

普鲁卡因与 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷对人肝肿瘤细胞株 HepG₂ 中 Wif-1 基因启动子甲基化影响的比较研究*

胡 曼¹, 戴立里^{1△}, 曾维政²

1. 重庆医科大学附属第二医院 消化内科 (重庆 400010); 2. 成都军区总医院 消化内科 (成都 610083)

【摘要】 目的 探讨普鲁卡因与 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷(5'-Aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dc)对人肝肿瘤细胞株 HepG₂ 经典 Wnt 信号通路抑制因子-1(Wif-1)基因启动子脱甲基化作用的影响。**方法** 以普鲁卡因或 5-aza-dc 干预 HepG₂ 细胞,采用 RT-PCR 及 Western blot 检测干预前后 Wif-1 基因 mRNA 及蛋白的表达;甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)检测干预前后 HepG₂ 细胞中 Wif-1 甲基化变化。**结果** RT-PCR 和 Western blot 结果显示经普鲁卡因或 5-aza-dc 作用前 HepG₂ 细胞 Wif-1 基因 mRNA 与蛋白呈低表达或缺失,经普鲁卡因或 5-aza-dc 作用后 HepG₂ 细胞 Wif-1 基因 mRNA 与蛋白呈高表达,各组间比较差异有统计学意义,且普鲁卡因实验组表达高于 5-aza-dc 实验组($P<0.05$)。MSP 结果显示,经普鲁卡因或 5-aza-dc 干预后 HepG₂ 细胞与干预前 HepG₂ 细胞比较均呈部分脱甲基化状态,对应的甲基化率分别为 $(14.41 \pm 3.37)\%$ 和 $(29.29 \pm 1.84)\%$ ($P<0.05$)。**结论** 普鲁卡因及 5-aza-dc 均可影响 Wif-1 基因启动子 CpG 岛的甲基化状态。普鲁卡因可以作为一种新的去甲基化药物且效果优于常规药物 5-aza-dc。

【关键词】 经典 Wnt 通路 Wif-1 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷 普鲁卡因 甲基化

Comparison of the Effect Between Procaine and 5-aza-dc on Wnt Inhibitory Factor 1 Promoter Methylation of HepG₂

HU Man¹, DAI Li-li^{1△}, ZENG Wei-zheng². 1. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Gastroenterology, Chengdu People's Liberation Army General Hospital, Chengdu 610083, China

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

【Abstract】 Objective To observe the CpG island methylation status, mRNA and protein expression of the Wnt inhibitory factor-1 (Wif-1) gene with procaine or 5'-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dc) on HepG₂. And to explore the comparison of the demethylation with 5-aza-dc or procaine. **Methods** HepG₂ cells were treated with 5-aza-dc or procaine. Wif-1 mRNA expression was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Wif-1 protein expression was detected by Western blot. The promoter methylation status of Wif-1 gene on treatment or not were detected by methylation-specific PCR (MSP). **Results** ① RT-PCR and Western blot exhibited that both Wif-1 mRNA and Wif-1 protein expression were positive in groups treated with procaine and 5-aza-dc and highly positive in the L₀ cells group, but weakly even negative in the HepG₂ cells without any treatment, the difference were statistically significant ($P<0.05$) (procaine experimental group was higher than that of 5-aza-dc experimental group, $P<0.05$). ② The positive rates of the promoter hypermethylated in procaine and 5-aza-dc groups were $(14.41 \pm 3.37)\%$ and $(29.29 \pm 1.84)\%$. Both of the two groups showed a part of the de-methylation status ($P<0.05$). **Conclusion** Both of procaine and 5-aza-dc can reverse the abnormal methylation of Wif-1 gene. Procaine can be more effective than conventional used 5-aza-dc and could be a new demethylation drug.

