

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.016

结直肠癌中 *RASSF1A* 启动子甲基化与 Cyclin D1 和 P53 表达的关系

胡佳乐^a, 陈云^b, 刘胜^a, 陈森林^a, 蒋梦洁^b (中国人民解放军第411医院 a. 普通外科; b. 检验病理科, 上海200081)

[摘要] 目的: 检测结直肠癌组织中 Ras 相关区域家族 1A (ras-association domain family 1A, *RASSF1A*) 基因启动子甲基化以及 Cyclin D1 和 P53 蛋白的表达, 分析它们与结直肠癌临床病理特征的关系。方法: 收集 2008 年 8 月至 2009 年 8 月长海医院病理科 37 例结直肠癌组织和 14 例癌旁组织(癌灶边缘 5 cm 以外组织)标本。甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 检测结直肠癌组织中 *RASSF1A* 基因启动子的甲基化, 免疫组织化学法检测结直肠癌组织中 Cyclin D1 和 P53 蛋白的表达, 分析 *RASSF1A* 启动子甲基化、Cyclin D1 和 P53 表达的关联性以及三者与结直肠癌临床病理特征的相关性。结果: 37 例结直肠癌组织中 *RASSF1A* 启动子甲基化有 23 例 (62.16%), 14 例癌旁组织中 *RASSF1A* 启动子甲基化有 12 例 (85.71%); 37 例癌组织中 Cyclin D1 阳性 14 例 (37.84%)、P53 阳性 15 例 (40.54%), 14 例癌旁组织中 Cyclin D1 和 p53 表达均为阴性。直肠癌组织中 *RASSF1A* 启动子甲基化阳性率高于结肠癌 ($P < 0.05$)。结直肠癌患者年龄与 Cyclin D1 表达呈负相关 ($P < 0.05$), 淋巴结转移与 P53 表达呈正相关 ($P < 0.05$)。结直肠癌组织中 *RASSF1A* 启动子甲基化与 Cyclin D1 和 P53 的表达无相关性。结论: *RASSF1A* 启动子甲基化、Cyclin D1 和 P53 蛋白表达三者的联合检测对研究结直肠癌的发生、发展有一定意义。

[关键词] 结直肠癌; Cyclin D1; P53; Ras 相关区域家族 1A 基因

[中图分类号] R392.2; R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0444-06

Relationship of *RASSF1A* promoter methylation with expressions of Cyclin D1 and P53 in colorectal cancer

HU Jia-le^a, CHEN Yun^b, LIU Sheng^a, CHEN Sen-lin^a, JIANG Meng-jie^b (a. Department of General Surgery; b. Department of Laboratory Medicine and Pathology, No.411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China)

[Abstract] **Objective:** To examine *RASSF1A* promoter methylation and Cyclin D1 and P53 expressions in colorectal cancer tissues, and to analyze their relationship with the clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. **Methods:** Thirty-seven colorectal cancer and 14 peri-cancer tissue samples were obtained from Changhai Hospital during Aug. 2008 to Aug. 2009. *RASSF1A* promoter methylation in colorectal cancer tissues was detected by methylation-specific PCR (MSP); expressions of Cyclin D1 and P53 in colorectal cancer tissues were examined by immunohistochemistry assay. The relationship among *RASSF1A* promoter methylation, Cyclin D1 and P53 expressions and their relationship with clinicopathologic characteristics of colorectal cancer was analyzed. **Results:** Methylation of *RASSF1A* promoter was found 23 (62.16%) of the 37 colorectal cancer tissues and 12 (85.71%) of the 14 peri-cancer tissues; 14 (37.84%) of the 37 colorectal cancer tissues had Cyclin D1 expression and 15 (40.54%) had P53 expression. Cyclin D1 and P53 expressions was negative in 14 peri-cancer tissues. *RASSF1A* promoter methylation rate in rectum cancer was higher than that in the colon cancer ($P < 0.05$). Cyclin D1 expression was negatively correlated with patient age ($P < 0.05$), and P53 expression was positively correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$); *RASSF1A* promoter methylation had no relationship with Cyclin D1 or P53 expressions ($P > 0.05$). **Conclusion:** Combined detection of *RASSF1A* promoter methylation, Cyclin D1 and P53 expressions may lay a foundation for studying development and progression of colorectal cancer.

