

[文章编号] 1000- 4718(2005)06- 1111- 06

# 启动子区 5' CpG 岛去甲基化对人结肠癌细胞生物学表型的影响\*

方晓明, 郑树<sup>△</sup>, 陈功星, 孙立峰, 吕庆华

(浙江大学医学院附属第二医院, 浙江大学肿瘤研究所, 浙江 杭州 310009)

**[摘要]** 目的: 探讨 DNA 启动子区 5' CpG 岛甲基化状态与人结肠癌 RKO 细胞增殖凋亡等生物学特征的关系。方法: 应用特异性 DNA 甲基转移酶(DNMTs) 抑制剂- 5- 氮- 2'- 脱氧胞苷(5- Aza- 2'- deoxycytidine, 5- Aza- CdR) 处理肠癌 RKO 细胞 72 h, 甲基化特异性 PCR(methylation- specific PCR, MSP) 及 DNA 测序法分析 p16/ CDKN2 基因 CpG 岛甲基化状态; MTT、FCM、荧光染色及透射电镜检测启动子区去甲基化后细胞生长、形态和细胞周期凋亡的影响。结果: DNMTs 抑制剂能较好地逆转启动子区胞嘧啶甲基化状态; CpG 岛去甲基化后能明显地抑制肠癌细胞的生长, 增加细胞群体倍增时间( $P < 0.01$ ), 诱导肠癌细胞凋亡, 影响肠癌细胞周期分布, 并具有良好的量效依赖关系。结论: 通过逆转 CpG 岛高甲基化能有效地抑制肠癌细胞增殖, 为临床治疗大肠癌提供新的作用靶点。

[关键词] 甲基化; 结直肠肿瘤; 细胞凋亡; 细胞周期; 脱氧胞苷

[中图分类号] R730.2; R730.5 [文献标识码] A

## Effects of promoter region 5' CpG island demethylation on biological phenotype in human colorectal cancer cells

FANG Xiao- ming, ZHENG Shu, CHEN Gong- xing, SUN Li- feng, LÜ Qing- hua

(Cancer Institute, The Second Affiliated Hospital, Medical School of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the relationship between methylation status of promoter region 5' CpG island and the biological phenotype in human colorectal cancer RKO cell lines. **METHODS:** RKO cells were treated with selective DNA methyltransferase (DNMTs) inhibitor, 5- Aza- 2'- deoxycytidine (5- Aza- CdR), for 72 h. Methylation- specific PCR (MSP), T- A clone and DNA sequence analysis were used to detect 5' CpG island methylation status of p16/ CDKN2 tumor suppressor gene. Cell growth, cell cycle arrest and apoptosis were analyzed by MTT, flow cytometry (FCM), fluorescent dye staining and transmission electron microscope. **RESULTS:** DNMTs inhibitor (5- Aza- CdR) effectively reversed the hypermethylation status of 5' CpG island. The effects of 5- Aza- CdR on cell growth inhibition ( $P < 0.01$ ), apoptosis and cell cycle arrest were observed in a dose- dependent manner. **CONCLUSION:** Selective DNMTs inhibitor inhibits cell growth by 5' CpG island demethylation, and this may be a potential new therapeutic target for colorectal cancer.

[KEY WORDS] Methylation; Colorectal neoplasms; Apoptosis; Cell cycle; Deoxycytidine

恶性肿瘤的生物学特征表现为无限增殖和转移, 其发生机制在于细胞内部基因结构的异常改变, DNA 甲基化是肿瘤表基因(epigenetic) 调控的一个重要机制, 对基因的转录和拼接有密切关系<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明, 基因启动子区的过度甲基化和许多抑癌基因的静默有关<sup>[2- 4]</sup>, 而这种异常的甲基化与细胞内 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DN-

MTS) 高表达相关<sup>[5, 6]</sup>。为此, 我们通过特异性甲基转移酶抑制剂- 5- 氮- 2'- 脱氧胞苷(5- Aza- 2'- deoxycytidine, 5- Aza- CdR) 作用人结肠癌 RKO 细胞株, 并以 p16/ CDKN2 这一重要细胞周期调控基因 CpG 岛甲基化状态的变化作为检测对象, 探讨启动子区去甲基化对肠癌 RKO 细胞生长增殖、凋亡等生物学表型的影响, 寻找大肠癌治疗的新靶点。

[收稿日期] 2003- 10- 20 [修回日期] 2004- 01- 12

\* [基金项目] 国家(973) 重点基础研究发展归划项目(No. G1998051200); 浙江省科技计划项目(No. 011110541)

