

- operative study. The Refractory Anemia Study Group of The Ministry of Health and Welfare, Japan [J]. *Leuk Res*, 1997, 21 (3): 241-247.
- [14] GARCIA-MANERO G, SHAN J, FADERL S, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome [J]. *Leukemia*, 2008, 22(3):538-543.
- [15] KANTARJIAN H, O'BRIEN S, RAVANDI F, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original international prognostic scoring system [J]. *Cancer*, 2008, 113(6):1351-1361.
- [16] GREENBERG PL, TUECHLER H, SCHANZ J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2012, 120(12):2454-2465.
- [17] 雷焯, 许晓倩, 杨建民, 等. IPSS及IPSS-R对骨髓增生异常综合征患者预后评估的比较分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35(12):1090-1094.
- [18] 武霄云, 陈双, 赵芳, 等. 血清铁蛋白水平在初诊骨髓增生异常综合征患者的意义 [J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(24):11384-11387. DOI: 10.3877/ema.jissn.1674-0785.2013.24.
- [19] 李冰, 陈毓华, 陈淑珍, 等. 血清铁蛋白与骨髓增生异常综合征危险度分层和预后的关系分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(06):610-612+626.
- [20] GATTO S, BALL G, ONIDA F, et al. Contribution of β -2 microglobulin levels to the prognostic stratification of survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) [J]. *Blood*, 2003, 102(5):1622-1625.
- [21] 孙谕, 傅晋翔. 骨髓增生异常综合征研究进展:第56届美国血液学会年会报道 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2015, 24(05):257-260.
- [22] LIN T L, NAGATA Y, KAO H W, et al. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations [J]. *Haematologica*, 2014, 99(1):28-36.
- [23] TRAINA F, VISCONTE V, ELSON P, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms [J]. *Leukemia*, 2014, 28(1):78-87.
- [24] STENGEL A, KERN W, HAFERLACH T, et al. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL—an analysis of 3307 cases [J]. *Leukemia*, 2017, 31(3):705-711.

(收稿日期:2019-12-30,修回日期:2020-01-09)

引用本文:王涛,王庆泊,岳浩洋,等.地西他滨对胃癌细胞 AGS 增殖和侵袭的影响 [J]. *安徽医药*, 2021, 25(7): 1281-1285. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.07.003.



◇ 药学研究 ◇

地西他滨对胃癌细胞 AGS 增殖和侵袭的影响

王涛,王庆泊,岳浩洋,张贵东,苑昭奖,连晓华,李恩君,刘博

作者单位:邯郸市中心医院普外六科,河北 邯郸 056000

通信作者:刘博,男,主任医师,硕士生导师,研究方向为普通外科、中西医结合肠内营养支持, Email:310655366@qq.com

基金项目:2017年河北省中医药管理局科研计划项目(2017294);邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1623208063-5)

摘要: **目的** 探究地西他滨对胃癌 AGS 细胞增殖和侵袭的影响及其作用机制。**方法** 本研究时间为2017年10月至2018年12月,采用地西他滨处理购自于中国科学院细胞库的胃癌 AGS 细胞,应用 MTT 法检测细胞增殖率,亚硫酸氢钠转化测序法检测 APC 基因启动子的甲基化程度,实时荧光定量 PCR 法检测 APC 基因 mRNA 的表达,Western blotting 检测 APC 蛋白表达,细胞锚定非依赖性生长分析法和 Transwell 细胞侵袭法检测细胞的增殖和侵袭能力。**结果** AGS 细胞中,APC 基因启动子高度甲基化((85.7±5.4)%);地西他滨处理 AGS 细胞后,细胞活力受到抑制,且呈浓度和时间依赖性。APC 基因启动子去甲基化,mRNA 和蛋白表达水平均升高($P<0.05$),5 μ M 升高(2.3±0.1)倍,10 μ M 升高(3.6±0.2)倍,25 μ M 升高(4.1±0.1)倍,50 μ M 升高(3.9±0.2)倍),增殖和侵袭能力均减弱($P<0.05$),AGS 组(290.3±5.7)个细胞,5 μ M 为(213.2±6.7)个细胞,10 μ M 为(160.4±7.3)个细胞,25 μ M 为(145.8±6.2)个细胞,50 μ M 为(119.2±8.6)个细胞)。**结论** 地西他滨可以抑制 AGS 细胞的增殖和侵袭,表现出抗肿瘤活性,其相关机制可能为去除 AGS 细胞中 APC 基因的甲基化,恢复 APC 基因的表达。

