

# *c-Raf* 基因对大肠癌细胞生长的作用及其分子机制研究

张乐<sup>1</sup>, 白月奎<sup>1</sup>, 刘凯东<sup>1</sup>, 刘铭<sup>1</sup>, 李非<sup>2</sup>, 罗淑萍<sup>3</sup>  
(1. 北京市海淀区医院, 北京 100081; 2. 首都医科大学宣武医院, 北京 100053;  
3. 郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450000)

**摘要:** [目的] 通过转染 siRNA 沉默 *c-Raf* 基因以探讨其在大肠癌细胞生长中的作用及其相关分子机制。[方法] 通过阳离子脂质体介导的方法将 siRNA 转染入大肠癌细胞 HCT116 和 SW620, 经 Western blot 验证 siRNA 的干扰效果。经 MTT 法、Transwell 实验、细胞克隆形成实验和流式细胞术研究下调 *c-Raf* 基因对 HCT116 和 SW620 增殖、迁移和相关细胞活力的影响。采用 Western blot 法检测转染 siRNA 后相关细胞周期蛋白水平。[结果] HCT116 和 SW620 转染后细胞活力明显下降, 转染 siRNA 48h 后 HCT116 与 SW620 细胞的抑制率分别为 34%、28%。流式细胞术发现 HCT116 和 SW620 在 *c-Raf* 基因下调后, 较多细胞滞留在 G<sub>1</sub> 期 ( $P < 0.05$ )。Western blot 实验发现转染 siRNA 后细胞 p-Cdc2、E2F1、CyclinD1 表达水平均有下降 ( $P < 0.05$ )。siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后, 细胞凋亡比例分别为  $9.68\% \pm 2.37\%$ 、 $7.29\% \pm 1.68\%$ , 均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后 Caspase-3 相对水平分别为  $0.57 \pm 0.11$ 、 $0.47 \pm 0.09$ , Bcl-2 相对水平分别为  $0.16 \pm 0.05$ 、 $0.23 \pm 0.04$ , 与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后 N-cadherin 相对水平分别为  $0.24 \pm 0.07$ 、 $0.22 \pm 0.04$ , E-cadherin 相对水平分别为  $0.47 \pm 0.12$ 、 $0.58 \pm 0.13$ , 与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。[结论] 通过下调 *c-Raf* 基因的表达可将大肠癌细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期, 促使细胞发生凋亡, 同时抑制大肠癌细胞发生 EMT 转化。

**关键词:** *c-Raf* 基因; 大肠肿瘤; 分子机制

中图分类号: R735.3+4 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2019)04-0293-07  
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B002

## Effect of *C-Raf* Gene on Growth of Colorectal Cancer Cells and Its Molecular Mechanism

ZHANG Le<sup>1</sup>, BAI Yue-kui<sup>1</sup>, LIU Kai-dong<sup>1</sup>, LIU Ming<sup>1</sup>, LI Fei<sup>2</sup>, LUO Shu-ping<sup>3</sup>

(1. Beijing Haidian Hospital, Beijing 100081, China; 2. Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing 100053, China; 3. Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the role of *c-Raf* gene in the growth of colorectal cancer cells and its molecular mechanism. [Methods] SiRNA was transfected into colorectal cancer HCT116 and SW620 cells with cationic liposome method, and the interference effect of siRNA was verified by Western blot. The effects of *c-Raf* gene on proliferation, migration, related cell viability of HCT116 and SW620 were studied by MTT assay, Transwell assay, cell clone formation assay and flow cytometry, respectively. The expression levels of p-Cdc2, E2F1 and CyclinD1 were detected by Western blot. [Results] The viability of HCT116 and SW620 decreased significantly after the siRNA transfection ( $P < 0.05$ ). And the inhibition rate of HCT116 and SW620 cells was 34% and 28% respectively after transfection of siRNA for 48h. The down-regulated *c-Raf* gene induced G<sub>1</sub>-phase arrest in HCT116 and SW620 cells. The expression of p-Cdc2, E2F1 and CyclinD1 decreased after siRNA transfection ( $P < 0.05$ ). After siRNA transfection, the percentage of apoptosis in HCT116 and SW620 cells was  $9.68\% \pm 2.37\%$  and  $7.29\% \pm 1.68\%$  respectively, which was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). After siRNA transfection the relative level of Caspase-3 in HCT116 and SW620 cells was  $0.57 \pm 0.11$  and  $0.47 \pm 0.09$ , the relative level of Bcl-2 was  $0.16 \pm 0.05$  and  $0.23 \pm 0.04$ , and there was significant difference with the control group ( $P < 0.05$ ). After siRNA transfection the relative level of N-cadherin was  $0.24 \pm 0.07$  and  $0.22 \pm 0.04$ , the relative level of E-cadherin was  $0.47 \pm 0.12$  and  $0.58 \pm 0.13$  in HCT116 and SW620 cells, and the difference with the control group was significant ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] The expression of *c-Raf* gene can arrest colorectal cancer cells in G<sub>1</sub> stage, induce cell apoptosis and inhibit the EMT transformation of colorectal cancer cells.

