

·论 著·

[文章编号]1000-8861(2010)12-0000-05

ERK 干扰质粒的构建及对胃癌细胞株 BGC823 DcR3 表达的影响

范 鑫, 庄国洪*, 黄小平, 杨东海, 刘 彬, 程小峰, 刘忠臣*

[摘 要] 目的 探讨胃癌发展的分子机制,通过构建 ERK1/2 shRNA 真核表达载体,体外研究其对胃癌细胞株 BGC823 ERK1/2 蛋白及 DcR3 表达水平的影响。方法 应用 PRNAT-U6.1/Neo 载体构建 ERK1/2 基因 shRNA 重组质粒,经脂质体法导入 BGC823 细胞中,分别设置对照组、干扰组和 U0126 抑制剂组。Western blot 法检测转染后 BGC823 细胞及抑制剂使用后 ERK1/2 蛋白的表达变化,荧光显微镜检测质粒自带 GFP 基因的表达情况确认转染效率,ELISA 法检测各组细胞上清中 DcR3 分泌蛋白的表达特点。结果 成功构建 ERK1/2 基因 shRNA 重组质粒。证明了 ERK1/2 蛋白的表达与 DcR3 的分泌水平在 BGC823 细胞株中呈正相关。结论 ERK1/2 干扰质粒明显降低 BGC823 细胞的 ERK1/2 蛋白表达水平,ERK 信号通路对 DcR3 的分泌具有重要调控作用,为其下游调控机制的研究奠定了基础。

[关键词] ERK1/2 基因; DcR3; RNA 干扰; 胃癌

[中图分类号] R392.3

[文献标识码] A

Construction of shRNA targeting at ERK gene and its effect on expression of DcR3 protein in BGC823 cell line

FAN Xin, ZHUANG Guohong, HUANG Xiaoping, YANG Donghai, LIU Bin, CHENG Xiao feng, LIU Zhongchen

Zhong Shan Hospital of Xiamen University Anti-Cancer Center, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] To evaluate the molecular mechanism of gastric cancer, we constructed an ERK1/2 shRNA expression vector, and studied its effects on ERK1/2 protein and expression character of DcR3 in gastric cancer cell line BGC823 in vitro. We constructed ERK1/2 shRNA recombinant plasmid with PRNAT-U6.1/Neo vector, and then transfected the plasmid into BGC823 cells with liposome. Then three groups were assessed: blank control group, interference group, U0126 inhibitor group. Protein expressions of ERK1/2 in the three groups were detected by Western blot analysis; the expression of GFP was identified by Fluorescent microscope to observe the efficiency of transfection; the expression of DcR3 protein in BGC823 culture supernatant was examined by ELISA. We found that the expression levels of ERK1/2 protein were positively related with expression character of DcR3 in BGC823 cell line. All these results show that the protein expression levels of ERK1/2 are significantly down-regulated by ERK1/2 shRNA recombinant plasmid. Furthermore, ERK signaling pathway plays an important role in regulating expression levels of DcR3, which could promote the study of downstream regulating mechanism.

[Key words] ERK1/2 gene; DcR3; RNA interference; Gastric cancer

细胞外信号调节激酶(Extracellular-signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2, p44/p42)是有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的重要成员。两者广泛地存在于人体各类细胞中。通过 Ras/Raf/MAPKK/MAPK/ERK 通路, Ras 等基因受刺激后,活化 MAPK、ERK1/2 等通路,促进细胞的增殖、分化。ERK1/2 经磷酸化活化后可通过调节细胞周期蛋白 D1 的表达,调节表皮生长因子在细胞周期 G₁ 期或 S 期的细胞增殖^[1]; 各种生长因子如:血小板生长因子(Platelet-derived

growth factor, PDGF)、神经生长因子(nerves growth factor, NGF)和血清、酪氨酸受体激酶、和 G 蛋白配对受体也能使 ERK1/2 的表达上调^[2]。ERK1/2 通路对 PD98059、U0126 等 MEK1/2 通路抑制剂很敏感,研究表明,使用上述药物后, ERK1/2 表达明显下调^[1]。据文献记载, ERK1/2 的高表达,对乳腺癌、大肠癌、胰腺癌、胆管癌、恶性黑色素瘤、白血病及黏液瘤等肿瘤,皆可作为独立的预测患者预后情况的参考指标^[3-7]。

