

• 基础实验研究论著 •

BAG-1、Bcl-2 双靶区反义 RNA 重组载体对 SGC-7901 细胞增殖的影响

陈建国¹, 韩跃武²

(1. 甘肃省卫生职业学院检验教研室, 兰州 730000; 2. 兰州大学基础医学院医学生物化学与分子生物学研究所, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 构建 BAG-1、Bcl-2 双靶区反义 RNA 重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 及单表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1 和 pVITRO2-AsBcl-2, 并初步研究它们对人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖活性的影响, 为进一步探讨该重组载体对肿瘤细胞的影响打下基础。方法 从胃癌细胞株 SGC-7901 总 RNA 中逆转录扩增包括全部编码序列的 BAG-1 和 Bcl-2 cDNA, TA 克隆到 pMD18-T Simple 载体, 分别经 BamH I 和 Cla I、EcoR I 和 Nhe I 双酶切并回收纯化目的片段后, 反向插入真核细胞双表达载体 pVITRO2 的 mcs1 和 mcs2 中, 经酶切、测序鉴定, 确定已建立单表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1 和 pVITRO2-AsBcl-2, 再将 Bcl-2 反向插入单表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1 的 mcs2 中, 构建双表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2, 酶切、测序鉴定。然后分别转染 SGC-7901 细胞, MTT 法检测细胞的增殖活性, 半定量 RT-PCR 检测基因 BAG-1 mRNA 和 Bcl-2 mRNA 的表达, 流式细胞术检测 SGC-7901 的细胞周期变化情况。结果 酶切、测序鉴定表明, 单表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1 和 pVITRO2-AsBcl-2 及共表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 构建成功。与对照组比较, MTT 法检测显示重组载体抑制 SGC-7901 细胞增殖, 并呈时间依赖性, 其中以 72 h 转染组抑制作用最显著 ($P < 0.01$); RT-PCR 结果显示 BAG-1 mRNA 和 Bcl-2 mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.01$), 而且共表达载体组比单表达载体组更为显著 ($P < 0.05$), 但 pVITRO2-AsBcl-2 组对 BAG-1 mRNA 表达水平无明显影响 ($P > 0.05$); 流式细胞术检测重组载体组凋亡细胞比例升高, 与 pVITRO2 组和对照组比较均有统计学意义 ($P < 0.01$), 并且共表达重组载体组的效应比单表达重组载体组更为显著 ($P < 0.01$), 凋亡率由对照组的 0.57% 增加至 15.75%。结论 成功构建双靶区反义 RNA 重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 及单表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1 和 pVITRO2-AsBcl-2, 并发现其能抑制 SGC-7901 细胞增殖并引起细胞凋亡, 且以 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 重组载体最为明显。

关键词:反义 RNA; 细胞增殖; 重组载体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3297-04

Construction of recombinant vectors carrying antisense RNA to dual-target BAG-1 and Bcl-2 and its effect on proliferation of SGC-7901 cellChen Jianguo¹, Han Yuerwu²

(1. Teaching and Researching Section of Medical Laboratory, Gansu Health Vocational College, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant co-expression vector carrying antisense RNA to dual-target BAG-1 and Bcl-2 genes and recombinant single expression vector carrying antisense RNA to target BAG-1 and Bcl-2 gene respectively, then to preliminarily investigate their effect on the proliferation of gastric cancer cell SGC-7901 in order to lay the foundation for further study the effect of this recombinant vector on the tumor cells. **Methods** RT-PCR was used to amplify the full length of BAG-1 and Bcl-2 cDNA from total RNA of gastric cancer cell line SGC-7901. The BAG-1 cDNA fragment and the Bcl-2 cDNA fragment were inserted into pMD18-T simple vector respectively. The pMD18-T-BAG-1 was digested with BamH I and Cla I and the pMD18-T-Bcl-2 was digested with EcoR I and Nhe I. Then the BAG-1 cDNA fragment and the Bcl-2 cDNA fragment were inserted into the mcs1 and mcs2 of the eukaryotic co-expression vector pVITRO2 in the antisense orientation respectively. The construction of the single expression vector pVITRO2-AsBAG-1 and pVITRO2-AsBcl-2 was confirmed by restriction endonuclease treatment and sequence identification. Then the Bcl-2 cDNA fragment was inserted into the mcs2 of the recombinant vector pVITRO2-AsBAG-1 in the antisense orientation to construct the co-expression vector pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2, and the recombinant vector was also identified by restriction endonucleases digestion and sequence identification. Then the recombinant vector was transfected into SGC-7901 cell respectively. The proliferation of the cell was determined by the MTT assay. The level change of BAG-1 and Bcl-2 mRNA in SGC-7901 cell was detected by the semi quantitative RT-PCR and the change situation of cell cycle was detected by the flow cytometry (FCM). **Results** The restriction endonucleases digestion and sequencing identification indicated that the eukaryotic co-expression vector pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 and the single gene expression vector pVITRO2-AsBAG-1 and pVITRO2-AsBcl-2 were constructed successfully. The MTT assay method demonstrated that compared with the control group, the recombinant vector could inhibit the proliferation of the cells in time dependent manner, and the inhibiting effect was most notably in the 72 h transfection group ($P < 0.01$); inhibition ratio of recombinant vector groups was significantly higher than that of control group and pVITRO2 group ($P < 0.01$). BAG-1 and Bcl-2 mRNA expression in recombinant vector groups were significantly decreased compared with

