

DOI: 10.13376/j.cbls/2021068

文章编号: 1004-0374(2021)05-0646-07

# DNA甲基化在肝癌中的研究进展

杨超祺, 刘松梅\*

(武汉大学中南医院检验科, 基因诊断中心, 武汉 430071)

**摘要:** DNA 甲基化是甲基选择性添加到胞嘧啶上形成 5- 甲基胞嘧啶的过程, 作为表观遗传修饰的重要方式, 可以在不改变 DNA 序列的情况下调控基因的表达。肿瘤抑制基因的表观遗传沉默是导致人类癌症发生、发展的主要事件。肝癌是严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤, 其发展是一个从慢性肝炎、肝硬化、原发性肝癌到转移性肝癌的多步骤过程。表观遗传调控的分子机制与肝癌密切相关。除了传统的血清学标志物和影像学检查, 一些高灵敏度和特异性的肿瘤标志基因甲基化检测在恶性肿瘤的早期诊断、治疗监测及预后评估方面具有很好的潜力。因此, 该文对可能用于肝癌高危人群早期筛查和风险评估的异常 DNA 甲基化相关的生物标志物进行综述。

**关键词:** DNA 甲基化; 肝癌; 生物标志物; 表观遗传

**中图分类号:** Q75; R735.7 **文献标志码:** A

## The role of DNA methylation in hepatocellular carcinoma

YANG Chao-Qi, LIU Song-Mei\*

(Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** DNA methylation is an epigenetic mechanism involving the transfer of a methyl group onto the C5 position of the cytosine, which regulates gene expression without changing DNA sequence. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes is a major event leading to the occurrence and progression of cancers. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the primary form of malignant liver cancer and it has been the main cause of cancer-related death. Development of HCC is a multistep process going from chronic inflammation, cirrhosis, and primary HCC to metastatic HCC. Epigenetic modifications have been considered as an important mechanism associated with HCC. In addition to traditional serological markers and imaging tests, some highly sensitive and specific methylation biomarkers do have great potentials for the early diagnosis and treatment efficiency evaluation of cancers. Here, we summarized the biomarkers related to aberrant DNA methylation that could be used for early screening and risk assessment in populations at high-risk of HCC.

**Key words:** DNA methylation; hepatocellular carcinoma; biomarker; epigenetics

原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 简称肝癌, 是常见的致命恶性肿瘤, 是全球发病率和死亡率最高的十大癌症之一。2018 年, 肝癌在全球癌症中的发病率和死亡率分别排第六位和第四位<sup>[1]</sup>。根据 GLOBOCAN 2018, 全球肝癌总发病 84 1080 例, 而中国肝癌发病 39 2868 例, 占全球总发病例数的 46.71%<sup>[2]</sup>。中国的肝癌死亡率 (25.9/10 万) 是全球肝癌死亡率 (10.2/10 万) 的 2.54 倍, 远高于其他国家<sup>[2]</sup>。美国的肝癌死亡率也呈上升趋势, 从 2000

年到 2016 年, 肝癌的死亡率上升了 43%<sup>[3]</sup>。目前, 肝癌以其 18% 的 5 年生存率成为仅次于胰腺癌的第二大致死肿瘤<sup>[4]</sup>, 严重威胁人类的生命健康。肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的

收稿日期: 2020-10-22; 修回日期: 2020-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(81772276, 81972009);  
湖北省自然科学基金创新群体项目(2019CFA018)

\*通信作者: E-mail: smliu@whu.edu.cn, Tel: 027-67812830

原发性肝癌, 约占肝癌的 90%, 是肝硬化结节经历“多步骤癌变 (multistep process of hepatocarcinogenesis in cirrhosis)”的结果<sup>[5]</sup>。HCC 的高发病率是由环境因素、遗传因素以及遗传和表观遗传的相互作用所造成的。

