

# 氧化修饰高密度脂蛋白对培养人动脉平滑肌细胞 细胞周期蛋白D<sub>1</sub>基因表达的影响\*

江渝 刘秉文\*\* 覃扬 孙芝琳

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

**摘要** 动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块中的主要细胞, 它的增殖在AS形成过程中极其重要。利用体外培养的人主动脉SMC, 观察了天然高密度脂蛋白(native high density lipoprotein, N-HDL)及氧化修饰HDL(oxidized HDL, OX-HDL)对培养人主动脉SMC cyclin D<sub>1</sub>(细胞周期蛋白D<sub>1</sub>)基因转录表达的影响。结果表明: (1)N-HDL对SMC cyclin D<sub>1</sub>基因表达无影响( $P > 0.05$ ); (2)OX-HDL使SMC cyclin D<sub>1</sub>基因表达显著增强( $P < 0.01$ ), 其表达量随时间(2, 12, 24 h)延长而增加。上述结果表明, OX-HDL的致AS作用可能与其刺激SMC cyclin D<sub>1</sub>基因表达增加有关。

**关键词** 动脉平滑肌细胞, 细胞周期蛋白D<sub>1</sub>基因, 基因表达, 氧化修饰高密度脂蛋白, 动脉粥样硬化

## Effect of Oxidatively Modified High Density Lipoprotein on Transcriptional Expression of Cyclin D<sub>1</sub> Gene in Cultured Human Arterial SMC

J IANG Yu, L U Bingwen, Q N Yang, SUN Zhilin

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

**Abstract** The smooth muscle cells (SMC) are the predominant type of cells within atherosclerotic lesions, and their proliferation plays an important role in the process of atherosclerosis (AS) genesis. Using the establishment of primary culture and subculture method for human arterial SMC, the effects of Native HDL and oxidized HDL on cyclin D<sub>1</sub> gene transcriptional expression were observed. Results are as follows: (1)N-HDL had no effects on the expression of cyclin D<sub>1</sub> gene in the cultured human SMC ( $P > 0.05$ ); (2)OX-HDL promoted the expression of cyclin D<sub>1</sub> gene significantly ( $P < 0.01$ ), the expression increased with the SMC incubating time (2, 12 and 24 hours) prolonged. These results suggest that the OX-HDL's atherogenic role may be closely related to its stimulating effect on cyclin D<sub>1</sub> gene expression.

**Key words** Arterial smooth muscle cell, Oxidized high density lipoprotein, Cyclin D<sub>1</sub> gene expression, Atherosclerosis

大量研究表明, HDL 具有抗AS作用, 而一旦HDL 发生氧化修饰(OX-HDL)后即具有致AS作用<sup>[1-3]</sup>。最近, 本室先后报道, 在高脂膳食诱发家兔高脂血症动物模型体内和内源性高甘油三酯血症患者体内不仅存在氧化修饰低密度脂蛋白(OX-LDL), 氧化修饰极低密度脂蛋白(OX-VLDL), 而且也存在氧化修饰高密度脂蛋白(OX-HDL)<sup>[4,5]</sup>。说明在某些特殊情况下活体内HDL 也可发生氧化修饰。

动脉平滑肌(SMC)是AS 斑块中的主要细胞成分, 它的增殖在AS 的形成过程中发挥着关键作用。由于SMC 尤其是人体动脉SMC 体外培养较难等

\* 教育部博士点科学基金及美国纽约中华医学基金部分资助

\*\* 联系人 Tel: (028) 5501289, Fax: (028) 5583252

E-mail: mailbox@wum.s.edu.cn

江渝, 男, 1961年2月生, 博士, 副教授

收稿日期: 1999-01-15, 修回日期: 1999-03-17

原因,使有关 SMC 的研究工作受到限制.在所查国内外文献中,迄今尚未见有关 OX-HDL 对培养人主动脉 SMC 细胞周期蛋白(cyclin) $D_1$  基因表达影响的报道.我们在建立人主动脉 SMC 体外培养方法的基础上,利用斑点杂交分析和 Northern 转膜印迹分析,观察了 OX-HDL 与人 SMC 保温不同时间, cyclin  $D_1$  基因表达的变化,为探讨 OX-HDL 刺激动脉 SMC 增殖的分子机制奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

核酸探针 cyclin  $D_1$  质粒与菌种由文一博士馈赠,  $\alpha$ -actin 重组质粒和 HB109 宿主菌由本室保存.