that in the control group and pVITRO2 group ($P < 0.01$), The RT-PCR results showed that the expression level of BAG-1 mRNA and Bcl-2 mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$), moreover the co-expression vector group was more notably than the single expression vector groups ($P < 0.05$), but the pVITRO2-AsBcl-2 had no obvious effect on the expression of BAG-1 mRNA ($P > 0.05$); the FCM detection results showed that the apoptosis rate of the recombinant vector groups was significantly higher than that of the control group and the pVITRO2 group with statistical difference ($P < 0.01$), and the co-expression vector group was more notably than single expression vector groups ($P < 0.01$). In addition, the effect of the co-expression recombinant vector group was more significant than that of the single expression co-expression vector ($P < 0.01$), the apoptosis rate was increased from 0.57% to 15.75%. **Conclusion** The co-expression recombinant vector pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 and single expression vector pVITRO2-AsBAG-1 and pVITRO2-AsBcl-2 are successfully constructed and they can inhibit the proliferation of SGC-7901 cell and induce cell apoptosis, moreover the pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 vector is most notably.

Key words: antisense RNA; cell proliferation; recombinant vector

肿瘤是人类面临的重大难题,随着分子生物学各项技术的日趋成熟,基因治疗作为肿瘤治疗的一个新手段,日益受到人们的重视。但目前肿瘤基因治疗的效果并不理想,单一基因治疗只能作用于肿瘤发生、发展过程中的某一环节,只有相关的基因共同作用才能使肿瘤得以抑制^[1]。Bcl-2 是目前公认的抗凋亡基因,主要通过调节线粒体的功能来调节凋亡,通过抑制细胞凋亡而参与肿瘤的发病,与肿瘤的分级、分期及预后有关^[2]。BAG-1 基因定位于 9 号染色体,包括 7 个外显子,通过调节翻译起始点可表达 P29、P33、P46、P50 四种异构蛋白^[3]。BAG-1 是一个抗凋亡分子,它不仅有独立的抗凋亡作用,而且可以增强 Bcl-2 的抗凋亡活性^[4],在乳腺癌、大肠癌、膀胱癌、肾癌等多种肿瘤中都有阳性表达^[5]。BAG-1 蛋白的抗凋亡机制及途径与 Bcl-2 相近,可与 Bcl-2 蛋白形成复合物,两者可相互影响、相互促进,协同发挥抑制细胞凋亡的作用^[6]。Xiong 等^[7]的研究表明,反义 BAG-1 能够增强抗癌药物诱导的肿瘤细胞凋亡,并降低 Bcl-2 的表达。本研究正是着眼于此,旨在构建反义双靶区重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 及单表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1 和 pVITRO2-AsBcl-2,并转染胃癌细胞株 SGC-7901 以观察他们对肿瘤细胞增殖的影响,进行对比分析,为今后寻找更有效的反义核酸药物提供实验基础和方法依据,为肿瘤的治疗提供新的策略和思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 真核细胞共表达载体 pVITRO2 购自 InvivoGen 公司;大肠杆菌 DH5 α 、SGC-7901 细胞由本研究所保存;总 RNA 提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒、潮霉素 Hygromycin B 购于上海生工公司;质粒抽提试剂盒购自天根生化公司,pMD18-T simple 载体、逆转录试剂盒、EcoR I、Nhe I、BamH I、Cla I、LA Taq 酶购自大连宝生物 Takara 公司,T4 DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品。

