

传世逆甲片对肿瘤早筛基因甲基化的抑制作用

杨未名¹, 於洪建², 范冬辉², 李赫宇², 王立辉^{1*}, 吴春福^{1*}

1. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院 药理系, 辽宁 沈阳 110016

2. 天津药食同源健康产业有限公司, 天津 300457

摘要: **目的** 探讨以多酚类天然产物为组方的传世逆甲片对肿瘤早筛基因甲基化的干预调控作用特点。**方法** 采用甲基化特异性定量聚合酶链式反应 (qMSP), 针对从文献中筛选得到的肿瘤早筛基因波形蛋白 (VIM)、前列腺素 E 受体 4 (PTGER4)、矮小同源盒基因 (SHOX2)、骨形态发生蛋白 3 (BMP3)、胞裂蛋白 9 (SEPT9) 基因, 设计甲基化特异性引物。选取肺癌 NCI-H446 细胞作为研究对象, 分别经 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的姜黄素、茶多酚、茶色素、传世逆甲片和 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 5-氮杂胞苷作用后, 提取全基因组 DNA, 得到其基因的启动子区的甲基化相对值。**结果** 多酚类天然产物姜黄素和 5-氮杂胞苷对 PTGER4、SHOX2、SEPT9 的启动子甲基化具有抑制作用, 而茶色素对 PTGER4、BMP3、SHOX2、SEPT9 基因启动子的甲基化具有促进作用, 传世逆甲片对 SHOX2 和 SEPT9 甲基化抑制作用最强。**结论** 传世逆甲片及其含有的多酚类物质能够抑制肿瘤早期筛查基因甲基化水平, 干预调控肿瘤早筛基因甲基化作用。

关键词: 传世逆甲片; 姜黄素; 茶多酚; 茶色素; 肿瘤早筛基因; 甲基化

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)12-2687-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.12.003

Inhibitory effect of polyphenolic agents and Nijia (TRANS-ME) Recipe on methylation of early tumor screening genes

YANG Wei-ming¹, YU Hong-jian², FAN Dong-hui², LI He-yu², WANG Li-hui¹, WU Chun-fu¹

1. Department of Pharmacy, School of Life Sciences and Biopharmaceutical, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Tianjin Yaoshitongyuan Health Industry Co., Ltd, Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Nijia (TRANS-ME) Recipe, which is grouped with polyphenolic natural products, on methylation of early tumor screening genes, and to provide an experimental basis for the study of natural polyphenols in tumor prevention. **Methods** Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction (qMSP) was used. Methylation-specific primers were designed for the early tumor screening genes VIM, PTGER4, SHOX2, BMP3, and SEPT9 genes obtained from literature screening. Lung cancer NCI-H446 cells were selected for the study, after being treated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ curcumin, tea polyphenol, tea pigment, Nijia (TRANS-ME) Recipe, and 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 5-azacytoside, whole genomic DNA was extracted, and then the relative methylation values of the promoter regions of their genes were obtained. **Results** Curcumin and 5-azacytoside inhibit the promoter methylation of PTGER4, SHOX2 and SEPT9, while tea pigment promotes the promoter methylation of PTGER4, BMP3, SHOX2, and SEPT9. The methylation inhibition of Nijia (TRANS-ME) Recipe of SHOX2 and SEPT9 was strongest. **Conclusion** Nijia (TRANS-ME) Recipe and the polyphenols contained in them can inhibit the methylation level of tumor early screening genes and regulate the methylation of tumor early screening genes.

