

· 技术与方法 ·

采用改进的三引物等位基因扩增法对痛风相关 SNP 位点的分型研究*

郑晨娜¹, 王清瑶², 黄玉香¹, 叶桂华³, 许超尘^{4△}, 杨会勇^{2▲}

(1. 福建省泉州市医学高等专科学校, 福建泉州 362000; 2. 福建省泉州市华侨大学分子药物研究院, 福建泉州 362000; 3. 福建省泉州市华侨大学医院检验科, 福建泉州 362000; 4. 福建省泉州正骨医院, 福建泉州 362000)

摘要:目的 对三引物等位基因扩增法进行改进, 实现直接对外周血样本进行痛风相关单核苷酸多态性(SNP)位点分型。方法 针对乙二胺四乙酸(EDTA)、肝素钠和枸橼酸钠等临床常用抗凝处理的外周血样品, 以 rs1165205 位点为靶位点, 配制适用于全血扩增的“YW”缓冲液, 优化聚合酶链反应(PCR)扩增体系和扩增条件, 实现 SNP 分型检测。选取 40 例男性健康志愿者和 40 例痛风患者, 对其进行 SNP 基因型检测。结果 改进后的三引物等位基因扩增法对 rs1165205 位点分型结果与 Sanger 测序检测一致。80 个样本中 rs1165205 位点各基因型在发病人群和未发病人群分布差异无统计学意义($P=0.335$)。结论 改进后的三引物等位基因特异性扩增法可以直接对临床常用抗凝处理的外周血样品痛风 SNP 位点进行快速分型研究。

关键词:三引物扩增法; 等位基因; 基因扩增; 痛风; 多态性, 单核苷酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)12-1476-04

Research on gout-related SNP genotyping by improved tri-primer allele gene amplification*

Zheng Chenna¹, Wang Qingyao², Huang Yuxiang¹, Ye Guihua³, Xu Chaochen^{4△}, Yang Huiyong^{2▲}

(1. Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian 362000, China; 2. Molecular Medicine Research Institute, Huaqiao University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Hospital of Huaqiao University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 4. Quanzhou Bonesetting Hospital, Quanzhou, Fujian 362000, China)

Abstract: Objective To improve the tri-primer allele gene amplification for realizing the single nucleotide polymorphisms (SNP) genotyping of the peripheral blood sample. **Methods** Aiming at the peripheral blood samples with the clinical usual anticoagulation processing by EDTA, heparin and citrate, with the locus rs1165205 as the target site, the buffer solution(YW) suitable for whole blood was prepared and the PCR amplification system and the amplification condition were optimized for realizing the detection of SNP genotyping. **Results** The genotyping results of locus rs1165205 by improved tri-primer allele gene amplification method were consistent with the results of the Sanger sequencing method, and the peripheral blood samples treated by different anticoagulant were genotyped by the improved tri-primer ASA. Among 80 samples, various genotypes of locus rs1165205 had no statistical differences in the distribution between the gout population and non-gout population($P=0.335$). **Conclusion** The improved tri-primer allele gene amplification method can be adopted to conduct the rapid genotyping research on gout SNP locus of the peripheral blood samples with the clinical usual anticoagulation processing.

Key words: tri-primer amplification; alleles; gene amplification; gout; polymorphism, single nucleotide

痛风是一种由于嘌呤代谢失常引起尿酸增高而引发组织损伤的疾病, 常表现为痛风石、关节强直性畸形、肾实质损害、尿路结石、高尿酸血症等多种慢性症状^[1-4]。近年来随着生活水平的提高, 痛风的发病率也急剧升高^[5]。有研究表明, 遗传因素在痛风发病过程中起很大作用, 以作为第 3 代分子标记的单核苷酸多态性(SNP)位点研究相关的分子机制有助于了解痛风的发生机制^[6]。在白种人群中, 位于 SLC17A3 基因的 SNP 位点 rs1165205 与痛风有很大联系, 其多态性位点 A 突变降低了痛风发病风险^[7]。为了解此 SNP 位点是否在汉族人群中也与痛风发病存在联系, 需要对大量的样本进行检查和分析, 因而一种简便快捷、特异性强、可靠的检测方法是此类研究能够成功进行的前提。本研究对当前较为成熟的三引物等位基因扩增法进行了改进: 研制了可直接用外周血进行扩增的“YW”缓冲液, 设计了等位基因特异性的扩增引物, 同时也对聚合酶链反应(PCR)扩增方法进行了改进, 采用高退火温度、低变性温度来增加扩增特异性。经验证, 改进后的方法可以用

