

# 高分辨熔解曲线法检测哈萨克族食管癌患者癌组织中 *FHIT*、*CDKN2A* 启动子区甲基化水平及临床意义

李卉<sup>1</sup>, 刘玲<sup>1</sup>, 王洪江<sup>2</sup>, 陈艳<sup>1</sup>, 庞作良<sup>2</sup>, 姜孝芳<sup>1</sup>, 吴军<sup>3</sup>, 李秀梅<sup>1</sup>, 马莉莉<sup>1</sup>, 周搏<sup>4</sup>, 李惠武<sup>1</sup>

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830011
4. 新疆医科大学临床医学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要** 建立高分辨熔解曲线法(HRM)定量检测哈萨克族食管癌患者癌组织中 *FHIT*、*CDKN2A* 甲基化水平, 并分析甲基化水平与食管癌病理参数的相关性。选取 30 例食管癌患者癌组织及 30 例癌旁组织, 提取 DNA, 进行甲基化修饰。将标准品 DNA(甲基化 DNA 与非甲基化 DNA 相互的掺入)稀释成 0, 5%, 25%, 50%, 75%, 100% 甲基化 DNA, 并进行重复性和灵敏性评价。应用 HRM 定量检测癌组织及癌旁组织甲基化水平, 探讨 *FHIT*、*CDKN2A* 基因启动子区甲基化水平与食管癌发生发展的关系。100%, 80%, 50%, 30%, 10%, 0 甲基化标准品的高分辨率熔解曲线从右向左依次排列, 待测基因在标准曲线上的位置即表示其甲基化程度。HRM 最低检测限为 1%, 明显高于 MSP 结果最低检测限 10%。在 30 例食管癌患者癌组织中, 检测出存在 *FHIT* 甲基化的为 36.7%。其中 8 例甲基化程度为 0—5%, 3 例为 5%—10%。*CDKN2A* 甲基化的为 100%, 其中 7 例甲基化程度为 0—5%, 11 例为 5%—10%, 12 例为 10%—25%。与正常组织比较, 抑癌基因的甲基化与癌症的发生无明显相关性。进一步讨论甲基化与食管癌的病理级别以及甲基化与分化程度的关系, 二者均无相关性。通过 HRM 技术成功建立了定量检测哈萨克族食管癌组织中 *FHIT*、*CDKN2A* 甲基化程度的方法, *FHIT*、*CDKN2A* 基因启动子甲基化与哈萨克族食管癌的发生发展无明显相关性, 但多个抑癌基因的甲基化有望成为其早期发生发展的分子指标。

**关键词** 食管癌; 甲基化; 高分辨熔解曲线; *FHIT*; *CDKN2A*

中图分类号 R34

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.31.009

## Determination of *FHIT* and *CDKN2A* Promoter Methylation Levels in Hazak's Esophageal Cancer Tissue Based on Methylation-sensitive High Resolution Melting Analysis and Its Clinical Significance

LI Hui<sup>1</sup>, LIU Ling<sup>1</sup>, WANG Hongjiang<sup>2</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>, PANG Zuoliang<sup>2</sup>, JIANG Xiaofang<sup>1</sup>, WU Jun<sup>3</sup>, LI Xiumei<sup>1</sup>, MA Lili<sup>1</sup>, ZHOU Bo<sup>4</sup>, LI Huiwu<sup>1</sup>

1. College of Preclinical, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
4. College of Clinic, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract** The promoter methylation of tumor suppressor gene is one of the most important mechanisms of tumorigenesis. The method of Methylation-Sensitive High-Resolution Melting-curve (MS-HRM) analysis was used to analyze methylation differences at the *FHIT*, *CDKN2A* locus in DNA samples from individuals with Esophageal Cancer (EC) ( $n=30$ ) and adjacent normal tissues ( $n=30$ ). After extracting

收稿日期: 2011-08-29; 修回日期: 2011-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81060172)

