

骨肉瘤中 RASSF1A 基因的甲基化状态研究

牛军涛 褚尤彪 蒋继亮 李 颖 范广丽

(中国人民解放军第四五四医院骨科 江苏 南京 210002)

摘要 目的:分析骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因甲基化状况。**方法:**运用甲基化特异性 PCR(MSP)分别检测 44 例骨肉瘤组织及相应的癌旁组织中 RASSF1A 基因启动子甲基化状态并分析其临床病理意义。**结果:**骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因异常甲基化率(61.4%)显著高于癌旁正常骨组织中 RASSF1A 基因的异常甲基化率(20.5%),二者之间差异具有统计学意义($P<0.05$)。RASSF1A 基因异常甲基化导致组织中 RASSF1A 基因 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低。另外,RASSF1A 基因异常甲基化和肿瘤组织分化程度及全身有无转移情况有相关性(P 值分别为 0.022 和 0.016),而与患者年龄、性别、肿瘤位置及大小等临床特征无关(P 值分别为 0.6944, 0.977, 0.786 和 0.831)。**结论:**RASSF1A 基因启动子高甲基化可能是导致其在骨肉瘤中表达水平降低的分子机制之一,有望成为骨肉瘤早期辅助诊断的一个重要分子标志物。

关键词:骨肉瘤;RASSF1A 基因;启动子甲基化;基因表达

中图分类号:R738 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-560-04

Analysis of Methylation Status of RASSF1A Gene in Human Osteosarcoma

NIU Jun-tao, CHU You-biao, JIANG Ji-liang, LI Ying, FAN Guang-li

(Department of Orthopaedics, the 454th Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the methylation status of RASSF1A gene in human osteosarcomas. **Methods:** Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the status of promoter hypermethylation of RASSF1A gene in 44 osteosarcoma and corresponding non-tumor bone tissues and the clinicopathological significance in human osteosarcoma was analyzed. **Results:** The methylation ratio of RASSF1A gene in osteosarcoma tissues (61.4%) was obviously higher than that in non-tumor bone tissues (20.5%, $P<0.05$). The aberrant methylation of RASSF1A gene induced the decreased expression of RASSF1A mRNA and protein in osteosarcoma or non-tumor bone tissues. Additionally, the methylation of RASSF1A gene was significantly associated with tumor differentiation and metastasis ($P=0.022$ and 0.016, respectively), but it had not associated with age, sex, tumor location and size of osteosarcoma patients ($P=0.6944$, 0.977, 0.786 and 0.831, respectively). **Conclusion:** The methylation of RASSF1A gene may contribute to the decreased RASSF1A gene expression, and detection of RASSF1A promoter methylation might be an important molecular marker for the earlier auxiliary diagnosis of osteosarcoma.

Key words: Osteosarcoma; RASSF1A gene; promoter methylation; gene expression

Chinese Library Classification(CLC): R738 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-560-04

前言

骨肉瘤是原发性恶性骨肿瘤中最常见的一种类型,好发于青少年和年轻成人,约占儿童肿瘤的 5%^[1]。尽管在早期诊断和综合治疗上获得了很大进步,但是骨肉瘤患者的五年生存率仍然只能达到 60-70%左右。骨肉瘤的发生是一个多因素和多阶段的过程,其表型变化是癌基因激活和抑癌基因失活共同导致的结果^[2]。近年来,大量的文献已经表明:除了遗传学改变因素,基因启动子区甲基化状态的改变是导致人类许多恶性肿瘤包括骨肉瘤中抑癌基因失活的一个重要因素^[3]。RAS 相关区域家族 1A 基因 (Ras association domain family 1A gene, RASSF1A)是从人体 3 号染色体短臂克隆出来的一种新型肿瘤抑癌基因,其参与了细胞凋亡信号的转导、微管的稳定作用和有丝分裂的

