

恶性胸膜间皮瘤细胞培养条件及 CDKN2B 对癌细胞的作用

尹小川¹⁾, 尹瑞扬²⁾, 李冉华¹⁾, 蔡方奇¹⁾, 崔岳¹⁾, 毕涛¹⁾, 童兴和¹⁾
(1)昆明医科大学第一附属医院胸外科, 云南昆明 650032;
(2)昆明医科大学海源学院第二临床医学系, 云南昆明 651700)

[摘要] **目的** 探讨不同培养条件(RPMI-1640、DMEM和DMEM/F12培养液)对人恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)组织中分离的MPM细胞传代的影响以及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2B(cyclin dependent kinase inhibitor 2B, CDKN2B)对MPM细胞增殖、侵袭和凋亡的作用。**方法** 从MPM组织中分离细胞分别用RPMI-1640、DMEM和DMEM/F12培养液培养。CCK-8检测细胞增殖, 细胞核及染色体利用瑞氏-吉姆萨染色观察, 免疫荧光实验检测MPM标志物Calretinin、CD141、CK5、EMA和WT-1荧光强度。RT-qPCR和Western blot分别检测CDKN2B的mRNA和蛋白表达能力。Transwell检测细胞侵袭能力, 流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果** 建立的MPM细胞在RPMI-1640、DMEM和DMEM/F12培养液中传至第10代仍具有较好的活力, 且MPM标志物Calretinin、CD141、CK5、EMA和WT-1在细胞中均表达, MPM细胞在RPMI-1640培养液中活力较为稳定。CDKN2B在MPM细胞中低表达($P < 0.05$), 过表达CDKN2B显著抑制MPM细胞的增殖($P < 0.05$)、侵袭($P < 0.05$)和上皮间质转化($P < 0.01$), 促进细胞凋亡($P < 0.01$)。**结论** 建立的MPM细胞可在RPMI-1640培养液中稳定传代, CDKN2B可作为MPM诊断和治疗的潜在靶标。

[关键词] 恶性胸膜间皮瘤; 培养条件; RPMI-1640培养液; CDKN2B; 增殖; 侵袭

[中图分类号] R734.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)01-0028-07

Culture of Malignant Pleural Mesothelioma Cells and the Effects of CDKN2B on Cancer Cell

YIN Xiaochuan¹⁾, YIN Ruiyang²⁾, LI Ranhua¹⁾, CAI Fangqi¹⁾, CUI Yue¹⁾, BI Tao¹⁾, TONG Xinghe¹⁾
(1) Dept. of Thoracic Surgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) The 2nd Clinical Medicine Department, Kunming Medical University HaiYuan College, Kunming Yunnan 651700, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of different culture conditions(RPMI-1640, DMEM and DMEM/F12 medium) on the passage of MPM cells isolated from the tissues of Malignant pleural mesothelioma(MPM), and to study the effects of CDKN2B on the proliferation, invasion and apoptosis of MPM cells. **Methods** MPM cells were isolated from MPM tissues and cultured in RPMI-1640, DMEM and DMEM/F12 medium, respectively. Cell proliferation was examined by CCK-8, and the nuclei and chromosomes were observed by Wright-Giemsa staining. Fluorescence intensities of Calretinin, CD141, CK5, EMA and WT-1 were conducted by immunofluorescence assay. The mRNA and protein expression of CDKN2B were detected by RT-qPCR and Western blot, respectively. Transwell was used to detect cell invasion and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. **Results** The established MPM cells showed good viability when passaged to the 10th generation in RPMI-1640, DMEM and DMEM/F12 cultures, and the MPM markers Calretinin, CD141, CK5, EMA and WT-1 were all expressed in the cells. The viability of MPM cells in RPMI-1640 culture medium was relatively stable.

[收稿日期] 2023-10-09

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 [2019FE001(-043)]

[作者简介] 尹小川(1973~), 男, 四川南充人, 医学博士, 主任医师, 主要从事胸外科临床、基础研究及教学工作。

[通信作者] 童兴和, E-mail: yxc9701@163.com

CDKN2B was downregulated in MPM cells ($P < 0.05$), and overexpression of CDKN2B significantly suppressed the proliferation ($P < 0.05$), invasion ($P < 0.05$) and epithelial interstitial transformation of MPM cells ($P < 0.01$), and promoted the apoptosis ($P < 0.01$). **Conclusion** The established MPM cells were stably passaged in RPMI-1640 culture medium, and CDKN2B may be a potential target for the diagnosis and treatment of MPM.

