

LZTS2 启动子 DNA 区域异常高甲基化与 乙肝源性肝细胞癌的关系研究*

刘彦明¹, 曹越², 何珊³, 张健¹, 吴良银¹, 蔡文灿¹

(1. 粤北人民医院检验科, 广东韶关 512026; 2. 韶关学院医学院医学技术系, 广东韶关 512026; 3. 南方医科大学检验学院, 广州 510515)

[摘要] **目的** 探讨 LZTS2 启动子基因 DNA 甲基化水平与乙肝源性肝细胞癌的关系。**方法** 采用甲基化特异性 PCR(MS-PCR)和非甲基化特异性 PCR(UMS-PCR)法检测 40 例健康体检者和各 50 例的慢性乙型肝炎(CHB 组)、乙肝源性肝硬化(LC 组)和乙肝源性肝细胞癌(HCC 组)患者的外周血 LZTS2 启动子区域甲基化水平。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用 Image J 软件分析 MS-PCR 条带灰度值(M)和 UMS-PCR 条带的灰度值(U),免疫组织化学技术分析 32 例乙肝源性肝细胞癌癌组织与癌旁组织中 LZTS2 的表达水平。**结果** NC 组、CHB 组、LC 组、HCC 组的 M 分别为 198.00 ± 46.65 、 255.32 ± 50.34 、 425.32 ± 105.45 、 715.32 ± 188.46 ,除 NC 组与 CHB 组之间差异无统计学意义外($P > 0.05$),其他组之间差异明显($P < 0.05$)。HCC 组肝癌组织中 LZTS2 表达量(0.13 ± 0.05)明显低于癌旁组织(0.34 ± 0.12),差异有统计学意义($P < 0.05$)。HCC 组 Edmondson-Steiner 分级 III~IV 级 M(771.92 ± 85.34)明显高于 I~II 级(605.44 ± 68.06),差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 随着慢性乙型肝炎-肝硬化-肝癌的进程演变,LZTS2 启动子区域甲基化程度逐渐增加,且与肝癌的 Edmondson-Steiner 分级呈正相关。

[关键词] 亮氨酸拉链肿瘤抑制因子 2;重亚硫酸氢盐;甲基化特异性 PCR;DNA 甲基化

[中图分类号] R446.11+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)11-1804-05

Study on the relationship between abnormal DNA hypermethylation of LZTS2 promoter region and hepatitis B-related hepatocellular carcinoma*

LIU Yanming¹, CAO Yue², HE Shan³, ZHANG Jian¹, WU Liangyin¹, CAI Wencan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 2. Department of Medical Technology, Shaoguan Medical College, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 3. Department of Medical Examination, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between abnormal hypermethylation of LZTS2 promoter region and hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. **Methods** Methylation specific PCR (MS-PCR) and un-methylation specific PCR (UMS-PCR) were used to detect the methylation level of LZTS2 promoter region in peripheral blood of 40 healthy patients, 50 patients with chronic hepatitis B (CHB group), 50 patients with hepatitis B-related liver cirrhosis (LC group) and 50 patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma (HCC group), the agar-gel electrophoresis was performed on the PCR amplification products. And the gray values of MS-PCR band (M) and UMS-PCR band (U) were analyzed by Image J software. The expression of LZTS2 postoperative resection of hepatocellular carcinoma and adjacent tissues in the 32 patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma was analyzed by immunohistochemistry. **Results** The value of M in the NC group, the CHB group, the LC group and the HCC group were 198.00 ± 46.65 , 255.32 ± 50.34 , 425.32 ± 105.45 and 715.32 ± 188.46 , respectively. Except that the difference between the NC group and the CHB group was not statistically significant ($P > 0.05$), the difference among other groups was significant ($P < 0.05$). The LZTS2 expression of hepatocellular carcinoma tissues in the HCC group was 0.13 ± 0.05 , which was significantly lower than that of paracancer tissues 0.34 ± 0.12 , the difference was significant ($P < 0.05$).

