

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.31.004

人源 CerS2 重组腺病毒构建及其对肝癌细胞 HepG2 细胞周期的作用*

杨小理¹, 钱 玥², 欧阳旭红¹, 向加林¹, 杨 艳¹, 王凤学^{3△}

(1. 遵义医学院附属医院医学检验科, 贵州遵义 563003; 2. 遵义医学院检验医学院 2015 级, 贵州遵义 563003; 3. 贵州省遵义市第一人民医院检验科 563003)

[摘要] **目的** 探讨神经酰胺合酶 2(CerS2)过表达对肝癌细胞 HepG2 细胞周期的影响及可能机制。**方法** 化学合成人源 CerS2 基因 CDS 区并构建重组穿梭质粒 pDC315-CerS2-绿色荧光蛋白(GFP),采用 Admax 系统将成功构建的 CerS2 重组穿梭质粒与骨架质粒共转染 HEK293 细胞,通过 Cre/loxP 实现重组,并进行扩增、纯化及滴度测定。将正确构建的 Adv-CerS2-GFP 重组腺病毒与空载分别感染肝癌细胞 HepG2(即对照组、空载组、实验组),激光共聚焦显微镜定位 CerS2-GFP 融合蛋白的表达,流式细胞术 PI 法检测各组细胞周期的分布;RT-qPCR、Western blot 法检测各组细胞 CerS2、p27mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 经测序分析验证重组腺病毒构建成功。HepG2 实验组 CerS2、p27mRNA、蛋白相对表达水平较对照组、空载组明显增加($P < 0.01$)。对照组与空载组细胞周期时相分布差异无统计学意义($P > 0.05$),实验组细胞较对照组、空载组 G_0/G_1 期百分比明显增加($P < 0.01$); G_2/M 、S 期明显减少($P < 0.01$)。**结论** 成功构建人源 CerS2 重组腺病毒且过表达的 CerS2 导致肝癌细胞 HepG2 细胞周期 G_0/G_1 期阻滞,其机制可能是通过上调 p27 从而抑制肝癌细胞的生长与增殖。

[关键词] 神经酰胺合酶;重组腺病毒;细胞周期;p27;激光扫描共聚焦显微镜**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)31-3978-04

Construction of recombinant adenovirus vector with CerS2 gene and effect of Ceramide

Synthasas 2 overexpression on cell cycle in hepatocarcinoma HepG2 cells*

YANG Xiaoli¹, QIAN Yue², OUYANG Xuhong¹, XIANG Jialin¹, YANG Yan¹, WANG Fengxue^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, GuiZhou 563003, China; 2. School of Laboratory Medicine, Zunyi Medical College, Zunyi, GuiZhou 563003, China; 3. Department of Laboratory, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi, GuiZhou 563003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ceramide synthase 2 (CerS2) overexpression on HepG2 cell cycle and its possible mechanism. **Methods** CerS2 gene was synthesized by chemical method and inserted to the polyclonal sites of adenovirus shuttle plasmid pDC315-CerS2-green fluorescent protein (GFP) to generate a recombinant shuttle plasmid. HEK293 cells were cotransfected to the successfully constructed recombinant shuttle vector and framework plasmids using the Admax system and the Cre/loxP recombinant enzyme system, amplified, purified, and measured its titer. HepG2 cells were transfected with the correctly constructed recombinant adenovirus vector with CerS2 gene and the empty vector (the blank group, the empty vector group, the experimental group), subcellular localization of CerS2-GFP fusion protein was detected by confocal laser scanning, the changes of cell cycle was analyzed by flow cytometry propidium iodide (PI) single staining; the expressions of mRNA and protein of CerS2 and p27 were measured by quantitative RT-qPCR and Western blot. **Results** The recombinant adenovirus vectors were successfully constructed. The mRNA and protein expressions of CerS2 and p27 significantly increased in the experimental group than the blank group and the empty vector group ($P < 0.01$). There was no statistical significance in cell cycle between the blank group and the empty vector group ($P > 0.05$), compared with the blank group and the empty vector group, G_0/G_1 phase of the experimental group increased ($P < 0.01$), G_2/M and S phase significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** The recombinant adenovirus vector was successfully constructed, and the overexpressed CerS2 leads to G_0/G_1 phase block in the HepG2 cell cycle of hepatoma cells, and the mechanism may be relative to inhibit the growth and proliferation of hepatoma cells by up-regulation of p27.