进程,与多种肿瘤的发生发展密切相关^[4]。RASSF1A 基因在正常组织中广泛表达,但在肺癌、膀胱癌、骨肉瘤等多种恶性肿瘤中均呈现表达降低或者缺失,机制可能和基因缺失、突变及 5'端启动子区域的 CpG 岛甲基化等相关^[5]。大量文献表明:在宫颈癌、乳腺癌、肝细胞癌等多种肿瘤组织中可以检测到 RASSF1A 基因启动子区的高甲基化状态^[6-8],但是其在骨肉瘤组织中的甲基化状态及临床意义并不是很清楚,也未见有相关文献进行报道。本实验收集了 44 例骨肉瘤组织及其癌旁正常骨组织,采用甲基化特异性 PCR (methylated-specific PCR, MSP)方法结合 RT-PCR 及 Western Blot 检 RASSF1A 基因启动子甲基化状态以及 mRNA 和蛋白水平的表达情况,以探讨该基因在骨肉瘤中低表达的可能机制及其临床病理意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

骨肉瘤患者均为 2002 年 5 月~2008 年 4 月间首次入院病例,所有患者均签署了知情同意书,全部患者术前均未经化

作者简介:牛军涛(1975-),男,主治医师,主要从事骨肉瘤发生的分子机制研究。电话:13951033914,

Email:juntaoniu@hotmail.com

(收稿日期:2010-10-15 接受日期:2010-11-11)

疗和放疗处理。切除的新鲜骨肉瘤和相应的瘤旁骨组织标本分别是 44 例,所有病例均有组织病理学诊断依据,按照国际抗癌联盟(UICC)标准进行 TNM 分期,组织标本保存于液氮或者 -80℃ 冰箱备用。

1.2 主要试剂

甲基化试剂氢醌和亚硫酸氢钠为美国 Sigma 公司产品; Wizard DNA 纯化试剂盒为美国 Promega 公司产品; 甲基化 PCR 扩增试剂盒为日本 Takara 公司产品; DNA 聚合酶及 DNA 分子量 Marker 购自 Takara 公司; 一抗体为羊抗人 RASSF1A 单克隆抗体(dilution 1:50, Santa cruz 公司) 购自南京优宁维公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 基因组 DNA 的提取及亚硫酸盐修饰

DNA 提取按照《分子克隆》常规方法将组织标本进行蛋白酶 K 消化、酚 / 氯仿抽提。然后经紫外分光光度计定量, DNA 纯度在 1.7~1.8, 抽提后 DNA 保存在 -20℃ 冰箱备用。基因组 DNA 的亚硫酸盐修饰按修饰试剂盒说明将基因组 DNA 进行甲基化修饰, 修饰后的 DNA 于 -20℃ 贮存备用, 所用甲基化修饰试剂盒购于上海博升生物科技有限公司。

1.4 甲基化特异性 PCR 分析 RASSF1A 基因甲基化

参照文献分别设计针对 RASSF1A 基因启动子区非甲基化和甲基化引物^[1]。非甲基化特异性引物: 上游 5'-TTTG-GTTGGAGTGTGTTAATGTG-3', 下游 5'-AACCCCGCGAAC-TAAAAACGA-3', 扩增产物 105bp; 甲基化特异性引物: 上游 5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3', 下游 5'-AACCCCGC-GAACTAAAAACGA-3', 扩增产物 93bp。PCR 反应体系为 25μl, 包括: 10× PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L dNTP, 0.5 mmol/L 上下游引物, 1U Taq DNA 聚合酶, 甲基化或非甲基化特异性上下游引物 10μmol/L 各 1.0μL, 模板 DNA 5μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 40s, 60℃ 45s, 72℃ 45s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。以已做出甲基化阳性组织作为阳性对照, 正常人外周血淋巴细胞 DNA 做阴性对照。取 5μL PCR 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 自动电泳凝胶成像分析系统扫描分析。

1.5 RT-PCR 检测

按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA (购自美国 Invitrogen 公司), 并参照逆转录试剂盒(Reverse Transcription System A3500,

美国 Promega 公司)说明书的比例加样, 将 RNA 逆转录成 cDNA。RASSF1A 基因根据 GeneBank 数据库 (NG_007182) 中 RASSF1A 基因 cDNA 序列合成, 上游引物: 5'-CTT TTACCT-GCCCAAGGATGC-3'; 下游引物: 5'-CAC CTCCCCAGAGTCA-TTTTCC-3', 扩增片断大小为 265bp; 内参 GAPDH 上游引物: 5'-TTAGCACCCCTGGCCAA-G-3'; 下游引物: 5'-CTTACTC-CTTGGAGGCCAT-3', 扩增片断大小为 492bp。PCR 反应条件: 94℃ 变性 3 min, 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 45s, 循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min。取 5μL PCR 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 自动电泳凝胶成像分析系统扫描分析。

