

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201402003

· 论著 ·

反义角蛋白13慢病毒质粒对鼻咽癌 细胞放射敏感性的影响

刘曼^{1,2}, 余林远³, 高雪¹, 施明¹, 王欢¹, 余宏¹

(1. 云南省第二人民医院耳鼻咽喉科, 云南昆明 650000; 2. 昆明医科大学, 云南昆明 650000; 3. 华中科技大学同济医学院第二临床学院, 湖北武汉 430000)

摘要: 目的 探讨反义角蛋白13(Keratin-13, KRT13)慢病毒质粒对鼻咽癌 HNE-1 细胞放射敏感性的影响。方法 构建稳定表达反义 KRT13 基因的慢病毒质粒, 并通过 G418 筛选出稳定转染该质粒的鼻咽癌 HNE-1 细胞。按数字随机法将细胞分为 control(正常 HNE-1 细胞)组、lentivirus(转染慢病毒空载体)组和 anti-KRT13(转染慢病毒质粒组)。并分别检测各组细胞中 KPT13 含量。同时采用流式细胞术检测细胞周期和凋亡的变化。在 0、1、2、4、6、8 Gy 6 个放射剂量点下, 采用克隆形成实验分析转染反义 KRT13 基因对细胞的存活影响, 并分别用单击多靶模型和线性二次模型拟合出细胞的剂量存活曲线, 对比放射生物学参数 D₀、D_q、N 值、 α 、 β 和 SF2 值, 评价细胞放射敏感性的变化。结果 转染慢病毒质粒组的 HNE-1 细胞 D₀、D_q、N 和 SF2 值较其他两组均增加, α / β 值减小, 且差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05); 反义 KRT13 可以阻滞细胞于 G₂/M 期, 同时抑制细胞凋亡。结论 反义 KRT13 慢病毒质粒可降低鼻咽癌 HNE-1 的放疗敏感性。

关键词: 角蛋白13; 反义慢病毒; 鼻咽癌 HNE-1 细胞; 放射敏感性

中图分类号: R739.63; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2014)02-0101-06

Effect of antisense KRT13 lentivirus plasmid on the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells

LIU Man, YU Lin-yuan, GAO Xue, SHI Ming, WANG Huan, YU Hong

(Department of Otolaryngology, the Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, 650000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of antisense KRT13 lentivirus plasmid on the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells (HNE-1). **Methods** The lentivirus package system carrying antisense RNA of KRT13 was constructed, and stable expressed antisense KRT13 HNE-1 cell line was screened by G418. The cells were randomly divided into three groups: control, lentivirus and anti-KRT13 group, and to detect the content of KRT13 in each group. Cells were exposed to radiation of various dosage (0, 1, 2, 4, 6 and 8 Gy), and then the clonogenic survival and curve fitting were used for calculating the radiobiological parameters and the sensitization enhancement ratio after radiation. The apoptosis and cell cycle changes were analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with the control cells and negative cells, anti-KRT13 cells showed obviously high values of D₀, D_q, N, and SF2 but significantly decreased α / β value and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Anti-KRT13 could block HNE-1 cells in G₂/M phase and inhibit the apoptosis. **Conclusion** Antisense KRT13 lentivirus plasmid can reduce the radiosensitivity of HNE-1 cells in vitro.

Key words: Keratin 13; Lentivirus; Antisense; Nasopharyngeal neoplasm; Radiosensitivity

鼻咽癌(NPC)是一种恶性上皮肿瘤,具有显著的地域性和种族性。在我国广东省,鼻咽癌的发病率居于世界首位,每年平均10万人中就有30~80例患病^[1]。目前多采用放射性治疗鼻咽癌,但癌细胞的辐射抗性可导致治疗失

