

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.002

TCF21 基因对肺腺癌 A549 细胞 DDP 化疗及放疗敏感性的影响*

陆 晓, 洗 磊[△]

(广西医科大学第一附属医院心胸外科, 南宁 530021)

[摘要] 目的 为探讨转录因子 21(TCF21)基因对人肺癌 A549 细胞放化疗敏感性的影响。方法 利用慢病毒转染技术在肺癌 A549 细胞中高表达 TCF21 基因,以荧光定量 PCR、Western blot 分析目的基因的表达,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测高表达 TCF21 肺腺癌 A549 细胞对顺铂(DDP)化疗敏感性的影响,平板克隆实验检测高表达 TCF21 肺腺癌 A549 细胞对放疗敏感性的影响。结果在 72 h 时,随着 DDP 浓度的增高(0、0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mg/L),各组细胞的抑制率相应增高,高表达组各个药物浓度时的抑制率明显高于空载体组与未转染组($P < 0.05$),而后两者之间无明显差异;过表达 TCF21 组随着药物浓度及时间增加,高表达组抑制率相应增高($P < 0.05$);接受 X 照射后,未转染组、未转染+放疗组、空载体组、空载体+放疗组、高表达组及高表达+放疗组克隆形成率分别为:95.17%±2.85%、88.20%±2.03%、93.80%±4.17%、85.60%±2.42%、71.67%±3.21%、56.00%±2.65%。结论 TCF21 基因高表达能显著增强肺癌 A549 细胞对放疗及 DDP 化疗敏感性。

[关键词] 肺肿瘤;放射疗法;药物疗法;A549;TCF21;敏感性

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)27-3748-05

The effects of TCF21 genes on radiation and chemotherapy sensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells*

Lu Xiao, Xian Lei[△]

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the transcription factor 21 (transcription factor 21, TCF21) gene on human lung cancer A549 cells sensitivity to chemotherapy. **Methods** Using lentivirus technology in A549 lung cancer cells highly expressed genes TCF21, fluorescence quantitative PCR, Western Blot analysis were used to analyse the expression of the target gene, MTT assay was used to detect the effect of TCF21 lung adenocarcinoma A549 cells on cisplatin (cis-Dichlorodiamineplatinum, DDP) chemosensitivity, and colony assay was used to detect the effect of overexpression of TCF21 lung adenocarcinoma A549 cells on radiosensitivity. **Results** After 72 h, with the increasing concentration of DDP (0, 0.625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000 mg/L), corresponding inhibition rates in each group increased, and the inhibition rate of the high expression group was significantly higher in empty vector group and untransfected group ($P < 0.05$), no significant difference between the two then; overexpression TCF21 group with drug concentration and time and increase the rate of high expression inhibition corresponding increase ($P < 0.05$); after receiving X radiation, non-transfected group, untransfected plus radiotherapy group, vector group, vector plus radiotherapy group, high expression and high expression + radiotherapy colony formation rates were: 95.17%±2.85%, 88.20%±2.03%, 93.80%±4.17%, 85.60%±2.42%, 71.67%±3.21%, 56.00%±2.65%. **Conclusion** TCF21 gene expression can significantly enhance the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy DDP A549 lung cancer cells.

[Key words] lung neoplasms; radiotherapy; chemotherapy; A549; TCF21; sensitivity

肺癌发病率和病死率均占恶性肿瘤的第一位^[1]。其中约 85%~90% 为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)。由于大部分患者就诊时已处于中晚期,存在局部及远处转移,放、化疗作为综合性治疗的一部分,是临床上肺癌主要治疗方法之一。转录因子 21(transcription factor 21, TCF-21)基因是近几年开始研究的一个较新的基因,位于人染色体 6q23-q24,属于基本螺旋环螺旋转录因子(basic helix-loop-helix transcription factors, bHLH)家族。bHLH 家族的转录因子具有中胚层特异性,对中胚层组织细胞增殖、分化、凋亡以及肿瘤发生发挥重要作用^[2]。研究表明 TCF-21 的表达与多种肿瘤(头颈部肿瘤、肺癌、肾透明细胞癌、黑色素瘤、胃癌)的发生发展相关^[3-7],但其作用的具体机制尚不明朗。本实验观察了 TCF21 基因对非小细胞肺癌细胞株(A549)顺铂(DDP)化

