

· 临床研究 ·

巢式 PCR 法检测肝母细胞瘤中 p15 和 p16 基因启动子异常甲基化

高红¹, 杨屹², 漆衡², 张可仞², 王维林²

(中国医科大学盛京医院 1. 卫生部小儿先天畸形重点实验室; 2. 小儿外科 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 DNA 甲基化被认为是反映细胞内 DNA 转录状态的重要遗传学标记。该研究旨在对小儿肝母细胞瘤中 p15 和 p16 基因 5' 启动子区 CpG 岛异常甲基化的相关性进行评估, 并分析其与小儿肝母细胞瘤发生发展的关系。**方法** 采用甲基化特异性 PCR 法, 对 30 例小儿肝母细胞瘤、癌旁和远癌正常组织进行巢式 PCR 扩增, 经凝胶电泳和测序方法检测目的片段。**结果** 30 例小儿肝母细胞瘤组织中 p15 和 p16 基因 5' CpG 岛有 30% (9/30) 和 67% (20/30)、癌旁组织中有 20% (6/30) 和 57% (17/30)、远癌正常组织有 13% (4/30) 和 33% (10/30) 异常甲基化。在肝母细胞瘤中发现 1 例 p15E2 纯合缺失, 缺失率为 3% (1/30), E1 和部分 II 区域未见缺失; p16E2 和部分 I2 区域中 3 例杂合缺失, 缺失率为 10% (3/30), E1 和部分 II 区域未见缺失。**结论** p15 和 p16 基因 5' 启动子区 CpG 岛的异常甲基化可能在肝母细胞瘤发生发展中扮演了重要角色, 其主要机制可能是启动子区 CpG 岛甲基化抑制了基因的转录。
[中国当代儿科杂志, 2005, 7(5): 404-407]

[关键词] 肝母细胞瘤; p15 基因; p16 基因; CpG 岛; DNA 甲基化

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)05-0404-04

Detection of abnormal methylation of p15 and p16 gene promotor by nested PCR in hepatoblastoma

Hong GAO, Yi YANG, Heng QI, Ke-Ren ZHANG, Wei-Lin WANG. The Major Laboratory of Health Ministry for Congenital Malformations, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: gaohong515@sina.com)

Abstract: Objective DNA methylation has been regarded as an important genetics marker reflecting the transcription state of DNA in cells. This study aimed to assess the methylation of CpG island in 5' promotor region of p15 and p16 genes in children with hepatoblastoma, and to explore its relationship with the development of hepatoblastoma. **Methods** The methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and PCR-SSCP techniques were used to analyze DNA methylation. The tumor tissues, the tissues beside the tumor and normal tissues beyond the tumor in 30 cases with hepatoblastoma were studied by nested MSP. The target fragment was verified by gel electrophoresis and sequencing. **Results** The incidence of abnormal methylation of 5' CpG island of p15 and p16 genes in tumor tissues was 30% (9/30) and 67% (20/30) respectively. It was 20% (6/30) and 57% (17/30) respectively in the tissues beside tumor and that was 13% (4/30) and 33% (10/30) respectively in the normal tissues beyond the tumor. Homozygous deletion of exon 2 of p15 gene was found in 1 of 30 cases (3%) in hepatoblastoma. No deletion of exon 1 or intron 1 was found. Heterozygous deletion of exon 2 of p16 gene and partial intron 2 was found in 3 of 30 cases (10%). No deletion of exon 1 or intron 1 was found. **Conclusions** The abnormal methylation of CpG island in 5' promotor region of p15 and p16 genes appears to play a role in the development of hepatoblastoma, which might be attributed to the inhibition of gene transcription by abnormal methylation of CpG island in the promotor region.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(5): 404-407]

Key words: Hepatoblastoma; p15 gene; p16 gene; CpG island; DNA methylation

肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 是小儿最常见的肝脏原发性恶性肿瘤, 迄今为止, 其发生的分子机制还不太清楚。随着分子生物学技术的迅速发展, 人们进一步认识到由正常肝细胞转变成癌细胞其最

根本的环节在于肝细胞内相关癌基因的过度表达与相关抑癌基因的失活和突变。DNA 甲基化具有多方面生物学意义, 甲基化主要发生在 CG 序列中的胞嘧啶碱基上, 但位于基因 5' 端的 CpG 岛通常是非

