

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.011

· 基础研究 ·

## *Klotho* 基因对子宫颈鳞癌细胞恶性生物学行为的影响及相关机制

张艳芳<sup>1</sup>, 李醒亚<sup>2</sup>(1. 安阳市肿瘤医院内五科, 河南 安阳 455000; 2. 郑州大学第一附属医院 肿瘤科, 河南 郑州 450003)

**[摘要]** **目的:**探讨 *Klotho* 基因对人子宫颈鳞癌细胞株 SiHa 生物学特性的影响及其作用机制。**方法:**实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测 *Klotho* 基因在子宫颈鳞癌细胞系 SiHa、HeLa 和 C33A 及人永生表皮细胞 HaCaT 细胞中的表达水平。构建 *Klotho* 过表达载体并转染 SiHa 细胞, 采用 CCK-8 法、Transwell 侵袭实验和流式细胞术检测 SiHa 细胞增殖、凋亡和迁移能力的变化; Western blotting 检测 Rho A 和 ROCK 1 蛋白表达水平。**结果:***Klotho* 在子宫颈鳞癌 SiHa、HeLa、C33A 细胞中表达水平低于 HaCaT 细胞 ( $P < 0.05$ )。在 SiHa 细胞中过表达 *Klotho* 后, (1) 细胞的增殖能力显著低于对照组 [ $67.37 \pm 5.04$ ] % vs [ $100.34 \pm 7.62$ ] %,  $P < 0.05$ ]; (2) G0/G1 期细胞百分率显著增加 [ $82.56 \pm 3.89$ ] % vs [ $61.37 \pm 3.28$ ] %,  $P < 0.05$ ], S 期细胞百分率显著减少 [ $9.12 \pm 2.48$ ] % vs [ $28.97 \pm 2.08$ ] %,  $P < 0.01$ ]; (3) 细胞早期凋亡率和晚期凋亡率均显著增加 (均  $P < 0.05$ ); (4) 细胞迁移率显著降低 ( $P < 0.01$ ); (5) Rho A 和 ROCK 1 蛋白表达水平均显著下降 (均  $P < 0.01$ )。**结论:***Klotho* 能够抑制人子宫颈鳞癌 SiHa 细胞的增殖和迁移, 并促进其凋亡; 作用机制可能与抑制 Rho A/ROCK 1 信号通路的活化有关, 提示 *Klotho* 可以作为诊断和靶向治疗子宫颈鳞癌的潜在作用位点。

**[关键词]** *Klotho* 基因; 子宫颈鳞癌; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R730.54; R737.33

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)05-0521-06

## Effect of *Klotho* gene on malignant biological behavior of cervical squamous cells and its mechanism

ZHANG Yanfang<sup>1</sup>, LI Xingya<sup>2</sup>(1. Fifth Department of Medical, Anyang Tumour Hospital, Anyang 455000, Henan, China; 2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of *Klotho* gene on the biological characteristics of cervical squamous cell carcinoma SiHa cells. **Methods:** The expression of *Klotho* in the cervical squamous cell carcinoma cell SiHa, HeLa and C33A lines and the human immortalized epidermal cell HaCaT line was detected by Real-time PCR and Western blotting. Vectors over-expressing *Klotho* were constructed and used to transfect SiHa cells, and then the cell proliferation, apoptosis and migration were detected with CCK-8 assay, Flow cytometry and Transwell assay, respectively. The expressions of Rho A and ROCK 1 at protein level were measured with Western blotting assay. **Results:** Expressions of *Klotho* in cervical cancer cell SiHa, HeLa and C33A lines were lower than that in the HeCaT line ( $P < 0.05$ ). After over-expression of *Klotho* in SiHa cells, (1) cell proliferation was significantly decreased, compared with control group ([ $67.37 \pm 5.04$ ] % vs [ $100.34 \pm 7.62$ ] %,  $P < 0.05$ ); (2) the percentage of cells at G0/G1 phrase was increased ([ $61.37 \pm 3.28$ ] % vs [ $82.56 \pm 3.89$ ] %,  $P < 0.05$ ), while the percentage at S phrase was decreased ([ $9.12 \pm 2.48$ ] % vs [ $28.97 \pm 2.08$ ] %,  $P < 0.01$ ); (3) cell apoptotic rate at both early and late stage were all decreased (all  $P < 0.05$ ); (4) cell migration was suppressed ( $P < 0.01$ ); (5) the expressions of Rho A and ROCK 1 at protein level were significantly decreased (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** *Klotho* suppressed SiHa cell proliferation and migration, and promoted cell apoptosis; the mechanism may be related to the suppression of Rho A/ROCK 1 signaling pathway activation, suggesting that *Klotho* may be used as a potential new target for diagnosis and targeted therapy of cervical squamous cell carcinoma.

