

TNIP1 真核表达载体的构建及表达

喻 丽¹⁾, 李梅章²⁾, 李金荣³⁾, 李晓岚¹⁾

(1) 昆明医科大学附属延安医院皮肤性病 / 风湿免疫科, 云南昆明 650051; 2) 云南大学生命科学院生物化学和分子生物学实验室, 云南昆明 650091; 3) 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 构建肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 相互作用蛋白 1 (TNIP1) 真核表达载体 (pEGFP-N3-TNIP1), 观察了解外源 TNIP1 蛋白的细胞内定位及其在 HeLa 细胞中的表达. **方法** 应用 RT-PCR 从人外周血淋巴细胞中扩增 TNIP1 基因的开放阅读框 (ORF), 将目的片段亚克隆入 pEGFP-N3 中, 筛选阳性克隆, 提取质粒测序进行鉴定. 将表达质粒转染 HeLa 细胞, 荧光显微镜观察融合蛋白在细胞内的表达与定位, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白质免疫印迹分别从 mRNA 水平和蛋白水平来检测 TNIP1 在 HeLa 细胞中的表达情况. MTT 实验检测细胞增殖情况、流式细胞仪检测细胞周期. **结果** 重组质粒双酶切鉴定, 在 1.9 kb 左右有明显的条带, DNA 测序结果证实重组质粒 pEGFP-N3-TNIP1 中含有的目的基因片段与 GenBank 上登录号为 BC014008.1 的 TNIP1 基因序列完全一致; 荧光倒置显微镜观察重组质粒转染 HeLa 细胞后有绿色荧光蛋白的表达, 转染 48 h 后通过 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测到 TNIP1 mRNA 和蛋白质的表达, 均较对照明显升高, 外源性的 TNIP1 蛋白主要定位于细胞质中. **结论** 成功构建了 pEGFP-N3-TNIP1 真核表达载体, 外源表达的 TNIP1 蛋白主要分布于 HeLa 细胞的细胞质部分, 过表达 TNIP1 蛋白不影响 HeLa 细胞的细胞周期及细胞生长存活.

[关键词] TNIP1 蛋白; HeLa 细胞; 基因克隆; 表达

[中图分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 01-0038-06

Construction and Expression of Eukaryotic Expression Vector pEGFP-N3-TNIP1

YU Li¹⁾, LI Mei-zhang²⁾, LI Jin-rong³⁾, LI Xiao-lan¹⁾

(1) *Dept. of Dermatology & Rheumatology, Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051;* 2) *Biological Chemistry and Molecular Biology, Life of Schools of Yunnan University, Kunming Yunnan 650091;* 3) *Dept. of Urology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)*

[Abstract] **Objective** To construct eukaryotic expression vector pEGFP-N3-TNIP1 and to observe the expression in HeLa cells. **Methods** pEGFP-N3-TNIP1 vector was constructed according to the standard molecular cloning strategies. Total RNA and protein were extracted in 48 h after transfection to detect the HeLa expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting, respectively. MTT was used to examine the growth of HeLa cells that were transformed by pEGFP-N3-TNIP1 plasmid DNA. Flow cytometry was used to analyze the cell cycle. **Results** The recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-N3-TNIP1 was successfully constructed, and the gene sequencing detect result suggested the TNIP1 sequence was identical to that published in GenBank (BC014008.1). Green fluorescence could be seen by fluorescence microscopy in 24-72 h

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81360457)

[作者简介] 喻丽 (1988~), 女, 云南泸西县人, 在读硕士研究生, 主要从事皮肤及风湿免疫科临床工作.

[通讯作者] 李晓岚. E-mail: lixiaolan96@hotmail.com

after transfection and a peak appeared within 48 h. qRT-PCR and Western blot can find TNIP1 mRNA and protein were expressed after transfection. Over-expressing TNIP1 didn't directly impact HeLa cells' growth. Conclusion TNIP1 eukaryotic expression vector was constructed successfully. Only cytoplasmic location of exogenous TNIP1 protein had been observed in the HeLa cells after transformed by the pEGFP-N3-TNIP1. Over-expressed TNIP1 protein did not directly impact the cell growth of HeLa cells in vitro.

