

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.17.003

Pax3 对神经细胞中的转录调控作用的实验研究 *

霍冰清 杨 旻 陈小帆 万 峻 张 伟[△]

(深圳北京大学香港科技大学医学中心生物医学研究所 广东 深圳 518000)

摘要 目的:探讨 Pax3 的过表达对 Neuro-2a 细胞中转录本的表达影响,初步分析 Pax3 对 Neuro-2a 细胞可能的转录调控作用。**方法:**反复冻融裂解法获取 Pax3 过表达腺病毒后将神经瘤母细胞系 Neuro-2a 传代培养,而后将 Pax3 过表达腺病毒和传代培养后的 Neuro-2a 细胞加入到同一培养皿中,蛋白质免疫印迹(Western blot)检测过表达 Pax3 蛋白的 Neuro-2a 细胞(Pax3 过表达组)和对照组(NC 组)Neuro-2a 细胞的 Pax3 蛋白表达水平,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 Pax3 过表达组和 NC 组 Neuro-2a 细胞的 Pax3mRNA 水平,Trizol 法提取 Pax3 过表达组和 NC 组 Neuro-2a 细胞的总 RNA,然后进行全转录本测序,最后将选出的有差异性的基因使用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证。**结果:**与 NC 组相比,Pax3 过表达组的 Pax3 蛋白和 Pax3mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$);Pax3 过表达组中发现了 1045 个基因表达上调,1313 个基因表达下调。通过 qRT-PCR 验证发现在 Pax3 过表达组中 Nppb 和 Chrna5 表达水平上升($P<0.05$),Arhgap5、Rock1、Rif1、Brca2、Prkg2 和 Stag2 表达水平下降($P<0.05$)。**结论:**Pax3 过表达腺病毒感染 Neuro-2a 细胞后,其蛋白和 mRNA 表达水平均升高,Rock1、Rif1 和 Stag2 可能作为 Pax3 的下游靶点参与调控 Neuro-2a 细胞周期和干细胞特性。

关键词:Pax3; Neuro-2a 细胞; 转录本测序

中图分类号:R-33; Q78; Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)17-3212-05

The Study on the Roles of Pax3 in the Transcriptional Regulation of Nerve Cells*

HUO Bing-qing, YANG Yang, CHEN Xiao-fan, WAN Jun, ZHANG Wei[△]

(Institute of Biomedical Research, Shenzhen Peking University Hong Kong University of Science and Technology Medical Center, Shenzhen, Guangdong, 518000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the transcriptional differences in Neuro-2a cells overexpressing Pax3 and analyze the possible transcriptional regulation of Pax3 on Neuro-2a cells. **Methods:** The overexpression adenovirus of Pax3 was obtained by repeated freeze-thaw method, and neuroblastoma cell line Neuro-2a was subcultured. Then, Pax3 overexpression adenovirus and subcultured Neuro-2a cells were added into the same culture dish. Western blot was used to detect the expression of Pax3 protein in Neuro-2a cells (Pax3 overexpressed group) and control group (NC group). Real time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of Pax3 mRNA in Neuro-2a cells of Pax3 overexpressed group and NC group. Total RNA of Pax3 overexpressed group and NC group that overexpressed Pax3 protein were extracted by Trizol. and then the whole transcript was sequenced, the selected genes were verified by qRT-PCR in the end. **Results:** Compared with NC group, The expression levels of Pax3 protein and Pax3 mRNA in Pax3 overexpressed group were significantly increased($P<0.05$); the expression levels of 1045 genes were upregulated and 1313 genes were downregulated in Pax3-overexpressed group. The results of qRT-PCR verified the expression changes of Nppb and Chrna5 increased ($P<0.05$), while the expression changes of Arhgap5, Rock1, Rif1, Brca2, Prkg2 and Stag2 decreased in Pax3 overexpressed group ($P<0.05$). **Conclusion:** Rock1, Rif1 and stag2 may be downstream targets of Pax3 to regulate cell cycle and stem cell characteristics of Neuro-2a.