* 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(B2018262);韶关市科技局计划项目(2018sn095);韶关市卫生和计划生育委员会科研项目(Y19042, Y18087)。作者简介:刘彦明(1982-),副主任检验技师,硕士,主要从事肿瘤抑癌基因甲基化与早期诊断价值研究。

The M of hepatocellular carcinoma of edmondson-steiner III - IV (771.92 ± 85.34) was significantly higher than that of I - II (605.44 ± 68.06), the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** With the development of chronic hepatitis B-liver cirrhosis-hepatocellular carcinoma, the hypermethylation of LZTS2 promoter region gradually increased, which is positively correlated with the Edmondson-Steiner grading of hepatocellular carcinoma.

[Key words] leucine zipper suppressor 2; bisulfite; methylation specific PCR; DNA methylation

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发病率在全球癌症中居第 5 位, 病死率居第 3 位, 且 HCC 的病情进展快, 易转移, 难以早期诊断。在我国乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染与 HCC 的发生密切相关^[1]。大多经历慢性乙型肝炎-肝纤维化-肝硬化-肝癌的演变过程。近几年, 以增强抑癌基因的表达为手段, 抑制肿瘤细胞增殖和转移为目的的分子靶向治疗已成为国内外肿瘤研究的热点^[2]。因此, 寻找慢性乙型肝炎-肝纤维化-肝硬化-肝癌演变过程中的靶点基因对研究肝癌的生物学行为及控制慢性肝炎到肝癌的发生、发展具有重要意义。亮氨酸拉链肿瘤抑制因子 2 (leucine zipper suppressor 2, LZTS2) 基因是新发现的肿瘤抑癌基因, 与 PTEN 抑癌基因位置相邻^[3]。研究发现, LZTS2 启动子区域异常高甲基化与喉鳞癌、肺癌、前列腺癌、神经胶质瘤、胃癌的发生、发展及预后相关^[4], 但 LZTS2 在肝癌中的表达及生物学作用尚不明确。本研究通过检测 LZTS2 在启动子区域甲基化及肝癌组织中的表达情况, 探讨 LZTS2 启动子区域异常甲基化对乙肝源性肝细胞癌的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集粤北人民医院 2018 年 6—12 月就诊的患者, 经乙型肝炎 5 项定量 (时间分辨荧光免疫分析) 或 HBV-DNA 检测确定为 HBV 携带者, 根据其临床病情与诊断分为慢性乙型肝炎组 (CHB 组, $n = 50$)、乙肝源性肝硬化组 (LC 组, $n = 50$)、乙肝源性肝细胞癌组 (HCC 组, $n = 50$)。肝细胞癌符合全国肿瘤防治办公室与中国抗癌协会合编的《新编常见恶性肿瘤诊治规范》中有关原发性肝细胞癌的诊断标准。排除标准: (1) 合并其他类型肝炎病毒感染; (2) 由乙醇、药物引起的肝损伤; (3) 合并其他部位肿瘤。粤北人民医院体检中心健康体检者作为对照组 (NC 组, $n = 40$)。排除标准: (1) 病毒性肝炎、脂肪肝、酒精肝、药物性肝炎等肝损伤疾病; (2) 半年内有手术史; (3) 慢性病史; (4) 熬夜、饮酒、吸烟、吸毒等不良生活习惯人群; (5) 肝功能、乙型肝炎 5 项、HBV-DNA 等结果异常; (6) 自述身体不适。所有患者均有完整临床资料, 其中 HCC 组有 32 例行肝癌切除术, 留取肝癌组织和癌旁组织 (与癌组织边缘距离大于 7 cm), 且肝癌患者术前未接受过放化疗。本研究经粤北人民医院伦理委员会批准 (sunc-IRB-2018), 患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器

