

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00756

抑制差减杂交方法筛选辐射诱导细胞恶性转化模型中的差异表达基因

高 福,蔡建明,崔建国,李百龙*,闵 锐,黄越承,倪 瑾,孙 顶,姜 昊

第二军医大学海军医学系放射医学教研室,上海 200433

[摘要] 目的:筛选辐射诱导的支气管上皮细胞恶性转化模型中的差异表达基因。方法:应用抑制差减杂交方法(SSH)构建辐射诱导的细胞转化模型差异表达基因的 cDNA 文库。对差减文库进行 PCR 筛选,对得到的差异片段进行测序及 BLAST 分析;对部分筛选出来的差异表达基因使用荧光定量 PCR 方法检测并确认其变化;将新的序列表达标签(EST)登录到 GenBank 上。结果:在 80 个进行测序的克隆中,得到确定序列的共 73 个。在转化细胞中表达下降的序列 41 条,BLAST 比较分析结果:得到已知序列 6 条;未知基因的 EST 序列 20 条;空载体序列 7 条;8 条为重复测定序列。在转化细胞中表达上升的序列 32 条,BLAST 分析:已知序列 14 条;未知基因的 EST 序列 9 条;重复测定的序列 9 条。对其中的部分基因改变进行荧光定量 PCR 检测,结果表明辐射转化组中 MY06、HACE1、ZNF143、HNRPH1 的表达量明显增加(与对照组相比,转化组中的 mRNA 分别增加了 3.49、29.38、12.99、5.00 倍);而 PCBP2、RPL15、TCERG1 的表达量下降(与对照组相比,转化组中的 mRNA 分别减少了 1.89、48.77、11.95 倍)。将得到的 29 个未知序列登录到 GenBank,序列 ID:EB643220~EB643248。结论:利用抑制差减杂交方法成功建立了恶性转化细胞模型差异表达 cDNA 文库,包含大量功能未知的新基因;ZNF143 表达增加,其与细胞的增殖与分裂有关,TCERG1 作为转录辅助激活因子在 mRNA 转录和后期的修饰过程中起到重要的作用,PCBP2 是一个 Polyc 连接蛋白,具有蛋白翻译调节功能,这些基因在辐射致癌中尚无研究报道。

[关键词] 抑制差减杂交;细胞恶性转化模型;辐射;差异表达基因;cDNA 文库

[中图分类号] R 827.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0756-06

Suppression subtraction hybridization in screening of differentially expressed genes in radiation-induced malignant transformation cellular model

GAO Fu, CAI Jian-ming, CUI Jian-guo, LI Bai-long*, MIN Rui, HUANG Yue-cheng, NI Jin, SUN Ding, JIANG Hao

Department of Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To screen for the differentially expressed genes during irradiation-induced malignant transformation of human bronchus epithelium cells (BEAS-2B). **Methods:** Suppression subtraction hybridization (SSH) was used to construct a subtracted cDNA library of differentially expressed genes during irradiation-induced malignant transformation of BEAS-2B cells. Then the subtracted library was screened by PCR and the differential fragments were sequenced and analyzed with BLAST. Fluorescent real-time quantitative PCR was used to investigate some of the differentially expressed genes. The new EST was registered in GenBank. **Results:** Then 40 clones were chosen to be sequenced from the library of increased expression and decreased expression respectively according to the length of insertion element. Totally 73 sequences were obtained from the 80 sequenced clones. Forty-one sequences were decreased in the transformed cells; BLAST analysis indicated that there were 6 known sequences, 20 unknown sequences, 7 void sequences and 8 repeated sequences. Thirty-two sequences were increased in the transformed cells; Blast analysis indicated that there were 14 known sequences, 9 unknown sequences, and 9 repeated sequences. Fluorescent quantitative PCR revealed that, compared with control group, the expression of MY06, HACE1, ZNF143, and HNRPH1 were significantly increased in the radiation transforming group, with their mRNAs increased by 3.49, 29.38, 12.99 and 5.00 folds, respectively. Compared with control group, the expression of PCBP2, RPL15, and TCERG1 in the radiation transforming group was significantly decreased, with their mRNAs decreased by 1.89, 48.77 and 11.95 folds, respectively. The 29 unknown sequences were registered in the GenBank (ID: EB643220-EB643248). **Conclusion:** The cDNA library has been successfully established for malignant transformation cellular model by suppression subtractive hybridization; the library includes

[收稿日期] 2007-12-12 **[接受日期]** 2008-03-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30370359). Supported by National Natural Science Foundation of China(30370359).

