文章编号:1000-5404(2008)04-0299-04

论著

# 乳腺癌细胞中 PNRC 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态的研究

张 艳,陈 彬,李渝萍,陈 健,陈 敏,娄桂予,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

**摘 要:目的** 研究乳腺癌细胞中富含脯氨酸核受体辅活化子(proline-rich nuclear receptor coactivator protein, PNRC)基因启动子 CpG 岛的甲基化状态及在 PNRC 转录调节中的作用。**方法** 应用 PT-PCR 检测 PNRC 基因在正常乳腺细胞与乳腺癌细胞中的表达情况,并运用"MethPrimer"软件对 PNRC 启动子区进行分析,预测 CpG 岛,通过甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 检测 PNRC 启动子区 CpG 岛的甲基化状况;PT-PCR 及 Northern 杂交检测乳腺癌细胞经甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2′-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine,5-Aza-dc)作用后,PNRC 基因 mRNA 的表达情况;Western blot 检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC 蛋白表达的影响;将含 PNRC 启动子序列的报告质粒转染乳腺癌细胞,再经 5-Aza-dc 处理后,检测 PNRC 基因启动子的活性。**结果** PNRC 基因在乳腺癌细胞中的表达较正常乳腺细胞明显降低;乳腺癌细胞 PNRC 基因启动子区存在 CpG 岛甲基化;乳腺癌细胞经 5-Aza-dc 处理后,PNRC 基因 mRNA 及蛋白表达水平显著增加,其 PNRC 基因启动子的活性也明显增强。**结论** PNRC 基因启动子区的高甲基化导致 PNRC 在乳腺癌细胞中表达降低。

**关键词**: PNRC;DNA 甲基化;MSP;5-氮杂-2′-脱氧胞苷

**中图法分类号**: R394.3;R730.23;R737.9 **文献标识码**: A

# On CpG island methylation status of PNRC gene in breast cancer cells

ZHANG Yan, CHEN Bin, LI Yu-ping, CHEN Jian, CHEN Min, LOU Gui-yu, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To detect hypermethylation status of the CpG island locating in the promoter region of PNRC gene and the regulation of hypermethylation on expression of PNRC gene in breast cancer cells. **Methods** The expression of PNRC gene in normal mammary gland cell and breast cancer cell line was analyzed by RT-PCR. After prediction of CpG island in promoter of PNRC gene using "MethPrimer" software, the status of methylation of CpG island in promoter of PNRC gene was analyzed using methylation-specific PCR (MSP). The expressions of mRNA and protein of PNRC were analyzed by RT-PCR, Northern hybridization and Western blot after treatment with methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc). MCF-7 cells transfected with the luciferase report plasmid that contains the promoter sequence of PNRC were treated with 5-Aza-dc and the promoter activity of PNRC was detected by luciferase assay. **Results** The expression level of PNRC gene in breast cancer cells was much lower than that in normal mammary gland cells, MCF-10A. The CpG island in promoter of PNRC was found to be methylated only in breast cancer MCF-7 cells but not in normal breast MCF-10A cells. In addition, the levels of mRNA and protein of PNRC in MCF-7 cells were increased dramatically in response to the treatment of 5-Aza-dc. The promoter activity of PNRC in MCF-7 cells was found to be elevated upon the treatment of 5-Aza-dc. **Conclusion** The hypermethylation of CpG island in promoter of PNRC is probably responsible for low PNRC expression in breast cancer cells.

**Key words**: PNRC; DNA methylation; methylation-specific PCR; 5-aza-2'-deoxycytidine

富含脯氨酸核受体辅活化子(proline-rich nuclear receptor coactivator protein, PNRC)是新近克隆和鉴定的核受体辅活化子,是以类固醇生成因子 1(SF1)作诱饵,利用酵母双杂合系统从人乳腺 cDNA 表达文库中筛选得到的[1]。PNRC 除了作为核受体的辅活化子外[2],还通过其 N 端与 C 端的两个富含脯氨酸的 SH3

**基金项目**:国家自然科学基金(30671056)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671056)
**作者简介**:张 艳,女,重庆市人,博士研究生,主要从事核受体基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752940,E-mail: tmmubiozy@yahoo.com.cn
**通信作者**:周度金,电话:(023)68752940,E-mail: dujinzhou@yahoo.com
**收稿日期**:2007-05-16;**修回日期**:2007-09-05