关键词: 胃肿瘤; 基因,肿瘤抑制; 地西他滨; APC 基因; 甲基化; 增殖; 侵袭

Effect of decitabine on proliferation and invasion of gastric cancer AGS cells

WANG Tao, WANG Qingbo, YUE Haoyang, ZHANG Guidong, YUAN Zhaojiang,

LIAN Xiaohua, LI Enjun, LIU Bo

Author Affiliation: The Sixth Department of General Surgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanisms of decitabine on the proliferation and invasion of gastric cancer AGS cells. **Methods** The study time was from October 2017 to December 2018. The AGS cells which purchased from the Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences were treated with decitabine and the cell proliferation rate was detected by MTT assay. The methylation status of the *APC* gene promoter was detected by bisulfite sequencing. The *APC* mRNA levels were measured by qRT-PCR, and the protein levels were detected by western blot. The proliferation and invasion ability of the AGS cells were detected by anchorage-independent growth assay and Transwell invasion assay. **Results** The *APC* gene promoter was hypermethylated in AGS cells [(85.7±5.4)%]. After decitabine treating the AGS cells, the cell viability was inhibited in a concentration and time-dependent manner, and the *APC* gene promoter was demethylated. The *APC* mRNA and protein expression levels were increased [5 μM increased (2.3±0.1) times, 10 μM increased (3.6±0.2) times, 25 μM increased (4.1±0.1) times, 50 μM increased (3.9±0.2) times] ($P<0.05$). And the proliferation and invasion ability of AGS cells were weakened [AGS group: (290.3±5.7) cells, 5 μM: (213.2±6.7) cells, 10 μM: (160.4±7.3) cells, 25 μM: (145.8±6.2) cells, 50 μM: (119.2±8.6) cells] ($P<0.05$). **Conclusion** Decitabine can inhibit the proliferation and invasion of AGS cells and exert its anticancer effects, the related mechanism may be to remove the methylation of the *APC* gene and restore its expression.

Key words: Stomach neoplasms; Genes, tumor suppressor; Decitabine; *APC* gene; Methylation; Proliferation; Invasion

胃癌(Gastric cancer, GC),是继肺癌之后,死亡率最高的常见恶性肿瘤^[1-2],已成为全世界主要的健康负担。中国的胃癌发病例数每年近40万,约占全球的42.6%,死亡率高达45%^[3-4],因此我国面临着十分严峻的抗击胃癌形势。DNA甲基化是表观遗传途径的基本调控方式,抑癌基因、DNA修复基因启动子的异常甲基化,会抑制基因的转录,导致功能丧失,与肿瘤的发生和发展相关^[5-6],已有报道肿瘤抑制基因*APC*在多种肿瘤中高度甲基化的情况^[7-9]。地西他滨(Decitabine, DAC)是一种天然2'-脱氧胞苷酸的腺苷类似物,通过抑制DNA甲基转移酶,减少DNA的甲基化,为目前已知最强的DNA甲基化特异性抑制剂^[10-11]。地西他滨作为抗肿瘤新药,在实体瘤中的作用报道较少。本研究以胃癌AGS细胞为研究对象,探究地西他滨对AGS细胞增殖和侵袭的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM/F12培养液、RPMI1640培养液、胎牛血清和胰蛋白酶购买于美国HyClone公司; TRIzol试剂购买于美国Invitrogen公司;基因组DNA提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购买于天根生化科技(北京)有限公司;RNA反转录试剂盒(Advantage RT-for-PCR)、实时荧光定量PCR试剂盒(Premix Taq™ Version 2.0)购买于宝日医生物技术(北京)有限公司;T-A克隆载体(pGEM-T载体系统)购买于上海普洛麦格生物产品有限公司;亚硫酸氢钠转化试剂盒(EpiTect Fast Bisulfite Conversion Kits)购买于德国QIAGEN公司;APC一抗(兔来源)、二抗购买于美国Cell Signaling Technology公司;MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购买于碧云天;DH5α化学感受态细胞购买于南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Transwell小室购买于Chemicon公司;地西他滨(5-Aza-2'-deox-

