

# 沉默生物钟基因 *Timeless* 对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡和侵袭能力的影响\*

梁连秀<sup>1△</sup>, 陈静平<sup>2</sup>, 杨达平<sup>1</sup>, 钟再焯<sup>1</sup>, 黄丽芳<sup>1</sup>, 宋建华<sup>1</sup>, 韦翠容<sup>1</sup>  
(广西医科大学第八附属医院<sup>1</sup>病理科,<sup>2</sup>妇科, 广西 贵港 537100)

**[摘要]** **目的:** 探讨沉默生物钟基因 *Timeless* (*TIM*) 对人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡和侵袭能力的影响。**方法:** 免疫组化法检测卵巢癌组织及正常卵巢组织中 TIM 蛋白表达, 分析 TIM 表达与卵巢癌病理特征的相关性。选取卵巢癌 SKOV3 细胞, 随机分为空白对照组、siRNA 对照组和 *TIM* 沉默 (*TIM* siRNA) 组。采用 Western blot 检测 TIM、Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、MMP-9、caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力。**结果:** TIM 蛋白在正常卵巢组织中呈阴性表达, 在卵巢癌组织中呈阳性表达。卵巢癌组织中 TIM 阳性表达率 (84.0%) 显著高于正常卵巢组织 (10.0%;  $P < 0.01$ )。TIM 表达与卵巢癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有关 ( $P < 0.05$ ), 而与年龄和病理类型无关 ( $P > 0.05$ )。TIM siRNA 组中 TIM、MMP-2、MMP-9 和 Bcl-2 的蛋白表达显著低于空白对照组和 siRNA 对照组 ( $P < 0.01$ ), 而 Bax、caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达显著高于空白对照组和 siRNA 对照组 ( $P < 0.01$ ); 空白对照组和 siRNA 对照组之间 TIM、MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达的差异无统计学显著性 ( $P > 0.05$ )。TIM siRNA 组的细胞凋亡率显著高于空白对照组和 siRNA 对照组 ( $P < 0.01$ ); 空白对照组和 siRNA 对照组之间细胞凋亡率的比较差异无统计学显著性 ( $P > 0.05$ )。TIM siRNA 组的细胞穿膜数显著低于空白对照组和 siRNA 对照组 ( $P < 0.01$ ); 空白对照组和 siRNA 对照组之间细胞穿膜数的差异无统计学显著性 ( $P > 0.05$ )。**结论:** 利用 siRNA 沉默卵巢癌 SKOV3 细胞中 *TIM* 表达, 可促进细胞凋亡, 抑制细胞侵袭。

**[关键词]** 卵巢癌; Timeless 蛋白; 生物钟; 细胞凋亡; 细胞侵袭

**[中图分类号]** R737.31; R730.23 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.07.003

## Effect of biological clock gene *Timeless* silencing on apoptosis and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells

SU Lian-xiu<sup>1</sup>, CHEN Jing-ping<sup>2</sup>, YANG Da-ping<sup>1</sup>, ZHONG Zai-chan<sup>1</sup>, HUANG Li-fang<sup>1</sup>, SONG Jian-hua<sup>1</sup>, WEI Cui-rong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, <sup>2</sup>Department of Gynecology, Eighth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guigang 537100, China. E-mail: kkkx66@yeah.net)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To evaluate the effect of biological clock gene *Timeless* (*TIM*) silencing on the apoptosis and invasion ability of human ovarian cancer SKOV3 cells. **METHODS:** The protein expression of TIM in the ovarian cancer tissues and normal ovarian tissues was detected by immunohistochemistry, and the correlation between the protein expression of TIM in ovarian cancer tissues and the pathological features was analyzed. The ovarian cancer SKOV3 cells were transfected with PBS (blank control group), control siRNA (siRNA control group) or *TIM* siRNA (*TIM* siRNA group). The protein expression of TIM, Bcl-2, Bax, MMP-2, MMP-9, caspase-3 and caspase-9 was determined by Western blot. The apoptosis was detected by flow cytometry. The invasion ability was measured by Transwell chamber test. **RESULTS:** The positive expression rate of TIM in the ovarian cancer tissues (84.0%) was significantly higher than that in the normal ovarian tissues (10.0%;  $P < 0.01$ ). TIM expression was associated with ovarian cancer differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis and TNM stage ( $P < 0.05$ ), but was not associated with age and pathological type ( $P > 0.05$ ). The protein expression levels of TIM, MMP-2, MMP-9 and Bcl-2 in *TIM* siRNA group were significantly decreased as compared with control group and siRNA control group ( $P < 0.01$ ), and the protein expression of Bax, caspase-3 and caspase-9 in

[收稿日期] 2018-08-21 [修回日期] 2018-12-17

\* [基金项目] 贵州省科技攻关项目 (No. 130515)

