

食管鳞状细胞癌组织 *Bin1* 基因启动子甲基化状态及其临床意义

王雪晓, 安入征, 张翔宇, 韩晓楠, 贾云沅, 刘丽华(河北医科大学第四医院 生物治疗科, 河北 石家庄 050035)

[摘要] **目的:** 探讨食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)患者的食管鳞癌组织、癌旁组织中 *Bin1* 基因启动子甲基化状态及其 mRNA 的表达及其临床意义。**方法:** 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分别检测 58 例经病理证实的 ESCC 患者的食管鳞癌组织、癌旁组织中 *Bin1* 基因 mRNA 的表达情况;用甲基化特异性 PCR(MSP)检测上述食管鳞癌组织中 *Bin1* 基因启动子甲基化状态,比较 ESCC 患者 *Bin1* 甲基化状态与临床病理分期的关系。**结果:** ESCC 组织中 *Bin1* 基因启动子甲基化率明显高于癌旁组织(58.62% vs 25.86%, $\chi^2 = 12.76$, $P < 0.01$), *Bin1* 甲基化状态与患者 TNM 分期、肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴结转移相关(均 $P < 0.05$)。ESCC 组织中 *Bin1* mRNA 的表达水平明显低于癌旁组织(0.78 ± 0.05) vs (1.03 ± 0.03), $t = 9.643$, $P < 0.01$];发生 *Bin1* 甲基化的组织中 *Bin1* mRNA 表达水平明显低于未发生甲基化的组织(0.68 ± 0.04) vs (0.85 ± 0.07), $t = 2.476$, $P < 0.05$)。**结论:** *Bin1* 基因启动子区甲基化状态可能与 ESCC 的发生密切相关,它是 ESCC 中 *Bin1* mRNA 低表达或缺失的机制之一,且与 ESCC 进展和淋巴结转移有关。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;DNA 甲基化;桥接整合因子-1 基因;侵袭;淋巴结转移

[中图分类号] R735.1;R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0382-05

Bin1 gene promoter methylation status and its clinical significance in esophageal squamous cell cancer tissues

WANG Xuexiao, AN Ruzheng, ZHANG Xiangyu, HAN Xiaonan, JIA Yunlong, LIU Lihua (Department of Biotherapy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the methylation status of *Bin1* gene promoter and its mRNA expression in cancer tissues and para-carcinoma normal tissues from patients with esophageal squamous cell cancer (ESCC), and to explore its clinical significance. **Methods:** The expression level of *Bin1* mRNA and its methylation status in ESCC tissues and the corresponding para-carcinoma normal tissues from 58 patients were determined by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and methylation specific PCR (MSP). The relationship between *Bin1* methylation status and clinical pathological staging was compared. **Results:** The methylation frequency of *Bin1* in ESCC tissues was significantly higher than that in the corresponding para-carcinoma normal tissues (58.62% vs 25.86%, $P < 0.01$), and the *Bin1* methylation status was closely correlated with TNM stage, tumor invasion depth, tumor differentiation and lymph node metastasis (all $P < 0.05$). Compared with para-carcinoma tissue specimens, the expression of *Bin1* mRNA in ESCC tissues was significantly lower (0.78 ± 0.05) vs (1.03 ± 0.03), $t = 9.643$, $P < 0.01$). The expression of *Bin1* mRNA in ESCC tissues with methylation was significantly lower than that in ESCC tissues without methylation (0.68 ± 0.04) vs (0.85 ± 0.07), $t = 2.476$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Aberrant promoter methylation of *Bin1* might be closely related to the development of ESCC, and it is one of the possible mechanisms that leads low expression or deletion of *Bin1* in ESCC. The DNA methylation of *Bin1* might be closely associated with tumor invasion and lymph node metastasis of ESCC.

