

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.002

吉非替尼对斑马鱼胚胎发育及肿瘤耐药基因表达的影响*

胡荣英^{1,2},舒莉萍^{1,2,△},何志旭^{2,3,▲},孙琮杰¹,李志操³,金璐³

(贵州医科大学:1.免疫学教研室;2.组织工程与干细胞中心;3.儿科学教研室,贵阳 550004)

[摘要] **目的** 研究吉非替尼对斑马鱼早期胚胎发育及 abcb4 肿瘤耐药基因表达的影响。**方法** 实验动物采用斑马鱼,实验分为吉非替尼组、阿霉素和吉非替尼的混合液组、空白对照组。将吉非替尼稀释成不同浓度梯度的药液,分别处理受精后 0.5~1.5 h(0.5~1.5 hpf)的斑马鱼胚胎,观察胚胎和幼鱼的死亡率、孵化率及畸形率变化。统计各浓度不同时间点的胚胎死亡率,计算出 IC₅₀ 的数值;统计 48 hpf 和 72 hpf 的胚胎孵化率及 120 hpf 的畸形率;收集不同组别的斑马鱼胚胎,通过实时荧光定量 PCR,检测斑马鱼胚胎中 abcb4 基因的表达量。**结果** 计算出吉非替尼在斑马鱼胚胎中的 IC₅₀ 为 16.18 μmol/L。与对照组比较,高剂量吉非替尼(≥20 μmol/L)显著抑制胚胎的孵化,并有明显的胚胎致死效应和致畸效应;吉非替尼组的斑马鱼胚胎 abcb4 基因的 mRNA 水平变化不显著,而阿霉素和吉非替尼的混合液组的 abcb4 基因的 mRNA 水平有明显变化($P < 0.05$)。**结论** 吉非替尼对斑马鱼早期胚胎中 abcb4 肿瘤耐药基因的表达水平无明显影响($P > 0.05$),但是吉非替尼能逆转易耐药药物阿霉素的耐药作用,提示使用斑马鱼可以构建肿瘤耐药模型。

[关键词] 斑马鱼;吉非替尼;发育毒性;abcb4;抗药性,多药**[中图分类号]** R965.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)32-4469-04

Effects of gefitinib on embryonic development and expression of tumor resistance genes in zebrafish*

Hu Rongying^{1,2}, Shu Liping^{1,2,△}, He Zhixu^{2,3,▲}, Sun Congjie¹, Li Zhicao³, Jin Lu³

(1. Department of Immunology; 2. Center for Tissue Engineering and Cell Research;

3. Department of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of gefitinib on early embryonic development and expression of abcb4 tumor resistance genes in zebrafish. **Methods** Zebrafish were adopted as experimental animals and divided into gefitinib group, mixture of doxorubicin and gefitinib group and blank group. Zebrafish embryos of 0.5–1.5 hours after fertilization(0.5–1.5 hpf) were exposed to different concentrations of gefitinib, and then embryo development of zebrafish in 24–120 hpf was observed and the number of death, hatch and malformation was recorded. The embryo mortality was calculated under different concentrations of gefitinib at different time points, and the numerical value of IC₅₀ was calculated; Hatching rates of zebrafish embryo in 48 hpf and 72 hpf and malformation rates of zebrafish embryo in 120 hpf were calculated. The zebrafish embryos exposed to different concentrations of gefitinib in different groups were collected, and the expression of abcb4 gene in zebrafish embryos was detected by real-time quantitative PCR. **Results** Gefitinib IC₅₀ in zebrafish embryos was 16.18 μmol/L. Compared with the control group, higher dosage(20 μmol/L) of gefitinib in other two groups significantly decreased hatching rates of embryos, and had obvious embryonic lethal effects and teratogenic effects. Moreover, the mRNA levels of the abcb4 gene in the zebrafish embryos of gefitinib group were not significantly changed, whereas the mRNA levels of the abcb4 gene in mixture of doxorubicin and gefitinib group were significantly different($P < 0.05$). **Conclusion** Gefitinib has no significant effects on the expression of abcb4 tumor resistance gene in early development of zebrafish embryos($P > 0.05$), but it can reverse the drug resistant effects of doxorubicin, suggesting that zebrafish can construct tumor resistance model.

