

湖南地区汉族人群 p53 基因第 72 位密码子多态性与宫颈鳞癌的相关性*

眭鸿颖 周萍 江宁 廖革望

(湖南省肿瘤医院妇瘤科 湖南长沙 410013)

摘要 目的: 探讨宫颈组织 p53 基因第 72 位密码子的多态性及分析第 72 位密码子的多态性与湖南地区汉族人群宫颈鳞癌的相关性。**方法:** 采用 PCR 方法扩增 101 例正常宫颈和 150 例宫颈鳞癌石蜡组织 p53 基因第 72 位密码子基因回收目的片段进行测序。采用 SPSS 11.5 软件分析 p53 基因第 72 位密码子的多态性。**结果:** p53 第 72 位密码子基因测序结果显示,在宫颈鳞癌组织中 Arg/Arg、Pro/Pro、Arg/Pro 所占比例分别为 40.66%、16.67%、42.67%;在正常宫颈组织中 Arg/Arg、Pro/Pro、Arg/Pro 所占比例分别为 47.53%、7.92%、44.55%。统计学分析结果显示,Arg/Arg 和 Arg/Pro 基因型在宫颈鳞癌和对照组中的表达差异没有统计学意义 ($P>0.05$),Pro/Pro 基因型在宫颈鳞癌组中所占比例显著高于正常宫颈组织 ($P<0.05$)。 **结论:** p53 基因第 72 位密码子 Pro/pro 基因型是湖南地区女性发生宫颈鳞癌易感因素。

关键词: p53 基因第 72 位密码子;多态性;宫颈癌;宫颈鳞癌

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)11-2083-04

Correlation between p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Squamous Cell Carcinoma of Chinese Han Population in Hunan Area*

SUI Hong-ying, ZHOU Ping, JIANG Ning, LIAO Ge-wang

(Department of Gynecology Oncology, Hunan Tumor Hospital, Changsha 410013, China)

ABSTRACT Objective: To study the p53codon72 polymorphism of cervical tissues, and analysis the relationship between p53codon72 polymorphism and cervical carcinoma of Han population in Hunan area. **Methods:** Use PCR to amplify the p53codon72 of 101 normal cervical and 150 cervical carcinomas paraffin tissues, purifying these fragments and sequencing. Used SPSS 14.0 software to analysis the p53codon72 polymorphism. **Results:** The sequencing results of p53codon72 showed that in cervical carcinoma tissues, the proportion of Arg/Arg, Pro/Pro, Arg/Pro was 31.33%, 59.33%, 9.33% respectively; in normal cervical tissue, the proportion of Arg/Arg, Pro/Pro, Arg/Pro was 42.57%, 54.46%; 2.97% respectively. Statistical analysis showed that the Arg/Arg and Arg/Pro genotype expression difference was not statistically significant ($P>0.05$) between cervical carcinomas tissues and normal cervical tissues; the Pro/Pro genotype expression in cervical carcinomas tissues was significantly higher than the normal cervical tissues ($P<0.05$). **Conclusion:** p53codon72 Pro/Pro genotype is one of the susceptibility factors to cervical carcinomas in Han women in Hunan area.

Key words: p53 codon 72; Polymorphism; Cerial cancer; Cervical Squamous Cell Carcinoma

Chinese Library Classification: R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2083-04

前言

p53 基因是目前发现的与人类肿瘤相关性最高的一种抑癌基因,在 DNA 合成修复、细胞周期、基因组的完整性等方面发挥着重要作用^[1]。p53 基因第 72 位密码子所在的第 4 外显子控制着细胞的生长抑制和凋亡。1987 年 Matlashewski 等^[2]首先发现在人群中 P53 基因第 4 外显子第 72 位密码子存在多态性,表达 2 种野生型 p53 蛋白:含精氨酸残基(ArgCGC)和含脯氨酸残基(ProCCC)。已有大量研究显示,p53 基因 Arg72Pro 多态性与肺癌^[3,4]、食管癌^[5]、肝癌^[6]、宫颈癌^[7]、乳腺癌^[8,9]、结直肠癌^[10]等多种恶性肿瘤相关。