于对痛风相关 SNP 位点的分型研究, 同时也为后续 rs1165205 与痛风的相关性分析提供一个简便、快捷、可靠的基因型检测法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择泉州正骨医院的痛风患者 40 例(痛风组)和男性健康志愿者 40 例(对照组), 血液样本分别被乙二胺四乙酸(EDTA)、肝素钠和枸橼酸钠 3 种抗凝剂做抗凝处理, 所有样本均得到医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 10×Taq DNA 聚合酶缓冲液、dNTP、Taq DNA 聚合酶均购自大连宝生物公司; “YW”缓冲液为实验室配制: 在商品化 PCR 扩增缓冲液基础上, 增加了 Mg²⁺ 浓度, 添加一定浓度的 NP-40 和甘油, 并将其 pH 调整至 9.5, 使之能在 PCR 实施过程中裂解血细胞, 能够有效提高 PCR 扩增的特异性和效率; 实验用水为灭菌的双蒸水, PCR 扩增仪购自上海恒久医疗器械公司; 电泳仪购自北京君意东方电泳设备有

* 基金项目: 福建省教育厅 A 类资助项目(JA11323); 泉州市科技局重点资助项目(2011Z5、2011Z30)。 作者简介: 郑晨娜(1978—), 讲师, 博士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。 △ 通讯作者, Tel: 18960283803; E-mail: xuchaochen1@163.com。 ▲ 通讯作者, Tel: 15359531722; E-mail: shyhy@hqu.edu.cn。

限公司,微量紫外分光光度计购自赛默飞世尔科技(原热电公司)有限公司。

1.2.2 全基因组 DNA 提取 取外周静脉全血 200 μL ,用全基因组 DNA 提取试剂盒(三博远志,北京)提取全基因组,用紫外分光光度计测定其浓度及纯度,以 TE 缓冲液调整终浓度为 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 左右。

1.2.3 引物设计 根据文献资料选择了位于 SLC17A3 基因的 SNP 位点 rs1165205(A>T),SNP 位点侧翼序列通过 NCBI 数据库获得(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),相关引物采用 Primer 5.0 设计:一条通用引物,两条 3' 端分别与 SNP 位点互补的特异性引物,其中 3' 端引入一个人工错配碱基,引物的 Tm 值及其他参数使用 OligoAnalyzer 3.0 软件(<http://scitools.idtdna.com/analyzer/>)计算,见表 1。

表 1 rs1165205 位点扩增引物

引物	引物序列(5'→3')	引物长度 (bp)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	产物长度 (bp)
正向	CAA TCC AAG CAG AGC CCC TAG TAG	24	59.5	—
反向 1	GCC TGG GAG ATA TTT TAC CAA ATG <u>AGA</u> <u>A</u>	28	57.5	212
反向 2	GCC TGG GAG ATA TTT TAC CAA ATG <u>AGA</u> <u>T</u>	28	57.4	212

—:人为引入错配碱基;—:此项无数据。

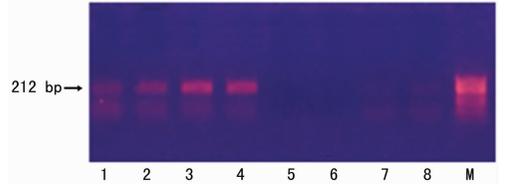
1.2.4 三引物扩增法的改进及对 rs1165205 的检测 (1)以提取的基因组为模板三引物扩增(体积为 20 μL): $10\times$ Buffer 2.0 μL ,通用引物、特异性引物各 0.4 μmol ,dNTP 200 mmol,模板 DNA 1.0 μL ,Taq DNA 聚合酶 1 U,无菌蒸馏水补足 20 μL 。反应温控循环参数:96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,循环 36 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(2)直接以外周血为模板的三引物扩增:“YW” Buffer 2.0 μL ,通用引物、特异性引物各 0.4 μmol ,dNTP 200 mmol,甘油 10%,Taq DNA 聚合酶 1 U,无菌蒸馏水补足至 19.4 μL ,震荡混匀离心后加入外周血样模板 0.6 μL 。反应温控循环参数:96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,循环 36 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(3)电泳检测:反应结束后,取 5 μL PCR 扩增产物,1 μL Loading Buffer,2%的琼脂糖凝胶电泳(EB 为染料),凝胶成像系统显像,根据条带的位置和数目分析基因型。

