

10株人癌细胞基因组的微卫星不稳定性特征

石中正^{1,2}, 刘燕¹, 罗敏¹, 陈英杰², 周轶平¹(¹昆明医科大学药学院暨省天然药物药理重点实验室, 云南省昆明市 650500; ²昆明医科大学基础医学院, 云南省昆明市 650500)

文章亮点:

人类基因组中, 微卫星的数量庞大, 且具有多态性, 要确定肿瘤细胞株微卫星的稳定性情况, 需要与癌旁正常组织对照, 而目前已无法找到肿瘤细胞株建系时的癌旁正常组织。实验利用文献报道的5个几近单态性的微卫星位点, 以正常细胞株为对照, 克服了这一难题, 测试了10株肿瘤细胞株的微卫星不稳定性情况, 很多细胞株微卫星不稳定性情况属于首次报道, 具有较强的创新性。

关键词:

组织构建; 组织工程; 人癌组织细胞; 微卫星不稳定性; 几近单态性位点; 银染

主题词:

癌; 细胞系; 肿瘤; 微卫星不稳定性

基金资助:

云南省应用基础研究计划项目(2011FZ098, 2014FB011); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(2014FB011); 云南省教育厅科学研究基金项目(2014Z060); 云南省天然药物药理重点实验室开放研究基金项目(2013G011, 2013G012)

摘要

背景: 为了解实验室常用人癌细胞的微卫星不稳定性情况。

目的: 从基因组微卫星水平分析各组织来源人癌细胞株的遗传背景差异。

方法: 取10株指数生长期的人白血病、结肠癌、胃癌、肝癌、肺癌、宫颈癌、膀胱癌细胞及2株人正常细胞(人脐静脉内皮细胞、人皮肤成纤维细胞), 提取细胞DNA, 对BAT-25, BAT-26, CAT-25, NR-24, SEC-63五个几近单态性的微卫星位点进行PCR扩增, 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳-银染法对产物进行检测, 同时用ABI 3720XL自动测序仪测序。

结果与结论: 人脐静脉内皮细胞、人皮肤成纤维细胞的5个微卫星位点扩增片段长度具有一致性及稳定性, 可作为正常对照。人结肠癌细胞、人膀胱癌细胞在BAT-25、BAT-26、CAT-25或NR-24位点扩增片段长度均较人脐静脉内皮细胞及人皮肤成纤维细胞缩短, 缩短产度为7-13 bp, 属于微卫星高度不稳定细胞。其他细胞在5个位点扩增片段的长度与人脐静脉内皮细胞、人皮肤成纤维细胞一致, 属于微卫星稳定细胞。实验结果揭示了受试人癌细胞基因组微卫星不稳定性水平, 为未来选择合适的细胞株进行药物活性筛选等试验奠定了基础。

石中正, 刘燕, 罗敏, 陈英杰, 周轶平. 10株人癌细胞基因组的微卫星不稳定性特征[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(7):1052-1056.

Microsatellite instability of 10 human cancer cell lines

Shi Zhong-zheng^{1,2}, Liu Yan¹, Luo Min¹, Chen Ying-jie², Zhou Yi-ping¹(¹Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, College of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China; ²College of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: We aim to understand microsatellite instability in various human cancer cells.

OBJECTIVE: To analyze the difference in genotypic background of various tissue-derived human cancer cells based on microsatellite instability.

METHODS: Ten human cancer cell lines at exponential phase were cultured, including human leukemia cells, colon cancer cells, stomach cancer cells, liver cancer cells, lung cancer cells, cervical cancer cells, bladder cancer cells, and two normal human cell lines (human umbilical vein endothelial cells and human skin fibroblasts), and their microsatellite stability statuses were detected by five quasi-monomorphic markers: BAT-25, BAT-26, CAT-25, SEC-63, NR-24. DNA of 10 human cancer cell lines, human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts was extracted and amplified by PCR. PCR products were detected by 12% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)-silver staining and sequenced by ABI 3720XL automatic sequencer.