结合模体,竞争性抑制 Ras 蛋白的激活,从而调节 Ras-MAPK 信号转导途径,抑制癌细胞的过度增殖[3]。已有研究表明 PNRC 的转录抑制与消化系统肿瘤及乳腺癌的发生、发展相关[3,4]。最近的研究表明,PNRC 在肿瘤组织中表达低下与其启动子区域甲基化有关[4]。为此,我们在克隆并分析了 PNRC 基因的5′侧翼区,鉴定了 PNRC 启动子活性区域的基础上[5],通过甲基化特异性 PCR(MSP)分析 PNRC 启动子区 CpG 岛在正常乳腺细胞与乳腺癌细胞中的甲基化状态,并应用特异性甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2′-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine,5-Aza-dc)干预,观察 PNRC 基因的 mRNA 转录、蛋白表达及启动子活性的改变,进一步探讨 PNRC 的转录抑制在乳腺癌的发生、发展中的机制,寻找乳腺癌治疗的新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

MCF-7、MCF-10A、HepG2 细胞株均由本室保存。细胞于含 10% FBS 的 DMEM 培养基(含 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素)中,置于5 % $CO_2$、37 ℃恒温恒湿培养,胰酶消化传代,每 1 ~2 天更换培养基。

### 1.2 主要试剂

Trizol reagent (Invitrogen 公司), AMV Reverse Transcriptase、Hotstart *Taq* 酶(Qiagen 公司),EZ DNA Methylation Kit (Zymo 公司),5-氮杂-2′-脱氧胞苷、蛋白酶 K(Sigma 公司),兔抗人 PNRC 抗血清(美国 Beckman 癌症研究所惠赠),抗人 β-actin(Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(北京中杉公司),化学发光显色剂(Pierce 公司),荧光素酶检测试剂盒(Promega 公司),转染试剂 Lipofectiamine 2000 (Invitrogen 公司),细胞培养液、FBS(Gibco 公司), PCR 引物(上海生工公司),其他试剂为国产分析纯。

### 1.3 RT-PCR 检测 PNRC 在 MCF10A 与 MCE-7 中的表达

按 Trizol reagent 说明书提取 MCF10A 与 MCF-7 的总 RNA,行 RT-PCR,其引物序列如下:PNRC:正义:5′-CCGCCACCCTATCTTCACTGG-3′,反义:5′-CCGCCCTCCAGACTCGGCC-3′;β-actin(内参):正义:5′-AGGAGCACCCCGTGCTGCTGA-3′,反义:5′-CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3′。

两步法 RT-PCR:①逆转录反应:2 μg 的 RNA 模板,70 ℃变性 10 min 后合成 cDNA:5 × AMV buffer 10 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μl, Random primer (50 ng/μl ) 1 μl, 核糖核酸酶抑制剂(RNasin) 0.5 μl, AMV 反义转录酶(20 U/μl) 1 μl, DEPC 处理水至 50 μl, 混匀后 25 ℃ 10 min , 42 ℃ 60 min, 70 ℃ 15 min 进行逆转录。②PCR 反应:反应体积 25 μl: cDNA 2 μl , 10 × buffer 2.5 μl , dNTP (2.5 mmol/L) 2 μl, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl , Hotstart *Taq* 酶 1 μl, 去离子水补至25 μl。β-actin 作为内参。PCR 反应条件:95 ℃变性15 min;94 ℃ 30 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环;72 ℃ 7 min。PCR 产物经2% 琼脂糖凝胶电泳,用 Bio-Rad 凝胶图像成像仪观察结果。

### 1.4 PNRC 启动子区 CpG 岛在 MCF10A 与 MCF-7 中的甲基化状态的分析

1.4.1 PNRC 启动子区 CpG 岛的预测 运用引物设计程序"MethPrimer"(http://www.urogene.org/methprimer/),对 PNRC 5′侧翼区的2.1 kb 序列进行分析,预测 CpG 岛并根据其序列设计甲基化特异性 PCR 引物。

