

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.008

· 基础研究 ·

RNA 干扰沉默 *PIN1* 对肺癌 A549 细胞增殖、细胞周期和成瘤的影响

谈进, 李士亭, 邱明玲, 方友平(南京医科大学附属淮安第一人民医院 胸外科, 江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:应用 RNA 干扰技术沉默肺癌 A549 细胞中 *PIN1*(protein interacting with N1MA1) 基因的表达,探讨其对 A549 细胞增殖、细胞周期和裸鼠成瘤能力的影响。方法:构建靶向 *PIN1* 基因的 shRNA 真核表达质粒 pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* 和无义对照质粒 pGPU6-GFP-Neo,以脂质体法转染 A549 细胞,G418 筛选稳定沉默 *PIN1* 基因的细胞株。Real-time PCR 和 Western blotting 验证 *PIN1* 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达,MTT 法和流式细胞术检测 A549 细胞增殖和细胞周期分布。将稳定沉默 *PIN1* 的 A549 细胞与对照细胞皮下接种裸鼠,观察接种后肿瘤生长情况。结果:成功构建了 pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* 载体,转染 A549 细胞并筛选获得稳定克隆。稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* 的 A549 细胞中 *PIN1* mRNA 表达量较 pGPU6-GFP-Neo 转染组下降了 89.3%;蛋白表达同时也显著抑制。*PIN1* 基因沉默组的 A549 细胞增殖速率明显下降($P < 0.01$),细胞出现 G_1 期阻滞。小鼠体内实验显示,*PIN1* 沉默的 A549 细胞在裸鼠体内成瘤能力降低($P < 0.01$)。结论:pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* 质粒稳定转染肺癌 A549 细胞能有效沉默 *PIN1* 基因的表达,从而抑制 A549 细胞的增殖、影响细胞周期和抑制成瘤能力。

[关键词] RNA 干扰;*PIN1* 基因;肺肿瘤;增殖

[中图分类号] R730.54; R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0403-05

Effect of RNA interference-based silencing of *PIN1* gene on proliferation, cell cycle and tumorigenicity of lung cancer A549 cells

TAN Jin, LI Shi-ting, QIU Ming-ling, FANG You-ping(Department of Chest Surgery, First People's Hospital of Huaian Affiliated to Nanjing Medical University, Huaian 223300, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:**To study the effect of *PIN1*(protein interacting with N1MA1) gene on proliferation, cell cycle and tumorigenicity of lung cancer A549 cells by silencing *PIN1* gene using RNA interference technique. **Methods:** The recombinant plasmid expressing short hairpin RNA (shRNA) targeting *PIN1* gene was constructed and named pGPU6-GFP-Neo-*PIN1*. A549 cells were transfected with pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* and the negative control plasmid (pGPU6-GFP-Neo) by lipofectamine 2000. Stable cell lines expressing *PIN1* shRNA were obtained after G418 screening. Real-time PCR and Western blotting analysis were performed to determine the expressions of *PIN1* at mRNA and protein levels, respectively. Proliferation and cell cycle distribution of A549 cells were detected by MTT assay and flow cytometry assay. Meanwhile, the growth of subcutaneously implanted tumors was observed in nude mice after inoculated with A549 cells with *PIN1* stably silenced and the control A549 cells. **Results:** pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* plasmid vector was successfully constructed and transfected into A549 cells. *PIN1* mRNA expression in A549 cells stably transfected with pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* decreased by 89.3% compared with that in pGPU6-GFP-Neo-transfected A549 cells, and *PIN1* protein was also inhibited by pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* transfection. Proliferation of *PIN1*-silenced A549 cells was significantly suppressed ($P < 0.01$), and their cell cycle was arrested in G_1 phase. The tumorigenicity of A549 cells in nude mice was inhibited when *PIN1* was silenced ($P < 0.01$). **Conclusion:** pGPU6-GFP-Neo-*PIN1* plasmid stably transfecting into lung cancer A549 cells can effectively silence *PIN1* gene expression, inhibit cell proliferation, influence cell cycle and inhibit tumorigenicity of A549 cells.

