论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408133

5-碘代杀结核菌素对HT-29细胞DLC-1基因的去甲基化作用

张灵敏,王亚旭,谢 凯,曾令海,李 权 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院普外科)

[摘要] **目的** 探讨5-碘代杀结核菌素(5-iodotubercidin,ITU)对人结肠癌细胞HT-29株增殖凋亡及DLC-1基因表达的影响。**方法** 不同浓度(0.1、0.5、1、2、4、6、8、10 μmol/L)ITU作用于HT-29细胞48 h,四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测HT-29细胞的增殖活性;ITU(0、2、4、6 μmol/L)作用于HT-29细胞48 h,流式细胞仪检测其凋亡率;ITU(0、2、4、6 μmol/L)作用于HT-29细胞48 h,亚硫酸氢盐克隆测序法(BSP)检测DLC-1基因启动子区CpG岛甲基化情况;同上的处理细胞的方法,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肝癌缺失基因-1(deleted in liver cancer-1,DLC-1)mRNA的表达;Western blot检测DLC-1基因蛋白表达。**结果** ①ITU可明显抑制HT-29细胞活力,在一定范围内随着药物浓度增加抑制细胞活力的作用越强($P<0.05$),以6 μmol/L组对HT-29细胞影响最大,$IC_{50}=(5.92\pm0.62)$ μmol/L。②分别以0、2、4、6 μmol/L ITU作用于HT-29细胞后,流式细胞仪检测各组凋亡率,分别为(9.56±2.21)%、(22.18±3.16)%、(34.23±3.16)%、(40.50±3.16)%,表明随着ITU浓度增加,对HT-29细胞的促凋亡作用越强。③经0、2、4、6 μmol/L ITU处理后DLC-1基因启动子区CpG岛甲基化率分别为91.67%、75.00%、61.67%、43.33%,表明ITU可以引起DLC-1基因启动子区甲基化程度降低。④在HT-29细胞中可检测到少量DLC-1 mRNA和蛋白的表达;相同条件经0、2、4、6 μmol/L ITU处理细胞后检测显示DLC-1基因mRNA和蛋白的表达增加,并随浓度增长,mRNA及蛋白表达随之增加。**结论** ITU可抑制人结肠癌HT-29细胞增殖,促进HT-29细胞凋亡,而这种抑制增殖作用可能和ITU降低DLC-1基因启动子区甲基化水平而诱导DLC-1基因上调有关。

[关键词] 5-碘代杀结核菌素;甲基化;结直肠肿瘤;基因,DLC-1

[中图法分类号] R73-361;R735.35;R977.3 [文献标志码] A

Effect of 5-iodotubercidin on proliferation and apoptosis in human colon cancer HT-29 cells and demethylation of deleted in liver cancer-1 gene

Zhang Lingmin, Wang Yaxu, Xie Kai, Zeng Linghai, Li Quan (Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of 5-iodotubercidin (ITU) on the proliferation and apoptosis in human colon cancer HT-29 cells and on the expression of deleted in liver cancer-1 (DLC-1) gene. **Methods** HT-29 cells were treated with different concentrations of ITU (0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 10 μmol/L) for 48 h, and the cell viability was studied by MTT assay. HT-29 cells were co-cultured with different concentrations of ITU (0, 2, 4, and 6 μmol/L) for 48 h, and the apoptosis rate was detected by flow cytometry. Meanwhile, the methylation levels of CpG islands at promoter region of DLC-1 gene were determined by bisulfite sequencing PCR (BSP). The DLC-1 mRNA expression levels were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the DLC-1 protein expression levels were detected by Western blotting. **Results** ITU distinctly inhibited the proliferation of HT-29 cells in a concentration-

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金(CSTC2012jjA10063)

[通信作者] 王亚旭,E-mail: 408861993@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/10.16016/j.1000-5404.201408133.html(2014-12-04)

dependent manner in a certain range, and the 6 μmol/L group had the greatest effect, with IC_{50} of 5.92 ± 0.62 μmol/L. The apoptotic rates of HT-29 cells treated with ITU (0, 2, 4, and 6 μmol/L) were (9.56 ± 2.21)%, (22.18 ± 3.16)%, (34.23 ± 3.16)%, and (40.5 ± 3.16)%, respectively, which were increased in a concentration-dependent manner. The methylation rates of CpG islands at the promoter region of DLC-1 gene were 91.67%, 75.00%, 61.67%, and 43.33%, respectively, after treatment with ITU (0, 2, 4, and 6 μmol/L). The results showed that ITU could decrease the methylation of DLC-1 gene promoter region. Little of DLC-1 mRNA and protein expression was detected in HT-29 cells, and ITU treatment increased the expression in a concentration-dependent manner. **Conclusion** ITU can inhibit the proliferation of HT-29 cells and induce apoptosis through decreasing the methylation level of DLC-1 gene promoter region and increasing the DLC-1 gene expression.

