

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.009

抑制 Livin 基因对肺腺癌 SPC-A1 细胞增殖及顺铂敏感性的影响 *

庄 莉 董 超 杨润祥 高春林

(昆明医科大学第三附属医院 云南 昆明 650118)

摘要 目的: Livin 是近年来发现的人类凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,发现在多数肿瘤中表达,与肿瘤发生有密切关系,并可能作为肿瘤诱导凋亡治疗的新靶点。本研究旨在探讨 siRNA-Livin 和夫拉平度(Flavopiridol, FP)协同凋亡诱导配体 (TRAIL) 两种方式有效抑制 Livin 表达,诱导非小细胞肺癌 SPC-A1 凋亡并增强对化疗药物顺铂的敏感性。**方法:** siRNA-Livin 转染 SPC-A1, Real-Time PCR 检测 Livin 基因的表达水平, MTT 检测干扰组和干扰加药组肿瘤细胞的增殖及活性; TRAIL、FP 单独及联合作用诱导细胞凋亡,蛋白质印迹法检测凋亡抑制蛋白 Livin 的表达水平, MTT 检测各处理组细胞的增殖及活性。**结果:** 100 nmol/LFP 处理组(F)细胞存活率为(84.30± 1.34)%, 100 ng/mL TRAIL 处理组(T)为(93.40± 1.56)%, FP 和 TRAIL 联合组(F+T)为(48.02± 1.35)%, siRNA-Livin 处理组为(50.88± 1.14)%, 1.2 μg/mL Cisplatin 处理组为(19.30± 0.89)%, siRNA-livin+Cisplatin 组为(14.37± 0.81)%, FP+T+Cisplatin 组为(10.86± 0.87)%, C 组存活率为 100%。F+T 组对细胞的增殖抑制作用显著高于单独用药组, siRNA-livin+Cisplatin 与 siRNA-Livin 组相比, FP+T+Cisplatin 与 FP+T 组相比都显著增强了化疗药物对 SPC-A1 的杀伤作用。50 μmol/LZ-VAD-FMK 预处理后联合用药组细胞的存活率为(88.16± 1.64)%, caspase 抑制剂能明显抑制 F+T 联合处理组的凋亡效应。**结论:** RNA 干扰和 F+T 联合用药都能显著降低凋亡抑制蛋白 Livin 的表达,有效抑制肿瘤细胞的增殖生长,并增强肿瘤细胞对化疗药物顺铂的敏感性,为肺腺癌的靶向治疗提供新的理论依据。

关键词: Livin; RNA 干扰; Flavopiridol; TRAIL; 顺铂; SPC-A1

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)06-1036-05

Inhibition of Livin Expression Suppresses Cell Proliferation and Enhances the Chemosensitivity to Cisplatin in Human Lung Adenocarcinoma Cells*

ZHUANG Li, DONG Chao, YANG Run-xiang, GAO Chun-lin

(Medical Oncology, Yunnan Cancer Hospital, Affiliated to Kunming Medical College, Kunming, Yunnan, 650118, China)

ABSTRACT Objective: Livin is a novel member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family that has been reported to be overexpressed in a variety of human malignancies. In order to investigate how depletion of Livin affects the proliferation of human lung adenocarcinoma cells, we used two quite different ways to down-regulate the livin expression, including RNAi-based approach specifically targeting Livin mRNA and the synergistic inhibitory effect between Flavopiridol and TRAIL. **Methods:** The siRNA recombinant expression vectors targeting Livin gene were transfected into SPC-A1 cells with Lipofectamine 2000. Real-time PCR was used to detect the expression of Livin mRNA. And the cell proliferation and viability was measured by MTT assay. The apoptosis inhibitory effect of Flavopiridol and TRAIL used singly and combinedly was also studied in SPC-A1. Western blotting analysis was used to confirm the expression of Livin protein. Cell proliferation and viability was tested by MTT assay. **Results:** The survival rate of each group was showed as follows: the Flavopiridol treatment group was (84.30± 1.34) %, the TRAIL treatment was (93.40± 1.56) %, the FP and TRAIL combination treatment group was (48.02± 1.35) %, the siRNA-Livin treatment group was (50.88± 1.14) %, the Cisplatin treatment group was (19.30± 0.89)%, the siRNA-livin and Cisplatin combination group was (14.37± 0.81) %, the FP and TRAIL and Cisplatin combination group was (10.86± 0.87) %, the Caspase inhibitor Z-VAD-FMK treatment group was (88.16± 1.64) %, the negative control group was 100 %. The survival rate of FP and TRAIL combination group was much lower than the FP group and TRAIL group. **Conclusion:** Both the RNA interference and FT synergistic could obviously inhibited the expression of Livin, effectively decreased the proliferation of SPC-A1 cells, and promoted the sensitivity of chemotherapeutic medicine cisplatin. All of this provide new theoretical foundation for the targeted therapy of lung cancer.

