

本文引用:王华帅,武明胜,李一金,谢彪,罗敏,何永恒. 天马颗粒对结肠直肠癌细胞中 FLI-1 启动子甲基化影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022,42(12):2016-2021.

天马颗粒对结肠直肠癌细胞中 FLI-1 启动子甲基化影响

王华帅^{1,2},武明胜²,李一金²,谢彪³,罗敏³,何永恒^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药研究院附属医院肛肠科,湖南长沙 410006;

3 湖南中医药大学第二附属医院肛肠科,湖南长沙 410005)

〔摘要〕目的 研究天马颗粒对结肠直肠癌细胞中 Friend 白血病整合素 1 转录因子(Friend leukemia integration 1, FLI-1)启动子甲基化的作用机制。**方法** 以结肠直肠癌细胞 HCT116、HT29、Caco-2 为研究对象,每种细胞分为 3 组:Blank 组、NC 组、TMKL 组。Blank 组为空白对照,NC 组予以空白血清干预,TMKL 组予以天马颗粒血清干预。采用 CCK8 筛选天马颗粒血清最佳干预浓度,Western blot 检测各组细胞中 FLI-1 蛋白表达,qPCR 法检测各组细胞 FLI-1 mRNA 表达,ELISA 法检测 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)、DNA 甲基转移酶 3a(DNA methyltransferase 3a, DNMT3a)蛋白表达,甲基化特异性 PCR(methylation-Specific PCR, MSP)检测各组细胞中 FLI-1 启动子甲基化。**结果** 天马颗粒血清对 HCT116、HT29 和 Caco-2 细胞增殖有抑制作用,其中 20%的天马颗粒血清浓度抑制效果最佳。在 HCT116 细胞分组和 Caco-2 细胞分组中,同 Blank 组、NC 组相比,TMKL 组 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达升高($P<0.05$),Blank 组同 NC 组相比差异无统计学意义($P>0.05$);在 HT29 细胞分组中,Blank 组、NC 组和 TMKL 组 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。在 HCT116、HT29 和 Caco-2 细胞中,同 Blank 组、NC 组相比,TMKL 组 DNMT1、DNMT3a 的表达量下降($P<0.05$),Blank 组同 NC 组相比差异无统计学意义($P>0.05$);在 HCT116 细胞中,同 Blank 组、NC 组相比,TMKL 组细胞 FLI-1 启动子产生了部分去甲基化,甲基化减弱,非甲基化增多,NC 组同 Blank 组相比无变化;在 HT29 细胞中,Blank 组、NC 组和 TMKL 组细胞 FLI-1 启动子无甲基化;在 Caco-2 细胞中,同 Blank 组、NC 组相比,TMKL 组细胞 FLI-1 启动子完全去甲基化,NC 组同 Blank 组相比无变化。**结论** 天马颗粒可能通过抑制 DNMT1、DNMT3a 蛋白表达,促使结肠直肠癌细胞中 FLI-1 启动子去甲基化,进而上调其表达。

〔关键词〕 天马颗粒;结肠直肠癌;DNA 甲基化;Friend 白血病整合素 1 转录因子;甲基化转移酶

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.12.010

Effects of Tianma Granule on methylation of FLI-1 promoter in colorectal cancer cells

WANG Huashuai^{1,2}, WU Mingsheng², LI Yijin², XIE Biao³, LUO Min³, HE Yongheng^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Anorectal Department, The Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China;

3. Anorectal Department, The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

〔Abstract〕 **Objective** To study the mechanism of Tianma Granule on methylation of friend leukemia integrin 1 (FLI-1) transcription factor promoter in colorectal cancer cells. **Methods** Colorectal cancer cells HCT116, HT29 and Caco-2 were divided

〔收稿日期〕2022-05-05

〔基金项目〕湖南省自然科学基金重点项目(2021JJ30419);湖南省中医药管理局科研基金重点项目(2021017);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2022ZYX06)。