RESULTS AND CONCLUSION: For all the five microsatellite markers detected, the length of their PCR amplified fragments was nearly identical in human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts, demonstrating their quasi-monomorphic nature. When compared with human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts, amplified fragments in human colon cancer cells (HCT-116) and human bladder cancer cells (BIU-87)

石中正, 男, 1986年生, 黑龙江省牡丹江市人, 汉族, 2014年昆明医科大学毕业, 硕士, 主要从事肿瘤药理研究。

并列第一作者: 刘燕, 女, 1988年生, 吉林省长春市人, 汉族, 2014年昆明医科大学毕业, 硕士, 主要从事肿瘤药理学研究。

并列第一作者: 罗敏, 女, 1977年生, 云南省昆明市人, 汉族, 2007年昆明医科大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤药理学研究。

通讯作者: 周轶平, 博士, 副教授, 昆明医科大学药学院暨省天然药物药理重点实验室, 云南省昆明市 650500

并列通讯作者: 陈英杰, 硕士, 教授, 昆明医科大学基础医学院, 云南省昆明市 650500

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.07.013
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2015)07-01052-05
稿件接受: 2014-11-17

Shi Zhong-zheng, Master, Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, College of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China; College of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China

Liu Yan, Master, Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, College of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China

Shi Zhong-zheng and Liu Yan contributed equally to this work.

Corresponding author: Zhou Yi-ping, M.D., Associate professor, Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, College of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China

Corresponding author: Chen Ying-jie, Master, Professor, College of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan Province, China

Accepted: 2014-11-17

were shortened for 7–13 bp at BAT-25, BAT-26, CAT-25 or NR-24, respectively. No obvious differences were found at all the five loci in other cells. According to the results, HCT-116 cells and BIU-87 were considered as cells with high-level microsatellite instability. Other cell lines exhibited microsatellite stability at five loci, and they were considered as microsatellite stable cells. Our study revealed status of genome instability in 10 human cancer cell lines, providing references for appropriate cell line selecting in future drug screening and basic medical research.

Subject headings: Carcinoma; Cell Line, Tumor; Microsatellite Instability

Funding: the Applied Basic Research Plan of Yunnan Province, No. 2011FZ098, 2014FB011; the Special Fund for the Basic Application Research of Yunnan Provincial Science and Technology Department & Kunming Medical University, No. 2014FB011; the Scientific Research Foundation of Yunnan Provincial Education Department, No. 2014Z060; the Open Research Foundation of Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, No. 2013G011, 2013G012

Shi ZZ, Liu Y, Luo M, Chen YJ, Zhou YP. Microsatellite instability of 10 human cancer cell lines. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(7):1052-1056.

0 引言 Introduction

肿瘤细胞区别于正常细胞的一个重要特点就是基因组不稳定,即肿瘤细胞处于高于正常情况下积累的稳定性突变状态^[1-2]。基因组不稳定性是癌变过程的早期阶段,而癌症则是基因组不稳定性延续的表现。微卫星(microsatellite, MS)又称短串联重复序列、简单重复序列,微卫星序列定位于基因的启动子、基因编码区、内含子及其与外显子交界区,与许多重要基因紧密连锁。微卫星通常由1–6个核苷酸组成,具有高度多态性,广泛存在于真核生物基因组中,约占真核基因组的5%。以二核苷酸重复序列即(CA或GT)_n最为常见,n为重复次数,通常为15–60次^[3-4]。微卫星DNA具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、呈孟德尔共显性遗传等特点,是目前最常用的遗传标记之一。目前国际上已广泛利用微卫星DNA的多态性进行各项研究和应用。如亲子鉴定、个体鉴定、遗传多样性分析、系统进化学研究以及功能定位等^[5-9]。

微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)是指肿瘤组织与其相应非肿瘤组织相比,微卫星重复单元的增加和丢失。微卫星不稳定性是肿瘤基因组不稳定性的重要标志。从基因水平看,微卫星做为基因变异和重排的来源,可能在肿瘤基因调控中起重要作用^[10-12]。

微卫星不稳定性是人类错配修复基因失活导致基因组不稳定的重要表现形式,为参与肿瘤形成分子通路之一。

目前认为,产生微卫星不稳定性的主要原因是错配修复功能缺陷^[13-15]。微卫星不稳定性通过DNA的复制和细胞分裂而被保存在基因组中,增加了其他基因的不稳定性,进而出现整个基因组的不稳定性,最终细胞的自发突变频率增高,导致细胞增生及分化异常,从而促进肿瘤的发生。研究表明,微卫

