文章编号:1000-5404(2009)04-0301-06

论著

钟基因 Per2 对白血病 K562 细胞增殖、分化、凋亡的影响及其机制研究

孙成铭[1],黄世峰[1],罗红伟[1],刘钉宾[1],田文君[1],朱喜丹[1],冯文莉[1],涂植光[1],温健萍[2],黄宗干[3] (重庆医科大学:[1]医学检验系临床血液学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室、重庆市重点实验室,[3]附属第一医院血液科,重庆 400016;[2]Canadian Blood Services, Hamilton, ON L8S 1H8 Canada)

摘 要:目的 研究钟基因 Period2(Per2)对慢粒急变 K562 细胞株增殖、分化、凋亡的影响及可能的分子机制。**方法** 将 Per2 表达质粒 pcDNA3.1-Per2 及空载对照质粒 pcDNA3.1 分别经阳离子脂质体介导转染 K562 细胞,用 G418 筛选出 Per2 稳定表达细胞株。瑞氏染色观察细胞形态,台盼蓝拒染法和 MTT 法检测 K562 细胞增殖,流式细胞仪分析细胞周期和凋亡,电镜观察细胞凋亡,RT-PCR 及 Western blot 方法检测该细胞株中增殖、凋亡相关基因 p53、cyclin B1 和c-myc等的表达。**结果** 筛选到稳定表达 Per 基因的稳定表达细胞株 K562/Per2 细胞,与空载体转染组及未处理对照组细胞相比,K562/Per2 细胞体积缩小,但是分化不明显;台盼蓝拒染法和 MTT 实验发现 Per2 抑制细胞生长与增殖能力;流式细胞仪检测周期结果 K562/Per2 细胞中 G_2 期细胞增多[转染组(36.1±5.5)%,空载组(12.5±2.9)%,未处理对照组(9.7±2.3)%,$P<0.05$],凋亡检测显示转染组细胞凋亡明显增加[14.8% $P<0.05$];电镜结果显示染色质浓集、断裂,核固缩和凋亡小体;RT-PCR 及 Western blot 显示 Per2 明显上调 p53 基因的 mRNA 和蛋白表达,而抑制 cyclin B1、c-myc 基因 mRNA 和蛋白的表达。**结论** 钟基因 Per2 能抑制 K562 细胞的生长和增殖,并诱导其发生凋亡,但对分化无明显作用。其机制可能是通过对细胞周期相关基因的调控并阻止细胞周期进程来实现的。

关键词: 钟基因;增殖;凋亡;细胞周期;节律调节
中图法分类号: R394.2;R730.23;R733.7 **文献标识码:** A

Mechanism research and effects of clock gene Per2 in K562 leukemia cells on their proliferation, differentiation and apoptosis

SUN Cheng-ming[1], HUANG Shi-feng[1], LUO Hong-wei[1], LIU Ding-bin[1], TIAN Wen-jun[1], ZHU Xi-dan[1], FENG Wen-li[1], TU Zhi-guang[1], WEN Jian-ping[2], HUANG Zong-gan[3] ([1]Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, [3]Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [2]Canadian Blood Services, Hamilton, ON L8S 1H8, Canada)

Abstract: Objective To investigate the effects of circadian clock gene Period2 (Per2) on the proliferation, differentiation and apoptosis of K562 cells and its probable molecular mechanism. **Methods** The Per2 expression plasmid pcDNA3.1-Per2 and empty control plasmid were respectively transfected into K562 cells with cationic liposome, and the resistant cells stably expressing Per2 gene were obtained by G418 selection. Their morphological changes were observed under light microscope following Wright-Giemsa staining. Trypan blue excluding staining and MTT assay were employed to evaluate cell proliferation. Flow cytometry was performed to analyze cell cycle distribution and cell apoptosis, and electron microscopy was used to detect cell apoptosis. Meanwhile, the expressions of proliferation and apoptosis associated proteins, such as P53, Cyclin B1 and C-Myc, were respectively detected by RT-PCR and Western blot analysis at mRNA and protein level. **Results** The K562/Per2 cell line stably expressing Per2 gene was screened out. As compared with either the empty plasmid transfected group (K562/empty) or the untreated group (K562/untreated), K562/Per2 cells