〔第一作者〕王华帅,男,博士研究生,研究方向:中医药防治肛肠疾病研究。

〔通信作者〕* 何永恒,男,硕士,主任医师,教授,E-mail:2320990685@qq.com。

into three groups: Blank group, NC group and TMKL group. Blank group was blank control. NC group was intervened with blank serum. TMKL group was intervened with Tianma Granule serum. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to screen the optimal intervention concentration of Tianma Granule serum. Western blot was taken to detect the expression of FLI-1 protein in each group. The expression of FLI-1 mRNA in each group was detected by qPCR. ELISA was used to detect the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) protein. Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation of FLI-1 promoter in each group. **Results** Tianma Granule serum inhibited the proliferation of HCT116, HT29 and Caco-2 cells. And 20% serum concentration of Tianma Granule had the best inhibitory effect. Compared with Blank group and NC group, in HCT116 and Caco-2 cell groups, the expression of FLI-1 protein and mRNA in TMKL group increased ($P<0.05$), while there was no difference between Blank group and NC group ($P>0.05$). In HT29 cell group, there was no difference in the expression of FLI-1 protein and mRNA among Blank group, NC group and TMKL group ($P>0.05$). Compared with Blank group and NC group, in HCT116, HT29 and Caco-2 cells, the expression of DNMT1 and DNMT3a in TMKL group decreased ($P<0.05$), while there was no difference between Blank group and NC group ($P>0.05$). Compared with blank group and NC group, in HCT116 cells, FLI-1 promoter in TMKL group produced partial demethylation, decreased methylation and increased non-methylation. And there was no change in NC group compared with blank group. In HT29 cells, there was no methylation of FLI-1 promoter in blank group, NC group and TMKL group. Compared with Blank group and NC group, in Caco-2 cells, the FLI-1 promoter in TMKL group was completely demethylated, and there was no change in NC group compared with Blank group. **Conclusion** Tianma Granule may promote the demethylation of FLI-1 promoter in colorectal cancer cells by inhibiting the expression of DNMT1 and DNMT3a proteins, which resulted in up-regulating the expression.

[**Keywords**] Tianma Granule; colorectal cancer; DNA methylation; Friend leukemia integrin 1 transcription factor; methyltransferase

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,也是世界上第三大最常见的恶性肿瘤^[1]。据统计,2018年全球新发癌症病例总数为1810万例,癌症死亡人数为960万人。其中,结直肠癌占总病例的6.1%,占总癌症死亡人数的9.2%^[2]。我国《2019年全国癌症报告》指出,结直肠癌依然是我国主要的恶性肿瘤之一,仅次于肺癌和胃癌。国内外研究一致认为,结肠癌会造成沉重的社会和经济负担^[3-4]。目前,认为其发病涉及疾病、肠道菌群、遗传、年龄和表观遗传等因素。现代临床治疗结直肠癌常采用手术、放化疗等方法,术后患者仍然面临着生存质量低、复发转移率高、药物抵抗等不良反应,中医药治疗结直肠癌具有抗复发转移、提高免疫力、减轻放化疗不良反应及延长生存周期等独特优势。

何永恒教授结合化痞膏、黄芪益损汤、内消瘰疬丸三方化裁而研制成天马颗粒,具有“拔癌毒,消结肿,通经络,止疼痛”功效,具备“攻、解、化、散、托”法的科学内涵。经过多年临床运用及实验研究^[5-13],天马颗粒组方得到不断优化,现已获得专利^[14]。前期研究发现,FLI-1在结直肠癌中是个抑癌基因,其表达受启动子甲基化影响,去甲基化作用后可使其过表达,抑制结直肠癌细胞增殖^[15]。DNA甲基化主要由甲

基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)和S-腺苷甲硫氨酸催化。而DNMT1、DNMT3a是DNMT主要组成。本实验在前期研究基础上,以HCT116、HT29、Caco-2细胞为研究对象,观察天马颗粒血清对FLI-1蛋白表达的影响,探究对FLI-1启动子甲基化作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及动物

人结直肠癌细胞HCT116、HT29、Caco-2细胞株购自武汉procell公司,批号CL-0096、CL-0118、CL-0050;8周龄SD雄性大鼠20只,体质量(200±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证:430727201101275856,伦理编号:LLBH-202010130001。

