

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130914

BIRC6 在肝细胞癌中的表达及其对肝癌细胞凋亡的影响

蒋金伟, 杨晓燕

(浙江省杭州市下沙医院普外科, 杭州 310018)

【摘要】目的:检测 baculoviral IAP repeat-containing 6(BIRC6)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织及癌旁组织中的表达情况并探讨其在 HCC 中的功能。**方法:**收集 40 例 HCC 及对应癌旁组织,运用 qRT-PCR 及免疫组化染色技术检测 BIRC6 在 HCC 及对应癌旁组织中的表达情况;qRT-PCR 技术检测人正常肝细胞株 LO2、HCC 细胞株 HepG2 和 SMMC-7721 中 BIRC6 mRNA 表达;应用 BIRC6 siRNA 转染人 HCC 细胞 SMMC-7721,通过 MTT 和流式细胞仪检测转染后细胞活力和细胞凋亡变化。**结果:**BIRC6 在 HCC 组织中的表达高于对应的癌旁组织($P=0.004$),HCC 组织中 BIRC6 蛋白高表达与较大肿瘤体积(>5 cm)和高 TNM 分期相关($P=0.029$; $P=0.002$);正常肝细胞株 LO2 中 BIRC6 mRNA 表达水平明显低于 HCC 细胞株 HepG2 和 SMMC-7721($P=0.000$),下调 BIRC6 表达导致 SMMC-7721 细胞活力降低和细胞凋亡增加($P=0.000$)。**结论:**BIRC6 高表达与 HCC 的恶性临床病理特征相关,BIRC6 在 HCC 中可能作为凋亡抑制因子发挥功能。

【关键词】BIRC6;肝细胞癌;凋亡;临床意义**【中国图书分类法分类号】**R735.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-03-26

Expressions of BIRC6 in hepatocellular carcinoma and their effects on apoptosis of hepatocellular carcinoma cell

JIANG Jinwei, YANG Xiaoyan

(Department of Surgery, Xiasha Hospital of Hangzhou)

【Abstract】Objective: To investigate the expressions of baculoviral IAP repeat-containing 6(BIRC6) and their role in hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods:** Forty samples of surgically resected HCC tissues and corresponding adjacent tissues were collected and BIRC6 expressions in HCC tissues and corresponding adjacent tissues were detected using qRT-PCR and immunohistochemistry. BIRC6 mRNA expressions in normal liver cell line(LO2) and HCC cell lines(HepG2 and SMMC-7721) were detected using qRT-PCR. BIRC6 siRNA was transfected into SMMC-7721 cells and cell viability and apoptosis were analyzed by MTT and flow cytometry. **Results:** Expressions of BIRC6 in HCC tissues were significantly upregulated compared with those in corresponding adjacent tissues ($P=0.004$). Clinicopathological evaluation suggested that BIRC6 high-expression was associated with large tumor size(>5 cm) and advanced TNM stage($P=0.029$; $P=0.002$). Expressions of BIRC6 mRNA were obviously lower in LO2 than in HepG2 and SMMC-7721($P=0.000$). siRNA suppressed expression of BIRC6 in SMMC-7721 cells decreased cell viability and increased cell apoptosis ($P=0.000$). **Conclusions:** High-expression of BIRC6 correlates with poor clinicopathological characteristics in HCC and BIRC6 may act as an inhibitor of apoptosis as well as a therapeutic target of HCC.

【Key words】 baculoviral IAP repeat-containing 6; hepatocellular carcinoma; apoptosis; clinical significance

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),简称肝癌,是最常见的肝脏原发性恶性肿瘤,全世界每年大约有 100 万人死于 HCC。尽管手术切除和肝移植已经显著改善小 HCC 及无转移 HCC 患者的生存时间,但是晚期 HCC 患者的预后仍然较差^[1]。Baculoviral IAP repeat-containing 6(BIRC6)是凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis protein, IAP)家族的一员,大