疗以及放疗敏感性增敏作用并探讨机制,初步判断 TCF21 基因是否能作为一种新的化疗及放射增敏靶点用于临床以便提高 NSCLC 的 5 年生存率。

1 材料与方法

1.1 实验材料 NSCLC 细胞株(A-549)由华中科技大学同济医学院免疫学教研室提供;RPMI 1640、10%胎牛血清购于 Hyclone 公司;兔抗人多克隆抗 TCF21 抗体购自 Abcam 公司(ab32981);顺铂购于美国 Sigma 公司,荧光定量 PCR 仪(Step one plus)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌 A549 细胞株,用含 10%胎牛血清的 1640 培养基(并添加 1%的青霉素链霉素)于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 慢病毒转染及细胞稳定转染株筛选 将细胞分为高表达组(含目的基因 TCF21 高表达组)、空载体组(阴性对照组)和未转染组(即未处理组),转染试剂由上海吉凯基因公司提供。转染流程按照吉凯基因公司说明书进行。转染前 8 h 取对数生长期细胞,调整细胞浓度为每毫升 3×10^4 个,取 A549 细胞 100 μL 接种至 96 孔板,总液体量为每孔 2 mL;待细胞融合率达到 50%~60% 时开始转染,转染 MOI 值为 50;8 字混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。转染 10 h 后将液体换为含 10% 胎牛血清的 1640 培养基。待细胞处于对数生长期,在高表达组和空载体组分别加入终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 puromycin,7 d 后 puromycin 浓度减半,药物筛选约 15 d 后,随机选取多个视野,分别计数白光与荧光条件下的可见细胞数,通过相同视野中荧光条件下可见细胞数与白光条件下可见细胞数之比计算平均转染效率。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 TCF21 的表达 Axy-Gen RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,取 1 μg RNA 作为模板进行逆转录,合成 cDNA,以 GAPDH 作为内参,使用 TIAN-GEN 生物公司的 SYBR Green Master Mix 进行荧光定量 PCR。PCR 进行 40 个循环,循环参数为(94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,54.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 32 s)引物如下:TCF21 上游 5'-CCA GCT ACA TCG CCC ACT TG-3',下游 5'-CTT TCA GGT CAC TCT CGG GTT TC-3',GAPDH 上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。反应体系:SYBR super Mix 荧光混合物 10 μL ,模板混合液(上、下游引物)1 μL ,水 8 μL ,cDNA 1 μL 。RT-PCR 结果分析,采用相对定量法检测转染组与对照组之间的差异化表达,以 GAPDH 作为内参照。根据扩增曲线,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法通过管家基因 GAPDH 进行校正。

1.2.4 Western blot 检测细胞中 TCF21 蛋白的表达 提取各组细胞中的总蛋白。蛋白跑胶(SDS-PAGE;5% 浓缩胶,10% 分离胶)后转膜至 0.22 μm 的 PVDF 膜上。5% 牛奶封闭 0.5 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 TCF21(1:2 000 稀释)和 GAPDH(1:5 000 稀释)一抗过夜。充分洗膜后室温孵育二抗 1 h,再次洗膜后进