【Key words】 Wnt signaling pathway Wif-1 5'-Aza-2'-deoxycytidine Procaine Methylation

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床上最常见的易致死性恶性肿瘤,在对其分子机制的研究上发现 Wnt 信号通路对 HCC 的发生发展起到了重要作用^[1]。经典 Wnt 信号通路抑制因

子-1(Wif-1)的超甲基化是 Wnt 信号通路异常激活的关键因素^[2]。然而常用的核苷类 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)抑制剂 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-dc)作为核苷类去甲基化药物却具有较大细胞毒性,限制了其临床应用,因而现在急需探求一种新的替代药物。最近有研究报道非核苷类 DNMT 抑制剂普鲁卡因对人结肠癌 HT-29 细

* 四川省科技厅课题基金(No. 05JY029-015)资助

△ 通讯作者, E-mail: cqykdxdalili@163.com

胞 *Syk* 基因具有脱甲基化的作用^[3]。普鲁卡因成本低廉而且细胞毒性相对较小,因而具有作为临床去甲基化药物的潜能。然而普鲁卡因作为脱甲基化药物运用在 HCC 的研究目前国内外还比较少见。国内仅有盐酸普鲁卡因对 HepG₂ 细胞 *Syk* 基因脱甲基化作用,以及对其抑制人肺癌细胞增殖的报道^[4]。目前普鲁卡因对 HepG₂ 细胞抑癌基因 *Wif-1* 脱甲基化作用鲜有研究,而通过与其与常见脱甲基化药物 5-aza-dc 脱甲基化程度的比较有望为临床上 HCC 化疗用药选择提供支持。本实验通过运用 RT-PCR 法、巢式甲基化特异性 PCR 法(MSP)以及 Western blot 法检验普鲁卡因与 5-aza-dc 对人肝肿瘤细胞株 HepG₂ 的 *Wif-1* 基因启动区甲基化状态和基因、蛋白表达水平的影响,为探讨 HCC 的发病机制提供新的依据,同时也为治疗该肿瘤提供新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 材料

肿瘤细胞:人肝癌细胞株 HepG₂、人肝细胞株 L₀ 由成都军区总医院肿瘤科文峰硕士惠赠。主要试剂:5-aza-dc、氢醌(Sigma 公司,美国),1%注射用普鲁卡因(昆明大观制药有限公司,生产批号:国药准字 H53020993),DMEM 低糖培养基(Hyclone 公司,美国),Rnase A 酶,细胞裂解液(天根公司,中国),Trizol (Invitrogen 公司,美国),Sss I 甲基转移酶(NEB 公司,美国),Wizard DNA clean-up (DNA 净化树脂, Promega 公司,美国),山羊抗人 Wnt-1 抗体(R&D Systems 公司,美国),兔抗羊 IgG(中杉金桥,中国),山羊抗人 β -actin 抗体(Santa Cruz 公司,美国),PCR 引物序列见实验方法,由上海生工合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 用 DMEM 低糖培养基将 5-aza-dc 或普鲁卡因稀释至所需工作浓度。所有细胞 37 °C、50 mL/L CO₂ 恒温培养传代,取 10~20 代细胞进行实验,第 2 d 贴壁生长后一次性添加普鲁卡因 14 μ g/L 或 5-aza-dc 5 μ g/L,连续培养 72 h。

实验分组:经普鲁卡因与 5-aza-dc 干预过 72 h 后的人肝肿瘤细胞株 HepG₂,标记为 P 组和 A 组;正常生长 72 h 后的正常人肝细胞株 L₀,标记为 L 组(在 RT-PCR 及 Western blot 中为阳性对照组);正常生长 72 h 后的人肝癌细胞株 HepG₂,标记为 H 组(在 RT-PCR 及 Western blot 中为阴性对照组)。