[Key words] zebrafish; gefitinib; developmental toxicity; abcb4; drug resistance, multiple

肿瘤已成为疾病死因之首,发病率和病死率逐年攀升,因此肿瘤已成为非常重要的公共健康问题。目前,化疗是肿瘤治疗的主要方法,而抗肿瘤药物的耐药性是导致肿瘤化疗失败的主要原因。有研究发现,肿瘤耐药和 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, abc)转运蛋白家族所介导的细胞药物外排作用密切相关^[1-2]。abc 转运体主要是将细胞内的药物外排到细胞外,减少作用靶点的药物浓度,从而产生耐药性。abcb1 是 abc 转运体亚家族 abcb 的成员之一,高表达于大部分肿瘤耐药细

胞中^[3-5]。对于 abcb1 基因的研究,目前主要在鼠类及耐药细胞株中进行^[6-7],还少有关于用斑马鱼研究 abcb1 基因的相关报道,尤为重要的是目前还没有很好的肿瘤耐药筛选斑马鱼模型。本研究以斑马鱼为模型生物,将斑马鱼发育早期的胚胎用抗肿瘤药物,表皮生长因子受体络氨酸激酶抑制剂吉非替尼(gefitinib)进行暴露实验,通过实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测斑马鱼 abcb4 基因在药物暴露下的表达情况。为评价斑马鱼的 abcb4 基因在耐药机制中的研究提供科学依据,也

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31460312);贵州省重大应用基础专项项目资助[(2015)2003]。 作者简介:胡荣英(1990—),在读硕士,主要从事发育生物学的研究。 △ 通信作者, E-mail: gyslp456@gmc.edu.cn。 ▲ 共同通信作者, E-mail: hzx@gmc.edu.cn。

为在斑马鱼模型中进行抗肿瘤药物筛选打下基础。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 斑马鱼由本实验室所饲养的 Tubingen 品系, 养殖方法参考 zebrafish book。每日光照 12 h, 黑暗 12 h, 28 °C 左右条件下雌雄鱼分缸饲养。采卵时取健康性成熟的斑马鱼按 1:1 或 1:2 的雌雄比例放入交配缸内, 在灯照 0.5 h 后收集胚胎。收集的胚胎进行消毒和洗涤后移入装有胚胎培养用水的一次性平皿中, 28 °C 恒温培养箱中进行培养。定时更换胚胎培养用水并吸出死胚胎, 防止影响胚胎正常发育。

1.2 主要仪器及试剂 仪器: 体视显微镜(日本 Nikon 公司); 生化培养箱(中国科迈公司); Bio-Rad CFX96TM Real-Time System 仪(美国 Bio-Rad 公司); T100TMBio-Rad PCR。试剂: 吉非替尼(美国 Sigma 公司); 二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司; TRIzol 试剂、逆转录试剂 First Strand cDNA Synthesis Kit(芬兰 Thermo 公司); IQTMSYBR Green Supermix 试剂(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 吉非替尼溶液的配制及暴露方法 吉非替尼用含 2% 的二甲基亚砜的双蒸水配置成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的母液, 分装, 避光保存于冰箱 4 °C 备用。实验前, 用胚胎培养用水进行梯度稀释, 配制吉非替尼最终浓度为 0~40 $\mu\text{mol/L}$ 的实验溶液, 设置胚胎培养液为对照组。待胚胎发育到 0.5~1.5 hpf, 挑选出健康的胚胎于 6 孔板中进行暴露, 每孔 20 枚胚胎, 加 5 mL 溶液, 置于 28 °C 恒温光照培养箱中以 12 h:12 h 光周期培养, 每天换液 3 次, 观察并记录胚胎的发育, 死亡、孵化和畸形等情况。

1.3.2 药物暴露剂量与毒性分析 根据吉非替尼浓度分为 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)、1 $\mu\text{mol/L}$ 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 组、40 $\mu\text{mol/L}$ 组, 吉非替尼分别作用于受精后 0.5~1.5 h(hours post-fertilization, hpf) 的胚胎, 统计分析每个浓度下 24、48、72、96、120 hpf, 5 个时相胚胎的死亡率、孵化率和畸形率, 绘制致死率、孵化率和畸形率的曲线图, 求出半数抑制浓度。实验每组 100 枚胚胎, 设置 3 个重复。本实验采用吉非替尼在斑马鱼胚胎上的半数抑制浓度 $\text{IC}_{50} = 16.18 \mu\text{mol/L}$ 为吉非替尼组的暴露浓度; 阿霉素的暴露浓度选择 10 $\mu\text{mol/L}$ ^[8], 另一实验组为吉非替尼和阿霉素的混合液。阿霉素在斑马鱼上的毒性筛选, 本课题组前期已经完成^[8]。