作者简介: 李卉, 助理研究员, 研究方向为哈萨克族食管癌发病的分子机制, 电子信箱: 147155099@qq.com; 李惠武(通信作者), 教授, 研究方向为哈萨克族食管癌发病机制, 电子信箱: huiwuli1234@163.com

and modifying DNA by methylating-agents, the standard DNA samples were mixed with the completely methylated DNA to make the dilute methylated DNAs of 0%, 5%, 25%, 50%, 75%, and 100%, respectively. And then their sensitivity and repeatability were evaluated. Using HRM, the methylation level was detected. And the relation between the methylation levels of *FHIT* and *CDKN2A* promoters and the development of EC is discussed. The high-resolution melting-curves of 100%, 80%, 50%, 30%, 10%, and 0% methylated DNA are decreasingly arranged from right to left, the locations on the standard curve denote the methylation level. The lowest detection limit of HRM is 1%, and it is more sensitive than the 10% detection limit of MSP. With the MS-HRM assay, 36.7% of the *FHIT* promoters (11/30) are methylated. Among them, there are eight cases with methylation level between 0%—5%, and three cases with methylation level between 5%—10%. 100% of the *CDKN2A* promoters (30/30) are methylated. There are seven cases with methylation level between 0%—5%, 11 cases with methylation level between 5%—10%, and 12 cases with methylation level between 10%—25%. Compared with the adjacent normal tissues, there is no significant relationship between the methylation and the development of the Hazak's EC. There is no significant relationship either between the methylation and the TNM or between methylation and differentiation of two genes in the Hazak's esophageal cancer. It is found that the MS-HRM is a simple, rapid, and robust method for screening methylation differences at the *FHIT*, *CDKN2A* locus; furthermore the more suppressor genes will be screened and found as the early diagnostic markers.

**Keywords** esophageal cancer; methylation; high-resolution melting-curve analysis; *FHIT*; *CDKN2A*

## 0 引言

新疆是中国食管癌高发区之一,尤其是哈萨克族居民的发病率最高。自20世纪70年代以来,对哈萨克族食管癌在流行病学方面的研究结果显示,新疆哈萨克族食管癌调整死亡率达 $68.88/10^5$ ,远高于全国平均水平( $14.95/10^5$ ),其中托里县哈萨克族则高达 $155.9/10^5$ ,而该县其他民族仅为 $22.3/10^{5[1-2]}$ 。目前对食管癌以手术为主的综合治疗效果已处于平台期,其5年总生存率仅为10%,依据肿瘤大小、位置、数目、分布、血管侵犯、转移等病理诊断方法已无法满足对该疾病的早期诊断。以往的研究表明,在食管癌的分子流行病学方面,所有相关基因,蛋白的筛查及可能的病因和分子生物学机制均未进行过系统的研究。表观遗传学尤其是DNA甲基化,在肿瘤的基因活性调节机制起到非常重要的作用。研究显示在各种肿瘤早期,甲基化沉默了多种基因<sup>[3-4]</sup>。不正常的甲基化事件在肿瘤早期发展中发生,从而可作为早期肿瘤检测的潜在标志<sup>[5]</sup>。高分辨溶解曲线HRM是一种特别适用于快速检测临床病理样品的方法<sup>[6]</sup>。本文采用HRM技术对*FHIT*、*CDKN2A*基因启动子区甲基化水平进行检测,以期找到食管癌发生的基因早期诊断指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

食管癌组织标本来源于新疆医科大学附属医院2008—2010年哈萨克族食管癌患者。食管癌标本30份,匹配癌旁组织30份。参照UICC制定的癌国际TNM法分为T2期6份,T3期9份,T4期15份。年龄在46—65岁之间。

### 1.2 试剂与仪器

CpGenome甲基化试剂盒(Chemicon公司,美国),荧光染料Evagreen(Biotium公司,美国),全基因组甲基化DNA(QIAGEN公司,德国),全基因组非甲基化DNA(脐带血DNA,自制)。LightCycler480荧光定量仪(Roche公司,瑞士),Nanodrop 1000定量仪(Thermo公司,美国),热启动酶

(QIAGEN,德国)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 提取DNA

使用传统的酚氯仿法提取基因组DNA。通过琼脂糖凝胶鉴定。紫外分光光度法进行浓度测定。

#### 1.3.2 亚硫酸钠进行基因组DNA甲基化修饰

取上述DNA样本1 $\mu$ g,使用CpGenome甲基化试剂盒按照说明书进行甲基化修饰。将修饰好的DNA用Nanodrop 1000定量仪定量至5ng/ $\mu$ L。

#### 1.3.3 引物设计

查找启动区,检测CpG岛,使用软件MethyPrimer设计引物,引物由北京金唯智生物科技服务有限公司合成。

引物名称序列5'—3'。

*FHIT*:产物长度111bp

SENSE: TTCGGGGTGATGATTTGA

ANTISENSE: TTCCCAACTATCAACATCCTAA

反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 10s,50个循环。PCR结束,取反应产物5 $\mu$ L琼脂糖凝胶电泳。