[收稿日期] 2005-03-08; [修回日期] 2005-06-09

[作者简介] 高红 (1959-) 女, 大学, 副主任技师。主攻方向: 小儿先天畸形分子生物学的研究。

甲基化的,近年来研究发现,如果 CpG 岛发生异常甲基化往往会改变基因表达模式,导致基因转录失活^[1]。在人的原发性肝癌中,有 p16 基因启动子区 CpG 岛异常高甲基化的报道,但比例差异较大,甚至有未检出甲基化的报道,这可能与种族与疾病背景差异有关^[2,3];而在肝癌中 p15 基因 CpG 岛甲基化研究极少报道。我们采用高特异、高灵敏的甲基化特异性 PCR (nMSP),检测 HB 组织及相应癌旁病变组织、远癌正常组织中 p15 和 p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化状况,分析 p15 和 p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化与 HB 发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 收集 30 例 HB 及其相应癌旁和远癌正常组织,均为 1996~2004 年我院小儿外科的手术后切除标本(每例均经病理确诊)。其中男 21 例,女 9 例,年龄 3~14 岁。

1.1.2 试剂 亚硫酸氢钠、对苯二酚为美国 Sigma 公司产品,引物由上海博亚生物技术有限公司合成,nMSP 引物序列见表 1,产物由上海生工生物技术有限公司测序。

1.2 方法

1.2.1 组织 DNA 提取 应用试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit(购自基因有限公司)提取组织 DNA。DNA 经紫外分光光度计定量,-70℃ 保存备用。亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA:取 2 μg DNA,经透析袋透析纯化后以 20 μL 灭菌去离子水溶解经亚硫酸氢钠修饰后的 DNA,-20℃ 保存备用。

1.2.2 引物序列及巢式 PCR 扩增 针对亚硫酸氢钠修饰过的 DNA p15 和 p16 基因启动子区 CpG 岛序列,分别设计甲基化特异引物 p15M 和 p16M^[5](见表 1)。同时设计同一区域 CpG 岛序列的非甲基化特异引物 p15U 和 p16U,作为亚硫酸氢钠转化的对照;在无基因缺失突变的情况下,甲基化特异引物无 PCR 扩增时,则出现非甲基化特异引物应有 PCR 扩增;当基因 CpG 岛部分甲基化时,甲基化特异和非甲基化特异引物都将出现 PCR 扩增。

1.2.3 巢式 nMSP 25 μL 反应体系中含 2.5 mmol/L dNTPs,上、下游引物为 10 pmol/L,亚硫酸氢钠转化 DNA 模板 50 ng,Taq DNA 聚合酶 1U。PCR 扩增时相应的复性温度见表 1。第 1 轮 PCR 用外侧引物,将第 1 轮 PCR 产物适当稀释(50 倍)取 2 μL 做第 2 轮 PCR。并以正常健康人外周血白细胞

DNA 为阴性对照、H₂O 为空白对照。10 μL PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像分析仪拍照。每次样品至少重复 1 次扩增,T-24 细胞 p15 和 p16 基因启动子区是高甲基化的^[6],故以 T-24 细胞 DNA 为阳性对照。

1.2.4 p15 和 p16 基因缺失、突变检测 p15 和 p16 两个外显子分别进行 PCR 扩增,以检测基因缺失,PCR 扩增引物序列及片段长度参见文献^[7]。p15 和 p16 SSCP 的 PCR:94℃ 1 min,66℃ (E1 及其上下游序列,204 bp),57℃ (I1 及其下游 E2 内 18 bp 序列,168 bp)或 55℃ (E2 和 I2,439 bp 和 362 bp)均为 1 min,72℃ 2 min,40 个循环。20 μL PCR 产物加入 3 倍体积变性液,98℃ 变性 5 min,上样于中性聚丙烯酰胺胶,1×TBE 缓冲液中 4℃ 电泳 14 h。p15 和 p16 外显子 1,2 PCR 产物分别用限制性内切酶 Sac II,Sal I 酶切后,变性进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色并作分析。

1.2.5 对 SSCP 有异常的 PCR 产物进行测序

表 1 p15,p16 基因巢式 nMSP 引物^[4]