Key words: Nijia (TRANS-ME) Recipe; curcumin; tea polyphenols; tea pigment; early tumor screening genes; methylation

癌症成为造成人类死亡的第二大原因, 乳腺癌、结直肠癌、肺癌等每年造成的死亡人数逐年增加^[1]。癌症晚期患者的死亡率明显高于早期诊断的患者, 随着全民健康意识的普及, 肿瘤早筛技术逐

收稿日期: 2022-06-30

作者简介: 杨未名, 女, 硕士, 研究方向为肿瘤药理。E-mail: weiming77939@163.com

*通信作者: 王立辉, 男, 教授, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: lhwang@syphu.edu.cn

吴春福, 男, 教授, 研究方向为药理学。E-mail: wucf@syphu.edu.cn

渐兴起。现如今,无创或微创的肿瘤早筛产品逐步步入市场。波形蛋白(VIM)、前列腺素 E 受体 4 (PTGER4)、矮小同源盒基因(SHOX2)、骨形态发生蛋白 3 (BMP3)、胞裂蛋白 9 (SEPT9) 等基因在无创和微创的肿瘤早筛检测中发挥重要作用,血液或粪便中上述基因启动子的甲基化成为癌症早期发展的重要标志物^[2]。

传世逆甲片是由茶叶等植物浓缩提取得到的多酚类混合物[表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) > 15%]。内含的多种多酚类物质均被报道具有潜在的干预调控肿瘤发生发展的作用。多酚被定义为具有至少 1 个芳香环和 1 个或多个羟基官能团的化合物,而天然多酚是指一类从小分子到高聚合化合物的植物次生代谢产物^[3]。天然多酚的抗癌功效在很大程度上归因于其强大的抗氧化和抗炎活性以及调节分子靶标和信号通路的能力^[4],这些功能可以进一步影响细胞生存、增殖、分化、迁移、血管形成、激素活性、解毒酶活性以及微环境中的免疫反应等^[5-6]。为此本研究以传世逆甲片与已报道的姜黄素、茶多酚、茶色素等单体多酚成分,以及临床用药 5-氮杂胞苷对照为研究对象,通过其对 VIM、PTGER4、SHOX2、BMP3、SEPT9 这 5 个肿瘤早筛基因甲基化的干预调控程度判断其预防肿瘤的可能作用,为多酚类物质预防癌症发生发展的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人小细胞肺癌细胞系 NCI-H446 购自美国模式培养物集存库。

1.2 试剂和仪器

传世逆甲片(茶叶等浓缩提取物 EGCG 质量分数 ≥ 15%,天津药食同源健康产业有限公司,生产批号:20210919-01),姜黄素(质量分数 95%,无锡市世纪生物工程有限公司,生产批号 211001),茶多酚(质量分数 98%,无锡市世纪生物工程有限公司,生产批号 211201),茶色素(无锡市世纪生物工程有限公司,生产批号 CSS20211101),5-氮杂胞苷(美国 MCE,生产批号 HY-10586)。

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司,批号 DP304),Methylamp™ DNA Modification 试剂盒(美国 Epigentek 公司,批号 P-1001),Methylamp™ MS-qPCR 试剂盒(美国 Epigentek 公司,批号 P-1028),RPMI-1640 培养液

(美国 Gibco 公司,批号 8121716),磷酸盐缓冲液(美国 Gibco 公司,批号 8121586),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 2059458CP),0.25%胰酶(美国 Gibco 公司,批号 2323661),青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司,批号 15140163),二甲基亚砜(美国 Sigma 公司,批号 D2650),qMSP 反应引物(上海生工生物工程技术有限公司)。

qPCR 仪(美国 Bio Rad 公司),细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),高速低温离心机(美国 Thermo Scientific 公司),分析天平(德国 Sartorius 公司),可调式移液器(美国 Thermo Scientific 公司),细胞冻存盒(美国 Nalgene 公司),纯水仪(德国 Millipore 公司),-80 °C 冰箱(美国 Thermo Scientific 公司),液氮生物容器(成都金凤公司),水浴锅(德国 Julabo 公司),超净工作台(美国 Thermo Scientific 公司),NanoDrop™2000 分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及给药

