

USP9X低表达通过下调Mcl-1促进肝癌细胞凋亡

胡惠雯¹ 汤成泳² 蒋清虎¹ 罗伟¹ 刘济铭¹ 魏续福¹ 刘锐¹ 吴忠均^{1*}

(¹重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016; ²重庆医科大学附属第一医院药剂科, 重庆 400016)

摘要 研究抑制泛素特异性蛋白酶9X(ubiquitin-specific protease 9X, USP9X)对人肝癌(primary hepatocellular carcinoma, HCC)细胞SMMC7721和HepG2中髓细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)蛋白的表达调控及对细胞凋亡和生长活力的影响。实验分为USP9X-siRNA组和阴性对照NC组两组进行分析。通过Western blot技术分别检测USP9X在肝癌细胞SMMC7721、HepG2和正常人肝细胞株L02中的蛋白表达情况;应用化学合成USP9X-siRNA转染肝癌细胞SMMC7721和HepG2,通过Western blot、流式细胞仪和MTT检测转染前后Mcl-1的蛋白表达差异以及细胞凋亡和生长活力变化。结果表明,USP9X在肝癌细胞SMMC7721和HepG2中的蛋白表达水平均高于正常肝细胞L02($t=15.155, P=0.000; t=9.171, P=0.001$);SMMC7721和HepG2细胞中抑制USP9X能明显下调Mcl-1的蛋白表达,并导致细胞凋亡增加和生长活力降低。提示,肝癌细胞SMMC7721和HepG2中USP9X表达上调;USP9X表达降低可能通过下调Mcl-1的蛋白表达进而诱导人肝癌细胞SMMC7721和HepG2的凋亡。

关键词 泛素特异性蛋白酶9X;原发性肝细胞肝癌;细胞凋亡;细胞生长活力;髓细胞白血病基因-1

Low Expression of USP9X Promoted Apoptosis of Hepatoma Cells Through Mcl-1 Down-regulation

Hu Huiwen¹, Tang Chengyong², Jiang Qinghu¹, Luo Wei¹, Liu Jiming¹, Wei Xufu¹, Liu Rui¹, Wu Zhongjun^{1*}

(¹Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Clinical Pharmacology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In this paper, we investigated the regulation of inhibiting ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) on myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) protein expression and its effect on apoptosis and viability of human hepatocellular carcinoma (HCC) cells SMMC7721 and HepG2. There were two groups in the study, USP9X-siRNA group and NC group. The protein expression of USP9X was detected in SMMC7721, HepG2 and normal human liver cell line L02. SMMC7721 and HepG2 cells were infected with USP9X-siRNA, and cell apoptosis and cell growth viability were analyzed by flow cytometry and MTT. Mcl-1, a potential target of USP9X, was detected by Western blot. We found that the protein expressions of USP9X in SMMC7721 and HepG2 were both higher than that in L02 ($t=15.155, P=0.000; t=9.171, P=0.001$). Inhibiting expression of USP9X in SMMC7721 and HepG2 cells obviously

收稿日期: 2014-02-15 接受日期: 2014-03-26

国家自然科学基金(批准号: 81171562)、重庆市科委基金项目(批准号: cstc2013yykfA110010)和重庆市渝中区科技计划项目(批准号: 20130118)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012176, E-mail: wzjtcy@126.com

Received: February 15, 2014 Accepted: March 26, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171562), the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.cstc2013yykfA110010) and the Science Foundation of Yuzhong District of Chongqing (Grant No.20130118)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012176, E-mail: wzjtcy@126.com

网络出版时间: 2014-06-26 14:18 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0041.html>

suppressed Mcl-1 protein expression as well as increased cell apoptosis and decreased cell viability. These results suggested that expression of USP9X was upregulated in hepatoma cells SMMC7721 and HepG2, and inhibiting USP9X might induce cell apoptosis in hepatocellular carcinoma cells SMMC7721 and HepG2 by down-regulating Mcl-1 protein expression.

