

The Expression of p21^{WAF1/CIP1} in Rabbit Proliferative Vitreoretinopathy

Caiyun You¹, Zhigang Yuan², Zheng Zeng¹, Hua Yan^{1*}

¹Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin

²Shanxi Eye Hospital, Taiyuan Shanxi

Email: *phuayan2000@163.com

Received: May 29th, 2015; accepted: Jun. 23rd, 2015; published: Jun. 26th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To observe the expression of p21^{WAF1/CIP1} during the course of experimental proliferative vitreoretinopathy (PVR) in rabbits and analyze its possible mechanism. **Method:** Thirty-one pigmented rabbits were divided into two groups, experimental group in 28 rabbits and normal control group in 3 rabbits. Histology was used to observe PVR progress. Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were used to detect the expression of p21^{WAF1/CIP1}, CDK₂, cyclin E protein or mRNA in retina on different set points. **Results:** Inflammatory cells infiltration was observed on day 7 in experimental rabbits' retina. The proliferative typical strip of local retina was formatted on day 14 and fixed fold was noticed on the retina on day 28. Western blot method showed that the relative expression of p21^{WAF1/CIP1} protein was lowest on day 14, and the relative expression of CDK2 and cyclin E protein were highest on day 14. The difference with that in other set points had strong statistic significance (F = 20.55, P = 0.00; F = 26.903, P = 0.000; F = 10.00, P = 0.00). RT-PCR method also showed that the lowest relative expression on the relative expression of p21^{WAF1/CIP1} mRNA was on day 14, and the highest relative expression on the relative expression of CDK2 and cyclin E mRNA were noticed on day 14. The difference had strong statistic significance with that in other groups (F = 18.06, P = 0.00; F = 14.90, P = 0.00; F = 87.64, P = 0.00). **Conclusions:** The expression of p21^{WAF1/CIP1} decreased during the course of PVR, which might contribute to the progress of PVR by regulation CDK2 and cyclin E levels.

Keywords

p21^{WAF1/CIP1}, Proliferative Vitreoretinopathy, Animal Model

*通讯作者。

p21^{WAF1/CIP1}在兔增生性玻璃体视网膜病变视网膜中的表达

由彩云¹, 袁志刚², 曾 峥¹, 颜 华^{1*}

¹天津医科大学总医院, 天津

²山西省眼科医院, 山西 太原

Email: *phuayan2000@163.com

收稿日期: 2015年5月29日; 录用日期: 2015年6月23日; 发布日期: 2015年6月26日

摘 要

目的: 观察p21^{WAF1/CIP1}在兔增生性玻璃体视网膜病变(PVR)模型中的变化, 探讨其在PVR发生发展的可能作用机制。方法: 选取青紫蓝兔31只, 实验组28只, 正常对照组3只, 组织病理学检查PVR病变情况, 蛋白免疫印迹(Western blot)及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测不同时间点视网膜p21^{WAF1/CIP1}、CDK₂、cyclin E表达情况。结果: 实验组7 d组织学检查视网膜表面炎性细胞聚集, 14 d时形成典型局部增殖条索, 28 d时形成固定皱褶。Western blot结果显示p21^{WAF1/CIP1}相对表达量14 d时最低; CDK₂蛋白及cyclin E蛋白的相对表达量14 d最高, 与其他时间点有统计学差异(F = 20.55, P = 0.00; F = 26.903, P = 0.000; F = 10.00, P = 0.00)。RT-PCR结果显示各组p21^{WAF1/CIP1}mRNA的相对表达量14 d时最低; CDK₂及cyclin E mRNA的相对表达量14 d最高, 与其他时间点差异显著(F = 18.06, P = 0.00; F = 14.90, P = 0.00; F = 87.64, P = 0.00)。结论: p21^{WAF1/CIP1}在PVR表达下降, 使PVR病情加重, 这一作用可能是通过调节CDK₂和cyclin E的表达实现。