DNA 提取试剂盒 (D1106) 购于广州捷倍斯生物科技有限公司, 重亚硫酸盐甲基化试剂盒 (59124) 购于德国 QIAGEN 公司, 合成引物购于北京擎科新业生物技术有限公司, DL2000 DNA Marker (MD114-02) 购于日本 TaKaRa 公司, dNTPs Mixture (CD117) 购于美国 Tangen 公司, 高效 DNA 聚合酶 (Code # AP131-02) 购于北京全式金生物有限公司, 无 DNA 酶和 RNA 酶的双蒸水 (C1D230A) 购于美国 GeneCopia 公司, 电热恒温水浴锅 (HW-SY11-K P2) 购于北京长风仪器仪表公司, PCR 仪 (EDC-810) 购于北京东胜创新科技有限公司, 水平电泳仪 (JY300) 和紫外分析仪 (JY025) 购于北京君意东方电泳设备有限公司。鼠源性 LZTS2 单克隆抗体 (Ab124191) 购于美国 Abcam 公司, 羊抗鼠 IgG 抗体 (17654AB) 购于美国 Thermo 公司, DAB 显色液 (765423) 购于广州捷倍斯生物科技有限公司, 生物显微镜购于 (BX53 型) 日本 Olympus 公司。

1.2.2 重亚硫酸盐 DNA 甲基化反应

反应体系: 取外周血提取 DNA ($1 \sim 500$ ng) $40 \mu\text{L}$, 置于 0.2 mL EP 管中, 加入 Bisulfite Mix 混合液 $85 \mu\text{L}$ 、DNA Protect Buffer $15 \mu\text{L}$ 、RNase-free Water $10 \mu\text{L}$, 总体积 $150 \mu\text{L}$ 。反应条件: 变性 95°C 5 min, 孵育 60°C 25 min, 变性 95°C 5 min, 孵育 60°C 85 min, 变性 95°C 5 min, 孵育 60°C 175 min, 维持 20°C 过夜。

1.2.3 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MS-PCR) 与非甲基化特异性 PCR (un-methylation specific PCR, UMS-PCR)

MS-PCR: 上游引物 GTAGAGTTGGTG-TAGAAGGGTAGC, 下游引物 GCAACTACT-CAACTTCCTAACGAT, 产物 187 bp; UMS-PCR: 上游引物 TAGAGTTGGTG-TAGAAGGGTAGTGA, 下游引物 CCACA ACTACTCAACTTCCTAA-CAAT, 产物 188 bp。反应体系: 重亚硫酸盐处理的 DNA 模板 $2 \mu\text{L}$ 、上下游引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 $0.5 \mu\text{L}$ 、SYBR Green Master Mix $10 \mu\text{L}$ 、 $50 \times$ ROX Reference Dye $2 \times 0.5 \mu\text{L}$ 、 H_2O $6.5 \mu\text{L}$, 总体积 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 50°C 2 min, 95°C 10 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 循环 40 次。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 置于凝胶成像仪上拍照保存备检。

1.2.4 免疫组织化学分析

组织标本经石蜡包埋,二甲苯脱蜡,抗原修复,去除内源性过氧化物酶,血清封闭,加一抗 LZTS2 抗体(稀释比例 1:100),酶标二抗,DAB 显色剂,苏木素复染,1%的盐酸酒精分化,脱水和封片等步骤后拍照保存备检,每张片子随机拍摄 3 个视野。阳性标本呈现棕黄色或棕褐色的颗粒分布在细胞核和细胞质中。

1.2.5 分级标准

Child-pugh 分级分为 A、B、C 级^[5],Edmondson-Steiner 分级分为 I~IV 级^[6]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合正态分布的计量资料以四分位[M(P_{25}), P_{75}]表示,采用 *t* 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组受试人群基本资料分析

各组受试者性别比例、血小板(PLT)比较差异无统计学意义($P > 0.05$),年龄、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、清蛋白(ALB)、前清蛋白(pALB)、总胆红素(TBIL)比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。LC 组患者肝硬

