

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00813

小干扰 RNA 抑制 $\Delta Np63\alpha$ 表达对人食管鳞癌细胞生物学特性的影响

李白翎¹, 杜大海², 张冠鑫¹, 徐志云^{1*}

1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过腺相关病毒介导的小干扰 RNA (siRNA) 抑制人食管鳞癌细胞 Eca109 中 $\Delta Np63\alpha$ 的表达, 观察其对食管鳞癌细胞生物学特性的影响。 **方法** 构建 H1 启动子驱动的表达针对 $\Delta Np63\alpha$ 的 siRNA 重组腺相关病毒 AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 并感染 Eca109 细胞。同时以感染空腺相关病毒 AAV-Null 的细胞及不加腺相关病毒的细胞分别作为对照组和空白对照组, 观察 siRNA 干扰 $\Delta Np63\alpha$ 表达在体外及体内对 Eca109 细胞生长、增殖、致瘤及凋亡的影响。 **结果** 与对照组和空白对照组比较, Eca109 细胞感染 AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 后 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白表达下降 (P 均 < 0.05), 细胞生长速度减慢 (P 均 < 0.05), 细胞增殖指数 (proliferation index, PI) 降低 (P 均 < 0.01), 裸鼠瘤体质量减轻 (P 均 < 0.05), 细胞凋亡增加 (P 均 < 0.05)。 **结论** 腺相关病毒介导的 siRNA 干扰能显著抑制 Eca109 细胞 $\Delta Np63\alpha$ 的表达, 减慢肿瘤细胞的增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤生长。

[关键词] $\Delta Np63\alpha$; 食管肿瘤; 鳞状细胞肿瘤; Eca109 细胞株; 腺相关病毒; RNA 干扰

[中图分类号] R 735.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0813-06

Effect of small interfering RNA targeting $\Delta Np63\alpha$ gene on the biological characteristics of human esophageal squamous carcinoma cells

LI Bai-ling¹, DU Da-hai², ZHANG Guan-xin¹, XU Zhi-yun^{1*}

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To construct a small interfering RNA (siRNA) vector targeting $\Delta Np63\alpha$ and investigate $\Delta Np63\alpha$ gene interference on the proliferation and apoptosis of human esophageal squamous carcinoma Eca109 cell line. **Methods** Adeno-associated virus (AAV)- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ driven by H1 promoter was constructed and was used to infect Eca109 cells. AAV-Null and normal cell lines were utilized in the control group and blank control group, respectively. The influence of siRNA interference of $\Delta Np63\alpha$ expression on the growth, proliferation, tumorigenic efficiency and apoptosis of Eca109 cells were analyzed *in vitro* and *in vivo*. **Results** Compared with the two control groups, the specific siRNA targeting $\Delta Np63\alpha$ gene significantly down-regulated the expression of $\Delta Np63\alpha$ protein levels in Eca109 cells (all $P < 0.05$). The growth of Eca109 cells infected with AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ was significantly lower than those in the two control groups (all $P < 0.05$). Cell cycle analysis showed the proliferation index (PI) of AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ infected cell line was significantly lower compared with the two control groups (all $P < 0.01$). *In vivo* experiment exhibited that AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ infected cells resulted in a lower tumor weight in nude mice compared with the cells in the two control groups (all $P < 0.05$). In addition, the apoptosis index (AI) of AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ infected cells were significantly higher than those of the other cell lines ($P < 0.05$). **Conclusion** AAV-mediated expression of siRNA can significantly reduce $\Delta Np63\alpha$ expression in Eca109 cells, slowing down the proliferation, promoting the apoptosis, and subsequently inhibiting the growth of tumor.

[Key words] $\Delta Np63\alpha$; esophageal neoplasms; squamous cell neoplasms; Eca109 cell line; adeno-associated virus; RNA interference

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8): 813-818]

[收稿日期] 2013-04-24 **[接受日期]** 2013-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (81201780), 上海市科委医学引导类科技项目 (114119a9300). Supported by National Natural Science Foundation of China (81201780) and Medical Guide Program of Shanghai Science and Technology Committee (114119a9300).