将人肺癌 NCI-H446 细胞培养在 37 °C、饱和湿度、含 5% CO₂ 培养箱中,1640 培养基中含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素,每 2~3 天换液 1 次。待细胞生长至 70% 融合时传代培养,取第 4~7 代对数生长期细胞,待细胞生长至 40% 融合时加入终质量浓度为 20 μg/mL 姜黄素、茶多酚、茶色素、传世逆甲片和终浓度为 2 μmol/L 的 5-氮杂胞苷,作用 48 h。

2.2 基因组 DNA 的提取

采用 DNA 提取试剂盒。贴壁细胞处理成细胞悬液,10 000 r/min 离心 1 min,吸去上清,加入 200 μL 悬浮缓冲液,震荡或用移液枪吹至悬浮。之后加入 20 μL 蛋白酶 K,混匀,之后加入 200 μL 缓冲液 GB,充分颠倒混匀,70 °C 放置 10 min,离心。加入 200 μL 无水乙醇,充分震荡混匀 15 s,离心去除内壁水珠。将上述所得溶液加进吸附柱 CB3 中,12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液。向柱 CB3 中加入 500 μL 缓冲液柱清洗缓冲液,12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液。向吸附柱 CB3 中加入 600 μL 漂洗液,12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置一段时间,目的是将吸附材料中残余的漂洗液晾干。转移吸附柱 CB3 至干净的离心管,加入 50~200 μL 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2~5 min,12 000 r/min 离心 2 min,将溶液收集到离心

管中。所得基因组 DNA 用 NANODROP 分光光度计测得浓度，为后续研究做准备。

2.3 亚硫酸氢盐转化

采用 Epigentek 公司 Methylamp™ DNA Modification Kit 进行亚硫酸氢盐转化。向 1 瓶亚硫酸氢盐粉末中加入 1.1 mL 缓冲溶液。涡旋，直到溶液清澈或饱和（约 2 min）。向该溶液中加入 40 μL DNA 保护试剂，轻轻涡旋。将以上混合溶液备用。将 2.2 中所得的基因组 DNA 样品和蒸馏水加入到 1.5 mL 管中，总体积为 24 μL ，混合均匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。将之前的混合溶液 125 μL 加入到样品中，涡旋。在 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min。孵育完成后，将离心柱放入 2 mL 的收集管中。样品中加入 300 μL 的 DNA 捕获试剂，混合，转移到柱中。12 000 r/min 离心 15 s，丢弃液体。向离心柱中加入 200 μL 的柱清洗试剂，12 000 r/min 离心 15 s。将 10 μL DNA 保护试剂加入到装有 1.1 mL 90%乙醇的离心管中，混合。将混合的 R1 - 乙醇溶液 50 μL 加入柱中；室温下静置 8 min，12 000 r/min 离心 15 s。

向柱中加入 200 μL 90%的乙醇，12 000 r/min 离心 15 s 柱，丢弃液体。将柱子重新放在收集管中，另外加入 200 μL 90%乙醇到柱中，12 000 r/min 离心 35 s。将柱放入 1 个 1.5 mL 的新离心管中，加入 8~18 μL DNA 洗脱试剂，12 000 r/min 离心 20 s，洗脱修饰后的 DNA。修饰后的 DNA 现可进行甲基化扩增或在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 2 个月。

2.4 甲基化特性

结合文献筛选到 VIM、SEPTIN9、PTGER4、SHOX2、BMP3 肿瘤早筛相关基因，根据 qMSP 引物设计原则和方法^[7]，应用 MethPrimer 网页工具 (<http://www.urogene.org/methprimer/>) 设计好相应的引物，见表 1。qMSP 反应体系及程序见表 2，反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 、7 min，循环：95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min \rightarrow 55 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 、8 min，延伸：72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min。

2.5 统计方法

qPCR 实验得到原始 ΔC_q 值，经根据 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_q}$ 值计算相对表达量数值 (relative expression)。以未加药组为空白为对照组，5-氮杂胞苷为阳性药物，采用 R 语言 (4.1.3 版本) 作层次聚类分析获得热图。

