

·论 著·

吉非替尼耐药人肺腺癌细胞的建立及耐药机制的研究

宁兰兰¹, 马为^{1*}, 刘俊¹, 王汉平², 李裕军¹

1. 广州医科大学附属广州市第一人民医院呼吸科, 广东 广州 510180;

2. 广州医科大学附属广州市第一人民医院中心实验室, 广东 广州 510180

摘要:目的 建立吉非替尼耐药的人肺腺癌细胞株 A549/GR, 并初步探讨其生物学特性及其耐药机制。方法 采用逐步增加吉非替尼剂量法诱导人肺腺癌细胞 A549 形成吉非替尼耐药的细胞株 A549/GR; CCK-8 法检测细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)及绘制细胞生长曲线, 并计算耐药指数; 显微镜下观察吉非替尼作用前后 A549、A549/GR 细胞形态学的改变; 直接测序法检测 EGFR 基因在酪氨酸激酶区的基因突变; qRT-PCR 法检测 EGFR 基因在 mRNA 水平表达的改变。结果 CCK-8 法测得 A549/GR 细胞的耐药指数为 6.00, 显示成功建立了吉非替尼耐药的细胞模型, 其倍增时间较亲代细胞缩短; 形态学观察显示 A549/GR 细胞极性消失, 有变长梭形的趋势; A549/GR 细胞系 EGFR 基因酪氨酸激酶区未发现基因突变; qRT-PCR 法显示 A549/GR 细胞 EGFR 基因在 mRNA 水平较亲代细胞轻度上调。结论 成功建立吉非替尼耐药人肺腺癌 A549/GR 细胞模型, A549/GR 细胞耐药性的产生与 EGFR 基因 18-21 外显子区域突变无关。

关键词: 吉非替尼; 耐药性; 表皮生长因子受体; 非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2014)9-1045-05

Establishment of a gefitinib-resistant cell line of human lung adenocarcinoma and its drug resistant mechanism

NING Lan-lan¹, MA Wei, LIU Jun, WANG Han-ping, LI Yu-jun

1. Department of Respiration, First People's Hospital of Guangzhou Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong, P. R. China

Corresponding author: MA Wei, E-mail: zhuchou@tom.com

Abstract: Objective To establish a gefitinib-resistant A549/GR cell line of human lung adenocarcinoma, and explore its biological characteristics and drug resistance mechanisms. Methods Gefitinib-resistant A549/GR was induced by stepwise selection after exposure to increasing doses of gefitinib. CCK-8 assay was applied to determinate IC₅₀, draw cell growth curve and calculate resistance index. The morphologic changes of A549/GR were observed under ordinary optical microscope; mutation analysis of EGFR was performed via direct sequencing; expression levels in mRNA of EGFR were determined by Q-RT-PCR method. Results A gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell line A549/GR were successfully established with resistance index of 6.00, which showed a markedly higher proliferation rate than parental cells. Loss of polarity and elongated spindle-shaped changes were observed under ordinary optical microscope. No gene mutations of EGFR in the tyrosine kinase were detected; and Q-RT-PCR results indicated that expression levels of mRNA in EGFR gene of A549/GR cell line were a little up-regulated as compared with parental cells ($P < 0.05$). Conclusions A gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell line A549/GR have been successfully established, and the development of drug resistance is not related with mutations in exons 18-21 of EGFR.

