

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00979

乳腺癌 3p 染色体微卫星杂合性缺失与血管生成

乔峰^{1,2}, 姜晓玲², 李曦洲¹, 施俊义^{1*}

1. 第二军医大学长海医院甲乳外科, 上海 200433
2. 解放军 88 医院病理科, 泰安 271000

[摘要] **目的** 探讨乳腺癌染色体 3p 区域微卫星杂合性缺失(LOH)与血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达及临床病理特征之间的关系。**方法** 选取乳腺浸润性导管癌病例石蜡组织切块 40 例。运用激光显微切割技术留取组织中导管癌及正常乳腺细胞,应用毛细管电泳测序技术进行 4 个微卫星位点的 LOH 检测。应用免疫组织化学技术 SP 法检测 CD34、VEGF 和 Her2 的表达,分析 LOH 与乳腺癌临床病理参数的关系。**结果** 40 例乳腺癌患者中 D3S1038 的 LOH 发生率为 20%(8/40),D3S1295 的 LOH 发生率为 37.5%(15/40),D3S1581 的 LOH 发生率为 17.5%(7/40),D3S3118 的 LOH 发生率为 5%(2/40)。LOH 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.6580$, $P<0.01$), LOH 和 MVD 也呈正相关($r=0.8049$, $P<0.01$)。LOH 发生率与 Her2 表达($r=0.5394$)、组织学分级($r=0.4972$)、淋巴结转移($r=0.5064$)、TNM 分期($r=0.5960$)均有相关性(均 $P<0.01$)。**结论** 乳腺癌染色体 3p 微卫星位点 LOH 与血管生成具有相关性,抑癌基因失活并通过对血管生成的影响可能为肿瘤生长与转移提供了条件;同时检测染色体 3p 微卫星位点 LOH 与血管生成情况,可能有助于更全面地了解乳腺癌的生物学特性。

[关键词] 乳腺肿瘤;杂合性缺失;病理性新生血管化;血管内皮生长因子

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)09-0979-06

Loss of heterozygosity at chromosome 3p microsatellite loci and angiogenesis in breast cancer

QIAO Feng^{1,2}, JIANG Xiao-ling², LI Xi-zhou¹, SHI Jun-yi^{1*}

1. Department of Thyroid and Breast Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pathology, No. 88 Hospital of PLA, Taian 271000, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To explore the association of loss of heterozygosity (LOH) at chromosome 3p and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression with clinicopathological features of breast cancer. **Methods** A total of 40 specimens of breast invasive ductal carcinoma were analyzed in the present study. The ductal carcinoma cells and normal breast cells were microdissected from the paraffin sections. Capillary electrophoresis method was used to detect LOH of four microsatellite loci located in the 3p site. Immunohistochemical staining was used to investigate the expression of CD34, VEGF and Her2 proteins in the 40 specimens. The association of LOH with the clinicopathological characteristics of breast carcinoma was evaluated. **Results** We found that in the 40 specimens LOH of D3S1038 was 20%(8/40), LOH of D3S1295 was 37.5%(15/40), LOH of D3S1581 was 17.5%(7/40), and LOH of D3S3118 was 5%(2/40). LOH was positively correlated with expression of VEGF ($r=0.6580$, $P<0.01$) and MVD ($r=0.8049$, $P<0.01$). We also found that LOH was significantly related to Her2 ($r=0.5394$), differentiation($r=0.4972$), lymph node metastasis($r=0.5064$), and TNM stage($r=0.5960$, all $P<0.01$). **Conclusion** LOH at chromosome 3p microsatellite loci is correlated with angiogenesis. Inactivation of tumor suppressor may influence angiogenesis and subsequently promote tumor growth and metastasis. Detection of LOH at chromosome 3p microsatellite loci together with angiogenesis can help to fully understand the biological characteristics of breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; loss of heterozygosity; angiogenesis; vascular endothelial growth factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9): 979-984]

乳腺癌的本质是一种基因病,其发生与基因组不稳定和体细胞遗传学改变关系密切。肿瘤抑制基因失活往往是由于 1 条等位基因发生杂合性缺失

(loss of heterozygosity, LOH), 而另外 1 条等位基因相应地发生突变。据有关乳腺癌的报道显示, 3p14(缺失频率 11%~44%)^[1]、3p21~22(69%)^[2]、

