

小鼠 PPA1 重组腺病毒的构建及在胰岛 β 细胞中的表达

郑月,张许,韩晓*

(南京医科大学江苏省人类功能基因组学重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:构建小鼠 PPA1 重组腺病毒,观察重组腺病毒在小鼠胰岛和 β -TC6 细胞中的表达,以及对脂肪酸引起的胰岛 β 细胞凋亡的影响。方法:将目的基因 PPA1 插入到腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV 中,质粒经 PCR 鉴定正确后用 *Pme* I 酶切线性化,转到含有腺病毒骨架 pAdeasy-1 的 BJ5183 细菌中进行同源重组,重组成功的质粒经 *Pac* I 酶切线性化后转染 QBI-293A 细胞,经包装得到 Ad-PPA1 腺病毒。根据绿色荧光蛋白(GFP)检测病毒滴度和感染效率。用病毒感染小鼠胰岛和 β -TC6 细胞,以 Western blot 法检测 PPA1 蛋白表达水平。Hoechst 染色法检测 PPA1 对细胞凋亡的影响。结果:重组腺病毒载体 pAdeasy-PPA1 经酶切鉴定确认构建成功,将 pAdeasy-PPA1 转染 QBI-293A 细胞,观察细胞病变效应提示病毒成功包装。重组腺病毒能够有效感染小鼠胰岛和 β -TC6 细胞并成功过表达 PPA1 蛋白。Hoechst 染色结果表明过表达 PPA1 可保护脂肪酸引起的胰岛 β 细胞凋亡。结论:成功构建携带小鼠 PPA1 基因的重组腺病毒,并证实过表达 PPA1 具有抗凋亡的作用,为进一步研究 PPA1 在胰岛 β 细胞中的功能奠定了基础。

[关键词] PPA1;腺病毒载体;胰岛 β 细胞

[中图分类号] Q257

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1019-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140804

Construction of recombinant adenovirus carrying mouse PPA1 gene and its expression in pancreatic β -cell

Zheng Yue,Zhang Xu,Han Xiao*

(*Jiangsu Province Key Lab of Human Functional Genomics,NJMU,Nanjing 210029,China*)

[Abstract] **Objective:**To construct recombinant adenovirus carrying mouse PPA1 gene,and detect its expression in mouse islets and β -TC6 cells,and observe its effect on fatty acid-induced pancreatic β cell apoptosis. **Methods:**The target gene of PPA1 was cloned into the shuttle vector pAdtrack-CMV. After identified by PCR,the plasmid was linearized by *Pme* I and recombined with backbone pAdeasy-1 in BJ5183 bacteria. The recombinant plasmid was linearized by *Pac* I enzymes digestion,transfected into QBI-293A cells,and packed for Ad-PPA1 adenovirus. According to the green fluorescent protein (GFP),the titer and infection rate was detected. The mouse islets and β -TC6 cells were infected by recombinant adenovirus and the protein level of PPA1 was detected by Western blot. By Hoechst staining,the effect of PPA1 on cell apoptosis was detected. **Results:**The recombinant adenovirus vector pAdeasy-PPA1 was successfully constructed. After pAdeasy-PPA1 was transfected into QBI-293A cells,cytopathic effect showed that the adenovirus was successfully packed. The recombinant adenovirus containing mouse PPA1 gene effectively infected mouse islets and β -TC6 cells,and over-express the protein levels of PPA1. Hoechst staining showed that over-expression of PPA1 protected β -TC6 cells against fatty acid-induced apoptosis. **Conclusion:**The recombinant adenovirus expressing PPA1 gene has been successfully obtained and over-expression of PPA1 has anti-apoptosis effect,which provided a basis for further study of PPA1 on pancreatic β -cell function.

