

PTC-209 靶向抑制 Bmi1 对人舌鳞癌细胞的体外抗癌作用

王琼^{1,2}, 吴亚平¹, 黄蓉¹, 程杰², 杨建荣², 王琰玲^{1*}, 李中武^{1*}

(¹南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学口腔医学研究所, 南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测 Bmi1(B lymphoma Mo-MLV insertion region 1)小分子化学抑制剂 PTC-209 对人舌鳞癌细胞中 Bmi1 表达的抑制作用,并探讨其对体外人舌鳞癌细胞生物表型的影响。方法:对人舌鳞癌细胞系 Cal27 予以 PTC-209 处理,通过蛋白质免疫印迹、实时定量逆转录聚合酶链反应检测 PTC-209 干预后细胞内 Bmi1 的表达变化;通过 MTT、Transwell、划痕试验等分析 PTC-209 处理对人舌鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响;应用克隆形成、肿瘤球培养、流式分选等实验分析 PTC-209 对人舌鳞癌细胞系中肿瘤干细胞亚群的影响。结果:PTC-209 能显著下调人舌鳞癌细胞中 Bmi1 的表达,并具有浓度和时间依赖效应 ($P < 0.05$);PTC-209 体外干预可明显抑制细胞增殖、侵袭和迁移能力,增强细胞对顺铂和 5-FU 的药物敏感性;PTC-209 能显著降低细胞克隆形成率、肿瘤球形成以及 ALDH⁺亚群细胞比例。结论:PTC-209 能在体外抑制人舌鳞癌细胞中 Bmi1 的表达,具有抑制细胞增殖、侵袭迁移和降低肿瘤干细胞亚群比例等抗肿瘤效应。

[关键词] 人舌鳞状细胞癌;Bmi1;PTC-209

[中图分类号] R739.91

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-836-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20170710

Therapeutic targeting of Bmi1 with PTC-209 in tongue squamous cell carcinoma *in vitro*

Wang Qiong^{1,2}, Wu Yaping², Huang Rong¹, Cheng Jie², Yang Jianrong², Wang Yanling^{1*}, Li Zhongwu^{2*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** In the present study, we aimed to investigate the small-molecule B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (Bmi1) inhibitor, PTC-209, for its effects on endogenous Bmi1 expression and cell behaviors in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) cell line *in vitro*. **Methods:** The TSCC cell line Cal27 was treated with PTC-209 *in vitro*, and the expression change of Bmi1 was detected by Western blotting and real-time RT-PCR assays. The changes of cell proliferation, invasion and migration were analyzed by MTT, transwell and wound-healing assay, respectively. The cancer stem cell (CSC) subpopulations in Cal27 were further assayed by tumorsphere formation, colony-forming and flow cytometry assays. **Results:** Bmi1 mRNA and protein levels were significantly decreased in Cal27 cells treated with PTC-209 in both dose- and time-dependent manners ($P < 0.05$). PTC-209 inhibited cell proliferation, migration and invasion, and had synergic anti-cancer effects when combined with cisplatin and 5-FU. Moreover, colony formation, sphere formation, and ALDH⁺ subpopulation were significantly reduced upon PTC-209 exposure. **Conclusion:** PTC-209 treatment induces Bmi1 reduction in TSCC cell line *in vitro*, and shows potent anti-tumor activity with reduced cell proliferation, migration, invasion and CSC subpopulation.

[Key words] tongue squamous cell carcinoma; Bmi1; PTC-209

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07): 836-841]

[基金项目] 国家自然科学基金(81602386, 81602378); 江苏省自然科学基金(BK20161024)

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: wy11280@163.com; 953212797@qq.com

