

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2018.05.08

DLC2 在结直肠癌中的表达和对结直肠癌细胞凋亡的影响

齐 翀, 洪 亮, 李 亮, 蔡元坤

(复旦大学附属上海市第五人民医院, 上海 200240)

摘要:[目的]探讨肝癌缺失基因 2(DLC2)在结直肠癌中的表达及对结直肠癌细胞凋亡的影响。[方法]收集结直肠癌组织及对应的癌旁组织,培养人结直肠癌细胞 HCT116、HT29、Caco2 和人正常肠上皮细胞 FHC, Western blot 检测组织及细胞中 DLC2 表达水平。结直肠癌细胞转染 DLC2 过表达载体(过表达组)和空载体(阴性组),以只加入转染试剂的细胞为对照组,Western blot 检测转染后细胞中 DLC2、p38、磷酸化的 p38(p-p38)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, Cleaved Caspase-3)表达,流式细胞术检测细胞凋亡情况。[结果]癌组织中 DLC2 的表达水平明显低于癌旁组织,差异有统计学意义($t=12.363, P=0.000$)。HT29、HCT116、Caco2 细胞中 DLC2 的表达水平明显低于 FHC 细胞,差异具有统计学意义($t_1=8.624, t_2=9.385, t_2=10.322, P=0.000$)。Caco2 (0.06 ± 0.03) 细胞中 DLC2 的表达水平明显低于 HT29、HCT116,差异具有统计学意义($t_1=8.676, t_2=7.645, P=0.000$)。后续实验选用 Caco2 细胞继续研究。阴性组 DLC2 的表达水平与对照组相比,差异没有统计学意义($t_1=2.325, P>0.05$)。过表达组 DLC2 的表达水平明显高于对照组,差异具有统计学意义($t_1=13.545, P=0.000$)。阴性组细胞凋亡率与对照组相比,差异没有统计学意义($t_1=1.646, P>0.05$)。过表达组细胞凋亡率明显高于对照组,差异具有统计学意义($t_1=36.256, P=0.000$)。阴性组、过表达组与对照组细胞中 p38 表达水平没有明显变化($t_1=2.335, t_2=1.464, P>0.05$)。阴性组与对照组细胞中 p-p38 表达水平没有明显变化($t_1=4.587, P>0.05$)。阴性组与对照组细胞中 Cleaved Caspase-3 表达水平没有明显变化($t_1=2.673, P>0.05$)。过表达组与对照组细胞中 p-p38 表达水平相比明显升高,差异有统计学意义($t_1=9.617, P=0.000$)。过表达组与对照组细胞中 Cleaved Caspase-3 表达水平相比明显升高,差异具有统计学意义($t_1=10.696, P=0.000$)。[结论]DLC2 在结直肠癌中表达下调,DLC2 可能通过作用于 p38 信号通路促进人结直肠癌细胞凋亡。

关键词:结直肠癌;凋亡;肝癌缺失基因 2;p38

中图分类号:R735.3

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2018)05-0420-06

Expression of DLC2 in colorectal cancer and its effect on apoptosis of colorectal cancer cells

QI Chong, HONG Liang, LI Liang, CAI Yuan-kun

(Fifth People's Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200240, China)

Corresponding author: E-mail: jihao807253@163.com

Abstract:[Objective] To investigate the expression of DLC2 in colorectal carcinoma and its effect on the apoptosis of colorectal cancer cells. [Methods] Colorectal cancer tissues and corresponding adjacent tissues were collected. Then human colorectal cancer cells HCT116, HT29, Caco2 and human normal intestinal epithelial cell line FHC were cultured. After that, the expression of DLC2 in tissues and cells will be detected by Western blot. Colorectal cancer cells were transfected with DLC2 overexpression vector(over expression group) and empty vector(negative group). The cells transfected with transfection reagent were used as control group. Western blot was used to detect the expressions of DLC2, p38, p-p38 and Cleaved Caspase-3 in

收稿日期:2017-07-01

基金项目:闵行区自然科学研究课题(No:2015MHZ046)