△ 通讯作者 Tel: 0571- 87783868; E- mail: zhengshu@zju.edu.cn

## 材 料 和 方 法

### 1 细胞培养及药物处理

RKO 人结肠癌细胞株由北京大学邓大君教授惠赠, 细胞贴壁生长于含葡萄糖 4 500 mg/L DMEM 培养液中 (Gibco 公司), 内含 10% 的胎牛血清 (杭州江滨生物技术有限公司), 青、链霉素各  $1 \times 10^5$  U/L, 于 37 °C、含体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度箱中培养, 每 4 - 5 d 消化传代 1 次。取对数生长期细胞传代 24 h 贴壁后, 分别用  $1 \times 10^{-7}$  mol/L、 $5 \times 10^{-7}$  mol/L 和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 5-Aza-CdR (Sigma 公司) 作用 72 h, 继续培养至 9 d, 用于后续实验。

### 2 甲基特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP)<sup>[7]</sup>

应用饱和酚/氯仿抽提各组 RKO 细胞基因组 DNA, 经 DNA Calculator (Pharmacia Biotech) 定量后, 取 3 µg DNA 定容于 50 µL 去离子水中, 经新鲜配制 10 mmol/L 30 µL 氢醌及 3 mol/L 520 µL 亚硫酸氢钠 (均为 Sigma 公司) 50 °C 水浴脱氨基 18 h, Wizard DNA Clean-up (Promega 公司) 过柱纯化, 无水乙醇沉淀并重新溶解于 30 µL 去离子水, 以此为模板, 分别用两对等位的 p16/CDKN2 甲基化 (p16-M) 和非甲基化 (p16-UM) 特异性引物扩增该基因的 CpG 岛。p16-M 引物序列为: 5'-TTATTAGAGGGTGGGG CCG-ATCGC-3' (sense primer), 5'-CCACCTAAATC G-ACCTCCGACCG-3' (antisense primer); p16-UM 引物: 5'-TTATTAGAGGGTGGGG TGGATTGT-3' (sense primer), 5'-CCACCTAAATC AACCTCC AACCA-3' (antisense primer), 下划线碱基为修饰后甲基化/非甲基化碱基差异。扩增条件: 使用 Gene Amp PCR System 2400 扩增仪 (PE 公司) 和 QIAGEN 试剂盒进行热启动沉降 PCR (68 °C → 55 °C) × 13 个循环 (-1.0 °C/循环) → 55 °C × 25 个循环, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

### 3 T-A 克隆及序列分析

割胶回收各 MSP 产物, 加入 3 倍体积的 Buffer QG (1 mg: 3 µL, QIAGEN 公司) 溶解琼脂糖凝胶, 过柱离心, Buffer PE 洗涤, EB 溶解 DNA 后真空抽干至 10 µL。选用 pGEM-T Easy 质粒 (Promega 公司) 为载体作连接, 反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 2 µL、2 × Ligation buffer 5 µL、pGEM-T easy 1 µL、RT-PCR 产物 1 µL、T4 DNA Ligase 1 µL, 室温下反应 3-4 h。进一步取感受态细菌 50 µL 加入连接产物 10 µL 中, 42 °C 热休克处理 60 s 后, 与 200 µL 无氨苄 LB 混匀后加 1 mol/L IPTG 4

µL 及 X-gal 16 µL 涂布于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养平板上, 37 °C 转化过夜。筛选带有重组质粒的白色菌落, 接种于 7 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的培养基中, 37 °C 300 r/min 摇床过夜扩菌, 用 3S Plasmid Miniprep Kit 按说明书抽提质粒 DNA, 并经 ABI PRISM 377 DNA Sequencer 自动测序仪进行测序。

### 4 四唑盐比色法 (MTT)

取经上述处理前后的对数生长期细胞, 按每孔  $2 \times 10^3$  个 (200 µL) 接种于 96 孔培养板中, 每 3 孔为 1 组, 共 7 板, 每日 1 板加入 5 g/L MTT 液 20 µL, 37 °C 孵育 4 h 后, 加 DMSO 150 µL 振荡溶解, 在 570 nm 波长酶联免疫检测仪 (Opsys MD) 上测定各孔吸光度值 (absorbance, A), 求其均值, 以 A 值为纵坐标, 时间 (d) 为横坐标绘制生长曲线。细胞倍增时间 (T<sub>D</sub>) 按公式:  $T_D = t \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$  计算; 细胞增殖抑制率 (cellular proliferation inhibition rate, CPIR) 按公式:  $CPIR = (1 - \text{实验组 A 均值} / \text{对照组 A 均值}) \times 100\%$  计算。

