

## CDK2-AP1 基因过表达对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及周期的影响

关晓燕, 周卫兵, 黄隽, 王龙云, 廖遇平

(中南大学湘雅医院肿瘤科, 长沙 410008)

**[摘要]** **目的:** 通过过表达手段上调细胞周期调节蛋白依赖性激酶 2- 关联蛋白 1(CDK2-AP1) 基因在乳腺癌细胞 MCF-7 中的表达, 并观察其对 MCF-7 细胞生长和细胞周期调控的作用。**方法:** 将 CDK2-AP1 基因的编码框构建于慢病毒表达载体, 导入 MCF-7 细胞, 应用实时定量 PCR 和 Western 印迹验证 CDK2-AP1 基因 mRNA 和蛋白的表达效率。利用 MTT 法绘制生长曲线、克隆形成实验观察 CDK2-AP1 基因过表达后 MCF-7 细胞生长的变化, PI 染色流式细胞仪检测 MCF-7 细胞周期的改变。通过 Western 印迹检测 CDK2-AP1 过表达后, 细胞周期相关蛋白 (CDK2, CDK4, P16<sup>Ink4A</sup>, P21<sup>Cip1/Waf1</sup>) 的表达。**结果:** 过表达 CDK2-AP1 基因的慢病毒感染 MCF-7 细胞可上调其 mRNA 表达 6.94 倍, 蛋白表达也十分显著地增高, 两者相一致。生长曲线显示 MCF-7 细胞过表达 CDK2-AP1 基因后, 增殖能力显著降低 ( $P<0.05$ ); 克隆形成实验表明, 其形成的克隆数目同样显著减少 ( $P<0.05$ ); 流式细胞仪检测证实 MCF-7 细胞过表达 CDK2-AP1 能够使细胞周期出现 G<sub>1</sub> 期阻滞, 并且出现凋亡峰; CDK2-AP1 基因表达上调导致 P21<sup>Cip1/Waf1</sup> 和 P16<sup>Ink4A</sup> 蛋白表达上调, CDK2 和 CDK4 蛋白表达下调。**结论:** CDK2-AP1 基因具有抑癌基因的功能, 在乳腺癌 MCF-7 细胞过表达该基因能够抑制细胞的生长和克隆形成能力, 并且使细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期。

**[关键词]** CDK2-AP1; 过表达; 增殖; 细胞周期

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.10.004

## Effect of CDK2-AP1 gene over-expression on proliferation and cell cycle regulation of breast cancer cell line MCF-7

GUAN Xiaoyan, ZHOU Weibing, HUANG Juan, WANG Longyun, LIAO Yuping

(Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To over-express cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1 (CDK2-AP1) gene, and investigate its effect on the proliferation and cell cycle regulation in breast cancer cell line MCF-7.

**Methods:** CDK2-AP1 gene coding region was cloned into lentivirus vector. Lentivirus particles were infected into MCF-7 cells to upregulate the expression of CDK2-AP1 gene. The expression level of CDK2-AP1 was detected at both mRNA and protein levels by real-time PCR and Western blot. MTT assay, colony formatting assay, and flow cytometry were performed to detect the change of proliferation and cell cycle in MCF-7 cells. We examined the expression of cell cycle associated genes (CDK2, CDK4, P16<sup>Ink4A</sup>, and P21<sup>Cip1/Waf1</sup>) followed by CDK2-AP1 over-expression by Western blot.

**Results:** CDK2-AP1 gene was up-regulated significantly at both mRNA (6.94 folds) and protein level. MTT based growth curve, colony formatting assay and flow cytometry showed that CDK2-

收稿日期 (Date of reception): 2011-11-16

作者简介 (Biography): 关晓燕, 硕士, 经治医师, 主要从事肿瘤学及放射治疗学研究, 现在安徽省六安市人民医院肿瘤放疗科工作。

通信作者 (Corresponding author): 周卫兵, Email: zhouweibing298@yahoo.com.cn

AP1 over-expression lentivirus inhibited the proliferation of MCF-7 cells with statistical difference ( $P < 0.05$ ). In addition, with CDK2-AP1 over-expression, MCF-7 cells were arrested in G<sub>1</sub> phase accompanied by apoptosis. Western blot showed that the expression level of P21<sup>Cip1/Waf1</sup> and P16<sup>Ink4A</sup> was upregulated, while the expression level of CDK2 and CDK4, members of the CDK family, was downregulated.

