

p16 基因甲基化与食管癌相关研究进展

李朝阳 徐致祥 谭家驹

2005 年国际癌症研究署(IARC)全球癌症统计报告显示,2002 年全世界食管癌发病人数为 462000 人,是世界上最常见的八大恶性肿瘤之一;2002 年全世界食管癌死亡人数为 386000 人,是全球六大致恶性肿瘤之一^[1]。中国是世界上食管癌高发区之一,其中以环太行山地区最为高发(如中国林州市),全国每年发病人数约 250000 人,占全世界每年发病人数一半以上^[2]。中国食管癌世界标化病死率为 23.40/10 万,占各种癌症死亡的 23.53%,仅次于肺癌、胃癌,居第 3 位。那这一严重威胁人类生命健康的恶魔,到底是如何发生发展的?目前尚未完全明了。p16 抑癌基因是 1993 年 Serrano 和 Beach 等^[3]首先确定的一个编码人类周期素依赖性激酶 4 (CDK4) 抑制因子(P16)的基因,相关研究表明 p16 基因的失活在食管癌的发生发展过程中扮演着重要的角色。而多数肿瘤组织相关研究表明,p16INK4a 基因缺失或突变十分少见,其失活主要是由于其 CpG 岛甲基化而导致其 mRNA 转录异常,致使基因转录受阻。本文将就近年来 p16 基因甲基化与食管癌的相关研究进展做一综述。

一、p16 基因及其甲基化

1. p16 基因:p16 基因是迄今所发现的第一个最直接抑制肿瘤发生的细胞固有成成分,位于人类第 9 号染色体短臂 2 区 1 带(9p21),全长 8.5kb,由编码序列和两个内含子组成,编码序列从 5'~3'被 2 个内含子分成 3 部分:5'区的 126 个碱基的外显子 1 307 个碱基的外显子 2 和 3'区的 11 个碱基的外显子 3^[3]。

2. DNA 甲基化:DNA 甲基化作用是在真核生物体内普遍存在的一种基因内源修饰作用,是基因的表观遗传学修饰方式,指 DNA 双螺旋中,在 DNA 甲基转移酶(DNMT)介导下,以 S-腺苷甲硫氨酸提供甲基团将胞嘧啶核苷酸的嘧啶环第 5 位碳原子甲基化,

并与其 3'端的鸟嘌呤形成甲基化的 CpG(mCpG),且在双链中对称出现。研究表明 DNA 甲基化与基因的表达呈反比关系。甲基化程度高,基因的表达则降低,反之去甲基化又可使基因的表达增加。那甲基化是如何影响基因表达的?目前的研究表明其机制主要表现为如下:①直接作用:CpG 岛甲基化直接干扰转录因子与调控区各自识别位点的结合;②间接作用:甲基结合蛋白特异性地结合甲基化 DNA 位点,从而抑制转录;③甲基化还可通过改变染色质结构抑制基因转录。异常的 DNA 甲基化主要发生在基因启动子区 CpG 岛,包括基因组整体的低甲基化及特定区域(如启动子区域)高甲基化,破坏基因组的正常甲基化模式,从而影响基因正常表达。导致细胞的增殖失控,促进肿瘤的发生和发展。p16 基因作为一种抑癌基因在食管癌中的存在状态及作用已为不少国内外学者所研究,多数肿瘤相关研究表明,p16 基因缺失或突变十分少见,而主要是由于其启动子区 CpG 岛甲基化导致其 mRNA 转录异常,致使该基因转录受阻,最终使其不能发挥相应的抑癌作用。