Key words: Livin; RNA interference; Flavopiridol; TRAIL; Cisplatin; SPC-A1

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1036-05

* 基金项目: 云南省科技厅应用基础研究基金计划面上项目(2010ZC131)

作者简介: 庄莉(1970-), 女, 硕士, 副教授, 副主任医师, 主要研究方向: 肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、淋巴瘤等常见肿瘤的诊断和综合治疗, E-mail: zhuanglikxy@126.com, 电话: 86-871-8185730

(收稿日期: 2014-03-07 接受日期: 2014-03-20)

前言

肺癌的发生、发展是一个多因素、多步骤参与的复杂过程,除了抑癌基因的失活和原癌基因的激活外,还涉及凋亡调控基因及关键性转录调控因子的异常表达。通过基因重组技术抑制肿瘤抗凋亡基因表达,可选择性诱导肿瘤细胞发生凋亡,对于迅速有效地清除肿瘤细胞具有重要意义,是肿瘤基因治疗的一项重要策略^[1]。选择肿瘤细胞特异表达基因并特异性地抑制其表达,是靶向诱导肿瘤细胞凋亡的关键^[2]。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)是TNF超家族成员,它与死亡受体DR4和DR5相结合,可有效激活细胞内的信号转导途径,特异性诱导肿瘤细胞的凋亡,对机体正常组织无明显毒副作用,是研究肿瘤细胞凋亡机制的最重要细胞因子之一^[3]。夫拉平度(flavopiridol,FP)是一种强有力的小分子细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂,可有效阻滞肿瘤细胞周期进程和诱导肿瘤细胞凋亡。TRAIL和化疗药物协同作用,可显著提升肿瘤细胞对TRAIL的敏感性,增加其凋亡诱导作用,缩减化疗药物的使用剂量,减少化疗药物的毒性^[4-6]。

Livin,凋亡抑制蛋白家族(inhibitors of apoptosis proteins,I-APs)中的新成员,已被证明在多种肿瘤组织中有表达^[7-17],在细胞的凋亡、增殖以及细胞周期的调控中起着举足轻重的作用^[18]。通过沉默livin基因,可以有效地抑制肿瘤细胞的增殖与迁移,促进癌细胞凋亡并增强化疗药物的敏感性^[19-28],siRNA-livin的凋亡抑制作用在肺腺癌中却鲜有报道。He等^[6]研究表明,Flavopiridol能显著增强TRAIL诱导SPC-A1细胞凋亡的作用,此协同凋亡效应与抗凋亡基因Livin的蛋白表达显著降低有关,是否增强化疗药物的敏感性尚无相关报道。

本研究利用siRNA沉默肺腺癌细胞中Livin基因的表达,观察对肿瘤细胞的增殖及化疗敏感性的影响,同时研究了Flavopiridol与TRAIL协同对SPC-A1的凋亡诱导及化疗增敏作用。本研究不仅拓展了肺腺癌靶向治疗的途径,更为进一步发现特异性凋亡调控药物靶点及信号通路提供更多的实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

人肺腺癌细胞株SPC-A1细胞购自南京凯基生物有限公司,DMEM培养液、FBA胎牛血清购自美国Gibco公司,Livin siRNA和Control siRNA由北京华大基因公司合成,转染试剂LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司,鼠抗人 β -actin单抗、人抗Livin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体购自美国Santa Cruz公司,MTT试剂盒购自上海生工生物工程公司,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒、荧光定量PCR试剂盒、total RNA提取试剂购自大连TAKARA公司,蛋白浓度测定试剂盒、ECL底物化学发光检测试剂盒购自美国Thermo Scientific公司,TRAIL购自德国Merk Millipore公司,Flavopiridol购自美国SIGMA公司,光谱Caspase抑制剂Z-VAD-FMK购自美国R&D Systems公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 人肺腺癌细胞株SPC-A1用10%胎

