

· 论 著 ·

PLC ϵ 特异性 shRNA 对人膀胱癌生物学行为的影响*刘 琪, 欧俐苹, 赵 懿, 程洪林, 张彦懿, 罗春丽 Δ

(重庆医科大学检验医学院/临床检验诊断学教育部重点实验室/重庆市重点实验室 400016)

摘要:目的 探讨人源磷脂酶 C ϵ (PLC ϵ)特异性短发夹 RNA(shRNA)对人膀胱癌增殖、凋亡、侵袭、转移能力的影响。方法 用携带 PLC ϵ shRNA 基因的真核表达质粒 pGenesil- PLC ϵ 转染 BIU-87 细胞,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹法检测各组细胞 PLC ϵ mRNA 和蛋白的变化。分别用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)、流式细胞术和免疫组化检测 BIU-87 细胞及裸鼠移植瘤增殖情况和细胞周期的变化;采用 RT-PCR 检测各组细胞 Bcl-2、Bax mRNA 的变化;采用 Transwell 小室体外侵袭法及明胶酶谱分析细胞的侵袭能力。**结果** 转染 pGenesil-PLC ϵ 质粒的细胞可明显抑制 PLC ϵ 基因和蛋白表达水平($P < 0.05$);MTT、流式细胞术与免疫组化检测结果表明转染 pGenesil- PLC ϵ 质粒的细胞生长明显受抑制($P < 0.05$),且细胞周期阻滞于 G $_0$ /G $_1$ 期;转染 pGenesil- PLC ϵ 质粒的细胞 Bcl-2/Bax mRNA 明显降低($P < 0.05$);明胶酶谱及侵袭实验显示转染 pGenesil-PLC ϵ 质粒的细胞侵袭、转移能力明显下降($P < 0.05$)。**结论** 特异性 shRNA 干扰 PLC ϵ 基因可抑制膀胱癌的生长,其作用机制可能与抑制肿瘤增殖、诱导细胞凋亡及抑制侵袭转移有关,PLC ϵ 为膀胱癌基因治疗的潜在靶点。

关键词:膀胱肿瘤;细胞增殖;肿瘤浸润;短发夹 RNA;磷脂酶 C ϵ

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)33-3342-04

Effect of PLC ϵ shRNA on biological behavior of bladder cancer*Liu Qi, Ou Liping, Zhao Yi, Cheng Honglin, Zhang Yanyi, Luo Chunli Δ

(College of Laboratory Medical Diagnostics/the Key Laboratory of Medical Diagnostics of Education Ministry/ the Key Laboratory of Chongqing, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the proliferation, apoptosis and invasion effect by silencing PLC ϵ in bladder cancer. **Methods** The shRNA recombinant plasmids targeting PLC ϵ gene was transfected into bladder carcinoma cell line BIU-87; RT-PCR and Western-blot detected the expression level of PLC ϵ mRNA and protein. The proliferation and cell cycle were respectively measured by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT), FCM and IHC. The expressions level of Bcl-2, Bax mRNA were detected by RT-PCR. Invasive power of BIU-87 was measured by membrane invasion culture system(Transwell chamber) and gelatin enzymography. **Results** The expression of PLC ϵ mRNA and protein were effectively reduced in transfected cell($P < 0.05$). The cellular proliferation was obviously inhibited in transfected BIU-87 cell($P < 0.05$) and the G $_0$ /G $_1$ cell cycle was increased. Bcl-2/Bax mRNA expression was down-regulated in transfected cell($P < 0.05$). The invasion power of cell transfected with positive plasmid was lower than the control group($P < 0.05$). **Conclusion** Transfection of PLC ϵ shRNA can inhibit the growth of bladder cancer, and the mechanism may relate to the inhibition of proliferation and invasion, and the induction of apoptosis. PLC ϵ shRNA may become to a potential molecular target for bladder cancer in gene therapy.