二、食管癌多阶段演变过程中 p16 甲基化及其表达情况及不同区域间的差异

食管癌的发生是一个多基因多因素参与、多阶段发展的复杂过程,是环境因素和遗传物质共同作用的结果。这一观点已得到全世界研究者的认可。而在基因层面目前的研究主要认为是两种机制起作用即遗传学机制和表观遗传学机制。其中表观遗传学直 1942 年提出以来就成为肿瘤研究的热点之一,而 DNA 甲基化作为表观遗传修饰形式之一更是热点中的热点。多项研究证实 p16 基因甲基化失活在多种恶性肿瘤中是常见的分子事件,因而推测该基因异常甲基化失活在食管癌的发生和发展过程中可能扮演着重要的角色^[4,5]。食管癌演变多阶段演进的组织学发生模式总结为:正常→基底细胞过度增生→不典型增生→原位癌→浸润癌。慢性中度食管炎可能是食管癌的重要癌前状态,为食管癌变提供了适宜的微环境^[6]。那么在食管癌的多阶段演变过程中 p16 基因

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2009AA02Z421)

作者单位:524000 湛江,广东医学院(李朝阳);528000 广东省佛山市第一人民医院(徐致祥、谭家驹)

通讯作者:谭家驹,电子信箱:tjj@fsyyy.com

甲基化及其表达到底是什么样的情况?而不同区域间的食管癌病人在这方面又有何种差异?这些都成为学者们研究的问题。

1. 食管癌癌前病变阶段:众所周知肿瘤的防治重点是癌前病变,如果当病人处于癌前病变阶段,就去给予干预和治疗,或许能从根本上解决肿瘤问题。而要早期发现癌前病变,就目前的科技水平来说还没有一种方法和指标能够去快速准确的做到。那 p16 基因甲基化及表达在食管癌癌前病变中是何种状况?能否作为快速准确检测食管癌癌前病变的生物学指标?现将近几年这方面研究列举如下。段秀方等^[7]研究发现食管正常上皮(包括单纯增生)、异型增生与鳞癌之间 P16 蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.01$),表现为 P16 蛋白随病情加重而阳性表达率逐次降低,即缺失率逐次升高。他们也认为 P16 蛋白的异常可以成为估价食管上皮异型增生生物学行为的有价值的指标,是食管癌早期诊断的敏感指标。Mohammad 等^[4]发现在一些癌旁和切缘组织中存在 p16 基因甲基化,提示这种表观遗传学改变可能发生在食管鳞癌形成的早期,认为可成为食管癌危险性的预测性生物标志。秦艳茹等^[8]研究发现在 NOR(正常食管上皮)和各级癌前病变组织及 SCC(鳞状细胞癌)组织中均出现不同程度的 p15、p16、mdm2 和 p53 表达。随着病变发展[从 NOR→BCH(基底细胞过度增生)→DYS(不典型增生)→CIS(原位癌)→SCC],p15 和 p16 的表达逐渐降低,mdm2 和 p53 的表达逐渐增高($P < 0.05$)。从而认为 p15、p16 的低表达和 p53、mdm2 的高表达可能是导致病变持续向癌方向发生发展的机制之一。郭晓青等^[9]研究发现,p16 及 FHIT 基因的甲基化在食管癌变的早期即已存在,可能是食管癌发生的重要因素之一,而且在肿瘤发展过程中发挥着一定的作用。余伟伟等^[10]发现,环太行山地区食管癌组织 p16 基因在癌前病变中 p16 启动子区即发生了纯合型甲基化、食管癌变的早期事件。p16 基因启动子区甲基化可单独影响 P16 蛋白的正常表达。Malley 等^[11]对 Barrett 食管的研究发现,p16 基因改变发生在病变发展早期。孟霞等^[12]研究发现,抑癌基因 P16 的蛋白表达变化可能发生在食管癌变的早期阶段。郭晓青等^[13]研究认为,p16 及 FHIT 基因甲基化检测有望将食管癌的筛查提前到原位癌阶段,这将为食管癌的早期发现提供帮助。Mohammad 等^[14]研究证实肥胖和职业暴露通过促进 p16 启动子甲基化增加患食管癌的危险性。

