

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00554

CpG 岛甲基化表型肺癌的分型标记及临床病理特征

吴康¹, 孙小波¹, 李艳艳², 李亚周¹, 邓安梅¹, 颜宏利^{1*}

1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433
2. 解放军 309 医院检验科, 北京 100091

[摘要] **目的** 比较新的 CpG 岛甲基化表型(CIMP)筛选标记基因和经典 CIMP 筛选标记基因在 CIMP 肺癌筛选中的作用, 并分析 CIMP 肺癌的临床病理特征。**方法** 取第二军医大学长海医院呼吸科 50 例肺癌患者的肺癌组织和癌旁组织, 提取 DNA, 进行甲基化转换后, 利用甲基化特异性 PCR(MSP)对新的 CIMP 筛选标记基因(*SHISA3*、*CTSL1*、*C10RF103* 和 *TMEM200B*)和经典的 CIMP 筛选标记基因(*CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3*)的启动子 CpG 岛区域进行扩增, 采用琼脂糖凝胶电泳分析其甲基化状态。运用 SPSS 统计软件对结果进行统计分析。**结果** 肺癌组织发生明显的甲基化, 所研究的 8 个基因甲基化水平明显高于癌旁组织($P=0.014$)。其中 *RUNX3* 甲基化与淋巴结转移及功能状态(PS)评分有关(P 值分别为 0.017、0.018)。年龄 >60 岁的肺癌患者甲基化率高于 ≤ 60 岁者($P=0.031$)。吸烟对 *CTSL1* 基因甲基化的影响也很大($P=0.018$)。**结论** CpG 岛甲基化表型肺癌具有独特的临床病理特征; 新的和经典的甲基化基因组合在 CIMP 肺癌筛选上都具有较高的灵敏度和特异性。

[关键词] 肺肿瘤; CpG 岛; 甲基化; 表型

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0554-06

Biomarkers and clinicopathologic features of CpG island methylator phenotype lung cancer

WU Kang¹, SUN Xiao-bo¹, LI Yan-yan², LI Ya-zhou¹, DENG An-mei¹, YAN Hong-li^{1*}

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Laboratory Medicine, No. 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China

[Abstract] **Objective** To compare the sensitivity and specificity of the new CpG island methylation phenotype (CIMP) selection marker with the classical CIMP selection marker, and to analyze the clinical pathological features of CIMP lung cancer. **Methods** Genomic DNA was extracted from 50 cases of lung cancer tissues and the corresponding adjacent normal lung tissues in Changhai Hospital. Methylation statues of new CIMP selction marker (*SHISA3*, *CTSL1*, *C10RF103* and *TMEM200B*) and the classical CIMP selection markers (*CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1* and *RUNX3*) were determined by methylation specific PCR, and the results were analyzed by SPSS software. **Results** Notable methylation was found in the lung caner tissues, with the methylation levels of the eight studied genes in the lung cancer tissues being significantly higher than those in the adjacent tissues ($P=0.014$). *RUNX3* gene methylation was significantly related to lymph node metastasis and PS score ($P=0.017$, $P=0.018$). The methylation rate in lung cancer patients aged over 60 was significantly higher than those aged younger than 60 years old ($P=0.031$). Smoking showed significant influence on *CTSL1* gene methylation ($P=0.018$). **Conclusion** CpG island methylation phenotypic lung cancer has unique clinical pathological features. Both the new and classic CIMP markers are of high sensitivity and specificity for the diagnosis of lung cancer.

