

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-166-6-93-99

Регуляторные эпигенетические факторы при раке пищевода (обзор литературы)

Кит О. И., Франциянц Е. М., Колесников Е. Н., Снежко А. В., Кожушко М. А.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344037, Ростов-на-Дону, Россия)

Regulatory epigenetic factors in esophageal cancer (literature review)

O. I. Kit, E. M. Frantsiyants, E. N. Kolesnikov, A. V. Snezhko, M. A. Kozhushko

Rostov Research Institute of Oncology (344037, Rostov-on-Don, Russia)

Для цитирования: Кит О. И., Франциянц Е. М., Колесников Е. Н., Снежко А. В., Кожушко М. А. Регуляторные эпигенетические факторы при раке пищевода (обзор литературы). Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;166(6): 93–99. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-166-6-93-99

For citation: Kit O. I., Frantsiyants E. M., Kolesnikov E. N., Snezhko A. V., Kozhushko M. A. Regulatory epigenetic factors in esophageal cancer (literature review). *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;166(6): 93–99. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-166-6-93-99

Кит Олег Иванович, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор

Франциянц Елена Михайловна, д.б.н., профессор, заместитель генерального директора по науке

Колесников Евгений Николаевич, к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий отделением Абдоминальной онкологии № 1, врач хирург

Снежко Александр Владимирович, д.м.н., ассистент кафедры онкологии

Кожушко Михаил Анатольевич, к.м.н., научный сотрудник, врач хирург, Scopus ID: 22953565000

Oleg I. Kit, Corresponding Member of RAS, D. Med. Sci., Professor, General Director; Scopus ID: 55994103100, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

Elena M. Frantsiyants, D. Biol. Sci., Professor, Deputy General Director for Science; Scopus ID: 55890047700

Evgeniy N. Kolesnikov, Cand. Med.Sci., senior researcher, Head of Department of Abdominal Oncology No. 1, surgeon; Scopus ID: 57190297598

Aleksandr V. Snezhko, D. Med. Sci., teaching assistant, Department of Oncology; Scopus ID: 6701854863

Mikhail A. Kozhushko, Cand. Med.Sci., researcher, surgeon; Scopus ID: 22953565

✉ Corresponding author:

Кожушко

Михаил Анатольевич

Mikhail A. Kozhushko

Scopus ID: 22953565000

Kozhushko.misha@yandex.ru

Резюме

В обзоре большого количества научных публикаций, посвященных проблеме заболеваемости раком пищевода (РП), представлены современные данные по эпидемиологии данного заболевания, основными морфологическими формами которого являются плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) и аденокарцинома пищевода (АП), отмечена тенденция к росту заболеваемости.

Одними из важных механизмов онкогенеза при РП являются эпигенетические факторы, которые не затрагивают первичную структуру ДНК, а изменяют активность определенных генов, при этом важной особенностью эпигенетических изменений является то, что они сохраняются при клеточном делении. Частым эпигенетическим механизмом при раке РП является метилирование цитозиновых оснований ДНК при курении и употреблении алкоголя. Представлены данные о том, что одновременное потребление табака и алкоголя при раке пищевода оказывает синергическое воздействие на канцерогенез.

Представлены современные данные о генах, которые часто подвергаются метилированию при РП, особенно RASSF1A, а также белках, ингибиторах циклинзависимой киназы, ответственных за важные этапы клеточного деления. Показана связь эпигенетических процессов метилирования с глубиной опухолевой инвазии и тенденцией к метастазированию, а также о том, что эпигенетические воздействия, в частности процессы метилирования могут быть маркером запущенности рака пищевода.

Summary

This article reviews a large number of papers on the problem of esophageal cancer (EC) incidence and presents current data on the disease epidemiology, including its main morphological types such as esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and esophageal adenocarcinoma (EA); incidence rates have shown a tendency to increase.

Epigenetic factors are an important mechanism of carcinogenesis in EC. They do not affect the primary DNA structure but change activity of certain genes; one of important characteristics of epigenetic modifications is their persistence throughout cell division. Methylation of DNA cytosine bases at smoking and alcohol consumption is a common epigenetic mechanism in EC. Simultaneous tobacco use and alcohol consumption is reported to have a synergetic effect on carcinogenesis.

The article presents modern data on genes often subjected to methylation in EC, especially RASSF1A, as well as on cyclin-dependent kinase inhibitor proteins responsible for important stages of cell division. An association between epigenetic methylation processes and the depth of tumor invasion and a tendency to metastasis is shown; epigenetic effects, in particular methylation processes, can be a marker of advanced esophageal cancer.