1.2 引物的设计与合成 根据 Gene Bank BAG-1 和 Bcl-2 的 mRNA 序列,用 primer premier 5.0 软件设计包括 BAG-1 和 Bcl-2 全部编码区序列的引物:BAG-1F 5'-GCC ATC GAT CAT CGC TGG GCG GTC AAC-3',在 5'端引入酶切位点 Cla I;BAG-1R 5'-CTC GGA TCC AGA GAC GGC AGA GCT GGT GG-3',在 5'端引入酶切位点 BamH I,扩增产物 1 144 bp。Bcl-2F 5'-CCT CTC GAG AAG GAT GGC GCA CGC TGG-3',在 5'端引入酶切位点 Nhe I;Bcl-2R 5'-CCG GAA TTC TTG GGG CAG GCA TGT TGA CT-3',在 5'端引入酶切位点 EcoR I,扩增产物 762 bp。另外,根据 β -actin、BAG-1 和 Bcl-2 的序列设计 RT-PCR 引物: β -actinF 5'-ACG TGG ACA TCC GCA AAG AC-3', β -actin R 5'-CTG CTG TCA CCT CAC CGT TC-3',扩增产物 442 bp;BAG-1F 5'-TAA GCG

GCA AAG CCA AGA CA-3',BAG-1R 5'-GAA AGT GAG CCA TTG GAG GG-3',扩增产物 260 bp;Bcl-2F 5'-TCC GAC CAC TAA TTG CCA AGC-3',Bcl-2R 5'-AGC CTC CAG CAG CCA GAA AG-3',扩增产物 169 bp;由上海生工公司合成。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 法获取目的基因 反应体系组成及操作按 Takara 公司的逆转录试剂盒说明进行。

1.3.2 重组载体的构建及鉴定 将 RT-PCR 产物 BAG-1 和 Bcl-2 分别插入 pMD18-T-simple 载体,经 BamH I + Cla I 和 EcoR I + Nhe I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,将 BAG-1 片段定向插入 pVITRO2 载体的多克隆位点 1(mcs1)中,构建单表达载体 pVITRO2-AsBAG-1;将 Bcl-2 片段定向插入 pVITRO2 载体的多克隆位点 2(mcs2)中,构建单表达载体 pVITRO2-AsBcl-2;再将 Bcl-2 片段定向插入单表达载体 pVITRO2-AsBAG-1 的多克隆位点 2(mcs2)中,双酶切鉴定后,由上海生工公司完成测序。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖活性 实验分组:pVITRO2-AsBAG-1 组、pVITRO2-AsBcl-2 组、pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 组、pVITRO2 组和空白对照组。取同一批次的对数生长期 SGC-7901 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^4 个细胞/mL,接种于 96 孔培养板,每组接种 6 孔,培养 24 h 后,按文献[8]的方法转染细胞。上述各组于培养的 24、48、72、96 h 后加入 5 mg/mL 的 MTT 液 20 μ L/孔,继续培养 4 h,吸出培养液后,加入 DMSO 液 150 μ L/孔,室温下将平板震荡 10 min,使结晶物完全溶解,酶标仪上检测各孔的 A_{490} 值,观察细胞增殖情况。

1.3.4 BAG-1 和 Bcl-2 mRNA 表达水平的检测 转染 72 h 后收集细胞,提取总 RNA,反应体系组成及操作按 Takara 公司的逆转录试剂盒说明,合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,PCR 反应体系为 $10 \times$ PCR Buffer II 5 μ L,10 mmol/L dNTP 2 μ L,10 μ mol/L β -actin、BAG-1 和 Bcl-2 上下游引物各 1 μ L,5 U/uL 的 TaKaRa Ex TaqTM HS 0.5 μ L,cDNA 3 μ L,双蒸水补足总体积 50 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、54 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 60 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析系统观察照相并用软件进行灰度值分析。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞周期分布 转染 72 h 后收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,75%的冷乙醇固定过夜,1 000 r/min 离心 10 min,弃固定液,PBS 洗涤 3 次,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,与含有 1% RNase 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)共同孵育 10 min,PI 染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期变化。

