

GCF 低表达宫颈癌 HeLa 细胞系的构建及辐射对其调控 IER5 基因表达的初步探究

史海敏 丁库克 周平坤 陈 丹 郭冬梅 赵春丽 张 新

摘 要 **目的** 构建 GCF 低表达的宫颈癌 HeLa 细胞系,在⁶⁰Co γ 射线照射下初步探究其细胞增殖以及调控宫颈癌放射敏感基因 IER5 的表达。**方法** 经带有荧光标记的 GCF 低表达的质粒稳定转染 HeLa 细胞, G418 筛选,蛋白印迹法、实时定量 PCR 法鉴定得到 GCF - shRNA - HeLa 单克隆细胞系。倒置显微镜观察细胞形态变化, CCK - 8 法探究不同剂量照射后的细胞增殖情况,在不同照射剂量下用蛋白印迹法检测 GCF - shRNA - HeLa 及对照细胞中 IER5 蛋白的表达情况。**结果** 成功构建稳定表达的 GCF - shRNA - HeLa 单克隆细胞系,显微镜下观察 GCF - shRNA - HeLa 细胞比正常 HeLa 细胞体积小,细胞间隙较大,其中梭形细胞较多。蛋白印迹法及实时定量 PCR 验证了 GCF - shRNA - HeLa 的蛋白表达及 mRNA 转录水平均低于对照组 ($P < 0.05$)。辐射情况下实验结果显示在同一照射剂量、同一时间下 GCF - shRNA - HeLa 细胞比 control 对照细胞增殖缓慢 ($P = 0.014$)。不同剂量照射情况下蛋白印迹法检测 HeLa 细胞、control - shRNA - HeLa 与 GCF - shRNA - HeLa 细胞 IER5 蛋白表达情况,结果同一辐射剂量下 GCF 沉默的细胞系中 IER5 的表达量比对照细胞高, 4Gy 照射的 GCF - shRNA - HeLa 的 IER5 表达量最高 ($P < 0.05$)。**结论** 本实验构建了低表达 GCF 的 HeLa 细胞系,初步探讨 GCF 作为 IER5 基因抑制性转录因子的作用。结合临床基因靶向治疗,可寻求可以降低 GCF 表达的方式,通过上调 IER5 表达这一双效途径来加速宫颈癌细胞凋亡。

关键词 GCF IER5 HeLa 细胞 细胞增殖

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.011

Constructing the Cervical Cancer HeLa Cell Line with Lower Expression of GCF Gene and Gxplre the Radiational Effects of it's Regulating on IER5 Gene. Shi Haimin, Ding Kuke, Zhou Pingkun, et al. Liaoning Cancer Hosptial, Department of Gynaecology, Liaoning 110042, China

Abstract Objective To construct and identify the HeLa cell line which express low level of GCF gene, investigate the effects on its proliferation and cell - cycle changes and IER5 gene after ⁶⁰Co γ radiation. **Methods** GCF low expression vector was stably transfected into the HeLa cells and then we got GCF - shRNA - HeLa monoclonal cells line by G418 screening. Western blot and real - time PCR were used to identifiicated it. The morphological characteristics of cells was observed with light microscope. Cells' proliferation was counted by CCK - 8. IER5 protein expression in GCF - shRNA - HeLa cell line and control cells were detected by Western blot. **Results** Constructing the HeLa cell line which express low level of GCF gene was successfully and the conclusion was that this cell line had smaller size, bigger intercellular space and more fusiform cells than normal HeLa cells observed by microscope. The results of Western blot and real - time PCR showed the level of mRNA of GCF - shRNA - HeLa lines was lower than control groups ($P < 0.05$). At the same time and radiation dose, the proliferation of GCF - shRNA - HeLa lines were slower than control cells ($P < 0.05$). At the same radition dose, the expression of IER5 in GCF - shRNA - HeLa was higher than control groups, and the 4Gy was the highest point. The results had significant difference $P < 0.05$. **Conclusion** We confirmed that the GCF could effectively knock down in HeLa cells, established the stable GCF - shRNA - HeLa cell line and validated GCF's influences as IER5 gene's inhibitive transcription factor. Combined with clinical gene targeted therapy, we could explore the way to reduce the expression of GCF to accelerate the apoptosis of cervical cancer cells by up - regulating IER5.

