

论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0860-04

## PAPST1 siRNA 抑制髓母细胞瘤细胞系 DAOY 增殖活性的研究

徐庆福<sup>1</sup>, 李立超<sup>2</sup>, 朱潇鹏<sup>1</sup>, Jesse Chung-Sean Pang<sup>3</sup>, 符星<sup>4</sup>, 刘景平<sup>4</sup>, 吕胜青<sup>1</sup> (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院神经外科<sup>1</sup>; 730000 兰州, 兰州大学第一医院神经外科<sup>2</sup>; 999077 香港, 香港中文大学解剖与细胞病理学系<sup>3</sup>; 410008 长沙, 中南大学湘雅医院神经外科<sup>4</sup>)

**[摘要]** 目的 研究 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸转运体 1 (adenosine-3-phospho-5-phosphosulfate transporter 1, PAPST1) 在髓母细胞瘤中的表达情况, 探讨其对髓母细胞瘤细胞系增殖活性的影响。方法 采用 qRT-PCR 法检测 25 例髓母细胞瘤标本、1 例原代培养髓母细胞瘤细胞、3 例髓母细胞瘤细胞系 PAPST1 表达, 并与正常小脑组织比较, 利用免疫组织化学检测 PAPST1 在髓母细胞瘤中的表达分布, 采用 PAPST1 siRNA 处理髓母细胞瘤细胞系 DAOY, 利用 qRT-PCR、Western blot 法检测 PAPST1 表达变化, CCK-8 法检测处理后的 DAOY 细胞系增殖活性。结果 与正常小脑组织相比, PAPST1 在 18/25 (72%) 的髓母细胞瘤标本及 DAOY、ONS-76 细胞系中呈 2 倍以上的高表达, 免疫组化显示 PAPST1 定位于细胞质中, 且染色明显强于正常小脑组织, PAPST1 siRNA 在 mRNA 及蛋白的水平明显干扰了 PAPST1 的表达 ( $P < 0.05$ ), DAOY 细胞的增殖活性受到明显抑制 ( $P < 0.05$ )。结论 PAPST1 在髓母细胞瘤中有广泛的高表达, 下调 PAPST1 的表达可以降低髓母细胞瘤细胞的增殖活性。

**[关键词]** 髓母细胞瘤; 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸转运体 1; 细胞增殖

**[中图分类号]** R394.3; R730.23; R739.4

**[文献标志码]** A

## PAPST1 siRNA inhibits proliferation in medulloblastoma cell line DAOY

Xu Qingfu<sup>1</sup>, Li Lichao<sup>2</sup>, Zhu Xiaopeng<sup>1</sup>, Jesse Chung-Sean Pang<sup>3</sup>, Fu Xing<sup>4</sup>, Liu Jingping<sup>4</sup>, Lyu Shengqing<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, First Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730030; <sup>3</sup>Department of Anatomical and Cellular Pathology, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, 999077; <sup>4</sup>Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression pattern of adenosine-3-phospho-5-phosphosulfate transporter 1 (PAPST1) in medulloblastoma (MB), and its role in proliferation of MB cells. **Methods** The expression of PAPST1 was examined by qRT-PCR in 25 MB tumor samples, 1 primary cultured MB cells (pri-MB), 3 MB cell lines (DAOY, D341 and ONS-76) and the normal cerebellums. The distribution of PAPST1 protein was stained by immunohistochemical technique. siRNA technique was applied in DAOY cells to knockdown the expression PAPST1 at mRNA and protein levels, which was confirmed by qRT-PCR and Western blot analysis. CCK-8 assay was carried out to determine the proliferation activity of DAOY cells after PAPST1 knockdown. **Results** qRT-PCR revealed >2 folds up-regulation in 18/25 (72%) MB samples and in DAOY and ONS-76 MB cell lines, compared with normal human cerebellum. Immunohistochemical staining revealed that the PAPST1 protein was located in the cytoplasm, and the stronger expression of PAPST1 in MB tumor tissues. The results of qRT-PCR and Western blotting showed a significant knockdown of PAPST1 at mRNA and protein levels in DAOY MB cells, and the CCK-8 assay revealed that cell proliferation was inhibited by siRNA technique. **Conclusion** High expression of PAPST1 is a common event in MB, and down-regulation of PAPST1 can induce proliferation inhibition in MB cells.

