

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.003

蜕皮激素诱导 MIIP 基因的表达对肝癌细胞增殖迁移的影响 *

张 梅 茹 懿 王秦豪 颜 广 张 耀 李 霞[△]

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 探讨蜕皮激素诱导迁移侵袭抑制蛋白基因 (migration and invasion inhibitory protein, MIIP) 基因的表达对肝癌细胞 SK-Hep-1 增殖和迁移能力的影响。**方法:** 采用 PCR 扩增 MIIP 基因, 连入 T 载体测序正确后, 插入到蜕皮激素可诱导真核表达载体 pIND 中。将 pIND-MIIP 和含蜕皮激素受体基因的表达式载体 pVgRXR 以脂质体转染法转染到 SK-Hep-1 中, 经 G418 和 Zeocin 双抗生素筛选获得稳定转染细胞株。蜕皮激素 Ponasterone A 诱导后, 采用 Western blot 检测 MIIP 表达, CCK-8 实验检测细胞增殖, 划痕实验检测细胞迁移。**结果:** 蜕皮激素诱导 MIIP 表达上调后, SK-Hep-1 细胞的增殖能力显著下降 ($P < 0.05$), 细胞的迁移能力明显减弱。**结论:** 建立了 MIIP 基因可诱导表达系统, 证实了肝癌细胞 SK-Hep-1 中 MIIP 过表达可抑制细胞的增殖及迁移能力。

关键词: 肝癌; 迁移侵袭抑制蛋白; 诱导基因表达; 迁移侵袭

中图分类号: R-33; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)09-1610-05

Effect of Ponasterone A induced MIIP Gene Expression on the Proliferation and Migration of Liver Cancer Cells*

ZHANG Mei, RU Yi, WANG Qin-hao, YAN Guang, ZHANG Yao, LI Xia[△]

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Ponasterone A induced migration invasion inhibitory protein (MIIP) expression on the proliferation and migration of human liver cancer cell line SK-Hep-1. **Methods:** MIIP gene was amplified by routine PCR, cloned into pMD18-T vector and confirmed by DNA sequencing, then inserted into the ecdysone-inducible eukaryotic expression pIND. SK-Hep-1 cells were co-transfected with pIND-MIIP and pVgRXR, an expression vector contained ecdysone receptor gene, and screened with G418 and Zeocin to obtain the stable clones. Upon treatment with Ponasterone A, one kind of ecdysone, MIIP expression, cell proliferation and migration were analyzed by Western blot, CCK8 and wound healing assay. **Results:** After Ponasterone A-induced expression of MIIP in SK-Hep-1, cell proliferation was significantly inhibited ($P < 0.05$), and cell migration was markedly attenuated. **Conclusion:** MIIP gene inducible expression system was established and MIIP could inhibit the proliferation and migration of SK-Hep-1 cells.

Key words: Hepatic carcinoma; MIIP; Inducible gene expression; Migration and invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)09-1610-05

前言

肝癌是一种高致命性的恶性肿瘤,居世界癌症死亡率第五^[1]。最新统计数据表明中国每年新发肝癌患者约六十万^[2],患者预后差,确诊后中位生存期仅 6-20 个月^[3,4]。肝癌恶性程度高、进展快与癌细胞的迁移和侵袭能力强相关,因此抑制癌细胞的迁移和侵袭对于肝癌的治疗和预后的改善具有十分重要的意义。

迁移侵袭抑制蛋白 (migration invasion inhibitory protein, MIIP) 是研究者利用酵母双杂交筛选胰岛素样生长因子结合蛋白 2(IGFBP2)的相互作用蛋白时发现的,其编码的蛋白质分子量大小约为 45 kDa,又称侵袭抑制蛋白 45 (invasion inhibitory protein45, Iip45)^[5]。MIIP 基因定位在 1 号染色体短臂 3 区 6 带 2 亚带,该区在许多肿瘤中缺失,包括前列腺癌、胶质瘤、乳腺

癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肉瘤等^[5-11]。研究表明 MIIP 在胶质瘤、肺癌食管鳞癌组织中的表达明显低于正常组织,且其表达水平与肺癌和食管癌的病理分期和预后负相关^[12,13]。MIIP 过表达可抑制细胞迁移侵袭^[14]、抑制周期进程和细胞增殖^[15],但目前关于 MIIP 在肝癌中的作用尚无报道。