**Subject words:** *C-Raf* gene; colorectal cancer; molecular mechanism

通信作者: 白月奎, 主任, 主任医师, 博士; 北京市海淀区普外科, 北京市海淀区中关村大街 29 号 (100081); E-mail: baiyuekui@163.com

收稿日期: 2017-09-11; 修回日期: 2018-04-02

大肠癌是发病率较高的恶性肿瘤,已有研究发现饮食热量摄入和大肠癌发生密切相关,也有部分学者认为某些患者受遗传因素的影响<sup>[1]</sup>。大肠癌早期症状较为隐匿,主要是排便习惯的改变、腹痛、发热、消瘦等<sup>[2]</sup>。大肠癌是一个多因素复杂演变过程,首先大肠的正常黏膜衍生出息肉,然后在致癌因素刺激下转化为腺瘤,最终病变为恶性肿瘤,大肠癌的常见类型是腺癌,其次为黏液癌,尽管大肠癌的治疗技术不断进步,但患者的5年生存率不足62.8%<sup>[3]</sup>。大肠癌的病变涉及众多的基因和相关信号通路活性的改变。有研究证实 *c-Raf* 基因可编码磷酸化激酶,在细胞的增殖分化过程中有重要作用,*c-Raf* 的表达异常可诱发肺癌变的产生,而 CRAF 功能的拮抗蛋白 RKIP 可降低肺癌细胞的增殖活力,因此 *c-Raf* 可作为肺癌患者治疗的参考指标<sup>[4]</sup>。*C-Raf* 基因与大肠癌的研究较少,本研究通过 siRNA 干扰技术降低 *c-Raf* 表达水平,进而探讨 *c-Raf* 基因下调后对大肠癌细胞活性的影响及其相关的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

大肠癌细胞株 HCT116 和 SW620 (赛百慷公司);胎牛血清和抗生素(Gemini 公司);Matrigel 胶(BD 公司);TRIzol 裂解液(APPLYGEN 公司);Transwell 小室(Corning 公司);siRNA (上海锐赛生物技术有限公司合成);*c-Raf*、*p-Cdc2*、*E2F1*、*CyclinD1*、*Bcl-2*、*Caspase-3*、*N-cadherin*、*E-cadherin*、 $\beta$ -actin 的一抗抗体(CST 公司);HRP 标记得二抗(广州沃维生物公司);流式细胞分选仪(BD 公司);超低温冰箱(海尔集团);摇床 MIR-H163-PC 细胞培养箱购自日本三洋公司。

### 1.2 细胞培养与转染

细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。按照 RNAi 转染说明书将 *c-Raf* 的干扰 siRNA (5'-GTCAGGCAGATTCCTA-3');与转染液混匀转入细胞培养液中,siRNA 转染浓度为 100nM,置于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育。阴性对照组(NC)转入随机序列 RNA(5'-GTAAGCTGGCAATGCAGA-3')。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞增殖实验

将对数生长期的 HCT116 和 SW620 细胞接种

到 5 块 96 孔板中,每个细胞组 8 个复孔,10h 后参照 1.2 步骤转染 siRNA,分别在 0h、12h、24h、36h、48h 后加入 20  $\mu$ l MTT 溶液,育孵 2h 后,在 490 nm 波长下用酶标仪检测 OD 值,以 OD 值的大小表示细胞相对增长率。

#### 1.3.2 克隆形成实验

将生长良好的细胞参照 1.2 转染 siRNA,孵育 24h 后接种 6 孔板,每孔 800 个细胞,并轻轻摇晃培养板使细胞均匀分布,置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 10d。克隆培养成形后甲醛固定,用 Giemsa 染液染色 10min 后用 PBS 清洗晾干,显微镜观察细胞高于 50 的克隆并拍照记录,实验重复 3 次。

#### 1.3.3 Transwell 实验

采用无血清细胞培养液制成密度为  $1 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液,吸取 150 $\mu$ l 在 Transwell 上室培养,同时 Transwell 下室加入 500 $\mu$ l 含胎牛血清的细胞培养液,置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 24h,细胞使用 600 $\mu$ l 甲醇室温固定 0.5h,吸去固定液后用 Giemsa 染液染色 15min,轻轻用 PBS 溶液清洗后用显微镜观察计数。