Key words ubiquitin-specific protease 9X; hepatocellular carcinoma; cell apoptosis; cell viability; myeloid cell leukemia-1

原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率极高,而其发生发展是一个复杂的多因素、多步骤过程^[1]。因此,深入研究原发性肝细胞肝癌发生发展的分子机制显得尤为重要。研究发现,泛素特异性蛋白酶9X(ubiquitin-specific protease 9X, USP9X)能通过去泛素化底物蛋白来影响肿瘤细胞增殖、黏附和信号转导,是肿瘤演进的重要因素之一,在调节蛋白酶体的活性、器官的发生、肿瘤的形成以及转录调控等方面都具有重要的作用^[2-6]。目前研究发现,USP9X在淋巴瘤、结肠癌、肺癌和乳腺癌中表达上调,抑制USP9X可通过调控髓细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)蛋白诱导细胞凋亡和抑制增殖^[7-10]。Mcl-1是凋亡抑制蛋白,由于其在肿瘤中高表达而备受关注。Mcl-1在肝癌中也高表达,其高表达与抑制肿瘤细胞凋亡有关^[11-12]。目前,USP9X与肝癌发生发展的关系尚不清楚,本实验通过检测USP9X在肝癌细胞和正常肝细胞中的表达情况,并在肝癌细胞中抑制USP9X表达从而研究其功能,初步探讨USP9X在肝癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(杭州四季清公司);MTT(美国Sigma公司);RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒和Taq DNA聚合酶(TaKaRa公司);兔源抗USP9X抗体(多抗,武汉三鹰生物技术有限公司);鼠源抗Mcl-1抗体(单抗,天津三箭生物技术有限公司);鼠源抗 β -tubulin抗体(单抗,天津三箭生物技术有限公司);ECL化学发光液(碧云天生物技术有限公司);二抗均购于碧云天生物技术有限公司;化学合成siRNA(上海吉玛制药技术有限公司);转染试剂Lipofectamine2000(天津三箭生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞株SMMC7721、HepG2和正常肝细胞株L02购自重庆医科大学生命科学院感染科实验室,以含10%灭活胎牛血清的RPMI1640培养基在37 °C、5% CO₂条件下常规培养。0.125%胰酶消化、传代,取对数生长期细胞进行实验。细胞用siRNA处理细胞48 h后,用于建立下调USP9X的细胞模型。

1.2.2 siRNA干扰 取对数生长期SMMC7721和HepG2细胞接种于6孔板,待长至40%~50%时加入20 μ mol/L的siRNA(NC-siRNA序列,正义链:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义链:5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'; USP9X-siRNA序列,正义链:5'-AGA AAU CGC UGG UAU AAA UUU TT-3',反义链:5'-AAA UUU AUA CCA GCG AUU UCU TT-3')。48 h后收集细胞,提取总RNA和总蛋白质,进行RT-PCR和Western blot分析;或将相同处理的细胞消化、重悬进行凋亡实验。

1.2.3 RT-PCR检测 采用Trizol法提取总RNA,分光光度法检测RNA浓度。参照文献[13]设计引物,以GAPDH为内参基因。取300 ng总RNA按逆转录试剂盒说明书合成cDNA序列,然后进行PCR反应,条件如下:94 °C预变性3 min;94 °C变性30 s,52 °C退火35 s,72 °C延伸50 s,共30个循环;最后72 °C延伸10 min。GAPDH以相同条件反应30个循环。PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳30 min后显影。显影结果经Quantity One软件进行图片分析,计算净光密度值。并以Bio-Image Analysis System进行半定量分析,结果以相对光密度值(relative optical density, ROD) \times 面积(mm²)表示。mRNA的相对含量=(目的条带ROD \times 面积)/(GAPDH条带ROD \times 面积)。USP9X序列(上游引物:5'-AGA TGA CCA AGA TGC CCC AGA TGA G-3',下游引物:5'-TTC ACC GCC TTC ATA ATT TTC TTG TGC-3');GAPDH序列(上游引物:5'-GAG CCA AAA GGG TCA TCA