[**Key words**] Malignant pleural mesothelioma; Culture conditions; RPMI-1640 culture medium; CDKN2B; Proliferation; Invasion

恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)是一种起源于胸膜腔内间皮细胞的恶性肿瘤细胞,侵袭性较高。MPM可分为上皮样、肉瘤样以及双相型3种亚型。其中,上皮样占60%,双相样占30%^[1]。石棉纤维的吸入是MPM的主要危险因素^[2]。据统计,从事石棉相关工作人群患MPM的概率为100/1000000,而普通人群的患病率为1/1000000^[3]。MPM早期无明显症状,潜伏期较长,通常为30~40 a。随着肿瘤的增大,患者会出现气促、胸部疼痛、咳嗽以及呼吸困难。由于早期无显著症状,患者多于晚期确诊,中位生存期为诊断后的12个月,5 a生存率低于3%^[4]。目前,MPM的临床治疗方法主要有手术切除、化学药物治疗、放射治疗以及三者联合治疗^[5-7],这些治疗虽然可提高患者的生存率,但治疗效果仍不够理想。靶向治疗是近来提出的治疗策略,早期的临床实验已初显成效^[8],寻找可行的标志物成为治疗MPM的新挑战。

肿瘤细胞是研究肿瘤发生和发展致病机制的关键工具,从肿瘤组织中分离得到的原代细胞生物学和遗传学特性与肿瘤细胞基本一致,体外培养的癌细胞可用于研究癌细胞生物学行为、癌变机制的探索、抗癌药物检测等,在肿瘤研究中起着不可估量的作用。本研究中,笔者取MPM患者的肿瘤组织,经分离得到原代细胞后分别利用RPMI-1640、DMEM和DMEM/F12培养基进行培养,观察3种培养基对MPM细胞传代的影响,同时探讨CDKN2B对MPM细胞增殖、侵袭和凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

多聚甲醛(天津光复), Triton X-100、Tween 20(Sigma-vecetec), PBS、抗淬灭封片剂(含DAPI)(北京中杉金桥), Annexin V-FITC/PI试剂、CCK-8试剂盒盒(上海碧云天), 瑞士-吉姆萨符合染色液(北京Solarbio)。CDKN2B、N-cadherin、Vimentin、

E-cadherin、Bcl-2、Bax、GAPDH抗体以及二抗(北京博奥森), Cleaved-caspase-3抗体(英国Abcam), 逆转录试剂盒(美国Merck Millipore), Lipofectamine 2000试剂盒(美国Invitrogen), SYBR II Premix Ex Taq试剂盒(日本Takara), Transwell小室(美国康宁)。

1.2 临床样本及细胞株建立

本研究中患者知情并签署知情同意书,同时获得了昆明医科大学第一附属医院伦理委员会的批准(2019伦审L第25号)。右侧胸膜结节患者麻醉后,利用高频电刀切割1个观察孔,分离胸腔黏连并切除纤维囊壁,电刀在不同方向切除部分含结节在内的壁层胸膜,取多个约1 cm × 1 cm × 1 cm的样本。样本置于含PBS的无菌离心管内,用含双抗的PBS冲洗3次后转移至实验室内。样本经无菌D-kank's溶液清洗2次,剪碎后将组织碎片黏附于培养瓶内壁,置于细胞培养箱内培养。当细胞融合至85%时,开始传代。

1.3 细胞培养及传代

分别配置含10% FBS的RPMI-1640、DMEM以及DMEM/F12培养液,将分离得到的MPM细胞分别接种于上述3种培养液中,在5% CO₂培养箱培养,每48 h更换1次培养液。待细胞密度达85%左右时,进行传代。用0.25%胰蛋白酶消化细胞并离心,加入细胞培养液制备单细胞悬液,按1:3的比例进行传代,并重复传代操作。

人间皮细胞MET-5A(上海中乔新舟)生长于人间皮完全培养基(上海中乔新舟)内,并置于5% CO₂, 37 °C环境中。

1.4 CCK-8实验

消化后的细胞接种至96孔板,每孔板2000个细胞,细胞在37 °C, 5% CO₂环境中培养。在培养的第0、6、12、24、48、72 h,将10 μL CCK-8试剂加至每孔,置于黑暗环境中培养1 h,酶标仪测定吸光度值。