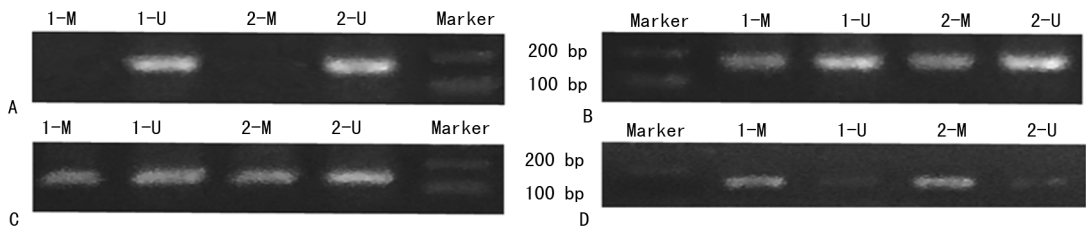
度测定值(LSM)24.11(18.38,29.84)Kpa,天冬氨酸氨基转移酶/血小板比值(APRI)2.25(1.45,3.05),肝纤维化指数 4(FIB-4)3.98(3.37,4.59),Child-pugh 分级 A 级 23 例、B 级 17 例、C 级 10 例。HCC 组患者小肝癌 13 例,Edmondson-Steiner 分级 I~II 级 11 例、III~IV 级 21 例。

2.2 各组外周血 DNA LZTS2 启动子区域甲基化情况分析

各组选择 2 例典型标本的 MS-PCR 和 UMS-PCR 扩增产物电泳图进行展示,见图 1。NC 组、CHB 组、LC 组、HCC 组的 MS-PCR 电泳条带灰度值(M)分别为 198.00 ± 46.65 、 255.32 ± 50.34 、 425.32 ± 105.45 、 715.32 ± 188.46 ,除 NC 组与 CHB 组之间差异无统计学意义外($P > 0.05$),其他组之间差异明显($P < 0.05$),见表 2。NC 组、CHB 组、LC 组、HCC 组的 M/U 分别为 0.25 ± 0.05 、 0.30 ± 0.12 、 0.78 ± 0.22 、 2.59 ± 0.35 ,除 NC 组与 CHB 组之间差异无统计学意义外($P > 0.05$),其他组之间差异明显($P < 0.05$),见表 2。LC 组 Child-pugh 分级 C 级 M 与 M/U 比值明显高于 A 级和 B 级,A 级与 B 级之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。HCC 组 Edmondson-Steiner 分级 III~IV 级 M 和 M/U 比值明显高于 I~II 级,见表 3。

表 1 各组受试人群基本情况

项目	NC 组(n=40)	CHB 组(n=50)	LC 组(n=50)	HCC 组(n=50)	P
男[n(%)]	24(60.00)	31(62.00)	31(62.00)	30(60.00)	0.895
年龄[M(P_{25}), P_{75}],岁	36.8(32.0,40.2)	44.6(35.6,53.2)	48.2(38.2,55.5)	53.7(39.5,65.7)	<0.001
PLT[M(P_{25}), P_{75}], $\times 10^9/L$	226.0(112.0,320.0)	193.5(95.0,266.0)	118.6(76.0,145.0)	120.8(80.0,142.0)	0.656
ALT[M(P_{25}), P_{75}],IU/L	28.2(18.9,35.3)	55.2(20.2,89.3)	98.2(51.3,150.3)	152.5(83.1,245.5)	0.033
AST[M(P_{25}), P_{75}],IU/L	22.0(18.0,33.5)	23.5(20.0,32.0)	33.0(25.0,54.0)	45.0(39.0,62.0)	0.013
ALB[M(P_{25}), P_{75}],g/L	44.2(38.5,45.3)	39.8(35.0,40.9)	37.5(34.2,39.8)	35.6(33.0,38.2)	0.016
pALB[M(P_{25}), P_{75}],mg/L	258.0(209.8,306.2)	186.0(146.5,225.5)	127.0(90.8,163.2)	110.0(79.4,140.6)	<0.001
TBIL[M(P_{25}), P_{75}], $\mu\text{mol/L}$	28.2(25.0,31.4)	29.8(26.2,33.4)	58.8(51.3,66.3)	84.2(74.3,94.1)	<0.001



