

[文章编号] 1000 - 4718(2008)03 - 0498 - 06

PSA 启动子介导的 TAT - p21^{WAF1/CIP1} 融合蛋白在前列腺癌细胞中的特异表达及活性初探*

蔡捷, 苑辉卿[△], 孔峰, 任凯, 王小玲, 吉恺, 胡晓燕, 张建业
(山东大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 设计并构建含有前列腺组织特异性抗原(PSA)启动子的 TAT - p21^{WAF1/CIP1} 融合蛋白真核表达载体(pPSA - TAT - p21), 使由 TAT 蛋白转导结构域(TAT)介导的抑癌基因蛋白 p21^{WAF1/CIP1} (p21) 能够在前列腺癌细胞中实现特异性的跨膜转运, 增强 p21 对前列腺癌的抑制作用。方法: 利用 PCR 技术构建含有 PSA 启动子、TAT 蛋白转导序列和 p21 读码框架的真核表达载体 pPSA - TAT - p21, 并进行酶切、测序鉴定。脂质体法在前列腺癌 LNCaP 细胞和结肠癌 HT - 29 细胞中转染上述表达载体及对照质粒后进行反转录 PCR(RT - PCR), 检测 p21 的 mRNA 以及蛋白在不同细胞中的表达情况。MTT 法检测转染 pPSA - TAT - p21 后 LNCaP 细胞的增殖情况。结果: 成功构建 pPSA - TAT - p21 真核表达载体。RT - PCR 和 Western blotting 结果显示 PSA - TAT - p21 在前列腺癌细胞中有明显表达, 在结肠癌细胞中基本不表达, 呈现特异性的表达, 而由 CMV 启动子介导的 p21(pCMV - 21) 对照组在两个细胞株中均有表达。细胞增殖实验结果显示, 含有 TAT 蛋白转导结构域的 PSA - TAT - p21 的融合蛋白对前列腺癌细胞增殖的抑制作用明显高于不含 TAT 的 PSA - p21 蛋白。结论: pPSA - TAT - p21 能够在前列腺癌细胞中特异性地高效表达, 为前列腺癌基因的靶向治疗提供了实验依据。

[关键词] 前列腺特异抗原; TAT - p21^{WAF1/CIP1} 融合蛋白; 前列腺肿瘤; LNCaP 细胞; HT - 29 细胞

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Targeting expression of TAT - p21^{WAF1/CIP1} fusion protein driven by PSA promoter in prostate cancer cells

CAI Jie, YUAN Hui - qing, KONG Feng, REN Kai, WANG Xiao - ling, JI Kai, HU Xiao - yan, ZHANG Jian - ye

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China.
E - mail: lyuanhq@sdu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** A eukaryotic expression vector containing p21^{WAF1/CIP1} (p21) gene fused to TAT transduction domain under the control of prostate - specific antigen promoter was constructed. Targeting expression of TAT - p21 fusion protein was examined in prostate cancer cells and colonic cancer cells. **METHODS:** The eukaryotic expression vector pPSA - TAT - p21 was produced by using the polymerase chain reaction (PCR). Transient transfections of pPSA - TAT - p21, pPSA - p21 or pCMV - p21 into the prostate cancer cell LNCaP and colonic cancer cell HT - 29 were conducted by using the lipofectamine 2000. Reverse transcription PCR (RT - PCR) was used to detect the expression of p21 in the level of mRNA. Prostate cancer cell growth was analyzed by the method of MTT. **RESULTS:** The vector pPSA - TAT - p21 was constructed and the entire coding region was confirmed by sequencing. RT - PCR results indicated that expressions of pPSA - TAT - p21 and pPSA - p21 were shown in prostate cancer cells and no detectable band was observed in colonic cancer cells, whereas pCMV - p21 expressed in both the cell lines. Inhibitory effect of p21 on cell growth was found from the results of MTT assay, indicating that pPSA - TAT - p21 had higher inhibitory effect when compared to pPSA - p21 group. **CONCLUSION:** The vector pPSA - TAT - p21 targeting expresses in prostate cancer cells and inhibits cell proliferation.