**[Key words]** medulloblastoma; adenosine-3-phospho-5-phosphosulfate transporter 1; cell proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973075), the Postdoctoral Return Grant from the WHO International Agency for Research on Cancer (FEL/10/01) and the Starting Fund of Overseas Returners of Third Military Medical University (2011D275). Corresponding author: Lyu Shengqing, E-mail: lvsq0518@gmail.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30973075);世界卫生组织国际癌症研究所博士后回国基金(FEL/10/01);第三军医大学回国人员启动基金(2011D275)

**[通信作者]** 吕胜青, E-mail: lvsq0518@gmail.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140224.1723.005.html>(2014-02-24)

髓母细胞瘤 (medulloblastoma, MB) 是较为常见的儿童颅内恶性肿瘤,占儿童脑肿瘤的20%,目前治疗方式多为手术切除、辅以放疗化疗等综合治疗。根据目前的危险因素进行分层,通常将年龄 $\leq 3$ 岁、术后肿瘤残留 $\geq 1.5$  cm<sup>2</sup>、就诊时有脊髓蛛网膜下腔播散的患者划分为高危组,其余患者划分为低危组;目前患者的5年生存率低危组为70%~80%,高危组达55%~60%。尽管与以往相比有了较大的进步,但患者常伴有长期放疗化疗的毒副作用,包括生长发育迟缓、神经内分泌障碍、认知功能及神经心理障碍<sup>[1-3]</sup>。为此,优化危险因素分层、分子靶向治疗变得尤为重要,更多的分子表达的异常也需要进一步研究探讨。

糖蛋白、蛋白聚糖、糖脂等大分子的硫酸化是一种重要的转录后修饰方式并参与调控了多种生物学过程。近年来研究发现硫酸化修饰的蛋白聚糖参与调控肿瘤多种癌基因信号通路,以及促进肿瘤细胞与微环境之间的相互作用<sup>[4]</sup>。因此,硫酸化修饰成为近年来肿瘤与微环境关系研究的热点问题。3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸转运体1 (adenosine-3-phospho-5-phosphosulfate transporter 1, PAPST1) 是硫酸化修饰过程中重要的活性硫酸根转运体, Kamiyama 等<sup>[5]</sup>发现 PAPST1 在直肠癌组织中呈高表达,并通过调控细胞表面蛋白聚糖的硫酸化水平而影响肿瘤的生长。尽管硫酸化的蛋白聚糖如硫酸肝素和硫酸软骨素与肿瘤的复杂关系已有研究,但对于参与其硫酸化修饰过程的转运体与肿瘤的相关性研究却知之甚少。为此,本研究探讨 PAPST1 在髓母细胞瘤中的表达分布及其对髓母细胞瘤细胞增殖特性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 临床标本 收集2010年1月至2013年6月第三军医大学新桥医院及中南大学湘雅医院神经外科经手术切除的MB标本25例,实验经本院及湘雅医院伦理学委员会许可。

1.1.2 细胞来源 人髓母细胞瘤细胞系 DAOY 和 D341 由香港中文大学解剖及细胞病理学系彭颂先教授提供, ONS-76 及 1 株原代培养细胞 (pri-MB) 由第三军医大学西南医院病理学研究所卞修武教授惠赠。

1.1.3 主要试剂与仪器  $\alpha$ -MEM、RPMI1640、DMEM 3 种培养基及胎牛血清均购自美国 HyClone 公司,青霉素-链霉素双抗购自碧云天公司, Opti-MEM I 培养基、Trizol 及 Lipofectamine 2000 均购自美国 Invitrogen 公司, qRT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,人正常小脑总 RNA 预混合物购自美国 Clontech 公司<sup>[6]</sup>, PAPST1 引物及  $\beta$ -actin 引物由上海百力格公司合成,兔抗 PAPST1 多克隆抗体购自美国 Abgent 公司,兔抗 GAPDH 单克隆抗体购自美国 CST 公司, SABC 免疫组化试剂盒及 Western blot 相关试剂均购自武汉博士德公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司,人 PAPST1 siRNA 及 FITC 标记的 control siRNA 均购自美国 Santa Cruz 公司, CCK-8 增殖检测试剂盒购自日本 Dojindo 公司,美国 Bio-Rad S1000 PCR 仪、

CFX96™ Real-time PCR 仪及 Mini-port 电泳系统等。

### 1.2 方法

1.2.1 标本的处理 术中标本取材后放入液氮中速冻后存入 -80 °C 冰箱,用于分子生物学实验,另有一部分标本采用标准方法固定,并进行脱水、浸蜡后行石蜡包埋,切片厚度为 5  $\mu$ m, MB 的诊断由 2 名经验丰富的病理科医师根据组织病理,结合 2007 版《WHO 中枢神经系统肿瘤病理学分类》<sup>[7]</sup> 判定。