基金项目: 云南省科技厅昆明医科大联合专项资金资助(2012FB084)。

作者简介: 刘曼,女,硕士研究生。

通信作者: 余宏, Email: 1791593276@qq.com

败,肿瘤局部失控或复发^[2]。因此,如何逆转肿瘤的辐射抗性是鼻咽癌治疗所面临的新问题。

细胞角蛋白(Cytokeratins)因在组织发生恶变后会出现差异性表达,被广泛应用于肿瘤的诊断^[3]。其中,角蛋白13(Keratin-13, KRT13)已经在各种癌症中发现^[4-7],同时有研究认为它与细胞的放射敏感性有关^[8-9]。本研究首次构建反义KRT13慢病毒质粒,筛选出稳定转染该慢病毒的鼻咽癌细胞株 anti-KRT13-HNE-1,并进一步探讨反义KRT13质粒对鼻咽癌细胞株放射敏感性的影响,为鼻咽癌新的基因-放射联合治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人鼻咽癌高分化鳞癌细胞株 HNE-1 由湘雅医学院肿瘤中心提供。pLV-EGFP 慢病毒载体及包装系统购自北京英茂盛业生物科技有限公司。pUC57-KRT13 由本科室构建。G418 和 PI 购自美国 Sigma 公司。Trizol 购自 Invitrogen 公司。cDNA 第一链合成试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒均购自北京天根生化公司。KRT13 和 β -actin 小鼠一抗、HRP 标记羊抗小鼠二抗均购自美国 Santa Cruz 公司。RIPA 裂解液、ECL 化学发光试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒均购自碧云天公司。

1.2 细胞培养

人鼻咽癌高分化鳞癌细胞株 HNE-1 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

1.3 质粒构建

反义 KRT13 设计的带有酶切位点引物,上游:(BamHI) GGATCCGCACCTGCTCTCAAT,下游:(ApII) GGGCCCAACCCCAACCAAGCCA,采用 PCR 法从已有的质粒模板 pUC57-KRT13 中扩增出所要的片段,随后用 BamHI 和 ApII 双酶切并回收,用 T4 连接酶与 pLV-EGFP 慢病毒质粒反向连接过夜得到连接产物。根据 pLV-EGFP 慢病毒包装系统说明书进行操作。

1.4 细胞感染及筛选稳定表达反义 KRT13 细胞系

PBS 稀释上清,并依照文献^[10]测定病毒滴度。将病毒依照滴度测定的量感染 HNE-1 细

胞 3 次,并定期在荧光显微镜下观察,当细胞均出现绿色荧光后即得到稳定的细胞株用于后续实验。

1.5 各组细胞中 KRT13 的检测

按数字随机法将细胞分为 control (正常 HEN-1 细胞)组、lentivirus (转染慢病毒空载体)组和 anti-KRT13 (转染慢病毒质粒组),以 Trizol 法提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,取 2 μ l mRNA 使用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链,按照荧光定量试剂盒说明对各组细胞的 cDNA 进行相对定量检测。扩增条件:变性 95℃ 2 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s (35 个循环);溶解曲线阶段依照仪器说明设定。结果采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 方法进行 mRNA 表达差异分析。

收集各组对数生长期细胞,RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法进行定量检测。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入小鼠一抗后 4℃ 过夜孵育,TBST 洗膜 3 次(5 min/次),加入稀释的 HRP 标记羊抗小鼠二抗,室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次(5 min/次)后,进行化学发光检测。 β -actin 作为内参进行进一步处理。

1.6 细胞辐射

选取指数生长期细胞,经 0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液,计数细胞浓度,按预定数量接种于 6 孔板中,置于培养箱中孵育 12 h 后,采用 Varian 2300 EX 直线加速器 6MV-X 线照射,剂量率 400 cGy/min,垂直辐射细胞,细胞上面覆盖 1 cm 有机玻璃填充物帮助剂量建成,固定源皮距 SSD 100 cm,照射野面积 10 cm \times 10 cm。

1.7 细胞周期实验

指数生长期细胞经 2 Gy 照射 24 h 后进行收集,加入 70% 冰乙醇中 4℃ 过夜,PBS 洗涤 3 遍后,避光将细胞加入到含有 50 μ g/ml 的 RNA 酶和 50 μ l/ml PI 染色液中,室温孵育 30 min 后,流式细胞仪检测细胞周期各时相所占比例。

