

Hint2基因过表达质粒的构建及其对肝癌细胞BEL-7402迁移的影响

李奇萌, 林国南 (首都医科大学, 北京 100069)

摘要: 目的 探讨Hint2基因过表达质粒的构建及其对肝癌细胞BEL-7402迁移的影响。方法 根据Hint2基因设计引物, 扩增Hint2基因全长并以pcDNA3.1 (+) 为载体构建Hint2过表达质粒。转染BEL-7402细胞提取mRNA和总蛋白, 分别使用Real-time PCR和Western blot检测转染细胞Hint2 mRNA和蛋白质表达的变化, 应用免疫荧光染色法对细胞中Hint2蛋白与细胞线粒体进行共定位。使用划痕愈合实验检测Hint2过表达后对肝癌细胞BEL-7402迁移能力的影响。结果 转染Hint2过表达质粒细胞的Hint2 mRNA和蛋白表达显著上调, 免疫荧光染色表明过表达的Hint2蛋白定位于线粒体。划痕愈合实验表明Hint2过表达质粒使肝癌细胞BEL-7402迁移速率显著降低。结论 Hint2过表达质粒能够上调BEL-7402细胞中Hint2 mRNA和蛋白质的表达水平, 表达的蛋白定位于细胞线粒体并抑制肝癌细胞的迁移。

关键词: Hint2; pcDNA3.1 (+); BEL-7402细胞

Construction of Hint2 overexpression plasmid and its effect on invasion capability of liver cancer cell BEL-7402

LI Qi-meng, LIN Guo-nan (Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To investigate the construction of Hint2 overexpression plasmid and its effect on invasion capability of liver cancer cell BEL-7402. **Methods** According to the sequence of Hint2 gene, primers were designed to amplify Hint2 gene fragment for Hint2 gene overexpression plasmid construction. mRNA and total protein were extracted from Hint2 overexpressed BEL-7402 cells, real-time PCR and Western blot were applied to determine the expression levels of Hint2, and then the location of exogenous Hint2 in mitochondria was confirmed through immunofluorescence staining. Subsequently, wound healing experiment was taken to detect the changes of invasion and migration capability of BEL-7402 cells after Hint2 overexpression. **Results** The mRNA and protein expression levels of Hint2 up-regulated significantly in BEL-7402 cells after transfection with Hint2 overexpression plasmid. According to the result of immunofluorescence staining, the exogenous Hint2 protein was co-located with the mitochondria. Wound healing experiment showed the up-regulation of Hint2 restrained the migration ability in BEL-7402 cells. **Conclusion** After transfection with Hint2 overexpression plasmid, the expression level of Hint2, which was bound with mitochondria, was increased and the migration ability of BEL-7402 cells was restrained.

Key words: Hint2; pcDNA3.1(+); BEL-7402 cells

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 发病率高、转移能力强且预后差, 是医学领域长久以来的难题之一^[1]。目前针对肝癌的治疗方法主要集中在肝切除、肝移植、药物治疗、放射治疗和化学治疗等, 但肝源严重短缺、肝癌细胞对药物敏感性随治疗次数增多而逐渐降低及放化疗难以取得理想效果等是目前肝癌治疗失败的重要原因^[2]。近年研究发

现, 肝癌细胞中Hint2表达量显著下调, 且Hint2可通过线粒体途径促使细胞凋亡^[3], 因此若能够通过基因治疗提高肝癌细胞中Hint2的表达, 促进肿瘤细胞的凋亡并抑制细胞转移, 或许可为攻克肝癌提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 BEL-7402 肝癌细胞株购于美国模式培养物研究所 (American Type Culture Collection, ATCC), pcDNA3.1/Neo 质粒由首都医科大学肝脏保护与再生调节重点实验室保存, pcDNA3.1/Hint2