行 ECL 发光,柯达胶片显影、定影。

1.2.5 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测高表达 TCF21 后 A549 细胞对化疗药物的敏感性 取培养各组细胞,分别细胞计数,调整细胞浓度为每毫升 3×10^4 。胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,培养 8 h 细胞贴壁后分别加入 DDP 至终浓度 0、0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mg/L,每组各设 5 复孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱分别培养 24、48、72、96 h 后,各孔加 MTT 20 μL 。上述条件继续培养 4 h,弃上清液后,每孔加二甲亚砜溶液(DMSO)150 μL 终止反应,微量振荡器振荡 10 min,置酶标仪设置在 570 nm 下,测定各孔的吸光度 A 值。药物对肿瘤细胞抑制率计算公式:药物对肿瘤细胞抑制率 = [1 - (药物孔平均 A 值/肿瘤细胞阴性对照孔平均 A 值)] $\times 100\%$ [8]。

1.2.6 平板克隆形成实验检测高表达 TCF21 对 A549 细胞放疗敏感性的影响 取培养的各细胞分别计数,取 400 个细胞接种于 6 孔板中,补充含 10% 胎牛血清的 1640 至每孔 2 mL,每组细胞接种 3 孔。8 h 贴壁后接受 2 Gy 的 X 线照射(照射条件:6 MV 光子线,源皮距(SSD)为 100 cm,照射野 10 cm \times 10 cm,剂量 DT = 2 Gy,射野覆盖全细胞培养板),然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 的恒温培养箱中培养 10~14 d,甲醇固定,结晶紫染色,低倍镜下计数大于 50 个细胞的克隆,以上实验重复 3 次取均数。实验计算克隆形成率(%) = 细胞克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计数资料用率表示,两组间比较使用 χ^2 检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TCF21 高表达慢病毒成功转染细胞 为检测慢病毒转染的转染效率,运用荧光显微镜对转染后经筛选的稳转株进行观察计数。高表达组和空载体组均可见绿色荧光蛋白表达,且平均转染效率为 85%(图 1)。