[**Key words**] 5-iodotubercidin; methylation; colorectal neoplasm; DLC-1 gene

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10063). Corresponding author: Wang Yaxu, E-mail: 408861993@qq.com

结直肠癌是世界上发病率和病死率最高的疾病之一。据报道,2008年全世界约123万人被诊断为结直肠癌,死亡人数达60万人[1]。近年研究表明,结肠癌相关抑癌基因由于CpG岛异常甲基化而失活在肿瘤的发生、发展中起重要作用。当基因组DNA启动子区甲基化状态发生改变,会造成转录基因表达异常,从而影响抑癌基因的表达[2-3]。而5-碘代杀结核菌素(5-iodotubercidin,ITU)有去甲基化作用[4],并可通过上调P53基因表达促进结肠癌细胞的凋亡[5]。本研究通过腺苷激酶抑制剂ITU作用于HT-29细胞,探讨ITU抑制结肠癌细胞生长的机制,以期为探索结肠癌的发病机制以及治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞(HT-29细胞,重庆医科大学生命研究院),ITU(成都诺维生物科技有限公司,进口分装),兔抗人肝癌缺失基因-1(deleted in liver cancer-1,DLC-1)多抗(加拿大PLlabs公司),辣根过氧化物酶IgG山羊抗兔抗体(北京金斯瑞生物有限公司),Western blot凝胶试剂盒、Western blot发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),逆转录PCR反应试剂盒(TaKaRa公司),SDS-PAGE电泳仪(北京六一仪器厂),DMEM培养基(HyClone公司),胎牛血清(美国Gibco公司),凝胶成像系统(美国Bio-Rad),9700基因扩增仪(美国ABI公司),DLC-1引物合成[生工生物工程(上海)有限公司]等。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测细胞增殖抑制率 显微镜下观察HT-29细胞状态良好,取对数生长期细胞,PBS漂洗3次后胰酶消化、收集细胞,计数板计数,调整细胞浓度,接种于96孔板中,每孔10^4个,加入DMEM培养基(含10%胎牛血清)至200 μL进行培养。取细胞贴壁后分为调零组、对照组以及8个不同浓度的ITU组(0.1、0.5、1、2、4、6、8、10 μmol/L),每组6个复孔,更换细胞培养液,并在培养基中按不同浓度加入ITU溶液。经37 ℃ 5% CO_2培养箱培养48 h后,于结束前4 h尽量避光向各孔加入MTT试剂20 μL,继续培养4 h后吸弃上清,再向各孔加入二甲基亚砜(DMSO)溶液150 μL,铝箔纸避光振荡15 min,待结晶充分溶解,酶标仪492 nm处测定各孔光密度值[D(492)]。计算ITU IC_{50}值及各组HT-29细胞的活力,细胞活力值 = [实验组平均D(492)值 − 调零组平均D(492)值]/[对照组平均D(492)值 − 调零组平均D(492)值] × 100%。

1.2.2 流式细胞术检测各组细胞的凋亡 取对数生长期细胞传代均匀接种于4个50 mL培养瓶中,各瓶加入DMEM培养基3 mL进行培养,48 h后观察细胞处于对数生长期且形态良好,分为4组,弃上清后1组加入不含ITU的培养基作为对照组,其余3组分别加入含2、4、6 μmol/L ITU的培养基,经37 ℃ 5% CO_2培养箱培养48 h后,弃上清PBS漂洗3次后用0.25%胰酶消化,终止消化离心后收集细胞,再用PBS漂洗离心3次,调整细胞浓度为1×10^6个/mL,经PI双染色,使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.3 亚硫酸氢盐克隆测序法(BSP)检测DLC-1基因启动子区甲基化情况 细胞分组及细胞处理同1.2.2,提取DNA,经亚硫酸氢钠修饰处理后,回收DNA进行PCR扩增,扩增片段包括6个CpG位点,甲基化引物序列上游引物:5′-TTTAAAGATCGAAACGAGGGAGCG-3′,下游引物:5′-CCCAACGAAAAAACCCGACTAACG-3′,产物长度为178 bp,扩增程序:98 ℃

