

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.007

· 临床研究 ·

## 金雀异黄素对肝癌 Bel-7404 细胞放疗增敏作用及其可能的机制

姜婧<sup>1</sup>, 颜宏利<sup>2</sup>, 杜爱英<sup>2</sup>, 郭玉玲<sup>1</sup>, 宋立华<sup>1</sup> (1. 上海交通大学 农业与生物学院 食品科学与工程系, 上海 200240; 2. 第二军医大学 长海医院 实验诊断科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 探讨金雀异黄素对肝癌 Bel-7404 细胞的放疗增敏作用及其作用机制。**方法:** 将肝癌 Bel-7404 细胞分为正常对照组 (NC)、Gen 处理组 (G)、单纯照射组 (R) 及 Gen + 辐照组 (G + R)。除 NC 组外, 其余各组分别采用 5  $\mu\text{mol/L}$  Gen 和/或 8 Gy X 射线 (剂量率 300 cGy/min) 处理, 利用 CCK-8 法、流式细胞术分别检测 Gen 与 X 射线单独或联用对 Bel-7404 细胞的增殖、细胞周期和凋亡的影响; 并通过 Western blotting 检测对 ATM-Chk2 通路相关蛋白表达及其磷酸化水平的影响。**结果:** G + R 组细胞在处理 24 h 时细胞增殖抑制率即显著高于 R 组 [ (16.80  $\pm$  2.59)% vs (9.76  $\pm$  2.11)% ,  $P < 0.05$  ], 且随着时间的延长, 对细胞增殖的抑制作用更明显; 与 NC 组比较, G、R、G + R 组细胞凋亡率和 G2/M 期细胞比例均显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且 G + R 组凋亡率显著高于 R 组 [ (51.86  $\pm$  2.88)% vs (33.18  $\pm$  4.48)% ,  $P < 0.01$  ]; G + R 组中 p-ATM 与 p-Chk2 表达量明显高于 G 组、R 组和 NC 组。**结论:** Gen 可以增强肝癌 Bel-7404 细胞的放疗敏感性, 其机制可能与 ATM-Chk2 信号通路的激活有关。

**[关键词]** 金雀异黄素; 放疗; 肝癌; 增敏

**[中图分类号]** R734.2; R730.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)04-0372-05

## Genistein ENHances radiosensitivity of hepatoma Bel-7404 cells and its possible mechanisms

JIANG Jing<sup>1</sup>, YAN Hongli<sup>2</sup>, DU Aiyang<sup>2</sup>, GUO Yuling<sup>1</sup>, SONG Lihua<sup>1</sup> (1. Department of Food Science and Technology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200140, China; 2. Department of Laboratory Diagnostics, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University of PLA, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of genistein (Gen) enhancing radio-sensitivity of Hepatoma Bel-7404 cells. **Methods:** Bel-7404 cells were divided into four groups: normal control (NC), genistein treatment (G), radiation alone treatment (R) as well as genistein + radiation treatment group (G + R). Except the NC group, the other three groups were treated with genistein (5  $\mu\text{mol/L}$ ) and/or X-ray irradiation (8 Gy) at a dose rate of 300 cGy/min, respectively. The effect of Gen and x-ray on cell proliferation, cell cycle and apoptosis of Bel-7404 cells were detected using CCK-8 and flow cytometry, respectively; the expression levels of ATM-Chk2 signal pathway related proteins were detected using western blotting. **Results:** The inhibitory rate on cell proliferation in G + R group was significantly higher than that in R group at 24 h after irradiation [ (16.80  $\pm$  2.59)% vs (9.76  $\pm$  2.11)% ,  $P < 0.05$  ]. And the inhibitory effect was enhanced in a time - dependent manner. Compared with NC group, the cell apoptosis rate and percentage of cells in G2/M phase were all significantly increased in G, R and G + R group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Combination of Gen with X - ray further increased cell apoptosis compared with X-ray treatment alone group [ (51.86  $\pm$  2.88)% vs (33.18  $\pm$  4.48)% ,  $P < 0.01$  ]. Furthermore, the expressions of p-ATM and p-Chk2 were obviously up-regulated in G + R group compared with that of R, G and NC group. **Conclusions:** Gen could enhance radiosensitivity of hep-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 31570869, 31170844)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China Grants (No. 81472770, 81672350)

