李梦媛,张文龙,杨星九,等. 慢病毒介导的 HNRNPK 下调对肝癌细胞 HepG2 增殖及迁移的影响［J］. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 54-59,115.
Li MY, Zhang WL, Yang XJ, et al. Effect of HNRNPK downregulation mediated by lentivirus infection on HepG2 cell proliferation and migration［J］. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 54-59,115.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 008

慢病毒介导的 HNRNPK 下调对肝癌细胞 HepG2 增殖及迁移的影响

李梦媛,张文龙,杨星九,朱紫薇,张国新,魏育敏,高　苒*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,国家人类疾病动物模型资源库,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京　100021)

【摘要】　目的　构建慢病毒介导 HNRNPK 下调的 HepG2 细胞稳转株,研究 HNRNPK 沉默对肝癌细胞增殖与迁移功能的影响。**方法**　以构建的慢病毒感染 HepG2 细胞并筛选阳性细胞获得稳定表达的细胞株,并检测 HNRNPK 表达效率。通过 CCK-8 法与细胞克隆形成实验研究 HNRNPK 下调对细胞增殖的影响。通过划痕实验与 Transwell 实验研究 HNRNPK 下调对细胞迁移的影响。**结果**　成功构建了慢病毒介导 HNRNPK 沉默的 HepG2 细胞稳转株,HNRNPK 沉默显著抑制了 HepG2 细胞的增殖与迁移能力。**结论**　HNRNPK 下调能够在体外抑制 HepG2 细胞的增殖与迁移。

【关键词】　HNRNPK; HepG2; 细胞迁移; 细胞增殖
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2022) 04-0054-06

Effect of HNRNPK downregulation mediated by lentivirus infection on HepG2 cell proliferation and migration

LI Mengyuan, ZHANG Wenlong, YANG Xingjiu, ZHU Ziwei, ZHANG Guoxin, WEI Yumin, GAO Ran*
(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College; National Human Diseases Animal Model Resource Center; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】　Objective　To establish a HepG2 cell line with downregulated heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK) mediated by lentivirus and study the effects of HNRNPK downregulation on cell proliferation and migration. **Methods**　HepG2 cells were infected with packaged lentivirus, and positive cells were selected to obtain stable transgenic cell lines. Then detected expression efficiency of HNRNPK. The effect of HNRNPK downregulation on cell proliferation was detected using cell counting CCK-8 and colony formation assays. The effect of HNRNPK downregulation on cell migration was detected using the wound healing and Transwell assays. **Results**　The HepG2 cell line with downregulated HNRNPK mediated by lentivirus infection was successfully constructed. HNRNPK-downregulation inhibited the proliferation and migration of HepG2 liver cells. **Conclusions**　HNRNPK-downregulation inhibits the proliferation and migration of HepG2 liver cells *in vitro*.

【Keywords】　HNRNPK; HepG2; cell migration; cell proliferation

[基金项目]首都卫生发展科研专项项目(首发 2021-1G-4271);中央高校基本科研业务费(3332020050)。
[作者简介]李梦媛(1988—),女,主管技师,研究方向:肿瘤学。E-mail:limengyuan767@ 126.com
[通信作者]高苒(1980—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:肿瘤学。E-mail:gaoran26@ hotmail.com

核不均一核糖核蛋白 K(heterogeneous nuclearribonucleoprotein K,HNRNPK)是一种能够在细胞质和细胞核中穿梭的高度保守的 RNA 结合蛋白,属于 hnRNPKs 家族成员。HNRNPK 在人类基因中广谱表达,能够作用于细胞的转录、翻译、染色体重塑等多种生理功能[1-2]。HNRNPK 能够参与肿瘤生长和转移等调控,多种肿瘤的形成和发展都与 HNRNPK 密切相关[1-4]。当前研究显示,HNRNPK 在人肺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌、宫颈癌等多种肿瘤中异常表达,其表达增多通常与恶性肿瘤患者的预后负相关[3-4]。原发性肝癌(primary hepatic carcinoma,PHC)是世界最高发的恶性肿瘤之一,在全球恶性肿瘤发病率中位居第 5 位,其发病机制复杂,死亡率高,且发病率逐年上升[5]。已有研究证实 HNRNPK 在肝癌组织细胞核中表达上调,并且随着肝癌细胞密度的增加,表达逐渐增强,乙肝病毒(hepatitis B virus,HBV)感染还有可能会促进 HNRNPK 的表达[6]。目前,HNPNPK 在肝癌发生发展中的分子机制尚未完全明确。本研究构建了通过强力霉素(doxycycline,DOX)诱导系统实现时间可控性 HNRNPK 沉默的 HepG2 细胞稳转株,为研究肝癌发病机制与治疗手段提供了实验工具。