1.3 统计学处理 所检测样本基因型风险分析,数据采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计;Hardy-Weinberg 检验(<http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>)验证各基因 SNP 位点已达到遗传平衡,确认所选样本是否具有群体代表性。基因型和等位

基因频率分布用计数资料表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

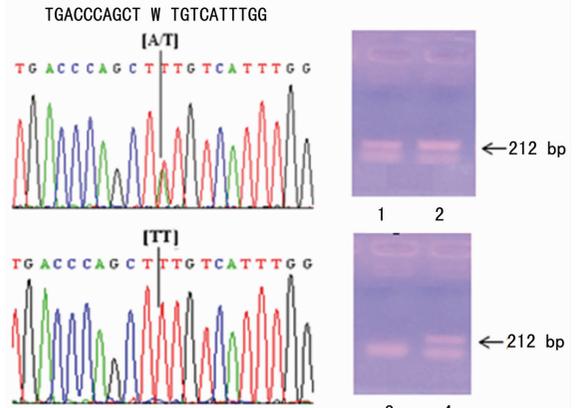
2 结果

2.1 运用改进的三引物扩增法进行基因分型 采用改进的三引物扩增法检测 SLC17A3 基因上的 SNP 位点 rs1165205 的基因型,共获得 3 种不同的基因型:AA 基因型、AT 基因型和 TT 基因型。以 SNP 基因型为 A/T(样品 1)的样本为模板,通过对退火温度和延伸时间的确定,当以基因组模板扩增时,商品化的扩增体系即可以获得可判读的效果,但是结果较为模糊(图 1 泳道 7、8)。但是以外周血为模板扩增时,则无法进行扩增(图 1 泳道 5、6);而采用“YW”缓冲液的体系则可以实现以基因组为模板及以外周血为模板的扩增(图 1 泳道 1~4)。



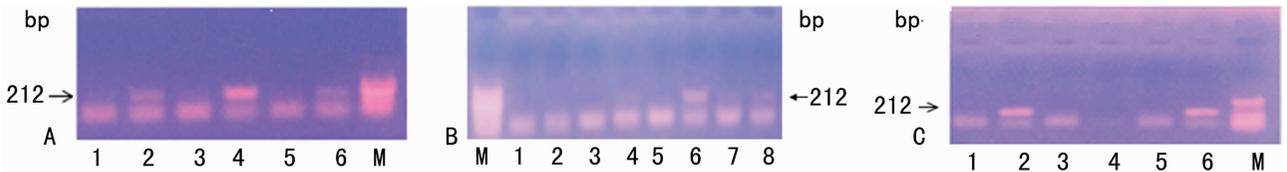
1~4:“YW”缓冲液;4~8:商品化缓冲液(TaKaRa 公司,大连);1、2、5、6:外周血样品;3、4、7、8:提纯的基因组样品;M:DNA 分子标记物。

图 1 以基因组和外周血样品为模板进行三引物扩增后的电泳结果(样品 1)



1:样品 2 等位基因为 A;2:样品 2 等位基因为 T;3、4:样品 3 等位基因为 A。

图 2 样品 rs1165205 位点等位基因 Sanger 测序与三引物法检测结果对比



A:枸橼酸钠抗凝剂处理(基因型均为 AA);B:EDTA 抗凝剂处理(基因型为 AT、AA、AA);C:肝素钠抗凝剂处理(基因型为 AA、AA);1:样品 1 等位基因为 A;2:样品 1 等位基因为 T;3:样品 2 等位基因为 A;4:样品 2 等位基因为 T;5:样品 3 等位基因为 A;6:样品 3 等位基因为 T;I:样品 1 等位基因为 A 的阴性对照;II:样品 1 等位基因为 T 的阴性对照;M:标记物。