本研究旨在建立 MIIP 基因的可诱导表达系统,利用该系统研究 MIIP 对肝癌细胞恶性行为的影响。研究中选用蜕皮激素可诱导表达质粒 pIND 和含蜕皮激素受体基因的表达式载体 pVgRXR 双载体系统以建立稳定转染细胞系,目的基因只有在蜕皮激素诱导后才能表达,进而研究其功能。我们采用分子克隆技术首先构建了 pIND-MIIP,将其与 pVgRXR 共转染肝癌细胞 SK-Hep-1, 获得稳定转染细胞株后以 Ponasterone A 诱导 MIIP 表达,观察细胞增殖、迁移能力的变化,初步探讨 MIIP 基

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31470803, 81572504);肿瘤生物学国家重点实验室(第四军医大学)自主课题(CBSKL2014Z09)

作者简介:张梅(1989-),硕士研究生,主要从事肿瘤发生发展的分子机制研究,电话:15229275986, E-mail: 1440052366@qq.com

[△] 通讯作者:李霞, E-mail: lixia@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-10-13 接受日期:2016-10-30)

因对肝癌细胞迁移、增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

SK-Hep-1 细胞由本室保存。试剂:PrimeSTAR MAX DNA Polymerase(TaKaRa, R045A); pCMV-HA-MIIP 模板; 限制性内切酶 Q.cut *Nhe*I、Q.cut *Xba*I (TaKaRa, 1622, 1634); T4 DNA 连接酶 (TaKaRa, 2011A); 感受态细胞 *E.coli* DH5 α (TaKaRa, 9057); 质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司, DP103); 哺乳动物真核表达载体 (pIND, pVgRXR, pMD18) 均由本室保存; G418(Sigma, 108321-42-2); Zeocin(Invitrogen, 1621158); 蜕皮激素 Ponasterone A(AdipoGen, 13408-56-5); 改良型 α -MEM 培养基; 胎牛血清 (天津灏洋公司, TBD31HB); Lipofectamine-2000 (Invitrogen); Cell Counting Kit-8 (七海生物 7 sea biotech, 20160406); 吉姆萨染液。抗体:MIIP (sigma, A80190); GAPDH (proteintech, 10494-I-AP); HRP 羊抗兔 IgG(康为世纪, cw0103)。Ponesterone A(AdipoGen, A00212)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 扩增 MIIP 基因的引物:MIIPu:5'-GGCGCT-AGCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGTGGAGG-CTGAGGAAGT-3', MIIPd:5'-TCT AGA TCA GGGCTTCT-GCCGTGG-3'; 其中 5' 端引物引入 *Nhe*I 酶切位点和 FLAG 标签序列(下划线), 3' 端引物引入 *Xba*I 酶切位点。

1.2.2 目的基因的扩增与克隆 以 pCMV-MIIP 为模板, 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 进行 30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳产物经胶回收后, 将目的片段定向插入 pMD18 载体中。将重组后的质粒转化扩增后, 用 *Nhe*I 和 *Xba*I 双酶切鉴定, 如果有与预期基因片段大小相近的片段切下即为阳性, 送华大基因公司测序。

1.2.3 真核表达载体 pIND 的构建 *Nhe*I 和 *Xba*I 双酶切测序正确的 pMD18-MIIP 载体和 pIND 分别以 *Nhe*I 和 *Xba*I 双酶切, 用 T4 连接酶连接经酶切和回收的片段 MIIP 和 pIND, 转化感受态细胞 *E.coli* DH5 α , 摇菌后用质粒提取试剂盒提取质粒, *Nhe*I 和 *Xba*I 双酶切鉴定, 阳性克隆由华大基因公司测序。

1.2.4 细胞培养 人肝癌 SK-Hep-1 细胞用含 10 %胎牛血清的改良型 α -MEM 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2.5 筛选药物(G418、Zeocin)浓度的确定 在加入筛选药物前一天将细胞以 70%的密度接种于 24 孔板, 第二天按浓度梯度(100 μ g/mL、200 μ g/mL、300 μ g/mL、400 μ g/mL、500 μ g/mL、600 μ g/mL、700 μ g/mL、800 μ g/mL、900 μ g/mL、1000 μ g/mL)分别加入 G418 和 Zeocin, 筛选 4 天后换液重新加药, 直到得到最佳浓度。经过十天的筛选, 确定 G418 的最佳浓度为 300 μ g/mL, Zeocin 的最佳浓度为 400 μ g/mL。