**[Key words]** *Klotho* gene; cervical squamous cell carcinoma; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(5): 521-526. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.011]

**[作者简介]** 张艳芳(1981-),女,硕士生,主治医师,主要从事恶性肿瘤的内科治疗研究, E-mail:13937297605@163.com

**[通信作者]** 李醒亚(LI Xingya, corresponding author),博士,主任医师,硕士生导师,主要从事恶性肿瘤的内科治疗研究, E-mail:554124576@qq.com

子宫颈癌的发生与高危型人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染密切相关,99.7%的鳞癌或94%~100%的腺癌及鳞腺癌中可检出高危型HPV,但其具体的发病机制仍不明确<sup>[1-3]</sup>。最早发现 *Klotho* 基因的功能与人类衰老有关,近年来随着其功能研究<sup>[4]</sup>的不断深入,尤其是该基因在肿瘤发生发展中的作用备受研究者的关注。有研究<sup>[5-7]</sup>表明, *Klotho* 基因在乳腺癌、卵巢癌、肝癌、直肠癌等恶性肿瘤中低表达,推测其可能作为一种抑癌基因参与调控肿瘤的发生发展。过表达 *Klotho* 可通过斯钙素-1(stanniocalcin-1, STC1)抑制甲状腺癌细胞系 FTC133 和 FTC238 的增殖,并促进其凋亡<sup>[8]</sup>;过表达 *Klotho* 可抑制肝癌 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的增殖,促进细胞凋亡,其机制可能与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关<sup>[9]</sup>。*Klotho* 在子宫颈癌中,尤其是在子宫颈腺癌低表达<sup>[10]</sup>,但其具体的作用机制仍不明确。本课题通过检测 *Klotho* 基因在不同类型人子宫颈鳞癌细胞株中的表达水平,探讨 SiHa 细胞中过表达 *Klotho* 对子宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移及细胞周期、凋亡等的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及主要试剂

人子宫颈癌细胞系 SiHa、Hela、C33A 及人永生表皮细胞 HaCaT 均购自中国科学院上海细胞库。胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基及 Opti-NEM 培养基购自美国 Gibco 公司, Lipofectamine™2000 转染试剂和 SYBR Green I Real-time PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司,兔抗人 *Klotho* 单克隆抗体(ab181373)、鼠抗人 Ras 同源基因家族成员 A(Ras homolog gene family member A, RhoA)单克隆抗体(ab54835)、兔抗人 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(Rho associated coiled coil forming protein kinase 1, ROCK 1)单克隆抗体(ab45171)购自美国 Abcam 公司,兔抗人 GAPDH 单克隆抗体(#2118)、抗鼠 IgG HRP-连接抗体(#7076)、抗兔 IgG HRP-连接抗体(#7074)购自美国 CST 公司, CCK-8 细胞增殖分析试剂盒购自日本同仁化学研究所,细胞周期及凋亡检测试剂盒购自凯基公司, *Klotho* 过表达质粒(pCMV6-KL)及其对照质粒(pCMV6)由 OriGene 公司提供。*Klotho* 和 GAPDH 引物由上海生工生物工程公司设计并合成(*Klotho* F: 5'-ACCTGCTGGCGCACAAACC-3'; R: 5'-TTGGCAAACCAACCTAGTACA-3'; GAPDH F: 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'; R: 5'-GAAGATG-GTGATGGGATTC-3')。