TCT C-3', 下游引物: 5'-AAA GGT GGA GGA GTG GGT G-3')。

1.2.4 Western blot分析 收集SMMC7721和HepG2细胞, 加入裂解液裂解细胞提取总蛋白。BCA法测定蛋白浓度后, 加入5×蛋白上样缓冲液, 沸水煮10 min。经8% SDS-PAGE电泳分离后, 电转至0.45 μm PVDF膜, 5%脱脂牛奶封闭1 h, 4 °C分别与抗USP9X(1:1 500)、抗Mcl-1(1:1 000)和内参β-tubulin(1:5 000)抗体过夜, PBST漂洗3次后用辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:3 000)孵育1 h, 漂洗后, 用ECL化学发光试剂显色, 在ChemGel Doc成像仪(Bio-Rad, 美国)分析结果。显影结果经Quantity One软件进行图片分析, 计算净光密度值。并以Bio-Image Analysis System进行半定量分析, 结果以ROD×面积(mm²)表示。蛋白的相对含量=(目的蛋白条带ROD×面积)/(β-tubulin条带ROD×面积)。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 6孔板中的SMMC7721和HepG2细胞转染后48 h, 收集细胞, 用预冷的PBS洗涤细胞3次, 2 000 r/min, 离心5 min, 收集细胞。加入500 μL的缓冲液悬浮细胞并加入5 μL双染凋亡试剂混匀后, 再加入5 μL碘化丙啶, 混匀; 室温、避光、反应15 min后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 MTT法检测细胞活力 按照每孔4 000个细胞的密度铺96孔板, 每个浓度设5个平行孔, 待细胞生长至对数期转染, 分别在转染后24, 48, 72 h加入MTT(5 mg/mL)试剂, 每孔20 μL, 继续培养4 h, 弃去细胞培养液, 每孔加入150 μL DMSO, 摇床避光摇10 min, 然后用酶标仪在490 nm处比色, 绘制生长曲线。

1.3 统计学处理

所有的统计学分析均在统计学软件SPSS 17.0上进行, 所有的实验至少重复3次, 实验数据用均数±标准差表示, 两组间比较采用*t*检验, *P*<0.05为差异显著, *P*<0.01为差异极显著。

2 结果

2.1 USP9X在肝癌细胞SMMC7721、HepG2中蛋白表达上调

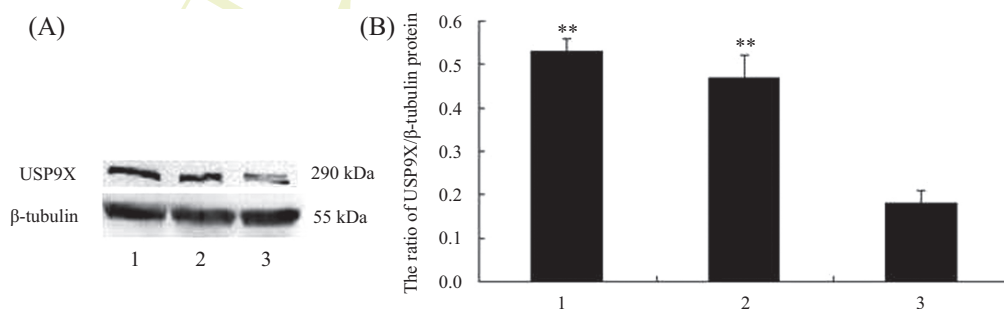
Western blot检测SMMC7721、HepG2和L02中USP9X的蛋白表达, 发现USP9X在肝癌细胞SMMC7721和HepG2中的蛋白表达水平均较正常肝细胞L02中高(*P*<0.01), 证明USP9X在SMMC7721和HepG2中蛋白表达上调(图1)。

2.2 转染后肝癌细胞SMMC7721和HepG2中USP9X的mRNA和蛋白表达被抑制

RT-PCR和Western blot分别检测转染后SMMC7721和HepG2细胞中不同处理组USP9X的mRNA和蛋白表达, 发现两种细胞中USP9X-siRNA组USP9X的mRNA和蛋白表达水平较各自NC组均下降, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 证明转染USP9X-siRNA后SMMC7721和HepG2中USP9X的mRNA和蛋白表达被抑制(图2和图3)。

2.3 抑制USP9X表达诱导肝癌细胞SMMC7721和HepG2的凋亡

流式细胞术检测转染SMMC7721和HepG2细胞48 h后各组细胞的凋亡水平, 结果显示, USP9X-siRNA组的肝癌细胞凋亡率均高于各自NC组, 差异有统计学意义(*P*<0.01), 证明抑制USP9X表达可促

