

siRNA 沉默 Gankyrin 基因对喉鳞癌 Hep-2 细胞生物学行为的影响

赵孝通¹, 李培华², 刘方舟³, 钱亦淳³, 姚瑶³, 张园^{3*}

(¹徐州医学院研究生学院, 江苏 徐州 221000; ²徐州医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 徐州 221000; ³南京医科大学附属江苏省肿瘤医院头颈外科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 观察小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 沉默 Gankyrin 基因对喉鳞癌 Hep-2 细胞的生物学行为影响。方法: 用 siRNA 沉默喉鳞癌 Hep-2 细胞中的 Gankyrin 基因, 运用实时定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 及蛋白印迹法 (Western blot) 技术检测转染前后 Gankyrin mRNA 及蛋白的表达。采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力, 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期, 细胞划痕损伤实验和 Transwell 小室实验检测细胞迁移能力, Matrigel 侵袭实验检测细胞侵袭能力, Western blot 检测 Gankyrin 下调后 p53 蛋白的表达。结果: qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, Gankyrin siRNA 组 Gankyrin mRNA 和蛋白的相对表达量均低于对照 siRNA 组和未处理组 ($P < 0.001$)。CCK-8 法显示 Gankyrin siRNA 组细胞增殖速度明显下降 ($P < 0.001$)。流式细胞仪检测结果表明, Gankyrin siRNA 组细胞凋亡率 $[(7.70 \pm 1.12)\%]$ 明显高于对照 siRNA 组 $[(2.34 \pm 0.32)\%]$ 和未处理组 $[(1.82 \pm 0.29)\%]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与两对照组相比, Gankyrin siRNA 组 G1 期比例增加, S 期比例减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。细胞划痕损伤实验和 Transwell 小室实验显示 Gankyrin siRNA 组的细胞迁移能力明显减弱 ($P < 0.01$); Matrigel 侵袭实验显示 Gankyrin siRNA 组细胞侵袭能力与对照 siRNA 组和未处理组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Gankyrin 表达下调增加了 Hep-2 细胞中 p53 蛋白的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。结论: Gankyrin 表达下调能抑制 Hep-2 细胞的增殖和迁移, 可能与细胞凋亡、细胞周期改变及 p53 的表达密切相关。

[关键词] 喉肿瘤; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡; Gankyrin

[中图分类号] R739.65

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)03-287-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160307

Effect of silencing Gankyrin by small interfering RNA on the biological behavior of laryngeal carcinoma cell lines Hep-2

Zhao Xiaotong¹, Li Peihua², Liu Fangzhou³, Qian Yichun³, Yao Yao³, Zhang Yuan^{3*}

(¹Graduate School, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000; ²Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000; ³Department of Head and Neck Surgery, Affiliated Jiangsu Cancer Hospital of NJMU, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of siRNA (small interference RNA) silencing Gankyrin on the behavior of human laryngeal carcinoma cell lines Hep-2. **Methods:** The expression of mRNA and protein levels of Gankyrin was detected by using qRT-PCR and Western blot before and after transfection, respectively. The cell proliferation was measured by CCK-8 assay. The apoptosis rate and cell cycle of Hep-2 cells were determined by flow cytometry. Cell migration was detected by wound healing assay and transwell assay. Matrigel assay was performed to observe cell invasive ability. The expression of p53 protein after down-regulation of Gankyrin was detected by Western blot. **Results:** Compared with the negative control group and the blank control group, the expressions of Gankyrin mRNA and protein were downregulated in the Gankyrin siRNA group, and the differences were statistically significant ($P < 0.001$). CCK-8 assay showed that the proliferation rate of the Gankyrin siRNA group was significantly decreased ($P < 0.001$). Flow cytometry showed that the apoptosis rate of the Gankyrin siRNA group $[(7.70 \pm 1.12)\%]$ was significantly higher than that in the negative control group $[(2.34 \pm 0.32)\%]$ and the blank control group $[(1.82 \pm 0.29)\%]$, and the differences were statistically significant ($P < 0.001$). Compared with the two controls, G1 phase cells of the Gankyrin siRNA group were significantly

