

沉默 Pokemon 基因对鼻咽癌细胞株 CNE-2 放射敏感性的影响

牛道立^{1,2}, 李建锋², 何 芬², 邹俊涛³, 周琼芳², 魏 旋², 李 杨², 陈龙华^{1*}

(1. 南方医科大学附属南方医院放疗科, 广东 广州 510515; 2. 广州医学院第一附属医院放疗科, 广东 广州 510070; 3. 中山大学中山医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨沉默 Pokemon 基因对鼻咽癌细胞(CNE-2)放射敏感性的影响, 寻求放射治疗鼻咽癌的新方法。【方法】首先利用 siRNA 预测软件得到 3 条 siRNA 序列, 并制备合成 siRNA 片段, 利用 RT-PCR 和免疫印迹法检测其沉默 Pokemon 基因的效果, 筛选出沉默效果最佳的 siRNA 片段, 转染 CNE-2 细胞后观察其对 CNE-2 细胞 p53 基因表达的影响、MTT 法检测细胞的增殖活性、流式细胞术检测细胞的凋亡、克隆形成法检测转染 siRNA 联合放射处理后细胞的放射增敏比。【结果】成功筛选出了沉默效应最佳的 siRNA 片段, 转染 CNE-2 细胞后能显著降低其 Pokemon 基因的表达、提高 p53 基因的表达、降低细胞的增殖活性、加速细胞的凋亡, 同时增加了 CNE-2 细胞的放射敏感性。【结论】沉默 Pokemon 基因能增加鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性, 这为临床鼻咽癌的放射增敏治疗提供了新思路。

关键词: Pokemon 基因; 鼻咽癌; 放射敏感性

中图分类号: R73 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)06-0733-06

Influence of Silencing Pokemon Gene with siRNA on Radiation Sensitivity of CNE-2 Cell

NIU Dao-li^{1,2}, LI Jian-feng², HE Fen², ZOU Jun-tao³, ZHOU Qiong-fang², WEI Xuan², LI Yang², CHEN Long-hua^{2*}

(1. Department of Chemotherapy, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Chemotherapy, The First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510070, China; 3. Department of Human Anatomy, Zhongshan Medical University, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of pokemon gene knockdown on radiation sensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell (CNE-2). 【Methods】Three siRNA sequences were designed through siRNA prediction software, and the best siRNA was screened by detecting the expression of Pokemon with RT-PCR and Western blotting. After the siRNA was transfected to CNE-2 cells, the p53 expression was investigated, and the cell proliferation was detected by MTT, and the apoptosis was detected by flow cytometry, and the radiosensitization ratio was detected by clone formation. 【Results】The best siRNA was successfully screened. siRNA transfecting could decrease Pokemon expression, enhance p53 expression, reduce the cell proliferation, accelerate apoptosis, and augment the radiosensitization. 【Conclusion】Knockdown of pokemon could increase radiosensitization of nasopharyngeal carcinoma cell (CNE-2), which supplied a new idea of the nasopharyngeal carcinoma radiotherapy.

Key words: pokemon; nasopharyngeal carcinoma; radiosensitization

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 733-738]

鼻咽癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 80% 发生在中国。放射治疗是目前的主要治疗手段。但是其 5 年生存率仍然在 80% 左右。Pokemon 基因也被称为 LRF、OCZF、FBI-1, 是第一个被发现的生

长素响应因子(Auxin response factor, ARF)特异性转录抑制物, 位于诸多抑癌基因和原癌基因的上游, 通过 ARF-p53 路径对肿瘤的发生发展进行调节, 是引起肿瘤发生发展的一个关键因素^[1]。本研

收稿日期: 2012-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(81000545); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20090171120047); 广东省自然科学基金(s2011010003915, 9451008901002145); 广州市教委重大科研项目(61100); 广州市医药卫生科技项目(201102A213119)

