

# 鸡 CDC25B-mRNA 探针制备及其在鸡十二指肠黏膜的原位杂交反应

章君慧<sup>1</sup>, 侯放亮<sup>2</sup>, 张 晖<sup>1</sup>, 包慧君<sup>1</sup>, 周 强<sup>3</sup>, 李梅英<sup>1</sup>, 初晓红<sup>1</sup>, 陈秋生<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095;

2. 陕西省家畜改良站, 泾阳 713702; 3. 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

**摘 要:** 应用 RT-PCR 方法从鸡胚中扩增 CDC25B 基因片段, 将其连接于 pGM-T easy。分别利用 pGM-T easy 中 T7 和 SP6 启动子及其 RNA 聚合酶, 以线性化的 CDC25B/pGM-T easy 为模板转录合成正、反义 DIG 标记 RNA 探针。以合成的地高辛 (DIG) 标记的 CDC25B-mRNA 为探针, 进一步应用原位杂交组织化学方法 (*in situ* hybridization histochemistry, ISHH) 探查 CDC25B-mRNA 在鸡十二指肠黏膜的分布。结果表明, 成年鸡十二指肠肠腺上皮细胞中有丰富的 CDC25B-mRNA 的转录, 其中 CDC25B-mRNA 探针杂交阳性细胞在肠腺基底部和小肠绒毛中部分别占上皮细胞总数的  $81.60\% \pm 9.63\%$  和  $36.21\% \pm 8.81\%$ 。原位杂交阳性产物大部分分布于十二指肠肠腺上皮“干细胞部”和“增生部”细胞的胞质和胞核, 肠腺基部杂交信号由下至上逐渐减弱, 至小肠绒毛下部消失, 转为阴性。在黏膜肌层以及肌肉层杂交反应呈阴性。本研究从基因水平证明了鸡十二指肠黏膜肠腺上皮“干细胞部”和“增生部”细胞中有 CDC25B-mRNA 的存在, 表明该区域有活跃的增殖过程, 以补充绒毛上端死亡脱落的细胞。

**关键词:** 鸡十二指肠黏膜; CDC25B-mRNA; 探针合成; 原位杂交

中图分类号: S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0769-06

## Preparation of Chicken CDC25B-mRNA Probe and Its Detection in Duodenal Mucosa by *in situ* Hybridization

QIN Jun-hui<sup>1</sup>, HOU Fang-liang<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, BAO Hui-jun<sup>1</sup>, ZHOU Qiang<sup>3</sup>,  
LI Mei-ying<sup>1</sup>, CHU Xiao-hong<sup>1</sup>, CHEN Qiu-sheng<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095,

China; 2. Livestock Improvement Station of Shann'xi, Jingyang 713702, China;

3. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In order to investigate the distribution of CDC25B-mRNA in the duodenal mucosa of chicken, the sense and anti-sense digoxigenin (DIG) labeled RNA probe were prepared and utilized. The fragment of CDC25B gene was obtained by RT-PCR through total RNA of chicken embryos. Amplified cDNA fragment was subcloned into pGM-T easy vector, and the plasmid was transformed into *E. coli* DH<sub>5α</sub> and screened by “white-blue plaque selection”. The recombinant plasmid was identified by *EcoR* I restriction enzyme digestion and sequencing, then CDC25B/pGM-T easy vector was linearized with the restriction enzyme of *Nco* I and *Spe* I respectively. The sense and anti-sense DIG labeled RNA probe were produced by SP6 and T7 RNA polymerase respectively and transcription *in vitro* according to the protocol of “DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)”. The sense and anti-sense RNA probes were prepared successfully. The distribution of CDC25B-mRNA in the duodenal mucosa of chicken was examined by *in situ* hybridization histo-

收稿日期: 2008-05-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30671513)