小约 528 kD。BIRC6 促进蛋白酶体降解促凋亡蛋白 caspase-9、SMAC/DIABLO 和 HTRA2/OMI^[2-5],同时 BIRC6 是胞质分裂的关键调节因子,从而在细胞增殖中发挥重要作用^[6]。最近的研究发现 BIRC6 在神经胶质瘤、肺癌、宫颈癌、纤维肉瘤、骨肉瘤、乳腺癌和结肠癌细胞中发挥凋亡抵抗功能^[3-12],但 BIRC6 在 HCC 中的表达情况及其功能研究国内外少有报道,本实验通过检测 BIRC6 在 HCC 及对应癌旁组织中的表达情况,并在 HCC 细胞中敲除 BIRC6 表达

作者介绍:蒋金伟, Email: fuxuankai@126.com,

研究方向:肝胆胰胃肠外科。

从而研究其功能,初步探讨 BIRC6 在 HCC 发生、发展中的作用,为 HCC 治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 标本来源

HCC 及对应癌旁组织来源于本院手术切除标本,共 40 例,其中男 33 例,女 7 例,年龄 31~69 岁,平均年龄(52.0 ± 3.5)岁。所有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肝细胞癌。所有标本于术中离体 30 min 内取材,1 份立即置入液氮中保存,另 1 份经 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 qRT-PCR BIRC6 引物(上游:5'-CACCCAGGTCTCCGATGAAC-3';下游:5'-TTGTTGACACTCTCAGCACAC-3')以及 β -actin 内参引物(上游:5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3';下游:5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3')由上海生工生物公司合成。按照 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)说明书步骤提取收集组织和细胞中的总 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(EXPRESS SYBR GreenERTM mRNA qRT-PCR Kit, Invitrogen, USA)说明书, 20 μL 反应体系,每个样本均做 4 个复孔。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。BIRC6 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算。

1.2.2 免疫组织化学染色 兔抗人 BIRC6 多克隆抗体(Novus Biologicals, 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 BIRC6 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 BIRC6 蛋白阳性表达。

1.2.3 细胞培养 人正常肝细胞系 LO2、HCC 细胞系 HepG2 和 SMMC-7721 购自于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。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。

1.2.4 RNA 干扰 BIRC6 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技术有限公司; 脂质体(Lipofectamine™ 2000)购自美国 Invitrogen 公司。用脂质体法瞬时转染 HCC 细胞 SMMC-7721。实验分组: (1) BIRC6 干扰组, 加入化学合成的 BIRC6 siRNA, 脂质体和培养液; (2) 阴性对照组, 加入无义序列 siRNA(NC), 脂质体和培养液。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: 500 μL 改良型 RPMI1640 培养液, 加入终浓度 100 nmol/L BIRC6 siRNA 匀混; B 液: 500 μL 改良型 RPMI1640 培养液, 加入 15 μL 脂质体(Lipofectamine™ 2000), 轻混后室温放置 5 min。将上述 A 液和 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 培养 6 h 后, 更换无抗生素、含 10% FBS 的改良型 RPMI1640 继续培养, 每孔总体积 2 ml。

1.2.5 MTT MTT 购自美国 Roche 公司。离心、收集 SMMC-7721 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 μL /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 μL , 继续避光培养 4 h, 弃上清, 每孔加 DMSO 150 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 Annexin-V-FLUOS 凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司。SMMC-7721 转染 BIRC6 mimic 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 $(1\sim5) \times 10^5$ 细胞悬浮液, 1 500 r/min, 5 min 离心后弃上清, 加入 500 μL 的 1 $\times$ 结合缓冲液。加入 5 μL Annexin V-FITC, 再加入 10 μL 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 Western blot 取转染 48 h 后的 SMMC-7721 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。14 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 23 V 电压湿转 12 h。5% 脱脂奶粉(TBS 溶解)室温封闭 1 h 后加入 1:500 稀释的兔抗人 BIRC6 多克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育

过夜, TBST 漂洗 5 min × 6 次后加入适当 (1:10 000) 浓度的二抗, 室温孵育 1 h。TBST 漂洗 5 min × 6 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。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 在文中列示, 均通过正态性检验。2 组间比较采用成组 t 检验 (方差齐同为常规 t 检验, 不齐同为校正 t 检验); 相关性分析采用 Spearman 相关; 3 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。此外, BIRC6 表达与 SMMC-7721 细胞活力和增殖的关系资料, 虽为多时点重复观测数据。但各组内的时间变化关系非本实验所关注, 故不考虑进行重复测量资料的分析, 仅对 2 组间对应时点资料做差异检验。因统计比较的总次数不算太多, 故暂不考虑调整检验水准, 取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

