

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00485

## 基因组消减杂交技术筛选肾透明细胞癌转移相关甲基化基因

孙浚雯<sup>1</sup>, 常文军<sup>1</sup>, 翟羽佳<sup>1</sup>, 谭晓洁<sup>1</sup>, 侯建国<sup>2</sup>, 余永伟<sup>3</sup>, 马立业<sup>4</sup>, 曹广文<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433
3. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433
4. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的:** 筛选能够早期诊断和预测肾透明细胞癌转移相关基因的甲基化生物标志。**方法:** 应用本室从临床新鲜组织标本体外培养建立的低转移性和高转移性肾透明细胞癌细胞株, 病理学鉴定后提取基因组 DNA, 应用 3 轮 *Not I* 基因组消减杂交的方法富集差异甲基化序列, 差异序列连接载体, 转化宿主菌和  $\alpha$  筛选后, 选取 40 个序列进行测序, 应用生物信息学分析确定启动子 CpG 岛甲基化序列, 并对未知基因功能进行预测。**结果:** DNA 测序后获得了 27 个单一克隆在高转移和低转移性肾透明细胞癌基因组中存在甲基化差异; 其中 5 个序列具有 CpG 岛, 其中 2 个对应于基因 MYADM 和 LOC646024 的启动子区。MYADM 与血细胞成熟、干细胞再生有关; 而 LOC646024 与 NK 细胞抗肿瘤相关的 UL16 结合蛋白 1 有 85% 的相似度。**结论:** 本研究从不同转移能力的中国人肾透明细胞癌基因组中获得多种转移相关性的新甲基化序列, 发现 MYADM 和 LOC646024 候选基因与肾癌转移相关。

**[关键词]** 肾透明细胞癌; 肿瘤转移; DNA 甲基化; 基因组消减杂交

**[中图分类号]** R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0485-06

### Screening for clear cell renal cell carcinoma metastasis-associated methylations by genome subtractive hybridization

SUN Jun-wen<sup>1</sup>, CHANG Wen-jun<sup>1</sup>, ZHAI Yu-jia<sup>1</sup>, TAN Xiao-jie<sup>1</sup>, HOU Jian-guo<sup>2</sup>, YU Yong-wei<sup>3</sup>, MA Li-ye<sup>4</sup>, CAO Guang-wen<sup>1\*</sup>

1. Department of Epidemiology, Faculty of Health Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433
4. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To screen for methylated biomarkers for the early diagnosis and prediction of clear cell renal cell cancer (ccRCC) metastasis. **Methods:** Highly and lowly metastatic ccRCC cell lines, which were established using fresh surgical specimens in our laboratory, were used in this study. Genomic DNA was extracted after pathological identification. Methylated genomic fragments were enriched by 3 cycles of *Not I* genomic DNA subtractive hybridization and were linked to vectors, which was then used for transformation, followed by  $\alpha$  selection. Forty positive clones were randomly selected for DNA sequencing. Bioinformatics analysis was used to identify methylation of CpG islands and to predict the function of unknown genes. **Results:** DNA sequencing revealed 27 independent clones with different methylations between the highly and lowly metastatic ccRCC. Five of the 27 clones contained CpG islands, and 2 of the 5 fragments contained CpG islands in the promoter regions of genes MYADM and LOC646024. MYADM was associated with maturation of hematopoietic cells and regeneration of stem cells. LOC646024 shared 85% homology with UL16 binding protein 1; the latter was related to tumor killing function of NK cells. **Conclusion:** Novel methylated sequences have been discovered from Chinese ccRCC cells with different potentials for metastasis. Methylation of 2 candidate genes, MYADM and LOC646024, is indicated to be involved in ccRCC metastasis. Our findings are valuable for the biomarker exploration to predict metastasis as well as molecular epidemiological research.

**[KEY WORDS]** clear cell renal cell carcinoma; neoplasm metastasis; DNA methylation; genomic DNA subtractive hybridization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 485-490]

**[收稿日期]** 2007-11-20 **[接受日期]** 2008-01-31

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30370788). Supported by National Natural Science Foundation of China (30370788).

