学校代码 10459
学号或申请号 201912402014965
密级 公开

郑州大学

硕士学位论文

协同致死策略在CHFR表观遗传沉默的食管癌中的应用及机制研究

作者姓名：李原野
导师姓名：郭明洲 教授

学科门类：医学
专业名称：药理学
培养院系：医学科学院
完成时间：2022年4月

A thesis(dissertation) submitted to

Zhengzhou university

for the degree of Master

The role of synergistic lethal strategy in CHFR epigenetic silencing in esophageal cancer

By Yuanye Li

Supervisor: Prof. Mingzhou Guo

Pharmacology

Academy of Medical Sciences

April 2022

摘要

背景和目的

食管癌是世界上常见的恶性肿瘤之一，我国占全球病例的一半以上，食管鳞癌是其主要类型(90%以上)。目前，早期手术切除是提高患者存活率最有效的方法，但因它在进展或转移之前很难被发现，故放化疗是最合适的选择，而事实证明，接受放化疗治疗的大多数患者的生存情况仍然不佳。虽然现在诊疗措施不断完善，食管癌死亡率有所下降，但患者预后仍然较差，5 年生存率仅为10％-25％。为了改善我国食管癌患者的总体生存和预后情况，针对食管癌靶向治疗的临床前和临床研究亟待开展。“协同致死”效应是基于“Knudson”二次打击学说而发展的肿瘤治疗新策略。在肿瘤细胞中，当某一条 DNA 损伤修复通路发生异常，细胞会依赖其补偿通路而存活，在此基础上阻断其补偿通路就会导致细胞死亡。带有叉头相关结构域和环指结构域的检查点(Checkpoint with fork-head associated and ring finger，CHFR)位于人类第 12 号染色体长臂 2 区 4 带 3 亚带，是一种具有肿瘤抑制功能的有丝分裂检查点蛋白。到目前为止，越来越多的研究报道肿瘤抑制基因的丢失通常由表观遗传学异常改变引起，包括 DNA 甲基化。正常基因甲基化在胚胎发育、细胞分化以及基因组稳定性等多方面发挥重要作用，然而异常的 DNA 甲基化很可能诱导肿瘤的发生。目前，针对 DNA 损伤修复（DNA damage repair，DDR）基因表观遗传学异常作为肿瘤治疗策略的研究较少，本课题旨在探究 CHFR 在食管癌细胞中参与 DNA 损伤修复的机制及应用“协同致死”新策略治疗食管癌的可能性。“协同致死”关系的筛选和正确利用不但可以拓宽和加速抗肿瘤药物靶标的发现，在未来甚至可以解决在肿瘤治疗中的一系列难题。

方法

本课题采用了半定量 RT-PCR、甲基化特异性 PCR（Methylation specific PCR，MSP）技术分析 CHFR 在 7 种食管癌细胞株中的表达是否受甲基化调控。通过 MSP 技术检测 1008 例原发食管癌组织中 CHFR 的甲基化率。将食管癌组织中 CHFR 的甲基化状态与临床病理相关资料进行统计学分析，并对其中 576 例有随访资料的病例进行生存分析。通过慢病毒感染技术构建 CHFR 稳定表达细胞模型，利用 CRISPR-Cas9 技术构建 CHFR 稳定敲除细胞模型，应用 MTT、western

blot 等实验阐明 CHFR 在食管癌中的作用机制，探究 CHFR 甲基化能否成为食管癌“协同致死”治疗的标记物。

结果

1. CHFR 在食管癌细胞中的表达受基因启动子区甲基化调控，CHFR 在 KYSE30、KYSE140、KYSE450 中正常表达，基因启动子区呈现非甲基化状态；CHFR 在 KYSE70 中表达减少，基因启动子区呈现部分甲基化状态；CHFR 在 KYSE150、KYSE410、KYSE510 中表达缺失，基因启动子区呈现完全甲基化状态。

2. CHFR 在正常食管组织中不发生甲基化（0/13），在原发食管癌组织中的甲基化率达 61.9%（624/1008）。食管癌中 CHFR 的甲基化状态与患者的性别（$p < 0.01$）、吸烟情况（$p < 0.01$）、饮酒情况（$p < 0.05$）及肿瘤的分化程度相关（$p < 0.05$），与年龄、家族史、肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移、脉管癌栓等因素无关（$p > 0.05$）。

3. 在食管癌细胞中，CHFR 基因在大剂量多西他赛（5 nM）诱导下能抑制同源重组（Homologous Recombination，HR）修复通路并激活非同源末端连接（Non-homologous end joining，NHEJ）修复通路进而影响细胞存活，这种作用不依赖于 DNA 损伤且可能是通过抑制丝氨酸苏氨酸激酶 15（Aurora kinase A，AURKA）的表达实现的。

4. 在食管癌细胞中，CHFR 基因在小剂量多西他赛（0.5 nM）诱导 DNA 损伤的前提下激活了 HR 修复通路，且 CHFR 恢复表达后对 ATM 抑制剂敏感。

结论

CHFR 基因在食管癌中的表达受甲基化调控，它可在大剂量多西他赛（5 nM）诱导下通过抑制 HR 信号通路、激活 NHEJ 信号通路而影响细胞存活，且此作用不依赖于 DNA 损伤。在小剂量多西他赛（0.5 nM）诱导 DNA 损伤的前提下激活 HR 通路，且 CHFR 恢复表达后对 ATM 抑制剂敏感。

关键词 食管癌；CHFR；DNA 甲基化；协同致死

Abstract

Background and purpose

Esophageal cancer is one of the most malignant tumors in the world. China accounts for more than half of the global cases, and esophageal squamous cell carcinoma is the main type (more than 90%). At present, early surgical resection is the most effective way to improve the survival rate of patients, However, for the reason that it is difficult to detect before its progression or metastasis, chemotherapy is the most appropriate choice, and facts have proved that the survival status of most patients treated with radiotherapy and chemotherapy is still poor. Although the diagnosis and treatment measures have been continuously improved and the mortality rate of esophageal cancer has decreased, the prognosis of patients remains bleak, and the 5-year survival rate is only 10%-25%. In order to improve the overall survival and prognosis of patients with esophageal cancer, preclinical and clinical studies on targeted therapy for esophageal cancer need to be carried out urgently. The “synthetic lethal” effect is a new strategy for tumor treatment based on the “Knudson's two-hit” theory. In tumor cells, when a certain DNA damage repair pathway is aberrant, cells will survive via its compensatory pathway, where basis blocking its compensatory pathway leads to cell death. A checkpoint with a forkhead associated domain and a ring finger domain (CHFR) is located at 12q24.33, and is a mitotic checkpoint protein with tumor suppressor function. An increasing number of studies have reported that loss of tumor suppressor genes is often caused by aberrant epigenetic changes, including DNA methylation. Normal gene methylation plays important roles in the process of embryonic development, cell differentiation as well as genomic stability. However, aberrant DNA methylation is likely to induce tumorigenesis. At present, few studies have focused on a promising cancer treatment strategy to target the epigenetic abnormalities of DNA damage repair genes as a cancer treatment strategy. The aim of this assay is to clarify the mechanism where CHFR is involved in DNA damage repair in esophageal cancer cells and the possibility of applying “synthetic

lethal" new strategies to treat esophageal cancer. The screening and proper utilization of the "synthetic lethal" relationship can not only broaden and accelerate the discovery of antitumor drug targets, but also solve a series of difficult problems in tumor therapy in the future.

Methods

In this study, we used semi-quantitative RT-PCR, methylation specific PCR (MSP) to analyze whether the expression of CHFR was regulated by methylation in seven esophageal cancer cell lines. The methylation rate of CHFR was detected by MSP technique in 1008 cases of primary esophageal cancer tissues. The correlation between methylation status of CHFR and clinicopathological data in esophageal cancer was statistically analysed, and 576 of these cases with follow-up data were selected for survival analysis . CHFR stable expression cell models were constructed by lentiviral infection technology, CHFR stable knockout cell models were constructed by CRISPR-CAS9 technology, meanwhile, MTT, Western blot and other experiments were applied to elucidate the mechanism of CHFR in esophageal cancer, and to explore whether CHFR methylation could be a marker for "synthetic lethal" treatment of esophageal cancer.

Results

1. The expression of CHFR in esophageal cancer cells was regulated by methylation of the promoter region of the gene. CHFR was normally expressed in KYSE30, KYSE140, KYSE450, and the promoter region of the gene was unmethylated; CHFR showed weak expression in KYSE70 and the promoter region of the gene was partially methylated; CHFR expression was absent in KYSE150, KYSE410, KYSE510 and the promoter region of the gene was fully methylated.

2. CHFR was unmethylated in normal esophageal tissues (0/13), and the methylation rate was up to 61.9% (624/1008) in primary esophageal cancer tissues. The methylation status of CHFR in esophageal cancer was significantly associated with the patients' gender ($P<0.01$), smoking status ($P<0.01$), alcohol consumption ($P<0.05$) and the extent of tumour differentiation ($P<0.05$), rather than with age, family history, tumour size, TNM stage, lymph node metastasis or vascular tumor thrombus ($P>0.05$).

3. In esophageal cancer cells, CHFR gene can inhibit the repair pathway of Homologous Recombination and activate the repair pathway of Non-homologous end joining induced by high dose docetaxel (5nM), which affects cell survival. This effect is independent of DNA damage and may be realized by inhibiting the expression of serine threonine kinase 15(Aurora kinase A, AURKA).

4. In esophageal cancer cells, CHFR gene activated HR repair pathway on the premise of DNA damage induced by low dose docetaxel (0.5nM), and CHFR was sensitive to ATM inhibitors after its expression was restored.

Conclusion

The expression of CHFR gene in esophageal carcinoma is regulated by methylation. It can affect cell survival by inhibiting HR signal pathway and activating NHEJ signal pathway under the induction of high dose docetaxel (5nM), and this effect is independent of DNA damage. Under the premise of DNA damage induced by low dose docetaxel (0.5nM), HR pathway was activated, and CHFR was sensitive to ATM inhibitor after its expression was restored.

Key words: Esophageal cancer; CHFR; DNA methylation; Synthetic lethal

目　录

第一章 前言.....1
1 食管癌研究现状.....1
2 DNA 损伤修复系统及“协同致死”新策略.....2
3 CHFR 研究情况.....4
第二章 食管癌细胞系中 CHFR 的甲基化调控.....6
1 实验材料.....6
1.1 食管癌细胞株.....6
1.2 主要实验耗材.....6
1.3 主要仪器及设备.....6
1.4 主要试剂及主要工作液配制方法.....7
2 实验方法.....8
2.1 细胞复苏及培养.....8
2.2 去甲基化药物处理食管癌细胞株.....8
2.3 食管癌细胞总 RNA 的提取.....9
2.4 逆转录反应.....9
2.5 RT-PCR 引物的设计及反应体系.....10
2.6 食管癌细胞 DNA 的提取.....11
2.7 DNA 的硫化.....11
2.8 MSP 引物设计及反应体系.....12
3 实验结果.....13
3.1 去甲基化药物 5-aza-dc 对食管癌细胞株中 CHFR 表达的影响.....13
3.2 CHFR 在食管癌细胞株中的甲基化状态.....14
4 讨论.....14
第三章 食管癌组织中 CHFR 甲基化与临床因素的相关性.....16
1 实验材料.....16
1.1 食管癌组织标本.....16
1.2 主要实验耗材、仪器及设备.....16
2 实验方法.....17
2.1 组织标本 DNA 的提取.....17
2.2 GTEX 和 TCGA 数据库分析 CHFR 表达及甲基化状态.....17
2.3 食管癌组织中 CHFR 的甲基化特异性 PCR 检测.....17
2.4 样本数据的相关性分析及生存分析.....17
3 实验结果.....18

3.1 CHFR 基因在 GTEX 和 TCGA 的食管癌数据库的表达差异 18
3.2 CHFR 在食管癌组织中的甲基化状态 19
3.3 CHFR 甲基化与临床因素之间的相关性 19
3.4 CHFR 甲基化与食管癌患者的总体生存时间分析 21
4 讨论 21
第四章 CHFR 在食管癌中参与的机制研究 23
1 实验材料 23
1.1 实验用细胞株模型 23
1.2 主要实验耗材 23
1.3 主要仪器及设备 23
1.4 主要试剂及其主要工作液的配制方法 24
2 实验方法 26
2.1 CHFR 稳定表达细胞株的构建 26
2.2 CHFR 稳定敲除细胞株的构建 32
2.3 CHFR 基因在食管癌中对 AURKA 蛋白的作用 37
2.4 CHFR 基因在食管癌中对 DNA 损伤修复蛋白的作用 37
2.5 CHFR 基因对 ATM 抑制剂 AZD0156 的敏感性实验 37
3 实验结果 38
3.1 CHFR 稳转和敲除细胞系的构建 38
3.2 食管癌细胞中 CHFR 负调控 AURKA 的表达 38
3.3 CHFR 在不同剂量多西他赛诱导下对 DNA 损伤修复通路的影响 39
3.4 CHFR 恢复表达使食管癌细胞对 ATM 抑制剂 AZD0156 更敏感 41
4 讨论 41
第五章 结论 45
参考文献 46
文献综述 基于表观遗传学异常的“协同致死”治疗新策略 51
参考文献 61

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文名称
AURKA	Aurora kinase A/Ser-Thonine Kinase 15	Aurora 激酶 A/丝氨酸苏氨酸激酶 15
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated	共济失调毛细血管扩张突变
BER	Base excision repair	碱基切除修复
CHFR	Checkpoint with fork-head associated and ring finger	含叉头相关结构域和环指结构域的检查点
DDR	DNA damage repair/response	DNA 损伤修复/响应
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	DNA 依赖性蛋白激酶催化亚基
DSB	Double strand break	双链断裂
EAC	Esophageal adenocarcinoma	食管腺癌
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma	食管鳞状细胞癌
FHA	Forkhead-associated domains	叉头相关结构域
HR	Homologous Recombination	同源重组
ICL	Interstrand cross-link	链内交联
IVD	In vitro-methylated DNA	体外甲基化的 DNA
MMR	Mismatch repair	错配修复
MSP	Methylation specific PCR	甲基化特异性 PCR
NER	Nucleotide excision repair	核苷酸切除修复
NHEJ	Non-homologous end joining	非同源末端连接
PARPi	PARP inhibitor	PARP 抑制剂
PBZ	poly(ADP-ribose)-binding zinc finger	聚（ADP-核糖）结合锌指
RF	Ring finger domains	中心环指结构域
SSB	Single strand break	单链断裂
TSS	Transcription start site	转录起始位点
5-aza-dc	5-aza-2’-deoxycytidine	5-杂氮-2'-脱氧胞苷

第一章 前言

1 食管癌研究现状

食管癌是我国常见的具有高度侵袭性的恶性肿瘤之一，根据 2020 年最新统计数据显示，食管癌在全球的发病率排名第七，致死性排名第六，2020 年有超过 60 万人被诊断为食管癌[1]。食管癌分为食管鳞癌（esophageal squamous cell carcinoma,ESCC）和食管腺癌（esophageal adenocarcinoma,EAC）两种病理类型，其病因和特征由于地域分布和种族的不同而存在差异。在南美，过量吸烟和饮酒是食管鳞癌的主要危险因素[2, 3]，与食管鳞癌相比，EAC 在西方国家相对常见且 EAC 的患者表现出与肝癌、肺癌和胰腺癌相似的特征，肥胖、胃食管反流病和 Barrett 食管是 EAC 发病的的主要危险因素。在全球范围内，ESCC 和 EAC 在男性中的发病率明显高于女性，占全世界所有食管癌病例的 70%[4]。另外，具有食管癌家族史的患者患食管癌的风险较高，而且往往这些患者的存活率也较低[5, 6]，这可能是因为家庭成员共有的环境因素造成的。

近年来由于人们对健康问题的重视，例如吸烟饮酒的情况有所减少，食管癌的发病呈现出了下降趋势[2]，但由于食管癌手术的高复发率、高死亡率和现有治疗手段的局限性，所以目前预防和早期发现仍然是最好的生存机会。在过去的几十年里，医学和癌症生物学取得了重大进展，但针对食管癌的治疗只有轻微的改善，其 5 年存活率仍保持在 15-20%[7]。食管癌的存活率低也可以归因于其异常异质性的表现。事实上，食管癌的异质性程度不仅见于不同的患者，同一肿瘤的不同部位也存在不同的基因组改变[8]。采用测序技术对食管癌进行大规模基因组分析之后，发现 ESCC 和 EAC 之间存在明显的基因组差异，例如 KRAS 和 ERBB2 在 EAC 中的改变比 ESCC 更为常见，而 NOTCH1 在 ESCC 中的改变比 EAC 更常见[9]。食管癌病例中还存在多种基因突变的现象，在多数食管鳞癌中可见 TP53 体细胞突变，另外，EGFR、CCND1、CDK4/CDK6 和 MDM2 经常在食管鳞癌中过表达，而 EAC 与 CCNE1、cyclin-E 和 MGST1 突变有关[10, 11]。

目前，精确给药的靶向治疗和由肿瘤特异性信号转导或特异性代谢途径控制的“靶点治疗”是肿瘤研究的热点。表皮生长因子受体是 ErbB 受体酪氨酸激酶家族的一员。EGFR 的异常激活与癌症的发生和发展密切相关，而 EGFR 在食

管癌的过度表达使其成为食管癌化疗和分子靶向治疗发展的关键候选分子。目前已开发许多相关药物以抑制 EGFR 信号转导，从而有效治疗食管癌，例如单克隆抗体西妥昔单抗和尼莫妥珠单抗，它可以识别 EGFR 的胞外区，阻断 EGF 与受体的结合，从而发挥抑癌作用[12]。此外，EGFR 靶向治疗的另一项新技术是通过相关载体，如脂质体纳米粒，将靶向药物包装并输送到细胞中的特定位置，以实现治疗靶点的精确定位，最终提高治疗效果[13]。人表皮生长因子受体 2(HER-2)是 EGFR 家族的成员之一，是一种定位于细胞膜的酪氨酸激酶，通过细胞内外信号传导调节细胞生长、分化以及肿瘤的发生发展[14, 15]。HER-2 是食管癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌分子治疗的重要靶点，曲妥珠单抗和拉帕替尼是针对 HER-2 的两种主要治疗药物。另外，血管内皮生长因子受体[16]、肝细胞生长因子受体[17]、哺乳动物雷帕霉素靶标[18]、成纤维细胞生长因子受体-2[19]都有望成为食管癌的潜在治疗靶点。免疫治疗是一种治疗食管癌的新方法[20, 21]，包括免疫检查点抑制剂/免疫调节剂、治疗性疫苗、单克隆抗体和过继细胞免疫治疗的应用。虽然放化疗与免疫治疗、靶向治疗的联合应用比单一药物治疗疗效更好、耐药性更低，但联合治疗引起的不良反应发生率也随之增加，目前迫切需要优化现有靶向药物的临床应用，所以开发更多疗效好、副作用小的新型治疗策略来更好的治疗食管癌、改善患者预后是目前亟待解决的问题。

2 DNA 损伤修复系统及“协同致死”新策略

人体 DNA 每天都会由于内源和外源性过程引起数百万个损伤。为此，人类机体进化出一套完整的 DDR 系统使 DNA 的突变达到最小化，以维持机体基因组的稳定。DDR 系统可分为 DNA 损伤信号通路、DNA 损伤修复通路和 DNA 损伤耐受通路。DNA 发生损伤后，DDR 系统可修复损伤位点或引导不可修复的受损细胞发生凋亡或衰老。而 DDR 系统的缺陷可能通过诱导驱动突变、产生肿瘤异质性和逃避凋亡来促进肿瘤细胞的生长[22]。DNA 损伤通常通过各种内源性修复机制来修复，从而以相对较低的驱动突变率维持人类 DNA 的完整性。与酿酒酵母等真核生物相似，DNA 损伤程度的阈值和调节这些阈值的机制在人类细胞中已被阐述。正常人类细胞在没有明显病理表型的前提下得到有效修复的 DNA 损伤水平，定义为 DNA 损伤的“稳态阈值”，又叫“动态平衡阈值”[23]；相比之下，在癌前阶段的细胞中，DNA 损伤增加，从而激活 DDR 机制。在此

阶段激活 DDR 机制会增强肿瘤抑制作用，例如细胞凋亡、衰老和其恶性转化的抑制[24]。肿瘤抑制或致癌过程是否占主导地位取决于此阶段后续突变的性质和位置。根据肿瘤进展的多步骤致癌模型，致癌过程会削弱 DDR 屏障，使细胞从 DDR 介导的细胞衰老或死亡过程中逃脱，DNA 损伤的进一步积累会刺激各种致癌信号通路，从而促进恶性转化[25, 26]。将癌前病变转变为癌性生长所需的 DNA 损伤最低水平定义为“恶性阈值”。目前，手术联合放化疗是大多数恶性肿瘤的主要治疗方法。放化疗都是通过诱导癌细胞中的 DNA 损伤来发挥作用，这种超生理水平的 DNA 损伤增加了细胞因有丝分裂灾难、坏死、细胞凋亡或衰老而死亡的可能性[27]。直接杀死肿瘤细胞或重新激活这些细胞中的肿瘤抑制机制的最低 DNA 损伤水平定义为“治疗阈值”。由上述机制我们可以看出，DNA 损伤一方面会增加基因组不稳定性，促进肿瘤发生；另一方面，DDR 系统中的缺陷也为肿瘤的治疗提供了更多的机会，由于 DNA 损伤修复信号级联的缺陷使得肿瘤细胞更加依赖于其代偿途径，目前基于此理念的方法也已被用于抗癌治疗[28]。

表观遗传修饰可在不改变 DNA 序列的前提下导致基因表达的改变，获得不同的表型，是调节基因表达的重要方式，通常与致癌性相关[29, 30]。表观遗传调控包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA，其中 DNA 甲基化是一类发生在胞嘧啶 5 号位碳原子上、可稳定遗传的表观修饰，也是研究最广泛的表观遗传调控方式。而在许多肿瘤中发现，肿瘤抑制基因启动子区 CpG 岛频繁发生甲基化[31]。许多 DDR 相关基因如 MGMT[32]、MLH1[33]、NRN1[34]、KISS1[35]等都在食管癌中发生了甲基化修饰，这就预示它们可能成为食管癌诊断和预防的标志物。目前，开发 DDR 抑制剂的主要挑战是寻找对 DDR 抑制敏感的遗传生物标记物。在目前所有可用的 DDR 抑制剂中，PARP 抑制剂（PARPi）具有最广泛的治疗窗口，但与化疗药物联合使用时，叠加毒性仍然是一个有待解决的问题。

