

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.012

· 临床研究 ·

凋亡蛋白酶活化因子-1 基因在贲门腺癌中的甲基化状态及其临床意义

马洪亮¹, 郭炜², 郭艳丽², 邝钢², 杨植彬², 董稚明² (1. 河北医科大学第四医院麻醉科, 河北石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室, 河北石家庄 050011)

[摘要] **目的:**探讨贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)中凋亡蛋白酶活化因子-1(apoptosis protease activating factor-1, *Apaf-1*)基因启动子区甲基化状态及其与果蝇 *zeste* 基因增强子人类同源物 2(enhancer of *zeste* homolog 2, EZH2)蛋白表达之间的相关性。**方法:**应用甲基化特异性 PCR(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测 GCA 组织及癌旁组织中 *Apaf-1* 基因甲基化状态,应用免疫组织化学法检测 GCA 组织及癌旁组织中 *Apaf-1* 和 EZH2 蛋白的表达情况。**结果:**GCA 组织中 *Apaf-1* 基因甲基化率显著高于癌旁组织[49.6%(62/125) vs 4.0%(5/125), $P < 0.01$], III 期和 IV 期 GCA 组织中 *Apaf-1* 基因甲基化率显著高于 I 期和 II 期(58.8% vs 38.6%, $P < 0.05$),但 GCA 组织中 *Apaf-1* 基因甲基化率与 GCA 的组织学分化程度无关($P > 0.05$)。GCA 组织中 *Apaf-1* 蛋白表达阳性率显著低于相应癌旁组织(39.2% vs 96.0%, $P < 0.01$),且与 *Apaf-1* 基因甲基化状态相关。GCA 组织中 EZH2 蛋白表达阳性率显著高于相应癌旁组织(74.4% vs 11.2%, $P < 0.01$),且与 *Apaf-1* 蛋白的表达呈负相关。**结论:**GCA 组织中 *Apaf-1* 基因启动子区呈高甲基化, *Apaf-1* 和 EZH2 蛋白可能共同参与了 GCA 的发展。

[关键词] 贲门腺癌;凋亡蛋白酶活化因子-1 基因(*Apaf-1*);DNA 甲基化;EZH2 蛋白

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0526-05

Methylation of apoptosis protease activating factor-1 gene in gastric cardia adenocarcinoma and its clinical significance

MA Hong-liang¹, GUO Wei², GUO Yan-li², KUANG Gang², YANG Zhi-bin², DONG Zhi-ming² (1. Department of Anesthesiology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Pathology, Hebei Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the methylation of apoptosis protease activating factor-1 (*Apaf-1*) gene promoter and its correlation with protein expression of enhancer of *zeste* homolog 2 (EZH2) in gastric cardia adenocarcinoma (GCA). **Methods:** Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) method was used to examine the methylation status of *Apaf-1* gene, and immunohistochemistry method was used to detect the protein expression of *Apaf-1* and EZH2 in GCA and paracancerous tissues. **Results:** The frequency of *Apaf-1* methylation in GCA tissues (49.6%, 62/125) was significantly higher than that in paracancerous tissues (4.0%, 5/125, $P < 0.01$). The methylation frequencies of *Apaf-1* gene in stage III and IV GCA tissues were significantly higher than those in stage I and II GCA tissues (58.8% vs 38.6%, $P < 0.05$). No significant difference in the methylation frequency of *Apaf-1* gene was found in three histological differentiated groups ($P > 0.05$). The positive protein expression of *Apaf-1* in GCA tissues was significantly decreased compared with paracancerous tissues (39.2% vs 96.0%, $P < 0.01$) and was correlated with its methylation status. The positive protein expression of EZH2 in GCA tissues was significantly increased compared with that in paracancerous tissues (74.4% vs 11.2%, $P < 0.01$) and was negatively correlated with the expression of *Apaf-1* protein in GCA. **Conclusion:** The promoter of *Apaf-1* gene is hypermethylated and both *Apaf-1* and EZH2 may play important roles in the development of GCA.