[收稿日期] 2011-04-21

[接受日期] 2011-06-01

[作者简介] 乔峰, 硕士, 主治医师, E-mail: qfxlkh@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873364, E-mail: shijunyi666@126.com

3p24~26(30%~48%)^[2-3]为缺失率最高的3个区域。我们选择这3个区域的4个微卫星(microsatellite,MS)位点联合应用激光捕获显微切割与毛细管电泳技术及SP法等分子生物学方法进行乳腺癌染色体微卫星位点 LOH 与血管生成相关性的研究。

1 材料和方法

1.1 组织标本的选择 43例乳腺浸润性导管癌组织均来自本院2005年9月至2009年2月手术切除石蜡包埋标本,行毛细管电泳后 LOH 信息缺失3例,获有效信息者40例。患者年龄32~71岁,平均(49.0±10.1)岁。入选标准:参照2003年WHO乳腺癌分类标准,所有病例均经2位病理科医师复习切片确诊为乳腺浸润性导管癌。一般情况及临床病理学参数、TNM分期等来源于病历记录。病理组织学分级及免疫组化结果来源于病理报告。剔除标准:术前行化疗、放疗的患者;乳腺穿刺而无手术切除标本的病例。组织学分级标准:根据Blorm-Richarcisonde 分级标准^[4]对所有病例进行评分。

1.2 激光显微切割 石蜡包埋组织切片(厚度6 μm)经脱蜡、常规H-E染色,在MMI Cell cut plus激光显微切割系统上提取目的细胞。确定要分离的导管癌以及正常乳腺导管细胞,分别进行切割并收集于MMI IsolationCap中备用。

1.3 DNA的PCR扩增 (1)DNA样品抽提:样品中加消化缓冲液(不含蛋白酶K)、蛋白酶K溶液、Tris饱和酚,水浴离心后,70%乙醇洗涤沉淀,室温晾干30 min; ddH₂O重新溶解沉淀;取1 μl测定浓度及纯度,余-20℃保存备用。(2)微卫星及其引物序列:微卫星信息及其引物序列来自PubMed Home, 荧光引物由上海基康生物技术有限公司提供(表1)。(3)PCR扩增的反应体系:在PCR仪中进行,反应总体积为10 μl,其中基因组DNA 50~100 ng,上、下游引物各10 μmol/L(1 μl), TaKaRa ExTaq DNA聚合酶2 U, dNTPs 1 μl(25 mmol/L), 10×ExTag Buffer (Mg²⁺ Plus) 1 μl, 加ddH₂O补到10 μl。反应条件:95℃预变性5 min后,94℃变性30 s,55~57℃退火30 s,72℃延伸30 s,共38次循环,最后72℃延伸10 min。

表1 微卫星引物序列

Tab 1 Sequence information of microsatellite primers

Name	Primer(5'-3')	Number of primer(bp)	Modified class
D3S1295F	ATG GTT TCA TGG ATA CAC ACA	21	6-FAM
D3S1295R	ATA AGT TTT GAT ACC CAC CCA	21	
D3S1038F	TCC AGT AAG AGG CTT CCT AG	20	6-FAM
D3S1038R	AAA GGG GTT CAG GAA ACC TG	20	
D3S1581F	CTC TTC CCA GTC CCT GTA TC	20	6-FAM
D3S1581R	GAT TGC ACT ATG TCT CCA GG	20	
D3S3118F	GCA GGA TCT ACA AAT CAT TTT ATT G	25	6-FAM
D3S3118R	TGT GAA GGT TTG TAA ATA GTC CAT G	25	

1.4 毛细管电泳测序 将美国ABI公司生产的Hi-Di Formamide 1 ml和GeneScan-500 LIZ Size Standard 50 μl混合后,取9.5 μl同PCR产物(20倍稀释后)0.5 μl混合,在ABI GeneAmp9700型PCR仪上95℃变性5 min,迅速放置在冰中5 min以上。然后在ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer上用PE公司的POP-4胶,15 kV于60℃下电泳28 min。电泳数据经GeneScan软件(3.1版)、GeneTyper(3.7版)处理后得到检测片段大小。

