

溃疡性结肠炎脾胃虚实证候核糖体蛋白基因表达研究

陈玉龙^{1,2} 陈蔚文^{1,3} 李茹柳¹ 林传权¹ 高小玲¹ 郭文峰¹

摘要 目的 研究健康人、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 脾虚证和湿热证患者核糖体蛋白 (ribosomal protein, RP) 基因表达差异情况, 为从蛋白合成角度理解“脾为气血生化之源”提供实验依据。
方法 制作 RP 基因芯片, 对 4 名健康人、4 例 UC 脾虚证和 4 例 UC 湿热证患者结肠黏膜进行检测, 应用 BRB-TOOL(3.9) 软件包进行数据分析, 对差异基因进行生物信息学分析。
结果 成功制作了包括 77 条 RP 基因, 2 条 RP 类似基因 (RPL26-like1、RPL7-like1) 的低密度芯片。UC (脾虚证 + 湿热证) 患者与健康人之间有 12 条差异基因, 全部为下调基因; 湿热证与健康人之间有 19 条差异基因, 全部呈下调趋势; 脾虚证与健康人有 3 条差异表达基因, 全部为下调基因; 脾虚证与湿热证有 6 条差异表达基因, 全部为上调基因。聚类分析显示健康人与 UC 患者样品可以根据本芯片的基因表达谱进行分类, 湿热证和脾虚证可以通过聚类分开。多个差异基因有共同转录调节因子。
结论 成功制作了 RP 基因芯片, UC 脾虚证和湿热证 RP 基因表达下调; 健康人、UC 脾虚证和 UC 湿热证都有各自相应的 RP 基因表达谱。

关键词 脾虚证; 湿热证; 基因芯片; 核糖体蛋白; 溃疡性结肠炎

Study on Ribosomal Protein Gene Expression in Patients with Ulcerative Colitis of Pi-asthenic Syndrome and Pi-sthenic Syndrome CHEN Yu-long, CHEN Wei-wen, LI Ru-liu, et al *Institute of Gastroenterology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510405)*

ABSTRACT Objective To study differential expression profiles of ribosomal protein (RP) genes in healthy subjects and ulcerative colitis (UC) patients of Pi-asthenic syndrome (PAS) and of dampness-heat syndrome (DHS), thus providing experimental bases for "Pi as the source of qi and blood" theory from the view of protein synthesis. **Methods** RP genes arrays were made. The mucous membrane of colon was detected in four UC patients of PAS (UC-PAS), four UC patients of DHS (UC-DHS), and four healthy subjects (N), and data analyzed using BRB-TOOL Software Package (3.9). Bioinformatics analyses were conducted in differential genes. **Results** Low-density RP gene chips were successfully produced, including 77 RP genes and two RP like genes (RPL26-like1 and RPL7-like1). There were twelve differential genes between UC (PAS + DHS) and N, all of which were down-regulated genes. There were nineteen differential genes between UC-DHS and N, all of which showed down-regulating tendency. There were three differential genes between UC-PAS and N, all of which were down-regulated genes. There were six differential genes between UC-PAS and UC-DHS, all of which were up-regulated genes. Cluster analysis showed that normal and UC samples of this chip can be classified according to gene expression profiles, and UC-PAS and UC-DHS can be classified by clustering. Various differential genes had a common transcription regulatory factor. **Conclusions** RP genes arrays were successfully produced. RP gene expressions were down-regulated in UC-PAS and UC-DHS. Corresponding gene expression profiles were shown in N, UC-PAS and UC-DHS.

KEYWORDS Pi-asthenic syndrome; dampness-heat syndrome; gene array; ribosomal protein; ulcerative colitis

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划重点项目 (No. 90209004); 广东省自然科学基金重点项目 (No. 05102323); 上海市教育委员会 E-研究院建设计划项目 (No. E03008)

作者单位: 1. 广州中医药大学脾胃研究所 (广州 510405); 2. 河南中医学院分子生物实验中心 (郑州 450008); 3. 上海市高校中医内科学 E-研究院, 上海中医药大学 (上海 201203)