1.3.3 abcb4 基因 mRNA 测定 根据各时间点斑马鱼胚胎的死亡率进行统计分析, 得到吉非替尼的半数抑制浓度 IC_{50} , 以此药物浓度暴露下的胚胎为实验组; 对照组为胚胎培养液处理组。收集实验组和对照组 24、48、72、96、120 hpf 5 个时相的斑马鱼胚胎各 100 枚, 置于离心管中。加入 TRIzol 液, 吹碎混匀, 经氯仿、异丙醇、75% 乙醇洗涤、晾干, 加入适量 DEPC 水溶解。将所提 RNA 用 First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂反转录合成 cDNA。用 BIO-RAD CFX96™ Real-Time System 仪按照 IQTMSYBR Green Supermix 试剂反应体系进行扩增, 扩增条件: 95 °C, 10 min; 95 °C, 15 s; 58.3 °C, 20 s; 72 °C, 20 s; 40 个循环。abcb4 引物由课题组前期合成, 基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值进行分析, 实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 所有数据统计分析均采用 SPSS16.0 软件完成, 浓度-效应曲线通过 Origin 8.0 软件进行非线性拟合, 并计算出 IC_{50} 。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉非替尼对斑马鱼胚胎的致死毒性效应 观察斑马鱼胚胎及幼鱼的存活情况, 与对照组相比, 随着药物浓度的增高, 胚胎死亡率逐渐增加。对照组、1 $\mu\text{mol/L}$ 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组在各个时间点的死亡率相差不大。但是 20 $\mu\text{mol/L}$ 组和 40 $\mu\text{mol/L}$ 组胚胎死亡率逐渐升高, 至 120 hpf, 40 $\mu\text{mol/L}$ 组死亡率达到 90.83%。根据各时间点的死亡率进行统计分析, 得到吉非替尼的半数抑制浓度 $\text{IC}_{50} = 16.18 \mu\text{mol/L}$ 。各浓度下不同时间点胚胎的死亡率比较, 见图 1。

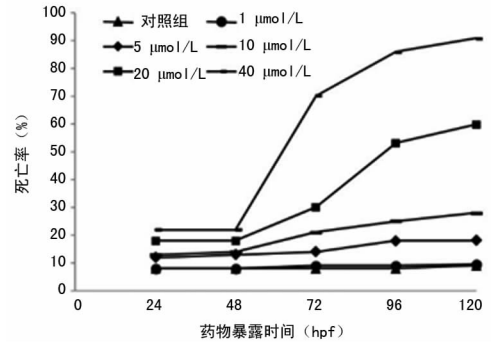
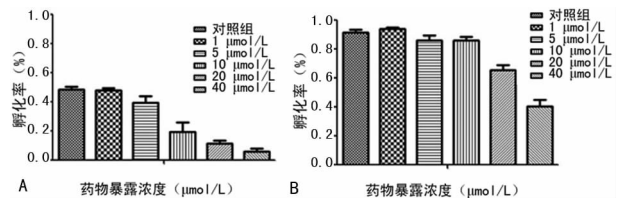


图 1 暴露于不同浓度吉非替尼的斑马鱼胚胎及幼鱼死亡率

2.2 吉非替尼对斑马鱼孵化率的影响 48 hpf 时, 与对照组相比, 5 $\mu\text{mol/L}$ 组孵化率差异无统计学意义, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组孵化率均显著降低; 72 hpf 时, 10 $\mu\text{mol/L}$ 给药组孵化率差异无统计学意义, 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组孵化率均显著降低, 尤其是 40 $\mu\text{mol/L}$ 组孵化率为 33%, 见图 2。