子宫颈癌(cervical carcinoma, CC)是世界妇女中第三位常见的恶性肿瘤,全世界每年都有约 20 万妇女死于此病^[11]。目前

的观点认为,p53 基因第 72 密码子存在种族和地域的差异。Beckman G 等^[12]指出 P53 基因第 72 密码子等位基因分布显示非常明显的种族差异和纬度差异。Storey 等^[13]提出 p53 第 4 外显子 72 密码的基因多态性可能是机体易患宫颈癌的一个重要基因遗传因素。陈长春^[14]等研究发现 p53 基因第 72 位密码子 Pro/Pro 基因型是湖北地区汉族女性发生宫颈鳞癌的遗传易感因素之一。

目前还没有有关湖南地区汉族人群 P53 基因第 72 位密码子多态性与宫颈鳞癌发病相关性的报道。本研究旨在对中国宫颈鳞癌高发地区之一的湖南省进行了样本的收集,就 p53 基因第 72 密码子的多态性与宫颈鳞癌发病的相关性进行研究,从而为湖南省女性宫颈癌的早期诊断、预防和治疗提供依据。

* 基金项目:长沙市科技计划(K0802052-31)

作者简介:眭鸿颖(1976-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:妇科肿瘤。

电话:13574848976 E-mail:hongyingsui@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-02-17 接受日期:2011-03-12)

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2005~2010 年间湖南省肿瘤医院妇瘤科 101 例汉族正常宫颈组织(因子宫肌瘤行全子宫切除术,病理诊断证实为正常宫颈)和 150 例宫颈鳞癌组织。均为 10%福尔马林固定、石蜡包埋组织标本。

蛋白酶 K 购自 promega 公司, DNA 凝胶 /PCR 产物纯化回收试剂盒、Taq 酶(含 dNTPs 和 buffer)、DNA Marker 等购自长沙爱科博生物科技有限公司,琼脂糖为西班牙进口,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用三种不同的 DNA 提取方法,即:TES 水浴脱蜡-试剂盒抽提法、TES 水浴脱蜡-酚氯仿抽提法、二甲苯水浴脱蜡-酚氯仿抽提法等方法进行 DNA 提取预实验,然后选择一种最好的方法进行所有样本的 DNA 提取。具体的操作步骤如下:

(1)TES 水浴脱蜡-试剂盒抽提法。组织切片(10 μm)4~6 张,装入 1.5 ml 的灭菌 Ep 管中,步骤 1:加入 1 ml TES 溶液,充分振荡,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,再次充分振荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 5 min,弃上清再加 1 ml TES 溶液水浴溶蜡,重复 3 遍。加入 1 ml 无水乙醇,充分混匀,离心 12 000 rpm 2 min,弃上清。打开 Ep 管,室温(15~25 $^{\circ}\text{C}$)下或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,直到残余的乙醇全部挥发。步骤 2:加入 180 μl Buffer ATL 和 20 μl 蛋白酶 K,充分混匀,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜。步骤 3:次日 90 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h,短暂离心 1.5 ml Ep 管,迅速加入 200 μl Buffer AL 和 200 μl 无水乙醇,充分混匀,短暂离心。步骤 4:小心转移全部消化物至 QI-Aamp 层析柱(放在 2 ml 收集管)中,盖上盖子,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 8 000 rpm 3 min,将柱子放入 1 个干净的收集管中,弃去原先的收集管。小心打开柱子,加入 500 μl Buffer AW1,盖上盖子,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 3 min,将柱子放入 1 个干净的收集管中,弃去原先的收集管。小心打开柱子,加入 500 μl Buffer AW2,盖上盖子,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 3 min,将柱子放入 1 个干净的收集管中,弃去原先的收集管。4 $^{\circ}\text{C}$ 全速离心 12 000 rpm 3 min,使膜完全干燥。步骤 5:将柱子放入 1 个 1.5 ml 干净的 Ep 管(未提供)中,弃去原先的收集管。小心打开柱子,加入 50 μl Buffer ATE。室温(15~25 $^{\circ}\text{C}$)下盖上盖子孵育 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 全速离心 12 000 rpm 1 min,若短期不用时应 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