### 1.2 细胞培养、转染和实验分组

实验用细胞系均培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中。取对数生长期细胞消化后接种于 6 孔板中( $1 \times 10^6$  个/孔),待细胞 60%~80% 汇合时,更换为无血清的培养基,同步化 12 h 后进行转染。实验分为空白对照(Ctrl)、阴性对照(pCMV6)和 *Klotho* 过表达(pCMV6-KL)3 组。将质粒溶解于 Opti-MEM 培养基中常温孵育 5 min,另取 Lipofectamine™2000 加入 Opti-MEM 培养基常温孵育 5 min,静置 20 min。将相应混合物加入各组细胞中,置于培养箱中培养 6 h 后,更换为正常细胞培养基继续培养 48 h。提取细胞蛋白测定转染效率并进行后续实验分析。

### 1.3 实时荧光定量 PCR 检测子宫颈癌细胞 *Klotho* 基因的表达水平

按照 TRIzol 说明书提取 SiHa、Hela、C33A 及 HaCaT 细胞总 RNA。纯化并定量后,取 2  $\mu$ g 总 RNA 以逆转录酶催化合成 cDNA,并采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 的方法检测 *Klotho* 的表达。PCR 循环条件:94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析基因的相对表达量。实验重复 6 次。

### 1.4 Western blotting 测定 SiHa 细胞的蛋白表达水平

提取各组细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。调整各组蛋白总上样量至 80  $\mu$ g,加入 4 倍体积的上样缓冲液进行 SDS-PAGE,后将蛋白转移至 PVDF 膜上,室温下加 5% 脱脂牛奶封闭 90 min,然后加入相应比例的一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次;再加入相对应的二抗室温孵育 120 min, TBST 洗涤 3 次,暗室中显影、定影并冲洗胶片。实验重复 6 次。所得数据采用 ImageJ 软件行灰度半定量分析。

### 1.5 CCK-8 法测定过表达 *Klotho* 对 SiHa 细胞增殖的影响

将 pCMV6、pCMV6-KL 和 Ctrl 组 SiHa 细胞接种于 96 孔板( $2 \times 10^3$  个/孔),处理后继续培养 22 h,每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂,培养箱中继续孵育 2 h。酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的光密度( $D$ )值。每组设 3 个复孔取均值,另设单孔只加入培养基作空白对照。实验重复 6 次。

### 1.6 流式细胞术检测过表达 *Klotho* 对 SiHa 细胞周期的影响

用无 EDTA 的胰酶消化 pCMV6、pCMV6-KL 和 Ctrl 组 SiHa 细胞后,离心收集细胞,加 PBS 漂洗 3 次后重悬细胞并调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/ml,加入 70% 无水乙醇于 4  $^{\circ}$ C 下避光过夜固定。 $1\ 000 \times g$

离心 5 min 后洗去乙醇, 避光加入碘化丙啶 (PI), 37 °C 条件下孵育 30 min, 流式细胞仪检测激发波长  $E_x = 488$  nm、发射波长  $E_m = 630$  nm 处的荧光强度。实验重复 6 次。

### 1.7 Annexin V/PI 双染色法及流式细胞术检测过表达 *Klotho* 对 SiHa 细胞凋亡的影响

用无 EDTA 的胰酶消化 pCMV6、pCMV6-KL 和 Ctrl 组 SiHa 细胞后, 离心收集细胞, 加 PBS 漂洗 3 次后, 用结合缓冲液重悬细胞并调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/ml, 加入 Annexin V-FITC 室温条件下避光孵育 10 min, 后避光加入 PI 继续反应 5 min。流式细胞仪检测激发波长  $E_x = 488$  nm、发射波长  $E_m = 530$  nm 处的荧光强度。实验重复 6 次。