图 3 不同抗凝处理外周血样品为模板的 rs1165205 位点等基因三引物扩增电泳结果

2.2 改进的三引物扩增法的特异性和稳定性 (1)验证改进的三引物法对 SNP 基因型的检测效果,本研究选取部分外周血样品(样品 2、3),先通过三引物法检测出其基因型为 AT 和 AA,然后再进行基因组提取进行普通 PCR 扩增,获得的 PCR 产物进行 Sanger 法测序鉴定(英骏公司,广州)样品 rs1165205

位点等位基因的扩增产物,结果见图 2。经分析,三引物法获得的 SNP 基因型与 Sanger 法测序结果一致,证明本研究对三引物法进行改进,可以获得准确的结果。(2)验证改进的全血三引物等位基因特异性扩增法对不同抗凝剂处理的外周血的检测效果,本研究随机选取不同抗凝剂(EDTA、枸橼酸钠、肝

素钠)处理的血液样本各 3 管进行扩增,抗凝的血液样本各 3 个直接全血扩增,经过电泳检测,均能得到长度为 212 bp 的目的产物,而且可以根据电泳条带的有无来实现的基因型的判断(图 3A~C)。

2.3 两组样本的 rs1165205 的基因型统计分析 本结果显示,两组样本之间无论是从基因型或者等位基因角度分析,差异均无统计学意义(表 2),其中 3 个 SNPs 不同基因型对痛风风险的估计来自 <http://www.snpedia.com>。为了验证其代表性,本研究又依据检测值对 rs1165205 位点进行了 Hardy-Weinberg 检验,结果对照组符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=0.421$),且痛风组也符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=0.128$),因此,本研究结果具有一定群体代表性。

表 2 两组样本 SLC17A3(rs1165205)3 个痛风相关基因上 SNP 基因型检测结果[n(%),n=40]

组别	基因型			等位基因	
	AA (降 0.85 倍)	A/T (降 0.85 倍)	TT (正常)	A(保护)	T(正常)
痛风组	4(10.00)	11(27.50)	25(62.50)	19(23.75)	61(76.25)
对照组	5(12.50)	15(37.50)	20(50.00)	25(31.25)	55(68.75)
χ^2	0.940			1.122	
P	0.335			0.291	

3 讨 论

从分子水平上讲,SNP 可以影响基因转录、翻译及翻译后蛋白质折叠从而影响基因功能,造成个体与个体之间、个体与群体之间以及群体与群体之间对疾病的易感性、抵抗力、药物反应性及其他遗传表型上的差异^[8]。研究与痛风相关的 SNP 位点,为研究痛风的发生和发展、解释个体间的表型差异以及疾病的易感程度提供了根本依据。而一个理想的 SNP 位点检测方法是个体进行 SNP 位点分析的前提。本研究采用改进的三引物等位基因扩增法对 80 个样本痛风相关 SNP 位点进行了检测,并与其他方法进行了对比分析。

三引物法是一种等位基因特异性扩增法,重点是引物的设计,包括一条正向引物,2 条 3' 端分别与 SNP 位点互补的等位基因特异性引物(反向 1 和反向 2)。PCR 结束后,即根据电泳条带的位置及数目判定基因型。为了提高扩增特异性,本文在反向 1 和反向 2 的 3' 端第 3 位(-3 位)引入一个错配碱基^[9-11]。

为了对比改进后的三引物法与当前常用 SNP 基因型检测方法如 Sanger 法测序、限制性片段长度多态性(RFLP)检测等的优缺点,本研究从操作流程、成本、准确性等方面进行了比较和分析。(1)操作流程:对于普通 PCR 扩增而言,扩增模板起着至关重要的作用,因此,当前商品化的 PCR 扩增体系对模板的要求较高,需要从组织细胞中提纯 DNA 作为模板。本研究采用普通基因组提取试剂盒,一般需要 200 μ L 血液样本,单个样本操作时间为 2.5~3.0 h,成本不算劳动成本约为 10 元/样(475 元/50 次),成本较高,而且操作不当会使产物损失并降低有效模板量。若采用外周血直接扩增,每次反应仅需外周血 0.6 μ L,不仅节约了成本而且极大地简化了操作流程,节省了大量操作时间。另外,在进行大量样本的外周血 DNA 提取时,样本之间交叉污染的概率很大,而且操作人员与外周血样品接触机会大大增加,增加了操作者潜在的疾病感染风险。因此,直接对外周血进行扩增因操作流程少可有效减少这些风险,使得大样本外周血临床检测更为可行。从检测方法而

