DOI:10.16016/j.1000-5404.201609133

莱菔硫烷抑制 LPS 诱导的小鼠星形胶质细胞增殖

陈亚星,袁继超,刘 伟,朱海涛,廖小俊,文泽贤,李 兰,林江凯 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[**摘要**] **目的** 探讨莱菔硫烷(sulforaphane,SFN)对脂多糖(LPS)诱导的星形胶质细胞(astrocyte,AST)增殖的影响及其机制。**方法** 体外培养小鼠原代星形胶质细胞,给予 0.1 μg/mL LPS 刺激星形胶质细胞活化增殖;同时分别给予不同浓度的莱菔硫烷(10、15、20 μmol/L)处理星形胶质细胞 24 h 后,CCK8 法检测细胞增殖情况;选取 20 μmol/L 作为干预剂量行 GFAP、Ki67 双标免疫荧光染色及流式细胞仪细胞周期检测,进一步验证莱菔硫烷对 LPS 诱导星形胶质增殖的作用;Western blot 检测细胞周期相关蛋白 P27kip1、CyclinD1、PCNA 的表达情况。**结果** CCK8 法检测显示 0.1 μg/mL LPS 能显著促进星形胶质细胞增殖($P<0.01$),而加入 20 μmol/L 莱菔硫烷能显著抑制 LPS 诱导的星形胶质细胞增殖($P<0.01$),并能减少 LPS 刺激下的 Ki67 阳性细胞($P<0.05$);细胞周期分析提示 20 μmol/L 莱菔硫烷可减少 LPS 诱导下的星形胶质细胞 S 期比例,增加 G1 期细胞比例($P<0.05$);Western blot 提示 20 μmol/L 莱菔硫烷能下调 LPS 刺激下 PCNA、CyclinD1 的表达,上调 P27kip1 表达($P<0.05$)。**结论** 莱菔硫烷可以通过调控星形胶质细胞细胞周期,抑制体外 LPS 诱导的星形胶质细胞增殖。

[**关键词**] 莱菔硫烷;星形胶质细胞;LPS;细胞周期;细胞增殖

[**中图法分类号**] R322.8; R363; R979.5 [**文献标志码**] A

Sulforaphane inhibits astrocyte proliferation by induced LPS in mice

Chen Yaxing, Yuan Jichao, Liu Wei, Zhu Haitao, Liao Xiaojun, Wen Zexian, Li Lan, Lin Jiangkai (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of sulforaphane (SFN) on the proliferation of astrocytes induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Primary astrocytes were isolated from the mouse cortex and then cultured *in vitro*. After the cells were stimulated with 0.1 μg/mL LPS in the absence or presence of different concentrations of SFN (10, 15 and 20 μmol/L) for 24 h, the cell proliferation was tested with CCK8 assay. Immunofluorescent double staining and cell cycle analysis were performed respectively in the cells treated with 20 μmol/L SFN to further verify the effect of SFN on the proliferation of astrocytes after LPS stimulation. The expression levels of cell cycle related proteins, P27kip1, Cyclin D1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in each group of cells were determined by Western blotting. **Results** CCK8 assay indicated that 0.1 μg/mL LPS promoted the proliferation of astrocytes ($P<0.01$). Treatment of 20 μmol/L SFN inhibited the proliferation significantly ($P<0.01$) and reduced the number of Ki67 positive cells under LPS stimulation ($P<0.05$). Cell cycle analysis showed that 20 μmol/L SFN treatment attenuated the

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81401012);国家自然科学基金面上项目(81571214)

[**通信作者**] 林江凯,E-mail:jklin@tmmu.edu.cn

李 兰,E-mail:lilan88@aliyun.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161129.1659.005.html

increment of cells in S phase and the reduction of cells in G1 phase which were induced by LPS stimulation ($P<0.05$). Western blot assay represented that LPS enhanced the expression of PCNA and Cyclin D1, meanwhile, decreased the level of P27kip1 ($P<0.05$). **Conclusion** SFN inhibits the proliferation of astrocytes induced by LPS, which may be through regulation of cell cycle.