牛血清的DMEM培养液培养,培养至对数生长期,以每孔 2×10^5 细胞接种至六孔板,37℃、5%CO₂过夜,待细胞生长至40%~50%密度时,Lipofectamine 2000进行转染,DMEM培养液将2.5 μ L siRNA、5 μ L Lipofectamine 2000分别稀释至250 μ L,将两者混匀,室温放置20 min后加入6孔板,使终浓度达到20 nmol/L。37℃、5%CO₂继续培养24 h换新鲜完全培养液。

1.2.2 siRNA序列的设计 首先根据GenBank的人源Livin基因序列和siRNA设计原则,应用Ambion生物公司的在线设计软件(siRNA Target Finder and Design tools)设计siRNA,将候选序列在BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)中进行序列比对,排除与其他基因编码序列或EST有同源性。最后选择2个siRNA,siRNA-Livin180和siRNA-Livin790,长度均为19 bp(表1),阴性对照(negative control-siRNA,NC-siRNA)为随机选取的siRNA序列。Livin-siRNA、NC-siRNA均由华大基因公司合成。

表1 Livin-siRNA的序列(小干扰RNA)

Table 1 Sequence of Livin-siRNAs (small interfering RNA)

SiRNA	Sequence
siRNA-Livin790	5'-GAGAGGUCCAGUCUGAAAG-3'
	5'-CUUUCAGACUGGACCUCUC-3'
SiRNA-Livin180	5'-CCUAAAGACAGUGCCAAGU-3'
	5'-ACUUGGCACUGUCUUUAGG-3'

1.2.3 细胞存活和增殖能力的MTT检测 以每孔 5×10^4 的密度接种SPC-A1细胞于24孔板,细胞贴壁后按组别分别处理。C组为Negative Control;FP组为培养液中加入100 nmol/L的Flavopiridol;T组为培养液中加入100 ng/mL的TRAIL;Cisplatin组为培养液中加入1.2 μ g/mL的顺铂;F+T组为培养液中加入100 nmol/L的FP,培养24 h,再加入100 ng/mL的TRAIL;FP+T+cisplatin组为细胞含100 nmol/L FP、100 ng/mL TRAIL培养液培养24 h后,再加入1.2 μ g/mL的顺铂;Livin-siRNA细胞组为livin干扰实验组;Livin-siRNA+cisplatin细胞组为转染siRNA-livin后,再加入1.2 μ g/mL的顺铂;Z-VAD-FMK组为Flavopiridol处理24 h后,加50 μ mol/L的Z-VAD-FMK作用3 h,再加入TRAIL。药物作用48 h后,每孔加入110 μ L含有10 μ L 5 g/L MTT的DMEM,37℃下温育4 h,每孔再加250 μ L的DMSO,振荡10 min,待结晶物完全溶解后测定波长570 nm处的吸光度值,每组复孔取平均值,计算肺癌细胞的存活率(lung-cancer cell survival,LCS)。肺癌细胞存活率=[实验孔A值-空白孔A值]/[对照孔A值-空白孔A值] $\times 100\%$ 。

1.2.4 Western blot检测Livin蛋白表达水平 收集转染48 h的各组细胞,PBS洗涤,加蛋白裂解液,14000 r/min离心10 min后吸取上清液,提取总蛋白。行SDS-PAGE电泳,将聚丙烯酰胺凝胶转移至缓冲液中平衡15 min,转至NC膜,脱脂奶粉室温封闭1 h,加一抗4℃过夜,次日37℃复温30 min,磷酸缓冲液振荡漂洗3次,每次5 min,加HRP二抗,37℃温育2 h,缓冲液振荡漂洗4次,每次3 min,双蒸水漂洗1次3 min,ECL显