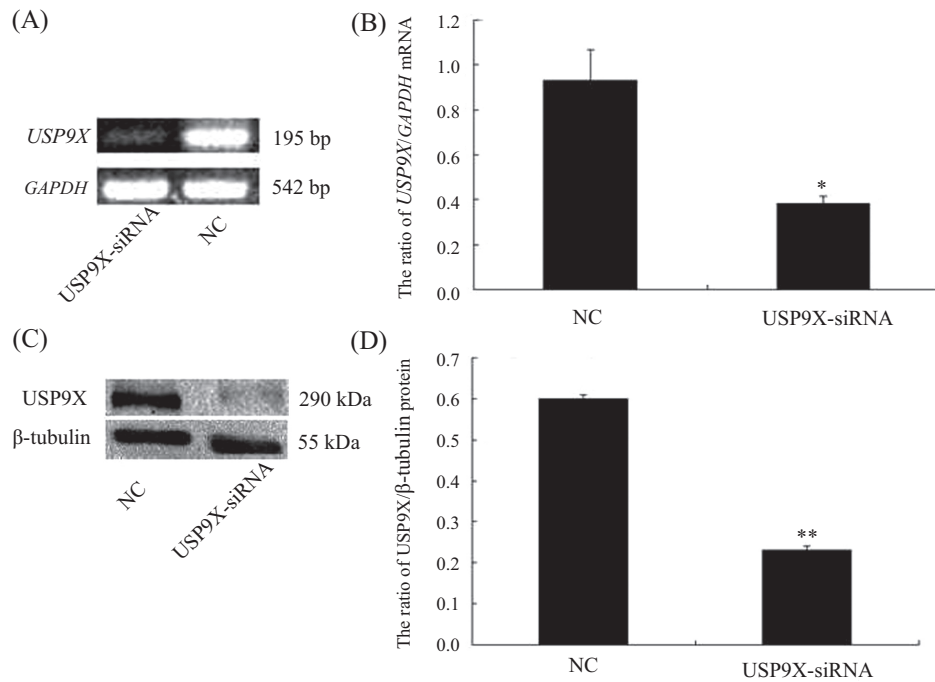


A: Western blot检测USP9X在各组细胞中的蛋白表达水平; B: USP9X在各组细胞中的蛋白相对表达量统计图。1: SMMC7721细胞; 2: HepG2细胞; 3: L02细胞。***P*<0.01, 与L02组比较。

A: the protein expression of USP9X in three cell groups by Western blot; B: quantification of USP9X protein levels relative to that of β-tubulin in three cell groups. 1: SMMC7721; 2: HepG2; 3: L02. ***P*<0.01 vs L02 group.

