

RASSF1A基因启动子区甲基化在贲门腺癌、食管下段鳞癌组织中的变化及临床意义

樊宇靖, 刘 宾, 王立东, 李 莉, 蓝 宇

■背景资料

河南林州是食管癌和贲门癌的高发地区, 该地区贲门腺癌的发病特征与远端胃癌明显不同, 却与食管下段鳞癌存在诸多相似之处。

樊宇靖, 蓝宇, 北京积水潭医院消化科 北京市 100035
刘宾, 李莉, 首都医科大学附属北京同仁医院消化科 北京市 100730

王立东, 郑州大学基础医学院 河南省食管癌重点开放试验室 河南郑州市 450052

作者贡献分布: 本课题由樊宇靖与刘宾共同设计; 实验过程由樊宇靖与李莉完成; 王立东提供技术指导; 数据整理统计由樊宇靖完成; 论文撰写由樊宇靖与蓝宇完成。

通讯作者: 樊宇靖, 100035, 北京市西城区新街口东街31号, 北京积水潭医院消化科. elyn_fan@sohu.com

电话: 010-58516688

收稿日期: 2010-12-07 修回日期: 2010-12-07

接受日期: 2010-12-17 在线出版日期: 2011-01-08

Clinical significance of RASSF1A promoter methylation in gastric cardiac carcinoma and esophageal squamous cell carcinoma

Yu-Jing Fan, Bin Liu, Li-Dong Wang, Li Li, Yu Lan

Yu-Jing Fan, Yu Lan, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Bin Liu, Li Li, Department of Gastroenterology, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China

Li-Dong Wang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer Research, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yu-Jing Fan, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, 31 East Xijiekou Avenue, Xicheng District, Beijing 100035, China. elyn_fan@sohu.com

Received: 2010-12-07 Revised: 2010-12-07

Accepted: 2010-12-17 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To investigate the methylation status of the promoter region of the RASSF1A gene in gastric cardiac adenocarcinoma (GCA) and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in the distal esophagus and to analyze their clinical significance.

METHODS: Thirty-three GCA patients and 36 ESCC patients who came from a high-incidence region of ESCC in Linzhou, Henan and were treated at Yaocun Esophageal Cancer Hospital and Linzhou Center Hospital were enrolled in

this study. No statistical differences were found in sex, age, and tumor differentiation between GCA and ESCC patients. No patients received chemotherapy or radiotherapy before operation. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to investigate the methylation status of the promoter region of the RASSF1A gene in the two groups of patients.

RESULTS: For GCA patients, the frequencies of RASSF1A promoter methylation in cancer tissue (CA), matched dysplasia tissue (DYS) and normal tissue (NOR) were 63.6%, 20% and 4.2%, respectively. For ESCC patients, the frequencies of RASSF1A promoter methylation in tumor tissue, matched dysplasia tissue and normal tissue were 66.7%, 25% and 16.7%, respectively. High methylation frequency was found in both types of cancer tissue. With the evolution of lesions (NOR-DYS-CA), the frequency of RASSF1A promoter methylation showed an increasing tendency in both GCA ($\chi^2 = 22.173$, $P < 0.001$) and ESCC patients ($\chi^2 = 19.324$, $P < 0.001$). The frequency of RASSF1A promoter methylation in normal tissue from GCA patients was lower than that from ESCC patients.

CONCLUSION: RASSF1A promoter hypermethylation is a molecular event that occurs in both GCA and ESCC patients. RASSF1A is a potential candidate biomarker for early detection of carcinoma of the esophagogastric junction.

