

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.004

· 基础研究 ·

桥接整合因子 1 通过 AKT-mTOR 通路诱导非小细胞肺癌 H1975 细胞周期阻滞

张翔宇, 邓佳, 王佳丽, 刘天旭, 吕微, 段玉青, 刘丽华(河北医科大学第四医院 生物治疗科, 河北 石家庄 050035)

[摘要] **目的:** 研究桥接整合因子 1 (bridging integrator 1, *Bin1*) 基因过表达后对非小细胞肺癌细胞株 H1975 细胞周期的影响及其作用机制。**方法:** 构建携带 *Bin1* 基因的 CMV-MCS-GFP-SV40-Neomycin-*Bin1* 质粒, 并转染 H1975 细胞 (*Bin1*⁺ 组), 另设置空白质粒转染组 (*Bin1*⁻ 组) 及空白对照组 (Ctrl 组), 利用 RT-PCR 和 Western blotting 分别检测 3 组细胞中 *Bin1* 在 mRNA 和蛋白质水平的表达情况。流式细胞术检测不同处理组 H1975 细胞周期的变化, Western blotting 分别检测各组中 AKT、mTOR 磷酸化水平及细胞周期相关蛋白 (周期蛋白 D1、CDK4、Rb) 的表达情况。**结果:** 与 *Bin1*⁻ 组、Ctrl 组比较, *Bin1*⁺ 组 H1975 细胞中 *Bin1* 在 mRNA、蛋白水平表达明显上调 (均 $P < 0.05$); H1975 细胞阻滞在 G1 期 (60.53 ± 1.89)% vs (46.14 ± 1.56)% (47.33 ± 2.07)%, 均 $P < 0.05$]; *Bin1*⁺ 组 H1975 细胞内 p-AKT、p-mTOR 表达下调 (均 $P < 0.05$), AKT、mTOR 表达变化无统计学差异 ($P > 0.05$); 周期蛋白 D1、CDK4 的表达量均明显下调 ($P < 0.05$), Rb 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。 **结论:** *Bin1* 基因在 H1975 细胞株过表达后明显诱导细胞周期阻滞, 其机制可能是通过抑制 AKT-mTOR 通路及其细胞周期相关蛋白实现的。

[关键词] 非小细胞肺癌; 桥接整合因子 1; 细胞周期; AKT-mTOR

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)02-0122-05

Bin1 block cell cycle of non-small cell cancer H1975 cell through AKT-mTOR pathway

ZHANG Xiangyu, DENG Jia, WANG Jiali, LIU Tianxu, LYU Wei, DUAN Yuqing, LIU Lihua (Department of Biotherapy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of bridging integrator 1 (*Bin1*) gene over-expression on cell cycle of non-small cell lung cancer H1975 line cell, and its mechanism. **Methods:** CMV-MCS-GFP-SV40-Neomycin-*Bin1* plasmid carrying *Bin1* gene was constructed and was transfected into the H1975 line cell (*Bin1*⁺ group). The H1975 line cell (*Bin1*⁻ group) transfected with empty plasmid and the H1975 line cell (Control group) were set up. Expressions of *Bin1* mRNA and protein in the H1975 cell of the 3 groups were respectively detected by RT-PCR and Western blotting assays. Cell cycle changes of the H1975 cell in the various treatment groups were examined by flow cytometry assay. Phosphorylation level of AKT and mTOR as well as expression of cell cycle related proteins (cyclinD1, CDK4 and Rb) in the various treatment groups were detected by Western blotting. **Results:** Comparing with the *Bin1*⁻ and control groups, expressions of *Bin1* mRNA and protein in the *Bin1*⁺ group were obviously up-regulation ($P < 0.05$), cell cycle of the H1975 cell in the *Bin1*⁺ group was blocked in G1 phase (60.53 ± 1.89 % vs 46.14 ± 1.56 % and 47.33 ± 2.07 %, $P < 0.05$), and in the H1975 cell of the *Bin1*⁺ group, expressions of p-AKT and p-mTOR were significantly down-regulation ($P < 0.05$), expressions of AKT and mTOR were not significantly difference ($P > 0.05$), expressions of cyclinD1 and CDK4 proteins were markedly down-regulation and expression of Rb protein was evidently increased ($P < 0.05$). **Conclusion:**