DcR3^[8-9]是一个新的肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员,它能竞争性地与 LIGHT 及 FasL 结合并抑制其介导的凋亡。研究发现 DcR3 在多种肿瘤细胞和某些自身免疫病中高度表达,并且肿瘤切除术后患者血清 DcR3 水平显著降低, Shen 等^[10]检测

基金项目:厦门市科技计划项目资助(3502Z20083008)

作者单位:361005 厦门大学医学院抗癌研究中心

* 通信作者:庄国洪 E-mail: zhuanguohong@yahoo.com.cn; 刘忠臣, E-mail: zyjt@163.com.cn

48 例病理学确诊的原发性肝癌组织及癌旁组织 DcR3 mRNA 的表达, 结果发现肝癌组织中 DcR3 mRNA 阳性表达率为 60.4%, 癌旁组织无阳性表达, 其表达与肿瘤大小、临床分期、肿瘤浸润和转移有关 ($P < 0.05$)。Kim 等^[1]发现在 LPS 刺激下, 人肠上皮细胞株 SW480、SW620 和 HT29 能选择性释放可溶性 DcR3, 并且, 所有细胞优先表达 Toll-like receptor 4 (TLR-4)。LPS 体外诱导 DcR3 释放好像是通过激活 MAPK /ERK1/2, 激活 JNK、NF- κ B 实现。

为了明确 ERK1/2 以及 DcR3 分子在胃癌中的发生发展关系, 本实验通过构建 ERK 干扰质粒和应用 ERK 抑制剂研究 DcR3 分子在胃癌细胞株 BGC823 中的表达变化。拟体外实验探讨: 在胃癌疾病的发展中, DcR3 分泌蛋白的调控机制。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 SiRNA 载体 PRNAT-U6.1/Neo 购自 Genescript 公司, *E. coli* Top10 菌株本室保存, 人胃癌 BGC823 细胞株由厦门大学医学院抗癌研究中心保存。

1.2 工具酶、转染试剂及其他 T4 DNA Ligase 购自 Fermentas 公司, *Bam*H, *Hind* 内切酶, DNA Marker, Ex Taq 均购自 TaKaRa 公司, PCR 产物及回收试剂盒购自 Omega 公司, PCR 引物合成由上海 Sangon 完成。质粒测序由上海英骏公司完成, 质粒中提试剂盒购自上海 Sangon 公司。FuGENE HD Transfection Reagent 购自 Roche 公司, Lipofectamine 2000 购自 InVitrogen 公司, Human DCR3 Platinum ELISA 定量试剂盒购自 Bender 公司, U0126 抑制剂购自 Sigma 公司, P-ERK、ERK、 β -actin 抗体均购自 Santa Cruz 公司, Amicon Ultra 超滤管购自 Millipore 公司。

1.3 PRNAT-U6.1/Neo-ERK1/2 干扰质粒的构建与鉴定 登陆 GenBank 查找并获取人源性 ERK1、ERK2 基因序列。利用 DNAssist 软件分析 ERK1 与 ERK2 编码区序列(ORF), 分别为 1140 bp 和 1 083 bp。选用 Genscript 公司载体设计软件 SiRNA target finder 分别从 ERK1、ERK2 的 ORF 中选择评分最高的靶序列位点 3 处, 分别命名为 ERK1 ONE: GACT CGCG TGGC CATC AAG; ERK1 TWO: CGGA TCAC AGTC GAGG AAG; ERK1 THREE:ACGG ATCA CAGT GGAG GAA; ERK2 ONE: GCAC CATT CAAG TTCG ACA; ERK2 TWO: CCTC TCGT ACAT CGGC GAG; ERK2 THREE: GGTG CCAT GGAA CAGG GTG; 然后利用 SiRNA Construct Builder 软件。构建