3 结果

3.1 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 PTGER4 甲基化的作用

与对照组相比，除茶色素外，5-氮杂胞苷、姜

表 1 qMSP 引物序列

Table 1 qMSP primer sequences

引物名称	序列 (5'→3')
VIM_MSP_M-F	GGCGGGGATTTTGTAAAGAAAAATTTTTC
VIM_MSP_M-R	TCTACAACCTTTAAAAAACGCCAATACGTA
SEPT9_MSP_M-F	TTATTATGTCGGATTCGCGGTTAAC
SEPT9_MSP_M-R	AAAATCCTCTCCAACACGTCCG
BMP3_MSP_M-F	TTTAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTC
BMP3_MSP_M-R	CGCGACCGAATACAACGAAATAACGA
PTGER4_MSP_M-F	AGTTGGGGATTAAGGTTTCG
PTGER4_MSP_M-R	AACTTTACAATACCCGCCGAT
SHOX2_MSP_M-F	CGTACGAGTATAGGCGTTTACG
SHOX2_MSP_M-R	AAAACGATTACTTTCGCCCG

表 2 qMSP 反应体系

Table 2 qMSP reaction system

成分	溶液体积/ μL	终浓度
甲基化 PCR 预混液(2 \times)	10	1 \times
前引物	1	0.4~0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
后引物	1	0.4~0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
DNA 模板	1~2	50 pg~0.1 μg
无酶水	6~7	—
总体积	20	—

黄素、茶多酚、传世逆甲片对 PTGER4 启动子的甲基化均具有抑制作用 ($P<0.05$)，见图 1。

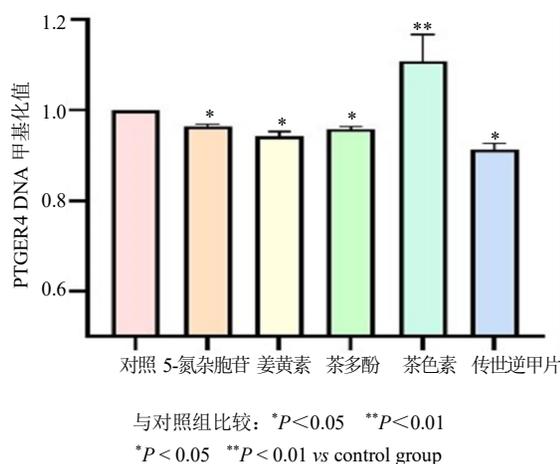


图 1 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 PTGER4 甲基化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of transmitted Nijia (TRANS-ME) Recipe and polyphenols on the DNA methylation of tumor early screening gene PTGER4 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 VIM 甲基化的作用

与对照组相比，茶色素、茶多酚、姜黄素、传世逆甲片对 VIM 启动子甲基化具有显著的抑制作用 ($P<0.05$)，见图 2。

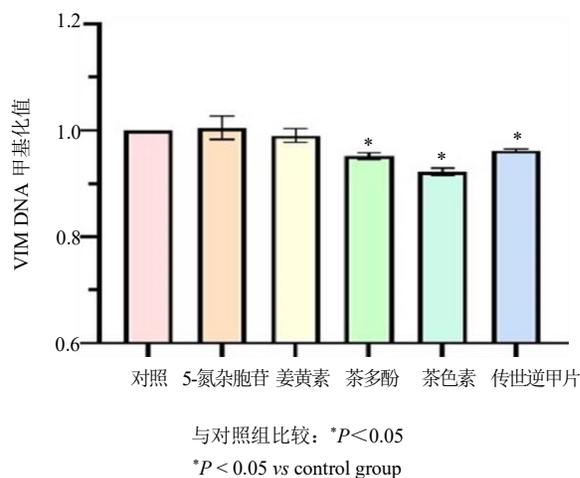


图 2 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 VIM 甲基化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of transmitted Nijia (TRANS-ME) Recipe and polyphenols on the DNA methylation of tumor early screening gene VIM ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 BMP3 甲基化的作用

