

利用慢病毒表达载体干扰梅花鹿角柄骨膜细胞 P21 基因^{*}

郭倩倩^{1,2}, 王大涛², 褚文辉², 鲁晓萍², 秦 欣^{1,2}, 赵海平², 李春义^{2**}

1. 江苏科技大学, 镇江 212018; 2. 中国农业科学院特产研究所 吉林省特种经济动物分子生物学国家重点实验室培育基地, 长春 130112

摘 要: 利用慢病毒干扰系统, 对东北梅花鹿角柄骨膜干细胞(PP 细胞)P21 基因进行干扰。结果表明: 筛选出的 2 条针对梅花鹿 P21 基因的 siRNA 与载体质粒 PLVTHM 连接成功, 并与 pMD2.G、pCMV-dr8.9 质粒共转染到 293T 细胞, 获得重组慢病毒; 通过感染 PP 细胞并利用流式细胞仪进行分选, 获得了纯度 90% 以上的感染细胞; 荧光定量 RT-PCR 检测表明 P21 基因的 mRNA 水平大幅度下调, 干扰效率达到 70%。表明成功干扰了 P21 基因在 PP 细胞中的表达, 获得了低表达 P21 的 PP 细胞系。

关键词: 鹿茸再生; P21 基因; RNAi; 角柄骨膜; 慢病毒表达载体

中图分类号: Q75; S825 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2014)01-0116-06

DOI: 10.13327/j.jlau.2014.1719

引文格式: 郭倩倩, 王大涛, 褚文辉, 等. 利用慢病毒表达载体干扰梅花鹿角柄骨膜细胞 P21 基因[J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(1): 116-121.

RNA Interference Targeting P21 Gene of Pedicle Periosteum Cells from Sika Deer by shRNA Lentivirus

GUO Qian-qian^{1,2}, WANG Da-tao², CHU Wen-hui², LU Xiao-ping², QIN Xin^{1,2}, ZHAO Hai-ping², LI Chun-yi²

1. Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China; 2. State Key Laboratory Cultivation Base of Jilin Provincial Special Economical Animal Molecular Biology, Institute of Special Animal and Plant Sciences of CAAS, Changchun 130112, China

Abstract: P21 gene of the pedicle periosteal cells of sika deer was interfered using RNAi in lentiviral vector system. The results showed that: (1) Two sequences of small interfering RNAs, targeting P21 gene of sika deer, were successfully reassembled into the lentiviral plasmids (Plvthm). Positive clones were identified based on the results of both PCR and sequencing. Recombinant lentivirus was acquired by each positive plasmid co-transfecting into 293 T cells with the plasmids pMD2.G and pCMV-dr8.9; (2) Recombinant lentivirus was successfully interfered into the PP cells, and the GFP positive cell proportion obtained by flow cytometry (FCM) sorting was about 90%; (3) The result of RT-PCR showed that the expression level of P21 mRNA in cells infected with recombinant lentiviral was obviously decreased, and the interferential efficiency was about 70%. Therefore, in this study, we successfully interfered the expression of P21 gene in the pp cells, and obtained pp cell line with decreased expression of

* 基金项目: “973”前期研究专项(2011CB111515), 吉林省自然科学基金项目(20101575)

作者简介: 郭倩倩, 女, 在读硕士研究生, 主要从事鹿茸分子生物学研究。

收稿日期: 2013-06-24

** 通讯作者

P21 gene, which lays foundation for revealing the regulatory mechanism of P21 underlying antler regeneration.

