

地西他滨对裸鼠子宫内膜癌移植瘤的作用及机制研究*

李冉红¹, 王雪萍², 刘 辉^{1△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(成都 610041);
2. 德阳市人民医院 妇产科(德阳 618000)

【摘要】 目的 探究去甲基化药物地西他滨对裸鼠子宫内膜癌移植瘤的作用及其机制。**方法** 建立子宫内膜癌裸鼠移植瘤模型后随机分为地西他滨组(AZA组)、顺铂组(DDP组)、醋酸甲羟孕酮组(MPA组)、AZA+DDP组、AZA+MPA组、DDP+MPA组、模型组,每组3只,各实验组给予相应药物(1 μg/g 单用或各1 μg/g 联合),模型组给予生理盐水,每3 d一次尾静脉注射给药,共给药8次。处理后观察各组裸鼠瘤体生长情况;取出瘤体后,计算抑瘤率;采用甲基化特异性PCR(MSP)、Western blot和TUNEL染色法分别检测移植瘤组织细胞中RASSF1A基因启动子区域甲基化状态、蛋白表达及肿瘤细胞的凋亡情况。**结果** AZA+DDP组抑瘤率最高,而AZA组抑瘤率最低。AZA组、AZA+DDP组、AZA+MPA组RASSF1A基因启动子区域甲基化水平明显降低,显示明显的非甲基化条带,其余组则主要显示甲基化条带。AZA组、AZA+DDP组、AZA+MPA组这三组之间RASSF1A蛋白的表达量差异无统计学意义($P>0.05$),但均高于模型组($P<0.05$);DDP组、MPA组、DDP+MPA组与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。凋亡指数为模型组 <3 个单药组 <3 个联合用药组($P<0.05$)。**结论** 地西他滨可逆转内膜癌中RASSF1A基因启动子区域的异常甲基化,恢复RASSF1A蛋白生物学功能,增强DDP与MPA的药效,对临床子宫内膜癌的治疗有很大的潜在应用价值。

【关键词】 地西他滨 移植瘤 子宫内膜癌 去甲基化 RASSF1A 基因

The Study of Decitabine Effect on the Endometrial Carcinoma Xenografted in Nude Mice LI Ran-hong¹, WANG Xue-ping², LIU Hui^{1△}. 1. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Birth Defects and Related Disease of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, China

△ Corresponding author, E-mail: lh666888@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of the demethylation drug 5-Aza-CdR on endometrial carcinoma xenografted in nude mice. **Methods** Randomly assigned the mice into decitabine (AZA), cisplatin (DDP), medroxyprogesterone acetate (MPA), AZA+DDP, AZA+MPA, DDP+MPA and model groups (three in each group) after building the models of xenografted tumor by transplanting the HEC-1B cells on nude mice, and dealt them respectively with corresponding drugs (1 μg/g, single or combination) in the experiment groups and normal saline in model group (injected per 3 d, 8 injections in total). Then the tumor inhibitory rates in different groups were calculated. The methylation and protein expression of RASSF1A gene was estimated by methylation specific PCR (MSP) and Western blot respectively, and apoptosis situation of carcinoma cell was estimated by tunel. **Results** Inhibitory rate in AZA + DDP group was the highest, and the lowest was AZA group. RASSF1A gene promoter region methylation levels of AZA, AZA + DDP and AZA + MPA groups significantly reduced and showed obvious demethylation stripes while other groups mainly showed the methylation stripes. The differences of RASSF1A protein expression between AZA, AZA + DDP and AZA + MPA groups were not statistical significant ($P>0.05$), but the three were higher than model group ($P<0.05$); there was no statistically significant difference respectively in the DDP, MPA, DDP + MPA groups compared with that of model group ($P>0.05$). In the comparison of apoptosis index, model group was the lowest, followed by the three single medicine groups, and the highest was three combination groups ($P<0.05$). **Conclusion** Demethylation drug 5-Aza-CdR in endometrial cancer treatment has a great potential clinical application value by reversing the abnormal methylation of RASSF1A gene, restoring biological functions of RASSF1A protein and strengthening the efficacy of DDP and MPA.