作者简介: 章君慧 (1983-), 女, 壮族, 硕士, 主要从事发育生物学研究, E-mail: diandian1002000@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 陈秋生, E-mail: chenqsh305@yahoo.com.cn

chemistry(ISHH). There were many labeled cells distributing in the duodenal mucosa of adult chicken. Of these labeled cells,  $81.60\% \pm 9.63\%$  and  $36.21\% \pm 8.81\%$  CDC25B-mRNA positive cells were distributed in the basilar part and middle portion of duodenal mucosa of adult chickens respectively. Most of these labeled cells were positive in the regions of the stem cell and proliferation. The positive signals were both in the cytoplasm and cell nucleus. The signals of ISHH were decreased from basilar part to upper in the crypt of lieberkuhn and disappeared in the inferior of villi of small intestine. The labeled cells were both negative in the lamina muscularis mucosae and muscular layer. In conclusion, the sense and anti-sense DIG labeled RNA probes for ISHH of CDC25B were prepared successfully in this experiment, which provided an approach to study further the location of CDC25B-mRNA in chicken. The results of ISHH confirmed the existence of CDC25B-mRNA and athletic proliferation activities in the duodenal mucosa of adult chicken.

**Key words:** duodenal mucosa of chicken; CDC25B-mRNA; probe synthesis; *in situ* hybridization histochemistry

CDC25 磷酸酶家族是一类在生物进化过程中高度保守的细胞周期调控因子<sup>[1]</sup>, 调节早期胚胎发育; 在成体, CDC25 的异常活化会导致人类一系列高发恶性肿瘤的发生。近年来对 CDC25B 磷酸酶的研究成为发育生物学和肿瘤医学的一个热点, 许多研究认为它与多种肿瘤的发生、发展以及预后有关<sup>[2]</sup>, 检测 CDC25B 的表达有望成为判断肿瘤细胞有丝分裂指数和增殖能力的一个可靠的分子指标<sup>[3]</sup>。鸡是发育生物学研究的重要模式生物之一, 对其保守基因结构和功能的研究不但可以阐述其在发育生物学中的作用, 而且得到的结果还可运用到人和哺乳动物疾病的预防和控制上<sup>[4]</sup>。作者应用地高辛标记的 RNA 探针在鸡成体组织上进行原位杂交试验, 检测 CDC25B 基因转录体在鸡十二指肠黏膜的表达情况, 以期能与哺乳动物中 CDC25B 在成体组织上的表达情况进行比较, 为研究禽类消化特征和发育的分子机制提供实验依据, 并为研究 CDC25B 的致瘤机理以及合成其抑制剂提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

10 只健康成年三黄鸡, 体质量 1.5~2.0 kg, 购自南京市卫岗农贸中心。Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司, Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶购于 TaKaRa 公司, pGM-T easy 质粒购于北京天为时代公司, 地高辛 RNA 标记试剂盒 (SP6/T7)、碱性磷酸酶标记的地高辛抗体及 NBT/BCIP 显色试剂购于 Roche 公司。

### 1.2 鸡 CDC25B/pGM-T easy 质粒的构建

参照鸡 CDC25B mRNA (GenBank 序列号 AJ720997) 设计引物, 上游引物: 5'-GGAGCCCT-GCGTGCCGAG-3' (对应于 AJ720997: 800-818); 下游引物: 5'-CAATTAACCCTCTAAAGGGTC-CTGGTGTGGCC-3' (对应于 AJ720997: 1359-1375), 由上海 Invitrogen 公司合成。

用 Trizol 试剂盒提取鸡胚总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 获得 575 bp 的 cDNA 目的片段。用 TA 克隆的方法将目的片段连接至 pGM-T easy。将此质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  株感受态细胞, 挑取阳性克隆进行扩增培养, 小量提取质粒, 再根据目的片段本身的酶切位点和 pGM-T easy 的多克隆酶切位点, 选用 EcoR I 酶进行酶切鉴定, 然后测序验证。

### 1.3 地高辛标记鸡 CDC25B-mRNA 正、反义 RNA 探针的合成

将阳性株扩增后提取的质粒分别用限制性内切酶 Nco I 和 Spe I 进行酶切, 使其完全线性化。回收酶切片段, 作为合成正、反义 RNA 探针的模板, 按 Roche 地高辛标记试剂盒说明书分别用 Sp6 和 T7 转录酶进行体外转录, 合成地高辛标记的正、反义 RNA 探针。合成的 RNA 探针用变性琼脂糖电泳和紫外分光光度计测定浓度。

