

顺铂诱导人鼻咽癌CNE2细胞衰老及其相关基因表达谱的研究

杨飞城, 黄岚珍, 阳晶, 黄希仕, 蒋晓山

Cisplatin-induced Senescence and Senescence-related Gene Expression Profiles in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells CNE2

YANG Feicheng, HUANG Lanzhen, YANG Jing, HUANG Xishi, JIANG Xiaoshan

The Center for Science Research, Guilin Medical University, Guilin 541004, China

Corresponding Author: JIANG Xiaoshan, E-mail: jiangxs@glmc.edu.cn



Abstract: Objective To investigate the effects of cisplatin induction *in vitro* on human nasopharyngeal carcinoma cells CNE2 and its possible molecular mechanism. **Methods** Proliferation of CNE2 cells treated with various concentrations (0.4–4.0 mg/L) of cisplatin was determined using MTT assay. The senescent cells were determined by a senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) activity assay and cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. A Syber Green real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to examine the changes of expression profiles of 78 human cellular senescence-related genes. **Results** Cisplatin inhibited the proliferation of CNE2 cells in a dose- and time-dependent manner, and significantly induced a cellular senescence in CNE2 cells, which respectively counted at 67.63% of senescent cells at day 6 and 89.22% at day 8, after treatment with 1.0 mg/L of cisplatin. A G₂/M phase arrest was observed. The expression levels of 16 senescence-related genes including TP53, TP63, p16Ink4a, p27Kip1, PTEN, RB1, TBX3, Cdc25C, Gadd45a, IGF1R, PIK3CA, BMI-1, B2M, MORC3, MYC and SPARC were increased ($P < 0.05$ or 0.01), while the 14 genes including Cyclin A2, Cyclin B1, Cyclin E1, CDK6, ATM, E2F1, ETS1, ETS2, MDM2, FN1, IGFBP3, RBL2, SERPINB2 and SIRT1 were decreased at mRNA levels ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** Cisplatin could induce G₂/M phase arrest and cellular senescence in CNE2 cells *in vitro*, which may involve a complicated network of p53-pRb signaling or/and PTEN signaling pathways mediated by p16 and p27.

Key words: Cisplatin; Tumor cell senescence; Nasopharyngeal carcinoma; Cell cycle arrest

摘要: 目的 探讨顺铂体外诱导人鼻咽癌CNE2细胞衰老的效应及其分子机制。方法 采用MTT比色法观察顺铂对CNE2细胞增殖的抑制作用, 衰老相关- β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 活性评判细胞衰老, 流式细胞术分析细胞周期分布, 实时定量PCR法检测78个人类细胞衰老相关基因的表达。结果 顺铂对CNE2细胞的增殖具有明显抑制作用; 1.0 mg/L顺铂处理后第6和第8天检测SA- β -gal染色阳性细胞数分别达到67.63%和89.22%, 细胞阻滞于G₂期; TP53、TP63、p16Ink4a、p27Kip1、PTEN、RB1、Cdc25C、TBX3、Gadd45a、IGF1R、PIK3CA、BMI-1、B2M、MORC3、MYC和SPARC等16个衰老相关基因的mRNA水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 0.01), Cyclin A2、Cyclin B1、Cyclin E1、CDK6、ATM、ETS2、MDM2、E2F1、ETS1、FN1、IGFBP3、RBL2、SERPINB2及SIRT1等14个基因表达水平下降 ($P < 0.05$ 或 0.01)。结论 顺铂能够在体外诱导CNE2细胞衰老, 其机制涉及p16和p27介导的p53-pRB和PTEN衰老信号调控网络。

关键词: 顺铂; 肿瘤细胞早衰; 鼻咽癌; 细胞周期阻滞

中图分类号: R739.62 **文献标识码:** A

0 引言

细胞衰老是指细胞从活跃增殖进入不可逆转的生长停滞状态的过程。过去肿瘤细胞因其无限增殖的特性, 被认为失去了衰老能力。近十余年的研究发现, 肿瘤细胞在一定条件下,

收稿日期: 2014-01-27; 修回日期: 2014-05-13

基金项目: 广西医学科学实验中心开放基金(KFJJ2011-13)