Заболееваемость раком пищевода (РП) в мире характеризуется значительными различиями, как в регионарных уровнях заболеваемости, так и в соотношении патоморфологических форм, основными из которых являются плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) и аденокарцинома пищевода (АП). Преобладающим гистологическим типом рака пищевода является ПРП, однако в США и странах Западной Европы очень быстро растет частота АП.

Наиболее высоким является уровень заболеваемости РП в Китае и некоторых частях Африки, который достигает 140 на 100 000 населения. В США и в Европе заболеваемость значительно ниже и составляет около 3 на 100 000 населения с тенденцией к снижению [10]. В России в 2016 году заболеваемость РП составила 5,5 на 100 000 населения и увеличилась за 10 лет более чем на 10% [1].

Рак пищевода занимает восьмое место в структуре смертности от онкологических заболеваний в мире и относится к опухолям с высокой степенью злокачественности. Индекс агрессивности опухоли при РП (соотношение умерших и вновь заболевших в течение года больных) составляет 95%. Важнейшим фактором снижения смертности от РП является выполнение хирургической операции на ранних стадиях заболевания, которое невозможно без своевременной диагностики. По современным воззрениям изучение регуляторных эпигенетических механизмов при РП для решения этой задачи может быть полезным.

Эпигенетическое воздействие не затрагивает первичную структуру ДНК, а изменяет активность определенных генов, при этом важной особенностью эпигенетических изменений является то, что они сохраняются при клеточном делении. Одним из хорошо изученных эпигенетических механизмов является метилирование цитозиновых оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты. За процесс метилирования ДНК отвечают три фермента, называемые ДНК-метилтрансферазами 1, 3a и 3b (DNMT1, DNMT3a и DNMT3b). Функция метилирования заключается в активации или инактивации гена. В большинстве случаев, метилирование промоторных областей гена приводит к подавлению его активности. Доказано, что даже незначительные изменения в степени метилирования ДНК могут существенно изменять уровень генетической экспрессии [2].

Метилирование ДНК тесно связано с возникновением и развитием различных опухолей, при этом оно является относительно ранним событием в канцерогенезе. Динамика процессов метилирования ДНК на этапах канцерогенеза, в том числе при РП, имеет тенденцию к прогрессированию. В настоящее время многие маркеры метилирования ДНК служат целям раннего обнаружения и прогнозирования течения, оценки степени выраженности терапевтического отклика и выявления «мишеней» для медикаментозного воздействия при различных типах злокачественных опухолей [14, 21, 26, 27, 52]. Несмотря на то, что в настоящее время выявлено много новых эпигенетических маркеров для различных типов злокачественных опухолей [62], количество сообщений в литературе о схемах метилирования ДНК при раке пищевода очень ограничено.

Общепризнано, что потребление табака и алкоголя способствуют канцерогенезу и является фактором риска для многих злокачественных опухолей. Табак содержит нитрозин-производный нитрозамин кетон – NNK и бензпирен, которые модулируют метилирование ДНК. Проведенный анализ группы генов-супрессоров опухолей в препаратах ПРП у человека выявил тесную связь потребления табака с гиперметилированием промоторных областей этих генов [50]. Ранее аналогичные результаты были получены другой группой исследователей [28]. На моделях крыс и мышей доказано, что NNK индуцирует гиперметилирование множественных генов – супрессоров опухолей животных и человека в печени и легких [36, 44, 56]. Проведенное исследование биологического воздействия бензпирена показало, что этот фактор не только вызывает мутации генов (например, в P53 и KRAS генах) *in vitro*, но и индуцирует метилирование промотора RAR β 2 с использованием ДНК (цитозин-5) – метилтрансферазы 3a (DNMT3A) в ее промоторной области [64]. Другая группа исследователей идентифицировала, что метилирование промотора гена гистидиновой триады при плоскоклеточном раке пищевода было в значительной степени связано с воздействием табачного дыма [31]. Отмечено, что частота метилирования промотора гена MSH3 была значительно выше в образцах опухолей у курильщиков, чем у некурящих [55]. Значительный интерес представляет изучение процессов метилирования генов, связанных с клеточным циклом.