Key words: antler regeneration; P21 gene; RNAi; pedicle periosteum; lentiviral expression vector

鹿茸是目前哺乳动物中唯一可以完全再生的附属器官, 每年都会进行周期性的脱落与完全再生。近年来的研究表明, 鹿茸再生是基于干细胞的割处再生^[1-3], 即鹿茸再生是依赖于鹿茸干细胞 AP/PP 的过程。鹿茸干细胞以较少的细胞数目和在较短的时间内就能生成大量井然有序的鹿茸组织, 这在其他正常组织器官中是不可能的。组织器官再生是源于细胞的分裂增殖, 细胞的分裂增殖依赖于细胞周期循环, 因此对鹿茸干细胞周期的研究对揭示鹿茸再生机制具有重要意义。

在早期的研究中, 低等动物损伤后再生多组织器官和附肢的能力是很常见的, 如海绵、涡虫、水螅、蝶螈等, 但在哺乳动物中这种能力却很少见。最近有报道指出 MRL 鼠能够关闭穿孔的耳洞, 具有独特的能力^[4-7]。在最新研究中发现, 普通小鼠敲除 P21 基因后也能获得这种再生能力^[8], 揭示了 P21 蛋白与再生有着非常密切的关系, 鹿茸作为一种再生模型, 推测 P21 蛋白在鹿茸再生过程中扮演着重要角色。

P21 蛋白是细胞周期的重要调控因子, 是一种周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 主要作用于 G1/S 检测点, 若 DNA 损伤发生在 G1 期, 则 P21 通过抑制 CDK 活性阻碍细胞进入 S 期; 若损伤发生于 S 期, 则可通过使 PCNA (增殖细胞核抗原) 失活而停止 DNA 合成。若 P21 缺乏则会使细胞周期跳过 G1 检查点直接进入 G2 期。许多研究表明, P21 与多种细胞反应有关, 如 DNA 损伤、抑制细胞周期的进程等^[9-10]。

对双链 RNA 的研究发现, 外源或内源性 dsRNA 可明显抑制细胞同源序列的基因表达, 故称之为 RNA 干扰 (RNAi)^[11]。本试验旨在通过构建 RNA 干扰所需的病毒载体并通过感染鹿茸干细胞干扰 P21 基因的表达, 获得稳定的 P21 低表达细胞系, 为下一步研究 P21 蛋白在鹿茸再生中的功能作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

PP 细胞、感受态细胞 DH5 α 、细胞株人胚肾细

胞 293t、载体质粒 pLVTHM、包膜质粒 pMD2.G、包装质粒 pCMV-dR8.91 均由中国农业科学院特产研究所吉林省省部共建特种经济动物分子生物学国家重点实验室保存。T4 DNA 连接酶 (New England, 北京), 限制性内切酶: *Cla* I、*Mlu* I, 小量/大量质粒 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN, 美国), 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (QIAGEN, 美国), 100 bp、1 kb DNA 分子量标志物 (全式金, 北京), 改良型杜氏培养基 (DMEM)、标准胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 (Invitrogen, 美国), 酵母提取物、胰化蛋白胨 (OXOID, 英国)、氨苄青霉素 (华北制药, 石家庄), NaCl、氯仿、无水乙醇 (北京化工, 北京), 离心超滤管 (Millipore, 美国), 其他常规试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 梅花鹿 P21 基因 shRNA 寡核苷酸链的获得 中国农业科学院特产研究所吉林省省部共建特种经济动物分子生物学国家重点实验室已测序获得梅花鹿 P21 基因 cDNA 序列 (待发表)。根据筛选法则选择了 2 条针对东北梅花鹿 P21 基因的高分 RNAi 靶序列, 并将筛选的 RNAi 靶序列在 NCBI 中进行序列同源性比对 (Blast), 以保证靶序列不会对鹿的其他基因及包装细胞的相关基因产生 RNAi 效应。在筛选好的 RNAi 靶序列两端分别接上相应的酶切位点、内成环结构、终止信号等以构成 shRNA 结构, 本试验选用的载体质粒为 PLVTHM 质粒, 如下为设计的寡核苷酸序列: shRNA1 正义链 5'-cgcggtcccc- GCGGTGGAAC TTC GACTTT *ttaagaga* AAAGTCGAAGTTCCA CCGCtttt ggaaat-3'; shRNA1 反义链 5'-cgatttcca aaaa GCGGT GGAAC TTCGACTTT *tctcttgaa* AAAGTCGAAGTT CCACCGC gggga-3'; shRNA2 正义链 5'-cgcggtcccc- CCAGCATGACAGATTTC TA *tcaagaga* TAGAAA TCTGTCATGCTGG tttt ggaaat-3'; shRNA2 反义链 5'-cgatttcc aaaaa CCAGCATGACAGATTTC TA *tctcttgaa* TAGAAATCTGTCATGCTGG gggga-3'。