[Key words] gastric cardia adenocarcinoma; apoptosis protease activating factor-1 (*Apaf-1*); DNA methylation;

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题资助(No. 20090465)。Project supported by the Key Project in Medical Scientific Research of Hebei Province (No. 20090465)

[作者简介] 马洪亮(1969-),男,河北省景县人,硕士,副主任技师,主要从事临床实验技术与肿瘤病因学的研究。E-mail: mhlcpb@yahoo.com.cn

[通信作者] 董稚明(DONG Zhi-ming, corresponding author), E-mail: dddzzmmm@yahoo.com.cn

enhancer of zeste homolog 2 protein (EZH2)

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 526-530]

凋亡蛋白酶活化因子-1(apoptosis protease activating factor-1, *Apaf-1*)是一种与凋亡相关的抑癌基因,是 c-Myc 诱导肿瘤细胞凋亡 P53 信号通路的下游成分,是线粒体凋亡途径重要的促凋亡因子,是凋亡体的核心成分。人 *Apaf-1* 基因位于染色体 12q23, 编码相对分子质量为 130 000 的蛋白分子^[1]。研究^[2]证实,*Apaf-1* 基因很少发生突变,甲基化引起的基因功能沉默可能是该基因表达下调的主要原因。在结肠癌、胃癌以及白血病等恶性肿瘤中可发现 *Apaf-1* 基因启动子区的高甲基化并伴有蛋白表达降低,且 *Apaf-1* 的表达与疾病的分期或预后有关^[3-6],但此基因在贲门腺癌(gastric cardiac adenocarcinoma, GCA)中的表达及甲基化状态国内外未见报道。果蝇 zeste 基因增强子人类同源物 2 基因(enhancer of zeste homolog 2, *EZH2*)是多梳蛋白家族(polycomb group, *PcG*)中一种进化高度保守的基因,定位于 7q35,可参与 P53 信号通路,并且人体细胞中 *EZH2* 和 DNA 甲基转移酶在功能上可能相关,特定靶基因的沉默可能需要 *EZH2* 和 DNA 甲基转移酶共同参与。在膀胱癌中证实 *Apaf-1* 是 *EZH2* 作用的靶基因,并可导致 *Apaf-1* 启动子高甲基化^[7],且在多种肿瘤中 *EZH2* 均呈高表达状态^[8-9],但 *Apaf-1* 和 *EZH2* 基因在 GCA 中的作用尚未阐明。本研究拟检测 GCA 中 *Apaf-1* 基因的甲基化状态及其与 *EZH2* 蛋白表达的相关性,并结合 GCA 临床资料探讨其与 GCA 各指标之间的关系,以期对 *Apaf-1* 基因甲基化及 *EZH2* 蛋白过表达在 GCA 发生、发展中的作用有更深入的认识。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

蛋白酶 K 为德国 Merck 公司产品,氢醌为美国 Sigma 公司产品,亚硫酸氢钠为美国 Sigma 公司产品。Wizard DNA 纯化试剂盒为美国 Promega 公司产品,甲基化酶(*Sss I*)为美国 New England BioLabs 公司产品,引物均在北京赛百胜基因技术有限公司合成。鼠抗人 *Apaf-1* 单克隆抗体(sc-65891)为美国 Santa Cruz 公司产品,兔抗人 *EZH2* 多克隆抗体(36-6300)为美国 Invitrogen 公司产品,免疫组化染色过程采用的即用型 SP 法免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术开发有限公司。

1.2 研究对象和标本来源

研究对象来自河北医科大学第四医院 2004 - 2010 年的 GCA 手术患者,共 125 例,其中男性 98 例、女性 27 例,年龄范围 37 ~ 78 岁,中位年龄 58.7 岁。每例患者均取 GCA 原发灶及癌旁正常黏膜(距离贲门癌原发灶 2 ~ 5 cm),全部患者术前均未经化疗和放疗。手术切除标本以 10% 中性甲醛溶液固定,常规制作蜡块保存,用于 DNA 的提取和免疫组织化学染色。肿瘤组织及癌旁组织均经常规病理诊断证实。按照国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)标准进行 TNM 分期,125 例肿瘤患者中 I 期 7 例(5.6%), II 期 50 例(40.0%), III 期 52 例(41.6%), IV 期 16 例(12.8%)。按照世界卫生组织(World Health Organization, WHO)肿瘤的病理学分级标准,53 例(42.4%)为高分化,46 例(36.8%)为中等分化,26 例(20.8%)为低分化。

1.3 甲基化特异性 PCR(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测 *Apaf-1* 的甲基化