1 材料和方法

1.1 细胞

HepG2 细胞系为本实验室冻存。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol 试剂、反转录试剂盒购自 Thermo 公司;SYBR green 荧光染料购自 Toyobo 公司;HNRNPK 抗体、HRP 标记的二抗购自 Abcam 公司;c-Myc、c-Jun 等抗体购自 CST 公司;CCK-8 试剂盒购自东仁化学科技有限公司;定量 PCR 专用 96 孔板购自 Life 公司;细胞培养板、Transwell 嵌套 24 孔板等购自 Corning 公司。实时荧光定量 PCR 仪和酶标仪购自 BIO RAD 公司;拍照显微镜为 Zeiss Axio Imager Z2 光学显微镜。

PCR 实验所用引物由英潍捷基公司合成。HNRNPK 的 siRNA 序列为 5'-GAGCTTCGATCAAAATTGA-3',由本实验室设计并提供给吉凯基因进行慢病毒载体的构建。

1.3 实验方法

1.3.1 稳转株的构建

按吉凯基因操作手册进行 HepG2 细胞的转染。将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,18 h 后,加入 MOI = 10 的病毒,8 h 后更换新鲜的培养基。并在 72 h 后,用工作浓度为 2 μg/mL 的嘌呤霉素继续筛选 48 h。观察细胞状态,用含有 1 μg/mL 嘌呤霉素的培养基维持并扩大培养阳性细胞。

1.3.2 HNRNPK 下调的 HepG2 细胞的形态观察

将构建的 HepG2 稳转株细胞接种于细胞培养板,用 DOX 诱导 HNRNPK 下调。48 h 后观察 HNRNPK 下调后 HepG2 细胞的形态。

1.3.3 Real time PCR 检测 HNRNPK 的下调水平

将构建的 HepG2 稳转株细胞接种于 12 孔板,分别用 0、1、2、5、10 μg/mL 浓度的 DOX 诱导 HNRNPK 下调。48 h 后,使用 TRIzol 试剂裂解细胞并提取 RNA,并进行反转录。采用 Real-time PCR 检测 HNRNPK mRNA 的相对表达量。HNRNPK 与 GAPDH 基因的上下游引物以及 PCR 反应体系参考本课题组前期研究[7]。通过 HNRNPK mRNA 的相对表达量确定 DOX 诱导 HepG2 细胞 HNRNPK 下调的最适浓度。

1.3.4 Western blot 检测 HNRNPK 的表达

接种构建的 HepG2 稳转株细胞,通过 DOX 诱导 HNRNPK 下调, 48 h 后收集细胞。通过 RIPA 裂解液冰上裂解并提取蛋白,加入 5×loading buffer 煮沸制成蛋白样品,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后按 300 mA 恒流转膜 90 min,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h 后,用 HNRNPK 一抗(1∶1000 稀释)4℃孵育过夜。次日,用 HRP 标记的二抗(1∶10000 稀释)室温孵育 1 h,显影检测目的蛋白。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞增殖

于 96 孔板按 3×10^3 个/孔的密度接种稳转株细胞,用 DOX 诱导 HNRNPK 下调。接种当天取 1 组培养上清,加入 CCK-8 试剂(1∶100 稀释),按照 CCK-8 检测试剂盒说明书检测 OD450,随后每 24 h 检测 1 次,直至 96 h。

1.3.6 细胞克隆形成实验检测细胞增殖

按 1×10^3 个/孔的密度将稳转株细胞接种于 6 孔板。DOX 诱导 HNRNPK 下调后,在显微镜下观

察克隆大小。待孔中大多数单个克隆中细胞数大于 50 时终止实验,用 4%多聚甲醛固定细胞,洗涤细胞后用 0.1%的结晶紫染色,洗去多余的结晶紫后,在显微镜下观察计算单克隆数并拍照。