Key words: Pax3; Neuro-2a cell; RNA sequencing

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)17-3212-05

前言

Paired box 基因(简称 Pax)是一类保守程度比较高的家族,其特征为成对盒结构域中由 128 个氨基酸组成的可以结合

DNA 的域,包含氨基端(PAI)和羧基端(RED)两个亚结构域^[1]。Pax 家族最早在果蝇中发现,随着研究的进一步深入发现其同源物广泛存在于各种动物中^[2,3]。研究发现,Pax3 对于脊椎动物胚胎初期神经嵴与神经管的发育有重要作用^[4]。据报道,在神经

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81874249)

作者简介:霍冰清(1993-),女,硕士研究生,研究方向:神经生物学,E-mail: huobq930224@163.com

[△] 通讯作者:张伟(1976-),男,博士,研究员,研究方向:转化医学,E-mail: zhangweispace@yeah.net

(收稿日期:2020-12-28 接受日期:2021-01-23)

管闭合到调控有丝分裂后的分化的过程中,Pax3 均发挥非常关键的作用^[5-7]。此外,研究表明 Pax3 的表达不止局限于背侧神经管^[8,9],还包括中间神经管^[10]。Pax3 基因敲除小鼠在肌生成和神经嵴细胞分化的过程中表现异常^[11]。在中枢神经系统,Pax3 基因敲除小鼠出现露脑畸形^[12]。迄今为止,Pax3 在神经系统中的研究多集中在神经管的形成阶段,但在其他阶段的研究较少。Neuro-2a 细胞为小鼠神经瘤母细胞,经诱导能分化成神经元样细胞,是体外模拟神经元分化的经典细胞株。本研究在 Neuro-2a 细胞中过表达 Pax3 基因,并进行全转录本测序,寻找差异基因并通过荧光定量 PCR 对差异基因进行验证,期望可以找到 Pax3 基因的下游靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞系

小鼠来源的神经瘤母细胞 Neuro-2a 细胞,购自于美国 American type culture collection 公司(美国组织细胞库)。

1.2 主要仪器及试剂

RNA 逆转录试剂盒 (Promega)、Trizol (Invitrogen)、2× SYBR Green qPCR Master Mix (BIO-RAD laboratories)、氯仿(广州化学试剂厂)、PCR 仪(BIO-RAD laboratories)、CFX96TM 荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD laboratories)。

1.3 方法

1.3.1 Pax3 的过表达腺病毒的构建 使用 LR Clonase II Enzyme Mix 试剂盒制作融合质粒,将目的基因 Pax3 和 ZsGreen1 整合进腺病毒包装质粒,再使用 PacI 内切酶,将整合后的质粒线性化,最后使用 Lipo2000 将线性化后的质粒转染进 293A 细胞中。约 7-10 天后,可见 293A 细胞肿胀漂浮,即可收取细胞。通过反复冻融法裂解细胞,获取所需要的 Pax3 过表达腺病毒。

1.3.2 细胞传代培养 小鼠来源神经瘤母细胞系 Neuro-2a 采用 DMEM 生长培养基(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素)置于 37℃、含 5% CO₂ 培养箱中静置培养。当细胞密度达到 80%时,按照 1:5 进行传代,约 3 天左右传代一次。

1.3.3 细胞感染过表达腺病毒 将 293A 细胞通过反复冻融来裂解,所需要的腺病毒可离心收取上清获得。将收集的上清分装,-80℃保存。感染前一天根据实验需要在培养皿中接种适量细胞,感染当天取所需腺病毒直接加入培养皿中。感染 24 小时后,更换培养基,调整细胞的生长状态。由于病毒中携带 Zs-Green1 元件,感染情况可使用荧光显微镜来观察,及时开展后续试验。

1.3.4 Trizol 法提取 RNA 加入 Trizol 的量根据细胞量选择,按照 5:1 的比例加入氯仿,手摇充分混匀。取上层水相,加入等体积的异丙醇,混匀,室温搁置 10 分钟,4℃离心 15 分钟,离心力不大于 12000×g。离心后可见沉淀。吸出上清,使用 75% 的乙醇清洗沉淀,4℃离心 5 分钟,离心力不大于 7500×g。重复清洗 2 次后去除上清,室温干燥 5 分钟。当沉淀由乳白色变为无色透明后,使用无 RNA 酶的去离子水来溶解 RNA,使用 Nanodrop 测浓度及 260/280 比值,检验 RNA 质量。

1.3.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 细胞采用预冷的 PBS 清洗两次后,加入 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解细胞,使