*CDKN2A*:产物长度142bp

SENSE: AGTGTTCGGAGGAGGTCT

ANTISENSE: CCCAATCCTCCTTCCTTA

反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性15min;95 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 45s,40个循环。PCR结束,取反应产物5 $\mu$ L琼脂糖凝胶电泳。

#### 1.3.4 PCR反应体系

10 $\times$ PCR Buffer 2.5 $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 0.5 $\mu$ L,dNTP (10mmol/L)0.5 $\mu$ L, 20 $\times$ Evagreen 饱和染料 1.0 $\mu$ L,10 $\mu$ m Primers 各 1.9 $\mu$ L,Template (5ng/ $\mu$ L)1.0 $\mu$ L,Taq 酶 (5U/ $\mu$ L) 0.2 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 15.5 $\mu$ L。

#### 1.3.5 构建标准品

在定量检测样本甲基化程度前,必须先建立标准曲线。以CpGenome universal methylated DNA(美国Chemicon公司)作为100%甲基化的标准品,以100%非甲基化的健康人组织

DNA 作为稀释剂,将两者浓度调至相同水平,按不同比例分别配成甲基化程度为 100%,80%,60%,40%,20%,10%,5%,1%和 0.1%系列浓度的标准曲线。用 HRM 方法检测 0—100% 标准品得到的荧光信号的强度,减去 0 的标准品的荧光信号的强度,得到差异显示的荧光信号强度,据此建立双对数标准曲线。

### 1.3.6 标准品检测

扩增后,将样品管转移到 LightCycler480,进行高分辨率熔解曲线分析,条件为:95℃ 1min,40℃ 1min,65℃ 1min 预处理后,每秒检测荧光 40 个。40℃冷却 10s。

### 1.3.7 甲基化程度检测

运行 LightCycler 480 gene scanning 程序,得分型图谱,判断样本曲线与标准曲线的位置,得样本甲基化程度数据。

### 1.3.8 统计学分析

用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。*FHIT* 及 *CDKN2A* 甲基化与病理参数相关性用 Chisquare 检验分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *FHIT* 及 *CDKN2A* 启动子区 CpG 岛 PCR 电泳图

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,如图 1,图 2 所示,

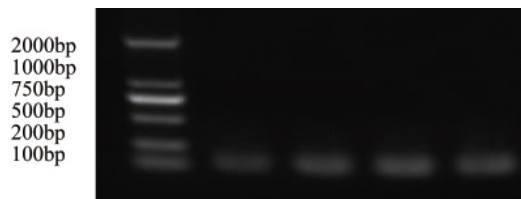


图 1 *FHIT* 启动子区 CpG 岛 PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of CpG island in *FHIT* promoter

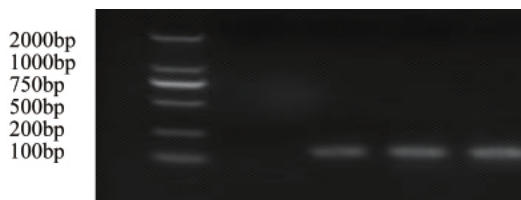


图 2 *CDKN2A* 启动子区 CpG 岛 PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of CpG island in *CDKN2A* promoter

*FHIT*PCR 产物长度 111bp,*CDKN2A*PCR 产物长度 142bp。

### 2.2 标准曲线的构建

运用 HRM 方法制作甲基化标准曲线:100%,80%,60%,40%,20%,10%,5%,1%和 0 甲基化标准品(图 3,图 4)。甲基化修饰的主要原理:亚硫酸氢盐可以将非甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而甲基胞嘧啶仍然以胞嘧啶保留下来,用亚硫