人主动脉 SMC 第 12~17 代(自行培养). DMEM 培养基(GBCO, BRL), 新生小牛血清(成都华西生化制品厂); HEPES (Merck); 胰蛋白酶(Difco, 上海化学试剂站进口分装); 配制消化液与 Hank 氏液所需其它试剂均为国产分析纯 L-谷氨酰胺, 丙酮酸钠(Sigma); 青霉素, 链霉素, 庆大霉素(华北制药厂); 二氧化碳温育箱(QUENE, USA).

核糖核酸酶 A, 无 RNA 酶的 DNA 酶, *EcoR* I, *Hind* III, 核酸 marker, MOPS, Sarcosyl(华美公司); 地高辛 DNA 标记及检测试剂盒(宝灵曼公司); 玻璃乳 DNA 分离系统由本室保存; DEPC, 盐酸胍(Sigma 公司).

### 1.2 方法

#### 1.2.1 核酸探针的制备及标记

Cyclin  $D_1$  和  $\alpha$ -actin 重组质粒分别转化宿主菌后, 均按碱裂解法分离纯化, 经相应的限制性内切酶消化后, 用玻璃乳 DNA 分离法回收插入片段. 按照试剂盒提供的方法, 采用随机引物法标记探针.

#### 1.2.2 SMC 总 RNA 提取

按酸性盐酸胍-酚-氯仿一步法<sup>[6]</sup>进行.

#### 1.2.3 HDL 的制备、氧化修饰及鉴定

1.2.3.1 人血浆 HDL 的制备: 新鲜人血浆购自成都市中心血站, 人血浆 HDL 采用本室张林华等<sup>[7]</sup>一次性密度梯度超速离心法制备, 测定纯化的 HDL 蛋白质含量. 分离的 HDL 置含 0.2% EDTA 的 PBS 透析 48 h. 超滤除菌后 4℃ 保存.

1.2.3.2 HDL 的氧化修饰: HDL 氧化修饰按 La 等<sup>[8]</sup>建立的方法进行, 将 HDL (2 mg/ml) 置 10  $\mu$ mol/L  $\text{Cu}^{2+}$  的 PBS 中, 37℃ 温育 24 h, 4℃ 透析除去  $\text{Cu}^{2+}$  后, 除菌过滤, 分装, 4℃ 保存备用.

1.2.3.3 234 nm 紫外光吸收测定: 共轭二烯(con-

jugated dienes CD) 在 234 nm 波长下, 有光吸收, 用日本岛津 UV-120-02 型紫外分光光度仪测定光吸收值.

1.2.3.4 硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reaction substance, TBARS)测定: 在激发光为 515 nm, 发射光为 550 nm 条件下按荧光法<sup>[9]</sup>置于日本岛津 RF-510 荧光分光光度仪测定荧光强度值.

1.2.3.5 琼脂糖凝胶脂蛋白电泳: 先用苏丹黑 B 预染天然的和氧化的 HDL 组分, 然后用 0.5% 琼脂糖凝胶在 70~80 V 下电泳 20~30 min.

1.2.4 N-HDL、OX-HDL 对 SMC cyclin  $D_1$  基因表达的影响

按传代法制备 SMC 细胞悬液(第 12~17 代细胞), 分别接种于 8 个大号培养瓶中, 细胞密度  $10^4 \sim 10^5$ /ml, 48 h 后弃去培养液, 用 Hank 氏液洗涤 3 次, 加入适量的无血清培养基(DMEM), 继续培养 24 h, 弃 DMEM, 每瓶分别加 HDL 及 OX-HDL 使其终浓度为 50  $\mu$ g/ml 脂蛋白的 3% LPDS(无脂人血清)无血清培养基, 对照仅加 3% LPDS 无血清培养基, 分别继续培养 0, 2, 12, 24 h, 然后按酸性盐酸胍-酚-氯仿一步法抽提 SMC 总 RNA. 重复实验 5 次.