Key Words: Gastric cardiac adenocarcinoma; Esophageal squamous cell carcinoma; RASSF1A; Methylation

Fan YJ, Liu B, Wang LD, Li L, Lan Y. Clinical significance of RASSF1A promoter methylation in gastric cardiac carcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 84-88

摘要

目的: 比较RASSF1A基因甲基化在贲门腺癌、食管下段鳞癌不同病理阶段组织中的共性和差异。

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

方法: 33例贲门腺癌和36例食管下段鳞癌手术切除标本纳入本研究, 每例标本选取癌组织, 癌旁不典型增生组织(距癌3-5 cm), 癌旁正常组织(距癌>5 cm)组织各1块, 采用甲基化特异性PCR检测RASSF1A基因启动子区的甲基化情况。

结果: 贲门腺癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分别为63.6%, 20%, 4.2%; 食管下段鳞癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分别为66.7%, 25%, 16.7%。随着病变程度的加重(癌旁正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), 贲门腺癌患者RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率呈上升趋势($\chi^2 = 22.173, P < 0.001$), 食管下段鳞癌患者RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率亦呈上升趋势($\chi^2 = 19.324, P < 0.001$), 但两者的升高幅度不同。贲门腺癌癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率明显低于食管下段鳞癌癌旁正常组织。

结论: RASSF1A基因启动子区高甲基化是贲门腺癌和食管下段鳞癌发生的共同分子事件, RASSF1A基因可作为胃食管交界部癌患者早期诊治和监测的候选指标。

关键词: 贲门腺癌; 食管下段鳞癌; Ras相关区域家族1A基因; 甲基化

樊宇靖, 刘宾, 王立东, 李莉, 蓝宇. RASSF1A基因启动子区甲基化在贲门腺癌、食管下段鳞癌组织中的变化及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 84-88
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/84.asp>

0 引言

河南林州是世界上食管癌发病率和死亡率最高的地区, 同时贲门癌也是此地区最常见的恶性肿瘤, 食管癌和贲门癌的发病率之比为2.4-4.1:1^[1]。贲门腺癌的发病特征与远端胃癌明显不同, 却与食管下段鳞癌存在诸多相似和联系, 主要表现在: (1)均具有显著的地区分布特征, 且高发地域与食管癌高发地域一致; (2)部分患者同时患有食管下段鳞癌和贲门腺癌; (3)部分患者具有一致的蛋白表达异常^[2]。鉴于该地区人群具有相同的遗传背景和环境因素, 我们推测其贲门腺癌和食管下段鳞癌的发病可能具有相同的危险因素和分子基础。在本研究中, 我们拟检测Ras相关区域家族1A(Ras association domain family

1A, RASSF1A)基因甲基化改变在贲门腺癌、食管下段鳞癌不同病理阶段组织中的共性和差异, 筛选肿瘤发生的易感基因, 为临床早期诊治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 33例贲门腺癌和36例食管下段鳞癌手术切除大体标本取自河南省食管癌重点开放实验室标本库, 来源于林州市姚村镇食管癌医院和林州市中心医院。两组患者在性别、年龄、分化程度上无统计学差异。所有患者术前均未接受任何放疗或化疗。食管下段鳞癌的纳入标准是: (1)肿瘤位置界于齿状线口侧且位于齿状线上15 cm以内; (2)齿状线清晰可见, 未累及; (3)经病理证实为食管鳞癌。贲门腺癌的纳入标准是: (1)肿瘤位置界于齿状线肛侧且位于齿状线下5 cm以内; (2)齿状线清晰可见, 未累及; (3)经病理证实为贲门腺癌。大体标本均在手术切除后2 h内收集, 于液氮保存, 转运到实验室标本库后, 放入-80 °C冰箱冻存备用。所选标本在冰上, 分别取正常组织块(距癌>5 cm)、癌旁组织块(距癌3-5 cm)、癌组织块进行连续冰冻切片数张, 厚度10 μm , 首先取1张进行组织病理学诊断, 然后采用显微刮片技术刮取所需病变组织提取DNA。组织获取均征得患者及家属知情同意。基因DNA修饰试剂盒购于美国Promega公司, Hot Start Taq酶, dNTP, DNA Marker均购于大连宝生物工程有限公司, 琼脂糖粉购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取: 采用酚-氯仿抽提法提取DNA。