关键词

p21^{WAF1/CIP1}, 增生性玻璃体视网膜病变, 动物模型

1. 引言

增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是孔源性视网膜脱离手术后及开放性眼外伤后严重的并发症, 是眼内发生的过度损伤修复过程, 由于多种增殖细胞在视网膜表面聚集形成视网膜前膜, 牵拉可造成视网膜脱离[1]。其发病机制仍不十分清楚, 而视网膜色素上皮细胞的异常增生是导致PVR发生的重要病理基础。p21^{WAF1/CIP1}是近年来发现的一种细胞周期负性调控基因, 参与抑制细胞生长、发育、分化等多种生物学功能, 阻止细胞从G₁期进入S期, 引起细胞周期停止, 抑制细胞增殖[2]。为探讨p21^{WAF1/CIP1}在PVR形成过程中的作用及机制, 本实验通过建立PVR动物模型, 观察视网膜中p21^{WAF1/CIP1}、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclindependent kinase, CDK)-2、细胞周期蛋白(cyclin)-E蛋白及mRNA水平, 探讨p21^{WAF1/CIP1}在PVR发病中的可能作用机制。现将结果报道如下。

2. 材料与方

2.1. 实验动物

成年青紫蓝兔31只(由天津医科大学动物中心提供), 体重1.5~2.5 kg, 雌雄不限, 实验组28只, 正常对照组3只。实验组每只兔随机选取一只眼作为实验眼。采用参考文献[3]的方法建立兔PVR动物模型。

2.2. 组织病理学检测

分别于建模后 7 d、14 d、21 d、28 d 每组随机选取 1 只兔子，过量麻醉处死后摘出眼球，10%福尔马林浸泡 30 分钟，用 1 ml 注射器抽吸部分玻璃体，并向玻璃体腔内注射 10%福尔马林约 0.5 ml，从内部固定视网膜，24 小时后矢状位剖开眼球，剖面穿过视神经，使眼球内部充分浸泡在固定液中，防止视网膜脱离。固定两天后，取出眼球组织，去除眼前节及晶状体，每半只眼球在与剖开面相对的赤道部巩膜开窗。梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡后、包埋制成石蜡标本，对全眼球进行切片。切片厚度 5 μm ，常规烘片、脱蜡、苏木素伊红(HE)染色、脱水、透明、封固后用光学显微镜观察并照相。

2.3. 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测视网膜 p21^{WAF1/CIP1}、CDK2、cyclin E 蛋白表达

过量麻醉处死正常组兔 3 只，摘除双侧眼球共 6 只；对于实验组，分别于建模后第 7 d、14 d、21 d、28 d 过量麻醉处死实验兔，每个时间点 6 只，每只摘除实验眼。于碎冰上去除眼前节和玻璃体，剥取视网膜组织置入液氮中备用。将标本按 1: 6 加入预冷的组织细胞裂解液，在 4℃下充分匀浆。静置 1 h 后，12,000 r/min \times 20 min 高速冷冻离心机离心，上清液与蛋白上样缓冲液>Loading Buffer (5 \times)、Reduce Agent (20 \times)充分混合，100℃煮沸 5 min。Bradford 法测定蛋白定量。每泳道上样 25 μg ，10% SDS-page 电泳分离蛋白，以半干法用 DYY-III40C 型电泳槽将电泳后的凝胶上蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上，0.5%脱脂奶粉封闭膜，室温 1.5 h 后加入兔抗 p21^{WAF1/CIP1} 抗体(1:200 美国 Santa Cruz 公司)、CDK2 鼠单克隆抗体(1:200，上海碧云天公司)、cyclin E 鼠单克隆抗体(1:200，上海碧云天公司)，4℃摇床过夜。次日，室温下用山羊抗兔 IgG/辣根过氧化物酶(HRP) (1: 2000)稀释，孵育 1 h，ECL 发光剂与膜反应 3 min，压片曝光 3 min。将胶片进行扫描，采用 Quantity One (Bio-Rad)软件，计算不同条带的灰度值(吸光强度 \times 面积)，以 β -actin 作为内参照，目的蛋白的相对表达量 = (其条带灰度值/内参条带灰度值) \times 100%。

