

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130907

MADD 抑制人前列腺癌 PC-3 细胞凋亡作用的研究

崔 崎, 韩 玲

(新疆医科大学附属中医医院泌尿外科, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】目的:检测含促分裂素原活化蛋白激酶激活死亡结构域蛋白(MAPK-activating death domain-containing protein, MADD)在前列腺癌组织及良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)组织中的表达并探讨其对前列腺癌细胞凋亡的作用。**方法:**收集 40 例人前列腺癌及 35 例 BPH 组织,免疫组化染色技术检测 MADD 的表达情况;Western blot 技术检测 MADD 在人前列腺癌细胞株(LNCaP、PC-3 和 PC-3M)和良性前列腺细胞株(BPH1)中的表达情况;应用 MADD siRNA 转染人前列腺癌 PC-3 细胞,Western blot 检测其 MADD、caspase-3 和 PARP 表达,MTT 和流式细胞仪检测细胞增殖和凋亡变化。**结果:**MADD 在前列腺癌组织中的表达高于 BPH 组织($P=0.000$);人前列腺癌细胞株 LNCaP、PC-3M 和 PC-3 中 MADD 表达水平明显高于良性前列腺细胞株 BPH1($P=0.009$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.000$),沉默 PC-3 细胞中 MADD 表达,导致活化型 caspase-3 和 PARP 降解产物表达增加,并诱导 PC-3 细胞凋亡增加和增殖活力降低($P=0.000$)。**结论:**前列腺癌组织中 MADD 表达明显增高,MADD 在前列腺癌中可能作为凋亡抑制因子发挥功能。

【关键词】含促分裂素原活化蛋白激酶激活死亡结构域蛋白;前列腺癌;良性前列腺增生;凋亡;增殖

【中国图书分类法分类号】R737.25

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-27

Role of MAPK-activating death domain-containing protein in inhibiting apoptosis of human prostate cancer PC-3 cells

CUI Qi, HAN Ling

(Department of Urology, the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of MAPK-activating death domain-containing protein(MADD) in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia(BPH) tissues and its effects on apoptosis of prostate cancer cells. **Methods:** Totally 40 samples of surgically resected prostate cancer tissues and 35 samples of BPH tissues were collected and MADD expressions in the samples were detected using immunohistochemistry. MADD protein expressions in benign prostatic cell line BPH1 and prostate cancer cell lines (LNCaP, PC-3 and PC-3M) were detected by Western blot. MADD siRNA was transfected into PC-3 cells, MADD, caspase-3 and PARP expression, cell viability and apoptosis were analyzed by Western blot, MTT and flow cytometry. **Results:** Expressions of MADD in prostate cancer tissues were significantly upregulated compared with those of the BPH tissues($P=0.000$). Expressions of MADD in prostate cancer cell lines LNCaP, PC-3M and PC-3 were obviously higher than those in benign prostatic cell line BPH1($P=0.009$, $P=0.001$, $P=0.000$, respectively). Knockdown of MADD in PC-3 cells enhanced expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP, as well as decreased cell viability and increased cell apoptosis($P=0.000$, respectively). **Conclusions:** Expression of MADD increases obviously in prostate cancers. MADD may act as an inhibitor of apoptosis as well as a therapeutic target of prostate cancer.

【Key words】MAPK-activating death domain-containing protein; prostate cancer; benign prostatic hyperplasia; apoptosis; proliferation

前列腺癌常常表现为雄性激素依赖的肿瘤,对雄激素剥夺治疗诱导的生长阻滞和凋亡敏感^[1]。尽管雄激素剥夺治疗最初是有效的,但是其常常导致肿瘤进展成为雄性激素非依赖表型,而这种表型的肿瘤一般对其他的治疗方案也抵抗。同样,雄性激

素非依赖表型常常是晚期前列腺癌的标志,是目前肿瘤治疗的一个难题^[1]。肿瘤向雄性激素非依赖表型进展的一个主要标志是凋亡抵抗显著增加,凋亡抵抗是由于抗凋亡基因表达上调引起的,而这些基因产物被认为是促进雄性激素非依赖表型进展的关键因子^[1-3]。含促分裂素原活化蛋白激酶激活死亡结构域蛋白(MAPK-activating death domain-containing protein, MADD)是胰岛素瘤-胰高血糖素瘤克隆