#### 1.3.4 流式细胞术

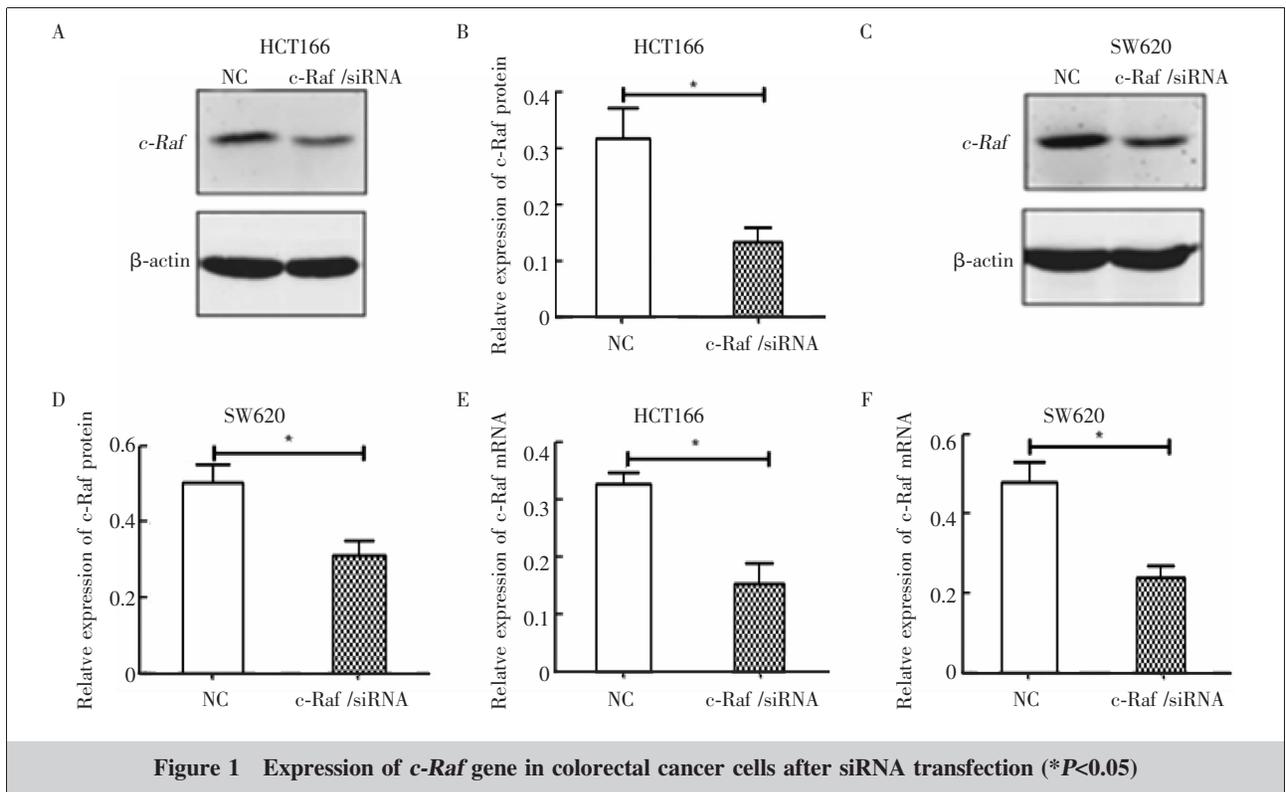
将生长状态良好细胞参照 1.2 转染 siRNA,孵育 24 h 后收集细胞,乙醇固定后 PBS 清洗 3 次,加入破膜剂后室温孵育 10min,离心后加入 0.5ml PBS 并在避光处加入 20 $\mu$ l 的碘化丙啶 (PI)4℃ 染色 15min,然后检测细胞周期。

#### 1.3.5 蛋白质印迹法检测

取对数生长期的细胞接种至 6 孔板培养,待 12h 后转染已合成的 siRNA,培养 24h 后采用胰蛋白酶消化并提取蛋白质。依据常规方法配制 5% 浓缩胶与 10% 分离胶,每孔上样 15 $\mu$ l 蛋白液(含蛋白质 25 $\mu$ g),在恒定电压 100V 电泳 1h 后将蛋白经半干法转膜至 PVDF 膜上,将 PVDF 膜移入 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液常温封闭 2h,然后经 TBST 溶液洗膜 3 次后,均匀混入按比例稀释后的一抗 4℃ 孵育 12h。然后将 PVDF 置于摇床用 TBST 洗涤 3 次,加入按 1:2000 稀释的二抗,室温孵育 1h 后,TBST 洗涤 3 次,在暗室用 ECL 显色并成像分析。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件处理数据,计量数据以均值 $\pm$ 标准差表示,多组样本采用单因素方差分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。



## 2 结果

### 2.1 *c-Raf* 在大肠癌细胞中的表达

在转染 *c-Raf* 基因的 siRNA 后, HCT116 细胞 *c-Raf* 蛋白表达量为  $0.13 \pm 0.06$ , 与 NC 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); SW620 细胞 *c-Raf* 蛋白表达量为  $0.27 \pm 0.09$ , 与 NC 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); HCT116 细胞 *c-Raf* 的 mRNA 相对水平为  $0.14 \pm 0.05$ , 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); SW620 细胞 *c-Raf* 的 mRNA 相对水平为  $0.21 \pm 0.08$ , 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明 *c-Raf* 基因的 siRNA 干扰成功。见 Figure 1。