2.4. RT-PCR 方法检测视网膜 p21^{WAF1/CIP1}、CDK2、cyclin E mRNA 表达水平

采用与 Western blot 相同的方法获取视网膜标本，Trizol (上海生物工程有限公司产品)提取兔视网膜组织标本总 RNA。紫外分光光度计测定行 RNA260、280 nm 处的吸光度[A, 旧称光密度(OD)值]，计算出总 RNA 样品浓度。引物由上海生物工程技术有限公司合成：p21^{WAF1/CIP1} 上游引物为 5'-GAA CCA TGT TGG GAG TGT-3'，下游引物为 5'-ACT GCT TAT TGG TCT TGT G-3'，目的片断长度为 321 碱基对(bp)；CDK2 上游引物为 5'-ATC CGC CTG GAC ACT GAG-3'，下游引物为 5'-GGT AAG AGT AGC CCA GGA-3'，目的片断长度为 269bp；cyclin E 上游引物为 5'-TTC CAC ACA GGA GCA AAG TAT G-3'，下游引物为 5'-TGC AAC TTT GGA GGG TAG ATT T-3'，目的片断长度为 377 bp；内参照基因 β -actin 的上游引物为 5'-AGT CGT TGG AGC GAG CAT-3'，下游引物为 5'-GTT TAT AGC ACT CTA CGG TAC-3'，目的片断长度为 121 bp。常规 PCR 程序扩增，琼脂糖凝胶中电泳分离，采用凝胶成像分析系统测量目的基因 p21^{WAF1/CIP1} 及内参 β -actin 的扩增条带的产物含量。

2.5. 统计分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析。数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学处理，组间两两比较采用 LSD-t 检验，P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

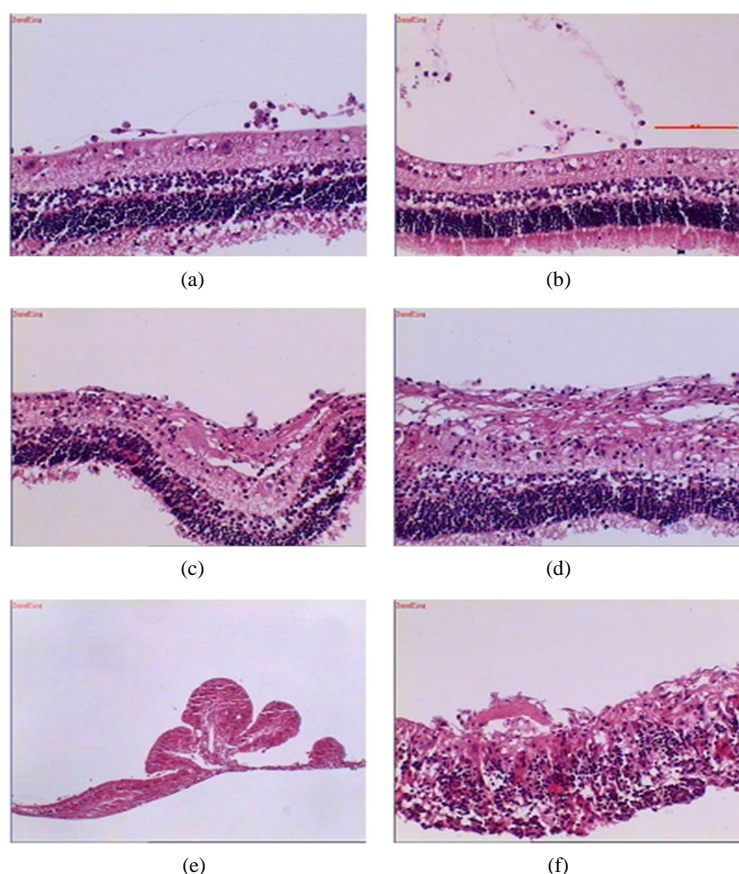
3.1. 组织病理学检查

实验组 7 d 病理组织学检查示视网膜表面炎性细胞聚集，可见成纤维细胞增生；14 d 时视网膜表面

增殖，形成典型局部增殖条索，视网膜出现皱褶；28 d 时视网膜增生更为明显，视网膜结构紊乱，形成视网膜固定皱褶，可观察到花节样外观。对照组 7 d 病理组织学检查示视网膜表面炎性细胞及渗出，未见典型成纤维细胞增生；14 d 时视网膜表面增殖明显，但仍未形成明显增殖条索；28 d 时视网膜结构尚存，视网膜表面形成明显增殖条索(图 1)。

