

恩替卡韦对肝癌HepG2细胞凋亡的诱导作用及其机制

张玉山*(南阳市中心医院感染科,河南南阳 473000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1366-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.21

摘要 目的:研究恩替卡韦对肝癌HepG2细胞凋亡的诱导作用及其机制。方法:以0(正常对照组)和10、30、100 μmol/L(低、中、高浓度组)恩替卡韦作用于HepG2细胞48 h,采用MTT法检测细胞活力;膜联蛋白V(Annexin V)-碘化丙啶(PI)流式双染法检测细胞凋亡情况;Western blot法检测细胞中核因子-κB p65(NF-κB p65)和核因子-κB抑制因子α(IκBα)磷酸化水平,以及Bax、Bcl-2、生存素及C-myc蛋白表达。结果:与正常对照组比较,恩替卡韦低、中、高浓度组细胞活力,NF-κB p65、IκBα磷酸化水平,Bcl-2、生存素及C-myc蛋白表达均降低,细胞凋亡率、Bax蛋白表达均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈浓度依赖性。结论:恩替卡韦能降低HepG2肝癌细胞的活力并诱导其凋亡,其机制可能与上调Bax表达,下调Bcl-2、生存素、C-myc表达及抑制NF-κB/IκBα信号通路激活有关。

关键词 恩替卡韦;肝癌HepG2细胞;凋亡;机制

Induction Effect and Mechanism of Entecavir on the Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

ZHANG Yushan(Dept. of Infectious Diseases, Nanyang Central Hospital, Henan Nanyang 473000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study induction effect of entecavir on the apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its mechanism. METHODS: After treated with 0 (normal control), 10, 30 and 100 μmol/L (low, medium and high concentration groups) entecavir for 48 h, MTT method was adopted to detect HepG2 cell viability. Annexin V-PI flow double staining was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to determine the phosphorylation of nuclear factor kappa B p65 (NF-κB p65) and nuclear factor kappa B inhibitor α (IκBα), and the protein expression of Bax, Bcl-2, Survivin and C-myc. RESULTS: Compared with normal control group, the cell viability, the phosphorylation of NF-κB p65 and IκBα, and the protein expression of Survivin, C-myc and Bcl-2 of entecavir low, medium and high concentration groups all decreased; the apoptotic rate, the protein expression of Bax increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), in concentration-dependent manner. CONCLUSIONS: Entecavir can decrease viability of HepG2 cells and induce cell apoptosis, which is related to up-regulation expression of Bax, down-regulation expression of Survivin, C-myc and Bcl-2, and blocking the activation of NF-κB/IκBα signaling pathway.

KEYWORDS Entecavir; Hepatocellular carcinoma HepG2 cells; Apoptosis; Mechanism

多,比如肝肠循环或其他循环过程(胃-肠循环、肠-肠循环等)或胃排空延迟、不同肠段吸收的差异、中药成分之间的转化等^[3]。关于连翘苷、芍药苷出现双峰的具体原因需要进一步考察。

本方法使用LC-MS/MS实现对前列安颗粒中2种指标性成分的血浆定量分析,并对其体内药动学进行研究,对于其体内物质基础的研究具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 郭进,刘灵改,胡玉录,等.前列安颗粒急性毒性与主要药效学研究[J].医药导报,2008,27(8):928.
- [2] 郭进,郝吉雪,刘灵改,等.前列安颗粒治疗慢性前列腺炎的实验研究[J].河北中医药学报,2008,23(1):3.
- [3] 张立怀,郭进,吴宗耀.前列安颗粒治疗慢性前列腺炎临床研究[J].中医学报,2012,27(12):1661.
- [4] 郝吉雪,郭进,陈奇斌,等.前列安颗粒治疗慢性前列腺炎的药效学研究[J].现代中西医结合杂志,2008,17(8):1152.
- [5] 陆小华,马骁,王建,等.赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(4):595.

