

• 基础实验研究论著 •

RNA 干扰 MBP-1 基因对胃癌细胞 SGC-7901 增殖影响*

耿 哲,姚海燕,韩跃武

(兰州大学基础医学院生物化学及分子生物学研究所,甘肃兰州 730000)

摘 要:目的 探讨 MBP-1(c-myc promoter binding protein 1, MBP-1)基因表达沉默对胃癌细胞株 SGC-7901 细胞增殖影响。
方法 实验分 3 组:空白对照组(未转染胃癌细胞)、阴性对照组(转染错义序列)和干扰组(转染 MBP-1 shRNA)。设计 2 条针对 MBP-1 基因的小干扰 RNA 片段及 1 条阴性对照 siRNA,并构建入 pSIREN-retroQ 质粒。将构建的重组 pSIREN-retroQ 质粒通过 Lipofectamine 2000 脂质体转染胃癌 SGC-7901 细胞,嘌呤霉素筛选稳转株细胞。Real time PCR 和 Western blot 分别检测 MBP-1 表达。MTT 法对 MBP-1 干扰后 SGC-7901 细胞增殖进行检测。**结果** 通过 PCR 扩增阳性克隆及测序,说明已成功构建 MBP-1 干扰及对照重组 pSIREN-retroQ 质粒。通过 Lipofectamine 2000 脂质体将重组质粒转染胃癌 SGC-7901 细胞,并通过嘌呤霉素筛选 2 周,说明已成功构建 MBP-1 干扰及对照 SGC-7901 稳转株细胞。Real time PCR 检测,干扰组 MBP-1 mRNA 相对表达量与空白对照组相比显著下调($P<0.05$)。Western blot 检测 MBP-1 蛋白表达,干扰组 MBP-1 表达量与空白对照组相比也都显著下调。MTT 法检测结果表明,MBP-1 干扰组细胞在 48、72、96 和 120 h 增殖能力比空白对照组都有显著的升高($P<0.05$)。**结论** 下调 MBP-1 基因表达能明显促进胃癌细胞 SGC-7901 的增殖,从而为胃癌基因治疗提供了新靶点。

关键词:胃癌细胞; RNA 干扰; MBP-1 基因; 细胞增殖

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)24-3301-03

Effects of RNAi of MBP-1 gene on proliferation of gastric cancer SGC-7901 cell line*

Geng Zhe, Yao Haiyan, Han Yuewu

(Research Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College,
Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of c-myc promoter binding protein(MBP-1)gene expression silencing on the proliferation in vitro in human gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** The cells divided into three groups: blank control group (cells without transfecting gastric cancer cell), negative control group (cells transfecting missense sequence) and experimental group (cells transfecting MBP-1 shRNA). Two MBP-1 shRNA sequences and one negative control shRNA sequence were designed, synthesized and cloned into pSIREN-retroQ plasma. Then the recombinant plasmids were constructed and transfected into human gastric cancer SGC-7901 cells by Lipofectamine 2000. After selection of cells with puromycin for two weeks, stable cell line SGC-7901 expressing gene of MBP-1 specific shRNA was obtained. The expressions of MBP-1 mRNA and protein in SGC-7901 were determined by the real time PCR and Western blot, respectively. The effects of altered expression of MBP-1 on the cell proliferation were measured by MTT cell proliferation assay. **Results** PCR and sequencing indicated that the recombinant plasmids pSIREN-retroQ was constructed. Then the recombinant plasmids were transfected into human gastric cancer SGC-7901 cells by Lipofectamine 2000. After selection of cells with puromycin for two weeks, stable cell line SGC-7901 expressing gene of MBP-1 specific shRNA was obtained. The relative expression level MBP-1 mRNA in the MBP-1 siRNA transfection group was significantly decreased compared with the blank control group($P<0.05$). Compared with the blank group, the expression levels of MBP-1 protein in the experimental group also significantly decreased. The proliferation abilities of SGC-7901 cells at 48, 72, 96, 120 h after MBP-1 siRNA transfection were significantly increased compared with the blank control group($P<0.05$). **Conclusion** Down-regulating the expression of MBP-1 can obviously promote the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901. MBP-1 gene may become the new target of gene therapy for gastric cancer.