[KEY WORDS] Prostate - specific antigen; TAT - p21^{WAF1/CIP1} fusion protein; Prostatic neoplasms; LNCaP cells; HT - 29 cells

[收稿日期] 2006 - 09 - 21 [修回日期] 2006 - 12 - 06

* [基金项目] 山东省卫生厅重点资助项目 (No. HZ023); 山东大学大学生科技创新基金

[△]通讯作者 Tel: 0531 - 88382092; E - mail: lyuanhq@sdu.edu.cn

前列腺癌(prostate cancer, Pca)作为激素依赖性的恶性肿瘤,潜伏期长,发病机制复杂,易复发转移,且复发后演变为激素非依赖性前列腺癌,恶性程度及死亡率高。前列腺癌的恶化转移过程涉及多种蛋白因子及信号转导途径,细胞周期相关调节因子失衡是其分子机制之一。研究表明雄激素可调节前列腺癌细胞中周期蛋白 cyclin 依赖的激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)2 和 4 的表达及活性,促进细胞增殖^[1]。另外,雄激素对 CDK 抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI)有不同的作用,它可抑制 p16 的表达,但上调 p21^{WAF1/CIP1} (p21) 的表达^[1-2]。p21 蛋白作为细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂可以和许多细胞周期蛋白/细胞周期蛋白依赖激酶复合物结合,如 cyclinA/CDK2 和 cyclinD1/CDK4,抑制 CDK 的活性,使 DNA 受损伤的细胞停滞于 G₁ 期进行修复,不能修复的则发生凋亡。有关 p21 基因表达调控的研究报道很多,p53、TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ 、TPA 等均可诱导其表达。已有研究表明,p21 与前列腺癌的恶化演变过程有关^[3-5],在前列腺癌细胞中转入外源性的 p21 基因则会抑制细胞增殖^[6]。鉴于 p21 在前列腺癌细胞增殖中的重要作用,我们尝试在前列腺癌细胞中靶向性表达 p21 来达到抑制前列腺癌的作用。

前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)是人前列腺组织中的特异的由前列腺上皮细胞分泌的单链糖蛋白,该基因的表达具有高度的组织特异性。因此,利用 PSA 的这一特性可构建前列腺组织特异性表达载体。为了提高 p21 表达载体的转染效率,我们在 p21 基因上游引入具有蛋白转导功能的信号肽 TAT。TAT 蛋白是人类艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV) 基因编码的一种转录激活因子,能以不依赖于 ATP、膜受体等方式穿过细胞膜。根据 TAT 蛋白中的蛋白转导结构域序列而设计的短肽(约含 11-14 个氨基酸残基)可与目的蛋白或多肽形成融合蛋白,使目的蛋白或多肽穿过细胞膜甚至通过血脑屏障,并在脑实质内达到一定浓度。近年来,国内外学者对 TAT 介导的融合蛋白穿透生物膜的作用进行了大量研究,已多有报道。但由于 TAT 蛋白转导结构域的穿膜特性缺乏组织特异性,因此,我们拟通过 PSA 启动子来介导 TAT-p21 融合蛋白的组织特异性表达,使 p21 能够在 TAT 穿膜肽的引导下在前列腺癌细胞高效、特异性表达,而增强 p21 的生物活性。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 质粒与菌株 质粒 pCMV-EGFP、pGL₃-basic

购于 Promega 公司,菌株 DH5 α 购于大连宝生物工程有限公司。pPSA-p21 由本室构建而成,其详细资料见文献^[7]。pGL₃-PSA(6 kb)由 Zhang^[8]惠赠。

1.2 细胞株 前列腺癌细胞株 LNCaP、大肠癌细胞株 HT-29 均购自中国科学院细胞所。

1.3 酶及化学试剂 Taq 酶, dNTP, DNAaseI, 限制性内切酶 Not I、Sal I、Hind III、EcoR I、Bbe I 以及所用 DNA marker 均购自大连宝生物工程有限公司。质粒提取试剂盒购自 Invitrogen 公司。脂质体 lipofectamine2000、Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。RT 试剂盒购自 Fermentas 公司。DNA 测序由上海博亚公司和大连宝生物工程有限公司完成。

1.4 主要仪器 Beckman allegro 64r centrifuge, Minispin eppendorf 离心机, Eppendorf Mastercycler personal PCR 仪, UVP 凝胶成像仪等。

