

肺癌细胞抑制 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因表达的机制研究

秦雪君,潘世扬*,王芳,彭萸,徐娟,韩月,孙瑞红,张丽霞,王宏,谢而付,高丽,庞智睿

(南京医科大学第一附属医院检验学部,国家临床检验重点专科建设单位,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究肺癌细胞能否直接影响 CD4⁺T 细胞干扰素- γ (IFN- γ)基因启动子甲基化水平。方法:ELISA 法检测肺癌组($n = 30$)及健康对照组($n = 30$)血浆 IFN- γ 水平;免疫磁珠分选两组外周血 CD4⁺T 细胞($n = 8$),提取 DNA 后经亚硫酸氢盐修饰,PCR 扩增 IFN- γ 基因启动子进行 TA 克隆测序,测序结果采用生物信息学软件进行分析;建立健康人 CD4⁺T 细胞与肺腺癌细胞株 SPC-A1 体外 Transwell 共培养体系($n = 6$),并设健康人 CD4⁺T 细胞单独培养为对照组,培养 5 d 后分别收集 CD4⁺T 细胞。CD4⁺T 细胞按上述法进行 TA 克隆测序。同时 CD4⁺T 细胞经 anti-CD3、anti-CD28 刺激 6、24 h,ELISA 法检测两组上清 IFN- γ 表达水平,RT-PCR 检测 CD4⁺T 细胞 IFN- γ mRNA 表达水平。结果:肺癌组血浆 IFN- γ 水平显著低于健康对照组 [(69.30 \pm 38.56) pg/ml vs (92.62 \pm 34.75) pg/ml, $P = 0.017$]; 肺癌组 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子甲基化水平显著高于健康对照组 (84.6% vs 68.6%, $P < 0.001$); 肺癌患者血浆 IFN- γ 水平与其基因启动子甲基化率呈负相关 ($r = -0.8503$, $P = 0.0107$)。体外 Transwell 共培养实验中,与对照组相比,实验组 CD4⁺T 细胞 anti-CD3、anti-CD28 刺激 6、24 h,IFN- γ 表达水平显著下降 [6 h: (14.53 \pm 7.12) pg/ml vs (36.14 \pm 23.51) pg/ml, 24 h: (7.81 \pm 4.02) pg/ml vs (24.85 \pm 15.58) pg/ml], 6 h 对照组 CD4⁺T 细胞 IFN- γ mRNA 表达水平为实验组的 2.37 倍。实验组 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子甲基化水平显著高于对照组 (85.4% vs 70.9%)。结论:肺癌细胞可诱导 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子发生高甲基化,进而导致 IFN- γ 基因表达下调,可能对肺癌患者的免疫抑制起重要作用。

[关键词] DNA 甲基化; 干扰素- γ ; CD4⁺T 细胞; 肺癌细胞

[中图分类号] Q786;R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-659-05

The mechanism of downregulation of IFN- γ expression in CD4⁺T cells by lung cancer cells

QIN Xue-jun, PAN Shi-yang*, WANG Fang, PENG Yin, XU Juan, HAN Yue, SUN Rui-hong, ZHANG Li-xia, WANG Hong, XIE Er-fu, GAO Li, PANG Zhi-rui

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, National Key Clinical Department of Laboratory Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether lung cancer cells can directly influence the methylation of IFN- γ gene promoter in CD4⁺T cells. **Methods:** The plasma level of IFN- γ was determined by ELISA in the lung cancer patient group ($n = 30$) and healthy control group ($n = 30$). CD4⁺T cells were isolated by CD4-positive isolation kit from peripheral blood of lung cancer patients ($n = 8$) and healthy controls ($n = 8$), and genomic DNA was extracted using QIAamp Mini Kit and bisulfite treated. IFN- γ gene promoter methylation was analyzed with methylation specific sequencing method and the result was analyzed by bioinformatics software; A Transwell culturing system was also established ($n = 6$). CD4⁺T cells of healthy volunteers were co-cultured with SPC-A1 as the experimental group and CD4⁺T cells cultured as the control group. After culturing for 5 d, CD4⁺T cells were collected to analyze IFN- γ gene promoter methylation using methylation specific sequencing method as described above. Meanwhile, CD4⁺T cells were stimulated by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 6 and 24 h. The IFN- γ of supernatant was detected by ELISA and RT-PCR was used to determine the mRNA transcript levels of IFN- γ . **Results:** The level of plasma IFN- γ was significantly lower in lung cancer patients (69.30 \pm 38.56 pg/ml vs 92.62 \pm 34.75 pg/ml, $P = 0.017$). The hypermethylation status of IFN- γ promoter in CD4⁺T cells of lung cancer patients was 84.6% (control, 68.6%) ($P < 0.001$). The concentration of plasma IFN- γ was negatively correlated with the percentage of methylation at the IFN- γ promoter in the patient group ($r = -0.8503$, $P = 0.0107$). In Transwell culturing system, after

