

RNA干扰*DNMT1*基因对胰腺癌细胞BxPC-3增殖的影响及相关机制

肖卫东, 李勇, 李学明, 蔡军, 曾林山, 胡伟

肖卫东, 李勇, 李学明, 蔡军, 曾林山, 胡伟, 南昌大学第一附属医院普外科 江西省南昌市 330006

肖卫东, 副教授, 医学博士, 主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究. 江西省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. GJJ08077

江西省自然科学基金资助项目, No. 2010GZY0316

作者贡献分布: 此课题由肖卫东与李勇设计; 研究过程由肖卫东、李学明、蔡军、曾林山及胡伟操作完成; 数据分析和论文写作由肖卫东与李勇完成.

通讯作者: 肖卫东, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院普外科. frankxwd@126.com

收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2011-10-28

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-28

RNA interference-mediated silencing of the *DNMT1* gene inhibits cell proliferation in human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3

Wei-Dong Xiao, Yong Li, Xue-Ming Li, Jun Cai, Lin-Shan Zeng, Wei Hu

Wei-Dong Xiao, Yong Li, Xue-Ming Li, Jun Cai, Lin-Shan Zeng, Wei Hu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the Education Office of Jiangxi Province, No. GJJ08077; the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 2010GZY0316

Correspondence to: Wei-dong Xiao, Associate Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. frankxwd@126.com

Received: 2011-09-01 Revised: 2011-10-28

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of RNA interference-mediated silencing of the DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) gene on the proliferation of pancreatic carcinoma BxPC-3 cells and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: BxPC-3 cells were divided into three groups: experimental group, negative control group and blank control group, which were transfected with a *DNMT1*-specific siRNA, a negative siRNA and empty liposomes using Lipofectamine™ 2000, respectively. The expression

of *DNMT1* mRNA and protein in the transfected cells was analyzed by real-time PCR and Western blot, respectively. Cell growth was measured by MTT assay, and cell apoptosis was examined by flow cytometry. The methylation of tumor suppressor genes (*p16*, *ppENK* and *RASSF1A*) was detected by methylation-specific PCR (MSP) 48 h after transfection.

RESULTS: The expression of *DNMT1* mRNA and protein in the experimental group was markedly down-regulated compared to that in the negative control group and blank control group (all $P < 0.01$). Cell growth was significantly slower (both $P < 0.05$) and the apoptosis rate was significantly higher ($44.46\% \pm 5.98\%$ vs $3.74\% \pm 1.02\%$ vs $5.07\% \pm 1.16\%$, both $P < 0.01$) in the experimental group than in the negative and blank control groups. The methylation of the *p16* and *ppENK* genes was detected in the blank and negative control groups but not in the experimental group. The methylation of *RASSF1A* gene was detected in the two control groups, while only partial methylation of this gene was detected in the experimental group.

CONCLUSION: Down-regulation of *DNMT1* inhibited cell growth and promoted apoptosis in human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 possible via mechanisms associated with the demethylation of tumor suppress genes (*p16*, *ppENK* and *RASSF1A*).

Key Words: Pancreatic cancer; DNA methyltransferase 1; RNA interference; Cell proliferation; Cell apoptosis; Tumor suppressor gene

Xiao WD, Li Y, Li XM, Cai J, Zeng LS, Hu W. RNA interference-mediated silencing of the *DNMT1* gene inhibits cell proliferation in human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(33): 3397-3401

摘要

目的: 探讨RNA干扰*DNMT1*基因对胰腺癌细胞BxPC-3增殖的影响及相关机制.

■背景资料

胰腺癌的发生发展是一个多因素、多阶段的过程, 其中DNA甲基化等表观遗传学改变发挥了重要作用, 其中*DNMT1*所起的维持甲基化的作用尤为重要.

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

■ 研究前沿

去甲基化治疗是当前胰腺癌治疗的研究热点和发展方向之一,亟待解决的问题是靶基因的选择和以何种安全、方便、有效的方式导入受体并实现治疗目的。

方法: 利用LipofectamineTM2000转染*DNMT1*-siRNA至胰腺癌细胞BxPC-3。实验共分为3组: 实验组(转染*DNMT1*-siRNA)、阴性对照组(转染negative-siRNA)和空白对照组(转染脂质体)。转染48 h后,应用荧光定量PCR法和Western blot法分别检测细胞中*DNMT1* mRNA和蛋白的表达水平; MTT法检测细胞体外增殖活力; FCM法检测细胞凋亡; 甲基化特异性PCR法(MSP)检测抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*的启动子甲基化状态。