Key words: urinary bladder neoplasms; cell proliferation; neoplasm invasiveness; short hairpin RNA; phospholipase C epsilon

膀胱癌是中国最常见的泌尿系统肿瘤,而 Ras 基因是最早发现与膀胱癌发生、发展密切相关的基因之一,在膀胱癌中通过表达突变蛋白产物致癌^[1-2]。最近研究表明,磷脂酶 C ϵ (phospholipase C epsilon, PLC ϵ)基因可通过 RA2 结构域与 H-Ras 结合而被激活^[3],是 H-Ras 新的效应分子^[4-6]。研究表明 PLC ϵ 在膀胱癌中高表达,利用 RNA 干扰技术可抑制膀胱癌细胞的增殖,但作用机制仍不明确^[7]。因此,本研究利用短发夹 RNA(shRNA)技术研究 PLC ϵ 基因对膀胱癌生物学行为的影响,以期证实膀胱癌的新靶点,为膀胱癌基因治疗提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料 人膀胱移行细胞癌株 BIU-87、PLC ϵ 特异性 shRNA 的重组表达质粒 pGenesil-PLC ϵ 及阴性对照 pGenesil-NP

重组质粒由本实验室保存,总 RNA 提取试剂 TRIzol 和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒均购自大连宝生物工程(Takara)有限公司,PCR 引物由美国 Invitrogen 公司合成,转染试剂 Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司,羊抗人 PLC ϵ 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗人周期蛋白 D1(cyclin D1)单克隆抗体、鼠抗人基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 单克隆抗体、SP-9000 通用型免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,Transwell 侵袭小室购自美国 BD 公司,明胶购自美国 Gibco 公司。

1.2 实验动物 BALB/c 雌性裸鼠 15 只,4~6 周龄,体质量 14~16 g,购自北京中国科学院实验动物研究所[动物饲养许可证号 SCXK(京)2005-0013]。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、实验分组、细胞转染及阳性克隆细胞筛选
 BIU-87 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。将 BIU-87 细胞以 1 × 10⁶ 个/孔的密度种于 6 孔板中, 待其生长到 90% 融合时, 按照脂质体 Lipofectamine 2000 说明书进行转染。实验分为 3 组: (1) 阳性质粒 pGenesil-PLCε 组 (实验组); (2) 阴性质粒 pGenesil-NP 组 (阴性对照组); (3) 未转染质粒组 (空白对照组)。转染 48 h 后用含 400 μg/mL G418 及 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基进行筛选, 每隔 2 d 更换一次培养基。当细胞大量死亡时, 将 G418 浓度减为 200 μg/mL 维持筛选, 3 周后抗性克隆, 挑选单克隆细胞扩大培养。

1.3.2 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测 BIU-87 细胞的增殖活性
 取对数生长期细胞, 以 2 × 10⁴ 个/毫升接种于 96 孔平底培养板, 每孔加入 200 μL 培养基。在实验分组的基础上另设调零组, 每组设 5 个复孔。转染后分别培养 0、24、48、96、120 h, 弃上清液, 每孔加入 20 μL 的 MTT (5 mg/mL) 继续培养 4 h 弃上清, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡孵育 10 min, 酶标仪 (490 nm) 检测各孔的吸光度 (OD 值)。按照公式: 抑制率 (%) = [1 - (OD 各组 - OD 调零组) / (OD 空白对照组 - OD 调零组)] × 100%, 计算各组抑制率。

1.3.3 流式细胞术检测 BIU-87 细胞的细胞周期分布
 取稳定转染生长状态好的细胞, 收集并离心, 用磷酸二氢盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次后弃上清液, 重悬细胞, 加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇溶液固定 18~24 h。将已固定的细胞悬液和等体积 PI 染液混合, 4 °C 放置 20~30 min, 测定前将样品用 300 目的尼龙膜过滤后放入流式细胞仪样品室, 以激发波长 488 nm 测定。

1.3.4 RT-PCR 检测细胞内 PLCε、Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达
 引物设计见表 1, 按 RT-PCR 试剂盒说明书进行, PCR 产物分别经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