Ген Fragile Histidine Triad (FHIT) рассматривается как «опекун» генома, и потеря этой функции опекуна инициирует начало нестабильности генома и развития рака [58]. Ген FHIT часто метилируется на ранних стадиях плоскоклеточного рака пищевода, при этом aberrантное метилирование FHIT может быть связано с воздействием табака и сопряжено с плохим прогнозом. Ретроспективное изучение метилирования FHIT в 257 первичных плоскоклеточных карциномах пищевода выявило aberrантное метилирование в 85 случаях, что составило более 33% из всех наблюдений. Было обнаружено, что метилирование FHIT в значительной степени связано с воздействием табачного дыма и коррелирует с плохим прогнозом, в том числе и при ранних стадиях рака. Опасность рецидива после эзофагэктомии для рака стадии с высокой степенью метилирования FHIT была в 5,81 раза выше, чем у тех, у кого метилирование было не выраженным. Рецидив был отмечен у 116 (45%) из 257 пациентов. Выживаемость после рецидива в I – II стадиях рака также была хуже у пациентов с метилированием FHIT, чем без него. Авторы предполагают, что метилирование промотором FHIT может быть независимым прогностическим биомаркером на ранней стадии плоскоклеточного рака пищевода [32].

Важное значение потребления алкоголя, как фактора риска развития рака пищевода доказана многими последовательными эпидемиологическими исследованиями, при этом у РП более сильная связь с потреблением алкоголя, чем при раке других органов [8, 37]. В настоящее время убедительно доказано наличие тесной связи между генетическим полиморфизмом этанол-метаболизирующих генов, таких как ацетальдегид дегидрогеназы и алкоголь дегидрогеназы и раком пищевода [41, 51, 59]. Получены данные о том, что потребление алкоголя связан с глобальным гипометилированием ДНК и гиперметилированием промотора гена-супрессора опухолей при раковых заболеваниях пищевода, печени и колоректального рака человека [53]. Одновременное потребление табака и алкоголя при раке пищевода оказывает синергическое воздействие на канцерогенез, и одновременное воздействие этих факторов отмечается в более чем 61% случаев РП [6, 43].

Гипометилирование глобальной геномной ДНК и гиперметилирование области промотора были широко изучены при многих онкологических заболеваниях, в том числе при раке пищевода [5, 7, 15, 23, 65, 67]. Доказана связь процессов метилирования aberrантной ДНК с основными компонентами клеточного цикла, восстановлением повреждений ДНК и сигнальными путями, связанными с возникновением злокачественной опухоли [39].

Семейство доменов ассоциации генов AA 1A (RASSF1A) ответственно в том числе и за фактор RASSF1A, который представляет собой связывающий микротрубочки и стабилизирующий белок. Доказано, что RASSF1A взаимодействует с микротрубочками и ингибирует прогрессирование клеток в M – фазе [46]. При плоскоклеточном РП отмечается частое метилирование RASSF1A [13,40]. Протеин RASSF10 является новым членом

совокупности белков группы Ras. Доказано, что RASSF10 ингибирует пролиферацию клеток и индуцирует остановку деления клеток в фазе G2. По данным одного из исследований, RASSF10 метилирован в 44,3% наблюдений плоскоклеточного рака пищевода [38].

Было обнаружено, что уровни метилирования гена RASSF1A в нормальных тканях пищевода и в плоскоклеточной карциноме пищевода имеют значительные различия. В связи с этим предположено, что гиперметилирование промотора CpG RASSF1A при РП у человека также играет важную роль в подавлении инактивации транскрипционного гена RASSF1A [13]. Высказано мнение, что RASSF1A, как один из членов семейства белков DNMT, является преобладающей метилтрансферазой, функционирующей прежде всего для поддержания структур метилирования ДНК после репликации последней. Доказан высокий уровень экспрессии белка DNMT1 в плоскоклеточной карциноме пищевода человека, что может свидетельствовать о связи нарушений экспрессии DNMT1 с развитием рака пищевода [33]. Кроме того, было обнаружено, что при выявлении метилирования RASSF1A в тканях опухоли при раке пищевода белок DNMT1 также часто был сверхэкспрессирован по сравнению с неметилированными случаями (41 положительный случай DNMT1 в 45 случаях RASSF1A) [12]. Авторы предположили, что высокая экспрессия DNMT1 в тканях опухоли при раке пищевода может привести к высокому метилированию в RSPF1A-промоторе гена Cp G. В проведенных исследованиях гиперметилирование RASSF1A в значительной степени коррелировало с низкой степенью дифференцировки и поздней стадией РП [34, 61]. Таким образом, возможно, экспрессия генов DNMT1 и RASSF1A у больных раком пищевода может быть использована в качестве опухолевого маркера и для ранней диагностики опухолей.