[Key words] RNA interfere; protein interacting with N1MA1 (*PIN1*) gene; lung neoplasms; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 403-407]

PIN1 (protein interacting with N1MA1)蛋白是由 *PIN1* 基因编码的一种人类高度保守的特异性磷酸化肽基脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans

[作者简介] 谈进(1975-),男,江苏省淮安市人,副主任医师,主要从事肺癌、食管癌的基础和临床研究

[通信作者] 谈进(TAN Jin, corresponding author), E-mail: jintan1@163.com

isomerases, PPIase), 能够特异性地识别磷酸化后的丝氨酸/苏脯氨酰基序, 诱导磷酸化蛋白的构象变化, 在细胞增殖和分化等许多细胞进程中起关键作用^[1-2]。研究^[3-4]发现, PIN1 在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、宫颈癌等多种肿瘤中高表达, 与肿瘤的发生相关, 有可能成为癌症治疗的新靶点。目前, PIN1 在肺癌中的作用还不十分明确, 本研究应用 RNA 干扰技术, 构建了针对 *PIN1* 基因的 shRNA 表达载体, 转染肺癌 A549 细胞, 并进行 G418 筛选。观察稳定沉默 *PIN1* 基因表达的 A549 细胞增殖、细胞周期和裸鼠成瘤能力的改变, 探讨 PIN1 蛋白在肺癌发生、发展中作用。

1 材料与方法

1.1 材料和动物

人肺癌 A549 细胞株购自中科院上海细胞所, DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, pGPU6-GFP-Neo 载体购自 Gene Pharma 公司, lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, Taq 酶购自 TaKaRa 公司, PIN1 多克隆抗体及 β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。质粒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, SYBR real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。PCR 引物合成与测序委托上海英俊公司进行。BALB/c 裸鼠[雄性, 4~6 周龄, (20 ± 2)g] 购自中科院上海实验动物中心[SCXK(沪)2007-0005], SFP 级环境饲养。

1.2 构建 *PIN1* shRNA 真核表达载体

根据文献^[5]报道, 针对人 *PIN1* 基因的 mRNA (Gene bank: NM_006221.2), 选定第 292~310 位碱基的序列 5'-CGGCTACATCCAGAAGATC-3' 作为 siRNA 靶点, 设计短发夹 shRNA 序列, 同时设置无义 siRNA 序列 TTCTCCGAACGTGTCACGT。正义链和反义链分别进行化学合成并退火成双链。pGPU6-GFP-Neo 空载体经 *Bam*H I 和 *Bbs* I 双酶切后与双链 DNA 进行连接反应, 随后转化感受态大肠杆菌, 挑选阳性的重组克隆进行 PCR 鉴定, PCR 阳性载体送测序, 对测序正确的克隆进行培养和扩增并抽提质粒 DNA。

1.3 细胞转染及稳定克隆筛选

按照脂质体 lipofectamine 2000 的说明书操作, 将 A549 细胞接种于 6 孔板, 70% 汇合度时, 在无血清培养基中按每孔 5 μ g 质粒混合 10 μ l 脂质体的比例进行转染。6 h 后改用含血清的培养基, 同时设置仅加入脂质体的空白对照, 在转染 24 h 后加入

G418 抗生素进行筛选, 初始质量浓度为 300 μ g/ml, 2 d 后改为 500 μ g/ml, 1 周后提高到 700 μ g/ml。抗生素维持培养 2 周后, 通过荧光监测有效转染克隆情况, 挑选阳性克隆转入 24 孔板扩大培养, 直至扩增至 25 cm^2 的培养瓶体系。