Key words GCF; IER5; HeLa Cells; cell proliferation

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770573/31170806);北京市自然科学基金资助项目(7092013);沈阳市科技攻关项目(F12193948)

作者单位:110042 沈阳,辽宁省肿瘤医院妇一科(史海敏、陈丹、郭冬梅、赵春丽、张新);100883 北京,中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全研究所(丁库克);100850 北京,中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所放射毒理与辐射危害评价研究室(周平坤)

GCF(GC binding factor)是人体中一个转录抑制因子,主要通过结合到某些基因的启动子从而抑制这些基因的转录水平,它由一个长度为 3kb 的 mRNA 编码^[1]。IER5(immediate early response gene 5)是早期慢反应家族中的一员,位于人 1 号染色体上 1q23.5, cDNA 全长 2369bp,该基因对细胞有丝分裂-细胞周期的调节和细胞凋亡可能发挥起重要作用^[2-6]。IER5 基因具有辐射敏感度,在一定辐射条件下可以促进 mRNA 水平高表达,这种 mRNA 高表达可以抑制细胞的生长,促进细胞死亡,降低细胞进入 G₁~S 期的比例或者阻滞细胞分裂^[7,8]。前期研究发现宫颈癌辐射敏感基因 IER5 可能存在 GCF 转录因子,位于 IER5 基因前 -386~-382bp 和 -274~-270bp 区域,可能起负性调控作用,随着辐射吸收剂量的增加,转录因子 GCF 抑制作用减弱^[9]。为进一步验证转录因子 GCF 的存在,是否真正地对 IER5 基因辐射诱导表达起作用,笔者通过构建 GCF 低表达 HeLa 细胞系,在辐射情况下研究其细胞增殖以及对 IER5 基因表达的影响。

材料与方法

1. 材料:(1)细胞株与质粒:人宫颈癌细胞系(HeLa 细胞)由军事医学科学院放射与辐射医学研究所放射毒理与辐射危害评价研究室保存,常规培养。4 种沉默 GCF 蛋白的 pGPU6/GFP/Neo shRNA 表达载体由本课题组前期构建并保存,编号分别为 1055、1696、470、796。(2)主要仪器与试剂:Lipofectamine 2000™、G418 硫酸盐、Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品,DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶为美国 Hyclone 公司产品,Ecl 显色液购自美国 Thermo 公司,反转录试剂盒购自上海海洋公司,Real Master Mix(SYBR Green)购自北京天根公司,Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自 DOJINDO,兔抗 GCF 单克隆抗体、鼠抗 β -actin 单克隆抗体购于 Sant Cruz 公司,鼠抗 IER5 多克隆抗体为 Abcam 公司产品。

2. 方法:(1)细胞转染与单克隆筛选:将前期已构建好的带有编码特异性沉默编号为 1055、1696、470、796 的 GCF 基因 shRNA 的质粒各取 4 μ g 溶于 60 μ l 无血清 DMEM 中,各加入 10 μ l Lipofectamine 2000™,进行细胞培养。48h 后更换含终浓度为 1000 μ g/ml 的 G418 的培养基进行筛选,14 天后形成肉眼可见的单克隆,挑选出阳性单克隆细胞系,用 500 μ g/ml 的 G418 维持筛选压力,继续培养。经过 2 个月阳性克隆的挑取、传代和培养,最终获得稳定的单克隆细胞。(2)蛋白质印迹法:选择荧光强度较高的单克隆细胞株、control 和 HeLa 细胞做 Western blot 法检测。BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量后,每泳道上样 40 μ g 总蛋白,用 8% SDS-PAGE 分离蛋白。电泳后,将蛋白转膜至 NC 膜,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭后分别敷兔抗 GCF 单克隆抗体(1:500 稀释)和鼠抗 β -