### 1.8 Transwell 侵袭实验检测过表达 *Klotho* 对 SiHa 细胞迁移的影响

常规消化并离心收集 pCMV6、pCMV6-KL 和 Ctrl 组 SiHa 细胞, 用培养基重悬细胞并调整其密度至  $2 \times 10^5$  个/ml。将各组细胞分别接种于 Transwell 小室的上室中, 在下室内加入常规培养基, 置于培养

箱中继续孵育 24 h。取出细胞常规处理后, 0.1% 结晶紫中染色后, 于倒置显微镜下观察、拍照, 并计数染色细胞的数目(每组细胞计数 5 个视野, 取其均值), 并统计相对迁移率(相对迁移率 = 处理组细胞迁移数/对照组细胞迁移数  $\times 100\%$ )。实验重复 6 次。

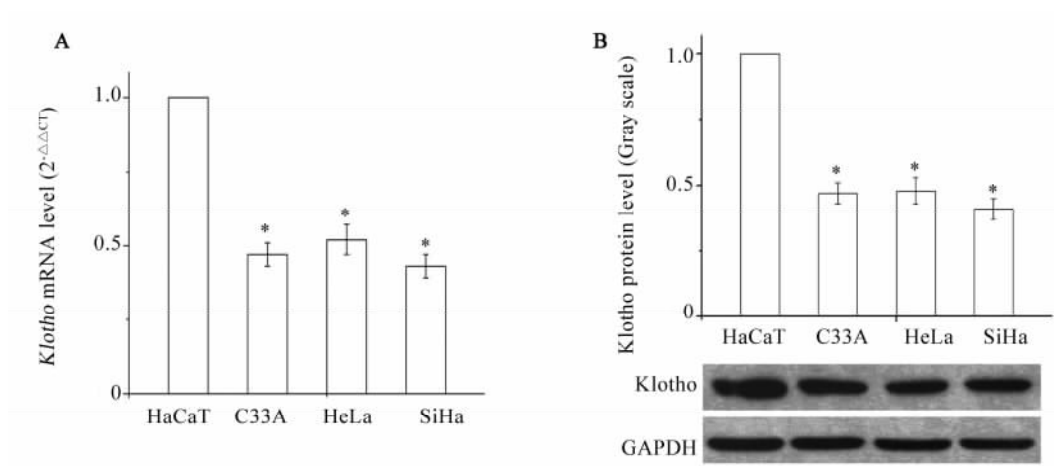
### 1.9 统计学处理

数据用 SPSS13.0 统计软件处理, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析, 各组均数间的两两比较用 Bonferroni 校正的  $t$  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 子宫颈鳞癌 SiHa、Hela、C33A 细胞中 *Klotho* 低表达

实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测结果(图 1)显示, 子宫颈鳞癌 SiHa、Hela 和 C33A 细胞中 *Klotho* 的表达水平均显著低于人永生化表皮细胞 HaCaT ( $P < 0.05$ )。结果提示 *Klotho* 在各型子宫颈鳞癌细胞中低表达, 可能参与调控子宫颈鳞癌细胞的生物学功能。



\*  $P < 0.05$  vs HaCaT cell line

A: Expression level of *Klotho* mRNA detected by Real-time PCR;

B: Expression level of *Klotho* protein detected by Western blotting

图 1 不同子宫颈鳞癌细胞系中 *Klotho* 的表达水平

Fig. 1 Expression of *Klotho* in different cervical cancer cell lines

### 2.2 转染 pCMV6-KL 后 SiHa 细胞中 *Klotho* 高表达

Western blotting 检测结果显示, pCMV6-KL 组、SiHa 细胞中 *Klotho* 的表达水平升高, 为对照组的 ( $2.63 \pm 0.07$ ) 倍, 差异具有统计学意义 ( $t = 4.76$ ,  $P < 0.01$ )。