* 基金项目:贵州省科学技术基金资助项目[黔科合基础(2016)1174;黔科合J字LKZ(2011)32;遵市科合社字(2011)20号]。 作者简介:

杨小理(1979—),主管技师,本科,主要从事临床检验诊断学研究。 △ 通信作者, E-mail: yy623yy@163.com。

[Key words] ceramide synthase; recombinant adenovirus vector; cell cycle; p27; laser scanning confocal microscope

神经酰胺合酶(ceramide synthase, CerS)基因家族成员主要包括 CerS1、CerS2、CerS4、CerS5、CerS6^[1-3],各成员在真核生物中呈现出严格的保守性^[4]。CerS2 参与神经酰胺的合成^[5],神经酰胺作为鞘磷脂信号途径中重要的第二信使效应分子,参与激活多种蛋白激酶和蛋白磷酸酶调节凋亡、增殖、分化和生长停滞等信号过程^[6]。研究表明,CerS2 在肝癌、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌细胞株中具有抑制肿瘤细胞增殖、侵袭的活性^[7-10],且较多研究关注 CerS2 在肿瘤微环境的作用及机制探讨。而 CerS 对动物来说是很重要的相关基因,其变异将导致严重的代谢紊乱,但 CerS2 在肿瘤与代谢中的作用却鲜有报道。本研究通过构建人源 CerS2 重组腺病毒,观察其对肝癌细胞 HepG2 的转染、介导 CerS2 基因的表达能力及对细胞周期的影响,为进一步研究 CerS2 基因对 HepG2 细胞生长及肝糖、脂质代谢可能的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 限制性内切酶、感受态大肠埃希菌 DH5 α 、引物合成、RT-PCR、QPCR 试剂盒均购自大连宝生物 Takara 公司;HEK293 购自上海中科院细胞库,AdMax 重组腺病毒表达载体购自加拿大 Microbix 公司;DMEM、胎牛血清、胰酶均购自 Gibco 公司;脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒均购自 Omega 公司;全蛋白提取试剂盒购自凯基生物技术有限公司;蛋白 Marker 为 Fermentas 产品,内参抗体为 Anti- β -actin-HRP-conjugated,购自康成;Anti-Ceramide synthase 2 抗体、Anti-p27 kip 1 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 人源 CerS2 基因的扩增 从 Genbank 检索人源基因序列即 NM_181746,送公司化学合成 CDS 区全长片段。取 1 μ L 作为模板,用 PrimerSTAR 进行目的片段 PCR 扩增,上游引物:5'-CGT AGA ACG CAG ATC GAA TTC GCC ACC ATG CTC CAG ACC TTG TAT GA-3';下游引物:5'-CCA TGG TGG CAA GCT TGT CAT TCT TAC GAT GGT TGT TAT T-3'。

1.2.2 穿梭质粒 pDC315-CerS2-GFP 的构建及重组质粒的筛选与鉴定 采用 1.0%的琼脂糖电泳 PCR 产物,对 PCR 产物进行回收、纯化,同时将 pDC315-绿色荧光蛋白(GFP)、PCR 产物线性化,并经 In-Fusion 交换酶连接、转化、选取阳性克隆经 PCR 鉴定且送大连宝生物测序。

1.2.3 重组腺病毒 pDC315-CerS2 的包装 将穿梭质粒 pDC315-CerS2 与 Admax 系统中 pBHGlomp Δ E1,

3cre 载体共转染 293 细胞,观察细胞状态,第 14 天左右出现细胞病变(cytopathic effect, CPE),待所有细胞都变圆并大部分开始脱落时,收集上清液和细胞,离心后保留细胞和 2 mL 上清液,用液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴锅反复冻融样品 3 次,离心去沉淀。加入 10% 无菌甘油,过滤后得到病毒毒种,保存在-80 $^{\circ}$ C。

1.2.4 Adv-CerS2-GFP 的扩增、纯化与滴度鉴定 待 293 细胞接近长满时,加入毒种 1 mL,当大部分细胞出现 CPE 且脱落时,收集病毒上清液,再次扩增,重组腺病毒经 Adeno-X Virus Purification Kit 纯化试剂盒纯化,保存在-80 $^{\circ}$ C。采用终点稀释法,计算病毒滴度。