1.2.2 基因组DNA的亚硫酸氢盐修饰: 采用Wizard DNA Clean-up System试剂盒, 操作步骤按试剂盒说明进行。

1.2.3 设计引物: 根据GenBank序列及参考文献[3]合成甲基化和非甲基化引物, 具体引物序列、退火温度及扩增片段大小见表1。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 甲基化特异性PCR: 按照Herman等^[4]提出的甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)方法, 每份经亚硫酸氢盐修饰后的标本都分别用甲基化与非甲基化引物扩增。PCR采用25 μL 反应体系: 10 \times PCR缓冲液(Mg²⁺ Plus)2.7 μL , dNTP(2.5 $\mu\text{mol/L}$)3 μL , 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)2 μL , 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)2 μL , 模板DNA 4 μL ,

■相关报道

林海等研究发现胃癌组织中RASSF1A基因mRNA表达较正常组织明显降低, 同时甲基化率显著高于正常组织, 推测RASSF1A基因启动子高甲基化可能是导致其表达减低的原因, 并与胃癌进展演变相关。

■创新盘点

本研究对同一高发区人群贲门腺癌和食管下段鳞癌甲基化情况进行了对比分析, 提出RASSF1A基因启动子区高甲基化是上述两种肿瘤发生的共同分子事件, 并且发生在肿瘤早期, 可作为胃食管交界部癌患者早期诊治和监测的候选指标。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)	退火温度(°C)	参考文献
RASSF1A M	F: GTGTTAACGCGTTGCGTATC R: AACCCCGCGAACTAAAAACGA	94	60	[4]
RASSF1A U	F: TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG R: CAAACCCACAACTAAAAACAA	108	60	[4]

MF: 甲基化上游引物; MR: 甲基化下游引物; UF: 非甲基化上游引物; UR: 非甲基化下游引物。

Taq DNA聚合酶0.3 μ L, 去离子水加至25 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 进入循环, 95 $^{\circ}$ C 40 s, 退火温度复性60 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共循环40次, 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 产物4 $^{\circ}$ C保存。

1.2.5 结果判定: 取6 μ L MSP扩增产物与2 μ L上样缓冲液充分混匀后, 加样至含有溴化乙啶的2%琼脂糖凝胶上电泳30 min, 以凝胶成像分析仪观察分析电泳结果。如甲基化特异引物扩增出目的条带, 而非甲基化特异引物无条带扩出, 视为纯合型甲基化; 如两对引物均扩增出目的条带, 视为杂合型甲基化; 以上两种类型均视为甲基化阳性; 如非甲基化特异性引物扩增出目的条带, 而甲基化引物无条带扩出, 视为非甲基化。如两对引物均未扩增出特异性条带, 则认为实验失败, 需重复实验。同时我们取新鲜胎盘组织, 按前述方法进行DNA的提取, 用CpG甲基化酶M.SssI(New England BioLabs[®] Inc.)修饰胎盘DNA, 利用已知甲基化的特性作为本研究的阳性对照。

统计学处理 采用SPSS15.0软件进行统计分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况 33例贲门腺癌患者中男性26例, 女性7例, 平均年龄 59.6 ± 7.7 岁, 其中高分化癌8例, 中分化癌12例, 低分化癌13例, 经病理证实后共选取72块组织, 其中癌组织33例, 癌旁不典型增生组织15例, 癌旁正常组织24例。36例食管下段鳞癌患者中男25例, 女11例, 平均年龄 59.3 ± 8.4 岁, 其中高分化癌6例, 中分化癌17例, 低分化癌13例, 经病理证实后共选取108块组织, 其中癌组织36例, 癌旁不典型增生组织36例, 正常组织36例。

2.2 贲门腺癌不同病理阶段组织中RASSF1A基因启动子区甲基化结果分析 贲门腺癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分

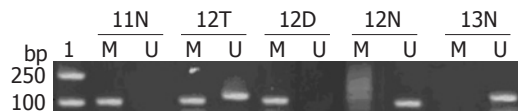


图 1 MSP检测RASSF1A甲基化电泳结果。1: Marker; M: 甲基化引物扩增后产物(94 bp), U: 非甲基化引物扩增后产物(108 bp); N: 癌旁正常组织; T: 癌组织; D: 癌旁不典型增生组织。