- [6] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等.芍药苷药理作用研究进展[J].中国药物警戒,2012,9(2):100.
- [7] 胡竟一,雷玲,余悦.连翘的抗炎解热作用研究[J].中药药理与临床,2007,23(3):51.
- [8] 冯卫生,李珂珂,郑晓珂.连翘化学成分的研究[J].中国药理学杂志,2009,44(7):490.
- [9] 梅雪,周安琴,周春阳,等.连翘叶的化学成分、药理学与毒理学研究概况[J].中国药房,2015,26(22):3143.
- [10] 郭进,郝吉雪,张卉,等.前列安颗粒喷雾干燥工艺研究[J].现代中西医结合杂志,2008,17(7):1072.
- [11] 刘斌,杨绍毅,魏伟. LC-MS/MS测定大鼠血浆中芍药苷及其药代动力学特征[J].安徽医科大学学报,2009,44(6):707.
- [12] 鲍天冬,张英丰,朱晓新,等. LC-MS研究炒白芍提取物中芍药苷在大鼠体内的药代动力学[J].中国中药杂志,2010,35(9):1193.
- [13] 陈曦,马越鸣,钟杰.药物浓度-时间曲线双峰现象研究进展[J].中国新药与临床杂志,2012,31(8):432.

* 副主任医师。研究方向:感染、肝病。电话:0377-63200090。
E-mail:yyyyxx0135@163.com

(收稿日期:2015-10-27 修回日期:2015-12-09)
(编辑:林静)

肝癌是世界上最常见的肿瘤之一,在国内其病死率仅次于肺癌,且发病率及病死率呈上升趋势,其预后极差,严重危害人类的健康。手术切除、放疗及化疗是肝癌主要的治疗手段^[1]。目前临床上用的化疗药物在杀死肿瘤细胞的同时,也对正常细胞产生严重的毒副作用,致使化疗中断或使患者产生严重的不良反应。因此,亟待寻找高效、低毒的肝癌治疗药物。由乙型肝炎病毒(HBV)引起的肝硬化、肝炎是肝癌发生的主要危险因素^[2-3]。恩替卡韦是治疗HBV的一线核苷类药,大量的临床研究不仅证实恩替卡韦能显著地抑制HBV患者病毒DNA复制,改善肝功能,还能显著地改善肝癌合并HBV感染患者的肝功能;而且恩替卡韦与肝动脉化疗栓塞术联合治疗乙型肝炎相关原发性肝癌,能显著提高患者生存期、减轻化疗肝损害等,改善患者预后^[4-6]。这些都说明了恩替卡韦对肝癌的治疗具有改善作用。因此,本研究拟通过体外细胞学研究阐明恩替卡韦对肝癌细胞凋亡的具体诱导机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

BSA/24S型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);CO₂培养箱、超净工作台、超低温冰箱(美国Thermo Scientific公司);ChemiDoc™ XRS型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司);Elx800型酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 药品与试剂

恩替卡韦片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:H20052237,规格:每片0.5 mg);小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:P0010)、膜联蛋白V(Annexin V)-碘化丙啶(PI)流式双染试剂盒(批号:C1063)购自碧云天生物技术研究所;兔抗核因子-κB p65(NF-κB p65)、磷酸化NF-κB p65(p-NF-κB p65)、核因子-κB抑制因子α(IκBα)、p-IκBα、Bax、Bcl-2、生存素(Survivin)及C-myc单克隆抗体购自美国Epitomics公司;MMT试剂(北京索莱宝生物科技有限公司)。

1.3 细胞

肝癌HepG2细胞购于中国科学院上海细胞库,目录号:TCHu72。

2 方法

2.1 MTT法检测细胞活力

将处于生长对数期的HepG2细胞消化,并调整细胞密度为 $4 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔板,于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h。以0(正常对照组)和10、30、100 μmol/L(低、中、高浓度组)恩替卡韦作用于HepG2细胞48 h后,每孔加MTT(5 mg/ml)20 μl,4 h后,弃上清,并每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,10 min后,采用酶标仪于570 nm波长处测定光密度(OD值)。计算细胞活力(%)=(试验组OD值)/(正常对照组OD值)×100%。试验重复3次。