言,改进的三引物法 PCR 扩增反应完毕后仅需要琼脂糖电泳即可获得结果,而 Sanger 法则需要 PCR 产物进一步纯化以及需要昂贵的核酸测序仪器进行检测,需要较高的成本和较长的时间;RFLP 等方法则需要 PCR 完成后,加入内切酶等处理步骤,优化内切酶反应条件也需要繁重的工作,酶切步骤很多时候也影响了检测的效果^[12]。(2)实现直接对外周血样本进行扩增:首先需要考虑到血液中大量的扩增抑制物对 PCR 扩增效率的影响,当前有研究者采用昂贵不容易获得的突变 Taq DNA 聚合酶提高对血样抑制物的抵抗能力^[13],同时添加增强剂增加 Taq DNA 聚合酶的活性^[14],添加结合抑制物来缓解其 Taq DNA 聚合酶的抑制作用^[15]。成本高而且对实验者素质要求较高。本研究采用本实验室配制的“YW”缓冲液,采用普通商品化 DNA 聚合酶即可实现直接以外周血为模板进行的等位基因特异性扩增(图 1)。另外本研究在改进的三引物扩增法引物设计中在等位基因特异性引物的 3' 端引入一个错配碱基,较传统的三引物扩增法,扩增效率有所降低,却可以很好地提高扩增特异性^[13],为基因型准确的判断提供保障。

为了研究该方法的稳定性和特异性,本研究选取了纯合子 AA 和杂合子 AT 基因型的血液样本,以及随机选取 EDTA、肝素钠和枸橼酸钠抗凝的血样各 3 个,分别进行了三引物等位基因扩增和检测。结果显示,本研究所使用方法与 Sanger 法测序所获得的结果一致(图 2)。对于不同抗凝剂处理的外周血样本,实验中发现 EDTA 和枸橼酸盐抗凝的血样均能得到较好的结果(图 3A、B);一些肝素钠抗凝剂处理的血样扩增较难,这可能与肝素具有强负电荷的理化性质有关,肝素与 DNA 聚合酶结合后,与同样带有负电荷的 DNA 模板之间产生排斥作用,从而使活性中心作用的空间位阻增大,未活化或未充分活化的 DNA 聚合酶与引物-模板复合体效率降低,引物不能延伸或延伸不完全,对 PCR 扩增造成影响^[16],本实验增加酶(1.0~1.5 U)的用量来实现等位基因特异性扩增。

在对 80 个样本进行 rs1165205 位点检测后针对基因型和等位基因进行统计分析检验发现,在对照组和痛风组之间差异无统计学意义($P=0.335$ 、 $P=0.291$),对其进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,发现对照组和痛风组均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=0.421$ 、 $P=0.128$)。可以认为 rs1165205 位点与所选人群的痛风发病相关性较小,需联合其他位点进行综合分析。

综上所述,本研究发展了一种基于外周血直接三引物等位基因扩增法来实现痛风相关 SNP rs1165205 的基因型的检测,可有效地降低检测成本,提高检测效率,适用于高通量样本检测。采用改进的外周血直接三引物扩增法对检测 SNP 位点 rs1165205 基因型进行了检测和与痛风发病相关性进行了初步分析,为后续痛风相关 SNP 位点与痛风发病相关性的分析与相应早期诊断方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Annemans L, Spaepen E, Gaskin M, et al. Gout in the UK and Germany: prevalence, comorbidities and management in general practice 2000-2005[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(7):960-966.
- [2] Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(10):3136-3141.
- [3] Winnard D, Wright C, Taylor WJ, et al. National preva-