通讯作者: 陈蔚文, Tel: 020 - 36585444, E-mail: piwei@gzhtcm.edu.cn

核糖体是细胞内负责蛋白质合成的重要细胞器,人的核糖体由 4 条 rRNA 和 80 种核糖体蛋白(ribosomal protein, RP) 构成。RP 是核糖体的重要组成部分,在核糖体的翻译过程中起重要的作用^[1]。本课题组利用基因芯片技术进行的临床研究发现^[2,3],脾虚证和湿热证存在多个 RP 基因下调趋向,RP 基因表达下调,说明脾虚证和湿热证可能存在蛋白质合成障碍。为了进一步验证脾虚证和湿热证 RP 基因下调这一发现,从蛋白合成角度为“脾为气血生化之源”提供实验依据,本实验制作 RP 基因低密度芯片,对健康人、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)脾虚证和湿热证患者结肠黏膜进行了检测,并对差异基因进行生物信息学分析。

资料与方法

1 临床资料

1.1 UC 诊断标准 参照 1993 年太原全国慢性非感染性肠道疾病学术研讨会讨论修订后的新标准(太原标准)^[4]。

1.2 中医辨证标准 UC 脾虚证和湿热证辨证标准,参考《中药新药临床研究指导原则》^[5]和 1993 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会第四届全国学术交流会《慢性非特异性溃疡性结肠炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准》^[4]。

1.3 健康志愿者选择标准 临床辨证无明显异常,舌象脉象正常,肠镜及病理检查结肠黏膜无明显病变。

1.4 纳入标准 (1)临床诊断为 UC;(2)肠镜检查诊断为 UC;病理观察符合 UC 的病理特点;(3)符合脾虚证或湿热证诊断标准;(4)签署知情同意书。

1.5 排除标准 (1)年龄 < 18 岁或 > 65 岁,妊娠或哺乳妇女,过敏体质者。(2)患有消化道其他器质性病变、心血管、脑血管、肝、肾、造血系统等严重原发性疾病及精神性疾病等。

1.6 一般资料 在广州中医药大学第一附属医院和中山大学第二附属医院收集 UC 脾虚证和湿热证患者。UC 脾虚证患者 4 例,其中男 2 例,女 2 例,年龄 29~73 岁,平均 54.75 岁,病程 1~17 年,平均 7.75 年;UC 湿热证患者 4 例,其中男 2 例,女 2 例,年龄 28~46 岁,平均 40.5 岁,病程 2~4 年,平均 2.75 年。健康自愿者 4 名,男 2 名,女 2 名,年龄 22~27 岁,平均 24 岁。

2 结肠黏膜采集

按照上述标准,由临床专家收集 UC 脾虚型、湿热型患者,于广州中医药大学第一附属医院和中山大学第

二附属医院肠镜室做肠镜检查。经肠镜下诊断后,钳夹降结肠部黏膜组织 3~4 块,每块约 2 mm × 2 mm × 2 mm,生理盐水(RNase-free)清洗后,取 1 块置于 3.6% 甲醛液中以备做病理切片,其余置于 RNAlater 中,液氮保存。

3 芯片制作

3.1 探针设计与合成

3.1.1 探针设计 从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/nucleotide/> 查找 RP 基因 mRNA 序列,应用 array designer 4.0 软件进行探针设计。选择标准矩阵设计,长度定为 58 mer, T_m 为 (85 ± 5) °C, Hairpin Maximum ΔG 为 -6.0 kcal/mol, self Dimer Maximum ΔG 为 -8.0 kcal/mol, run repeat Maximum length 为 5 bp, 为正义链探针。探针设计后,进入 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 进行在线比对,选取和对应基因 mRNA 序列比分值 > 90, 和人类其他基因 mRNA 序列比分值 < 40 的探针。

作为固定化的阳性对照序列 Hex, 其 5' 端修饰荧光素, 作为杂交的阳性对照的看家基因序列(Actinβ、GAPD、LDHA、RPS9) 和芯片系统的阳性对照 8 个酵母核酸序列由博奥生物工程技术公司提供。

3.1.2 探针合成 由上海英俊公司完成寡核苷酸探针合成。

3.2 寡核苷酸芯片的制备

3.2.1 芯片的打印 将合成好的寡核苷酸探针溶于 ddH₂O 中,调整浓度为 3 μg/μL, 然后取 6.5 μL 与等体积的 DMSO 混匀,并转移到 384 孔板中备用。把 oligo 探针用 SmartArray™ (Capital BioCorp, Beijing, China) 点制在 1 张 75 mm × 25 mm、经过氨基化修饰的载玻片上。点制在芯片上的探针还包括:人的 4 个看家基因(Actinβ、GAPD、LDHA、RPS9) 作为杂交阳性对照, Hex 作为点样阳性对照,点样溶液 50% DMSO 作为阴性对照,以及酵母的 8 个基因间序列作为外标。点阵示包括有 16 行, 18 列,点间距为 225 μm,点的直径约为 150 μm,每条探针在芯片上重复 3 次,每张玻片 4 个点阵。