**[作者简介]** 孙浚雯, 硕士生, E-mail: junwensun510@hotmail.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070420, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统常见恶性肿瘤,占全球内脏恶性肿瘤的2.6%,发病率约占肾肿瘤的85%,近年来RCC的发病率和病死率不断上升<sup>[1]</sup>。RCC早期症状不明显,30%的患者在诊断明确时已出现转移,其平均生存期为8~10个月,2年内的生存率为10%~20%<sup>[2]</sup>;11%的RCC患者在根治性肾切除术后5年内死亡<sup>[3-4]</sup>。目前研究<sup>[5]</sup>发现,对一些肿瘤特异基因甲基化状态进行筛查可用于肿瘤的早期诊断和转移预测。有关RCC DNA甲基化方面的研究已有多篇文献报道,但以研究其发生相关的DNA甲基化为主。目前已经发现p16 INK4A<sup>[6]</sup>、VHL<sup>[7-8]</sup>、APC、GSTP<sup>[9]</sup>、DAPK、CDH1、RASSF1A<sup>[10]</sup>、DLC1<sup>[11]</sup>等肿瘤抑制基因(tumor suppressor genes, TSG)在RCC发生早期出现明显甲基化,可以作为RCC发生相关甲基化生物标志物用于鉴别肿瘤及癌旁组织的DNA甲基化差异。但在大量临床研究验证中发现,与RCC发生相关的DNA甲基化生物标志物大多表达频率偏低,仅34%,效率偏低<sup>[12]</sup>。肿瘤转移是肾细胞癌患者生活质量下降和死亡的首要原因,但是目前临床上既没有肿瘤转移的早期诊断标志,也没有肿瘤切除术后复发的预测标志物。启动子甲基化是RCC转移相关抑制基因表达下调的常见机制,该类DNA甲基化生物标志物稳定、特异与肿瘤转移及术后复发密切相关,具有广阔的应用前景。

本研究采用基因组消减杂交技术筛选肾透明细胞癌转移相关DNA甲基化基因,以寻求具有诊断意义的RCC转移相关DNA甲基化生物标志。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及试剂

*Bam*H I酶(D1010A),*Bgl* II酶(D1021S),T4 DNA连接酶(D2011A),*Not* I酶(D1166A),UDG(尿嘧啶糖基化酶,#EN0361),MBN(绿豆核酸酶,D2420),克隆载体pMD18-T(D101A),均购自大连TaKaRa公司。PCR主要试剂:10×PCR缓冲液、10 mmol/L dNTP混合物、TaqPlusase购自上海天根生物工程有限公司;实验引物:*Not*X,5'-AAA AGA ATG TCA GTG TGT CAC GTA TGG ACG AAT TCG C-3';*Not*Y,3'-AAA CTT ACA GTG TGT GTC ACG TAT GGC TGC TTA AGC GCC GG-5',均由上海Invitrogen公司合成。

### 1.2 细胞培养及DNA抽提

应用本实验室前期

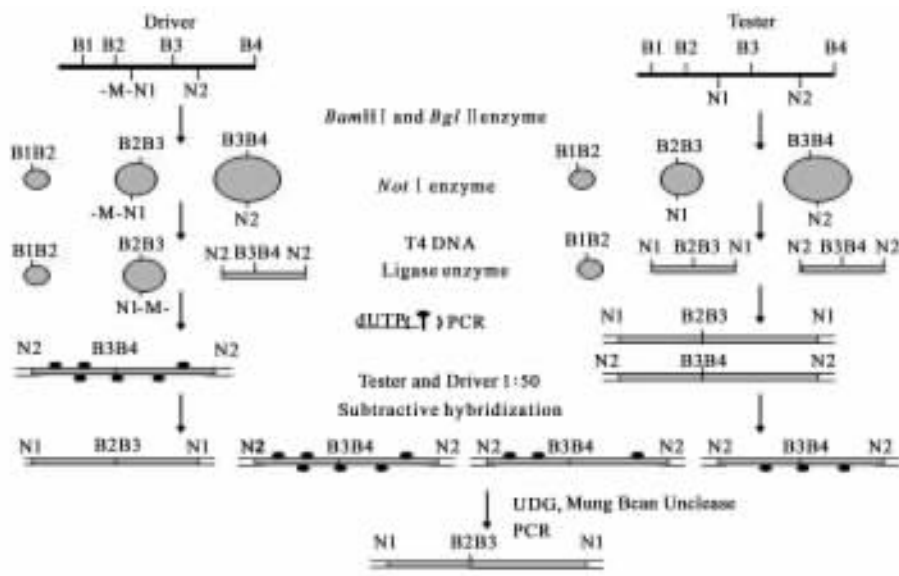
建立的汉族人能够无限传代的2株在动物模型中证实具有转移潜能的肾透明细胞癌(ccRCC)细胞株<sup>[13]</sup>,1株转移肿瘤细胞来自肾透明细胞癌转移至脊柱的患者,另1株原位肿瘤细胞来自性别、病理类型与之匹配的患者,但未发生转移。转移肿瘤和原位肿瘤标本均来自第二军医大学长海医院泌尿外科,并经病理切片证实。所有细胞株体外传代培养到30代。目的基因群(Tester)来自转移肿瘤细胞,驱赶基因群(Driver)来自原位肿瘤细胞,进行基因组消减杂交。两组细胞均在相同的培养条件下培养传代,抽提基因组DNA之前12 h换液,组织经匀浆、蛋白酶消化后,采用快速DNA抽提方法分别抽提DNA,两组基因组DNA经浓度、纯度和完整性鉴定后储存。