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (No. 81201607); 河北省杰出青年基金资助项目 (No. H2014206320); 河北省高层次人才培养项目资助 (No. A201401040)。Project supported by the Young Scientists Foundation of the National Natural Science Foundation of China (No. 81201607), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2014206320), and the High Level Talents of Hebei Province (No. A201401040)

[作者简介] 张翔宇 (1991 -), 女, 研究生, 主要从事肿瘤生物治疗的临床与基础研究, E-mail: xiguashangedou@163.com

[通信作者] 刘丽华 (LIU Lihua, corresponding author), 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤生物治疗、肿瘤免疫的基础与临床研究, E-mail: Lihualiu567@hotmail.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170120.1116.008.html>

Over-expression of *Bin1* gene in the H195 cell could obviously induce blocking of the cell cycle and its mechanism might be caused by inhibiting AKT-mTOR pathway and its cell cycle related proteins.

[**Key words**] non-small lung cancer; bridging intergrator 1(*Bin1*); cell cycle; AKT-mTOR

[*Chin J Cancer Biother*, 2017, 24(2): 122-126. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.004]

目前,肺癌已经成为发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一,严重影响人类健康,其中约 80% 的肺癌为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1]。近年来,虽然临床治疗 NSCLC 的手术治疗、药物化疗、放射治疗等方法日趋成熟,但并未明显提高其整体生存率,其原因是 NSCLC 恶性程度高且易复发转移^[2],因此,可针对 NSCLC 的特点寻找新的治疗方案。研究^[3-5]发现,细胞周期相关因子严格调控细胞增殖、生长和分裂等过程,其异常调控在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。桥接整合因子 1(bridging intergrator protein 1, *Bin1*)是一种具有抑癌作用的配体蛋白,在一些生长迅速、易转移复发的肿瘤中常伴随 *Bin1* 蛋白低表达^[6-7],其通过与 c-Myc 的 N 端结合,参与细胞周期调控及增殖等肿瘤恶性生物学行为,但在 NSCLC 中发生发展中的作用鲜有研究。本研究旨在分析 NSCLC(H1975 细胞株)中, *Bin1* 高表达对细胞周期、细胞周期相关因子(周期蛋白 D1、CDK4、Rb)的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要细胞、试剂和仪器

人 NSCLC 细胞株 H1975(*Bin1* 低表达)由中国协和医学院基础研究所惠赠,本实验室冻存。1640 培养基和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,TRIzol 及转染试剂 Lipofectamine[®]2000 购自美国 Invitrogen 公司,PCR 中所需试剂均购自北京全式金生物公司,引物由上海生工合成,质粒提取试剂盒购自天根生化试剂公司,真核表达重组质粒 CMV-MCS-GFP-SV40-Neomycin-*Bin1* 和空白对照质粒 CMV-MCS-GFP-SV40-Neomycin 均购自上海吉凯基因生物公司,ECL 化学发光试剂盒购自碧云天公司;鼠抗人 *Bin1* 单克隆抗体购自 Merck Millipore 公司,兔抗鼠周期蛋白 D1、CDK4、Rb 抗体购自 CST 公司,山羊抗兔二抗购自 Abcam 公司。实时定量 PCR 仪(Minicycler)购自 MJ Research 公司。

1.2 H1975 细胞培养和细胞转染

在含 10% 胎牛血清、0.1% 双抗的 1640 培养基中常规培养 H1975 细胞株,待细胞密度达到 70% ~ 80%,用胰酶消化并收集后铺 6 孔板,继续培养,待细胞密度达到 80% 后分为 3 组,分别为 *Bin1*⁺ 组(转