星稳定与否与肿瘤的预后及对化疗药物的敏感程度有关系^[16-20]。

近年发现的人类错配修复基因启动子区高度甲基化,引起微卫星不稳定,使癌基因、抑癌基因的突变积累,导致癌基因激活和抑癌基因失活,最终引起细胞恶变,肿瘤形成。人类错配修复基因启动子CpG岛甲基化是人类错配修复基因失活的重要机制,而人类错配修复基因的表达失活可导致微卫星不稳定性的产生,促进癌症的发生。在高微卫星不稳定性肺癌组织中90%人类错配修复基因高度抑制(即甲基化),且与低频微卫星不稳定性组和微卫星稳定组相比有显著差异^[21-23]。

从基因组微卫星水平了解人肿瘤细胞株的遗传背景差异,是用它们进行药物活性筛选等试验不可缺少的一个环节。微卫星不稳定性有望成为一种癌症基因筛查工具,区分特殊类型肿瘤,也有望成为预后的独立预测因子。检测微卫星不稳定性有可能成为癌症鉴别诊断、评价预后、指导化疗的分子标志物之一^[24-26]。

由于人类基因组中,微卫星的数量庞大,且具有多态性,研究肿瘤微卫星的稳定性难度较大,且需要与癌旁正常组织进行比较。体外抗肿瘤活性筛选中常用的肿瘤细胞株已无法找到其来源的癌旁正常组织,因此各组织来源的肿瘤细胞株微卫星的稳定性鲜见报道。本研究选取BAT-25, BAT-26, CAT-25, NR-24, SEC-63, 5个微卫星位点,测定10株人癌细胞在5个位点微卫星的序列。由于5个位点是几近单态性的,无需与癌旁正常组织对比,只需与人正常细胞相比较即可确定各株细胞的微卫星不稳定性水平。研究结果从基因组微卫星水平阐明了各组织来源人癌细胞株的遗传背景差异,为未来选择合适的细胞株进行药物活性筛选等试验提供了依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2013年5至12月在昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室完成。

材料:

10株人癌细胞基因组微卫星不稳定性实验所用细胞、试剂及仪器:

细胞、试剂及仪器	来源
人白血病细胞(K562)、人结肠癌细胞(HCT-116)、人胃癌细胞(SGC-7901)、人肝癌细胞(HepG2)、人肺癌细胞(A549、GLC-82、NCI-H446)、人宫颈癌细胞(Hela)、人膀胱癌细胞(EJ、BIU-87)、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人皮肤成纤维细胞(HDF)	昆明医科大学 云南省天然药物 药理重点实验室
DNA提取试剂盒(DP090430)、PCR扩增试剂盒(PR110413)	北京天根公司
引物	由天根公司合成
核酸蛋白检测仪(BDTND-1000)、基础电泳仪(PowerPac Basic, BIO-RAD)、化学发光凝胶成像仪(Fluorchem, Proteinsimple)、ABI 3730XL自动测序仪	美国

实验方法:

细胞培养: 人白血病细胞(K562)、人结肠癌细胞(HCT-116)、人胃癌细胞(SGC-7901)、人肝癌细胞(HepG2)、人肺癌细胞(A549、GLC-82、NCI-H446)、人宫颈癌细胞(Hela)、人膀胱癌细胞(EJ、BIU-87)及人皮肤成纤维细胞、人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 用含体积分数10%血清的RPMI-1640培养基培养。

细胞DNA的提取: 采用吸附柱法提取细胞中DNA, 并用核酸蛋白检测仪器定量。

PCR扩增特定位点DNA片段: BAT-25、BAT-26、CAT-25、NR-24、SEC-63 五个位点引物序列来自于文献报道^[27-29], 见表1。向每组样品中分别加入PCR试剂盒中各反应体系及特定位点引物。反应步骤: 95 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 54 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 72 °C最后延伸10 min, 循环30次。

聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)及银染法检测微卫星位点PCR扩增后产物: 用30%丙烯酰胺母液及10%过硫酸铵(APS)配制12%聚丙烯酰胺凝胶, 各样品上样3 μL后, 于垂直电泳槽中, 150 V电压持续电泳2 h。用乙醇、冰乙酸配制成固定液, 0.25%硝酸银溶液为染色液及3%氢氧化钠, 0.2%甲醛配制的显色液进行银染显色反应。并用凝胶化学发光成像仪照相、分析。