[作者简介] 高 福,博士,讲师.E-mail: gaofu_2002@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25074453, E-mail: libailong2003@yahoo.com.cn

a number of unknown genes. The increased gene ZNF143 is associated with cell proliferation and cell division. TCERG1, as an assistant transcription activation factor, plays an important role in the mRNA transcription and later modification. PCBP2, a Polyc connection protein, plays a modulating role in protein translation. These genes have not been reported in the radiation carcinogenicity.

[KEY WORDS] suppression subtractive hybridization; malignant transformations cellular model; irradiation; differential expression genes; cDNA library

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 756-761]

辐射的致癌效应和其他肿瘤的发生类似,是极其复杂的过程,涉及到多个肿瘤相关基因的改变和功能的异常^[1]。目前已知与辐射诱导肿瘤相关的基因编码产物(蛋白和酶等)参与了信号转导、损伤修复、细胞周期调控、增殖分裂、能量代谢、凋亡等一系列机体的生物学行为过程^[2]。随着辐射致癌研究机制的深入,有些问题^[3]显得越发重要:辐射致癌过程中还涉及到哪些基因和事件,在辐射致癌过程中还有哪些未知功能的基因参与,其作用如何? 这些问题的解决取决于合适的筛选差异表达基因方法的应用。

抑制差减杂交(suppressive subtractive hybridization, SSH)是一种简便而高效的寻找差异表达基因的新方法。该方法具有减数杂交和平衡显示差异基因的优点,可使低丰度的差异 mRNA 得以显现^[4-6]。现有的各种差异表达基因筛选方法均存在某些不足之处,SSH 方法的成功建立使肿瘤差异基因检测取得重要进展,是研究肿瘤发生机制的一个重要研究方法。本研究以⁶⁰Co γ 射线照射诱发的支气管上皮细胞 BEAS-2B 的恶性转化模型为研究对象,采用抑制差减杂交技术对辐射致细胞恶性转化过程中的差异表达基因进行了较为全面的分析,以期从基因水平深入探讨辐射致癌的分子机制,充实完善现有理论。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂 正常传代培养的 BEAS-2B 细胞和辐射诱导的 BEAS-2B 恶性转化细胞,恶性转化细胞模型为本室建立,22 Gy ⁶⁰Co γ 射线分 3 次照射,裸鼠体内注射成瘤证实^[7]。LHC-8 培养基购自美国 Biofluid 公司;细胞总 RNA 抽提试剂盒(Trizol);购自上海华舜生物公司;Nucleo trap mRNA purification, AdvantageTM II PCR enzyme system, PCR-SelectTM cDNA subtraction kit 均购自 Clontech 公司;DH5 α 大肠杆菌为本室保存;T₄ DNA 连接酶, MBI; pUCm-T 载体, 上海生工生物技术公司; Perfect Real Time(Sybr Green I) 荧光定量反应试剂盒以及 PCR 反应试剂购于 TaKaRa 公司。

1.2 RNA 抽提及 mRNA 纯化 取辐照后恶性转化细胞和正常培养的 BEAS-2B 细胞,其总 RNA 提取按照试剂盒说明书进行,甲醛变性电泳证实无明显降解。使用 Nucleo trap mRNA purification 试剂盒分离纯化出 mRNA,核酸/蛋白分光光度计定量。

1.3 抑制差减杂交 具体流程按照 Clontech 说明书进行。以转化组和对照组、阳性控制组(人骨骼肌,试剂盒内提供)mRNA 为模板进行逆转录,再将单链 cDNA 合成双链 cDNA,各组分别用 *Rsa* I 酶切。将转化组、对照组 mRNA 分别标记为 tester (T1)、driver(D1),所得最后结果为转化组中表达的基因;为了检测在转化组中表达缺失的基因,将对照组细胞 mRNA 样本记为 tester(T2),转化组 mRNA 样本记为 driver(D2)。将实验组(tester)分成 2 管,分别加不同的 DNA 接头 adaptor1 和 adaptor2R,凝胶电泳进行连接效率分析。然后进行两轮消减杂交。杂交后产物行两轮 PCR 扩增,第一轮扩增 30 个循环,第二轮扩增 18 个循环,凝胶电泳分析其产物。

