

MiR-204 对角膜上皮细胞增生的抑制作用

梁荣鑫 杜金林 黄涛

442000 十堰,湖北医药学院附属人民医院检验科(梁荣鑫),眼科(黄涛);100000 北京,中国人民解放军第三〇二医院眼科(杜金林)

通信作者:梁荣鑫,Email:15586919387@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.005

【摘要】背景 作为角膜上皮组织的主要细胞成分,角膜上皮细胞通过迁移、增生以及分化等生物学行为在角膜上皮组织的损伤修复中发挥重要作用。微小 RNA(miRNA)是内源性表达的单链非编码 RNA,参与多种生物活动的调控过程,研究报道 miR-204 在正常角膜上皮组织内呈高表达,但其生物学功能仍不清楚。

目的 研究 miR-204 对角膜上皮细胞增生的调控及其分子机制。**方法** 收集角膜屈光手术过程中患者脱落的角膜上皮组织,同时体外培养人角膜上皮细胞株(HCECs)。采用实时荧光定量 PCR 技术分别检测角膜上皮组织和 HCECs 中 miR-204 的表达情况。将培养的 HCECs 分为 3 个组,分别用含 miR-204 mimic 的脂质体或空脂质体转染到 HCECs 内作为 miR-204 mimic 转染组和阳性对照组,正常培养的细胞作为正常对照组。用平板克隆形成试验检测各组培养细胞的克隆数以评价细胞的增生能力;采用流式细胞仪检测不同细胞周期的细胞百分比;采用 Western blot 技术检测各组细胞中磷酸化细胞内细胞周期相关蛋白 p-RB、转录因子 E2F1、p27、细胞周期蛋白 CyclinA、细胞周期蛋白依赖性激酶 CDC2、磷酸化 CDC2(p-CDC2)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK2)的表达情况。**结果** miR-204 mRNA 在正常人角膜上皮组织中的相对表达量为 1.077 ± 0.268 ,明显高于 HCECs 中的 0.041 ± 0.018 ,差异有统计学意义($t=7.700, P<0.001$)。平板克隆形成试验显示 miR-204 mimic 转染组细胞克隆数明显少于阳性对照组和空白对照组。流式细胞仪检测结果显示,miR-204 mimic 转染组 G1 期细胞百分比为 47.75%,明显高于阳性对照组的 37.23% 和空白对照组的 40.72%。Western blot 检测表明,miR-204 mimic 转染组细胞中 CDK2 和 p-CDC2 蛋白的相对表达量明显低于阳性对照组,E2F1 和 P27 蛋白的相对表达量明显高于阳性对照组,差异均有统计学意义($t=5.39、10.65、14.87、25.11$,均 $P<0.01$)。

结论 正常的角膜上皮组织中 miR-204 的高表达可能参与角膜上皮细胞的非增生状态的维持。miR-204 可上调 E2F1 和 p27 蛋白在 HCECs 中的表达,抑制复合物 CDK2/CyclinA 和 p-CDC2/CyclinA 的形成,使角膜上皮细胞停滞在 G1 期,从而抑制角膜上皮细胞的增生。

【关键词】 角膜上皮细胞;微小 RNA;细胞增生;细胞周期;基因表达;人;miR-204

Inhibitory effect of miR-204 on corneal epithelial cell proliferation *in vitro* Liang Rongxin, Du Jinlin, Huang Tao

Clinical Laboratory (Liang RX), Department of Ophthalmology (Huang T), Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; Department of Ophthalmology, 302 Military Hospital of China, Beijing 100000, China (Du JL)

Corresponding author: Liang Rongxin, Email: 15586919387@163.com

[Abstract] Background As the main cellular constituent of corneal epithelium, corneal epithelial cells play critical roles in regulating and controlling the migration, proliferation and differentiation of cells during the repair of damage. MicroRNA (miRNA) is endogenously expressed small non-coding RNAs, which participates in a variety of biological processes. Previous studies demonstrated that miR-204 is highly expressed in normal corneal epithelium, but its function is still unclear. **Objective** This study was to investigate the function and mechanism of miR-204 in corneal epithelial cell proliferation. **Methods** Corneal epithelial tissue was collected during the corneal refractive surgery from the patients with refractive error under the informed consent, and human corneal epithelial cells (HCECs) were cultured and passaged. The relative expressing levels of miR-204 mRNA in the normal corneal epithelium and HCECs were detected by real time quantitative PCR. Cultured HCECs were evenly divided into three groups. The

