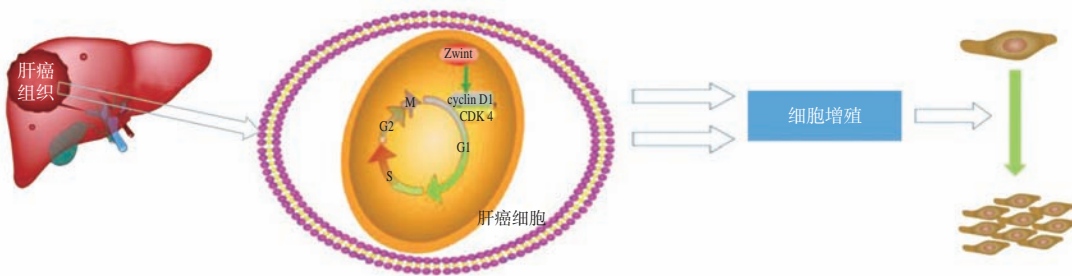


· 实验研究 ·

Zwint高表达对肝癌细胞增殖和肝癌肝移植预后的影响

李慧 汪根树 郑俊 蔡建业 张俊斌 程道柔 周奇 杨扬

结构式摘要



【摘要】 目的 探讨Zwint结合因子(Zwint)在原发性肝癌(肝癌)中的表达情况及其对肝癌肝移植预后的影响。方法 收集50例肝癌肝移植受体的肝癌组织、癌旁组织及临床资料。采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)、蛋白免疫印迹(Western Blot)法和免疫组织化学(免疫组化)法,分别比较20例肝癌肝移植受体的20对肝癌组织及癌旁组织中Zwint信使核糖核酸(mRNA)表达情况和Zwint蛋白的表达水平;选取两个成功干扰Zwint表达的肝癌细胞系HepG-2(si-Zwint-1组和si-Zwint-2组),以空白对照作为si-NC组,采用细胞计数试剂盒(CCK)-8实验、平板克隆实验和细胞周期实验,比较各组细胞的增殖能力和细胞周期;采用Western Blot法和免疫组化法,分析肝癌组织和肝癌细胞中Zwint与细胞周期蛋白D1(cyclin D1)表达的一致性;以Zwint蛋白表达水平的中位数为分割点,将入组病例分为高表达组(22例)和低表达组(28例),分析Zwint蛋白表达水平与肝癌肝移植受体临床特征、总体存活率及无复发存活率的关系。结果 实时荧光定量PCR结果提示肝癌组织中Zwint mRNA表达水平高于癌旁组织($P=0.03$)。Western Blot及免疫组化结果均提示肝癌组织中Zwint蛋白的表达水平高于癌旁组织(均为 $P<0.05$)。干扰肝癌细胞系HepG-2的Zwint基因后,CCK-8及平板克隆实验显示细胞增殖能力明显减弱(均为 $P<0.01$),细胞周期阻滞于G₁期(均为 $P<0.05$)。Zwint蛋白表达水平与肿瘤直径和肿瘤、淋巴、转移(TNM)分期密切相关(均为 $P<0.05$)。Zwint高表达组肝癌肝移植受体的总体存活率低于低表达组($P=0.02$)。结论 Zwint高表达于肝癌组织,其通过调节细胞周期促进肝癌细胞增殖,且Zwint表达水平与肝癌肝移植后预后呈负相关。

【关键词】 Zwint结合因子(Zwint);原发性肝癌;肝移植;细胞增殖;细胞周期;细胞周期蛋白D1(cyclin D1);细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)4;肿瘤、淋巴、转移(TNM)分期;存活率

【中图分类号】 R617, R735.7 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2018)0006-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.02.006

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81170422);广东省科技计划社会发展领域项目(2017A020215178);广东省科技计划项目(2014A020212717);广州市计划项目科学研究专项(2014J4100128)

作者单位:510630 广州,中山大学附属第三医院肝脏外科暨肝移植中心 广东省肝脏疾病研究重点实验室(李慧、汪根树、郑俊、蔡建业、程道柔、杨扬),骨科(张俊斌);中山大学附属第一医院肝胆外科(周奇)

作者简介:李慧,男,1992年生,硕士研究生,研究方向为肝癌的临床与基础研究,Email: lihealth0303@163.com

通讯作者:汪根树,男,1968年生,博士,主任医师,研究方向为肝癌的临床与基础研究,Email: wgsh168@163.com

Effect of high expression of Zwint on the proliferation of hepatoma cells and the prognosis of liver transplantation for hepatocellular carcinoma

Li Hui*, Wang Genshu, Zheng Jun, Cai Jianye, Zhang Junbin, Cheng Daorou, Zhou Qi, Yang Yang.