1.5 瑞氏吉姆萨染色

细胞经0.25%胰蛋白酶消化,0.01 mol/L PBS漂洗每次5 min,重复3次。细胞经4%多聚甲醛

固定 30 min。PBS 漂洗细胞后加入瑞氏-吉姆萨复合液染色 1 min。滴加等量的 0.01 mol 的磷酸盐缓冲液至玻片，与瑞氏吉姆萨染色液混匀，15 min 后蒸馏水漂洗，晾干玻片后显微镜拍照并记录。

1.6 免疫荧光染色

细胞经 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。固定后的细胞加入 0.2% Triton X-100 在室温中通透 20 min。随后加入 5% 正常血清封闭，1 h 后取出玻片上多余的封闭液，与稀释后的一抗 4 ℃ 过夜孵育。0.01 mol/L PBST 漂洗玻片，与二抗孵育 1 h。漂洗、封片，荧光显微镜观察荧光强度。

1.7 Western blot

收集细胞，通过 RIPA 试剂充分裂解细胞，提取细胞中的总蛋白。测定总蛋白浓度，使用 SDS-PAGE 在 10% 凝胶上对蛋白质进行电泳，并转移到 PVDF 膜。室温中，用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h，随后分别与稀释后的一抗过夜孵育，再与二抗孵育 2 h。通过增强化学发光试剂盒显示目的条带。

1.8 RT-qPCR

收集 MPM 细胞，TRIzol 提取细胞中的总 RNA，逆转录试剂盒用于合成 cDNA。SYBR II Premix Ex Taq 试剂盒用于 CDKN2B mRNA 的 qPCR 检测。GAPDH 作为 CDKN2B 的参照物。2^{-ΔΔct} 法用于分析 CDKN2B mRNA 表达。

1.9 细胞转染

上海吉凯基因合成 pcDNA-NC 和 pcDNA-CDKN2B。根据试剂盒说明书，利用 Lipofectamine 2000 试剂盒将 pcDNA-NC 和 pcDNA-CDKN2B 分别转染至 MPM 细胞中，将细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h。RT-qPCR 和 Western blot 检测转染效率。

1.10 Transwell 检测侵袭

8 μm 的 Transwell 小室用于检测细胞侵袭能力。无血清培养基稀释的基质胶平铺于小室上室。无血清 RPMI-1640 培养液重悬消化后的细胞，再接种于 24 孔板(6 × 10⁴ 个/孔)，下室中加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液。Transwell 小室放入细胞培养箱常规培养。48 h 后，取出下室，用 4% 多聚甲醛固定细胞，0.1% 结晶紫染色，倒置显微镜观察细胞。

1.11 流式细胞术检测凋亡

0.25% 胰蛋白酶消化 MPM 细胞，PBS 漂洗。加入 5 μL FITC 与细胞混合均匀，避光孵育 15 min。再与 3 μL PI 避光孵育 5 min，流式细胞仪分析细

胞凋亡率。

1.12 统计学处理

上述实验均进行 3 次重复。GraphPad Prism 8 用于分析数据及绘图，2 组间数据比较采用学生 *t* 检验。多组间差异通过采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 Tukey's 检验。数据表示为均值 ± 标准差。*P* < 0.05 代表差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 3 种培养条件对 MPM 细胞形态和增殖的作用

分别利用 RPMI-1640、DMEM 和 DMEM/F12 培养液培养细胞并进行传代，观察发现，MPM 细胞主要呈短梭形或不规则多角形、贴壁，相连成片，重叠生长，见图 1A。DMEM 和 DMEM/F12 培养液培养的 MPM 细胞在 P(passage, P)10 时相对稀疏，细胞多呈长梭形，分散分布。随后，通过 CCK-8 实验检测细胞增殖活力，各组中 P1 细胞增殖活力无明显差异(*P* > 0.05)，P5 细胞在 DMEM 组和 DMEM/F12 培养 12 h 时增殖活力显著高于 RPMI-1640 组，P10 中各组细胞的增殖活力在 72 h 时 RPMI-1640 组中细胞活力高于 DMEM 和 DMEM/F12 组(*P* < 0.05)。由此表明，建立的 MPM 细胞在 RPMI-1640 组细胞的活力较为稳定。