[**Key words**] sulforaphane; astrocyte; LPS; cell cycle; cell proliferation

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81401012) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81571214). Corresponding author: Lin Jiangkai, E-mail: jklin@tmmu.edu.cn; Li Lan, E-mail: lilan88@aliyun.com

星形胶质细胞活化(astrogliosis)是中枢神经系统损伤的重要病理生理学过程,主要表现为星形胶质细胞增殖、肥大、分泌各种炎症因子及细胞外基质[1]。星形胶质细胞的过度活化是中枢神经系统损伤过程中造成二次损伤的主要因素之一[2-4],尤其是星形胶质细胞活化后期所形成的胶质瘢痕是阻碍神经元轴突再生的主要障碍[2,5-6]。研究表明,炎症是导致星形胶质细胞增殖活化和胶质瘢痕形成的主要原因[5]。目前,如何减少中枢神经系统损伤后过度的炎症反应和星形胶质细胞的活化是中枢神经系统损伤的主要研究方向之一。

莱菔硫烷又名萝卜硫素,是在西兰花等十字花科植物中提取出的天然生物活性物质,具有显著的抗氧化、抗肿瘤、抗炎等广泛作用[7-9];作为常见的抗氧化、抗炎物质,我们的前期研究已证实莱菔硫烷可以抑制小鼠脊髓损伤后损伤部位炎症因子的分泌,抑制胶质瘢痕的形成[10]。本实验通过体外 LPS 刺激星形胶质细胞活化增殖并施以莱菔硫烷干预,利用 CCK8 实验、Ki67 免疫荧光染色、流式细胞仪分析细胞周期、Western blot 检测细胞周期相关蛋白表达等方法,进一步探讨莱菔硫烷对星形胶质细胞活化增殖的作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 实验动物 健康雌性及雄性 ICR 小鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,饲养于西南医院 SPF 级动物房,出生 1~3 d 的 ICR 乳鼠均由该小鼠繁殖而来。实验严格遵照第三军医大学实验动物实验管理规定进行。

1.1.2 主要试剂及药品 山羊源 GFAP 抗体(Abcam,英国),兔源 S100β 抗体(Sigma,美国),兔源 Cyclin D1 抗体(Boster,中国),兔源 Ki67 抗体(Abcam,英国),兔源 PCNA 抗体(Boster,中国),小鼠源 P27kip1 抗体(Boster,中国),小鼠源 β-actin 抗体(Santa Cruz,中国),Cy3 驴抗兔二抗(Santa Cruz,美国),FITC 驴抗羊二抗(Santa Cruz,美国),DMEM/F12(HyClone,美国),0.25% 胰蛋白酶(HyClone,美国),胎牛血清(Gibico,美国),莱菔硫烷(LKT,美国),CCK8 试剂盒(Dojindo,日本),细胞周期检测试剂盒(贝博生物,中国)。

1.1.3 主要仪器 多功能酶标仪(Thermo Fisher,美国),Western blot 设备(Bio-Rad,美国),冷冻离心机(Eppendorff,德国),激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss,德国),CO_2 细胞孵箱(Thermo Fisher,美国)。

1.2 方法

1.2.1 原代小鼠皮层星形胶质细胞培养与鉴定 取出生 1~3 d 内的 ICR 乳鼠,75% 酒精消毒后迅速断头,逐层剪开皮肤及颅骨,从颅底完整取出脑组织置于冰 HBSS 缓冲液中。体视显微镜下分离大脑皮层,完整剥除脑膜。剪碎皮层组织,0.25% 胰蛋白酶 37 ℃消化 10 min 后加入完全培养基(含 10% 胎牛血清 DMEM/F12)终止消化。反复轻柔吹打组织,70 μm 滤网过滤。滤液 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入新鲜完全培养基重悬细胞后接种于细胞培养瓶中,移入 5% CO_2、37 ℃孵箱培养。2~3 d 换液 1 次,培养第 9 天细胞完全融合后,转移至恒温定轨摇床 230 r/min、37 ℃摇床 22 h 后换液,剩余贴壁细胞胰酶消化后接种至激光共聚焦培养皿及 6 孔板中,行 GFAP 及 S100β 双标鉴定,阳性细胞达 95% 以上。细胞在接种后 48 h 行 LPS 及莱菔硫烷分组进行干预。

