋白直接与CDK相互作用,抑制CDK1/Cyclin B1复合物的激酶活性。Gadd45蛋白参与了DNA修复过程,当DNA损伤后,所有的Gadd45蛋白家族成员被迅速诱导,从而导致细胞周期停滞和/或凋亡^[46]。Gadd45家族包括Gadd45 α 、Gadd45 β 和Gadd45 γ 3个成员。它们的分子功能相似,但它们在在不同情况下表达不同。Gadd45 α 参与维持基因稳定性,是DNA修复和抑制细胞生长的核心蛋白^[47]。研究表明,Gadd45 α 是招募DNA甲基化的位点^[48],能够促进CpG甲基化并对激活DNA甲基化起着关键作用。而Gadd45 α 蛋白也参与DNA去甲基化过程且在其中起着重要作用。Gadd45 α 招募DNA修复机制促进去甲基化,通过DNA修复将甲基化标记去除,从而使沉默的表观遗传基因减少。因此,Gadd45 α 的作用被认为是通过改变DNA甲基化状态来解除由表观遗传调节引起的基因沉默^[49]。研究表明,Gadd45 α 的功能改变或者表达异常都将导致基因组不稳定性,进而会促进细胞向恶性转化,在神经系统中,Gadd45 α 由于损伤信号被激活而导致细胞周期停滞^[50]。Gadd45 β 被证明是一种参与神经营养因子基因[包括脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, *BDNF*)]启动子的DNA去甲基化的蛋白质,神经营养因子其已经高度涉及酒精饮酒行为,较低的DNA去甲基化蛋白Gadd45 β 水平可能影响BDNF的表达,这可能导致酒精饮酒行为改变^[51]。另外,Gadd45 γ 在肿瘤组织中少有突变,其启动子的CpG岛是肿瘤特异的甲基化靶序列,很多肿瘤因Gadd45 γ 启动子甲基化后而出现Gadd45 γ 表达降低或缺失;无Gadd45 γ 突变的肿瘤中,

启动子的超甲基化状态可通过去甲基化试剂逆转, 这可作为一个新的肿瘤治疗方法^[52]。另外, 有研究表明, *Gadd45a*启动子区甲基化水平降低与DNMTs增高有关^[53]。DMNTs的水平是伴随细胞周期的进程而发生改变, 这种改变持续存在于S期和G₂/M期, 而*Gadd45*是*p53*基因的下游靶基因, 对细胞周期G₂/M期具有阻滞作用^[54]。因此, *Gadd45*启动子DNA异常甲基化使*Gadd45α*过表达, 可引起G₂/M期检测点调控的紊乱。

3.2.2 *p53*的下游基因 G₂/M期进程受到成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)(一种cyclinB1/cdc2复合物)的驱动, 它是G₂/M期监测点通路上的主要靶点。在*p53*调控的G₂/M期转变机制中, cdc2对于细胞进入有丝分裂必不可少, 它同时被*p53*的三个转录因子*p21*、*Cadd45*、*14-3-3σ*抑制。*14-3-3σ*抑癌基因位于1p35, 它是重要的细胞周期负性调节蛋白之一, *14-3-3σ*通过对*p53*的作用而调控G₂/M检查点, 从而对细胞周期发挥负性调控作用^[55]。研究发现, 在许多肿瘤细胞中, *14-3-3σ*基因CpG岛的甲基化发生的频率高, 使*14-3-3σ*基因沉默或低表达, 导致G₂期监测点损伤, 从而使细胞发生恶性增殖和转化^[56]。

3.3 纺锤体检测点

纺锤体组装检查点的作用是监测纺锤体形成过程中染色体不正确的组合, 在有丝分裂中期引发周期阻滞, 以阻止有丝分裂后期启动、胞质分裂和DNA再复制。哺乳动物纺锤体检查点相关蛋白Mad和Bub在微管黏附作用缺陷时被激活, 抑制有丝分裂后期启动复合物(anaphase promoting complex, APC), 阻止有丝分裂中后期的周期进展。Li等^[57]分离出一种人类有丝分裂检查点基因(human mitotic check-point gene) *hsMAD2*, 它存在于M期早期浓缩染色体的着丝粒上, 当纺锤体装配出现紊乱时, *hsMAD2*便灭活APC使细胞停滞在M期。在肝癌细胞的研究中发现, *hsMAD2*基因上游0.5 Kb的启动子频繁出现异常甲基化而使*hsMAD2*沉默^[58], 并最终导致M期检查点功能缺陷以及肿瘤形成。此外, PLKs激酶也参与了纺锤体形成的调节。PLKs是丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员。PLKs在整个细胞周期进展中表现为一种动力学定位, 包括在有丝分裂早期的着丝粒和中心体定位、纺锤体定位和后期的胞质分裂位点的定位。从这种动力学定位模式推断,

