

***Bcl-3* 表达对结直肠癌组织和 HCT 116 细胞恶性生物学行为的影响**

胡永伟,朱荣,曹方,丁厚中,韩玮(江苏大学附属昆山医院 普外科,江苏 昆山 215300)

[摘要] **目的:** 探讨 *Bcl-3* 蛋白在人结直肠癌组织中的表达以及沉默 *Bcl-3* 基因后对结肠癌 HCT 116 细胞增殖与凋亡的影响。**方法:** 选取 2012 年 1 月至 2015 年 12 月于江苏大学附属昆山医院行结直肠癌根治术的 86 例患者结直肠癌组织及相对应的癌旁组织标本,应用免疫组织化学法检测结直肠癌组织中 *Bcl-3* 蛋白的表达。将 HCT 116 细胞分为 3 组:空白对照组、Control siRNA 组和 *Bcl-3* siRNA 组,按分组转染 *Bcl-3* siRNA 和 Control siRNA,Western blotting 法检测各组 *Bcl-3* 表达量以鉴定转染效率;MTT 法、平板克隆实验、流式细胞术分别检测各组增殖能力、克隆形成能力、细胞周期分布及细胞凋亡率的变化。**结果:** *Bcl-3* 蛋白在结直肠癌组织明显高于相应癌旁组织阳性表达率(72.09% vs 48.84%, $P < 0.05$)。结直肠癌组织中 *Bcl-3* 蛋白的表达与组织学分级、淋巴结转移及 Dukes 分期有关($P < 0.05$)。转染 48 h 后,空白对照组、Control siRNA 组 *Bcl-3* 相对蛋白量表达水平明显高于 *Bcl-3* siRNA 组($P < 0.05$)。MTT 实验中可见 *Bcl-3* siRNA 组光密度(D)值在转染 24、48、72、96 h 时均明显低于空白对照组和 Control siRNA 组($P < 0.05$),*Bcl-3* siRNA 组克隆形成率明显低于其他 2 组($P < 0.05$)。流式细胞术显示,*Bcl-3* siRNA 组 G2 期细胞比例及凋亡率高于空白对照组和 Control siRNA 组($P < 0.05$)。**结论:** 结直肠癌组织中 *Bcl-3* 蛋白的高表达与组织学分级、淋巴结转移及 Dukes 分期有关;沉默 *Bcl-3* 可能导致结肠癌 HCT 116 细胞的细胞周期停滞在 G2 期,抑制细胞增殖能力及克隆形成能力,并促进细胞凋亡。

[关键词] *Bcl-3*;免疫组化;结直肠癌;增殖;凋亡

[中图分类号] R735.3; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)02-0168-06

Effects of *Bcl-3* expression on the malignant biologic behavior of colorectal cancer HCT 116 cells

HU Yongwei, ZHU Rong, CAO Fang, DING Houzhong, HAN Wei (Department of General Surgery, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore *Bcl-3* protein expression in human colorectal cancer and the effects of *Bcl-3* gene silencing on proliferation and apoptosis of colorectal cancer HCT 116 cell line. **Methods:** 86 colorectal cancer tissues and the corresponding adjacent tissues from patients treated in Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University between January 2012 and December 2015 were collected to analyze the correlation between *Bcl-3* expression and clinicopathological features of colorectal cancer. Immunohistochemistry was used to detect *Bcl-3* protein expression in 86 samples. HCT 116 cells were cultivated and divided into three groups: blank control group, control siRNA group (transfecting with control siRNA) and *Bcl-3* siRNA (transfecting with *Bcl-3* siRNA); and then Western blotting was used to determine *Bcl-3* expression to verify the transfection efficiency. In addition, MTT, plate clone formation assay, Flow cytometry and streaming apoptosis assay were used to detect the proliferation, cloning formation, cell cycle distribution and the rate of apoptosis in each group, respectively. **Results:** IHC showed the positive expression rate of *Bcl-3* protein in cancer tissues and adjacent normal tissues was 72.09% and 48.84% ($P < 0.05$), respectively. The *Bcl-3* protein expression in colorectal cancer tissues was positively correlated with histological grade, lymph node metastasis and Dukes staging ($P < 0.05$). After being transfected for 48 h, the relative *Bcl-3* expression level of blank control group and control siRNA group was significantly

