

喉鳞状细胞癌 ESRRG 基因启动子甲基化及临床意义研究

胡燕 沈志森 周重昌 袁洁 徐捷 郝文娟 叶栋 邓红霞

【摘要】目的 探讨雌激素相关受体 γ (ESRRG) 基因启动子在 LSCC 组织中的甲基化状态, 分析其与临床病理特征及预后的关系, 并评估其对 LSCC 的诊断价值。**方法** 采用焦磷酸测序方法检测 89 例男性 LSCC 患者 LSCC 组织与癌旁正常组织的 ESRRG 基因启动子甲基化水平; 分析 ESRRG 基因启动子甲基化水平与患者临床病理特征的关系; 绘制 ROC 曲线评估 ESRRG 基因甲基化水平对 LSCC 的诊断价值; 采用 Kaplan-Meier 法绘制患者生存曲线, 并比较高甲基化组 (甲基化水平 $>26.41\%$) 与低甲基化组 (甲基化水平 $\leq 26.41\%$) 5 年生存率。**结果** LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平高于癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。T₃₋₄ 期患者 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平高于 T₁₋₂ 期患者 ($P < 0.05$), 临床分期 III、IV 期患者 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平高于 I、II 期患者 ($P < 0.05$)。AUC 为 0.81, 当 ESRRG 基因启动子甲基化水平为 26.41% 时, 诊断 LSCC 的灵敏度、特异度分别为 0.7079、0.7865。ESRRG 基因启动子低甲基化组患者 5 年生存率高于高甲基化组患者 (69.03% vs 45.12%, $P < 0.05$)。**结论** ESRRG 基因启动子在 LSCC 组织中呈高甲基化水平, 且在 T₃₋₄ 期及 III、IV 期患者 LSCC 组织中明显增高, 高甲基化水平患者预后较差。

【关键词】 ESRRG 基因 DNA 甲基化 喉鳞状细胞癌

ESRRG promoter methylation in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance HU Yan, SHEN Zhisen, ZHOU Chongchang, et al. School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315200, China

【Abstract】Objective To investigate the methylation status of estrogen-related receptor γ (ESRRG) gene promoter in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) tissues and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis of patients. **Methods** ESRRG gene promoter methylation status in LSCC tissues and adjacent normal tissues of 89 male LSCC patients were detected by bisulfite pyrosequencing method. And the relationship between ESRRG promoter methylation and the clinicopathological characteristics of patients was analyzed. The diagnostic value of ESRRG methylation in LSCC was evaluated by ROC curve. Kaplan-Meier curve was used to evaluate the survival of patients, and the 5-year survival rate was compared between the hypermethylated group (methylation level $>26.41\%$) and the hypomethylated group (methylation level $\leq 26.41\%$). **Results** ESRRG promoter was more frequently hypermethylated in LSCC tissues than that in adjacent normal tissues ($P < 0.05$). ESRRG promoter methylation in LSCC patients with T₃₋₄ classification was higher than that with T₁₋₂ classification ($P < 0.05$); ESRRG promoter methylation in patients with clinical stage III, IV was higher than that in those with clinical stage I, II ($P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of ROC curve was 0.81; taken the methylation of ESRRG promoter of 26.41%, the sensitivity and specificity of the diagnosis of LSCC were 0.7079 and 0.7865, respectively. The 5-year survival rate of ESRRG promoter hypomethylated group was significantly higher than that of hypermethylated group (69.03% vs 45.12%, $P < 0.05$). **Conclusion** ESRRG gene promoter methylation is higher in LSCC tissues; it increases significantly in patients with T₃₋₄ classification and clinical stage III, IV; and the patients with high levels of methylation may have poor prognosis.

【Key words】 ESRRG gene DNA methylation Laryngeal squamous cell carcinoma

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.15.2019-647

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY19H160014); 宁波市医疗卫生品牌学科建设项目 (PPXK2018-02)

作者单位: 315200 宁波大学医学院 (胡燕、袁洁、徐捷); 宁波大学附属李惠利医院耳鼻咽喉头颈外科 (沈志森、周重昌、郝文娟、叶栋、邓红霞)

通信作者: 沈志森, E-mail: szs7216@163.com

喉癌是常见的头颈部恶性肿瘤之一^[1], 其中喉鳞状细胞癌 (LSCC) 是最常见的病理学类型^[2]。手术和放化疗是目前临床上治疗 LSCC 的主要方法。据统计, LSCC 患者的 5 年生存率较低, 这主要是由于患者淋巴结转移率、复发率和第二原发肿瘤发生率较高所致^[3]。LSCC 的发生是多因素共同作用的结果, 其中包括遗传因素及吸烟、饮酒、人乳头瘤病毒感染等环境因素^[4], 但 LSCC

