

MGMT 甲基化影响替莫唑胺对胶质母细胞瘤疗效的研究

李庆斌¹ 李瑞岩¹ 丛方方² 丁美娇² 李永利^{1△}

(1 哈尔滨医科大学第二临床医学院神经外科 黑龙江 哈尔滨 150086 2 哈尔滨市儿童医院 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要 目的 探讨 MGMT 甲基化如何影响替莫唑胺对胶质母细胞瘤的治疗效果。方法 选取 41 个胶质母细胞瘤患者(根据相同替莫唑胺化疗方案治疗下临床结局的不同分为两组)的肿瘤组织,采用甲基化特异性聚合酶链反应分析胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子区过甲基化状态,同时采用免疫组织化学法分析胶质瘤组织中 MGMT 蛋白表达情况。结果 临床结局不佳组中,以 MGMT 蛋白表达阳性的肿瘤为主(72.2%),而在结局相对良好组中, MGMT 蛋白表达的阳性率仅为 39.1%,在 MGMT 蛋白表达阳性的 22 例胶质母细胞瘤组织中,7 例 MGMT 启动子甲基化,阳性率为 31.8%,在 MGMT 蛋白表达阴性的 19 例中,14 例 MGMT 启动子甲基化,阳性率为 73.7%($P<0.05$)。结论 MGMT 基因启动子区的甲基化状态与 MGMT 蛋白的表达相关。MGMT 基因启动子过甲基化, MGMT 蛋白表达较低, MGMT 基因启动子去甲基化, MGMT 蛋白表达较高。MGMT 启动子过甲基化通过抑制 MGMT 基因的表达而增加替莫唑胺的疗效。

关键词 胶质母细胞瘤;MGMT(O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶);替莫唑胺;甲基化;免疫组织化学

中图分类号 R739.4 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)08-1471-05

Effect of Promoter Hypermethylation of DNA Repair Gene O⁶-methylguanine DNA Methyltransferase to the Treatment of Temozolomide in Glioblastoma

LI Qing-bin¹, LI Rui-yan¹, CONG Fang-fang², DING Mei-jiao², LI Yong-li^{1△}

(1 Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

2 Harbin Childrens' Hospital, Harbin, Heilongjiang Province, 150010, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of the hypermethylation of MGMT promoter on the treatment of temozolomide to glioblastomas (GBM). **Methods:** Tumors were chosen (divided into two groups according to different clinical endings with the same treatment of temozolomide); Methylation-specific PCR was used to detect the promoter methylation of the MGMT gene and loss of transcription in glioma tissues. MGMT expression was examined by immunohistochemistry method. **Results:** The majority(72.2%) of tumors' MGMT protein expressed positive in the group whose clinical endings are bad, but the positive rate is only 39.1% in the other group whose clinical endings are relatively good. Among the 41 GBM samples, MGMT expressed in 22 samples, in which hypermethylation was in 7 (31.7%) cases, while there was no MGMT expression in 19 samples, in which hypermethylation was detected in 14(73.7%) cases. Spearman correlation coefficient was used to analyze the result. The relation was significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The relationship between the aberrant methylation of MGMT gene promoter and the expression of MGMT in glioma is significant. The promoter hypermethylation of MGMT can elevate the sensitive of temozolomide through inhibiting the expression of MGMT gene.

Key words: Glioblastoma; O⁶-methylguanineDNA; Methyltransferase; Temozolomide; Hypermethylation; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)08-1471-05

前言

胶质瘤往往能够从中枢系统中发现,发病率非常高同时治疗难度比较大,在原发性脑肿瘤中份额通常能够达到 40~50%,全世界每年因此而死亡的人数达 120000 人。恶性胶质瘤尤其是多形性胶质母细胞瘤呈浸润性生长,死亡率高,容易复发,平均存活时间 18 个月。由于治疗缺乏针对性,至今胶质瘤的治疗仍然是一项国际性难题。改善胶质瘤患者的治疗效果、

延缓肿瘤的增长、延长患者的生存时间已经成为神经外科界的一项重大任务。当今对于胶质瘤进行处理慢慢朝外科治疗辅助放化疗方向进行过渡,不过通过这种手段进行治疗效果并不是特别突出^[1]。化疗在治疗过程中往往能够产生非常关键的影响,肿瘤自身性能水平能够在治疗效果方面产生非常明显的影响^[2]。

