

# 核定位 CBF $\beta$ 基因重组腺相关病毒载体的构建与鉴定

关天富 段 莉 王大平

**摘要** **目的** 构建携带核定位信号的核结合因子(nuclear location signal core binding factor beta, NLS - CBF $\beta$ )的重组腺相关病毒载体,从而实现体外诱导关节液间充质干细胞成软骨分化。**方法** 使用分子生物学方法将腺相关病毒载体与 NLS - CBF $\beta$  基因相结合,构建 pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP 表达质粒;采用 PEI 转染法将 pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP 表达质粒和 pAAV - RC、pAAV - Helper 质粒共转染至 AAV - 293 细胞中,包装并生产携带 CBF $\beta$  的重组腺相关病毒 rAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP,进一步将病毒感染人关节液来源间充质干细胞,实时荧光定量聚合酶链反应(real - time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT - PCR)检测 CBF $\beta$  基因在细胞内的表达水平。**结果** 双酶切及 DNA 测序证明 NLS - CBF $\beta$  已成功构建到 pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP 表达质粒中,AAV - 293 细胞表达红色荧光蛋白提示共转染成功,包装的重组腺相关病毒 rAAV - CBF $\beta$  - RFP 感染人关节液间充质干细胞后,能显著增加细胞中 CBF $\beta$  基因的表达水平。**结论** 携带 NLS - CBF $\beta$  重组腺相关病毒的包装成功,并能在人关节液间充质干细胞中有效转染和表达,为进一步探索 rAAV - NLS - CBF $\beta$  诱导间充质干细胞成软骨分化的研究提供了实验基础。

**关键词** 核定位信号 核结合因子 腺相关病毒 软骨分化 间充质干细胞

**中图分类号** R684 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.04.008

**Construction and Identification of Nuclear Localization CBF $\beta$  Gene Recombinant Adeno - associated Virus Vector.** GUAN Tianfu, DUAN Li, WANG Daping. Shantou University Medical College, Guangdong 515031, China

**Abstract** **Objective** To construct the recombinant adeno - associated virus (rAAV) vector which carrying nuclear location signal core binding factor beta (NLS - CBF $\beta$ ), and induce chondrogenic differentiation of articular fluid mesenchymal stem cells in vitro. **Methods** pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP expression plasmid was constructed by combining adeno - associated virus vector with NLS - CBF $\beta$  gene using molecular biology method. pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP expression plasmid, pAAV - RC and pAAV - Helper plasmid were co - transfected into the AAV - 293 cells by PEI transfection method, recombinant adeno - associated virus rAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP carrying CBF $\beta$  was packed and produced, the virus was further infected with human synovial fluid mesenchymal stem cells, the expression level of CBF $\beta$  gene in the cells were detected by real - time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT - PCR). **Results** pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP expression plasmid expression plasmid was successfully constructed and was verified by double digestion and DNA sequencing, and the expression of red fluorescent protein in AAV - 293 cells indicated that co - transfection was successful. After the recombinant adeno - associated virus rAAV - CBF $\beta$  - RFP was infected with human joint fluid mesenchymal stem cells, it can significantly increase the expression level of CBF $\beta$  gene in cells. **Conclusion** The recombinant adeno - associated virus carrying NLS - CBF $\beta$  was successfully packaged and effectively transfected and expressed in human joint fluid mesenchymal stem cells, which provided an experimental basis for further research on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by rAAV - NLS - CBF $\beta$ .

**Key words** Nuclear location signal; CBF $\beta$ ; Adeno - associated virus; Chondrogenic differentiation; Mesenchymal stem cells

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的退行性疾病,其病理特点为关节软骨退变、破坏,软骨下骨硬

化及骨赘形成,目前尚缺乏有效的治疗手段<sup>[1]</sup>。软骨细胞移植目前作用于软骨损伤修复及软骨组织工程研究,被认为是治疗骨关节炎的可行方法,但其增殖、分化能力差,而间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有优异的多分化潜能,其软骨分化潜能可在软骨损伤、骨关节炎修复等方面发挥重要作用,可作为软骨修复的种子细胞<sup>[2]</sup>。

kartogenin (KGN)是近年来发现的一种低分子化合物,可促进间充质干细胞成软骨分化,核结合因子

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81972116,81772394);深圳市科技计划项目(GJHZ20200731095606019,SGDX20201103095800003)