[作者简介] 李白翎, 硕士, 副主任医师. E-mail: smmu_libailing@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161761, E-mail: zhiyunx@hotmail.com

P63 作为公认的表皮干细胞标记物,在各种上皮组织的正常分化和细胞形态的维持中具有重要功能^[1]。P63 基因常见的异构体分为 2 种:含转录激活区的 *TAp63* 型和无转录激活区的 $\Delta Np63$ 型;前者具有肿瘤抑制因子活性,而后者具有原癌基因活性^[2];并且 $\Delta Np63\alpha$ 亚型是其活性最强的一种。既往研究发现,食管鳞癌组织中 $\Delta Np63\alpha$ 表达显著上升,并通过调节一系列的基因表达改变细胞内外的微环境,使上皮干细胞在脱离基底膜后仍然维持低分化状态及其增殖特性,不断分裂增殖,从而促进肿瘤的增长与转移^[3]。目前有关 $\Delta Np63\alpha$ 在食管鳞癌中的作用机制报道尚少。本研究采用针对 $\Delta Np63\alpha$ 的小干扰 RNA (siRNA) 重组腺相关病毒 AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 感染食管鳞癌细胞 Eca109,通过抑制 $\Delta Np63\alpha$ 表达观察癌细胞生物学特性的变化,探讨 $\Delta Np63\alpha$ 在食管鳞癌发生、发展过程中的作用及其可能的机制和途径。

1 材料和方法

1.1 材料 由 H1 启动子驱动的重组腺相关病毒 AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 由解放军胸心外科研究所制备完成;空腺相关病毒 AAV-Null 为自制;人食管鳞癌细胞株 Eca109 购自中国科学院上海细胞生物学研究所;SPF 级 BALB/c 4~6 周龄雌性裸鼠由第二军医大学实验动物中心提供;小鼠抗人 $\Delta Np63\alpha$ 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;胎牛血清、DMEM、RPMI 1640 培养液为美国 Gibco 公司产品;感染试剂购自美国 Invitrogen 公司;免疫组化试剂盒购自美国 BioGenex Lab 公司;MTT 检测试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞感染及分组 24 孔培养板培养 Eca109 细胞至约 80% 融合时,根据随机对照表,取 3 孔细胞计数,按感染复数 (MOI) 值 100 加入重组腺相关病毒 AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ (实验组)。另取 3 孔细胞计数后按 MOI 值 100 加入空腺相关病毒 AAV-Null (对照组),再取 3 孔细胞计数后不加腺相关病毒 (空白对照组)。

1.3 蛋白质印迹分析检测蛋白表达 分别收集培养 48 h 后的实验组、对照组及空白对照组 Eca109 细胞,用 5% SDS 裂解细胞,细胞裂解上清液经

SDS-PAGE 分离后,转印至硝酸纤维素膜上,经过小鼠抗人 $\Delta Np63\alpha$ 单克隆抗体 (工作浓度为 1:400) 和羊抗小鼠 IgG-HRP 多克隆抗体 (工作浓度为 1:400) 二步免疫反应,化学发光、显影,以 GAPDH 为内参照。用 Bio-Rad 图像分析系统成像并分析,以目的蛋白条带的灰度值与 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值表示蛋白相对表达量。

1.4 MTT 法检测细胞生长情况 Eca109 细胞接种于 96 孔板后,分别于接种后的 1、2、3、4、5 d 每孔加入 20 μ g MTT (5 g/L),4 h 后弃上清,加 150 μ L 二甲亚砜 (DMSO),振荡 10 min 至紫色结晶完全溶解,用酶标仪在 490 nm 波长处测各孔光密度值 (D 值)。实验重复 3 次,绘制细胞生长曲线。

1.5 细胞周期分析 分别收集各组的对数生长期 Eca109 细胞,按常规方法进行细胞周期检测,计算细胞的增殖指数 (proliferation index, PI): $PI = (S + G_2) / (S + G_2 + G_1)$ 。

