维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0163-06

表达重组干扰质粒对 Tca8113 细胞 c-erbB-2、Bcl-2 基因表达干扰作用的实验研究

季　平,张福军,李少林

(重庆医科大学附属口腔医院颌面外科,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨表达重组干扰质粒(RNAi 技术)对人舌鳞癌细胞株(Tca8113)细胞中 c-erbB-2、Bcl-2 基因表达的干扰效率。方法:按 siRNA 设计原则设计针对 c-erbB-2、Bcl-2 基因的 Oligo DNA,体外化学合成 Oligo DNA,Oligo DNA 退火、连接、转化、筛选克隆,构建针对 c-erbB-2 基因的表达重组 RNA 干扰质粒(psiC1、psiC2、psiC3)和针对 Bcl-2 基因的表达重组 RNA 干扰质粒(psiB1、psiB2、psiB3),细胞脂质体转染 Tca8113 细胞,Real-time RT-PCR 的标准曲线、扩增曲线和熔解曲线的数据收集处理,采用荧光定量 RT-PCR 方法检测重组干扰质粒对 Tca8113 细胞中 c-erbB-2、Bcl-2 基因表达的干扰效率。结果:实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 psiC1、siC2、psiC3 质粒脂质体转染后 c-erbB-2 基因的表达情况结果显示 psiC2、psiC3 相对于对照组均有不同程度的干扰效果,psiC1 相对于对照没有干扰效果。psiC2 的干扰程度较大为 62.68%,psiC3 的干扰程度较小为 40.61%。psiB1、psiB3 相对于对照组无明显干扰效果,psiB2 的干扰程度高达 66.20%。结论:针对 c-erbB-2、Bcl-2 基因的表达重组 RNA 干扰质粒 psiC2(gAgTCCCAACCATgTCAAA)、psiB2(CCgggAgATAgTgATgAA)能有效沉默 Tca8113 细胞中 c-erbB-2、Bcl-2 基因的表达。

【关键词】重组干扰质粒;脂质体转染;基因表达;实时荧光定量 RT-PCR

【中国图书分类法分类号】Q786;R739.86　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-10-23

Silence the expression of c-erbB-2 and Bcl-2 gene in Tca8113 cell line by rnai technique

JI Ping, et al

(Department of Maxillofacial Surgery, the Stomatology Affiliated Hopital,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the interfering efficiency of RNAi technique on the expression of c-erbB-2 and Bcl-2 oncogene in human tongue squamous carcinoma (Tca8113). *Methods*: The recombined RNAi plasmids for c-erbB-2 and Bcl-2 oncogene were constituted by the four successive steps-designing of Oligo DNAs,synthesis of Oligo DNAs, transfection of Oligo DNAs into pSUPER.neo+gfp vectors and selection of positive plasmids. In order to silence the expression of c-erbB-2 and Bcl-2 oncogenes, the recombined RNAi plasmids were transfected into Tca8113 cells by culturing together for about 10 hours, and the interfering efficiency of RNAi for the two oncogenes was evaluated by fluorescence-quantitative RT-PCR. *Results*: The interfering efficiencies for c-erbB-2 oncogene were 62.68% and 40.61%, respectively in psiC1、psiC2、psiC3, while the interfering efficiencies for Bcl-2 oncogene were 66.20% and respectively in psiB1、siB2、psiB3. *Conclusion*: The recombined RNAi plasmids of psiC2 (gAgTCCCAACCATgTCAAA) for c-erbB-2 oncogene and of psiB2(CCgggAgATAgTgATgAA) for Bcl-2 oncogene can effectively silence the expression of c-erbB-2 and Bcl-2 oncogenes in Tca8113 cell.

【Key words】Recombined interfering plasmid; Liposomes transfection; Gene expression; Fluorescence-quantitative RT-PCR

随着医学分子生物学的不断发展,基因分析技术层出不穷,如:PCR 技术、mRNA 差异显示技术、FISH 技术、辐射性杂交、酵母双杂交技术、SELEX 技术、基因打靶技术、转基因动物技术、反义寡核苷酸技术、RNA 干扰技术、生物芯片及蛋白质芯片等。目前,RNAi 技术已比较成熟并大量应用于各个领域研究。如应用 RNAi 高通量研究基因组功能和信

作者介绍:季　平(1961-),男,博士,副教授
主要研究方向:肿瘤相关研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30070230),重庆市科委自然科学基金资助项目(CSTC,2005DB5241),重庆市卫生局科研项目(052153)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