1.6 Western Blot 检测

取冻存的骨肉瘤组织和瘤旁骨组织各 200mg 按组织和蛋白裂解液 1:5 加入 1mL 裂解液 (0.1mol/L NaCl, 0.01mol/L Tris-HCl pH 7.6; 0.001 mol/L EDTA, 1 mg/L Leupatin, 100 mg/L PMSF), 匀浆器匀浆提取总蛋白, BCA 法蛋白定量。取 100μg 总蛋白变性 10 min 后, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白电泳分离后经电转移槽转移至 PVDF 膜, 50g/L 脱脂奶粉室温封闭 1h。PVDF 膜置于 1:50 稀释的一抗 (羊抗人 RASSF1A 单克隆抗体, SantaCruz 公司产品) 稀释液中, 4℃ 过夜, TBST 洗膜 30 min, 再置于 1:4500 稀释的二抗 (抗羊 IgG-HRP, 北京中杉金桥生物公司产品) 稀释液中, 37℃ 孵育 1h, TBST 洗膜 45 min 后加入 ECL 发光剂显影曝光。

1.7 统计学分析

所有数据均在 SPSS13.0 软件包中进行分析, 各组间的差异用卡方检验进行分析, 相关性分析采用 Spearman 分析, P<0.05 被认为具有统计学差别意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因的异常甲基化检测

本研究中全部 44 例骨肉瘤和瘤旁骨组织均成功地进行了 RASSF1A 基因的 MSP 分析, 其甲基化状态有三种情况: 完全甲基化、部分甲基化及非甲基化(图 1)。44 例骨肉瘤组织中有 27 例(61.4%)可以检测到 RASSF1A 基因的异常甲基化, 而 44 例瘤旁骨组织中仅有 9 例(20.5%)检测到 RASSF1A 基因的异常甲基化, 可以判断骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因启动子的异常甲基化频率显著高于瘤旁骨组织(P<0.05)。

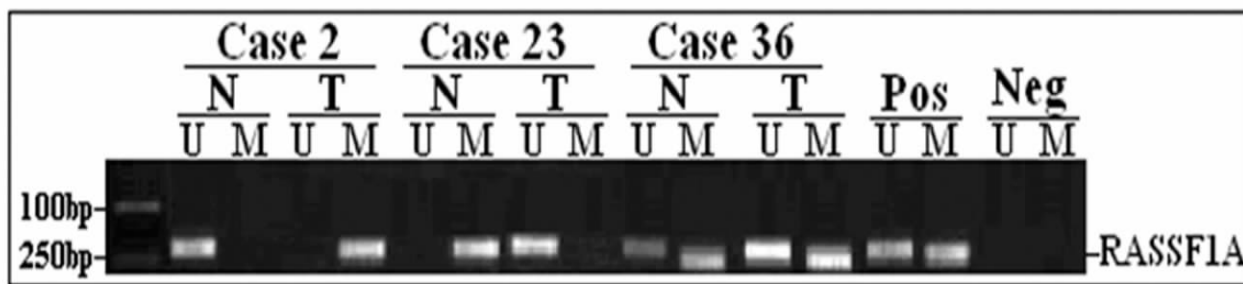


图 1 MSP 分析组织中 RASSF1A 基因的甲基化状况。U: 未甲基化特异性引物扩增; M: 甲基化特异性引物扩增。Pos: 阳性对照组织; Neg: 阴性对照为水。N: 正常骨组织; T: 骨肿瘤组织。

Fig. 1 MSP analysis of methylation status of RASSF1A gene in tissues. U: Non methylation-specific PCR; M: Methylation-specific PCR. N: non-tumor bone tissues; T: osteosarcoma tissues.