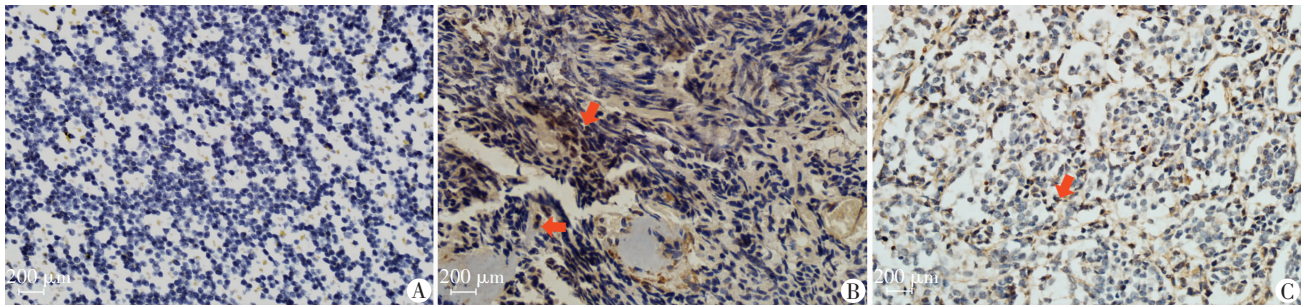
1.2.2 细胞培养、细胞分组及 siRNA 干扰 髓母细胞瘤细胞系 DAOY、D341 在  $\alpha$ -MEM 中培养, ONS-76 在 RPMI1640 中培养, 1 种原代细胞在 DMEM 中培养,所有的培养基含有 10% 的胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素,并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。取对数生长期的 DAOY 细胞以  $3 \times 10^5$  /孔接种于 24 孔板中并以不含双抗培养基培养 12 h, 更换为 Opti-MEM I 培养基,取 40 pmol 的 PAPST1 siRNA 与 50  $\mu$ L Opti-MEM I 培养基混合,另取 1  $\mu$ L 的 Lipofectamine 2000 与 50  $\mu$ L Opti-MEM I 培养基混合并置于室温下 8 min, 继而将两种液体混合,轻轻混匀后室温静置 20 min, 随后加入到单个培养孔中使得最终转染工作液的浓度为 80 nmol/L, 并置于孵箱中培养 6 h, 随后更换普通培养基,并用同样的方法转染 control siRNA, 转染后 6 h 在荧光显微镜下观察细胞荧光表达情况,判定转染效率。实验分为 4 组: PAPST1 siRNA 转染组 (PAPST1 siRNA + Lipofectamine 2000)、阴性对照组 (control siRNA + Lipofectamine 2000)、脂质体组 (Lipofectamine 2000)、空白对照组 (不做处理)。

1.2.3 qRT-PCR 检测 MB 标本及细胞中 PAPST1 的表达 用 Trizol 法提取组织和细胞总 RNA, 测定浓度和纯度后取 1  $\mu$ g RNA 作为模板在 42 °C、2 min 去除基因组 DNA, 随后在逆转录酶的作用下 37 °C、15 min 进行反转录, 85 °C 下 5 s 灭活逆转录酶。根据试剂盒推荐, 实时定量 PCR 的总的反应体系为 20  $\mu$ L, 取 1  $\mu$ L 的 cDNA 产物作为模板, qPCR 反应条件如下: 预变性 95 °C 3 min、退火 95 °C 10 s、延伸 57.6 °C 30 s 共 45 个循环。含量通过 Ct 值及校正曲线获得, 以  $\beta$ -actin 作为内参。PAPST1 上游引物为 5'-CTATGTTCTTCCATTCTGG-3', 下游引物为 5'-ACCGTCTCCAGGTAGTCTTC-3', 产物长度 108 bp<sup>[8]</sup>;  $\beta$ -actin 上游引物为 5'-GCACCACACCTTCTACAATGAGC-3', 下游引物为 5'-TAGCACAGCCTGGATGCAACG-3', 产物长度为 163 bp。