1.2 主要药物及试剂

天马颗粒购自湖南中医药大学第二附属医院(批准号[湘]卫药剂9706024),规格10×10g/包,用法:成人1包/次,2次/d。将上述药物加水加热30min,使药物溶解,过滤;在残渣中继续加水加热30min,过滤,重复操作,使得药物充分溶解,合并滤液,混合浓缩制备成含药质量浓度为0.09g/mL的药液,灭

菌后置于 4 °C 冰箱保存。

DNMT1、DNMT3a 检测试剂盒(美国 Abcam 公司,批号:ab113470、ab113469);FLI-1 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:A5644);actin 抗体(美国 proteintech 公司,批号:66009-1-Ig);mRNA 逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture、DM2000 Plus DNA Marker(中国北京康为世纪公司,批号:CW2569、CW2141、CW2601、CW0632);DEPC、Tris(美国 Sigma 公司,批号:D5758-25ML、V900483);Trizol(美国 Thermo 公司,批号 15596026);核酸染料(中国北京普利莱公司,批号:PB11141);BCA 蛋白试剂盒(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:CW0014S)。

1.3 主要仪器

台式冷冻离心机(中国湖南湘仪公司,型号:H1650R);荧光 PCR 板、荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司,型号:PIKOREAL96、SPL0960);电泳仪、水平琼脂糖电泳槽(中国北京六一公司,型号:DYY-2C、DYCP-31DN);旋涡混合器(中国江苏其林贝尔公司,型号:GL-88B);全自动酶标洗板机、多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:PW-812、MB-530)。

1.4 细胞培养

HCT116、HT29 细胞株采用 McCoy's 5A+1% 青-链霉素双抗培养基,Caco-2 细胞采用 MEM 培养基+1%青-链霉素双抗培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的条件下常规培养。

1.5 动物血清制备

将 20 只 SD 雄性大鼠随机分为 2 组,中药组和空白组,每组 10 只。中药组按照人-动物体表面积关系换算出大鼠每日中药等效剂量 1.86 g/kg,给予相应中药药液灌胃,2 次/d;空白组予以等容量的灭菌水灌胃。连续给药 7 d,末次灌胃 1 h 后,采用腹主动脉采血法,离心、提取血清、过滤、灭活补体,保存在-20 °C 的冰箱中备用。

1.6 分组

将每种结直肠癌细胞分为 3 组:Blank 组、NC 组、TMKL 组,Blank 组为空白对照,NC 组予以空白

血清干预,TMKL 组予以天马颗粒血清干预。

1.7 CCK8 筛选天马颗粒血清最佳干预浓度

以 5×10^3 /mL 细胞密度接种至 96 孔培养板中,用冷培养液将细胞同步化处理,分别加入胎牛血清、空白血清和天马颗粒血清,每组设置 5%、10%、15%、20%,每组均设 3 个复孔。待分别干预处理 24 h 后,吸弃上清,每孔加入 10 μ L CCK8 溶液及 90 μ L 完全培养基,培养箱中孵育 2 h。使用酶标仪测定 450 nm 处 OD 值。细胞增殖率=[(对照孔 OD 值-实验孔 OD 值)/对照孔 OD 值] \times 100%。

1.8 Western blot 检测 FLI-1 蛋白相对表达

将分组处理过的细胞进行胰酶消化,4500 r/min 离心 5 min,离心半径 17.8 cm,去上清液,加入裂解液,冰上裂解 30 min,配制 BSA 浓度梯度标准液及 BCA 工作液,在进行蛋白质定量分析后,进行蛋白电泳,电泳条件为 90 V,30 min 后转 120 V,然后进行转膜,封闭 2 h 后在 4 °C 条件下孵育一抗 FLI-1(1:1000)和内参 β -actin(1:5000)孵育过夜,洗膜后加入 HRP 标记的二抗(1:10 000),采用化学发光剂显影,Image J 软件进行灰度分析。

1.9 qPCR 检测 FLI-1 mRNA 表达

使用 Trizol 法提取各组细胞中的总 RNA,测定 RNA 浓度后,逆转录合成 cDNA。按照试剂盒说明书进行实时定量 PCR 检测。运用 2^{- $\Delta\Delta$} 方法进行数据分析。引物设计见表 1。