1.5 LOH判断标准 当患者正常组织DNA标本为多态标记杂合子,即出现2个等位基因片段,才能作为信息个体用于LOH分析。与同一个体的正常

癌旁组织比较,LOH是以肿瘤组织中微卫星DNA两种等位基因的相对强度比与正常组织的等位基因相对强度比之间的比值(allele ratio)作为判定依据。Allele ratio值(T1:T2/N1:N2)<0.6或>1.67时,该位点判为LOH(T:肿瘤组织,N:正常组织)^[5]。

1.6 免疫组化染色方法 采用SP法。免疫组织化学检测试剂盒及抗体购自福州迈新生物技术有限公司。用防脱片剂多聚赖氨酸涂载玻片,60℃烤箱烘3 h,石蜡切片常规脱蜡至水。所有抗体均用已知阳性标本作阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。根据每种抗体的要求,对组织抗原进行相应的

抗原修复。将组织切片置 3% 过氧化氢溶液, 室温下孵育 15 min 以阻断内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 3 次 × 3 min。滴加正常山羊血清封闭液, 室温下孵育 10 min。甩去血清封闭液, 每张切片滴加一抗, 放入温盒中于 4℃ 冰箱内过夜。切片过夜后加入二抗, 室温孵育 10 min; 加链霉素过氧化酶溶液后室温下孵育 10 min; 上述步骤均以 0.01 mol/L PBS 振洗 3 次, 2 min/次, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 复染后置于显微镜下观察。

1.7 免疫组化结果判定 免疫组化阳性均呈棕色或棕褐色显色。VEGF 阳性定位于细胞质, ER、PR 均定位于细胞核, 每例切片观察 10 个高倍镜视野, 将肿瘤细胞超过 10% 阳性染色者判定为阳性表达, 反之为阴性。Her2、CD34 阳性定位于细胞膜, 在肿瘤 10% 以上区域出现连续细胞膜着色者判定为阳性。

1.8 微血管密度(microvessel density, MVD)计数标准 按照 Weidner^[6]的评判标准, 计算肿瘤内着色的毛细血管和微小血管, 凡呈现棕色单个内皮细胞或内皮细胞群者均作为 1 个血管计数, 但肌层较厚及管腔面积大于 8 个红细胞直径的血管不计数。每张染色切片选择 3 个血管最多的癌间质区, 在 200 倍视野下进行血管计数, 每例标本分别计数 5 个视野, 取其平均值。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用百分构成比表示。两个率间差异采用 Pearson χ^2 检验, 多个率间单向有序资料采取等级资料的秩和检验。Kruskal-Wallis 法进行多组间两两比较。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 LOH 检测 电泳图横坐标代表 PCR 产物及内标的碱基数, 纵坐标代表相对荧光信号强度(图 1)。在所有 40 例乳腺癌中, 共有 21 例(52.5%)患者发生 LOH, 其中 3 例(7.5%)有 3 个位点发生 LOH; 5 例(12.5%)有 2 个位点发生 LOH; 13 例(32.5%)有 1 个位点发生 LOH。4 个 3p 位点 LOH 发生率不同, 差异有统计学意义 ($P = 0.0039$, 表 2)。

2.2 LOH 与 MVD 的关系 CD34 表达于细胞胞膜, 能明确显示血管内皮细胞(图 2A), 利于计数微血管生成数目。所有乳腺癌病例 MVD 平均值为 84.425 ± 30.293 (35.000 ~ 153.000)。将同时有

0 个、1 个、2 个、3 个位点发生 LOH 的病例分为 LOH0~LOH3 共 4 个组别, 随着发生 LOH 位点数目的增加, MVD 数值也增加(表 3)。仅 LOH1 与 LOH2 两组之间 MVD 差异无统计学意义, 而在其他各组间两两比较 MVD 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

