

RIN1 过表达对人胃腺癌 MKN28 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响

邢晓静,谷小虎,马天飞

(辽宁省肿瘤医院,辽宁省肿瘤防治办公室,辽宁 沈阳 110042)

摘要: [目的] 研究 RIN1 过表达对人胃腺癌 MKN28 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响。[方法] ①采用 Western blot 法和免疫荧光法检测 RIN1 在 MKN28 细胞中表达; ②采用 Burd-U 标记检测 MKN28 细胞高表达 RIN1 后细胞增殖能力变化; ③采用 Transwell 法、细胞划痕法检测 MKN28 细胞高表达 RIN1 后细胞侵袭和迁移能力变化; ④采用 AV/PI 染色法、Hoechst 染色法检测 MKN28 细胞高表达 RIN1 后细胞凋亡情况。[结果] ①RIN1 在 MKN28 细胞中呈高表达,表达量是空载对照组的 3.22 倍,且主要分布在细胞质中; ②Burd-U 染色结果显示,RIN1 高表达 MKN28 细胞的阳性率显著性升高,与空载对照组相比为 $75.6\% \pm 5.4\%$ vs $25.6\% \pm 1.1\%$ ($P < 0.01$); ③RIN1 高表达 MKN28 细胞的侵袭和迁移能力明显增强,与空载对照组相比分别为 122.0 ± 7.0 vs 65.00 ± 2.52 ($P < 0.01$) 和 $54.22\% \pm 3.45\%$ vs $38.6\% \pm 2.45\%$ ($P < 0.01$); ④RIN1 高表达 MKN28 细胞株细胞凋亡数显著性减少,与空载对照组相比为 $21.63\% \pm 2.60\%$ vs $8.07\% \pm 1.60\%$ ($P < 0.01$)。[结论] RIN1 过表达促进 MKN28 细胞增殖、侵袭和迁移,抑制 MKN28 细胞凋亡; RIN1 可能是介导胃癌发生的癌基因之一。

关键词: RIN1; 人胃腺癌 MKN28 细胞; 增殖; 侵袭; 迁移; 凋亡

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2014)07-0601-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.07.A014

Effect of RIN1 Overexpression on Proliferation, Invasion, Migration and Apoptosis of Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line MKN28

XING Xiao-jing, GU Xiao-hu, MA Tian-fei

(Liaoning Cancer Hospital & Institute, Liaoning Provincial Cancer Prevention and Control Office, Shenyang 110042, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of RIN1 overexpression on proliferation, invasion, migration and apoptosis of human gastric adenocarcinoma cell line MKN28. [Methods] RIN1 expression in pcDNA3.1(+)/RIN1/ MKN28 cells were identified by Western blot and Immunofluorescence. The effect of RIN1 overexpression on proliferation, invasion, migration and apoptosis of MKN28 cells were analyzed by Brd-U assay, Transwell chamber and Scratch Wound Healing, AV/PI dye method and Hoechst staining, respectively. [Results] RIN1 was highly expressed in pcDNA3.1 (+)/RIN1/MKN28 cells. The quantity of RIN1 expression on pcDNA3.1(+)/RIN1/MKN28 cells was 3.22 times of pcDNA3.1(+)/MKN28 cells, and RIN1 mainly distributed in the cytoplasm. Compared with pcDNA3.1(+)/MKN28 cells, the proliferation ability of pcDNA3.1 (+)/RIN1/MKN28 cells ($75.6\% \pm 5.4\%$ vs $25.6\% \pm 1.1\%$, $P < 0.01$) was significantly enhanced, and the migrated cell number (122.0 ± 7.0 vs 65.00 ± 2.52 , $P < 0.01$) and the migrated rate of pcDNA3.1 (+)/RIN1/MKN28 cells ($54.22\% \pm 3.45\%$ vs $38.6\% \pm 2.45\%$, $P < 0.01$) were markedly increased and the apoptotic rate of pcDNA3.1 (+)/RIN1/MKN28 cells ($8.07\% \pm 1.60\%$ vs $21.63\% \pm 2.60\%$, $P < 0.01$) was dramatically reduced. [Conclusion] RIN1 overexpressed in MKN28 cells is capable of promoting proliferation, invasion, migration and inhibiting apoptosis, and RIN1 may be one of oncogenes to take part in the occurrence of gastric cancer.