作者简介: 牛道立, 主任医师, 放射肿瘤学专业, E-mail: daoliniu@163.com; * 通信作者: 陈龙华, 教授, 博士生导师

究合成高效的沉默 Pokemon 肿瘤基因的 siRNA 片段,转染鼻咽癌细胞(CNE-2),联合放射治疗,观察其对 CNE-2 细胞放射敏感性的影响,为 Pokemon 基因与放疗结合的临床治疗策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鼻咽癌 CNE-2 细胞株由中山大学肿瘤防治中心夏云飞教授馈赠;胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自杭州四季青公司;PCR 试剂盒为 TAKARA PCR Kit(AMV)Ver.3.0;转染试剂盒为 LIPOFECTAMINE RNAIMAX,购自 Invitrogen 公司;兔抗人 Pokemon 多抗购自 Abcam 公司;鼠抗人 p53 抗体、GAPDH 抗体、山羊抗兔、山羊抗鼠 IgG 二抗均购自 Invitrogen 公司;p53 过表达重组 pcDNA-p53 载体为本课题组保存。其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 Pokemon 基因 siRNA 片段的合成

根据 NCBI GenBank 上公布的人类 Pokemon 基因(NM_015898)序列,根据 shRNA 的设计原则,利用在线软件筛选出干扰序列交由广州市锐博生物科技有限公司合成, Si-h-ZBTB7A_001 (5' GGACCUUGUAGAUCAAAUU dTdT 3'); Si-h-ZBTB7A_002 (5' GCACAGACACCUC AAGAAAdTdT 3'); Si-h-ZBTB7A_003 (5' CCCACAACUACGACCU GAA dTdT 3'), 所选择的序列通过 BLAST 软件在 GenBank 上做比对,证明所选择的 siRNA 序列与其他基因没有同源性。实验同时以 GACATCATA GGTGCATGC 作为阴性对照组的干扰序列,此序列不与任何人类基因序列同源。

1.3 细胞培养和细胞转染

1.3.1 siRNA 的转染 CNE-2 细胞常规培养于含体积分数 10%胎牛血清的 1640 培养液中,体积分数 5% CO₂、37 °C 恒温箱培养。取对数生长期的细胞,然后接种至 96 孔板及 6 孔板中,细胞生长达到 40%~60%时,按照 Lipofectamine RNAimax 试剂盒操作步骤及试剂配制比例,加入转染试剂及 siRNA 片段,4 h 后加入新鲜培养液。实验设立实验组(Si-h-ZBTB7A_001、002、003)、对照组和空白组。实验组为 siRNA 转染组,对照组为阴性对照组,空白组只加入相同试剂,未加入转染片段。

1.3.2 pcDNA-p53 载体的转染 取对数生长期的

CNE-2 细胞用胰酶消化,制成细胞悬液,稀释后按照 4×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板中,次日按 3 μ g 质粒/孔转染细胞,按照 Lipofectamine RNAimax 试剂盒操作步骤及试剂配制比例,加入转染试剂及 pcDNA-p53 载体,4 h 后加入新鲜培养液。24 h 后收集细胞。每组 3 个复孔。

1.4 Pokemon 基因表达的检测

应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Pokemon 基因 RNA 的表达。收集转染后培养 24 h 的 CNE-2 细胞用 TRIzol 法提取总的细胞 RNA。Pokemon 引物的上游序列 5'-CAGCCAAGTCTGTG ACTTGCACGTAC-3', 下游序列 5'-CTATGTCCG AAAGTGTCTGTGCATC-3'(产物 134 bp);GAPDH 引物上游序列 5'-CCCATGGCAAATTCATGGCA CCG-3', 下游序列 5'-GTCATGGATGACCTTGGC CAGGG-3'。PCR 的反应体系为 25 μ L: 逆转录产物 1 μ L, 10 \times Taq 酶反应缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ 2.0 μ L, dNTP 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Taq 酶 1 μ L, 去离子水补足 25 μ L。循环参数:Pokemon 基因:预变性(94 °C, 2 min), 30 个循环的变性(94 °C, 30s)、退火(54 °C, 30 s)、延伸(72 °C, 4 min), 最后补充延伸(72 °C, 10 min); 成像仪上进行拍照, 利用相关图像分析软件 SensiAnsys 分析电泳条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.5 Pokemon 蛋白表达的检测

采用 Western blotting (免疫印迹法) 检测 CNE-E 细胞中 Pokemon 蛋白的表达。转染后 24 h, 收集 CNE-2 细胞, 使用细胞裂解液抽提细胞总蛋白, 应用 Bradford 法检测细胞总蛋白浓度, 取 50 μ g 总蛋白进行电泳分析。使用 SDS-PAGE 进行蛋白分离, 然后将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜, 使用的脱脂奶粉封闭液封闭 2 h, 后加入 1:1 000 的兔抗人 Pokemon 蛋白多克隆抗体, 4 °C 冰箱过夜后加入 1:5 000 羊抗兔 IgG-HRP 二抗, 孵育 1 h, 洗膜 3 次, 至 Kodar 成像仪上拍照。利用 SensiAnsys 图像分析软件扫描分析条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.6 p53 基因表达的检测