烷化剂药物从治疗过程中得到了普遍的采纳,尤其是替莫唑胺^[3],烷化剂药物^[4]。DNA 损伤修复基因 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)^[5]为肿瘤细胞提高自身性能,保护自身免遭破坏的重要前提,从肿瘤细胞内, MGMT 分子共包括 2 个烷基受体,能够承担烷基化破坏的细胞 DNA 上 O⁶-烷基鸟嘌呤上的烷基,能够对接受烷基化的鸟嘌呤进行相应的调整,所以能够有效避免产生 DNA 交联,通过这种方式能够最大限度的减少其消极影响。

作者简介 李庆斌(1983-),住院医师,研究方向:胶质瘤的分子生物学研究 脑血管病 E-mail:liqingbin1111@163.com

△通讯作者 李永利 主任医师 E-mail liyongli9999@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-11-03 接受日期 2011-11-28)

所以, 抵制烷化剂药物破坏肿瘤细胞相关功能, 为导致肿瘤细胞性能提高的关键影响因素。但是 MGMT 从肿瘤细胞性能提高过程中有着重要的作用。

本研究借助甲基化特异性聚合酶链反应还有免疫组化相关手段对 41 例原发胶质母细胞瘤的 MGMT 启动子甲基化水平还有 MGMT 蛋白展示能力进行审核, 同时利用研究上述目标还有病人临床信息之间的关系探讨 MGMT 如何影响替莫唑胺对胶质母细胞瘤的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 材料来源

选取哈尔滨医科大学附属第二医院从 2009 年~2011 年收治的胶质瘤患者的肿瘤组织 41 例, 男性 25 例, 女性 16 例, 年龄 10 岁~68 岁(平均年龄 46.3 岁), 患者全部行手术治疗, 术后病理证实为多形性胶质母细胞瘤(WHO 级), 患者均为第一次发病, 因此诊断全部是原发胶质母细胞瘤, 术后行头部增强 MRI 检查证实肿瘤全切, 均在术后进行标准化替莫唑胺化疗($150\text{mg}/\text{m}^2$ 口服, 连服 5 天, 间隔 23 天为一个疗程, 第 2 个疗程开始药量改为 $200\text{mg}/\text{m}^2$)。患者出院后电话进行随访, 每月一次。对于肿瘤复发患者以影像学检查证实复发的日期作为复发时间。

肿瘤组织均在术中取得, 将标本分为两份, 一份标本在取得后 1 小时内放于液氮中保存, 主要从 DNA 获得过程中得到采纳, 其他的标本在甲醛检测清楚之后进行相应处理能够从免疫组化过程中得到采纳。标本均行 HE 染色证明肿瘤成分 >

80%。

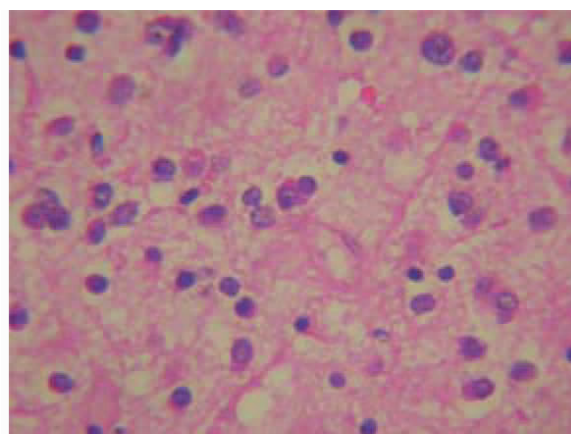


图 1 肿瘤组织 HE 染色

Fig.1 HE stan of tumour tissue

根据随访资料将患者分为两组。

1.2 主要试剂

QIAamp DNA Mini kit(Cat.No.51309)购于北京博奥生物有限公司, CpGenome™ DNA 修饰试剂盒购自美国 Chemicon 公司, 四川宇康生物技术有限公司担任了甲基转移酶诊断试剂盒主要供应商。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取