[Key words] colorectal neoplasms; Cyclin D1; P53; ras-association domain family 1A gene (*RASSF1A*)

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 444-449]

[基金项目] 上海市虹口区卫生局重点课题资助[虹卫(2007)151号]。Project supported by the Key Research Foundation from Health Bureau of Hongkou District of Shanghai [No. (2007)151]

[作者简介] 胡佳乐(1966-),男,浙江省嘉兴市人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤治疗基础和临床的研究。现工作单位:中国人民解放军第100医院,苏州,215007。E-mail: drhu1966@yahoo.com.cn

结直肠癌是我国大中城市发病率居第二、三位的恶性肿瘤,目前我国早期诊断率不足 10%,探索有效的诊断标志物很有必要。Ras 相关区域家族 1A 基因 (ras-association domain family 1A, RASSF1A) 在正常组织中广泛表达,而在多种原发性恶性肿瘤中,常因启动子区的甲基化而表达缺失。RASSF1A 基因启动子 CpG 岛的甲基化在多种肿瘤组织和肿瘤患者的体液中可以检测到,由此说明其具有肿瘤标志物的价值^[1]。但 RASSF1A 在结直肠癌患者的表达情况国内鲜有报道。细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 是参与细胞周期调控的一种重要因子,在人类多种肿瘤中存在着过度表达现象;P53 是研究最为广泛深入的肿瘤基因之一。探讨 RASSF1A 甲基化及与 Cyclin D1 和 P53 的关系有助于加深对散发性结直肠癌发生、发展的认识。

1 材料与方法

1.1 标本来源和主要试剂

收集 2008 年 8 月至 2009 年 8 月长海医院病理科的结直肠癌根治术患者新鲜组织 37 例,分别取癌组织 37 例、癌旁组织(瘤灶边缘 5 cm 以外的组织) 14 例。标本离体后立即置于 -80 °C 冰箱冻存,同步取材组织作石蜡包埋。本组患者中男 25 例、女 12 例,年龄 30 ~ 86 岁,中位年龄为 67 岁。按肿瘤部位分为直肠 21 例,结肠 16 例(乙状结肠 7 例,升、降结肠 6 例,横结肠 2 例,盲肠 1 例)。按 WHO 分类标准,37 例结直肠癌中高分化癌 2 例,中分化癌 31 例,低分化癌 4 例。术后病理有淋巴结转移者 8 例。所有患者术前均未接受放、化疗及生物治疗。鼠抗人 Cyclin D1 单克隆抗体购自上海太阳生物技术有

限公司,鼠抗人 P53 单克隆抗体、Envision 二步法免疫组化检测试剂盒及 DAB 显色剂为 DAKO 公司产品。抗体工作稀释度均为 1:50。

1.2 DNA 提取

新鲜癌组织和癌旁组织制成匀浆,采用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA 抽提试剂盒 (Cat. No. 51340) 提取组织 DNA。DNA 纯品的 D_{260}/D_{280} 值为 1.6 ~ 1.9。本实验样本抽提基因组 DNA 的 D_{260}/D_{280} 值符合要求,可以进行后续甲基化实验。