号转导系统上下游分子相互关系、基因表达调控，有可能为肿瘤基因治疗提供新策略[1]。本实验旨在进行表达重组干扰质粒（RNAi 技术）对人舌鳞癌细胞株（Tca8113）细胞中基因（c-erbB-2、Bcl-2）表达干扰的实验研究，以期对肿瘤的发生、发展、侵袭、转移的机理从转录后基因组学水平进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 TCA-8113 细胞株（由武汉中国典型培养物保藏中心提供）。pSUPER RNAi System 和 Oligo 寡核苷酸，pSUPER RNA System 购自美国 Ambion 公司。Oligo 寡核苷酸由上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司合成。

1.1.2 主要试剂 质粒小量抽提试剂盒（Sigma 公司）。脂质体（Lipafectamine2000）（Invitrogen 公司），RNA 酶抑制剂（40U/μl）（Promega 公司），看家基因 GAPDH 标准品（上海复旦悦达生物生物技术有限公司自制，批号 040326），看家基因 GAPDH 引物、c-erbB-2、Bcl-2 靶基因引物（上海中科开瑞生物芯片股份有限公司合成），Bgl II、Hind III 限制性内切酶（TOYOBO 公司），Top 10F' 感受态细菌（上海复旦悦达生物技术有限公司保存）。

1.1.3 主要仪器设备 SCS-24 型摇床（上海市离心机械研究所），核酸蛋白分析仪（BECKMAN DU640），台式高速冷冻离心机（Biofuge Primo R 75005453, BECKMAN），核酸凝胶成像系统（Kodak EDAS 290），荧光定量 PCR 仪（BIO-Rad i-Cycler），普通 PCR 仪（A&B 9700），CO_2 培养箱（Forma 3111, Thermo Life Sciences Ltd.），超净工作台（吴江市升华净化设备厂），荧光倒置显微镜（Leica DMIL IL FLUO，徕卡显微系统有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

1.2.2 设计、合成 Oligo DNA 由上海中科开瑞生物芯片股份有限公司合成以下 12 条 Oligo DNA，各 2.0 OD，加 ddH_2O 配制成 3 mg/ml 溶液。-20℃保存。序列见表 1。

1.2.3 构建表达重组 RNA 干扰质粒

（1）根据 c-erbB-2、Bcl-2 基因的 cDNA 序列中分别设计 3 个 siRNA 靶位点，合成 12 条寡核苷酸。1%琼脂糖凝胶电泳分析，每个克隆中均可见大小为 287bp 的片段，说明 siRNA 小片段已经插入（图 4）。选择 B1-1、B2-2、B3-1、C1-2、C2-1、C3-1 克隆进行测序确认，获得 siRNA 正确插入载体的阳性克隆。