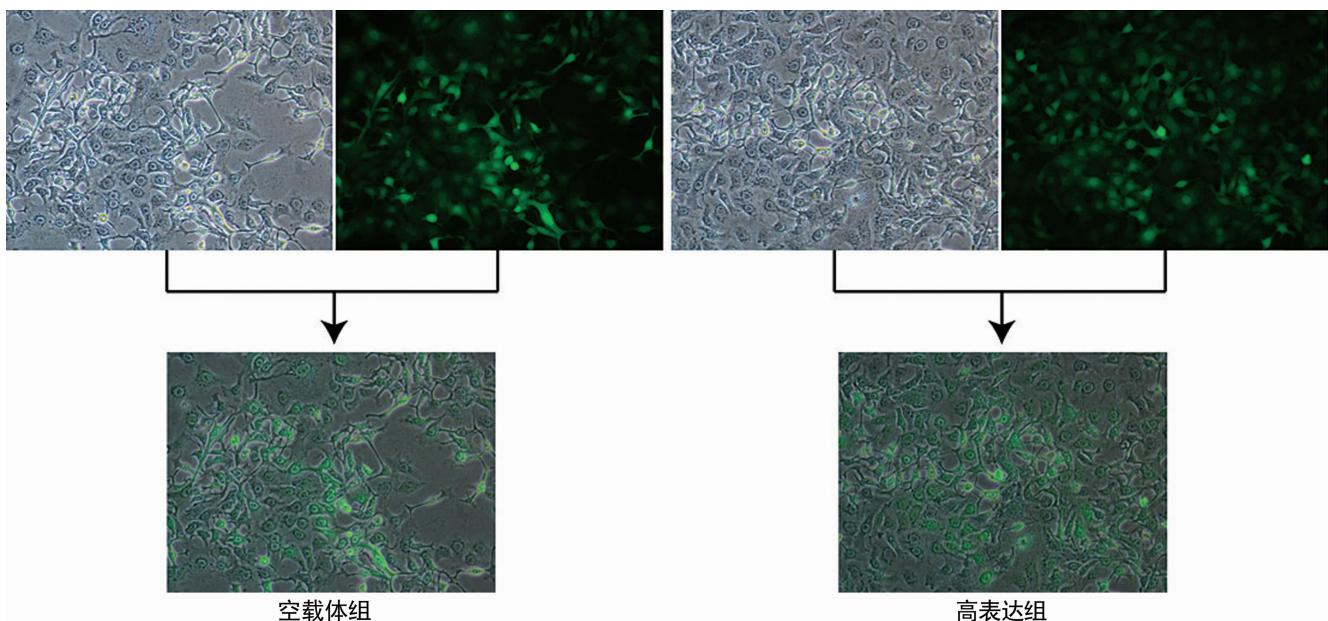


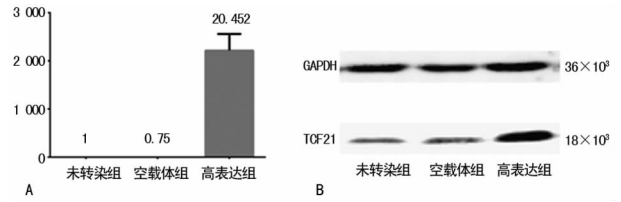
图 1 TCF21 在肺癌细胞 A549 中的表达($\times 160$)

2.2 RT-PCR 检测 TCF21 基因 mRNA 的表达水平 为检测 TCF21 是否成功高表达,对转染后经筛选的稳转株进行了荧光定量 PCR 检测。结果表明高表达组 mRNA 表达量(20 452.65±190.12)远高于未转染组和空载体组的 TCF21 mRNA 表达量(1.00±0.21 和 0.75±0.16, $P<0.05$,图 2A)。

2.3 Western blot 检测 TCF21 蛋白的表达水平 为检测 TCF21 蛋白是否成功高表达,采用 Western blot 技术检测各组细胞中 TCF21 蛋白水平。结果表明相较于未转染组,高表达组 TCF21 蛋白表达量明显增高,而空载体组和未转染组均未见明显 TCF21 蛋白表达。这与荧光定量 PCR 的检测结果一致,进一步说明肺腺癌 A549 细胞中成功高表达了 TCF21 (图 2B)。

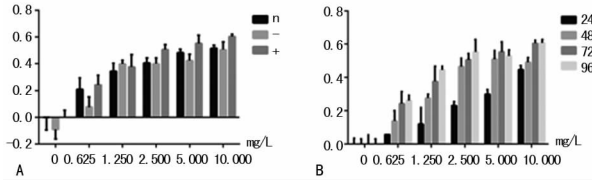
2.4 MTT 法检测高表达 TCF21 对肺腺癌 A549 细胞 DDP 化疗敏感性的影响 为检测高表达 TCF21 对肺腺癌 A549 细胞 DDP 化疗敏感性的影响,对不同浓度 DDP、不同时间作用后的各组细胞采用 MTT 法进行了细胞活性检测。实验结果显示:在 72 h 时,随着 DDP 浓度的增高(0、0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mg/L),除药物浓度为 0 mg/L 外各组细胞的抑制率相应增高(表 1),且高表达组各个药物浓度时的抑制率相较于空载体组与未转染组均明显增高($P<0.05$),而后两者之间无明显差异;且过表达 TCF21 组随着药物浓度及时间及的增加,除药物浓度为 0 mg/L 外各时间段抑制率相应增高(表