别为63.6%, 20%, 4.2%。随着贲门黏膜病变逐渐加重(正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率呈上升趋势($\chi^2 = 22.173$, $P < 0.001$)。其中癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比有统计学差异(63.6% vs 4.2%, $P < 0.05$); 癌旁不典型增生组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比无统计学差异(20% vs 4.2%, $P > 0.05$); 癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁不典型增生组织相比无统计学差异(63.6% vs 20%, $P > 0.05$, 图1)。

2.3 食管下段鳞癌不同病理阶段组织中RASSF1A基因启动子区甲基化结果分析 食管下段鳞癌癌组织、癌旁不典型增生组织和癌旁正常组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率分别为66.7%, 25%, 16.7%; 随着食管黏膜病变逐渐加重(正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率呈上升趋势($\chi^2 = 19.324$, $P < 0.001$)。其中癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比具有统计学差异(66.7% vs 16.7%, $P < 0.01$); 癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁不典型增生组织相比具有显著统计学差异(66.7% vs 25%, $P < 0.01$); 癌旁不典型增生组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率与癌旁正常组织相比无统计学差异(25% vs 16.7%, $P > 0.05$, 图1)。

2.3 贲门腺癌/食管下段鳞癌组织中RASSF1A基因启动子区甲基化的对比分析 贲门腺癌癌组

表 2 贲门腺癌/食管下段鳞癌组织RASSF1A基因启动子区的甲基化

	贲门腺癌组		食管下段鳞癌组		χ^2 值	P值
	n	n(%)	n	n(%)		
癌旁正常组织	24	1(4.2)	36	6(16.7)	2.183	0.143
癌旁不典型增生组织	15	3(20.0)	36	9(25.0)	2.147	0.503
癌组织	33	21(63.6)	36	24(66.7)	0.070	0.792

组织和食管下段鳞癌组织RASSF1A基因启动子区的甲基化发生率均高, 两者比较无统计学差异(63.6% vs 66.7%, $P>0.05$)。随着病变程度的加重(正常组织-癌旁不典型增生组织-癌组织), RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率在两组肿瘤中均呈上升趋势, 但两者的升高幅度不同。RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率在贲门腺癌癌旁正常组织中低于食管下段鳞癌癌旁正常组织, 但无统计学差异(4.2% vs 16.7%, $P>0.05$, 表2)。

3 讨论

由于贲门癌和食管下段癌的早期症状不典型, 诊断指标欠敏感, 大部分患者就诊时已为中晚期^[5], 病变常常累及齿状线, 很难界定肿瘤究竟来源于食管或贲门, 近年来常将两者统称为胃食管交界部癌。胃食管交界部癌患者的5年生存率非常低, 如何实现早期诊治是目前临床上迫切需要解决的问题。

RASSF1A基因是位于人染色体3p21.3区位点的抑癌基因, 含340个氨基酸的开放读框, 编码相对分子质量38 800 Da的蛋白多肽, 通过参与抑制Ras/RASSF1/ERK通路的信号传导调控细胞的增殖和凋亡、维持微管稳定性^[6]。研究表明, RASSF1A基因在多种恶性肿瘤组织(如肺癌、乳腺癌、膀胱癌、食管癌、结肠癌等)中存在表达缺失或减低, 启动子CpG岛异常甲基化和杂合性丢失是其沉默的主要原因^[7-9]。如Lo等^[10]发现, 在食管鳞状细胞癌和鼻咽癌组织中存在RASSF1A基因的表达减低, 表达减低程度与肿瘤的分级、分型、有无淋巴结转移等密切相关。林海等^[11]研究发现胃癌组织中RASSF1A基因mRNA表达较正常组织明显降低, 同时甲基化率显著高于正常组织, 推测RASSF1A基因启动子高甲基化可能是导致其表达减低的原因, 并与胃癌进展演变相关。但目前关于胃食管交界部癌RASSF1A基因甲基化的研究尚少, 同一高发区胃食管交界部癌主要病理类型肿瘤甲基化