目前, 临床上常用于 HCC 诊断的实验室指标是血清甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP), 虽然其敏感度和特异性较低, 但仍是最广泛使用的监测和筛查 HCC 的生物标志物; 甲胎蛋白异质体 (Lens culinaris-agglutinin-reactive fraction of AFP, AFP-L3) 的升高与肝癌的一些病理学特征相关, 是病理侵犯性的一个指标; 异常凝血酶原 (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, PIVKA-II) 是一种维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导的蛋白质, 对 AFP 阴性的 HCC 患者的早期筛查有一定的作用; 影像学检查同样可以有效地监测肝硬化患者早期 HCC 的发生。超声检查联合血清 AFP 监测, 对于肝硬化患者早期 HCC 的诊断灵敏度仅仅只有 63% (95% CI, 48%~75%)<sup>[6]</sup>。由于缺乏有效的分子标志物, 无法实施靶向性的精准治疗, HCC 确诊时大多数患者为终末期或发生远端转移, 5 年生存期不到 10%<sup>[7]</sup>。因此, 动态监测肝功能和肝癌标志物以预测不良事件, 早期诊断肝癌是临床提高 HCC 疗效, 控制转移和复发, 改善患者生存期的关键。

在过去的 40 年里, 有大量研究表明, 异常 DNA 甲基化与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[8]</sup>。肿瘤细胞中的抑癌基因异常甲基化, 在肿瘤早期诊断方面具有很大的潜力。寻找可以早期诊断 HCC 的生物标志物成为当今肿瘤领域的研究热点和当务之急。因此, 本文将主要对可能用于 HCC 高危人群早期筛查和风险评估的异常 DNA 甲基化相关的生物标志物进行综述。

## 1 DNA甲基化的生理功能与调控机制

DNA 甲基化 (DNA methylation) 是一种常见的化学修饰形式, 由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 催化, 活性甲基从 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 转移到胞嘧啶的 5 位碳上, 形成 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5mC), 在不改变 DNA 序列的前提下, 引起 DNA 构象、DNA 稳定性以及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而控制基因表达<sup>[9]</sup>。CpG 二核苷酸是由胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 组成的一个核苷酸链。某些基因上游的转录调控区及其附近存在着成串的 CpG 二核苷酸序列, 这些区段被称作 CpG 岛。作

为一种表观遗传调控机制, 5mC 主要发生在 CpG 二核苷酸序列, 通过与转录因子相互作用或改变染色质结构调控基因功能<sup>[10]</sup>。哺乳动物的 DNA 甲基化主要发生在胚胎发育早期和原始生殖细胞中<sup>[11]</sup>, 在不同的发育阶段和细胞分化的过程中, DNA 甲基化图谱 (DNA methylation profiles) 均受到调节。DNA 甲基化在几乎所有生物体的细胞生理、DNA 复制和转录、组织特异性基因表达、基因组印迹、X 染色体失活中都发挥着重要的作用<sup>[12]</sup>。DNA 甲基化和去甲基化保持动态的平衡, 发挥正常的生理调控功能<sup>[13]</sup>。

## 2 DNA甲基化在癌症中的作用机制

DNA 甲基化异常包括基因组重复区域的整体 DNA 低甲基化和特定基因启动子区域的 DNA 高甲基化。肿瘤细胞中可能存在这两种类型的 DNA 甲基化异常<sup>[14]</sup>。基因组重复区域 DNA 低甲基化激活转录, 引起染色质结构改变, 而 CpG 岛 DNA 高甲基化造成基因沉默和表达下降, 这两种效应都会影响细胞的正常生物学进程 (图 1)。