每个标本均取 10 μ m 石蜡切片 10 ~ 20 片,按常规蛋白酶 K 消化,酚/氯仿抽提法提取癌组织和癌旁正常组织基因组 DNA。DNA 处理按本课题之前的报道^[10]。用于检测 *Apaf-1* 基因甲基化的上游引物: 5'-GAGGTGTCGTAGCGGTATTC-3' 和 5'-CGAAAATTAACGAAATAAACGTC-3', 扩增产物长度为 212 bp。用于检测 *Apaf-1* 非甲基化的上游引物: 5'-GAGGTGTTGTAGTGGTATTTG-3' 和下游引物: 5'-CAAAAATTAACAAAATAAACAT-3', 扩增产物长度为 212 bp。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, MSP 阳性对照采用基因组 DNA 经甲基化酶(*Sss I*)处理以后进行 PCR, 阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。为进行 MSP 检测的质量控制, 随机选取 10% 的标本进行重复实验。

1.4 免疫组织化学染色检测 *Apaf-1* 和 *EZH2* 蛋白的表达

石蜡切片常规脱蜡至水, 3% 甲醇 H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶, 微波修复 15 min。依次加入一抗(*Apaf-1* 抗体, 浓度 1:50; *EZH2* 抗体, 浓度 2 μ g/ml)及相应生物素化二抗工作液和辣根过氧化物酶标记的三抗工作液, DAB 显色, 苏木精复染细胞核, 常规脱水, 透明, 中性树胶封片。PBS 取代一抗作为空白对照。选用正常胃黏膜组织作为 *Apaf-1* 表达的阳

性对照, 已知阳性切片作为 EZH2 表达的阳性对照。

随机选取 5 个高倍视野(×400)计数肿瘤细胞数和阳性细胞数, 得出阳性细胞百分率, 阳性细胞率 ≤ 25% 记为 0 分, 26% ~ 50% 为 1 分, 51% ~ 75% 为 2 分, >75% 为 3 分; 再按阳性细胞呈现的染色强度予以记分, 无显色为 0 分, 浅棕黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。将上述 2 项得分相加, 0 分判为“-”, 1~2 分判为“+”, 3~4 分判为“++”, 5~6 分判为“+++”。由 3 名有经验的临床病理医师阅片, 并采用双盲评估的方法, 根据其评分的平均值来确定判定结果。本研究进行结果分析时, 以“++”和“+++”定义该蛋白为阳性表达, “-”和“+”定义为阴性表达。

1.5 统计学处理

数据统计分析采用 SPSS11.5 软件进行。采用 χ^2 和校正 χ^2 检验, 相关性分析采用 Spearman 分析, 双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GCA 中 *Apaf-1* 基因甲基化状态

125 例 GCA 组织及相应癌旁正常组织均成功进行了 *Apaf-1* 基因的 MSP 分析(图 1)。*Apaf-1* 基因在 GCA 中的甲基化率为 49.6% (62/125), 显著高于癌旁正常组织的 4.0% (5/125) ($\chi^2 = 66.247, P = 0.000$) (表 1)。发生甲基化的 5 例正常组织其相应的癌组织也均呈 *Apaf-1* 基因高甲基化状态。*Apaf-1* 基因在 GCA 中的甲基化与患者年龄、性别无关。按照 TNM 分期进行统计分析, III 期和 IV 期 GCA 患者癌组织中 *Apaf-1* 基因发生甲基化的比率显著高于 I 期和 II 期患者 ($\chi^2 = 5.075, P = 0.024$)。按照肿瘤病理分级进行分析, 随着肿瘤组织分化程度的降低, *Apaf-1* 甲基化率有逐渐升高趋势, 但无显著性差异 ($\chi^2 = 4.008, P = 0.135$) (表 2)。

表 1 GCA 组织及癌旁组织中 *Apaf-1* 基因甲基化状态以及 *Apaf-1*、EZH2 蛋白的表达

Tab. 1 Methylation status of *Apaf-1* gene, expressions of *Apaf-1* and EZH2 proteins in GCA and paracancerous tissues

Group	Methylation frequency of <i>Apaf-1</i> gene		Expression of <i>Apaf-1</i>		Expression of EZH2	
	n (%)	P	n (%)	P	n (%)	P
Paracancerous tissue	5(4.0)		120(96.0)		14(11.2)	
GCA tissue	62(49.6)	0.000	49(39.2)	0.000	93(74.4)	0.000

表 2 GCA 组织中 *Apaf-1* 甲基化及 *Apaf-1*、EZH2 蛋白的表达与 GCA 临床病理特征的关系

Tab. 2 Relationship of *Apaf-1* methylation and expressions of *Apaf-1* and EZH2 proteins in GCA tissues and clinical pathological characteristics of GCA