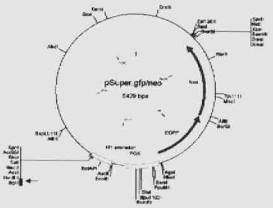


图 1 干扰重组质粒构建图谱

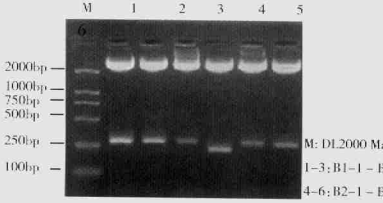


表 1 重组干扰质粒的干扰靶基因序列和 OligoDNA 序列

靶基因序列	名称	Oligo DNA 序列
gCTgCACCTgACgCCCTTC	B1 sense	5′-gATCCCCgCTgCACCTgACgCCCTTCTTCAAgAgAAgggCgTCAggTgCAgCTTTTTA-3′
	B1 antisense	5′-AgCTTAAAAAgCTgCACCTgACgCCCTTCTCTCTTgAAgAAgggCgTCAggTgCAgCggg-3′
CCgggAgATAgTgATgAAg	B2 sense	5′-gATCCCCCCgggAgATAgTgATgAAgTTCAAgAgACTTCATCACTATCTCCCggTTTTTA-3′
	B2 antisense	5′-AgCTTAAAAACCgggAgATAgTgATgAAgTCTCTTgAACTTCATCACTATCTCCCggggg-3′
gACTCTgCTCAgTTTggCC	B3 sense	5′-gATCCCCgACTCTgCTCAgTTTggCGTTCAAgAgAggCCAAACTgAgCAgAgTCTTTTTA-3′
	B3 antisense	5′-AgCTTAAAAAgACTCTgCTCAgTTTggCGTCTCTTgAAggCCAAACTgAgCAgAgTCggg-3′
AATTCCAgTggCCATCAAA	C1 sense	5′-gATCCCCAATTCCAgTggCCATCAAATTCAAgAgATTTgATggCCACTggAATTTTTTTA-3′
	C1 antisense	5′-AgCTTAAAAAAATTCCAgTggCCATCAAATCTCTTgAATTTgATggCCACTggAATTggg-3′
gAgTCCCAACCATgTCAAA	C2 sense	5′-gATCCCCgAgTCCCAACCATgTCAAATTCAAgAgATTTgACATggTTgggACTCTTTTTA-3′
	C2 antisense	5′-AgCTTAAAAAgAgTCCCAACCATgTCAAATCTCTTgAATTTgACATggTTgggACTCggg-3′
CAATACGACCCCTgTCACA	C3 sense	5′-gATCCCCCAATACCACCCCTgTCACATTCAAgAgATgTgACAggggTggTATTgTTTTTA-3′
	C3 antisense	5′-AgCTTAAAAACAATACCACCCCTgTCACATCTCTTgAATgTgACAggggTggTATTgggg-3′

维普资讯 http://www.cqvip.com

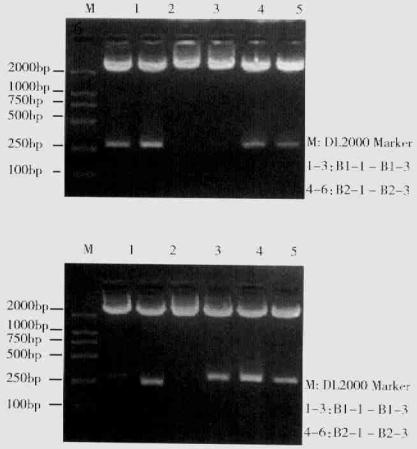


图 2　重组质粒 EcoR Ⅰ和 Hind Ⅲ酶切鉴定图

（2）Oligo DNA 退火　各取正反义 Oligo DNA 1 ml，48 ml 退火缓冲液（100 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L HEPES pH 7.4）混匀，于 90℃ 4min、56℃ 10min、30℃ 60min，缓慢降温到 10℃。直接进行连接反应或 -20℃长期保存。

（3）连接　用 Hind Ⅲ和 Bgl Ⅱ限制性内切酶酶切 pSUPER.neo+gfp 载体，胶回收纯化。取上述退火后的 Oligo DNA 片段和纯化后的载体、按片段：载体 =3：1 的摩尔比进行连接，混匀后于 42℃水浴 5min，立即插入冰中，放置 5min，于冰上加入 8 ml 快速连接酶混合液，连接总体积为 16 ml，混匀后于 16℃水浴 2h。

（4）转化　在转化前用 Bgl Ⅱ限制性内切酶酶切连接产物。取出 8 ml 连接产物加入 100 ml Top10F' 感受态菌中，轻弹混匀，冰浴放置 45min，42℃水浴热休克 90s，取出立即插入冰中 5min，加入预热的无抗生素 LB 液 900 ml，轻轻颠倒混匀后于 37℃摇床复苏 1h，转速 200 r/min，复苏后 6000 r/min 离心 2min，将细菌沉淀均匀涂布含有氨苄青霉素（100 mg/ml）和四环素（100 mg/ml）的 LB 琼脂平板，放于 37℃温箱中培养过夜。

（5）筛选克隆　从转化平板上随机挑选细菌克隆各 3 个，分别命名为 B1-1、B1-2、B1-3、B2-1、B2-2、B2-3、B3-1、B3-2、B3-3、C1-1、C1-2、C1-3、C2-1、C2-2、C2-3、C3-1、C3-2、C3-3，接种于 3 ml LB 液体培养基（含氨苄青霉素 100 mg/ml 和四环素 100 mg/ml），37℃振摇（250 r/min）培养 16h。用碱变性法小量抽提质粒 DNA，取 10 ml 抽提的质粒用 EcoR Ⅰ和 Hind Ⅲ酶切鉴定重组质粒，重组质粒酶切后有 287 bp 大小片段产生者为阳性，重组质粒酶切后有 227 bp 大小片段产生者为阴性。

