文章编号:1000-5404(2014)04-0381-05

论著

大鼠增殖抑制基因抑制大鼠胶质瘤细胞的增殖及其机制

高 鹏[1,2],蒋树财[1],郭 晖[3],杨 强[1],方志豪[1],赵 巍[1,4],沈 冰[2] (750004 银川,宁夏医科大学:研究生院[1],总医院神经外科[2],科学技术研究中心[4];261000 山东 潍坊,潍坊市人民医院神经外科[3])

[摘要] **目的** 观察腺病毒介导的大鼠增殖抑制基因(rat hyperplasia suppressor gene, rHSG)在大鼠胶质瘤细胞(C6)中的表达及其对大鼠胶质瘤细胞增殖的影响,并探讨其作用的机制。**方法** 用含有rHSG基因的重组腺病毒载体(Adv-rHSG-GFP)转染C6细胞,采用Western blot和免疫细胞化学法检测rHSG蛋白的表达;使用流式细胞仪分析细胞周期,并结合MTT、细胞计数法和平板克隆形成实验观察rHSG对细胞增殖的影响;应用Western blot检测增殖细胞核抗原(PCNA)和细胞周期调控蛋白$p27^{Kip1}$、$p21^{Cip1}$的蛋白表达变化。**结果** Adv-rHSG-GFP转染组C6细胞中:rHSG蛋白的相对表达量均明显高于未转染组和Adv-GFP转染组($P<0.01$);流式细胞仪分析结果表明细胞周期被阻滞在G_0/G_1期,且MTT、细胞计数和平板克隆形成实验显示大鼠胶质瘤细胞增殖受到明显抑制($P<0.01$);与未转染组和Adv-GFP转染组相比,周期调控蛋白$p27^{Kip1}$、$p21^{Cip1}$表达升高,PCNA表达降低($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** rHSG基因过表达能够抑制大鼠胶质瘤细胞增殖,其机制可能是通过参与细胞周期调节发挥作用。

[关键词] 神经胶质瘤;腺病毒;大鼠增殖抑制基因;细胞,C6
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R730.264 [文献标志码] A

Expression and mechanism of rat hyperplasia suppressor gene suppressing growth of rat C6 glioma cells

Gao Peng[1,2], Jiang Shucai[1], Guo Hui[3], Yang Qiang[1], Fang Zhihao[1], Zhao Wei[1,4], Shen Bing[2] ([1] School of Gratuate, [2] Department of Neurosurgery, General Hospital, [4] Medical Sci-Tech Research Center, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750004; [3] Department of Neurosurgery, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong Province, 261000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of rat hyperplasia suppressor gene (rHSG) in rat glioma cell as well as the effect of rHSG on rat glioma cell proliferation, and to explore the mechanism. **Methods** The rat glioma cells (C6 cells) were transfected with recombinant adenovirus vector containing rHSG (Adv-rHSG-GFP). Western blotting and immunohistochemical assay were applied for determining the expression of rHSG protein. The effect of rHSG on cell cycle was analyzed by flow cytometry. Together with MTT assay, cytometry and plate cloning formation method were used for identifying the effect of rHSG on cell proliferation. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cell cycle regulatory proteins $p27^{Kip1}$ and $p21^{Cip1}$ were determined by Western blotting. **Results** It was observed that in C6 cells transfected with Adv-rHSG-GFP, the protein expression level of rHSG was higher than that in untransfected cells and cells transfected with Adv-GFP ($P<0.01$). The results from flow cytometry indicated that the cell cycle of C6 cells transfected with Adv-rHSG-GFP was arrested in G_0/G_1 phase. MTT assay, cytometry and plate cloning formation results showed that the proliferation of C6 cells transfected with Adv-rHSG-GFP was markedly inhibited ($P<0.01$). The expression levels of $p27^{Kip1}$ and $p21^{Cip1}$ were increased while that of PCNA was decreased in C6 cells transfected with Adv-rHSG-GFP, as compared to untransfected cells and cells transfected with Adv-GFP ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** The over-expression of rHSG can suppress the proliferation of rat glioma cells, with the possible mechanism of cell cycle regulation.