[基金项目] 国家自然科学基金(30972821, 30901344, 30901262), 江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK201114)

*通讯作者, E-mail: sypan@njmu.edu.cn

stimulation for 6 and 24 h, the expression of IFN- γ in the experimental group was significantly lower than that of the control group [6 h: (14.53 \pm 7.12) pg/ml vs (36.14 \pm 23.51) pg/ml, 24 h: (7.81 \pm 4.02) pg/ml vs (24.85 \pm 15.58) pg/ml]. The mRNA transcript levels of IFN- γ of the control groups were increased 2.37 fold after stimulation for 6 h. The hypermethylation status of the IFN- γ promoter in CD4⁺ T cells of the experimental group was 85.4% (control, 70.9%). **Conclusion:** Lung cancer cell can induce the hypermethylation of IFN- γ gene promoter, which downregulates the expression of the IFN- γ gene, and it may play an important role on the immunosuppression of lung cancer patients.

[Key words] DNA methylation; IFN- γ ; CD4⁺ T cells; lung cancer cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 659-663]

肺癌是严重威胁人类健康的肿瘤之一,我国肺癌发病率及病死率均居肿瘤之首^[1]。肺癌患者往往呈现免疫功能低下状态,包括细胞免疫及体液免疫。研究发现 Th 亚型细胞分泌的各种细胞因子在肿瘤的细胞免疫中发挥了重要作用^[2]。其中 Th1 型细胞分泌白介素(IL)-2、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等,主要介导细胞免疫应答;Th2 型细胞分泌 IL-4、IL-10 等,与体液免疫应答有关,反映体液免疫状况^[3-4]。在这些细胞因子中,IFN- γ 作为正性调节因子在抑制肿瘤发生和发展中发挥了重要作用^[5]。最新证据表明,肺癌患者体内 IFN- γ 水平下降,不仅导致细胞免疫功能下降,同时,体液免疫应答也随之降低^[6]。

细胞因子的表达调控是一个复杂的过程,其基因表达可通过表观遗传学进行调控^[7]。DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学修饰。在体内,一些基因或基因组的启动子或 5'端附近 CpG 碱基对的甲基化修饰后可阻碍相关基因的转录,导致其表达量下降^[8]。有研究证实 IFN- γ 基因表达与 DNA 甲基化密切相关,DNA 甲基化主要是从转录水平上调节启动子的基因表达,被认为是一种抑制 IFN- γ 表达的长效机制^[9]。肿瘤细胞是否能引起肺癌 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子甲基化状态改变从而导致 IFN- γ 表达下调,目前尚未清楚。因此本研究主要探讨研究 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因表达下调与肿瘤之间是否存在直接的关系,从表观遗传学的方面为肺癌的免疫抑制及肿瘤的免疫逃避提供重要依据。

1 对象和方法

1.1 对象

肺癌组选择 2010 年 12 月~2011 年 10 月在南京医科大学第一附属医院就医,经病理诊断证实为肺癌的患者。其中男 14 例,女 16 例,平均年龄为 (59.93 \pm 10.62)岁,腺癌 23 例,鳞癌 2 例,细支气管肺泡癌 2 例,低分化癌 3 例。

对照组选择 2011 年 4 月~2011 年 10 月在南京医科大学第一附属医院健康体检成人 30 例,其中男 17 例,女 13 例,平均年龄为 (43.70 \pm 12.92)岁。Transwell 共培养实验中健康志愿者选择 2010 年 12 月~2011 年 5 月在江苏省南京市红十字血液中心健康献血者 6 例,其中男 3 例,女 3 例,平均年龄为 (30.00 \pm 3.35)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理

所有肺癌患者均于手术前采集静脉血 10 ml, EDTA-K₂ 抗凝,于室温 2 000 r/min 离心 5 min,分离上层血浆,并继续 4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min 离心 10 min,吸取上层无细胞血浆分装,-70 $^{\circ}$ C 保存用于 IFN- γ 检测。下层细胞采用淋巴细胞分离液(天津灏洋)分离单个核细胞,免疫磁珠(挪威 Invitrogen Dynal 公司)分选单个核细胞中 CD4⁺T 细胞。收集所得细胞置-70 $^{\circ}$ C 保存以便后续进行 DNA 提取,亚硫酸氢盐修饰,PCR 扩增及 TA 克隆测序。