*Department of Hepatic Surgery, Organ Transplantation Center, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Key Laboratory of Liver Disease Research of Guangdong Province, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: Wang Genshu, Email: wgsh168@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of zeste white 10 interactor (Zwint) in primary hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on the prognosis of liver transplantation for HCC. **Methods** HCC tissues, paracancerous tissues and clinical data of 50 liver transplant recipients for HCC were collected. The expression levels of Zwint messenger RNA (mRNA) and Zwint protein in 20 pairs of HCC tissues and paracancerous tissues of 20 liver transplant recipients for HCC were compared using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR), Western Blot and immunohistochemistry (IHC). Two HCC cell lines HepG-2 which interfered with the expression of Zwint successfully were selected as si-Zwint-1 group and si-Zwint-2 group, and the blank control was taken as si-NC group. The cell proliferation and cell cycle of various groups were compared using cell counting kit (CCK) -8 experiment, flat-cloning assay and cell cycle experiment. The consistency of the expression of Zwint and cyclin D1 in HCC tissues and cells was analyzed using Western Blot and IHC. The enrolled patients were divided into high expression group (22 cases) and low expression group (28 cases) based on the median of Zwint protein expression level, and the relationship of the expression level of Zwint protein and clinical characteristics, overall survival rate and disease free survival rate of liver transplant recipients for HCC was analyzed. **Results** The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the expression level of Zwint mRNA in HCC tissues was higher than that of paracancerous tissues ($P=0.03$). The results of Western Blot and IHC showed that the expression level of Zwint protein in HCC tissues was higher than that of paracancerous tissues (both $P<0.05$). After the *Zwint* gene of HCC cell line HepG-2 was interfered, CCK-8 and flat-cloning assay showed that the cell proliferation potential was significantly weakened (all $P<0.01$), and the cell cycle arrested at stage G_1 (all $P<0.05$). The expression level of Zwint protein was closely related to tumor diameter and tumor, node, metastasis (TNM) staging (all $P<0.05$). The overall survival rate of liver transplant recipients for HCC in the high Zwint expression group was lower than that of the low expression group ($P=0.02$). **Conclusions** Zwint is highly expressed in HCC tissues, and it can promote the proliferation of HCC cells through regulating cell cycle. The expression level of Zwint is negatively correlated with the prognosis of liver transplantation for HCC.

【Key words】 Zeste White 10 interactor (Zwint); Primary hepatocellular carcinoma; Liver transplantation; Cell proliferation; Cell cycle; Cyclin protein D1 (cyclin D1); Cyclin dependent kinase (CDK) 4; Tumor, node and metastasis (TNM) staging; Survival rate

原发性肝癌（肝癌）是最常见的恶性肿瘤之一，最新研究表明其致死率在所有恶性肿瘤中排第3位^[1-3]。掌握肝癌发生发展的机制，改善肝癌患者的预后仍是肝脏疾病研究领域的重要任务。正如其他实体肿瘤一般，肝癌的发生是一个长期的过程，涉及大量的基因及表观遗传的突变^[4-5]。尽管已有大量研究报道肝癌的相关发生及进展机制，但其详尽的分子机制尚未完全清楚。

Zw10结合因子（Zeste White 10 interactor, Zwint）是一种调控着丝点分裂的蛋白，由*Zwint*基因编码，其与Zw10结合共定位于着丝粒上，并附着于染色体和纺锤体的微管间，是染色体运动和有丝分裂检查站（checkpoint）的重要调控蛋白。已有研究报道*Zwint*

基因高表达于乳腺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中^[6-7]。然而，*Zwint*基因在肝癌的发生及进展中是否发挥作用及其可能的分子机制，笔者尚未见报道。

本研究旨在探讨*Zwint*在肝癌组织中的表达情况，分析其与肝癌临床病理特征及肝癌肝移植受体的预后之间的关系，并通过干扰肝癌细胞系中*Zwint*表达，分析*Zwint*与肝癌细胞功能的关系及其潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

选择2009年1月至2010年1月在中山大学附

属第三医院肝移植中心首次确诊为原发性肝癌并接受同种异体原位肝移植术的50例受体纳入本研究,其中男36例,女14例,年龄(50±10)岁,所有受体术前均未接受过手术切除或介入等治疗。收集50例受体的肝癌组织和癌旁组织,并收集受体的肝功能Child-Pugh分级,甲胎蛋白水平,有否微血管侵犯,肿瘤体积,肿瘤、淋巴、转移(TNM)分期等临床资料。