人舌鳞状细胞癌是全身最为常见的恶性实体肿瘤之一,具有局部侵袭、颈淋巴结转移等恶性生物学特征,患者 5 年生存率仅为 60%左右^[1]。Bmi1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1) 是多梳基因家族 (polycomb group genes, PcGs) 的核心成员,主要通过改变染色质结构来调控基因的表达 (常为抑制基因的转录),从而参与调控细胞增殖、凋亡、衰老和肿瘤生成等过程^[2-4]。另外, Bmi1 是正常组织干细胞和肿瘤干细胞自我更新与分化调控的关键分子之一^[2,5]。研究发现 Bmi1 在多种人类恶性肿瘤中呈异常高表达,与肿瘤的发生、发展及患者的不良预后密切相关,是肿瘤新的分子标志物和潜在治疗靶点^[6-8]。本课题组前期研究已揭示 Bmi1 在舌鳞状细胞癌组织中呈异常高表达,与颈淋巴结转移和患者总体生存率低相关^[9]; Bmi1 基因沉默可显著抑制舌鳞癌细胞的增殖、侵袭和迁移等生物学表型^[10-11]。值得一提的是, PTC-209 是近期发现的一种新型、高选择性 Bmi1 小分子化学抑制剂,能显著抑制结肠癌、前列腺癌肿瘤干细胞的自我更新,在移植瘤动物模型中能有效阻断结肠癌、前列腺癌和肺腺癌的生长,具有临床转化潜力^[12-14]。但 PTC-209 对人舌鳞癌细胞中 Bmi1 的表达及其对细胞表型的影响尚未见有报道。本研究旨在探讨 PTC-209 对人舌鳞癌细胞中 Bmi1 的表达及对人舌鳞癌细胞生物表型的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人舌鳞癌细胞系 Cal27 购自美国 ATCC, 于南京医科大学口腔医学研究所保存。培养液为 DMEM/F12 (Gibco 公司, 美国), 含 10% 胎牛血清 (FBS, Hyclone 公司, 美国)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青、链霉素。培养条件为 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱。0.25% 胰酶消化液 (Gibco 公司, 美国); PTC-209 (MedChem Express 公司, 美国) 以 10 mg/mL 浓度溶于 DMSO (Sigma 公司, 美国) 后分装保存备用, 使用前以含 10% FBS 的培养基稀释至需要浓度; 兔抗 Bmi-1 (1:1 000 稀释, CST 公司, 美国), 兔抗 GAPDH (1:1 000 稀释, Santa Cruz 公司, 美国); TRIzol (Invitrogen 公司, 美国), Prime Script RT reagent Kit、SYBR Premix (宝生物公司, 大连)。其余试剂均是化学纯级。

1.2 方法

1.2.1 MTT 实验

细胞以 3 000 个/孔接种于 96 孔板 (体积 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 每组设置 6 个复孔; 实验组细胞贴壁后加入

PTC-209 (对照组加入等浓度的 DMSO), 经孵箱培养 24 h 后加入 20 μL MTT (5 mg/mL) 溶液终止培养。应用微孔板分光光度计 (Spectramax 公司, 美国) 常规检测孔板中各孔 490 nm 吸光度值。

1.2.2 细胞迁移、侵袭实验

采用孔板底部划痕法进行细胞迁移实验; 采用 Transwell 小室法进行细胞侵袭实验。

1.2.3 细胞流式检测

采用试剂盒 ALDEFLUOR (StemCell Technologies 公司, 加拿大) 按照说明书步骤进行人舌鳞癌细胞中 ALDH⁺ 细胞比例的流式检测。

1.2.4 平板克隆实验

将细胞悬液 (1 000 个/ mL) 接种于培养皿中常规培养, 定期镜下观察。当培养皿中出现明显细胞克隆时终止培养。4% 多聚甲醛固定, 加入结晶紫染色后显微镜下拍照, 计数 >30 个细胞的克隆数, 计算克隆形成率, 克隆形成率 (%) = 克隆数 / 接种细胞数 \times 100%。

1.2.5 肿瘤细胞体外成球实验

取单细胞悬液 (1 000 个/ mL) 接种于超低黏附培养板 (Corning 公司, 美国) 中, 加入含 N_2 、 B_{27} 添加物、表皮生长因子 (EGF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、成纤维细胞生长因子 (FGF, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的无血清培养基进行培养。培养 7~10 d 左右镜下观察肿瘤细胞克隆成球情况。