引物名称	序列	片段长度 (bp)	退火温度 (℃)
p16A	F 5'-GAAGAAAGAGGAGGGTTCG-3' R 5'-CTACAAACCTCTACCCACC-3'	280	60
p16M	F 5'-TTATTAGAGGCTGGGCGGATCGC-3' R 5'-GACCCCGAACCCTGACCGTAA-3'	150	65
p16U	F 5'-TTATTAGAGGCTGGGCTGGATTGT-3' R 5'-CAACCCCAAAACCACAACCATAA-3'	151	65
p15A	F 5'-CGCGCACCTGCGGCC-3' R 5'-CCGTGAGCGGCCG-3'	234	60
p15M	F 5'-GCGTTCGTATTTTCGCGTT-3' R 5'-CAATAACCGAACCACCA-3'	148	60
p15U	F 5'-TGTGATGTGTGGTT-3' R 5'-CCATACAATAACCAAC-3'	154	60

M,甲基化特异引物;U,非甲基化特异引物;F 和 R,正义引物和反义引物;带下划线的碱基表示甲基化改变位点

1.3 结果判断

取 PCR 扩增产物 10 μL,用已知的 DNA Marker 作为标记,2% 琼脂糖凝胶中电泳,溴乙锭染色,紫外灯下检测扩增产物,观察有无缺失,1D KODAK 成像扫描系统摄片保存。

p15 和 p16 外显子 1,2 的 PCR 产物 5 μL 分别用限制性内切酶 Sac II,Sal I 酶切,变性进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,与未酶切的样本比较,特异扩增带无明显减弱者为甲基化阳性,无阳性扩增带,为甲基化阴性。

选择有扩增产物的样本,重新进行 100 μL 反应体系的 PCR 扩增,经 PCR 纯化试剂盒 (Promage 产

品)纯化后,由上海生工生物工程有限公司进行DNA测序。

2 结果

2.1 nMSP 法检测

首先用 p15A 和 p16A 扩增出一个 234 bp 和 280 bp 的 p15 和 p16 基因启动子区片段。然后分别用 p15-M, p15-U 和 p16-M, p16-U 特异性引物进行第 2 次扩增,对于阳性(甲基化)标本,都有特异性扩增产物;对于阴性(非甲基化)标本,只有非甲基化引物的扩增产物。3 种标本中都可检测出 p15 和 p16 基因的异常甲基化(图 1,图 2)。本实验分别用 nMSP 法检测了 30 例 HB 的癌、癌旁以及远癌正常组织中 p15 和 p16 基因的甲基化状态,检测率分别为癌组织有 30% (9/30) 和 67% (20/30) 异常甲基化;癌旁组织有 20% (6/30) 和 57% (17/30) 异常甲基化;远癌正常组织只有 13% (4/30) 和 33% (10/30) 异常甲基化;30 例健康人外周血均为 p15 和 p16 基因 5'启动子区 CpG 岛甲基化阴性。

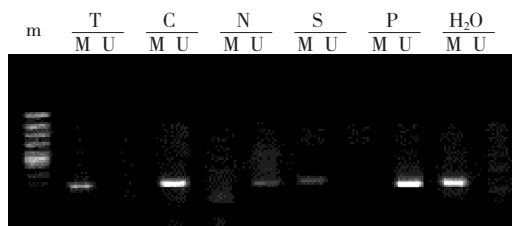


图 1 MSP 法检测 HB, 癌旁, 正常组织及健康外周血 p15 基因的甲基化状态。M: 用 p15-M 特异性引物进行扩增; U: 用 p15-U 特异性引物进行扩增; m: Marker DL, 2000; T: HB 组织; C: 癌旁组织; N: 正常组织; S: 正常人健康外周血(阴性对照); P: T-24 细胞(阳性对照); H₂O: 空白对照

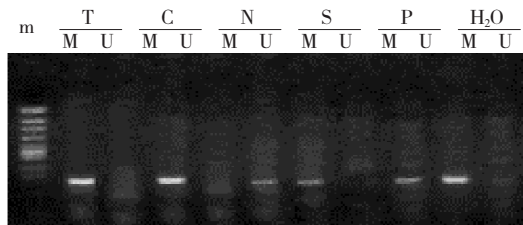


图 2 MSP 法检测 HB, 癌旁, 正常组织及健康外周血 p16 基因的甲基化状态。M: 用 p16-M 特异性引物进行扩增; U: 用 p16-U 特异性引物进行扩增; m: Marker DL, 2000; T: HB 组织; C: 癌旁组织; N: 正常组织; S: 正常人健康外周血(阴性对照); P: T-24 细胞(阳性对照); H₂O: 空白对照