Key words: RIN1; human gastric adenocarcinoma cell line MKN28; proliferation; invasion; migration; apoptosis

胃癌是常见恶性肿瘤,也是我国肿瘤相关致死率较高的恶性肿瘤之一。2008 年,中国 56 个肿瘤登

记处提交的肿瘤登记资料显示:胃癌位居城市恶性肿瘤发病率的第 2 位,农村发病率的第 1 位^[1]。虽然在过去的 20 年,大量的癌基因和抑癌基因被发现与胃癌发生密切相关,但我们对胃癌发生的机制仍知之甚少^[2]。RIN1(Ras and Rab interactor 1)是 Ras 效

收稿日期:2013-11-29;修回日期:2013-12-20

基金项目:辽宁省科技公关项目(2012225016);辽宁省自然科学基金(201102111);国家自然科学基金项目(81201968)

E-mail: 13940066477@163.com

应蛋白,主要生物学作用是调节上皮细胞的迁移和內吞作用^[3]。研究发现,RIN1在胃腺癌组织中呈高表达,与肿瘤分期、迁移、预后都有相关性,被认为在胃癌发生、发展中发挥了重要作用^[4]。本研究拟观察RIN1过表达对人胃腺癌MKN28细胞增殖、侵袭迁移和凋亡的影响,从而在细胞水平阐明RIN1的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃腺癌MKN28细胞株、高表达RIN1细胞株pcDNA3.1(+)/RIN1/MKN28及表达空载细胞株pcDNA3.1(+)/MKN28均由本实验室保存或前期制备;胎牛血清、RPMI1640培养基、青霉素、链霉素及G418均购自Gibco公司;兔抗人RIN1多克隆抗体、 β -actin单克隆抗体、Brd U单克隆抗体、HRP标记的羊抗兔/鼠抗体和荧光标记羊抗兔/鼠抗体均购自Santa公司;Transwell小室购自Corning公司;Matrigel购自BD公司;Brd U购自Invitrogen公司;流式细胞检测细胞周期试剂AV/PI试剂盒、免疫荧光检测细胞凋亡Hoechst染色液均购自碧云天公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。电泳系统为北京六一公司产品,AE31荧光倒置显微镜为Motic公司产品,EPICSXL-4流式细胞仪为BeckmanCoulte公司产品,ELX-800酶标仪为Biotek公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MKN28细胞株、pcDNA3.1(+)/RIN1/MKN28细胞株、pcDNA3.1(+)/MKN28细胞株均常规培养于含10%胎牛血清、100U/ml青霉素和100mg/L链霉素的RPMI1640培养基中,置于37℃、5%CO₂、相对湿度95%的培养箱中培养。每2~3d用0.05%胰蛋白酶-EDTA消化传代1次。取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 Western blot法检测人胃腺癌MKN28细胞中RIN1表达

取对数生长期细胞,冰冷PBS洗3次后,加入400 μ l NP-40裂解液,置于冰上,用移液器将其吹散至单细胞悬液,然后继续置于冰上静置5min。开启低温冷冻离心机,12 000r/min,4℃离心10min,分离上清为所得的蛋白质抽提物。BCA试剂盒检测蛋白

浓度后,取20 μ g蛋白制成20 μ l的上样缓冲液,经10%凝胶电泳(电压80V,恒压电泳2.5h),转印(70V转印1.5h)后将载有目的蛋白的PVDF膜浸入5%(M/V)脱脂奶粉溶液中,室温摇床缓慢摇动封闭1h,经RIN1兔抗人一抗(5%脱脂奶粉1:500稀释抗体)4℃过夜、HRP标记羊抗兔二抗(5%脱脂奶粉1:5000稀释抗体)37℃孵育0.5h后,ECL显影。显影后的PVDF膜经抗体剥离,重新封闭,经HRP标记 β -actin抗体(5%脱脂奶粉1:5000稀释抗体)37℃孵育1h后,ECL显影。

1.2.3 免疫荧光法检测人胃腺癌MKN28细胞中RIN1表达

取对数生长期细胞消化、传代平铺到24孔板中,待细胞生长至80%后,冰冷PBS清洗,加入冰冷4%多聚甲醛中,4℃固定30min,用PBS洗3遍,每次5min;加入1% Triton X-100破膜8min,用PBS洗3遍,每次5min;滴加1%正常兔血清室温封闭15min后,加入RIN1兔抗人一抗(1%正常兔血清1:200稀释抗体)至完全覆盖细胞,4℃过夜,取出细胞,用PBS洗3次,每次5min;FITC标记羊抗兔二抗(1%正常兔血清1:200稀释抗体)37℃孵育0.5h后用PBS洗3次,每次5min;加入100 μ l DAPI染液,37℃孵育20min,用PBS洗3次,每次5min;抗荧光淬灭剂处理后封片,于荧光显微镜下观察染色效果,拍照。每个样本选取5个视野计数细胞个数,取平均数。