2. 食管癌癌变阶段:食管癌癌变阶段包括原位癌及浸润癌,在这个阶段,p16 基因甲基化及表达情况又是如何?这些情况与食管癌的恶性程度、TNM 分期、淋巴结转移及预后又有什么样的关系?现将近几年相关方面的研究列举如下。Wong 等^[15]发现,p16 缺失与食管癌淋巴结转移有关,p16 的检测可评估病人的预后。也发现 p16 基因异常及 P16 蛋白的表达缺失与食管鳞癌的发生及恶性进展有关,从而检测 P16 蛋白有可能成为判断食管鳞癌预后的一个指标。宋长山等^[16]研究发现,P16 蛋白的表达缺失在食管癌的发生、进展、转移复发过程中产生了重要的作用。认为 p16 基因的异常可能是贯穿食管癌的发生发展过程中一个分子事件,而 p16 基因蛋白检测可作为临床辅助诊断食管癌、判定恶性程度、估计预后的辅助指标。宋长山等^[17]研究发现 p16 基因启动子区的异常甲基化符合一个量的积累过程。在食管癌的演进过程发挥着重要作用,其甲基化程度与癌变的进展密切相关。郭晓青等^[18]发现 P16 蛋白表达缺失是食管癌以及癌前病变发生的一个早期事件,p16 基因可能通过启动子区甲基化失活参与了食管癌的发生发展过程。缪珑昇等^[19]研究发现,在食管鳞癌中 p16INK4a 基因启动子甲基化较常见,是蛋白失表达的原因,与食管鳞癌密切相关。而临床病理特征方面仅与分化程度相关,且甲基化频率在不同分期的食管鳞癌中保持相对稳定,与肿瘤的浸润深度及淋巴结转移等无关,提示这一变化可能出现在食管鳞癌发生的早期阶段,是食管鳞癌发生的早期事件。宋长山等^[20]研究认为,p16 基因甲基化在食管癌发生发展中起着重要作用,而食管鳞癌的分期和淋巴结转移与 p16 基因甲基化之间有密切关系。徐志巧等^[21]研究认为 P16 蛋白失活与肿瘤的恶性程度增高,淋巴结转移力增强有关。Noushin 等^[22]研究认为 P16 的高度甲基化是 P16 蛋白低表达的作用机制,这一过程在食管鳞状细胞癌的发展中起着重要的作用。这和 P53 的过度表达密切相关,并可能影响异常表达蛋白在 P53-MDM2 和 P16-Rb 途径上的积累,这预示着在食管鳞状细胞癌的发展中相关通路可能存在着相互交集。Fujiwara 等^[23]研究表明,p16 启动子甲基化抑制 p16 表达,而其表达的缺失与食管癌病人预后不良有紧密关系。同时这一结果可能导致新的治疗方案的出现,如 p16 基因治疗。

3. 不同区域间食管癌 p16 甲基化及其表达情况的差异:食管癌在全世界范围内呈现出发病率及病死

率的不均衡分布,高发区的发病率及病死率可能是低发区的数十倍乃至上百倍不等。那不同区域间 p16 基因的甲基化及表达情况是否有差异?

最早报道这一问题的是徐致祥、宋长山等^[18],他们研究发现高发区癌组织 p16 基因甲基化率明显高于低发区,差异有显著性($P < 0.05$),且两组间癌组织 P16 蛋白表达率差异无显著性($P > 0.05$)。他们认为 p16 基因异常甲基化可能是高发区食管癌癌变过程的重要事件,而在低发区 p16 基因异常甲基化可能不是其失活的主要机制。高、低发区可能存在不同的食管癌致癌机制。宋长山等^[24]在南北食管癌的比较研究中发现 p16 基因异常甲基化后功能失活可能是南、北两地食管癌癌变过程的重要事件,在我国南北环境气候条件不同的两地高发区食管癌的发生中均起着重要的作用。同时也认为甲基化在食管癌发生过程中可能是一个时间和剂量的积累过程。