1.3.2 对肿瘤组织 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰

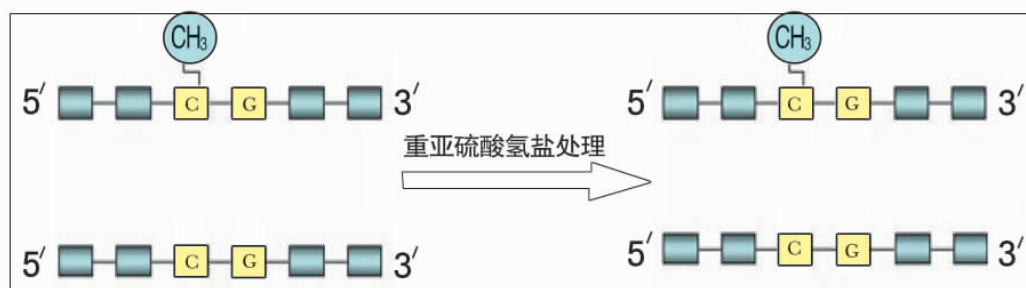


图 2 重亚硫酸盐处理过程示意图

Fig.2 Sketch map of bisulfite disposal

1.3.3 甲基化特异性 PCR(Methylation-specific PCR, MS-PCR)

结合相关资料对引物进行规^[6], 其中甲基化引物主要包括: 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTCGC-3'(上游), 5'-GCACTCT-TCCGAAAACGAAACG-3'(下游), 非甲基化引物为: 5'-TTTGT-GTTTTGATGTTGTAGGTTTTGT-3'(上游), 5'-AACTCCAC-ACTCTTCC AAAAACAACA-3'(下游)。反应体系(25μl)内共包括模板 DNA 总量为 0.2μg、1.0μmol/L 各引物、1.25mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleosidetriphosphate, dNTP)、 $\text{Mg}^{2+} 6.0\text{mmol/L}$ 、1.5U 耐热的 TaqDNA 聚合酶和 10×反应缓冲液 2.5μl。最适宜的温度是 96℃ 10min, 防止出现 PCR 变化, 把 PCR 产物进行冷冻处理, 经过一段时间之后补充 TaqDNA polymerase, 开展 PCR 变化。96℃ 40s, 59℃ 30s, 72℃ 20s, 经过一系列的处理之后对其进行处理, 使其保持稳定, 从恒温下进行封

装。想要提高检测有效水平, 通过符合标准的外周血淋巴细胞 DNA、借助(Spiroplasma sp1 strainMQ1, SssI)甲基转移酶对胎盘 DNA 进行调整依次开展非甲基化和甲基化对比试验。将 20μl PCR 扩增产物还有部分上样缓冲液进行搅拌然后补充到溴化乙啶(EB)的 2%琼脂糖凝胶电泳之中, 在具备了缓冲液设施中进行处理, 电压应当保持稳定, 通过凝胶成像分析仪(UVI)对其进行检测。将 DNA Marker (100bp)当作最关键的衡量指标, 大体能够了解 PCR 扩增产物规模还有扩增特异性。从特定环境中进行检测并进行记录(参考图 4)。

1.3.4 免疫组织化学 在免疫组织化学方面进行审核: 从显微镜进行试验, 假如能够从肿瘤细胞核中发现粉红色着色颗粒则表明肿瘤是阳性的。假如表现出强着色、阳性细胞 >30%则能够叫做强阳性(++), 着色水平较低, 无法清楚判断的阳性细胞 ≤30%