1.4 Real-time PCR 检测 *PIN1* mRNA 的表达

取对数生长期、状态良好的稳定转染单克隆 A549 细胞, 挑选 5 个克隆分别接种入 24 孔培养板。收集细胞 RNA, 逆转录成 cDNA, 采用 real-time PCR (Bio Rad, iQ5) 检测 *PIN1* mRNA 的表达情况。*PIN1* 引物由 Beacon designer 7 软件设计, 上游引物: 5'-TCAGGCCGAGTGTACTAC-3', 下游引物: 5'-CGGAGGATGATGTGGATG-3', 扩增片段大小 427 bp。以 β -actin 为内参基因, 上游引物: 5'-CGGCATTGTCACCAACTG-3', 下游引物: 5'-CGCTCGGTCAGGATCTTC-3', 扩增片段大小 369 bp。原始 CT 值的计算应用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法^[6]。

1.5 Western blotting 检测 PIN1 蛋白的表达

选取在 real-time PCR 实验中沉默效率最高的一株 A549 稳定细胞株, 胰酶消化, PBS 洗 2 次, 收集细胞。用 RIPA 裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 蛋白定量。取 30 μ g 蛋白经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转移至硝酸纤维素膜上。PIN1 一抗稀释倍数为 1:800, 用增强化学发光显色系统显色, 以 β -actin 作为内参(稀释倍数 1:2000)。

1.6 MTT 法检测 A549 细胞的增殖

实验分为 3 组: 未转染对照组 (control), pGPU6-GFP-Neo 组和 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 组。每组每个时间点 6 个复孔, 每孔 2000 个细胞。接种第 2 天加 MTT (5 mg/ml) 10 μ l/孔, 4 h 后吸出孔内液体, 加入 DMSO 100 μ l/孔。5 min 后检测 490 nm 光密度 *D* 值。连续检测 5 d, 以时间为横坐标, D_{490} 为纵坐标, 绘制细胞增殖曲线。

1.7 流式细胞术检测 A549 细胞的细胞周期

G418 筛选获得稳定转染 A549 细胞后, 实验分为未转染对照组 (control)、pGPU6-GFP-Neo 组和 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 组 3 组。胰酶消化各组细胞, 冰冷 PBS 洗涤, 200 $\times g$ 离心 5 min, 收集细胞, 然后加入 70% 的冰乙醇 1 ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第 2 天重复洗涤和离心收集细胞, 再以冰 PBS 重悬细胞, 各组样品分别加入 PI (50 μ g/ml) 及 RNase (100 μ g/ml), 避光冰浴 15 min 后上流式细胞仪检测。以增殖指数 (proliferation index, PI) 表示 A549 细胞的增殖水平, $\text{PI}(\%) = (S + G_2/M) / (S + G_2/M + G_1) \times 100\%$ 。

1.8 沉默 *PIN1* 基因对 A549 细胞裸鼠成瘤的影响

pGPU6-GFP-Neo 组和 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 组 A549 细胞长到一定密度后,用无血清的 DMEM 培养液制成 2.5×10^7 /ml 细胞悬液,用 1 ml 注射器吸取 0.2 ml 接种于 BALB/c 裸小鼠右背侧皮下 (5×10^6 /只),每组分别接种 6 只小鼠。接种后的小鼠连续观察 4 周,每周测量肿瘤大小。观察结束后处死动物,取肿瘤并称重。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒的 A549 细胞表达 GFP 荧光

A549 细胞转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒和对照 pGPU6-GFP-Neo 质粒后 36 h,可见少量细胞漂浮,体现出转染试剂一定的毒性。转染 1 周后,未转染质粒的细胞全部死亡,有效转染的细胞少量存活,且能够继续生长培养。转染 2 周后形成克隆,挑取单克隆扩大培养,细胞形态无明显变化,但 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 组 A549 细胞生长变慢,稳定表达 GFP 荧光(图 1),且能够正常传代、冻存和复苏。

