神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000978

EPO通过上调 CyclinD1 表达促进胶质母细胞瘤的体外增殖

王文涛，唐兆华，霍　钢，李　英，王海全，叶小琳，刘自力，谭　赢，石　爽
（重庆医科大学附属第一医院神经外科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）对胶质母细胞瘤体外增殖的影响，并探讨其机制。**方法**：体外培养胶质母细胞瘤 U87 细胞株，实验分为对照组、EPO 处理组及 EPO+细胞周期素 D1（CyclinD1）拮抗剂组。对照组：用等体积 PBS 替代 EPO；EPO 处理组：在 U87 细胞的培养基中加入 EPO（0.1 U/ml）处理 7d；EPO+cyclinD1 拮抗剂组：U87 细胞的培养基中同时加入 EPO（0.1 U/ml）及 CyclinD1 拮抗剂（5 μmol/L）共处理 7 d。用 Cell Counting Kit-8（CCK-8）法测细胞增殖情况，细胞倍增时间检测各组细胞增殖速度，RT-PCR、Western blot 和细胞免疫荧光法（immunofluorescence，IF）测定细胞周期关键蛋白 CyclinD1 的mRNA 和蛋白表达变化，流式细胞仪检测各组细胞周期。**结果**：与对照组相比，EPO 处理组中 U87 细胞生长速度明显增快（CCK8：第 3 天 P=0.014，第 5 天 P=0.029，倍增时间：P=0.012），细胞中 CyclinD1 的 mRNA 及蛋白表达水平也明显升高，差异有统计学意义（mRNA：P=0.001，蛋白：P=0.002，荧光定量：P=0.005），流式细胞仪检测发现 U87 细胞的增殖指数也明显升高（P=0.000）；与 EPO处理组相比，EPO+cyclinD1 拮抗剂组细胞 CyclinD1 mRNA 及蛋白的表达水平明显降低（mRNA：P=0.009，蛋白：P=0.000，荧光定量：P=0.013），流式细胞仪检测细胞增殖指数则有显著下降（P=0.000），同时细胞增殖能力和速度较 EPO 处理组明显降低（CCK8：第 3 天 P=0.000，第 5 天 P=0.000，倍增时间：P=0.001）。**结论**：本研究发现 EPO 可显著促进胶质母细胞瘤的体外增殖，上调细胞周期关键蛋白 CyclinD1 的表达，加快细胞增殖周期可能是其重要的分子机制。

【关键词】促红细胞生成素；胶质母细胞瘤；CyclinD1；细胞周期；增殖；CyclinD1 拮抗剂
【中图分类号】R739.41　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-02-22

Erythropoietin promotes the proliferation of glioblastoma cells through up-regulation of CyclinD1 *in vitro*

Wang Wentao, Tang Zhaohua, Huo Gang, Li Ying, Wang Haiquan, Ye Xiaolin, Liu Zili, Tan Ying, Shi Shuang
(Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on the proliferation of glioblastoma cells *in vitro* and its mechanism. ***Methods***: U87 cells were cultured *in vitro* and divided into three groups: control group treated with equal value of PBS; EPO treatment group cultured with a dose of 0.1 U/ml EPO for seven days; EPO + CyclinD1 antagonist group treated with EPO (0.1 U/ml) and CyclinD1 antagonist (5 μmol/L) for seven days. The proliferative ability was measured by cell counting Kit-8 assay and double time; CyclinD1 expression was detected by RT-PCR, Western blot and cell immunofluorescence, respectively. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. ***Results***: EPO promoted the proliferation of U87 cells and the mRNA and protein levels of CyclinD1. CyclinD1 antagonist inhibited the mRNA and protein levels of CyclinD1 induced by EPO; U87 cells were blockaded at G1 stage, and the proliferation of ability was significantly reduced. ***Conclusion***: EPO may significantly promote the proliferation of U87 cells through upregulation the expression of CyclinD1; its molecular mechanism may relate with accelerated cell proliferation cycle.