通常叫做阳性(+) ,不具备着色细胞通常叫做阴性(-)(如图 5~7)。

1.3.5 统计学分析

2 结果

2.1 肿瘤组织提取的基因组 DNA 电泳结果如图 2 所示。

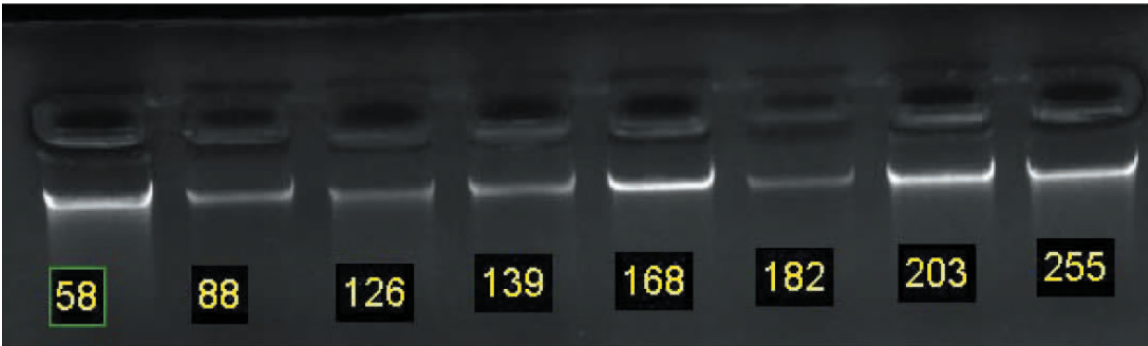


图 3 提取 DNA 的结果
Fig.3 Extraction of DNA

2.2 甲基化特异性 PCR 结果



图 4 MGMT 基因对子甲基化阳性的组织进行相应的处理、MGMT 基因则对子甲基化相关对比试验进行处理还有阴性比较试验分析表。
PS:MGMT 基因保证了子甲基化阳性的组织能够正常工作;NS:MGMT 基因保证了子去甲基化阳性的组织能够正常工作;NL:通常而言人体内淋巴细胞(MGMT 基因能够保证子去甲基化正常工作);P:进行相应处理之后胎盘组织(MGMT 基因能够保证子甲基化正常工作);M:MGMT 基因在子甲基化过程中产生的影响;U:MGMT 基因在子去甲基化过程中产生的影响

Fig.4 Electrophoretogram of the tissue which MGMT promoter hypermethylation and control groups. PS:MGMT promoter hypermethylation. NS: MGMT promoter demethylation. NL: Lymphocyte of normal human blood (positive control of demethylation).P:Methylation of placenta tissue (positive control of hypermethylation).M: MGMT promoter hypermethylation.U: MGMT promoter demethylation

2.3 免疫组化结果的判定

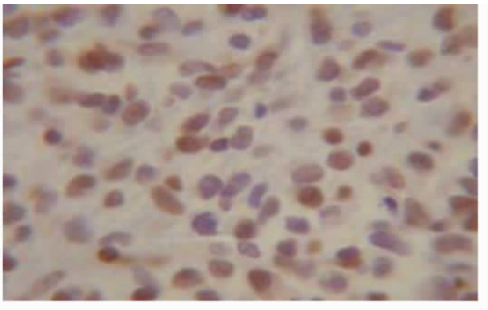


图 5 MGMT 蛋白表达强阳性(×1000)
Fig.5 MGMT protein express strong positive

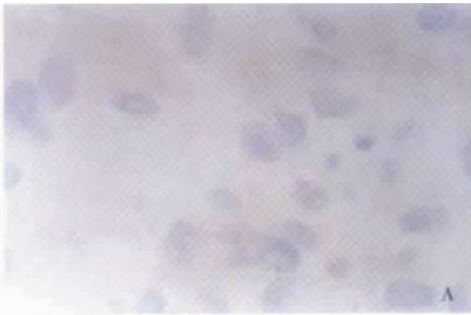


图 7 MGMT 蛋白表达阴性(×1000)
Fig.7 Mgmt Protein express negative

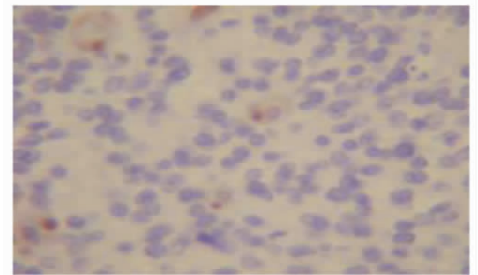


图 6 MGMT 蛋白表达阳性(×1000)
Fig.6 MGMT protein express positive

2.4 临床结局不同地两组患者肿瘤组织 MGMT 蛋白表达的分析

6 个月内复发组的 18 例标本中 MGMT 蛋白表达阳性的为 13 例，占 72.2%，在 12 个月内无复发组的 23 例标本中 MGMT 表达阳性的为 9 例，占 39.1%(如表 1)，两组中的 MGMT 蛋白表达有差异 $P<0.05$ 。

组 1 中患者的复发较早，预后不良，替莫唑胺的治疗效果不佳，而组 2 中患者无进展生存期长，超过 12 个月，替莫唑胺治疗效果良好，因此，通过两组病人临床信息之间的对比，联系

MGMT 蛋白表达情况来看 ,替莫唑胺的疗效和 MGMT 蛋白的 表达有相关性。

表 1 替莫唑胺疗效和 MGMT 蛋白表达的关系
Table 1 The correlation of the treatment of temozolomide and the expression of MGMT protein

