

DOI: 10.13376/j.cblls/2018045

文章编号: 1004-0374(2018)04-0366-08



慈维敏, 中国科学院北京基因组研究所研究员 / 博导。2004 年获得中科院生物物理研究所博士学位并进入美国爱因斯坦医学院从事博士后研究, 2008 年转入康奈尔医学院, 2009 年回国。研究主要集中于 DNA 甲基化表观遗传在胚胎发育和肿瘤发生发展及转移中的调控作用和分子机制; 同时也在探索表观调控在恶性肿瘤中的靶向治疗策略。近 5 年来, 主持多项国家自然科学基金重大项目、面上项目等, 并获得了 2014 年度自然科学基金委优秀青年项目支持。以通信作者或第一作者身份在 *Blood*、*Cell* (封面)、*Cancer Cell*、*Cell Res* 以及 *Epigenetics* 等国际著名学术杂志发表文章数篇。

## DNA 甲基化/去甲基化与疾病概览

马 琴, 周媛媛, 慈维敏\*

(中国科学院北京基因组研究所精准医学重点实验室, 北京 100101)

**摘 要:** DNA 甲基化 (5mC) 状态与疾病的发生发展密切相关, 异常甲基化状态是肿瘤的重要特征, 包括基因组整体甲基化水平降低和 CpG 岛局部甲基化程度的异常升高。近期研究还发现, DNA 甲基化可以继续氧化为 DNA 羟甲基化 (5hmC), 而 5hmC 可能是一种新的表观修饰或者参与 DNA 去甲基化。随着 DNA 甲基化测序技术的发展, 可以得到全基因组单碱基分辨率的 5mC 和 5hmC 图谱, 深入研究 5mC 和 5hmC 的动态变化对发育和肿瘤的影响, 并期望找到潜在应用于肿瘤诊断和治疗的表观标志物。该文主要总结了 DNA 甲基化 / 去甲基化及其在肿瘤发生发展过程中的动态变化、潜在的表观标志物以及检测和治疗研究进展。

**关键词:** DNA 甲基化; DNA 羟甲基化; 表观标志物; 肿瘤检测和治疗

**中图分类号:** Q71; Q75; R730.5      **文献标志码:** A

## DNA methylation and demethylation in disease

MA Qin, ZHOU Yuan-Yuan, CI Wei-Min\*

(Key Laboratory of Genomic and Precision Medicine, Beijing Institute of Genomics,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** DNA methylation (5mC) is widely distributed in mammal cells. DNA methylation reprogramming has been proposed to be involved in development and tumorigenesis. Previous studies indicate that DNA hydroxymethylation (5hmC) generated from 5mC oxidation is not just an intermediate of DNA demethylation, but may be functional as a stable epigenetic mark. With the development of 5mC and 5hmC sequencing techniques, we can achieve 5mC and 5hmC patterns at single-nucleotide resolution. By further exploring the DNA methylation/DNA demethylation reprogramming during embryonic development and tumorigenesis, we aimed to evaluate the

收稿日期: 2017-11-16

基金项目: 卢嘉锡国际团队项目(K.C.Wong Education Foundation); 中科院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-SMC039); 国家自然科学基金项目(81672541, 81422035); 国家重点研发计划“精准医学研究”重点专项(2016YFC0900303); 中科院重点部署项目(KJZD-EW-L14)

\*通信作者: E-mail: ciwm@big.ac.cn; Tel: 010-84097318

functional role of DNA methylation reprogramming and the potential intervention strategies for cancers. Thus, in this review, we provide an overview of the DNA methylation/demethylation reprogramming during embryonic development and tumorigenesis, and discuss recent findings on the potential epigenetic markers for tumour detection and treatment.

**Key words:** DNA methylation; DNA hydroxymethylation; epigenetic markers; cancer detection and treatment

早在 1988 年, 约翰·霍普金斯大学医学院教授 Bert Vogelstein 就在 *New Engl J Med* 上指出, 恶性肿瘤的本质是“Tumorigenesis in large part is owing to the discovery of genes, that when mutated, lead to cancer”<sup>[1]</sup>。基因突变确实可以使罹患肿瘤的风险上升, 甚至诱发癌症<sup>[2]</sup>, 比如 BRCA1 基因的突变会导致女性乳腺癌和卵巢癌高风险<sup>[3]</sup>, EGFR 基因的突变在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中有重要作用<sup>[4]</sup>, 而 FAT4 和 ARID1A 基因的突变则可能引发胃癌<sup>[5]</sup>; 但是, 随着研究的深入, 研究人员发现, 很多基因突变并非是驱动癌症的关键因素, 很多重要蛋白在肿瘤中的水平异常升高或降低也同该基因的突变无直接关联<sup>[6-8]</sup>。越来越多的研究表明, 除基因组变异之外, 还有另外一种不依赖 DNA 序列改变的方式——表观遗传变异对癌症的发生发展也起到了重要的作用<sup>[9]</sup>, 其中 DNA 甲基化水平改变是最早发现, 也是较为重要的表观遗传改变之一。