三、p16 甲基化检测技术

从上面的文章我们可以了解到 p16 基因甲基化在食管癌的发生发展过程中起着举足轻重的作用,而且越来越多的研究证实 p16 基因甲基化可以作为一种生物学指标,应用于食管癌的早期诊断及转移、复发、生存期、耐药、化疗敏感性等方面的评估。那如何能准确敏感的检测到体内的 p16 甲基化情况?根据检测原理的不同,目前 DNA 甲基化的检测技术大致可分为 3 大类:①将 DNA 降解为单核苷酸而后通过化学分析仪器如液相色谱或质谱对甲基化与非甲基化的胞嘧啶进行区分;②用序列特异性甲基化内切酶使 DNA 部份降解,通过 PCR 方法或 Southern 印迹区分甲基化与非甲基化的相关序列;③利用亚硫酸氢钠预处理 DNA,直接通过引物延伸反应或偶联其他机制对甲基化与非甲基化的胞嘧啶进行区分,包括甲基化特异性的 PCR、亚硫酸氢盐测序法等。而大多数研究人员应用的最多的是高效液相色谱法、甲基化敏感性限制性内切酶法和甲基化特异性的 PCR 等检测方法。对于这几种方法的原理及优缺点已相当普及,因此本文就不一一介绍。在这里主要介绍几种基于这些原理的改进型检测方法。

1. 甲基化特异性焦磷酸微测序技术(MS - Pyrosequencing):焦磷酸微测序技术是由 4 种酶(DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶)催化的同一反应体系中的酶级联化学发光反应,在每一轮测序反应中,只加入一种三磷酸脱氧核糖核酸(dNTP),若该 dNTP 与模板配对,聚合酶就可以将

其掺入到引物链中并释放出等摩尔数的焦磷酸基团(PPi),PPi 可最终转化为可见光信号,并转化为一个峰值,每个峰值的高度与反应中掺入的核苷酸数目成正比,根据获得的峰值图即可读取准确的 DNA 序列信息。用焦磷酸测序技术检测基因甲基化水平,常用重亚硫酸盐将基因组 DNA 中的未甲基化的胞嘧啶修饰为尿嘧啶,甲基化的胞嘧啶保持不变,在以后的 PCR 扩增中,尿嘧啶将变成胸腺嘧啶,因此甲基化位点就成为 1 个普通的 C/T 单碱基多态性位点,其中等位基因 C 的频率即为基因甲基化的程度,它的基因频率为 0 ~ 100%。通过检测等位基因 C 的频率就能准确地得到基因甲基化的程度。该技术具有操作简便,不需要制备胶,不需要毛细管及可以对同一段基因的多个甲基化位点进行分析检测,并可以同时检测 96 个样品等优点。李宏伟等^[25]通过研究成功构建了甲基化特异性焦磷酸测序检测 RAR β 2 启动子区域甲基化阳性对照和阴性对照标准品质粒。建立了甲基化特异性焦磷酸测序检测基因启动子甲基化的方法。

2. 错配杂交化学发光法:错配杂交化学发光法是一种基于错配杂交和化学发光原理而建立的检测方法。其方法是用亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA,所有未甲基化的胞嘧啶都被转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不发生变化。设计合成 1 对不含 CpG 位点的引物,同时扩增甲基化或非甲基化目的 DNA 片段,用 2 条分别与甲基化及非甲基化 CpG 位点互补的寡核苷酸探针与扩增产物进行杂交及化学发光检测,通过探针杂交信号强度比确定样品 DNA 中甲基化的 p16 基因的比例。姚群峰等^[26]研究发现错配杂交化学发光法具有较好的精密性(CV 为 5.2% ~ 6.4%)和灵敏度(2.5×10^{-4} pmol),是一种检测快速、操作简便的 p16 基因甲基化的定量检测方法。

3. 巢式甲基化特异性 PCR 法:巢式甲基化特异性 PCR 是基于甲基化特异性 PCR 原理的改进型甲基化检测方法。其方法是将基因组 DNA 变性成为单链,用亚硫酸氢盐修饰单链 DNA,所有未甲基化的胞嘧啶被转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不变。设计针对甲基化和非甲基化等位基因的特异引物,进行巢式 PCR 扩增,最后经凝胶电泳检测目的片段。徐新娟等^[27]研究证实,巢式甲基化特异性 PCR 是一种灵敏度高、特异性强的甲基化检测方法,可广泛应用于不同类型标本基因启动子甲基化的分析。姚群峰等^[28]研究证实利用巢式 MSP(nMSP)法检测外周血