2.2 流式双染试验检测细胞凋亡情况

将处于生长对数期的HepG2细胞消化,并调整细胞密度

为 $8 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$,接种于6孔板,于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h。按“2.1”项下方法加药培养48 h后,按照Annexin V/PI流式双染试剂盒说明书的方法,用0.25%的胰蛋白酶消化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,以离心半径为15 cm、转速2 000 r/min离心5 min,收集细胞;按顺序分别加入500 μl结合缓冲液(Binding buffer)、5 μl Annexin V-FITC及5 μl PI,混匀,于室温避光反应10 min,在1 h内进行流式细胞仪检测。其中,流式细胞图左上限代表可允许误差范围,左下限代表存活细胞,右上限代表早期凋亡细胞,右下限代表晚期凋亡细胞。本研究的凋亡细胞主要是早期凋亡细胞+晚期凋亡细胞。试验重复3次。

2.3 Western blot法检测细胞中NF-κB/IκBα信号通路及相关因子表达

按“2.2”项下方法接种HepG2细胞,加药作用48 h。收集细胞,加入RIPA裂解液,裂解,以离心半径为15 cm、转速10 000 r/min离心10 min,收获蛋白。采用BCA蛋白定量试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,十二烷基硫酸钠凝胶电泳,湿法转膜,加入一抗(兔抗NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκBα、p-IκBα、Survivin、C-myc、Bax、Bcl-2单克隆抗体,稀释比例为1:100)孵育,4℃过夜;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液(TBST)漂洗后,加入二抗[辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L),稀释比例为1:500]室温孵育1~2 h。TBST漂洗,滴加增强化学发光液(ECL),在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity One”软件对各抗体条带灰度值进行统计。以Survivin、C-myc、Bcl-2、Bax与GAPDH灰度值的比值表示相应蛋白的相对表达量;以p-IκBα与IκBα、p-NF-κB p65与NF-κB p65灰度值的比值表示IκBα、NF-κB p65的磷酸化水平。试验重复3次。

2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞活力测定结果

与正常对照组比较,恩替卡韦低、中、高浓度组HepG2细胞的细胞活力降低[(88.53 ± 7.24)%、(70.98 ± 6.80)%、(53.29 ± 5.16)%],差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦低浓度组比较,恩替卡韦中、高浓度组HepG2细胞的细胞活力降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦中浓度组比较,恩替卡韦高浓度组HepG2细胞的细胞活力降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.2 细胞凋亡测定结果

与正常对照组比较,恩替卡韦低、中、高浓度组HepG2细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦低浓度组比较,恩替卡韦中、高浓度组HepG2细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦中浓度组比较,恩替卡韦高浓度组HepG2细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞的凋亡情况测定结果见表1。

3.3 细胞中Bax及Bcl-2蛋白表达的测定结果

与正常对照组比较,恩替卡韦低、中、高浓度组HepG2细

表1 各组细胞的凋亡情况测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Determination results of cell apoptosis in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	早期凋亡率, %	晚期凋亡率, %
正常对照组	4.28 ± 0.42	4.53 ± 0.18
恩替卡韦低浓度组	15.20 ± 1.24*	9.12 ± 1.07*
恩替卡韦中浓度组	21.36 ± 2.46**	12.54 ± 1.28**
恩替卡韦高浓度组	23.47 ± 2.15*** ^Δ	18.59 ± 1.79*** ^Δ

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与恩替卡韦低浓度组比较, # $P < 0.01$;与恩替卡韦中浓度组比较, ^Δ $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. entecavir low concentration group, # $P < 0.01$; vs. entecavir medium concentration group, ^Δ $P < 0.01$

