

· 基础研究 ·

PDE4D在哮喘患儿和哮喘模型的表达差异

张秀青,于春琳,刘峰,赵德育*

南京医科大学附属儿童医院呼吸科,江苏 南京 210008

[摘要] 目的:筛选哮喘相关候选基因,并在人群和动物水平验证。方法:从高通量基因表达数据库(gene expression omnibus, GEO)搜索哮喘痰相关基因芯片数据,利用GEO 2R筛选表达差异基因,并参考全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)筛选哮喘相关基因,收集哮喘患儿及同期健康儿童痰标本,构建小鼠哮喘模型、大鼠肥大细胞株(RBL-2H3)哮喘模型,应用RT-PCR进行验证。结果:共纳入2套哮喘痰基因芯片数据,选出有交集的差异表达基因190个,结合GWAS最终筛选出哮喘相关基因磷酸二酯酶4D(PDE4D)。进一步验证PDE4D在哮喘患儿痰样本中表达上调($P < 0.05$),但在哮喘小鼠模型整个肺组织中表达下调($P < 0.05$),而在致敏的RBL-2H3细胞中表达上调($P < 0.05$)。结论:PDE4D在人群、哮喘小鼠及肥大细胞中存在差异表达,可能作为肥大细胞参与哮喘发展的研究靶点。

[关键词] PDE4D;哮喘;GEO;GWAS;肥大细胞

[中图分类号] R725.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)11-1561-06

doi:10.7655/NYDXBNS20191102

Expression differences of PDE4D in asthmatic children and asthmatic models

Zhang Xiuqing, Yu Chunlin, Liu Feng, Zhao Deyu*

Department of Respiration, Nanjing Children's Hospital Affiliated of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to screen for asthma-related candidate genes and validate at the population and animal levels to explore the pathogenesis of asthma. **Methods:** The asthma-related sputum chip was searched from Gene Expression Omnibus (GEO), the differentially expressed genes were screened by GEO 2R, and the asthma-related genes were screened by reference to the whole gene association analysis (GWAS). Asthmatic children and healthy children's sputum specimens were collected. Mouse asthma model construct and rat mast cell strain (RBL-2H3) asthma model were constructed, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for differential expression verification. **Results:** Two sets of asthmatic gene chip data were included, and 190 differentially expressed genes with crossovers were selected. GWAS was used to finally screen out the asthma-related gene PDE4D. It was further verified that the expression of PDE4D was increased in the sputum samples of asthmatic children ($P < 0.05$), and decreased in the whole lung tissue of the asthma mouse model ($P < 0.05$), but up-regulated in the sensitized RBL-2H3 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** PDE4D is differentially expressed in human, asthmatic mice and mast cells, which may serve as a research target for mast cells to participate in the development of asthma.

[Key words] PDE4D; asthma; GEO; GWAS; mast cells

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(11): 1561-1566]

[基金项目] 江苏省青年医学人才项目(QNRC2016087);南京市科委(社发)(201723003);南京市卫计委重点项目(ZKX18041)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhaodeyu988@126.com

哮喘是由多种细胞及细胞组分参与的慢性气道炎症,常伴有气道高反应性,高浓度IgE,导致反复发作的喘息、气促、胸闷和(或)咳嗽等症状。其中肥大细胞通过浸润及膜上与特异性IgE结合的IgE高亲和力受体(FcεRI)交联而活化,随后分泌多

种介质,参与过敏性哮喘的气道炎症及重塑。全球目前约有3亿人患有哮喘,每年导致25万人死亡^[1],目前针对哮喘的治疗方法并不令人满意,可用于预防哮喘的方法并不理想,因此进一步研究哮喘的发病机制,对未来的哮喘治疗至关重要。