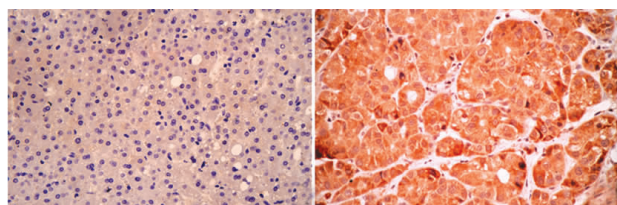
2.1 HCC 及对应癌旁组织中 BIRC6 的表达

qRT-PCR 结果参见表 1。BIRC6 mRNA 在 HCC 组织中的表达水平 (0.72 ± 0.29) 高于对应的癌旁组织 (0.20 ± 0.11) (Stetterthwaite 校正 t 检验, $t=10.691$, $P=0.000$)。BIRC6 蛋白与 mRNA 表达趋势一致: 在 HCC 组织中的表达水平 (7.68 ± 2.13) 高于对应的癌旁组织 (1.24 ± 0.23) (常规 t 检验, $t=8.456$, $P=0.004$); BIRC6 蛋白主要定位在胞质中 (图 1)。数据统计分析结果参见表 1。

表 1 BIRC6 蛋白与 mRNA 表达比较

Tab.1 Comparison between BIRC6 protein and mRNA

组别	例数 (n)	肝癌组织	癌旁组织	两类组织比较: t 值, P 值
BIRC6 蛋白	40	7.68 ± 2.13	1.24 ± 0.23	8.456, 0.004
mRNA	40	0.72 ± 0.29	0.20 ± 0.11	10.69, 0.000



A. 癌旁组织

B. 肝癌组织

图 1 BIRC6 在肝癌及对应癌旁组织中的免疫组化染色 (SP, 400 ×)

Fig.1 Immunohistochemical staining of BIRC6 in HCC tissues and corresponding adjacent tissues (SP, 400 ×)

2.2 BIRC6 蛋白的表达与 HCC 临床病理特征的关系

BIRC 蛋白表达与 HCC 临床病理特征的相关性分析结果见表 2。BIRC6 蛋白高表达与较大肿瘤体积 ($P<0.05$) 和高 TNM 分期 ($P<0.05$) 呈显著的相关性。

2.3 LO2、HepG2 和 SMMC-7721 细胞中 BIRC6 mRNA 的表达

人正常肝细胞系 LO2 中 BIRC6 mRNA 表达水平 ($0.08 \pm$

0.01) 明显低于 HCC 细胞系 HepG2 (0.34 ± 0.05) 和 SMMC-7721 (0.42 ± 0.04) 中 BIRC6 mRNA 的表达水平 (图 2), 各组细胞间比较差异具有统计学意义 ($F=67.714$, $P=0.000$), 各组细胞间两两比较差异均有统计学意义 ($P=0.000$)。

表 2 BIRC6 蛋白表达水平与 HCC 临床病理特征的关系 ($n=40$)

Tab.2 Correlation between clinicopathological characteristics and protein expression of BIRC6 in HCC patients ($n=40$)

临床特征	类别	BIRC6 表达水平 (Mean ± SD)	r_s 值	P 值
性别	男	6.92 ± 2.19	-0.035	0.809
	女	6.08 ± 1.78		
年龄 (岁)	≥ 50	6.02 ± 1.19	0.108	0.501
	< 50	6.98 ± 1.73		
HBV 感染	有	5.42 ± 2.09	0.183	0.204
	无	6.48 ± 1.98		
肝硬化	有	6.32 ± 2.34	0.159	0.221
	无	7.08 ± 2.78		
血清 AFP 值 (ng/ml)	> 400	4.92 ± 2.19	0.191	0.471
	≤ 400	6.05 ± 2.78		
肿瘤体积 (cm)	> 5	8.92 ± 2.19	0.429	0.029
	≤ 5	3.08 ± 1.77		
肝内转移	有	4.97 ± 2.39	0.203	0.352
	无	6.48 ± 2.98		
门脉侵犯	有	4.93 ± 2.49	0.198	0.205
	无	6.98 ± 3.08		
Edmonson 分级	I + II	5.27 ± 2.11	0.214	0.178
	III	6.18 ± 3.78		
TNM 分期	I + II	2.92 ± 1.39	0.571	0.002
	III + IV	9.08 ± 2.88		

