文章编号:1000-5404(2012)08-0705-05

论著

慢病毒介导 BC047440 基因沉默逆转 HepG2/ADM 细胞化疗耐药性机制的探讨

王 峥,郑 璐,黄小兵,杨彤翰,李 靖,梁 平 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 利用 siRNA 方法沉默 HepG2/ADM 细胞系中 BC047440 基因,观察其受抑制后对细胞多药耐药性的影响及其分子机制。**方法** 建立 BC047440 蛋白在 HepG2/ADM 细胞系 siRNA 干扰模型,采用 Western blot 检测 BC047440 蛋白的表达;实验分 3 组:BC047440-shRNA 组、control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组。CCK-8 法分析阿霉素对细胞生长抑制率的影响,流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期分布;Western blot 检测 BC047440 沉默后 NF-κB 蛋白表达的变化;Real-time PCR 检测 Survivin、CCNL1 基因 mRNA 水平的变化。**结果** 成功建立 BC047440 蛋白 siRNA 干扰模型;NF-κB 蛋白表达 BC047440-shRNA 组约为 HepG2/ADM 组 67.69%,约为 control-shRNA 组 67.39%;细胞毒性实验中 24、48 h 阿霉素对 BC047440-shRNA 组细胞毒性作用明显增强;流式细胞仪检测结果显示 BC047440-shRNA 组细胞凋亡明显增多,细胞周期分布多停留于 G_1/G_0 期,S 期细胞明显减少。Real-time PCR 检测 BC047440-shRNA 组 Survivin 基因 mRNA 表达约为 control-shRNA 组 37%,约为 HepG2/ADM 组 42%;检测 BC047440-shRNA 组 CCNL1 基因 mRNA 表达约为 control-shRNA 组 3.5 倍,约为 HepG2/ADM 组 2.4 倍。**结论** 沉默 BC047440 基因可通过 NF-κB 信号通路及其下游 Survivin、CCNL1 信号逆转 HepG2/ADM 细胞的多药耐药性,提示 BC047440 基因可能是形成肝癌多药耐药的重要分子之一。

[关键词] BC047440、人多药耐药细胞系 HepG2/ADM、核转录因子-κB、Survivin、CCNL1
[中图法分类号] R394.2;R73-361;R735.7 [文献标志码] A

Mechanism underlying drug resistance of HepG2/ADM cells silently reversed by lentivirus-mediated BC047440 gene during chemotherapy

Wang Zheng, Zheng Lu, Huang Xiaobing, Yang Tonghan, Li Jing, Liang Ping (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of RNA interference (RNAi)-silenced BC047440 gene on multidrug resistance of HepG2/ADM cells and its molecular mechanism. **Methods** BC047440 protein siRNA interference model was established in HepG2/ADM cells. Expression of BC047440 protein was detected by Western blotting. Experiment was conducted in BC047440-shRNA group, control-shRNA group and HepG2/ADM group. Effect of adriamycin on cell growth was analyzed with CCK-8 method. Cell cycle and apoptosis were assayed by flow cytometry. Expression of NF-κB protein, Survivin mRNA and CCNL1 mRNA was detected by Western blotting and RT-PCR, respectively, after BC047440 was silenced. **Results** The siRNA interference model was successfully established. The NF-κB protein was expressed about 71.5% in BC047440-shRNA group and HepG2/ADM group, and about 70.0% in control-shRNA group. The cytotoxicity of adriamycin at 24 and 48 h was significantly higher in BC047440-shRNA group. Flow cytometry showed that the number of apoptotic cells was significantly greater in BC047440-shRNA group, the cell cycle was maintained at the G_1/G_0 phase, and the number of HepG2/ADM cells was reduced at the S phase. RT-PCR showed that the Survivin mRNA was expressed about 37% in control-shRNA group and about 42% in HepG2/ADM group, while the expression of CCNL1 mRNA was about 3.5-fold higher in BC047440-shRNA group than in control-shRNA group and about 2.4-fold higher than in HepG2/ADM group. **Conclusion** Silencing BC047440 gene can reverse the multidrug resistance of HepG2/ADM cells though the NF-κB, and downstream survivin and CCNL1 signaling pathways, which indicates that BC047440 gene may be one of the important molecules for the multidrug resistance of liver cancer.