1.2.2 RT-PCR 检测 *Wif-1* 基因 mRNA 用

Trizol 提取各组培养细胞总 RNA。按 K1621 RT 试剂盒操作说明进行逆转录。采用一步法合成 cDNA:42 °C 60 min,70 °C 5 min,4 °C 终止反应,-20 °C 保存。PCR 反应体系总体积为 20 μ L。取 10 % 的标本均进行重复实验。*Wif-1* 基因:F 5'-CCGAAATGGAGGCTTTTGTGA-3', R 5'-TGGT TGAGCAGTTTGCTTTG-3',94 °C 30 s,42.5 °C 30 s,72 °C 30 s 共 25 个循环,然后 72 °C 延伸 10 min,扩增产物长度为 188 bp。扩增对照 β -actin 基因:F 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3', R 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAG-3',94 °C 30 s,54.1 °C 30 s,72 °C 30 s 共 35 个循环,然后 72 °C 延伸 10 min,扩增产物长度 250 bp。用灭菌重蒸馏水(ddH₂O)代替 cDNA 进行 PCR 扩增,作为空白参照(质量控制用),标记为 Water。取 PCR 产物 15 μ L 进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统下观察结果。条带运用 Quantity One 软件进行分析,以 *Wif-1* 与 β -actin 条带灰度值比值表示 *Wif-1* 的相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测 *Wif-1* 蛋白表达 10 % 分离胶恒压 80 V,30 min 后提高到 110 V,90 min。湿转法恒流 300 mA,40 min 后将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转至 PVDF 膜。5 % 脱脂奶粉/TBS-T 37 °C 封闭 1 h 后,与山羊抗人 *Wif-1* 抗体(1 mL:0.2 μ g)或山羊抗人 β -actin 抗体(1:10 000),孵育过夜。用 TBST 洗膜(3 次 10 min)。与辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 抗体(1:20 000),37 °C,孵育 1 h。TBST 洗膜(3 次 10 min)照相显影。Quantity One 软件进行条带分析,以 *Wif-1* 与 β -actin 条带灰度值比值表示 *Wif-1* 的相对表达量。每个样本重复 3 次。

1.2.4 MSP 检测 *Wif-1* 基因启动子 CpG 岛甲基化状态 常规氛-氯仿提取细胞 DNA 经紫外分光光度计测定纯度和质量,选择吸光度(A)_{260/280} 值在 1.75~2.0 之间的样本进行 DNA 甲基化修饰处理。将约 2 μ g DNA 溶于 45 μ L 灭菌水中,加入 3 mol/L NaOH 5 μ L,37 °C 温浴 20 min。加入 10 mol/L 氢醌 30 μ L(pH 5.0)和 3 mol/L NaHSO₃ 520 μ L(pH 5.0),轻摇混匀。用 100 μ L 石蜡油覆盖,53 °C 水浴锅避光孵育 16 h。过夜后用 Wizard DNA clean-up (DNA 净化树脂)系统纯化 DNA,将纯化后的 DNA 溶于 45 μ L 去离子双蒸水中。加入 3 mol/L NaOH 溶液 5 μ L,37 °C 温水浴 20 min。加入 5 μ L 3 mol/L NaAc(4 °C,pH5.2)和冷乙醇 100 μ L

(-20 ℃,100%),-20 ℃过夜。隔日取出后离心 30 min(20 000× *g*,4 ℃),弃上清,加入 70%冷乙醇 200 μL(-20 ℃),离心 10 min(20 000× *g*,4 ℃),吸去上清,并重复 1 次。所得 DNA 沉淀充分吹干,溶于 40 μL 灭菌水中,-20 ℃保存。

质量控制:选择经亚硫酸氢盐修饰的正常人来源的外周血淋巴细胞 DNA 为非甲基化的阳性参照,标记为 P₁。用 Sss I 甲基转移酶处理过的正常人来源的外周血淋巴细胞 DNA 作为甲基化的阳性参照(Sss I 甲基化酶修饰的 DNA 用内切酶检验),标记为 P₂;用等量的去离子水为空白参照,标记为 Water。

甲基化引物 PCR 的反应条件如下。第 1 轮 PCR:外侧链,F 5'-TAGGGGTTTTTGTAGTGT TT-3',R 5'-ACCTAAATACCAAAAAACCTAC-3',95 ℃ 5 min 1 个循环,95 ℃ 30 s,48.6 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 40 个循环,然后 72 ℃延伸 10 min,扩增产物长度为 404 bp。第 2 轮 PCR:用第 1 轮产物作为模板进行扩增。PCR 反应体系为 20 μL。内侧链甲基化引物,F 5'-CGTTTTATTGGGCGTATC GT-3',R 5'-ACTAACGCGAACGAAATACGA-3',95 ℃ 5 min 1 个循环,95 ℃ 30 s,56.1 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 20 个循环,然后 72 ℃延伸 10 min,扩增