作者单位:515031 汕头大学医学院(关天富);518035 深圳市第二人民医院、深圳大学第一附属医院、广东省人工智能与数字骨科技术研究中心骨科(段莉、王大平)

通信作者:段莉,电子信箱:duanl@szu.edu.cn;王大平,电子信箱:wangdp@mail.sustech.edu.cn

CBF $\beta$  (core binding factor -  $\beta$ ) 是低分子化合物 KGN 促 MSCs 成软骨分化的下游通路中的关键因子<sup>[3]</sup>。当 KGN 分子进入细胞质内, 通过与其配体丝蛋白 A (filamin A, FLNA) 结合, 该蛋白除了可作为 KGN 结合的配体外, 还与 CBF $\beta$  结合。而 FLNA 通常与 CBF $\beta$  结合形成复合体存在胞质当中, 当 CBF $\beta$  与 FLNA 分离后, 进入细胞核与 DNA 转录因子 RUNX1 结合形成二聚体, 激活下游通路<sup>[4]</sup>, 由此可见, CBF $\beta$  的入核可能是 KGN 发挥作用的重要一环。最早的核定位信号序列在 1984 年于 SV40 病毒大 T 抗原上发现, 研究认为, 大多数蛋白进入细胞核需要核定位信号的参与<sup>[5]</sup>。因此, 构建核定位 CBF $\beta$  表达载体, 能进一步探讨核定位 CBF $\beta$  对 MSCs 成软骨分化的作用。

腺相关病毒 (adeno associated virus, AAV) 由于其广泛的组织嗜性和低免疫原性, 被应用于临床实验, 目前为止已经有两种基于 AAV 的疗法在欧美国家获得了监管部门的批准<sup>[6]</sup>。而本研究应用分子生物学方法构建 pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP 表达质粒, 通过 PEI 转染法将该质粒和 pAAV - RC、pAAV - Helper 共转染至 AAV - 293 细胞中, 包装生成重组腺相关病毒 rAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP, 为进一步的基因疗法提供实验基础。

### 资料与方法

1. 一般资料: 细胞 AAV 包装质粒 pAAV - MCS (山东维真生物科技有限公司)。感受态细菌 ST-BL3、AAV - 293 细胞系及两种腺相关病毒包装质粒 pHelper、pAAV - RC 由本实验室保存。DMEM (美国 Gibco 公司) 培养液, 胎牛血清 (上海凯茂生物医药有限公司), EcoR I 和 Hind III 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶 (广州瑞真生物技术有限公司), 质粒抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司), DNA 测序 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。转染试剂 PEI Poly-sciences 配成储存液 (2mg/ml)。胶回收试剂盒 (德国 Qiagen 公司)。

2. 目的基因的获取: CBF $\beta$  的序列, 设计合成引物: NLS - CBF $\beta$  - RFP 上游引物: 5' - CGGAATTCGCTAGCATGAAGAGGCCT - 3', 下游引物: 5' - CCCAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTC - 3'。该序列中包含 EcoR I (5' - G<sup>A</sup>AATTC - 3') 和 Hind III (5' - A<sup>A</sup>AGCTT - 3') 酶切位点。将合成的引物稀释成 10 $\mu$ mol/L, 分别取正向引物和反向引物各 15 $\mu$ l, 加入至 50 $\mu$ l 反应体系, 按照 PCR 试剂盒反应条件进行扩

增。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5min, (98 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min)  $\times$  30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 2min。Qiagen 试剂盒提纯回收产物。取回收产物琼脂糖凝胶电泳, 确认目的基因 NLS - CBF - RFP 片段扩增成功, 切胶后使用试剂盒回收。