色拍照。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测 Livin mRNA 表达水平 收集转染 48 h 的各組细胞, Trizol 法提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 随后进行目的片段的扩增。Livin 基因的引物序列: 上游 5'-GGA-GAGAGGTCCAGTCTGAAAGT-3', 下游 5'-ACCTTGCACGTCCTCTCCTC-3'; HBOA 基因的引物序列: 上游 5'-ATCAAA-GAAATCAGTCAGGAGACG-3', 下游 5'-CTCTTTGGCTATC-CACTCATCAAT-3'。25 μ L 荧光定量 PCR 体系: ddH₂O 8.5 μ L, 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μ L, cDNA 溶液 2 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s(测荧光 1 次)进行 40 个循环; 之后从 60 $^{\circ}$ C 至 95 $^{\circ}$ C, 以 0.2 $^{\circ}$ C 台阶升温, 进行熔解曲线分析。各組样品设 3 个复孔, 以 HBOA 为内参照, 以 0 mg/ml 组为标准对照比较, 计算 Δ Ct 值及 $\Delta\Delta$ Ct 值: Δ Ct=Ct(Livin)-Ct(HBOA), $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct(实验组)- Δ Ct(对照组), 以 $\Delta\Delta$ Ct 均值进行组间比较, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件分析, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Livin 在 SPC-A1 中的表达

免疫印迹检测 Livin 蛋白在人肺腺癌 SPC-A1 细胞系、人肺腺癌 A549 细胞系、人宫颈癌 Hale 细胞系和人乳腺癌 MCF-7 细胞系中的表达, 图 1 可见, Livin 蛋白在 SPC-A1 中有高表达。

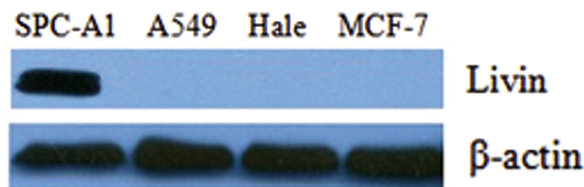


图 1 Livin 在 SPC-A1 中的表达

Fig. 1 The expression of Livin protein in human SPC-A1

2.2 Livin siRNA 对 SPC-A1 细胞 Livin 表达的影响

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 转染 si-Livin180 与 si-Livin790 后, Livin mRNA 的表达量分别下调至 NC-siRNA 组的(52 $\pm$ 1.21)%和(64.4 $\pm$ 1.7)%, 可见 siRNA-Livin790 明显阻断了人肺腺癌细胞中 Livin mRNA 的表达(图 2), 因此后续实验选择 siRNA-Livin790 为干扰实验组。

2.3 FP 和 TRAIL 对 livin 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, T、F、T+F 组处理 48 h 后, F+T 联合作用使凋亡抑制蛋白 Livin 表达水平显著降低。与对照组相比, TRAIL 和 Flavopiridol 单独处理 SPC-A1 细胞时, Livin 蛋白表达水平无明显差异(图 3)。

2.4 Z-VAD-FMK 对 Livin 凋亡蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, FT 联合作用能显著降低 Livin 蛋白的表达水平, 而 Z-VAD-FMK 能有效的抑制 FT 的这种联合作用(图 4), 即 Caspase 抑制剂能有效抑制 FT 联合作用产生的凋亡效应。

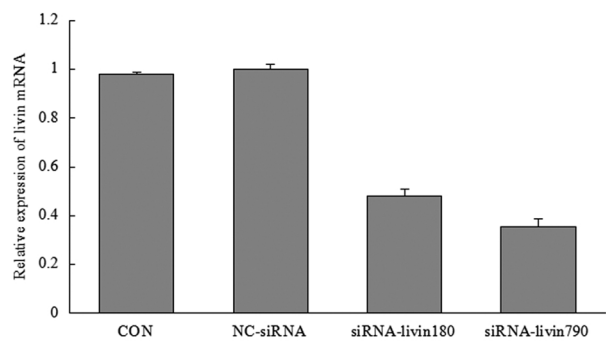


图 2 Real-Time PCR 检测 RNA 干扰后的 Livin 基因表达

Fig. 2 Livin mRNA expression level in human SPC-A1.