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20151561)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yzhang1963@163.com

increased, S phase cells were significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Wound healing assay and transwell assay showed that the cell migration ability in the Gankyrin siRNA group was decreased significantly ($P < 0.01$). Matrigel assay showed that Gankyrin siRNA did not impact the invasive ability of Hep-2 cell ($P > 0.05$). The expression of p53 protein in the Gankyrin siRNA group was increased ($P < 0.001$). **Conclusion:** Down-regulation of Gankyrin inhibited the proliferation and migration ability of Hep-2 cell, which may be associated with the alteration of apoptosis, cell cycle and the expression level of p53.

[Key words] laryngeal neoplasms; cell proliferation; cell cycle; apoptosis; Gankyrin

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03):287-292, 329]

Gankyrin 是近年新发现的癌基因。2000年,日本学者 Higashitsuji 等^[1]在人肝癌组织 cDNA 文库中发现了 Gankyrin 基因,通过对比肝癌组织与正常组织,首次提出 Gankyrin mRNA 在肝癌组织中高表达。研究发现, Gankyrin 可通过多种信号通路影响肝癌细胞的生物学行为,对肿瘤细胞增殖和凋亡起到调控作用,加速肿瘤恶化^[2-4]。近年, Gankyrin 在食管癌^[5]、结肠癌^[6]、胃癌^[7]、乳腺癌^[8]等恶性肿瘤中的作用也逐渐引起国内外学者的关注。Gankyrin 的表达与多种肿瘤的恶性程度、转移、预后等密切相关,也是许多恶性肿瘤重要的基因治疗潜在分子靶点。有关 Gankyrin 在头颈部肿瘤的相关研究还处于初始阶段,鲜有相关报道。喉鳞癌是头颈部常见的恶性肿瘤,其发生发展受体内多种基因及蛋白影响。本研究通过 siRNA 沉默喉鳞癌 Hep-2 细胞中 Gankyrin 的表达,观察 Gankyrin 抑制对喉鳞癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等细胞生物学行为的影响,探讨 Gankyrin 在喉鳞癌发生和发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人喉鳞癌 Hep-2 细胞系由复旦大学附属耳鼻喉科医院郑娟医师惠赠。RPMI1640 培养液、胰酶和胎牛血清(Gibco 公司,美国),脂质 Lipofectamine 2000 及 Opti-MEM(Life 公司,美国),qRT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),CCK-8 试剂盒(南京凯基生物有限公司),FTTC Annexin V 凋亡检测试剂盒(BD 公司,美国),Transwell 小室(Millipore 公司,美国),Matrigel 侵袭小室(CORNING 公司,美国)。兔抗人 Gankyrin 抗体、鼠抗人 p53 抗体、GAPDH 抗体(Santa Cruz 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

Hep-2 细胞在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含青霉素 80 U/mL,链霉素 0.08 mg/mL)中

生长,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 siRNA 的设计、合成及转染

siRNA 序列由南京锐真生物技术有限公司合成。Gankyrin siRNA 正义链 5'-GCCGGGAUGA-GAUUGUAAATT-3',反义链 5'-UUUACAAUCU-CAUCCCGGCTT-3'。阴性对照 siRNA 正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。转染前 24 h,以 4×10^5 个/孔的细胞密度在 6 孔板中接种 Hep-2 细胞,每孔加入 2 mL 完全培养基,使第 2 天细胞汇合度 70%~80%。分为未处理组、对照 siRNA 组和 Gankyrin siRNA 组。转染前 6 孔板需更换完全培养基,取 200 μ L Opti-MEM 与 20 μ L siRNA 混匀,静置 5 min 后将 200 μ L Opti-MEM 与 10 μ L Lipofectamine 2000 混合液加入其中,再次混匀静置 15 min 后加入已接种 Hep-2 细胞的 6 孔板。37℃ 5% CO₂ 环境下培养 24 h 行 qRT-PCR,培养 48 h 行 Western blot 检测转染效率。