的对比研究更少。河南食管贲门癌高发区胃食管交界部癌主要由贲门腺癌和食管下段鳞癌构成^[12,13]。在本研究中, 我们对贲门腺癌和食管下段鳞癌的纳入标准进行了明确的规定, 保证了所选样本的准确性。我们发现贲门腺癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率显著高于癌旁正常组织(63.6% vs 4.2%), 食管下段鳞癌组织RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率显著高于癌旁正常组织(66.7% vs 16.7%), 提示RASSF1A基因启动子区的高甲基化与贲门腺癌和食管下段鳞癌的发生密切相关, 是两者发生的共同分子事件。鉴于两组人群具有相似的环境因素和遗传背景, 并且在流行病学上有诸多相似之处, 推测RASSF1A基因可能在共同的致癌因素作用下出现异常甲基化。

DNA的甲基化具有非常重要的临床意义和应用前景。研究发现DNA甲基化可以在血清等临床非常容易获得的标本中检测^[14], 并且这种甲基化状态具有可逆性, 应用甲基化抑制剂5-氮-2脱氧胞苷(5-aza-dC)处理后可重新活化^[15], 为临床早期诊治提供新的方向。本研究中, 随着病变程度的逐渐加重, 两组患者RASSF1A基因启动子区甲基化的发生率均呈升高趋势, 推测RASSF1A基因启动子区甲基化异常可能发生在肿瘤的早期阶段、并贯穿肿瘤发展的整个过程; RASSF1A基因有可能作为胃食管交界部癌患者早期诊治和监测的候选指标。随着病变程度的加重, RASSF1A基因甲基化发生率的变化幅度在贲门腺癌和食管下段鳞癌组织中存在差异, 贲门腺癌组织RASSF1A基因甲基化的发生率与食管下段鳞癌组织(63.6% vs 66.7%)近似; 而贲门腺癌癌旁正常组织RASSF1A基因甲基化的发生率明显低于食管下段鳞癌癌旁正常组织(4.2% vs 16.7%), 我们推测可能与RASSF1A基因在不同组织类型肿瘤的癌变过程中参与的方式和所起作用的大小不同有关。通过建立不同肿瘤组织和同一肿瘤组织不同病理阶段中形成的特异性甲基化谱, 可用于区别不同类型的肿

■应用要点

本研究发现RASSF1A基因启动子区高甲基化在肿瘤早期即出现, 可用于临床早期诊断。不同类型肿瘤甲基化改变的趋势存在差异, 推测通过建立特异性甲基化谱, 可用于区别不同类型的肿瘤或肿瘤的不同亚型。

■同行评价

本文学术性较好,具有一定的临床价值。

瘤或肿瘤的不同亚型。贲门腺癌旁正常组织 RASSF1A 基因甲基化的发生率与食管下段鳞癌旁正常组织比较无显著性差异,可能与样本量偏少有关,有待进一步扩大样本量。

目前贲门癌的发病机制尚不清楚,有文献报道42%-68%的贲门癌与Barrett's食管有关^[16],Barrett's食管可能是贲门癌的危险因素之一。还有学者认为,贲门黏膜是真正的化生黏膜,是肠化生形成的一个动态过程,是Barrett's食管的前体^[17]。众所周知,Barrett's食管是食管腺癌的癌前病变,贲门癌和食管腺癌的发病机制是否相同尚不清楚。有研究认为食管腺癌和贲门腺癌的危险因素,如饮酒,吸烟,体质量指数,遗传因素,低抗氧化剂膳食,服用食管下括约肌松弛药物等并不相同,因此应将两者作为不同的疾病分别对待^[1]。近年来西方国家Barrett's食管和食管腺癌的发病率明显升高,部分地区食管腺癌已成为食管癌发病的主要病理类型^[18]。随着我国经济水平的提高和生活模式的西化,反流性食管炎和Barrett's食管的发病率也呈上升趋势^[19],但食管腺癌发病率偏低,食管鳞癌仍是食管癌发病的主要病理类型,同时贲门腺癌发病率呈明显的升高趋势。我国国家胃食管交界部癌的主要病理类型(食管下段鳞癌和贲门癌)与西方国家(食管下段腺癌和食管下段鳞癌)明显不同。在本研究中,我们发现同一高发区人群贲门腺癌和食管下段鳞癌之间存在相同的流行病学特征和共同分子事件,有可能是一种相关性疾病;推测我国胃食管交界部癌的发病机制与西方国家可能存在不同,但有待进一步的研究。