Key words: Gefitinib; Drug resistance; EGFR; NSCLC

非小细胞肺癌(Non small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总发病率的80%左右,是恶性程度最高的肿瘤。目前,在针对非小细胞肺癌的分子靶向治疗中,机制研究最为深入的是靶向表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)的小分子酪氨酸激酶抑制剂和单克隆抗体。

作为表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(Epidermal growth factor receptor tyrosinekinase inhibitors, EGFR-TKIs)类靶向药物,吉非替尼(gefitinib)是低分

子量苯胺喹唑啉的衍生物,是最早应用于治疗NSCLC的靶向药物之一^[1]。多项国际大型研究(如泛亚洲研究IPASS、西班牙研究LCG、美国CRYSTAL和OPUS等研究)均证实,吉非替尼对于肺腺癌治疗有效,特别是对于亚洲的无吸烟史的肺腺癌女性患者^[2-3]。尽管吉非替尼对于NSCLC显示出良好的治疗效应,但仅对部分存在EGFR基因突变或拷贝数增加的患者有效,疗效不一致;少数无EGFR突变的患者亦可能存在一定疗效^[4]。更为严重的是,EGFR-TKIs

基金项目:广州市科技计划项目(No.2011J4100027)

作者简介:宁兰兰(1986~),女,硕士研究生,研究方向:肺癌分子靶向药物治疗。

*通讯作者:马为, E-mail: zhuchou@tom.com

长期应用终导致继发性耐药的产生,严重削弱了其抗肿瘤效应。关于继发性耐药的相关研究中,目前普遍认同是EGFR基因的二次突变学说^[5-6];但亦有研究显示,吉非替尼的耐药与药物的转运、EGFR/Met基因的扩增、EGFR下游信号通路的非依赖性激活、旁路信号通路激活以及信号通路的改变有关,非单一机制能完全解释其耐药性^[2,5,7-8]。本研究选用EGFR基因野生型的人肺腺癌A549细胞,予逐步增加吉非替尼剂量法建立吉非替尼耐药的人肺腺癌A549/GR细胞系,并观察其生物学特性和耐药机制,为研究肿瘤细胞对吉非替尼耐药的分子机制及筛选靶向药物分子标记提供了可靠的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人肺腺癌细胞株A549购自中山大学实验动物中心细胞库。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640、胎牛血清购自Gibco公司。CCK-8试剂购自日本同仁公司。Neasy Blood & Tissue Kit购自法国Qiagen公司。引物、Q-RT-PCR试剂盒购自日本的TaKaRa公司。Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司。吉非替尼(Gefitinib)购自美国R&D公司,DMSO购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞耐药性培养 吉非替尼溶解于DMSO中配成40mM的储存液,保存于-20℃。A549细胞培养在37.0℃、5% CO₂、85%湿度的恒温培养箱中。取对数生长期细胞,按吉非替尼浓度梯度为5、10、15、20、25和30μM的顺序逐步加药培养,细胞在该药物浓度下可稳定生长后即进行下一浓度培养,直至A549细胞可在吉非替尼浓度为30μM的药液中稳定生长,历时约10个月。A549/GR细胞在无药物培养基中培养6个月后仍可在吉非替尼浓度为30μM的培养液中生长,耐药性稳定。取无药物培养基中培养2周的对数期A549/GR细胞用于后续试验。

1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖情况 取对数生长期A549、A549/GR细胞分别接种于96孔细胞培养板(2~3×10³/孔),每孔含细胞悬液100μL(空白组仅加100μL培养基)。试验设药物组、阴性对照组、空白组,药物组加入吉非替尼,使其终摩尔浓度分别为2.50、5.00、10.00、20.00、30.00、40.00、60.00、80.00、120.00μM;阴性对照组加入与药物组等容量的细胞培养基;空白组加入与药物组等容量的PBS。每组设3个重复孔,置于37.0℃、5% CO₂培养箱中常规孵育72h,吸去各孔中液体,每孔加入CCK-8液10μL+培养

液90μL,孵育3h,选择450nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光(OD₄₅₀)值。据OD值计算细胞存活率(vital rate, VR): $VR(\%) = (OD_{\text{用药物组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{阴性对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。由药物浓度的对数值与VR线性回归求出各药物的半数抑制浓度(50% inhibition Concentration, IC₅₀),并计算耐药指数RI(resistance index): $RI = IC_{50}(A549/GR) / IC_{50}(A549)$ 。以上实验均重复3次。