1.2.6 Real-time RT-PCR

提取细胞总 RNA 逆转录为 cDNA 后进行定量 PCR 检测。应用 Primer premier 5 设计目的基因的上、下游引物, 序列如下: Bmi1, F: 5'-AAATGCTGG-AGAAGTGGAAAG-3', R: 5'-CTGTGGATGAGGAGACTGC-3'; ALDH1, F: 5'-CCGCTCGAGATGTCATCC-TCAGGCACGCCAGACTT-3', R: 5'-ACGCGTCGACTTATGAGTTCTTCTGAGAGATTTTC-3'; SOX2, F: 5'-CCCCCGCGGCAATAGCA-3', R: 5'-TCGGCGCCGGGAGATACAT-3'; OCT4, F: 5'-ATTGAGCCAAACGACCATCT-3', R: 5'-TCTCACTCGGTTCTCGATACTG-3'; 内参 GAPDH, F: 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTC-3', R: 5'-CCATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'。

1.2.7 Western blot 实验

应用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液水浴煮沸, 分装后 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱储存备用。蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离后常规湿转法转移蛋白至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后一抗封闭过夜。次日复温后 TBST 洗膜、二抗孵育、TBST 再次洗涤后加入化学发光液, 凝胶电泳成像系统进行图像采集。

1.3 统计学方法

实验数据均以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。应用SPSS19.0软件进行数据统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),再用LSD检验进行两两比较。 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PTC-209 抑制人舌鳞癌细胞中 Bmi1 的表达

应用不同浓度 PTC-209 作用于 Cal27 细胞 48 h 后收集蛋白进行 Western blot 检测, 结果发现 PTC-209 能显著抑制细胞中 Bmi1 蛋白的表达水平, 在浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 时差异显著, 且随药物浓度增加呈剂量依赖效应; 再选择 10 $\mu\text{mol/L}$ PTC-209 作用于细胞, 发现该化合物对细胞中 Bmi1 蛋白水平的抑制有时间依赖效应, 作用时间 24 h 后差异明显 ($P < 0.05$, 图 1A)。定量 RT-PCR 结果显示, 10 $\mu\text{mol/L}$ PTC-209 作用于细胞 48 h 后, 细胞中 Bmi1 mRNA 表达水平也出现明显下调 (图 1B)。本研究选择 PTC-209 以作用浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 和作用时间 48 h 进行后续细胞表型的研究。

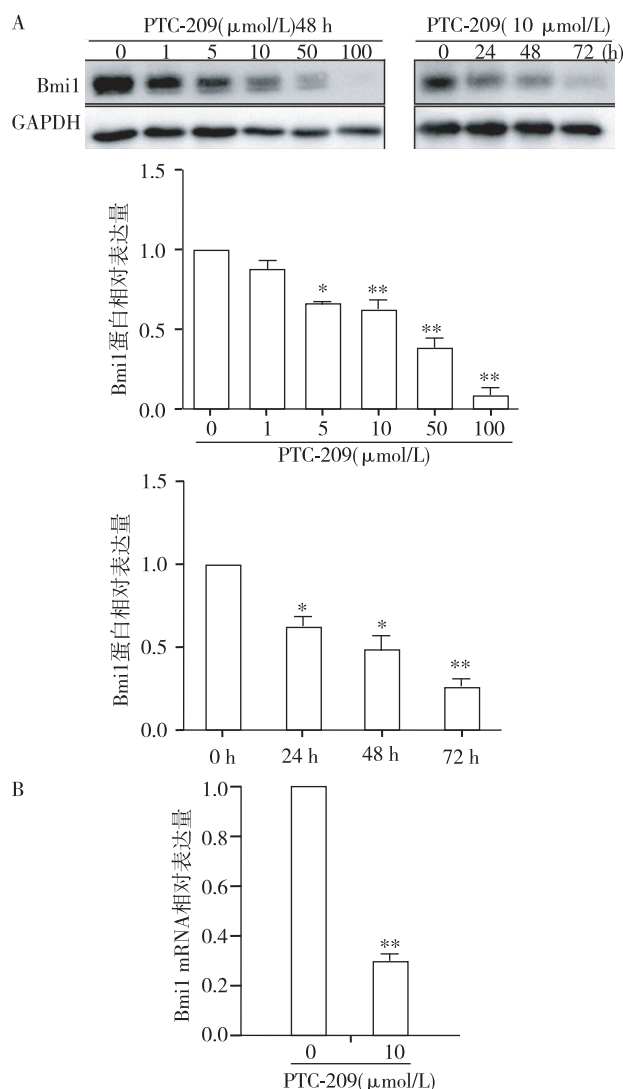
2.2 PTC-209 对人舌鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭表型的影响

