

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.014

甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析筛查大肠癌的性能评价*

肖著军^{1,4}, 萧著玲², 陈金敏³, 邓飞鸿³, 许岸高^{4△}

(1. 惠州市中山大学惠亚医院消化内科, 广东惠州 516081; 2. 湖南省永州市蓝山县中心医院消化科 425800; 3. 南方医科大学南方医院消化内科, 广州 510515; 4. 广东省惠州市医学研究所 516003)

摘要:目的 评价通过甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析(MS-HRM)检测粪便中人 DNA 甲基化筛查大肠癌(CRC)的性能。方法 收集合格的新鲜粪便标本 82 例, 其中 CRC 患者 27 例(CRC 组)、进展期腺瘤(AA)患者 25 例(AA 组)和结肠镜阴性的正常人 30 例(对照组), 在 LightCycler 480 设备上应用 MS-HRM 技术检测上述粪便中 *vimentin* 基因的甲基化状态, 并与粪便潜血试验(FOBT)的诊断性能相比较。结果 MS-HRM 在 CRC 组、AA 组和对照组中检测 *vimentin* 基因甲基化的阳性率分别为 81.5%(22/27), 80.0%(20/25)和 6.7%(2/30)。FOBT 在 CRC 组、AA 组和对照组中的阳性率分别为 37.0%(10/27), 12.0%(3/25)和 3.3%(1/30)。在病例组中, MS-HRM 和 FOBT 的诊断敏感性分别为 80.8%(42/52)和 25.0%(13/52), 前者显著高于后者($P<0.05$); 在对照组中两者的诊断特异性分别为 93.3%(28/30)和 96.7%(29/30), 两者差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 在 CRC 筛查中, MS-HRM 技术检测粪便中 *vimentin* 基因甲基化状态的诊断性能明显优于 FOBT, 具有潜在的应用价值。

关键词: 甲基化; 肿瘤; 波形蛋白; DNA; 进展期腺瘤; 甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析

中图分类号: R574.6 文献标识码: A 文章编号: 1671-8348(2015)02-0186-03

Colorectal cancer screening by utilizing methylation-sensitive high-resolution melting curve analysis*

Xiao Zhujun^{1,4}, Xiao Zhuling², Chen Jinmin³, Deng Feihong³, Xu Angao^{4△}

(1. Department of Gastroenterology, Hui Ya Hospital of the First Hospital, Sun Yat-Sen University, Huizhou, Guangdong 516081, China; 2. Department of Gastroenterology, Lanshan Central Hospital, Yongzhou, Hunan 425800, China; 3. Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 4. Huizhou Medicine Institute, Huizhou, Guangdong 516003, China)

Abstract: Objective To assess the performance of the methylation-sensitive high-resolution melting curve analysis (MS-HRM analysis) on the detection of the methylation in stool DNA for colorectal cancer screening. **Methods** Eighty-two qualified stool samples were collected from 27 patients with colorectal cancer patients (CRC group), 25 patients with advanced adenomas (AA group), and 30 healthy people (control group). The methylation status of vimentin gene in all of the stool samples was detected by the MS-HRM analysis on the LightCycler 480 platform. The fecal occult blood test (FOBT) was also used for the same samples. **Results** The positive rates of the MS-HRM assay in the CRC group, AA group, and control group were 81.5% (22/27), 80.0% (20/25), and 6.7% (2/30) respectively. The positive rates of FOBT in the three groups were 37.0% (10/27), 12.0% (3/25) and 3.3% (1/30) respectively. The diagnostic sensitivity of the MS-HRM assay for colorectal cancer and advanced adenomas (80.8%, 42/52) was significantly higher than that of FOBT (25.0%, 13/52) ($P<0.05$). No significant difference was found in the diagnostic specificity between the MS-HRM assay (93.3%, 28/30) and the FOBT (96.7%, 29/30) ($P>0.05$). **Conclusion** MS-HRM performs better than FOBT and has great application potential in the detection of stool DNA methylation for colorectal cancer screening.