作者简介:齐 翀,男,硕士,副主任医师,研究方向:结肠癌

通讯作者:齐 翀, E-mail: jihao807253@163.com

transfected cells. And flow cytometry will be used to detect cell apoptosis. [Results] The expression level of DLC2 in cancer tissues was significantly lower than that in the adjacent tissues, and the difference was statistically significant ($t=12.363, P=0.000$). The expression of DLC2 in HT29, HCT116, Caco2 was significantly lower than that of FHC cells, and the difference was statistically significant ($t_1=8.624, t_2=9.385, t_2=10.322, P=0.000$). The expression level of DLC2 in Caco2 cells was significantly lower than that of HT29 and HCT116, and the difference was statistically significant ($t_1=8.676, t_2=7.645, P=0.000$). Follow-up experiments were performed by using Caco2 cells. There is no statistically significant difference between the expression level of DLC2 in negative group and that in control group. ($t_1=2.325, P>0.05$). The expression level of DLC2 in the over expression group was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($t_1=13.545, P=0.000$). There is no statistically significant difference between the apoptosis rate of the negative group and that of control group ($t_1=1.646, P>0.05$). The apoptosis rate of over expression group was significantly higher than that of the control group, and the difference was statistically significant ($t_1=36.256, P=0.000$). Compared with the control group, the expression of p38 in the negative group and over expression group had no significant changes ($t_1=2.335, t_2=1.464, P>0.05$). Compared with the control group, the expression of p-p38 in the negative group (0.24 ± 0.04) had no significant change ($t_1=4.587, P>0.05$). And there is no significant difference between the expression of Cleaved Caspase-3 in the negative group and the control group ($t_1=2.673, P>0.05$). The expression level of p-p38 in the over expression group was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($t_1=9.617, P=0.000$). The expression level of Cleaved Caspase-3 in the over expression group was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($t_1=2.673, P>0.05$). [Conclusion] There is downregulation of DLC2 expression in colorectal cancer cells. DLC2 may promote apoptosis of human colorectal cancer cells by acting on p38 signaling pathway.

Key words: colorectal cancer; apoptosis; deleted in liver cancer 2; p38

据统计,每年约有超过 120 万的新增结直肠癌患者,其中每年约有 60 万人死于结直肠癌。结直肠癌的发病率在全部恶性肿瘤中位居前三,而死亡率位居前五^[1]。结直肠癌具有发病快、诊断率低、转移能力强、容易复发等特点,结直肠癌 5 年内的生存率只有 60% 左右,并且其中有超过一半的患者因为癌症的转移而死亡^[2]。探讨结直肠癌的发病机制是目前临床上研究的一个热点。

肝癌缺失基因 2 (deleted in liver cancer 2, DCL2) 是一种抑癌基因,其最初分离至肝脏中而得名^[3]。正常情况下, DCL2 在生命机体的组织器官中广泛表达,而在肝癌、肺癌、乳腺癌等多种癌症组织中表达缺失,并且调控多种癌症细胞的凋亡^[4-7]。本研究首先检测结直肠癌组织和细胞中 DCL2 的表达水平,并通过体外细胞实验检测 DCL2 对结直肠癌细胞凋亡的作用及机制,以期为进一步揭示结直肠癌的发病机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 组织

选取我院 2012 年 2 月~2015 年 12 月收治的确诊并切除的结直肠癌患者的结直肠癌组织及对应

的癌旁组织各 52 例,所有组织标本的采集均经过患者及其家属知情同意,组织标本保存于液氮中。

结直肠癌细胞 HCT116、HT29、Caco2 和人正常肠上皮细胞 FHC 均购自于中国科学院细胞库。

1.2 主要仪器及试剂

流式细胞仪购自于美国 Thermo; 胎牛血清购自于上海四季青生物工程材料有限公司; p EGFP-N1-DCL2 由山东维真生物科技有限公司构建并鉴定; DMEM 培养基购自于美国 Gibco; 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度检测试剂盒购自于碧云天生物技术有限公司; DCL2 多克隆抗体、p38 多克隆抗体、磷酸化的 p38 (p-p38) 多克隆抗体、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, Cleaved Caspase-3) 多克隆抗体均购自于美国 Stanta Cruz。