1.6 裸鼠成瘤实验 实验裸鼠随机分为 3 组,分组同前,每组 6 只。在裸鼠背部皮下注射对数生长期 Eca109 细胞 0.2 mL (2×10^7 个)。当裸鼠皮下形成种植瘤后 (约在 Eca109 细胞注射 1 周左右出现肉眼可见的瘤体),用 1 mL 注射器抽取 100 μ L 7.0×10^7 IU/mL 的 AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$,在肿瘤长径注射点多方向瘤内注射,对照组与空白对照组分别注射等量的空病毒和 PBS。隔日 1 次,共 5 次。接种 30 d 后处死裸鼠,取出瘤体称质量。

1.7 免疫组化染色及结果判定标准 裸鼠移植瘤标本均经 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋。常规制备 5~6 μ m 厚连续切片,用于免疫组化染色。免疫组化染色采用 SABC 法,高温抗原修复,染色程序参照说明书进行。用已知阳性切片作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。

$\Delta Np63\alpha$ 主要表达于细胞核中,染色呈棕黄色颗粒。每张切片均随机观察 5 个高倍视野 ($\times 400$) 下的 100 个细胞,用半定量积分法判定结果,阳性着色细胞百分比 $\leq 5\%$ 记为 0 分,6%~25% 记为 1 分,26%~50% 记为 2 分,51%~75% 记为 3 分,76%~100% 记为 4 分;阳性强度以黄色染色记为 1 分,棕黄色记为 2 分,棕褐色记为 3 分。表达强度以两者积分乘积表示,0~5 分为阴性表达,6~12 分为阳性表达。

1.8 TUNEL 法检测细胞凋亡 常规石蜡切片脱蜡至水后用 PBS 冲洗 3 min \times 3 次。20 ng/mL 新配制的蛋白酶 K 在 37 $^{\circ}$ C 下消化 20 min; 0.1 mmol/L 甘氨酸-PBS 洗 5 min, PBS 洗 3 min \times 3 次。加入 30 μ L 的 TUNEL 反应液, 37 $^{\circ}$ C 作用 60 min, PBS 洗 3 min \times 3 次。甘油明胶封片, 显微镜下观察。阳性信号为棕黄色, 局限于细胞核内, 呈圆形、椭圆形、新月体形或环形; 阳性染色的细胞为凋亡细胞^[4]。每组随机选取 12 张切片, 每张切片随机取 3 个阳性视野观察并计数 500 个细胞, 计算细胞凋亡指数(凋亡细胞数占细胞总数的百分比)。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验和方差分析; 计数资料用百分率表示, 采用 χ^2 检验。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 蛋白质印迹分析法检测 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白表达 结果显示, 实验组 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白表达量 (605.13 ± 42.31) 低于对照组 (985.78 ± 59.53) 和空白对照组 ($1\ 015.31\pm 43.62$), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 而对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 1)。

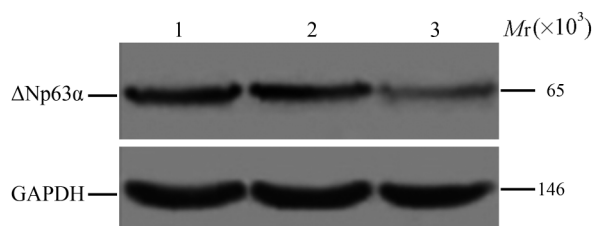


图 1 蛋白质印迹分析检测靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA 干扰后 Eca109 细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白表达
Fig 1 Western blotting analysis of $\Delta Np63\alpha$ protein expression in Eca109 cells after siRNA targeting $\Delta Np63\alpha$

1: AAV-Null group; 2: Normal group; 3: AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ group

2.2 MTT 法检测细胞生长情况 结果显示, 实验组细胞生长曲线较平缓, 细胞生长速度较对照组和空白对照组明显减慢, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 而对照组与空白对照组比较, 细胞生长速度差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图 2)。结果表明靶向

$\Delta Np63\alpha$ siRNA 干扰能抑制细胞的生长。

2.3 细胞周期分析结果 结果显示, 实验组 PI (0.38 ± 0.33) 低于对照组 (0.67 ± 0.25) 和空白对照组 (0.72 ± 0.34), 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 而对照组与空白对照组比较, PI 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果表明靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA 干扰能抑制细胞增殖。