1.8 细胞凋亡检测

指数生长期细胞经 2 Gy 照射 24 h 后,胰酶消化并用 PBS 洗涤 3 遍,重悬细胞离心后弃上清,加入 190 μ l Annexin V-FITC 溶液轻轻重

悬细胞,室温孵育 10 min 后,再加入 5 μ l 碘化丙丁(PI)染色液,轻轻混匀。冰浴避光放置。随即进行流式细胞术检测。

1.9 克隆形成实验

3 组细胞按预定数量接种于 6 孔板中,每组均设 0、1、2、4、6、8 Gy 6 个剂量组,每一剂量组 3 个复孔。照射后的细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养。当出现肉眼可见克隆时,终止培养,2 ml 甲醇固定 15 min,4% 吉姆萨溶液染色 10 ~ 30 min,去染色液,自然干燥。显微镜下计数含 50 个细胞以上的克隆数,计算克隆形成率(planting efficiency, PE, 克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 \times 100%)和存活分数(surviving fraction, SF, 存活分数 = 受照射细胞的克隆形成率/对照细胞的克隆形成率 \times 100%)。以 3 次照射的存活分数均值进行分析,运用 GraphPad Prism 6.0 软件进行多靶单击模型和线性二次模型曲线拟合,绘制剂量存活曲线,并计算多靶单击模型参数 D0、Dq、和 N 和线性二次模型参数 α 、 β 、 α/β 、SF2 (survival fraction at 2 Gy)。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)或独立样本的 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒构建、感染及稳筛细胞系的建立

构建含有 KRT13 反义序列的慢病毒质粒经测序比对确认正确后,共转染 293FT 细胞得到含有慢病毒的上清液,测定滴度后感染 HNE-1 细胞,经过 G418 筛选后得到稳筛细胞系。

2.2 反义 KRT13 鼻咽癌细胞株的鉴定

RT-qPCR 检测 3 组细胞中 KRT13 的 mRNA 表达水平,结果(图 1A)显示:与正常细胞组相比,空载体组为正常细胞组的 1.011,无明显差异($P > 0.05$);质粒组为正常细胞组的 0.284,表达明显降低($P < 0.001$)。Western blot 的检测结果从蛋白水平上确证了这一结果(图 1B)。

2.3 细胞周期和凋亡检测

流式细胞仪分析结果表明(图 2、3),照射前正常细胞组、空载体组、质粒组的细胞周期

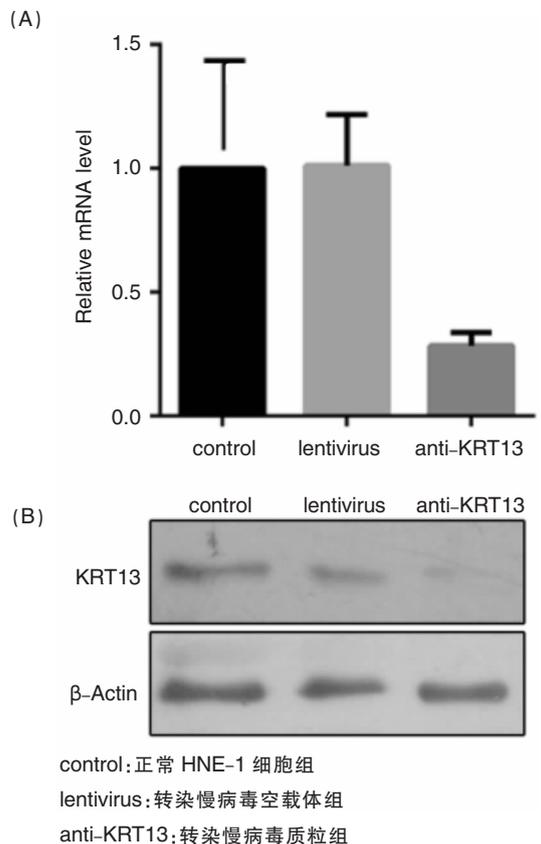


图 1 反义 KRT13 慢病毒质粒对 HNE-1 细胞内 KRT13 表达量的影响 A: Realtime PCR 检测各组细胞中 KRT13 的 mRNA 表达情况; B: Western blot 检测各组细胞 KRT13 蛋白表达情况