1.2.3 qRT-PCR 检测 Gankyrin 的表达

转染 24 h 后,TRIzol 法提取各组 RNA,Nanodrop 2000 调零后,取 2 μ L RNA 溶液检测 RNA 提取质量, $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 在 1.8~2.0 之间,则表示纯度较高。按照 RT-qPCR 试剂盒说明书行逆转录。Gankyrin 引物参照 Li 等^[9]的文献,由南京金斯瑞生物有限公司合成,上游引物 5'-TCCTCTTCATATTGGC-GCTT-3',下游引物 5'-CTTGAGCACCTTTTCCCA-GAA-3',内参为管家基因 GAPDH,未处理组为对照组。PCR 在 QuantStudio 6 Flex 仪器上运行,经 50℃ 2 min,95℃ 10 min 变性,40 循环扩增,每循环包括 95℃ 15 s,60℃ 1 min,反应体系为 10 μ L。Gankyrin 的表达计算使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[10]。

1.2.4 Western blot 法检测 Gankyrin 蛋白及 p53 蛋白的表达

转染 48 h 后,使用 IP 裂解液抽提各组蛋白,BCA 法进行蛋白定量。每孔加样 50 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 蛋白电泳。电泳结束后,使用 eBlot 快速蛋白

转印系统将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h,1×TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min。加入 Gankyrin、p53 一抗(1:200),GAPDH 一抗(1:500)作为内参,4℃摇床过夜。1×TBST 缓冲液漂洗 3 次,加入二抗孵育 2 h。1×TBST 缓冲液漂洗 3 次,Odyssey 荧光扫描仪扫描。Image Studio 软件分别计算 Gankyrin、p53 与内参 GAPDH 的灰度比,分析蛋白相对表达量,实验重复 3 次。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力

收集未处理组、对照 siRNA 组和 Gankyrin siRNA 组中的 Hep-2 细胞接种 96 孔板,调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL,每孔加入 100 μ L,每组设 5 个复孔。置 37℃ 5%CO₂ 环境下培养,测定细胞增殖速率前 1 h 加入 10 μ L CCK-8,分别于培养 24、48、72、96 h 用酶标仪测定 450 nm 的吸光度值并绘制增殖曲线,实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞法检测细胞周期

转染 24 h 后,用胰酶消化并收集各组细胞,用预冷 PBS 液洗涤,75%冰乙醇固定,-20℃过夜。加入 PI 染色液 4℃静置 30 min,使用 FACSCalibu 流式细胞仪检测各组细胞周期分布,实验重复 3 次。

1.2.7 流式细胞法检测细胞凋亡

转染 36 h 后收集各组细胞及其培养液,按照 FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒说明书操作,使用 FACS Calibu 流式细胞仪检测细胞凋亡,实验重复 3 次。

1.2.8 细胞划痕损伤实验检测细胞迁移能力

细胞接种于 6 孔板中,转染 24 h 后,当细胞汇合度达 90%~100%时,移液器枪头行横线划痕,PBS 清洗划下的细胞,每孔加入 2 mL 无血清 RPMI1640 培养基,分别于 0、24、48 h 观察各组细胞的迁移情况,愈合率 (%)=(1-48 h 划痕距离/初始距离)×100%,实验重复 3 次。

1.2.9 Transwell 小室检测细胞迁移能力

转染 24 h 后取各组细胞,胰酶消化后使用无血清的 RPMI1640 培养基调整细胞密度为 4×10^5 个/mL。取 100 μ L 细胞加入上室,下室加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基 500 μ L。置 37℃ 5%CO₂ 环境下培养 36 h,移除上室培养基,无菌棉签擦去内面残余细胞,4%多聚甲醛固定 10 min,0.1%结晶紫染色 10 min,在光学显微镜下进行计数,每孔随机选取 5 个视野,取平均值,实验重复 3 次。