发生的具体分子机制尚待深入探讨。DNA 甲基化是最早发现的基因修饰方式之一,启动子区域 CpG 岛的甲基化修饰对基因表达的影响十分重要,高甲基化修饰会导致基因转录抑制或沉默。抑癌基因高甲基化会导致抑癌作用异常,从而导致癌症发生、发展^[5]。人雌激素相关受体 γ (ESRRG) 基因位于人体染色体 1q41^[6]。ESRRG 蛋白属孤儿核受体,可在无天然配体的条件下发挥生物学作用^[7]。研究表明,ESRRG 基因与肿瘤细胞代谢、增殖、转移等有关,起抑癌作用,包括乳腺癌^[8]、子宫内膜癌^[9]、卵巢癌^[10]及前列腺癌^[11]等性别相关肿瘤。据世界癌症组织统计,LSCC 男性高发,在女性中发生率较低,笔者推测 LSCC 的发生亦与性别相关基因有关。基于此,本研究探讨 ESRRG 基因启动子在男性 LSCC 组织中的甲基化状态,分析其与临床病理特征及预后的关系,并评估其对 LSCC 的诊断价值,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2011 年 4 月至 2015 年 2 月在宁波大学附属李惠利医院耳鼻咽喉头颈外科行手术治疗的男性 LSCC 患者 89 例,年龄 40~86(60.15±9.06)岁。患者术前均未接受过放化疗。病理学诊断严格按照国际癌症控制联盟(UICC)分类指南(TNM 2002)分期,其中 I 期 28 例、II 期 15 例、III 期 12 例、IV 期 34 例。患者术后随访 5 年,其中失访 5 例,死亡 32 例,存活 52 例。术中留取的 LSCC 组织与距癌组织边缘 0.5cm 以上的癌旁正常组织标本立即置于 RNA 保存液中保存于-80℃冰箱。本研究获宁波大学附属李惠利医院医学伦理委员会批准,患者知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及亚硫酸盐转化和纯化 严格按照 QIAamp DNA Mini 试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)说明书提取患者 LSCC 组织与癌旁正常组织的 DNA。严格按照 ZYMO EZ-DNA Methylation-Gold 试剂盒(Zymo Research, Irvine, CA, USA)说明书进行 DNA 亚硫酸盐转化和纯化。

1.2.2 DNA 扩增及焦磷酸测序 检测 LSCC 组织与癌

旁正常组织中 ESRRG 基因启动子上连续 6 个 CG 位点(hg19: chr1: 217311596-217311629)的甲基化水平。严格按照聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(PyroMark PCR Kit; Qiagen)说明书将亚硫酸盐处理过的 DNA 进行扩增。ESRRG 基因正向引物序列为 5'-TAGAGTTA-GAGGGAGATGAATTG-3',反向引物序列为 5'-Biotin-TCTTTTCAAATCCATCACTAA-3'。PCR 反应条件如下: 95℃预变性 10min 后,循环“95℃变性 30s,50℃退火 40s,72℃延伸 60s”共 45 次。应用 PyroMark Q24(Qiagen)焦磷酸测序仪,按焦磷酸测序试剂盒(EpiTech Bisulfite Kits, Qiagen)说明书对 ESRRG 基因启动子进行测序,测序序列为 5'-GGGAGATGAATTGGG-3',直接从测序仪上读得 ESRRG 基因启动子甲基化水平。以上所有实验步骤均重复 3 次,取 3 次结果的平均值。

1.3 观察指标 (1)比较 LSCC 组织与癌旁正常组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平。(2)分析 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平与患者临床病理特征的关系,包括年龄、吸烟行为及肿瘤组织学类型、部位、T 分期、淋巴结转移及临床分期等。(3)评估 ESRRG 基因启动子甲基化水平对 LSCC 的诊断价值。(4)以甲基化水平 26.41% 为临界值,将患者分为高甲基化组(61 例)和低甲基化组(28 例),分析 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平与患者预后的关系。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,LSCC 组织与癌旁正常组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平比较采用配对 t 检验,不同临床病理特征的 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平比较采用两独立样本 t 检验;绘制 ROC 曲线评估 ESRRG 基因启动子甲基化水平对 LSCC 的诊断价值,得出 AUC、灵敏度、特异度;采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,生存率的比较采用 log-rank 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LSCC 组织与癌旁正常组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平比较 见表 1。