1.2.3 细胞生长测定及倍增时间计算 取对数生长期A549、A549/GR细胞分别接种96孔细胞培养板(5×10³/孔),孵育1、2、3、4、5、6和7d后取样(6重复孔),进行细胞增殖检测(方法同1.2.2),绘制细胞生长曲线,计算细胞倍增时间(TD)。Patterson公式计算细胞在对数生长期的群体TD。 $TD = T \lg 2 / \lg(N/N_0)$, T表示细胞处于对数生长期的培养时间, N及N₀分别表示终止和初始的细胞数。以上实验均重复3次。

1.2.4 细胞形态学的观察 将A549和A549/GR细胞及HE染色后的细胞,分别置于倒置光学显微镜及免疫荧光显微镜下,观察其形态,并拍照作比较。

1.2.5 直接测序法检测A549/GR细胞中EGFR基因18-21外显子突变 A549/GR细胞基因组DNA的提取使用DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, France),实验步骤依据说明书,提取的DNA经紫外分光光度计检测其总量及纯度。利用基因扩增PCR仪分别扩增EGFR外显子19和21目的片段,由TaKaRa公司鉴定合成。外显子18引物如下:18-F 5'-gaggtgaccctt-gtctctgtgt-3', 18-R 5'-cccaaactcagtgaaacaaa-3';外显子19引物如下:19-F 5'-attcgtggagcccaacag-3', 19-R 5'-gccagtaattgcctgtttcc-3';外显子20引物如下:20-F 5'-acttcacagccctgcgtaaac-3', 20-R 5'-atgggacaggcact-gatttgt-3';外显子21引物如下:21-F 5'-gtcagcagcgggt-tacatct-3', 21-R 5'-aagcagctctggctcacact-3'^[9-10]。PCR产物片段大小经琼脂糖电泳检测后,送广州Beogene科技有限公司进行测序,每个PCR产物进行双向测序。测序结果采用Chromas软件进行分析。

1.2.6 实时荧光定量PCR法检测EGFR mRNA的表达 实验设对照(A549)组、耐药(A549/GR)组,各取对数期细胞约1×10⁶个,根据Trizol试剂盒操作说明提取细胞总RNA,分光光度计测定所抽提RNA量,根据TaKaRa公司cDNA合成试剂盒操作说明逆转录生成cDNA,每个PCR设3个复孔。PCR引物序列分别为:EGFR F 5'-agggccttgccgcaaagtgt-3', R 5'-ccaccg-gcaggatgtggagat-3'; Human 18S rRNA(内参)F 5'-gact-caacacgggaacctcac-3', R 5'-ccagacaaatcgctccac-caac-3';由TaKaRa公司鉴定合成。应用iQTM5多重实

时荧光定量PCR仪行PCR扩增。PCR循环条件:预变性95℃ 1min,变性95℃ 10 s,退火及延伸64℃ 25 s, 40个循环。用相对定量分析软件进行分析,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来确定目的基因的相对表达量。 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 内参基因})_{\text{耐药组}} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 内参基因})_{\text{对照组}}$ 。

1.3 统计学分析 应用SPSS 13.0统计学软件进行分析,本研究检测指标的数据资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,A549、A549/GR细胞在各基因mRNA水平表达的差异采用两独立样本间的 t 检验。采用双尾检测, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉非替尼耐药人肺腺癌细胞系A549/GR的建立 A549/GR与A549细胞经不同浓度吉非替尼培养72h