1.3 细胞培养

将装有结直肠癌细胞 HCT116、HT29、Caco2 和人正常肠上皮细胞 FHC 的冻存管从液氮中取出,放在 37℃ 的水浴锅中融化,在融化过程中不间断的进行振荡,使细胞在 1 min 内融化。1000

r/min 离心 10 min,吸除上清液,用 1 ml 的含有 10%胎牛血清的 DMEM 细胞培养液悬浮细胞后,接种到细胞培养瓶中,将细胞培养液添加至 5 ml,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 2 d,观察细胞长满后,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞两次后,加入 3 ml 含有 0.25%胰蛋白酶的消化液在 37℃消化 1 min,观察已经贴壁的细胞成为圆形后,加入 5 ml 的细胞培养液,混合后,1:2 的比例接种到细胞培养瓶中继续培养。

1.4 Western blot 检测组织中 DCL2 表达

取 50 mg 的结直肠癌组织及对应的癌旁组织,剪碎后,转移至组织匀浆器中,加入 1 ml 的组织裂解液,放在冰上研磨后静置 30 min,4℃,12000 r/min 离心 10 min,用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测细胞中 DCL2 表达水平。将组织蛋白与 2×Loading buffer 充分混合后,放在 100℃的孵育器中煮沸 5 min,每孔中加入 40 μl 的蛋白样品,加入到蛋白凝胶上样孔中,蛋白凝胶用 10%分离胶和 5%的浓缩胶,90 V 恒压电泳,观察 maker 进入分离胶的低端时,终止电泳。将蛋白凝胶在 100 V 的电压下转膜 90 min,取出转膜后的硝酸纤维素膜,放置于 5%的脱脂奶粉中封闭 2 h,加入 1000 倍稀释的一抗在 4℃孵育过夜后,用 2000 倍稀释的二抗在室温下反应 90 min,滴加显色液后,Image J 分析目的蛋白表达水平。

1.5 Western blot 检测细胞中 DCL2 表达

取数生长期的结直肠癌细胞 HCT116、HT29、Caco2 和人正常肠上皮细胞 FHC,弃去细胞培养液,加入 400 μl 的细胞裂解液,放在冰上裂解 30 min 后,4℃,12000 rpm 离心 10 min,细胞总蛋白存在于上清液中,用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度。按照 1.4 中步骤检测细胞中 DCL2 表达。

1.6 细胞转染

取培养至对数生长期的结直肠癌细胞以 2×10⁴ 个/ml 接种到 96 孔细胞培养板中,每孔中加入 100 μl 的细胞悬浮液,观察细胞融合度为 60%时,用 Lipofectamine 2000 将 DCL2 过表达载体(p EGFP-N1-DCL2)转染至细胞中,命名为过表达组,同时转染空载体(p EGFP-N1),命名为阴性组,培养 6 h 后,更换细胞培养液继续培养,同时设置只加入转染试剂的细胞为对照组。培养 48 h 后,参照 1.5 中检测细胞中 DCL2 的表达水平。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

取转染后 48 h 的各组细胞,胰蛋白酶消化后,1000 r/min 离心 10 min,收集 10⁶ 个细胞,用 500 μl 的 Binding buffer 悬浮细胞后,加入体积为 5 μl 的 Annexin V,放在避光条件下室温反应 30 min,加入

PI 5 μl,避光反应 5 min。流式细胞仪检测细胞凋亡情况,分析细胞凋亡率。

1.8 Western blot 检测 p38、p-p38、Cleaved Caspase-3 表达

收集各组细胞,培养 48 h 后,根据 1.5 中 Western blot 方法检测细胞中 p38、p-p38、Cleaved Caspase-3 的表达水平。