中, G0/G1 以及 S 期均无显著性差异, 但 G2/M 期细胞比例略有差别, 分别为 (10.67 \pm 0.91)%、(10.74 \pm 0.24)% 和 (13.04 \pm 0.80)% ($P = 0.123$)。照射 2 Gy 24 h 后, G2 期细胞比例均显著升高, 分别为 (29.42 \pm 1.75)%、(28.74 \pm 1.07)% 和 (39.20 \pm 1.40)%, 3 组细胞均出现 G2/M 期阻滞, 且质粒组更为明显, 与其他组相比差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05), 说明 KRT13 沉默后显著增加了辐射引起的细胞 G2 期阻滞。此外, 细胞凋亡分析结果表明, 2 Gy 照射 24 h 后, 质粒组细胞凋亡率 (8.74 \pm 0.80)% 较正常细胞组 (21.45 \pm 0.49)% 及空载体组 (21.46 \pm 0.64)% 的细胞凋亡率下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

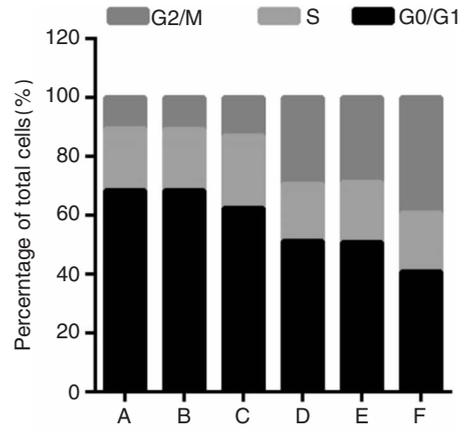
2.4 KRT13 沉默后降低鼻咽癌 HNE-1 细胞体外放疗敏感性

3 组细胞经过 X 射线照射后, 依据各剂量组克隆数计算出克隆形成率和存活分数(图 4), 并应用 GraphPad Prism 6.0 软件进行曲

线拟合,绘制出存活曲线(图 5、6),求出多靶单击模型及线性二次模型各放射生物学参数,并统计分析(表 1)。

图 4 结果表明,转染反义 CK13 组的克隆形成数和形成率明显大于空载体组和正常细胞组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 5、6 结果表明,X 线照射后,正常细胞组和空载体组的各组放射生物学参数均相似,说明两组细胞的放射敏感性无显著性变化。而在相同放射剂量下,与空载体组和正常细胞组相比,转染反义 CK13 基因后的细胞存活分数升高,可以看出,转染反义 CK13 基因后,D0、Dq、SF2 均增加, α 值、 α/β 均减小。说明 CK13 基因的沉默减低了 HNE1 细胞的放射敏感性(表 1)。



A: control; B: lentivirus; C: anti-KRT13; D: control-24h; E: lentivirus-24h; F: anti-KRT13-24h

图 2 流式细胞仪检测 3 组细胞照射前后细胞周期的变化

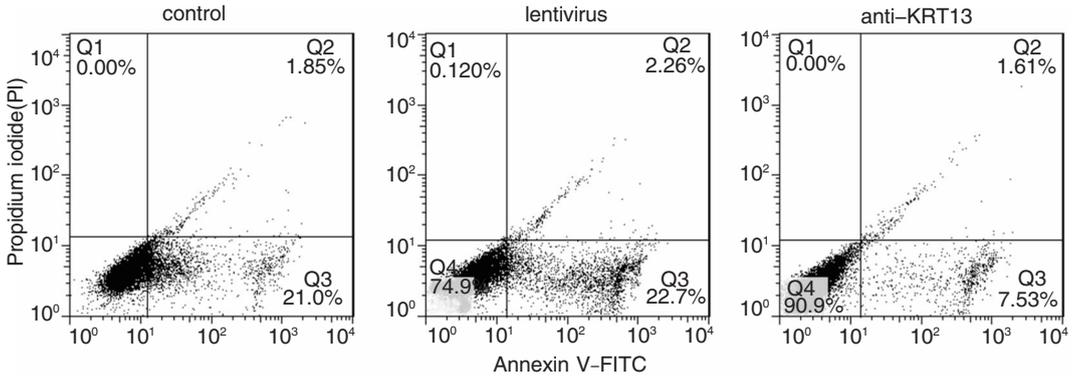


图 3 反义 KRT13 对 HNE-1 细胞凋亡的影响 (2 Gy, 24 h)