质粒为本人构建。

1.2 主要试剂仪器 主要试剂包括:高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(FBS)(美国 Equitech-Bio 公司)、FuGENE HD Transfection(美国 Promega 公司)、EcoR I(日本 TaKaRa 公司)、BamH I(日本 TaKaRa 公司)、T4 DNA 连接酶(日本 TaKaRa 公司)、氨苄青霉素钠(美国 Sigma 公司)、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(北京天根生物科技有限公司)、质粒大提试剂盒(北京天根生物科技有限公司)、Hint2 抗体(美国 Novus Biologicals 公司)、MitoTracker Green(上海碧云天生物技术有限公司)及 ALEXA Fluor594 标记抗兔 IgG(北京中杉金桥公司)。主要仪器包括:细胞培养箱 HERAccl150i(美国 Thermo 公司)、细菌培养箱 B6060(德国 Heraeus 公司)、蛋白垂直电泳槽 MINISUB(美国 Bio-Rad 公司)、蛋白转印电泳槽 Mini Trans-Blot(美国 Bio-Rad 公司)、化学发光扫描仪 c-Digit(美国 LI-COR 公司)、Real-time PCR 仪 Rotor-Gene Q(德国 Qiagen 公司)、荧光倒置相差显微镜 FW4000(德国 Leica 公司)及酶标仪 BIO-RAD 680(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞cDNA的制备和Hint2过表达质粒的构建 采用Trizol法提取细胞mRNA,使用mRNA逆转录试剂盒将细胞mRNA逆转录为cDNA,于-20℃冰箱保存。在Pubmed基因库中选取Hint2基因序列,根据网站对基因序列的标注,选取其中编码蛋白质的区域^[4],利用Oligo7软件设计上下游引物序列,并在引物前后添加内切酶识别序列,上游引物序列为5'-CGGGATCCATGGCTGCTGCTGTGCTGTG-3',下游引物序列为5'-CGGAATTCTTAACAC CACAAGGTTCTTT-3',委托北京奥科鼎盛公司进行序列合成。稀释引物后取cDNA进行PCR反应,反应体系为:1 μl DNA模板、1 μl上游引物、1 μl下游引物、25 μl 2×PCR StarMix和22 μl ddH₂O。反应条件为94℃变性30秒;55℃复性30秒;72℃延伸1分钟,共30个循环。反应完成后加入6×上样缓冲液,取2~5 μl进行琼脂糖凝胶电泳,切下阳性条带进行胶回收,回收所得即为Hint2基因全长。将pcDNA3.1质粒与扩增的目的基因同时进行酶切,过夜,随后对连接产物进行琼脂糖凝胶电泳,切下相应位置的样本回收,采用DNA连接酶连接纯化目的基因和质粒后,将连接产物转入感受态细胞扩增培养,提取质粒并委托北京奥科鼎盛公司测序。

1.3.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(Real-

Time PCR) 采用Oligo 7软件根据Hint2基因片段进行引物序列设计,18sRNA上游引物为:5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3',下游引物为:5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3';Hint2上游引物为:5'-ACGACCAGCAGCTTCTAGGACA-3',下游引物为:5'-CCCATCTTGCCATCATTAACCAC-3',委托北京奥科鼎盛公司合成。引物可有效扩增模板DNA序列并与荧光染料SYBR Green结合,再通过机器对荧光值进行检测。反应条件为:95℃1分钟;95℃15秒,60℃1分钟,40个循环;95℃15秒,60℃1分钟;95℃30秒。通过计算RQ值($RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$)比较细胞样本间mRNA的表达差异。为减少系统误差和偶然误差,每个样本使用3个复孔进行检测,取3个复孔Ct的平均值计算RQ,结果以柱状图表示。

1.3.3 Western blot Hint2过表达质粒转染细胞48小时后使用RAPI裂解液提取细胞总蛋白,经BCA试剂盒定量后,配置10% SDS凝胶进行蛋白质电泳,使用湿转法将蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1小时,加入1:1000稀释的兔抗人Hint2抗体,4℃摇床过夜,第2天取出后以TBST洗膜3次,每次10分钟,洗膜后加入1:5000稀释的HRP标记羊抗兔IgG二抗,室温孵育1小时,TBST洗膜3次,每次10分钟,采用ECL发光检测,化学发光扫描仪扫描成像分析蛋白表达量^[5-7]。