△通讯作者 Tel: 13397854280; E-mail: kkkx66@yeah.net

*TIM* siRNA group was significantly increased as compared with blank control group and siRNA control group ( $P < 0.01$ ). No significant difference of the protein expression of *TIM*, *MMP-2*, *MMP-9*, *Bcl-2*, *Bax*, *caspase-3* and *caspase-9* between blank control group and siRNA control group was observed ( $P > 0.05$ ). The apoptotic rate in *TIM* siRNA group was significantly higher than that in blank control group and siRNA control group ( $P < 0.01$ ), and that in blank control group and siRNA control group was not significantly different ( $P > 0.05$ ). The penetrated cell number in *TIM* siRNA group was significantly less than that in blank control group and siRNA control group ( $P < 0.01$ ), and that in blank control group and siRNA control group was not significantly different ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION:** Silencing of *TIM* gene in ovarian cancer SKOV3 cells by siRNA promotes apoptosis, and inhibits cell invasion.

[**KEY WORDS**] Ovarian cancer; Timeless protein; Biological clocks; Apoptosis; Cell invasion

卵巢癌是继子宫内膜癌及宫颈癌发生率居第3的妇科恶性肿瘤,其死亡率居妇科恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>。治疗过程中肿瘤的复发和转移是卵巢癌相关性死亡的最主要原因<sup>[2]</sup>。因此,探寻卵巢癌的特异性治疗靶点具有十分重要的意义。生物钟基因 *Timeless* (以下简称 *TIM*) 位于人类第12号染色体上,长约43 kb,编码产物为 *TIM* 蛋白,它可以与另一生物钟基因 *Per* 形成异二聚体,行使其调节生物节律的功能,是维持内源性生物钟运作的核心元件<sup>[3-4]</sup>。近年来研究表明,包括 *TIM* 在内的多种生物钟基因广泛参与恶性肿瘤的发生与发展,如乳腺癌<sup>[5]</sup>、肺癌<sup>[6]</sup>和肝癌<sup>[7]</sup>等。但 *TIM* 与卵巢癌的相关研究尚未见报道。本研究采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术沉默人卵巢癌 SKOV3 细胞中 *TIM* 表达,并分析 *TIM* 表达下调对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡和侵袭能力的影响,初步探讨 *TIM* 在卵巢癌治疗中的靶点作用,以期对卵巢癌的临床治疗提供理论依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验材料

卵巢癌 SKOV3 细胞购于美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC)。Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen; *TIM* siRNA、siRNA 对照、鼠抗人 *TIM* 单克隆抗体、兔抗人 *Bcl-2* 多克隆抗体、兔抗人 *Bax* 多克隆抗体、兔抗人基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, *MMP-2*) 多克隆抗体和兔抗人 *MMP-9* 多克隆抗体均购自 Santa Cruz; DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco; 凋亡检测试剂盒购自 BD。

### 2 方法

**2.1 免疫组化染色** 选取 50 例卵巢癌组织样本及 50 例正常卵巢组织样本。采用免疫组化染色检测卵巢癌组织及正常卵巢组织中 *TIM* 蛋白的表达。抗原修复采用煮沸修复法,免疫组化染色采用 EnVision 二步法。

**2.2 细胞培养** 卵巢癌 SKOV3 细胞培养于含 1% 青霉素和链霉素及 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液

中,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每天换液 1 次。收集对数生长期细胞。

**2.3 转染及分组** 待细胞生长至 85% ~ 90% 汇合时,收集细胞,调节细胞浓度至  $2 \times 10^6$  /L,将细胞接种于 6 孔培养板,每孔 1 mL。细胞接种后 24 h,将细胞分为 3 组,即空白对照 (blank control) 组、siRNA 对照 (siRNA control) 组和 *TIM* siRNA 组,siRNA 对照组和 *TIM* siRNA 组分别转染 siRNA 对照和 *TIM* siRNA,空白对照组未转染。转染操作参照 Lipofectamine™ 2000 说明书。转染之后,将细胞置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养,6 h 后取出换液,之后继续培养 48 h。

**2.4 Western blot 检测蛋白表达** 转染后 48 h 收集各组细胞,加入细胞蛋白裂解液提取总蛋白,定量蛋白浓度,行 10% SDS-PAGE,转至 PVDF 膜,5% 封闭液 4 ℃ 封闭 2 h,加入 I 抗 (*TIM*、*Bcl-2*、*Bax*、*caspase-3*、*caspase-9*、*MMP-2*、*MMP-9* 和  $\beta$ -actin, 均 1:100), 4 ℃ 摇床孵育过夜,加入 II 抗 (1:1 000) 室温孵育 2 h, ECL 反应 1 ~ 3 min,暗室曝光,显影、定影处理, Image-Pro Plus 软件分析数据。