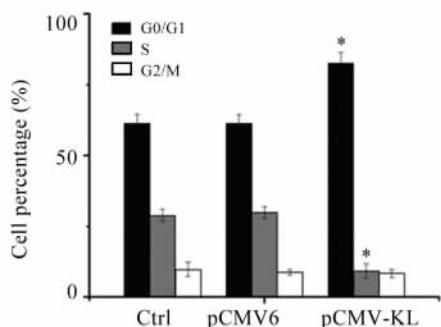
### 2.3 过表达 *Klotho* 抑制 SiHa 细胞的增殖

CCK-8 法检测结果显示, 转染 pCMV6-KL 后,

SiHa 细胞增殖率显著低于对照组 [ $(67.37 \pm 5.04)\%$  vs  $(100.34 \pm 7.62)\%$ ,  $t = 3.12$ ,  $P < 0.05$ ]。

流式细胞术检测结果(图 2)显示, 和对照组相比, 过表达 *Klotho* 后, G0/G1 期细胞所占百分比显著增加 [ $(82.56 \pm 3.89)\%$  vs  $(61.37 \pm 3.28)\%$ ,  $t = 2.89$ ,  $P < 0.05$ ], S 期细胞显著减少 [ $(9.12 \pm$

2.48)% vs (28.97 ± 2.08)%,  $t = 5.13$ ,  $P < 0.01$ ], 说明过表达 Klotho 可阻滞 SiHa 细胞周期由 G0/G1 期向 S 期发展。结果提示, 过表达 Klotho 可抑制子宫颈癌 SiHa 细胞的增殖。



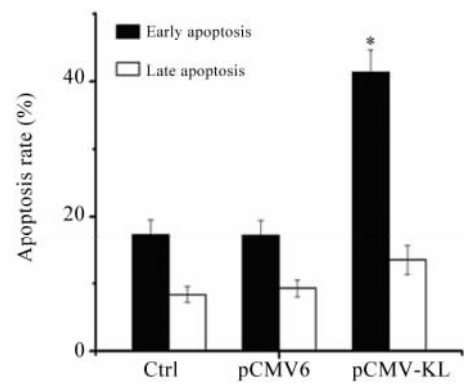
\*  $P < 0.05$  vs Ctrl group

图 2 过表达 Klotho 对 SiHa 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of Klotho over-expression on the cell cycle of SiHa cells

### 2.4 过表达 Klotho 促进 SiHa 细胞的凋亡

AnnexinV/PI 双染法检测结果(图 3)显示, 和对照组相比, 过表达 Klotho 后, SiHa 细胞的早期凋亡率显著增加 [ (41.37 ± 3.23)% vs (17.32 ± 2.11)%,  $t = 3.26$ ,  $P < 0.05$ ]; 中晚期细胞凋亡率也显著增加 [ (13.51 ± 2.15)% vs (9.31 ± 1.24)%,  $t = 2.78$ ,  $P < 0.05$  ]。结果表明, 过表达 Klotho 可明显促进子宫颈癌 SiHa 细胞的凋亡。