2 方法

2.1 重组质粒 pPSA-TAT-p21 的构建 以质粒 pPSA-p21 为模板 PCR 扩增 p21 蛋白的读码框架(495 bp),上游引物中含 TAT 蛋白转导结构域序列,使之与 p21 形成融合基因。TAT 起始端引入起始密码子 ATG, TAT 片段的 DNA 序列是: ATG GGT TAC GGC AGG AAG AAG CGT CGT CAG CGC AGG CGC GGT GGC GGC。PCR 扩增片段的两端分别设计 Hind III 和 Bbe I 的酶切位点,上下游引物分别是: F01: 5' - CCCAAGCCTTGGCATTCCGGTACTGTTGTA-AAGCCACCATGGGTTACGGCAGGAAGAAGC - 3' (AAGCCTT 为 Hind III 酶切位点); F02: 5' - GGCT-TACGGCAGGAAGAAGCGTCTCAGCGCAGGCCGG-GTGGCGGCTCAGAACCGGCTGGGGATGTC - 3'; R: 5' - ACTGGGCGCCTTATTAGGGCTTCCTCTTGAGAAG - 3' (GGCGCC 为 Bbe I 酶切位点)。在上游引物中直接合成了 TAT 序列,引物序列比较长,故将该引物分为含有部分重叠序列的两段引物(已用横线标注),同时加入扩增体系,利用 PCR 反应的指数倍增原理,获得 TAT-p21 片段。PCR 产物进行胶回收、纯化,回收产物末端进行加 A,加 A 后的产物克隆至 pMD18-T simple 克隆载体,菌落 PCR 法筛选阳性克隆。重组载体经测序鉴定后,用 Hind III 和 Bbe I 进行双酶切,电泳后胶回收得到片段 I。同时将含有 PSA(6 kb)启动子的载体 pGL₃-PSA(6 kb) 分别进行 Hind III/EcoR I 以及 EcoR I/Bbe I 双酶切, Hind III/EcoR I 双酶切后回收 0.6 kb 的片段 II, EcoR I/Bbe I 双酶切后回收 10 kb 的片段 III,将回收得到的片段 I、II、III 在 16 °C, T₄ DNA 连接酶作用下连接过夜,连接产物转化 DH5 α 菌,扩增转化菌,用上游引物 P1: 5' - GGGCAGCGGTTCCATCTTC - 3', 和下游引物 P2: 5' - TCTCCAGCGGTTCCATCTTC - 3', 经菌

落 PCR 法筛选阳性克隆, 测序鉴定后得到重组载体 pPSA - TAT - p21 用于转染实验。

2.2 重组质粒 pCMV - p21 的构建 质粒 pEGFP - N1 和 pPSA - p21 分别用 *Sal* I / *Not* I 进行双酶切。pEGFP - N1 经双酶切后, 胶回收得到含有 CMV 启动子的 4.2 kb 的大片段; pPSA - p21 经双酶切后, 胶回收得到 560 bp 的 p21 编码序列片段(含 p21 编码序列与酶切位点之间的 DNA 序列), 两个回收片段在 16 °C, *T*₄ DNA 连接酶作用下连接过夜, 连接产物转化 DH5 α 菌, 扩增转化菌, 用碱裂解法小量抽提质粒, 酶切鉴定、测序, 得到重组载体 pCMV - p21 用于转染实验。

2.3 细胞培养 LNCaP 细胞和 HT - 29 细胞均按常规方法在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养, LNCaP 细胞的培养基为含有 10% 胎牛血清的 RPMI - 1640, HT - 29 细胞的培养基为含有 10% 小牛血清的 RPMI - 1640。

2.4 总 RNA 提取及 RT - PCR 分析 细胞接种于 24 孔板培养至 50% - 70% 丰度, 用脂质体 lipofectamine2000 将质粒 pPSA - TAT - p21、pPSA - p21 分别转染细胞, pCMV - p21 以及空白质粒 pGL3 - basic 设为对照组。细胞转染 6 h 后换成含有 1% 活性炭处理的血清, 细胞继续培养 24 h 后, 经冷的 PBS 缓冲液洗涤, Trizol 法提取细胞中的总 RNA, 总 RNA 经过 DNAaseI 处理后, 用 oligo dT 引物反转录得到 cDNA, 以 cDNA 为模板, p21 基因特异引物扩增 p21, 检查 p21 mRNA 在细胞中的表达情况。另设 β - actin 为内对照, 以检测 PCR 实验条件及上样量。p21 的上下游引物分别为: F: 5' - GATGTCGTCAGAAC - CCA - 3' ; R: 5' - CTGCCTCCTCCCAACTCA - 3' 。 β - actin 的上下游引物分别为: F: 5' - GTGGGGCGC - CCCAGGCACCA - 3' ; R: 5' - CTCCTTAATGTCACG - CACGATTT - 3' 。

