

肿瘤发病机制与治疗

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000021

人 MCPH1 基因重组慢病毒的制备及稳定感染
HeLa 细胞系的建立

麦 力, 张 冀, 刘革力, 卜友泉, 李 韵, 樊建军, 宋方洲

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心、基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建人 MCPH1(microcephalin 1)基因重组慢病毒载体并建立稳定过表达 MCPH1 基因的宫颈癌 HeLa 细胞株。**方法:**将 MCPH1 基因重组到 pLenO-DCE 质粒中, 构建重组质粒 pLenO-DCE-MCPH1, 经酶切和测序鉴定后, 与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞, 包装重组慢病毒, 滴度测定后, 感染 HeLa 细胞, 用有限稀释法筛选稳定的细胞克隆, real-time PCR 和 Western blot 分别检测细胞中 MCPH1 mRNA 和蛋白水平。**结果:**经酶切和测序鉴定, 成功构建 MCPH1 重组慢病毒载体, 并成功包装慢病毒, 滴度为 1.24×10^9 TU/ml; 慢病毒感染 HeLa 细胞后经有限稀释法成功筛选到 MCPH1 稳定表达细胞株 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa; real-time PCR 证实 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 细胞株较正常组 HeLa ($P=0.000$) 和 pLenO-DCE-HeLa 组 ($P=0.000$) 的 MCPH1 mRNA 水平显著地增高; Western blot 进一步证实 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 细胞株过表达 MCPH1。**结论:**成功构建 MCPH1 重组慢病毒, 并建立了稳定表达 MCPH1 基因的细胞株 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa, 为进一步研究 MCPH1 在宫颈癌中的作用奠定了基础。

【关键词】慢病毒; MCPH1 基因; 宫颈肿瘤; 单克隆细胞**【中图分类号】**R737.33; R-331; R73-36*2**【文献标志码】**A**【收稿时间】**2013-10-22Construction of a recombinant lentivirus expressing MCPH1 and
establishment of its stably infected HeLa cell line

Mai Li, Zhang Ji, Liu Geli, Bu Youquan, Li Yun, Fan Jianjun, Song Fangzhou

(Molecular Medicine and Cancer Research Center; Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct a recombinant lentiviral vector expressing microcephalin 1 (MCPH1) and to establish a human cervical cancer HeLa cell line stably overexpressing MCPH1. **Methods:** A recombinant lentiviral vector pLenO-DCE-MCPH1 was generated by cloning human MCPH1 gene into the lentiviral vector pLenO-DCE. Being identified by restriction enzyme digestion and sequencing, the recombinant lentiviral vector pLenO-DCE-MCPH1 was packaged in 293T cells with the packaging plasmids including pRsv-REV, pMDlg-pRRE and pMD2G. According to the expression level of green fluorescent protein (GFP), the viral titer was tested by flow cytometry. After being infected with the lentiviral suspension, HeLa cells stably overexpressing MCPH1 were selected by limiting dilution analysis. Real-time PCR and Western blot examined MCPH1 mRNA and protein levels of stably infected HeLa cells.

Results: DNA restriction enzyme digestion and sequencing demonstrated that the pLenO-DCE-MCPH1 recombinant lentiviral vector was constructed successfully. The recombinant lentivirus with a titer of 1.24×10^9 TU/ml was generated from 293T cells with the packaging system. HeLa cells were infected with pLenO-DCE-MCPH1 recombinant lentivirus, and then a stable cell line, pLenO-DCE-MCPH1-HeLa, was established by limiting dilution method. Real-time PCR showed the expression of MCPH1 mRNA in pLenO-DCE-MCPH1-HeLa was significantly higher than that of HeLa ($P=0.000$) and pLenO-DCE-HeLa ($P=0.000$). Western blot also demonstrated MCPH1 protein expression was increased in pLenO-DCE-MCPH1-HeLa than in HeLa and pLenO-DCE-HeLa. **Conclusions:** Recombinant lentivirus expressing MCPH1 and stable cell line pLenO-DCE-MCPH1-HeLa are successfully constructed, which is conducive to studying the function of MCPH1 in cervical cancer.