表 1 LSCC 组织与癌旁正常组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平比较(%)

组别	<i>n</i>	CG1 位点	CG2 位点	CG3 位点	CG4 位点	CG5 位点	CG6 位点	均值
LSCC 组织	89	40.45 ± 14.39	34.11 ± 14.40	34.91 ± 15.23	35.00 ± 15.69	39.79 ± 14.96	32.92 ± 17.25	36.20 ± 14.71
癌旁正常组织	89	24.61 ± 10.67	21.35 ± 12.63	21.93 ± 11.87	19.71 ± 11.15	26.36 ± 11.59	14.73 ± 6.79	21.45 ± 10.32
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

由表 1 可见,LSCC 组织 ESRRG 基因启动子每个 CG 位点的甲基化水平均高于癌旁正常组织(均 $P <$

0.05)。6 个 CG 位点甲基化水平的均值可以代表组织的甲基化水平,结果显示 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子

甲基化水平高于癌旁正常组织($P<0.05$)。

2.2 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平与患者临床病理特征的关系分析 见表 2。

表 2 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平与患者临床病理特征的关系分析

临床病理特征	n	ESRRG 基因启动子甲基化水平(%)	P 值
年龄			
<60 岁	48	36.79 ± 14.48	>0.05
≥60 岁	41	35.50 ± 15.11	
吸烟行为			
无	15	32.71 ± 14.93	>0.05
有	74	36.90 ± 14.66	
肿瘤组织学类型			
高分化	47	38.95 ± 15.58	>0.05
中/低分化	42	33.11 ± 13.17	
肿瘤部位			
声门上型	33	36.83 ± 16.46	>0.05
声门型/声门下型	56	45.82 ± 13.71	
T 分期			
T ₁₋₂ 期	54	32.97 ± 13.83	<0.05
T ₃₋₄ 期	35	41.17 ± 14.82	
淋巴结转移			
无	62	34.91 ± 13.58	>0.05
有	27	39.15 ± 16.91	
临床分期			
I、II 期	43	31.80 ± 11.84	<0.05
III、IV 期	46	40.31 ± 16.00	

由表 2 可见, T₃₋₄ 期患者 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平高于 T₁₋₂ 期患者($P<0.05$), III、IV 期患者 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平高于 I、II 期患者($P<0.05$)。不同年龄、吸烟行为、肿瘤组织学类型、肿瘤部位、淋巴结转移的患者 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.3 ESRRG 基因启动子甲基化水平对 LSCC 的诊断价值分析 见图 1。

由图 1 可见, AUC 为 0.81, 表明检测 ESRRG 基因启动子甲基化水平对诊断 LSCC 具有一定的诊断价值。当 ESRRG 基因启动子甲基化水平为 26.41% 时, 诊断 LSCC 的灵敏度、特异度分别为 0.7079、0.7865。此时, 假阳性率和假阴性率分别为 0.2135、0.2921, 阳性预测值为 0.7683, 阴性预测值为 0.7292, 诊断符合率为 74.72%。