1.3.4 细胞瞬时转染(transient transfection) 在6孔板中接种待转染细胞,密度为 5×10^4 个细胞/孔,细胞贴壁后,准备转染。向2个1.5 ml EP管加入100 μl opti-MEM后分别加入2 μg质粒(pcDNA3.1/Neo或pcDNA3.1/Hint2)和6 μl Eugene HD转染试剂,静置5分钟后,将两管溶液轻柔混合均匀,静置15分钟。弃去6孔板中旧培养液,PBS漂洗3次,向每孔中加入500 μl DMEM培养基。加入混合的转染试剂和质粒至6孔板中培养6小时。弃去旧培养基,加入含10% FBS的DMEM完全培养基,24小时后更换新的含10% FBS的DMEM培养基。24小时后收集细胞用于后续实验^[8]。

1.3.5 细胞的免疫荧光技术 取出细胞后用1×PBS轻柔洗去皿中多余培养基,4%多聚甲醛处理细胞15~25分钟以固定细胞形态,用0.1% Triton X-100室温通透细胞膜5分钟,PBS冲洗后加入1 ml 5% BSA封闭液,室温封闭45分钟。随后加入一抗,于4℃静置过夜。PBST轻柔洗去皿中一抗溶液,重复3次,每次10分钟。吸弃多余PBST,加入已用抗体稀释液稀释的荧光二抗,湿盒中室温避光孵育30分

钟，弃去荧光二抗，避光条件下，PBST轻柔洗去皿中二抗溶液，重复3次，每次15分钟。滴加DAPI避光孵育5分钟，使标本中细胞核染色。PBST轻柔洗去DAPI染液。最后在激光共聚焦扫描显微镜下观察采集图像。

1.3.6 划痕愈合实验 收集转染Hint2过表达质粒和空载质粒的BEL-7402细胞接种在6孔板上（汇合度约90%），待细胞贴壁后用1000 μ l的枪头在6孔板底部垂直划线，PBS洗去脱落细胞，再加入DMEM培养基，培养0小时、12小时和24小时后分别置于倒置显微镜下拍照，对比不同时间段的划痕宽度，以24小时划痕宽度与0小时划痕宽度的比值评估细胞迁移能力。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对所得

数据进行统计分析。各实验均独立重复3次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验或配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hint2 基因的 PCR 扩增 目的基因扩增出的 Hint2 DNA 条带见图 1。

2.2 质粒及目的基因的酶切 限制性内切酶对质粒相应的酶切位点进行切割, 质粒环状结构被破坏, 见图 2。

2.3 Hint2 过表达质粒测序 Hint2 过表达质粒构建成功后, 测序结果见图 3, 将测序结果与美国国家生

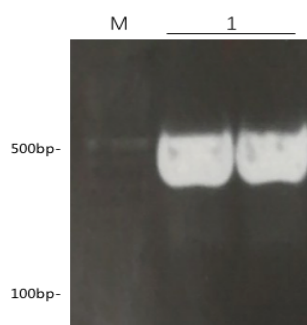


图 1 目的基因扩增电泳图

注: M 为 Marker, 1 为目的基因片段

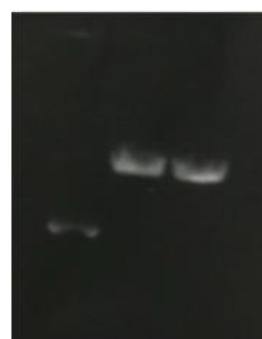
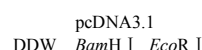


图 2 质粒酶切电泳图

注: DDW 为双蒸水对照组

Mus musculus histidine triad nucleotide binding protein 2 (Hint2), mRNA
Sequence ID: [NM_026871.1](#) Length: 636 Number of Matches: 1