(2)TES 水浴脱蜡-酚氯仿抽提。组织切片(10 μm)4~6 张,装入 1.5 ml 的灭菌 Ep 管中,步骤 1:加入 1 ml TES 溶液,充分振荡,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,再次充分振荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 5 min,弃上清再加 1 ml TES 溶液水浴溶蜡,重复 3 遍。加入 1 ml 无水乙醇,充分混匀,离心 12 000 rpm 2 min,弃上清。打开 Ep 管,室温(15~25 $^{\circ}\text{C}$)下或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,直到残余的乙醇全部挥发。步骤 2:在已脱蜡的组织切片管内加入 500 μl TET 溶液,加蛋白酶 K 15~45 μl (根据 Ep 管中的组织量而定),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜。步骤 3:次日在已消化过夜的组织中加入 Tris 平衡酚 500 μl 充分振荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 10 min,重复 2 次。取上清至新的 Ep 管中,加入 Tris 平衡酚 250 μl 、氯仿/异

戊醇(24:1)250 μl 充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 10 min。取上清并加入 1 ml 无水酒精和 10 μl 3 mol NaAc 充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。步骤 4:4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 10 min,弃上清。将已沉淀的 DNA 用 75%酒精漂洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 全速离心 10 min,弃上清,重复 2 次。打开 Ep 管,直到残余的乙醇全部挥发,再加入 50 μl TE 缓冲液溶解 DNA,若短期不用时应 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

(3)二甲苯水浴脱蜡-酚氯仿抽提法。组织切片(10 μm)4~6 张,装入 1.5 ml 的灭菌 Ep 管中,步骤 1:加入 1 ml 二甲苯溶液,充分振荡,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,再次充分振荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 5 min,弃上清再加 1 ml 二甲苯溶液水浴溶蜡,重复 3 遍。加入 1 ml 无水乙醇,充分混匀,离心 12 000 rpm 2 min,弃上清。打开 Ep 管,室温(15~25 $^{\circ}\text{C}$)下或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,直到残余的乙醇全部挥发。步骤 2:在已脱蜡的组织切片管内加入 500 μl TET 溶液,加蛋白酶 K 15~45 μl (根据 Ep 管中的组织量而定),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜。步骤 3:次日在已消化过夜的组织中加入 Tris 平衡酚 500 μl 充分振荡,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 10 min,重复 2 次。取上清至新的 Ep 管中,加入 Tris 平衡酚 250 μl 、氯仿/异戊醇(24:1)250 μl 充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 10 min。取上清并加入 1 ml 无水酒精和 10 μl 3 mol NaAc 充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。步骤 4:4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10000 rpm 10 min,弃上清。将已沉淀的 DNA 用 75%酒精漂洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 全速离心 10 min,弃上清,重复 2 次。打开 Ep 管,直到残余的乙醇全部挥发,再加入 50 μl TE 缓冲液溶解 DNA,若短期不用时应 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.2.2 引物的合成 特异扩增 p53 基因多态性引物由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列如下:p53F 5'-CTCCCA-GAATGCCAGAGG-3',p53R 5'-AGAAGCCCAGACGGAAAC-3'。经过软件分析,引物特异。扩增产物序列为:CTCCCA-GAATGCCAGAGGCTGCTCCCC (C/G)CGTGGCC CCTGCA-CCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAG CCCC-CTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAA AC-CTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCT。扩增长度 153bp,序列中的 C(C/G)C 为多态性位点,用下游引物测序。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应总体积 50 μL ,其中 10 \times PCR buffer (Mg²⁺ Included) 5.0 μL ,2.5 mM dNTPs 1 μL ,5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL ,20 pmol/L Primer 上下游各 1 μL ,DNA 200 ng,去离子水补充到 50 μL ,石蜡封顶,进行 PCR 扩增。

扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,退火 56 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 40s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳和胶回收

PCR 产物经过 2%的琼脂糖凝胶电泳后,切胶并用试剂盒回收 PCR 产物(详见产品说明书)。回收后送 invitrogen 公司测序,对结果进行分析。

1.2.5 统计学方法采用 χ^2 检验

以 χ^2 检验比较各基因型频率在各组之间的差异, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。统计分析采用 SPSS 11.5 软件。