作者介绍:崔 崎, Email: cuiqi-xj@126.com,

研究方向:泌尿外科。

通信作者:韩 玲, Email: hl_hblin@163.com。

20 (insulinoma-glucagonoma clone 20, IG20) 基因的一个剪接变体, 对于肿瘤细胞存活和抵抗肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 诱导的凋亡十分重要^[4]。MADD 在肺腺癌、甲状腺癌、卵巢癌和乳腺癌等组织中高表达, 并通过抑制凋亡来促进肿瘤细胞生存^[4-5], 但 MADD 在前列腺癌中的表达情况及其功能研究国内外尚无公开报道, 本实验通过检测 MADD 在前列腺癌组织中的表达及对 PC-3 细胞增殖和凋亡的影响, 初步探讨 MADD 在前列腺癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

40 例前列腺癌组织及 35 例良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 组织来源于本院手术切除标本, 所有肿瘤患者术前均未行放射、化疗及射频消融治疗, 所有组织标本经术后病理学证实为前列腺癌或 BPH 组织。所有标本于术中离体 30 min 内取材, 经 10% 福尔马林溶液固定, 石蜡包埋、切片备用。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学染色 兔抗人 MADD 多克隆抗体 (sc-98434, SANTA CRUZ, USA), 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。对石蜡块进行 4 μm 连续切片制片。经过脱蜡过程后, 枸橼酸盐缓冲液进行热抗原修复, 30 ml/L H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶, 100 ml/L 山羊血清封闭, 将以 1:100 比例稀释的兔抗人 MADD 加于标本后, 置于湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。以 PBS 取代一抗为阴性对照。滴加生物素标记的山羊抗兔工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 20 min。滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液, 孵育 30 min。滴加 DAB 显色, 苏木精轻度复染, 梯度脱水至透明。显微镜下观察、成像系统拍照, 统计分析实验结果。用染色强度联合阳性细胞百分比进行评分: 染色强度分为 4 等级: 0 分, 阴性; 1 分, 弱阳性; 2 分, 中度; 3 分, 强阳性; 阳性细胞百分比分级如下: 阳性细胞 $\leq 5\%$ = 0 分, 6%~25% = 1 分, 26%~50% = 2 分, 51%~75% = 3 分, >75% = 4 分。染色强度和阳性细胞百分比评分相乘 ≥ 1 分则认为 MADD 蛋白阳性表达。

1.2.2 细胞培养 人良性前列腺细胞系 BPH1 和前列腺癌细胞系 LNCaP、PC-3 和 PC-3M 购自于中国科学院生物化学与细胞生物研究所。细胞培养于含 100 ml/L 胎牛血清 (四季青, 浙江天杭生物科技有限公司) 的改良型 RPMI1640 培养基 (HyClone) 中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 ml/L CO_2 细胞培养箱中, 饱和湿度下培养。稳定传代 2、3 代后, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 Western blot 兔抗人 caspase-3 多克隆抗体 (sc-7148) 和兔抗人 PARP 多克隆抗体 (sc-7150) 购自美国 SANTA CRUZ 公司。取转染 48 h 后的 PC-3 细胞, 弃培养基, 用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次后加入 RIPA 裂解液充分裂解, 15 000 r/min 离心 15 min 后取上清, BCA 法测定总蛋白浓度。电泳前将蛋白样品按 5:1 比例加入 6 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸 5 min 后即用于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 135 V 电压湿转 2 h。5% 脱脂奶粉 (TBST 溶解) 室温封闭 1 h 后加入适当比例稀释 (1:500~1:2 500) 的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次后加入适当 (1:10 000) 浓度的二抗, 室温孵育 1.2~2.0 h。TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次。暗室内浸入 ECL 液显色, 并使胶片曝光, 全自动 X 线洗片机洗片。