### 1.3 *Not* I酶切富集非甲基化片段

采用*Not* I基因组消减杂交方法<sup>[14]</sup>并加以改进(图1)。基因组DNA经*Bam*H I和*Bgl* II双酶切5 h;酶切产物在4℃下用T4 DNA连接酶过夜使自身环化;环化产物用*Not* I在37℃下酶切5 h;用10 mol/L缓冲液(TaKaRa)将引物*Not*X和*Not*Y混合(1:1)配成终浓度为20 μmol/L的溶液,置于100℃水浴中5 min后在室温下缓慢降温,即为接头溶液;取*Not* I酶切后产物与接头按照1:10的比例混合,在T4 DNA连接酶作用下4℃连接过夜;最后以*Not*X为引物,连接产物为模板,进行PCR扩增,其中,Driver用dUTP,Tester用dTTP作为原料进行PCR反应,反应条件如下:72℃变性5 min;95℃1 min,60℃1 min,72℃2 min,30个循环;72℃5 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳观察所富集的非甲基化片段。

### 1.4 消减杂交

取Tester和Driver的富集片段按1:50的比例混合;经纯化后,加入杂交缓冲液[0.5 mol/L NaCl,50 mmol/L Tris(pH 7.5),0.2% SDS,40%(体积分数)甲酰胺]中;滴加石蜡油封闭,置入100℃水浴中5 min后转入42℃水浴杂交48 h;杂交产物经纯化后用5 μl尿嘧啶糖基酶消化含dUTP的核苷酸DNA链,再用绿豆核酸酶在37℃30 min降解产物中的单链DNA,将处理后的产物进行PCR扩增,即完成第1轮杂交。根据实验结果共进行了3轮消减杂交,以获得差异序列;取1~3轮杂交产物进行琼脂糖凝胶(1.5%)电泳,观察消减结果,并用PCR产物纯化试剂盒纯化消减产物。

图 1 *Not I* 消减杂交步骤Fig 1 Procedure of *Not I* subtraction hybridization

B: *Bam*H I and *Bgl* II enzyme cutting site; N: *Not* I enzyme cutting site; M: Methylation site

1.5 克隆及测序 纯化后的杂交产物与 pMD18-T 连接,按照标准程序转化 XL-Blue 大肠杆菌;在含 Amp 的固体 LB 平板中进行  $\alpha$  筛选,37℃ 下培养 24~36 h,同时设置阳性对照,待菌落长至 2 mm 左右置于 4℃ 下避光放置 4~5 h,计数菌斑数量;随机挑选 96 个白色菌落置于含 Amp 的液体 LB 培养基中 37℃ 下过夜,取培养后的菌液以 *Not*X 为引物进行菌落 PCR,所有 96 个菌管都进行 PCR 反应(95℃ 1.5 min;95℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 1.5 min,30 个循环;72℃ 5 min),产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳;根据条带情况选择 40 个菌液送上海 Invitrogen 公司进行测序。

1.6 生物信息学分析 获得的测序序列根据以下流程进行生物信息学分析。主要包括:Stand package(<http://staden.sourceforge.net/>)软件剔除载体序列和接头序列;Repeat Masker(<http://www.repeatmasker.org/>)屏蔽 DNA 重复序列;Meth primer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>)和 CpG Island Searcher (<http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx>)搜索序列中是否含有 CpG 岛,其中 CpG 岛判定标准为:长度 > 200 bp,GC 含量 > 50%,CpG/GpC > 0.5。人类基因组定位和参考基因的获得主要用如下两个在线软件进行比对和定位:Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606>)和 Blat (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>)。