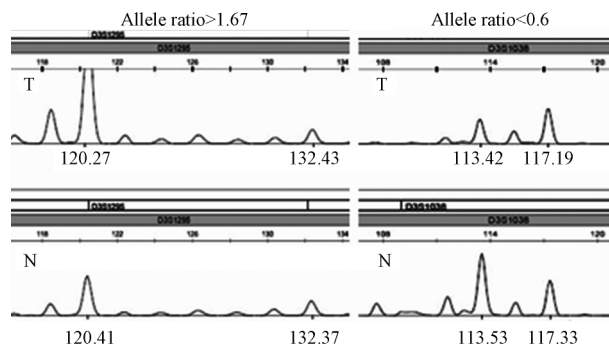


图 1 两种 LOH 峰型

Fig 1 Two types of LOH apex-models

T: Tumor tissue; N: Normal tissue from the same patient; LOH: Loss of heterozygosity

表 2 40 例乳腺癌染色体 4 个 3p 微卫星位点 LOH 发生率
Tab 2 Incidences of LOH of 4 microsatellite loci at chromosome 3p in 40 breast cancer specimens

MS loci	Incidence of LOH n(%)
D3S1038	8(20)
D3S1295	15(37.5)
D3S1581	7(17.5)
D3S3118	2(5)

MS: Microsatellite; LOH: Loss of heterozygosity. Rank sum test. $P = 0.0039$

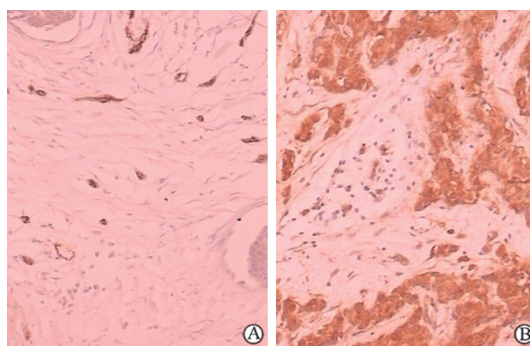


图 2 乳腺癌 CD34(+, A) 和 VEGF(+, B) 染色
Fig 2 Positive expression of CD34(A) and VEGF(B) in breast infiltrating ductal carcinoma as detected by immunohistochemical staining (SP)

Original magnification: ×100

2.3 LOH 与 VEGF 的关系 VEGF 的阳性表达于细胞质, 呈棕黄色至棕褐色颗粒(图 2B)。在所有 40 例中, 共有 31 例呈 VEGF 阳性表达, 9 例 VEGF

阴性表达均发生在 LOH0 组(表 4)。不同 LOH 水平组间 VEGF 表达差异有统计学意义($P < 0.005$)。

表 3 不同 LOH 水平组的 MVD 情况
Tab 3 MVD in groups with different levels of LOH

LOH level	MVD																		
LOH0	42	78	52	88	68	85	48	64	55	93	44	73	63	35	53	84	48	55	51
LOH1	106	92	121	97	87	94	99	111	98	46	99	102	73						
LOH2	131	103	89	116	91														
LOH3	144	153	146																

LOH0-3 indicates that there are 0-3 sites with LOH. LOH; Loss of heterozygosity; MVD; Microvessel density. MVD values were similar between LOH1 and LOH2, and were significantly different between others. Rank sum test. $P < 0.05$

表 4 不同 LOH 水平组间 VEGF 的表达
Tab 4 Expression of VEGF in groups with different levels of LOH (n)

LOH level	VEGF(+)	VEGF(-)
LOH0	10	9
LOH1	13	0
LOH2	5	0
LOH3	3	0

LOH0-3 indicates that there are 0-3 sites with LOH. LOH; Loss of heterozygosity; VEGF; Vascular endothelial growth factor. Rank sum test. $P < 0.005$

2.4 LOH、VEGF 与各临床病理参数的相关性 应用 Spearman 等级相关分析 LOH、VEGF 等各项参数间的相关性,发现 LOH 与 VEGF、MVD、Her2、ER、淋巴结转移、TNM 分期及组织学分级呈正相关。VEGF 与 LOH、MVD、Her2、ER、淋巴结转移、TNM 分期及组织学分级呈正相关。MVD 与 LOH、VEGF、Her2、淋巴结转移、TNM 分期及组织学分级均呈正相关(表 5)。