用细胞刮收集细胞,4℃,12000 rpm 离心 15 分钟后收集上清。由 10%的 SDS-PAGE 分离并转移到醋酸纤维素膜上。膜用 5% BSA 封闭 2 小时后,一抗 4℃摇床孵育过夜,二抗室温孵育 1 小时。用 Thermo Fisher 公司的 SuperSignal™ Western Blot Enhancer 发光试剂盒显色。

1.3.6 转录本测序 Neuro-2a 细胞感染过表达 Pax3 的腺病毒 48 小时后,按照 Trizol 法收取全部 RNA。设置 Pax3 过表达组和对照组(NC 组),每组两个平行样本。使用 Nanodrop 测定 RNA 浓度及 260/280 比值,确定 RNA 质量符合测序要求后,将转录本测序委托北京诺禾致源有限公司完成。

1.3.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 使用 Promega cDNA 逆转录试剂盒,采用随机引物将前述提取的 RNA 逆转录成 cDNA。取 cDNA 模板 15-20ng 进行 qRT-PCR 检测,采用 SYBR Green qPCR Master Mix(BIO-RAD laboratories)。设置技术平行的 3 个样品,比较不同样品的 CT 值(循环数)来计算表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS21.0 对实验数据进行统计分析,计量资料以均值±标准误(Mean±SEM)表示,使用 t 检验和方差分析对不同实验组的数据进行统计, $P<0.05$ 认为存在显著性差异。

2 结果

2.1 Pax3 过表达腺病毒效率检测

使用 Pax3 过表达腺病毒感染 Neuro-2a 细胞 48 小时后收取样本 RNA 和蛋白,分别进行 qRT-PCR 和 Western blot 方法来检测感染效率。在 qRT-PCR 结果中可见,Pax3 腺病毒感染的细胞中 Pax3 mRNA 水平显著升高(图 1A)。Western blot 结果显示 Pax3 腺病毒感染的细胞中 Pax3 蛋白水平显著升高(图 1B)。

2.2 转录本测序结果与差异分析

分析样本间基因表达水平的相关性是检验实验可靠性和样本选择是否合理的重要指标。相关系数与 1 越接近,则说明样品的相似度就越高。一般要求样本间 Pearson 系数在 0.9 附近,表示生物学重复性较好。测序结果显示,Pax3 过表达组与 NC 组间 Pearson 系数均在 0.9 附近,表示制备的生物学重复样本合格(图 2)。本研究再对 Pax3 过表达组和 NC 组进行差异基因分析,共得到 2358 个差异倍数大于 2 倍的差异基因,经统计学分析,均具有统计学意义。在我们得到的这 2358 个基因中,有 1045 个基因表达上调,1313 个基因表达下调(图 3)。经过分析,本研究挑选了一些与细胞周期、肌动蛋白细胞骨架的调节、调控干细胞多能性通路等方面相关的差异基因(见表 1),便于后期通过 qRT-PCR 对测序结果进行验证,以及进一步对 Pax3 调控 Neuro-2a 细胞下游基因变化情况进行分析和讨论。

2.3 样本中对差异显著的基因的验证

为了验证测序结果的真实性,本研究提取感染 Pax3 过表达腺病毒的 Neuro-2a 细胞的 mRNA,应用 qRT-PCR 的方法,对表 1 中所选取的基因进行验证(图 4)。结果发现和测序结果一致,Nppb 和 Chrna5 在 Pax3 过表达组表达水平上升,Arhgap5、Rock1、Rif1、Brca2、Prkg2 和 Stag2 在 Pax3 过表达组中表达水平下降。