高通量基因表达数据库(gene expression omnibus, GEO)是一个国际公共数据库,接收高通量基因表达和其他功能基因组数据集,包括检查基因组甲基化,染色质结构和基因组-蛋白质相互作用数据。该数据库不仅支持数据访问,还提供多种数据分析工具^[2]。利用基因芯片技术和生物信息学分析技术在分子水平进行数据挖掘,为研究疾病分子机制提供依据^[3-4]。全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)是指在全基因组层面上,开展多中心、大样本、反复验证的基因与疾病的关联研究,是通过对大规模的群体DNA样本进行全基因组高密度遗传标记分型,将基因多态性与特定的表型联系起来。目前已有大型的国际哮喘GWAS协作,且已筛选了一些特定种群共有遗传风险因子^[5]。

本研究基于GEO芯片数据库中哮喘痰基因芯片数据及已有哮喘相关GWAS数据,对哮喘患者痰中差异基因进行筛选及验证。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠肥大细胞株RBL-2H3(上海生命科学研究院细胞资源中心),哮喘患儿及非哮喘儿童痰样本(南京医科大学附属儿童医院),BALB/c小鼠(南京医科大学动物实验中心),DMEM高糖培养基和胎牛血清(Gibco公司,美国),TRIzol试剂(ThermoFisher公司,美国),逆转录试剂盒和SYBR Green预混液(Vazyme公司,中国),抗DNP IgE、DNP-HSA(Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 GEO芯片数据差异表达基因筛选

登陆GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)下载哮喘芯片数据。数据集入选条件:①数据集来自全基因组RNA表达芯片;②样品为人类哮喘和正常对照痰样。在GEO利用GEO 2R进行芯片数据分析,获得差异表达基因。

1.2.2 痰样本采集

用雾化蒸汽吸入法采集哮喘患儿及同期健康儿童痰样本,分为哮喘组和对照组。首先,测定受试者第1秒用力呼气量(FEV1)和肺活量(VC),以确

定气道受限程度,吸入 β_2 受体激动剂,以预防诱导过程中产生支气管收缩。20 min后再测定FEV1,若FEV1下降大于预计值的20%或受试者出现了不适,应立即停止;反之,可继续吸入高渗性氯化钠溶液(3%~5%),并让受试者清理鼻涕、漱口后留取痰液。

1.2.3 卵清蛋白(optical variable attenuator, OVA)哮喘小鼠模型构建

BALB/c小鼠20只,6~8周,体重18~22 g。随机分为对照组10只和OVA组10只。用雾化机对小鼠进行雾化,雾化颗粒的平均直径约为4 μm 。对照组在第0天及第14天腹腔注射200 μL PBS,从第25天开始雾化吸入4 mL PBS,雾化每次30 min,连续4 d,1次/d。OVA组在第0天及第14天腹腔注射200 μL OVA致敏液,从第25天开始雾化吸入PBS配置的1% OVA溶液4 mL,雾化每次30 min,连续4 d,1次/d。

1.2.4 肺泡灌洗及取肺组织

在最后1次雾化吸入24 h内对所有小鼠进行麻醉,行肺泡灌洗,肺泡灌洗液(BALF)细胞计数,取肺组织制备病理切片,观察光镜下支气管及肺组织的病理变化。小鼠腹腔注射水合氯醛麻醉,充分暴露并游离气管,通过穿刺针缓慢注入气管内800 μL 灭菌生理盐水,反复抽吸3次,共能获得约600 μL BALF,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。充分暴露肺组织,分离双肺,左肺置于4%多聚甲醛溶液,用于制备病理切片。右肺-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存用于后续基因表达相关实验。BALF中细胞总数及嗜酸性粒细胞计数: BALF以1 200 r/min离心10 min,弃上清,用500 μL PBS重悬细胞沉淀,取100 μL 在细胞计数台测定细胞总数,取细胞悬液进行涂片,风干后用无水乙醇固定。

1.2.5 肺组织脱水包埋及切片染色

肺组织在4%多聚甲醛中固定24 h后,梯度脱水及浸蜡。取出组织块,置于石蜡包埋盒中,迅速放入冷水中,待石蜡完全凝固后取出以完成包埋。吸干蜡块的表面液体,将蜡块固定在切片机上进行切片,全部切完后将载玻片置于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内烘干。HE染色并封片,在光镜下观察制备好的染色石蜡切片,随机选择视野进行图片采集,主要观察支气管及肺组织周围炎症细胞的浸润情况。