3. 构建重组穿梭质粒载体<sup>[7]</sup>: 将腺病毒穿梭质粒 pAAV - MSC 和 PCR 扩增获得的含有 EcoR I 和 Hind III 酶切位点的片段分别用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 在 37 $^{\circ}$ C 进行双酶切 1h, 95 $^{\circ}$ C 灭活限制性内切酶, 取酶切产物用 T4 DNA 连接酶于 37 $^{\circ}$ C 连接 1h, 连接产物转化 STBL3 感受态细菌, 氨苄霉素筛选阳性克隆, 12 ~ 16h 后挑取克隆, 氨苄抗性的 LB 培养基摇菌, Qiagen 试剂盒提取质粒; 所提取的质粒用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 双酶切进行鉴定, DNA 测序验证, 证实重组穿梭质粒载体构建成功。

4. 质粒转染: 利用 AAV Helper Free System 包装系统, 将生长至 80% 密度的 AAV - 293 (1.0 ~ 1.5)  $\times$  10<sup>6</sup> 细胞传代至 10cm 培养皿, 在含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24h。当细胞融合度至约 80% 进行转染。将 pAAV - NLS - CBF $\beta$  - RFP (10 $\mu$ g)、pHelper (12 $\mu$ g) 及 pAAV - RC (8 $\mu$ g) 3 质粒共 30 $\mu$ g 加入 350 $\mu$ l DMEM, 再加入 30 $\mu$ l PEI 转染试剂, 震荡 10s, 短暂离心, 静置 15min, 共转染至 AAV - 293 细胞。显微镜下监测 AAV - 293 细胞形态变化及细胞毒性反应, 并于 48h 后, 荧光显微镜下观察并计算 AAV - 293 细胞中表达红色荧光蛋白的比例, 确定细胞的包装效率。

5. 病毒纯化: 转染 72h 后, 收获 AAV - 293 细胞以及培养上清液, 细胞悬液在干冰 - 乙醇浴和 37 $^{\circ}$ C 水浴交替下冻融 3 个循环。每个冻融时间为 10min。然后加入 1/10 体积的氯仿, 置于 37% 摇床中剧烈振荡至细胞完全溶解破裂, 加入固体氯化钠至终浓度 1mol/L, 室温下振荡溶解, 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 15min, 取出上层水相加固态 PEG 8000 至终浓度 10%, 振荡溶解后冰浴 1h, 4 $^{\circ}$ C 11000r/min 离心 15min, 移除上清液, 沉淀用适量 PBS 缓冲液洗脱离心管管底和管壁上的沉淀, 加 DNase 和 RNase 至终浓度 1 $\mu$ g/ml, 室温下消化 30min。再加等体积氯仿抽提, 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 5min, 无菌操作下小心吸出上层水相, 即为浓缩纯化的 rAAV - CBF $\beta$  - RFP 病毒液。

6. 人关节液 MSCs 的纯化与体外培养<sup>[8]</sup>: 经深圳市第二人民医院医学伦理学委员会批准, 关节液样本取自深圳市第二人民医院的捐赠者。关节液通过细

胞过滤器过滤(40 $\mu$ m 尼龙,美国 FALCON 公司),并在室温下以 1000  $\times$   $g$  离心 5min,弃去上清液,用完全培养基重悬沉淀(Gibco 培养基,添加 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素),然后在 T25 培养瓶中培养。5 天后,去除非贴壁细胞。培养基每隔 2 天更换 1 次,第 3 代细胞用于实验。

7. CBF $\beta$  表达水平检测:提取细胞的总 RNA,利用 RT-PCR 检测 CBF $\beta$  表达水平。按照试剂盒要求,提取细胞的总 RNA,并对 RNA 进行反转录,合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,用 CBF $\beta$  和 GAPDH 的特异性上游以及下游引物,分别对目的基因 CBF $\beta$  和内参基因 GAPDH 进行扩增,反应体系按照 SYBR II 荧光定量 PCR 试剂盒说明进行,用 CFX96 real-time 系统(Thermal Cycler,美国 Bio-Rad 公司)进行检测。采用相对定量法进行 CBF $\beta$  水平分析,CBF $\beta$  的表达水平用  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  表示,其中  $\Delta Cq = Cq(CBF\beta) - Cq(GAPDH)$ 。以无处理的 SF-MSCs 为空白对照组,感染 rAAV-U6 病毒的 SF-MSCs 为阴性对照组,以感染 rAAV-CBF-RFP 的 SF-MSCs 为实验组,设定 CBF $\beta$  表达水平基线为 0,比较 3 组表达水平。

