

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.01.008

羽扇豆醇介导MDM2-p53通路对胃癌细胞生物学行为的影响*

吴元元¹ 费素娟^{2Δ} 苗蓓² 赵铮活¹ 李桃¹

(1 徐州医科大学研究生学院 江苏 徐州 221002; 2 徐州医科大学附属医院消化内科 江苏 徐州 221002)

摘要 目的:探讨羽扇豆醇介导鼠双微基因 2(Mouse double microgene 2,MDM2)-p53 通路对胃癌细胞生物学行为的影响及相关机制。**方法:**对数生长期的胃癌小鼠 MFC 细胞株随机分为三组。实验 1 组与实验 2 组给予 10 mg/L 和 20 mg/L 的羽扇豆醇处理,对照组以等体积的 1×磷酸盐缓冲液处理。对比三组 MFC 细胞细胞增殖、凋亡、迁移与侵袭,及 MDM2-p53 通路蛋白表达。**结果:**细胞处理后 6 h 与 12 h,实验 1 组与实验 2 组的细胞增殖指数、细胞迁移与侵袭指数、MDM2 蛋白相对表达水平显著低对于对照组,实验 2 组也低于实验 1 组,对比差异都有统计学意义($P<0.05$)。细胞处理后 6 h 与 12 h,实验 1 组与实验 2 组的细胞凋亡指数、p53 蛋白相对表达水平显著高于对照组,实验 2 组也高于实验 1 组,对比差异都有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**羽扇豆醇能促进胃癌细胞 p53 蛋白的表达,抑制 MDM2 蛋白的表达,从而促进细胞凋亡,抑制胃癌的增殖、侵袭与转移,且具有剂量依赖性。

关键词:羽扇豆醇;MDM2-p53 通路;胃癌;细胞增殖;细胞凋亡**中图分类号:**R-33;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)01-46-04

Lupeol-mediated MDM2-p53 Pathway Affects on the Biological Behavior of Gastric Cancer Cells and Related Mechanisms*

WU Yuan-yuan¹, FEI Su-juan^{2Δ}, MIAO Bei², ZHAO Ben-huo¹, LI Tao¹

(1 Graduate School of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221002, China;

2 Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221002, China)

ABSTRACT Objective: To explore Lupeol-mediated mouse double microgene 2 (MDM2)-p53 pathway affects the biological behavior of gastric cancer cells and related mechanisms. **Methods:** Gastric cancer mouse MFC cell lines in logarithmic growth phase were randomly divided into three groups-control group, experiment 1 group and experiment 2 group. experiment 1 group and experiment 2 group were given 10 mg/L and 20 mg/L lupin alcohol treatment. The control group were treated with an equal volume of 1× phosphate buffer. Compare the cell proliferation, apoptosis, migration and invasion of the three groups of MFC cells, and the expression of MDM2-p53 pathway protein. **Results:** At 6 h and 12 h after cell treatment, the relative expression levels of cell proliferation index, cell migration and invasion index, and MDM2 protein in experimental group 1 and experimental group 2 were significantly lower than the control group, and the experimental group 2 were also lower than experimental group 1, compared the differences all have statistical significance ($P<0.05$). At 6 h and 12 h after cell treatment, the relative expression levels of apoptosis index and p53 protein in the experimental group 1 and experimental group 2 were significantly higher than those in the control group, and the experimental group 2 were also higher than that in experimental group 1, compared the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Lupeol can promote the expression of p53 protein and inhibit the expression of MDM2 protein in gastric cancer cells, thereby promote apoptosis, inhibiting the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer in dose-dependent manner.

Key words: Lupeol; MDM2-p53 pathway; Gastric cancer; Cell proliferation; Apoptosis**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R735.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)01-46-04

前言

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,在恶性肿瘤中位居第 3 位,约占 10 %^[1,2]。改善胃癌预后结局,需要进行早期诊断与根治^[3,4]。胃癌的病因未完全阐明,目前认为与幽门螺旋杆菌感染、环境因素和遗传因素有关,涉及到 MDM2-p53 通路