【Key words】lentivirus; microcephalin 1 gene; cervical cancer; single clone cells

作者介绍: 麦 力, Email: mailicqmu@163.com,

研究方向: 肿瘤分子生物学。

通信作者: 宋方洲, Email: fzsongcq@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30800410); 高等学校

博士学科点专项科研基金资助项目 (编号: 20070631011)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000021.html>

MCPH1(microcephalin 1)也叫 BRIT1(BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression 1),是以大脑体积减小及智力迟钝为特征的原发性小头畸形(primary microcephaly)的主要致病基因之一,因此该基因也称作小脑症基因。MCPH1 基因最初是在筛选人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase component, hTERT)阻遏物时被发现,定位于 8p23.1, cDNA 长度为 2 508 bp, 包含 14 个外显子, 编码 835 个氨基酸, 其蛋白分子量 110 kDa。MCPH1 分子中包含 3 个结构域 BRCT(breast cancer susceptibility gene-1 carboxyl terminus), 2 个位于 C-末端(C-BRCT), 1 个位于 N-末端(N-BRCT), 近 N-末端处有核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 中间有一个 IMPDH 结构域^[1]。

MCPH1 的功能研究目前是国际上一个非常活跃的新热点。目前的研究证实 MCPH1 基因的突变是原发性小头畸形中的一个主要病因^[2]。同时研究也证实 MCPH1 是 DNA 损伤应答通路中一个重要分子^[3]。在 DNA 损伤后, 它和调节 DNA 损伤应答的 ATM/ATR 信号通路中的多个蛋白相互作用, 参与调节染色体的结构和 DNA 损伤检验点^[4]。然而 DNA 损伤应答是机体早期抵御肿瘤发生的重要防线^[5], 因此推测 MCPH1 在肿瘤的发生发展中扮演着重要作用。目前, 本研究小组已研究证实: 在宫颈癌组织中 MCPH1 的表达较正常组织中的表达降低^[6]。据此推测: MCPH1 的缺失与宫颈癌的发生发展密切相关。为进一步体内外研究 MCPH1 在宫颈癌中的作用, 本研究将构建 MCPH1 基因重组慢病毒载体, 并建立稳定表达外源性 MCPH1 蛋白的人宫颈癌 HeLa 单克隆细胞株。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶(*Bam*H I、*Eco*R I、*Swa* I、*Xho* I), T4 DNA 连接酶及荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物公司; Lipo-fectamine 2000 转染试剂及 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司; MCPH1 一抗购自 Abcam 公司; HRP 标记的 IgG 二抗购自北京鼎国生物技术公司; 293T 和 HeLa 细胞购自中科院细胞库; 感受态 *E.coli* DH5 α 、pLenO-DCE 载体由本研究室保存。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体 pLenO-DCE-MCPH1 构建及鉴定 使用 *Xho* I 对 pCDNA3.1-MCPH1 重组质粒进行单酶切, 并进行末端平滑化处理, 再用 *Eco*R I 对酶切产物进行单酶切, 胶回收 MCPH1 基因片段; 慢病毒载体 pLenO-DCE(图 1)经 *Swa* I

和 *Eco*R I 双酶切后胶回收大片段。将 MCPH1 基因片段与线性化的 pLenO-DCE 载体经 T4 DNA 连接酶连接, 将连接反应混合物转化感受态 *E.coli* DH5 α , 并涂布在氨苄青霉素的 LB (luria-bertani) 琼脂平板上, 于 37 °C 培养, 16~18 h 至单菌落形成。挑取若干单克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡过夜。取 5 ml 菌液用 Axygen 质粒提取试剂盒提取重组质粒, 以 pLenO-DCE 质粒作为对照, 使用 *Bam*H I 单酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒, 进一步测序鉴定插入模板是否正确。鉴定正确的质粒分别命名为 pLenO-DCE-MCPH1。