4 min 预变性,94 ℃ 45 s 变性,66 ℃ 45 s 退火,72 ℃ 1 min 延伸;共20 个循环后,72 ℃ 8 min 修复延伸。产物进行3%琼脂糖凝胶电泳,纯化产物经连接载体、质粒提取后选取 10 个基因克隆位点进行测序,了解各组启动子区甲基化情况。

1.2.4 RT-PCR 检测 DLC-1 基因 mRNA 的表达 细胞分组及各组细胞处理同 1.2.2,根据 TaKaRa 公司操作说明提取 RNA,在紫光分光光度计上检测 RNA 浓度,使各组 $D(260)/D(280)$ 值为 1.8 ~ 2.2。按照说明在冰上加入各逆转录试剂后逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 引物序列:DLC-1 基因上游引物 5′-AAGTGGCAATTGGTTTGTCT-3′,下游引物 5′-AGGAAATTGGAGTGCAGTGT-3′,产物长度为 120 bp;β-actin 为内参,上游引物 5′-CCACTGGCATCGTGATGGAC-3′,下游引物 5′-GCGGATGTCCACGTCACACT-3′,产物长度为 423 bp。扩增条件:① 94 ℃ 3 min 预变性;② 94 ℃ 30 s 变性;③ 63.3 ℃ 45 s 退火;④ 72 ℃ 45 s 延伸38 个循环;⑤ 72 ℃ 2 min;⑥ 10 ℃ 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,恒压 60 V,电泳约 20 min 后采用凝胶成像系统进行分析。

1.2.5 Western blot 检测 DLC-1 蛋白表达情况 细胞分组及细胞处理同 1.2.2,按照细胞裂解液说明提取各组细胞蛋白,制作蛋白标准曲线后计算出蛋白浓度。8%聚丙烯凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,在蜡板上分别敷兔抗人 DLC-1 多抗(1∶2 000 稀释)及β-actin 抗体,冰箱 4 ℃封闭过夜,PBST 漂洗后加入辣根过氧化物酶 IgG 山羊抗兔抗体(1∶1 000 稀释),37 ℃ 封闭 1 h,PBST 液洗膜后 ECL 放射自显影。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析结合 LSD 检验。

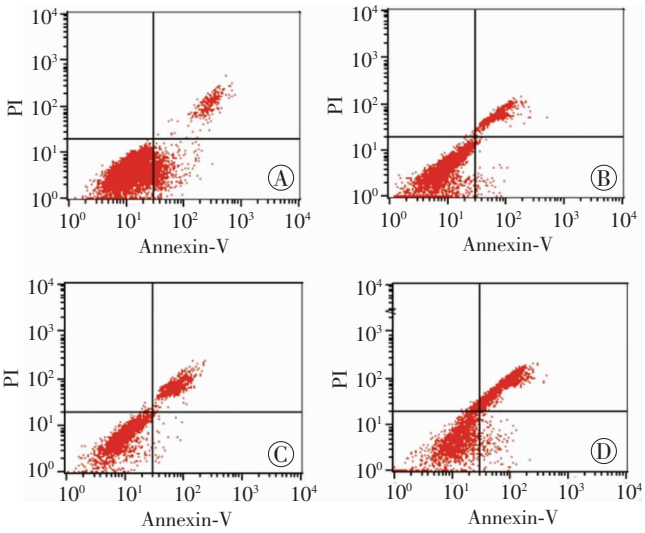
2 结果

2.1 不同浓度 ITU 对 HT-29 细胞活力的影响

不同浓度(0.1、0.5、1、2、4、6、8、10 μmol/L)ITU 作用于 HT-29 细胞 48 h 后,细胞平均活力值分别为(95.71 ± 2.56)%、(92.45 ± 3.78)%、(77.55 ± 3.46)%、(69.35 ± 3.76)%、(59.47 ± 3.23)%、(41.65 ± 6.81)%、(42.08 ± 5.41)%、(44.96 ± 1.98)%;与对照组相比,0.1、0.5 μmol/L 的细胞活力值差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各组差异有统计学意义($P < 0.05$)。比较各组对 HT-29 细胞的抑制作用,以 6 μmol/L 组对 HT-29 细胞影响最大,IC_{50} = (5.92 ± 0.62) μmol/L。