【Key words】erythropoietin; glioblastoma; CyclinD1; cell cycle; proliferation; CyclinD1 antagonist

作者介绍：王文涛，Email：cqykdxsw@sina.com，
研究方向：颅内肿瘤。
通信作者：霍　钢，Email：Xiaomin198171@tom.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81306409）；国家临床重点专科经费建设资助项目（编号：财社〔2011〕170 号）；重庆市教委科学技术研究资助项目（编号：KJ1500219）；重庆市渝中区科技计划资助项目（编号：20150108）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1645.102.html（2016-05-13）

胶质母细胞瘤是一种恶性程度高、增殖速度快、复发率高的中枢神经系统恶性肿瘤[1]。目前，对于胶质母细胞瘤快速增殖的机制不清楚，尚未开发出有效抑制该肿瘤生长的新药物。促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）及其受体在神经系统、乳腺等正常组织中表达，发挥着自分泌作用，促进细胞增殖、对抗凋亡等重要组织营养与保护功能[2-3]。但 EPO 在中枢神经系统中胶质母细胞瘤的快速增殖能力中的作用及机制尚未见到深入的研究。本研究旨在通过体外实验探讨 EPO 对胶质母细胞瘤增殖的影响及机制。细胞周期素 D1（CyclinD1）是细胞周期中最为关键的调控蛋白，它的表达量增高可使细胞增殖周期缩短，生长速度加快，在细胞增殖的调节中发挥了重要作用[4-5]。本文研究 EPO 是否通过调节 CyclinD1 的表达促进胶质母细胞瘤的增殖。

1 材料与方法

1.1 材料

高糖 DMEM 培养基（美国 Sigma），胎牛血清（美国 Hyclone），胰酶（中国博士德），CCK-8（VAzyme，USA），CyclinD1 多克隆抗体（美国 abcam），CyclinD1 拮抗剂（美国 abcam），RT-PCR 试剂盒（美国 Ferments），Western blot 试剂（中国碧云天），EPO（中国金坦），小鼠血清，荧光（Cy3 or FITC）标记二抗（Jackson ImmunoResearch，Baltimore，MD，USA），DAPI（中国碧云天），青-链霉素（中国碧云天）。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人 U87 胶质母细胞瘤细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 DMEM 培养基在 37 ℃，5%CO_2 和 95%空气组成的湿润孵育箱培养。用内含 0.02%EDTA 的 0.25%的胰酶消化细胞，2~3 d 换液传代。

1.2.2 CCK8 法检测各组生长曲线 U87 胶质母细胞瘤接种于 6 块 96 孔板，细胞密度为 2 000 个/100 μl/孔，用 EPO（0.1 U/ml）、EPO 及 CyclinD1 拮抗剂（5 μmol/L）或 PBS 连续处理 7 d，每孔加 10 μl CCK-8 溶液在 37 ℃培养 1 h，用酶标仪（MultiskanMK33，Thermo Electron Corporation，China）在 450 nm 处检测吸光度（absorbance，A）值。用 CCK-8 定量评估细胞生长能力。本实验重复 3 次（根据细胞增殖曲线选取最佳检测时间点，下同）。

1.2.3 倍增时间检测各组细胞的增殖速度 U87 胶质母细胞瘤接种于 3 个培养瓶中（5 000 个/瓶），用 EPO（0.1 U/ml）、EPO 及 CyclinD1 拮抗剂（5 μmol/L）或 PBS 连续处理 5 d。37 ℃培养 7 d，消化计数。根据倍增时间公式（$h=7\times\log2/(\log t_7-\log t_0)$）计算倍增时间（$t_0$ 为种植的细胞数，t_7 为第 7 天细胞数）。本实验重复 3 次。