[Key words] PPA1;adenovirus vector;pancreatic β -cell

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(08):1019-1024]

[基金项目] 国家自然科学基金(81370878)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:hanxiao@njmu.edu.cn

焦磷酸水解酶 1(pyrophosphatase 1,PPA1)属于无机焦磷酸酶中的蛋白磷酸酶家族,它可以催化 1 分子焦磷酸盐生成 2 分子无机磷酸盐,并且释放能量,是细胞内焦磷酸盐代谢的关键反应,包括参与

DNA与RNA合成,脂肪酸和氨基酸活化^[1]。目前对PPA1功能研究还较少,现有研究主要发现PPA1与线虫发育密切相关,为大肠杆菌生长所必需;PPA1与成骨细胞中的胶原形成有关;年老大鼠肝脏中PPA1表达高于年轻大鼠;胃癌患者中,高表达的PPA1参与胃癌细胞的迁移和侵袭^[2-5]。本课题组前期研究借助染色体免疫共沉淀和DNA选择性连接相结合(ChIP-DSL)的方法,在脂肪酸处理的小鼠胰岛 β 细胞中,筛选出189个可能受转录因子叉头框O1(forkhead box O1, FoxO1)调控的下游靶基因,经初步定量PCR筛选发现PPA1的表达在脂肪酸处理后发生显著变化^[6],并首次发现FoxO1可以直接结合在PPA1基因的启动子区,调控其转录活性。FoxO1是胰岛素信号通路中重要的调节因子,参与胰岛 β 细胞的生长、分化、增殖与凋亡等过程,它的活化是脂肪酸诱导 β 细胞凋亡的必要环节, β 细胞凋亡在糖尿病发生发展中起到重要作用^[7-9]。作为FoxO1下游靶基因,PPA1在脂肪酸诱导 β 细胞凋亡中是否发挥作用,值得进一步探讨。因此,本研究构建了高表达PPA1基因的腺病毒表达系统,在小鼠原代胰岛和小鼠胰岛素瘤细胞系 β -TC6中检测其表达,并在 β -TC6细胞中观察过表达PPA1对脂肪酸诱导的细胞凋亡影响,为进一步研究PPA1在胰岛 β 细胞中的作用和功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

对照腺病毒Ad-GFP、质粒PPA1-myc、 β -TC6细胞来自本实验室;穿梭载体pAdTrack-CMV、含pAdeasy-1载体的BJ5183菌种与QBI-293A细胞均由南京大学宁文教授馈赠;小鼠PPA1基因CDS区特异性引物由上海华大基因公司合成;Primer Star PCR试剂盒、内切酶Sma I、Hind III、EcoR V与T4 DNA连接酶均(日本TaKaRa公司);内切酶Pac I(美国NEB公司);小量胶回收试剂盒与质粒纯化试剂盒购自美国Axygen公司;Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);PPA1抗体和 β -tubulin抗体(美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶偶联的抗兔和抗鼠IgG(美国Chemicon公司);DMEM、胎牛血清、青/链霉素、棕榈酸(palmitic acid, Plam)、Hoechst 33342染料(美国Sigma公司);ICR小鼠(8周龄,雄性,南京大学模式动物研究所)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的酶切、连接、转化、提取以及感受态制备

参考文献[10]的方法。

1.2.2 穿梭质粒pAdtrack-CMV-PPA1的构建和鉴定

从实验室原有质粒PPA1-myc上用限制性内切酶Hind III、Sma I切下目的片段,空载质粒pAdTrack-CMV用Hind III和EcoR V双酶切,酶切于37℃水浴锅中反应过夜,产物按清洁回收试剂盒说明进行回收,片段与载体按合适比例用T4连接酶于16℃连接过夜。连接产物转化DH5 α 感受态细菌,涂于卡那霉素抗性LB培养基平板上,37℃培养过夜。挑取数个边缘光滑中等大小的单个菌落,分别接种于卡那霉素抗性LB培养液中,37℃振荡培养过夜并提取质粒,PCR后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,如果PCR产物片段为900 bp左右则视为阳性克隆,选择1个阳性克隆送华大基因公司测序,以确定插入的PPA1序列是否正确。