1.3 亚硫酸氢钠化学修饰 DNA

采用 Qiagen 公司的 EpiTect Bisulfite Kit (Cat. No. 59104) 处理已提取的各样本 DNA,按照说明书要求在 200 μ l 的 PCR 管中准备反应体系: DNA 1 ng ~ 20 μ g (RNase-free 水补到 20 μ l),亚硫酸盐缓冲液 85 μ l, DNA 保护缓冲液 35 μ l,总体积 140 μ l。在 PCR 仪上进行下述反应,计 5 h: 99 °C 5 min,60 °C 25 min,99 °C 5 min,60 °C 85 min,99 °C 5 min,60 °C 175 min,20 °C 恒温。续之 BL、BW、BD 等缓冲液处理,最后加 20 μ l 的溴化乙锭缓冲液到离心柱中间的硅胶膜上,离心收集 DNA。

1.4 MSP 法检测结直肠癌及癌旁组织中 RASSF1A 基因启动子区甲基化的情况

采用 DNA 甲基化特异性 PCR (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 法进行检测。采用 3 对引物对已完成化学修饰的各样本 DNA 进行 PCR 扩增。引物参照文献[2],其序列见表 1。PCR 反应为两轮反应的巢式 PCR,经过第二轮后,甲基化 (M) PCR 产物为 76 bp,非甲基化 (U) PCR 产物为 81 bp,2.5% 琼脂糖电泳鉴定 PCR 反应结果。结直肠癌标本的 MSP 产物各 1 例送检测序。

表 1 MSP 引物序列及反应条件

Tab.1 Primer sequences and reaction condition of MSP

Primer	Sequences	Annealing temperature ($t/^\circ\text{C}$)	Cycling number
RASSF1A_F1	5'-GTTTACTTTGGATTTTGGGGGAG-3'	59	23
RASSF1A_R1	5'-CCCRCAACTCAATAAACTCAAACCTC-3'		
RASSF1A_MF1	5'-GGGTTCGTTTTGTGTTTTCGTTC-3'	63	30
RASSF1A_MR1	5'-TAACCCGATTAAACCCGTACTTCG-3'		
RASSF1A_UF1	5'-GGGGTTTGTGTTTTGTGTTTTGTTT-3'	63	30
RASSF1A_UR1	5'-AACATAACCCAATTAAACCCATACTTCA-3'		

1.5 免疫组织化学法检测结直肠癌及癌旁组织中 Cyclin D1 和 P53 蛋白的表达

甲基化检测病例的同步石蜡包埋蜡块,4 μm 连续切片。常规脱蜡至水,0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液电煲抗原修复 20 min,取出冷却。PBS 冲洗后切片分别滴加一抗(鼠抗人 Cyclin D1,P53),4 °C 冰箱过夜,PBS 冲洗后滴加 ChemMate™ EnVision/HRP 兔/小鼠检测试剂,室温湿盒中放置 30 min,PBS 冲洗后应用 DAB 显色 5~10 min,苏木精复染,封片,光镜下观察。以上步骤中,以 PBS 代替一抗为阴性对照,已知阳性切片为阳性对照。染色结果判定标准:每个高倍视野 100 个细胞中阳性细胞的百分比 >10% 为阳性、≤10% 为阴性。

1.6 统计学处理

RASSF1A 甲基化率、Cyclin D1 和 P53 表达率的组间比较采用 Fisher's 精确检验;指标间的关系分析采用 Spearman 等级相关分析。Cyclin D1(或 P53 蛋白)表达组与非表达组间“RASSF1A 甲基化和非甲基化组合状态”的分布差异采用 Wilcoxon 秩和检验。所有统计分析均使用 Stata 11.0 软件进行。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织中 RASSF1A 启动子甲基化分析

MSP 法检测结果(图 1)显示,37 例散发性结直肠癌组织中,RASSF1A 基因启动子甲基化有 23 例,甲基化率为 62.16%;14 例癌旁组织 12 例甲基化阳性,甲基化率为 85.71%。