### 1.4 原位杂交试验 (ISHH)

正常鸡经颈动脉放血处死, 迅速取十二指肠于 4% 多聚甲醛中固定 4 h, 然后于含 200 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖的 PBS 中 4℃ 过夜, 冰冻切片 (10  $\mu$ m) 并融于多聚赖氨酸预处理过的载玻片上, 分别用于原位杂交试验和 HE 染色。杂交前后的处理过程参考前人介

绍的方法<sup>[5]</sup>,并稍加改进:切片依次经 PBS 漂洗 5 min×3 次,0.1 mol·L<sup>-1</sup>甘氨酸/PBS 漂洗 5 min,0.3% TritonX-100/PBS 漂洗 5 min,蛋白酶 K(2 mg·L<sup>-1</sup>)溶液 37℃ 消化 30 min,4%多聚甲醛 4℃ 再固定 5 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,0.25%乙酸酐(用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>三乙醇胺新鲜配置)中漂洗 5 min,2×SSC10 min;预杂交液中 42℃ 预杂交 2 h,杂交液中(含地高辛标记 mRNA 反义 RNA 探针 2 μg·mL<sup>-1</sup>)42℃ 杂交 18 h;杂交后切片经过 2×SSC 洗 15 min×2 次,1×SSC15 min×2 次,然后 0.1×SSC30 min×2 次,洗液温度均为 37℃;再经 Buffer I 10 min×2 次,Blocking solution 内 37℃ 30 min,Buffer I 10 min×2 次,1:500 稀释的碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体,37℃ 孵育 2 h;Buffer I 10 min×2 次,Buffer II 10 min,然后于 NBT/BCIP 显色液中室温 1.5~3 h 避光显色,封片观察。

设计 2 个阴性对照:(1)用地高辛标记的 CDC25B-mRNA 正义探针代替反义探针进行杂交;(2)用普通羊血清代替羊抗地高辛抗体。其他步骤相同。

取鸡十二指肠段冰冻切片,常规 HE 染色,BHO-2 显微镜下观察。

### 1.5 数据统计

在 200 倍视野下,在原位杂交切片上,随机选取并统计 1 个视野中的 CDC25B-mRNA 阳性细胞数量。同时统计与其相邻切片对应视野中 HE 染色的细胞数量。每只鸡选取 1 个视野,共统计 10 只鸡(n=10)。以相邻切片的 HE 染色结果为参照,计算鸡十二指肠的肠腺基底部和小肠绒毛中部 CDC25B-mRNA 阳性细胞的百分率,并统计平均百分率及标准差。

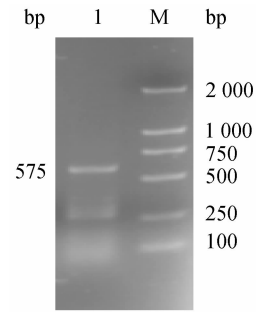
## 2 结果与分析

### 2.1 CDC25B/pGM-T easy 质粒的构建和酶切鉴定

从鸡胚中提取 RNA,用 RT-PCR 成功扩增出 575 bp 的目的片段(图 1)。阳性克隆菌株扩增培养,提取质粒,再用 *EcoR* I 进行酶切鉴定(图 2)。

### 2.2 探针浓度的测定

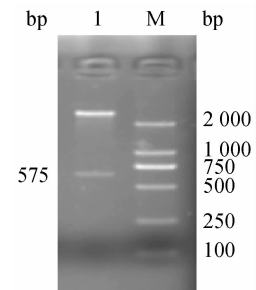
合成好的 RNA 探针用 2%变性琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计进行浓度鉴定:正义探针浓度为 288 ng·μL<sup>-1</sup>;反义探针浓度为 280 ng·μL<sup>-1</sup>。一般原位杂交 RNA 探针浓度要求为 0.5~5 ng·μL<sup>-1</sup>,表明成功合成 CDC25B 的地高辛标记



1. RT-PCR product; M. DL2000 marker

图 1 CDC25B/RT-PCR 扩增目的片段

Fig. 1 Gel electrophoresis of the CDC25B fragment from RT-PCR



1. CDC25B/pGM-T easy digested with *EcoR* I; M. DL2000 marker

图 2 CDC25B/pGM-T easy 质粒的 *EcoR* I 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of CDC25B/pGM-T easy with *EcoR* I

