doi:10.11659/jjssx.10E022066

·基础研究·

Epac1对垂体腺瘤细胞增殖和细胞周期的影响及分子机制研究

孙 炜,王俊文,李 然,黄逸民,张 卓,雷 霆 (华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科,湖北 武汉 430030)

[摘 要] **目的** 探索垂体生长激素腺瘤细胞增殖的分子机制。**方法** 收集12例肢端肥大症患者的功能性生长激素垂体腺瘤(fGH-PA)组织样本。qPCR法测定fGH-PA组织和大鼠RGC-5、MMQ、GH3细胞中cAMP直接激活的交换蛋白1(Epac1)mRNA表达水平。免疫组织化学测定fGH-PA组织中Epac1蛋白表达情况。Western blot测定MMQ、GH3细胞中Epac1蛋白表达情况。在GH3细胞中过表达或敲低Epac1,或敲低cAMP反应元件结合蛋白(CREB),流式细胞术测定细胞周期变化;CCK-8法测定细胞增殖能力;Western blot测定细胞内p-CREB、CREB、Cyclin D1、CDK2、p21的表达情况。**结果** qPCR和免疫组织化学结果显示,与旁侧正常组织相比,fGH-PA组织中Epac1 mRNA和蛋白表达水平明显增高(P<0.05)。qPCR和Western blot结果显示,与RGC-5细胞相比,MMQ和GH3细胞中Epac1 mRNA和蛋白表达水平明显增高(P<0.05)。在GH3细胞中过表达Epac1后,与Control组相比,Epac1-OE组G0/G1期和S期细胞占比明显减少(P<0.05),G2/M期细胞占比明显增多(P<0.05);细胞增殖能力明显增强(P<0.05);细胞内p-CREB和Cyclin D1的表达水平明显升高(P<0.05),CDK2和p21的表达水平明显降低(P<0.05),而CREB的表达水平无明显变化(P>0.05)。在GH3细胞中敲低Epac1或敲低CREB后,上述所有结果均发生逆转(P>0.05)。**结论** 垂体生长激素腺瘤细胞中Epac1过表达能够上调细胞内p-CREB的水平,并促进腺瘤细胞通过G1/S期检查点,发生细胞周期检查点失调和大量增殖,但不影响CREB的表达水平。

[关键词] 功能性生长激素垂体腺瘤;细胞增殖;细胞周期;G1/S期检查点蛋白;Epac1;CREB
[中图分类号] R736.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-10-15

Effects and molecular mechanisms of Epac1 on pituitary adenoma cell proliferation and cell cycle

SUN Wei, WANG Jun-wen, LI Ran, HUANG Yi-min, ZHANG Zhuo, LEI Ting (Department of Neurosurgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of pituitary growth hormone adenoma cell proliferation. **Methods** Functional growth hormone-secreting pituitary adenoma (fGH-PA) tissue samples were collected from 12 patients with acromegaly. The exchange protein 1 directly activated by cAMP (Epac1) mRNA expression levels in fGH-PA tissues and rat RGC-5, MMQ and GH3 cells were determined by qPCR. The expression levels of Epac1 in fGH-PA tissues were determined by immunohistochemistry. Western blot was used to determine the expression levels of Epac1 in MMQ and GH3 cells. Overexpression or knockdown of Epac1, or knockdown of cAMP response element-binding protein (CREB) in GH3 cells, cell cycle changes were determined by flow cytometry, cell proliferation ability was determined by CCK-8 assay, and the expression levels of p-CREB, CREB, Cyclin D1, CDK2 and p21 in cells were determined by Western blot. **Results** qPCR and immunohistochemistry results showed that the expression levels of Epac1 mRNA and protein in fGH-PA tissues were significantly higher than those in adjacent normal tissues (P<0.05). qPCR and Western blot results showed that compared with RGC-5 cells, the expression levels of Epac1 mRNA and protein in MMQ and GH3 cells were significantly increased (P<0.05). After overexpression of Epac1 in GH3 cells, compared with the Control group, the proportion of cells in G0/G1 phase and S phase in the Epac1-OE group were significantly reduced (P<0.05), and the proportion of cells in G2/M phase were significantly increased (P<0.05); the cell proliferation ability were significantly enhanced (P<0.05); the expression levels of p-CREB and Cyclin D1 in cells were significantly increased (P<0.05), the expression levels of CDK2 and p21 were significantly decreased (P<0.05), while there was no significant change in the expression level of CREB between the two groups (P>0.05). After knockdown of Epac1 or knockdown of CREB in GH3 cells, all of the above results were reversed (P<0.05). **Conclusion** The overexpression of Epac1 in pituitary growth hormone adenoma cells can up-regulate the levels of p-CREB in cells, and promote adenoma cells to pass through G1/S phase checkpoint, resulting in cell cycle checkpoint disorder and massive proliferation, but it does not affect the expression levels of CREB.