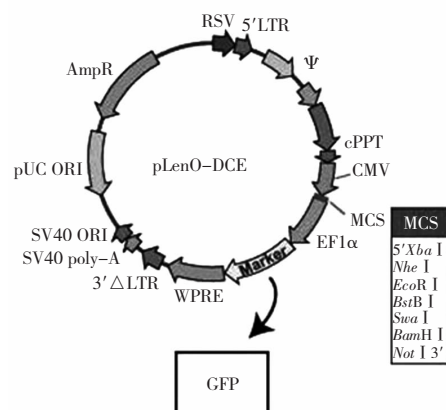


图 1 pLenO-DCE 载体图

Fig.1 pLenO-DCE vector

1.2.2 慢病毒包装 将 293T 细胞种植于 10 cm 细胞培养皿中 ($2 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 个), 培养过夜后, 将重组质粒 pLenO-DCE-MCPH1 和 pRsv-REV, pMDlg-pRRE, pMD2G 经 Lipo-fectamine 2000 共转染到 293T 细胞中, 转染 8 h 后更换培养基, 72 h 后, 收集病毒上清液并用 0.45 μ m 滤器(Millipore)过滤, 4 °C, 25 000 r/min 离心 2 h; 而后以冰 DMEM 重悬病毒沉淀, 4 °C 溶解过夜, -80 °C 中保存病毒液。

1.2.3 滴度测定 用逐孔稀释法测定病毒滴度: 转导前 1 d, 293T 细胞按 1×10^5 个/孔, 接种于 96 孔板中, 体积 100 μ l。根据预期滴度, 准备 7 个无菌的 EP 管, 在每个管中加入 90 μ l 培养基, 取病毒原液 10 μ l 加入到第 1 个管中, 混匀后, 取 10 μ l 加入到第 2 个管中, 继续相同的操作直到最后 1 管, 选取所需的细胞孔, 吸去 90 μ l 培养基, 加入稀释好的病毒溶液, 放入培养箱培养, 24 h 后, 加入新鲜培养基 100 μ l。96 h 后荧光显微镜下观察感染情况, 并收取细胞上流式细胞仪检测绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)阳性细胞比率。根据结果计算滴度: 滴度(TU/ml) = $1 \times 10^5 \times$ GFP 阳性细胞比率(%) $\div$ 病毒原液体积(ml)。

1.2.4 慢病毒感染 HeLa 细胞 感染前 1 d 取对数生长期状态良好的 HeLa 细胞按每孔 5×10^4 个/孔, 接种于 24 板中。感染时, 孔中加入 500 μ l 含 pLenO-DCE-MCPH1 病毒液(MOI=10)及聚凝胺(8 μ g/ml)的无血清 DMEM 培养基, 24 h 后, 均更换成 500 μ l 含 10% 的胎牛血清 DMEM 培养液, 72 h 后观察细胞荧光发光情况。

1.2.5 慢病毒稳定感染 HeLa 细胞株的建立 有限稀释法建立单克隆细胞株:慢病毒感染 HeLa 细胞 96 h 后,消化计数并调整浓度为 10 个/ml,反复吹吸细胞悬液,然后向 96 孔板中每孔加 100 μ l 细胞悬液。常规培养 20 d 后,在荧光显微镜下观察单克隆形成的生长状态、细胞形态无明显改变,选择荧光强度较高的阳性克隆孔,然后逐级扩大培养后,保存并命名为 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa。