2 结果

2.1 石蜡组织 DNA 提取结果

图 1 是三种不同的 DNA 提取方法(TES 水浴脱蜡-试剂

盒抽提法、TES 水浴脱蜡 - 酚氯仿抽提法、二甲苯水浴脱蜡 - 酚氯仿抽提法) 提取出来的 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果。从图可以看出, 三种方法提取的 DNA 质量有一定差异, TES 水浴脱蜡 - 试剂盒抽提法提取的 DNA 降解程度较低、TES 水浴脱蜡 - 酚氯仿抽提法次之、二甲苯水浴脱蜡 - 酚氯仿抽提法降解最多。

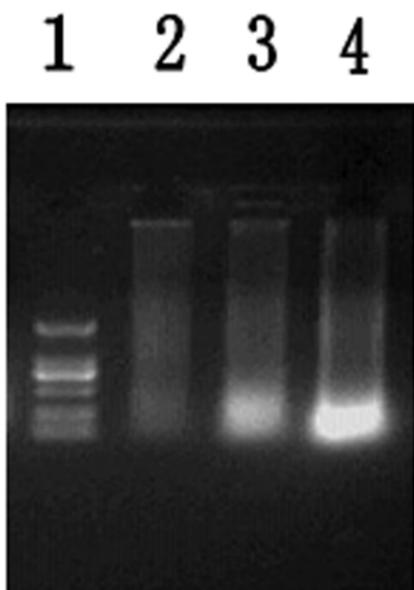


图 1 不同提取方法提取的 DNA 结果

1 :DNA Marker(100 250 500 750 1000 2000) 2 TES 水浴脱蜡 - 试剂盒抽提法提出的 DNA 3 TES 水浴脱蜡 - 酚氯仿抽提法提出的 DNA 4 二甲苯水浴脱蜡 - 酚氯仿抽提法提出的 DNA

Fig.1 DNA extraction results use different methods

1:DNA Marker(100, 250, 500, 750, 1000, 2000); 2:DNA lodged using extraction method by TES water bath dewax kit; 3:DNA lodged using extraction method by TES water bath dewax - phenol chloroform; 4:DNA lodged using extraction method by xylene water bath dewax - phenol chloroform

2.2 P53 基因第 72 位密码子 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

图 2 是样本 p53 基因第 72 位密码子 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果, 从图中可以看出, 和 DNA Marker 相比, 扩增产物长度在 100-250bp 之间, 因为理论产物长度是 153bp, 因此实验与理论结果相符。

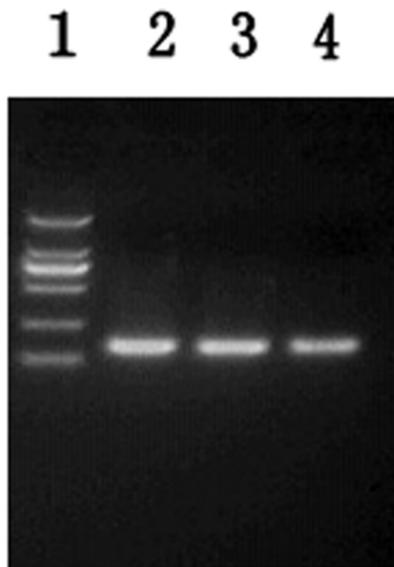


图 2 p53codon72 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

1 DNA Marker(100 250 500 750 1000 2000) 2,3,4 PCR 阳性结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis results of p53codon72 products

1:DNA Marker(100,250,500,750,1000,2000); 2,3,4:PCR positiveness

2.3 P53 基因第 72 位密码子 PCR 扩增产物测序可能出现的结果

根据 P53 基因的碱基序列特点, 第 72 位密码子处测序结果可能出现三种基因型: 一、第 72 位密码子第二个碱基出现 G 和 C 两个峰, CGC 翻译后为 Arg, CCC 翻译后为 Pro, 即 Arg/Pro 基因型; 二、第 72 位密码子第二个碱基出现单个 C 峰, CCC 翻译后为 Pro, 即 Pro/Pro 基因型, 即出现双峰; 三、第 72 位密码子第二个碱基出现单个 G 峰, CGC 翻译后为 Arg, 即 Arg/Arg 基因型。