1.2.4 Brd-U标记法检测细胞增殖

取对数生长期细胞消化、传代平铺到24孔板中,待细胞生长至50%后,用含0.4%FCS培养液同步化处理3d,使绝大多数细胞处于G₀期;去除培养基后,无菌PBS清洗2次后加入Brd-U(终浓度为30 μ g/L),37℃孵育8h,弃培养液,PBS清洗3次;用甲醇固定10min,弃甲醇,PBS清洗3次。甲酰胺在100℃处理变性核酸5min,PBS清洗3次;加入1%山羊血清封闭液37℃孵育30min后,去除封闭液,加入一抗即鼠抗体人Brd-U单抗(使用1%山羊血清按1:50稀释)4℃孵育过夜;PBS清洗3次,加入二抗即PE标记的羊抗鼠抗体(使用1%山羊血清按1:100稀释)37℃孵育30min;PBS洗3次,加入100 μ l DAPI染液,37℃孵育20min,用PBS洗3次,每次5min;抗荧光淬灭剂处理后封片,于荧光显微镜下观察染色效果,拍照。每个样本选取5个视野计数细胞个数,

取平均数。

1.2.5 Transwell 法检测细胞侵袭能力

将包被好的 Transwell 小室放入 24 孔板中,下室加入含 10% FBS 的培养液 750 μ l; 取对数生长期细胞消化,收集细胞,无血清培养稀释后细胞计数,以 5×10^4 个/孔细胞平铺到上室中,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度条件下培养 24h,取出 Transwell 小室,PBS 上、下室各冲洗 1 次;用棉签擦去微孔膜上层细胞;多聚甲醛室温下固定 20min,苏木素染液染色 3min,蒸馏水冲洗。在倒置显微镜下(200 $\times$)对迁移至微孔膜下层的细胞计数。每个样本选取 5 个视野计数细胞个数,取平均数。

1.2.6 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

取对数生长期细胞消化,传代平铺到 6 孔板中,待细胞生长至 80%后,弃去培养基,利用 200 μ l pipette tip 造成细胞划痕,加入无血清培养基清洗 2 次细胞表面,除去细胞碎片;用含血清培养基继续培养 6h,于倒置显微镜下拍照记录,并计算各实验组迁移距离。

1.2.7 AV/PI 染色法检测细胞凋亡

取对数生长期细胞消化,正常传代培养,待细胞生长至 90%后,收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,800r/min 离心 5min 收集细胞,吸除上清,残留约 50 μ l PBS,每管细胞样品中加入 500 μ l Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ l Propidium Iodide,混匀;室温避光孵育 10min,用 PBS

洗 2 遍,每次 3min,进行流式细胞检测。

1.2.8 Hoechst 染色法检测细胞凋亡

取对数生长期细胞消化,传代平铺到 6 孔板中,待细胞生长至 60%后,弃去培养基,用 PBS 洗 2 遍,加入 0.5ml 固定液,4 $^{\circ}$ C 固定 20min;去固定液,用 PBS 洗 2 遍,每次 3min,期间手动晃动数次,吸尽液体;均匀滴上 0.5ml Hoechst33258 染色液,染色 5min,去染色液,用 PBS 洗 2 遍,每次 3min,吸尽液体。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,让细胞接触封片液,尽量避免气泡;随即将玻片置荧光显微镜下观察,进行图像采集。

1.3 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行统计学处理,数据用平均值 $\pm$ 标准差表示,两组间均值比较用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RIN1 在人胃腺癌 MKN28 细胞中呈过表达

pcDNA3.1(+)/RIN1/MKN28 细胞株中 RIN1 表达为对照细胞株 pcDNA3.1(+)/MKN28 的 3.22 倍,RIN1 主要分布在细胞质中(Figure 1, Figure 2)。