表达异常、DNA 修复异常等多个方面^[5,6]。p53 基因是一种抑癌基因,是细胞生长周期中的负调节因子^[7]。鼠双微基因 2(Mouse double microgene 2,MDM2)对细胞生长具有调节作用,MDM2 可通过与 p53 蛋白结合形成 MDM2-p53 通路,形成负反馈环,发挥 p53 依赖活性^[8]。羽扇豆醇是一种从植物和中草药中提取的三萜类化合物,也为三萜烯,分子量为 426.72,其广泛存在于

* 基金项目:江苏省卫计委医学科研项目(H2018111)

作者简介:吴元元(1982-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:消化内科,电话:18262858320,E-mail:misswu_yy@163.com

Δ 通讯作者:费素娟(1963-),女,主任医师,研究生导师,研究方向:消化道肿瘤临床与基础,

电话:18052268662,E-mail:xyfyfeisj99@163.com

(收稿日期:2020-08-05 接受日期:2020-08-27)

各种药材、瓜果、蔬菜中,具备抗基因突变、抗炎、抗关节炎等多种功能^[9]。最新的研究发现羽扇豆醇有抑瘤的作用^[10],但具体的机制还不明确。本文具体探讨了羽扇豆醇介导MDM2-p53通路对胃癌细胞生物学行为的影响及相关机制,希望寻求新的治疗方法与靶点。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

小鼠胃癌MFC细胞株购自中国科学院细胞资源库(本实验室保存),羽扇豆醇(纯度 $\geq 98\%$,美国Sigma公司),山羊抗小鼠 β -actin(Santa Cruz公司),鼠抗人MDM2单克隆抗体、鼠抗人p53单克隆抗体(R&D,USA),胎牛血清、RPMI-1640培养基(Hyclone公司)。

1.2 细胞分组与处理

羽扇豆醇原液的配置:取羽扇豆醇3mg,用二甲基亚砜、无水乙醇混匀,配置原液浓度为40mg/mL,在 -20°C 冰箱保存。MFC细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中传代培养。将对数生长期的细胞随机分为三组-对照组、实验1组与实验2组。实验1组与实验2组的每孔细胞中加入羽扇豆醇原液,最终质量浓度分别为10mg/L和20mg/L;对照组以等体积的1 $\times$ 磷酸盐缓冲液处理。三组细胞经过处理后替换后常规培养基进行培养。

1.3 MTT法检测细胞增殖

将对数期的细胞制成单细胞悬液(5×10^5 个/mL),加200 μL 到96孔板,培养24h后加入20 μL (5mg/mL)的MTT母液,孵育4h,加入200 μL 二甲亚砜,震荡混匀,490nm处用酶标仪中测定吸光值,计算增殖指数。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

调整处理后的细胞浓度为 1×10^6 个/mL,弃上清,重悬后收

集细胞。加入400 μL 1 $\times$ Binding Buffer+5 μL AnnexinV-FITC重悬混匀细胞,室温避光孵育15min。再加入10 μL PI染色液,混匀后避光孵育5min,采用流式细胞仪检测计算凋亡指数。

1.5 Transwell小室实验检测细胞迁移与侵袭

调整处理后的细胞浓度为 2×10^5 个/mL,在下室加入800 μL 含10%FBS培养基,上室加入20 μL 细胞悬液,继续培养24h;取出上室,采用多聚甲醛室温固定30min,然后采用0.4%结晶紫室温染色15~30min,中性树胶封片,镜下观察并计算细胞迁移指数。在检测细胞侵袭中,以 2×10^5 细胞密度接种于24孔板的Transwell小室中,向Transwell小室下加入500 μL 的培养液,培养24h后取出Transwell小室,固定后也进行结晶紫室温染色15~30min,中性树胶封片,镜下观察并计算侵袭指数。

1.6 Western blot检测蛋白表达

收集细胞并提取蛋白,定量蛋白浓度,按照常规步骤进行Western blot检测,检测抗体为抗 β -Actin抗MDM2抗体、抗p53抗体,曝光后进行灰度扫描,记录目的蛋白的相对表达量。1.3~1.6实验均重复3次,取平均。

1.7 统计方法

应用SPSS 22.00,以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示实验计量数据,对比行t检验,多组间对比用单因素方差分析,以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖指数对比

细胞处理后6h与12h,实验1组与实验2组的细胞增殖指数显著低对于对照组,实验2组也低于实验1组($P<0.05$),见表1。

表1 三组细胞处理后不同时间点的增殖指数对比($\%, \bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of proliferation index at different time points after treatment of three groups of cells ($\%, \bar{x}\pm s$)

Groups	n	6 h	12 h
Experiment 2	3	42.55 $\pm$ 4.55* [#]	53.14 $\pm$ 6.03* [#]
Experiment 1	3	61.07 $\pm$ 6.21*	71.12 $\pm$ 7.12*
Control group	3	89.11 $\pm$ 6.18	91.17 $\pm$ 8.12
F		14.092	12.045
P		0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the experimental 1, [#] $P<0.05$, the same below.