PLKs通过磷酸化Cdc25C和cyclinB控制有丝分裂的启动, 继而激活Cdk1/cyclinB激酶复合物。PLKs也可影响染色质间黏着力的强弱和中心体的成熟, 引起双极纺锤体形成。在纺锤体形成期间对PLKs功能的破坏, 会导致细胞周期蛋白降解受阻和有丝分裂的持续进行。PLK4在不同类型的肿瘤中表达水平各异, 在原发性肝癌中其表达下调, 推测可能与启动子的高甲基化或异常丢失相关^[59]。在星形细胞瘤和多形性胶质母细胞瘤中的*PLK5*基因高甲基化使*PLK5*基因沉默, 进而加快肿瘤发展进程; 增加*PLK5*的表达可致胶质瘤细胞的细胞周期停滞, 进而导致肿瘤细胞凋亡^[60]。

4 结语

细胞的生长和分化是细胞生命活动的基本特征。哺乳动物细胞通过细胞周期的调控来实现个体的发育及自我的更新。研究发现, 很多疾病(如肿瘤、帕金森病、阿尔茨海默病)的发生、发展与细胞周期监测点(如*p53*、*p21*等)的异常密切相关。尽管目前对于DNA甲基化在细胞周期调控中的重要作用已被认可, 但是有关DNA甲基化与许多细胞周期关键性调控因素之间的具体作用机制仍未完全阐明。因此, DNA甲基化在细胞周期调控机制的深入研究中, 不仅有助于进一步了解细胞周期的复杂过程, 同时还将大大提高肿瘤等疾病的临床诊断和治疗水平。

参考文献 (References)

- 1 Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013; 14(3): 204-20.
- 2 Ehrlich M, Lacey M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics* 2013; 5(5): 553-68.
- 3 Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115(10): 39-59.
- 4 Geiman TM, Muegge K. DNA methylation in early development. *Mol Reprod Dev* 2010; 77(2): 105-13.
- 5 Chubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* 2015; 517(7534): 321-6.
- 6 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(11): 148-59.
- 7 Al-Kaabi A, van Bockel LW, Pothen AJ, Willems SM. p16 (INK4A) and p14 (ARF) gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Dis Markers* 2014; 2014: 260549.
- 8 Radhakrishnan R, Kabekkodu S, Satyamoorthy K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis.