结果: 与空白对照组和阴性对照组相比,实验组的*DNMT1* mRNA及蛋白表达量均显著降低($P<0.01$); 实验组细胞增殖明显受到抑制($P<0.05$), 细胞凋亡率明显增加($44.46\% \pm 5.98\%$ vs $3.74\% \pm 1.02\%$ vs $5.07\% \pm 1.16\%$, $P<0.01$)。空白对照组与阴性对照组的*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因甲基化阳性,而实验组的*p16*和*ppENK*基因甲基化阴性,*RASSF1A*基因部分甲基化。

结论: *DNMT1*基因表达下调后,能抑制胰腺癌细胞BxPC-3细胞增殖,并能诱导其发生细胞凋亡; 其作用机制与抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*去甲基化有关。

关键词: 胰腺肿瘤; DNA甲基转移酶1; RNA干扰; 细胞增殖; 细胞凋亡; 抑癌基因

肖卫东, 李勇, 李学明, 蔡军, 曾林山, 胡伟. RNA干扰*DNMT1*基因对胰腺癌细胞BxPC-3增殖的影响及相关机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(33): 3397-3401
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3397.asp>

0 引言

胰腺癌的发病率在世界范围内呈逐年上升趋势,美国癌症协会的最新资料显示其发病率达11/10万,居恶性肿瘤的第10位,病死率已跃居恶性肿瘤的第4位^[1]。国内的流行病学资料也显示胰腺癌发病率在逐年上升^[2,3]。胰腺癌的发生发展是一个多因素、多阶段的过程,其中DNA甲基化等表观遗传学改变发挥了重要作用^[4,5]。DNA甲基化过程有赖于DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的介导,其中*DNMT1*所起的维持甲基化的作用尤为重要^[6-8]。本研究通过脂质体将*DNMT1*小干扰RNA片段(small interference RNA, siRNA)稳定转染入胰腺癌细胞BxPC-3,观察其对细胞增殖和凋亡的影响,并探讨相关作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株BxPC-3购自上海细胞生物研究所细胞库, *DNMT1*以及阴性对照siRNA由Thermo公司设计合成, *DNMT1*-siRNA的靶序列为: 5'-GGAAGAAGAGUUACU-AUAA-3'。兔抗人*DNMT1*单克隆抗体购于Santa Cruz公司,二抗及发光试剂等购于晶美生物工程公司; 逆转录试剂盒购于TaKaRa公司; RPMI-1640培养基、Trizol RNA分离试剂和LipofectamineTM2000购于Invitrogen公司; Wizard DNA clean-up system购于Promega公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物; RealMasterMix(probe)购于北京天根生化科技有限公司; PCR引物和荧光探针由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和siRNA转染: 用含有100 mL/L胎牛血清RPMI-1640培养液在37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中常规培养胰腺癌细胞BxPC-3,取对数生长期的细胞用于实验。将细胞以 2×10^5 个/孔接种于96孔培养板中,实验分3组: 实验组(转染*DNMT1*-siRNA); 阴性对照组(转染negative-siRNA); 空白对照组(转染脂质体)。采用LipofectamineTM2000脂质体转染siRNA, siRNA终浓度为40 nmol/L,每组设3个复孔。转染6 h后更换成RPMI-1640培养液,继续常规培养,48 h时收集细胞。

1.2.2 荧光定量PCR检测*DNMT1* mRNA表达水平: *DNMT1*引物序列: 上游: 5'-GTTCTTCCTCC-TGGAGAATGTCA-3', 下游: 5'-GGGCCAC-GCCGTAAGT-3', 探针5'-TTGTCTCCTTCAAGC GCTCCATGGTC-3', 扩增产物138 bp; 内参3-磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)引物序列: 上游: 5'-CCCATGTTTCGTCATGGGTGT-3', 下游: 5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3', 探针: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3', 扩增产物145 bp。

Trizol法提取总RNA,用逆转录试剂盒将总RNA逆转录合成cDNA。PCR总反应体系为25 μ L,其中含2.5 \times RealMasterMix、引物(目的基因/内参)、探针、cDNA模板、20 \times Probe Enhancer solution和ddH₂O。PCR反应条件: 94 °C预变性2 min, 94 °C变性15 s, 62 °C退火延伸30 s,共40个循环。实验重复3次。由PCR反应曲线得到域值循环数(Ct),以*GAPDH*作为内参照,计算基因相对表达量(RQ值 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$)。

1.2.3 Western blot检测*DNMT1*蛋白表达水平: 收集各组细胞, 蛋白提取液提取蛋白, Bradford法测蛋白含量. 每泳道25 μ g蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 转硝酸纤维素膜(NC膜), 鼠抗人*DNMT1*(1:100)过夜, 二抗羊抗兔(1:5000)室温孵育1 h, 二氨基联苯胺(DAB)显色, Bio-Rad凝胶成像系统摄影. 以 β -肌动蛋白(β -actin)作为参照.