1.2.6 细胞转染和稳定细胞株的筛选 SK-Hep-1 细胞常规消化后接种于 6 孔板, 次日待细胞密度达到 70%时按照说明书进行转染。具体如下:将 pIND-MIIP(空载体 pIND 作为对照)和 pVgRXR 以及 Lipofectamine-2000 分别加入到 200 μ L 无血清培养液中, 静置 5 min 后将二者混匀, 室温静置 20 min。六孔板内生长的细胞换新鲜培养液 1600 μ L, 滴加入上述转染液, 正

常培养 48 h 后以 1:6 传代, 同时加入 Zeocin (终浓度 400 μ g/mL) 和 G418 (300 μ g/mL)进行筛选。两周后挑取单个集落进行扩大培养, 命名为 SK-Hep-1-pIND-MIIP (对照组为 SK-Hep-1-pIND)。

1.2.7 蜕皮激素诱导 以 SK-Hep-1-pIND 细胞为对照, SK-Hep-1-pIND-MIIP 为实验组, 分别给予 Ponesterone A(1 mg/mL)处理或对照溶剂 DMSO(二甲基亚砜)处理不同时间, 进行相应实验。

1.2.8 Western blot SK-Hep-1-pIND-MIIP 和 SK-Hep-1-pIND 细胞接种于 6 cm 皿, 待细胞密度约为 70%时以 Ponesterone A 诱导或不诱导, 24 h 后收取细胞。细胞用 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min, 12000 rpm 离心收集上清液, 利用 BCA 蛋白法定量, 平衡各组间浓度后加入 1 $\times$ Loading Buffer 缓冲液, 100 °C 煮沸 5 min, 12000 rpm 离心 2 min。各组样品取 20 μ L 蛋白样品进行 SDS -PAGE 电泳 1.5 h, 100V 恒压转膜 2 h, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗室温孵育 1 h, 置于 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 每次 7 min, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 7 min, 发光检测。

1.2.9 CCK8 细胞增殖检测实验 将处于对数生长期的稳转细胞系 SK-Hep-1-pIND-MIIP 和 SK-Hep-1-pIND 常规消化, 并进行细胞计数, 将细胞浓度调整为 1 $\times$ 10⁴/mL, 于 96 孔板中每孔分别加入 200 μ L 细胞悬液, 设置 6 个复孔。分别于第 1-7 天终止培养, 每孔中加入 10 μ L CCK8 溶液, 37 °C 培养 1 小时, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值, 并绘制细胞增殖曲线。

1.2.10 细胞迁移检测 - 划痕实验 将对数生长期的稳转细胞系 SK-Hep-1-pIND-MIIP 和 SK-Hep-1-pIND 常规消化, 接种于 6 孔板中, 待细胞密度约为 70%左右时, 用直尺和枪头划横线, 然后用 PBS 轻轻的冲洗, 洗去划下的细胞。加入无血清的培养液进行培养, 分别在 0 h、24 h、48 h 拍照。

1.3 统计学方法

数据以 SPSS 16.0 软件进行分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示, 采用 t 检验, 以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 含 MIIP 基因的可诱导表达载体 pIND 重组质粒的构建和鉴定

以 PCR 方法获得的 MIIP 基因连接入 pMD18 载体中, 经 *Nhe*I 和 *Xba*I 双酶切后, 插入 pIND 载体中, 命名为 pIND-MIIP。重组质粒再经 *Nhe*I 和 *Xba*I 双酶切后, 用 1%琼脂糖凝胶电泳, 得到 5023 bp 和 1194 bp 两条片段(图 1), 初步证明克隆正确。阳性克隆经测序证实所插入的序列正确(图 2)。

2.2 SK-Hep-1-pIND-MIIP 和 SK-Hep-1-pIND 稳转细胞系建立的鉴定

将构建成功的 pIND-MIIP 或 pIND 分别与 pVgRXR 共转染 SK-Hep-1 细胞, 经药物筛选获得稳定转染细胞株。蜕皮激素诱导 24 h 后收集细胞, 提取蛋白, Western blot 检测 Ponesterone A 诱导前后 MIIP 蛋白表达水平。结果(图 3)显示 SK-Hep-1-pIND-MIIP Ponesterone A 处理后(pIND-MIIP(+))MIIP 表达水平明显上调, 而对照组 SK-Hep-1-pIND 中诱导前后 MIIP 表达无变化, 证明稳转细胞系建立成功。