MSP 产物测序结果可见:(1)甲基化比对结果。

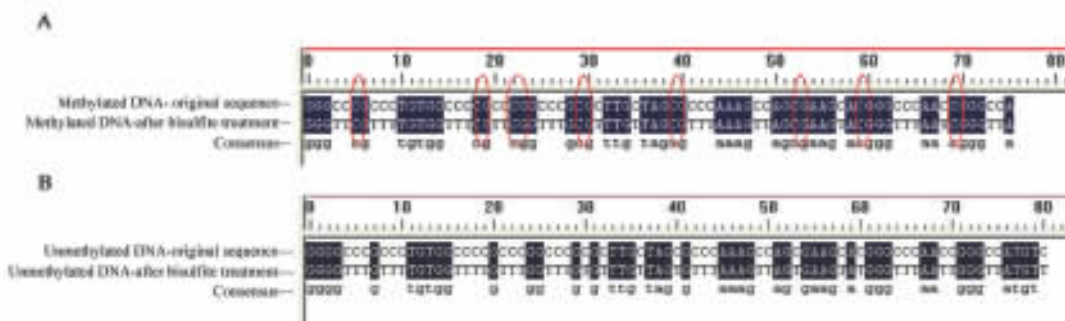


图 2 RASSF1A 基因甲基化(A)和非甲基化(B)样品的测序分析

Fig. 2 Sequencing analysis of methylated (A) and unmethylated (B) RASSF1A gene samples

2.2 结直肠癌组织中 Cyclin D1 和 P53 蛋白的表达

Cyclin D1 和 P53 蛋白阳性染色位于细胞核,表现为棕黄色颗粒。37 例结直肠癌中有 14 例(37.84%)Cyclin D1 表达阳性,有 15 例(40.54%)P53 蛋白表达阳性(图 3)。14 例癌周组织的 Cyclin

将甲基化产物纯化后构建到测序载体中测序,碱基若发生了甲基化,那么用亚硫酸盐处理时对应的碱基“C”不会发生相应变化,这就是对应的甲基化“CpG 岛”区域;而未甲基化的碱基,在进行亚硫酸盐处理时,“C”会变成对应的“T”。将甲基化处理的序列与还原后的原始序列比对会发现“CpG 岛”区域(图 2A 中用红色圆圈标注的区域)。还原后的序列经 NCBI 中软件分析显示,该序列为 RASSF1 的序列,完全符合实验设计。测序的结直肠癌标本的 MSP 甲基化产物中,RASSF1A 基因启动子 CpG 岛的 8 个位点均发生了甲基化。(2)非甲基化比对检测,比较方法同甲基化比对。将甲基化处理的测序序列与还原后的原始序列比对,会发现非甲基化区域无“CpG 岛”区域(图 2B)。

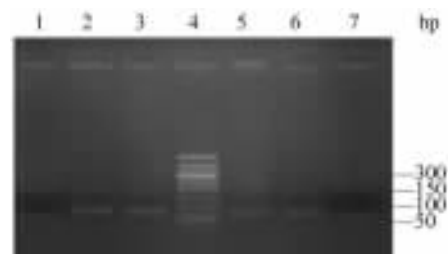


图 1 MSP 法检测结直肠癌组织中 RASSF1A 基因启动子的甲基化

Fig. 1 MSP analyzed RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer tissues

1: Negative control of unmethylation; 2,3: Unmethylation-specific products; 4: Marker; 5,6: Methylation-specific products; 7: Negative control of methylation