表 1 合成的引物

基因	引物序列	长度(bp)
PLCε	5'-CAT GGA AGG ATA AGC GTT GGT-3'	395
	5'-CCC AAG TCC CGT GTT AAG A-3'	
β-actin	5'-AGG CCA ACC GCG AGA AGA TG-3'	494
	5'-AGT TTC GTG GAT GCC ACA GG-3'	
Bcl-2	5'-CCC AAG TCC CGT GTT AAG A-3'	130
	5'-CCT AGC AAC GGA ATA CGT AA-3'	
Bax	5'-GAT GCG TCC ACC AAG AAG CT-3'	170
	5'-CGG CCC CAG TTG AAG TTG-3'	
GAPDH	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	450
	5'-ATG TCG TTG TCC CAC CT-3'	

1.3.5 蛋白质印迹法检测各组细胞 PLCε 蛋白表达
 用细胞裂解液 (RIPA) 裂解各组细胞, 提取细胞总蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度。以 50 μg 蛋白上样, 经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离转 PVDF 膜, 5% 封闭液 4 °C 封闭过夜, 加一抗 (1 : 200) 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, ECL

显色剂显影, 图像分析。

1.3.6 Transwell 小室体外侵袭法
 在 8 μm 孔径聚碳酸酯微孔滤膜上均匀涂抹一层 1 : 5 稀释的人工基底膜 Matrigel, 约 40 微升/室; 小室上层分别加入各组细胞悬液 200 μL, 细胞浓度均为 5 × 10⁵ 个/毫升, 每组设 3 个复孔, 检测各组细胞的侵袭能力。每孔随机计数 5 个视野 (× 400), 以穿膜的肿瘤细胞数作为评价其侵袭能力的指标, 取平均值。

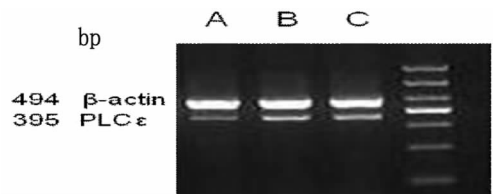
1.3.7 明胶酶谱分析
 各组 BIU-87 细胞均长至 80% 时弃去含血清的培养基, 用无血清培养基洗 3 遍后加入 2 mL 无血清培养基, 继续培养 4 h 后收集培养基, 并进行活细胞计数, 将收集的培养基 4 °C 离心并过滤, 将各组样品上样, 于 8% SDS-PAGE, 160 V 恒压电泳 2~3 h, 将凝胶于 2.5% Triton-X100 液体内 37 °C 振荡 1 h, 然后置于酶缓冲液中 37 °C 孵育 16 h, 0.5% 考马斯亮蓝染液染色, 脱色至合适, 扫描出图片。

1.3.8 免疫组化检测移植瘤组织 cyclin D1 蛋白的表达
 取各组细胞制成 2 × 10⁷ 个/毫升的细胞悬液, 用 0.2 mL 接种于裸鼠左臀部皮下, 观察移植瘤生长情况。1 个月处死裸鼠, 取出移植瘤, 组织经 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 按免疫组化说明书步骤行 SP-9000 法观察 cyclin D1 蛋白的表达。

1.4 统计学处理
 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用统计学软件 SPSS16.0 分析, 组间均数比较采用 SNK 法检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

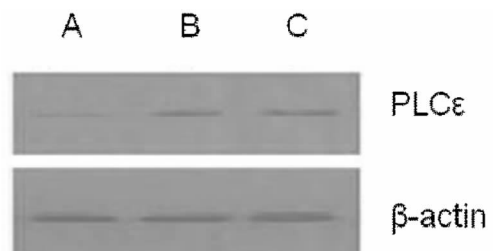
2 结果

2.1 RT-PCR 及蛋白质印迹法检测结果
 RT-PCR 结果显示, 实验组 PLCε mRNA 明显低于其他两组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 见图 1; 与对照组比较, 实验组 PLCε mRNA 表达下降 46.65%。蛋白质印迹法检测结果显示, 实验组 PLCε 蛋白明显低于其他两组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 见图 2; 与对照组比较, 实验组表达下降 32.41%。各组间 β-actin 表达量差异无统计学意义 (P > 0.05)。