Range 1: 7 to 572 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|--|--------------|-----------|-----------|
| 1035 bits(560) | 0.0 | 564/566(99%) | 0/566(0%) | Plus/Plus |
| Query 1 | AtggctgctgctgtgctgtcgttgcctgtggcgcttgccgcgtcgccgcagaaacctggctgcC | 60 | | |
| Sbjct 7 | ATGGCTGCTGCTGTGTCGTGCTGCCGCTGGGCTTCCGCCTCGCCGCAGAACCTGGCTGCC | 66 | | |
| Query 61 | CGCGGGGGCCCGGGGGCGCAGGTCGAGGAAACGCAGGGGTGTCCGACGGGAGTAAGTG | 120 | | |
| Sbjct 67 | CGCGGGGGCCCGGGGGCGCAGGTCGAGGAAACGCAGGGGTGTCCGACGGGAGTAAGTG | 126 | | |
| Query 121 | GCCAAGGCCAGAAAAGCAGCTCCTGGAGGAGCATGCCAACCATCTTCTCCCAGATTTTG | 180 | | |
| Sbjct 127 | GCCAAGGCCAGAAAAGCAGCTCCTGGAGGAGCATGCCAACCATCTTCTCCCAGATTTTG | 186 | | |
| Query 181 | GACCGGAGTCTCCAGCTGACATTCTATATGAAGATCAGCAGTGCCTTGTGTTCCGCGAC | 240 | | |
| Sbjct 187 | GACCGGAGTCTCCAGCTGACATTCTATATGAAGATCAGCAGTGCCTTGTGTTCCGTGAC | 246 | | |
| Query 241 | GTAGTCTCTCAGGCTCCTGTGCAC TTCTGGTCATTCTAGGAAGCCATTCTCTCGAATT | 300 | | |
| Sbjct 247 | GTAGTCTCTCAGGCTCCTGTGCAC TTCTGGTCATTCTAGGAAGCCATTCTCTCGAATT | 306 | | |
| Query 301 | AGCCAGGCTGAAGAGGACGACCAGCAGCTTCTAGGACACTTACTCCTTGTGGCCAGAAG | 360 | | |
| Sbjct 307 | AGCCAGGCTGAAGAGGACGACCAGCAGCTTCTAGGACACTTACTCCTTGTGGCCAGAAG | 366 | | |
| Query 361 | ATAGCACAGGCCCAGGTCGAAAAGATGGGTATCGACTTGTGGTTAATGATGCCAAGATG | 420 | | |
| Sbjct 367 | ATAGCACAGGCCCAGGTCGAAAAGATGGGTATCGACTTGTGGTTAATGATGCCAAGATG | 426 | | |
| Query 421 | GGCGCACAGTCTGTGTAACCTGCACATTCACTGACTTGTGAGGCCAGCAGCTGCAGTG | 480 | | |
| Sbjct 427 | GGCGCACAGTCTGTGTAACCTGCACATTCACTGACTTGTGAGGCCAGCAGCTGCAGTG | 486 | | |
| Query 481 | CACCTTGCCTAAACCTGCCAGCTGGCCAAGGACCAAGCCCTGGATGCTTGGACGGAGAA | 540 | | |
| Sbjct 487 | CCACCTTGCCTAAACCTGCCAGCTGGCCAAGGACCAAGCCCTGGATGCTTGGACGGAGAA | 546 | | |
| Query 541 | TGGAAAAAGGAACCTTGTGGTGTTAA | 566 | | |
| Sbjct 547 | TGGAAAAAGGAACCTTGTGGTGTTAA | 572 | | |

图3 基因测序结果与 Hint2 基因序列对比

物技术信息中心网站数据库^[9]进行对比,结果显示第24和237位点发生了突变。转录翻译后的氨基酸序列比对结果见图4,未发现氨基酸位点突变。因此,确定该质粒表达的蛋白质为Hint2蛋白。