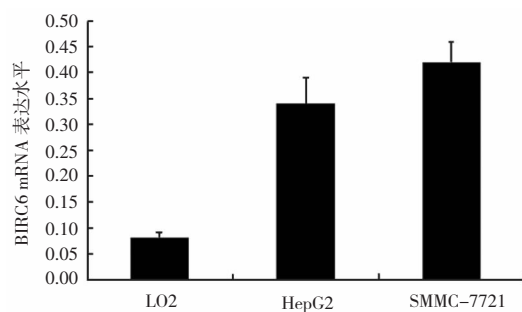


图 2 BIRC6 mRNA 在 LO2、HepG2 和 SMMC-7721 细胞中的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.2 BIRC6 mRNA expression in LO2, HepG2 and SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 siRNA 下调 SMMC-7721 细胞中 BIRC6 表达

SMMC-7721 细胞转染 BIRC6 siRNA, qRT-PCR 及 Western blot 检测干扰效率, 结果显示, 与阴性对照组比较, 人 HCC 细胞系 SMMC-7721 转染 siRNA 后 BIRC6 mRNA 及蛋白的表达水平明显降低 ($F=29.538$, $P=0.006$, 图 3)。

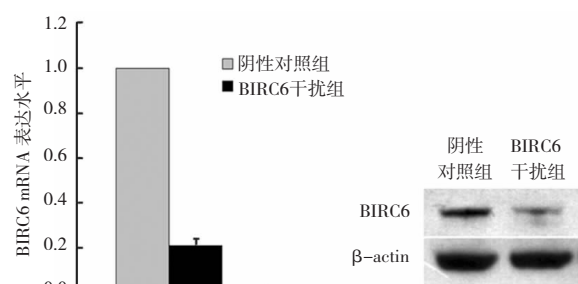


图3 SMMC-7721 细胞转染 BIRC6 siRNA 后导致 BIRC6 mRNA 及蛋白表达下调 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Reduction of BIRC6 mRNA and protein expression induced by treatment of SMMC-7721 cell with BIRC6 siRNAs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 下调 BIRC6 导致细胞活力降低

研究表明 BIRC6 与细胞增殖和凋亡相关^[2,8-9]。为了验证 BIRC6 与 HCC 细胞增殖的相关性, BIRC6 siRNA 转染 SMMC-7721 细胞, MTT 检测转染 24、48 h 和 72 h 后细胞活力变化, 结果显示 BIRC6 干扰组细胞增殖率较阴性对照组明显降低。参见图 4 及表 3。

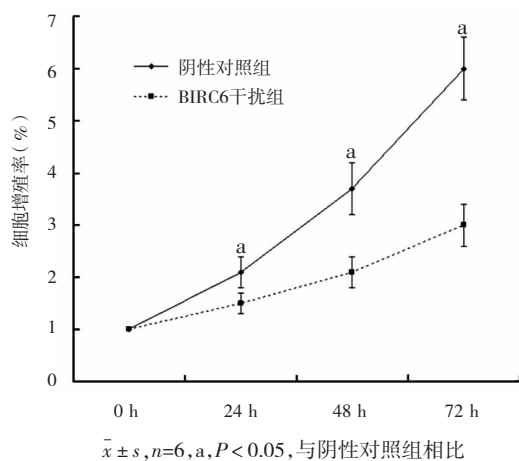
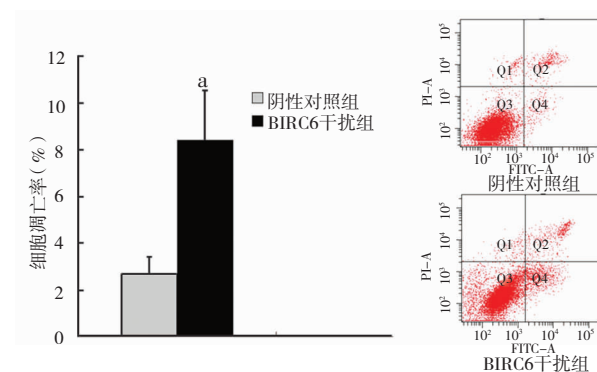