应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 p53 基因 RNA 的表达。收集转染后 24 h 的 CNE-2 细胞用 TRIzol 法提取总 RNA。p53 引物上游序列 5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTAC-3', 下游序列 5'-CTATGTCCGAAAAGTGTCTGTGCATC-3'。PCR 的反应体系为 25 μ L: 逆转录产物 1 μ L, 10 \times

Taq 酶反应缓冲液 2.5 μL , MgCl_2 2.0 μL , dNTP 1 μL , 上下游引物各 1 μL , Taq 酶 1 μL , 去离子水补足 25 μL 。循环参数:p53 基因: 预变性 (94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min), 30 个循环的变性(94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s)、退火(53 $^{\circ}\text{C}$, 30 s)、延伸(72 $^{\circ}\text{C}$, 4 min), 最后补充延伸(72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min); 然后在 Kodar 成像仪上进行拍照, 利用 SensiAnsys 图像分析软件分析电泳条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.7 p53 蛋白表达的检测

采用 Western blotting (免疫印迹法) 检测 p53 蛋白的表达。转染后 24 h, 将 CNE-2 细胞使用细胞裂解液抽提细胞总蛋白, 利用 Bradford 法检测总蛋白的浓度, 50 μg 总蛋白进行电泳。使用 SDS-PAGE 分离蛋白, 完毕后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 脱脂奶粉封闭液封闭 2 h, 加入 1:3 000 鼠抗人 p53 蛋白多克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜; 洗膜 3 次, 加入 1:5 000 羊抗鼠 IgG-HRP, 孵育 1 h, 洗膜后 Kodar 成像仪上拍照。利用 SensiAnsys 图像分析软件扫描分析条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.8 细胞增殖活性的检测

采用 MTT (噻唑蓝) 法检测 CNE-2 细胞的增殖活性。将处于对数生长期的转染组及对照组细胞接种 96 孔板 (3000 个/孔), 选取 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 时间点弃去培养基, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 继续培养 4 h, 弃去 MTT 溶液, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μL , 室温下震荡 10 min, 酶标仪 490 nm 处测定每孔的吸光度光度值 (A 值), 然后绘制 CNE-2 细胞生长曲线图, 计算 CNE-2 细胞的生长抑制率。实验重复 3 次。

1.9 平板克隆形成实验

将 CNE-2 细胞胰酶消化后制成单细胞悬液, 在每孔 (6 孔板) 中接入 200 个细胞, 每组设 3 个复孔, 在 RPMI1640+10% 新生牛血清、饱和湿度、体积分数 5% CO_2 条件下培养 10~14 d, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, 结晶紫染色 10 min, 自然干燥, 在显微镜下计数 50 个细胞以上的克隆数。

1.10 Transwell 迁移实验

将 CNE-2 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度条件下使用培养液 (RPMI1640+5% NBS) 培养 24 h, 在小室的上腔中加入 200 μL Invasion Buffer, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h, 胰酶消化细胞, 1 000 r/min 离心 10 min (离心半径 $r = 15$ cm), 收集细胞, 用

Invasion Buffer 重悬细胞, 小心弃除 Transwell 小室中的 Invasion Buffer, 均匀加入 200 μL 细胞悬液至小室上腔, 将细胞放入培养箱中, 放置 18~24 h, 将 Transwell 小室放入多聚甲醛中固定 20 min, 风干后用结晶紫染色液染色 30 min, 显微镜下计数细胞, 计数 10 个高倍视野 ($\times 200$) 下穿过滤膜的细胞数。实验重复 3 次。

1.11 细胞凋亡的检测

流式细胞术检测 CNE-2 细胞的凋亡率。收集 1×10^6 个处于对数生长期 CNE-2 细胞, 按照试剂盒步骤 1000 $\times g$ 离心 10 min, 加入预冷 PBS 洗涤 3 次, 将细胞重悬于 200 μL 的 Binding Buffer, 加入 10 μL Annexin V-FITC, 混匀, 避光室温反应 15 min, 上机前 5 min 加入 10 μL 碘化吡啶, 再加入 300 μL 的 Binding Buffer, 1 h 内上机检测。以各组中凋亡细胞占总计数细胞的百分比计算凋亡率。实验重复 3 次。

