

· 论 著 ·

BCL6B 基因启动子区域甲基化与结肠癌的关系研究

赵勇, 章必成, 高建飞, 饶智国

广州军区武汉总医院肿瘤科, 湖北 武汉 430070

摘要: **目的** 探讨 BCL6B 基因启动子区域甲基化与结肠癌的关系。**方法** 选取在广州军区武汉总医院 2013 年 1 月至 2015 年 1 月病理检查确诊为结肠癌 53 例患者的癌组织和癌旁组织, 来自该院实验室的结肠癌细胞株和正常人外周血淋巴细胞及正常结肠黏膜组织。比较结肠癌组织、癌旁组织和正常结肠黏膜组织 BCL6B 甲基化状况的差异; 比较结肠癌组织和癌旁组织中 BCL6B 表达和免疫染色评分的差异。分析各病理参数对结肠癌组织 BCL6B 甲基化的影响。**结果** 53 例结肠癌组织中 41 例发生 BCL6B 启动子区域甲基化, 甲基化率为 77.36%; 结肠癌细胞系 RKO、HT29 为完全 BCL6B 甲基化, 其余为半甲基化; 正常结肠黏膜组织未发现甲基化。53 例结肠癌组织中有 45 例(84.91%) BCL6B 低表达或表达缺失; 53 例癌旁组织中有 9 例(16.98%) BCL6B 低表达或表达缺失, 两种组织 BCL6B 表达的差异具有统计学意义($P < 0.05$); 结肠癌组织的染色评分低于癌旁组织[(4.35 ± 2.15) 分 vs (6.28 ± 3.46) 分, $P < 0.05$]。结肠癌组织 BCL6B 甲基化率在有淋巴结转移、高 TNM 分期、低分化程度患者中较无淋巴结转移、低 TNM 分期、高分化程度患者中明显增高, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** 结肠癌组织 BCL6B 启动子区域甲基化高于癌旁组织和正常结肠黏膜组织, BCL6B 甲基化与淋巴结转移、TNM 分期、分化程度相关。

关键词: 结肠癌; BCL6B 基因甲基化; 癌旁组织; 结肠癌细胞株; 淋巴结转移; TNM 分期; 分化程度

中图分类号: R 735.3⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)08-1013-05

Relationship between methylation of BCL6B gene promoter region and colon cancer

ZHAO Yong, ZHANG Bi-cheng, GAO Jian-fei, RAO Zhi-guo

Department of Oncology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, Wuhan, Hubei 430070, China

Corresponding author: ZHANG Bi-cheng, E-mail: zh4300@hotmail.com

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between methylation of BCL6B gene promoter region and colon cancer. **Methods** The cancer tissues and paracancerous tissues from 53 patients with colon cancer diagnosed by pathological examination between January 2013 and January 2015 in Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, the colon cancer cell line from the hospital laboratory, the peripheral blood lymphocytes and the normal colon mucosa tissues from healthy subjects were selected. The methylation status of BCL6B in colon cancer tissues, paracancerous tissues and normal colon mucosa tissues were compared. BCL6B expressions and immune staining scores were compared between colon cancer tissues and paracancerous tissues. The impact of the pathological parameters on BCL6B methylation of colon cancer tissues was analyzed. **Results** BCL6B gene promoter region methylation occurred in colon cancer tissues of 41 cases out of 53 cases, so the methylation rate was 77.36%. In colon cancer cell line, RKO and HT29 were complete methylation, and SW480, SW620, HCT116, DLD1, LOVO were hemimethylation. No BCL6B methylation was found in normal colon tissues. BCL6B presented low expression or loss of expression in the colon cancer tissues of 45 cases(84.91%), and BCL6B presented low expression or loss of expression in paracancerous tissues of 9 cases(16.98%), and there was significant difference in BCL6B expression between the two tissues ($P < 0.05$). The immune staining score in colon cancer tissues was significantly lower than that in paracancerous tissues (4.35 ± 2.15 vs 6.28 ± 3.46, $P < 0.05$). The BCL6B methylation rates in patients with lymph node metastasis, high TNM staging and low differentiation degree were significantly higher than those in patients without lymph node metastasis, with low TNM staging and high differentiation degree (all $P < 0.05$). **Conclusion** The methylation level of BCL6B gene promoter region in colon carcinoma tissues is higher than those in paracancerous tissues and normal colon mucosa tissues, and BCL6B methylation is correlated with lymph node metastasis, TNM staging and

differentiation degree.

