

· 综 述 ·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2019.06.011

p21 亚细胞定位与肿瘤

刘 妍, 邓堂刚, 叶 茂*

(湖南大学 生物学院, 中国湖南 长沙 410082)

摘 要: p21 是一种重要的周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (cyclin-dependent-kinase inhibitor, CKI), 主要通过调控细胞周期维持细胞的生长和增殖。此外, p21 还参与调控细胞凋亡、细胞衰老以及细胞运动等过程。近年来越来越多的研究表明, p21 的功能具有双重性。当 p21 定位在细胞核时, 其主要通过抑制周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的活性介导细胞周期停滞, 抑制细胞增殖; 当定位在细胞质时, p21 能够促进细胞增殖。本文主要对 p21 的生物学功能、亚细胞定位调控机制及其在肿瘤研究中的最新进展予以综述。

关键词: p21; 生物学功能; 亚细胞定位; 转位机制; 肿瘤

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2019)06-0501-09

Subcellular Localization of p21 and Tumors

LIU Yan, DENG Tang-gang, YE Mao*

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China)

Abstract: p21 is an important cyclin-dependent-kinase inhibitor (CKI) and maintains cell growth and proliferation by regulating the cell cycle. It also participates in the processes of apoptosis, cell senescence and cell movement. In recent years, more and more studies have shown that the function of p21 is dualistic. When p21 is located in the nucleus, it mediates cell cycle arrest and inhibits cell proliferation by inhibiting the activity of cyclin-dependent kinases (CDKs). However, p21 can promote cell proliferation in the cytoplasm. Here, the main biological functions, the regulatory mechanisms of subcellular localization of p21 and its recent advances in tumor research were reviewed.

Key words: p21; biology function; subcellular localization; transfer mechanism; tumor

(Life Science Research, 2019, 23(6): 501~509)

p21 是一种周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)抑制剂, 属于 Cip/Kip 家族, 作为 p53 下游重要的因子之一, 与肿瘤的发生发展紧密相关。近年来研究发现, p21 的功能会随着其亚细胞定位的变化而改变。当 DNA 发生损伤时, 细胞核 p21 与 CDKs 和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合, 诱导细胞周期停滞, 促使细胞完成 DNA 损伤修复, 从而维持基因组的稳定并抑制肿瘤细胞增殖。细胞质 p21 的表达与肿瘤发生发展呈正相关。研究发现, 细胞质 p21 在人乳腺癌、肝细胞癌、黑色素瘤、白

血病等恶性肿瘤组织中高表达, 并且与其侵袭、转移、耐药等不良预后密切相关^[1]。由于 p21 在功能上具有双重性, 因此明确 p21 在不同肿瘤中的生物学功能及其转位作用机制, 对靶向 p21 的肿瘤临床治疗具有重要参考意义。

1 p21 的结构

人 p21 蛋白由 *CDKN1A* 基因编码, 该基因定位在 6 号染色体短臂上。p21 蛋白包含 164 个氨基酸, 富含精氨酸, 相对分子质量约为 18 kD。p21 蛋白的分子结构如图 1 所示, 其 N 端特异性结合

收稿日期: 2019-03-08; 修回日期: 2019-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81672760); 湖南省自然科学基金资助项目(2016JJ3048); 湖南省重点研发计划项目(2018SK2128)

作者简介: 刘妍(1993-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子机制研究; * 通讯作者: 叶茂(1972-), 男, 湖南长沙人, 博士, 湖南大学生物学院教授, 主要从事肿瘤生物学研究, Tel: 0731-88821834, E-mail: yemaocsu@hotmail.com。

cyclin/CDKs 复合物。其中, 位于 17~24 位氨基酸的 cyclin 结合基序 1 (Cy1 位点) 主要结合 cyclin D1/CDK4、cyclin E/CDK2 等 cyclin/CDKs 复合物, 抑制细胞周期进行。另外, p21 的 155~157 位氨基酸处存在一个亚 RXL 基序(Cy2 位点), 该区域同样结合 cyclin/CDKs 复合物, 参与细胞周期的调控^[2]。p21 通过 Tyr-77 (Y77) 残基与 CDKs 的 ATP 结合位点结合, 进而抑制 CDKs 催化活性^[2]。p21 的 143~160 氨基酸处存在含有 8 个氨基酸残基的 PCNA 互作蛋白盒(PIP-box)结构, 可增强 p21 与 PCNA 的结合能力^[3]。除此之外, p21 的 66~74 位氨基酸和 102~119 位氨基酸处各包含一个核输出信号(nuclear export signal, NES), 与其核输出及泛素化降解有关; 140~142 位氨基酸处含有一个细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 负责 p21 的细胞核定位并实现抑制细胞增殖的功能^[4]。

2 p21 的生物学功能及作用机制

2.1 p21 与细胞周期

2.1.1 细胞核 p21 与细胞周期

真核生物细胞周期的正常运行主要依赖于 CDKs 和周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent-kinase inhibitors, CKIs)组成的调控系统。细胞核 p21 通过调控细胞周期相关蛋白质影响细胞周期进程。在 G1 期, p21 通过抑制 cyclin D/CDK4/6 复合物的活性, 抑制细胞周期运行, 促使细胞完成 DNA 损伤修复。在 G1/S 期转换过程中, cyclin E/CDK2 复合物在 G1 期对肿瘤抑制蛋白 Rb 进行磷酸化, 释放 E2F 转录因子, 促使细胞进入 S 期, 如果 G1 期 DNA 发生损伤, p21 则会抑制 CDK2 活性, 阻止细胞进入 S 期, 诱导细胞停滞。PCNA 作为 DNA 聚合酶 δ 和 DNA 聚合酶 ϵ 的辅助因子, 是 DNA 复制和修复所必需的, 在与 PCNA 之间的相互作用中, p21 可能扮演双重角色。如果 S 期发生 DNA 损伤, 则 p21 使 PCNA 失活, 从而阻止 DNA 复制, 促使细胞进行 DNA 损伤修复^[5]; 同时, p21 能够通过 PCNA 结合的肽段