将 shRNA 的正义链和反义链交由上海生工进行化学合成。合成后进行体外退火, 并将其分别命名为 P1siRNA、P2siRNA。

1.2.2 重组质粒的构建与鉴定 用限制性内切酶 *Cla*I 与 *Mlu*I 对载体质粒进行双酶切。用 T₄ DNA 连接酶在 22℃ 将退火产物分别与酶切后载体连接。将连接产物转化到感受态细胞 DH5 α 中,涂布,培养箱中 37℃ 过夜培养。挑取大小适宜的单菌落,220 r/min、37℃,过夜摇菌。取 3 mL 菌液使用 QIAGEN 质粒小提试剂盒提取质粒。按照通用 PCR 引物设计法则,使用 Primer 5.0 软件在双酶切位点的上、下游设计 1 对引物,以未连接的空白 pLVTHM 质粒作为阴性对照,对小量提取的重组质粒进行 PCR 鉴定:上游引物 5'-ctgggaatcaccataaacg-3';下游引物 5'-ttattcccatgcgacggat-3'。

将 PCR 鉴定为阳性克隆的质粒送于上海生工进行测序。

1.2.3 慢病毒 3 质粒系统的无内毒素大量提取 将本文“1.2.2”中测序为阳性的载体质粒 pLVTHM 与包膜质粒 pMD2.G 及包装质粒 pCMV-d δ 8.91 分别进行转化、涂布、挑菌及小量扩增。然后,按 1:500 的比例将菌液稀释到 LB 液体培养基(含 Amp 100 μ g/mL)中,37℃、220 r/min 振荡培养 15 h,进行大量培养。当 OD 值达到约 0.8 时,使用 QIAGEN 大量质粒提取试剂盒提取质粒。

1.2.4 重组慢病毒的包装及病毒的浓缩收集 利用 0.25%胰酶消化 293 t 细胞并计数,接种细胞于 10 cm 细胞培养皿中,当细胞融合度达到 90%以上时,即可进行转染。对于每板细胞,用 1.5 mL 无血清 DMEM 稀释 24 μ g DNA [*m*(pLVTHM); *m*(pCMV-d δ 8.91); *m*(pMD2.G)=2:1:5:0.75)] 与 60 μ L Lipofectamine 2000,室温下孵育 15 min。将细胞培养皿中更换 DMEM 完全培养基,然后分别逐滴加入复合物,并轻轻摇动培养皿使其混匀。将细胞培养皿在 37℃,5% CO₂ 孵箱孵育 24 h 后,倒置荧光显微镜下检测 GFP 表达情况以确定转染效率。若转染效果良好,则进行第 1 次收毒,冻存于液氮中,可长期保存。转染 48 h 后进行第 2 次收毒。

1.2.5 包装病毒对 PP 细胞的感染与分选 复苏一定数目的鹿茸角柄骨髓干细胞即 PP 细胞,胰酶消化后进行细胞计数,接种细胞于 6 孔板中,每板加 2 mL 含胎牛血清与抗生素的 DMEM,待细胞贴壁且细胞密度为 50%~70% 时,接种本文“1.2.4”中浓缩的病毒,37℃,5% CO₂ 孵箱孵育 24 h 后,每隔 12 h 在倒置显微镜下观察荧光的表