产物长度 145 bp。内侧链非甲基化引物,F 5'-CGTTTTATTGGGCGTATCGT-3',R 5'-AAAA AACTAACACAAACAAAA-3',95 ℃ 5 min 1 个循环,95 ℃ 30 s,51.1 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,20 个循环,然后 72 ℃延伸 10 min,扩增产物长度 154 bp。产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,Gold View 染色,于凝胶成像系统观察结果,Quantity One 软件进行条带分析。相对甲基化率的计算公式:甲基化率(MSP ratio)=甲基化条带灰度值/(甲基化条带灰度值+非甲基化条带灰度值)×100%。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。实验结果各组间采用方差齐性检验,方差齐者,用单因素方差分析进行多组间比较,SNK-*q* 检验进行组间两两比较。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 *Wif-1* mRNA 的表达结果

实验组(P 组、A 组)中 *Wif-1* mRNA 呈高表达,阳性对照组(L 组)呈强阳性表达,阴性对照组(H 组)呈低表达或缺失。普鲁卡因实验组 *Wif-1* mRNA 的相对表达量高于 5-aza-dc 实验组,差异有统计学意义($P=0.028$)。见图 1、表 1。

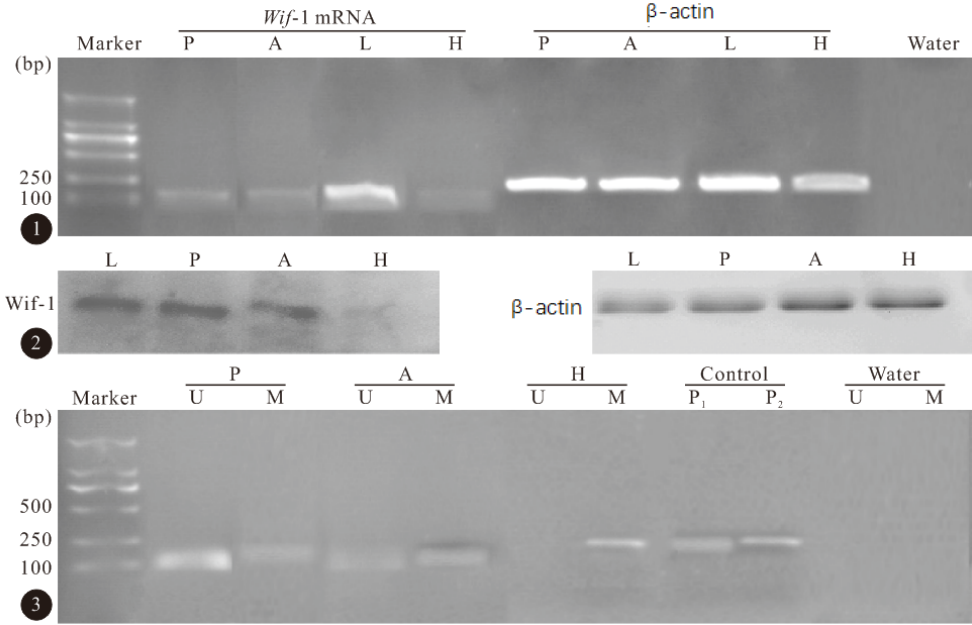


图 1 *Wif-1* 基因反转录聚合酶链反应各组 mRNA 的表达

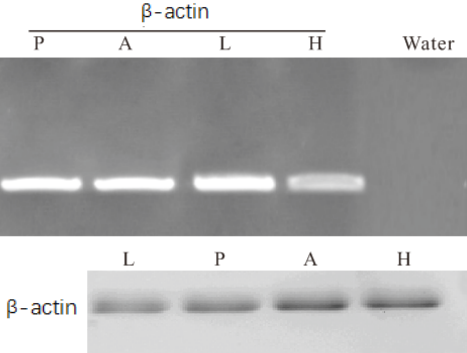


图 2 Western blot 检测 *Wif-1* 蛋白表达水平

Fig 1 The levels of *Wif-1* mRNA in each group evaluated with reverse transcription polymerase chain reaction