作者单位: 541004 桂林, 桂林医学院科学实验中心

通信作者: 蒋晓山, E-mail: jiangxs@glmc.edu.cn

作者简介: 杨飞城 (1989-), 女, 硕士在读, 主要从事肿瘤细胞早衰诱导的实验研究

如小剂量的化疗药物或射线辐照等处理可以被诱导进入衰老状态^[1-2]。这种诱导性衰老有别于复制性衰老, 被称为早熟衰老即早衰 (premature senescence)。顺铂化学名顺式二氨基二氯络铂, 系临床常用的细胞周期非特异性广谱抗肿瘤药物。研究发现, 顺铂通过p53依赖或非依赖途径可以在体外和 (或) 体内诱导人乳腺癌、肺癌、大肠癌等多种肿瘤细胞发生衰老^[2], 其详细机制还不清楚。本研究探讨顺铂对人鼻咽癌CNE2细胞的早衰诱导作用, 对78个潜在的细胞衰老相关调控基因的表达谱进行了筛查, 为阐明顺铂诱导肿瘤细胞早衰的作用机制、寻找肿瘤细胞早衰调控分子提供了有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

顺铂 (齐鲁制药公司) 溶于去离子水, 贮存液100 mg/L; 噻唑蓝 (MTT) (美国Amresco公司); 二甲基亚砜 (DMSO)、碘化丙啶 (PI) (美国Sigma公司); Trizol试剂和反转录酶试剂盒 (美国Invitrogen公司); 荧光定量PCR反应试剂盒、Sybe Green荧光染料MIX和7500Fast实时荧光定量PCR仪 (美国ABI公司); CO₂细胞培养箱 (美国NBS公司); iMark型酶标仪 (美国Bio-Rad); FACS Aria III流式细胞仪 (美国BD公司)。

1.2 细胞株与细胞培养

人鼻咽癌细胞株CNE2购自中国科学院细胞所 (上海) 细胞库, 常规培养于体积分数10%胎牛血清 (美国HyClone) 的RPMI 1640 (HyClone) 培养液、含5%CO₂的37℃培养箱中, 每3~4天换液传代。

1.3 MTT法检测细胞增殖

将人鼻咽癌CNE2细胞以 4×10^3 个/孔接种于96孔板。第2天分别加入不同浓度的顺铂, 等量去离子水+培养液作为对照组, 另设无细胞空白组, 每组5个复孔。于选定时间分别加入MTT每孔10 μ l, 培养4 h, 离心弃上清液, 加DMSO每孔200 μ l, 振荡至沉淀完全溶解, 酶标仪读取各孔在510 nm处的吸光度 (A) 值, 绘制细胞生长曲线, 实验重复3次。

1.4 细胞衰老相关的 β 半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 活性检测

细胞种于6孔培养板, 顺铂处理后的第6、8天分别吸弃培养液, PBS洗1次后固定于0.2%戊二醛5 min; PBS洗3次, 加入X-gal 染液 (1 mg/ml X-gal, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM

K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 40 mM NaPi, pH 6.0), 37℃培养6~24 h。光学显微镜下计数蓝染的细胞^[3]。

1.5 流式细胞术 (FCM) 检测细胞周期

(1) 细胞周期同步化: 无血清的RPMI 1640培养液培养CNE2细胞5天, 使大部分细胞停留在G₁期。(2) 细胞周期检测: 常规消化并计数同步化的CNE2细胞, 以 5×10^5 个细胞/皿接种于 $\Phi 60$ mm培养皿, 10 h后加入顺铂及等量去离子水 (对照组) 处理24 h; 于选定时间收集细胞制成单细胞悬液, 70%乙醇固定, 1%RNA酶处理、PI染色后上流式细胞仪检测 (激发波长562 nm, 发射波长630 nm) 细胞周期分布 (DNA 含量) 情况。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测细胞周期调控相关基因的表达

