

肿瘤患者血清 DNA 甲基化的研究进展^①

南克俊, 魏永长 综述, 李 旭 审校

(西安交通大学第一医院肿瘤内科, 陕西 西安 710061)

【摘要】血清 DNA 是循环核酸的一种, DNA 甲基化与肿瘤的发生发展有密切关系; 甲基化特异性 PCR(MSP) 是血清 DNA 甲基化检测的灵敏方法, 血清 DNA 甲基化在肿瘤的早期诊断、分期、治疗及预后监测等方面有重要意义, 是目前肿瘤分子生物学研究热点之一, 具有极大的应用价值。

【关键词】肿瘤; 血清 DNA; 甲基化特异性 PCR; 甲基化

中图分类号: R730

文献标识码: A

早在 1947 年 Mandel 和 Metais 就发现了循环核酸, 30 年后 Leon 等人的研究发现肿瘤患者血液循环中游离 DNA 的水平显著高于正常人^[1]。血清 DNA 是循环核酸的一种, 它是血清中游离于细胞外的一种 DNA, 随着分子生物学的发展, 循环/血清 DNA 成为无创检测肿瘤微转移的最重要的手段而受到重视。细胞癌变是一个多阶段过程, 涉及基因和基因外的多种改变, 基因改变是指本身结构的异常, 方式有点突变、基因缺失、扩增、重排等; 基因外 (epigenetic) 改变即表遗传学改变主要指 DNA 分子中胞嘧啶发生甲基化, 引起基因表达异常, 但不改变 DNA 序列和基因产物, DNA 的甲基化在细胞的癌变过程中扮演着重要的角色, 是当前分子生物学的研究热点之一。血清 DNA 甲基化的检测是循环核酸研究的一项重要内容, 它与人类多种肿瘤的早期诊断、分期、治疗及预后密切相关。

1 血清 DNA 的来源

肿瘤病人和健康人血清中都存在游离 DNA, 健康人循环中 DNA 来源于淋巴细胞或其它有核细胞, 但肿瘤病人血清中存在大量 DNA, 这些基因物质从何而来仍不清楚。近年的研究表明可能存在以下几种途径: ①血循环中肿瘤细胞溶解或微转移灶排出。Miyazono^[2]对有关 DNA 的量作了统计, 发现在胰

腺癌病人中 1 ml 血浆有 1000 个肿瘤细胞, 远远超过以往的发现。用另一 DNA 提取方法 (boehninger columns) 提取的 DNA 量比用 Qiagen Kit 提取的 DNA 量多 10 倍, 估计 1 ml 外周血有 1 万个肿瘤细胞。②肿瘤细胞的坏死或凋亡。因为在具有较多坏死组织的大肿瘤或进展期伴转移的病人血清中发现较大量的 DNA, 从而推测血清 DNA 有可能来自肿瘤细胞的坏死。新近研究认为凋亡也是循环 DNA 的来源, Gicon 等^[3]应用凝胶电泳法检测血浆 DNA, 发现胰腺癌病人血浆 DNA 呈现凋亡细胞所特有的典型的“梯型”条带。Jahr S 等^[4]认为肿瘤细胞的坏死或凋亡是血清 DNA 的主要来源, 并用实验证实了这一来源, 在试管内和小鼠体内诱导肝细胞凋亡或坏死, 释放的 DNA 的数量就会增加, 凝胶电泳可以区分不同肿瘤病人的血浆 DNA 是凋亡或坏死的 DNA。然而在早期肿瘤患者中已能检测到血清 DNA 的升高, 表明肿瘤细胞的坏死可能并非循环 DNA 的唯一来源。③肿瘤不断释放 DNA 进入血液循环。淋巴细胞或离体培养的器官能通过一种自我平衡的机制自发释放核蛋白复合物, 并优先释放细胞内新合成的 DNA。有人推测肿瘤循环 DNA 可能以同样的方式释放入血。Stroun 等^[5]用结核菌素刺激淋巴细胞, 结果发现转化细胞中 90% 以上新合成的 DNA 被分泌入培养液, 而细胞死亡率却不超过 11%。与淋巴细胞相似, Anker 发现体外培