actin 单克隆抗体(1:4000 稀释),4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,8min $\times$ 3 次,敷二抗 Anti-Rabbit IgG 和 Anti-Mouse IgG(均 1:4000 稀释)1h,洗膜,Ecl 显影,扫描分析。IER5 抗体为羊抗 IER5 单克隆抗体(1:1000 稀释),二抗 Anti-Goat IgG(1:4000 稀释)。(3)实时定量 PCR 法:提取细胞系的总 mRNA 并进行浓度分析和纯度鉴定,用反转录试剂盒合成 cDNA,反应体系为 10 μ l。每孔依次加入 5 $\times$ RT Master Mix 2 μ l, RNA template 1 μ g,补充 Nuclease-free Water 至体系为 10 μ l,反应条件为 37℃ 15min,50℃ 5min,98℃ 5min,合成的 cDNA 4℃ 保存备用。实时定量 PCR 加样如下:每孔依次加入的 2.5 $\times$ Real Master Mix/20 $\times$ SYBR solution 9 μ l,正向引物反向引物各 4 μ l(1 $\times$), GCF 引物序列为:上游引物 5'-ATGAAACGCAG-GCAAGATGA-3',下游引物 5'-TGTTCCTTCCTGATGGTTC-3'; β -actin 引物序列为:上游引物 5'-GCGCGCTACAGCT-TCA-3',下游引物 5'-CTTAATGTACGCACTTTCC-3'。cDNA 0.33 μ l,补充 Nuclease-free Water 2.67 μ l,反应体系为 20 μ l。反应条件 95℃ 1min,95℃ 15s,53℃ 20s,68℃ 45s,反应循环次数为 40 次,融解曲线分析,每个扩增的样本均设内参基因 β -actin 和空白对照组,每个样本均设 2 个重复孔。扩增完毕后仪器内置的 MJ Opticon Monitor 分析软件自行处理测试数据。(4)Cell Counting Kit-8 检测细胞增殖:选对数生长期的 GCF-shRNA-HeLa 细胞和 control 对照细胞分别接种于 96 孔板,每种细胞接种 2 组,每组 4 个孔,每孔接种 5000 个细胞,接种 5 天量并每组设 4 个空白对照孔。37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24h 后接受 0、2、4Gy ⁶⁰Co γ 射线照射,孵箱继续培养 24h 后做第 1 天计数,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,将板在培养箱内孵育 2h,用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度,连续测 5 天。

3. 统计学方法:采用统计软件 SPSS 17.0 对实验结果进行统计学处理和分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,单变量配对资料之间的比较采用配对样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 倒置显微镜观察细胞形态的变化:经稳定转染筛选的单克隆细胞系和空载细胞系相比,细胞形态发生明显变化,单克隆细胞系细胞体积变小,而且细胞间隙较大,其中梭形细胞较多(图 1)。GFP 绿色荧光蛋白在细胞中肉眼明显可见,显微镜下观察更明显,且连续传代 20 次此形态一直可见(图 2)。

2. 蛋白印迹法检测 GCF 蛋白表达:选出肉眼可见绿色荧光程度较高且能稳定遗传的 1055-C、1055-D、1055-F、1055-M、1696-A、1696-B、470-B、470-E、796-A、阴性对照 control 及空白对照 HeLa 细胞株进行蛋白印迹检测(图 3),结果显示 GCF 蛋白相对表达量,1055-C 组为 0.23 ± 0.03 , 1055-D 组为 0.32 ± 0.02 , 1055-F 组为 $0.51\pm$

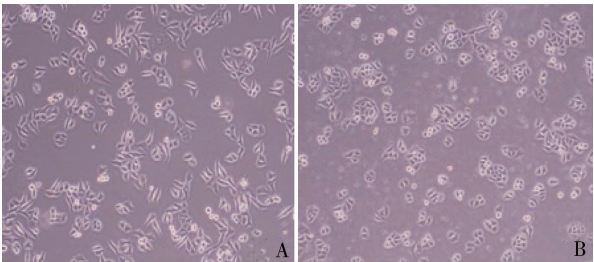


图 1 GCF - shRNA - HeLa 与 control 对照
细胞形态与大小对比 (× 40)
A. GCF - shRNA - HeLa 细胞系; B. control 细胞