抑制 DNA 酶 1 的活性, 进而抑制 PCNA 依赖的碱基错配修复和碱基切除修复^[6]。另外, p21 与 PCNA 竞争性结合 Myc, 同时 Myc 能够阻断 p21 和 PCNA 之间的结合, 从而抑制 p21 活性, 促进 DNA 复制, 进而促进 G1/S 期转换。核蛋白 ICBP90 (inverted CCAAT box binding protein of 90 kD) 也能参与细胞周期的调控, 其表达水平在 G1 期和 G2/M 期达到峰值, 在这两个时期中 ICBP90 通过结合 DNA 拓扑异构酶 II α (DNA topoisomerase II α , Topo II α) 上的 CCAAT 盒结构域, 促进细胞增殖。DNA 损伤能促进 p53 转录激活 p21, 从而导致 ICBP90 的转录水平降低, 并促进其蛋白质降解, 引起细胞停滞, 诱导细胞凋亡^[7]。另有研究表明, 在染色体组装过程中, ICBP90 与组蛋白赖氨酸甲基转移酶 G9a 结合能够抑制 p21 的启动子活性^[8]。因此, p21 与 ICBP90 之间的平衡也是调控细胞周期的重要机制。此外, 因为 ICBP90 还具有 E3 连接酶的活性^[8], 所以 ICBP90 是否能够介导 p21 的泛素化降解也值得进一步思考。

G2/M 期的转换主要与 cyclin B/CDK1 复合物有关。与其他 cyclin/CDKs 复合物相比, cyclin B/CDK1 复合物对 p21 的亲合力较弱, 但是当 DNA 受到损伤时, G2/M 检查点被激活, p21 与 cyclin B/CDK1 复合物结合, 从而阻断细胞分裂周期因子 25 (cell division cycle 25, Cdc25) 和周期蛋白依赖性激酶激活激酶(cyclin-dependent-kinase activating kinase, CAK)的活化, 阻止 G2/M 期的转换。有研究提出, p21 与 PCNA 的相互作用也可能导致细胞停滞在 G2 期, 推测是由于 p21 使 PCNA 失活, 造成 S 期的 DNA 损伤, 进而引起细胞分裂周期因子 2 (cell division cycle 2, Cdc2) 活性降低, 将细胞停滞在 G2 期^[9]。Cdc20 是后期促进复合物/细胞周期体(anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C)的底物接头蛋白。研究发现, 早期有丝分裂抑制因子 1 (early mitotic inhibitor 1, Emi1) 可抑制 Cdc20 与底物结合, 当 DNA 发生损伤时, p21 能够通过下调 Emi1 进而激活 APC/C^{Cdc20} 复合物, 促进其对 cyclin A 和 cyclin B 的泛素化降解,

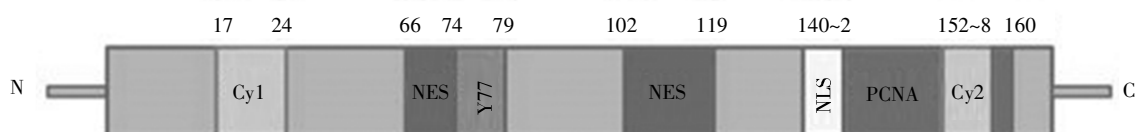


图 1 p21 蛋白的分子结构示意图

Fig.1 The schematic diagram of p21

引起细胞周期停滞在 G2 期^[10]。

2.1.2 细胞质 p21 与细胞周期

细胞质 p21 也能通过影响 CDKs 的活性调控 G1/S 期转换。研究表明, p21 的 Ser130 或 Thr145 发生磷酸化后, 一方面会丧失与细胞核中 cyclin/CDKs 复合物结合的能力, 导致其失去阻滞细胞周期运行的功能; 另一方面, p21 从细胞核中转移到细胞质中, 同时细胞质 cyclin E/CDK2 表达量升高, 两者在细胞质中的结合能够促进 G1/S 期的转换, 但具体的调控机制有待进一步阐明^[11]。另有研究表明, 在一般情况下, 细胞质 p21 能够抑制细胞凋亡, 但当用视磺酸刺激前 B 淋巴瘤细胞时, p21 表达上调, 且 p21 与 cyclin E/CDK2 形成的复合物水平升高, 从而促进前 B 淋巴瘤细胞的凋亡^[12]。以上研究表明, 在细胞质中 p21 仍然会结合 cyclin/CDKs 复合物, 调控细胞周期运行。另外, Thr145 磷酸化的 p21 还可通过激活 cyclin D1/CDK4 复合物介导 G1/S 期的转换, 同时 p21 对 PCNA 的抑制能力减弱可促进 DNA 合成及 S 期运行, 最终促使细胞增殖^[13]。

2.2 p21 与细胞凋亡

2.2.1 细胞核 p21 与细胞凋亡

除参与调控细胞周期外, p21 还是细胞凋亡重要的调控因子。作为 p53 重要的下游靶标分子之一, p21 可以响应 p53 对细胞凋亡的调控。当 DNA 受到轻度损伤时, p21 在 p53 存在的情况下能够诱导细胞周期停滞在 G2 期, 促使细胞进行 DNA 损伤修复, 进而阻止细胞凋亡; 如果 DNA 损伤严重, p53 可直接诱导细胞发生凋亡。