达情况以确定感染效率。试验设稳定转染 P21 干扰质粒组(P1、P2)、稳定转染空白载体组(blank)以及对照未感染组(control)。当感染 72 h 后进行传代,扩增被感染的 PP 细胞。细胞计数,并调整浓度到 1 $\times$ 10⁷/mL,38 μ m(400 目)筛网过滤后,利用流式细胞仪(BD influx)分选出表达 GFP 的阳性细胞。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测 P21mRNA 的表达 取分选后的 PP 细胞与对照细胞使用 Bioteke 试剂盒提取总 RNA,并利用分光光度计在 260,280 nm 处检测 OD 值,以确定所提 RNA 的浓度及纯度。总 RNA 使用 Takara 试剂盒进行反转录,得到 cDNA,以其为模板使用 Roche 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应,每个样品设 3 个重复。为避免试验误差,对目的基因的定量结果进行校正,选择 actin 基因作为内参基因,以未感染的 PP 细胞作为对照,反应条件:95℃预变性 15 min;94℃变性 15 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 32 s,共 40 个循环。针对 P21 设计的荧光定量 PCR 上下游引物:上游引物 5'-GACCACTTGGACCTGTCGCT-3';下游引物 5'-GGGTTAGGGCTTCCTCTTGG-3'。

针对 actin 内参基因设计荧光定量 PCR 上下游引物:上游引物 5'-GCGTGACATCAAGGA GAAGC-3';下游引物 5'-GGAAGGACGGCTGGA AGA-3'。

2 结 果

2.1 载体质粒阳性克隆的 PCR 鉴定结果

空白质粒 PLV PCR 扩增后片段大小为 85 bp,连接 SiRNA 后载体质粒扩增后片段大小为 141 bp (图 1)。

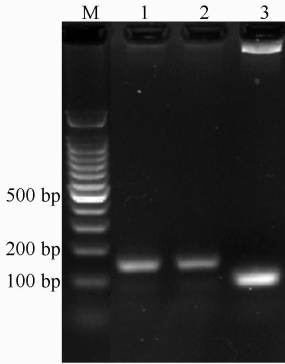
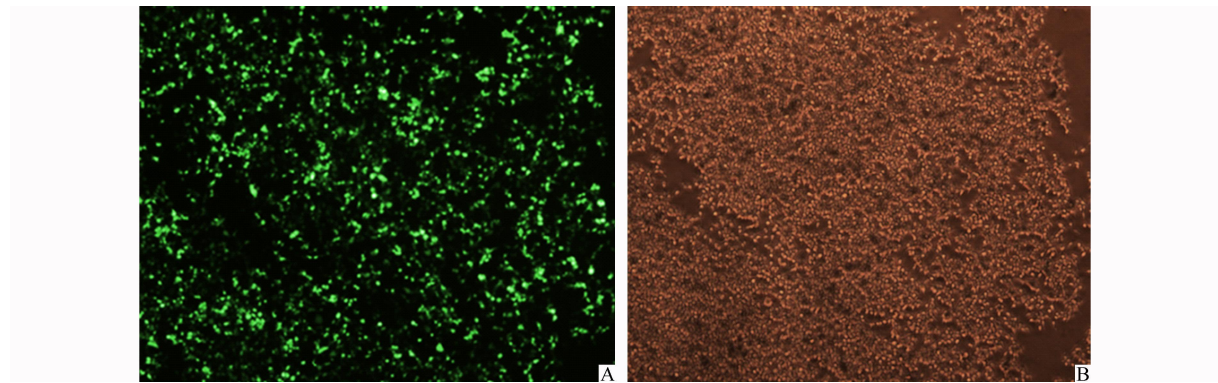


图 1 阳性克隆质粒 PCR 结果
Fig. 1. PCR results of the positive clones

由图 1 可见, 3 号泳道为空白质粒扩增后的阴性对照, 接近 100 bp; 1, 2 号泳道分别为连接了 P1siRNA 与 P2siRNA 的质粒扩增后的电泳结果, 位于 100 bp 和 200 bp 之间, 明显大于阴性对照, 这与试验预期相符, 说明挑选的阳性克隆正确, 送于上海生工进行测序, 测序结果最终确定阳性克隆中正确插入了所需的 RNAi 靶位点序列, 重组质粒连接成功。