A: 48 hpf 孵化率; B: 72 hpf 孵化率

图 2 暴露于不同浓度吉非替尼的斑马鱼胚胎孵化率

2.3 吉非替尼对斑马鱼发育畸形的影响 斑马鱼胚胎在 36~72 hpf 孵化, 高浓度药物对胚胎的孵化有抑制作用。为了便于观察和统计, 选择 120 hpf 各实验组, 对幼鱼的畸形率进行统计分析。随着药物浓度的增加, 幼鱼的畸形率逐渐升高。当药物浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 幼鱼的畸形率为 53.47%; 而 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 幼鱼的畸形率高达 100%, 见图 3。

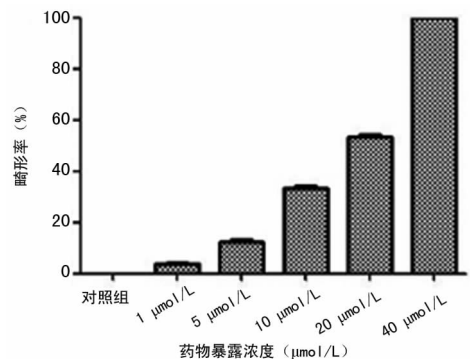


图 3 暴露于不同浓度吉非替尼的斑马鱼幼鱼畸形率

2.4 吉非替尼对斑马鱼胚胎 abcb4 基因 mRNA 的影响 吉非替尼组和对照组从 72 hpf 开始, abcb4 基因 mRNA 水平开始随胚胎时相的增加而升高, 相同时相吉非替尼实验组斑马鱼胚胎 abcb4 基因 mRNA 的水平均与对照组无显著变化 ($P > 0.05$), 见表 1、图 4。但是当该浓度下的吉非替尼和临床常用的易引起耐药的抗肿瘤药物阿霉素的混合液, 在 72、96、120 hpf 这 3 个时相, 相同时间点阿霉素和吉非替尼的混合液组斑马鱼胚胎 abcb4 基因 mRNA 的水平均较阿霉素组明显降低。72 hpf 阿霉素和吉非替尼的混合液组与阿霉素组比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.0120$); 96 hpf 阿霉素和吉非替尼的混合液组与阿霉素组比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.0416$); 120 hpf

阿霉素和吉非替尼的混合液组与阿霉素组比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.0069$), 见表 2、图 5。

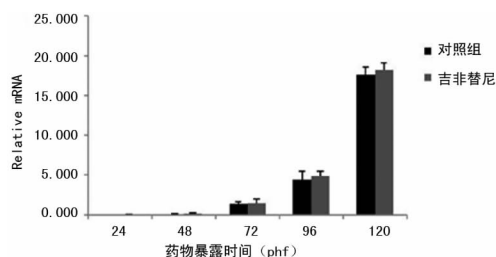


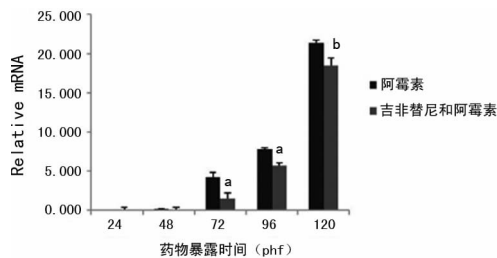
图 4 不同时相的斑马鱼胚胎 abcb4 基因的 mRNA 表达变化

表 1 不同浓度吉非替尼各时相的斑马鱼胚胎 abcb4 基因的 mRNA 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
对照组	0.0013 ± 0.0006	0.0840 ± 0.0171	1.3549 ± 0.2351	4.4264 ± 1.0098	17.6398 ± 0.9209
吉非替尼	0.0040 ± 0.0029	0.1635 ± 0.0202	1.4148 ± 0.5966	4.8548 ± 0.5997	18.1796 ± 0.8846

表 2 不同药物各时相的斑马鱼胚胎 abcb4 基因的 mRNA 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
阿霉素	0.0503 ± 0.0050	0.1772 ± 0.0120	4.2501 ± 0.5796	7.7964 ± 0.2379	21.3257 ± 0.3451
阿霉素和吉非替尼	0.0818 ± 0.0268	0.1515 ± 0.0566	1.5212 ± 0.6900	5.6970 ± 0.3998	18.4547 ± 0.9763