*edu/cgi-bin/hgBlat*)。无配比基因和参照基因的序列用启动子和第 1 外显子预测软件 FirstEF 进行预测(<http://rulai.cshl.edu/tools/FirstEF>),采用在线 EPD 软件(<http://www.epd.isb-sib.ch/>)进行搜索。选择具有启动子位点或处在第 1 外显子的 CpG 岛的序列作为候选序列。

## 2 结果

2.1 消减杂交及文库构建结果 转移性 RCC 和非转移性 RCC 基因组 DNA 经 *Not* I 酶切富集后进行凝胶电泳,片段范围均在 200~900 bp,符合预定片段的大小;以非转移性 RCC 基因组作为 Tester 经 3 轮消减杂交后获得 3 个差异条带;克隆转化后,经  $\alpha$  斑筛选获得 96 个白色克隆,84 个克隆经菌落 PCR 扩增后出现单一电泳条带。共选出 40 个片段长度不等的克隆进行测序。

2.2 序列分析基本情况 测定 40 个序列,剔除接头序列及载体序列后共获得 27 个序列单一基因组 DNA 序列(表 1)。27 个序列的生物信息学定位、CpG 岛的预测和参考基因情况如下:其中 8 个没有同源序列,2 个序列分别与小鼠 RZR1、小鼠 EMP2 对应,7 个序列分别与 RPS6KA3、LOC646024、ROR2、MYADM、LOC730259、INTS1 和 ERN1 基因对应,3 个序列属于 LINE 和简单重复序列。2 个序列含 CpG 岛并处在基因启动子或第一外显子。

表 1 27 个与肾透明细胞癌转移相关甲基化 DNA 克隆及其参考序列

Tab 1 Twenty-seven DNA methylated clones related to RCC metastasis

Clone	Frequency	Size(bp)	CpG island	Refseq gene	Position	Location
1	4	246	No	Mouse FZR1	Exon	Ch10(qC1)
2	1	90	-	No match	-	-
3	2	163	No	No refseq	-	Ch4(p15. 32)
4	1	157	No	RPS6KA3	Intron	ChX(p22. 12)
5	1	107	No	No refseq	-	Ch3(p11. 2)
6	2	124	-	No match	-	-
7	2	167	No	No refseq	-	Ch10(p11. 23)
8	1	288	No	Mouse EMP2	Exon	Ch16(qA1)
9	1	150	Yes	LOC646024	Promoter	Ch6(q25. 1)
10	1	124	-	No match	-	-
11	1	225	No	LINE-L1	-	Ch15(q21. 3)
12	1	140	No	ROR2	Intron	Ch9(q22. 31)
13	1	166	No	No refseq	-	Ch11(q13. 4)
14	1	153	No	LINE-L1	-	Ch1(p32. 2)
15	1	124	-	No match	-	-
16	1	155	-	Simple repeat	-	-
17	1	248	Yes	MYADM	First exon	Ch19(q13. 41)
18	1	168	No	LOC730259	Intron	Ch2(p11. 2)
19	1	195	No	INTS1	Intron	Ch7(p22. 3)
20	1	169	No	Cow Ch5	-	-
21	1	169	No	Human EST	-	Ch17(q11. 2)
22	1	172	No	ERN1	Exon	Ch17(q23. 3)
23	5	254	Yes	No match	-	-
24	1	257	Yes	No match	-	-
25	1	129	-	No match	-	-
26	1	157	No	No refseq	-	Ch13(q21. 33)
27	1	212	Yes	No match	-	-