A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组。

图 1 RT-PCR 检测各组细胞 PLCε mRNA 表达

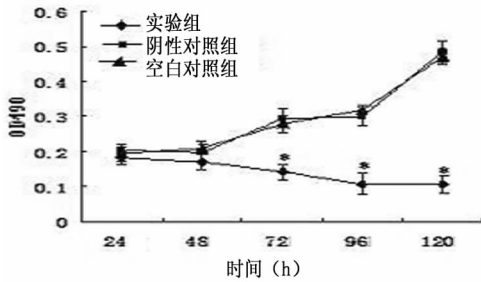


A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组

图 2 蛋白质印迹法检测各组细胞 PLCε 蛋白表达

2.2 MMT 检测结果
 实验组细胞较阴性对照组和空白对照组细胞增殖明显减慢, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 (P > 0.05), 见图 3。

2.3 流式细胞术检测细胞周期结果 实验组细胞与其他两组比较, G_0/G_1 期细胞增多, 而 G_2/M 期细胞明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阴性对照组和空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见插 I 图 4。



*: $P < 0.01$, 与阴性对照组和空白对照组比较。

图 3 各组细胞生长曲线

2.4 RT-PCR 检测转染 pGenesil-PLC ϵ 质粒对 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响 Bcl-2 的 RT-PCR 结果显示, 实验组细胞 Bcl-2 mRNA 表达低于其他两组 ($P < 0.05$); Bax 的 RT-PCR 结果显示, 实验组细胞 Bax mRNA 表达明显高于其他两组 ($P < 0.05$); 实验组 Bcl-2 mRNA/Bax mRNA 明显低于其他两组 ($P < 0.05$), 见表 2。

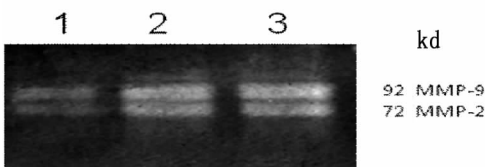
表 2 各组 Bcl-2、Bax mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
空白对照组	0.569 ± 0.13	0.333 ± 0.13	1.71 ± 0.05
阴性对照组	0.688 ± 0.17	0.381 ± 0.13	1.79 ± 0.03
实验组	0.365 ± 0.11*	0.763 ± 0.17*	0.48 ± 0.04*

*: $P < 0.05$, 与空白对照组和阴性对照组比较。

2.5 Transwell 小室体外侵袭实验结果 实验组细胞较其他两组侵袭细胞数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见插 I 图 5; 阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 明胶酶谱分析 实验组细胞分泌 MMP-2、MMP-9 水平明显低于其他两组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 6。



1: 实验组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组。

图 6 各组细胞明胶酶谱分析结果

2.7 免疫组化检测移植瘤组织 cyclin D1 蛋白的表达 实验组 cyclin D1 蛋白阳性细胞数较其他两组明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见插 I 图 7。

3 讨论

PLC ϵ 是最近发现的癌基因^[4], 与磷脂酶 C 其他成员的同源性较少, 构成一个新的 PLC 同工酶。其在 C 端有 2 个 RA 结构域 (RA1 和 RA2), N 端有一个 RasGEF 结构域^[5,7]。PLC ϵ 可通过 RA2 结构域与 H-Ras 的 GTP 结合而被激活^[5-6]。

Bai 等^[8] 发现 PLC ϵ 在化学致癌物诱导形成的皮肤癌中起着非常重要作用; Bourguignon 等^[9] 研究也认为 PLC ϵ 可能与肿瘤的生长和转移有关; 同时 Oka 等^[10] 发现 PLC ϵ 敲除老鼠中, PLC ϵ 的敲除与皮肤癌的生长受抑制密切相关。本研究通过 shRNA 干扰技术, 发现实验组能明显抑制膀胱癌细胞 BIU-87 的增殖能力, 并使细胞阻滞于 G_0/G_1 期; cyclin 是调节细胞周期活动的重要蛋白质, 在细胞增殖与肿瘤的发生、发展中具有重要作用; cyclin D1 是 G_1 期细胞周期素, 主要作用是促进细胞通过 G_1/S 检查点。当 cyclin D1 基因过度表达时可缩短细胞 G_1 期, 从而导致细胞增殖失控, 肿瘤发生^[11]。本研究发现在裸鼠移植瘤中实验组能下调 cyclin D1 的表达, 提示 PLC ϵ 基因的沉默能抑制膀胱癌细胞增殖能力。