## 1 肿瘤组织DNA整体的去甲基化状态

DNA 甲基化紊乱与肿瘤密切相关, 异常的甲基化状态是肿瘤的重要特征<sup>[10-12]</sup>。如图 1 所示, 肿瘤细胞中发生了全基因组水平的去甲基化和启动子区域的高甲基化过程。20 世纪 80 年代, 研究者首次通过液相色谱的方法发现肿瘤呈现全基因组低甲基化的特征, 原发性恶性肿瘤 DNA 低甲基化的比例介于转移和良性肿瘤之间<sup>[13-14]</sup>。另有研究发现, 全基因组水平的去甲基化可以发生在大片段的区域, 并且与基因表达的随机波动相关, 可能进而对肿瘤的发生发展产生影响<sup>[15]</sup>。小鼠体外实验和体内实验均表明, 全基因组水平的去甲基化可能导致基因组不稳定, 增加肿瘤发生几率<sup>[11,16]</sup>, 也可能诱导癌基因激活, 如在结直肠癌中 R-ras 基因激活<sup>[17]</sup>。Vaz 等<sup>[18]</sup>研究表明, 香烟烟雾能导致 DNA 甲基化修饰重要的蛋白 DNMT1 等的异常表达, 进而促使细胞的 DNA 甲基化紊乱, 抑癌基因表达下调, 导致 KRAS 基因上调, 触发肺癌的发生。

因此, 探索肿瘤中 DNA 去甲基化的机制对于了解肿瘤的发生发展非常重要。直到 2009 年, DNA

双加氧酶——TET (ten-eleven-translocation) 蛋白的发现, 才揭开了 DNA 去甲基化研究的新篇章<sup>[19]</sup>。TET 可以将 5- 甲基胞嘧啶 (5mC) 氧化成 5- 羟甲基胞嘧啶 (5hmC), 然后, 进一步氧化成 5- 甲酰胞嘧啶 (5fC) 和 5- 羧甲基胞嘧啶 (5caC), 最后通过特异识别 5caC 的糖苷酶介导的碱基切除修复 (BER) 途径转变成未甲基化的胞嘧啶<sup>[20]</sup>。所以, 理论上, 肿瘤细胞中 TET 蛋白家族发生突变应该比正常癌旁组织累积更多的 5mC 修饰。然而, 研究结果却不甚相同<sup>[21-23]</sup>: 在一些没有 TET 突变的患者中依然呈现较显著的去甲基化状态。因此, TET 突变同甲基化、去甲基化的水平变化的关联仍需进一步探索研究。然而, 以往甲基化研究的金标准重亚硫酸盐测序 (BS-seq)<sup>[24]</sup>, 并不能区分 5mC 和 5hmC; 而作为新的 DNA 表观遗传修饰方式, 5hmC 近年来受到了广泛关注, 要进一步了解 5hmC 表观遗传修饰的作用和功能, 就必须区分 5mC 和 5hmC 并且确定它们在基因组的位置。2012 年, 5hmC 测序技术的突破, 如 TET 依赖的重亚硫酸盐测序 (TAB-seq)<sup>[25]</sup>, 为我们深入探索 DNA 表观遗传修饰在肿瘤中的作用机制提供了技术支持。

对多种肿瘤的研究发现, 在肿瘤组织中 5hmC 水平更低。在 5hmC 单碱基测序技术开发之前, 主要通过免疫组化、斑点杂交、质谱检测发现不同肿瘤组织均存在 5hmC 水平降低的现象。2011 年, 研究者通过液相色谱串联质谱等发现, 鳞状细胞肺癌、脑癌、乳腺癌等肿瘤中 5hmC 含量大幅下降; 而免疫组化结果表明, 在不同类型的恶性肿瘤中均有 5hmC 的显著下降<sup>[26]</sup>。同时, 研究者通过免疫组化、斑点杂交以及羟甲基化和甲基化敏感标签测序 (HMST-seq) 发现, 肝癌样本中 5hmC 显著降低<sup>[27-29]</sup>。2016 年, 一项利用 5hmC 单碱基测序技术的研究发现, 肾癌肿瘤细胞中并非是全基因组甲基化水平降低, 而是 5hmC 水平的降低<sup>[30]</sup>。