我们将单一基因的突变不会对细胞产生影响，当两种或多种基因组合同时突变缺失则会对细胞产生致命作用这一现象称为“协同致死”效应。应用 PARPi 治疗 BRCA1/2 突变的乳腺癌是利用“协同致死”效应治疗肿瘤最经典的例子。在 DNA 损伤中，最严重的损伤是单链断裂（single strand break，SSB）和双链断裂（double strand break，DSB），其中 SSB 更为常见，SSB 的修复过程主要由 PARP 介导发生，而当 SSB 没有及时得到修复，就会导致致命性的 DSB。DNA 的 DSB 主要由 BRCA1/2 介导的 HR 修复，BRCA1/2 缺陷会导致 HR 能力缺陷，

而具有 HR 缺陷的肿瘤细胞就会表现出对 PARPi 的敏感性。事实上，PARPi 对于 BRCA1/2 正常表达的肿瘤细胞也有一定的杀伤作用，只不过其对 PARPi 的敏感性与 BRCA1/2 突变的肿瘤细胞相比相差近 1000 倍[36]。Olaparib 治疗 BRCA1/2 突变的卵巢癌和乳腺癌细胞是第一个利用基于“协同致死”策略的治疗方法来治疗具有 DDR 缺陷肿瘤的成功案例[37]，这推动了人们通过利用“协同致死”策略来寻找 DDR 信号通路中更具靶向性的成分，包括但不限于 DNA-PK、ATR、ATM、CHK1、RAD51 和 WEE1 等。基于 DDR 的肿瘤治疗方法能够通过“协同致死”相互作用对缺乏特定 DDR 功能的肿瘤患者量身定做治疗方案，这为肿瘤的靶向性治疗提供了更广泛的治疗窗口。

3 CHFR 研究情况

具有叉头相关结构域和环指结构域的检查点（checkpoint with forkhead and ring finger domains，CHFR），又名 RNF116、RNF196，是位于人类第 12 号染色体长臂 2 区 4 带 3 亚带的蛋白编码基因，在人体正常组织中广泛表达，于 2000 年首次发现。其编码的蛋白质具有一个 N 端叉头相关结构域（forkhead-associated domains，FHA）、环指结构域（ring finger domains，RF）和一个带有 RAR 结合的锌指基序(poly(ADP-ribose)-binding zinc finger，PBZ)的 Cysteine 富集区。FHA 结构域的功能在很大程度上是未知的，研究表明，FHA 结构域包含磷酸肽识别基序，其在多种磷酸化依赖性和非依赖性生物学过程中发挥作用，包括 DNA 损伤反应、信号转导和细胞周期调节[38]；RF 结构域与 CHFR 的泛素化活性密切相关，能够形成 lysine 48 和 lysine 63 连接的多泛素化链[39]；Cysteine 富集区对于 CHFR 和靶蛋白之间的相互作用非常重要，在富含半胱氨酸的区域内，RAR 结合的锌指基序(PBZ)能够结合多聚(ADP-核糖)PARP 家族成员，如 PARP-1[40, 41]。CHFR 最初被鉴定为一种有丝分裂检查点蛋白[42, 43]，后来通过建立 CHFR 基因敲除小鼠首次表明 CHFR 是一个具有肿瘤抑制功能的有丝分裂检查点基因，在维持基因组稳定性方面发挥关键作用[44]。

CHFR 作为一种 E3 泛素连接酶，其中一个靶蛋白是 PLK1，PLK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，参与 CDC25 的磷酸化，从而调节 cyclin B1-CDK 的活性，PLK1 的磷酸化和激活是由另一种激酶 AURKA 介导的[40, 41]。CHFR 通过泛素化作用降解 PLK1 和 AURKA，抑制 cyclin B1-CDK 复合体的形成，从而促进细胞周期阻

滞[44, 45]。另外 TOPK 也是 CHFR 的泛素化底物，与 PLK1 相同，TOPK 也是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，CHFR 通过抑制 TOPK，阻止 TOPK 诱导的 AKT 活化，从而阻断 G2/M 期细胞进程[46]。嗜铬激肽蛋白 Kif22 在纺锤体微管的组织和染色体运动中起作用，CHFR 对 Kif22 活性的调节与维持染色体稳定密切相关[47]。此外，PARP1 和 CHFR 之间的相互作用在 DNA 损伤修复中发挥重要作用，首先，它促使 CHFR 被招募到 DNA 损伤位点，继而与 RNF8 共同促进组蛋白的泛素化，导致更宽松的染色质模式[48, 49]；其次，通过 CHFR 介导的 PARP1 泛素化及其随后的蛋白酶体降解，一旦启动 DNA 损伤修复，它就能将 PARP1 从受损的染色质上移除，这对 DNA 损伤修复至关重要[50]。AURKA 又称乳腺肿瘤激活激酶(Breast tumor activated kinase，BTAK)或丝氨酸苏氨酸激酶 15(Ser-Thonine Kinase 15，STK15)，是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员之一。以往研究表明，AURKA 是一种促癌基因，经常在各种人类肿瘤中过表达[51, 52]。目前，AURKA 在多种肿瘤中不仅被当作治疗靶标，而且还被用作诊断和预后的分子标志物以及影响细胞增殖、侵袭和迁移的分子标记，包括膀胱癌[53]、头颈癌[54]、结直肠癌[55]和肺腺癌[56]等。CHFR 通过泛素化作用调节 AURKA 的表达水平，进而调节下游信号通路参与 DNA 损伤反应，维持基因组的稳定。研究表明，CHFR-AURKA 通路的中断促进了肿瘤的发生和发展[44]。

DNA 发生损伤后，CHFR 立即被招募到 DNA 损伤位点，并与 DNA 损伤位点的替代标记物 γ-H_2AX 共同定位，此外，内源性 CHFR 也重新定位到 DNA 损伤部位，这表明 CHFR 直接参与 DNA 损伤反应。而 CHFR 可能在不同的情况下激活不同的 DNA 损伤修复通路，以维持机体的基因组稳定性。本课题通过研究食管癌细胞系中 CHFR 的表达及其启动子区的甲基化改变，明确其在食管癌细胞系中的表达是否受表观遗传调控；通过建立 CHFR 稳定表达和稳定敲除的细胞株模型，明确 CHFR 在食管癌细胞中的作用机制；结合临床资料分析探讨 CHFR 作为临床应用指标的潜在价值，基于细胞内 DDR 通路之间的补偿效应，发展一种“协同致死”肿瘤治疗新策略。

第二章 食管癌细胞系中 CHFR 的甲基化调控

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式，它通过 DNA 甲基转移酶的作用在胞嘧啶 5 位碳原子上添加甲基（CH_3）基团进而引起基因的转录激活或抑制，在基因表达、细胞功能、细胞分化和肿瘤进展的调节中发挥作用。CHFR 作为一个细胞周期调控因子，在维持基因组稳定性方面起着关键作用，同时在肿瘤的发生、发展过程中扮演着抑癌基因的角色。肿瘤抑制基因中的高甲基化导致细胞粘附、分化、细胞周期调节、细胞凋亡以及 DNA 损伤修复的细胞通路失调，这促进了肿瘤发生。目前已有大量研究提示 CHFR 基因表达沉默（通常是由于启动子 CpG 岛甲基化）可能作为生物标志物来预测多种肿瘤的预后情况。本部分实验通过在食管癌细胞系中分析 CHFR 表达情况以及基因启动子区甲基化情况，探讨 CHFR 基因在食管癌细胞系中的表达是否受甲基化调控。

1 实验材料

1.1 食管癌细胞株

实验中使用的食管癌细胞系包括 KYSE30、KYSE70、KYSE140、KYSE150、KYSE410、KYSE450 和 KYSE510。所有细胞系均为贴壁的食管鳞癌细胞，细胞 RPMI1640 培养基含有 1%的青霉素-链霉素和 10%的胎牛血清。所有细胞均在含有 5% CO_2 的 37℃细胞培养箱中培养。所有细胞均由中国人民解放军消化内科实验室提供。

1.2 主要实验耗材

不同规格的细胞培养皿，细胞冻存管，不同规格的无菌移液管、玻璃吸管，普通及无菌的不同规格的 EP 管、八排管，不同体积的锥形瓶，1L 量筒等。

1.3 主要仪器及设备

仪器及设备	厂家
CO_2 细胞培养箱	亚泰科隆
蒸汽灭菌器	云泰仪器

超净工作台	亚泰科隆
倒置显微镜	OLYMPUS
低速离心机	科大创新
低温高速离心机	Thermo Scientific
分光光度计	Thermo Scientific
酶标仪	Thermo Scientific
恒温水浴箱	长风仪器
紫外凝胶成像仪	沙船生物
PCR 仪	Bio-Rad
电泳槽	六一仪器

1.4 主要试剂及主要工作液配制方法

试剂	厂家
胎牛血清	Gemini
青-链霉素溶液	Beyotime Biotechnology
RPMI-1640	GIBCO
DMEM	GIBCO
胰蛋白酶	Sigma-aldrich
5-aza-dc	Sigma-aldrich
蛋白酶 K	Sigma-aldrich
三羟甲基氨基甲烷（Tris）	Sigma-aldrich
十二烷基硫酸钠（SDS）	Sigma-aldrich
DEPC 水	Sigma-aldrich
三氯甲烷	国药集团
无水乙醇	国药集团
异丙醇	国药集团
EDTA	国药集团
醋酸铵	国药集团
糖原	国药集团
Trizol	invitrogen
RNA 酶固相清除剂	invitrogen

逆转录试剂盒	invitrogen
亚硫酸氢钠	Sigma
氢醌	Sigma
Wizard DNA clean-up	Promega
2×Taq 酶	擎科生物
DNA marker	中科瑞泰

（1）RPMI-1640 细胞完全培养液：向 RPMI-1640 培养液中加入 1%青-链霉素溶液、10%胎牛血清，混匀后于 4℃保存，使用时提前拿出恢复至室温。

（2）细胞冻存液：RPMI-1640 培养基（60%）、胎牛血清（30%）及 DMSO（10%）混匀后于 4℃冰箱储存备用。

（3）10×DNA 提取缓冲液：含 0.1 M EDTA（pH8.0），1%SDS，10 mM Tris-Cl（pH8.0），使用时稀释至 1×。

（4）5×TBE 缓冲液:0.5 M EDTA（pH8.0）200 mL，Tris-Cl 54 g，27.5 g 硼酸，去离子水定容至 1 L，使用时稀释到 0.5×。

2 实验方法

2.1 细胞复苏及培养

将实验室冻存的目标细胞株从-80℃冰箱取出后立即置于细胞培养箱中融化，之后加入到有其 3 倍体积的细胞完全培养液中，吹吸混匀，室温低速离心（800 转/分，3 分钟）。去上清，向细胞沉淀中加入适量细胞完全培养液将其吹散成单细胞悬液，铺于 10 cm 培养皿中，在 5% CO_2、37℃恒温条件下于培养箱中培养。当细胞处于对数生长期时，进行传代，小心吸出旧培养液，0.9％生理盐水润洗 2-3 次后，加入适量胰酶，放入 37℃恒温培养箱内消化数分钟，显微镜下观察，待细胞呈现出饱满球形且细胞之间无成片粘连时，加入 2 倍体积完全培养液终止消化，吹打混匀，室温离心（800 rpm，5 min）、重悬、分皿传代。

2.2 去甲基化药物处理食管癌细胞株

取状态良好的食管癌细胞，每个细胞系都分为两皿，即实验组和对照组，且传代时保证其第二天的融合度达 20％-30％，实验条件满足后向实验组中加入 5-aza-dc 至其终浓度达 2 μM，24 h 后更换一次培养液并重新加药，对照组加入

与实验组相同体积的细胞培养液，不加药物诱导。3-5 天后分别提取其总 RNA 进行检测。

2.3 食管癌细胞总 RNA 的提取

（1）取出要收取 RNA 的细胞，首先用 0.9%生理盐水快速清洗 3 遍，洗尽残留的细胞培养液，加入适量 Trizol 将细胞覆盖，常温条件下用胶头滴管反复吹打，显微镜下观察至细胞完全脱落，将 Trizol 裂解液转移至 EP 管中后置于-30℃或者-80℃冰箱保存，或直接进行下一步提取；

（2）向 1 mL 的 Trizol 裂解液中，加入 300 μL 氯仿（避光放置），上下颠倒至混匀，室温静置至管内液体出现分层即可；

（3）样品分层后，于 4℃高速离心机中离心 10 min，13000 rpm；

（4）离心结束后可见 EP 管内分为 3 层，从上至下分别为含 RNA 的水相层、蛋白质层、有机相层。将水相层转移至无 RNA 酶的 EP 管内（不要吸到中间层），加入与相同体积的异丙醇，混匀；

（5）4℃离心机将样品以 13000 rpm，离心 10 min。结束后可见管底有沉淀析出，即为 RNA 沉淀；

（6）弃上清，加入 700 μL 70%-75%的无水乙醇，重悬 RNA 沉淀，洗去杂质成分，4℃，13000 rpm，5 min。而后重复清洗一次；

（7）弃去离心管内乙醇溶液，短暂离心，用无 RNA 酶的移液枪吸取残余的上清液，待其挥发 1-2 min，风干沉淀；

（8）加入适量 DEPC 水溶解 RNA 沉淀，分别取 2 μL RNA 溶液使用分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳（冰浴条件下）检测浓度和质量。若测得 A_{260} 与 A_{280} 的比值在 1.8-2.0 范围内，说明 RNA 纯度较好；凝胶紫外成像若可清楚显示核糖体 RNA 亚基 28S、18S 条带且亮度比接近 2:1，表示 RNA 质量较好，可进行下一步逆转录反应。

2.4 逆转录反应

（1）总 RNA 使用试剂盒逆转录成 cDNA，首先，向无 RNA 酶的八连管内加入

模板 RNA	5 μg
Random primer	1 μL

用 DEPC 水定容至　　12 μL

（2）将上步配好的体系轻柔混匀，短暂离心，65℃，5 min，之后立即置于冰上，防止复构；

（3）继续向八连管内加入：

5×Reaction Buffer	4 μL
10mM dNTP Mix	2 μL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	1 μL
RevertAid RT (200 U/μL)	1 μL

（4）将八连管短暂离心混匀，25℃，5 min；42℃，1 h；70℃，5 min；

（5）结束后将 20 μL cDNA 用 ddH_2O 稀释至 100 μL，并于-20℃冰箱保存。

2.5 RT-PCR 引物的设计及反应体系

在 NCBI 下载 CHFR mRNA 序列，利用 Primer Blast 且在遵循以上 PCR 引物设计原则的前提下，设计 CHFR 基因、GAPDH 基因的 RT 引物（跨内含子）：

Gene Name	Primer Sequense（5'-3'）	Length(bp)
CHFR	F:TCCGTGAGCTGACCTATCAG R:GGTGAGCTTTCACCTGAGTG	120
GAPDH	F:GACCACAGTCCATGCCATCAC R:GTCCACCACCCTGTTGCTGTA	454

PCR 反应体系 25（μL）：

2× Taq 酶	12.5 μL
去离子水	8.5 μL
上游引物（F）	1 μL
下游引物（R）	1 μL
模板 cDNA	2 μL

RT-PCR 扩增 CHFR 的反应条件：

95℃ 5 min；

95℃ 30 s → 64℃ 30 s → 72℃ 40 s（3 cycles）；

95℃ 30 s → 61℃ 30 s → 72℃ 40 s（3 cycles）；

95℃ 30 s → 58℃ 30 s → 72℃ 40 s（3 cycles）；

95℃ 30 s → 55℃ 30 s → 72℃ 40 s（26 cycles）；

72℃ 5 min；

4℃ +∞

RT-PCR 扩增 GAPDH 的反应条件：

95℃ 5 min；

95℃ 30 s → 60℃ 30 s → 72℃ 40 s（25 cycles）；

72℃ 5 min；

4℃ +∞

2.6 食管癌细胞 DNA 的提取

（1）将生长状态良好的食管癌细胞，按照常规处理方法消化离心，得到的细胞沉淀可短暂保存至-20℃冰箱或直接进行 DNA 的提取；

（2）向细胞沉淀中加入 2-3 mL TES，之后加入 100 μL 蛋白酶 K，随即放入 55℃恒温水浴锅中震荡消化 3 h 以上，直至浑浊的消化液变澄清即为消化完全；

（3）将消化液从恒温水浴锅拿出放至室温，加入等量的饱和酚/氯仿，剧烈震荡，室温下静置，直至液体分层；

（4）将分层后的消化液小心放入常温离心机内，4200rpm，10 min；

（5）将上清转移至预先准备好的洁净的离心管中，注意不要吸到中层，加入 1/10 体积的 7.5 M NH_4Cl 溶液，沿管壁缓慢加入 2-3 倍体积的无水乙醇，缓慢来回颠倒，可见白色絮状物析出；

（6）用胶头吸管将絮状物转移至 1.5 mL EP 管中，加入 800 μL 75%的乙醇清洗，然后 10000 rpm，5 min。重复一次；

（7）弃上清，将 EP 管倒扣控干乙醇，晾干沉淀；

（8）加入适量的去离子水将沉淀完全溶解；

（9）检测 DNA 浓度和纯度，若吸光度 A_{260} 与 A_{280} 的比值在 1.8 左右时，说明 DNA 纯度较好。取 2 μL DNA 溶液，进行 1%琼脂糖凝胶电泳，若 DNA 主带清晰，提示 DNA 质量较高，而后置于 20℃待用。

2.7 DNA 的硫化

（1）取质量好、纯度高的 DNA 原液稀释成 0.2 μg/μL 的工作液，取 10 μL 工作液至 1.5 mL 离心管，补充去离子水至 50 μL；

（2）贴管壁快速加入 5.5 μL 2 M NaOH 溶液（尽量保证样品之间的反应时间相同），37℃金属浴作用 15 min，打开 DNA 双链结构；

（3）在金属浴作用期间配制 10 mM 的氢醌溶液（称取 0.0275 g 氢醌加入去离子水定容至 25 mL，避光，现配现用），3 M $NaHSO_3$ 溶液（称取 9.42 g 亚硫酸氢钠，使用 10 M NaOH 调节 PH 至 5.0，定容至 25 mL，避光放置、现配现用）；

（4）DNA 双链结构打开后，立即加入 30 μL 10 mM 的氢醌溶液，肉眼可见液体变为金属黄色。然后立即加入 520 μL 3 M 的 $NaHSO_3$ 溶液，轻柔混匀后溶液又变为无色；

（5）将样品用锡箔纸包裹严实，放入 50℃恒温水浴锅中，避光反应 14-16 h（时间短易发生硫化不完全）；

（6）将加有 1 mL DNA clean uP resin 的过滤柱插至泵中，加入硫化好的 DNA 样品，用胶头滴管轻轻吹打使 DNA 与树脂结合；

（7）打开阀门进行过滤，使 DNA 充分结合在过滤柱的滤膜上。样品过滤完之后，加入 1-2 mL 80%的异丙醇进行清洗，待抽干后，将柱子插入提前加入 5.5 μL 3M 的氢氧化钠溶液的 1.5 mL 离心管中；

（8）在滤膜上方加入 50 μL 预热至 55℃的去离子水，常温离心机，10000 rpm，1 min，将滤膜上结合的 DNA 洗脱下来，静置 4 min，使其与氢氧化钠充分接触，终止硫化；

（9）按 1:17 的比例加入 18 μL 糖原（10 mg/μL）和 NH_4AC 溶液（7.5 M）的混合溶液，加入 3 倍体积预冷无水乙醇，于-80℃沉淀 3 h 以上；

（12）将产物取出，立即放入 4℃离心机中，13000 rpm，离心 25-35 min。然后用预冷的 75%乙醇清洗沉淀，4℃，13000 rpm，3 min；

（13）弃上清，短暂离心，将离心管倒扣用吸水纸吸尽残留的乙醇，然后立即插至冰上，加入 20 μL 预冷的双蒸水至沉淀完全溶解，可直接进行 MSP 或于-80℃保存。

2.8 MSP 引物设计及反应体系

在 NCBI 下载 CHFR DNA 序列，利用 Primer Blast 且在遵循以上 MSP 引物设计原则的前提下，设计 CHFR 基因的 MSP 引物：

Primer Sequense（5'-3'）	Length(bp)
U-F:GATTGTAGTTATTTTTGTGATTTGTAGGTGAT U-R:AACTAAAACAAAACCAAAAATAACCCACA	115
M-F:GTTATTTTCGTGATTCGTAGGCGAC M-R:CGAAACCGAAAATAACCCGCG	100

MSP 反应体系 25（μL）：

2× FMSP Mix	12.5 μL
去离子水	8 μL
上游引物（U/M-F）	1 μL
下游引物（U/M-R）	1 μL
硫化产物	2.5 μL

反应条件：

95℃，5 min；

95℃，30 s → 60℃，30 s → 72℃，40 s（35 cycles）；

72℃，5 min；

4℃，+∞

3 实验结果

3.1 去甲基化药物 5-aza-dc 对食管癌细胞株中 CHFR 表达的影响

我们使用 7 株状态良好的食管癌细胞系的 RNA 逆转录成 cDNA，通过 RT-PCR 检测 CHFR 基因的 mRNA 表达情况。结果如图 2-1，发现在 KYSE30、KYSE140、KYSE450 细胞中 CHFR 正常表达，而在 KYSE70 细胞中 CHFR 的表达降低，在 KYSE150、KYSE410 和 KYSE510 细胞中 CHFR 的表达缺失。为了进一步验证 CHFR 基因的表达受到启动子区域甲基化的调控，我们应用去甲基化药物（5-aza-dc）处理食管癌细胞后发现，KYSE30、KYSE140、KYSE450 细胞中 CHFR 的表达无明显变化，KYSE70 细胞中 CHFR 的表达增加，KYSE150、KYSE410、KYSE510 细胞中恢复 CHFR 基因的表达。结果表明 CHFR 基因的表达受到启动子区域甲基化的调控。

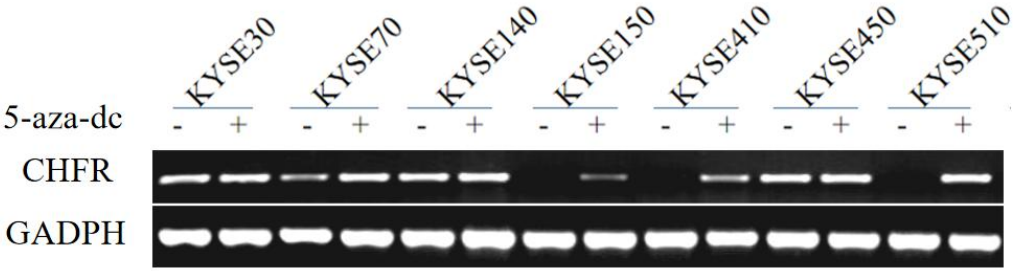


图 2-1. 食管癌细胞系中 CHFR 基因在应用去甲基化药物处理前后的表达情况。

注：“-”表示 5-aza-dc 处理前，“+”表示 5-aza-dc 处理后

3.2 CHFR 在食管癌细胞株中的甲基化状态

本实验设计CHFR基因启动子区甲基化及非甲基化特异性引物后，利用MSP技术检测 CHFR 在不同食管癌细胞株中的甲基化状态。结果显示（图 2-2），CHFR 在 KYSE30、KYSE140、KYSE450 中没有发生甲基化，在 KYSE70 中出现部分甲基化，在 KYSE150、KYSE410 和 KYSE510 中发生了完全甲基化改变。