1.2.2 CCK8 法检测星形胶质细胞增殖 将纯化的星形胶质细胞按 3 000 个/孔接种至 96 孔板中。细胞贴壁 18 h 后将培养基更换为无血清 DMEM/F12 细胞处理 24 h 后转为含 1% 胎牛血清的 DMEM/F12。设空白对照组、LPS 刺激组、DMSO + LPS 组、LPS + 莱菔硫烷(10、15、20 μmol/L)干预组。每组 5 个复孔,干预 24 h。干预结束后各孔分别加入 10 μL CCK8 溶液,37 ℃ 孵育 2 h 后,使用多功能酶标仪在 450 nm 波长读取 $D(450)$ 值。

1.2.3　免疫荧光双标染色测定 Ki67 阳性细胞率　细胞干预后,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,PBS 漂洗 3 次,0.25% Triton X-100 细胞通透 10 min 后,5% BSA 封闭 2 h,羊源 GFAP 抗体及兔源 Ki67 抗体分别孵育过夜,PBS 漂洗后,孵育相应的荧光二抗、DAPI 染核后封片,置激光共聚焦显微镜下观察,计算 Ki67、GFAP 双标阳性细胞率。

1.2.4　流式细胞仪测定各组细胞周期　原代星形胶质细胞接种于 6 孔板中,细胞 70% 融合时,施以上述干预,24 h 后 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,收集细胞于 EP 管中,75% 冰乙醇 -20℃固定 1 h,冷 PBS 洗涤、重悬细胞后加入 RNase A 溶液,37 ℃水浴 30 min,400 目筛网过滤后加入 400 μL PI,混匀后 4 ℃避光孵育 30 min,流式细胞仪上机检测,最大激发波长 488 nm。

1.2.5　Western blot 检测各组 PCNA、CyclinD1、P27kip1 蛋白表达　纯化的原代皮层星形胶质细胞接种于 6 孔板中,待细胞达 80% 融合时,按空白对照组、LPS 刺激组、DMSO + LPS 组、LPS + 20 μmol/L SFN 组分别施加干预。24 h 后,RIPA 裂解液裂解细胞提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 20 μg 蛋白样品上样,100 V 电泳 1.5 h,200 mA 转膜 2 h,5% BSA 室温封闭 2 h,加入不同一抗 4 ℃孵育过夜;洗膜,室温孵育二抗 2 h,Bio-Rad 凝胶成像仪显影,使用 Image Lab 软件分析条带,检测各组 PCNA、CyclinD1、P27kip1 表达水平。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。