2, $P<0.05$)。说明 TCF21 能增强肺腺癌 A549 细胞对 DDP 化疗敏感性(图 3)。



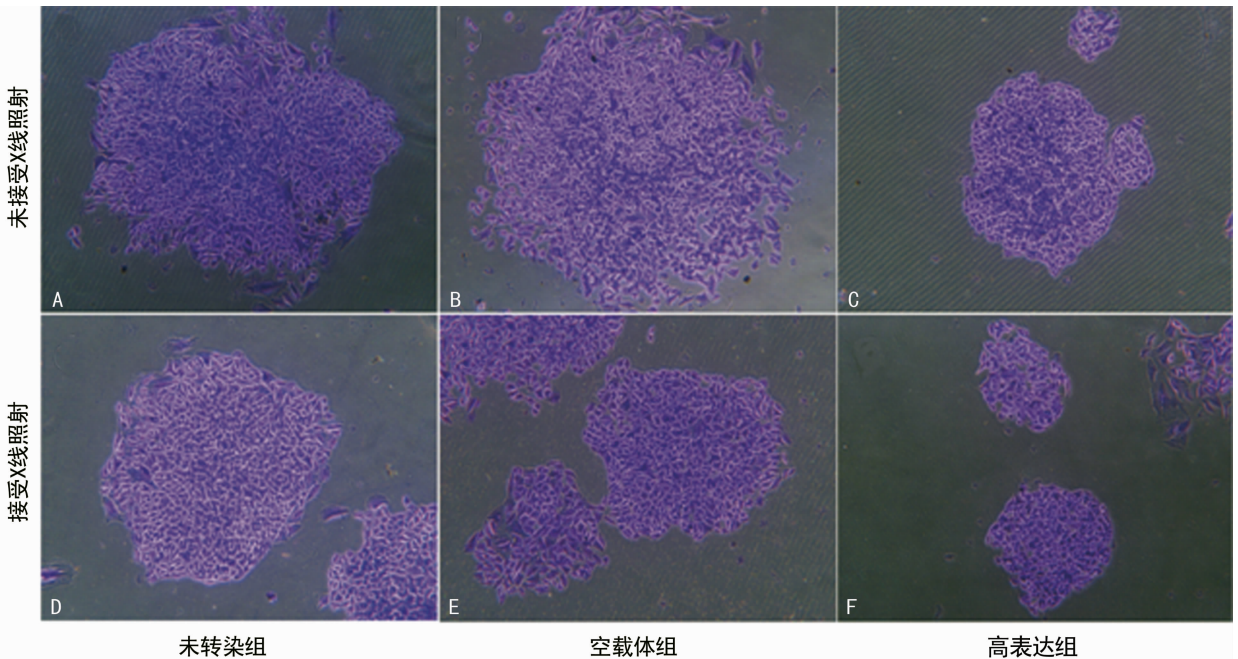
A: 荧光定量 PCT; B: Western blot 检测。

图 2 荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 TCF21 在各组中的表达



A: 72h 时不同浓度 DDP 对各组细胞化疗敏感性的影响(n: 未转染组; - : 空载体组、+ : 高表达组); B: 不同浓度 DDP 及不同时间对高表达 TCF21 组化疗敏感性的影响。

图 3 MTT 检测 DDP 对化疗敏感性的影响



A、B、C 未接受 X 线照射, D、E、F 接受 X 线照射。

图 4 平板克隆实验检测高表达 TCF21 对 A549 细胞放疗敏感性的影响(结晶紫×80)

表 1 72h 时不同药物浓度 DDP 对各组细胞的抑制率($\bar{x}\pm s$)

药物浓度(mg/L)	空载体组	未转染组	高表达组
0	0.00±0.09	0.09±0.07	0.00±0.06
0.625	0.21±0.09	0.08±0.08	0.24±0.09
1.250	0.34±0.06	0.48±0.03	0.38±0.16
2.500	0.40±0.04	0.40±0.04	0.51±0.19
5.000	0.40±0.03	0.42±0.05	0.55±0.21
10.000	0.52±0.23	0.51±0.06	0.60±0.22

2.5 平板克隆形成实验检测高表达 TCF21 对 A549 细胞放疗敏感性的影响 为检测高表达 TCF21 对 A549 细胞放疗敏感性的影响,采用平板克隆形成实验对接受 2 Gy 的 X 线照射后的各组细胞进行了增殖活性检测。结果表明:2 周后,未转染组、未转染+放疗组、空载体组、空载体+放疗组、高表达组及高表达+放疗组克隆形成率分别为:95.17%±2.85%、88.20%±2.03%、93.80%±4.17%、85.60%±2.42%、71.67%±3.21%、56.00%±2.65%。实验结果显示高表达组细胞克隆形成率低于其他各组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4)。