[Key words] TNIP1; HeLa cells; Gene clone; Expression

肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 相互作用蛋白 1 (TNF α -induced protein 3-interacting protein 1, TNIP1) 作为核心调控蛋白在众多的信号下游的分子传导中发挥重要作用^[1]。

TNIP1 于 1999 年首次被克隆出来, 全长的 cDNA 为 1 911 bp, 编码的一个长约 72 kDa 的蛋白质^[2]。TNIP1 编码 ABIN1 蛋白, 具有与肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 (A20) 相互协同作用, 能够协同抑制 TNF 受体和 Toll 受体所介导的 NF- κ B 的激活和 TNF 介导的细胞程序性死亡。最新的研究发现: TNIP1 可以通过与其它蛋白的直接结合抑制该蛋白的功能^[3-7]。目前已知 TNIP1 介导的蛋白-蛋白相互抑制作用已经涉及许多重要的跨膜受体 (例如: TNF α 和 EGF) 和核受体 (例如: PPAR 和 RAR) 信号通路^[3-7]。研究发现: TNIP1 与 A20 蛋白或者 P105 蛋白结合, 前者阻止了 NEMO 的泛素化降解的过程^[5-6], 后者则抑制 P50 的活化, 最终切断了 TNF α 下游的转录调节的激活^[7]。此外, TNIP1 还可以同 FADD 结构域作用阻止了 TNF α -Caspas8 依赖的细胞凋亡的过程, 因此 TNIP1 也被视为抗凋亡的调节因子^[8]。

在 TNIP1 基因敲除的动物中, 突变基因型的小鼠的出生率仅有 4.3%, 远远低于预期的 25% 的比率, 说明 TNIP1 对小鼠的胚胎的正常发育是必须的^[9]。考虑到细胞生长是胚胎发育的重要环节, 同时 TNIP1 蛋白磷酸化程度在细胞周期中由 M 期转变为 G₁ 期过程中出现了减少^[9], 提示 TNIP1 蛋白在正常细胞周期具有一定的功能。众所周知, 肿瘤组织的产生和发展与细胞周期和细胞增殖的异常直接有关。在对前列腺和食管癌临床病理学研究中发现: 肿瘤组织内部的 TNIP1 蛋白的表达要高于癌旁周围正常的组织^[10], 表明 TNIP1 蛋白对肿瘤细胞的生物学功能具有类似的调节作用。但是 TNIP1 蛋白的功能还缺少直接的证据。

本实验将外源性的 TNIP1 基因克隆于 pEGFP-N3 载体中, 成功构建了 pEGFP-N3-TNIP1 真核表达载体, 为进一步研究 TNIP1 在肿瘤方面的功能做基础准备, 为探讨肿瘤的发病机制及肿瘤的新型临床治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pEGFP-N3 真核表达载体购置于北京义翘神州生物技术有限公司。大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和 Trans2K TM Plus II DNA Maker 通过 Transgen 公司订购。DNA 凝胶回收试剂盒和质粒 DNA 小量提取试剂盒购自 Omega 公司。Trizol RNA 提取液、RT-PCR 反转录试剂盒、限制性内切酶 Hind III 和 BamH I、Ex Taq 酶和 T4 DNA 连接酶等试剂均购置于 TaKaRa 公司。转染试剂 X-treme GENE HP & 9 DNA 和 SYBR Green Real time PCR 试剂盒分别购置于 Invitrogen 公司和大连宝生物公司。Anti-TNIP1 antibody (兔抗人) 购自 abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 技术扩增目的基因片段 从 GenBank 上查到 TNIP1 基因 (登录号 BC014008.1) 序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物, 并由上海生工生物工程技术有限公司合成该引物。F: 5' ATGGAAGGGAGAGGACCGT-AC 3', R: 5' CTGAGGCCCTCACGGTC 3', 以人外周血淋巴细胞 cDNA 为模板 PCR 扩增目的片段。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 67 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增终产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 切下目的条带后利用 DNA 胶回收试剂盒回收 TNIP1 基因的 cDNA 片段。

1.2.2 pEGFP-N3-TNIP1 重组质粒的构建 将上述胶回收的目的基因片段和真核表达质粒 pEGFP-N3 分别用限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 进行双酶切 (37 $^{\circ}$ C 恒温反应 5 h)。将酶切产物分别于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收目的基因与载体片段。用 T4-DNA 连接酶连接上述 2 个酶切产物, 16 $^{\circ}$ C 恒温反应过夜。将连接产物转化入 DH5 α 中, 通过扩增、摇菌、涂板、挑单克隆, 菌落 PCR。将菌落 PCR 阳性克隆接种、摇菌过夜后抽提重组质粒。并对重组表达质粒进行双酶切