2.4 LSCC 组织 ESRRG 基因启动子甲基化水平与患者预后的关系分析 在随访中, 5 例患者失访(均为低甲基化组), 低甲基化组患者 4 例死亡, 高甲基化组患者

28 例死亡, 其余存活。生存曲线见图 2、3。

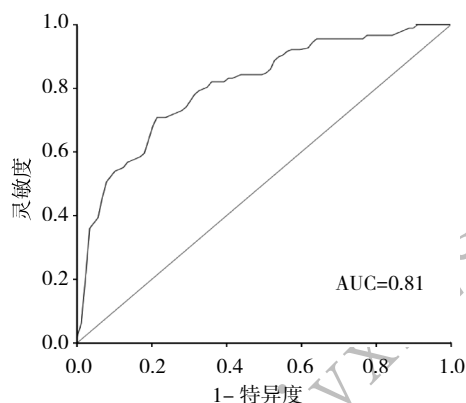


图 1 ESRRG 基因启动子甲基化水平诊断 LSCC 的 ROC 曲线

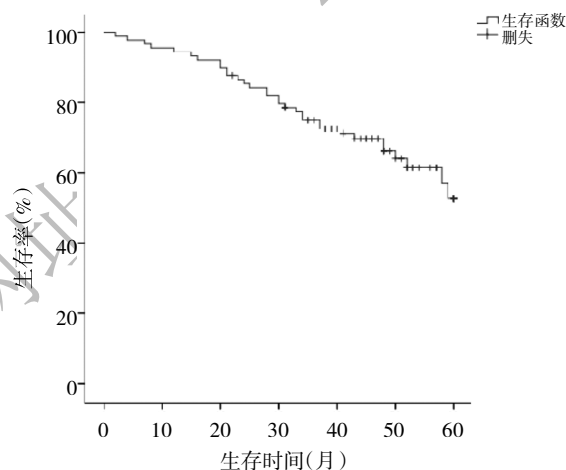


图 2 89 例 LSCC 患者生存曲线

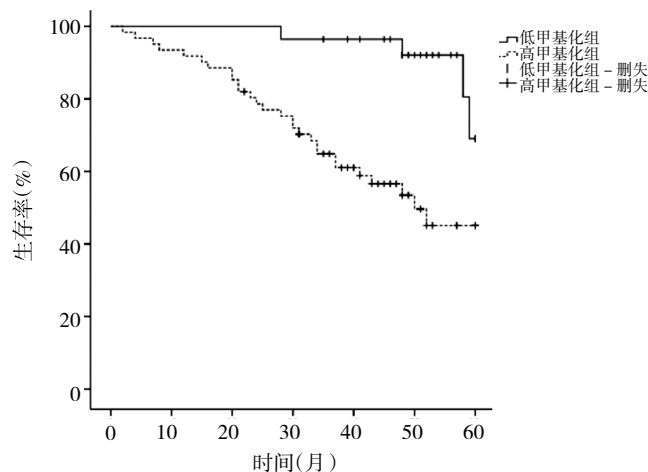


图 3 高甲基化组与低甲基化组患者生存曲线比较

由图 2 可见, LSCC 患者的 5 年生存率为 52.65%。由图 3 可见, ESRRG 基因启动子低甲基化组患者 5 年生存率高于高甲基化组患者(69.03% vs 45.12%, $P<0.05$)。

3 讨论

ESRRG 蛋白为孤儿核受体,可在无天然配体的条件下发挥生物学作用。其主要通过结合相关基因启动子序列,转录调控下游靶基因的表达发挥作用,而小分子配体可以加强(PGC-1 α ^[12]、GRIP-1)或抑制(SHP、DAX-1^[13]、SMILE^[14]、GNL3L)ESRRG 对靶基因的转录作用。采用染色体免疫沉淀技术(CHIP)分析发现,ESRRG 基因的靶基因有很多^[15],目前研究的靶基因包括代谢相关基因如己糖激酶 2(HK2)、甘油醛脱氢酶(GAPDH)及丙酮酸脱氢酶激酶 4(PDK4)^[16]等;细胞周期相关基因如 p21、p27^[18]等;细胞迁移相关基因如 E-钙黏附蛋白^[17]、S100A4^[18]等。因此,ESRRG 基因与肿瘤细胞代谢、增殖、转移等有关。ESRRG 与雌激素受体的高度同源主要位于 ESRRG 的 DNA 结合结构区,因此 ESRRG 在性别相关肿瘤中研究较多,发现其主要起抑制肿瘤的作用。

目前临床诊断 LSCC 的方法主要包括影像学技术及内镜或支撑喉镜下病理学活检。影像学技术作为普查项目不实际,往往在晚期肿瘤患者症状明显时考虑此技术,并且作为手术参考的辅助项目进行;内镜或支撑喉镜下病理学活检目前仍是 LSCC 诊断的金标准,但该方法是有创操作,也不适用于普查。LSCC 治疗方法主要以手术为主,放化疗为辅,而晚期 LSCC 手术大大降低了患者的生活质量,如通气障碍、发声障碍等。故寻求微创、简便、早期诊断 LSCC 的肿瘤标记物及治疗靶点有着重要意义。大量研究从分子遗传学角度对 LSCC 的发病机制及预后进行研究,而目前仍无巨大的突破,仍未有同甲胎蛋白、癌胚抗原等公认的肿瘤标志物的出现,因此探索 LSCC 的分子遗传学机制仍在继续。目前所知,LSCC 患者中大部分为男性。因此,临床有理由推测男性中存在某种基因表达低于女性,而此基因具有抑制 LSCC 发生、发展的作用。