Key words: Colon cancer; BCL6B gene methylation; Paracancerous tissues; Colon cancer cell line; Lymph node metastasis; TNM staging; Differentiation degree

在消化道肿瘤中,结肠癌发病率及病死率均较高,且呈现逐年上升的趋势^[1],其中吸烟、不当饮食及年龄因素均属于其诱病的独立危险因素^[2]。手术、放化疗及基因靶向治疗作为结肠癌主要治疗方式,虽可在一定程度上消除肿瘤及抑制病情发展,但患者术后的中位生存时间及 5 年生存率并没有明显改变^[3]。因此,通过探查结肠癌具体发病机制,寻找影响其产生及发展的关键病理分子标志物,对提高结肠癌的治疗效果有重要意义。

研究显示,抑癌基因内启动子区域因高甲基化后的表达缺失或下调与癌症产生及发展具有显著相关性,而食管癌患者 BCL6B 基因启动子区域高甲基化后表现失活后^[4],可影响肿瘤的产生及发展,但其在结肠癌肿瘤产生机制中的具体作用尚未探查清晰。本研究选择本院经病理检查确诊为结肠癌的患者癌组织和癌旁组织标本作为实验对象,旨在探讨 BCL6B 基因启动子区域甲基化与结肠癌的关系,从而为预防结肠癌发病及治疗结肠癌提供新方向,现将研究结果总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月在本院经病理检查确诊为结肠癌的患者 53 例,在手术后获取患者的结肠癌和癌旁组织。53 例中男 38 例,女 15 例;年龄 36~75(56.24±6.39)岁,其中≥60 岁者 24 例,<60 岁 29 例;有淋巴结转移者 23 例,无转移者 30 例;TNM 分期 I+II 期者 28 例,III+IV 期者 25 例;分化程度:高分化 15 例,中分化 17 例,低分化 21 例。结肠癌细胞株包括 RKO、SW480、SW620、HT-29、HCT116、DLD1、LOVO,来自本院实验室。同时选取在我院健康体检的正常人抽取血标本获得的外周血淋巴细胞,并行肠镜下结肠黏膜组织活检获得正常结肠黏膜组织。本研究符合医学伦理,对所有研究对象说明了研究的目的,并签订了知情同意书。

1.2 实验试剂和耗材 蛋白酶 K 购自美国 Sigma 公司,SSS1 甲基化酶购自美国 NEB 公司,BCL6B 去甲基化 PCR 引物购自深圳华大基因有限公司,DAB 试剂盒购自北京赛驰生物科技有限公司,DNA 纯化回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)购自天津法莫西医药科技有限公司,糖原购自上海士锋生物科技有限公司,Nano-