[Key words] lung neoplasms; CpG islands; methylation; phenotype

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5): 554-559]

肺癌是呼吸系统最常见的恶性肿瘤, 其发病率在发达国家和发展中国家均排在第 1 位, 预计到 2020 年, 肺癌仍是中国新增发病和死亡人数最多的

癌症^[1]。目前, 肺癌的主要治疗手段包括手术治疗、放疗、化疗和靶向治疗等, 尽管近年来上述治疗措施已取得很大进步, 但其复发率和病死率仍很高, 主要

[收稿日期] 2015-02-16 **[接受日期]** 2015-04-10

[作者简介] 吴康, 硕士生, 检验技师, E-mail: 759051596@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162079, E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn

原因在于其发病、转移及复发等相关机制尚不明确。

DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要机制,其不改变 DNA 序列,但影响基因转录调控,是导致抑癌基因失活的重要原因^[2]。CpG 岛甲基化表型(CIMP)的概念于 1999 年首次被提出,研究发现某些结直肠癌 CpG 岛位点启动子被广泛甲基化,造成某些抑癌基因和其他一些肿瘤相关基因的失活^[3]。这些 CIMP 被发现有不同临床表现和分子特征,可以用于研究和评估 CIMP 相关肿瘤^[4]。肺癌起源于一系列遗传和表观遗传的变化,也是 CIMP 相关肿瘤之一^[5]。目前肺癌 CIMP 的相关报道较少,究竟哪些甲基化基因可以作为肺癌 CIMP 分型的基因标记尚不清楚。

在前期研究中,我们利用 DNA 甲基化结合蛋白(MBP)沉淀+二代测序的方法,比较了 3 对 CIMP 阳性和非阳性肿瘤组织的差异^[6]。本研究拟在此基础上,挑选 4 个仅在 CIMP 肿瘤甲基化的基因 *SHISA3*、*CTSL1*、*C1ORF103* 和 *TMEM200B* 进行研究,并和经典的 CIMP 筛选基因 *CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3* 进行比较,旨在找到更准确的 CIMP 肺癌筛选的基因组合,探讨 CIMP 肺癌的临床病理特征,为肺癌的 CIMP 分型和个体化诊疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象 依据病理检验结果,选取 50 例第二军医大学长海医院 2013—2014 年收治的肺癌患者,收集临床病例资料。所有肺癌患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗,未患有其他肿瘤疾病。男 39 例,女 11 例,年龄(54.8±8.6)岁。所有参与本研究的肺癌患者或其家属均签署授权进行基因检测的知情同意书。

1.2 肿瘤组织和血浆游离 DNA 提取 手术切除肿瘤标本后立即转移至-80℃低温冰箱中保存。经病理检查肿瘤细胞>70%的标本方进行基因组抽提。组织 DNA 提取采用 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)。抽提 DNA 测 D_{260}/D_{280} 和琼脂糖凝胶进行质量鉴定。

1.3 CIMP 分型 采用 500 ng 提取的基因组 DNA 用 Zymo EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, Orange, USA)进行亚硫酸氢盐处理,具体操作按照试剂盒的说明进行,处理后的 DNA 置于-20℃冻存,保存时间少于 1 个月。CIMP 分型选用

文献[7]中的基因 *CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3* (经典组合)和我们筛选的基因 *SHISA3*、*CTSL1*、*C1ORF103*、*TMEM200B* (新基因组合)作为筛选标记。扩增甲基化和非甲基化的引物采用 MethPrimer 软件进行设计(<http://www.urogene.org/methprimer/>),引物由 Invitrogen 公司合成。

上述基因位点的甲基化状态运用甲基化特异性 PCR(MSP)^[8]进行分析,因 DNA 经 C-T 转换后 Tm 降低,因此退火温度选择 53℃,其他反应条件同普通 PCR。PCR 反应体系内含 2×PCR Buffer 10 μL,上、下游引物各 0.5 μL(20 μmol/L),模板 DNA 2 μL,以去离子水补足至 20 μL。为防止假阳性或假阴性,每次 PCR 扩增时均采用阳性甲基化基因组 DNA 对照 (Chemicon-CpGenome universal Methylated DNA, Millipore, USA)、阴性外周血淋巴细胞(PBMC)基因组 DNA 对照和阴性无 RNA 酶水对照。