D1 和 P53 蛋白染色无明显阳性反应。不加一抗的阴性对照,免疫组织化学染色为阴性。

2.3 结直肠癌组织中 RASSF1A 启动子甲基化、Cyclin D1 和 P53 蛋白表达与临床病理特征间的关系

由表 2 可见,直肠癌 RASSF1A 甲基化阳性率高

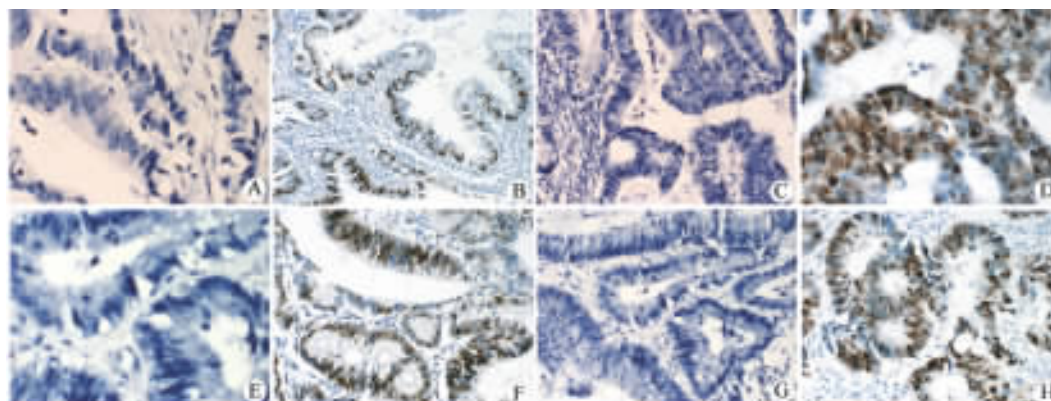


图3 结直肠腺癌组织中 Cyclin D1 和 P53 蛋白的表达

Fig. 3 Expressions of Cyclin D1 and P53 protein in colorectal cancer tissues

A-D: Rectal cancer tissue; E-H: Colon cancer tissue; A: Cyclin D1(-)(×400); B: Cyclin D1(+)(×100); C: P53(-)(×200); D: P53(+)(×400); E: Cyclin D1(-)(×400); F: Cyclin D1(+)(×200); G: P53(-)(×200); H: P53(+)(×200)

表2 结直肠癌组织 *RASSF1A* 甲基化、Cyclin D1 和 P53 表达与临床病理特征的关系

Tab.2 Relationship of *RASSF1A* promoter methylation, Cyclin D1 and P53 with clinicopathologic characteristics of colorectal cancer tissues

Clinicopathologic characteristic	Methylation			CyclinD1			P53		
	+	-	P	+	-	P	+	-	P
Age									
<60	6	6	0.470	7	5	0.146	6	6	0.488
≥60	17	8		7	18		9	16	
Gender									
Male	14	11	0.306	11	14	0.306	10	15	1.000
Female	9	3		3	9		5	7	
Gross Specimen									
Mass type	7	2	0.434	2	7	0.434	3	6	0.711
Ulcer type	16	12		12	16		12	16	
Differentiation									
Low	4	0	0.095	1	3	0.510	1	3	0.511
Middle	17	14		13	18		14	17	
High	2	0		0	2		0	2	
Depth of invasion									
Mucosa	1	0	0.802	0	1	0.802	0	1	0.806
Muscularis	5	2		2	5		2	5	
Adventitia	17	12		12	17		13	16	
Tumor location									
Rectum	16	5	0.044	6	15	0.183	10	11	0.500
Colon	7	9		8	8		3	4	
Infiltrating nodes outside of colorectum									
+	1	2	0.544	0	3	0.275	1	2	1.000
-	22	12		14	20		14	20	
Lymphatic invasion									
+	8	3	0.477	7	4	0.063	8	3	0.025
-	15	11		7	19		7	19	
Coexisting adenoma									
+	4	3	1.000	3	4	1.000	2	5	0.677
-	19	11		11	19		13	17	

于结肠癌($P < 0.05$)。Spearman 等级相关显示:年龄与 Cyclin D1 表达量间呈负相关(Spearman 等级相关系数为 -0.3626 , $P = 0.0274$), 即年龄越高, Cyclin D1 表达量越低; P53 表达与淋巴结转移间相关系数为 0.3985 ($P = 0.0146$), P53 表达与淋巴结转移呈正相关, 有淋巴结转移者 P53 的阳性率高。RASSF1A 甲基化与病人的性别、大体分类、病理分化、浸润程度、伴发息肉等均无关。