1.12 克隆形成法检测 CNE-2 细胞的放射敏感性

使用西门子直线加速器分别使用 0、2、4、6、8、10 Gy 的剂量的 6MV X 射线照射各孔 CNE-2 细胞, 然后将 CNE-2 胰酶消化后制成单细胞悬液, 按照剂量大小分别将 1×10^2 、 1×10^3 、 2×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 个细胞接种于 60 mm 培养皿中, 每个照射剂量均设 3 个平行样品。采用西门子直线加速器照射 (射线种类及能量: 6MV X 线, 射野 20 cm \times 20 cm, SSD = 100 cm, 机架角 180 $^{\circ}$, 下垫 1.5 cm 等效膜)。然后将培养皿在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养 2 周。2 周后将各组 CNE-2 细胞用 95% 乙醇固定, Giemsa 染色后计数 (>50 个细胞计数为一个存活集落), 计算存活分数 (surviving fraction, SF) 和克隆形成率。应用单击多靶数学模型 (single-hit multitarget model) 计算 $D0$ 值 (平均致死剂量) 和 Dq 值 (准域剂量)。使用 GraphPad Prism 4.0 软件拟合细胞存活曲线。

1.13 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。所得数据结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 利用 SPSS13.0 统计软件的单因素 ANOVA 检验。

2 结果

2.1 转染后 p53 基因及蛋白的表达

利用 RT-PCR 检测 p53 基因表达, 利用 Western blot 检测 p53 蛋白表达。结果显示, 转染 pcDNA-p53 和 Si-h-ZBTB7A_002, P53 的基因表达及蛋白表达较对照组均增强 ($P < 0.05$), 而 pcDNA-p53 较 Si-h-ZBTB7A_002 组的表达更加明显 ($P < 0.05$; 图 1、2)。

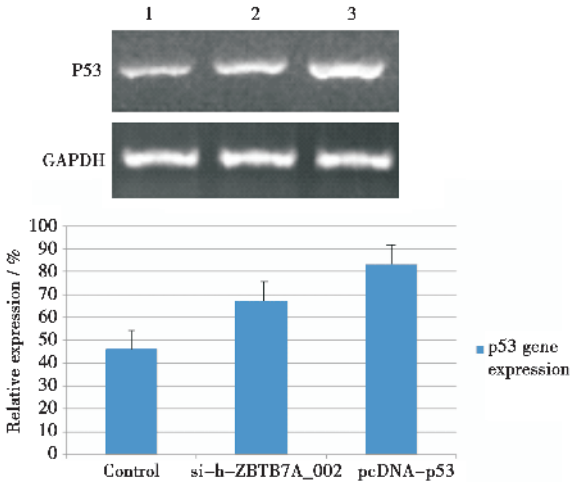


图 1 转染后 p53 基因 RT-PCR 表达结果

Fig.1 RT-PCR expression of p53 gene after transfection

1: control; 2: Si-h-ZBTB7A_002; 3: pcDNA-p53. $n = 3$.

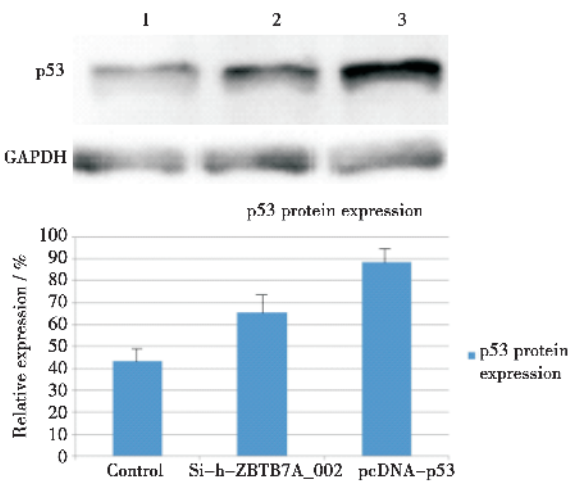


图 2 转染后 p53 基因蛋白表达结果

Fig.2 Expression of p53 protein after transfection

1: control; 2: Si-h-ZBTB7A_002; 3: pcDNA-p53. $n = 3$.