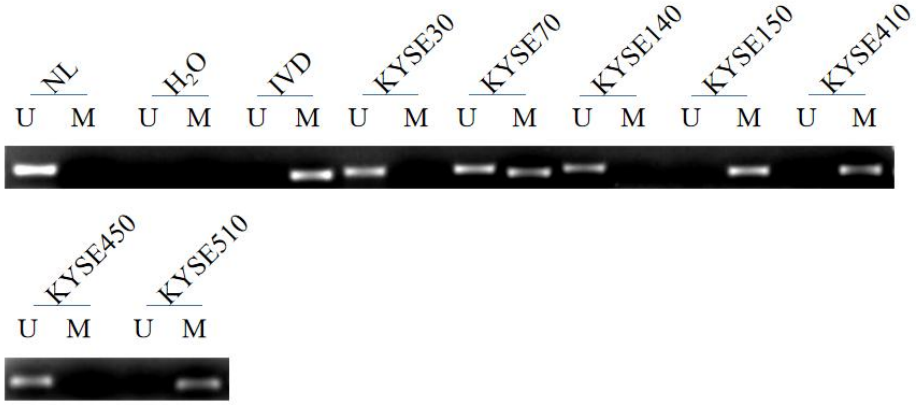


图 2-2. 食管癌细胞系中 CHFR 基因启动子区甲基化状态。

注：NL：正常人外周血淋巴细胞 DNA，作为 Unmethylation 的对照；IVD：体外甲基化修饰 DNA，作为 Methylation 的对照；H_2O:体系阴性对照, 排除污染；U：Unmethylation；M：Methylation。

4 讨论

食管癌在发生发展过程中受到多种肿瘤抑制基因的共同相互作用，其基因表达不仅受到基因序列的影响，同时也受表观遗传学调控。DNA 甲基化是一种广泛的表观遗传现象。正常的 DNA 甲基化是许多生物过程的重要调节机制，而

DNA 甲基化的异常表征会通过不同的方式影响肿瘤的发生。例如，DNA 重复序列低甲基化会使乳腺癌、肺癌、膀胱癌及肝癌的基因组不稳定性增加[57]，启动子低甲基化使涎腺腺样囊性癌、乳腺癌、黑色素瘤中的原癌基因被激活[58]，CpG 岛高甲基化会抑制乳腺癌、结直肠癌、胃癌和神经胶质瘤中的抑癌基因和/或 DDR 相关基因的表达[59]。CHFR 与许多癌症的发生发展密切相关，它的主要功能是当细胞暴露在各种应激条件下时，延缓细胞周期并通过介导下游 DNA 损伤修复通路来修复 DNA 损伤。

本部分实验拟在食管癌细胞系中探讨 CHFR 的表达是否受甲基化调控。实验发现 CHFR 基因在食管癌细胞 KYSE30、KYSE140、KYSE450 细胞株中正常表达，其启动子区未发生甲基化；在 KYSE70 细胞中 CHFR 的表达降低，启动子区发生了部分甲基化修饰；而在 KYSE150、KYSE410 和 KYSE510 细胞中 CHFR 的表达缺失，其启动子区为完全甲基化状态。由此得知，CHFR 基因在食管癌细胞系中的表达与其基因启动子区甲基化状态存在对应关系，CHFR 会由于其启动子区甲基化修饰而沉默。同时在应用甲基转移酶抑制剂（5-aza-dc）处理后发现，CHFR 基因在缺失表达的细胞株中恢复表达，在低表达的细胞株中升高了其表达水平，而正常表达 CHFR 的细胞株不受甲基转移酶抑制剂的影响，这进一步在功能上明确了 CHFR 在食管癌细胞中的表达受甲基化调控。

第三章 食管癌组织中 CHFR 甲基化与临床因素的相关性

在上部分的研究中，我们明确了 CHFR 的表达在食管癌细胞中受甲基化的调控。实验中用到的这些熟知的食管癌细胞是从不同食管癌患者的肿瘤组织中分离后，在体外经过人工培养传代，成功建立的细胞体系。因此，利用食管癌细胞株实验得到的体外实验结果，一定程度上也反应了临床病例中实际存在的情况。为了进一步探究在人类食管癌发生发展过程中是否存在 CHFR 异常的甲基化改变，我们首先利用网上公开数据库的信息来分析人食管组织中 CHFR 的表达和甲基化的情况，而后进一步利用从食管癌高发地区河南省林州市、安阳市肿瘤医院以及从中国人民解放军总医院收集的食管组织样本，检测食管癌组织样本中 CHFR 的甲基化情况。同时对 CHFR 甲基化与食管癌患者一般情况、病理特征、生存时间之间的相关性进行分析，探究 CHFR 甲基化在食管癌诊疗过程中是否具有潜在的临床应用价值。

1 实验材料

1.1 食管癌组织标本

本实验采用的 1008 例原发性食管癌组织来自食管癌高发的河南省林州市、安阳市肿瘤医院，13 例正常食管组织来自于中国人民解放军总医院。通过查询取得的所有食管癌标本的病例和病理信息，筛除不符合条件的食管癌标本，目的是保证所有标本均为原发食管癌。本研究获得中国人民解放军总医院伦理委员会批准(批号:20090701-015)。

1.2 主要实验耗材、仪器及设备

参照本论文第二章。

2 实验方法

2.1 组织标本 DNA 的提取

将冰冻储存的食管癌及癌旁组织取出放入 1.5 mL 离心管内，立即放入盛有液氮的保温桶中冷却数分钟，待组织冷冻后用锤子快速将组织块锤碎，转移至 15 mL 离心管内。依据组织块大小加入适量 DNA 提取缓冲液和蛋白酶 K，颠倒混匀后后放入 55℃恒温水浴锅中消化，在消化的前一小时，不断摇晃离心管，使蛋白酶 K 与组织碎片充分接触，然后放入水浴锅过夜，次日观察消化情况，若组织块较大或消化不完全，可补加 DNA 提取缓冲液和蛋白酶 K，同时增加消化时间，直至观察到消化液变澄清为止。后续提取步骤参照第二章“食管癌细胞 DNA 的提取”即可。

2.2 GTEX 和 TCGA 数据库分析 CHFR 表达及甲基化状态

利用 Genotype-Tissue Express（GTEx）和 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库下载了 663 例正常食管粘膜样本和 181 例食管癌组织样本的 CHFR 的 mRNA 表达情况。

2.3 食管癌组织中 CHFR 的甲基化特异性 PCR 检测

将上步得到的 DNA 溶液稀释成 0.2 μg/μL 的工作液浓度，取 2 μL 进行凝胶电泳，选取条带明显无杂带的样品进行 DNA 的硫化和甲基化特异性 PCR 检测。后续步骤与第二章“DNA 的硫化”和“MSP 引物设计反应体系”相同。

2.4 样本数据的相关性分析及生存分析

汇总所有符合实验条件的食管癌标本，对性别、年龄、吸烟、饮酒、家族史、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、脉管癌栓等病理因素采用 SPSS22.0 统计学分析软件进行分析。CHFR 启动子区甲基化率与其相关因素的相关性采用 χ^2 检验进行分析。CHFR 基因在食管癌和正常食管组织的表达差异采用 t 检验进行分析。$P < 0.05$ 时认为有统计学意义。利用 Kaplan-Meier 法对 CHFR 甲基化和非甲基化的两组患者的生存情况进行分析。$P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 CHFR 基因在 GTEX 和 TCGA 的食管癌数据库的表达差异

为了验证 CHFR 的表达差异是否与其启动子区域甲基化相关，本实验首先利用肿瘤基因组图谱(TCGA)和基因型-组织表达(GTEx)数据库预测 CHFR 的表达是否受启动子区域甲基化的调控。对从 TCGA 和 GTEx 数据库中提取得到的 181 例食管癌组织和 663 例正常食管粘膜中 CHFR 的基因表达数据进行对比；对 CHFR 启动子区的 11 个 CpG 位点进行甲基化水平与 CHFR mRNA 表达水平进行相关性分析。结果显示，CHFR 基因在食管癌组织中的表达低于正常食管组织，且其表达的降低与位于启动子区域的甲基化相关(图 3-1)。结果表明 CHFR 的表达受启动子区域甲基化的调控。

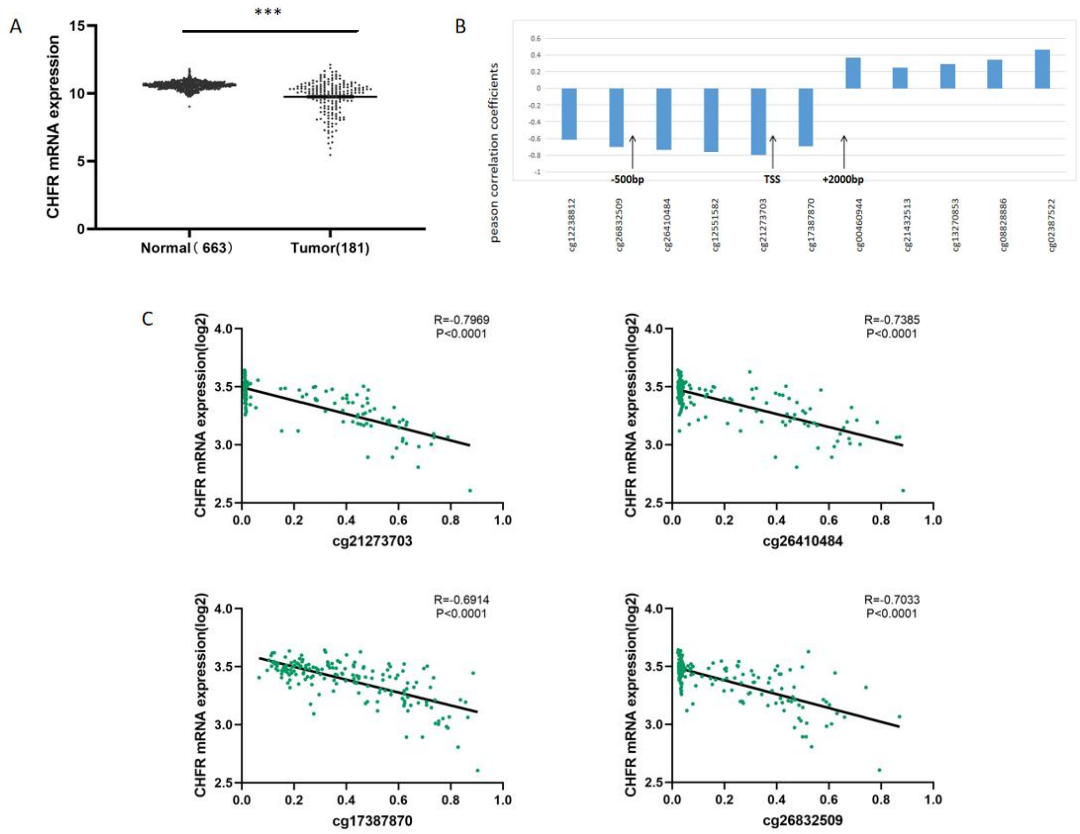


图 3-1. GTEx 和 TCGA 显示 CHFR 的表达与其启动子区的甲基化状态呈负相关。

注：A. Normal：食管正常组织，Tumor：食管癌组织。B. CHFR 基因启动子区 11 个 CpG 位点甲基化水平与 CHFR mRNA 表达水平的相关性分析。C. CHFR 甲基化程度与其表达水平负相关系数最为明显的 4 个 CpG 位点的分析结果。***：$P < 0.001$。

3.2 CHFR 在食管癌组织中的甲基化状态

提取纳入病例的 13 例正常食管组织（图 3-2，A）和 1008 例食管癌组织的 DNA（图 3-2，B），经过 DNA 的硫化及 MSP 技术对其进行甲基化检测，发现在 13 例正常食管组织中，CHFR 为非甲基化状态，排除了 CHFR 在食管癌组织中特异性甲基化的可能性。在 1008 例原发食管癌组织中，有 624 例发生了甲基化，其甲基化率为 61.9%。结果显示，CHFR 基因在食管癌中频繁发生甲基化。

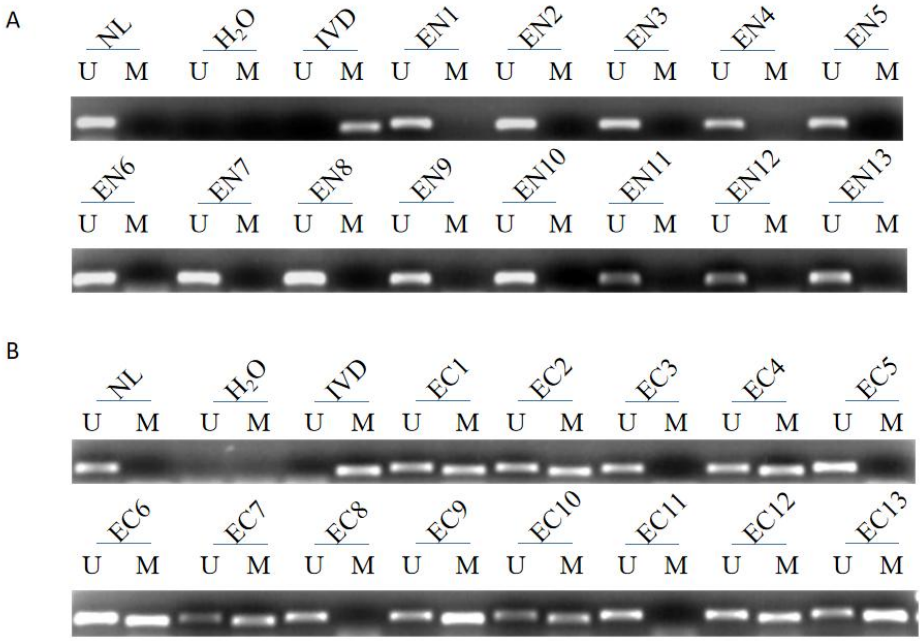


图 3-2. CHFR 在正常食管和食管癌（部分）组织中的甲基化状态。

注：NL：正常人外周血淋巴细胞 DNA，作为 Unmethylation 的对照；IVD：体外甲基化修饰 DNA，作为 Methylation 的对照；H_2O：体系阴性对照, 排除污染；U：Unmethylation；M：Methylation。EN：正常食管组织；EC：食管癌组织。

3.3 CHFR 甲基化与临床因素之间的相关性

本课题汇总了纳入病例的所有信息之后，对 CHFR 甲基化与患者的年龄、性别、吸烟情况、饮酒情况、食管癌家族史、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和脉管癌栓进行了相关性分析，结果如下（表 3-1）。CHFR 基因甲基化与性别（$P < 0.01$）、吸烟情况（$P < 0.01$）、饮酒情况（$P < 0.05$）和食管癌分化程度（$P < 0.05$）显著相关，与年龄、食管癌家族史、肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移及脉管癌栓无相关性（$P > 0.05$）。

表 3-1. CHFR 甲基化状态与食管癌患者临床因素的相关性分析

Clinical factor	NO.	CHFR methylation status		*P-value
		unmethylated n=384（38.1%）	Methylated n=624（61.9%）	
Age				
＜60	315	131	184	0.124
≥60	693	253	440	
Gender				
Male	674	278	396	**0.003**
Female	334	106	228	
Smoking				
No	563	189	374	**0.001**
Yes	445	195	250	
Drinking				
No	725	262	463	**0.041**
Yes	283	122	161	
Cancer family history				
Negative	687	273	414	0.116
Positive	321	111	210	
Tumor size (cm)				
<5	634	273	401	0.252
≥5	374	151	233	
Differentiation				
Well	300	102	198	**0.046**
Moderate	532	202	330	
Poor	176	80	96	
TNM stage				
I+II	533	193	340	0.192
III+IV	475	191	284	
Lymph node metastasis				
Negative	528	193	335	0.290
Positive	480	191	289	
Cancer embolus				
Negative	915	344	571	0.306
Positive	93	40	53	

3.4 CHFR 甲基化与食管癌患者的总体生存时间分析

在 1008 例食管癌组织中，选择具有完整生存资料的 576 例患者，利用 K-M 法对CHFR 甲基化与非甲基化的两组患者的生存情况进行分析。结果显示，CHFR 甲基化与食管癌患者的生存时间并无明显相关性（$P>0.05$）。

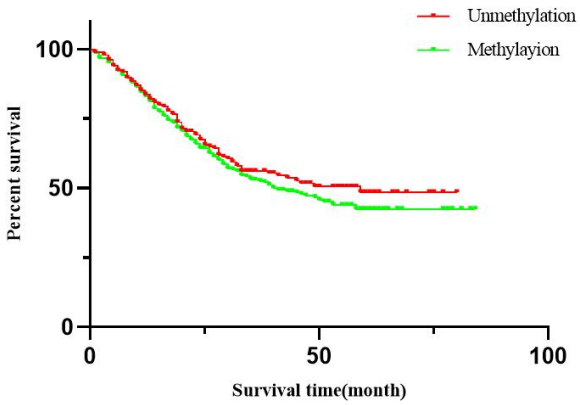


图 3-3. CHFR 甲基化与非甲基化食管癌患者的生存时间

表 3-2. CHFR 甲基化状态与食管癌患者的生存分析

CHFR	Numbers	Nμmber of events	Medial sμrvival（months）	*P*（log-rank test）
Unmethylation	186	85	59	0.260
Methylation	390	199	40	

4 讨论

CHFR 是控制染色体完整性的关键分子。与其他有丝分裂检查点基因相比，CHFR 在肿瘤中更易失活[42]。肿瘤中的 CHFR 失活可能是启动子 CpG 岛甲基化的结果，同时在一系列肿瘤中的确发现了 CHFR 高甲基化[60]，包括胃癌、肺癌和结直肠癌。本部分首先利用 Genotype-Tissue Express（GTEx）和 The Cancer Genome Atlas（TCGA）数据库分析 CHFR 在正常食管组织和食管癌组织中的表达差异，分析 CHFR 基因启动子区的甲基化。研究发现，CHFR 基因在食管癌组织中的 mRNA 表达量显著低于正常食管组织，且启动子区附近 CPG 位点的甲基化与 mRNA 表达量呈负相关，表明 CHFR 启动子区甲基化下调了 CHFR 基因的表达。这些结果提示，CHFR 异常甲基化可能成为食管癌治疗的潜在标志物。

另外我们之前的研究发现，CHFR 在食管癌发生早期很少甲基化，但在晚期

肿瘤阶段频繁发生甲基化，这表明 CHFR 甲基化是食管癌的晚期标志物，而 CHFR 的甲基化也已被视为各种肿瘤中的化学敏感标志物[61]。但之前的研究中检测的病例样本量较小，样本数约在 35-110 例之间，不同研究中 CHFR 的甲基化率的差异受检测样本量、检测方法以及检测的甲基化位点等的影响。本研究检测样本量较大（1008 例），一定程度上更加能反映我国食管癌患者中 CHFR 的甲基化情况。然后我们通过对 1008 例食管癌组织标本的甲基化检测，证实了在食管癌组织中经常发生 CHFR 的甲基化修饰，其甲基化率为 61.9％，结果显示，其甲基化率要高于以前的报道（12.5％-45％）。在未来食管癌的诊断中，若能将 CHFR 纳入特定基因组合进行甲基化水平检测，可能会有利于提高肿瘤诊断的效能。

通过对 CHFR 甲基化状态与患者一般情况与病理特征的相关性分析，发现 CHFR 甲基化与性别、吸烟情况、饮酒情况和食管癌分化程度显著相关，有吸烟、饮酒习惯的患者 CHFR 的甲基化频率更高。CHFR 失活与肿瘤预后之间的关联已被广泛研究，例如 CHFR 蛋白表达减少与吸烟相关的肺鳞状细胞癌预后不良有关[62]，且 CHFR 的高甲基化被发现是肺癌和结直肠癌预后不良的预测因子[63, 64]。但本部分实验未发现 CHFR 甲基化与总生存时间有明显相关性，这可能是由于食管癌的发生发展不仅受到甲基化的调控，还受其它多种因素如生活条件、饮食习惯、地域差异等因素的影响。之前的研究表明，CHFR 甲基化可能是紫杉醇等药物敏感性的标志物，本部分实验的局限性在于没有将进一步将接受药物化疗和不接受化疗的样本进行分析，在后续的工作中将进一步探讨。

第四章 CHFR 在食管癌中参与的机制研究

上部分实验中，通过分析公开数据库内 CHFR 的表达和甲基化信息以及检测食管癌临床组织标本中 CHFR 启动子区的甲基化状态，发现在食管癌的发生过程中存在 CHFR 基因的异常甲基化改变，其启动子区甲基化的修饰抑制了 CHFR 基因的转录，使 CHFR 的表达缺失，且 CHFR 甲基化与食管癌患者分化程度的恶性表型相关联，提示 CHFR 甲基化沉默可能是促进食管癌发生发展的重要因素。本部分研究进一步探索 CHFR 在食管癌发生发展过程中所扮演的重要角色。首先构建 CHFR 稳定表达载体以及 CRISPR-Cas9-CHFR 敲除载体，利用慢病毒感染、嘌呤霉素筛选、单克隆培养的方式获得 CHFR 稳定表达的食管癌细胞株 KYSE150、KYSE510 和 CHFR 基因敲除细胞株 KYSE30，以这 3 种细胞株为实验模型，探索 CHFR 在食管癌中的 DNA 损伤修复作用机制。

1 实验材料

1.1 实验用细胞株模型

本章节选用 CHFR 缺失表达的 KYSE150、KYSE510 细胞株和 CHFR 正常表达的 KYSE30 细胞株作为细胞模型，病毒包装所用细胞为 293T 细胞，采用 DMEM 培养基（1%青霉素-链霉素，10%胎牛血清）进行培养，所有细胞均置于含 5% CO_2 的 37℃细胞培养箱中进行培养。

1.2 主要实验耗材

细胞计数板，载玻片，盖玻片，6 孔板，12 孔板，24 孔板，96 孔板，不同规格的细胞培养皿，细胞冻存管，5 mL、10 mL 无菌移液管，玻璃吸管，普通及无菌 1.5 mL、2 mL、5 mL EP 管，普通及无菌八排管、0.22 μM 滤膜、PVDF 膜、抗体孵育袋等。

1.3 主要仪器及设备

仪器及设备	厂家
eBlot™ L1 快速湿转仪	中国金斯瑞生物科技有限公司

Amersham Imager 680 多功能成像仪	GE Healthcare Life Sciences
酶标仪	Thermo Scientific
电泳槽	北京六一仪器厂生物科技有限公司