Известно, что белки p14, p15 и p16 являются ингибиторами циклинзависимой киназы, и ответственны за регулирование перехода G1-S в клеточном цикле по принципу отрицательной обратной связи. При плоскоклеточном раке, а также фоновых поражениях пищевода белок p16 метилируется чаще, чем p14 и p15 [18]. Это может являться признаком участия белка p16 в ранних стадиях канцерогенеза пищевода. Показатели метилирования p16 связаны с глубиной опухолевой инвазии и тенденцией к метастазированию, процесс метилирования происходит уже на ранних стадиях развития РП, и часто бывает связаны с плохим прогнозом [6, 32].

Еще одним белком, участвующим в регуляции митоза, является CHFR [49]. Доказано, что при различных злокачественных опухолях частота метилирования CHFR часто значительно повышается [19, 20, 54]. Считается, что при РП CHFR может участвовать в индукции остановки фазы деления клетки G2/M. В 45% наблюдений инвазивного плоскоклеточного РП отмечается метилирование CHFR, как правило, при распространенных опухолях, и относительно редко при ранних стадиях ракового поражения пищевода. Это указывает на возможность определения метилирования CHFR в качестве маркера поздних и запущенных форм

заболевания, что может быть использовано для определения стратегии лечения РП [62].

Активирование сигнального пути Wnt и β -catenin может индуцировать MYC, cyclin D1 и экспрессию других последующих генов, способствуя пролиферации клеток и приводя к развитию злокачественной опухоли, в том числе рака пищевода [9]. Отмечено, что в сигнальном пути Wnt ген SFRP1 метилируется в 95%, а ген SFRP2 метилируется в 83% наблюдений плоскоклеточного рака пищевода [48]. Сообщается, что SRY-box, содержащий ген 17 (SOX17), играет критическую роль в регуляции канцерогенеза посредством влияния на активность пути Wnt, и при плоскоклеточной карциноме пищевода ген SOX17 часто метилирован. Таким образом, метилирование гена SOX17 может быть маркером раннего выявления рака пищевода, при этом отмечается связь этого процесса с употреблением алкоголя у пациентов [24]. Отмечено, что уменьшение экспрессии SOX17 связано с плохим прогнозом при РП [28].

К группе генов-супрессоров опухолей относятся группа генов APC, основная функция которых заключается в регуляции сигнальных путей, ответственных за рост. По сравнению с РП, аденоматозные APC метилированы чаще в случаях аденокарциномы пищевода [20], и у тех пациентов, у которых выявлено метилирование APC пациентов двухлетняя выживаемость при раке пищевода снижается [66].

Известно, что трансформирующий сигнал фактора роста- β (TGF- β) при злокачественных опухолях регулирует процессы иницирования, прогрессирования и метастазирования, и считается как опухолевым супрессором, так и онкогеном [5, 42]. Имеются несколько сообщений об эпигенетической регуляции передачи сигналов TGF- β при РП. Одним из важных компонентов сигнального пути TGF- β является фактор транскрипции, связанный с рутином 3 (RUNX3), и по данным Zheng et al., (2011) он часто метилируется при плоскоклеточном раке пищевода [68].

Принято считать, что биологические процессы контролируются сетями транскрипции. Таким образом, изучение экспрессии генов транскрипционного фактора (TF) может иметь значение в прогнозировании опухолевой прогрессии, в том числе и при РП. Одним из генов, относящихся к группе TF, относится DACH1. Имеются данные, что при

раке пищевода гиперметилирование промоторной области регулирует экспрессию DACH1. При раке пищевода имеется прямая связь между частотой метилирования DACH1, степенью дифференцировки и стадией опухоли, и этот показатель может служить индикатором прогрессирования злокачественного процесса. Исследования показали, что DACH1 подавляет рост рака пищевода человека путем активации передачи сигналов TGF- β [60]. Доказано, что белок FBXO32 является геном-мишенью TGF- β и метилируется в 52,3% случаев РП [45]. Данные исследования, проведенного Guo et al., (2014) показали, что при РП метилирование FBXO32 связано с плохим 5-летним общим выживанием [20].