1.2.10 Matrigel 侵袭实验检测细胞侵袭能力

Matrigel 侵袭小室上层加入 400 μ L 无血清 RPMI1640 培养基,移至含 700 μ L 有血清培养基的 24 孔

板中,置 37℃ 5% CO₂ 环境下行水化预铺胶 2 h。取转染 24 h 的细胞,胰酶消化后重悬,并用无血清的 RPMI1640 培养基调整细胞密度为 4×10^5 个/mL。取 100 μ L 细胞加入含 Matrigel 的上室,下室加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基 500 μ L。培养 48 h 后,无菌棉签擦去内面残余细胞,固定,染色,计数,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经方差齐性检验后,计量数据间的比较根据情况采用多样本均数的方差分析、LSD-*t* 检验或重复测量资料的方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gankyrin 基因沉默效果评价

Gankyrin siRNA 组的 Gankyrin mRNA 相对表达量(0.298 ± 0.045)低于对照 siRNA 组(0.988 ± 0.323)和未处理组(1.029 ± 0.101),差异有统计学意义($F=478.88$,图 1A);Gankyrin 蛋白相对表达量(0.132 ± 0.019)低于对照 siRNA 组(0.761 ± 0.215)和未处理组(0.787 ± 0.294),差异有统计学意义($F=723.076$, $P < 0.001$,图 1B、C)。对照 siRNA 组和未处理组的 Gankyrin mRNA、蛋白表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 CCK-8 实验结果

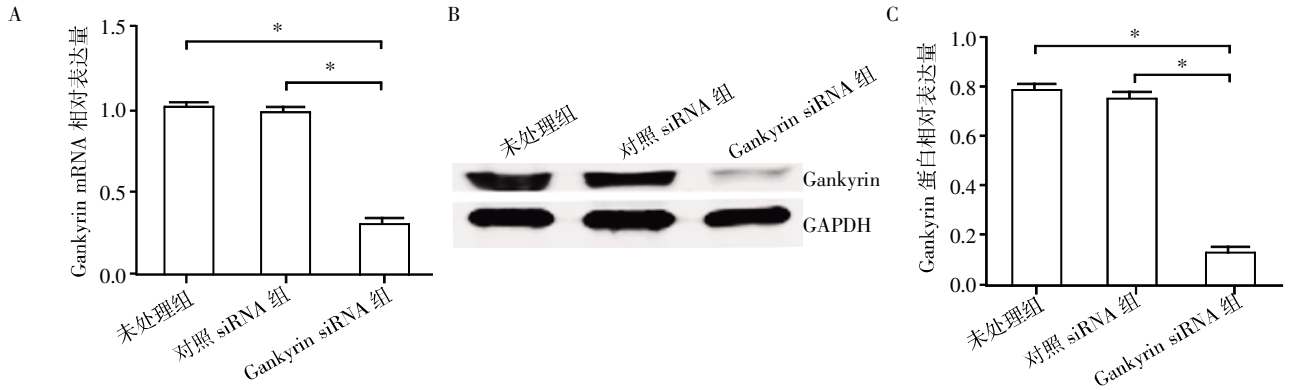
转染后,Gankyrin siRNA 组的细胞增殖明显低于对照 siRNA 组($F=844.43$, $P < 0.001$)和未处理组($F=797.13$, $P < 0.001$),未处理组和对照 siRNA 转染组差异均无统计学意义($F=0.05$, $P > 0.05$,图 2)。结果表明,Gankyrin 下调后,Hep-2 细胞增殖受到抑制。

2.3 细胞凋亡检测结果

转染 36 h 后,细胞凋亡检测结果显示(图 3A) Gankyrin siRNA 组细胞凋亡率为(7.70 ± 1.12)%,明显高于对照 siRNA 组[(2.34 ± 0.32)%]和未处理组[(1.82 ± 0.29)%],差异有统计学意义($F=65.81$, P 均 < 0.001),未处理组和对照 siRNA 组差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 Gankyrin 下调后可促进 Hep-2 细胞的凋亡。

2.4 细胞周期检测结果

流式细胞术检测细胞周期结果显示(图 3B),与对照 siRNA 转染组[(53.23 ± 1.39)%]和未处理组[(51.64 ± 1.43)%]相比,Gankyrin siRNA 组细胞阻滞在 G1 期的比例[(67.13 ± 1.36)%]增多($F=112.29$, P 均 < 0.001);与未处理组[(32.66 ± 1.27)%]和对