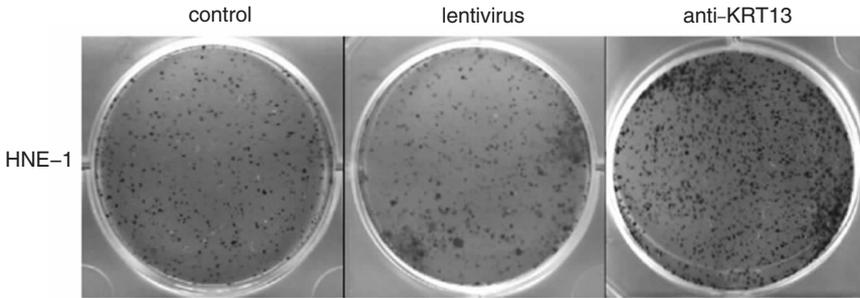


图 4 克隆形成实验

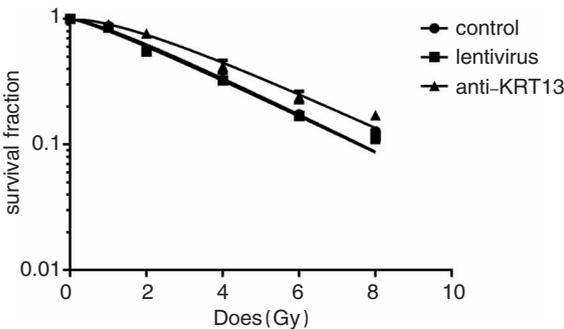


图 5 不同 HNE-1 细胞的存活曲线(单击多靶模型)

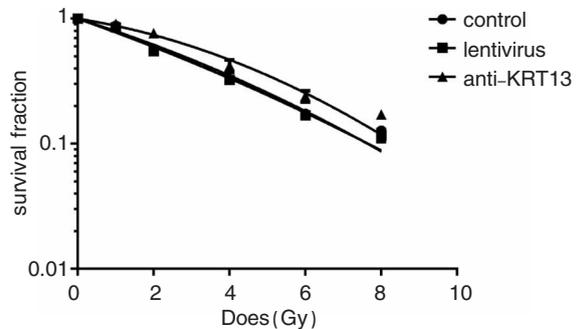


图 6 不同 HNE-1 细胞的存活曲线(线性二次模型)

表 1 鼻咽癌细胞株 HNE-1 各组的放射生物学参数比较

分组	单击多靶模型			线性二次模型			SF2
	D0	N	Dq	α	β	α/β	
control	2.890	1.416	0.437	0.218	0.011	20.018	0.626
lentivirus	2.976	1.286	0.325	0.245	0.0075	34.008	0.601
anti-KRT13	3.097	1.851	0.828	0.111	0.020	5.684	0.747

3 讨论

KRT13 基因是非角化复层鳞状上皮细胞分化的标志, KRT13 与 KRT4 结合在一起, 形成绝大多数腔内复层鳞状上皮的主要角蛋白网^[11], 通常 KRT13 基因只表达在非角化复层鳞状上皮的浅层, 如鼻咽、舌、食管及泌尿系统上皮等^[12-13], 但这些部位的肿瘤 KRT13 基因多表达异常, 邱元正等^[14]采用免疫组化及 Northern-blot 方法检查发现, 鼻咽癌中 KRT13 表达下调; 王亚利等^[15]采用芯片分析发现鼻咽癌 CNE-2 细胞骨架相关蛋白中, KRT13 基因表达下调, 他们认为放射线改变了细胞形态, 影响细胞的信息传递, 改变肿瘤细胞的稳定性, 从而改变了细胞的放射敏感性。这提示我们在分子靶向治疗尚无法完全取代放化疗等经典治疗方法之时, 充分利用这种协同和增敏作用, 实现提高放疗疗效与减少副作用, 将更具临床应用意义。