在肿瘤基因组的整体 DNA 低甲基化过程中, 5mC 水平存在轻度到中等程度的减少, 平均减少约 5%~20%<sup>[15]</sup>。甲基化水平降低使得染色质的结构不够紧密, 基因组的不稳定性增加。例如, DNMTs 缺陷的小鼠患肿瘤的风险增加, 这可能归因于 DNA 低甲基化造成抑癌基因的杂合性丢失以及基因组稳定性的降低<sup>[16]</sup>。基因组整体 DNA 低甲基化的另一个结果是可能对基因转录模式产生影响, 尽管其在基因表达中的作用尚不清楚, 但有研究表明, DNA 低甲基化将通过基因转录过程中的异常转录激活而增加“转录噪声”, 可能干扰编码链的转录<sup>[17]</sup>。基因特异性的 DNA 低甲基化事件也与癌症的发生有关。例如, 生殖系特异基因通过启动子区域 DNA 低甲基化而在肿瘤中被激活, 这些生殖系表达的基因被称为“癌-睾丸基因 (cancer testis genes)”或“癌-生殖系基因 (cancer germ line genes)”, 通常只在精子发生过程中起作用, 而在大多数体细胞组织中被 DNA 甲基化沉默<sup>[18]</sup>。

CpG 岛的 DNA 高甲基化不仅见于大多数原发性和转移性肿瘤灶, 而且还可见于癌前病变组织的基因组中<sup>[19]</sup>。特定基因启动子的 DNA 高甲基化使启动子沉默, 导致转录过程中特定亚型的表达改变; 当这种情况发生在抑癌基因时, DNA 高甲基化就可能通过抑癌基因的失活导致癌症发生<sup>[20]</sup>。

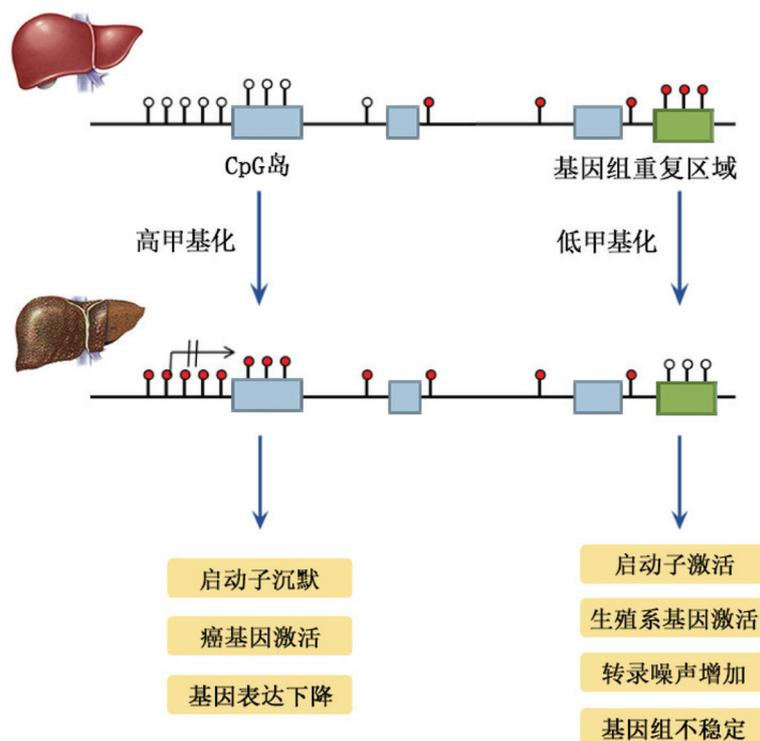


图1 DNA甲基化在癌症中的作用机制示意图

无论是DNA低甲基化还是DNA高甲基化,异常的DNA甲基化都可能通过调控细胞增殖、诱导细胞凋亡或衰老、血管生成、细胞黏附、细胞侵袭和转移、DNA修复和基因组稳定性、抗炎反应以及其他机制促进肿瘤的发生、发展<sup>[15]</sup>。在肝癌的发生与发展过程中,DNA甲基化修饰的异常变化也参与其中。甲基化异常的基因有助于理解基因的表达调控,相关的生物标志物将为肝癌的诊断和治疗提供新的理论依据。

