

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.05.003

全反式维甲酸对肝癌细胞系 HepG2 中肿瘤干细胞 相关基因蛋白表达的影响*

朱新锋¹, 张霞¹, 白建华², 高红强²

(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院肝胆胰外科, 武汉 430000; 2. 昆明医科大学附属甘美医院肝胆胰外科, 昆明 650011)

[摘要] **目的** 探讨全反式维甲酸(ATRA)对肝癌细胞系 HepG2 中肿瘤干细胞相关基因蛋白表达的影响。**方法** 选取肝癌细胞系 HepG2 细胞株行传代培养后,分选 CD133⁺ 的 HepG2 肝癌干细胞接种于 96 孔板,分为高量组、低量组、对照组,每组 32 孔。高量组加入 10 μmol/L ATRA,低量组加入 1 μmol/L ATRA,对照组不作任何处理。通过细胞增殖实验(MTT 法)检测细胞增殖能力,通过蛋白质印迹法检测 Cyclin D 和 STAT3 基因蛋白水平,统计分析所有 HepG2 肝癌干细胞的细胞增殖能力、Cyclin D 和 STAT3 基因蛋白水平。**结果** 耐药型肝癌 HepG2 细胞在 1、5、10 d 时细胞增殖能力方面,高量组、低量组、对照组呈逐渐上升趋势,但高量组上升值明显低于低量组,低量组上升值明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);蛋白质印迹法 ATRA 的 1、5、10 d 结果表明,与对照组比较,高量组、低量组 Cyclin D 和 STAT3 基因蛋白表达水平不断下降,但高量组下降值明显高于低量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** ATRA 可有效降低肝癌细胞系 HepG2 中肿瘤干细胞 Cyclin D、STAT3 等基因蛋白表达水平,有利于抑制 HepG2 肝癌干细胞的增殖。

[关键词] 全反式维甲酸;耐药型;肝癌干细胞;HepG2;增殖**[中图法分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)05-0733-05

Effect of all-transretinoic acid on tumor stem cells related genes protein expression in liver cancer cell line HepG2*

ZHU Xinfeng¹, ZHANG Xia¹, BAI Jianhua², GAO Hongqiang²

(1. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430000, China;

2. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Affiliated Ganmei Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the effect of all-transretinoic acid(ATRA) on tumor stem cells related genes protein expression in liver cancer cell line HepG2. **Methods** The liver cancer cell line HepG2 was selected for conducting the passage culture. The CD133⁺ HepG2 liver cancer stem cells were seeded on 96 well plates, which were divided into the high level group, low level group and control group, 32 holes in each group. The high level group was added with 10 μmol/L ATRA, the low level group was added with 1 μmol/L ATRA and the control group had no any processing. The cell proliferation ability was detected by using the MTT method, Western blot method was used to detect Cyclin D and STAT3 gene protein levels. Then the proliferation ability of HepG2 liver cancer stem cell, Cyclin D and STAT3 gene protein levels were statistically analyzed. **Results** In the aspect of A570 value of drug-resistant type liver cancer HepG2 cells on 1, 5, 10 d, the high level group, low level group and control group showed the gradual increasing trend, but the rising value in the high level group was significantly lower than that in the low level group, and the rising value in the low level group was significantly lower than that in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The ATRA results detected by Western blot on 1, 5, 10 d indicated that compared with the control group, the cyclin D and STAT3 gene protein expression levels in the high level group and low level group were constantly decreased, but the descend value in the high level group was significantly higher than

* 基金项目: 云南省应用基础研究[昆医联合专项]2013FZ22。 作者简介: 朱新锋(1974—), 副主任医师, 博士, 主要从事肝胆胰外科方面研究。

that in the low level group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** ATRA can effectively reduce the Cyclin D and STAT3 gene protein expression levels in liver cancer stem cell line HepG2, and is helpful to reduce the proliferation of liver cancer stem cells HepG2.