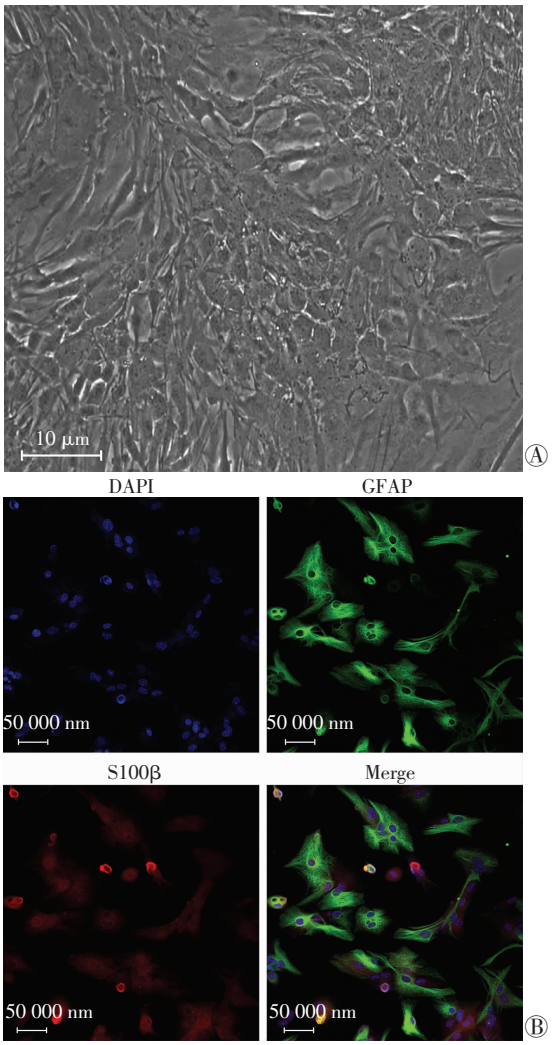
2　结果

2.1　星形胶质细胞的培养和免疫荧光鉴定

星形胶质细胞贴壁生长,呈铺路石样紧密排列,细胞折光度低(图 1A)。免疫荧光染色显示几乎所有细胞表达均表达胶质细胞标志 S100β,95% 以上细胞表达星形胶质细胞标志 GFAP(图 1B)。

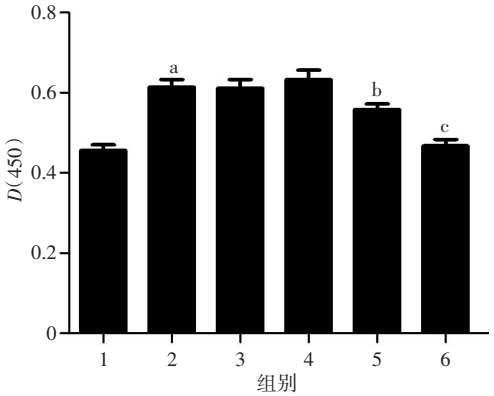
2.2　SFN 对 LPS 诱导星形胶质细胞增殖的影响

0.1 μg/mL LPS 可明显刺激星形胶质细胞增殖($P<0.01$),DMSO 组对 LPS 刺激的星形胶质细胞增殖无明显影响,10 μmol/L SFN 对刺激后星形胶质细胞的增殖较 LPS 刺激组无明显影响,LPS 刺激星形胶质细胞的同时分别给予 15、20 μmol/L SFN,可明显抑制 LPS 诱导的星形胶质细胞增殖($P<0.05$),其中 20 μmol/L SFN 对 LPS 诱导的星形胶质细胞增殖抑制更明显($P<0.01$)。见图 2。



A:相差显微镜下原代培养的星形胶质细胞形态;B:S100β、GFAP 免疫荧光双标染色鉴定原代培养的星形胶质细胞

图 1　星形胶质细胞培养与鉴定



1:空白对照组;2:LPS 组;3:LPS + DMSO 组;4:LPS + 10 μmol/L SFN 组;5:LPS + 15 μmol/L SFN 组;6:LPS + 20 μmol/L SFN 组;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 LPS 组及 LPS + DMSO 组比较