(1) 引物设计与合成: 参照SABiosciences公司人类细胞衰老相关基因的PCR阵列中的84个基因表 (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-050Z.html) 选取78个基因 (名称见表1), 委托美国Invitrogen (上海) 公司设计、合成基因特异的定量PCR引物 (序列略)。(2) 总RNA提取及反转录反应: 收集细胞, 分别按照Trizol说明书提取总RNA和M-MLV反转录酶试剂盒说明书反转录成cDNA。(3) 实时荧光定量PCR: 将反转录所得cDNA分别在不同的微量管中进行扩增, 采用Sybe Green实时荧光染料法, 按照荧光定量PCR反应试剂盒操作手册配制20 μ l反应体系; 反应条件: 50℃预变性 20 s, 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40个循环, 结果根据标准曲线由软件自动计算后得出。

1.7 统计学方法

应用SPSS 20.0统计软件, 重复测量资料方差分析, 样本两两比较进行LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对CNE2细胞增殖的影响

不同浓度 (0.4、1.0、4.0 mg/L及对照组) 的顺铂处理人鼻咽癌CNE2细胞24 h, 然后更换正常培养液。MTT法每隔24 h检测细胞活力, 共观察5天。从第2天开始, 顺铂处理组的细胞生长曲线逐渐变得低平, 以4.0 mg/L浓度组最为明显, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图1。提示顺铂对人鼻咽癌CNE2细胞的增殖活性具有显著抑制作用, 呈时间和剂量依赖性。

表1 顺铂对CNE2细胞衰老相关基因表达谱的影响

Table1 Effect of cisplatin on senescence-related gene expression profile in CNE 2 cells