2.2 RIN1 过表达对 MKN28 细胞增殖的影响

RIN1 过表达 MKN28 细胞株形态与对照空白组

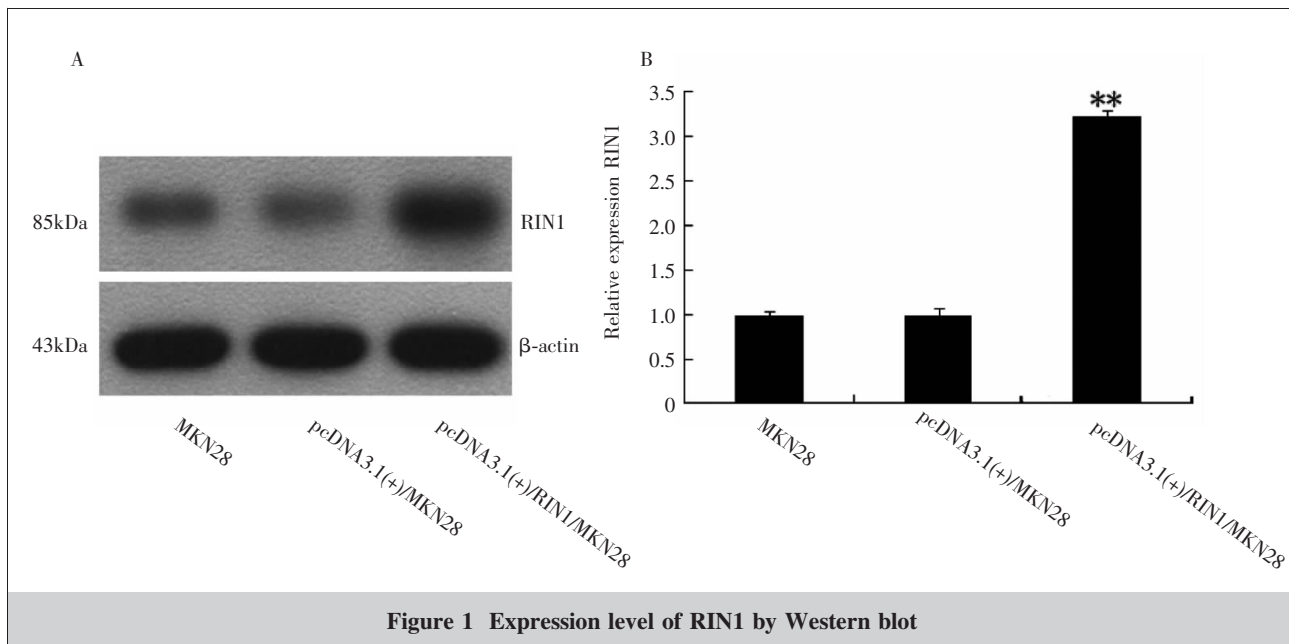


Figure 1 Expression level of RIN1 by Western blot

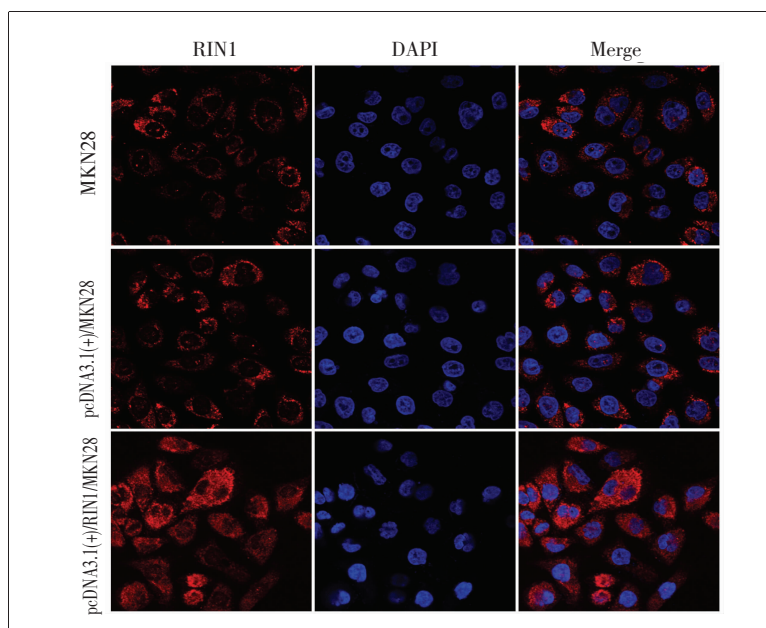


Figure 2 RIN1 expression by immunofluorescence

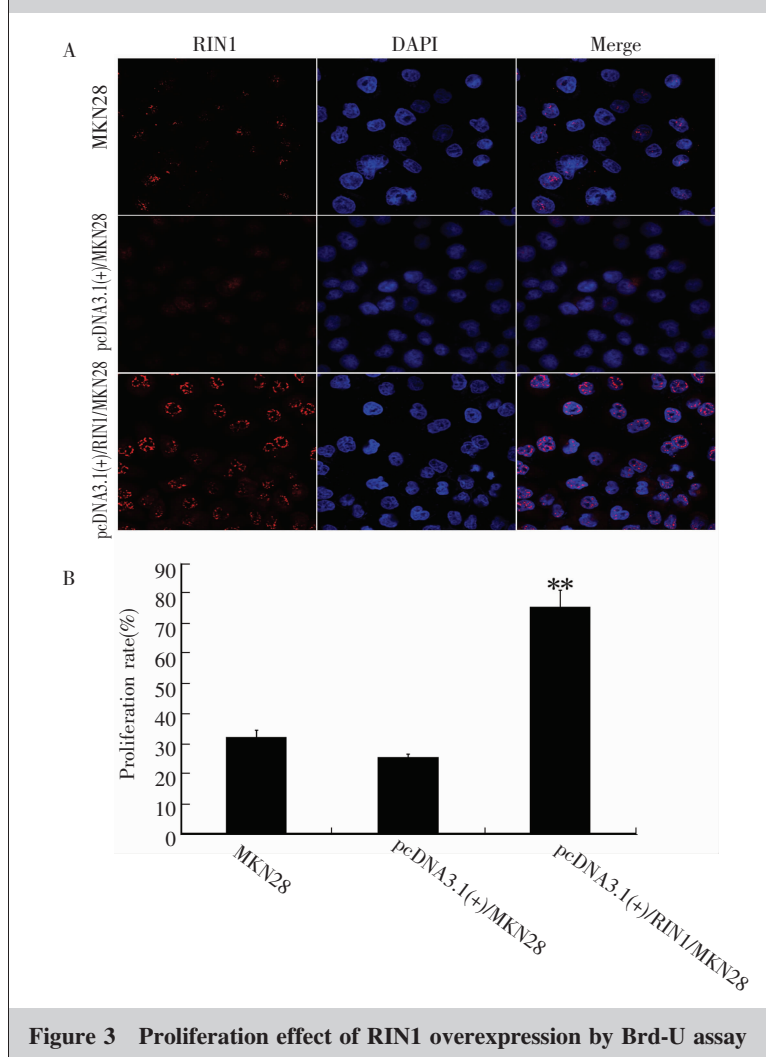


Figure 3 Proliferation effect of RIN1 overexpression by Brd-U assay

细胞无明显差异。细胞经同步化处理 3d 后,加入Brd-U(终浓度为 30 μ g/L)培养细胞,使 DNA 复制过程中嵌入 Brd-U,8h 后终止细胞生长,采用免疫荧光法检测 Brd-U 的强度,以此反映 DNA 复制和细胞增殖能力。与空载对照组相比,pcDNA3.1(+)/RIN1/MKN28 细胞株的 Brd-U 阳性率显著性升高(75.6% $\pm$ 5.4% vs 25.6% $\pm$ 1.1%) ($P<0.01$)(Figure 3)。

2.3 RIN1 过表达对 MKN28 细胞侵袭和迁移的影响