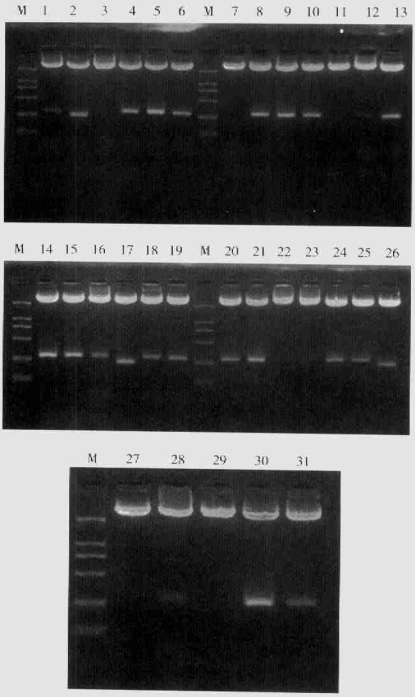


图 3　克隆酶切鉴定结果

1.2.4　重组质粒的小量抽提　取 37℃振摇（250 r/min）培养过夜的菌液 1.5ml，6000 r/min 离心 2min 收集菌体后，用质粒小量抽提试剂盒（Sigma 公司）进行质粒抽提。

1.2.5　细胞脂质体转染　取 C-erbB-2、Bcl-2 和无关对照质粒各 2 mg 采用 Lipafectamine2000 脂质体转染人舌鳞状细胞癌系 TCA8113 细胞，因 pSUPER.neo+gfp 载体能够表达 GFP 绿色荧光蛋白，在荧光显微镜下可见绿色荧光，以估算转染效率。图 4A 和 4B 分别为相差显微镜和绿色荧光蛋白观测结果，说明重组质粒已成功转入细胞。



A

维普资讯 http://www.cqvip.com



B

图 4 TCA8113 细胞转染后荧光照片

1.2.6 数据处理 根据公式计算干扰效率：干扰效率 =（对照组 − 干扰组）/ 对照组 × 100%。

2 结 果

2.1 重组干扰质粒对 Bcl-2 基因干扰效果

为了检验 siRNA 对 Bcl-2 基因的干扰效果，采用荧光定量 RT-PCR 方法检测 psiB1、siB2、psiB3 质粒脂质体转染后 Bcl-2 基因的表达情况。从图 5、图 6 和表 2 可以看出，psiB1、psiB3 相对于对照组无明显干扰效果，psiB2 的干扰程度高达 66.20%。

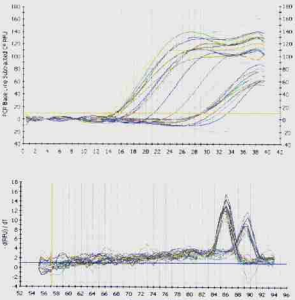


图 5 Real-time PCR 分析 C-erbB-2 基因的干扰情况分析（标准曲线、扩增曲线和熔解曲线）

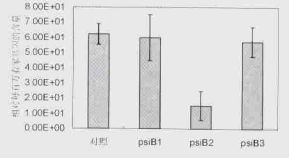


图 6 重组干扰质粒对 C-erb-B-2 基因干扰程度分析图

表 2 荧光定量 RT-PCR 检测重组干扰质粒对 Bcl-2 基因的干扰效果

名称	拷贝 /μl		拷贝 /μl	相对每百万看家基因的含量	均值 ± 标准差	干扰程度
对照 -a	1.66E+02	看家基因	3.08E+06	5.39E+01	6.22E+01 ± 11.74	
对照 -b	1.98E+02		2.81E+06	7.05E+01		
psiB1-a	5.02E+01		2.97E+06	1.69E+01	6.00E+01 ± 60.88	3.54%
psiB1-b	2.00E+02		1.94E+06	1.03E+02		
psiB2-a	4.92E-01		1.37E+05	3.59E+00	1.51E+01 ± 16.34	66.20%
psiB2-b	2.00E+01		7.50E+05	2.67E+01		
psiB3-a	2.13E+02		3.08E+06	6.92E+01	5.73E+01 ± 16.83	7.88%
psiB3-b	1.71E+02		3.77E+06	4.54E+01		
		标准品	6.00E+02			
			6.00E+03			
			6.00E+04			
			6.00E+05			
			6.00E+06			

