

醋酸棉酚对人腺样囊性癌 ACC-M 细胞 P16 基因甲基化及 mRNA 表达的影响及其意义

岳万远, 陈文飞, 付 帅, 吴 勇
(昆明医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 研究醋酸棉酚 (gossypol acetic acid, GAA) 对体外培养的人腺样囊性癌 ACC-M 细胞 P16 基因甲基化及 mRNA 表达的影响, 初步探讨醋酸棉酚的抗肿瘤作用机制. **方法** (1) 应用甲基化特异性 PCR (MSP) 检测 ACC-M 细胞在 GAA 作用 48、72 h 后 P16 基因甲基化状态的改变情况; (2) 应用实时荧光定量法 (RFQ-PCR) 检测 ACC-M 细胞在 GAA 作用 48、72 h 后 P16 基因 mRNA 的表达变化. **结果** (1) MSP 检测结果显示: 分别以 19、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 GAA 作用 ACC-M 细胞 48、72 h 后, P16 甲基化条带的平均灰度值低于对照组 ($P < 0.05$); (2) RFQ-PCR 检测显示: 分别以 19、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 GAA 作用 ACC-M 细胞 48、72 h 后细胞中 P16 mRNA 的表达水平高于对照组 ($P < 0.05$). **结论** GAA 可降低 P16 基因的甲基化水平, 且能增强 P16 基因 mRNA 表达, 这可能是 GAA 抗肿瘤作用的机制之一.

[关键词] 人腺样囊性癌; 醋酸棉酚; P16; DNA 甲基化

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 05 - 0017 - 05

Effects of Gossypol Acetic Acid on DNA Methylation Level and mRNA Expression of p16 Gene in Human Adenoid Cystic Carcinoma ACC-M Cells

YUE Wan - yuan, CHEN Wen - fei, FU Shuai, WU Yong
(Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of gossypol acetic acid (GAA) on methylation level and mRNA expression of p16 gene in human adenoid cystic carcinoma ACC-M cells in vitro, and investigate the antitumor mechanism of GAA. **Methods** (1) Methylation specific PCR (MS-PCR) was used to detect methylation level changing of the p16 in ACC-M cells treated by GAA for 48 h and 72 h. (2) Real-time fluorescence quantitative PCR (RFQ-PCR) was used to detect mRNA expression level changing of the p16 in ACC-M cells treated by GAA for 48 h and 72 h. **Results** (1) Compared with the control group, MS-PCR showed the hypermethylation of CpG island in gene promoter of p16 was partly reversed after GAA treatment (19 $\mu\text{mol/L}$ GAA for 48 h and 10 $\mu\text{mol/L}$ for 72 h, $P < 0.05$). (2) The results of RFQ-PCR showed that mRNA expression of p16 in ACC-M cells was significantly higher than that in the control group after GAA treatment (19 $\mu\text{mol/L}$ GAA for 48 h and 10 $\mu\text{mol/L}$ for 72 h, $P < 0.05$). **Conclusion** GAA can reduce the p16 gene methylation level and increase p16 gene mRNA expression, which might be one of the mechanisms of GAA antitumor activity.

[Key words] Human adenoid cystic carcinoma; Gossypol acetic acid; p16; DNA methylation

腺样囊性癌 (adenoid cystic carcinoma, ACC) 是涎腺组织来源的常见的恶性肿瘤之一, 生长较为缓慢但侵袭性强, 常沿神经、血管生长, 易复

发和转移, 加之对化疗、放疗不敏感, 给临床治疗带来较大的困难. 研究证实^[1,2], 与正常腺体组织相比在 ACC 中有大量抑癌基因发生了高甲基化.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81160326); 云南省科技计划资助项目 (2009CD207)

[作者简介] 岳万远 (1986~), 男, 云南昭通市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事口腔颌面外科临床及研究工作.