Key words: gastric cancer cell; RNA interfering; MBP-1 gene; cell proliferation

胃癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,受到环境因素和饮食习惯影响,甘肃省胃癌发病率处于全国高位。MBP-1 是一种在转录水平对癌基因 c-myc 表达抑制从而对肿瘤发生起控制作用的蛋白质^[1]。癌基因 c-myc 在肿瘤发生过程中通过改变很多细胞功能,比如影响细胞增殖、分化、对凋亡的敏感,从而导致肿瘤发生^[2]。从癌基因与抑癌基因水平研究胃癌分子病理机制以及寻找基因治疗新靶点已经成为一个较新

的领域。本项目通过 RNA 干扰下调胃癌 SGC-7901 细胞中 MBP-1 的表达,了解 MBP-1 对肿瘤细胞的增殖的影响,为寻找与 MBP-1 作用机制相关胃癌基因治疗新靶点打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌 SGC-7901 细胞购自上海博谷生物技术有限公司, RPMI 1640 培养液、胎牛血清及 opti-MEM 培养液由美国 Gibco 公司生产, RNA 干扰质粒 pSIREN-retroQ(含嘌呤

* 基金项目:兰州大学“中央高校基本科研业务费专项资金”自由探索项目(lzujbky-2012-187)。 作者简介:耿哲,男,讲师,主要从事肿瘤分子生物学研究。

霉素筛选标记)、逆转录试剂盒、Real time PCR 试剂盒为大连 TaKaRa 公司产品,引物、质粒小量提取试剂盒、去毒素质粒提取试剂盒、RIPA 裂解液为上海生工生物工程技术服务有限公司产品, RNA 抽提试剂 Trizol Regent、脂质体 Lipofectamine 2000 为美国 Invitrogen 公司产品,四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)由美国 Sigma 公司生产, MBP-1 兔抗人多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,人 GAPDH 内参抗体、山羊抗兔辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、ECL 化学发光试剂盒购自上海鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MBP-1 干扰序列构建与鉴定 针对 MBP-1 两条干扰序列及一条阴性对照序列委托宝生物(大连)工程有限公司设计合成。干扰质粒 1 为 CTE954-2,靶序列为:GCA TTG GAG CAG AGG TTT ACC;正义链为:GAT CCG CAT TGG AGC AGA GGT TTA CCT TCA AGA GAG GTA AAC CTC TGC TCC AAT GCT TTT TTG;反义链为:AAT TCA AAA AAG CAT TGG AGC AGA GGT TTA CCT CTC TTG AAG GTA AAC CTC TGC TCC AAT GCG。干扰质粒 2 为 CTE954-4,靶序列为:GCG TCA TGG TGT CTC ATC GTT;正义链为:GAT CCG CGT CAT GGT GTC TCA TCG TTT TCA AGA GAA ACG ATG AGA CAC CAT GAC GCT TTT TTG;反义链为:AAT TCA AAA AAG CGT CAT GGT GTC TCA TCG TTT CTC TTG AAA ACG ATG AGA CAC CAT GAC GCG。同时设计阴性对照质粒 CTE954-N,靶序列为:GTA CCT CTA GCG ATC AAA CGA;正义链为:GAT CCG TAC CTC TAG CGA TCA AAC GAT TCA AGA GAT CGT TTG ATC GCT AGA GGT ACT TTT TTG;反义链为:AAT TCA AAA AAG TAC CTC TAG CGA TCA AAC GAT CTC TTG AAT CGT TTG ATC GCT AGA GGT ACG,引物退火后,将退火产物分别与 pSIREN-retroQ(BamH I /EcoR I)载体连接,转化感受态 JM109,涂布平板后 37 ℃ 过夜培养。用引物 pSIREN-F1 和 pSIREN-R1 对阳性克隆进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。引物序列为 pSIREN-F1:TGG ATG TGG AAT GTG TGC GA;pSIREN-R1:TTT GTA CAC CCT AAG CCT CC。同时使用 U6 Forward、pSIREN-F1 引物对 CTE954-2、CTE954-4、CTE954-N 质粒进行测序。U6Forward 测序引物序列为:CTT GAA CCT CCT CGT TCG ACC CCG CCT C。以上构建与鉴定工作均由宝生物(大连)工程有限公司完成,阳性克隆电泳结果及质粒测序结果由宝生物公司提供。

1.2.2 细胞培养及实验分组 人胃癌 SGC-7901 细胞系置于含 100 ml/L 胎牛血清的 1640 培养液中,37 ℃ 50 mL/L CO₂ 饱和湿度环境条件下连续培养。细胞分为 4 组:(1)空白对照组,即未处理 SGC-7901 细胞;(2)阴性对照组,转染载体为 pSIREN-retroQ CTE954-N;(3)MBP-1 干扰 1 组,转染载体为 pSIREN-retroQ CTE954-2;(4)MBP-1 干扰 2 组,转染载体为 pSIREN-retroQ CTE954-4。