[**Key words**] BC047440; multidrug resistance of HepG2/ADM; NF-κB; Survivin; CCNL1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81001105). Corresponding author: Li Jing, Tel: 86-23-68774606, E-mail: xqyylijing@tom.com

[基金项目] 国家自然科学青年基金(81001105)
[通信作者] 李 靖,电话:(023)68774606,E-mail: xqyylijing@tom.com

原发性肝癌对我国人群健康危害非常巨大,目前以手术切除为主的综合治疗疗效不佳,其5年生存率仅5%左右。辅助化疗疗效不佳主要是由于原发性肝癌的多药耐药(multiple drug resistance,MDR)所致[1]。研究表明,癌基因、细胞周期调节基因、细胞凋亡基因等众多基因的异常激活或异常失活是肝癌发生的分子基础[2],而其包括化疗耐药在内的多种临床生物学行为则是多种拮抗/促进因子平衡紊乱的结果[3]。通过基因学操作在分子水平上干预发生紊乱的平衡可能是解决肝癌多药耐药的关键。

本课题组在前期研究中发现1条长约1 460 bp的基因BC047440[4],对其编码氨基酸进行功能区预测,发现BC047440是COMMD基因家族成员,其编码的蛋白可能是一种转录相关因子[5]。研究发现此类蛋白在调节NF-κB活化中可能发挥重要作用[6];在肝癌组织中高表达,且与肝癌的侵袭、转移及生存等生物学行为呈显著相关[7]。通过siRNA沉默HepG2细胞系BC047440基因表达,细胞周期阻滞于S期,并表现出增殖抑制[8]。而过表达BC047440基因的HepG2细胞系,细胞周期则主要阻滞于G_0/G_1期,并表现出凋亡抵抗[9],提示HepG2增殖抑制可能是肿瘤细胞倍增时间延长、分裂受阻或诱导凋亡的综合表现。而我们前期预实验发现BC047440基因在HepG2/ADM细胞系表达明显高于亲本HepG2细胞系,提示BC047440基因可能是HepG2/ADM细胞系多药耐药性产生的重要分子之一。本实验通过慢病毒介导siRNA沉默HepG2/ADM细胞系BC047440基因,重点分析HepG2/ADM细胞系NF-κB信号通路及其下游分子Survivin、CCNL1基因在BC047440基因信号网络中作用,并根据对细胞周期调控的认识,通过操作BC047440基因调控影响HepG2/ADM细胞系的周期分布,初步研究BC047440基因所介导的多药耐药机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌HepG2/ADM多药细胞系购自南京凯基生物公司(耐药株的亲本细胞株HepG2 from ATCC)。PCR用试剂primer、dsDNA oligo、重组BC047440-shRNA慢病毒载体及control-shRNA慢病毒载体由本科室研究生钟扬惠赠,RNAiso Plus、PrimeScriptRT reagentKit(TaKaRa公司),CCK-8(同仁化学研究所)、r*Taq*DNA Polymerase(ToYoBo公司),*Hpa* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶、T_4 DNA ligase、T_4 DNA ligasebuffer(NEB公司),Opti-MEM、Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),DL 5 000 DNA Marker(TaKaRa公司),DNA Marker Ⅰ(天根公司),Beyo ECL Plus化学发光剂(碧云天公司),胰酶(Gibco公司),DMEM/H培养基(HyClone公司),标准胎牛血清(TBD公司),PBS(博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 重组慢病毒转染HepG2/ADM多药细胞及Western blot检测HepG2细胞BC047440蛋白的表达 参照文献[10]报道测定重组慢病毒感染HepG2/ADM多药细胞最适感染复数及检测感染成功后BC047440蛋白表达。

1.2.2 CCK-8检测各组细胞与阿霉素共培养后细胞生长抑制率 实验分3组:BC047440-shRNA组、control-shRNA组和HepG2/ADM组。取各组细胞按1×10^4/孔接种96孔板上,4 h后加入阿霉素共培养,阿霉素每孔终浓度调整为2.5 μg/ml,以无细胞孔为空白对照调零,以未经药物处理的细胞为阴性对照。每6孔为1组,共接种3板,每日取出1板,采用CCK-8于酶标仪测定波长460 nm的光密度值[$D(460)$],重复实验3次,计算平均抑制率。抑制率=[对照组$D(460)$值-试验组$D(460)$值]/对照组$D(460)$值×100%。