图 3 巢式甲基化检测运

Fig 2 The levels of *Wif-1*

protein in each group evaluated with Western blot

Fig 3 Representative results showing promoter methylation amplified by MSP of *Wif-1*

P: Procaine intervention in HepG₂ cell line; A: 5-aza-dc intervention in HepG₂ cell line; L: L₀ cell line; H: HepG₂ cell line; Water: Water blanks; M: Methylated sequences; U: Unmethylated sequences; P₁: Unmethylated lymphocyte DNA as unmethylation positive control; P₂: Lymphocyte DNA methylated *in vitro* by excessive CpG (Sss I) as methylation positive control

2.2 Western blot 检测 Wif-1 蛋白表达水平

Western blot 结果显示在相对分子质量 32000 处出现特异性蛋白与预想结果一致。Wif-1 蛋白在实验组(P 组、A 组)中呈高表达,阳性对照组(L 组)中呈强阳性表达,在阴性对照组(H 组)呈低表达或缺失。5-aza-dc 实验组的表达量低于普鲁卡因实验组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、表 1。

2.3 MSP 法检测 Wif-1 基因启动子甲基化状态

见图 3、表 2。普鲁卡因实验组和 5-aza-dc 实验

组中均可检测出 Wif-1 甲基化条带(M)和 Wif-1 非甲基化条带(U)。L 组细胞只扩增出 Wif-1 非甲基化条带。HepG₂ 细胞的 Wif-1 基因启动子甲基化在 5-aza-dc 和普鲁卡因处理后与干预前的 H 组相比,均显示出 Wif-1 甲基化条带减弱(P 均 <0.05),Wif-1 非甲基化条带增强(P 均 <0.05)。5-aza-dc[(29.29±1.84)%]及普鲁卡因处理后[(14.41±3.37)%]的相对甲基化率与未经药物干预的 HepG₂ 细胞[(98.82±1.02)%]比较差异均有

表 1 各组 Wif-1 mRNA 和蛋白的相对表达含量(灰度值)比较($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 1 Comparison of Wif-1 mRNA and protein expression in each group (gray value) ($\bar{x}\pm s,n=3$)

	P group	A group	L group	H group
mRNA	0.1789±0.0320*·#	0.1159±0.0201*	0.2260±0.0223	0.0645±0.0112
Protein	1.6710±0.1712*·#	1.1738±0.2325*	1.9300±0.1220	0.0531±0.1323

P, A, L, H; Denote the same as those in Fig 1. * $P<0.05$, vs. L and H group; # $P<0.05$, vs. A group

表 2 各组 Wif-1 甲基化与非甲基化的表达($\bar{x}\pm s,n=50$)
Table 2 Comparison of Wif-1 methylation and unmethylation expression in each group (gray value) ($\bar{x}\pm s,n=50$)

	A group	P group	H group
M	0.0841±0.0201 Δ ·*	0.0402±0.0032 Δ	1.2175±0.0011
U	0.1962±0.0031 Δ ·*	0.2469±0.0017 Δ	0.0145±0.0025

Δ $P<0.05$, vs. H group; * $P<0.05$, vs. P group. M; Methylation; U; Unmethylation; A, P, H; Denote the same as those in Fig 1