RIN1 过表达 MKN28 细胞侵袭和迁移能力均显著性增强,pcDNA3.1(+)/RIN1/MKN28 细胞侵袭透过率为 122.0 $\pm$ 7.0,高于对照组的 65.00 $\pm$ 2.52,细胞迁移率为 54.22% $\pm$ 3.45%,高于对照组的 38.6% $\pm$ 2.45%(P 均 <0.01)(Figure 4,Figure 5)。

2.4 RIN1 过表达对 MKN28 细胞凋亡的影响

本研究中,细胞凋亡率显著减少。RIN1 高表达 MKN28 细胞株凋亡数与空载对照组相比为 21.63% $\pm$ 2.60% vs 8.07% $\pm$ 1.60% ($P<0.01$)。pcDNA3.1 (+)/RIN1/MKN28 细胞的 AV/PI 阳性率为 1.92%,低于对照组的 5.85%,AV 阳性率为 6.15%,低于对照组的 15.78%(P 均 <0.01);细胞核表现为高度皱缩(Figure 6, Figure 7)。

3 讨论

肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、凋亡与基因的表达密切相关。RIN1 作为 RAS 的效应蛋白在多种肿瘤的发生中发挥了重要作用。Fang 等^[5]研究显示 RIN1 在黑色素瘤组织中的高表达与肿瘤的不良预后相关性。Shan 等^[6]研究表明 RIN1 在癌组织中的表达显著性高于癌旁组织,RIN1 的表达量与癌组织的分型、癌组织中 Ki-67 的表达呈正相关,5 年生存率为 29%的研究组 RIN1 的表达