[Key words] esophageal squamous cell cancer; DNA methylation; *Bin1*; invasion; lymph node metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 382-386. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.015]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81201607);河北省杰出青年基金资助项目(No. H2014206320);河北省高层次人才资助项目(No. A201401040)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81201607), the Outstanding Youth Foundation of Hebei Province (No. H2014206320), and the High Level Talents of Hebei Province (No. A201401040)

[作者简介] 王雪晓(1989-),男,河北省石家庄人,研究生,主要从事肿瘤生物治疗的临床与基础研究,E-mail: wangxuexiao217@163.com

[通信作者] 刘丽华(LIU Lihua, corresponding author),E-mail: lihualiu567@hotmail.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160530.1534.002.html>

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)是最常见的恶性肿瘤之一,虽然多学科协作治疗使 ESCC 患者无进展生存期、总生存期得到提高,但 ESCC 侵袭周围组织和淋巴结转移仍然是影响总生存期的重要原因之一^[1]。桥接整合因子-1(bridging integrator-1, *Bin1*)是至今发现的唯一具有抑癌功能的配体蛋白^[2],在多种恶性肿瘤中呈低表达或缺失状态^[3]。DNA 甲基化是表观遗传的主要表现形式之一,与基因沉默、遗传印记、生物胚胎发育调节、维持细胞正常功能以及肿瘤的发生密切相关。目前有关抑癌基因 *Bin1* 甲基化状态在 ESCC 中的表达及意义的研究尚无报道。本实验通过检测 *Bin1* 在食管鳞癌组织及癌旁组织中的甲基化状态及 mRNA 的表达情况,分析其相关性,并探讨其与患者临床病理特征的关系,为进一步研究 *Bin1* 在 ESCC 侵袭转移中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

组织标本均来自河北医科大学第四医院 2014 年 6 月至 2015 年 6 月胸外科收治的 ESCC 手术患者,肿瘤组织及其癌旁组织(距原发灶边缘 3~5 cm 以上)共 58 例。其中男性 39 例,女性 19 例;年龄 37~74 岁,中位年龄 59 岁。每位患者术前均未行抗肿瘤治疗且术后有明确的病理诊断。标本切除后一部分在新鲜状态下置于液氮中冻存,随后转移至 -80 °C 超低温冰箱贮存备用,用于提取组织总 RNA 与 DNA;另一部分标本经 10% 福尔马林溶液固定,常规制作蜡块保存,并经 H-E 染色,确定所取肿瘤标本均为 ESCC 组织,癌旁组织中均未见癌细胞的浸润。按照 UICC 标准进行 TNM 分期: I 期 6 例、II 期 38 例、III 期 13 例、IV 期 1 例。按照 WHO 肿瘤病理学分级标准分级:高分化 17 例、中分化 8 例、低分化 33 例;有淋巴结转移者 37 例,无淋巴结转移者 21 例。所有标本和临床资料采集均经患者同意且签署知情同意书、医院医学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒、Wizard DNA 纯化试剂盒、GoTaq @ GreenMaster Mix 和 2 × GoldStar Taq Master Mix 均购自美国 Promega 公司,PCR 及甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)引物均在北京赛百盛基因技术有限公司合成,*Bin1* 甲基化上游引物为 5'-GGAAGATTAAGACGTTAGGTCGGCG-3',下游引物为 5'-ACCGAACCTCAAACCGCGATCGACG-3',非

甲基化上游引物为 5'-GGAAGATTAAGATGTTAGGTTGGTG-3',下游引物为 5'-ACCAAACCTCAAAC-CACAATCAACA-3',扩增产物长度均为 215 bp。qRT-PCR 的 *Bin1* 上游引物 5'-CAAGTCCCCATCT-CAGCCAG-3',下游引物为 5'-GGATCACCAGCAC-CACATCA-3',扩增长度为 296 bp, β -actin 上游引物为 5'-GTCACCTTCACCGTTCAGTTTT-3',下游引物为 5'-CTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTT-3',扩增长度为 156 bp。蛋白酶 K 购自美国 Ambion 公司,Fotodyne 凝胶成像分析系统为美国 PE 公司产品,7500 Real-time PCR System 仪为 Applied Biosystems 公司产品。

1.3 MSP 检测 ESCC 组织和癌旁组织中 *Bin1* 甲基化状态

应用酚/氯仿抽提法提取 ECSS 组织中的 DNA 并进行纯化。设计相应的 MSP 引物及非甲基化特异性引物。扩增条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s、退火 30 s、72 °C 延伸 60 s,循环 35 次,72 °C 延伸 5 min。采用 GeneSys 图像分析系统进行分析。甲基化发生率的统计分析:甲基化率(%)=(完全甲基化标本数+不完全甲基化标本数)/总标本数×100%。MSP 阳性对照采用经甲基化酶 *Sss I* 处理以后的基因组 DNA 进行 PCR,阴性对照采用灭菌双蒸水代替 DNA 模板进行 PCR 扩增。为对 MSP 检测的进行质量控制,随机选取 10% 的标本进行重复实验,重复性达到 95% 以上。