1.2.3 流式细胞技术测定细胞凋亡及细胞周期 周期分布:取各组对数生长期细胞,用胰蛋酶消化后收集细胞,PBS漂洗2次,按照细胞周期测试剂盒说明书操作,最后用流式细胞仪检测,并用Multicycle for Windows软件分析细胞周期分布的变化。凋亡情况:各组细胞分别接种在6孔板中,与0.04 mg/L的阿霉素作用48 h后,常规胰蛋白酶消制成1×10^9/L的单细胞悬液,按照细胞凋亡试剂说明书操作,最后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 Western blot检测HepG2/ADM细胞NF-κB蛋白表达 重组慢病毒感染HepG2/ADM细胞96 h后,以20 ng/ml TNF-α刺激30 min后,提取各组细胞总蛋白。吸弃培养瓶中培养基,以预先冷却的PBS清洗2次,加入RIPA细胞裂解液150 μl并提取各组细胞总蛋白,蛋白浓度的检测采用BCA法。各组取相同量蛋白,并与1/4样本体积5×SDS上样缓冲溶液充分混匀,煮沸变性5 min。聚丙烯酰胺凝胶(10%分离胶、4%浓缩胶)电泳,恒流电转(5.5 mA/cm^2)到PVDF膜,在5% TBST脱脂奶粉溶液中封闭1 h,以TBST液清洗3次,每次10 min。将PVDF膜放入一抗溶液(1∶500)4 ℃过夜;TBST液清洗3次,每次10 min;将PVDF膜置于二抗溶液(1∶5 000)37 ℃孵育2 h;TBST溶液洗涤3次,每次10 min;加入1 ml的ECL化学发光剂;以β-actin为内参,凝胶扫描仪采集图像。

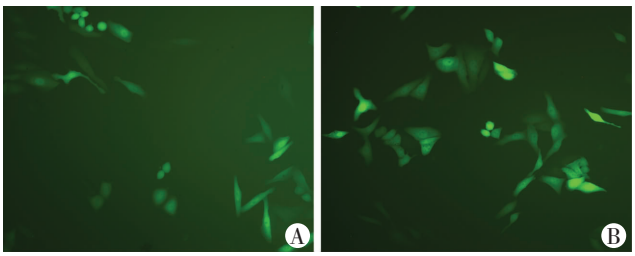
1.2.5 Real-time PCR检测相关基因Survivin、CCNL1 mRNA水平的变化 按照RNAout说明书进行各实验组细胞总RNA提取。提取的总RNA采用琼脂糖凝胶电泳检测其完整度,通过DU-800紫外分光光度计定量后,调整各实验组为相同浓度,按PrimeScriptRT reagentKit(TaKaRa公司)说明书逆转录成对应cDNA,冻存备用。Real-time PCR反应采用50 μl体系,每组细胞cDNA 2 μl,2×PCR buffer 25 μl,2对引物各1 μl,EEPCH_2O 20.5 μl,Sybr green 0.5 μl,终体积50 μl。β-actin基因为内参照,上游引物:5′-CCAACCGCGAGAAGATGA-3′,下游引物:5′-ACCAGAGGCGTACAGGGATAG-3′,序列长度为98 bp。Survivin基因上游引物:5′-CAAGAACCACCGCATCTCTA-3′,下游引物:5′-GCAACCGGACGAATGCTT-3′,序列长度为211 bp。CCNL1基因上游引物:5′-GATGCCAACCTCCCTCAACGAC-3′,下游引物:5′-CTCCTCGCACTTCTGTTCCTC-3′,序列长度为171 bp。引物合成由上海威斯腾公司完成。PCR反应条件:94 ℃,4 min;94 ℃,20 s,60 ℃,30 s,72 ℃,30 s,35个循环,72 ℃检测信号。

1.2.6 统计学分析 计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件进行Mann-Whitney U检验。

2 结果

2.1 成功建立 BC047440 蛋白 siRNA 干扰模型

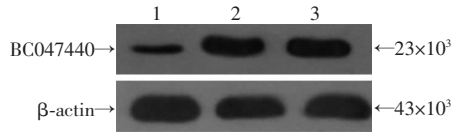
重组慢病毒感染 HepG2 细胞 48、72 h 后，分别在荧光显微镜观察，可见当 MOI 值为 20 时，荧光表达率高，荧光强度强，细胞状态较好（图 1）。