1.2.3 重组腺病毒质粒载体pAdeasy-PPA1的构建与鉴定

构建正确的穿梭质粒pAdtrack-CMV-PPA1经Pme I酶切线性化,清洁纯化后转化到含有腺病毒骨架pAdeasy-1的BJ5183感受态细菌中,涂于卡那霉素抗性LB培养基平板上,37℃培养过夜,挑取中等大小的菌落接种于卡那霉素抗性LB培养液中,37℃振荡培养过夜,提取质粒并进行琼脂糖凝胶电泳,根据分子量初筛重组体,选取分子量大于pAdeasy-1的质粒用Pac I酶切鉴定。

1.2.4 病毒的包装与扩增

取15 μ g重组腺病毒质粒用Pac I酶切,经酚/氯仿纯化后,利用脂质体转染试剂Lipofectamine 2000转染到QBI-293A细胞中。7 d后观察到细胞开始出现细胞致病变效应(CPE),即细胞变圆、肿胀并开始脱落。待90%细胞出现CPE,此时用枪头直接吹散细胞并收集细胞,经-80℃和37℃反复冻融3次以裂解细胞,释放出病毒,离心收集上清即获得原代病毒。

原代病毒感染QBI-293A细胞,待多数细胞出现CPE时,按前述方法收集细胞以获得第2代病毒,同样的方法可以获得第3代病毒。病毒用0.22 μ m滤器过滤除菌,分装后保存于-80℃冰箱。

1.2.5 重组腺病毒滴度的测定

病毒感染细胞之前需要对滴度进行测定,滴度用感染复数MOI(multiplicity of infection)表示,其含义是感染时病毒与细胞数量的比值。测定方法:接种293A细胞于48孔板中,待细胞密度在90%左右时,将病毒按照1:200、1:500、1:1 000、1:2 000、1:5 000、

1:10 000、1:20 000 稀释度用培养液稀释,每孔弃去原培养液,加入 100 μ l 稀释后的病毒培养液,3 h 后每孔补加 200 μ l 培养液。培养 72 h,观察荧光和 CPE 情况,细胞完全病变所对应的滴度为 10~20 MOI。根据每孔细胞数以及对应稀释倍数即可计算出病毒滴度。

1.2.6 Western blot 检测腺病毒 Ad-PPA1 的表达

分别在胰岛和 β -TC6 细胞中验证 Ad-PPA1 的表达。提取 ICR 小鼠原代胰岛分为 2 组,每组约 500 个胰岛,分别感染病毒 Ad-GFP 和 Ad-PPA1,以 30 MOI 病毒感染,4 h 后换液继续培养 24 h,荧光显微镜下观察感染效率,并收集胰岛,加入细胞裂解液提取总蛋白。同样的方法,在 β -TC6 细胞中感染病毒 Ad-GFP 和 Ad-PPA1 并提取总蛋白。定量后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移到 PVDF 膜上,以 PPA1 抗体作为一抗(浓度 1:1 000),以辣根过氧化物酶标记的兔抗体作为二抗(浓度 1:3 000),采用化学发光法检测 PPA1 蛋白表达。

1.2.7 Hoechst 染色检测细胞凋亡

β -TC6 细胞接种于 24 孔板中,用 Ad-GFP 和 Ad-PPA1 感染细胞 24 h 后,再用 0.4 mmol/L Palm 处理细胞 72 h。吸去培养液,用 PBS 洗涤 2~3 次,吸去上清,加入 1%多聚甲醛室温固定 15 min;吸去固定液,用 PBS 洗涤 2~3 次,加入 100 μ l Hoechst(终浓度 5 μ g/ml)室温孵育 5 min;吸去上清,用 PBS 洗涤 2~3 次,最后吸去上清,每孔加入 150 μ l PBS。荧光显微镜下观察,Hoechst 染料可结合细胞核 DNA,经过紫外光激发后发出蓝色荧光,细胞凋亡时核固缩,为蓝色亮点,且亮度明显强于未凋亡细胞。随机选取 3 个视野进行凋亡细胞计数。