基金项目: 国家自然科学基金(30600748)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600748)
作者简介: 孙成铭,男,山东省烟台市人,博士研究生,副主任技师,主要从事白血病发病机制方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)68485938
通信作者: 冯文莉,E-mail:fengwlcqmu@sina.com
收稿日期: 2008-05-09;**修回日期:** 2008-10-17

was smaller in volume and showed no obvious cellular differentiation. Circadian clock gene Per2 could significantly inhibit both growth and proliferation of K562 cells. The percentage of K562 cells in G_2/M phase increased [K562/Per2 group (36.1 ± 5.5)%, K562/empty group (12.5 ± 2.9)%, untreated group (9.7 ± 2.3)%, $P<0.05$] and more apoptotic cells were found in the transfected group (14.8%, $P<0.05$). Nuclear condensation, fragmentation, karyopycnosis and apoptotic bodies were found under transmission electron microscope in the K562/Per2 group. P53 was significantly elevated at the mRNA and protein level, while Cyclin B1 and C-Myc were downregulated. **Conclusion** Expression of circadian clock gene Per2 can not only inhibit the growth and proliferation of K562 cells, but also induce massive apoptosis possibly through its regulation on cell cycle associated genes and subsequent inhibition on cell cycle progression.

Key words: circadian clock gene; proliferation; apoptosis; cell cycle; rhythm regulation

慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)是一种获得性造血干细胞克隆增殖性血液系统恶性肿瘤,95%的患者骨髓细胞有特征性细胞遗传学异常(费城染色体 Ph),由该易位产生 bcr/abl 融合基因及其编码的融合蛋白在该病的发生、发展中起重要的作用[1]。CML 急变一直是困扰临床血液工作者的难题,如何在其急变的源头寻求防治和治疗 CML 的策略已成为国内外研究者们研究的热点和方向。

钟基因 Per2 是 Period 基因家族成员中的关键一员,因能调控昼夜节律(24 h)而得名。国外研究表明[2-4],钟基因 Per2 与小鼠肿瘤发生密切相关。单独转染 Per2 基因可促使小鼠肺肿瘤细胞发生凋亡[5]。同时,对 CML 患者的研究[6]表明,Per2 mRNA 水平随 CML 由慢性期向急变期的转变而减少:急变期 < 慢性期 < 正常人。目前,国内外对 Per2 基因在白血病,特别是 CML 急变中的作用尚少见系统研究。本研究以 CML 急变期 K562 细胞株为模型,研究外源性过表达 Per2 基因对 K562 细胞分化、增殖和凋亡的影响,并探讨可能的机制,旨在说明 Per2 基因作为一种抑癌基因在 CML 中发挥重要作用,并预期探索 CML 基因治疗的新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人慢性粒细胞白血病急变期 K562 细胞株为本室冻存,胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品;质粒 pcDNA3.1-Per2 由美国马萨诸塞医学院(University of Massachusetts Medical School)Steven Reppert 馈赠, 空载 pcDNA3.1 质粒由本室保存。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、总 RNA 提取试剂、逆转录酶 M-MLV 及限制性内切酶、脂质体 Lipofectamine2000 等分别购自 TaKaRa、Promega、Invitrogen 公司;鼠抗人 c-myc、p53、cyclin B1 单抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,兔抗鼠和羊抗鼠二抗购自博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562 细胞用含 10% 灭活胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液,于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的恒温培养箱中培养,常规传代换液,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 质粒酶切鉴定 按 *Bam*H Ⅰ和 *Xba* Ⅰ内切酶使用说明书进行。

1.2.3 质粒转染及稳定筛选

1.2.3.1 阳离子脂质体介导的质粒转染 参照脂质体(Lipofectamine2000)说明书中悬浮细胞转染操作步骤进行:将质粒与脂质体按照 1∶1 比例在两管中以无血清 RPMI1640 稀释,两者轻轻混合后静置 30 min。加入以无血清 RPMI1640 洗涤并与调整好细胞数 5×10^5 的 K562 细胞悬液,轻轻混匀,置 37 ℃培育 5 h 后加入含 15% 胎牛血清(FCS)的 RPMI1640 培养液继续培养。