liposome with miR-204 mimic was transfected into the cells of the miR-204 mimic group, and blank liposome was transfected in the cells of the positive control group, and regularly cultured cells served as the normal control group. Cell proliferation capability was evaluated by colony-forming assay, and the percentage of the cells in different cell cycles was analyzed by flow cytometry. Western blot assay was employed to detect the expression levels of p-RB, E2F1, p27, CyclinA, CDC2, p-CDC2 and CDK2 proteins in the cells. **Results** The relative expression levels of miR-204 mRNA were 1.077 ± 0.268 in the normal corneal epithelium and 0.041 ± 0.018 in the HCECs, showing a significant difference between them ($t = 7.700, P < 0.001$). The cloning cell number was evidently decreased in the miR-204 mimic group in comparison with the positive control group and normal control group. The percentage of cells in the G1 phase was 47.75% in the miR-204 mimic group, which was significantly higher than 37.23% in the positive control group and 40.72% in the normal control group. The expression levels of E2F1 and p27 proteins in the cells were elevated ($t = 14.87, 25.11$; both at $P < 0.01$) and those of CDK2 and p-CDC2 proteins were decreased ($t = 5.39, 10.65$; both at $P < 0.01$) in the miR-204 mimic group in comparison with the positive control group.

Conclusions The overexpression of miR-204 in the normal corneas probably is associated with non-proliferation status of corneal epithelial cells. Transfection of miR-204 into corneal epithelial cells can inhibit the proliferation of corneal epithelial cells probably by up-regulating the expression of E2F1 and p27 and suppressing the expression of CDK2/CyclinA and p-CDC2/CyclinA, which lead to cell arrest in G1 phase.

[Key words] Epithelial cells, corneal; MicroRNAs; Proliferation; Cyclins; Gene expression; Humans; miR-204

角膜上皮细胞是构成人角膜上皮组织的主要细胞成分,正常情况下处于非增生状态,角膜上皮受损后,角膜上皮细胞通过增生、迁移及分化等生物学过程参与损伤的修复^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性表达的、长度约为 22 nt 的单链非编码 RNA,广泛存在于生物界,在物种间具有高度的进化保守性,参与许多生命活动的调控过程,包括细胞增生、迁移、分化及凋亡等^[2-6]。miR-204 位于人 9 号染色体上(9q21.12)。在细胞内,miR-204 的初级转录产物在细胞核内由 RNA 聚合酶 II 合成,然后由 Drosha 酶剪接成长约 70 bp 的前体 miRNA,再由转运蛋白 Exportin-5 将其转运至细胞质内,由 Dicer 酶剪切成成熟的 miR-204^[7-10]。成熟的 miR-204 通过与靶基因 3-UTR 区域互补配对,从而在转录后水平调控基因的表达^[11]。研究报道,在许多癌细胞内 miR-204 具有抑制细胞增生的作用,如子宫内膜癌,胃癌及肝癌等^[12-14]。另有研究表明,正常人角膜上皮组织中 miR-204 呈高表达^[15],但其生物学功能仍不清楚。本研究中拟研究角膜上皮细胞内 miR-204 对细胞增生的调控作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人角膜上皮细胞系 HCECs 购自上海 ATCC 细胞库。角膜上皮组织来源于 4 例 2013 年于十堰市人民医院行角膜屈光手术的屈光不正患者,排除角膜炎患者及角膜用药史者。术中收集术眼脱落

的角膜上皮组织,并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。标本的收集及使用已告知患者,并征得患者口头知情同意。

1.1.2 主要试剂及仪器 Trizol 溶液(上海生物工程有限公司);miR-204 探针、TaqMan RNA 逆转录试剂盒(美国 ABI 公司);PI 染色试剂盒、APTI 蛋白裂解液(中国上海生物技术有限公司);F12/DMEM 细胞培养液(1:1,美国 Invitrogen 公司);兔抗人 p-RB 抗体(ab47763)、兔抗人 E2F1 抗体(ab112580)、兔抗人 p27 抗体(ab137736)、兔抗人 CyclinA 抗体(ab38)、兔抗人 CDK2 抗体(ab32147)、兔抗人 CDC2 抗体(ab32094)、兔抗人 p-CDC2 抗体(ab47329)、兔抗人 GAPDH 抗体(ab9484)(美国 Abcam 公司);miR-204 mimic(美国 Ambion 公司)。Arktik PCR 仪(美国 Thermo 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量 PCR 法检测人角膜上皮组织及 HCECs 中 miR-204 的表达 采用 Trizol 法提取组织标本和培养细胞中的总 RNA。RNA 测定仪测定 RNA 样品浓度,采用逆转录试剂盒将 20 μg RNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,采用 TaqMan 探针法检测 miR-204 的表达,U6 作为内参,计算 miR-204 的相对表达量。每个样品重复操作 3 次。