1.2.5 RNA-DNA 斑点杂交及 Northern 杂交分析

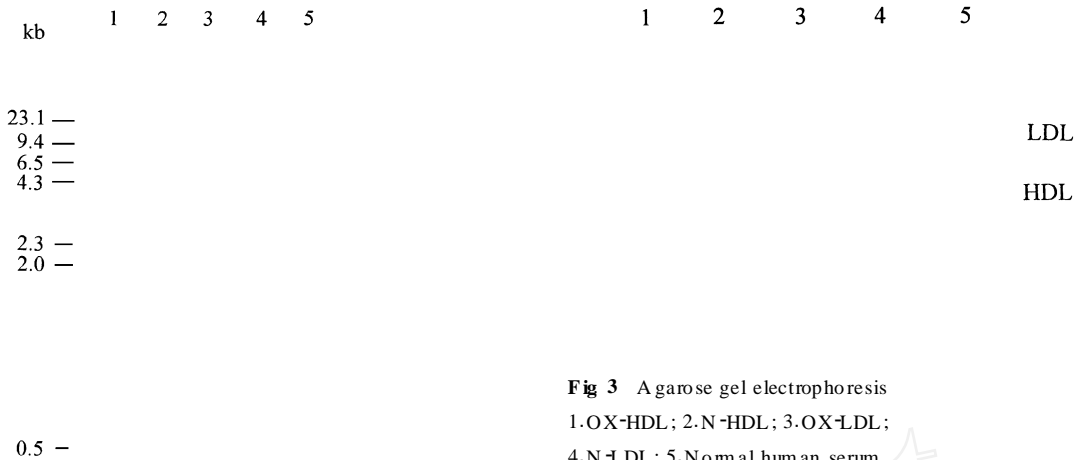
1.2.5.1 斑点杂交: 将 10  $\mu$ g SMC 总 RNA 样品(加等体积甲酰胺)点于尼龙膜上, 80℃ 烘烤 2 h, 与地高辛标记的探针(cyclin  $D_1$  和  $\alpha$ -actin)杂交 17 h, 杂交条件采用甲酰胺系统, 地高辛标记 DNA 探针. 漂洗, 显色完毕后, 用 UVP-T ransillum inator 中的 grab-it 和 Gelwork ID intermediate 软件扫描系统记录蓝色深浅.

1.2.5.2 Northern 杂交分析: SMC 总 RNA 经甲醛变性电泳法<sup>[10]</sup>电泳分离后, 将其转移到固相支持物尼龙膜上, 再用地高辛标记的探针与之杂交. 40  $\mu$ g RNA 经甲醛变性后, 进行电泳 6~7 h (5 V/cm), 转膜 18 h, 以后步骤与斑点杂交分析相同.

## 2 结果

### 2.1 用作探针的 DNA 片段的鉴定

Cyclin  $D_1$  和  $\alpha$ -actin 的重组质粒用相应的限制性核酸内切酶切割, 经玻璃乳 DNA 分离系统回收插入片段. 经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见用作探针的各种 DNA 插入片段大小与文献报道一致, 其中, cyclin  $D_1$  基因长 1.3 kb (*EcoR* I),  $\alpha$ -actin 基因长 0.8 kb (*Hind* III 酶切), 见 Fig. 1.



**Fig 3** Agarose gel electrophoresis

1. OX-HDL; 2. N-HDL; 3. OX-LDL;  
4. N-LDL; 5. Normal human serum

**Fig 1** Separation of insert fragment by agarose electrophoresis

1.  $\lambda$ DNA/Hind III marker; 2.  $\alpha$ Actin insert;  
3.  $\alpha$ Actin/Hind III; 4. Cyclin D<sub>1</sub> insert  
5. Cyclin D<sub>1</sub>/EcoR I

**2.2 培养人 SMC 总 RNA 纯度的鉴定**

脂蛋白与人 SMC 分别培养 2、12 和 24 h 后, 用一步法提取纯化 SMC 总 RNA, 经 DNase (RNase-Free) 水解样品中残留的 DNA, 测定  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  值为 1.8~2.0, 说明无蛋白污染, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见细胞总 RNA 电泳分离后呈清晰的 28S 和 18S 二条区带, 样品槽中无 DNA 滞留, 说明 RNA 样品无降解, 无细胞 DNA 混杂, 见 Fig 2.

— 28S  
— 18S

**Fig 2** Agarose electrophoresis of total RNA from cultured human arterial SMC

**2.3 OX-HDL 的鉴定**

**2.3.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定见 Fig 3**

由 Fig 3 可见, N-HDL 与正常人血清 HDL 电泳迁移率一致, 而 OX-HDL 则明显增加.