8. 统计学方法:应用 GraphPad Prism8 统计学软件进行数据分析和制图,使用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

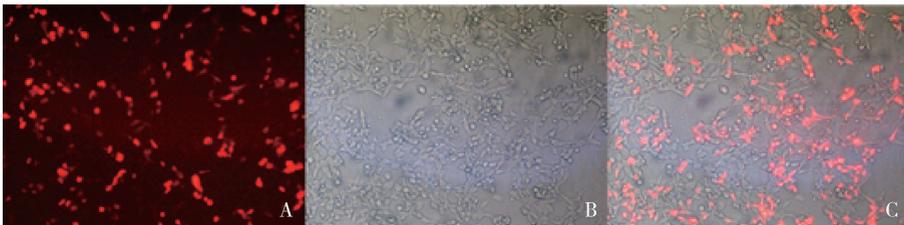


图 2 转染 48h 后 RFP 的表达情况( $\times 100$ )  
A. 荧光显微镜下观;B. 荧光显微镜下明场;C. 融合

3. 实时定量 PCR 检测 CBF $\beta$  表达水平:rAAV-NLS-CBF $\beta$ -RFP 病毒感染 MSCs 后,利用实时定量 PCR 检测 CBF $\beta$  表达情况,对照组间比较差异无统计学意义。与对照组比较,实验组的 CBF $\beta$  表达水平明显升高,这表明 rAAV-NLS-CBF $\beta$ -RFP 病毒已经感染 MSCs。rAAV-NLS-CBF $\beta$ -RFP 感染 MSCs 后第 1、2 天时,CBF $\beta$  的表达均升高,特别是在 48h 升高显著,与对照组比较,差异有统计学意义(图 3)。说明该方式构建的 NLS-CBF $\beta$ -RFP 表达载体能够在感染细胞后能维持较长的外源性表达 CBF $\beta$  的表达水平。

## 结 果

1. 重组腺相关病毒穿梭质粒的构建、同源重组和鉴定:pAAV-NLS-CBF $\beta$ -RFP 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定(图 1)及 DNA 测序,结果与设计的 NLS-CBF $\beta$ -RFP 序列同源性 100%,说明 NLS-CBF $\beta$ -RFP 已被成功克隆至穿梭质粒 pAAV-NLS-CBF $\beta$ -RFP 当中。

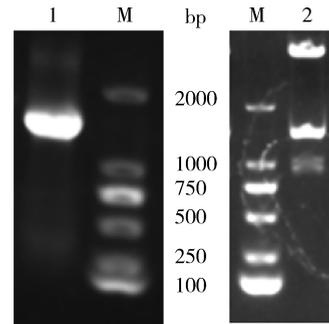


图 1 重组腺相关病毒质粒 pAAV-NLS-CBF-RFP 的 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定  
M. DNA marker;1. NLS-CBF $\beta$ -RFP PCR 退火(约 1.7kb);  
2. pAAV-NLS-CBF $\beta$ -RFP 双酶切

2. AAV-293 细胞包装重组腺相关病毒:荧光显微镜下观察 3 质粒共转染 24h 后,80% 的细胞表达红色荧光蛋白(图 2)。

## 讨 论

目前尚无有效抑制骨关节炎恶化的治疗,最终往往发展成患者需行关节置换术,这给社会及个人带来沉重经济负担。软骨损伤会导致骨关节炎的发展,但由于软骨缺乏血管,损伤的软骨再生能力弱<sup>[9]</sup>。而 MSCs 作为种子细胞,具有良好的三系分化能力,目前市场上有商品化的诱导分化剂,其主要为转化生长因子  $\beta 3$ ,但有研究证明,该诱导分化因子会引起软骨细胞的钙化、肥大化,难以维持细胞表型<sup>[10]</sup>。而 KGN 分子良好的诱导分化能力,但该分子水溶性差,给药后会形成沉淀,导致药物的有效浓度降低,这限制其