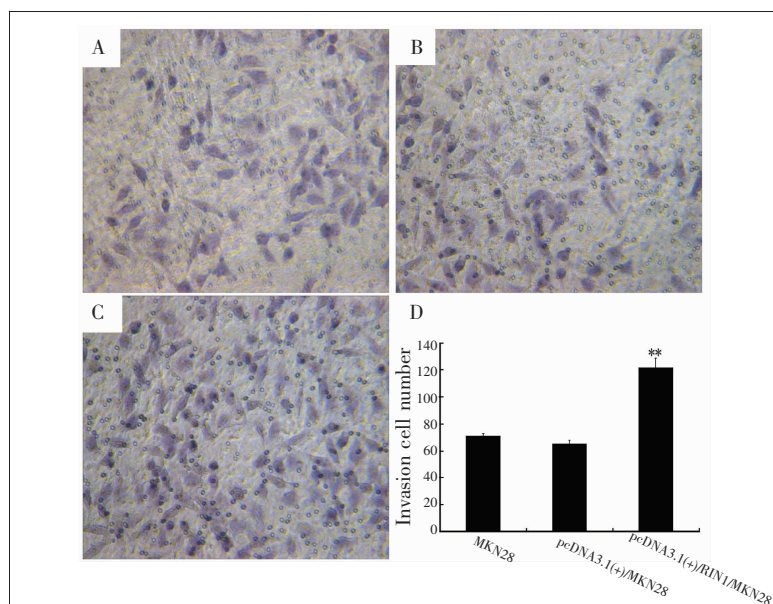


Figure 4 Effect of RIN1 overexpression on cell invasion ability by Transwell chamber

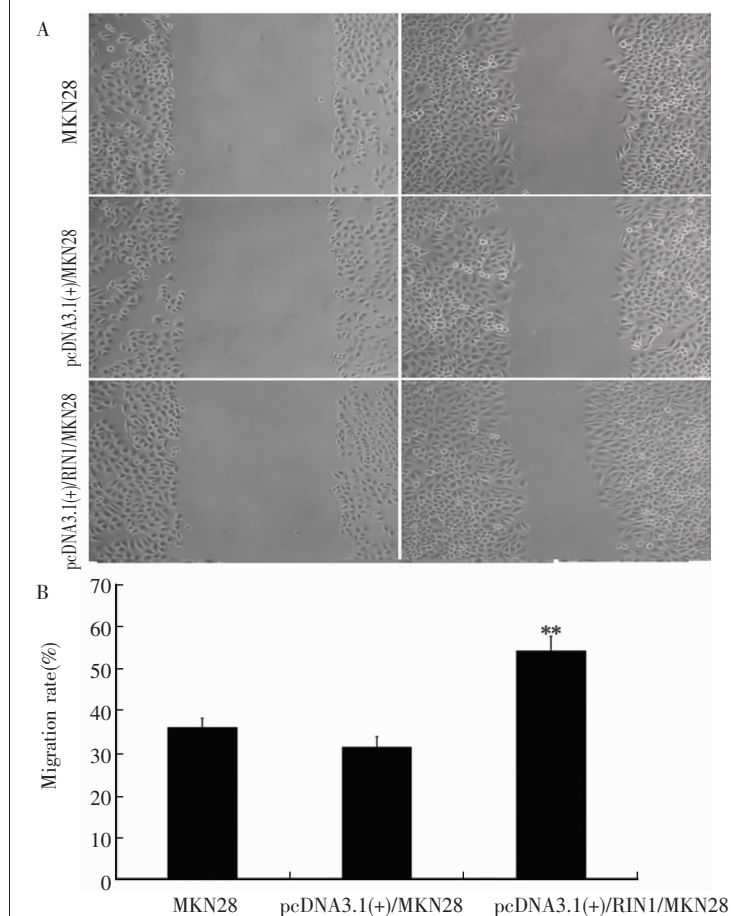


Figure 5 Effect of RIN1 overexpression on cell migration ability by Scratch Wound Healing

量较 5 年生存率为 43% 的研究组明显升高。在肺癌的相关研究中, RIN1 在非小细胞肺癌中呈高表达, 且与肿瘤的分化程度、分期、淋巴结转移都呈正相关, 且 RIN1 高表达组患者生存率更低^[7]。在胃癌的相关研究中, RIN1 在 54.3% 胃癌组织中呈高表达, 且与肿瘤大小、分型、肿瘤分期及淋巴结转移密切相关, 多变量分析显示 RIN1 可作为独立因素应用于肿瘤的预后和肿瘤患者生存期的评估^[4]。然而 Milstein 等^[8]研究报告指出, RIN1 在乳腺癌发生中主要发挥抑癌作用, 在肿瘤组织中的表达减少, 可能与 RIN1 启动子区的甲基化和转录抑制因子 SNAIL 的高表达有关^[8]。表明 RIN1 在不同的肿瘤组织中发挥不同的调节作用。