鉴定,取 10 μ L 质粒送上海生工测序鉴定,剩余质粒 -20°C 冻存。

1.2.3 pEGFP-N3-TNIP1 表达质粒的转染 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 HeLa 细胞,培养条件为 37°C , 5% CO_2 的恒温培养箱。当 HeLa 细胞长满培养板(六孔板) 60% 的面积时,用罗氏转染试剂 X-tremeGENE HP & 9 DNA 进行转染。实验分为:(1) 空质粒组 pEGFP-N3; (2) 重组质粒组 pEGFP-N3-TNIP1; (3) 空白组 HeLa 细胞(不加任何的外源 DNA)。转染前把培养基换成无血清培养基,转染时按 2 μg 质粒加 5 μL 转染试剂,并将转染试剂和质粒混匀后室温孵育 20 min,最后再将混合液加入到细胞中,边加边摇晃,然后放入 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养,6 h 后再补加 10% 胎牛血清,继续培养 24~48 h,荧光倒置显微镜下观察各个时间点的绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.4 转染细胞绿色荧光蛋白的观察 待 HeLa 细胞转染 24 h、48 h、72 h 后分别于荧光倒置显微镜(OLYMPUS IX71) 下观察融合蛋白的表达情况,并拍照。

1.2.5 流式细胞仪分析 HeLa 细胞转染 48 h 后,收集细胞,PBS 洗 3 次后,用流式细胞仪分析 GFP 表达的细胞,检测不同处理组细胞的转染情况。另外收集细胞后加入预冷 70% 的乙醇固定, 4°C 放置 1~2 h,离心弃去固定液,用 1 mL PBS 重悬细胞,加入 100 μL 碘化丙啶(PI) 染料染色(终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4°C 避光 30 min)。流式细胞仪检测不同处理组细胞周期的分布情况,并作图分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测转染细胞 mRNA 表达 收集细胞,提取总 RNA,根据 RT-PCR 反转录试剂盒说明,将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为扩增模板行实时荧光定量(qRT-PCR) 扩增(7300 型 ABI USA)。反应体系为:cDNA 模板 2 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,SYBR Premix 12.5 μL ,Rox 0.5 μL ,ddH₂O 补充体积至 25 μL 。反应程序: 95°C , 2 min 1 个循环; 95°C , 30 s, 58°C , 40 s, 40 个循环;溶解曲线: 95°C , 15 s; 60°C , 30 s, 95°C , 15 s。对实验数据进行统计学分析。

1.2.7 Western blot 检测转染细胞蛋白的表达水平 收集细胞,PBS 洗 3 次,加入蛋白裂解液混匀,冰上静置孵育 30 min。然后在 4°C , 12 000 r/min 条件下离心 15 min,去沉淀,上清加入适量 5x 蛋白上样缓冲液, 100°C 煮沸 5 min。分别配制 12.5% 的分离胶和 4% 的浓缩胶,上样量为 50 μg

(计算出相应的体积),85V 电压,2 h 跑胶,经过转膜,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,PBST 洗膜,每次 5 min,共洗 3 次。依常规步骤进行一抗、二抗孵育。孵育结束加入发光液进行暗室发光,拍照。

1.2.8 MTT 实验检测细胞增殖 HeLa 转染 48 h 后,收集细胞,以每孔 100 μL 细胞悬液(含细胞数为 100 个/孔或 1 000 个/孔)接种于 96 孔板中,实验分空白对照组(只有 HeLa 细胞)、转染 pEGFP-N3 空质粒组、转染 pEGFP-N3-TNIP1 重组质粒组,并各设 3 个复孔。然后分别检测 Day0, Day1, Day3, Day5, Day7 细胞增殖情况。注意应在同一时间点测定,并且于检测前 4 h 于每孔加入 20 μL MTS 染料(避光),继续培养。最后用酶标仪检测 490 nm 波长吸光值。

