

MGMT 基因启动子甲基化检测在脑胶质瘤化疗中的意义

郑长青¹, 季守平¹, 宫 锋¹, 李安民², 邵军利², 章扬培¹

Detection of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in chemotherapy for glioma

Chang-Qing Zheng,¹ Shou-Ping Ji,¹ Feng Gong,¹ An-Ming Li,² Jun-Li Tai² and Yang-Pei Zhang¹

1. 军事医学科学院野战输血研究所,
血液生物化学与分子生物学实验室,
北京 100850

2. 解放军总医院第一附属医院
脑外科,
北京 100037

1. Department of Biochemistry and
Molecular Biology,
Institute of Transfusion Medicine,
Academy of Military Medical Sciences,
Beijing, 100850,
P.R. China

2. The First Affiliated Hospital,
PLA General Hospital,
Beijing, 100037,
P.R. China

基金项目: 国家自然科学基金
(30671995);

Grant: National Natural Science
Foundation of China (No. 30671995)

通讯作者: 章扬培

Correspondence to: Yang-Pei Zhang
Tel.: 86.10.68151876
Fax: 86.10.68151876
Email: zhangyp@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2008-10-23

修回日期: 2009-01-19

[Abstract] Background and Objective: Epigenetic silencing of the DNA repair gene, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), is associated with the therapeutic response to methylating agents. This study was to assess the value of detecting the promoter methylation of MGMT gene in chemotherapy for glioma. Methods: Methylation-specific PCR (MSP) was employed to detect MGMT promoter CpG island methylation in 39 samples of glioma taken from surgery. Western blot and immunohistochemistry were used to detect protein expression. MTT were employed to detect the sensitivity of two glioma cell lines to alkylating agents, ACNU and TMZ. The Kaplan-Meier curve was adopted to estimate the overall survival according to the methylation status of the MGMT promoter. Results: Methylation of MGMT promoter CpG island was detectable in 46.2% of glioma tissues, but not in any normal tissues. The expression rate of MGMT protein was 61.5%. The status of MGMT methylation status was association with the protein level of MGMT ($P < 0.05$). The MGMT gene was demethylated in glioma cell line SHG-44 following 5-Aza-CdR treatment; the expression of MGMT protein was restored and the resistance of SHG44 cells to alkylating agents was reversed. The overall survival was higher in patients with methylated MGMT promoter than in those with unmethylated MGMT promoter ($P < 0.05$). Conclusions: The status of MGMT promoter CpG island methylation is closely correlated to MGMT protein expression and sensitivity of cells to alkylating agents in glioma. Detection of the methylated sequences of MGMT may be used as a predictive factor for the treatment of glioma.

Key words: glioma, promoter CpG island, hypermethylation, DNA repair, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)

【摘要】背景与目的: 如何预测和克服肿瘤细胞对化疗药物的耐药性, 实施个体化治疗是肿瘤化疗急需解决的问题。与基因启动子甲基化密切相关的 DNA 损伤修复基因 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT) 表观沉默与肿瘤对烷化剂药物化疗敏感性密切相关。本研究探讨检测 MGMT 基因启动子 CpG 岛甲基化在判断脑胶质瘤患者预后及预测肿瘤对烷化剂药物耐药性中的意义。方法: 甲基化特异性 PCR (MSP) 法检测脑胶质瘤组织及肿瘤细胞株 MGMT 基因启动子甲基化状态, 蛋白印迹和免疫组化法测定蛋白表达, MTT 法检测肿瘤细胞株对烷化剂药物敏感性, 将患者随访资料针对 MGMT 甲基化状态绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 并进行 log-rank 检验分析。结果: 39 例脑胶质瘤患者组织 MGMT 基因启动子甲基化发生率为 46.2%, 蛋白表达阳性率为 61.5%, 且肿瘤组织中 MGMT 基因甲基化状态与蛋白表达显著相关 ($P < 0.05$); 6 例正常组织均未检测出基因甲基化。MGMT 基因过甲基化的脑胶质瘤 SHG-44 细胞株用 5-Aza-CdR 处理后完全脱甲基化, MGMT 蛋白恢复了表