2.4 人结直肠癌组织 RASSF1A 基因启动子甲基化与 Cyclin D1 和 P53 蛋白表达的关系

RASSF1A 基因启动子甲基化表达阳性与否和 Cyclin D1、P53 的表达经 Fisher's 确切概率法分析, 分别 $P = 1.00$ 、 $P = 0.314$ 。Spearman 相关分析结果显示, RASSF1A 甲基化和 Cyclin D1 的相关系数为 0.034 ($P = 0.841$), 与 P53 的相关系数为 0.1902 ($P = 0.260$)。故 RASSF1A 甲基化水平与 Cyclin D1 和 P53 两者的表达均无关。经 Wilcoxon 秩和检验, RASSF1A 基因启动子甲基化和非甲基化的阳性与否的三种组合状态的等级分布, 在 Cyclin D1 表达组与未表达组间无差异 ($P = 0.74$), 在 P53 蛋白表达组与未表达组间亦无差异 ($P = 0.10$)。本组 37 例肿瘤病例有 3 例甲基化和非甲基化反应均阴性, 剔除 3 例后的 34 例统计分析结果基本一致。

3 讨论

随着肿瘤研究的深入, 人们发现除了 DNA 突变等遗传学改变外, 基因甲基化和组蛋白乙酰化等不涉及 DNA 序列改变的表现遗传学机制在部分肿瘤的发生中可能起着至关重要的作用^[3,4]。Xu 等^[5]研究了结直肠癌 31 种基因启动子 CpG 岛的甲基化状态, 结果有 17 种基因的甲基化与其早期发生有关。RASSF1A 表达的缺失是人类恶性肿瘤中最常见的一个分子事件。据报道^[6], 目前至少有 37 种肿瘤存在该基因的启动子甲基化。本组散发性结直肠癌组织中, RASSF1A 基因启动子甲基化频率为 62.16% , 直肠癌发生率高于结肠癌。文献报道结直肠癌 RASSF1A 甲基化率从 $12.0\% \sim 81.3\%$ 。Wagner 等^[7]发现, 结直肠癌细胞系及原发性结直肠癌中存在的 RASSF1A 甲基化, 与 *p16INK4A* 甲基化无关联。van Engeland 等^[8]研究 222 例散发性结直肠癌的 RASSF1A 甲基化, 大部分伴 *K-ras* 突变的结直肠癌标本缺乏 RASSF1A 甲基化, 认为是 *K-ras* 野生型结直肠癌的常见事件。RASSF1A 甲基化与结直肠癌发生过程中的一些其他重要基因如 *BRAF*、*hMLH1*、*APC* 等的关系也受到关注^[9-10]。

RASSF1A 蛋白在凋亡的信号转导、微管稳定性和细胞周期循环方面有潜在的作用^[11]。RASSF1A 可以抑制 Cyclin D1 的积聚, 使细胞周期停滞在 G_1/S 期^[12]。Cyclin D1 的过度表达可使细胞持续增殖, 从而导致细胞失控生长, 多种肿瘤组织中都普遍存在该现象。本组结直肠癌中 Cyclin D1 蛋白即有较高的表达率, 且与年龄有关联。在结直肠癌的发生发展过程中, P53 基因突变被认为是一个晚期事件, 其突变率各家报道不一, 从 $22\% \sim 70\%$ 。本组研究 P53 阳性率 40.54% , 与文献平均值相近。此外, 本组有淋巴结转移者 P53 的阳性率高, 说明 P53 过度表达的结直肠癌预后不佳。由于 P53 基因的突变与肿瘤的浸润行为关联, 说明其直接或间接促进了结直肠癌的进一步发展。Cyclin D1 和 P53 都是结直肠癌形成过程中的重要基因^[13]。本组 RASSF1A 甲基化及与非甲基化的不同组合状态与 Cyclin D1 和 P53 基因表达无关联, 有待从转录和蛋白表达水平及增加病例研究之。