1.2.4 MTT法检测细胞增殖活性: 将细胞接种96孔板(2×10^4 个/孔), 每孔100 μ L, 每组设3个复孔. 细胞铺板密度达到90%-95%后进行转染, 转染6 h后加入完全培养基, 培养12、24、48、72 h后, 每孔加入浓度为5 g/L MTT 30 μ L, 在37 $^{\circ}$ C下作用4 h后弃去. 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次后每孔加入150 μ L二甲基亚砷(DMSO), 振荡15 min使结晶充分溶解. 在酶标仪测定492 nm波长下的吸光度值(A), 以A值为纵坐标, 培养时间(h)为横坐标绘制细胞生长曲线, 并计算细胞生长抑制率, 抑制率(%) = $(A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$.

1.2.5 FCM检测细胞凋亡: 用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化收集各组细胞; 加入PBS洗涤细胞2次, 收集 5×10^5 个细胞; 加入250 μ L Binding Buffer悬浮细胞; 加入5 μ L Annexin V-FITC混匀, 再加入5 μ L碘化丙啶(PI)混匀; 室温、避光反应5-10 min; 在1 h内进行流式细仪分析, 分别检测各组细胞凋亡.

1.2.6 甲基化特异性PCR法(MSP)检测*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因启动子甲基化: 收集各组细胞, 按DNA纯化试剂盒说明书步骤提取DNA. 取1 μ g DNA溶解于36 μ L ddH₂O中, 加入新鲜配制的3M NaOH(终浓度为0.3 mol/L) 4 μ L变性, 37 $^{\circ}$ C水浴15 min, 加入新鲜配制的10 mmol/L对苯二酚30 μ L和3.6 mol/L(PH5.0)重亚硫酸钠520 μ L, 55 $^{\circ}$ C水浴16 h, 用Wizard DNA clean-up system纯化. 同一标本以甲基化和未甲基化引物分别扩增, *p16*基因未甲基化引物序列: 上游: 5'-GGGTGGATTGTGTGTGTTT-3', 下游: 5'-CCATAACCAACCAATCAACCA-3'; 甲基化引物序列: 上游: 5'-GGCGGATCGCGTGCGTTC-3', 下游: 5'-CGTAACCAATCAACCG-3'. *RASSF1A*基因未甲基化引物序列: 上游: 5'-TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG-3', 下游: 5'-CAAACCCACAACTAAAAACAA-3'; 甲基化引物序列: 上游: 5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3', 下游: 5'-AACCCCGCGAACTA-

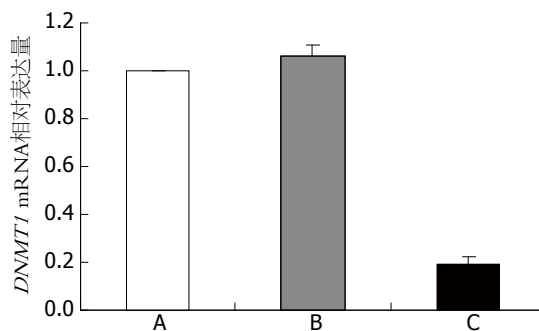


图1 荧光定量PCR检测转染后*DNMT1* mRNA. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组.

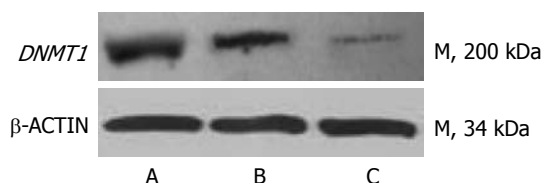


图2 Western blot检测转染后*DNMT1*蛋白. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组.

AAAACGA-3'. *ppENK*基因未甲基化引物序列: 上游: 5'-TTGTGTGGGGAGTTATTGAGT-3', 下游: 5'-CACCTTCACAAAAAAATCAATC-3'; 甲基化引物序列: 上游: 5'-TGTGGGGAGT-TATCGAGC-3', 下游: 5'-GCCTTCGC-GAAAAAAATCG-3'. PCR总反应体系25 μ L, 含ddH₂O、10 \times PCR buffer、dNTP、上游和下游引物、模板DNA、Taq酶. 循环参数: 95 $^{\circ}$ C预变性10 min; 80 $^{\circ}$ C加入Taq DNA聚合酶; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火温度62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s; 共36个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸3 min. 取6 μ L扩增产物于3%琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶图像成像仪下观察结果.