Genes	Functional groups	Fold-change*	P*	Genes	Functional group	Fold-change*	P*
GAPDH	Control	1.00±0.00		HPRT1	Oxidative stress	3.89±0.78	0.104
ACTB	Cytoskeleton	3.57±0.89	0.631	IGFBP3	p53/pRb signaling	- 1.68±0.56	0.002
ALDH1A3	p53/pRb Signaling	2.13±0.43	0.173	IGFBP7	Interferon	2.76±0.40	0.212
AKT1	p53/pRb Signaling	- 1.19±0.71	0.010	IGF1R	p53/pRb signaling	2.34±0.56	0.003
ATM	DNA damage	- 2.57±0.22	0.023	ING1	p53/pRb signaling	2.64±0.41	0.076
BMI-1	Aging pathway	5.60±0.36	0.047	MAP2K1	MAPK signaling	2.68±0.58	0.051
B2M	Aging pathway	4.12±0.19	0.008	MAP2K3	MAPK signaling	- 1.02±0.63	0.086
CALR	Aging pathway	1.93±0.41	0.222	MAP2K6	p53/pRb signaling	2.10±0.61	0.126
Cyclin A2	p53/pRb signaling	- 3.19±0.56	0.006	MAPK14	p53/pRb signaling	2.22±0.62	0.412
Cyclin B1	p53/pRb signaling	- 1.56±0.42	0.039	MDM2	MAPK signaling	- 2.79±0.11	0.017
Cyclin D1	p53/pRb signaling	1.94±0.61	0.058	MORC3	p53/pRb signaling	1.91±0.34	0.017
Cyclin E1	p53/pRb signaling	- 3.12±0.29	0.034	MYC	p53/pRb signaling	2.46±0.90	0.009
CD44	Cell adhesion	- 1.65±0.58	0.047	NBN	DNA damage	3.08±0.88	0.512
Cdc25C	p53/pRb signaling	2.91±0.58	0.030	NFKB1	Interferon	- 1.42±0.34	0.126
CDK2	Aging pathway	2.17±0.57	0.211	PCNA	p53/pRb signaling	4.77±0.46	0.208
CDK4	Aging pathway	2.26±0.55	0.142	PIK3CA	p53/pRb signaling	2.23±0.90	0.006
CDK6	Aging pathway	- 1.34±0.33	0.049	PLAU	p53/pRb signaling	3.37±0.72	0.051
p21Cip1	Aging pathway	2.42±0.56	0.080	PRLP0	DNA damage	2.93±0.90	0.352
p27Kip1	Interferon	5.82±0.69	0.011	PTEN	Other	4.15±0.26	0.001
p57Kip2	p53/pRb signaling	2.68±0.65	0.084	RB1	p53/pRb signaling	2.61±0.92	0.009
p16Ink4a	p53/pRb signaling	2.54±0.37	0.046	RBL1	p53/pRb signaling	2.51±0.42	0.051
p15Ink4b	p53/pRb signaling	2.36±0.67	0.092	RBL2	p53/pRb signaling	- 1.14±0.30	0.012
p18Ink4c	p53/pRb signaling	2.81±0.64	0.125	TBX2	p53/pRb signaling	- 1.81±0.25	0.091
CDKN2D	p53/pRb signaling	2.00±0.41	0.208	SERPINB2	p53/pRb signaling	- 11.0±0.61	0.034
CHEK1	Aging pathway	2.21±0.73	0.153	SERPINE1	p53/pRb signaling	- 1.27±0.27	0.163
CHEK2	Aging pathway	3.00±0.64	0.125	SIRT1	p53/pRb signaling	- 1.37±0.64	0.018
CITED2	p53/pRb signaling	- 1.34±0.78	0.065	SPARC	p53/pRb signaling	1.79±0.43	0.012
COL1A1	Cell adhesion	- 1.91±0.64	0.458	TBX3	p16 Effector	3.89±0.83	0.014
COL3A1	Cell adhesion	- 1.46±0.68	0.050	TERF2	DNA damage	2.24±0.34	0.073
CREG1	p53/pRb signaling	2.93±0.74	0.091	TERT	DNA damage	2.82±0.61	0.062
E2F1	Aging pathway	- 1.27±0.34	0.031	TGFB1	p53/pRb signaling	1.84±0.61	0.061
E2F3	Aging pathway	- 1.13±0.87	0.065	TGFB1I1	Cell adhesion	- 1.14±0.83	0.084
EGR1	Interferon	3.01±0.64	0.053	THBS1	Cell adhesion	- 1.35±0.86	0.058
ETS1	Interferon	- 1.24±0.44	0.027	TP53BP1	DNA samage	- 1.89±0.39	0.065
ETS2	Interferon	- 1.51±0.33	0.036	TP53	p53/pRb signaling	2.01±0.44	0.043
FN1	Cytoskeleton	- 8.99±0.45	0.030	TP63	p53/pRb signaling	9.91±0.63	0.008
Gadd45a	DNA damage	3.74±0.32	0.023	TP73	p53/pRb signaling	2.62±0.40	0.074
GLB1	p53/pRb signaling	- 1.25±0.70	0.506	TWIST1	Aging pathway	2.79±0.56	0.106
GSK3B	p53/pRb signaling	- 1.24±0.33	0.214	VIM	Cytoskeleton	3.63±0.34	0.080

Notes: Genes were assigned to nine functional groups as indicated in the second column; Genes were marked as “other” if no special assignment to one of these groups could be made; $\bar{x}\pm s$ of three independent experiments of screening was presented; *: compared with the control group