### 3 DNA甲基化与肝癌

鉴于血清蛋白标志物AFP、AFP-L3和PIVKA-II的灵敏度和特异性的局限性,如一些良性肝病、转移性肝癌、其他恶性肿瘤如胃癌、胰腺癌等也表现出AFP升高,以及基于影像学诊断的费用较为昂贵,因此,寻找基于外周血的新型早期肝癌分子标志物已成为临床迫切需要解决的问题,利用甲基化标志物来实现肝癌的无创早期筛查成为近年来研究的热点。

#### 3.1 肝癌组织中的异常DNA甲基化

Hou等<sup>[21]</sup>报道,与正常肝组织相比,HCC患者癌组织的44个基因中,54个CpG岛发生了高甲基化,而在这些基因中,*EYA4*的甲基化水平与无病生存率(disease free survival, DFS)和总生存率(overall

survival, OS)呈负相关,说明*EYA4*异常的高甲基化可能促进HCC进展。Ding等<sup>[22]</sup>通过实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测得出,HCC癌组织的甲基化程度(平均水平59.1%)比邻近的非肿瘤组织(平均水平36.9%)更高,且癌组织中的抑癌基因*PDCD4*高甲基化与其表达下调存在显著的相关性。Villanueva等<sup>[23]</sup>的研究证实,HCC患者的肿瘤组织与癌旁非肿瘤性组织相比,*RASSF1*、*IGF2*、*APC*、*NKX6-2*和*NEFH*基因均出现异常甲基化,能够作为标志物预测患者的肝癌发病率和生存率。Sueoka等<sup>[24]</sup>则在肝癌组织中发现了*SAMSNI*启动子的高甲基化导致*SAMSNI* mRNA表达降低,而*SAMSNI*的mRNA水平与肿瘤大小呈负相关。Chen等<sup>[25]</sup>分析发现肝癌组织中*ACADS*水平明显下调,并参与了HCC细胞的增殖和转移,敲除*DMNT*以后,*ACADS*在HCC细胞中的表达显著增加。此外,2020年的一项160例HCC患者*ADRA1A*启动子区域的甲基化水平与临床特征的研究结果显示,与正常组织相比,肝癌患者肿瘤组织中的*ADRA1A*启动子区域甲基化水平显著升高,*ADRA1A*的mRNA和蛋白水平降低,而DNA甲基转移酶抑制剂可以增加肝癌细胞株*ADRA1A*的mRNA表达,说明*ADRA1A*基因高甲基化可能参与了HCC的发生<sup>[26]</sup>。

### 3.2 肝癌外周血中异常DNA甲基化

相对于组织标本来说, 外周血中 DNA 甲基化改变更具有无创检测和早期发现癌变的价值。Liu 等<sup>[27]</sup>报道, 66.7% 的肝癌患者血清 DNA 中 *LINE-1* 低甲基化, 73.3% 的肝癌患者血清 DNA 中 *RASSF1A* 启动子高甲基化, 且 *LINE-1* 低甲基化和 *RASSF1A* 启动子高甲基化之间存在显著的相关性。这与 Harada 等<sup>[28]</sup>在 208 例 HCC 患者中的研究结果一致, 说明 *LINE-1* 可能作为一种生物标志物来识别肝癌患者, 而 *LINE-1* 与 *RASSF1A* 联合检测可以更有效地预测早期 HCC。Wei 等<sup>[29]</sup>通过检测肝癌患者和健康人的 116 例肝组织样本、326 例血浆样本的 DNA 甲基化状态, 发现 *SOCS3* 在组织和血浆中的甲基化状态与 AFP400、肿瘤大小和肿瘤分化程度有关, *SOCS3* 甲基化可作为筛选 HCC 高危个体的无创分子标志物。