体外实验选择人肝癌细胞系HepG-2,购自中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂及仪器

主要试剂: Trizol总RNA提取试剂、转染试剂RNAimax均购自美国Invitrogen公司; RNA逆转录试剂及SYBR Green I Master Mix试剂均购自瑞士Roche公司; 兔抗人Zwint多克隆抗体、小鼠抗人Zwint多克隆抗体均购自美国Abcam公司, 兔抗人磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体、兔抗人细胞周期蛋白D1(cyclin D1)单克隆抗体、兔抗人细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin dependent kinase, CDK)4单克隆抗体及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的抗兔IgG抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司; 细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK)-8、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白含量检测试剂盒及细胞周期流式检测试剂盒均购自中国凯基生物有限公司。

主要仪器: 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)分析系统购自瑞士Roche公司; 蛋白免疫印迹(Western Blot)化学发光系统购自美国ProteinSimple公司; 酶标仪购自美国Biotek公司; 流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量聚合酶链反应 随机选取20例受体的肝癌组织和癌旁组织,行实时荧光定量PCR检测,检测Zwint信使核糖核酸(mRNA)表达情况。按照说明书使用Trizol提取肝癌组织及癌旁组织内总RNA,测量浓度后取1 μg总RNA进行逆转录成20 μg的互补脱氧核糖核酸(cDNA)。使用20 μL体系按照SYBR Green I Master Mix说明书附带的方案以GAPDH为内参进行实时荧光定

量PCR操作。PCR反应方案: 95℃反应5 min循环1次; 95℃反应10 s, 60℃反应30 s, 72℃反应20 s, 扩增40次循环; 95℃反应5 s, 65℃反应1 min循环1次。引物序列如下: Zwint正向引物为5'-ACGTTTCTGCAGAGGGTAAGG-3', 反向引物为5'-CAGCCTTGAAGGACACACCA-3'; GAPDH正向引物为5'-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3', 反向引物为5'-GCGCCAATACGACCAAATC-3'。使用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算mRNA的相对表达量。

1.3.2 免疫组织化学法 50例受体的肝癌组织和癌旁组织的石蜡切片按文献报道的方法脱蜡后水化^[8-9], 3%过氧化氢封闭过氧化物酶活性,之后用pH为8.0的乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)高温高压抗原修复2 min,再用10%山羊血清在37℃封闭40 min。封闭完孵育一抗(按1:100稀释小鼠抗人Zwint多克隆抗体,1:1000稀释兔抗人cyclin D1单克隆抗体)4℃过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,二抗37℃孵育20 min, DAB显色,苏木素染核后脱水封片。由两位研究者单独对染色后的石蜡切片进行评分,评分由强度和面积两部分组成。评分标准包括: (1)强度,不表达为0分,弱表达为1分,中表达为2分,强表达为3分。(2)面积,0~25%为0分,26%~50%为1分,51%~75%为2分,76%~100%为3分。总分为强度×面积。

1.3.3 细胞培养、干扰及分组 选择人肝癌细胞系HepG-2进行体外实验,培养于含10%胎牛血清及1%双抗的DMEM培养基中,每3日用0.25%胰酶消化并传代,培养于37℃、5%CO₂培养箱内。细胞干扰前培养于6孔板中,按转染试剂RNAiMax的说明书将Zwint小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)转染入肝癌细胞系内,并设置空白对照组转染正常对照RNA;转染48 h后细胞验证干扰效率并用于后续实验研究。选取两个成功干扰Zwint表达的肝癌细胞系HepG-2(si-Zwint-1组和si-Zwint-2组),以空白对照组作为si-NC组。

1.3.4 蛋白免疫印迹法 按使用说明书使用全蛋白提取试剂盒提取肝癌组织及干扰后的HepG-2细胞总蛋白;按BCA蛋白浓度检测试剂盒使用说明书测量浓度后,取50 μg蛋白于SDS-PAGE凝胶电泳,随后转移至0.45 μm聚偏氟乙烯膜,5%脱脂牛奶封闭后于4℃(孵育兔抗人Zwint、cyclin D1、CDK4单克隆抗体均稀释为1:1000,兔抗人GAPDH单克隆抗体稀释

为1:1 000)过夜。TBST清洗3遍后室温孵育二抗HRP标记的抗兔IgG抗体1 h, TBST清洗3遍后曝光。条带采用Image J软件进行灰度值分析。

1.3.5 细胞增殖实验和细胞周期实验 CCK-8实验: 将各组细胞铺至8块96孔板内, 各板做6个复孔, 分别于铺板后6 h及每间隔24 h加入CCK-8试剂后于酶标仪450 nm下测量吸光度(A_{450}), 得出吸光度值比较各组间细胞数差异。平板克隆实验: 干扰成功后于6孔板内加入各组细胞各500个, 不换液连续培养14 d后行结晶紫染色。细胞周期实验: 各组细胞按细胞周期流式检测试剂盒说明进行流式细胞仪分析, 结果采用FlowJo软件进行分析。