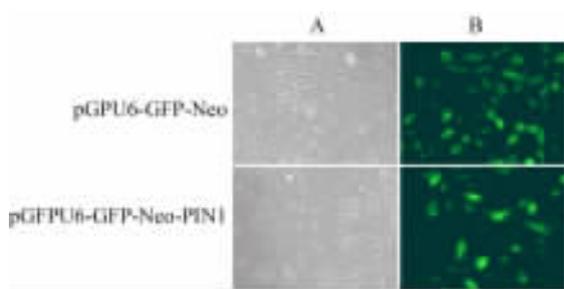


图 1 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 载体稳定转染 A549 细胞($\times 200$)

Fig. 1 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 vector was stably transfected into A549 cells ($\times 200$)

A: Under light microscope; B: Under fluorescence microscope

2.2 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒沉默 A549 细胞中 *PIN1* mRNA 的表达

针对 *PIN1* 基因设计 PCR 引物,以 β -actin 为内参,进行 *PIN1* mRNA 的检测。选取 5 个典型的稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 的单克隆 A549 细胞,mRNA 的定量结果(图 2)显示,稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 的阳性 A549 克隆均存在不同程度的 *PIN1* 基因沉默,抑制效率最高达到 89.3%。选取

细胞状态良好,荧光表达适度,*PIN1* 基因沉默效率大于 80% 的 A549 单克隆细胞传代培养,1 个月后检测 *PIN1* 基因沉默效率,无明显改变。

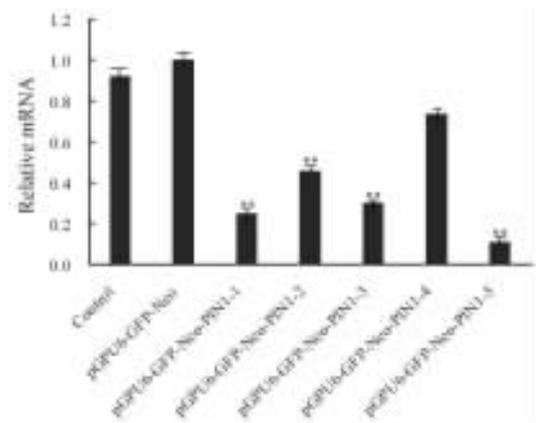


图 2 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒沉默 A549 细胞中 *PIN1* mRNA 的表达

Fig. 2 *PIN1* mRNA expression was inhibited in A549 cells stably transfected with pGPU6-GFP-Neo-PIN1 plasmid

** $P < 0.01$ vs pGPU6-GFP-Neo

2.3 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒沉默 A549 细胞中 *PIN1* 蛋白的表达

选取 real-time PCR 验证沉默效率最佳的稳定转染细胞,提取细胞蛋白,用 Western blotting 检测 *PIN1* 蛋白的表达。结果(图 3)显示,稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒的 A549 细胞 *PIN1* 蛋白表达水平显著降低,而无义 pGPU6-GFP-Neo 稳定转染 A549 细胞与未转染 A549 细胞相比表达没有明显改变。

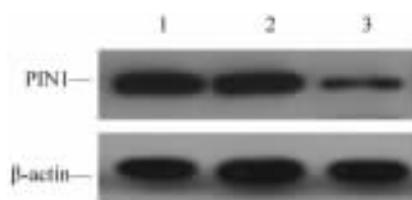


图 3 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒沉默 A549 细胞中 *PIN1* 蛋白的表达

Fig. 3 *PIN1* protein expression was inhibited in A549 cells stably transfected with pGPU6-GFP-Neo-PIN1 plasmid

1: Control; 2: pGPU6-GFP-Neo; 3: pGPU6-GFP-PIN1

2.4 沉默 *PIN1* 蛋白表达抑制 A549 细胞的增殖

MTT 法检测 A549 细胞增殖,结果(图 4)显示,沉默 *PIN1* 的 A549 细胞增殖明显减缓。稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒组 2 至 5 d 各时间点的 D_{490} 值均低于稳定转染 pGPU6-GFP-Neo 组和未转染