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 干扰重组质粒对 C-erbB-2 基因干扰效果

采用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 psiC1、psiC2、psiC3 质粒脂质体转染后 C-erbB-2 基因的表达情况。从图 7、图 8 和表 3 可以看出，psiC2、psiC3 相对于对照组均有不同程度的干扰效果，psiC1 相对于对照没有干扰效果。psiC2 的干扰程度较大为 62.68%，psiC3 的干扰程度较小为 40.61%。

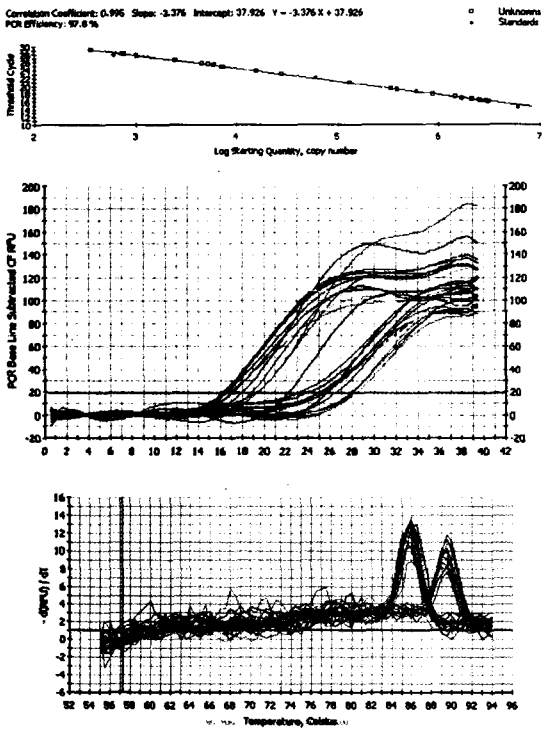


图 7 Real-time PCR 分析 C-erbB-2 基因的干扰情况分析（标准曲线、扩增曲线和熔解曲线）

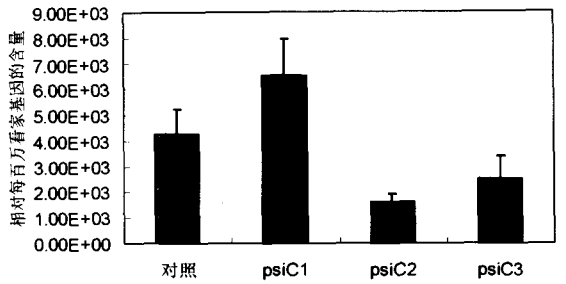


图 8 重组干扰质粒对 C-erb-B-2 基因干扰程度分析图

3 讨 论

基因表达的调控是一个复杂而精细的过程，可以发生在 DNA 水平的调控：如染色质的丢失、基因的扩增、基因重排、DNA 甲基化、染色质结构改变；转录水平调控：转录起始复合物的形成、反式作用因子、转录起始的调控；转录后水平的调控：5′ 端加帽和 3′ 端多聚腺苷酸化、mRNA 的选择剪接、mRNA 运输；翻译水平的调控；翻译后水平的调控[4,5]。对基因表达调控的研究分析可以针对不同的环节采用相应的技术进行，本实验采用 RNA 干扰技术在转录后水平上对目的基因进行开、闭并研究基因沉默后其表达产物（产物蛋白质）的变化、细胞生理、生命的改变。C-erbB-2 基因过表达是因为 erbB-2 基因放大（gene amplification）以及 erbB-2 基因转录表达水平升高，目前对于人的 erb B-2 基因的启动子结构区的序列进行分析，鉴定出了有关

表 3 荧光定量 RT-PCR 检测重组干扰质粒对 Bcl-2 基因的干扰效果

名称	拷贝 /μl		拷贝 /μl	相对每百万看家基因的含量	均值 ± 标准差	干扰程度
对照 -1	8.20E+02	看家基因	1.30E+05	6.31E+03	4.26E+03 ± 2899.13	
对照 -2	7.46E+02		3.37E+05	2.21E+03		
C1-a	7.33E+03		2.94E+06	2.49E+03	6.53E+03 ± 5734.64	无效
C1-b	2.77E+04		2.62E+06	1.06E+04		
C2-a	7.73E+02		3.84E+05	2.01E+03	1.59E+03 ± 593.97	62.68%
C2-b	1.02E+03		8.75E+05	1.17E+03		
C3-a	5.23E+03		3.08E+06	3.58E+03	2.53E+03 ± 1492.00	40.61%
C3-b	2.47E+03		1.68E+06	1.47E+03		
		标准品	6.00E+02			
			6.00E+03			
			6.00E+04			
			6.00E+05			
			6.00E+06			