1.2.4 RNA 干扰 MADD siRNA (5'-GUU-UCA-AAG-CAG-GAU-GAU-G-dTdT-3') 及其阴性对照购自上海吉玛制药有限公司; TurboFect Transfection Reagent 购自美国 Thermo Scientific 公司。实验分组: (1) MADD 干扰组 (MADD siRNA), 加入化学合成的 MADD siRNA, 脂质体和培养液; (2) 阴性对照组 (control), 加入无义序列 siRNA (NC), 脂质体和培养液; (3) 空白组 (mock), 未做任何处理。实验步骤: 用无抗生素、含 10% FBS 的改良型 RPMI1640 培养液将细胞接种于 6 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养至细胞融合度约 70%, 更换新鲜的无抗生素、无 FBS 的改良型 RPMI1640 培养液。A 液: 50 μl 改良型 RPMI1640 培养液, 加入终浓度 100 nmol/L MADD siRNA 4 μl 匀混; B 液: 50 μl 改良型 RPMI1640 培养液, 加入 16 μl TurboFect Transfection Reagent, 轻混后室温放置 5 min。将上述 A 和 B 液混合, 室温放置 20 min, 加入到细胞中, 并补充改良型 RPMI1640 培养液至总体积 2 ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养。

1.2.5 qRT-PCR MADD 引物 (上游: 5'-CTGCAGGTGACC-CTGGAAGGGATC-3'; 下游: 5'-TGTACCCGGGTCAGCTAG-AGACAGGCC-3') 以及 β -actin 内参引物 (上游: 5'-AGCGA-GCATCCCCAAAGTT-3'; 下游: 5'-GGGCACGAAGGCTCA-TCATT-3') 由上海生工生物公司合成。RNA Fastagen 200 总 RNA 提取试剂盒购于上海飞捷生物技术有限公司, 按照说明书步骤提取收集细胞中的总 RNA, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间的 RNA 标本进行逆转录。使用 Ferments 逆转录试剂盒 (Ferments, USA) 合成 cDNA, 按照说明书配制反应液 12 μl , 65 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 反应, 冰上冷却后, 加相应试剂至 20 μl , 25 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。将获得的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。Real-time PCR 反应体系: 依照 real-time PCR 试剂盒 [SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) Kit, TaKaRa, Japan] 说明书, 20 μl 反应体系, 每个样本均做 4 个复孔, 应用 ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Bio-systems, USA) 进行 PCR 扩增。反应条件 50 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min, 扩增 40 个循环。60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时采集荧光信号, 反应结束后直接得到样本的域值循环数, 每一标本均计算平均值, 通过平均值计算

相对含量。MADD 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 Annexin-V-FLUOS 凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司。PC-3 细胞转染 MADD siRNA 36 h 后,用 PBS 洗涤细胞 1 次,再用胰酶消化液解离细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清收集细胞。用 PBS 重新悬浮细胞,并计数。取 $(1\sim5) \times 10^5$ 个细胞悬浮液,1 500 r/min,5 min 离心后弃上清,加入 500 μ l 的 1 $\times$ 结合缓冲液。加入 5 μ l Annexin V-FITC,再加入 10 μ l 碘化丙啶,移液器轻轻吹打混匀。在室温下,避光反应 5~15 min,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.2.7 MTT MTT 购自美国 Roche 公司。离心、收集 PC-3 细胞,用 RPMI1640 培养基重悬制成单细胞悬液。调节细胞密度约为 2×10^5 个/ml,以 200 μ l /孔接种于 96 孔板。96 孔板的左上孔设为空白孔,只加培养基,不加 MTT 及细胞,用于设备调零,每组设 6 个复孔。每孔加 5 mg/ml MTT 溶液 20 μ l,继续避光培养 4 h,弃上清,每孔加 DMSO 150 μ l,37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 20 min 至颗粒溶解。于酶标仪上测定各孔 570 nm 的吸光度(absorbance, A)值,计算各处理组细胞活性;细胞活性=实验组 A 均值/对照组 A 均值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料在文中以 $\bar{x} \pm s$ 描述,均通过正态性检验。2 组间比较采用成组 t 检验 (Stterthwaite 校正 t 检验),3 组间比较采用单因素方差分析及两两比较 LSD- t 检验。取检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 前列腺癌及 BPH 组织中 MADD 的表达