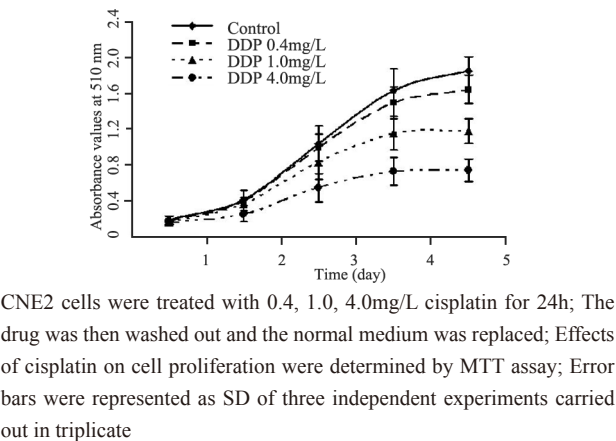
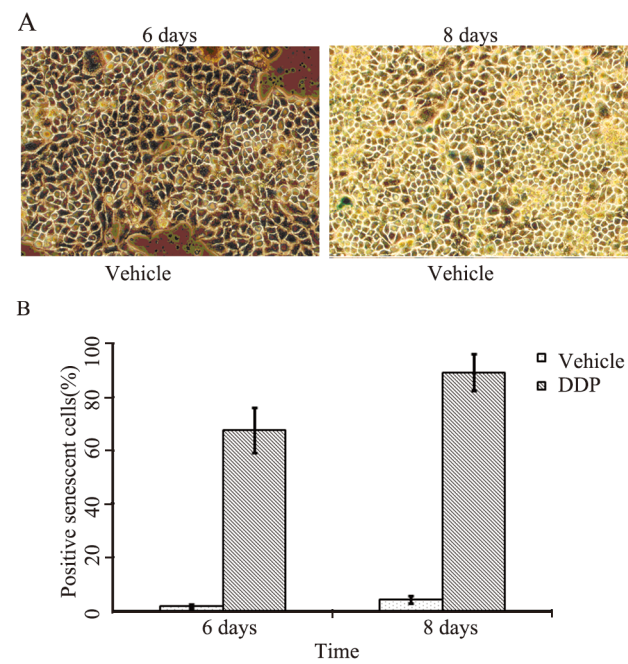


图1 MTT法检测不同浓度顺铂对CNE2细胞增殖的抑制作用
Figure1 Inhibitory effect of Cisplatin at different concentrations on CNE2 cells proliferation detected by MTT assay

2.2 顺铂对CNE2细胞衰老的诱导作用

顺铂能够诱导多种培养中的人肿瘤细胞发生衰老。衰老细胞通常体积变大扁平、核膜内陷、细胞器变形，并表达在pH6.0时有高酶活性的β-半乳糖苷酶，催化底物X-Gal生成深蓝色沉积产物。为检测顺铂对鼻咽癌CNE2细胞的衰老诱导效应，本研究以1.0 mg/L顺铂处理CNE2细胞，24 h后洗去药物，更换正常培养液继续培养。顺铂处理6天后，细胞呈现大而扁平的衰老样形态；于第6、8天行细胞衰老相关-β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）染色及计数，分别测得67.63%和89.22%的细胞呈胞质蓝染，而对照组分别仅有0.73%和1.25%细胞染色阳性，组间差异有统计学意义(P < 0.0001)，见图2。



CNE2 cells were treated with 1.0 mg/L cisplatin for 24h; The drug was then washed out and the normal medium was replaced; A: morphology of control cells and cisplatin-treated cells were examined by phase-contrast microscopy($\times 200$); B: percentage of positive senescent cells determined by SA- β -gal staining the results were represented as the mean $\pm$ SD of three independent experiments; *: $P < 0.0001$, compared with untreated (vehicle) control cells

图2 衰老相关- β -半乳糖苷酶染色检测顺铂对CNE2细胞衰老的诱导作用

Figure2 Cisplatin-induced CNE2 cells senescence detected by SA- β -gal staining

2.3 顺铂对CNE2细胞周期的影响

衰老的细胞在一段时间内仍然维持代谢活动，但失去了对有丝分裂原刺激的反应，细胞周期停滞。为了解顺铂对CNE2细胞周期进程的影响，本研究以1.0 mg/L顺铂处理细胞24 h，收集细胞行PI染色，流式细胞仪检测细胞周期分布情况，共观察72 h。结果表明，与对照组比较，72 h后细胞顺铂处理组仍阻滞于G₂/M期，见图3A。S期和G₂/M期细胞分别增加了13.79%和317.89%，而G₁期细胞相应减少，见表2，组间G₂/M期差异有统计学意义 ($P < 0.001$)，见图3B。