[Key words] all-transretinoic acid; drug resistant type; liver cancer stem cell; HepG2; proliferation

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,具有发病率高、病死率高等特点。早期肝癌常症状无特异性,随病情进展可导致肝区疼痛、乏力、消瘦等症状,严重者可引起肝衰竭,甚至引起死亡^[1]。目前,肝癌的治疗方法有多种,由于多数患者被发现时已处于中晚期阶段,手术治疗疗效欠佳,化疗、放疗等治疗成为了其极重要的治疗方法,但由于肝癌的化疗耐药明显,易导致疗效欠佳,故如何提高患者的疗效具有重要的临床意义^[2-3]。而全反式维甲酸(ATRA)是临床上常用的一种分化剂,已逐渐被应用于恶性肿瘤的治疗中,有利于增加癌细胞对化疗药物的敏感性,同时加速肿瘤细胞分化和凋亡^[4]。对此,本研究对在肝癌细胞系 HepG2 中应用 ATRA 进行实验,探讨其对肿瘤干细胞相关基因的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与仪器 肝癌细胞系 HepG2 细胞株购于中国科学院昆明动物研究所,ATRA 和二甲基亚砜(DMSO)和四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司,双抗(青霉素/链霉素)购于上海 Hyclone 公司,DMEM 培养基购于上海 Gibico 公司,0.25%胰蛋白酶购于上海 Hyclone 公司,细胞因子 EGF、FGF2、B27 购于德国 Miltenyi 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)购于北京 Solarbio 公司,CD133 磁珠、MACS 分选柱、磁珠分选套装购于德国 Miltenyi 公司,新生胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司,鼠抗人 Cyclin D 和 STAT3 抗体购于上海联世生物科技有限公司,显色试剂盒购于美国 Pierce 公司,其中 ATRA 通过二甲基亚砜(DMSO)溶解配制成 20 mmol/L, -20 °C 避光保存,使用时通过完全培养基稀释至使用浓度。

1.1.2 仪器 超净工作台(苏州净化设备厂),680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),倒置显微镜和共聚焦荧光显微镜(日本 Olympus 公司),核酸蛋白测定仪和化学发光凝胶成像仪(美国 GE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞培养 将复苏后的人肝癌细胞系 HepG2 细胞通过含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养,在显微镜下观察细胞生长状态和密度,选择生长状态良好和密度达到 85% 以上的细胞进行传代培养。

1.2.2 HepG2 肝癌细胞株中 CD133⁺ 细胞的磁珠分选 取出培养箱中的 HepG2 进行胰酶消化后,在细胞冲洗液里加入 FcR Blocking 20 μL 和 CD133 磁珠抗体 20 μL,混匀后在 4 °C 孵育 30 min 后进行磁珠抗体孵育,再进行磁珠分选,分选出 CD133⁺ 的 HepG2 肝癌干细胞。

1.2.3 干细胞培养、纯化和鉴定 肝癌干细胞(HepG2/CD133⁺)的培养基为不含酚红的 DMEM/F12,含有 20 ng/mL EGF、10 ng/mL FGF2 和 1% B27 生长因子以维持干细胞的干性和生长;细胞培养于悬浮细胞 6 孔培养皿中,当细胞生长到 5 d 形成干细胞球后,300 r/min 离心收集细胞;移除上清液,加入 1 mL 胰酶进行重悬,静置 5 min;用移液器反复吹打直至细胞球变成单个细胞,PBS 清洗后再次 300 r/min 离心收集细胞;去除上清液,将细胞重悬于干细胞培养基中,按 1:2 比例传代于新的 6 孔悬浮细胞培养板中;每天观察细胞状态,防止污染;CD133⁺ 细胞每培养 3 代后(每代 5~7 d),用 CD133 磁珠抗体进行分离纯化,保证 CD133 的高阳性率,分离纯化后进行流式细胞鉴定 CD33⁺ 细胞纯度。