2.2 骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因 mRNA 及蛋白表达的检测

为了分析 RASSF1A 基因甲基化的作用,我们分别运用 RT-PCR 和 Western Blot 试验从 mRNA 和蛋白水平分析骨肉瘤及癌旁组织中 RASSF1A 基因的表达情况(图 2)。结果表明: RASSF1A 基因的完全或者部分甲基化可以诱导骨肉瘤或者癌

旁组织中 RASSF1A 基因 mRNA 和蛋白表达呈现不表达或者低表达状态,而在 RASSF1A 基因呈现非甲基化的组织中 RASSF1A 基因无论是 mRNA 还是蛋白水平均呈现高表达状态。因此,RASSF1A 基因启动子的甲基化可能是骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因表达失活的一个重要分子机制。

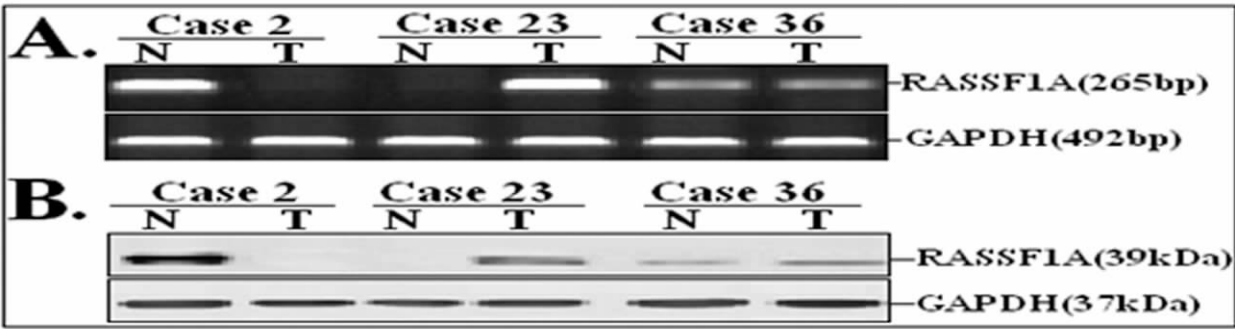


图 2 骨肉瘤和癌旁骨组织中 RASSF1A 基因的表达。A: RT-PCR 检测 mRNA 表达; B: Western Blot 检测蛋白表达。N: 癌旁组织; T: 骨肉瘤组织; GAPDH: 内参照

Fig.2 Analysis of RASSF1A expression in osteosarcoma and corresponding non-tumor tissues. A: RT-PCR analysis of mRNA expression; B: Western Blot analysis of protein expression. N: Non-tumor bone tissues; T: Osteosarcoma tissues. GAPDH: internal control

2.3 骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因甲基化的临床病理学意义

为了进一步明确 RASSF1A 基因甲基化在骨肉瘤中的临床病理意义,我们分析了 44 例骨肿瘤患者的临床病理特征与 RASSF1A 甲基化状态之间的关系(表 1)。统计学分析结果显示:RASSF1A 基因在分化程度差的骨肉瘤组织中的甲基化率为 42.1%,而在分化程度好或者中等的骨肉瘤组织中的甲基化

率则为 76.0%,二者具有显著统计学差别(P=0.022)。另外,有转移的骨肉瘤组织中 RASSF1A 基因甲基化率(78.3%)显著高于其在不伴有转移的骨肉瘤组织中的甲基化率(42.9%;P=0.016)。但是 RASSF1A 基因甲基化率则与骨肉瘤患者的性别、年龄、肿瘤大小及位置无显著相关性(P 值分别为 0.944, 0.977, 0.786 和 0.831)。

表 1 RASSF1A 甲基化与骨肉瘤患者临床病理特征的关系
Table 1 Association between RASSF1A methylation and clinicopathological factors of osteosarcoma patients (*P<0.05)