3.2.2 芯片打印后的处理 将打印的芯片置于 3 × SSC 的水蒸汽上方约 5 s, 迅速将芯片置于 100 °C 烤箱中干燥约 1 min, 重复上述步骤 1 次。将芯片置于紫外交联仪中,调整总能量为 300 mJ 进行紫外交联。处理后的芯片置于干燥的暗盒中。

4 芯片杂交和数据处理

4.1 样品总 RNA 提取、核酸标记、杂交、扫描 应用 Trizol 法提取样品总 RNA, 取适量 RNA 采用核酸

定量分析仪和琼脂糖凝胶电泳检测质量,余 -80 ℃ 保存。

用逆转录法进行 Cy5-dCTP, Cy3-dCTP 荧光探针标记, 试验样品标记 Cy5-dCTP, 共同参照标记 Cy3-dCTP, 共同参照由乳腺癌、肝毒细胞瘤、宫颈腺癌、睾丸胚胎细胞瘤、脑胶质细胞瘤、黑色素瘤、脂肪瘤、淋巴瘤细胞瘤、成淋巴细胞非白血性白血病、B 淋巴细胞骨髓瘤等 10 个人肿瘤细胞系总 RNA 等量混合而成。

试验样品和共同参照配对杂交, 芯片用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪 (Capital BioCorp, Beijing, China) 进行扫描。

4.2 芯片数据分析 采用 LuxScan 3.0 图像分析软件 (Capital BioCorp, Beijing, China) 对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号, 点信号值为前景值中位数减去背景值中位数, 选取 60 000 > 信号值 > 400 点左右有效点。片间校正: 参考文献根据 cy5 和 cy3 总体信号的 global mean 对各芯片进行片间线性校正, 使得各张芯片的 global mean 相同^[6]。片内归一化: 应用看家基因对 cy5/cy3 比值做归一化处理。取每张芯片归一化后的 ratio 值, 应用 BRB-TOOL (3.90) 进行分析, 作双样本 *t* 检验。

结 果

1 探针设计

除 RPS17、RPS23、RPS24 没有合格的探针外, 共设计探针 77 条 RP 基因, 2 条 RP 类似基因 (RPL26-like1、RPL7-like1), 4 个看家基因探针、1 个 Hex 探针。

2 总 RNA 质量和芯片制作质量

经过检测 12 样品总 RNA 的 28 S 和 18 S 条带清晰, 28 S 条带约是 18 S 条带的 2 倍 (图 1), 说明 RNA 完整性较好。

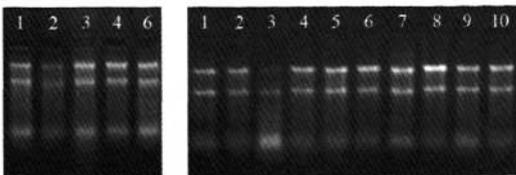
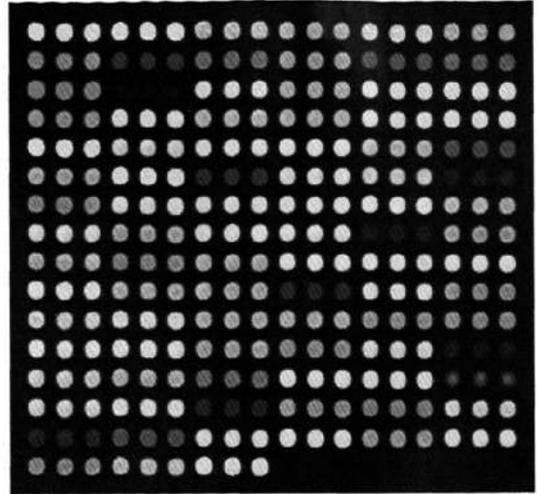


图 1 样品 RNA 电泳图

各矩阵 Hex、外标等阳性对照信号正常, 阴性对照检测为阴性; 看家基因重复性好, Ratio 值 CV 不超过 0.3; 无影响数据的污染, 漏点率不超过 3%; 检测率 > 80% (图 2)。