A：转染 48 h；B：转染 72 h

图 1 荧光显微镜观察慢病毒转染不同时间 HepG2/ADM 细胞形态 （×200）

BC047440-shRNA 组的 BC047440 蛋白表达量较 control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组明显降低，control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组间 BC047440 蛋白表达量无明显差异（图 2）。以 β-actin 为参照，设 HepG2/ADM 组 BC047440 蛋白表达率为 100%，计算出 BC047440-shRNA 组 BC047440 蛋白抑制率为 71.5%。



1：BC047440-shRNA 组；2：control-shRNA 组；3：HepG2/ADM 组

图 2 Western blot 检测各组 BC047440 蛋白的表达

2.2 CCK-8 检测细胞生长抑制率

培养 24、48 h BC047440-shRNA 组较 control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组细胞生长抑制率明显升高（$P<0.05$），control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组间无明显差异（$P>0.05$）；72 h 各组细胞的生长抑制率无明显差异（$P>0.05$）。见表 1。

表 1 阿霉素为 IC_{50} 时 3 组不同培养时间细胞抑制率

[$D(460)$，$n=3$，$\bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
HepG2/ADM 组	0.341 ± 0.027	0.518 ± 0.025	0.936 ± 0.004
control-shRNA 组	0.355 ± 0.027	0.527 ± 0.029	0.935 ± 0.009
BC047440-shRNA 组	0.593 ± 0.317[a]	0.846 ± 0.017[a]	0.924 ± 0.004

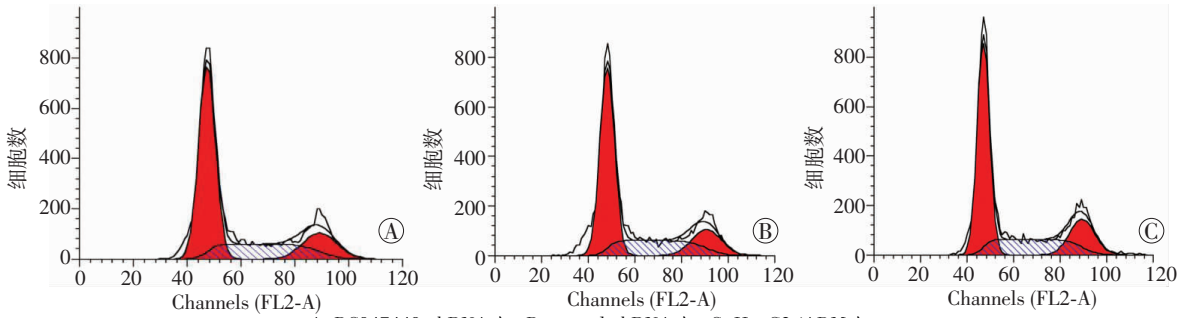
a：$P<0.05$，与 HepG2/ADM 组和 control-shRNA 组比较

2.3 流式细胞技术测定细胞周期及细胞凋亡

流式细胞仪测得 BC047440-shRNA 组细胞周期阻滞于 S 期（图 3A），而 control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组细胞周期则主要阻滞于 G_0/G_1 期（图 3B、C）。与阿霉素（终浓度 0.04 μg/ml）共培养 48 h 后，BC047440-shRNA 组细胞凋亡率（14.20%）明显高于 control-shRNA 组（3.92%）和 HepG2/ADM 组（5.08%），见图 4。

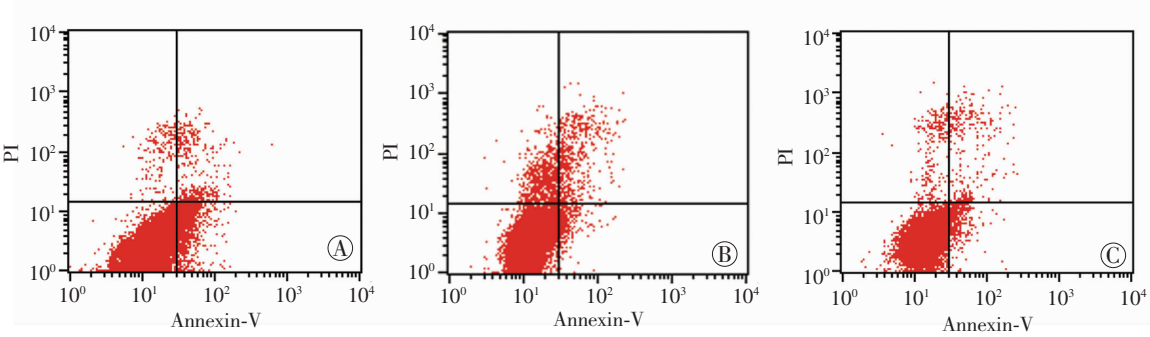
2.4 siRNA 沉默 HepG2/ADM 细胞 BC047440 基因后对 NF-κB 的影响