1.2.3.2 稳定表达筛选 转染后 24 h 进行细胞传代,第 2 天开始将转染的细胞在含 800 μg/ml G418 的培养基中培养,G418 的浓度经浓度反应分析后确定,含抗生素的培养基每周换液 2 次。10 ~ 14 d 后,观察到抗性克隆,通过有限稀释法筛选获取单克隆抗性细胞,培养增殖,进行后续实验。同时以转染 pcDNA3.1 空载质粒 K562 细胞为空载组,K562 细胞为未处理对照组。

1.2.4 瑞氏染色 收集对数生长期的 K562 细胞,PBS 洗涤 3 次后进行细胞离心涂片。瑞氏染色 10 min 后光镜下观察细胞形态变化。

1.2.5 细胞生长曲线制作 采用台盼蓝拒染法,取对数生长期细胞以 1×10^4/孔接种于 24 孔培养板中,连续培养 5 d,每天取 3 孔细胞,以台盼蓝拒染法计算活细胞数,取均值绘制生长曲线。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖 收集对数生长期的实验组 pcDNA3.1-Per2-K562、空载 pcDNA3.1-K562、对照 K562 组,接种于 96 孔培养板(3×10^4/L),细胞铺板处理 5 d。每组设 5 个平行孔。每孔加入 MTT 后孵育 4 h,于 595 nm 波长测吸光度值[D(595)],计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = (处理组吸光度值 - 空白组吸光度值)/空白组吸光度值 × 100%

1.2.7　流式细胞仪检测细胞周期　　将空载组、转染组和未处理组 K562 细胞,经 PBS 洗涤,70% 乙醇固定,加入 PBS 溶液室温处理 30 min,离心去上清,加入 50 μg/ml RNase A 消化 30 min,再加入终浓度为 50 μg/ml 的碘化丙啶(PI)染色 30 min,上流式细胞仪检测。

1.2.8　流式细胞仪检测凋亡　　离心收集转染后 48 h 的细胞,将转染组和空载组细胞经 PBS 洗涤后,按照凋亡试剂盒说明处理细胞,以未处理 K562 细胞为对照组,在流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.9　电镜观察细胞凋亡　　离心收集转染后 48 h 的细胞起来(细胞数 >10),固定包埋,超薄切片,染色,H-600IV 型透射电子显微镜下观察细胞形态、细胞质及细胞核的变化(×8 000)。

1.2.10　RT-PCR 检测相关基因表达　　RNA 提取用 Trizol 试剂(Invitrogen)按说明书进行,取 2 μg RNA,用 M-MLV 逆转录酶制备 cDNA,取 2 μl cDNA 进行 PCR 扩增。实验中用到的所有引物序列如表 1 所示。

表 1　RT-PCR 实验中合成的引物序列及预期产物长度

基因名称	引物序列	产物长度(bp)
β-actin(BC001301)	5′-CTGACTGACTACCTCATGAAGATC-3′	
	5′-GTGAGAAGGTCGGAAGGAAGG-3′	247
p53(NM_000546.3)	5′-AGAATCTCCGCAAGAAAGG-3′	
	5′-GCAAGCAAGGGTTCAAAGAC-3′	417
c-myc(NM_002467)	5′-CAACCCTTGCCGCATCCAC-3′	
	5′-CCTCCTCGTCGCAGTAGAA-3′	318
cyclin B1(NM_031966.2)	5′-TTTCTGCTGGGTGTAGGTC-3′	
	5′-AGGTTCTGGCTCAGGTTCT-3′	407
Per2(NM_022817)	5′-TGTATTTTTAGTAGAGACAGGGT-3′	
	5′-CATAACAGCAGAGTAAGATTTTG-3′	444

PCR 反应体系 4 × dNTP 2 μl,10 × buffer 4 μl,上游引物(5 μmol/L)2 μl,下游引物(5 μmol/L)2 μl,反转录产物 4 μl,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl)0.4 μl,加水至 40 μl。PCR 反应条件为 94 ℃ 3 min;94 ℃ 40 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 5 min→4 ℃ 保存。取 PCR 产物 5 μl 上样于 1.6% 的琼脂糖凝胶中,80V 电压,电泳 1 h。凝胶分析系统观察、分析。