达,同时细胞株对烷化剂药物敏感性也发生逆转,由敏感转变为耐受。在采用手术、放疗和烷化剂尼莫司汀化疗等综合治疗的 39 例脑胶质瘤患者中,MGMT 基因甲基化的患者生存率显著高于 MGMT 基因未甲基化患者($P<0.05$)。结论:MGMT 基因甲基化状态与蛋白表达及肿瘤细胞对烷化剂药物敏感性密切相关,有可能替代 MGMT 蛋白检测成为判断脑胶质瘤患者预后和预测肿瘤对烷化剂化疗耐药性的标志分子。

关键词:脑胶质瘤;启动子 CpG 岛甲基化;DNA 修复;MGMT;耐药性;分子标志物

中图分类号:R73 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2009)06-0575-06

恶性脑胶质瘤是人类难治性肿瘤之一,尽管脑胶质瘤的治疗方法已经由单一的手术治疗发展到今天的手术加放疗和化疗等综合治疗,但是在过去的几十年里,恶性脑瘤患者的预后并没有得到明显的改善,耐药是化疗疗效不佳的主要原因。一些研究资料已经证实 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O⁶-methylguanaine-DNA methyltransferase, MGMT)能够迅速修复由烷化剂药物引起的 DNA 烷化损伤,从而使细胞对烷化剂产生耐受^[1,2]。MGMT 在脑胶质瘤组织中的表达与肿瘤的耐药性有关,是造成肿瘤耐药的主要原因,以抑制 MGMT 活性为基础,合理使用烷化剂的预见性、个体性方案正在进行各期临床试验^[3-5]。但诊断性 MGMT 检测遇到方法学及标本来源等较多困难,近年来,与基因甲基化密切相关的 MGMT 基因表观沉默研究取得较大进展,MGMT 基因甲基化与肿瘤细胞对烷化剂药物敏感性密切相关^[6]。基因甲基化检测有可能成为肿瘤诊断及预测肿瘤对烷化剂药物敏感性的标志分子。本研究拟从基础和临床两方面评估 MGMT 甲基化检测在预测脑胶质瘤细胞对烷化剂药物敏感性、进行个体性化疗中的意义。

1 材料与方法

1.1 患者和组织标本来源

39 例脑胶质瘤组织来源于 2003 年 4 月至 2007 年 12 月解放军总医院第一附属医院手术切除标本,新鲜组织样本切除后立即贮存于液氮中。所有的样本均为原发性肿瘤,其中星形胶质细胞瘤 11 例,少枝胶质细胞瘤 5 例,少枝星形细胞瘤 10 例,多形性胶质母细胞瘤 13 例。病理分型和分级按 WHO 中枢神经系统肿瘤分类和分级标准, I ~ II 级 14 例, III ~ IV 级 25 例。患者中男性 18 例,女性

21 例,年龄 18~72 岁,中位年龄 37 岁。患者均接受了开颅手术切除、术后给予常规放疗和尼莫司汀(ACNU)等烷化剂化疗,每 3 个月随访一次。6 例正常脑组织来源于脑外伤及脑皮质造瘘患者。

1.2 脑胶质瘤细胞株进行 5-Aza-CdR 脱甲基化处理

脑胶质瘤细胞株 SHG-44、U251 购自中科院上海细胞库;培养基:SHG-44 为 RPMI-1640(Sigma), U251 为高糖 DMEM(Gibco)均添加 10%胎牛血清及双抗,于 37℃、5% CO₂、100%湿度培养箱中培养。SHG-44 和 U251 细胞按常规培养,使细胞处于对数生长期。加 5 μmol/L 浓度的 5Aza-CdR 培养 6 d,分别在第 1、3、5 天换液,药物浓度保持一致,培养 6 d 后换成常规培养基培养 7 d,进行药物敏感性试验。同时用未加药培养基培养的细胞作对照,并收集细胞分别行基因组 DNA 提取和蛋白印迹试验。

1.3 MTT 法检测脑胶质瘤细胞株烷化剂药物敏感性试验

药物配制:尼莫司汀(ACNU)(三共株式会社,溶于 PBS 配成 5 mg/mL),替莫唑胺(Sigma, DMSO 助溶解用 PBS 配成 5 mg/mL),MTT (Amersco,用 PBS 制成 5 mg/mL)。药物配成后均经 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌,分装-20℃保存。