首先通过 MTT 实验检测 PTC-209 对人舌鳞癌细胞增殖的影响, 结果表明: PTC-209 处理细胞 24 h 后吸光度值低于对照组 ($P < 0.01$), 随 PTC-209 作用浓度的提高, 吸光度值逐渐降低 (图 2)。划痕实验和 Transwell 侵袭实验结果显示, PTC-209 干预后细胞迁移和侵袭能力显著降低 (图 3、4)。

为了揭示 PTC-209 干预是否能增加人舌鳞癌对化疗药物的敏感性, 设计了单药干预和联合用药体外细胞干预实验, 分别为对照组 (CN)、PTC-209、顺铂、5-FU、PTC-209+顺铂、PTC-209+5-FU 干预组。结果显示, 24 h 和 48 h 后联合用药组细胞的吸光度值均显著低于单独干预组 ($P < 0.05$, 图 5)。以上提示 PTC-209 干预可增强人舌鳞癌细胞对顺铂和 5-FU 的药物敏感性。

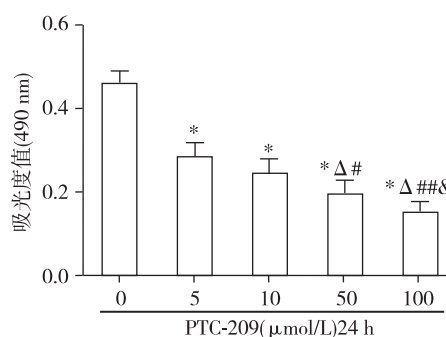
2.3 PTC-209 降低人舌鳞癌肿瘤干细胞亚群比例

既往研究结果提示 Bmi1 可能是包括人舌鳞癌在内多种肿瘤干细胞自我更新和分化的关键调控分子^[3,13]。因此, 首先采用流式分选实验检测 Cal27 细胞中 ALDH⁺标记细胞的比例, 结果发现 PTC-209 处理后 ALDH⁺细胞比例从 2.4%降低到0.3% (图 6)。体外细胞克隆形成实验发现: PTC-209 作用后细胞克隆形成率显著降低 (图 7)。肿瘤克隆成球实验发现:



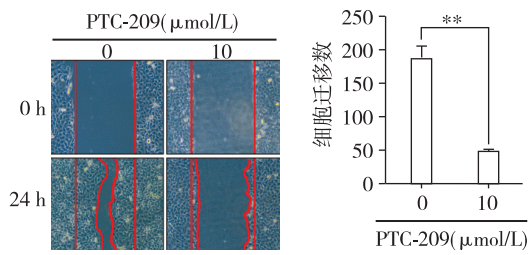
A: PTC-209 以浓度和时间梯度的方式抑制 Bmi1 蛋白水平的表达 (与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$); B: PTC-209 抑制 Bmi1 mRNA 水平的表达 (** $P < 0.01$, $n = 3$)。C: PTC-209 抑制 Bmi1 mRNA 水平的表达 (** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 1 PTC-209 抑制人舌鳞癌细胞 Cal27 Bmi1 的表达
Figure 1 Expression level of Bmi1 was decreased following PTC-209 treatment in Cal27 cells