表 2 实验组不同药物浓度 DDP 及不同药物作用时间
对各组细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

药物浓度(mg/L)	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.00±0.03	0.00±0.03	0.00±0.06	0.00±0.05
0.625	0.05±0.01	0.14±0.06	0.24±0.09	0.26±0.08
1.250	0.11±0.07	0.28±0.07	0.38±0.16	0.44±0.16
2.500	0.23±0.10	0.47±0.16	0.51±0.19	0.55±0.22
5.000	0.30±0.16	0.51±0.18	0.55±0.21	0.52±0.22
10.000	0.45±0.21	0.49±0.17	0.60±0.22	0.61±0.23

3 讨 论

肺腺癌在我国的发病率有上升趋势,已成为我国最常见的病理类型。肺腺癌约占原发性肺癌的 50%,但其发生机制尚不明朗。研究表明多种抑癌基因(如 p53、PTEN、Rb 等)启动子异常甲基化导致基因表达异常与肺癌发生密切相关^[9-13]。TCF21 是新发现的抑癌基因。研究表明 TCF21 在多种肿瘤中存在启动子区域甲基化,且其在肿瘤组织中的表达量较正常组织明显降低。本课题组前期研究表明抑癌基因 TCF21 可抑制 A549 细胞的增殖和迁移、诱导凋亡^[14]。

当前 LAC 的治疗手段主要包括手术、放疗和化疗等。但肺癌的多重耐药(multi-drug resistance, MDR)一直严重影响着 LAC 的化疗效果和预后。临床多以联合化疗、联合放疗等来提高治疗效果。同时作用强而毒副作用较小的放、化疗增敏剂越来越受到大家的关注。

TCF-21 属于 bHLH 家族成员。bHLH 蛋白在 HLH 区域构成非共价二聚体,形成一对 DNA 结合基序,竟而结合至 E 盒(CANNTG)的共同 DNA 序列,通过调节在多种发育相关基因的启动子和(或)增强子而发挥其转录激活或阻抑作用^[15]。对 TCF21 基因所属的 bHLH 家族研究发现,经典的 bHLH 转录因子 DEC1/2 突变或缺失与多种肿瘤如口腔癌、乳腺癌的发生及转移特征密切相关^[16-23]。DEC1/2 作为 PI3K/AKT 信号传导途径的靶基因调节 c-Myc 的表达参与乏氧诱导的细胞增殖^[24]。还有研究发现,TCF-21 基因作为肾母细胞瘤抑制基因 1(Wilms' tumour suppressor gene 1, WT1)基因的下流,WT1 可直接结合 TCF-21 上游区域调控 TCF-21 基因的表达^[25]。而 WT1 可通过 PI3K/AKT 信号通路影响 DDP 对肺癌的化疗敏感性^[25]。

众所周知,PI3K/AKT 信号通路在正常生理和致癌过程对细胞增殖、分化起着重要作用。此外,异常的激活 PI3K/AKT/mTOR 途径是获得性耐药的机制之一^[25-26]。由于 TCF-21 基因所属的 bHLH 家族中的经典转录因子是 PI3K/AKT 信号传导途径的一个重要的靶基因,而且 TCF-21 基因有可能通过 PI3K/AKT 信号通路影响 DDP 对肺癌的化疗敏感性。因此,作者提出假设:TCF-21 有无可能是通过 PI3K/AKT 信号通路影响肿瘤细胞的增殖,也通过 PI3K/AKT 信号通路影响 DDP 对肺癌的化疗敏感性?