[基金项目] 苏州市科教青年科技基金资助项目(No. KJXW2015053),昆山市社会发展科技计划资助项目(No. KS1654)。Project supported by the Suzhou Youth Program of Science and Education (No. KJXW2015053), and the Kunshan Science and Technology Program of Social Development(No. KS1654)

[作者简介] 胡永伟(1981-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤临床学的研究, E-mail: applehuyongwei@126.com

[通信作者] 韩玮(HAN Wei, corresponding author),硕士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的临床研究, E-mail: hans64@126.com

higher than that of *Bcl-3* siRNA group ($P < 0.05$), indicating successful transfection. MTT assay showed the absorbance value in all groups increased in a time-dependent manner. The optical density of *Bcl-3* siRNA group was significantly lower than that of blank control group and control siRNA group at 24, 48, 72 and 96 h after transfection ($P < 0.05$), and colony formation rate of *Bcl-3* siRNA group was obviously lower than the other two groups ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that the proportion of G2 phase cells and cell apoptosis rate of *Bcl-3* siRNA group was higher than those of blank control group and the control siRNA group ($P < 0.05$). **Conclusions:** *Bcl-3* protein expression in colorectal cancer tissues was positively correlated with histological grade, lymph node metastasis and Dukes staging; *Bcl-3* silencing might induce HCT 116 cell cycle arrest at G phase, suppress cell proliferation and colony formation, and promote cell apoptosis.

[**Key words**] *Bcl-3*; immunohistochemical; colorectal cancer; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(2): 168-173. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.011]

Bcl-3 基因是 B 细胞慢性淋巴细胞白血病的一个亚型,属于 I κ B 激酶家族蛋白,在肿瘤形成过程中起着重要的调控作用^[1]。有文献^[24]报道,在结直肠癌组织中 *Bcl-3* 高表达且与预后密切相关,沉默 *Bcl-3* 后,结直肠癌 RKO 细胞的增殖能力下降,并且对奥沙利铂的敏感性显著提高。笔者研究结直肠癌组织 *Bcl-3* 表达情况与临床病理因素关系,再通过沉默结肠癌 HCT 116 细胞内 *Bcl-3* 来探讨下调 *Bcl-3* 蛋白对结肠癌细胞增殖能力、细胞周期分布及细胞凋亡的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2012 年 1 月至 2015 年 12 月于江苏大学附属昆山医院行结直肠癌根治术的 86 例患者的结直肠癌组织及相应癌旁组织标本,其中男性 37 例,女性 49 例,男女比例为 0.76:1,中位年龄 55 岁;术前均未接受放疗或化疗,术后病理结果均经 2 名以上病理医师确认,且都有完整的临床病例资料。

1.2 主要试剂

结直肠癌 HCT 116 细胞由中国科学院上海生物细胞研究所提供。*Bcl-3* siRNA、Control siRNA、小鼠抗人 *Bcl-3* 单克隆抗体及相应二抗购自美国 Santa Cruz 公司,S-P 免疫组织化学试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物公司,Lipofectamine[®] 2000 转染试剂购自美国 Life 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,DMEM、无血清培养基、PBS、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,化学发光检测试剂盒购自美国 Pierce 公司,MTT 检测试剂盒及 SDS-PAGE 快速配制试剂盒均购自碧云天生物技术研究,细胞周期及细胞凋亡检测试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测人结直肠癌组织中 *Bcl-3* 蛋白的表达

采用 S-P 法检测 *Bcl-3* 蛋白,常规脱蜡水化,柠檬酸盐修复液高温修复抗原后,严格按照试剂盒说明书进行操作。常规 DAB 显色,苏木精复染,脱水透明及中性树胶封片,*Bcl-3* 小鼠抗人单克隆抗体稀释度为 1:100,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。本实验结果判定:先按染色强度(核染或胞质染)记分:淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;再按阳性细胞所占百分比计分:5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。染色强度评分和阳性细胞计数评分相乘结果 >2 时为阳性。