1.3.7 划痕实验检测细胞迁移

按 2.5×10^5 个/孔的密度将稳转株细胞接种于 12 孔板。细胞贴壁后用 200 μL 枪头竖直划线。除去孔中漂浮的细胞,用含 DOX 与 1%胎牛血清的培养基继续培养细胞。在划痕后第 48 h 拍照记录细胞迁移状态。

1.3.8 Transwell 实验检测细胞迁移

将稳转株细胞接种于 6 孔板,用 DOX 诱导 HNRNPK 下调。次日,用胰酶消化重悬细胞,并用无血清培养基离心洗涤两次除去血清,随后用含 DOX 的无血清培养基重悬并制备细胞悬液。在 24 孔板(下室)中加入 500 μL 含 20%胎牛血清的完全培养基,在 Transwell 小室(上室)中加入含有 DOX 的 150 μL 细胞悬液。将 Transwell 小室浸入 24 孔板中,继续诱导培养 24 h。除去 Transwell 小室中的培养基,PBS 洗涤后用甲醇于室温固定细胞。用 PBS 洗去多余的甲醇后,用 0.1%的结晶紫染色。最后用 ddH_2O 洗去多余的结晶紫,并用棉签小心除去 Transwell 小室腔内多余的细胞,揭下基底膜固定于载玻片,用中性树脂封片,晾干后在显微镜下观察并计算迁移细胞的数量。

1.3.9 Western blot 检测相关信号通路

检测步骤同 1.3.4,通过 Western blot 方法检测 β-Catenin、c-Myc、c-Jun、MMP7、CCND1、Cyclin-D1 等蛋白的表达。

1.4 统计学方法

通过 GraphPad Prism V.5.0 软件对实验数据进行统计学分析及 t 检验,数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HNRNPK 沉默不影响 HepG2 细胞的形态

实验结果如图 1 所示,DOX 诱导 HNRNPK 下调后,HepG2 细胞在形态上无明显变化,但与对照病毒组比较,细胞密度稍有不同,可能是增殖能力受到影响,具体差异需进一步实验分析。

2.2 HepG2 稳转株中 HNRNPK 的表达显著下调

实验结果如图 2A 所示,DOX 诱导后 HepG2 稳转株中 HNRNPK mRNA 显著下调。在 DOX 的浓度为 5、10 μg/mL 时,HNRNPK 均能下调约 60%,且二者之间无显著差异,显示 5 μg/mL 是 DOX 诱导 HNRNPK 下调的最适浓度。进一步检测 HNRNPK 蛋白水平的表达,如图 2B、图 2C 所示,用工作浓度为 5、10 μg/mL 的 DOX 诱导细胞,HNRNPK 表达同样下调。

2.3 HNRNPK 下调抑制了 HepG2 细胞的增殖

实验结果如图 3 所示,检测 HepG2 细胞的增殖能力,经统计学分析,与对照组比较,HNRNPK 下调的 HepG2 细胞增殖能力明显减弱,并且单克隆数量明显减少,表明 HNRNPK 下调显著抑制了 HepG2 细胞的增殖。

2.4 HNRNPK 下调抑制了 HepG2 细胞的迁移

实验结果如图 4 所示,通过划痕实验与 Transwell 实验检测 HepG2 细胞的迁移能力,经统计学分析,HNRNPK 下调的 HepG2 细胞的迁移距离明显减小,并且穿过基底膜的细胞数量明显减少,表明 HNRNPK 下调显著抑制了 HepG2 细胞的迁移。

2.5 HNRNPK 下调对 HepG2 细胞增殖与迁移相关的信号通路的抑制

实验结果如图 5 所示,检测稳转株细胞中增殖与迁移相关的信号通路的蛋白表达。HNRNPK 下调后,HepG2 细胞中的 Cyclin-D1、CCND1、β-Catenin、c-Myc、c-Jun、MMP7 等蛋白表达均降低。