2.2 细胞凋亡指数对比

细胞处理后6h与12h,实验1组与实验2组的细胞凋亡指数显著高于对照组,实验2组也高于实验1组($P<0.05$),见表2。

2.3 细胞迁移与侵袭指数对比

细胞处理后6h与12h,实验1组与实验2组的细胞迁移与侵袭指数显著低于对照组,实验2组也低于实验1组($P<0.05$),见表3。

2.4 MDM2、p53蛋白表达对比

细胞处理后6h与12h,实验1组与实验2组的MDM2

蛋白相对表达水平低于对照组,p53蛋白相对表达水平高于对照组($P<0.05$),见表4。

3 讨论

胃癌的增殖和凋亡是一个复杂的发展过程,对其进行早期治疗能显著性地提高患者生存率^[11,12]。羽扇豆醇是一种可从多种果蔬、中草药等植物中提取的五环三萜类化合物,不溶于水,但可以溶于乙醇、乙醚等多种有机溶剂^[13]。羽扇豆醇具有抑制肿瘤的作用,能够抑制蛋白激酶和丝氨酸蛋白酶的活动,从而抑制恶性肿瘤的增殖与分化^[14]。并且该药属于天然化合物,对

表 2 三组细胞处理后不同时间点的凋亡指数对比(% , $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of apoptosis index at different time points after treatment of three groups of cells (% , $\bar{x}\pm s$)

Groups	n	6 h	12 h
Experiment 2	3	42.58±1.49* [#]	48.29±1.48* [#]
Experiment 1	3	33.21±1.22*	35.32±1.77*
Control group	3	2.60±0.14	3.45±0.44
F		14.583	12.013
P		0.000	0.000

表 3 三组细胞迁移与侵袭指数对比(% , $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of cells migration and invasion indexes of three groups (% , $\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Cell migration index	Cell invasion index		
		6 h	12 h	6 h	12 h
Experiment 2	3	6.77±1.30* [#]	8.92±1.22* [#]	4.99±1.03* [#]	9.02±1.44* [#]
Experiment 1	3	14.20±1.48*	19.72±1.15*	11.38±1.14*	12.48±1.57*
Control group	3	24.98±3.18	28.99±2.57	22.01±2.57	23.00±3.15
F		9.483	8.474	12.030	10.001
P		0.002	0.008	0.000	0.001

表 4 三组细胞处理后不同时间点的 MDM2、p53 蛋白表达对比($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of MDM2 and p53 protein expression at different time points after treatment of three groups of cells ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	MDM2		p53	
		6 h	2 h	6 h	12 h
Experiment 2	3	0.65±0.11* [#]	0.48±0.12* [#]	5.62±0.45* [#]	6.49±0.44* [#]
Experiment 1	3	2.78±0.12*	3.20±0.14*	2.46±0.13*	3.00±0.14*
Control group	3	3.91±0.14	4.00±0.15	0.89±0.11	0.76±0.09
F		7.933	10.943	12.033	11.887
P		0.011	0.000	0.000	0.000