除与 p53 有关外, p21 也能够响应细胞周期相关转录因子 E2F、Myc、核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)、信号转导和转录活化因子(signal transducer and activators of transcription, STAT)等的调控, 进而促进细胞凋亡。p21 对 Rb 磷酸化后能够通过招募染色体重构复合物 SWI/SNF (yeast switch in mating type/sucrose non fermentation)抑制 E2F 的转录活性, 进而阻断 DNA 复制, 促进细胞凋亡^[14]。Myc 可通过与转录抑制因子 ZMIZ-1 结合抑制 p21 的功能, 同时 Myc 还能招募转录因子激活增强子结合蛋白 4 (activating enhancer binding protein 4, AP4)和赖氨酸特异性去甲基化酶 5B (lysine-specific demethylase 5B, KDM5B), 阻断 Myc 与 p21 启动子结合, 抑制 p21 转录, 进而诱导细胞凋亡。另外, Myc 也可通过 miR17-92 对 p21 的

mRNA 进行剪切, 抑制 p21 的转录, 从而促进细胞凋亡^[15]。当细胞受到外界刺激时, p21 与 NF- κ B 和 STAT 结合能够抑制 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2)、细胞型 Fas 相关死亡区域蛋白样 IL-1 β 转换酶抑制蛋白 (cellular FADD-like IL-1 β -converting enzyme-inhibitory protein, c-FLIP)、Bcl-XL (B cell lymphoma-XL) 和 X 连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 等抗凋亡蛋白的表达, 进而诱导细胞凋亡^[16]。p21 的上调可促进 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的表达上调, 从而引起细胞中 Bax 与 Bcl-2 的蛋白质比例发生变化, 最终导致细胞发生凋亡^[17]。

2.2.2 细胞质 p21 与细胞凋亡

细胞质 p21 能够抑制细胞凋亡。细胞质 p21 主要通过调控细胞周期蛋白及一些凋亡相关蛋白质的活性实现其抗凋亡的功能, 这些因子包括 cyclin/CDKs、胱天蛋白酶 3 (caspase-3)、caspase-8、凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)、致癌蛋白 Ras (rat sarcoma) 及应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK) 等。研究表明, 细胞质 p21 促进了乳腺癌细胞的侵袭和转移, 并且能够增强其耐药性; 免疫组化结果显示, 细胞质 p21 的高表达伴随着细胞质 cyclin B1 的表达上调, 同时乳腺癌患者生存期缩短, 由此推测细胞质 p21 可能通过 cyclin B1 调控细胞周期并抑制细胞凋亡, 但是具体机制还未明确^[9]。当细胞受到外界刺激时, caspase-3 对 p21 进行切割降解, 减弱 p21 对 cyclin A/CDK2 复合物活性的抑制, 进而诱导细胞凋亡。此外, p21 与 caspase-3 的相互作用还可阻止由 Fas 介导的细胞凋亡^[18]。p21 过表达能够阻断死亡受体 4 细胞质结构域介导的 caspase-8 诱导的细胞凋亡^[19]。蛋白激酶 B (AKT) 对 p21 的 Thr145 磷酸化后促使其进入细胞质中, 随后 p21 与 ASK1 形成复合物, 抑制促分裂原活化的蛋白激酶激酶 4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4, MAPKK4) 和 MAPKK6 的活化, 进而分别抑制下游激酶 SPAK 和 p38 的活性, 最终抑制细胞凋亡^[20]。当细胞受辐射刺激时, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路被激活, 而 p21 能通过抑制该信号通路下游的 caspase-3 和 caspase-9 的活化, 抑制由辐射诱导的细胞凋亡。Ras 通过激活磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxy kinase, PI3K) 和 M-APKK 途径使 p21 磷酸化, 并介导其定位在细胞

质, 随后与 Rho 相关卷曲螺旋激酶(Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK)结合, 抑制 ROCK/LIMIK/cofilin 途径介导的细胞凋亡^[21]。

在单核细胞中人们也发现了细胞质 p21 的高表达, 其通过抑制细胞凋亡阻止细胞终端分化。在外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中, p21 从细胞核到细胞质的转位, 可增强 PBMCs 对多种细胞因子刺激的抵抗能力; 生化分析结果显示, 细胞质 p21 能够结合并抑制 ASK1 的活性, 同时抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activation protein kinase, MAPK)级联反应介导的细胞凋亡^[22]。在滋养层巨细胞分化过程中, p21 被 AKT 磷酸化, G1 期和 S 期的细胞质 p21 蛋白水平均升高, 促进细胞存活^[23]; 另外, 当人胚胎成纤维细胞的 DNA 发生轻度损伤时, 胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)能够对 p21 进行磷酸化, 导致其细胞质转位, 从而抑制细胞凋亡^[24], 上述信息提示细胞质 p21 对细胞凋亡的抑制与其磷酸化修饰紧密相关。

3 p21 细胞质定位的调控机制

蛋白质的磷酸化修饰能够改变其在细胞中的亚细胞定位, 从而导致其功能发生改变。p21 蛋白含有多个磷酸化位点, 目前发现 p21 的 NES 和 NLS 附近有 5 个磷酸化位点, 均与其核质穿梭有关。当磷酸化的 AKT 对 p21 的 NLS 附近的 Thr145 进行磷酸化时, p21 稳定性提高, 并且可使其由细胞核加速转向细胞质, 同时 p21 也由抑癌因子变为促癌因子^[25]。由于亚细胞定位的不同会使 p21 具有不同的功能, 因此阐明 p21 在肿瘤细胞中的转位机制对研究 p21 的功能具有重要意义。p21 的转位不仅与多种调控因素有关, 还与不同种类的细胞系有关。目前研究较为清楚的是 ERK2 和 AKT 对 p21 的磷酸化介导的细胞质转位。