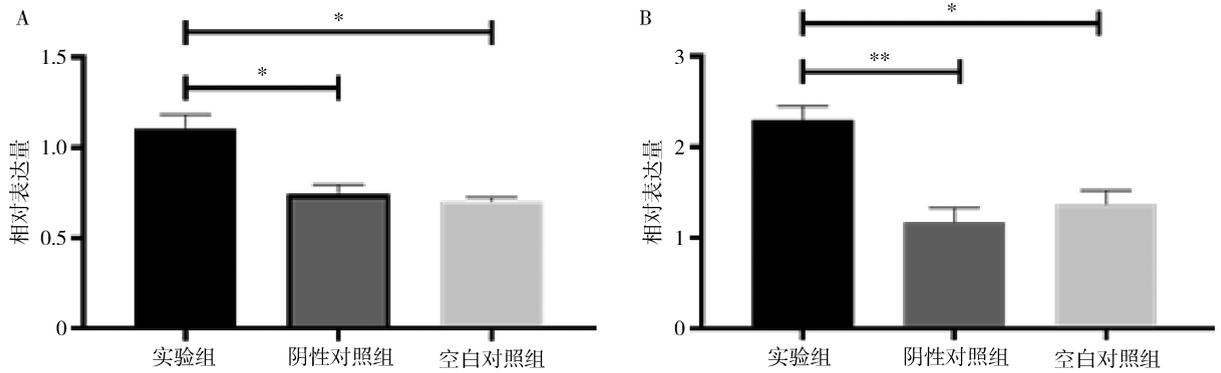


图 3 CBFβ 的 mRNA 表达水平 (n = 3)

A. 24h; B. 48h. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

诱导 MSCs 成软骨分化的应用<sup>[8]</sup>,为优化 KGN 给药,科研人员开发出了许多途径,如通过关节腔注射 KGN 给药、构建药物输送系统、药物支架等,或通过联合使用其他药物,均显示 KGN 良好的促进 MSCs 成软骨分化效果<sup>[11-18]</sup>。此外,近年来有研究使用工程化外泌体将 KGN 靶向递送至间充质干细胞,能取得优异的效果<sup>[8]</sup>。

AAV 依赖于其他病毒(如腺病毒和疱疹病毒)提供的基本辅助功能,以实现有效的病毒复制和繁殖,已被成功地用于在体内各种组织中建立有效和长期的基因表达,因此在基因治疗研究中起重要的作用,并已经形成商业化的产品<sup>[19]</sup>。本研究通过使用 KGN 促 MSCs 成软骨分化的下游通路中的关键因子 CBFβ,使用腺相关病毒为载体,成功构建了核定位重组腺相关病毒表达载体 pAAV - NLS - CBFβ - RFP,采用 PEI 法于 AAV - 293 细胞中成功包装出具有感染性的 NLS - CBFβ - RFP 病毒,为进一步研究导入外源性核定位 CBFβ 后 SF - MSCs 分化提供了工具。使用重组腺相关病毒载体介导的核定位 CBFβ 基因过表达是一种比较简单的研究方法,将来可用于骨关节炎的基因治疗。

核定位信号是一小段氨基酸序列,早发现的核定位序列只有 7 个氨基酸大小,其主要通过整合到蛋白结构中,可促进蛋白迅速在细胞核中的积聚<sup>[5]</sup>。在此后的研究逐渐发现了其他的核定位序列,虽然长度有所不同,但有类似的特征<sup>[20]</sup>。核定位信号转运蛋白的主要过程为,其与蛋白形成核孔靶向复合体,在 ATP/GTP 存在下,该复合体与细胞核表面的核孔复合体结合,进而进入细胞核<sup>[21]</sup>。因此,在设计 DNA 序列时,加入核定位信号序列,可成为靶向细胞核的一种技术手段,这或许有助于探究药物或其他分子进