【Key words】 Decitabine Xenografted tumor endometrial carcinoma Demethylation RASSF1A gene

DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的作用下发生的可逆的化学修饰过程。基因的异常甲基化可通过去甲基

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2010SZ0107)资助

△ 通信作者, E-mail: lh666888@163.com

化逆转或者抑制,从而发挥正常的生物学功能。地西他滨,即 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷(5-AZA-2'-deoxy cytidine, 5-Aza-CdR),为核苷类 DNMT 抑制剂,在肿瘤细胞内被脱氧胞苷激酶磷酸化,以磷酸盐的形式参与 DNA 复制,高浓度时抑制 DNA 合成从而发挥细胞毒作用,低浓度时替代胞嘧啶与 DNMT 的半胱氨酸残基上的巯基共价结合,使 DNMT 失活而达到去甲基化、恢复抑癌基因的功能^[1]。地西他滨可直接与 DNA 结合而不需行体内脱氧,故毒性较小,目前已被美国食品药监局(FDA)批准上市治疗恶性肿瘤,主要用于骨髓增生异常综合征的治疗^[2]。国内外研究表明在细胞水平,地西他滨可逆转子宫内膜癌细胞 Ras-association domain family 1A 基因(RASSF1A)的异常甲基化,恢复其表达,并可抑制肿瘤细胞生长及诱导凋亡。本研究旨在建立动物模型,研究在体内该药物对内膜癌的作用及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、细胞和实验动物

地西他滨、顺铂、醋酸甲羟孕酮购自 Sigma 公司;Anti-RASSF1A 购自 BIOSS 公司;RT-PCR 试剂盒 Premix Taq Version 2.0 (Loading dye Mix)、Trizol 购自大连宝生物;PVDF 膜购自 MILLIPORE 公司;TUNEL 试剂盒购自 PROMEGA 公司。人中分化子宫内膜腺癌细胞株 HEC-1-B,引种于中科院上海细胞库。BALB/C nu/nu 雌性裸鼠,4~6 周,16~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 裸鼠皮下接种人子宫内膜癌细胞 HEC-1B

将细胞置于含 10% 特级胎牛血清的 MEM 培养基,于培养箱(37 °C,体积分数 5% CO₂, pH 7.2)中培养,裸鼠在四川大学实验动物中心 SPF 级动物房饲养 1 周并观察其生活习性。在超净工作台内收集对数生长期细胞,用含 EDTA(质量分数 0.01%)的胰酶消化后悬浮于无血清培养基中,调整细胞密度为 5×10⁷ mL⁻¹,体积分数 75% 的酒精消毒 24 只裸鼠右下肢处皮肤进行皮下接种,0.1 mL/只,注射后轻轻按压 30 s,防止细胞悬浮液从针孔处漏出。

1.3 实验分组及干预

接种处移植瘤形成粟粒大小结节时,取其中瘤体大小相近的 21 只裸鼠随机分 7 组,每组 3 只;第 1 组,地西他滨组(AZA 组:1 μg/g);第 2 组,顺铂组(DDP 组:1 μg/g);第 3 组,醋酸甲羟孕酮组

(MPA 组:1 μg/g);第 4 组,AZA+DDP 组(两种药物各 1 μg/g);第 5 组,AZA+MPA 组(两种药物各 1 μg/g);第 6 组,DDP+MPA 组(两种药物各 1 μg/g);第 7 组,模型组(相同体积生理盐水)。尾静脉注射给药,给药量根据裸鼠体质量计算,并调整注射体积均为 0.2 mL,每 3 d 一次,共给药 8 次。给药期间密切观察裸鼠的一般状况,每 3 d 测体质量、肿瘤体积(V),于停药第 3 d 处死裸鼠,取出瘤体,称质量,计算抑瘤率。抑瘤率(%)=[(V_{模型组}-V_{实验组})/V_{模型组}]×100%。将标本置于-70 °C 冰箱备用。

1.4 甲基化特异性 PCR(MSP)检测各组移植瘤组织细胞中 RASSF1A 基因 DNA 甲基化状态

将各组冰冻瘤体组织剪碎消化后用有机溶剂分别抽提组织中 RASSF1A 的 DNA,依次进行甲基化修饰、DNA 纯化、PCR 扩增。RASSF1A 基因 DNA 序列查询于 NCBI 人类基因组数据库。引物参考文献^[3],由 Invitrogen 公司合成。用于检测 RASSF1A 非甲基化的引物为上游:5'-GGTTTT GTGAGAGTGTGTTTAG-3',下游:5'-CACTAA CAAACACAAACCAAAC-3';扩增产物长度 169 bp。用于检测 RASSF1A 甲基化的引物为上游:5'-CACTAACAAACACAAACCAAAC-3',下游:5'-GCTAACAAACGCGAACCG-3',扩增产物长度 169 bp。PCR 反应条件:95 °C 起始变性 5 min 后,95 °C 变性 45 s、58 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 45 s,35 个循环后,72 °C 继续延伸 7 min,4 °C 维持结束。抽取扩增样品 5 μL,用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果,用琼脂糖凝胶成像仪检测灰度值进行成像分析。