ABI 3730XL自动测序仪对PCR扩增产物进行测序: 基于sanger法, 4种双脱氧核苷酸(ddNTP)的碱基分别用不同的荧光进行标记, ABI 3730XL自动测序仪对待测样品进行毛细管电泳, 通过毛细管时, 不同长度的DNA片段上的4种荧光基团被激光激发, 发出不同颜色的荧光, 被CCD检测系统识别, 并直接翻译成DNA序列。

主要观察指标: 人脐静脉内皮细胞、人皮肤成纤维细胞和10株人癌细胞在5个微卫星位点的扩增片段长度。

表1 五个微卫星位点引物序列

Table 1 Primer sequences of five microsatellite loci

微卫星位点	引物
BAT-25	Forward: 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3' Reverse: 5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'
BAT-26	Forward: 5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3' Reverse: 5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'
CAT-25	Forward: 5'-CCT AGA AAC CTT TAT CCC TGC TT-3' Reverse: 5'-GAG CTT GCA GTG AGC TGA GA-3'
NR-24	Forward: 5'-GCT GAA TTT TAC CTC CTG AC-3' Reverse: 5'-ATT GTG CCA TTG CAT TCC AA-3'
SEC-63	Forward: 5'-AGT AAA GCA CCC AAG AAA ACT GC-3' Reverse: 5'-TGC TTT TGT TTC TGT TGC TTT G-3'

2 结果 Results

2.1 人脐静脉内皮细胞和人皮肤成纤维细胞5个微卫星位点长度 人脐静脉内皮细胞和人皮肤成纤维细胞在5个位点上的PCR产物长度均一致。经测序仪测序, 该2株细胞的扩增序列长度相差在1 bp以内, 见表2。说明人皮肤成纤维细胞, 人脐静脉内皮细胞的5个微卫星位点长度具有一致性及稳定性, 可作为正常对照(图1)。

2.2 各株细胞的微卫星不稳定性分析 以人脐静脉内皮细胞, 人皮肤成纤维细胞为正常对照, 人结肠癌细胞HCT-116在BAT-25、BAT-26、CAT-25、NR-24位点扩增片段长度较人脐静脉内皮细胞及人皮肤成纤维细胞均缩短(图1A-D), 表2的测序结果显示缩短产度为7-13 bp, 说明HCT-116在这4个位点上显现微卫星不稳定性, 属于微卫星高不稳定性细胞。而在SEC-63位点, HCT-116扩增片段长度与人脐静脉内皮细胞、人皮肤成纤维细胞持平(图1E), 片段长度仅差1 bp(表2), 说明HCT-116在该微卫星位点稳定。人膀胱癌细胞BIU-87在BAT-25、BAT-26、CAT-25位点扩增片段长度均较人脐静脉内皮细胞及人皮肤成纤维细胞缩短(图1A-C), 缩短长度为8-13 bp(表2), 表现为微卫星不稳定, 属于微卫星高不稳定性细胞。在NR-24、SEC-63位点, BIU-87扩增片段长度与人脐静脉内皮细胞、人皮肤成纤维细胞持平(图1D-E), 片段长度相似(表2), 显现微卫星稳定性。

以人皮肤成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞为正常对照, K562、SGC-7901、HepG2、A549、GLC-82、NCI-H446、Hela、EJ细胞在5个微卫星位点无扩增片段长度变化(图1), 片段长度差异在2 bp以内(测序结果略), 显现微卫星稳定性。

3 讨论 Discussion

人类基因组携带至少10万个微卫星, 约有15 000个标志物覆盖人类所有的染色体, 并且具有高度的多态性。1996年国际上拟定了一个通过对比癌和癌旁正常组织微卫星的情况, 判定结直肠癌微卫星不稳定性的标准^[30]。该标准使用单核苷酸位点: BAT-25(原癌基因c-kit内含子区的微卫星位点)和BAT-26(hMSH2第5个内含子区域的单腺苷酸重复片段)及二核苷酸位点:D5S346、D2S123、D17S250为标志位点检测微卫星不稳定性。其中BAT-25和BAT-26