机体的毒性比较低。羽扇豆醇已在恶性血液疾病、妇科肿瘤、消化道肿瘤方面显示了很好的抗癌活性,能抑制人恶性肿瘤细胞的生长^[15,16]。并且该药还对机体的很多重要脏器具有保护作用^[17,18]。本研究显示胃癌细胞经过羽扇豆醇处理后 6 h 与 12 h,实验 1 组与实验 2 组的细胞增殖指数、细胞迁移与侵袭指数显著低对于对照组,实验 2 组也低于实验 1 组,与郭敏^[19]等学者的研究类似,探讨羽扇豆醇对人膀胱癌 T24 细胞增殖的影响及对 p53/miR-34a 通路调控机制,结果显示 T24 细胞经羽扇豆醇处理后,其细胞增殖受到明显抑制,且呈一定的剂量依赖性。与对照组相比,羽扇豆醇能够使 T24 细胞中 p53 蛋白表达上调,还能够增加 miR-34a 表达水平。王明^[20]等学者也探究狼毒大戟活性成分羽扇豆醇(lupeol)对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭转移的作用,结果显示羽扇豆醇对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的黏附、迁移和侵袭有明显的抑制作用,并具有一定的量效关系,由此可见,羽扇豆醇在体外能够有效地抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭和转移。表明羽扇豆醇能抑制胃癌的增殖、侵袭与转移,且具有剂量依赖性。特别是羽扇豆醇与其作用基因能够形成一个复杂的调控网络,调节细胞的增殖与分化;也能够提高化疗敏感性,与化疗产生协同作用^[21]。

胃癌细胞的增殖与凋亡是决定患者预后的关键因素^[22]。促癌基因与抑癌基因一旦表达失调,可能快速促进肿瘤的发生^[23]。羽扇豆醇俗称鲁冰花,存在于羽扇豆种子的表皮和橡胶植物、无花果树的胶乳中,花序挺拔,花色艳丽多彩,花期长,可用于观赏配植。体外与体内实验表明羽扇豆醇具有广泛的抗氧化、抗炎症、抗癌等作用^[24]。本研究显示细胞处理后 6 h 与 12 h,实验 1 组与实验 2 组的细胞凋亡指数显著高于对照组,实验 2 组也高于实验 1 组,表明羽扇豆醇能促进胃癌的凋亡,且具有剂量依赖性。当前也有研究羽扇豆醇在体内外对消化道恶性肿瘤的自我更新能力具有抑制作用,也可抑制肿瘤细胞在无胸腺动物模型中的致瘤能力^[25]。羽扇豆醇能抑制肺癌、前列腺癌细胞的生长,主要是通过抑制 Ras 通路,激活了 fas 受体,诱导癌细胞的凋亡,且与剂量有关^[19]。

MDM2 和野生型 p53 在机体内保持微妙的平衡,MDM2 与 p53 结合形成 p53-MDM2 复合物,p53 诱导 MDM2 表达,MDM2 可使 p53 泛素化而被蛋白酶降解。MDM2-p53 反馈体系可参与细胞周期调控、细胞生长抑制、凋亡等多种过程,也与疾病的发生、发展显著相关^[26,27]。p53 基因是一种抑癌基因,参与细胞的凋亡、分化、DNA 修复等多种生物学行为^[28]。MDM2

为鼠双微体基因,也为一种原癌基因,对多种细胞生长具有调节作用^[29]。MDM2 在生物体内经过剪切可形成多种不同相对分子质量的变异体,如 p85、p90、p57、p64 等。MDM2 可通过与 p53 蛋白结合形成 MDM2-p53 负反馈环,发挥 p53 依赖活性。MDM2 是 p53 的主要抑制剂,其通过多种通路及机制抑制 p53 的功能。比如 MDM2 可泛素化 p53,然后由蛋白酶体所降解,从而抑制 p53 的转录活性^[30]。本研究显示细胞处理后 6 h 与 12 h,实验 1 组与实验 2 组的 MDM2 蛋白相对表达水平低于对照组,p53 蛋白相对表达水平高于对照组,与张玲莉^[31]学者的研究类似,研究羽扇豆醇在人高转移肝癌细胞系 HCCLM3 中的抗增殖作用机制,不同浓度羽扇豆醇在 12~48 h 对 HCCLM3 细胞处理,结果显示与对照组相比,HCCLM3 细胞内 Caspase-3 的 mRNA 表达量增加 50%~150%,同时高剂量(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的羽扇豆醇处理细胞后使胞内 p53 的 mRNA 表达量分别上调 1 倍以上。目前对于羽扇豆醇与胃癌细胞中 MDM2 蛋白表达的研究还没有具体的研究。本研究结果表明羽扇豆醇能促进胃癌细胞 p53 蛋白的表达,抑制 MDM2 蛋白的表达,且具有剂量依赖性。从机制上分析,羽扇豆醇 1 参与到了细胞发育的多个阶段中,可在多个水平调节靶蛋白的表达,从而对恶性肿瘤有抑制生长及诱导分化作用^[32]。