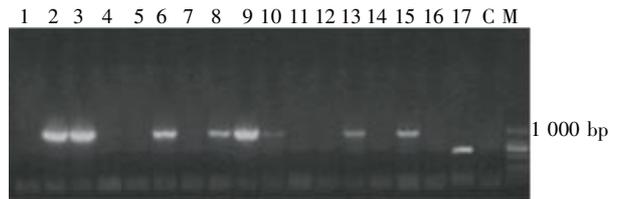
1.3 统计学方法

计量数据用均数和标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,组间比较采用双尾 t 检验和方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 穿梭质粒 pAdtrack-CMV-PPA1 的鉴定

PCR 检测挑取的 pAdtrack-CMV-PPA1 克隆质粒,如果片段成功插入载体中,则可以扩增出 900 bp 左右的条带,而对照质粒 pAdtrack-CMV 没有条带(图 1)。PCR 结果显示 2、3、6、8、9、10、13、15 号为阳性克隆,随机挑选 3 号质粒送测序,结果显示目的片段序列与 PPA1 CDS 区序列完全一致,证明穿梭质粒构建成功。



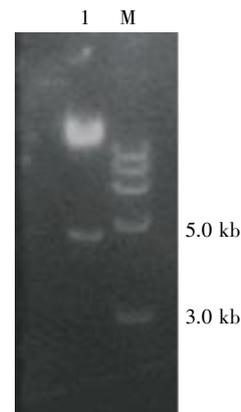
1~17:待鉴定质粒 pAdtrack-CMV-PPA1 的 PCR 产物;C:对照质粒 pAdtrack-CMV 的 PCR 产物;M:DNA Marker。

图 1 穿梭质粒 pAdtrack-CMV-PPA1 PCR 鉴定

Figure 1 Identification of shuttle plasmid pAdtrack-CMV-PPA1 by PCR

2.2 重组质粒 pAdeasy-PPA1 的鉴定

构建成功的穿梭质粒 pAdtrack-CMV-PPA1 经 *Pme* I 酶切线性化,转化到 BJ5183 感受态细菌中同源重组,重组成功的质粒经 *Pac* I 酶切后会出现两条带,一条近 30 kb;另一条为 3.0 kb 或 4.5 kb 左右(取决于不同的同源重组方式)。图 2 显示腺病毒质粒重组成功。



1:重组腺病毒质粒 pAdeasy-PPA1 经 *Pac* I 酶切后产物;M:DNA Marker。

图 2 重组腺病毒质粒 pAdeasy-PPA1 的酶切鉴定

Figure 2 Identification of pAdeasy-PPA1 vector by restriction enzyme

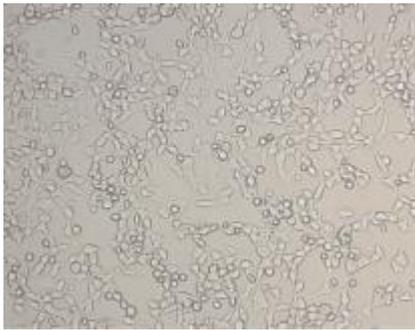
2.3 重组腺病毒的包装

重组成功的腺病毒质粒转染 QBI-293A 细胞,约 24 h 开始表达绿色荧光蛋白,荧光强度随着感染时间的延长而逐渐增强,病毒感染 7 d,观察到细胞开始发生变圆、肿大、脱落等致病变效应(图 3)。待 90%以上细胞出现 CPE 时收集细胞,得到原代病毒。

2.4 重组腺病毒 Ad-PPA1 的感染效率

腺病毒 Ad-GFP 和 Ad-PPA1 分别感染胰岛和 β -TC6 细胞 24 h,荧光显微镜下观察到清晰的绿色荧光,说明病毒感染效率很高(图 4)。

2.5 重组腺病毒在小鼠胰岛和 β -TC6 中的表达



腺病毒 Ad-PPA1 感染 QBI-293A 细胞, 7 d 后细胞开始发生病变。
图 3 重组腺病毒的体外包装 (×100)
Figure 3 Recombinant adenovirus in vitro packaging (×100)

用 Ad-GFP 和 Ad-PPA1 重组腺病毒分别感染小鼠胰岛和 β -TC6 细胞并提取总蛋白, Western blot 结果显示 PPA1 蛋白在胰岛和 β -TC6 细胞中成功过表达(图 5)。说明构建的腺病毒 Ad-PPA1 能够过表达 PPA1。