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比, * $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比, # $P < 0.01$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比, § $P < 0.05$ 。

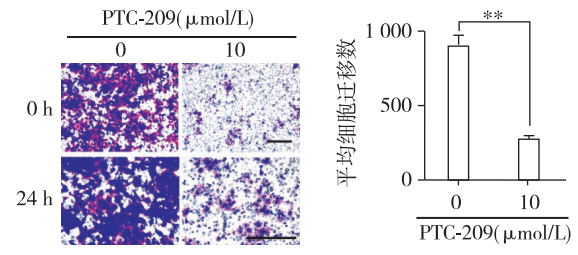
图 2 PTC-209 抑制 Cal27 增殖
Figure 2 PTC-209 inhibited cell proliferation in Cal27 cells



PTC-209 处理细胞 24 h 后划痕实验结果 (** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 3 PTC-209 抑制 Cal27 迁移

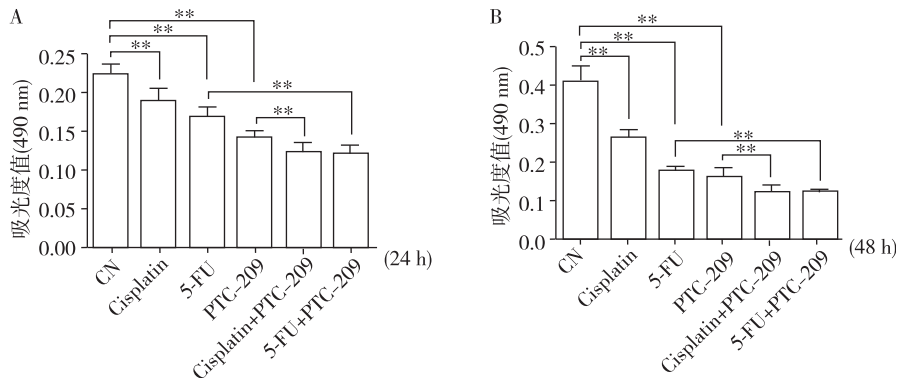
Figure 3 PTC-209 inhibited cell migration in Cal27 cells



PTC-209 处理细胞 24 h 后侵袭实验结果 (** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 4 PTC-209 抑制 Cal27 侵袭

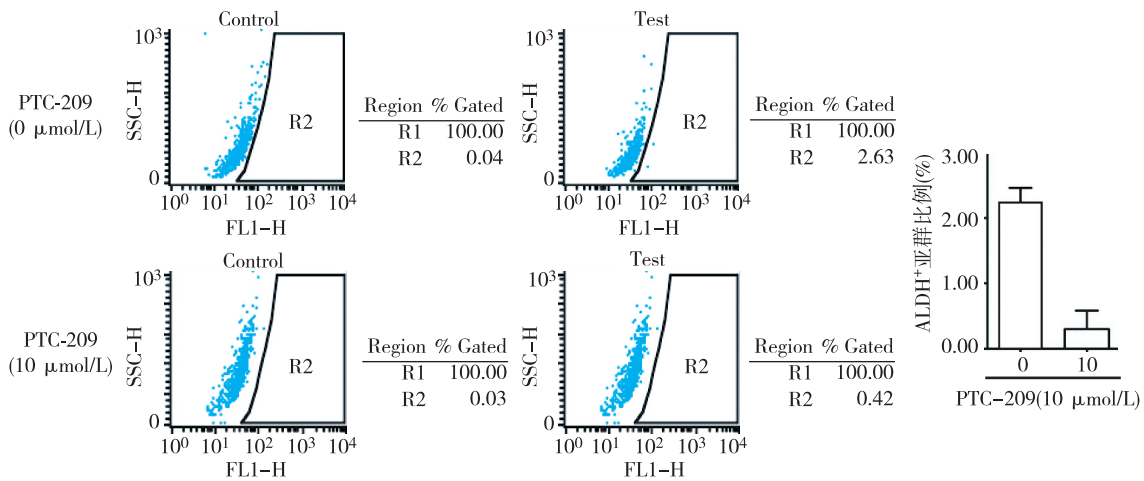
Figure 4 PTC-209 inhibited cell invasion in Cal27 cells