Key words: methylation; neoplasms; vimentin; DNA; advanced adenomas; methylation-sensitive high-resolution melting

目前, 全球大肠癌(colorectal cancer, CRC)的发病率和病死率居第 3 位, 而且有逐年上升的趋势。在中国, 随着经济社会的快速发展, 人们饮食结构发生较大变化, CRC 发病率也逐年升高^[1]。有研究发现, 诊断为 CRC 早期的患者中 5 年生存率可超过 90%, 而伴有淋巴结转移的, 5 年生存率大约只有 60%, 如果出现有远处转移则 5 年生存率不到 10%^[2]。因此, CRC 早期筛查是影响其预后的关键因素。而 CRC 筛查常用的粪便潜血(faecal occult blood testing, FOBT)、结肠镜和 CT 结肠成像术等方法都难以完全达到安全简便、接受性好和成本效益好等大规模筛查的要求, 寻求更理想的筛查方法是当务之急。粪便 DNA 检测作为一种非侵袭性、简便并具有很高敏感

性和特异性的方法深受人们的欢迎^[3]。但是, 目前粪便 DNA 检测费用较高, 还不能用于 CRC 的筛查^[3-5]。自从 2001 年 Worm 等^[6]首次运用高分辨率熔解曲线分析(high-resolution melting, HRM)检测 CpG 岛甲基化以来, 先后有人用此技术检测大肠肿瘤患者血液和组织中基因甲基化, 其检出率分别为 48.0%^[7]和 33.3%~63.0%^[8], 都取得了理想的结果。大量研究证实甲基化敏感性高分辨率熔解曲线分析(methylation-sensitive high-resolution melting, MS-HRM)作为一种 PCR 后闭管操作技术, 检测基因甲基化具有性能好、可靠、快捷、成本低等优势^[9-10]。目前, 国内外尚无评价 MS-HRM 检测患者粪便中基因甲基化筛查大肠肿瘤性能的研究报道。因此, 本研究采

* 基金项目: 惠州市科技计划项目(2013y122)。 作者简介: 肖著军(1988—), 住院医师, 硕士, 主要从事大肠癌早期筛查和诊断方向研究。

△ 通讯作者, Tel: (0752)2833065; E-mail: angao62@21cn.com。

用 MS-HRM 技术检测 CRC 患者、进展期腺瘤(advanced adenomas, AA)患者和正常人粪便 DNA 中 *vimentin* 基因甲基化状态来探讨 MS-HRM 在 CRC 筛查中应用的潜在价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 9 月至 2013 年 1 月在南方医科大学南方医院内镜中心行全结肠镜检查并经病理证实的 CRC 患者 27 例(CRC 组)、AA 患者 25 例(AA 组)和 30 例结肠镜阴性对照者(对照组)的粪便样本。CRC 组和 AA 组纳入标准:(1)年龄大于 40 岁、病理组织学检查(均由两位经验丰富的胃肠道病理学专家阅片判定)确诊为结直肠癌 AA(指直径大于或等于 1 cm 或组织学检测为绒毛状腺瘤或重度异型性增生的腺瘤)或 CRC 患者;(2)能收集合格粪便样本的患者。CRC 组和 AA 组排除标准:(1)家族性或遗传性结直肠癌或肿瘤;(2)伴有其他系统或器官肿瘤;(3)CRC 或 AA 患者同时患有炎症性肠病;(4)术前有放疗或化疗史;(5)妊娠或有严重肝肾功能不全者;(6)非原发癌灶者及不能确诊等其他情况。对照组纳入标准:(1)年龄、性别匹配;(2)肠镜检查阴性;(3)收集到合格粪便样本。对照组排除标准:(1)各种原因而未行肠镜检查的;(2)收到的粪便样本不合格。本研究经南方医科大学南方医院伦理委员会批准,患者均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 用商品化的粪便留样瓶收集 CRC 患者、AA 患者手术前和正常人新鲜粪便标本约 3 g,所有粪便标本收集后 36 h 内保存于-80 ℃冰箱待测。