1.4.2 甲基化特异性 PCR(MSP) ①用异丙醇沉淀法[6]提取 MCF10A 、MCF-7 细胞 DNA,并用紫外分光光度仪定量。②DNA 亚硫酸氢钠修饰和回收纯化,按 Zymo DNA CpG 岛甲基化修饰试剂盒说明进行。其简要步骤为:取 1 μg 基因组 DNA 变性(3 mol/L NaOH,37 ℃,孵育 15 min),再硫化(3.12 mol/L 亚硫酸氢钠及 5 mmol/L 氢醌,55 ℃,孵育 16 h),然后脱盐、脱硫、乙醇沉淀回收 DNA。③PCR 检测 PNRC 启动子甲基化状态[7],甲基化引物(M):正义:5′-GTTGGTTGTTTGTGTGTGTTTATTC-3′,反义:5′-CCCAACTCCGAATATTATTATCG-3′;非甲基化扩增引物(U):正义:5′-GTTGGTTGTTTGTGTGTGTTTATTT-3′,反义:5′-ACCCCAACTCCAAATATTATTATCA-3′。PCR 反应条件:95 ℃变性 15 min;94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环; 72 ℃ 7 min。PCR 产物经2% 琼脂糖凝胶电泳,用 Bio-Rad 凝胶图像成像仪观察结果。

1.4.3 直接测序分析 MSP 产物的甲基化状态 将 MSP 扩增得到的产物,按 Omega 公司 DNA 凝胶回收试剂盒说明,进行纯化回收, 连接至 TA 载体上,然后转化大肠杆菌 DH5α,经酶切筛选阳性克隆, 然后送上海英骏公司进行序列测定。

### 1.5 5-Aza-dc 干预对 PNRC 启动子甲基化的影响

1.5.1 RT-PCR 检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC mRNA 表达的影响 将 MCF-7 接种于6 孔板,培养 24 h 后,分别用 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24、72、120 h,收集细胞,按 1.3 所述方法提取 PNRC 总 RNA,行 RT-PCR。

1.5.2 Northern 杂交检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC mRNA 表达的影响 将 MCF-7 接种于 6 孔板,培养 24 h 后,分别用 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24、72 h,收集细胞,用 Trizol Reagent 提取总 RNA。10 μg 的总 RNA 经含甲醛的1% 琼脂糖凝胶电泳后,RNA 在 10 × SSC 中吸印至 Zeta Probe GT 膜 (Bio-Rad) 12 ~ 16 h,再将膜放入 80 ℃烤 1 h。用于检测 PNRC mRNA 的 cDNA 探针为 900 bp,用 Megaprime DNA 标记试剂盒 (Amersham Biosciences )标记,放射性同位素为[α-$^{32}$P] dCTP。膜在 5 × SSC 浸湿后,放入 ExpressHyb 液中(Clontech) 预杂交 68 ℃ 30 min,再在 ExpressHyb 液中杂交 68 ℃ 1 h。杂交后的膜用2 × SSC/0.05% SDS 缓冲液于室温下洗 2 次,每次15 min,再用 0.1 × SSC/0.1% SDS 缓冲液于50 ℃洗膜 1 次,15 min。洗膜后, 压 X 线平片, -70 ℃放射自显影过液。二次杂交:洗脱 PNRC 放射性标记的探针后,膜再与$^{32}$P 标记的 840 bp GAPDH cDNA 探针杂交,杂交、洗膜条件同前。放射自显影后,用扫描仪对放射自显影底片进行扫描,以对应的 GAPDH 扫描值作为参照,计算出相对 mRNA 的值。

1.5.3 Western blot 检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC 蛋白表达的影响 乳腺癌细胞 MCF-7 接种于 6 孔板,培养 24 h 后,用 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24、48、72 h 后,提取细胞总蛋白,Bradford 法测蛋白浓度。15% SDS-PAGE,上样量 50 μg,湿转

200 mA, 2 h,PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,再用兔抗人 PNRC(1∶200)4 ℃孵育过夜,PBST 洗膜,二抗(1∶5 000)室温孵育 1 h,PBST 洗膜。β-actin 作为内参。暗室内 X 线平片感光成像并进行图像分析。