1.2.3 MBP-1 RNA 干扰稳转胃癌 SGC-7901 细胞株构建 将阴性对照组、MBP-1 干扰 1 组和 MBP-1 干扰 2 组质粒通过 Lipofectamine 2000 分别转染 SGC-7901 细胞。转染前一天,在 4 个 3.5 cm 直径培养皿中接种细胞,每个培养皿 1×10⁶ 个 SGC-7901 细胞,保证细胞密度达到 90%;取 1 μg pSIREN-retroQ CTE954-2、1 μg pSIREN-retroQ CTE954-4 和 1 μg pSIREN-retroQ CTE954-N 各自溶于 50 μL opti-MEM 培养液中;另取 3 支 200 μL 离心管分别加入 50 μL opti-MEM 培养液,再

各自加入 1 μL Lipofectamine 2000 转染试剂溶于培养液,室温放置 5 min。取上述 pSIREN-retroQ CTE954-2、CTE954-4 和 CTE954-N 质粒溶液分别和前述混合后 Lipofectamine 2000 转染试剂液混匀,室温放置 20 min;将混合液分别加入 SGC-7901 细胞培养皿进行转染,并于 5% CO₂ 37 ℃ 下培养,48 h 后,用 2 μg/mL 嘌呤霉素筛选;2 周后筛选得到稳定转染的 MBP-1 干扰 1 组、MBP-1 干扰 2 组以及阴性对照组细胞株。

1.2.4 Real time PCR 检测 MBP-1 表达 取空白对照组、阴性对照组、MBP-1 干扰组胃癌 SGC-7901 细胞,提取细胞总 RNA,逆转录获得 cDNA,具体方法参照宝生物公司逆转录试剂盒说明书。取 cDNA 产物,Real time PCR 扩增检测 MBP-1 基因表达,具体方法参照宝生物公司 Real time PCR 操作说明书。MBP-1 引物序列为 F:CGT TCA ATG TCA TCA ATG GCG GT;R:CTT CAG GTT GTG GTA AAC CTC TG。Real time PCR 内参人 GAPDH 序列为 F:AAC AGC CTC AAG ATC ATC AGC AA;R:GAG TCC TTC CAC GAT ACC AAA GT。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.2.5 Western blot 检测 MBP-1 蛋白表达 取空白对照组、阴性对照组、MBP-1 干扰组胃癌 SGC-7901 细胞,RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳,转膜,一抗 1:500 稀释于 5%脱脂奶粉,4 ℃ 孵育过夜;HRP 标记的二抗 1:1 000 稀释于 5%脱脂奶粉孵育 1 h;ECL 发光,暗盒曝光,X 光片显影、定影。一抗为兔抗人 MBP-1 多克隆抗体,二抗为山羊抗兔 HRP。

1.2.6 细胞增殖实验 取对数生长期 SGC-7901 细胞,以每孔 5×10⁴ 个细胞接种于 96 孔板,每孔培养液为 200 μL,实验分 4 组,每组设 4 个复孔,并于 37 ℃、50 mL/L CO₂ 细胞培养箱中培养。12 h 后换加无血清 RPMI 1640 培养液 200 mL 继续培养 12 h,使细胞周期同步化,然后换加含 100 mL/L 胎牛血清培养液,分别再培养 24、48、72、96、120 h 后终止培养,在避光条件下加 5 g/L MTT 溶液 20 μL/孔,孵育 4 h,弃上清液,避光条件下加 DMSO 150 μL/孔,置酶标仪上振荡 10 min。以空白孔调零测各孔 570 nm 吸光度(A₅₇₀)值。试验重复 3 次,结果取平均值。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析。实验结果的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

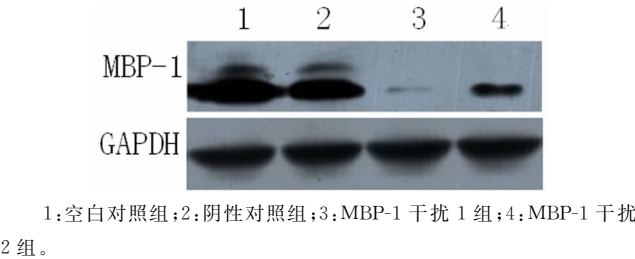
2 结果

2.1 构建 MBP-1 pSIREN-retroQ RNA 干扰质粒 退火产物分别与 pSIREN-retroQ(BamH I /EcoR I)载体连接后,转化感受态 JM109 细胞。从转化平板上挑取 4 个单菌落,用引物 pSIREN-F1/pSIREN-R1 分别对干扰 1 组、干扰 2 组及阴性对照组质粒进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳,阳性克隆检测结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),说明 MBP-1 干扰质粒及阴性对照质粒都已经构建成功。通过 U6 Forward、pSIREN-F1 引物对 CTE954-2、CTE954-4、CTE954-N 质粒进行测序,测序结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),说明 2 条 MBP-1 干扰质粒及一条阴性序列对照质粒都准确构建。