1.2.4 细胞增殖实验(MTT 法) 取培养后肝肿瘤相关间充质干细胞样细胞以 2.5×10^7 /L 密度接种于 96 孔板,调整细胞浓度为 5×10^3 /mL、每孔 200 μL、边缘孔 200 μL 的 PBS 填充,按 1:1 比例分为高量组、低量组、对照组,待细胞贴壁后弃去培养液,PBS 轻洗 3 次,高量组加入 10 μmol/L ATRA,低量组加入 1 μmol/L ATRA,对照组不作任何处理,按 1、5、10 d 共 3 个时相培养,每孔加入 10 μL 的 MTT(5 g/L)孵育 4 h 后,每孔加入 100 μL DMSO 终止,振荡 10 min,全自动酶标仪检测 570 nm 波长吸光度(A),每个浓度设置 6 个复孔,3 次实验,取平均值。

1.2.5 Cyclin D 和 STAT3 基因蛋白检测(蛋白质印迹法) 提取细胞总蛋白、测定蛋白浓度后定量、加上样缓冲液 99 °C 变性 10 min、蛋白上样后,电泳、转硝酸纤维素膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,按分别加入 1:1 000 的 Cyclin D 和 1:20 000 的 GAPDH 一抗,4 °C 过夜杂交,第 2 天洗膜后分别加入羊和鼠二抗室温杂交 1 h,洗膜后加入显影液显影,以对照组 1.00 为对照,3 次实验,取平均值,以相同的方法测定 STAT3 基因蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件处理数

表 1 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(n)	1 d	5 d	10 d	上升值
对照组	32	0.753±0.042	0.956±0.054	1.254±0.067	0.511±0.026
低量组	32	0.679±0.038	0.875±0.049	1.184±0.061	0.403±0.024
高量组	32	0.624±0.034	0.795±0.041	0.867±0.057	0.244±0.016
F		35.762	47.284	59.782	73.654
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验;计数资料以率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞增殖能力的影响 HepG2肝癌干细胞在 1、5、10 d 细胞增殖能力方面,高量组、低量组、对照组呈逐渐上升趋势,但高量组上升值明显低于低量组,低量组上升值明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 1。

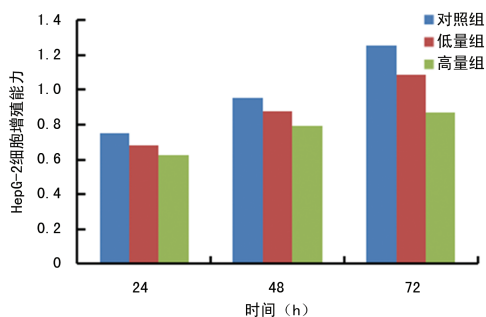


图 1 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞增殖能力的影响

2.2 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞 Cyclin D 基因蛋白表达的影响 蛋白质印迹法结果表明,与对照组比较,高量组、低量组 Cyclin D 基因蛋白表达水平不断下降,但高量组下降值明显高于低量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2、图 2~3。

表 2 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞 Cyclin D 基因蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(n)	1 d	5 d	10 d	下降值
对照组	32	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	0.00±0.00
低量组	32	0.91±0.08	0.85±0.07	0.79±0.05	0.23±0.03
高量组	32	0.84±0.07	0.78±0.06	0.68±0.04	0.31±0.04
F		23.457	30.428	42.861	48.762
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞 STAT3 基因蛋白表达的影响 蛋白质印迹法结果表明,与对照组比较,高量组、低量组 STAT3 基因蛋白表达水平不断下降,但高量组下降值明显高于低量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3、图 4 和 5。