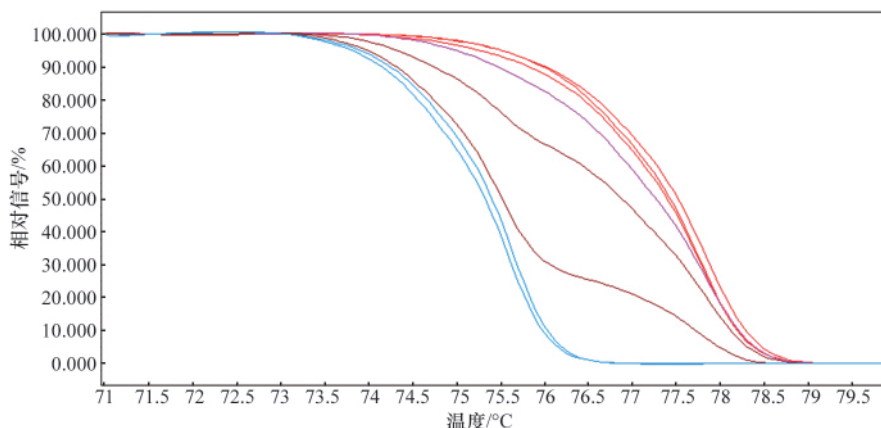


图 3 *FHIT* 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of *FHIT*

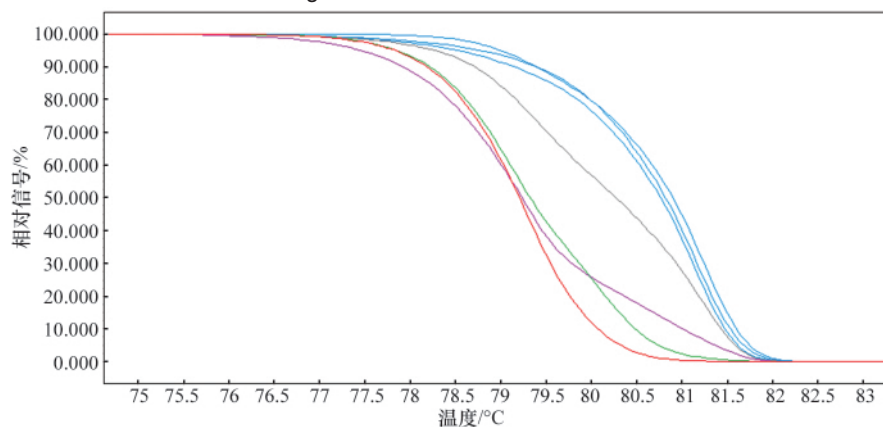


图 4 *CDKN2A* 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of *CDKN2A*

酸氢盐处理样本后,再进行 PCR 扩增,由于甲基化的序列 G:C 含量比较高,因此,  $T_m$  值也比相应的非甲基化序列高,  $T_m$  值与甲基化程度呈正比。所以在熔解曲线图中,  $T_m$  值随着甲基化程度的升高而升高,曲线从左往右依次分开排列,因此能精确地划分标本甲基化程度。

### 2.3 食管癌标本的检测

结果显示,30 例食管癌本中有 *FHIT* 甲基化的为 36.7%, *CDKN2A* 甲基化的为 100%。

### 2.4 *FHIT*、*CDKN2A* 甲基化水平与食管癌的相关分析

由表 1 可知, *FHIT* 启动子甲基化水平与食管癌无明显相关 ( $\chi^2=0.067, P=0.795$ ), *CDKN2A* 启动子甲基化水平与食管癌也无明显相关 ( $\chi^2=2.933, P=0.402$ )。由表 2 可知, *FHIT* 启动子甲基化水平与食管癌组织 TNM 分期无相关性 ( $\chi^2=1.212, P=0.271$ ), *CDKN2A* 启动子甲基化水平与食管癌组织 TNM 分期也无明显相关 ( $\chi^2=5.389, P=0.068$ )。由表 3 可知, *FHIT* 启动子

表 1 *FHIT* 及 *CDKN2A* 甲基化水平与食管癌的相关性  
Table 1 Correlation between EC and methylation level in *FHIT* and *CDKN2A*

甲基化水平/%	<i>FHIT</i>		$\chi^2$	<i>P</i>	<i>CDKN2A</i>		$\chi^2$	<i>P</i>
	EC 组织	正常癌旁组织			EC 组织	正常癌旁组织		
0—5	8	7	0.067	0.795	7	3	2.933	0.402
5—10	3	2			11	11		
10—25	—	—			12	15		
75—100	—	—			0	1		

表 2 临床组织标本 *FHIT* 及 *CDKN2A* 甲基化水平与食管癌组织 TNM 分期的关系

Table 2 Relation between methylation level in *FHIT* and *CDKN2A* and the TNM classification of EC

甲基化水平/%	<i>FHIT</i>		$\chi^2$	<i>P</i>	<i>CDKN2A</i>		$\chi^2$	<i>P</i>
	II 期	III 期			II 期	III 期		
0—5	8	19	1.212	0.271	4	3	5.389	0.068
5—10	0	3			3	8		
10—25	—	—			1	11		

表 3 临床组织标本 *FHIT* 及 *CDKN2A* 甲基化水平与食管癌组织分化的关系

Table 3 Relation between methylation level in *FHIT* and *CDKN2A* and the tissue differentiation with EC