2.2 p15 和 p16 基因的缺失

2.2.1 p15 基因纯合缺失 p15E2 的突变分析,

用限制性内切酶 Sam I 将 439 bp 的 PCR 扩增产物酶切为 200 bp 和 239 bp 两个片段,然后再进行 SSCP 分析,发现 HB 组织中有 1 例单链 DNA 迁移率改变,SSCP 表现为 4 条额外带(图 3),突变率为 3% (1/30)。作为 p15 基因其它癌旁以及对照的远癌正常组织均未显示额外迁移带。

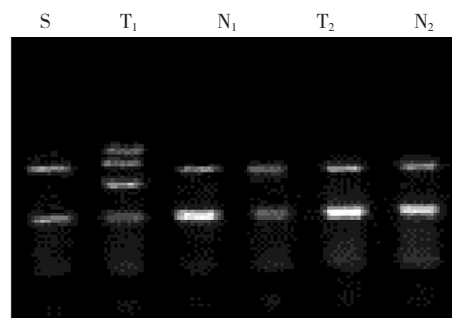


图 3 p15 基因的 SSCP 分析。p15 基因第二外显子经 Sam I 酶切后的 SSCP 分析,可见 p15 基因,第二外显子中 T1 有单链带的电泳迁移异常;S: 正常对照;T: HB 组织;N: 远癌正常组织

2.2.2 p16 基因杂合缺失 用多重 PCR 方法分析,

30 例 HB 组织中发现 p16E2 和部分 I2 区域中有 3 例缺失(为杂合缺失),缺失率为 10% (3/30)。1 例 PCR 产物经测序证实 E2 分别导致氨基酸序列 TAA→TAC 同义突变和 CTA→ATA 错义突变(表 2, 图 4),且这 1 例 HB 的癌旁及正常组织测序均未见突变。E1 和部分 I1 区域未见缺失。

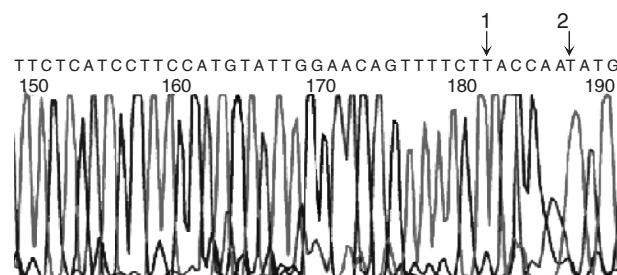


图 4 p16 基因扩增发生甲基化的组织 DNA PCR 产物部分测序图。箭头处 1 显示 TAA 变为 TAC;箭头处 2 显示 CTA 变为 ATA

表 2 肝母细胞瘤中 p16 基因突变

肿瘤名称	第一外显子	
癌旁及正常组织	CAGTTTCTTAACCA	TCTTAACCACTATCT
肝母细胞瘤	CAGTTTCTTAACCA	TCTTAACCAATATCT
突变特性	终止密码子→酪氨酸	亮氨酸→异亮氨酸

3 讨论

DNA 甲基化是 DNA 分子上重要的碱基修饰方

式之一,研究表明^[8],其基因启动子或5'端调节区内及其附近 CpG 岛甲基化常引起基因的转录失活。在肿瘤组织中,已发现一系列抑癌基因存在启动子区异常高甲基化所导致的失活现象^[9]。p16 基因全长 8.5 kb,由 2 个内含子和 3 个外显子组成,其 5'端的 126 bp 编码外显子 1,中间部分的 307 bp 编码外显子 2,3'端的 11 bp 编码外显子 3^[10]。

我们的研究以及国内外其他研究均表明,利用 nMSP 进行基因甲基化分析的灵敏度和可操作性优于目前已知其他 DNA 水平的分子检测方法。首先,改良后的半巢式 nMSP 方法对 p16,p15 基因甲基化检出率有明显提高;其次,DNA 甲基化是一种比较稳定的 DNA 修饰,可以在子代细胞中保留,并且随癌变进程有增强的趋势^[11]。同时,对于抑癌基因来说,CpG 的胞嘧啶甲基化主要发生在启动子区域,而其他突变(如点突变)经常发生在基因序列中的不同区域,因此检测比较简单。此外,DNA 甲基化分析是一种正向检测方法,即:将甲基化异常的获得作为判断标准,分析结果不会受正常细胞存在的干扰,检测结果直观,降低了假阴性率和假阳性率,也使不同实验室的数据具有可比性^[12]。本实验中采用 nMSP 法对待测区域进行 2 次扩增,提高了检测的特异性和灵敏度,非常适合于检测血清/组织中微量的 DNA 的甲基化状态。