2.5 Western blotting 检测 p21 蛋白的表达 将各质粒按照上述方法转染入细胞, 细胞转染 6 h 后换成含有 1% 活性炭处理的血清, 24 h 后收集细胞, 经冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 用细胞裂解液裂解细胞 30 min, 离心后取上清, BCA 法测蛋白浓度, 进行 SDS - PAGE, 然后将蛋白转移至硝酸纤维素薄膜上, 加入兔抗人单抗 (1:2 500), 鼠抗人 actin 多抗 (1:2 000) 以及相应的山羊抗兔和抗鼠的 HRP II 抗, 最后加入底物 ECL 显色。

2.6 MTT 法 细胞接种至 24 孔板, 质粒 pPSA - TAT - p21、pPSA - p21、pCMV - p21 以及空白质粒 pGL₃ - basic 经 lipofectamine2000 转染细胞 24 h 后加

MTT, 4 h 后吸出上清加入 DMSO 测定样品的吸光度, 根据吸光度值大小判断细胞增殖情况。

结 果

1 pPSA - TAT - p21 表达载体的构建

前列腺细胞特异表达载体 pPSA - TAT - p21 的构建过程如图 1A 所示。将连接片段 I、II、III 连接后得到 pPSA - TAT - p21 重组载体, 阳性菌落的 PCR 鉴定结果如图 1B 所示, 泳道 2 显示 1 200 bp 大小的条带, 与预期结果相符。经测序鉴定, 其序列与 PSA - TAT - p21 插入片段完全一致, 确定为 pPSA - TAT - p21 表达载体。

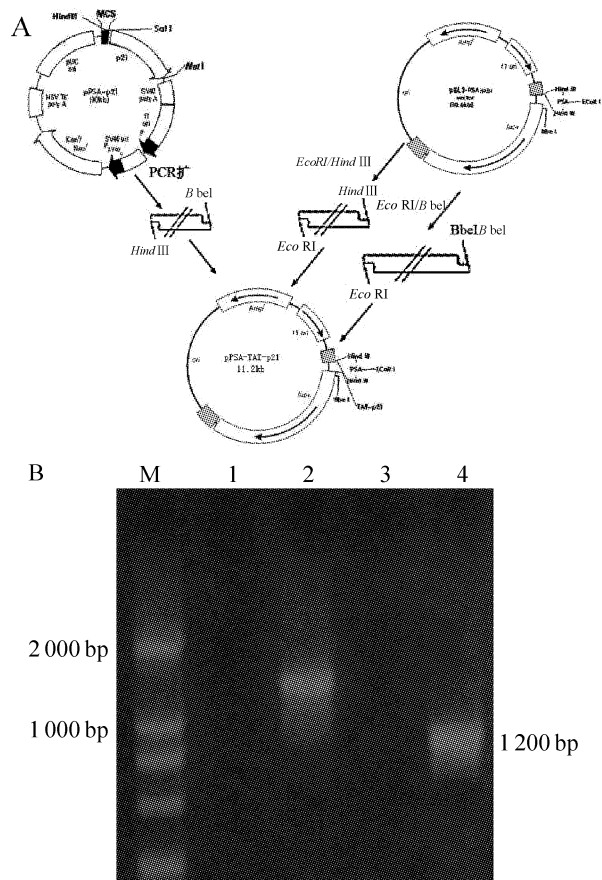


Fig 1 Construct of pPSA - TAT - p21. A: representative model of construct of pPSA - TAT - p21; B: identification of pPSA - TAT - p21 expression vector by colony PCR. Lane 1, 3, and 4 were negative colonies; Lane 2 was a positive colony.