1.5 Western blot 检测各组 RASSF1A 蛋白的表达

取各组冰冻(-70 °C)瘤体组织 100 mg 充分剪碎后裂解、离心提取蛋白质,加入等体积 5×蛋白质凝胶电泳上样缓冲液,95 °C 变性 10 min,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,使样品通过浓缩胶与分离胶(电压约 8 V/cm),然后进行转膜(电流 130 mA,电压 20 V,30 min),于室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h;4 °C 一抗过夜(RASSF1A 抗体滴度为 1:200,GFAP 抗体滴度为 1:300,内参 β-actin 抗体滴度为 1:1 000),TBST 洗涤 3 次后 37 °C 二抗孵育 1 h(滴度 1:3 000),TBST 洗涤 3 次后曝光,采用自动电泳凝胶定量图像分析系统分析结果判定,蛋白相对表达量以相应条带与内参条带积分光密度(OD)值的比值表示。

1.6 TUNEL 法检测各组细胞凋亡情况

取各组冰冻瘤块组织,体积分数 10% 甲醛液,石蜡包埋后 5 μm 连续切片,用二甲苯脱蜡,乙醇水化,PBS 液洗涤,过氧化氢封闭,消化洗涤后,然后按 TUNEL 试剂盒说明书操作。倒置荧光显微镜下观察。结果判定:每张切片在低倍镜下随机选取 5 个区域后,400 倍镜下读取分析,以凋亡细胞数占细胞总数的百分比为凋亡指数(AI)。

1.7 统计学方法

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠皮下移植瘤成瘤及一般情况

2.1.1 接种成瘤及裸鼠一般情况变化 裸鼠接种子宫内 膜癌 HEC-1B 细胞后一周左右于接种部位长出直径约 0.3~0.5 cm 结节并逐渐长大,周围有新生血管形成表明造模成功,成瘤 23 只,成瘤率 95.83%。裸鼠接种子宫内 膜癌 HEC-1B 细胞后 4~6 d,注射部位变硬、红肿,约第 9 d 结节直径平均约 0.3~0.5 cm。接种后随瘤体增大,裸鼠精神、饮食及对外界反应均较接种前降低,体质量无明显改变。而分组给药后裸鼠精神、活动等与给药前相比无明显变化,提示实验药物无明显毒副作用。

2.1.2 不同药物对裸鼠移植瘤生长的影响 由表 1 可见,治疗结束后取瘤体称质量,各实验组均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组间比较,仅 AZA 组与 AZA+MPA 组、DDP+MPA 组差异有统计学意义($P < 0.05$),余各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。抑瘤率比较:DDP 组、AZA+MPA 组、DDP+MPA 组这 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),其中 AZA+DDP 组的抑瘤率最高,AZA 组抑瘤率最低($P < 0.05$)。

2.2 裸鼠移植瘤组织 RASSF1A 基因启动子区域

表 1 不同药物处理的裸鼠移植瘤质量及抑瘤率的比较($n=3$)		
Table 1 Mass and inhibitory rates of xenograft in groups ($n=3$)		
Group	Inhibitory rate	Tumor mass/g
AZA	43.379% [#]	1.39 $\pm$ 0.16
DDP	71.481%	1.04 $\pm$ 0.35
MPA	56.614% [#]	1.26 $\pm$ 0.08
AZA+DDP	81.249% [#]	0.81 $\pm$ 0.30
AZA+MPA	70.023%	0.71 $\pm$ 0.32 Δ
DDP+MPA	74.051%	0.62 $\pm$ 0.25 Δ
Model	—	2.12 $\pm$ 0.12 [#]