A: qRT-PCR 检测各组 Gankyrin mRNA 表达水平; B: Western blot 检测各组 Gankyrin 蛋白表达水平; C: Gankyrin 蛋白表达定量分析结果。两组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 1 转染后各组 Gankyrin 的表达水平

Figure 1 Gankyrin expression level after transfection in each group

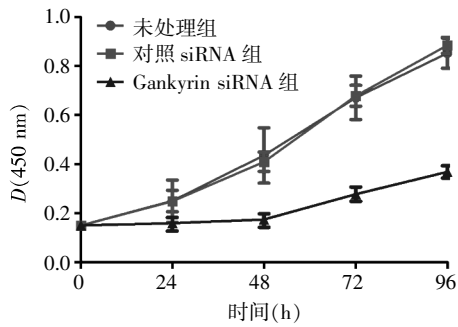


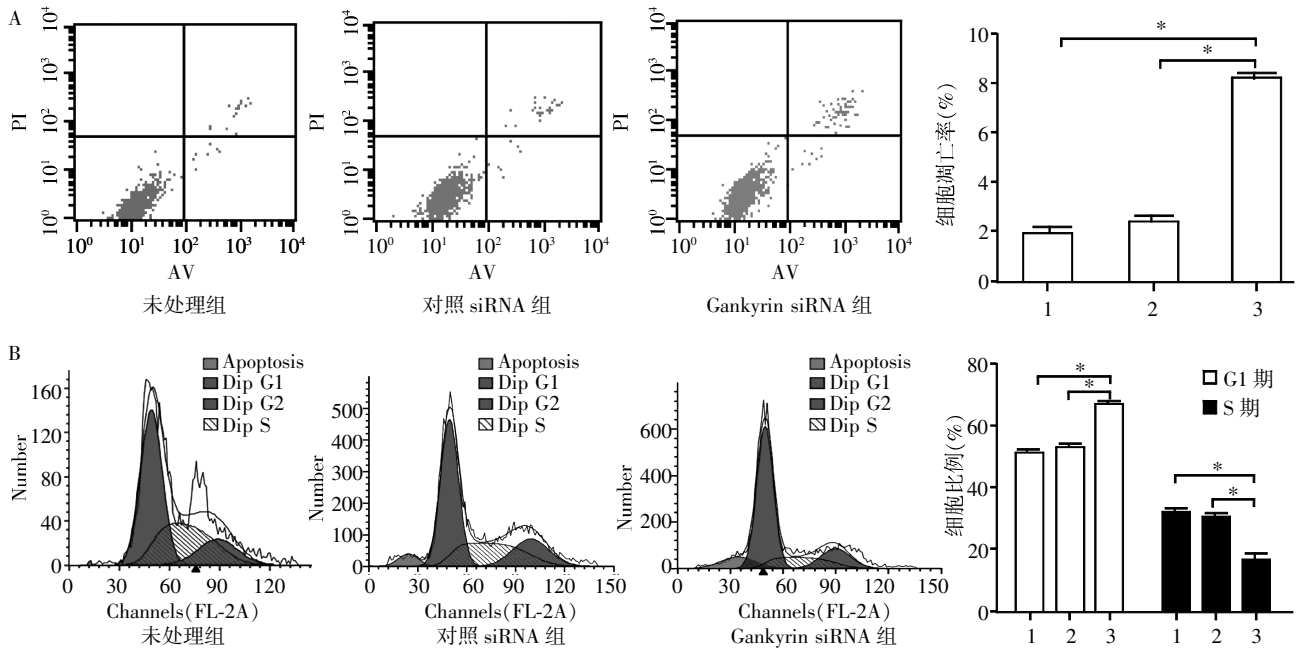
图 2 CCK-8 法检测各组不同时间细胞增殖情况

Figure 2 Cell proliferation at different times by CCK-8 method in each group

照 siRNA 组 [(31.17 ± 2.89)%] 相比, Gankyrin siRNA 组分布在 S 期的细胞比例 [(17.44 ± 3.44)%] 减少 ($F=28.62$, P 均 < 0.001)。