### 5 荧光显微镜细胞形态观察

各组细胞按上述处理生长于玻璃片上, PBS 洗涤 3 次, 取荧光染料吖啶橙 (AO) 贮存液 (终浓度 10 g/L, 溶于 PBS 中, 避光 4 °C 保存), 直接滴于细胞爬片上, 荧光显微镜 520 nm 激发波长观察细胞形态, 每组重复 3 次。

### 6 透射电镜观察

消化、收集各组 RKO 细胞, PBS 洗涤 3 次, 以 4 °C 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定包埋, 制成薄片, 甲苯胺染色, 光镜定位, 透射电镜 (JEM-200X JEOL) 下观察细胞超微结构。

### 7 流式细胞仪 (FCM) 检测

收集经不同浓度处理的 RKO 细胞, PBS 洗涤 2 次后, 于旋涡混匀状态滴入 4 °C 75% 乙醇, 固定细胞 24 h, 弃上清, PBS 洗涤 2 次, 加 1% RNase 液 200 µL, 37 °C 30 min, 经 300 目尼龙网过滤, 50 mg/L PI 染色, 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率变化。

### 8 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用统计软件 SPSS 10.0 for Windows 处理, 组间比较用 *t* 检验。

## 结 果

### 1 p16/CDKN2 基因 CpG 岛甲基化状态的检测

由图 1 可见, 未经 5-Aza-CdR 作用的对照组 RKO 细胞, 只有甲基化特异性引物 (p16-M) 有扩增

产物,而经不同浓度 5- Aza- CdR 处理的 RKO 肠癌细胞, p16- M 的表达产物有明显降低趋势,同时非甲基化特异性引物(p16- UM)扩增产物明显增强,并呈现明显的量效关系。

在 MSP 检测 p16/CDKN2 基因甲基化状态的基础上,经 T- A 克隆、测序显示:未经 5- Aza- CdR 作用的对照组 RKO 细胞基因组 DNA,其胞嘧啶保持不变,提示在其单链 DNA 中胞嘧啶呈甲基化状态;而经 5- Aza- CdR 作用的 RKO 结肠癌细胞基因组 DNA,其胞嘧啶均已变为胸腺嘧啶,表明在 DNA 单链中胞嘧啶已去甲基化,其它碱基则完全一致(图 2)。

### 2 CpG 岛去甲基化对细胞生长、群体倍增时间及细胞抑制率的影响

经不同浓度 5- Aza- CdR 处理, RKO 细胞的生长增殖活性均有明显抑制,并且随浓度的增加其抑制的量效关系显著。根据细胞倍增公式计算,3 个处理细胞组的  $T_D$  值分别为 (25.90 ± 2.41) h、(28.56 ± 2.94) h 和 (32.54 ± 3.02) h,明显大于未经处理(对照)

细胞  $T_D$  值(17.41 ± 2.03) h(与 0.1 μmol/L 组相比较  $P < 0.05$ ;分别与 0.5 及 1.0 μmol/L 组相比较  $P < 0.01$ ,图 3);且经去甲基化后,各细胞组 CPIR 较对照组 CPIR 值明显增加(图 4)。

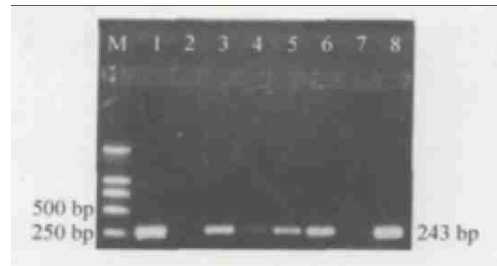


Fig 1 DNA methylation status of RKO cells by MSP. M: DNA marker DL2000; 1: no 5- Aza- CdR (p16- M); 2: No 5- Aza- CdR (p16- UM); 3: 0.1 μmol/L 5- Aza- CdR (p16- M); 4: 0.1 μmol/L 5- Aza- CdR (p16- UM); 5: 0.5 μmol/L 5- Aza- CdR (p16- M); 6: 0.5 μmol/L 5- Aza- CdR (p16- UM); 7: 1.0 μmol/L 5- Aza- CdR (p16- M); 8: 1.0 μmol/L 5- Aza- CdR (p16- UM).