注: 第 1 行 1~12 列为看家基因, 第 1 行 13~18 列及第 2 行 1~18 列为外标阳性对照, 第 3 行 1~3 列为固化阳性对照, 4~6 列为阴性对照, 其他点为靶基因

图 2 基因杂交各点伪色图

3 差异表达基因的数量及上下调趋向

3.1 脾虚证与健康人差异表达基因比较 对 79 条差异基因进行双样本 *t* 检验, 差异基因设定标准: (1) $P < 0.05$, (2) $1.5 < \text{比值} < 0.67$, 必须满足 (1) (2) 条。结果: 脾虚证/健康人比值 < 1 的为下调基因, 比值 > 1 为上调基因。结果有 3 条差异基因, 全部为下调, 它们是 RPS6、RPL34、RPL26。

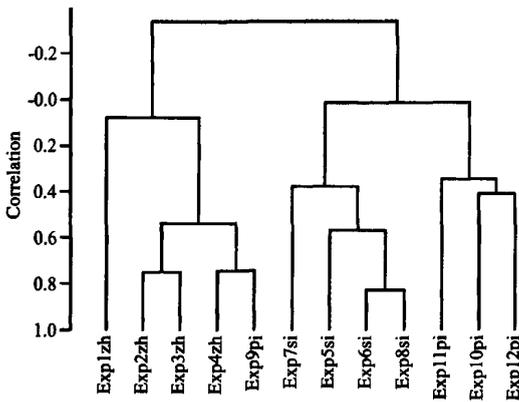
3.2 湿热证与健康人差异表达基因比较 检验方法和差异基因判定方法如 3.1, 湿热证/健康人比值 < 1 为下调基因, 比值 > 1 为上调基因, 结果发现, 有 19 条差异基因, 全部为下调基因。它们分别为 RPL34、RPL9、RPS27、RPS12、RPS28、RPS3a、RPL30、RPLP2、RPL26、RPL39、RPL41、RPS13、RPL37a、RPS27a、RPL36a、RPL31、RPL7、RPL8、RPL15。

3.3 脾虚证与湿热证差异表达基因比较 检验方法和差异基因判定方法如 3.1, 脾虚证/湿热证比值 < 1 为下调基因, 比值 > 1 为上调基因。结果发现, 有 6 条差异基因, 全部为上调基因 RPL9、RPS3a、RPS27、RPS12、RPL41、RPL34。

3.4 UC (脾虚证 + 湿热证) 与健康人比较差异表达基因 检验方法和差异基因判定方法如 3.1, UC 患者/健康人 < 1 为下调基因, 比值 > 1 为上调基因。结果有 12 条差异基因全部为下调基因, 它们是 RPL34、RPL9、RPS28、RPL26、RPLP2、RPL30、RPS12、RPS3a、RPL39、RPS27、RPL37a、RPL7。

4 样品层积聚类

采用层积聚类,对每张芯片比值以 genes 为中心, metric 为 centered correlation, linkage 为 average linkage, 对样品进行层积聚类(图 3)。由图 3 可以看出一个脾虚样品(pi1)和健康组聚为一起外,健康组和 UC(脾虚+湿热)各样品可以很好地通过聚类分开,说明健康和 UC 患者样品可以根据本芯片的基因表达谱进行分类。脾虚组和湿热组也可很好的通过聚类分开,说明两者在本芯片中有不同基因表达谱,可通过本基因表达谱对溃疡性结肠炎脾虚证和湿热证进行分类。



注:每张芯片 ratio 值以 genes 为中心, metric 为 uncentered correlation, linkage 为 average linkage, 对样品进行层积聚类, zh 为健康组, si 为湿热组, pi 为脾虚组

图 3 样品层级聚类

讨论

核糖体作为细胞内负责蛋白质合成的重要细胞器一直为人们所熟知。核糖体蛋白质根据来源于大小亚基分别命名为 RPL 和 RPS, 是核糖体的重要组成部分,在核糖体的翻译过程中起重要作用;例如对 rRNA 进行折叠,形成有功能的三维结构,在蛋白质合成过程中对核糖体的空间构象进行调整,在核糖体的结合位点上协同 rRNA 催化蛋白质的合成等^[7]。同时,核糖体蛋白还有许多核糖体外功能如细胞凋亡、增殖、转化等。本研究对健康人、UC 脾虚证和湿热证患者对人核糖体 77 条基因和 2 条核糖体蛋白假基因(80 条基因中 3 条基因没有特异探针)表达状况进行研究。