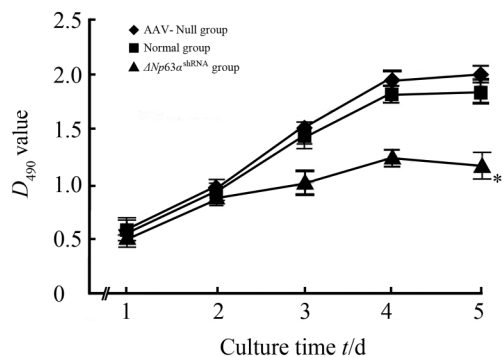


图 2 靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA 干扰后 Eca109 细胞生长曲线

Fig 2 Eca109 cell growth curve after siRNA targeting $\Delta Np63\alpha$

* $P<0.05$ vs AAV-Null group and normal group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.4 裸鼠成瘤实验结果 接种 30 d 后处死裸鼠, 取瘤体称质量。实验组瘤体质量 [(1.27 ± 0.59) g] 较对照组 [(1.96 ± 0.34) g] 和空白对照组 [(2.11 ± 0.47) g] 减轻, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 而对照组与空白对照组比较, 瘤体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果提示靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA 干扰能明显抑制肿瘤生长速度。

2.5 免疫组化染色结果 结果显示, $\Delta Np63\alpha$ 蛋白阳性染色均定位于细胞核内, 呈现棕黄色着色(图 3)。实验组 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白阳性表达率 [$(26\pm 17)\%$] 低于对照组 [$(59\pm 9)\%$] 和空白对照组 [$(58\pm 12)\%$], 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 而对照组与空白对照组比较, $\Delta Np63\alpha$ 蛋白阳性表达率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果表明靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA 干扰后肿瘤组织内 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白表达量降低。

2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡结果 显微镜下观察可见, 实验组肿瘤细胞凋亡增多, 呈簇状分布, 而对照组、空白对照组仅有散在分布的凋亡细胞

(图4)。实验组细胞凋亡指数 $[(14.16 \pm 8.36)\%]$ 高于对照组 $[(8.45 \pm 5.85)\%]$ 和空白对照组 $[(8.91 \pm 7.63)\%]$,差异均有统计学意义 $(P < 0.05)$,而对照

组与空白对照组比较,细胞凋亡指数差异无统计学意义 $(P > 0.05)$ 。

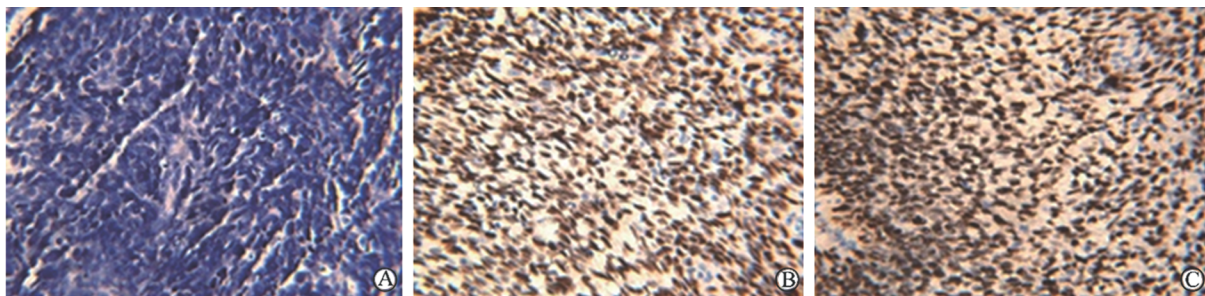


图3 靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA干扰后肿瘤组织 $\Delta Np63\alpha$ 表达的免疫组化分析(SABC法)

Fig 3 $\Delta Np63\alpha$ expression of tumor tissues after siRNA targeting $\Delta Np63\alpha$ by immunohistochemical analysis (SABC method)

A: AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ group; B: AAV-Null group; C: Normal group. Original magnification: $\times 200$