Известно, что в геноме человека примерно 17% составляют элементы LINE-1, вследствие чего по степени метилирования LINE-1 можно оценить общий уровень метилирования ДНК [11]. Показатели метилирования LINE-1 при РП сильно варьируют, однако в большинстве исследований в целом гипометилирование LINE-1 является маркером плохого прогноза у пациентов с ранними стадиями опухолей, в отличие от больных с опухолями поздних стадий [47]. Проведенные исследования показали, что в фоновых поражениях эпителия пищевода у человека могут быть метилированы большое количество различных белков [17, 23, 57, 60]. Как правило, частота метилирования увеличивается с прогрессированием рака пищевода, и в частности метилирование SHFR является маркером запущенности плоскоклеточного РП [65].

Определение степени метилирования в динамике лечения рака также может быть полезно для оценки реакции на химиотерапевтические агенты и прогнозирования исходов заболевания. Например, у пациентов, пролеченных оксалиплатином, общая выживаемость была более длительной в группе с неметилированной MLH1 по сравнению с метилированной группой MLH1 [35]. Таким образом, профилирование метилирования ДНК выявило специфические маркеры для различных опухолей, чувствительные к лекарственным средствам. Дальнейшие научные исследования, направленные на выявление биомаркеров, которые могут предсказывать реакцию на проводимую химиотерапию при раке, позволят реализовать прецизионный подход к лечению онкобольных.

Литература | References

1. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А. Д. Каприна, В. В., Старинского, Г. В. Петровой – М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ России, – 2018., 250с.).

Kaprin A. D., Starinsky V. V., Petrova G. V. Zlokačestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2016 godu (zabolevayemost i smertnost) [Malignant neoplasms in Russia in 2016 (incidence and mortality)]. Moscow, MNIOI im. P. A. Gertsena, 2018. 250 p.

2. С. М. Закиян, В. В. Власов, Е. В. Дементьева. Эпигенетика /– Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. – 592 с.

Zakiyan S. M., Vlasov V. V., Dementieva E. V. Epigenetika [Epigenetics]. Novosibirsk, SO RAN Publ., 2012. 592 p.

3. Кит О.И., Франциянц Е. М., Колесников Е. Н., Черярина Н. Д., Козлова Л. С., Погорелова Ю. А., Розенко Л. Я. Факторы роста в ткани рака пищевода различного гистогенеза. Журнал «Современные проблемы науки и образования» № 2 2016. с. 12

Kit O. I., Frantsiyants E. M., Kolesnikov E. N., et al. Growth factors in tissues of esophageal cancer of different histogenesis. Modern problems of science and education 2016, no. 2, p.12..