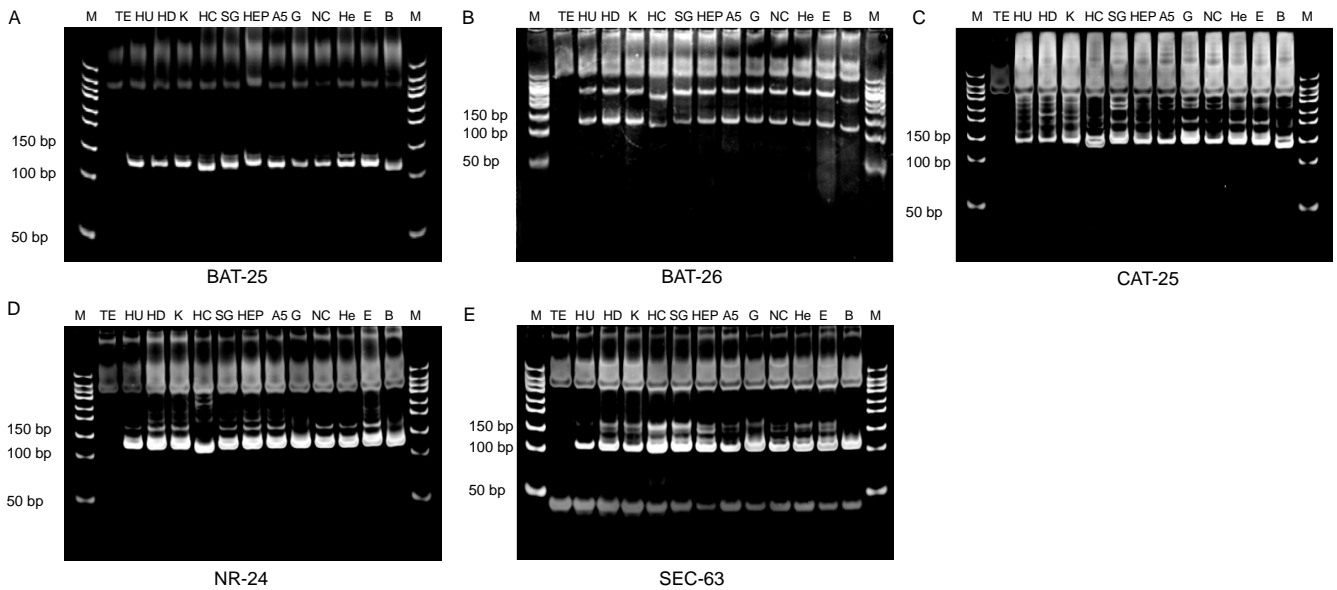


图 1 BAT-25、BAT-26、CAT-25、NR-24、SEC-63 五个微卫星位点 PCR 扩增后产物分析

Figure 1 PCR product analysis at BAT-25, BAT-26, CAT-25, SEC-63, NR-24

图注: M: Marker; TE: 电泳缓冲液; HU: 人脐静脉内皮细胞; HD: 人皮肤成纤维细胞; K: 人白血病细胞; HC: 人结肠癌细胞; SG: 人胃癌细胞; HEP: 人肝癌细胞; A5: 人肺癌细胞; G: 人肺癌细胞; NC: 人肺癌细胞; He: 人宫颈癌细胞; E: 人膀胱癌细胞; B: 人膀胱癌细胞。人脐静脉内皮细胞和人皮肤成纤维细胞在 5 个位点上的 PCR 产物长度均一致

表 2 ABI 3730XL 自动测序仪检测 PCR 扩增产物长度

Table 2 PCR product length sequenced by ABI 3720XL automatic sequencer

细胞	BAT-25	BAT-26	CAT-25	NR-24	SEC-63
人脐静脉内皮细胞	116 bp	114 bp	132 bp	120 bp	99 bp
人皮肤成纤维细胞	116 bp	113 bp	132 bp	119 bp	99 bp
人结肠癌细胞	109 bp	101 bp	125 bp	110 bp	98 bp
人膀胱癌细胞	108 bp	100 bp	126 bp	121 bp	99 bp