A:NC 组;B:CHB 组;C:LC 组;D:HCC 组;1-M:编号 1 的样本 MS-PCR 扩增产物泳道;1-U:编号 1 的样本 UMS-PCR 扩增产物泳道;2-M:编号 2 的样本 MS-PCR 扩增产物泳道;2-U:编号 2 的样本 UMS-PCR 扩增产物泳道;Marker:标记物。

图 1 各组受试者 MS-PCR 和 UMS-PCR 扩展产物电泳图

表 2 各组受试者 MS-PCR 和 UMS-PCR 电泳条带灰度值及 M/U 比值($\bar{x} \pm s$)

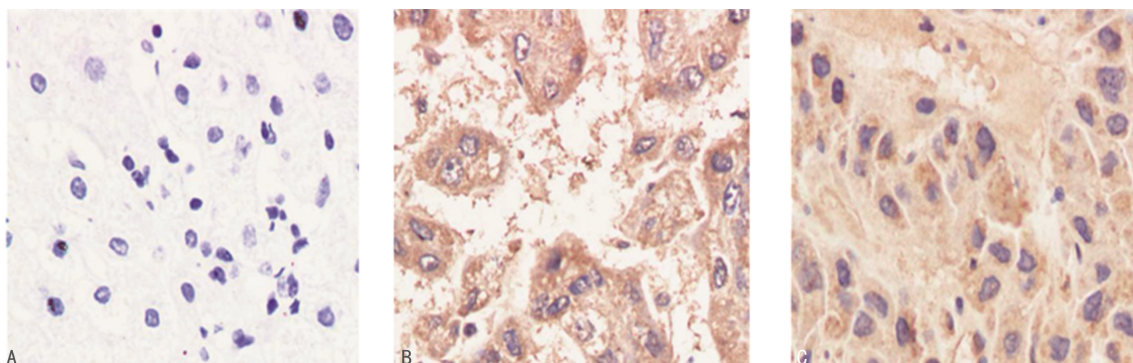
项目	NC 组(n=40)	CHB 组(n=50)	LC 组(n=50)	HCC 组(n=50)
M	198.00 ± 40.65	255.32 ± 50.34	$425.32 \pm 105.45^* \#$	$715.32 \pm 188.46^* \# \Delta$
U	988.22 ± 63.56	739.22 ± 43.57	$654.22 \pm 23.58^* \#$	$288.22 \pm 23.59^* \# \Delta$
M/U	0.25 ± 0.05	0.30 ± 0.12	$0.78 \pm 0.22^* \#$	$2.59 \pm 0.35^* \# \Delta$

U:UMS-PCR 电泳条带灰度值;*: $P < 0.05$,与 NC 组比较;#: $P < 0.05$,与 CHB 组比较; Δ : $P < 0.05$,与 LC 组比较。

表 3 LC 组 Child-pugh 分级及 HCC 组 Edmondson-Steiner 分级甲基化分析($\bar{x} \pm s$)

项目	Child-pugh 分级			Edmondson-Steiner 分级	
	A 级(n=23)	B 级(n=17)	C 级(n=10)	I ~ II 级(n=11)	III ~ IV 级(n=21)
M	374.55±40.20	400.07±45.45	552.75±56.32*#	605.44±68.06	771.92±85.34 Δ
U	890.65±63.56	815.52±45.73	667.54±36.75*#	388.22±29.55	240.54±25.88 Δ
M/U	0.42±0.05	0.49±0.12	0.83±0.22*#	1.60±0.28	3.25±0.56 Δ