[通讯作者] 吴勇. E-mail: wy72205@gmail.com

DNA 甲基化能使抑癌基因沉默或功能缺失,而去甲基化后使之活化恢复表达.通过应用去甲基化制剂诱导因高甲基化而失活或低表达的抑癌基因的再表达,可恢复机体对细胞正常生长的调控功能,有可能达到治疗癌症的目的^[3].P16 基因又称周期素依赖性激酶抑制蛋白编码基因,直接参与细胞周期的调控,负调节细胞增殖及分裂,阻止细胞进入 S 期,从而抑制细胞的增殖,被认为是最重要的抑癌基因之一.棉酚(gossypol, GP)又称棉子醇,是从棉籽油里提取的一种成分,醋酸棉酚(Gossypol acetic acid)是棉酚的药用形式,较棉酚稳定.本课题研究已表明^[4,5],GAA 具有抑制肿瘤生长的作用,能抑制体外培养的人舌鳞癌 Tca8113 细胞及腺样囊性癌 ACC-M 细胞生长,但具体机制尚不明确.本研究旨在了解 GAA 对体外培养的 ACC-M 细胞 P16 基因启动子区 DNA 甲基化状态及 mRNA 表达的影响,初步探讨 GAA 的抗肿瘤作用机制.

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肺高转移性腺样囊性癌 ACC-M 细胞株(购自上海沪峰生物科技有限公司),GAA(购自美国 Sigma 公司),RPMI1640 培养液及灭活胎牛血清(购自 HyClone 公司),甲基化修饰试剂盒(购自 ZYMO RESEARCH 公司)、细胞基因组提取试剂盒和 TRIzol 试剂(购自 TIANGEN 生物公司),SYBR Green PCR Master Mix(购自 INVITROGEN 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 ACC-M 细胞用含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素 G、100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液,置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次.

1.2.2 甲基化特异性 PCR (MSP) 方法检测 ACC-M 细胞在 GAA 分别作用 48、72 h 后 P16 基因甲基化水平的改变 取对数生长期的 ACC-M 细胞,调整细胞密度为 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/mL,接种于 25 cm² 培养瓶中,置于培养箱中培养 36 h 后,至细胞单层铺满瓶底约 60%~70%,弃瓶内旧培养基,分别加入含 19、10 μmol/L GAA(前期实验得出的 48、72 h 时间段的 IC₅₀ 值)的 10% 的 RPMI 1640 培养液 4 mL 分别作用 48、72 h,对照组培养基中为 0.2% DMSO 的 RPMI 1640 培养液.分别收集细胞,提取基因组 DNA,亚硫酸氢钠修饰,收

集纯化 DNA.以修饰后的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增.引物由应用 MS-PCR 引物设计软件(<http://www.urogene.org/methprimer>)并参考文献设计,由 INVITROGEN 公司合成:甲基化引物:5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'(forward),5'-CCACCTAAATCGACCTCCGACCG-3'(reverse),扩增片段为 234 bp.非甲基化引物:5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'(forward),5'-CCACCTAAATCAACCTCCAACCA-3'(reverse),扩增片段为 234 bp.25 μL 反应体系:样品 DNA 2 μL,上下游引物各 1 μL,HotMasterTaq 1 μL,dNTP Mixture 2 μL,10×HotMasterTaq Buffer 2.5 μL,双蒸水 15.5 μL.PCR 反应条件:94.5 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 20 s,55 °C 退火 2 s,70 °C 延伸 1 min,反复 30 个循环,70 °C 延伸 6 min,扩增产物 4 °C 保存.PCR 扩增时以等量灭菌 ddH₂O 代替模板 DNA 作阴性对照.