胞中Bax蛋白相对表达量升高,恩替卡韦中、高浓度组HepG2细胞中Bcl-2蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦低浓度组比较,恩替卡韦中、高浓度组HepG2细胞中Bax蛋白相对表达量升高,恩替卡韦高浓度组HepG2细胞中Bcl-2蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与恩替卡韦中浓度组比较,恩替卡韦高浓度组HepG2细胞中Bax蛋白相对表达量升高,Bcl-2蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞中Bax、Bcl-2蛋白表达的电泳图见图1,测定结果见表2。

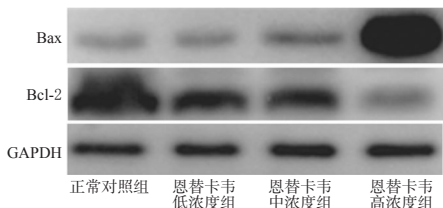


图1 各组细胞中Bax、Bcl-2蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoresis of the expressions of Bax and Bcl-2 protein in cell of each group

表2 各组细胞中Bax、Bcl-2蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Determination results of the expression of Bax and Bcl-2 protein in cell of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
正常对照组	0.255 ± 0.005	1.938 ± 0.018
恩替卡韦低浓度组	0.287 ± 0.029*	0.978 ± 0.095*
恩替卡韦中浓度组	0.352 ± 0.034**	0.835 ± 0.083**
恩替卡韦高浓度组	3.084 ± 0.149*** ^Δ	0.326 ± 0.029*** ^Δ

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与恩替卡韦低浓度组比较, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与恩替卡韦中浓度组比较, ^Δ $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. entecavir low concentration group, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. entecavir medium concentration group, ^Δ $P < 0.01$

3.4 细胞中Survivin及C-myc蛋白表达的测定结果

与正常对照组比较,恩替卡韦低、中、高浓度组HepG2细胞中Survivin及C-myc蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦低浓度组比较,恩替卡韦中、高浓度组HepG2细胞中Survivin及C-myc蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦中浓度组比较,恩替卡韦高浓度组HepG2细胞中C-myc蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞中Survivin、C-myc蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表3。

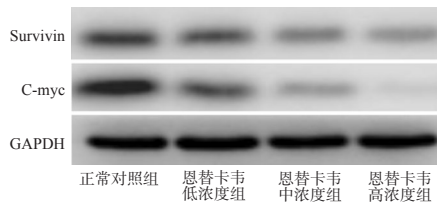


图2 各组细胞中Survivin、C-myc蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoresis of the expression of Survivin and C-myc protein in cell of each group

表3 各组细胞中Survivin、C-myc蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Results of the expression of Survivin and C-myc protein in cell of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Survivin/GAPDH	C-myc/GAPDH
正常对照组	0.696 ± 0.078	0.998 ± 0.097
恩替卡韦低浓度组	0.484 ± 0.065*	0.461 ± 0.041*
恩替卡韦中浓度组	0.310 ± 0.034**	0.295 ± 0.024**
恩替卡韦高浓度组	0.300 ± 0.030**	0.130 ± 0.014*** ^Δ

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与恩替卡韦低浓度组比较, # $P < 0.01$;与恩替卡韦中浓度组比较, ^Δ $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. entecavir low concentration group, # $P < 0.01$; vs. entecavir medium concentration group, ^Δ $P < 0.01$

3.5 细胞中NF-κB p65及IκBα磷酸化水平的测定结果

与正常对照组比较,恩替卡韦低、中、高浓度组HepG2细胞中p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-IκBα/IκBα比值降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦低浓度组比较,恩替卡韦中、高浓度组HepG2细胞中p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-IκBα/IκBα比值降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与恩替卡韦中浓度组比较,恩替卡韦高浓度组HepG2细胞中p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-IκBα/IκBα比例降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞中NF-κB p65及IκBα磷酸化的电泳图见图3,测定结果见表4。