1.4 主要试剂及其主要工作液的配制方法

试剂	厂家
pEASY-T1 Cloning kit	全式金生物
DH5α感受态细胞	全式金生物
X-gal（5-溴-4 氯 -3-吲哚-β-D-吡喃半乳糖苷）	全式金生物
IPTG（异丙基硫代半乳糖苷）	全式金生物
氨苄青霉素（Ampicillin）	Beyotime Biotechnology
琼脂糖粉	Beyotime Biotechnology
酵母粉	Thermo Scientific OXOID
胰蛋白胨	Thermo Scientific OXOID
Opti-MEMI	Thermo Scientific
Lipofectamine 3000 试剂	Thermo Scientific
嘌呤霉素(Puromycin Dihydrochloride）	Sigma-aldrich
病毒滴度检测卡	北京博奥龙免疫技术有限公司
RIPA 强裂解液	Beyotime Biotechnology
PMSF	Beyotime Biotechnology
蛋白酶抑制剂混合液（PIC）	Beyotime Biotechnology
一抗稀释液	Beyotime Biotechnology
蛋白上样缓冲液	Beyotime Biotechnology
磷酸酶抑制剂	凯基生物有限公司
MTT 细胞增殖-毒性检测试剂盒	凯基生物有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	康为世纪
蛋白 marker	Bio-Rad
BamH I、EcoR I 内切酶	Takara
质粒小提试剂盒	GeneStar
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	天根生化
T4 DNA Ligase（Buffer 5×）	Thermo Scientific

ECL 化学发光底物	Bio-Rad
Tween 20	北京克尔慧生物科技有限公司
小鼠抗人β-actin（AF0003）	Beyotime Biotechnology
兔抗人 CHFR（Cat No. 12169-1-AP）	Proteintech
鼠抗人 AURKA（Cat No. 66757-1-Ig）	Proteintech
甘氨酸	Biomol GmbH
10× k buffer	Takara
pCDH-CMV-MCS-EF1-puro 表达载体	301 消化内科实验室
病毒包装质粒（plp、plp2、vsvg）	301 消化内科实验室
Polybrene	翌圣生物科技股份有限公司
lentiCRISPR v2 载体	301 消化内科实验室
ATM 抑制剂（AZD0156）（CAS No. 1821428-35-6）	selleck 生物公司

主要工作液的配制方法：

（1） 1.0 M Tris-cl（pH 6.8）：Tris 60.57 g，ddH_2O 完全溶解后用浓 HCL 调 pH 至 6.8，定容至 500 mL。

（2） 1.0 M Tris-cl（pH 7.5）：Tris 60.57 g，ddH_2O 完全溶解后用浓 HCL 调 pH 至 7.5，定容至 500 mL。

（3） 1.5 M Tris-cl（pH 8.8）：Tris 90.86 g，ddH_2O 完全溶解后用浓 HCL 调 pH 至 8.8，定容至 500 mL。

（4） 10× Wester Blot 电泳液：甘氨酸 144 g、SDS 10 g、Tris 30.2 g，ddH_2O 完全溶解后定容至 1 L，使用时稀释至 1×。

（5） 10×TBS：87.6 g NaCl、100mL 1 M Tris-cl（pH 7.5），ddH_2O 完全溶解后定容至 1 L。使用时配成 1×工作液，即取 50 mL 10×TBS、0.5 mL 吐温 20，字后定容至 500 mL。

（6） 10%过硫酸铵（AP）：过硫酸铵 2 g，ddH_2O 完全溶解后定容至 20 mL，4℃避光储存。

（7） 封闭液：即 5%脱脂奶，1×TBST 溶解 5 g 脱脂奶粉并定容至 100 mL，4℃短暂储存。

（8） LB 液（固）体培养基：2.5 g 酵母提取物、5 g NaCl、5 g 胰蛋白胨，7.5 g 琼脂粉（固），加入 ddH_2O 中至完全溶解后定容至 500 mL，高压灭菌后将

液体培养基置于 4℃冰箱备用；待加入琼脂粉的固体培养基的温度降至 50℃后加入 1‰的 AMP，摇匀后倒入固体培养皿中，凝固后应用封口膜封口，4℃存储。

2 实验方法

2.1 CHFR 稳定表达细胞株的构建

2.1.1 CHFR 质粒来源

pcDNA3.1(+) 装载目的基因 CHFR（transcript variant 1, mRNA NM_001161344）的质粒购自长沙科文生物科技有限公司。

2.1.2 PCR 扩增 CDS 区

设计引物，将 CHFR 的蛋白编码序列从 pcDNA3.1-CHFR-3×Flag 质粒上扩增下来，选择实验室储存的 PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 质粒作为构建 CHFR 稳定表达质粒的载体，并分析 pcDNA3.1-CHFR-3×Flag 质粒和 PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 质粒的序列和酶切位点（图 4-1），避开 CHFR 基因序列中的酶切位点（图 4-2）后，选择 BamH I 内切酶和 EcoR I 内切酶作为质粒的酶切位点，依据保护碱基添加原则设计包含 BamH I 和 EcoR I 酶切位点的 CDS 扩增引物。

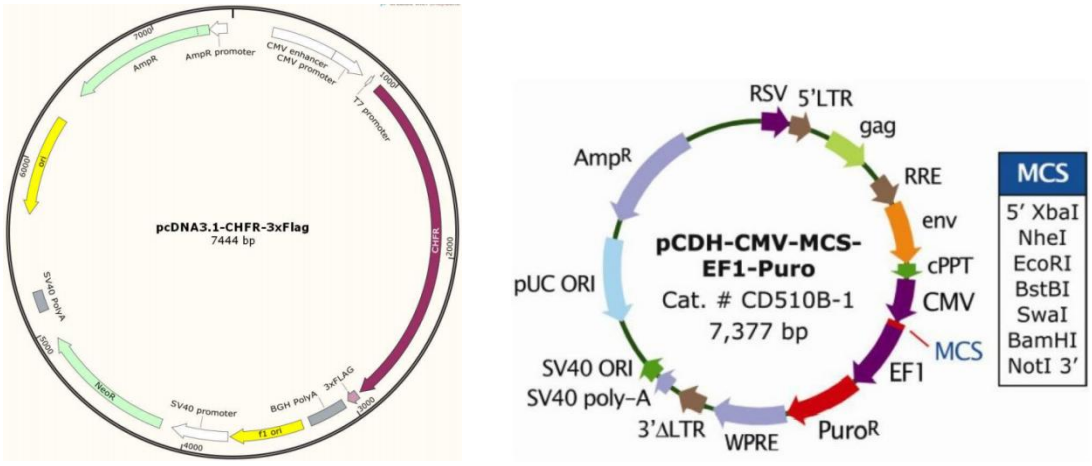


图 4-1. pcDNA3.1-CHFR-3×Flag（左）、PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 质粒图谱（右）

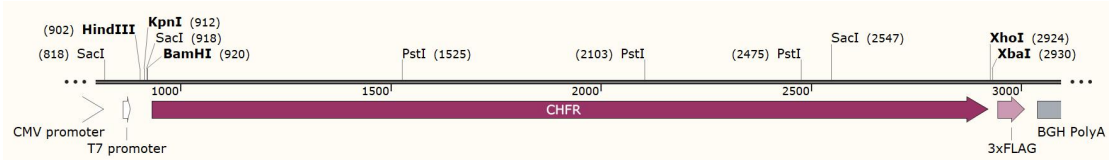


图 4-2. CHFR-CDS-1995bp

CHFR-CDS 扩增引物序列：

内切酶	引物序列（5'-3'）
EcoR I	CHFR-CDS-F: G**GAATTC**ATGGAGCGGCCCGAGGAAGGCA
BamH I	CHFR-CDS-R: CG**GGATCC**TTAGTTTTTGAACCTTGTCTGTTCACAG

CHFR-CDS PCR 扩增反应体系：

2× FMSP Mix	12.5 μL
去离子水	8 μL
CHFR-CDS-F	1 μL
CHFR-CDS-R	1 μL
pcDNA3.1-CHFR-3×Flag 质粒	2.5 μL

反应条件：

95℃，5 min；

95℃，30 s → 60℃，30 s → 72℃，2 min（35 cycles）；

72℃，5 min；

4℃，+∞

将反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，而后在紫外成像仪下将带有目的条带的凝胶切割下来，根据凝胶回收试剂盒的指导步骤，对 DNA 片段进行回收，从而获得具有 BamH I 和 EcoR I 酶切位点的 DNA 片段。

2.1.3 重组质粒的鉴定及测序

（1）使用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 双酶切 PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 质粒和目的片段的胶回收产物。

双酶切体系：		
	BamH I	1 μL
	EcoR I	1 μL
	10× k buffer	2 μL

PCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 质粒/胶回收产物	0.5-1 μg
去离子水	补至 20 μL

将体系混匀，进行 30℃，30 min；37℃，30 min 的酶切反应，将产物进行琼脂糖凝胶电泳，回收酶切成功的载体片段和目的基因片段；

（2）CDS 区连接 T4 载体：

连接体系：	T4 DNA 连接酶	1 μL
	T4 DNA 连接酶 buffer（5×）	2 μL
	载体片段	100 ng
	目的基因片段	25 ng
	去离子水补充至	10 μL

体系配好之后混合均匀，置 16℃反应 16 h；

（3）大肠杆菌转化：取出感受态细胞 DH5α 置于冰上融化，吸取 50 μL 置于洁净的 1.5 mL EP 管中，向其中加入 5 μL 连接产物，于冰上静置 20-30 min；而后 42℃金属浴热激 90 s，然后立即置于冰上 1-2 min；吸取 500 μL LB 液体培养基加入上述 EP 管中，于 37℃恒温箱中摇晃 1 h 左右；在避光条件下准备 LB 平板，准备一个洁净的 1.5 mL EP 管，加入氨苄青霉素 50 μL、IPTG（500 mM）8 μL、X-gal（20 mg/mL）40 μL，轻轻摇晃混匀，均匀涂抹在 LB 平板表面，室温下放置 20-30 min；取出摇晃 1 h 后的感受态细胞，室温，3000 rpm，离心 3 min，弃去部分上清，将剩余部分（约 150 μL）混匀，均匀涂抹在平板上，37℃恒温箱中正置培养 30 min，再倒置培养 12-16 h；

（4）质粒提取：培养时间足够后，取出培养皿，观察菌落生长情况。可以看出，在培养皿中出现蓝色和白色的菌落。选择 10 个白色阳性克隆，放置在 1‰氨苄青霉素的液态 LB 培养基中。在 37℃恒温箱以 150-200 转/分的速度摇晃过夜，按照质粒小型提取试剂盒的说明提取质粒，通过浓度测定和琼脂糖电泳检测其浓度和质量，将符合实验要求的质粒于-20℃储存；

（5）酶切测序鉴定重组质粒：

连接体系：	BamH I	1 μL
	EcoR I	1 μL
	10× k buffer	2 μL
	质粒	1 μg
	去离子水	补至 20 μL

将体系混匀后进行 30℃，30 min；37℃，30 min 的酶切反应，之后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，选择酶切大小正确的单克隆质粒进行测序，将测序结果正确的质粒置于-20℃储存。

2.1.4 CHFR 慢病毒的制备

（1）将实验室储存的 293T 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中，待细胞传代 2-3 次、状态良好时，消化离心，重铺到 10 cm 细胞培养皿中，保证次日细胞融合度达到 70％-80％左右，同时根据质粒提取试剂盒的说明步骤提取 pCDH-CMV-MCS-EF1-puro 表达载体质粒和病毒包装质粒（plp、plp2、vsvg）准备转染；

（2）转染前 1 h，将完全 DMEM 培养液更换为不含双抗和血清的双无培养液，同时根据 Lipofectamine 3000 试剂盒准备相关转染试剂：

A 液：	Opti-MEMI	500 μL
	P3000	24 μL
	PLP1	3 μg
	PLP2	3 μg
	VSVG	3 μg
	PCDH-CHFR/PCDH-Vector 质粒	3 μg

A 液配制完成后轻摇混匀，室温静置 5 min；

B 液：	Opti-MEMI	500 μL
	Lipo 3000	36 μL

将 A 液和 B 液轻轻混合，室温下再静置 5 min。然后将混合转染试剂缓慢加入两皿准备好的 293T 细胞中，十字法摇匀，注意不要剧烈摇晃，以免细胞脱落；

（3）6-8 h 后，将培养基更换为 DMEM 完全细胞培养基（含双抗和胎牛血清）；

（4）48 h 后，在生物安全柜中收集病毒上清液，用 0.22 μM 的滤膜过滤杂质，使用病毒检测卡检测病毒滴度，然后于 4℃冰箱短暂保存或-80℃长期保存或直接感染细胞。

2.1.5 慢病毒感染 KYSE150 和 KYSE510 细胞株

（1）将 KYSE150 和 KYSE510 细胞株接种于 10 cm 细胞培养皿中，待传代

2-3 次、状态良好时重新消化离心，每个细胞株分别接种于两皿培养皿中，保证次日细胞融合度达到 25%-35%，准备感染；

（2）感染前弃去旧培养液，加入 5 mL 含双抗的完全培养基，再向培养皿中加入 5 mL PCDH-CHFR、PCDH-Vector 病毒上清，再加入 1‰的 Polybrene（1 μg/μL）增加感染效率，轻轻摇晃使其混匀；

（3）感染 8-12 h 后，弃去旧培养液，观察细胞状态，若状态良好可依照上述步骤重复感染一次，若状态较差，可更换为含有双抗的完全培养基培养 24 h，待状态回转再重复感染。

2.1.6 Puro 筛选 CHFR 稳定表达细胞株

由于 pCDH-CMV-MCS-EF1-puro 质粒本身携带有嘌呤抗性基因，所以选用嘌呤霉素对感染细胞株进行筛选。根据嘌呤霉素使用说明，设置了 0 μg/mL-10 μg/mL 共 11 个浓度梯度，将 KYSE150 和 KYSE510 消化后接种于 24 孔板内，保证次日细胞融合度达到 25%-30%，每个浓度设置 3 个重复孔，将不同浓度的嘌呤霉素分别加入到相应的孔内，以药物作用 3 天后细胞全部死亡的浓度作为药物筛选的浓度。KYSE150 和 KYSE510 细胞的药物筛选浓度分别是 1.5 μg/mL 和 0.6 μg/mL。向病毒感染后的 KYSE150 和 KYSE510 细胞中加入致死浓度的嘌呤霉素，作用 3 天。

2.1.7 CHFR 稳定转染细胞株单克隆验证

（1）细胞总蛋白的收取：将感染之后的 KYSE150 和 KYSE510 细胞铺种于 5 cm 细胞培养皿中。当细胞状态良好且处于对数生长期时，弃掉旧培养基，用提前预冷的生理盐水清洗两遍，吸干残液后加入含有 1% PMSF 的 200 μL RIPA 裂解液中，用移液枪的枪头刮下皿底细胞，置于 EP 管中冰浴裂解 20-30 min。4℃，13000 rpm，离心 25 min。离心结束后取 2 μL 上清液加入到含有 18 μL 生理盐水的 96 孔板的相应孔内以用于后续蛋白定量，小心吸取定量剩余上清液（注意不要吸到底部白色沉淀）置于另外一个洁净的 EP 管内，按蛋白 Loading 与蛋白上清为 1：4 的比例加入 5×蛋白 Loading。将其轻弹混匀后，100℃金属浴中变性 5 min，而后放入-20℃冰箱保存；

（2）BCA 法蛋白定量：根据 BCA 试剂盒的说明，用生理盐水将 2 μg/μL 的 BSA 稀释成 0 μg/mL、0.0625 μg/mL、0.125 μg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、

1 μg/mL 六个浓度梯度，作为蛋白标准曲线使用。定量工作液按照 A 液和 B 液为 50：1 的比例配制，每个样品设置两个重复孔，向上步已经准备好的 2 μL 蛋白上清与 18 μL 生理盐水的混合液中分别加入 200 μL 定量工作液，在 37℃恒温的条件下，静置孵育 30 min。而后立即在 570 nm 波长下测量每孔吸光度。得到吸光度值之后，首先根据标准品测得的浓度绘制标准曲线，再计算所测蛋白的浓度；

（3）Western Blot 检测稳转细胞株 CHFR 蛋白的表达：

SDS-PAGE 凝胶的配制：首先，将两块长短不一的玻璃板放入已经组合好的制胶框的凹槽中卡紧，向玻璃板中间注满水，放置 10 min 验漏；按（表 4-1）配制下层分离胶，最后加入 TEMED 促凝剂，摇匀后立即灌入已验漏的玻璃板中，然后缓慢加入水至液体溢出或少量异丙醇，使胶面保持水平；等待 20 min 左右，倒去上层水或异丙醇倒置控干水分；按（表 4-1）配制浓缩胶，同样在最后加入 TEMED 促凝剂，摇匀后立即灌入玻璃板剩余空隙，插入已经清洗好的梳子。20 min 左右后，将玻璃板才能够制胶架上取下，放入电泳槽中，加入稀释好的 1× 电泳液，缓慢将梳子拔出等待上样使用；

表 4-1. SDS-PAGE 凝胶的配制表

	分离胶（10%）			浓缩胶（5%）		
组分名称	5 mL	10mL	15 mL	3mL	4 mL	5 mL
30%聚丙烯酰胺	1.7	3.3	7.9	0.5	0.67	0.83
去离子水	1.8	4	5.9	2.1	2.7	3.4
10%过硫酸铵(AP)	0.05	0.1	0.15	0.03	0.04	0.05
1.5 M Tris-HCl(pH8.8)	1.3	2.5	3.8			
1.0 M Tris-HCl(pH6.8)				0.38	0.5	0.63
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.003	0.004	0.005
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.03	0.04	0.05

上样及电泳：根据蛋白浓度，计算上样量（一般上样量含有 20-30 μg 蛋白即可）。加样时要缓慢，防止漂样，样品上样结束后在其两侧加入 3-6 μL 蛋白 marker，先 80 V 电泳，待样品跑到分离胶后，改为 120 V 跑到分离胶底部；

转膜：撬开玻璃板，根据凝胶大小裁剪 PVDF 膜，在甲醇中浸润 10 s 左右激活后，放入 ddH_2O 中备用。按照海绵、凝胶、PVDF 膜、海绵的顺序依次覆盖，擀去气泡后合起夹子放入转模仪；

封闭：转膜结束后，打开夹子，取出 PVDF 膜，将膜正面朝上并在右上方剪角作为标记，接着立即放入 1×TBST 中洗涤 3 min，之后将膜放入 5%脱脂牛奶置于水平摇床上摇晃封闭 2 h 或 4℃冰箱过夜；

孵育抗体：封闭完成后，弃去封闭液，TBST 摇晃洗涤 3 次/5 min，根据蛋白分子量裁剪 PVDF 膜，将膜放入孵育袋中，加入一抗（CHFR 抗体 1:1000 稀释，β-Actin 1:4000 稀释），室温孵育 2-4 h（依据抗体特性的不同会有所变化）或 4℃过夜。结束后回收一抗，将膜再次放入 TBST 洗涤 3 次/3 min；

曝光：A、B 液等比例配制发光液，将膜放入成像仪中，将发光液均匀滴加在膜上，进行曝光。

2.2 CHFR 稳定敲除细胞株的构建

2.2.1 sgRNA 序列

通过 NCBI 网站获取 CHFR 基因组和 CDS 序列信息（NM_001161344），选择 CHFR 基因的第一、二外显子序列进行分析，靶向序列设计程序来源于：http://crispr.mit.edu（Zhangfeng 实验室在线数据库），选择得分最高的序列进行 sgRNA-Cas9 载体构建（图 4-3）。

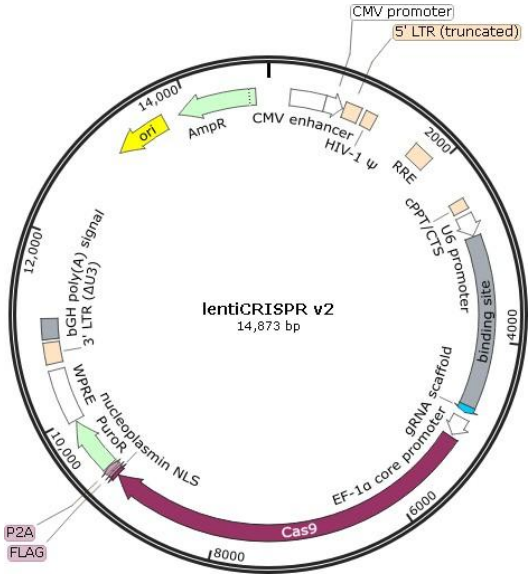


图 4-3. lentiCRISPR-v2 载体图谱

首先按照上述设计原则合成相应的 oligo，N 即为靶点序列信息（图 4-4）。

图 4-4. CHFR 基因敲除靶点序列设计

设计的 CHFR 基因敲除靶点 sgRNA 序列如下：

表 4-2. CHFR 基因敲除靶点 sgRNA 序列

靶点	名称	序列(5'-3')	碱基数
SgRNA-1	CHFR-sgRNA-F1	CACCGgaatcatgcgcaagaatcgg	25
	CHFR-sgRNA-R1	AAACccgattcttgcgcatgattcC	25
SgRNA-2	CHFR-sgRNA-F2	CACCGaatcccgatggagcggcccg	25
	CHFR-sgRNA-R2	AAACcgggccgctccatcgggattC	25
SgRNA-3	CHFR-sgRNA-F3	CACCGcgcacctcgtctccgcccga	25
	CHFR-sgRNA-R3	AAACtcgggcggagacgaggtgcgC	25
SgRNA-4	CHFR-sgRNA-F4	CACCGtggaccatcgggcggagacg	25
	CHFR-sgRNA-R4	AAACcgtctccgcccgatggtccaC	25
SgRNA-5	CHFR-sgRNA-F5	CACCGcgtgtggcctgcccgcaacc	25
	CHFR-sgRNA-R5	AAACggttgcgggcaggccacacgC	25
SgRNA-6	CHFR-sgRNA-F6	CACCGtccgcagatgtgaatcccga	25
	CHFR-sgRNA-R6	AAACtcgggattcacatctgcggaC	25
SgRNA-7	CHFR-sgRNA-F7	CACCGccttcctcgggccgctccat	25
	CHFR-sgRNA-R7	AAACatggagcggcccgaggaaggC	25
SgRNA-8	CHFR-sgRNA-F8	CACCGagtctccatgggcgtttccg	25
	CHFR-sgRNA-R8	AAACcggaaacgcccatggagactC	25