当表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激细胞时, ERK2 被持续激活, 并对 p21 的 Thr57 和 Ser130 进行磷酸化, 促进 p21 由细胞核转位至细胞质, 同时促进 S 期激活相关蛋白 2 (S-phase kinase-associated protein 2, Skp2)介导的 p21 的泛素-蛋白酶体途径降解^[26]。AKT 能够直接对 p21 的 Thr145 进行磷酸化, 而且 Thr145 靠近 p21 的 NLS, 其磷酸化修饰可阻止 p21 与核输入蛋白结合, 从而将 p21 滞留在细胞质中; 另外, AKT 还可通过激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 间接

对 p21 的 Ser146 进行磷酸化, 从而将 p21 阻滞在细胞质中, 并且延长了 p21 的半衰期^[25]。p21 中 Thr145 和 Ser146 的磷酸化可阻碍 p21 与 PCNA 的结合, 而游离的 PCNA 会激活 DNA 聚合酶, 促进 S 期运行, 最终导致 DNA 错配修复和碱基切除修复缺陷^[26], 这可能是细胞质 p21 导致肿瘤细胞恶性增殖的一种机制。除介导 p21 的磷酸化外, AKT 还能通过抑制糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3)的活性阻止 GSK3 对 p21 的 Thr57 磷酸化, 该位点的去磷酸化可减弱 p21 与 CDKs 的结合, 进而减弱由 CDKs 介导的 p21 降解, 所以 AKT 也可能通过 GSK3 延长 p21 的半衰期, 并促进其细胞质转位^[27], 但具体机制还有待进一步阐明。

研究发现, 一些激酶也可通过 AKT 调控 p21 的细胞质定位, 如 NF- κ B 抑制激酶 β (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta, IKK β)、人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)及热激蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27)等。IKK β 参与了 p21 在细胞质中的积累, 一方面, 当细胞受到外界刺激时, IKK β 被肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)磷酸化激活, 释放 NF- κ B, 促进 p21 的转录; 另一方面, IKK β 促进 AKT 的 Ser473 磷酸化, 进而促进 p21 的磷酸化, 将其阻滞在细胞质中, 而 p21 在细胞质中的积累可使乳腺癌细胞获得较强的耐药性, 最终促进癌细胞存活^[28]。Winters 等^[29]经过连续 9 年对乳腺癌细胞的研究发现, 在细胞培养过程中, HER-2 能够诱导 p21 的细胞质定位, 并能够抵抗细胞凋亡, 而定位在细胞质中的 p21 可减弱对细胞核中细胞周期蛋白的抑制, 从而促进肿瘤细胞增殖。研究人员推测可能是 HER-2 通过磷酸化激活了 AKT, AKT 进一步对 p21 的 Thr145 磷酸化, 从而使 p21 由细胞核向细胞质转位, 一旦抑制 AKT 的激酶活性, p21 则重新定位到细胞核, 并且其促增殖活性降低^[30]。HSP27 也可通过对 AKT 进行磷酸化, 促进 p21 向细胞质转位^[31]。以上 3 种蛋白激酶都是通过 AKT 间接促进 p21 的细胞质定位, 但是这三者是否可通过直接催化 p21 的磷酸化介导其细胞质定位还有待深入研究。综上所述可知, 对 AKT 进行人为干扰是调节 p21 的重要手段之一, AKT 抑制剂的筛选和开发是重要的研究方向并具有重要的肿瘤临床治疗意义。最先开发出的 AKT 抑制剂

是以 ipatasertib、Nl-71-101、GSK690693 等为代表的 ATP 竞争性抑制剂, 目前该类抑制剂家族已有 10 余种^[32]。研究发现, ipatasertib 在 I 期临床试验中对实体瘤患者具有较好的疗效以及安全性^[33]; 在 II 期临床试验中, 与安慰剂相比, ipatasertib 与紫杉醇连用能够延长三阴性乳腺癌患者的无进展生存期^[34], 可见 ipatasertib 在肿瘤的临床治疗上具有良好应用前景。但是 ATP 竞争性抑制剂对 AKT 同工酶无选择性, 对于与 AKT 结构相似的激酶如 PKA、ROCK 等的选择性差, 因此出现了 AKT 的变构抑制剂。AKT 变构抑制剂主要包括 5,6 二苯吡嗪 2 (1H)、MK-2206、SR13668 等, 有近 20 种。该类抑制剂具有高选择性和相对较低的毒性, 其中, MK-2206 与吉非替尼的联合使用已投入非小细胞肺癌的 II 期临床试验^[32]; 同时 MK-2206 也已经进入晚期乳腺癌的 II 期临床试验^[35]。另外, 还有一些不可逆转的 AKT 抑制剂的开发, 例如 II-AF101 等。目前, 该类抑制剂的家族成员较少, 是值得深入研究的方向^[32]。总的来讲, 尽管有很多 AKT 抑制剂相继被发现, 但是应用于肿瘤临床治疗的很少, 且单独使用效果不佳, 通常需要与一些化疗药物协同使用。

此外, p21 与某些蛋白质的物理结合也可能导致其定位改变。有研究发现, 阿霉素(DOX)处理人胰腺癌细胞株 PANC1 后, 促进了 p65 与 p21 启动子的结合, 同时能够促进 p21 由细胞核转位到细胞质, 转位至细胞质后的 p21 与 caspase-3 前体(pro-caspase 3)结合, 阻止了 p21 重新向细胞核转位, 同时还增加了 c-IAP1、Bcl-2 等抗凋亡因子的转录水平, 从而促进细胞增殖^[36]。除以上机制外, DNA 损伤后, 核苷酸还原酶小亚基 p53R2 上调, 为肿瘤细胞提供 dNTP, 促使其进行 DNA 损伤修复, 同时还伴随着细胞质 p21 的上调, 进而激活 CDK4/6, 随后引起 Rb 对 E2F 的激活, 促进细胞增殖^[37]。在大多数癌症中 p53 发生突变, p53R2 对细胞质 p21 的上调是否依赖于突变的 p53 值得深入探究。