① 收稿日期: 2002-12-02; 修订日期: 2003-2-10

基金项目: 陕西省科技攻关项目(2002K10-G1)

作者简介: 南克俊(1958-), 男, 陕西省兴平人, 副教授, 博士, 主要研究方向为肿瘤综合治疗。

Tel: 029-3705937, E-mail: Alisantra0351@sin.com

养的白血病病人的肿瘤细胞比正常对照细胞释放更多的DNA。给小鼠注射具有刺激有丝分裂效应的细菌脂多糖,可观察到小鼠释放入血的DNA量增多。由此可见,外周血中存在肿瘤细胞DNA是以上3种不同途径共同作用的结果。但究竟哪种机制占主要地位仍不十分清楚。

2 基因甲基化与肿瘤

DNA的甲基化是指生物体在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DMT)的催化下,以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基转移到特定碱基上去的过程。高等真核细胞通常是对DNA分子上5'-CpG-3'序列的胞嘧啶进行甲基化修饰。CpG二核苷酸在人类基因组中占10%,其中70%~80%呈甲基化状态,可称为甲基化的CpG位点。非甲基化CpG二核苷酸区域仅占基因组的1%~2%,这些CpG二核苷酸以较大的密度分布于基因的5'端,称为CpG岛。CpG岛一般为几百至一千碱基长,通常位于基因的5'端启动区,也可延伸至基因的外显子区。

DNA甲基化改变通过基因机制和表遗传学机制引起与细胞增殖和分化有关的基因表达异常,造成细胞失去对正常分化过程的控制而发生癌变,最后形成肿瘤。甲基化与肿瘤基因突变有关,5mCpG二核苷酸中的5mC可自发或在酶的催化下能以较高的速率脱氨基转换为胸腺嘧啶(T),甲基化的CpG可突变为TpG,这种突变在抑癌基因P53中也很常见,是肿瘤相关基因甲基化促进细胞恶变的一种机制。DNA甲基化的表遗传学改变与癌基因的激活以及抑癌基因的失活有关,包括癌基因的低甲基化、抑癌基因的高甲基化、基因组不稳定性、基因印迹等几个方面。

①70年代以来研究发现,许多肿瘤细胞中癌基因DNA甲基化水平降低,而在正常细胞中是完全甲基化的,如化学致癌诱发的大鼠肝癌结节中观察到*raf*、*c-myc*、*c-fos*、*c-H-ras*、和*c-K-ras*等基因的低甲基化;②抑癌基因的高甲基化作为基因失活的表遗传学机制首先是在人类散发性视网膜母细胞瘤的RB基因中被发现的。VHL基因5'CpG岛的重新甲基化在散发的肾母细胞瘤中也被报道过^[6]。在人类原发性肿瘤组织中,包括膀胱癌,乳腺癌,肺癌,结肠癌,头颈部鳞状细胞癌等出现P16基因异常甲基化^[7]。而在原发性神经胶质瘤和淋巴瘤,白血病中,发生P15基因CpG岛重新甲基化。RB、VHL、P16和P15等基因甲基化普遍存在于多种缺乏基因突变和基因丢失

的肿瘤中的事实,说明DNA甲基化是人类肿瘤中抑癌基因失活的一种重要机制;③DNA修复缺陷是基因组不稳定的主要机制,基因突变是错配修复基因表达缺陷的原因,最近Ellenson LH等^[8]研究显示,人类微卫星不稳定性肿瘤中的hMLH1的基因由于启动子区高甲基化而导致hMLH1基因沉默也是微卫星不稳定性的重要原因(特别是在无突变的情况下),从而说明DNA甲基化改变也是肿瘤基因组不稳定的基础;④基因印迹是指来自双亲的基因或染色体存在功能差异在子代表现出不同,这是由于在生殖细胞发生过程中,基因受到甲基化修饰(被印迹)的结果,被印迹的基因表达受到抑制。近年来许多研究表明,一些肿瘤的发生与基因印迹的异常有关,发现肿瘤细胞中存在基因印迹的丢失^[9]。基因印迹是通过甲基化传递的,故可将基因印迹的丢失看作是表遗传学改变的一种类型。