2.2 瑞氏-吉姆萨染色结果

瑞氏吉姆萨染色结果，见图 2。3 种条件下培养的 MPM 细胞多为椭球型或不规则多边形，核呈紫蓝色，胞质为淡紫色，细胞胞体饱满，形态均一。细胞核大小不一，偶有巨核和多核。

2.3 免疫荧光检测 MPM 细胞标志物

通过免疫荧光染色检测 MPM 标志物 Calretinin、CD141、CK5、EMA 和 WT-1 的荧光强度，结果显示，3 种培养条件下 Calretinin、CD141、CK5、EMA 和 WT-1 均在 P1、P5 和 P10 的 MPM 细胞中表达，且 Calretinin 和 CK5 的荧光强度较高，见图 3。

2.4 CDKN2B 调控 MPM 细胞增殖、侵袭和凋亡

上述实验结果表明，分离得到的 MPM 细胞在 RPMI-1640 培养条件下细胞活力相对稳定，笔者选择 RPMI-1640 培养基培养分离得到 MPM 细胞。RT-qPCR 和 Western blot 检测第 5 代 MPM 细胞中 CDKN2B 的表达，发现 CDKN2B mRNA 和蛋白表达在 MPM 细胞中表达低于人间皮膜细胞 MET-5A(*P* < 0.05)，见图 4A ~ 4B。随后，在

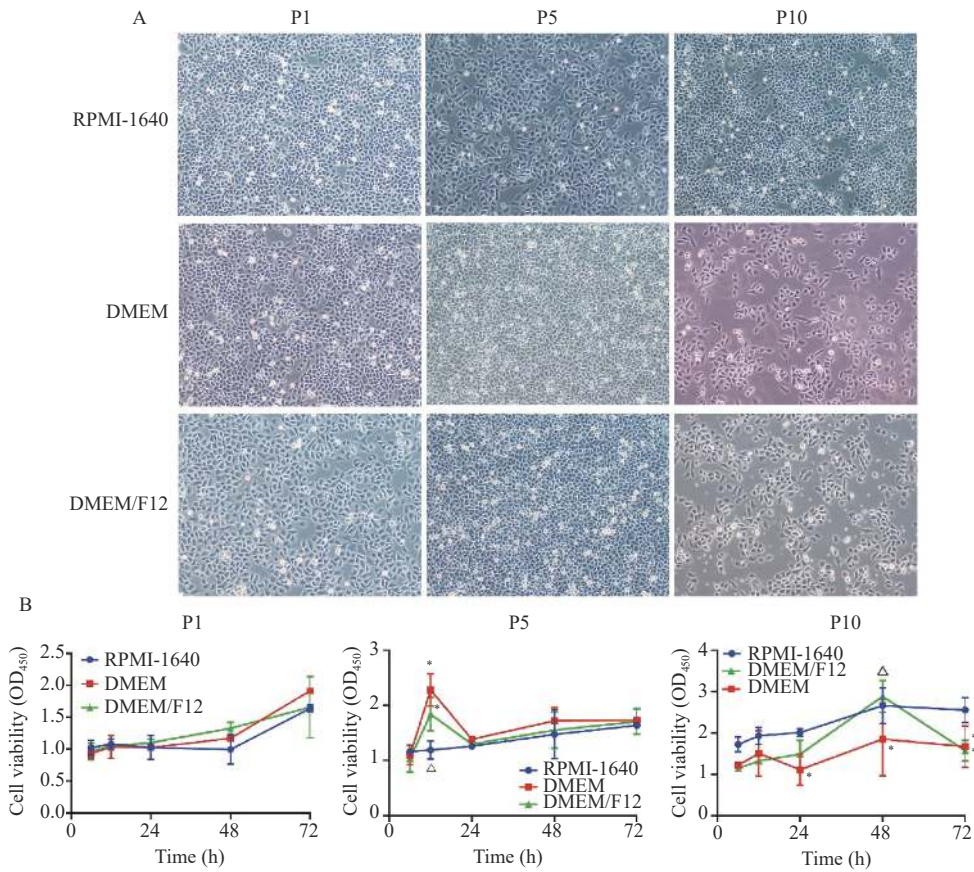


图 1 3 种培养条件对 MPM 细胞形态和增殖的作用

Fig. 1 Effect of three culture conditions on morphology and proliferation of MPM cells