2.4 质粒转染细胞后 Hint2 基因 mRNA 表达变化 质粒构建后转染 BEL-7402 细胞,在显微镜下观察细胞生长状态良好、结构清晰无细菌污染。Real-Time PCR 结果显示转染后 BEL-7402 细胞中 Hint2 基因 mRNA 水平显著升高,对照组(转染空载质粒) RQ 值为 0.7268 ± 0.1433 ,实验组(转染 Hint2 过表达质粒) RQ 值为 3.177 ± 0.2005 ,差异有统计学意义 ($t=9.219$, $P=0.0003$),见图5。

2.5 质粒转染细胞后 Hint2 蛋白表达变化 使用化学发光扫描仪自带软件对电泳条带进行灰度分析,以细胞中 Hint2 蛋白与 GAPDH 蛋白灰度值的比值作

为衡量蛋白相对表达水平的标准。结果显示对照组细胞与实验组细胞 Hint2 蛋白的相对表达水平分别为 0.51 ± 0.07 和 1.12 ± 0.09 ,差异有统计学意义 ($t=6.75$, $P=0.021$),见图6。

2.6 Hint2 蛋白与线粒体共定位 使用带绿色荧光的 MitoTracker 对细胞线粒体进行染色,同时使用红色荧光对 Hint2 蛋白进行染色,染色后发现红色荧光与绿色荧光重合,说明质粒表达的蛋白定位于线粒体发挥作用,见图7。

2.7 划痕愈合实验检测 Hint2 基因过表达对肝癌细胞 BEL-7402 迁移的影响 转染 Hint2 过表达质粒的细胞在24小时后细胞迁移距离为 $(161.4 \pm 21.79) \mu\text{m}$,显著低于对照组的 $(300.8 \pm 22.11) \mu\text{m}$,差异有统计学意义 ($t=4.492$, $P=0.002$),表明 BEL-7402 细胞的迁移能力与 Hint2 表达量呈负相关,见图8。