**Conclusion:** CDK2-AP1 gene plays a cancer suppressor role in breast cancer. Its function includes inhibiting the proliferation of MCF-7 cells and arresting the cell cycle in G<sub>1</sub> phase.

## KEY WORDS

CDK2-AP1; over-expression; proliferation; cell cycle

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,目前,中国乳腺癌的发病率虽然低于欧美国家,但在发达城市乳腺癌的发病率以每年 3% 的速度递增<sup>[1]</sup>。以手术、放疗、化疗和内分泌治疗为主的综合治疗模式极大地提高了乳腺癌患者的生存率,但进展期和复发性乳腺癌的预后仍不理想。随着对肿瘤分子病理学认识的不断深入,以及 DNA 重组技术的快速发展,基因治疗逐渐成为肿瘤生物治疗学中的重要组成部分,并在进展期和复发性乳腺癌的治疗中显示出良好的应用前景<sup>[2]</sup>。利用基因转染技术将相应基因转染乳腺癌细胞从而抑制乳腺癌细胞增殖是目前基因治疗乳腺癌的主要手段之一。目前研究较多的是 HER-2 基因,陈嘉等<sup>[3]</sup>利用脂质体介导将 E1A 基因转染 HER-2 表达阳性的乳腺癌细胞系 MCF-7, E1A 基因抑制 HER-2 表达的同时, MCF-7 细胞增殖减少,肿瘤细胞集落形成能力降低,从而诱导 MCF-7 发生凋亡。细胞周期调节蛋白依赖性激酶 2- 关联蛋白 1 (cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1, CDK2-AP1) 不仅可调节 CDK2 的激酶活性, 还是一种生长抑制因子。有研究<sup>[4]</sup>发现在动物模型中 CDK2-AP1 的异常表达与肿瘤细胞倍增密切相关,证实 CDK2-AP1 基因具有抑制细胞生长的作用。目前已发现 CDK2-AP1 在口腔鳞癌<sup>[5]</sup>、食道鳞状上皮细胞癌<sup>[6]</sup>、胃癌<sup>[7]</sup>等表达下调,可见 CDK2-AP1 下调可能与恶性肿瘤的发生发展有关。本研究利用慢病毒载体转染 CDK2-AP1 基因,从而上调 MCF-7 细胞中 CDK2-AP1 基因的表达,观察其对 MCF-7 细胞增殖活性、克隆形成能力和细胞周期的影响,探讨 CDK2-AP1 在乳腺癌细胞中的生物学作用,为阐明乳腺癌发生机制及开发针对性的治疗应用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

慢病毒载体由瑞士 Genev 大学 Trono 实验室改造<sup>[8]</sup>; 限制性内切酶、Age I 酶和 T4 连接酶购自美

国 New England Biolabs (NEB) 公司; M-MLV 反转录酶、dNTP 和 RNA 酶抑制剂购自美国 Promega 公司; 带有标签的 CDK2-AP1 开放阅读框 cDNA 克隆购自美国 Origene 公司; PCR 引物合成与测序委托美国 Invitrogen 公司进行, TRIzol, Lipofectamin 2000 转染试剂, DMEM, 胰酶也购自该公司; SYBR 定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司; 人胚肾细胞 293T, 人乳腺癌细胞 MCF-7 来源于中科院上海细胞库; enhanced chemiluminescence (ECL) Western 试剂盒购自美国 Amersham 公司; 胎牛血清和 Opti-MEM 购自美国 Gibco 公司; 质粒 DNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自美国 Qiagen 公司; CDK2-AP1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; GAPDH 内对照抗体、二抗购自美国 Santa-Cruz 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 构建 CDK2-AP1 基因表达载体并包装慢病毒颗粒

使用 Age I 酶对慢病毒载体进行酶切消化, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物。根据 GeneBank 中 CDK2-AP1 (NM\_004642) 序列, 设计 CDK2-AP1 的 PCR 扩增引物, 利用 PCR 方式转接, PCR 产物两端含 Age I 酶切位点黏性末端 (ACCGGT), 通过连接酶反应直接连入酶切后的慢病毒表达载体 CMV 启动子下游。反应体系如下: ddH<sub>2</sub>O 12.4  $\mu$ L, 5 $\times$  Taq buffer 4  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L, Primer(F) (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L, Primer(R) (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L, Template (10 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, Taq polymerase 0.2  $\mu$ L。反应条件如下: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68  $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 30 个循环, 68  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 扩增 CDK2-AP1 基因。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