将细胞用培养基配成 1×10⁵/mL 悬液,加在 96 孔无菌培养板内,每孔 190 μL,孵育 24 h,使肿瘤细胞处在对数生长期。实验设阴性对照组及各种药物的实验组:(1)阴性对照;(2)ACNU;(3)TMZ;将 7 个不同浓度药物分别加在 96 孔板内,每孔加药量 10 μL,每种剂量 3 个平行孔。阴性对照孔加入等量的完全培养液,重新放入培养箱中培养 72 h 后取出,测定结果。根据下列公式计算细胞存活率。细胞存活率=药物组平均 A₅₇₀ 值/阴性对照组平均 A₅₇₀ 值×100%。计算 IC₅₀ 值(细胞存活 50%时所对应的药物浓度)。实验重复 3 次,取平均值进行统计分析。

1.4 DNA 抽提

用基因组 DNA 提取试剂盒(DNA Extraction kit, Promga)提取新鲜冰冻组织和肿瘤细胞株基因组 DNA,操作步骤按说明书进行。DNA 抽提后用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测纯度及含量。

1.5 甲基化特异性 PCR(MSP)

用 DNA 甲基化修饰试剂盒(EZ DNA Methylation-gold™ Kit)对上述抽提的基因组 DNA

进行亚硫酸氢盐修饰(按试剂盒操作说明进行)。修饰后,甲基化的胞嘧啶(C)保持不变,而未甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶(U),在随后的 PCR 反应中,被 *Taq* 酶读作为胸腺嘧啶(T)。经过修饰的 DNA 样品分别以甲基化和未甲基化引物进行扩增,扩增 MGMT 基因启动子区-20 至第一外显子之间的一段含增强子的核酸,引物序列参照文献^[6],由北京奥科生物技术有限责任公司合成。MGMT 基因甲基化引物:正义链:5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTT CGC-3',反义链:5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAA CG-3' MGMT 基因未甲基化引物:正义链:5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3',反义链:5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3' 退火温度分别为 55℃ 和 63℃。

DNA 扩增选用 Hotstart *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa),反应条件为:95℃ 5 min;95℃ 45 s,各对引物退火温度 45 s,72℃ 60 s,35 个循环后 72℃ 延伸 5 min。以正常人外周血淋巴细胞(PBL)DNA 作为未甲基化阳性对照,用甲基化酶(MSSsI)(New England Biolabs)处理的 PBL DNA 作为甲基化阳性对照,蒸馏水代替模板作为阴性对照。PCR 产物用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,紫外光凝胶成像系统观察结果。

1.6 免疫组织化学染色

组织标本经过甲醛固定、石蜡包埋。MGMT 的免疫组化染色采用 DAB 显色方法,MGMT 为鼠抗人单克隆抗体(北京中杉金桥生物有限公司提供)。MGMT 抗体为细胞核和浆着色,在镜下细胞核、浆棕染并且明显强于背景者为阳性,反之为阴性。阳

性细胞<5%为阴性,≥5%而<10%为弱阳性,≥10%而<30%为阳性,≥30%为强阳性。

1.7 统计学分析

统计学分析用 SPSS 13.0 for windows 软件完成,多样本均数比较采用单因素方差分析,两组均数比较采用单样本 *t* 检验,用药前后比较采用配对 *t* 检验。基因甲基化状态与患者生存期的关系用 Kaplan Merier 生存曲线表示,并进行 log-rank 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑胶质瘤实体瘤 MGMT 基因启动子甲基化状态与蛋白表达的关系

MSP 结果如图 1 所示,脑胶质瘤组织中出现未甲基化条带(U)扩增,而不出现甲基化条带(M)扩增,判定为基因未甲基化;U 和 M 条带均出现扩增,则判定为基因甲基化。在 39 例脑胶质瘤组织样本中,MGMT 基因启动子甲基化发生率为 46.2%