染真核表达重组质粒 CMV-MCS-GFP-SV40-Neomycin-*Bin1*)、*Bin1*⁻ 组(转染空白对照质粒 CMV-MCS-GFP-SV40-Neomycin)、空白对照组(不转染任何质粒),按照 Invitrogen 公司的 Lipofectamine[®]2000 转染试剂说明书进行操作。

1.3 Western blotting 实验鉴定 *Bin1* 基因转染效果

转染 48 h 后,分别提取 3 组细胞的 RNA,用 RT-PCR 检测细胞内 *Bin1* mRNA 表达情况,上游引物 5'-CAAGTCCCCATCTCAGCCAG-3',下游引物 5'-GGATCACCAGCACCACCACATCA-3',扩增片段为 296 bp。分别裂解 3 组细胞,提取蛋白,*Bin1* 单抗及 HRP 标记的二抗用 Western blotting 检测细胞内 *Bin1* 蛋白的表达情况,BCA 法定量后,各取含 30 μg 总蛋白的样品加入上样缓冲液和 PBS 配齐 20 μl 体系,沸水中煮 10 min,置于冰上冷却,用 10% SDS-PAGE 分离蛋白后转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉温室封闭 PVDF 膜 2 h, TBST 洗膜后加 Quantity One 4.6 软件分析图像,以 GAPDH 为内参,与各个检测蛋白条带的灰度值之比表示蛋白的相对表达量,其相对分子质量约为 46 000。实验重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测 *Bin1* 过表达对 H1975 细胞周期的影响

取处于对数生长期的细胞,消化并计数,将细胞浓度调至 1.0×10^5 /ml 后铺 6 孔板,继续培养。待细胞浓度达到 80% 后,消化并收集在离心管中,4 ℃, 3 000 × g 离心 5 min; 弃上清,用预冷的 PBS 洗 2 次,过 400 目的细胞钢筛后,转移至 EP 管中,4 ℃, 3 000 × g 离心 5 min; 弃上清,加入 2 ml 胎牛血清后,用流式细胞仪检测分别检测 3 组细胞株细胞周期中 G1 期、S 期及 G2/M 期的细胞数量及其所占比例。实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 检测细胞中 AKT、mTOR 磷酸化水平及其细胞周期相关蛋白表达的影响

分别提取 3 组细胞总蛋白,按 1.3 中方法,用 Western blotting 检测各组细胞中相关蛋白表达水平。一抗为兔抗鼠 AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、周期蛋白 D1、CDK4、Rb 抗体,二抗为山羊抗兔多抗。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

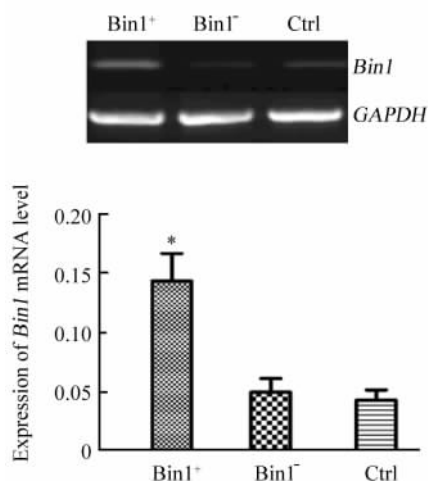
采用 SPSS20.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$