2.2 构建 MBP-1 RNAi 胃癌 SGC-7901 稳转细胞株 将阴性对照组、MBP-1 干扰 1 组和 MBP-1 干扰 2 组质粒分别转染胃癌 SGC-7901 细胞。48 h 后 2 μg/mL 嘌呤霉素筛选,2 周后得到 CTE954-N 阴性对照组、CTE954-2 干扰 1 组和 CTE954-4 干扰 2 组稳转 SGC-7901 细胞株。

2.3 Real time PCR 检测 MBP-1 干扰效率 取空白对照组、阴性对照组、MBP-1 干扰组胃癌 SGC-7901 细胞,提取细胞总 RNA,逆转录获得 cDNA。用人 GAPDH 作为内参,real time PCR 扩增检测 MBP-1 基因表达,检测结果见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),MBP-1 干扰 1 组、干扰 2 组 MBP-1 mRNA 表达都远远低于空白对照组,干扰组与空白对照组之间结果差异有统计学意义($P<0.05$),而空白对照组与阴性对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。说明设计、构建的 MBP-1 干扰序列能有效下调 MBP-1 基因在 mRNA 水平表达。干扰 1 组、干扰 2 组与空白对照组之间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 Western blot 检测 MBP-1 干扰效率 取空白对照组、阴性对照组、MBP-1 干扰组胃癌 SGC-7901 细胞,Western blot 检测 MBP-1 表达,检测结果见图 4,MBP-1 干扰 1 组、干扰 2 组 MBP-1 蛋白表达水平都远远低于空白对照组,说明设计、构建的 MBP-1 干扰序列能有效下调 MBP-1 基因在蛋白水平表达。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:MBP-1 干扰 1 组;4:MBP-1 干扰 2 组。

图 4 Western blot 检测 MBP-1 干扰细胞 MBP-1 表达

2.5 MTT 法检测 MBP-1 RNAi SGC-7901 细胞增殖 为了解 MBP-1 基因下调对 SGC-7901 细胞增殖的影响,MTT 试验检测空白对照组、阴性对照组、MBP-1 干扰 1 组和 MBP-1 干扰 2 组胃癌 SGC-7901 细胞增殖。MTT 检测结果见图 5 和表 1,通过测定 24、48、72、96 和 120 h 干扰组和空白对照组 A_{570} 值,发现 48、72、96、120 h 干扰组吸光度值都显著大于空白对照组($P<0.05$),干扰组吸光度值与空白对照组之间比较差异有统计学意义($P<0.05$),而空白对照组与阴性对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。说明 RNA 干扰 MBP-1 基因表达可以显著提高胃癌 SGC-7901 细胞增殖。干扰 1 组、干扰 2 组与空白对照组之间,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

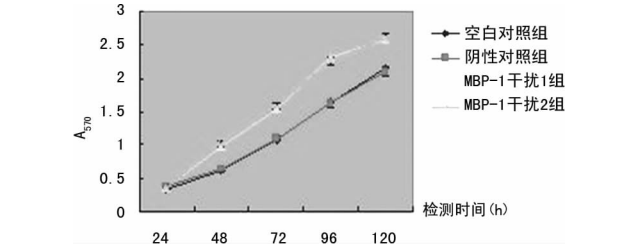


图 5 MTT 法检测 MBP-1 干扰细胞增殖

表 1 MTT 法检测 MBP-1 干扰细胞增殖($n=3$)				
时间	空白对照组	阴性对照组	MBP-1 干扰 1 组	MBP-1 干扰 2 组
24 h	0.34±0.038	0.37±0.040	0.35±0.044	0.36±0.035
48 h	0.62±0.059	0.64±0.047	0.97±0.032*	1.02±0.045*
72 h	1.07±0.055	1.10±0.036	1.53±0.058*	1.58±0.051*
96 h	1.64±0.031	1.62±0.042	2.31±0.067*	2.27±0.057*
120 h	2.15±0.050	2.10±0.065	2.57±0.046*	2.61±0.064*