表 5 LOH 与 VEGF 等临床病理参数之间相关性分析

Tab 5 Correlation analysis between LOH and clinicopathological parameters of breast cancer patients

Parameters	Rk_ER	Rk_Her2	Rk_LN	Rk_LOH	Rk_MVD	Rk_PR	Rk_TNM	Rk_VEGF	Rk_Year	Rk_Grade
Rk_ER	1/0	0.356 9	0.282 6	0.458 5	0.221 1	0.633 4	0.364 5	0.419 4	0.469 3	0.227 3
Rk_Her2	*	1/0	0.546 9	0.539 4	0.513 2	0.146 7	0.530 9	0.624 7	0.412 2	0.405 4
Rk_LN	**	**	1/0	0.506 4	0.461 5	0.072 3	0.607 3	0.625 5	0.262 0	0.535 1
Rk_LOH	**	**	**	1/0	0.804 9	0.192 7	0.596 0	0.658 0	0.209 5	0.497 2
Rk_MVD	**	**	**	**	1/0	0.062 1	0.716 7	0.702 1	0.215 6	0.483 6
Rk_PR	**	**	**	**	**	1/0	0.245 9	0.307 1	0.259 4	0.252 8
Rk_TNM	*	**	**	**	**	**	1/0	0.617 1	0.397 1	0.591 0
Rk_VEGF	**	**	**	**	**	**	**	1/0	0.546 9	0.574 4
Rk_Year	**	**	**	**	**	**	*	**	1/0	0.183 9
Rk_Grade	**	**	**	**	**	**	**	**	**	1/0

The upper triangle shows r , the lower triangle shows significant signs. Rk_ER; Rank-estrogen receptor; Rk_LN; Rank-lymph nodes; Rk_LOH; Rank-loss of heterozygosity; Rk_MVD; Rank-microvessel density; Rk_PR; Rank-progesterone receptor. Rank sum test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3 讨论

LOH 见于与乳腺癌相关的多种抑癌基因中,是抑癌基因重要的失活形式,是乳腺癌发病的重要机制。而肿瘤血管的生成则是肿瘤发生和转移的先决条件。因此我们探讨了乳腺癌染色体 3p 微卫星位点 LOH 与血管生成等相关临床病理参数之间的关系。

MVD 是肿瘤血管生成活性或强度的定量指标

之一,VEGF 是体内最重要的促血管生成因子,与乳腺癌血管生成、肿瘤增长和转移相关^[7]。本研究发现随着发生 LOH 位点数目的增加,MVD 数值也显著增加,说明 LOH 发生对肿瘤微血管的生成有明显的促进作用;而所有 VEGF 阴性表达均发生在未发生 LOH 的患者,发生 LOH 的肿瘤组织则均呈 VEGF 阳性表达,说明 LOH 的发生与 VEGF 的表达密切相关。发生 LOH 的肿瘤很可能通过影响

VEGF 表达来促进微血管的生成,进而表现为 MVD 数值的明显增加。随着肿瘤血管的生成及增加,肿瘤的生长、侵袭性以及转移能力将快速发展,本实验中 LOH 的发生与肿瘤的组织学分级、MVD、淋巴结转移及 TNM 分期均呈正相关,亦对此做出了证实。因此了解此过程有助于我们全面分析病情,联合检测染色体微卫星位点的 LOH 和血管生成可以为临床预后评估和治疗选择提供更多的信息,同时也提示可以开展 2 个或多个靶点的联合靶向治疗,利用它们之间的相互调节作用加强肿瘤综合性治疗的力度^[8],为乳腺癌临床治疗提供新策略。

染色体微卫星位点的 LOH 一般是通过抑癌基因的失活、促进血管生成,达到促进肿瘤发生、发展、演变的结局,此过程涉及细胞信号转导、细胞增殖和血管生成多方面机制。我们选择的 4 个位点 D3S1038、D3S1295、D3S1581、D3S3118 所对应的基因分别为 VHL、FHIT、FLNB、TUSC2,本研究证实 4 个位点 LOH 发生水平与 VEGF、Her2 表达以及 MVD 正相关,说明其所对应的 4 个抑癌基因与 VEGF 等血管生成因素之间存在相互作用,进而影响肿瘤的进一步发展。