2.2.2 CHFR 稳定敲除载体的构建

（1)首先将合成的 Oligo 用去离子水稀释至终浓度为 20 μM(5 倍稀释即可)，然后按照下列体系（20 μL）混合：

Oligo-1（20 μM）	3 μL
Oligo-2（20 μM）	3 μL
去离子水	14 μL

（2）按照下列反应条件进行退火反应：

95℃ 10 min
90℃ 3 min
85℃ 3 min
80℃ 3 min
...
~每个循环减 5℃
...
25℃ +∞

（3）载体酶切和回收：吸取实验室储存的 Fubio-sgRNA-CRISPR/Cas9 质粒的菌液 100 μL，加入到含有氨苄抗性的 15 mL 液体 LB 培养基中，37℃恒温培养箱中摇晃培养 12-16 h，提取质粒、酶切，体系如下：

lentiCRISPR v2	3 μg
BsmB I（NEB，R0580S ）	1 μL
NEBuffer 3.1	2 μL
去离子水	补至 20 μL

55℃，1 h，将反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，回收目的载体片段（约 12Kb）。

（4）连接、转化：将酶切割后的 CRISPR 载体与退火后的产物进行连接，连接体系(20 μL)如下：

引物退火产物	8 μL
lentiCRISPR v2 酶切后的纯化产物	6 μL
5× T4 DNA Ligase buffer	4 μL
T4 DNA Ligase（invitrogen）	2 μL

25℃，1 h，反应结束后取 10 μL 转化 100 μL DH5α 感受态细胞，涂板（氨苄抗性），37℃恒温培养。次日挑取白色单克隆菌落，提取质粒并测序（参考第四章第二节），将测序结果正确的质粒的菌液与甘油 1:1 混匀后于-80℃冰箱储存。

2.2.3 CHFR 稳定敲除载体活性检测

（1）质粒转染：选择状态良好的 KYSE30 细胞，常规消化离心后以次日细

胞融合度可达 70-80%的标准铺种于 6 孔板中；次日转染前 1 h 将旧细胞培养基更换为 1 mL/孔双无培养基（无胎牛血清和青-链霉素），摇匀后放入 37℃ CO2 培养箱中。配制转染体系如下：

A 液：	Opti-MEMI	125 μL
	P3000	6 μL
	lentiCRISPR v2-CHFR/Vector 质粒	3 μg
B 液：	Opti-MEMI	125 μL
	Lipo 3000	9 μL

A、B 液轻柔混匀后静置 5 min，加入 6 孔板中后摇匀，6 h 后更换为完全培养基，次日观察细胞状态，若状态良好可重复感染，增加效率；

（2）Puro 筛选 CHFR 稳定敲除细胞株：待感染后的细胞生长状态良好时，加入 puro（终浓度为 2.5 μg/mL）进行筛选，每 24 h 更换一次培养液，同时重新加入相同浓度的嘌呤霉素，维持 3 天。然后将药物筛选之后的 KYSE30 细胞消化离心，提取基因组 DNA（具体步骤参照第二章第二节）；

（3）基因组 PCR 扩增：在靶位点的基因组序列上下游设计 PCR 扩增引物，产物长度控制在 300-500 bp 之间。另外设计活性检测引物时，要使上游引物和下游引物到靶位点的距离相差 100 bp 以上，目的是为了在后续实验中，T7E1 酶切时可在琼脂糖凝胶上观察到大小不同的两条带，有利于辨别该靶点是否有效。

针对 8 处靶点进行 PCR 引物设计，序列如下：

靶点	碱基序列(5'-3')
SgRNA-1、3、4	F_1：AGATGTGAATCCCGATGGAG
	R_1：TCGTTCCATTACAGTCAGAAAAG
SgRNA-5	F_2、R_1
SgRNA-2、6、8	F_2：AGCTGAGGGAGCCGCAATGT
	R_2：ACCTCGTCTCCGCCCGATG

PCR 反应体系（25 μL）如下：

2× Taq 酶	12.5 μL
去离子水	8.5 μL
上游引物（F）	1 μL
下游引物（R）	1 μL
模板基因组 DNA	2 μL

反应条件如下：

95℃ 5 min；

95℃ 30 s → 64℃ 30 s → 72℃ 40 s（3 cycles）；

95℃ 30 s → 61℃ 30 s → 72℃ 40 s（3 cycles）；

95℃ 30 s → 58℃ 30 s → 72℃ 40 s（3 cycles）；

95℃ 30 s → 55℃ 30 s → 72℃ 40 s（26 cycles）；

72℃ 5 min；

4℃ +∞

反应结束之后，将 25 μL 反应产物全部用于 2%琼脂糖凝胶电泳，在紫外灯照射下切取目的条带，进行胶回收；

（4）PCR 产物程序退火：

退火体系如下：

PCR 纯化产物	18 μL
NEB buffer 2	2 μL

退火程序如下：

95℃	10 min
90℃	3 min
85℃	3 min
80℃	3 min
...	
~每个循环减 5℃	
...	
25℃	+∞

（5）T7E1 酶活性检测：

退火体系如下：

PCR 程序退火产物	20 μL
T7E1（NEB. E3321）	1 μL

37℃酶切 1 h-1.5 h，2%-3%琼脂糖凝胶，DNA 电泳鉴定检测。如果同一泳道内除了主带还能切出两条带，则说明该靶点有效。

2.2.4 筛选稳定敲除 CHFR 细胞株

选择位于 CHFR 基因第二个外显子上游、下游的两个有效靶点 SgRNA-1、SgRNA-6 的敲除载体，分别与 PLP1、PLP2、VSVG 共同转染 293T 细胞，收集病毒上清，待 CHFR 正常表达的 KYSE30 细胞株状态良好时转染，转染前弃去细胞旧培养基，更换为 5 mL 含双抗的完全培养基,再加入 2.5 mL SgRNA-1 和 2.5 mL SgRNA-6 的病毒上清共同转染，增加敲除效率。接着使用嘌呤霉素进行药物筛选（2.5 μg/mL），铺板筛选 CHFR 稳定敲除单克隆即可。具体步骤参照第四章第二节。

2.3 CHFR 基因在食管癌中对 AURKA 蛋白的作用

将处于对数生长期，稳定表达或敲除 CHFR 的 KYSE150、KYSE510 和 KYSE30 细胞株及空载对照细胞株常规消化离心，铺种于细胞培养皿中，待细胞融合度达 80％左右，收取细胞总蛋白，通过 Western Blot 实验检测 AURKA 蛋白的表达水平。

2.4 CHFR 基因在食管癌中对 DNA 损伤修复蛋白的作用

将处于对数生长期，稳定表达或敲除 CHFR 的 KYSE150、KYSE510 和 KYSE30 细胞株及空载对照细胞株常规消化离心，根据食管癌细胞对多西他赛的 IC_{50} 值，应用不同剂量（0.5 nM，5 nM）多西他赛诱导，在不同时间点收取细胞总蛋白，通过 Western Blot 实验检测 HR 通路和 NHEJ 通路相关蛋白的表达水平。

2.5 CHFR 基因对 ATM 抑制剂 AZD0156 的敏感性实验

将对数生长期，状态良好的食管癌细胞消化、离心，进行细胞计数。按照所需细胞量（KYSE510 细胞 2500 个/孔，KYSE150 和 KYSE30 细胞 2000 个/孔），将细胞均匀铺种于 96 板内，每组设置 6 个重复孔。细胞过夜培养后，除去培养液，根据每个细胞对 ATM 抑制剂 AZD0156 的敏感度设置不同梯度的药物浓度。药物作用 48 h 后，终止其作用，向相应样品孔内加入 50 μL 1×MTT 工作液，将 96 孔板放入 37℃培养箱中孵育 4 h。反应完成后，完全去除孔内液体，每孔加入 150 μL DMSO，避光震荡溶解甲瓒结晶。将 96 孔板置入酶标仪中，检测 490 nm 下吸光值。采用 Graphpad Prism 软件作图，计算药物半数致死量（IC_{50} 值）。

3 实验结果

3.1 CHFR 稳转和敲除细胞系的构建

使用慢病毒包装技术感染 KYSE150 和 KYSE510 细胞株，利用 CRISPR/Cas9 敲除技术，构建 KYSE30 敲除细胞株，收取总蛋白后进行 Western Blot 验证，结果显示，稳定表达 CHFR 基因的 KYSE150 和 KYSE510 细胞株和敲除 CHFR 基因表达的 KYSE30 细胞株模型构建成功。

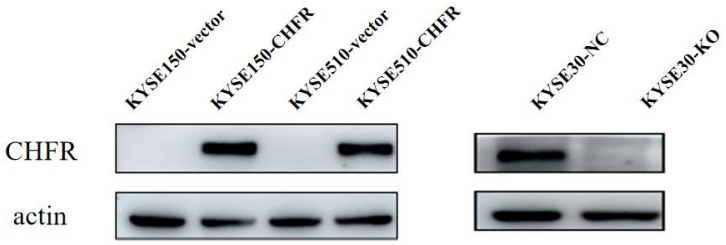


图 4-5. 构建 CHFR 稳定表达和稳定敲除细胞株

3.2 食管癌细胞中 CHFR 负调控 AURKA 的表达

研究发现，CHFR 缺陷小鼠中肿瘤发生率增加，染色体分离和胞质分裂缺陷，这些表型与在 AURKA 过表达的小鼠中观察到的表型非常相似，它们之间显著的相似性预示这两种蛋白之间存在着某种潜在的联系。事实证明，作为 E3 泛素连接酶，CHFR 可以直接靶向 AURKA 进行泛素化和降解[44]。CHFR 通过调节 AURKA 的表达水平来维持基因组稳定性，而 CHFR-AURKA 途径的破坏可促进肿瘤发生。为了研究 CHFR 在食管癌中发挥 DNA 损伤修复功能的作用机制，我们选择了 AURKA 蛋白作为研究 CHFR 下游通路的中间桥梁。我们检测了在食管癌细胞系中 CHFR 基因表达恢复及敲除前后 AURKA 蛋白的表达水平。结果发现，在 KYSE150 和 KYSE510 中恢复 CHFR 的表达之后，AURKA 的蛋白表达水平降低，而当 KYSE30 细胞敲除 CHFR 基因之后，AURKA 的表达水平升高。以上结果表明在食管癌细胞系中，CHFR 基因负调控 AURKA 蛋白的表达。

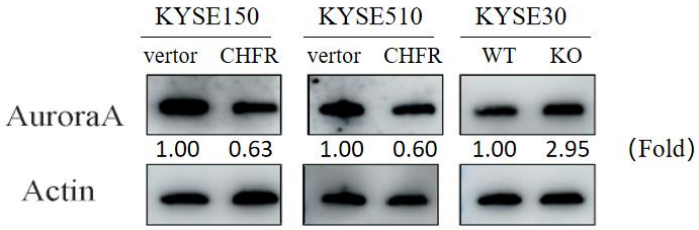
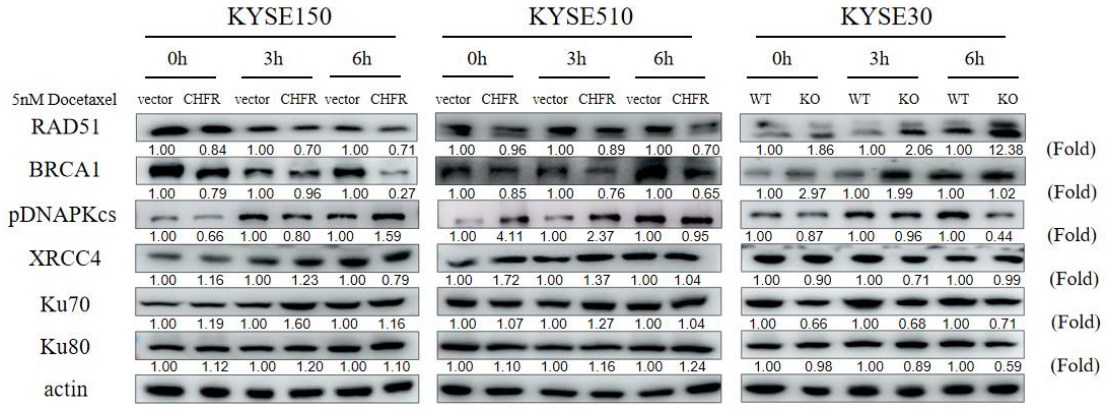
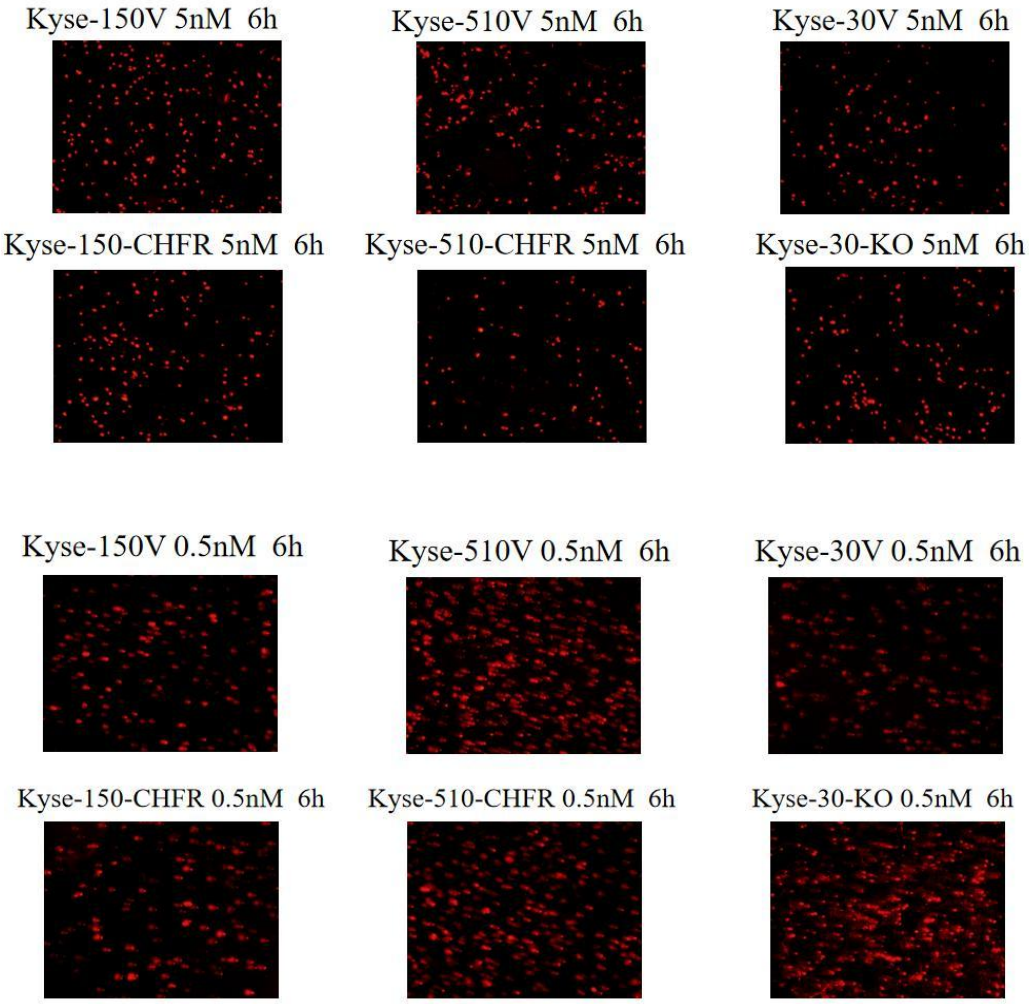


图 4-6. CHFR 对食管癌细胞中 AURKA 蛋白表达的影响

3.3 CHFR 在不同剂量多西他赛诱导下对 DNA 损伤修复通路的影响

当人类细胞 DNA 发生损伤时，会造成 SSB 甚至 DSB，此时，机体会通过 NHEJ 和 HR 通路进行 DNA 损伤的修复，修复途径中的缺陷会导致基因组不稳定并促进肿瘤发生。通过文献调研得知，AURKA 通过介导 HR 及 NHEJ 通路相关蛋白的表达，在 DNA 损伤修复中发挥重要作用。为了进一步探究 CHFR 在食管癌中参与的损伤修复通路，我们研究了 CHFR 在 HR 及 NHEJ 信号通路中的作用。根据设置梯度浓度多西他赛的筛药结果，我们选择 5 nM 作为大剂量短时间作用于食管癌细胞进行诱导，然后使用 Wersten Blot 技术检测 CHFR 基因恢复表达及敲除前后 KYSE150、KYSE510 和 KYSE30 细胞中 HR 和 NHEJ 信号通路的关键蛋白分子的表达水平。结果显示，在 KYSE150 和 KYSE510 细胞中当 CHFR 基因恢复表达后，BRCA1、RAD51 的表达降低，Ku70、Ku80、XRCC4 及 pDNAPKcs 表达升高；而在 KYSE30 细胞中，当 CHFR 基因敲除后，BRCA1、RAD51 的表达升高，Ku70、Ku80、XRCC4 及 pDNAPKcs 表达降低（图 4.7）。这些结果表明，在 5 nM 多西他赛诱导食管癌细胞的情况下，CHFR 基因通过降低 HR 通路相关蛋白 BRCA1、RAD51 的表达和增加 Ku70、Ku80、XRCC4 及 pDNAPKcs 的活性来影响细胞存活。值得注意的是，通过彗星实验发现，在 5 nM 多西他赛诱导的情况下细胞 DNA 并未发生损伤，说明此时发生的协同作用并不是在诱导 DNA 损伤下的协同。相反，在 0.5 nM 多西他赛诱导下，KYSE150 细胞 DNA 发生明显损伤，在此基础上，CHFR 基因激活了 HR 通路相关蛋白 BRCA1、RAD51 及 pATM 的表达，KYSE150 和 KYSE30 细胞株目前正在研究中。





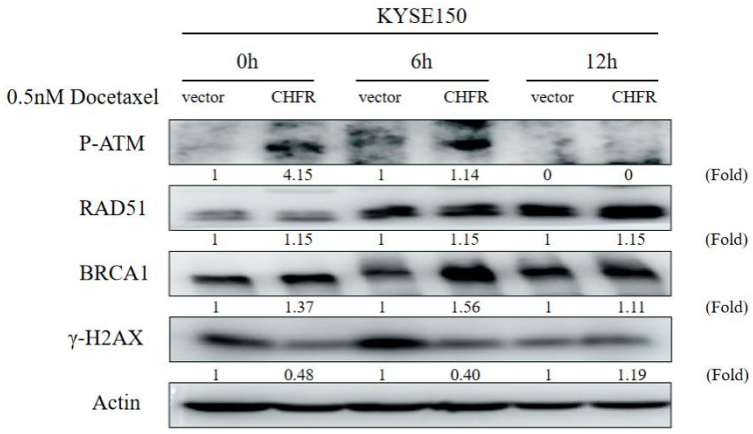


图 4-7. 彗星实验检测 DNA 损伤情况及 Western blot 检测 HR 及 NHEJ 信号通路的关键蛋白分子的表达水平

3.4 CHFR 恢复表达使食管癌细胞对 ATM 抑制剂 AZD0156 更敏感

DNA 双链断裂是一种致命的细胞损伤。为了应对这种 DNA 损伤，细胞进化出了几种重叠和互补的 DNA 修复途径。其中，HR 和 NHEJ 是双链损伤修复的两条互补路径。在上一节我们发现 CHFR 在 0.5 nM 多西他赛的诱导下可造成细胞 DNA 损伤，并激活 HR 修复通路。基于 ATMi 是 HR 修复通路的主要协调蛋白，因此我们通过 MTT 检测 CHFR 基因恢复表达及敲除前后对 AZD0156 敏感性的变化。CHFR 基因恢复表达后，在 KYSE150 和 KYSE510 的空载和过表达细胞中 AZD0156 的 IC_{50} 值分别是 8.56±0.49 μM vs. 2.84±0.52 μM 和 17.30±0.51 μM vs. 4.80±0.78 μM，当敲除 CHFR 的表达后，KYSE30 正常及敲除细胞中 AZD0156 的 IC_{50} 值分别为 2.33±0.47 μM vs. 42.78±0.11 μM。经分析 CHFR 基因敲除前后的 IC_{50} 均具有统计学意义(P<0.01)。以上结果表明，CHFR 的重新表达可以使食管癌细胞对 ATM 抑制剂 AZD0156 更加敏感（图 4.8）。

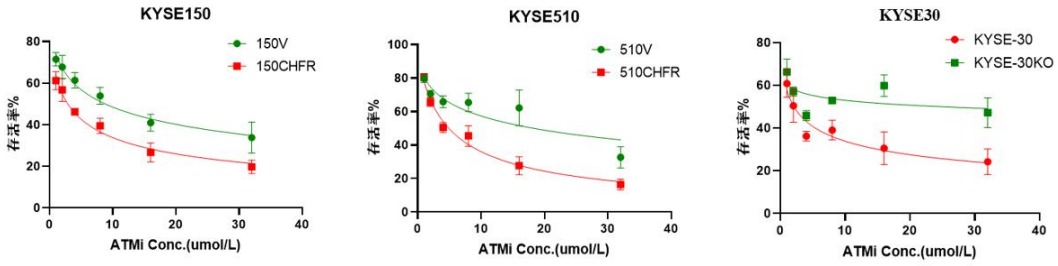


图 4-8. CHFR 基因对 ATMi(AZD0156)的敏感性

4 讨论

传统的肿瘤治疗方法仅针对肿瘤细胞的高增殖率，其选择性不足，为了提供更多选择性的肿瘤治疗方法，分子靶向的治疗方法成为了研究的热点。目前，用 PARP1 抑制剂治疗 BRCA1/2 缺陷肿瘤仍然是唯一基于协同致死相互作用的临床批准的肿瘤治疗方法。“BRCAness”的概念最初是指一些散发性肿瘤的表型与“家族性 BRCA”突变携带者相同，通过发现更多功能性的“BRCAness”生物标志物，而扩展其应用范围。通过对“BRCAness”模型生物学功能的学习和深度分析，我们发现任何 DNA 损伤修复的关键调控分子的缺陷均可能成为“协同致死”的标志物，如 ATM、ATR、BEND4 等。