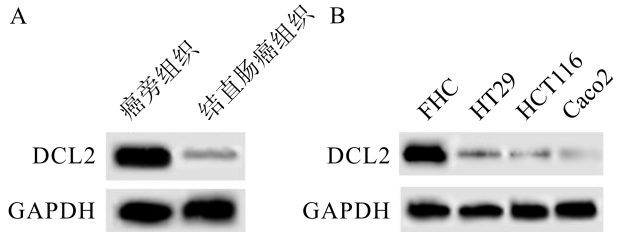
1.9 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计学软件分析实验数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组数据比较用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织及细胞中 DCL2 表达结果

癌组织(0.12±0.05)中 DCL2 的表达水平明显低于癌旁组织(1.12±0.13),差异有统计学意义(*t* = 12.363, *P* = 0.000)。HT29(0.14±0.06)、HCT116(0.11±0.03)、Caco2(0.06±0.03)细胞中 DCL2 的表达水平明显低于 FHC 细胞(1.26±0.12),差异有统计学意义(*t*₁ = 8.624, *t*₂ = 9.385, *t*₃ = 10.322, *P* = 0.000)。Caco2(0.06±0.03)细胞中 DCL2 的表达水平明显低于 HT29(0.14±0.06)、HCT116(0.11±0.03),差异有统计学意义(*t*₁ = 8.676, *t*₂ = 7.645, *P* = 0.000)。后续实验选用 Caco2 细胞继续研究。见图 1、表 1。



A: Western blot 检测结直肠癌及癌旁组织中 DCL2 表达; B: Western blot 检测结直肠癌细胞及正常肠上皮细胞中 DCL2 表达

图 1 结直肠癌组织和细胞中 DCL2 表达

表 1 DLC2 蛋白表达水平		$\bar{x} \pm s$
组织及细胞	DLC2 蛋白表达水平	
癌旁组织	1.12±0.13	
癌组织	0.12±0.05 ¹⁾	
FHC 细胞	1.26±0.12	
HT29 细胞	0.14±0.06 ²⁾	
HCT116 细胞	0.11±0.03 ²⁾	
Caco2 细胞	0.06±0.03 ²⁾³⁾	
与癌旁组织比较, ¹⁾ $P<0.01$;与 FHC 细胞比较, ²⁾ $P<0.01$;与 HT29,HCT116 细胞比较, ³⁾ $P<0.01$ 。		

2.2 转染后细胞中 DLC2 表达结果

Caco2 细胞转染后,检测各组细胞中 DLC2 表达结果见图 2 中所示,以 GAPDH 为内参,统计对照组、阴性组、过表达组细胞中 DLC2 表达水平依次为: 0.06 ± 0.04 、 0.07 ± 0.02 、 0.85 ± 0.09 。阴性组(0.07 ± 0.02)DLC2 的表达水平与对照组(0.06 ± 0.04)相比,差异无统计学意义($t_1=2.325,P>0.05$)。过表达组(0.85 ± 0.09)DLC2 的表达水平明显高于对照组(0.06 ± 0.04),差异有统计学意义($t_1=13.545,P<0.01$)。见表 2。



图 2 Western blot 检测细胞转染后 DLC2 表达

表 2 DLC2 蛋白表达水平		$\bar{x}\pm s$
组别	DLC2 蛋白表达水平	
对照组	0.06 ± 0.04	
阴性组	$0.07\pm0.02^{1)}$	
过表达组	0.85 ± 0.09	

与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

2.3 细胞凋亡检测结果

结果见图 3 中所示,统计对照组、阴性组和过表达组细胞凋亡率依次为: $(9.62\pm1.18)\%$ 、 $(9.84\pm1.05)\%$ 、 $(46.32\pm5.21)\%$ 。阴性组细胞凋亡率与对照组比较,差异无统计学意义($t_1=1.646,P>0.05$)。过表达组细胞凋亡率明显高于对照组,见表 3。差异有统计学意义($t_1=36.256,P<0.01$)。