1.2.5 Adv-CerS2-GFP 在肝癌细胞 HepG2 中的表达及亚细胞定位 在 6 孔板中细胞爬片,将 Adv-GFP(空载组)、Adv-CerS2-GFP(实验组)分别感染 HepG2 细胞,并设 HepG2 空白对照组,感染 48 h 后,PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min,并采用 DAPI 染核,激光扫描共聚焦显微镜观察与拍照,蓝光激发和发射波长分别为 340 nm/488 nm,GFP 激发和发射波长为 488 nm/525 nm。

1.2.6 RT-qPCR 和 Western blot 法检测各组细胞 CerS2、p27 的表达 感染 48 h 后采用 Trizol 分别提取各组细胞的总 RNA,逆转录合成 cDNA,采用 SYBR Green I 荧光染料 RT-qPCR 二步法检测 CerS2 mRNA 表达水平,以 β -actin 基因作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示基因相对表达量。所用引物 β -actin 上游:5'-TTG CGT TAC ACC CTT TCT T-3',下游:5'-GTC ACC TTC ACC GTT CCA-3';CerS2 上游:5'-ATC GTC TTC GCC ATT GTT-3',下游:5'-CGG TCA CTG CGT TCA TCT-3';p27 kip1 上游:5'-GGC TAA CTC TGA GGA CAC-3',下游:5'-TTC TTC TGT TCT GTT GGC-3'。采用全蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量,取蛋白 30~50 μ g 行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)转移至 PVDF 膜、封闭、一抗(分别为 anti-CerS2 antibody、anti-p27 kip1 antibody)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜、洗膜,二抗室温孵育 1~2 h,洗膜并显色成像,比较条带灰度值与灰度比。

1.2.7 流式细胞术 PI 法检测各组细胞周期的改变 腺病毒转染 48 h 后,收集、调整细胞浓度约 1×10^6 个/mL,70%冷乙醇 500 μ L、4 $^{\circ}$ C 下固定 2 h,100 μ L RNase A 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,再加入 400 μ L PI 染色混匀,4 $^{\circ}$ C 避光 30 min;上机检测,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS22.0 进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差(one-

way ANOVO) 分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CerS2 目的基因扩增的 PCR 产物及重组穿梭质粒 pDC315-CerS2-GFP 的鉴定 将 PCR 扩增得到的产物回收、经 EcoR I 与 Kpn I 双酶切后取 2 μ L 电泳鉴定, 所得到的片段大小约为 1 142 bp 左右, 与目的片段 cDNA 大小一致。重组穿梭质粒 pDC315-CerS2-GFP 测序结果显示, 所克隆片段与 NM_18746 序列 CDS 区完全一致(图 1)。病毒滴度为 1.0×10^9

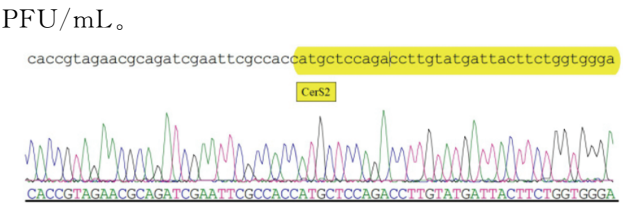


图 1 Lassa2 重组腺病毒测序结果(仅展示部分)