1.2.2 HCECs 的培养及转染 配制 HCECs 细胞培养液:45 ml DMEM/F12+5 ml 胎牛血清+5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰岛素+10 ng/ml 表皮细胞生长因子。转染液含 400 μl OPTI+4 μl 脂质体+6 μl 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ miR-204 mimic 或无生物活性作用的寡核苷酸链。将培养的细胞均衡分为正常

对照组、miR-204 mimic 转染组和阳性对照组,其中 miR-204 mimic 转染组细胞转染体外合成的 miR-204 寡核苷酸链,阳性对照组细胞转染长度与 miR-204 相同但在细胞内无生物活性作用的寡核苷酸链,空白对照组不进行细胞转染。

1.2.3 平板克隆实验检测细胞的增生 将复苏的 HCECs 接种至 25 cm² 的培养瓶内培养 48 h,然后用胰酶消化并传代。将细胞以 3×10³/孔的密度接种至 6 孔板,培养后 12 h 每孔加入转染液 410 μl,继续培养 24 h,弃培养液,用体积分数 4% 甲醛固定 30 min,再用结晶紫染色 10 min。PBS 冲洗 3 次后,晾干,检测克隆斑的大小,记录细胞生长情况并拍照。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期情况 细胞转染后 24 h 用胰酶消化细胞,收集细胞至离心管中,用体积分数 70% 乙醇 20 ℃ 固定过夜,以 PI 染色试剂盒对细胞进行染色,用流式细胞仪检测不同细胞周期的细胞百分率。

1.2.5 Western blot 法检测各目的蛋白的相对表达 HCECs 转染 24 h 后,用 200 μl APTI 蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白,采用双缩脲法检测蛋白质量浓度。蛋白于 95 ℃ 变性 5 min,每孔上样 8 μl(20 μg),采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离,再用转膜仪将蛋白转到硝酸纤维素膜上。封闭液(脱脂奶粉溶于 PBST,0.05 g/ml)室温封闭 2 h,加入相应一抗室温孵育 3 h;PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入相应二抗室温孵育 2 h;再用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,暗室曝光显影,用胶片记录发光强度。用 ImageJ 图像处理软件测量蛋白对应条带灰度值,以 GAPDH 作为内参,计算各目的蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 P-P plot 证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组两水平试验设计,miR-204 mimic 转染组与阳性对照组间细胞中各目的蛋白表达量的差异比较均采用独立样本 t 检验。采用双尾检测法, P<0.01 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 培养 HCECs 的细胞形态表现

HCECs 培养结果显示,细胞大小均一,

形态一致,呈碎石状排列,可多次传代(>10 代),且形态特征较稳定。(图 1)

2.2 miR-204 在人角膜上皮组织及 HCECs 中的表达情况

实时荧光定量 PCR 结果显示,正常人角膜上皮组织中 miR-204 mRNA 的相对表达量为 1.077±0.268, HCECs 中 miR-204 mRNA 的相对表达量为 0.041±0.018,差异具有统计学意义(t=7.700, P<0.001)(图 2)

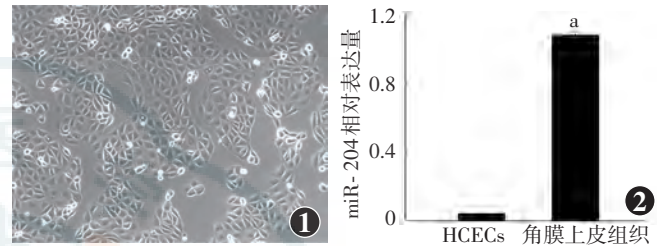


图 1 HCECs 细胞形态 细胞大小均一,形态一致,呈碎石状排列
图 2 HCECs 和人角膜上皮组织中 miR-204 的相对表达量 与 HCECs 比较,*P<0.01(独立样本 t 检验,n=4) HCECs:人角膜上皮细胞系