2 结果

2.1 pEGFP-N3-TNIP1 真核表达载体的构建及鉴定

通过 RT-PCR 扩增到一段约 1.9 kb 的 DNA 片段(图 1 左下),片段大小与预期完全一致。该目的片段经 Hind III/BamH I 双酶切后连接到 pEGFP-N3 载体,构建了一个新的 pEGFP-N3-TNIP1 重组质粒。重组质粒进一步经过 Hind III/BamH I 双酶切(图 1 右下)和 DNA 测序进行鉴定,证实具有正确的 ORF,说明已成功构建 TNIP1 过表达质粒,GenBank 上登录号为 BC014008.1。

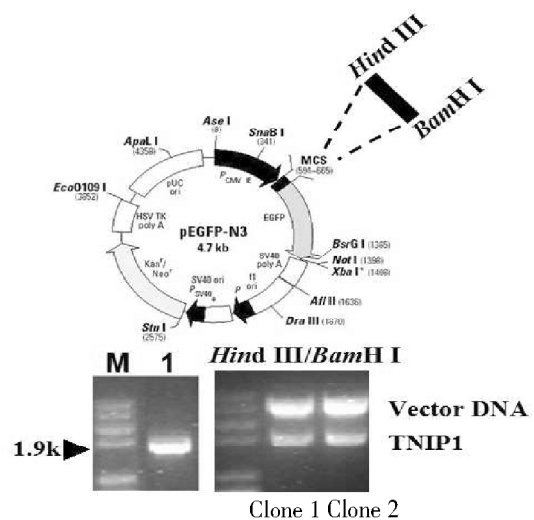


图 1 pEGFP-N3-TNIP1 真核表达载体的构建
Fig. 1 Construction of pEGFP-N3-TNIP1 eukaryotic expression vector

2.2 pEGFP-N3-TNIP1 重组质粒转染 HeLa 细胞的效率和 TNIP1 蛋白在细胞内的定位

为了检测重组质粒转染 HeLa 细胞的效率, pEGFP-N3 和 pEGFP-N3-TNIP1 质粒 DNA 分别作为对照 (标记为 Vector) 和 TNIP1 过表达质粒 (标记为 TNIP1) 转染一定量的培养的 HeLa 细胞. 由图 2A 和 B 可知 pEGFP-N3 和 pEGFP-N3-TNIP1 转染的 HeLa 细胞都出现了绿色荧光蛋白表达的细胞. 但是 pEGFP-N3-TNIP1 转染的 HeLa 细胞的数目仅为 pEGFP-N3 转染细胞的 30% 左右 (图 2C 和 D), 这一差异可能是受到构建本身大小的影响. 此外, 与转染空质粒 pEGFP-N3 (标记为 Vector, 图 2A) 相比, 转染 pEGFP-N3-TNIP1 重组质粒 (标记为 TNIP1, 图 2B) 绿色荧光蛋白的定位不一样. 在空质粒组转染的细胞中, 绿色荧光蛋白同时分布在细胞质和细胞核 (图 2A, 细箭头所示), 而重组质粒组融合蛋白仅表达在细胞核外 (图 2B, 粗箭头所示), 表明外源表达的 TNIP1 的蛋白可能主要定位于细胞质中.

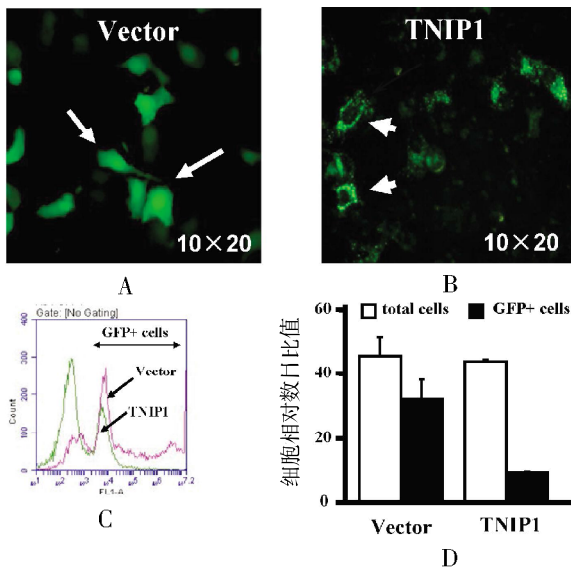


图 2 TNIP1 蛋白的细胞内定位及 pEGFP-N3-TNIP1 在 HeLa 细胞中的转染效率

Fig. 2 Localization of TNIP1 protein and transfection efficiency of pEGFP-N3-TNIP1 in the HeLa cells

A:空质粒 (Vector) 转染组; B:表达质粒 (TNIP1) 转染组; C:流式细胞仪分析 GFP 表达的细胞; D:流式分析结果.