与对照组相比, 5-氮杂胞苷、姜黄素、茶色素对 BMP3 甲基化具有促进作用 ($P < 0.05, 0.01$)。茶多酚和传世逆甲片对 BMP3 甲基化具有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 见图 3。

3.4 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 PTGER4 甲基化的作用

与对照组相比, 5-氮杂胞苷、姜黄素、茶多酚、

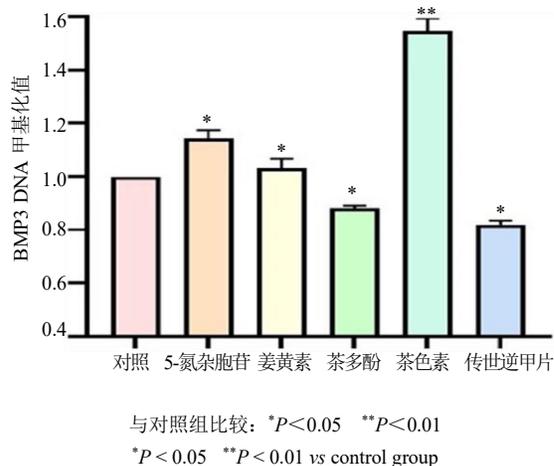


图 3 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 BMP3 甲基化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of transmitted Nijia (TRANS-ME) Recipe and polyphenols on the DNA methylation of tumor early screening gene BMP3 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

传世逆甲片对 SHOX2 和 SEPT9 甲基化均具有显著抑制作用 ($P < 0.05, 0.01$); 而茶色素对 SHOX2 和 SEPT9 甲基化均具有促进作用 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 4。

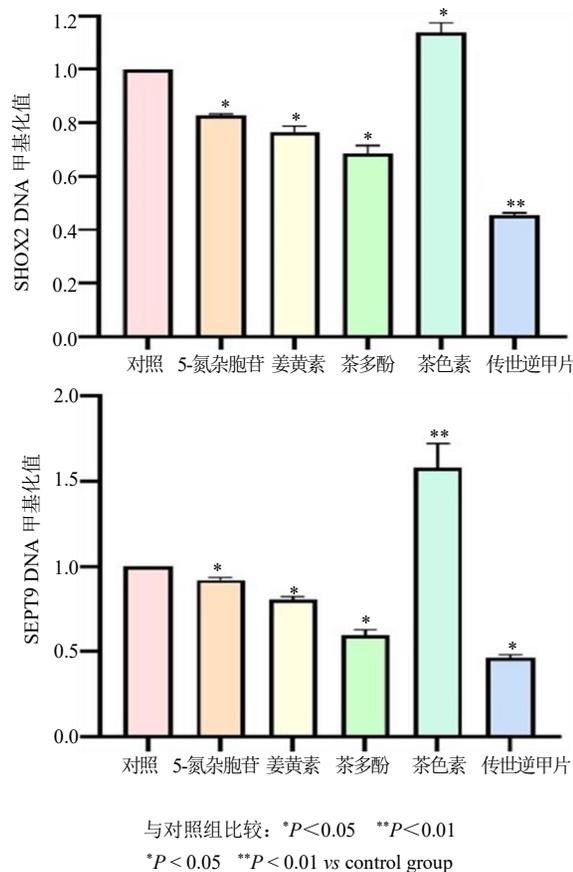


图 4 传世逆甲片及多酚类物质对肿瘤早筛基因 SHOX2 和 SEPT9 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of transmitted Nijia (TRANS-ME) Recipe and polyphenols on the DNA methylation of tumor early screening gene SHOX2 and SEPT9 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 传世逆甲片及多酚类物质对 5 个肿瘤早筛基因甲基化作用的聚类分析结果