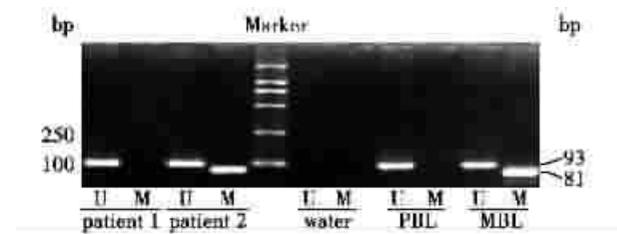


图 1 脑胶质瘤组织 MGMT 基因启动子 CpG 岛甲基化状态检测
Figure 1 Methylation-specific PCR analysis of MGMT promoter CpG island methylation in glioma tissues
PBL: peripheral blood lymphocytes; MPBL: methylated PBL; U: unmethylated; M: methylated.

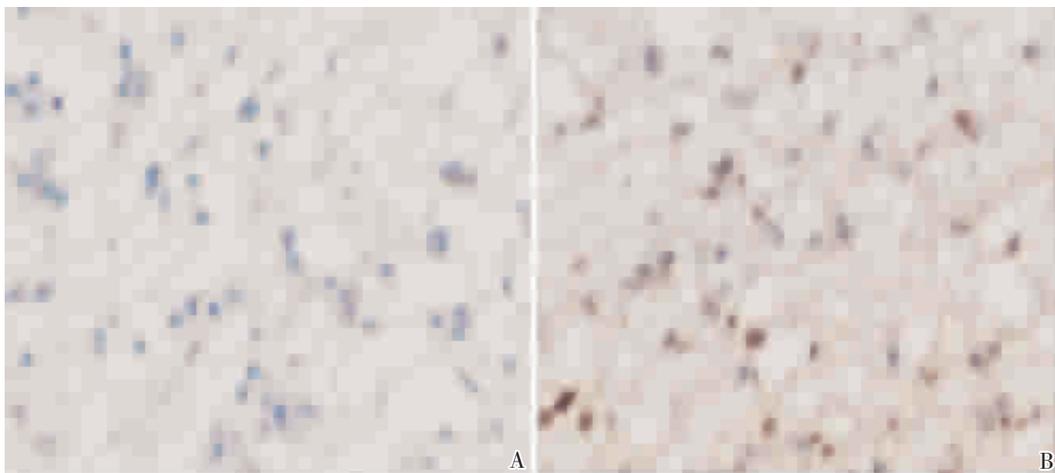


图 2 MGMT 在脑胶质瘤组织中的表达 (DAB ×200)

Figure 2 Expression of MGMT in glioma tissues detected by immunohistochemistry (DAB ×200)

A: negative expression of MGMT in the nucleolus and cytoplasm; B: positive expression of MGMT (brown) in the nucleolus and cytoplasm.

(18/39), 在 6 例正常人组织样本中均未检测到 MGMT 基因甲基化。免疫组化结果见图 2, 39 例脑胶质瘤患者组织中 MGMT 蛋白表达阳性率为 61.5% (25/39), 18 例 MGMT 基因甲基化患者中, 有 14 例 MGMT 蛋白阴性。3 例为弱阳性表达, 1 例 MGMT 阳性表达, 而 21 例 MGMT 基因未甲基化患者中, 只有 1 例 MGMT 蛋白表达阴性, 其余 20 例 MGMT 蛋白均为阳性表达。经 Spearman 检验分析, 脑胶质瘤患者中 MGMT 基因甲基化状态与 MGMT 蛋白表达明显相关 ($P < 0.05$), 见表 1。另外, 脑胶质瘤组织中 MGMT 基因甲基化发生率与患者性别、年龄、肿瘤大小、病理类型、疾病分期无明显的相关性 ($P > 0.05$)。

表 1 脑胶质瘤 MGMT 基因甲基化状态与 MGMT 蛋白表达的关系

MGMT promoter	MGMT protein expression(case)		Total [cases (%)]	Spearman
	Positive	Negative		
Methylation	4	14	18 (46.2)	0.031
Unmethylation	20	1	21 (53.8)	

