

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.02.008

血液肿瘤专题 · 论著

Apollon siRNA 联合川芎嗪对白血病细胞增殖及凋亡的影响

贾秀红 孝飞飞 李建厂

(滨州医学院附属医院儿科, 山东 滨州 256603)

[摘要] **目的** 观察 Apollon siRNA 靶向沉默 Apollon 基因联合川芎嗪 (TMP) 对人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 增殖及凋亡的影响。**方法** 根据前期实验筛选出的干扰效果最佳的 Apollon siRNA 片段, 构建 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 真核表达载体, 并将构建成功的载体转染至 K562 细胞。将实验分为细胞对照组 (未行任何处理)、阴性对照组 (转染阴性质粒载体) 和 RNA 干扰组 (转染 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 质粒载体), 利用 RT-PCR 法和细胞免疫荧光法分别检测各组细胞 Apollon mRNA 及蛋白的表达情况; 再于上述分组基础上新增 TMP 组 (施加 320 $\mu\text{g/mL}$ TMP)、TMP+ 阴性对照组和 TMP+RNA 干扰组, 应用 MTT 法和流式细胞术分别检测各组 K562 细胞的增殖能力和细胞凋亡率。**结果** 构建的 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 载体能在 K562 细胞内稳定表达; RNA 干扰组 Apollon mRNA 及其蛋白的相对表达水平明显低于细胞对照组和阴性对照组 (均 $P<0.05$); RNA 干扰组 K562 细胞的增殖抑制率和凋亡率高于细胞对照组 ($P<0.05$), 与 RNA 干扰组及 TMP 组比较, siRNA 转染联合 TMP 能显著提高 K562 细胞的增殖抑制率和凋亡率 (均 $P<0.05$)。**结论** Apollon siRNA 转染能显著抑制 K562 细胞增殖并促进其凋亡, 且与 TMP 联合使用对提高 K562 细胞的增殖抑制率和凋亡率具有显著协同作用, 提示 siRNA 技术联合药物在白血病治疗中具有重要的潜在价值。 [中国当代儿科杂志, 2014, 16 (2): 135-140]

[关键词] Apollon 基因; RNA 干扰; 川芎嗪; 白血病 K562 细胞

Effect of Apollon siRNA combined with tetramethylpyrazine on proliferation and apoptosis of leukemia K562 cells

JIA Xiu-Hong, XIAO Fei-Fei, LI Jian-Chang. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China (Email: jiaxiuhong001@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of small interfering RNA (siRNA) silencing Apollon gene combined with tetramethylpyrazine (TMP) on the proliferation and apoptosis of human chronic myeloid leukemia cell line K562. **Methods** K562 cells were divided into blank control, negative control, and RNA interference (RNAi) group. For the RNAi group, the pGPHI-GFP-Neo-Apollon eukaryotic expression vector based on the best Apollon siRNA fragments screened out in previous experiments was constructed; the blank control group received no treatment, and the negative control group was transfected with negative plasmid vector. The mRNA and protein expression of Apollon was measured by RT-PCR and cell immunofluorescence, respectively. Additionally, TMP (320 $\mu\text{g/mL}$) was applied to set TMP, TMP+negative control, and TMP+RNAi groups. The cell viability and apoptosis rate were determined by MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results** The constructed vector was stably expressed in K562 cells. The RNAi group had significantly lower mRNA and protein expression of Apollon than the blank control group and negative control ($P<0.05$). The RNAi group had significantly increased proliferation inhibition rate and apoptosis rate, as compared with the blank control group ($P<0.05$). The TMP+RNAi group had significantly increased proliferation inhibition rate and apoptosis rate, as compared with the RNAi, and TMP groups ($P<0.05$). **Conclusions** Apollon siRNA can significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of K562 cells, and the addition of TMP can further increase the proliferation inhibition rate and apoptosis rate, suggesting that siRNA technology combined with drugs has a significant potential value in the treatment of leukemia. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(2): 135-140]

Key words: Apollon gene; RNA interference; Tetramethylpyrazine; Leukemia K562 cell