## 2 抑癌基因的高甲基化状态

抑癌基因启动子区域 CpG 岛高甲基化是许多肿瘤发生的早期重要事件<sup>[10-12]</sup>。多项研究结果提示,

抑癌基因启动子区 CpG 岛的异常高甲基化在没有改变基因序列的情况下，调控基因的表达，导致转录失活，使该基因表达沉默，由此提出抑癌基因启动子高甲基化是遗传性肿瘤发生过程的第二次打击的理论<sup>[31-32]</sup>。从基因组范围内看，在多种肿瘤中都表现出启动子区域特异高甲基化的特征<sup>[10]</sup>，如肾癌 VHL 基因<sup>[33]</sup>、黑色素瘤 P16 基因<sup>[34]</sup>、直肠癌 APC 基因<sup>[35]</sup>等。抑癌基因启动子区域的 CpG 岛高甲基化可以影响参与细胞周期、细胞凋亡、DNA 修复、血管生成等的基因，而这些基因的失活均与癌症的发生发展密切相关。

### 3 DNA甲基化/去甲基化与疾病的诊断和治疗

广泛的研究认为 DNA 甲基化发生在肿瘤的早期，促进肿瘤的发生和发展。因此，DNA 甲基化作为一个潜在的诊断和治疗靶点，是目前肿瘤研究的重点之一。现有的肿瘤检测方法缺乏灵敏性和特异性，很多肿瘤检测出来已是中晚期。早期诊断可以实现肿瘤的有效预防甚至治愈，所以实现肿瘤的早期诊断一直是肿瘤研究领域的重点。以下为不同肿瘤中 DNA 甲基化作为诊断标志物的潜在应用。

现有的结直肠癌 (CRC) 检测的手段主要是通过粪便隐血检测和肠镜检测。粪便检测稳定性不够，且灵敏度很有限。而肠镜有侵略性，患者需要承受一些痛苦，并且一些特殊疾病的患者无法进行肠镜，这些都限制了它的应用。目前我国结直肠癌的早诊率较低，明显低于日本及欧美国家。因此，急需无侵略性的敏感的早期诊断的标志物。2008 年，Lofton-Day 等<sup>[36]</sup>在结直肠癌患者血浆样本和正常

对照中检测了 TMEFF2、NGFR 和 SEPT9 的甲基化状态，其结果表明，SEPT9 的检测特异性和灵敏度最好。紧接着，有多个研究报道证明 SEPT9 启动子高甲基化是结直肠癌检测的甲基化标志物，并提供了优化的检测方法<sup>[37-42]</sup>。研究已经证明，SEPT9 是结直肠癌特异的甲基化诊断标志物，在 CRC 的所有分期的样本中均检测到。SEPT9 标志物检测主要靶向检测 SEPT9\_V2 转录本的第三个 CpG 岛 (包含启动子和转录起始位点)，这个区域在 CRC 和腺瘤中呈现高甲基化，并且 CRC 和腺瘤中的甲基化模式存在差异，腺瘤的这个区域的 5' 端保持未甲基化状态，这也代表了肿瘤发展过程中甲基化的一个过渡状态以及肿瘤恶性进展的生物学进程。SEPT9 甲基化检测阳性率伴随结直肠癌进展呈上升趋势。对结直肠癌 I 期检出率平均约为 50%；II 期和 III 期检出率约为 70%；而 IV 期检出率几乎能到 100%；同时检测能保持高达 90% 以上的特异性<sup>[43]</sup>。SEPT9 检测是现有的 CRC 检测中最敏感的单一标志物，但目前关于 SEPT9 能否将腺瘤 (息肉) 与正常样本区分开的研究还非常有限。几项前瞻性研究表明，虽然 SEPT9 检测能部分将腺瘤 (息肉) 与正常样本区分开，但灵敏度非常有限<sup>[37,40,42,44]</sup>。这些结果表明，SEPT9 甲基化检测需提高对早期结直肠癌和进展期腺瘤的灵敏度。SEPT9 甲基化检测已经证实是早期结直肠癌筛查的最佳方法之一，其在临床应用中非常广泛。由于其在检测无明显症状的癌前病变如结直肠腺瘤中灵敏度不符合要求，因此 SEPT9 甲基化检测在成为常规筛查方法和癌前检测的有效工具之前还有很多问题需要解决。除了 SEPT9 以外，也