甲基化水平/%	<i>FHIT</i>		$\chi^2$	<i>P</i>	<i>CDKN2A</i>		$\chi^2$	<i>P</i>
	II 期	III 期			低分化	高-中分化		
0—5	8	19	1.212	0.271	3	4	2.949	0.229
5—10	0	3			1	10		
10—25	—	—			4	8		

甲基化水平与食管癌组织分化无相关性 ( $\chi^2=1.212, P=0.271$ ), *CDKN2A* 启动子甲基化水平与食管癌组织分化也无相关性 ( $\chi^2=2.949, P=0.229$ )。

### 3 讨论

DNA 甲基化是最早发现的基因表观修饰方式之一, DNA 甲基化异常包括原癌基因低甲基化和抑癌基因高甲基化。DNA 的甲基化是在 DNA 甲基化转移酶 (DNMTs) 的作用下使 CpG 二核苷酸 5' 端的胞嘧啶转变为 5' 甲基胞嘧啶。这种 DNA 修饰方式并没有改变基因序列, 但它调控了基因的表达。DNA 甲基化能关闭某些基因的活性, 去甲基化则诱导了基因的重新活化和表达<sup>[7]</sup>。甲基化程度高, 基因的表达则降低, 去甲基化又可使基因的表达增加。

目前肿瘤甲基化的研究主要集中在抑癌基因, 这是因为此前研究发现肿瘤的发生可能与抑癌基因启动子区的 CpG 岛甲基化造成抑癌基因关闭有关<sup>[8]</sup>。由于 CpG 岛的局部高度甲基化早于细胞的恶性增生, 因此甲基化的诊断可以用于肿瘤发生的早期预测<sup>[9]</sup>。

HRM 分析技术是 2002 年由犹他大学和爱德华科技公司合作开发, 最初应用于单核苷酸多态检测分析的一项新技术<sup>[10]</sup>。Wojdacz 等<sup>[6]</sup>阐述了用 HRM 技术在甲基化研究方面的应用。HRM 技术可检测低至 0.1% 的甲基化程度, 并根据已知甲基化程度的标准曲线对未知样品的甲基化程度进行测定。HRM 分析基于片段解链曲线图形差异可分析出 1bp 的区别, 从而可以检测出经亚硫酸盐甲基化处理的扩增产物的甲基化差异<sup>[11-13]</sup>。HRM 是一种高灵敏度的甲基化检测方法, 并且其高度的重复性和低成本将对肿瘤的研究和临床应用有很大帮助。

抑癌基因脆性组氨酸三联体 (Fragile Histidine Triad, *FHIT*) 基因由 Ohta 等<sup>[14]</sup>1996 年利用外显子捕捉法和定位克隆技术, 位于人类染色体 3p14.2。近年来, 大量研究表明, *FHIT* 基因在人类许多原发恶性肿瘤组织以及多种恶性肿瘤细胞系中存在异常, 尤其是在和环境致癌因素关系密切的恶性肿瘤中, 如食管癌等病变早期即可有 *FHIT* 基因异常变异率增高。分别检测食管癌前病变不同阶段轻度、中重度不典型增生和鳞状细胞原位癌、浸润癌 *FHIT* 基因的甲基化频率分别为 22.73%, 45.45%, 64.29% 和 67.57%, 显示在不典型增生阶段随着病变程度的加重, *FHIT* 基因的甲基化频率呈逐渐增加趋势<sup>[15]</sup>。中、重度不典型增生与原位癌和浸润癌比较无明显差异, 可能其甲基化在食管癌变的早期即已存在<sup>[11]</sup>。Yang 等<sup>[6]</sup>发现 *FHIT* 基因的异常甲基化与杂合子缺失 (LOH) 有密切关系, “两次打击模式”是 *FHIT* 基因失活的重要机制。另外, 位于 5' 端启动子区域的 CpG 岛发生甲基化是导致转录失活的重要原因<sup>[13-14]</sup>。

抑癌基因 *CDKN2A* 属于 INK4I (Cyclin-dependent kinase 4 inhibitors) 家族, 定位于 9p21, 全长 8.5kb, 有 3 个外显子和 2 个内含子, 其编码的蛋白是细胞周期蛋白激酶抑制剂, 通过