1.2.6 细胞培养及致敏

大鼠肥大细胞株(RBL-2H3)培养于含10% FBS的EMEM完全培养液中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱,接种于6孔板中,分为2组,即对照组、IgE介导组。IgE介导组予500 ng/mL抗DNP IgE致敏过夜,对照组不予处理;第2天吸去培养基,台氏缓冲液洗涤2次

后,IgE介导组予1 000 ng/mL的DNP-HSA在37 ℃ 5% CO₂中激发6 h后收集细胞,对照组不予激发。

1.2.7 组织、细胞总RNA提取及RT-PCR反应

组织取50 mg左右研磨成粉或收细胞,加1 mL TRIzol,冰上裂解5 min,加200 μL 氯仿,震荡混匀后静置5 min,4 ℃下12 000 r/min离心15 min,收集上清液至新离心管中,加500 μL异丙醇,室温静置10 min,4 ℃下12 000 r/min离心10 min,去上清后用1 mL 75%乙醇清洗沉淀,4 ℃下7 500 r/min离心5 min,吸去上清,室温下风干后用20 μL无核酶水稀释。用超微量分光光度计检测RNA浓度,以500 ng/μL逆转。SYBR Green RT-PCR反应体系检测基因表达水平。所用引物种类及其序列见表1。相对表达量采用2^{-ΔΔC_t}法计算。

表1 引物种类及其序列

Table 1 Primer types and their sequences

基因	种属	位置	序列(5'→3')
PDE4D	人	上游	TCCTACGCGGTGGAGACC
		下游	TCAAAACGCCTGAGTCCCTG
	小鼠	上游	TGAGTAACAGTTGCAGCGAGA
		下游	CGAGATAGGGCTCCATTCCAC
	大鼠	上游	GCACCATGGAGAGGAACACT
		下游	CTTCGCAAGTCCGTTTGCTC
GAPDH	人	上游	AAGCCTGCCGGTACTAAC
		下游	GTTAAAAGCAGCCCTGGTGAC
	小鼠	上游	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC
		下游	AATCCGTTACACCCGACCTT
	大鼠	上游	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA
		下游	TGAACCTGCCGTGGGTAGAG

1.3 统计学方法

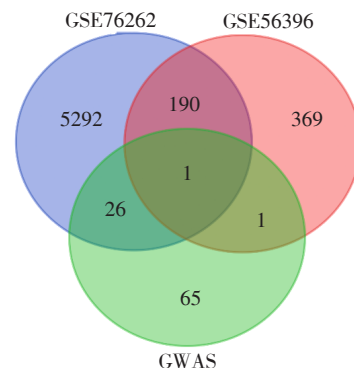
采用GraphPad Prism 5软件对相关实验数据进行统计学分析。采用单因素方差分析方法对多组实验数据进行统计学差异显著性分析,采用Dunnett's *t* 检验法对其中的组间两两数据进行统计学下差异比较分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芯片数据分析及差异基因筛选

经检索,共有2套哮喘基因芯片纳入分析(GSE76262:哮喘痰样本118例、健康对照痰样本21例;GSE56396:哮喘痰样本100例、健康对照痰样本12例)。利用GEO 2R对芯片数据进行芯片信号值预处理,筛选差异表达基因。差异基因的条件为