1.4 研究方法

采用实时荧光定量PCR、Western Blot法和免疫组织化学(免疫组化)法, 比较20例肝癌肝移植受体的20对肝癌组织及癌旁组织中Zwint mRNA表达情况和Zwint蛋白的表达水平; 采用CCK-8实验、平板克隆实验和细胞周期实验, 比较各组细胞的增殖功能和细胞周期; 采用Western Blot法和免疫组化法, 分析肝癌组织和肝癌细胞中Zwint与cyclin D1表达的一致性; 以Zwint蛋白表达水平的中位数为分割点

(以免疫组化评分3分为分割点, 低表达为 ≤ 3 分, 高表达为 >3 分), 将入组病例分为高表达组(22例)和低表达组(28例), 分析Zwint蛋白表达水平与肝癌肝移植受体临床特征、总体存活率及无复发存活率的关系。

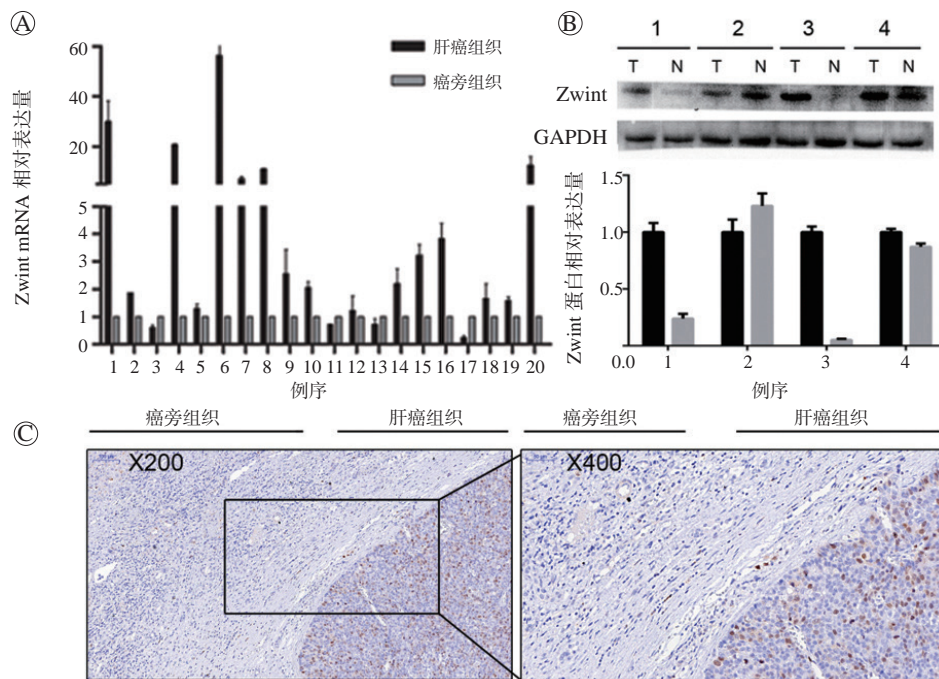
1.5 统计学方法

以SPSS 18.0软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 比较以配对样本 t 检验或者独立样本 t 检验; 计数资料以率或构成比表示, 比较采用 χ^2 检验; 采用Kaplan-Meier法进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌及癌旁组织中的Zwint mRNA及Zwint蛋白表达情况

20例肝癌肝移植受体的20对肝癌组织及癌旁组织中Zwint mRNA表达情况见图1A, 经配对 t 检验发现, 肝癌组织内Zwint mRNA表达水平高于癌旁组织, 差异有统计学意义($t=2.308, P=0.03$)。Western Blot及免疫组化结果均提示肝癌组织中Zwint蛋白的表达水平高于癌旁组织($P < 0.05$, 图1B、C)。



A 图为实时荧光定量 PCR 分析肝癌组织及其配对的癌旁组织 Zwint mRNA 表达情况; B 图为 Western Blot 法分析肝癌组织及其配对的癌旁组织 Zwint 蛋白表达情况, T 为肝癌组织, N 为癌旁组织; C 图为免疫组化法分析肝癌组织及癌旁组织 Zwint 蛋白表达情况(核内呈褐色的为 Zwint 阳性细胞, 呈蓝色的为 Zwint 阴性细胞)