1.2.4 RT-PCR 检测各组细胞 CyclinD1mRNA 表达 收集 EPO（0.1 U/ml）、EPO 及 CyclinD1 拮抗剂（5 μmol/L）或 PBS 连续处理 5 d 的 U87 胶质母细胞瘤细胞，试剂盒（Invitrogen）提取总 RNA，用 Promega RT kit 将 1 mg 总 RNA 逆转录为 cDNA 并使用下列引物扩增：CyclinD1 引物上游 5'-TCAGATGTCCACATCTCGGACGTCG-3'，下游 5'-ATGGAACACCAGCTCCTGTGCTGCG-3'，扩增片段长 888 bp；β-肌动蛋白（β-actin）引物上游 5'ACCTCCAACACCCCAGCCATG3'，下游 5'-CTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGG-3'扩增片段长 691 bp（Takara）。每个 PCR 循环包括 95 ℃ 30 s，55℃ 30 s，68 ℃ 1 min。然后将 PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶电泳分离并检测。长波紫外灯下观测照相。用 Quantity One 软件分析电泳条带平均光密度值，cyclinD1/β-actin 积分 A 值为 CyclinD1mRNA 表达水平。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞 CyclinD1 蛋白表达 分别收集用 EPO（0.1 U/ml）、EPO 及 CyclinD1 拮抗剂（5 μmol/L）或 PBS 连续处理 5 d 的 U87 胶质母细胞瘤细胞提取细胞总蛋白。每孔加入 50 μg 蛋白样品电泳，用 PDVF 膜转膜，封闭后加一抗 CyclinD1（1:1 000），4 ℃孵育过夜，加入 HRP 标记的二抗（1:2 000），37 ℃孵育 2 h，ECL 显影，Tubulin 作为内对照参数。用 Fusion 软件分析条带平均光密度值，CyclinD1/α-tubulin 积分 A 值为 CyclinD1 蛋白表达水平。实验重复 3 次。

1.2.6 细胞免疫荧光 将 U87 胶质母细胞瘤细胞消化、计数，接种于内含消毒小玻片的 24 孔板内（5×10^4 个/孔），用 EPO（0.1 U/ml）、EPO 及 CyclinD1 拮抗剂（5 μmol/L）或 PBS 连续处理 5 d，用 PBS 清洗，4%多聚甲醛固定 20 min，0.1% Triton-100 作用 5 min，1%正常小鼠血清稀释 PBS 中封闭非特异性结合 37 ℃ 30 min。随后，用兔抗 CyclinD1 多克隆抗体孵育细胞（1:100）4 ℃过夜。PBS 洗 3 次使用荧光（Cy3 or FITC）标记二抗（1:100）孵育细胞。二抗孵育过后用 DAPI（0.2 mg/ml，2 min）染色样本 DNA。片子储存在 4 ℃暗盒之中通过 ZEISS（Germany Observer.Z1）荧光显微镜观察。实验重复 3 次。

1.2.7 流式细胞术检测各组细胞的细胞周期 分别收集用 EPO（0.1 U/ml）、EPO 及 CyclinD1 拮抗剂（5 μmol/L）或 PBS 连续处理 5 d 的 U87 胶质母细胞瘤细胞，固定于-20 ℃预冷的 70%乙醇 4 ℃过夜。然后，将细胞重悬在含 50 μg/ml 普罗匹定碘化物（PI）和 200 μg/ml RNase A 的普罗匹定碘化物（PI）染色缓冲液中，37 ℃培养 15 min。通过流式细胞仪检测 PI 荧光。增殖指数=(S+G2)/(G1+S+G2)。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

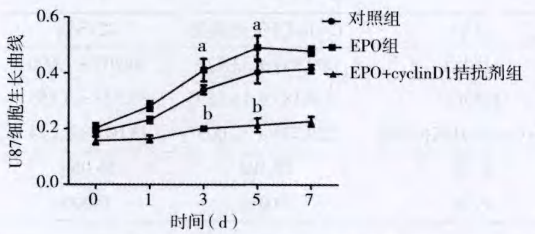
采用 SPSS 17.0 进行分析，计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 CCK8 法检测各组细胞的增殖能力

如表 1 示，对照组、EPO（0.1U/ml）组、EPO+cyclinD1 拮抗剂组处理第 0 天，3 组细胞没有差异，第 1 天 3 细胞出现差异并继续扩大，差异没有统计学意义[对照组（0.230 ± 0.011）；E-

PO组(0.280 ± 0.017)；EPO+cyclinD1 拮抗剂组(0.184 ± 0.013)，P >0.05]，第 3 天时 EPO 处理组与对照组细胞数量的差异有统计学意义(P=0.014)，EPO 处理组和 EPO+cyclinD1 拮抗剂组差异有统计学意义(P=0.000)，第 5 天时上述差异进一步扩大，差异有统计学意义(P=0.029)，EPO 处理组和 EPO+cyclinD1 拮抗剂组差异有统计学意义(P=0.000)，第 7 天 EPO 处理组细胞稍下降，对照组细胞仍有增殖，但两者没有统计学意义(P>0.05)。见图 1。