[**Key words**] glioma; adenovirus; rat proliferation inhibition gene; cells, C6

Supported by the Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region Education Department Foundation (NGY2011054). Corresponding author: Shen Bing, E-mail: shenbing315@sina.com

[基金项目] 宁夏回族自治区教育厅基金(NGY2011054)
[通信作者] 沈 冰,E-mail: shenbing315@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.2029.013.html(2013-12-29)

2007年发表的WHO神经系统肿瘤分类中发病率最高,分类、分型最多者当属神经上皮组织肿瘤[1]。其中,神经胶质瘤约占50%。目前,对于胶质瘤仍以手术治疗为主,加以其他方法辅助治疗。恶性胶质瘤尤其是多形胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)恶性程度高,术后复发率高。其中位生存期小于1年,且大多数患者在确诊后2年内死亡[2]。近年来随着医学生物学技术的飞速发展,基因治疗等新疗法已从实验研究向临床应用过渡,并取得了一定的疗效,运用这些方法可以控制肿瘤发展,减少肿瘤血供,缩小肿瘤体积,为手术、放疗、化疗提供机会。

大鼠增殖抑制基因(rat hyperplasia suppressor gene, rHSG)又名大鼠线粒体融合基因2(mitofusin 2, rMfn2),首次被发现于高血压大鼠的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)中,与正常大鼠相比,其在高血压大鼠VSMCs中的表达水平明显下调[3];Chen等[3]在随后的研究中发现,rHSG可以通过抑制Ras/Raf/Mek/Erk途径有效地阻遏VCMCs细胞周期并抑制细胞增殖,这对于研究抑制恶性肿瘤细胞无限增殖有极大的提示。我们前期已经证实rHSG与大鼠胶质瘤发展有相关性,并且通过对大鼠胶质瘤的体内rHSG干预,发现其可抑制胶质瘤血管增生从而抑制肿瘤生长[4-5]。故本研究拟在排除血管干扰的情况下,对外源性rHSG作用于大鼠胶质瘤细胞的影响及其机制进行探讨,旨在为进一步研究rHSG的过表达和恶性胶质瘤生长的关系提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

C6细胞和Adv-rHSG-GFP、Adv-GFP病毒纯化液由本实验室保存;胎牛血清、DMEM培养液购自美国HyClone公司;小鼠抗大鼠rHSG单克隆抗体购自美国Abcam公司;兔抗大鼠$p27^{Kipl}$和$p21^{Cipl}$单克隆抗体购自美国Bioworld公司;小鼠抗大鼠PCNA多克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司;小鼠抗大鼠β-actin多克隆抗体、羊抗小鼠IgG抗体、羊抗兔IgG抗体、免疫组化染色试剂盒和DAB显色液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;全蛋白提取试剂盒和BCA蛋白定量检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组、培养及干预 实验分为3组:未转染组(PBS control)、Adv-rHSG-GFP组和Adv-GFP组,用以下方法分别培养细胞并进行干预,再于24、48、72、96 h收集细胞进行后续实验。

将复苏的C6细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液,置于37 ℃、湿度恒定且CO_2体积分数为5%的培养箱中传代培养。细胞贴壁后,用含0.2% FBS的DMEM同步化24 h,再以最适转染复数(MOI)的腺病毒转染细胞(未转染组使用PBS干预),4 h后弃去培养液,换为完全培养基继续培养直至实验用。

1.2.2 腺病毒转染效率测定

1.2.2.1 荧光显微镜观察绿色荧光 C6细胞按1×10^5个/孔接种于6孔板,细胞贴壁后,用含0.2% FBS的DMEM同步化24 h,再以MOI为0、10、50、80和100的Adv-rHSG-GFP和Adv-GFP进行转染;腺病毒转染24 h后,在荧光显微镜下观察。绿色细胞为转染成功的阳性细胞,若90%以上的细胞带有绿色荧光,提示腺病毒转染效率高。

1.2.2.2 流式细胞仪检测GFP的表达 通过流式细胞仪检测GFP阳性细胞的百分比来评价腺病毒转染的效率;以MOI为0、10、50、80和100的Adv-rHSG-GFP和Adv-GFP转染C6细胞;腺病毒转染24 h后,将细胞制备成单细胞悬液上机检测GFP阳性细胞百分比。