图 1 肝癌组织及癌旁组织 Zwint mRNA 和 Zwint 蛋白表达情况

Figure 1 Expression of Zwint mRNA and Zwint protein in liver cancer tissues and paraneoplastic tissues

2.2 各组肝癌细胞增殖功能和细胞周期的比较

Western Blot 结果显示, 经 RNA 干扰, si-Zwint-1 组和 si-Zwint-2 组中 Zwint 蛋白表达明显减少, 提示干扰成功 (图 2A)。干扰肝癌细胞系 HepG-2 的 Zwint 基因后, CCK-8 实验结果显示, si-Zwint-1 组和 si-Zwint-2 组细胞的增殖能力较 si-NC 组弱, 差异有统计学意义 (均为 $P < 0.01$, 图 2B); 平板克隆实验显示, si-Zwint-1 组和 si-Zwint-2 组细胞的单细胞成团能力较 si-NC 组弱 (均为 $P < 0.01$, 图 2C); 细胞周期实验显示, si-Zwint-1 组和 si-Zwint-2 组细胞的细胞周期阻滞于 G₁ 期, 其 S 期和 G₂ 期面积较 si-NC 组小 (均为 $P < 0.05$, 图 2D)。

2.3 Zwint 与 cyclin D1 表达的一致性

临床病理石蜡切片行免疫组化检测, 高表达 Zwint 蛋白的肝癌组织中 cyclin D1 蛋白亦高表达, 低表达 Zwint 蛋白的肝癌组织其 cyclin D1 蛋白表达量较弱 ($P < 0.05$, 图 3A)。干扰肝癌细胞系 HepG-2 的

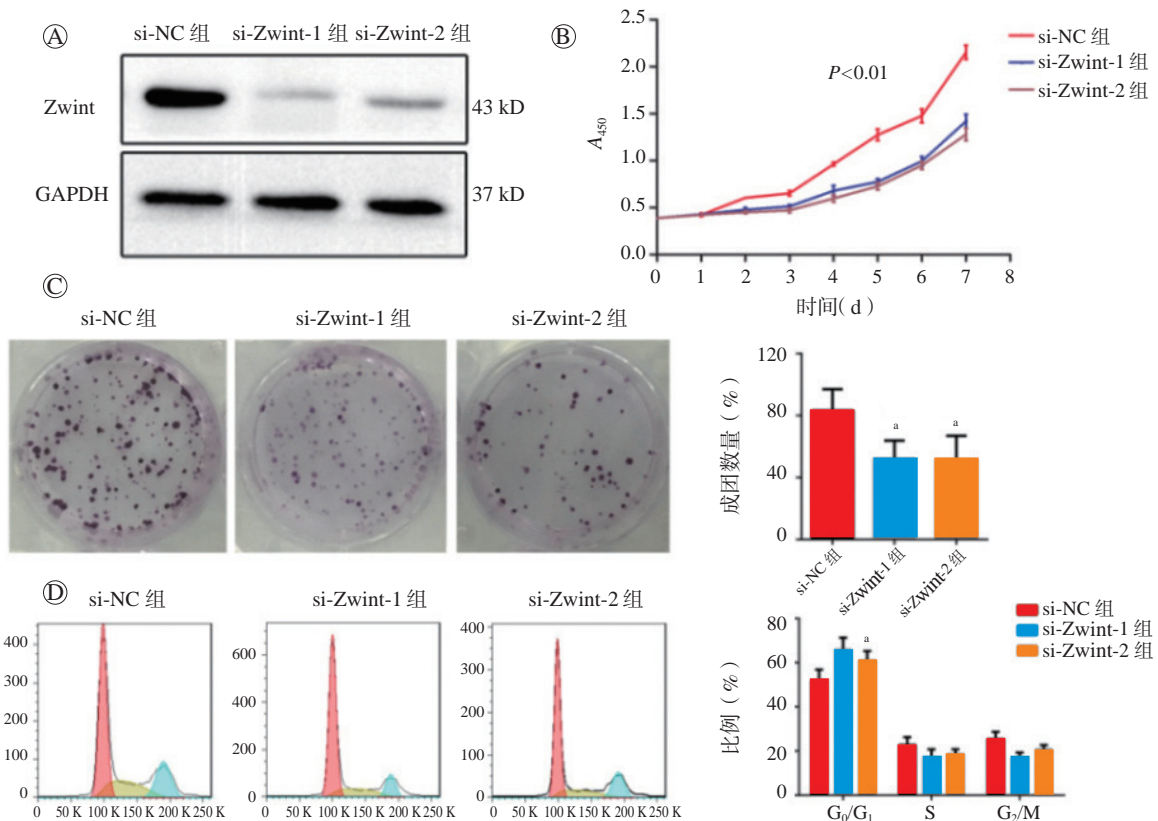
Zwint 基因后, 与 si-NC 组比较, si-Zwint-1 组和 si-Zwint-2 组肝癌细胞的细胞周期相关蛋白 cyclin D1 及 CDK4 表达水平均明显下降 ($P < 0.05$, 图 3B)。