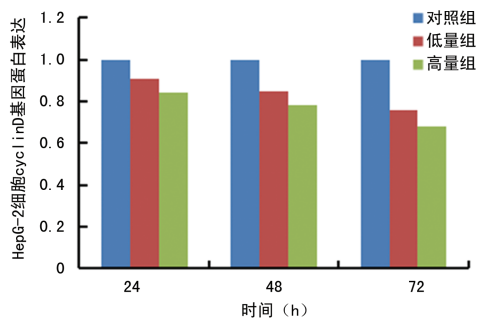


图 2 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞 Cyclin D 基因蛋白表达的影响

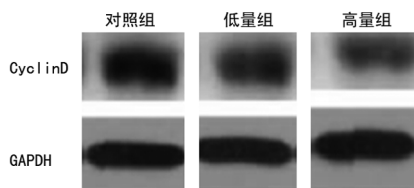


图 3 Cyclin D 基因蛋白蛋白质印迹法

表 3 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞 STAT3 基因蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(n)	1 d	5 d	10 d	下降值
对照组	32	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	0
低量组	32	0.94±0.08	0.88±0.06	0.82±0.05	0.20±0.03
高量组	32	0.87±0.07	0.79±0.05	0.70±0.04	0.31±0.04
F		20.436	26.751	38.927	53.612
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

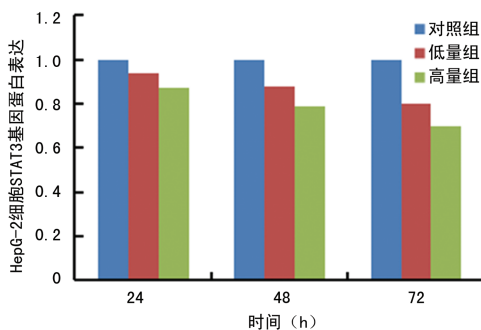


图 4 ATRA 对 HepG2 肝癌干细胞 STAT3 基因蛋白表达的影响

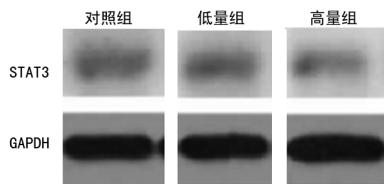


图 5 STAT3 基因蛋白蛋白质印迹法

3 讨 论

肝癌是指发生在肝脏部位的恶性肿瘤病变,其病因尚未明确,是一个多因素、多步骤的复杂过程,主要与病毒感染、环境、肝硬化等有关,患者在早期一般无临床症状亦难以察觉,临床确诊时多已至中晚期,导致无法接受手术切除治疗^[5]。而化疗是临床上治疗肝癌的重要方法之一,通过化疗药物的细胞毒作用可有效灭杀肝癌细胞,但由于肝癌细胞易出现化疗耐药,影响患者的治疗效果,故如何有效确保患者的临床疗效具有重要的价值^[6]。

有研究表明,肿瘤组织中存在一类具有干细胞特征的肿瘤细胞即肿瘤干细胞,有自我更新、多能分化、高速增殖等特性,这类细胞在肿瘤细胞中占有的比例虽小,但可高表达耐药相关基因,以对抗肿瘤细胞凋亡及改变肿瘤细胞表面的药物作用靶点,还可将化疗药物泵出肿瘤细胞,使细胞毒类药物对静息期的肿瘤干细胞及活跃期肿瘤细胞的杀伤作用下降,从而对化疗药物产生抗性^[7]。目前已明确的肝癌干细胞标志有 CD133、EpCAM、CD44、OV6、CK19、CD90 和甲胎蛋白(AFP)等,其中 CD133 最具代表性^[8],本研究选用肝癌公认且最常见的 CD133 抗原作为分选标记。

而有研究表明,细胞周期检测点是细胞增殖调控的关键位点,Cyclin D 蛋白则是调节 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白,可与 CDK4 或 CDK6 形成激酶复合物,在细胞增殖过程中发挥重要作用,如加快释放转录因子 E2F、使关键底物 PRb 磷酸化等,进而促使细胞生长周期加快,在肿瘤干细胞中呈高表达状态,在诱导细胞恶性增殖中发挥重要的作用^[9]。同时,有研究显示 STAT3 基因是肿瘤发生、发展的关键转录因子,可参与调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移等一系列生物学行为的信号通路,其基因表达可促使肿瘤细胞增殖、抗凋亡、缺氧反应、转移、血管生成等多种相关基因的表达,从而增强肿瘤细胞增殖、转移、侵袭等生物学行为的能力^[10]。