\*  $P < 0.05$  vs Ctrl group

图 3 过表达 Klotho 对细胞凋亡的影响

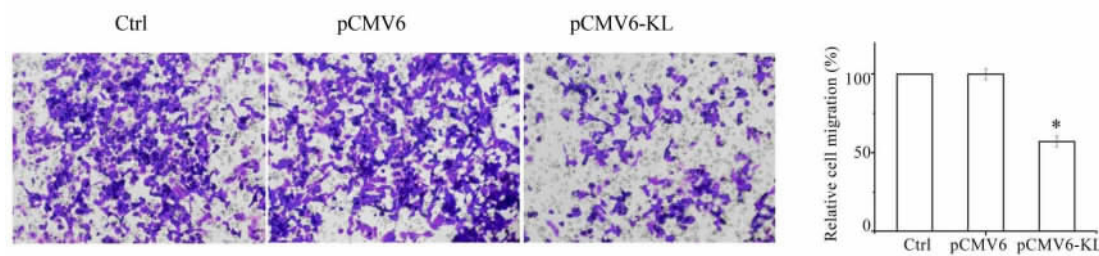
Fig. 3 Effect of Klotho over-expression on the cell apoptosis of SiHa cells

### 2.5 过表达 Klotho 抑制 SiHa 细胞的迁移

Transwell 侵袭实验检测结果(图 4)显示, pCMV6-KL 组 SiHa 细胞迁移率低于 pCMV6 组和 Ctrl 组 ( $t = 3.79$ ,  $P < 0.01$ )。结果表明过表达 Klotho 可抑制子宫颈癌 SiHa 细胞的迁移能力。

### 2.6 过表达 Klotho 后 SiHa 细胞 Rho A 和 ROCK 1 蛋白低表达

Western blotting 检测结果(图 5)显示, 和对照组相比, 过表达 Klotho 后 SiHa 细胞 Rho A 和 ROCK 1 蛋白表达水平显著下降 ( $t = 4.16, 4.46$ , 均  $P < 0.01$ )。结果表明 Klotho 可抑制 Rho A/ROCK 1 信号通路的激活。



\*  $P < 0.05$  vs Ctrl group or pCMV6 group

图 4 Transwell 检测过表达 Klotho 对 SiHa 细胞迁移的影响(结晶紫染色, ×400)

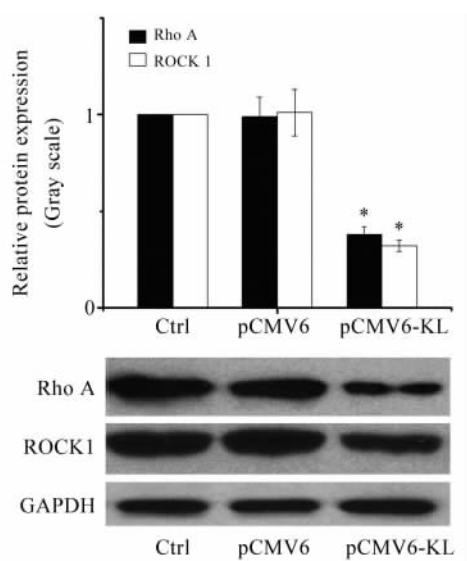
Fig. 4 Effect of Klotho over-expression on SiHa cell migration determined by Transwell assay( Crystal violet staining, ×400 )

## 3 讨论

子宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 近年来发病率呈上升化及年轻化趋势, 严重威胁女性

的健康。随着分子生物学研究的进展, 人们对子宫颈癌的认识逐渐加深, 除了 HPV 感染这一高危因素外, 子宫颈癌相关肿瘤标志物和基因的研究也不断深入。有研究<sup>[10]</sup>显示, Klotho 在子宫颈癌中低表

达,但其具体作用仍不明确。本研究检测了几种不同类型的子宫颈癌细胞,均出现 *Klotho* 的低表达,与之前的研究结果类似,提示 *Klotho* 在子宫颈癌中可能发挥抑癌基因样作用;同时有可能参与调节子宫颈癌细胞的生物学功能。



\*  $P < 0.05$  vs Ctrl group

图5 过表达 *Klotho* 对 SiHa 细胞中 Rho A 和 ROCK1 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of *Klotho* over-expression on the protein expressions of Rho A and ROCK1 in SiHa cells determined by Western blotting