1.5.4　5-Aza-dc 干预后对 PNRC 启动子活性的影响　　将生长状态良好的 MCF-7 细胞按 $1\times10^5$/孔接种于 24 孔培养板里,待细胞完全贴壁生长至 70% ~80% 时,用 1×PBS 洗涤细胞 2 次。用 pGL3-Basic 和 pGL3-PNRC/ -323 ~ +57 质粒转染细胞。按 Lipofectiamine 2000 试剂使用说明,按 1∶2质量比配制待转染质粒/Lipofectiamine 2000 混合液,每孔加入 0.1 μg 的 pSVβ-gal 质粒作为内标。用 OPTI-MEM Ⅰ无血清无抗生素培养基稀释至 100 μl,混匀,室温放置 20 min 后,加入到细胞生长的 24 孔培养板里,再加 400 μl OPTI-MEM Ⅰ无血清无抗生素培养基,置 5% $CO_2$、37 ℃育 4 ~6 h 后,换成含 10% FBS 的 DMEM 培养基,培养基加入终浓度为 10 μmol/L 5-Aza-dc 继续培养,5-Aza-dc 处理 24 h 后收集细胞。1×PBS 洗涤细胞 2 次,加入 100 μl 1× 裂解缓冲液,反复冻融后,移入 1.5 ml Eppendorf 管中,4 ℃,12 000×$g$ 离心 2 min,取 20 μl 上清,按照检测试剂说明书操作,用化学发光检测仪测定报告质粒的荧光素酶活性,酶标仪检测作为内标的 pSVβ-gal 质粒的 β-半乳糖苷酶活性。根据荧光素酶活性分析去甲基化对 PNRC 启动子活性的影响。

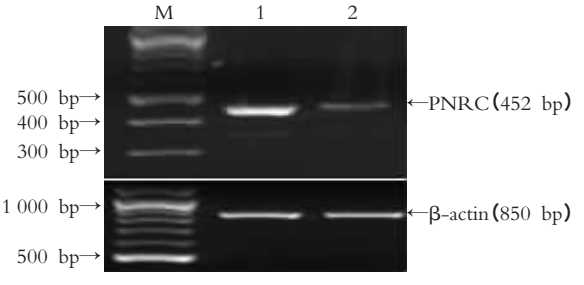
### 1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　PNRC 在正常乳腺细胞与乳腺癌细胞中的表达

经 RT-PCR 检测发现,PNRC 在 MCF10A 中的表达明显高于在 MCF-7 中的表达(图 1)。




M: DNA 标准; 1: MCF10A; 2: MCF-7

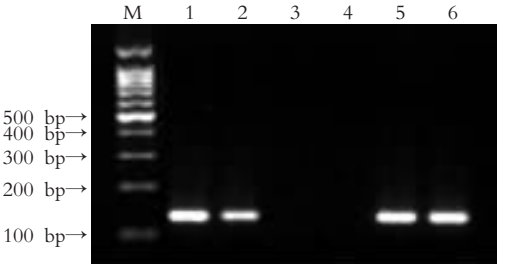
**图 1　MCF10A 和 MCF-7 细胞中 PNRC 的表达**

### 2.2　PNRC 启动子区 CpG 岛的预测

运用引物设计程序"MethPrimer"(http: //www. urogene. org/methprimer/), 对 PNRC 启动子区的 -572 ~ +227 (800 bp) 进行 CpG 岛的预测,结果发现该区存在 1 个 CpG 岛(188 ~745 bp),大小为 558 bp。

### 2.3　PNRC 启动子区 CpG 岛在正常乳腺细胞与乳腺癌细胞中的甲基化状态

针对 PNRC 基因启动子区采用甲基化特异性 PCR,根据特异性甲基化引物(M)和非甲基化引物(U),用 MCF10A 和 MCF-7 的 DNA(1 μg)作为模板进行 PCR,均能扩增出预期大小产物,分别为 142 bp(甲基化引物)和 144 bp(非甲基化引物)(图 2)。




M: DNA 标准; 1: MCF-7 中甲基化引物; 2: MCF-7 中非甲基化引物扩增结果; 3: MCF-7 未经硫化处理; 4: MCF10A 未经硫化处理; 5: MCF10A 中甲基化引物扩增结果; 6: MCF10A 中非甲基化引物扩增结果

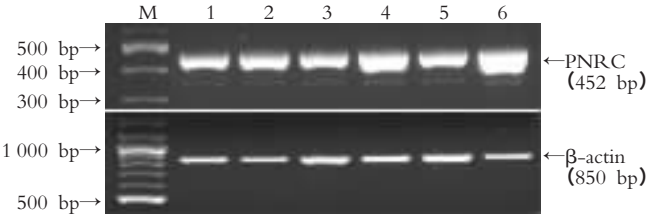
**图 2　MCF-7 和 MCF10A 细胞中 PNRC 启动子区甲基化 MSP 分析结果**