Group	N	<i>Apaf-1</i> methylation frequency		Expression of <i>Apaf-1</i>		Expression of EZH2	
		n (%)	P	n (%)	P	n (%)	P
Age							
<50	26	11(42.3)		12(46.1)		17(65.4)	
≥50	99	51(51.5)	0.403	37(37.4)	0.414	76(76.8)	0.237
Gender							
Male	98	51(52.0)		38(38.8)		71(72.4)	
Female	27	11(40.7)	0.298	11(40.7)	0.853	22(81.5)	0.341
TNM stage							
I	7	2(28.6)		4(57.1)		4(57.1)	
II	50	20(40.0)		25(50.0)		33(66.0)	
III	52	29(55.8)		18(34.6)		42(80.8)	
IV	16	11(68.8)	0.024 ^a	2(12.5)	0.014 ^a	14(87.5)	0.026 ^a
Pathological differentiation of tumor							
Well	53	21(39.6)		27(50.9)		33(62.3)	
Moderate	46	25(54.3)		17(37.0)		36(78.3)	
Poor	26	16(61.5)	0.135 ^b	5(19.2)	0.023 ^b	24(92.3)	0.012 ^b

a: P value of stage III and IV patients against stage I and II patients; b: P value among three differentiated groups

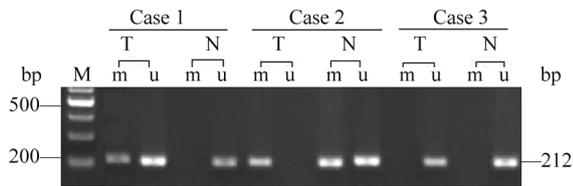


图1 GCA 组织中 *Apaf-1* 基因甲基化分析

Fig. 1 Methylation analysis of *Apaf-1* gene in GCA tissues

M: Marker; u: Unmethylated gene; m: Methylated gene;

T: Tumor tissue; N: Corresponding normal tissue.

Cases 1: Tumor-specific methylation; Case 2: Tumor is fully methylated, whereas the corresponding normal tissue has a very faint band demonstrating methylation;

Case 3: Both tumor and corresponding normal tissues are unmethylated

2.2 GCA 中 *Apaf-1* 蛋白的表达情况

Apaf-1 蛋白免疫组化染色为胞质着色(图2)。GCA 组织 *Apaf-1* 蛋白表达阳性率为 39.2% (49/125), 而相应癌旁正常组织的 *Apaf-1* 蛋白表达阳性率为 96.0% (120/125), 两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 92.063, P = 0.000$) (表1)。*Apaf-1* 蛋白在 GCA 组织中的表达与患者的年龄、性别无关; III 期和 IV 期 GCA 患者 *Apaf-1* 蛋白表达水平显著低于 I 期和 II 期患者 ($\chi^2 = 5.995, P = 0.014$); 随着肿瘤组织分化程度的降低, *Apaf-1* 蛋白阳性表达率逐渐降低 ($\chi^2 = 7.514, P = 0.023$) (表2)。发生 *Apaf-1* 基因高甲基化的 62 例 GCA 组织中有 54 例 *Apaf-1* 蛋白表达为阴性, 而未发生 *Apaf-1* 基因甲基化的 63 例 GCA 组织中仅有 22 例 *Apaf-1* 蛋白表达为阴性, *Apaf-1* 基因启动子甲基化与其蛋白表达之间呈明显的负相关 ($r = -0.534, P < 0.01$)。

2.3 GCA 中 *EZH2* 蛋白的表达

EZH2 蛋白免疫组化染色为胞核着色(图2)。GCA 组织中 *EZH2* 蛋白表达的阳性率为 74.4% (93/125), 而相应癌旁正常组织的蛋白表达阳性率为 11.2% (14/125), 两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 101.970, P = 0.000$) (表1)。III 期和 IV 期 GCA 患者 *EZH2* 蛋白表达水平显著高于 I 期和 II 期患者 ($\chi^2 = 4.952, P = 0.026$); 随着肿瘤组织分化程度的降低, *EZH2* 蛋白阳性表达率逐渐增高 ($\chi^2 = 8.836, P = 0.012$) (表2)。62 例 *Apaf-1* 高甲基化的 GCA 组织中 53 例 *EZH2* 蛋白表达呈阳性, 两者呈显著的正相关 ($r = 0.252, P < 0.01$); 93 例 *EZH2* 蛋白表达阳性的 GCA 组织中 72 例 *Apaf-1* 蛋白的表达呈阴性, 两者呈明显的负相关 ($r = -0.580, P < 0.01$) (表3)。