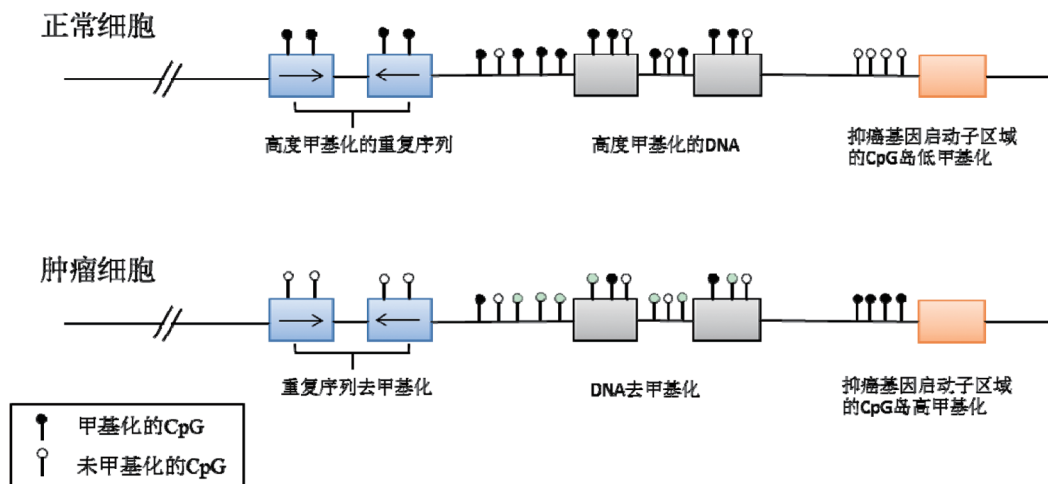


图1 DNA甲基化/去甲基化与肿瘤



有一些关于其他潜在的甲基化标志物的研究。其中两项研究表明, NDRG4 和 PHACTR3 启动子甲基化是在粪便样本中实现无创检测的潜在标志物<sup>[45-46]</sup>。此外, 2017年, Li 等<sup>[47]</sup>研究表明, CMTM3、SSTR2 和 MDF1 基因的启动子在肿瘤样本中显著甲基化, 且与肿瘤的分期无显著关联性, 暗示这些甲基化改变可能发生在早期, 但还需要进一步大样本验证。总结来说, CRC 筛查和早期诊断的最优方法还需要进一步研究确认。

在黑色素瘤的研究中发现, PTEN<sup>[48-49]</sup>、P16/14<sup>[50-54]</sup> 和 RASSF1A<sup>[55]</sup> 基因启动子呈现高甲基化。其中, PTEN 启动子区甲基化是患者不良预后的一个因素<sup>[49]</sup>; 而 RASSF1A 启动子甲基化在转移样本中比例更高, 暗示可能参与肿瘤的进展过程<sup>[56]</sup>。RASSF1A 启动子甲基化会导致基因表达降低, 而经过 DNA 甲基化抑制剂 (5-aza-2-deoxycytidine, DEC) 处理后, 基因表达水平恢复<sup>[57]</sup>。此外, 其他的异常甲基化的基因, 如 HOXB13、SYK 和 LXN 可能作为肿瘤抑制因子发挥功能<sup>[58-59]</sup>; 同时, 研究发现致癌基因的启动子区域高甲基化, 如 KIT 基因, 但目前不清楚其功能作用<sup>[60]</sup>。

乳腺癌甲基化的标志物研究中, 目前通常利用全血或者血浆进行检测。然而, 对全血 DNA 甲基化的研究非常有限, 并且结论也有矛盾的。总的来说, 由于全血背景比较杂, 检测手段灵敏度有限, 还需要进一步的优化。而对全血特异基因甲基化的研究中, BRCA1 的研究报道最多<sup>[61-67]</sup>, 这些报道都发现了乳腺癌患者中 BRCA1 的甲基化水平更高, 其中 4 项研究显示差异显著。此外, 有两项研究报道显示, ATM 基因在乳腺癌中呈现基因体区域的高甲基化<sup>[68-69]</sup>。此外, 在血浆的 DNA 甲基化研究中, 发现 RASSF1A、APC、RARB 基因在乳腺癌中呈现特异的高甲基化<sup>[70-76]</sup>。目前乳腺癌甲基化检测的研究还需要进一步利用血浆游离 DNA 进行 DNA 甲基化组学的检测, 并进行大规模的筛选和临床关联研究, 期望能找到可用于诊断的甲基化标志物。