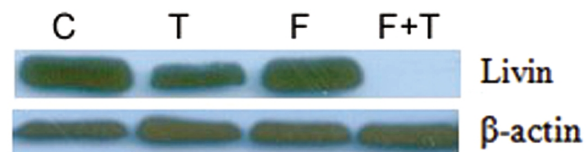


图 3 Flavopiridol(F)、TRAIL(T)用药后 Livin 蛋白的表达

Fig. 3 Synergistic inhibitory effect between Flavopiridol and TRAIL on livin protein expression. Flavopiridol treatment group was named as F group. TRAIL treatment group was named as T group. Synergistic treatment group was named as F+T group

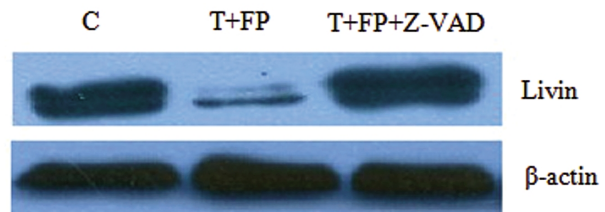


图 4 抑制剂 Z-VAD-FMK 处理后 Livin 蛋白的表达

Fig. 4 Effect of caspase inhibitor Z-VAD-FMK on livin protein expression

2.5 干预 Livin 对 SPC-A1 细胞凋亡的影响

F 组存活率为(84.30 $\pm$ 1.34)%, T 组存活率为(93.40 $\pm$ 1.56)%, F+T 组存活率为(48.02 $\pm$ 1.35)%, siRNA-Livin 组存活率为(50.88 $\pm$ 1.14)%, Cisplatin 组存活率为(19.30 $\pm$ 0.89)%, siRNA-livin+Cisplatin 组存活率为(14.37 $\pm$ 0.81)%, FP+T+Cisplatin 组存活率为(10.86 $\pm$ 0.87)%, C 组存活率为 100%。F+T 组对细胞的增殖抑制作用显著高于单独用药组, siRNA-livin+Cisplatin 与 siRNA-Livin 组相比, FP+T+Cisplatin 与 FP+T 组相比都显著增强了化疗药物对 SPC-A1 的杀伤作用。Z-VAD-FMK 预处理后联合用药组细胞的存活率为(88.16 $\pm$ 1.64)%, caspase 抑制剂能有效抑制 FT 联合作用产生的凋亡诱导效应(图 5)。

3 讨论

凋亡抑制蛋白(Inhibitor of Apoptosis family of proteins, IAPs)家族是近年来发现的一类内源性细胞凋亡抑制蛋白, 主要通过抑制凋亡蛋白酶 Caspase 的级联反应, 阻断死亡受体 TNFR 介导的凋亡信号转导, 与 NF- κ B 相互作用发挥抗细胞凋亡作用^[20]。IAP 家族有多个家族成员, 包括 X 染色体相关性 IAP(XIAP)、NAIP、c-IAP-1 (BIRC2)、c-IAP-2 (BIRC3)、BRUCE

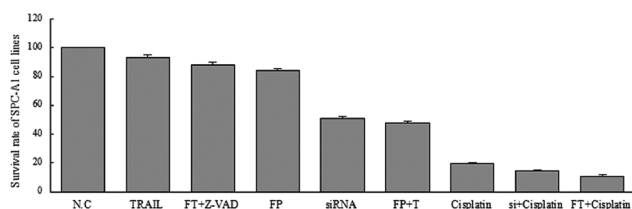


图5 MTT 检测干预 Livin 对细胞增殖的影响,抑制 livin 能显著降低 SPC-A1 的细胞增殖并增强化疗效果

Fig. 5 Effect of livin inhibition on cell proliferation. MTT assay was to investigate the proliferative activities of SPC-A1 cells and indicated that suppression of livin significantly diminished proliferative activities of SPC-A1 cells, and this suppression effect unexpectedly improved the chemotherapy drug's therapeutic effect

(BIRC6、APOLLON)、Ts-IAP(ILP-2、BIRC8)、Survivin(BIRC5)和 livin(BIRC7、KIAP 和 ML-IAP)^[30]。IAPs 家族结构高度保守,氨基端有 70 个氨基酸串联的杆状病毒 IAP 重复序列(baculoviral IAP repeats, BIRs),是 IAPs 家族抑制细胞凋亡所必需,相邻的羧基末端含有由 7 个 Cys 和 1 个 His 通过与 Zn²⁺ 结合而形成的锌指样稳定结构(Ring 结构域),具有 E3 泛素连接酶活性^[31],对细胞的生长与凋亡起到平衡作用^[32]。