2.2 脑胶质瘤细胞系 MGMT 基因甲基化状态与蛋白表达及药物敏感性相关性

脑胶质瘤细胞株 SHG-44 MGMT 基因启动子 CpG 岛高甲基化, 蛋白印迹试验为阴性; 用 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 处理后, SHG-44 细胞 MGMT 基因完全脱甲基化, MGMT 蛋白又恢复了表达; MGMT 基因未甲基化的脑胶质瘤细胞株 U251 在 5-Aza-CdR 处理前后 MGMT 蛋白均高表达。处理前后内参灰度比值无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 3、4。

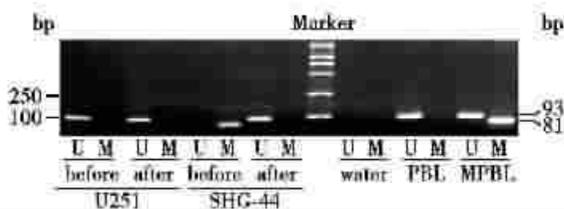


图 3 5-Aza-CdR 处理前后脑胶质瘤细胞株 MGMT 基因甲基化状态变化

Figure 3 Changes in the status of MGMT methylation of glioma cell lines after 5-Aza-CdR treatment

SHG-44 细胞和 U251 细胞对烷化剂药物敏感



图 4 Western blot 检测脑胶质瘤细胞株 5-Aza-CdR 处理前后 MGMT 表达

Figure 4 Expression of MGMT protein in glioma cell lines after 5-Aza-CdR treatment by western blot

性试验结果见图 5。SHG-44 细胞对烷化剂 ACNU 的 IC_{50} 值为 $30 \mu\text{g/mL}$ 、对 TMZ 的 IC_{50} 值为 $11 \mu\text{g/mL}$, 表现为对两种烷化剂较为敏感; U251 细胞对 ACNU 和 TMZ 的 IC_{50} 值分别为 $93.6 \mu\text{g/mL}$ 、 $25 \mu\text{g/mL}$, 对烷化剂耐受。5-Aza-CdR 处理细胞后, MGMT 基因启动子脱甲基化的 SHG-44 细胞对烷化剂药物敏感性也发生了逆转, SHG-44 细胞系对 ACNU 和 TMZ 的 IC_{50} 值分别升高了 2.5 倍和 3.1 倍。U251 细胞在 5-Aza-CdR 处理前后对烷化剂 ACNU 和 TMZ 敏感性没有明显变化 ($P > 0.05$)。

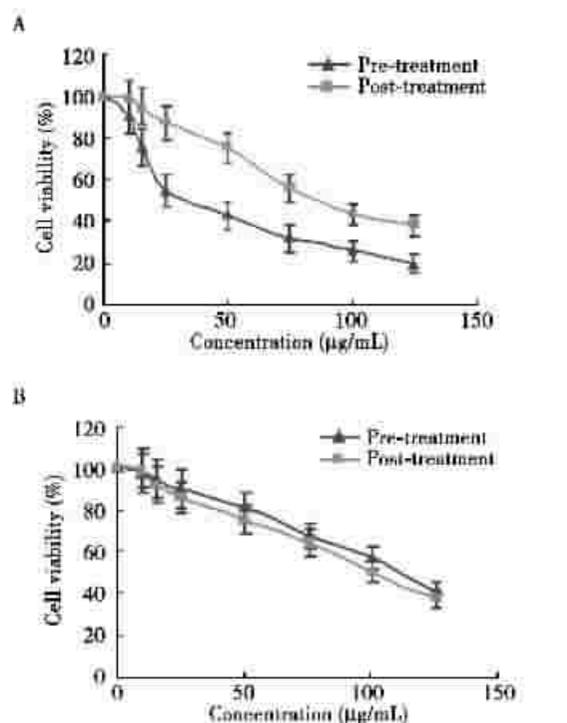


图 5 SHG-44、U251 细胞株 5-Aza-CdR 处理前后对烷化剂药物敏感性变化

Figure 5 Drug sensitivity of SHG-44 and U251 towards alkylating agents before and after 5-Aza-CdR treatment
A: SHG-44 cells; B: U251 cells