### 3.3 肝炎病毒感染与肝癌异常DNA甲基化

肝炎病毒感染是肝癌的重要危险因素, 尤其是中国的肝癌患者, 慢性乙肝病毒感染是首要病因。研究证实, 乙型肝炎病毒 (HBV) 和丙型肝炎病毒 (HCV) 感染可以引起多种基因的甲基化异常, 甚至在感染的早期阶段, DNA 甲基化就已经发生改变。Nishida 等<sup>[30]</sup>通过全基因组分析发现了 HCC 组织中 DNA 甲基化的 CpG 位点的分布改变及这种改变在 HCC 进展过程中的逐步积累。2019 年的一项 meta 分析评估了 HBV 感染对 HCC 中 DNA 甲基化的作用, 被纳入的研究都关注了 HBV 阳性和 HBV 阴性患者肝癌组织之间的 13 个基因的区别, 结果显示, 其中 6 个基因 (*p16*、*RASSF1A*、*GSTP1*、*APC*、*p15* 和 *SFRP1*) 的甲基化水平存在显著差异, 提示 HBV 感染可诱导这些基因在 HCC 中发生甲基化<sup>[31]</sup>。Dou 等<sup>[32]</sup>证实了在 HBV 阳性的 HCC 患者中, *CDH1*、*DNMT3b* 和 *ESR1* 的甲基化频率明显高于肝硬化、慢性乙型肝炎患者和正常对照。Dong 等<sup>[33]</sup>采用荧光定量法 (Methy Light) 评估血清中 *RASSF1A*、*APC*、*BVES*、*TIMP3*、*GSTP1* 和 *HOXA9* 等多个基因启动子甲基化对 HBV 阳性 HCC 患者的诊断价值, 结果表明, 结合血清中 *RASSF1A*、*BVES* 和 *HOXA9* 基因启动子的甲基化程度可以提高 HBV 阳性 HCC 患者的诊断性能。Tian 等<sup>[34]</sup>报道 HBV 阳性 HCC 患者的 *HCCS1* 启动子甲基化频率明显高于健康对照组。此外, 血清 *IGFBP7* 启动子甲基化也可以提高 HBV 阳性 HCC 患者筛查的准确性<sup>[35]</sup>。

总之, 这些研究都表明, 异常 DNA 甲基化是肝癌早期诊断的潜在生物标志物, 基于血液样本中

的甲基化标志物的检测有望为肝癌无创筛查提供一种经济、高效的手段。表 1 总结了肝癌中 DNA 甲基化的相关研究。

## 4 DNA甲基化检测方法

5mC 作为最常见的 DNA 修饰碱基, 目前已有不少成熟的检测方法。亚硫酸氢钠转化法 (sodium bisulfite treatment) 作为 5mC 的金标准方法, 已被广泛用于全基因组的 5mC 分析, 包括单碱基分辨率的检测<sup>[36]</sup>。其原理是利用亚硫酸盐将单链 DNA 中未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶不发生改变。

亚硫酸氢钠转化测序法 (bisulfite sequencing) 于 1992 年由 Frommer 等<sup>[37]</sup>首次提出。该方法是 DNA 经亚硫酸盐处理后, 进行 PCR 扩增、纯化、克隆、测序等步骤, 得到基因组 DNA 分子的精确甲基化图谱, 其中测序凝胶上的清晰阳性条带显示出每个 5mC 的位置。

焦磷酸测序 (pyrosequencing) 是另一种广泛使用的甲基化分析方法, 同样基于亚硫酸氢钠转化法建立。亚硫酸盐处理后的 DNA 进行 PCR 扩增反应, 并使用焦磷酸测序仪定量分析每个 CpG 位点的甲基化状态, 可以得到甲基化分子的比率<sup>[38]</sup>。此方法需要克隆, 只能分析小范围的 CpG 位点, 适合全基因组范围的检查, 但不适合大规模的癌症筛查<sup>[39]</sup>。

甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 也是一种经典的检测方法, 于 1996 年由 Herman 等<sup>[40]</sup>提出。此方法需要设计可以识别甲基化 CpG 的 M 探针和非甲基化 CpG 的 U 探针, 然后根据亚硫酸氢钠转化后甲基化位点和非甲基化位点碱基的差异, 设计两对不同的引物进行 PCR 扩增, 再通过凝胶电泳检测扩增片段, 判断基因是否发生甲基化。MSP 法可以检测较低浓度的甲基化水平, 但只能对已知序列的甲基化状态进行分析, 不能定量分析甲基化水平<sup>[39]</sup>。