VHL 基因定位于染色体 3p25~26 区,得名于 Von Hippel-Lindau (VHL) 病。VHL 病为临床十分罕见的家族性常染色体显性遗传性肿瘤病,包括中枢神经系统血管母细胞瘤、内脏肿瘤和囊肿等^[9-10]。VHL 基因与 Wnt/ β -catenin 致癌信号通路有着密切的联系^[11]。在 VHL 基因失活的情况下,pVHL 不能正常表达,因而不能形成 E-3 泛素连接酶复合体,导致 HIF 的含量增加,从而使得 VEGF、GLUT-1、TGF- α 等细胞因子表达,这些细胞因子广泛参与细胞内的能量代谢、血管生长、细胞周期、细胞凋亡等生理过程,与肿瘤的发生、发展密切相关^[12-13]。有研究发现 VHL 基因突变,pVHL 降解 HIF-1 α 的通道失活,使肿瘤 VEGF 水平升高,侵袭能力增强^[14]。

FHIT 基因是 1996 年 Ohta 等^[15]以外显后捕获法在染色体 3p14.2 区定位的一个候选肿瘤抑制基因。人类最常见的染色体脆性位点 FRA3B 位于 FHIT 基因编码的第一个外显子(外显子 5)的两侧。FHIT 基因的 LOH 使一条等位基因失活,而启动子的甲基化又导致了另一条等位基因的失活。在那些存在 LOH 的乳腺癌中,启动子的甲基化导致了 FHIT 基因的“沉默”。有研究认为这种“二次打击模式”是 FHIT 基因失活的重要机制,从而支持了 FHIT 基因作为肿瘤抑制基因在散发性乳腺癌的发生发展中起重要作用^[16]。本研究发现 FHIT 基因

附近的 D3S1295 位点 LOH 高达 37.5%,与前述研究相符。

D3S1581 附近的基因为 FLNB。肌动蛋白结合蛋白细丝 A(FLNA)和 B(FLNB)表达于血管内皮细胞,在血管发育过程中发挥重要作用。Del Valle-Pérez 等^[17]研究发现,用小干扰 RNA 敲除 FLNB 后通过减低血管内皮细胞迁移能力从而抑制 VEGF 诱导的体外血管生成。此外,他们发现了一种信号复合物(包括 FLNB、Rac-1 和 Vav-2),在 VEGF 激活刺激后将进一步与血管内皮生长因子受体 VEGFR2 和整合素 α V β 5 相互作用,从而引发血管生成,肿瘤在获得新生血管后,可呈几何倍数增生,发展演变加快。

D3S3118 位于 3p21.3,此位上的基因为 TUSC2(tumour suppressor candidate 2, TUSC2),又被称为 Fus-1。Lee 等^[18]发现 MiR-378 能提高肿瘤血管生成及肿瘤细胞的存活、生长,就是通过作用于 SuFu 和 TUSC2 这两个肿瘤抑制因子。

本次研究 LOH 的检出率低于既往的文献报道。经过复习实验步骤及复核实验数据后,我们认为主要是由于既往研究粗糙的切割组织方法混杂了大量非目标细胞的信息,传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳则掺杂了实验者的主观臆断,再加上 PCR 反应的放大作用已经干扰了最终的研究结果。Taylor 等^[19]所做的研究亦对此做了证实。而本研究联合应用激光捕获显微切割与毛细管电泳技术等分子生物学方法成功地解决了目的细胞异质性问题,避免了因时间、温度、染色剂浓度等原因产生的误差。使染色体分析的定性、定量研究更加准确,数据化实验结果更精确、更有统计学意义。

乳腺癌的发生发展是综合性多步骤过程,我们认为:乳腺癌染色体 3p 微卫星 LOH 与血管生成具有相关性,抑癌基因失活并通过对血管生成的影响可能为肿瘤生长与转移提供了条件;如果将染色体 3p 微卫星 LOH 与血管生成情况同时检测,可能有助于更全面地了解乳腺癌的生物学特性。

[参考文献]

- [1] Matsumoto S, Minobe K, Utada Y, Furukawa K, Onda M, Sakamoto G, et al. Loss of heterozygosity at 3p24-p25 as a prognostic factor in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2000, 152: 63-69.
- [2] Maitra A, Wistuba I I, Washington C, Virmani A K, Ashfaq R, Milchgrub S, et al. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159: 119-130.