4 参考文献

- 张军,程妍. Barrett食管与贲门癌. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2665-2668
- 吴会芳,王立东,范宗民,高珊珊,任景丽,王俊宽,李吉林,焦新英,刘小莉,邵珊,李琮宇,李苹娟,张彦霞,郭花芹,尹艳春,李江曼,何欣,邢国兰,刘保池. 青年食管鳞癌和贲门腺癌组织中Ras相关区域家族1A蛋白的表达. 郑州大学学报(医学版) 2007; 42: 409-411
- Zöschbauer-Müller S, Lam S, Toyooka S, Virmani AK, Toyooka KO, Seidl S, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers. *Int J Cancer* 2003; 107: 612-616
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- Fan YJ, Song X, Li JL, Li XM, Liu B, Wang R, Fan ZM, Wang LD. Esophageal and gastric cardia cancers on 4238 Chinese patients residing in municipal and rural regions: a histopathological comparison during 24-year period. *World J Surg* 2008; 32: 1980-1988
- Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* 2007; 120: 3163-3172
- Yazici H, Terry MB, Cho YH, Senie RT, Liao Y, Andrulis I, Santella RM. Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2723-2725
- Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Kanauchi N, Endoh M, Sadahiro M, Motoyama T. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2007; 58: 131-138
- Oliveira C, Velho S, Domingo E, Preto A, Hofstra RM, Hamelin R, Yamamoto H, Seruca R, Schwartz S Jr. Concomitant RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 2005; 24: 7630-7634
- Lo PH, Xie D, Chan KC, Xu FP, Kuzmin I, Lerman MI, Law S, Chua D, Sham J, Lung ML. Reduced expression of RASSF1A in esophageal and nasopharyngeal carcinomas significantly correlates with tumor stage. *Cancer Lett* 2007; 257: 199-205
- 林海,曹俊,张斌,吴育美,邹晓平. RUNX3、RASSF1A启动子高甲基化与胃癌进展转移的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18: 889-896
- 王立东,李吉林,张彦霞,焦新英,王俊宽,杜娟娟,吴会芳,范宗民,何欣,宋昕,申秋,樊慧,高姗姗,常扶保,常智慧,吴爱群,邢国兰. 河南贲门癌高发区贲门癌发生部位分析. 郑州大学学报(医学版) 2007; 42: 389-392
- 李秀敏,赵志敏,常廷民,张渊智,周福有,王建坡,王立东,常扶保,郭涛,孔国强,张连群,侯晓华. 食管癌高发区1259例食管癌患者临床病理与遗传易感性. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2367-2373
- Brooks JD, Cairns P, Shore RE, Klein CB, Wirgin I, Afanasyeva Y, Zeleniuch-Jacquotte A. DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: results of a nested case-control study. *Cancer Epidemiol* 2010; 34: 717-723
- Deng T, Zhang Y. 5-Aza-2'-deoxycytidine reactivates expression of RUNX3 by deletion of DNA methyltransferases leading to caspase independent apoptosis in colorectal cancer Lovo cells. *Biomed Pharmacother* 2009; 63: 492-500
- Underwood JA, Williams JW, Keate RF. Clinical findings and risk factors for Candida esophagitis in outpatients. *Dis Esophagus* 2003; 16: 66-69
- Marsman WA, van Sandick JW, Tytgat GN, ten Kate FJ, van Lanschot JJ. The presence and mucin histochemistry of cardiac type mucosa at the esophagogastric junction. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 212-217
- Walther C, Zilling T, Perfekt R, Möller T. [Strongly increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia]. *Lakartidningen* 2004; 101: 180-183
- 李兆申,徐晓蓉,许国铭,邹多武,孙振兴,王雯,叶萍,陆建萍. 反流性食管炎的临床特征分析. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 315-318

编辑 曹丽鸥 电编 何基才