图 2　CCK8 法检测不同浓度 SFN 对 LPS 刺激星形胶质细胞增殖的作用

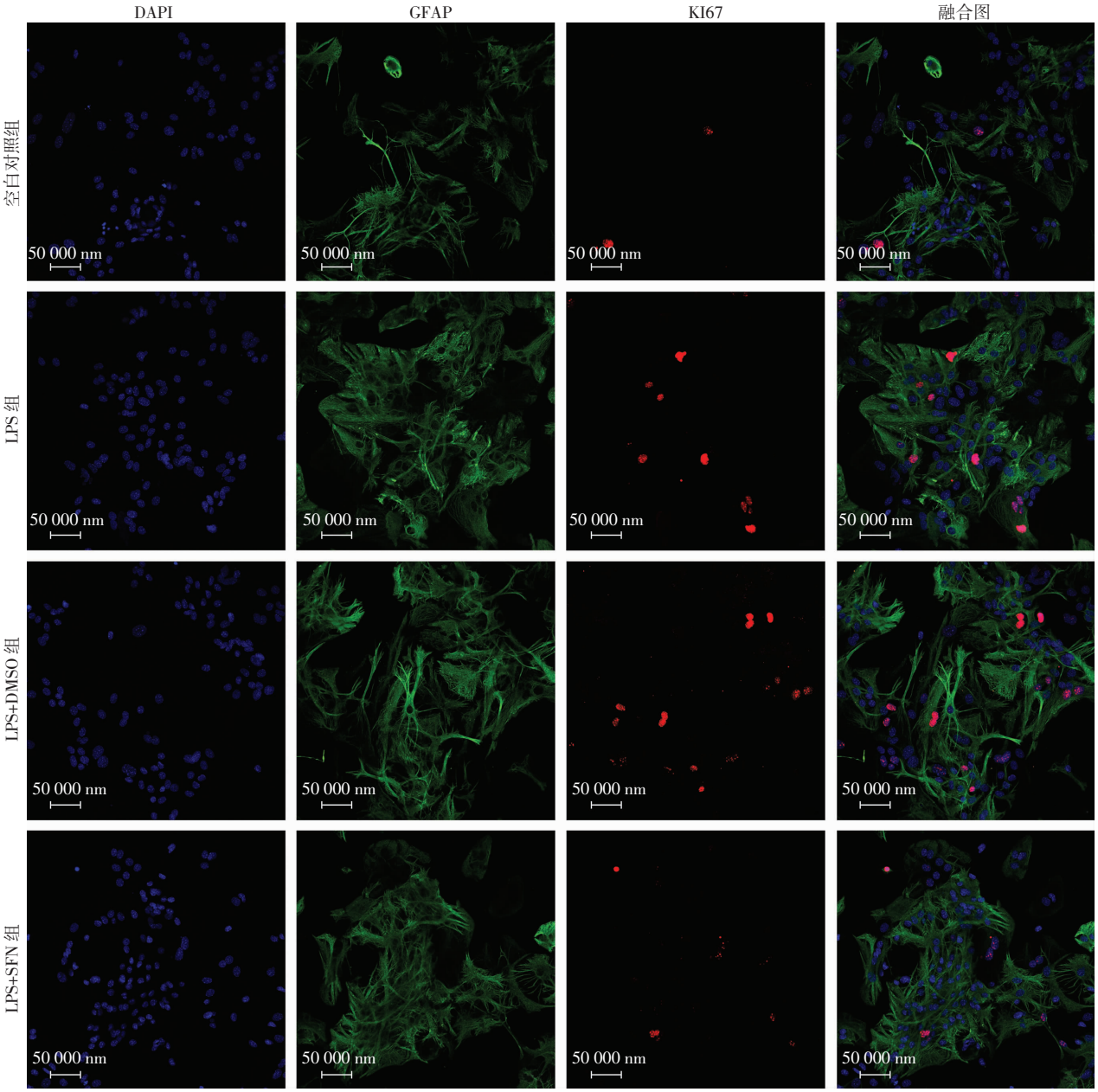


图 3 Ki67、GFAP 双标免疫荧光染色检测各组星形胶质细胞增殖情况

2.3 SFN 对 LPS 刺激后星形胶质细胞 Ki67 阳性率的影响

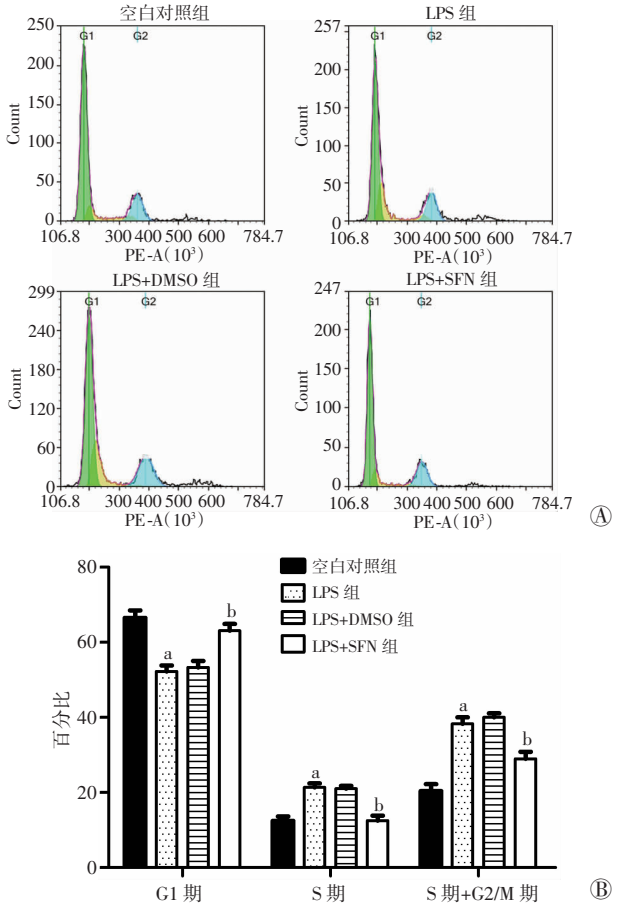
0.1 μg/mL LPS 刺激星形胶质细胞 24 h 后 Ki67 阳性细胞率较空白对照组明显增加,DMSO 组 Ki67 阳性细胞率较 LPS 刺激组无明显改变,20 μmol/L SFN 组可显著减少 LPS 刺激下 Ki67 阳性细胞率。见图 3。