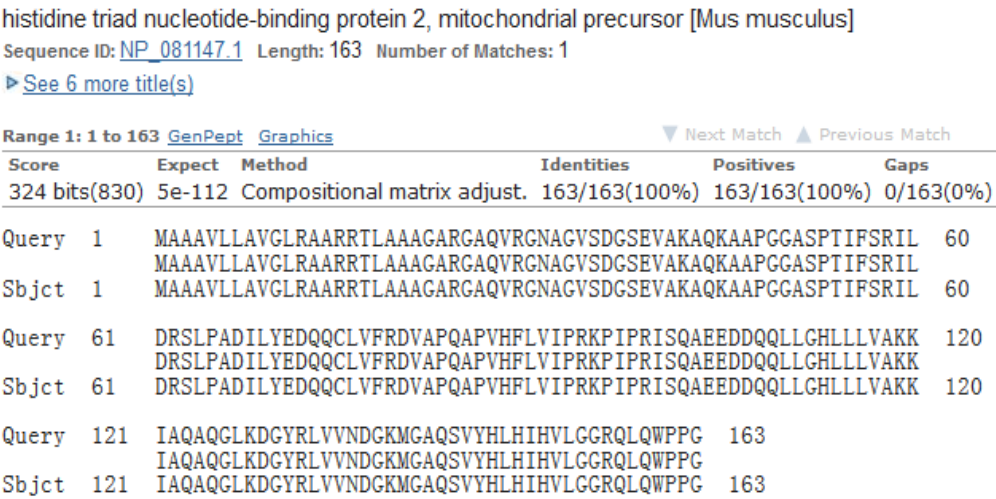


图4 蛋白序列与 Hint2 蛋白序列对比

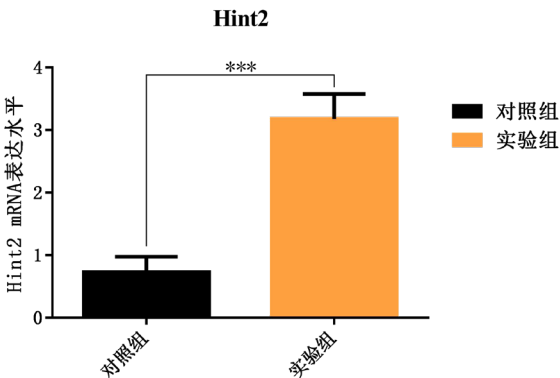


图5 质粒转染细胞后 Hint2 基因 mRNA 的表达

注: 对照组转染空载质粒, 实验组转染 Hint2 过表达质粒, 转染 Hint2 过表达质粒后, 细胞内 Hint2 mRNA 表达水平显著上升 ($t=9.219$, $P=0.0003$)

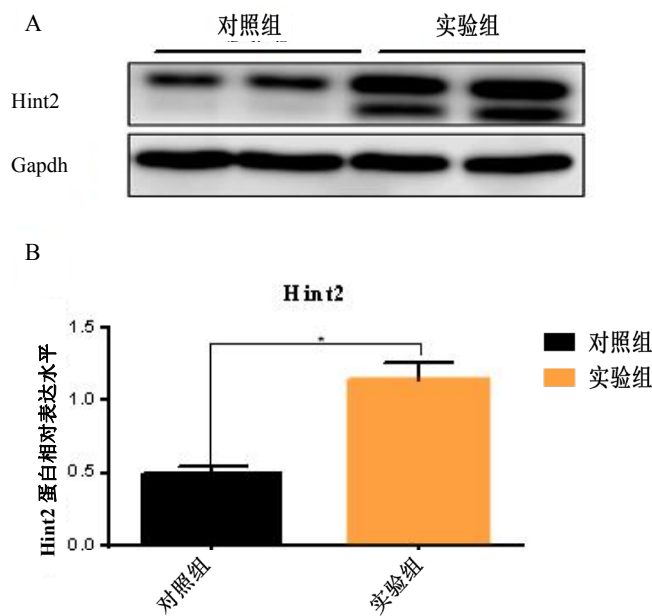


图 6 Western blot 检测细胞 Hint2 蛋白表达

注：A 为 Western blot 实验结果，对照组转染空载质粒，实验组转染 Hint2 过表达质粒；B 为 Western blot 统计结果，实验组 Hint2 蛋白表达量显著上调 ($t = 6.75$, $P = 0.021$)