### 2.2 *c-Raf* 基因下调后对 HCT116 和 SW620 细胞增殖的影响

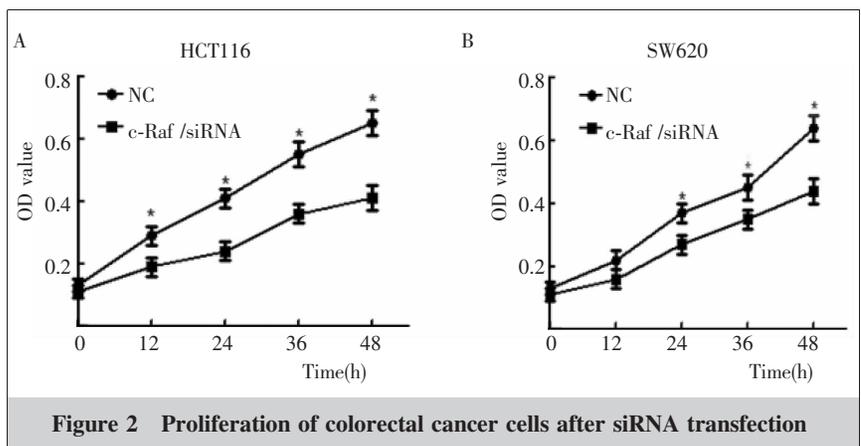
在培养 12h、24h、36h、48h 后, *c-Raf* 基因下调的 HCT116、SW620 与对照组相比, 细胞活力下降 ( $P < 0.05$ )。其中 48h 时, 转染 siRNA 的 HCT116 与 SW620 细胞的抑制率分别为 34%、28%。表明下调 *c-Raf* 基因的表达可抑制癌细胞的增殖。见 Figure 2。

### 2.3 *c-Raf* 基因下调后对 HCT116 和 SW620 细胞迁移能力的影响

Transwell 实验发现, HCT116 和 SW620 在转染了针对 *c-Raf* 基因的 siRNA 后, HCT116 迁移的相对细胞数量从  $325 \pm 35$  个下降到  $217 \pm 27$  个, SW620 迁移的相对细胞数量从  $186 \pm 27$  个下降到  $74 \pm 15$  个 ( $P < 0.05$ )。下调 *c-Raf* 基因可抑制大肠癌细胞的迁移能力。见 Figure 3。

### 2.4 *c-Raf* 基因下调后对细胞平板克隆形成能力的影响

*c-Raf* 基因下调后 HCT116 和 SW620 细胞克隆下降明显, HCT116 细胞克隆从  $369 \pm 23$  个降为  $164 \pm$



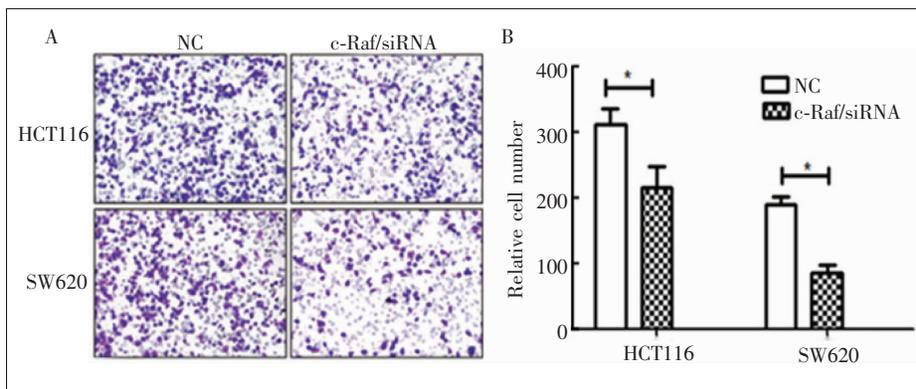
15 个, SW620 细胞克隆从 538±42 个降为 226±23 个( $P<0.05$ )。说明 HCT116 和 SW620 细胞克隆形成与 *c-Raf* 基因密切相关。见 Figure 4。

**2.5 *c-Raf* 基因下调后对细胞周期的影响**

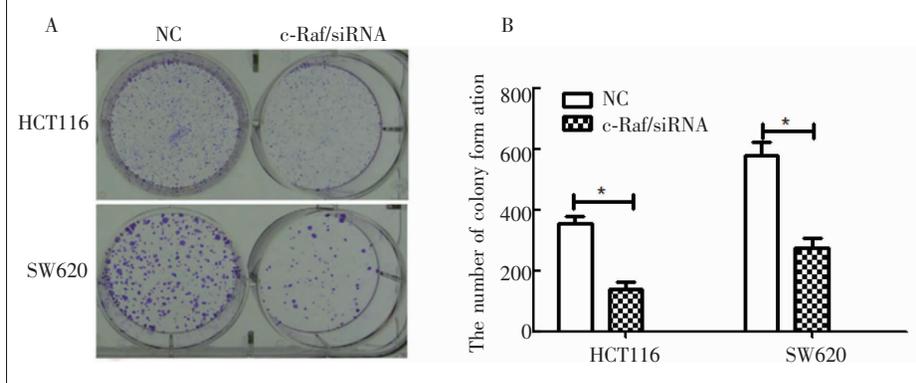
流式细胞术发现 HCT116 和 SW620 干扰组的  $G_0/G_1$  期比例分别为 85.49%±8.54%、81.63%±7.43%, HCT116 和 SW620 对照组的  $G_0/G_1$  期比例分别为 72.61%±7.51%、62.29%±5.43%, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。HCT116 和 SW620 干扰组的 S 期比例分别为 10.68%±0.76%、6.26%±0.69%, HCT116 和 SW620 对照组的 S 期比例分别为 23.53%±3.52%、15.43%±2.67%, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。表明 *c-Raf* 基因下调后  $G_0/G_1$  期的 HCT 116 和 SW620 细胞水平上升, S 期的 HCT 116 和 SW620 细胞水平下降。见 Figure 5。