Drop2000 超微量分光光度计购自北京科尔德科贸有限公司,TGL16M/TGL16 台式高速冷冻离心机购自长沙英泰仪器有限公司。

1.3 BCL6B 甲基化检测方法 取 RKO、SW480、SW620、HT-29、HCT116、DLD1、LOVO 结肠癌细胞株分别置于 75 cm² 的培养瓶内融合,每株细胞系设置两瓶(含处理组和未处理组),处理组待细胞贴壁后滴入 1:1 000 体积比 5-Aza-dC 处理,未处理组和处理组 24 h/次更换培养基。待各细胞株培养至对数生长期,弃培养基,PBS 洗 2 次,滴入含 EDTA 胰酶离心瓶内消化,滴入 5 ml 完全培养基中和,PBS 洗细胞 2 次,滴入 2 ml TES 缓冲液、100 μl 蛋白酶 K 于 50 °C 水浴 2 h 至其充分消化,滴入等体积的酚/氯仿混合液,轻晃均匀后,室温静置 10 min,4 000 r/min 离心 15~20 min,取上清液滴入干净离心管,重复离心 2~3 次直至获得纯化 DNA,滴入 1:3 体积无水乙醇及 1/10 体积 7.5 M 醋酸铵(NH₄Ac)待 DNA 析出,抽取置于干净试管,滴入 70% 乙醇 1~2 ml,11 000 r/min 离心 5 min,充分洗 DNA 沉淀,弃上清液,室温干燥数分钟后,滴入适量双蒸水溶解,若要长期保存需向 DNA 沉淀滴入适量无水乙醇,NanoDrop2000 检测 DNA 纯度和浓度,检测所提 DNA 质量,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,观察 DNA 有无降解,检测合格后 DNA 于 -80 °C 冷存。取 100 μg 收取结肠癌细胞株 DNA 制备甲基化阳性对照 DNA,双蒸水溶解后调整体积至 300 μl,加入 32 mmol/L SAM 液 5 μl、10× 缓冲液 50 μl、SSS1 甲基化酶 25 μl 和双蒸水 120 μl,于 37 °C 下反应 3~4 h,加入 500 μl 酚/氯仿混匀,13 000 r/min 离心 15 min,取上清液置于干净离心管内,加入氯仿 700 μl,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液置于干净离心管内,分别依次加入糖原 2 μl,7.5 M 乙酸铵 70 μl 和 2.5 倍体积无水乙醇,-80 °C 下静置 30~40 min,4 °C 下 12 000 r/min 离心 15~20 min;弃去上清液,加 70% 乙醇 1 000 μl 后 12 000 r/min 离心 10 min,除去水后加入 200 μl 高压处理去离子水,NanoDrop2000 测定 DNA 浓度及纯度。甲基化特异性 PCR 实验测定 BCL6B 甲基化状况,BCL6B M(甲基化特异性引物)引物长度为 115 bp,引物设计如下:上游:5'-CGTTTTGGATTTCGTTATTTGGAGAGC-3',下游:5'-TAACCTCGACTCCTTTATCTAACC-3',BCL6B U(非甲基化特异性引物)引物长度为 120 bp,

上游:5'-TTTTGTTTTGGATTTGTTATTTGGAGAGT-3',
下游:5'-CTTAACCTCAACTCCTTTATCTAACCA-3',反
应体系为 25 μl, FMSM Mix 12.5 μl, 上游引物 1 μl, 下
游引物 1 μl, 双蒸水 8.5 μl, 硫化产物模板 2 μl; 反
应条件:95 °C 预变 5 min, 95 °C 下 30 s, 60 °C 下 30 s,
72 °C 下 40 s, 共 35 个循环, 72 °C 退火 7 min。取 15 μl
PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 结肠癌组织、癌旁组织和正常结肠黏膜组织
BCL6B 表达的免疫染色检测方法 结肠癌组织、癌
旁组织和正常结肠黏膜组织甲醛固定、脱水、石蜡包
埋及连续切片, 片厚 4 μm, 切片 65 °C 下烤 2 h, 脱蜡
后蒸馏水洗 2 次。置于 3% H₂O₂ 室温下孵育 20 min,
蒸馏水洗 5 min, PBS 内泡 5 min。将切片浸于枸橼酸
盐缓冲液内, 不锈钢压力锅修复抗原 2 ~ 3 min, PBS
洗 3 次, 5 min/次。滴入山羊血清封闭液于切片上,
室温下孵育 20 ~ 30 min, 滴入 1:200 稀释 BCL6B 一
抗, 4 °C 过夜孵育; 次日 PBS 洗 3 次, 5 min/次; 滴入
加强剂 PV-9000 试剂 1 二抗 50 μl, 37 °C 下孵育 20 ~
30 min, PBS 洗 3 次, 5 min/次, HRP 标记的 II 抗 PV-
9000 试剂 2 二抗 50 μl, 37 °C 下孵育 20 ~ 30 min, PBS
洗 3 次, 5 min/次; DAB 显色, DAB 显色试剂盒购自
北京索莱宝科技有限公司, 待 5 min 后蒸馏水洗涤终
止显色, 苏木素复染、1% 酒精盐酸分化, 自来水洗涤
返蓝, 蒸馏水再洗涤, 分别行脱水、透明后封片, 置于
显微镜观察切片染色情况。