可以连接到载体 PRNAT-U6.1/Neo, 转录后可经加工产生 SiRNA, 进而干扰目的基因表达的片段。利用 DNAssist 软件生成互补寡核苷酸片段后并设计各自鉴定引物。以 ERK1 ONE 为例, 其中 P1 为 PRNAT-U6.1/Neo: 5'-CAGT ATCT GCT CCCT GCTT-3'。P2 则为上述各靶序列的反向互补序列。确认无误后合成构建。单链 DNA 经变性, 退火形成双链 DNA 片段, 与经过 *Bam*H、*Hind* 双酶切后的 PRNAT-U6.1/Neo 质粒连接, 连接产物转化 Top10 感受态菌种, LB 平板挑取单菌落阳性筛选。PCR 反应体系为: ddw 38 μ l、10 \times PCR buffer 5 μ l、dNTP Mixture 5 μ l、模板 DNA 2.5 ng、P1 0.5 μ l、P2 0.5 μ l。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 45 $^{\circ}$ C 退火 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳确定阳性克隆并测序, 测序正确的阳性克隆扩增中提备用。

1.4 细胞培养、转染

1.4.1 细胞培养 人肾上皮细胞系 293T, 人胃癌细胞系 BGC823 用含有 15% 小牛血清及青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养, 隔日传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.4.2 293T 细胞转染 待 293T 细胞在六孔板中融合度达 90% 左右时, Lipofectamine 2000 转染各组质粒, 每孔质粒 4 μ g, 每孔使用 Lipofectamine 2000 体积 10 μ l。实验组分为 ERK1 ONE 干扰组、ERK1 TWO 干扰组、ERK1 THREE 干扰组、ERK1 对照组; ERK2 ONE 干扰组、ERK2 TWO 干扰组、ERK2 THREE 干扰组、ERK2 对照组。48~72 h 检测转染及干扰效率, 筛选最有效干扰组。

1.4.3 BGC823 细胞转染 待 BGC823 细胞融合度达到 70% 左右时, 用 FuGENE HD Transfection Reagent 转染六组 BGC823 细胞。FuGENE HD (μ l) 与 DNA (μ g) 比例选用 5 : 2、6 : 2 及对照组转染: 即分为: ERK1 5 : 2 干扰组、ERK1 6 : 2 干扰组、ERK1 对照组; ERK2 5 : 2 干扰组、ERK2 6 : 2 干扰组、ERK2 对照组。48 h 荧光显微镜观察转染效率, Western blot 检测相关蛋白表达。

1.5 ERK 抑制剂 U0126 与细菌脂多糖 LPS 的应用 根据前期预实验确定 U0126 分为 5 个剂量组: 0、2、5、10、20 μ mol/L, LPS 刺激剂浓度为 50 ng/ml (抑制剂作用 30 min 再加入 LPS)。24 h 后收集细胞 Western blot 检测, 同时收集细胞上清检测 DcR3 蛋白表达。

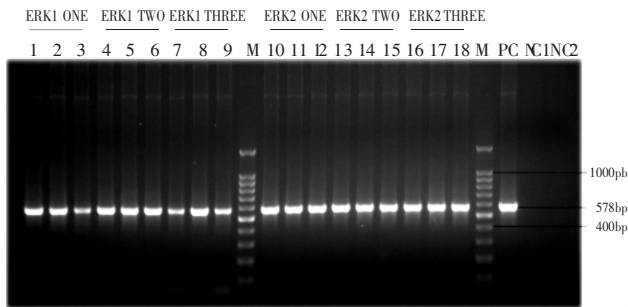
1.6 Western blot 法检测细胞内 ERK 蛋白表达 依据 1.4 及 1.5 的方法将各组细胞收集裂解提取蛋白,