**2.6 *c-Raf* 基因下调后对相关细胞周期蛋白表达的影响**

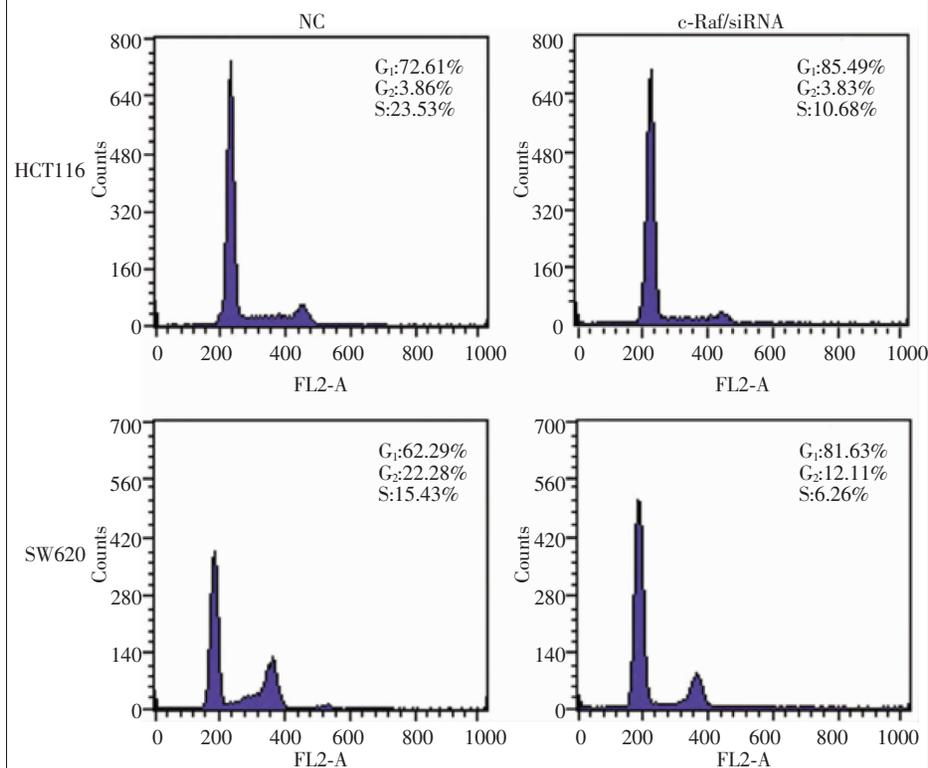
siRNA 转染 HCT116 后 E2F1、p-Cdc2 和 CyclinD1 蛋白相对水平分别为 0.17±0.06、0.21±0.04、0.23±0.05, 与对照组相比差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。转染后 SW620 细胞 E2F1、p-Cdc2 和 CyclinD1 蛋白相对水平分别为 0.14±0.03、0.23±0.06、0.19±0.04, 与对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。说明 *c-Raf* 基因下调后可引发相关细胞周期蛋白水平下降。见 Figure 6。