2.2 转染后对细胞增殖活性的影响

利用 MTT 法检测细胞的增殖活性。结果显示: 转染 Si-h-ZBTB7A_002 片段及 pcDNA-p53 载体后, 细胞的增殖活性较对照组受到抑制 ($P < 0.05$); 而 pcDNA-p53 组细胞的增殖活性与 Si-h-

ZBTB7A_002 组相比, 细胞增殖活性降低较为明显 ($P < 0.05$, 图 3)。

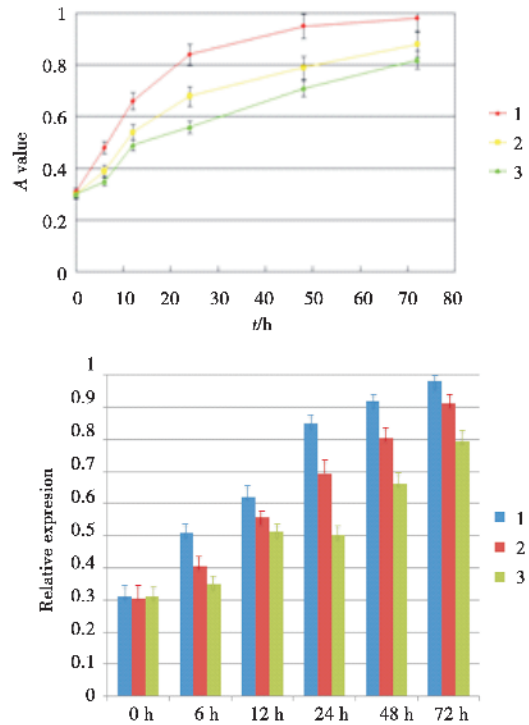


图 3 转染后细胞增殖活性的影响

Fig.3 Increase activity of cell after transfection

1: control; 2: Si-h-ZBTB7A_002; 3: pcDNA-p53. $n = 3$.

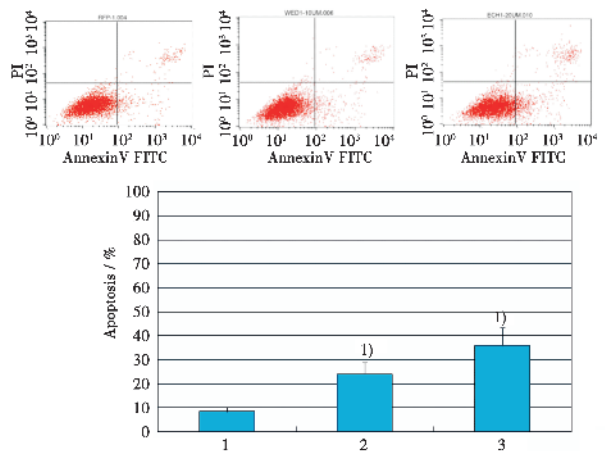


图 4 转染对细胞凋亡的影响

Fig.4 Apoptosis after transfection

1: control; 2: Si-h-ZBTB7A_002; 3: pcDNA-p53. $n = 3$. 1) $P < 0.05$ vs control

2.3 平板克隆形成实验

我们采用平板克隆形成法检测沉默 Pokemon 基因对 CNE-2 细胞克隆形成能力的影响。以每孔

200个细胞的数量接种于6孔板,10~14 d后结晶紫染色显微镜下检测细胞克隆数,Si-h-ZBTB7A_002组(54.00 ± 2.65)、pcDNA-p53组(40.33 ± 1.53)细胞形成的平板克隆数显著少于对照组(83.33 ± 2.08)($P < 0.001$),而pcDNA-p53组得克隆形成数又少于Si-h-ZBTB7A_002组。

2.4 Transwell 迁移实验

同对照组细胞相比,铺板12 h后Si-h-ZBTB7A_002组(45.00 ± 1.00)、pcDNA-p53组(33.00 ± 2.64)细胞穿透基质胶的细胞数较对照组(82.67 ± 1.53)显著减少($P < 0.001$)。pcDNA-p53组穿透基质胶的细胞数又明显少于Si-h-ZBTB7A_002组。

2.5 转染后对细胞凋亡的影响

利用流式细胞术检测细胞的凋亡情况。结果显示:感染Si-h-ZBTB7A_002后及pcDNA-p53后,二组细胞的凋亡较对照组明显增加($P < 0.05$),而pcDNA-p53组对细胞凋亡的影响较Si-h-ZBTB7A_002组更加明显($P < 0.05$)(图4)。