图 1 表达载体 pPSA - TAT - p21 的构建

2 重组质粒 pCMV - p21 的构建

pPSA - TAT - p21 为组织特异性表达载体, 我们选用由通用启动子 CMV 介导的 p21 表达载体作为对照载体, 其构建过程如图 2A 所示。将得到的阳性重组体进行酶切鉴定如图 2B 所示, 泳道 1、2 分别为

pEGFP - N1 和 pPSA - p21 酶切后所得片段,泳道 3、4 为所得阳性重组体经酶切后显示 560 bp 大小的片段和 4.2 kb 大小的片段,与预期结果相符。载体经测序鉴定,确定为 pCMV - p21 表达载体。

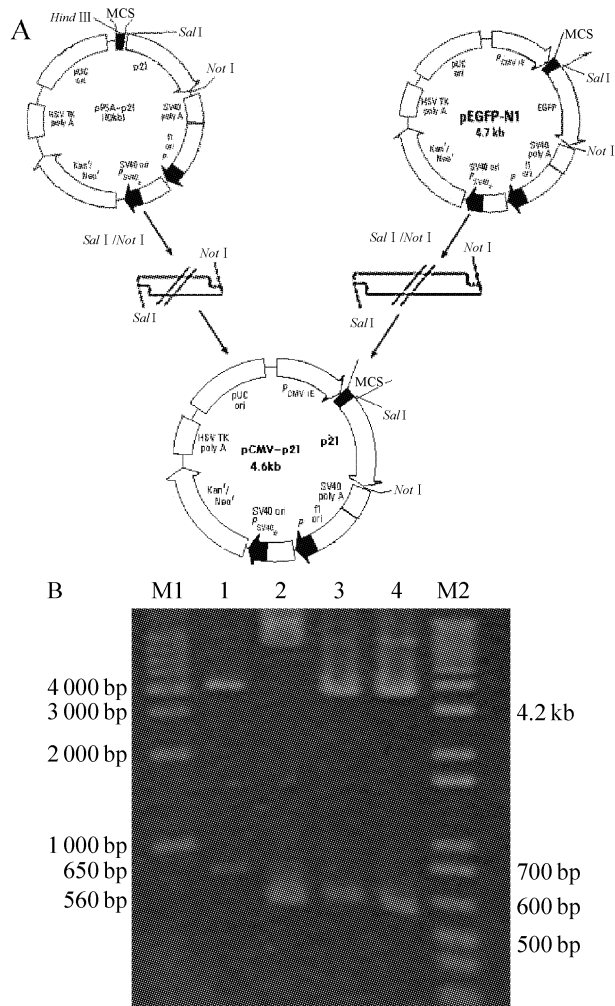


Fig 2 Construct of pCMV - p21. A: representative model of construct of pCMV - p21; B: identification of pCMV - p21 expression vector. Lane 1 showed the 650bp and 4.2 kb fragments of pEGFP - N1 digested by Sal I and Not I; Lane 2 showed the 560 bp and 9.5 kb fragments of pPSA - p21 digested by Sal I and Not I; Lane 3 and 4 showed the 560 bp and 4.2 kb fragments of pCMV - p21 digested by Sal I and Not I.

图 2 表达载体 pCMV - p21 的构建

3 RT - PCR 检测 p21 mRNA 水平的表达

利用 RT - PCR 的方法检测 p21 的 mRNA 在前列腺癌 LNCaP 和大肠癌 HT - 29 细胞中的表达情况。将 pPSA - TAT - p21、pPSA - p21 分别转染 LNCaP 细胞和 HT - 29 细胞 24 h 后进行 RT - PCR。PCR 产物经电泳鉴定,结果如图 3 所示,含有 PSA 启动子的表达载体 pPSA - TAT - p21 和 pPSA - p21 在前列腺癌细胞中均有表达 (泳道 1 和 2),其 mRNA

表达水平明显高于在大肠癌细胞中的表达(泳道 1、2 与泳道 5、6),表明 PSA 启动子能够介导 p21 在前列腺癌细胞中的靶向表达。另外,泳道 1、2 的结果也显示,含有转导序列 TAT 的 pPSA - TAT - p21 与不含 TAT 的 pPSA - p21,其 p21 在 mRNA 水平上的表达并无明显差异。由通用启动子 CMV 介导的 p21 在 LNCaP 细胞和 HT - 29 细胞中均有较强的表达(泳道 3 和 7),而阴性对照组在两种细胞中均无明显条带(泳道 4 和泳道 8)。另外,在 HT - 29 细胞中,转染了 pPSA - TAT - p21 和 pPSA - p21 以及阴性对照 pGL₃ - basic 均有 p21 的微弱表达,可能与内源性 p21 的微量表达有关。上述结果表明,PSA 启动子能够介导 p21 在前列腺癌细胞中特异表达。