入细胞核的研究。

此外,CBFβ 是胚胎骨形态发生的必要因子,但其在调控软骨细胞增殖、分化以及出生后的软骨和骨形成的具体机制尚不清楚。有研究通过构建 CBFβ 缺乏小鼠模型,发现了 CBFβ 缺乏的小鼠表现出严重的骨质疏松以及大量脂肪细胞积聚,当 CBFβ 过表达时,上述症状可被逆转,研究结果证明了 CBFβ 通过 WNT 旁分泌通路发挥作用以及内分泌作用,调节脂肪细胞向成骨细胞的分化<sup>[22]</sup>。还有研究发现,CBFβ 通过上调 IHH (Indian hedgehog) 通路的表达,抑制甲状旁腺激素相关蛋白受体 (parathyroid hormone - related protein receptor, PPR) 在出生后软骨和骨形成中的表达,控制软骨细胞增殖和分化的平衡<sup>[23]</sup>。但目前仍未有研究能完全阐释 CBFβ 在软骨细胞的增殖、分化中的机制。因此,构建核定位 CBFβ 基因的重组腺相关病毒载体,或许将来能在间充质干细胞的成软骨分化研究中发挥重要作用。

参考文献

- Hunter DJ, Bierma - Zeinstra S. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745 - 1759
- Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, et al. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage [J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(1): 21 - 34
- Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, et al. A stem cell - based approach to cartilage repair [J]. Science, 2012, 336(6082): 717 - 721
- Marini JC, Forlino A. Replenishing cartilage from endogenous stem cells [J]. N Engl J Med, 2012, 366(26): 2522 - 2524
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, et al. A short amino acid sequence able to specify nuclear location [J]. Cell, 1984, 39(3 Pt 2): 499 - 509
- Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno - associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(5): 358 - 378
- 贺鹏, 段莉, 梁宇杰. 抑制 miR - 140 腺相关病毒载体的构建及鉴定 [J]. 广东医学, 2016, 37(7): 970 - 973
- Xu X, Liang Y, Li X, et al. Exosome - mediated delivery of kartoge-

- nin for chondrogenesis of synovial fluid – derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120539
- 9 Chijimatsu R, Saito T. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage development[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(20): 3939 – 3952
  - 10 Mueller MB, Fischer M, Zellner J, *et al.* Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF – beta isoforms and chondrogenic conditioning[J]. *Cells Tissues Organs*, 2010, 192(3): 158 – 166
  - 11 Hu Q, Ding B, Yan X, *et al.* Polyethylene glycol modified PAMAM dendrimer delivery of kartogenin to induce chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(7): 2189 – 2198
  - 12 Kang ML, Ko JY, Kim JE, *et al.* Intra – articular delivery of kartogenin – conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(37): 9984 – 9994
  - 13 Li X, Ding J, Zhang Z, *et al.* Kartogenin – incorporated thermogel supports stem cells for significant cartilage regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(8): 5148 – 5159
  - 14 Maudens P, Seemayer CA, Thauvin C, *et al.* Nanocrystal – polymer particles: extended delivery carriers for osteoarthritis treatment[J]. *Small*, 2018, 14(8), doi: 10.1002/smll. 201703108
  - 15 Yang W, Zheng Y, Chen J, *et al.* Preparation and characterization of the collagen/cellulose nanocrystals/USPIO scaffolds loaded kartogenin for cartilage regeneration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 99: 1362 – 1373
  - 16 Sun X, Wang J, Wang Y, *et al.* Collagen – based porous scaffolds containing PLGA microspheres for controlled kartogenin release in cartilage tissue engineering[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8): 1957 – 1966
  - 17 Jia Z, Wang S, Liang Y, *et al.* Combination of kartogenin and transforming growth factor –  $\beta$ 3 supports synovial fluid – derived mesenchymal stem cell – based cartilage regeneration [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2056 – 2069
  - 18 Zhao Y, Teng B, Sun X, *et al.* Synergistic effects of kartogenin and transforming growth factor –  $\beta$ 3 on chondrogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Orthop Surg*, 2020, 12(3): 938 – 945
  - 19 Li C, Samulski RJ. Engineering adeno – associated virus vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(4): 255 – 272
  - 20 Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, *et al.* The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV – 40 large T antigen [J]. *J Cell Biol*, 1988, 107(3): 841 – 849
  - 21 Yoneda Y. How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus [J]. *J Biochem*, 1997, 121(5): 811 – 817
  - 22 Wu M, Wang Y, Shao JZ, *et al.* Cbfbeta governs osteoblast – adipocyte lineage commitment through enhancing beta – catenin signaling and suppressing adipogenesis gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(38): 10119 – 10124
  - 23 Tian F, Wu M, Deng L, *et al.* Core binding factor beta (Cbfbeta) controls the balance of chondrocyte proliferation and differentiation by upregulating Indian hedgehog (Ihh) expression and inhibiting parathyroid hormone – related protein receptor (PPR) expression in postnatal cartilage and bone formation [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(7): 1564 – 1574