1.4 siRNA 转染结肠癌 HCT 116 细胞

取 HCT 116 细胞在含 10% 胎牛血清、无抗生素的 DMEM 中培养,于 37 °C、5% CO₂ 条件下传代生长。将处于对数生长期的 HCT 116 细胞随机分为空白对照组、Control siRNA 组和 *Bcl-3* siRNA 组并接种于 96 孔板上,分别予以正常培养,转染 Control siRNA 和转染 *Bcl-3* siRNA。至细胞密度达到 80%~90% 时,进行转染:将 Control siRNA 或 *Bcl-3* siRNA 加入到无血清培养基中,并分别与 Lipofectamine[®] 2000 转染试剂混合静置 20 min 后加入相应组内,于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 4~6 h 后换 DMEM 继续培养。

1.5 Western blotting 检测转染 siRNA 对 HCT116 细胞中 *Bcl-3* 蛋白表达的影响

提取各组细胞总蛋白于 10% SDS 胶上电泳,再将蛋白电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h;分别加入一抗(抗 *Bcl-3*、内参抗 β -actin 抗体),4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,再加入对应二抗,室温孵育 1 h,TBST 再次洗膜 3 次后,加入 ECL 发光液进行显影,以蛋白灰度分析软件 Quantity One 分析结果。本实验重复 3 次,取平均值。

1.6 MTT 法检测沉默 *Bcl-3* 对 HCT 116 细胞增殖

的影响

将各组细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 6 孔板, 各设 5 个复孔, 将培养板在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 分别于 24、48、72、96 h 时加入 $10 \mu\text{l}$ 的 MTT 溶液, 37°C 孵育 4 h 后, 弃上清, 每孔加 $150 \mu\text{l}$ 的 DMSO 后在酶标仪上 570 nm 处读取光密度 (D) 值。本实验重复 3 次。

1.7 平板克隆实验检测沉默 *Bcl-3* 对 HCT 116 细胞克隆形成率的影响

分别将各组细胞按 200 个/孔种于 6 孔板上, 在 37°C 、5% CO_2 环境下培养, 每隔 3 d 更换 1 次培养液, 培养至孔内出现肉眼可见的细胞团块, 10 ~ 14 d 时; 弃培养液, 甲醇固定, 结晶紫染色, 拍照后计数 (以 50 个细胞以上为一个集落)。计算公式为: 克隆形成率 (%) = (克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.8 流式细胞术检测沉默 *Bcl-3* 对 HCT 116 细胞周期和凋亡的影响

转染 48 h 后, 收集各组细胞, 70% 冰乙醇于 4°C 固定 24 h 后取出, PBS 洗涤、离心后, 加入 RNase A 和 PI 反应, 37°C 避光水浴染色 30 min, 然后上流式细胞仪检测细胞周期, 并用 Modfit 软件分析细胞周期分布。

转染 48 h 后, 4°C 预冷 PBS 洗涤、离心各组细胞 2 次, $250 \mu\text{l}$ 稀释的结合缓冲液重悬细胞。取 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液于 5 ml 流式管中, 加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V/FITC 和 $10 \mu\text{l}$ PI, 混匀后于室温避光孵育 15 ~ 20 min, 然后在反应管中加入 $400 \mu\text{l}$ PBS, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较进行 LSD- t 检验, 组内变量采用配对 χ^2 检验, 多组比较进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Bcl-3* 蛋白在结直肠癌组织中呈高表达

免疫组织化学法检测结果 (图 1) 显示, *Bcl-3* 蛋白在结直肠癌的表达显著高于相应癌旁组织 (72.09% vs 48.84%, $P < 0.05$)。

2.2 结直肠癌组织中 *Bcl-3* 的表达与部分临床病理指标有关

结直肠癌组织中 *Bcl-3* 蛋白的表达与组织学分级、淋巴结转移及 Dukes 分期有关 ($P < 0.05$), 而与年龄、性别、肿瘤大小、分布及血清 CEA、CA19-9、CA12-5 等表达水平无关 ($P > 0.05$)。见表 1。

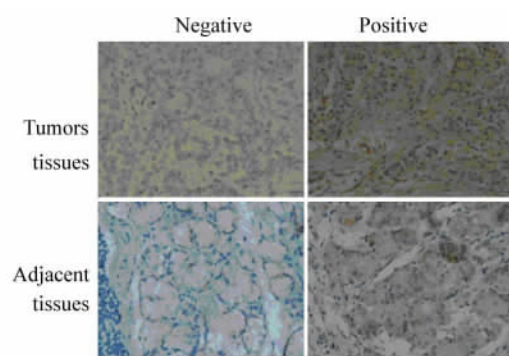


图 1 *Bcl-3* 蛋白在结直肠癌及相应癌旁组织中的表达 (S-P 法, $\times 400$)

