

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.19.012

BBC3 基因表达与肺鳞状细胞癌预后的相关性及其分子机制研究*

李超¹, 沈学远¹, 胡煜琳^{2,3,△}(1. 重庆医科大学附属永川医院胸心外科, 重庆 402160; 2. 重庆医科大学附属永川医院
肾病风湿科, 重庆 402160; 3. 重庆市荣昌区人民医院内科 402160)

[摘要] **目的** 验证 BCL2 绑定组件 3(BBC3)基因表达与肺鳞状细胞癌(LUSC)术后生存时间的相关性,探究其分子机制。**方法** 利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测 BBC3 基因在 39 例 LUSC 患者肿瘤组织标本内的表达,并对患者进行随访,收集临床生存资料。使用 Kaplan-Meier 法结合 log rank 检验进行生存分析,使用 COX 比例风险模型进行多因素生存分析。在 NCI-H226 细胞系内过表达 BBC3 基因,利用噻唑蓝(MTT)法及流式细胞术检测其表达对细胞增殖及凋亡的影响。**结果** BBC3 的表达与肿瘤是否转移($r=0.556, P=0.023$)、肿瘤大小($r=0.532, P=0.042$)、T 分期($r=0.551, P=0.021$)及 TNM 分期($r=0.524, P=0.047$)明显相关。Kaplan-Meier 法结合 log rank 检验发现 BBC3 表达与患者生存时间明显相关,BBC3 高表达者生存时间明显高于 BBC3 低表达者($\chi^2=7.542, P=0.006$)。COX 比例风险模型分析发现,肿瘤是否转移、肿瘤 T 分期、TNM 分期及 BBC3 表达均独立且明显影响患者的生存时间($P<0.05$)。重组 BBC3 质粒组凋亡细胞比例明显高于对照组与空载质粒组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** BBC3 基因表达可抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡,与 LUSC 预后具有明显相关性,可能作为判别 LUSC 术后生存预测的潜在辅助性分子标志物。

[关键词] BBC3;肺;肿瘤;鳞状细胞;预后;细胞增殖;细胞凋亡;生物学标记**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)19-2631-04

Study on the relationship between BBC3 expression and prognosis of patients with squamous cell lung neoplasms and its mechanism*

Li Chao¹, Shen Xueyuan¹, Hu Yulin^{2,3,△}(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;
2. Department of Nephropathy and Rheumatism, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;
3. Department of Internal Medicine, Rongchang District People's Hospital, Chongqing 402160, China)

[Abstract] **Objective** To explore the correlation between BCL2 binding component 3 (BBC3) expression and postoperative survival time of lung squamous cell carcinoma (LUSC), and investigate its molecular mechanism. **Methods** The expression of BBC3 in 39 patients was detected by using qRT-PCR assay. Meanwhile, clinical data of all patients were collected by follow-up visit. Then, the survival analysis was performed by using Kaplan-Meier and log rank tests. Moreover, multiple factors analysis was performed using COX proportional hazard model. At last, BBC3 was over-expressed in NCI-H226 cell lines, then detected the effects of BBC3 expression on cell proliferation and apoptosis by using MTT assay and flow cytometry. **Results** BBC3 expression were significantly correlated with the tumor metastasis ($r=0.556, P=0.023$), tumor size ($r=0.532, P=0.042$), T staging ($r=0.551, P=0.021$) and TNM staging ($r=0.524, P=0.047$). Meanwhile, the results of Kaplan-Meier and log rank tests found that BBC3 expression was significantly correlated with survival time of patients with LUSC, and the length of survival time in patients with high BBC3 expression was longer than that in patients with low BBC3 expression ($\chi^2=7.542, P=0.006$). The COX proportional hazard model indicated that tumor metastasis, T staging, TNM staging and BBC3 expression were independent factors which significantly affected survival time. Moreover, the proportion of apoptotic cells in the recombinant plasmid BBCs group was higher than that in the empty plasmid group and control group ($P<0.05$). **Conclusion** BBC3 expression could suppress the proliferation of tumor cells and promote apoptosis, and are significantly correlated with survival time of patients, so which may be assistant biomarkers for prognosis of LUSC.