[收稿日期] 2013-06-26; [接受日期] 2013-12-26

[基金项目] 山东省科学技术发展计划项目 (2010GSF10264)。

[作者简介] 贾秀红, 女, 硕士, 教授。

白血病是最常见的血液系统恶性肿瘤,其发病机制与细胞过度增生、分化阻滞和凋亡受抑密切相关,其抗凋亡能力增强可能与细胞内抗凋亡基因过度表达密切相关^[1]。Apollon 是内源性凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员,在白血病细胞内高表达,尤其在白血病诱导无缓解、髓外白血病、复发患者中表达明显增高,高表达患者骨髓及外周白血血病细胞清除率及3年无复发生存率均较低,预后差^[2]。因此,下调 Apollon 基因表达有望成为白血病基因治疗的有效靶点。川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)作为活血化瘀中药制剂已在临床应用多年,近年来, TMP 在白血病方面的研究增多,其抗白血病细胞增殖作用在许多研究中得到证实^[3], TMP 作为天然药物安全范围大,耐受性较好,临床应用结果表明几乎没有患者发生不良反应。结合白血病血瘀内阻的临床特征,本研究首次观察靶向 Apollon siRNA 技术联合中药 TMP 对 K562 细胞增殖、凋亡的影响,进一步探讨基因联合中药抗白血病的作用机制,为其应用到白血病的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 由滨州医学院中心实验室提供;胎牛血清和 RPMI-1640 购于美国 Hyclone 公司;脂质体 Lipofectamine TM 2000 购于美国 Invitrogen 公司;兔抗人 Apollon 多克隆抗体一抗购于美国 Santa Cruz 公司,带有红色荧光标记的四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)二抗购于上海江莱生物科技有限公司;四甲基偶氮唑盐购于美国 Sigma 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物公司;RT-PCR 试剂盒购于日本 Takara 公司;Apollon 及 β -actin 引物由上海赛百盛公司合成;靶向 Apollon 的 siRNA 序列、阴性对照 siRNA 序列由上海吉玛公司合成。

1.2 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 载体构建、鉴定及转染

前期试验已筛选出针对 GenBank 中人 Apollon (ID: 57448) 的特异性有效 siRNA 序列 (Sense: 5'-CUGCCUCUUUCAGGCAAUATT-3', Anti-sense:

5'-UAUUGCCUGAAAGAGGCAGTT-3') ; 阴性对照组序列为 Sense: 5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGTC-AAG-3', Anti-sense: 5'-GATTACGTGACACGTTCCG-AGAATT-3', 与人类基因无同源性。构建的 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 质粒载体带有绿色荧光蛋白 GFP 转染标记基因及卡那霉素抗性基因,用 BamHI、PstI 限制酶分别做酶切鉴定及测序,测序结果显示插入片段正确。将 K562 细胞接种于含青霉素、链霉素(终浓度均为 100 U/mL)及 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养,于细胞对数生长期时按照 Lipofectamine TM 2000 说明书进行转染,转染效率 = 荧光蛋白表达细胞数 / 细胞总数 × 100%。

1.3 RT-PCR 法检测 Apollon mRNA 的表达水平

取对数生长期的 K562 细胞以 3×10^5 / 孔的密度接种于 6 孔培养板中,按照 1.2 中的方法进行转染,实验分为 RNA 干扰组(转染 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 质粒载体)、阴性对照组(转染阴性质粒载体)和细胞对照组(未转染质粒载体),每组设 3 个平行样本。转染后 48 h 提取总 RNA,两步法行 RT-PCR, Apollon 引物序列:上游引物: 5'-TGGCTCAAGCTGGATTTTAT-3',下游引物: 5'-TTCAGACCAAGGTTTCATCAG-3',片段长度: 116 bp; 内参 β -actin: 上游引物: 5'-TCATGTTTGAGACCTTCAA-3',下游引物: 5'-GTCTTTGCGGATGTCCACG-3',片段长度: 513 bp。反应体系(25 μ L): 2 × MasterMix 12.5 μ L,上下游引物各 1 μ L, β -actin 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, 灭菌水 8.5 μ L。反应条件: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共进行 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。产物于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳。经分析软件分析、计算出目的基因 mRNA 的相对表达水平: 以 Apollon/ β -actin 灰度比值(ODR)表示。实验独立重复 3 次。