1.2.3 实时荧光定量 PCR (RFQ-PCR) 检测 GAA 对 ACC-M 细胞 P16 基因 mRNA 表达的影响 细胞培养及 GAA 处理同前.TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA,按反转录试剂盒说明书提供的方法将其进行反转录,以此反转录产物为模板,加入 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG,在 ABI 7000 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应及荧光信号检测.引物由由 INVITROGEN 公司设计合成,P16 上游引物序列为 5'-GATGCGGGAAGGGAAA-GG-3',下游引物序列为 5'-GAAAGCGGGTGG-GTTGT-3';β-actin(内参照)上游引物序列为 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3',下游引物序列为 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'.PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 20 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 35 s,共 45 个循环;72 °C 复性 8 min.熔解曲线从 70 °C~90 °C,每 0.3 °C 读取荧光信号 1 次,持续 0.1 s.取 P16 及 β-actin 的平均 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 P16 mRNA 表达的差异倍数, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}} = (Ct_{\text{实验组 P16}} - Ct_{\text{实验组 } \beta\text{-actin}}) - (Ct_{\text{对照组 P16}} - Ct_{\text{对照组 } \beta\text{-actin}})$. $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ 表示目的基因表达上调, $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ 表示目的基因表达下调.实验重复 3 次.

1.3 统计学处理

实验数据以表示,通过 ImageJ 图片软件分析基因甲基化条带平均光度值.应用 SPSS 统计软件,对数据进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,利用 Games-Howell 法或 Student-Newman-Keuls 法行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 GAA 作用后 ACC-M 细胞 P16 基因甲基化水平

结果显示以终浓度 19 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 48 h、10 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 72 h 后 P16 基因的甲基化条带亮度均比对照组低, 同时非甲基化条带均明显增亮(图 1). 应用 ImageJ 软件测量各个条带灰度值, 结果显示甲基化条带及非甲基化条带平均灰度值与对照组比较均具有统计学差异 ($P < 0.05$, 表 1). 提示 GAA 能有效地降低 P16 基因该位点的甲基化水平.

2.2 GAA 作用后 ACC-M 细胞 P16 基因 mRNA 表达

RFQ-PCR 结果表明(图 2): 经 GAA 处理 48、72 h 后, 与对照组相比, 实验组 ACC-M 细胞中 P16 基因的 mRNA 相对表达量均出现表达上调, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 但 19 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 48 h 组与 10 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 72 h 组间无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 2.

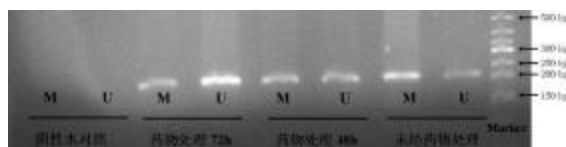


图 1 GAA 作用前后 ACC-M 细胞中 P16 基因甲基化状态变化情况

Fig 1 P16 methylation status of ACC-M cell lines before and after treatment by GAA

M: 甲基化产物片段 234 bp; U: 非甲基化产物片段 234 bp.

表 1 GAA 作用前后 ACC-M 细胞中 P16 基因电泳条带平均灰度值 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 3$]

Tab. 1 Average gray value of P16 DNA electrophoretic band in ACC-M cells before and after treatment by GAA [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 3$]

组别	甲基化条带平均灰度	未甲基化条带平均灰度
0 $\mu\text{mol/L}$ GAA 处理 72 h	191.79 \pm 1.24	40.57 \pm 2.60
19 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 48 h 组	117.78 \pm 2.18 [△]	92.42 \pm 5.23 [*]
10 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 72 h 组	91.76 \pm 7.61 ^{△△}	460.28 \pm 5.21 ^{*#}

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组甲基化条带相比, [△] $P < 0.05$; 与 19 $\mu\text{mol/L}$ 组甲基化条带相比, ^{△△} $P < 0.05$; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组未甲基化条带相比, ^{*} $P < 0.05$; 与 19 $\mu\text{mol/L}$ 组未甲基化条带相比, [#] $P < 0.05$.