已有研究报道 DNA 高甲基化可导致 LSCC 抑癌基因表达下调,抑制癌症进展^[19]。在 LSCC 组织中,高甲基化的基因有 CBY^[20]、DAPK^[21]等,这些基因都被视为 LSCC 的抑癌基因。本研究主要探讨 ESRRG 基因启动子在男性 LSCC 组织中的甲基化状态,分析其与临床病理特征及预后的关系,并评估其对 LSCC 的诊断价值。结果显示,ESRRG 基因启动子甲基化水平在男性 LSCC 组织中明显高于癌旁正常组织,表明在男性 LSCC 组织中 ESRRG 基因的转录可能受到限制,从而减少了 ESRRG 蛋白的表达,加大了 LSCC 发生的风险。因此,

ESRRG 基因在 LSCC 中可能也发挥着抑癌作用。

在 ESRRG 基因启动子甲基化水平与 LSCC 患者临床病理特征的关系分析中发现,ESRRG 基因启动子甲基化水平与肿瘤 T 分期和临床分期呈正相关,而与淋巴结转移无明显关系。临床分期是由 TNM 分期综合评估的结果,本研究结果发现 ESRRG 基因启动子甲基化水平对临床分期的影响主要是 T 分期引起的,因此笔者考虑 ESRRG 基因启动子甲基化状态可能在 LSCC 中主要对肿瘤大小起抑制作用,可能具有抑制肿瘤增殖的作用。同时 ESRRG 基因启动子高甲基化可以预测肿瘤进展情况,可为治疗方案作一参考。此外,临床还可通过降低患者 ESRRG 基因启动子甲基化状态抑制肿瘤进展。研究报道,DNA 甲基化状态与患者的生活习惯有关^[22]。在 LSCC 的研究中,p14、APC 基因甲基化与吸烟、饮酒等相关^[23]。而本研究中 ESRRG 基因启动子甲基化水平与男性 LSCC 患者吸烟行为并无统计学上的意义,这提示 ESRRG 基因启动子甲基化水平与吸烟因素无相关性,可能存在其他影响 ESRRG 基因启动子甲基化的危险因素。

肿瘤特异性标志物一直以来是癌症研究中的热点话题,而目前尚无特异的肿瘤标志物可以协助早期诊断 LSCC 及评估 LSCC 患者预后。本研究结果显示,ESRRG 基因启动子甲基化水平对诊断 LSCC 具有较高的灵敏度、特异度,分别为 0.7079、0.7865。AUC 表明 ESRRG 基因作为肿瘤标志物具有一定的可靠性,具有较高的诊断价值。其可以与其他肿瘤标志物,如上述 CMTM3、miR-34a 等基因进行联合诊断。有研究报道 DNA 甲基化状态可纳入癌症的预后指标^[21]。据相关数据统计,LSCC 患者 5 年生存率约 57%^[3]。本研究中 LSCC 患者的 5 年生存率约 52%,稍低于上述统计情况。将 LSCC 患者分成高、低甲基化组,对这两组患者的 5 年生存率进行比较,发现低甲基化组患者的 5 年生存率明显高于高甲基化组,说明 ESRRG 基因启动子高甲基化水平是影响 LSCC 患者预后的不良因素。

综上所述,本研究结果显示 ESRRG 基因启动子在 LSCC 组织中呈高甲基化水平,且在 T₃₋₄ 期及Ⅲ、Ⅳ期患者 LSCC 组织中明显增高。ESRRG 基因启动子高甲基化 LSCC 患者预后较差。检测 ESRRG 基因启动子甲基化水平可为 LSCC 的诊断和靶向治疗提供新思路,并为预后判断提供新线索。