**[作者简介]** 姜婧 (1990 - ), 女, 硕士生, 主要从事食品分子营养学研究, E-mail: 992448173@qq.com

**[通信作者]** 宋立华 (SONG Lihua, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事食品分子营养学、营养与慢性病预防、功能性食品研究及其开发应用研究, E-mail: lihuas@sjtu.edu.cn

atoma Bel-7404 cells, and the mechanism might be related with the activation of ATM-Chk2 signal pathway.

[ **Key words** ] genistein; radiation; sensitization; liver cancer

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 372-378. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.007 ]

肝癌是一种危害性极大的恶性肿瘤,病情发展迅速,给患者生命安全带来巨大威胁。目前的治疗手段主要有手术及放化疗,由于手术切除后复发率仍较高,且肝癌对多种抗肿瘤药物不敏感,因此放疗是肝癌综合治疗中的重要组成部分。但高剂量的射线照射会带来很多不良反应,如何提高肿瘤细胞对放疗的敏感性成为目前肿瘤研究中的重要问题。金雀异黄酮(genistein, Gen),是一种来源于豆科植物和齿状植物的天然异黄酮化合物。在细胞和动物实验中,Gen都表现出抗肿瘤活性,且在一定剂量范围内无毒性或毒性很低,是一种很有潜力的抗肿瘤活性化学物质<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3-6]</sup>发现其对食管癌细胞、前列腺癌 DU145 细胞、宫颈癌细胞及结肠癌细胞等具有放疗增敏作用,而关于 Gen 能否增强肝癌细胞放疗敏感性的报道较少。因此,本实验通过将 Gen 与 X 射线放疗联合使用,观察其对肝癌 Bel-7404 细胞的影响,并初步探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人肝癌细胞 Bel-7404 购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;金雀异黄酮(纯度 $\geq 98\%$ )购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基(Hyclone)购自上海博光生物科技有限公司;胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Annexin-V/PI 凋亡试剂、PI/RNase 染色缓冲液购自美国 BD 公司, $\beta$ -actin、周期监测点激酶 2(checkpoint kinase 2, Chk2)、p-Chk2、共济失调毛细血管扩张突变蛋白(ataxia telangiectasia mutated, ATM)、p-ATM 抗体购自美国 CST 公司。

### 1.2 细胞培养及辐照方法

Bel-7404 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的条件下进行培养。每 2~3 d 传代一次,待细胞处于对数生长期进行后续实验。

本实验照射的放射源采用 6MV-X 线直线加速器,照射野 10 cm $\times$ 10 cm,源皮距 100 cm,剂量率 300 cGy/min,辐照剂量采用 8 Gy。

### 1.3 CCK-8 实验检测单独或联合使用 Gen 和 X 射线对 Bel-7404 细胞增殖的影响

取对数生长期的肝癌细胞 Bel-7404 制成单细胞悬液,接种至 96 孔板(2 $\times$ 10<sup>3</sup>/孔),分设正常对照

组(NC)、Gen 处理组(G)、单纯照射组(R)及 Gen + 辐照组(G + R),每组细胞接种 5 个复孔培养 24 h 至细胞贴壁后,吸除细胞培养液后加 DMEM 培养液 100  $\mu$ l/孔。G 组和 G + R 组加入 Gen 至其终浓度为 5  $\mu$ mol/L;NC 组和 R 组加入等量 DMSO;并设置只加培养基的调零组(B)。继续培养 4 h 后给予 R 组和 G + R 组 8 Gy X 射线照射。分别于照射后 24、48 及 72 h 后,加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂和 100  $\mu$ l 培养基孵育 1.5 h,检测各孔 450 nm 处光密度(D)值,计算细胞增殖抑制率,观察不同处理对细胞增殖的影响。增殖抑制率(%) = 1 - [(NC 组 D 值 - 实验组 D 值)/NC 组 D 值]  $\times$  100%。本实验重复 3 次。