[#] $P < 0.05$, vs. other groups; Δ $P < 0.05$, vs. AZA group

DNA 甲基化状态

各组条带显示结果如图 1A 所示:模型组中 RASSF1A 基因启动子区明显甲基化,而用地西他滨处理的 1、4、5 组则甲基化程度降低,显示明显非甲基化条带,即甲基化的 RASSF1A 基因被地西他滨部分逆转。其他实验组 RASSF1A 基因启动子区则主要呈甲基化,同时显示甲基化和非甲基化条带。各组条带灰度值的结果如图 1B 所示:各组两两比较非甲基化条带的灰度值:AZA 组 $>$ AZA+DDP 组、AZA+MPA 组 $>$ 其余各组($P < 0.01$),AZA+MPA 组与 AZA+DDP 组差异无统计学意义($P > 0.05$),DDP、MPA、DDP+MPA 与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组两两比较甲基化条带的灰度值:AZA 组 $<$ AZA+DDP 组、AZA+MPA 组 $<$ 其余各组,差异有统计学意义($P < 0.05$),AZA+MPA 组与 AZA+DDP 组差异无统计学意义($P > 0.05$),DDP、MPA、DDP+MPA 与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组瘤体组织 RASSF1A 蛋白表达情况

各组药物作用后,Western blot 显示(表 2,图 2),AZA 组、AZA+DDP 组、AZA+MPA 组这 3 组之间 RASSF1A 蛋白的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),但均高于模型组($P < 0.05$);DDP 组

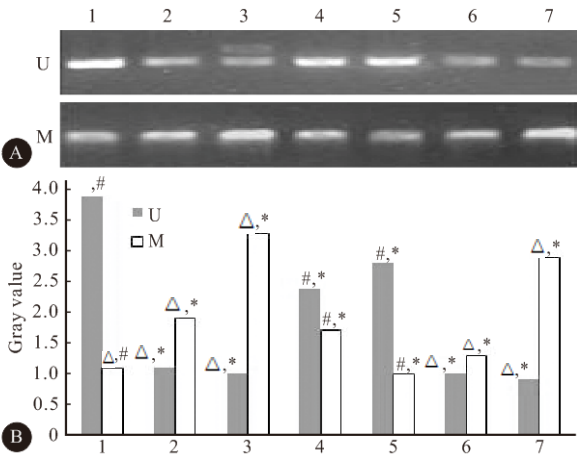


图 1 5-Aza-CdR 对裸鼠移植瘤 RASSF1A 甲基化状态的影响(A)和 各组甲基化和非甲基化条带的灰度值(B)

Fig 1 DNA methylation status of RASSF1A gene promoter regions of xenograft (A); grey values of methylation and unmethylation in the band in all groups (B)

U: Unmethylation; M: Methylation. 1-7: AZA, DDP, MPA, AZA+DDP, AZA+MPA, DDP+MPA, and model group, respectively. * $P < 0.05$, vs. group 1; Δ $P < 0.05$, vs. group 4; [#] $P < 0.05$, vs. group 7

表 2 各组 RASSF1A 蛋白的表达量(IOD 值)及 AI($n=3$)

Table 2 RASSF1A protein expression (IOD value) and apoptosis index (AI) in each group ($n=3$)

Group	Protein	AI
AZA	2.27±0.13 *	42.11%±5.19% *
DDP	0.99±0.06	36.22%±2.69% *
MPA	0.98±0.15	41.33%±2.84% *
AZA+DDP	2.26±0.69 *	66.44%±3.56% *,#
AZA+MPA	2.17±0.38 *	72.00%±4.70% *,#
DDP+MPA	0.85±0.23	73.22%±1.53% *,#
Model	1.25±0.34	18.11%±0.69%