2.6 PPA1 过表达降低 Palm 诱导的胰岛 β 细胞凋亡

分别用病毒 Ad-GFP 和 Ad-PPA1 感染 β -TC6 细胞 24 h 后, 再用 0.4 mmol/L Palm 处理细胞 72 h, Hoechst 染色检测细胞凋亡状况。结果显示, 0.4 mmol/L Palm 处理 β -TC6 后可明显诱导细胞凋亡,

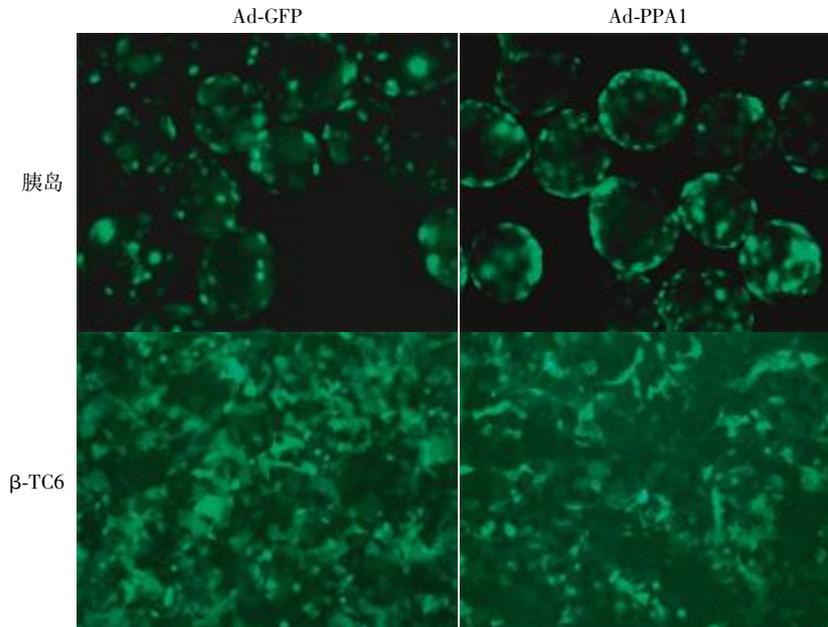


图 4 腺病毒在小鼠胰岛和 β -TC6 细胞中的感染效率(×100)
Figure 4 Transfection efficiency of adenovirus in mouse islets and β -TC6 cells(×100)

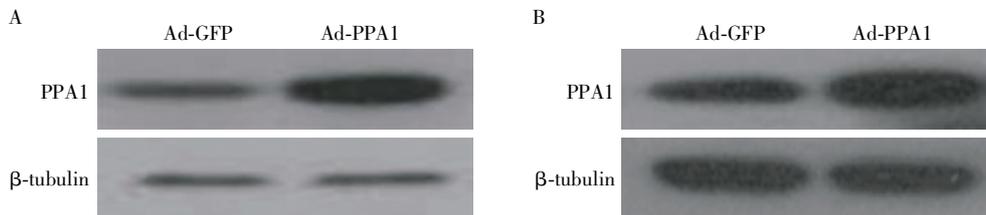


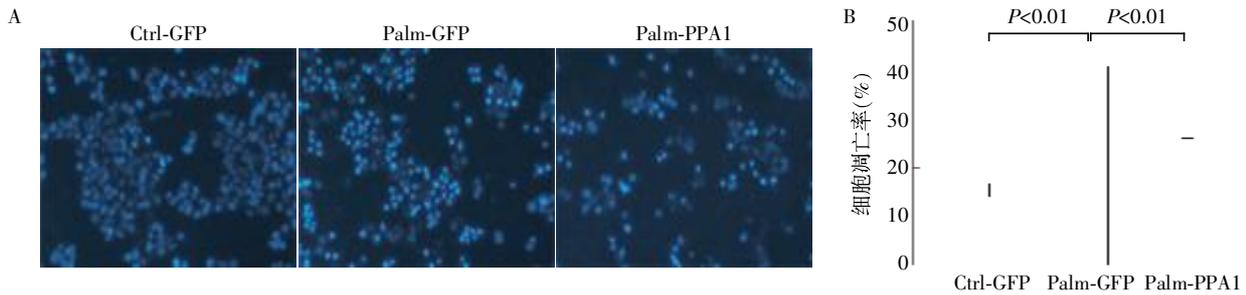
图 5 PPA1 在小鼠胰岛(A)和 β -TC6 细胞(B)中的表达
Figure 5 Expression of PPA1 in mouse islets (A) and β -TC6 cells (B)