**2.3.2 硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 及共轭二烯 (CD) 鉴定见 Table 1.**

**Table 1** Identification of oxidized HDL by TBARS and CD

n (TBARS per mg protein)		A <sub>234nm</sub>	
/nmol		(CD per mg protein)	
N-HDL	OX-HDL	N-HDL	OX-HDL
0.785 ± 0.046	3.478 ± 0.086*	0.712 ± 0.073	1.938 ± 0.033*

$\bar{x} \pm s, n = 6$

\* Compared with N-HDL,  $P < 0.01$

由 Table 1 可见, OX-HDL 的共轭二烯 (CD) 在 234 nm 光吸收及 OX-HDL 的 TBARS 值均显著高于 N-HDL ( $P < 0.01$ ) HDL 发生了氧化修饰, 分子内共轭二烯 (CD) 增加, 其 234 nm 光吸收值及 TBARS 值均增加, 由 Fig 3 可见, OX-HDL 电泳迁移率显著大于 N-HDL, 表明本实验所用 OX-HDL 符合要求.

**2.4 OX-HDL 对培养人动脉 SMC cyclin D<sub>1</sub> 基因表达的影响**

**2.4.1 斑点杂交分析:** 将不同时间提取的细胞 RNA 样品点在尼龙膜的不同位置上, 分别与地高辛标记的 cyclin D<sub>1</sub> 基因片段以及  $\alpha$ -actin 内标探针进行斑点杂交. 采用计算机扫描分析系统对每个样品杂交信号进行扫描分析, 所得 cyclin D<sub>1</sub> 基因表达强度值见 Table 2

从 Table 2 可见:

1) 未加脂蛋白对照组的 SMC cyclin D<sub>1</sub> 基因均有一定的表达, 说明 cyclin D<sub>1</sub> 基因在维持人动脉 SMC 的正常生长及功能具有一定作用.

2) HDL 对 SMC cyclin D<sub>1</sub> 基因相对含量无影响, 说明 N-HDL 对 cyclin D<sub>1</sub> 基因表达无影响.

3) OX-HDL 使 SMC cyclin D<sub>1</sub> 基因表达增加, cyclin D<sub>1</sub> 基因 mRNA 含量 2 h 开始增加 ( $P <$

0.01), 以后逐渐上升, 至24 h 达到峰值, 与对照组 比较增加了2.67倍( $P < 0.01$ ) .

**Table 2** Effect of OX-HDL on cyclin  $D_1$  gene expression in human cultured arterial SMC (relative scanning intensity/ $\mu\text{g RNA}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

No	Control				N-HDL				OX-HDL			
	0 h	2 h	12 h	24 h	0 h	2 h	12 h	24 h	0 h	2 h	12 h	24 h
1	912	1102	1130	951	859	983	1031	1041	1040	1813	2541	3852
2	1032	1192	1071	1049	1039	1009	1181	1180	992	1725	2635	3902
3	1123	1040	1078	1091	1007	1152	913	1183	1121	1941	2712	3841
4	1089	1004	1009	1101	1101	1146	1030	1032	1035	1885	2649	3782
$\bar{x} \pm s$	1039 $\pm$ 92	1084 $\pm$ 82	1071 $\pm$ 49	1048 $\pm$ 48	1010 $\pm$ 86	1072 $\pm$ 89	1038 $\pm$ 109	1109 $\pm$ 83	1047 $\pm$ 53	1841 $\pm$ 93.4 <sup>1),2)</sup>	2834 $\pm$ 70 <sup>1),2)</sup>	3844 $\pm$ 49 <sup>1),2)</sup>

1). Compared with the control group,  $P < 0.01$ ; 2). Compared with "0" h group,  $P < 0.01$

**2.4.2 Northern 杂交分析:** 将 N-HDL 和 OX-HDL 与人 SMC 分别保温2, 12和24 h 提取 SMC 的总 RNA, 将其进行转移电泳后, mRNA 吸附在尼龙膜上, 分别与地高辛标记的 cyclin  $D_1$  基因片段和  $\alpha$ -

actin 内标探针进行杂交, 漂洗, 显色 采用计算机扫描分析系统对每个样品杂交信号进行扫描分析得 cyclin  $D_1$  基因 mRNA 相对含量见 Table 3 .