1.4 细胞免疫荧光检测 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 载体对 K562 细胞 Apollon 蛋白表达的影响

将稳定转染 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 载体、阴性载体及未转染的 3 组 K562 细胞制成单细胞悬液,滴在经多聚赖氨酸处理的载玻片上,每组各制作 3 张细胞爬片,把载玻片放入 24 孔板,置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,48 h 后取出细胞爬片,

经4%多聚甲醛固定,1%Triton 穿孔,2%的BSA封闭30 min,加入一抗4℃过夜(1:100),加入荧光二抗TRITC(1:120),避光、室温反应1 h, PBS漂洗,50%缓冲甘油封片,激光共聚焦拍照,实验独立重复3次。参照Image ProPlus 6.0专业图像分析软件测定细胞荧光强度,将荧光图片转换成灰度图片,测量其光密度(OD)和总面积数值,利用OD与总面积的比值计算灰度图片红色荧光区域的平均灰度(荧光强度)数值。

1.5 MTT 法检测细胞增殖能力

将对数生长期的 1×10^4 个K562细胞接种于96孔培养板,实验分为6组:细胞对照组(未行任何处理)、阴性对照组(转染阴性质粒载体)、RNA干扰组(转染pGPHI-GFP-Neo-Apollon质粒载体)、TMP组(施加320 μg/mL TMP)、阴性对照+TMP组及RNA干扰+TMP组,每组设5个平行复孔。分别于转染后24、48、72 h每孔加入5 g/L的MTT溶液20 μL,孵育4 h后吸弃上清,每孔加入DMSO150 μL,避光、振荡及裂解15 min后,于490 nm波长处用酶标仪检测各孔吸光度A值。计算各组细胞的增殖抑制率(IR): $IR = (1 - \text{实验组A值} / \text{细胞对照组A值}) \times 100\%$ 。实验独立重复3次。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

实验细胞分组同1.5,每组设3个平行样本。细胞转染24 h后收集细胞,经PBS洗涤细胞2次,加入500 μL的Binding Buffer重悬细胞,加入5 μL AnnexinV-FITC混匀,再加入5 μL Propidium Iodide混匀,室温、避光反应15 min,1 h内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验独立重复3次。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用One-Way Anova分析,多个样本均数间两两比较采用SNK-q检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 重组载体转染 K562 细胞

取对数生长期的K562细胞进行转染,细胞转

染24~48 h后,在荧光显微镜下观察到大量绿色荧光蛋白GFP基因的表达,经计算后得出转染效率>50%,见图1。

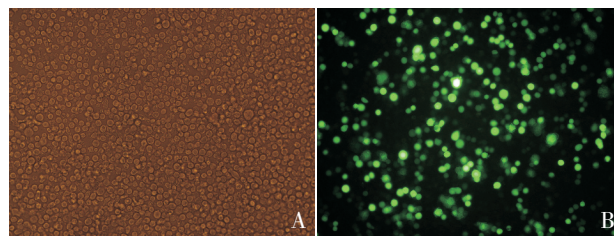


图1 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 重组载体转染 K562 细胞($\times 100$) A: 普通显微镜拍摄照片; B: 荧光显微镜拍摄照片。

2.2 重组载体对 K562 细胞 Apollon mRNA 表达水平的影响

3组Apollon mRNA的相对表达量比较差异有统计学意义($F=57.573$, $P=0.012$),其中RNA干扰组Apollon mRNA相对表达量为 $27.622\% \pm 0.057\%$,明显低于细胞对照组($89.770\% \pm 0.028\%$)和阴性对照组($84.868\% \pm 0.057\%$),差异有统计学意义(分别 $P=0.025$ 、 0.019),而细胞对照组和阴性对照组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图2。