2.2 Cers2 亚细胞定位 激光扫描共聚焦结果显示, 在细胞核周围呈现蓝、绿色重叠, 少量分布在细胞质内, 见图 2。

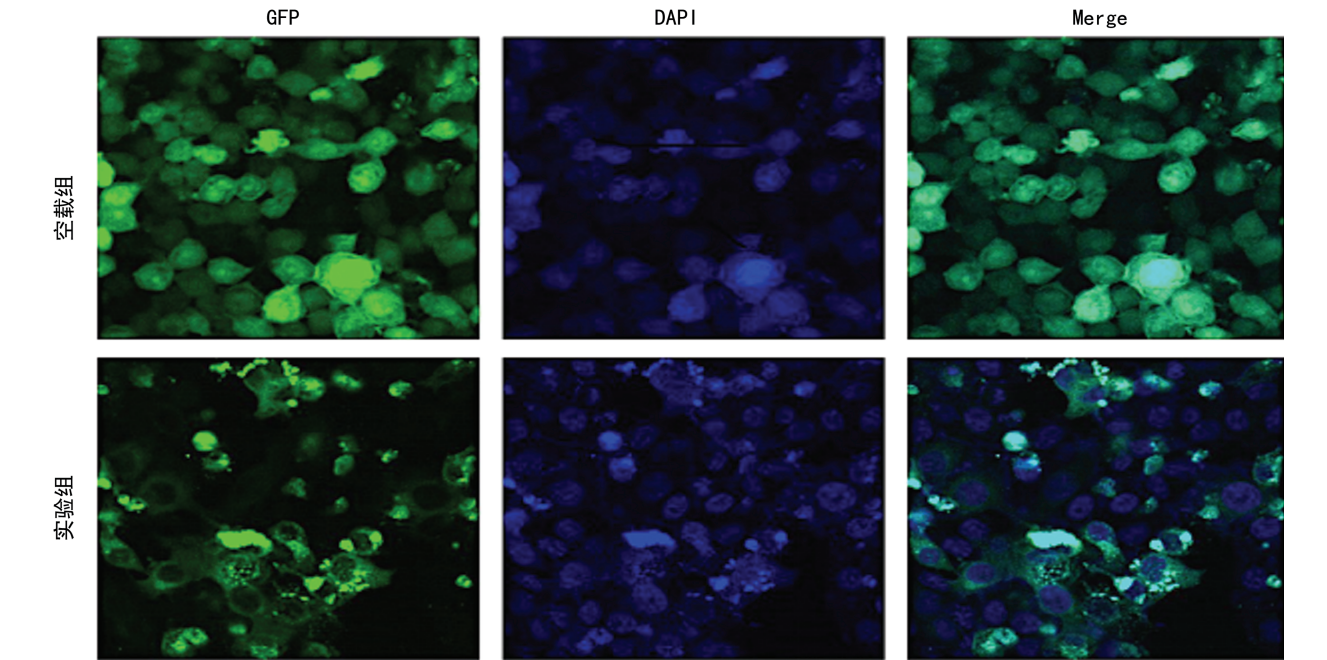
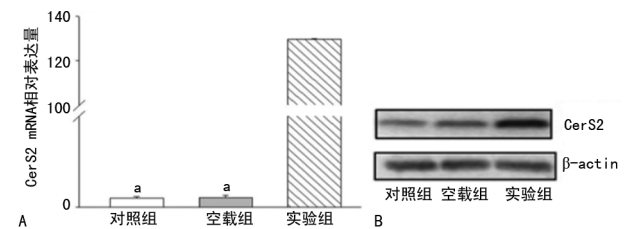


图 2 CerS2 在 HepG2 肝癌细胞中的表达(亚细胞定位)

2.3 各组 HepG2 肝癌细胞 CerS2 表达水平比较 对照组、空载组 CerS2 表达比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 感染 48 h 的实验组比对照组 CerS2 mRNA 相对表达量增加了 129.79 倍 ($P<0.01$), 蛋白表达水平也明显增加 ($P<0.01$), 见图 3。

2.4 各组细胞周期的变化 流式细胞仪 PI 法结果显示, 与对照组、空载组比较, 实验组细胞 G_0/G_1 期百分比明显增加, G_2/M 、S 期百分比均明显减少 ($P<0.01$), 见表 1、图 4。