图1 USP9X在肝癌细胞SMMC7721和HepG2中蛋白表达上调

Fig.1 USP9X protein levels were up-regulated in SMMC7721 and HepG2 cells

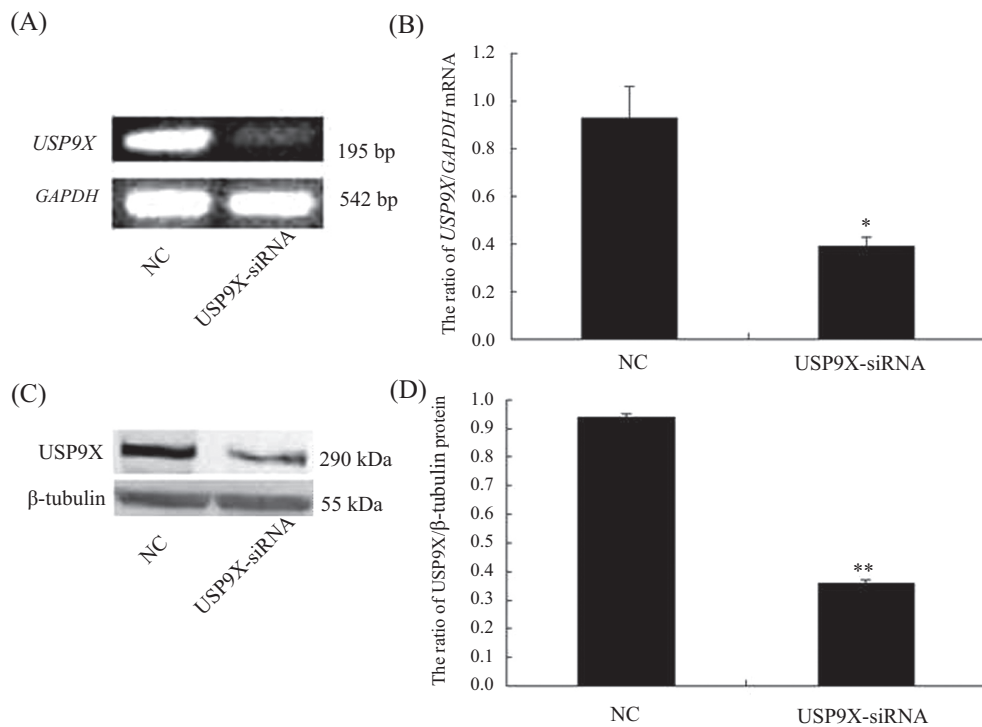


A: siRNA干扰后*USP9X*的mRNA水平变化; B: siRNA干扰后*USP9X*的mRNA相对表达量的统计图; C: siRNA干扰后*USP9X*的蛋白水平变化; D: siRNA干扰后*USP9X*的蛋白相对表达量的统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与NC组比较。

A: RT-PCR analysis of *USP9X* mRNA; B: quantification of *USP9X* mRNA levels relative to that of *GAPDH*; C: Western blot analysis of *USP9X* protein; D: quantification of *USP9X* protein levels relative to that of β -tubulin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group.

图2 转染后肝癌细胞SMMC7721中*USP9X*的mRNA和蛋白表达被抑制

Fig.2 mRNA and protein levels of *USP9X* were inhibited in SMMC7721 cells after siRNA interference

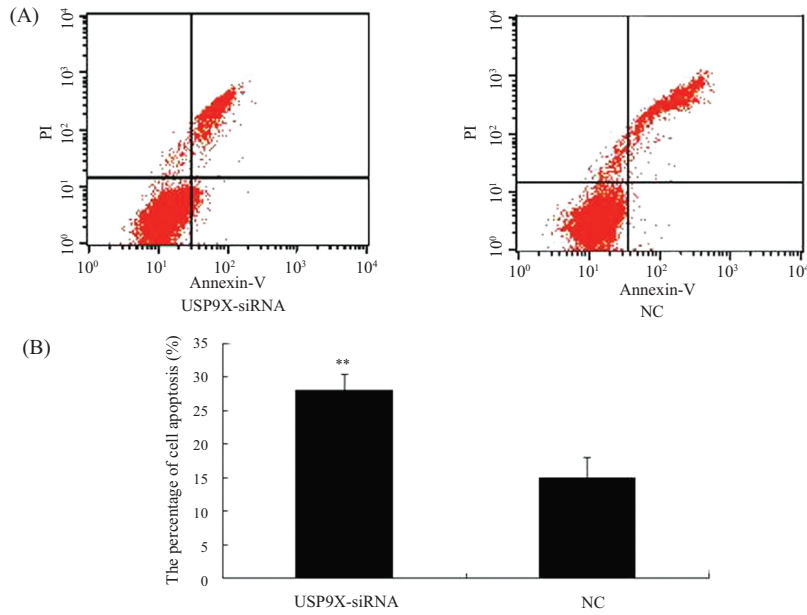


A: siRNA干扰后*USP9X*的mRNA水平变化; B: siRNA干扰后*USP9X*的mRNA相对表达量的统计图; C: siRNA干扰后*USP9X*的蛋白水平变化; D: siRNA干扰后*USP9X*的蛋白相对表达量的统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与NC组比较。

A: RT-PCR analysis of *USP9X* mRNA; B: quantification of *USP9X* mRNA levels relative to that of *GAPDH*; C: Western blot analysis of *USP9X* protein; D: quantification of *USP9X* protein levels relative to that of β -tubulin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group.