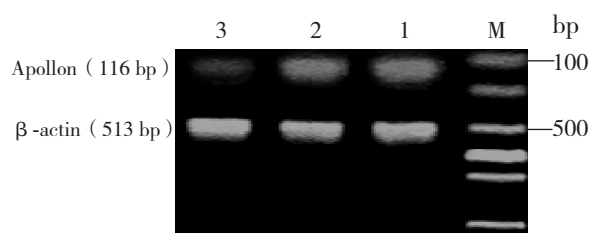


图2 RT-PCR 检测各组 Apollon mRNA 的表达水平 M: Marker; 1: 细胞对照组; 2: 阴性对照组; 3: RNA 干扰组。

2.3 重组载体对 K562 细胞 Apollon 蛋白表达的影响

细胞免疫荧光检测细胞Apollon蛋白的表达,3组Apollon蛋白的荧光强度比较差异有统计学意义($F=71.063$, $P=0.013$),其中RNA干扰组细胞Apollon蛋白的荧光强度为 $16.0\% \pm 1.7\%$,明显低于细胞对照组($35.4\% \pm 2.9\%$)和阴性对照组($35.0\% \pm 2.7\%$),差异有统计学意义(分别 $P=0.016$ 、 0.013),而细胞对照组和阴性对照组间

比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 3。

2.4 MTT 检测对 K562 细胞增殖的影响

MTT 结果显示: 在转染后各时间点, RNA 干扰组和 TMP 组的 IR 值均明显高于细胞对照组 (均 $P<0.05$), 且 RNA 干扰组的 IR 值均明显高于 TMP 组 (均 $P<0.05$), 说明单独使用重组载

体或 TMP 均可抑制 K562 细胞增殖, 且 siRNA 抑制细胞增殖的作用强于 TMP; TMP+RNA 干扰组的 IR 值均明显高于 RNA 干扰组和 TMP 组 (均 $P<0.05$), 说明重组载体联合 TMP 作用于 K562 细胞后具有协同效应, 对 K562 细胞的增殖抑制率显著提高。见表 1。

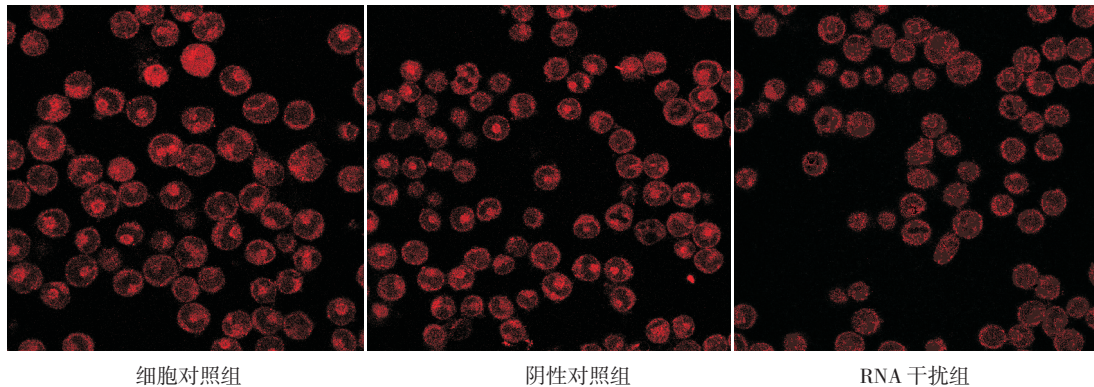


图 3 细胞免疫荧光检测 Apollon 蛋白的表达水平 ($\times 400$) RNA 干扰组细胞 Apollon 蛋白的荧光强度明显低于细胞对照组和阴性对照组, 而细胞对照组和阴性对照组间 Apollon 蛋白的荧光强度表达无差异。红色荧光标记为 Apollon 蛋白阳性表达。