荧光定量法 (MethyLight) 是一种基于实时荧光定量 PCR 的高通量甲基化检测技术 (quantitative methylation specific PCR, qMSP), 通过设计特异性的引物和 TaqMan 荧光探针, 最终根据荧光信号的强度定量检测甲基化水平<sup>[41]</sup>。MethyLight 法使容易出现假阳性的 MSP 法的特异性增加, 且不需要进行额外的电泳分离, 减小检测误差<sup>[42]</sup>, 不仅具有高度敏感性和可重复性, 而且能够快速检测患者样本中的生物相关信息。此外, 数字 PCR 技术的蓬勃发

表1 肝癌中DNA甲基化的相关研究

研究	检测方法	样本	样本类型	基因标志物	参考文献
Hou 2014	qRT-PCR	肝癌154例 正常对照6例	组织	<i>EYA4</i>	[21]
Ding 2016	qRT-PCR	肝癌56例 正常对照56例	组织	<i>PDCD4</i>	[22]
Villanueva 2015	焦磷酸测序	实验组 肝癌221例 正常对照10例 确认组 肝癌83例	组织	<i>RASSF1</i> 、 <i>IGF2</i> 、 <i>APC</i> 、 <i>NKX6-2</i> 、 <i>NEFH</i>	[23]
Sueoka 2015	qRT-PCR	肝癌144例 正常对照144例	组织	<i>SAMSN1</i>	[24]
Harada 2015	焦磷酸测序	肝癌208例 正常对照79例	血清	<i>LINE-1</i>	[28]
Dou 2016	MSP	肝癌183例 肝硬化47例 慢性乙肝126例 正常对照50例	血清	<i>CDH1</i> 、 <i>DNMT3b</i> 、 <i>ESR1</i>	[32]
Liu 2017	MSP	肝癌75例 正常对照50例	血清	<i>LINE-1</i> 、 <i>RASSF1</i>	[27]
Wei 2018	qRT-PCR	组织 肝癌48例 配对对照48例 肝硬化10例 良性肝病6例 健康个体4例 血清 肝癌119例 肝硬化105例 良性肝病52例 健康个体50例	组织、血清	<i>SOCS3</i>	[29]
Dong 2017	qMSP	肝癌98例 肝硬化75例 慢性乙肝90例 正常对照80例	血清	<i>RASSF1A</i> 、 <i>BVES</i> 、 <i>HOXA9</i>	[33]
Tian 2017	MSP	肝癌20例 慢性乙肝146例 正常对照27例	血清	<i>HCCS1</i>	[34]
Tao 2018	qMSP	HBV相关肝癌80例 慢性乙肝35例 正常对照20例	血清	<i>IGFBP7</i>	[35]
Chen 2019	qRT-PCR	肝癌282例 正常对照47例	组织	<i>ACADS</i>	[25]
Chen 2020	qRT-PCR	肝癌160例 正常对照160例	组织	<i>ADRA1A</i>	[26]

展使其在检测微量的DNA甲基化异常时具有巨大潜力，基于磁珠和油包水微液滴结构的数字PCR技术，即BEAMing技术也被应用到DNA甲基化

的检测中<sup>[43]</sup>。使用数字MethyLight法检测DNA甲基化在癌症早期诊断和长期病情监测中具有十分广阔的前景。

2019年, 牛津大学的华人科学家宋春啸教授等发展了一种不需要亚硫酸盐处理的、效率高、覆盖范围广的DNA甲基化测序方法——TAPS, 可以对目标序列直接进行DNA甲基化单碱基分辨率的测序, 相对于亚硫酸氢钠转化法, 具有对DNA损伤小、所需起始样本量低、成本更低的特点, 更容易推广应用<sup>[44]</sup>, 如血浆游离DNA甲基化的检测实现早期癌症的无创检测, 单细胞DNA甲基化测序提示肿瘤异质性等。