1.2.2 主要试剂和仪器 QIAamp DNA stool mini kit(50 次)和 EpiTect HRM PCR Kit(100 次)购自德国 Qiagen 公司;CpGenome Universal Methylated DNA(10 μg)和 CpGenome Universal Unmethylated DNA(10 μg)购自美国 Millipore 公司;EZ DNA Methylation-Gold™ Kit(50 次)购自美国 Zymoresearch 公司;MS-HRM 检测采用全自动实时荧光定量 PCR 系统 LightCycler480 System(罗氏公司);便隐血检测试纸(胶体金人血红蛋白单抗检测法,万华普曼生物工程有限公司)。

1.2.3 引物设计和合成 根据 *vimentin* 基因 CpG 岛序列,由上海生工公司设计合成引物。*vimentin* 基因的 MS-HRM 引物序列为,上游:5'-GCG ATG GTT TAG TTG TAA GTT GGT AGT-3',下游:5'-CTA TCC CGC CGA TTA AAA ACT CCT A-3',退火温度为 63 ℃,扩增片段长度为 126 bp。

1.2.4 粪便 DNA 的提取 按 QIAamp DNA stool mini kit(Qiagen)说明书操作。称取粪便约 200 mg 于 2 mL EP 管,加入 1.6 mL Buffer ASL 涡旋混匀 1 min,使粪便溶解,13 000 r/min 离心 1 min。吸取 1.4 mL 上清液到新的 2 mL EP 管,加入 inhibitEX Tablet 混匀 1 min,室温静置 1 min,吸收杂质,13 000 r/min 离心 3 min。吸 25 μL Proteinase K 到新 2 mL EP 管中,加入上清液 600 μL,Buffer AL 600 μL,混匀,70 ℃温浴 10 min。加 600 μL 无水乙醇到裂解液,混匀。取吸附柱,加入上述裂解液,13 000 r/min 离心 1 min,弃废液。加入 500 μL 的 AW1,13 000 r/min 离心 1 min,弃废液。加入 500 μL 的 AW2,13 000 r/min 离心 3 min,弃废液。最后回收 DNA,溶于 100 μL Buffer AE,并保存在-20 ℃冰箱。DNA 浓度和纯度使用 NanoDropND-1000 UV Spectrophotometer 分光光度计测定,DNA 质量经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 亚硫酸氢盐处理 取 500 ng DNA 样品,按照 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit(50 次,zymoresearch)甲基化修饰试剂盒说明书进行甲基化修饰,修饰时间约为 3.5 h,修饰后

的 DNA 在 24 h 内进行 PCR 扩增。

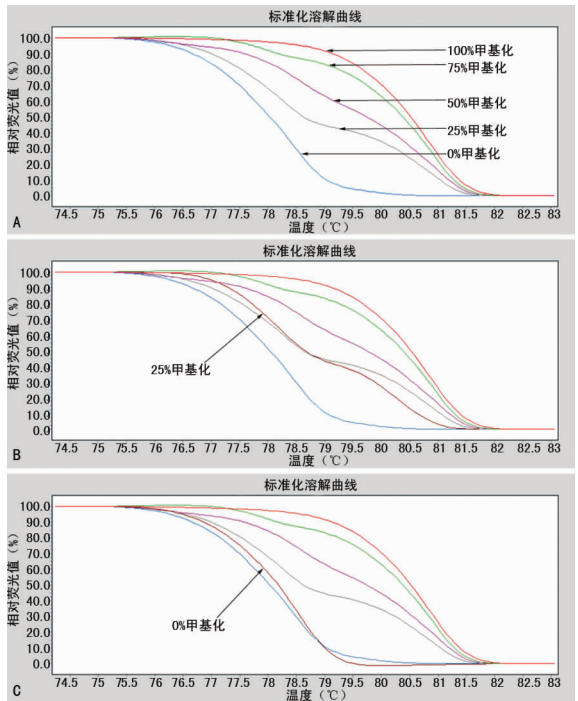
1.2.6 MS-HRM 分析 PCR 扩增和 HRM 在 LightCycler480 System 一个反应中完成,步骤按 EpiTect HRM PCR Kit(100 次,Qiagen)说明书进行,所有反应均可重复进行。25 μL 反应体系包括:12.5 μL 2x EpiTect HRM PCR Master Mix,上下游引物(10 μmol/L)各 1.9 μL,0.2 μL 亚硫酸氢盐修饰后 DNA,8.5 μL DEPC 水;反应条件如下:95 ℃ 15 min,然后 95 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 10 s,共 45 个循环。扩增后 HRM 步骤,65 ℃ 1 s,然后按 0.02 ℃/s 的速度从 65 ℃升至 95 ℃,每秒钟收集 25 次荧光。最后 40 ℃冷却 1 s。使用 Gene Scanning Software 分析 HRM 的数据。