ycytidine)购买于美国Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胃癌细胞系培养 本研究时间为2017年10月至2018年12月。人胃黏膜细胞系GES-1、胃癌细胞系AGS购买于中国科学院细胞库。AGS使用含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养液培养, GES-1使用含有10%胎牛血清的RPMI1640培养液培养,培养条件为37℃、5%二氧化碳,两天换一次培养基,细胞汇合度达到85%以上时进行传代培养。

1.2.2 地西他滨(DAC)处理胃癌细胞 AGS细胞分为空白对照组和实验组,空白对照组在培养液中添加相应体积的PBS缓冲液;实验组培养液中添加10 μM的DAC,隔天弃掉旧培养基,添加新鲜的培养基和10 μM的DAC,连续用DAC处理3 d,然后进行后续的实验探究。

1.2.3 MTT法检测细胞活力 MTT比色法,是一种检测细胞存活和生长的方法。取对数生长期的AGS细胞,使用胰酶消化吹散成细胞悬液,稀释成 5×10^4 个/mL,然后取100 μL细胞悬液(即 0.5×10^4 个细胞)铺于96孔板,常规培养。待细胞贴壁后,更换分别含有5 μM、10 μM、25 μM、50 μM DAC的培养基100 μL,分别培养24 h、48 h、72 h和96 h。分别在对应的时间点,于培养的细胞中加入20 μL 5 mg/mL的MTT,继续培养4 h。然后每孔细胞再加入150 μL的二甲基亚砜,于摇床上轻轻摇晃10 min,再于酶标仪下检测490 nm波长下的吸光值。以增殖率为纵坐标,处理时间为横坐标,绘制曲线,每组处理分别设置3个重复。

1.2.4 亚硫酸氢钠转化基因组DNA 收集细胞,5 000 r/min离心5 min,弃上清,加入200 μL PBS缓冲液重悬细胞,使用基因组DNA提取试剂盒,根据说明书操作提取基因组DNA,然后使用亚硫酸氢钠转化试剂盒进行转化修饰。

1.2.5 亚硫酸氢盐测序 APC基因启动子亚硫酸氢盐测序的扩增引物^[8]见表1,该引物可扩增出APC基因启动的部分序列,长261 bp,覆盖21个CpG位点,序列如下:5-
ACTGCCATCAACTTCCTTGCTTGCTGGGGACTGGG
GCCCGCAGGGCATAACCCCGAGGGGTACGGGGCT
AGGGCTAGGCAGGCTGTGCGGTTGGGCGGGGCC
TGTGCCCCACTGCGGAGTGCGGTTCGGGAAGCGG
AGAGAGAAGCAGCTGTGTAATCCGCTGGATGCGG
ACCAGGGCGCTCCCCATTCCCGTCCGGGAGCCCCG
GATTGGCTGGGTGTGGGCGCACGTGACCGACAT-
GTGGCTGTATTGGTGCAGCCCCG-3'。

PCR的扩增条件为:95℃预变性5 min;95℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增35个循环;72℃延伸5 min。扩增后的PCR产物经2.5%的琼脂糖凝胶电泳后,使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行纯化回收,回收后的产物与pGEM-T质粒载体进行连接,重组的质粒再转化DH5 α 感受态细胞,涂氨苄平板,挑取10个菌落进行测序。