图3 转染后肝癌细胞HepG2中*USP9X*的mRNA和蛋白表达被抑制

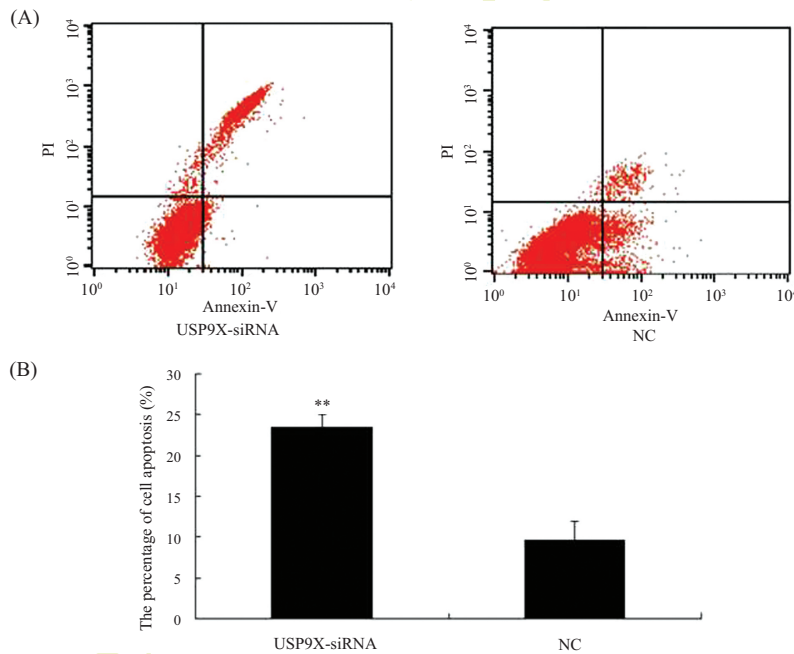
Fig.3 mRNA and protein levels of *USP9X* were inhibited in HepG2 cells after siRNA interference



A: 流式细胞术检测不同处理组细胞的凋亡图; B: siRNA干扰后不同处理组细胞的凋亡统计图。 ** $P < 0.01$, 与NC组比较。
 A: the cell apoptosis of different treated groups by FCM; B: quantification of cell apoptosis in different treated groups. ** $P < 0.01$ vs NC group.

图4 流式细胞术检测在SMMC7721中不同处理组细胞的凋亡

Fig.4 The apoptosis of different treated groups in SMMC7721 by FCM



A: 流式细胞术检测不同处理组细胞的凋亡图; B: siRNA干扰后不同处理组细胞的凋亡统计图。 ** $P < 0.01$, 与NC组比较。
 A: the cell apoptosis of different treated groups by FCM; B: quantification of cell apoptosis in different treated groups. ** $P < 0.01$ vs NC group.

图5 流式细胞术检测在HepG2中不同处理组细胞的凋亡

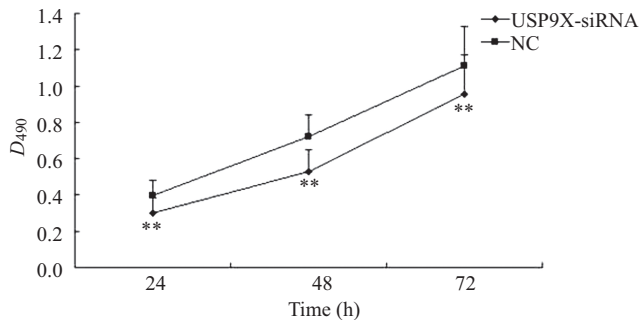
Fig.5 The apoptosis of different treated groups in HepG2 by FCM

使SMMC7721和HepG2细胞凋亡(图4和图5)。

2.4 抑制USP9X表达降低肝癌细胞SMMC7721和HepG2的生长活力

MTT检测转染SMMC7721和HepG2细胞48 h后

各组细胞在490 nm处的吸光度值, 并绘制生长曲线。结果显示, USP9X-siRNA组的肝癌细胞吸光度值均低于各自NC组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 证明抑制USP9X表达降低SMMC7721和HepG2的生长活力

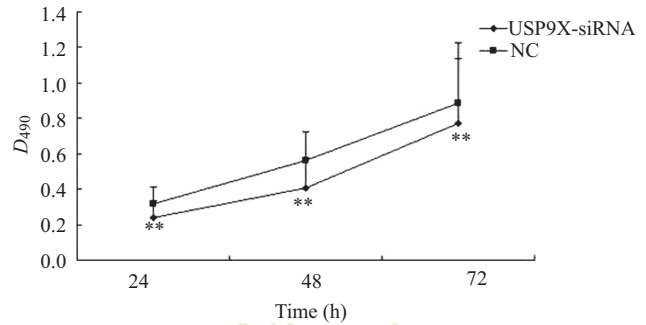


** $P < 0.01$, 与NC组比较。

** $P < 0.01$ vs NC group.

图6 抑制USP9X表达降低SMMC7721肝癌细胞的生长活力

Fig.6 Suppression of SMMC7721 cell growth viability by inhibiting expression of USP9X