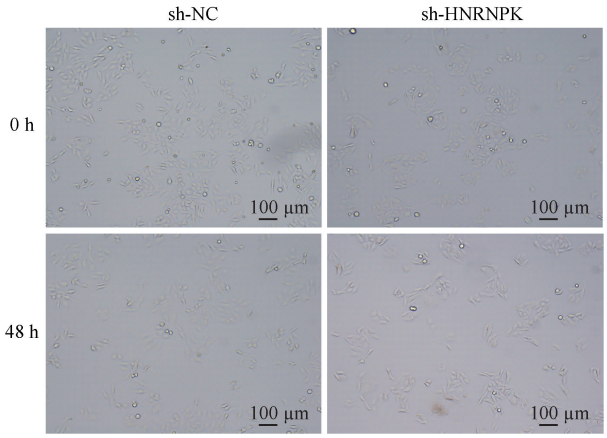
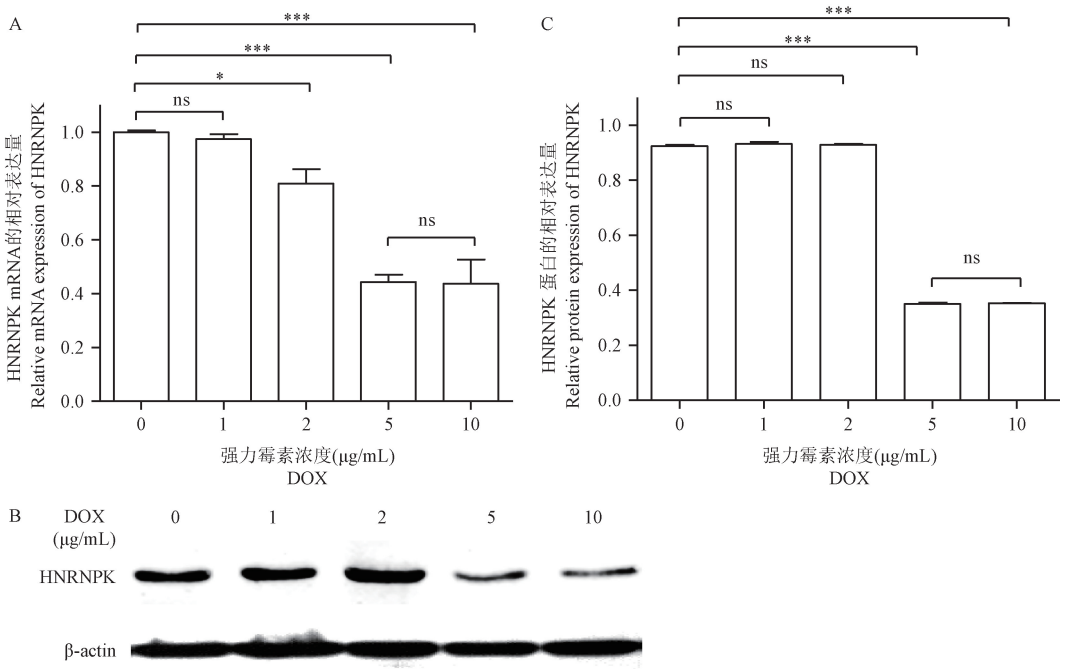


图 1 HNRNPK 下调的 HepG2 细胞形态

Figure 1 Cellular morphology of HepG2 cells after HNRNPK downregulation

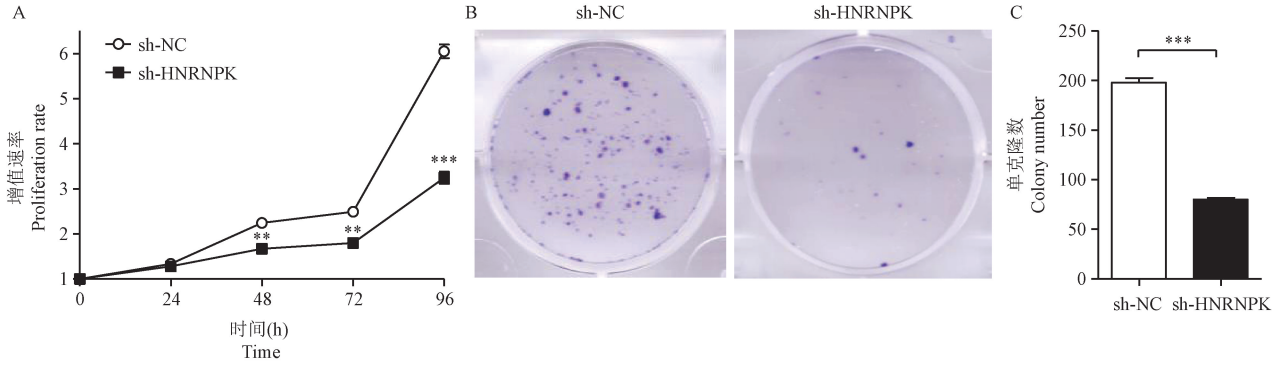


注：A：定量 PCR；B：Western blot；C：HNRNPK 蛋白相对表达量。与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$。