1.4 差减 cDNA 文库建立 取 5 μ l 第二轮 PCR 产物与 1 μ l pUCm-T 载体进行标准连接反应,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(氯化钙法),接种于 X-gal/IPTG/氨苄琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。分别计数蓝白克隆并做好相应标记。将暂不进行分析的白色克隆挑取后在 5 ml LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振摇过夜,加 15%甘油,液氮速冻,置-70 $^{\circ}$ C 保种。

1.5 文库筛选 随机挑选 120 个白色菌落克隆,分别接种于氨苄 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振摇培养 6 h,各取 1 μ l 菌液用第二轮引物进行 PCR 扩增。产物进行琼脂糖凝胶电泳检测有无特异性插入片段。

1.6 差异片段 DNA 序列分析 将有特异性片段插入的克隆菌液送至上海英骏生物技术公司进行载体克隆测序,测序引物为 M13 通用引物,测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行比对分析。将新的片段序列登录到 GenBank 上。

1.7 荧光定量 PCR 分析 运用 Sybr Green I 荧光定量 RT-PCR 方法检测 MY06、HACE1、ZNF143、HNRPH1、PCBP2、RPL15、TCERG1、DDX5 几条基

因的改变情况,GAPDH 为内参对照。先将各待测样本 RNA 进行反转录,反转录操作按照 Promega 公司 M-MLV-RT 试剂盒说明书进行。优化后的实时定量 RT-PCR 体系如下:SYBR Premix Ex Taq (2×)10 μl,上、下游引物各 0.4 μl,各待检 cDNA 模板 1 μl,灭菌双蒸水 8.2 μl,总量 20 μl。将反应体系稍微离心后放入定量 PCR 仪内,采用 2 步法进行扩增。反应条件:95℃,10 s;95℃,5 s,60℃,20 s,40 个循环。根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数(Ct 值)。

结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[8]: ΔC_t 处理组 = Ct 处理组 - Ct 处理组内参; ΔC_t 对照组 = Ct 对照组 - Ct 对照组内参; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ 处理组 - ΔC_t 对照组。RNA 处理组/RNA 对照组 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果 在第一轮扩增中,Tt、Dt、Ct (内对照)扩增结果为弱的条带,或不可见;作为对照的两端均加了接头的 Tc、Dc、Cc 则可见到片状扩增产物(Cc 条带片段分布)。而作为 PCR 控制条件的呈 $\phi\times 174$ DNA/*Hae* III 消化 marker 片段分布。因为模板数量少,而且为了增加杂交的特异性,因此第一轮扩增结果条带弱或者不明显为理想状态,否则需要减少循环数(图 1)。第二轮扩增可见从 150~1 500 bp 均有较清晰的特异条带。且作为实验内对照的 Cc 的扩增与试剂盒中所提供的标准 Cc 扩增相比其位置、带数相同,并且电泳结果更为清晰,说明实验操作取得成功(图 2)。

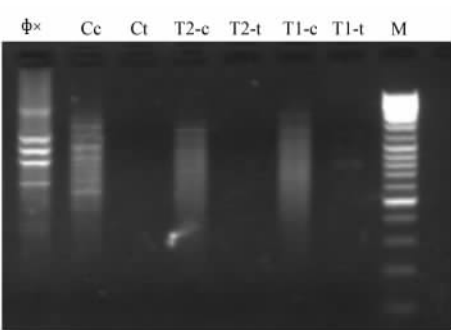


图 1 首轮 PCR 扩增结果
Fig 1 Results of primary PCR amplification

Φx: PCR control-subtracted cDNA; Cc: Unsubtracted tester control for the control subtraction; Ct: Subtracted control skeletal muscle cDNA; T2-c: Unsubtracted tester control for the reverse subtraction; T2-t: Reverse-subtracted experimental cDNA; T1-c: Unsubtracted tester control; T1-t: Forward-subtracted experimental cDNA; M: Marker