4 p21 与肿瘤

4.1 细胞核 p21 与肿瘤

4.1.1 白血病

白血病是造血系统的克隆性恶性疾病, 髓系分化障碍是其主要的发病机制之一。其根据细胞的分化程度可分为急、慢性白血病。通过对白血病

患者的临床样本进行分析发现, p21 在白血病细胞中呈低表达, 其低表达能够导致白血病细胞分化受阻; 采用一定治疗手段后, p21 的表达水平升高, 这些信息提示 p21 可作为白血病化疗疗效的评价指标^[38]。视磺酸是治疗白血病的主要化疗药物之一, 其主要是通过诱导 p21 转录来促进肿瘤细胞的分化, 最终缓解急性早幼粒细胞白血病^[39]。因此, p21 能够促进白血病细胞分化, 进而诱导白血病细胞的凋亡。

近年来人们在白血病细胞中也陆续发现了一些 p21 的上游调控因子, 如 NF- κ B 和克鲁佩尔样因子 2 (Kruppel-like factor 2, KLF2)。NF- κ B 能够直接激活 p21 的表达, 从而响应骨髓白血病细胞中的 DNA 损伤, 进而控制 DNA 损伤诱导的髓样分化^[40]。KLF2 是 KLF 家族锌指转录因子的成员, 在白血病细胞 Jurkat 中, KLF2 能够通过上调 p21 的表达抑制 Jurkat 细胞生长^[41]。因此, NF- κ B 和 KLF2 有望作为白血病治疗的分子靶标。

4.1.2 黑色素瘤

黑色素瘤是皮肤癌中最为恶性的肿瘤。Vidal 等^[42]的研究发现, p21 在不同种类的黑色素瘤细胞中的蛋白质表达水平差异很大且功能也具有双重性。在黑色素瘤细胞 SK-MEL-110 中, p21 能阻止由 p53 诱导的细胞程序性死亡, 促进黑色素瘤细胞存活^[43]; 而 p21 能够抑制黑色素瘤细胞 A375 和 WM1976 的增殖^[44]。EZH2 (enhancer of zeste homolog 2)是表观遗传转录抑制因子, 研究发现其在正常的黑色素细胞中不表达, 但是在黑色素瘤发生发展过程中表达升高, 且可通过抑制 p21 的活性抑制黑色素瘤细胞的衰老和凋亡^[45]。

目前临床上主要采用手术切除和术后放疗的方式治疗黑色素瘤, 但是肿瘤常抗放疗。二甲双胍是治疗糖尿病的常用药, 近年来有研究将二甲双胍用于黑色素瘤的治疗, 且治疗效果显著, 在机制上二甲双胍可以通过作用于腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)促进 p53 的磷酸化, 从而间接促进 p21 的上调, 最终促进细胞凋亡^[46]。可见, p21 可作为黑色素瘤治疗的潜在靶点, 同时二甲双胍和双胍衍生物类药物可能是治疗黑色素瘤的新手段。

4.1.3 肺癌

最新的全球癌症统计报告表明, 2018 年全球肺癌的死亡人数占癌症总死亡人数的 18.4%, 是癌症死亡的主要原因^[47]。目前针对肺癌的主要治

疗手段是手术切除和化疗,但是,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)对化疗相对不敏感,因此筛选肺癌分子标志物具有重要意义。研究发现,p21的表达与NSCLC的组织分化程度显著相关,p21免疫反应常见于病灶,而且p21表达不依赖于p53,所有p53⁺/p21⁻的NSCLC患者在进行手术切除后1年内死亡,说明p21可作为非小细胞肺癌独立的预后因素,是潜在的重要临床标志物^[48]。在肺癌中,p21受到过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)配体的刺激而表达水平升高,进而抑制人肺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[49]。未来可针对肺癌中p21的正调控因子开发激活剂,以提高p21在肺癌中的表达水平,从而抑制肺癌的发生发展。

4.1.4 结直肠癌

Bukholm等^[50]发现在原发性结直肠癌中p21的表达偏低,而且p21的缺失与高死亡率密切相关,这提示在临床上p21的表达水平可作为判断原发性结直肠癌是否具有转移风险的指标。Zirbes等^[51]连续6年对294名结直肠癌患者的肿瘤样本进行了分析,发现p21表达呈阳性的患者存活率更高,说明p21可能会抑制结直肠癌的发生发展。

4.1.5 前列腺癌

前列腺癌是美国男性癌症中的第二大癌症^[47],目前临床上主要采用水飞蓟素(silibinin)进行治疗。研究发现,silibinin能够促进前列腺癌细胞中p21和p27的转录,进而抑制前列腺癌细胞增殖^[52]。另外,槲皮素也被应用于前列腺癌的治疗,在槲皮素的作用下,前列腺癌细胞PC-3中的p21表达升高,并将细胞周期阻滞在G2/M期,诱导细胞凋亡^[53]。上述研究表明,细胞核p21在前列腺癌中能够响应化疗药物处理引起的细胞凋亡,因此明确这些药物处理后,p21在前列腺癌中具体的上下游调控机制,将有助于针对这类药物开发合适的分子靶标,增强药物靶向性,提高前列腺癌的治疗效率。

4.1.6 膀胱癌

膀胱癌是男性生殖系统常见的恶性肿瘤。目前,临床上采用卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG)进行辅助治疗。在卡介苗治疗过程中,细胞核中的p21和p27表达升高,阻滞细胞周期运转,最终引起细胞凋亡,提示p21和p27在细胞核中的表达水平可能与卡介苗治疗效果呈正相关^[54]。因此,p21和p27的共表达量与卡介苗最佳治疗效果的关系可深入研究。