- [3] Sourvinos G, Miyakis S, Liloglou T L, Field J K, Spandidos D A. Von Hippel-Lindau tumour suppressor gene is not involved in sporadic human breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2001, 22: 131-136.
- [4] 张廷缪,涂小予,徐薇菱,平波,黄政,王坚,等. 乳腺癌组织学分级及预后因素分析[J]. *中华病理学杂志*, 1998, 27: 405-409.
- [5] Canzian F, Salovaara R, Hemminki A, Kristo P, Chadwick R B, Aaltonen L A, et al. Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 3331-3337.
- [6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36: 169-180.
- [7] 赵建华,唐金海,孟凡青,秦建伟,赵祥生. 乳腺癌组织和血清中内皮细胞抑制素 VEGF 表达与肿瘤血管生成[J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 32: 79-82.
- [8] Konecny G E, Meng Y G, Untch M, Wang H J, Bauerfeind I, Epstein M, et al. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 1706-1716.
- [9] Akcaglar S, Yavascaoglu I, Vuruskan H, Oktay B. Genetic evaluation of von Hippel-Lindau disease for early diagnosis and improved prognosis[J]. *Int Urol Nephrol*, 2008, 40: 615-620.
- [10] Hayden M G, Gephart R, Kalanithi P, Chou D. Von Hippel-Lindau disease in pregnancy; a brief review[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16: 611-613.
- [11] Bemdt J D, Moon R T, Major M B. β -catenin gets jaded and von Hippel-Lindau is to blame[J]. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34: 101-104.
- [12] Maxwell P H, Pugh C W, Ratcliffe P J. The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 502: 365-376.
- [13] Ivanov S V, Ivanova A V, Salnikow K, Timofeeva O, Subramaniam M, Lerman M I. Two novel VHL targets, TGFBI (BIGH3) and its transactivator KLF10, are up-regulated in renal clear cell carcinoma and other tumors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370: 536-540.
- [14] Kurban G, Hudon V, Duplan E, Ohh M, Pause A. Characterization of a Von Hippel-Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 1313-1319.
- [15] Ohta M, Inoue H, Coticelli M G, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. *Cell*, 1996, 84: 587-597.
- [16] 付琼,姚根有,汤绚丽,陈丽荣,郑振波. 乳腺癌与癌前病变的微卫星不稳定性与 3p 杂合性缺失[J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29: 34-40.
- [17] Del Valle-Pérez B, Martínez V G, Lacasa-Salavert C, Figueras A, Shapiro S S, Takafuta T, et al. Filamin B plays a key role in vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility through its interaction with Rac-1 and Vav-2[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 10748-10760.
- [18] Lee D Y, Deng Z, Wang C H, Yang B B. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 20350-20355.
- [19] Taylor T B, Nambiar P R, Raja R, Cheung E, Rosenberg D W, Anderegg B. Microgenomics: identification of new expression profiles via small and single-cell sample analyses[J]. *Cytometry*, 2004, 59A: 254-261.

[本文编辑] 孙岩

· 书 讯 ·

《腹膜外剖宫产术》已出版

该书由彭鹏主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-857-2,16开,定价70.00元。

该书详细、系统地介绍了腹膜外剖宫产术有关的临床解剖、各种术式的优缺点、入路、操作方法和手术技巧。特别是手指分离法腹膜外剖宫产术是目前国内外广泛采用的暴露好、损伤少,对母婴健康干扰极小的一种术式,具有简便、安全、省时、无并发症等优点。该书可帮助青年产科医师提高手术技巧,避免因剖宫产手术不当或失误造成的副损伤及其他术后并发症,更好地为广大母婴的健康服务。

该书可作为医学生进入临床实践的入门参考书,也适合中、高级产科医务工作者和医学院校师生阅读参考。

该书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>