总之,羽扇豆醇能促进胃癌细胞 p53 蛋白的表达,抑制 MDM2 蛋白的表达,从而促进细胞凋亡,抑制胃癌的增殖、侵袭与转移,且具有剂量依赖性。本研究也存在一定的不足,未进一步验证 miR-21 的功能,在其调节 MDM2-p53 的机制方面还有待进一步深入,将在后续的工作中进行完善。

参考文献(References)

- [1] 潘思远,房静远.胃癌靶向治疗的研究进展[J].中华内科杂志,2020,59(2): 148-152
- [2] 朱思莹,冀明.早期胃癌的规范化诊断和治疗[J].中华内科杂志,2020,59(3): 236-239
- [3] 雷彩琴,原丽莉.胃癌早期诊断相关血清肿瘤标志物的研究进展[J].山东医药,2020,60(10): 87-91
- [4] 何雨欣,陈卫昌.胃癌腹膜转移生物学标志物的研究进展[J].国际消化病杂志,2020,40(2): 100-103,108
- [5] Zhao K, Yang Y, Zhang G, et al. Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin E3 ligase MARCH7 [J]. EMBO Rep, 2018, 19(2): 305-319
- [6] Joana, Pereira-Marques, Rui, et al. Helicobacter pylori Infection, the Gastric Microbiome and Gastric Cancer[J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 2019, 1149: 195-210
- [7] Tackmann NR, Zhang Y. Mouse modelling of the MDM2/MDMX-p53 signalling axis[J]. J Mol Cell Biol, 2017, 9(1): 34-44
- [8] Vecino R, Burguete MC, Jover-Mengual T, et al. The MDM2-p53 pathway is involved in preconditioning-induced neuronal tolerance to ischemia[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): e1610
- [9] 王明,崔红霞,刘吉成.羽扇豆醇增强对沉默 ST3GalIII 基因的 MDA-MB-231 细胞侵袭转移的抑制作用[J].解剖学报,2020,51(1): 26-31
- [10] 王勤涛,王俊华,刘晓晨,等.羽扇豆醇缓解氧化应激对心肌缺血再灌注大鼠心脏功能和心肌组织的保护作用[J].中国免疫学杂志,2020,36(3): 282-288
- [11] 刘嘉庆,张大伟,李光.胃癌组织内皮素-1 和 P53 表达及其临床意义[J].中国老年学杂志,2020,40(6): 1170-1172
- [12] Rugge M, Meggio A, Pravadeelli C, et al. Gastritis staging in the endoscopic follow-up for the secondary prevention of gastric cancer: a 5-year prospective study of 1755 patients[J]. Gut, 2019, 68(1): 11-17
- [13] 江兴菊,潘年松,田晓云,等.羽扇豆醇通过 MAPKs 信号通路对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用研究[J].中国药房,2019,30(14): 1925-1930
- [14] Ling K, Jiang L, Liang S, et al. Nanog interaction with the androgen receptor signaling axis induce ovarian cancer stem cell regulation: studies based on the CRISPR/Cas9 system [J]. J Ovarian Research, 2018, 11(1): 1-16
- [15] Saxena HO, Deshmukh AK, Ganesh. HPTLC analysis of Lupeol in roots of *Uraria picta* Desv: A Dashmool species for identification of superior germplasm and conservation [C]// Harnessing the sub-Himalayan Plant Diversity for Human Welfare, 2015
- [16] Ali KMS, Kulsoom KSU, Rukhaiya KS, et al. Fruit-Derived Polysaccharides and Terpenoids: Recent Update on the Gastroprotective Effects and Mechanisms[J]. Frontiers Pharmacology, 2018, 9: e569
- [17] 侯辰,唐鹏,刘玥,等.羽扇豆醇对脑缺血再灌注大鼠氧化应激损伤和炎症反应的调节作用及机制研究[J].解放军医药杂志,2018,30(10): 6-10
- [18] Ma, S, Guan, et al. Lupeol Suppresses Cisplatin-Induced Nuclear Factor-kappa B Activation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Inhibits Local Invasion and Nodal Metastasis in an Orthotopic Nude Mouse Model (vol 67, pg 8800, 2007)[J]. Cancer Research the Official Organ of the American Association for Cancer Research Inc, 2016, 76(7): 2052-2053
- [19] 郭敏,刘佩,郑国华,等.p53/miR-34a 通路介导羽扇豆醇的抑制人膀胱癌 T24 细胞增殖作用[J].中国药师,2016,19(9): 1629-1632
- [20] 王明,崔红霞,孙超,等.羽扇豆醇对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭转移作用及机制研究[J].药学报,2016,51(4): 558-562
- [21] 唐泽严,杨小彤,周旭,等.羽扇豆醇抑制人肝癌 Huh-7 细胞增殖机制研究[J].中国药师,2017,20(9): 1521-1525
- [22] Yanfei J, Shuhua H, Guangchao J, et al. Overexpression of ARNT2 is associated with decreased cell proliferation and better prognosis in gastric cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 450(1-2): 97-103
- [23] Li N, Qin JF, Han X, et al. miR 21a negatively modulates tumor suppressor genes PTEN and miR 200c and further promotes the transformation of M2 macrophages [J]. Immunol Cell Biol, 2018, 96(1): 68-80
- [24] 毕亭亭,吕荣,李道鸿,等.羽扇豆醇增强胰腺癌细胞对氟尿嘧啶的敏感性[J].中华实验外科杂志,2017,34(12): 2148-2150
- [25] Azer SA. MDM2-p53 Interactions in Human Hepatocellular Carcinoma: What Is the Role of Nutlins and New Therapeutic Options?[J]. EMBO Rep, 2018, 7(4): e64
- [26] Gupta A, Shah K, Oza M J, et al. Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: A novel therapy for cancer treatment [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109(122): 484-492
- [27] Chen Y, Yan R, Li B, et al. Silencing CCNG1 protects MPC-5 cells from high glucose-induced proliferation-inhibition and apoptosis-promotion via MDM2/p53 signaling pathway [J]. Int Urol Nephrol, 2020, 52(3): 581-593
- [28] Bhat MK, Yu CL, Yap N, et al. Tumor Suppressor p53 Is a Negative Regulator in Thyroid Hormone Receptor Signaling Pathways[J]. J Bio Chemist, 1997, 272(46): 28989-28993