1.10 ELISA 检测 DNMT1、DNMT3a 蛋白

根据 ELISA 试剂盒说明书,对分组处理后的细胞进行 DNMT1、DNMT3a 蛋白含量检测。

1.11 MSP 检测 FLI-1 启动子甲基化

根据基因组 DNA 提取试剂盒说明书,提取各组细胞中基因组 DNA,应用紫外分光光度法测定 DNA 浓度和纯度,采用 EZ DNA 甲基化试剂盒对 DNA 进行亚硫酸钠处理,利用反应柱进行脱硫及净化,纯化后 DNA 可用于后续 PCR 反应。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min、95 °C 变性 45 s、58 °C(甲基化)/57 °C(非甲基化) 45 s、72 °C 退火 45 s、35 次循环,最后 72 °C 延伸 10 min。反应产物进行琼脂糖凝

表 1 PCR 引物序列

基因名称	正向引物	反向引物	产物长度/bp
β -actin	-ACCCCTGAAGTACCCCATCGAG-	-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-	224
FLI-1	-TCCCCAGGAAGTGGAATTGAG-	-TGGGAGGGGTTGATCTTGT-	156

胶电泳,凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。FLI-1 启动子甲基化引物序列设计见表 2。

表 2 FLI-1 启动子甲基化引物设计

引物名称	序列	长度/bp
甲基化引物	正向:5'-TTCGTTATTTTAGGTTTGGTTACGT-3'	25
	反向:5'-ATTAACCCGAAAACACTCACTCG-3'	22
非甲基化引物	正向:5'-TTTGTTATTTTAGGTTTGGTTATGT-3'	25
	反向:5'-AATTAACCCAAAACACTCACTCATC-3'	25

1.12 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,Graphpad Prism 7.2 绘图。计量资料采用 Kolmogorov-Smirnov 法检测数据正态性,符合正态分布的采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,行独立样本 *t* 检验;不符合正态分布的数据用中位数(四分位间距)描述,行 Mann-Whitney *U* 检验。

2 结果

2.1 天马颗粒血清最佳干预浓度

同 Blank 组、NC 组相比,TKML 组含药血清为 20% 时,HCT116、HT29 和 Caco-2 细胞增殖均受到

抑制($P<0.05$)。因此,选取 20% 的天马颗粒血清浓度作为后续实验的干预浓度。详见图 1。

2.2 天马颗粒血清对 FLI-1 蛋白相对表达及 mRNA 表达影响

在 HCT116 细胞、Caco-2 细胞中,同 Blank 组、NC 组相比,TKML 组 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达升高($P<0.05$);同 NC 组相比,Blank 组 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。在 HT29 细胞中,同 Blank 组、NC 组相比,TKML 组 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$);同 NC 组相比,Blank 组 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 2。

2.3 天马颗粒血清对 DNMT1、DNMT3a 蛋白表达影响

在 HCT116、HT29 和 Caco-2 细胞中,同 Blank 组、NC 组相比,TKML 组 DNMT1、DNMT3a 的表达量下降($P<0.05$);同 NC 组相比,Blank 组 DNMT1、DNMT3a 的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 3。