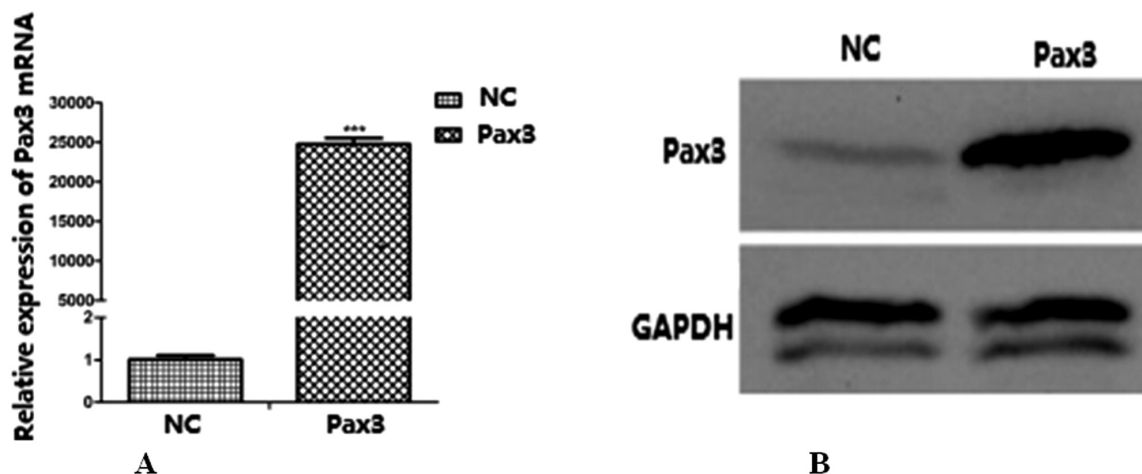


图1 感染 Pax3 过表达腺病毒后细胞 Pax3mRNA 和蛋白表达水平的变化

Fig.1 Changes of Pax3 mRNA and protein expression in cells infected with Pax3 overexpression adenovirus

Note: Compared with NC group, *** $P < 0.05$.

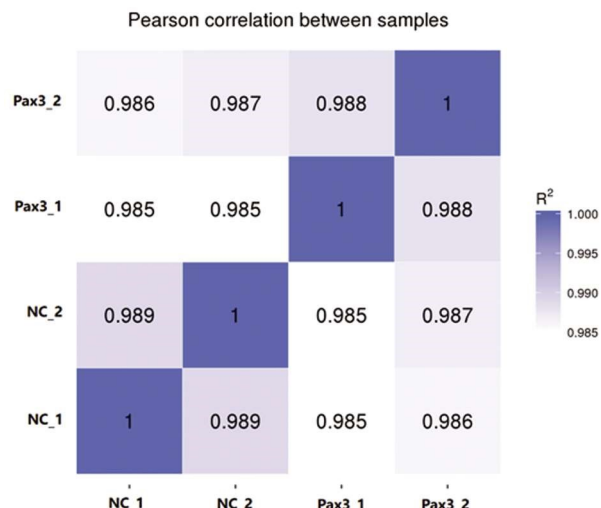


图2 Pax3 过表达组与 NC 组测序样本间基因表达水平相关性结果

Fig. 2 Correlation of gene expression between Pax3 overexpression group and NC group

3 讨论

近些年来,关于 Pax 基因家族的功能被广泛研究。在小鼠中,Pax3 在胚胎第 8 天开始表达于正处在发育的脊髓的背侧面,并且在未分化或分化程度低的细胞中高表达,随着细胞分化程度增高表达下降,而在分化成熟细胞中表达再次增高^[4]。据报道,从神经管闭合到调控有丝分裂后的分化,Pax3 在这些重要的细胞过程中扮演非常关键的角色^[8]。根据胚胎期 Pax3 的表达分布特征,Pax3 发生突变会直接影响中枢神经及神经嵴衍生组织的发育,在人体则表现为 Waardenburg 综合征 I (WSI)。WSI 是显性常染色体遗传病,症状为色素生成紊乱,内眼角侧向错位,还伴有耳聋、精神障碍^[13]。Pax3 还可以和 Zic1 等其他转录因子共同作用,激活神经嵴细胞这类具有多向分化潜力的细胞^[14]。由此可知,Pax3 过表达后很有可能会诱导神经前体细胞向神经细胞分化,但目前这些研究多集中在神经管形成时期,而在出生后的功能研究仍存在很多未知。

Neuro-2a 细胞系最初来源于小鼠自发性神经母细胞瘤细

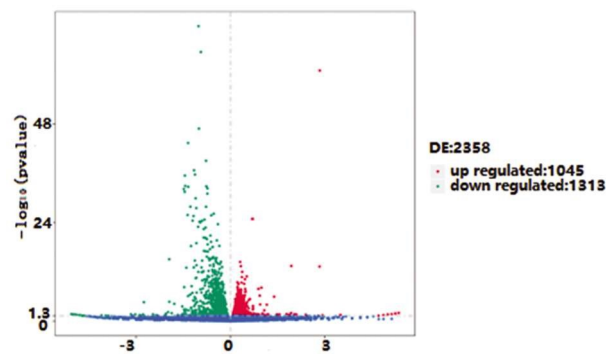


图3 Pax3 过表达组与 NC 组的差异基因火山图分析

Fig.3 Volcano map analysis of difference gene between Pax3 overexpression group and NC group