取 5 μL MSP 产物,加入 1 μL 10×Loading Buffer,于含 0.5 mg/L 溴化乙啶的 2.5%琼脂糖凝胶上电泳,凝胶成像系统拍照观察。提纯并扩增凝胶上的条带,再取产物进行电泳。MSP 产物电泳时只出现未甲基化条带时,该样本计为未甲基化;MSP 产物电泳时出现甲基化条带,无论是否出现未甲基化条带,均计为甲基化。4 个基因中 3 个或 3 个以上基因同时出现甲基化条带者,则该样本定义为 CIMP 阳性^[9]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件包分析,GraphPad Prism 5 软件绘图。用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法分析 CIMP 表型与肺癌患者临床病理因素的关系。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 MSP 检测 DNA 甲基化 图 1 为 *CACNA1G* 和 *IGF2* 两个基因在 5 个样品中的 MSP 检测结果。阴性无 RNA 酶水对照无条带扩增,证明引物和反应体系无污染。外周血淋巴细胞(PBMC)阴性对照(一 control)仅能扩增非甲基化条带,阳性对照能扩增甲基化和非甲基化条带,说明该基因在外周血淋巴细胞中无甲基化,也证明了引物扩增的特异性。

2.2 经典 CIMP 分型基因的甲基化阳性率及与临床病理特征的关系 在经典的 4 个基因中,*CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3* 在癌组织和癌旁组织的甲基化率分别为 46.0%(23/50) vs

22.0%(11/50)、28.0%(14/50) vs 8.0%(4/50)、58.0%(29/50) vs 18.0%(9/50)和50.0%(25/50) vs 18.0%(9/50),4个基因在癌组织中的甲基化率均高于癌旁组织。由表1可见,RUNX3基因的甲

基化与淋巴结转移($P=0.017$)和功能状态(PS)评分($P=0.018$)相关,IGF2基因的甲基化与淋巴结转移相关($P=0.026$),CACNA1G基因的甲基化与年龄相关($P=0.011$)。

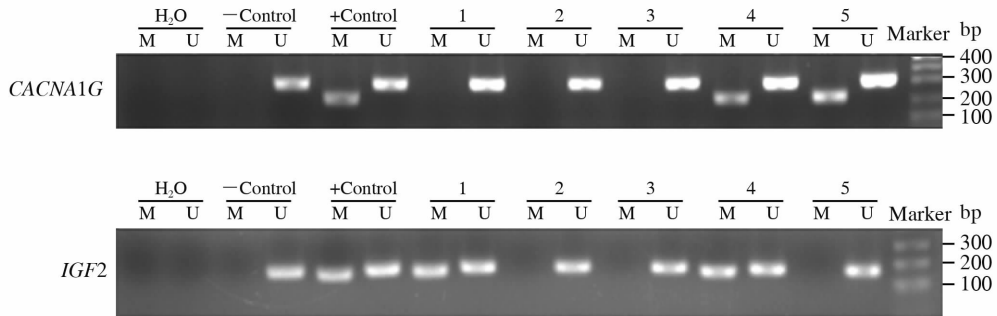


图1 MSP检测甲基化示意图

H₂O:阴性无RNA酶水对照;-Control:阴性外周血淋巴细胞基因组DNA对照;+Control:阳性甲基化基因组DNA对照;1~5:样品1~5。M:甲基化引物扩增的条带;U:非甲基化引物扩增的条带