结果发现 UC 患者与健康人有不同的核糖体蛋白基因表达谱,除 1 例脾虚证外,能根据基因表达谱把样品很好地分开。从基因表达谱来看,UC 患者与健康人比较,有 12 条差异基因,皆呈下调趋势。

目前除有 1 篇用基因芯片检测到 UC 组与对照组比

较 RPL7 表达下调报道外^[8],尚未见有其他核糖体蛋白与 UC 关系研究的报道,本研究也发现该基因 UC 患者表达下调。作为核糖体重要组成部分的 RPL7 参与翻译起始因子结合、核糖体与内质网附着等多种作用,除此之外,该蛋白可能还与神经细胞分化、衰老、肿瘤发生密切相关^[9-11]。值得注意的是系统性红斑狼疮患者中常常有 RPL7 抗体存在^[12],说明该蛋白与免疫性疾病有密切关系。UC 的发生和发展与机体免疫系统紊乱密切相关,因此 RPL7 与 UC 的关系有必要深入研究。

UC 组分为脾虚 UC 和湿热 UC 两型,研究表明由于不同证型症候群之间的差异,两组有不同的基因表达谱,并能根据表达谱对两型样品能够很好地分类。

脾虚 UC 患者与健康人之间由 3 条差异基因,全部下调。聚类分析和基因表达相关分析显示,有 1 例脾虚 UC 基因表达情况与健康人很相近,这也可能是造成两者差异基因较少的缘故。3 条差异基因中,RPS6 是脾虚 UC 患者与健康人之间特有的表达差异基因(湿热 UC 和健康人该基因没有差异),有研究表明该基因表达蛋白具有蛋白激酶活性,是 mTOR 信号通路中的重要成员,为核糖体蛋白激酶 S6K 的底物,调控含有 5' TOP 结构的 mRNAs 的翻译起始。5' TOP mRNAs 占细胞总 mRNAs 的 20% 左右,编码多种蛋白翻译元件组分如核糖体蛋白、polyA 结合蛋白、延长因子 eEF2 等。因此 RPS6 能够调控着翻译元件的生物合成^[13]。脾虚证该基因表达下调,结合本课题组以往的研究,发现脾虚证多个核糖体蛋白基因下调这一现象,表明脾虚证患者可能存在有翻译元件的合成障碍,但尚需要进一步研究。

RPS6 和差异基因 RPL26 有共同转录调节因子 c-Myc,同时与本研究 UC 表现为下调 RPL8、RPS13 等多个基因有共同调节因子,也说明 RPS6 下调可能和其他核糖体基因下调有共同调节机制,这是核糖体蛋白基因转录的调节特点,虽然不同的核糖体蛋白还各有自己特有的调节机制^[14]。

UC 脾虚患者与健康人比较,如果单以 *t* 检验 $P < 0.05$ 作为差异基因筛选条件,则有 26 条差异基因,全部下调。其中 RPS8、RPL19、RPL6 在以前的研究中脾虚证与湿热证比较表达下调^[3]。有研究表明,缺乏必要的氨基酸饮食可导致 RPS8 和 RPL26 mRNA 表达减少及 RPS6 激酶 6 磷酸化降低^[15],同时禁食也可导致 RPS8 mRNA 下降^[16],说明这 2 条基因表达与饮食有密切关系。脾虚证患者常常出现饮食减少,或腹泻引起营养吸收不足,这是否可致 RPS8 表达下调,尚需进一步研究。

湿热 UC 患者与健康人之间有 19 条差异表达基

因,其中 RPL15 在慢性胃炎湿热证与健康人之间也为差异基因,且都表达为下调^[2]。有研究表明,RPL15 在胃癌和食管癌组织及多种胃癌细胞系中表达上调,RPL15 可以促进胃癌细胞,用 siRNA 技术降低该基因表达,阻滞了胃癌 SGC7901 细胞的生长及在裸鼠身上的成瘤作用^[17];但此基因在皮肤癌组织中与正常皮肤比较低表达^[18]。以上研究提示该基因与肿瘤的发生密切相关,可能涉及到细胞生长、增殖等多种机制,这可为研究该基因在 UC 湿热中下调机制提供一定参考,因为 UC 与结肠癌发生相关^[19]。