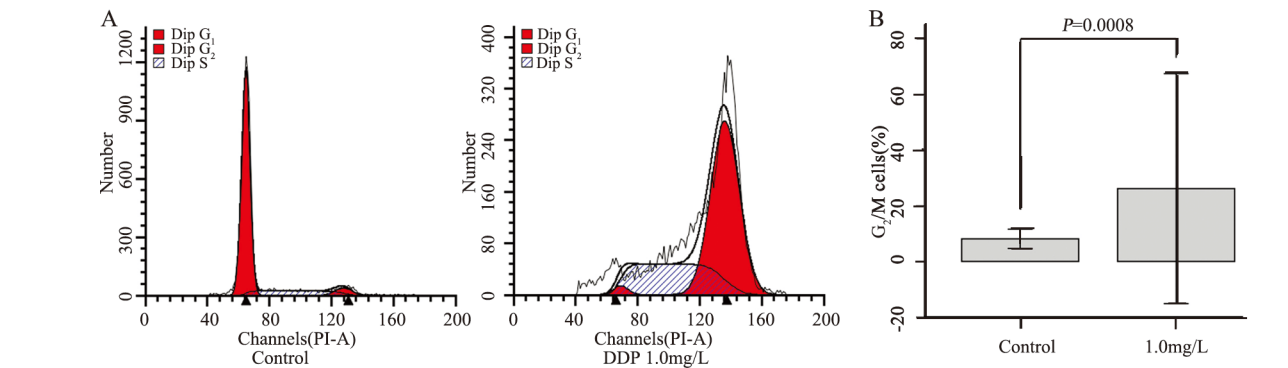
表2 顺铂对CNE2细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 3$)

Table2 Effect of cisplatin on cell cycle of CNE 2 cells ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 3$)

Groups	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	66.75 $\pm$ 15.29	25.60 $\pm$ 13.31	7.66 $\pm$ 2.36
DDP 1.0mg/L	38.87 $\pm$ 32.22	29.13 $\pm$ 3.98	32.00 $\pm$ 28.37

2.4 顺铂对CNE2细胞78个衰老相关基因表达的影响

本研究采用Sybe Green实时荧光定量RT-PCR方法筛查了顺铂处理24 h后CNE2细胞中78个衰老相关基因的表达情况。与对照组比较，TP53、TP63、p16Ink4a、p27Kip1、PTEN、RB1、TBX3、Cdc25C、Gadd45a、IGF1R、PIK3CA、BMI-1、B2M、MORC3、MYC和SPARC等16个基因的mRNA水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 0.01)，而Cyclin A2、Cyclin B1、Cyclin E1、CDK6、ATM、E2F1、ETS1、ETS2、MDM2、FN1、IGFBP3、RBL2、SERPINB2及SIRT1等14个基因mRNA表达水平呈不同程度的下降 ($P < 0.05$ 或 0.01)，见表1。功能上看，这些基因主要参与细胞周期调控、特别是p53/pRB和PTEN介导的衰老信号通路调控，一些基因则与DNA损伤、干扰素反应和细胞骨架与黏附等细胞衰老启动和形态变化密切相关。



CNE2 cells were treated with 1.0mg/L cisplatin for 24h; the drug was then washed out and the normal medium was replaced; A: cell cycle distribution was determined by flow cytometry after 72h; B: the percentage of G₂/M phase cells was represented as the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments

图3 流式细胞术检测顺铂阻滞CNE2细胞于G₂/M期

Figure3 Cisplatin-induced CNE2 cells arrest in G₂/M phase determined by flow cytometry

3 讨论

近年来发现,多种抗癌药物如环磷酰胺、氟尿嘧啶、顺铂、阿霉素、博来霉素、喜树碱等可以在体内和(或)体外诱导人乳腺癌、肺癌、大肠癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞发生衰老^[1-2],这种诱导性细胞衰老与端粒长短无关,称之为早衰。寻找早衰调控分子,是当前肿瘤学研究的前沿热点^[4-5]。本研究发现,顺铂对鼻咽癌CNE2细胞的增殖具有明显的抑制作用;较低剂量(1.0 mg/L)的顺铂能够诱导CNE2细胞发生明显的G₂期阻滞,伴随细胞体积变大扁平、表达在pH6.0时有高酶活性的 β -半乳糖苷酶等典型衰老表现,提示顺铂具有诱导CNE2细胞早衰的生物学效应。