1.2.3 观察干预后细胞内rHSG蛋白的表达

1.2.3.1 免疫细胞化学法 C6细胞以5×10^4个/孔种于24孔板中制成细胞爬片,培养细胞并进行干预;分别在各时间点收集细胞,按照免疫组化染色试剂盒说明书的步骤操作,后经DAB显色、苏木精对比染色、梯度乙醇脱水、干燥和封片。C6细胞的细胞质显示棕黄色或棕褐色着色为rHSG阳性。使用Olympus BH2-RFCA显微镜(×400)对爬片进行拍照,应用Image Pro Plus 6.0图像分析软件来计算每张爬片阳性区域的平均光密度(IOD/area),该值用于评价rHSG阳性的强弱。

1.2.3.2 Western blot法检测干预后细胞内rHSG及PCNA、$p27^{Kipl}$、$p21^{Cipl}$蛋白的表达 C6细胞以1×10^6个/孔种于60 mm培养皿中,培养细胞并进行干预,在既定时间点用细胞刮收集细胞;按照全蛋白提取试剂盒说明书的步骤提取蛋白样本,采用BCA法测定样本浓度;取适量蛋白样本加入上样缓冲液100 ℃煮沸6 min变性,经SDS聚丙烯酸胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和电转膜后,用5%脱脂奶封闭1 h,再加一抗在4 ℃冰箱中孵育过夜,所用一抗浓度如下:rHSG(1∶400),PCNA(1∶200),$p27^{Kipl}$(1∶500),$p21^{Cipl}$(1∶500),β-actin(1∶1 000);用TBST洗膜3次,再加入相应的二抗杂交;化学发光法检测rHSG、PCNA、$p27^{Kipl}$、$p21^{Cipl}$蛋白的相对表达量。

1.2.4 观察rHSG对细胞增殖的影响

1.2.4.1 台盼蓝拒染法计数细胞 C6细胞以5×10^4个/孔种于6孔板,各组每个时间点设3个平行孔,培养细胞并进行干预;用细胞重悬液收集细胞后与台盼蓝染色液1∶1轻轻混匀,染色3 min后用血细胞计数器光镜下计数活细胞数(死细胞被染成淡蓝色,而活细胞拒染)。

1.2.4.2 MTT法 C6细胞以3×10^3个/孔种于96孔板,各组每个时间点设6个平行孔,培养细胞并进行干预;检测前4 h吸去培养液,PBS洗涤1次,加MTT溶液50 μL/孔,37 ℃孵育30 min后倾斜板30°,小心吸出上清液,再加150 μL/孔二甲基亚砜(DMSO),振荡10 min,溶解紫色结晶;选择490 nm波长,用酶标仪测定每孔OD值。

1.2.4.3 平板克隆形成实验 取各时间点各组细胞制备单细胞悬液,调整细胞密度,接种于60 mm培养皿中(500个/皿),十字方向轻轻晃动培养皿使细胞分散均匀;于37 ℃、5% CO_2培养箱中,静置培养14 d;弃去培养液,加甲醇固定后结晶紫染色,流水洗去染色液室温下干燥。普通光镜下观察克隆数,细胞数大于50个为1个克隆数,并计算克隆形成率[克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%]。

1.2.4.4 流式细胞仪检测 rHSG 对细胞周期的影响 C6 细胞以 5×10^5 个/皿种于 60 mm 培养皿中,培养细胞并进行干预,在既定时间点收集细胞;制备单细胞悬液后加入 70% 乙醇固定过夜,RNA 酶 37 ℃消化 30 min,400 目筛网过滤,PI 4 ℃染色 30 min,流式细胞仪分析细胞周期。

1.3 统计学分析

所有实验至少重复 3 次,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件,样本均数间的比较行单因素方差分析。