	MGMT 蛋白表达阳性(n) Positive expression of MGMT(n)	MGMT 蛋白表达阴性(n) Negative expression of MGMT(n)	阳性率(%) Positive rate	总计(n) Total(n)
组 1(Group 1)	13	5	72.2	18
组 2(Group 2)	9	14	39.1	23
总计(Total)	22	19		41

2.5 MGMT 蛋白表达和 MGMT 启动子甲基化的关系

从所有胶质母细胞瘤试验过程中 ,MGMT 蛋白展现了非常突出的强阳性还有阳性的共计 22 个 ,另外有 7 个 MGMT 基因启动子甲基化阳性 ,阳性率保持在 31.8% ,从 MGMT 蛋白呈

现突出阴性的试验里 ,有 14 个 MGMT 基因启动子甲基化呈现了比较突出的阳性 ,阳性率保持在 73.7% ,用 spearman 相关系数分析 , $P<0.05$ (参考表 2)。能够发现 MGMT 蛋白自身展示还有 MGMT 基因启动子甲基化存在非常紧密的联系。

表 2 MGMT 蛋白自身展示还有 MGMT 基因启动子甲基化之间联系
Table 2 The correlation of the expression of MGMT protein and Hypermethylation of MGMT promoter

MGMT 蛋白表达 Expression of MGMT Protein	MGMT 基因启动子 The promoter of MGMT	合计(n) Total(n)	Spearman 相关系数 Correlation coefficient of Spearman
	甲基化(n) Hypermethylation(n)	去甲基化(n) Demethylation(n)	
阳性(Positive)	7	15	0.04
阴性(Negative)	14	5	
总计(Total)	21	20	

3 讨论

3.1 MGMT 蛋白表达和替莫唑胺疗效的关系

本研究中在选取标本的时候进行了严格筛选 ,所选取的两组标本对比鲜明 ,同样的病理级别 ,同样术后影像学证明肿瘤全切 ,均行标准化替莫唑胺化疗 ,但组 1 中的患者均在 6 个月内复发 ,而组 2 中患者化疗满 6 个疗程后 ,在 12 个月内无复发 ,那是否可以说组 1 为替莫唑胺耐药组 ,而组 2 为替莫唑胺敏感组呢 ?笔者认为这样说略显牵强 ,在随访过程中我们还发现组 1 中的患者的肿瘤不但复发得早 ,而且进展迅速 ,18 例患者中有 6 例于复发后 2 个月内死亡 ,所以我们可以称组 1 为替莫唑胺化疗效果不佳组 ,而组 2 为替莫唑胺化疗效果相对良好组。

过去大家对肿瘤的认识局限于肿瘤所起源的组织 ,但随着分子水平研究的不断深入 ,人们逐渐认识到肿瘤的发生是分子水平的缺陷和表观遗传学^[7,8]的异常改变等多个因素共同作用的结果 ,虽然所选患者有相同的组织病理分级 ,但他们的疾病在发生发展过程中的分子水平的致病原因可能是不同的 ,可能为不同的致癌基因过度表达或者是癌症相关的转导通路^[9,10]的异常等 ,所以说组 1 患者早期复发 ,并不一定是对替莫唑胺耐药 ,可能是组 1 的部分患者的肿瘤在分子水平分级上的恶性程度高 ,本身就是预后不良的类型 ;而组 2 中的患者虽然没有复

发 ,生存期长 ,也不见得是对替莫唑胺敏感 ,可能是肿瘤本身属于良好预后类型 ,即使不使用化疗药物也不一定会复发。

虽然不能称组 1 和组 2 为耐药组与敏感组的对比 ,但免疫组化检测的肿瘤组织 MGMT 蛋白的表达水平 ,在化疗效果不佳组中 MGMT 蛋白表达阳性率为 72.2% ,而在化疗效果良好组里 MGMT 蛋白表达阳性率为 39.1% , $P<0.05$,肿瘤组织 MGMT 蛋白的表达水平和替莫唑胺的疗效是有相关性的。且这种相关性和以往的报道是相符的^[11,12] ,烷化剂药物破坏肿瘤细胞原理现在非常清楚 ,关键借助导致肿瘤细胞 DNA 出现烷基化破坏(其中涵盖了甲基化、乙基化、氯乙基化等) ,通过这种方式产生 DNA 交联 ,避免 DNA 无限增生 ,达到破坏肿瘤细胞的目的。从肿瘤细胞内 ,MGMT 分子中共包括 2 个烷基受体 ,能够承担烷基化破坏的细胞 DNA 上 O⁶- 烷基鸟嘌呤上的烷基 ,能够对进行烷基化的鸟嘌呤进行相应的调整 ,所以能够有效避免产生 DNA 交联 ,能够有效减少烷化剂药物造成的消极影响。所以 ,抵制烷化剂药物破坏肿瘤细胞相关功能 ,为导致肿瘤细胞性能提高的关键影响因素。