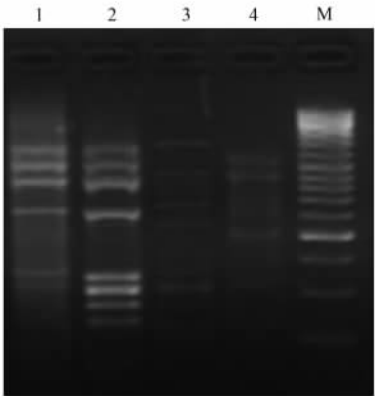


图 2 第二轮 PCR 扩增结果
Fig 2 Results of secondary PCR amplification
1: PCR control-subtracted cDNA; 2: Subtracted control skeletal muscle cDNA; 3: Reverse-subtracted experimental cDNA; 4: Forward-subtracted experimental cDNA; M: Marker

2.2 差异条带的扩增及筛选 由于同一大小 PCR 产物可能会在文库中形成一定数目的克隆,为减少测定序列工作量,将 T 载体内克隆的片段进行 PCR 扩增后电泳,从中挑选具有不同插入长度的克隆再进行序列测定。从随机挑取进行摇菌的 120 个克隆中选出具有不同插入片段的 80 个克隆进行测序(图 3)。



图 3 T 载体差异条带的扩增及筛选
Fig 3 Amplification and screening of clone fragment inserted T vector

M: Marker; 1-19: Different inserted fragments

2.3 测序结果 在 80 个进行测序的克隆中,得到确定序列的共 73 个。在转化细胞中表达上升的序列 32 条,BLAST 分析:(1)已知序列 14 条;(2)未知基因的 EST 序列 9 条;(3)重复测定的序列 9 条。在转化细胞中表达下降的序列 41 条,进行 BLAST 比较分析:(1)已知序列 6 条;(2)未知基因的 EST 序列 20 条;(3)空载体序列 7 条;(4)8 条为重复测定序列。将未知的 29 条 EST 序列登录到 GenBank 上,登录注册号为:EB643220~EB643248(表 1、2)。

表 1 恶性转化模型中表达下调的基因

Tab 1 Down-regulated genes in malignant transformation cell model		
SSH Library No	GenBank ID	Description
D1	NM_001040006	Homo sapiens transcription elongation regulator 1(TCERG1)
D4	AB208825	Poly(rC) binding protein 2 (PCBP2)
D6	EB643220	Unknown EST sequence
D7	EB643221	Unknown EST sequence
D8	NM_002948	Homo sapiens ribosomal protein L15 (RPL15)
D9	EB643222	Unknown EST sequence
D10	EB643223	Unknown EST sequence
D12	EB643224	Unknown EST sequence
D13	EB643225	Unknown EST sequence
D15	EB643226	Unknown EST sequence
D17	EB643227	Unknown EST sequence
D19	NM_001040006	Homo sapiens transcription elongation regulator 1 (TCERG1)
D23	EB643228	Unknown EST sequence
D24	EB643229	Unknown EST sequence
D25	EB643230	Unknown EST sequence
D26	EB643231	Unknown EST sequence
D28	EB643232	Unknown EST sequence
D30	EB643233	Unknown EST sequence
D31	EB643234	Unknown EST sequence
D35	EB643235	Unknown EST sequence
D38	BC064541	Homo sapiens solute carrier family 25,member 28
D41	EB643236	Unknown EST sequence
D42	EB643237	Unknown EST sequence
D43	NM_002948	Homo sapiens ribosomal protein L15 (RPL15)
D46	EB643238	Unknown EST sequence
D50	EB643239	Unknown EST sequence