图 2　不同浓度 DOX 诱导 HNRNPK 下调（$n=3$）

Note. A, qPCR. B, Western blot.C, Relative protein expression of HNRNPK. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$.

Figure 2　HNRNPK downregulated by different doses of DOX



注：A：CCK-8 分析实验；B：细胞克隆形成实验；C：单克隆计数。与对照组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

图 3　HNRNPK 下调抑制 HepG2 细胞的增殖（$n=3$）

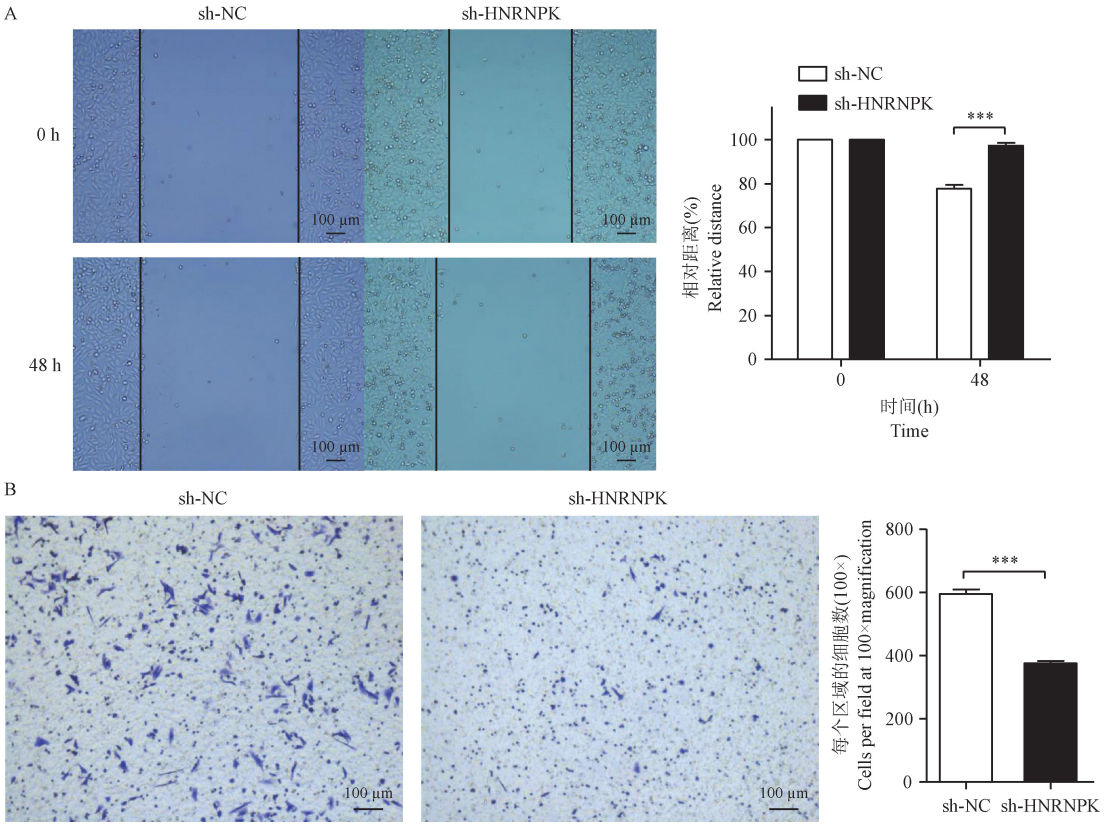
Note. A, CCK-8 assay. B, Colony formation assay. C, Colony number. Compared with the control group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 3　HNRNPK downregulation inhibited the proliferation of HepG2 cells