肿瘤过程中DNA发生异常甲基化的分子机制还不清楚,可能与DMT有关也可能因为保护CpG岛不被甲基化的某种蛋白质的功能丧失。目前发现了3个有活性的哺乳动物DNA甲基转移酶-DNMT1和两种新的DNA甲基化酶DNMT3A、DNMT3B,后二者在体外具有将甲基加到未甲基化的DNA上的功能^[10]。人类某些肿瘤中3个DNMT基因表达升高。Yokochi T等^[11]最新发现DNMT3A与非甲基化DNA结合的能力比半甲基化DNA结合的能力强3倍,能非特异性地结合DNA,并且先结合DNA再与SAM结合。

3 血清DNA的甲基化的检测方法

目前有多种检测DNA甲基化的方法:①高效液相色谱法(HPLC)是经典的DNA甲基化测定方法,但它只能测定DNA总的甲基化水平,不能准确反映DNA甲基化与细胞恶性转化的关系;②限制性内切酶酶切DNA印迹杂交法敏感性较低,所需样本DNA也较多;③限制性内切酶切PCR法则先用甲基化敏感的限制性内切酶消化DNA,再以切割位点侧翼序列为引物用PCR扩增待测片段。此法所需的DNA样品少,灵敏度高,但是由于限制性内切酶消化不完全可产生假阳性,如果测定序列中存在两个或两个以上相同的酶切位点,容易出现假阴性;④PCR测序法,用固相DNA测序法对亚硫酸氢钠处理后的基因组DNA进行序列分析,通过与正常组织的测序比较来判断肿瘤DNA的甲基化改变。其检测甲基化水平准确,完善,但是繁琐费时且需要昂贵的测序试剂和

放射性物质,在临床推广有一定的难度;⑤甲基化特异性 PCR 法 (methylation - specific PCR, MSP), MSP 方法是 1996 年发展起来的一种检测方法,其基本原理:用亚硫酸氢钠处理 DNA,未甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶,甲基化的胞嘧啶则不变;然后用 3 对甲基化特异性引物对所测基因的同—核苷酸序列进行扩增,其关键在于 3 对特殊引物的设计。MSP 法具有以下优点:敏感性很高,能检测出 0.1% 的甲基化 DNA (50 pg), 1 ng DNA (与 DNA 载体鱼精蛋白结合) 即可被检测;样本用量少,也适用于石蜡包埋的组织;能检查所有的 CpG 位点,而不仅限于限制性内切酶能识别的位点,排除了因限制性内切酶消化不全而可能产生的假阳性;能达到与 Southern 定量分析相接近的半定量分析;并且扩增可用不同的限制性方法进一步证实。血清中 DNA 由于含量少,适合 MSP 方法检测。Goessl C 等^[12]认为荧光 MSP 是前列腺癌分子诊断的特异性工具,用荧光 MSP 检测前列腺癌病人癌组织、血浆/血清、精液和前列腺按摩后的尿液 GSTP1 启动子甲基化的检出率分别为 94%、72%、50%、36%。前列腺癌病人的循环肿瘤细胞用 MSP 检测率为 30%。

4 血清 DNA 甲基化检测的意义

以 PCR 技术为基础的 MSP 为血清 DNA 甲基化检测提供了简便、敏感的方法;血清中 DNA 甲基化作为肿瘤标记在肿瘤的早期诊断、早期复发、监测治疗的反应、预测肿瘤预后等方面有较大的应用价值。