1.5 观察指标 比较结肠癌组织、癌旁组织和正常
结肠黏膜组织 BCL6B 启动子区域甲基化状况的差
异; 比较结肠癌组织和癌旁组织中 BCL6B 表达和免
疫染色评分的差异。分析结肠癌组织 BCL6B 甲基化
和性别、年龄、淋巴结转移、TNM 分期、分化程度等病
理参数的关系。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分
析。免疫染色评分用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检
验进行两组比较; BCL6B 表达用频数和 (%) 表示, 其
在不同组织中、在不同临床和病理特征中的差异比
较, 采用 χ^2 检验。 *P* < 0.05 表示差异具有统计学
意义。

2 结果

2.1 BCL6B 在结肠癌组织、结肠癌细胞系和正常结
肠组织中甲基化状况比较 图 1 中, IVD 为只能扩增
出甲基化条带的阳性对照, NL 为正常人外周血淋巴
细胞的阴性对照, H₂O 为灭菌双蒸水的空白对照, U
为非甲基化条带, M 为甲基化条带。检测 53 例结肠
癌组织的 BCL6B 甲基化状况, 41 例发生甲基化, 甲

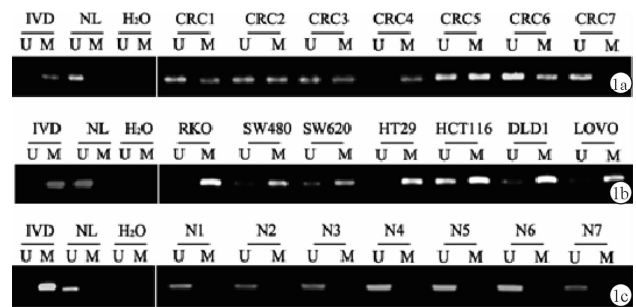
基化率为 77.36% (图 1a); 检测结肠癌细胞系的
BCL6B 甲基化状况, RKO、HT29 为完全甲基化, 其余
为半甲基化 (图 1b); 检测正常结肠组织的 BCL6B 甲
基化状况, 未发现甲基化 (图 1c)。

2.2 结肠癌组织和癌旁组织中 BCL6B 表达和免疫
染色评分比较 53 例结肠癌组织中有 45 例 BCL6B
低表达或表达缺失, 其中又有 41 例为 BCL6B 甲基
化, 53 例癌旁组织中有 9 例 BCL6B 低表达或表达缺
失, 两种组织 BCL6B 表达的差异具有统计学意义
(*P* < 0.01); 结肠癌组织的染色评分 (4.35 ± 2.15) 低
于癌旁组织 (6.28 ± 3.46), 差异具有统计学意义
(*P* < 0.01)。见表 1、图 2。

2.3 结肠癌组织 BCL6B 甲基化与各病理参数的关
系比较 结肠癌组织 BCL6B 甲基化率在有淋巴结转
移、高 TNM 分期、低分化程度患者中较无淋巴结转
移、低 TNM 分期、高分化程度患者中明显增高, 差
异有统计学意义 (*P* 均 < 0.05); 结肠癌组织 BCL6B 甲
基化在不同性别和年龄中的差异无统计学意义 (*P* 均
> 0.05)。见表 2。