Keywords: functional growth hormone-secreting pituitary adenoma; cell proliferation; cell cycle; G1/S phase checkpoint protein; Epac1; CREB

[基金项目] 国家自然科学基金(82173136)
[通信作者] 雷 霆,E-mail:tlei@tjh.tjmu.edu.cn

垂体腺瘤(pituitary adenoma,PA)起源于垂体前叶,是第三大常见的中枢神经系统肿瘤,是蝶鞍最常见的病变,占所有中枢神经系统肿瘤的10%[1-2]。大多数PA为散发,且65%以上为功能性PA或激素分泌型PA,即使没有发生转移,也会导致激素分泌过多或分泌不足、视觉缺陷以及其他残疾等[3]。功能性生长激素垂体腺瘤(functional growth hormone-secreting pituitary adenoma,fGH-PA)是PA最重要的一种形式,其分泌生长激素和生长激素释放激素,引起生长激素细胞增生和生长激素过量释放[4]。成年人生长激素过量会导致肢端肥大症;年轻人若在骨骺尚未闭合时开始发病,会导致身材高大或巨人症。

细胞周期检查点失调、细胞发生持续增殖是PA生长的主要驱动因素,高达80%的PA存在G1/S期检查点失调[5]。cAMP直接激活的交换蛋白1(exchange protein 1 directly activated by cAMP,Epac1)是一种新发现的cAMP效应器蛋白,在癌症中具有双重功能,可促进或抑制癌症的形成和进展[6]。cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein,CREB)是一种具有cAMP响应元件的转录因子,可通过下游多种通路改变细胞周期进程。本研究通过测定PA组织临床样本中Epac1的表达水平和体外实验,探讨Epac1通过磷酸化CREB引起细胞周期检查点失调、促进PA细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

大鼠视网膜永生化细胞系RGC-5细胞、大鼠泌乳素瘤细胞系MMQ细胞、大鼠垂体瘤细胞系GH3细胞、Ham′s F-12K培养液购自武汉普诺赛生物科技有限公司。TRIzol裂解缓冲液(批号:2792739)、RIPA裂解和提取缓冲液(批号:YJ378720)、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS;批号:2831969RP)、DMEM培养液(批号:2797239)、Lipofectamine 3000脂质体(批号:2754186)购自美国赛默飞世尔科技公司。马血清购自上海酶研生物科技有限公司。FastKing RT Kit(批号:116502396)、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) Kit(批号:205709634)购自天根生化科技有限公司。一抗(兔抗人单抗):Epac1(批号:107789164)、p-CREB(批号:109645324)、CREB(批号:315769455)、Cyclin D1(批号:164389790)、CDK2(批号:324758912)、p21(批号:521467936)、β-actin(批号264683965)购自美国Abcam公司。山羊抗兔IgG(H+L)HRP二抗(批号:LK7046567915)购自杭州联科生物科技有限公司。细胞周期检测试剂盒(PI/RNase A Staining;批号:DJD45762318)购自日本Dojindo生物公司。

正置光学显微镜(型号:ECLIPSE Ti2)购自日本Nikon株式会社,流式细胞仪(型号:CytoFLEX SRT)购自贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司,酶标仪(型号:Sunrise)购自帝肯(上海)实验器材有限公司。

1.2 临床样本收集

收集2019年8月至2021年7月我院12例肢端肥大症患者的fGH-PA组织。其中男7例,女5例;年龄26~56岁,中位年龄39岁。纳入标准:年龄在18岁及以上;基于临床特征和生化证据确诊为肢端肥大症;磁共振成像显示蝶鞍内有垂体瘤;经2 h口服葡萄糖耐量试验后未抑制的生长激素低于0.4 μg/L;胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1,IGF-1)水平超过正常上限的1.3倍;距离最近一次垂体手术已有3个月以上。

1.3 qPCR

使用TRIzol裂解缓冲液在液氮中研磨并裂解组织或细胞,提取组织及细胞总RNA。使用FastKing RT Kit试剂盒合成cDNA。使用SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)Kit进行qPCR扩增。引物序列(5′-3′):Epac1正向GCTGGCTCCTTCGTCTGAG,Epac1反向GCTGGCTCCTTCGTCTGAG;GAPDH正向ATGGGCAGCCGTTAGGAAAG,GAPDH反向AGGAAAAGCATCACCCGGAG。