^a: $P<0.05$, 与实验组比较

图 3 各组 HepG2 肝癌细胞 CerS2 表达水平比较

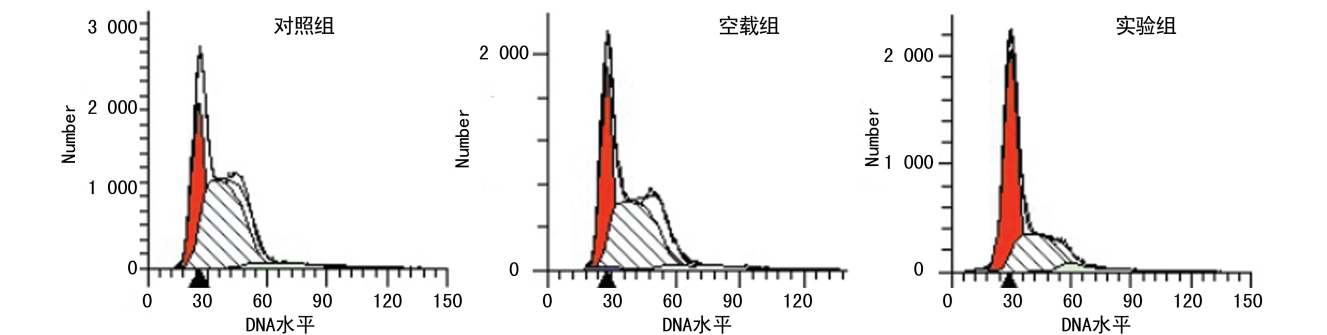
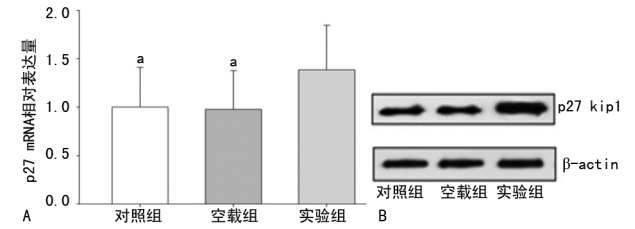


图 4 各组细胞周期分析结果

表 1	各组细胞周期百分比比较($\bar{x}\pm s, \%$)		
组别	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期	S 期
对照组	43.09±2.46 ^a	11.58±1.39 ^a	45.33±1.97 ^a
空载组	42.64±2.36 ^a	11.25±2.13 ^a	46.11±1.77 ^a
实验组	66.58±1.49	2.02±0.86	31.40±2.04

^a: $P<0.01$,与实验组比较

2.5 各组 HepG2 细胞 p27 kip1 表达水平比较 实验组 p27 kip1 mRNA 表达水平较对照组、空载组明显上调($P=0.026, 0.019$),且 p27 kip1 蛋白表达水平也明显高于对照组及空载组($P<0.01$),见图 5。



^a: $P<0.05$,与实验组比较

图 5 各组 HepG2 细胞 p27 kip1 表达水平比较

3 讨 论

CerS2 基因是在肝癌相关基因大规模功能筛选时发现的与肿瘤转移相关的新基因,研究表明其含保守的 TLC 功能域和特定的 HOX 功能域,HOX 作为序列特异性 DNA 结合转录调节因子,在调控基因转录方面有着非常重要的作用,其对神经酰胺的合成是必需的,早期研究发现 HOX 域与细胞周期调控密切相关,通过细胞周期影响细胞生长^[6]。此外,CerS2 在结构上包含了一个看家基因的典型特征,这是该家族其它成员所没有的,其在各类肿瘤中抗肿瘤的具体机制仍不清楚。

本研究应用 Admax 系统构建重组腺病毒表达载体,该包装系统利用了重组酶系统(Cre-loxP 和 FLP-*frt*),操作简单且重组效率高、获得的病毒产率高、目的基因的表达水平高,采用的增强型绿色荧光强度较普通荧光强度提升且保留了荧光蛋白功能的同时能快速有效的对融合的目的基因进行报告。经酶切、测序鉴定,CerS2 重组腺病毒构建成功,并在 HepG2 肝癌细胞中形成高效过表达,亚细胞定位结果提示 CerS2 融合蛋白在细胞核周围表达,少量在细胞质。该重组腺病毒的构建为本课题进一步研究 CerS2 在肿瘤代谢中的作用及机制奠定了基础。

几乎所有肿瘤细胞的生物学特性都是由于细胞周期紊乱所导致的失控性生长,即肿瘤细胞的生长依赖于细胞周期的正常更替^[11]。G₁/S 期是细胞周期的主要限制点,其中细胞在 G₁ 期完成必要的生长和物质准备,在 S 期完成其遗传物质—染色体 DNA 的复制, G₂ 期进行必要的检查及修复,以确保 DNA 复制的准确性,然后在 M 期完成遗传物质到子细胞中的均等分配,并使细胞一分为二,而 G₀ 期是指细胞处于

阻滞的状态,是脱离细胞周期、暂时停止分裂的一个阶段。本研究中流式细胞仪分析细胞周期各时相的百分比结果显示 CerS2 基因抑制了肝癌细胞的生长,使细胞大量处于 G₀/G₁ 期,阻滞肝癌细胞 HepG2 进入下一阶段的增殖及分裂。