肿瘤的发生发展进程与肿瘤细胞的恶性增殖及凋亡抵抗密切相关。大量的研究<sup>[8-9,11]</sup>表明, *Klotho* 可抑制肿瘤细胞的增殖,促进其凋亡。为深入探讨子宫颈癌细胞中 *Klotho* 抑癌作用及其机制,本实验通过检测人子宫颈癌细胞中 *Klotho* 的表达,探讨 *Klotho* 对子宫颈癌细胞生物学特性的影响。依据前期实验结果,笔者发现 SiHa 细胞中 *Klotho* 的表达水平较低,故而选用 SiHa 细胞对 *Klotho* 基因的作用进行了深入的分析。本研究结果显示,过表达 *Klotho* 后, SiHa 细胞的增殖率显著降低,并出现细胞周期的 G1/S 阻滞;过表达 *Klotho* 后 SiHa 细胞的凋亡率明显增加。结果提示 *Klotho* 在子宫颈癌中可能通过促进癌细胞的增殖并抑制其凋亡,抑制肿瘤的发生发展进程。癌细胞的转移也是肿瘤恶性程度的一个重要标志。有研究<sup>[12]</sup>提示,在真皮毛细血管内皮细胞中,抑制 *Klotho* 的表达可抑制细胞迁移。在人脐静脉内皮细胞中, *Klotho* 可通过激活 AKT 信号通路促进细胞的增殖、迁移及黏附<sup>[13]</sup>。miR-

199a-5p 促进胃癌细胞的侵袭转移的下游靶基因正是 *Klotho*<sup>[14]</sup>。这些研究均提示, *Klotho* 基因与细胞的侵袭迁移密切相关。本实验结果发现,过表达 *Klotho* 后 SiHa 细胞的迁移能力明显下降。提示 *Klotho* 可抑制 SiHa 细胞的扩散和转移,抑制子宫颈癌的恶化进程。

关于 *Klotho* 抑制细胞增殖和迁移,并抑制细胞凋亡的机制在不同的细胞中呈不同的表现。在直肠癌细胞中 *Klotho* 可通过抑制胰岛素样生长因子 1 受体( insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R )介导的 PI3K/AKT 信号通路抑制细胞的增殖及侵袭<sup>[11]</sup>; 而 *Klotho* 抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡则与负调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路密切相关<sup>[9]</sup>。RhoA 蛋白是 Rho( Ras homologue )超家族的一员,属于小分子 G 蛋白,具有 GTP 酶活性。有研究<sup>[15-17]</sup>显示, RhoA 蛋白在多种恶性肿瘤中高表达,且可通过影响细胞周期来调节细胞的增殖, ROCK1 则是 RhoA 下游重要的效应分子,并与细胞的侵袭转移密切相关。本实验发现过表达 *Klotho* 后细胞中 Rho A 和 ROCK 1 蛋白表达水平显著下降,说明 *Klotho* 可抑制 Rho A/ROCK 1 信号通路的激活。因此推测 *Klotho* 可能通过调控 Rho A/ROCK 1 通路影响子宫颈癌细胞的增殖、迁移及凋亡等生物学行为,但其中涉及的具体作用机制仍需进一步地研究。

综上所述, *Klotho* 在各类子宫颈癌细胞中低表达,且 *Klotho* 能够抑制人子宫颈癌 SiHa 细胞的增殖和迁移,并促进其凋亡,其作用机制可能与抑制 Rho A/ROCK 1 信号通路的活化有关。