3 讨论

目前, 关于结肠癌等恶性肿瘤的具体分子产生机
制均未探查清楚, 但随着分子遗传学研究的深入, 诸

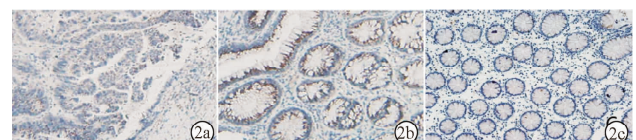


注: 1a: 结肠癌组织; 1b: 结肠癌细胞系; 1c: 正常结肠组织。

图 1 PCR 测定 BCL6B 在不同组织中的甲基化状况

表 1 结肠癌组织和癌旁组织中 BCL6B 表达
和免疫染色评分比较

组别	例数	BCL6B 低表达 [例 (%)]	染色评分 (分, $\bar{x} \pm s$)
结肠癌组织	53	45 (84.91)	4.35 ± 2.15
癌旁组织	53	9 (16.98)	6.28 ± 3.46
χ^2/t 值		48.923	3.449
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01



注: 2a: 结肠癌组织; 2b: 癌旁组织; 2c: 正常结肠组织。

图 2 各种组织免疫染色 BCL6B 表达情况 (×400)

表 2 结肠癌组织 BCL6B 甲基化与各病理参数的关系
例(%)

临床病理参数	例	甲基化 (n=41)	非甲基化 (n=12)	χ^2 值	P 值
性别					
男	38	28(73.68)	10(26.32)	2.310	0.129
女	15	13(86.67)	2(13.33)		
年龄(岁)					
≥60	24	20(83.33)	4(16.67)	0.894	0.344
<60	29	21(72.41)	8(27.59)		
淋巴结转移					
是	23	21(91.30)	2(8.70)	4.512	0.034
否	30	20(66.67)	10(33.33)		
TNM 分期					
I + II	28	18(64.29)	10(35.71)	5.792	0.016
III + IV	25	23(92.00)	2(8.00)		
分化程度					
高分化	15	9(60.00)	6(40.00)	6.858	0.032
中分化	17	12(70.59)	5(29.41)		
低分化	21	20(95.24)	1(4.76)		

多实验结果显示,原癌基因过表达和抑癌基因杂合性缺失可能在癌症的产生过程中起着关键性作用^[5-7],而抑癌基因表观失活和恶性肿瘤促基因表观上调则和恶性肿瘤产生及发展具有密切相关性,因此研究者开始从表观遗传学上寻找治疗癌症的新方向。表观遗传学主要是指机体存在的一系列非 DNA 序列改变诱导性遗传基因表达变化,其中包括 DNA 甲基化、染色质重塑、组蛋白修饰和非编码 RNA 调控等,而 DNA 甲基化则是抗癌研究的重点^[8]。

DNA 甲基化过程即在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)诱导下,将 S 腺苷甲硫氨酸(SAM)以甲基供体形式转移至胞嘧啶 5 位碳原子上,形成 5-甲基胞嘧啶(5-mC)即甲基化胞嘧啶,该突变主要发生于 CpG 二联核苷位置,而其他基因序列甲基化概率较低。研究中将结构基因内 5'端调控区富含 CpG 二联核苷簇排列集合称为 CpG 岛^[9],其分子量约为 500~1 000 bp,迄今为止,已探明约 56% 人体基因含有此结构^[10]。文献称,CpG 岛存在位置处于基因启动子区域内,其可在特定条件下出现甲基化突变,虽然不会促进其初始基因序列的稳定,但可致其染色体结构紧密度和基因稳定性均增强^[11],造成基因转录沉寂失能,进而促使细胞生长、分化出现病理性突变,使得机体基因损伤后无法被正常修复,间接诱发肿瘤产生。因此,笔者认为可通过人工方式诱导 CpG 岛甲基化,从而研究启动子区域甲基化与结肠癌产生及发展的相关性。

BCL6B 基因属于 BCL6 同源基因之一,主要位于 17 号染色体 p13.1 上,在细胞遗传信息复制过程中发挥转录抑制因子的作用,其 mRNA 广泛表达于人