本研究通过体外细胞培养进一步探索 TCF21 高表达对肺腺癌 A549 细胞 DDP 化疗及放疗敏感性的影响,结果发现 TCF21 基因高表达能显著增强肺腺癌 A549 细胞对放疗及 DDP 化疗敏感性。那么 TCF21 是否是通过 PI3K/AKT 信号通路影响 DDP 对肺癌的化疗敏感性,这一猜想尚需实验证实。另一方面,作为癌症中频繁被激活的信号通路之一,PI3K/AKT 通路在多种癌症中表达异常。那么 TCF21 是否通过 PI3K/AKT 通路实现抑癌作用,这需要进一步拓展研究。

本研究通过肺腺癌细胞株 A549 体外细胞培养来探索 TCF21 高表达对肺腺癌 A549 细胞顺铂化疗及放疗敏感性的影响,问题在于体外细胞实验不能够完全模拟体内生理环境,故实验存在一定的局限性。对于本研究中 TCF21 基因高表达引起的放、化疗增敏作用,为进一步确定其准确性,应该进一步检测细胞增殖和凋亡相关 mRNA 及蛋白的表达量,以及小鼠体内实验。这也为后期研究留下了空间。

参考文献

- [1] 支修益,吴一龙,马胜林,等.原发性肺癌诊疗规范(2011年版)[J].中国肺癌杂志,2012,15(12):677-688.
- [2] Robb L, Mifsud L, Hartley L, et al. Epicardin: a novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads[J]. Dev Dyn, 1998, 213(1):105-113.
- [3] Smith LT, Lin M, Brena RM, et al. Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(4):982-987.
- [4] Arab K, Smith LT, Gast A, et al. Epigenetic deregulation of TCF21 inhibits metastasis suppressor KISS1 in metastatic melanoma[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(10):1467-1473.
- [5] Richards KL, Zhang B, Sun M, et al. Methylation of the candidate biomarker TCF21 is very frequent across a spectrum of early-stage nonsmall cell lung cancers[J]. Cancer, 2011, 117(3):606-617.
- [6] Ye YW, Jiang ZM, Li WH, et al. Down-regulation of TCF21 is associated with poor survival in clear cell renal cell carcinoma[J]. Neoplasia, 2012, 59(6):599-605.
- [7] Funato N, Ohyama K, Kuroda T, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor epicardin/capsulin/Pod-1 suppresses differentiation by negative regulation of transcription[J]. J Biol Chem, 2003, 278(9):7486-7493.
- [8] 董立新,李向春,董淑芬,等.不同化疗药物对口腔鳞状细胞癌抑制率的体外实验分析[J].山东医药,2011,51(24):69-70.
- [9] Wu DW, Lee MC, Wang J, et al. DDX3 loss by p53 inactivation promotes tumor malignancy via the MDM2/Slug/E-cadherin pathway and poor patient outcome in non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene, 2014, 33(12):1515-1526.
- [10] Shimizu K, Yamagata K, Kurokawa MA, et al. Roles of AML1/RUNX1 in T-cell malignancy induced by loss of p53[J]. Cancer Sci, 2013, 104(8):1033-1038.
- [11] Cheng T, Zhang JG, Cheng YH, et al. Relationship between PTEN and Livin expression and malignancy of renal cell carcinomas[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6):2681-2685.
- [12] Zheng H, Takahashi H, Murai Y, et al. Low expression of FHIT and PTEN correlates with malignancy of gastric carcinomas: tissue-array findings[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(4):432-440.