表 2 恶性转化模型中表达上升的基因

Tab 2 Up-regulated genes in malignant transformation cell model		
SSH Library No	GenBank ID	Description
T1	NM_000980	Homo sapiens ribosomal protein L18a
T2	NM_019597	Canis familiaris similar to Heterogeneous nuclearrbonucleoprotein H (hnRNP H)
T3	NM_017615	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 86
T4	NM_000980	Homo sapiens ribosomal protein L18a
T5	NM_004396	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 (DDX5)
T6	NM_003442	Homo sapiens zinc finger protein 143 (clone pHZ-1) (ZNF143)
T8	NM_005274	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein),gamma. 5 (GNG5)
T9	NM_004396	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 (DDX5)
T10	NM_004999	Homo sapiens myosin VI
T13	EB643240	Unknown EST sequence
T15	EB643241	Unknown EST sequence
T17	EB643242	Unknown EST sequence
T18	EB643243	Unknown EST sequence
T19	XM_939776	Homo sapiens hypothetical protein LOC650690
T22	EB643244	Unknown EST sequence
T24	EB643245	Unknown EST sequence
T26	EB643246	Unknown EST sequence
T28	NM_000310	Homo sapiens palmitoyl-protein thioesterase 1
T31	EB643247	Unknown EST sequence
T37	NM_004999	Homo sapiens myosin VI
T38	XM_939776	Homo sapiens hypothetical protein LOC650690
T42	NM_010310	Guanine nucleotide binding protein
T46	BC015958	Homo sapiens poly(A) binding protein,cytoplasmic 1
T47	NM_004999	Homo sapiens myosin VI
T54	EB643248	Unknown EST sequence
T55	BC034982	Homo sapiens HECT domain and ankyrin repeat containing,E3 ubiquitin protein ligase 1
T56	NR_002802	Homo sapiens trophoblast-derived noncoding RNA

2.4 部分基因差异表达的验证结果 与正常代数培养细胞相比较,辐射转化组中 MY06、HACE1、ZNF143、HNRPH1 的表达量明显增加(与对照组相比,转化组中的 mRNA 分别增加了 3.49、29.38、12.99、5.00 倍);而 PCBP2、RPL15、TCERG1 的表达量下降(与对照组相比,转化组中的 mRNA 分别减少了 1.89、48.77、11.95 倍);DDX5 的表达未见明显改变。此次检测共选取了 8 条 SSH 实验筛选出来的表达改变基因,其中 7 条基因的表达量经荧光定量 PCR 验证确实发生了改变。表明 SSH 筛选出来的差异片段绝大多数的表达确实发生了明显改变,实验结果具有较高的可信度。

3 讨论

研究表明,众多基因诸如 p53、p16、AMT、Rb、hRAD50、c-myc、H-ras、Rb 等基因在辐射致癌过程中都有参与^[1-3]。由于辐射诱发肿瘤的相关基因改变谱随着种属、个体、组织类型以及诱因的不同而存在明显的不同,在细胞恶性转化的各个时期基因的改变也不尽相同,在某个肿瘤的发生中伴发的众多基因的改变中,很难区别哪些基因对肿瘤的发生和发展起重要作用,哪些是肿瘤生成过程中由于 DNA 修复异常及基因组的不稳定性引起的继发性改变;以及尚有相当多的功能未知基因存在。这些原因使得辐射诱发肿瘤(同样也存在于其他肿瘤发生机制的研究中)发生机制的研究变的异常复杂。因此,迫切需要从整体的角度全面识别正常细胞与相应恶性转化细胞之间的差异表达基因,并寻找出功能未知的参与细胞恶性转化过程的新基因。

抑制差减杂交技术(SSH)由 Diatchenko 等^[5]在 1996 年建立。SSH 技术筛选差异表达基因的优点有:(1)假阳性低:Von 等^[6]用转移性和非转移性两种腺癌细胞株做比较,有力地证明了 SSH 的阳性率高达 94%,并认为检测每个克隆是否为假阳性已无必要。(2)高敏感性:SSH 方法所做的均等化和目标片段的富集,保证了低丰度的 mRNA 也可被检出^[6,9]。(3)速度快、效率高:程序相对简单,操作简便易行,一次 SSH 反应可同时分离上百个差异表达基因。SSH 自从建立以来就相继有在肿瘤相关基因研究方面的应用报道:(1)肿瘤中新的相关基因的研究:相继用 SSH 技术从肾细胞癌^[10]、结肠癌^[11]、肺鳞状上皮细胞肺癌^[12]等肿瘤细胞中分离得到许多新的差异表达基因,证明 SSH 确实为分离新的相关表达基因的有效方法。(2)肿瘤发生机制方面的研究:Sandhu 等^[13]利用 SSH 和 cDNA 微阵列技