2.6 转染后对细胞放射敏感性的影响

Si-h-ZBTB7A_002组、pcDNA-p53组及空白对照组的CNE-2细胞接受0~10 Gy的X线照射,培养14 d后可见大小不等的细胞克隆。经GraphPad Prism 4.0软件拟合的细胞存活曲线(图5)(半对数坐标图)。Si-h-ZBTB7A_002组、pcDNA-p53组的Dq值分别为 1.989 ± 0.017 、 2.309 ± 0.477 ;D0值分别为 2.363 ± 0.047 、 2.773 ± 0.031 。Si-h-ZBTB7A_002组和pcDNA-p53组的放射增敏比SER值分别为1.25、1.16。提示Si-h-ZBTB7A_002组和pcDNA-p53组均能够增加CNE-2细胞的放射敏感性,相比而言,Si-h-ZBTB7A_002组效果更加明显。

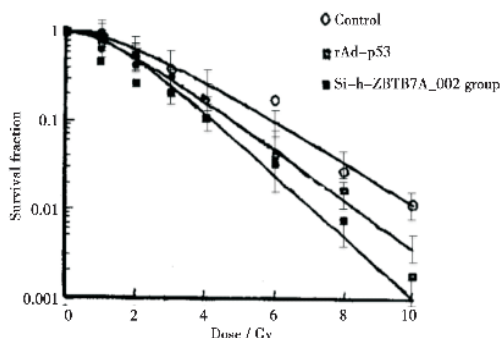


图5 细胞放射敏感性的影响

Fig.5 Radiosensitivity of cell

3 讨论

放射治疗是鼻咽癌治疗的主要方法,与其他类型的恶性肿瘤相比,取得了较为满意临床治疗效果,但是,仍有部分患者的临床治疗效果不甚明显,此外,由于鼻咽癌生长位置的特殊性,较高的放疗剂量也造成了周围正常组织的损伤严重,降低了患者的生存质量。

原癌基因 Pokemon(zbtb7 基因)位于人类染色体 19p13.3 区域,全长 21 600 bp。Pokemon 基因 mRNA 长 4 456 bp,该基因由 2 个外显子构成,其中含有一个开放的阅读框,编码含 584 个氨基酸的一个 Pokemon 蛋白多肽,分子质量为 61.5 ku。研究表明,Pokemon 可能是通过抑制抑癌基因 ARF 的转录来发挥致癌作用,通过 Pokemon $\uparrow \rightarrow$ ARF $\downarrow \rightarrow$ MDM2 $\uparrow \rightarrow$ p53 $\downarrow \rightarrow$ 肿瘤发生这一致癌模式而发挥抑制肿瘤生长的作用^[1]。Pokemon 基因的作用位点位于许多肿瘤抑制基因和原癌基因的上游,因此将其作为治疗靶点具有十分重要意义。目前发现原癌基因 Pokemon 在一些人类肿瘤如淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和膀胱癌等肿瘤中存在高表达^[2-8]。其中在鼻咽癌细胞,高伟等^[9]认为 Pokemon 基因也存在高表达。P53 作为 Pokemon 基因的效应基因,当基因组的 DNA 受到损害时,参与受损 DNA 的修复;如果修复失败,P53 将会启动细胞程序性死亡过程,诱导凋亡。研究^[10-12]表明:将 P53 基因导入肿瘤细胞后能够抑制肿瘤细胞的生长,增加肿瘤细胞的凋亡率。

本研究通过将 Pokemon siRNA 及 pcDNA-p53 转染鼻咽癌(CNE-2)细胞,观察其对细胞放疗敏感性的影响,结果显示:虽然 pcDNA-p53 组在 P53 基因的表达、鼻咽癌的增殖及凋亡的影响均较 Pokemon siRNA 效果更加明显,但其对鼻咽癌细胞的放射敏感性却不及后者明显。其原因可能是:Pokemon 基因是很多原癌基因的上游基因,可能其作用途径除了 ARF-P53 外,还有通过其他途径起到致癌作用。Maeda 等^[13-14]的研究表明:pokemon 发挥致癌活性可能通过对其他多重附加目标基因(multiple additional target genes)的表现遗传(epigenetic)的控制发挥作用;此外,POZ/BTB 包含的域蛋白(domain containing proteins)和与 cullin 相关的 E3 连接酶(cullin-based E3 ligases)