表1 经典CIMP分型基因启动子甲基化与临床病理特征的关系

指标	CACNA1G		IGF2		NEUROG1		RUNX3		CIMP		n
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
总例数	23	27	14	36	29	21	25	25	15	35	
性别	$P=0.184$		$P=0.114$		$P=0.668$		$P=0.306$		$P=0.602$		
男	16	23	13	26	22	17	18	21	11	28	
女	7	4	1	10	7	4	7	4	4	7	
年龄(岁)	$P=0.011$		$P=0.529$		$P=0.390$		$P=0.777$		$P=0.031$		
>60	16	9	6	19	16	9	13	12	11	14	
≤60	7	18	8	17	13	12	12	13	4	21	
吸烟史	$P=0.869$		$P=0.181$		$P=0.738$		$P=0.556$		$P=0.797$		
有	15	17	11	21	18	14	10	8	10	22	
无	8	10	3	15	11	7	15	17	5	13	
病理类型	$P=0.522$		$P=0.919$		$P=0.474$		$P=0.254$		$P=0.804$		
腺癌	9	13	6	16	14	8	13	9	7	15	
非腺癌	14	14	8	20	15	13	12	16	8	20	
肿瘤分期	$P=0.555$		$P=0.278$		$P=0.963$		$P=0.089$		$P=0.174$		
I期	10	14	5	19	14	10	9	15	5	19	
II/III期	13	13	9	17	15	11	16	10	10	16	
肿瘤直径 d/cm	$P=0.741$		$P=0.781$		$P=0.179$		$P=0.777$		$P=0.577$		
>3	10	13	6	17	11	12	11	12	6	17	
≤3	13	14	8	19	18	9	14	13	9	18	
淋巴结转移	$P=0.52$		$P=0.026$		$P=0.793$		$P=0.017$		$P=0.205$		
是	6	5	6	5	6	5	9	2	5	6	
否	17	22	8	31	23	16	16	23	10	29	
PS评分	$P=0.869$		$P=0.529$		$P=0.793$		$P=0.018$		$P=0.368$		
0	8	10	6	12	10	8	5	13	4	14	
>0	15	17	8	24	19	13	20	12	11	21	

CIMP:CpG岛甲基化表型;PS:功能状态

利用 *CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3* 4 个基因进行 CIMP 分型, 在 50 例肿瘤组织中, 15 例(30%)有 3 个或 4 个基因甲基化, 即 CIMP(+); 而癌旁组织中也有 2 例 CIMP(+), 且这 2 例患者对应的肿瘤组织也呈 CIMP(+). 同 CIMP(-) 患者相比, CIMP(+)患者发病年龄偏大($P=0.031$), 其他病理特征差异无统计学意义(表 1).

2.3 新的 CIMP 分型基因的甲基化阳性率及与临床病理特征的关系 4 个新的甲基化基因 *SHISA3*、*CTSL1*、*C1ORF103*、*TMEM200B* 在 50 例肺癌的癌组织和癌旁组织的甲基化率分别为 76.0%(38/50) vs 52.0%(26/50)、38.0%(19/50) vs 10.0%(5/50)、

72.0%(36/50) vs 56.0%(28/50) 和 48.0%(24/50) vs 20.0%(10/50), 该 4 个基因在癌组织中的甲基化率均高于癌旁组织。其中 *CTSL1* 基因的甲基化与吸烟史有关($P=0.018$, 表 2)。

利用 *SHISA3*、*CTSL1*、*C1ORF103*、*TMEM200B* 4 个基因进行 CIMP 分型, 在 50 例肿瘤组织中, 23 例(46%)属于 CIMP(+)肺癌; 而癌旁组织中也有 3 例 CIMP(+), 这 3 例患者对应的肿瘤组织也呈 CIMP(+). 同 CIMP(-) 患者相比, CIMP(+)患者发病年龄偏大($P=0.031$), 有吸烟史的患者 CIMP(+)比例较大[36%(18/50)], 但差异无统计学意义($P=0.053$, 表 2)。