1.4 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统

计软件处理,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BAG-1 和 Bcl-2 的 PCR 扩增 以同一个 cDNA 为模板,用设计引物进行 PCR 扩增,所得 BAG-1 和 Bcl-2 特异性条带均与预期的 1 144 bp 和 762 bp 目的基因大小接近,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 单表达载体的酶切鉴定 单表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1 和 pVITRO2-AsBcl-2 分别经 EcoR I + Nhe I 和 BamH I + Cla I 双酶切消化,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),分别产生约 766 bp 和 6 321 bp(图 2 中第 1、2 泳道),1 144 bp 和 6 321 bp(图 2 中第 3、4 泳道)大小的片段,初步表明重组载体带有 BAG-1 和 Bcl-2 基因。

2.3 重组双表达载体的鉴定 双表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 经 EcoR I + Nhe I 双酶切消化,琼脂糖凝胶电泳结果显示,分别产生约 766 bp 和 7 465 bp 大小的片段,初步表明重组载体带有 Bcl-2 基因,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。双表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 经 BamH I + Cla I 双酶切消化,琼脂糖凝胶电泳结果,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),分别产生约 1 144 bp、3 040 bp 和 4 071 bp(图 4 中第 2 泳道)大小的片段,这是由于 Bcl-2 基因 567 bp 处含有 BamH I 酶切位点。同样,用 BamH I + Cla I 双酶切消化 pVITRO2-AsBcl-2 和 pVITRO2-AsBAG-1 重组载体做对照,可以看到由于 pVITRO2-AsBcl-2 重组载体载体中由于 Bcl-2 基因含有 BamH I 酶切位点,而 mcs1 的 BamH I 和 Cla I 酶切位点相距太近,所切出的片段太小(13 bp),电泳图上无法看到,仅显示 3 040 bp 和 4 071 bp 大小的片段(图 4 中第 1 泳道),pVITRO2-AsBAG-1 重组载体上只有 mcs1 BAG-1 基因之间的 BamH I 和 Cla I 酶切位点,所以只切出 1 144 bp 和 6 321 bp 大小的片段(图 4 中第 3 泳道)。通过 BamH I + Cla I 双酶切鉴定,进一步证明双表达重组载体 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 带有 BAG-1 和 Bcl-2 基因。

2.4 MTT 法检测细胞增殖活性 在重组载体的作用下,SGC-7901 细胞的增殖受到明显抑制,抑制作用具有时间依赖性,在 72 h 达到顶峰,以 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 组的抑制作用最为明显,96 h 其抑制细胞增殖的作用不再增加并有所减弱;经统计学分析,与对照组和 pVITRO2 组比较,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。各重组载体组增殖速度减慢,差异有统计学意义($P < 0.01$),并且在转染 72 h 后,与 pVITRO2-AsBAG-1 组和 pVITRO2-AsBcl-2 组相比,pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 组的抑制作用更强($P < 0.05$)。

2.5 重组载体对 mRNA 表达的影响 RT-PCR 产物经琼脂糖电泳显示:转染 72 h 后,见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),空白对照组和 pVITRO2 组中可见清晰的 169 bp 和 260 bp 的片段(图 5 中第 1~2 泳道),而重组载体组中 169 bp 和 260 bp 处的基因片段较淡(图 5 中第 3~5 泳道)。442 bp 处为内参照 β -actin,可以看见其亮度基本一致。对其光密度值进行统计学分析见表 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),与对照组和 pVITRO2 组相比,pVITRO2-AsBAG-1 和 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 组 BAG-1 和 Bcl-2 基因表达明显降低($P < 0.01$);pVITRO2-AsBcl-2 组虽然 Bcl-2 基因表达有明显降低($P < 0.01$),但 BAG-1 基因表达没有显著变化($P > 0.05$)。

2.6 重组反义载体对 SGC-7901 细胞周期的影响 FCM 检测发现 G_0/G_1 期细胞所占比例由对照组的 47.67%、49.17%增至 73.07%,而 S 期细胞则分别从 44.15%、39.70%下降至 16.40%,凋亡率由对照组的 0.57%、1.12%增加至 15.75%,见表 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),重组载体组与对照组、pVITRO2 组比较有统计学意义($P < 0.01$),并且 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 组与 pVITRO2-AsBAG-1 组、pVITRO2-AsBcl-2 组相比较,作用更加明显($P < 0.01$)。表明细胞经重组载体作用后,导致 BAG-1 和 Bcl-2 促进细胞增殖的功能下降,抑制 G_1 期细胞进入 S 期。