A: 倒置显微镜下观察 P1、P5 和 P10 细胞形态(100×); B: CCK-8 检测 P1、P5 和 P10 细胞细胞增殖活力; 与 RPMI-1640 组比较, * $P < 0.05$; 与 DMEM 组比较, $\Delta P < 0.05$; P1: 第 1 代; P5: 第 5 代; P10: 第 10 代。

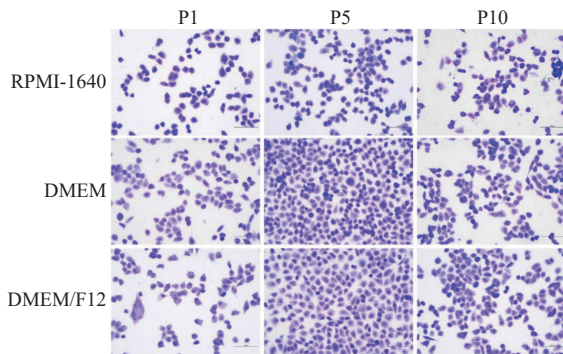


图 2 瑞氏-吉姆萨染色结果(20×)

Fig. 2 The results of Wright Giemsa staining(20×)

MPM 细胞中转染 pcDNA-CDKN2B, 转染后 CDKN2B 的表达显著高于对照组 ($P < 0.05$), 见图 4C ~ 4D。CCK-8、Transwell、Western blot 以及流式细胞术结果表明, 相比较于对照组, 过表达 CDKN2B 组中 MPM 细胞的增殖活力降低 ($P < 0.05$), 见图 4E; 过表达 CDKN2B 抑制细胞侵袭 ($P < 0.05$), 见图 4F; 在过表达 CDKN2B 组中间质标志物 N-cadherin ($P < 0.001$) 和 Vimentin ($P < 0.01$) 表达降低, 上皮标志物 E-cadherin 表达升高

($P < 0.01$), 见图 4G; 与对照组相比, 过表达 CDKN2B 组 MPM 细胞凋亡率 ($P < 0.01$) 和促凋亡蛋白 Cleaved-caspase-3 ($P < 0.01$) 和 Bax ($P < 0.001$) 表达升高, Bcl-2 表达被抑制 ($P < 0.01$), 见图 4H ~ 4I。由此表明, 过表达 CDKN2B 可抑制 MPM 细胞增殖和转移, 促进细胞凋亡。

3 讨论

MPM 的发生与石棉暴露密切相关, 尽管大多数国家已禁止使用石棉, 但目前 MPM 的发病率仍在继续攀升。因此, 了解 MPM 发病机制对于对抗 MPM 至关重要。体外 MPM 模型是研究疾病以及开发新疗法的宝贵工具。本研究中, 笔者从 MPM 组织中提取 MPM 细胞并分别置于 RPMI-1640、DMEM 以及 DMEM/F12 培养液中培养传代, 发现在 RPMI-1640 培养液中第 1 至第 10 代的细胞状态相对稳定, 笔者推测 RPMI-1640 培养液更适合分离的 MPM 细胞培养。

目前, 已有报道从肿瘤组织或胸腔液中建立

MPM 细胞系，成功率为 20%~80%^[9-13]。许多细胞系具有 MPM 肿瘤中常见的遗传突变，可代表一系列的 MPM 组织病理学亚型。然而，大多数研究中建立的细胞系未与原始肿瘤组织中的基因组进行比较，无法确定建立的细胞系与组织病理学的相似程度。Oey 等^[14]报道，MPM 细胞培养物中存在大量的单核苷酸取代物聚集在一个点上，而这一现象未在原发性肿瘤组织中观察到。此外，商业 MPM 细胞与原代细胞之间的转录组存在明显不同，且商业 MPM 细胞代谢向糖酵解表型转移^[9]，MPM 细胞对药物敏感性存在较大的个体差异^[15]。本研究中，笔者培养的 MPM 细胞均表达