**2.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 转染后 48 h 收集各组细胞,预冷 PBS 缓冲液漂洗,调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个,离心、弃上清,加入 500  $\mu$ L 结合缓冲液重悬细胞,依次加入 Annexin V-FITC 和 propidium iodide 各 5  $\mu$ L,室温避光孵育 15 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡。

**2.6 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力** 于小室上室铺上 50  $\mu$ L Matrigel (F12K 培养基 1:3 稀释),收集转染 48 h 后细胞,并将 100  $\mu$ L 单细胞悬液加入上室,下室加入 500  $\mu$ L 含 20% FBS 的 F12K 完全培养基,将细胞置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h。弃上室液体,用棉签擦拭聚碳酸酯膜上层的细胞及 Matrigel,用 4% 多聚甲醛固定滤膜下层,HE 染色,倒置显微镜下观察,取 5 个视野,200 倍镜下计数穿膜细胞。

### 3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示,多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两两比较采用 Bonferroni 校正的

$t$  检验;计数资料用例数(百分比)[ $n(\%)$ ]表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 1 免疫组织化学染色观察

TIM 在正常卵巢组织中呈阴性表达,而在卵巢

癌组织中呈阳性表达,表现为棕黄色着色,主要分布在细胞质及细胞周围,见图 1。50 例卵巢癌组织中 TIM 阳性表达率为 84.0% (42/50),50 例正常卵巢组织中 TIM 阳性表达率为 10.0% (5/50),卵巢癌组织中 TIM 阳性表达率显著高于正常卵巢组织( $P < 0.01$ )。

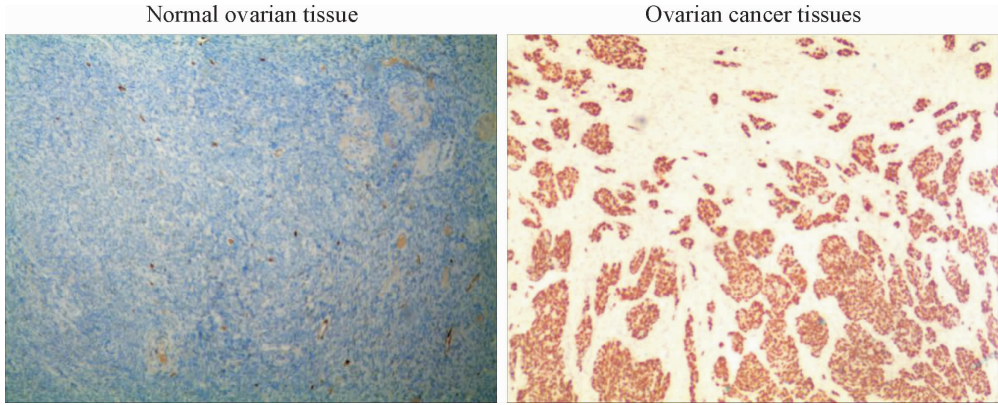


Figure 1. Immunohistochemical detection of TIM expression in normal ovarian and ovarian cancer tissues ( $\times 100$ ).

图 1 正常卵巢和卵巢癌组织中 TIM 表达的免疫组化检测结果

### 2 TIM 表达与卵巢癌临床病理特征的关系

TIM 蛋白表达与卵巢癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有关( $P < 0.05$ ),而与年龄和病理类型无关( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 TIM 表达与卵巢癌临床病理特征的关系

Table 1. The relationship between TIM expression and clinicopathologic features of ovarian cancer [ $n(\%)$ ]

| Pathological factors                      | $n$ | TIM positive  |
|---|-----|---------------|
| Age                                       |     |               |
| > 50 years                                | 29  | 25 (86.2)     |
| $\leq 50$ years                           | 21  | 17 (80.9)     |
| Pathological pattern                      |     |               |
| Serous type                               | 27  | 22 (81.5)     |
| Mucinous type                             | 23  | 20 (86.9)     |
| Differentiation degree                    |     |               |
| Poorly-differentiated                     | 26  | 26 (100.0) ** |
| High-differentiated/middle-differentiated | 24  | 16 (66.7)     |
| Infiltration depth                        |     |               |
| T1 + T2                                   | 12  | 5 (41.7) **   |
| T3 + T4                                   | 38  | 37 (97.4)     |
| Lymphnode metastasis                      |     |               |
| Negative                                  | 14  | 9 (64.3) *    |
| Positive                                  | 36  | 33 (91.7)     |
| TNM                                       |     |               |
| I + II                                    | 18  | 12 (66.7) *   |
| III + IV                                  | 32  | 30 (93.8)     |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs other groups.