4.1 早期诊断中的应用

肿瘤病人血清或血浆中肿瘤相关基因改变如癌基因的突变、染色体微卫星不稳定性、抑癌基因的突变、基因杂合现象的丢失等与原发灶的改变相一致为应用血清中 DNA 甲基化作为肿瘤标记检测和监测肿瘤的发生、发展提供了令人鼓舞的可能。有科学家发现,血清异常甲基化总是与肿瘤组织甲基化同时出现^[13]。Esteller M 等^[14]MSP 法检测 22 例 NSCLC 肿瘤抑制基因 P16(CDKN2)启动子甲基化、死亡相关蛋白激酶(DAP 酶)、谷胱甘肽 S 转移酶 P1 和 O⁶ 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基化转移酶(MGMT),发现 68% (15/22) NSCLC 肿瘤组织中至少有一种以上基因发生甲基化异常,而对照组正常肺组织无类似变化,15 例有甲基化的原发肿瘤中 11 例(73%)血清里也发现基因不正常甲基化。也有人血清 DNA 甲基化的诊断作用提出质疑,认为血清中肿瘤来源 DNA 甲基化缺乏组

织特异性而在临床中没有应用价值^[15]。甲基化检测的诊断价值可能与不同的基因和/或不同的肿瘤类型有关,一些血清标志物如甲基化 P16 由于其甲基化失活是人类肿瘤的共同特征能够检测多种类型肿瘤,然而对于一些特殊类型的肿瘤可用血清 DNA 中的另一些标志物检测,hMLH1 启动子甲基化检测大多数有微卫星不稳定性的散发结肠癌和子宫内膜癌^[16, 17],GSTP1 在 90% 的前列腺癌中有异常甲基化,因而是这些肿瘤的理想特异性血清标志物。

4.2 与肿瘤分期的关系

临床上指导肿瘤治疗的各种分期包括 TNM 分期都是以大体病理为依据,事实上早已发生微转移,有人发现,肿瘤转移患者血清 DNA 水平是没有肿瘤转移患者的 2 倍。Zou 等学者用 MSP 检测 52 例结直肠癌患者肿瘤组织和血清标本的 P16 基因甲基化,对照组为 34 例腺瘤性息肉和 10 例健康人。结果发现 52 例结直肠癌患者有 20 例甲基化占 38%,20 例中有 14 例(70%)血清检测出同样的甲基化,在其他 32 例肿瘤组织中无甲基化结直肠癌患者和对照组的血清中均未检测到甲基化。而且血清中 P16 基因系列甲基化与 Dukes' 分期显著相关^[18]。Sanchez-Cespedes M 等^[19]用 MSP 检测头颈部肿瘤病人 4 种 DNA 异常甲基化,并用甲基化的出现作为肿瘤细胞标志对血清 DNA 进行检测。结果发现基因启动子甲基化的检出与淋巴结受侵犯 ($P = 0.014$) 和疾病的进展期 ($P = 0.016$) 有显著相关,进一步提示关键基因启动子甲基化在头颈部肿瘤中常见,为疾病对肿瘤病人的影响提供了颇有前景的血清监测标志物。

4.3 与肿瘤复发的关系

正如血清中的肝癌特异性 mRNA 和 DNA,围手术期外周血中 AFP - mRNA 的变化能够早期预见 HCC 的复发一样,血清 DNA 启动子甲基化与肿瘤复发有关,Inbal B 发现血清 DNA 启动子甲基化的详细类型能够提供原发肿瘤生物行为的线索,如肿瘤转移抑制基因死亡相关蛋白激酶(DAPkinase)基因 CpG 岛甲基化的失表达意味着该肿瘤具有转移潜力^[20]。Wong IH 等^[21]研究发现肝癌病人中 48% (12/25 人)肿瘤 P15、P16 同时甲基化,其血浆/血清检测出 P15/P16 甲基化为 92% (11/12),同时甲基化的 12 例病人有 75% 发生临床转移或复发 ($P = 0.027$)。Esteller M 等^[14]研究认为检测血清中的肿瘤相关基因启动子甲基化对 NSCLC 的诊断和复发有监测作用。