将纯化后的连接产物 (10  $\mu$ L) 转入用氯化钙制备的新鲜的细菌感受态细胞。将 150  $\mu$ L 已转化的感受态细胞转移到含 20 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 和 AMP 抗性 (100 mg/mL) 的 LB 琼脂培养基上, 于 37  $^{\circ}$ C 培养 16

h. 对阳性克隆先进行 PCR 鉴定, 连接成功的克隆送基因公司测序, 选出重组 CDK2-AP1 基因表达序列正确的载体。

使用美国 Qiagen 公司的质粒抽提试剂盒提取慢病毒包装系统中 CDK2-AP1 过表达质粒和两个慢病毒辅助质粒。将 HEK293T 细胞以  $6 \times 10^6$ /mL 的密度接种于 15 cm 培养皿, 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 培养至 70%~80% 融合, 慢病毒三质粒以脂质体转染法共转染 293T 细胞。收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液, 4500 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片, 过滤后置于 25000 r/min 超速离心 90 min, 而后以冰的 PBS 溶液重悬病毒沉淀, 检测滴度后置于 -80 °C 冰箱中保存。

### 1.2.2 慢病毒颗粒感染乳腺癌 MCF-7 细胞后 CDK2-AP1 基因表达效率验证

将 CDK2-AP1 慢病毒按照感染复数 (MOI) 为 20, 感染 6 孔培养板中的乳腺癌细胞 MCF-7, 慢病毒携带的 CDK2-AP1 基因表达序列整合入 MCF-7 细胞从而获得稳定过表达。感染 96 h 后分别抽提细胞总 RNA 和蛋白。

反转录后的 cDNA 采用 Real-time PCR 检测 CDK2-AP1 mRNA 过表达状态。CDK2-AP1 引物序列如下: 上游引物为 5'-AAGAGCAACCCACCAACC-3', 下游引物为 5'-ATCAACTTACAATAAACGCAGAAC-3'; actin 引物序列如下: 上游引物为 5'-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3', 下游引物为 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'。两步法行实时荧光定量, 95 °C 预变性 15 s, 之后 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 60 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。每次在延伸阶段读取吸光度值。PCR 结束后, 95 °C 变性 1 min, 冷却至 55 °C, 从 55 °C 开始升温至 95 °C, 每一步保持在 30 s 内上升 0.5 °C, 同时读取吸光度值, 绘制熔解曲线。

提取的总蛋白进行 Western 印迹检测 CDK2-AP1 蛋白的表达效率。采用 BCA 法测定蛋白浓度。根据目的蛋白分子质量大小配制分离胶和浓缩胶, 等胶凝固好后, 将其放入电泳槽中, 加足够的电泳液后开始准备上样。电泳结束后, 使用转移电泳装置, 冰浴, 350 mA 恒流条件下电转 120 min, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 把已经转好的 PVDF 膜以封闭液稀释的 CDK2-AP1 或 GAPDH 抗体, 于 4 °C 孵育 12 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min。接着将 PVDF 膜用封闭液稀释相应的辣根过氧化物酶共价的二抗在室温下孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。采用 ECL Western 试剂盒进行显色。

### 1.2.3 MTT 法绘制细胞生长曲线

将 MCF-7 细胞以  $2 \times 10^4$  的密度接种于 6 孔板,

培养 24 h 后, 空载体对照病毒和 CDK2-AP1 过表达病毒均按 MOI=20 感染 MCF-7 细胞, 感染 96 h 后收集细胞, 以 2000 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 每组设 3 个复孔。在 1~5 d 每天取样细胞加入 MTT 溶液 (5 mg/mL), 37 °C 培育 4 h, 弃培养基, 每孔加 100  $\mu$ L DMSO, 室温振荡使结晶充分溶解, 酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度值, 以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

### 1.2.4 克隆形成实验

将感染空载体对照病毒和 CDK2-AP1 过表达病毒 96 h 的 MCF-7 细胞, 以 200 个/孔的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 每组平行设 3 个复孔; 将接种好的细胞于培养箱中继续培养至 14 d, 中途换液同时观察细胞状态, 实验终止时 PBS 洗涤细胞 2 次, 多聚甲醛固定细胞后, PBS 洗涤细胞 2 次, Giemsa 染色, 去离子水洗涤 3 次后, 计数克隆并拍照。