ATRA 是临床上常用的一种分化剂,是动物体内维生素 A 的代谢中间产物,具有诱导肿瘤细胞分化和凋亡、增加癌细胞对化疗药物敏感性、促进免疫细胞增殖、增强免疫细胞对肿瘤细胞杀灭作用等作用,已逐渐被应用于多种恶性肿瘤治疗中,且具有良好的疗效^[11]。

本研究通过在肝癌细胞系 HepG2 中应用 ATRA 进行实验,在 HepG2 肝癌干细胞 1、5、10 d 的 A570 值方面,高量组、低量组、对照组呈逐渐上升趋势,但高量组上升值明显低于低量组,低量组上升值明显低于对照组,表明 ATRA 可有效抑制 HepG2 肝癌干细胞的增殖,且其药物浓度越高,抑制作用越显著。这可能是由于 ATRA 可诱使肿瘤干细胞分化,使异常的肿瘤干细胞分裂方式增加细胞数量的复杂过程得以恢复,并使其分化^[12-13],尤其是使其中的肝肿瘤干细胞分化而失去干细胞自我更新、多能分化、高速增殖等特性,进而被 ATRA 诱导和分化为肝癌细胞,从而有效抑制 HepG2 肝癌干细胞的增殖。同时,随着时间的推移,可能因为增殖周期(2~3 d)比肝癌干细胞短(5~7 d),肝癌细胞又可再被 ATRA 分化为增殖周期接近正常的细胞^[13-14],从而有效降低了肿瘤细胞侵袭及迁移能力及抑制了肿瘤的复发与转移,并有效减少了干细胞高表达耐药相关基因的作用,有利于提高疗效。同时研究中发现蛋白质印迹法 ATRA 的 1、5、10 d 结果表明,与对照组比较,高量组、低量组 Cyclin D 和 STAT3 基因蛋白表达水平不断下降,但高量组下降值明显高于低量组,表明 ATRA 可有效降低肝癌细胞系 HepG2 中肿瘤干细胞 Cyclin D、STAT3 等基因蛋白表达水平。这可能是 ATRA 能够有效激发肝肿瘤干细胞的分化潜能,使肝肿瘤干细胞周期得以调节,导致肝肿瘤干细胞无法获得自主生长信号,尤其是可能通过抑制调节 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白 Cyclin D 的表达,使肝肿瘤干细胞增殖周期延长,并可能通过抑制 STAT3 基因的活化,使肝肿瘤干细胞增殖、抗凋亡、缺氧反应、转移、血管生成等多种相关基因的表达下降^[15],有效抑制了 HepG2 肝癌干细胞的增殖并诱导其向肝肿瘤细胞分化,并随着 ATRA 的持续分化作用,能够进一步促使肝肿瘤细胞趋向分化为接近正常的细胞,从而减弱肝肿瘤细胞增殖、转移、侵袭等生物学行为的能力。但本研究仍存在不足,ATRA 如何下调 Cyclin D、STAT3 的机制及相关通路仍不清楚,还需做大量的研究以作探讨。

综上所述,ATRA 可有效降低 HepG2 肝癌干细胞 Cyclin D、STAT3 等基因蛋白表达水平,有利于抑制 HepG2 肝癌干细胞的增殖。

参考文献

- [1] KIM M S, LEE W S, JEONG J, et al. Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37):40158-40171.
- [2] LOU Y, QIAN W, MENG H, et al. High efficacy of arse-