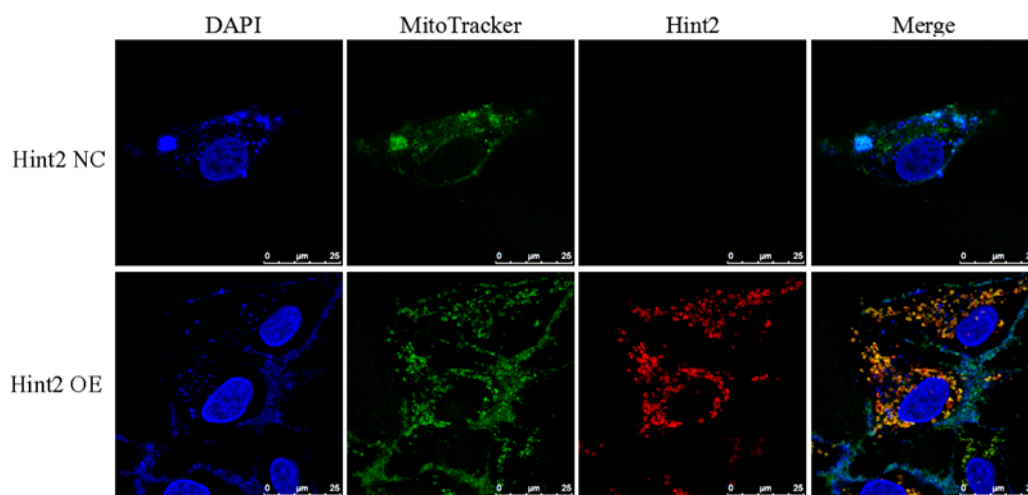


图 7 免疫荧光对线粒体和 Hint2 蛋白的共定位

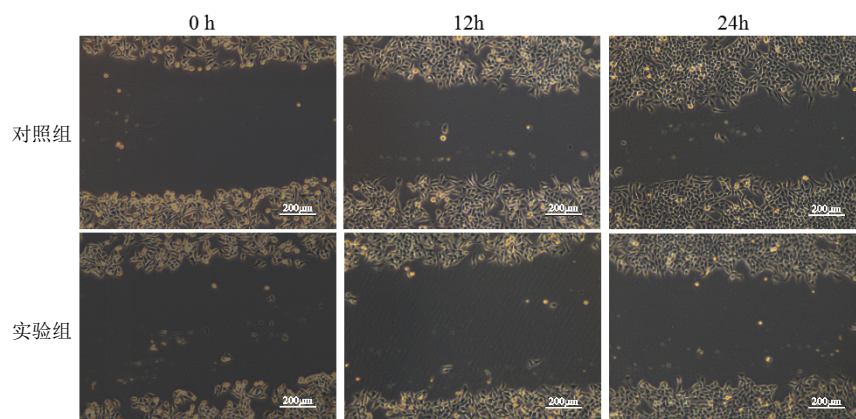


图 8 BEL-7402 细胞划痕实验

3 讨论

Hint蛋白家族即组氨酸三联蛋白家族,所有Hint家族成员都具有His-X-His-X-His-XX的相似序列^[10],这一序列经修饰后形成蛋白质与核酸结合、水解和转移的结合位点^[11]。若三联体中央组氨酸残基突变会使蛋白自动酶解失活。Hint2蛋白是Hint蛋白家族中的重要一员,是包含163个氨基酸残基的蛋白质,分子量约为17 kD^[12]。有文献报道Hint2与Hint1有61%序列同源,与Hint3有28%序列同源^[13]。Hint2蛋白在脑、肝脏和胰腺等细胞中均有表达^[14],但在肝脏中表达量最高^[15],而且主要定位在细胞线粒体内膜上发挥作用^[16]。近年研究显示Hint2可抑制肿瘤增殖,下调Hint2表达量可增强肿瘤细胞的增殖和迁移能力^[17]。Hint2可通过线粒体途径诱发肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤的增殖,并在控制肿瘤迁移过程中发挥重要作用^[18-20]。

本实验采用PubMed所提供的Hint2基因序列设计引物,经PCR扩增后采用EcoR I和BamH I双酶切将目的基因序列插入pcDNA3.1质粒中,构建了Hint2过表达质粒,将质粒转入DH5 α 感受态细胞进行阳性筛选和扩增,提取质粒后进行测序,结果显示Hint2基因插入pcDNA3.1质粒中,质粒构建成功。转染BEL-7402人肝癌细胞后对细胞mRNA和蛋白表达水平进行检测,发现实验组与对照组相比Hint2表达量显著升高,共定位结果显示质粒表达的蛋白质最终定位于线粒体发挥作用。划痕愈合实验表明过表达Hint2的BEL-7402细胞与对照组细胞相比迁移速率显著减慢。

本研究表明,构建的Hint2过表达质粒可上调BEL-7402细胞Hint2蛋白表达量,过表达的Hint2蛋白定位于细胞线粒体发挥作用,使肿瘤细胞的迁移能力受到限制。本研究结果为深入探讨Hint2过表达并影响肿瘤细胞代谢的分子机制奠定了基础,并为肝肿瘤的基因治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] 晁旭,赵家荣,张艳芳. 肝癌干细胞表面标志物及其在临床诊疗中的应用研究进展[J]. 转化医学杂志,2018,7(2):125-128.
- [2] 郭娜,赵瑞君,程璟霞. 抗菌肽对肝癌多药耐药细胞Bel-7402/ADM增殖和耐药性影响[J]. 中国公共卫生,2018,34(5):1-5.
- [3] Chen L, Sun Q, Zhou D et al. HINT2 triggers mitochondrial Ca²⁺ influx by regulating the mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU) complex and enhances gemcitabine apoptotic effect in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett,2017,411:106-116.