统计学意义($P_{5-aza-dc}=0.001,P_{普鲁卡因}=0.00$)。

3 讨论

近年来大量研究显示原发性肝癌的发生发展与抑癌基因的 DNA 甲基化密切相关,而使其启动区脱甲基化是延缓甚至逆转实体肿瘤的有效手段。Shitani 等^[5]研究表明 *KLHL35*、*PAX5*、*PENK* 和 *SPDYA* 基因启动区的甲基化率在癌体和癌旁组织相对于正常组织显著增高。Huang 等^[6] 试验进一步表明 Wif-1 的甲基化可以作为促进肝癌发展的一个独立因素。Deng 等^[7] 的实验也证明 Wif-1 mRNA 的下调与其启动区的甲基化程度呈正相关。体外实验表明影响 Wif-1 能阻断 Wnt 信号通路从而抑制肝癌细胞生长。本研究发现,HepG₂ 在未经脱甲基化药物干预前抑癌基因 Wif-1 mRNA 及其蛋白呈低表达甚至缺失,甲基化率高达(98.82±1.02)%,经核苷类去甲基化药物 5-aza-dc 或非核苷类药物普鲁卡因干预后 Wif-1 mRNA 表达均上调,蛋白均呈高表达,甲基化率均下降。本实验结果进一步支持了 Deng 等的研究,并对两类不同的 DNMT 抑制剂使 Wif-1 复活的可能性做了对比探

讨。

本研究运用巢式 MSP 法首先用 Wif-1 外侧引物扩增出 404 bp Wif-1 启动子区片段。全部 DNA 标本中均可以扩增出相应片段。然后分别用 Wif-1-M 和 Wif-1-U 进行第 2 次扩增,在使用普鲁卡因和 5-aza-dc 干预的实验组均出现部分甲基化,使原本已经沉默的 Wif-1 又重新活跃。李洪利等^[8] 研究结果显示经 5-aza-dc 处理后,HepG₂ 细胞株中 *SLIT2* 基因甲基化程度得到一定程度逆转,并呈现出剂量依赖性,在 4.0 μ mol/L 的浓度作用 48 h 后,无甲基化条带出现。而本实验用浓度为 5 μ g/L 的 5-aza-dc 作用 72 h 后仍有甲基化条带出现,原因可能与不同抑癌基因启动区对 DNMT 抑制剂敏感度不同,或与 Wif-1-M 对应的扩增片段缺失有关。

本实验中经 5-aza-dc 与普鲁卡因处理后,抑癌基因 Wif-1 甲基化水平均明显降低,同时 Wif-1 基因 mRNA 与蛋白表达水平明显上调(普鲁卡因干预组强于 5-aza-dc 干预组),说明这两种去甲基化药物均可以通过去甲基化作用活化原被甲基化沉默的 Wif-1 抑癌基因,进而上调其蛋白表达水平。通过对两类 DNMT 抑制剂脱甲基化效果的对比发现:普鲁卡因干预的人肝肿瘤细胞 HepG₂ Wif-1 基因启动区甲基率较常规脱甲基化药物低。这可能与其作用机制不同相关。核苷类 DNMT 抑制剂 5-aza-dc 可取代胞嘧啶嵌入核苷酸中,共价俘获甲基转移酶 DNMT,从而消除 DNA 甲基化,重现基因表达^[9]。普鲁卡因作为非核苷类去甲基化药物能非共价结合 DNMT,特异性地通过与 (下转第 41 页)

changes during the apoptotic process of HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochem Mol Biol Int*,1999;47(5):765-771.

11 Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol*,2002;13(4):858-865.

12 Kim JS, Lee JM, Chwae YJ, *et al.* Cisplatin-induced apoptosis in Hep3B cells: mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol*,2004;67(8):1459-1468.

13 Azuma M, Tamatani T, Ashida Y, *et al.* Cisplatin induces apoptosis in oral squamous carcinoma cells by the mitochondria-mediated but not the NF-kappaB-suppressed pathway. *Oral Oncol*,2003;39(3):282-289.

14 Wang P, Song JH, Song DK, *et al.* Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal*,2006;18(9):1528-1535.

15 Jacobs EJ, Rodriguez C, Mondul AM. A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*,2005;97(13):

975-980.

16 Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, *et al.* Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*,2001;21(4B):2895-2900.