注：a，EPO 组与对照组比较 P<0.05，b：EPO 组与 EPO+cyclinD1 拮抗剂组比较 P<0.01

图 1　CCK8 检测各组间细胞的 A 值（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.1　A values of each group detected by cell counting Kit 8 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

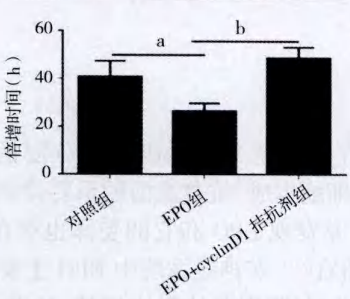
2.2　倍增时间法检测各组细胞增殖速度

如表 1 示，对照组细胞倍增所需时间平均值为(40.79 ± 6.48) h；EPO 处理组倍增时间较对照组显著缩短至(26.55 ± 3.20) h，生长速度明显加快(P=0.012)；EPO+cyclinD1 拮抗剂组倍增时间较 EPO 处理组显著延长至(48.57 ± 4.41) h，生长速度明显降低，差异有统计学意义(P=0.001)。见图 2。

表 1　各组间细胞的 A 值及倍增时间（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Tab.1　A values and doubling time of each group ($\bar{x} \pm s$, n=3)

分组	A值		克隆团数目
	5 d	5 d	
对照组	0.340 ± 0.016	0.404 ± 0.039	40.79 ± 6.48
EPO组	0.411 ± 0.041	0.492 ± 0.042	26.55 ± 3.20
EPO+cyclinD1 拮抗剂组	0.201 ± 0.006	0.213 ± 0.025	48.57 ± 4.41
F 值	52.475	45.396	15.669
P 值	0.000	0.000	0.004



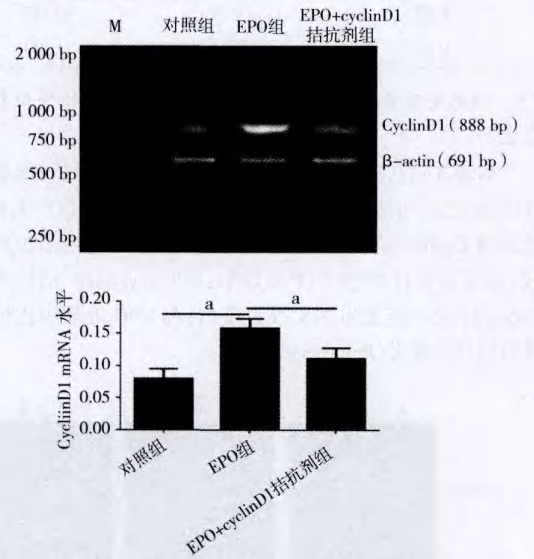
注：a，EPO 组与对照组比较 P<0.05；b：EPO 组与 EPO+cyclinD1 拮抗剂组比较 P<0.01

图 2　各组间 U87 细胞倍增时间比较（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.2　Doubling time of U87 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, n=3)

2.3　RT-PCR 法测定各组细胞中 CyclinD1 的 mRNA 表达变化

如表 2 示，对照组细胞有少量的 CyclinD1 mRNA 表达；与对照组比较，EPO 处理组细胞 CyclinD1 mRNA 表达明显升高并具有统计学意义(P=0.001)；EPO+cyclinD1 拮抗剂组较EPO 处理组 CyclinD1 表达有明显降低，差异有统计学意义(P=0.009)。见图 3。



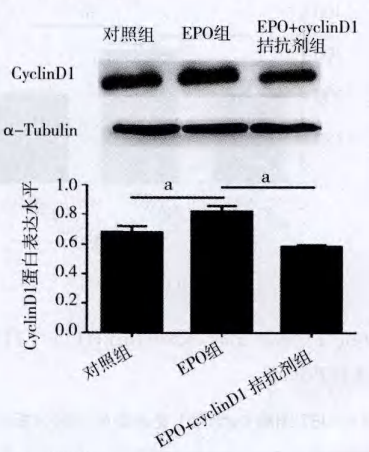
注：a，EPO 组与对照组及 EPO+cyclinD1 拮抗剂组比较，P<0.01

图 3　各组 U87 细胞中 cyclinD1 mRNA 表达水平（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.3　Relative mRNA level of cyclinD1 detected by RT-PCR in U87 cells of each group ($\bar{x} \pm s$, n=3)