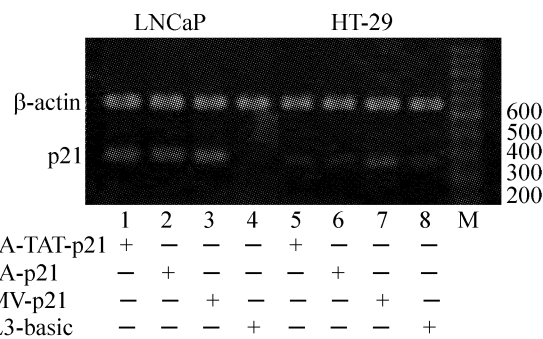


Fig 3 Detection of p21 expression in mRNA level by RT - PCR in LNCaP and HT - 29 cells. Lane 1 - 4: expression of p21 in LNCaP cells after transfection; Lane 5 - 8: expression of p21 in HT - 29 cells after transfection.

图 3 RT - PCR 检测 LNCaP 细胞和 HT - 29 细胞中 p21 基因 mRNA 水平的表达

4 Western blotting 检测 p21 蛋白的表达

利用 Western blotting 的方法检测 p21 蛋白在前列腺癌 LNCaP 和大肠癌 HT - 29 细胞中的表达情况,结果如图 4 所示,以 β - actin 蛋白为内参照,含有转导序列 TAT 的 pPSA - TAT - p21 比不含 TAT 的 pPSA - p21 以及由通用启动子 CMV 介导的 p21 在前列腺癌细胞中的表达要高(泳道 1、2、3),其它结果与 RT - PCR 结果一致。这一结果在蛋白水平进一步证实了 PSA 启动子能够介导 p21 在前列腺癌细胞中特异表达,并且表明 TAT 能够发挥其穿膜肽的作用。

5 MTT 法测定前列腺癌细胞增殖情况

利用 MTT 法进一步检测前列腺癌 LNCaP 细胞转染 pPSA - TAT - p21、pPSA - p21 后的增殖情况,结果如图 5 所示。p21 能够抑制 LNCaP 细胞的增殖,且由 PSA 介导的 TAT - p21 对细胞的抑制作用比不含 TAT 的 p21 作用明显。另外,由通用启动子 CMV 介导的 p21 在前列腺癌细胞中能够表达,因而

对细胞的增殖也有一定的抑制作用。

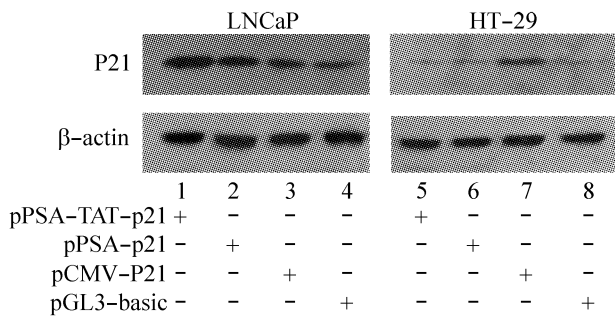


Fig 4 Detection of p21 expression in protein level by Western blotting in LNCaP and HT - 29 cells. Lane 1 - 4: expression of p21 in LNCaP cells after transfection ; Lane 5 - 8: expression of p21 in HT - 29 cells after transfection.

图 4 Western blotting 检测 LNCaP 细胞和 HT - 29 细胞中 p21 基因蛋白水平的表达

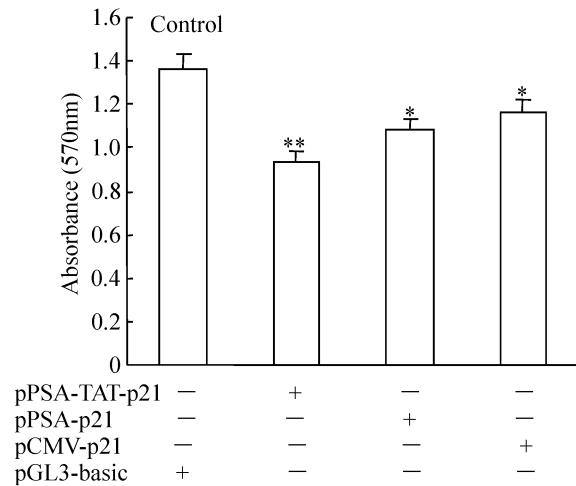


Fig 5 Effect of the p21 on LNCaP cell growth by MTT analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