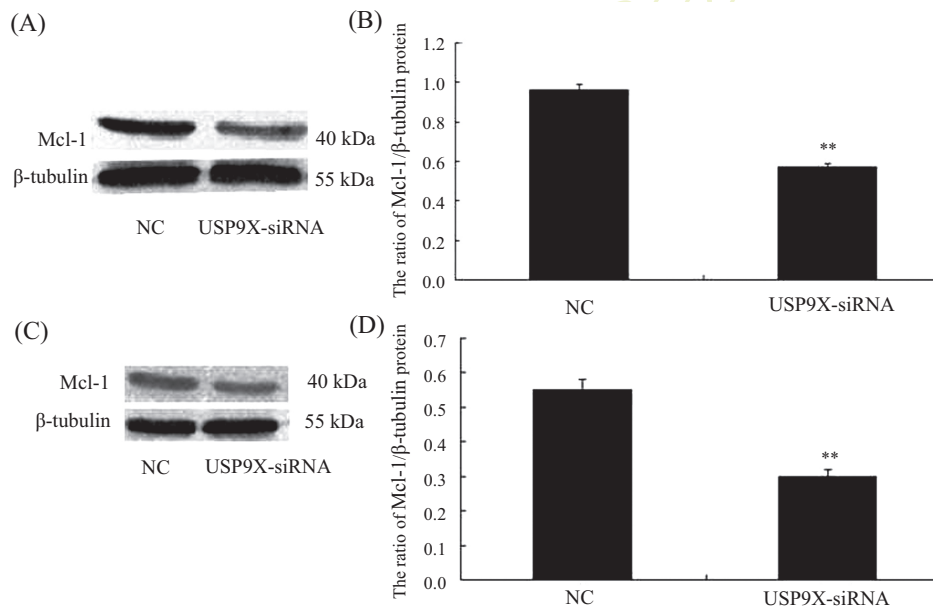


** $P < 0.01$, 与NC组比较。

** $P < 0.01$ vs NC group.

图7 抑制USP9X表达降低HepG2肝癌细胞的生长活力

Fig.7 Suppression of HepG2 cell growth viability by inhibiting expression of USP9X



A: Western blot检测转染后SMMC7721细胞中Mcl-1的蛋白水平; B: 转染后SMMC7721细胞中Mcl-1的蛋白相对表达量的统计图; C: Western blot检测转染后HepG2细胞中Mcl-1的蛋白水平; D: 转染后HepG2细胞中Mcl-1的蛋白相对表达量的统计图。** $P < 0.01$, 与NC组比较。

A: Western blot analysis of Mcl-1 protein in SMMC7721; B: quantification of Mcl-1 protein levels relative to that of β -tubulin in SMMC7721; C: Western blot analysis of Mcl-1 protein in HepG2; D: quantification of Mcl-1 protein levels relative to that of β -tubulin in HepG2. ** $P < 0.01$ vs NC group.

图8 抑制USP9X表达使SMMC7721和HepG2中Mcl-1蛋白表达下调

Fig.8 Down-regulation of Mcl-1 protein expression in SMMC7721 and HepG2 cells by inhibiting expression of USP9X

(图6和图7)。

2.5 抑制USP9X表达使肝癌细胞SMMC7721和HepG2中Mcl-1的蛋白表达下调

Western blot检测转染SMMC7721和HepG2细胞48 h后下游蛋白Mcl-1的蛋白表达。结果显示,与各自NC组比较,USP9X-siRNA组中Mcl-1的蛋白表达量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),证明在SMMC7721和HepG2中,抑制USP9X表达可下调Mcl-1的蛋白表达(图8)。

3 讨论

肝细胞性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,全球每年大约60万人死于肝癌^[14],其发病率和死亡率分别占所有肿瘤的第6位和第3位^[15],鉴于如此严峻的形势,如何控制和治理HCC成为亟待解决的问题。研究表明,泛素蛋白酶体系统可以通过泛素化过程降解靶蛋白,进而调节细胞周期、基因转录和抗原提呈等过程^[16-17]。USP9X是一种泛素特异性蛋白酶,可作用泛素与底物蛋白之间的连接键将两者分离,