[Key words] BBC3;lung;neoplasms,squamous cell;prognosis;cell proliferation;apoptosis;biological markers

肺癌是当今世界对人类健康与生命危害最大的恶性肿瘤之一,肺癌因其早期不易被发现并且对化疗和放疗产生耐药,故病死率高^[1]。其中肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)占有非小细胞肺癌(non-small cell lung cancers, NSCLC)的 80%以上,是最常见的肺癌类型。目前, LUSC 发生、发展的分子机制研究已有大量的积累,但由于缺少准确的预后分子标志物或指标,患者的 5 年生存率仍然处于非常低的水平^[2-3]。生物芯片、高通量测序及蛋白质谱等高通

量生物技术的迅速发展,为快速有效地寻找 LUSC 的早期预后分子标志物提供了新的视角与方向^[1,4-8]。目前,已有部分研究通过高通量技术,发现了一些潜在的分子标志物,例如:表皮生长因子受体(EGFR)^[9]、核苷酸剪切修复复合体(ERCC1)的 5' 核酸内切酶^[10]、原癌基因 Kirsten-Rous 肉瘤病毒(K-ras)^[11]、核糖核苷酸还原酶的调节亚基(RRM1)^[12]。但又陆续有研究发现,这些标志物的预测准确性及与 LUSC 的功能相关性都有限,且缺少多中心、大样本研究的验证^[13-14]。因此,

* 基金项目:重庆市科委一般项目(cstc2016jcyjA0343);重庆市卫生局科研面上项目(2015MSXM058);重庆市永川区自然科学基金(Ycstc, 2015nc5004);重庆医科大学附属永川医院院内课题(YJZQN201529, YJSCI201504)。作者简介:李超(1980-),主治医师,硕士,主要从事胸部肿瘤的基础与临床研究。△ 通信作者:E-mail:lcr808@126.com。

在本课题组的前期工作中,利用公共数据库中收集得到的大量 LUSC 组织标本表达谱数据及临床生存资料数据,结合生物信息学分析发现了 5 个潜在的 LUSC 预后相关的基因。其中 BCL2 绑定组件 3(BCL2 binding component 3, BBC3) 还未有研究发现其与 LUSC 的关系^[15]。本研究中收集 39 例患者 LUSC 组织标本及相关的临床生存资料,并检测 BBC3 基因的表达情况,进一步验证 BBC3 基因与 LUSC 预后的相关性。同时,研究 BBC3 基因与癌细胞增殖与凋亡的分子机制,评估其作为 LUSC 预后分子诊断标志物的潜力。

1 资料与方法

1.1 一般资料

LUSC 组织标本均取自重庆医科大学附属永川医院 2010—2012 年手术切除的 LUSC 组织,患者共 39 例,男 28 例,女 11 例;年龄 34~72 岁;有吸烟史者 26 例,无吸烟史者 13 例;22 例肿瘤发生转移,17 例未转移;肿瘤大于或等于 3 cm 者 21 例,<3 cm 者 18 例;T 分期 0 期 20 例,Ⅰ期 8 例,Ⅱ期 11 例;TNM 分期 Ⅰ期 13 例,Ⅱ期 12 例,Ⅲ期 14 例;癌胚抗原(CEA)水平高 22 例,正常 17 例;术后 10 例行化疗,29 例未行化疗。所有标本均在离体后 30 min 内液氮速冻,并于 -80 °C 冰箱保存。术后跟踪随访患者至 2015 年 6 月,记录死亡时间与病例,每 3 个月随访 1 次,每次详细记录患者的一般体征及相关检查结果,以手术时间为生存起始时间,以随访结束时间为终止时间,随访时间均大于 3 年,对于非肿瘤原因导致的死亡视为“存活”,随访截止时有 20 人死亡。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与基因过表达试验

人肺癌 NCI-H226 细胞购自中国科学院细胞库(货号:TCHu235)。常规培养,接种至 6 孔板,待细胞生长铺满约 60%~80%,按照 lipofectamine 2000™ 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书进行转染,经检测无突变的重组质粒加入量为 4 μg/L,转染细胞后加入 100 mL/L 胎牛血清 1640 培养液(上海远慕生物科技有限公司),于 37 °C、5%CO₂ 条件下培养细胞 48 h,挑取单克隆集落逐步扩增后传代培养,以 200 μg/mL G418 维持。试验设 3 个组,分别为无转染空白细胞对照(NCI-H226)组,空载质粒转染细胞对照(NCI-H226-pcDNA3.1)组及重组 BBC3 质粒试验(NCI-H226-pcDNA3.1-BBC3)组。利用蛋白质印迹法(Western blotting)检测 BBC3 基因的表达。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