1.4 免疫组织化学

手术获得fGH-PA样本后,立即浸没于10%中性福尔马林缓冲液中,4 ℃下固定超过48 h后进行石蜡包埋和切片。切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化后,常规使用微波炉进行抗原修复。向切片滴加3%的双氧水,于室温避光封闭30 min;向切片滴加封闭缓冲液,于室温封闭1 h;向切片滴加Epac1一抗工作液,于4 ℃孵育过夜;次日向切片滴加二抗山羊抗兔IgG(H+L)HRP工作液,于室温孵育1 h。向切片滴加生物素底物,于室温孵育30 min;向切片滴加1×DAB显色液,避光显色5~10 min,于光学显微镜下观察并拍照。

1.5 细胞培养

RGC-5细胞培养于含10.0% FBS和100 UI/mL青霉素-链霉素的DMEM培养液中;MMQ细胞和GH3细胞培养于含2.5% FBS、15.0%马血清和100 UI/mL青

霉素-链霉素的Ham's F-12K培养液中,置于37 ℃恒温湿润的CO_2孵育箱中维持培养。

1.6 Western blot

使用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解和提取缓冲液,在液氮中研磨并裂解组织或细胞,提取总蛋白。采用含10.0%脱脂奶粉的TBS-T缓冲液封闭PVDF膜。向膜上滴加一抗工作液并于4 ℃孵育过夜。次日,向膜上滴加二抗工作液并于室温孵育1 h。使用ECL超敏化学发光底物对目的条带进行显影。使用Image J v 1.8.0对图像进行灰度分析。

1.7 转染

使用GH3细胞进行转染,过表达或敲低Epac1,或敲低CREB。使用Lipofectamine 3000脂质体进行转染。转染结束48 h后,检测下游指标。对于过表达Epac1实验,分别向细胞转染pcDNA3.1空质粒(Vector组)或pcDNA3.1-Epac1质粒(Epac1-OE组),未做任何转染处理的细胞为Control组。为了扩增Epac1开放阅读框(open reading frame,ORF)完整序列,使用引物对Epac1 ORF-正向引物5′-CCCCTTATCAAAGCTGATG-3′,Epac1 ORF-反向引物5′-CTAATCCTGCAAAAGAATA-3′扩增Epac1,并将其插入pcDNA3.1载体中,构建Epac1过表达载体。对于敲低Epac1实验,分别向细胞转染Epac1 shRNA(Epac1 shRNA组)或shRNA NT(shRNA NT组),未做任何转染处理的细胞为Control组。Epac1 shRNA序列为5′-GCAGTGCTGCTCTGGCCGG-3′;shRNA NT序列为5′-CACGGTCTGACACTGACTG-3′。对于敲低CREB实验,分别向细胞转染CREB shRNA(CREB shRNA组)或shRNA NT-2(shRNA NT-2组),未做任何转染处理的细胞为Control组。CREB shRNA序列为5′-ACGGAGGAGCTTGTA CCAC-3′;shRNA NT-2序列为5′-CAGACTGTGCT AGACAATG-3′。

1.8 流式细胞术

将6孔板中的各组细胞制备为单细胞悬液,每0.5 mL单细胞悬液中加入5 mL冰预冷的70.0%乙醇,于4 ℃固定细胞过夜。次日,以800 r/min离心15 min,收集固定好的细胞;加入0.5 mL PBS重悬细胞。向单细胞悬液中加入终浓度为50 μg/mL的RNase A,将细胞置于37 ℃水浴中孵育30 min。加入终浓度为65 μg/mL的PI,于冰浴中避光孵育30 min。然后上机流式细胞仪测定细胞周期。

1.9 CCK-8法测定细胞增殖能力

使用CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒进行测定。实验操作步骤参照说明书进行。使用酶标仪在450 nm处测定光密度(optical density,OD)值。