4. *Kit O.I., Bazaev A. L., Novikova I. A., Grankina A. O., Бондаренко Е. С., Селютина О. Н., Максимов А. Ю.* Клинические и морфологические факторы прогноза и параметры клеточного цикла при раке пищевода. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016. № 124. с. 484–493.
Kit O. I., Bazaev A. L., Novikova I. A., Grankina A. O. et al. Clinical and morphological factors and prediction parameters of cell cycle in esophageal cancer. Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University. 2016, no. 124, pp. 484–493. doi: 10.21515/1990-4665-124-028
5. *Ahrens TD, Werner M, Lassmann S.* Epigenetics in esophageal cancers. *Cell Tissue Res.* 2014;356(3):643–55. doi: 10.1007/s00441-014-1876-y.
6. *Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, et al.* Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(8):725–31. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.004.
7. *Baba Y, Watanabe M, Baba H.* Review of the alterations in DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Surg Today.* 2013;43(12):1355–64. doi: 10.1007/s00595-012-0451-y.
8. *Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G.* A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer.* 2001;85(11):1700–5. doi: 10.1054/bjoc.2001.2140.
9. *Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman FT, Benhattar J.* Alterations of the Wnt signaling pathway during the neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Oncogene.* 2006;25(21):3084–92. doi: 10.1038/sj.onc.1209338.
10. *Cook MB, Wild CP, Forman D.* A systematic review and meta-analysis of the sex ratio for Barrett's esophagus, erosive reflux disease, and nonerosive reflux disease. *Am J Epidemiol.* 2005;162:1050–1061.
11. *Cordaux R, Batzer MA.* The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet.* 2009;10(10):691–703. doi: 10.1038/nrg2640.
12. *Du Z, Ma K, Sun X, Li A, Wang H, Zhang L, et al.* Methylation of RASSF1A gene promoter and the correlation with DNMT1 expression that may contribute to esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2015;13(1):141. doi: 10.1186/s12957-015-0557-y.
13. *Du Zh., Ma K., Sun X., Li A., Wang H., Zhang L., Lin F., Feng X., Song J.* Methylation of the promoter of the RASSF1A gene and correlation with the expression of DNMT1, which can promote the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *World J Surg Oncol.* 2015; 13: 141. Posted online 2015 Apr 8. doi: 10.1186 / s12957-015-0557-y PMID: PMC4403718 PMID: 25886188
14. *Goel A, Boland CR.* Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2012;143(6):1442–60. doi: 10.1053/j.gastro.2012.09.032.
15. *Guo H, Yan W, Yang Y, Guo M.* Promoter region methylation of DNA damage repair genes in human gastric cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2014;94(28):2193–6.
16. *Guo M, Alumkal J, Drachova T, Gao D, Marina SS, Jen J, et al.* CHFR methylation strongly correlates with methylation of DNA damage repair and apoptotic pathway genes in non-small cell lung cancer. *Discov Med.* 2015;19(104):151–8.
17. *Guo M, Ren J, Brock MV, Herman JG, Carraway HE.* Promoter methylation of HIN-1 in the progression to esophageal squamous cancer. *Epigenetics.* 2008;3(6):336–41. doi: 10.4161/epi.3.6.7158.
18. *Guo M, Ren J, House MG, Qi Y, Brock MV, Herman JG.* Accumulation of promoter methylation suggests epigenetic progression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res.* 2006;12(15):4515–22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2858.
19. *Guo M, Yan W.* Epigenetics of gastric cancer. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:783–99. doi: 10.1007/978-1-4939-1804-1_41.
20. *Guo W, Zhang M, Shen S, Guo Y, Kuang G, Yang Z, et al.* Aberrant methylation and decreased expression of the TGF-beta/Smad target gene FBXO32 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2014;120(16):2412–23. doi: 10.1002/cncr.28764.
21. *Heyn H, Esteller M.* DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012;13(10):679–92. doi: 10.1038/nrg3270.
22. *Jia Y, Guo M.* Epigenetic changes in colorectal cancer. *Chin J Cancer.* 2013;32(1):21–30. doi: 10.5732/cjc.011.10245.
23. *Jia Y, Yang Y, Brock MV, Cao B, Zhan Q, Li Y, et al.* Methylation of TFPI-2 is an early event of esophageal carcinogenesis. *Epigenomics.* 2012;4(2):135–46. doi: 10.2217/epi.12.11.
24. *Jia Y, Yang Y, Zhan Q, Brock MV, Zheng X, Yu Y, et al.* Inhibition of SOX17 by microRNA 141 and methylation activates the WNT signaling pathway in esophageal cancer. *J Mol Diagn.* 2012;14(6):577–85. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.06.004.
25. *Jia Y, Yang Y, Zhan Q, Brock MV, Zheng X, Yu Y, et al.* Inhibition of SOX17 by microRNA 141 and methylation activates the WNT signaling pathway in esophageal cancer. *J Mol Diagn.* 2012;14(6):577–85. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.06.004.
26. *Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA.* Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1069–78. doi: 10.1038/nbt.1678.
27. *Kit O.I., Vodolazhskiy D. I., Kolesnikov E. N., Timoshkina N. N.* Epigenetic markers of esophageal cancer: DNA METHYLATION Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry. 2017. T. 11. № 1. С. 55–61.
28. *Kulkarni V, Saranath D.* Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol.* 2004;40(2):145–53. doi: 10.1016/S1368-8375(03)00143-X.
29. *Kuo IY, Wu CC, Chang JM, Huang YL, Lin CH, Yan JJ, et al.* Low SOX17 expression is a prognostic factor and drives transcriptional dysregulation and esophageal cancer progression. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2014;135(3):563–73. doi: 10.1002/ijc.28695.
30. *Lee EJ I, Lee BB, Kim JW, Shim YM, Hoseok I, Han J, Cho EY, Park J, Kim DH.* The aberrant methylation of the Fragile Histidine Triad gene is associated with poor prognosis at an early stage of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Eur J Cancer.* 2006 May, 42 (7): 972–80. Epub 2006 Mar 27. PMID: 16564166 DOI: 10.1016 / j.ejca.2006.01.021
31. *Lee EJ, Lee BB, Han J, Cho EY, Shim YM, Park J, et al.* CpG island hypermethylation of E-cadherin (CDH1) and integrin alpha4 is associated with recurrence of early stage esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2008;123(9):2073–9. doi: 10.1002/ijc.23598.
32. *Lee EJ, Lee BB, Kim JW, Shim YM, Hoseok I, Han J, et al.* Aberrant methylation of Fragile Histidine Triad gene is associated with poor prognosis in early stage esophageal