图 1 MSP 检测 RKO 肠癌细胞甲基化状态

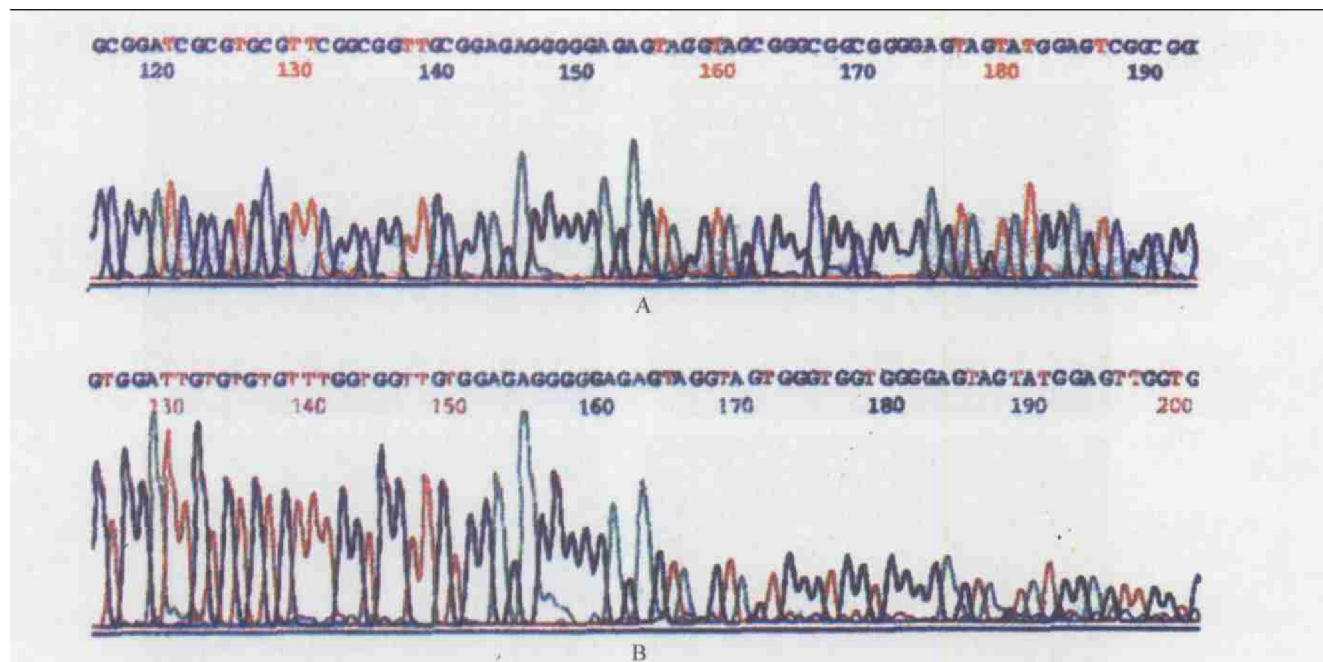


Fig 2 DNA allelic fragment sequence of 5-Aza-CdR untreated and treated in RKO cells. All cytosines in 5-Aza-CdR untreated RKO cells (A) remain in C, while all CpG cytosines in 5-Aza-CdR treated RKO cells (B) had been converted to T.

图 2 经及未经 5-Aza-CdR 作用后 RKO 肠癌细胞 p16/CDKN2 等位碱基序列

### 3 荧光显微镜下调亡细胞形态的观察

荧光显微镜下, AO 染色的未经去甲基化诱导的 RKO 细胞胞核呈绿色,染色均匀一致,核膜光滑,无染色质聚集现象;而经去甲基化诱导后的 RKO 细胞可见胞核变小固缩,核膜欠光滑,染色质浓缩凝集、分块成亮黄色荧光,部分细胞出泡形成凋亡小体(图 5)。

### 4 透射电镜观察细胞超微结构变化

透射电镜下可见,未经去甲基化处理的对照组肿瘤细胞核圆、形态规则,核仁清晰,染色质分布均匀,细胞膜完整;经 5- Aza- CdR 诱导去甲基化后细胞器肿胀,核膜皱缩内陷不规则,染色质边集于核膜下或呈新月状分布,随着浓度增高,染色质浓缩、边

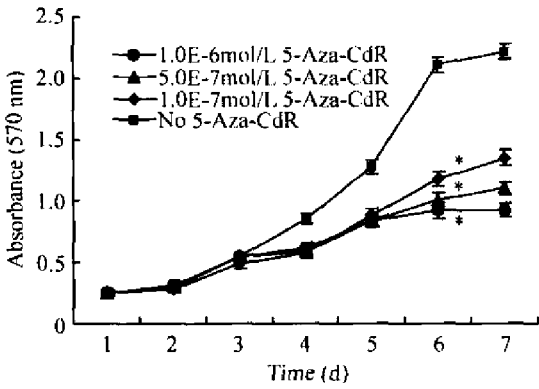


Fig 3 Growth curve of RKO colorectal cancer cells after treatment with 5- Aza- CdR.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.01$  vs no 5- Aza- CdR.