2.2 不同浓度 ITU 对 HT-29 细胞凋亡的影响

不同浓度 ITU 作用于 HT-29 细胞后,采用 Annexin-V/PI 染色,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率(图 1),对照组 HT-29 细胞凋亡率为(9.56 ± 2.21)%,2、4、6 μmol/L ITU 组 HT-29 细胞凋亡率分别为(22.18 ± 3.16)%、(34.23 ± 3.16)%、(40.50 ± 3.16)%。表明不同浓度 ITU 对 HT-29 细胞的凋亡均有影响。2、4、6 μmol/L ITU 组与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明随着 ITU 浓度增加,其对 HT-29 细胞的促凋亡作用越强。



A:对照组;B:2 μmol/L ITU 组;C:4 μmol/L ITU 组;D:6 μmol/L ITU 组

图 1 不同浓度 ITU 处理后 HT-29 细胞 48 h 凋亡率

2.3 BSP 检测各组启动子区甲基化情况

BSP 检测 DLC-1 基因启动子区有 6 个 CpG 岛,经检测 10 个克隆位点后,对照组甲基化率为 91.67%(55/60),2、4、6 μmol/L ITU 组甲基化率分别为 75.00%(45/60)、61.67%(37/60)、43.33%(26/60),2、4、6 μmol/L ITU 组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。表明 ITU 可以引起 DLC-1 基因启动子区甲基化程度降低。

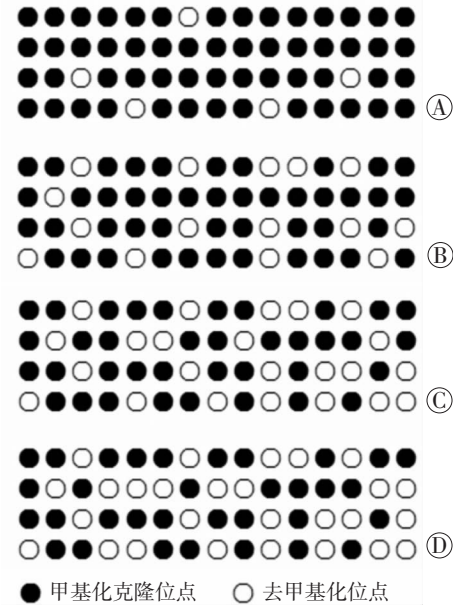
2.4 DLC-1 基因 mRNA 的表达情况

不同浓度 ITU 处理 HT-29 细胞,RT-PCR 检测结果显示,随着 ITU 浓度增大,DLC-1 基因 mRNA 表达逐渐增加。灰度值分析结果显示,与对照组相比,2、4、6 μmol/L ITU 组的 DLC-1 基因 mRNA 的表达及各组间两两相比差异均有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

2.5 HT-29 细胞 DLC-1 蛋白表达情况

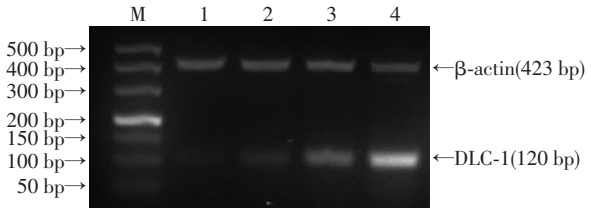
各条带灰度值随着 ITU 浓度增加而逐渐增加。对照组和不同浓度(2、4、6 μmol/L)ITU 组的灰度值与内参灰度值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