RNA 探针。进一步将探针稀释成 10 ng·μL<sup>-1</sup>,分装,-20℃ 保存,用于下一步原位杂交试验。

### 2.3 原位杂交试验结果

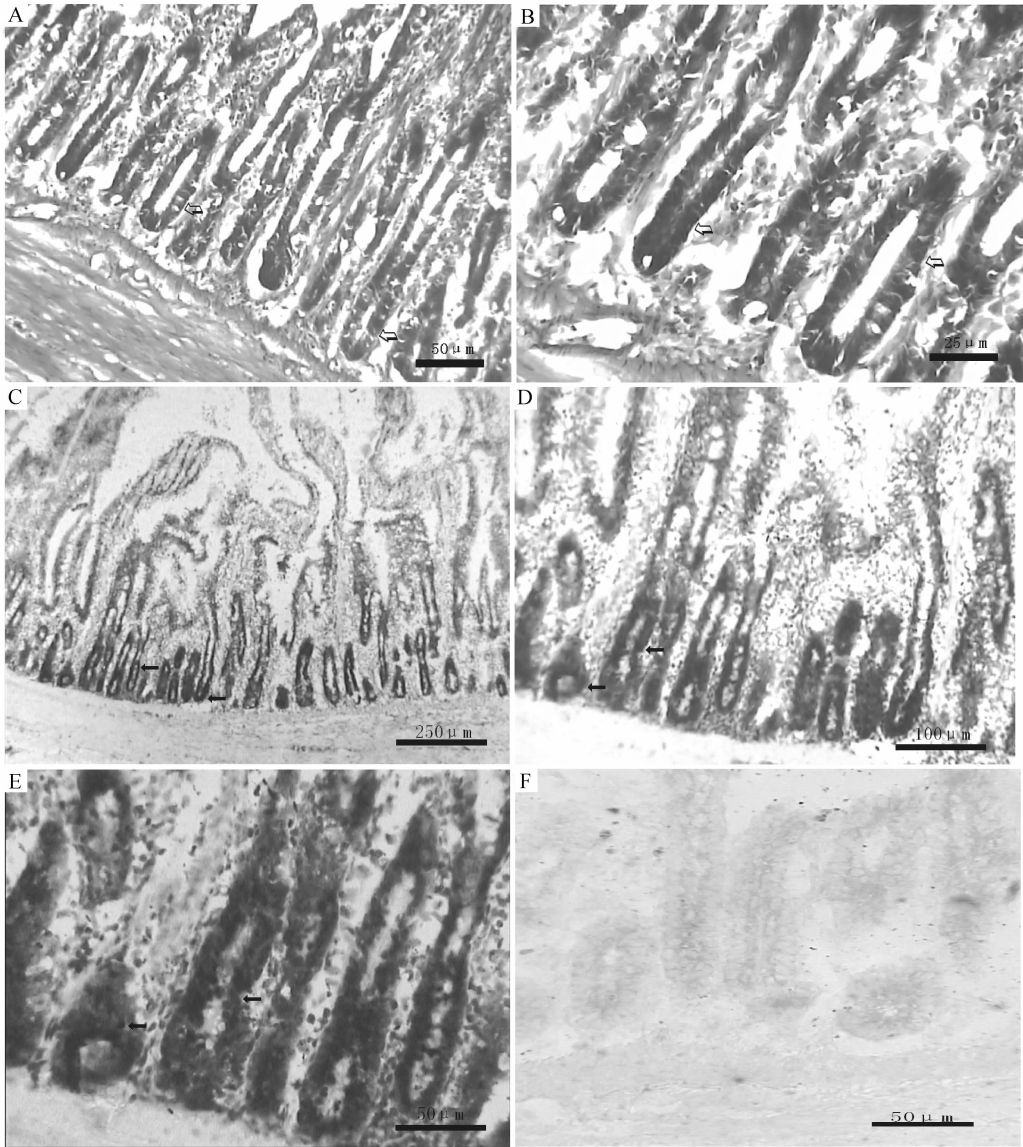
禽类消化道黏膜表面的绒毛上皮有吸收细胞、杯状细胞和内分泌细胞。肠腺除有上述 3 种细胞外,还有未分化细胞和潘氏细胞。未分化细胞分布于肠腺下半部,分裂间期的未分化细胞呈柱状,胞质嗜碱性,核位于近基底面(如图 3-A、B)。CDC25B-mRNA 与反义探针结合后的阳性产物呈蓝紫色,阳性杂交信号主要位于十二指肠固有层肠腺的中下段未分化细胞中(如图 3-C 至 3-E)。