DNA 发生损伤（SSB/DSB）后，机体的 DDR 信号网络可感知 DNA 损伤，

阻止细胞周期并激活 DNA 损伤修复途径，未能修复损伤或错误修复均可导致细胞死亡或大规模染色体改变，包括缺失，易位和染色体融合，这些都会增强基因组的不稳定性，促进肿瘤发生。对于 DSB，机体有两种不同的修复途径：NHEJ 和 HR。在 NHEJ 通路中，Ku70 和 Ku80 形成异二聚体后与游离 DNA 末端特异性结合，将 DNA-PKcs 招募到损伤位点，进而激活 XRCC4 介导的 DNA 断裂末端的重新连接，研究表明，DNA-PKcs 直接参与经典的 NHEJ，且可在整个细胞周期中发挥损伤修复作用。ATM 位于 HR 信号网络的核心，ATM 在许多 DDR 调节的细胞反应、细胞周期停滞、DNA 修复和细胞凋亡中发挥重要作用。有研究表明，ATM 缺陷细胞对 NHEJ 通路表现出强烈的倾向性，而且通过实验证明了 DNA-PKcs 抑制剂对体内 ATM 缺陷淋巴瘤是有效的，表明 DNA-PKcs 是治疗 ATM 缺陷型恶性肿瘤的药物靶标[65]，这为 ATM 缺陷肿瘤的治疗提供了一个治疗窗口。同时，DNA 损伤后，在 DNA 损伤位点发生蛋白质 PAR 化，这主要由 PARP1 催化，DNA 损伤部位的 PAR 化将 DDR 相关蛋白募集到 DNA 损伤中以实现其修复功能[66]。但同时也要避免在 DDR 过程中 PARP1 的持续激活所造成的基因组不稳定[67]。CHFR 依赖性泛素化对于抑制 DNA 损伤位点的 PARP1 的活性是非常重要的。CHFR 的缺失延长了 PARP1 在 DNA 损伤位点的保留，这可能诱导 DNA 损伤的积累并促进肿瘤发生。

CHFR 作为 E3 泛素连接酶靶向 AURKA 进行泛素化降解的作用已被报道[44]。研究表明，在卵巢癌细胞中使用小分子抑制剂 Alisertib 特异性抑制 AURKA 活性后，可以增加 DNA-PKcs 的活性刺激 NHEJ 修复途径，降低 HR 修复所必需的 PARP 和 BRCA1/2 的表达，而体外研究也显示出相同的结果。这些结果揭示了 AURKA 在 DNA 修复调控中的新的非有丝分裂功能[68]。而 CHFR 处于 AURKA 的上游，在体内外调节 AURKA 的表达，这可能为基于 CHFR 甲基化沉默为前提向肿瘤的靶向性治疗提供新的靶点。

“协同致死”效应是由于两个（多个）基因的遗传或表观遗传机制同时发生异常而诱导的细胞死亡。研究发现，大多数已知的“协同致死”相互作用是基于基因缺失表达而实现的，但其它因素如基因过表达、化合物的破坏和抑制作用以及环境因素都可能导致这种现象的发生[69, 70]。“协同致死”的概念推动了人类遗传学在新型癌症治疗策略中的发展[71, 72]。在大多数情况下，基于“协同致死”的肿瘤疗法以肿瘤特异性遗传背景为基础，将肿瘤细胞与正常细胞区分开来以产生特异性治疗效果。应用 PARPi 治疗 BRCA1/2 突变的乳腺癌是利用

“协同致死”效应治疗肿瘤最经典的例子[73]。缺乏 BRCA1 或 BRCA2 的肿瘤细胞依赖于其它 DNA 修复途径来应对增加的复制压力，这些途径包括 PARP1 介导的 SSB 修复和 NHEJ 修复通路。因此，BRCA1/2 缺陷细胞中 PARP1 的化学抑制可导致复制叉崩塌和随后的特异性细胞死亡[74, 75]。虽然现在“协同致死”的理念越来越成熟，但是通过影响 DNA 修复机制作为协同致死疗法的一部分是否会导致继发性肿瘤还需要进一步研究。某些肿瘤细胞的表型和功能异质性对于这些方法的广泛临床应用仍然是一个挑战。但不可否认的是，“协同致死”是一种有前景的治疗策略，可能使肿瘤治疗多样化。

多西他赛又名多西紫杉醇，属于紫杉类化合物，它作为细胞周期特异性药物，可通过加强微管聚合作用和抑制微管解聚作用，形成稳定的非功能性微管束，破坏细胞有丝分裂，干扰 DNA 的合成，这一点与铂类药物由于 DNA 形成链内和链间交联形成的 DNA 损伤机制不同。与紫杉醇相比，多西他赛与微管蛋白的结合亲和力更强。在以往的研究中经常以铂类和多西他赛联合使用治疗恶性肿瘤如胃癌、卵巢癌及肺腺癌。我们之前的研究发现，CHFR 基因甲基化状态与食管癌细胞对顺铂的敏感性没有显著差异，而应用紫杉醇或多西他赛后，CHFR 甲基化沉默的细胞更容易发生凋亡[61]。目前关于多西他赛诱导 DNA 损伤的机制的报道较少，通常情况下，肿瘤细胞的代谢水平会高于正常细胞，在此过程中伴随着活性氧的积累，活性氧的累积会对 DNA 产生有害影响，并引发后续的 DNA 损伤反应。基于肿瘤细胞的这个特点，紫杉醇及多西他赛等紫杉类化合物诱导的 DNA 损伤可能与其氧化应激产生的活性氧有关。

有研究表明，多西他赛在前列腺癌亲代细胞中可以诱导明显的 DNA 损伤[76]。但由于不同类型肿瘤细胞的遗传背景、生长状态及生长环境的不同，其对不同的药物以及相同药物不同剂量的敏感性也各不相同，所以针对性的选择药物剂量至关重要。本章研究发现，在食管癌细胞中 CHFR 基因在大剂量（5 nM）多西他赛诱导下通过降低 HR 通路相关蛋白 BRCA1、RAD51 的表达和增加 NHEJ 通路相关蛋白 Ku70、Ku80、XRCC4 及 pDNAPKcs 的活性来影响细胞存活。同时研究发现，大剂量多西他赛诱导并不会引起明显的 DNA 损伤，结合上述结果考虑，大剂量多西他赛可能通过其它途径引发了细胞死亡（如凋亡、铁死亡等），且这种作用不依赖于 DNA 损伤。而小剂量多西他赛（0.5 nM）可以诱导 DNA 损伤，并激活 HR 修复通路。同时我们探讨了 CHFR 基因表达恢复及敲除之后对 ATM 抑制剂敏感性的变化。结果表明，CHFR 恢复表达可以使食管癌细胞对

ATM 抑制剂更加敏感，这一结果也在侧面印证了 CHFR 基因在 DNA 损伤的前提条件下可以激活食管癌细胞中的 HR 信号通路。基于以上结果，CHFR 基因的甲基化状态与在小剂量多西他赛诱导产生 DNA 损伤及其修复通路之间的“协同致死”机制仍有待进一步探讨。

第五章 结论

（1）本课题明确了 CHFR 基因在食管癌中的表达受启动子区甲基化调控。

（2）本课题通过分析 CHFR 基因的甲基化与临床因素之间的相关性，发现 CHFR 甲基化与与性别、吸烟情况、饮酒情况和食管癌分化程度显著相关（$P < 0.05$），但未发现 CHFR 甲基化与患者生存时间有明显相关性（$P > 0.05$），CHFR 甲基化是食管癌治疗潜在的标志物。

（3）在食管癌细胞中，CHFR 基因在大剂量多西他赛（5 nM）诱导下通过降低 HR 通路相关蛋白 BRCA1、RAD51 的表达和增加 Ku70、Ku80、XRCC4 及 pDNAPKcs 的活性来刺激 NHEJ 通路进而影响细胞存活，且这种作用不依赖于 DNA 损伤。

（4）在食管癌细胞中，CHFR 基因在小剂量多西他赛（0.5 nM）诱导 DNA 损伤的前提下激活 HR 通路，且 CHFR 恢复表达后对 ATM 抑制剂敏感。CHFR 基因的甲基化状态与在小剂量多西他赛诱导产生 DNA 损伤及其修复通路之间的“协同致死”机制仍有待进一步探讨。

参考文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021 May;71(3):209-249.
2. Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma. N Engl J Med. 2014 Dec 25;371(26):2499-509.
3. Zhang L, Zhou Y, Cheng C, et al., Genomic analyses reveal mutational signatures and frequently altered genes in esophageal squamous cell carcinoma. Am J Hum Genet. 2015. 96(4): p. 597-611.
4. Uhlenhopp DJ, Then EO, Sunkara T, et al., Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors. Clin J Gastroenterol. 2020. 13(6): p. 1010-1021.
5. Chen T, Cheng H, Chen X, et al., Family history of esophageal cancer increases the risk of esophageal squamous cell carcinoma. Sci Rep. 2015. 5(1): p. 1-9.
6. Su Z, Zou GR, Mao YP, et al., Prognostic impact of family history of cancer in Southern Chinese patients with esophageal squamous cell cancer. J Cancer. 2019. 10(6): p. 1349.
7. Njei B, McCarty TR, Birk JW. Trends in esophageal cancer survival in united States adults from 1973 to 2009: a SEER database analysis. J Gastroenterol Hepatol. 2016. 31(6): p. 1141-1146.
8. Wang H, DeFina SM, Bajpai M, et al., DNA methylation markers in esophageal cancer: an emerging tool for cancer surveillance and treatment. Am J Cancer Res. 2021. 11(11): p. 5644.
9. Wang K, Johnson A, Ali SM, et al., Comprehensive genomic profiling of advanced esophageal squamous cell carcinomas and esophageal adenocarcinomas reveals similarities and differences. Oncologist. 2015. 20(10): p. 1132-1139.
10. Huang FL, Yu SJ. Yu, Esophageal cancer: risk factors, genetic association, and treatment. Asian J Surg. 2018. 41(3): p. 210-215.
11. Buas MF, He Q, Johnson LG, et al., Germline variation in inflammation-related pathways and risk of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. Gut. 2017. 66(10): p. 1739-1747.
12. Yang YM, Hong P, Xu WW, et al., Advances in targeted therapy for esophageal cancer. Signal Transduct Target Ther. 2020. 5(1): p. 1-11.
13. Mahmood MQ, Shukla SD, Dua K, et al., The role of epidermal growth factor receptor in the management of gastrointestinal carcinomas: present status and future perspectives. Curr Pharm Des. 2017. 23(16): p. 2314-2320.
14. Wild CP, Hardie LJ. Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions. Nat Rev Cancer. 2003. 3(9): p. 676-684.

15. Almhanna K, Rosa M, Henderson-Jackson E, et al., Her-2 expression in gastroesophageal intestinal metaplasia, dysplasia, and adenocarcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2016. 24(9): p. 633.
16. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004. 25(4): p. 581-611.
17. Xu YP, Lin G, Sun XJ, et al., C-Met as a molecular marker for esophageal squamous cell carcinoma and its association with clinical outcome. J Cancer. 2016. 7(5): p. 587.
18. Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, et al., Phosphorylated mTOR expression is associated with poor prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 2010. 17(9): p. 2486-2493.
19. Wang SQ, Wang X, Zheng K, et al., Simultaneous targeting PI3K and PERK pathways promotes cell death and improves the clinical prognosis in esophageal squamous carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 2017. 493(1): p. 534-541.
20. Tanaka T, Nakamura J, Noshiro H. Promising immunotherapies for esophageal cancer. Expert Opin Biol Ther. 2017. 17(6): p. 723-733.
21. Zhang Y, Zhang Y, Zhang L. Expression of cancer–testis antigens in esophageal cancer and their progress in immunotherapy. J Cancer Res Clin Oncol. 2019. 145(2): p. 281-291.
22. Tubbs A, Nussenzweig A. Nussenzweig, Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. Cell. 2017. 168(4): p. 644-656.
23. Khanna A. DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse? Cancer Res. 2015. 75(11): p. 2133-2138.
24. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al., Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature. 2005. 434(7035): p. 907-913.
25. Vafa O, Wade M, Kern S, et al., c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. Mol Cell. 2002. 9(5): p. 1031-1044.
26. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, et al., Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. 107(19): p. 8788-8793.
27. Verheij M. Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. Cancer Metastasis Rev. 2008. 27(3): p. 471-480.
28. Pilié PG, Tang C, Mills GB, et al., State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2019. 16(2): p. 81-104.
29. Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. Nat Med. 2011. 17(3): p. 330-339.
30. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, et al., An operational definition of epigenetics. Genes Dev. 2009. 23(7): p. 781-783.

31. Roberti A, Valdes AF, Torrecillas R, et al., Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. Clin Epigenetics. 2019. 11(1): p. 1-18.
32. Rehman Au, Saikia S, Iqbal MA, et al., Decreased expression of MGMT in correlation with aberrant DNA methylation in esophageal cancer patients from North India. Tumour Biol. 2017. 39(6): p. 1010428317705770.
33. Li J, Ye D, Wang L, et al., Role of MLH1 methylation in esophageal cancer carcinogenesis and its clinical significance. Onco Targets Ther. 2018. 11: p. 651.
34. Du W, Gao A, Herman JG, et al., Methylation of NRN1 is a novel synthetic lethal marker of PI3K-Akt-mTOR and ATR inhibitors in esophageal cancer. Cancer Sci. 2021. 112(7): p. 2870.
35. Duan H, Ding X, Luo H. et al., KISS-1, Mediated by Promoter Methylation, Suppresses Esophageal Squamous Cell Carcinoma Metastasis via MMP2/9/MAPK Axis. Dig Dis Sci. 2022: p. 1-17.
36. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al., Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature. 2005. 434(7035): p. 917-921.
37. Cheng B, Pan W, Xing Y, et al., Recent advances in DDR (DNA damage response) inhibitors for cancer therapy. Eur J Med Chem. 2022: p. 114109.
38. Niederkorn M, Agarwal P, Starczynowski DT. TIFA and TIFAB: FHA-domain proteins involved in inflammation, hematopoiesis, and disease. Exp Hematol. 2020. 90: p. 18-29.
39. Bothos J, Summers MK, Venere M, et al., The Chfr mitotic checkpoint protein functions with ubc13-Mms2 to form Lys63-linked polyubiquitin chains. Oncogene. 2003. 22(46): p. 7101-7107.
40. Privette LM, Weier JF, Nguyen HN, et al., Loss of CHFR in human mammary epithelial cells causes genomic instability by disrupting the mitotic spindle assembly checkpoint. Neoplasia. 2008. 10(7): p. 643-652.
41. Vader G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. Biochim Biophys Acta. 2008. 1786(1): p. 60-72.
42. Scolnick DM, Halazonetis TD. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. Nature. 2000. 406(6794): p. 430-435.
43. Summers MK, Bothos J, Halazonetis TD. The CHFR mitotic checkpoint protein delays cell cycle progression by excluding Cyclin B1 from the nucleus. Oncogene. 2005. 24(16): p. 2589-2598.
44. Yu X, Minter-Dykhouse K, Malureanu L, et al., Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. Nat Genet. 2005. 37(4): p. 401-406.
45. Kang D, Chen J, Wong J, et al., The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. J Cell Biol. 2002. 156(2): p. 249-260.
46. Shinde SR, Gangula NR, Kavela S, et al., TOPK and PTEN participate in CHFR mediated mitotic checkpoint. Cell Signal. 2013. 25(12): p. 2511-2517.

47. Maddika S, Sy SM, Chen J. Functional interaction between Chfr and Kif22 controls genomic stability. J Biol Chem. 2009. 284(19): p. 12998-13003.
48. Wu J, Chen Y, Lu LY, et al., Chfr and RNF8 synergistically regulate ATM activation. Nat Struct Mol Biol. 2011. 18(7): p. 761-768.
49. Liu C, Wu J, Paudyal SC, et al., CHFR is important for the first wave of ubiquitination at DNA damage sites. Nucleic Acids Res. 2013. 41(3): p. 1698-1710.
50. Kashima L, Idogawa M, Mita H, et al., CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation. J Biol Chem. 2012. 287(16): p. 12975-12984.
51. Kanamori S, Kajihara I, Kanazawa-Yamada S, et al., Expression of aurora kinase A expression in dermatofibrosarcoma protuberans. J Dermatol. 2018. 45(4): p. 507-508.
52. Lykkesfeldt AE, Iversen BR, Jensen MB, et al., Aurora kinase A as a possible marker for endocrine resistance in early estrogen receptor positive breast cancer. Acta Oncol. 2018. 57(1): p. 67-73.
53. Guo M, Lu S, Huang H, et al., Increased AURKA promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in bladder cancer. BMC Syst Biol. 2018. 12(7): p. 11-17.
54. Shaikh MH, Idris A, Johnson NW, et al., Aurora kinases are a novel therapeutic target for HPV-positive head and neck cancers. Oral Oncol. 2018. 86: p. 105-112.
55. Goos JA, Coupe VM, Diosdado B, et al., Aurora kinase A (AURKA) expression in colorectal cancer liver metastasis is associated with poor prognosis. Br J Cancer. 2013. 109(9): p. 2445-2452.
56. Zhong N, Shi S, Wang H, et al., Silencing AURKA with siRNA inhibits cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. Int J Oncol. 2016. 49(3): p. 1028-1038.
57. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, et al., Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. Oncogene. 2004. 23(54): p. 8841-8846.
58. Shao C, Sun W, Tan M, et al., Integrated, genome-wide screening for hypomethylated oncogenes in salivary gland adenoid cystic carcinoma. Clin Cancer Res. 2011. 17(13): p. 4320-4330.
59. Biswas S, Rao CM. Epigenetics in cancer: fundamentals and beyond. Pharmacol Ther. 2017. 173: p. 118-134.
60. Derks S, Cleven AH, Melotte V, et al., Emerging evidence for CHFR as a cancer biomarker: from tumor biology to precision medicine. Cancer Metastasis Rev. 2014. 33(1): p. 161-171.
61. Yun T, Liu Y, Gao D, et al., Methylation of CHFR sensitizes esophageal squamous cell cancer to docetaxel and paclitaxel. Genes Cancer. 2015. 6(1-2): p. 38.
62. Takeshita M, Koga T, Takayama K, et al., CHFR expression is preferentially impaired in smoking-related squamous cell carcinoma of the lung, and the diminished expression significantly harms outcomes. Int J Cancer. 2008 Oct 1;123(7):1623-30.

63. Koga T, Takeshita M, Yano T, et al., CHFR hypermethylation and EGFR mutation are mutually exclusive and exhibit contrastive clinical backgrounds and outcomes in non-small cell lung cancer. Int J Cancer. 2011. 128(5): p. 1009-1017.
64. Tanaka M, Chang P, Li Y, et al., Association of CHFR promoter methylation with disease recurrence in locally advanced colon cancer. Clin Cancer Res. 2011. 17(13): p. 4531-4540.
65. Riabinska A, Daheim M, Herter-Sprie GS, et al., Therapeutic targeting of a robust non-oncogene addiction to PRKDC in ATM-defective tumors. Sci Transl Med. 2013. 5(189): p. 189ra78-189ra78.
66. Monaco L, Kolthur-Seetharam u, Loury R, et al., Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly (ADP-ribosyl) ation in response to DNA damage. Proc Natl Acad Sci USA. 2005. 102(40): p. 14244-14248.
67. Herceg Z, Wang ZQ. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. Mutat Res. 2001. 477(1-2): p. 97-110.
68. Do TV, Hirst J, Hyter S, et al., Aurora A kinase regulates non-homologous end-joining and poly(ADP-ribose) polymerase function in ovarian carcinoma cells. Oncotarget. 2017 ;8(31):50376-50392.
69. Nijman SM. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. FEBS Lett. 2011. 585(1): p. 1-6.
70. O'Neil N J, Bailey M L, Hieter P. Synthetic lethality and cancer. Nat Rev Genet. 2017. 18(10): p. 613-623.
71. Brown J S, O'Carrigan B, Jackson S P, et al., Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors. Cancer Discov. 2017. 7(1): p. 20-37.
72. Muller F L, Aquilanti E A, DePinho R A. DePinho, Collateral lethality: a new therapeutic strategy in oncology. Trends Cancer. 2015. 1(3): p. 161-173.
73. Lord C J, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. Science. 2017. 355(6330): p. 1152-1158.
74. Helleday T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. Mol Oncol. 2011. 5(4): p. 387-393.
75. Pommier Y, O'Connor M J, De Bono J. et al., Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. Sci Transl Med. 2016. 8(362): p. 362ps17-362ps17.
76. Chao OS, Goodman OB Jr. DNA-PKc inhibition overcomes taxane resistance by promoting taxane-induced DNA damage in prostate cancer cells. Prostate. 2021 Oct;81(14):1032-1048.