### 1.2.5 流式细胞术检测细胞周期分布

将上述慢病毒感染 96 h 的细胞以  $5 \times 10^6$  个细胞铺 6 cm 培养皿, 培养 48 h 至细胞达 80% 的融合, 收集培养上清于 15 mL 离心管中, 用胰酶消化贴壁细胞收集于同一离心管中, 1500 r/min 离心 5 min; 用 1 mL 预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次, 转移细胞至 1.5 mL 离心管, 4 °C 条件下 1500 r/min 离心 5 min, 收集细胞。用 50  $\mu$ L 预冷 PBS 重悬细胞, 并吹散成单细胞悬液, 将单细胞悬液逐滴加入预冷的 950  $\mu$ L 70% 乙醇中。离心, 预冷的 PBS 洗涤 1 次, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每管细胞样品加入 500  $\mu$ L PI 染色液, 37 °C 避光孵育 1 h, 使用流式细胞仪检测细胞周期分布。

## 1.3 统计学处理

实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据采用统计学软件 SPSS16.0 for Windows 进行分析; 组间差异采用配对 *t* 检验;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MCF-7 细胞 CDK2-AP1 基因过表达效率验证

以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法统计相对表达丰度, 过表达慢病毒感染组 CDK2-AP1 基因的表达强度是对照组的 6.94 倍, 两者之间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 1A)。Western 印迹检测 CDK2-AP1 蛋白表达效率证实 MCF-7 细胞中 CDK2-AP1 的本底表达较弱, 而过表达实验组的 CDK2-AP1 表达明显增强, 高于内对照基因 GAPDH (图 1B)。



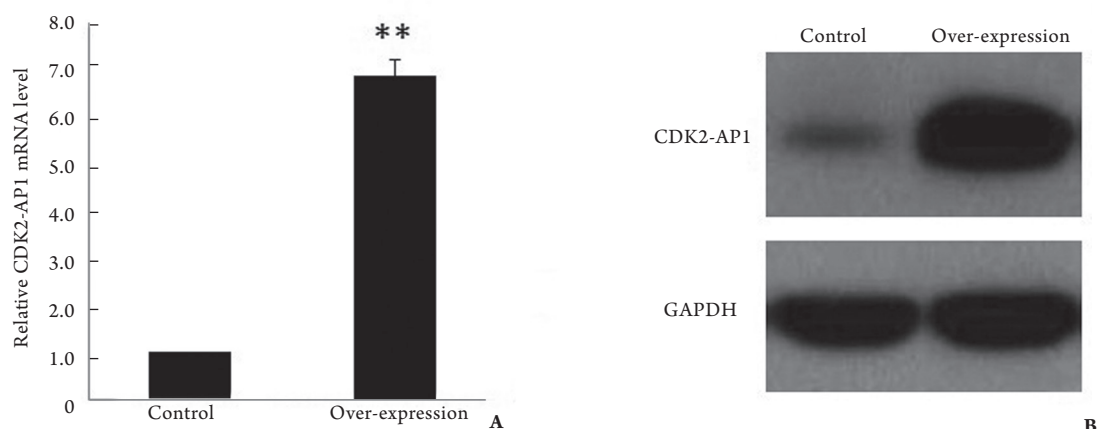


图1 MCF-7 细胞 CDK2-AP1 基因过表达效率验证。A: Real-time PCR 结果统计分析图 ( $\bar{x} \pm s$ ); B: Western 印迹电泳图。Control: 感染空载体对照慢病毒; Over-expression: 感染 CDK2-AP1 过表达慢病毒。与 control 比较,  $**P < 0.01$ 。

**Figure 1** Expression level of CDK2-AP1 gene in breast cancer cell line MCF-7. A: Statistical graph of the Real-time PCR results ( $\bar{x} \pm s$ ); B: Picture of Western blot. Control: Infected lentivirus particles without CDK2-AP1 gene; Over-expression: Infected CDK2-AP1 over-expression lentivirus particles.  $**P < 0.01$  vs control.