1.2.6 Real-time PCR 检测 MCPH1 mRNA 的表达水平 常规培养 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 细胞株和未经处理的 HeLa 细胞株(正常组 HeLa),以及用上述相同方法建立的稳定表达 GFP 的 pLenO-DCE-HeLa 细胞株,提取各组细胞株的总 RNA,在逆转录酶作用下合成 cDNA,将 cDNA 稀释 10 倍后进行 real-time PCR 反应。反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™ II 5 μ l,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.1 μ l,cDNA 模板 1 μ l,ddH₂O 3.8 μ l。引物序列如下:MCPH1 引物正义链:5'-AGTGGGAGAGGCCAAAAGCC-3',反义链:5'-GTTCGAA-CGGCTCCTCAGAA-3';GAPDH 引物正义链:5'-CGCTC-TCTGCTCCTCTGTT-3',反义链:5'-CCATGGTGTCTGAGC-GATGT-3'。反应程序:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C,10 s;60 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环,相同试验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 检测 MCPH1 蛋白的表达水平 常规培养 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 细胞株,正常组 HeLa 细胞株及 pLenO-DCE-HeLa 细胞株,提取各组细胞株的总蛋白,用 BCA 蛋白分析试剂盒测定浓度,取 40 μ g 处理的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,5%脱脂奶粉室温振荡封闭 1 h,与 MCPH1 一抗(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,再与 HRP 标记的 IgG(1:5 000)二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,化学发光法检测蛋白表达,以 β -actin 作为内参。

1.3 统计分析

采用统计软件 SPSS 21.0,实验数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,成组设计的多个样本均数的比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 慢病毒载体 pLenO-DCE-MCPH1 构建及鉴定

慢病毒载体 pLenO-DCE 和 pCDNA3.1-MCPH1 经双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳分离得如图 2A 所示片段。胶回收的收线性化的 pLenO-DCE 片段和 MCPH1 基因片段,经 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化感受态 *E.coli* DH5 α ,经氨苄青霉素抗性基因筛选,提取质粒,经 *Bam*H I 单酶切后,经鉴定得大约 2 000 bp 的小片段和与线性化 pLenO-DCE 大小一致的大片段(图 2B)。结果证实慢病毒载体构建成功,进一步测序证实其序列无突变,与 GenBank 数据库中 MCPH1 cDNA 序列一致。将该重组慢病毒载体命名为:pLenO-DCE-MCPH1。

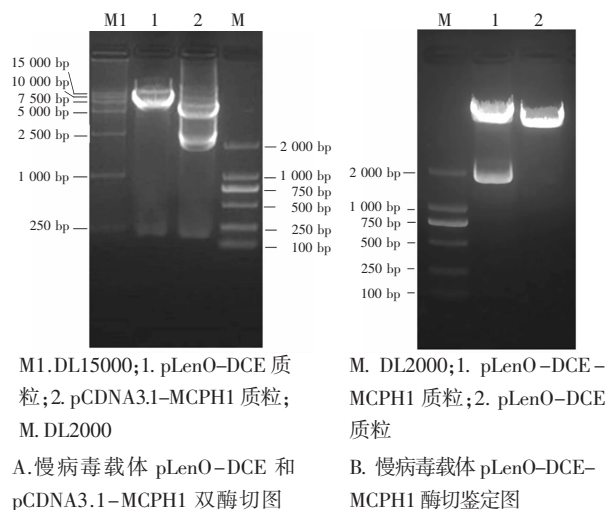
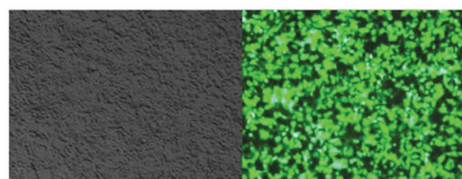


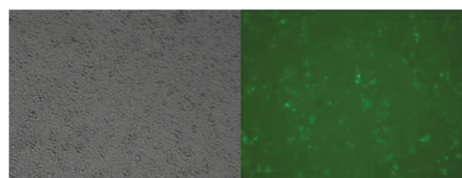
图 2 慢病毒载体 pLenO-DCE-MCPH1 构建及鉴定图
Fig.2 Construction and confirmation of the recombinant pLenO-DCE-MCPH1 vector