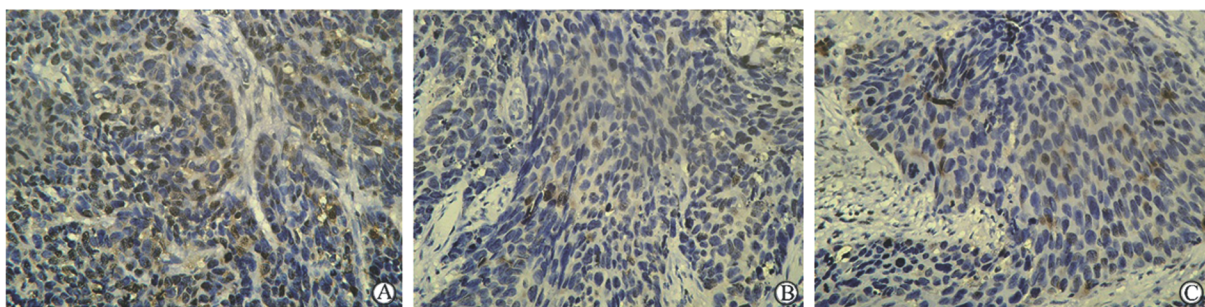


图4 靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA干扰后肿瘤组织细胞凋亡分析

Fig 4 Apoptosis analysis in tumor tissues following siRNA targeting $\Delta Np63\alpha$

A: AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ group; B: AAV-Null group; C: Normal group. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

P63 定位于染色体 3q27~29,该区基因组的异常扩增多见于鳞癌,并且 $\Delta Np63\alpha$ 的表达特点已在食管鳞癌^[5-6]、表皮鳞癌^[7]、头颈部鳞癌^[8]、肺鳞癌^[9]、口腔鳞癌^[10]、鼻咽癌^[11]等多种鳞状上皮源性的恶性肿瘤中证实。目前研究证实,在食管鳞癌组织中表达的主要是 $\Delta Np63\alpha$,而 TAp63 的表达极少或没有;但 $\Delta Np63\alpha$ 在正常食管组织及食管腺癌中表达呈阴性。 $\Delta Np63\alpha$ 在低分化和高分化的鳞状细胞癌中表达有显著差异,在高分化鳞癌中阳性细胞主要分布于癌巢边缘,在巢周呈环样分布;在低分化鳞癌中阳性细胞紊乱地分布于癌巢中央或边缘,强阳性表达率高于高分化鳞癌^[4-5]。以上结果提示 $\Delta Np63\alpha$ 表达与食管鳞癌分化程度有关,呈现出肿瘤分化程度越低, $\Delta Np63\alpha$ 表达越高的趋势。

近期关于 p63 基因功能的研究中,Nature 报道了来自德州大学安德森肿瘤中心 Flores 等学者的研究成果:在头颈部鳞癌组织中 $\Delta Np63\alpha$ 表达的显著上升可能通过调节一系列的基因改变细胞内外的微环境,使上皮干细胞在脱离基底膜后仍然维持低分化状态及其增殖特性,不断分裂增殖^[3]。该研究提示 $\Delta Np63\alpha$ 参与肿瘤发生发展的机制涉及细胞周期调控、凋亡、分化以及细胞黏附迁移等多方面。Keyes 等^[12]在对 $\Delta Np63\alpha$ 功能的研究中发现, $\Delta Np63\alpha$ 具有“类干细胞(stem like)”调控作用,通过对干细胞相关基因的影响,促进肿瘤的发生和增殖。其作用机制可能为抑制人体本身一种体内的抗癌过程——“致癌基因引发的衰老(oncogene-induced senescence, OIS)”而促进肿瘤的发生。 $\Delta Np63\alpha$ 的这种致癌作用是通过上调其下游靶基因染色质重塑蛋白 Lsh(lymphoid-specific helicase)的表达,导致