表 2 GAA 作用 48、72h 后各组细胞 P16、 β -actin 基因表达 Ct 值 [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 3$]

Tab. 2 The mRNA expression of P16 in ACC-M cells treatment by GAA for 48 h and 72 h [$(\bar{x} \pm s)$, $n = 3$]

组别	p16 Ct 值	β -actin Ct 值	$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值
0 $\mu\text{mol/L}$ GAA 处理 72 h	29.86 \pm 0.10	20.34 \pm 0.28	1
19 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 48 h 组	32.80 \pm 0.76	23.89 \pm 0.22	4.02 \pm 0.52 [△]
10 $\mu\text{mol/L}$ GAA 作用 72 h 组	31.96 \pm 1.10	23.19 \pm 0.78	4.43 \pm 0.73 [△]

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值比较, [△] $P < 0.05$.

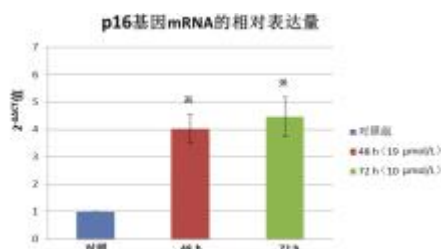


图 2 GAA 作用 48、72 h 后 P16 基因 mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值

Fig 2 The $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ value of p16 mRNA expression treated by GAA for 48 h and 72 h

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, ^{*} $P < 0.05$.

3 讨论

许多研究^[6-8]证实, 棉酚可通过直接损伤线粒体抑制细胞能量代谢、抑制 DNA 聚合酶、拓扑异构酶 II 的活性、抑制端粒酶的活性、干预信号传导

通路以及抑制 Bcl-2 蛋白的过度表达等途径来抑制肿瘤细胞生长和 DNA 的合成及诱导肿瘤细胞的凋亡, 从而达到抗肿瘤的效果. 将左旋棉酚和地塞米松联合应用, 发现左旋棉酚能和地塞米松发生协同作用诱导人骨髓瘤细胞系包括耐药细胞株和原发性骨髓瘤患者细胞的凋亡^[9]. 也有研究^[10]将化疗药物如紫杉醇、吉西他滨、卡铂联合棉酚作用于膀胱肿瘤细胞结果显示棉酚能作为一种致敏剂提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性. 本课题已有研究结果证实醋酸棉酚能对人舌鳞癌细胞系中存在的高甲基化基因有一定的去甲基化作用^[4,11], 并能使 hMLH1 (错配修复蛋白 1)、MGMT (O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶) 基因的蛋白及 mRNA 表达增高, 同时 DNA 甲基转移酶 1 的 mRNA 表达下调, 这可能是 GAA 去甲基化的作用机制.

P16 基因又称周期素依赖性激酶抑制蛋白编码基因, 直接参与细胞周期的调控, 负调节细胞增殖及分裂, 其编码的蛋白是一种重要的细胞周期负调控蛋白, 通过与细胞周期蛋白依赖激酶 CDK4 和 CDK6 结合而抑制蛋白激酶活性, 阻止细胞进入 S 期, 从而抑制细胞的增殖, 被认为是最重要的抑癌基因之一。研究表明^[12,13]P16 基因 CpG 岛甲基化可导致 P16 表达缺失, 是该基因失活的重要原因。Maruya 等^[14]对 22 例 ACC 临床标本的研究表明, P16 基因启动子区的甲基化发生率为 21%, 其他研究表明在口腔鳞癌组织中可检测到较高的 P16 启动子高甲基化, 并且与肿瘤的侵袭、预后及患者年龄有关^[15]。对口腔黏膜白斑的 P16 甲基化进行检测, 发现其甲基化发生率为 25.6% (21/82), 提示其可能与口腔肿瘤的早期发生有关^[16]。在基因表达方面, 史宏男等^[17]研究表明 P16 蛋白在 ACC-M 中表达缺失, 而在腺样囊性癌细胞株 ACC-2 中表达阳性, 提示 Pp16 可能与腺样囊性癌的转移有关, 对腺样囊性癌的组织标本的研究发现 P16 蛋白无表达或弱表达率为 52.2% (12/23)^[18], 一些临床调查研究也认为 P16 蛋白表达阳性的口腔鳞癌患者有更高的术后生存率^[19], 同时 P16 高表达而 EGFR (表皮生长因子受体) 低表达的口咽部鳞癌术后患者有更高的术后生存率和较低的术后复发率^[20]。