国外的一些研究^[14,2]揭示, 结直肠的腺瘤、增生性息肉、异常隐窝病灶(ACF)以及息肉型和扁平型的早期结直肠癌中均存在一定的 RASSF1A 甲基化。本组研究中 RASSF1A 甲基化与肿瘤的浸润深度、肠外浸润结节、淋巴结转移等恶性生物学行为关系不密切, 表明它不是结直肠癌发生、发展的晚期事件。有文献^[15]认为, 结直肠癌 RASSF1A 甲基化与临床指标间的关系不是很大; 组织学分类一、二期的甲基化频率高于三期^[16]。Derks 等^[17]报道, 非进展期结直肠腺瘤中未出现染色体改变, 但已表现许多基因的甲基化。Sakamoto 等^[18]检测了 48 例早期扁平性结直肠肿瘤(39 例早期癌, 9 例黏膜内高级别不典型增生)及对应的 39 例正常黏膜, RASSF1A 甲基化率, 肿瘤为 81.3% ($39/48$), 正常结肠黏膜为 49% ($19/39$), 认为 RASSF1A 甲基化是非常早期的一种变化, 可发生于正常结肠黏膜上。国内外一些研究认为许多癌旁非肿瘤组织 RASSF1A 甲基化为阴性, 转录表达明显高于肿瘤组; 但也有报道注意到癌旁组织有一定量的 RASSF1A 甲基化表达^[19-23], 这可能与癌旁组织的取材范围不一致或组织反应性不同有关。结直肠癌旁“移行黏膜”系指癌旁具有黏液性质异常的黏膜, 被认为是一种癌前病变, 分布的范围平均距癌 3.4 cm 左右^[24]。根据致癌物作用于肠黏膜后结直肠病变呈弥漫、多灶性的观察, 有学者^[25-26]提出了结直肠黏膜癌变“场效应”理论。本组取材 14 例癌周组织, 有 12 例出现 RASSF1A 甲基化, 对应的肿瘤组织也同样为 RASSF1A 甲基化, 与

“场效应”理论吻合。*RASSF1A* 甲基化在一些肿瘤旁及癌前病变的表达支持其参与了肿瘤早期形成的假说^[23]。结直肠癌及癌周组织 *RASSF1A* 甲基化的同步出现对于结直肠癌防治具有一定的指示意义。(致谢:南通大学公共卫生学院流行病与医学统计学教研室荀鹏程博士帮助分析数据;第二军医大学长海医院病理科提供结直肠癌组织标本。)

[参 考 文 献]