临床病理特征 (Clinicopathological factors)	RASSF1A 基因甲基化状态 (Status of RASSF1A methylation)		P 值 (P-value)
	甲基化例数(%) Methylation (%)	未甲基化例数(%) Unmethylation (%)	
性别 (Gender)			0.944
男性 (male)	14(60.9)	9(39.1)	
女性 (Female)	13(61.9)	8(38.1)	
年龄(岁) Age (years)			0.977
≤ 20	11(61.1)	7(38.9)	
>20	16(61.5)	10(38.5)	
肿瘤大小(tumor size) (cm ³)			0.786
≤ 50	18(60.0)	12(40.0)	
>50	9(64.3)	5(35.6)	
肿瘤位置 (Tumor location)			0.831
胫 / 股骨 (Tibia/femur)	15(22.9)	10(77.1)	
其它 (Elsewhere)	12(54.5)	7(45.5)	
肿瘤分化 (Differentiation)			0.022*
好 / 中等 (Well/Moderate)	19(76.0)	6(24.0)	
坏 (Bad)	8(42.1)	11(57.9)	
转移情况 (Metastasis)			0.016*
有 (Yes)	18(78.3)	5(21.7)	
无 (No)	9(42.9)	12(57.1)	

3 讨论

DNA 甲基化是指生物体在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DMT)的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基转移到特定的碱基上的过程。DNA 甲基化是表遗传学作用的主要形式,因此逐渐成为后基因时代生命科学领域研究的热点^[9]。近年来,大量的研究表明:DNA 甲基化状态的改变尤成为肿瘤相关基因功能失活的一个重要分子机制,被认为是肿瘤发生的一个早期事件,这种变化包括基因组整体甲基化水平降低和 CpG 岛局部甲基化水平的异常升高,从而导致基因组的不稳定(如染色体的不稳定、可移动遗传因子的激活、原癌基因的表达)和抑癌基因的不表达。若抑癌基因中有活性的等位基因失活,则发生癌症的机率提高,例如:胰岛素样生长因子-2(IGF-2)基因印记丢失导致多种肿瘤,如 Wilm's 瘤^[10,11]。因此,DNA 紊乱的甲基化状态检测已成为肿瘤发生分子机制研究领域的一个热点。但是目前国内外对骨肉瘤的 DNA 甲基化研究并不很多,DNA 的高甲基化在骨肉瘤发生分子机制中的作用仍不清楚,因此本课题的研究有助于进一步探索表观遗传学与骨肉瘤发生发展过程之间的关系。

RASSF1A 基因是新近从 3p21.3 克隆出来的候选抑癌基因,其 cDNA 全长 1873 bp,共含有 6 个外显子,编码含 340 个氨基酸的阅读框架,产物分子量为 38.8 kDa 大小的可溶性胞浆蛋白^[12]。该基因在多种正常人体组织中呈现高表达,其调控的靶基因具有包括调控基因转录、细胞周期及凋亡、细胞黏附及信号转导等多种生理功能^[13]。但是,RASSF1A 基因在多种人类肿瘤组织中被发现呈现表达失或者低表达状态^[14],其中国内学者刘之川等发现 RASSF1A 在骨肉瘤组织中的缺失率达到 43.33%而在骨软骨瘤和正常骨组织中的表达率达到 100%,同时他们还发现 RASSF1A 基因的表达与肿瘤的 Enneking 分期及是否发生远处转移密切相关^[15]。其他研究小组也得出了类型的研究结果,因此 RASSF1A 基因表达缺失可能是骨肉瘤发生的一个早期事件^[16,17]。DNA 甲基化可能是 RASSF1A 基因表达异常或者失活的一个重要途径,已有多篇文献报道了 RASSF1A 基因甲基化与人类肿瘤之间的关系,其中包括:乳腺癌、胶质瘤、宫颈癌等多种实体肿瘤^[18-20]。研究表明:RASSF1A 基因启动子区的异常甲基化可能在多种肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用,是癌变的一个重要的分子机制^[21,22]。但是 RASSF1A 基因在骨肉瘤组织中的甲基化状态仍不清楚,目前国内外未见有详细报道,因此本课题拟深入探讨 RASSF1A 基因在骨肉瘤及癌旁组织中的甲基化状态,并分析其甲基化对该基因在组织中表达水平的影响及其与患者临床病理特征之间的关系,为深刻揭示骨肉瘤发生的分子机制开辟新的思路。