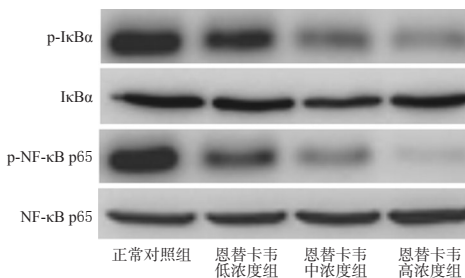


图3 各组细胞中NF-κB p65及IκBα磷酸化的电泳图

Fig 3 Electrophoresis of the phosphorylation of NF-κB p65 and IκBα in cell of each group

4 讨论

恩替卡韦是一种选择性抑制HBV复制的核苷类药,主要是通过抑制HBV病毒DNA复制过程中多聚酶的启动及mRNA逆转录负链的合成,从而抑制HBV正链的生成,最终发挥抗病毒作用。本课题前期临床试验证实,恩替卡韦辅助治疗慢性乙型肝炎肝硬化临床效果显著,能够显著改善患者肝功能,并显著改善临床症状和体征^[7]。此外,恩替卡韦长期治疗拉米夫定失效的慢性乙型肝炎患者疗效显著、安全性较好^[8]。恩替

表4 各组细胞中NF-κB p65及IκBα磷酸化水平的测定结果
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Results of the phosphorylation of NF-κB p65 and IκBα in cell of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-IκBα / IκBα	p-NF-κB p65 / NF-κB p65
正常对照组	1.382 ± 0.114	1.227 ± 0.106
恩替卡韦低浓度组	0.807 ± 0.073*	0.423 ± 0.039*
恩替卡韦中浓度组	0.315 ± 0.028**	0.252 ± 0.036**
恩替卡韦高浓度组	0.148 ± 0.014**Δ	0.134 ± 0.013**Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与恩替卡韦低浓度组比较,** $P < 0.01$;与恩替卡韦中浓度组比较,Δ $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. entecavir low concentration group, ** $P < 0.01$; vs. entecavir medium concentration group, Δ $P < 0.01$

卡韦与肝动脉化疗栓塞、介入方法联合治疗乙型肝炎相关原发性肝癌,能显著延长患者生存期、减轻化疗肝损害等,改善患者预后^[6,9]。这些研究结果充分说明了恩替卡韦对于HBV,以及由HBV引起的肝炎、肝硬化及肝癌具有显著治疗效果。因此,本研究在此基础上探讨恩替卡韦对肝癌治疗作用的相关机制。通过MTT法及流式双染试验考察恩替卡韦对HepG2肝癌细胞活力及凋亡情况的影响,结果表明恩替卡韦能显著地降低HepG2细胞活力,提高细胞凋亡率,且呈浓度依赖性,从而说明恩替卡韦在一定程度上能诱导HepG2细胞凋亡,从而达到治疗肝癌的目的。

肝癌等众多肿瘤的发生、发展最终归结于癌基因的激活及抑癌基因的失活。其中,Bcl-2及Bax是一对常见的癌基因及抑癌基因。Bax mRNA的表达低下或缺失参与了肝胆管癌的发生、发展过程^[10];Bcl-2的过表达参与了肝癌的发生、发展及转移等过程^[11]。Survivin是目前已发现的最强凋亡蛋白抑制因子,在正常分化组织中不表达,在肝癌组织表达量过高,并与肝癌的发生、发展密切相关^[12]。RNAi干扰Survivin能显著诱导人肝癌细胞株SMCC-7721凋亡^[13]。C-myc亦是常见的癌基因,在肝癌组织中过表达,并与肿瘤体积、分化程度、转移、脉管浸润和包膜累犯密切相关^[14]。因此,上调抑癌基因Bax表达,下调癌基因Bcl-2、Survivin及C-myc表达,能显著地诱导肝癌细胞凋亡。肿瘤细胞中癌基因的激活与抑癌基因的失活,由多种信号通路所调控,如NF-κB信号通路。NF-κB是一类能与多种基因启动子或增强子κB位点发生特异性结合并促进其转录的蛋白。未受上游信号或外部环境刺激时,NF-κB与IκB结合;当受到刺激时,IκB被降解、磷酸化,释放NF-κB p65,使之恢复转录活性并从细胞质转移到细胞核内,调节相关基因的表达,如Bax、Bcl-2等。目前已证实通过沉默HepG2中NF-κB p65的表达,能显著地诱导肝癌细胞FAT10凋亡^[15]。