表 1 MTT 检测 Apollon siRNA 联合 TMP 对 K562 细胞的增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	A 值	IR(%)	A 值	IR(%)	A 值	IR(%)
细胞对照组	0.273 ± 0.003	0	0.518 ± 0.014	0	0.721 ± 0.049	0
阴性对照组	0.276 ± 0.005	6.0 ± 1.2	0.556 ± 0.043	7.6 ± 3.0	0.635 ± 0.031	6.7 ± 3.3
RNA 干扰组	0.151 ± 0.004^a	47.0 ± 2.9^a	0.247 ± 0.035^a	54.6 ± 3.4^a	0.274 ± 0.038^a	63.1 ± 6.3^a
TMP 组	$0.208 \pm 0.004^{a,b}$	$11.0 \pm 3.6^{a,b}$	$0.432 \pm 0.027^{a,b}$	$12.2 \pm 1.1^{a,b}$	$0.532 \pm 0.042^{a,b}$	$18.8 \pm 4.1^{a,b}$
TMP+ 阴性对照组	0.217 ± 0.006	9.5 ± 2.9	0.472 ± 0.031	11.5 ± 1.0	0.491 ± 0.051	17.5 ± 4.2
TMP+RNA 干扰组	$0.113 \pm 0.002^{b,c}$	$60.4 \pm 2.6^{b,c}$	$0.134 \pm 0.008^{b,c}$	$72.7 \pm 5.1^{b,c}$	$0.168 \pm 0.009^{b,c}$	$80.0 \pm 6.5^{b,c}$
F 值	157.019	112.080	163.903	174.107	133.190	242.013
P 值	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001

注: a 为与同时时间点细胞对照组比较, $P<0.05$; b 为与同时时间点 RNA 干扰组比较, $P<0.05$; c 为与同时时间点 TMP 组比较, $P<0.05$ 。

2.5 流式细胞术检测 K562 细胞的凋亡情况

6 组 K562 细胞的凋亡率比较差异有统计学意义 ($F=143.47$, $P<0.01$)。RNA 干扰组 ($23.22\% \pm 0.98\%$) 和 TMP 组 ($13.61\% \pm 0.80\%$) 细胞凋亡率均明显高于细胞对照组 ($6.37\% \pm 0.12\%$) 和阴性对照组 ($5.83\% \pm 0.24\%$), 差异有

统计学意义 (均 $P<0.05$)。TMP+RNA 干扰组细胞凋亡率 ($38.21\% \pm 0.97\%$) 明显高于 TMP 组、TMP+ 阴性对照组 ($14.01\% \pm 0.91\%$) 和 RNA 干扰组, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$), 表明重组载体联合 TMP 比单用 siRNA 或 TMP 诱导 K562 细胞的凋亡率高, 见图 4。