PTC-209 与顺铂、5-FU 联用 24 h(A)、48 h(B)后 MTT 检测吸光度值 (** $P < 0.01$, $n = 3$)。

图 5 PTC-209 对抗癌药物顺铂和 5-FU 起协同增效作用

Figure 5 PTC-209 had synergistic anti-cancer effects when combined with cisplatin and 5-FU



PTC-209 处理细胞 48 h 后流式实验测试 ALDH⁺ 细胞亚群比例 ($n = 3$)。

图 6 PTC-209 降低 Cal27 肿瘤干细胞亚群比例

Figure 6 ALDH⁺ subpopulation was significantly decreased upon PTC-209 exposure in Cal27 cells

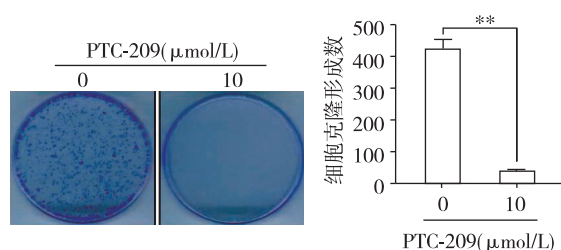
PTC-209 处理后悬浮生长的肿瘤球数量也显著少于对照组(图 8);定量 PCR 实验进一步发现:肿瘤干细胞干性调控相关标记分子 ALDH1、SOX2、OCT4 和 Nanog 的表达也明显下调(图 9)。

3 讨论

Bmi1 作为重要癌基因参与多种恶性肿瘤的发生、发展和转移,在肿瘤中呈异常高表达,其表达水

平与肿瘤恶性生物学行为以及患者的不良预后密切相关^[8-9,11]。Bmi1 被认为是肿瘤的分子标记物之一,也是生物治疗的重要靶点,具有潜在的临床转化潜力^[10,13]。然而,到目前为止,尚未见有 PTC-209 对人舌鳞癌细胞中 Bmi1 的表达及细胞表型影响的报道。本研究主要探索了 Bmi1 特异性小分子抑制剂 PTC-209 对人舌鳞癌的体外抗肿瘤作用。

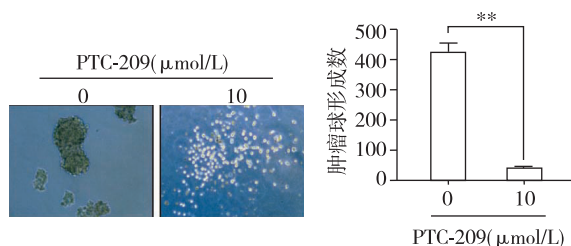
本研究发现:PTC-209 处理人舌鳞癌细胞系



PTC-209 处理细胞 7 d 后克隆形成实验结果 (** $P < 0.01, n = 3$).

图 7 PTC-209 抑制 Cal27 细胞体外克隆形成

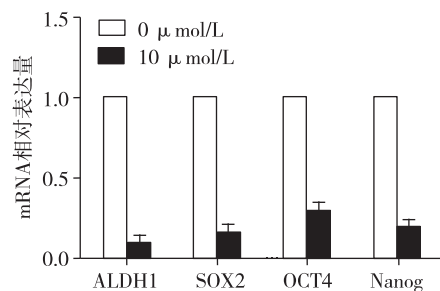
Figure 7 PTC-209 reduced colony formation in Cal27 cells



PTC-209 处理细胞 7 d 后肿瘤球形成实验结果 (** $P < 0.01, n = 3$).

图 8 PTC-209 抑制 Cal27 细胞肿瘤球形成

Figure 8 PTC-209 reduced sphere formation in Cal27 cells



PTC-209 处理 48 h 后 PCR 检测细胞干性基因表达 ($n = 3$).