### 3 各组卵巢癌 SKOV3 细胞中 TIM 蛋白的表达

TIM siRNA 组中 TIM 的蛋白表达显著低于空白对照组和 siRNA 对照组( $P < 0.01$ );空白对照组和 siRNA 对照组之间 TIM 蛋白表达水平的差异无统计学显著性( $P > 0.05$ ),见图 2。

### 4 沉默 TIM 基因的表达对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响

TIM siRNA 组细胞凋亡率显著高于空白对照组和 siRNA 对照组( $P < 0.01$ );空白对照组和 siRNA 对照组之间细胞凋亡率的差异无统计学显著性( $P > 0.05$ ),见图 3。

### 5 沉默 TIM 基因的表达对卵巢癌 SKOV3 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

TIM siRNA 组中 Bcl-2 蛋白表达显著低于空白对照组和 siRNA 对照组( $P < 0.01$ ),而 Bax 蛋白表达显著高于空白对照组和 siRNA 对照组( $P < 0.01$ );空白对照组和 siRNA 对照组之间 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平的差异无统计学显著性( $P > 0.05$ ),见图 4。

### 6 沉默 TIM 基因的表达对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭能力的影响

TIM siRNA 组的细胞穿膜数显著低于空白对照组和 siRNA 对照组( $P < 0.01$ );空白对照组和 siRNA 对照组之间细胞穿膜数的差异无统计学显著性( $P > 0.05$ ),见图 5。

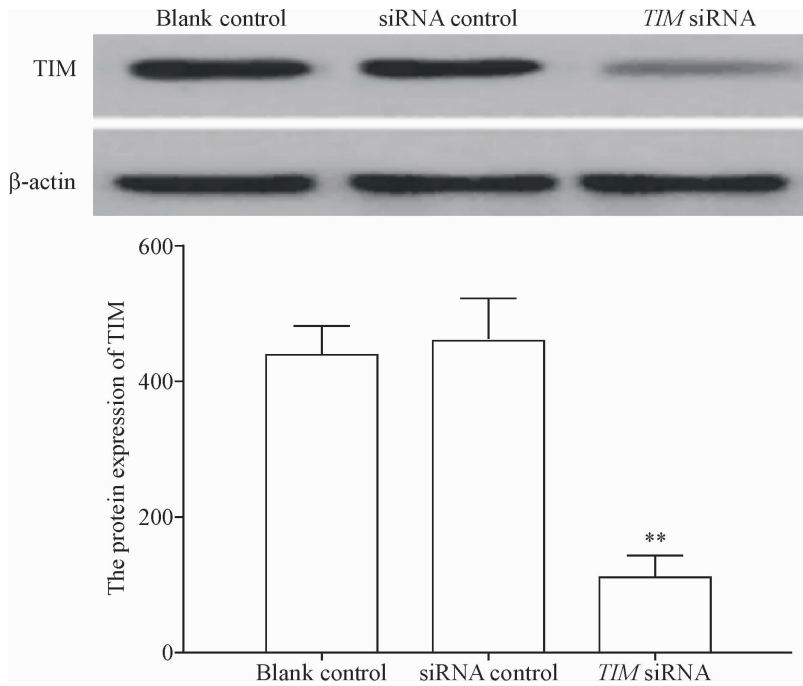


Figure 2. Western blot was used to detected the TIM protein expression in blank control group, siRNA control group and TIM siRNA group. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs blank control group and siRNA control group.