2.3 各组培养的 HCECs 增生能力比较

平板克隆形成试验检测结果显示 miR-204 mimic 转染组细胞克隆数明显少于阳性对照组和空白对照组(图 3)。流式细胞仪检测结果显示,miR-204 mimic 转染组细胞 G1 期细胞数量为 47.75%,明显高于 NC 转染组的 37.23% 和空白对照组的 40.72%(图 4)。miR-204 mimic 转染组 G1/S 期细胞数量比值为 1.84±0.06,高于阳性对照组的 1.01±0.10 和空白对照组的

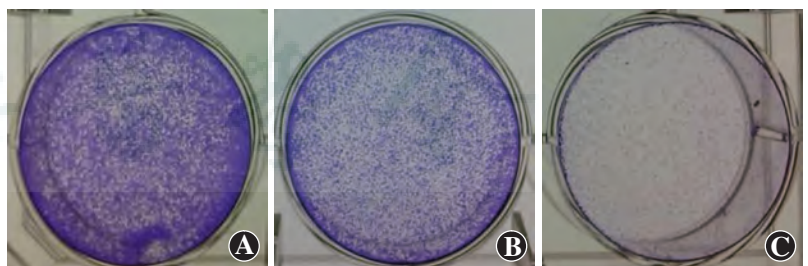


图 3 平板克隆形成试验中各组细胞克隆数目的比较 A:空白对照组细胞克隆数多 B:阳性对照组细胞克隆数较多 C:miR-204 mimic 转染组细胞克隆数很少

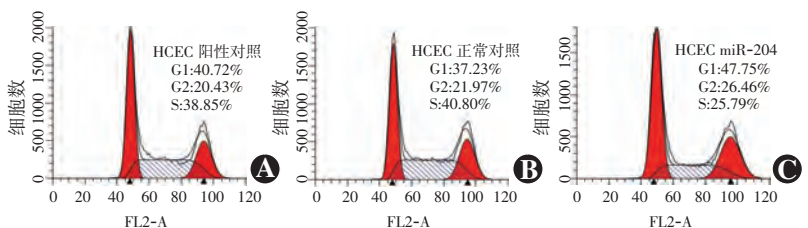


图 4 流式细胞仪检测不同细胞周期的细胞百分比 A:空白对照组 B:阳性对照组 C:miR-204 mimic 转染组 HCECs:人角膜上皮细胞系

1.04±0.09, 差异均有统计学意义 ($t = 12.07、13.12$, 均 $P < 0.001$)。

2.4 各组 HCECs 中各目的蛋白的相对表达

Western blot 检测结果显示 miR-204 mimic 转染组细胞中 CDK2 和 p-CDC2 蛋白的相对表达量明显低于阳性对照组, E2F1 和 p27 蛋白的相对表达量明显高于阳性对照组, 差异有统计学意义 ($t = 5.39、10.65、14.87、25.11$, 均 $P < 0.01$)。2 个组间 p-RB、CyclinA 和 CDC2 蛋白的相对表达量比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 5, 表 1)。

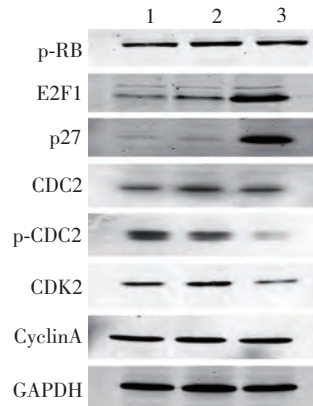


图 5 Western blot 检测 HCECs 中 p-RB、E2F1、p27、CDC2、p-CDC2、CDK2、CyclinA 蛋白的相对表达
1: 空白对照组 2: 阳性对照组 3: miR-204 mimic 转染组

表 1 各组 HCECs 中各目的蛋白的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	各目的蛋白的相对表达量						
		p-RB	E2F1	p27	CDC2	p-CDC2	CDK2	CyclinA
阳性对照组	3	0.270±0.034	0.510±0.038	0.413±0.023	0.482±0.026	0.522±0.057	0.390±0.052	0.609±0.053
miR-204 mimic 转染组	3	0.279±0.013	1.263±0.079	1.399±0.064	0.526±0.048	0.161±0.014	0.209±0.026	0.699±0.040
<i>t</i>		0.43	14.87	25.11	1.39	10.65	5.39	2.39
<i>P</i>		>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05