也存在明显的功能相关性,而且 Pokemon 基因还可以通过蛋白质的泛素化作用(ubiquitination)来调节以上的相关基因或通路。另外,Pessler 等^[15]也提出 pokemon 蛋白可以利用 POZ/BTB 域形成同源或异源二聚体发挥作用,而且可以共享相似的 DNA 共有序列。另外,还有研究表明,Pokemon 可以通过 survivin^[16]、表皮生长因子^[17]、Bcl-2^[18]、H-ras^[19]等发挥致癌作用。因此,我们可以认为 Pokemon 蛋白的功能网络很可能是动态地发挥作用,而且比预期的更加多态和复杂。因此,Pokemon 基因可能在与放疗的联合过程中,启动了其他诸多的相关功能通路,从而发挥了比单纯干扰 ARF-P53 通路更加明显的效果。我们的研究也证明了这一点。

本研究结果为将基因转导与放疗联合作为鼻咽癌放射治疗这一新的临床治疗方案提供的初步的实验依据。下一步我们将继续探讨沉默 Pokemon 基因增加鼻咽癌细胞放射敏感性的机制。

参考文献:

- [1] Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression[J]. *Nature*, 2005, 433(7023): 278-285.
- [2] 赵智宏,王胜发,张铁娃,等. Pokemon 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(6): 491-494.
- [3] Himanshu A, Anshu A, William J, et al. Expression of leukemia/lymphoma related factor (LRF/Pokemon) in human benign prostate hyperplasia and prostate cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90(2): 226-230.
- [4] 李志明,蔡曦光. Pokemon 与 E2F1 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2009, 49(16): 96-98.
- [5] 张保宁. 乳腺癌临床研究的回顾与展望[J]. *中华医学杂志*, 2005, 81(1): 1-5.
- [6] 崔明,徐海,杨彦,等. Pokemon 基因在乳腺癌中的表达及意义[J]. *临床外科杂志*, 2007, 15(6): 399-401.
- [7] 刘海峰,曲宏岩. Pokemon mdm2 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2008, 42(6): 601-604.
- [8] 计勇,何晓顺,马毅. Pokemon 在肝细胞癌远处转移、肝硬化和健康人群外周血中的表达及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(11): 1320-1322.
- [9] 高伟等. Pokemon 在鼻咽癌中的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(01): 0037-0041.
- [10] 张沁宏,王东,牟江洪,等. 重组介导的 P53 基因对肝癌细胞生长抑制作用的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(2): 121-124.
- [11] Hoshino I, Matsubara H, Akutsu Y, et al. Role of histone deacetylase inhibitor in adenovirus-mediated P53 gene therapy in esophageal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(2A): 665-671.
- [12] Oshima Y, Sasaki Y, Negishi H, et al. Antitumor effect of adenovirus-mediated P53 family gene transfer on osteosarcoma cell lines [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(7): Epub ahead of print.
- [13] Maeda T, Robin M, Hobbs RM, et al. Pandolfi PP. The transcription factor pokemon: a new key player in cancer pathogenesis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(9): 8575-8578.
- [14] Pintard L, Willems A, Peter M. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family [J]. *EMBO J*, 2004, 23(9): 1681-1687.
- [15] Pessler F, Hernandez N. Flexible DNA binding of the BTB/POZ-domain protein FBI-1 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 29327-29335.
- [16] Xuyu Zu, Jun Ma. Pro-oncogene Pokemon promotes breast cancer progression by upregulating survivin expression [J]. *Breast Cancer*, 2011, 13(2): R26.
- [17] Himanshu A, Anshu A, Devendra K, et al. Epidermal growth factor increases LRF/Pokemon expression in human prostate cancer cells [J]. *Breast Cancer*, 2011, 91(2): 496-501.
- [18] Zhao X, Ning Q, Sun X, et al. Pokemon reduces Bcl-2 expression through NF- κ Bp65: A possible mechanism of hepatocellular carcinoma [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2011, 4(6): 492-497.
- [19] Zhang QL, Tian DA, Xu XJ. Depletion of Pokemon gene inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through inhibition of H-ras [J]. *Onkologie*, 2011, 34(10): 526-531.

(编辑 王晓鹰)