2.5 细胞划痕损伤实验结果

Gankyrin siRNA 组细胞划痕愈合较慢, Gankyrin siRNA 组 48 h 愈合率 [(26.50 ± 1.49)%] 明显低于对照 siRNA 组 [(50.54 ± 3.45)%] 和未处理组 [(49.54 ± 5.26)%], 差异有统计学意义 ($F=39.77$, P 均 < 0.001 , 图 4A), 未处理组和对照 siRNA 转染组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A: Gankyrin 表达下调对 Hep-2 细胞凋亡的影响 B: Gankyrin 表达下调对 Hep-2 细胞周期的影响。1: 未处理组 2: 对照 siRNA 组 3: Gankyrin siRNA 组。两组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 3 流式细胞术检测 Gankyrin 表达下调对 Hep-2 细胞凋亡和细胞周期的影响

Figure 3 The effect of down-regulated Gankyrin expression on apoptosis and cell cycle of Hep-2 cells by flow cytometry

2.6 Transwell 小室实验结果

Gankyrin siRNA 组细胞穿膜数[(200.00 ± 10.00)个],低于对照 siRNA 组[(333.33 ± 20.82)个]和未处理组[(355.00 ± 15.00)个],差异有统计学意义($F=83.62, P$ 均 < 0.01, 图 4B),结果表明 Gankyrin 下调能抑制 Hep-2 细胞的迁移,未处理组和对照 siRNA 转染组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.7 Matrigel 侵袭实验结果

Gankyrin siRNA 组、未处理组和对照 siRNA 组的细胞穿膜数分别为(265.00 ± 15.00)个、(283.33 ± 15.28)个、(285.00 ± 18.03)个,Gankyrin siRNA 组平均穿膜细胞数小于其余两组,但差异无统计学意义

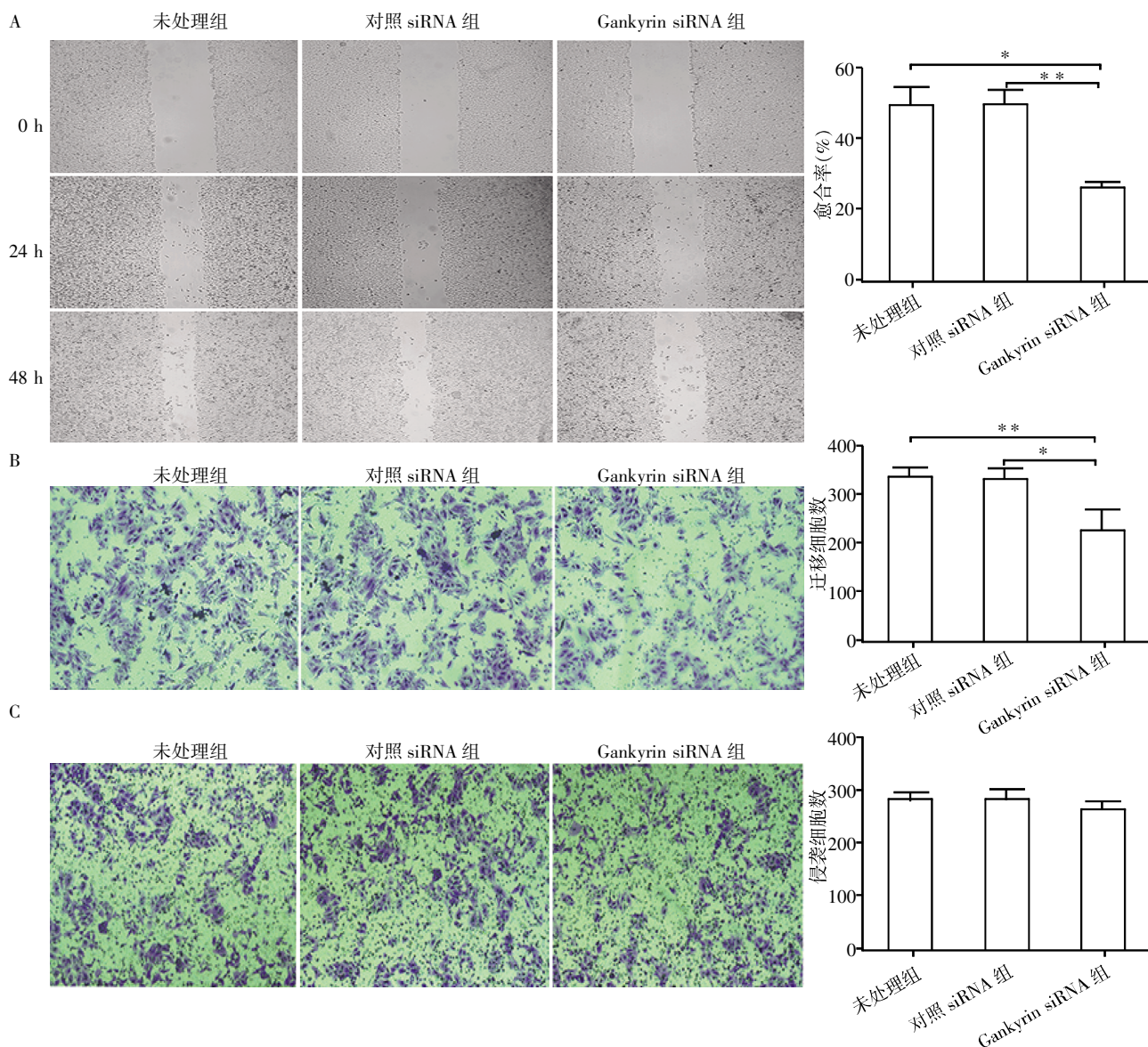
($F=1.42, P > 0.05$, 图 4C)。表明 Gankyrin 下调对 Hep-2 细胞侵袭能力无显著影响。