图2 空白对照组、siRNA 对照组和 TIM siRNA 组中 TIM 蛋白表达的 Western blot 检测结果

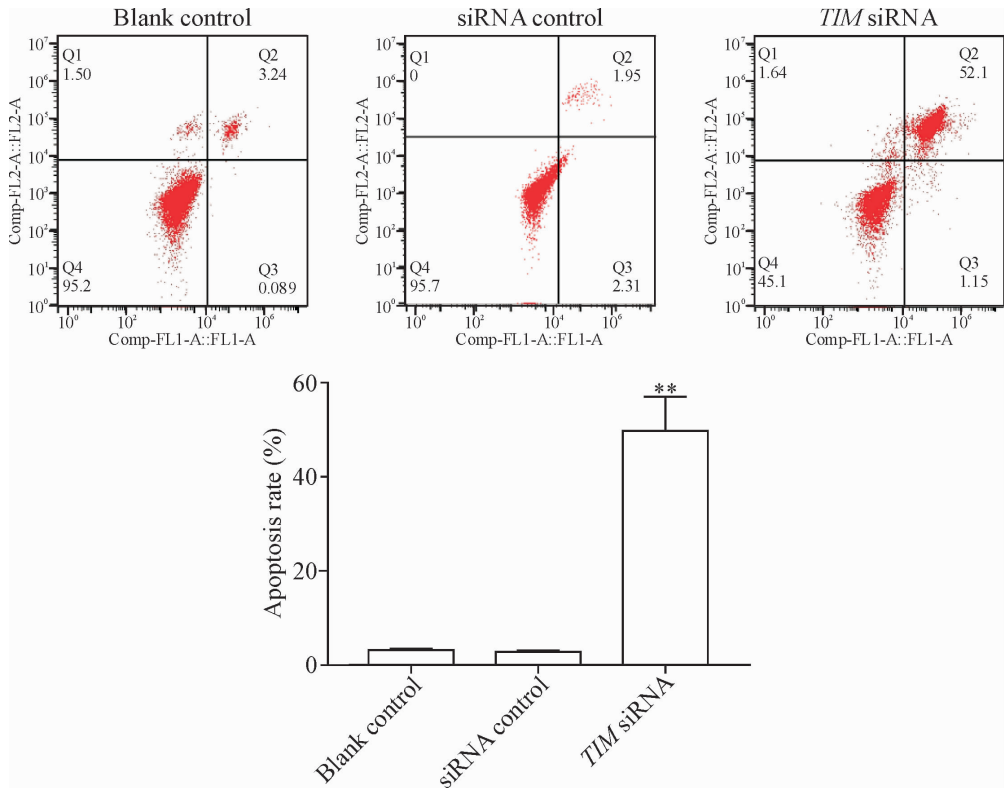


Figure 3. The apoptotic rate in blank control group, siRNA control group and TIM siRNA group was analyzed by flow cytometry. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs blank control group and siRNA control group.

图3 空白对照组、siRNA 对照组和 TIM siRNA 组细胞凋亡率的流式细胞术检测结果

### 7 沉默 TIM 基因的表达对卵巢癌 SKOV3 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

TIM siRNA 组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著

低于空白对照组和 siRNA 对照组 ( $P < 0.01$ )；空白对照组和 siRNA 对照组之间 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平的差异无统计学显著性,见图 6。

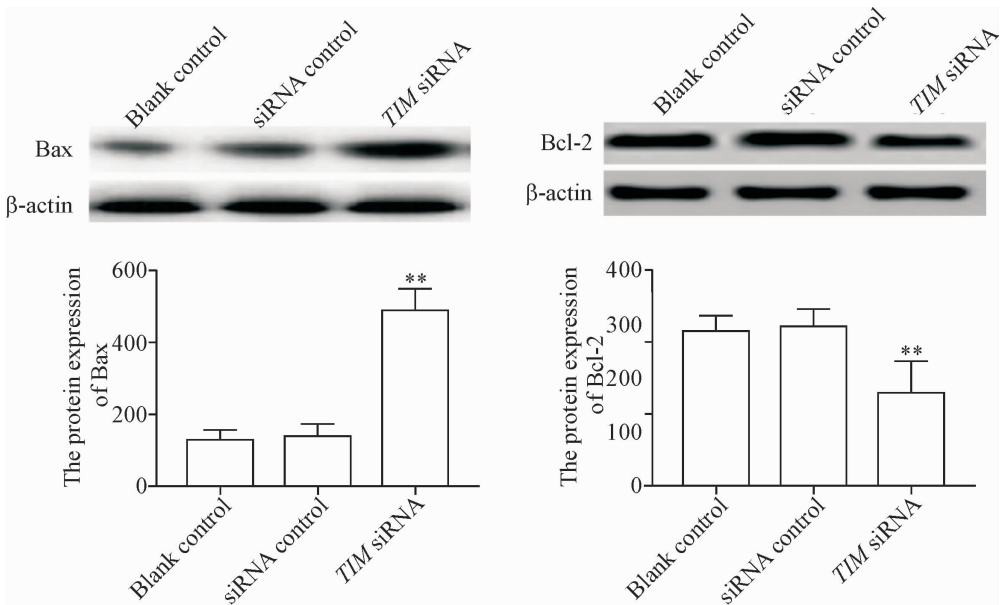


Figure 4. The protein expression of Bcl-2 and Bax in blank control group, siRNA control group and *TIM* siRNA group determined by Western blot. Mean ± SD. *n* = 3. \*\* *P* < 0.01 vs blank control group and siRNA control group.