MPM 标志物 Calretinin、CD141、CK5、EMA 和 WT-1。

CDKN2B 是细胞 G1 周期进展调节因子，通过与 CDK4 或 CDK6 形成复合物以及阻止 CDK 激酶的活化，从而发挥调控作用。同时，CDKN1B 还在细胞应激识别和调节发育和增加阶段的细胞衰老、分化和凋亡中发挥多方面的作用^[16]。CDKN2B 被发现在肿瘤细胞的恶性转化过程中突变和缺失^[17-18]。例如，通过表观遗传抑制 CDKN2B 的表达，可促进结直肠癌细胞的增殖和结直肠癌的进展^[19]。抑制 CDKN2B 可显著促进膀胱癌患者的增殖并抑制细胞的凋亡^[20]。CDKN2B 表达增加抑制

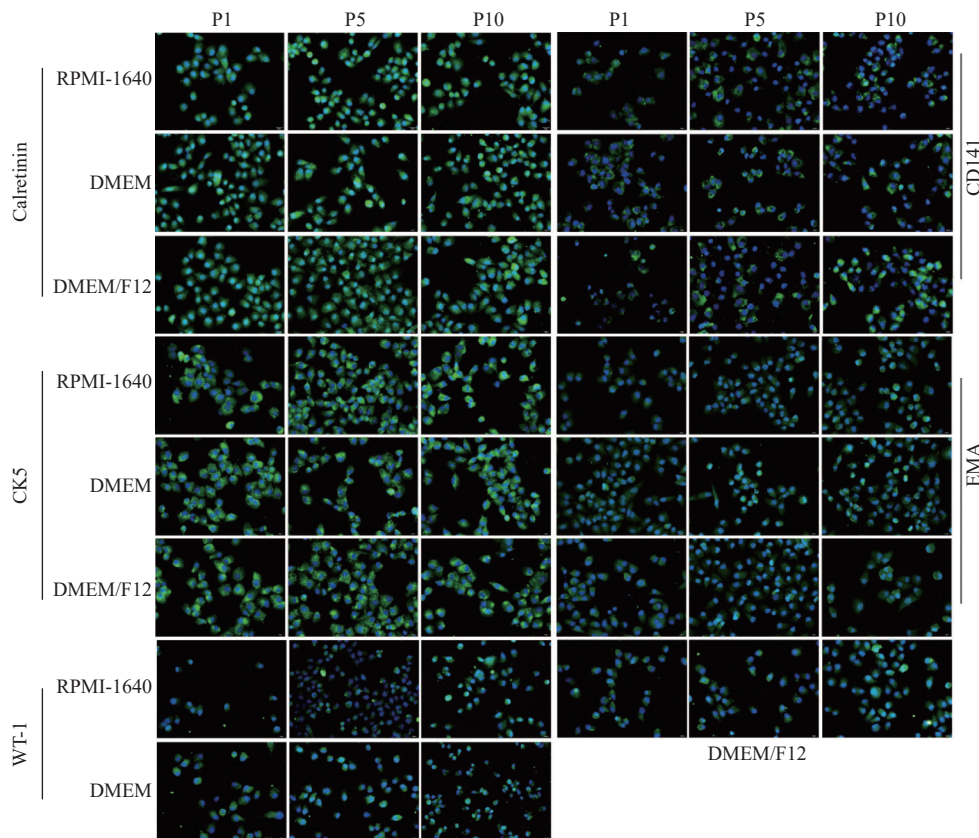
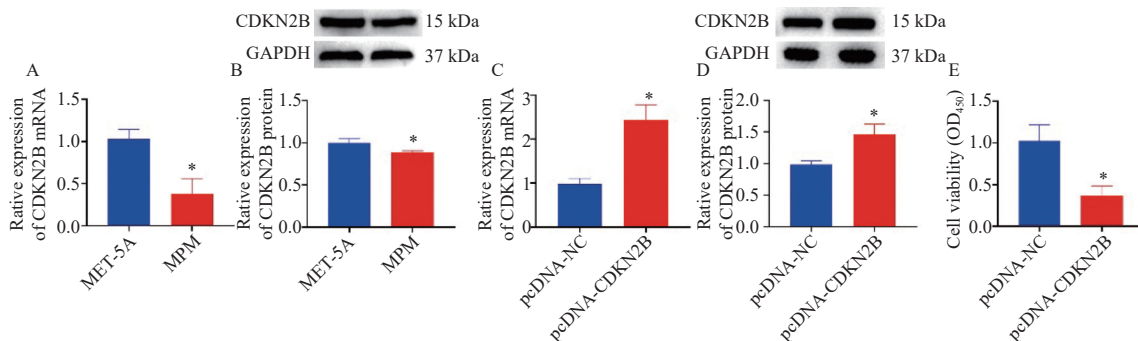