2.4　Western blot 法测定各组细胞中 CyclinD1 的蛋白表达变化

如表 2 示，对照组细胞有少量的 CyclinD1 蛋白表达；与对照组比较，EPO 处理组细胞的 CyclinD1 蛋白量有明显升高并具有统计学差异(P=0.002)；EPO+cyclinD1 拮抗剂组较 EPO 处理组细胞 CyclinD1 蛋白表达量有明显降低，差异有统计学意义(P=0.000)。见图 4。



注：a，EPO 组与对照组比较及 EPO+cyclinD1 拮抗剂组比较，P<0.01

图 4　各组间 U87 细胞 cyclinD1 蛋白表达水平（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.4　Protein levels of cyclinD1 detected by Western blot in U87 cells of each group ($\bar{x} \pm s$, n=3)

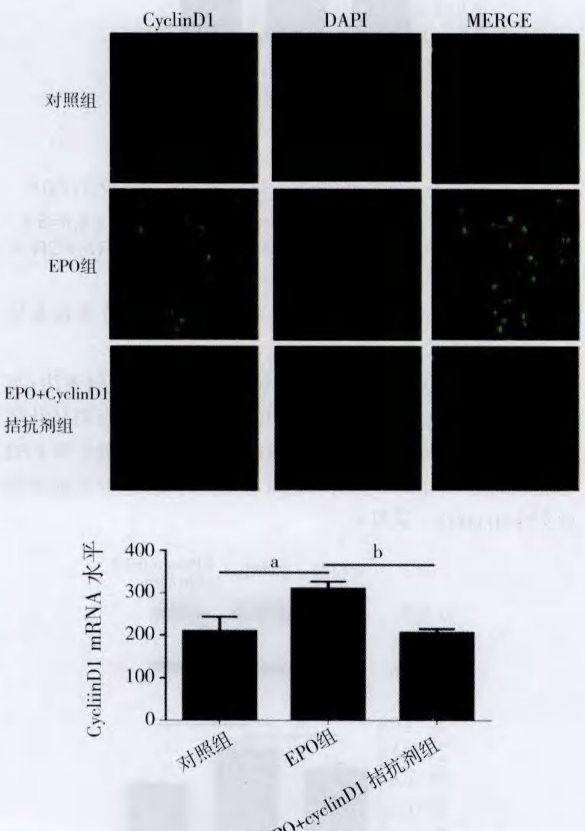
表 2 各组细胞中 cyclinD1 表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2 Expression level of cyclinD1 of each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	CyclinD1 mRNA 水平	CyclinD1蛋白水平
对照组	0.080 ± 0.015	0.682 ± 0.041
EPO组	0.158 ± 0.015	0.821 ± 0.037
EPO+CyclinD1 拮抗剂组	0.111 ± 0.017	0.586 ± 0.011
F 值	19.773	39.417
P 值	0.002	0.000

2.5 细胞免疫荧光法测定各组细胞中 CyclinD1 的蛋白表达变化

如表 3 示，CyclinD1 的蛋白主要表达于细胞核，细胞浆有少量表达，对照组 CyclinD1 荧光强度 209.99 ± 33.72；EPO 处理组 CyclinD1 荧光强度为 310.19 ± 16.54，与对照组相比较，差异有统计学意义（P=0.005）；EPO+cyclinD1 拮抗剂组 CyclinD1 荧光强度为 228.77 ± 32.01，与 EPO 处理组比较差异有统计学意义（P=0.013）。见图 5。



注：a，EPO 组与对照组比较 P<0.01，b：EPO 组与 EPO+cyclinD1 拮抗剂组比较 P<0.05

图 5 各组间 U87 细胞 cyclinD1 免疫荧光定量分析（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.5 Immunofluorescence quantitative analysis of cyclinD1 in U87 cells of each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