图4 空白对照组、siRNA 对照组和 *TIM* siRNA 组中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的 Western blot 检测结果

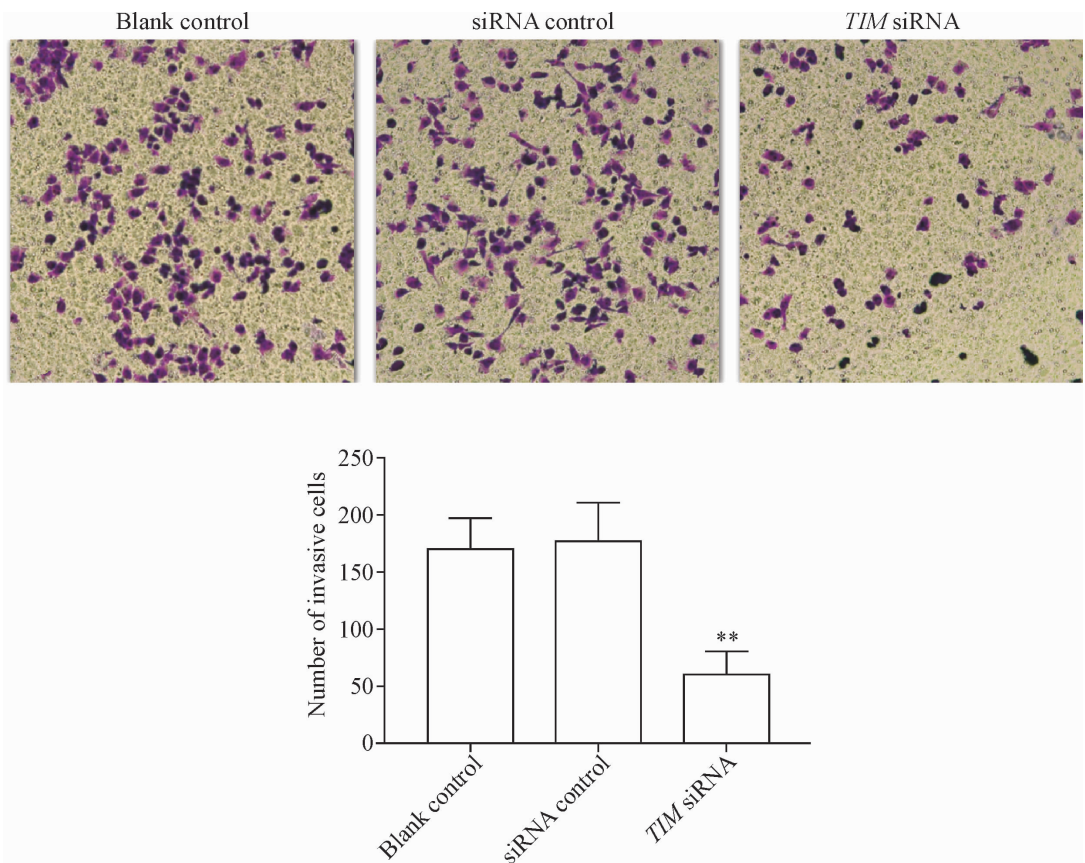


Figure 5. The invasion ability in blank control group, siRNA control group and *TIM* siRNA group was detected by Transwell chamber test. Mean ± SD. *n* = 3. \*\* *P* < 0.01 vs blank control group and siRNA control group.

图5 空白对照组、siRNA 对照组和 *TIM* siRNA 组细胞侵袭能力的 Transwell 小室实验检测结果

**8 沉默 *TIM* 对卵巢癌 SKOV3 细胞中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达的影响** 达显著高于空白对照组和 siRNA 对照组 (*P* < 0.01), 见图 7。

*TIM* siRNA 组中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表

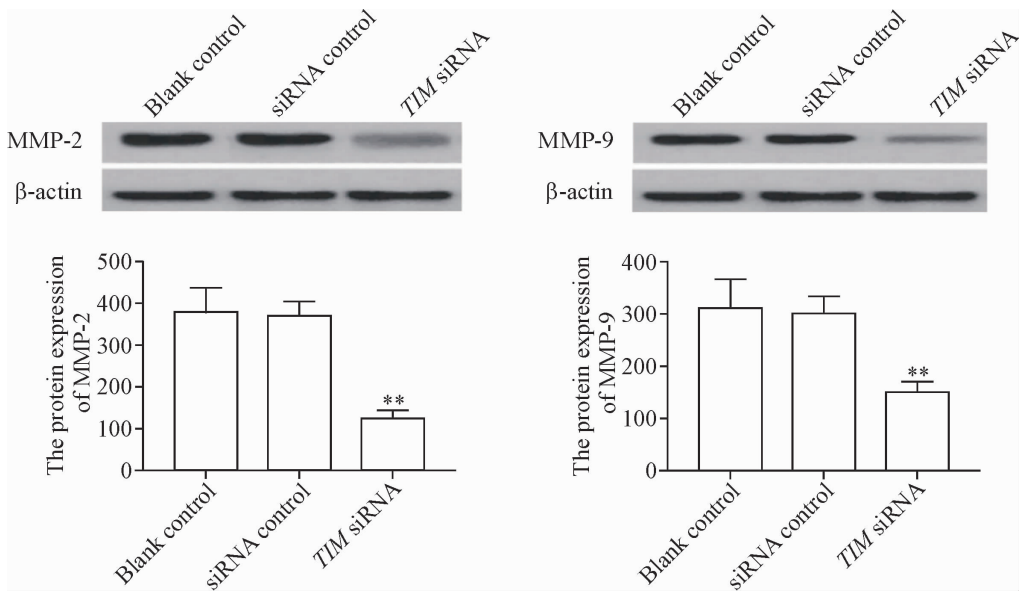


Figure 6. The protein expression of MMP-2 and MMP-9 in blank control group, siRNA control group and TIM siRNA group was determined by Western blot. Mean ±SD. n = 3. \*\* P < 0. 01 vs blank control group and siRNA control group.