*: $P<0.01$,与空白对照组比较。

3 讨 论

癌基因 c-myc 编码一种核内的转录因子,在很多人类肿瘤都有广泛地过量表达^[3]。在促有丝分裂的刺激下,c-myc 被快速诱导生成并调节正常的细胞周期^[4]。而过度表达 c-myc 会导致细胞中心体数目的异常^[5]。此外,c-myc 还被证实通过诱导 DNA 损伤和细胞中心体的失常而对染色体结构稳定性产生损坏,导致细胞分裂错误和非整倍体产生^[6]。新近的研究表明,c-myc 可以在非常广泛的基础之上在转录水平增强所有被激活基因表达,而不只是对传统认识的特异靶基因^[7]。已知 MBP-1 结合到 c-myc 基因 P2 启动子(P2 promoter)启动子上^[8],在转录水平抑制 c-myc 表达。

Kanda 等^[9]发现 MBP-1 在感受态免疫小鼠当中可以抑制小鼠乳腺癌肿瘤细胞 EO771 在同系 C57BL/6 小鼠中的生长,并且抑制肿瘤细胞转移。Ghosh 等^[10]发现非小细胞肺癌细胞系 H1299 外源表达 MBP-1 蛋白可大量诱导 H1299 细胞死亡。将腺病毒表达的 MBP-1 瘤内注射到人肺癌异种物,而这种异种物是结合到裸鼠上的,结果发现 MBP-1 能抑制肿瘤的生长,与对照相组比较经 MBP-1 这样处理显著延长了裸鼠的生存时间。Ghosh 等^[11]还通过 RNA 干扰抑制前列腺癌 DU145 细胞中 MBP-1 表达发现 MBP-1 通过抑制 MAPK 信号通路抑制 DU145 细胞生长。下调前列腺癌 PC3 细胞中 MBP-1 的表达可以延缓 PC3 细胞周期的进程,研究发现 MBP-1 表达下调使得周期素 A 和 B1 的表达都显著降低^[12]。此外,Ray 等^[13]在人乳腺癌细胞中过表达 MBP-1 能诱导人乳腺癌细胞凋亡。Ghosh 等^[14]也在人乳腺癌细胞证实 MBP-1 可以诱导细胞凋亡,这种作用是通过 MBP-1 使得细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆,从而激活 caspase-9 前体、caspase-3 前体和多聚 ADP-核糖聚合酶剪接(poly ADP-ribose polymerase cleavage, PARP cleavage),并进一步证实其作用是通过下调 Bcl-xL(B-cell lymphoma-extra large)实现的。

肿瘤发生是多种因素共同参与、多个基因相互作用的结果。由于目前在很多人类肿瘤中都发现癌基因 c-myc 高表达,所以认为基于 MBP-1 在转录水平抑制 c-myc 表达,由此对肿瘤细胞具有降低肿瘤浸润、抑制生长、促进凋亡等作用,可以将 MBP-1 看作一种具有肿瘤基因治疗前景的“抑癌基因”^[15],使得以 MBP-1 为靶点基因治疗在肿瘤治疗上具有更加广阔的前景和应用价值。而对 MBP-1 细胞中表达研究也发现 MBP-1 很多正常组织和肿瘤细胞都有非常广泛表达^[16]。在不同的肿瘤细胞中,由于 c-myc 异常表达,MBP-1 的表达就可以对肿瘤增殖等生物学效应进行控制。正是基于对 MBP-1 在肿瘤基因治疗方面的认识,通过 RNA 干扰技术下调胃癌 SGC-7901 细胞中 MBP-1 表达,Real time PCR 及 Western blot 检测干扰组和空白对照组 MBP-1 表达,说明已经成功构建 MBP-1 稳转 SGC-7901 干扰株细胞。MTT 检测可以看到 MBP-1 表达下调后肿瘤细胞增殖从 48 h 到 120 h 都比空白对照组显著增高,说明下调 MBP-1 的基因表达能促进 SGC-7901 细胞增殖,进一步证实 MBP-1 在肿瘤增殖方面发挥重要作用。此外,Hsu 等^[17]在胃癌细胞当中下调 MBP-1 表达,发现 MBP-1 通过下调 Cox2(cyclooxygenase 2)的表达对肿瘤增殖、转移等产生影响,说明 MBP-1 对肿瘤细胞的抑制作用不仅仅通过 c-myc 一条途径,确切机制还需要更进一步的阐明。

综上所述,通过 RNA 干扰下调胃癌 SGC-7901 细胞 MBP-1 的表达,促进了细胞增殖,说明 MBP-1 在胃癌细胞的生长中发挥重要作用。进一步研究 MBP-1 对胃癌的发生、发展及其

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)