2.4 SFN 对 LPS 诱导星形胶质细胞周期的影响

0.1 μg/mL LPS 刺激使细胞 S 期比例增加而 G1 期比例降低($P<0.05$),DMSO 组各期比例较 LPS 刺激组无明显变化,给予 SFN 可降低 LPS 刺激后处于 S 期细胞的比例及 S 期 + G2/M 期细胞比例($P<0.05$),升高 G1 期细胞比例($P<0.05$)。见图 4。

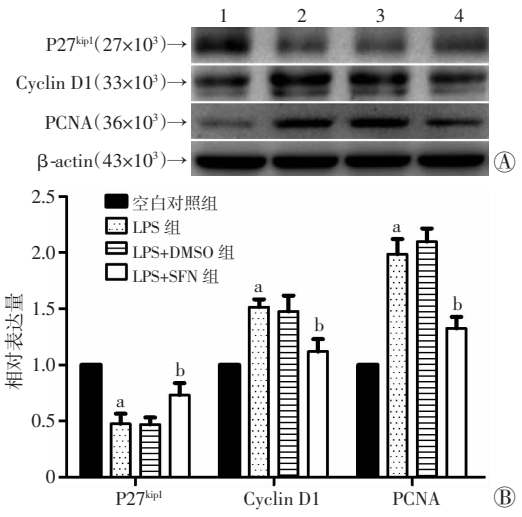
2.5 SFN 对细胞周期及增殖相关蛋白 PCNA、Cyclin D1、P27kip1 表达的影响

Western blot 检测各组细胞周期相关蛋白,LPS 刺激后细胞表达 PCNA 较空白对照组明显增高($P<0.05$),Cyclin D1 表达也随 LPS 刺激明显增高($P<0.05$),P27kip1 表达较空白对照组下降($P<0.05$),加用 SFN 干预后 PCNA 及 CyclinD1 较 LPS 刺激组降低($P<0.05$),P27kip1 表达较 LPS 刺激组有所升高($P<0.05$),而 DMSO + LPS 组 PCNA、Cyclin D1、P27kip1 表达较单纯 LPS 刺激组无明显影响,提示 SFN 可能通过调控 P27kip1、CyclinD1 表达进而影响星形胶质细胞增殖。见图 5。



A:流式细胞仪检测结果;B:细胞周期统计结果;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组和 LPS+DMSO 组比较

图 4 流式细胞仪检测各组细胞周期



A:Western blot 检测结果 1:空白对照组;2:LPS 组;3:LPS+DMSO 组;4:LPS+SFN 组;B:蛋白表达半定量分析结果;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组和 LPS+溶剂组比较

图 5 Western blot 检测各组 P27kip1、Cyclin D1、PCNA 蛋白表达

3 讨论

莱菔硫烷是来源于天然植物中的活性成分,具有可通过血脑屏障、低毒性等特点。目前的研究证实其在脑卒中[11-12]、帕金森病[13]、阿尔茨海默病[14]等多种中枢神经系统疾病模型中均具有保护作用。而莱菔硫烷良好的抗炎、抗氧化药理作用也提示其在抑制星形胶质细胞过度增殖及胶质瘢痕形成中具有潜在的应用价值。

在离体研究中,LPS 刺激诱导星形胶质细胞增殖活化是模拟神经系统损伤后炎症导致的星形胶质细胞增殖活化的常用模型[15-18]。故本实验采用了 LPS 刺激星形胶质细胞增殖模型,进一步研究莱菔硫烷对炎症诱导的星形胶质细胞增殖的作用。