2 结果

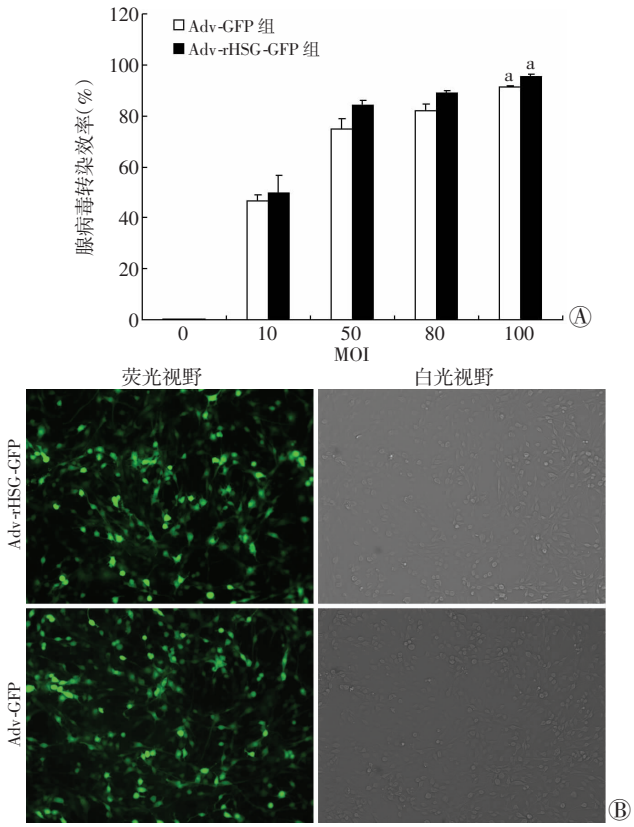
2.1 腺病毒高效转染 C6 细胞

腺病毒转染 C6 细胞 24 h 后,在倒置荧光显微镜下可发现有绿色荧光蛋白表达的阳性细胞,随着 MOI 的增高,阳性细胞比例也在逐渐增高。根据倒置荧光显微镜下的观察结果,收集细胞通过流式细胞仪检测发现,当 MOI = 100 时,转染效率可达 90% 以上。见图 1。

2.2 Adv-rHSG-GFP 转染 C6 细胞后 rHSG 蛋白在细胞中高表达及其下调增殖细胞核抗原(PCNA)和上调细胞周期调控蛋白 $p27^{Kip1}$、$p21^{Cip1}$ 的表达

免疫细胞化学法检测显示,rHSG 蛋白于细胞质中表达,呈棕黄色,各时间点转染 Adv-rHSG-GFP 组比 Adv-GFP 组和未转染组 rHSG 蛋白表达明显增强($P<0.01$,$n=6$),说明转染 Adv-rHSG-GFP 组能够高表达 rHSG 蛋白。24 ~ 96 h 的 rHSG 蛋白表达量分别为(0.120 ± 0.005)、(0.334 ± 0.002)、(0.277 ± 0.011)、(0.305 ± 0.003),由此可知,rHSG 转染细胞后 24 h 即有表达,于 48 h 达到高峰,持续至 72 h 又开始减少,到 96 h 又略升高($P<0.01$,$n=6$),24 ~ 96 h 均呈高表达。见图 2。

Western blot 检测结果显示,各组各时间点均有 rHSG 蛋白的特异性条带,但转染 Adv-rHSG-GFP 组比转染 Adv-GFP 组和未转染组 rHSG 蛋白表达量明显增强($P<0.01$,$n=3$);转染 Adv-rHSG-GFP 组的 rHSG 蛋白表达量于 48 h 达到高峰,72 h 检测其表达量相比 48 h 减少,到 96 h 又略增高且与 48 h 表达量无统计学差异($P>0.05$,$n=3$)。当过表达 rHSG 时,Adv-rHSG-GFP 组各时间点 $p27^{Kip1}$ 和 $p21^{Cip1}$ 蛋白表达量增加,PCNA 蛋白表达量降低($P<0.01$,$n=3$);$p27^{Kip1}$ 蛋白表达量 24 h 即有增高,96 h 达到最大($P<0.01$,$n=3$);$p21^{Cip1}$ 蛋白表达量 24 h 即有增高,96 h 达到最大($P>0.05$,$n=3$);PCNA 蛋白表达量24 h 即有降低,48、72 h 与 24 h 相比无明显变化($P>0.05$,$n=3$),96 h 略升高($P<0.05$,$n=3$)。见图 3。