血清中 p16 基因启动子的甲基化,可为食管癌的筛查、早期诊断及预后判断提供有价值的信息。

四、去甲基化在肿瘤治疗中的应用相关研究

与基因突变、缺失等遗传学改变不同,表观遗传修饰作为肿瘤发生的机制之一具有可逆性,因此利用这一特征在肿瘤或癌前病变中可以通过去甲基化方法恢复某些关键性抑癌基因的表达,从而达到预防或治疗肿瘤的目的。而去甲基化药物作为主要的去甲基化途径,已成为日益重要的肿瘤治疗方法。目前去甲基化药物主要指 DNMT 抑制剂,其大致可以分为 3 大类:核苷类 DNMT 抑制剂,如地西他滨(5-氮杂-2'-脱氧胞苷);非核苷类弱 DNMT 抑制剂,如肼屈嗪;自行设计的抑制剂,如 RG108。下面将简要介绍地西他滨等去甲基化药物。

1. 地西他滨:地西他滨是第一个被美国 FDA 批准上市治疗恶性肿瘤的去甲基化药物,其药理作用是它们可以被整合到分裂细胞内的核酸中并形成稳定的共价键抑制甲基化转移酶活性,从而随着每一次细胞分裂周期,DNA 的甲基化程度进行性减少,从而逆转 DNA 的甲基化过程,诱导肿瘤细胞向正常细胞分化或诱导肿瘤细胞凋亡。李沛等^[29]研究证实 5-氮杂-2'-脱氧胞苷能够有效逆转 EC1 和 EC9706 细胞中 E-Cadherin 基因甲基化状态,并使其蛋白恢复表达;而对 TIMP3 基因的甲基化状态和蛋白表达影响不大。徐昕等^[30]研究发现,在 Raji 细胞中 P15INK4B 基因高度甲基化,并且其表达下降,而地西他滨可通过去甲基化抑制淋巴瘤增殖。

2. Zebularine:Zebularine 是一种胞苷类似物,目前还没有统一的中文译名,其去甲基化的可能机制是 Marquez 等^[31]研究发现 Zebularine 首先被磷酸化成双磷酸形式,经过一系列转变,最终转变为脱氧三磷酸-Zeb(dZTP)与 DNA 链的胞嘧啶相结合。接着 Zebularine 的 2-(1H)-嘧啶酮环与 DNA 链的鸟嘌呤形成碱基对,导致 DNA 双链间的 G:C 碱基间的氢键由两个变为 3 个。由于这种双链间的脆弱作用力,降低了碱基翻转所需要的能量,使得 DNA 和甲基化转移酶的结合更加容易。而 2-(1H)-嘧啶酮环取代胞嘧啶与 DNMT 相结合,形成了一种致密共价复合物阻止了 DNMT 的释放,从而使子代 DNA 达到去甲基化状态。Billam 等^[32]研究认为 zebularine 对于人类乳腺癌细胞系来说是一种有效的 DNA 甲基转移酶抑制剂和去甲基化剂,而且其可能产生与地西他滨和伏立诺他一样的疗效。Scott 等^[33]在体外研究发现

Zebularine 对于人类急性粒细胞白血病是一种有效的 p15INK4B 甲基化及细胞生长抑制剂,其研究结果证实它对非上皮细胞性恶性肿瘤也有疗效,同时也为评估其治疗骨髓源性恶性肿瘤的临床疗效提供了强有力的理论依据。

五、结 语

众所周知,食管癌的发生发展是由多基因、多因素所导致的,而在环境因素、吸烟、饮酒、酸菜、营养、遗传易感性、人类乳头状病毒等这些可能引起食管癌的因素中,目前研究认为环境因素起主导作用。而环境因素致癌,只能通过诱导内在的基因变异才能产生作用。那 p16 基因甲基化的情况与食管癌环境方面的特征有何种联系,能否去解释这些特征的产生。如食管癌不规则同心圆分布区其 p16 甲基化情况是否相同?它们之间是否有什么关联性?其又能否很好的去解释这种特异现象?我国学者徐致祥等提出的《氮循环-N-亚硝基化合物内合成假说》对食管癌的这些特征作出了合理的解释,但由于缺乏大量的实验数据去验证,使其存在很大的争议性,而如果我们能从分子生物学层面解释这些问题,从而为验证其假说的正确性提供一些线索,必将给食管癌的一级预防产生深远影响。