- lence of gout derived from administrative health data in Aotearoa New Zealand[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2012, 51(5):901-909.
- [4] Kuo CF, See LC, Luo SF, et al. Gout; an independent risk factor for all-cause and cardiovascular mortality[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2010, 49(7):141-146.
- [5] So A. Developments in the scientific and clinical understanding of gout[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(5):221-227.
- [6] Roddy E, Doherty M. Epidemiology of gout[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(6):223-234.
- [7] Dehghan A, Kottgen A, Yang Q, et al. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout; a genome-wide association study[J]. *Lancet*, 2008, 372(9654):1953-1961.
- [8] 刘越, 吕社民. 单核苷酸多态性影响基因功能的机制[J]. *生命的化学*, 2008, 28(2):214-216.
- [9] Wu M, Du ZW, Liu JN, et al. Improved allele-specific polymerase chain reaction for single nucleotide polymorphism genotyping[J]. *Chem Res*, 2010, 26(2):259-262.
- [10] Chen H, Morrell PL, Toleno DM, et al. Allele-specific PCR can improve the efficiency of experimental resolution of heterozygotes in resequencing studies[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(4):647-658.
- [11] Wang K, Zhang JT, Yun YX, et al. Improvement on PCR-CT PP; a SNP genotyping approach based on mismatch technique[J]. *Hereditas*, 2011, 33(2):182-188.
- [12] Wolf C, Rentsch J, Hübner P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA; a reliable method for species identification[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(4):1350-1355.
- [13] Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, et al. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(5):e40.
- [14] Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq[J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(2):152-161.
- [15] Kane A, Matsubara K, Nakamura H, et al. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from Bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification[J]. *J Forensic Sci*, 1994, 39(2):362-372.
- [16] Al-soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(2):485-493.

(收稿日期:2013-09-13 修回日期:2013-12-22)

(上接第 1475 页)

此确定本研究成功构建了 MACC1 慢病毒干扰载体,并能有效感染 MB-231 细胞,尤其是提高 MOI 值可以提高细胞的感染率,但对细胞状态可能产生影响。因此,本研究认为 MB-231 细胞的最佳感染条件为 MOI=40,本研究选择感染效率高(>90%),MCI 值低的感染条件,为进一步研究 MACC1 在乳腺癌中的作用及后续动物基因治疗奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1 a newly identified key regulator of HGF-MET signaling predicts colon cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(1):59-67.
- [2] Stein U, Dahlmann M, Walther W, et al. MACC1-more than metastasis Facts and predictions about a novel gene [J]. *J Mol Med*, 2010, 88(1):11-18.
- [3] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, et al. MACC1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9):3441-3444.
- [4] Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis MACC1 and Met as metastatic pacemakers[J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 41(12):2356-2359.
- [5] Shirahata A, Shinmura K, Kitamura Y, et al. MACC1 as a maker for advanced colorectal carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7):2689-2692.
- [6] Stein U, Burock S, Herrmann P, et al. Circulating MACC1 transcripts in colorectal cancer patient plasma predict metastasis and prognosis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e49249.
- [7] 刘清泉,刘青光,答献峰,等. MACC1 基因在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2010, 39(1):22-24, 28.
- [8] 王妮娜,谢剑明,郑大勇,等. 稳定表达 MACC1 的胃癌 BGC-823/pBaBb-puro-MACC1 细胞株的建立及其肿瘤相关基因的研究基因[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(3):312-316.
- [9] Hu X, Fu X, Wen S, et al. Prognostic value of MACC1 and c-met expressions in non-small cell lung cancer[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2012, 15(7):399-403.
- [10] Raghav KP, Wang W, Liu S, et al. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8):2269-2277.
- [11] El-Attar HA, Sheta MI. Hepatocyte growth factor profile with breast cancer[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2011, 54(3):509-513.
- [12] Locatelli A, Lofgren KA, Daniel AR, et al. Mechanisms of HGF/Met signaling to Brk and Sam68 in breast cancer progression[J]. *Horm Cancer*, 2012, 3(1/2):14-25.
- [13] 王婧男,张楠,赵建强,等. 乳腺癌中 HGF 及其受体 c-met 的表达与淋巴管生成及淋巴道转移的关系[J]. *山东大学学报:医学版*, 2010, 48(3):90-93.

(收稿日期:2013-10-08 修回日期:2013-12-22)