本实验通过甲基化特异性 PCR (MSP) 方法检测 ACC-M 细胞在 GAA 分别作用 48、72 h 后 P16 基因甲基化水平的改变, 结果表明: GAA 作用后 ACC-M 细胞 P16 基因甲基化水平降低 ($P < 0.05$)。应用实时荧光定量 PCR (RFQ-PCR) 检测 GAA 对 ACC-M 细胞 P16 基因 mRNA 表达的影响, 结果表明: GAA 作用后 ACC-M 细胞 P16 基因 mRNA 表达水平升高。笔者可以推断 GAA 在一定的浓度范围内, 可以让 P16 基因维持低甲基化状态, 从而使基因恢复表达。因此, 对 P16 基因去甲基化治疗可以作为涎腺腺样囊性癌基因治疗的一个潜在靶点。通过恢复因高甲基化而失活或低表达的而未发生突变或丢失的抑癌基因的再表达, 可恢复机体对细胞正常生长的调控功能, 有可能达到治疗癌症的目的。

DNA 去甲基化通路在疾病治疗中是一个极具潜力而又新颖的表观遗传治疗干预的关键, 参与 DNA 去甲基化过程的酶将作为一个重要的药物分子靶标。笔者预测棉酚可能会成为一种新型去甲基化型抗肿瘤药物, 其作用机制仍需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] BELL A, BELL D, WEBER R S, et al. CpG island methylation profiling in human salivary gland adenoid cystic carcinoma[J]. *Cancer*, 2011, 117(13):2 898 - 2 909.
- [2] DURR M L, MYDLARZ W K, SHAO C, et al. Quantitative methylation profiles for multiple tumor suppressor gene promoters in salivary gland tumors[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5):e10 828.
- [3] BYUN D S, LEE M G, CHAE K S. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19):7 034 - 7 038.
- [4] 付帅. 醋酸棉酚对人舌鳞癌Tca8113细胞生长及hMLH1和MGMT基因甲基化水平的影响[D]. 昆明:昆明医学院, 2011.
- [5] 岳万远. 醋酸棉酚对人腺样囊性癌ACC-M细胞E-cadherin、P16基因甲基化及mRNA表达的影响[D]. 昆明:昆明医学院, 2011.
- [6] 代友彪, 杨四涛, 唐辉. 左旋棉酚抗肿瘤作用的研究进展[J]. *中国药业*, 2009, 18(19):1 - 2.
- [7] LEI X, CHEN Y, DU G, et al. Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2 [J]. *The FASEB journal*, 2006, 20(12):2 147 - 2 149.
- [8] WANG G, NIKOLOVSKA-COLESKA Z, YANG C, et al. Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins [J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2006, 49(21):6 139 - 6 142.
- [9] KLINE M P, RAJKUMAR S V, TIMM M M, et al. R(-)-gossypol (AT-101) activates programmed cell death in multiple myeloma cells [J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(5): 568 - 576.
- [10] MACOSKA J A, ADSULE S, TANTIVEJKUL K, et al. (-) Gossypol promotes the apoptosis of bladder cancer cells in vitro [J]. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 2008, 58(5-6):323.
- [11] 陈文飞, 付帅, 岳万远, 等. 醋酸棉酚对人舌鳞癌Tca8113细胞凋亡及DNA甲基转移酶1表达的影响[J]. *肿瘤*, 2013, 33(5):404 - 408.
- [12] YOSHINO M, SUZUKI M, TIAN L, et al. Promoter hypermethylation of the p16 and Wif-1 genes as an independent prognostic marker in stage IA non-small cell lung cancers [J]. *International journal of oncology*, 2009, 35(5): 1 201 - 1 209.
- [13] TAGHAVI N, BIRAMIJAMAL F, SOTOUDEH M, et al. p16INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2

染^[8].