1.2.2 Transwell 共培养实验体系

Transwell 共培养实验是在带有 0.4 μ m 微孔内室(英国 RoTrac 公司)的 24 孔板上进行。细胞均以 10%人 AB 血清(美国 Nalgene 公司)RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司)重悬。实验组中肺腺癌细胞株 SPC-A1 (2 \times 10⁵ 个/孔,中国科学院细胞库)生长于 24 孔细胞培养板外室,按 1.2.1 所述方法分离健康志愿者初分白细胞中 CD4⁺T 细胞加入 Transwell 培养内室(6 \times 10⁵ 个/孔),同时设置内室为 CD4⁺T 细胞外室无 SPC-A1 为对照组(6 \times 10⁵ 个/孔)。每组设 6 个复孔。置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养,5 d 后分别收集两组 CD4⁺T 细胞,1 \times 10⁶ 个细胞进行 DNA TA 克隆测序。5 \times 10⁴ 个/孔细胞转移至 96 孔板中,每组设 3 个复孔,每孔加入 0.1 μ g 刺激剂 anti-CD3、anti-CD28 培养 6、24 h 后收集上清用以检测 IFN- γ ,收集 CD4⁺T 细胞提取 RNA 进行 RT-PCR。

1.2.3 IFN- γ 检测

采用双抗体 ELISA 试剂盒(深圳达科为)检测上清及血浆 IFN- γ 水平。

1.2.4 CD4⁺T 细胞 DNA 提取, 亚硫酸氢盐修饰, PCR 扩增及 TA 克隆测序

CD4⁺T 细胞采用 QIAamp Mini Kit(美国 Qiagen 公司)提取 DNA, 用 S7820 化学修饰试剂盒(美国 Chemicom 公司)对 CD4⁺T 细胞 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰。采用针对 IFN- γ 基因启动子区的引物对修饰后的模板在 PCR 仪(ABI2720 型, 美国 ABI 公司)上进行扩增。PCR 引物序列参照文献^[10], 上游引物: 5'-TATAAATAAAAAATCAACATTTTACCAAAA-3' 下游引物: 5'-TTGGTAGTAATAGTTAAGAGAATTTA-3'。PCR 反应体系, 条件: 模板 DNA 2 μ l, 10 \times buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μ l, dNTP 2 μ l, 上下游引物各 0.5 μ l, 热启动 DNA 聚合酶 0.125 μ l, 去离子水 17.375 μ l, 修饰后的模板扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环。

扩增后的产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶回收试剂盒(美国 Qiagen 公司)回收目的 DNA (526 bp)。回收的 DNA 采用 DNA A-Tailing Kit(日本 TaKaRa 公司)按操作说明进行 TA 克隆。每个样本挑取 15 个克隆子测序, 此操作均由南京金斯瑞公司完成。

1.2.5 RNA 提取及 RT-PCR

采用 miRNeasy Mini Kit(美国 Qiagen 公司)提取 CD4⁺T 细胞 RNA 后用 PrimeScript RT reagent Kit(日本 TaKaRa 公司)逆转录合成 cDNA, 以 SYBR Premix Ex TaqTM II 为荧光染料, β -actin 基因为内参照, 进行 IFN- γ 基因实时荧光定量 PCR 检测(ABI 7500 型)。PCR 引物序列参照文献^[2], 上游引物: 5'-GCAGGTCATTCAGATGTAGCGG-3' 下游引物: 5'-TGTCTTCCTTGATGGTCTCCACAC-3'。PCR 反应体系, 条件: 模板 cDNA 2 μ l, SYBR II 10 μ l, 上下游引物各 1.0 μ l, 去离子水 6 μ l, 修饰后的模板扩增程序如下: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s 1 个循环, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 40 个循环, 64 $^{\circ}$ C 延伸 34 s。根据 Ct 值按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算公式进行相对定量。

1.2.6 测序分析

采用生物信息学软件(Chromas Version 1.45)分析测序结果。IFN- γ 基因启动子甲基化率=(启动子区甲基化的 CpG 个数/启动子区总 CpG 个数) \times 100%。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS16.0 进行分析。正态分布数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间 IFN- γ 水平比