## 2.2 CDK2-AP1 基因表达对 MCF-7 细胞生长的影响

自第 3 天起, 转染 CDK2-AP1 基因过表达慢病毒的 MCF-7 细胞其生长状态受到明显抑制, 第 3~5 天检测差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2), 表明 CDK2-AP1 具有抑制 MCF-7 细胞增殖的功能。

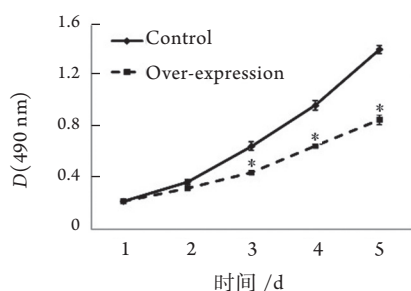


图2 CDK2-AP1 基因表达对 MCF-7 细胞生长的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )。Control: 感染空载体对照慢病毒; Over-expression: 感染 CDK2-AP1 过表达慢病毒。与 control 比较,  $*P < 0.05$ 。

**Figure 2** Effect of CDK2-AP1 over-expression on the proliferation of MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ). Control: Infected lentivirus particles without CDK2-AP1 gene; Over-expression: Infected CDK2-AP1 over-expression lentivirus particles.  $*P < 0.05$  vs control.

## 2.3 CDK2-AP1 基因过表达对 MCF-7 细胞克隆形成能力的影响

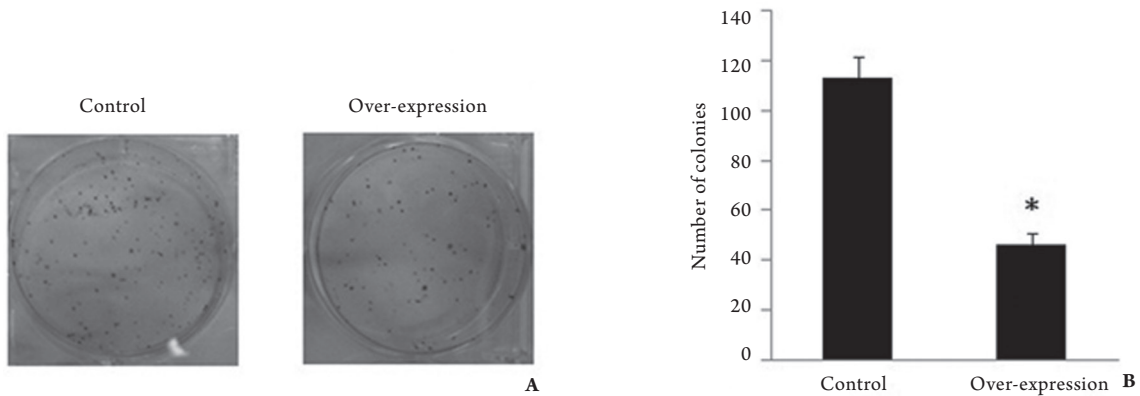
MCF-7 细胞转染 CDK2-AP1 基因过表达慢病毒后细胞的克隆形成能力较空载体对照组明显受到抑制 (图 3 A), GIEMSA 染色后计数克隆并统计分析, 证实形成  $>50$  个细胞的克隆数目显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 3 B), 由此推断 CDK2-AP1 基因可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的克隆形成能力。

## 2.4 CDK2-AP1 基因过表达对 MCF-7 细胞周期的影响

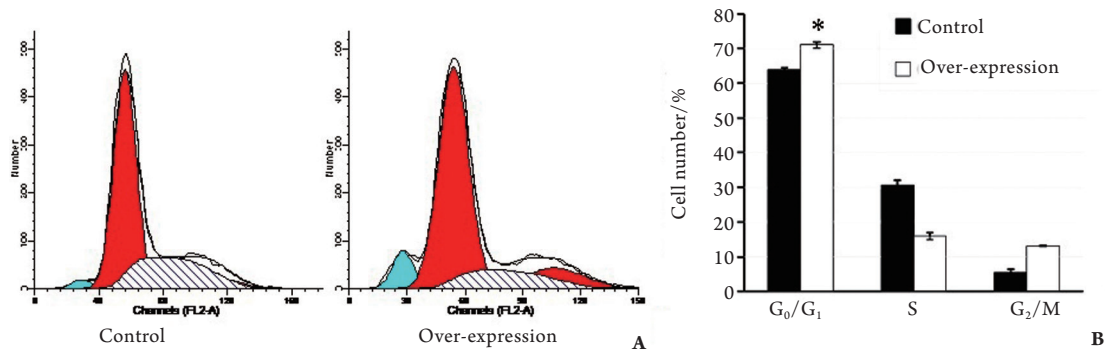
与转染空载体对照组相比, CDK2-AP1 基因过表达后能够使  $G_1$  期细胞增多, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 同时, 过表达组的  $G_1$  期细胞峰前出现凋亡峰, 表明凋亡细胞比例增加 (图 4)。