图 9 PTC-209 抑制 Cal27 细胞干性调控相关标记分子表达

Figure 9 PTC-209 reduced the expression of stemness associated factors in Cal27 cells

Cal27 后细胞中 Bmi1 蛋白表达水平降低,具有时间和浓度依赖效应。这与既往研究结果类似^[12-13]。Kreso 等^[13]通过高通量筛选获得 Bmi1 抑制剂 PTC-209,其在体外能抑制人结肠癌细胞 HCT116 中 Bmi1 的表达,并呈剂量依赖效应,IC₅₀ 为 0.5 μmol/L。进一步研究发现,PTC-209 可能主要作用于 Bmi1 基因的 5' 和 3'-UTR 区,对 Bmi1 的表达起转录后调控作用^[13]。有意思的是,本研究发现 PTC-209 也能降低细胞中 Bmi1 mRNA 水平的表达,这提示 PTC-209 对 Bmi1 的调控不仅仅是在转录后水平,也可能是通过抑制其转录过程降低其胞内表达水平。PTC-209 抑制细胞中 Bmi1 的具体生化和分子机制仍有待于进一步深入研究。

后续细胞表型研究揭示 PTC-209 处理人舌鳞癌

细胞后,其增殖、迁移和侵袭能力均显著降低。Meng 等^[15]研究发现,当 shRNA 介导的 Bmi1 基因沉默后肺癌细胞的侵袭迁移能力下降,Bmi1 能够通过调控下游基因 (P16、P14 和 E-cadherin) 的表达进而调节细胞的侵袭迁移能力。Bmi1 也是人舌鳞癌细胞上皮间质转变过程中的关键中介分子,与肿瘤的侵袭转移密切相关^[3]。此外,本研究还发现,PTC-209 处理后细胞增殖活性下降,对顺铂和 5-FU 的药物敏感性增强。与此类似的是,Mayr 等^[12]研究发现 PTC-209 与顺铂联用对胆管癌治疗具有协同增效作用; Bolomsky 等^[16]研究发现 PTC-209 能阻碍骨髓瘤细胞的生长,与泊马度胺和卡菲米布等抗癌药物具有协同效应。这些结果提示,PTC-209 能增加肿瘤化疗药物的敏感性,与其他化疗药物联合使用时可能具有协同增效作用。

越来越多的证据表明:肿瘤干细胞是肿瘤中的一种特殊细胞亚群,与肿瘤发生、转移、复发和耐药有关^[17]。而 Bmi1 作为干性调控基因可直接参与调控肿瘤干细胞的生物学行为^[2,13,18]。Kreso 等^[13]研究发现结直肠癌肿瘤干细胞的自我更新和增殖高度依赖于 Bmi1 的表达;PTC-209 作用后引起肿瘤干细胞周期停滞、自我更新和成瘤能力降低,从而引起不可逆的损伤。本实验中,PTC-209 降低人舌鳞癌细胞的克隆形成率,抑制肿瘤球形成,降低 ALDH⁺亚群细胞的比例等。上述结果也提示,Bmi1 是人舌鳞癌肿瘤干细胞亚群调控的重要分子;PTC-209 体外干预可对人舌鳞癌中肿瘤干细胞产生抑制效应。

综上所述,PTC-209 能显著抑制人舌鳞癌细胞中 Bmi1 的表达,在体外产生多种抗肿瘤效应。然而,有关 PTC-209 对人舌鳞癌 Bmi1 的体内外抑制作用及机制仍有待于进一步研究与验证。

【参考文献】

- [1] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62: 220-241
- [2] Lukacs RU, Memarzadeh S, Wu H, et al. Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation [J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(6): 682-693
- [3] Yang MH, Hsu DS, Wang HW, et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(10): 982-992
- [4] Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer [J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(3): 299-313