表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

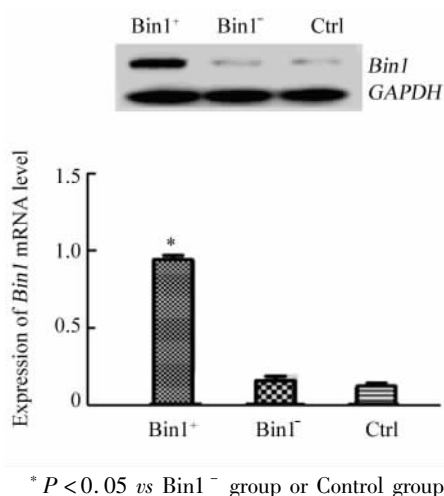
2.1 Bin1 质粒成功转染并在 H1975 细胞内表达

RT-PCR(图1)及 Western blotting(图2)检测结果显示,Bin1⁺组 *Bin1* 基因 mRNA 和蛋白表达较另两组明显上调($P < 0.05$),Bin1⁻组、Ctrl 组 *Bin1* mRNA 和蛋白表达水平上无统计学差异($P > 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs Bin1⁻ group or Control group

图1 *Bin1* 表达质粒转染促进 H1975 细胞内 *Bin1* 的表达
Fig.1 Transfection of *Bin1* expressing plasmid facilitated the expression of *Bin1* in H1975 cells



* $P < 0.05$ vs Bin1⁻ group or Control group

图2 *Bin1* 表达质粒转染促进 H1975 细胞内 *Bin1* 蛋白的表达
Fig.2 Transfection of *Bin1* expressing plasmid facilitated the expression of *Bin1* of protein in H1975 cells

2.2 Bin1 过表达阻滞 H1975 细胞周期于 G1 期

H1975 细胞 Bin1 转染后,流式细胞仪检测结果

(图3)显示,与 Bin1⁻组、Ctrl 组相比,Bin1⁺组细胞中的 DNA 合成受到抑制,阻止 Bin1⁺转染组细胞从 G0/G1 期进入 S 期,使 G0/G1 期百分比明显增加 [(60.53 ± 1.89)% vs (46.14 ± 1.56)%、(47.33 ± 2.07)%],均 $P < 0.05$ 。

2.3 过表达 Bin1 能降低 H1975 细胞内 AKT 表达和 mTOR 蛋白磷酸化水平

Western blotting 检测 Bin1 对 AKT-mTOR 通路的影响,结果(图4)显示,与 Bin1⁻组、Ctrl 组相比,Bin1⁺组中 AKT、mTOR 表达未见明显变化($P > 0.05$),而 p-AKT、p-mTOR 表达下调($P < 0.05$);Bin1⁻组和 Ctrl 组中 4 种蛋白的表达均未见明显差异($P > 0.05$)。

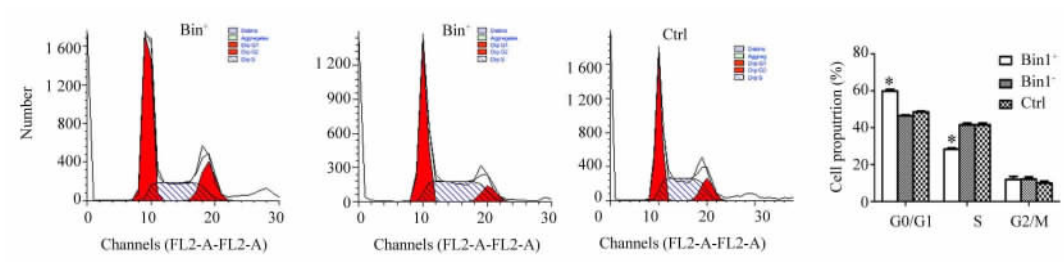
2.3 Bin1 过表达能影响细胞周期相关周期蛋白 D1、CDK4、Rb 蛋白的表达

Western blotting 检测 Bin1 对细胞周期相关蛋白的影响,结果(图5)显示,Bin1⁺组与 Bin1⁻组、Ctrl 组相比,Bin1⁺组的细胞周期相关蛋白周期蛋白 D1、CDK4 的表达量均明显下调($P < 0.05$),Rb 表达量明显上调,而 Bin1⁻组、Ctrl 组的表达量均无明显改变($P > 0.05$)。