肿瘤抑制基因 p16,p15 失活被较多报道,虽然在原发性肝细胞癌(HCC)中 p16 基因的失活已有报道^[13],但主要失活机制很不一致。这种差异可能与实验样本、实验方法及分析标准不同有关。最近 Jin^[14]报道,在 20 例 HCC 中 p16 E2 纯合缺失率是 15%,p15 E2 纯合缺失率是 20%,p16 E2 和 p15 E2 共同缺失率为 10%,并认为 p15 和 p16 基因纯合性缺失和甲基化是两个较主要的基因失活机制,p15 和 p16 基因改变是肝细胞癌起源的重要因素。我们采用 nMSP 法检测了 30 例 HB、癌旁以及远癌正常组织,检测出 HB p15,p16 基因异常甲基化有 30%和 67%;癌旁组织有 20%和 57%;远癌正常组织只有 13%和 33%。迄今已有许多事实证明,在许多肿瘤中,包括肝细胞癌,对 p16 和 p15 基因来说,除了缺失、突变以外,p16 和 p15 基因甲基化是一种较普遍的现象。本研究在 30 例 HB 中发现 1 例 p15 E2 缺失(为纯合缺失),缺失率为 3%,相应的癌旁组织及正常组织中均未发现有缺失或突变;p16 E2 和部分 I2 区域中有 3 例缺失(为杂合缺失),缺失率为 10%,而相应癌旁组织及正常组织中 E1 和部分 I1 区域均未见缺失。可见这一研究结果与大多数国内

外研究结果相近。但是我们关于 p15,p16 基因缺失率实验低于 Jin 研究结果,可能是由于样本误差所致。我们认为 p15 或 p16 纯合缺失以及二者共同缺失是 p16,p15 基因在 HB 中的失活方式之一。恶性肿瘤的发生与发展是由于多种致癌机制作用的结果,包括 p15,p16 基因的其他外显子缺失、突变和甲基化,因此 p15 E2 或 p16 E2 纯合缺失以及二者共同缺失只是引起 HB 发生、发展的机制之一。上述实验结果提示我们部分 HB 通过修复 p15 E2 或 p16 E2 缺失,可能对控制其肿瘤的发生发展有益。

本研究中还发现 3 例标本中癌旁组织 p15/p16 电泳密度比明显高于其相应的癌组织。这可能因癌旁组织中混杂有 p15/p16 基因缺失的癌组织,使癌旁组织的 p15/p16 基因 PCR 产物电泳带密度降低,导致 p15/p16 电泳带密度比明显低于癌旁组织。提示在研究 p15,p16 基因缺失时,选择远离癌组织作为自身对照可更好地避免癌组织污染。在 HB 的发生与发展过程中均伴有 p15/p16 基因的缺失和甲基化变异,由于细胞失去了负性调控作用,从而增殖过度易于发生恶性转化和肿瘤转移,因而导入正常 p15/p16 基因可能对突变细胞向表型良性转化有一定价值,为临床开展肿瘤抑癌基因治疗提供依据。

[参 考 文 献]

- [1] Hou P, Ji M, Li S, He N, Lu Z. High-throughput method for detecting DNA methylation[J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 6(2):139-150.
- [2] Furukawa O, Takeshima Y, Awaya H, Ishida H, Kohno N, Inai K. Aberrant methylation of p14 (ARF), p15 (INK4b) and p16 (INK4a) genes and location of the primary site in pulmonary squamous cell carcinoma[J]. Pathol Int, 2004, 54(8):549-555.
- [3] Ezoe S, Matsumura I, Satoh Y, Tanaka H, Kanakura Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Cell Cycle, 2004, 3(3):314-318.
- [4] Yu J, Ni M, Xu J, Zhang H, Gao B, Gu J, et al. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis[J]. BMC Cancer, 2002, 2(1):29.
- [5] Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res, 2000, 60(21):5954-5958.
- [6] 李建良,费琦,余坚,张红宇,王鹏,朱景德. 肝癌细胞系中肝转移相关候选基因启动子区域 CpG 岛甲基化和表达水平的相关性研究[J]. 癌症, 2004, 23(9):985-991.
- [7] Zhao Y, Zhang S, Fu B, Xiao C. Abnormalities of tumor suppressor genes P16 and P15 in primary maxillofacial squamous cell carcinomas[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1999, 112(1):26-33.
- [8] Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PM, Johnson PJ, Huang DP. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(1):131-137.