2.2 慢病毒包装及滴度测定

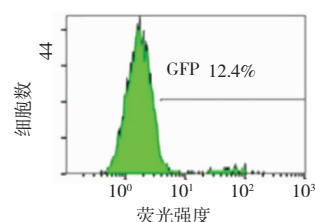
重组质粒与包装质粒共转染 293T 细胞 24 h 后,几乎所有 293T 细胞发出较亮的绿色荧光,说明此慢病毒载体转导效率较高,病毒包装成功(图 3A)。用逐孔稀释法检测病毒滴度,图 3B 为稀释 0.01 μ l 的慢病毒悬液感染 293T 细胞 96 h 后孔内细胞荧光发光情况,取此孔细胞上流式细胞仪检测阳性细胞比率为 12.4%(图 3C)。故计算慢病毒滴度为 $10^5 \times 12.4\% \div (0.01 \times 10^{-3} \text{ ml}) = 1.24 \times 10^9 \text{ TU/ml}$ 。



A. 重组质粒与包装质粒共转染 293T 细胞 24 h 后,明视野(左边,100 $\times$)与荧光视野(右边,100 $\times$)下观察 293T 细胞



B. 0.01 μ l 慢病毒悬液感染 293T 细胞 96 h 后,明视野(左边,100 $\times$)与荧光视野(右边,100 $\times$)下观察 293T 细胞



C. 流式细胞仪检测 0.01 μ l 慢病毒悬液感染 293T 细胞的阳性细胞比率

图 3 慢病毒包装及病毒滴度测定

Fig.3 Production of and titrating of the lentiviral stock

2.3 慢病毒稳定感染 HeLa 细胞株的建立

慢病毒感染 HeLa 细胞后,用有限稀释法筛选出一株单克隆细胞株 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa,其细胞形态与未处理的 HeLa 细胞的形态没有明显差异,生长良好,所有细胞均发出绿色荧光(图 4)。

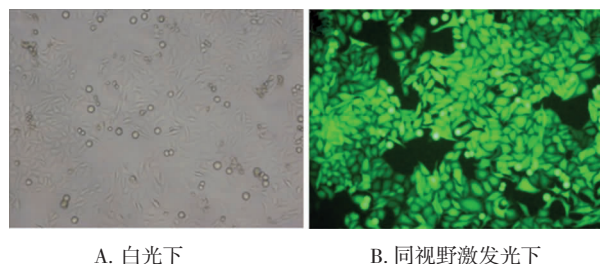


图 4 荧光显微镜观察 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 单克隆细胞 (200 ×)

Fig.4 Morphology of pLenO-DCE-MCPH1-HeLa cells under fluorescent microscope (200 ×)

2.4 Real-time PCR 检测稳定细胞株 MCPH1 mRNA 的表达

提取 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa, pLenO-DCE-HeLa 及正常组 HeLa 细胞株的总 RNA,逆转录成 cDNA,用 real-time PCR 检测 MCPH1 mRNA 的表达。结果如表 1,经统计分析显示: pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 细胞株较正常组 HeLa ($P=0.000$) 和 pLenO-DCE-HeLa 组 ($P=0.000$) MCPH1 mRNA 水平明显增高,具有统计学意义;而正常组 HeLa 和 pLenO-DCE-HeLa 间 MCPH1 mRNA 水平无明显变化,无统计学意义 ($P=0.433$)。结果表明:重组慢病毒 pLenO-DCE-MCPH1 感染细胞后,能成功过表达 MCPH1 mRNA。

表 1 Real-time PCR 检测 MCPH1 mRNA 表达水平

Tab.1 Expression of MCPH1 mRNA examined

组别	by real-time PCR		
	MCPH1 Mean (CT)	GAPDH Mean (CT)	$2^{-\Delta\Delta CT}$
pLenO-DCE-MCPH1-HeLa	21.06 ± 0.02	18.20 ± 0.03	31.26 ± 0.52 ^{ab}
pLenO-DCE-HeLa	26.03 ± 0.39	18.49 ± 0.18	1.24 ± 0.31 ^c
正常组 HeLa	25.93 ± 0.14	18.11 ± 0.17	1.00 ± 0.09
F 值	430.47	5.31	7 338.64
P 值	0.000	0.047	0.000