3 讨论

肺癌作为发病率和病死率最高的恶性肿瘤,失控性增殖是其重要特征,抑癌基因失活可导致细胞生长失控,进而促进肿瘤的发生发展^[8]。Bin1 是目前发现的唯一具有抑癌功能的配体蛋白,它在乳腺癌、恶性黑色素瘤、前列腺癌等多种肿瘤中均呈低表达或表达缺失状态,Pan 等^[9]研究发现,Bin1 过表达可以抑制肿瘤细胞周期进展,其缺失可以促进肿瘤细胞失控性增殖。

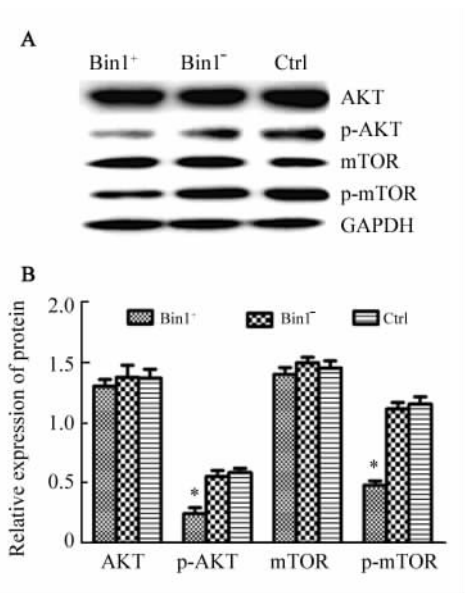
细胞周期调控是一个十分复杂的过程,与多种信号通路和细胞因子密切相关^[10]。AKT-mTOR 信号通路活化可以诱导细胞抗凋亡及细胞分化异常等现象,并且可以导致细胞失控性增殖,在细胞周期调控过程中起重要作用^[11]。AKT 是一种 Ser/Thr 蛋白激酶,被 PDK1 磷酸化后激活,作用于其下游基因 mTOR,使其磷酸化缩短细胞周期,促进细胞分裂增殖^[12]。本研究发现,在低表达 Bin1 的 H1975 细胞中通过转染使 Bin1 过表达后,AKT、mTOR 表达未见明显变化,但 p-AKT、p-mTOR 表达均下调,推测 Bin1 可能是通过抑制 AKT、mTOR 磷酸化,诱导细胞周期阻滞,进而抑制肿瘤细胞的分裂增殖。此外,AKT 还可通过周期蛋白 D1-CDK4-Rb 调控细胞周期,影响细胞增殖^[13]。G1 期到 S 期的过渡是细胞



* $P < 0.05$ vs Bin1⁻ group or Control group

图 3 Bin1 转染诱导 H1975 细胞周期受阻于 G0/G1 期

Fig. 3 Effect of transfection of Bin1 on cell cycle arrest in G0/G1 phase in H1975



* $P < 0.05$ vs Bin1⁻ group or Control group

A: The band of proteins in western blotting image;

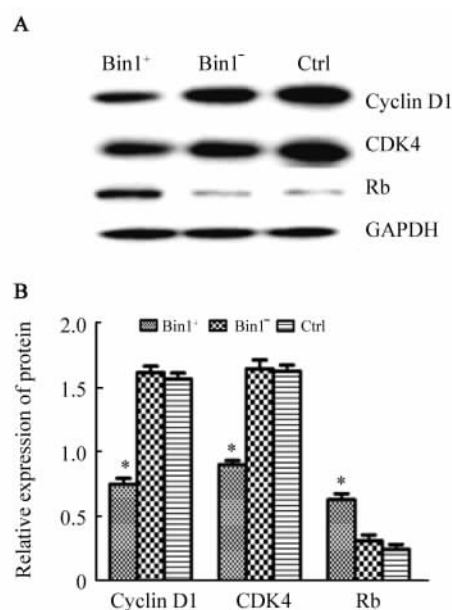
B: Statistical histograms of proteins

图 4 Bin1 过表达下调 H1975 细胞内 AKT、mTOR 的磷酸化水平

Fig. 4 Overexpression of Bin1 ectopic can downregulate phosphorylation level of AKT, mTOR of H1975 cells