*: $P < 0.05$, 与 A 级比较; #: $P < 0.05$, 与 B 级比较; Δ : $P < 0.05$, 与 I ~ II 级比较。



A: 阴性对照; B: 癌旁组织; C: 肝癌组织。

图 2 肝癌组织及癌旁组织中 LZTS2 基因表达情况($\times 400$)

2.3 LZTS2 在肝癌组织和癌旁组织的表达情况

HCC 组中有 32 例患者行肝癌切除术, 免疫组织化学结果显示 LZTS2 在细胞核和细胞质均有表达, 见图 2。肝癌组织中 LZTS2 表达量(0.13 ± 0.05)明显低于癌旁组织(0.34 ± 0.12), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 肝癌组织及癌旁组织 LZTS2 表达情况($\bar{x} \pm s$)

项目	癌旁组织	肝癌组织
IOD	5 598.40±724.54	1 876.58±347.88
Area	17 054.65±603.22	16 986.98±535.66
IOD/Area	0.34±0.12	0.13±0.05*

IOD: 积分光密度; Area: 所选区域; IOD/Area: 所选区域的平均积分光密度值; *: $P < 0.05$, 与癌旁组织比较。

3 讨论

病毒性肝炎、长期饮酒、曲霉毒素和遗传因素是 HCC 发生的高危因素, 在我国尤其以 HBV 的慢性、反复持续性感染有关的 HCC 最常见。HBV 感染是导致 HCC 的高危因素之一, 约占全球 HCC 的 50%~80%^[7]。研究证实 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、B 细胞及非特异性免疫细胞和分子相互作用, 反复引起肝细胞慢性坏死性炎症和再生, 从而介导肝纤维化-肝硬化-肝癌的演变过程^[8]。然而, 驱动 HBV 感染致 HCC 的机制尚不清楚。DNA 甲基化是表观遗传调控中研究得很透彻的机制之一, 抑癌基因启动子区域的异常甲基化被认为是抑癌基因失活的第三种机制^[9], 主要发生在基因转录起始位点附近的 CpG 岛。大量研究表明, 抑癌基因中 CpG 岛的异常高甲基化在促进肿瘤发生、发展中起着至关

重要的作用, 可成分子标记物用于疾病的诊断及治疗^[10-11]。

LZTS2 抑癌基因位于人类 10 号染色体(10q24.3), 与经典抑癌基因 PTEN 的位点(10q23.3)临近^[12-13], 这两个区域在多种肿瘤中频繁下调表达^[14]。LZTS 基因家族成员主要参与转录调控和细胞周期的调控。有研究表明, LZTS2 通过在细胞核内富集 β -catenin 对肿瘤的发生、发展起到重要作用^[14]; 同时 β -catenin 也是 Wnt 信号通路中至关重要的一员^[3]。有研究还发现, LZTS2 以 p85 依赖的方式抑制鼻咽癌的肿瘤发生和放射抵抗, 表明靶向 LZTS2/PI3K/AKT 信号轴是鼻咽癌放射增敏的一种潜在治疗策略^[15-17], 但少见 LZTS2 与肝癌的进展关系报道。

为消除每个样本扩增产物量之间的差异, 选择 M/U 比值进行分析结果更加可靠。本研究结果显示, 除 LZTS2 启动子区域甲基化的 M/U 比值在 NC 组与 CHB 组之间差异无统计学意义外, 其他组之间差异明显。Child-pugh A 级属于代偿性肝硬化, B 级属于失代偿初期尚未合并胃出血、肝性脑病和腹水, C 级患者合并了严重的并发症^[5]。结果显示, C 级甲基化程度明显高于 A 级和 B 级, A 级、B 级间甲基化程度差异不明显。Edmondson-Steiner 分级属于病理分级^[6]。本研究显示 III ~ IV 级甲基化程度明显高于 I ~ II, 说明 LZTS2 启动子异常高甲基化与肝癌细胞的分化程度有关。本研究揭示随着慢性乙型肝炎-肝硬化-肝癌的进程演变, LZTS2 启动子区域 DNA 甲基化程度也逐渐增加, 且与 HCC 的病理分级有关。