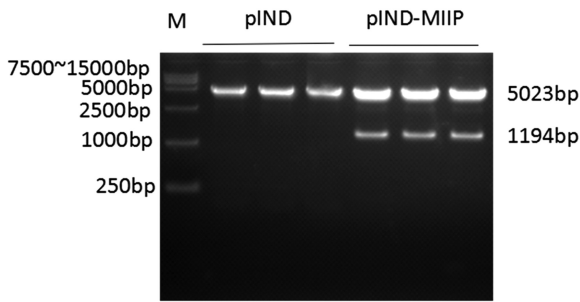


图1 重组质粒载体的酶切电泳鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant plasmid vector by enzyme digestion and electrophoresis
M: DL15000 Marker

2.3 MIIP 过表达对 SK-Hep-1 细胞增殖能力的影响

CCK8 实验结果(图 4)显示,Ponesterone A 诱导处理后的 SK-Hep-1-pIND-MIIP 细胞增殖速率相较于未处理组增殖速率减慢,从第 6 天起差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),但对照组 SK-Hep-1-pIND 细胞 Ponesterone A 诱导前后没有明显变化。这些结果表明 Ponesterone A 诱导 MIIP 表达可明显抑制 SK-Hep-1 细胞增殖能力。

2.4 MIIP 过表达对 SK-Hep-1 细胞迁移能力的影响

通过拍照分析 0 h、24 h、48 h 的划痕实验结果(图 5,表 1),结果显示 Ponesterone A 诱导处理后的 SK-Hep-1-pIND-MIIP 细胞迁移明显慢于未处理组,但对照组 SK-Hep-1-pIND 细胞在 Ponesterone A 诱导前后细胞迁移没有明显变化,说明 MIIP 过表达可以抑制 SK-Hep-1 细胞的迁移能力。

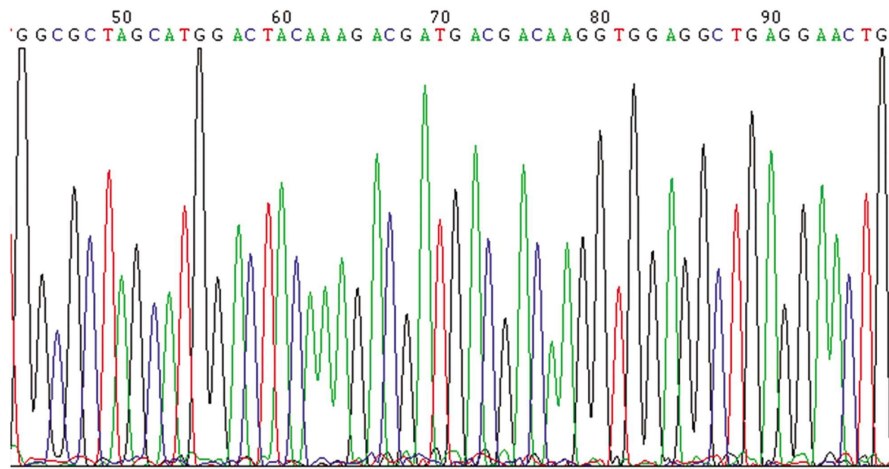


图2 重组质粒 pIND-MIIP 测序鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid vector pIND by DNA sequencing

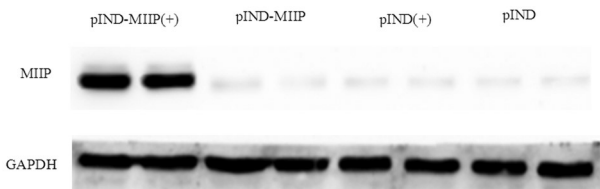


图3 SK-Hep-1-pIND-MIIP 和 SK-Hep-1-pIND 稳转细胞系鉴定

Fig. 3 The identification of the stable cell strain of SK-Hep-1-pIND-MIIP and SK-Hep-1-pIND