表1 亚硫酸氢钠转化测序引物

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度	产物大小
APC	APC-F	ATTGTTATTAATTTTTTTGTTTGGG	62℃	261 bp
	APC-R	CGAAGTACACCAATACAACCATATC		

1.2.6 实时荧光定量PCR检测(qRT-PCR) 使用TRIzol提取处理后的细胞总RNA,然后使用TaKaRa的RNA反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,用 β -actin作为内参进行实时荧光定量PCR扩增分析,每组包含3个重复。相关引物信息见表2。扩增条件为:95℃预变性30 s;95℃ 5 s,56℃ 20 s,72℃ 20 s,40个循环;72℃延伸5 min。根据扩增的循环数Ct值,使用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来对比相关基因mRNA的表达情况。

表2 qRT-PCR引物

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度	产物大小
APC	正向	TCCTCCGCAATGTGTCAG	56℃	109 bp
	反向	AGGCTGTGCCAAGTCAGATC		
β -actin	正向	TTTGGCTATACCCTACTGGCA	56℃	109 bp
	反向	CTGCACAGTCGTACATATC		

1.2.7 Western blot 收集细胞,提取总蛋白质,进行BCA蛋白质定量,使用总量40 μ g的蛋白质进行常规的电泳,半干法将蛋白电转至PVDF膜上。用5%的牛血清白蛋白溶液封闭转好的PVDF膜2 h, TBST缓冲液漂洗3次,然后敷育一抗,一抗的稀释比例为1:1 000,4℃摇床过夜。TBST充分漂洗

PVDF膜3次,然后加入荧光标记的二抗孵育,避光37℃摇床2 h。再经TBST漂洗3次后,于BIO-RAD的凝胶成像系统上进行扫描成像分析。

1.2.8 锚定非依赖性生长分析 经10 μ M DAC处理72 h后的AGS细胞,用胰酶消化吹散成细胞悬液,取1 mL细胞悬液(包含 2×10^5 个细胞)与1 mL 1%琼脂糖溶液混合,铺于6孔板中,每周覆盖新鲜的软琼脂培养液,培养4周,然后观察细胞的克隆情况,并拍照进行计数分析。

1.2.9 Transwell细胞侵袭实验分析 将Transwell小室放入培养板中,在上室中加入300 μ L无血清DMEM/F12培养基,在37℃培养箱中孵育30 min,弃去培养基。然后将经过不同浓度DAC处理后的AGS细胞(1×10^5 个细胞)重悬于100 μ L无血清DMEM/F12培养基中,然后加入小室的上室,下室则加入200 μ L含10% FBS的DMEM/F12培养基,于37℃培养24 h。之后取出上室,用棉签刮去上室内侧细胞,再用甲醇固定侵袭的细胞,使用苏木素染色,然后使用倒置显微镜进行计数。随机选择3个视野,对通过基质层侵袭进入的细胞进行计数,每次测定重复三次。

1.3 统计学方法 实验数据采用SPSS 19.0软件进行统计分析,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 进行表示,组间资料对比采用独立样本t检验,组间差异采用单因素方差分析,事后比较采用LSD法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 地西他滨对胃癌AGS细胞活力的影响 首先为了验证去甲基化药物地西他滨(DAC)对于胃癌AGS细胞的活力是否有影响,以及为了筛选合适的药物处理浓度和处理时间,我们分别使用5 μ M、10 μ M、25 μ M和50 μ M的DAC处理AGS细胞,并于24 h、48 h、72 h和96 h后使用MTT比色法检测细胞的增殖情况。

实验结果表明,DAC对于胃癌AGS细胞的增殖具有抑制作用,且呈剂量和时间依赖性(图1)。当使用10 μ M的DAC处理72 h后,AGS细胞的活力仍在60%以上(63.2%),而当使用更高的浓度或者更长的时间处理时,对细胞活力的影响比较大,且细胞形态也不好。所以,我们选择10 μ M、72 h作为DAC处理AGS细胞的基本条件。