样品经 12%SDS-PAGE 电泳分离后,湿转至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,洗膜、孵育一抗(ERK1、ERK2、P-ERK1/2)过夜,TBST 洗膜 3 次,室温下孵育二抗(1:3000)1 h。同上洗膜 3 次,ECL 发光化学检测。

1.7 ELISA 定量试剂盒检测 DCR3 蛋白表达 收集细胞上清离心,弃去细胞碎片,应用 Millipore 超滤管以 4 000 g 离心力 45 min 浓缩细胞上清至 50 μ l。使用 Human DcR3 Platinum ELISA 试剂盒,依照说明书绘制标准曲线并检测样品浓度。

2 结果

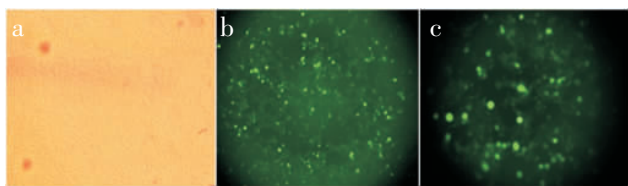
2.1 干扰质粒阳性克隆鉴定 利用上述合成 ERK1 ONE、ERK1 TWO 等下游鉴定引物 P2 及共有上游鉴定引物 P1,并在六块琼脂板上分别挑取 3 个阳性克隆进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳检测可见在 500~600 bp 处均有扩增带,阳性率为 100%,与预期条带(578 bp)相符。将阳性鉴定克隆测序,并将正确的重组质粒命名为 PRNAT-U6.1/Neo-ERK1/2 (图 1)。



1-18) bacterial colony; M) DNA marker; PC) positive control; NC1) absence of downstream; NC2) blank control.

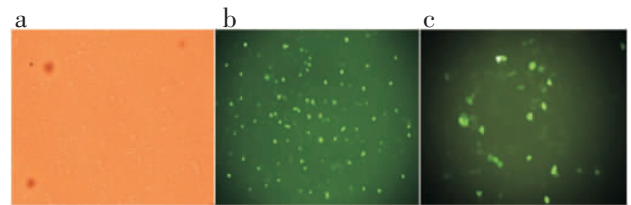
图 1 干扰质粒的阳性克隆鉴定
Fig 1 Analysis of RNAi plasmid

2.2 293T 和 BGC823 细胞培养及转染 图 2 示 293T 细胞转染 PRNAT-U6.1/Neo-ERK 效果图(InVitrogen),转染比例为 4 μ g : 10 μ l(质粒:脂质体);图 3 示 BGC823 细胞转染 PRNAT-U6.1/Neo 效果图(Roche),转染比例为 6 μ l : 2 μ g(脂质体:质粒)。对比正常光镜下,两组细胞均有绿色荧光蛋白表达,且 293T 细胞的转染效率略高于 BGC823(图 2、图 3)。



a) normal 293T(x100); b) 293T after transfection(x100); c) 293T after transfection(x200).

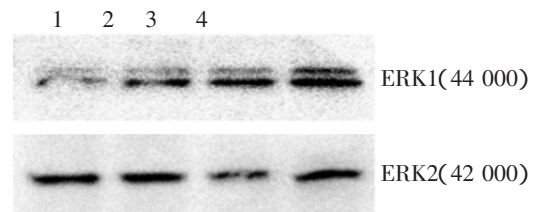
图 2 荧光显微镜下 PRNAT-U6.1/Neo-ERK 转染 293T 细胞
Fig 2 293T cell observed by fluorescence after PRNAT-U6.1/Neo-ERK transfection



a) normal 293T (x100); b) 293T after transfection (x100); c) 293T after transfection(x200).