利用 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提取细胞总 RNA,具体步骤参考试剂盒说明。采用 SYBR Green 法检测 BBC3 基因的表达。采用 10.00 μL ABI 体系,包括单链 cDNA 1.00 μL,SYBR Green Real-time PCR Master Mix 5.00 μL,上游引物和下游引物各 0.45 μL(1 μmol/L),再加去离子水 3.10 μL。采用 ABI Stepone qRT-PCR 仪检测。PCR 循环参数:95 °C 60 s,95 °C 15 s,60 °C 15 s,72 °C 35 s,共 40 个循环。以 β-actin 基因作为内参照进行 PCR,用计算机软件(StepOne™ Software v3.0)分析各反应的荧光强度得出反应的循环阈值(cycle threshold, Ct)。使用比较 Ct 值法计算目的基因的相对表达水平。引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物

基因	引物	序列(5'-3')
BBC3	正向引物	GCC AGA TTT GTG AGA CAA GAG G
	反向引物	CAG GCA CCT AAT TGG GCT C
β-actin	正向引物	CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC
	反向引物	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT

1.2.3 Western blotting

收集细胞,加入细胞裂解液,提取总蛋白。采用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后将蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,在 5%牛血清清蛋白(BSA)溶液中室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合。Tris 缓冲生理盐水/吐温(TBS/T)洗膜 3 次,每次 5 min。封闭过的膜加入一级抗体(CST,货号:4976,1:1 000 稀释)4 °C 过夜,抗原抗体结合。TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二级抗体(CST,货号:7467,1:3 000 稀释)以结合一级抗体及 HRP 标记的抗生物素抗体以结合分子量标准,室温孵育膜 1 h。TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min。加入化学发光底物发光,用凝胶成像系统(美国 Chemiluminescence imaging system)扫描图像,Image J 分析软件将图片上每个特异条带灰度数值化,统计 BBC3 蛋白与 β-actin 吸光度(A)值比值。

1.2.4 噻唑蓝(MTT)比色法

收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度约 5×10⁴/mL,接种于 96 孔板,每孔加入 100 μL,培养箱中培养至细胞单层铺满孔底。共设置 3 组:对照组,空载质粒组,重组 BBC3 质粒组,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后,倒置显微镜下观察。每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h,2 000 r/min 离心 96 孔板,利用虹吸原理弃去培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,置摇床上振荡 10 min。在酶标仪 490 nm 波长处测量各孔 A 值。

1.2.5 流式细胞术

3 组细胞(对照组、质粒组、重组 BBC3 质粒组)取对数生长期细胞以 1×10⁵/孔接种于 96 孔板中,每孔 2 mL 体系,待细胞贴壁后换液。3 组均设 3 个复孔,继续培养 24 h 后,消化收集细胞(包括上清中的细胞),磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 遍,弃去上清液,加入 5 μL 磷脂结合蛋白 V(Annexin V)和 1 μL 碘化丙啶(PI)做标记,避光 15 min,再加入 1×Buffer 400 μL,上机检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,使用 Spearman 等级相关分析 BBC3 基因表达与各临床指标间的相关性,使用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,使用 log rank 检验分析单因素预后显著性,使用 COX 比例风险模型进行多因素生存分析。采用 Students'*t* 检验计算不同组间的差异。检验水准 α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBC3 基因表达与临床资料及 LUSC 预后的相关性