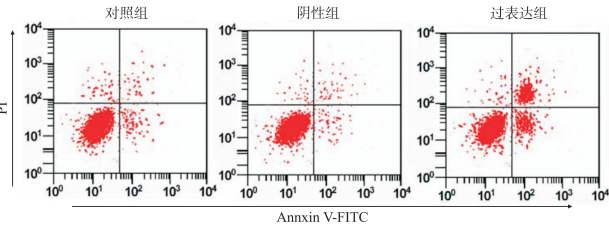


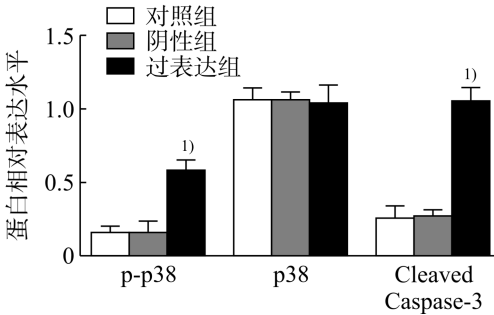
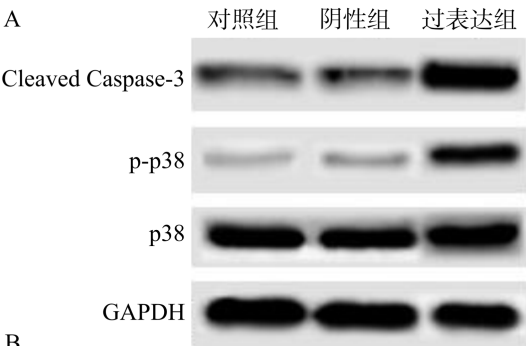
图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡结果

表 3 细胞凋亡率		$\%,\bar{x}\pm s$
组别	细胞凋亡率	
对照组	9.62 ± 1.18	
阴性组	$9.84\pm1.05^{1)}$	
过表达组	$46.32\pm5.21^{1)}$	

与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

2.4 细胞中 p38、p-p38、Cleaved Caspase-3 表达结果

结果见图 4 中所示,阴性组(1.05 ± 0.06)、过表达组(1.03 ± 0.12)与对照组(1.01 ± 0.14)细胞中 p38 表达水平没有明显变化($t_1=2.335,t_2=1.464,P>0.05$)。阴性组(0.24 ± 0.04)与对照组(0.22 ± 0.03)细胞中 p-p38 表达水平没有明显变化($t_1=4.587,P>0.05$)。阴性组(0.35 ± 0.05)与对照组(0.34 ± 0.07)细胞中 Cleaved Caspase-3 表达水平没有明显变化($t_1=2.673,P>0.05$)。过表达组(0.76 ± 0.06)与对照组(0.22 ± 0.02)细胞中 p-p38 表达水平比较明显升高,差异有统计学意义($t_1=9.617,P=0.000$)。过表达组(1.06 ± 0.06)与对照组(0.34 ± 0.07)细胞中 Cleaved Caspase-3 表达水平比较明显升高,差异有统计学意义($t_1=10.6966,P=0.000$)。



A: Western blot 结果;B: 蛋白相对表达水平;与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

图 4 细胞中 p38、p-p38、Cleaved Caspase-3 表达

3 讨论

DCL2 属于 DCL 亚家族的成员之一,该基因是位于染色体 13q12.3 的一种抑癌基因^[8]。有研究表明,DCL2 mRNA 在结直肠癌组织中的表达水平仅为对应癌旁组织中的一半^[9]。后续的研究表明,乳腺癌、前列腺癌、胃癌、食管癌等癌症中均存在 DLC2 的表达下调,不仅是癌症组织,在癌细胞中也发现 DLC2 的表达下调^[10]。在乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-453 中 DLC2 表达缺失,在前列腺癌细胞