文献综述

基于表观遗传学异常的“协同致死”治疗新策略

1.1 介绍

生物体的细胞经常受到各种内源性和外源性因素造成的 DNA 损伤。代谢副产物，例如来自线粒体呼吸链的活性氧（ROS），是 DNA 损伤最常见的内部来源。氧自由基可导致碱基损伤和 DNA 断裂，这是正常细胞代谢的结果。DNA 外源性损伤主要包括紫外线(UV)、电离辐射(IR)和遗传毒性药物(如化疗药物)。为了维持基因组的稳定性，细胞必须进化出一个“分子工具箱”来适当地修复损伤。这个“工具箱”被称为 DNA 损伤响应/修复(DNA damage response/repair,DDR)，DDR 系统是一个由多种感知、信号转导和执行系统组成的复杂信号网络。因为人类的大多数致癌改变(突变、易位、扩增、缺失和表观遗传修饰)都是由于受损 DNA 的无效修复引起的，所以 DNA 损伤和相关的修复机制在癌症发生中起着至关重要的作用[1]。人类有多种类型的 DNA 损伤以及不同但相互关联的 DDR 机制，包括直接修复，碱基切除修复，核苷酸切除修复，错配修复，链内交联，同源重组修复及非同源末端连接[2]。在所有 DNA 损伤中，DNA 的 SSB 是最常见的(大约 $1x10^4$ 个/天)，它们主要是由内源性活性氧造成的遗传毒性作用的结果[3]。SSB 主要由 BER 修复，BER 是一种非常强大的修复机制，大部分 DNA 的微小异常改变例如氧化损伤、烷基化修饰及单链断裂，都可以通过碱基切除修复途径来修复，以保护细胞免受内源性和外源性刺激的伤害。然而在这种损伤得不到修复的情况下，SSB 可能会导致 DNA 复制叉坍塌，进而导致 DNA 的双链断裂，这对于细胞是致命的伤害。对于 DSBs 损伤，主要有 NHEJ 和 HR 两种修复方式。NHEJ 是一种存在于整个细胞周期中的有效的修复方法，在 G1 期和 S 期发挥重要作用。它不依赖同源 DNA 序列，而是通过 DNA 连接酶直接连接 DSB 末端。尽管这种修复方法快速有效，但可能会导致一些碱基或序列的插入和删除。HR 是一个复杂而精确的修复过程。它需要未受损姐妹染色单体的同源序列作为修复模板，主要作用于细胞周期的 S 期和 G2 期[4, 5]。

细胞对 DNA 损伤的反应是癌症生物学中最重要的领域之一[6]。早在 1914 年，德国科学家西奥多·博弗里(Theodor Boveri)就发表了他关于恶性肿瘤起源

的研究成果，提出“特殊和异常的染色体构成”可能是肿瘤发生的原因。整个世纪以来，不断涌现大量的数据来支持基因组不稳定在肿瘤中的作用，包括染色体数量和结构以及 DNA 组成的改变[7, 8]。首先，细胞 DNA 受损会导致肿瘤。许多人类肿瘤易感综合征是由 DDR 相关基因的突变引起的。其次，我们可以利用 DNA 损伤治疗肿瘤。目前，用来治疗恶性肿瘤的大多数治疗方法都是针对 DNA 损伤进行干预，包括放射治疗和许多化疗药物。因此，从肿瘤治疗的角度来看，DNA 损伤是肿瘤的一把双刃剑，它可以导致细胞基因组的不稳定，加剧染色体异常的累积促进肿瘤的发生发展；另一方面，我们可以利用肿瘤细胞 DDR 缺陷这一特点，使用放化疗药物进行干预以达到靶向杀伤肿瘤细胞的效果。

DDR 缺陷可导致基因组不稳定性增加，这是致癌转化的一种关键机制，过度的基因组不稳定本身可以通过诱导致命的突变、有丝分裂灾难而产生致命的后果。之前的研究首先集中于识别独特的致癌基因或通路上，这些基因编码的蛋白或参与的通路可以作为治疗恶性肿瘤的靶点。第一代药物如顺铂，可以非特异性地破坏 DNA，虽然其靶向性不强，造成副作用较大，但仍是大多数抗癌治疗方案的首选。随着大规模基因组研究的发展，确定单个 DDR 途径在肿瘤中的突变状态得到了更好的诠释。根据肿瘤修复途径的缺失来合理选择 DNA 损伤剂，从而使现有的 DNA 损伤剂能够以“选择者”的方式使用。与 DDR 通路在预防肿瘤发生中的关键作用一致，它们的失活可能导致许多肿瘤易感性(例如，BRCA1/2 突变在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和胰腺癌的早期发病中)。肿瘤细胞通常至少有一个 DDR 途径存在缺陷，相当大比例的肿瘤(尤其是乳腺癌和卵巢癌)表现出 DDR 基因的缺陷[9, 10]。

1946 年，Dobzhansky 根据黑腹果蝇研究中观察到的现象首次提出了“协同致死效应”的概念，即如果一个基因发生突变，黑腹果蝇可以正常存活，但如果两个基因同时发生突变，可能会带来致命的后果[11]。以往研究表明，DNA 损伤修复通路的选择性丢失在肿瘤中是一种早期和频繁的事件，约 40%到 50%的肿瘤中都存在 DDR 的缺失。基于肿瘤本身的 DDR 缺陷，它更依赖于其它的 DNA 损伤修复途径，这就赋予肿瘤细胞一个明显的治疗靶点，也是“协同致死”治疗的基础，即在肿瘤细胞 DDR 缺陷的前提下，抑制损伤修复通路的补偿途径将特异性地杀死恶性肿瘤细胞，而对正常细胞几乎没有影响，从而达到靶向治疗效果[12]。应用 PARPi 治疗 BRCA1/2 突变的乳腺癌是利用“协同致死”效应治疗肿瘤最经典的例子。随着 RNAi 和 CRISPR 基因编辑技术的快速发展，大规模筛

选单个基因缺失对肿瘤细胞存活的影响成为可能，从而有可能发现更多的协同致死靶点[13]。

1942 年，康拉德·沃丁顿(Conrad Waddington)提出了“表观遗传学”(Epigenetics)一词，用来描述不改变基因型的表型遗传变化。目前，表观遗传学的定义已经变得更加全面，但它通常指的是“不涉及 DNA 序列变化的，由染色体变化产生的稳定的可遗传表型”[14]。表观遗传学研究主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA。DNA 甲基化是一种最常见的表观遗传学修饰，正常基因甲基化在胚胎发育、细胞分化以及基因组稳定性等多方面发挥功能，而抑癌基因启动子区域 DNA 甲基化异常与与肿瘤的发生发展密切相关。本文聚焦基于表观遗传异常和“协同致死”效应在肿瘤中的应用进行综述。

1.2 DDR 系统在肿瘤发生发展中的作用和 DDR 抑制剂的进展

细胞在 DNA 严重损伤后的命运在很大程度上取决于 DNA 损伤的程度及其修复能力，不同细胞类型的 DNA 修复能力不同，一些肿瘤细胞在复制和遗传毒性应激条件下表现出较强的 DNA 修复能力[15]。肿瘤细胞本身具有的 DDR 缺陷使得它们更容易受到特定 DDR 抑制的影响，我们可以利用肿瘤细胞这一特性将癌细胞与具有完善 DDR 系统的正常细胞区分开来[16, 17]。随着肿瘤生物学的进步，DDR 成为潜在的治疗靶点，也研究出了一系列针对 DDR 组分的抑制剂。

当细胞 DNA 发生损伤时，ATM 和/或 ATR 可以激活 DDR 通路，以确保细胞存活或凋亡。ATM 通过 MRN 复合物(Mre11-Rad50-NBS1)对 DNA DSB 做出反应，进而产生 γ -H2AX 信号，磷酸化并激活 Chk2，导致 S 期和 G1-S 检查点的激活；ATR 在被复制蛋白 A(Replication Protein A，RPA)包被的单链 DNA 激活后，ATR 相互作用蛋白(ATIP)直接与 RPA 结合，导致 ATR 定位于 DNA 损伤位点，ATR-CHK1 信号级联导致细胞周期停滞在 G2-M 期[18]，从而为 DNA 损伤修复提供时间。ATM 和 ATR 信号之间有多个级别的串扰，它们协同维持细胞活性和基因组稳定性[19, 20]。ATM/ATR 抑制剂可以干扰 DNA 损伤反应，导致快速增殖的肿瘤细胞 DNA 损伤修复障碍，最终导致肿瘤细胞死亡。因为正常细胞具有额外的 DDR 成分（例如 MMR、NER 等），故单独阻断 ATM/ATR 对正常细胞的影响有限。因此，抑制 ATM/ATR 可能是靶向肿瘤治疗的有效策略，许多小分子 ATM/ATR 抑制剂已被发现并正在进行临床前研究。第一个选择性 ATM 抑制剂(Ku-55933)是通过筛选 PIKK 家族（phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase

family）靶向化合物文库而开发的，它对 ATM 的选择性是 ATR、DNA-PK 和 PI3K 的 100 倍[21, 22]。Ku-55933 通过阻断 HR 修复信号从而增加γ-H2AX 和 RAD51 的聚集，使细胞对引起 DSB 的细胞毒性剂敏感[23]。Ku-60019 是 Ku-55933 的类似物，具有更好的药代动力学和生物利用度，Ku-60019 和顺铂联合会诱导 PTEN 缺陷细胞的合成杀伤力，Ku-59403 是第一个在临床前试验中测试的血管紧张素转换酶抑制剂，可以增强化疗和低剂量 IR 的疗效[24, 25]。最早抑制 ATR 的化学物质是天然分子咖啡因和五味子乙素 B，但它们的抑制作用是非特异性的，而且只能在高浓度下起作用[26, 27]。目前 ATR 抑制剂 VE-821（后来被命名为 VE-822）正在进行临床研究[28]，同时在针对其他靶点开发抑制剂的研究中发现了一些 ATR 抑制剂，Nu6027 最初被选择用于 CDK2 抑制，后来被发现可以抑制 HR，从而使细胞对 DNA 损伤剂和 PARPi 敏感[29]。新一代 ATR 抑制剂包括 AZD6738，它是化合物 AZ20 的衍生物，目前正在进行临床研究[8]。

如上所述，CHK1 通过磷酸化招募一系列调节蛋白，积极参与 ATM 和 ATR 介导的 DNA 损伤反应，还能通过磷酸化细胞分裂周期因子 25A（CDC25A）激活 S 期检查点，导致 CDC25A 的降解和 S 期细胞周期蛋白依赖性激酶 2(CDK2)活性的降低[30, 31]，CHK1 还磷酸化 Thr-309 上的 RAD51，促进其在 HR-309 上与 BRCA2 的相互作用[8, 32]。值得注意的是，CHK1 还作用于一些对细胞生存至关重要的生理过程。例如，CHK1 的抑制导致 p53 诱导的死亡结构域(p53-induced death domain，PIDD)信号和相关的 caspase 2 介导的细胞死亡[33]。最近有研究表明，CHK1 磷酸化核磷蛋白(NPM)，一种参与多种细胞功能的伴侣蛋白，包括破坏其与 PIDD 的相互作用，从而保护细胞免受 caspase 2 介导的细胞死亡[34]。第一代 CHK1 抑制剂被用作化学增敏剂，由于它们与血浆蛋白 1-酸性糖蛋白的高亲和力，大多数是非特异性的，半衰期长，生物利用度低[35]。早期的 CHK1 抑制剂大多数与 DNA 损伤剂联合使用用于治疗肿瘤[36, 37]，第二代 CHK1 抑制剂显著提高了其选择性，这些 CHK1 靶向药物与产生 DNA 损伤的药物有很强的协同作用。最近，临床试验(NCT02797977，NCT02797964)报道了一种新的 CHK1 抑制剂 SRA737 与小剂量吉西他滨联合使用得到了显著的效果，另外 SRA737 还显示了与 PARPi 的协同作用[38]。

为了应对 DNA 损伤，激活的 ATR 使 CHK1 磷酸化，CHK1 反过来磷酸化 Wee1 和 cdc25[39, 40]。与 cdc25 活性的磷酸化抑制不同，Wee1 被激活，然后在 Tyr15 和 thr14 位点磷酸化，以抑制 CDK1 其活性，导致 G2/M 期阻滞，为 DNA 损伤

修复留出时间。此外，Wee1 还通过 CDK1 Tyr15 位点的磷酸化阻止了 DNA 复制完成之前从 S 期到 G2 期的进展[41]。另外据报道，WEE1 磷酸化了 Tyr37 位点上的组蛋白 H_2B，从而阻止了某些组蛋白基因的转录，减轻了组蛋白 mRNA 翻转机制的压力。G1/S 和 G2/M 检查点受 p53 基因调控，p53 基因在肿瘤细胞中经常缺失。在这种情况下，肿瘤细胞变得高度依赖 WEE1 介导的 G2/M 检查点控制来进行 DNA 修复[42, 43]。一些肿瘤经常伴有 WEE1 的过度表达，这降低了它们对放化疗的敏感性[44, 45]。此外，化疗耐药卵巢癌的全基因组特征表明，抑制 WEE1 在多个肿瘤相关途径中的表达是可行的[46, 47]。目前，大多数临床研究都集中在 WEE1 抑制与化疗药物的联合使用上。第一种选择性 WEE1 抑制剂 adavosertib(AZD1775)是通过筛选小分子化合物文库获得的，AZD1775 即使作为单一疗法也显示出强大的抗肿瘤活性[48, 49]，但 AZD1775 经常会引起一些不良反应。由于 WEE1 在正常细胞的一些生理过程中是必需的，不良反应事件通常会影响经历频繁分裂的细胞，如造血系统和肠上皮细胞[50]。为此，AZD1775,290 的剂量和治疗方案正在优化，其类似物也正在开发中[51]。另一项研究尝试是为 AZD1775 寻找更多的生物标志物，以减少非靶标效应。AZD1775 能够诱导 Fanconi 贫血或 HR 途径缺陷细胞的合成致死性[49, 52]，提示 AZD1775 的疗效可以通过进一步抑制其它 DDR 途径来增强。

DNA 依赖的蛋白激酶最初是在 1985 年偶然发现的，随后 DNA 依赖的蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)被鉴定出来。DNA-PKcs 由 PRKDC/XRCC7 基因编码且在人类细胞中表达丰富，是 PIKK 家族中最大的成员(在人类每个细胞中有 5×104~1×105 个分子)[8, 53]。DNA-PKcs 与参与 DDR、ATM 和 ATR 的另外两个 PIKK 家族成员具有相似的结构域，例如激酶结构域和保守的 FRAP-ATM-TRRAP(FAT)结构域。DNA-PK 在 NHEJ 修复途径中发挥关键作用。从机制上讲，Ku 复合体(Ku70 和 Ku80)首先激活 NHEJ 通路。随后，DNA-PKcs 与 DSB 结合，启动 DNA 修复，招募其它的 NHEJ 核心蛋白(例如 DNA 连接酶 IV、XRCC4、PAXX 和 XLF)来完成 DNA 修复过程[54]。最近的研究表明，DNA-PK 在各种肿瘤类型中都观察到其表达的上调，包括胃肠道癌[55]、肺癌和肝细胞癌[56]，并且与较高的肿瘤分级和较差的预后相关[57]。此外，在黑色素瘤中，DNA-PKcs 表达增加与肿瘤微环境有利于转移的进展表型有关[58]。DNA-PKcs 上调可促进甲状腺[59]、鼻咽癌[60]、宫颈癌[61]和白血病对放疗和化疗的耐药性[62]。长期以来，NHEJ 通路中关键分子的缺失一直被认为是肿瘤进展和对 DSB 诱导剂敏感性增

加的标志[63, 64]。如上所述，DNA-PK 在肿瘤中表达的上调促进了 DNA 损伤的修复，阻止了肿瘤细胞的死亡，而 DNA-PK 抑制剂可消除 DNA-PKcs 的活性，抑制其 DNA 修复功能，与此同时，DNA-PK 抑制剂与放化疗药物联合使用，可以在克服肿瘤细胞耐药方面发挥协同作用，从而达到更好的治疗效果。因此，DNA-PK 被认为是一种适合抗癌治疗的药物靶点[65, 66]。第一个报道的 DNA-PK 抑制化合物是咖啡因，它在体外对 ATM 和 ATR 具有激酶活性，后来证明对 DNA-PK 有抑制作用[67]。这些早期 DNA-PK 抑制剂的进一步应用由于选择性差和复杂的结构而受到限制，比如 wortmannin（沃特曼宁）[27]和 vanillin（香草素）[68]。随着先导化合物 LY294002 的出现，后来开发了更具体和更有效的衍生化合物，例如 Nu7441 无论在体内外都能抑制放化疗诱导的 DSB 的修复[69, 70]，Nu7427[71]和 Nu7026[72]可增强 IR 和拓扑异构酶 II 抑制剂化疗的治疗效果[73]。新一代 DNA-PK 选择性抑制剂 VX-984[74]、M3814[75]通过抑制放化疗诱导的 NHEJ 修复，从而阻止 DSB 修复，进而增强对多种肿瘤的治疗效率。CC-115 作为一种新型的 mTOR 和 DNA-PK 双重抑制剂，用正在进行一项针对恶性血液病和晚期实体肿瘤患者的 I 期研究[76, 77]。

多聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)超家族成员参与多种生物学过程，在 MMR、SSBR 和 DSBR 中发挥重要作用。PARP1 是研究最多且公认的 DNA 损伤感受器，它作为信号转导分子，与 DNA 断裂位点结合，然后在 DNA 断裂位点附近的靶蛋白上合成聚腺苷二磷酸核糖(PAR)链(PAR 化)以及自身的 PAR 化(自动 PAR 化)。这些 PAR 链导致额外的 DNA 修复效应器的招募，从而完成 DNA 修复过程[78]。当 PARP1 通过锌指结构域与 DNA 结合时，PARP1 蛋白的构象变化解除了螺旋域（HD）和催化域之间的自抑制相互作用，允许 PARP1 辅助因子烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β-NAD+)与酶的活性位点结合。然后，PARP1 利用β-NAD+的水解来催化 ADP-核糖部分转移到靶蛋白上。DNA 断裂附近蛋白质的这种 PAR 化可能通过改变染色质结构(例如通过组蛋白-PAR 化)和通过定位 DNA 修复效应器(例如 XRCC1)来介导 DNA 修复。PARP1 的自动 PAR 化最终导致其自身从 DNA 损伤部位释放出来[79]。2005 年，两项开创性的研究表明，缺乏 BRCA1/2 的肿瘤细胞对 DNA 修复酶 PARP 家族的小分子抑制剂选择性敏感[80, 81]，BRCA1/2 是参与 HR 修复的关键肿瘤抑制蛋白，PARP1 是 PARPi 的主要靶点，主要参与 SSB 的修复。如果正常情况下抑制肿瘤细胞中 PARP1 蛋白的活性，则会导致 DNA 单链断裂片段的累积。然而，肿瘤细胞中的另一套修复系统，即 BRCA1/2 介导的

HR 通路，可以代偿性的增加 DNA 损伤修复功能，因此对于正常细胞来说，单独抑制 PARP1 的活性并不致命。相反，在缺乏 BRCA1/2 从而导致 HR 缺陷的情况下，PARPi 引起的 DNA 损伤无法修复，从而导致细胞死亡，在此基础上抑制 PARP 的活性可以产生更好的靶向杀伤肿瘤细胞的效果[82, 83]。后来的研究表明，其他肿瘤抑制基因的缺失(其中许多与 HR 有关)也会导致 PARPi 的增敏[84, 85]。

1.3 基于“Knudson”二次打击学说的表观遗传调控

“二次打击”学说，又叫“Knudson”二次打击事件，是人类遗传学家 Knudson 在分析儿童视网膜母细胞瘤发病率的基础上提出的。他认为这种疾病是在生殖细胞和出生后的体细胞中发生两次累积突变后的结果。后来，来自分子生物学的证据也证实了这一假设。“二次打击”理论的实质是视网膜母细胞瘤抑制基因 Rb1 的一对等位基因发生了突变。换句话说，细胞癌变的前提条件是抑癌基因两个等位基因同时发生“功能丧失”[86, 87]。我们在传统意义上将“一个基因的缺失不会对细胞产生致命作用，但两个或两个以上基因同时缺失时会对细胞产生致命的杀伤作用”这一现象称为“协同致死”效应。目前，大多数靶向治疗方法是利用肿瘤特异性遗传变化的分子靶向策略，当肿瘤细胞依赖突变致癌基因的活性时，可以通过灭活该致癌基因的产物来选择性地消除肿瘤细胞。BCR-ABL 激酶抑制剂在慢性粒细胞白血病中的治疗[88]和利用 HER2 抗体治疗 HER2 过表达的癌症[89]是基于致癌基因成瘾的成功治疗的实例。然而，尽管一些靶向致癌基因的抑制剂对某些肿瘤有效，但并不是所有的肿瘤都有该致癌基因的存在。相反，在治疗过程中更容易出现耐药的情况。那么在这些肿瘤中，我们就可以利用靶向第二靶点，根据“Knudson”二次打击学说的理论指导，与第一靶点即肿瘤特异性突变一起，达到“协同致死”的效果[90]。DDR 和细胞周期调节相关基因在人类肿瘤中频繁发生甲基化改变，这种表观遗传沉默机制可能导致这些基因失活或“功能丧失”，因此将异常表观遗传变化应用于人类肿瘤的“协同致死”治疗是可行的。

1.4 DDR 相关基因的表观遗传沉默及基于表观遗传学异常的“协同致死”效应

虽然人体的所有细胞本质上都具有相同的基因，但正是表观遗传信息调节了基因组如何被解读，并在不同的发育阶段、细胞分化中表现出来。表观遗传

学与多种生理和病理过程有关，包括基因组印迹、X 染色体失活、组织特异性基因表达、染色体稳定性、转座因子的抑制、衰老以及包括癌症在内的许多疾病[91]。研究表明，异常的遗传及表观遗传学改变发生在肿瘤发生发展的早期阶段，并且在扮演着非常重要的角色，而且在人类肿瘤中，异常的表观遗传学改变的发生比基因突变更加频繁，例如，CDK2NA 和 MLH1 的表观遗传沉默比这两个公认的 DDR 基因中任何一个的突变失活更为常见[92]。在各种类型的人类肿瘤中，有 300 多个基因和基因产物发生表观遗传改变[93]。

表观遗传调控主要涉及三个方面：组蛋白修饰、非编码 RNA 及 DNA 甲基化。组蛋白修饰与染色质结构密切相关，后者在基因调控和癌变中发挥重要作用[94]。基因表达的调节是通过组蛋白尾部的翻译后共价修饰实现的，包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、总酰化、脯氨酸异构化和 ADP 核糖基化[95, 96]，它控制着染色质的结构状态和特定位点内基因的转录状态且这些修饰都是可逆的。特定基因组区域中组蛋白修饰的各种组合可以导致更“开放”或“封闭”的染色质结构，从而激活或抑制基因的表达，例如 SYMD2 在乳腺癌和结直肠癌中的上调、JMJD3 在肺癌和肝癌中的下调及 UTX 在鳞状细胞癌和肾癌中的失活突变[97, 98]。在人类转录基因组中，只有 1-2%的转录基因可以编码蛋白质，而其他大多数转录为非编码 RNA（Non-coding RNA，NcRNA）而不具有蛋白质翻译功能[99]。小分子干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（miRNA）、Piwi 相互作用 RNA（piRNA）、环状 RNA（CircRNA）和长链非编码 RNA（LncRNA）都属于 NcRNAs[92]，LncRNA 作为调控因子，在细胞凋亡、生长、分化、增殖等细胞过程中发挥着重要作用[100]。截止到目前，人类基因组编码了共 28000 多个不同的 LncRNAs，其中许多仍在探索阶段[101, 102]。NcRNAs 异常表达和突变与肿瘤的发生、转移和肿瘤分期密切相关[103, 104]，最新研究表明，而 LncRNAs 在生理和病理条件下可介导 DNA 甲基化[105]，这也使得 LncRNAs 有望成为肿瘤新型的潜在生物标志物和治疗靶点。

DNA 甲基化是研究最广泛的表观遗传修饰，DNA 甲基化与癌症的关系最早出现在 1983 年，当时的研究表明，肿瘤细胞显示出全基因组低甲基化和 CpG 岛启动子区域高甲基化[106, 107]。迄今为止，大量的研究发现在人类肿瘤中抑癌基因启动子区频繁发生甲基化，DNA 甲基化也由于 DNA 性质稳定、甲基化检测技术的成熟而作为肿瘤早期检测、预后的标记物和治疗靶点[108]。如 P14、p15 和 p16 是细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂，在细胞周期中负向调控 G1-S 期转换，P16 在食管癌中经常发生甲基化[109]；RAS 结合结构域家族 1A(RASSF1A)