结合 MGMT 酶活性自身明显的差异 ,能够对肿瘤细胞进行清楚的细化 :首先为不具备 MGMT 活性的细胞 ,也就是 Mer- 还有 Mex- 细胞 ;其次为具备 MGMT 活性的细胞 ,也就是 Mer+ 还有 Mex+ 细胞。上述细胞对肿瘤细胞的破坏作用存在非常明显的差异。Mer- 还有 Mex- 型肿瘤细胞能够清楚感知烷

化剂,Mer+ 还有 Mex+ 型肿瘤细胞基本不会对其产生反应, MGMT 酶活性实际水平能够明显影响肿瘤细胞自身性能。通过各项调查分析都能够发现:MGMT 展示阳性的肿瘤细胞自身性能远远超过了 MGMT 展示阴性者自身性能。在细胞中完全不具备 MGMT 展示的过程中,肿瘤细胞能够积极的做出反应;在烷化剂治疗过程中效果非常突出的肿瘤,自身 MGMT 展示水平不是很高。通过分析能够发现,亚硝胺类药物还有替莫唑胺(TMZ)产生影响关键记住 DNA 鸟嘌呤 O⁶ 的烷基化进行处理,但是肿瘤细胞中 MGMT 能够造成 DNA 烷基化尤其为甲基化破坏进行调整,为肿瘤细胞自身性能不断提高、适应性逐渐增强的关键影响因素^[13,14]。

本次研究中 MGMT 蛋白表达水平也可以验证 MGMT 基因在胶质瘤对于替莫唑胺耐药的机制。

3.2 MGMT 启动子区甲基化对替莫唑胺化疗的作用

本实验中对于 MGMT 启动子区甲基化情况也进行了研究,结果发现从 MGMT 蛋白展示了突出强阳性还有阳性的试验中,共计 7 个试验 MGMT 基因启动子甲基化阳性,阳性率保持在 31.3%,但是从 MGMT 蛋白展示突出阴性的试验中,1 共计 11 个试验 MGMT 基因启动子甲基化阳性,阳性率保持在 78.6%,展现胶质母细胞瘤结构内 MGMT 启动子甲基化状态还有 MGMT 蛋白展示存在非常紧密的联系。

MGMT 基因同很多管家基因非常类似,在工作过程中不具备 TATA 盒还有 CAAT 盒,不过某些部分 GC 序列比例特别高,尤其从其转录起始点区域比例能够达到 90%。MGMT 基因 5' 端处理部分 GC 序列比例同样特别高。肿瘤抑制基因同另外部分肿瘤相关基因的启动子还有 5' 端内高度甲基化为肿瘤一致的性质,同时往往造成基因转录终止还有部分蛋白遭受破坏。因为 MGMT 基因呈现了上述性质,所以能够认为启动子中 CpG 岛的过度甲基化能够阻碍基因进行展示。

启动子甲基化从 MGMT 基因出现的特别普遍,往往能够从 MGMT 基因启动子 CpG 岛得到展示,造成这个基因转录无法有效进行,蛋白展示水平降低。Esteller 等^[15]对 524 例多种原发肿瘤、肿瘤细胞株还有正常组织进行研究,了解到全部的正常组织还有展示 MGMT 的细胞株都不具备 MGMT 基因甲基化,但是没有展示 MGMT 的细胞株都出现了甲基化情况;另外,相关工作者通过免疫组织化学法(IHC)对很多原发肿瘤的 MGMT 展示还有 MGMT 基因甲基化联系进行预测,了解到 13 例 MGMT 基因启动子区甲基化肿瘤占据了绝大部分(92%)不具备 MGMT 展示,但是在所有不具备 MGMT 基因甲基化的肿瘤中绝大部分(94%)都展示了 MGMT。表明 MGMT 基因启动子区 CpG 岛甲基化为造成 MGMT 展示水平降低的关键影响因素。Pulling 等^[16]原来借助甲基化特异性聚合酶链反应(Methylation-specific PCR, MSP)还有 IHC 对 MGMT 基因甲基化还有 MGMT 蛋白展示水平进行研究,通过调查了解到 MGMT 基因启动子甲基化出现率通常保持在 51%,MSP 和 IHC 检审核能够保持在 83%,表示 MGMT 基因启动子甲基化为细胞中不具备 MGMT 蛋白关键影响因素。