**Figure 3 Migration of colorectal cancer cells after transfection of siRNA (\* $P<0.05$ )**



**Figure 4 Clone formation of colorectal cancer cells after transfection of siRNA (\* $P<0.05$ )**



**Figure 5 Cell cycle of colorectal cancer cells after transfection of siRNA**

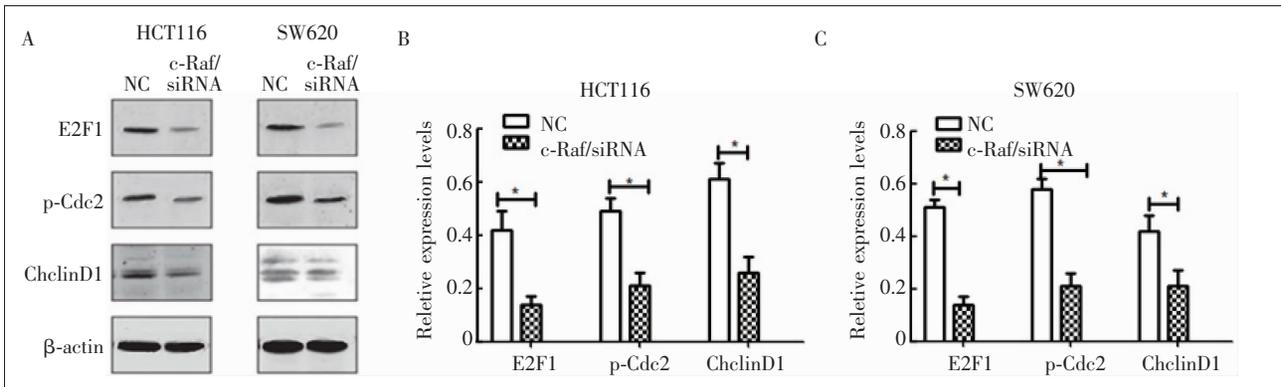


Figure 6 Expression of cyclin protein related to colorectal cancer cells after siRNA transfection(\* $P < 0.05$ )

### 2.7 *c-Raf* 基因下调后对相关细胞凋亡的影响

HCT116 和 SW620 干扰组的凋亡比例分别为  $9.68\% \pm 2.37\%$ 、 $7.29\% \pm 1.68\%$ ，显著高于对照组( $P < 0.05$ )。见 Figure 7。

### 2.8 *c-Raf* 基因下调后对相关凋亡蛋白表达的影响

siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后 Caspase-3 相对水平为  $0.57 \pm 0.11$ 、 $0.47 \pm 0.09$ ，与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )；Bcl-2 相对水平为  $0.16 \pm 0.05$ 、 $0.23 \pm 0.04$ ，与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，说明 *c-Raf* 基因下调后促使凋亡相关蛋白水平变化。见 Figure 8。

### 2.9 *c-Raf* 基因下调后对细胞 EMT 转化相关蛋白表达的影响

检测 siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后 N-cadherin 相对水平为  $0.24 \pm$

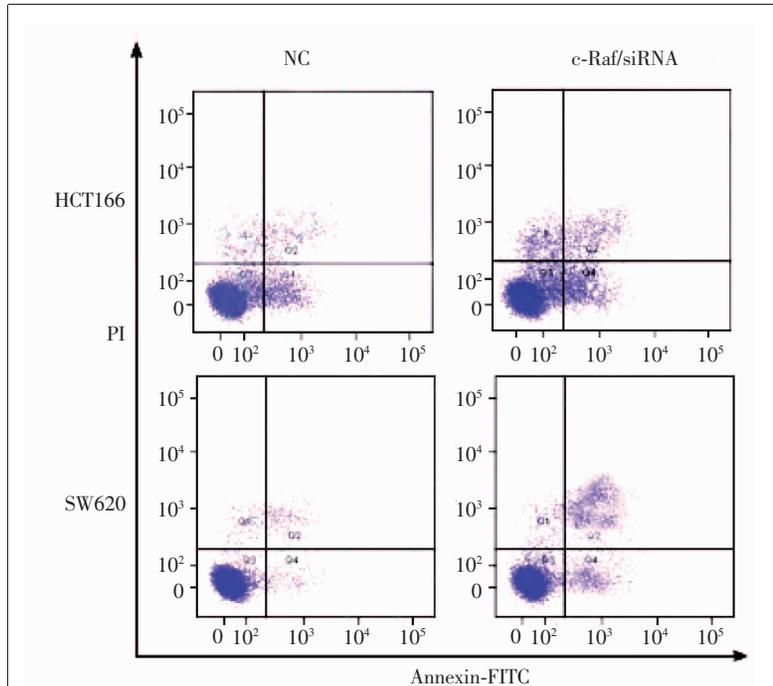


Figure 7 The apoptosis level of colorectal cancer cells after siRNA transfection

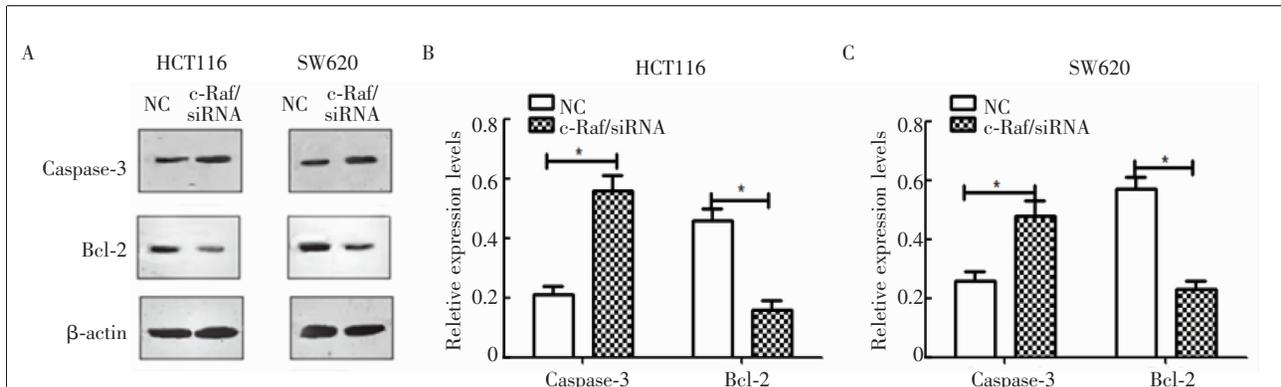


Figure 8 Expression of apoptosis protein related to colorectal cancer cells after siRNA transfection(\* $P < 0.05$ )