注: HCECs: 人角膜上皮细胞系 (独立样本 *t* 检验)

3 讨论

角膜上皮细胞的增生是角膜上皮损伤修复的一个重要过程, 其增生能力关系到损伤修复的速率, 正常的角膜上皮组织处于非增生状态。HCECs 是人角膜上皮来源的角膜上皮细胞系, 较正常角膜上皮细胞增生能力强, 故推测这 2 种相同来源的角膜上皮细胞对增生能力的调控机制可能不同。研究其差异性调控的分子机制可为促进角膜上皮损伤修复过程中角膜上皮细胞的增生提供理论依据。

既往的研究报道, miR-204 可抑制肿瘤细胞的增生能力^[16-17]。我们通过荧光定量 PCR 检测发现, 正常角膜上皮组织中 miR-204 呈高表达, 在 HCECs 中 miR-204 呈低表达, 提示 miR-204 表达水平可能与角膜上皮细胞的增生能力有关。本研究中将 miR-204 转染到 HCECs 内, 提高 miR-204 在 HCECs 中的表达水平, 并运用克隆形成试验检测细胞的增生能力, 发现转染 miR-204 的 HCECs 增生能力受到抑制, 这和既往的研究结果一致, 推测 miR-204 可抑制角膜上皮细胞的增生^[16-17]。在正常的角膜上皮组织中, miR-204 的高表达可能参与角膜上皮细胞低增生状态的维持, 而修复过程中的角膜上皮组织中角膜上皮细胞的增生能力提高, 可能伴随有 miR-204 表达水平的降低。

细胞增生能力受细胞周期的直接调控, 细胞周期可分为 G1 期、S 期、G2 期、M 期和 G0 期, 任何一个时期的细胞发生停滞都会对细胞的增生能力产生影响。

为研究 miR-204 调控 HCECs 增生的作用机制, 我们将合成的外源性 miR-204 mimic 转染到 HCECs, 发现转染 miR-204 后 G1 期细胞百分比明显增加, 故认为 miR-204 使 HCECs 停滞在 G1 期, 继而可导致细胞增生能力的减弱。

细胞周期的不同时期细胞内发挥调控作用的基因存在差异。CDK2、p-CDC2、CDC2、E2F1、p27、p-RB、CyclinA 在细胞 G1 期的调控过程中发挥着重要作用。RB 可在 CDKs 的作用下发生磷酸化, p-RB 与 E2F1 结合可调控下游细胞周期相关因子的表达, 促进细胞由 G1 期进入 S 期。但本研究中采用 Western blot 技术检测上述蛋白的表达情况, 发现 miR-204 对 p-RB 的表达并无显著影响, 故认为可排除该信号通路。细胞中 E2F1 表达水平的上调可使细胞滞留于 G1 期, p27 是一种抑癌基因, 其编码蛋白 p27 也可导致细胞发生 G1 期滞留^[18-21]。细胞内 CDK2/CyclinA、p-CDC2/CyclinA 这 2 种复合物的形成对于细胞周期的调控发挥重要作用, 当这 2 种复合物的形成受到抑制时, 细胞可发生 G1 滞留^[22-23]。本研究中将 miR-204 转染到 HCECs, 对 p-RB 和 CyclinA 蛋白的表达无显著影响, 但可使 CDK2 和 p-CDC2 蛋白的表达水平下调, 使 E2F1 和 p27 蛋白的表达水平上调。从上述结果可以得出结论, 在 HCECs 内 miR-204 可通过促进 E2F1 和 p27 蛋白的表达及抑制复合物 CDK2/CyclinA、p-CDC2/CyclinA 的形成而使角膜上皮细胞发生 G1/S 期阻滞。

综上所述, miR-204 可抑制角膜上皮细胞的增生,

其在正常的角膜上皮组织中的高表达可能在维持角膜上皮细胞的非增生状态中发挥作用。miR-204 转染到 HCECs 后可促进 E2F1 和 p27 蛋白的表达,抑制复合物 CDK2/CyclinA 和 p-CDC2/CyclinA 的形成,从而抑制角膜上皮的增生。