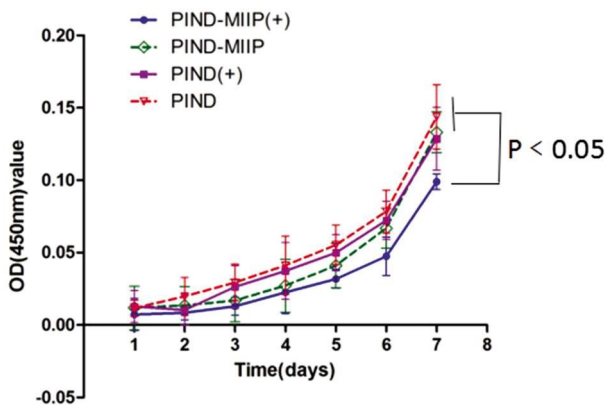


图4 MIIP 过表达对 SK-Hep-1 细胞增殖的影响

Fig. 4 The effect of MIIP on proliferation of SK-Hep-1 cells

3 讨论

肿瘤的发生、侵袭和转移是多基因、多因素、多步骤相互协调作用的复杂过程,也是目前癌症治疗面临的严峻挑战。原发肿瘤可以通过手术切除或放射治疗,但是转移的肿瘤难以在不损伤正常的组织下通过上述手段治疗。因此,研究肿瘤的转移和侵袭的分子机制具有重要的意义。

迁移侵袭抑制蛋白 (migration and invasion inhibitor protein, MIIP) 是新发现的具有肿瘤迁移侵袭抑制、调节肿瘤细胞有丝分裂检查点作用的蛋白,由 388 个氨基酸组成,MIIP 蛋白具有较强的亲水性,结构中包含 3 个 SEG 域(低成分复杂区)和 1 个整联蛋白 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽结合域)。MIIP 通过与 IGFBP-2 蛋白 C 端的甲状腺蛋白-RGD 区域结合而抑制其促进肿瘤细胞侵袭的作用^[4],与 IGFBP-2 蛋白通过侵袭信号通路来共同调节细胞的侵袭能力。在其第 81~89、143~151、173~181 及 314~322 位氨基酸的位置包含 4 个破坏框 (Destruction box, D box) 结构域。D box 结构域是由 9 个氨基酸组成的一段特殊序列(RXXLXXXXN, X 代表任意氨基酸),其第一位的氨基酸(R)和第四位的亮氨酸(L)高度保守^[5]。含有 D box 结构域的蛋白主要在控制细胞周期中发挥作用。此外,MIIP 具有 6 个苏氨酸、42 个丝氨酸以及 1 个潜在的苏氨酸磷酸化位点。MIIP 还包含一个四重升降螺旋捆,该螺旋捆与细胞色素超

家族成员具有同源性^[14]。MIIP 的这些结构特点提示其可能在多种细胞信号传递中起重要作用。目前关于 MIIP 作用机制的研究报道包括:MIIP 通过与 IGFBP2 结合拮抗 IGFBP2 的促进细胞侵袭作用^[14];MIIP 与 Cdc20 直接结合可抑制 APC/Cdc20 复合物的形成,从而使细胞停滞在有丝分裂中期,导致染色体不稳定和肿瘤的发生^[16-18];MIIP 与组蛋白去乙酰化酶 6 (histone

deacetylase 6,HDAC6) 相互作用,降低 HDAC6 稳定性及活性,抑制 HDAC6 介导的 α 微管去乙酰化作用,使 α 微管乙酰化水平增加,稳定微管结构而降低细胞运动性,从而抑制细胞的迁移^[18,20]。因此,MIIP 作为一个潜在的肿瘤抑制基因可能通过多种信号通路影响肿瘤的侵袭与迁移。