### 2.4　直接测序分析 MSP 产物的甲基化状态

将 MSP 扩增得到的产物,连接至 TA 载体上。经过序列测定发现,MCF-7 细胞中 PNRC 启动子区有 3 个 CG 位点发生了甲基化,而 MCF10A 细胞中 PNRC 启动子区的 CpG 岛未发生甲基化。

### 2.5　RT-PCR 检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC mRNA 表达的影响

MCF-7 细胞经 10 μmol/L 5-Aza-dc 分别处理 24、72、120 h 后,提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR。结果显示,经5-Aza-dc 分别处理 72 h 和 120 h 后,PNRC mRNA 表达水平较未经处理的对照组显著增加(图 3)。

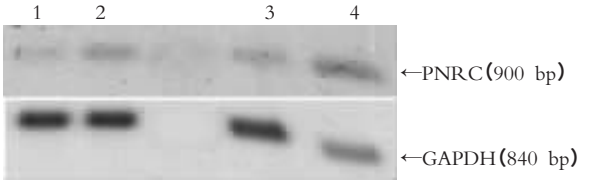



M: DNA 标准; 1、3、5: 未处理的 MCF-7 细胞; 2: 5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞 24 h; 4: 5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞 72 h; 6: 5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞 120 h

**图 3　5-Aza-dc 干预对 MCF-7 细胞 PNRC mRNA 表达的影响**

### 2.6　Northern 杂交检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC mRNA 表达的影响

MCF-7 细胞经 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24、72 h 后,提取细胞总 RNA ,进行 Northern blot 分析。结果显示,PNRC 的 mRNA 表达水平较对照组显著增加(图 4)。

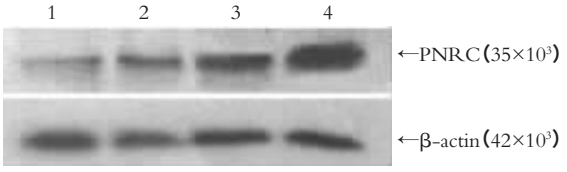



1、3: 未处理的 MCF-7 细胞; 2: 5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞 24 h; 4: 5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞 72 h

**图 4　Northern 杂交检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC mRNA 表达的影响**

### 2.7 Western blot 检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC 蛋白表达的影响

MCF-7 细胞经 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24、48、72 h 后，提取细胞总蛋白，经 Western blot 检测发现，细胞经5-Aza-dc 分别处理 48 h 和 72 h 后，PNRC 蛋白表达较未经 5-Aza-dc 处理的对照组明显增加（图 5）。




1：未处理的 MCF-7 细胞；2：5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞 24 h；3：5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞48 h；4：5-Aza-dc 处理 MCF-7 细胞72 h

**图 5 Western blot 检测 5-Aza-dc 干预对 PNRC 蛋白表达的影响**

### 2.8 5-Aza-dc 干预后对 PNRC 启动子活性的影响

将含 PNRC 启动子序列的报告质粒（pGL3-PNRC/ －323 ~ +57）转染 MCF-7 细胞后，再经 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24 h 后检测荧光素酶活性。结果显示经 5-Aza-dc 处理后，PNRC 基因启动子活性（7 985 537 ±259 693）较未经 5-Aza-dc 处理的对照组（4 214 518 ±233 222）显著升高（$P<0.01$）。

## 3 讨论

核受体辅活化子 PNRC 自身表达水平的改变与多种肿瘤相关，PNRC 在消化系统肿瘤、乳腺癌组织及乳腺癌细胞系 MCF-7 中的表达较相应的正常组织或正常乳腺细胞（MCF10A）明显低下，这提示 PNRC 的转录抑制与消化系统肿瘤及乳腺癌的发生、发展密切相关。

DNA 甲基化是哺乳类动物一个重要的基因外调控方式，这种表观遗传调控（epigenetic regulation）方式，尽管不存在 DNA 序列的改变，但可通过 DNA 自身化学修饰的方式从转录水平影响基因的表达。研究发现，肿瘤发生时常出现不同程度的 DNA 甲基化模式改变，因此，这种改变可作为肿瘤的早期分子诊断指标[8]。最近的研究表明，类似于其他抑癌基因，PNRC 在肿瘤组织中表达低下与其启动子区域的甲基化有关。因此，弄清 PNRC 的转录抑制调节情况，对于研究其在乳腺癌的发生、发展中的机制，以及如何逆转 PNRC 在肿瘤中的表达，抑制肿瘤细胞的增生具有重要的理论意义和实际应用价值。