1.2.11　Western blot 检测蛋白表达　　收集空载组、转染组细胞和未处理 K562 细胞,细胞裂解液提取细胞总蛋白,并测定蛋白含量。取 80 μg 蛋白质,进行 12% SDS-PAGE 电泳、电转膜,BSA 封闭后,加一抗鼠抗人抗体孵育过夜,抗体稀释度为 1∶2 000,漂洗后加二抗羊抗鼠(1∶2 000)室温下孵育 2 h,TBST 洗 3 次后化学发光显示试剂盒显色并成像分析。GAPDH 作为内参。

1.3　统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SAS 8.2 统计软件进行 Student's *t* 检验。

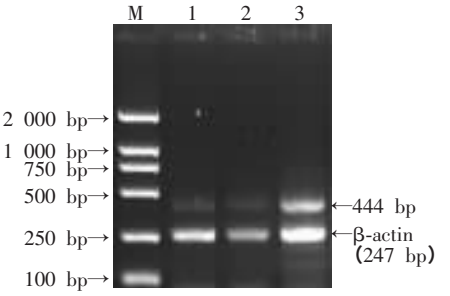
2　结果

2.1　重组质粒 pcDNA3.1-Per2 的双酶切鉴定

pcDNA3.1-Per2 重组质粒经 *Bam*H Ⅰ/*Xba* Ⅰ双酶切后的产物分别为 5 500 bp(为 pcDNA3.1 载体骨架)、1 580 bp 和 3 323 bp,分别与 pcDNA3.1 载体经 *Bam*H Ⅰ单酶切后获得的条带(5 500 bp)和作者提供的酶切片段长度基本一致。重组质粒双向测序结果与理论值完全一致。

2.2　Per2 基因在 K562 细胞中成功转染

将筛选到的单克隆培养后提取 RNA 逆转录后进行 RT-PCR ,结果显示 Per2 转染组其 mRNA 水平明显高于空载组和对照组。如图 1 所示。



M: 标准(DL 2000); 1: K562; 2: pcDNA3.1-K562; 3: pcDNA3.1-Per2-K562

图 1　RT-PCR 检测 Per2 表达

2.3　细胞形态学分析

各实验组细胞经瑞氏染色后在光镜下观察细胞形态及核染色质的变化,结果如图 2 所示。K562 细胞经 Per2 基因转染后,其细胞核和染色质没有明显变化,但细胞体积变小。说明 Per2 对 K562 细胞分化无明显作用。

2.4　对细胞生长曲线的影响

通过对生长曲线的观察发现:Per2 过表达对 K562 细胞的生长具有明显的抑制作用,而空载体对 K562 细胞的生长无明显影响。细胞生长情况如表 2。

表 2　不同培养时间的 K562 细胞计数结果 ($\times 10^4$/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
转染组	1.3 ± 0.4	5.0 ± 1.1	8.7 ± 1.7[ab]	21 ± 3.2[ab]	28 ± 4.1[ab]
空载组	1.4 ± 0.3	6.1 ± 1.2	29 ± 3.6	75 ± 4.5	120 ± 11.2
对照组	1.3 ± 0.2	5.5 ± 1.1	23 ± 3.3	68 ± 4.1	113 ± 12.4

a: $P < 0.05$,与空载组比较; b: $P < 0.05$,与对照组比较

2.5　MTT 实验结果

Per2 过表达对 K562 细胞的增殖具有明显的抑制作用,增殖抑制率为 71%,而空载体对 K562 细胞的增殖无明显影响(9.1%)。

2.6　对 K562 细胞周期的影响

与未处理细胞及空载转染组细胞相比,K562/Per2 组 G_2 期细胞比例增高(表 3),差别有统计学意义($P < 0.05$)。提示 Per2 过表达能促使细胞发生 G_2 期阻滞(图 3)。

2.7　对 K562 细胞凋亡的影响

AnnexinV-PI 双染色结果表明:相对于对照组细胞(凋亡率 3.0%)和空载组细胞(凋亡率 3.68%),转染组细胞 (凋亡率 14.8%)凋亡明显增加,差别有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

表3 K562细胞周期的变化(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	G_1	S	G_2
转染组	27.7±4.4	36.2±5.7	36.1±5.5
空载组	58.9±7.8	28.6±4.1	12.5±2.9[a]
对照组	46.4±6.3	43.9±5.9	9.7±2.3[a]