胞。虽然 Neuro-2a 细胞属于脑肿瘤细胞,但其本身的内在的形态和生理特性非常类似于神经元发育过程中的神经干细胞,这些特性使得 Neuro-2a 细胞在神经元存活、神经元分化等研究中被广泛选择^[15,16]。因此,在本研究中使用 Neuro-2a 细胞系,过表达 Pax3 后进行全转录本测序,寻找差异基因并通过 qRT-PCR 对测序结果进行验证。通过对 Pax3 过表达后下游差异表达的基因进行 KEGG 通路富集分析,这些具有差异的基因主要集中在肌动蛋白细胞骨架的调节、细胞周期、调控干细胞多能性通路等方面。

骨髓基质抗原 2(STAG2)基因主要参与 DNA 修复和有丝分裂后期染色体分离及姐妹染色单体形成的过程,确保有丝分裂过程的顺利进行^[17-19]。研究表明,STAG2 基因表达下调可能会招致黏合蛋白复合体的功能异常,从而导致染色体数目异常^[20,21]。丝氨酸 / 苏氨酸激酶 1(ROCK1)所编码的蛋白属于系统发育中较保守的酶类,从胚胎发育到成年期均有表达^[22]。研究表明,ROCK1 活力被抑制后不仅会导致胞质分裂延迟,还会使得 G1 期中心粒分离异常,最终影响细胞有丝分裂过程^[23]。根据测序结果,这类基因的下调表明 Pax3 过表达后,可能会在一定程度上影响细胞正常有丝分裂过程,从而减缓了细胞的增殖,进而对细胞周期及后续存活造成较大影响。

表 1 Pax3 过表达组与 NC 组间差异表达基因

Table 1 Differential expression genes between Pax3 overexpression group and NC group

Gene_id	Log2FoldChange	Up/down expression	P value	KEGG Pathway enrichment
Nppb	2.84	Up	5.14E-14	cGMP-PKG Pathway
Chrm1	1.56	Up	0.022478233	Actin cytoskeleton regulation
Chrna5	1.39	Up	1.09E-06	Neuroactive ligand receptor interaction
Zfp945	-1.95	Down	8.29E-16	Cell senescence
Cdc25a	-1.48	Down	6.53E-33	Cell cycle
Arhgap5	-1.45	Down	3.38E-36	Focal adhesion
Kif18a	-1.40	Down	9.72E-14	Dopaminergic synapse
Cenpe	-1.36	Down	1.39E-26	Cell cycle
Rock1	-1.20	Down	3.31E-25	Actin cytoskeleton regulation
Rif1	-1.16	Down	1.77E-37	Stem cell pluripotency
Prkg2	-1.08	Down	2.39E-14	Thermogenesis
Brca2	-1.08	Down	1.03E-19	Pancreatic cancer
Atp11c	-1.02	Down	1.01E-12	Parkinson's disease
Stag2	-0.98	Down	5.94E-25	Cell cycle

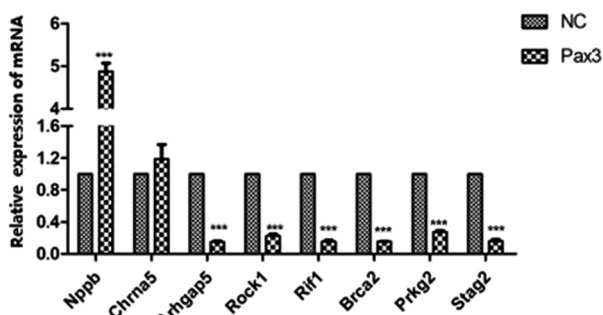


图 4 Pax3 过表达组与 NC 组中对部分差异基因的验证结果

Fig.4 Validation results of partial differential genes in Pax3 overexpression group and NC group

Note: Compared with NC group, *** $P < 0.05$.