2.4 Zwint 蛋白表达水平与临床特征、总体存活率及无复发存活率的关系

Zwint 表达水平与性别、年龄、肝功能 Child-Pugh 分级、甲胎蛋白水平及有否微血管侵犯间无明显相关 (均为 $P > 0.05$)。Zwint 表达水平与肿瘤直径、TNM 分期密切相关 (均为 $P < 0.05$) (表 1)。Kaplan-Meier 曲线生存分析发现, Zwint 高表达组肝癌肝移植受体的总体存活率低于低表达组 ($P = 0.02$, 图 4A), 高表达组和低表达组的无复发存活率比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.732$, 图 4B)。

3 讨论

肝癌的发生是极其复杂的过程, 涉及多种分子机制。目前肝癌肝移植受体的预后仍较差, 探讨影响肝



A 图为验证干扰效率; B 图为 CCK-8 实验分析各组细胞的增殖能力; C 图为平板克隆实验分析各组细胞的单细胞成团能力, 与 si-NC 组比较, ^a $P < 0.01$; D 图为细胞周期实验分析各组细胞的细胞周期情况, 与 si-NC 组比较, ^a $P < 0.05$

图 2 各组肝癌细胞的增殖能力和细胞周期情况

Figure 2 Cell proliferation and cell cycle of hepatoma carcinoma cells in each group

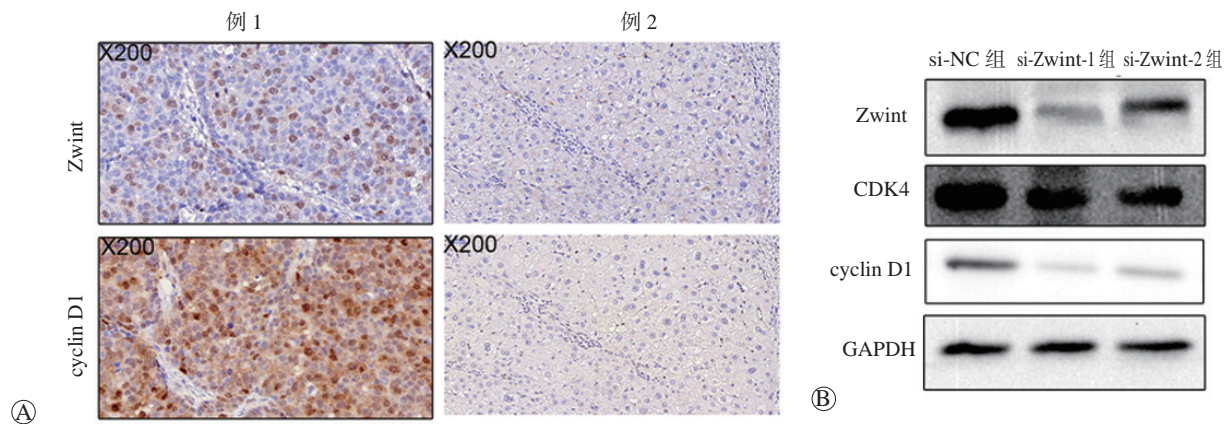


图 3 Zwint、cyclin D1 及其相关蛋白在肝癌组织和细胞内的表达情况

Figure 3 Expression of Zwint, cyclin D1 and correlative protein in liver cancer tissues and cells

表 1 Zwint 表达与肝癌受体临床特征指标的关系

Table 1 Relationship between Zwint expression and clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma recipients[n(%)]

指标	n	Zwint 表达		P 值
		低表达组 (n=28)	高表达组 (n=22)	
性别				
男	36	20 (40)	16 (32)	0.919
女	14	8 (16)	6 (12)	
年龄				
≤55 岁	35	21 (42)	14 (28)	0.384
>55 岁	15	7 (14)	8 (16)	
肝功能 Child-Pugh 分级				
A 级	29	19 (38)	10 (20)	0.278
B 级	16	7 (14)	9 (18)	
C 级	5	2 (4)	3 (6)	
甲胎蛋白				
≤400 μg/L	34	22 (44)	12 (24)	0.071
>400 μg/L	16	6 (12)	10 (20)	
肿瘤直径				
≤5 cm	36	26 (52)	10 (20)	<0.001
>5 cm	14	2 (4)	12 (24)	
微血管侵犯				
有	9	5 (10)	4 (8)	0.976
否	41	23 (46)	18 (36)	
TNM 分期				
<3 期	36	24 (48)	12 (24)	0.015
≥3 期	14	4 (8)	10 (20)	