3 讨 论

实施肿瘤联合基因治疗的关键在于目的基因的高效联合转移及表达,这将直接影响其治疗效果^[9]。本研究将 2 个目的基因亚克隆入同一真核表达载体 pVITRO2 中,构建出 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 载体,达到了将两基因同时导入细胞内的目的。经 MTT 法检测表明,重组载体可明显抑制 SGC-7901 细胞的增殖,并呈现时效关系,与对照组比较当重组载体作用 SGC-7901 细胞 72 h 时,抑制作用最为明显($P < 0.01$),而且 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 重组载体与单表达重组载体相比,其对 SGC-7901 细胞的抑制作用更为显著($P < 0.05$);而到 96 h 时,其抑制作用不再增加并有所减弱,可能是由于瞬时转染后,载体 DNA 随细胞分裂而逐渐丢失,目的基因的表达时限短暂所致^[10]。此载体的构建成功,为研究 BAG-1 和 Bcl-2 的协同作用奠定了基础。

RT-PCR 实验结果经凝胶成像灰度值分析软件分析提示,各重组载体组和相对应的目的基因 mRNA 表达均有明显的下降,其可能的机制是反义 RNA 分别与 BAG-1 mRNA 和 Bcl-2 mRNA 形成复合物而被核酶剪切降解所致;pVITRO2-AsBAG-1 重组载体组 Bcl-2 mRNA 表达下降与文献报道一致^[7],是由于 BAG-1 具有上调 Bcl-2 表达的作用,BAG-1 的表达下降,Bcl-2 的表达亦随之下降,而 pVITRO2-AsBcl-2 重组载体组对 BAG-1 mRNA 的表达无明显影响。

FCM 法检测细胞周期结果证明, G_0/G_1 期细胞所占比例由对照组的 47.67%、49.17%增至 73.07%,而 S 期细胞则分别从 44.15%、39.70%下降至 16.40%,凋亡率由对照组的 0.57%、1.12%增加至 15.75%。表明重组载体可以抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖,并促进其凋亡,且以 pVITRO2-AsBAG-1-Bcl-2 重组载体最为明显。这应与双基因导入后既抑制了 BAG-1 基因的表达,也抑制了 Bcl-2 基因的表达,将细胞周期有效阻滞在周期起始点 G_1 期,并显著诱导细胞凋亡有关,因为 Bcl-2 蛋白可能是线粒体 PT 孔道的组成成分,具有抑制 caspase 使线粒体 PT 通道打开的能力^[11],而 BAG-1 是一种多功能蛋白,不但可以和 Bcl-2 结合,而且可以和 Hsp70、RAF-1、HGF 受体、核激素受体等多种靶分子相互作用,调节细胞的生长与存活^[12]。

本研究构建了针对 BAG-1 和 Bcl-2 全部编码区的单、共表达重组载体,体外作用于胃癌细胞 SGC-7901,观察到了良好的抑瘤效果,其可能的机制是共表达重组载体组反义 RNA 不但分别与 BAG-1 mRNA 和 Bcl-2 mRNA 形成复合物而被核酶剪切降解,而且由于 BAG-1 表达的下降进一步下调了 Bcl-2 的表达,抑制肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞凋亡。通过本实验研究,为针对双基因的反义治疗策略提供了初步的理论依据。尽管如此,该重组载体对肿瘤细胞蛋白表达水平的影响以及体内实验等仍然值得深入研究。(下转第 3303 页)

作用机制将为基因治疗胃癌新靶点的寻找奠定基础。

参考文献

[1] Ray R, Miller DM. Cloning and characterization of a human c-myc promoter-binding protein[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(21): 2154-2161.

[2] Duensing S, Darr S, Cuevas R, et al. Tripeptidyl Peptidase II is required for c-MYC-induced centriole overduplication and a novel therapeutic target in c-MYC-associated neoplasms [J]. Genes Cancer, 2010, 1(9): 883-892.

[3] Inoue S, Hao Z, Elia AJ, et al. Mule/Huwei1/Arf-BP1 suppresses Ras-driven tumorigenesis by preventing c-Myc/Miz1-mediated down-regulation of p21 and p15[J]. Genes Dev, 2013, 27(10): 1101-1114.

[4] Soucek L, Evan GI. The ups and downs of Myc biology[J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20(1): 91-95.

[5] Duensing S, Lee BH, Dal CP, et al. Excessive centrosome abnormalities without ongoing numerical chromosome instability in a Burkitt's lymphoma[J]. Mol Cancer, 2003, 2(1): 30-37.

[6] Duensing A, Spardy N, Chatterjee P, et al. Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins[J]. Environ Mol Mutagen, 2009, 50(8): 741-747.