* $P<0.05$, vs. model group; # $P<0.05$, vs. AZA, DDP and MPA groups

($P=0.085$)、MPA 组($P=0.089$)、DDP+MPA 组($P=0.051$)与模型组比较差异无统计学意义。

2.4 各组裸鼠瘤体 HEC-1-B 细胞凋亡情况

TUNEL 法测细胞凋亡染色结果见图 3,与模型组相比,实验各组凋亡细胞染色结果均显著增强,

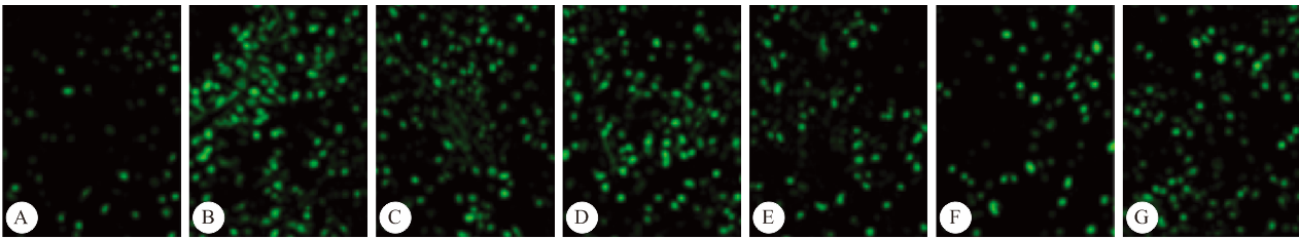


图 3 各组裸鼠移植瘤瘤体 HEC-1-B 细胞凋亡情况。TUNEL 染色 ×400

Fig 3 Apoptosis of xenograft HEC-1-B cells in all groups. TUNEL staining ×400

A-G: Model, DDP+MPA, AZA+MPA, AZA+DDP, MPA, DDP and AZA group, respectively

3 讨论

RASSF1A 为近年新发现的抑癌基因^[4], NEPHEW 等^[5]认为 RASSF1A 启动子区域异常甲基化致抑癌基因失活是多种妇科肿瘤发生的重要途径。此外,大量文献显示体外实验中,子宫内膜癌中 RASSF1A 启动子区呈高甲基化状态,mRNA 及蛋白水平的表达量均低于正常甚至缺失,这亦被我们之前的研究证实^[6-8]。本研究建立内膜癌移植瘤裸鼠模型,模拟体内发病环境,探索裸鼠体内地西他滨对 RASSF1A 的去甲基化作用及对活体内膜癌移植瘤的疗效评估,结果显示:经分组药物处理的裸鼠,精神、活动等较给药前无明显差异,可见实验药物对裸鼠无明显毒副作用;MSP 和 Western blot 结果显示:地西他滨处理的各实验组甲基化程度均较其他组低且 RASSF1A 蛋白表达量增加,提示子宫内膜癌移植瘤细胞中确实存在该区域的异常甲基化,且该过程在体内亦可被去甲基化作用而逆转,启

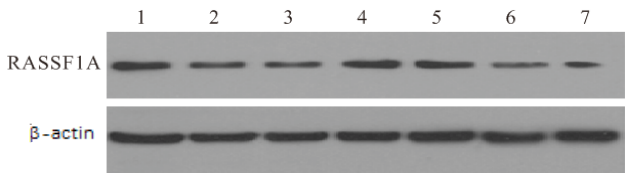


图 2 各组 RASSF1A 蛋白的 Western blot 分析

Fig 2 The RASSF1A protein expression in groups

1-7 denote the same as those in fig 1

且联合用药组强于单药组。药物处理后的 AI 见表 2。AZA 组、DDP 组、MPA 组这 3 个单药组之间 AI 差异无统计学意义($P>0.05$),但均低于 3 个联合用药组($P<0.05$),均高于模型组($P<0.05$)。AZA+DDP 组、AZA+MAP 组、DDP+MPA 组这 3 个联合用药组间 AI 差异无统计学意义($P>0.05$)。

动子区域的异常甲基化很可能为该抑癌基因表达降低、丧失生理功能的关键因素。SHENG 等^[9]研究亦表明抑癌基因 CDH13 和 SHP1 在子宫内膜癌中存在启动子区域的异常甲基化,并证实地西他滨可显著逆转高甲基化修饰,增加相关基因的表达。

此外,抑瘤率的比较结果提示地西他滨单用效果最差;与单用 DDP 或 MPA 相比,地西他滨与 DDP 或 MPA 联合应用后疗效显著提高,推测子宫内膜样腺癌中的孕激素受体基因中可能存在异常甲基化,地西他滨的去甲基化作用恰好使其恢复了相关的正常生物学功能。之前,也有文献报道内膜癌中孕激素受体基因启动子区域呈异常高甲基化状态、表达量明显降低^[10]。

同时,移植瘤细胞凋亡结果亦显示,地西他滨、DDP、MPA 均可诱导子宫内膜癌活体移植瘤细胞凋亡且药效无明显差异,联合用药可增强作用效果。已有研究^[11-13]证实高效孕激素及其类似物可抑制子宫内膜癌细胞的增生,这一特性使其成为了临床