### 1.4 流式细胞术检测单独或联合使用 Gen 和 X 射线对 Bel-7404 细胞周期及凋亡的影响

取对数生长期的 Bel-7404 细胞接种于 6 孔板中,分组及处理条件同 1.3。

细胞周期检测。48 h 后终止培养,胰酶消化成单细胞悬液,PBS 洗涤 2 次,1 500 r/min 离心 5 min,加入 -20 °C 预冷的 75% 乙醇,4 °C 固定过夜。用 4 °C 预冷 PBS 洗涤 1 次,加入 PI/RNase 染色缓冲液,500  $\mu$ l/次(1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞),室温下避光 15 min,流式细胞仪测定细胞周期。

细胞凋亡检测。72 h 收集细胞后,用适当体积 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞,加入 Annexin V 室温下避光孵育 15 min,再加入 PI 室温下避光孵育 5 min,立即上机检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

### 1.5 Western blotting 检测单独或联合使用 Gen 和 X 射线对 Bel-7404 细胞内 ATM-Chk2 通路相关蛋白表达的影响

收集不同处理组细胞,裂解提取总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度,每组取 30  $\mu$ g 蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,5% BSA 封闭,加入相应的一抗 4 °C 孵育过夜(1:1 000),TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:2 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,将 ECL 发光试剂盒中 A 液和 B 液等体积混合,均匀涂满 PVDF 膜表面,静置 5 min 左右,将膜置入凝胶成像仪中显影,检测目的蛋白的表达。

### 1.6 统计学分析

所有统计资料均采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间的比较用独

立样本  $t$  检验, 多组之间的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  (双侧检验) 为有统计学差异。

## 2 结果

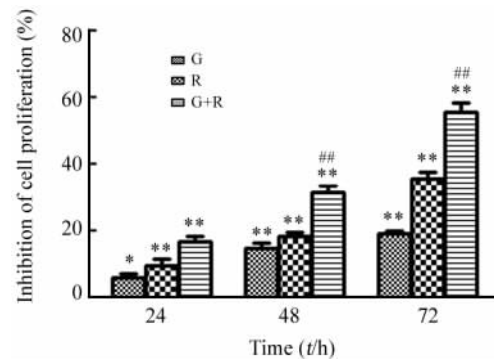
### 2.1 Gen 与 X 射线辐照联用对 Bel-7404 肝癌细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果如图 1 所示,  $5 \mu\text{mol/L}$  Gen 处理 Bel-7404 肝癌细胞 24、48、72 h 后, 细胞增殖的抑制率分别是  $(6.16 \pm 1.97)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(14.75 \pm 3.02)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(19.38 \pm 1.29)\%$  ( $P < 0.01$ ), 表明与 NC 组相比, 单独使用 Gen 对 Bel-7404 细胞的增殖具有抑制作用; R 和 G + R 组细胞 24、48、72 h 的细胞增殖抑制率分别为  $(9.76 \pm 2.11)\%$  vs  $(16.80 \pm 2.59)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(18.46 \pm 2.42)\%$  vs  $(31.70 \pm 3.60)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(35.87 \pm 3.31)\%$  vs  $(55.86 \pm 4.21)\%$  ( $P < 0.01$ ), 可见较低剂量 Gen 与辐照联用即具有较好的辐射增敏作用, 且随着时间的延长, 对细胞增殖的抑制作用更明显。

### 2.2 Gen 与 X 射线辐照联用促进 Bel-7404 细胞周期 G2/M 期阻滞

流式细胞术检测细胞周期结果(图 2)显示, 与

NC 组比较, G、R、G + R 组 G0/G1 期细胞百分数分别减少  $(8.44 \pm 2.33)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(23.85 \pm 3.05)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(34.88 \pm 2.90)\%$  ( $P < 0.01$ ), S 期细胞百分数变化不大, G2/M 期细胞百分数分别增加了  $(8.14 \pm 1.32)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(23.91 \pm 3.36)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(39.25 \pm 2.34)\%$  ( $P < 0.01$ ), 均有显著性差异。