## 5 小结与展望

随着研究的不断深入, 越来越多的癌症早期诊断、分类或分级的生物标志物不断被发现, 极大地推进了研究者和临床工作者从分子水平对肿瘤的认识, 包括癌症的发病机制和基于基因的早期诊断、病情监测以及预后评估。表观遗传修饰, 特别是DNA甲基化在肿瘤发生发展中的作用越来越受到关注。

包括肝癌在内的多种肿瘤的发生是一个复杂的多步骤过程, 涉及多级反应和突变的积累, 包括一系列遗传和表观遗传的改变。既往研究发现, 在部分肝癌患者的组织、血液、粪便、尿液和其他体液中检测到的异常甲基化DNA, 可能成为肝癌早期诊断的生物标志物。此外, 大量研究表明, DNA甲基化生物标志物有望为了解食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌和急性髓性白血病等恶性肿瘤提供有价值的信息<sup>[45-52]</sup>。尽管如此, 表观遗传学的确切调控机制, 以及DNA甲基化改变与临床表现是否具有相关性仍缺乏充足的证据, 这些研究结果与实际的诊断和治疗之间仍存在一定的差距, 这些问题仍有待进一步的基础研究和大规模的临床研究证实。

### [参 考 文 献]

- [1] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2019, 380: 1450-62
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424
- [3] Xu J. Trends in liver cancer mortality among adults aged 25 and over in the United States, 2000-2016. *NCHS Data Brief*, 2018, 314: 1-8
- [4] Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2014, featuring survival. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109: djx030
- [5] Kobayashi M, Ikeda K, Hosaka T, et al. Dysplastic nodules frequently develop into hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. *Cancer*, 2006, 106: 636-47
- [6] Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, et al. Surveillance imaging and  $\alpha$  fetoprotein for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 2018, 154: 1706-18
- [7] Eggert T, McGlynn KA, Duffy A, et al. Epidemiology of fibrolamellar hepatocellular carcinoma in the USA, 2000-10. *Gut*, 2013, 62: 1667-8
- [8] Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, et al. DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Res*, 2016, 76: 3446-50
- [9] Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38: 23-38
- [10] Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med*, 2017, 49: e322
- [11] Guibert S, Forné T, Weber M. Dynamic regulation of DNA methylation during mammalian development. *Epigenomics*, 2009, 1: 81-98
- [12] Chen Y, Hong T, Wang S, et al. Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 2844-72
- [13] Jeltsch A, Broche J, Bashtrykov P. Molecular processes connecting DNA methylation patterns with DNA methyltransferases and histone modifications in mammalian genomes. *Genes (Basel)*, 2018, 9: 566
- [14] Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8: a019505
- [15] Pfeifer GP. Defining driver DNA methylation changes in human cancer. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1166
- [16] Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 2003, 300: 455
- [17] Neri F, Rapelli S, Krepelova A, et al. Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. *Nature*, 2017, 543: 72-7
- [18] Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett*, 2017, 396: 130-7
- [19] Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*, 2000, 24: 132-8
- [20] Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics*, 2017, 12: 416-32
- [21] Hou X, Peng JX, Hao XY, et al. DNA methylation profiling identifies EYA4 gene as a prognostic molecular marker in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21: 3891-9
- [22] Ding X, Cheng X, Gong M, et al. Hypermethylation and expression silencing of PDCD4 gene in hepatocellular carcinoma: a consort study. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95: e2729
- [23] Villanueva A, Portela A, Sayols S, et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2015, 61: 1945-56