我们通过 CCK8 法和 Ki67 免疫染色测定细胞增殖发现 20 μmol/L SFN 干预细胞时,可明显抑制 LPS 诱导的星形胶质细胞增殖;流式细胞周期检测结果提示在 LPS 的刺激下 S 期星形胶质细胞明显增多,处于静止状态的 G1 期细胞相应减少,而加用 20 μmol/L SFN 处理可以减少 LPS 刺激下 S 期细胞的比例,并降低处于增殖状态的细胞(S+G2/M 期细胞)比例,溶剂对照组则未显示相应的改变。说明 SFN 可以通过调控星形胶质细胞的细胞周期,阻滞处于静止状态的 G1 期细胞向 S 期转化,从而抑制 LPS 导致的星形胶质细胞过度增殖。

Zhao 等[15]在体外实验中运用 LPS 刺激星形胶质细胞模拟脊髓损伤后星形胶质细胞的增殖,发现一定剂量的 LPS 刺激体外培养的星形胶质细胞可以增加细胞内 PCNA 的表达,并且下调 P27kip1 从而促进星形胶质细胞增殖。张双伟等[19]发现脊髓损伤后 P27kip1 表达显著降低,且主要定位于星形胶质细胞,进而推断其可能与脊髓损伤后星形胶质细胞增殖有关。Chung 等[20]发现莱菔硫烷可以通过下调 SKP2 稳定 P27kip1,抑制人结肠癌细胞的增殖。我们的 Western blot 实验结果显示 LPS 处理星形胶质细胞后细胞增殖相关蛋白:PCNA、CyclinD1 蛋白表达水平较对照组显著升高,加用 SFN 后可以减少 PCNA 和 CyclinD1 的表达量;而在 LPS 刺激下细胞周期负调控因子 P27kip1 的表达下降,加用 SFN 干预后 P27kip1 的表达较单纯 LPS 刺激组有所上升。这与细胞周期检测、CCK8 细胞增殖实验和 Ki67 免疫荧光染色结果基本一致,说明 SFN 可能通过某种机制调控 P27kip1 等细胞周期相关调控蛋白的表达,进而抑制 LPS 诱导的星形胶质细胞增殖,其具体调控机制有待于进一步的实验探索。

中枢神经系统损伤发病率、致残、致死率高,目前尚缺乏有效的药物治疗手段。而中枢神经系统损伤后星形胶质细胞增殖活化形成的胶质瘢痕是阻碍中枢神

经系统损伤后功能恢复的主要障碍之一。我们的体外研究初步揭示了莱菔硫烷对炎症诱导的星形胶质细胞增殖中的作用,为莱菔硫烷在中枢神经系统损伤中的应用提供了初步的基础依据。

参考文献:

[1] Escartin C, Bonvento G. Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy[J]. Mol Neurobiol, 2008, 38(3): 231-241. DOI:10.1007/s12035-008-8043-y

[2] Fitch M T, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure[J]. Exp Neurol, 2008, 209(2): 294-301. DOI:10.1016/j.expneurol.2007.05.014

[3] Goldshmit Y, Kanner S, Zacs M, *et al*. Rapamycin increases neuronal survival, reduces inflammation and astrocyte proliferation after spinal cord injury[J]. Mol Cell Neurosci, 2015, 68: 82-91. DOI:10.1016/j.mcn.2015.04.006

[4] Babaee A, Eftekhar-Vaghefi S H, Asadi-Shekaari M, *et al*. Melatonin treatment reduces astrogliosis and apoptosis in rats with traumatic brain injury[J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(9): 867-872.