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与阿霉素组比较

图 5 不同时相的斑马鱼胚胎 abcb4 基因的 mRNA 表达变化

3 讨论

吉非替尼属于小分子表皮生长因子受体 (EGFR) 络氨酸激酶抑制剂, 通过与三磷酸腺苷竞争性结合, 可抑制 EGFR 自磷酸化作用, 抑制细胞周期蛋白依赖性激酶活性, 使细胞周期停滞在 G₁ 期。目前吉非替尼广泛应用于晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 治疗的分子靶向药物^[9-10]。

研究发现吉非替尼能明显逆转紫杉醇在过表达 abcb1 的细胞株中的耐药性, 并增加紫杉醇在过表达 abcb1 的细胞株中的药物浓度。由于吉非替尼对 abcb1 转运功能有抑制作用, 使药物外排作用减少, 提高细胞内的药物浓度^[11]。吉非替尼在细胞上的毒性研究及对部分易引起耐药的抗肿瘤药物的逆转耐药作用有报道, 但是吉非替尼在斑马鱼早期胚胎发育的毒性研究。对斑马鱼 abcb4 耐药基因表达的影响; 对易引起耐药的抗肿瘤药物阿霉素的耐药性影响少见相关报道。

目前研究提示, abcb1 基因与肿瘤耐药关系密切, 但其耐药的详细分子机制及以此为基础筛选新的肿瘤药物的研究模型还比较局限。目前耐药性的研究主要使用小鼠及耐药细胞

株开展相关工作。由于小鼠生长周期长、使用成本高、基因操作技术制备模型动物的手段较复杂, 使用有一定局限性; 耐药细胞株虽然操作简便, 但是不能反映机体整体情况。而斑马鱼具有胚胎体积小、周期短、胚胎透明、易观察和技术操作容易等优点, 故在胚胎发育毒性研究、药物筛选和新药开发中被广泛应用, 可作为药物临床前安全评估的重要体内模型^[12-13]。

本课题组前期通过生物信息学分析, 发现斑马鱼 abcb4 基因与人类耐药相关基因 abcb1 的氨基酸序列相似度为 64%^[8]。有研究报道, 斑马鱼 abcb4 基因与细胞内药物吸收与积累量的变化情况有关^[14-16], 但是关于 abcb4 基因在斑马鱼上具体耐药机制和有关的肿瘤耐药模型少见相关报道。

本研究对斑马鱼胚胎进行抗肿瘤药物吉非替尼暴露后, 急性毒性实验结果表明吉非替尼对斑马鱼有明显的发育毒性, 能导致斑马鱼发育迟缓和畸变。与对照组相比, 低剂量吉非替尼对斑马鱼胚胎无发育毒性, 高剂量吉非替尼显著抑制胚胎孵化率, 并有明显的胚胎致死率和畸形效应。斑马鱼死亡率和畸形率均随给药剂量的增加和给药时间的延长而升高。通过死亡率计算出吉非替尼在斑马鱼胚胎发育早期中的 IC₅₀ = (16.18 ± 0.56) μmol/L。选用该药物浓度为最大无毒性效应浓度对各时相的斑马鱼胚胎进行暴露, 并收集胚胎。通过实时荧光定量 PCR 方法, 检测斑马鱼中 abcb4 基因的表达情况。本研究显示, 吉非替尼暴露后的斑马鱼胚胎 abcb4 基因 mRNA 水平与对照组相比, 表达无显著差异; 而阿霉素和吉非替尼的混合液与阿霉素单独暴露后的斑马鱼胚胎 abcb4 基因 mRNA 水平差异显著, 混合液组明显降低了斑马鱼胚胎 abcb4 基因 mRNA 水平。