本研究通过Western blot法进一步探讨恩替卡韦对HepG2肝癌细胞凋亡诱导作用的具体机制,结果表明,一定剂量恩替卡韦能显著地提高癌基因Bax表达,抑制抑癌基因Bcl-2、Survivin、C-myc表达,并下调NF-κB p65及IκBα磷酸化水平,从而诱导细胞凋亡。

综上所述,恩替卡韦能通过抑制NF-κB信号通路,并调节

其下游靶蛋白表达,显著地诱导肝癌细胞的凋亡。

参考文献

- [1] 杨浩,杨连粤.肝癌术后复发转移相关因素研究进展[J].中国实用外科杂志,2012,32(10):868.
- [2] Polednak AP. Surveillance and interpretation of trends in US age-specific incidence rates for primary liver cancer, in relation to the epidemic of hepatitis C infection[J]. *J Registry Manag*, 2013, 40(3):115.
- [3] Strasser SI. Managing hepatitis B to prevent liver cancer: recent advances[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 8(4):409.
- [4] 苏毅,包剑锋,梁学琳,等.恩替卡韦对CHB患者外周血T淋巴细胞PD-1水平及肝功能的影响[J].中国微生态学杂志,2015,27(3):354.
- [5] 蒋进发,陈国勇,赵明海,等.恩替卡韦抗病毒治疗对肝癌HBV感染患者术后预后的影响[J].中国现代医学杂志,2014,24(33):90.
- [6] 王丽君,卜文哲,陈华,等. TACE联合恩替卡韦治疗乙型肝炎相关原发性肝癌回顾性分析[J].中华肿瘤防治杂志,2014,21(20):1617.
- [7] 张玉山.恩替卡韦辅助治疗慢性乙型肝炎肝硬化临床效果分析[J].中国实用医药,2012,7(4):156.
- [8] 吴华峰,刘琦,刘立亚,等.恩替卡韦长期治疗拉米夫定失败的慢性乙型肝炎的临床观察[J].中国药房,2014,25(40):3783.
- [9] 郭猛.恩替卡韦联合介入治疗乙型肝炎相关原发性肝癌的临床研究[J].中国普通外科杂志,2014,23(7):898.
- [10] Zhao W, Zhang B, Guo X, et al. Expression of Ki-67, Bax and p73 in patients with hilar cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2014, 14(4):197.
- [11] 杨闯,魏振彤,郑宇,等.肝癌中Bcl-2、Bax和C-myc基因的表达及其临床意义[J].中国老年学杂志,2009,29(4):450.
- [12] 郭人花,王同杉,陈晓峰,等.肝癌组织Survivin和p-Akt及ER表达及其临床意义分析[J].中华肿瘤防治杂志,2011,18(24):1929.
- [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.
- [14] 黄文峰,张小玲,谢志军,等.原发性肝癌中PTEN、Kiss-1和C-myc的表达及意义[J].中国老年学杂志,2013,33(3):563.
- [15] 高芸,李少一,商雪莹,等. RNAi沉默NF-κB p65基因对肝癌细胞FAT10表达的影响[J].中国医科大学学报,2013,42(5):385.

(收稿日期:2015-10-27 修回日期:2015-12-11)

(编辑:邹丽娟)