2.3 RCC 转移相关的甲基化序列 27 个克隆中仅有 Clone 9 与 Clone 17 分别处在第 1 外显子和内含子区域,所对应区域均存在 CpG 岛。Clone 9 和

Clone 17 序列在基因组 DNA 中的定位研究发现,两个序列分别与 LOC646024 和 MYADM 相对应(图 2)。

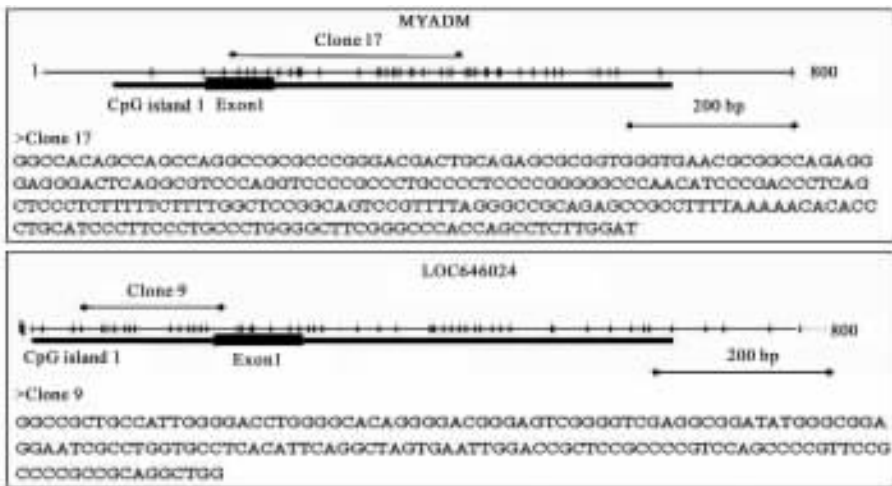


图 2 Clone 17 和 Clone 9 序列分别定位于 MYADM 和 LOC646024 的基因组位点

Fig 2 Sequences of Clone 17 and Clone 9 were located at genomic loci of MYADM and LOC646024, respectively

3 讨论

MCA/RDA 法是常用的肿瘤相关的甲基化标志物的筛选研究的方法<sup>[15]</sup>,但这种方法的缺点是重

复序列中有 70% 以上为甲基化片段,因此,在后续筛选中需要剔除大量重复序列,增加了工作的难度。本研究采用的 Not I 酶切法可以避免这种繁重的后期筛选工作。采用 Not I 酶切法先富集非甲基化片

段,然后对转移和原位 RCC 细胞进行基因组消减杂交,得到差异 DNA 甲基化片段,然后进行克隆、测序、分析,后续的筛选工作将变得容易。本研究成功获得了 40 个 ccRCC 转移相关差异克隆,27 个单一克隆,其中含 CpG 岛的仅有 5 个序列,这其中仅 2 个目的序列含 CpG 岛并处在基因启动子或第 1 外显子区,实验效率偏低。这可能与前期设计 PCR 退火温度过低有关。我们发现在甲基化特异性 PCR 反应中,退火温度的高低与 CG 含量正相关;可提高预变性温度(一般应 $>95^{\circ}\text{C}$ ,10 min)和变性温度( $>95^{\circ}\text{C}$ ,1 min),退火温度以 $60^{\circ}\text{C}$ 作梯度或 $70^{\circ}\text{C}$ 作降落进行甲基化特异性 PCR 可以很好地提高实验效率<sup>[16]</sup>。本实验结果也为我们后续改良基因组消减杂交方法提供了基础。

本次实验得到 2 个含 CpG 岛的克隆分别与 MYADM 和 LOC646024 候选基因相吻合,并且都含 CpG 岛并处于基因启动子或第 1 外显子区,与目前甲基化相关生物标志物基础机制相吻合。通过 Blast 对 MYADM 和 LOC646024 的氨基酸序列进行比较,发现 MYADM 是已知的序列,被报道与血细胞成熟、干细胞再生等有关;而 LOC646024 是一个新的未报道过的序列,本研究在对其氨基酸序列和核酸序列进行比对后发现其与 UL16 结合蛋白 1 分别有 85% 和 99% 的相似度,可以认定二者功能十分相似。查阅文献后我们发现 UL16 结合蛋白 1 在与 NK 细胞抗肿瘤相关性方面有不少报道。NK 细胞参与免疫系统的发生、发展等重要环节调节过程,是机体天然免疫的主要承担者,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。NK 细胞始终通过其受体 NKG2D 对病变组织、外来物质和恶性转化的细胞发挥着持续稳定的免疫监视作用;NK 细胞只有通过 NKG2D 才能识别和杀伤那些膜上有其配体分子表达的靶细胞,所以 NKG2D 的配体分子可以作为这些病变细胞的一个重要的标志物<sup>[18]</sup>。如人巨细胞病毒蛋白 UL16 的结合蛋白(ULBPs),是 NK 细胞的受体 NKG2D 的另一种新发现的配体分子,在病毒感染及人类巨细胞病毒免疫逃逸过程中可能起着重要作用。ULBPs 目前发现的成员有 ULBP1、ULBP2、ULBP3,可表达于多种细胞、组织及肿瘤中<sup>[19]</sup>。总之,NK 细胞受体 NKG2D 及其配体分子 ULBPs 传递抑制或激活信号调节着 NK 细胞活性与功能,在肿瘤细胞的免疫监视过程中发挥着十分重要的作用<sup>[20]</sup>。考虑到本研究的候选基因 LOC646024 与 ULBP1 氨基酸序列和核酸序列的相似度,可以推测 LOC646024 可能也是 ULBPs 家族