## 2.5 CDK2-AP1 基因过表达对 MCF-7 细胞周期相关蛋白表达水平的影响

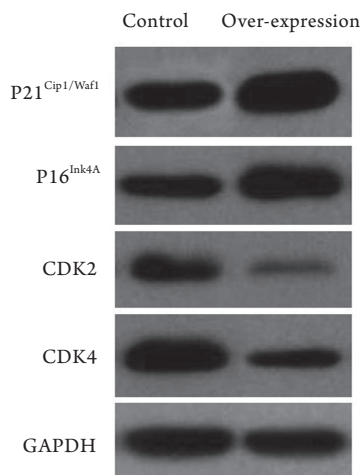
与转染空载体对照组相比, CDK2-AP1 基因过表达后, CDK2-AP1 基因表达上调导致 P21<sup>Cip1/Waf1</sup> 和 P16<sup>Ink4A</sup> 蛋白表达上调, CDK2 和 CDK4 蛋白表达下调 (图 5)。



**图 3 CDK2-AP1 基因过表达对 MCF-7 细胞克隆形成能力的影响。**A: MCF-7 细胞克隆 Giemsa 染色照片; B: 克隆形成实验统计图 ( $\bar{x}\pm s$ )。Control: 感染空载体对照慢病毒; Over-expression: 感染 CDK2-AP1 过表达慢病毒。与 control 比较, \* $P<0.05$ 。  
**Figure 3 Effect of CDK2-AP1 over-expression on cloning formation ability of MCF-7.** A: Picture of MCF-7 cell colonies stained with Giemsa; B: Statistical graph of colony formatting assay ( $\bar{x}\pm s$ ). Control: Infected lentivirus particles without CDK2-AP1 gene; Over-expression: Infected CDK2-AP1 over-expression lentivirus particles. \* $P<0.05$  vs control.



**图 4 CDK2-AP1 基因过表达对 MCF-7 细胞周期及周期相关蛋白表达水平的影响。**A: 流式细胞仪检测峰型图; B: 细胞周期比例统计图 ( $\bar{x}\pm s$ )。Control: 感染空载体对照慢病毒; Over-expression: 感染 CDK2-AP1 过表达慢病毒。与 control 比较, \* $P<0.05$ 。  
**Figure 4 Effects of CDK2-AP1 over-expression on MCF-7 cell cycle distribution as assessed by flow cytometry.** A: Peak type figure of flow cytometric analysis; B: Statistical graph of cell cycle proportion ( $\bar{x}\pm s$ ). Control: Infected lentivirus particles without CDK2-AP1 gene; Over-expression: Infected CDK2-AP1 over-expression lentivirus particles. \* $P<0.05$  vs control.



**图 5 Western 印迹示 CDK2, CDK4, P16<sup>Ink4A</sup>, P21<sup>Cip1/Waf1</sup> 的表达。**  
**Figure 5 Western blot showing the expression of CDK2, CDK4, P16<sup>Ink4A</sup>, and P21<sup>Cip1/Waf1</sup> expression.**

### 3 讨论

细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDKs) 对细胞周期起着核心的调控作用, 作为细胞周期核心调控环节的 CDKs 与相应的细胞周期蛋白结合是细胞周期各类分子事件的启动和进行的必要条件, 通过对细胞周期蛋白的磷酸化修饰使细胞周期从一个时相进入另一个时相。不同种类的细胞周期蛋白与不同种类的 CDKs 结合, 对细胞周期的不同时相进行调控<sup>[9]</sup>。在恶性肿瘤中, CDK 分子和细胞周期蛋白水平往往异常升高, 使细胞周期发生紊乱<sup>[10]</sup>。CDK2 激活后与 cyclinE, cyclinA 结合, 从而参与 G<sub>1</sub>/S 期转化、DNA 复制及 DNA 合成<sup>[11]</sup>。CDK2-AP1 又名 DOC1, 是 1995 年由 Todd 等<sup>[12]</sup> 从正常角质化细胞中分离出来的生长抑制因