从而破坏泛素化过程,抑制靶蛋白降解,达到稳定靶蛋白的目的,此过程可使某些癌蛋白异常积聚,促进肿瘤的发生发展^[8,18]。近年研究表明,USP9X参与多种肿瘤的发生发展过程,与促进肿瘤的发生发展及预后密切相关^[9]。目前研究发现,USP9X在淋巴瘤、结肠癌、肺癌和乳腺癌中都表达上调,抑制肿瘤细胞的凋亡,发挥促进肿瘤发生发展的作用^[7-10]。本研究发现,USP9X在肝癌细胞SMMC7721和HepG2中的表达高于正常肝细胞,为了探讨USP9X在肝癌中的功能,本研究在肝癌细胞SMMC7721和HepG2中抑制USP9X,流式细胞仪和MTT检测发现抑制USP9X表达能促进细胞凋亡和抑制增殖。

研究发现,*Mcl-1*是凋亡抑制基因,在肝细胞肝癌中,*Mcl-1*表达上调且可通过抑制肝癌细胞的凋亡过程从而促进肝细胞肝癌的发展^[11-12]。因此,研究下调*Mcl-1*能为抑制肝癌的发展提供有力的帮助。*Mcl-1*是USP9X的靶点之一,在淋巴瘤中抑制USP9X表达可以通过作用于*Mcl-1*的多聚泛素链下调其蛋白表达抑制癌症的发生;在结肠癌和肺癌中,抑制USP9X的活性可以通过促进*Mcl-1*的泛素化降解使*Mcl-1*蛋白表达降低而产生凋亡。本研究应用USP9X-siRNA转染人肝癌细胞SMMC7721和HepG2,发现*Mcl-1*的蛋白表达明显下调,提示在肝癌中USP9X低表达也可以下调*Mcl-1*的蛋白表达,这在肝癌中首次证明了USP9X可以通过调控*Mcl-1*影响肝癌的发生发展过程。

综上所述,本研究推测抑制USP9X表达可能通过下调*Mcl-1*蛋白表达从而诱导肝癌细胞凋亡,但是肝癌发生发展的过程比较复杂,USP9X的下游靶点可能不止一个,因此在肝癌中USP9X的功能及调控机制仍需进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362(9399): 1907-17.
- 2 DiAntonio A, Hicke L. Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 223-46.
- 3 杨波, 谢丛华. 泛素特异性蛋白酶9X与肿瘤. *国际肿瘤学杂志* (Yang Bo, Xie Conghua. Ubiquitin specific peptidase 9x and tumor. *International Journal of Oncology*) 2011; 38(12): 900-2.
- 4 Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci* 2009; 100(8): 1374-81.
- 5 Becuwe M, Herrador A, Haguenaer-Tsapis R, Vincent O, Léon S. Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family. *Biochem Res Int* 2012; 2012: 242764.
- 6 Kapuria V, Peterson LF, Fang D, Bornmann WG, Talpaz M, Donato NJ. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9265-76.
- 7 Peddaboina C, Jupiter D, Fletcher S, Yap JL, Rai A, Tobin RP, *et al.* The downregulation of Mcl-1 via USP9X inhibition sensitizes solid tumors to Bcl-x1 inhibition. *BMC Cancer* 2012; 12: 541.
- 8 Sun H, Kapuria V, Peterson LF, Fang D, Bornmann WG, Bartholomeusz G, *et al.* Bcr-Abl ubiquitination and Usp9x inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis. *Blood* 2011; 117(11): 3151-62.
- 9 Deng S, Zhou H, Xiong R, Lu Y, Yan D, Xing T, *et al.* Overexpression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res Tr* 2007; 104(1): 21-30.
- 10 Schwickart M, Huang X, Lill JR, Liu J, Ferrando R, French DM, *et al.* Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 2010; 463(7277): 103-7.
- 11 Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Müller M, *et al.* Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28(1): 25-32.
- 12 Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schuchmann M, Weber A, Weinmann A, Krammer PH, *et al.* Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction. *BMC Cancer* 2006; 6: 232.
- 13 Jolly L A, Taylor V, Wood SA. USP9X enhances the polarity and self-renewal of embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Mol Biol Cell* 2009; 20(7): 2015-29.
- 14 Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48(6): 2047-63.
- 15 Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012; 379(9822): 1245-55.
- 16 Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(9): 739-51.
- 17 Cheng Y, Li G. Role of the ubiquitin ligase Fbw7 in cancer progression. *Cancer Metast Rev* 2012; 31(1/2): 75-87.
- 18 Hogarty MD. Mcl1 becomes ubiquitin-ous: new opportunities to antagonize a pro-survival protein. *Cell Res* 2010; 20(4): 391-3.