而 PPA1 过表达可显著保护 Palm 引起的胰岛 β 细胞凋亡(图 6)。

3 讨论

2 型糖尿病是由胰岛素分泌相对不足和胰岛素抵抗所造成的代谢综合征, 目前具体发病机制尚不

完全清楚, 但是有功能的胰岛 β 细胞数量减少在这一过程中发挥着举足轻重的作用, 许多研究表明胰岛 β 细胞的凋亡是 2 型糖尿病发生发展的一个重要因素^[11-13]。2 型糖尿病的发生发展与肥胖人群数量的增加密切相关, 肥胖人群血浆中游离脂肪酸的水平往往异常升高, 长期高浓度脂肪酸对 β 细胞的



A:通过 Hoechst 染色在荧光显微镜下观察细胞核固缩情况($\times 100$);B:对核固缩阳性细胞计数并统计结果。

图 6 过表达 PPA1 对 Palm 诱导的胰岛 β 细胞凋亡的影响

Figure 6 Effect of over-expression of PPA1 on pancreatic β -cell apoptosis by Palm

功能和存活有着严重危害,此外持续高浓度的脂肪酸可以直接导致胰岛 β 细胞凋亡^[14-17]。

转录因子 FoxO1 的活化是脂肪酸诱导胰岛 β 细胞凋亡的必要环节,抑制 FoxO1 可以有效保护细胞免受脂肪酸的毒性作用^[18]。PPA1 是 FoxO1 调控的下游靶基因之一,进一步研究 PPA1 的功能有助于了解脂肪酸引起胰岛 β 细胞凋亡的机制。本研究采用 Palm 处理 β -TC6 细胞 72 h,Hoechst 染色结果显示长时间的脂毒性刺激可诱导细胞凋亡,而过表达 PPA1 能部分降低凋亡,表明 PPA1 在胰岛 β 细胞中发挥了抗凋亡作用。PPA1 是催化焦磷酸盐水解的酶,对调节细胞内焦磷酸盐水平起到重要作用。有研究表明,体内沉积过多焦磷酸盐会引起一些疾病的发生,如焦磷酸钙沉积导致的关节病^[19]。脂肪酸引起胰岛 β 细胞凋亡,推测可能机制之一是由于胞内焦磷酸盐过量,PPA1 不足引起,而给予过量的外源性 PPA1,促进了焦磷酸盐水解,但这一假设尚待进一步验证。

本研究构建的重组腺病毒 Ad-PPA1,由于其中携带编码 GFP 的序列,故方便在荧光显微镜下观察该病毒在细胞中的感染,腺病毒 Ad-PPA1 在小鼠胰岛和 β -TC6 细胞中感染效率很高,并且 PPA1 蛋白能够成功过表达。另外还发现,PPA1 过表达对胰岛 β 细胞起到保护作用,能够降低脂肪酸诱导的细胞凋亡,但具体机制有待进一步研究。总之本研究构建的 PPA1 重组腺病毒为后续研究提供便利的实验工具,为深入探讨 PPA1 在糖尿病病理进程中对胰岛 β 细胞生存和功能的影响,阐明糖尿病发病机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Tezuka Y,Okada M,Tada Y,et al. Regulation of neurite growth by inorganic pyrophosphatase 1 via JNK dephosphorylation[J]. PLoS One,2013,8(4):e61649