作为 Ras 的效应蛋白, RIN1 发挥生物学作用主要通过两种途径^[3]: 第一条途径是作为 Rab5 的鸟嘌呤核苷酸交换因子, 直接活化 Rab5 介导的 Ras 泛素化, 调节 Ras 促进细胞的内吞作用, 加速表皮生长因子受体(EGFR)内陷降解, 抑制 ERK 活化^[9]。然而有研究显示 RIN1 在 Hop62、H650、A549 等非小细胞肺癌细胞中呈高表达, 耗竭 A549 细胞内 RIN1 能够下调 EGFR, 从而抑制 A549 细胞的增殖效率^[10]。同时 Inoue 等^[11]研究显示, 在结肠癌 LoVo 细胞中, RIN1 可通过 Ras 促使磷酸化 ERK1/2 蛋白磷酸化, 促进细胞增殖。Fang 等^[5]研究提示, RIN1 能够抑制细胞凋亡, RIN1 表达下调后将显著性抑制黑色素瘤 A375 增殖, 诱发 caspase-3 活化启动细胞凋亡^[5]。在我们的研究中, RIN1 过表达胃癌 MKN28 细胞增殖及抗凋亡能力均显著性增强, 提示在胃癌中 RIN1 能够发挥促进肿瘤细胞增殖、抗细胞凋亡作用。