参考文献

- 1 Parkin DM, Freddie B, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108
- 2 Yang L, Parkin DM, Li L, *et al.* Time trend in cancer mortality in China, 1987-1999 [J]. Int J Cancer 2003; 106:771-783
- 3 Serrano M, Hannou GT, Reach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin CDK4 [J]. Nature, 1993, 366:704-707
- 4 Mohammad RA. Aberrant p16 methylation, a possible epigenetic risk factor in familial esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Gastrointest Cancer. 2005, 36(1):47-54
- 5 郭晓青,王士杰,张健慧,等. 食管鳞状细胞癌及癌前病变组织中 p16 基因甲基化的研究 [J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(7):495-497
- 6 王立东. 食管癌变机理和防治研究 [J]. 中国新消化病学杂志, 1996, 4(特刊 5):9210
- 7 段秀方,芦晓红. p16 及 CyclinD1 在食管癌前病变中的表达及其意义 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(1):99-101
- 8 秦艳茹,王立东. 食管癌前病变和癌组织中 p15、p16、mdm2 和 p53 蛋白的表达 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(1):47-48
- 9 郭晓青,王士杰,张健慧,等. 食管癌前病变组织 p16 及 FHIT 基因甲基化探讨 [J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(10):554-557
- 10 余炜伟,王立东,李醒亚,等. 食管鳞癌组织 p16 基因调控区甲基化及其蛋白表达研究 [J]. 山东医药, 2005, 45(31):5-7

- 11 Malley CC, Galipeau PC, Li X, *et al.* Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(10): 3414 - 3427
- 12 孟霞, 张立玮. 食管癌癌前病变基因分子水平的研究进展[J]. *临床消化病杂志*, 2004, 16(1): 46 - 48
- 13 郭晓青, 王士杰, 张健慧, 等. 血浆 p16 和 FHIT 基因甲基化在食管癌及癌前病变检测的临床意义[J]. *肿瘤*, 2006, 26(9): 832 - 835
- 14 Mohammad GS, Miotto E, Callegari E, *et al.* Associations of risk factors obesity and occupational airborne exposures with CDKN2A/p16 aberrant DNA methylation in esophageal cancer patients[J]. *Dis Esophagus*, 2010, 23(7): 597 - 602
- 15 Wong IH, Lo YM, Zhang J, *et al.* Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 71 - 73
- 16 宋长山, 谭家驹. p16 与 survivin 蛋白在食管癌中的表达及意义[J]. *中国肿瘤*, 2007, 16(8): 625 - 627
- 17 宋长山, 郭校锡. 高低发区食管癌 p16 基因甲基化及其表达的比较[J]. *广东医学*, 2009, 30(6): 919 - 922
- 18 郭晓青, 王士杰. 食管癌变过程中 p16 和 FHIT 甲基化与蛋白失表达关系的研究[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(14): 2751 - 2755
- 19 缪珑昇 相加庆. 食管鳞癌中 hMLH1、E-cadherin、p16INK4a 基因启动子甲基化及其意义[J]. *中国癌症杂志*, 2009, 19(5): 340 - 346
- 20 宋长山, 谭家驹, 崔金环, 等. 食管鳞癌中 p16 基因启动子区甲基化及其表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(1): 14 - 17
- 21 徐志巧, 帖晓静, 刘建民, 等. 抑癌基因 MTS1/P16 蛋白在食管癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国现代医生*, 2007, 45(10): 8 - 9
- 22 Noushin T, Firouzeh B, Masoud S, *et al.* p16^{INK4a} hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 138
- 23 Fujiwara S, Noguchi T, Takeno S, *et al.* Hypermethylation of p16 gene promoter correlates with loss of p16 expression that results in poor