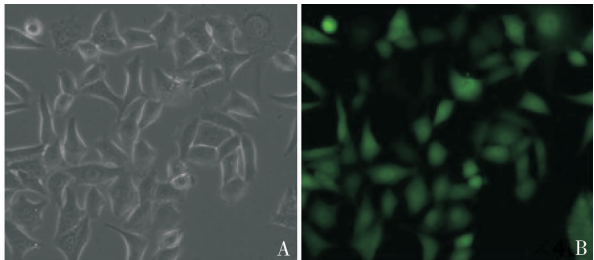


图 2 GCF - shRNA - HeLa 单克隆细胞系绿色
荧光蛋白表达情况 (× 400)
A. 明视野; B. 荧光视野

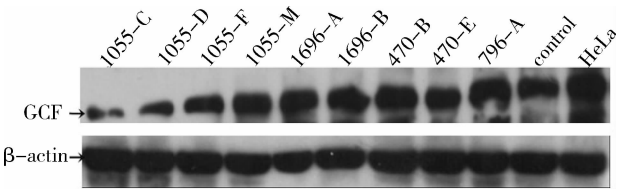


图 3 蛋白印迹法检测 GCF - shRNA - HeLa、
control、HeLa 细胞中 GCF 蛋白表达情况

0.03, 1055 - M 组为 0.85 ± 0.06 , 1696 - A 组为 0.97 ± 0.09 , 1696 - B 组为 0.94 ± 0.05 , 470 - B 组为 0.99 ± 0.03 , 470 - E 组为 0.88 ± 0.08 , 796 - A 组为 0.89 ± 0.03 , 与阴性对照组 1.14 ± 0.06 和空白对照组

1.16 ± 0.09 比较, GCF 蛋白表达均明显下降, 其中以 1055 - C 细胞株蛋白相对表达量下降最为明显, 差异有统计学意义 ($F = 935.6, P = 0.001$)。

3. 实时定量 PCR 检测 mRNA 转录水平: 结合蛋白印迹实验结果使用实时定量 PCR 方法及 Opticon Monitor 软件检测并分析稳定转染的细胞株 1055 - C、1055D、1696 - A、470 - B、796 - A 及对照组 control 细胞 mRNA 转录水平。设对照组 control 细胞 mRNA 转录水平为 1, 结果显示 GCF 基因 mRNA 转录水平, 各组分别为 0.24 ± 0.15 、 0.43 ± 0.17 、 0.62 ± 0.21 、 0.84 ± 0.13 、 0.76 ± 0.19 , 均低于对照组细胞, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中表达量最低的仍是 1055 - C 细胞株。实时定量 PCR 结合蛋白印迹检测结果, 1055 - C 细胞株为笔者筛选出的 GCF 低表达的细胞系, 命名为 GCF - shRNA - HeLa 细胞。

4. 辐射情况下了解细胞增殖情况: 用细胞计数 Kit - 8 试剂盒检测不同剂量照射下 GCF - shRNA - HeLa 和 control 对照细胞增殖情况。对两组细胞增殖数据进行统计分析, 结果表明在同一照射剂量、同一时间下 GCF - shRNA - HeLa 细胞比 control 对照细胞增殖缓慢, 差异有统计学意义 ($F = 965.2, P = 0.014$, 图 4、表 1)。