表 2 新的 CIMP 分型基因启动子甲基化与临床病理特征的关系

指标	<i>SHISA3</i>		<i>CTSL1</i>		<i>C1ORF103</i>		<i>TMEM200B</i>		CIMP	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
总例数	38	12	19	31	36	14	24	26	23	27
性别	$P=0.424$		$P=0.170$		$P=0.144$		$P=0.623$		$P=0.189$	
男	31	8	17	22	30	9	18	21	20	19
女	7	4	2	9	6	5	6	5	3	8
年龄(岁)	$P=0.508$		$P=0.771$		$P=0.529$		$P=1.000$		$P=0.031$	
>60	20	5	9	16	19	6	12	13	13	12
≤60	18	7	10	15	17	8	12	13	10	15
吸烟史	$P=0.639$		$P=0.018$		$P=0.052$		$P=0.832$		$P=0.053$	
有	25	7	15	17	26	6	15	17	18	14
无	13	5	4	14	10	8	9	9	5	13
病理类型	$P=0.852$		$P=0.707$		$P=0.072$		$P=0.802$		$P=0.945$	
腺癌	17	5	9	13	13	9	11	11	10	12
非腺癌	21	7	10	18	23	5	13	15	13	15
肿瘤分期	$P=0.243$		$P=0.608$		$P=0.650$		$P=0.402$		$P=0.586$	
I 期	20	4	10	14	18	6	13	11	12	12
II/III 期	18	8	9	17	18	8	11	15	11	15
肿瘤直径 d/cm	$P=0.730$		$P=0.057$		$P=0.781$		$P=0.982$		$P=0.811$	
>3	18	5	12	11	17	6	11	12	11	12
≤3	20	7	7	20	19	8	13	14	12	15
淋巴结转移	$P=1.000$		$P=0.564$		$P=0.144$		$P=0.240$		$P=0.520$	
是	8	3	5	6	6	5	7	4	6	5
否	30	9	14	25	30	9	17	22	17	22
PS 评分	$P=0.639$		$P=0.923$		$P=0.979$		$P=0.832$		$P=0.449$	
0	13	5	7	11	13	5	9	9	7	11
>0	25	7	12	20	23	9	15	17	16	16

CIMP: CpG 岛甲基化表型; PS: 功能状态

3 讨论

目前肺癌发病率及死亡率都较高,主要原因为肺癌发生发展的分子机制尚不明确,同时肺癌起病隐匿,早期无特异性症状,大多数肺癌患者就诊时已进入晚期。因此,迫切需要进一步探讨其分子发生机制,寻找理想的早期诊断和分子分型标记物。从遗传的角度讲,肺癌也是环境因素和遗传因素相互作用的结果。环境因素包括吸烟、环境污染等;遗传因素则主要包括一系列遗传和表观遗传的变化,前者如染色体畸变、基因突变等,后者如 DNA 甲基化、miRNAs 和组蛋白修饰等的改变。CIMP 肿瘤是一类特殊的、主要由于 DNA 甲基化导致的肿瘤。CIMP 是一种特殊的分子亚型,具有独特的临床病理特征:如好发于近端结肠、女性、黏液性癌、低分化、高微卫星不稳定性(MSI)、高 BRAF 突变和低 TP53 突变^[10-11]等。

Hughes 等^[12] 建议检测 *MINT1*、*MINT2*、*MINT31*、*CDKN2A* 和 *MLH1* 启动子的甲基化来判断是否为 CIMP 肿瘤;Weisenberger 等^[13] 在 295 个肿瘤中检测了 92 个基因的 CpG 岛 DNA 甲基化情况,最后选择了 5 个基因 (*CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3*、*SOCS1*) 的 CpG 岛作为 CIMP 筛选的标记。但这些 CIMP 筛选标记基因都是基于结直肠癌提出的,是否适合于肺癌尚不清楚。

本研究发现经典的 CIMP 分型标记基因 *CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1* 和 *RUNX3* 在肺癌中的甲基化率高于癌旁组织,且与肺癌临床病理特征关系密切。其中 *CACNA1G* 与年龄有一定的关系,>60 岁的患者该基因甲基化阳性率升高。*IGF2* 和 *RUNX3* 在淋巴结转移上具有一定的意义,发生淋巴结转移的患者此两个基因甲基化率升高。提示可利用这两个基因甲基化检测来判断是否发生肺癌的淋巴结转移。Harden 等^[14] 研究也有类似发现。另外,*RUNX3* 甲基化与临床 PS 评分具有一定的关系,当 PS 评分>0 时,此基因甲基化阳性率增高。

本研究还以 4 个新基因 *SHISA3*、*CTSL1*、*C1ORF103* 和 *TMEM200B* 作为 CIMP 分型标记进行研究,发现年龄越大 CIMP 阳性率越高。另外发现 *CTSL1* 基因与吸烟史有一定的关系,有吸烟史的患者此基因阳性率升高。这与 Ostrow 等^[15] 的研究