为进一步探讨其可能的作用机制,本实验观察了上调的 CerS2 对细胞周期调节蛋白 p27 表达的影响。p27 蛋白是 CIP/KIP 家族成员之一,是细胞增殖一个主要的负调控因子,通过结合及调控各种细胞周期素(Cyclin)-细胞周期素依赖性激酶(CDK)包括 Cyclin D(D1, D2, D3)-CDK4/CDK6、Cyclin E-CDK2 复合物^[11-12],从而调控细胞进入 G₁ 期和 S 期^[13],其调控肿瘤细胞周期的同时能抑制肿瘤细胞的分裂,是负性调控细胞周期的蛋白^[14]。p27 被认为是人类多种肿瘤独立的预后因子和未来可能的肿瘤治疗靶点。有研究报道,CDK 抑制结构域位于 p27 蛋白的 N-末端部分,该结构域使细胞足以停滞于 G₀/G₁ 期,但 p27 可能在不同的细胞与不同分子相互作用,在适当的时间到达适当的细胞内位置发挥其生物学活性,呈现出对细胞周期不同的调控^[15]。本研究结果提示上调的 CerS2 基因促进 p27 蛋白表达增强,这可能是肝癌细胞 HepG2 细胞周期 G₀/G₁ 期阻滞的可能机制之一,但其具体的分子生物学机制如过表达的 CerS2 是通过何细胞调控因子或信号调控网络导致 p27 上调及 p27 通过抑制何种 Cyclin-CDK 复合物导致细胞周期的改变等等尚待后续深入研究。

参考文献

[1] SASSA T,HIRAYAMA T,KIHARA A. Enzyme activities of the ceramide synthases CERS2-6 are regulated by phosphorylation in the c-terminal region[J]. J Biol Chem, 2016,291(14):7477-7487.

[2] GOSEJACOB D,JAEGER P S,VOM DORP K A,et al. Ceramide synthase 5 is essential to maintain C-16:0-Ceramide pools and contributes to the development of diet-induced obesity[J]. J Biol Chem, 2016, 291 (13): 6989-7003.

[3] GISELE PESCIO L,JAIME SANTACREU B,GISELA LOPEZ V,et al. Changes in ceramide metabolism are essential in Madin-Darby canine kidney cell differentiation [J]. J Lipid Res,2017,58(7):1428-1438.

[4] MIZUTANI Y,KIHARA A,IGARASHI Y. Mammalian lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides[J]. Biochem J,2005,390(1):263-271.

[5] CHAURASIA B,SUMMERS S A. Ceramides-lipotoxic inducers of metabolic disorders[J]. Trends Endocrinol Metab,2015,26(10):538-550.

[6] BIKMAN B T,SUMMERS S A. Ceramide as modulators of cellular and whole-body metabolism[J]. J Clin Invest, 2011,121(11):4222-4230.

[7] FAN S,NIU Y,TAN N,et al. LASS2(下转第 3986 页)

本研究中发现,黄芪-葛根以 2 : 1、3 : 1 比例与 0 : 1 比例配伍时比较,葛根素吸收 $C_{\max}$ 、半衰期、 $T_{\max}$ 、CL/F、消除半衰期等均有明显变化,提示黄芪可以延长葛根素在大鼠体内吸收半衰期,从而增加葛根素的治疗时间。黄芪-葛根以 0 : 1、2 : 1 和 3 : 1 比例配伍时 $C_{\max}$ 及 $T_{\max}$ 均无明显差异,表明葛根素在体内吸收可能具有饱和现象,提示其在体内的吸收可能除了被动吸收外,还存在主动转运和易化扩散等多种方式。黄芪-葛根以 3 : 1 比例配伍时消除半衰期、V/F、 AUC_{0-420} 、AUMC、MRT 等参数的变化较黄芪-葛根 2 : 1 配伍时变化更明显($P<0.05$),证实了黄芪-葛根的配伍比例可影响葛根素在体内的药动学行为。

综上所述,本研究从药动学行为上验证了黄芪-葛根以 2 : 1 和 3 : 1 的比例配伍时与单用葛根时体内药动学行为存在明显差异,二者配伍时黄芪可有效提高葛根素在大鼠体内的生物利用度,减缓消除时间,延长药物作用时间而达到协同增效的目的。