的成员,但其在细胞表面的表达以及与 NKG2D 结合能力还未被证实,仍需要大量更加深入的分子水平上的研究。这两个候选基因能否作为 DNA 甲基化生物标志物用于临床大量样本中,后期还需不断在临床上验证。该研究结果为后续 ccRCC 转移相关的甲基化标志物的研究奠定了基础。通过对 RCC DNA 甲基化相关生物标志物的多元性分析,对 RCC 的早期诊断、转移预测和病程预计以及临床诊治有着重要的指导意义。

## [参考文献]

- [1] Herbert T, Cohen M D, Francis J, McGovern M D. Renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2005, 354: 2477-2490.
- [2] Jungwirth A, Schally A V, Pinski J, Groot K, Armatis P, Halmos G. Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71 inhibits *in vivo* proliferation of caki-1 renal adenocarcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 5810-1813.
- [3] Lerner S E, Hawkins C A, Blute M L, Grabner A, Wollan P C, Eick H, et al. Disease outcome in patients with low stage renal cell carcinoma treated with nephron sparing or radical surgery [J]. J Urol, 1996, 155: 1868-1873.
- [4] 谭晓洁. 肾细胞癌转移的分子机制及相关遗传学特征[J]. 国外医学:泌尿系统分册, 2005, 25: 8-11.
- [5] Ann S W, Barbara E, Peter L M. DNA hypomethylation and human disease[J]. BBA, 2007, 1775: 138-162.
- [6] Sanz-Casla M T, Maestro M L, del Barco V, Zanna I, Moreno J, Vidaurreta M, et al. Loss of heterozygosity and methylation of p16 in renal cell carcinoma[J]. Urol Res, 2003, 31: 159-162.
- [7] Morrissey C, Martinez A, Zatyka M, Schraml P, Latif F, Maher E R. Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21. 3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61: 7277-7281.
- [8] 刘宁, 那彦群. 肾癌中 VHL 基因的研究进展与临床应用[J]. 国外医学:泌尿系统分册, 2005, 25: 4-7.
- [9] Esteller M, Corn P G, Urena J M, Gabrielson E, BayLin S B, Herman J G, et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia[J]. Cancer Res, 1998, 58: 4515-4518.
- [10] Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh F M, Augelsoni D, et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21. 3 is involved in kidney tumorigenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 7504-7509.
- [11] Zhang Q, Ying J, Zhang K, Li H, Ng K, Zhao Y, et al. Aberrant methylation of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 in renal cell carcinoma[J]. Cancer Letters, 2006, 25: 1271-1277.
- [12] Sutherland C L, Chalupny N J, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells[J]. J Immunol, 2002, 168: 671-679.
- [13] 翟羽佳, 谭晓洁, 侯建国, 肖建如, 徐丹枫, 余伟伟, 等. 汉族人肾透明细胞癌细胞系的建立[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 479-484.
- [14] Li J F, Protopopov A, Wang F L, Senchenko V, Petushkov V, Vorontsova O. Not I subtraction and Not I-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes[J]. PNAS, 2002, 6: 10724-10729.

- [15] 朱益民,林洁,黄琼,来茂德.应用甲基化 CpG 岛扩增法结合代表性差异分析筛选结肠癌相关的甲基化 DNA 片段[J].中华医学遗传学杂志,2003,20:425-429.
- [16] 冯景,周有利,张吉才,陶建蜀.甲基化特异性 PCR 全程易出现的问题与控制措施[J].检验医学,2006,21:437-438.
- [17] 刘占锋,刘明.NK 细胞受体 NKG2D 及其与肝细胞癌的关系研究进展[J].山东医药,2007,17:93-95.
- [18] 肖萍,薛玲,乔慧.NKG2D 及其配体在肿瘤免疫中的作用[J].实用临床医学,2005,6:173-175.
- [19] 刘会兰.NKG2D 受体在抗肿瘤免疫中的作用[J].国际肿瘤学杂志,2006,33:329-331.
- [20] Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation *via* NKG2D:towards a new paradigm in immune recognition[J]. Curr Opin Immunot,2002,14:306-311.

[本文编辑] 曹静