免疫组化染色显示 MADD 在前列腺癌组织中的表达水平 ($6.12 \pm 0.42, n=40$) 较之对应的 BPH 组织 ($2.24 \pm 0.18, n=35$) 有统计学意义 ($t=53.12, P=0.000$, Stterthwaite 校正 t 检验)。MADD 蛋白主要定位在胞质和胞膜 (图 1)。

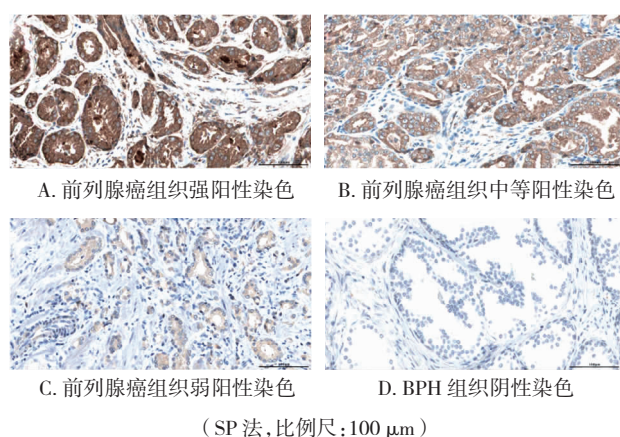


图 1 MADD 在前列腺癌及 BPH 组织中的免疫组化染色

Fig.1 Immunohistochemical staining of MADD in prostate cancer tissues and BPH tissues

2.2 BPH1、LNCaP、PC-3M 和 PC-3 细胞中 MADD 的表达

人良性前列腺细胞系 BPH1 中 MADD 的表达水平 (0.08 ± 0.01) 明显低于前列腺癌细胞系 LNCaP (0.23 ± 0.04)、PC-3M (0.29 ± 0.06) 和 PC-3 (0.41 ± 0.08) (图 2), 各组细胞间比较差异具有统计学意义 ($F=19.308, P=0.001$), BPH1 细胞与 LNCaP、PC-3M 和 PC-3 细胞间两两比较差异均有统计学意义 ($P=0.009, P=0.001, P=0.000$)。

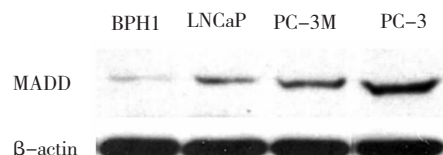


图 2 MADD 在 BPH1、LNCaP、PC-3M 和 PC-3 细胞中的表达水平

Fig.2 MADD expressions in BPH1, LNCaP, PC-3M and PC-3 cells

2.3 siRNA 沉默 PC-3 细胞中 MADD 表达

PC-3 细胞转染 MADD siRNA 后, qRT-PCR 及 Western blot 检测干扰效率, 结果显示, 与空白组和阴性对照组比较, 人前列腺癌细胞系 PC-3 转染 siRNA 后 MADD mRNA 及蛋白的表达水平明显降低 (图 3), 各组间比较具有统计学差异 ($F=172.38, P=0.000; F=267.45, P=0.000$), MADD 干扰组与空白组和阴性对照组组间两两比较差异均有统计学意义 ($P=0.000$)。

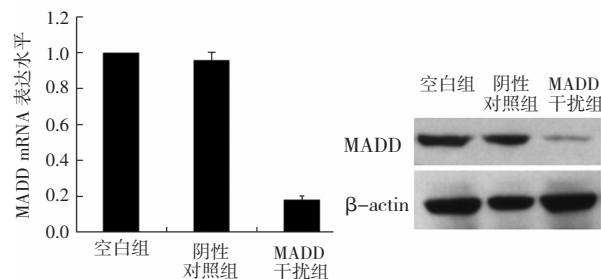
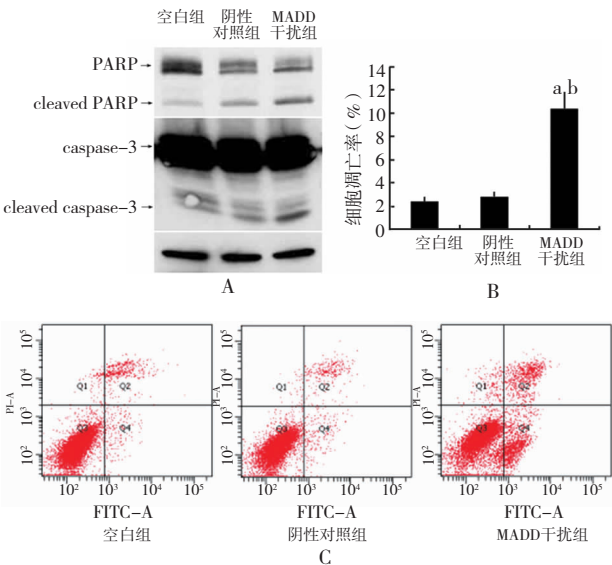