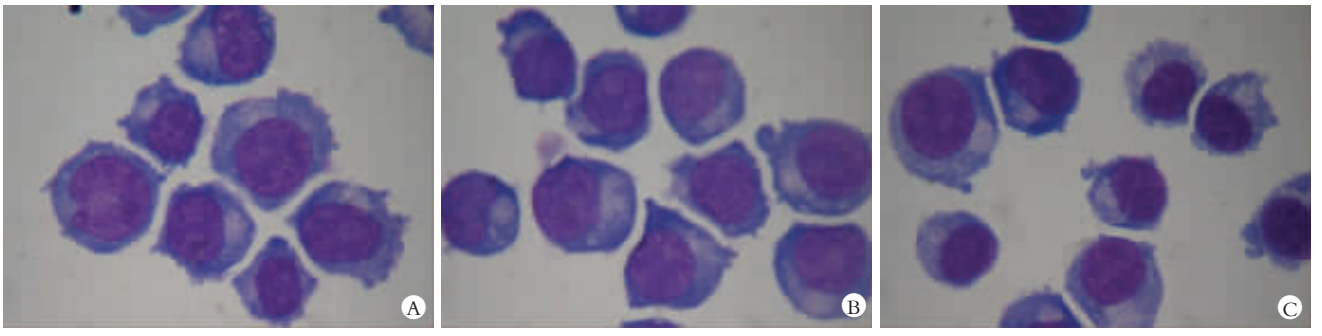
a: $P<0.05$,与转染组比较

2.8 电镜观察细胞凋亡

透射电镜下观察到对照组K562细胞体积较大,核膜完整、核仁清楚、染色质丰富,核浆比例大。而转染组细胞表面微绒毛结构明显减少,细胞质电子密度增高,染色质浓集,核固缩、核分裂等形态学改变,并可见凋亡小体(图5)。

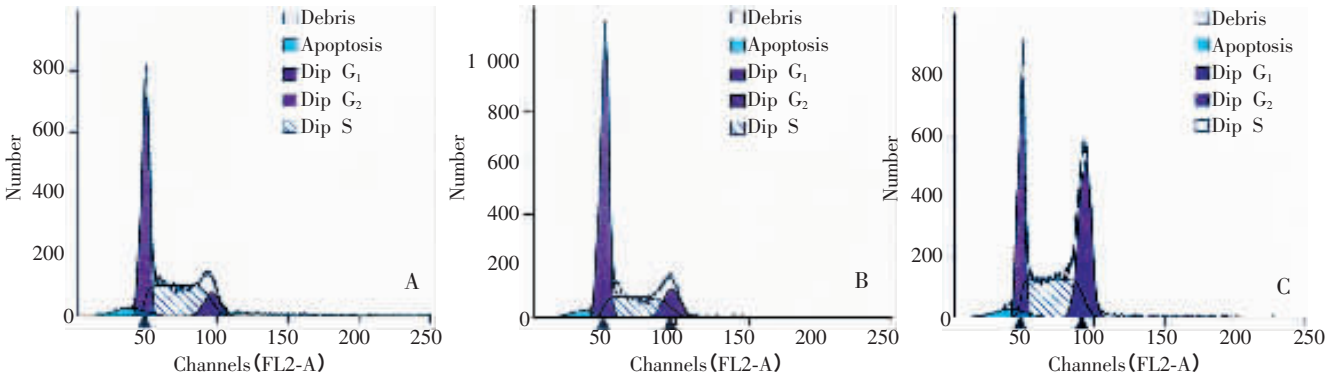
2.9 RT-PCR检测p53、cyclin B1、c-myc基因mRNA的表达

RT-PCR检测各组K562细胞p53、cyclin B1、c-myc基因mRNA的结果如图6所示。p53基因的mRNA表达水平升高,而cyclin B1和c-myc基因的mRNA表达水平则被明显下调。以各目的条带和内参β-actin的密度相比,转染组p53表达水平分别比空载组和对照组p53表达水平升高了1.4倍和1.56倍,均有显著性差异($P<0.05$);转染组表达水平分别比空载组和对照组cyclin B1表达水平降低了26%和23%,均有显著性差异($P<0.05$);而转染组c-myc表达水平分别比空载组和对照组c-myc表达水平降低了28%和33%,亦均有显著性差异($P<0.05$)。