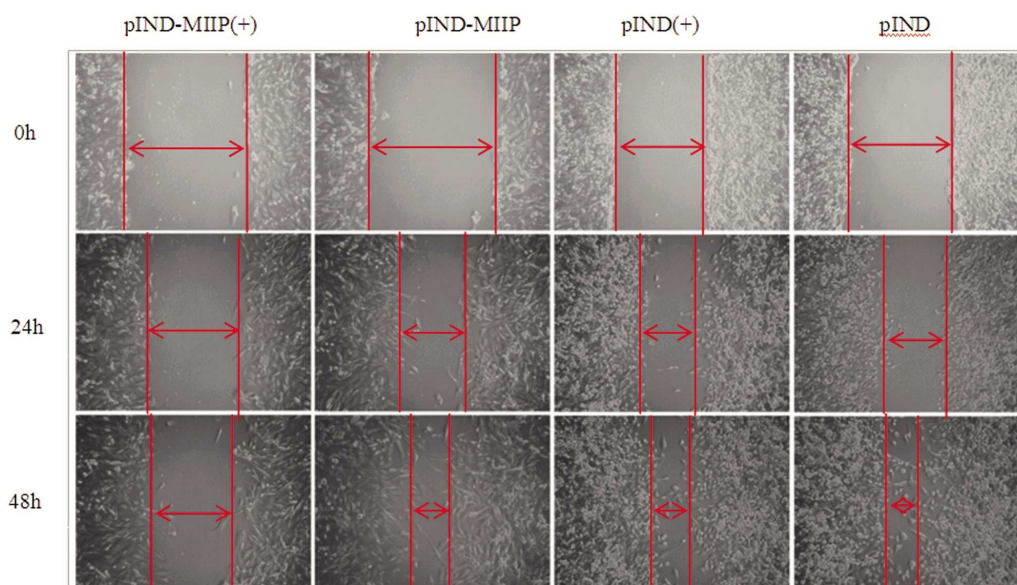


Fig.5 MIIP 过表达对 SK-Hep-1 细胞迁移的影响

Fig.5 The effect of MIIP on migration of SK-Hep-1 cells

表 1 迁移划痕实验数据统计表

Table 1 The wound scratch assay data statistics

Groups	n	Fusion range(cm,Mean $\pm$ SD)		
		0 h	24 h	48 h
pIND-MIIP(+)	3	1.7 $\pm$ 0.01	1.41 $\pm$ 0.03	1.15 $\pm$ 0.05
pIND-MIIP	3	1.75 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.07
pIND(+)	3	1.27 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.07
pIND	3	1.48 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.08	0.49 $\pm$ 0.07

注:与实验组相比,具有统计学意义($P < 0.01$)。

Note: The comparison to experiment group was statistically significant($P < 0.01$).

MIIP 为抑癌基因,抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭,MIIP 可以通过 IGFBP2 调控细胞的有丝分裂,通过 HDAC6 下调目的蛋白^[5]。Song et al 首先报道在高侵袭性胶质瘤中 MIIP 的表达低于正常的脑组织和间变性胶质瘤组织^[14]。Wu et al 发现高度恶性胶质瘤中的 MIIP 表达量低于低恶性程度的胶质瘤。由于 MIIP 为抑癌基因,在肿瘤细胞中的稳定过表达会抑制细胞生长,获得稳定细胞株较为困难,所以本研究选用可诱导表达系统建立稳定转染的肝癌细胞株,结果显示 MIIP 在该诱导表达系统中几乎无泄漏表达,只有在给予诱导剂时才表达。目前关于 MIIP 在肝癌中的作用尚无研究报道,本研究在 MIIP 表达量较低的肝癌细胞 SK-Hep-1 中展开,建立可诱导表达 MIIP 的肝癌细胞系 SK-Hep-1,同样,我们发现在肝癌细胞中 MIIP 的表达水平较低,同时 MIIP 抑制了细胞的增殖和迁移。我们初步研究了 MIIP 基因对肝癌细胞增殖迁移的影响,为后续深入研究

MIIP 的功能以及分子机制奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29
- [2] Wanqing Chen, Rongshou Zheng, Baade PD, et al. Cancer Statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [3] Diwakar Davar, Tarhini AA, Kirkwood JM. Adjuvant therapy for melanoma[J]. Cancer J, 2012, 18(2): 192-202
- [4] Fabio Farinati, Alessandro Vitale, Gaya Spolverato, et al. Development and Validation of a New Prognostic System for Patients with Hepatocellular Carcinoma[J]. PLoS Med, 2016, 13(4): e1002006
- [5] Wei Zhang, Jing Wen, Yingmei Wang. MIIP, a cytoskeleton regulator that blocks cell migration and invasion, delays mitosis, and suppresses tumorigenesis[J]. Curr Protein Pept Sci, 2011, 12(1): 68-73
- [6] Song F, Zhang L, Ji P, et al. Altered expression and loss of heterozy-