图 3 荧光显微镜下 PRNAT-U6.1/Neo-ERK 转染 BGC823 细胞
Fig 3 BGC823 cell observed by fluorescence after PRNAT-U6.1/Neo-ERK transfection

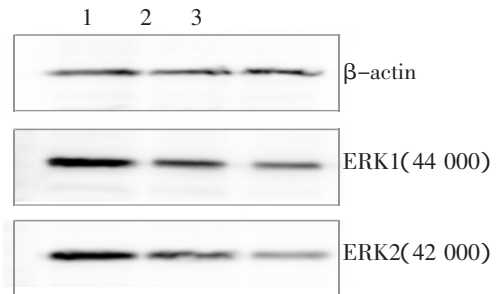
2.3 Western blot 检测最有效干扰质粒 如图 4 所示,ERK1 干扰质粒 one、two、three 转染人肾上皮 293T 细胞后与 ERK1 空白对照组相比,可见 ERK1 干扰质粒对应的蛋白表达量均有下降,以 ERK1 ONE 干扰质粒最为显著,同样可见 ERK2 干扰质粒以 ERK2 THREE 最为明显,故干扰胃癌 BGC823 细胞株分别选用 ERK1 ONE、ERK2 THREE 质粒(图 4)。



1) ERK1/2 one interference plasmid; 2) ERK1/2 two interference plasmid; 3) ERK1/2 three interference plasmid; 4) ERK1/2 control plasmid.

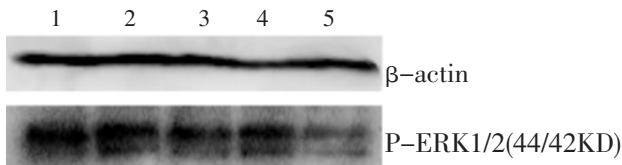
图 4 PRNAT-U6.1/Neo-ERK1/2 质粒筛选
Fig 4 Screening of PRNAT-U6.1/Neo-ERK1/2 plasmid

2.4 Western blot 检测干扰组、抑制剂组 BGC823 细胞中 ERK1/2 的表达 如图 5 所示,与空白对照组相比,转染 ERK1/2(ERK1 ONE、ERK2 THREE)干扰质粒的 BGC823 细胞的 ERK1/2 的表达量均有下降,且在以 6:2 转染比例时干扰效果最佳,如图 6 所示 ERK1/2 抑制剂 U0126 能够明显抑制 P-ERK1/2 蛋白的表达,并且随着药物浓度的增加,蛋白表达量逐渐下降,两者呈现负相关(图 5、图 6)。



1) control group; 2) 5:2 (plasmid: reagent); 3) 6:2(plasmid: reagent).
图 5 ERK1/2 干扰质粒对 BGC823 细胞中 ERK1/2 蛋白表达的影响

Fig 5 The expression of ERK1/2 protein in BGC823 after treatment with ERK1/2 interference plasmid

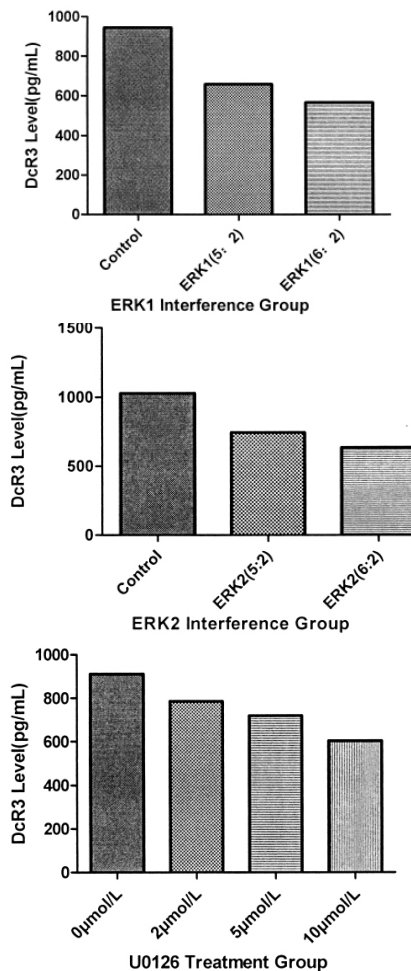


1) 0 μmol/L(u0126); 2) 2 μmol/L(u0126); 3) 5 μmol/L(u0126); 4) 10 μmol/L(u0126); 5) 20 μmol/L(u0126).