- [4] 倪升丽,胡富勇,李增,等. TMEM88真核表达质粒的构建及其功能研究[J]. 安徽医科大学学报,2017,52(6):839-842.
- [5] 徐瑞敏,陈志康,甘惠玲,等. 过表达STAT1与CD74CD44促进结肠癌细胞粘附和迁移的相关性[J]. 实用癌症杂志,2017,32(7):1094-1098.
- [6] 贾三三,李婷,白欣艳,等. 丝氨酸/精氨酸蛋白特异激酶2基因真核表达质粒的构建及其对HeLa细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2016,29(5):463-468.
- [7] 胡晓云,陈锦章,廖毓菁,等. 过表达富组氨酸糖蛋白在体外抑制MHCC-97H肝癌细胞增殖[J]. 实用肝脏病杂志,2014,17(6):632-635.
- [8] 温丽敏,白欣艳,王玉晶,等. 小鼠丝氨酸/精氨酸蛋白特异激酶2基因真核重组表达质粒的构建及其对微管蛋白聚合的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2017,30(8):800-805.
- [9] 马浩洁,冯婉迪,盖聪,等. Parkin基因过表达质粒和细胞模型的构建[J]. 现代生物医学进展,2018,18(3):407-412.
- [10] Brenner C, Bieganowski P, Pace HC, et al. The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins[J]. J Cell Physiol,1999,181(2):179-187.
- [11] Brenner C. Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases[J]. Biochemistry, 2002,41(29):9003-9014.
- [12] Bretes E, Wojdyla-Mamoń AM, Kowalska J, et al. Hint2, the mitochondrial nucleoside 5'-phosphoramidate hydrolase; properties of the homogeneous protein from sheep (Ovis aries) liver[J]. Acta Biochim Pol,2013,60(2):249-254.
- [13] Maize KM, Wagner CR, Finzel BC. Structural characterization of human histidine triad nucleotide-binding protein 2, a member of the histidine triad superfamily[J]. FEBS J,2013,280(14):3389-3398.
- [14] Dolot R, Włodarczyk A, Bujacz GD, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human histidine triad nucleotide-binding protein 2 (hHINT2)[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun,2013,69(Pt 7):783-787.
- [15] Ndiaye D, Collado-Hilly M, Martin J, et al. Characterization of the effect of the mitochondrial protein Hint2 on intracellular Ca²⁺ dynamics[J]. Biophys J,2013,105(5):1268-1275.
- [16] Lenglet S, Antigny F, Vetterli L, et al. Hint2 is expressed in the mitochondria of H295R cells and is involved in steroidogenesis[J]. Endocrinology,2008,149(11):5461-5469.
- [17] Li W, Cai S, Wang L, et al. HINT2 downregulation promotes colorectal carcinoma migration and metastasis[J]. Oncotarget,2017,8(8):13521-13531.
- [18] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell,2011,144(5):646-674.
- [19] Martin J, Magnino F, Schmidt K, et al. Hint2, a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology,2006,130(7):2179-2188.
- [20] Lee LR, Teng PN, Nguyen H et al. Progesterone enhances calcitriol antitumor activity by upregulating vitamin D receptor expression and promoting apoptosis in endometrial cancer cells[J]. Cancer Prev Res (Phila),2013,6(7):731-743.

收稿日期: 2018-04-26

李奇萌,林国南. Hint2基因过表达质粒的构建及其对肝癌细胞BEL-7402迁移的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018,10(3):1-6.