- J Oral Pathol Med 2011; 40(9): 665-76.
- 9 Sun L, Hui AM, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase expression is associated with an early stage of human hepatocarcinogenesis. *Ipn J Cancer Res* 1997; 88(12): 165-70.
- 10 Dugué A, Brinkman MT, Milne RL, Wong EM, FitzGerald LM, Bassett JK, *et al.* Genome-wide measures of DNA methylation in peripheral blood and the risk of urothelial cell carcinoma: a prospective nested case-control study. *Br J Cancer* 2016; 115(6): 664-73.
- 11 Chuang YH, aul KC, Bronstein JM, Bordelon Y, Horvath S, Ritz B. Parkinson's disease is associated with DNA methylation levels in human blood and saliva. *Genome Med* 2017; 9(1): 76-88.
- 12 Gao Z, Fu HJ, Zhao LB, Sun ZY, Yang YF, Zhu HY. Aberrant DNA methylation associated with Alzheimer's disease in the superior temporal gyrus. *Exp Ther Med* 2018; 15(1): 103-8.
- 13 Blomen VA, Boonstra J. Cell fate determination during G₁ phase progression. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(23): 84-104.
- 14 Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16 (ink4a) expression in tumors: Functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* 2011; 10(15): 497-503.
- 15 Cui C, Gan Y, Gu L, Wilson J, Liu Z, Zhang B, *et al.* P16-specific DNA methylation by engineered zinc finger methyltransferase inactivates gene transcription and promotes cancer metastasis. *Genome Biol* 2015; 16: 252-64.
- 16 Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, Khademi H, Malekzadeh R, Moaven O, *et al.* p16INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2010; 10: 138.
- 17 McDermott KM, Zhang J, Holst CR, Kozakiewicz BK, Singla V, Tlsty TD. 16 (INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol* 2006; 4(3): e51.
- 18 Guo T, Chai X, Liu Q, Peng W, Peng Z, Cai Y. Downregulation of P16 promotes cigarette smoke extract-induced vascular smooth muscle cell proliferation via preventing G₁/S phase transition. *Exp Ther Med* 2017; 14(1): 214-20.
- 19 do Nascimento Borges B, Burbano RM, Harada ML. Analysis of the methylation patterns of the p16 INK4A, p15 INK4B, and APC genes in gastric adenocarcinoma patients from a Brazilian population. *Tumors Biol* 2013; 34(4): 127-33.
- 20 Ballestar E, Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002; 23(7): 103-9.
- 21 Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The 21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369(6481): 574-8.
- 22 Shin JY, Kim HS, ark J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60(2): 262-5.
- 23 Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on 21 (WAF1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002; 8(3): 400-5.
- 24 Tan HH, Porter AG. 21(WAF1) negatively regulates DNMT1 expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382(1): 171-6.
- 25 Lubecka-ietruszewska K, Kaufman-Szymczyk A, Stefanska B, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, Fabianowska-Majewska K. Clofarabine, a novel adenosine analogue, reactivates DNA methylation-silenced tumor suppressor genes and inhibits cell growth in breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2014; 723: 76-287.
- 26 Schneider-Stock R, Ocker M. Eipgenetictherapy in cancer: molecular background and clinical development of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors. *IDrugs* 2007; 10(8): 557-61.
- 27 寿延宁, 刘德若, 平野隆, 龚云波, 前田纯一. 非小细胞肺癌57/Ki2和cyclin E的表达及与临床病理和预后的相关性. *中国煤炭工业医学杂志(Shou Yanning, Liu Deruo, Ping Yelong, Gong Yunbo, Maeda Junyi. Expression of 57/Ki2 and cyclin E in non-small cell lung cancer and its correlation with clinicopathology and prognosis. China Coal Industry Medical Journal)* 2007; 6(10): 636-8.
- 28 Kikuchi T, Toyota M, Itoh F, Suzuki H, Obata T, Yamamoto H, *et al.* Inactivation of 57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene* 2002; 21(17): 741-9.
- 29 Kuang SQ, Ling X, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Andreeff M, Garcia-Manero G. Differential tumor suppressor properties and transforming growth factor-beta responsiveness of p57KIP2 in leukemia cells with aberrant p57KIP2 promoter DNA methylation. *Oncogene* 2007; 26(10): 439-48.
- 30 Pinto P, Rocha P, Veiga I, Guedes J, Pinheiro M, Peixoto A, *et al.* Comparison of methodologies for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Genet* 2011; 204(8): 439-46.
- 31 Whitehall V, Tran K, Umaathy A, Grieu F, Hewitt C, Evans TJ, *et al.* A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. *J Mol Diagn* 2009; 11(6): 543-52.
- 32 Hung CC, Lee N, Chang CH, Jong YJ, Chen CP, Hsieh WS, *et al.* Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. *Clin Biochem* 2008; 41(3): 162-6.
- 33 Bodoor K, Haddad Y, Alkhateeb A, Al-Abbadi A, Dowairi M, Magableh A, *et al.* DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(1): 75-84.
- 34 Won SH, Lee HJ, Jeong SJ, Lee HJ, Lee EO, Jung DB, *et al.* Tanshinone IIA induces mitochondria dependent apoptosis in association with an inhibition of phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(11): 828-34.
- 35 Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008; 133(3): 403-14.
- 36 Stankovic T, Milinkovic V, Bankovic J, Dinic J, Tanic N, Dramicanin T, *et al.* Comparative analyses of individual and multiple alterations of p53, PTEN and p16 in non-small cell lung carcinoma, glioma and breast carcinoma samples. *Biomed Pharmacother* 2014; 68(5): 521-6.
- 37 Peng H, Chen Y, Gong P, Cai L, Lyu X, Jiang Q, *et al.* Higher methylation intensity induced by EBV LMP1 via NF-κB/DNMT3b signaling contributes to silencing of PTEN gene. *Oncotarget* 2016; 7(26): 25-37.
- 38 Siddiqui S, Akhter N, Deo SV, Shukla NK, Husain SA. A study on promoter methylation of PTEN in sporadic breast cancer