注:a,与 pLenO-DCE-HeLa 组比较, $P=0.000$;b,与正常组 HeLa 比较, $P=0.000$;c,与正常组 HeLa 比较, $P=0.433$

2.5 Western blot 检测稳定细胞株 MCPH1 蛋白的水平

提取 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa, pLenO-DCE-HeLa 及正常组 HeLa 细胞总蛋白。Western blot 检测 MCPH1 和 β -actin 的蛋白水平。pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 组较正常组 HeLa 和 pLenO-DCE-HeLa 组, MCPH1 蛋白条带明显增强, β -actin 基本一致(图 5)。结果证实重组慢病毒 pLenO-DCE-MCPH1 感染 HeLa 细胞后,能成功过表达 MCPH1 蛋白。

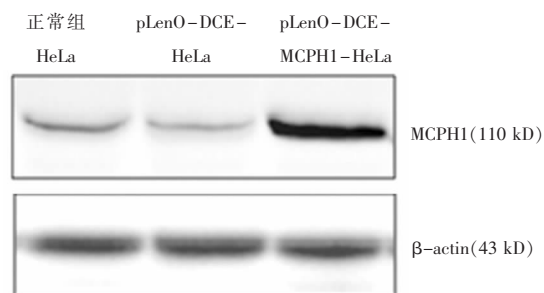


图 5 Western blot 检测细胞中人 MCPH1 蛋白的表达

Fig.5 Protein levels of MCPH1 in cells detected by Western blot

3 讨论

宫颈癌是威胁妇女健康最为严重的疾病之一,是全球女性中第 2 位高发的恶性肿瘤,是发展中国家女性癌症死亡最常见的原因,我国每年宫颈癌死亡人数为 5.3 万^[7]。传统治疗方法以手术、化疗及放疗为主,但患者生存率仍不理想。因此,结合最新的分子生物学研究成果,进一步研究宫颈癌发生发展的分子机理,研究开发相应的新的宫颈癌诊断和治疗方法,具有重要的理论和现实意义。