图 6 空白对照组、siRNA 对照组和 TIM siRNA 组中 MMP-2 和 MMP9 蛋白表达的 Western blot 检测结果

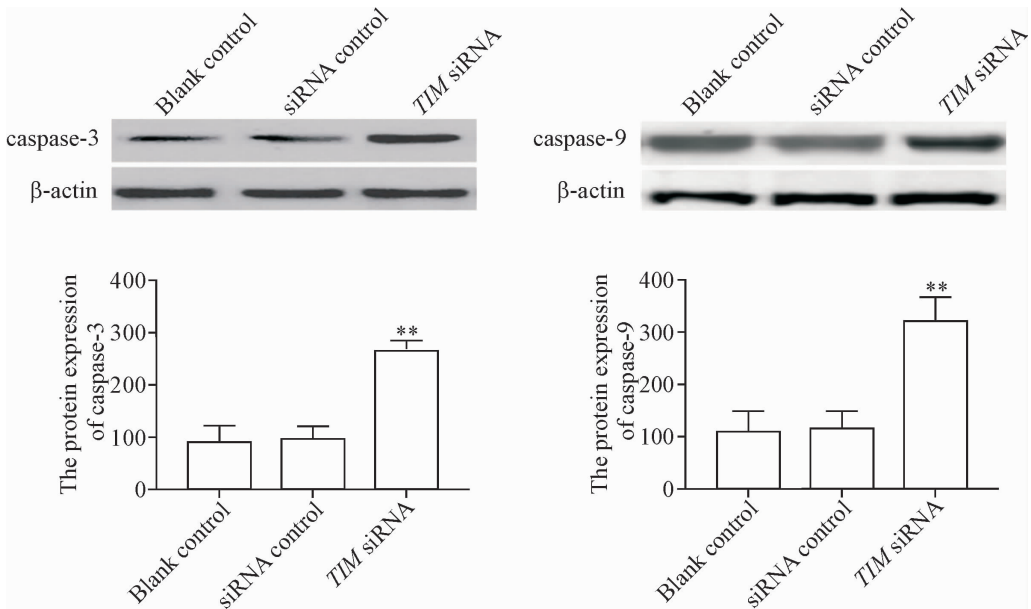


Figure 7. The protein expression of caspase-3 and caspase-9 in blank control group, siRNA control group and TIM siRNA group determined by Western blot. Mean ±SD. n = 3. \*\* P < 0. 01 vs blank control group and siRNA control group.

图 7 空白对照组、siRNA 对照组和 TIM siRNA 组中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达的 Western blot 检测结果

### 讨 论

卵巢癌发病隐匿,缺乏早期的典型症状,故早期诊断困难,大多数患者确诊时已为晚期,并出现广泛的腹腔转移,根治手术难以实施。同时,由于化疗耐药等原因,卵巢癌5年生存率较低。当前,卵巢癌的临床诊疗存在“2个70%”:超过70%的卵巢癌患者确诊时已为晚期,约70%的卵巢癌患者在治疗后2年内复发<sup>[8]</sup>。因此,迫切需要明确卵巢癌的发病机制,提高其临床诊疗水平。

生物钟节律是指生物体对其所生存的周期性环境作出的一系列适应性反应。生物钟作为一种内源性定时体系,它可使机体行为和生理呈现近似24h的节律,并以此调节血压、睡眠、激素分泌和免疫活动等生理过程。当机体受到外界环境影响时,如应激、辐射和药物等,可引起DNA损伤而使生物钟节律重新设置<sup>[9]</sup>。生物钟紊乱会增加包括恶性肿瘤在内的多种疾病的发生风险<sup>[10]</sup>。生物钟基因是产生和维持生物昼夜节律的分子基础,而TIM则是生物钟基因家族的重要成员之一<sup>[11]</sup>。Chi等<sup>[12]</sup>研究表明,