在其他各种肿瘤中均发现了潜在的甲基化标志物, 如在肺腺癌中 HOXA11 基因启动子高甲基化<sup>[77]</sup>、前列腺癌中 GSTP1 启动子的甲基化<sup>[78-79]</sup>。2006年, Muthusamy 等<sup>[58]</sup> 在乳腺癌、结直肠癌、肝癌和肺癌中通过寻找肿瘤共甲基化模块区域的甲基化模式的改变预测存活, 并寻找肿瘤组织中差异甲基化的模块区域作为潜在的标志物。2017年, Xu 等<sup>[80]</sup> 在研究中建立了通过检测少量血液中循环肿瘤 DNA

特定位点甲基化水平, 对肝癌进行早期诊断及疗效和预后预测的新方法, 找到了 10 个早期诊断和疗效相关以及 8 个预后相关的甲基化位点。Mundbjerg 等<sup>[81]</sup> 研究发现了与前列腺肿瘤侵袭性相关的 25 个 DNA 甲基化位点, 而以此预测出的具有侵袭性的肿瘤呈现淋巴结转移和更高的肿瘤分期的特征。越来越多的研究找到肿瘤特异甲基化的基因可能作为潜在的甲基化标志物, 但还需要大规模的临床数据支持, 并且还需要提高标志物的敏感性和特异性以达到临床标准。

由于 DNA 甲基化是可逆的, 因此, 可以通过改变肿瘤甲基化的状态来作为肿瘤治疗的一种新策略。目前没有针对特定靶点的 DNA 甲基化抑制剂。两种主要用于治疗的 DNA 甲基化抑制剂——5-aza-2-deoxycytidine (DEC) 和 5-azacitidine (AZA) 为抑制 DNMTs 的抑制剂, 并且被 FDA 批准用于治疗骨髓增生异常综合征和急性髓细胞白血病<sup>[82-83]</sup>, 但 DEC 和 AZA 的反应效果有明显的剂量依赖性, 并且作用时间非常有限。目前仍然不清楚这些药物发挥作用的具体机制以及如何提高合适的作用时间。而在实体瘤中的临床试验很少, 应用也受到极大的限制。

#### 4 DNA羟甲基化作为肿瘤诊断的新型标记物和潜在靶点

2012年, Lian 等<sup>[84]</sup> 研究发现, 在黑色素瘤中 5hmC 水平显著下降, 而 IDH2 和 TET2 表达下调可能是其中的原因, 而通过上调 IDH2 或者 TET2 表达水平, 可以重建细胞内的 5hmC 水平, 进而抑制黑色素瘤的生长, 暗示了肿瘤表观遗传治疗的新策略。2016年, Chen 等<sup>[30]</sup> 的研究中通过 TAB-seq 和 BS-seq 的方法获得了透明肾细胞癌样本和癌旁组织的单碱基分辨率的 5mC 和 5hmC 图谱, 结果发现在肾癌发生过程中 5hmC 重编程被抑制, 导致肾癌细胞中存在广泛的基因体区超甲基化。结合临床数据也提示, 5hmC 水平降低是肾癌更敏感的预后表观标记物, 而裸鼠实验中 5hmC 的回调抑制了肿瘤的生长也说明了 5hmC 在肾癌中的重编程不是一种伴随现象, 更有可能是一种驱动力, 暗示 5hmC 可以作为肾癌预后监测的新型表观遗传标记物和靶向治疗的靶点。2016年, Johnson 等<sup>[85]</sup> 通过 BS-seq 和 oxBS-seq 的方法得到胶质母细胞瘤的 5hmC 单碱基图谱, 发现肿瘤样本中 5hmC 水平降低, 并且 5hmC 越低, 患者的总生存期越短。根据以上研究

结果, 可以进一步提出肿瘤组织中 5hmC 和 5mC 变化的模型 (图 2)。这些研究都暗示 5hmC 可以作为早期诊断和靶向治疗的靶点。2017 年, 同时有两项在多种肿瘤中对血浆中游离 DNA 的 5hmC 富集测序分析的结果表明, 5hmC 的信号可以用于预测肿瘤类型和分期<sup>[86-87]</sup>。研究发现, 肺癌的进展过程中游离 DNA 的 5hmC 逐步下降; 而肝癌和胰腺癌中则表现出某些区域显著的 5hmC 变化。结果表明, 游离 DNA 的 5hmC 变化不仅可用于诊断肿瘤类型, 同时在有些肿瘤中可以追踪肿瘤的进展情况。