- [13] Ropke M, Boltze C, Meyer B, et al. Rb-loss is associated with high malignancy in chondrosarcoma[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(1):89-95.
- [14] 胡松. 抑癌基因 TCF21 对肺癌细胞 A549 增殖, 迁移和凋亡的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(4):302-307.
- [15] Quaggin SE, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney[J]. *Mech Dev*, 1998, 71(1/2):37-48.
- [16] Wu YY, Sato F, Yamada T, et al. The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(4):1337-1346.
- [17] Xu Q, Ma P, Hu C, et al. Overexpression of the DEC1 protein induces senescence in vitro and is related to better survival in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e41862.
- [18] Liu Y, Miao Y, Wang J, et al. DEC1 is positively associated with the malignant phenotype of invasive breast cancers and negatively correlated with the expression of claudin-1[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4):855-860.
- [19] Liu Y, Wang L, Lin XY, et al. The transcription factor DEC1 (BHLHE40/STRA13/SHARP-2) is negatively associated with TNM stage in non-small-cell lung cancer and inhibits the proliferation through cyclin D1 in A549 and BE1 cells[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3):1641-1650.
- [20] Zhu Y, Xu L, Zhang J, et al. Sunitinib induces cellular senescence via p53/Dec1 activation in renal cell carcinoma cells[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(8):1052-1061.
- [21] Wu Y, Sato H, Suzuki T, et al. Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by bHLH transcription factor DEC2[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3):815-820.
- [22] You JM, Lin L, Liu Q, et al. The correlation between the expression of differentiated embryo-chondrocyte expressed gene 1 and oral squamous cell carcinoma[J]. *Eur J Med Res*, 2014, 19:21.
- [23] Suzuki M, Sato F, Bhawal UK. The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates Twist1 through an E-box element[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455(3/4):390-395.
- [24] Li Y, Bi Z. Ultraviolet-B induced expression of hypoxia-inducible factor 1 α , transferrin receptor through EGFR/PI3K/AKT/DEC1 pathway[J]. *Front Med China*, 2007, 1(1):79-86.
- [25] Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, et al. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland[J]. *Dev Cell*, 2013, 27(1):5-18.
- [26] Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(3):1.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-06)

(上接第 3747 页)

- analogs and interferon[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(23):2427-2431.
- [4] Minami M. Future therapy for hepatitis B virus infection[J]. *Clin J Gastroenterol*, 2015, 8(4):167-171.
- [5] Liu Y, Chiriva-Internati M, You C, et al. Use and specificity of breast cancer antigen/milk protein BA46 for generating anti-self-cytotoxic T lymphocytes by recombinant adeno-associated virus-based gene loading of dendritic cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3):304-312.
- [6] Manzoor S, Saalim M, Imran M, et al. Hepatitis B virus therapy: What's the future holding for us? [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(44):12558-12575.
- [7] Liu T, Song HL, Zheng WP, et al. Inhibition of HBV replication in HepG2. 2. 15 cells by human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2015, 45(5):495-501.
- [8] 邱燕, 杨彬, 柳纪省. 重组腺相关病毒载体的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012, 11:49-53.
- [9] You CX, Shi M, Liu Y, et al. AAV2/IL-12 gene delivery into dendritic cells (DC) enhances CTL stimulation above other IL-12 applications Evidence for IL-12 intracrine activity in DC[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(6):847-855.
- [10] 刘勇, 吴邦富, 胡媛媛. 抗 HBV-DC 联合药物治疗乙型肝炎病毒携带者的临床疗效[J]. *中国药物经济学*, 2014, 9(21):37-38.
- [11] Gaudet D, Méthot J, Déry S, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL S447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(4):361-369.
- [12] Büning H, Perabo L, Coutelle O, et al. Recent developments in adeno-associated virus vector technology[J]. *J Gene Med*, 2008, 10(7):717-733.
- [13] Rey-Rico A, Cucchiari M. Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery[J]. *Acta Biomater*, 2016, 29(29):1-10.
- [14] Dai SL, Zhuo M, Song LL, et al. Dendritic cell-based vaccination with lentiviral vectors encoding ubiquitinated hepatitis B core antigen enhances hepatitis B virus-specific immune responses in vivo[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, 47(11):870-879.
- [15] 丛敏, 王萍, 阎钟钰, 等. 含乙型肝炎病毒 C 基因的重组腺相关病毒对树突状细胞的作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(1):17-19.
- [16] You H, Liu Y, Cong M, et al. HBV genes induce cytotoxic T-lymphocyte response upon adeno-associated virus (AAV) vector delivery into dendritic cells[J]. *J Viral Hepat*, 2006, 13(9):605-612.

(收稿日期:2016-04-18 修回日期:2016-07-06)