对照组的 D_{490} 值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 pGPU6-GFP-Neo 组和未转染对照组无差异 ($P > 0.05$)。

2.5 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒对 A549 细胞周期的影响

取未转染 A549 细胞、稳定转染 pGPU6-GFP-Neo 和 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒的 A549 细胞, PI 染色后流式术检测 A549 细胞的细胞周期。结果 (表 1) 显示, *PIN1* 基因被沉默后 A549 细胞增殖指数显著降低 ($P < 0.05$), 且细胞阻滞于 G_1 期。

2.6 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒抑制 A549 细胞裸鼠成瘤

将未转染 A549 细胞、稳定转染 pGPU6-GFP-Neo 和 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒的 A549 细胞扩增后接种于裸鼠皮下, 观察肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线 (图 5)。pGPU6-GFP-Neo 质粒组 A549 细胞移植瘤体积显著大于 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒组 A549 细胞移植瘤 ($P < 0.01$), 而未转染 A549 细胞组与 pGPU6-GFP-Neo 质粒组无明显差异。处死裸鼠取肿瘤称重发现, pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒组 A549

细胞成瘤显著受到抑制, 移植瘤质量为 (0.19 ± 0.10) g, 显著低于 pGPU6-GFP-Neo 质粒肿瘤质量组的 (0.44 ± 0.11) g 和未转染组的肿瘤质量 (0.48 ± 0.13) g ($P < 0.01$)。

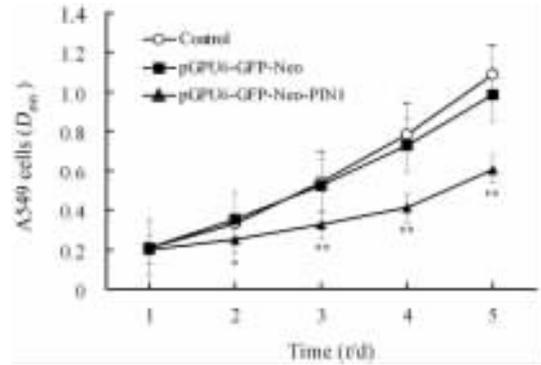


图 4 沉默 PIN1 蛋白表达抑制 A549 细胞的增殖

Fig. 4 Silencing PIN1 protein expression inhibited proliferation of A549 cells

* $P < 0.01$ vs pGPU6-GFP-Neo or control

表 1 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒对 A549 细胞周期的影响 (%)

Tab. 1 Effect of pGPU6-GFP-Neo-PIN1 plasmid transfection on cell cycle of A549 cells (%)

Group	G_1	G_2/M	S	PI
Control	56.81 ± 0.75	9.97 ± 0.76	33.22 ± 0.63	43.19 ± 0.75
pGPU6-GFP-Neo	52.08 ± 0.61	11.80 ± 0.51	36.12 ± 0.79	47.92 ± 0.61
pGPU6-GFP-Neo-PIN1	$67.12 \pm 0.80^*$	11.26 ± 0.26	$21.62 \pm 1.00^*$	$32.88 \pm 0.80^*$

* $P < 0.05$ vs pGPU6-GFP-Neo

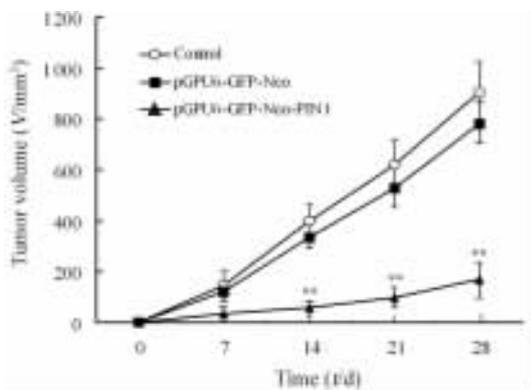


图 5 稳定转染 pGPU6-GFP-Neo-PIN1 质粒抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤生长