## [参考文献]

- [1] ABDELMUTTI N, HOFFMAN-GOETZ L. Risk messages about HPV, cervical cancer and the HPV vaccine gardasil in North American News Magazines[ J ]. J Cancer Educ, 2010, 25( 3 ): 451-456. DOI:10.1007/s13187-010-0087-9.
- [2] CHEN W, MOLIJN A, ENQI W, et al. The variable clinicopathological categories and role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma: a hospital based nation-wide multi-center retrospective study across China[ J ]. Int J Cancer, 2016, 139( 12 ): 2687-2697. DOI:10.1002/ijc.30401.
- [3] MOGA M A, DIMIENESCU O G, ARVATESCU C A, et al. The role of natural polyphenols in the prevention and treatment of cervical cancer-an overview[ J/OL ]. Molecules, 2016, 21( 8 ). pii: E1055[ 2016-01-24 ]. <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/8/1055>. DOI:10.3390/molecules21081055.
- [4] PAVLATOU M G, REMALEY A T, GOLD P W. *Klotho*: a humeral mediator in CSF and plasma that influences longevity and susceptibility to multiple complex disorders, including depression [ J/OL ]. Transl Psychiatry, 2016, 6( 8 ): e876[ 2017-01-24 ].

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5022081/. DOI: 10.1038/tp.2016.135.
- [5] RUBINEK T, WOLF I. The role of alpha-Klotho as a universal tumor suppressor [J/OL]. *Vitam Horm*, 2016, 101: 197-214 [2016-01-24]. <http://www.sciencedirect.com/science/bookseries/00836729>. DOI:10.1016/bs.vh.2016.03.001.
- [6] TANG X, WANG Y, FAN Z, et al. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Lab Invest*, 2016, 96(2):197-205. DOI: 10.1038/labinvest.2015.86.
- [7] LIU C, CUI W, WANG L, et al. Klotho gene polymorphisms are related to colorectal cancer susceptibility [J/OL]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6):7446-7449 [2016-01-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4525985/>.
- [8] DAI D, WANG Q, LI X, et al. Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1):552-558. DOI: 10.3892/or.2015.4358.
- [9] SUN H, GAO Y, LU K, et al. Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2015, 13:307 [2016-01-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619481/>. DOI:10.1186/s12957-015-0717-0.
- [10] AVIEL-RONEN S, RUBINEK T, ZADOK O, et al. Klotho expression in cervical cancer: differential expression in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(1):53-57. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-202929.
- [11] LI X X, HUANG L Y, PENG J J, et al. Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(2):611-618. DOI: 10.3892/ijo.2014.2430.
- [12] MARKIEWICZ M, PANNEERSELVAM K, MARKS N. Role of Klotho in migration and proliferation of human dermal microvascular endothelial cells [J/OL]. *Microvasc Res*, 2016, 107: 76-82 [2016-01-24]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00262862>. DOI: 10.1016/j.mvr.2016.05.005.
- [13] 王芳娟, 胡巨龙, 熊力, 等. Klotho 蛋白对人脐静脉内皮细胞增殖迁移黏附及血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(28): 2207-2211. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2014.28.012.
- [14] HE X J, MA Y Y, YU S, et al. Up-regulated miR-199a-5p in gastric cancer functions as an oncogene and targets Klotho [J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14:218 [2016-01-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3994330/>. DOI: 10.1186/1471-2407-14-218.
- [15] HINSENKAMP I, SCHULZ S, ROSCHER M, et al. Inhibition of Rho-associated kinase 1/2 attenuates tumor growth in murine gastric cancer [J]. *Neoplasia*, 2016, 18(8):500-511. DOI: 10.1016/j.neo.2016.07.002.
- [16] DÍAZ-NÚÑEZ M, DIEZ-TORRE A, DE WEVER O, et al. Histone deacetylase inhibitors induce invasion of human melanoma cells in vitro via differential regulation of N-cadherin expression and RhoA activity [J/OL]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 667 [2017-01-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4994393/>. DOI: 10.1186/s12885-016-2693-3.
- [17] YUAN W, GUO Y Q, LI X Y, et al. MicroRNA-126 inhibits colon cancer cell proliferation and invasion by targeting the chemokine (C-X-C motif) receptor 4 and Ras homolog gene family, member A, signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 60230-60244. DOI: 10.18632/oncotarget.11176.
- [收稿日期] 2016-12-20 [修回日期] 2017-02-17  
[本文编辑] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *L*(*l*)、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)