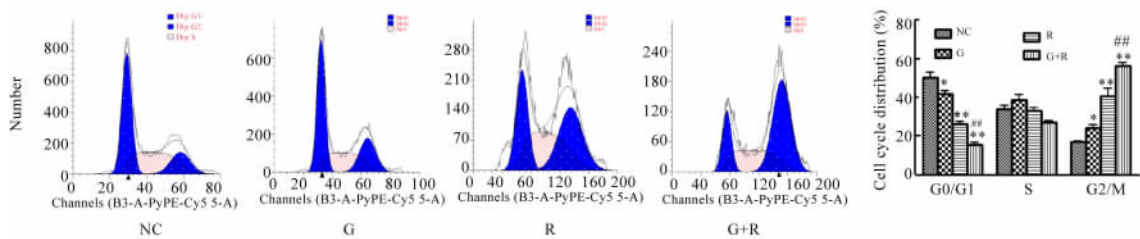


\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs NC group;

#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs R group

图 1 Gen 与 X 射线辐照联用对 Bel-7404 细胞增殖的影响

Fig. 1 Combined effects of Gen and X-ray irradiation on the proliferation of Bel-7404 cells



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs NC group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs R group

图 2 Gen 与 X 射线辐照联用对 Bel-7404 细胞周期分布的影响

Fig. 2 Combined effects of Gen and X-ray irradiation on the cell cycle distribution of Bel-7404 cells

### 2.3 Gen 与 X 射线辐射联用促进 Bel-7404 细胞凋亡

流式细胞术检测细胞凋亡结果(图 3)显示, G 组凋亡率为  $(8.91 \pm 1.96)\%$ , 与 NC 组相比无显著差别; 与 NC 组相比, 单纯辐照和联合给药均能不同程度诱导肿瘤细胞的凋亡, R 组和 G + R 组凋亡率分别为  $(33.18 \pm 4.48)\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $(51.86 \pm 2.88)\%$  ( $P < 0.01$ ), 且 G + R 组凋亡率显著高于 R 组 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 Gen 联合 X 射线辐射促进 ATM-Chk2 通路相

#### 关蛋白的磷酸化

细胞处理 72 h 后 ATM-Chk2 通路相关蛋白的表达情况如图 4, ATM 与 Chk2 总蛋白含量在不同处理组中表达量基本一致, 但磷酸化水平蛋白表达具有明显差异, NC 组中磷酸化 ATM 与 Chk2 蛋白基本不表达, G 组、R 组及 G + R 组的 P-ATM 与 P-Chk2 蛋白均有一定的表达, 且联用组 (G + R) 的磷酸化蛋白表达量最高, 明显高于单纯处理组 (G 组和 R 组)。

### 3 讨论

放射治疗是临床治疗恶性肿瘤常用的手段之一。肿瘤放射治疗的效果与肿瘤对放疗的敏感性有密切关系<sup>[7]</sup>。细胞经 X 射线照射后,其增殖率是反

映细胞内在放射敏感性的主要特征<sup>[8]</sup>。本研究发现,较低浓度 Gen 与 X 射线联用时,较单独使用 X 射线照射可显著抑制肝癌细胞的增殖,表明 Gen 可以增强肝癌细胞的放射敏感性。