结合并抑制细胞周期依赖的蛋白激酶 CDK4 和 CDK6,使 Rb 磷酸化程度降低来调控细胞通过 G1 期,从而抑制细胞的增殖。国内研究食管轻度、中重度不典型增生、鳞状细胞原位癌和浸润癌组织中 *CDKN2A* 基因的甲基化频率分别为 22.73%, 59.09%, 78.57% 和 64.86%<sup>[17]</sup>。Abbaszadegan 等<sup>[18]</sup>研究一组散发食管癌患者 *CDKN2A* 基因的甲基化率为 73.3%, 食管癌高风险家系中甲基化率为 64.3%, 并认为是食管癌高风险家系中很有价值的早期肿瘤诊断标志。

通过 HRM 检测 *FHIT*、*CDKN2A* 基因启动子区甲基化水平,结果显示,*FHIT*、*CDKN2A* 启动子区甲基化与哈萨克族食管癌的发生发展无直接相关性,原因之一可能是样本量过少导致,后续的研究将加大样本量并筛选多个基因,以期寻找评估食管癌发生的早期诊断指标。

#### 4 结论

成功建立基因启动子区甲基化水平的方法,该方法灵敏度高,操作简单,可检测低至 1% 甲基化水平,比 MSP 方法更敏感。但由于标本量过少,未检测出 *FHIT*、*CDKN2A* 基因启动子区甲基化水平与食管癌的发生发展有明显相关性,后续将扩大标本量及筛选更多的基因,寻找出评估食管癌发生的早期诊断指标。

#### 参考文献 (References)

- [1] Munoz N. Epidemiological aspects of oesophageal cancer [J]. *Endoscopy*, 1993, 25(9): 609-612.
- [2] Li J Y. Epidemiology of esophageal cancer in China [J]. *National Cancer Institute Monograph*, 1982, Jul(62): 113-120.
- [3] Esteller M. Epigenetics in cancer [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2008, 358(11): 1148-1159.
- [4] Jones P A, Baylin S B. The epigenomics of cancer[J]. *Cell*, 2007, 128(4): 683-692.
- [5] Shi H, Wang M X, Caldwell C W. CpG islands: Their potential as biomarkers for cancer [J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2007, 7(5): 519-531.
- [6] Wojdacz T K, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high throughput assessment of methylation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(6), 35: e41.
- [7] Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques [J]. *Biogerontology*, 2003, 4(4): 233-250.
- [8] 黄琼晓, 金帆, 黄荷凤. DNA 甲基化的研究方法学[J]. 国外医学遗传学分册, 2004, 27(6): 354-358.  
Huang Qiongxiao, Jin Fan, Huang Hefeng. *Foreign Medical Sciences Section of Genetics*. 2004, 27(6): 354-358.
- [9] Nuovo G J, Plaia T W, Belinsky S A, et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(22): 12754-12759.
- [10] Gundry C, Vandersteen J, Reed G, et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(3): 396-406.
- [11] White H E, Hall V J, Cross N C. Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes[J]. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(11): 1960-1962.
- [12] Reed G H, Kent J O, Wittwer C T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics [J]. *Pharmacogenomics*, 2007(8): 597-608.
- [13] Wojdacz T K, Dobrovic A, Algar E M. Rapid detection of methylation change at H19 in human imprinting disorders using methylation-sensitive high-resolution melting[J]. *Human Mutation*, 2008, 29(10): 1-6.
- [14] Ohta M, Inoue H, Cotticelli, M G, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3P14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3; 8) breakpoint is abnormal in digestive tract cancers [J]. *Cell*, 1996, 84(4): 587-597.
- [15] Noguchi T, Akeno S, Kimnta Y, et al. FHIT expression and hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2003, 11(4): 441-447.
- [16] Yang Q F, Nakamura M, Nakamura Y, et al. Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2002, 8(9): 2890-2893.
- [17] 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.  
Guo Xiaqing, Wang Shijie, Zhang Jianhui, et al. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2005, 32(10): 554-557.
- [18] Abbaszadegan M R, Raziee H R. Aberrant p16 methylation, a possible epigenetic risk factor in familial esophageal squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, 2005, 36(1): 47-54.

(责任编辑 胡兴平)

#### 《科技导报》“研究论文”栏目征稿

“研究论文”栏目专门发表自然科学、工程技术领域具有创新性的研究论文,要求学术价值显著、实验数据完整、具有原始性和创造性,同时应重点突出、文字精炼、引证及数据准确、图表清晰,并附中、英文摘要以及作者姓名、所在单位、通信地址、关键词等信息。在线投稿: [www.kjdb.org](http://www.kjdb.org)。