后,测得细胞存活率(%),见表1。随着吉非替尼浓度的增加,A549/GR、A549细胞存活率逐渐下降,各浓度组间差异有统计学意义($F=321.851, P=0.000$);同浓度组间A549、A659/GR存活率的差异有统计学意义($F=89.037, P=0.000$)。A549细胞的 IC_{50} 值为 $(8.02 \pm 0.63) \mu\text{mol/L}$, A549/GR的 IC_{50} 值为 $(48.05 \pm 4.33) \mu\text{mol/L}$,两者的差异具有统计学意义, $P=0.000$,耐药指数为6.00,其耐药曲线如图1。A549/GR细胞在无药物培养基中培养6个月后仍可在吉非替尼浓度为 $30 \mu\text{M}$ 的药液中生长,耐药性稳定。

2.2 吉非替尼耐药细胞A549/GR及A549的生长曲线及倍增时间 CCK-8法测得A549/GR、A549在第1、2、3、4、5、6、7d所测的 OD_{450} 值(与细胞数目成正比)分别为 0.21 ± 0.03 、 0.31 ± 0.02 、 0.41 ± 0.02 、 0.82 ± 0.07 、

表1 不同浓度吉非替尼作用72h后A549/GR、A549细胞的存活率(%)

Table 1 Survival rate of A549/GR and A549 cells after treatment with different concentration of gefitinib for 72 h(%)

细胞 Cells	吉非替尼浓度 Gefitinib/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$								
	2.50	5.00	10.00	20.00	30.00	40.00	60.00	80.00	120.00
A549/GR	95.85 \pm 3.63	99.16 \pm 4.06	93.39 \pm 7.31	92.31 \pm 3.45	82.93 \pm 4.86	65.77 \pm 4.27	42.12 \pm 2.82	19.17 \pm 2.08	0.20 \pm 0.01
A549	88.70 \pm 6.22	82.80 \pm 4.09	47.76 \pm 5.30	27.71 \pm 3.06	6.10 \pm 0.16	4.02 \pm 0.36	1.39 \pm 0.27	1.19 \pm 0.10	0.01 \pm 0.00

1.30 ± 0.10 、 2.03 ± 0.05 、 3.32 ± 0.05 及 0.20 ± 0.03 、 0.23 ± 0.04 、 0.29 ± 0.02 、 0.51 ± 0.05 、 0.76 ± 0.03 、 1.17 ± 0.05 、 1.95 ± 0.04 ,据 OD_{450} 值绘制细胞生长曲线如图2所示,A549/GR、A549的倍增时间分别为 $(31.97 \pm 1.13) \text{h}$ 、 $(34.85 \pm 1.00) \text{h}$,两者相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),耐药细胞倍增时间缩短,增殖速度较亲代加快。

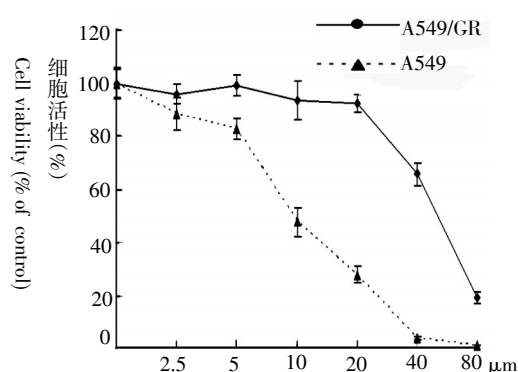


图1 A549/GR和A549细胞的耐药性曲线

Fig. 1 Resistance curves of A549 / GR and A549 cells

2.3 细胞形态学观察 倒置光学显微镜下可见,A549细胞呈饱满的多边形,大小一致,透光性好(图3A);在诱导耐药的过程中,其形态出现不同程度变化,主要表现为:形态各异,大小不一,细胞有变长梭形的趋势,透光性减弱。耐药细胞株A549/GR停止给药1周时可见细胞体积增大,细胞变长梭形,此时所