图 6 BGC823 细胞在不同的抑制剂(U0126)浓度下(24 h)P-ERK1/2 蛋白的表达变化

Fig 6 The expression of P-ERK1/2 protein in BGC823 treated with different inhibitor concentration for 24 h

2.5 Elisa 检测干扰组、抑制剂组 DcR3 分泌蛋白表达 (低剂量 LPS 刺激 DcR3 释放) 如图 7 所示, ERK1/2 干扰组 BGC823 细胞上清 DcR3 蛋白表达较对照组下降,其趋势与图 5 中 ERK 蛋白表达量相符,结果证明了两组呈正相关;U0126 抑制剂组药物浓度为 0、2、5、10 μmol/L 时 DcR3 蛋白表达与图 6 中 P-ERK 蛋白表达同样呈现下降趋势,亦说明了 DcR3 的分泌与 P-ERK 蛋白的正相关。



a) Expression of DcR3 protein in BGC823 culture supernatant treated with ERK1 interference plasmid; b) Expression of DcR3 protein in BGC823 culture supernatant treated with ERK2 interference plasmid; c) Expression of DcR3 protein in BGC823 culture supernatant treated with different inhibitor concentration.

图 7 干扰组、抑制剂组 DcR3 分泌蛋白表达

Fig 7 The protein expression of DcR3 in every group

3 讨论

ERK/MAPK 信号传导途径在胃肠道肿瘤的发生和发展中起重要作用。众多研究均表明, ERK/MAPK 信号传导途径能够促进胃肠道肿瘤细胞的增殖。ERK/MAPK 信号转导通路的异常活化能够导致细胞丧失凋亡和分化的能力,促使细胞恶性转化,异常增殖,产生肿瘤,并能进一步促进肿瘤细胞的增殖。在肝癌发展过程中,肿瘤细胞通过异常表达 Fas 或使 Fas 功能失常而逃逸 FasL 诱导肿瘤细胞凋亡的功能;同时,肿瘤细胞大量表达 DcR3 来竞争结合 FasL 从而逃避机体的免疫监视^[12]。肿瘤的快速增殖、丧失凋亡、ERK 的异常活化、DcR3 的大量表达,四者之间的时间一致性值得进一步探讨。

为了更明确 ERK1/2 的重要作用,同时更深入的了解 DcR3 分泌机制,本实验利用了其上游激酶 MEK1/2 的特异性抑制剂 U0126 阻断了 ERK1/2 的功能。再通过 Western blot 和 ELISA 技术同时分析了在胃癌细胞株中 ERK1/2 的表达与 DcR3 分泌的相关性。并且还进一步的筛选了最适 ERK1/2 干扰质粒转染 BGC823 细胞干扰 ERK1/2 的表达。在鉴定成功干扰后,并给予了低剂量的 LPS 刺激,检测出了 ERK1/2 与 DcR3 分泌的变化及两者的相关性。

本实验的结果显示:在胃癌细胞株 BGC823 中, ERK1/2 分子及 DcR3 分泌蛋白都处在较高表达水平。并且 ERK1/2 分子的表达与 DcR3 蛋白呈正相关。进一步阐明了胃癌细胞中 Ras/Raf/MAPKKK/MAPKK/MAPK/ERK 通路参与了 DcR3 的表达调控,且可能在 DcR3 的表达调控中起关键作用。后续的研究,我们将在本实验的基础上进一步展开对 DcR3 调控机制的分析。明确 DcR3 分泌蛋白的表达是否受到其他关键细胞因子变化的影响。为胃癌及其他肿瘤的早期诊断和免疫治疗方法的探索奠定基础。

【参考文献】

[1] Roberts OL, Holmes K, Muller J, et al. ERK5 and the regulation of endothelial cell function [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37: 1254-1259.

[2] Moriyama M, Jayakumar AR, Tong XY, et al. Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in the Mechanism of Oxidant-Induced Cell Swelling in Cultured Astrocytes [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(11): 2450-2458.