上治疗内膜癌重要的非手术治疗方法,特别是针对癌前病变或者早期癌变要求保留生育功能者。另外,SHAO^[14]研究表明内膜癌细胞中孕激素受体基因的异常高甲基化可致细胞质中的孕激素受体表达水平降低,从而导致内膜癌细胞对高效孕激素的耐药性,并同样指出该异常高甲基化修饰是可以逆转的。

综合以上,本研究得出,地西他滨可抑制活体内子宫内膜癌移植瘤生长,诱导癌细胞凋亡,并可增强DDP和MPA的抑瘤作用,其机制很可能为该药物的去甲基化作用逆转了体内相关功能基因的异常甲基化,如RASSF1A和孕激素受体基因,恢复蛋白表达,从而恢复基因的正常生物学功能。该研究有望为去甲基化药物地西他滨的临床应用和内膜癌诊疗方案的完善提供理论和实验依据。

肿瘤的发生是一个复杂的过程,多种癌基因抑癌基因参与子宫内膜癌的发生发展,RASSF1A基因启动子区的高甲基化状态导致该基因低表达,但该基因的低表达可能只是参与内膜癌发生发展的因素之一,地西他滨抑制子宫内膜癌生长,诱导凋亡的机制可能不仅是恢复RASSF1A抑癌基因的功能,尚不能排除其他机制。本研究探索新抑癌基因RASSF1A在子宫内膜癌发生、发展中的作用,评估去甲基化治疗在子宫内膜癌治疗中的应用价值,为RASSF1A基因在子宫内膜癌中的进一步研究奠定了一定的基础,有望为寻找新的子宫内膜癌治疗靶点提供理论依据。

参 考 文 献

[1] LYKO F, BROWN R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *Nat Cancer Inst*,2005,97(20):1498-1506.

[2] ISSA JP, KANTARJIAN HM, KIRKPATRICK P. Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov*,2005,4(4):275-276.

[3] 张玉泉,冒小燕,张 沐,等. 人子宫内膜癌细胞株 HEC-1-B 中 RASSF1A 基因的甲基化及其表达. *交通医学*,2010,24(1):10-12.

[4] DAMMANN R, LI C, YOON JH, *et al*. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from

the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*,2000,25(3):315-319.

[5] NEPHEW KP, HUANG TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett*,2003,190(2):125-133.

[6] ZHANG QY, ZHOU L, ZHANG DH, *et al*. Frequency and significance of CpG island methylator phenotype in endometrial cancer. *Pract J Cancer*,2010,25(3):247-251.

[7] PALLARES J, VELASCO A, ERITJA N. Promotor hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Modern Pathol*,2008,21(6):691-699.

[8] 黄丽萍,陈 晨,王雪萍,等. 5-Aza-CdR 对子宫内膜癌中 RASSF1A 基因甲基化的作用. *四川大学学报(医学版)*,2015,46(3):380-383.

[9] SHENG Y, WANG H, LIU D, *et al*. Methylation of tumor suppressor gene *CDH13* and *SHP1* promoters and their epigenetic regulation by the UHRF1/PRMT5 complex in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*,2016,140(1):145-151.

[10] YU CG, JIANG XY, LI B, *et al*. Expression of ER, PR, C-erbB-2 and Ki-67 in endometrial carcinoma and their relationships with the clinicopathological features. *Asian Pac J Cancer Prev*,2015,16(15):6789-9674.

[11] USHIJIMA K, YAHATA H, YOSHIKAWA H, *et al*. Multicenter phase II study of fertility-sparing treatment with medroxyprogesterone acetate for endometrial carcinoma and atypical hyperplasia in young women. *J Clin Oncol*,2007,25(19):2798-2803.

[12] YANG S, THIEL KW, DE GEEST K, *et al*. Endometrial cancer: reviving progesterone therapy in the molecular age. *Discov Med*,2011,12(64):205-212.

[13] KIM JJ, KURITA T, BULUN SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev*,2013,34(1):130-162.

[14] SHAO R. Progesterone receptor isoforms A and B: new insights into the mechanism of progesterone resistance for the treatment of endometrial carcinoma. *Ecancermedalscience*,2013(7):381 [2015-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3869473/>. doi: 10.3332/ecancer.2013.381.

(2015-11-18 收稿,2016-06-26 修回)
编辑 吕 熙