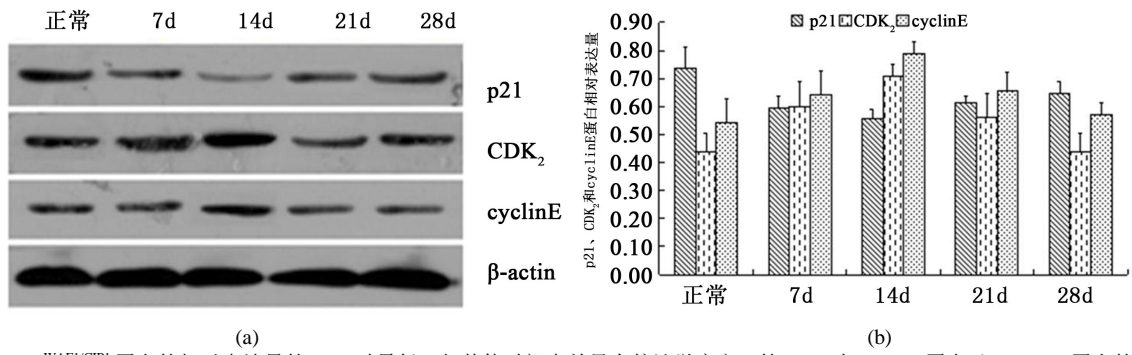
3.2. Western blot 方法检测视网膜 p21^{WAF1/CIP1}、CDK₂、cyclin E 蛋白表达

p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的相对表达量在正常组为 0.74 ± 0.08 ，建模后第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 分别为 0.60 ± 0.05 、 0.56 ± 0.03 、 0.74 ± 0.02 和 0.65 ± 0.04 。P21^{WAF1/CIP1} 蛋白的相对表达量第 14 d 时最低，与其他时间点差异有统计学意义($F = 20.55, P = 0.00$)。CDK₂ 蛋白的相对表达量在正常组为 0.44 ± 0.06 ，建模后第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 分别为 0.60 ± 0.09 、 0.71 ± 0.04 、 0.37 ± 0.09 和 0.44 ± 0.06 。cyclin E 蛋白的相对表达量在正常组为 0.68 ± 0.09 ，建模后第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 分别为 0.64 ± 0.08 、 0.79 ± 0.04 、 0.66 ± 0.06 和 0.57 ± 0.04 。第 14 d 时，CDK₂ 蛋白及 cyclin E 蛋白的相对表达量最高，与其他时间点差异均有统计学意义($F = 26.903, P = 0.000; F = 10.00, P = 0.00$) (图 2)。



(a) 实验组 7 d 视网膜表面炎性细胞聚集，可见成纤维细胞增生 HE × 200；(b) 对照组 7 d 视网膜表面炎性细胞及渗出，未见典型成纤维细胞增生 HE × 200；(c) 实验组 14 d 视网膜表面增殖，形成典型局部增殖条索 HE × 200；(d) 对照组 14 d 视网膜表面增殖明显，但未形成明显增殖条索 HE × 200；(e) 实验组 28 d 视网膜增生明显，视网膜结构紊乱，形成视网膜固定皱褶，呈花节样外观 HE × 100；(f) 对照组 28 d 视网膜表面形成明显增殖条索，视网膜结构尚存 HE × 200

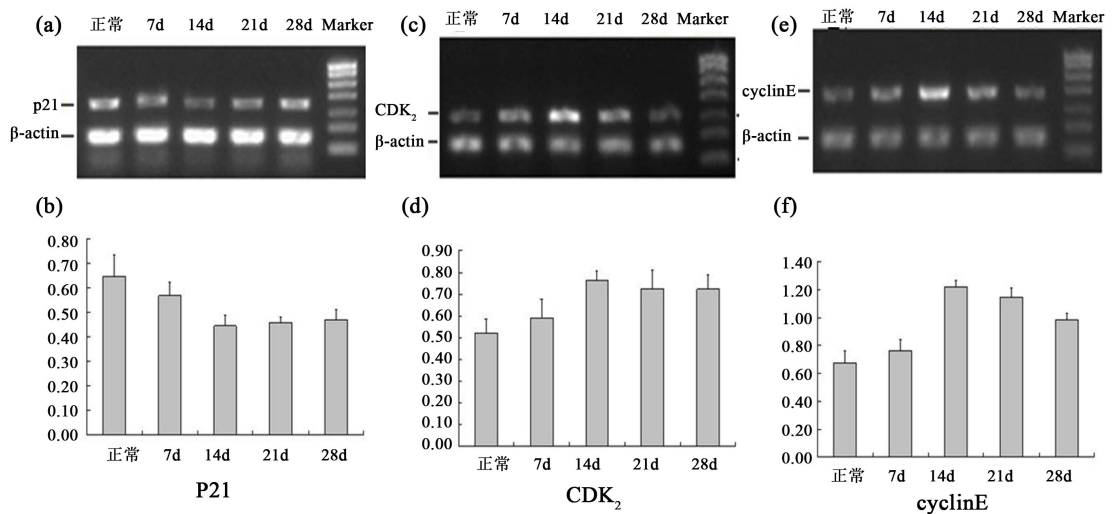
Figure 1. H&E staining of proliferative retina in experimental and control group
图 1. HE 染色示实验组及对照组兔视网膜病理改变