图 5 MTT 法检测 p21 对 LNCaP 细胞增殖的影响

讨 论

寻找有效的治疗方法依然是前列腺癌临床治疗亟待解决的问题,前列腺癌基因治疗也是正在探索的方向之一。但缺乏组织特异性是基因治疗面临的一大难题。许多研究证实 TAT 能够携带多种蛋白包括抑癌蛋白在组织中自由穿膜,而如果用于体内基因治疗,这种无组织特异性的穿膜将会产生毒副作用,因此我们根据 PSA 在前列腺癌中表达的特异性,将 PSA 启动子与融合基因 TAT - p21 重组,实现抑癌基因 p21 的组织特异性表达,同时又能够提高其表达效率,从而更加有效地发挥其抑制前列腺癌细胞增殖的功能。

PSA 是前列腺特异性抗原,其表达与前列腺癌关系密切^[9],研究表明,多数前列腺癌无论早期还是

晚期均有 PSA 的持续表达,因此 PSA 是前列腺癌临床诊断治疗检测及预后的敏感指标^[10,11],由于 PSA 几乎只在前列腺癌组织中表达^[12],所以该基因的启动子具有高度的组织特异性,尤其适合构建前列腺组织特异性表达载体,使治疗基因在前列腺癌中选择性的表达。PSA 启动子为 PSA 基因上游的一段 6kb 的调控序列,包括启动序列、增强子、雄激素应答元件(ARE)等^[13],其中 ARE 元件是雄激素受体结合位点,因此雄激素及其受体能够通过 PSA 启动子上 ARE 元件的结合调节 PSA 的表达。根据 PSA 启动子的这一特点我们将其序列^[14]构建在质粒中作为一个特异性启动子,启动抑癌基因的表达,用于前列腺癌的靶向基因治疗。

有研究报道,蛋白转导序列 TAT 能够携带分子量为 15 - 120 kD 的蛋白穿过细胞膜,使目的蛋白能更好地发挥生物学功能^[15]。如 TAT 能够携带抑癌基因 p53 进行跨膜转导,提高其生物学活性。但也有研究指出有些蛋白与 TAT 结合为融合蛋白后既不能在细胞间转导也不能发挥作用^[16],可能与目的蛋白的分子大小、空间构象等有关。p21 作为抑癌基因与前列腺癌的发生发展有着密切的关系^[17],我们将其 495 bp 的读码框架与 TAT 序列构建在 PSA 启动子的下游,使其表达成 TAT - p21 融合蛋白。

我们的实验结果表明,由 PSA 启动子介导的外源性 p21 基因可在前列腺癌细胞 LNCaP 中特异表达,而且在 PSA 启动子介导下的 TAT - p21^{WAF1/CIP1} 融合蛋白与 p21 相比能够更加高效地表达并且有效地抑制前列腺癌细胞的增殖。RT - PCR 结果中显示含有转导序列 TAT 的 pPSA - TAT - p21 与不含 TAT 的 pPSA - p21,其 p21 在 mRNA 水平上的表达并无明显差异,而 Western 印迹实验中,转染了 pPSA - TAT - p21 的细胞中 p21 蛋白的表达水平明显高于转染了 pPSA - p21 的细胞。这表明 TAT 并不影响 p21 融合基因在转录水平的表达,而是介导 p21 融合蛋白的跨膜转运,提高了 p21 蛋白的表达。因此,TAT 与 p21 形成的融合蛋白能够增强 p21 蛋白的表达及其活性,可能与 TAT 介导的跨膜转运有关。

由于 PSA 启动子中的 ARE 元件是雄激素受体结合的位点,其表达和功能主要受雄激素的调控,在雄激素依赖和雄激素非依赖的前列腺癌细胞中,pPSA - TAT - p21 表达及功能的差别以及可能的分子机制等是我们需要进一步探讨的问题,相关工作正在进行中。

[参 考 文 献]