BBC3 的表达与肿瘤是否转移($r=0.556, P=0.023$)、肿瘤大小($r=0.532, P=0.042$)、T 分期($r=0.551, P=0.021$)及 TNM 分期($r=0.524, P=0.047$)明显相关,与年龄($r=0.231, P=0.467$)、性别($r=0.215, P=0.632$)、吸烟史($r=0.313, P=0.197$)、CEA 水平($r=0.322, P=0.124$)、术后是否化疗($r=0.304, P=0.226$)无明显相关性,见表 2。以 39 份组织标本 BBC3 基因表达水平的中位数为界,分为 BBC3 高表达者(17 例)与 BBC3 低表达者(22 例)。使用 Kaplan-Meier 法绘制 LUSC 患者的生存曲线,见图 1;同时利用 log rank 检验分析 BBC3 表达与生存时间的相关性,结果显示二者明显相关,其中 BBC3 高表达者生存时间明显高于 BBC3 低表达者,差异有统计学意义($\chi^2=7.542, P=0.006$)。

2.2 多因素分析生存时间的影响因素

本研究使用 COX 比例风险模型对可能影响患者生存时间的多种临床资料进行多因素分析,结果发现,肿瘤是否转移、肿瘤 T 分期、TNM 分期及 BBC3 表达均独立且明显影响患者的生存时间,见表 3。

2.3 BBC3 对细胞增殖的影响

Western blotting 检测 3 组细胞中 BBC3 基因表达情况见图 2A。重组 BBC3 质粒组中 BBC3 表达明显升高($P<0.05$),而对照组与空载质粒组比较,差异

无统计学意义($P>0.05$),BBC3 基因的过表达试验有效。采用 MTT 法检测 BBC3 表达对细胞增殖能力的影响,结果发现,与对照组相比,空载质粒组细胞存活率为 108%,重组 BBC3 质粒组降低到 74%;重组 BBC3 质粒组与对照组及空载质粒组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2B。

表 2 患者临床资料与 BBC3 表达相关性

临床资料	n	r	P
年龄(岁)		0.231	0.467
<60	14		
≥60	25		
性别		0.215	0.632
男	28		
女	11		
吸烟史		0.313	0.197
是	26		
否	13		
是否转移		0.556	0.023
是	22		
否	17		
肿瘤大小(cm)		0.532	0.042
>3	21		
<3	18		
T 分期		0.551	0.021
0	20		
I	8		
II	11		
TNM 分期		0.524	0.047
I	17		
II	12		
III	14		
CEA 水平		0.322	0.124
高	22		
正常	17		
术后化疗		0.304	0.226
是	10		
否	29		

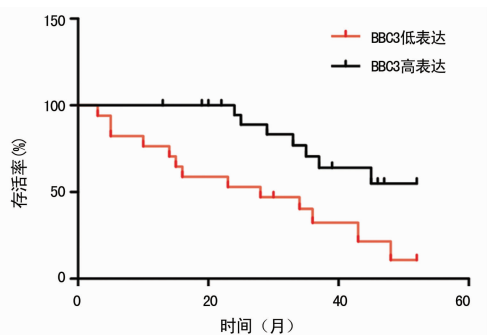


图 1 BBC3 高表达与低表达患者的生存曲线

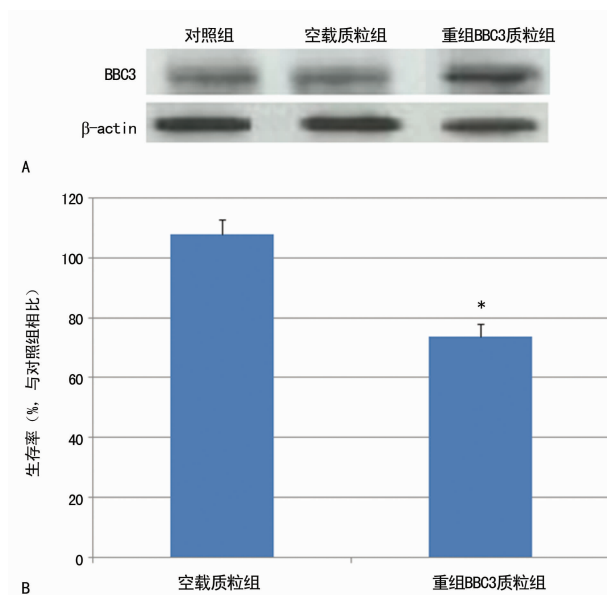
2.4 BBC3 对细胞凋亡的影响 利用流式细胞术检测 3 组细胞的凋亡,对照组、空载质粒组、重组 BBC3 质粒组细胞的凋亡率分别为 (51.28 ± 6.23)%、(54.34 ± 5.46)% 及 (75.08 ± 6.24)%,其中重组 BBC3 质粒组凋亡细胞比例明显高于其他两组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而对对照组与空载质粒