4 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA

- Cancer J Clin, 2019, 69(1):7–34. DOI:10.3322/caac.21551.
- [2] Yang J, Zhou L, Zhang Y, et al. DIAPH1 Is Upregulated and Inhibits Cell Apoptosis through ATR/p53/Caspase-3 Signaling Pathway in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma[J]. Dis Markers, 2019, 2019:6716472. DOI:10.1155/2019/6716472.
 - [3] Kostrzewska-Poczekaj M, Byzia E, Soloch N, et al. DIAPH2 alterations increase cellular motility and may contribute to the metastatic potential of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2019, [Epub ahead of print]. DOI:10.1093/carcin/bgz035.
 - [4] Muscat JE, Wynder EL. Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer[J]. Cancer, 1992, 69(9): 2244–2251. DOI:10.1002/1097-0142(19920501)69:9<2244::aid-cncr2820690906>3.0.co;2-o.
 - [5] Huang C, Zhou X, Li Z, et al. Downregulation of thrombospondin-1 by DNA hypermethylation is associated with tumor progression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. MMR, 2016, 14(3): 2489–2496. DOI:10.3892/mmr.2016.5580.
 - [6] Eudy JD, Yao S, Weston MD, et al. Isolation of a gene encoding a novel member of the nuclear receptor superfamily from the critical region of usher syndrome type IIa at 1q41[J]. Genomics, 1998, 50(3):382–384. DOI: 10.1006/geno.1998.5345.
 - [7] Misra J, Kim DK, Choi HS. ERR γ : a Junior Orphan with a Senior Role in Metabolism[J]. TEM, 2017, 28(4):261–272. DOI: 10.1016/j.tem.2016.12.005.
 - [8] Ang J, Sheng J, Lai K, et al. Identification of estrogen receptor-related receptor gamma as a direct transcriptional target of angiogenin[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e71487. DOI: 10.1371/journal.pone.0071487.
 - [9] Sun Y, Wang C, Yang H, et al. The effect of estrogen on the proliferation of endometrial cancer cells is mediated by ERR γ through AKT and ERK1/2[J]. CEJ, 2014, 23(5):418–424. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000052.
 - [10] Sun P, Sehoul J, Denkert C, et al. Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new tumor biomarkers in ovarian cancer cells[J]. J Mol Med (Berl), 2005, 83(6):457–467. DOI: 10.1007/s00109-005-0639-3.
 - [11] Audet-Walsh E, Yee T, McGuirk S, et al. Androgen-Dependent Repression of ERR γ Reprograms Metabolism in Prostate Cancer[J]. Cancer Res, 2017, 77(2):378–389. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1204.
 - [12] Wang L, Liu J, Saha P, et al. The orphan nuclear receptor SHP regulates PGC-1 α expression and energy production in brown adipocytes[J]. Cell Metab, 2005, 2(4):227–238. DOI:10.1016/j.cmet.2005.08.010.
 - [13] Park YY, Ahn SW, Kim HJ, et al. An autoregulatory loop controlling orphan nuclear receptor DAX-1 gene expression by orphan nuclear receptor ERR γ [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(21):6756–68. DOI: 10.1093/nar/gky1272.
 - [14] Xie YB, Park JH, Kim DK, et al. Transcriptional corepressor SMILE recruits SIRT1 to inhibit nuclear receptor estrogen receptor-related receptor gamma transactivation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(42):28762–28774. DOI: 10.1074/jbc.M109.034165.
 - [15] Cai Q, Lin T, Kamarajugadda S, et al. Regulation of glycolysis and the Warburg effect by estrogen-related receptors [J]. Oncogene, 2013, 32(16):2079–2086. DOI: 10.1038/onc.2012.221.
 - [16] Lee JH, Kim EJ, Kim DK, et al. Hypoxia induces PDK4 gene expression through induction of the orphan nuclear receptor ERR γ [J]. PLoS One, 2012, 7(9):e46324. DOI: 10.1371/journal.pone.0046324.
 - [17] Tiraby C, Hazen BC, Gantner ML, et al. Estrogen-related receptor gamma promotes mesenchymal-to-epithelial transition and suppresses breast tumor growth[J]. Cancer Res, 2011, 71(7):2518–2528. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1315.
 - [18] Hua T, Wang X, Chi S, et al. Estrogen-related receptor gamma promotes the migration and metastasis of endometrial cancer cells by targeting S100A4[J]. Oncol Rep, 2018, 40(2):823–832. DOI: 10.3892/or.2018.6471.
 - [19] Bednarek K, Kostrzewska-Poczekaj M, Szaumkessel M, et al. Downregulation of gene expression in laryngeal squamous cell carcinoma is an effect of DNA hypermethylation and correlates with disease progression[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(7): 1249–1261.
 - [20] Ren G, Zhao DA, Xu J, et al. Expression of CBY and methylation of CBY at promoter region in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Tumori, 2015, 101(2):215–222. DOI: 10.5301/tj.5000242.
 - [21] Paluszczak J, Misiak P, Wierzbicka M, et al. Frequent hypermethylation of DAPK, RARbeta, MGMT, RASSF1A and FHIT in laryngeal squamous cell carcinomas and adjacent normal mucosa[J]. Oral Oncol, 2011, 47(2):104–107. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.11.006.
 - [22] Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, et al. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage[J]. Int J Cancer, 2007, 121(8):1724–1728. DOI: 10.1002/ijc.22889.
 - [23] van Engeland M, Weijenberg M, Roemen GM, et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(12):3133–3137. DOI: 10.1002/cncr.11380.

(收稿日期:2019-03-02)

(本文编辑:李媚)