- [24] Sueoka S, Kanda M, Sugimoto H, et al. Suppression of *SAMSNI* expression is associated with the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22 Suppl 3: S1453-60
- [25] Chen D, Feng X, Lv Z, et al. *ACADS* acts as a potential methylation biomarker associated with the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinomas. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 8825-44
- [26] Chen G, Fan X, Li Y, et al. Promoter aberrant methylation status of *ADRA1A* is associated with hepatocellular carcinoma. *Epigenetics*, 2020, 15: 684-701
- [27] Liu ZJ, Huang Y, Wei L, et al. Combination of *LINE-1* hypomethylation and *RASSF1A* promoter hypermethylation in serum DNA is a non-invasion prognostic biomarker for early recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Neoplasma*, 2017, 64: 795-802
- [28] Harada K, Baba Y, Ishimoto T, et al. *LINE-1* methylation level and patient prognosis in a database of 208 hepatocellular carcinomas. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22: 1280-7
- [29] Wei L, Huang Y, Zhao R, et al. Detection of promoter methylation status of suppressor of cytokine signaling 3 (*SOCS3*) in tissue and plasma from Chinese patients with different hepatic diseases. *Clin Exp Med*, 2018, 18: 79-87
- [30] Nishida N, Nishimura T, Nakai T, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation and tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis*, 2014, 32: 658-63
- [31] Zhang C, Huang C, Sui X, et al. Association between gene methylation and HBV infection in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer*, 2019, 10: 6457-65
- [32] Dou CY, Fan YC, Cao CJ, et al. Sera DNA methylation of *CDH1*, *DNMT3b* and *ESR1* promoters as biomarker for the early diagnosis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*, 2016, 61: 1130-8
- [33] Dong X, Hou Q, Chen Y, et al. Diagnostic value of the methylation of multiple gene promoters in serum in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dis Markers*, 2017, 2017: 2929381
- [34] Tian MM, Fan YC, Zhao J, et al. Hepatocellular carcinoma suppressor 1 promoter hypermethylation in serum. A diagnostic and prognostic study in hepatitis B. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2017, 41: 171-80
- [35] Tao LP, Fan XP, Fan YC, et al. Combined detection of insulin-like growth factor-binding protein 7 promoter methylation improves the diagnostic efficacy of AFP in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract*, 2018, 214: 144-50
- [36] Hofer A, Liu ZJ, Balasubramanian S. Detection, structure and function of modified DNA bases. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 6420-9
- [37] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 1827-31
- [38] Harrington CT, Lin EI, Olson MT, et al. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137: 1296-303
- [39] Yokoi K, Yamashita K, Watanabe M. Analysis of DNA methylation status in bodily fluids for early detection of cancer. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 735
- [40] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9821-6
- [41] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: E32
- [42] Olkhov-Mitsel E, Zdravic D, Kron K, et al. Novel multiplex methylight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids. *Sci Rep*, 2014, 4: 4432
- [43] Barault L, Amatu A, Bleeker FE, et al. Digital PCR quantification of *MGMT* methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 2015, 26: 1994-9
- [44] Liu Y, Siejka-Zielińska P, Velikova G, et al. Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 424-9
- [45] Li D, Zhang L, Liu Y, et al. Specific DNA methylation markers in the diagnosis and prognosis of esophageal cancer. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 11640-58
- [46] Choi SJ, Jung SW, Huh S, et al. Alteration of DNA methylation in gastric cancer with chemotherapy. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27: 1367-78
- [47] Kisiel JB, Klepp P, Allawi HT, et al. Analysis of DNA methylation at specific loci in stool samples detects colorectal cancer and high-grade dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17: 914-21
- [48] Joo JE, Dowty JG, Milne RL, et al. Heritable DNA methylation marks associated with susceptibility to breast cancer. *Nat Commun*, 2018, 9: 867
- [49] He W, Ju D, Jie Z, et al. Aberrant CpG-methylation affects genes expression predicting survival in lung adenocarcinoma. *Cancer Med*, 2018, 7: 5716-26
- [50] Yu Y, Cao H, Zhang M, et al. Prognostic value of DNA methylation for bladder cancer. *Clin Chim Acta*, 2018, 484: 207-12
- [51] Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2013, 368: 2059-74
- [52] Saghafinia S, Mina M, Riggi N, et al. Pan-cancer landscape of aberrant DNA methylation across human tumors. *Cell Rep*, 2018, 25: 1066-80