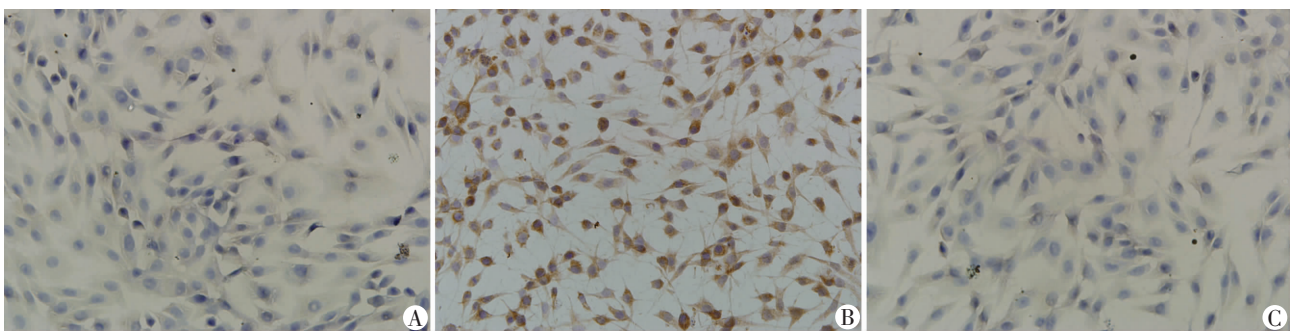
A:转染效率分析 a:$P<0.01$,与未转染组(MOI = 0)比较;B:MOI = 100 时,Adv-rHSG-GFP 和 Adv-GFP 荧光显微镜观察 (×400)

图 1 腺病毒转染 C6 细胞的效率测定

2.3 rHSG 抑制 C6 细胞增殖

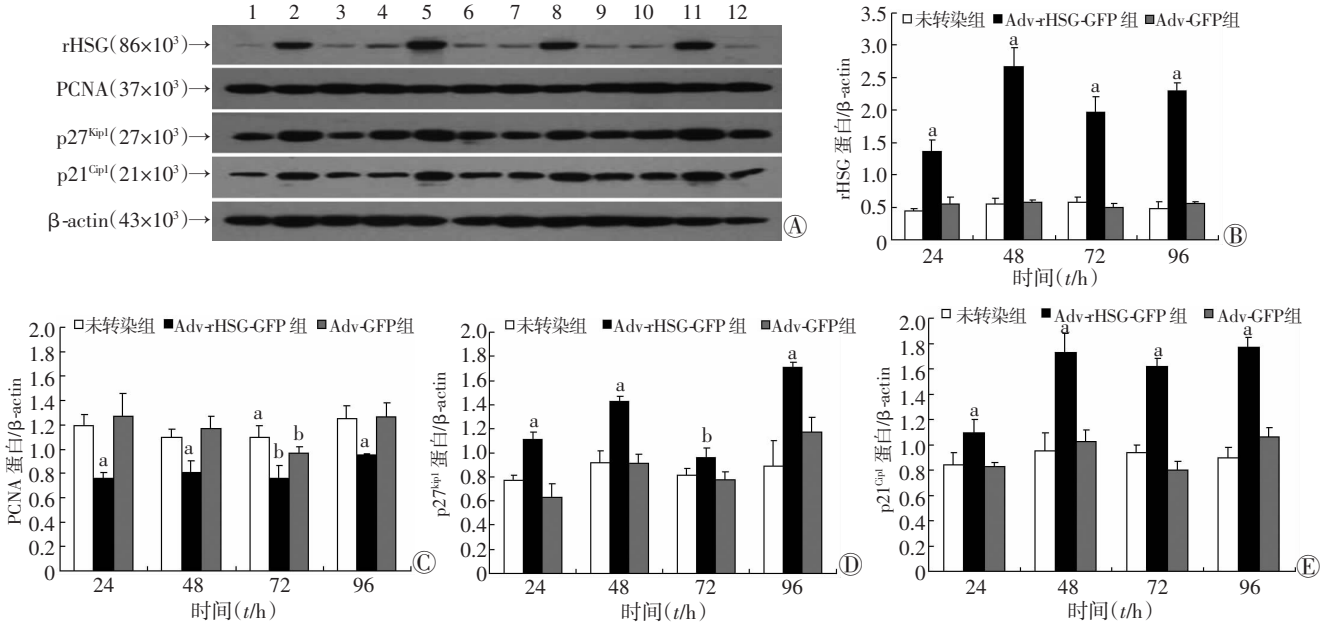
2.3.1 台盼蓝拒染法计数细胞和 MTT 实验 台盼蓝拒染法计数细胞(图 4A)结果显示,Adv-rHSG-GFP 转染 C6 细胞 24 ~ 96 h 后,Adv-rHSG-GFP 组细胞数明显低于未转染组与 Adv-GFP 组($P<0.01$,$n=3$),而未转染组与 Adv-GFP 组无明显差异($P>0.05$);MTT 法(图 4B)检测表明,Adv-rHSG-GFP 组与转染 Adv-GFP 组和未转染组相比,24 ~ 96 h 光密度值明显降低($P<0.01$,$n=3$),细胞增殖被抑制,而未转染组与 Adv-GFP 组无明显差异($P>0.05$)。