PZ-HPV7、MLC 中发现 DLC2 存在微弱的表达^[11]。本研究收集了结直肠癌组织及对应的癌旁组织各 52 例,通过 Western blot 检测发现在结直肠组织中 DLC2 的表达水平明显减少,与此同时,本研究还检测了结直肠癌细胞 HCT116、HT29、Caco2 和人正常肠上皮细胞 FHC 中 DLC2 的水平,同样发现,DLC2 在正常的肠上皮细胞中的表达水平最高,而 3 株人结直肠癌细胞 HCT116、HT29、Caco2 中 DLC2 水平明显下降,这些均说明,DLC2 在结直肠癌中表达下调,这与之前的研究报道相符。本研究还更进一步在体外细胞实验中探讨了 DLC2 在结直肠癌中的作用,选用表达下调最多的 Caco2 为研究对象,通过细胞转染 DLC2 过表达载体过表达细胞中 DLC2 的表达,并经过 Western blot 检测结果证实,DLC2 过表达载体能够提高结直肠癌细胞中 DLC2 的表达。

细胞凋亡是一种自然情况下的细胞死亡,又可以称为程序性细胞死亡,在生命机体内环境稳定中发挥调控作用。细胞凋亡的发生不仅与机体胚胎发育、免疫系统维持等有关,还参与疾病的发生^[12-13]。细胞凋亡的发生与凋亡蛋白有关,在癌症发生过程中,促凋亡蛋白表达增多时能够促进癌细胞的凋亡,从而抑制癌症的发展。Caspase 级联反应几乎存在于生命机体内的所有组织和器官中,细胞凋亡信号发出时,Caspase 级联反应被激活,凋亡执行因子 Caspase-3 活化,细胞凋亡发生^[14-16]。有研究表明,Caspase-3 活化水平在癌症组织中表达下调,抑癌基因和抗肿瘤药物能够通过激活 Caspase-3 的活化而促进癌细胞凋亡,从而发挥抑制癌症发展的作用^[17]。本研究检测了过表达 DLC2 后结直肠癌细胞凋亡情况,结果发现,DLC2 能够促进结直肠癌细胞的凋亡,这与之前的研究报道一致。

p38 信号通路是与丝氨酸/苏氨酸酶相关的信号通路,参与细胞内信号传导过程^[18]。Li 等^[19]研究表明,曲古抑菌素能够通过作用于 p38 信号通路而最终影响人胃癌细胞 SCM1 凋亡。Jiang 等^[20]运用免疫组化的方法发现在乳腺癌组织中 p38 磷酸化水平异常降低,而激活 p38 信号通路后的 MDA-MB-231 细胞凋亡增多。本研究检测了过表达 DLC2 后结直肠癌细胞中 p38 的磷酸化水平,发现 DLC2 能够促进结直肠癌细胞中 p38 的磷酸化,这提示,DLC2 可能通过激活 p38 信号通路促进结直肠癌细胞凋亡。

综上所述,DLC2 在结直肠癌组织和细胞中均表达缺失,并且能够促进人结直肠癌细胞的凋亡,作用机制可能与 p38 信号通路激活有关。本研究结果

为后续进一步在体内探讨结直肠癌的发病机制奠定了基础,为结直肠癌的治疗提供了理论基础。

参考文献

- [1] Gnant M, Mlineritsch B, Stoeger H, et al. Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12[J]. *Annals of Oncology*, 2015, 26(2):313-320.
- [2] 郑燕芳,李纪强,姜茂竹,等.结直肠癌诊断相关基因的文献计量学与生物信息学分析[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(04):968-970.
- [3] Bugaut A, Jantos K, Wietor J L, et al. Exploring the Differential Recognition of DNA G - Quadruplex Targets by Small Molecules Using Dynamic Combinatorial Chemistry[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(14):2677-2680.
- [4] Ching Y P, Wong C M, Chan S F, et al. Deleted in liver cancer(DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma[J]. *Jl Bil Chem*, 2003, 278(12):10824-10830.
- [5] Guan M, Zhou X, Soultizis N, et al. Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: potential clinical applications[J]. *Clinical cancer research*, 2006, 12(5):1412-1419.
- [6] Leung T H Y, Ching Y P, Yam J W P, et al. Deleted in liver cancer 2(DLC2) suppresses cell transformation by means of inhibition of RhoA activity[J]. *Proc Nati Acad Sci USA*, 2005, 102(42):15207-15212.
- [7] Yang X, Zhou X, Tone P, et al. Cooperative antiproliferative effect of coordinated ectopic expression of DLC1 tumor suppressor protein and silencing of MYC oncogene expression in liver cancer cells: Therapeutic implications[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(2):1591-1596.
- [8] Parent J S, Bouteiller N, Elmayan T, et al. Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing[J]. *Plant J*, 2015, 81(2):223-232.
- [9] 高凯. DCL2 表达调控结直肠癌发生、侵袭转移及预后的作用机制研究[D]. 中南大学, 2013.
- [10] 林原, 薛玲. 潜在抑癌基因 DLC2 在肿瘤中的表达情况[J]. *中华医学会病理学分会 2010 年学术年会日程及论文汇编*, 2010.
- [11] Morales A A, Olsson A, Celsing F, et al. Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2004, 18(1):41-47.
- [12] Seo J, Kim B, Dhanasekaran D N, et al. Curcumin in-