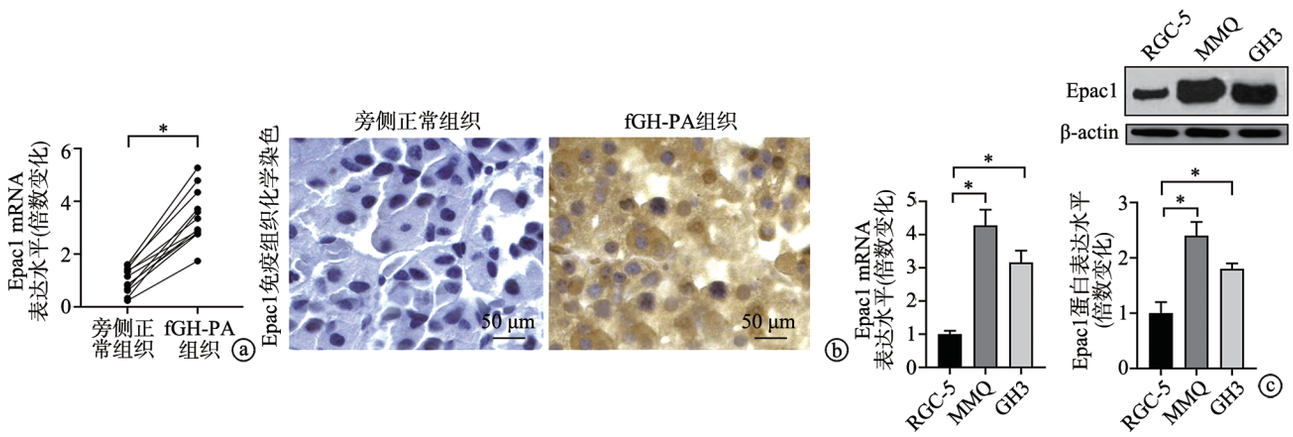
1.10 统计学处理

使用GraphPad Prism v8统计学软件对数据进行分析。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。2组间比较采用t检验;多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Epac1在人fGH-PA组织和大鼠垂体瘤细胞系中过表达

与旁侧正常组织相比,fGH-PA组织中Epac1 mRNA的表达水平明显增高($P<0.05$),见图1a;在fGH-PA组织中Epac1蛋白免疫组织化学着色明显增强($P<0.05$),见图1b。与RGC-5细胞相比,MMQ细胞和GH3细胞中Epac1 mRNA和蛋白的表达水平均明显升高($P<0.05$),见图1c。

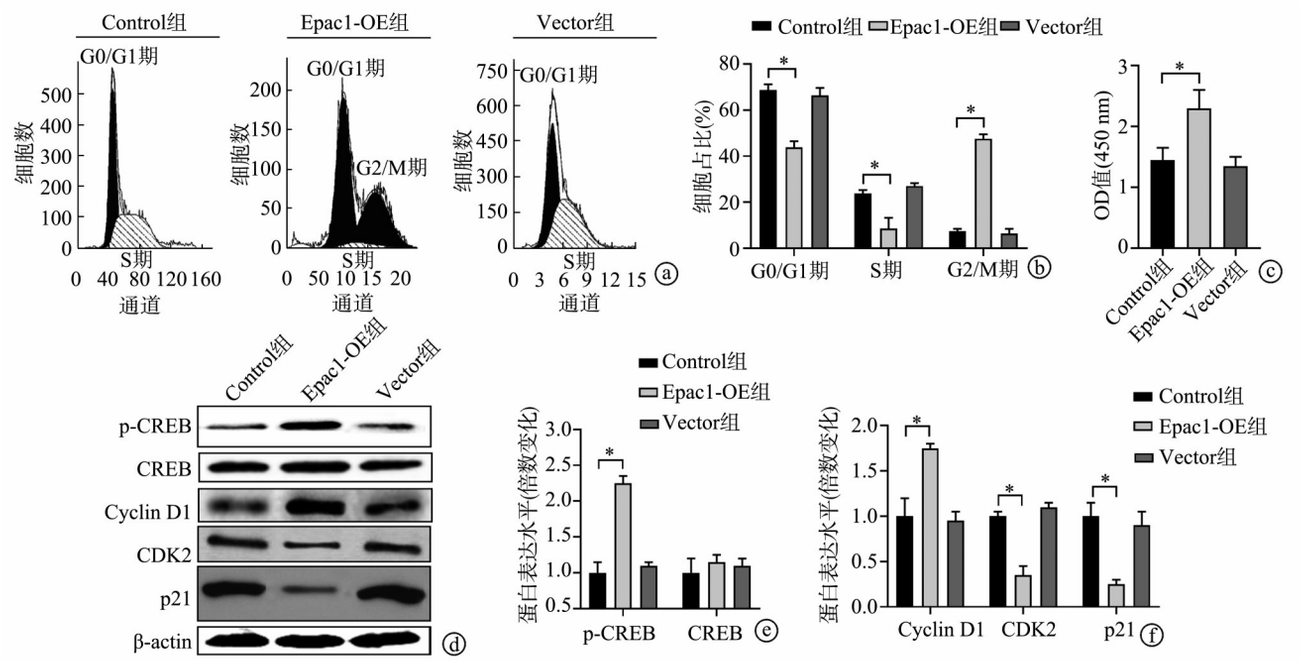


a、b:qPCR和免疫组织化学测定组织中Epac1 mRNA和蛋白的表达;c:qPCR和Western blot测定细胞中Epac1 mRNA和蛋白的表达 *:$P<0.05$