本实验对云南某大学云南籍新生入学体检血清进行莱姆病和恙虫病 IgG 抗体的检测,进一步证实云南省存在莱姆病和恙虫病感染. 但这两种虫媒传染病在临床上容易误诊,借助分子生物学诊断和血清学诊断等可以对其进行鉴别. 关于莱姆病和恙虫病在云南的流行特征以及疫源地性质等,有待进一步研究.

云南地处中国的西南部,典型的热带和亚热带气候、漫长的国境线、与东南亚地区频繁的经济贸易和国际旅游往来,使之成为各种虫媒传染病的高发区. 对于类似莱姆病和恙虫病的新发和再发热带虫媒传染病,必须加强其病例监测,做好预防和控制,防止疫情暴发流行.

[参考文献]

- [1] 宝福凯,柳爱华,程传贤. 新发虫媒传染病流行趋势、因果分析和对策[J]. 中国热带医学, 2009, 9(3): 515 - 562.
- [2] BAO FU-KAI, EROL FIKRIG. The pathogen-vector-host interactions during *Borrelia burgdorferi* transmission [J]. *Chin J Vector Bio&Control*, 2008, 19(3): 264 - 268.
- [3] 张媛春,李六九,雷素娟,等. 云南玉溪地区莱姆病调查[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(6): 107 - 108.
- [4] 耿震,侯学霞,郝琴,等. 827例拟诊莱姆病患者抗伯氏疏螺旋体抗体检查结果分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(3): 219 - 221.
- [5] 马海滨,周宏宁,宝福凯. 云南勐腊县磨憨口岸蜱类鼠类分布状况调查[J]. 医学动物防制, 2010, 26(8): 719 - 720.
- [6] 冯锡光,陈渊民,自登云,等. 云南北部金沙江流域恙虫病调查研究 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2001, 12(2): 120 - 121.
- [7] 罗秉荣,王尚位. 云南大理州感染恙虫病2例[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2005, 3(2): 70.
- [8] ZHANG L J, LI X M, ZHANG D R, et al. Molecular epidemic survey on co-prevalence of scrub typhus and marine typhus in Yuxi city, Yunnan province of China [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(15): 1 314 - 1 318.
(2014 - 02 - 14 收稿)
- [14] MARUYA S, KURITAKI H, SHIMOYAMA N, et al. Expression of p16 protein and hypermethylation status of its promoter gene in adenoid cystic carcinoma of the head and neck [J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2003, 65(1): 26 - 32.
- [15] SU P, HUANG W, WU H, et al. p16INK4A promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner[J]. *Oral oncology*, 2010, 46(10): 734 - 739.
- [16] LIU M, FENG L, TANG X. Gene promoter hypermethylation in leukoplakia of the oral mucosa [J]. *Pathology and Laboratory Medicine International*, 2010, 2: 71 - 77.
- [17] 史宏男,周正炎,顾云峰. 涎腺腺样囊性癌细胞株 p16 基因缺失, 突变及表达意义[J]. 口腔颌面外科杂志, 2001, 11(2): 111 - 113.
- [18] 柯小亮. 涎腺腺样囊性癌转基因治疗研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [19] BOSE P, FILKOWSKY J, BILICHAK A, et al. p16-Directed transcriptome profiling in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncology*, 2013, 49(Supplement 1): S26.
- [20] CHANDARANA S P, LEE J S, CHANOWSKI E J, et al. Prevalence and predictive role of p16 and epidermal growth factor receptor in surgically treated oropharyngeal and oral cavity cancer[J]. *Head & Neck*, 2013, 35(8): 1 083 - 1 090.
(2014 - 03 - 24 收稿)

(上接第 20 页)

protein expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *BMC cancer*, 2010, 10(1): 138.