BC047440-shRNA 组 NF-κB 蛋白表达量较 control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组明显降低，control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组间 NF-κB 蛋白表达量无明显差异（图 5）。以 β-actin 为参照，设 HepG2/ADM 组 NF-κB 蛋白表达率为 100%，计算出 BC047440-shRNA 组 NF-κB 蛋白抑制率为 67.39%。



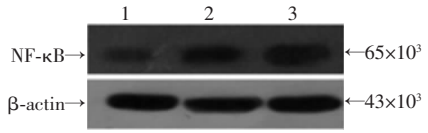
A：BC047440-shRNA 组；B：control-shRNA 组；C：HepG2/ADM 组

图 3 流式细胞技术测定各组细胞周期的变化



A：BC047440-shRNA 组；B：control-shRNA 组；C：HepG2/ADM 组

图 4 流式细胞技术测定各组细胞凋亡情况

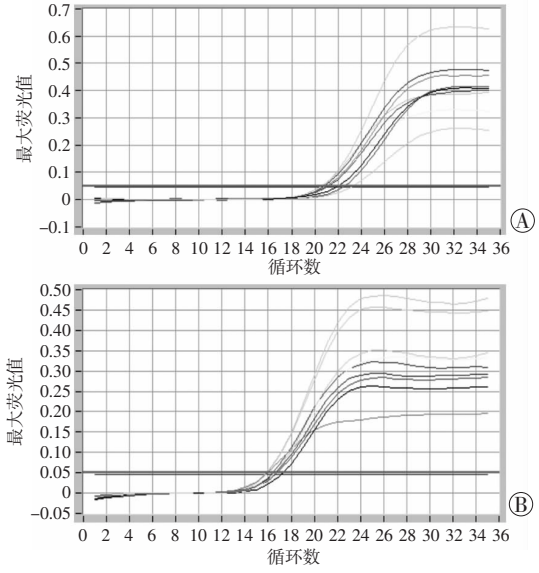


1:BC047440-shRNA 组;2:Control-shRNA 组;3:HepG2/ADM 组

图5 Western blot 检测各组 NF-κB 蛋白的表达

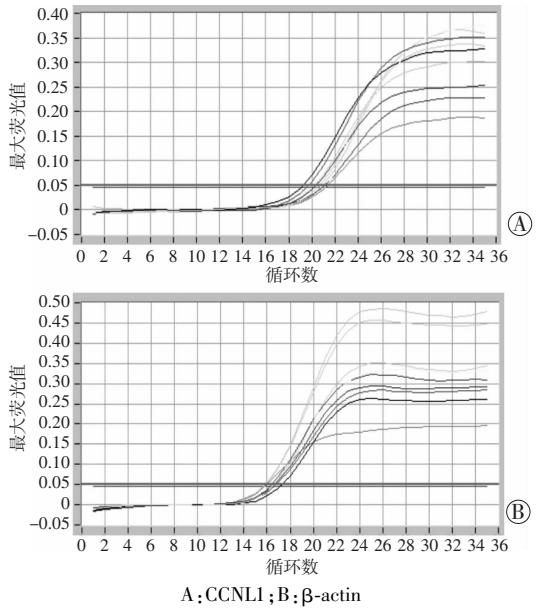
2.5 Real-time PCR 检测相关基因 Survivin、CCNL1 在 mRNA 水平的变化

以 HepG2/ADM 组为参照,结果显示 BC047440-shRNA 组 Survivin 基因 mRNA 表达较 control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组明显降低,分别为 37% 和 42%,control-shRNA 组和 HepG2 组间 BC047440 无明显差异(图6);BC047440-shRNA 组 CCNL1 基因 mRNA 表达较 control-shRNA 组和 HepG2/ADM 组明显升高,分别为 3.5、2.4 倍,control-shRNA 组和 HepG2 组间 BC047440 无明显差异(图7)。