图1 Epac1 mRNA和蛋白在fGH-PA组织和大鼠垂体瘤细胞系中的表达

2.2 过表达Epac1上调p-CREB促进大鼠垂体瘤细胞周期失调和大量增殖

与Control组相比，Epac1-OE组G0/G1期和S期细胞占比明显减少（$P<0.05$），G2/M期细胞占比明显增多（$P<0.05$）；Vector组G0/G1期、S期和G2/M期细胞占比无明显差异（$P>0.05$），见图2a、b。与Control组相比，Epac1-OE组细胞增殖能力明显增强（$P<0.05$）；而Vector组细胞增殖能力无明显差异（$P>0.05$），见图2c。与Control组相比，Epac1-OE组细胞内p-CREB、Cyclin D1的表达水平明显升高（$P<0.05$），CDK2和p21的表达水平明显降低（$P<0.05$），CREB的表达水平无明显变化（$P>0.05$）；而Vector组细胞内上述蛋白的表达水平无明显差异（$P>0.05$），见图2d~f。



a、b：流式细胞术测定细胞周期变化情况和定量统计结果；c：CCK-8法测定细胞增殖能力；d~f：Western blot测定细胞内p-CREB、CREB、Cyclin D1、CDK2、p21的表达 *：$P<0.05$

图2 过表达Epac1前后细胞周期及其相关蛋白和细胞增殖能力变化测定

2.3 敲低Epac1抑制大鼠垂体瘤细胞周期失调和大量增殖

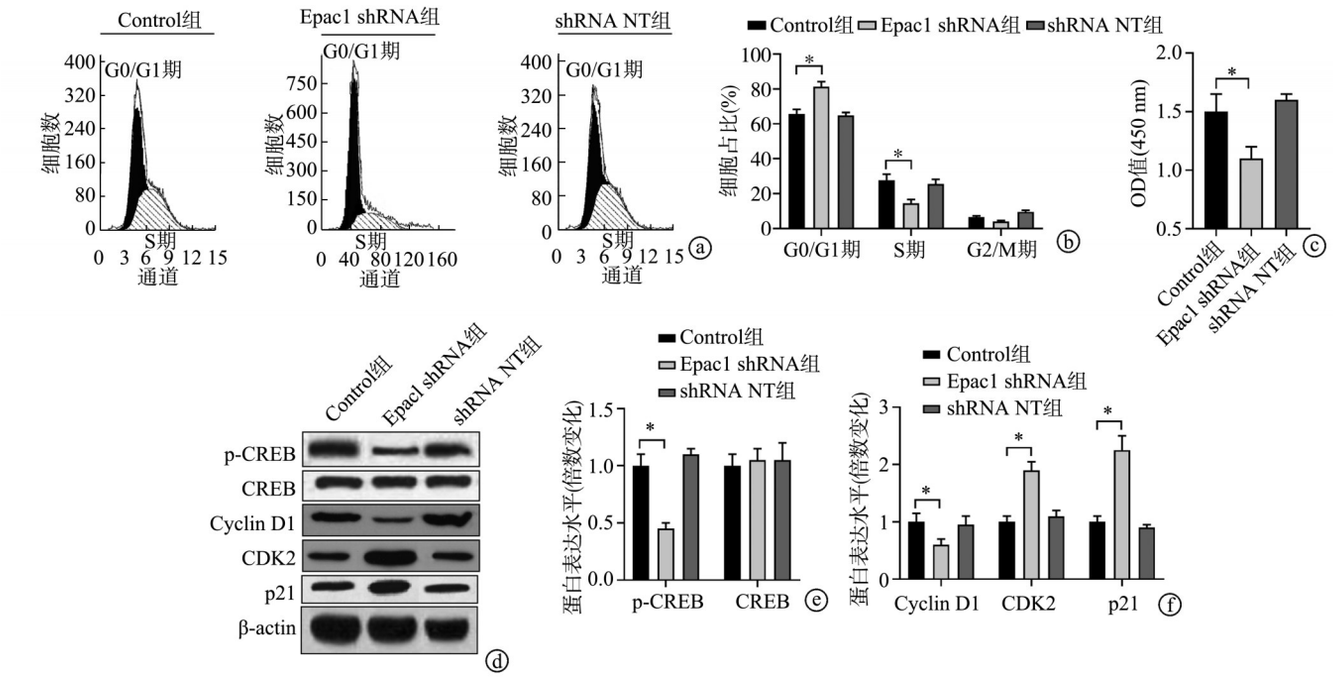
与Control组相比，Epac1 shRNA组G0/G1期细胞占比明显增多（$P<0.05$），S期细胞占比明显减少（$P<0.05$），G2/M期细胞占比无明显差异（$P>0.05$）；shRNA NT组G0/G1期、S期和G2/M期细胞占比无明显差异（$P>0.05$），见图3a、b。与Control组相比，Epac1 shRNA组细胞增殖能力明显减弱（$P<0.05$）；而shRNA NT组细胞增殖能力无明显差异（$P>0.05$），见图3c。与Control组相比，Epac1 shRNA组细胞内p-CREB和Cyclin D1的表达水平明显降低（$P<0.05$），CDK2和p21的表达水平明显升高（$P<0.05$），CREB的表达水平无明显差异（$P>0.05$）；而shRNA NT组细胞内上述蛋白的表达水平无明显差异（$P>0.05$），见图3d~f。