- squamous cell carcinoma. *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990) 2006;42(7):972–80. doi: 10.1016/j.ejca.2006.01.021.
33. Li B, Wang B, Niu LJ, Jiang L, Qiu CC. Hypermethylation of multiple tumor-related genes associated with DNMT3b up-regulation served as a biomarker for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Epigenetics*. 2011;6(3):307–16. doi: 10.4161/epi.6.3.14182.
 34. Li B., Wang B., Niu Li-H., Jiang L., Qiu C.-C. The hypermethylation of multiple tumor-related genes associated with the regulation of DNMT3b served as a biomarker for early diagnosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Epigenetics*. 2011 Mar; 6 (3): 307–316. Posted online 2011 Mar 1. doi: 10.4161 / epi.6.3.14182 PMID: PMC3092679 PMID: 2115031
 35. Li Y, Yang Y, Lu Y, Herman JG, Brock MV, Zhao P. *et al.* Predictive value of CHFR and MLH1 methylation in human gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(2):280–7. doi: 10.1007/s10120–014–0370–2.
 36. Lin RK, Hsieh YS, Lin P, Hsu HS, Chen CY, Tang YA. *et al.* The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. *J Clin Invest*. 2010;120(2):521–32. doi: 10.1172/JCI40706.
 37. Liu Y, Chen H, Sun Z, Chen X. Molecular mechanisms of ethanol-associated oro-esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2015;361(2):164–73. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.006.
 38. Lu D, Ma J, Zhan Q, Li Y, Qin J, Guo M. Epigenetic silencing of RASSF10 promotes tumor growth in esophageal squamous cell carcinoma. *Discov Med*. 2014;17(94):169–78.
 39. Ma Kai, Cao Baoping, Guo M. Detective, prognostic and prognostic value of DNA methylation in the cellular carcinoma of the human esophagus *Clin Epigenetics*. 2016; 8: 43. Posted online on 2016 April 22. Doi: 10.1186/s13148–016–0210–9 PMID: PMC4840959
 40. Mao WM, Li P, Zheng QQ, Wang CC, Ge MH, Hu FJ. *et al.* Hypermethylation-modulated downregulation of RASSF1A expression is associated with the progression of esophageal cancer. *Arch Med Res*. 2011;42(3):182–8. doi: 10.1016/j.armed.2011.04.002.
 41. Oze I, Matsuo K, Suzuki T, Kawase T, Watanabe M, Hiraki A. *et al.* Impact of multiple alcohol dehydrogenase gene polymorphisms on risk of upper aerodigestive tract cancers in a Japanese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(11):3097–102. doi: 10.1158/1055–9965.EPI-09–0499.
 42. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):21–62.
 43. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health*. 2006;29(3):193–8.
 44. Pulling LC, Vuilleminot BR, Hutt JA, Devereux TR, Belinsky SA. Aberrant promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene is early and frequent in murine lung tumors induced by cigarette smoke and tobacco carcinogens. *Cancer Res*. 2004;64(11):3844–8. doi: 10.1158/0008–5472.CAN-03–2119.
 45. Qin H, Chan MW, Liyanarachchi S, Balch C, Potter D, Souriraj IJ. *et al.* An integrative ChIP-chip and gene expression profiling to model SMAD regulatory modules. *BMC systems biology*. 2009;3:73. doi: 10.1186/1752–0509–3–73.
 46. Rong R, Jiang LY, Sheikh MS, Huang Y. Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene*. 2007;26(55):7700–8. doi: 10.1038/sj.onc.1210575.
 47. Saito K, Kawakami K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Minamoto T. Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(8):2418–26. doi: 10.1158/1078–0432.CCR-09–2819.
 48. Saito T, Mitomi H, Imamhasan A, Hayashi T, Mitani K, Takahashi M. *et al.* Downregulation of sFRP-2 by epigenetic silencing activates the beta-catenin/Wnt signaling pathway in esophageal basaloid squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. 2014;464(2):135–43. doi: 10.1007/s00428–014–1538–1.
 49. 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):2589–98. doi: 10.1038/sj.onc.1208428.
 50. Talukdar FR, Ghosh SK, Laskar RS, Mondal R. Epigenetic, genetic and environmental interactions in esophageal squamous cell carcinoma from northeast India. *PLoS one*. 2013;8(4): e60996. doi: 10.1371/journal.pone.0060996.
 51. Tanaka F, Yamamoto K, Suzuki S, Inoue H, Tsurumaru M, Kajiyama Y, *et al.* Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on oesophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. *Gut*. 2010;59(11):1457–64. doi: 10.1136/gut.2009.205724.
 52. Toh Y, Egashira A, Yamamoto M. Epigenetic alterations and their clinical implications in esophageal squamous cell carcinoma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;61(5):262–9. doi: 10.1007/s11748–013–0235–3.
 53. Varela-Rey M, Woodhoo A, Martinez-Chantar ML, Mato JM, Lu SC. Alcohol, DNA methylation, and cancer. *Alcohol Res*. 2013;35(1):25–35.
 54. Vitiello M, Tuccoli A, Poliseno L. Long non-coding RNAs in cancer: implications for personalized therapy. *Cell Oncol (Dordr)* 2015;38(1):17–28. doi: 10.1007/s13402–014–0180-x.
 55. Vogelsang M, Paccez JD, Schafer G, Dzobo K, Zerbini LF, Parker MI. Aberrant methylation of the MSH3 promoter and distal enhancer in esophageal cancer patients exposed to first-hand tobacco smoke. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2014.
 56. Vuilleminot BR, Hutt JA, Belinsky SA. Gene promoter hypermethylation in mouse lung tumors. *Mol Cancer Res*. 2006;4(4):267–73. doi: 10.1158/1541–7786.MCR-05–0218.
 57. Wang X, Tian X, Liu F, Zhao Y, Sun M, Chen D, Lu C, Wang Z, Shi X, Zhang Q, *et al.* Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study. *BMC Cancer*. 2010;10:19.
 58. Waters CE, Saldivar JC, Hosseini SA, Huebner K. The FHIT gene product: tumor suppressor and genome “caretaker” Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2014;71(23):4577–87. doi: 10.1007/s00018–014–1722–0.
 59. Wu C, Kraft P, Zhai K, Chang J, Wang Z, Li Y. *et al.* Genome-wide association analyses of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese identify multiple susceptibility loci and gene-environment interactions. *Nat Genet*. 2012;44(10):1090–7. doi: 10.1038/ng.2411.
 60. Wu L, Herman JG, Brock MV, Wu K, Mao G, Yan W. *et al.* Silencing DACH1 promotes esophageal cancer growth by inhibiting TGF-beta signaling. *PLoS One*. 2014;9(4): e95509. doi: 10.1371/journal.pone.0095509.