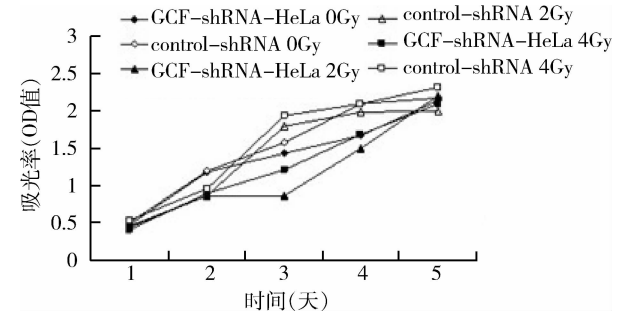


图 4 不同剂量照射下 GCF - shRNA - HeLa、
control - shRNA - HeLa 细胞的生长曲线

表 1 不同剂量照射下 GCF 基因沉默对 HeLa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞系 (照射剂量)	生长时间				
	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天
GCF - shRNA (0Gy)	$0.49 \pm 0.13^*$	$1.18 \pm 0.15^*$	$1.52 \pm 0.25^*$	$1.71 \pm 0.31^*$	$2.15 \pm 0.37^*$
control - shRNA (0Gy)	0.54 ± 0.19	1.21 ± 0.21	1.43 ± 0.28	2.01 ± 0.29	2.18 ± 0.42
GCF - shRNA (2Gy)	$0.41 \pm 0.17^*$	$0.86 \pm 0.21^*$	$1.09 \pm 0.23^*$	$1.49 \pm 0.25^*$	$2.20 \pm 0.39^*$
control - shRNA (2Gy)	0.43 ± 0.14	0.87 ± 0.19	0.85 ± 0.29	1.93 ± 0.29	2.07 ± 0.41
GCF - shRNA (4Gy)	$0.45 \pm 0.12^*$	$0.91 \pm 0.14^*$	$1.21 \pm 0.30^*$	$1.68 \pm 0.33^*$	$2.11 \pm 0.44^*$
control - shRNA (4Gy)	0.47 ± 0.20	0.96 ± 0.24	1.96 ± 0.26	2.10 ± 0.38	2.45 ± 0.51

与同照射剂量 control - shRNA 相比, $^* P < 0.05$

5. 蛋白印迹法检测 GCF - shRNA - HeLa 和对照细胞中 IER5 蛋白表达:蛋白印迹法检测结果显示(图 5、表 2),同一辐照剂量下 GCF 沉默的细胞系中 IER5 的表达量比对照细胞高($P < 0.05$),4Gy 照射组的 GCF - shRNA - HeLa 中 IER5 表达量最高均明显

高于 0Gy、2Gy 照射组,两组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同剂量下 control - shRNA - HeLa 比正常 HeLa 细胞 IER5 蛋白表达量高,说明可能本质粒空载体 pGPU6/GFP/Neo 有刺激 IER5 蛋白表达的作用,有待于进一步开展实验研究。

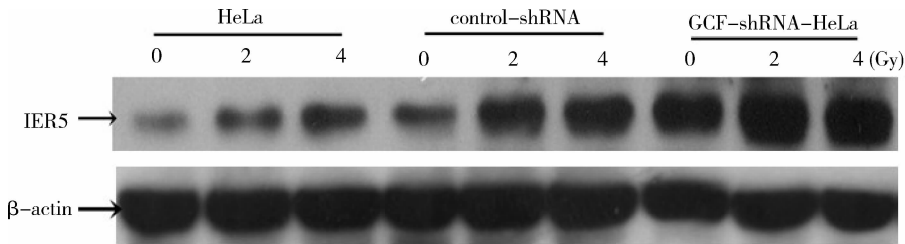


图 5 不同照射剂量下 HeLa 细胞、control 对照细胞与 GCF - shRNA - HeLa 细胞 IER5 蛋白表达情况

表 2 不同照射剂量下 GCF - shRNA - HeLa 细胞与对照细胞中 IER5 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞系	照射剂量 (Gy)		
	0	2	4
HeLa	0.22 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.87 ± 0.05
control - shRNA - HeLa	0.47 ± 0.02	1.02 ± 0.09	1.49 ± 0.06
GCF - shRNA - HeLa	1.26 ± 0.07 *	1.46 ± 0.08 *	1.89 ± 0.05 ** [△]

同一照射剂量,与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 GCF - shRNA - HeLa 组 0Gy 相比, $F = 853.5$, # $P < 0.05$; 与 GCF - shRNA - HeLa 组 2Gy 相比, $F = 927.3$, [△] $P < 0.05$

讨 论

研究发现 GCF 是人体中的一个能抑制某些基因转录的转录因子,它由一个长度为 3kb 的 mRNA 编码^[10]。GCF 基因序列为 GCF cDNA 包含 2661 个核苷酸编码写的 GCF 781 个氨基酸的蛋白^[11]。研究人员对 GCF 基因在不同细胞中的表达水平进行了测定,并且确定了 GCF 基因的染色体定位,原位杂交之后通过一个 1.9kb GCF cDNA 的基因探针分析人类染色体,结果显示 GCF 基因在 2p11.1 ~ 11.2。GCF 主要调控那些编码生长因子(EGF)或者生长因子受体(EGFR)的基因的转录。GCF 通过一个序列特异性方式结合到 EGF 受体基因的一个 GC 丰富序列,表现出对这个启动子的转录抑制活性^[12]。