2.4 敲低CREB抑制大鼠垂体瘤细胞周期失调和大量增殖

与Control组相比，CREB shRNA组G0/G1期细胞占比明显增多（$P<0.05$），S期细胞占比明显减少（$P<0.05$），G2/M期细胞占比无明显差异（$P>0.05$）；shRNA NT-2组G0/G1期、S期和G2/M期细胞占比无明显差异（$P>0.05$），见图4a、b。CREB shRNA组细胞增殖能力明显减弱（$P<0.05$）；而shRNA NT-2组细胞增殖能力无明显差异（$P>0.05$），见图4c。与Control组相比，CREB shRNA组细胞内p-CREB、CREB和Cyclin D1的表达水平明显降低（$P<0.05$），CDK2和p21的表达水平明显升高（$P<0.05$）；而shRNA NT-2组细胞内上述蛋白的表达水平无明显差异（$P>0.05$），见图4d~f。

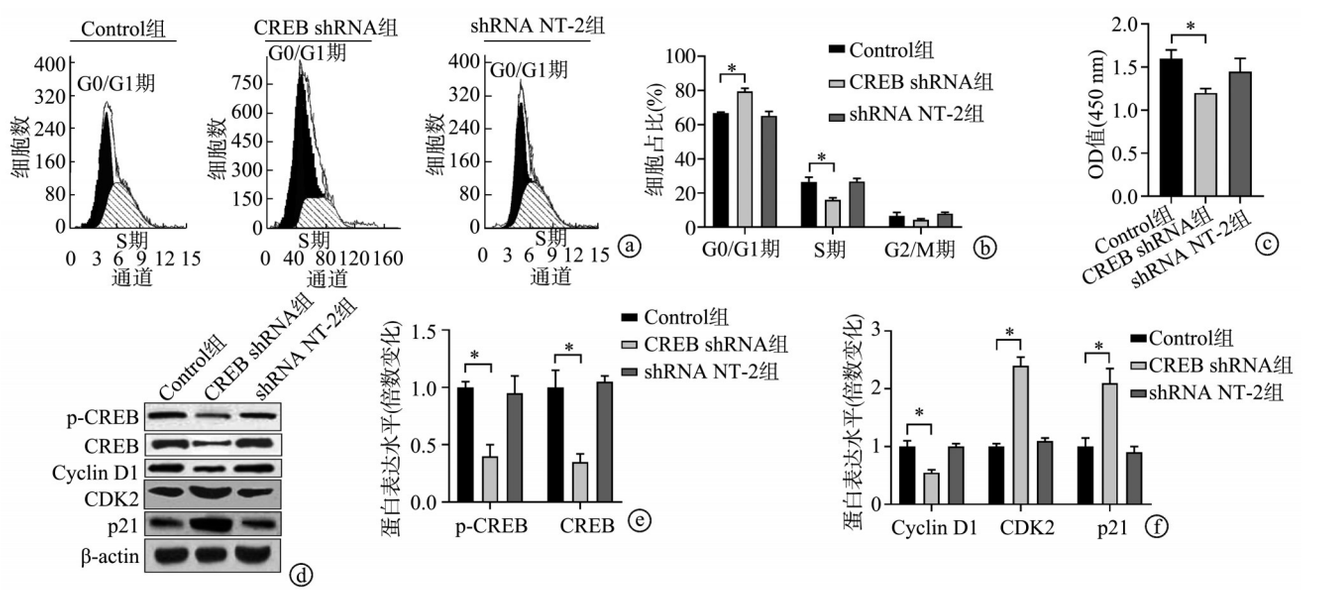
3 讨论

Epac1与多种肿瘤的恶性增殖相关。锂和Epac1特异性抑制剂ESI-09协同抑制胰腺癌细胞增殖和存活[7]。Epac1在低级别神经胶质瘤中的分泌水平高于其在高级别神经胶质瘤中的分泌水平，并参与神经胶质瘤的发展[8]。过表达RBM10通过抑制Epac1的激活



a、b:流式细胞术测定细胞周期变化情况和定量统计结果;c:CCK-8法测定细胞增殖能力;d~f:Western blot测定细胞内p-CREB、CREB、Cyclin D1、CDK2、p21的表达 *:$P<0.05$

图3 敲低Epac1前后细胞周期及其相关蛋白和细胞增殖能力变化测定



a、b:流式细胞术测定细胞周期变化情况和定量统计结果;c:CCK-8法测定细胞增殖能力;d~f:Western blot测定细胞内p-CREB、CREB、Cyclin D1、CDK2、p21的表达 *:$P<0.05$

图4 敲低CREB前后细胞周期及其相关蛋白和细胞增殖能力变化测定

抑制肺腺癌细胞增殖[9]。本研究也发现,Epac1在人fGH-PA组织和大鼠垂体瘤细胞中高表达。

CREB磷酸化和异常活化可促进癌细胞增殖。CREB在食管鳞状细胞癌组织中高表达,并与食管癌患者的淋巴结转移和肿瘤-淋巴结转移-远端转移分期呈正相关。下调CREB的表达可有效抑制体外和体内食管癌细胞生长,诱导癌细胞S期周期停滞,引发细胞凋亡并抑制细胞迁移和侵袭[10]。PAK1对于许多癌症的发生和发展至关重要。在人非小细胞肺癌组织中发现,PAK1与CREB的表达水平均升高,并且PAK1通过磷酸化CREB促进癌细胞增殖[11]。在弥漫性恶性间皮瘤组织中,Aki1高表达并通过Aki1/AKT/p-CREB轴促进癌细胞增殖[12]。本研究结果显示,在GH3细胞中过表达Epac1能够上调CREB的磷酸化水平,敲低