(收稿日期: 2022 – 04 – 28)

(修回日期: 2022 – 05 – 16)

(上接第 25 页)

- 16 邱歆曼. TRIM50 在卵巢癌组织中的表达和在体内外的作用效应及其分子机制的研究[D]. 济南: 山东大学, 2019
- 17 Song Z, Guo Q, Wang H, *et al.* miR – 5193, regulated by FUT1, suppresses proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting TRIM11 [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(11): 153148
- 18 Mandell MA, Saha B, Thompson TA. The tripartite nexus: autophagy, cancer, and tripartite motif – containing protein family members [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 308
- 19 Sun J, Chen X, Ji X, *et al.* TRIM21 deficiency promotes cell proliferation and tumorigenesis via regulating p21 expression in ovarian cancer [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 6024 – 6035
- 20 万璐. TRIM27 调控 PDCD4 的作用及其机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2018
- 21 Zhu X, Wu Y, Miao X, *et al.* High expression of TRIM44 is associated with enhanced cell proliferation, migration, invasion, and resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 14615 – 14628
- 22 Li HL, Duan YA, Zhao N. MiR – 34a – 5p directly targeting TRIM44 affects the biological behavior of ovarian cancer cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3): 1250 – 1260
- 23 Zhao L, Zhang P, Su XJ, *et al.* The ubiquitin ligase TRIM56 inhibits ovarian cancer progression by targeting vimentin [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2420 – 2425
- 24 Liu X, Zheng C, Li Y, *et al.* Research progress of TRIM59 in malignant tumor [J]. *Journal of Oncology*, 2018, 24(11): 1098 – 1102
- 25 Zhang P, Zhang H, Wang Y, *et al.* Tripartite motif – containing protein 59 (TRIM59) promotes epithelial ovarian cancer progression via the focal adhesion kinase (FAK)/AKT/Matrix metalloproteinase (MMP) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 3366 – 3373
- 26 Wang Y, Zhou Z, Wang X, *et al.* TRIM59 is a novel marker of poor prognosis and promotes malignant progression of ovarian cancer by inducing annexin A2 expression [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(3): 1051
- 27 Qiu Y, Liu P, Ma X, *et al.* TRIM50 acts as a novel Src suppressor and inhibits ovarian cancer progression [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(9): 1412 – 1420
- 28 Sun J, Zhang T, Cheng M, *et al.* TRIM29 facilitates the epithelial – to mesenchymal transition and the progression of colorectal cancer via the activation of the Wnt/ $\beta$  – catenin signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 104
- 29 Hao L, Wang JM, Liu BQ, *et al.* m6A – YTHDF1 – mediated TRIM29 upregulation facilitates the stem cell – like phenotype of cisplatin – resistant ovarian cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868(1): 118878
- 30 Qiao HY, Zhang Q, Wang JM, *et al.* TRIM29 regulates the SETBP1/SET/PP2A axis via transcription factor VEZF1 to promote progression of ovarian cancer [J]. *Cancer Lett*, 2022, 529: 85 – 99
- 31 Jiang J, Xie C, Liu Y, *et al.* Up – regulation of miR – 383 – 5p suppresses proliferation and enhances chemosensitivity in ovarian cancer cells by targeting TRIM27 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 595 – 601
- 32 常旺燕, 李爱明, 窦丽, 等. TRIM21 通过 Wnt/ $\beta$  – catenin 信号通路调控卵巢癌细胞增殖及耐药 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(7): 749 – 756

(收稿日期: 2022 – 04 – 29)

(修回日期: 2022 – 05 – 31)