- [10] 邹园园,张素卿,黄师菊,等. 2-3 岁儿童孤独症谱系障碍与发育性语言障碍的 Gesell 结果分析 [J]. 中国儿童保健杂志, 2015, 23(3): 298-300
- [11] Lin QX, Wu GH, Zhang L, et al. Abnormal processing characteristics to basic emotional faces in the early phase in children with autism spectrum disorder[J]. Chin J Contemp Ped, 2018, 20(2): 134-139
- [12] Srivastava AK, Schwartz CE. Intellectual disability and autism spectrum disorders: Causal genes and molecular mechanisms [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2014, 46(Pt 2): 161-174
- [13] Jing C, Laura MJ, Anna RD, et al. Social Networks of Children With Developmental Language Disorder in Inclusive Preschool Programs [J]. Child development, 2020, 91(2): 471-487
- [14] 郑小斐,陈津津. 300 例语言障碍儿童的智能发育水平分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(11): 1115-1118
- [15] Juliane, Hasselaar, Carolyn, et al. Case marking in German-speaking children with specific language impairment and with phonological impairment[J]. Clin Linguist Phon, 2019, 33(1-2): 117-134
- [16] 赖雪芳,谢洋,程双. 18-24 月龄孤独症谱系障碍患儿智能发育水平的分析[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(13): 2994-2996
- [17] 姜丽娜,李明,边旻. Gesell 问卷用于评价小儿神经发育的信度及效度分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(13): 1113-1115
- [18] 中华医学会儿科学分会发育行为学组. 孤独症谱系障碍儿童早期识别筛查和早期干预专家共识 [J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(12): 890-897
- [19] 周翔,陈强,陈红,等. Gesell 发育量表对 2 岁内孤独症谱系障碍患儿的应用研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2016, 24(12): 1329-1331
- [20] Rao V, Ashok M. Intelligence in Autism [J]. Indian J Psychol Med, 2013, 35(4): 428-428
- [21] Duncan AW, Bishop SL. Understanding the gap between cognitive abilities and daily living skills in adolescents with autism spectrum disorders with average intelligence[J]. Autism, 2013, 19(1): 64-72
- [22] Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism [J]. Lancet, 2014, 383(9920): 896-910
- [23] 刘贤,林穗方,陈文雄,等. 中国儿童孤独症谱系障碍患病率 Meta 分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2018, 26(4): 402-406+429
- [24] 李洪华. 孤独症谱系障碍流行病学研究现状[J]. 中华临床医师杂志, 2014, 24(8): 4471-4474
- [25] Meghan R. Swanson, Kevin Donovan, Sarah Paterson, et al. Early language exposure supports later language skills in infants with and without autism: Talking to infants with ASD supports language[J]. Autism Research, 2019, 43: e2163
- [26] Waterhouse L, London E, Gillberg C. ASD Validity [J]. Review Journal of Autism and Developmental Disorders, 2016, 3(4): 302-329
- [27] Thompson T. Autism research and services for young children: history, progress and challenges[J]. J Appl Res Intellect Disabil, 2013, 26(2): 81-107