Fig. 1 Expression of *Bcl-3* in colorectal cancer tissues and adjacent tissues (S-P, $\times 400$)

2.3 转染 siRNA 成功降低 HCT 116 细胞内 *Bcl-3* 的表达

Western blotting 检测各组细胞 *Bcl-3* 蛋白表达结果 (图 2) 显示, 空白对照组 *Bcl-3* 蛋白相对表达量明显高于 *Bcl-3* siRNA 组 (1.0311 ± 0.1036 vs 0.5842 ± 0.0218 , $P < 0.05$), 提示干扰 *Bcl-3* 表达成功。

2.4 干扰 *Bcl-3* 表达降低 HCT 116 细胞增殖能力

MMT 法检测结果 (表 2) 显示, 各组不同时间点 D 值均随时间依次上升, *Bcl-3* siRNA 组 D 值在 48、72、96 h 3 个时间点均明显低于空白对照组和 Control siRNA 组 ($P < 0.05$)。

2.5 干扰 *Bcl-3* 表达降低 HCT 116 细胞平板克隆形成能力

平板克隆实验结果显示, *Bcl-3* siRNA 组克隆形成率明显低于空白对照组、Control siRNA 组 [$(34.4 \pm 5.70)\%$ vs $(72.3 \pm 7.16)\%$ 、 $(75.6 \pm 6.12)\%$, 均 $P < 0.05$]。

2.6 干扰 *Bcl-3* 表达后 HCT 116 细胞 G2 期受到明显阻滞

流式细胞术检测结果 (图 3) 显示, 空白对照组、Control siRNA 转染组和 *Bcl-3* siRNA 转染组的细胞周期分布情况为: *Bcl-3* siRNA 组 G1 期低于空白对照组和 Control siRNA 组 (均 $P < 0.05$), 而 G2 期高于空白对照组和 Control siRNA 组 (均 $P < 0.05$)。

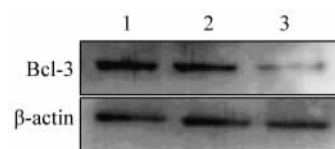
2.7 干扰 *Bcl-3* 表达后 HCT 116 细胞凋亡率显著增加

流式细胞术检测结果 (图 4) 显示, *Bcl-3* siRNA 组凋亡率明显高于空白对照组和 Control siRNA 组 (均 $P < 0.05$)。

表 1 结直肠癌 *Bcl-3* 蛋白阳性表达与临床病理指标的关系[*n*(%)]

Tab. 1 Relationship between *Bcl-3* positive expression and clinicopathologic factors of colorectal carcinoma(*n*[%])

Factor	<i>N</i>	<i>Bcl-3</i> expression	χ^2	<i>P</i>
Age(<i>t/a</i>)			0.06	>0.05
≤50	34	24(70.59)		
>50	52	38(73.08)		
Gender			1.28	>0.05
Male	37	29(78.38)		
Female	49	33(67.35)		
Size (<i>d/cm</i>)			1.44	>0.05
<2	18	11(61.11)		
2~5	38	29(76.32)		
>5	30	22(73.33)		
Histological grade			8.61	<0.05
1	18	9(50.00)		
2	45	32(71.11)		
3	23	21(91.30)		
Lymph node invasion			18.41	<0.01
No	51	28(54.90)		
Yes	35	34(97.14)		
Location			3.18	>0.05
Left	21	13(61.90)		
Right	49	39(79.59)		
Rectum	16	10(62.50)		
Dukes stage			6.82	<0.01
A/B	38	22(57.89)		
C/D	48	40(83.33)		
Serum CEA[$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$]			3.34	>0.05
<5	55	36(65.45)		
≥5	31	26(83.87)		
Serum CA19-9 [$\rho/(\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$]			2.09	>0.05
<37	62	42(67.74)		
≥37	24	20(83.33)		
Serum CA12-5 [$\rho/(\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$]			2.67	>0.05
<35	58	45(77.59)		
≥35	28	17(60.71)		