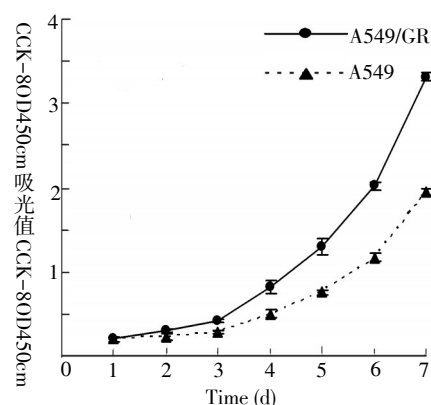
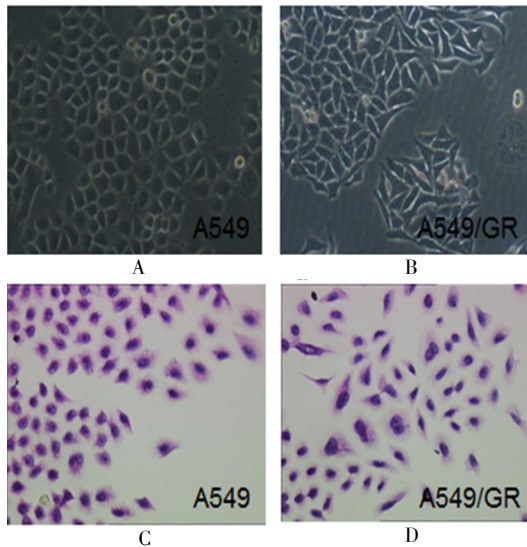


图2 A549/GR和A549细胞的生长曲线($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Proliferative rate of A549/GR and A549 cells($\bar{x} \pm s$)

测的 IC_{50} 值最大(55.173 ± 5.085) μM ;继续用无药培养基培养,其体积稍有变小,但较亲本株大,形态仍为长梭形,并保持形态稳定(图3B),所测 IC_{50} 值略有下降(48.049 ± 2.334) μM ,但保持稳定。HE染色后的A549、A549/GR细胞株胞核形态如图3C、D所示,A549细胞胞核大小较均一,A549/GR细胞株胞核大小不一,核分叶增多。

2.4 A549/GR细胞中EGFR基因水平的改变 直接测序法未在EGFR基因的18-21外显子发现有意义的突变;实时荧光定量PCR检测显示A549/GR细胞EGFR mRNA与亲代株的比值分别为 1.18 ± 0.07 ,A549/GR细胞的EGFR基因在mRNA水平表达较亲代细胞轻度上调,差别具有统计学意义($P < 0.05$),见图4。

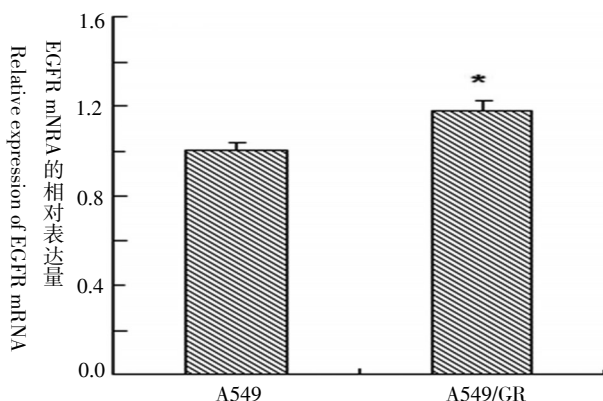


(A,B) A549 和 A549/GR 细胞置于普通光学显微镜下的形态学观察(×100);(C,D) A549 和 A549/GR 细胞进行 HE 染色后置于普通光学显微镜下的形态学观察(×100)。

(A,B) A549 and A549/GR cells observed under ordinary optical microscope(×100);(C,D) A549 and A549/GR cells observed under ordinary optical microscope after hematoxylin-eosin staining (×100).

图3 耐药细胞系的形态学改变观察

Fig. 3 Observation of morphologic changes in a gefitinib-resistant cell line



*表示两组差别有统计学意义, $P < 0.05$ 。

*Represented statistical significance between the two groups, $P < 0.05$.