[3] Schmitz KJ, Otterbach F, Callies R, et al. Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer: a clinicopathological study of 99 cases [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17: 15-21.

(下转第 1047 页)

的 FHR4 蛋白,并可特异识别天然状态下的 FHR4 蛋白 2 株可稳定分泌抗 FHR4 mAb 的杂交瘤细胞株 GCA058 ,GGF044 在 Western blot 检测中能特异性识别 FHR4 蛋白,且均可用于间接免疫荧光染色检测细胞中表达的 FHR4 蛋白,其主要定位于细胞浆中;同时可用于免疫组化染色检测 FHR4 在成人肝脏组织肝细胞浆中的表达。由于抗 FHR4 抗血清和 mAbs 对 FHR4 具有很好的识别特性,因此,为进一步研究 FHR4 的功能提供了必要的工具。

【参考文献】

- [1] Zipfel PF. Complement factor H: physiology and pathophysiology [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2001, 27(3): 191-199.
- [2] Jozsi M, Richter H, Loschmann I, et al. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene [J]. *Europ J Hum Genet*, 2005, 13(3): 321-329.
- [3] 马艳梅,黄钟,刘志刚,等.鸡蛋主要过敏原 Gal d1 片段基因的克隆、表达、纯化及免疫学鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(7): 589-593.
- [4] 赵振富,苏雪莹,初国良,等.β-淀粉样蛋白特异性单链抗体的制备及鉴定 [J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(3): 215-219.
- [5] Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, et al. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 27657-27662.
- [6] Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration [J]. *Science*, 2005, 308(5720): 385-389.
- [7] Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration [J]. *Science*, 2005, 308(5720): 419-421.
- [8] Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration [J]. *Science*, 2005, 308(5720): 421-424.
- [9] Despret DD, Klaver CC, Witteman JC, et al. Complement Factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration [J]. *JAMA*, 2006, 296(3): 301-309.
- [10] McRae JL, Murphy BE, Eyre HJ, et al. Location and structure of the human FHR-5 gene [J]. *Genetica*, 2002, 114(2): 157-161.
- [11] Skerka C, Hellwage J, Weber W, et al. The human factor H-related protein 4 (FHR4): a novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins [J]. *J Bio Chem*, 1997, 272(9): 5627-5634.
- [12] Hellwage J, Jokiranta TS, Koistinen V, et al. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin [J]. *FEBS Lett*, 1999, 462(3): 345-352.

(收稿日期 2009-08-31, 修回日期 2010-09-05)

(编辑 侯瑞)

(上接第 1042 页)

- [4] Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Alakus H, et al. Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) but not AKT predicts poor prognosis in colorectal carcinoma and is associated with k-ras mutations [J]. *Virchows Arch*, 2007, 450: 151-159.
- [5] Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 1473-1482.
- [6] Xu X, Sakon M, Nagano H, et al. Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2004, 11: 25-32.
- [7] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 2846-2850.
- [8] Chen PH, Yang CR. Decoy Receptor 3 Expression in ASPC-1 Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells via the Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Akt-, and NF-kappa B-Dependent Pathway [J]. *J Immunol*, 2008, 181(12): 8441-8449.
- [9] 李文珠,李迎,罗芳洪,等.诱骗受体 DcR3 对佐剂型关节炎大鼠模型的作用分析 [J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(1): 23-28.
- [10] Shen HW, Wu YL, Peng SY. Overexpression and genomic amplification of decoy receptor 3 in hepatocellular carcinoma and significance thereof [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003, 83(9): 744-747.
- [11] Kim S, Fotiadu A, Kotoula V, et al. Increased expression of soluble decoy receptor 3 in acutely inflamed intestinal epithelia [J]. *Clinical Immunology*, 2005, 115(10): 286-294.
- [12] 刘忠臣,罗芳洪,庄国洪,等.肝癌发展中 FasL 及其受体 Fas/DcR3 的表达分析 [J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(3): 242-245.

(收稿日期:2010-10-07, 修回日期:2010-10-12)

(编辑 金晓琳)