1.2.4 免疫组化检测 PAPST1 的表达分布 石蜡切片常规脱蜡, 0.3% 的过氧化氢封闭内源性的过氧化物酶, 高温、高压 (121 °C, 0.12 MPa) 修复 20 min, 冷却到室温后用山羊血清 + 0.3% Triton X-100, 37 °C 封闭 1 h, 加入一抗 (PAPST1, 1:90), 4 °C, 过夜。室温复温 1 h, PBS 漂洗 10 min  $\times$  3 次; 加入山羊抗兔 IgG, 37 °C 1 h, PBS 漂洗 10 min  $\times$  3 次; 孵育 SABC 试剂, 37 °C 1 h, PBS 漂洗 10 min  $\times$  3 次, DAB 显色后苏木精复染细胞核, 脱水透明后中性树脂胶封片, 阴性对照采用抗体稀释液代替 PAPST1 抗体。

1.2.5 Western blot 检测 siRNA 处理细胞 PAPST1 蛋白的表达

PAPST1 siRNA 转染细胞 24、48、72 h 后各组细胞分别取适量并进行裂解提取蛋白质, BCA 法检测蛋白浓度, 配制 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质, 总蛋白上样量为 40  $\mu$ g, 转膜后用 5% 的脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 抗体稀释液稀释后的 PAPST1 抗体 (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 10 min  $\times$  3 次, 随后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:2 000) 37 °C 孵育 1 h, TBST 漂洗 10 min  $\times$  3 次, ECL 显色, 收集发光信号, 以 GAPDH 作为内参对照。



A: 正常小脑组织; B、C: 髓母细胞瘤组织 ↑: 棕色颗粒定位于细胞质, 分布广泛  
图1 免疫组化检测 PAPST1 在 MB 标本中的表达与分布 (SABC)

1.2.6 CCK-8 细胞增殖活性分析 取 PAPST1 siRNA 转染组、阴性对照组、脂质体组、空白对照组对数生长期的细胞, 以  $1 \times 10^3$ /孔接种到 96 孔板中, 设置 3 个复孔, 另设加入空白培养基的空白对照, 并于培养后的 24、48、72 h, 每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ L, 混匀并在 37  $^{\circ}$ C 下培养 1 h 后, 用酶标仪采集 450 nm 处细胞的光密度值, 将各组扣除空白培养体系本底光密度值并加以比较。

### 1.3 统计学分析

数据采用微软 Excel 2007 分析、制图, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并进行重复测量方差分析。

## 2 结果

### 2.1 MB 标本、细胞及正常小脑组织 PAPST1 mRNA 的表达

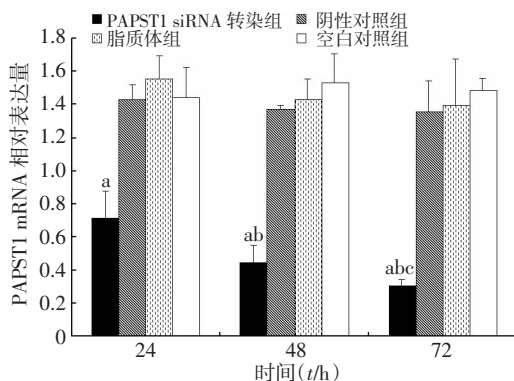
qRT-PCR 分析显示 72% (18/25) 的 MB 标本中 PAPST1 高表达, DAOY、ONS-76 2 株 MB 细胞系中 PAPST1 呈现高表达, 表达量高于正常小脑组织的 2 倍。

### 2.2 免疫组织化学检测 MB 标本中 PAPST1 的表达分布

免疫组化结果 (图 1) 显示 PAPST1 在 MB 标本中均有表达, 表达主要集中于细胞质, 为粗细不等的棕黄色颗粒, 正常小脑组织棕色颗粒信号较弱, 仅仅呈现散在灶状弱阳性。

### 2.3 转染的 PAPST1 siRNA 抑制 DAOY 细胞 PAPST1 mRNA 表达

PAPST1 siRNA 转染组的细胞 PAPST1 mRNA 的表达明显低于其他 3 组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 随着时间的延长, PAPST1 mRNA 表达呈现下降趋势, 见图 2。