静息状态对于维持成体内干细胞的长期存活非常重要。干细胞可以通过分化产生新的细胞来使组织保持稳态。因此,拥有进入静息状态和分化状态的能力可以使成体干细胞远离损伤,免受耗竭^[24]。据报道,Pax3 可以调节具有干细胞特性的卫星细胞的激活,并且在维持卫星细胞的功能中起到重要作用^[25-27]。Neuro-2a 细胞作为体外模拟神经元分化的经典细胞株,具有许多类似于神经干细胞的固有形态和生理特性^[28]。Rif1 为阻遏蛋白激活蛋白 1(RAP1)的相互作用因子,在端粒长度的调节中具有关键作用^[29]。近些年研究人员发现 Rif1 不仅参与 DNA 损伤反应的调节过程,还在小鼠胚胎干细胞中高表达,并且参与干细胞自我更新过程^[30]。测序结果中显示 Rif1 表达下调,表明 Rif1 可能作为 Pax3 潜在的下游靶点进而调节 Neuro-2a 细胞多能性。

综上所述,本研究在过表达 Pax3 的 Neuro-2a 细胞转录本测序中发现了很多差异基因,对这些基因的进一步分析会对目前 Pax3 在成熟神经细胞系中的研究起到补充作用,而目前发现对于 Pax3 可能存在调控 Neuro-2a 细胞周期和干细胞多能

性的具体机制有待日后深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Yao Xiao, Remko Offringa. PDK1 Regulates Auxin Transport and Arabidopsis Vascular Development Through AGC1 Kinase PAX[J]. Nat Plants, 2020, 6(5): 544-555
- [2] Yu-Chieh David Chen, Scarlet Jinhong Park, William W Ja, et al. Using Pox-Neuro (Poxn) Mutants in Drosophila Gustation Research: A Double-Edged Sword[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 382
- [3] Mohammed Hasen, Alwyn Gomez, Logan Froese, et al. Alternative Continuous Intracranial Pressure-Derived Cerebrovascular Reactivity Metrics in Traumatic Brain Injury: A Scoping Overview [J]. Acta Neurochir (Wien), 2020, 162(7): 1647-1662
- [4] Ann M Laszczyk, Atsuko Y Higashi, Sanjeevkumar R Patel, et al. Pax2 and Pax8 Proteins Regulate Urea Transporters and Aquaporins to Control Urine Concentration in the Adult Kidney [J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(6): 1212-1225
- [5] S H Smith, K Stevenson, J Del-Pozo, et al. Atypical Histiocytosis in Red Squirrels (Sciurus Vulgaris)[J]. J Comp Pathol, 2017, 156(4): 446-450
- [6] Ying Wang, Junqing Yuan, Jihong Wang, et al. Mixed Epithelial and Stromal Tumor of the Kidney: Report of a Rare Case and Review of Literature[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11772-11775
- [7] Edward Grimley, Gregory R Dressler. Are Pax Proteins Potential Therapeutic Targets in Kidney Disease and Cancer?[J]. Kidney Int, 2018, 94(2): 259-267
- [8] Alejandro Martin-Montalvo, Petra I Lorenzo, Livia López-Noriega, et al. Targeting Pancreatic Expressed PAX Genes for the Treatment of Diabetes Mellitus and Pancreatic Neuroendocrine Tumors [J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(1): 77-89
- [9] Sandra Navet, Auxane Buresi, Sébastien Baratte, et al. The Pax Gene Family: Highlights From Cephalopods [J]. PLoS One, 2017, 12(3):