A:Survivin;B:β-actin

图6 各组 Survivin Real-time PCR 曲线分析



A:CCNL1;B:β-actin

图7 各组 CCNL1 Real-time PCR 曲线分析

3 讨论

阿霉素等许多化疗药物在诱导肝癌细胞凋亡的过程中会产生耐药性,其机制是多种因子平衡紊乱的结果。因此,通过基因操作在分子水平上寻找一个良好的靶点干预发生紊乱的平衡可能是解决其多药耐药的关键。在前期研究中,我们利用抑制消减杂交技术分离出在肝癌组织中高表达的 EST 片段[11]。进一步用 cDNA 末端快速扩增法(RACE)获得了 1 条长约 1 470 bp 的全长基因 cDNA,发现其与 GenBank 的新基因(登录号 BC047440)同源。将 BC047440 基因放入癌基因组解剖学计划(cancer genome anatomy project,CGAP)的多个 SAGE 文库中,以虚拟 Northern blot 分析 BC047440 的基因表达谱,发现该基因在乳腺、胃、脑、胰腺、卵巢、前列腺等多个 SAGE 肿瘤文库中表达,但只在脑、骨髓等几个正常的文库中表达,因此推断其可能在肿瘤形成的某个环节中具有重要作用[4]。此外,有学者用 RT-PCR 方法已证明其在肝癌组织中表达强度明显高于相对应的正常组织。从而证实 BC047440 基因与肝癌的发生、发展高度相关[7]。我们进一步检测 BC047440 基因在阿霉素诱导多药耐药细胞系(HepG2/ADM)中表达,发现 HepG2/ADM 细胞 BC047440 基因表达较亲本 HepG2 细胞中明显升高,提示 BC047440 基因可能参与了阿霉素慢性诱导 HepG2 细胞多药耐药的发生,但具体分子机制尚不清楚。本实验在 HepG2/ADM 多药耐药细胞中沉默 BC047440 基因,观察其在 HepG2/ADM 细胞增殖、凋亡以及细胞周期中的作用。

本实验应用 CCK-8 法检测慢病毒 BC047440-siRNA 干扰 HepG2/ADM 细胞后,该细胞与阿霉素共培养的生长抑制率,结果显示:HepG2/ADM 细胞株沉默 BC047440 基因后,表现为实验组生长抑制率于 24、48 h 明显增高($P<0.05$),而 72 h 生长抑制率各组无明显差异;应用流式细胞技术测定各组细胞周期,测定沉默 BC047440 基因后与终浓度 0.04 mg/L 阿霉素作用 48 h 后细胞的凋亡率。结果显示 48 h 细胞周期阻滞于 S 期,并且细胞凋亡率明显增高,提示沉默 BC047440 基因后能够部分逆转 HepG2/ADM 细胞株对阿霉素的耐药性,增强肝癌 HepG2/ADM 细胞株对 ADM 的敏感性。

本课题组前期实验证明 BC047440 基因与 NF-κB 传导通路有关。许多炎性因子、致癌剂、相关基因均可以激活 NF-κB 从而引发肿瘤的发生及肿瘤细胞的增

殖及抗凋亡,而抗凋亡则是耐药形成一个关键因素。沉默了 BC047440 的 HepG2 细胞株,其细胞质内活化 p50 的数量较野生株减少,其 NF-κB 核转位明显低于野生株 HepG2,NF-κB 的活性只有野生株的 1/4[9]。更有学者通过基因芯片检测发现,沉默 BC047440 基因后,有 189 个基因表达有显著差异,其中上调的有由 NF-κB 调控与细胞周期及细胞凋亡相关的重要基因:细胞周期蛋白 L1(CyclinL1,CCNL1)。CCNL1 是属于调控细胞周期的重要因子。并有研究发现 CCNL1 过表达能够抑制人肝癌细胞 SMMC7721 的生长,诱导细胞凋亡[12]。我们进一步研究 NF-κB 的调控对象 c-myc、bcl-2,见 c-myc 上调,而 bcl-2 却无明显变化[8]。而 Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins,IAP)家族的重要成员,是抑制细胞凋亡的主要成分之一,对肿瘤增殖及凋亡等肿瘤生物学行为起着重要作用[13]。不仅如此,Survivin 还可经抑制细胞色素 C 释放途径在线立体水平发挥肿瘤抗凋亡效应,从而在细胞的异常增殖和恶性转化中发挥作用。因此 BC047440 基因经 NF-κB 信号通路上调凋亡抑制蛋白 Survivin 间接抑制细胞凋亡将是本实验研究重点之一。