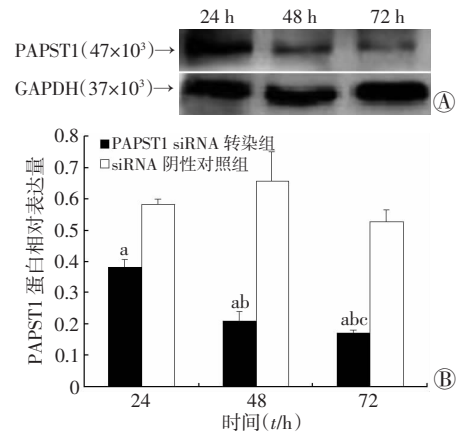


a:  $P < 0.05$ , 与同时相点其他 3 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与转染 PAPST1 siRNA 24 h 比较; c:  $P < 0.05$ , 与转染 PAPST1 siRNA 48 h 比较

图2 PAPST1 siRNA 对 DAOY 细胞转录 PAPST1 的影响

### 2.4 转染 PAPST1 siRNA 对 DAOY 细胞 PAPST1 蛋白表达的抑制作用

PAPST1 siRNA 转染 DAOY 后, Western blot 结果 (图 3) 提示, PAPST1 蛋白表达水平较 siRNA 阴性对照组明显下降, 蛋白表达的下降低具有时间依赖性, 72 h 时蛋白表达下降最低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

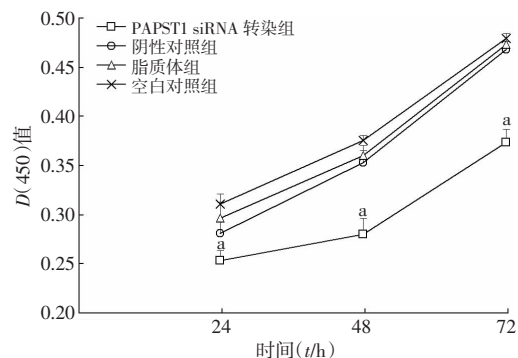


A: Western blot 检测; B: 半定量分析 a:  $P < 0.05$ , 与同时相点 siRNA 阴性对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与转染 PAPST1 siRNA 24 h 比较; c:  $P < 0.05$ , 与转染 PAPST1 siRNA 48 h 比较

图3 PAPST1 siRNA 对 DAOY 细胞 PAPST1 蛋白质表达的影响

### 2.5 PAPST1 表达下调对 DAOY 细胞增殖活性的影响

CCK-8 检测结果 (图 4) 显示, PAPST1 siRNA 转染 MB 细胞系 DAOY 后, 其 450 nm 处的光密度值与阴性对照组、脂质体组、空白对照组相比有明显下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而阴性对照组、脂质体组、空白对照组之间差异不具有统计学意义, 故利用化学合成的 siRNA 下调 PAPST1 的表达后, 可以降低 DAOY 细胞的体外增殖活性。



a:  $P < 0.05$ , 与阴性对照组、脂质体组、空白对照组比较

图4 PAPST1 siRNA 对 DAOY 细胞系体外增殖活性影响

### 3 讨论

本课题组前期针对 miR-22 调控髓母细胞瘤凋亡的分子机理进行了深入的研究,验证了 PAPST1 是 miR-22 的新靶点<sup>[9]</sup>。本研究试图进一步探讨 PAPST1 参与髓母细胞瘤的相关发病机制。

PAPST1 定位于染色体 6p12.1 - p11.2, 又称溶质载体家族 35B2 (solute carrier family 35 member B2, SLC35B2), 该转运体定位于微粒体膜及高尔基体膜上, 将 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 (adenosine-3-phospho-5-phosphosulfate, PAPS) 转运到高尔基体腔, 作为一种活性硫酸根的供体, 广泛参与了生物大分子翻译后的硫酸化修饰<sup>[10]</sup>。目前有文献报道了硫酸化的蛋白聚糖类分子与肿瘤微环境相互作用调控下游肿瘤相关信号通路参与了肿瘤的增殖、迁移<sup>[11]</sup>。Martinez 等<sup>[11]</sup>在乳腺癌细胞系中发现糖胺聚糖硫酸肝素及硫酸软骨素的硫酸化程度决定了其与选择素的亲和性, 并于黏液酰路易士 X (sialyl-Lewis x, sLex) 结合选择素构成竞争共同参与了选择素介导的乳腺癌转移。对于硫酸肝素蛋白聚糖的碳 6 位的硫酸化及其程度影响着碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 促有丝分裂信号通路的激活<sup>[12]</sup>。在食管鳞状细胞癌中, 通过上调硫酸酯酶 1 (sulfatase1, SULF1) 使得细胞表面硫酸化肝素碳 6 位硫酸基团丢失, 从而阻止了配体-硫酸肝素蛋白聚糖-受体复合体的形成而降低了肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 介导的 MAPK 信号通路的激活, 最终导致癌细胞侵袭性及增殖活性均下降<sup>[13]</sup>。以上研究均提示了蛋白聚糖参与了肿瘤的生物学过程, 然而其功能的发挥是与硫酸化修饰密不可分的。由于其硫酸化修饰发生在高尔基体中, 硫酸基团由细胞质中的 PAPS 通过其转运体 PAPST1 转入高尔基体而提供, 故我们有理由推测 PAPST1 是控制蛋白聚糖硫酸化的重要环节, 该受体的异常也必然参与到肿瘤的发病机制中。另有文献报道在直肠癌中发现 PAPST1 高表达, 下调其表达后可以降低直肠癌细胞的增殖<sup>[5]</sup>; 在伯基特淋巴瘤细胞系中 PAPST1 高表达, 增强了硫酸化角质素蛋白聚糖的合成继而活化 p38 MAPK 和 PI-3K 信号通路在一定程度上对抗了放疗所引起的细胞凋亡<sup>[14]</sup>。因此, PAPST1 表达的异常在肿瘤发病中起着重要的作用。