3　讨论

与正常人比较，HNRNPK 在慢性 HBV 性肝炎、肝炎后肝硬化及乙肝相关性原发性肝癌患者的血清、尿液中表达上调，表明其与乙肝相关性原发性肝癌具有相关性[8]。并且，HNRNPK 同样在肝癌组织细胞核中表达上调，其表达随着肝癌细胞密度的增加逐渐增强，提示 HNRNPK 的高表达可能与肝癌细胞恶性转化和肿瘤发展密切相关[6]。长链非编码 RNA（long non-coding RNAs, lncRNAs）是 HNRNPK 的主要调节因子，二者相互作用能够调控基因的转录与翻译[3]。Qin 等[9]通过研究证实一种名为 p53 稳定和激活 RNA（p53-stabilizing and activating RNA, PSTAR）的 lncRNA 能够通过抑制 HNRNPK 的去类泛素化促进 p53 信号传导，从而抑制肝癌细胞的增殖。

Zhang 等[10]发现 lncRNA CASC11 能够与 HNRNPK 相互作用激活 Wnt/β-Catenin 信号通路，继而促进结直肠癌的生长转移。Liu 等[11]研究证实 Wnt/β-Catenin 信号通路能够参与 HNRNPK 驱动的头颈鳞癌增殖和迁移抑制过程。Wnt/β-Catenin 通路在肝脏发育、再生和肝癌发生过程中也起着重要

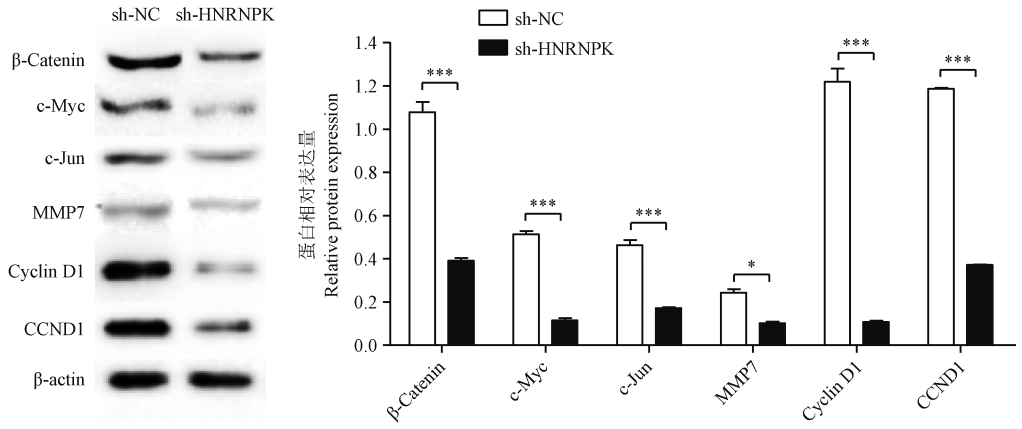


注：A：划痕实验；B：Transwell 实验。与对照组比较，*** $P<0.001$。

图 4 HNRNPK 下调抑制 HepG2 细胞的迁移（$n=3$）

Note. A, Wound healing assay. B, Transwell assay. Compared with the control group, *** $P<0.001$.

Figure 4 HNRNPK downregulation inhibited the migration of HepG2 cells



注：与对照组比较，* $P<0.05$，*** $P<0.001$。

图 5 HNRNPK 下调抑制 HepG2 细胞增殖与迁移相关的信号通路（$n=3$）

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 5 HNRNPK downregulation inhibited related signaling pathways of proliferation and migration in HepG2 cells

作用[12]，已有研究显示激活 Wnt/β-Catenin 通路能够促进 HepG2 细胞的增殖和迁移，因而该通路的激活能够促进肝癌的发展，是肝癌发生的重要分子机制[13]。当 Wnt/β-Catenin 信号通路被激活时，包括 Cyclin-D1、c-Jun、c-Myc 和基质金属蛋白酶 7（matrix metalloproteinase 7，MMP7）在内的下游靶向基因也被异常激活[14]。MMPs 能降解细胞外基质中的各种蛋白成分、生长因子和细胞表面受体，破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障，从而被认为是肿瘤浸润转移过程中主要的蛋白水解酶[15]。HNRNPK 能够激