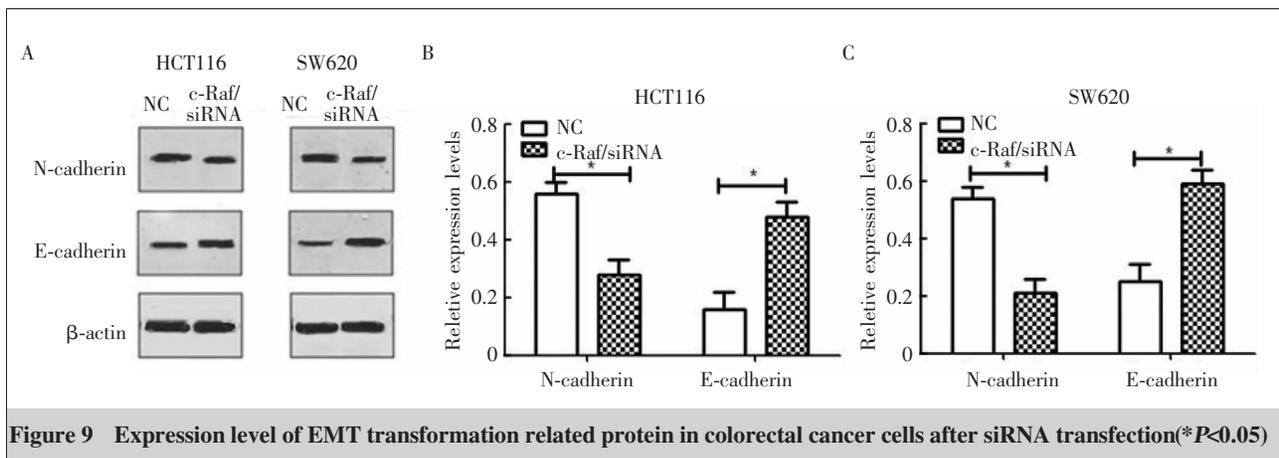


Figure 9 Expression level of EMT transformation related protein in colorectal cancer cells after siRNA transfection(\* $P < 0.05$ )

0.07、 $0.22 \pm 0.04$ ，与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；E-cadherin 相对水平为  $0.47 \pm 0.12$ 、 $0.58 \pm 0.13$ ，与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，说明 *c-Raf* 基因下调后可抑制细胞的 EMT 转化。见 Figure 9。

### 3 讨论

肿瘤的发生机理较为复杂，受遗传因素和外界致癌因素等多重作用的结果，许多基因在细胞癌变的过程中表达发生变化，进而影响下游信号通路的调控，最终可改变细胞的生物学活性，如细胞的增殖、迁移和分化等<sup>[5,6]</sup>。已发现许多基因的活性与大肠癌发生有关，如 *PTEN*、*APC*、*Axin* 等，相关基因调控网络研究尚少<sup>[7,8]</sup>。因此，通过探讨基因与癌症的作用机制，可为新药的开发与癌症治疗提供实验基础。*c-Raf* 表达的磷酸化激酶具有调控下游相关的信号通路的能力，*c-Raf* 在多种肿瘤中存在高表达，刺激肿瘤细胞的增殖与扩散<sup>[9]</sup>。

最初 RNA 干扰是科学家在研究秀丽新小杆线虫反义 RNA 的作用中发现的，直到 Fire 等学者在 1998 年通过实验证明了某些小 RNA 具有抑制同源基因表达的能力<sup>[10]</sup>。有研究发现下调宫颈癌细胞中 *c-Raf* 基因可降低细胞的增殖能力<sup>[11]</sup>。本研究将体外合成的 siRNA 转染入大肠癌细胞 HCT116 和 SW620 内，Western blotting 证实转染后细胞 *c-Raf* 基因下调。细胞增殖实验表明在培养不同时间后，*c-Raf* 基因下调的 HCT116、SW620 增殖能力下降 ( $P < 0.05$ )，表明 *c-Raf* 基因在癌细胞的增殖过程中发挥重要作用。Transwell 实验发现，HCT116 和 SW620

在转染了针对 *c-Raf* 基因的 siRNA 后，细胞活动能力减弱 ( $P < 0.05$ )。*c-Raf* 基因下调后 HCT116 和 SW620 细胞克隆形成数量明显下降 ( $P < 0.05$ )。有研究发现 *c-Raf* 与 MAPKs 信号转导通路密切相关，可将外界刺激转至胞内，相应的蛋白如黏附分子、细胞外基质蛋白酶等蛋白的分泌均会变化，从而对细胞活性产生影响<sup>[12,13]</sup>。