较采用独立样本 *t* 检验, 组间甲基化率比较采用 Fisher's 确切概率法, 相关性分析采用 Spearman 等级相关。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组与对照组间 IFN- γ 水平比较

肺癌组的血浆 IFN- γ 水平为 (69.30 \pm 38.56) pg/ml, 显著低于对照组 (92.62 \pm 34.75) pg/ml, 差异具有统计学意义 ($P = 0.017$)。

2.2 肺癌组与对照组间 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子甲基化水平差异

两组中各选取了 8 例样本, 免疫磁珠分选外周血中 CD4⁺T 细胞, 提取 DNA 后进行亚硫酸氢盐修饰, 修饰后 DNA 模板进行 IFN- γ PCR 扩增, 扩增产物进行 TA 克隆测序。采用 CpG 对甲基化率来评估启动子甲基化水平。IFN- γ 基因启动子区包含 6 个 CpG 位点分析 (-295、-186、-54、+122、+128、+171)。

结果显示, 肺癌组与对照组的总甲基化率分别为 84.6%、68.6%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。与对照组相比, 肺癌组 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子部位 6 个位点均呈现高甲基化。将 6 个 CpG 位点甲基化百分率进行比较, 结果如图 1 所示, 肺癌组各个位点甲基化率均高于对照组 (75.8%~90.8% vs 63.0%~75.0%), 除 -295 以外, 其余 5 个位点差异均具有统计学意义。

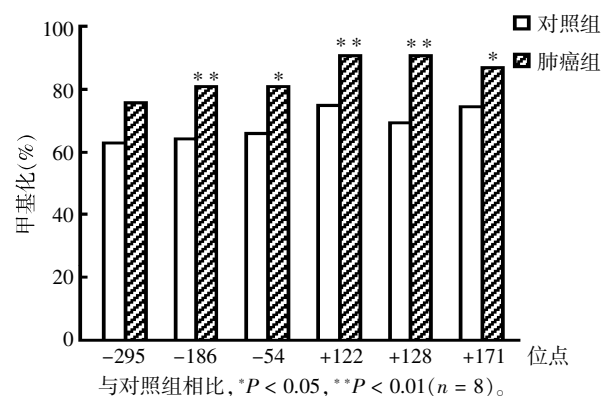


图 1 肺癌组与对照组 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子 6 个位点甲基化率比较

Figure 1 The comparison of percentage methylation of 6 CpG sites in the IFN- γ promoter of CD4⁺T cells between lung cancer patients and healthy controls

2.3 肺癌组血浆 IFN- γ 水平与该基因启动子甲基化之间的关系

肺癌组血浆 IFN- γ 水平与该基因启动子总甲基化率之间的相关性分析显示, 血浆 IFN- γ 水平与该基

因启动子总甲基化率之间呈负相关性 ($r = -0.8503$, $P = 0.0107$), 即 IFN- γ 基因启动子甲基化率越高, 血浆 IFN- γ 水平越低, 两者的相关性具有统计学意义(图 2)。

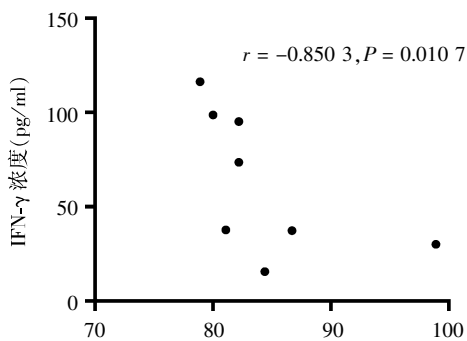


图 2 肺癌组血浆 IFN- γ 水平与 CD4⁺T 细胞中 IFN- γ 启动子甲基化相关性

Figure 2 Correlation between the percentage of methylation and the IFN- γ concentration in the lung cancer patient

2.4 Transwell 共培养实验 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 表达差异

培养 5 d 后收集两组 CD4⁺T 细胞, 在 anti-CD3、anti-CD28 刺激 6、24 h 后, 实验组 CD4⁺T 细胞与对照组相比, 其上清 IFN- γ 表达水平均明显下降, 6 h: (14.53 \pm 7.12) pg/ml vs (36.14 \pm 23.51) pg/ml; 24 h: (7.81 \pm 4.02) pg/ml vs (24.85 \pm 15.58) pg/ml。RT-PCR 结果显示对照组中 CD4⁺T 细胞的 IFN- γ 基因 mRNA 在 6 h 时表达量为实验组的 2.37 倍, 24 h 时表达量为 1.86 倍(图 3)。