IER5 基因启动因子 - 386 ~ - 382bp 以及 - 274 ~ - 270bp 处存在转录因子 GCF 顺式作用元件,并且还发现转录因子 GCF 对顺式作用元件起负性调节作用,这种负性调节作用随吸收剂量的增加而减弱。为了研究 GCF 转录因子对宫颈癌 HeLa 细胞的影响,构建了含有 GCF - shRNA 的载体转染 HeLa 细胞,经过 G418 筛选出含有这种载体稳定表达的

GCF - shRNA - HeLa 单克隆细胞,并用蛋白印迹法和实时定量 PCR 法验证。细胞增殖曲线从细胞层面上在研究 GCF 作为抑制性因子的功能上起了一定支持作用:同一照射剂量、同一时间下 GCF - shRNA - HeLa 细胞比对照细胞增殖缓慢。前期已有实验研究得到了 IER5 基因可能存在 GCF 转录因子和 IER5 基因表达上调可以促进细胞凋亡的结论,可以设想 GCF 作为 IER5 的抑制性转录因子,在 GCF 基因下调后抑制了细胞的生长促进了细胞凋亡,可以作为解释 GCF - shRNA - HeLa 细胞比 control 对照细胞增殖缓慢的一种原因。

众所周知,在细胞的 G₁ 或 G₂ 期用低剂量的放射线照射会导致细胞周期的停滞在 G₂ 期,细胞在这一时期进行 DNA 修复^[13]。GCF - shRNA - HeLa 沉默了对辐射敏感的转录因子,细胞在 G₂/M 期相对减少,相对提高了凋亡比例且辐射敏感度下降。也证明了 GCF 有可以促进细胞的分裂且提高细胞对辐射的敏感度的作用。另一方面,因为不论 GCF 是否下调细胞都会因辐射依赖性而出现 G₂/M 期阻滞,但 GCF 下调后使这种依赖性稍有下降,说明了 GCF 下调后 DNA 损伤修复能力有所下降而使细胞凋亡的比例增高。为研究 GCF 对 IER5 基因的影响,笔者继续 GCF - shRNA - HeLa 细胞和对照细胞中的 IER5 基因表达做了检测。同一辐照剂量下 GCF 沉默的细胞系中 IER5 的表达量比对照细胞高,且随剂量的增加 IER5 表达量增加,可以解释为一种情况,因为 GCF 是抑制 IER5 表达的转录因子,当 GCF 下调,IER5 的表达升高,而前期实验证明了 IER5 的升高恰恰抑制了 HeLa 细胞的生长。

本研究通过构建 GCF 沉默的 HeLa 细胞系从细

胞层面和基因层面研究 GCF 作为 IER5 抑制性转录因子的作用以及其辐射敏感度对 IER5 基因的作用。鉴于 IER5 基因的不同辐射剂量的辐射效应与辐射后时间效应,对临床进行的肿瘤放疗剂量选择与辐射后药物的时间选择都有一定的参考价值。在对一些恶性肿瘤如肝癌、宫颈癌研究中笔者都检测到辐射情况下影响 IER5 基因的表达,因此在这些癌细胞中沉默 GCF 也会出现 IER5 基因高表达。宫颈癌作为威胁女性身体健康的一大恶性肿瘤,其放射治疗为较成熟的治疗方法。在放疗前预测放疗敏感度,制定个体化放疗计划,观察癌细胞放射反应及判定疗效已成为目前宫颈癌研究的主要方向。虽然目前研究仅表明 IER5 基因可能与细胞周期的调节、细胞凋亡研究,其辐射后的生物学效应仍然未知,但随着关于 GCF 和 IER5 研究的进展,笔者设想可以 GCF 作为一个突破点,寻找一种可以降低 GCF 表达的方式,在不必辐照或者降低辐照情况下,通过 IER5 表达上调这一途径来双效加速肿瘤细胞凋亡,而不至对正常癌旁组织造成损伤,这可能会为临床宫颈癌的基因治疗拓宽新思路。

参考文献

- Ohtsuka H, Oikawa M, Ariake K, *et al.* GC - binding factor 2 in - teracts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines [J]. *International Journal of Cancer*, 2011, 129 (7):1599 - 1610
- Gregory SG, Barlow KF, Mclay KE, *et al.* The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1 [J]. *Nature*, 2006, 441 (7091):315 - 321
- Williams M, Lyu M, Yang Y, *et al.* Ier5, A novel member of the slow - kinetics immediate - early genes [J]. *Genomics*, 1999, 55 (3):327 -