- e0172719
- [10] Chris Gard, Gloria Gonzalez Curto, Youcef El-Mokhtar Frarma, et al. Pax3- And Pax7-mediated Dbx1 Regulation Orchestrates the Patterning of Intermediate Spinal Interneurons [J]. *Dev Biol*, 2017, 432(1): 24-33
- [11] Masashi Naito, Masaki Mori, Masayo Inagawa, et al. Dnmt3a Regulates Proliferation of Muscle Satellite Cells via p57Kip2 [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(7): e1006167
- [12] Tetsuo Ohnishi, Ikuo Miura, Hisako Ohba, et al. A Spontaneous and Novel Pax3 Mutant Mouse That Models Waardenburg Syndrome and Neural Tube Defects[J]. *Gene*, 2017, 607: 16-22
- [13] Mark D Zarella, Douglas Bowman, Famke Aeffner, et al. A Practical Guide to Whole Slide Imaging: A White Paper From the Digital Pathology Association [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2019, 143 (2): 222-234
- [14] Jason A Hanna, Matthew R Garcia, Alicia Lardennois, et al. PAX3-FOXO1 Drives miR-486-5p and Represses miR-221 Contributing to Pathogenesis of Alveolar Rhabdomyosarcoma [J]. *Oncogene*, 2018, 37(15): 1991-2007
- [15] 孙林琳,杨松林,王晔,等.miR-139 在 Aβ25-35 诱导 Neuro-2a 细胞损伤中的机制研究[J].*中风与神经疾病杂志*, 2019, 36(1): 53-57
- [16] 谢祥军,吴菲菲,王圣明,等.京尼平通过线粒体动力学缓解氧化应激诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡 [J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(3): 320-326
- [17] Hiromi Aoi, Ming Lei, Takeshi Mizuguchi, et al. Nonsense Variants in STAG2 Result in Distinct Sex-Dependent Phenotypes [J]. *J Hum Genet*, 2019, 64(5): 487-492
- [18] 徐娟,吴诚龙,唐爱发.基质抗原 2 在肿瘤中的研究进展[J].*中国现代医学杂志*, 2018, 28(9): 60-64
- [19] Alana Lelo, Frederik Prip, Brent T Harris, et al. STAG2 Is a Biomarker for Prediction of Recurrence and Progression in Papillary Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24 (17): 4145-4153
- [20] Gourish Mondal, Meredith Stevers, Benjamin Goode, et al. A Requirement for STAG2 in Replication Fork Progression Creates a Targetable Synthetic Lethality in Cohesin-Mutant Cancers [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1686
- [21] Balázs Györfi, Lőrinc Pongor, Giulia Bottai, et al. An Integrative Bioinformatics Approach Reveals Coding and Non-Coding Gene Variants Associated With Gene Expression Profiles and Outcome in Breast Cancer Molecular Subtypes [J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(8): 1107-1114
- [22] 冀宏,底旺,李清怀.微小 RNA-1243 直接靶向丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 1 和丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 2 调节甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞迁移[J].*中华实验外科杂志*, 2018, 35(11): 2048-2050
- [23] Claire Marceaux, Dominique Petit, Jacques Bertoglio, et al. Phosphorylation of ARHGAP19 by CDK1 and ROCK Regulates Its Subcellular Localization and Function During Mitosis[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131 (5): jcs208397
- [24] 张立杰,李晓玉,蒲仕明,等.造血干细胞静息的分子调节研究进展 [J].*山东医药*, 2018, 58(34): 104-106
- [25] Jing Ma, Ken Lin, Hong-Chao Jiang, et al. A Novel Mutation of the PAX3 Gene in a Chinese Family With Waardenburg Syndrome Type I[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(7): e00798
- [26] Nurit Yanay, Moran Elbaz 3, Jenya Konikov-Rozenman, et al. Pax7, Pax3 and Mamstr Genes Are Involved in Skeletal Muscle Impaired Regeneration of dy2J/dy2J Mouse Model of Lama2-CMD [J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(20): 3369-3390
- [27] Fang Biao Zhan, Xian Wei Zhang, Shi Long Feng, et al. MicroRNA-206 Reduces Osteosarcoma Cell Malignancy In Vitro by Targeting the PAX3-MET Axis[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(2): 163-173
- [28] 张伟,何薇,赵丁丁,等. D609 对 Neuro-2a 脑神经瘤细胞增殖和细胞周期的影响[J].*现代生物医学进展*, 2016, 16(8): 1447-1449, 1419
- [29] Sylwia Kedziora, Vamsi K Gali, Rosemary HC Wilson, et al. Rif1 acts through Protein Phosphatase 1 but independent of replication timing to suppress telomere extension in budding yeast [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(8): 3993-4003
- [30] P Li, X Ma, I R Adams, et al. A Tight Control of Rif1 by Oct4 and Smad3 Is Critical for Mouse Embryonic Stem Cell Stability [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(1): e1588

(上接第 3231 页)

- [26] 陈松, 储智勇, 汪家春. Bcl-2 家族与肝再生 [J]. *肝脏*, 2013, 18(3): 197-199
- [27] Zhou C, Qian L, Ma H, et al. Enhancement of amygdalin activated with β-D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 516-523
- [28] 柳松, 王晓倩, 廖广辉, 等. 苦杏仁苷抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(7): 99-101
- [29] Makarević J, Tsaur I, Juengel E, et al. Amygdalin delays cell cycle progression and blocks growth of prostate cancer cells in vitro[J]. *Life Sci*, 2016, 147: 137-142
- [30] Cassim W, de Kock M. The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells in vitro [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 32