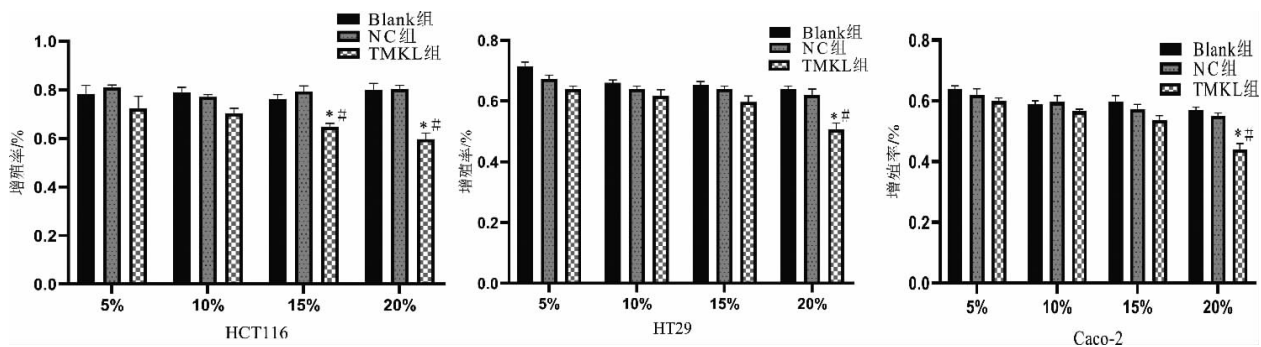


图 1 不同浓度天马颗粒血清对多种结直肠癌细胞增殖的影响

注:同 Blank 组相比,* $P<0.05$;同 NC 组相比,# $P<0.05$ 。

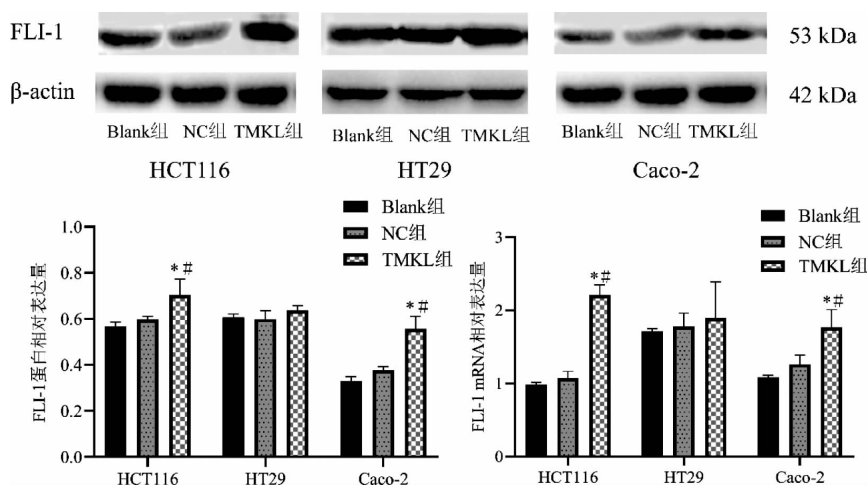


图 2 天马颗粒血清对多种结直肠癌细胞 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达影响

注:同 Blank 组相比,* $P<0.05$;同 NC 组相比,# $P<0.05$ 。

2.4 天马颗粒血清对 FLI-1 启动子甲基化影响

在 HCT116 细胞中,同 Blank 组、NC 相比, TMKL 组细胞 FLI-1 启动子产生了部分去甲基化,甲基化减弱,非甲基化增多;NC 组同 Blank 相比无变化。在 HT29 细胞中,Blank 组、NC 组和 TMKL 组细胞 FLI-1 启动子无甲基化;在 Caco-2 细胞中,同 Blank 组、NC 组相比, TMKL 组细胞 FLI-1 启动子完全去甲基化,NC 组同 Blank 组相比无变化。详见图 4。

3 讨论

DNA 甲基化异常是表观遗传学改变的一个常见形式,并已被证明与多种癌症密切相关^[16-17]。常见的 DNA 甲基化包括启动子 CpG 岛的局灶性高甲基化和 DNA 的整体低甲基化。前者会触发靶基因的转录沉默,而后者会降低染色体的稳定性,这是癌症发展过程中最关键的表观遗传学改变。DNA 甲基化主要由 DNMT 和 S-腺苷甲硫氨酸催化。这种变化通常是可逆的。而 DNMT1、DNMT3a 是 DNMTs 主要组成。DNMT1 主要参与新合成的单链 DNA 甲基化,并将甲基化信息传递给后代细胞,在 DNA 复制中维持甲基化发挥主要作用。DNMT3a 主要负责在胚胎发生过程中 DNA 甲基化^[18]。肿瘤细胞中 DNMT 的高表达导致抑癌基因的高甲基化,进而失活,最终导致肿瘤的形成^[19-20]。MSP 是目前较为常用的甲基化检测方法, MSP 条带亮度在一定程度上可代表发生甲基