在本研究中, 我们发现 PAPST1 在髓母细胞瘤中广泛高表达, 支持了我们前期研究中 miR-22 对其具有调控作用的结论, 免疫组化提示其分布于细胞质中, 这是与其定位于高尔基体膜密不可分的, 干扰其表达后导致 MB 细胞系增殖活性降低, 这可能是由于 PAPST1

下调后细胞表面的蛋白聚糖分子硫酸化程度下降, 使得增殖相关的信号通路不能很好地活化有关, 其下游具体信号途径及相关的分子状态, 以及 PAPST1 表达强度与 MB 危险分层、患者预后的相关性都有待于进一步研究。对 PAPST1 参与髓母细胞瘤发病机制的探索, 有望为其治疗找到新的有效分子靶点。

### 参考文献:

- [1] De-Bont J M, Packer R J, Michiels E M, *et al.* Biological background of pediatric medulloblastoma and ependymoma: a review from a translational research perspective[J]. *Neuro Oncol*, 2008, 10(6): 1040 - 1060.
- [2] Gajjar A, Packer R J, Foreman N K, *et al.* Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: central nervous system tumors [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2013, 60(6): 1022 - 1026.
- [3] Northcott P A, Jones D T, Kool M, *et al.* Medulloblastomics: the end of the beginning[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(12): 818 - 834.
- [4] Wade A, Robinson A E, Engler J R, *et al.* Proteoglycans and their roles in brain cancer[J]. *FEBS J*, 2013, 280(10): 2399 - 2417.
- [5] Kamiyama S, Ichimiya T, Ikehara Y, *et al.* Expression and the role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma[J]. *Glycobiology*, 2011, 21(2): 235 - 246.
- [6] Lv S Q, Kim Y H, Giulio F, *et al.* Genetic alterations in microRNAs in medulloblastomas[J]. *Brain Pathol*, 2012, 22(2): 230 - 239.
- [7] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, *et al.* WHO classification of tumours of the central nervous system[M]//World Health Organization classification of tumours. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2007.
- [8] Nishimura M, Suzuki S, Satoh T, *et al.* Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier 35 transporters[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2009, 24(1): 91 - 99.
- [9] Xu Q F, Pan Y W, Li L C, *et al.* MiR-22 is Frequently Down-regulated in Medulloblastomas, and Inhibits Cell Proliferation via the Novel Target PAPST1[J]. *Brain Pathol*, 2014, [Epub ahead of print].
- [10] Kamiyama S, Suda T, Ueda R, *et al.* Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28): 25958 - 25963.
- [11] Martinez P, Vergoten G, Colomb F, *et al.* Over-sulfated glycosaminoglycans are alternative selectin ligands: insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(7): 919 - 931.
- [12] Pye D A, Vives R R, Turnbull J E, *et al.* Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(36): 22936 - 22942.
- [13] Liu C T, Zhu S T, Li P, *et al.* SULF1 inhibits proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(5): 1256 - 1263.
- [14] Nakayama F, Umeda S, Ichimiya T, *et al.* Sulfation of keratan sulfate proteoglycan reduces radiation-induced apoptosis in human Burkitt's lymphoma cell lines[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(2): 231 - 237.

(收稿: 2013-12-24; 修回: 2014-01-16)

(编辑 邓强庭)