表注: 人脐静脉内皮细胞和人皮肤成纤维细胞在 5 个位点上的 PCR 产物长度几近一致。

是单核苷酸重复序列, 研究显示它们在人体细胞中保守性好, 属于几近单态性(quasimonomorphic)的标志^[31-32]。用它们检测微卫星的不稳定性避免了必须用同源(来自同一个体)的正常组织细胞为对照的必要性, 可以用人正常细胞做对照, 使得直接应用肿瘤细胞株研究微卫星不稳定性成为可能。CAT-25(位于 caspase 2 基因的 3' 非翻译区)、NR-24(锌指蛋白 2)和 SEC-63(编码内质网膜的蛋白质)是继 BAT-25 和 BAT-26 之后, 被推荐用于检测微卫星不稳定性的高敏感单态性位点^[33], BAT-25、BAT-26 合并 CAT-25、NR-24、SEC-63 可以准确而全面地检出癌细胞的微卫星稳定状态, 准确率在 99% 以上^[34]。

本实验中, 2 株人正常细胞株: 人皮肤成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞, 在上述 5 个位点扩增产物几乎保持一致(扩增片段长度差异在 1 bp 以内), 佐证了这 5 个位点确为几近单态性的微卫星位点。同时, 研究通过比较 10 株人癌细胞在上述 5 个几近单态性微卫星位点 DNA 序列与 2 株人正常细胞的差异, 测定出 10 株肿瘤细胞的微卫星稳定状态。微卫星位点有 ≥ 2 个位点出现不稳定, 定义为高频微卫星不稳定性 (high-frequent MSI, MSI-H), 1 个位点出现不稳定, 定义为

低频微卫星不稳定性 (low-frequent MSI, MSI-L), 无位点不稳定时判定为微卫星稳定 (microsatellite stability, MSS)。

从结果可以看出, 人结肠癌细胞 HCT-116, 在 5 个位点均表现出微卫星不稳定性, 属于微卫星高度不稳定 (MSI-H) 细胞; 人膀胱癌细胞 BIU-87, 在 BAT-25、BAT-26 和 CAT-25 三个位点表现出微卫星不稳定性, 也属于微卫星高度不稳定 (MSI-H) 细胞; K562、SGC-7901、HepG2、A549、GLC-82、NCI-H446、Hela、EJ 细胞在 5 个位点均表现出微卫星稳定性, 属于微卫星稳定 (MSS) 细胞。人结肠癌细胞与人膀胱癌细胞在 BAT-25、BAT-26 和 CAT-25 三个位点均表现出不稳定性, 说明 BAT-25、BAT-26 和 CAT-25 是比 NR-24 及 SEC-63 更为敏感的测定微卫星不稳定性的位点。人结肠癌细胞是高频微卫星不稳定性细胞, 已有文献报道^[35-36], 本研究结果与其一致。

本实验发现人膀胱癌细胞 BIU-87 也是一株微卫星高不稳定的细胞, 这与临床发现微卫星不稳定性多发于大肠癌、膀胱癌、子宫内膜癌的报道吻合^[7, 26]。值得一提的是, 同为膀胱癌的 EJ 细胞却在所测定的 5 个位点表现出微卫星稳定性, 说明微卫星不稳定性不仅与肿瘤发生的器官来源有关, 还与个体的遗传背景有关, 同种器官来源的肿瘤细胞株之间存在着明显的遗传差异。这种差异值得在选用人癌细胞作为实验对象时加以考虑, 同时, 值得对产生这种差异的原因及后果进行进一步的研究。