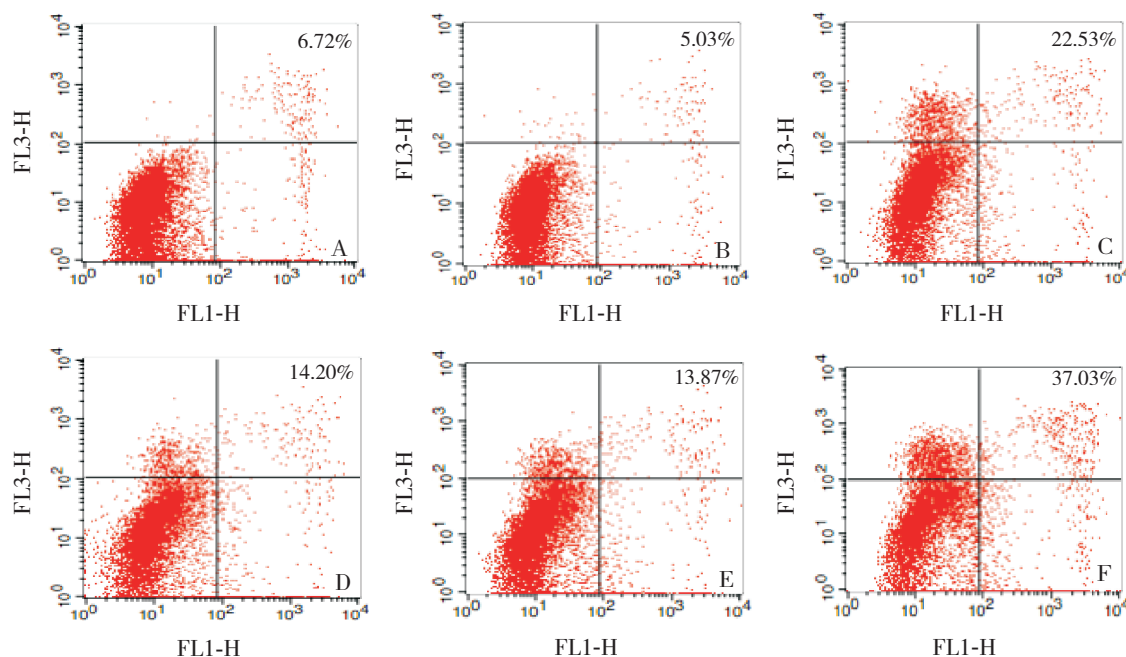


图4 流式细胞术检测 Apollon siRNA 联合 TMP 对各组 K562 细胞凋亡率的影响 A: 细胞对照组; B: 阴性对照组; C: RNA 干扰组; D: TMP 组; E: TMP+ 阴性对照组; F: TMP+RNA 干扰组。图中右上象限示凋亡细胞。

3 讨论

凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 家族是近年来发现最强的内源性凋亡抑制因子, 发现该家族的一些成员在白血病、乳腺癌、甲状腺肿瘤、脑瘤、消化道肿瘤及口腔癌等人类多种肿瘤内高表达^[4]。Apollon (BRUCE/BIRC6, BIR-containing protein 6) 是 IAPs 家族中分子量最大的成员, 其抑制凋亡途径主要通过结合下游 Smac、HtrA2 以及 caspase 等机制发挥抑制凋亡作用^[5], Apollon 基因表达增高可能在白血病发病中起重要作用, Smolewski 等^[6]发现, Apollon 基因在急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和弥漫型大 B 细胞淋巴瘤中表达明显增高; Apollon 高表达的患者病情进展快, 预后差, 持续高表达可抑制白血病细胞凋亡, 其在白血病中的研究还比较少, 提示可将其作为影响白血病临床治疗结果及预后的危险因素之一^[7]。目前, 由于白血病化疗方案的不断改进, ALL 5 年生存率达 80% 以上, 但应用于慢性粒细胞白血病 (CML) 的化疗药物效果远差于 ALL, 治疗 CML 的最佳措施仍是造血干细胞移植, 但由于供体缺乏、费用高及风险大等原因, 限制了其在临床的应用。陈建发等^[8]应用 siRNA 干扰肝癌

HCC 细胞 Apollon 基因表达, 能显著提高 HCC 细胞对 5-FU、阿霉素等化疗药物的敏感性, 提示其药物敏感性与细胞凋亡密切相关, Apollon 在影响药物疗效方面可能是一个重要的潜在因子。近期研究表明, Apollon 基因在细胞凋亡信号通路是一个关键的基因调控点, 上调 Apollon 基因表达, 细胞对药物敏感性降低, 下调 Apollon 基因表达, 细胞对药物敏感性升高^[9]。

白血病细胞对结构、作用靶点和药理机制不同的化疗药物易产生交叉耐药, 耐药的产生与细胞凋亡受抑密切相关, Apollon 基因高表达影响细胞凋亡, 在肿瘤治疗方面有重大影响, 常规剂量化疗药物对部分白血病患者有效, 且易导致治疗不彻底、复发等; 大剂量化疗可明显提高细胞内药物浓度, 使其缓解率明显提高, 但毒副作用也随之增加, 常导致化疗中断或失败, 总生存期明显缩短。TMP 由中药植物根茎中提取, 能激活腺苷酸环化酶进一步阻断 Ca^{2+} 内流, 是一种钙通道阻滞剂, 患者对其耐受性好, 几乎无副作用^[10]。有研究表明, 浓度为 160 $\mu\text{g/mL}$ 的 TMP 能抑制内皮细胞的生长, 其还有直接抑制肿瘤细胞生长、免疫调节、化疗增效减毒作用, 可作为恶性肿瘤的辅助用药^[11]。吴涛等^[12]发现 TMP 对 K562 及