2 2 重组慢病毒 3 质粒共转染效果检测

在 293t 细胞中进行由 Lipofectamine 2000 介导的 plvthm、pCMV-dr8.91、pMD2. G 3 质粒共转染。由图 2 可见, 24 h 后在倒置荧光显微镜下可观察到大量的 GFP 绿色荧光, 均匀分布于视野中, 并且在可见光下观察, 293t 细胞生长旺盛、紧密排列, 细胞呈圆粒型, 无死细胞或细胞碎片, 表明质粒成功共转染 293t 细胞。



A. 3 质粒共转染 24 h 后 293t 细胞中 GFP 表达情况 GFP expression of 293t cells 24 h after co-transfection; B. 3 质粒共转染 24 h 后 293t 细胞生长情况 293t cells at 24 h after co-transfection

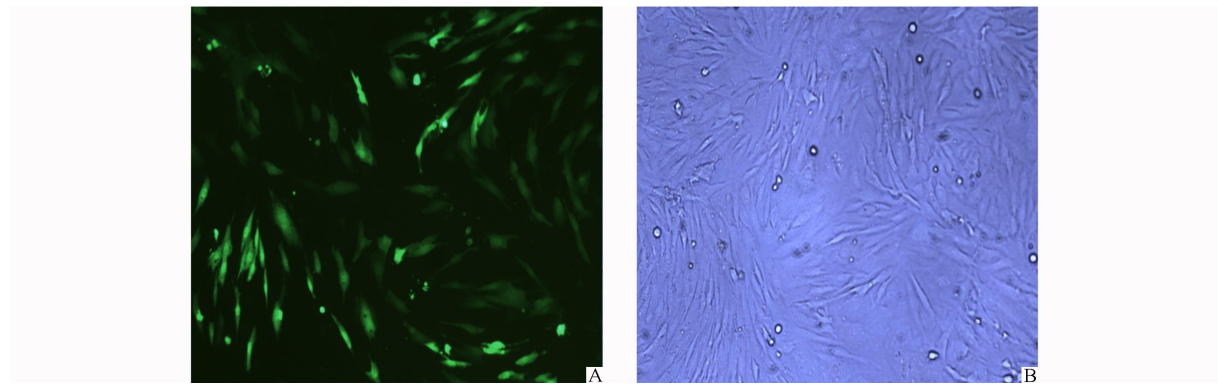
图 2 293t 细胞生长情况

Fig. 2. Growth condition of 293t cells

2 3 病毒感染结果

用包装成功的慢病毒感染 PP 细胞, 约 3 d 后在倒置荧光显微镜下观察。由图 3 可见, 感染慢病毒载体的 PP 细胞, 有大量绿色荧光分布于视野

中(图 3—A), 在可见光(相差)下可看到 PP 细胞生长状况良好(图 3—B)。通过细胞计数得出感染效率约为 30%, 将细胞进行传代培养得到大量已感染细胞, 以用于后续阳性细胞分选。



A. PP 细胞感染重组质粒后细胞中 GFP 表达情况 GFP expression of pp cells after infection; B. PP 细胞感染重组质粒后细胞生长情况 PP cells after infection

图 3 PP 细胞生长情况

Fig. 3. Growth condition of PP cells

2 4 流式细胞术分选阳性感染细胞结果

以未感染的 PP 细胞作为阴性对照, 由于不含其 GFP 蛋白, 因此不发绿色荧光, 由此可以利用流式细胞仪分选出纯度较高的感染细胞。试验结果表明, 感染质粒组细胞约占 30%。经过流式分选后, 感染细胞纯度约达到 90%, 利于后续检测对 P21 基因的感染效率。

2 5 荧光定量 PCR 检测结果

以未干扰 PP 细胞为阴性对照进行 RT-PCR, 通过熔解曲线分析发现, actin 基因与 P21 基因各有单一的峰, 表明 2 个基因均被特异扩增。

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析方法进行数据分析, 图 4 为 P1siRNA 与 P2siRNA 干扰 PP 细胞后基因的相对表达量, 由图 4 可见, 与空白载体组(blank)以及对照未感染组(control)相比, 干扰组 P1-siRNA 与 P2-siRNA 干扰 PP 细胞后, P21 的转录均受到明显抑制, 干扰效率约为 70%, 而空白载体组与对照未感染组之间虽有差异但不明显, 说明载体本身对细胞 P21 表达影响较小, 可以忽略。因此可确定携带 P1-SiRNA 与 P2-siRNA 的表达载体可有效沉默 P21 基因的表达, 成功获得 P21 低表达的梅花鹿 PP 细胞系。