本课题组前期通过运用 MSP 方法对 44 例临床明确诊断的骨肉瘤及癌旁骨组织 RASSF1A 基因的甲基化状态进行了检测和分析,结果表明 RASSF1A 基因骨肉瘤组织中的甲基化率(61.4%)显著高于其在癌旁正常骨组织中的甲基化率(20.5%),说明了 RASSF1A 基因异常甲基化在骨肉瘤组织中具有肿瘤特异性,可能在骨肉瘤发生的早期过程中发挥着重要的作用。因此,对 RASSF1A 基因的异常甲基化检测将对骨肉瘤的早期诊断具有重要的参考价值。同时我们还分析了 RASSF

1A 基因异常甲基化对该基因表达的影响进行了分析,分别运用 RT-PCR 和 Western Blot 方法从基因转录和翻译水平检测了骨肉瘤和癌旁骨组织中 RASSF1A 基因的表达情况,结果发现 RASSF1A 基因发生完全或者部分甲基化的骨肉瘤或者癌旁组织中其 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,也进一步表明了 RASSF1A 基因的异常甲基化可能是骨肉瘤组织中该基因表达失活或者缺失的一个重要分子机制。另外,我们还发现:RASSF1A 基因的异常甲基化与骨肉瘤患者的肿瘤分化程度和全身有无转移密切相关,即肿瘤分化程度越差的组织其甲基化比例越高,伴有转移的组织其甲基化比例也越高,但与病人的其他临床病理特征比如年龄、性别、肿瘤部位和大小等无显著性相关。鉴于本研究中骨肉瘤组织的样本量比较小,还有待于大样本量进一步分析和验证。

总之,甲基化调控机制可能是 RASSF1A 基因的重要调控途径之一,RASSF1A 基因的异常甲基化引起其表达的缺失与骨肉瘤的发生、发展密切相关,从而为进一步探讨骨肉瘤的发生机制并为骨肉瘤的临床治疗选择靶点提供了重要的实验依据。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56: 106-130
- [2] Guillou L, Aurias A Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles [J]. Virchows Arch, 2010, 456(2): 201-217
- [3] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-428
- [4] Donniger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor [J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 18): 3163-3172
- [5] Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors [J]. Biochemistry (Mosc), 2005, 70(5): 576-583
- [6] Cohen Y, Singer G, Lavie O, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(8): 2981-2984
- [7] Kioulafa M, Kaklamanis L, Mavroudis D, et al. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation in operable breast cancer [J]. Clin Biochem, 2009, 42(10-11): 970-975
- [8] Hu L, Chen G, Yu H, et al. Clinicopathological significance of RASSF1A reduced expression and hypermethylation in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatol Int, 2010, 4(1): 423-432
- [9] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(9): 607-620
- [10] Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics [J]. Annu Rev Genet, 1996, 30: 441-464
- [11] Biran H, Ariel I, De Groot N, et al. On the oncodevelopmental role of human imprinted genes [J]. Med Hypotheses, 1994, 43(2): 119-123
- [12] Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, et al. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update [J]. Histol Histopathol, 2005, 20(2): 645-663
- [13] Avruch J, Xavier R, Bardeesy N, et al. Rassf family of tumor suppressor polypeptides [J]. J Biol Chem, 2009, 284(17): 11001-11005
- [14] Hesson LB, Cooper WN, Latif F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster [J]. Oncogene, 2007, 26(52): 7283-7301

(下转第 597 页)