HL-60 细胞具有抑制效应,可轻度抑制肿瘤细胞生长,还能增加化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用。鉴于化疗药物的严重不良反应,寻找高效低毒的治疗方案是目前临床白血病治疗中急需解决的问题,遂本实验通过 siRNA 技术沉默抑凋亡 Apollon 基因和安全性较高的 TMP 联合作用于 K562 细胞,观察其对慢性髓系白血病 K562 细胞的影响,探讨靶向 Apollon siRNA 联合 TMP 能否诱导 K562 细胞凋亡。结果显示 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 载体能有效沉默 K562 细胞内 Apollon 基因表达;siRNA 作用 K562 细胞 48 h 后,采用细胞免疫荧光技术检测 RNA 干扰组细胞内 Apollon 蛋白表达量明显低于细胞及阴性对照组,表明靶向 Apollon siRNA 能对 Apollon 产生稳定抑制,可依此为基础进一步探讨 Apollon 基因与白血病发病及治疗之间的关系。MTT 结果显示随着时间的延长, RNA 干扰组对 K562 细胞的 IR 依次增高,72 h IR 可达 $63.1\% \pm 6.3\%$,TMP 单独作用于细胞亦可诱导 K562 细胞发生轻度凋亡,但与 siRNA 联合后 72 h IR 可达 $80.0\% \pm 6.5\%$,明显高于细胞对照组及阴性对照组;流式结果显示重组载体转染 K562 细胞 24 h 后凋亡率为 $23.22\% \pm 0.98\%$,加入药物 TMP 后凋亡率可达 $38.21\% \pm 0.97\%$,能明显促进 K562 细胞凋亡,Apollon 的过度表达抑制细胞凋亡,减少内源性 Apollon 的表达可增强药物诱导的细胞凋亡,结论与 Pennati 等^[13]通过 siRNA 介导的 Apollon 下调可使肿瘤细胞更易于发生由抗癌药物所诱导的细胞凋亡的研究相符。

综上所述,本实验构建靶向 Apollon 的 pGPHI-GFP-Neo-Apollon 载体能有效降低 Apollon mRNA 及蛋白的表达水平,使 K562 细胞更易发生由非细胞毒性剂量的 TMP 所诱导的细胞凋亡,两者联合后效果优于单独应用,具有协同作用,其作用机制可能与沉默抑凋亡基因使其更易由 TMP 启动细胞凋亡机制有关,其具体机制还有待进一

步研究,对靶向沉默 Apollon 基因联合中药 TMP 也许能为临床白血病治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Long J, Parkin B, Ouillette P, et al. Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia[J]. *Blood*, 2010, 116(1): 71-80.
- [2] Sung KW, Choi J, Hwang YK, et al. Overexpression of apollon, an antiapoptotic protein, is associated with poor prognosis in childhood de novo acute myeloid leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(17): 5109-5114.
- [3] 张伟,戴碧涛,汪明宇,等.川芎嗪对白血病细胞黏附运动和侵袭的影响[J].*重庆医科大学学报*,2008,33(4):403-406.
- [4] Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a Name?[J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 123-135.
- [5] Bartke T, Pohl C, Pwrowolakis G, et al. Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chemer E2/E3 ubiquitin Ligase[J]. *Mol Cell*, 2004, 14(6): 801-811.
- [6] Smolewski P, Robak T. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies[J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(8): 633-649.
- [7] Ismail EA, Mahmoud HM, Tawfik LM, et al. BIRC6/Apollon gene expression in childhood acute leukemia: impact on therapeutic response and prognosis[J]. *Eur J Haematol*, 2012, 88(2): 118-127.
- [8] 陈建发,李宇华,陈引香,等. Apollon siRNA 提高肝癌细胞化疗敏感性的实验研究[J].*南方医科大学学报*,2011,31(10):1701-1704.
- [9] Amundson SA, Myers TG, Scudiero DS, et al. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 6101-6110.
- [10] 杨岚,杨平地,梁蓉,等.川芎嗪联合环胞霉素 A 逆转白血病多药耐药的研究[J].*癌症*,2000,19(4):304-306.
- [11] 李乃农,陈元仲,吕联皇,等.白血病细胞端粒酶活性的研究[J].*白血病淋巴瘤*,2002,11(5):21-28.
- [12] 吴涛,瞿桂芳.川芎嗪对白血病 K562 细胞增殖和凋亡的影响[J].*中国冶金工业医学杂志*,2010,27(1):5-7.
- [13] Pennati M, Millo E, Gandellini P, et al. RNA interference-mediated validation of survivin and Apollon/BRUCE as new therapeutic targets for cancer therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(2): 69-78.

(本文编辑:万静)