所以 MGMT 对子区甲基化进行处理过程中,MGMT 自身性能降低甚至沉默,从而导致了 DNA 的烷化损伤不被修复,增加了对亚硝胺类药物及替莫唑胺的敏感性。

3.3 MGMT 作为胶质瘤的分子标志物的应用

实验的最终目的是应用于临床,因为组织病理学的分级对于化疗药物的指导已越来越不准确了,国内外的学者都在找寻能够预测化疗药物疗效的分子标志物, MGMT 启动子区甲基化是一个合适的指标,但组织标本进行估量依旧存在非常大的问题。近年来,因为检测技术水平持续提高,肿瘤 DNA 甲基化分子标志物不但可以从肿瘤组织内进行审核,从血浆还有体液(如尿液、粪便、痰、唾液、支气管肺泡灌洗液、乳房抽吸液等)内也可以进行检测,极大地扩展了研究资源。因而其从肿瘤临床治疗角度未来发展前景非常乐观,成为了社会关注的焦点。如 Ramirez^[17],Weave^[18]。外周血 DNA 甲基化检测给肿瘤治疗指明了不同以往的方向,也许能够借助估计患者外周血中肿瘤相关基因甲基化状态对胶质瘤病发病率进行分析还有衡量患者治疗效果。

Balana 等^[19] Ramirez 等^[20]。所以,从胶质瘤病人血清内 MGMT 基因启动子甲基化进行估量同样能够在估量病人治疗效果还有对化疗计划进行安排产生非常关键的影响。同样能够在化疗病人治疗之后病情检测发挥重要的作用,能够记录治疗情况,对化疗手段进行甄选。

参考文献(References)

- [1] Rekers NH, Sminia P, Peters GJ. Towards tailored therapy of glioblastoma multiforme[J]. J Chemother, 2011, 23(4):187-199
- [2] Haar CP, Hebban P, Wallace GC, et al. Drug Resistance in Glioblastoma: A Mini Review[J]. Neurochem Res, 2012
- [3] Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance[J]. Curr Mol Pharmacol, 2011, 24
- [4] Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents[J]. at Rev Cancer, 2012 12. doi: 10.1038/nrc3185
- [5] Gouws C, Pretorius PJ. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): can function explain a suicidal mechanism [J]? Med Hypotheses, 2011, 11, 77(5):857-860
- [6] Zhang YP. Study on MGMT assay and tumor individual predictable chemotherapy[J]. Chinese Journal of Cancer, 2004, 23(6):724-734
- [7] Freson K, Izzi B, Van Geet C. From genetics to epigenetics in platelet research[J]. Thromb Res, 2011, 10
- [8] Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, et al. Aging and epigenetics: Longitudinal changes in gene-specific DNA methylation [J]. Epigenetics, 2012, 7(1): [Epub ahead of print]
- [9] Polisetty RV, Gautam P, Sharma R, et al. LC-MS/MS analysis of differentially expressed glioblastoma membrane proteome reveals altered calcium signalling and other protein groups of regulatory functions[J]. Mol Cell Proteomics, 2012-2014
- [10] Golubovskaya VM, Cance W. Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer[J]. Front Biosci, 2010 6;15:901-912
- [11] Quillien V, Vauléon E, Saikali S, et al. MGMT analysis in gliomas [J]. Bull Cancer, 2011, Mar 1, 98(3):291-303
- [12] Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, et al. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas [J]. Int J Cancer, 2011, 8, 129(3):659-670

(下转第 1494 页)

途径。

参考文献(References)