1: Blank control group; 2: Control siRNA group; 3: *Bcl-3* siRNA group

图 2 各组 HCT 116 细胞 *Bcl-3* 蛋白表达水平

Fig. 2 Expressions of *Bcl-3* in HCT 116 cells of each group

3 讨论

目前认为, *Bcl-3* 蛋白正常水平的表达对维持人体免疫系统、防止过度炎症反应起到重要作用,而在多种肿瘤中 *Bcl-3* 蛋白常过度表达,从而促进肿瘤形成和发展^[5]。本研究首先通过免疫组化检测 *Bcl-3* 蛋白在结直肠癌组织及其癌旁组织中的表达,发现其表达水平与组织学分级、淋巴结转移及 Dukes 分期有关,而与年龄、性别、肿瘤大小及分布无相关。王少敏等^[6]在对结直肠癌组织(46 例)进行免疫组化实验时发现 *Bcl-3* 高表达与低分化密切相关,而分期无关。还有文献^[7]报道,在乳腺癌 MCF-7 细胞中,雌二醇撤药后,可能会通过激活 NF- κ B 和 *Bcl-3* 来实现激发激素非依赖性转变及促进肿瘤生长。本实验中,笔者试图探索 *Bcl-3* 蛋白表达与肠癌相关肿瘤标志物(包括血清 CEA、CA19-9、CA12-5 等)的关系,结果表明 *Bcl-3* 表达水平与这类标志物间无明显相关性。通过转染 *Bcl-3* siRNA,可下调 HCT 116 结肠癌细胞中 *Bcl-3* 蛋白的表达,说明通过转染 siRNA 成功构建下调 *Bcl-3* 表达水平的 HCT 116 细胞株。之后在 MTT 实验中发现,沉默 *Bcl-3* 基因后, HCT 116 结肠癌细胞的增殖能力显著降低,并在 48、72、96 h 3 个时间点效果显著;在克隆形成实验中同样能够发现,沉默 *Bcl-3* 后,癌细胞集落能力显著降低。通过流式细胞术探索沉默 *Bcl-3* 后增殖能力减弱可能的机制:沉默 *Bcl-3* 基因后, HCT 116 细胞周期 G2 期分布明显增多,说明 HCT 116 肠癌细胞 G2 期明显受阻滞;而沉默后细胞凋亡率明显升高,说明很有可能 *Bcl-3* 对 HCT 116 细胞有着抑制凋亡的作用,在沉默该基因后这种抑制凋亡的作用明显减弱,导致癌细胞凋亡能力增强。有研究^[8]显示,在一项关于沉默结肠癌细胞 *Bcl-3* 基因的研究中也同样发现了 *Bcl-3* 蛋白表达下调后,多种结肠癌细胞可通过下调 p-AKT 表达来增强增殖抑制率。

表 2 siRNA 转染对 HCT 116 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, D_{570}$)
 Tab. 2 Effect of siRNA transfection on proliferation of HCT 116 cells($\bar{x} \pm s, D_{570}$)

Group	n	24 h	48 h	72 h	96 h
Blank control	15	0.402 ± 0.012	0.709 ± 0.038	1.603 ± 0.183	2.044 ± 0.117
Control siRNA	15	0.422 ± 0.011	0.693 ± 0.071	1.579 ± 0.046	1.807 ± 0.108
<i>Bcl-3</i> siRNA	15	0.397 ± 0.008	0.571 ± 0.036*	0.817 ± 0.066*	1.306 ± 0.051*