目前, 鼻咽癌公认和有效的治疗方法为放射治疗或以放疗为主的综合治疗。尽管很多研究表明反义寡核苷酸和 RNAi 干扰对鼻咽癌细胞放射敏感性具有一定影响, 但是由于其在体内运送过程中易被降解限制了二者的应用。反义核酸作为基因治疗药物, 具有高度特异性、高效性、低毒安全等优点, 是一种优化的药物设计。采用慢病毒作为载体可感染非分裂期细胞, 实现细胞的稳定表达, 可容纳复杂 DNA, 是相对理想的基因治疗载体^[16]。

本研究首次尝试以 KRT13 基因中合理的反义序列为对象, 成功构建慢病毒载体, 将 KRT13 的反义 RNA 导入鼻咽癌 HNE-1 细胞中, 通过 G418 筛选出稳定表达反义 KRT13 片段的鼻咽癌 HNE-1 细胞。RT-PCR 和 Western blot 检测结果也证实了该细胞中 KRT13 的表达明显下调。我们进一步采用克隆形成实验及曲线拟合分析了反义 KRT13 鼻咽癌 HNE-1 细

胞的放射敏感性。D0 值愈大, 细胞对放射愈抗拒; Dq 反映亚致死性损伤修复能力的大小, Dq 值小则修复能力弱; α 值决定低剂量照射下损伤的程度, α 值越大, 说明细胞对辐射越敏感, β 值的贡献随照射剂量增大而增大, 组织的 α/β 值高, 对损伤修复能力弱^[17]。研究结果显示, 与正常细胞组和转染空载体组相比, 转染质粒组的 SF2 值明显增加, 放射增敏比为 1.4014, D0、Dq 值均明显偏高, P 值分别为 0.002 和 0.003, α/β 值显著降低, 说明 KRT13 沉默后细胞对放射损伤的修复能力增强, 反而降低了 HNE-1 细胞的放射敏感性。这从另一个方向证明了 KRT13 的调控可以影响鼻咽癌细胞的放射敏感性。

为进一步研究 KRT13 影响放疗敏感性的可能机制, 我们采用流式细胞仪对照射前后的细胞周期和细胞凋亡变化进行了检测。本研究结果显示 HNE-1 细胞在辐射 24 h 后均出现 G2/M 期阻滞, 但转染质粒组 G2/M 期较正常细胞组显著升高。辐射可以引起肿瘤细胞 DNA 的损伤, 常常导致细胞阻滞在 G1 期或 G2 期进行修复, 以防止细胞进入下一个周期复制受损的 DNA 或进行异常分裂^[18]。

尽管很多研究表明角蛋白的特异性表达是一些癌症的标志, 但是角蛋白如何影响肿瘤的发生尚不明确。有报道表明角蛋白在癌症中的异常表达常与 AKT/mTOR 有关, 此通路本身常在浸润性肿瘤中被激活, 提高了部分角蛋白介导的 AKT 在上皮肿瘤发生中有重要作用的可能性^[19-20]。角蛋白还与 PKC 有相互作用, 最近的研究表明, 一些角蛋白的分化特异性可能涉及到了 PKC/AP-1 信号通路^[21]。此外, 降低 NOTCH1 的表达也会调控 KRT13 的表达下调^[22]。这些都表明了角蛋白在细胞中作为分子伴侣的支架重要作用^[23]。

本研究结果说明 KRT13 可能是一个鼻咽癌放射敏感性相关的调控因子, 转染反义 KRT13 慢病毒降低了鼻咽癌细胞株 HNE-1 的

辐射敏感性。这从另一个侧面为鼻咽癌新的基因-放射联合治疗提供了理论基础。下一步我们将在动物模型验证反义 KRT13 的鼻咽癌 HNE-1 细胞株对辐射敏感性的影响,同时对 KRT13 的作用分子机理进行深入研究,希望能为临床应用及靶向治疗带来新的思路。