- [28] 邹小兵,邓红珠. 美国精神疾病诊断分类手册第 5 版 "孤独症谱系障碍诊断标准" 解读[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(8): 561-563
- [29] Blair G, Melissa A. E, Stewart H. M, et al. Recent Advances in Understanding and Managing Autism Spectrum Disorders[J]. J Child Neurol, 2015, 30(14): 1887-1920
- [30] 中国抗癫痫协会共患病专业委员会. 儿童癫痫共患孤独症谱系障碍诊断治疗的中国专家共识[J]. 癫痫杂志, 2019, 5(1): 3-6
- [31] Rachael B, Andrew P, Teodora G, et al. Additive effects of social and non-social attention during infancy relate to later autism spectrum disorder[J]. Dev Sci, 2014, 17(4): 612-620
- [32] Bontinck Chloë, Petra W, Ellen D, et al. Social Interactions Between 24-Month-Old Children and Their Older Sibling with Autism Spectrum Disorder: Characteristics and Association with Social-Communicative Development[J]. J Autism Dev Disord, 2018, 48(12): 4118-4137
- [33] Nai-Wen T, Daniel K. Homeostatic plasticity in neural development [J]. Neural Development, 2018, 13(6): e9
- [34] Monica D, Rosenberg B, Casey J, et al. Prediction complements explanation in understanding the developing brain [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 589-592
- [35] 王芳,张纪水,刘依林,等. 孤独症谱系障碍 DNA 甲基化研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2018, 45(5): 805-807
- [36] Ivan Y. Iourov, Yuri B. Yurov, Svetlana G. Vorsanova. Neurogenomic Pathway of Autism Spectrum Disorders: Linking Germline and Somatic Mutations to Genetic-Environmental Interactions[J]. Current Bioinformatics, 2017, 12(1): 19-26
- [37] 韩颖. 儿童神经发育异常的早期干预[J]. 中国儿童保健杂志, 2019, 29(4): 1-3
- [38] Adam J. Booth, Jonathan D. Rodgers, Martin A. Volker, et al. Psychometric Characteristics of the DANVA-2 in High-Functioning Children with ASD [J]. J Autism Develop Disorders, 2019, 49: 4147-4158
- [39] Adema R, Michael CC, Thomas B. Synapse-Selective Control of Cortical Maturation and Plasticity by Parvalbumin-Autonomous Action of SynCAM 1[J]. Cell Reports, 2019, 26(2): 381-393
- [40] 唐彩云,闻芳,于兰,等. 孤独症综合干预年龄及时间对治疗效果的影响[J]. 中国妇幼健康研究, 2018, 29(3): 258-261

(上接第 49 页)

- [29] Inoue K, Fry EA, Frazier DP. Transcription factors that interact with p53 and MDM2[J]. Int J Cancer, 2016, 138(7): 1577-1585
- [30] Qin JJ, Li X, Hunt C, et al. Natural products targeting the p53-MDM2 pathway and mutant p53: Recent advances and implications in cancer medicine[J]. Genes Dis, 2018, 5(3): 204-219
- [31] 张玲莉,邱振鹏,彭燕. 羽扇豆醇对人高转移肝癌 HCCLM3 增殖影响的机制研究[J]. 中国药师, 2015, 18(6): 21-25
- [32] Wu D, Prives C. Relevance of the p53-MDM2 axis to aging [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 169-179