2.3 pEGFP-N3-TNIP1 在 HeLa 细胞中的表达

将构建好 pEGFP-N3-TNIP1 转染 HeLa 细胞 (转染 pEGFP-N3 作为对照), 48 h 后收集细胞, 检测过表达 TNIP1 基因在 HeLa 细胞中 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况. 结果显示: pEGFP-N3-TNIP1

(TNIP1) 转染组较空质粒 pEGFP-N3 (Vector) 转染组的 TNIP1 mRNA 表达水平出现了显著升高 (图 3A), 且具有极显著的差异 ($P < 0.01$). Western blot 的结果也证实了除了较低的内源性 TNIP1 蛋白表达外, 外源性 TNIP1 的蛋白表达水平在 HeLa 细胞中也出现了明显的上调 (图 3B). 说明重组质粒 pEGFP-N3-TNIP1 在哺乳动物细胞中能很好的表达.

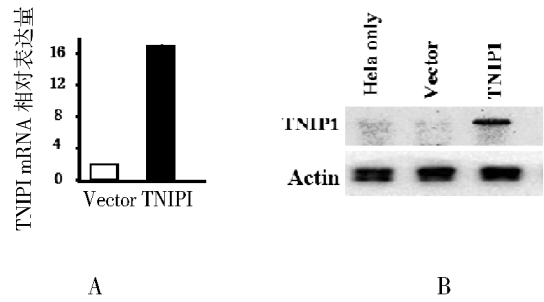


图 3 过表达 TNIP1 在 HeLa 细胞中 mRNA 和蛋白水平检测

Fig. 3 Detected mRNA and protein levels of over expression TNIP1 in HeLa cells

A:Real-time PCR 分析结果; B:Western blot 分析结果.

2.4 过表达 TNIP1 对 HeLa 细胞生长的影响

为了研究 TNIP1 基因对 HeLa 细胞生长有无影响, 空白对照组 (Blank)、pEGFP-N3 转染组 (Vector) 和 pEGFP-N3-TNIP1 转染组 (TNIP1) 细胞在不同的生长时间点测定其存活和生长情况. 结果显示: 过表达外源性的 TNIP1 蛋白并不直接影响 HeLa 细胞的存活和生长 (图 4).

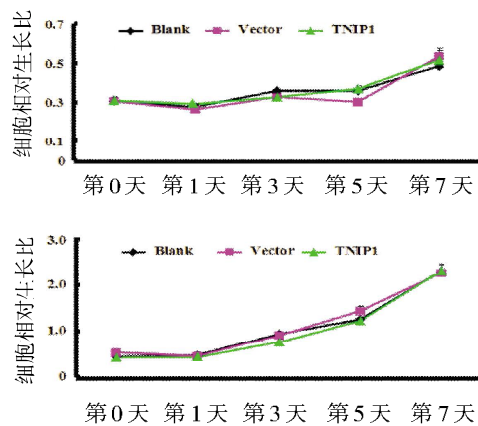


图 4 过表达 TNIP1 对 HeLa 细胞生长的影响

Fig. 4 The effect of over expression TNIP1 on the growth of HeLa cells

A:100 个细胞 / 孔; B:1 000 个细胞 / 孔.

2.5 过表达 TNIP1 对 HeLa 细胞分裂周期的影响

细胞转染 48 h 后, 收集细胞, PI 染色, 对空白对照组 (Blank)、pEGFP-N3 转染组 (Vector) 和 pEGFP-N3-TNIP1 转染组 (TNIP1) 的细胞采用流式细胞仪来分析细胞分裂周期的各个时相. 结果显示: TNIP1 蛋白在 HeLa 细胞过表达后, 短时间内对细胞的各个分裂阶段都没有影响 (图 5). 这一结果与上述细胞生长的观察完全一致.