Fig. 5 Growth of A549-implanted tumors in nude mice was inhibited after stably transfected with pGPU6-GFP-Neo-PIN1

* $P < 0.01$ vs pGPU6-GFP-Neo

3 讨论

蛋白质脯氨酸残基前的丝氨酸或苏氨酸位点的磷酸化修饰, 在细胞的生命过程中起重要作用。PIN1 属于肽脯氨酰顺反异构酶家族的一员, 可特异性地识别蛋白分子中磷酸化的丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸 (pSer/Thr-Pro) 基序, 导致其构型改变, 对细胞周期起着非常重要的调节作用^[4,7]。人类 *PIN1* 基因定位于 19p13, 其编码蛋白由 163 个氨基酸构成, 相对分子质量为 18 000, 含有 2 个结构域。N 端的中心结构域由 1~39 位氨基酸构成, 参与识别和结合底物的 pSer/Thr-Pro 序列; C 端的催化结构域由 45~163 位氨基酸构成, 诱导底物的构象变化^[8]。

PIN1 与哺乳动物细胞周期的 G_2/M 进展密切相关, 作为一种磷酸化依赖蛋白, 可与 polo 样激酶 1、Cdc25C 和 Cdc27 等有丝分裂过程中涉及的磷酸

蛋白相互作用^[9-11]。Kuramochi 等^[12]研究发现, *PIN1* 在结直肠癌组织中高表达, 而正常组织不表达或低表达, 且 *PIN1* 的表达与肿瘤恶性程度相关。Wulf 等^[13]报道, *PIN1* 在乳腺癌组织中高表达, 其表达水平与乳腺癌临床分期、病理分级正相关。Ayala 等^[14]发现, 高表达 *PIN1* 的前列腺癌患者预后差于不表达 *PIN1* 的前列腺癌患者, 提出 *PIN1* 是一个良好的预后判断指标, 且准确率优于前列腺癌的特异性血清抗原检测。Li 等^[5]观测到 *PIN1* 在宫颈癌中高表达, 且能够影响细胞增殖和克隆形成能力, 通过促进 cyclin D1 和 Rb 的磷酸化, 诱导细胞周期由 G₁ 向 S 期转变。

已有一些报道发现, 肺癌组织中 *PIN1* 蛋白表达上调^[15-16], 而关于 *PIN1* 在肺癌中的作用尚不清晰。本研究应用 RNA 干扰技术抑制肺癌 A549 细胞中 *PIN1* 蛋白的表达, 观察其对 A549 细胞增殖和细胞周期的影响。本研究成功构建了靶向 *PIN1* 基因的 shRNA 真核表达载体, 转染 A549 细胞后, 经由 G418 筛选, 能稳定转录短发卡结构的 shRNA, 并在胞内自动加工成 siRNA 抑制 *PIN1* 的表达。通过定量 PCR 和 Western blotting 在 mRNA 和蛋白水平的检测, 确定其有效沉默了 *PIN1* 蛋白的表达。

在头颈部鳞状细胞癌中 *PIN1* 过表达, 促进蛋白磷酸化, 而抑制 *PIN1* 表达可阻断细胞周期进程并诱导肿瘤细胞死亡^[17]。本研究结果表明, 下调 *PIN1* 表达可抑制 A549 细胞的增殖, 使细胞周期阻滞在 G₁ 期, 同时能够抑制 A549 细胞的裸鼠成瘤能力, 表明 *PIN1* 的高表达与肺癌恶性增殖密切相关。这可能是由于 *PIN1* 引起底物构象和功能改变, 使肿瘤细胞磷酸化信号过度激活, 最终导致细胞增殖失控, 发生恶性转化。*PIN1* 在人类癌症中过度表达可作为一个新的诊断和治疗的靶分子^[18]。RNA 干扰特异性沉默 *PIN1* 表达可抑制肺癌细胞的增殖, 靶向 *PIN1* 的基因治疗可能成为肺癌治疗的新策略。