低倍镜下观察,可见小肠腺上皮的杂交反应在基底部由下至上呈强弱趋势,腺体底部反应最强,甚至使细胞间的界限消失;小肠绒毛上皮中部杂交信号逐渐减弱,反应渐渐消失;小肠绒毛黏膜上皮反应为阴性,黏膜肌层和肌肉层的反应结果呈阴性(如图 3-C)。高倍镜下发现,阳性细胞集中分布在肠腺基

底部的“潘氏细胞-干细胞部”和肠腺体部的“增生部”,该区大部分为未分化细胞所在的区域。

用地高辛标记的 CDC25B-mRNA 正义探针(图

3-F)代替反义探针进行原位杂交结果为阴性;用普通羊血清代替羊抗地高辛抗体原位杂交结果也为阴性,未见任何蓝紫色深染的细胞。



◁. 肠腺; ◀. 阳性细胞; A. 十二指肠黏膜 (HE 染色),  $\times 100$ ; B. 十二指肠黏膜 (HE 染色),  $\times 200$ ; C. 十二指肠黏膜 ISHH 反应, NBT/BCIP 显色,  $\times 40$ ; D. 十二指肠黏膜 ISHH 反应, NBT/BCIP 显色,  $\times 100$ ; E. 十二指肠黏膜 ISHH 反应, NBT/BCIP 显色,  $\times 200$ ; F. 阴性对照(正义探针),  $\times 200$

◁. Intestinal gland; ◀. Positive cells; A. Duodenal mucosa (HE staining),  $\times 100$ ; B. Duodenal mucosa (HE staining),  $\times 200$ ; C. Reaction of ISHH on the duodenal mucosa, NBT/BCIP staining  $\times 40$ ; D. Reaction of ISHH on the duodenal mucosa, NBT/BCIP staining,  $\times 100$ ; E. Reaction of ISHH on the duodenal mucosa, NBT/BCIP staining  $\times 200$ ; F. Negative control,  $\times 200$

图 3 鸡十二指肠黏膜 CDC25B 的原位杂交试验结果

Fig. 3 Distribution of CDC25B-mRNA in the duodenal mucosa of Chicken by ISHH

## 2.4 阳性细胞数据统计结果

以与杂交切片相邻的另一张切片 HE 染色的细胞数量为参照,分别统计了 10 只鸡十二指肠的肠腺底部和小肠绒毛中部 CDC25B-mRNA 反义探针 ISHH 阳性细胞百分率并进行分析,其中 CDC25B-mRNA 探针杂交阳性细胞在肠腺底部和小肠绒毛中部分别占上皮细胞总数的  $81.60\% \pm 9.63\%$  和  $36.21\% \pm 8.81\%$ 。由于小肠绒毛顶部阳性细胞极少,故未进行统计。从统计结果可以看出,小肠腺上皮的杂交反应从肠腺底部由下至上呈由强到弱的趋势。