维普资讯 http://www.cqvip.com

erb B-2 基因表达活动有关的基础表达(basalexpression)和调节表达(regulatedexpression)的结构元件，发现 erb B-2 基因的 5′ - 末端非翻译区的核苷酸序列中转录因子结合的核苷酸序列，与高度保守的转录因子识别与结合的核苷酸序列具有高度的同源性。人 erb B-2 基因的转录可从两个相距很近的转录起始位点开始转录，第一个位于 -179、-178 和 -177nt 位点，第二个则位于 TATA 盒式结构上游 25 个核苷酸的位点上，即 -204 ~ -200nt 的位点上。有关 erb B-2 调节性表达的元件以大鼠的 erb B-2 基因进行了较为详细的研究，利用基因的缺失突变、凝胶迁移率以及突变分析，发现了多个具有抑制性作用的位点结构以及具有激活作用的位点结构。人 erb B-2 基因的 -526 ~ -516 核苷酸序列即为其增强子（enhancer）序列结构，是 pRB 肿瘤抑制蛋白转录抑制作用的一段靶序列，同时也是 neu 基因自身调节（autoregulation）的一个作用位点。在 erb B-2 基因翻译起始位点上游 285 ~ 279nt 之间的核苷酸序列，是为腺病毒 E1A 蛋白抑制 erb B-2 基因转录活动的一段靶基因序列。有研究表明从乳腺癌细胞核中提取的核蛋白中，发现核蛋白转录因子 OB2-1 可与 erb B-2 基因序列中 CTGCAGG 核苷酸序列进行结合导致 erb B-2 的表达水平显著升高，对于人、大鼠和小鼠的 erb B-2 基因序列进行比较，发现 RVF 增强子序列，GGA 重复序列(能与 erb B 启动子序列互补)以及转录因子 Spl、OTF-1、、AP2 和 FATFl 结合的特异性序列，都是高度保守的核苷酸序列[6~10]。在试验当中我们依据人 erb B-2 基因的 -526 ~ -516 核苷酸序列即为其增强子 (enhancer) 序列结构、RVF 增强子序列，GGA 重复序列（能与 erb B 启动子序列互补）以及转录因子 Spl、OTF-1、AP2 和 FATFl 结合的特异性、高度保守的核苷酸序列的基因结构特点，设计针对 c-erbB-2 目的基因的三个靶位点 siRNA 并构建重组干扰质粒 psiC1、psiC2、psiC3，荧光定量 RT-PCR 方法检测 psiC1、psiC2、psiC3 质粒脂质体转染后 C-erbB-2 基因的表达情况，结果显示：psiC2、psiC3 相对于对照组均有不同程度的干扰效果，psiC1 相对于对照没有干扰效果，psiC2 的干扰程度较大为 62.68%，psiC3 的干扰程度较小为 40.61%。

bcl-2 含 3 个外显子，其中外显子 2 和外显子 3 的一小部分序列共同编码蛋白序列。因内含子 2 剪接方式的不同，可编码两种 mRNA，即 bcl-2a 及 bcl-2b，但似乎只有 bcl-2a 有生物学活性。尽管 bcl-2 基因激活的主要机制是基因的易位，但也存在点突变及基因扩增。而 bcl-2 基因扩增则会导致相应蛋白大量表达[11,12]。在试验当中我们依据 bcl-2 三个外显子特异性、高度保守的核苷酸序列的基因结构特点，设计针对 bcl-2 目的基因的三个靶位点 siRNA 并构建重组干扰质粒 psiB1、psiB2、psiB3，荧光定量 RT-PCR 方法检测 psiB1、psiB2、psiB3 质粒脂质体转染后 bcl-2 基因的表达情况，结果显示：psiB1、psiB3 相对于对照组无明显干扰效果，psiB2 的干扰程度高达 66.20%。

上述结果表明 RNA 技术构建的重组干扰质粒能有效沉默 c-erbB-2、Bcl-2 基因表达，但 RNA 干扰只是对基因进行敲低（即对基因表达进行开、闭，保持了基因结构的完整性和稳定性）而不是敲除，由于靶序例的选择是经验性（常采用鸟枪法）、随机性，干扰效率变化范围较大，最高可达 90% ~95%，干扰效率的高低受 siRNA 设计靶序列针对性、基因结构、染色质的构相、siRNA 是否为化学合成、转染方式、实验操作是否规范等诸多因素的影响，其中设计靶序列 siRNA 最为关键[11,12]。

参 考 文 献

[1] Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash [J]. Science, 2002;298(5602):2296-2297.