术,观察了石棉诱导鼠发生癌变的不同阶段基因表达谱的变化,研究发现石棉可能通过影响整合素介导的信号传递和细胞外基质蛋白发挥致癌作用;(3)外界因素对肿瘤细胞的作用:Seta 等^[14]将 SSH 和 cDNA 微阵列相结合,筛查了缺氧前后嗜铬细胞瘤细胞株差异表达的基因,发现缺氧时 MAPK 磷酸酶-1 的表达明显上调,部分通过 p38 激酶介导的通路发挥作用。(4)癌基因的作用通路研究:Cobellis 等^[15]利用 SSH 方法探讨癌基因 v-H-Ras 致甲状腺上皮细胞恶性转化时的基因变化,发现 57 个 v-H-Ras 特异性作用的靶片段。到目前为止,该方法已相继应用在大肠癌、肺癌、前列腺癌、乳头状甲状腺癌、食管癌、B 细胞淋巴瘤、肾癌、肝癌、黑色素瘤及肾上腺皮质腺瘤中癌基因或抑癌基因的克隆鉴定上,并发现了一些新的候选基因。

尽管 SSH 具有较高特异性,但与其他筛选差异表达基因方法类似,SSH 也存在着假阳性的问题。为了验证差减 cDNA 文库的阳性率,对其中部分已知基因进行实时荧光定量 PCR 检验。经 FQ-PCR 检验:辐射转化组中 MY06、HACE1、ZNF143、HNRPH1 的表达量明显增加(与对照组相比,转化组中的 mRNA 分别增加了 3.49、29.38、12.99、5.00 倍);而 PCBP2、RPL15、TCERG1 的表达量下降(与对照组相比,转化组中的 mRNA 分别减少了 1.89、48.77、11.95 倍)。在 8 条进行定量的基因中,有 7 条的表达发生了确定性的改变,阳性率高达 87.5%,表明 cDNA 文库构建成功。

ZNF143 是转录调控蛋白基因,包含一系列重复的锌指结构区,与正常和转化细胞的增殖与分裂功能有关;ZNF143 对 BUB1B 的转录具有正向调控作用,而 BUB1B 是一个重要的 G₂/M 周期位点控制蛋白基因,其功能丧失将导致染色体的遗传不稳定性,而非整倍体染色体产生^[16]。此外,ZNF143 还能够激活对 DNA 损伤反应的基因表达^[17]。

TCERG1(CA150)转录延伸调节因子 1 mRNA 全长 4.5 kb,编码一个 1 097 个氨基酸的蛋白,相对分子质量为 150 000。TCERG1 作为转录辅助激活因子在 mRNA 转录和后期的修饰过程中起到重要的作用^[18-19]。TCERG1 与 RNA 多聚酶作用,介导 Tat 的启动活性,并能以依赖 TATA 盒方式调节某些启动子,例如 ITGA4 调节的转录延长。HIV 在机体内的高效表达依赖于 TCERG1 以及病毒编码的反式作用子 Tat 的活性。TCERG1 的缺失能够抑制 Tat 的反式激活作用,过表达的 CA150 突变同样也降低 Tat 介导的 HIV 启动活性。有关

TCERG1 在肿瘤发生机制中的研究目前未有报道。

PCBP2 的 mRNA 在人体各组织细胞中均有转录,PCBP2 蛋白通过其 KH(hnRNP K homology)区能识别并连接到 DNA/RNA poly(rC)序列,磷酸化后结合作用降低,PCBP2 具有蛋白翻译调节功能^[20]。PCBP2 介导了脊髓灰质炎病毒在细胞内的复制、翻译与安装^[21]。原癌基因 c-myc mRNA 的 5'端有核糖体进入结合位点,PCBP2 与同家族成员 PCBP1 及 hnRNP K 能够结合到 c-myc 的内部核糖体进入结合位点上,体外实验显示这些 Polyc 连接蛋白在与 N-ras 等上游蛋白共同作用下能够使 c-myc 的翻译活性增加 3 倍以上,大多数的多发性骨髓瘤患者 c-myc 结合 Polyc 连接蛋白能力增加^[22-23]。有关 PCBP2 在辐射致癌中的作用研究未见报道,其具体作用如何有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

[1] Little J. Radiation carcinogenesis[J]. Carcinogenesis,2000,21: 397-404.

[2] 高 福,杨 平,韩 玲,蔡建明,黄越承,赵 芳,等. ⁶⁰Co γ 射线诱导的白血病模型中辐射致癌相关基因的筛选[J]. 第二军医大学学报,2003,24:697-701.