图4 A549/GR 细胞中 EGFR mRNA 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of EGFR mRNA in A549/GR cells

3 讨论

目前继发性耐药严重削弱了 EGFR-TKIs 的疗效,本研究拟建立吉非替尼耐药的人肺腺癌 A549/GR 细胞模型,对其生物学特性进行深入研究,并初步探讨其耐药分子机制。

众所周知,EGFR 基因二次突变是 EGFR-TKI 初始治疗有效患者产生耐药性的最主要的原因,本研究选取 EGFR 基因为野生型的肺腺癌细胞系 A549 作为细胞模型,以避免在耐药培养过程中产生 EGFR 酪氨酸激酶区的二次突变。耐药性的确立以耐药指数达

6.0~7.0 为标准,本研究中 A549/GR 细胞的耐药指数为 6.00。A549 细胞对吉非替尼的 IC_{50} 低于 $10.00\mu M$,属于中度敏感细胞^[11]。采用逐步增加吉非替尼剂量法诱导人肺腺癌细胞 A549 形成耐药细胞 A549/GR^[12],A549/GR 细胞的 IC_{50} 达 $(48.5 \pm 4.33)\mu mol/L$,其耐药指数是 6.00,耐药性稳定存在。在 Rho JK^[13] 的研究中,A549 细胞对吉非替尼的 IC_{50} 为 $4.40 \pm 0.40\mu M$,而在 Noro R^[14] 的研究中,其对吉非替尼的 IC_{50} 为 $10.00\mu M$,本研究中 A549 细胞的 IC_{50} 值为 $(8.02 \pm 1.43)\mu mol/L$,更接近于后者。

A549 细胞在吉非替尼耐药培养过程中, IC_{50} 达到 $10\sim 30\mu M$ 所需的时间较长,耐药性增长慢;在培养耐药细胞 IC_{50} 至 $40\sim 50\mu M$ 时,所需时间相对于耐药初期的培养时间短,耐药性增长快。A549/GR 细胞在形态上表现为细胞体积较亲代细胞增大,体积大小不一,细胞有变长梭形的趋势,其倍增时间也明显缩短,对吉非替尼稳定耐受,停止给药后能长期保持耐药性,耐药细胞模型成功建立。

本研究亦显示 EGFR 基因表达上调,在 Kenichi Suda^[14] 等人的研究中有相同的结果,表明吉非替尼作为小分子酪氨酸激酶抑制剂靶向 EGFR 的结果并非是完全抑制,而是进一步激活 EGFR 信号通路。对于临床上可逆性 EGFR-TKIs 一线治疗 NSCLC,耐药性产生后是否继续应用或改为不可逆性 EGFR-TKI 治疗有一定的参考意义。

EGFR 基因突变检测未发现有意义的突变,表明 A549/GR 细胞耐药性的产生与 EGFR 基因 18-21 外显子突变无关,与 Guix M 等研究者的结果一致^[15];亦可推测少数分子靶向药物治疗有效的 EGFR 基因野生型的患者,在使用 EGFR-TKI 治疗时不易发生 EGFR 基因突变。

总结以上研究结果,吉非替尼耐药的人肺腺癌 A549/GR 细胞模型生物学特性改变明显,耐药性稳定存在,是较理想的研究分子靶向药物耐药分子机制的细胞模型;A549/GR 细胞耐药性的产生与 EGFR 基因 18-21 外显子突变无关。

参考文献

- [1] Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial [J]. JAMA, 2003, 290(16):2149-58. PubMed PMID:14570950.
- [2] Brugger W, Thomas M. EGFR-TKI resistant non-small cell lung cancer (NSCLC): new developments and implications for future treatment [J]. Lung Cancer, 2012, 77(1):2-8.
- [3] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in

- taxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-57. Epub 2009 Aug 19. PubMed PMID: 19692680.
- [4] Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11: 521 - 529.
- [5] Nurwidya F, Takahashi F, Murakami A, et al. Acquired resistance of non-small cell lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. *Respir Investig*, 2014, 52(2):82-91.
- [6] Hata A, Katakami N, Yoshioka H, et al. Rebiopsy of non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor: Comparison between T790M mutation-positive and mutation-negative populations [J]. *Cancer*, 2013, 119(24):4325-4332.
- [7] Peled N, Wynes MW, Ikeda N, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a biomarker for resistance to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013, 36(4):277-288.
- [8] Gelsomino F, Facchinetti F, Haspinger ER, et al. Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 89(2):284-299.
- [9] 车德海,田强,曹京燕,等. DNA 直接测序技术检测 EGFR 基因突变指导厄洛替尼一线治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察 [J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(10):2009-2013.
- [10] 赵婧雅,王笑影,曾海英,等. 直接测序法与蝎形探针扩增阻滞突变系统检测肺癌小活检标本 EGFR 基因突变的比较[J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(02):106-113.
- [11] Noro R, Gemma A, Kosaihiira S, et al. Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation [J]. *BMC Cancer*, 2006, 6:277.
- [12] Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, et al. Nishio K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(1):36-44.
- [13] Rho JK, Choi YJ, Lee JK, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line [J]. *Lung Cancer*, 2009, 63(2):219-226.
- [14] Suda K, Tomizawa K, Osada H, et al. Conversion from the "oncogene addiction" to "drug addiction" by intensive inhibition of the EGFR and MET in lung cancer with activating EGFR mutation [J]. *Lung Cancer*. 2012, 76(3):292-299.
- [15] Guix M, Faber AC, Wang SE, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118:2609 - 2619.

收稿日期:2014-04-18 编辑:符式刚

(上接第 1038 页)

849.

- [10] 王湛, 尉秀霞, 周玲, 等. EB 病毒 LMP2-LMP1 融合基因免疫效果的初步研究[J]. *中国病毒病杂志*, 2011, 1 (1) :45-50.
- [11] Kraus RJ, Mirocha SJ, Stephany HM, et al. Identification of a novel element involved in regulation of the lytic switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus [J]. *J Virol*, 2001, 75:867-877.
- [12] Kraus RJ, Perrigoue JG, Mertz JE. EB negatively regulates the lytic switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus [J]. *J Virol*, 2003, 77:199-207.
- [13] Sun H, Yao K, Chen Y. Induction of T-cell immunity against Epstein-Barr virus-associated tumors by means of adenovirally transduced dendritic cells [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2006, 117(8): 1558-1563.
- [14] 龚福生, 郑秋红, 郑天荣, 等. GM-CSF 重组腺病毒转染外周血树突状细胞的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(2):107-110.
- [15] Wu B, Qi R, Li B, et al. Effect of active immunization against a recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/somatostatin fusion protein on the growth of mice [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, (39):6773-6779.
- [16] Cui H, Chang XH, Liu B, et al. The anti-tumor immune responses induced by a fusion protein of ovarian carcinoma anti idiotype antibody 6B11ScFv and murine GM-CSF in BALB/c mice [J]. *Gynecol Cancer*, 2004, 14(2): 234-241.
- [17] 崔瑛, 王云, 刘成玉, 等. 融合基因 GM-CSF-BZLF1 重组腺病毒表达载体的构建[J]. *青岛大学医学院学报*, 2010, 46(5):407-410, 414.
- [18] Xue QJ, Wang H, Li XZ, et al. Construction and expression of prokaryotic expression vector containing EB virus gene Z2A [J]. *Chin J Viral Dis*, 2011, 1(4): 282-286.
- [19] Wang Yun, Liu Xia, Xing Xiaoming, et al. Variations of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 gene in gastric carcinomas and nasopharyngeal carcinomas from Northern China [J]. *Virus research*, 2010, 147: 258-264.

收稿日期:2014-03-28 编辑:谢永慧