1.2.7 粪便潜血试验 按照便隐血检测试纸说明书操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,基因频率采用直接计数法,计数资料采用率表示,各组间比较采用 χ^2 检验和 Fisher's 精确概率法,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MS-HRM 在 3 组粪便样本中的阳性检出率 粪便中 *vimentin* 基因甲基化阳性检出率在 CRC 组、AA 组和对照组中分别为 81.5%(22/27),80.0%(20/25)和 6.7%(2/30),病例组明显高于对照组($\chi^2=42.012, P<0.05$)。其中,CRC 组和 AA 组均明显高于对照组($\chi^2=32.629, P<0.05$; $\chi^2=30.556, P<0.05$),而 CRC 组和 AA 组间差异无统计学意义($\chi^2=0.000, P>0.05$),见图 1。



A: 各种比例甲基化标准曲线;B: 某大肠癌样本甲基化阳性结果;C: 某大肠癌样本甲基化阴性结果。

图 1 *vimentin* 基因的 MS-HRM 检测结果。

2.2 FOBT 在 3 组粪便样本中的阳性检出率 FOBT 在 CRC 组、AA 组和对照组中的阳性检出率分别为 37.0%(10/27)、12.0%(3/25)和 3.3%(1/30),病例组明显高于对照组($\chi^2=6.308, P<0.05$)。其中,CRC 组明显高于对照组($\chi^2=10.365, P<0.05$),而 AA 组与对照组间无明显差异($\chi^2=0.506, P>0.05$);CRC 组的阳性检出率明显高于 AA 组($\chi^2=4.340, P<0.05$)。

2.3 MS-HRM 和 FOBT 的诊断性能比较 在病例组中,MS-HRM 和 FOBT 的诊断敏感性分别为 80.8%(42/52)和 25.0%(13/52),前者显著高于后者($\chi^2=32.454,P<0.05$);在对照组中,两者的诊断特异性分别为 93.3%(28/30)和 96.7%(29/30),两者之间无明显差异($\chi^2=0.000,P>0.05$),见表 1。

表 1 3 组中 <i>vimentin</i> 基因甲基化状态[n(%)]			
组别	n	<i>vimentin</i> 甲基化阳性	FOBT 阳性
CRC 组	27	22(81.5)	10(37.0)
AA 组	25	20(80.0)	3(12.0)
对照组	30	2(6.7)	1(3.3)

3 讨 论

近年来我国 CRC 发病率呈升高趋势,早期诊断是改善其预后的关键,筛查可以提高早期诊断率。与粪便潜血和肠镜相比,粪便 DNA 检测具有诸多优势,并被列入美国结直肠癌筛查指南的供选方法。除廉价外,粪便 DNA 检测几乎继承了粪便潜血检测所有优点,而且具有更好的检测性能,检测 CRC 的敏感性达 52%~91%,特异性达 91%~97%^[3];更重要的是腺瘤检出率更高,能有效地降低 CRC 的发病率。粪便 DNA 与粪便潜血单独检测 AA 的敏感性分别是 18%和 10%($P<0.05$),特异性相当,分别是 94%和 95%^[3]。此外,粪便 DNA 只需 1 次大便采样^[5,11-12];它不受大肠肿瘤部位的影响^[13];DNA 来源于大肠局部肿瘤本身,而且癌细胞的脱落量大,加上逃避了细胞凋亡,其 DNA 仍保持完整,这些都无形中提高了检测的灵敏度^[3,5,14]。