癌肝移植预后的因素和分子机制、制定更加有效的抗肿瘤治疗方案已是迫在眉睫的任务^[10-11]。在本研究中,我们初步探讨了 *Zwint* 基因是否可作为预测肝癌肝移

植受体预后的分子位点,从而为将来抗肿瘤精准治疗提供理论依据。我们发现在同一肝癌肝移植受体的癌组织及癌旁组织中,*Zwint* 基因转录而成的 mRNA 及

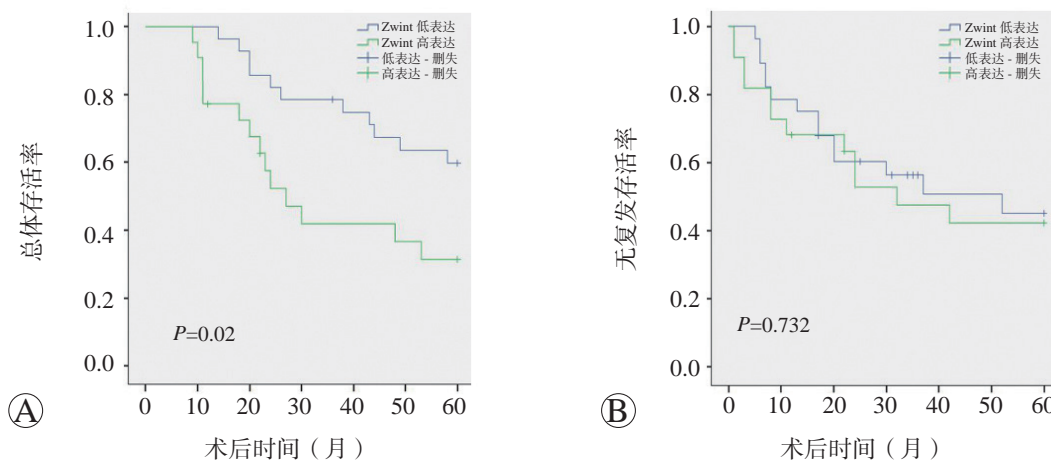


图 4 Zwint 高表达组和低表达组的总体生存曲线和无复发生存曲线

Figure 4 Total survival curve and recurrence free survival curve of high Zwint expression group and low Zwint expression group

翻译后的蛋白在癌组织中明显表达增高。Zwint 蛋白表达水平与肿瘤直径、TNM 分期相关，且 Zwint 蛋白水平高表达的肝癌肝移植患者的预后较表达低者差。此外，通过干预实验，我们发现干扰肝癌细胞中 Zwint 基因的表达后，细胞的增殖水平较对照组明显减弱。Zwint 蛋白是通过调节细胞周期，从而调节肝癌细胞增殖能力，在 Zwint 基因干扰后调控细胞周期关键蛋白 cyclin D1 的表达明显降低。免疫组织化学结果显示在肝癌组织中 Zwint 蛋白表达水平与 cyclin D1 表达水平一致。

Zwint 基因编码的蛋白由 278 个氨基酸组成。已有研究报道 Zwint 蛋白为有丝分裂检查站的关键调控蛋白，起着监管调控细胞周期的作用^[12]。细胞周期检查站在细胞周期调控中起监管作用，当细胞周期运转至检查站时将接受检测，上一时相完成后方可进入下一时相^[13-14]。此外，有报道称，Zwint 与染色体不稳定性 (chromosome instability, CIN) 相关，而 CIN 所致的染色体数量异常被认为是多种人类恶性肿瘤的标志物^[15]。Brendle 等^[16]学者研究发现在乳腺癌患者中，过表达 Zwint 将促进肿瘤相关的非整倍体的形成，且 Zwint 高表达的患者预后较差。

我们首次探讨了 Zwint 基因表达及其在肝癌进展中发挥的作用。本研究发现，Zwint 通过调节细胞周期来调节细胞增殖，下调 Zwint 表达将抑制肝癌细胞增殖。细胞周期关键蛋白 cyclin D1 开始表达于 G₁ 期，调控细胞周期由 G₁ 期进入 S 期。此前有研究结果示 cyclin D1 高表达于乳腺癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、

黑色素瘤、膀胱癌及神经母细胞瘤等多种人类恶性肿瘤中^[17-21]。cyclin D1 在细胞周期中的早期进程中发挥作用，它的启动将激活 CDK4^[18]，从而促使完成完整的细胞周期。