4.2 细胞质 p21 与肿瘤

4.2.1 乳腺癌

细胞质p21在乳腺癌细胞中很常见。定位在细胞质中的p21能够促进乳腺癌细胞的侵袭和转移,并且能够增强其耐药性。Caffo等^[55]长期跟踪观察了261例乳腺癌患者的p21免疫原性,发现p21的过表达与大肿瘤大小、阳性淋巴结状态、组织学分级和高有丝分裂相关,并且与患者短生存期有关,表明p21在细胞质中的定位与乳腺癌的恶性增殖有重要联系,可以作为乳腺癌的预后靶标。但是,由于细胞质中p21的调控机制尚未完全明确,所以到目前为止,并没有针对细胞质p21的药物开发。需要指出的是,现阶段已有针对caspase-3的降解而间接抑制p21活性的促凋亡药物的开发,并有望投入临床应用^[56]。此外,有研究报道,细胞质中p21的表达与乳腺癌标志物HER-2的过表达密切相关,细胞质p21的表达与其Thr145磷酸化呈正相关,同时也与HER-2及磷酸化的AKT高度相关^[29]。由此可见,在针对乳腺癌的治疗过程中,可使用AKT特异性抑制剂,以抑制其介导的p21转位,同时还可以直接针对细胞质p21及HER-2开发抑制剂,以达到抑制或减缓肿瘤增殖以及增强肿瘤细胞药物敏感性的治疗目的。

4.2.2 卵巢癌

研究发现,p21可能是卵巢癌临床治疗中一个重要的分子靶标。在高级别浆液性卵巢癌细胞(high-grade serous ovarian cancer cells, HGSCs)中,突变的p53能够介导癌蛋白PAX8的促增殖作用,反过来,PAX8能够正向调控p53的表达,从而进一步转录激活HGSCs细胞质中p21的表达,促进细胞增殖^[57]。

卵巢细胞癌变过程中,细胞质p21的表达水平升高,促进卵巢癌细胞对顺铂产生耐药性,同时促进卵巢癌复发^[58]。与卵巢癌细胞OV2008相比,卵巢癌细胞C13中细胞质p21的表达水平更高,并且低剂量的顺铂能够诱导OV2008细胞中的p21由细胞核向细胞质转移。总之,细胞质p21可以作为治疗耐药性卵巢癌的潜在靶标。

4.2.3 肝癌

部分人类肝癌细胞表达p21,而且p21的高表达与患者短生存期有关,敲减p21则能延缓肝癌的发生发展进程。在慢性肝损伤期间,p21是肝脏祖细胞活化必需的,但p21对肝再生的影响取

表1 p21在不同肿瘤细胞中的定位及其生物学功能
Table 1 Location and biological functions of p21 in different tumor cells

Cancer	Gene interaction	Subcellular localization	Biological functions	References
Leukemia	<i>NF-κB, KLF2</i>	Nuclear	Induces leukemia cell differentiation and promoting apoptosis	[39~40]
Melanoma	<i>p53, ZESTE</i>	Nuclear	Inhibits cell proliferation	[42~43]
Colorectal cancer	<i>p53, CDKs</i>	Nuclear	p21 downregulation associates with p53 detection and the development of metastasis and poor survival. p21 inhibits cell proliferation by inhibiting cyclin/CDKs conformation	[51]
Prostate cancer	None observed	Nuclear	Nuclear p21 is accumulated to promote tumor cell apoptosis in response to anti-cancer drug treatment	[52]
Bladder cancer	None observed	Nuclear	Nuclear p21 is accumulated to promote tumor cell apoptosis in response to anti-cancer drug treatment	[54]
NSCLC	<i>PPARγ</i>	Nuclear	p21 inhibits cell proliferation in response to DNA damage	[49]
Breast cancer	<i>IKKβ</i>	Cytoplasmic	Increased total and cytoplasmic p21 expression was observed in primary cancer and was associated with the expression of <i>IKKβ</i>	[28]
	<i>HER-2</i>	Cytoplasmic	Positive correlation of <i>HER-2</i> expression and cytoplasmic p21 and associated with poor prognosis	[29]
Hepatocellular carcinoma	<i>p65</i>	Cytoplasmic	Cytoplasmic p21 associated with HCCs, especially in moderately and poorly differentiated HCCs, in tumors with p53 deletion or mutation, the expression of p21 is decreased by targeting down-regulation of p65, and cell proliferation is inhibited	[59]
Ovarian cancer	<i>CDK2</i>	Cytoplasmic	High levels of p21 correlate with poor survival	[58]
Testicular cancer	<i>CDK2</i>	Cytoplasmic	High cytoplasmic p21 expression enhances resistance to cisplatin of testicular embryonal carcinoma via activating CDK2	[60]

决于细胞内 p21 的表达水平,也取决于其在肿瘤微环境中的作用。Shiraki 等^[59]的研究发现,在多种肝癌细胞中,p21 主要定位在细胞质中,并且细胞质 p21 的表达在分化不完全的肝癌细胞中比分化良好的细胞中高,由此推测细胞质 p21 能够作为肝癌的预后靶标。

4.2.4 睾丸癌

睾丸癌是泌尿外科中恶性程度很高的肿瘤之一,并且能够对化疗药物产生较强耐受性。研究发现,在睾丸胚胎癌中,细胞质 p21 表达升高,随后通过抑制 CDK2 活性使肿瘤细胞产生对顺铂的耐药性,并且这种耐药机制与 Oct4/miR-106b/p21 调控途径有关^[60]。细胞质 p21 与睾丸癌的恶性程度呈正相关,可能是睾丸癌难以治愈的原因之一,未来可针细胞质 p21 开发治疗睾丸癌的靶向药物。

5 结语

p21 对细胞周期的调控具有重要意义,且同时参与了细胞凋亡、细胞衰老以及基因的转录调控等多种重要的生理过程,对肿瘤细胞的发生发展具有关键的调控作用。多项研究表明,p21 既可作为肿瘤抑制因子,也是促癌因子。由于亚细胞