染色体重建,使表皮干细胞向肿瘤细胞分化。Yang等^[13]研究发现, $\Delta Np63\alpha$ 通过调控NF- κ B家族基因的表达,诱导上皮干细胞分化为头颈部鳞癌细胞,并促进肿瘤增生、转移及炎症反应的发生。Lena等^[14]提出 $\Delta Np63\alpha$ 是头颈部鳞癌干细胞的“干性”调控基因,促进肿瘤的发生、侵袭与转移。 $\Delta Np63\alpha$ 还通过诱导热休克蛋白70(HSP70)的表达、激活 β -catenin信号途径、抑制胰岛素样生长因子结合蛋白3的表达及P73依赖的细胞凋亡途径抑制肿瘤细胞凋亡,参与肿瘤的形成^[15-17]。这些相关研究进一步证实了 $\Delta Np63\alpha$ 在鳞癌干细胞“干性”维持中的重要作用。因此,以 $\Delta Np63\alpha$ 为靶向的基因治疗,可能为提高食管鳞癌的治疗效果提供新的方向。

本实验通过siRNA干扰技术,采用腺相关病毒为载体,将外源性靶向 $\Delta Np63\alpha$ 的siRNA转入人食管鳞癌细胞系Eca109中。运用蛋白质印迹分析法检测siRNA干扰后 $\Delta Np63\alpha$ 蛋白表达情况,结果显示感染后 $\Delta Np63\alpha$ 表达降低($P < 0.05$),提示以腺相关病毒为载体能将靶向 $\Delta Np63\alpha$ 的siRNA高效转入食管鳞癌细胞中,获得满意的干扰效果。我们进一步采用MTT法观察AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 感染的Eca109细胞生长情况,结果表明实验组细胞较空病毒对照组以及空白对照组细胞增殖受到抑制($P < 0.05$)。为明确AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 对Eca109细胞周期和凋亡的影响,我们检测了细胞周期和凋亡的变化,结果显示实验组细胞PI低于空病毒对照组以及空白对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。上述结果表明,AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 有效抑制了食管鳞癌Eca109细胞的体外增殖并诱导其凋亡。

在体内实验中,实验组裸鼠肿瘤细胞生长减慢($P < 0.05$),提示抑制 $\Delta Np63\alpha$ 的表达可使肿瘤生长速度减缓,但不能阻止肿瘤的发生。为进一步证实AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 在体内的作用,我们检测了肿瘤组织中 $\Delta Np63\alpha$ 的表达及细胞凋亡情况。结果发现靶向 $\Delta Np63\alpha$ siRNA干扰后肿瘤组织内 $\Delta Np63\alpha$ 表达量降低($P < 0.05$),肿瘤组织内发现大量凋亡细胞。其作用机制可能为^[18-20]:(1) $\Delta Np63\alpha$ 通过激活细胞生长及增殖相关基因,赋予肿瘤细胞增殖潜能。如 $\Delta Np63\alpha$ 可直接与腺苷脱氨酶(ADA)、脂肪酸合酶(FASN)的p53-RE结合,激活转录。(2) $\Delta Np63\alpha$ 通过负调节某些细胞周期抑制因子促进细

胞增殖;而通过siRNA技术抑制 $\Delta Np63\alpha$ 的表达可以抑制细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡。(3) $\Delta Np63\alpha$ 在快速增殖的细胞中可促进细胞周期运转,而在趋于分化的细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 则扮演周期抑制子的角色。(4) $\Delta Np63\alpha$ 抑制细胞信号通路,经由JNK通路、Notch通路等调节细胞分化过程。阻断Notch信号通路, $\Delta Np63\alpha$ -Notch的平衡受到破坏,细胞可能失去分化能力而不断分裂,获得肿瘤干细胞增殖特性而促进肿瘤发生。