周期中重要的转折点, 研究表明周期蛋白 D1 对细胞周期 G1/S 的转换至关重要, 其在 G1 期开始表达后结合并激活 CDK4/6, 形成 CDK4/6-CyclinD 复合物^[14-15], 当相应的 CKD4s 激活后刺激 Rb 蛋白磷酸化而激活, 磷酸化的 Rb 启动靶基因转录和 DNA 复制, 细胞周期由 G1 期进入 S 期, 进而引起细胞增殖^[16-18]。因此周期蛋白 D1 激活导致 CDK4 对 Rb 调控失衡^[19-20], 进而导致细胞失控生长, 诱导肿瘤形成。本研究中, 发现 Bin1 过表达可以诱导 H1975 细胞 G1 期阻滞。Western blotting 检测细胞周期相关蛋白发现周期蛋白 D、CDK4 蛋白表达量显著降低, 而 Rb 蛋白表达量明显上调, 表明 Bin1 可能通过

抑制周期蛋白 D、CDK4 激活, 阻碍 Rb 磷酸化, 进而阻滞 G1 期进入 S 期, 从而抑制肿瘤细胞生长。以上结果说明 Bin1 通过抑制细胞周期相关蛋白表达诱导细胞周期阻滞。



* $P < 0.05$ vs Bin1⁻ group or Control group

A: The band of proteins in western blotting image;

B: Statistical histograms of proteins

图 5 Bin1 过表达对 H1975 细胞周期蛋白 D1、CDK4、Rb 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Bin1 overexpression on the expression of Cyclin D1, CDK4 and Rb of H1975 cells