综上所述, 本研究证实了吉非替尼对斑马鱼 abcb4 基因表达水平无明显变化, 对易引起耐药的抗肿瘤药物阿霉素有逆转

耐药的作用。说明斑马鱼中的肿瘤药物耐药性与 *abcb4* 基因有关,而人类该耐药机制主要是由 *abcb1* 基因发挥作用,故本实验证实斑马鱼 *abcb4* 基因与人的 *abcb1* 基因具有较高的同源性,且斑马鱼的 *abcb4* 基因表达水平的变化和同源基因在人细胞上研究一致。介于人类耐药相关基因 *abcb1* 在肿瘤多药耐药中的重要性,由此推测斑马鱼中 *abcb4* 基因表达变化与多药耐药相关联。因此,本文通过对斑马鱼 *abcb4* 基因的研究,为多药耐药转基因斑马鱼模型建立以及抗肿瘤药物在斑马鱼模型进行多药耐药性筛选奠定了重要实验基础。因此,可以选择 *abcb4* 为靶基因进行操作,建立斑马鱼肿瘤多药耐药模型开展相关研究工作。另外,通过研究发现吉非替尼不仅不易引起耐药,反而对易引起耐药的药物有逆转耐药的作用,因此在以后的临床用药中,可以考虑用吉非替尼和易耐药的抗肿瘤药物联合应用于相关的临床治疗,这样可以提高治疗效果。同时,用斑马鱼构建肿瘤多药耐药模型,为以后新药临床前的耐药性筛选及临床用药中药物耐药性的评价提供筛药模型。提示临床用药时,对于易耐药的药物采用像吉非替尼这样逆转耐药的药物联合运用,提高临床疗效。

由于抗肿瘤药物种类繁多,且发生机制复杂。除吉非替尼、吉非替尼和阿霉素的混合液外,还需要选用更多不易耐药的抗肿瘤药物及吉非替尼和更多的易耐药的药物联合运用进行验证,从而检测耐药相关的基因、蛋白和相关的信号通路,以期进一步了解 *abcb4* 基因在斑马鱼多药耐药中的相关影响。

参考文献

- [1] Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(6):487-493.
- [2] Chen Z, Shi T, Zhang L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette(ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):153-164.
- [3] Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, et al. ABC transporters in cancer; more than just drug efflux pumps [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2):147-156.
- [4] Holland IB. ABC transporters, mechanisms and biology: an overview [J]. *Essays Biochem*, 2011, 50(1):1-17.
- [5] Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455(1):152-162.
- [6] Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, et al. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology [J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 26:1-9.
- [7] Schumacher T, Krohn M, Hofrichter J, et al. ABC transporters B1, C1 and G2 differentially regulate neuroregeneration in mice [J]. *PloS one*, 2012, 7(4):e35613.
- [8] 孙琮杰,何志旭,舒莉萍,等.阿霉素对模式生物斑马鱼中 *abcb4* 基因表达的影响 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(1):7-13.
- [9] Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, et al. Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2016, 93:69-76.
- [10] Leggas M, Panetta JC, Zhuang Y, et al. Gefitinib modulates the function of multiple ATP-binding cassette transporters in vivo [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9):4802-4807.
- [11] Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR, et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade [J]. *Drug Resist Updat*, 2015, 18:1-17.
- [12] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(5):353-367.
- [13] MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(10):721-731.
- [14] Fischer S, Klüver N, Burkhardt-Medicke K, et al. *Abcb4* acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *BMC Biol*, 2013, 11(1):1-16.
- [15] Kiehl S, Herkt SC, Richter AM, et al. ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:6899.
- [16] Lu X, Long Y, Sun R, et al. Zebrafish *Abcb4* is a potential efflux transporter of microcystin-LR [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2015, 167:35-42.
- [17] Platt EJ, Bilaska M, Kozak SL, et al. Evidence that ecotropic murine leukemia virus contamination in TZM-bl cells does not affect the outcome of neutralizing antibody assays with human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 2009, 83(16):8289-8292.
- [18] Sieg SF, Bazdar DA, Lederman MM. S-phase entry leads to cell death in circulating T cells from HIV-infected persons [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(6):1382-1387.

(收稿日期:2017-04-19 修回日期:2017-06-17)

(收稿日期:2017-04-18 修回日期:2017-06-16)

(上接第 4468 页)

- [15] Yu CR, Kim SH, Mahdi RM, et al. SOCS3 deletion in T lymphocytes suppresses development of chronic ocular inflammation via upregulation of CTLA-4 and expansion of regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2013, 191(10):5036-5043.
- [16] Shahin K, Sartor M, Hart DN, et al. Alterations in chemokine receptor CCR5 expression on blood dendritic cells correlate with acute Graft-Versus-Host disease [J]. *Transplantation*, 2013, 96(8):753-762.