组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3、表 4。

表 3 影响生存时间的多因素分析

变量	HR(95%CI)	Wald χ^2	P
年龄	1.562(0.736~2.056)	1.233	0.356
性别	0.698(0.265~1.078)	0.923	0.234
吸烟史	1.234(0.893~1.671)	3.245	0.189
是否转移	2.313(1.632~2.845)	5.681	0.035
肿瘤大小	1.697(1.094~2.113)	2.221	0.091
T 分期	2.134(1.674~2.794)	4.392	0.029
TNM 分期	2.476(1.734~2.992)	4.528	0.026
CEA 水平	1.015(0.634~1.548)	1.113	0.515
术后化疗	0.634(0.254~0.984)	0.792	0.376
BBC3 表达	0.236(0.112~0.486)	8.235	0.006

HR:风险比



A: Western blotting 检测 3 组细胞内 BBC3 表达;B: MTT 法检测 3 组细胞的增殖能力;*: $P<0.05$,与空载质粒组比较

图 2 3 组细胞内 BBC3 的表达及细胞增殖能力

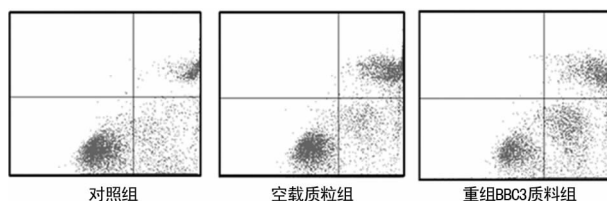


图 3 流式细胞术检测 3 组细胞凋亡

表 4 BBC3 表达对细胞凋亡的影响(%)

组别	UL	UR	LL	LR
对照组	0.13	24.31	48.59	26.97
空载质粒组	0.18	26.18	45.48	28.16
重组 BBC3 质粒组	1.21	28.59	23.71	46.49

UL:左上角(单核细胞);LL:左下角(活细胞);UR:右上角(坏死及末期凋亡细胞);LR:右下角(早期凋亡细胞)

3 讨论

传统利用高通量技术筛选肿瘤标志物的技术手段,往往只单纯地分析所有基因的表达情况(转录组学研究),筛选出在不同组间表达存在明显差异的基因。而后再扩大样本量检测某些候选标志基因的表达,进一步验证其分型的准确性和稳定

性。而区别于传统的高通量技术筛选肿瘤标志物的方式,在本课题组的前期工作中,不仅仅考虑基因在不同组间的表达差异情况(Cox 生存分析),同时,还进一步整合了基因间的调控关系信息(TF 调控基因集)、基因与其他分子间的调控关系信息(miRNA 靶向基因集)及基因本身的生物学功能信息(GO 功能数据集)。最终利用基因表达信息(转录组)结合以上 3 种其他层面的分子信息综合分析筛选,最后得到更具有生物学代表性的候选分子标志物,其中包括了 BBC3^[15]。而本研究即通过收集 LUSC 患者组织标本,针对前期工作得到的 BBC3 基因进行进一步的试验验证,然后利用 Kaplan-Meier 法及 Cox 比例风险分析发现,BBC3 基因的表达确实与 LUSC 患者的临床生存时间明显相关。