子, 人类此基因定位于 12q24, 全长 1.6 kb, 该基因可编码 115 个氨基酸, 其蛋白质分子质量为 12.4 kD<sup>[11, 13]</sup>。CDK2-AP1 是一个与周期素依赖性蛋白激酶 CDK2 确切相关的蛋白, CDK2-AP1 过量表达直接降低细胞内 CDK2 表达, 抑制 CDK2 相关激酶活性, 从而降低 CDK2 活性, 影响细胞周期的表型导致细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞, 抑制细胞 DNA 合成及增殖<sup>[11]</sup>, 另外其可以与 DNA 聚合酶  $\alpha$ / 引发酶产生相互作用, 调节催化亚基 P180 的磷酸化, 进而对细胞周期中 S 期的 DNA 复制具有负调控的作用, 从而导致细胞周期停滞抑制肿瘤细胞生长增殖和细胞程序性凋亡<sup>[13-14]</sup>。这与本研究观察到的结果相一致。

CDK2-AP1 不仅可以调控 CDK2 的活性, 其低表达可导致 pRB 磷酸化, 从而在 TGF- $\beta$ 1 调节的生长抑制系统中发挥重要的作用<sup>[15]</sup>。最近 Peng 等<sup>[16]</sup>的研究发现: CDK2-AP1 的表达缺陷会伴随有 TGF- $\beta$ -Smad 信号通路的异常, 最终导致人类口腔鳞癌细胞对 TGF- $\beta$ 1 诱导的生长抑制效应产生抵抗作用。

由此可见, CDK2-AP1 可以调控 CDK2 的活性, PRB 和 P180 的磷酸化, 以及 TGF- $\beta$ -Smad 信号通路, 进而发挥其对细胞生长的抑制作用, 具有抑癌基因的潜在功能。目前 CDK2-AP1 基因对口腔鳞癌、结肠癌等功能影响已得到证实<sup>[16-18]</sup>, 但有关 CDK2-AP1 基因在人乳腺癌发生、发展过程中的作用尚未阐明。

慢病毒载体是以 HIV-1 为基础发展起来的基因治疗载体, 不但可以感染非分裂期细胞, 还具有容纳外源性目的基因片段大、稳定整合持久表达、免疫反应小等优点。本研究应用慢病毒介导的过表达技术在乳腺癌 MCF-7 细胞上调 CDK2-AP1 基因的表达, 证实该基因的表达上调可致 MCF-7 细胞增殖减缓, 克隆形成能力减弱, 细胞周期出现 G<sub>1</sub> 期阻滞, 诱导细胞凋亡增加。CDK2-AP1 基因能够调控细胞周期, 使细胞复制能力降低, 验证了其表达对乳腺癌 MCF-7 细胞具有抑制增殖的作用。表明针对 CDK2-AP1 基因的靶向策略能够抑制乳腺癌细胞的恶性增殖, 这就使得 CDK2-AP1 分子在肿瘤的基因治疗上存在可能的应用前景。