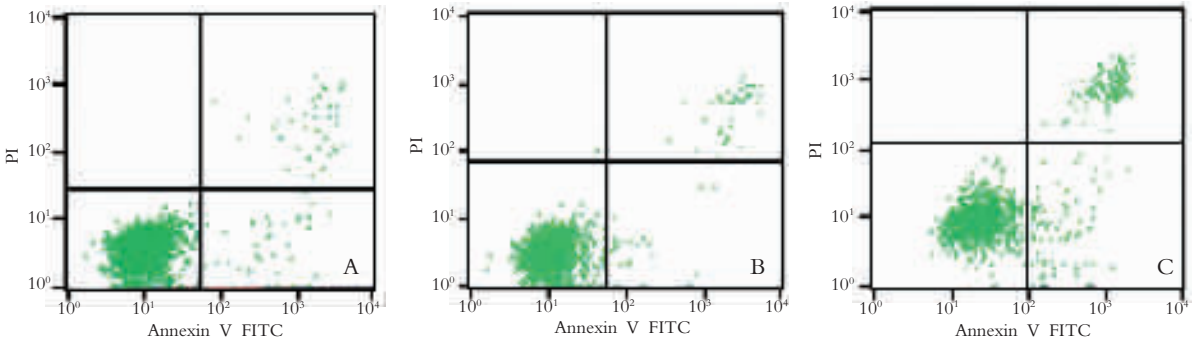
A:对照组; B: 空载组; C: 转染组

图2 K562细胞瑞氏染色结果 (×1 000)



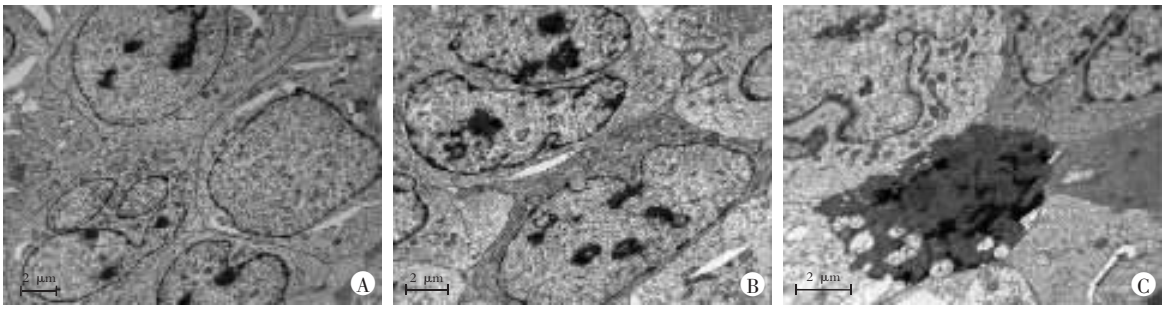
A: 对照组 B:空载组 C: 转染组

图3 K562细胞周期的流式细胞仪检测结果



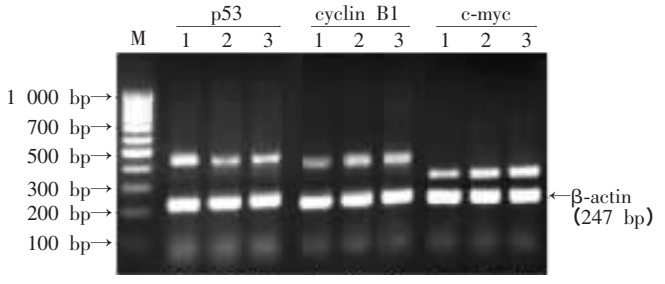
A:对照组; B: 空载组; C: 转染组

图4 K562细胞凋亡的流式细胞仪检测结果



A:对照组; B: 空载组; C: 转染组

图 5　K562 细胞凋亡的电镜观察结果 (TEM)