参考文献

- [1] Ma A, Zhao B, Boulton M, et al. A role for Notch signaling in corneal wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2011, 19(1): 98-106. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2010.00648.x.
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [3] Ninova M, Ronshaugen M, Griffiths-Jones S. Conserved temporal patterns of microRNA expression in *Drosophila* support a developmental hourglass model[J]. *Genome Biol Evol*, 2014, 6(9): 2459-2467. DOI:10.1093/gbe/evu183.
- [4] Tong SJ, Liu J, Wang X, et al. microRNA-181 promotes prostate cancer cell proliferation by regulating DAX-1 expression[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(4): 1296-1300. DOI:10.3892/etm.2014.1846.
- [5] Feng S, Pan W, Jin Y, et al. miR-25 promotes ovarian cancer proliferation and motility by targeting LATS2[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12): 12339-12344. DOI:10.1007/s13277-014-2546-0.
- [6] Hecht E, Zago M, Sarill M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-dependent regulation of miR-196a expression controls lung fibroblast apoptosis but not proliferation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280(3): 511-525. DOI:10.1016/j.taap.2014.08.023.
- [7] Lim LP, Glasner ME, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes[J/OL]. *Science*, 2003, 299(5612): 1540 [2015-10-15]. <http://www.sciencemag.org/content/299/5612/1540>. long. DOI: 10.1126/science.1080372.
- [8] Jiang F, Ye X, Liu X, et al. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(14): 1674-1679.
- [9] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex[J]. *Cell*, 2003, 115(2): 199-208.
- [10] Katahira J, Yoneda Y. Nucleocytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs[J]. *Traffic*, 2011, 12(11): 1468-1474. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01211.x.
- [11] Li Y, Peng A, Ge S, et al. miR-204 suppresses cochlear spiral ganglion neuron survival in vitro by targeting *TMPRSS3*[J]. *Hear Res*, 2014, 314: 60-64. DOI:10.1016/j.heares.2014.05.002.
- [12] Zhou X, Li L, Su J, et al. Decreased miR-204 in *H. pylori*-associated gastric cancer promotes cancer cell proliferation and invasion by targeting *SOX4*[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101457 [2015-06-11]. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0101457>. DOI: 10.1371/journal.pone.0101457.
- [13] Cui ZH, Shen SQ, Chen ZB, et al. Growth inhibition of hepatocellular carcinoma tumor endothelial cells by miR-204-3p and underlying mechanism[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(18): 5493-5504. DOI:10.3748/wjg.v20.i18.5493.
- [14] Bao W, Wang HH, Tian FJ, et al. A TrkB-STAT3-miR-204-5p regulatory circuitry controls proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells[J/OL]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 155 [2015-10-13]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3879200/>. DOI: 10.1186/1476-4598-12-155.
- [15] Li Y, Piatigorsky J. Targeted deletion of Dicer disrupts lens morphogenesis, corneal epithelium stratification, and whole eye development[J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(9): 2388-2400. DOI: 10.1002/dvdy.22056.
- [16] Yin Y, Zhang B, Wang W, et al. miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(23): 6187-6199. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-1030.
- [17] Xia Y, Zhu Y, Ma T, et al. miR-204 functions as a tumor suppressor by regulating *SIX1* in NSCLC[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(20): 3703-3712. DOI:10.1016/j.febslet.2014.08.016.
- [18] Xie Y, Wang C, Li L, et al. Overexpression of E2F-1 inhibits progression of gastric cancer in vitro[J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(6): 640-649. DOI:10.1016/j.cellbi.2009.02.015.
- [19] Xiao Q, Li L, Xie Y, et al. Transcription factor E2F-1 is upregulated in human gastric cancer tissues and its overexpression suppresses gastric tumor cell proliferation[J]. *Cell Oncol*, 2007, 29(4): 335-349.
- [20] Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21[J]. *Cell*, 1994, 78(1): 67-74.
- [21] Aoki T, Motoi F, Sakata N, et al. Somatostatin analog inhibits the growth of insulinoma cells by p27-mediated G1 cell cycle arrest[J]. *Pancreas*, 2014, 43(5): 720-729. DOI:10.1097/MPA.0000000000000128.
- [22] Mikule K, Delaval B, Kaldis P, et al. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(2): 160-170.
- [23] Slingerland JM, Hengst L, Pan CH, et al. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 3683-3694. DOI:10.1128/MCB.14.6.3683.

(收稿日期:2015-09-11)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

读者·作者·编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)