为此，我们在克隆并分析了 PNRC 基因的 5′侧翼区，鉴定了 PNRC 启动子活性区域的基础上，运用“MethPrimer”软件对 PNRC 启动子区进行分析，预测 CpG 岛，通过甲基化特异性 PCR（MSP）分析 PNRC 启动子区 CpG 岛在正常乳腺细胞与乳腺癌细胞中的甲基化状态，分别针对 PNRC 基因启动子区设计特异甲基化引物和非甲基化引物，均扩增得到预期大小的产物，提示在 MCF-7 细胞中 PNRC 基因启动子区存在 CpG 岛甲基化。再对 MSP 产物直接测序，与 MCF10A 细胞比对发现，MCF-7 细胞中 PNRC 启动子区有 3 个 CG 位点发生了甲基化，而 MCF10A 细胞中 PNRC 启动子区的 CpG 岛未发生甲基化，这进一步说明了 PNRC 基因启动子区的高甲基化是导致 PNRC 在乳腺癌细胞中的表达低下的主要因素。

与基因的缺失、突变等遗传学改变不同，肿瘤发生中 DNA 甲基化等表观遗传学的改变是可以逆转的。因此，通过去甲基化处理可以重新激活某些因甲基化而表达沉默的关键性抑癌基因。为了进一步验证高甲基化对 PNRC 基因在乳腺癌细胞中的表达调控作用，我们采用抑制甲基转移酶活性的去甲基化药物：5-氮杂-2′-脱氧胞苷（5-aza-2’-deoxycytidine，5-Aza-dc）来处理 MCF-7 乳腺癌细胞株，处理 24、72、120 h 后，经 RT-PCR 和 Northern 杂交检测，发现 PNRC mRNA 表达水平明显上调，并且随着 5-Aza-dc 处理细胞时间的增加，PNRC mRNA 表达水平也逐渐增加。Western blot 检测，发现 5-Aza-dc 干预后，MCF-7 乳腺癌细胞株 PNRC 的蛋白表达水平也显著增强了。此外，通过报告基因的检测，发现 PNRC 基因启动子经5-Aza-dc 干预后，启动子活性也明显增加。结果提示，PNRC 基因启动子区的高甲基化的表观遗传学的改变导致 PNRC 在乳腺癌细胞中的表达低下，参与了 PNRC 在乳腺癌细胞中的转录抑制，与乳腺癌的发生、发展密切相关，从而为进一步探讨乳腺癌的发生机制并为乳腺癌的治疗提供了重要的实验依据。

**参考文献：**

[1] Zhou D, Quach K M, Yang C, *et al*. PNRC: a proline-rich nuclear receptor coregulatory protein that modulates transcriptional activation of multiple nuclear receptors including orphan receptors SF1 (steroidogenic factor 1) and ERRalpha1 (estrogen related receptor alpha-1)[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14 (7): 986 - 998.

[2] Zhou D, Ye J J, Li Y, *et al*. The molecular basis of the interaction between the proline-rich SH3-binding motif of PNRC and estrogen receptor alpha[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(20): 5974 - 5986.

[3] Zhou D, Chen B, Ye J J, *et al*. A novel crosstalk mechanism between nuclear receptor-mediated and growth factor/Ras-mediated pathways through PNRC-Grb2 interaction[J]. Oncogene, 2004, 23(31): 5394 - 5404.

[4] Kanai Y, Ushijima S, Saito Y, *et al*. MRNA expression of genes altered by 5-azacytidine treatment in cancer cell lines is associated with clinicopathological parameters of human cancers[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127 (12): 697 - 706.

[5] 张 艳，陈 彬，陈 敏，等. 人 PNRC 基因启动子的初步鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2007，23(4)：278 - 284.

[6] Laird P W, Zijderveld A, Linders K, *et al*. Simplified mammalian DNA isolation procedure[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(15): 4293.

[7] 张 艳，陈 彬，陈 敏，等. DNA 甲基化 PCR 引物的设计[J]. 第三军医大学学报，2008，30(3)：268 - 269.

[8] 王 刚，刘 利，陈 杰，等. 白血病细胞雄激素受体基因启动子甲基化状态的研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(10)：932 - 934.

（编辑 郭建秀）