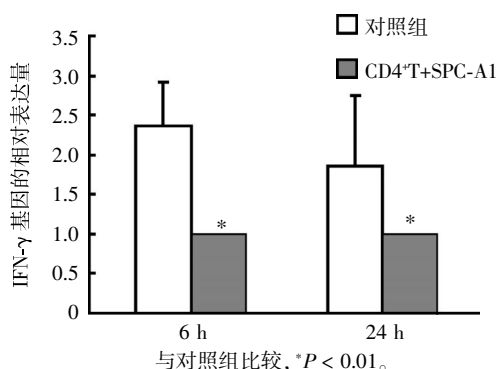


图 3 Transwell 共培养实验中 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 表达差异
Figure 3 The comparison of expression of IFN- γ between CD4⁺T cell cultured with SPC-A1 group and control group

2.5 Transwell 共培养实验 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子甲基化水平差异

对培养 5 d 后收集的两组 CD4⁺T 细胞 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰, IFN- γ PCR 扩增产物进行 TA 克隆测序分析。结果显示, CD4⁺T 细胞与 SPC-A1 共

培养组总甲基化率与对照组的总甲基化率分别为 85.4%、70.9%, 具有显著统计学差异 ($P < 0.001$)。实验中 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子 6 个 CpG 位点均呈现高甲基化。将 6 个 CpG 位点甲基化率进行比较, 结果如图 4 所示, CD4⁺T 细胞与 SPC-A1 共培养组各个位点甲基化率均高于对照组 (80.0%~95.5% vs 64.4%~78.9%), 除 +122 以外, 其余 5 个位点差异均具有统计学意义。此处有统计学意义的 5 个位点与肺癌组有差异, 分析其原因, 主要由于体内实验与体外实验有别所致, 体外 Transwell 共培养实验是肺癌细胞与 CD4⁺T 细胞一对一的培养, 而肺癌患者体内的肺癌细胞生长不仅受到 CD4⁺T 细胞影响, 而且还受体内其他多种因素影响。

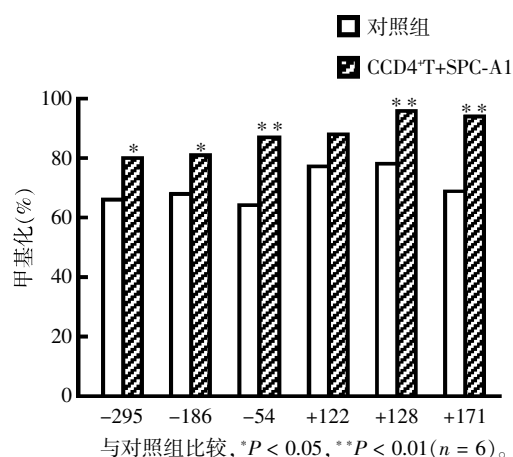


图 4 Transwell 共培养实验 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子 6 个 CpG 位点甲基化率比较

Figure 4 The comparison of percentage methylation of 6 CpG sites in the IFN- γ gene promoter between CD4⁺T cell cultured with SPC-A1 group and control group

3 讨论

近年来的研究显示, IFN- γ 在肿瘤的细胞免疫中发挥着重要作用, IFN- γ 能够直接或间接抑制肿瘤生长, 介导免疫系统对肿瘤细胞的清除^[11]。本研究检测了肺癌患者与健康人血浆 IFN- γ 水平, 结果与报道相符。由于 CD4⁺T 细胞是分泌 IFN- γ 的主要免疫细胞, 因此本文推测肺癌患者外周血 IFN- γ 下降可能与 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因的表达下调有关。DNA 甲基化是基因表观遗传学修饰方式之一, 与基因的表达密切相关。甲基化影响基因表达的机制之一是甲基化 CpG 结构直接影响转录因子(TF)与启动子区域结合, 从而抑制转录^[12]。本研究结果显示肺癌组 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子部位呈现高甲基化。无论其总甲基化百分率或是各个位点的甲基

化百分率均显著高于健康对照组(-295、-186、-54、+122、+128、+171)。其中,-186、-54 是转录因子结合位点,而+122、+128 是靠近转录的起始位点^[8]。进一步分析揭示肺癌组血浆 IFN- γ 水平与基因启动子甲基化百分率为负相关性($r = -0.8503, P = 0.0107$),即 IFN- γ 表达下调与该基因启动子的高甲基化密切相关。