化的基因启动子含量,即反映基因的甲基化水平^[21]。

传统中药及一些提取物具有去甲基化作用,相对于化学合成药物,其对正常组织损伤低,副作用小^[22]。王剑等^[23]研究发现,补肾健骨中药复方通过降低骨组织 Leptin 启动子甲基化防治骨质疏松症,任玲^[24]运用简化基因组甲基化测序方法发现通脉逐瘀颗粒对冠心病气滞血瘀证的可能机制是降低 APOA5 基因甲基化水平。陈馨等^[25]使用高浓度的姜黄素干预胃癌 SGC-7901 细胞后发现,姜黄素对胃癌细胞具有抑制增殖作用,且对 p16 和 MGMT 基因具有甲基化抑制作用,并促进基因表达。

在天马颗粒血清干预后, HCT116、HT29 和 Caco-2 细胞的 DNMT1、DNMT3a 表达降低 ($P<0.05$), HCT116 细胞中 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P<0.05$), HT29 细胞中 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达无显著变化 ($P<0.05$), Caco-2 细胞中 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。

此外, MSP 中 Blank 组结果显示, HCT116 细胞中 FLI-1 启动子部分甲基化, HT29 细胞中 FLI-1 启动子无甲基化, Caco-2 细胞中 FLI-1 启动子完全甲基化。MSP 中 TMKL 组结果显示,对于存在 FLI-1 甲基化的 HCT116 细胞和 Caco-2 细胞,天马颗粒可以促进 FLI-1 去甲基化;而对不存在 FLI-1 启动子甲基化的 HT29 细胞,天马颗粒对 FLI-1 甲基化无影响。

前期研究发现, FLI-1 基因的表达受启动子甲

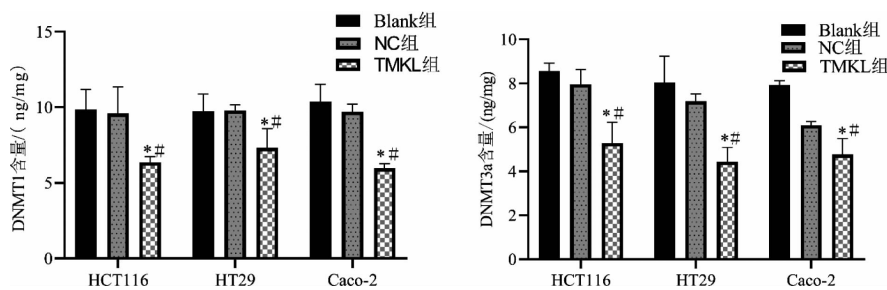


图 3 天马颗粒血清对多种结直肠癌细胞 DNMT1、DNMT3a 蛋白表达影响

注:同 Blank 组相比, * $P<0.05$;同 NC 组相比, # $P<0.05$ 。

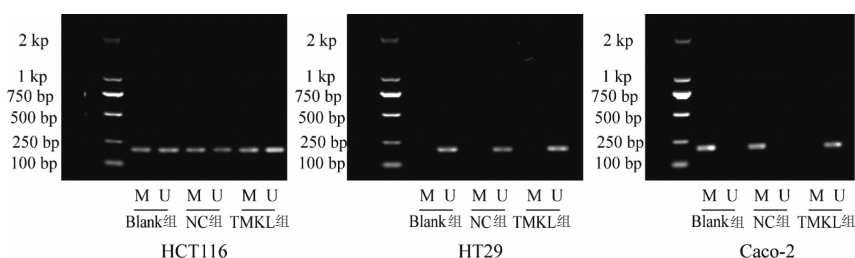


图 4 天马颗粒血清对多种结直肠癌细胞 FLI-1 启动子甲基化影响

基化调控^[15], DNMT1 及 DNMT3a 是维持 DNA 甲基化酶, 而天马颗粒血清抑制 DNMT1 及 DNMT3a 表达。结合上述实验结果推测天马颗粒可能通过抑制 DNMT1 及 DNMT3a 表达, 使得 FLI-1 甲基化减弱, 从而上调 FLI-1 蛋白及 mRNA 表达。