2.3.2 平板克隆形成实验 各组细胞克隆形成能力的检测结果显示,各时间点 Adv-rHSG-GFP 组细胞的平板克隆形成率明显低于未转染组与 Adv-GFP 组($P<0.01$,$n=3$),未转染组与 Adv-GFP 组无明显差异($P>0.05$)。见表 1,图 5。



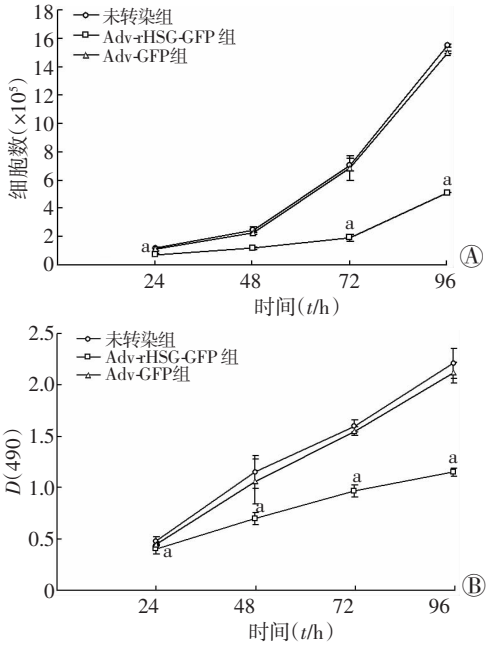
A:未转染组;B:Adv-rHSG-GFP 组;C:Adv-GFP 组

图 2 免疫细胞化学法检测转染 C6 细胞 rHSG 蛋白表达 (SABC ×400)



A：Western blot 检测结果　1,4,7,10：未转染组；2,5,8,11：Adv-rHSG-GFP 组；3,6,9,12：Adv-GFP 组；B～E：rHSG、PCNA、$p27^{Kip1}$、$p21^{Cip1}$ 蛋白表达　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与未转染组和 Adv-GFP 组比较

图3　Adv-rHSG-GFP 转染 C6 细胞后各时间点 rHSG 蛋白的表达以及 PCNA、细胞周期调控蛋白 $p27^{Kip1}$、$p21^{Cip1}$ 的表达



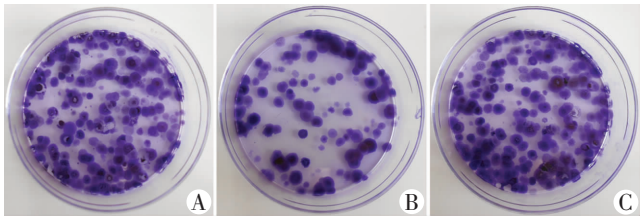
A：台盼蓝拒染法计数细胞检测 rHSG 对 C6 细胞的增殖作用；B：MTT法检测 rHSG 对 C6 细胞的增殖作用　a：$P<0.01$，与未转染组和 Adv-GFP 组比较