参考文献:

- [1] Tabyaoui I, Serhier Z, Sahraoui S, et al. Immunohistochemical expression of latent membrane protein 1 (LMP1) and p53 in nasopharyngeal carcinoma: Moroccan experience [J]. *Afr Health Sci*, 2013, 13(3): 710-717.
- [2] 蒋昌斌,刘秀芳,贺玉香,等. DNA-PKcs 反义寡核苷酸对不同 p53 功能状态的鼻咽癌细胞株辐射抗性的影响[J]. *癌症*, 2008, 27(2): 139-143.
- [3] 初培国. 细胞角蛋白染色在肿瘤诊断中的应用[J]. *中华病理学杂志*, 2004, 33(3): 273-276.
- [4] Hudson LG, Gale JM, Padilla RS, et al. Microarray analysis of cutaneous squamous cell carcinomas reveals enhanced expression of epidermal differentiation complex genes [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(7): 619-629.
- [5] Mikami TJ, Cheng J, Maruyama S, et al. Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ [J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(6): 497-503.
- [6] Negishi A, Masuda M, Ono M, et al. Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(9): 1605-1611.
- [7] Sakamoto K, Aragaki T, Morita K, et al. Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis [J]. *Histopathology*, 2011, 58(4): 531-542.
- [8] 邱元正,肖健云,田勇泉,等. 维甲酸诱导后 CK13 基因在鼻咽癌中的表达研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2003, 9(5): 290-292.
- [9] 陈丹月,余宏,吴永寿,等. 细胞角蛋白 13 基因联合放疗对人鼻咽癌细胞株的作用[J]. *云南医药*, 2012, 33(5): 422-424.
- [10] 陈小艳,张弓,刘芳,等. LMP1 基因重组慢病毒载体的构建及体外表达[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(5): 837-840.
- [11] Malecha MJ, Miettinen M. Expression of keratin 13 in human epithelial neoplasms [J]. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1991, 418(3): 249-254.
- [12] Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells [J]. *Cell*, 1982, 31(1): 11-24.
- [13] Endres M, Leinhase I, Kaps C, et al. Changes in the gene expression pattern of cytokeratins in human respiratory epithelial cells during culture [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2005, 262(5): 390-396.
- [14] 邱元正,田勇泉. 细胞角蛋白基因 13 在鼻咽癌中的作用研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1999, 21(6): 444-446.
- [15] 王亚利,王西京,王中卫,等. 放射抗拒性鼻咽癌细胞系的建立及差异表达基因[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2009, 30(6): 741-745.
- [16] 李川,金源,来森艳,等. 反义 p55PIK 慢病毒载体的构建及其对甲状腺癌细胞 FTC236 增殖的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(6): 790-794.
- [17] 沈瑜,糜福顺. 肿瘤放射生物学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002: 64-65.
- [18] 何金年,姚东方,李杰恩. 莜术醇对人鼻咽癌细胞 CNE2 增殖、凋亡及周期的影响[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2011, 17(3): 171-174.
- [19] 任舒灵,刘勇,李果,等. EphA2 蛋白调控鼻咽癌紫杉醇敏感性的实验研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2013, 19(1): 28-31, 37.
- [20] Fortier AM, Van Themsche C, Asselin E, et al. Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(5): 984-988.
- [21] Bose A, The MT, Hutchison IL, et al. Two mechanisms regulate keratin K15 expression in keratinocytes: role of PKC/AP-1 and FOXM1 mediated signalling [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38599.
- [22] Sakamoto K, Fujii T, Kawachi H, et al. Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms [J]. *Lab Invest*, 2012, 92(5): 688-702.
- [23] Toivola D, Strnad P, Habtezion A, et al. Intermediate filaments take the heat as stress proteins [J]. *Trends in cell biology*, 2010, 20(2): 79-91.

(修回日期:2014-03-12)