活 Ras-raf-MARK 信号通路,上调在肿瘤转移中起关键性作用的相关基因,如 MMP3、MMP10 等[16]。肝癌组织中 β-Catenin 的异常表达通常与 MMP-7 呈正相关[17]。本实验中,当 HNRNPK 下调时,HepG2 细胞中的 β-Catenin 表达水平也降低,同时其通路下游的 Cyclin-D1、c-Jun、c-Myc、MMP7 表达受到抑制。表明 HNRNPK 的下调抑制了 Wnt/β-Catenin 通路的激活,因而抑制其下游 MMP7 等一系列调控细胞迁移的靶基因表达,最终导致 HepG2 细胞的迁移受到抑制。此外,已有研究证实 HNRNPK 能够参与细胞周期 G0/G1 期与调控 Cyclin-D1 开关蛋白 2,从而影响膀胱癌细胞增殖和凋亡[18]。原癌基因 Cyclin-D1 由 CCND1 基因所编码,是一种 G1/S 期特异性周期蛋白。Cyclin-D1 在多种肿瘤中均被发现基因过表达,过表达的 Cyclin-D1 能够导致细胞癌变[19]。本实验中,HNRNPK 的下调抑制了 CCND1 与 Cyclin-D1 的表达,可能导致细胞周期阻滞,抑制了 HepG2 细胞的增殖。

本实验构建了由 DOX 诱导系统调控 HNRNPK 稳定下调的 HepG2 细胞株,能够实现时间可控性 HNRNPK 表达,为进一步研究 HNRNPK 对肿瘤形成时间以及肿瘤转移的影响及作用机制提供了更便利的条件与良好的实验基础。当前的研究报导显示,虽然 HNRNPK 在多种恶性肿瘤中均显示出异常表达的现象,其在不同肿瘤发生发展中发挥的具体作用却不甚相同[20-22],因此不能单纯地将 HNRNPK 划分为癌基因或抑癌基因。HNRNPK 在肿瘤中发挥的具体生物学功能可能与其和不同蛋白、RNA 相互作用从而参与多种信号通路的调控有关。综上所述,HNRNPK 的下调抑制了肝癌细胞 HepG2 的增殖与迁移,表明 HNRNPK 的异常表达可能促进了肝癌的发展、且对多种肿瘤都有着至关重要的影响,深入研究 HNRNPK 的作用机制可能为临床肿瘤治疗和预后提供新的思路。

参考文献:

[1] Chen Y, Zeng Y, Xiao Z, et al. Role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 14296-14305.

[2] 张国新, 张文龙, 李梦媛, 等. hnRNPs 家族参与调控肿瘤免疫微环境的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 273-277.

[3] 杨明, 聂国辉, 柯朝阳. hnRNPK 蛋白功能与肿瘤的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(18): 3605-3610.

[4] 黄昊, 杨星九, 李梦媛, 等. 异质性胞核核糖核蛋白 K 与肿瘤研究的最新进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 100-105.

[5] Jiang X, Tan HY, Teng S, et al. The role of AMP-activated protein kinase as a potential target of treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(5): 647.

[6] 范薇薇, 余艳婷, 洪毅, 等. 异质性胞核核糖核蛋白 K 在肝癌组织及不同密度肝癌细胞中的表达 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(1): 20-23.

[7] 李梦媛, 杨星九, 张文龙, 等. DOX 调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株的构建与研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 59-65.

[8] 侯佳影, 周晓明, 陈晨, 等. 核不均一核糖核蛋白 K(hnRNP K)在慢性肝病不同病理阶段的表达水平 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 665-673.

[9] Qin G, Tu X, Li H, et al. Long noncoding RNA p53-stabilizing and activating RNA promotes p53 signaling by inhibiting heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K deSUMOylation and suppresses hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2020, 71(1): 112-129.

[10] Zhang Z, Zhou C, Chang Y, et al. Long non-coding RNA CASC11 interacts with hnRNP-K and activates the WNT/β-catenin pathway to promote growth and metastasis in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2016, 376(1): 62-73.

[11] Liu H, Chen X, Yang X, et al. Involvement of the Wnt/β-Catenin signaling pathway in the heterogenous nuclear ribonucleoprotein K-driven inhibition of proliferation and migration in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2020, 20(6): 394.