相符,也符合 CIMP 在其他肿瘤如结直肠癌中的临床病理特征。

之前的研究已明确 DNA 的超甲基化与在启动子区域具有高水平胞嘧啶的基因沉默有关,这种基因通常沉默转录^[16]。肺癌病理类型不同,其基因甲基化率可能也会存在差异。Yanagawa 等^[17] 报道 *p16* 的甲基化与鳞癌密切相关,而 *APC* 和 *RUNX3* 基因的甲基化则与腺癌密切相关。van der Weyden 等^[18] 和 Talikka 等^[19] 认为,CIMP 肺癌与非小细胞肺癌密切相关。然而本研究的 8 个基因甲基化与病理类型无明显相关性。本研究还发现,性别对甲基化结果没有影响,这也不同于 Vaissière 等^[20] 的报道。虽然本研究也发现 CIMP 肿瘤与年龄、淋巴结转移等有关,但其他的临床病理特征未发现明显差异,这可能与样本数较小、甲基化检测手段不够灵敏有关,需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 代敏,任建松,李霓,李倩,杨琳,陈玉恒. 中国 2008 年肿瘤发病和死亡情况估计及预测[J]. 中华流行病学杂志,2012,33:57-61.
- [2] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J G, Baylin S B, Issa J P. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999,96: 8681-8686.
- [3] Ng J M, Yu J. Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci,2015,16:2472-2496.
- [4] Falahi F, Sgro A, Blancafort P. Epigenome engineering in cancer: fairytale or a realistic path to the clinic? [J]. Front Oncol,2015,5:22.
- [5] Baylin S B, Jones P A. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications [J]. Nat Rev Cancer,2011,11:726-734.
- [6] Xu Y, Hu B, Choi A J, Gopalan B, Lee B H, Kalady M F. Unique DNA methylome profiles in CpG island methylator phenotype colon cancers[J]. Genome Res, 2012,22:283-291.
- [7] Pickard B S, Malloy M P, Clark L, Lehellard S, Ewald H L, Mors O, et al. Candidate psychiatric illness genes identified in patients with pericentric inversions of chromosome 18[J]. Psychiatr Genet,2005,15: 37-44.
- [8] Nawaz I, Qiu X, Wu H, Li Y, Fan Y, Hu L F, et al. Development of a multiplex methylation specific PCR suitable for (early) detection of non-small cell lung

- cancer[J]. *Epigenetics*, 2014, 9:1138-1148.
- [9] Kim H, Kim Y H, Kim S E, Kim N G, Noh S H, Kim H. Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability[J]. *J Pathol*, 2003, 200: 23-31.
- [10] Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen P J, Aghdaei H A, Zali M R. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer[J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2013, 6:120-128.
- [11] Samowitz W S, Albertsen H, Herrick J, Levin T R, Sweeney C, Murtaugh M A, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129:837-845.
- [12] Hughes L A, Khalid-de Bakker C A, Smits K M, van den Brandt P A, Jonkers D, Ahuja N, et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825:77-85.
- [13] Weisenberger D J, Siegmund K D, Campan M, Young J, Long T I. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer[J]. *Nat Genet*, 2006, 38: 787-793.
- [14] Harden S V, Tokumaru Y, Westra W H, Goodman S, Ahrendt S A, Yang S C, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9:1370-1375.
- [15] Ostrow K, Michailidi C, Guerrero-Preston R, Hoque M O, Greengard A, Rom W, et al. Cigarette smoke induces methylation of the tumor suppressor gene NISCH[J]. *Epigenetics*, 2013, 8:383-388.
- [16] Lao V V, Grady W M. Epigenetics and colorectal cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8: 686-700.
- [17] Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T. Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94: 589-592.
- [18] van der Weyden L, Adams D J. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776:58-85.
- [19] Talikka M, Sierro N, Ivanov N V, Chaudhary N, Peck M J, Hoeng J, et al. Genomic impact of cigarette smoke, with application to three smoking-related diseases[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2012, 42:877-889.
- [20] Vaissière T, Hung R J, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 243-252.

[本文编辑] 尹 茶