Epac1能够下调CREB的磷酸化水平,上调p-CREB能够促进细胞通过G1/S期检查点并大量增殖。这是一项新的发现,即在人fGH-PA组织和大鼠垂体瘤细胞中高表达的Epac1是通过上调CREB的磷酸化水平促进癌细胞G1/S期检查点失调并增殖。与此同时,本研究中敲低CREB抑制大鼠垂体瘤细胞周期失调和大量增殖的结果也进一步佐证了上述结论。

细胞周期相关蛋白Cyclin D1、CDK2、p21是关键的G1/S期检查点蛋白[13]。Cyclin D1可以直接与基因组DNA结合,作为转录因子激活或下调基因表达,在肿瘤发生和发展过程中发挥关键的促癌细胞增殖作用[14]。组成型激活的Rac1上调p-AKT和Cyclin D1,诱导癌细胞增殖[15]。细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-dependent kinases,CDKs)能够加强对细胞周期S期的控制并抵消DNA损伤诱导的细胞周期停滞[16]。AKT通过上调TopBP1的磷酸化水平绕过CDK2对G1/S期的管控,增强DNA复制并通过S期,促进癌细胞增殖[17]。细胞对S期管控失控会引发癌细胞大量增殖。有研究显示,p21/p27轴为G1/S期转换的关键检查点通路,且该通路在许多癌症中被劫持,使癌细胞维持不受控制的增殖状态[18]。Suv4-20h1通过下调慢性髓性白血病K562细胞中$p21^{WAF1/CIP1}$的表达促进癌细胞由G1期向S期转变[19]。即癌细胞可通过上调Cyclin D1,抑制CDK2和p21的表达,通过G1/S期检查点并恶性增殖。本研究结果显示,过表达Epac1引起的p-CREB水平上调能够引起CDK2和p21的表达下调及Cyclin D1的高表达,导致癌细胞通过G1/S期,发生大量增殖。

综上,Epac1在人fGH-PA组织中高表达,且在GH3细胞中过表达Epac1能够上调p-CREB的水平,促进GH3细胞通过G1/S期检查点,发生细胞周期检查点失调和癌细胞大量增殖。但研究结论尚需进行在体动物模型水平上的验证实验。

[参考文献]

[1] Daly AF, Beckers A. The epidemiology of pituitary adenomas[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2020, 49(3): 347-355. doi: 10.1016/j.ecl.2020.04.002.