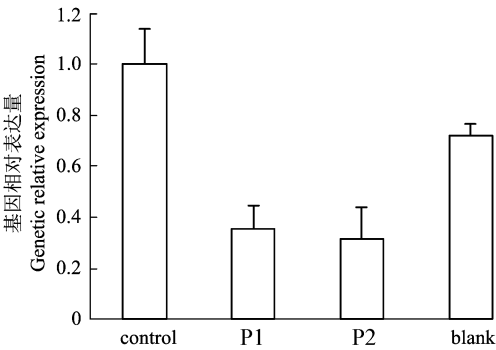


Fig. 4. Real-time PCR 检测 P21 基因的基因沉默效应
Fig. 4. Gene silencing effects of P21 gene detected by real-time PCR

3 讨 论

鹿茸作为哺乳动物唯一可以再生的附属器官, 其再生机制的研究近年来已成为研究热点。与传统的再生模式生物相比, 鹿茸再生有着独特的特点。例如成年蝾螈受伤或截肢后肢体的代替就是起始于芽基的形成^[12-13], 这种能力是再生的一个典型特点, 而鹿茸再生却是基于干细胞的一种割处再生^[2 14-16], 并且几种典型的再生模型细

胞周期都存在着 G2 期的积累。在最近有关具有再生能力的 MRL 鼠的研究中, 去除 P21 基因后普通小鼠具有了可再生能力^[8], 并且同样发现了 G2 期细胞的积累, 而在鹿茸再生中尚未见相关的研究报道。本试验成功构建了针对 P21 基因的 RNA 干扰表达载体, 并通过荧光定量 PCR 检测, 确定了试验设计的小干扰 RNA 对鹿茸骨髓干细胞具有明显的干扰效果, 获得了稳定低表达 P21 基因的鹿茸干细胞系, 为以后研究 P21 基因沉默对鹿茸干细胞在鹿茸再生上的影响奠定了基础, 从而确定 P21 蛋白是否是鹿茸再生中的一个重要因素, 明确 P21 在鹿茸再生中的作用。

P21 蛋白作为周期蛋白依赖性激酶抑制剂的一员, 在细胞周期的 G1 检测点发挥作用, 可以被 G1 期的主要调控蛋白 P53 所转录激活¹⁷⁻¹⁸, 阻滞 G1 期, 抑制细胞增殖。因此, 没有 P21 蛋白, 则 G1 检查点就不能完全起作用, 对 G2 检查点产生依赖, 从而导致特殊的细胞周期⁸。最近的一个研究中, 人类成纤维细胞去除 P21 后, 观察到了与在再生表型中相类似的细胞增殖与 P53 上调¹⁹。有其他研究也为细胞周期调控对再生的重要作用提供了证据。在体外, 蝾螈肌小管和 Rb-/- 鼠肌小管再生潜能与 Rb 的高度磷酸化是相关的^[20-21], 这与 P21 缺乏时在功能上相同, cyclin-cdk 不会被抑制, 因此会绕过 G1 检查点。在突变的小鼠中 P21 的缺乏加强了肝再生以及肌细胞的增殖^[22-24], 并且, 在这些试验中这些组织都正常再生。可见, P21 的下调起着惊人的作用, 仅这一个分子的去除便可导致整个动物体的附属器官再生。因此对于鹿茸再生, 这样一个哺乳动物中特殊的再生模型来说, 探究清楚与 P21 的关系对进一步揭示鹿茸再生方式有着重要的意义。