1.4 qRT-PCR 检测 *Bin1* mRNA 在 ESCC 及癌旁组织中的表达

首先按 TRIzol 试剂说明书提供的操作步骤提取 ESCC 和癌旁组织中的总 RNA,采用紫外分光光度计测量其含量及纯度,并参照反转录试剂盒说明书步骤,将 RNA 反转录为 cDNA,之后以该 cDNA 为模板,加入实时荧光定量 PCR 的反应体系进行 PCR 扩增,以 β -actin 作为内参照。扩增条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 45 s、退火 45 s、72 °C 延伸 50 s,共 35 个循环;最后,72 °C 延伸 7 min。使用 qRT-PCR 仪对 *Bin1* mRNA 表达水平进行实时荧光定量分析,绘制熔接曲线。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 作为 ESCC 组织与其癌旁组织的 mRNA 的相对表达水平。为 qRT-PCR 的质量控制,随机选取 10% 的标本进行重复实验 3 次,重复性达到 95% 以上。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,ESCC 组织、发生甲基化的 ESCC 组织、未发生甲基化的 ESCC 组织与癌旁组织 *Bin1* mRNA 表达水

平的比较采用单因素方差分析,ESCC 与癌旁组织甲基化状态的比较、DNA 甲基化状态与 mRNA 表达水平及临床病理资料的相关性分析以及采用 χ^2 和校正 χ^2 检验,以上均为双侧检验,发生甲基化的 ESCC 与未发生甲基化的 ESCC 组织 *Bin1* mRNA 表达水平的比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC 组织和癌旁组织中 *Bin1* 甲基化状态

MSP 检测结果(图 1)显示,ESCC 组织中 *Bin1* 基因启动子甲基化率明显高于癌旁组织(58.62% vs 25.86%, $\chi^2 = 12.76, P < 0.01$)。

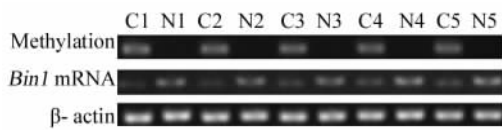


图 1 ESCC 组织及癌旁组织 *Bin1* 甲基化状态($n = 5$)

Fig. 1 Methylation status of *Bin1* in ESCC tumor tissues and para-carcinoma normal tissues ($n = 5$)

C1-C5: Cancer tissues; N1-N5: para-carcinoma tissues

2.2 ESCC 组织中 *Bin1* 基因甲基化状态与患者临床病理特征的关系

表 1 所见,*Bin1* 基因甲基化状态与肿瘤分化程度、TNM 分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$),与患者年龄、性别比较无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 ESCC 组织和癌旁组织中 *Bin1* mRNA 与 *Bin1* 甲基化状态之间的关系

qRT-PCR 检测(图 2)结果显示,ESCC 组织中 *Bin1* mRNA 的表达水平明显低于癌旁组织[(0.78 ± 0.05) vs (1.03 ± 0.03)], $t = 9.643, P < 0.01$; *Bin1* 发生甲基化的组织中 *Bin1* mRNA 表达水平显著低于未发生甲基化的组织[(0.68 ± 0.04) vs (0.85 ± 0.07)], $t = 2.476, P < 0.05$ 。

3 讨论

表观遗传是在不改变基因序列的情况下,通过细胞分裂的传递而对基因表达产生调控作用,其中正常基因甲基化引起的基因沉默是癌症的第一表观遗传学标记^[4]。DNA 甲基化是指生物体在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DMT)的催化下,将甲基供体 s-腺苷甲硫氨酸(s-adenosylmethionine,

SAM)转移到特定的碱基上的过程。甲基化的存在决定基因转录的关闭,使这些基因沉默,从而影响 DNA 基因修复、细胞凋亡和血管形成等,并间接影响下游靶基因转录因子的转录^[5]。细胞在有丝分裂过程中的甲基化,可在复制后调控基因转录,并诱导稳定的基因沉默机制^[6]。在体细胞中 DNA 甲基化主要发生在抑癌基因的启动子区,且存在异常甲基化的 CpG 岛^[7]。有证据表明,DNA 甲基化水平在某些 CpG 岛中既可以是可变的也可以是稳定的,说明某些位点的甲基化可能存在个体差异^[8]。抑癌基因的甲基化发生基因沉默的现象非常普遍,如视网膜细胞瘤中 *Rb1* 基因、结肠癌中 *MLH1* 基因、乳腺癌中 *BRCA1* 基因等多种肿瘤中抑癌基因发生甲基化的现象在文献中均有报道。