- 量变化和左心室舒张功能改变的实验研究[J].体育科学, 1996,16(6):48-53
- Xiong Zheng-ying Tian Zhen-jun,Guo Jin. Exercise overload and pressure overload rats myocardial collagen content changes and left ventricular diastolic function change of experiments [J]. Sports science, 1996,16(6):48-53
- [34] 田振军, 熊正英. 运动超负荷和压力超负荷大鼠心肌局部RAS-ALD系统变化关系的研究[J].体育科学,1998,18(5):63-67
- Tian Zhen-jun, Xiong Zheng-ying. Exercise overload and pressure overload rats myocardial local RAS - ALD system changes research of the relationship[J]. Sports science, 1998,18(5):63-67
- [35] Carraro U, Franceschi C. Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise[J].Aging Milano, 1997,9(1-2):19-34
- [36] 袁海平,刘学,史仍飞.大鼠不同强度运动对心肌细胞凋亡及其抗氧化能力的影响[J].体育科学,2002,22(1):107-109
- Yuan Hai-ping, Liu Xue, Shi Reng-fei. Rats with different strength movement on myocardial cell apoptosis and anti-oxxydation ability influence[J]. Sports science, 2002,22(1):107-109
- [37] 袁海平,孙蓉,史仍飞,等.大鼠不同强度运动对肝细胞凋亡的影响[J].上海体育学院学报,2001,25(4):31-34
- Yuan Hai-ping,Sun Rong, Shi Reng-fei, et al. Rats with different strength movement on the liver cell apoptosis influence [J]. Shanghai sports college journals, 2001,25(4):31-34
- [38] 史仍飞,袁海平,刘学,等.不同强度运动对大鼠脂质代谢的影响及机理探讨[J].中国运动医学杂志,2003,22(5):509-511
- Shi Reng-fei, Yuan Hai-ping, Liu Xue, et al. Different strength movement to rat on lipid metabolism and influence mechanism is discussed [J]. Chinese sports medicine magazine, 2003,22(5):509-511
- [39] 张宝凤. 肝细胞凋亡和病毒性肝炎 [J]. 中华肝病杂志,1996,4(3):182-186
- Zhang Bao-feng. Liver cell apoptosis and viral hepatitis [J]. China's liver magazine,1996,4(3):182-186
- [40] 刘丽萍,李雷,王光平,等.游泳训练后大鼠肝细胞 SOD、MDA、线粒体膜电位变化与细胞凋亡的关系 [J]. 中国运动医学杂志,2002,21(2):161-165
- Liu Li-ping, Li Lei, Wang Guang-ping, et al. Swimming training after rat liver cells, MDA and SOD the mitochondrial membrane potential changes and apoptosis relationship[J]. Chinese sports medicine magazine, 2002,21(2):161-165
- [41] 李雷,刘丽萍,容仕霖,等.疲劳时大鼠肌、肝细胞 Ca^{2+} 、SOD/MDA 比值变化与细胞凋亡的实验研究[J].北京体育大学学报,2002,25(6):766-768
- Li Lei, Liu Li-ping, Rong Shi-lin, et al. Fatigue rats Ca^{2+} muscle, liver cell, SOD/MDA ratio change and apoptosis of experiments[J]. Beijing sport university journals, 2002,25(6):766-768
- [42] 汤长发,周婕.运动与细胞凋亡[J].北京体育大学学报,2004,27(1):68-70
- Tang Chang-fa, Zhou Jie. Sports and apoptosis [J]. Beijing sport university journals, 2004,27(1):68-70
-
- (上接第 563 页)
- [15] 刘之川,邵增务,邓超,等. RASSF1A 基因在骨肉瘤中的表达及其临床意义[J]. 实用骨科杂志, 2009, 15(7): 514-516
- Liu Zhi-chuan, Shao Zeng-wu, Deng Chao, et al. Expression of RASSF1A Gene in Osteosarcoma and Its Clinical Significance [J]. Journal of Practical Othopaedics, 2009, 15(7): 514-516
- [16] 高甲科, 李书. 骨肉瘤组织中 RASSF1A、Cyclin D1 蛋白表达及意义[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 37-39
- Gao Jia-ke, Li Shu. Expression and clinical significances of RASSF1A and Cyclin D1 protein in osteosarcoma tissue [J]. Shandong Medical Journal, 2009, 15(7): 514-516
- [17] Lim S, Yang MH, Park JH, et al. Inactivation of the RASSF1A in osteosarcoma [J]. Oncol Rep, 2003, 10(4): 897-901
- [18] Pfeifer GP, Yoon JH, Liu L, et al. Methylation of the RASSF1A gene in human cancers [J]. Biol Chem, 2002, 383(6): 907-914
- [19] Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 114-128
- [20] Patra SK, Szyf M. DNA methylation-mediated nucleosome dynamics and oncogenic Ras signaling: insights from FAS, FAS ligand and RASSF1A [J]. FEBS J, 2008, 275(21): 5217-5235
- [21] van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1776(1): 58-85
- [22] Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer [J]. Dis Markers, 2007, 23(1-2): 73-87