(上接第 90 页)

- Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, *et al.* Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed - lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29 (5):703 - 708
- Zhang F, Qi Y, Harrison TJ, *et al.* Hepatitis E genotype 4 virus from feces of monkeys infected experimentally can be cultured in PLC/ PRF/5 cells and upregulate host interferon - inducible genes [J]. *J Med Virol*, 2014, 86 (10):1736 - 1744
- Sung WK, Zheng H, Li S, *et al.* Genome - wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44 (7):765 - 769
- Lau CC, Sun T, Ching AK, *et al.* Viral - human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25 (3):335 - 349
- Li W, Zeng X, Lee NP, *et al.* HIVID: an efficient method to detect HBV integration using low coverage sequencing [J]. *Genomics*, 2013, 102 (4):338 - 344
- Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252 (2):157 - 170

- Okada A, Kushima K, Aoki Y, *et al.* Identification of early - responsive genes correlated to valproic acid - induced neural tube defects in mice [J]. *Clinical and Molecular Teratology*, 2005, 73 (4):229 - 238
- Jansova E, Koutna I, Krontora d P, *et al.* Comparative transcriptomem aps: a new approach to the diagnosis of colorectal carcinoma patients using cDNA m - ieroarrays [J]. *Clin Genet*, 2006, 69 (3):218 - 227
- Tavakoli H, Manoochehri M, Mosalla SMM, *et al.* Dose - dependent and gender - related radiation - induced transcription alterations of Gadd45a and Ier5 in human lymphocytes exposed to gamma ray emitted by ⁶⁰Co [J]. *Radiation Protection Dosimetry*, 2013, 154 (1):37 - 44
- 李秀楠, 李莉, 杨川杰, 等. IER5 基因对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36 (7):843 - 853
- Ding KK, Shang ZF, Hao C, *et al.* Induced expression of the IER5 gene by γ - ray irradiation and its involvement in cell cycle checkpoint control and survival [J]. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2009, 48 (2):205 - 213
- 崔巍, 尹玲玲, 董凌月, 等. 早期反应基因 Ier5 启动子区辐射敏感的转录因子结合位点研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2012, 32 (1):15 - 19
- Laura B, Hitoshi Y, Ira P, *et al.* Biochemical characterization of human GCF transcription factor in tumor cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (3):1689 - 1694
- Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, *et al.* GCF2/LRRFIPI promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin - de - pendent RhoA activation [J]. *Cancer Lett*, 2012, 325 (1):99 - 107
- Masato T, Peizhong M, Gang W, *et al.* Molecular analysis of the GCF gene identities revisions to the cDNA and amino acid sequences [J]. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1999, 1447 (1):125 - 133
- Fernet M, Mégnin - Chanet F, Hall J, *et al.* Control of the G₂/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper - radiosensitivity [J]. *DNA Repair* 2010, 9 (1):48 - 57

(收稿日期:2014 - 10 - 05)

(修回日期:2014 - 10 - 20)

- Jiang Z, Jhunjhunwala S, Liu J, *et al.* The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients [J]. *Genome Res*, 2012, 22 (4):593 - 601
- Ding D, Lou X, Hua D, *et al.* Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next - generation sequencing - based approach [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8 (12):e1003065
- Toh ST, Jin Y, Liu L, *et al.* Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (4):787 - 798
- Kappler R, Leuschner I, Schweinitz DV. The role of TERT in hepatoblastoma and their progenies with HCC - like features [J]. *J Hepatol*, 2014, 61 (6):1312 - 1320
- Dong R, Zheng S, Dong K. TERT promoter mutation during development of hepatoblastoma to hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2015, 62 (2):497
- Fan C, Dong L, Zhu N, *et al.* Isolation of siRNA target by biotinylated siRNA reveals that human CCDC12 promotes early erythroid differentiation [J]. *Leuk Res*, 2012, 36 (6):779 - 783

(收稿日期:2014 - 11 - 18)

(修回日期:2014 - 12 - 15)