本实验通过 Bin1 质粒转染非小细胞肺癌细胞 (H1975 细胞株) 后研究其对细胞周期的影响及其相关机制, 发现 Bin1 基因转染后诱导 H1975 细胞周期 G1 期到 S 期发育阻滞, 进而抑制细胞增殖, 这为深入研究 Bin1 在抑制 NSCLC 增殖及其治疗中的作用奠定了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] PAN X, WANG R, BIAN H, et al. Overexpression of inhibitor of growth 4 enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer cell Line SPC-A1[J/OL]. *Technol in Cancer Res&Treat*, 2016 [2016-08-28]. <http://tct.sagepub.com/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=27381846>. DOI:10.1177/1533034616656315.
- [2] WEN J, LUO K J, LIU Q W, et al. The epithelial-mesenchymal transition phenotype of metastatic lymphnodes impacts the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37581-37588. DOI: 10.18632/oncotarget.9036.
- [3] LIU H J, OOMS L M, SRIJAKOTRE N, et al. PtdIns(3,4,5) P3-dependent rac exchanger 1 (PREX1) rac-guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity promotes breast cancer cell proliferation and tumor growth via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(33): 17258-17270. DOI:10.1074/jbc.M116.743401.
- [4] LIU T, LI W M, WANG W P, et al. Inhibiting CREPT reduces the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells by down-regulating cell cycle related protein[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(5): 2097-2113. DOI: 10.1083/15384101.2016.1282207.
- [5] MIYAWAKI Y, KAWACHI H, OOI A, et al. Genomic copy-number alterations of MYC and FHIT genes are associated with survival in esophageal squamous-cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8): 1558-1566. DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02329.x.
- [6] PYNDIAH S, SAKAMURO D. c-MYC, PARP1 and Bin1 as targets for therapy of cancer cell resistance[J]. *Med Sci(Paris)*, 2013, 29(2):133-135. DOI:10.1051/medsci/2013292006.
- [7] JIA Y, WANG H, WANG Y, et al. Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(5): 1095-1106. DOI:10.1002/ijc.29481.
- [8] PAUKLIN S, VALLIER L. The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity[J]. *Cell*, 2013, 155(1): 135-147. DOI:10.1016/j.cell.2013.08.031.
- [9] PAN K, LIANG X T, ZHANG H K, et al. Characterization of bridging integrator 1 (Bin1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Mol Med*, 2012, 18:507-518[2016-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356425/>. DOI:10.2119/molmed.2011.00319.
- [10] XU W, MCARTHUR G. Cell cycle regulation and melanoma[J]. *Curr Oncol Rep*, 2016, 18(6):34. DOI:10.1007/s11912-016-0524-y.
- [11] ASNAGHI L, BRUNO P, PRIULLA M, et al. mTOR: a protein kinase switching between life and death[J]. *Pharmacol Res*, 2004, 50(6):545-549. DOI:10.1016/j.phrs.2004.03.007.
- [12] FOLLO M Y, MANZOLI L, POLI A, et al. PLC and PI3K/AKT/mTOR signalling in disease and cancer[J/OL]. *Adv Biol Regul*, 2015, 57: 10-16[2016-08-28]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221249261400061X>. DOI:10.1016/j.jbior.2014.10.004.
- [13] LU Z, ZHOU R, KONG Y, et al. S-sequol, a secondary metabolite of natural anticancer isoflavone daidzein, inhibits prostate cancer growth in vitro and in vivo, through activating the AKT/FOXO3a pathway[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2016, 16(5):455-465. DOI:10.2174/1568009616666151207105720.
- [14] THE I, RUIJTENBERG S, BOUCHET B P, et al. Rb and FZRI/Cdh1 determine CDK4/6-cyclin D requirement in *C. elegans* and human cancer cells[J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6:5906[2016-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354291/>. DOI:10.1038/ncomms6906.
- [15] PARK C, JEONG J S, JEONG J W, et al. Ethanol extract of *Kalopanax septemlobus* leaf inhibits HepG2 human hepatocellular carcinoma cell proliferation via inducing cell cycle arrest at G1 phase [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(4):344-350. DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.03.003.
- [16] XIA H, LONG J, ZHANG R, et al. MiR-32 contributed to cell proliferation of human breast cancer cells by suppressing of PHLPP2 expression[J/OL]. *Biomed & Pharmacother*, 2015, 75: 105-110 [2016-08-28]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753-3322\(15\)00181-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753-3322(15)00181-X). DOI: 10.1016/j.biopha.2015.07.037.
- [17] SCHAAL C, PILLAI S, CHELLAPPAN S P. The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis [J/OL]. *Adv Cancer Res*, 2014, 121:147-182[2016-08-28]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002490000044>. DOI:10.1016/B978-0-12-800249-0.00004-4.
- [18] MENG F, QIAN J, YUE H, et al. SUMOylation of Rb enhances its binding with CDK2 and phosphorylation at early G1 phase[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15 (13): 1724-1732. DOI: 10.1080/15384101.2016.1182267.
- [19] PHANG C W, KARSANI S A, SETHI G, et al. Flavokawain C inhibits cell cycle and promotes apoptosis, associated with endoplasmic reticulum stress and regulation of MAPKs and AKT Signaling pathways in HCT 116 human colon carcinoma cells[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148775[2016-08-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4747580/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0148775.
- [20] de SOUZA A A, ALTEMANI A, PASSADOR-SANTOS F, et al. Dysregulation of the Rb pathway in recurrent pleomorphic adenoma of the salivary glands[J]. *Virchows Arch*, 2015, 467(3):295-301. DOI:10.1007/s00428-015-1804-x.

[收稿日期] 2016 - 09 - 12

[修回日期] 2016 - 12 - 15

[本文编辑] 王映红