参与肿瘤细胞凋亡的基因有正、负调控因子两类, 主要包括由 caspase 家族为代表的凋亡活化基因和以 Bcl-2 家族为代表的凋亡抑制基因共同调节。Bcl-2 家族基因分为抑凋亡基因 (如 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、mcl-1 等) 和促凋亡基因 (如 Bax、Bcl-xs、Bak 等)。有研究显示 Bcl-2/Bax 比值降低, 使肿瘤细胞易发生凋亡, 对化疗较敏感^[12-14]。本研究通过检测细胞凋亡基因 Bcl-2、Bax 的表达变化, 发现转染 PLC ϵ shRNA 可促使膀胱癌发生凋亡。

膀胱肿瘤常见的生物学特点还包括易复发和侵袭、转移, 而与肿瘤侵袭、转移密切相关的分子中有一类为基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs), 其能够降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 参与肿瘤侵袭与转移, 其中主要包括 MMP-2、MMP-9^[15]。MMPs 以何种类型存在与肿瘤的种类及恶性程度密切相关。从侵袭、转移的角度, 本研究发现转染 PLC ϵ shRNA 的细胞 MMP-9 和 MMP-2 明显减少, 且侵袭细胞数也明显减少。

综上所述, 本研究阐明了 PLC ϵ 在膀胱癌中发挥的重要作用, 干扰 PLC ϵ 基因对膀胱癌细胞的增殖、凋亡、侵袭、转移产生影响, 并对其机制进行部分探讨, 为早期诊断和膀胱癌新的治疗手段提供了一种新的途径。

参考文献:

- [1] Choudhary S, Wang KK, Wang HC. Oncogenic H-Ras, FK228, and exogenous H_2O_2 cooperatively activated the ERK pathway in selective induction of human urinary bladder cancer J82 cell death[J]. Mol Carcinog, 2011, 50 (3): 215-219.
- [2] Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(4): 295-308.
- [3] Wu D, Tadano M, Edamatsu H, et al. Neuronal lineage-specific induction of phospholipase C expression in the developing mouse brain[J]. Eur J Neurosci, 2003, 17(8): 1571-1580.
- [4] Song C, Hu CD, Masagom B, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLC epsilon, through membrane targeting by Ras[J]. Biol Chem, 2001, 276 (4): 2752-2757.
- [5] Lopez I, Eric CM, Ding J, et al. A novel bifunctional phos-

pholipase C that is regulated by Gal2 and stimulates the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Biol Chem*, 2001, 4(276):2758-2765.

- [6] Kelly GG, Sarah ER, Ondrako JM, et al. Phospholipase C ϵ : a novel Ras effector [J]. *EMBO J*, 2001, 4(20):743-754.
- [7] 郭永灿, 罗春丽, 蔡晓钟, 等. 磷脂酶 C ϵ 基因在膀胱移行细胞癌中表达及其临床意义 [J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(1):52-54.
- [8] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, et al. Crucial role of phospholipase C epsilon in chemical carcinogen-induced skin tumor development [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24):8808-8810.
- [9] Bourguignon LY, Gilad E, Brightman A, et al. Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca²⁺ signaling and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(20):14026-14040.
- [10] Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, et al. Enhancement of ultraviolet B-induced skin tumor development in phospho-

lipase C ϵ -knockout mice is associated with decreased cell death [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(10):1897-1902.