2.3 MGMT 基因甲基化状态与患者生存期的关系 对行手术切除、放疗和烷化剂化疗等综合治疗

的 39 例脑胶质瘤患者 MGMT 基因甲基化状态与生存期的关系绘制成 Kaplan-Merier 生存曲线,并进行 log-rank 检验分析。结果显示 MGMT 基因甲基化患者中位生存期为 26 个月,而未甲基化患者的中位生存期仅为 16 个月。通过比较, MGMT 基因甲基化患者生存期与 MGMT 未甲基化患者生存期差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 见图 6。

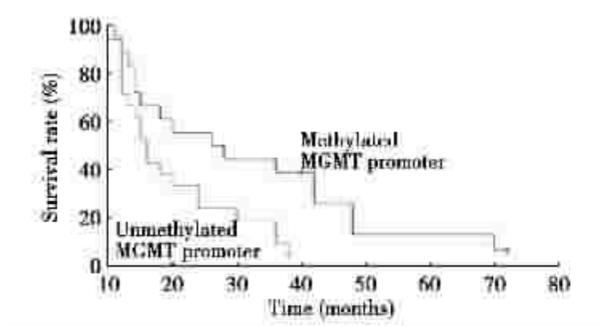


图 6 39 例脑胶质瘤患者对 MGMT 启动子甲基化的 Kaplan-Merier 生存曲线

Figure 6 Overall survival of 39 patients with glioblastoma according to MGMT promoter methylation status

3 讨论

化疗是脑胶质瘤综合治疗中的一个重要手段,烷化剂化疗在脑胶质瘤治疗中占有重要位置,氮乙基亚硝胺类 (CENUs) 药物和新一代单功能烷化剂替莫唑胺 (TMZ) 是脑胶质瘤化疗的首选,但临床治疗个体差异明显,耐药成为化疗成功与否的主要障碍。如何预测和克服肿瘤细胞对化疗药物的耐药性是脑瘤化疗急需解决的问题。

MGMT 作为一种 DNA 修复蛋白,能够移除 DNA 上鸟嘌呤 O⁶ 位点的能致突变毒性和细胞毒性的烷基化加合物,使损伤的鸟嘌呤恢复,从而能够保护细胞对抗烷基化基团的损害,是肿瘤耐受烷化剂药物的主要原因。MGMT 在 DNA 修复蛋白中是很独特的,它以直接损伤逆转路径,只需一步反应就能将 O⁶-AG 上的烷基化基团共价转移到自身的半胱氨酸残基活性位点上,使 DNA 上损伤的鸟嘌呤复原。这是一种自杀性反应,甲基化的 MGMT 蛋白失去活性,随后从 DNA 上释放下来,通过泛素化路径降解,而不能重新脱甲基化以恢复活性。许多研究资料已经证实, MGMT 在脑胶质瘤组织中的表达明显地影响了烷化剂的治疗效果,从而影响患者的预后^[5-7]。

近年来,与基因启动子甲基化密切相关的

MGMT 表观沉默取得较大进展,一方面, MGMT 基因沉默可导致肿瘤相关基因转换突变的累积,可能启动和促进了肿瘤的发生;另一方面, MGMT 基因过甲基化还与肿瘤增强对烷化剂药物敏感性密切相关^[7,8]。

以抑制 MGMT 活性为基础,合理使用烷化剂的预见性、个体性方案正在进行各期临床试验。但诊断性 MGMT 检测遇到方法学及标本来源等较多困难,研究者们试图以检测组织中 MGMT 蛋白水平或者测定 MGMT 活性作为评估药物敏感性指标。但是,相关检测方法如免疫组化和活性测定,受到很多因素的干扰,如 MGMT 表达容易受到烷化剂药物、放疗以及糖皮质激素等因素的诱导^[8],免疫组化和酶活性测定还受到正常组织和肿瘤浸润淋巴细胞的影响,与 MGMT 表达水平检测方法相比,用 MSP 方法来检测基因甲基化状态更为可靠和简便,由于只有肿瘤组织中才有甲基化的等位基因,即使有非肿瘤组织的污染也不会影响检测结果。CpG 岛甲基化是肿瘤组织可稳定遗传的 DNA 改变,启动子甲基化是更稳定的预测细胞诱导 MGMT 能力的标志。因此, MGMT 基因甲基化在肿瘤早期诊断和预测肿瘤对烷化剂药物耐药性中可能具有重要意义。