参考文献

[1] 曾楚华,向庆伟. 医学衷中参西录·医论篇[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2017:103-104.
[2] 赵进喜,李成卫. 糖尿病临床药对新用[M]. 北京:中国医药科技出版社,2006:93.
[3] 王庆国. 糖尿病及其并发症常用药对[M]. 北京:中国医药科技出版社,2006:93-96.
[4] 王春怡,陈艳芬,李卫民,等. 黄芪葛根汤对实验性糖尿病及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):144-149.
[5] 李艳敏,范颖,刘烨,等. 黄芪黄酮与葛根黄酮配伍对肝脏

糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):109-112.
[6] 来慧丽.“黄芪-葛根”药对对乙醇诱导的胃黏膜损伤的保护[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
[7] 聂彦娜. 黄芪和葛根素注射液对糖尿病肾病内质网应激 GRP78,ATF4,CHOP 表达的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
[8] 易月娥. 黄芪和葛根对糖尿病肾病内质网激未折叠蛋白反应 PERK 通路的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
[9] 陈绍华,朱伟民,樊远志. 葛根黄芪汤加减治疗神经根型颈椎病疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志,2012,20(11):18-19.
[10] 范颖,李新,刘烨,等. 黄芪葛根配伍对糖尿病大鼠肝脏 INS,ADPN,LEP,GLUT-4 的影响及其交互作用[J]. 中华中医药杂志,2015,30(10):3713-3716.
[11] 张志慧,李姝玉,王岩飞,等. 黄芪注射液联合葛根素注射液对糖尿病肾病 KKAy 小鼠 78kD-葡萄糖调节蛋白的影响[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(5):323-326.
[12] 陈艳芬,王春怡,李卫民,等. 黄芪葛根汤对糖尿病心肌病大鼠氧化应激和 NF- κ B 表达的影响[J]. 中成药,2012,34(8):1428-1432.
[13] 陈放,刘开扬,徐珊,等. 葛根素对 STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜的保护作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2011,27(9):1279-1284.
[14] 潘振宇,包兆胜,吴仲敏,等. 葛根素对糖尿病心肌细胞的保护及其机制研究[J]. 分子细胞生物学报,2009,42(2):137-144.

(收稿日期:2018-02-02 修回日期:2018-06-26)

(上接第 3981 页)

enhances chemosensitivity of breast cancer by counteracting acidic tumor microenvironment through inhibiting activity of V-ATPase proton pump[J]. Oncogene,2013,32(13):1682-1690.
[8] GU D,JIN H,JIN G,et al. The asialoglycoprotein receptor suppresses the metastasis of hepatocellular carcinoma via LASS2-mediated inhibition of V-ATPase activity[J]. Cancer Lett,2016,379(1):107-116.
[9] YANG P,YIN K,ZHONG D,et al. Inhibition of osteosarcoma cell progression by Marco H2A via the downregulation of cyclin D and cyclin dependent kinase genes[J]. Mol Med Rep,2015,11(3):1905-1910.
[10] WANG H,ZUO Y,DING M,et al. Lass2 inhibits growth and invasion of bladder cancer by regulating ATPase activity[J]. Oncol Lett,2017,13(2):661-668.
[11] PARK C,JEONG J S,JEONG J W,et al. Ethanol extract of kalopanax septemlobus leaf inhibits HepG2 human hepatocellular carcinoma cell proliferation via inducing

cell cycle arrest at G₁ phase[J]. Asian Pac J Trop Med,2016,9(4):336-342.
[12] BELLETTI B,FABRIS L,BALDASSARRE G. p27kip1: An all-round tumor suppressor[J]. Mol Cell Oncol,2016,3(5):e1141742.
[13] STEIN J,MILEWSKI W M,DEY A. The negative cell cycle regulators, p27 Kip1, p18 Ink4c, and GSK-3, play critical role in maintaining quiescence of adult human pancreatic β -cells and restrict their ability to proliferate [J]. Islets. 2013,5(4):156-169.
[14] CHOI H H,GUMA S,FANG L,et al. Regulating the stability and localization of CDK inhibitor p27 (Kip1) via CSN6-COP1 axis[J]. Cell cycle,2015,14(14):2265-2273.
[15] HNIT S S,XIE C,YAO M,et al. p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation[J]. Int J Biochem Cell Biol,2015,68(1):9-14.

(收稿日期:2018-01-30 修回日期:2018-06-24)