各种基因型的测序峰图如图 3 所示:

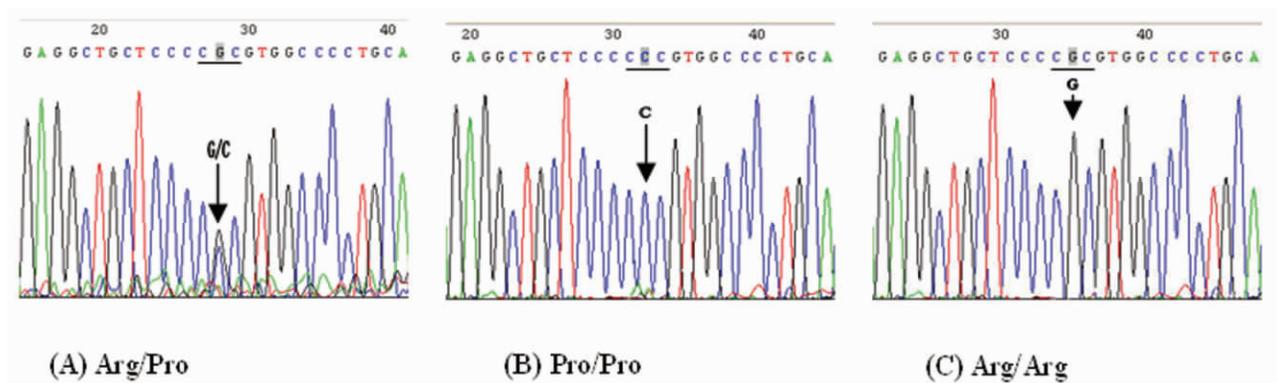


图 3 三种基因型测序峰图结果

Fig.3 Three genotype sequencing peak figure results

2.4 p53 Arg72Pro 多态性在各组宫颈组织中的分布
回收 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳的特异性条带, 送测

序公司进行测序。测序结果与上面的峰型进行对比, 进行样本的基因型确定, 结果如表 1。

表 1 正常组和宫颈鳞癌组 p53 密码子 72 基因型和等位基因分布

Table 1 Distribution of p53 codon 72 genotypes and alleles in normal group and cervical carcinomas group

分组 Group	P53 基因型(p53 Arg72Pro)		P53 genotype(p53 Arg72Pro)		P53 等位基因 P53 allele	
	Arg/Arg	Arg/Pro	Arg/Pro	Pro/Pro	ArgCGC	ProCCC
正常宫颈组织(101) Normal cervix organization	48	45	8		141	61
宫颈鳞癌组织(150) Cervix squama cancer organization	61	64	25		186	114

测序结果显示,在正常宫颈组织中 p53codon72 基因型所占比例如下 Arg/Arg 为 47.53%、Pro/Pro 为 7.92%、Arg/Pro 为 44.55%、P53codon72 等位基因所占比例为 ArgCGC 占 69.8% 和 ProCCC 占 30.2%。在宫颈鳞癌组织中 p53 基因型所占比例如下 Arg/Arg 为 40.66%、Pro/Pro 为 16.67%、Arg/Pro 为 42.67%、P53codon72 等位基因所占比例为 ArgCGC 占 62.0% 和 ProCCC 占 38.0%。