图 3 PC-3 细胞转染 MADD siRNA 后导致 MADD mRNA 及蛋白表达下调 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Reduction of MADD mRNA and protein expression after the transfection of PC-3 cell with siRNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4 沉默 MADD 导致细胞凋亡率增加

研究表明 MADD 与凋亡抵抗相关, 为了验证 MADD 与前列腺癌细胞凋亡的相关性, PC-3 细胞转染 MADD siRNA 36 h 后, Western blot 检测发现实验组细胞凋亡活化型 caspase-3 (cleaved caspase-3) 和 PARP 降解产物 (cleaved PARP) 表达水平较另外 2 组明显升高 (图 4A), 进一步流式细胞仪检测发现与空白组及阴性对照组相比细胞凋亡率增加, 两两比较显示: MADD 干扰组和空白组间差异有统计学意义, MADD 干扰组和阴性对照组间差异也有统计学意义 ($P=0.000$), 参见图 4B、4C 及表 1。



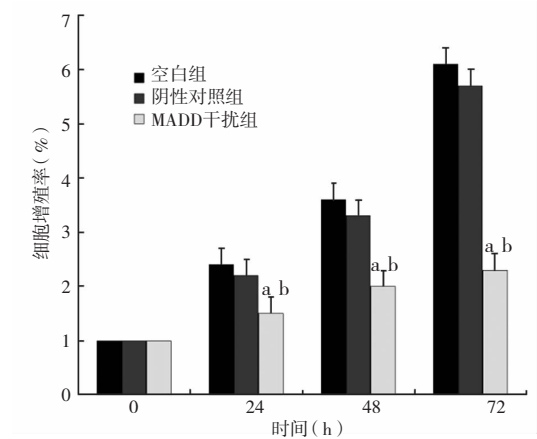
A. 沉默 MADD 导致活化型 caspase-3 和 PARP 降解产物表达增加;B 和 C.沉默 MADD 导致细胞凋亡率增加; $\bar{x} \pm s, n=6$, a, 与空白组相比, $P < 0.05$; b. 与阴性对照组相比, $P < 0.05$

图 4 MADD 表达下调导致 PC-3 细胞凋亡增加

Fig.4 Increase of PC-3 cell apoptosis induced by MADD expression reduction

2.5 沉默 MADD 导致细胞增殖率降低

为了进一步验证 MADD 是否促进前列腺癌细胞增殖, MADD siRNA 转染 PC-3 细胞, MTT 检测转染 24、48 h 和 72 h 后细胞增殖活力变化, 结果显示实验组细胞增殖率较空白组和阴性对照组降低 ($P < 0.05$, 图 5、表 2~4)。



$\bar{x} \pm s, n=6$; a, 与空白组相比, $P < 0.05$; b. 与阴性对照组相比, $P < 0.05$

图 5 MADD 表达下调导致 PC-3 细胞活力和增殖率降低

Fig.5 Decreases of PC-3 cell viability and proliferation rate induced by MADD expression reduction

表 1 空白组、阴性对照组和 MADD 干扰组细胞凋亡率的比较

Tab.1 Comparison of cell apoptosis rates in mock, control siRNA and MADD siRNA groups

组别	例数 (n)	单因素方差分析		多重比较 (LSD-t) 法	
		$\bar{x} \pm s$	F、P 值	组合	P 值
空白组	6	2.2 ± 0.2	599.095, 0.000	空白组 vs. 阴性对照组	0.430
阴性对照组	6	2.7 ± 0.3		空白组 vs. MADD 干扰组	0.000
MADD 干扰组	6	10.7 ± 1.8		阴性对照组 vs. MADD 干扰组	0.000