表 1 ESCC 组织 *Bin1* 甲基化状态与患者临床病理特征的关系

Tab. 1 Correlation between methylation status of *Bin1* and clinicopathological features of ESCC

Feature	N	Methylation frequency		
		n (%)	χ^2	P
Gender				
Male	39	23(58.97)	0.006	0.938
Female	19	11(57.89)		
Age(t/a)				
≤60	30	17(60.71)	0.098	0.754
>60	28	17(56.67)		
Differentiation				
Well + Moderate	25	9(36.00)	9.269	0.002
Poor	33	25(75.76)		
TNM stage				
I + II	44	21(47.73)	8.918	0.003
III + IV	14	13(92.86)		
Invasion depth				
T1 + T2	23	10(43.48)	4.531	0.033
T3	35	25(71.43)		
Lymph node metastasis				
Positive	37	26(70.27)	4.207	0.040
Negative	21	9(42.86)		

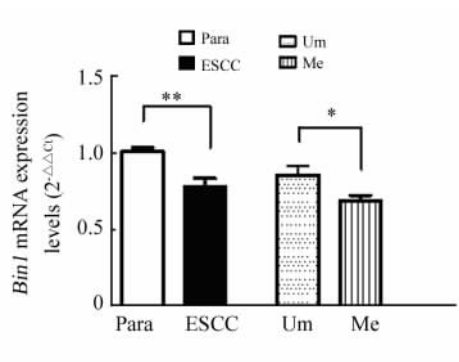


图2 *Bin1* 甲基化前后 ESCC 组织和癌旁组织中 *Bin1* mRNA 的表达

Fig. 2 Expression levels of *Bin1* mRNA in ESCC tissues and para-carcinoma tissues before and after methylation

Para: Para-carcinoma tissues; Um: Unmethylated ESCC tissues; Me: Methylated ESCC tissues;

* $P < 0.05$ vs unmethylated ESCC;

** $P < 0.01$ vs para-carcinoma tissues

Bin1 基因位于人染色体 2q13-3, 是至今发现的唯一具有抑癌功能的配体蛋白, *Bin1* 蛋白通过与 c-Myc 蛋白的 N' 末端结合来激活其肿瘤抑制作用^[9]。*Bin1* 在 DNA 修复、细胞周期调控、细胞凋亡、细胞膜动力学中功能复杂, 与其选择性剪接、分布模式的多样性、亚细胞定位和蛋白质的相互作用等有关^[10-11]。本课题组前期研究^[12]结果表明, *Bin1* 在 ESCC 中呈低表达状态, 但其机制目前尚不清楚。本实验通过对 58 例 ESCC 组织及其相应癌旁组织中 *Bin1* 启动子区的甲基化状态进行检测, 发现 *Bin1* 在 ESCC 组织中呈高甲基化状态, 其启动子区甲基化发生率明显高于癌旁组织, 且 ESCC 组织中 *Bin1* mRNA 的表达明显低于癌旁组织, 这与 Ling 等^[13]在 ESCC 组织中发现 P14ARF 甲基化与 mRNA 的表达关系一致, 提示 *Bin1* 启动子区甲基化可能是其在 ESCC 组织中低表达或缺失的机制之一。本实验还发现在发生甲基化的 ESCC 组织中 *Bin1* mRNA 明显低于未发生甲基化的 ESCC 组织中, 这与 Sun 等^[14]在 ESCC 组织中抑癌基因 *PTEN* 通过其甲基化与 mRNA 低表达或缺失相关联的结果一致, 进一步表明 *Bin1* 低表达或缺失与 DNA 甲基化有关。

作者前期的研究表明, *Bin1* 与 ESCC 患者临床分期、病理组织分级、肿瘤浸润深度和淋巴转移呈负相关。本文通过对 58 例 ESCC 患者的临床病理特征、淋巴结转移情况与 *Bin1* 甲基化状态进行统计学分析, 发现低分化组 *Bin1* 的甲基化率明显高于