[2] Gregory J, Hannon. RNA interference [J]. Nature, 2002;418: 11.

[3] Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells [J]. Genes & Development, 2002;16:948-958.

[4] Hannon GJ, Conklin DS. RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells [J]. Methods Mol Biol, 2004; 257:255-266.

[5] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference[J]. Nucleic Acids Res, 2004;32:936-948.

[6] Grishok A. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C.elegans developmental timing [J]. Cell, 2001;106:23-34.

[7] Amant F, Vloeberghs V, Woestenborghs H, et al. ERBB-2 gene overexpression and amplification in uterine sarcomas [J]. Gynecol Oncol, 2004;95(3):583-587.

[8] Trost TM, Lausch EU, Fees SA. Schmitt Premature senes-

（下转第 179 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

程度上提示 p16 基因甲基化可能参与了肿瘤的转移。有学者认为在检测 p16 基因甲基化时只涉及了第一外显子的甲基化情况，并未检测全部上游启动子区域，而这些区域与基因的表达更相关[3]。张静[11]等人提出在检测 p16 基因甲基化时应多检测几个酶切位点，以更具说服力，本实验只检测了 p16 基因中第一外显子内的全部酶切位点，包括两个 HpaⅡ位点和一个 SacⅡ酶切位点，虽然该区域与 p16 基因的转录表达有密切关系，但不是 p16 基因全部上游启动子区域，要更加明确 p16 基因甲基化在原发性乳腺癌中的作用，尚需作进一步研究。

通信作者：张　徽（Email: zhanghui200157@sina.com），重庆医科大学病理教研室
第一作者现工作单位：常州市肿瘤医院病理科

参 考 文 献

[1] Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Doherty JP, et al. DNA methylation in the promoter region of the p16 gene in human breast tumors [J]. Br J Cancer, 1999;79:251-256.

[2] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumula-tion in gastric carcinomas [J]. Cancer Res, 1998;58(9):1808-1812.

[3] Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, et al. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16 messenger RNA is a marker of poor prognosis [J]. Clinical Cancer Res, 2000;6(7):2777-2787.

[4] Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, et al. Over-expression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype [J]. Breast Cancer Res and Treatment, 2001;67(1):61-70.

[5] Geradts J, Wilson PA. High frequency of aberrant p16 expression in human breast cancer[J]. AM J Pathology, 1996;149(1):15-20.

[6] Ruas M, Peters G. The p16 INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives [J]. Biochim Biophys Acta, 1998;1378(2):F115-177.

[7] Gorgoulis VG, Koutroumbi EN, Kotsinas A, et al. Alterations of p16-pRb pathway and chromosome locus 9p21-22 in sporadic invasive breast cancinomas [J]. Mol Med, 1998;4:807-822.

[8] 郭山春，廖松林，孟振行，等. 乳腺癌 p16 基因的纯合缺失，高甲基化，突变及其表达[J]. 中华病理学杂志，1999;28(2):105-108.

[9] Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, et al. p16 (INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma [J]. Int J cancer, 2005;114(3):414-421.

[10] Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, et al. Methylation of p16 promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia [J]. Cancer Res, 2003;63(7):1596-1601.

[11] 张　静，来茂德，陈　俭. 结直肠癌及结直肠黏膜 p16 基因 5′ CpG 岛甲基化状态的研究[J].中华病理学杂志，2000;29(2):95-98.

（上接第 168 页）

cence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells [J]. Cancer Res, 2005;65(3):84.

[9] Ueda Y, Wang S, Dumont N, et al. Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility[J]. J Biol Chem, 2004;279(23):24505-24513.

[10] Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells [J]. Nature, 1988;335:440-442.

[11] Chen Y, Kayano T, Takagi M. Dysregulated expression of bcl-2 and bax in oral carcinomas: evidence of post-transcriptional control [J]. Oral Pathol Med, 2000;29:63-69.

[12] Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death [J]. Nature, 1990;348:334-336.

[13] Giarnieri E, Mancini R, Pisani T, et al. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix [J]. Clin Cancer Res, 2000;6(9):3600-3606.