说明 ITU 作用于 HT-29 细胞后可促进 DLC-1 蛋白表达水平的增加。



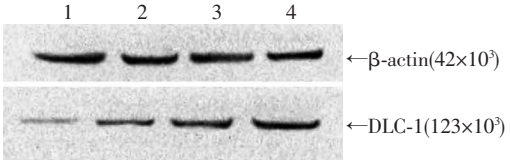
A:对照组;B、C、D:分别为 2、4、6 μmol/L ITU 组

图 2 不同浓度 ITU 处理 HT-29 细胞后 DLC-1 基因甲基化表达情况



M:标准;1:对照组;2 ~ 4:分别为 2、4、6 μmol/L ITU 组

图 3 不同浓度 ITU 处理 HT-29 细胞后 DLC-1 基因 mRNA 表达情况



1:对照组;2 ~ 4:分别为 2、4、6 μmol/L ITU 组

图 4 Western blot 检测 DLC-1 蛋白的表达

3 讨论

ITU 是一种广泛的激酶抑制剂,特别是腺苷激酶的抑制剂,可影响细胞的增殖和生存。ITU 作为腺苷激酶的抑制剂被广泛使用。细胞内腺苷激酶是腺苷再摄取及代谢的关键酶,其通过将胞内腺苷转化为 AMP 调节细胞内腺苷水平,而通过抑制腺苷激酶活性则可有效提高细胞微环境腺苷水平[6]。而以腺苷激酶为靶点的干预措施可造成体内腺苷稳态失衡,其在癫痫、退行性神经疾病以及精神疾病方面发挥重要作用。Zhang 等[5]研究发现 ITU 可引起结肠癌细胞 HCT-116 的 DNA 损伤,激活 ATM-p53 途径,引起 p53 基因表达上调,促进结肠癌细胞凋亡;同时应用 ITU 还可使裸鼠的结肠癌肿瘤迅速缩小,而对照组则依然生长。因此,我们推测 ITU 可能是一种新的基因毒药物,具有化疗作用的潜能。

本研究表明,不同浓度的 ITU 对结肠癌 HT-29 细胞活力均产生抑制作用,以 6 μmol/L ITU 对 HT-29 细胞的抑制作用最大,0.1、0.5 μmol/L ITU 对 HT-29 细胞的抑制作用同对照组相比差异无统计学意义,但1 ~ 6 μmol/L ITU 对 HT-29 细胞的抑制作用具有剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$),即 ITU 可以抑制 HT-29 细胞的增殖。流式细胞仪检测结果显示,ITU 作用 HT-29 细胞 48 h 后凋亡率明显增加,和对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 ITU 具有抑制结肠癌细胞生长、促进细胞凋亡的作用,进一步证明 ITU 具有抗肿瘤的作用。研究发现,腺苷诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡,与内质网凋亡途径有关,并且发现腺苷在细胞内可能通过腺苷激酶而不是转氨酶的代谢途径参与诱导细胞凋亡[7-8]。腺苷通过进入胞内激发不同的途径不仅可诱导肝癌细胞凋亡,还可以抑制胃癌(胞内激活腺苷酸活化激酶途径有关)[9]、食管癌(内质网通路有关)[10]以及神经胶质瘤细胞(胞内 DNA 合成受阻有关)[11]等凋亡。因此 ITU 发挥抗肿瘤作用可能和增加细胞内腺苷浓度有关。

DLC-1 基因是一种新的抑癌基因,1998 年由 Yuan 等首先在原发性肝癌中分离出,位于人类染色体 8p21-22,全长 3 800 bp 的 DLC-1 cDNA 编码 1 091 个氨基酸的蛋白质,定位于细胞质中[12]。在多数肿瘤中 DLC-1 基因不表达或低表达,其发生主要与启动子区域发生甲基化有关。本实验结果显示,DLC-1 基因在人结肠癌 HT-29 细胞中其 mRNA 少量表达,而蛋白也少量表达,同时检测 DLC-1 基因启动子区甲基化水平为 91.67%,呈高甲基化状态,提示在 HT-29 细胞中 DLC-1 基因低表达可能与启动子区甲基化水平有关。

本研究进一步表明,HT-29 细胞分别经 2、4、6 μmol/L ITU 处理 48 h 后,DLC-1 基因启动子区域甲基化程度由对照组的 91.67% 分别下降到 75.00%、61.67%、43.33%,两两比较差异有统计学意义($P<0.05$),说明 ITU 对 DLC-1 基因有去甲基化作用,与上述 ITU 可降低神经细胞的甲基化水平的结论一致;同

时ITU作用于HT-29细胞后可使DLC-1基因启动子区CpG岛甲基化程度降低。大量研究表明腺苷有去甲基化的作用。Williams-Karnesky等[4]研究证实腺苷及ITU均可降低大鼠脑部海马神经细胞的甲基化水平,并考虑可能是因为抑制甲基转移酶所致。谢凯等[3]研究发现,腺苷可逆转结肠癌细胞抑癌基因hMLH1启动子区的甲基化状态,使其表达上调,产生促进细胞凋亡的作用。而ITU可增加细胞内腺苷浓度,因此ITU产生去甲基化作用有可能是因为ITU抑制腺苷激酶活性后细胞内腺苷浓度增加,进一步产生了去甲基化作用。在前列腺癌中去甲基化药物可通过去甲基化使抑癌基因重新表达而产生抑制肿瘤细胞的作用[13]。由此可以推测,ITU诱导HT-29细胞凋亡可能和降低DLC-1基因启动子区域的甲基化水平有关。