2.8 p53 蛋白表达检测结果

Gankyrin siRNA 组 p53 蛋白相对表达量(0.660 ± 0.071)高于对照 siRNA 组(0.201 ± 0.043)和未处理组(0.172 ± 0.040),差异有统计学意义($F=80.697, P$ 均 < 0.001,图 5)。对照 siRNA 组和未处理组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

Gankyrin 是新发现的癌基因,其产物蛋白是一种在空间结构上高度保守的小分子蛋白,通过与不



A: 各组划痕损伤实验细胞迁移结果及各组 48 h 愈合率; B: Transwell 细胞迁移实验各组检测结果(结晶紫染色, ×100); C: Matrigel 侵袭实验各组检测结果(结晶紫染色, ×100)。两组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 4 划痕损伤实验、Transwell 细胞迁移实验及 Matrigel 侵袭实验结果

Figure 4 Results of wound healing assay, transwell assay and Matrigel assay

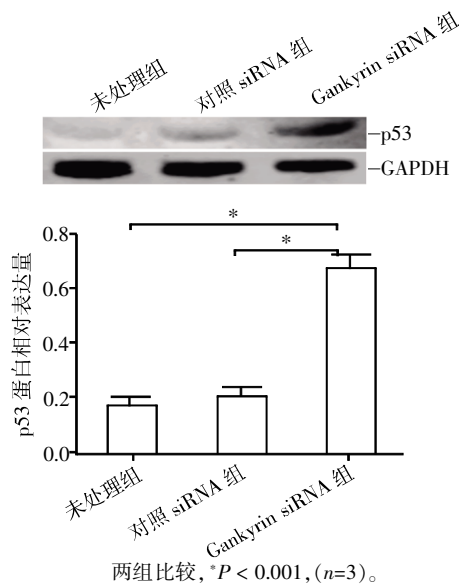


图 5 Western blot 检测各组 p53 蛋白表达水平

Figure 5 p53 protein level was detected by Western blot in each group

同蛋白质结合,调控细胞增殖并产生相应的细胞生命活动^[11]。自 Gankyrin 蛋白在肝癌组织中高表达被发现以来^[1],人们陆续发现 Gankyrin 与多种恶性肿瘤的发生发展有关^[5-8,12-13]。我们的前期研究显示,Gankyrin 蛋白表达水平在喉鳞癌组织中显著升高(待发表)。全面系统地探讨 Gankyrin 在不同恶性肿瘤细胞生物学行为中的作用,对于恶性肿瘤的诊治、预后判断有着重要价值。