[2] Islam MK,Miyoshi T,Yamada M,et al. Pyrophosphatase of the roundworm *Ascaris sum* plays an essential role in the worm's molting and development [J]. Infect Immun,2005,73(4):1995-2004

[3] Polewski MD,Johnson KA,Foster M,et al. Inorganic pyrophosphatase induces type I collagen in osteoblasts[J]. Bone,2010,46(1):81-90

[4] Kharbhih WJ,Sharma R. Age-dependent increased expression and activity of inorganic pyrophosphatase in the liver of male mice and its further enhancement with short- and long-term dietary restriction [J]. Biogerontology,2014,15(1):81-86

[5] Jeong SH,Ko GH,Cho YH,et al. Pyrophosphatase over-expression is associated with cell migration, invasion, and poor prognosis in gastric cancer [J]. Tumour Biol,2012,33(6):1889-1898

[6] Lin HY,Yin Y,Zhang JX,et al. Identification of direct forkhead box O1 targets involved in palmitate-induced apoptosis in clonal insulin-secreting cells using chromatin immunoprecipitation coupled to DNA selection and ligation[J]. Diabetologia,2012,55(10):2703-2712

[7] Khan S,Jena GB. Protective role of sodium butyrate, a HDAC inhibitor on beta-cell proliferation, function and glucose homeostasis through modulation of p38/ERK MAPK and apoptotic pathways: Study in juvenile diabetic rat [J]. Chem Biol Interact,2014,213:1-12

[8] Omae N,Ito M,Hase S,et al. Suppression of FoxO1/cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector A (Cidea) axis protects mouse β -cells against palmitic acid-induced apoptosis [J]. Mol Cell Endocrinol,2012,348(1):297-302

[9] Tavana O,Puebla-Osorio N,Sang M,et al. Absence of p53-dependent apoptosis combined with nonhomologous end-joining deficiency leads to a severe diabetic phenotype in mice [J]. Diabetes,2010,59(1):135-142

[10] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版

社,1993;34-36

[11] Kristensen JM, Skov V, Petersson SJ, et al. A PGC-1 α - and muscle fibre type-related decrease in markers of mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of humans with inherited insulin resistance [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(5):1006-1015

[12] Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes [J]. *Cell*, 2001, 104(4):517-529

[13] Zhou Y, Lee J, Reno CM. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1 FoxO1 interaction [J]. *Nat Med*, 2011, 17(3):356-365

[14] Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8(4):228-236

[15] Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance; time for a reevaluation [J]. *Diabetes*, 2011, 60(10):2441-2449

[16] Shao S, Liu Z, Yang Y. SREBP-1c, Pdx-1, and GLP-1R involved in palmitate - EPA regulated glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(3):634-42

[17] Green CD, Olson LK. Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic β -cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300(4):640-649

[18] Martinez SC, Tanabe K, Cras-Meneur C, et al. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Diabetes*, 2008, 57(4):846-859

[19] Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(1):C1-C11

[收稿日期] 2014-04-17

(上接第 1014 页)

Yang 1 regulates the transcriptional repression of survivin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(1):208-213

[7] Weng W, Wang M, Xie S, et al. YY1-C/EBP α -miR34a regulatory circuitry is involved in renal cell carcinoma progression [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4):1921-1927

[8] Allouche A, Nolens G, Tancredi A, et al. The combined immunodetection of AP-2 α and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(1):R9

[9] Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepez S, et al. Overexpression of VEGF and TGF- β 1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer; implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(1):69-79

[10] Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer [J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(1):131-141

[11] Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, et al. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10):3686-3696

[12] Zhang Q, Stovall DB, Inoue K, et al. The oncogenic role of Yin Yang 1 [J]. *Crit Rev Oncog*, 2011, 16(3-4):163-197

[13] 王静萱, 张清媛, 刘姝伶, 等. 乳腺癌组织中 YY1 表达与 E-cadherin 甲基化状态的关系 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(16):1169-1179

[14] Wang X, Zhang S, Zhang J, et al. Annexin A6 is down-regulated through promoter methylation in gastric cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2013, 5(5):555-562

[收稿日期] 2014-03-09