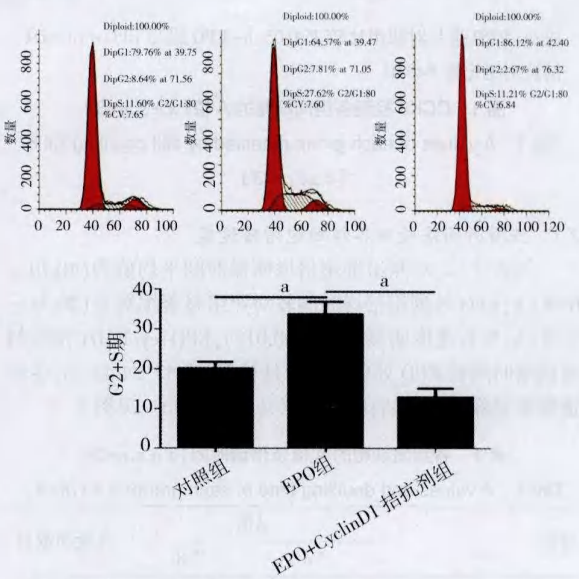
2.6 流式细胞术检测各组细胞的细胞周期变化情况

如表 3 示，流式细胞术检测结果显示对照组细胞处于 G1 期的百分率为 79.79%，增殖指数为 0.202 ± 1.690；EPO 处理组细胞处于 G1 期的百分率为 66.27%，增殖指数为0.337 ± 3.155，与对照组相比较明显提高（P=0.000）；EPO+cyclinD1 拮抗剂组处于 G1 期的百分率为 86.96%，增殖指数为0.130 ± 2.214，与 EPO 处理组相比较明显降低（P=0.000）。见图 6。

表 3 各组细胞免疫荧光定量和周期分析（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Immunofluorescence quantitative analysis and cell cycle of each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	CyclinD1荧光强度	G2+S期
对照组	209.997 ± 33.722	20.207 ± 1.690
EPO组	310.187 ± 16.539	33.727 ± 3.155
EPO+CyclinD1拮抗剂组	228.773 ± 32.009	13.043 ± 2.214
F 值	10.483	56.056
P 值	0.011	0.000



注：a，EPO 组与对照组及 EPO+CyclinD1 拮抗剂组比较，P<0.001

图 6 各组间 U87 细胞周期检测（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.6 Cell cycle detected by flow cytometry in U87 cells of each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

3 讨 论

EPO 在传统意义上是由肾脏分泌的，对抗缺氧、促进红细胞生成，抗贫血的的重要营养因子。近二十年，研究发现 EPO 和它的受体也存在于脑、心脏等其他器官[2-3]。在神经系统中 EPO 主要由星形胶质细胞分泌，有着重要的促进增殖、抗凋亡等组织保护作用[6-7]。但 EPO 是否能够促进胶质母细胞瘤细胞增殖，其具体调节机制如何，尚未见到国内外研究报道。本研究则旨在通过观察 EPO 处理对体外胶

质母细胞瘤细胞的增殖情况及细胞周期关键蛋白 CyclinD1 表达的影响，探讨 EPO 在胶质母细胞瘤增殖中的作用及其机理。

在本研究的体外实验中，通过细胞生长曲线及细胞倍增时间实验发现，EPO 处理的胶质母细胞瘤细胞在体外增殖的速度显著提升，培养相同时间点时细胞数量较对照组明显增多，细胞数量增加一倍所需要的时间也明显缩短。以上实验表明 EPO 对胶质母细胞瘤细胞的增殖有明显的促进作用。CyclinD1 是细胞周期中最为关键的调控蛋白，在细胞增殖的调节中发挥了重要作用[4-5]。但目前，国内研究尚未明确 EPO 是否是通过提高 CyclinD1 表达，加快细胞周期，从而促进胶质母细胞瘤增殖的。本研究中，联合使用 EPO 及 CyclinD1 拮抗剂处理体外胶质母细胞瘤细胞时，阻断了 EPO 促进胶质母细胞瘤细胞的增殖作用，这提示 CyclinD1 蛋白是 EPO 促进胶质母细胞瘤细胞增殖作用中的关键性效应蛋白。