- rer prognosis in esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Dis Esophagus*, 2008, 21(2): 125 - 131
- 24 宋长山, 谭家驹. 高发区食管癌患者 p16 基因甲基化及其表达的比较研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2007, 12(8): 570 - 574
- 25 李宏伟, 李慎, 梁平, 等. 焦磷酸测序检测 RARβ2 基因启动子甲基化方法的建立[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(14): 1285 - 1288
- 26 姚群峰, 宁勇, 郝巧玲, 等. 错配杂交化学发光法定量检测 p16 基因过甲基化[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(10): 1057 - 1059
- 27 徐新娟, 韩钰, 丁文柏, 等. 巢式甲基化特异性 PCR 检测不同类型组织标本中 WIF-1 基因启动子异常甲基化[J]. *现代生物医学进展*, 2005, 8(9): 1671 - 1674
- 28 姚群峰, 康新江, 郝巧玲, 等. 巢式甲基化特异性 PCR 检测食管癌病人血清中 p16 基因启动子区过甲基化[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(8): 463 - 466
- 29 李沛, 赵璇, 马俊芬, 等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷和 5-氟尿嘧啶对食管癌细胞系中 E-Cadherin 和 TIMP3 基因甲基化状态及蛋白表达的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2010, 45(5): 719 - 723
- 30 徐昕, 戴秋新, 徐茂忠, 等. 地西他滨对淋巴瘤细胞株 Raji 中 P15INK4B 基因的去甲基化作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2010, 48(7): 61 - 64
- 31 Marquez VE, Barchi JJ Jr, Kelley JA, *et al.* Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. the magic of its chemistry and biology[J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2005, 24(5-7): 305 - 318
- 32 Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 120(3): 581 - 592
- 33 Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, *et al.* Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression[J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(2): 263 - 273
(收稿: 2011-05-13)
(修回: 2011-05-23)

(上接第 152 页)

CT 灌注成像低剂量扫描能有效地反映肺癌的分化程度, 诸灌注参数中 BF、PH、T1_{SPN} - T1_{AA} 评价 NSCLC 的分化程度有一定帮助, 其中 BF 和 PH 与肺癌分化程度具有显著相关性。

参考文献

- 1 Axel I. Cerebral blood flow determination by rapid-sequence computed tomography: theoretical analysis[J]. *Radiology*, 1980, 137(3): 679 - 686
- 2 刘进康, 周晖, 熊曾, 等. 多层螺旋 CT 灌注成像与非小细胞肺癌病理特征的关系[J]. *临床放射学杂志*, 2009, 28(4): 479 - 483
- 3 刘进康, 胡成平, 周漠玲, 等. 多层螺旋 CT 灌注成像评价非小细胞肺癌分化程度的价值及其机制[J]. *中华放射学杂志*, 2009, 31(6): 460 - 464

- 4 李慎江, 肖湘生, 刘士远, 等. 肺结节的不均匀灌注[J]. *中华放射学杂志*, 2008, 42(8): 862 - 865
- 5 Miles KA, Charnsangavej C, Lee FT, *et al.* Application of CT in the investigation of angiogenesis in oncology[J]. *Acad Radiol*, 2000, 7(10): 840 - 850
- 6 翁姗姗, 宋伟. 低剂量螺旋 CT 扫描对肺内结节的诊断价值[J]. *癌症进展*, 2010, 8(4): 351
- 7 谭泽兵, 周顺科, 张子曙, 等. 采集时间对肺癌 CT 灌注成像影响的研究[J]. *中华放射学杂志*, 2008, 42(5): 539 - 540
- 8 张金娥, 梁长虹, 赵振军, 等. CT 肺灌注在肺结节诊断中的应用研究[J]. *中华放射学杂志*, 2005, 39(10): 1041 - 1045
- 9 刘士远, 周康荣, 肖湘生, 等. 周围型肺癌微血管密度与 CT 增强的关系[J]. *中华放射学杂志* 1999, 33(10): 694 - 698
(收稿: 2011-04-04)
(修回: 2011-04-21)