DLC-1基因可抑制结肠癌细胞的增殖,同时在结肠癌的侵袭和转移中都发挥着重要的作用。Wang等[14]应用可编码DLC-1基因的重组慢病毒载体转染人结肠癌SW480细胞,应用RT-PCR及Western blot技术检测DLC-1基因和蛋白均过度表达,β-链蛋白(β-catenin)和糖原合成酶激酶-3(GSK-3β)表达均上调,同时c-myc基因表达下调;过度表达DLC-1基因可抑制细胞增殖、菌落形成、侵袭和转移,并阻滞细胞在G_1期且伴随着细胞凋亡,故认为DLC-1基因作为抑癌基因可抑制人结肠癌细胞的生长和侵袭。本实验继续应用RT-PCR和Western blot检测后证实,不同浓度ITU作用于HT-29细胞后DLC-1基因在mRNA和蛋白质水平的表达明显增加。金月玲等[15]用去甲基化药物5-氮杂胞苷药物处理DLC-1表达阴性的HT-29细胞后DLC-l基因表达上调,因此提示结肠癌中DLC-1基因表达沉默或低表达与启动子区高甲基化状态有关。综上所述,该DLC-1基因上调可能与ITU产生去甲基化作用使DLC-1基因启动子区CpG岛甲基化程度降低有关,而DLC-1基因上调可进一步产生抑制肿瘤细胞增殖的作用。

综上所述,本研究表明,ITU可抑制结肠癌细胞增殖、诱导结肠癌细胞凋亡,而这种抑制增殖作用可能和ITU降低DLC-1基因启动子区甲基化水平而诱导DLC-1基因上调有关。本研究为揭示ITU诱导结肠癌细胞凋亡的机制提供一定的理论依据。下一步需要检测更多的抑癌基因和癌基因,并进行动物实验方面的研究,但ITU抗肿瘤的具体机制还有待深入研究。

参考文献:

[1] Ferlay J, Shin H, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[2] 舒宁波, 王亚旭, 曾令海, 等. 5-杂氮-2′-脱氧胞苷对人结肠癌细胞增殖的抑制作用及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(3): 452-454.

[3] 谢凯, 王亚旭, 申海鹰, 等. 腺苷对人结直肠癌细胞hMLH1基因甲基化的影响[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(16): 1261-1264.

[4] Williams-Karnesky R L, Sandau U S, Lusardi T A, *et al*. Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(8): 3552-3563.

[5] Zhang X, Jia D, Liu H, *et al*. Identification of 5-Indotubercidin as a genotoxic drug with anti-cancer potential[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62527.

[6] Kowaluk E A, Bhagwat S S, Jarvis M F. Adenosine kinase inhibitors[J]. Curr Pharm Des, 1998, 4(5): 403-416.

[7] 吴灵飞, 苏剑东, 李国平, 等. 腺苷体外对人肝癌HepG2细胞凋亡的诱导作用及其作用机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(3): 205-211.

[8] 孙其恺, 王伟, 荚卫东. 表观遗传修饰与肝癌的关系[J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12(9): 717-720.

[9] Saitoh M, Nagai K, Nakagawa K, *et al*. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 67(10): 2005-2011.

[10] 韦碧柳, 李国平, 蒲泽锦, 等. 腺苷诱导人食管癌EC109细胞凋亡及其内质网分子机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(6): 532-537.

[11] Ohkubo S, Nagata K, Nakahata N. Adenosine uptake-dependent C6 cell growth inhibition[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 577(1/3): 35-43.

[12] 张培文, 官成浓. 抑癌基因DLC-1的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(2): 24-27.

[13] 倪渐凤, 孙晓娟, 张伟杰, 等. 三氧化二砷对前列腺癌DU-145细胞RASSF1A基因的去甲基化作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(7): 639-642.

[14] Wang C, Wang J, Liu H, *et al*. Tumor suppressor DLC-1 induces apoptosis and inhibits the growth and invasion of colon cancer cells through the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2014, 31(5): 2270-2278.

[15] 金月玲, 田小强, 商延芳, 等. 3种结肠癌细胞株中DLC-1基因的表达及其启动子区的甲基化状态研究[J]. 东南大学学报: 医学版, 2008, 27(1): 6-10.

(**收稿**:2014-08-18;**修回**:2014-10-09)

(编辑 龙 亮)