## 3 讨论

**3.1** CDC25 同源物调控有丝分裂期的启动主要是通过去磷酸化,使特异性 CDK 复合物发生激活来调节细胞分裂周期和转变的进程。除了植物,在所有真核生物组织中均发现有 CDC25 磷酸酶的存在。哺乳动物中已鉴定出 3 种 CDC25 的同源物分别为 CDC25A、B 和 C;在非洲蟾蜍中发现有 CDC25A 和 C;而在鸡胚试验中发现,鸡胚中仅存在 2 种磷酸酶, CDC25A 和 B,至今还没发现有关鸡 CDC25C 的报道<sup>[6]</sup>。早期认为它们中的任何一个仅在细胞周期的某个阶段发挥作用<sup>[7]</sup>,但近来研究表明,所有 CDC25 异构体都协同调控正常细胞分裂,促进细胞周期运转<sup>[8-9]</sup>。CDC25B 作为有丝分裂的激活剂,主要在 G2/M 期通过对 CDK 激酶的 Tyr-15 和 Thr-14 去磷酸化而激活 CDK,促进细胞进入有丝分裂期<sup>[10]</sup>。有关 CDC25B 在鸡体内的表达,仅见 Bénazéraf 等在早期鸡胚试验的报道<sup>[11]</sup>,在鸡成体组织中还未见有关 CDC25B 在消化道上皮表达的报道,为了探究 CDC25B 的表达水平与正在增殖的细胞的关系,作者通过对 GenBank 数据库中 CDC25B 基因(AJ720997)进行分析,设计合成了一对引物,通过 RT-PCR 技术获得 575 bp 的 DNA 片段,利用随机引物法,将纯化的 DNA 片段标记成地高辛探针,用于分析鸡十二指肠黏膜中的 CDC25B-mRNA 水平。CDC25B 反义 RNA 原位杂交显示, CDC25B 基因广泛表达于鸡十二指肠黏膜,尤其是正在分裂的干细胞中表达量相当丰富。CDC25B 基因分布广泛,提示该基因在禽类小肠黏膜上皮的增殖、迁移和分化中可能起重要作用。

**3.2** 哺乳动物小肠的黏膜上皮与肠腺上皮均为单层柱状上皮,在黏膜表面的绒毛上皮有吸收细胞、杯

状细胞和内分泌细胞,而肠腺还有未分化细胞和潘氏细胞。未分化细胞分布于肠腺下半部,常见分裂相,它可增生、分化和补充从绒毛顶端脱落的吸收细胞和杯状细胞。一般认为<sup>[12-13]</sup>,肠内分泌细胞与潘氏细胞也源于未分化细胞,故这种细胞是肠上皮的干细胞,又称增殖细胞,他们与前述的未分化细胞结构是一致的。未分化细胞增殖分化并向绒毛顶部移动,以更新肠腺及绒毛的各种细胞。根据小肠上皮细胞的更新过程,将哺乳动物小肠黏膜上皮分为 5 部分,包括肠腺基部的“潘氏细胞-干细胞部”、肠腺中段的“增生部”、肠腺上部的“成熟部”以及绒毛大部分的“功能部”、绒毛顶端“脱落部”或“脱落带”。作者应用地高辛标记的 RNA 探针在成年鸡十二指肠黏膜进行原位杂交染色,检测到 CDC25B 基因转录体在小肠隐窝上皮中的表达情况——在中下段的未分化细胞中大量表达,其中在肠腺底部阳性细胞占上皮细胞总数的  $81.60\% \pm 9.63\%$ ,上升到小肠绒毛中段的阳性细胞比例降至  $36.21\% \pm 8.81\%$ ,而在小肠绒毛顶端,仅见个别阳性细胞。该表达在小肠腺上皮由基底部下部至上呈由强到弱的趋势,底部反应最强,细胞着色也较深,甚至使上皮细胞间的界限消失,而至绒毛中段黏膜上皮反应渐弱。CDC25B-mRNA 在鸡十二指肠黏膜分布与表达的规律,说明在肠腺底部至中段的细胞正在进行着活跃的增殖,这与小肠隐窝具有增殖性的说法是对应的,而且其增殖趋势恰与哺乳动物分区相一致,故也可将鸡的肠腺和黏膜上皮分为肠腺基部的“潘氏细胞-干细胞部”和中部的“增生部”、肠腺上部“成熟部”、绒毛大部分的“功能部”以及绒毛顶端的“脱落部”。

**3.3** CDC25B 存在不同的亚型,不同的亚型可能与细胞的定位有关。关于 CDC25B 在不同的细胞周期阶段定位仍具有很大的争议,可能是因为每种剪接形式有不同的定位。CDC25B 有 5 种可供选择的剪接形式,他们在人类细胞和哺乳动物细胞中以不同的水平存在,这些形式的生理学差异还不清楚<sup>[8]</sup>,大部分的研究都未区分剪接体。然而,已经有研究证实 S 期和 M 期 CDC25B 的剪接体在细胞核和细胞质之间来回穿梭,并且该过程是被 14-3-3 结合蛋白和 CDC25B 中的核输出信号(NES)和核定位信号(NLS)的存在联合介导<sup>[14-16]</sup>。CDC25B 属于短半衰期蛋白,它的 mRNA、蛋白水平、激酶活性及在细胞中的分布变化不大,不完全随细胞周期时相的转