MGMT 基因甲基化已经在很多人类肿瘤中有报道,如肺癌、食管癌、结肠癌、宫颈癌等^[6,9,10],但在健康人及肿瘤患者的正常组织中均未检测出相关基因的甲基化。与其他研究者一致,我们在正常组织中没有检测到 MGMT 基因的甲基化,相反在脑胶质瘤患者肿瘤组织中 MGMT 基因甲基化发生率为 46.2%。表明 DNA 修复基因 MGMT 甲基化是脑胶质瘤发生过程中常见的分子事件,可能与胶质瘤的发生有关。Kaplan-Merier 生存分析结果显示 MGMT 甲基化患者生存期要明显长于 MGMT 基因未甲基化的患者。本研究中的 39 例脑胶质瘤患者均进行了开颅手术切除、放疗和烷化剂 ACNU 化疗等综合性治疗。但生存期的差异是否与 MGMT 甲基化状态调控了 MGMT 的表达,从而影响肿瘤对烷化剂敏感性有关呢?我们在用脱甲基化药物处理胶质瘤细胞实验中,证实 MGMT 基因甲基化状态与蛋白表达和肿瘤细胞株对烷化剂药物敏感性密切相关。MGMT 基因甲基化的细胞 MGMT 蛋白低表达或缺失, MGMT 未甲基化细胞 MGMT 蛋白高表达;用 5-Aza-CdR 处理细胞后,脱甲基化的 SHG-44 细胞 MGMT 蛋白恢复表达,同时细胞对烷化剂

药物的敏感性也发生逆转,从反面证实了 MGMT 基因启动子甲基化调控 MGMT 蛋白的表达,从而影响细胞对烷化剂药物敏感性。Hegi 等^[7]研究也表明,脑胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化的患者临床预后较好,采用放疗联合替莫唑胺化疗后的生存期与单纯放疗相比,其差异有统计学意义,而 MGMT 基因启动子未甲基化的患者单纯放疗与放疗联合化疗后的生存期差异无统计意义。这均提示 MGMT 甲基化状态对脑胶质瘤患者生存期的影响是因为 MGMT 基因甲基化影响了 MGMT 蛋白的表达,提高了烷化剂化疗疗效,从而影响了患者的预后。

综上所述, MGMT 基因启动子甲基化状态与 MGMT 表达及细胞对烷化剂药物敏感性密切相关,可以较稳定地反映脑胶质瘤细胞诱导 MGMT 的能力,有可能成为判断脑胶质瘤患者预后及预测肿瘤对烷化剂药物耐药性的标志分子。随着检测方法的改进,研究者已经在不同肿瘤的血清、尿液、痰液和粪便等排泄物中检测到基因过甲基化^[9-11]。如果能够证实体液和组织中能等同地检测到肿瘤治疗相关基因的甲基化,则可能为临床肿瘤治疗提供一种检测方便稳定的生物标记系统。

致谢:此课题在研究过程中得到军事医学科学院野战输血研究所五室全体科研工作者和解放军第 307 医院李鼎峰主任的大力帮助,在此一并致谢。

[参 考 文 献]

- [1] Sabharwal A, Middleton MR. Exploiting the role of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) in cancer therapy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006,6(4):355-363.
- [2] Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004,4(4):296-307.
- [3] Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend [J]. *DNA Rep*, 2007,6(8):1155-1160.
- [4] Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy [J]. *Nat Rev*, 2008,8(3):193-204.
- [5] 章扬培. 甲基转移酶与肿瘤耐药预见性、个体化化疗的研究 [J]. *癌症*, 2004,23(6):724-734.
- [6] Lee S, Kim WH, Jung HY, et al. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2002,161(3):1015-1022.
- [7] Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005,352(10):997-1003.
- [8] Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, et al. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy [J]. *Annu Rev Med*, 2008,59:267-280.
- [9] Leung WK, To KF, Chu ES, et al. Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in the serum of patients with gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005,92(12):2190-2194.
- [10] 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.
- [11] Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, et al. Quantization of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006,98(14):996-1004.

[编辑及校对:庄爱华]