2.2 地西他滨对APC基因启动子甲基化的影响 亚硫酸氢钠转化测序法是目前检测DNA甲基化最经典的方法^[12-13],首先,我们检测了胃癌AGS细胞系,发现APC基因启动子高度甲基化((85.7 \pm 5.4)%。作为对比,我们也检测了胃黏膜细胞系GES-1的情况,其APC基因启动子无甲基化(0%)。然后AGS细胞经10 μ M DAC处理72 h后,APC基因启动子的甲基化程度

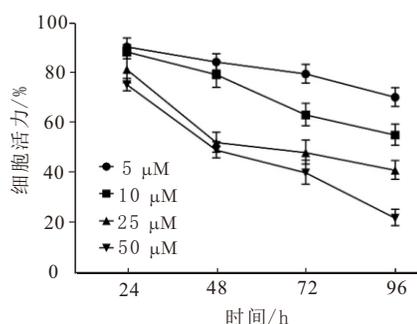
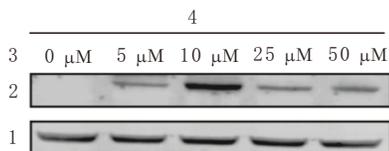


图1 不同浓度和处理时间的地西他滨对 AGS 细胞活力的影响

降低((33.3±2.5%)(n=20, t=13.051, P<0.001)。以上结果表明,在胃癌 AGS 细胞中,APC 基因启动子高度甲基化,而 DAC 有良好的去甲基化作用。

2.3 地西他滨对 APC 基因 mRNA 及蛋白质表达的影响 我们检测了 AGS 细胞经 DAC 处理后,APC 基因 mRNA 的表达情况。实验结果表明,经 5 μM、10 μM、25 μM、50 μM DAC 处理 72 h 后,APC 基因 mRNA 的表达量分别增加了(2.3±0.1)倍(n=15, P<0.001)、(3.6±0.2)倍(n=15, P<0.001)、(4.1±0.1)倍(n=15, P<0.001)和(3.9±0.2)倍(n=15, P<0.001),与未经处理的 AGS 组对比,表达水平平均升高。蛋白质的表达情况与 mRNA 大致相同,经 DAC 处理后,APC 蛋白的表达提高(图 2)。以上结果表明,AGS 细胞中 APC 基因的表达被抑制了,而 DAC 可以恢复 APC 基因的表达。



注:1—β-肌动蛋白,2—APC 细胞,3—地西他滨,4—胃癌 AGS 细胞

图2 地西他滨对 AGS 细胞中 APC 蛋白表达的影响

2.4 地西他滨对 AGS 细胞增殖和侵袭的影响 APC 基因表达的缺失会引起一系列的级联反应,最终导致细胞分裂的加速^[14]。为了研究 APC 基因去甲基化重新表达后对胃癌细胞增殖和侵袭的影响,我们进行了细胞锚定非依赖性生长实验分析和 Transwell 细胞侵袭分析。实验结果表明,在软琼脂中,AGS 细胞能形成大量的细胞克隆,且克隆簇大而清晰,说明 AGS 细胞在悬浮状态下增殖良好(图 3)。而经过 10 μM DAC 处理 72 h 后,AGS 在软琼脂中并无明显克隆簇形成,细胞克隆数显著下降(图 3, n=6, t=13.404, P<0.001)。Transwell 细胞侵袭实验结果显示,AGS 细胞侵袭的最多,大约(290.3±5.7)个细胞,经 5 μM、10 μM、25 μM、50 μM DAC 处理 72 h 后的细胞侵袭数分别为(213.2±6.7)个(n=15, P<0.001)、

(160.4±7.3)个(n=15, P<0.001)、(145.8±6.2)个(n=15, P<0.001)和(119.2±8.6)个(n=15, P<0.001),与 AGS 组比较,侵袭能力均逐渐下降。以上结果表明经过 DAC 处理后,AGS 细胞的增殖和侵袭能力降低。