Livin 是 IAPs 家族中的重要成员,全长 4.6kb,位于 20 号染色体长臂 1 区 3 带 20q13.3,由 6 个内含子与 7 个外显子组成^[33]。多项研究证明,Livin 在多种肿瘤组织中有表达,包括膀胱癌^[7,8]、非小细胞肺癌^[9]、鼻咽癌^[10]、肾癌^[11]、肝癌^[12]、成神经细胞瘤^[13]、结肠癌^[14]、黑色素瘤^[15]、骨肉瘤^[16]、胃癌^[17]等,通过抑制抗凋亡基因 Livin 的表达,增加肿瘤细胞凋亡的敏感性,增强放化疗药物对肿瘤细胞的杀伤性,提高化疗药物效价,为恶性肿瘤的治疗提供新的方法。本研究将 siRNA 沉默技术应用于人肺腺癌 SPC-A1,靶向沉默 livin,经 RT-PCR 证实,RNA 干扰后 livin mRNA 的表达量明显低于对照组。经过对细胞系生长的观察,成功抑制 livin 基因的肿瘤细胞其生长速度明显减慢,凋亡明显,出现了生长、增殖抑制。实验结果显示,靶向沉默 livin,不仅能够显著降低肿瘤细胞的增殖能力,更加增强了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,加快恶性肿瘤细胞的凋亡。关于 Livin 在肺腺癌中的信号通路还需进一步的深入研究。Yang D 等^[34]在研究中发现,丝裂霉素、TNF- α 、caspase-3、caspase-9 可能参与敲除 livin 基因所激活的凋亡通路。Ou J 等^[35]的研究证明,敲除 livin 基因通过阻断 MAPK 通路抑制胃癌细胞的增殖与侵袭。

TRAIL 和化疗药物协同作用,可显著提升肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性,增加其凋亡诱导作用,缩减化疗药物的使用剂量,减少化疗药物的毒性^[5]。本研究结果显示,FP 和 TRAIL 单独作用时,Livin 蛋白表达都无明显改变,FP 与 TRAIL 联合用药诱导 SPC-A1 凋亡的过程中,凋亡抑制蛋白 Livin 的表达明显下降,表明 Livin 参与 FP 增强 TRAIL 介导的凋亡诱导通路,这与 He 等^[6]获得的实验结果一致。FT 联合化疗药物顺铂对肿瘤细胞的杀伤作用更加明显,更进一步增强 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的能力,FT 的凋亡抑制作用甚至比沉默 livin 基因更加明显。

综上所述,siRNA 沉默 Livin 及 Flavopiridol 与 TRAIL 联合用药可明显抑制 Livin 的表达,并显著性抑制 SPC-A1 肿瘤细胞的增殖,大大增强其对化疗药物顺铂的敏感性,有望成为肺腺癌基因治疗的新靶点。目前对于 Livin 的各项研究还处于试验阶段,还需要大量的动物及临床试验来证实 Livin 的医疗价值,相信对 Livin 的进一步研究能对肿瘤治疗提供新的途径。

参考文献(References)

- [1] Furusu A, Nakayama K, Xu Q, et al. Expression, regulation and function of inhibitor of apoptosis family genes in rat mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(2): 579-586
- [2] Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 153-159
- [3] Yasuda H, Tanaka K, Okita Y, et al. CD133, OCT4 and NANOG in ulcerative colitis-associated colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(6): 1065-1071
- [4] Li X, Wang J, Xu Z, et al. Expression of sox2 and oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 7663-7675
- [5] Trinh DT, Shibata K, Hirose T, et al. Diagnostic utility of CD117, CD133, SALL4, OCT4, TLI1 and glypican-3 in malignant germ cell tumors of the ovary[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2012, 38(5): 841-848
- [6] He YQ, Zhuang li, Liu SY, et al. Mechanism of the apoptosis induction by Flavopiridol synergizes TRAIL in SPC-A1 cell[J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2013, 20(10): 730-733
- [7] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(1): 85-90
- [8] Xi RC, Sheng YR, Chen WH, et al. Expression of survivin and livin predicts early recurrence in non-muscle invasive bladder cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(5): 550-554
- [9] Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, et al. Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2004, 46(3): 299-304
- [10] Xiang Y, Yao H, Wang S, et al. Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(1): 126-130
- [11] Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, et al. Expression of the apoptosis inhibitor livin in renal cell carcinomas: correlations with pathology and outcome[J]. *Tumour Biol*, 2007, 28(3): 132-138
- [12] Augello C, Caruso L, Maggioni M, et al. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 125
- [13] Dasgupta A, Alvarado CS, Xu Z, et al. Expression and functional role of inhibitor-of-apoptosis protein livin (BIRC7) in neuroblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(1): 53-59
- [14] Xi RC, Biao WS, Gang ZZ. Significant elevation of survivin and livin expression in human colorectal cancer: inverse correlation between expression and overall survival[J]. *Onkologie*, 2011, 34(8-9): 428-432
- [15] Lazar I, Perlman R, Lotem M, et al. The clinical effect of the inhibitor