图4 BIRC6 表达下调导致 SMMC-7721 细胞活力和增殖降低

Fig.4 Decrease of SMMC-7721 cancer cell viability and proliferation induced by BIRC6 expression reduction

2.6 下调 BIRC6 导致细胞凋亡增加

为了进一步验证 BIRC6 是否抑制 HCC 细胞凋亡, SMMC-7721 细胞转染 BIRC6 siRNA 36 h 后, 流式细胞仪检测发现与阴性对照组相比细胞凋亡率增加 ($t=-8.480, P=0.000$, 图 5)。



$\bar{x} \pm s, n=6, a, P < 0.05$, 与阴性对照组相比

图5 BIRC6 表达下调导致 SMMC-7721 细胞凋亡增加

Fig.5 Increase of SMMC-7721 cancer cell apoptosis induced by BIRC6 expression reduction

3 讨论

细胞增殖与死亡之间的平衡失调参与了 HCC 发生过程, p53 基因缺失和(或)突变是导致 HCC 细胞抗凋亡和化疗抵抗的重要因素之一, 同时许多 HCC 对死亡受体配体如 FasL 或 TRAIL 以及转化生长因子诱导的凋亡也不敏感。尽管 HCC 中存在一些促凋亡基因表达下调, 但是导致细胞死亡与存活之间平衡失调的主要因素还是抗凋亡基因的过度激活, 很多分子参与了 HCC 细胞凋亡抵抗, 如 Bcl-XL, Mcl-1, cIAP1, XIAP 和 Survivin 等, 其中 cIAP1, XIAP 和 Survivin 都属于 IAP 家族成员。

IAP 家族的另外一个成员 BIRC6 由一个 N 末端 BIR 区域和一个 C 末端泛素载体区域组成, C 末端泛素载体(UBC)区域具有 E2/E3 泛素连接酶活性, 从而发挥抗凋亡功能^[2]。BIRC6 通过其 BIR 区域结合并抑制 caspases-3、6、7、9 的活性, BIRC6 与 caspases 相互作用阻止了 caspase 的级联反应和凋亡^[2], 而 BIRC6 的 UBC 区域可以促进蛋白酶体降解促凋亡蛋白 caspase-9, SMAC/DIABLO 和 HTRA2/OMI^[2-5]。BIRC6 在多种肿瘤的凋亡抵抗中发挥重要作用^[3-12], BIRC6 mRNA 在结直肠癌和急性髓样白血病临床组织标本中高表达, 其表达上调与化疗抵抗和较差

表3 不同时间点 BIRC siRNA 组和 control siRNA 组细胞增殖率比较

Tab.3 Comparison of cell viability between BIRC6 siRNA group and control siRNA group at different checkpoints

组别	例数 (n)	0 h	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	6	1.00	2.10 ± 0.31	3.62 ± 0.57	5.82 ± 0.68
BIRC6 干扰组	6	1.00	1.32 ± 0.19	1.84 ± 0.33	2.81 ± 0.46
2 组比较 t 值、P 值			5.25, 0.000	6.62, 0.000	8.98, 0.000

注: 计量数据, 采用成组 t 检验 (常规 t 检验); 0 h 时点值为基准参照值, 故为 1.00 且无标准差值

的无复发存活率相关^[13-14]。BIRC6 蛋白在前列腺癌组织和细胞中表达升高,且其高表达与 Gleason 6~8 肿瘤和药物抵抗相关^[15]。本研究通过组织标本发现 BIRC6 mRNA 和蛋白在 HCC 组织中表达水平高于对应的癌旁组织,且 BIRC6 蛋白高表达与较大肿瘤体积(> 5 cm)和高 TNM 分期显著相关,进一步研究还发现 BIRC6 mRNA 在人正常肝细胞 LO2 中的表达水平明显低于 HCC 细胞 SMMC-7721 和 HepG2,提示 BIRC6 在 HCC 中可能发挥重要功能。