中高分化组, III、IV 期组的甲基化率明显高于 I、II 期组, 浸润深度在 T3 组的甲基化率明显高于 T1、T2 组, 有淋巴结转移组的甲基化率明显高于无淋巴结转移组, 这些结果提示, *Bin1* 甲基化与 ESCC 在分化程度低、侵袭深度高、恶性程度高及有淋巴结转移相关, 这与 Hoshimoto 等^[15]在 ESCC 中抑癌基因 *APC* 和 *RASSF1* 甲基化程度与临床病理特征的相关性结果一致, 进一步提示了 *Bin1* 甲基化是导致 *Bin1* 低表达或缺失, 从而影响临床分期、病理组织分级、肿瘤浸润深度和淋巴结转移的重要机制。

本研究通过 MSP 检测 ESCC 组织中 *Bin1* 甲基化状态, 发现启动子区 CpG 岛异常高甲基化是导致 *Bin1* mRNA 在 ESCC 中表达下调或缺失的重要机制, 且 *Bin1* 甲基化与 ESCC 进展和淋巴结转移有关。本研究结果将为深入研究 *Bin1* 功能和 *Bin1* 基因甲基化作为新的生物学标志物或治疗靶点奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] BABA Y, WATANABE M, SHIGAKI H, et al. Negative lymph-node count is associated with survival in patients with resected esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Surgery*, 2013, 153 (2): 234-241. DOI:10.1016/j.surg.2012.08.001.
- [2] PAN K, LIANG X T, ZHANG H K, et al. Characterization of bridging integrator 1 (BIN1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med*, 2012, 18 (1): 507-518. DOI:10.2119/molmed.2011.00319.
- [3] KUZNETSOVA E B, KEKEEVA T V, LARIN S S, et al. Methylation of the BIN1 gene promoter CpG island associated with breast and prostate cancer [J/OL]. *J Carcinog*, 2007, 6:9 [2016-10-02]. <http://www.carcinogenesis.com/article.asp? = 1477-3163>. DOI:10.1186/1477-3163-6-9.
- [4] SANDOVAL J, ESTELLER M. Cancer epigenomics: beyond genomics [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2012, 22 (1): 50-55. DOI:10.1016/j.gde.2012.02.008.
- [5] VIRANI S, COLACINO J A, Kim J H, et al. Cancer epigenetics: a brief review [J]. *ILAR J*, 2012, 53: 359-369. DOI:10.1093/ilar.53.3-4.359.
- [6] LATTANZIO L, LO N C. Epigenetics and DNA methylation in cancer [J]. *World J Transl Med*, 2015, 4 (1): 11-24. DOI:10.5528/wjtm.v4.i1.11.
- [7] KAGAMI M, O'SULLIVAN M J, Green A J, et al. The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers [J/OL]. *PLoS Genet*, 2010, 17, 6 (6): e1000992 [2015-10-02]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000992>. DOI:10.1371/journal.pgen.1000992.
- [8] LIU Y, ARYEE M J, PADYUKOV L, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31 (2): 142-147. DOI:10.1038/nbt.2487.

- [9] CASSIMERE E K, PYNDIAH S, SAKAMURO D. The c-MYC interacting proapoptotic tumor suppressor BIN1 is a transcriptional target for E2F1 in response to DNA damage [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16: 1641-1653. DOI:10.1038/cdd.2009.98.
- [10] ESMAILZADEH S, HUANG Y, SU M W, et al. BIN1 tumor suppressor regulates Fas/Fas ligand-mediated apoptosis through c-FLIP in cutaneous T-cell lymphoma [J]. *Leukemia*, 2015, 29(6): 1402-1413. DOI:10.1038/leu.2015.9.
- [11] PTOKIV I, COWLING B S, LAPORTE J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(5): 453-463. DOI:10.1007/s00109-014-1138-1.
- [12] JIA Y, WANG H, WANG Y, et al. Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(5): 1095-1106. DOI:10.1002/ijc.29481.
- [13] LING Y, ZHANG C, SHEN R, et al. p14ARF repression induced by promoter methylation associated with metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dis Esophagus*, 2014, 27(2): 182-187. DOI:10.1111/j.1442-2050.2012.01413.x.
- [14] SUN Z, JI N, BI M, et al. PTEN gene is infrequently hypermethylated in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 5849-5857. DOI:10.1007/s13277-015-3256-y.
- [15] HOSHIMOTO S, TAKEUCHI H, ONO S, et al. Genome-wide hypomethylation and specific tumor-related gene hypermethylation are associated with esophageal squamous cell carcinoma outcome [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(3): 509-517. DOI:10.1097/JTO.0000000000000441.
- [收稿日期] 2015 - 12 - 20 [修回日期] 2016 - 03 - 24
[本文编辑] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