[7] Lin CY, Loven J, Rahl PB, et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc[J]. Cell, 2012, 151(1): 56-67.

[8] Chaudhary D, Miller DM. The c-myc promoter binding protein (MBP-1) and TBP bind simultaneously in the minor groove of the c-myc P2 promoter[J]. Biochemistry, 1995, 34(10): 3438-3445.

[9] Kanda T, Raychoudhuri A, Steele R, et al. MBP-1 inhibits breast cancer growth and metastasis in immunocompetent mice[J]. Cancer Res, 2009, 69(24): 9354-9359.

[10] Ghosh AK, Steele R, Ryerse J, et al. Tumor-suppressive effects of MBP-1 in non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11907-11912.

[11] Ghosh AK, Steele R, Ray RB. C-myc promoter-binding protein 1 (MBP-1) regulates prostate cancer cell growth by inhibiting MAPK pathway[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 14325-14330.

[12] Ghosh AK, Steele R, Ray RB. Knockdown of MBP-1 in Human Prostate Cancer Cells Delays Cell Cycle Progression [J]. J Biol Chem, 2006, 281(33): 23652-23657.

[13] Ray RB, Steele R, Seftor E, et al. Human breast carcinoma cells transfected with the gene encoding a c-myc promoter-binding protein (MBP-1) inhibits tumors in nude mice[J]. Cancer Res, 1995, 55(17): 3747-3751.

[14] Ghosh AK, Majumder M, Steele R, et al. MBP-1 mediated apoptosis involves cytochrome c release from mitochondria [J]. Oncogene, 2002, 21(18): 2775-2784.

[15] Chang YS, Wu W, Walsh G, et al. Enolase alpha is frequently down-regulated in non-small cell lung cancer and predicts aggressive biological behavior[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(20): 3641-3644.

[16] Lung J, Liu KJ, Chang JY, et al. MBP-1 is efficiently encoded by an alternative transcript of the ENO1 gene but post-translationally regulated by proteasome-dependent protein turnover. FEBS J 2010, 277(20): 4308-4321.

[17] Hsu KW, Hsieh RH, Wu CW, et al. MBP-1 suppresses growth and metastasis of gastric cancer cells through COX-2[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(24): 5127-5137.

(收稿日期: 2014-04-14)

(上接第 3299 页)

参考文献

[1] 张红宇, 孙强, 王亚东, 等. 野生型 P53、P16 基因联合抑制人胃癌细胞 HGC27 生长的实验研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(6): 344-346.

[2] Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family[J]. Nature, 1997, 387(6): 773-776.

[3] Yang X, Chernenko G, Hao Y, et al. Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells[J]. Oncogene, 1998, 17(8): 981-989.

[4] Crocoll A, Schneiket J, Hubner S, et al. BAG-1M: A potential specificity determinant of corticosteroid receptor action [J]. Kidney Int, 2009, 57(12): 1265-1269.

[5] Wood J, Pring M, Eveson JW, et al. Co-overexpression of Bag-1 and heat shock protein 70 in human epidermal squamous cell carcinoma; Bag-1-mediated resistance to 5-fluorouracil-induced apoptosis [J]. British Journal of Cancer, 2011, 104(9): 1459-1471.

[6] Kudoh M, Knee DA, Takayama S, et al. Bag1 proteins regulate growth and survival of ZR-75-1 human breast cancer cells[J].

Cancer Res, 2002, 62(18): 1904-1909.

[7] Xiong J, Chen J, Chernenko G, et al. Antisense BAG-1 sensitizes HeLa cells to apoptosis by multiple pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(3): 585-591.

[8] 司徒镇强, 吴军正, 刘斌, 等. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 2004: 351-352.

[9] 廖翔, 杨述华, 邵增务, 等. pIRES-p16ink4a-hRb1 载体的构建及其对骨肉瘤细胞周期的调控[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2006, 35(2): 224-227.

[10] 刘定燮, 周晓巍, 黄培堂. 哺乳动物细胞表达系统及其研究进展[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(4): 308-311.

[11] Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, et al. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane[J]. J Biol Chem, 2001, 276(21): 18361-18374.

[12] Nakagami H, Morishita R, Nishikawa T, et al. Lack of association between the hepatocyte growth factor receptor, c-met, and the anti-apoptotic action of bag-1 in endothelial cells[J]. Hypertens Res, 2004, 27(5): 359-365.

(收稿日期: 2014-04-10)