$P \leq 0.01$ 。2套哮喘基因芯片共得差异表达基因191个,其中仅磷酸二酯酶4D(PDE4D)为哮喘及相关表型GWAS易感基因^[6](图1)。



GSE76262 差异表达基因(蓝色),GSE56396 差异表达基因(红色),哮喘及相关表型GWAS易感基因(绿色)。

图1 基因芯片数据分析

Figure 1 Analysis of gene chip data

2.2 在人痰标本验证PDE4D的差异表达

收取临床哮喘患儿及同期健康儿童痰标本,进行RT-PCR验证,结果与芯片分析结果一致(图2),与健康对照组相比,PDE4D在哮喘组痰标本中有明显高表达趋势。

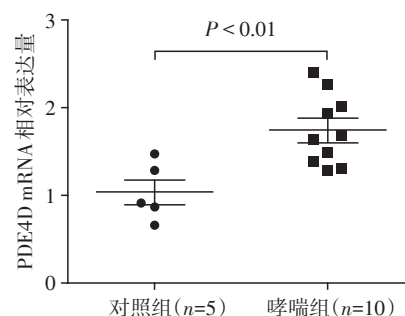


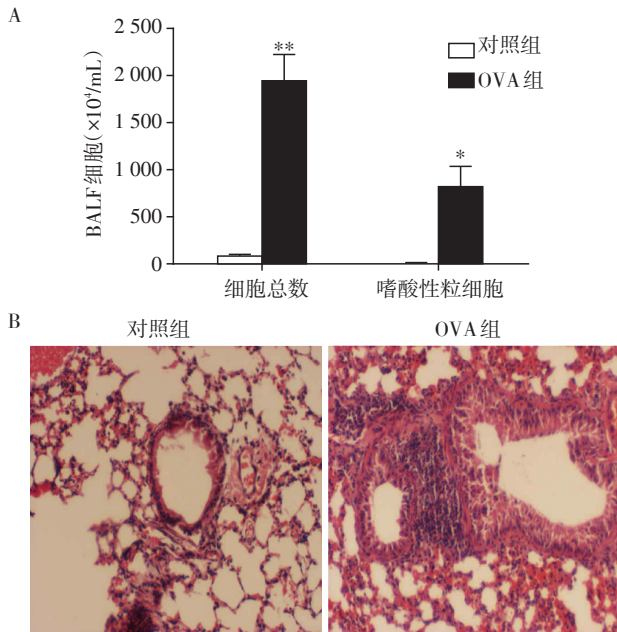
图2 RT-PCR验证PDE4D在哮喘患儿痰标本中的表达

Figure 2 The expression of PDE4D in two groups of sputum samples verified by RT-PCR

2.3 在动物组织验证PDE4D的差异表达

BALB/c小鼠经过2次OVA致敏后,在之后的雾化过程中会出现抓耳挠腮现象。在最后1次OVA雾化后24 h内进行双侧肺泡灌洗及取肺组织。BALF中细胞计数显示OVA致敏组与对照组相比,细胞总数及嗜酸性粒细胞总数的绝对值有明显上升,嗜酸性粒细胞占细胞总数的含量百分比也较对照组上调(图3A)。OVA组与对照组的病理结果显示,OVA组的肺组织及支气管周围炎性细胞如嗜酸性粒细胞浸润,较对照组明显增多(图3B)。在哮喘

造模小鼠的肺组织中,嗜酸性粒细胞及中性粒细胞浸润明显增多,而BALF中的细胞总数及嗜酸性粒细胞绝对值明显升高,证明哮喘小鼠模型造模成功。而与对照组相比,OVA组小鼠整个肺组织中PDE4D的表达明显降低(图4),提示可能在OVA小鼠肺组织中某些细胞的PDE4D呈低表达趋势。



A: 与对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=8$); B: OVA组肺组织及支气管周围炎性细胞浸润较对照明显增多(HE, $\times 200$)。

图3 构建哮喘小鼠模型

Figure 3 Construction of a mouse model for asthma

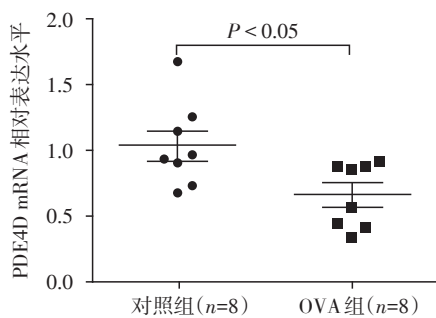


图4 RT-PCR 验证 PDE4D 在哮喘小鼠模型的表达

Figure 4 The expression of PDE4D in mouse model of asthma by RT-PCR

2.4 PDE4D 在肥大细胞中的差异表达

肥大细胞在哮喘的发生发展中发挥着重要作用,为了研究PDE4D是否在致敏肥大细胞中有差异表达。将RBL-2H3细胞致敏后,检测PDE4D的表达量,发现在致敏的RBL-2H3细胞中PDE4D表达量显著上调(图5)。这提示肥大细胞PDE4D差异表达可