另一条途径为 RIN1 与 ABL 酪氨酸激酶 SH3/SH2 的亚基结合, 直接活化

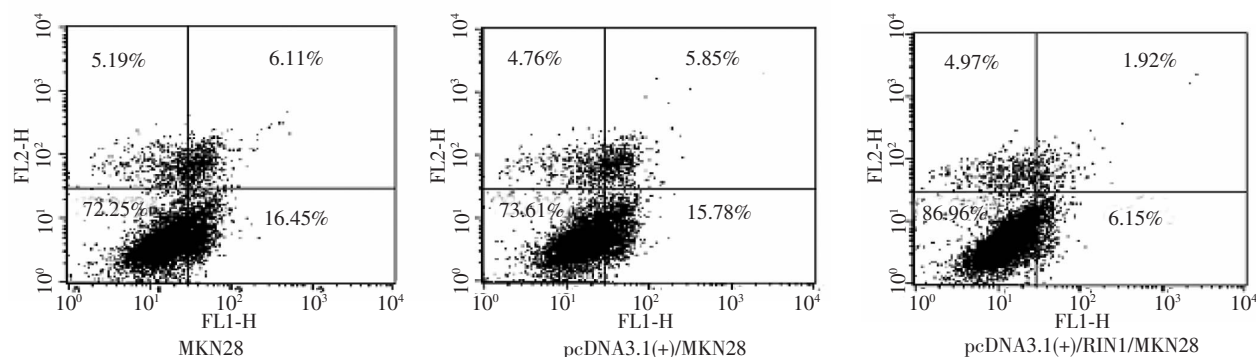


Figure 6 Effect of RIN1 overexpression on cell apoptosis by AV/PI dye method

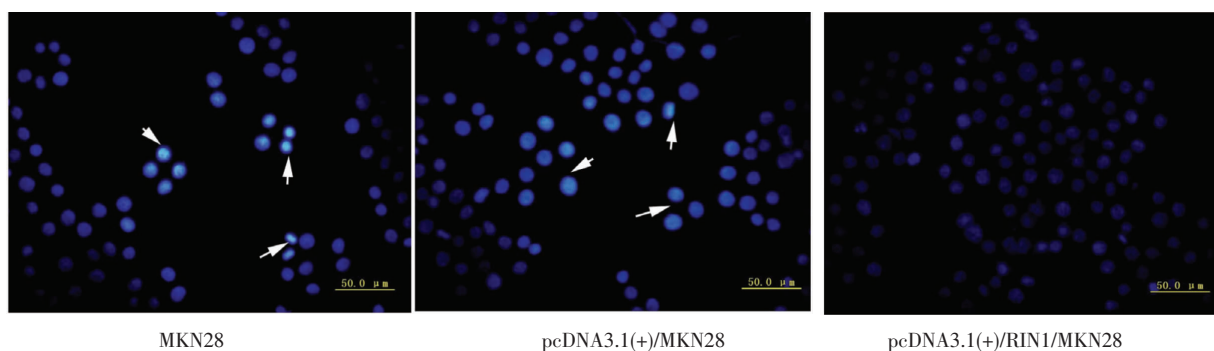


Figure 7 Effect of RIN1 overexpression on cell apoptosis by Hoechst staining

BCR-ABL 激酶,抑制细胞的侵袭和转移^[12]。研究显示这与蛋白激酶 D (PKD) 有关,PKD 依赖的 RIN1-292 位点磷酸化直接决定 ABL 的活化,调控细胞的迁移能力;292 位点突变能够有效恢复细胞的迁移能力^[3]。然而有研究显示,能够有效抑制细胞侵袭和迁移的 PKD 在胃癌细胞中呈低表达,可能与 PKD 启动子甲基化有关^[13-15]。在我们的研究中,RIN1 过表达胃腺癌 MKN28 细胞侵袭和迁移能力均显著性增强,提示在胃癌中 PKD 表达降低,可能是 RIN1 发挥促进细胞侵袭和转移凋亡作用的主要原因。同时研究显示 RIN1 活化 ABL 能够稳固细胞表面的 EGFR^[16],促进细胞增殖,增加 ABL 酪氨酸激酶对药物伊马替尼的耐药性^[17]。我们的前期研究显示 RIN1 过表达 S 期胃腺癌 MKN28 细胞增多,与 Giallongo^[18] 的研究得到伊马替尼能够抑制细胞由 G₁ 期到 S 期一致。

RIN1 在肿瘤中作用机制复杂,在本研究中,我们论证了 RIN1 过表达能够促进人胃腺癌 MKN28 细胞增殖、侵袭、转移,并发挥抗细胞凋亡作用,与临

床研究结果一致^[4]。提示 RIN1 高表达可能是胃癌发生、发展的基础;进一步明确 RIN1 的作用机制后,RIN1 可被作为一个新的胃癌标志物应用于胃癌的早期诊断与治疗。

参考文献:

- [1] Zheng RS,Zheng SW,Wu LY,et al. Report of incidence and mortality from China cancer registries in 2008 [J]. China Cancer,2012,21(1):1-12.[郑荣寿,张思维,吴良有,等.中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2012,21(1):1-12.]
- [2] Ooi CH,Ivanova T,Wu J,et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer [J]. PLoS Genet,2009,5(10):e1000676.
- [3] Ziegler S,Eiseler T,Scholz RP,et al. A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration [J]. Mol Biol Cell,2011,22(5):570-580.
- [4] Yu HF,Zhao G,Ge ZJ,et al. High RIN1 expression is associated with poor prognosis in patients with gastric ade-

- nocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(5): 1557–1563.
- [5] Fang P, Zhao Z, Tian H, et al. RIN1 exhibits oncogenic property to suppress apoptosis and its aberrant accumulation associates with poor prognosis in melanoma [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(5): 1511–1518.
- [6] Shan GY, Zhang Z, Chen QG, et al. Overexpression of RIN1 associates with tumor grade and progression in patients of bladder urothelial carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(3): 847–855.
- [7] Wang Q, Gao Y, Tang Y, et al. Prognostic significance of RIN1 gene expression in human non-small cell lung cancer[J]. *Acta Histochem*, 2012, 114(5): 463–468.
- [8] Milstein M, Mooser CK, Hu H, et al. RIN1 is a breast tumor suppressor gene[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11510–11516.
- [9] Xu L, Lubkov V, Taylor LJ, et al. Feedback regulation of Ras signaling by Rabex-5-mediated ubiquitination[J]. *Curr Biol*, 2010, 20(15): 1372–1377.
- [10] Tomshine JC, Severson SR, Wigle DA, et al. Cell proliferation and epidermal growth factor signaling in non-small cell lung adenocarcinoma cell lines are dependent on RIN1[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(39): 26331–26339.
- [11] Inoue T, Goi T, Hirono Y, et al. RIN1-Ras-ERK pathway plays an important role in carcinogenesis in colon cancer cell line LoVo[J]. *Oncol Res*, 2011, 19(12): 527–534.
- [12] Hu H, Bliss JM, Wang Y, et al. RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(9): 815–823.
- [13] Eiseler T, Döppler H, Yan IK, et al. Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated β -actin reorganization and cell motility through slingshot [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(5): 545–556.
- [14] Eiseler T, Hausser A, De Kimpe L, et al. Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(24): 18672–18683.
- [15] Kim M, Jang HR, Kim JH, et al. Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(3): 629–637.
- [16] Balaji K, Mooser C, Janson CM, et al. RIN1 orchestrates the activation of RAB5 GTPases and ABL tyrosine kinases to determine the fate of EGFR [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 23): 5887–5896.
- [17] Thai M, Ting PY, McLaughlin J, et al. ABL fusion oncogene transformation and inhibitor sensitivity are mediated by the cellular regulator RIN1 [J]. *Leukemia*, 2011, 25(2): 290–300.
- [18] Giallongo C, La Cava P, Tibullo D, et al. SPARC expression in CML is associated to imatinib treatment and to inhibition of leukemia cell proliferation [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 60.