- nic trioxide plus all-trans retinoic acid based induction and maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia[J]. *Leuk Res*, 2013, 37(1):37-42.
- [3] YANG J, CAI X T, LU W G, et al. Evodiamine inhibits STAT3 signaling by inducing phosphatase shatterproof 1 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2):243-251.
- [4] LONG Z J, HU Y, LI X D, et al. ATO/ATRA/anthracycline-chemotherapy sequential consolidation achieves long-term efficacy in primary acute promyelocytic leukemia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e104610.
- [5] 丛文铭, 步宏, 陈杰, 等. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015 版)[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 40(3):241-246.
- [6] STEIN E M, TALLMAN M S. Acute promyelocytic leukemia in children and adolescents[J]. *Acta Haematol*, 2014, 132(3/4):307-312.
- [7] LEPILLER Q, ABBAS W, KUMAR A, et al. HCMV activates the IL-6-JAK-STAT3 axis in HepG2 cells and primary human hepatocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59591.
- [8] MORIYA C, TANIGUCHI H, MIYATA K, et al. Inhibition of PRDM14 expression in pancreatic cancer suppresses cancer stem-like properties and liver metastasis in mice[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(6):638-648.
- [9] FISHER B T, SINGH S, HUANG Y S, et al. Induction mortality, ATRA administration, and resource utilization in a nationally representative cohort of children with acute promyelocytic leukemia in the United States from 1999 to 2009[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(1):68-73.
- [10] FARAH R A, HORKOS J G, BUSTROS Y D, et al. A multicenter experience from Lebanon in childhood and adolescent acute myeloid leukemia: high rate of early death in childhood acute promyelocytic leukemia[J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2015, 7(1):e2015012.
- [11] CHEN H G, XIE K L, HAN H Z, et al. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of molecular Hydrogen in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages[J]. *Int J Surg*, 2013, 11(10):1060-1066.
- [12] SUN X F, HAN L H, SETH P, et al. Disordered purinergic signaling and abnormal cellular metabolism are associated with development of liver cancer in Cd39/ENTPD1 null mice[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1):205-216.
- [13] RAJASEKARAN D, SRIVASTAVA J, EBEID K, et al. Combination of nanoparticle-delivered siRNA for astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) and all-trans retinoic acid (ATRA): an effective therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(8):1651-1661.
- [14] LO-COCO F, AVVISATI G, VIGNETTI M, et al. Retinoic acid and Arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(2):111-121.
- [15] CARBAJO-PESCADOR S, ORDOEZ R, BENET M, et al. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 α and STAT 3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(1):83-91.
- (收稿日期:2018-09-26 修回日期:2018-11-10)
-
- (上接第 732 页)
- [16] HOMMA N Y, HAPPEL M F, NODAL F R, et al. A role for auditory corticothalamic feedback in the perception of complex sounds[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(25):6149-6161.
- [17] ZHOU Y, MESIK L, SUN Y J, et al. Generation of spike latency tuning by thalamocortical circuits in auditory cortex[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(29):9969-9980.
- [18] KATO H K, ASINOF S K, ISAACSON J S. Network-Level control of frequency tuning in auditory cortex[J]. *Neuron*, 2017, 95(2):412-423.
- [19] 卢静, 戴体俊, 曾因明. c-fos 基因表达的相关机制和意义[J]. *国外医学(麻醉学与复苏分册)*, 2004, 25(5):273-275.
- [20] FINLAYSON P G, ADAM T J. Excitatory and inhibitory response adaptation in the superior olive complex affects binaural acoustic processing[J]. *Hear Res*, 1997, 103(1/2):1-18.
- [21] STEINMANN S, MEIER J, NOLTE G, et al. The callosal relay model of interhemispheric communication: new evidence from effective connectivity analysis[J]. *Brain Topogr*, 2018, 31(2):218-226.
- [22] ROCK C, APICELLA A J. Callosal projections drive Neuronal-Specific responses in the mouse auditory cortex[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(17):6703-6713.
- [23] WINER J A, PRIETO J J. Layer V in cat primary auditory cortex (AI): cellular architecture and identification of projection neurons[J]. *J Comp Neurol*, 2001, 434(4):379-412.
- [24] ZHOU Z Q, ZHANG G F, LI X M, et al. Loss of phenotype of parvalbumin interneurons in rat prefrontal cortex is involved in antidepressant- and Pro-psychotic-Like behaviors following acute and repeated ketamine administration[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(2):808-819.
- [25] MOORE A K, WEHR M. Parvalbumin-expressing inhibitory interneurons in auditory cortex are well-tuned for frequency[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(34):13713-13723.
- (收稿日期:2018-09-18 修回日期:2018-11-02)