(下转第 410 页)

呈正相关(正常组与单纯性肥胖组相关系数 r 分别为0.2883和0.337,均 $P < 0.01$ 。

2.5 误差控制

每个96孔板共享一条标准曲线,同一标本双孔或多孔OD值的标准差(STDEV) $> 20\%$ 应重测,以避免加样误差或样本OD值超过最大浓度标准品OD值(即浓度过高)应据具体情况进一步稀释,如1:60 $\rightarrow$ 1:80再复测;实验中避免反复冻融血标本。

3 讨论

ASP是从血浆分离出的一种小分子蛋白质,分子量8 932道尔顿,与C3a desArg为同一物质^[1]。目前认为ASP是一种新型的脂源性激素,是脂肪储备的重要调节因子,主要作用是调节脂肪细胞甘油三酯的合成速度和抑制其脂解,与肥胖症的发生密切相关。ASP通过与细胞表面受体相互作用,激活胞内第二信使系统来协调葡萄糖的转运和脂肪酸的酯化。ASP代谢途径功能失调,将引起一系列脂质代谢紊乱,可能导致肥胖症、糖尿病和心血管疾病的发生^[1]。已有研究表明,肥胖症、冠心病、糖尿病患者血浆ASP浓度显著升高^[6]。我们的研究表明,儿童血浆ASP浓度与BMI呈正相关,高BMI的个体,血浆ASP水平升高,促进餐后游离脂肪酸的酯化和葡萄糖的转运,从而增加脂肪细胞内TG的合成,促进餐后血循环中TG的清除,最终导致个体总体脂增加。众所周知,肥胖是最常见的营养障碍性疾病,许多成年人肥胖症始于儿童,并与糖尿病、高血压、冠心病等密切相关^[7],但目前尚缺乏监测儿童肥胖

症的发展趋势和可能并发心血管疾病危险性的有效检测手段。因此,检测血浆ASP水平,对了解上述疾病的病理生理变化规律及发病机制有重要意义,血浆ASP的水平可作为判断儿童肥胖症的发展趋势和评价其未来发生心血管疾病、糖尿病危险性的新指标。血浆ASP的检测可作为脂代谢检测的一种新方法。但在实验过程中应注意排除干扰因素,控制误差。

[参 考 文 献]

- [1] Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues[J]. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82(1):170-190.
- [2] 张斌,陈忠,姚顺芳,胡秀芬,王宏伟. 促酰化蛋白水平与儿童肥胖的关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(4):291-293.
- [3] van de Graaf EA, Jansen HM, Bakker MM, Alberts C, Eeftink Schattenkerk JK, Out TA. ELISA of complement C3a in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *J Immunol Methods*, 1992, 147(2):241-250.
- [4] Saleh J, Summers LK, Cianflone K, Fielding BA, Sniderman AD, Frayn KN. Coordinated release of acylation stimulating protein (ASP) and triacylglycerol clearance by human adipose tissue in vivo in the postprandial period[J]. *J Lipid Res*, 1998, 39(4):884-891.
- [5] Scantlebury T, Maslowska M, Cianflone K. Chylomicron-specific enhancement of acylation stimulating protein and precursor protein C3 production in differentiated human adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(33):20903-20909.
- [6] Cianflone K, Xia Z, Chen LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in human and rodents[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1609(2):127-143.
- [7] 潘发明,祁红,陶芳标,曾广玉,周伟,刘旭祥. 儿童血压轨迹现象的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5(2):127-129.
- [8] (本文编辑:吉耕中)
- [9] Wong TS, Man MW, Lam AK, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR[J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(13):1881-1887.
- [10] Widschwendter M, Jones PA. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(1):17-21.
- [11] Fruhwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential[J]. *Mol Genet Metab*, 2002, 75(1):1-16.
- [12] Pineau P, Marchio A, Nagamori S, Seki S, Tiollais P, Dejean A. Homozygous deletion scanning in hepatobiliary tumor cell lines reveals alternative pathways for liver carcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2003, 37(4):852-861.
- [13] Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(1):131-135.
- [14] Jin M, Piao Z, Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, et al. p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2000, 89(1):60-68.
- [15] (本文编辑:吉耕中)

(上接第407页)