从分子水平上看,细胞衰老是p53和pRb信号通路激活导致的细胞周期停滞。细胞周期受到周期素(Cyclin)、周期素依赖性蛋白激酶(CDK)和周期素依赖性蛋白激酶抑制物(CDKI)的严格调控。通常认为,当细胞内DNA受损时,p53即被激活,启动p21Waf1/Cip1、p16Ink4a、p27Kip1等相关CDKI,通过p21下调CDK2和CDK3或p16下调CDK4和CDK6的活性,抑制视网膜母细胞瘤蛋白(RB)和转录因子E2F的磷酸化过程,使细胞停止增殖^[6-7],p27则可与CDK2/Cyclin A或CDK4/Cyclin D复合物结合,诱导细胞的生长停滞^[8]。p53功能受到AKT、MDM蛋白的直接调控,对于缺p53和Rb的肿瘤细胞,其早衰机制可由p53相关蛋白p63或p73启动^[9]。而p16和p27表达水平还与PTEN和TGF β 信号通路、以及ETS2和多种原癌基因活性密切相关^[10]。本研究采用高通量荧光定量PCR技术对顺铂处理后的CNE2细胞内78个衰老相关基因的表达水平进行了筛查,结果表明TP53、TP63和RB1的mRNA水平及其下游衰老调控基因p16和p27的表达水平显著升高,伴随PTEN、Myc以及p16效应因子TBX3转录显著增强,而Cyclin A2、Cyclin B1、Cyclin E1以及CDK6表达水平显著降低。Cyclin A2、B1和E1均能够促进细胞从G₂期进入M期^[11-12],而它们所形成的CDK复合物活性受到p27的负调控^[8,12]。顺铂诱导的Cyclin A2和B1水平下调与p27水平上调是否为G₂/M期阻滞的重要原因,值得探讨。

细胞早衰信号的启动包括DNA损伤、氧化应

激、干扰素反应、胰岛素生长因子(IGF-1)、有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)激活等诸多因素^[2,5,10]。本研究在顺铂CNE2细胞早衰模型中发现Gadd45A、IGFBP3、IGF1R、ETS1、ETS2、FN1等基因表达均有异常,提示细胞早衰调控的网络信号多样、机制复杂。

初步结果表明,顺铂能够在体外引发CNE2细胞G₂/M期阻滞,诱导细胞早衰,其机制涉及p16和p27介导的p53-pRB和PTEN信号调控网络。本研究结果为深入揭示顺铂诱导肿瘤细胞衰老的分子机制提供了有价值的信息。

参考文献:

- [1] Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2705-15.
- [2] Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, *et al*. Therapy-induced senescence in cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(20): 1536-46.
- [3] Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al*. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(20): 9363-7.
- [4] Acosta JC, Gil J. Senescence: a new weapon for cancer therapy[J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(4): 211-9.
- [5] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, *et al*. The hallmarks of aging[J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1194-217.
- [6] Rufini A, Tucci P, Celardo I, *et al*. Senescence and aging: the critical roles of p53[J]. *Oncogene*, 2013, 32(43): 5129-43.
- [7] Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, *et al*. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors[J]. *Oncogene*, 2011, 30(18): 2087-97.
- [8] Ou L, Ferreira AM, Otieno S, *et al*. Incomplete folding upon binding mediates Cdk4/cyclin D complex activation by tyrosine phosphorylation of inhibitor p27 protein[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34): 30142-51.
- [9] Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network[J]. *Oncogene*, 2007, 26(36): 5169-83.
- [10] Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, *et al*. Pro-senescence therapy for cancer treatment[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(7): 503-11.
- [11] Badie C, Bourhis J, Sobczak-Thépot J, *et al*. p53-dependent G₂ arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(3): 642-50.
- [12] Hu R, Aplin AE. Skp2 regulates G₂/M progression in a p53-dependent manner[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(11): 4602-10.

[编辑: 黄园玲; 校对: 周永红]