过表达 TIM 有助于提高恶性肿瘤的存活及增殖,提示 TIM 表达上调对于促进肿瘤的发生发展具有重要作用。为了初步阐明 Timeless 在卵巢癌中的作用及机制,我们将 TIM 的特异性 siRNA 转染至卵巢癌 SKOV3 细胞,结果发现 TIM siRNA 能显著下调卵巢癌 SKOV3 细胞中 TIM 蛋白表达,该结果为进一步研究 TIM 在卵巢癌中的功能奠定了基础。

凋亡抵抗是多种恶性肿瘤共有的特性,也是导致放化疗效果不佳的主要因素。Elgohary 等<sup>[13]</sup> 研究显示,TIM 表达下调可显著诱导肝癌细胞凋亡,提示 TIM 对肝癌细胞凋亡具有调控作用。本研究中,为探讨 TIM 对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的调控作用,我们分析了沉默 TIM 后卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡率的变化。结果发现,转染 TIM siRNA 可显著诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡。进一步分析凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达变化发现,转染 TIM siRNA 能显著降低 Bcl-2 的蛋白表达,并提高 Bax、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达。上述结果提示,沉默 TIM 可诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡,表现为抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,同时促凋亡蛋白 Bax 表达上调,其机制可能与 caspase-3/caspase-9 介导的凋亡信号通路启动有关。远处侵袭是肿瘤细胞最典型的生物学特征之一,在该过程中,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)参与其中,并发挥侵袭诱导作用。Reszka 等<sup>[14]</sup> 研究表明,在乳腺癌组织中,Per、Cry 及 Clock 等大多数生物钟基因均呈现低表达,但 TIM 在其中却呈高表达,且在侵袭性乳腺癌中其表达上调更为显著,提示 TIM 可能具有介导肿瘤细胞远处侵袭的作用。本研究结果显示,转染 TIM siRNA 可显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭水平,同时可显著降低 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平。上述结果提示,沉默 TIM 可降低卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭能力,且机制可能与下调 MMP-2 和 MMP-9 表达有关。

综上所述,利用 siRNA 沉默卵巢癌 SKOV3 细胞中 TIM 表达,可促进细胞凋亡,抑制细胞侵袭。

#### [参 考 文 献]

[1] 周 磊,肖 然,陈 颖,等. 人附睾蛋白 4 基因表达下调对卵巢癌细胞生物学行为的影响[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(10):687-690.

[2] Zhang H, Liu T, Zhang Z, et al. Integrated proteogeno-

mic characterization of human high-grade serous ovarian cancer[J]. Cell, 2016, 166(3):755-765.

- [3] Pavelka J, Shimada K, Kostal V. TIMELESS: a link between fly's circadian and photoperiodic clocks? [J]. Eur J Entomol, 2003, 100:255-265.
- [4] Top D, Harms E, Syed S, et al. GSK-3 and CK2 kinases converge on Timeless to regulate the master clock [J]. Cell Rep, 2016, 16(2):357-367.
- [5] Fu A, Leaderer D, Zheng T, et al. Genetic and epigenetic associations of circadian gene TIMELESS and breast cancer risk[J]. Mol Carcinog, 2012, 51(12):923-929.
- [6] Yoshida K, Sato M, Hase T, et al. TIMELESS is overexpressed in lung cancer and its expression correlates with poor patient survival [J]. Cancer Sci, 2013, 104(9):171-177.
- [7] 彭 桦,何前进,金 涛,等. 生物钟基因 Timeless 在 HBV 相关肝癌组织中的表达及其与乙肝病毒 X 蛋白的关系[J]. 山东医药, 2016, 56(40):21-24.
- [8] Cannioto RA, Moysich KB. Epithelial ovarian cancer and recreational physical activity: a review of the epidemiological literature and implications for exercise prescription [J]. Gynecol Oncol, 2015, 137(3):559-573.
- [9] Mazzoccoli G, Colangelo T, Panza A, et al. Analysis of clock gene-miRNA correlation networks reveals candidate drivers in colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(29):45444-45461.
- [10] Sun Y, Jin L, Sui YX, et al. Circadian gene CLOCK affects drug-resistant gene expression and cell proliferation in ovarian cancer SKOV3/DDP cell lines through autophagy [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2017, 32(4):139-146.
- [11] Mao Y, Fu A, Leaderer D, et al. Potential cancer-related role of circadian gene TIMELESS suggested by expression profiling and *in vitro* analyses [J]. BMC Cancer, 2013, 13:498.
- [12] Chi L, Zou Y, Ling Q, et al. TIMELESS contributes to the progression of breast cancer through activation of MYC [J]. Breast Cancer Res, 2017, 19:53.
- [13] Elgohary N, Pellegrino R, Neumann O, et al. Protumorigenic role of Timeless in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 2015, 46(2):597-606.
- [14] Reszka E, Przybek M. Circadian genes in breast cancer [J]. Adv Clin Chem, 2016, 75:53-70.

(责任编辑:陈妙玲,罗 森)