5hmC 作为强组织特异性的表观遗传标志物, 可能是用于肿瘤诊断的更敏感标志物。通过研究不同细胞类型的 5hmC 图谱的特征以及肿瘤中 5hmC

重编程的图谱, 期望可以找到潜在的组织特异性 5hmC 检测标志物, 用于肿瘤的早期诊断。而对肿瘤组织中基因组 5hmC 图谱的重构, 也是肿瘤诊断潜在的治疗策略。2017 年, Cimmino 等<sup>[88]</sup> 研究发现, 在缺失 TET2 的小鼠中静脉注射高剂量维生素 C 可回复细胞 5hmC 的水平, 促进 DNA 去甲基化, 进而诱导干细胞分化成熟, 从而抑制了人白血病异种移植小鼠的成瘤和进展。另一项研究发现, 造血干细胞摄取高水平的维生素 C 而调节其功能并抑制白血病的发生<sup>[89]</sup>。越来越多的研究表明, 高剂量维生素 C 是肿瘤辅助治疗的潜在药物<sup>[90-92]</sup>, 但具体的作用机制是多方面的, 还需要进一步深入研究和临床验证。

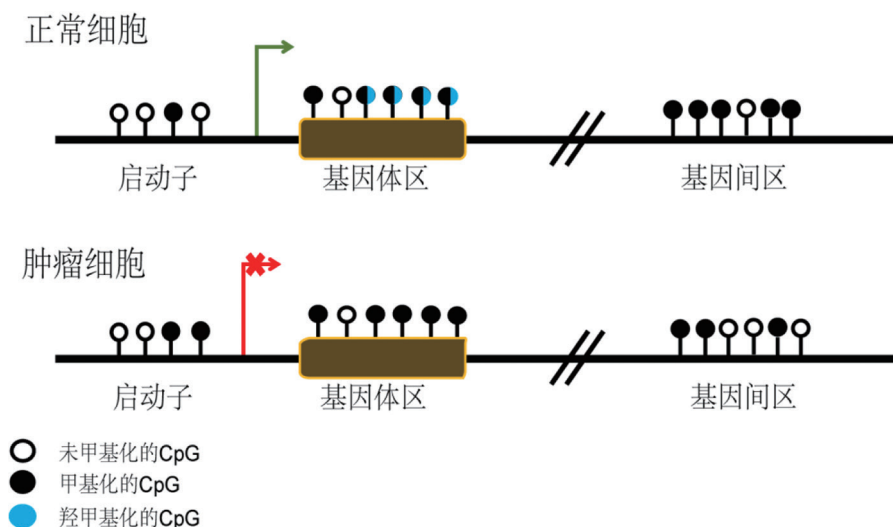


图2 肿瘤组织中基因体区域5hmC降低导致5mC升高

### [参 考 文 献]

- [1] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Engl J Med*, 1988, 319: 525-32
- [2] Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, et al. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 703-18
- [3] Billack B, Monteiro ANA. BRCA1 in breast and ovarian cancer predisposition. *Cancer Lett*, 2005, 227: 1-7
- [4] Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Lab Invest*, 2014, 94: 129-37
- [5] Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nat Genet*, 2012, 44: 570-4
- [6] Kim MS, Yoo NJ, Lee SH. Absence of paxillin gene mutation in lung cancer and other common solid cancers. *Tumori*, 2011, 97: 211-3
- [7] Manda R, Kohno T, Hamada K, et al. Absence of *hSNF5/INI1* mutation in human lung cancer. *Cancer Lett*, 2000, 153: 57-61
- [8] Liu TT, Liang XM, Bjorkholm M, et al. The absence of *TERT* promoter mutations in primary gastric cancer. *Gene*, 2014, 540: 266-7
- [9] Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*, 2012, 81: 303-11
- [10] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 415-28
- [11] Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 2003, 300: 455
- [12] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New Engl J*