表 2 空白组、阴性对照组和 MADD 干扰组细胞 24 h 增殖率的比较

Tab.2 Comparison of 24 h cell proliferation rates in mock, control siRNA and MADD siRNA groups

组别	例数 (n)	单因素方差分析		多重比较 (LSD-t) 法	
		$\bar{x} \pm s$	F、P 值	组合	P 值
空白组	6	2.3 ± 0.2	169.754, 0.000	空白组 vs. 阴性对照组	0.731
阴性对照组	6	2.1 ± 0.3		空白组 vs. MADD 干扰组	0.000
MADD 干扰组	6	1.5 ± 0.3		阴性对照组 vs. MADD 干扰组	0.000

表 3 空白组、阴性对照组和 MADD 干扰组细胞 48 h 增殖率的比较

Tab.3 Comparison of 48 h cell proliferation rates in mock, control siRNA and MADD siRNA groups

组别	例数 (n)	单因素方差分析		多重比较 (LSD-t) 法	
		$\bar{x} \pm s$	F、P 值	组合	P 值
空白组	6	3.5 ± 0.3	574.726, 0.000	空白组 vs. 阴性对照组	0.130
阴性对照组	6	3.3 ± 0.2		空白组 vs. MADD 干扰组	0.000
MADD 干扰组	6	1.9 ± 0.2		阴性对照组 vs. MADD 干扰组	0.000

表 4 空白组、阴性对照组和 MADD 干扰组细胞 72 h 增殖率的比较

Tab.4 Comparison of 72 h cell proliferation rates in mock, control siRNA and MADD siRNA groups

组别	例数 (n)	单因素方差分析		多重比较 (LSD-t) 法	
		$\bar{x} \pm s$	F、P 值	组合	P 值
空白组	6	6.2 ± 0.4	796.661, 0.000	空白组 vs. 阴性对照组	0.277
阴性对照组	6	5.7 ± 0.3		空白组 vs. MADD 干扰组	0.000
MADD 干扰组	6	2.3 ± 0.2		阴性对照组 vs. MADD 干扰组	0.000

3 讨 论

凋亡抵抗是肿瘤的重要标志之一^[6],在前列腺癌中多种机制参与其中,包括死亡受体介导的凋亡抵抗^[7]。死亡受体的配体中 TRAIL 被认为是一个有潜力的肿瘤治疗靶点,因为其可以选择性诱导变异细胞凋亡而不影响正常细胞。TRAIL 在肿瘤细胞中与死亡受体 4(death receptor 4, DR4)及 5(DR5)结合,导致死亡受体低聚反应并募集包含 Fas 相关死亡结构域蛋白(fas associated death domain containing protein, FADD)和 procaspase-8^[8], procaspase-8 被诱导激活分裂形成 caspase-8,进一步激活 caspase-3 而导致细胞死亡。然而前列腺癌细胞抵抗 TRAIL 诱导的凋亡,这种抵抗可能是因为死亡受体和下游 caspase 激活效应分子表达下调以及抗凋亡因子表达上调所致^[9-11]。研究表明在肿瘤细胞中 MADD 高表达,其结合 DR4 和 DR5 抑制 FADD 向死亡受体募集,进一步研究发现 MADD 被沉默后, FADD 更容易向死亡受体募集从而诱导凋亡^[12-13]。

研究已经证实 MADD 是一个抗凋亡蛋白,其在肿瘤组织和细胞中表达升高, MADD 在甲状腺癌、卵巢癌和宫颈癌中与 DR4 和 DR5 结合从而抵抗 TRAIL 诱导的凋亡^[12-15]。然而 MADD 在前列腺癌中的表达及对前列腺癌凋亡的影响尚不清楚,本课题通过临床组织标本研究发现 MADD 在前列腺癌组织中表达水平高于对应的 BPH 组织,进一步研究还发现 MADD 在人良性前列腺细胞株 BPH1 中表达水平明显低于前列腺癌细胞株 LNCaP、PC-3 和 PC-3M,这与 MADD 在其他肿瘤中的表达趋势一致。