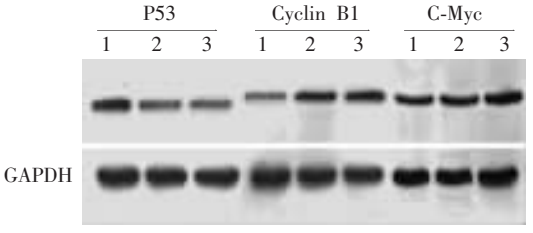


M: DNA 标准; 1: 转染组; 2: 对照组; 3: 空载组

图 6　RT-PCR 检测 p53、cyclin B1、c-myc 基因表达

2.10　Western blot 检测 P53、Cyclin B1、C-Myc 蛋白表达

Western blot 结果与 RT-PCR 结果基本吻合,进一步说明了 Per2 基因对节律相关基因的调节作用。Per2 基因对 CML 细胞具有一定生长增殖抑制作用和凋亡诱导作用,其具体机制可能通过对细胞周期相关基因的调控起作用。如图 7 所示。



1: 转染组; 2:对照组; 3: 空载组

图 7　Western blot 检测 P53、Cyclin B1、C-Myc 蛋白表达

3　讨论

最新的分子学和遗传学证据[7-9]证实了节律基因在癌症中的重要作用,有研究提示,节律基因除了调节生物体的日常节律外,对小鼠肿瘤的生长具有一定的抑制作用。流行病学调查研究也表明长期夜班的女性患乳腺癌的概率明显高于正常上班人群;而夜班的男性人群易患前列腺癌[10]。因此我们很容易把癌症的发生和节律失调联系在一起,但是节律基因与癌症的分子机制尚不清楚。

昼夜节律基因可以调节细胞周期的关键位点,这一研究最初在单细胞原核生物薄肌眼虫中得到证实[11]。另外,昼夜节律基因在控制肠上皮细胞和口腔黏膜细胞的生长和凋亡中也起作用。大约有 10% 的表现被昼夜节律系统所调控[12,13]。mPER1 和 mPER2 突变体小鼠的细胞分裂周期明显短于野生型小鼠。这些研究表明昼夜节律基因在细胞分裂中起到了重要的作用。在众多细胞周期相关基因中,c-myc、p53、cyclin D1 和 cyclin B1 等被节律基因所调控[14]。国外学者在小鼠肝脏模型的研究显示昼夜节律基因调节细胞的分裂周期,而且在调节 G_2/M 期的过程中表现出显著作用[15]。最新研究[16]证实,Per1 参与了 ATM-chk1/chk2 的 DNA 损伤反应通路,并且预示可能作为一肿瘤抑制因子起作用。根据国外的研究进展,本研究观察了钟基因 Per2 基因对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞分化、增殖和凋亡的影响,并初步探讨了其可能机制。

本实验证实转染 Per2 基因对 K562 细胞具有增殖抑制作用,并能促进细胞凋亡,而细胞体积缩小,我们分析可能是细胞凋亡前的一种状态,但是对分化无明显作用。流式细胞仪检测 K562 细胞发生 G_2/M 期阻滞,RT-PCR 和 Western blot 检测显示,G_2/M 期调控基因 cyclin B1 被明显下调,说明 Per2 基因可能通过对调控 G_2/M 期的重要基因的调控而影响细胞周期进程。G_2/M 期的进程是由激活的 Cdc/Cyclin B1 复合物所驱动的,cyclin B1 的转录水平和翻译水平都将对 G_2/M 期起到关键作用。Cyclin B1 的低表达在一定程度上可以导致细胞 G_2/M 期阻滞,促使细胞增殖减慢。而在人类的许多肿瘤中都观察到 Cyclin B1 的过表达。有研究表明 DNA 损伤时可以影响 Cyclin B1 的水平,cyclin B1 的 mRNA 水平下降可能源于其稳定性下降。另外,当 DNA 损伤检测点被激活后,Cyclin B1 蛋白也会受到影响。有研究证实当细胞应答细胞损伤时,需要 14-3-3σ 蛋白的参与,14-3-3σ 以 P53 依赖的方式表达上调,继而发生 G_2/M 期阻滞。本研究结果表明钟

基因 Per2 在 G_2/M 期中扮演着重要的角色。c-myc 基因为肿瘤相关基因,在白血病中是过表达的,且能抑制细胞分化和促进细胞增殖。本研究结果显示 Per2 对 c-myc 具有抑制作用,但其具体机制有待深入研究。p53 为肿瘤抑制基因,其表达上调可以抑制肿瘤的生长,本研究中 Per2 明显上调 p53 基因的表达,提示我们 Per2 有可能通过 p53 这一信号通路达到肿瘤抑制作用。