- of apoptosis protein livin in melanoma [J]. *Oncology*, 2012, 82(4): 197-204
- [16] Li X, Fan S, Li L, et al. RNA interference-mediated knockdown of Livin suppresses cell proliferation and invasion and enhances the chemosensitivity to cisplatin in human osteosarcoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1): 159-168
- [17] Liang YZ, Fang TY, Xu HG, et al. Expression of CD44v6 and Livin in gastric cancer tissue[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(17): 3161-3165
- [18] Dasgupta A, Alvarado S, Xu Z, et al. Expression and functional role of inhibitor-of-apoptosis protein livin (BIRC7) in neuroblastoma[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 400(1): 53-59
- [19] Yu L, Wang Z. Effects of Livin gene RNA interference on apoptosis of cervical cancer HeLa cells and enhanced sensitivity to cisplatin[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(5): 625-630
- [20] Wang TS, Ding QQ, Guo RH, et al. Expression of livin in gastric cancer and induction of apoptosis in SGC-7901 cells by shRNA-mediated silencing of livin gene [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(5): 333-338
- [21] Yang D, Song X, Zhang J, et al. Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(2): 137-144
- [22] Wang X, Xu J, Ju S, et al. Livin gene plays a role in drug resistance of colon cancer cells[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(7-8): 655-660
- [23] Yang D, Song X, Zhang J, et al. Suppression of livin gene expression by siRNA leads to growth inhibition and apoptosis induction in human bladder cancer T24 cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(5): 1039-1044
- [24] Liu H, Wang S, Sun H, et al. Inhibition of tumorigenesis and invasion of hepatocellular carcinoma by siRNA-mediated silencing of the livin gene[J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(6): 903-907
- [25] Yuan B, Ran B, Wang S, et al. siRNA directed against Livin inhibits tumor growth and induces apoptosis in human glioma cells [J]. *J Neurooncol*, 2012, 107(1): 81-87
- [26] Chen F, Yang D, Wang S, et al. Livin regulates prostate cancer cell invasion by impacting the NF-kappaB signaling pathway and the expression of FN and CXCR4[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(3): 274-283
- [27] Liu X, Wang A, Gao H, et al. Expression and role of the inhibitor of apoptosis protein livin in chemotherapy sensitivity of ovarian carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(3): 1021-1028
- [28] Wang XT, Xie YB, Xiao Q. siRNA targeting of Cdx2 inhibits growth of human gastric cancer MGC-803 cells [J]. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2012, 18(16): 1903-1914
- [29] Wang CP, Gong LJ. Inhibitor of apoptosis family of proteins: IAPs [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Pathophysiology and Clinical Medicine*, 2001, 21(1): 10-12
- [30] Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(6): 401-410
- [31] Yan B, Kong M, Chen S, et al. VEGF stimulation enhances Livin protein synthesis through mTOR signaling [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 111(5): 1114-1124
- [32] Abd-Elrahman I, Hershko K, Neuman T, et al. The inhibitor of apoptosis protein Livin (ML-IAP) plays a dual role in tumorigenicity [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(13): 5475-5480
- [33] Run J, Huang HR. Research progress of the inhibitor of apoptosis protein Livin[J]. *Journal of Guangdong Medical College*, 2008, 26(1): 68-71
- [34] Yang D, Song X, Zhang J, et al. Suppression of livin gene expression by siRNA leads to growth inhibition and apoptosis induction in human bladder cancer T24 cells [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2010, 74(5): 1039-1044
- [35] Ou JM, Ye B, Qiu MK. et al. Knockdown of Livin inhibits growth and invasion of gastric cancer cells through blockade of the MAPK pathway in vitro and in vivo[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(1): 276-284