- gosity of the migration and invasion inhibitory protein (MIIP) gene in breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 2771-2778
- [7] Higashi M, Kolla V, Iyer R, et al. Retinoic acid-induced CHD5 upregulation and neuronal differentiation of neuroblastoma[J]. *Mol Cancer*, 2015, 150(14): 150
- [8] Janoueix-Lerosey, Novikov E, Monteiro M, et al. Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma[J]. *Oncogene*, 2004, 23(35): 5912-5922
- [9] Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, et al. Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(8): 1555-1565
- [10] Wang X, Liu H, Wang X, et al. Clinical significance of migration and invasion inhibitor protein expression in non-small-cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(6): 2417-2422
- [11] Lee M, Nam ES, Jung SH, et al. 1p36.22 region containing PGD gene is frequently gained in human cervical cancer [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2014, 40(2): 545-553
- [12] Wen J, Fu J, Ling Y, et al. MIIP accelerates epidermal growth factor receptor protein turnover and attenuates proliferation in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9118-9134
- [13] Wen J, Liu QW, Luo KJ, et al. MIIP expression predicts outcomes of surgically resected esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8): 10141-10148
- [14] Song SW, Fuller GN, Khan A, et al. Ilp45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGF-BP-2 stimulation of glioma cell invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(24): 13970-13975
- [15] Ji P, Smith SM, Wang Y, et al. Inhibition of gliomagenesis and attenuation of mitotic transition by MIIP [J]. *Oncogene*, 2010, 29(24): 3501-3508
- [16] Li M, Fang X, Wei Z, et al. Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice [J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(6): 983-994
- [17] Michel L, Benezra R, Diaz-Rodriguez E, et al. MAD2 dependent mitotic checkpoint defects in tumorigenesis and tumor cell death: a double edged sword[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(8): 990-992
- [18] Sun Y, Ji P, Chen T, et al. Haploinsufficiency of miip disables APC/CCdc20-securin/topoisomerase IIa rheostat and induces chromosomal instability in colorectal cancer [J]. *Asia-Pacific Journal of clinical oncology*, 2014, 109(SI): 261-261
- [19] Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, et al. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(8): 4389-4394
- [20] Wu Y, Song SW, Sun J, et al. Ilp45 inhibits cell migration through inhibition of HDAC6[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(6): 3554-3560

(上接第 1666 页)

- [11] Kurahara H, Takao S, Kuwahata T, et al. Clinical significance of folate receptor β -expressing tumor-associated macrophages in pancreatic cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(7): 2264-2271
- [12] Son HJ, Park JW, Chang HJ, et al. Preoperative plasma hyperfibrinogenemia is predictive of poor prognosis in patients with nonmetastatic colon cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(9): 2908-2913
- [13] Sun Xiang, Gan Xiao-qing, Wang Qiong. Clinical observation of high intensity focused ultrasound in the treatment of pancreatic carcinoma [J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2011, 15 (9): 1093-1094
- [14] Colbert LE, Hall WA, Nickleach D, et al. Chemoradiation therapy sequencing for resected pancreatic adenocarcinoma in the National Cancer Data Base[J]. *Cancer*, 2014, 120(4): 499-506
- [15] Maemura K, Shintchi H, Noma H, et al. Comparison of hyper-fractionated accelerated and standard fractionated radiotherapy with concomitant low-dose gemcitabine for unresectable pancreatic cancer[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(4C): 2369-2372
- [16] Farrow B, Sugiyama Y, Chen A. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development [J]. *Ann Surg*, 2004, 239(6): 763-769
- [17] Hu Wei, Zhang Juan. Clinical observation on the effect of three dimensional-conformal radiotherapy combined with Gemcitabine chemotherapy for advanced pancreatic cancers [J]. *Hainan Medical Journal*, 2012, 23(8): 21-23
- [18] Huang J, Xu L, Luo Y, et al. The inflammation-based scores to predict prognosis of patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(4): 883
- [19] Shimoda M, Katoh M, Kita J, et al. The Glasgow Prognostic Score is a good predictor of treatment outcome in patients with unresectable pancreatic cancer[J]. *Chemotherapy*, 2010, 6(6): 501-506
- [20] Luo G, Guo M, Liu Z, et al. Blood neutrophil-lymphocyte ratio predicts survival in patients with advanced pancreatic cancer treated with chemotherapy[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(2): 670-676