- patients from North India. *Breast Cancer* 2016; 23(6): 922-31.
- 39 Geybels MS, Fang M, Wright JL, Qu X, Bibikova M, Klotzle B, *et al.* PTEN loss is associated with prostate cancer recurrence and alterations in tumor DNA methylation profiles. *Oncotarget* 2017; 8(48): 338-48.
- 40 Kong D, Yamori T. Advances in development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Curr Med Chem* 2009; 16(22): 839-54.
- 41 Sawada M, Sawamoto K. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio J Med* 2013; 62(1): 13-28.
- 42 Amiri A, Cho W, Zhou J, Birnbaum SG, Sinton CM, McKay RM, *et al.* Pten deletion in adult hippocampal neural stem/progenitor cells causes cellular abnormalities and alters neurogenesis. *J Neurosci* 2012; 32(17): 880-90.
- 43 Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, *et al.* PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(11): 199-204.
- 44 Young W. Sinal cord regeneration. *Cell Translant* 2014; 23(4/5): 573-611.
- 45 Duan S, Yuan G, Liu X, Ren R, Li J, Zhang W, *et al.* PTEN deficiency reprograms human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype. *Nat Commun* 2015; 6: 10068.
- 46 García V, García JM, Peña C, Silva J, Domínguez G, Rodríguez R, *et al.* The GADD45, ZBRK1 and BRCA1 pathway: quantitative analysis of mRNA expression in colon carcinomas. *J Pathol* 2005; 206(1): 92-9.
- 47 Hollander MC, Fornace AJ. Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a. *Oncogene* 2002; 21(40): 228-33.
- 48 Jin SG, Guo C, Feifer G. GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genet* 2008; 4(3): e1000013.
- 49 Gavin D, Kusumo H, Zhang H, Guidotti A, Pandey SC. Role of growth arrest and DNA damage-Inducible, beta in alcohol-drinking behaviors. *Alcohol Clin Exp Res* 2016; 40(2): 263-72.
- 50 Schomacher L. Mammalian DNA demethylation: multiple faces and upstream regulation. *Epigenetics* 2013; 8(7): 679-84.
- 51 Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, *et al.* Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 2009; 323(5917): 74-7.
- 52 Michaelis KA, Knox AJ, Xu M, Kiseljak-Vassiliades K, Edwards MG, Geraci M, *et al.* Identification of growth arrest and DNA-damage-inducible gene beta (GADD45beta) as a novel tumor suppressor in pituitary gonadotrope tumors. *Endocrinology* 2011; 152(10): 603-13.
- 53 Lee B, Morano A, Porcellini A, Muller MT. GADD45 α inhibition of DNMT1 dependent DNA methylation during homology directed DNA repair. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(6): 481-93.
- 54 Zhu N, Shao Y, Xu L, Yu L, Sun L. Gadd45-alpha and Gadd45-gamma utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G₂/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells. *Mol Biol Rep* 2009; 36(8): 75-85.
- 55 Lee MH, Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(3): 225-34.
- 56 Simson T, Gale T, Reis-Filho J S, Jones C, Parry S, Steele D, *et al.* Distribution and significance of 14-3-3 sigma, a novel myoepithelial marker, in normal, benign, and malignant breast tissue. *J Pathol* 2004; 202(3): 274-85.
- 57 Li Y, Benezra R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* 1996; 274(5285): 246-8.
- 58 Jeong SJ, Shin HJ, Kim SJ, Ha GH, Cho BI, Baek KH, *et al.* Transcriptional abnormality of the hsMAD2 mitotic checkpoint gene is a potential link to hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64(23): 666-73.
- 59 Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, Ehemann V, Staniscia T, Evert M, *et al.* Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51(3): 857-68.
- 60 deCarcer G, Escobar B, Higuero AM, García L, Ansón A, Pérez G, *et al.* Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Mol Cell Biol* 2011; 31(6): 225-39.