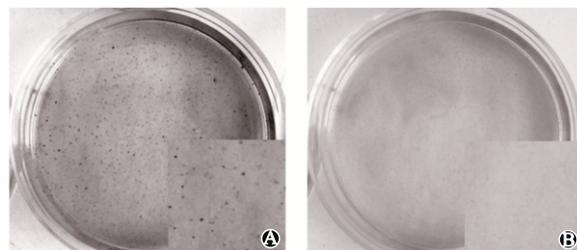


图3 细胞侵袭能力分析:A为 AGS 细胞;B为 10 μM DAC 处理后的 AGS 细胞

3 讨论

胃癌是亚洲常见的恶性肿瘤,也是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率分别位列全球第 5 和第 6 位^[15],且近几年来随着现代生活的发展,受不良生活习惯及环境污染的影响,胃癌出现了年轻化的趋势。通常胃癌的预后不佳,平均五年生存率低于 20%^[16],因为胃癌的确诊往往已经到了晚期,早期胃癌没有明显症状^[17]。因此,我国胃癌防治任重道远。

APC 基因为肿瘤抑制基因,位于染色体的 5q21,其编码的肿瘤抑制蛋白为 Wnt 信号通路的拮抗剂,同时还涉及其他的生理过程,包括细胞迁移和粘附、转录激活和凋亡^[14],该基因的缺陷会导致家族性腺瘤性息肉病(FAP)^[18],这是一种常染色体显性的恶性疾病,通常会发展为恶性肿瘤。APC 基因与结直肠癌的发生发展密切相关,有报道 85% 的结肠癌中存在 APC 基因缺失或失活的情况^[19]。除了基因突变, DNA 异常甲基化也会影响基因的表达。DNA 甲基化作为表观遗传学的基本修饰方式,近年来也成为肿瘤研究的焦点, DNA 甲基化程度和模式的改变是肿瘤发生和发展一个重要因素。在肺癌尤其是非小细胞肺癌中, APC 基因存在过甲基化的情况^[8],在消化道肿瘤当中, APC 基因是失活的抑癌基因之一^[20]。

在本研究中,我们通过亚硫酸氢钠转化测序法,观察到胃癌 AGS 细胞系中, APC 基因启动子 CpG 位点胞嘧啶存在异常高度甲基化的情况,而作为对比,正常的胃黏膜细胞系 GES-1 中则不存在甲基化。APC 基因启动子甲基化之后, mRNA 和蛋白表达减少,功能失活,可能与胃癌的发生发展及侵袭等相关。

DNA 甲基转移酶是 DNA 甲基化过程中的关键因素,地西他滨作为去甲基化药物,可以被整合到

复制的DNA中并与DNA甲基转移酶的活性位点形成不可逆的共价键,从而抑制DNA甲基转移酶,达到去甲基化的作用,重新活化DNA^[21]。已有研究表明,地西他滨在多种血液疾病中具有良好的疗效,包括骨髓增生异常综合征(MDS)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)和镰状细胞性贫血等^[10,22-23],而对于实体瘤的疗效还需进一步研究^[24]。在本研究中,我们观察到地西他滨对于胃癌AGS细胞活力也有抑制作用,且地西他滨浓度越高、处理时间越长,抑制作用越明显。亚硫酸氢钠转化测序实验也表明,地西他滨可以去除AGS细胞中APC基因启动子上的甲基化,随后的qRT-PCR和western blot实验也表明,地西他滨可以恢复APC基因的表达。细胞锚定非依赖性生长实验和Transwell细胞侵袭实验可观察肿瘤细胞的增殖侵袭情况,在软琼脂糖中培养的悬浮状态下,AGS细胞依旧可以很好地生长增殖及侵袭,形成多克隆簇,而经地西他滨处理后的AGS细胞增殖能力减弱,Transwell实验也表明经地西他滨处理后的AGS细胞侵袭能力减弱。由此表明地西他滨可以抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,其机制可能为通过逆转APC基因的甲基化。