是一种微管结合稳定蛋白，RASSF1A 与微管相互作用，抑制 M 期细胞进程[110]，RASSF1A 在 ESCC 中经常甲基化[108]；RASSF10 是 Ras 相关家族的新成员，RASSF10 抑制细胞增殖，诱导 G2/M 期阻滞，RASSF10 在食管癌中的甲基化率达 44.3%[111]；WRN 基因是一种同时具有解旋酶和核酸外切酶活性的 RecQ 家族成员，研究表明其在 11 种原发肿瘤中均有甲基化特征，上皮性肿瘤中 WRN 甲基化发生率最高的是结直肠癌(37.9%)，其次是非小细胞肺癌(37.5%)、胃癌(25%)、前列腺(20%)、乳腺癌(17.2%)和甲状腺(12.5%)，在血液系统恶性肿瘤中，WRN 基因启动子甲基化多见于非霍奇金淋巴瘤(23.7%)，而在急性淋巴细胞白血病(9.5%)和急性髓系白血病(4.8%)中较少见，在间叶性肿瘤类型中，软骨肉瘤(33.3%)和骨肉瘤(11.1%)存在 WRN 高甲基化，WRN 的高甲基化使这些癌细胞对拓扑异构酶抑制剂和 DNA 损伤剂的作用非常敏感[112]；TMEM176A 在 53.66%的原发性肺癌中被甲基化，且其甲基化也成为了 ATMi 的一种新型合成致死治疗标志物[113]；人类 SLFN11 基因编码一种与 RNA 解旋酶结构相似的蛋白质，SLFN11 在胃癌中的表达受启动子区域甲基化的调控，且 SLFN11 的甲基化可能作为人胃癌中顺铂耐药的标志物[114]。其他基因如 NRN1[115]、TGFBR2[116]、IGFBPL1[117]、RAI2[118]、ZNF331[119]、HOXD10[120]、DACT2[121]等都曾在不同类型癌症中发生甲基化改变。除了最经典的“BRCAness”，这些肿瘤抑制基因的表观遗传学异常改变都可能为基于“二次打击学说”理论的“协同致死效应”新策略提供新的可能。

1.5 展望

表观遗传改变是人类癌症发病机制中的驱动因素，这一概念现在已被广泛接受。与“突变驱动基因”不同的是，在人类癌症中，更多的“表观驱动基因”通过异常的表观遗传变化而异常表达[122]。PARPi 治疗 BRCA1/2 突变细胞是人类肿瘤协同致死治疗的理想模型，然而，BRCA1/2 的突变相对罕见，我们通过对“协同致死”概念的扩展以及从经典范例中总结的经验，发现任何 DDR 调节因子的缺陷都可能作为“协同致死”治疗的标志物，包括 ATM、ATR、PALB2、MGMT、SLFN11 和 FANCC。尽管基于“协同致死”的疗法有着非常好的前景，但要让其进入临床，还有很多阻碍。第一个相当大的障碍是由于高通量筛查技术预测的假阳性和假阴性相互作用而导致的强大的、临床相关的“协同致死”相互作用的识别，这就要求后续研究使用其他实验方法(如将不同药物进行组合)交叉验

证。其次，这些遗传相互作用会导致致命性后果，使其恢复和识别突变成为一项挑战。第三，由于不同细胞类型之间的遗传和代谢差异，信号通路和细胞内环境的调节是不同的，这使得大多数“协同致死”相互作用是条件依赖性的，需要大量的突变基因对组合才可能建立有效的协同致死相互作用。目前，RNAi 和 CRISPR 技术的突破以及基因组测序技术的进步使得直接在人类细胞中进行大规模协同致死性筛查成为可能，进而快速识别区分肿瘤细胞和非肿瘤细胞的遗传和表观遗传变化，例如 CDK 已被证实与许多肿瘤相关基因如 MYC、TP53、RAS 和 PARP 具有协同致死作用[123]。DDR 机制对于维持正常细胞基因组稳定性是必不可少的，而基于表观遗传学异常和“Knudson”二次打击学说的“协同致死效应”就是通过 DNA 损伤修复基因的表观遗传沉默导致其所介导的通路或途径失活，在此基础上寻找并抑制其补偿途径，以发挥协同作用的巨大潜力。综上所述，基于 DDR 的肿瘤治疗方法能够通过“协同致死”相互作用为缺乏特定 DDR 功能的肿瘤患者量身定做治疗方案，提供潜在的更广泛的治疗窗口。

参考文献

1. Khanna A. DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse? Cancer Res. 2015. 75(11): p. 2133-2138.
2. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. Nat Rev Cancer. 2012. 12(12): p. 801-817.
3. Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. Proc Natl Acad Sci USA. 2001. 98(15): p. 8241-8246.
4. Brandsma I, Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. Genome Integr. 2012. 3(1): p. 1-10.
5. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. Mol Cell. 2010. 40(2): p. 179-204.
6. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the united States today. J Natl Cancer Inst. 1981. 66(6): p. 1192-1308.
7. Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. J Cell Sci. 2008. 121(Supplement_1): p. 1-84.
8. Wang M, Chen S, Ao D. Targeting DNA repair pathway in cancer: Mechanisms and clinical application. MedComm (2020). 2021 Dec 7;2(4):654-691.
9. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. D'Andrea, Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. Trends Cell Biol. 2016. 26(1): p. 52-64.
10. Kennedy RD, D'Andrea AD. D'Andrea, DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. J Clin Oncol. 2006. 24(23): p. 3799-3808.
11. Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. Nat Rev Cancer. 2005. 5(9): p. 689-698.
12. Gao A, Guo M. Epigenetic based synthetic lethal strategies in human cancers. Biomark Res. 2020. 8(1): p. 1-14.
13. Cheng B, Pan W, Xing Y, et al., Recent advances in DDR (DNA damage response) inhibitors for cancer therapy. Eur J Med Chem. 2022: p. 114109.
14. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, et al., Cancer epigenetics: moving forward. PLoS Genet. 2018. 14(6): p. e1007362.
15. Kauffmann A, Rosselli F, Lazar V, et al., High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. Oncogene. 2008. 27(5): p. 565-573.
16. Basourakos SP, Li L, Aparicio AM, et al., Combination platinum-based and DNA damage response-targeting cancer therapy: evolution and future directions. Curr Med Chem. 2017. 24(15): p. 1586-1606.

17. McPherson KS, Korzhnev DM. Korzhnev, Targeting protein–protein interactions in the DNA damage response pathways for cancer chemotherapy. RSC Chem Biol. 2021. 2(4): p. 1167-1195.
18. Sundar R, Brown J, Ingles Russo A, et al., Targeting ATR in cancer medicine. Curr Probl Cancer. 2017. 41(4): p. 302-315.
19. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al., ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science. 2007. 316(5828): p. 1160-1166.
20. Yang J, Xu ZP, Huang Y, et al,. ATM and ATR: sensing DNA damage. World J Gastroenterol. 2004 Jan 15;10(2):155-60.
21. Stracker TH, Roig I, Knobel PA, et al., The ATM signaling network in development and disease. Front Genet. 2013. 4: p. 37.
22. Lito P, Solomon M, Li LS, et al., Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. Science. 2016. 351(6273): p. 604-608.
23. Herrero AB, Gutiérrez NC. Targeting ongoing DNA damage in multiple myeloma: Effects of DNA damage response inhibitors on plasma cell survival. Front Oncol. 2017. 7: p. 98.
24. Golding SE, Rosenberg E, Valerie N, et al., Improved ATM kinase inhibitor Ku-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. Mol Cancer Ther. 2009. 8(10): p. 2894-2902.
25. Batey MA, Zhao Y, Kyle S, et al., Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, Ku59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. Mol Cancer Ther. 2013. 12(6): p. 959-967.
26. Nishida H, Tatewaki N, Nakajima Y, et al., Inhibition of ATR protein kinase activity by schisandrin B in DNA damage response. Nucleic Acids Res. 2009. 37(17): p. 5678-5689.
27. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, et al., Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. Cancer Res. 1999. 59(17): p. 4375-4382.
28. Fokas E, Prevo R, Pollard JR, et al., Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. Cell Death Dis. 2012. 3(12): p. e441-e441.
29. Peasland A, Wang LZ, Rowling E, et al., Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, Nu6027, in breast and ovarian cancer cell lines. Br J Cancer. 2011. 105(3): p. 372-381.
30. Gatei M, Sloper K, Sorensen C, et al., Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. J Biol Chem. 2003. 278(17): p. 14806-14811.
31. Busino L, Donzelli M, Chiesa M, et al., Degradation of Cdc25A by β-TrCP during S phase and in response to DNA damage. Nature. 2003. 426(6962): p. 87-91.

32. Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenberg AL, et al., The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. Oncogene. 2008. 27(28): p. 3977-3985.
33. Pan Y, Ren KH, He HW, et al., Knockdown of Chk1 sensitizes human colon carcinoma HCT116 cells in a p53-dependent manner to lidamycin through abrogation of a G2/M checkpoint and induction of apoptosis. Cancer Biol Ther. 2009. 8(16): p. 1559-1566.
34. Hiregange D, Naick H, Rao BJ. ATR signalling mediates the prosurvival function of phospho-NPM against PIDDosome mediated cell death. Cell Signal. 2020. 71: p. 109602.
35. Fuse E, Tanii H, Kurata N, et al., Unpredicted clinical pharmacology of uCN-01 caused by specific binding to human α1-acid glycoprotein. Cancer Res. 1998. 58(15): p. 3248-3253.
36. Dai Y, Grant S. Grant, New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. Clin Cancer Res. 2010. 16(2): p. 376-383.
37. McNeely S, Beckmann R, Bence Lin AK. CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. Pharmacol Ther. 2014. 142(1): p. 1-10.
38. Booth L, Roberts J, Poklepovic A, et al., The CHK1 inhibitor SRA737 synergizes with PARP1 inhibitors to kill carcinoma cells. Cancer Biol Ther. 2018. 19(9): p. 786-796.
39. Saldivar JC, Cortez D, Cimprich KA. The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017. 18(10): p. 622-636.
40. Ma M, Rodriguez A, Sugimoto K. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition. Curr Genet. 2020. 66(2): p. 327-333.
41. Mahajan K, Mahajan NP. WEE1 tyrosine kinase, a novel epigenetic modifier. Trends Genet. 2013. 29(7): p. 394-402.
42. Mir SE, De Witt Hamer PC, Krawczyk PM, et al., In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. Cancer Cell. 2010. 18(3): p. 244-257.
43. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, et al., p53-deficient cells rely on ATM-and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. Cancer Cell. 2007. 11(2): p. 175-189.
44. Wang F, Zhu Y, Huang Y, et al., Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. Oncogene. 2005. 24(24): p. 3875-3885.
45. Mak JP, Man WY, Chow JP, et al., Pharmacological inactivation of CHK1 and WEE1 induces mitotic catastrophe in nasopharyngeal carcinoma cells. Oncotarget. 2015. 6(25): p. 21074.
46. Ceccaldi R, Liu JC, Amunugama R, et al., Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Polθ-mediated repair. Nature. 2015. 518(7538): p. 258-262.
47. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al., Whole–genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. Nature. 2015. 521(7553): p. 489-494.

48. Hirai H, Iwasawa Y, Okada M, et al., Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. Mol Cancer Ther. 2009. 8(11): p. 2992-3000.
49. Leijen S, van Geel RM, Pavlick AC, et al., Phase I study evaluating WEE1 inhibitor AZD1775 as monotherapy and in combination with gemcitabine, cisplatin, or carboplatin in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 2016. 34(36): p. 4371.
50. Elbæk CR, Petrosius V, Sørensen CS. WEE1 kinase limits CDK activities to safeguard DNA replication and mitotic entry. Mutat Res. 2020. 819: p. 111694.
51. Matheson CJ, Venkataraman S, Amani V, et al., A WEE1 inhibitor analog of AZD1775 maintains synergy with cisplatin and demonstrates reduced single-agent cytotoxicity in medulloblastoma cells. ACS Chem Biol. 2016. 11(4): p. 921-930.
52. Kausar T, Schreiber JS, Karnak D, et al., Sensitization of pancreatic cancers to gemcitabine chemoradiation by WEE1 kinase inhibition depends on homologous recombination repair. Neoplasia. 2015. 17(10): p. 757-766.
53. Chang HH, Lieber MR. Structure-specific nuclease activities of Artemis and the Artemis: DNA-PKcs complex. Nucleic Acids Res. 2016. 44(11): p. 4991-4997.
54. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. Mol Cell. 2017. 66(6): p. 801-817.
55. Hosoi Y, Watanabe T, Nakagawa K, et al., Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. Int J Oncol. 2004. 25(2): p. 461-468.
56. Cornell L, Munck JM, Alsinet C, et al., DNA-PK—a candidate driver of hepatocarcinogenesis and tissue biomarker that predicts response to treatment and survival. Clin Cancer Res. 2015. 21(4): p. 925-933.
57. Abdel-Fatah TM, Arora A, Moseley P, et al., ATM, ATR and DNA-PKcs expressions correlate to adverse clinical outcomes in epithelial ovarian cancers. BBA Clin. 2014. 2: p. 10-17.
58. Kotula E, Berthault N, Agrario C, et al., DNA-PKcs plays role in cancer metastasis through regulation of secreted proteins involved in migration and invasion. Cell Cycle. 2015. 14(12): p. 1961-1972.
59. Ihara M, Ashizawa K, Shichijo K, et al., Expression of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is associated with the radiosensitivity of human thyroid cancer cell lines. J Radiat Res. 2019. 60(2): p. 171-177.
60. Shintani S, Mihara M, Li C, et al., Up-regulation of DNA-dependent protein kinase correlates with radiation resistance in oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2003. 94(10): p. 894-900.
61. Beskow C, Skikuniene J, Holgersson A, et al., Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86. Br J Cancer. 2009. 101(5): p. 816-821.

62. Willmore E, Elliott SL, Mainou-Fowler T, et al., DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res. 2008. 14(12): p. 3984-3992.
63. van der Burg M, van Dongen JJ, van Gent DC. DNA-PKcs deficiency in human: long predicted, finally found. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2009. 9(6): p. 503-509.
64. Schwartz C, Rohr O, Wallet C. Targeting the DNA-PK complex: its rationale use in cancer and HIV-1 infection. Biochem Pharmacol. 2019. 160: p. 80-91.
65. Damia G. Targeting DNA-PK in cancer. Mutat Res. 2020. 821: p. 111692.
66. Hu S, Hui Z, Lirussi F, et al., Small molecule DNA-PK inhibitors as potential cancer therapy: a patent review (2010–present). Expert Opin Ther Pat. 2021. 31(5): p. 435-452.
67. Block WD, Merkle D, Meek K, et al., Selective inhibition of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) by the radiosensitizing agent caffeine. Nucleic Acids Res. 2004. 32(6): p. 1967-1972.
68. Durant S, Karran P. Vanillins--a novel family of DNA-PK inhibitors. Nucleic Acids Res. 2003. 31(19): p. 5501-5512.
69. Leahy JJ, Golding BT, Griffin RJ, et al., Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (Nu7441) by screening of chromenone libraries. Bioorg Med Chem Lett. 2004. 14(24): p. 6083-6087.
70. Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, et al., Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor Nu7441. Cancer Res. 2006. 66(10): p. 5354-5362.
71. Hardcastle IR, Cockcroft X, Curtin NJ, et al., Discovery of potent chromen-4-one inhibitors of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) using a small-molecule library approach. J Med Chem. 2005. 48(24): p. 7829-7846.
72. Hollick JJ, Golding BT, Hardcastle IR, et al., 2, 6-disubstituted pyran-4-one and thiopyran-4-one inhibitors of DNA-Dependent protein kinase (DNA-PK). Bioorg Med Chem Lett. 2003. 13(18): p. 3083-3086.
73. Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, et al., A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, Nu7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. Blood. 2004. 103(12): p. 4659-4665.
74. Timme CR, Rath BH, O'Neill JW, et al., The DNA-PK inhibitor VX-984 enhances the radiosensitivity of glioblastoma cells grown in vitro and as orthotopic xenografts. Mol Cancer Ther. 2018. 17(6): p. 1207-1216.
75. Zenke FT, Zimmermann A, Sirrenberg C, et al., Pharmacologic inhibitor of DNA-PK, M3814, potentiates radiotherapy and regresses human tumors in mouse models. Mol Cancer Ther. 2020. 19(5): p. 1091-1101.
76. Zheng B, Sun X, Chen XF, et al., Dual inhibition of DNA-PKcs and mTOR by CC-115 potently inhibits human renal cell carcinoma cell growth. Aging (Albany NY). 2020. 12(20): p. 20445.

77. Tsuji T, Sapinoso LM, Tran T, et al., CC-115, a dual inhibitor of mTOR kinase and DNA-PK, blocks DNA damage repair pathways and selectively inhibits ATM-deficient cell growth in vitro. Oncotarget. 2017. 8(43): p. 74688.
78. Langelier MF, Eisemann T, Riccio AA, et al., PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly (ADP-ribose) posttranslational modification. Curr Opin Struct Biol. 2018. 53: p. 187-198.
79. Murai J, Huang SY, Renaud A, et al., Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. Mol Cancer Ther. 2014. 13(2): p. 433-443.
80. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al., Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature. 2005. 434(7035): p. 917-921.
81. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al., Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. Nature. 2005. 434(7035): p. 913-917.
82. Dziadkowiec KN, Gąsiorowska E, Nowak-Markwitz E, et al., PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. Prz Menopauzalny. 2016. 15(4): p. 215.
83. Hu Y, Guo M. Synthetic lethality strategies: Beyond BRCA1/2 mutations in pancreatic cancer. Cancer Sci. 2020. 111(9): p. 3111-3121.
84. Murai J, Huang SY, Das BB, et al., Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. Cancer Res. 2012. 72(21): p. 5588-5599.
85. Bajrami I, Frankum JR, Konde A, et al., Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. Cancer Res. 2014. 74(1): p. 287-297.
86. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1971. 68(4): p. 820-823.
87. Bellacosa A. Chromosomes and Cancer, Genetic hits and mutation rate in colorectal tumorigenesis: versatility of Knudson's theory and implications for cancer prevention. Genes Chromosomes Cancer. 2003. 38(4): p. 382-388.
88. Rossari F, Minutolo F, Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. J Hematol Oncol. 2018. 11(1): p. 1-14.
89. Larionov AA. Current therapies for human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer patients. Front Oncol. 2018. 8: p. 89.
90. O'Neil NJ, Bailey ML, Hieter P. Synthetic lethality and cancer. Nat Rev Genet. 2017. 18(10): p. 613-623.
91. Roberti A, Valdes AF, Torrecillas R, et al., Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. Clin Epigenetics. 2019. 11(1): p. 1-18.
92. Yan W, Herman JG, Guo M. Epigenome-based personalized medicine in human cancer. Epigenomics. 2016. 8(1): p. 119-133.
93. Kanwal R, Gupta S. Epigenetics and cancer. J Appl Physiol (1985). 2010. 109(2): p. 598-605.

94. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nat Rev Genet. 2009. 10(5): p. 295-304.
95. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007. 128(4): p. 693-705.
96. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011. 21(3): p. 381-395.
97. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotechnol. 2010. 28(10): p. 1057-1068.
98. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. Clin Genet. 2012. 81(4): p. 303-311.
99. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al., Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. Proc Natl Acad Sci USA. 2009. 106(28): p. 11667-11672.
100. Beylerli O, Gareev I, Sufianov A, et al., Long noncoding RNAs as promising biomarkers in cancer. Noncoding RNA Res. 2022 Feb 25;7(2):66-70.
101. Bhan A, Mandal SS. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. Biochim Biophys Acta. 2015. 1856(1): p. 151-164.
102. Tragante V, Moore JH, Asselbergs FW. The ENCODE project and perspectives on pathways. Genet Epidemiol. 2014. 38(4): p. 275-280.
103. Vitiello M, Tuccoli A, Poliseno L. Long non-coding RNAs in cancer: implications for personalized therapy. Cell Oncol (Dordr). 2015. 38(1): p. 17-28.
104. Bartonicek N, Maag JL, Dinger ME. Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements. Mol Cancer. 2016. 15(1): p. 1-10.
105. Huang W, Li H, Yu Q, et al., LncRNA-mediated DNA methylation: an emerging mechanism in cancer and beyond. J Exp Clin Cancer Res. 2022. 41(1): p. 1-12.
106. Shen L, Kondo Y, Guo Y, et al., Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. PLoS Genet. 2007. 3(10): p. e181.
107. Sinčić N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. Curr Opin Oncol. 2011. 23(1): p. 69-76.
108. Ma K, Cao B, Guo M. The detective, prognostic, and predictive value of DNA methylation in human esophageal squamous cell carcinoma. Clin Epigenetics. 2016. 8(1): p. 1-9.
109. Guo M, Ren J, House MG, et al., Accumulation of promoter methylation suggests epigenetic progression in squamous cell carcinoma of the esophagus. Clin Cancer Res. 2006. 12(15): p. 4515-4522.
110. Rong R, Jiang LY, Sheikh MS, et al., Mitotic kinase AuRKA phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. Oncogene. 2007. 26(55): p. 7700-7708.

111. Lu D, Ma J, Zhan Q, et al., Epigenetic silencing of RASSF10 promotes tumor growth in esophageal squamous cell carcinoma. Discov Med. 2014. 17(94): p. 169-178.
112. Agrelo R, Cheng WH, Setien F, et al., Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2006. 103(23): p. 8822-8827.
113. Li H, Yang W, Zhang M, et al., Methylation of TMEM176A, a key ERK signaling regulator, is a novel synthetic lethality marker of ATM inhibitors in human lung cancer. Epigenomics. 2021. 13(17): p. 1403-1419.
114. Peng Y, Wang L, Wu L, et al., Methylation of SLFN11 promotes gastric cancer growth and increases gastric cancer cell resistance to cisplatin. J Cancer. 2019. 10(24): p. 6124.
115. Du W, Gao A, Herman JG, et al., Methylation of NRN1 is a novel synthetic lethal marker of PI3K-Akt-mTOR and ATR inhibitors in esophageal cancer. Cancer Sci. 2021. 112(7): p. 2870.
116. Ma Y, He S, Gao A, et al., Methylation silencing of TGF-β receptor type II is involved in malignant transformation of esophageal squamous cell carcinoma. Clin Epigenetics. 2020. 12(1): p. 1-12.
117. Liu Y, Zhang M, He T, et al., Epigenetic silencing of IGFBPL1 promotes esophageal cancer growth by activating PI3K-AKT signaling. Clin Epigenetics. 2020. 12(1): p. 1-12.
118. Yan W, Wu K, Herman JG, et al., Retinoic acid-induced 2 (RAI2) is a novel tumor suppressor, and promoter region methylation of RAI2 is a poor prognostic marker in colorectal cancer. Clin Epigenetics. 2018. 10(1): p. 1-14.
119. Wang Y, He T, Herman JG, et al., Methylation of ZNF331 is an independent prognostic marker of colorectal cancer and promotes colorectal cancer growth. Clin Epigenetics. 2017. 9(1): p. 1-12.
120. Guo Y, Peng Y, Gao D, et al., Silencing HOXD10 by promoter region hypermethylation activates ERK signaling in hepatocellular carcinoma. Clin Epigenetics. 2017. 9(1): p. 1-13.
121. Li J, Zhang M, He T, et al., Methylation of DACT2 promotes breast cancer development by activating Wnt signaling. Sci Rep. 2017. 7(1): p. 1-10.
122. Dolsten M, Søgaard M. Precision medicine: an approach to R&D for delivering superior medicines to patients. Clin Transl Med. 2012, Springer. p. 1-4.
123. Li K, You J, Wu Q, et al., Cyclin-dependent kinases-based synthetic lethality: Evidence, concept, and strategy. Acta Pharm Sin B. 2021. 11(9): p. 2738-2748.