duces apoptosis by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase activity in ovarian cancer cells [J]. Cancer letters, 2016, 371(1):30—37.

[13] Wiegering A, Matthes N, Mühling B, et al. Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis (RITA) Enhances the Response of RITA-Sensitive Colorectal Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents 5-Fluorouracil and Oxaliplatin[J]. Neoplasia, 2017, 19(4):301—309.

[14] Sallmyr A, Matsumoto Y, Roginskaya V, et al. Inhibiting Mitochondrial DNA Ligase III α Activates Caspase 1-Dependent Apoptosis in Cancer Cells[J]. Cancer Research, 2016, 76(18):5431—5441.

[15] Shamaladevi N, Araki S, Lyn D A, et al. The andean anticancer herbal product BIRM causes destabilization of androgen receptor and induces caspase-8 mediated-apoptosis in prostate cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(51):84201—84213.

[16] Das D, Persaud L, Dejoie J, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) activates caspases in human prostate cancer cells through sigma 1 receptor[J]. Biochem Biophys Res commum, 2016, 470(2):319—323.

[17] Almomen A, Jarboe E A, Dodson M K, et al. Imiquimod Induces Apoptosis in Human Endometrial Cancer Cells In vitro and Prevents Tumor Progression In vivo [J]. Pharmaceutical research, 2016, 33(9):2209—2217.

[18] Semaan J, Pinon A, Rioux B, et al. Resistance to 3 - HTMC-Induced Apoptosis Through Activation of PI3 K/Akt, MEK/ERK, and p38/COX - 2/PGE2 Pathways in Human HT-29 and HCT116 Colorectal Cancer Cells[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(12):2875—2885.

[19] Li L, Fan B, Zhang L H, et al. Trichostatin A potentiates TRAIL-induced antitumor effects via inhibition of ERK/FOXM1 pathway in gastric cancer [J]. Tumor Biology, 2016, 37(8):10269—10278.

[20] Jiang X, Li T, Liu R H. 2 α -Hydroxyursolic acid inhibited cell proliferation and induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells through the p38/ MAPK signal transduction pathway[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(8):1806—1816.

文题的规范

文题是论文的必要组成部分,它是读者识别论文并判断是否需要阅读的主要依据。因此,文题的作用十分重要,务必字斟句酌,细心推敲。文题的用字要求简洁、明了,能概括论文主要内容,并便于标引和检索。一般使用充分反映文章主题内容的短语,不使用具有主、谓、宾结构的完整语句,不使用标点。中文题名一般不宜超过 20 字,如语意未尽,则可借助于副标题(可在总标题之后用圆括号括出,也可在副标题前加破折号示之)予以补充。文题应避免使用非公知公认的缩略语、字符和代号,尽量不出现结构式和数学式等,也不宜将原形词和缩略语同时列出。虚词应尽可能不用,避免使用“……的研究”、“……的探讨”、“……的体会”、“……的报告”等非特定词。说明文题的重要信息不应遗漏,可在文题右上角加“*”号,然后在文题页下方划一横线,与作者信息一起,予以注释。