[3] 蔡建明,程天民. 辐射致癌分子机制研究现状及展望[J]. 第二军医大学学报,2003,24:728-732.

[4] Gurskaya G,Diatchenko L,Chenchik A,Siebert P D,Khaspek-ov G L,Lukyanov K A, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of jurkat cell transcripts induced by phytohe maglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate[J]. Anal Biochem,1996, 240:90-97.

[5] Diatchenko L,Lau Y F,Campbell A P,Chenchik A,Moadam F, Huang B, et al. Suppression subtractive hybridization; a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996, 93:6025-6030.

[6] von Stein O D,Thies W G,Hofmann M. A high throughout screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Res,1997,25:2598-2602.

[7] 高 福,蔡建明,崔建国,黄定德,李百龙,杨 平,等. ⁶⁰Co γ 射线体外诱发的人支气管上皮细胞(BEAS-2B)恶性转化模型的建立[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14:435-440.

[8] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method [J]. Methods,2001,25:402-408.

[9] Diatchenko L,Lukyanov S,Lau Y F,Siebert P D. Suppression subtractive hybridization; a versatile method for identifying differentially expressed genes[J]. Methods Enzymol,1999,303: 349-380.

[10] Pitzer C,Stassar M,Zöller M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization[J]. J Cancer Res Clin Oncol,1999,125(8-9):487-492.

[11] Andreu P,Colnot S,Godard C,Laurent-Puig P,Lamarque D, Kahn A,et al. Identification of the IFITM family as a new molecular marker in human colorectal tumors[J]. Cancer Res, 2006,66:1949-1955.

[12] Sen S,Ateeq B,Sharma H,Datta P,Gupta S D,Bal S,et al. Molecular profiling of genes in squamous cell lung carcinoma in Asian Indians[J]. Life Sci,2008,82(13-14):772-779.

[13] Sandhu H,Dehnen W,Roller M,Abel J,Unfried K. mRNA expression patterns in different stages of asbestos-induced carcinogenesis in rats[J]. Carcinogenesis,2000,21:1023-1029.

[14] Seta K,Kim R,Kim H W,Millhorn D E,Beitner-Johnson D. Hypoxia-induced regulation of MAPK phosphatase-1 as identified by subtractive suppression hybridization and cDNA microarray analysis[J]. J Biol Chem,2001,276:44405-44412.

[15] Cobellis G,Missero C,Simionati B,Valle G,Di Lauro R. Immediate early genes induced by H-Ras in thyroid cells[J]. Oncogene,2001,20:2281-2290.

[16] Myslinski E,Gérard M A,Krol A,Carbon P. Transcription of the human cell cycle regulated BUB1B gene requires hStaf/ ZNF143[J]. Nucleic Acids Res,2007,35:3453-3464.

[17] Ishiguchi H,Izumi H,Torigoe T,Yoshida Y,Kubota H,Tsuji S,et al. ZNF143 activates gene expression in response to DNA damage and binds to cisplatin-modified DNA[J]. Int J Cancer, 2004,111:900-909.

[18] Pearson J L,Robinson T J,Muñoz M J,Kornblihtt A R,Garcia-Blanco M A. Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing[J]. J Biol Chem,2008,283:7949-7961.

[19] Andresen J M,Gayán J,Cherny S S,Brocklebank D,Alkorta-Aranburu G,Addis E A,et al. Replication of twelve association studies for Huntington's disease residual age of onset in large Venezuelan kindreds[J]. J Med Genet,2007,44:44-50.

[20] Perrotti D,Cesi V,Trotta R,Guerzoni C,Santilli G,Campbell K,et al. BCR-ABL suppresses C/EBP-alpha expression through inhibitory action of hnRNP E2[J]. Nat Genet,2002,30:48-58.

[21] Perera R,Daijogo S,Walter B L,Nguyen J H,Semler B L. Cellular protein modification by poliovirus: the two faces of poly (rC)-binding protein[J]. J Virol,2007,81:8919-8932.

[22] Evans J R,Mitchell S A,Spriggs K A,Ostrowski J,Bomszyk K,Ostarek D,et al. Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncogene,2003,22:8012-8020.

[23] Ostareck-Lederer A,Ostareck D H,Hentze M W. Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2[J]. Trends Biochem Sci,1998,23:409-411.

[本文编辑] 尹 茶