IAP 家族的其他成员如 XIAP 和 Survivin 在 HCC 中的抗凋亡功能已有报道^[16-17],本课题中探讨 BIRC6 是否在 HCC 中也发挥凋亡抵抗功能,通过 siRNA 特异性下调 BIRC6 表达,MTT 和流式细胞仪检测发现 SMMC-7721 HCC 细胞活力降低和细胞凋亡率增加,提示 BIRC6 在 HCC 中也发挥抗凋亡作用。已经证实乳腺癌和肺癌细胞中 BIRC6 表达缺失触发的凋亡与 p53 稳定相关^[8,11],但 BIRC6 在 HCC 中的抗凋亡机制尚需进一步研究。

综上所述,BIRC6 在 HCC 中高表达且与恶性临床病例特征相关,功能学研究提示其可能参与 HCC 细胞的凋亡抵抗,提示 BIRC6 可能作为潜在预后判断指标,并可能成为 HCC 靶向治疗的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] 涂康生,杨雪,宋涛,等.原发性肝细胞癌组织中 CIP2A 和 c-myc 蛋白的表达及其意义[J].中国普通外科杂志,2011,20(1):95-98.
- Tu K S, Yang X, Song T, et al. Evaluation of CIP2A and c-myc expression and its correlation with the clinicopathological significance in primary hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2011, 20(1): 95-98.
- [2] Bartke T, Pohl C, Pyrowolakis G, et al. Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase[J]. Mol Cell, 2004, 14(6): 801-811.
- [3] Hao Y, Sekine K, Kawabata A, et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 849-860.
- [4] Qiu X B, Goldberg A L. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and

- mature forms of Smac and caspase-9[J]. J Biol Chem, 2005, 280(1): 174-182.
- [5] Sekine K, Hao Y, Suzuki Y, et al. HtrA2 cleaves Apollon and induces cell death by IAP-binding motif in Apollon-deficient cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330(1): 279-285.
- [6] Pohl C, Jentsch S. Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE[J]. Cell, 2008, 132(5): 832-845.
- [7] Chen Z, Naito M, Hori S, et al. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264(3): 847-854.
- [8] Ren J, Shi M, Liu R, et al. The Birc6(Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(3): 565-570.
- [9] Chu L, Gu J, Sun L, et al. Oncolytic adenovirus-mediated shRNA against Apollon inhibits tumor cell growth and enhances antitumor effect of 5-fluorouracil[J]. Gene Ther, 2008, 15(7): 484-494.
- [10] Qiu X B, Markant S L, Yuan J, et al. Nrdp1-mediated degradation of the gigantic IAP, BRUCE, is a novel pathway for triggering apoptosis[J]. EMBO J, 2004, 23(4): 800-810.
- [11] Lopercolo A, Pennati M, Gandellini P, et al. Apollon gene silencing induces apoptosis in breast cancer cells through p53 stabilisation and caspase-3 activation[J]. Br J Cancer, 2009, 100(5): 739-746.
- [12] Van Houdt W J, Emmink B L, Pham T V, et al. Comparative proteomics of colon cancer stem cells and differentiated tumor cells identifies BIRC6 as a potential therapeutic target[J]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10(12): M111.011353.
- [13] Bianchini M, Levy E, Zucchini C, et al. Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa[J]. Int J Oncol, 2006, 29(1): 83-94.
- [14] Sung K W, Choi J, Hwang Y K, et al. Overexpression of Apollon, an antiapoptotic protein, is associated with poor prognosis in childhood de novo acute myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(17): 5109-5114.
- [15] Low C G, Luk I S, Lin D, et al. BIRC6 protein, an inhibitor of apoptosis; role in survival of human prostate cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55837.
- [16] Zhao X, Ogunwobi O O, Liu C. Survivin inhibition is critical for Bcl-2 inhibitor-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e21980.
- [17] Pan Q, Liu B, Liu J, et al. Synergistic antitumor activity of XIAP-shRNA and TRAIL expressed by oncolytic adenoviruses in experimental HCC[J]. Acta Oncol, 2008, 47(1): 135-144.

(责任编辑:冉明会)