沉默 MADD 表达可以增强细胞自发死亡并且增加 caspase-8 的活性从而诱导凋亡^[16-18],为了进一步验证 MADD 是否参与前列腺癌细胞的凋亡抵抗,本研究采用 siRNA 技术特异性沉默 MADD, Western blot 检测凋亡标志物活化型 caspase-3 和 PARP 降解产物明显增加, MTT 和流式细胞仪检测发现 PC-3 前列腺癌细胞增殖活力降低和细胞凋亡率增加,提示 MADD 在前列腺癌中也是一种抗凋亡蛋白,但 MADD 在前列腺癌中的抗凋亡机制尚需进一步研究。

综上所述, MADD 在前列腺癌中高表达,功能学研究提示其可能参与前列腺癌细胞的凋亡抵抗,提示 MADD 可能成为前列腺癌靶向治疗的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Gleave M, Miyake H, Chi K. Beyond simple castration; targeting the molecular basis of treatment resistance in advanced prostate cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 56(s1): 47-57.
- [2] Miyake H, Nelson C, Rennie P S, et al. Overexpression of insulin-

like growth factor binding protein-5 helps accelerate progression to androgen-independence in the human prostate LNCaP tumor model through activation of phosphatidylinositol 3'-kinase pathway[J]. Endocrinology, 2000, 141(6): 2257-2265.

[3] Rocchi P, So A, Kojima S, et al. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(18): 6595-6602.

[4] 魏玉平, 吴金香, 郭元芳, 等. MADD 在肺腺癌组织中的表达及对肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(4): 354-357.

Wei Y P, Wu J X, Guo Y F, et al. Expression of MADD in lung adenocarcinoma tissues and its effects on proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2012, 28(4): 354-357.

[5] Turner A, Li LC, Pilli T, et al. MADD knock-down enhances doxorubicin and TRAIL induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Plos one, 2013, 8(2): e56817.

[6] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer; the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[7] Voelkel-Johnson C. TRAIL-mediated signaling in prostate, bladder and renal cancer[J]. Nat Rev Urol, 2011, 8(8): 417-427.

[8] Bodmer J L, Holler N, Reynard S, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(4): 241-243.

[9] Ashkenazi A, Herbst R S. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists[J]. J Clin Invest, 2008, 118(6): 1979-1990.

[10] Schattenberg J M, Schuchmann M, Galle P R. Cell death and hepatocarcinogenesis: dysregulation of apoptosis signaling pathways[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(s1): 213-219.

[11] Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(3): 228-237.

[12] Mulherkar N, Prasad K V, Prabhakar B S. MADD/DENN splice variant of the IG20 gene is a negative regulator of caspase-8 activation. knockdown enhances TRAIL-induced apoptosis of cancer cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(16): 11715-11721.

[13] Mulherkar N, Ramaswamy M, Mordt D C, et al. MADD/DENN splice variant of the IG20 gene is necessary and sufficient for cancer cell survival[J]. Oncogene, 2006, 25(47): 6252-6261.

[14] Li L C, Jayaram S, Ganesh L, et al. Knockdown of MADD and c-FLIP overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cells[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 205(4): 362.e12-25.

[15] Subramanian M, Pilli T, Bhattacharya P, et al. Knockdown of IG20 gene expression renders thyroid cancer cells susceptible to apoptosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(4): 1467-1471.

[16] Li P, Jayarama S, Ganesh L, et al. Akt-phosphorylated mitogen-activated kinase-activating death domain protein (MADD) inhibits TRAIL-induced apoptosis by blocking Fas-associated death domain (FADD) association with death receptor 4[J]. J Biol Chem, 2010, 285(29): 22713-22722.

[17] Bi W, Wei Y, Wu J, et al. MADD promotes the survival of human lung adenocarcinoma cells by inhibiting apoptosis[J]. Oncol Rep, 2013, 29(4): 1533-1539.

[18] Li L C, Jayarama S, Pilli T, et al. Down-modulation of expression, or dephosphorylation, of IG20/MADD in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant thyroid cancer cells makes them susceptible to treatment with this ligand[J]. Thyroid, 2013, 23(1): 70-78.

(责任编辑: 冉明会)