作为哺乳动物唯一可以完全再生的附属器官, 鹿茸再生对于器官再生, 特别是肢体再生的研究具有重要意义。肢体再生的突破点是骨再生, 而鹿茸恰恰是这样一种主要由骨组成的器官, 有限的骨髓干细胞能在短短的 2 个月内完成整个鹿茸的再生, 这为最终实现人类肢体再生成为可能; 并且其惊人的细胞增殖速度却不发生癌变, 这也为人类研究癌症提供了一个良好的生物模型, 因此鹿茸再生机制的研究具有重要的意义。

参考文献:

[1] Li C, Suttie J M, Clark D E. Histological examination of antler re-

- generation in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2000, 260(1): 62-71.
- [2] Li G, Suttie J M. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? [J]. *Anat Embryol (Berl)*, 2001, 204(5): 375-388.
 - [3] Li C, Martin S K, Clark D E, et al. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 328(1): 65-75.
 - [4] Gourevitch L, Clark L, Bedelbaeva K, et al. Dynamic changes after murine digit amputation: the MRL mouse digit shows waves of tissue remodeling, growth, and apoptosis [J]. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(3): 447-455.
 - [5] Fitzgerald J, Rich C, Burkhardt D, et al. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(11): 1319-1326.
 - [6] Chadwick R B, Bu L, Yu H, et al. Digit tip regrowth and differential gene expression in MRL/MpJ, DBA/2, and C57BL/6 mice [J]. *Wound Repair Regen*, 2007, 15(2): 275-284.
 - [7] Clark L D, Clark R K, Heber-Katz E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration [J]. *Immunol Immunopathol*, 1998, 88(1): 35-45.
 - [8] Bedelbaeva K, Snyder A, Gourevitch D, et al. Lack of P21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(13): 5845-5850.
 - [9] Weiss R H. P21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in reast and ther cancers [J]. *Aner Cell*, 2003, 425(6): 425-429.
 - [10] Cazzalini O, Scovassi A I, Savio M, et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor P21(CDKN1A) in the DNA damage response [J]. *Mutat Res*, 2010, 704(1-3): 12-20.
 - [11] Montgomery M K, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15502-15507.
 - [12] Stocum D L. Amphibian regeneration and stem cells [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, 280: 1-70.
 - [13] Brookes J P, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine [J]. *Science*, 2005, 310(5756): 1919-23.
 - [14] Li C, Hamis A J, Suttie J M. Tissue interactions and antlerogenesis: new findings revealed by a xenograft approach [J]. *J Exp Zool*, 2001, 290(1): 18-30.
 - [15] Li C, Suttie J M. Histological studies of pedicle skin formation and its transformation to antler velvet in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. *Anat Rec*, 2000, 260(1): 62-71.
 - [16] Li C, Yang F, Li G, et al. Antler regeneration: a dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin [J]. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 2007, 307(2): 95-105.
 - [17] Kastan M B, Lin D S. The many substrates and functions of ATM [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(3): 179-186.
 - [18] Wahl G M, Carr A M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53 [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(12): 277-286.
 - [19] Penuca P, Cazzalini O, Madine M, et al. Loss of P21 CDKN1A impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(1): 105-114.
 - [20] Schneider J W, Gu W, Zhu L, et al. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells [J]. *Science*, 1994, 264(5): 1467-1471.
 - [21] Tanaka E M, Gann A A, Gates P B, et al. New myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein [J]. *Cell Biol*, 1997, 136(1): 155-165.
 - [22] Hawke T J, Jiang N, Garry D J. Absence of P21CIP rescues myogenic progenitor cell proliferative and regenerative capacity in Foxk1 null mice [J]. *Biol Chem*, 2003, 278(6): 4015-4020.
 - [23] Stepniak E, Ricci R, Eferl R, et al. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/P21 and p38 MAPK activity [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(16): 2306-2314.
 - [24] Willenbring H, Shama A D, Vogel A, et al. Loss of P21 permits carcinogenesis from chronically damaged liver and kidney epithelial cells despite unchecked apoptosis [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(1): 59-67.

(责任编辑: 林海涛)