Ortiz 等^[5]通过下调食管癌细胞中 Gankyrin 的表达,发现食管癌细胞的增殖能力和侵袭能力均受到抑制;Tang 等^[6]研究表明,抑制 Gankyrin 的表达能够抑制体外人结肠癌细胞的增殖;Zhang 等^[14]在子宫内膜癌细胞的研究也得到了相近结论。本研究利用 siRNA 干扰技术使喉鳞癌 Hep-2 细胞中的 Gankyrin 表达下调,探讨 Gankyrin 基因对 Hep-2 细胞生物学行为的影响。通过 CCK-8、细胞划痕损伤实验、Transwell 实验证实,下调 Gankyrin 后,Hep-2 细胞的增殖及迁移能力均明显受到抑制,结论与上述研究结果基本一致。流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期结果显示,Hep-2 细胞阻滞在 G1 期的比例升高,S 期比例降低,细胞凋亡比例增加。Matrigel 侵袭实验显示侵袭能力无明显改变。

研究表明,Gankyrin 主要通过 p53 和 Rb 两个抑癌基因影响细胞周期和凋亡,从而促进细胞过度增殖^[2-3,11]。Higashitsuji 等^[2]指出,Gankyrin 过表达可促进 Mdm2 对 p53 泛素化降解,通过负性调节 p53 促使细胞过度增殖及肿瘤细胞的形成。p53 是一种

与肿瘤相关性高、功能强大、研究透彻的基因,它通过细胞周期停滞和启动细胞凋亡影响肿瘤细胞增殖。Qiu 等^[15]将 p53 作为靶点,通过转导将野生型 p53 基因转入喉鳞癌 Hep-2 细胞系中,使其直接抑制喉鳞癌细胞的增殖,从而控制癌症进展。本研究发现,Gankyrin 下调后,Hep-2 细胞中的 p53 蛋白相对含量增加,这与细胞周期 G1 期阻滞、细胞凋亡比例增加的实验结果相吻合,提示体外条件下 Gankyrin 可能通过参与调节 p53 这一途径影响喉鳞癌细胞的增殖,同时也提示 Gankyrin 应用于喉鳞癌基因治疗中的可行性。细胞信号转导通路错综复杂,Gankyrin 或在其他通路中也影响着喉鳞癌细胞的恶性生物学行为,进一步研究具体机制将有助于 Gankyrin 在喉鳞癌的诊疗中发挥作用。

综上所述,沉默 Gankyrin 基因可抑制喉鳞癌细胞的增殖和迁移,诱导细胞凋亡和细胞周期的改变。Gankyrin 基因在喉鳞癌细胞中发挥着多种生物学作用,可能是喉鳞癌潜在的基因治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by Gankyrin, an oncogenic ankyrin repeat protein overexpressed in hepatomas[J]. Nat Med, 2000, 6(1): 96-99
- [2] Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, et al. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53[J]. Cancer Cell, 2005, 8(1): 75-87
- [3] Li J, Tsai MD. Novel insights into the INK4-CDK4/6-Rb pathway: counter action of Gankyrin against INK4 proteins regulates the CDK4-mediated phosphorylation of Rb[J]. Biochemistry, 2002, 41(12): 3977-3983
- [4] Man JH, Liang B, Gu YX, et al. Gankyrin plays an essential role in Ras-induced tumorigenesis through regulation of the RhoA/ROCK pathway in mammalian cells[J]. J Clin Invest, 2010, 120(8): 2829-2841
- [5] Ortiz CM, Ito T, Tanaka E, et al. Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. Int J Cancer, 2008, 122(2): 325-332
- [6] Tang SH, Yang GT, Meng Y, et al. Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(2): 88-95
- [7] Zheng JY, Hu H, Du JJ, et al. p28GANK is a novel marker

(下转第 329 页)