图 3 免疫荧光检测 MPM 细胞标志物(40×)

Fig. 3 The MPM cells biomarkers were detected by immunofluorescence assay(40×)



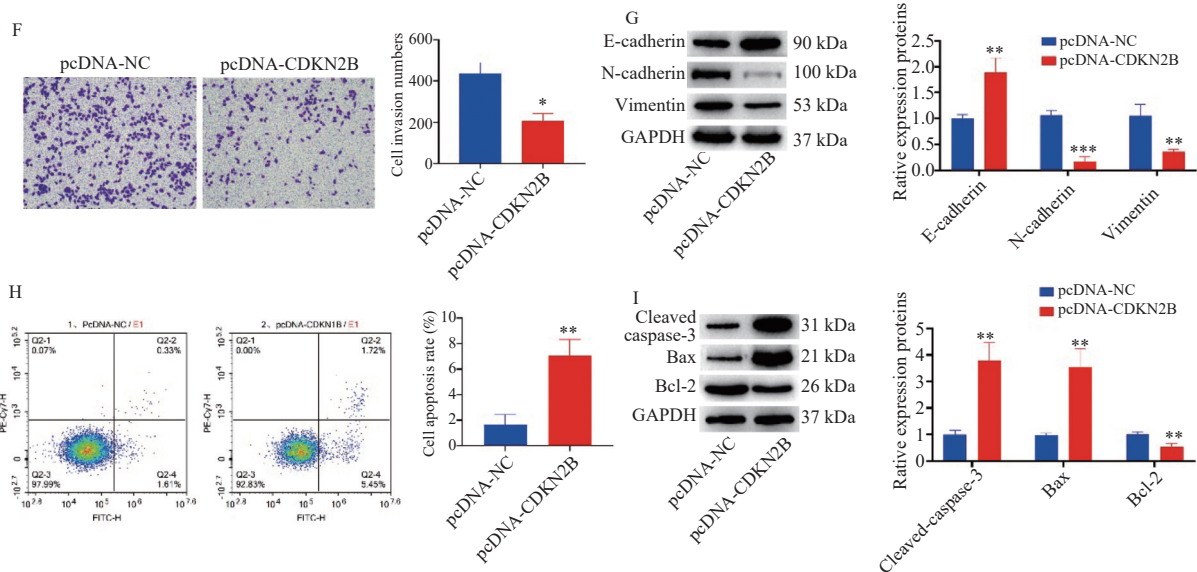


图 4 CDKN2B 调控 MPM 细胞增殖、侵袭、上皮间质转化和凋亡

Fig. 4 CDKN2B modulated the proliferation, invasion, epithelial interstitial transformation and apoptosis of MPM cells

A: RT-qPCR 检测 CDKN2B mRNA 表达; B: Western blot 检测 CDKN2B 蛋白表达; 与 MET-5A 组相比, $*P < 0.05$; C: RT-qPCR 检测 pcDNA-CDKN2B 转染效率; D: Western blot 检测 pcDNA-CDKN2B 转染效率; E: CCK-8 检测细胞增殖活力; F: Transwell 检测细胞侵袭能力; G: Western blot 检测细胞上皮间质转化相关标志物的蛋白表达; H: 流式细胞术检测细胞凋亡率; I: Western blot 检测细胞凋亡相关标志物的蛋白表达; 与 pcDNA-NC 组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

胆管癌细胞增殖, 抑制胆管癌的发展^[21]。CDKN2B 缺失与儿童急性淋巴细胞白血病患者较差的无复发生存率相关^[22]。在本研究中, 笔者发现 CDKN2B 在 MPM 细胞中低表达, 过表达 CDKN2B 显著抑制 MPM 细胞的增殖、侵袭和上皮间质转化, 并促进细胞凋亡。