[参考文献]

- [1] Lu KP, Zhou XZ. The prolyl isomerase *PIN1*: A pivotal new twist in phosphorylation signaling and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 904-916.
- [2] Lu KP. Prolyl isomerase *PIN1* as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(3): 175-180.
- [3] Bao L, Kimzey A, Sauter G, Sowadski JM, Lu KP, Wang DG. Prevalent over-expression of prolyl isomerase *PIN1* in human cancers [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(5): 1727-1737.
- [4] Ryo A, Liou YC, Lu KP, Wulf G. Prolyl isomerase *PIN1*: A cat-

alyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(15): 773-783.

- [5] Li H, Wang S, Zhu T, Zhou J, Xu Q, Lu Y, et al. *PIN1* contributes to cervical tumorigenesis by regulating cyclin D1 expression [J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(3): 491-496.
- [6] Varambally S, Laxman B, Mehra R, Cao Q, Dhanasekaran SM, Tomlins SA, et al. Golgi protein *GOLM1* is a tissue and urine biomarker of prostate cancer [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(11): 1285-1294.
- [7] Yunokuchi I, Fan H, Iwamoto Y, Araki C, Yuda M, Umemura H, et al. Prolyl isomerase *PIN1* shares functional similarity with phosphorylated CTD interacting factor *PCIF1* in vertebrate cells [J]. *Genes Cells*, 2009, 14(9): 1105-1118.
- [8] Lu KP, Hanes SD, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis [J]. *Nature*, 1996, 380(6574): 544-547.
- [9] Jentsch S, Siepe D. *PIN1*, a novel switch in the ubiquitin pathway [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(23): 3800-3801.
- [10] Lu KP. Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: A novel cell cycle regulatory mechanism [J]. *Prog Cell Cycle Res*, 2000, 4: 83-96.
- [11] Lv L, Zhou Z, Huang X, Zhao Y, Zhang L, Shi Y, et al. Inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase *PIN1* induces cell cycle arrest and apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(1): 41-54.
- [12] Kuramochi J, Arai T, Ikeda S, Kumagai J, Uetake H, Sugihara K. High *PIN1* expression is associated with tumor progression in colorectal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2006, 94(2): 155-160.
- [13] Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, et al. *PIN1* is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1 [J]. *EMBO*, 2001, 20(13): 3459-3472.
- [14] Ayala G, Wang D, Wulf G, Frolov A, Li R, Sowadski J, et al. The prolyl isomerase *PIN1* is a novel prognostic marker in human prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6244-6251.
- [15] 刘群, 赖长城, 毛宇彬, 洪亮, 孙丽芳, 宋崑, 等. *PIN1* 基因在非小细胞肺癌中的表达及其意义 [J]. *中国癌症杂志*, 2008, 18(8): 607-610.
- [16] Tan X, Zhou F, Wan J, Hang J, Chen Z, Li B, et al. *PIN1* expression contributes to lung cancer: Prognosis and carcinogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(2): 111-119.
- [17] Wiegand S, Dakic B, Rath AFE, Makarova G, Sterz C, Meissner W, et al. The rotamase *PIN1* is up-regulated, hypophosphorylated and required for cell cycle progression in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(10): e140-149.
- [18] Chen J, Li L, Zhang Y, Yang H, Wei Y, Zhang L, et al. Interaction of *PIN1* with *Nek6* and characterization of their expression correlation in Chinese hepatocellular carcinoma patients [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(4): 1059-1065.

[收稿日期] 2010-04-20

[修回日期] 2010-05-16

[本文编辑] 徐红梅