表3 GCA 组织中 *EZH2* 蛋白的表达与 *Apaf-1* 基因甲基化及 *Apaf-1* 蛋白表达间的相关性

Tab. 3 Correlation of *EZH2* protein expression with *Apaf-1* gene methylation and *Apaf-1* protein expression in GCA tissues

EZH2 expression	<i>Apaf-1</i> methylation		P	Apaf-1 expression		P
	+	-		+	-	
+	53	40	0.005	21	72	0.000
-	9	23		28	4	

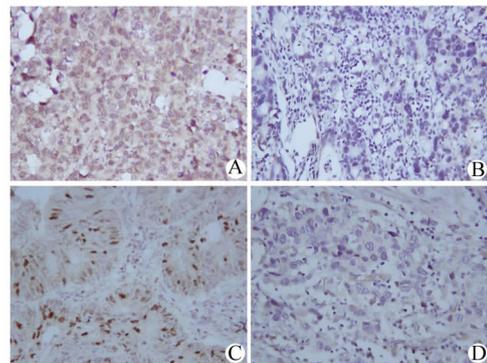


图2 GCA 组织中 *Apaf-1* 和 *EZH2* 蛋白的表达 ($\times 400$)

Fig. 2 Expressions of *Apaf-1* and *EZH2* protein in GCA tissues ($\times 400$)

A, B: *Apaf-1* staining; C, D: *EZH2* staining

3 讨论

1997 年 Zou 等^[11]首次从 HeLa 细胞胞质内纯化和克隆出 *Apaf-1*, 其后的研究^[12]表明, *Apaf-1* 广泛存在于人体中, 在成人的心、肺、肝、脾、胰腺、肾、小肠、胸腺、结肠、子宫等组织中都可表达, 并且在胚胎的肝、脑、肺、肾中也有表达。*Apaf-1* 在成人的外周血粒细胞、脾脏以及胚胎的脑、肾、肺中表达量最高, 与这些组织细胞的高凋亡率相一致^[1]。*Apaf-1* 的表达异常可引起细胞凋亡过程紊乱, 并与许多疾病有直接或间接的关系。在多种肿瘤中可检测到 *Apaf-1* 的低表达, 且引起 *Apaf-1* 基因功能缺失的机制主要是 *Apaf-1* 基因甲基化或者等位基因缺失引起的基因功能“沉默”^[3-6]。本研究发现, *Apaf-1* 基因在 GCA 中可发生高频率的甲基化, 并有相应 *Apaf-1* 蛋白表达缺失, 提示 *Apaf-1* 基因启动子区甲基化导致的基因沉默可能是 GCA 中此基因失活的重要原因之一。

本研究发现, GCA 中 *Apaf-1* 蛋白表达显著低于

癌旁正常组织, 并与 *Apaf-1* 基因甲基化状态呈明显的负相关, 但发生甲基化的 GCA 中仍有 8 例 *Apaf-1* 蛋白表达呈阳性。基因异质性甲基化或一个等位基因发生甲基化可能是一个重要的原因, 而且在本研究中也发现, *Apaf-1* 蛋白表达呈阳性而同时发生甲基化的组织, 其甲基化均表现为不完全甲基化状态。有研究^[13]认为, CpG 岛甲基化的密度与转录的抑制程度有关, 弱的启动子能被密度较低的甲基化完全抑制, 而当启动子由增强子增强时, 即可恢复转录功能。部分 GCA 中可能 *Apaf-1* 基因启动子甲基化程度不足以抑制转录而导致发生 *Apaf-1* 基因甲基化的 GCA 中 *Apaf-1* 蛋白表达仍为阳性。另外, 本研究还发现, 未发生 *Apaf-1* 基因甲基化的 GCA 中, *Apaf-1* 蛋白表达仍可呈阴性, 究其原因, 可能还有其他机制比如杂合缺失导致 *Apaf-1* 基因在 GCA 中失活, 除了本研究证实的 *Apaf-1* 基因异常高甲基化导致 *Apaf-1* 在 GCA 中失活以外, *Apaf-1* 蛋白表达降低的其他作用机制尚有待于进一步研究。