图3 5- Aza- CdR 对肠癌 RKO 细胞生长曲线图

集明显, 并伴有典型凋亡小体形成(图6)。

### 5 FCM 检测 RKO 细胞周期及细胞凋亡率变化

流式细胞仪分析可见, 经不同浓度 5- Aza- CdR 诱导去甲基化后的 RKO 肠癌细胞, 在 DNA 图谱 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期前出现一个亚二倍体峰(即凋亡峰, 图7), 定量分析亚二倍体峰显示, 各处理细胞组凋亡率分别

为 3.36% ± 0.25%、6.72% ± 0.61%、16.85% ± 1.46%, 与 5- Aza- CdR 去甲基化诱导浓度成正比。同时可见, S 期细胞比例增高, 相应的 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例降低(表1)。

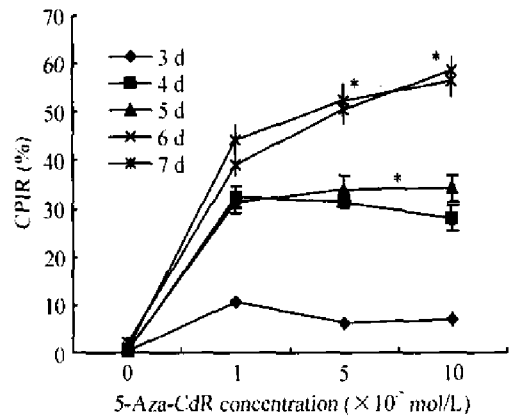


Fig 4 Inhibition rate of 5- Aza- CdR on RKO cells. Cells were incubated with No,  $1 \times 10^{-7}$  mol/L,  $5 \times 10^{-7}$  mol/L and  $1 \times 10^{-6}$  mol/L for 3 d, 4 d, 5 d, 6 d, 7 d, respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.01$  vs no 5- Aza- CdR.