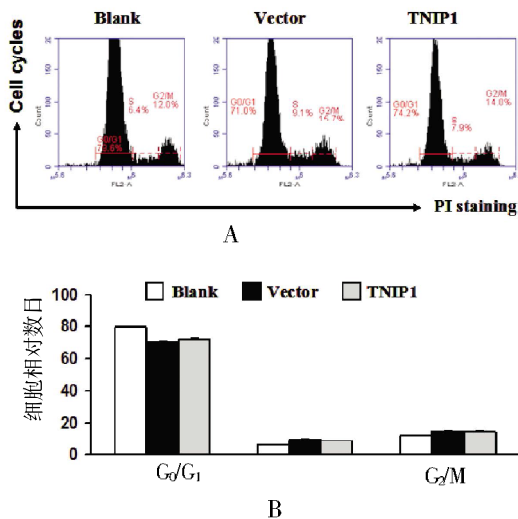


图 5 流式细胞仪检测过表达质粒对 HeLa 细胞分裂周期的影响

Fig. 5 The impact of over-expressing vector on the proliferation of HeLa cells detected by flow cytometry

A:流式细胞仪分析细胞周期; B:细胞周期分析结果.

3 讨论

研究发现 TNIP1 基因与细胞分化、凋亡、炎症反应的调节密切相关. TNIP1 蛋白在人体中分布较为广泛, 不具有组织特异性. 内源性 TNIP1 蛋白则同时分布于细胞质和细胞核. TNIP1 蛋白通过与其它蛋白 (特别是一些信号下游的转导分子) 结合并且抑制其调节功能, 在炎症反应和细胞凋亡中起关键调节作用^[4]. 最新的研究发现, TNIP1 蛋白细胞内定位与其功能具有一定关联, 调节细胞质和细胞核中的其它蛋白质功能. 功能之一, 作为核定位的蛋白, TNIP1 蛋白与核受体 (例如: 过氧化物酶增殖物激活受体 PPAR 和视黄酸受体 RAR) 直接结合, 跟随核受体从细胞质转移到细胞核后抑制核受体的转录调节机制^[11]. 功能之二, 作为细胞质蛋白, TNIP1 蛋白则从多个步骤抑制膜受体 (例如: 肿瘤坏死因子 TNF 受体和表皮生长因子 EGF 受体)

下游的信号通路^[5,6]. 其次, TNIP1 蛋白与 p105 蛋白结合阻止了 NF- κ B 的亚基 p50 的正常形成, 抑制了 TNFR-NF- κ B 介导的信号传导^[7]. 最后, TNIP1 蛋白与凋亡复合物 I 结合后导致 Caspas8 不能顺利结合到凋亡复合物 I, 不能形成具有凋亡功能的复合物 II, 从而抑制了 TNFR 介导的细胞凋亡信号^[8].

在肿瘤细胞中, 有关 TNIP1 蛋白功能的研究尚处于起步阶段. 已有研究发现, 肿瘤细胞的 TNIP1 蛋白的表达可能高于正常的细胞^[10]. 但是, TNIP1 蛋白在肿瘤细胞中的功能还不太清楚. 为了进一步验证 TNIP1 蛋白在肿瘤方面的功能, 构建了 TNIP1 过表达的真核表达质粒 (pEGFP-N3-TNIP1) 并在 HeLa 细胞中得到与前期研究不同的结果, 即: 外源性 TNIP1 蛋白仅分布在 HeLa 细胞的细胞质 (图 2), 提示外源表达 TNIP1 蛋白可能不参与核受体介导的信号通路的调节. 此外, 外源性 TNIP1 蛋白并不直接影响 HeLa 细胞的生长、存活 (图 4、图 5). 尽管如此, 尚不能简单排除 TNIP1 蛋白在肿瘤细胞中的其它功能. 例如: 肿瘤细胞中是否也存在 TNIP1 基因介导的抗凋亡的机制; 还有肿瘤细胞中内源性 TNIP1 蛋白的功能也需要深入的研究; 相关的研究对了解 TNIP1 蛋白在肿瘤细胞中的中的重要调节机制及肿瘤疾病的发病机制将具有重要的意义.