统计学处理 数据采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 应用SPSS11.0统计软件中的*t*检验和单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 siRNA转染对*DNMT1* mRNA和蛋白表达的影响 与空白对照组和阴性对照组相比, 实验组*DNMT1* mRNA和蛋白表达量显著降低($P < 0.01$), 而阴性对照组与空白对照组无明显差异($P > 0.05$, 图1, 2).

2.2 siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3细胞增殖的影响 MTT法检测结果显示, 转染后24-72 h, 实验组的细胞生长速度较空白对照组和阴性对照组明显减慢, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 24 h、

■ 相关报道

许多研究显示在多种不同的肿瘤组织或细胞中检测出*DNMT1*的高表达, 并密切参与肿瘤的发生发展, 其作用机制可能与*DNMT1*的高表达导致多种抑癌基因启动子高甲基化而表达失活有关.

■同行评价

本研究通过干扰 *DNMT1* 基因表达, 证明该基因可抑制胰腺癌细胞生长并诱导其凋亡, 为临床上去甲基化治疗提供了一个新靶点。

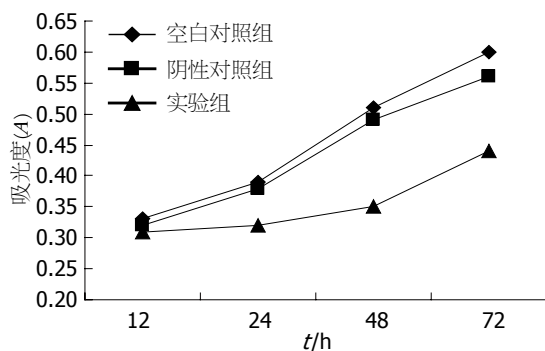


图3 *DNMT1*-siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3细胞增殖的影响。

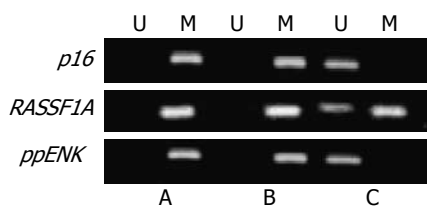


图4 MSP检测*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因启动子甲基化(U: 未甲基化引物; M: 甲基化引物)。A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 实验组。

48 h和72 h时实验组的细胞生长抑制率分别为17.9%、30.9%和26.8%(图3)。

2.3 siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3细胞凋亡的影响 FCM检测结果显示, 转染后48 h, 空白对照组、阴性对照组和实验组的细胞凋亡率分别为 $3.74\% \pm 1.02\%$ 、 $5.07\% \pm 1.16\%$ 和 $44.46\% \pm 5.98\%$ 。与空白对照组和阴性对照组比较, 实验组的细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$)。

2.4 siRNA转染对胰腺癌细胞BxPC-3抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*启动子甲基化的影响 MSP检测结果显示, 空白对照组与阴性对照组的*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因甲基化阳性, 而实验组*p16*和*ppENK*基因甲基化阴性, *RASSF1A*基因部分甲基化(图4)。

3 讨论

目前, 许多研究显示在多种不同的肿瘤组织或细胞中检测出*DNMT1*的高表达, 并密切参与肿瘤的发生发展, 其作用机制可能与*DNMT1*的高表达导致多种抑癌基因启动子高甲基化而表达失活有关。以往的实验研究发现, 在非小细胞肺癌细胞NCI-H1299^[9]和乳腺癌细胞HCC1954^[9]、食管鳞癌细胞EC9706^[10]以及膀胱癌细胞T24^[11]等癌细胞株中, 以*DNMT1*为靶点的基因治疗能有效抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡。