类组织内。诸多文献显示,BCL6B 可促进精原干细胞自我更新^[12],与干细胞分化及细胞生长、增殖具有相关性。通过参阅文献可知,BCL6B 基因 CpG 岛甲基化可通过基因启动子促使抑癌基因及其上、下游基因转录失活而实现。本研究探讨结肠癌细胞株内抑癌基因 BCL6B 启动子区域即 CpG 岛的甲基化,该过程可促使癌细胞基因间 caspase 信号通路活性和抗凋亡调节因子表达下调,从而造成上调 p21 和下调细胞周期蛋白依赖性激酶 1 实现对细胞增殖的抑制,并造成抑癌基因低表达。甲基化特异性 PCR 实验结果显示,结肠癌细胞系内 BCL6B 启动子区域的 CpG 岛甲基化率为 77.36%,而去甲基化药物 5-Aza-dC 处理后 BCL6B 表达明显上升,这表明结肠癌细胞内 BCL6B 启动子区存在异常高甲基化现象,且其表达在启动子区甲基化影响下发生变化。本研究对结肠癌组织和癌旁组织中 BCL6B 的表达进行染色实验,结果显示,结肠癌组织的染色评分显著低于癌旁组织,表明肿瘤组织内 BCL6B 启动子区异常高甲基化率显著高于正常组织,因此,笔者认为某些不具备 PCR 检测条件及技术的医疗机构在结肠癌早期诊断中,可将 BCL6B 启动子区域甲基化作为结肠癌病理学染色诊断标志物之一。

肿瘤细胞基因异常甲基化和患者年龄、性别、临床 TNM 分期、分化程度和预后等病理特征具有相关性^[13],而本研究确认结肠癌组织 BCL6B 启动子区域甲基化发生率在不同淋巴结转移、TNM 分期、分化程度中具有显著差异,但未显示其和患者年龄、性别之间具有相关性,这可能与本实验选取结肠癌细胞株样本量较少或年龄、性别范围较小相关。而本研究未对患者进行远期随访,因此也不能反映 BCL6B 启动子区域甲基化和患者预后的相关情况,尚需扩大样本量和设计远期随访方案对研究进行完善。

总之,本研究显示,结肠癌患者癌灶产生及发展可能和 BCL6B 启动子区域甲基化具有相关性,其原因可能与 BCL6B 甲基化后表达下调、对肿瘤细胞增殖和克隆形成抑制性降低有关,因此针对该特性研发可调控 BCL6B 甲基化表观靶向的抗癌药物,或可为结肠癌的治疗开拓新思路。BCL6B 对结肠癌细胞浸润及转移能力的影响作用如何,值得我们进一步研究。

参考文献

- [1] Song HW, Wikinson MF. Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 30(2): 14-26.

量稍显不足,因此无法进一步分析 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 三种 lncRNA 的表达与 HCC 临床特征之间的关系,只能“定性”地认为它们与 HCC 发生发展有潜在联系,并不能明确具体时间段所参与的生物学过程;再者,统计学方法的设计也有欠缺,未能反映各因素各水平的交互作用。因此今后的研究还应纳入更多样本,采用实时荧光定量 PCR 方法对 lncRNAs 的表达情况进行分析,以为临床工作提供更有价值的参考。