[参考文献]

- [1] RAMIREZ V P, GUREVICH I, ANESKIEVICH B J. Emerging roles for TNIP1 in regulating post-receptor signaling[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2012, 23(3): 109-118.
- [2] FUKUSHI M, DIXON J, KIMURA T, et al. Identification and cloning of a novel cellular protein Naf1, Nef-associated factor 1, that increases cell surface CD4 expression[J]. FEBS Letters, 1999, 442(5): 83-88.
- [3] IGOR GUREVICH, CARMEN ZHANG, PRISCILLA C, et al. PPAR γ and NF- κ B regulate the gene promoter activity of their shared repressor, TNIP1 [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(1): 1-15.
- [4] HEYNINCK K, KREIKE M M, BEYAERT R. Structure-function analysis of the A20-binding inhibitor of NF-kappa B activation, ABIN-1 [J]. FEBS Lett, 2003, 536(1-3): 135-140.
- [5] MAURO C, PACIFICO F, LAVORGNA A, et al. ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB [J]. J Biol Chem, 2006, 281(27):

(下转第 47 页)

- 527.
- [3] BURREL M, REIG M, FORNER A, et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolization (TACE) using Drug Eluting Beads Implications for clinical practice and trial design [J]. *Hepatology*, 2012, 56(6): 1330–1335.
- [4] LIU J J, YANG C L, JIANG J H, et al. Mechanism of SGC-7901. apoptosis induced by Houttuynia cordata thinn subterranean stem extraction [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2014, 30(2): 257–261.
- [5] KEEGAN P E, LUNEC J, NEAL D E. p53 And p53-regulated genes in bladder cancer [J]. *Br J Urol*, 1998, 82(5): 710–720.
- [6] MULLER P A, VOUSDEN K H. P53 mutations in cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 5(1): 2.
- [7] 戴大英. 肿瘤抑制基因P53和P21WAF1/Cip1/Sd1的相关性 [J]. *生理、病理科学与临床分册*, 2000, 20(6): 440–442.
- [8] VENTURA A, KIRSCH D G, MCLAUGHLIN M E, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo [J]. *Nature*, 2007, 445(7128): 661–665.
- [9] DEY A, VERMA C S, LANE D P. Updates on P53: modulation of P53 degradation as a therapeutic approach [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(1): 4–8.
- [10] ALITALO K, TAMMELA T, PETROVA T V. Lymphangiogenesis in development and human disease [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 946–953.
- [11] CHEN Z Y, WEI W, GUO Z X. Using multiple cytokines to predict hepatocellular carcinoma recurrence in two patient cohorts [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(3): 733–740.
- [12] 高建芝, 杜经丽, 李佳. VEGF相关信号通路在肝癌组织中的表达及临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(1): 75–78.
- [13] BACHELDER, ROBIN E/RE, WENDT, et al. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4 [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(24): 7203–7206.
- [14] KIM B K, KIM B R, LEE H J. Tumor-suppressive effect of a telomerase-derived peptide by inhibiting hypoxia-induced HIF-1 α -VEGF signaling axis [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 2924–2933.
- (2014-11-17 收稿)

(上接第42页)

- 18482–18488.
- [6] COHEN S, CIECHANOVER A, KRAVTSOVA-IVANTSIV Y, et al. ABIN-1 negatively regulates NF- κ B by inhibiting processing of the p105 precursor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389(2): 205–210.
- [7] VALLABHAPURAPU S, KARIN M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(3): 693–733.
- [8] OSHIMA S, TURER E E, CALLAHAN J A, et al. ABIN-1 is a ubiquitin sensor that restricts cell death and sustains embryonic development [J]. *Nature*, 2009, 457(722): 906–909.
- [9] GUREVICH I, ZHANG C, FRANCIS N, et al. TNIP1, a retinoic acid receptor corepressor and A20-binding inhibitor of NF- κ B, distributes to both nuclear and cytoplasmic locations [J]. *Histochem Cytochem*, 2011, 59(12): 1101–1112.
- [10] GUREVICH I, ZHANG C, FRANCIS N, et al. Human TNF α -induced protein 3-interacting protein 1 (TNIP1) promoter activation is regulated by retinoic acid receptors [J]. *Gene*, 2013, 515(1): 42–48.
- [11] ENCARNACAO P C, RAMIREZ V P, ZHANG C, et al. Sp sites contribute to basal and inducible expression of the human TNIP1 (TNF α -inducible protein 3-interacting protein 1) promoter [J]. *Biochem J*, 2013, 452(3): 519–529.
- (2014-09-08 收稿)