图4 5- Aza- CdR 对肠癌 RKO 细胞生长抑制率的影响

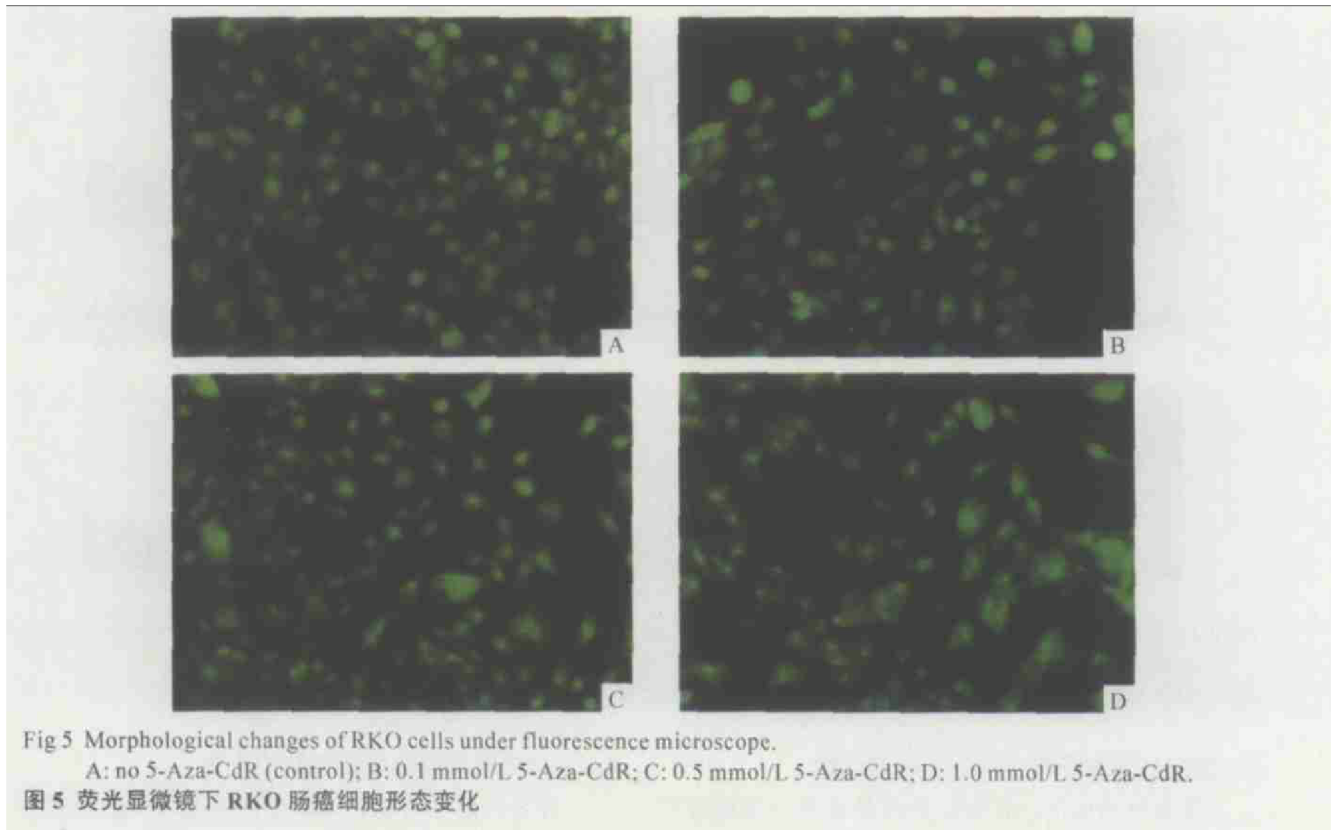


Fig 5 Morphological changes of RKO cells under fluorescence microscope. A: no 5-Aza-CdR (control); B: 0.1 mmol/L 5-Aza-CdR; C: 0.5 mmol/L 5-Aza-CdR; D: 1.0 mmol/L 5-Aza-CdR. 图5 荧光显微镜下 RKO 肠癌细胞形态变化

## 讨 论

DNA 甲基化是指由 DNMTs 介导, 在胞嘧啶(C)的第 5 位碳原子上加上一甲基基团, 使之变成 5- 甲

基胞嘧啶(5- mC)的化学修饰过程, 这种修饰反应主要发生在 CpG 二核苷酸的胞嘧啶<sup>[8]</sup>。研究表明近 50% 的人类家族性恶性肿瘤细胞发现有肿瘤抑癌基因突变/ 缺失等一级结构变化, 但仍有相当部分癌细

胞无编码区突变的证据,而这些抑癌基因却因 CpG 岛高甲基化处于失活状态<sup>[3,9]</sup>,从而表明基因启动子区高甲基化是肿瘤抑癌基因失活的重要途径之一。

本实验首先探讨了特异性 DNMTs 抑制剂(5-Aza- CdR)对 p16/CDKN2 基因 CpG 岛甲基化状态的影响。目前检测甲基化的主要方法有:酶切法、限制酶 PCR、Southern 印迹、MSP、DHPLC、DNA 测序、COBRA 等,其中以 DNA 测序法最为确切可靠。我们选用 MSP 和 DNA 测序相结合,研究证明,5-Aza- CdR 具有较好的去甲基化作用,能使 CpG 岛 5- 甲基胞嘧啶(5- mC)转变为胞嘧啶(C),进一步在亚硫酸氢钠

表 1 不同浓度 5- Aza- CdR 诱导对 RKO 肠癌细胞凋亡率及周期分布的影响

Tab 1 The influence of 5- Aza- CdR on apoptotic rate and cell cycle distribution in RKO cells (% .  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ )

5- Aza- CdR ( $\mu\text{mol/L}$ )	Apoptosis	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	1.28 $\pm$ 0.22	80.49 $\pm$ 5.10	6.14 $\pm$ 0.56	13.37 $\pm$ 1.64
0.1	3.36 $\pm$ 0.25	81.69 $\pm$ 5.28	10.04 $\pm$ 0.91 <sup>#</sup>	8.27 $\pm$ 1.12 <sup>#</sup>
0.5	6.72 $\pm$ 0.61 <sup>#</sup>	79.41 $\pm$ 5.07	11.24 $\pm$ 0.96 <sup>#</sup>	9.34 $\pm$ 1.22 <sup>#</sup>
1.0	16.85 $\pm$ 1.46 <sup>#</sup>	79.44 $\pm$ 4.92	12.13 $\pm$ 1.10 <sup>#</sup>	8.43 $\pm$ 1.08 <sup>#</sup>