- [1] Ralf F. Bischoff, Herwig Ponstingl. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC 1[J]. Nature, 1991, 354 (6348):80-82
- [2] 曹允考,张贵学,陈大元等. GTPase Ran 及其生物学作用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(3):6-9
Cao Yun-kao, Zhang Gui-xue, Chen Da-yuan, et al. GTPase Ran and its biological role[J]. Journal of Cell Biology, 2004, 26(3):6-9(In Chinese)
- [3] Karsten W. Regulating access to the genome:nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle[J]. Cell, 2003, 112(11): 441-451
- [4] Alex M, Erin C.Towards a quantitative understanding of mitotic spindle assembly and mechanics[J]. Cell Science, 2010, 123(20): 3435-3445
- [5] Athale CA, Dinarina A, Mora CM, et al. Regulation of microtubule dynamics by reaction cascades around chromosomes [J]. Science, 2008, 322:1243-1247
- [6] Dinarina A, Pugieux C, Corral M. M, et al. Chromatin shapes the mitotic spindle[J]. Cell, 2009, 38: 502-513
- [7] Krister W, Kent LR, Channing JD, et al. The Ras superfamily at a glance[J]. Journal of Cell Science, 2005, 118: 843-846
- [8] Koichi A, Tetsuro S, Hiroko T, et al. Ran,a Small GTPase Gene, Encodes Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Epitopes Capable of Inducing HL-A-A33-restricted and Tumor-Reactive CTLs in Cancer Patients[J]. Clinical Cancer Research, 2004, (10):6695-6702
- [9] Jesse CG, Kerry B. Microtubule motors in eukaryotic spindle assembly and maintenance[J]. Semin.Cell Dev. Biol, 2010, 21:248-254
- [10] Gatlin JC, Matov A, Danuser G,et al. Directly probing the mechanical properties of the spindle and its matrix[J]. Cell Biol, 2010, 188:481-489
- [11] Goshima G, Kimura A. New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle[J].Curr. Opin. Cell Biol, 2010, 22: 44-49
- [12] Needleman DJ, Groen A, Ohi R, et al. Fast microtubule dynamics in meiotic spindles measured by single molecule imaging: evidence that the spindle environment does not stabilize microtubules [J].Mol. Biol.Cel, 2009, 21:323-333
- [13] Walczak CE, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis[J]. Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2010, 11, 91-102
- [14] Liu D, Vader G, Vromans MJ. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of Aurora B kinase from kinetochore substrates[J]. Science, 2009, 323:1350-1353
- [15] Emberley ED, Gietz RD, Campbell JD, et al. RanBPM interacts with psoriasin in vitro and their expression correlates with specific clinical features in vivo in breast cancer[J]. BMC Cancer, 2002, 2:28-34
- [16] Fang X, Pedro MC, Thomas MG, et al. A Survivin-Ran Complex Regulates Spindle Formation in Tumor Cells [J]. Molecular and cellular biology, 2008: 5299-5311
- [17] Kimi H, Ichiro T, Ryo M, et al. Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy [J]. International Journal of General Medicine, 2009,2:243-257
- [18] Li SR, Gyselman VG, Dorudi S, et al. Elevated levels of RanBP7 mRNA in colorectal carcinoma are associated with increased proliferation and are similar to the transcription pattern of the protooncogene c-myc[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271:537-543
- [19] Karsten W. Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle[J]. Cell, 2003, (112): 441-451
- [20] Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, et al. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers[J]. Nat. Genet, 2006, 38:1043-1048
- [21] Hideyuki A, Takao K, Hiromichi S, et al. High expression of Ran GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear cell renal cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2008, 122: 2391-2397

(上接第 1475 页)

- [13] Hegi M E, Diserens A C, Gorlla T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 997-1003
- [14] Hegi M E, Diserens A C, Godard S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 1871-1874
- [15] Esteller M, Hamilton S R, Burger P C, et al. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia[J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 793-797
- [16] Pulling L C, Divine K K, KlInge D M, et al. Promoter hypermethylation of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression[J]. Cancer Res, 2003, 63 (16): 4842-4848
- [17] Ramirez JL, Taron M, Balana C, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management[J]. Rocs Akad Med Bialymst, 2003, 48: 34-41
- [18] Weaver KD, Grossman SA, Herman JG. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma [J]. Cancer Invest, 2006, 24(1): 35-40
- [19] Balana C, Ramirez J L, Taron M, et al. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)- 1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(4): 1461-1468
- [20] Ramirez J L, Taron M, Balana C, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management [J]. Roc Akad Med Bialymst, 2003, 48: 34-41