在对胰腺癌的研究中, Peng等^[12,13]报道,

*DNMT1*在胰腺癌组织中高表达, 并与肿瘤T分期及TNM分期密切相关。*DNMT1*高表达预示患者预后不良, 而且*BRCA1*、*APC*、*p16*、*TIMP-3*等基因的高甲基化与*DNMT1*表达上调有关。因此, 推测*DNMT1*也可作为胰腺癌基因治疗的靶点。国内学者徐岷等^[14,15]报道转染*DNMT1* siRNA能有效抑制胰腺癌PaTu8988细胞*DNMT1* mRNA的表达, 同时抑制细胞增殖、促进细胞凋亡, 其机制可能与上调细胞周期调控基因*p21*的表达有关。本研究同样以*DNMT1*为靶基因, 在胰腺癌细胞BxPC-3中利用RNAi技术沉默靶基因的表达, 从而观察其对细胞增殖和凋亡的影响。实验结果显示, 在*DNMT1*基因表达下调后, 胰腺癌细胞BxPC-3生长速度明显减缓, 细胞凋亡率明显增加。

p16、*RASSF1A*和*ppENK*是与多种肿瘤发生发展密切相关的重要抑癌基因, 参与细胞周期的调控, 负调节细胞增殖及分裂, 他们在胰腺癌中都因基因启动子CpG岛高甲基化而表达失活^[16-19]。Ueki等^[16]报道胰腺癌组织中*ppENK*基因启动子甲基化发生率为93%; Dammann等^[19]的研究结果显示, 胰腺癌组织中*RASSF1A*和*p16*基因启动子甲基化发生率分别为64%和43%; 在8株胰腺癌细胞系中, *RASSF1A*和*p16*基因启动子甲基化发生率则分别高达87.5%和63%。为进一步探讨*DNMT1*-siRNA对胰腺癌细胞BxPC-3的相关抑癌作用机制, 本研究观察了沉默*DNMT1*基因对*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因启动子甲基化状态的影响, 结果显示, 空白对照组与阴性对照组的*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*基因甲基化阳性, 而实验组的*p16*和*ppENK*基因甲基化阴性, *RASSF1A*基因部分甲基化。该结果提示, *DNMT1*基因表达下调后抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*不同程度去甲基化, 抑癌基因去甲基化后可以在细胞中重新表达, 从而通过多种途径发挥其抑癌作用。

总之, 本研究结果表明, *DNMT1*基因表达下调后, 能抑制胰腺癌细胞BxPC-3细胞生长, 并能诱导其发生细胞凋亡, 其作用机制与抑癌基因*p16*、*RASSF1A*和*ppENK*去甲基化有关, 提示*DNMT1*是胰腺癌去甲基化治疗的一个有效靶点。

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- 赵玉沛. 胰腺癌的诊断与治疗现状与未来. 中华肝胆外科杂志 2009; 15: 321-323
- 倪泉兴. 胰腺癌的临床流行病学研究现状. 胰腺病学

- 2006; 2: 65-68
- 4 宋天强, 李强. 胰腺癌的表遗传学研究进展. 中华实验外科杂志 2009; 26: 267-269
- 5 Omura N, Goggins M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 310-326
- 6 Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003; 33: 61-65
- 7 Jung Y, Park J, Kim TY, Park JH, Jong HS, Im SA, Robertson KD, Bang YJ, Kim TY. Potential advantages of DNA methyltransferase 1 (DNMT1)-targeted inhibition for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85: 1137-1148
- 8 Egger G, Jeong S, Escobar SG, Cortez CC, Li TW, Saito Y, Yoo CB, Jones PA, Liang G. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 14080-14085
- 9 Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, Minna JD. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3137-3143
- 10 刘莺, 李克, 刘文静, 王居峰, 樊青霞. 下调DNMT1对食管鳞癌EC9706细胞增殖、迁移的影响及相关机制的研究. 中国癌症杂志 2009; 19: 826-829
- 11 张士龙, 曾甫清, 彭世波, 董继华, 廖贵益, 汪良. shRNA沉默基因DNMT1的表达对膀胱癌T24细胞增殖与凋亡的影响. 华中科技大学学报(医学版) 2009; 38: 165-168
- 12 Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci* 2005; 96: 403-408
- 13 Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, Hirohashi S. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1160-1168
- 14 徐岷, 高道健, 张玉琦, 高军, 李兆申, 龚燕芳, 吴洪玉, 杜奕奇, 金晶, 满晓华. RNA干扰DNA甲基转移酶1对人胰腺癌PaTu8988细胞增殖和凋亡的影响. 中华胰腺病杂志 2008; 8: 92-94
- 15 徐岷, 高军, 高道健, 张玉琦, 杜奕奇, 刘枫, 龚燕芳, 吴洪玉, 李兆申. DNMT1 siRNA对人胰腺癌PaTu8988细胞周期的调控机制研究. 中华胰腺病杂志 2009; 34: 21-23
- 16 Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 8540-8546
- 17 Sato N, Ueki T, Fukushima N, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of CpG islands in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 2002; 123: 365-372
- 18 Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 1573-1581
- 19 Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊: 序号, 作者(列出全体作者).文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号;书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.