## 参考文献

1. 彭卫军, 顾雅佳. 重视乳腺影像学检查技术和诊断水平的普及与提高为降低我国乳腺癌发病率而努力[J]. 中华放射学杂志, 2009, 43(5): 453-454.
2. 王深明, 林颖. 乳腺癌基因治疗进展[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(1): 55-58.
3. 陈嘉, 申良方, 钟美佐, 等. E1A抑制乳腺癌MCF-7细胞增殖及其分子机制[J]. 中南大学学报:医学版, 2008, 33(7): 582-586.
4. Figueiredo ML, Kim Y, St John MA, et al. P12 (CDK2-AP1) gene therapy strategy inhibits tumor growth in an in vivo mouse model of head and neck cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(10): 3939-3948.
5. Shintani S, Mihara M, Terakado N, et al. Reduction of p12DOC-1 expression is a negative prognostic indicator in patients with surgically resected oral squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9): 2776-2782.
6. Hiyoshi Y, Watanabe M, Hirashima K, et al. p12CDK2-AP1 is associated with tumor progression and a poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2009, 22(1): 35-39.
7. Choi MG, Sohn TS, Park SB, et al. Decreased expression of p12 is associated with more advanced tumor invasion in human gastric cancer tissues [J]. Eur Surg Res, 2009, 42(4): 223-229.
8. Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system[J]. J Virol, 1998, 72(11): 8463-8471.
9. Gopinathan L, Ratnacaram CK, Kaldis P. Established and novel cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development [J]. Results Probl Cell Differ, 2011, 53: 365-389.
10. Zolocheska O, Figueiredo ML. Cell-cycle regulators CDK2-AP1 and bicalutamide suppress malignant biological interactions between prostate cancer and bone cells [J]. Prostate, 2011, 71(4): 353-367.
11. Shintani S, Ohyama H, Zhang X, et al. p12(DOC-1) is a novel cyclin-dependent kinase 2-associated protein [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(17): 6300-6307.
12. Todd R, McBride J, Tsuji T, et al. Deleted in oral cancer-1 (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene [J]. FASEB J, 1995, 9(13): 1362-1370.
13. Tsuji T, Duh FM, Latif F, et al. Cloning, mapping, expression, function, PENG Weijun, GU Yajia. Boost and generalization of breast imaging and diagnostic ability in order to reduce the incidence of breast cancer in our country [J]. Chinese Journal of Radiology, 2009, 43(5): 453-454.
- WANG Shenming, LIN Ying. Progress in gene therapy of breast cancer [J]. Chinese Journal of Surgery, 2006, 44(1): 55-58.
- CHEN Jia, SHEN Liangfang, ZHONG Meizuo, et al. Molecular mechanism of proliferation of human breast cancer cell MCF-7 inhibited by E1A gene [J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2008, 33(7): 582-586.

- and mutation analyses of the human ortholog of the hamster putative tumor suppressor gene doc-1 [J]. J Biol Chem, 1998, 273(12): 6704-6709.
14. Matsuo K, Shintani S, Tsuji T, et al. p12(DOC-1), a growth suppressor, associates with DNA polymerase  $\alpha$ /primase [J]. FASEB J, 2000, 14(10): 1318-1324.
15. Hu MG, Hu G-F, Kim Y, et al. Role of p12CDK2-AP1 in transforming growth factor-b1- mediated growth suppression [J]. Cancer Res, 2004, 64(2): 490-499.
16. Peng H, Shintani S, Kim Y, et al. Loss of p12CDK2-AP1 Expression in human oral squamous cell carcinoma with disrupted transforming growth factor-b-smad signaling pathway[J]. Neoplasia, 2006, 8(12): 1028-1036.
17. Yuan Z, Sotsky Kent T, Weber TK. Differential expression of DOC-1 in microsatellite-unstable human colorectal cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(40): 6304-6310.
18. Shin J, Yuan Z, Fordyce K, et al. A del T poly T (8) mutation in the 3' untranslated region (UTR) of the CDK2-AP1 gene is functionally significant causing decreased mRNA stability resulting in decreased CDK2-AP1 expression in human microsatellite unstable (MSI) colorectal cancer (CRC) [J]. Surgery, 2007, 142(2): 222-227.

(本文编辑 郭征)

## 本刊常用词汇英文缩写表

从 2012 年第 1 期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	纤连蛋白	FN
Toll 样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心电图	ECG
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	心脏监护病房	CCU
白细胞	WBC	抗体毒素蛋白-生物素酶复合物法	ABC 法	血管紧张素 II	AngII
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管内皮生长因子	VEGF
半数抑制浓度	IC <sub>50</sub>	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC 法	血管性血友病因子	vWF
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血红蛋白	Hb
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP 法	绿色荧光蛋白	GFP	血肌酐	SCr
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血尿素氮	BUN
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血小板	PLT
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血压	BP
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素 / 脂多糖	LPS	血氧饱和度	SO <sub>2</sub>
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	严重急性呼吸综合征	SARS
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮	NO
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	一氧化氮合酶	NOS
动脉血二氧化碳分压	PaCO <sub>2</sub>	凝血酶原时间	PT	乙二醇四乙酸	EDTA
动脉血氧分压	PaO <sub>2</sub>	牛血清白蛋白	BSA	乙酰胆碱	ACh
二甲亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒	HBV
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH <sub>2</sub> O	异硫氰酸荧光素	FLTC
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核因子- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MIT	原位末端标记法	TUNEL
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	杂合性缺失	LOH
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	增强化学发光法	ECL
环氧化酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	肿瘤坏死因子	TNF
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	重症监护病房	ICU
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	转化生长因子	TGF
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	自然杀伤细胞	NK 细胞
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	Tbil
计算机 X 线断层照相技术	CT				