根据层次聚类的结果显示, 茶多酚对 5 个肿瘤早筛基因的甲基化抑制模式与传世逆甲片最相似, 都具有明显抑制作用。姜黄素和 5-氮杂胞苷对部分早筛基因 (PTGER4、SHOX2、SEPT9) 的启动子甲基化具有抑制作用, 而茶色素对 PTGER4、BMP3、SHOX2、SEPT9 基因启动子的甲基化具有促进作用, 见图 5。

4 讨论

癌症是威胁人类生命健康的重要因素, 早期癌症筛查能够有效降低患者的死亡率, 提高其生活质量, 降低家庭负担。近年来, 随着对肿瘤表观遗传

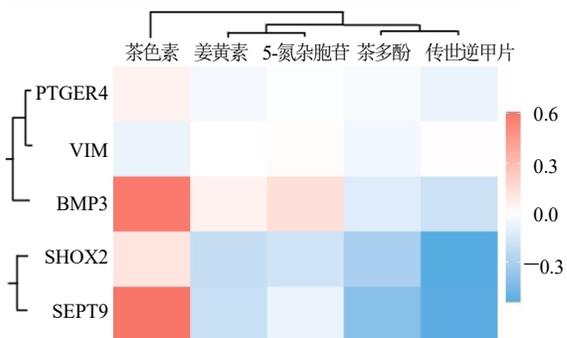


图 5 传世逆甲片及多酚类物质处理后肿瘤早筛基因甲基化水平层次聚类分析热图

Fig. 5 Heat map for hierarchical clustering analysis of gene methylation levels in early screening of tumor after treatment with transmitted inverse Nijia (TRANSM-E) Recipe and polyphenols

学的深入认知, 研究人员已开发出多种肿瘤相关基因甲基化试剂盒应用于肿瘤早筛, 对于肿瘤的早期诊断发挥重要作用。然而, 对于这些肿瘤早筛基因如何干预至今报道还很少。因为肿瘤早筛基因往往具有一定的生物学功能, 对这些基因的早期干预方式的研究对于肿瘤的预防可能具有一定的作用。传世逆甲片是多酚类物质的混合成分, 主要是茶叶提取物, 与姜黄素、茶多酚、茶色素等常见多酚类物质比较, 对肿瘤早筛基因有较强的抑制作用, 其机制可能与药物对人体内 DNA 甲基转移酶的抑制作用有关。探索多酚类物质对肿瘤早筛基因启动子甲基化的作用, 有利于发现癌症早期预防的有效措施, 为天然产物的癌症早期预防作用提供一定理论基础。

DNA 甲基转移酶包括 DNMT3A、DNMT3B、DNMT1 等, 细胞在不同模式下基因的启动子甲基化与 DNA 甲基转移酶的活性功能密切相关。基因启动子的甲基化程度升高, 往往伴随该基因表达量的下降。研究证明, 多酚类物质姜黄素等可以通过调控表观调控 DNMT3A、DNMT3B, 影响 mTOR 等促癌基因启动子的甲基化水平, 使 mTOR 的表达降低, 影响细胞自噬等肿瘤生物学特性^[8-10], 这说明多酚类物质可能具有调控肿瘤早筛基因甲基化的作用。为此, 本研究探索了传世逆甲片及几种多酚类物质对于肿瘤早筛基因甲基化水平的影响。研究选择了作为早诊试剂盒中的相关基因, 包括 VIM、PTGER4、SHOX2、BMP3、SEPT9。PTGER4 作为一种 G 蛋白耦连受体在多种癌症早期发展中发挥作用, 能够介导细胞中多个 G 蛋白耦连受体信号通