- [1] Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of *RASSF1A* methylation in cancer [J]. *Disease Markers*, 2007, 23(1/2): 73-87.
- [2] Greenspan EJ, Jablonski MA, Rajan TV, Levine J, Belinsky GS, Rosenberg DW. Epigenetic alterations in *RASSF1A* in human aberrant crypt foci [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(7): 1316-1322.
- [3] Prabhu JS, Korlimarla A, Banerjee A, Wani S, Sahoo PK R. Gene-specific methylation: Potential markers for colorectal cancer [J]. *Int J Biol Markers*, 2009, 24(1): 57-62.
- [4] Noda H, Mashima R, Kamiyama H, Okada SY, Kawamura J, Konishi F. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in sporadic colorectal cancer in young patients [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26(4): 521-526.
- [5] Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(23): 3441-3454.
- [6] van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (*RASSF*) members and their role in human tumorigenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776(1): 58-85.
- [7] Wagner KJ, Cooper WN, Grundy RG, Caldwell G, Jones C, Wadley RB, et al. Frequent *RASSF1A* tumour suppressor gene promoter methylation in Wilms' tumour and colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21(47): 7277-7282.
- [8] van-Engeland M, MJM Roemen G, Brink M, Pachen MM, Weijnenberg MP, de Bruïne AP, et al. K-ras mutations and *RASSF1A* promoter methylation in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21(23): 3792-3795.
- [9] Ahlquist T, Bottillo I, Danielsen SA, Meling GI, Rognum TO, Lind GE, et al. Ras signaling in colorectal carcinomas through alteration of RAS, RAF, NF1, and/or *RASSF1A* [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(7): 680-686.
- [10] Derks S, Postma C, Carvalho B, van den Bosch SM, Moerkerk PT, Herman JG, et al. Integrated analysis of chromosomal, microsatellite and epigenetic instability in colorectal cancer identifies specific associations between promoter methylation of pivotal tumour suppressor and DNA repair genes and specific chromosomal alterations [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(2): 434-439.
- [11] Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene *RASSF1A* in human tumors [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(5): 576-583.
- [12] Guo W, Dong Z, Chen Z, Yang Z, Wen D, Kuang G, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of *RASSF1A* in gastric cardia adenocarcinoma [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(4): 459-465.
- [13] Chen WC, Lin MS, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y, et al. Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(5): 699-708.
- [14] Noda H, Kato Y, Yoshikawa H, Arai M, Togashi K, Nagai H, et al. Frequent involvement of Ras-signalling pathways in both polypoid-type and flat-type early-stage colorectal cancers [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006, 25(2): 235-242.
- [15] Kee SK, Lee JY, Kim MJ, Lee SM, Jung YW, Kim YJ, et al. Hypermethylation of the Ras association domain family 1A (*RASSF1A*) gene in gallbladder cancer [J]. *Mol Cells*, 2007, 24(3): 364-371.
- [16] Pallares J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, et al. Promoter hypermethylation and reduced expression of *RASSF1A* are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(6): 691-699.
- [17] Derks S, Postma C, Moerkerk PT, van den Bosch SM, Carvalho B, Hermesen MA, et al. Promoter methylation precedes chromosomal alterations in colorectal cancer development [J]. *Cell Oncol*, 2006, 28(5/6): 247-257.
- [18] Sakamoto N, Terai T, Ajioka Y, Abe S, Kobayasi O, Hirai S, et al. Frequent hypermethylation of *RASSF1A* in early flat-type colorectal tumors [J]. *Oncogene*, 2004, 23(55): 8900-8907.
- [19] 许承弼, 滕博, 李长青, 金春顺. 喉鳞状细胞癌中 *RASSF1A* 基因启动子区甲基化及蛋白表达 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2006, 32(2): 326-329.
- [20] 叶梅, 夏冰, 郭秋莎, 周峰, 章晓联. 胃癌组织 *RASSF1A* 甲基化对其 mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(12): 1008-1012.
- [21] 周晓俊, 薛万江, 秦磊, 钱海鑫. 原发性肝癌中 *RASSF1A* 基因表达失活及其临床意义 [J]. *江苏医药*, 2007, 33(1): 24-27.
- [22] 余宗涛, 袁亚莉, 张吉才, 高琼, 吕军. 肺癌患者 Ras 相关区域家族 1A 基因启动子异常甲基化的检测 [J]. *临床内科杂志*, 2007, 24(1): 23-25.
- [23] Peters I, Rehmet K, Wilke N, Kuczyk MA, Hennenlotter J, Eilers T, et al. *RASSF1A* promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis [J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 49.
- [24] 刘复生, 刘彤华. 肿瘤病理学 [M]. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1997: 862.
- [25] 张亚历, 张振书, 杨希山. 大肠癌的基础与临床 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1999: 295.
- [26] Scott N, Sagar P, Stewart J, Blair GE, Dixon MF, Quirke P. p53 in colorectal cancer: Clinicopathological correlation and prognostic significance [J]. *Br J Cancer*, 1991, 63(2): 317-319.

[收稿日期] 2010-04-11

[修回日期] 2010-06-22

[本文编辑] 王莹