图4　台盼蓝拒染法计数细胞和 MTT 法检测转染后 rHSG 对 C6 细胞增殖的影响

表1　平板克隆形成实验检测 rHSG 对胶质瘤细胞增殖的影响（%，$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
未转染组	32.13±1.01	32.07±0.90	31.47±0.46	31.40±0.53
Adv-rHSG-GFP 组	23.27±0.42[a]	18.00±0.53[a]	22.47±1.60[a]	22.87±1.33[a]
Adv-GFP 组	30.93±0.90	31.00±1.00	31.13±1.01	30.67±1.53

a：$P<0.01$，与未转染组和 Adv-GFP 组比较



A：未转染组；B：Adv-rHSG-GFP 组；C：Adv-GFP 组

图5　平板克隆形成实验观察各组细胞克隆形成情况

2.3.3　流式细胞仪检测 rHSG 对细胞周期的影响　流式细胞仪检测结果显示，转染 24 h 后，未转染组、Adv-rHSG-GFP 组和 Adv-GFP 组 G_0/G_1 期细胞百分率分别为（45.28±1.59）%、（53.42±1.09）%、（46.33±0.92）%，转染 48 h 后，3 组细胞进入 G_0/G_1 期细胞百分率分别为（45.14±1.02）%、（63.96±0.96）%、（46.62±2.83）%，转染 72 h 后，3 组细胞进入 G_0/G_1 期细胞百分率分别为（45.05±1.85）%、（58.66±1.10）%、（47.78±1.75）%，转染 96 h 后，3 组细胞进入 G_0/G_1 期细胞百分率分别为（45.21±1.85）%、（61.42±1.01）%、（46.26±0.99）%；结果表明：Adv-rHSG-GFP 组的 C6 细胞周期受到明显影响，与未转染组与 Adv-GFP 组相比，Adv-rHSG-GFP 组的各个时间点处于 G_0/G_1 期的细胞比例明显升高（$P<0.01$，$n=3$），细胞周期被明显阻滞于 G_0/G_1 期；而未转染组与 Adv-GFP 组无显著变化。

3　讨论

rHSG 目前已被定义为细胞增殖抑制基因，通过诸多研究发现，在一些恶性肿瘤细胞株如肺癌细胞株 A549 和结肠癌细胞株 HT-29 中转染 rHSG 后细胞增殖被明显抑制，说明 rHSG 具有明显的抗肿瘤作

用[6-7],但在 rHSG 作用于脑胶质瘤细胞方面尚少见报道。因此,本研究通过一系列实验来探讨 rHSG 基因对脑胶质瘤细胞的作用及其内在机制。

本研究采用重组腺病毒系统,使 rHSG 基因在 C6 细胞内产生高效表达。通过细胞增殖实验,发现 rHSG 基因可明显抑制 C6 细胞增殖,这与上述对于肺癌细胞株 A549 和结肠癌细胞株 HT-29 的研究结果一致。通过对过表达 rHSG 后细胞周期的检测,发现细胞周期被阻滞在 G_0/G_1 期,因此,我们推测,rHSG 可能通过作用于 C6 细胞 G_0/G_1 期,阻滞其向 S 期进展,从而达到抑制 C6 细胞增殖的作用。

脑胶质瘤是细胞增殖紊乱的疾病,肿瘤细胞的发生、发展与细胞周期调控的异常有关,细胞周期调控的破坏在一定程度上会导致肿瘤的发生[8]。p21 和 p27 作为细胞周期调控中常见的基因,它们在氨基酸水平上有着明显的同源性,属细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制因子(CKI),能抑制 G_1 期 CDK-细胞周期蛋白复合体活性而引起 G_1 期停滞[9-10]。PCNA 是真核生物复制复合体的核心成分,现已证明 PCNA 可以通过与蛋白结合对调控细胞周期的相关蛋白产生作用,从而影响细胞周期的调控[11]。例如,PCNA 可与 p21 形成复合体,此复合体能抑制 CDK 活性,从而进一步影响 Rb 蛋白的磷酸化和与之结合的转录因子的释放,将细胞周期阻滞在 G_1 期而不能进入 S 期[12]。本研究发现,rHSG 过表达时,p21、p27 蛋白表达增加,而 PCNA 蛋白表达降低。由此我们推测,rHSG 可能通过促进 p21 和 p27 蛋白的表达来调控 C6 细胞周期,使 C6 细胞周期停滞于 G_0/G_1 期;同时,p21 的高表达又能与 PCNA 蛋白形成大量的复合体,将 C6 细胞阻滞在 G_1 期从而影响细胞周期的进展,这也解释了当 p21 和 p27 蛋白表达增高时 PCNA 蛋白表达降低的原因。