[1] Zhang J, Hsu B A JC, Kinseth B A MA, et al. Indole - 3

- carbinol induces a G₁ cell cycle arrest and inhibits prostate - specific antigen production in human LNCaP prostate carcinoma cells [J]. *Cancer*, 2003, 98 (11): 2511 - 2520.
- [2] Haag P, Bektic J, Bartsch G, et al. Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 96(3-4): 251 - 258.
- [3] Park HY, Kim MK, Moon SI, et al. Cell cycle arrest and apoptotic induction in LNCaP cells by MCS - C2, novel cyclin - dependent kinase inhibitor, through p53/p21^{WAF1/CIP1} pathway [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(5): 430 - 436.
- [4] Lu S, Ren C, Liu Y, et al. PI3K - Akt signaling is involved in the regulation of p21 (WAF/CIP) expression and androgen - independent growth in prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(1): 245 - 251.
- [5] Agus DB, Cordon - Cardo C, Fox W, et al. p21^{WAF1/CIP1} gene is inactivated in metastatic prostatic cancer cell lines by promoter methylation [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2005, 8(4): 321 - 326.
- [6] Bataller M, Portugal J. Apoptosis and cell recovery in response to oxidative stress in p53 - deficient prostate carcinoma cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 437(2): 151 - 158.
- [7] 王廷杰, 张建业, 陈蔚文, 等. 前列腺癌细胞 PC - 3M 对外源基因 pPSA - p21 表达的抑制作用 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2004, 42(1): 19 - 22.
- [8] Zhang S, Murtha PE, Young CY. Defining a functional androgen responsive element in the 5' far upstream flanking region of the prostate - specific antigen gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(3): 784 - 788.
- [9] Brawer MK. Assays for complexed prostate - specific antigen and other advances in the diagnosis of prostate cancer [J]. *Rev Urol*, 2003, 5(Suppl 6): S10 - S16.
- [10] 曹开源, 戴淑琴, 肖娜, 等. 新型前列腺特异性膜抗原剪接变异体的发现及临床意义探讨 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(11): 2185 - 2188.
- [11] 曹开源, 肖娜, 徐霖, 等. 前列腺特异膜抗原剪接变异体的基因结构和多态性分析 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(12): 2377 - 2379.
- [12] Gould DC, Feneley MR, Kirby RS. Prostate - specific antigen testing in hypogonadism: implications for the safety of testosterone - replacement therapy [J]. *Urologe A*, 2006, 45(8): 1002 - 1005.
- [13] Chapel - Fernandes S, Jordier F, Lauro F, et al. Use of the PSA enhancer core element to modulate the expression of prostate - and non - prostate - specific basal promoters in a lentiviral vector context [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(10): 919 - 929.
- [14] Schuur ER, Henderson GA, Kmetec LA, et al. Prostate - specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(12): 7043 - 7051.
- [15] Zender L, Kuhnel F, Kock R. VP22 - mediated intercellular transport of p53 in hepatoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2002, 9(6): 489 - 496.
- [16] Leifert JA, Harkins S, Whitton JL. Full - length protein attached to the HIV tat protein transduction domain are neither transduced between cells, nor exhibit enhanced immunogenicity [J]. *Gene Therapy*, 2002, 9(21): 1422 - 1428.
- [17] Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin - dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002, 1(8): 639 - 649.

书 讯

为适应病理生理学双语教学、留学生及研究生教学的需要,由谢可鸣、王小川和钱睿哲主编,苏州大学医学院、华中科技大学同济医学院、复旦大学上海医学院等国内 19 所医学院校病理生理学骨干教师联合编写、并由王建枝和金惠铭教授主审的病理生理学双语教学大型配套教材《Pathophysiology—Review and Self - Assessment(英文版病理生理学复习与自测)》于 2008 年 2 月由人民卫生出版社正式出版。该教材全部用英文编写,共分 20 章,分别与病理生理学绪论、疾病概论、基本病理过程、器官系统病理生理及细胞分子病理生理等理论教学内容相配套,各章均包括学习目的(Learning objectives)、自测习题(Questions for self - assessment)和参考答案及相关解释(Reference Answers to Questions and Related Explanations)3 部分的内容。自测习题包括了 A 型题、X 型多选题、名词解释、是非题、简答题和论述题等 6 类题型,全书共有 1270 多个题目。

该书由卫生部教材办公室批准立项,为国内基础及临床医学各门课程中的第一本双语配套教材。

在本教材出版的基础上,本书的编者也即将编写完成病理生理学英文试题库及评分标准,该题库及试卷生成系统将由苏州大学医学院病理生理教研室最后制作完成。

需要此教材的医学院校可直接向人民卫生出版社订购,需要病理生理学英文试卷生成系统软件的院校可与苏州大学医学院病理生理教研室联系(电话:0512 - 65880118)。

苏州大学医学院病理生理学教研室 谢可鸣