本试验设计采取甲基化和非甲基化引物各一对, 且二者针对的是同一 CpG 位点。若某一样本在监测

位点未发生甲基化,但其他非监测位点存在甲基化,可能导致研究结果未发生甲基化的情况。后续笔者会完善研究,在现有的基础上增加甲基化测序的环节,对启动子区域的甲基化位点进行细致筛查。

参考文献

- [1] LIU Y M, CAO Y, CAI W C, et al. Combined detection of AFP-L3, GP73 and TIP30 enhances diagnostic accuracy for HBV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *J Pak Med Assoc*, 2019, 69(9): 1278-1285.
- [2] WANG L H, WU C F, RAJASEKARAN N, et al. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(6): 2647-2693.
- [3] SHEN Z, LIN L, CAO B, et al. LZTS2 promoter hypermethylation: a potential biomarker for the diagnosis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1): 42.
- [4] YU E J, HOOKER E, JOHNSON D T, et al. LZTS2 and PTEN collaboratively regulate ss-catenin in prostatic tumorigenesis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174357.
- [5] 林国桢, 代天星, 刘荣强, 等. 不同肝功能 Child-Pugh 分级对肝癌肝移植受者预后的影响[J]. *器官移植*, 2019, 10(3): 308-312.
- [6] ZHANG L, JIA G, SHI B, et al. PRSS8 is down-regulated and suppresses tumour growth and metastases in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3/4): 757-769.
- [7] LIU Y M, CAO Y, CAI W C, et al. Aberrant expression of two miRNAs promotes proliferation, hepatitis B virus amplification, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells: evidence from bioinformatic analysis and experimental validation[J]. *Peer J*, 2020, 8: e9100.
- [8] CHEN Y Y, TIAN Z G. HBV-induced immune imbalance in the development of HCC [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2048.
- [9] 刘瑜, 刘红刚. DNA 甲基化与喉癌相关性的研究进展[J]. *中华病理学杂志*, 2011, 40(1): 67-70.
- [10] GALANOPOULOS M, TSOUKALAS N, PANIKOLAOU I S, et al. Abnormal DNA methylation as a cell-free circulating DNA biomarker for colorectal cancer detection: A review of literature[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2017, 9(4): 142-152.
- [11] JIN P, SONG Y, YU G. The role of abnormal methylation of Wnt5a gene promoter regions in human epithelial ovarian cancer: a clinical and experimental study [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2018, 2018: 6567081.
- [12] CUI X, JIANG X Y, WEI C S, et al. Astragaloside IV suppresses development of hepatocellular carcinoma by regulating miR-150-5p/ β -catenin axis[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020, 78: 103397.
- [13] GAO R, CAI C, GAN J, et al. Mir-1236 down-regulates alpha-fetoprotein, thus causing PTEN accumulation, which inhibits the PI3K/Akt pathway and malignant phenotype in hepatoma cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 6014-6028.
- [14] JOHNSON D T, LUONG R, LEE S H, et al. Deletion of leucine zipper tumor suppressor 2 (Lzts2) increases susceptibility to tumor development[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(6): 3727-3738.
- [15] XU S, LI Y, LU Y, et al. LZTS2 inhibits PI3K/AKT activation and radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by interacting with p85[J]. *Cancer Lett*, 2018, 420: 38-48.
- [16] CUI Q Z, TANG Z P, ZHANG X P, et al. Leucine zipper tumor suppressor 2 inhibits cell proliferation and regulates Lef/Tcf-dependent transcription through Akt/GSK3 β signaling pathway in lung cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 2013, 61(9): 659-670.
- [17] HOU Y, LI H, HUO W. THBS4 silencing regulates the cancer stem cell-like properties in prostate cancer via blocking the PI3K/Akt pathway[J]. *Prostate*, 2020, 80(10): 753-763.

(收稿日期: 2019-12-18 修回日期: 2020-01-29)