为了进一步探究 BBC3 基因在肿瘤预后中可能的分子机制,本研究进一步对 BBC3 在 NCI-226 细胞内进行过表达试验,然后检测 BBC3 的表达对细胞增殖及凋亡能力的影响,结果发现,BBC3 的高表达可以抑制细胞的增殖并促进细胞凋亡。由此认为,在 LUSC 的发展过程中,BBC3 基因参与细胞凋亡通路,是影响 LUSC 生存时间的关键机制。同时,BBC3 基因本身也是一个经典的促凋亡蛋白,属于 Bcl2 蛋白家族成员,可与其他 Bcl2 蛋白家族成员结合并诱导线粒体功能紊乱,同时激活(Caspase)凋亡途径^[16]。另还有研究发现,其在细胞自噬过程中也起到重要作用^[17]。因 BBC3 在凋亡过程中的重要作用,有研究认为其可能成为肿瘤治疗的一个关键性靶点蛋白。目前已有研究证明,BBC3 与胰腺导管腺癌预后明显相关,其在生存时间长的患者肿瘤组织内明显高表达^[18]。但目前尚缺乏研究证明其与 LUSC 发生、发展相关。而本研究发现 BBC3 基因的表达确实与 LUSC 患者的临床生存时间呈明显负相关。笔者认为其分子机制可能是,BBC3 在 LUSC 组织中高表达,可促进肿瘤细胞的凋亡,有效降低术后 LUSC 肿瘤的复发能力。因此,笔者认为 BBC3 的表达高低可以作为 LUSC 预后的分子标志物,并可与其他预后相关的临床资料相联合对 LUSC 的预后进行判断。

但是,受限于目前临床样本量,BBC3 在临床预后上的诊断价值还需要更大样本及更长随访时间的研究。同时,笔者认为疾病分子标志物的真正确立,不仅需要统计学上证明其疾病分类的准确性和稳定性,还需要通过进一步的试验探究其在疾病发生过程中的具体机制,从生物学上证明其切实有效,且可作为疾病的分子标志物用于临床检验。因此,针对 BBC3 基因在 LUSC 组织中的具体分子机制研究,尤其是参与的上下游基因调控通路,将是本课题组下一步的重点工作。

参考文献

- [1] Tan X, Qin W, Zhang L, et al. A 5-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21): 6802-6811.
- [2] Tanoue LT, Detterbeck FC. New TNM classification for non-small-cell lung cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(4): 413-423.
- [3] Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004[J]. *Ann Oncol*, 2005, 16(3): 481-488.
- [4] Gao W, Shen H, Liu L, et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(4): 557-566.
- [5] Mcdoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, et al. Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 1127-1138.
- [6] Hu Z, Wang J, Yao T, et al. Identification of novel mutations of TP53, ALK and RET gene in metastatic thymic squamous cell carcinoma and its therapeutic implication[J]. *Lung Cancer*, 2013, 81(1): 27-31.
- [7] Carvalho RH, Hou J, Haberle V, et al. Genomewide DNA methylation analysis identifies novel methylated genes in Non-Small-Cell lung carcinomas[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(5): 562-573.
- [8] Carvalho RH, Haberle V, Hou J, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of non-small cell lung carcinomas[J]. *Epigenetics Chromatin*, 2012, 5(1): 9.
- [9] Meert AP, Martin B, Delmotte P, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer; a systematic review with meta-analysis[J]. *Eur Respir J*, 2002, 20(4): 975-981.
- [10] Lord RV, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2286-2291.
- [11] Johnson ML, Sima CS, Chaft J, et al. Association of KRAS and EGFR mutations with survival in patients with advanced lung adenocarcinomas[J]. *Cancer*, 2013, 119(2): 356-362.
- [12] Simon GR, Schell MJ, Begum M, et al. Preliminary indication of survival benefit from ERCC1 and RRM1-tailored chemotherapy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer: evidence from an individual patient analysis[J]. *Cancer*, 2012, 118(9): 2525-2531.
- [13] Brattström D, Wester K, Bergqvist M, et al. HER-2, EGFR, COX-2 expression status correlated to microvessel density and survival in resected non-small cell lung cancer[J]. *Acta Oncol*, 2004, 43(1): 80-86.
- [14] Onn A, Correa AM, Gilcrease M, et al. Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1 pt 1): 136-143.
- [15] Li C, Ran M, Hu YL, et al. Identifying molecular biomarker for the lung squamous cell carcinoma by integrating multifactorial data[J]. *Curr Bioinform*, 2015, 10(1): 106-111.
- [16] Follis AV, Chipuk JE, Fisher JC, et al. PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(3): 163-168.
- [17] Thorburn J, Andrysyk Z, Staskiewicz LA, et al. Autophagy controls the kinetics and extent of mitochondrial apoptosis by regulating PUMA levels[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(1): 45-52.
- [18] Du QH, Zhang KJ, Jiao XL, et al. Prognostic significance of PUMA in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(6): 2066-2072.