[2] 赵 鹏,刘志远,许 可,等. 垂体腺瘤神经外科临床路径[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2022, 14(1): 16-21. doi: 10.3969/j.issn.1674-4136.2022.01.004.

[3] 朱惠娟,王任直. 垂体腺瘤临床诊治进展[J]. 协和医学杂志,2020,11(5):533-536. doi:10.3969/j.issn.1674-9081.2020.05.007.

[4] 高 巍,赵莉红,王 玮,等. 基于WHO新分类的垂体腺瘤诊断及临床病理分析[J]. 首都医科大学学报,2020,41(3):364-371. doi:10.3969/j.issn.1006-7795.2020.03.009.

[5] Ilie MD, Jouanneau E, Raverot G. Aggressive pituitary adenomas and carcinomas[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2020, 49(3): 505-515. doi:10.1016/j.ecl.2020.05.008.

[6] Wehbe N, Slika H, Mesmar J, et al. The role of Epac1 in cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6489. doi: 10.3390/ijms21186489.

[7] Wang X, Luo C, Cheng X, et al. Lithium and an Epac1-specific inhibitor ESI-09 synergistically suppress pancreatic cancer cell proliferation and survival[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(7): 573-580. doi:10.1093/abbs/gmx045.

[8] Richard SA. Epac12: A new and promising protein for glioma pathogenesis and therapy[J]. Oncol Rev, 2020, 14(1): 446. doi: 10.4081/oncol.2020.446.

[9] Jin X, Di X, Wang R, et al. RBM10 inhibits cell proliferation of lung adenocarcinoma via RAP1/AKT/CREB signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 3897-3904. doi:10.1111/jcmm.14263.

[10] Chen P, Li M, Hao Q, et al. Targeting the overexpressed CREB inhibits esophageal squamous cell carcinoma cell growth[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1369-1377. doi:10.3892/or.2017.6167.

[11] Chung JH, Kim DH, Kim YS, et al. Upregulation of p21-activated kinase 1 (PAK1)/CREB axis in squamous non-small cell lung carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(1): 304-316. doi: 10.1159/000494007.

[12] Yamada T, Amann JM, Fukuda K, et al. Akt kinase-interacting protein 1 signals through creb to drive diffuse malignant mesothelioma[J]. Cancer Res, 2018, 75(19): 4188-4197. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0858.

[13] Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(12): 1313-1326. doi:10.1007/s00109-016-1475-3.

[14] Xiong Y, Wang Y, Li T, et al. A novel function for cyclin D1 as a transcriptional role in oncogenesis and tumor development by ChIP-Seq and RNA-Seq[J]. J Cancer, 2021, 12(17): 5181-5192. doi: 10.7150/jca.52909.

[15] Liu L, Zhang H, Shi L, et al. Inhibition of Rac1 activity induces G1/S phase arrest through the GSK3/cyclin D1 pathway in human cancer cells[J]. Oncol Rep, 2017, 32(4): 1395-1400. doi: 10.3892/or.2014.3388.

[16] Bačević K, Lossaint G, Achour TN, et al. CDK2 strengthens the intra-S checkpoint and counteracts cell cycle exit induced by DNA damage[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13429. doi: 10.1038/s41598-017-12868-5.

[17] Liu K, Graves JD, Lee YJ, et al. Cell cycle-dependent switch of TopBP1 functions by CDK2 and AKT[J]. Mol Cell Biol, 2020, 40(8): e00599-19. doi:10.1128/MCB.00599-19.

[18] Hume S, Grou CP, Lascaux P, et al. The NUCKS1-SKP2-p21/p27 axis controls S phase entry[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6959. doi: 10.1038/s41467-021-27124-8.

[19] Wu Y, Wang Y, Liu M, et al. Suv4-20h1 promotes G1 to S phase transition by downregulating p21 WAF1/CIP1 expression in chronic myeloid leukemia K562 cells[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 6123-6130. doi:10.3892/ol.2018.8092.

(编辑:贺绍梅)