本研究中，EPO 处理的胶质母细胞瘤细胞中 CyclinD1 的 mRNA 和蛋白表达量均较对照组有显著增高，细胞增殖周期检测发现胶质母细胞瘤处于 G1 期的比例减少，对分裂原的依赖性减弱，S 期比例增高，增殖指数显著升高，提示 CyclinD1 表达上调及细胞周期的加快在 EPO 促进胶质母细胞瘤增殖发挥了非常重要的作用。现有研究表明，CyclinD1 作为细胞周期中最为关键的调控蛋白，其表达量增高可使细胞从 G1 期加快进入 S 期，细胞增殖周期缩短，细胞增殖加速，提高了细胞的增殖能力[8]。EPO 可通过与其受体 EPOR 结合，激活下游的 Wnt 信号通路[9-11]，提高 Wnt/β-catenin 信号通路活性，上调 CyclinD1 表达，促进细胞增殖[12-13]。Artegiani 等[14]在 2011 年的研究中发现成年鼠脑中 CyclinD1 的过表达能够引起神经干细胞的更快生长。Makito 等在 2013 年的研究中发现缺氧环境中，EPO 能够通过上调 CyclinD1 加快细胞从 G1 期进入 S 期刺激人肾细胞的增殖[15]。在本研究中，CyclinD1 拮抗剂有效阻断了 CyclinD1 高表达，联合使用 EPO 及 CyclinD1 拮抗剂处理细胞时，增殖指数较 EPO 单独处理时明显降低，显著抑制 EPO 促进细胞增殖，验证了 CyclinD1 表达调节在 EPO 促进胶质母细胞瘤增殖中的关键性作用。

综上所述，本研究发现 EPO 可通过上调 CyclinD1 表达水平，显著缩短胶质母细胞瘤细胞增殖周期，促进胶质母细胞瘤的体外增殖。本研究的发现为进一步探索 EPO 促进胶质母细胞瘤增殖的机制及胶质母细胞瘤的治疗提供坚实的理论与实验的依据。

参 考 文 献

[1] Paw I, Carpenter RC, Watabe K, et al. Mechanisms regulating glioma invasion[J]. Cancer Lett, 2015, 362(1): 1-7.

[2] Elliott S, Sinclair AM. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells[J]. Biologics, 2012(6): 163-89.

[3] Miller JL, Church TJ, Leonoudakis D, et al. Discovery and characterization of nonpeptidyl agonists of the tissue-protective erythropoietin receptor[J]. Molecular Pharmacology, 2015, 88(2): 357-367.

[4] Lee JY, Na KL. Up-regulation of cyclinD1 and Bcl2A1 by insulin is involved in osteoclast proliferation[J]. Life Sciences, 2014, 114(2): 57-61.

[5] Ma J, Cui B, Ding X, et al. Over-expression of Cyclin D1 promotes NSCs proliferation and induces the differentiation into astrocytes via Jak-STAT3 pathways[J]. Neurochemical Research, 2015, 40(8): 1681-1690.

[6] Liang K, Esteva FC, Stemke HK, et al. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation[J]. Cancer Cell, 2010, 18(5): 423-435.

[7] Yin D, Kawabata HO, Huynh T, et al. Glioblastoma multiforme cells: expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin[J]. International Journal of Oncology, 2007, 31(5): 1193-1198.

[8] Mao X, Cao B, Wood TE, et al. A small-molecule inhibitor of D-cyclin transactivation displays preclinical efficacy in myeloma and leukemia via phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Blood, 2011, 117(6): 1986-1997.

[9] Chen X, Wang C C, Song S M, et al. The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/-catenin signaling[J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2015, 114(5): 430-437.

[10] Gu X, Yao L, Ma G, et al. TCTP promotes glioma cell proliferation in vitro and in vivo via enhanced -catenin/TCF-4 transcription[J]. Neuro-Oncology, 2013, 16(2): 217-227.

[11] Kwon MS, Kim MH, Kim SH, et al. Erythropoietin exerts cell protective effect by activating PI3K/Akt and MAPK pathways in C6 Cells [J]. Neurological Research, 2014, 36(3): 215-223.

[12] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways[J]. Science, 2004, 303(5663): 1483-1487.

[13] 梁大宁. 小干扰 RNA 抑制 CyclinD1 表达诱导瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的研究[D]. 南方医科大学, 2008.

[14] Artegiani B, Lindemann D, Calegari F. Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain[J]. Journal of Experimental Medicine, 2011, 208(5): 937-948.

[15] Miyake M, Goodison S, Lawton A, et al. Erythropoietin is a JAK2 and ERK1/2 effector that can promote renal tumor cell proliferation under hypoxic conditions[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2013, 6(1): 1-14.

（责任编辑：冉明会）