4.4 与肿瘤预后的关系

在有些病例中,循环核酸的水平随着成功的抗癌治疗而下降,这提示循环中游离DNA可以被用来监测疾病的进展。研究发现,外周血DNA浓度超过100 ng/ml的患者存活率低,治疗后血清DNA浓度增高或者保持不变,往往提示治疗无效,是肿瘤复发及预后不良的指标。结肠腺瘤性息肉病基因(APC)的基因及基因后变化在胃肠肿的发展中常见,Usadel H等通过半定量甲基化特异性荧光素实时PCR来检测肺癌病人时发现肺癌肿瘤组织APC启动子甲基化高频率和水平在本研究队列中是唯一预见较低生存期的独立因子,血清/血浆DNA非损伤肿瘤标志物即APC甲基化分析在原发性肺癌中可以作为有前景的预后因子^[22]。台湾学者研究发现血清DNA甲基化与生存期有关。他们收集84例散发T3N0M0期结直肠癌的标本并复习临床资料,结果P16基因启动子甲基化不仅与DNA复制错误有着显著的关系,而且与非甲基化相比,对生存期不利($P=0.0001$),P16甲基化预示着生存期缩短^[23]。Brabender J等^[24]发现在原发性NSCLC中MGMT基因启动子高甲基化与短生存期有关,还可以作为具有侵袭行为的重要生物标志。

5 结束语

DNA甲基化在基因突变,基因表达,细胞增殖、分化、发育,基因印记等方面都起着重要作用,与肿瘤发生和演进有密切联系。肿瘤迄今仍是医学界的一大难题,医学家强调“早发现、早诊断、早治疗”,然而大部分病人在诊断时已经是中晚期,由于微转移的存在,即使是所谓“早期”的实体瘤,根治术后复发率、转移率高达50%以上。目前,许多肿瘤来源的基因改变已经能够在血浆和血清中检测到,例如:癌基因的突变、癌基因的增殖和肿瘤相关病毒DNA。人们对外周血循环DNA的变化进行了多方面的深入研究,发现通过肿瘤病人血清DNA可检测到肿瘤特征性的基因改变,如癌基因K-ras、抑癌基因P53的突变,P16、hMLH1、VHL的甲基化及微小卫星不稳定性等。这些可以反映肿瘤中核酸的改变往往先于肿瘤蛋白质标记物的出现,又可以通过微创的方法检测,因而在早期发现亚临床病灶、评价亚临床病灶进展及预测肿瘤预后方面远远优于肿瘤蛋白质标志,有望成为评价肿瘤状态的高度特异性的标志。存在一些问题 and 今后努力的方向:①血清DNA的来源和机制仍不明确;②仍有50%肿瘤病人的血浆DNA在正常范围,仅从外周血循环DNA量的变化诊断肿瘤价

值有限;由于CpG岛的异常甲基化具有非随机的和肿瘤类型的特异性,必须进一步寻找具体病种的特异性DNA甲基化标志才能有助于肿瘤的早期诊断和筛选;③理论上不清楚DNA甲基化是基因异常的结果还是基因异常的促进、巩固因素;④进一步探索血清DNA甲基化标记物的精确定量分析手段及其在临床应用推广问题。

参考文献:

- [1] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3): 646-650.
- [2] Miyazono F, Takao S, Natsugoe S, et al. Molecular detection of circulating cancer cells during surgery in patients with biliary-pancreatic cancer [J]. *Am J Surg*, 1999, 177(6): 475-479.
- [3] Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls [J]. *Pancreas*, 1998, 17(1): 89-97.
- [4] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1659-1665.
- [5] Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 906: 161-168.
- [6] Kuzmin I, Geil L, Ge H, et al. Analysis of aberrant methylation of the VHL gene by transgenes, monochromosome transfer, and cell fusion [J]. *Oncogene*, 1999, 18(41): 5672-5679.
- [7] Cody DT, Huang Y, Darby CJ, et al. Differential DNA methylation of the p16INK4A/CDKN2A promoter in human oral cancer cells and normal human oral keratinocytes [J]. *Oral Oncol*, 1999, 35(5): 516-522.
- [8] Ellenson LH. MLH1 promoter hypermethylation in microsatellite instability-positive endometrial carcinoma. Cause or consequence? [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(5): 1399-1402.
- [9] Derrane M. Gene imprinting: making an impression on cancer research [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(1): 16-18.
- [10] Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, et al. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(10): 2108-2113.
- [11] Yokochi T, Robertson KD. Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(14): 11735-11745.
- [12] Goessl C, Krause H, Muller M, et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 5941-5945.
- [13] Lee TL, Leung WK, Chan MW, et al. Detection of gene promoter

文章编号: 1004-616X(2003)04-0253-04

· 综述 ·

JNK/MAPK 途径调控机制研究进展^①

张文伶, 金勇丰, 朱成钢, 张耀洲*

(浙江大学生物化学研究所, 浙江 杭州 310029)

【摘要】 JNK 信号途径与多种疾病的发病机制有关, 如癌症、中风、鳞皮病、心脏病、发炎和神经萎缩等疾病。抑制 JNK 途径的药物具有一定的临床应用价值, 因此 JNK 是一个分子治疗靶。JNK 信号途径中的各成员相互作用的机制是目前研究热点之一, 本文就此研究的进展作一综述。

【关键词】 JNK; 相互作用; 停泊位点; 支架蛋白

中图分类号: R730.2

文献标识码: A

JNK(c-Jun NH2-terminal kinases) 家族, 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶, 也被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated MAP kinases, SAPK), 是哺乳动物内发现的第三类 MAPK(mitogen-activated protein kinases) 家族。JNK 在传导胞外信号至核转录因子时起着重要作用, 可以提高转录能力。JNK 信号途径存在于多种生命过程中, 如细胞生长、癌基因转化、细胞分化和细胞

死亡。有多种刺激信号都可介导 JNK 的活化, 如生长因子、细胞因子和环境应激。近来研究表明, JNK 与多种疾病发生机制有关, 从而使 JNK 在临床上可做为一个潜在的分子治疗靶。

1 JNK 的表达形式

JNK 蛋白可由 3 个基因编码。Jnk1 和 Jnk2 基因

① 收稿日期: 2003-04-28; 修订日期: 2003-05-26

作者简介: 张文伶(1976-), 女, 安徽省人, 医师, 硕士, 研究方向: 基因表达与调控。

* 通讯作者: Tel: 0571-86971414, E-mail: yzhzhang@zju.edu.cn

- hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(6): 1761-1766.
- [14] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 67-70.
- [15] Vis AN, Oomen M, Schroder FH, et al. Feasibility of assessment of promoter methylation of the CD44 gene in serum of prostate cancer patients [J]. *Mol Urol*, 2001, 5(4): 199-203.
- [16] Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6870-6875.
- [17] Esteller M, Levine R, Baylin SB, et al. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas [J]. *Oncogene*, 1998, 17(18): 2413-2417.
- [18] Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(1): 188-191.
- [19] Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 892-895.
- [20] Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis [J]. *Nature*, 1997, 390(6656): 180-184.
- [21] Wong IH, Lo YM, Yeo W, et al. Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9): 3516-3521.
- [22] Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(2): 371-375.
- [23] Liang JT, Chang KJ, Chen JC, et al. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3 N0 M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival [J]. *Oncology*, 1999, 57(2): 149-156.
- [24] Brabender J, Usadel H, Metzger R, et al. Quantitative (6) methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1): 223-227.