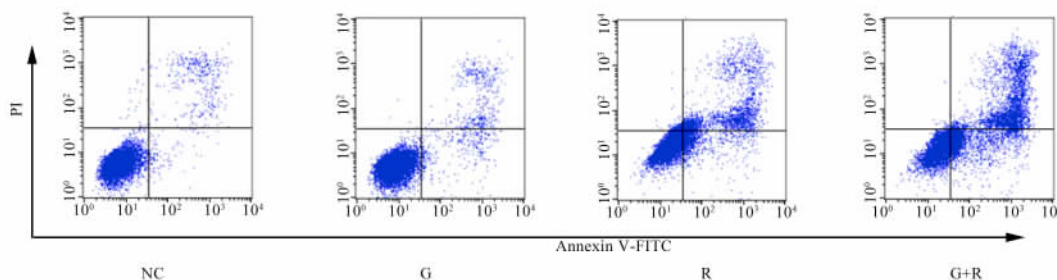


图 3 Gen 与 X 辐射联用对 Bel-7404 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Combined effects of Gen and X-ray irradiation on the apoptosis of Bel-7404 cells

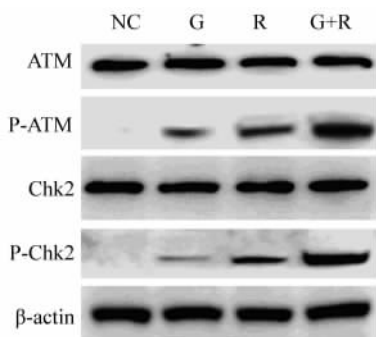


图 4 Gen 与 X 辐射联用对 Bel-7404 细胞 ATM-Chk2 通路相关蛋白磷酸化的影响

Fig. 4 Effects of Gen combined with X-ray irradiation on the expressions of ATM -Chk2 pathway related proteins and those phosphorylations in Bel-7404 cells

抑制肿瘤细胞的增殖,主要是通过阻止细胞周期进程和/或诱导细胞凋亡来实现的。细胞周期与细胞放疗敏感性密切相关,研究<sup>[9]</sup>表明 G2/M 期的细胞对射线最敏感。Rafoul<sup>[10]</sup>等发现,Gen 与放疗联用处理前列腺癌细胞,可调控 Cyclin B 等细胞周期相关蛋白的表达,将细胞周期阻滞于 G2/M 期,增强放疗的治疗效果。细胞周期主要由毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白( ataxia-telangiectasiamutation, ATM)和 ATM 相互作用蛋白( ATM-Rad3-Related, ATR)激酶及其下游底物如 Chk2、Chk1 等进行调控,其中,ATM 蛋白激酶对放射线引起的 DNA 双链断裂损伤非常敏感,会自动发生磷酸化活化,进而

激活 ATM-Chk2 信号通路,诱导细胞发生 G2/M 期阻滞<sup>[11-14]</sup>。本研究结果显示,Gen 增强了放疗诱导的肝癌细胞 G2/M 期阻滞,并且 Gen 还增加了放疗诱导的 ATM 激酶磷酸化,其下游底物 Chk2 的磷酸化水平也相应增加。因此,提示 Gen 对放疗诱导人肝癌细胞 G2/M 阻滞的增强可能与 ATM 及 Chk2 磷酸化水平增加有关。

细胞周期的阻滞为 DNA 损伤修复提供了时间,但对于无法修复的细胞则以凋亡的形式被清除,因此许多发生细胞周期阻滞的细胞,都会伴随细胞的凋亡<sup>[15-16]</sup>。本研究发现,低浓度的 Gen 基本不会引起细胞的凋亡,但 Gen 可以显著增强 X 射线诱导细胞凋亡的作用。ATM 在 DNA 损伤修复及细胞凋亡中具有重要作用<sup>[17]</sup>;磷酸化激活的 ATM 通过 Chk2 等激酶诱导肝癌细胞发生周期阻滞,促进 DNA 损伤的修复;同时启动凋亡途径,使 DNA 损伤无法修复的细胞以凋亡的形式清除<sup>[18-19]</sup>。提示 Gen 促进放射后细胞的凋亡可能与 ATM-Chk2 信号通路的激活有关。

综上所述,Gen 对 Bel-7404 肝癌细胞有明显的放疗增敏作用,促进细胞周期阻滞及凋亡,抑制细胞的增殖,其分子机制可能与 ATM-Chk2 信号通路的激活有关。本研究将为肝癌的临床放疗增敏提供新的治疗策略。

### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] MOON Y J, WANG X, MORRIS M E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism[ J ]. Toxicol In Vitro,

- 2006, 20(2): 187-210. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.048.
- [2] WANG Q, GE X, TIAN X, et al. Soy isoflavone: the multipurpose phytochemical[J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(5): 697-701. DOI: 10.3892/br.2013.129.
- [3] AKIMOTO T, NONAKA T, ISHIKAWA H, et al. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, enhanced radiosensitivity in human esophageal cancer cell lines in vitro: possible involvement of inhibition of survival signal transduction pathways[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50(1): 195-201. DOI: 10.1016/s0360-3016(00)01560-1.
- [4] YAN S X, EJIMA Y, SASAKI R, et al. Combination of genistein with ionizing radiation on androgen-independent prostate cancer cells[J]. *Asian J Androl*, 2004, 6(4): 285-290. DOI: 10.1016/s0360-3016(03)01251-3.
- [5] YASHAR C M, SPANOS W J, TAYLOR D D, et al. Potentiation of the radiation effect with genistein in cervical cancer cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 99(1): 199-205. DOI: 10.1016/j.ygyno.2005.07.002.
- [6] GRUCA A, KRAWCZYK Z, SZEJA W, et al. Synthetic genistein glycosides inhibiting EGFR phosphorylation enhance the effect of radiation in HCT 116 colon cancer cells[J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 18558-18573. DOI: 10.3390/molecules191118558.
- [7] GENTILE M, LATONEN L, LAIHO M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(16): 4779-4790. DOI: 10.1093/nar/gkg675.
- [8] EYLER C E, RIC J N. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(17): 2839-2845. DOI: 10.1200/jco.2007.15.1829.
- [9] PSWLIK T M, GEYOMARLI K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 59(4): 928-942. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2004.03.005.
- [10] RAFFOUL J J, WANG Y, KUCUK O, et al. Genistein inhibits radiation-induced activation of NF-kappa B in prostate cancer cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest[J/OL]. *BMC Cancer*, 2006, 6(1): 107[2016-10-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1464148/>. DOI: 10.1186/1471-2407-6-107.
- [11] AHN J Y, SCBWAZ J K, PIWAICA-WORMS H, et al. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(1): 5934-5936.
- [12] ZHOU B B, CHATURVEDI P, SPRING K, et al. Caffeine abolishes the mammalian G2/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10342-10348. DOI: 10.1074/jbc.275.14.10342.
- [13] PAULL T T. Mechanisms of ATM activation[J]. *Annual Rev Biochem*, 2015, 84: 711-738. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034335.
- [14] YAN Y, HEIN A L, GREER P M, et al. A novel function of HER2/Neu in the activation of G2/M checkpoint in response to  $\gamma$ -irradiation[J]. *Oncogene*, 2015, 34(17): 2215-2226. DOI: 10.1038/onc.2014.167.
- [15] ROOS W P, THOMAS A D, KAINA B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(1): 20-33. DOI: 10.1038/nrc.2015.2.
- [16] KARIMIAN A, AHMADI Y, YOUSEFI B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage[J/OL]. *DNA Repair (Amst)*, 2016, 42: 63-71 [2016-12-06] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786416300477>. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008.
- [17] ABU-ODEH M, SALAH Z, HERBEL C, et al. WWOX, the common fragile site FRA16D gene product, regulates ATM activation and the DNA damage response[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(44): E4716-E4725 [2016-10-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4226089/>. DOI: 10.1073/pnas.1409252111.
- [18] KOUNDRIOUKOFF S, POLO S, ALMOUZNI G. Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints[J/OL]. *DNA Repair (Amst)*, 2004, 3: 969-978 [2016-10-06] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786404000692>. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.010.
- [19] SHECHTER D, COSTANZO V, GAUTIER J. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(7): 648-655. DOI: 10.1038/ncb1020373.232499.
- [收稿日期] 2016-10-12 [修回日期] 2017-03-08  
[本文编辑] 黄静怡