此外,p21 和 p27 还被认为是潜在的抑癌基因,通过对它们的研究发现:p21 蛋白处于高表达状态时,细胞能正常增殖和分化,肿瘤发生的可能性较小[13];p27 蛋白的表达高低与肿瘤的分化程度以及分期有关,p27 蛋白的高表达可以抑制肿瘤细胞的增殖,促进细胞凋亡并降低肿瘤的浸润[14]。PCNA 与细胞 DNA 合成密切相关,在细胞增殖的启动上起重要作用,并且它是目前肿瘤增殖相关研究中可靠的增殖性标志物之一[15]。以上论述都在我们的相关实验结果中得到了证实,因而也成为了 rHSG 的过表达对 C6 细胞增殖有抑制作用的有力证据。

综上所述,rHSG 的过表达可明显抑制大鼠胶质瘤细胞的增殖,其机制可能是通过参与细胞周期调节发挥作用,提示 rHSG 是胶质瘤一个潜在的治疗靶点。

本研究在我们之前的基础上进一步探讨了 rHSG 对大鼠胶质瘤的作用和相关机制。既是对 rHSG 作用大鼠胶质瘤研究的补充,也为后续研究以及其他相关研究提供了实验室依据。但 rHSG 对大鼠胶质瘤细胞凋亡、迁移和细胞外基质成分的改变及其作用机制还需进一步的研究。

参考文献:

[1] Fuller G N, Scheithauer B W. The 2007 revised world health organization (WHO) classification of tumours of the central nervous system: newly codified entities[J]. Brain Pathol, 2007, 17(3): 304-307.

[2] Reifenberger G, Hentschel B, Felsberg J, *et al*. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly[J]. Int J Cancer, 2012, 131(6): 1342-1350.

[3] Chen K H, Guo X, Ma D, *et al*. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 872-883.

[4] 郝文炯, 刘国华, 孙涛, 等. 大鼠增殖抑制基因表达变化与恶性脑胶质瘤生长的关系[J]. 肿瘤, 2009, 29(3): 235-239.

[5] 王占伟, 郝文炯, 赵巍, 等. 腺病毒介导的大鼠增殖抑制基因抑制大鼠胶质瘤的生长[J]. 肿瘤, 2012, 32(9): 696-702.

[6] Karbowski M, Lee Y J, Gaume B, *et al*. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis [J]. J Cell Biol, 2002, 159(6): 931-938.

[7] Wu L, Li Z, Zhang Y, *et al*. Adenovirus-expressed human hyperplasia suppressor gene induces apoptosis in cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(1): 222-232.

[8] Coleman W B. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis[J]. Curr Mol Med, 2003, 3(6): 573-588.

[9] Jung Y S, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity[J]. Cell Signal, 2010, 22(7): 1003-1012.

[10] Ou L, Waddell M B, Kriwacki R W. Mechanism of cell cycle entry mediated by the intrinsically disordered protein p27(Kip1)[J]. ACS Chem Biol, 2012, 7(4): 678-682.

[11] Geng L, Huntoon C J, Karnitz L M. RAD18-mediated ubiquitination of PCNA activates the Fanconi anemia DNA repair network[J]. J Cell Biol, 2010, 191(2): 249-257.

[12] Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes[J]. Mol Biol Cell, 1993, 4(9): 897-906.

[13] Rego M A, Harney J A, Mauro M, *et al*. Regulation of the activation of the Fanconi anemia pathway by the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor[J]. Oncogene, 2012, 31(3): 366-375.

[14] See W L, Miller J P, Squatrito M, *et al*. Defective DNA double-strand break repair underlies enhanced tumorigenesis and chromosomal instability in p27-deficient mice with factor-induced oligodendrogliomas[J]. Oncogene, 2010, 29(12): 1720-1731.

[15] Hagedorn M, Delugin M, Abraldes I, *et al*. FBXW7/hCDC4 controls glioma cell proliferation *in vitro* and is a prognostic marker for survival in glioblastoma patients[J]. Cell Div, 2007, 2: 9.

(**收稿**:2013-09-05;**修回**:2013-11-28)

(编辑 王小寒)