3 讨论

3.1 石蜡组织 DNA 提取方法的选择

当今,对肿瘤发病机理的研究已经上升到了基因水平,但研究者在短期内通常难以获得大量的病例分析的新鲜标本,从而影响研究的进程。这就需要能从长期保存的福尔马林固定石蜡包埋组织(FFPET)中提取 DNA。石蜡组织 DNA 提取方法很多,但是归纳起来就两种,试剂盒和溶液法。不管哪种方法,都需要两个步骤,脱蜡和 DNA 提取。因此要获得一定质量的石蜡组织 DNA,就是需要选择一种有效的脱蜡方法和 DNA 提取方法。目前国内外多采用二甲苯脱蜡,但该方法所得 DNA 量较少,并且易出现 DNA 链的降解(小片段的 DNA),同时所使用的有机溶剂二甲苯试剂易造成环境的污染和对操作者身体的伤害^[15]。本实验中的三种方法提取的 DNA 质量上有一定差异,单从 DNA 的质量上来说,应该选择 TES 水浴脱蜡-试剂盒抽提法来提取 DNA,但是考虑到经济因素以及 DNA 质量对 DNA 扩增结果的影响上来说, TES 水浴脱蜡-酚氯仿抽提方法可能是更好的选择,因为该办法不需要使用二甲苯以及昂贵的试剂盒,而且扩增的结果完全能满足这个实验的需要。当然如果经费很充裕的话,还是优选 TES 水浴脱蜡-试剂盒抽提法来进行 DNA 的提取。

3.2 p53 基因第 72 密码子多态性结果分析

宫颈鳞癌发病机制到目前为止尚不清楚,研究证明这是一个复杂的多步骤多因素作用的结果,涉及遗传和外源性等诸多因素。目前普遍认为 p53 基因第 72 位密码子基因型多态性存在种族和地域差异。本研究发现在湖南省汉族正常人群中 Arg/Arg 基因型的比例为 47.53%。符合 Beckman 等^[12]报道 Arg/Arg 基因型比例随纬度增加而逐渐增加的结果。这一结果也与 p53 基因第 72 位密码子 Arg/Arg 基因型多态性在汉族人群中的比例由东南向西北方向逐渐降低的分布特征相一致。湖南省汉族宫颈鳞癌患者中 Arg/Arg 基因型的比例为 40.66%, Pro/Pro 基因型比例为 16.67%。各地汉族宫颈鳞癌患者 p53 基因第 72 位密码子基因型多态性分布也不一致。我国宫颈癌的

分布主要在中西部地区,形成一个自北向南由内蒙到湖南的高死亡率的条形地带。上述高危地区中湖南、湖北和陕西等地携带 Arg 等位基因的宫颈癌患者比例较其它地区低,携带 Pro 等位基因的宫颈癌患者相对较多,显示该基因差异对宫颈癌发病可能有影响。

对研究的结果进行分析发现:在宫颈鳞癌组中与正常组之间 Arg/Pro 基因型与 Arg/Arg 基因型无显著性差异(P=0.681); Pro/Pro 基因型与 Arg/Pro 基因型无显著性差异(P=0.076); Pro/Pro 基因型与 Arg/Arg 基因型相比差异显著(P=0.041), Pro/Pro 基因型在宫颈鳞癌组中所占比例高于正常组,ProCCC 等位基因与 ArgCGC 等位基因相比差异极显著(P=0.020),宫颈鳞癌组 ProCCC 等位基因所占比例显著大于正常组。这与已有的研究结果^[14] p53 基因第 72 位密码子 Pro/Pro 基因型是发生宫颈鳞癌的遗传易感因素十分相符。是否能断定等位基因由 ArgCGC 突变为 ProCCC 就存在患病风险,还需要进一步的实验研究来证实。下一步需要扩大取样量以期对湖南省内不同地区的标本以及癌症的不同分期分级标本的 p53 基因第 72 位密码子来进行进一步分析。

参考文献(References)

- [1] 朱新勇,张同全,王福春,等. p53、bcl-2 和 nm23 基因在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国普外基础与临床杂志,2003,10(6):589
- [2] Zhu Xin-yong, Zhang Tong-quan, Wang Fu-chun, et al. The expression of P53, bcl-2 and nm23 gene in stomach tissue and their clinical significance [J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2003,10(6):589 (In Chinese)
- [3] Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, et al. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53[J]. Mol Cell Biol, 1987, 7(2):961-963
- [4] Hu Y, McDermott MP, Ahrendt SA. The p53 codon 72 proline allele is associated with p53 gene mutations in non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005,11(7):2502
- [5] Han JY, Lee GK, Jang DH, et al. Association of p53codon72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer, 2008; 113(4):799
- [6] Lee JM, Shun CT, Wu MT, et al. The associations of p53 overexpression with p53codon72 genetic polymorphism in esophageal cancer[J]. Mutat Res, 2006; 594(1-2):181
- [7] Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, et al. Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in Chinese population[J]. World J Gastroenterol, 2005; 11(2):289