作者贡献: 周轶平、陈英杰进行实验设计, 实验实施为石中正、刘燕、罗敏, 实验评估为陈英杰, 石中正, 周轶平成文, 陈英杰审校, 周轶平、陈英杰对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 微卫星 (microsatellite, MS) - 又称短串联重复序列、简单重复序列, 微卫星序列定位于基因的启动子、基因编码区、内含子及其与外显子交界区, 与许多重要基因紧密连锁。通常由 1-6 个核苷酸组成, 具有高度多态性, 广泛存在于真核生物基因组中, 约占真核基因组的 5%。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Schmutte C, Fishel R. Genomic instability: First step to carcinogenesis. *Anticancer Res.* 1999;19:4665-4696.
- [2] Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med.* 2003; 3:589-596.
- [3] 周尊强, 赵金鹏. 微卫星不稳定性与恶性肿瘤[J]. 国际遗传性杂志, 2006, 29(1): 74-76.
- [4] 卿海燕, 刘冰. 肿瘤微卫星异常改变的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(6): 422-425.
- [5] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research.* 1989;17(16):6463-6467.
- [6] Padar Z, Egyed B, Kontadakis K, et al. Canine STR analyses in forensic practice. Observation of a possible mutation in a dog hair. *J Legal Med.* 2002;116(5):286-288.
- [7] Gadducci A, Cosio S, Gneazzani AR, et al. Tissue and serum biomarkers as prognostic variables in endometrioid-type endometrial cancer. *Oncol Hematol.* 2011;80(2):181-192.
- [8] Irion DN, Schaffer AL, Famula TR, et al. Analysis of Genetic Variation in 28 Dog Breed Populations With 100 Microsatellite Markers. *J Hered.* 2003;94(1):81-87.
- [9] Parker HG, Kim LV, Sutter NB, et al. Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science.* 2004;304(4):1161-1164.
- [10] Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010; 7(3): 153-162.
- [11] 姚旭, 孟令勤, 刘源, 等. 胆管癌中微卫星不稳定的变化[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(8): 1646-1647.
- [12] Cervantes A, Rodriguez Braun E, Pérez Fidalgo A, et al. Molecular biology of gastric cancer. *Clin Transl Oncol.* 2007; 9(2):208-215.
- [13] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in human cancers. *Nature.* 1998;396(2):643-649.
- [14] Vaish M, Mittal B. DNA mismatch repair, microsatellite instability and cancer. *Indian J Exp Biol.* 2002;40(5):989-994.
- [15] Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):3073-2087.
- [16] Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(3):220-228.
- [17] Kaur G, Masoud A, Raihan N, et al. Mismatch repair genes expression defects & association with clinicopathological characteristics in colorectal carcinoma. *Indian J Med Res.* 2011;134(2):186-192.
- [18] Woerner SM, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, et al. Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors. *Cancer Biomark.* 2006; 2(1):69-86.
- [19] Yuji Takahashi, Kazuya Kondol, Toshiyuki Hirose, et al. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Mol Carcinogenesis.* 2005;42(3):150-158.
- [20] 秦丹卿, 孟祥宁, 白静, 等. DNA错配修复与肿瘤的发生及治疗[J]. 国际遗传学杂志, 2011, 34(6): 294-299.
- [21] Gay LJ, Arends MJ, Mitrou PN, et al. MLH1 promoter methylation, diet, and lifestyle factors in mismatch repair deficient colorectal cancer patients from EPIC-Norfolk. *Nutr Cancer.* 2011;63(7): 1000-1010.
- [22] 闻旭阳, 戴广海. hMLH1基因启动子CpG岛甲基化, 微卫星不稳定与胃癌[J]. 中国医药导报, 2011, 8(7): 9-10.
- [23] LING Zhi-qiang, LI Pei, GE Ming-hua, et al. Aberrant methylation of different DNA repair genes demonstrates distinct prognostic value for esophageal cancer. *Digest Dis & Sci.* 2011;56(10):2992-3004.
- [24] Dietmaier W. Microsatellite instability. A new predictive marker. *Pathologe.* 2010;31(2):268-273.
- [25] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(20):3219-3226.
- [26] Cristina Bilbao, Pedro Carlos Lara, et al. Microsatellite instability predicts clinical outcome in radiation-treated endometrioid endometrial cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(1):9-13.
- [27] Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer.* 2001;93(1):12-19.
- [28] Buhard O, Suraweera N, Lectard A, et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers.* 2004; 200(4-5):251-257.
- [29] Bianchi F, Galizia E, Catalani R, et al. CAT25 is a mononucleotide marker to identify HNPCC patients. *J Mol Diagn.* 2009;11(3):248-252.
- [30] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(4): 5248-5257.
- [31] Zhou XP, Hoang JM, Cottu P, et al. Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene.* 1997;15 (3): 713-1718.
- [32] Suraweera N, Iacopetta B, Duval A, et al. Conservation of mononucleotide repeats within 3' and 5' untranslated regions and their instability in MSI-H colorectal cancer. *Oncogene.* 2001;20(7):7472-7477.
- [33] Deschoolmeester V, Baay M, Wuyts W, et al. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. *J Mol Diagn.* 2008;10(2):154-159.
- [34] Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, et al. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res.* 1997;57(2):300-303.
- [35] Gayet J, Zhou XP, Duval A, et al. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene.* 2001;20(5):5025-5032.
- [36] Ionov Y, Matsui SI, Cowell JK. A role for p300/CREB binding protein genes in promoting cancer progression in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *PNAS.* 2004; 101(5):1273-1278.