在 CRC 筛查的粪便 DNA 分子标记中,目前存在着一种以甲基化标记取代基因突变标记的趋势^[5]。Bosch 等^[5]总结近 10 年关于 CRC 粪便 DNA 标记物的研究发现,单个甲基化标记检测能达到与一组基因突变标记相当的性能。以基因突变作为粪便 DNA 筛查标记,其特异性和敏感性均不能满足 CRC 筛查的要求,检测 CRC 的敏感性为 25%~73%,检测大肠腺瘤的敏感性为 15%~17%,特异性为 94%~96%;而以单个基因甲基化为粪便 DNA 筛查标记,检测 CRC 敏感性达 38%~94%,检测大肠腺瘤的敏感性为 31%~70%,特异性为 79%~100%^[5]。因此,基因甲基化是筛查 CRC 较理想的生物标记。在众多 CRC 早期筛查的粪便 DNA 甲基化标记中,*vimentin* 是研究比较成熟并被充分证实具有很好检测性能的基因^[15]。有研究表明,*vimentin* 基因在组织样本中进行甲基化分析,检测 CRC 和腺瘤的灵敏度分别是 53%~83%和 50%~84%^[12,15];通过粪便 *vimentin* 基因甲基化分析检测 CRC 和 AA 的敏感性也分别达 81%和 83%,特异性为 82%^[16]。然而,目前常用基因甲基化检测技术难以满足便捷、经济、安全高效的大规模筛查要求,急需寻求更理想的检测技术。

MS-HRM 是表观遗传学中检测 CpG 位点的最新技术。它主要是根据 DNA 序列的长度、GC 含量、碱基互补性差异和特定饱和染料可以插入 DNA 双链中的特性,应用高分辨率的熔解曲线对样品进行分析,通过比较曲线的熔解温度和峰形,在一系列的 CpG 位点中,检测出单个甲基化的发生,也可以对平均甲基化水平进行分析,是一种 PCR 后闭管操作技术,无需序列特异性探针及 PCR 后继分管处理,具有高通量、无污染、操作简便快捷、灵敏度高、重复性好、成本低、不受检测位点局限等优势^[9-10]。有研究发现,MS-HRM 检测 CRC 患者外周血中 AKAP12 基因启动子甲基化的敏感性为 48.0%,特异性为

98.0%^[7];检测 CRC 组织中 MGMT 基因甲基化的敏感性为 42.4%,特异性为 91.0%^[8]。这些研究都证实 MS-HRM 检测基因甲基化具有性能好、可靠、快捷、成本低等优势。与血液、组织不同,粪便中人 DNA 含量极低,其平均浓度为 100 ng/g,大约只占总粪便 DNA 的 0.01%,其他微生物和食物 DNA 却占 99.99%;而且粪便中的人 DNA 还包括来自正常大肠黏膜的 DNA^[17]。因此,从粪便中检测人基因甲基化对检测技术要求更高。