综上所述，Zwint 高表达于肝癌组织中，其通过调节细胞周期促进肝癌细胞增殖，且 Zwint 高表达与肝癌恶性程度及肝癌肝移植预后呈负相关。此研究结果有望为将来肝癌治疗提供新的靶点。

参考文献：

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] MALUCCIO M, COVEY A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399. DOI: 10.3322/caac.21161.
- [3] YANG JD, ROBERTS LR. Hepatocellular carcinoma: a global view[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(8): 448-458. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.100.
- [4] 蔡燕, 黄俊琪. 肝癌转移相关标志物的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(12): 2059-2061. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.12.045.
- CAI Y, HUANG JQ. Research on markers related to metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. J Pract Med, 2017, 33(12): 2059-2061. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.12.045.
- [5] HWANG S, MOON DB, AHN CS, et al. Risk-based long-term screening for hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation[J].

- Transplant Proc, 2013, 45(8): 3076-3084. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.08.068.
- [6] WOO SEO D, YEOP YOU S, CHUNG WJ, et al. Zwint-1 is required for spindle assembly checkpoint function and kinetochore-microtubule attachment during oocyte meiosis[J]. Sci Rep, 2015, 5:15431. DOI: 10.1038/srep15431.
- [7] XU Z, ZHOU Y, CAO Y, et al. Identification of candidate biomarkers and analysis of prognostic values in ovarian cancer by integrated bioinformatics analysis[J]. Med Oncol, 2016, 33(11): 130.
- [8] CHEN L, LI Y, LIN CH, et al. Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma[J]. Nat Med, 2013, 19(2): 209-216. DOI: 10.1038/nm.3043.
- [9] SARASWAT S, ROUT PK, KHARCHE SD, et al. Molecular expression of caprine estrogen receptor gene 1 in reproductive and non-reproductive tissues[J]. Reprod Domest Anim, 2016, 51(6): 1049-1054. DOI: 10.1111/rda.12774.
- [10] XIONG Y, HU B, WEI L, et al. Upregulated expression of polycomb protein Ring1 contributes to poor prognosis and accelerated proliferation in human hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2015, 36(12): 9579-9588. DOI: 10.1007/s13277-015-3721-7.
- [11] XING C, ZHOU W, DING S, et al. Reversing effect of ring finger protein 43 inhibition on malignant phenotypes of human hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(1): 94-103. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0672.
- [12] WANG H, HU X, DING X, et al. Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling[J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54590-54598.
- [13] BARTKOVA J, HOREJSÍ Z, KOED K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis[J]. Nature, 2005, 434(7035): 864-870.
- [14] GORGOULIS VG, VASSILIOU LV, KARAKAIDOS P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions[J]. Nature, 2005, 434(7035): 907-913.
- [15] KOPS GJ, WEAVER BA, CLEVELAND DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(10): 773-785.
- [16] BRENDLE A, BRANDT A, JOHANSSON R, et al. Single nucleotide polymorphisms in chromosomal instability genes and risk and clinical outcome of breast cancer: a Swedish prospective case-control study[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(3): 435-442. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.001.
- [17] ZHONG Z, YEOW WS, ZOU C, et al. Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(5): 2105-2114. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1108.
- [18] LI Z, QU L, LUO W, et al. Mig-6 is down-regulated in HCC and inhibits the proliferation of HCC cells via the P-ERK/Cyclin D1 pathway[J]. Exp Mol Pathol, 2017, 102(3): 492-499. DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.05.004.
- [19] COCO MARTIN JM, BALKENENDE A, VERSCHOOR T, et al. Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line[J]. Cancer Res, 1999, 59(5): 1134-1140.
- [20] LING L, WEI T, HE L, et al. Low-intensity pulsed ultrasound activates ERK1/2 and PI3K-Akt signalling pathways and promotes the proliferation of human amnion-derived mesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif, 2017, 50(6): e12383. DOI: 10.1111/cpr.12383.
- [21] 李文梅, 刘佳佳, 张印坡, 等. 乳腺癌组织中周期素依赖性激酶 10 基因启动子甲基化状态检测的临床意义[J]. 转化医学杂志, 2017, 6(1): 20-21,31. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3097.2017.01.005.
- LI WM, LIU JJ, ZHANG YP, et al. Clinical significance of the cyclin-dependent kinase 10 gene promoter methylation in breast cancer[J]. Translat Med J, 2017, 6(1): 20-21,31. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3097.2017.01.005.

(收稿日期: 2018-01-03)
(本文编辑: 邬加佳 朱佩玲)