路。VIM 起到支持细胞形态的作用, 在癌症早期常作为肿瘤筛查标记物在血液中被检出。BMP3 能够抑制成骨细胞分化, 负向调节骨密度, 也是肿瘤早筛的重要标志物之一。SHOX2 和 SEPT9 在肺癌和结肠癌的早期筛查中发挥重要作用, 分别调控器官发育和细胞的周期进程。这些基因在功能机制上与肿瘤的发生发展具有一定关系^[11-15]。

本研究发现姜黄素、茶多酚对 5 种肿瘤早筛基因甲基化均具有抑制作用, 但抑制强度较弱。茶色素对 VIM 甲基化具有抑制作用。传世逆甲片对 5 种肿瘤早筛基因中的 PTGER4、SHOX2、BMP3、SEPT9 甲基化具有显著的抑制作用, 对 SHOX2 和 SEPT9 甲基化抑制作用最强。结果说明, 多酚类物质在调控肿瘤早筛基因甲基化方面具有相似性。

在癌症发展不同阶段, 肿瘤细胞的 DNA 甲基化模式不同, 意味着甲基化下游影响的基因表达量可能具有差异, 差异基因在癌症的发生发展过程中所起到的作用也会有所变化^[16]。多酚类物质能够抑制癌症早期阶段相应基因的 DNA 甲基化, 意味其对癌症早期的发生发展具有潜在的预防和治疗价值。随着癌症早筛基因的生物学的深入, 天然产物在抗癌领域的发展将会进入新的阶段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [2] 曹雷, 郭利娟, 郭晓锦, 等. 癌症液体活检新思路: 数字 PCR 检测 DNA 甲基化 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2019, 46(11): 1085-1100.
- [3] Adornetto A, Rombolà L, Morrone L A, *et al.* Natural products: Evidence for neuroprotection to be exploited in glaucoma [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 3158.
- [4] 张焕金, 蔡林儿. 绿茶提取物茶多酚抗癌作用的研究进展 [J]. 华南国防医学杂志, 2012, 26(5): 522-523.
- [5] Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, *et al.* Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 686.
- [6] Sajadimajd S, Bahramsoltani R, Iranpanah A, *et al.* Advances on natural polyphenols as anticancer agents for skin cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 151: 104584.
- [7] Pajares M J, Palanca-Ballester C, Urtasun R, *et al.* Methods for analysis of specific DNA methylation status [J]. *Methods*, 2021, 187: 3-12.
- [8] Chen T C, Chuang J Y, Ko C Y, *et al.* AR ubiquitination

- induced by the curcumin analog suppresses growth of temozolomide-resistant glioblastoma through disrupting GPX4-mediated redox homeostasis [J]. *Redox Biol*, 2020, 30: 101413.
- [9] Satar A N, Ismail M N, Yahaya B H. Synergistic roles of curcumin in sensitising the cisplatin effect on a cancer stem cell-like population derived from non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1056.
- [10] Chen J, Ying Y, Zhu H, *et al.* Curcumin-induced promoter hypermethylation of the mammalian target of rapamycin gene in multiple myeloma cells [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 1108-1114.
- [11] Ridge K M, Eriksson J E, Pekny M, *et al.* Roles of vimentin in health and disease [J]. *Genes Dev*, 2022, 36(7-8): 391-407.
- [12] Shoji Y, Takahashi M, Kitamura T, *et al.* Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development [J]. *Gut*, 2004, 53(8): 1151-1158.
- [13] Li N, Zeng Y, Huang J. Signaling pathways and clinical application of RASSF1A and SHOX2 in lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(6): 1379-1393.
- [14] Wen J, Liu X, Qi Y, *et al.* BMP3 suppresses colon tumorigenesis via ActRIIB/SMAD2-dependent and TAK1/JNK signaling pathways [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 428.
- [15] Scott M, McCluggage W G, Hillan K J, *et al.* Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(5): 1325-1329.
- [16] Liu M C, Oxnard G R, Klein E A, *et al.* Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(6): 745-759.

[责任编辑 高源]