定位及肿瘤细胞种类的不同,p21 的功能也不同。表 1 总结了 p21 在常见肿瘤中的定位及其生物学功能。当 p21 定位于细胞核时,能够抑制肿瘤的发生和发展;当其定位在细胞质时,能够促进乳腺癌、头颈癌、前列腺癌、睾丸癌等肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及耐药性。因此,充分了解 p21 的生物学功能及其转位调控机制能够为肿瘤靶向性的治疗提供重要的策略和方向。

参考文献(References):

- [1] GARTEL A L. Is p21 an oncogene[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(6): 1385-1386.
- [2] CHEN J, SAHA P, KORNBLUTH S, *et al.* Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21^{cm}[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(9): 4673-4682.
- [3] HARA K, UCHIDA M, TAGATA R, *et al.* Structure of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bound to an APIM peptide reveals the universality of PCNA interaction[J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 2018, 74(Pt 4): 214-221.
- [4] GARTEL A L, SERFAS M S, TYNER A L. p21—negative regulator of the cell cycle[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society*, 1996, 213(2): 138-149.

- [5] BARR A R, COOPER S, HELDT F S, *et al.* DNA damage during S-phase mediates the proliferation–quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14728.
- [6] SAMSON T, TAMARAA R, VLADIMIR N P, *et al.* Regulatory roles of p21 and apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in base excision repair[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(52): 48781–48789.
- [7] ARIMA Y, HIROTA T, BRONNER C, *et al.* Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21^{Cip1/WAF1}-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition[J]. *Genes Cells*, 2004, 9(2): 131–142.
- [8] KARAGIANNI P, AMAZIT L, QIN J, *et al.* ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(2): 705–717.
- [9] DASH B C, EI-DEIRY W S. Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclinB–Cdc2 kinase activity[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(8): 3364–3387.
- [10] CAPPELL S D, MARK K G, GARBETT D, *et al.* Emi1 switches from being a substrate to an inhibitor of APC/C^{CDH1} to start the cell cycle[J]. *Nature*, 2018, 558(7709): 313–317.
- [11] OREND G, HUNTER T, RUOSLAHTI E. Cytoplasmic displacement of cyclinE–cdk2 inhibitors p21^{Cip1} and p27^{Kip1} in anchorage-independent cells[J]. *Oncogene*, 1998, 16(20): 2575–2583.
- [12] BAO G C, WANG J G, JONG A. Increased p21 expression and complex formation with cyclin E/CDK2 in retinoid-induced pre-B lymphoma cell apoptosis[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(15): 3687–3693.
- [13] CHOI E J. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21[J]. *Nutrition and Cancer*, 2007, 59(1): 115–119.
- [14] KURAYOSHI K, OZONO E, IWANAGA R, *et al.* The key role of E2F in tumor suppression through specific regulation of tumor suppressor genes in response to oncogenic changes[M]// UCHIUMI F. *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells—Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics*, IntechOpen, 2018, DOI: 10.5772/intechopen.72125.
- [15] BRETONES G, DELGADO M D, LEÓN J. Myc and cell cycle control[J]. *Biochimica et Biophysica Acta—Gene Regulatory Mechanisms*, 2015, 1849(5): 506–516.
- [16] KIM E M, JUNG C H, KIM J, *et al.* The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(11): 3092–3100.
- [17] OU X H, LU Y, LIAO L F, *et al.* Nitidine chloride induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through a pathway involving p53, p21, Bax and Bcl-2[J]. *Oncology Reports*, 2014, 33(3): 1264–1274.
- [18] SUZUKI A, TSUTOMI Y, AKAHANE K, *et al.* Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21^{WAF1} and IAP gene family ILP[J]. *Oncogene*, 1998, 17(8): 931–939.
- [19] XU S Q, EI-DEIRY W S. p21^{WAF1/CIP1} inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269(1): 179–190.
- [20] ABBAS T, DUTTA A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(6): 400–414.
- [21] KARIMIAN A, AHMADI Y, YOUSEFI B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage[J]. *DNA Repair*, 2016, 42: 63–71.
- [22] ASADA M, YAMADA T, LCHIJO H, *et al.* Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21^{Cip1/WAF1} in monocytic differentiation[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(5): 1223–1234.
- [23] DE RENTY C, DEPAMPHILIS M L, ULLAH Z. Cytoplasmic localization of p21 protects trophoblast giant cells from DNA damage induced apoptosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97434.
- [24] HEO J I, OH S J, KHO Y J, *et al.* ERK mediates anti-apoptotic effect through phosphorylation and cytoplasmic localization of p21^{Waf1/Cip1/INK4} in response to DNA damage in normal human embryonic fibroblast (HEF) cells[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(4): 2785–2791.
- [25] HERON-MILHAVET L, FRANCKHAUSER C, RANA V, *et al.* Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(22): 8267–8280.
- [26] WANG W, NACUSI L, SHEAFF R J, *et al.* Ubiquitination of p21^{Cip1/WAF1} by SCF^{Skp2}: substrate requirement and ubiquitination site selection[J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 14553–14564.
- [27] XU C, KIM N G, GUMBINER B M. Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(24): 4032–4039.
- [28] PING B, HE X H, XIA W Y, *et al.* Cytoplasmic expression of p21^{CIP1/WAF1} is correlated with IKK β overexpression in human breast cancers[J]. *International Journal of Oncology*, 2006, 29(5): 1103–1110.
- [29] WINTERS Z E, LEEK R D, BRADBURN M J, *et al.* Cytoplasmic p21^{WAF1/CIP1} expression is correlated with HER-2/neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis[J]. *Breast Cancer Research*, 2003, 5(6): R242–R249.
- [30] ZOHNY S F, AL-MALKI A L, ZAMZAMI M A, *et al.* p21^{Waf1/Cip1}: its paradoxical effect in the regulation of breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2019, 26(2): 131–137.
- [31] LU H, SUN C Y, ZHOU T, *et al.* HSP27 knockdown increases cytoplasmic p21 and cisplatin sensitivity in ovarian carcinoma cells[J]. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 2016, 23(3): 119–128.
- [32] NITULESCU G M, MARGINA D, JUZENAS P, *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: the long journey from drug discovery to clinical use[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 48(3): 869–885.
- [33] SAURA C, RODA D, ROSELLÓ S, *et al.* A first-in-human phase I study of the ATP-competitive AKT inhibitor ipatasertib demonstrates robust and safe targeting of AKT in patients with solid tumors[J]. *Cancer Discovery*, 2017, 7(1): 102–113.