到目前为止尚无证据表明肺癌细胞可直接作用于 CD4⁺T 细胞使其 IFN- γ 表达降低。本研究通过体外 Transwell 共培养实验进行了进一步探索。结果显示健康人的 CD4⁺T 细胞在肺腺癌细胞影响下,IFN- γ 基因启动子发生高甲基化改变,且 IFN- γ 表达水平下调。研究结果提示肿瘤微环境确实存在小分子物质(可通过 0.4 μm 微孔),可参与诱导 IFN- γ 基因启动子发生高甲基化改变。有研究表明 DNA 甲基化的发生与 DNA 甲基化转移酶密切相关^[13],因而推测这些物质可能通过刺激活化 DNA 甲基化转移酶使 IFN- γ 启动子部位发生高甲基化,从而调控 IFN- γ 表达。该假说有待进一步的研究来证实。体外 Transwell 共培养实验结果也进一步佐证了肺癌患者 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子高甲基化及其表达水平存在相关性。肺癌患者 CD4⁺T 细胞 IFN- γ 基因启动子区域的高甲基化可能通过影响 TF 与 IFN- γ 基因启动子区域结合,阻碍 IFN- γ mRNA 表达,导致机体 IFN- γ 水平低下,机体的细胞因子网络失衡,从而使 MHC I 类分子递呈肿瘤抗原的能力减弱,有利于肿瘤细胞的免疫逃逸。

本课题组前期研究结果表明肺癌抑癌基因的低表达是由于抑癌基因启动子高甲基化造成的,去甲基化药物有助于恢复抑癌基因的表达^[14-15]。此研究提高了抗肿瘤治疗的针对性。针对 IFN- γ 基因在肺癌患者的高甲基化情况,同样可以考虑通过去甲基化药物使 IFN- γ 表达水平升高,从而增强机体的抗肿瘤细胞免疫作用。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J. Cancer statistics. 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(2): 277-300
- [2] Janson PC, Marits P, Thörn M, et al. CpG Methylation of the IFNG gene as a Mechanism to induce immunosuppression in tumor-infiltrating lymphocytes [J]. J Immunol, 2008, 181(14): 2878-2886
- [3] Li Z, Pradera F, Kammertoens T, et al. Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN- γ -dependent tumor rejection [J]. J Immunol, 2007, 179(3): 1568-1576
- [4] Alshaker HA, Matalka KZ. IFN- γ , IL-17 and TGF- β involvement in shaping the tumor microenvironment; The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors [J]. Cancer Cell Int, 2011, 11(1): 33-43
- [5] Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- γ in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(19): 6118-6124
- [6] du Pre' SA, Redelman D, Hunter KW Jr. Microenvironment of the murine mammary carcinoma 4T1; Endogenous IFN- γ affects tumor phenotype, growth, and metastasis [J]. Exp Mol Pathol, 2008, 85(3): 174-178
- [7] Dong J, Ivascu C, Chang HD et al. IL-10 is excluded from the functional cytokine memory of human CD4⁺ memory T lymphocytes [J]. J Immunol, 2007, 179(4): 2389-2396
- [8] Kwon NH, Kim JS, Lee JY, et al. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN- γ promoter genes in patients with bronchial asthma [J]. J Clin Immunol, 2008, 28(2): 139-146
- [9] Yano S, Ghosh P, Kusaba H, et al. Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population [J]. J Immunol, 2003, 171(5): 2510-2516
- [10] White GP, Watt PM, Holt BJ, et al. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO⁺ T cells [J]. J Immunol, 2002, 168(6): 2820-2827
- [11] Miller CH, Maher SG, Young HA. Clinical use of interferon- γ [J]. Ann NY Acad Sci, 2009, 1182(1): 69-79
- [12] Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, et al. Interactions of host IL-6 and IFN- γ and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression [J]. Cancer Immunol Immunother, 2008, 57(7): 1091-1104
- [13] Jones B, Chen J. Inhibition of IFN- γ transcription by site-specific methylation during T helper cell development [J]. EMBO J, 2006, 25(11): 2443-2452
- [14] Pan S, Zhang L, Gao L, et al. The property of methylated APC gene promoter and its influence on lung cancer cell line [J]. Biomed Pharmacother, 2009, 63(7): 463-468
- [15] 张丽霞, 潘世扬, 陈丹, 等. 肺癌细胞株 APC 基因启动子对其转录的影响 [J]. 癌症杂志, 2007, 26(6): 576-580

[收稿日期] 2011-12-22