#  $P < 0.01$ , # #  $P < 0.05$  vs 0 mol/L 5- Aza- CdR (control).

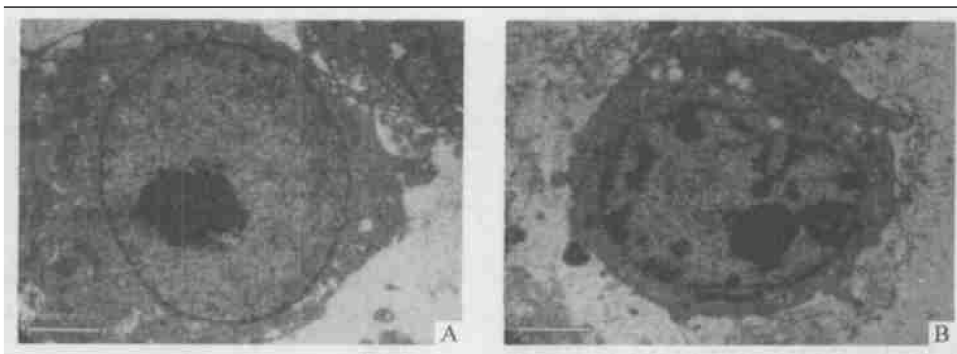


Fig 6 Ultrastructural changes of RKO cell under transmission electron microscopic. A: untreated (control) RKO cell; B: treated (methylated) RKO cell.

图 6 透射电镜下 RKO 肠癌细胞超微结构变化

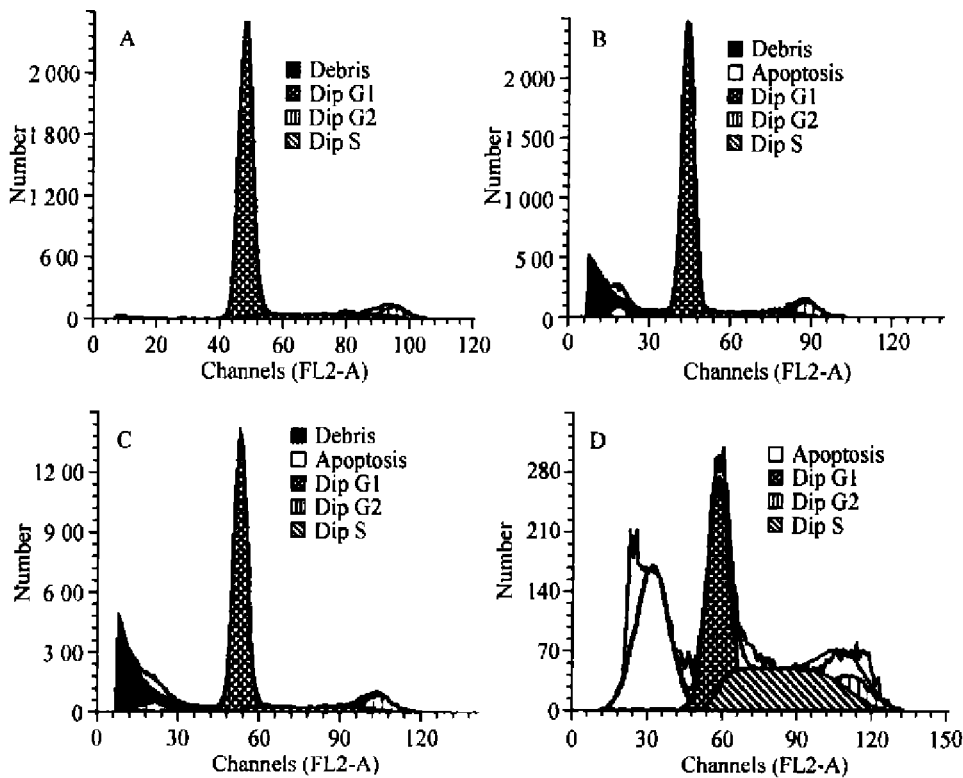


Fig 7 RKO cell cycle and apoptosis rate analysis by flow cytometry.  $n = 3$ . A: no 5- Aza- CdR (control); B: 0.1  $\mu\text{mol/L}$  5- Aza- CdR; C: 0.5  $\mu\text{mol/L}$  5- Aza- CdR; D: 1.0  $\mu\text{mol/L}$  5- Aza- CdR.