本研究表明AAV- $\Delta Np63\alpha^{shRNA}$ 可有效抑制人食管鳞癌Eca109细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 表达,从而抑制细胞增殖。同时通过荷瘤裸鼠在体实验进一步证明 $\Delta Np63\alpha$ 沉默可抑制Eca109细胞的生长、增殖,促进其凋亡,从而延缓肿瘤生长速度。 $\Delta Np63\alpha$ 与肿瘤发生、发展的关系非常复杂,涉及细胞增殖、凋亡、分化以及细胞黏附迁移等多方面的调控,其在肿瘤调控网络中的具体作用机制等有待进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Abbas O, Richards J E, Yaar R, Mahalingam M. Stem cell markers (cytokeratin 15, cytokeratin 19 and p63) in *in situ* and invasive cutaneous epithelial lesions[J]. Mod Pathol, 2011, 24: 90-97.
- [2] Notari M, Hu Y, Koch S, Lu M, Ratnayaka I, Zhong S, et al. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 16645-16650.
- [3] Su X, Chakravarti D, Cho M S, Liu L, Gi Y J, Lin Y L, et al. TA p63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs [J]. Nature, 2010, 467: 986-990.
- [4] Loo D T. *In situ* detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques [J]. Methods Mol Biol, 2011, 682: 3-13.
- [5] Thépot A, Hautefeuille A, Cros M P, Abedi-Ardekani B, Pétré A, Damour O, et al. Intraepithelial p63-dependent expression of distinct components of cell adhesion complexes in normal esophageal mucosa and squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2010, 127: 2051-2062.

- [6] Herfs M, Hubert P, Suarez-Carmona M, Reschner A, Saussez S, Berx G, et al. Regulation of p63 isoforms by snail and slug transcription factors in human squamous cell carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176:1941-1949.
- [7] Shalom-Feuerstein R, Lena A M, Zhou H, De La Forest Divonne S, Van Bokhoven H, Candi E, et al. Δ Np63 is an ectodermal gatekeeper of epidermal morphogenesis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18:887-896.
- [8] Ehsanian R, Brown M, Lu H, Yang X P, Pattatheyl A, Yan B, et al. YAP dysregulation by phosphorylation or Δ Np63-mediated gene repression promotes proliferation, survival and migration in head and neck cancer subsets[J]. *Oncogene*, 2010, 29:6160-6171.
- [9] Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, et al. p63 and p73 isoform expression in non-small cell lung cancer and corresponding morphological normal lung tissue[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6:473-481.
- [10] Ravindran G, Devaraj H. Aberrant expression of β -catenin and its association with Δ Np63, Notch-1, and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma [J]. *Clin Oral Investig*, 2012, 16:1275-1288.
- [11] Chiang C T, Chu W K, Chow S E, Chen J K. Overexpression of Δ Np63 in a human nasopharyngeal carcinoma cell line downregulates CKIs and enhances cell proliferation[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219:117-122.
- [12] Keyes W M, Pecoraro M, Aranda V, Vernersson-Lindhahl E, Li W, Vogel H, et al. Δ Np63 α is an oncogene that targets chromatin remodeler Lsh to drive skin stem cell proliferation and tumorigenesis[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8:164-176.
- [13] Yang X, Lu H, Yan B, Romano R A, Bian Y, Friedman J, et al. Δ Np63 versatily regulates a Broad *NF- κ B* gene program and promotes squamous epithelial proliferation, migration, and inflammation[J]. *Cancer Res*, 2011, 71:3688-3700.
- [14] Lena A M, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, Aberdam D, Knight R A, Melino G, et al. miR-203 represses 'stemness' by repressing Δ Np63 [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15:1187-1195.
- [15] Bergholz J, Xiao Z X. Role of p63 in development, tumorigenesis and cancer progression[J]. *Cancer Microenviron*, 2012, 5:311-322.
- [16] Suzuki D, Senoo M. Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors[J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132:2461-2464.
- [17] Lefort K, Dotto G P. p63 and epithelial metaplasia: a gutsy choice[J]. *Cell*, 2011, 145:1003-1005.
- [18] Graziano V, De Laurenzi V. Role of p63 in cancer development[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1816:57-66.
- [19] Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2011, 16:296-327.
- [20] Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, et al. p63 and p73 isoform expression in non-small cell lung cancer and corresponding morphological normal lung tissue[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6:473-481.

[本文编辑] 商素芳

· 更正启事 ·

关于《糖尿病肾病患者尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的改变及其临床意义》一文的更正

本刊2012年33卷第9期1032~1034页刊登的吴坚等的论文《糖尿病肾病患者尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的改变及其临床意义》因作者的疏忽,将文中尿微量白蛋白/尿肌酐(uAlb/uCr)的单位误写为mg/mmol,现更正为mg/g(论文网络版已进行了相应更正),并向广大读者致歉。