[5] Sofroniew M V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation[J]. Trends Neurosci, 2009, 32(12): 638-647. DOI:10.1016/j.tins.2009.08.002

[6] Burda J E, Sofroniew M V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease[J]. Neuron, 2014, 81(2): 229-248. DOI:10.1016/j.neuron.2013.12.034

[7] de Figueiredo S M, Binda N S, Nogueira-Machado J A, *et al*. The antioxidant properties of organosulfur compounds (sulforaphane)[J]. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2015, 9(1): 24-39. DOI: 10.2174/1872214809666150505164138

[8] Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, *et al*. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis[J]. Apoptosis, 2015, 20(12): 1531-1562. DOI:10.1007/s10495-015-1169-2

[9] Lee J, Ahn H, Hong E J, *et al*. Sulforaphane attenuates activation of NLRP3 and NLRC4 inflammasomes but not AIM2 inflammasome[J]. Cell Immunol, 2016, 306-307: 53-60. DOI:10.1016/j.cellimm.2016.07.007

[10] 廖小俊, 袁继超, 朱海涛, 等. 莱菔硫烷对小鼠脊髓损伤后后肢功能的作用[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(10): 1066-1072. DOI:10.16016/j.1000-5404.201511182
Liao Xiaojun, Yuan Jichao, Zhu Haitao, *et al*. Effect of sulforaphane on hindlimb function after spinal cord injury in mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(10): 1066-1072. DOI:10.16016/j.1000-5404.201511182

[11] 吴雪梅, 巫静娴, 喻姗姗, 等. 莱菔硫烷对神经元氧糖剥夺/复氧损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(18): 1907-1911.
Wu Xuemei, Wu Jingxian, Yu Shanshan, *et al*. Sulforaphane protects neurons against injury induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation[J]. J Third Mil Med Univ, 2011, 33(18): 1907-1911.

[12] Alfieri A, Srivastava S, Siow R C, *et al*. Sulforaphane preconditioning of the Nrf2/HO-1 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disruption and neurological deficits in stroke[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65: 1012-1022. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.190

[13] Cook A L, Vitale A M, Ravishankar S, *et al*. NRF2 activation restores disease related metabolic deficiencies in olfactory neurosphere-derived cells from patients with sporadic Parkinson's disease[J]. PLoS ONE, 2011, 6(7): e21907. DOI:10.1371/journal.pone.0021907

[14] Zhang R, Miao Q W, Zhu C X, *et al*. Sulforaphane ameliorates neurobehavioral deficits and protects the brain from amyloid β deposits and peroxidation in mice with Alzheimer-like lesions[J]. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2015, 30(2): 183-191. DOI: 10.1177/1533317514542645

[15] Zhao J, Zhang S, Wu X, *et al*. KPC1 expression and essential role after acute spinal cord injury in adult rat[J]. Neurochem Res, 2011, 36(3): 549-558. DOI:10.1007/s11064-010-0377-y

[16] Hong P, Jiang M, Li H. Functional requirement of dicer1 and miR-17-5p in reactive astrocyte proliferation after spinal cord injury in the mouse[J]. Glia, 2014, 62(12): 2044-2060. DOI:10.1002/glia.22725

[17] Zhang H, Liu Y, Li Y, *et al*. The expression of CAP1 after traumatic brain injury and its role in astrocyte proliferation[J]. J Mol Neurosci, 2014, 54(4): 653-663. DOI:10.1007/s12031-014-0363-y

[18] Zhao W, Wang Y, Shi W, *et al*. The expression of FBP1 after traumatic brain injury and its role in astrocyte proliferation[J]. J Mol Neurosci, 2013, 51(3): 687-694. DOI:10.1007/s12031-013-0049-x

[19] 张双伟, 黄克伦, 陈毕, 等. p27kip1 和 Skp2 在大鼠脊髓损伤过程中的表达变化及意义[J]. 中华神经外科杂志, 2014, 30(2): 194-199. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2014.02.027
Zhang Shuangwei, Huang Kelun, Chen Bi, *et al*. The expression and role of p27kip1/Skp2 after spinal cord injury in the rat model[J]. Chin J Neurosurg, 2014, 30(2): 194-199. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2014.02.027

[20] Chung Y K, Chi-Hung Or R, Lu C H, *et al*. Sulforaphane down-regulates SKP2 to stabilize p27(KIP1) for inducing antiproliferation in human colon adenocarcinoma cells[J]. J Biosci Bioeng, 2015, 119(1): 35-42. DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.06.009

(**收稿**:2016-09-20;**修回**:2016-11-07)

(编辑 张 维)