17 Cohen AN, Veena MS, Srivatsan ES, *et al.* Suppreasion of interleukin 6 and 8 production in head and neck cancer cells with curcumin via inhibition of IKappa beta kinase. *Arch Otolaryngd Head Neck Surg*,2009;135(2):190-197.

18 Zhai JX, Zhang ZX, Feng YJ, *et al.* PDTc attenuate LPS-induced kidney injury in syetemic lupus erythe matosus-prone MRL/lpr mice. *Mol Bio Rep*,2012;39(6):6763-6771.

19 Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, *et al.* Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol Carcinog*,2005;44(1):51-59.

(2012-07-30 收稿,2012-10-21 修回)
编辑 沈 进

(上接第 30 页)

DNA 的 CpG 岛密集区紧密结合从而直接干扰 DNMT,强烈地使超甲基化的 CpG 岛去甲基化,以使沉默的抑癌基因重新复活,发挥作用不需渗入 DNA、破坏 DNA 结构^[10-12]。

综上所述,DNMT 抑制剂有望成为新的 HCC 内科化疗药品。非核苷类 DNMT 抑制剂普鲁卡因相比核苷类 DNMT 抑制剂 5-aza-dc 对 HepG₂ *Wif-1* 基因启动区脱甲基化作用更强,而且化学性质更加稳定,可口服给药。因其不整合入 DNA,故出现细胞毒性作用更小,该类药物可能具有更广阔的临床应用前景。但是 Wnt 通路的失调也可能导致胚胎的夭折、发育畸形并且增加成体癌症发生的可能。所以应严格控制运用药物的适用范围,掌握药物毒反应剂量与副反应剂量^[13],这将成为后续实验的研究重点。

参 考 文 献

1 Yuan F, Zhou W, Zou C, *et al.* Expression of Oct4 in HCC and modulation to wnt/ β -catenin and TGF- β signal pathways. *Mol Cell Biochem*,2010;343(1-2):155-62.

2 Lee BB, Lee EJ, Jung EH, *et al.* Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and *Wif-1* genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*,2009;15(19):6185-6191.

3 高曰文,朱耀明,王艳林等.盐酸普鲁卡因对人结肠癌 HT-29 细胞 *Syk* 基因甲基化及表达的影响. *生物技术通报*,2010;12:173-177.

4 Gao Z, Xu Z, Hung MS, *et al.* Procaine and procainamide inhibit the Wnt canonical pathway by promoter demethylation

of WIF-1 in lung cancer cells. *Oncol Rep*,2009;22(6):1479-1484.

5 Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*,2012;33(5):1307-1317.

6 Huang L, Li MX, Wang L, *et al.* Prognostic value of Wnt inhibitory factor-1 expression in hepatocellular carcinoma that is independent of gene methylation. *Tumour Biol*,2011;32(1):233-240.

7 Deng Y, Yu B, Cheng Q, *et al.* Epigenetic silencing of WIF-1 in hepatocellular carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*,2010;136(8):1161-1167.

8 李洪利,张伟栋,李文通等.5-氮杂脱氧胞苷对肝癌细胞 HepG₂ 中抑癌基因 FHIT 表达的影响. *癌症*,2009;28(9):967-971.

9 Glait-Santar C, Benayahu D. SVEP1 promoter regulation by methylation of CpG sites. *Gene*,2011;490(1-2):6-14.

10 Tada M, Imazeki F, Fukai K, *et al.* Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. *Hepatol Int*,2007;1(3):355-364.

11 Montes de Oca A, Madueño JA, Martinez-Moreno JM, *et al.* High-phosphate-induced calcification is related to SM22 α promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res*,2010;25(9):1996-2005.

12 Tada M, Imazeki F, Fukai K, *et al.* Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells. *Hepatol Int*,2007;1(3):355-364.

13 张 魄,王志禄,石守兰等.家族聚集性高血压 Wnt 信号通路基因表达的研究. *中国危重病急救医学*,2011;23(6):349-351.

(2012-05-14 收稿,2012-09-19 修回)
编辑 吕 熙