P21^{WAF1/CIP1} 蛋白的相对表达量第 14 d 时最低，与其他时间点差异有统计学意义；第 14 d 时，CDK₂ 蛋白及 cyclin E 蛋白的相对表达量最高，与其他时间点差异均有统计学意义

Figure 2. Protein (a) and its the relative expression (b) of p21^{WAF1/CIP1}, CDK₂, and cyclin E in proliferative retina on experimental and control group were examined by western blot (n = 6)

图 2. Western blot 检测实验组及对照组增生性视网膜 p21^{WAF1/CIP1}、CDK₂、cyclin E 蛋白的表达(a)及相对表达量(b) (n = 6)



P21^{WAF1/CIP1} mRNA 的相对表达量第 14 d 时最低，与其他时间点差异有统计学意义；第 14 d 时，CDK₂ 及 cyclin E mRNA 的相对表达量最高，与其他时间点差异均有统计学意义

Figure 3. mRNA (1,3,5) and its relative expression (2,4,6) of p21^{WAF1/CIP1}, CDK₂ and cyclin E in proliferative retina on experimental and control group were examined by RT-PCR analysis (n = 6)

图 3. RT-PCR 检测实验组及对照组增生性视网膜 p21^{WAF1/CIP1}、CDK₂ 与 cyclin E mRNA 的表达(1,3,5)及其相对表达量(2,4,6) (n = 6)

3.3. RT-PCR 法检测视网膜 p21^{WAF1/CIP1}、CDK₂、cyclin E mRNA 的表达

图 3(a)显示 p21^{WAF1/CIP1} 与 β -actin 在兔正常视网膜及建模后不同时间点视网膜的 mRNA 扩增产物电泳结果。各组 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 的相对表达量，正常组为 0.65 ± 0.09 ，建模后第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 分别为 0.57 ± 0.05 、 0.45 ± 0.04 、 0.46 ± 0.02 和 0.47 ± 0.04 ，第 14 d 时 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 的相对表达量最低，与其他时间点差异有统计学意义($F = 18.06, P = 0.00$) (图 3(b))。图 3(c)显示 CDK₂ 与 β -actin 在兔正常视网膜及建模后不同时间点视网膜的 mRNA 扩增产物电泳结果。正常组 CDK₂ mRNA 的相对表达量为 0.52 ± 0.06 ，建模后第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 分别为 0.59 ± 0.09 、 0.76 ± 0.04 、 0.73 ± 0.09 和 0.72 ± 0.06 。图 3(e)显示 cyclin E 与 β -actin 在兔正常视网膜及建模后不同时间点视网膜的 mRNA 扩增产物电泳结果。正常组 cyclin E mRNA 的相对表达量为 0.68 ± 0.09 ，建模后第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 分别为 0.76 ± 0.08 、

1.22 ± 0.04、1.15 ± 0.06 和 0.99 ± 0.04。第 14 d 时 CDK₂ mRNA(图 3(d))及 cyclin E mRNA(图 3(f))的相对表达量最高, 与其他时间点差异有统计学意义(F = 14.90, P = 0.00; F = 87.64, P = 0.00)。