- [34] KIM S B, DENT R, IM S A, *et al.* Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *The Lancet Oncology*, 2017, 18(10): 1360-1372.
- [35] XING Y, LIN N U, MAURER M A, *et al.* Phase II trial of AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation[J]. *Breast Cancer Research*, 2019, 21(1): 1-12.
- [36] ZHOU Y Q, LI G, JI Y, *et al.* Cytoplasmic p21 induced by p65 prevents doxorubicin-induced cell death in pancreatic carcinoma cell line[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2012, 19: 15.
- [37] YOUSEFI B, RAHMATI M, AHMADI Y. The roles of p53R2 in cancer progression based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic p21[J]. *Life Sciences*, 2014, 99(1-2): 14-17.
- [38] 邓家德, 李扬. p21^{WAF1} 蛋白在白血病中的表达及其意义[J]. *广州医药(DENG Jia-de, LI Yang. Significance of p21^{WAF1} expression in leukaemia[J]. Guangzhou Medical Journal)*, 2000, 31(2): 19-20.
- [39] CASINI T, PELICCI P G. A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest[J]. *Oncogene*, 1999, 18(21): 3235-3243.
- [40] NICOLAE C M, O'CONNOR M J, CONSTANTIN D, *et al.* NF- κ B regulates p21 expression and controls DNA damage-induced leukemic differentiation[J]. *Oncogene*, 2018, 37(27): 3647-3656.
- [41] WU J H, LINGREL J B. KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1}[J]. *Oncogene*, 2004, 23(49): 8088-8096.
- [42] VIDAL M J, LOGANZO F, HAYWARD N K, *et al.* Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour-suppressor gene in malignant melanomas[J]. *Melanoma Research*, 1995, 5(4): 243-250.
- [43] GOROSPE M, CIRIELLI C, WANG X, *et al.* p21^{Waf1/Cip1} protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells[J]. *Oncogene*, 1997, 14(8): 929-935.
- [44] SCHMIDT K, CARROLL J S, YEE E, *et al.* The lncRNA SLNCR recruits the androgen receptor to EGR1-bound genes in melanoma and inhibits expression of tumor suppressor p21[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(8): 2493-2507.
- [45] FAN T, JIANG S L, CHUNG N, *et al.* EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/*CDKN1A* expression[J]. *Molecular Cancer Research*, 2011, 9(4): 418-429.
- [46] JAUNE E, ROCCHI S. Metformin: focus on melanoma[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 472.
- [47] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(6): 394-424.
- [48] FUJINO M, DOSAKA-AKITA H, HARADA M, *et al.* Prognostic significance of p53 and ras p21 expression in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer*, 1995, 76(12): 2457-2463.
- [49] HAN S W, SIDELL N, FISHER P B, *et al.* Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human lung carcinoma cells[J]. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(6): 1911-1919.
- [50] BUKHOLM I K, NESLAND J M. Protein expression of p53, p21^{WAF1/CIP1}, Bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas[J]. *Virchows Archiv*, 2000, 436(3): 224-228.
- [51] ZIRBES T K, BALDUS S E, MOENIG S P, *et al.* Prognostic impact of p21^{Waf1/Cip1} in colorectal cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2000, 89(1): 14-18.
- [52] ROY S, KAUR M, AGARWAL C, *et al.* p21 and p27 induction by silibinin is essential for its cell cycle arrest effect in prostate carcinoma cells[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, 6(10): 2696-2707.
- [53] VIJAYABABU M, KANAGARAJ P, ARUNKUMAR A, *et al.* Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2005, 131(11): 765-771.
- [54] WATANABE S, YAMAGUCHI S, FUJII N, *et al.* Nuclear co-expression of p21 and p27 induced effective cell-cycle arrest in T24 cells treated with BCG[J]. *Cytotechnology*, 2019, 1(2): 1-11.
- [55] CAFFO O, DOGLIONI C, VERONESE S, *et al.* Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up[J]. *Clinical Cancer Research*, 1996, 2(9): 1591-1599.
- [56] CHANG B D, WATANABE K, BROUDE E V, *et al.* Effects of p21^{Waf1/Cip1/Sbi1} on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, 97(8): 4291-4296.
- [57] GHANNAM-SHAHBARI D, JACOB E, KAKUN R R, *et al.* PAX8 activates a p53-p21-dependent pro-proliferative effect in high grade serous ovarian carcinoma[J]. *Oncogene*, 2018, 37(17): 2213-2224.
- [58] XIA X, MA Q F, LI X, *et al.* Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer[J]. *BioMed Central Cancer*, 2011, 11: 399.
- [59] SHIRAKI K, WAGAYAMA H. Cytoplasmic p21^{WAF1/CIP1} expression in human hepatocellular carcinomas[J]. *Liver International*, 2006, 26(8): 1018-1019.
- [60] KOSTER R, DI PIETRO A, TIMMER-BOSSCHA H, *et al.* Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(10): 3594-3605.