换而改变。在细胞周期各阶段均有 CDC25B 的表达,在细胞间期,没有活性的 Cdk1/cyclinB 定位在细胞质,而 CDC25B 存在于细胞核中;在 G1 期 CDC25B 定位于细胞质和细胞核中,S 和 G2 期则定位于细胞质,在 G1-S/G2 期达到峰值;在 G2 期的末期,CDC25B 被转运进入细胞质,活化的 CDC25B 能够在体内去除 CDK1 中的酪氨酸残基,使 Cdk1/cyclinB 复合物去磷酸化并使其激活,促进细胞分裂<sup>[17-18]</sup>。而在 M 期 CDC25B 又由细胞质转向核区<sup>[19]</sup>。本试验显示的阳性信号分布于细胞核和细胞质,胞质和胞核均呈紫蓝色,这一结果在分子形态学上支持如下观点: CDC25B 存在于细胞周期的不同时期,在 S 期后期以及 G2 前期积累并在 S/G2 转换时达到峰值,并在核质中来回穿梭。

#### 参考文献:

- [1] NISSON I, HOFFMANN I. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family [J]. *Progress in Cell Research*, 2000, 4:107-114.
- [2] HORTWELL L, KASTAN M. Cell cycle control and cancer [J]. *Science*, 1994, 266:182-186.
- [3] 翟德忠,黄强. 细胞周期蛋白依赖性激酶 cdc2 与恶性肿瘤发生发展的研究 [J]. *肿瘤*, 2006, 26(5):489-491.
- [4] CLAUDIO D. The Chick: A great model system commentary becomes even greater [J]. *Developmental Cell*, 2005, 8:9-17.
- [5] 冯亚玫,柳金雄,陈秋生,等. 鸡 SP-mRNA 探针制备及其在 INR 的杂交反应 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(1):117-122.
- [6] BOUTROS R, LOBJOIS V, DUCOMMUN B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? [J]. *Cancer*, 2007, 7:495-507.
- [7] WILLKER E, YAFFEM B. Proteins—a focus on cancer and human disease [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2004, 37: 633-642.
- [8] BOUTROS R, DOZIER C, DUCOMMUN B. The when and wheres of Cdc25 phosphatases [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18:1-7.
- [9] 马云彤,齐浩. CDC25 在细胞周期运行和细胞周期检验点应答中的作用和调控机制 [J]. *西安文理学院学报:自然科学版*, 2006, 9(4):11-17.
- [10] LAMMER C, WAGERER S. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells [J]. *Journal of Cell Science*, 1998, 111: 2445-2453.
- [11] BENAZERAF B, CHEN QS, Peco E, et al. Identification of an unexpected link between the Shh pathway and a G2/M regulator, the phosphatase CDC25B [J]. *Developmental Biology*, 2006, 294:133-147.
- [12] 成令忠,钟翠平,蔡文琴,等. 现代组织学 [M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2003.
- [13] 布卢姆. 组织学 [M]. 北京:科学出版社,1984.
- [14] BULAVIND V, HIGASHIMOTO Y, POPOFFI J, et al. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires P38 kinase [J]. *Nature*, 2001, 411 (6833): 102-107.
- [15] LINDQVIST A, KALLSTORM H, ROSENTHAL K. Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117:4979-4990.
- [16] UCHIDA S, OHTSUBO M, SHIMURA M, et al. Nuclear export signal in CDC25B [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316:226-232.
- [17] GABRIELLI B, DESOUZA C, ELLEM K, et al. Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells [J]. *J Cell Sci*, 1996, 109:1081-1093.
- [18] LINDQVIST A, KALLSTROM H, LUNDGREN A, et al. CDC25B cooperates with CDC25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1/Cdk1 at the centrosome [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171 (1):35-45.
- [19] GASPAROTTO D, MAESTRO R, PICCININ S, et al. Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers [J]. *Cancer Res*, 1997, 57 (12): 2366-2368.