综上,胃癌AGS细胞中存在异常高程度的APC基因启动子甲基化,导致基因失活,这对胃癌细胞的增殖和侵袭具有重要意义。地西他滨具有抑制AGS细胞增殖和侵袭的能力,其机制可能与逆转APC基因启动子的甲基化、恢复APC基因的表达相关。本研究探讨了地西他滨对于胃癌细胞的影响,并初步阐明了地西他滨抑制胃癌AGS细胞的作用机制,可对地西他滨用于胃癌治疗提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 白金铭,张炫,乔佳欢,等. 胃癌的发病机制及其防治方法[J]. 吉林医药学院学报,2018,39(4):310-312.
- [2] 陈万青,李贺,孙可欣,等. 2014年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志,2018,40(1):5-13.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAAD E PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床,2017,44(1):52-58.
- [5] 宋乔,高世超,王培昌. DNA甲基化的分子机制及其研究进展[J]. 基因组学与应用生物学,2019,38(7):3317-3322.
- [6] MITTELSTRAß K, WALDENBERGER M. DNA methylation in human lipid metabolism and related diseases [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2018, 29(2): 116-124.
- [7] 赵琦,相绿竹,彭瑞,等. DNA及RNA甲基化检测在肿瘤诊断中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(11):1356-1360.
- [8] PAN S, ZHANG L, GAO L, et al. The property of methylated APC gene promotor and its influence on lung cancer cell line [J]. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63(7): 463-468.
- [9] NAKAMURA M, NISHIKAWA J, SAITO M, et al. Decitabine inhibits tumor cell proliferation and up-regulates E-cadherin expression in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer [J]. *J Med Virol*, 2017, 89(3): 508-517.
- [10] KANTARJIAN H, ISSA J P, ROSENFELD C S, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study [J]. *Cancer*, 2006, 106(8): 1794-803.
- [11] 张前鹏,韩永胜. 地西他滨治疗血液系统恶性肿瘤的研究进展[J]. 安徽医药,2017,21(11):1957-1962.
- [12] UHLMANN K, ROHDE K, ZELLER C, et al. Distinct methylation profiles of glioma subtypes [J]. *International Journal of Cancer*, 2003, 106(1): 52-59.
- [13] MEISSNER A, GNIRKE A, BELL G W, et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(18): 5868-5877.
- [14] MARKOWITZ S D, BERTAGNOLLI M M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(25): 2449-2460.
- [15] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *International Journal of Cancer*, 2015, 136(5): 359-386.
- [16] CORREA P. Gastric cancer: overview [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2013, 42(2): 211-217.
- [17] 盛剑秋,金鹏. 早期胃癌内镜诊断进展[J]. 中华消化杂志, 2018, 38(3): 149-151.
- [18] AUST D E, TERDIMAN J P, WILLENBUCHER R F, et al. The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis [J]. *Cancer*, 2002, 94(5): 1421-1427.
- [19] 马德程,武丽萍,赵华文,等. 结直肠癌相关的原癌基因和抑癌基因研究现状及进展[J]. 河北医药, 2019, 41(14): 2210-2215.
- [20] 程蕾,凌志强,毛伟敏. 食管癌组织APC基因启动子区5'-CpG岛甲基化模型的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(3): 200-204.
- [21] NIE J, LIU L, LI X, et al. Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors [J]. *Cancer Letters*, 2014, 354(1): 12-20.
- [22] ISSA J P, GARCAMANERO G, GILES F J, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies [J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1635-1640.
- [23] LÜBBERT M, SUCIU S, BAILA L, et al. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the european organisation for research and treatment of cancer leukemia group and the german MDS study group [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(15): 1987-1996.
- [24] FANG F, ZUO Q, PILROSE J, et al. Decitabine reactivated pathways in platinum resistant ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(11): 3579-3589.

(收稿日期:2019-11-15,修回日期:2020-02-05)