(下转第 2061 页)

- [J].现代预防医学,2006,33(3):384-385
- Jin Xue-mei, Liu Su-hua. Determination of lead and arsenic in food by Graphite furnace atomic absorption spectrometry [J]. Journal of Preventive Medicine, 2006,33 (3) :384-385
- [8] 胡晓,林亲录.蜂胶的保健功能及应用进展[J].农产品加工,2007,5:31-38
- Hu Xiao, Lin Qin-lu. Health functions of propolis and application [J]. Processing of agricultural products, 2007,5:31-38
- [9] 付文燕.微波消解—石墨炉原子吸收光谱法测定蜂胶中铅[J].理化检验 - 化学分册,2010,46(3)230-231
- FU Wen-yan. GF-AAS Determination of Lead in Propolis with microwave assisted sample digestion [J]. Physical Testing - Chemical Analysis, 2010,46(3)230-231
- [10] 南垚,郭伽,郑莲香,等.蜂胶化学成分研究进展[J].世界科学技术 - 中医药现代化,2006,1(8):61-72
- Nan Yao, Guo Jia, Zheng Lian-Xiang, et al. Advances in Studies on Chemical Constituents of Propolis [J]. World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica. 2006,1(8):61-72
- [11] 韩文辉,钟立人,张燕平.蜂胶有效成分提取研究[J].黑龙江商学院学报(自然科学版),2000,16(4):18-22
- Han Wen-hui, Zhong Li-ren, Zhang Yan-ping. Extraction of the effective components of propolis [J]. Heilongjiang Commercial College (Natural Science),2000,16(4):18-22
- [12] 茅力,杨森,陈景衡,等.蜂胶醇溶液营养成分分析[J].南京医科大学学报,1998,18(6):543-544
- Mao Li, Yang Sen, Chen Jing-heng, et al. Nutrition Analysis of propolis alcohol solution [J]. Nanjing Medical University, 1998,18 (6): 543-544
-
- (上接第 2086 页)
- [7] Deshpande A, Nolan JP, White PS, et al. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer [J]. J Infect Dis, 2005, 191(6): 969-976
- [8] Damin AP, Frazzon AP, Damin DC, et al. Evidence for an association of P53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk [J]. Cancer Detect Prev, 2006; 30(6):523
- [9] Gochhait S, Bukhari SI, Bairwa N, et al. Implication of BRCA 2-26G>A 5' untranslated region polymorphism in susceptibility to sporadic breast cancer and its modulation by p53 codon 72 Arg >Pro polymorphism [J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(5): 71
- [10] Jones JS, Chi X, Gu X et al. p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population [J]. Clin Cancer Res, 2004; 10(17): 5845
- [11] Zhang J, Zheng A, Gong JL, et al. Study on the correlation between midkine expression and cervical cancer [J/CD]. Chin J Obstet Gynecol Pediatr (Electron Ed), 2008,4(4): 316-320
- [12] Beckman G, Birgander R, Sjlander A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection [J]. Hum Hered, 1994, 44(5):266-270
- [13] Storey A, Thomas M, Kalita S, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer [J]. Nature, 1998, 393(6682):229-234
- [14] 陈长春,丁晓华,蔡红兵,等.湖北地区汉族人群 p53 基因第 72 位密码子多态性与宫颈鳞癌相关性 [J]. 肿瘤学杂志.2009,15(11): 961-964
- Chen Chang-Chun, Ding Xiao-Hua, Cai Hong-Bin et al. Correlation between p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Squamous Cell Carcinoma in Chinese Han Population in Hubei Area [J]. Journal of Oncology, 2009, 2009,15(11): 961-964 (In Chinese)
- [15] 屠其华,郭晓君,张行,等.改良的石蜡包埋组织中提取高质量基因组 DNA [J]. 中国实验诊断学,2006,10(9):1001-1003
- Tu Qi-Hua, Guo Xiao-Jun, Zhang Xing et al. Extract high quality genomic DNA from improved paraffin embedding tissues [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2006,10(9):1001-1003. (In Chinese)