61. Yamaguchi S, Kato H, Miyazaki T, Sohda M, Kimura H, Ide M, et al. RASSF1A gene promoter methylation in esophageal cancer specimens. *Dis Esophagus*. 2005;18(4):253–6. doi: 10.1111/j.1442–2050.2005.00501.x.
62. Yan W, Guo M. Epigenetics of colorectal cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:405–24. doi: 10.1007/978–1–4939–1804–1_22.
63. Yan W, Herman JG, Guo M. Epigenome-based personalized medicine in human cancer. *Epigenomics*. 2016;8(1):119–33. doi: 10.2217/epi.15.84.
64. Ye F, Xu XC. Benzo[a]pyrene diol epoxide suppresses retinoic acid receptor-beta2 expression by recruiting DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3A. *Mol Cancer*. 2010;9:93. doi: 10.1186/1476–4598–9–93.
65. Yun T, Liu Y, Gao D, Linghu E, Brock MV, Yin D, et al. Methylation of CHFR sensitizes esophageal squamous cell cancer to docetaxel and paclitaxel. *Genes Cancer*. 2015;6(1–2):38–48.
66. Zare M, Jazii FR, Alivand MR, Nasser NK, Malekzadeh R, Yazdanbod M. Qualitative analysis of adenomatous polyposis Coli promoter: hypermethylation, engagement and effects on survival of patients with esophageal cancer in a high risk region of the world, a potential molecular marker. *BMC cancer*. 2009;9:24. doi: 10.1186/1471–2407–9–24.
67. Zhang XM, Guo MZ. The value of epigenetic markers in esophageal cancer. *Front Med China*. 2010;4(4):378–84. doi: 10.1007/s11684–010–0230–3.
68. Zheng Y, Zhang Y, Huang X, Chen L. Analysis of the RUNX3 gene methylation in serum DNA from esophageal squamous cell carcinoma, gastric and colorectal adenocarcinoma patients. *Hepatogastroenterology*. 2011;58(112):2