4. 讨论

PVR 是在孔源性视网膜脱离和眼球穿孔伤后的机体自我修复过程, 是眼的一种增生性反应。其发病机制目前尚不十分清楚。目前研究认为, PVR 的发生与有多种细胞因子有关, 这些因子刺激视网膜色素上皮细胞、神经胶质细胞及成纤维细胞等在视网膜表面及玻璃体内增生, 参与增殖膜形成, 促进膜收缩, 导致视网膜脱离。

细胞进入细胞周期后由于受到各种机制的共同调控, 保证了细胞按顺序经历各个事件, 细胞完成正确分裂[4], 细胞增殖发生。近年来研究发现细胞周期调控蛋白主要包括以下几类: cyclins、CDK 和细胞周期依赖性激酶抑制剂(cyclindependent kinase inhibitor, CKI)。当细胞周期调节机制发生改变时将可能导致细胞增殖失控, 引起肿瘤等以细胞增殖为特征性疾病。目前发现 G₁/S 期检测点在细胞周期调控中起着比较重要的作用[5], 而且起作用的主要调节因子是 CDK₂, 激活或者抑制 CDK₂ 可以调控细胞的增殖[6]。

p21^{WAF1/CIP1} 是目前已知的 cyclin 与 CDK 复合物的广泛抑制剂, 它通过依赖和非依赖 p53 途径, 对细胞内信号和细胞外信号做出反应, 参与细胞生长、发育、分化、衰老及 DNA 损伤修复等多种功能[7] [8]。p21^{WAF1/CIP1} 能阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期, 引起细胞周期停止, 抑制细胞增殖[9]。近年来的研究还发现, 在 TGF、TNF- α 、干扰素- β 等因素的作用下, p21^{WAF1/CIP1} 基因可以脱离 P53 的作用快速发生反应, 使受损的细胞发生 G₁ 期的细胞周期阻滞, 防止异常细胞的增殖, 称非 P53 依赖性激活途径[8] [10]。另外, p21^{WAF1/CIP1} 通过与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合, 抑制 PCNA 与 DNA 聚合酶 δ 结合, 阻断 DNA 正常复制过程, 使细胞增殖减缓[11]。Faria 等[12]研究抑癌基因 p53、p21^{WAF1/CIP1} 及 p27^{KIP1} 在星形细胞瘤中表达水平时发现, 随着肿瘤恶性程度的增高, p21^{WAF1/CIP1} 呈低表达。赵成等[13]对视网膜母细胞瘤 p21^{WAF1/CIP1} 表达研究中也发现 p21^{WAF1/CIP1} 在视网膜母细胞瘤中的表达明显低于正常视网膜组织。以上研究均表明, p21^{WAF1/CIP1} 低表达可能为异常增殖性疾病的发病机制之一。

本实验通过建立 PVR 动物模型, 检测 p21^{WAF1/CIP1} 在 PVR 视网膜组织中表达, 探讨 p21^{WAF1/CIP1} 在 PVR 发生发展的变化及其可能的作用机制。结果显示 p21^{WAF1/CIP1} 在正常组有一定量的表达, 实验组表达降低, 且在建模后第 14 d 时表达最低。分析其原因, 在正常组有一定量的 p21^{WAF1/CIP1} 表达, 可以使视网膜细胞处于一个增殖及抑制的平衡状态, 既保证细胞新旧更迭, 维持一定量的细胞进入正常细胞周期进行分裂增殖, 又可防止无序的细胞增殖, 产生肿瘤等以增殖为特征性疾病。建模后最初 7d, 在各种炎症因子及细胞活性物质的作用下, p21^{WAF1/CIP1} 表达有所下调, 为细胞的增殖做准备, 在大体病变可发现视网膜炎症细胞浸润与细胞增生的早期表现。在建模后第 14 d, 可检测到 p21^{WAF1/CIP1} 弱表达, 而此期正是视网膜前膜及各种增殖细胞快速增殖的时期, p21^{WAF1/CIP1} 作为细胞增殖抑制因子, 其蛋白及基因水平在这一时期表现为弱表达, 有利于增殖细胞的生长, 与其生物学功能一致, 细胞性前膜开始形成并有收缩牵拉的表现, 临床上 PVR 患者在此时如施行手术, 可看到典型 PVR 改变[14], 此时是施行手术的最佳时机。在建模后第 21 d 和 28 d, p21^{WAF1/CIP1} 表达有所回升, 但仍低于正常水平, 病理学检查可见细胞增殖进一步加重, 表现为视网膜增殖, 膜的收缩引起视网膜不规则皱褶牵拉视网膜, 临床上此期也可观察到 PVR 患者形成漏斗状视网膜脱离, 此时手术不仅难度增大, 而且手术后效果欠佳[15]。而 CDK2 和 cyclin E 作为 p21^{WAF1/CIP1} 的下游蛋白及细胞周期的正性调节蛋白, 在 PVR 整个病程中其蛋白及 mRNA 表达与 p21^{WAF1/CIP1} 正好相反, 随着病程延长, 表达量逐渐升高, 至 14 d 时表达最高, 之后略有下降, 但仍高于正常水平。