作为 *PcG* 家族中一种进化高度保守的基因, *EZH2* 对细胞增殖是必需的, 其高表达可导致细胞进入 S 期^[14]。早期的研究^[15]认为, *PcG* 家族和 DNA 甲基化在生化方面属于各自独立的基因沉默系统, 但近年来的研究^[16-17]发现, 人体细胞中 *EZH2* 和 DNA 甲基转移酶在功能上可能相关, 特定靶基因的沉默可能需要 *EZH2* 和 DNA 甲基转移酶的共同调控, *EZH2* 有可能是 DNA 甲基转移酶甲基化和沉默靶基因的上游基因。体外实验研究^[18]证实, *EZH2* 的高表达可导致其靶基因如 *WNT1* 及 *KCNA1* 的启动子区高甲基化。随后, Hinz 等^[7]发现, 在膀胱癌中 *EZH2* 可调节 *Apaf-1* 基因的启动子区甲基化, 并证实 *Apaf-1* 有可能是 *EZH2* 的靶基因。本研究也发现, GCA 中 *EZH2* 蛋白与 *Apaf-1* 的甲基化状态及 *Apaf-1* 蛋白的表达密切相关。研究^[14]显示, 活化的 P53 能够通过抑制 *EZH2* 基因的启动子区活性而抑制 *EZH2* 基因的表达。在肿瘤组织中, P53 可通过基因突变而失活, 从而失去了对 *EZH2* 基因的抑制作用, 导致 *EZH2* 表达增高, 以致促使其靶基因 *Apaf-1* 发生启动子区高甲基化而失活。

[参考文献]

- [1] Riedl SJ, Li W, Chao Y, et al. Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP [J]. *Nature*, 2005, 434 (7035): 926-933.
- [2] Reubold TF, Wohlgemuth S, Eschenburg S. A new model for the transition of APAF-1 from inactive monomer to caspase-activating

apoptosome [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(47): 32717-32724.

- [3] Poplawski T, Tomaszewska K, Galicki M, et al. Promoter methylation of cancer-related genes in gastric carcinoma [J]. *Exp Oncol*, 2008, 30(2): 112-116.
- [4] Ahmad ST, Arjumand W, Seth A, et al. Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(2): 395-402.
- [5] Zlobec I, Minoo P, Baker K, et al. Loss of APAF-1 expression is associated with tumour progression and adverse prognosis in colorectal cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(6): 1101-1107.
- [6] Chim CS, Chan WW, Kwong YL. Epigenetic dysregulation of the DAP kinase/p14/HDM2/p53/Apaf-1 apoptosis pathway in acute leukaemias [J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(7): 844-847.
- [7] Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, et al. EZH2 polycomb transcriptional repressor expression correlates with methylation of the APAF-1 gene in superficial transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Tumour Biol*, 2007, 28(3): 151-157.
- [8] Fujii S, Tokita K, Wada N, et al. MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes [J]. *Oncogene*, 2011, 30(39): 4118-4128.
- [9] Kobayashi Y, Absher DM, Gulzar ZG, et al. DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer [J]. *Genome Res*, 2011, 21 (7): 1017-1027.
- [10] 董稚明, 郭炜, 郭艳丽, 等. 食管鳞状细胞癌中 Smad4 基因 CpG 岛甲基化状态分析 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17 (6): 597-603.
- [11] Zou H, Henzel WJ, Liu X, et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [J]. *Cell*, 1997, 90(3): 405-413.
- [12] Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 19): 3209-3214.
- [13] Winter S, Fischle W. Epigenetic markers and their cross-talk [J]. *Essays Biochem*, 2010, 48(1): 45-61.
- [14] Tang X, Milyavsky M, Shats I, et al. Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (24): 5759-5769.
- [15] Guittou AE, Berger F. Control of reproduction by polycomb group complexes in animals and plants [J]. *Int J Dev Biol*, 2005, 49 (5/6): 707-716.
- [16] Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics [J]. *Mutat Res*, 2008, 647(1/2): 21-29.
- [17] Roure V, Bantignies F. Polycomb group-mediated gene silencing mechanisms: Stability versus flexibility [J]. *Epigenomics*, 2009, 1(2): 301-318.
- [18] Vire E, Brenner C, Deplus R, et al. The polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation [J]. *Nature*, 2006, 439 (7078): 871-874.

[收稿日期] 2012-05-12

[修回日期] 2012-07-18

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