综上所述, 笔者分离得到的 MPM 细胞在 RPMI-1640 培养液中可稳定传代, CDKN2B 在 MPM 细胞中低表达, 过表达 CDKN2B 抑制细胞增殖、侵袭和上皮间质转化并诱导细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] Bruno R, Alì G, Fontanini G. Molecular markers and new diagnostic methods to differentiate malignant from benign mesothelial pleural proliferations: A literature review[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(Suppl 2): S342-S352.
- [2] Stumphius J, Meyer P B. Asbestos bodies and mesothelioma[J]. *Ann Occup Hyg*, 1968, 11(4): 283-293.
- [3] Porret E, Madelaine J, Galateau-Sallé F, et al. Epidemiology, molecular biology, diagnostic and therapeutic strategy of malignant pleural mesothelioma in 2007 - an update[J]. *Rev Mal Respir*, 2007, 24(8 Pt 2): 6S157-6S164.
- [4] Robinson B W, Musk A W, Lake R A. Malignant mesothelioma[J]. *Lancet*, 2005, 366(9483): 397-408.
- [5] Santoro A, O'brien M E, Stahel R A, et al. Pemetrexed plus cisplatin or pemetrexed plus carboplatin for chemonaïve patients with malignant pleural mesothelioma: Results of the international expanded access program[J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(7): 756-763.
- [6] Macleod N, Chalmers A, O'rourke N, et al. Is radiotherapy useful for treating pain in mesothelioma? A phase ii trial[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(6): 944-950.
- [7] Clive A O, Taylor H, Dobson L, et al. Prophylactic radiotherapy for the prevention of procedure-tract metastases after surgical and large-bore pleural procedures in malignant pleural mesothelioma (SMART): A multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(8): 1094-1104.
- [8] Zalcman G, Mazieres J, Margery J, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the mesothelioma avastin cisplatin pemetrexed study (MAPS): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2016, 387(10026): 1405-1414.
- [9] Chernova T, Sun X M, Powley I R, et al. Molecular profil-

- ing reveals primary mesothelioma cell lines recapitulate human disease[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(7): 1152–1164.
- [10] Manning L S, Whitaker D, Murch A R, et al. Establishment and characterization of five human malignant mesothelioma cell lines derived from pleural effusions[J]. *Int J Cancer*, 1991, 47(2): 285–290.
- [11] Kobayashi M, Takeuchi T, Ohtsuki Y. Establishment of three novel human malignant pleural mesothelioma cell lines: Morphological and cytogenetical studies and EGFR mutation status[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(1a): 197–208.
- [12] Philippeaux M M, Pache J C, Dahoun S, et al. Establishment of permanent cell lines purified from human mesothelioma: Morphological aspects, new marker expression and karyotypic analysis[J]. *Histochem Cell Biol*, 2004, 122(3): 249–260.
- [13] Kanellakis N I, Asciak R, Hamid M A, et al. Patient-derived malignant pleural mesothelioma cell cultures: A tool to advance biomarker-driven treatments[J]. *Thorax*, 2020, 75(11): 1004–1008.
- [14] Oey H, Daniels M, Relan V, et al. Whole-genome sequencing of human malignant mesothelioma tumours and cell lines[J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(6): 724–734.
- [15] Szulkin A, Nilsson G, Mundt F, et al. Variation in drug sensitivity of malignant mesothelioma cell lines with substantial effects of selenite and bortezomib, highlights need for individualized therapy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65903.
- [16] Yuile A, Satgunaseelan L, Wei J Q, et al. CDKN2A/B homozygous deletions in astrocytomas: A literature review[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(7): 5276–5292.
- [17] Pozdeyev N, Gay L M, Sokol E S, et al. Genetic analysis of 779 advanced differentiated and anaplastic thyroid cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(13): 3059–3068.
- [18] Fortin Ensign S P, Jenkins R B, Giannini C, et al. Translational significance of CDKN2A/B homozygous deletion in isocitrate dehydrogenase-mutant astrocytoma[J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25(1): 28–36.
- [19] Yang L, Ma D W, Cao Y P, et al. PRMT5 functionally associates with EZH2 to promote colorectal cancer progression through epigenetically repressing CDKN2B expression[J]. *Theranostics*, 2021, 11(8): 3742–3759.
- [20] Yang J, Liu Y, He A, et al. Hsa-miR-429 promotes bladder cancer cell proliferation via inhibiting CDKN2B[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68721–68729.
- [21] Cao K, Li B, Zhang Y W, et al. miR-29b restrains cholangiocarcinoma progression by relieving DNMT3B-mediated repression of CDKN2B expression[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(4): 6055–6065.
- [22] Boldrin E, Gaffo E, Niedermayer A, et al. MicroRNA-497/195 is tumor suppressive and cooperates with CDKN2A/B in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2021, 138(20): 1953–1965.