因此, 根据以上结果我们认为 p21^{WAF1/CIP1} 可能是 PVR 病程进展中起关键作用的调控因子, 由于其低表达, 引起下游 CDK₂、cyclin E 的高表达, 从而使病变程度进一步加重。p21^{WAF1/CIP1} 在建模后第 14 d 表

达最低, 之后逐渐升高, 但仍维持在一个较低的水平, 对细胞增殖的调控可能是通过对下游蛋白 CDK2、cyclin E 的调控来实现的。

基金项目

本文由天津市应用基础与前沿技术研究计划(12JCYBJC33900)基金项目支持。

参考文献 (References)

- [1] Iandiev, I., Bringmann, A. and Wiedemann, P. (2010) Proliferative vitreoretinopathy pathogenesis and therapy. *Klin Monbl Augenheilkd*, **227**, 168-174.
- [2] Jung, Y.S., Qian, Y. and Chen, X. (2010) Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*, **22**, 1003-1012.
- [3] 袁志刚, 韩金栋, 颜华, 李海燕 (2011) 玻璃体腔注射人 PRP 联合巩膜外冷冻建立 PVR 动物模型的研究. *眼科新进展*, **31**, 930-933.
- [4] Csikász-Nagy, A., Palmisano, A. and Záborszky, J. (2011) Molecular network dynamics of cell cycle control: Transitions to start and finish. *Methods in Molecular Biology*, **761**, 277-291.
- [5] Blagosklonny, M.V. and Pardee, A.B. (2002) The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle*, **1**, 103-110.
- [6] Neganova, I., Zhang, X., Atkinson, S. and Lako, M. (2009) Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene*, **28**, 20-30.
- [7] Pang, L.Y., Scott, M., Hayward, R.L., Mohammed, H., Whitelaw, C.B., Smith, G.C. and Hupp, T.R. (2011) p21 (WAF1) is component of a positive feedback loop that maintains the p53 transcriptional program. *Cell Cycle*, **10**, 932-950.
- [8] Lee, J.H., Lee, S.Y., Lee, J.H. and Lee, S.H. (2010) p21 WAF1 is involved in interferon- β -induced attenuation of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in ovarian cancer. *Molecules and Cells*, **30**, 327-333.
- [9] Ma, H., Zhou, Z., Wei, S. and Wei, Q. (2011) Association between p21 Ser31Arg polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Chinese Journal of Cancer*, **30**, 254-263.
- [10] Nakamura, S., Kamakura, T. and Ookura, T. (2009) Tongue epithelial KT-1 cell-cycle arrest by TGF- β associated with induction of p21(Cip1) and p15 (Ink4b). *Cytotechnology*, **61**, 109-116.
- [11] Abbas, T., Sivaprasad, M., Terai, K., Amador, V., Pagano, M. and Dutta, A. (2008) PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Development*, **22**, 2496-2506.
- [12] Faria, M.H., Patrocínio, R.M., Moraes Filho, M.O. and Rabenhorst, S.H. (2007) Immunoeexpression of tumor suppressor genes p53, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 in human astrocytic tumors. *Arq Neuropsiquiatr*, **65**, 1114-1122.
- [13] 赵成, 游志鹏 (2009) p21WAF1/CIP1 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义. *眼科研究*, **27**, 903-905.
- [14] 马志中 (2010) 我国眼外伤近五年研究进展. *中华眼科杂志*, **46**, 911-914.
- [15] 赵霞, 马志中 (2009) 关于玻璃体手术治疗眼外伤的争议. *中国实用眼科杂志*, **27**, 1329-1332.