脾虚 UC 与湿热 UC 相比,有 6 条差异基因,全部为上调基因。在慢性胃炎脾虚与湿热差异基因比较中,差异基因中有 1 条核糖体基因,也表达为上调^[2],但与此处的差异基因不重复。不过,与湿热证比较核糖体蛋白基因在脾虚证表达上调这一现象尚需要进一步验证,其机制有待进一步研究。

综上所述,本研究设计和制作了合格的核糖体蛋白基因芯片,在对 UC 脾虚证和湿热证检测中,发现 UC 患者和健康人、UC 脾虚证和 UC 湿热证都各自有相应的核糖体蛋白基因表达谱,通过该芯片基因表达谱可以很好地对它们进行分类。在它们之间发现了一些差异表达基因,其中 UC 和健康人比较核糖体蛋白基因表达呈下调趋势,UC 脾虚证下调基因较少,但与以往研究有少量重复基因;UC 湿热证下调基因较多,UC 脾虚证和 UC 湿热证也有部分差异表达基因。这些差异表达基因有待进一步验证,其意义需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Denis Lafontaine, David Tollervey. The function and synthesis of ribosomes [J]. *Nature Rev*, 2001, 2(7): 514-520.
- [2] Chen YL, Chen WW, Wang YF, et al. Bioinformatics research of chronic superficial gastritis with spleen asthenic syndrome by gene arrays[J]. *Chin J Integr Med*, 2009, 15(5): 341-346.
- [3] 陈蔚文,王颖芳,劳绍贤,等. 脾气虚证患者基因差异表达研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(1):148-152.
Chen WW, Wang YF, Lao SX, et al. Profile of gene differential expression in chronic gastritis with deficiency of spleen-qi patient[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2008, 24(1): 148-152.
- [4] 江学良,权启镇,王志奎. 溃疡性结肠炎的诊断、分型及疗效标准[J]. *世界华人消化杂志*, 2000, 8(3):332-334.
Jiang XL, Quan QZ, Wang ZK. The diagnosis, typing, and efficacy standard of ulcerative colitis[J]. *World Chin J Dig*, 2000, 8(3):332-334.
- [5] 国家药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:129.
State Food and Drug Administration. Guiding principle of clinical research on new drugs of traditional Chinese medicine (trial) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2002:129.
- [6] Bolstad BM, Irizarry RA, Strand MA, et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(2):185-193.
- [7] Franceschi F, Duffy EM. Structure-based drug design meets the ribosome [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(7):1016-1025.
- [8] Toiyama Y, Mizoguchi A, Kimura K, et al. Persistence of gene expression changes in noninflamed and inflamed colonic mucosa in ulcerative colitis and their presence in colonic carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(33): 5151-5155.
- [9] van de Vijver MJ, He YD, van't Veer, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(25): 1999-2009.
- [10] Wu WC, Liu HW, Lin A. Human ribosomal protein L7 displays an ER binding property and is involved in ribosome-ER association[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(4): 651-657.
- [11] Seshadri T, Uzman JA, Oshima J, et al. Identification of a transcript that is down-regulated in senescent human fibroblasts. Cloning, sequence analysis, and regulation of the human L7 ribosomal protein gene[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(25): 18474-18480.
- [12] Donauer J, Wochner M, Witte E, et al. Autoreactive human T cell lines recognizing ribosomal protein L7[J]. *Int Immunol*, 1999, 11(2): 125-132.
- [13] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1926-1945.
- [14] Hu HY, Li XM. Transcriptional regulation in eukaryotic ribosomal protein genes[J]. *Genomics*, 2007, 90(4):421-423.
- [15] Anthony TG, Reiter AK, Anthony JC. Deficiency of dietary EAA preferentially inhibits mRNA translation of ribosomal proteins in liver of meal-fed rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(3): E430-439.
- [16] Anand P, Gruppuso PA. The regulation of hepatic protein synthesis during fasting in the rat [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16):16427-16436.
- [17] Wang H, Zhao LN, Li KZ. Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6:91.
- [18] Dang C, Gottschling M, Manning K. Identification of dysregulated genes in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(3):513-519.
- [19] Velayos FS, Loftus EV Jr, Jess T, et al. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: a case-control study [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7): 1941-1949.

(收稿:2010-05-17 修回:2011-01-17)