- [11] 韩镇远, 钟甘平, 李向前, 等. 膀胱移行细胞癌组织中 Hec 1, Cyclin D1 的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2010, 50(10):72-73.
- [12] 张长江, 高永生, 黄克岭, 等. 凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 在膀胱移行细胞癌中的表达 [J]. *中国综合临床*, 2010, 26(3):311-312.
- [13] Vanage DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets from part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis [J]. *Br J Haematol*, 1997, 99(4):824-831.
- [14] Maung Z, Macleam F, Reid M, et al. The relationship between Bcl-2 expression and response to chemotherapy in liver cancer [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 11(2):104-109.
- [15] Cheng YC, Chen LM, Chang MH, et al. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 325(1/2):15-23.

(收稿日期:2011-09-21 修回日期:2011-10-20)

(上接第 3341 页)

Cenp-E 基因在细胞 G₂/M 期高表达, 在细胞间期基本不表达, 诺考达唑处理可以使 HepG-2 细胞和 LO2 细胞同步在 G₂/M 期的细胞基本一样多, 便于在同一水平分析 Cenp-E 基因在二者之间的差异, 本研究结果也表明诺考达唑处理后 HepG-2 细胞和 LO2 细胞同步在分裂期的细胞基本一样多。诺考达唑处理之前, HepG-2 细胞 Cenp-E mRNA 量略高于 LO2 细胞, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示未经诺考达唑处理, 两种细胞 G₂/M 细胞所占比较低, Cenp-E mRNA 的表达差异难以显现; 诺考达唑处理后 LO2 细胞 Cenp-E mRNA 和蛋白水平明显高于 HepG-2 细胞 ($P < 0.05$), 提示 LO2 细胞在分裂期对 Cenp-E 表达的应激上调能力高于 HepG-2 细胞, HepG-2 细胞分裂期 Cenp-E 表达为相对缺乏, 从而引起 SCP 监控功能缺陷, 导致 G₂/M 期纺锤丝与染色体着丝粒未全部正常连接时细胞即进入后期, 引起细胞染色体数目异常。作者进一步通过构建 Cenp-E shRNA 载体转染到 LO2 细胞中, 通过间接免疫荧光检测发现, Cenp-E 蛋白表达在被转染的细胞中明显下降, 进一步说明 Cenp-E 表达降低直接或间接影响着丝粒的正确装配, 最终导致染色体数目异常, 细胞出现癌前病变^[9]。但 Cenp-E 具体怎样参与细胞染色体异常过程还不是很清楚。

本研究从一个侧面反映肝癌细胞 G₂/M 期 Cenp-E 蛋白表达应激性的增高能力明显低于 LO2 细胞, 提示 Cenp-E 的相对缺乏可能是 HepG-2 细胞染色体数目异常形成的原因之一, 为进一步探明 Cenp-E 在肿瘤发生中的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Duesberg P, Rausch C, Rasrck D, et al. Genetic instability of cancer cell is proportional to their degree of aneuploidy [J]. *Proc Natl Acadsci USA*, 1998, 95(23):13692-

13697.

- [2] 丛文铭, 吴孟超. 肝癌基因组不稳定性的研究现状与展望 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 1(23):5-8.
- [3] Pan J, Chen RH. Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(12):1439-1451.
- [4] Orthaus S, Ohndorf S, Diekmann S. RNAi knockdown of human kinetochore protein CENP-H [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(1):36-46.
- [5] Maia AF, Lopes CS, Sunkel CE. BubR1 and CENP-E have antagonistic effects upon the stability of microtubule-kinetochore attachments in *Drosophila* S2 cell mitosis [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(11):1367-1378.
- [6] Fraschini R, Beretta A, Sironi L, et al. Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores [J]. *EMBO J*, 2001, 20:6648-6659.
- [7] Chung E, Chen RH. Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5:748-753.
- [8] Tang Z, Shu H, Oncel D, et al. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2004, 16(3):387-397.
- [9] Liu D, Zhang N, Du J, et al. Interaction of Skp1 with CENP-E at the midbody is essential for cytokinesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(1):394-402.

(收稿日期:2011-06-10 修回日期:2010-09-10)