**Table 3** Effect of OX-HDL on cyclin  $D_1$  gene expression in human cultured arterial SMC (relative scanning intensity/ $\mu\text{g RNA}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

No	Control				N-HDL				OX-HDL			
	0 h	2 h	12 h	24 h	0 h	2 h	12 h	24 h	0 h	2 h	12 h	24 h
1	771	708	746	706	741	701	718	721	781	1071	1289	1621
2	704	719	721	725	750	781	729	719	721	1001	1241	1701
3	785	671	781	731	781	676	689	728	739	987	1310	1607
4	810	805	623	789	835	765	813	692	771	1043	1264	1689
$\bar{x} \pm s$	767 $\pm$ 45	725 $\pm$ 56	717 $\pm$ 67	737 $\pm$ 35	776 $\pm$ 42	730 $\pm$ 50	737 $\pm$ 53	715 $\pm$ 15	753 $\pm$ 27	1025 $\pm$ 89 <sup>1),2)</sup>	1276 $\pm$ 30 <sup>1),2)</sup>	1654 $\pm$ 47 <sup>1),2)</sup>

1). Compared with the control group,  $P < 0.01$ ; 2). Compared with the "0" h group,  $P < 0.01$

从 Table 3可见, Northern 杂交结果与斑点杂交结果一致 .1)HDL 对人 SMC cyclin  $D_1$  基因表达无影响, 2)OX-HDL 刺激 SMC cyclin  $D_1$  基因显著增加, 其 mRNA 相对含量2 h 明显增加, 12 h 继续增加, 到24 h 达峰值, 与对照组相比, 增加了1.24倍 ( $P < 0.01$ ) .

### 3 讨 论

大量流行病学, 临床病理, 动物实验研究及本室以往研究均表明, HDL 有抗 AS 作用, 本研究用 N-HDL 与 SMC 作用不同时间显示, N-HDL 对 SMC cyclin  $D_1$  基因表达没有影响, 表明 N-HDL 对动脉 SMC 的增殖无影响 .

HDL 具有抗 AS 的作用, 90年代以来我们及国

外研究均发现, 一旦 HDL 在体外氧化修饰后, OX-HDL 即具有致 AS 作用<sup>[2,3,11]</sup> 本室以往研究表明, 在高脂血症活体内存在 OX-HDL<sup>[12]</sup> 因此, 我们认为在对 AS 的发病机制的研究中, 不仅应注意 OX-LDL 和 OX-VLDL 的作用, 而且也应注意 OX-HDL 的作用 .

迄今尚未见有关 OX-HDL 对人动脉 SMC cyclin  $D_1$  基因表达影响研究的报道. Cyclin 为细胞周期蛋白, 参与细胞周期活动, 调节细胞分裂、增殖, 分为 A、B、D 和 E 几类<sup>[13]</sup>, 而 cyclin  $D_1$  又分为  $D_1$ 、 $D_2$  和  $D_4$  等几个亚类 .1991年 Xiong 等<sup>[14]</sup> 确定了 cyclin  $D_1$ , 它显著区别于 cyclin A、B、E cyclin  $D_1$  是细胞周期蛋白的一个新家族, 关于它的功能目前尚不十分清楚 .该蛋白在细胞周期的  $G_1$  期表达, 并与 cdc2 相

关蛋白相偶连 在恶性胶质瘤细胞中, cyclin  $D_1$  基因过度表达 但在不同细胞中, cyclin  $D_1$  基因表达又有很大变异, 而较高水平的表达与细胞增殖有关 研究表明, 人 cyclin  $D_1$  与各类增生性疾病密切相关 Xiong 等<sup>[15]</sup> 研究发现, 在成纤维细胞中 cyclin  $D_1$  可与胞浆多种蛋白结合, 在这些蛋白质中已证明有些是蛋白激酶如 CDK<sub>2</sub>, CDK<sub>4</sub> 和 CDK<sub>5</sub> 等的催化亚基 另外, 他们还发现可与 cyclin  $D_1$  结合的一种 36 kD 的蛋白质是增殖细胞核抗原(PCNA) Speir 等<sup>[16]</sup> 合成了能结合人 PCNA 的 mRNA 的反义寡核苷酸(15聚或18聚核苷酸)并将其转入到兔主动脉 SMC, 结果发现 PCNA 反义 RNA 能抑制 SMC 生长, 其抑制作用有浓度依赖关系, 抑制效果可持续至少 9 d 这表明 PCNA 可能参与 SMC 的增殖过程 cyclin  $D_1$  能通过结合胞浆蛋白激酶催化亚基及 PCNA, 调节细胞周期, 促进 DNA 合成, 引起细胞增殖.