本刊论文后参考文献的著录格式严格遵守 2015 年新发布的国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求,相对于旧的国家标准和本刊原有的著录格式,主要有以下改动:(1)作者姓名的书写,国人作者拼音姓在前、全大写,名在后、取每个汉字拼音的首字母大写(其间加空格);外籍作者姓在前、全大写,名在后、取名的首字母大写(其间加空格);(2)参考文献著录项目中增加“数字对象唯一标识码(DOI)”,电子资源的各类文献(过去称电子文献)除“获取和访问路径”中包含 DOI 外,均须在“获取和访问路径”项后写上 DOI;非电子资源的各类文献(即传统纸质文献),凡文献原文中或检索到的文献著录条目中有 DOI 者也应在此项后写上 DOI。DOI 的获取,中文文献通过查阅原文或中文 DOI 网站(<http://www.chinadoi.cn>)查询;外文文献通过查找原文或登录 PubMed 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)或 Crossref.org 网站(<http://www.crossref.org>)等查找。常用参考文献的著录格式举例如下:

1 连续出版物(期刊)析出文献

著录格式:主要责任者.题名[文献类型标识/文献载体标识].刊名,出版年,卷(期):起-止页. DOI.

- [1] KNUDSEN E S, MCCLENDON A K, FRANCO J, et al. RB loss contributes to aggressive tumor phenotypes in MYC-driven triple negative breast cancer [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(1):109-122. DOI:10.4161/15384101.2014.967118.

2 电子连续出版物(期刊)析出文献

著录格式:主要责任者.题名[文献类型标识/文献载体标识].刊名,出版年,卷(期):起-止页(更新或修改日期)[引用日期].获取或访问路径. DOI.

- [1] GONG F, PENG X, SANG Y, et al. Dichloroacetate induces protective autophagy in LoVo cells: involvement of cathepsin D/thioredoxin-like protein 1 and Akt-mTOR-mediated signaling [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(11): e913 [2015-11-07]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3847316>. DOI:10.1038/cddis.2013.438.

3 专著

- [1] ABRAMS W B, BEER M H, BERKOW R. 默克老年病手册 [M]. 陈灏珠,王赞舜,刘厚钰,等,译.2版.北京:人民卫生出版社,1996:2-25.
- [2] DEVERELL W, IGLER D. A companion to California history [M/OL]. New York: John Wiley & Sons, 2013: 21-22 [2013-11-15] [2014-06-24]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444305036.ch2/summary>.

4 专著析出文献

- [1] WEINSTEIN L, SWARTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganisms [M] //SODERMAN W A Jr, SODERMAN W A. Pathogenic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

5 学位论文

- [1] 曹新广. Cathepsin 和 Cystatin 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州. 郑州大学, 2007.
- [2] 刘乃安. 生物材料热解失重动力学及其分析方法研究 [D/OL]. 安徽:中国科学技术大学, 2000: 17-18 [2014-08-29]. http://wenku.baidu.com/link?url=GJDXb4lxBUXnIpmq1XoEGSfIh8TMLbidW_Ljlyu33tp707u52rKliyp_U_FBGUmox70vPNaVIVBALAMd5_yfwuKUUO-AGYuB7cuZ-BYEhXa. DOI: 10.7666/d.y351065.

6 专利文献

- [1] 钱其军,李琳芳,吴红平,等.一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PiK),其制备方法及应用:中国,20101496839[P].2010-10-14.
- [2] KOSEKI A, MOMOSE H, KAWAHITO M, et al. Compiler: US 8288402 [P/OL]. 2002-05-25 [2002-05-28]. <http://FF&p=1&u=metahtml/PTO/search-bool.html&r=5&f=G&l=50&col=AND&d=PG01&sl=IBM.AS.&OS=AN/IBM/RS=AN/IBM>.