[12] 杨茂, 邹清亮, 程丽. Wnt-β-catenin 信号在肝脏发育再生和肝癌发生中的作用 [J]. 成都医学院学报, 2020, 15(5): 669-672, 676.

[13] 李伟, 谢肖俊, 陈胜林, 等. Wnt/β-Catenin 信号通路在肝癌发生中的分子机制研究 [J]. 中国现代手术学杂志, 2014, 18(1): 3-8.

[14] Liang S, Zhang S, Wang P, et al. LncRNA, TUG1 regulates the oral squamous cell carcinoma progression possibly via interacting with Wnt/β-catenin signaling [J]. Gene, 2017, 608: 49-57.

[15] Gonzalez-Avila G, Sommer B, Mendoza-Posada DA, et al. Matrix metal-loproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2019, 137: 57-83.

[16] Gao R, Yu Y, Inoue A, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) promotes tumor metastasis by induction of genes involved in extracellular matrix, cell movement, and angiogenesis [J]. J Biol Chem, 2013, 288(21): 15046-15056.

[17] 王春峰, 张连峰. HBV 相关性肝癌组织中 β-catenin 和基质金属蛋白酶-7 表达及意义 [J]. 医药论坛杂志, 2013, 34(7): 76-77.

[18] Chen X, Gu P, Xie R, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(7): 1266-1279.

(下转第 115 页)

[9] 蒙少鹏. 实验动物设施自动控制系统的应用问题及对策[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(8): 72-75.
[10] 张文慧, 王芳. 实验动物设施的建设与管理[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(11): 183-186.
[11] Wei S, Li Z, Ren M, et al. Social defeat stress before pregnancy induces depressive-like behaviours and cognitive deficits in adult male offspring: correlation with neurobiological changes [J]. BMC Neurosci, 2018, 19(1): 61.
[12] Liu C, Ying Z, Li Z, et al. Danzhi Xiaoyao powder promotes neuronal regeneration by downregulating notch signaling pathway in the treatment of generalized anxiety disorder [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 772576.
[13] Wei S, Geng X, Li Z, et al. A forced swim-based rat model of premenstrual depression: effects of hormonal changes and drug intervention [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(23): 24357-24370.
[14] 欧少华, 周斌, 刘吉宏. 某 GLP 实验动物设施空调及通风系统设计研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 110-116.
[15] 周庆生. GLP 实验动物房的节能与优化-南京中医药大学唐仲英科技楼实验动物房设计[J]. 江苏建筑, 2015, 2: 11-17.
[16] 程水生, 滕颖. 北美国家大动物生物安全实验室的建设与管理[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10): 170-172.
[17] Imanaka A, Morinobu S, Toki S, et al. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors [J]. Behav Brain Res, 2006, 173(1): 129-137.
[18] Sawamura T, Shimizu K, Nibuya M, et al. Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats [J]. Neurosci Lett, 2004, 357(1): 37-40.
[19] Zheng J, Tian Y, Xu H, et al. A standardized protocol for the induction of specific social fear in mice [J]. Neurosci Bull, 2021 37(12): 1708-1712.
[20] Von Ziegler L, Sturman O, Bohacek J. Big behavior: challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling [J]. Neuropsychopharmacology, 2021, 46(1): 33-44.
[21] Bohnslav JP, Wimalasena NK, Clausing KJ, et al. DeepEthogram, a machine learning pipeline for supervised behavior classification from raw pixels [J]. Elife, 2021, 10: e63377.

〔收稿日期〕2021-12-28

(上接第 59 页)

[19] John RR, Malathi N, Ravindran C, et al. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior [J]. Indian J Dent Res, 2017, 28: 187-192.
[20] Huang H, Han Y, Yang X, et al. HNRNPK inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/p21/CCND1 pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(61): 103364-103374.
[21] Gallardo M, Lee H, Zhang X, et al. hnRNPK is a haploinsufficient tumor suppressor that regulates proliferation and differentiation programs in hematologic malignancies [J]. Cancer Cell, 2015, 28(4): 486-499.
[22] Carpenter B, McKay M, Dundas SR, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2006, 95(7): 921-927.

〔收稿日期〕2021-07-05