- Med, 2003, 349: 2042-54
- [13] Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11: 6883-94
- [14] Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10: 2709-21
- [15] Hansen KD, Timp W, Bravo HC, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet*, 2011, 43: 768-75
- [16] Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 2003, 300: 489
- [17] Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, et al. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res*, 2005, 65: 2115-24
- [18] Vaz M, Hwang SY, Kagiampakis I, et al. Chronic cigarette smoke-induced epigenomic changes precede sensitization of bronchial epithelial cells to single-step transformation by KRAS mutations. *Cancer Cell*, 2017, 32: 360-76.e6
- [19] Tahiliani M, Koh KP, Shen YH, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324: 930-5
- [20] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 2013, 502: 472-9
- [21] Figueroa ME, Wahab OA, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 2010, 18: 553-67
- [22] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, 2010, 468: 839-43
- [23] Yamazaki J, Taby R, Vasanthakumar A, et al. Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics*, 2012, 7: 201-7
- [24] Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462: 315-22
- [25] Yu M, Hon GC, Szulwach KE, et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell*, 2012, 149: 1368-80
- [26] Jin SG, Jiang Y, Qiu R, et al. 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res*, 2011, 71: 7360-5
- [27] Liu C, Liu L, Chen X, et al. Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1. *PLoS One*, 2013, 8: e62828
- [28] Gao F, Xia Y, Wang J, et al. Integrated analyses of DNA methylation and hydroxymethylation reveal tumor suppressive roles of ECM1, ATF5, and EOMES in human hepatocellular carcinoma. *Genome Biol*, 2014, 15: 533
- [29] Thomson JP, Ottaviano R, Unterberger EB, et al. Loss of tet1-associated 5-hydroxymethylcytosine is concomitant with aberrant promoter hypermethylation in liver cancer. *Cancer Res*, 2016, 76: 3097
- [30] Chen K, Zhang J, Guo Z, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer. *Cell Res*, 2016, 26: 103-18
- [31] Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*, 2004, 36: 417-22
- [32] Mader C. *The biology of cancer*[M]. New York: Garland Science, 2006: 850
- [33] Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 9700-4
- [34] Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res*, 1995, 55: 4531-5
- [35] Jin Z, Tamura G, Tsuchiya T, et al. Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *Br J Cancer*, 2001, 85: 69-73
- [36] Lofton-Day C, Model F, Devos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem*, 2008, 54: 414-23
- [37] Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*, 2008, 3: e3759
- [38] Tóth K, Sipos F, Kalmár A, et al. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PLoS One*, 2012, 7: e46000
- [39] deVos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem*, 2009, 55: 1337-46
- [40] Tanzer M, Balluff B, Distler J, et al. Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLoS One*, 2010, 5: e9061
- [41] Payne SR. From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker mSEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics*, 2010, 2: 575-85
- [42] Warren JD, Xiong W, Bunker AM, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med*, 2011, 9: 133
- [43] Li Y, Song L, Gong Y, et al. Detection of colorectal cancer by DNA methylation biomarker SEPT9: past, present and future. *PLoS One*, 2014, 8: 755-69
- [44] Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*, 2014, 63: 317-25
- [45] Melotte V, Lentjes MH, van den Bosch SM, et al. N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101: 916-27
- [46] Bosch LJ, Oort FA, Neerinx M, et al. DNA methylation



- of phosphatase and actin regulator 3 detects colorectal cancer in stool and complements FIT. *Cancer Prev Res: Phila*, 2012, 5: 464-72
- [47] Li J, Chen C, Bi X, et al. DNA methylation of *CMTM3*, *SSTR2*, and *MDFI* genes in colorectal cancer. *Gene*, 2017, 630: 1-7
- [48] Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, et al. Epigenetic silencing of the *PTEN* gene in melanoma. *Cancer Res*, 2006, 66: 6546-52
- [49] Lahtz C, Stranzenbach R, Fiedler E, et al. Methylation of *PTEN* as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. *J Invest Dermatol*, 2010, 130: 620-2
- [50] Gonzalgo ML, Bender CM, You EH, et al. Low frequency of *p16/CDKN2A* methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res*, 1997, 57: 5336
- [51] Jonsson A, Tuominen R, Grafström E, et al. High frequency of *p16<sup>INK4A</sup>* promoter methylation in *NRAS*-mutated cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 2010, 130: 2809-17
- [52] Straume O, Smeds J, Kumar R, et al. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of *CDKN2A* in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol*, 2002, 161: 229-37
- [53] Freedberg DE, Rigas SH, Russak J, et al. Frequent p16-independent inactivation of p14<sup>ARF</sup> in human melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100: 784-95
- [54] Venza M, Visalli M, Biondo C, et al. Epigenetic regulation of p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup> expression in cutaneous and uveal melanoma. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849: 247-56
- [55] Spugnardi M, Tommasi S, Dammann R, et al. Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res*, 2003, 63: 1639
- [56] Tanemura A, Terando AM, Sim MS, et al. CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 1801-7
- [57] Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, et al. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene*, 2004, 23: 4014-22
- [58] Muthusamy V, Duraisamy S, Bradbury CM, et al. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res*, 2006, 66: 11187-93
- [59] Muthusamy V, Premi S, Soper C, et al. The hematopoietic stem cell regulatory gene latexin has tumor-suppressive properties in malignant melanoma. *J Invest Dermatol*, 2013, 133: 1827-33
- [60] Dahl C, Abildgaard C, Riber-Hansen R, et al. KIT is a frequent target for epigenetic silencing in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 2015, 135: 516-24
- [61] Cho YH, Yazici H, Wu HC, et al. Aberrant promoter hypermethylation and genomic hypomethylation in tumor, adjacent normal tissues and blood from breast cancer patients. *Anticancer Res*, 2010, 30: 2489-96
- [62] Bosviel R, Garcia S, Lavediaux G, et al. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36: e177-82
- [63] Gupta S, Jaworska-Bieniek K, Narod SA, et al. Methylation of the *BRCA1* promoter in peripheral blood DNA is associated with triple-negative and medullary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 148: 615-22
- [64] Cho YH, McCullough LE, Gammon MD, et al. Promoter hypermethylation in white blood cell DNA and breast cancer risk. *J Cancer*, 2015, 6: 819-24
- [65] Snell C, Krypuy M, Wong EM, et al. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a *BRCA1* tumour phenotype. *Breast Cancer Res*, 2008, 10: R12
- [66] Iwamoto T, Yamamoto N, Taguchi T, et al. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with *BRCA1* promoter methylation. *Breast Cancer Res Treatment*, 2011, 129: 69-77
- [67] Wong EM, Southey MC, Fox SB, et al. Constitutional methylation of the *BRCA1* promoter is specifically associated with *BRCA1* mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev Res: Phila*, 2011, 4: 23-33
- [68] Brennan K, Garcia-Closas M, Orr N, et al. Intragenic *ATM* methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res*, 2012, 72: 2304-13
- [69] Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, et al. Gene-body hypermethylation of *ATM* in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Hum Mol Genet*, 2009, 18: 1332-42
- [70] Brooks JD, Cairns P, Shore RE, et al. DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: results of a nested case-control study. *Cancer Epidemiol*, 2010, 34: 717-23
- [71] Van der Auwera I, Elst HJ, Van Laere SJ, et al. The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *Br J Cancer*, 2009, 100: 1277-86
- [72] Dulaimi E, Hillinck J, de Caceres II, et al. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 6189
- [73] Yazici H, Terry MB, Cho YH, et al. Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA prior to breast cancer diagnosis in the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18: 2723-5
- [74] Papadopoulou E, Davilas E, Sotiriou V, et al. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate and breast cancer. *Ann New York Acad Sci*, 2006, 1075: 235-43
- [75] Zmetakova I, Danihel L, Smolkova B, et al. Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. *Neoplasma*, 2013, 60: 635-46
- [76] Hoque MO, Feng Q, Toure P, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 4262-9
- [77] Li Q, Chen C, Ren X, et al. DNA methylation profiling