* $P < 0.05$ vs Blank control group or Control siRNA group

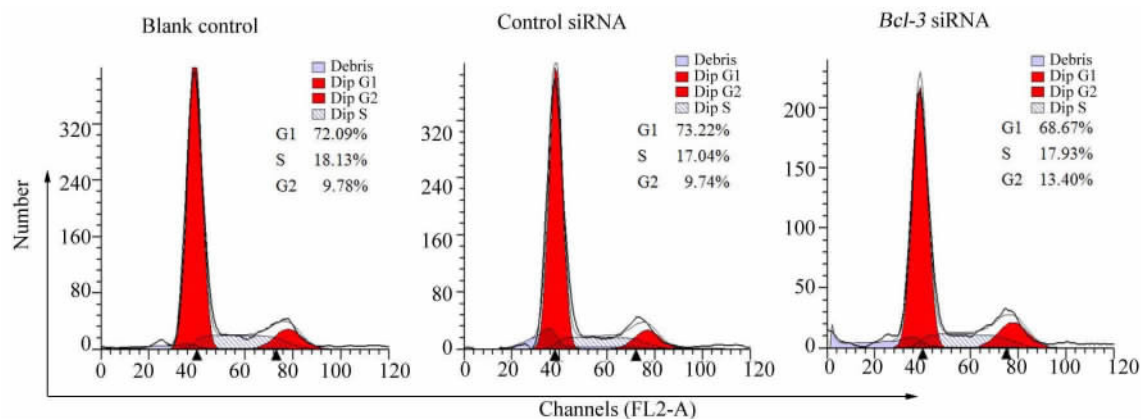


图 3 siRNA 转染后 HCT 116 细胞周期分布情况
 Fig. 3 The cell-cycle distribution of HCT 116 cells after siRNA transfection

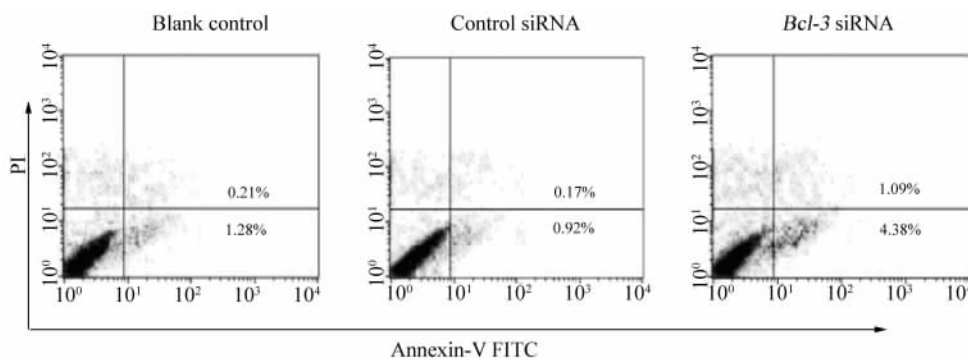


图 4 siRNA 转染后 HCT 116 细胞的凋亡率
 Fig. 4 The apoptosis rates of HCT 116 after siRNA transfection

本研究综合了免疫组化、临床资料以及体外试验,共同证实了 *Bcl-3* 基因在结直肠癌发生发展中的重要作用。然而本研究的标本收集数量仅 86 例,且数据源于回顾性分析,客观性相对较差,也缺乏随访数据^[9]。体外试验中,仅研究了 HCT 116 细胞,并未继续研究其他的细胞生物学特性,如侵袭能力及迁移能力的影响等。本研究通过 siRNA 瞬时转染的方式,发现沉默 *Bcl-3* 后能够有效抑制 HCT 116 细胞生物学行为,然而裸鼠荷瘤体内试验和 *Bcl-3*

沉默后引发的一系列调控机制还有待于慢病毒载体的构建^[10-12]。因此,在将来的研究中,有必要继续收集临床资料和组织标本,并完善随访体系;继续培养 HCT-15、SW620、SW480 等其他结肠癌细胞株,并完善侵袭迁移等其他细胞学实验,并进一步探索沉默 *Bcl-3* 后引起这类细胞学行为改变的相关机制。相比于 *P53*、*Ras* 基因等其他经典的癌相关基因^[13-17],国内外关于 *Bcl-3* 基因的研究目前还较少,因此,这也是值得继续探索下去的理由之一。

综上所述,结直肠癌组织中 *Bcl-3* 蛋白的表达与组织学分级、淋巴结转移及 Dukes 分期呈正相关;沉默 *Bcl-3* 可能通过使 HCT 116 结肠癌细胞的细胞周期停滞在 G2 期,以降低细胞增殖能力,并能增强促凋亡能力抑制细胞生长。

[参 考 文 献]