MCPH1 的功能研究是目前国际上一个活跃的热点,主要集中在 MCPH1 在 DNA 损伤应答中的作用研究,而 MCPH1 在肿瘤中潜在功能目前尚不清楚。而目前多个研究小组已证实 MCPH1 在多个肿瘤组织中表达降低,如:乳腺癌^[8],卵巢癌^[9],慢性髓样白血病^[10]。而本课题组研究证实 31 例宫颈癌标本中有 19 例 MCPH1 mRNA 水平是显著性降低的^[6]。基于这些研究本课题组假设 MCPH1 是一个潜在的抑癌基因,能够抑制宫颈癌的发生发展。而最近一个研究小组证实 MCPH1 通过调节 p53 蛋白的稳定性而抑制乳腺癌的发生发展^[11],这一结果也印证了本研究的假设。为验证此假设,本研究小组前期构建了表达 MCPH1 基因的真核表达质粒,转染 HeLa 细胞,并证实 MCPH1 过表达能诱导 HeLa 细胞凋亡^[12],但其具体机制尚不明确。同时,重组真核表达质粒在脂质体、磷酸钙等介导下瞬时转染细胞,其转染效率较低,毒性较大,且外源基因整合到细胞基因组中效率极低,多次传代容易丢失,不能持续稳定地表达外源基因,更不能满足动物实验的要求。因此我们构建表达 MCPH1 的重组慢病毒载体,包装慢病毒,并感染 HeLa 细胞,建立稳定表达 MCPH1 的单克隆细胞系,为进一步体内外研究 MCPH1 在宫颈癌中的作用奠定了基础。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷 I 型病毒为基础发展起来的基因治疗载体,是目前载体工具研究的热点。慢病毒载体具有以下优点:(1)使用安全,不具致病性;(2)病毒基因组整合于宿主基因组,长时间、稳定表达外源基因;(3)可感染分裂期和非分裂期细胞;(4)宿主范围广;(5)可产生转基因动物,效率达 50%以上;(6)所获病毒滴度高;(7)低免疫源性。由于慢病毒载体具有上述优点,使得慢病毒成为目前基因功能研究和基因治疗较理想的载体工具。本研究使用的 pLenO-DCE 慢病毒载体,由 CMV 启动子启动,MCS 区域带有多个限制性酶切位点,能将目的基因片段有效转染入哺乳动物细胞并整合到宿主细胞基因组中,同时带有 GFP 的荧光标记,因此能对表达重组 DNA 的细胞进行有效筛选,并方便观察慢病毒感染细胞的表达效率。本研究中成功构建了能表达 MCPH1 基因的慢病毒载体 pLenO-DCE-MCPH1,经 293T 细胞包装成具有完整功能的病毒颗粒后,且病毒滴度高达 1.24×10^9 TU/ml,能满足后续细胞实验和动物实验的需要。重组慢病毒成功感染 HeLa 细胞,通过有限稀释法筛选出 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 单克隆细胞株,并经 real-time PCR 和 Western blot 证实 pLenO-DCE-MCPH1-HeLa 单克隆细胞株较 pLenO-DCE-HeLa 及正常组 HeLa 两对照组中 MCPH1 mRNA 和蛋白水平的表达均有明显的升高,为进一步在体外和体内研究 MCPH1 在宫颈癌中确切机制奠定了良好的实验基础。

参 考 文 献

[1] Lin SY, Liang Y, Li K. Multiple roles of BRIT1/MCPH1 in DNA damage response, DNA repair, and cancer suppression[J]. Yonsei Med J, 2010, 51(3): 295-301.

[2] Hosseini MM, Tonekaboni SH, Papari E, et al. A novel mutation in MCPH1 gene in an Iranian family with primary microcephaly[J]. J Pak Med Assoc, 2012, 62(11): 1244-1247.

[3] Alderton GK, Galbiati L, Griffith E, et al. Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(7): 725-733.

[4] Peng G, Lin SY. BRIT1/MCPH1 is a multifunctional DNA damage responsive protein mediating DNA repair-associated chromatin remodeling[J]. Cell Cycle, 2009, 8(19): 3071-3072.

[5] Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis[J]. Nature, 2005, 434(7035): 864-870.

[6] 苟小燕, 袁成福, 胡仁智, 等. 应用 SYBR 实时荧光定量 Real-Time PCR 法检测人宫颈癌 MCPH1 mRNA 表达[J]. 医学分子生物学杂志, 2011, 8(5): 415-418.

[7] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[8] Jo YH, Kim HO, Lee J, et al. MCPH1 protein expression and polymorphisms are associated with risk of breast cancer[J]. Gene, 2013, 517(2): 184-190.

[9] Bruning-Richardson A, Bond J, Alsiary R, et al. ASPM and microcephalin expression in epithelial ovarian cancer correlates with tumour grade and survival [J]. Br J Cancer, 2011, 104(10): 1602-1610.

[10] Giallongo C, Tibullo D, La Cava P, et al. BRIT1/MCPH1 expression in chronic myeloid leukemia and its regulation of the G2/M checkpoint [J]. Acta Haematol, 2011, 126(4): 205-210.

[11] Zhang B, Wang E, Dai H, et al. BRIT1 regulates p53 stability and functions as a tumor suppressor in breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(10): 2271-2280.

[12] 胡仁智, 宋方洲, 袁成福, 等. BRIT1 基因过表达对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(4): 429-432.

(责任编辑:唐宗顺)

欢迎订阅, 敬请赐稿!