细胞周期失控可导致细胞增殖异常。通过流式细胞术发现较多的 HCT116 和 SW620 细胞滞留在  $G_1$  期，同时 S 期细胞减少，表明细胞分裂受到限制。已有大量研究表明 cyclins、CDKs、cyclin E、p-Rb、E2F1 等蛋白参与调控细胞周期<sup>[14]</sup>，其中 CDK 蛋白与 cyclin D 蛋白复合物是细胞开始进入细胞周期的开关，而 cyclin E 蛋白参与  $G_1$  期进入 S 期的相关调控，转录因子 E2F1 可与 Rb 蛋白共同控制细胞周期的进展，磷酸化的 Rb 蛋白可增强 E2F1 的转录活性，促进细胞的分裂<sup>[15,16]</sup>。分析 siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后相关蛋白的水平，发现与对照组相比 E2F1、p-Cdc2 和 CyclinD1 蛋白表达水平均有一定程度的下降 ( $P < 0.05$ )。说明 *c-Raf* 基因下调后可引发相关细胞周期蛋白水平下降，与细胞周期数据一致。HCT116 和 SW620 干扰组的凋亡比例分别为  $9.68\% \pm 2.37\%$ 、 $7.29\% \pm 1.68\%$ ，显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后 Bcl-2 有一定程度的下降，Caspase-3 水平上升 ( $P < 0.05$ )，说明 *c-Raf* 基因下调后可引发相关凋亡蛋白水平变化。siRNA 转染 HCT116 和 SW620 细胞后 N-cadherin 水平下降，E-cadherin 水平上升，提示 *c-Raf* 基因下调后可抑制细胞的 EMT 转化。

综上所述，通过下调 *c-Raf* 基因表达可将细胞

周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期,促使细胞发生凋亡,同时抑制大肠癌细胞发生 EMT 转化,为大肠癌的治疗提供一定的实验基础。

## 参考文献:

- [1] Kim JE, Kim KK, Kim SY, et al. MAP2K1 mutation in colorectal cancer patients; therapeutic challenge using patient-derived tumor cell lines [J]. *J Cancer*, 2017, (12): 2263–2268.
- [2] Stanilov NS, Miteva L, Cirovski G, et al. Increased transforming growth factor  $\beta$  and interleukin 10 transcripts in peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer patients[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2016, 20(6):458–462.
- [3] Chen SW, Zhu J, Ma J, et al. Overexpression of long non-coding RNA H19 is associated with unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer and increased proliferation and migration in colon cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2):2446–2452.
- [4] Hwang NL, Kang YJ, Sung B, et al. MHY451 induces cell cycle arrest and apoptosis by ROS generation in HCT116 human colorectal cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1783–1789.
- [5] Gui L, Wang Z, Han J, et al. High expression of Orai1 enhances cell proliferation and is associated with poor prognosis in human colorectal cancer [J]. *Clin Lab*, 2016, 62(9): 1689–1698.
- [6] Leu JD, Wang BS, Chiu SJ, et al. Combining fisetin and ionizing radiation suppresses the growth of mammalian colorectal cancers in xenograft tumor models [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):4975–4982.
- [7] Koelzer VH, Canonica K, Dawson H, et al. Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: impact on single cell invasion(tumor budding) and clinicopathological outcome[J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5(4):e1106677.
- [8] Li Y, Wang J, Dai X, et al. miR-451 regulates FoxO3 nuclear accumulation through Ywhaz in human colorectal cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12):2775–2785.
- [9] Matsuda T, Fujita H, Kunimoto Y, et al. Analysis of recurrent cases after laparoscopic surgery for colorectal cancer [J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(132):1028–1032.
- [10] Yang R, Liu X, Thakolwiboon S, et al. Protein markers associated with an ALDH sub-population in colorectal cancer[J]. *J Proteomics Bioinform*, 2016, 9(10):238–247.
- [11] Seebauer CT, Brunner S, Glockzin G, et al. Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer is characterized by structural and functional reorganization of the tumor microenvironment inducing senescence and proliferation arrest in cancer cells[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(12):e1242543.
- [12] Chen DL, Chen LZ, Lu YX, et al. Long noncoding RNA XIST expedites metastasis and modulates epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8):e3011.
- [13] Wu CT, Tsai YT, Lai JN, et al. Demographic and medication characteristics of traditional Chinese medicine users among colorectal cancer survivors: a nationwide database study in Taiwan[J]. *J Tradit Complement Med*, 2016, 7(2): 188–194.
- [14] Noura S, Shuto T, Muratsu A, et al. Pathological complete response in a case of multiple liver metastases from rectal cancer treated with XELOX plus bevacizumab(Bev)therapy [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2016, 43(12):1742–1744.
- [15] Behrouz Sharif S, Hashemzadeh S, Mousavi Ardehaie R, et al. Detection of aberrant methylated SEPT9 and NTRK3 genes in sporadic colorectal cancer patients as a potential diagnostic biomarker[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):5335–5343.
- [16] Wang S, Zhang S, Zhao Z, et al. Connexin 43 enhances paclitaxel cytotoxicity in colorectal cancer cell lines [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2):1212–1218.