- identifies the *HOXA11* gene as an early diagnostic and prognostic molecular marker in human lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 2017, 8: 33100-9
- [78] Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, et al. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, 64: 1975
- [79] Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11733-7
- [80] Xu RH, Wei W, Krawczyk M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater*, 2017, 16: 1155-61
- [81] Mundbjerg K, Chopra S, Alemozaffar M, et al. Identifying aggressive prostate cancer foci using a DNA methylation classifier. *Genome Biol*, 2017, 18: 3
- [82] Navada SC, Steinmann J, Lubbert M, et al. Clinical development of demethylating agents in hematology. *J Clin Invest*, 2014, 124: 40-6
- [83] Saunthararajah Y. Key clinical observations after 5-azacytidine and decitabine treatment of myelodysplastic syndromes suggest practical solutions for better outcomes. *Hematology*, 2013, 2013: 511-21
- [84] Lian Christine G, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*, 2012, 150: 1135-46
- [85] Johnson KC, Houseman EA, King JE, et al. 5-Hydroxymethylcytosine localizes to enhancer elements and is associated with survival in glioblastoma patients. *Nat Commun*, 2016, 7: 13177
- [86] Song CX, Yin S, Ma L, et al. 5-Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages. *Cell Res*, 2017, 27: 1231-42
- [87] Li W, Zhang X, Lu X, et al. 5-Hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers. *Cell Res*, 2017, 27: 1243-57
- [88] Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, et al. Restoration of TET2 function blocks aberrant self-renewal and leukemia progression. *Cell*, 2017, 170: 1079-95.e20
- [89] Agathocleous M, Meacham CE, Burgess RJ, et al. Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature*, 2017, 549: 476-81
- [90] Yun J, Mullarky E, Lu C, et al. Vitamin C selectively kills *KRAS* and *BRAF* mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*, 2015, 350: 1391-6
- [91] Schoenfeld JD, Sibenaller ZA, Mapuskar KA, et al.  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ -mediated disruption of Fe metabolism causes the differential susceptibility of NSCLC and GBM cancer cells to pharmacological ascorbate. *Cancer Cell*, 2017, 31: 487-500.e8
- [92] Liu MM, Ohtani H, Zhou WD, et al. Vitamin C increases viral mimicry induced by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 10238-44