- [5] Yadirgi G, Leinster V, Acquati S, et al. Conditional activation of Bmi1 expression regulates self-renewal, apoptosis, and differentiation of neural stem/progenitor cells in vitro and in vivo[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(4): 700-712
- [6] Zhou Y, Zhang L, Pan H, et al. Bmi1 essentially mediates podocalyxin-enhanced Cisplatin chemoresistance in oral tongue squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123208
- [7] Ferretti R, Bhutkar A, Mcnamara MC, et al. BMI1 induces an invasive signature in melanoma that promotes metastasis and chemoresistance[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(1): 18-33
- [8] Benard A, Goossens-Beumer IJ, Van Hoesel AQ, et al. Prognostic value of polycomb proteins EZH2, BMI1 and SUZ12 and histone modification H3K27me3 in colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108265
- [9] 魏子程, 张 玮, 陈 胜, 等. Bmi-1 在舌鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *实用口腔医学杂志*, 2013, 29(5): 660-663
- [10] 汪 瀚, 李中武, 朱玉敏, 等. Bmi1 基因沉默对人舌鳞癌细胞生物学功能的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(1): 39-45
- [11] Li Z, Wang Y, Yuan C, et al. Oncogenic roles of Bmi1 and its therapeutic inhibition by histone deacetylase inhibitor in tongue cancer[J]. *Lab Invest*, 2014, 94(12): 1431-1445
- [12] Mayr C, Wagner A, Loeffelberger M, et al. The BMI1 inhibitor PTC-209 is a potential compound to halt cellular growth in biliary tract cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1): 745-758
- [13] Kreso A, Van Galen P, Pedley NM, et al. Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer[J]. *Nat Med*, 2014, 20(1): 29-36
- [14] Yong KJ, Basseres DS, Welner RS, et al. Targeted BMI1 inhibition impairs tumor growth in lung adenocarcinomas with low CEBP α expression[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(350): 350ra104
- [15] Meng X, Wang Y, Zheng X, et al. shRNA-mediated knockdown of Bmi-1 inhibit lung adenocarcinoma cell migration and metastasis[J]. *Lung Cancer*, 2012, 77(1): 24-30
- [16] Bolonsky A, Schlangen K, Schreiner W, et al. Targeting of BMI-1 with PTC-209 shows potent anti-myeloma activity and impairs the tumour microenvironment[J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 17
- [17] Wicha MS. Targeting self-renewal, an Achilles' heel of cancer stem cells[J]. *Nat Med*, 2014, 20(1): 14-15
- [18] Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(3): 372-378
- [收稿日期] 2016-10-20

(上接第 803 页)

- synthesis of type I collagen [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(3): 825-832
- [12] Ji Y, Dou YN, Zhao QW, et al. Paeoniflorin suppresses TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(6): 794-804
- [13] Martin MD, Chung JH, Kanne JP. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Thorac Imaging*, 2016, 31(3): 127-139
- [14] Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(7): 1339-1350
- [15] Smith RE, Strieter RM, Phan SH, et al. C-C chemokines: novel mediators of the profibrotic inflammatory response to bleomycin challenge[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 15(6): 693-702
- [16] Gasse P, Mary C, Guenon I, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12): 3786-3799
- [17] Hosseini N, Cho Y, Lockey RF, et al. The role of the NLRP3 inflammasome in pulmonary diseases[J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2015, 9(4): 188-197
- [18] Rastrick J, Birrell M. The role of the inflammasome in fibrotic respiratory diseases [J]. *Minerva Med*, 2014, 105(1): 9-23
- [19] Sayan M, Mossman BT. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13(1): 51
- [20] Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, et al. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung[J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(3): 910-918
- [21] Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(4): 333-342
- [22] King TE, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22): 2083-2092
- [23] Chambers DC. Nintedanib for idiopathic pulmonary fibrosis: An Asian perspective[J]. *Respirology*, 2016, 21(8): 1342-1343
- [24] Rogliani P, Calzetta L, Cavalli F, et al. Pirfenidone, nintedanib and N-acetylcysteine for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2016, 40: 95-103
- [收稿日期] 2016-11-08