本实验中我们首先应用 Western blot 检测沉默 BC047440 基因后 HepG2/ADM 细胞中 NF-κB 蛋白的表达,发现其显著降低,提示 HepG2/ADM 细胞多药耐药的发生可能与 BC047440 通过调控 NF-κB 信号通路相关。接着,我们重点选取受 NF-κB 调控的与凋亡及细胞周期相关的 Survivin、CCNL1 基因,用 Real-time PCR 检测其 mRNA 水平的变化,发现 BC047440 基因表达下调后,HepG2/ADM 细胞中 Survivin 基因 mRNA 水平明显下调,而 CCNL1 基因 mRNA 水平明显上调,结合本实验流式细胞技术检测细胞周期及凋亡结果:沉默 BC047440 基因后细胞凋亡明显增多,细胞周期分布多停留于 G_1/G_0 期,S 期细胞明显减少。从而证实 BC047440 基因可能通过调控 NF-κB 信号传导通路及其下游相关基因影响细胞周期及抑制细胞凋亡产生肝癌多药耐药的肿瘤生物学现象。

综上,本实验再次证明 BC047440 基因可能是一个肝癌形成耐药的重要相关基因,其在肝癌中的高表达并调控 NF-κB 基因及其下游重要基因 Survivin 及 CCNL1 的变化可能对肝癌化疗耐药的发生、发展具有一定的促进作用。而上述基因在促进肿瘤细胞发生、发展中起着各自不同的重要作用,因此本实验可为下一步探讨沉默 BC047440 基因后,主要是通过促进肿瘤细胞凋亡或通过阻滞肿瘤细胞周期,还是抑制肿瘤倍增时间的方式逆转肝肿瘤多药耐药性抑制肝肿瘤生长及提供线索。但肝癌多药耐药的发生、发展是多基因、多阶段的复杂信号网络作用过程,BC047440 基因在其中发挥了怎样一个重要作用,沉默该基因逆转 HepG2/ADM 细胞系多药耐药性在整个信号网络中扮演何种角色,它们在不同时相的相互作用如何,特别是在蛋白层面的变化及相互影响都有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Vander-Borght S, Komuta M, Libbrecht L, *et al*. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin[J]. Liver Int, 2008, 28(10): 1370 – 1380.

[2] 王伟丽, 高英堂. 肝癌相关基因及相互作用的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(29): 3289 – 3294.

[3] Teufel A, Staib F, Kanzler S, *et al*. Genetics of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(16): 2271 – 2282.

[4] 赵弘智, 李靖, 梁平, 等. 一条肝癌相关新基因的全长 cDNA 克隆[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(7): 483, 487.

[5] Burstein E, Hoberg J E, Wilkinson A S, *et al*. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1[J]. J Biol Chem, 2005, 280(23): 22222 – 22232.

[6] de-Bie P, van-de-Sluis B, Burstein E, *et al*. Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling[J]. Biochem J, 2006, 398(1): 62 – 71.

[7] 郑璐, 李靖, 梁平, 等. 新基因 BC047440 在多种肿瘤组织中的表达及其意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2008, 15(3): 185 – 189.

[8] 刘世呈, 李靖, 黄小兵, 等. BC047440-siRNA 对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制及其分子机制的初步探讨[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(23): 2207 – 2211.

[9] 黄小兵, 梁平, 李靖, 等. BC047440 基因通过 NF-κB 调节 HepG2 细胞增殖的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2090 – 2092.

[10] 钟扬, 李靖, 黄小兵, 等. 慢病毒载体介导的人肝癌 HepG2 细胞 BC047440 基因沉默[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 744 – 748.

[11] 赵弘智, 梁平, 李靖, 等. 肝癌相关 cDNA 片段的快速克隆和表达[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(8): 1785 – 1788.

[12] Yang L, Li N, Wang C, *et al*. Cyclin L2, a novel RNA polymerase II-associated cyclin, is involved in pre-mRNA splicing and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(12): 11639 – 11648.

[13] Mita A C, Mita M M, Nawrocki S T, *et al*. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5000 – 5005.

(**收稿**:2012-01-13;**修回**:2012-02-29)

(编辑 汪勤俭)