参考文献

- [1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*,2012,142(6):1264-1273.
 - [2] Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *PLoS One*,2011,6(12):e28486.
 - [3] Tanaka M, Katayama F, Kato H, et al. Hepatitis B and C virus infection and hepatocellular carcinoma in China: a review of epidemiology and control measures[J]. *J Epidemiol*,2011,21(6):401-416.
 - [4] Mercer TR, Dingler ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*,2009,10(3):155-159.
 - [5] Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, et al. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer[J]. *Br J Cancer*,2013,108(12):2419-2425.
 - [6] 赵艳华. 肝癌长链非编码 RNA 差异表达谱构建及 AFAP1-AS1 功能初步验证[D]. 长沙:中南大学,2014.
 - [7] 袁声贤. 长链非编码 RNA 在肝癌发生、发展过程中的作用及临床意义[D]. 上海:第二军医大学,2014.
 - [8] 赖明春. 长链非编码 RNA MALAT-1 在肝癌肝移植术后肿瘤复发预测中的价值研究[D]. 杭州:浙江大学,2012.
 - [9] Li Z, Zhao X, Bai S, et al. Proteomics identification of cyclophilin a as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma[J]. *Mol Cell Proteomics*,2008,7(10):1810-1823.
 - [10] Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology[J]. *Cancer Discov*,2011,1(5):391-407.
 - [11] Zhang H, Chen Z, Wang X, et al. Long non-coding RNA: a new player in cancer[J]. *J Hematol Oncol*,2013,6(1):1-7.
 - [12] Yuan SX, Yang F, Yang Y, et al. Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy[J]. *Hepatology*,2012,56(6):2231-2241.
 - [13] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. *Nat Rev Cancer*,2003,3(6):453-458.
 - [14] Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*,2003,22(39):8031-8041.
 - [15] Zhu Q, Zhou L, Yang Z, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation[J]. *Med Oncol*,2012,29(2):985-993.
 - [16] 刘武韬. 肝细胞癌 lncRNA 表达谱研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.
- 收稿日期:2016-02-06 修回日期:2016-03-08 编辑:王国品

(上接第 1016 页)

- [2] Wang J, Dong L, Xu L, et al. B cell CLL/lymphoma 6 member B inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice[J]. *Cancer Lett*,2014,355(2):192-200.
 - [3] Zhang X, Shi K, Li Y, et al. Lipopolysaccharide inhibits the self-renewal of spermatogonial stem cells in vitro via downregulation of GDNF expression in Sertoli cells[J]. *Reprod Toxicol*,2014,45(6):87-93.
 - [4] 董腾慧. BCL6B 基因启动子区异常高甲基化与食管癌的关系研究[D]. 郑州:郑州大学,2012.
 - [5] Wang W, Huang P, Wu P, et al. BCL6B expression in hepatocellular carcinoma and its efficacy in the inhibition of liver damage and fibrogenesis[J]. *Oncotarget*,2015,6(24):20252-20265.
 - [6] 余宗涛,张吉才,高琼,等. 5-氮-2'-脱氧胞苷对肺癌 A549/DDP 细胞凋亡及 hMLH1 表达的影响[J]. *肿瘤研究与临床*,2015,27(3):149-152.
 - [7] Li X, Yu J, Brock MV, et al. Epigenetic silencing of BCL6B inactivates p53 signaling and causes human hepatocellular carcinoma cell resist to 5-FU[J]. *Oncotarget*,2015,6(13):11547-11560.
 - [8] 余昆,李云峰,杨之斌,等. GATA4 基因甲基化在早期结直肠癌诊断中的作用[J]. *肿瘤学杂志*,2015,21(1):30-33.
 - [9] 任卉. Survivin 基因沉默对 HeLa 细胞凋亡、细胞周期和启动子甲基化的影响[D]. 广州:广东医学院,2015.
 - [10] 何琼,王冕,周建文,等. 多重 MethyLight 在结直肠癌相关基因 ALX4 和 SEPT9 甲基化检测中的应用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*,2015,36(5):657-662.
 - [11] Yang Q, Gao J, Xu L, et al. Promoter hypermethylation of BCL6B gene is a potential plasma DNA biomarker for gastric cancer[J]. *Biomarkers*,2013,18(8):721-725.
 - [12] 张炯,张鑫,武玉. 子宫颈癌组织中 RASSF2A 基因启动子甲基化状态的研究[J]. *肿瘤研究与临床*,2015,27(2):117-119.
 - [13] Sisakhtnezhad S, Bahrami AR, Matin MM, et al. The molecular signature and spermatogenesis potential of newborn chicken spermatogonial stem cells in vitro[J]. *In Vitro Cell Dev Anim*,2015,51(4):415-425.
- 收稿日期:2016-02-21 修回日期:2016-03-20 编辑:王国品