本研究应用 MS-HRM 技术检测粪便中 *vimentin* 基因的甲基化状态来筛查大肠肿瘤,在 CRC 和 AA 组中的诊断敏感性分别为 81.5%和 80.0%,在对照组中的诊断特异性为 93.3%,诊断敏感性和特异性都在目前国外研究报道的范围内(CRC 和 AA 诊断敏感性分别为 38.0%~86.0%和 15.0%~83.0%,诊断特异性为 73.0%~100.0%)^[5,12,16],且比较理想。FOBT 具有操作简便、价格低廉、非侵入性等优点,是目前筛查 CRC 最常用的方法,但它敏感性和特异性欠佳。本研究中 FOBT 对 CRC 和 AA 的诊断敏感性分别为 37.5%和 12.0%,这与国外相关研究报道相近^[3],却明显低于笔者用 MS-HRM 检测基因甲基化对 CRC 和 AA 的诊断敏感性。两种方法的特异性无明显差异。研究已经证实,绝大多数 CRC 是从癌前病变演变而来,遵循“早期腺瘤-进展期腺瘤-癌”的癌变模式^[18]。对腺瘤尤其是 AA 进行检测并及时处理,不仅可以降低 CRC 的病死率,还可以降低其发病率,因此,腺瘤才是预防筛查的真正目标。但是目前最常用的 CRC 筛查方法 FOBT 对腺瘤的检出率太低^[3,13],对 CRC 的发病率影响较小。本试验 FOBT 在 AA 组中的阳性率也只有 12.0%,与对照组无明显差异。而 MS-HRM 技术对 AA 的检出率却能达到 80.0%,与 CRC 的检出率相近。此外,FOBT 还易受饮食及痔疮、炎症性肠病等其他疾病的影响,而 MS-HRM 方法不受饮食影响。显然,应用 MS-HRM 检测粪便中基因甲基化有望取代 FOBT 而作为 CRC 筛查的手段。

然而,研究发现 *vimentin* 基因并不只是在大肠肿瘤中发生甲基化,它还与很多肿瘤的发生、发展及预后相关,比如乳腺癌等^[19]。更重要的是它在上消化道肿瘤中也有很高的检出率,甚至可以作为筛查上消化道肿瘤的生物标记^[20]。因此还需要对通过 *vimentin* 基因甲基化检测筛查出来的 CRC 患者进行肠镜等其他检查方法以进一步确诊。和 FOBT 结果受其他疾病影响一样,这并不影响对应用 MS-HRM 技术来筛查 CRC 的性能评估。

参考文献:

[1] Wan DS. Epidemiologic trend of and strategies for colorectal cancer[J]. Ai Zheng, 2009, 28(9): 897-902.

[2] Ries L, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2005 [Z]. Bethesda: U. S. Natl Cancer, 2008.

[3] Miller S, Steele S. Novel molecular screening approaches in colorectal cancer[J]. J Surg Oncol, 2012, 105(5): 459-467.

[4] Lansdorp-Vogelaar I, Knudsen AB, Brenner H. Cost-effectiveness of colorectal cancer screening-an overview[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010, 24(4): 439-449.

[5] Bosch LJ, Carvalho B, Fijneman RJ, et al. Molecular tests for colorectal cancer screening[J]. Clin (下转第 191 页)

地佐辛-芬太尼联合用药镇痛效果略优于单用芬太尼组。而地佐辛与芬太尼联合使用产生的镇痛效果较单用芬太尼者略强,但差异也无统计学意义($P>0.05$)。由于地佐辛不产生典型的 μ 受体依赖,可使胃肠平滑肌松弛、减少恶心呕吐的发生率^[13-15]。结果显示,地佐辛联合芬太尼组患者恶心呕吐、尿潴留、皮肤瘙痒、头痛头晕、嗜睡等不良反应发生率明显低于单用芬太尼组患者($P<0.05$)。

综上所述,地佐辛联合芬太尼静脉镇痛完全可以满足超声消融治疗的需要,治疗中血流动力学稳定,治疗结束后镇痛时间长,同时呼吸抑制、恶心呕吐等不良反应少,值得临床推广。

参考文献:

[1] Edwards RD, Moss JG, Lumsden MA, et al. Uterine-artery embolization versus surgery for symptomatic uterine fibroids[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(4): 360-370.

[2] 朱丽, 陈文直, 陈锦云, 等. 子宫肌瘤超声消融与 MRI 信号特征关系的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(14): 1370-1373.

[3] 罗宗荣, 李飞. 高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤 76 例的麻醉体会[J]. *中国临床研究*, 2013, 26(1): 61-62.