综上所述, 天马颗粒血清可能是通过抑制 DNMT1、DNMT3a 蛋白表达, 促使结直肠癌细胞中 FLI-1 启动子去甲基化, 进而上调其表达。

参考文献

- [1] AFOLABI H, MD SALLEH S, ZAKARIA Z, et al. A systematic review and Meta-analysis on the occurrence of biomarker mutation in colorectal cancer among the Asian population[J]. *BioMed Research International*, 2022, 2022: 5824183.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2021, 71(3): 209–249.
- [3] MD A P, MADISON HYER MS J, et al. Financial impact of out-of-pocket costs among patients undergoing resection for colorectal carcinoma[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2022, 29(9): 5387–5397.
- [4] 李秦川, 姜倩, 陈希, 等. 结直肠癌患者临床治疗经济负担研究[J]. *临床药物治疗杂志*, 2021, 19(7): 65–70.
- [5] 管燕, 周平兰. 天马颗粒的质量标准研究[J]. *中医药导报*, 2006, 12(5): 76–77, 81.
- [6] 邓松华, 谢彪, 彭天书, 等. 应用正交设计优化天马颗粒剂配方的实验研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(3): 266–269.
- [7] 彭天书. 天马颗粒剂的拆方研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [8] 钟英才. 天马颗粒剂的毒理学实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2005.
- [9] 吴志强. “天马颗粒剂”对大肠癌 SW-480 细胞凋亡及相关基因的影响的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2005.
- [10] 邓松华. 天马颗粒剂的拆方研究及其精减方对大肠癌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的作用[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [11] 黄国栋, 李家邦, 何永恒, 等. 天马颗粒剂治疗不能行根治术中晚期大肠癌患者临床研究[J]. *中国中医急症*, 2006, 15(12): 1346–1347.
- [12] 黄晨容, 郭颂铭, 何永恒. 天马颗粒剂对延长大肠癌根治术后生存期的临床研究[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2004, 25(1): 58–60.
- [13] 彭天书, 谢彪, 聂甜, 等. 天马颗粒剂在抑制结直肠癌术后肿瘤复发中的临床效果[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 191–193.
- [14] 何永恒, 邓松华. 一种治疗大肠癌的中药组合物及其制备方法: CN108324880B[P]. 2021–09–21.
- [15] XIE B, HU F, LI M, et al. FLI-1 mediates tumor suppressor function via Klotho signaling in regulating CRC[J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(7): 1514–1522.
- [16] DAI Q X, LIAO Y H, DENG X H, et al. A novel epigenetic signature to predict recurrence-free survival in patients with colon cancer[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2020, 508: 54–60.
- [17] WU X Y, CHEN H C, LI W W, et al. DNMT1 promotes cell proliferation via methylating hMLH1 and hMSH2 promoters in EGFR-mutated non-small cell lung cancer[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2020, 168(2): 151–157.
- [18] BESTOR T H. The DNA methyltransferases of mammals[J]. *Human Molecular Genetics*, 2000, 9(16): 2395–2402.
- [19] 张新远, 褚俊峰, 严正, 等. DNA 甲基化抑制剂在恶性淋巴瘤中的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48(14): 743–747.
- [20] SHI R C, ZHAO K, WANG T, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine potentiates anti-tumor immunity in colorectal peritoneal metastasis by modulating ABC A9-mediated cholesterol accumulation in macrophages[J]. *Theranostics*, 2022, 12(2): 875–890.
- [21] LU Y, QU H, QI D, et al. OCT4 maintains self-renewal and reverses senescence in human hair follicle mesenchymal stem cells through the downregulation of p21 by DNA methyltransferases[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 28.
- [22] 徐凯红, 严笑, 杨澍君, 等. 白花丹醌对白血病细胞 DNA 甲基转移酶的作用[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2021, 31(12): 1090–1093.
- [23] 王剑, 丰雪妮, 刘剑辉, 等. 补肾健骨中药复方对去卵巢骨质疏松症大鼠骨组织 Leptin 启动子甲基化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(5): 668–672, 688.
- [24] 任玲. 通脉逐瘀颗粒对冠心病气滞血瘀证 DNA 甲基化的影响[D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.
- [25] 陈馨, 肖乐, 吴小雪, 等. 姜黄素对胃癌细胞抑癌基因甲基化的抑制作用[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2015, 44(6): 674–677.

(本文编辑 苏维)