本研究证实了节律基因在 CML 中的重要作用。然而这一新的发现仅仅是我们研究的起点,许多机制,例如节律基因在肿瘤中如何通过相关的作用因子起作用以及其在信号转导机制中的作用通路等,尚未阐明,仍有待于进一步研究。当前,在肿瘤的治疗中许多潜在的治疗方式还未得到充分的发掘,而时间生物疗法[17]作为一新的治疗手段已逐渐得到认可,虽然目前的许多实验还只是处于动物研究阶段,还未进入临床应用,但是这一治疗方案的实施必将给癌症患者带来新的福音。

参考文献:

[1] Goldman J M, Melo J V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment [J]. N Engl J Med, 2003, 349(15): 1451 - 1464.

[2] Fu L, Pelicano H, Liu J, *et al*. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo* [J]. Cell, 2002, 111(1): 41 - 50.

[3] Miller B H, McDearmon E L, Panda S, *et al*. Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(9): 3342 - 3347.

[4] Filipski E, Li X M, Levi F. Disruption of circadian coordination and malignant growth[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 509 - 514.

[5] Hua H, Wang Y, Wan C, *et al*. Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis[J]. Cancer Sci, 2006, 97(7): 589 - 596.

[6] Yang M Y, Chang J G, Lin P M, *et al*. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3 [J]. Cancer Sci, 2006, 97(12): 1298 - 1307.

[7] Chen-Goodspeed M, Lee C C. Tumor suppression and circadian function[J]. J Biol Rhythms, 2007, 22(4): 291 - 298.

[8] Lee C C. Tumor suppression by the mammalian Period genes [J]. Cancer Causes Control, 2006 , 17(4): 525 - 530.

[9] Mignot E, Takahashi J S. A circadian sleep disorder reveals a complex clock [J]. Cell, 2007, 128(1): 22 - 23.

[10] Kubo T, Ozasa K, Mikami K, *et al*. Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study [J]. Am J Epidemiol, 2006, 164(6): 549 - 555.

[11] Mittag M. Circadian rhythms in microalgae [J]. Int Rev Cytol, 2001, 206: 213 - 247.

[12] Panda S, Antoch M P, Miller B H, *et al*. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock[J]. Cell, 2002, 109(3): 307 - 320.

[13] Storch K F, Lipan O, Leykin I, *et al*. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart [J]. Nature, 2002, 417(6884): 78 - 83.

[14] Kondratov R V, Antoch M P. Circadian proteins in the regulation of cell cycle and genotoxic stress responses[J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(7): 311 - 317.

[15] Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, *et al*. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*[J]. Science, 2003, 302(5643): 255 - 259.

[16] Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, *et al*. The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells [J]. Mol Cell, 2006, 22(3): 375 - 382.

[17] Levi F. Chronotherapeutics: the relevance of timing in cancer therapy [J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 611 - 621.

(编辑 汪勤俭)

《东南国防医药》征稿征订启事

《东南国防医药》是南京军区联勤部卫生部主管、南京军区医学科学技术委员会主办的综合性医学学术期刊(双月刊)。国内统一刊号:CN 32-1713/R,国际标准刊号:ISSN 1672-271X,是中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、全军优秀期刊,被中国学术期刊综合评价数据库、中国万方数据-数字化期刊群、中文生物医学期刊文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊(光盘版)、中华首席医学网等收录。

《东南国防医药》设有专家论坛、论著、综述·讲座、临床经验、护理园地、医院管理、部队卫生、短篇·个案等栏目。对各类基金资助课题论文以及申报军区和地方科技进步奖、医疗成果奖的论文优先选登。所有来稿一律不收审稿费,请勿在来稿中夹寄或邮寄。本刊双月 20 日出版,每册定价 8.00 元,全年 48.00 元。欢迎广大作者与读者积极投稿订阅。

地址:南京市明故宫路 6 号 《东南国防医药》编辑部 邮编:210016

电话:0501-868555、868556(军) 025-80868555、80868556(地)

E-mail: dngfyy@163.com