- [1] MALDONADO V, MELENDEZ-ZAJGLA J. Role of Bcl-3 in solid tumors[J/OL]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 152[2016-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3258214>. DOI: 10.1186/1476-4598-10-152.
- [2] PUVVADA S D, FUNKHOUSER W K, GREENE K, et al. NF- κ B and Bcl-3 activation are prognostic in metastatic colorectal cancer[J]. *Oncology*, 2010, 78(1): 181-188. DOI:10.1159/000313697.
- [3] 王少敏, 叶小磊, 倪曙民, 等. *Bcl-3* 基因沉默对 *Bcl-3* 高表达的人大肠癌 RKO 细胞增殖和药物敏感性的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(8): 1412-1416.
- [4] SAAMARTHY K, BJÖRNER S, JOHANSSON M, et al. Early diagnostic value of Bcl-3 localization in colorectal cancer[J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 341[2016-7-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4434567>. DOI: 10.1186/s12885-015-1342-6.
- [5] 王少敏, 叶孟, 倪曙民. *Bcl-3* 的研究进展[J]. *生命科学*, 2009, 21(1): 97-101.
- [6] 王少敏, 叶孟, 倪曙民, 等. 结直肠癌组织 *Bcl-3* 蛋白表达及其临床意义分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(4): 285-287.
- [7] PRATT M A, BISHOP T E, WHITE D, et al. Estrogen withdrawal-induced NF- κ B activity and Bcl-3 expression in breast cancer cells: roles in growth and hormone independence[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(19): 6887-6900. DOI:10.1128/mcb.23.19.6887-6900.2003.
- [8] URBAN B C, COLLARD T J, EAGLE C J, et al. Bcl-3 expression promotes colorectal tumorigenesis through activation of AKT signalling[J]. *Gut*, 2016, 65(7): 1151-1164. DOI:10.1136/gutjnl-2014-308270.
- [9] 王树玲, 方军, 马丹, 等. 临床研究的选题和设计思路[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(1): 140-144. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.024.
- [10] 黄宇贤, 陈心彤, 蔡宋浩, 等. siRNA 干扰 NF- κ B 家族成员表达抑制人肝癌 HepG2 细胞表达 NKG2DLs[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(6): 696-702. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.004.
- [11] 马贵亮, 张学斌, 朱新红, 等. 重组 TNF- α 慢病毒感染的脐血间质干细胞对胃癌移植瘤生长的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(6): 604-608. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.007.
- [12] 晋佳路, 朱仁书, 谢育媛, 等. 慢病毒载体介导 CDK2 基因沉默对黑色素瘤 B16-F1 细胞生物学行为的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(2): 243-249. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.015.
- [13] THAMKACHY R, KUMAR R, RAJASEKHARAN K N, et al. ERK mediated upregulation of death receptor 5 overcomes the lack of p53 functionality in the diaminothiazole DAT1 induced apoptosis in colon cancer models: efficiency of DAT1 in Ras-Raf mutated cells[J/OL]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 22[2016-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4782294>. DOI:10.1186/s12943-016-0505-7.
- [14] INES C, DONIA O, RAHMA B, et al. Implication of K-ras and p53 in colorectal cancer carcinogenesis in tunisian population cohort[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 7163-7175. DOI:10.1007/s13277-014-1874-4.
- [15] 杨晓丹, 郭子健, 刘贝贝, 等. Med19 基因沉默对 p53 野生型和突变型乳腺癌细胞紫杉醇化疗疗效的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(6): 716-723. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.007.
- [16] HUANG P, ZHANG H, ZHANG X F, et al. Evaluation of intra-ductal ultrasonography, endoscopic brush cytology and K-ras, P53 gene mutation in the early diagnosis of malignant bile duct stricture [J]. *Chin Med J*, 2015, 128(14): 1887-1892. DOI:10.4103/0366-6999.160508.
- [17] 王连静, 郭炜, 刘丽宏. 淋巴瘤中 RAS 相关区域家族 5A 基因启动子区甲基化状态及其 mRNA 表达与患者临床表现的关系 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(4): 537-544. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.014.

[收稿日期] 2016 - 10 - 10

[修回日期] 2016 - 12 - 15

[本文编辑] 王映红

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
上海厦泰生物科技有限公司	封三
索尼(中国)有限公司生命科学业务部	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心集团	后插页