图 7 FCM 分析 RKO 肠癌细胞周期及细胞凋亡率变化

## [参 考 文 献]

脱氨基后转变为尿嘧啶(U),并经特异性的非甲基化引物扩增与胸腺嘧啶(T)互补配对,而甲基化的胞嘧啶(5-mC)不受脱氨基影响而保持胞嘧啶(C)不变<sup>[10]</sup>。结果表明:结肠癌 RKO 细胞 p16/CDKN2 基因与启动子区 CpG 岛的异常高甲基化相关,通过 5-Aza-CdR 竞争性地抑制 DNMTs 能达到 CpG 岛去甲基化作用,而且这种去甲基化程度与 5-Aza-CdR 诱导呈量效关系。本实验较好地结合了 MSP 及 DNA 测序法两者优点,敏感而特异地检测了 RKO 细胞 p16/CDKN2 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态的变化。

凋亡是细胞接受外界信号刺激后由基因自由控制发生的有序性细胞死亡过程,这种程序性死亡不仅对胚胎发生、免疫发育及维持机体稳定等生物学功能至关重要,而且在细胞增殖、肿瘤形成和发展中也起调控作用<sup>[11]</sup>。本实验电镜下可见,应用 5-Aza-CdR 诱导后,RKO 细胞核膜皱缩内陷,核染色质浓缩并凝集于核膜周边,伴芽突形成凋亡小体等典型的凋亡细胞形态学改变,而且所诱导细胞凋亡率与 5-Aza-CdR 诱导剂量具有量效依赖关系,同时细胞周期分析可见,去甲基化后能使细胞阻滞于 S 期,而使得进入 G<sub>2</sub>/M 期的细胞减少,说明 DNA 去甲基化后抗癌作用可能是通过影响细胞周期而起作用,该结果与一些文献报道相似<sup>[12,13]</sup>,这提示在临床上联合使用 S 期特异性药物,或可提高化疗的敏感性。关于 DNA 去甲基化与细胞凋亡之间的相关机制尚不明确,是否同样也存在着凋亡调控基因(如 *bcl-2*、*bax*、*c-myc* 等)启动子区胞嘧啶异常甲基化状态,对此我们将作进一步地研究。

肿瘤细胞的无限增殖是恶性肿瘤发生与发展的基础,其增殖率是决定肿瘤生物学行为的一个重要参数,也反映了肿瘤预后、对放疗及化疗的反应和转归等生物学特征。从本实验结果分析,DNA 启动子区去甲基化能明显地抑制肠癌细胞增殖,延长细胞倍增时间,并与其诱导剂量呈正相关,推测这种抑制作用与去甲基化后重新激活沉默抑癌基因(如 p16/CDKN2 基因)的转录和表达有着因果关系<sup>[14]</sup>;此外与去甲基化后引起细胞凋亡有关。

鉴于肿瘤甲基化表现为 DNA 广泛低甲基化和部分区域的高甲基化共存,因此,进一步对甲基化研究可加深我们对表遗传学(epigenetics)在肿瘤发生、发展中作用的认识,同时,DNA 甲基化的可逆性特征为今后临床抗肿瘤治疗提供了一种新的思路。

- [1] Momparler RL, Bovenzi V. DNA Methylation and cancer[J]. J Cell Physiol, 2000, 183(2): 145- 154.
- [2] Bird A. DNA methylation de novo[J]. Science, 1999, 286(5448): 2287- 2288.
- [3] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(8): 3225- 3229.
- [4] Suter CM, Norrie M, Ku SL, et al. CpG island methylation is a common finding in colorectal cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 2003, 88(3): 413- 419.
- [5] Sun L, Hui AM, Kanai Y, et al. Increased DNA methyltransferase expression is associated with an early stage of human hepatocarcinogenesis[J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(12): 1165- 1170.
- [6] Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells[J]. Nature, 2002, 416(6880): 552- 556.
- [7] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Sci USA, 1996, 93(18): 9821- 9826.
- [8] Slack A, Cervoni N, Pinard M, et al. Feedback regulation of DNA methyltransferase gene expression by methylation[J]. Eur J Biochem, 1999, 264(1): 191- 199.
- [9] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, et al. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia[J]. Adv Cancer Res, 1998, 72: 141- 196.
- [10] Clark SJ, Harrison J, Paul CL, et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15): 2990- 2997.
- [11] Langlois NE, Eremin O, Heys SD. Apoptosis and prognosis in cancer: rational and relevance[J]. J R Coll Surg Edinb, 2000, 45(4): 211- 219.
- [12] Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines[J]. Cancer Res, 1998, 58(1): 95- 101.
- [13] Bullock G, Ray S, Reed JC, et al. Intracellular metabolism of Ara-C and resulting DNA fragmentation and apoptosis of human AML HL-60 cells possessing disparate levels of bcl-2 protein[J]. Leukemia, 1996, 10(11): 1731- 1740.
- [14] 方晓明,孙立峰,彭佳萍,等. 5-氮-2'-脱氧胞苷对 RKO 结肠癌细胞株 p16/CDKN2 基因去甲基化的转录调节作用[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(23): 2077- 2082.