本研究显示, OX-HDL 可引起人动脉 SMC 的 cyclin  $D_1$  基因表达增加 ( $P < 0.01$ ) 推测, OX-HDL 通过与 SMC 膜 OX-HDL 受体结合, 激活细胞内信号传导通路活化核内原癌基因 (*fos*, *sis*, *myc* 等) 和 cyclin  $D_1$  基因的表达 cyclin  $D_1$  基因是极早表达基因, 它的表达产物可通过与胞浆 CDK<sub>2</sub>, CDK<sub>5</sub>, CDK<sub>4</sub> 及 DNA 结合蛋白及 PCNA 结合, 促进 DNA 合成, 最终导致 SMC 增殖 由于 cyclin  $D_1$  基因表达持续时间较长, 能持续作用细胞 24 h, 且其表达产物作用于不同蛋白激酶, 提示 cyclin  $D_1$  基因的激活在人动脉 SMC 增殖中可能发挥重要作用.

## References

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s *Nature*, 1994; **362**(4): 801~ 809
- 汪浩川, 刘秉文, 傅明德 天然和氧化修饰 LDL、VLDL 及 HDL 对培养人动脉平滑肌细胞原癌基因 *fos* 及 *myc* 表达的影响 生物化学杂志 (Wang Haochuan, Liu Bingwen, Fu Mingde. Effect of native and oxidation modified LDL, VLDL and HDL on transcriptional expression of *fos*, *myc* oncogenes of cultured human arterial SMC. *Chin Biochem J*), 1995; **11**(3): 304~ 310
- 汪浩川, 刘秉文, 傅明德 天然和氧化修饰脂蛋白对人动脉平滑肌细胞原癌基因表达的影响 生物化学与生物物理学报 (Wang Haochuan, Liu Bingwen, Fu Mingde. Effects of native and oxidation modified lipoproteins on proto-oncogene expression of cultured human arterial SMCs *Acta Biochim Biophys Sin*), 1995; **27**: 507~ 513
- 江渝, 刘秉文, 傅明德 高脂膳食诱发家兔血清 LPO 升高及 LDL、VLDL 和 HDL 在活体内的氧化修饰 华西医科大学学报 (Jiang Yu, Liu Bingwen, Fu Mingde. Oxidative modification of serum LDL, VLDL and HDL induced by fed on high cholesterol diet *in vivo* in rabbits *J West China Univ Med Sci*), 1997; **28**(1): 1~ 5
- 江渝, 刘秉文, 范萍 内源性高甘油三酯血症患者体内存在氧化型低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白 中国动脉硬化杂志 (Jiang Yu, Liu Bingwen, Fan Ping. Oxidative modification of plasma low density lipoprotein, very low density lipoprotein and high density lipoprotein in endogenous hypertriglyceridemia *Chin J Arterioscler*), 1997; **5**(2): 99~ 102
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987; **162**: 156~ 159
- 张林华, 刘秉文 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白 生物化学与生物物理学报 (Zhang Linhua, Liu Bingwen. Separation of human serum lipoproteins by one-step ultracentrifugation *Acta Biochim Biophys Sin*), 1989; **21**(3): 257~ 260
- La Ville A E, Sola R, Balanya J, Turner P R, Masana L. *In vitro* oxidized HDL is recognized by the scavenger receptor of macrophages: Implications for its protective role *in vivo* *Atherosclerosis*, 1994; **105**: 179~ 189
- Liu R, Saku K, Zhang B, Hirata K, Shimomi, Arakawa K. *In vivo* kinetics of oxidatively modified HDL. *Biochem Med Mol Biol*, 1993; **49**: 392~ 297
- 金冬雁, 黎孟枫等译 侯云德等校 分子克隆实验指南(第2版), 北京: 科学出版社 (Jin Dongyan, Li Mengfeng. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Beijing: Science Press), 1995: 366~ 370
- Musanti R, Ghiselli G. Interaction of Oxidized HDL with J774-A1 macrophages causes intracellular accumulation of unesterified cholesterol *Arterioscler Thromb*, 1993; **13**: 1334~ 1345
- Liu B W, Jiang Y, Fu M D. Oxidative modification of serum LDL, VLDL and HDL *in vivo* *Atherosclerosis*, 1997; **134**(1~ 2): 224
- Sherr C J. Cancer cell cycles *Science*, 1996; **274**: 1672~ 1677
- Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. Human D type cyclin. *Cell*, 1991; **65**: 691~ 699
- Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*, 1992; **71**: 505~ 514
- Spier E, Epstein S E. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferation cell nuclear antigen. *Circulation*, 1992; **82**(2): 537~ 538