[4] Gharagozlou P, Hashemi E, Delorey TM, et al. Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors[J]. *BMC Pharmacol*, 2006, 6: 3.

[5] Cohen RI, Edwards WT, Kezer EA, et al. Serial intravenous doses of dezocine, morphine, and nalbuphine in the

management of postoperative pain for outpatients[J]. *Anesth Analg*, 1993, 77(3): 533-539.

[6] 江明性. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 134-140.

[7] 岳修勤. 地佐辛与芬太尼应用于术后静脉镇痛的临床效果比较[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2010, 16(4): 255.

[8] 刘俊, 徐越峰. 地佐辛应用于瑞芬太尼静脉麻醉术后痛觉过敏观察[J]. *中国医疗前沿*, 2009(24): 15-16.

[9] 陈宁, 杨程, 余剑波. 镇痛药物使用手册[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2010: 1-6.

[10] 刘萍, 黄红, 栗俊. 地佐辛超前镇痛在妇科腹腔镜手术中的应用[J]. *昆明医学院学报*, 2010, 31(10): 57-60.

[11] 张从利, 邱正国, 孔祥国. 地佐辛和芬太尼联合应用在骨科手术后自控静脉镇痛的疗效观察[J]. *中国医药导刊*, 2012, 14(6): 1038-1039.

[12] 新良, 曾因明, 陈伯玺. 现代麻醉学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 24.

[13] 夏明, 商立军. 术后恶心呕吐的发病因素及其预防[J]. *国外医学: 麻醉学与复苏分册*, 2001, 22(4): 220-223.

[14] 段砺瑕, 李晓玲. 地佐辛注射液的药理作用及临床应用[J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(9): 851-852.

[15] 刘俊, 徐越峰. 地佐辛应用于瑞芬太尼静脉麻醉术后痛觉过敏观察[J]. *中国医疗前沿*, 2009, 4(24): 15-16.

(收稿日期: 2014-08-24 修回日期: 2014-10-25)

(上接第 188 页)

Colorectal Cancer, 2011, 10(1): 8-23.

[6] Worm J, Aggerholm A, Guldberg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(7): 1183-1189.

[7] Liu W, Guan M, Su B, et al. Rapid determination of AKAP12 promoter methylation levels in peripheral blood using methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) analysis: application in colorectal cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(13/14): 940-946.

[8] Balic M, Pichler M, Strutz J, et al. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis[J]. *J Mol Diagn*, 2009, 11(2): 102-108.

[9] Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(6): 857-859.

[10] Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(2): 219-240.

[11] van Dam L, Kuipers EJ, van Leerdam ME. Performance improvements of stool-based screening tests [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24(4): 479-492.

[12] Ned RM, Melillo S, Marrone M. Fecal DNA testing for Colorectal Cancer Screening, the ColoSure™ test [J]. *PLoS Curr*, 2011, 3: RRN1220.

[13] Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, et al. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia[J]. *Ann Intern Med*, 2008, 149(7): 441-450, W81.

[14] Young GP, Bosch LJ. Fecal Tests: From Blood to Molecular Markers[J]. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2011, 7(1): 62-70.

[15] Mikeska T, Bock C, Do H, et al. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012, 12(5): 473-487.

[16] Cummings LC, Cooper GS. Colorectal cancer screening: update for 2011[J]. *Semin Oncol*, 2011, 38(4): 483-489.

[17] Osborn NK, Ahlquist DA. Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(1): 192-206.

[18] Risio M. The natural history of colorectal adenomas and early cancer[J]. *Pathologie*, 2012, 33 Suppl 2: 206-210.

[19] Ulirsch J, Fan C, Knafl G, et al. Vimentin DNA methylation predicts survival in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(2): 383-396.

[20] Moinova H, Leidner RS, Ravi L, et al. Aberrant vimentin methylation is characteristic of upper gastrointestinal pathologies[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21(4): 594-600.

(收稿日期: 2014-08-30 修回日期: 2014-10-22)