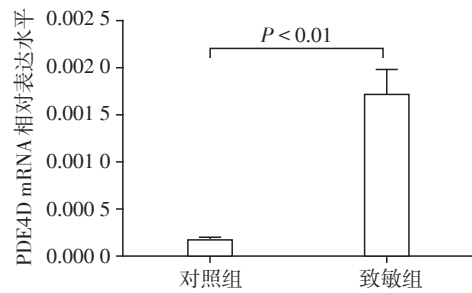


图5 RT-PCR 检测 PDE4D 在 RBL-2H3 致敏组及对照组表达

Figure 5 PDE4D expression in RBL-2H3 sensitized group and control group detected by RT-PCR

能在哮喘的发展中发挥作用。

3 讨论

哮喘是一种异质性临床综合症,由基因与环境因素综合作用引起^[7]。基于目前的研究报道,许多环境因素与哮喘相关,包括环境过度清洁^[8](卫生假说^[9])、暴露于室内^[10]、烟草烟雾^[11]、以及饮食因素^[12-13]等。但遗传因素占哮喘总风险的40%~60%^[14-15],GWAS研究已经确定了多个哮喘风险基因座,这表明在哮喘的发病机制中不是由单个基因,而是由多个基因共同参与的。

2007年进行了哮喘的第一次GWAS研究,鉴定17q21中的ORMDL3基因是儿童哮喘发病风险因子^[16]。后续有相关研究发现ORMDL3启动子区域多态性调节ORMDL3转录,从而调控TH₂型细胞因子水平^[17]。气道平滑肌中ORMDL3表达增加可诱导气道平滑肌增殖和收缩增强,从而导致哮喘患者气道高反应性增加^[18]。一项对欧洲10365例哮喘受试者和16110例对照受试者进行的大规模GWAS研究确定了哮喘的易感基因位点,包括IL1RL1/IL18R1、HLA-DQ、IL33、SMAD3、ORMDL3、GSDMB和IL2RB。其中HLA-DQ与哮喘及血清总IgE浓度有显著相关性^[19]。在一项哮喘小鼠模型实验中显示HLA-DQ可以促进BALF嗜酸性粒细胞增多,肺部炎症,及气道高反应性^[20]。Th₂相关疾病模型中IL-33是IL1RL1的配体,IL-33通过扩增TH₂型细胞,促进肥大细胞介导的过敏性炎症^[21]。

在对422例非西班牙裔白人哮喘儿童受试者进行全基因组关联分析中已将PDE4D鉴定为哮喘易感基因^[22]。相关临床研究,通过对英国哮喘家族群分析确定PDE4D多态性对哮喘中临床相关终点的贡献^[23]。PDE4D在控制气道平滑肌收缩中起关键

作用^[24-27],在PDE4D敲基因小鼠中毒蕈碱胆碱能气道反应缺失。磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)通过降解环核苷酸(cAMP)作为该途径的关键调节剂。PDE分为11个亚家族,可降解细胞溶质cAMP。已发现在人气管平滑肌细胞(ASM)中,PDE4D是参与cAMP降解的主要PDE亚型。本研究通过分析2套GEO哮喘痰基因表达芯片数据,其中共有的差异表达基因有191个,其中仅PDE4D为已有哮喘及相关表型GWAS候选位点。进一步收取临床哮喘患儿的痰标本,采用OVA致敏SPF级BALB/c小鼠,用RT-PCR技术检测在哮喘患儿的痰标本、哮喘及对照小鼠整个肺脏中PDE4D的表达变化,和前期芯片分析结果相符,哮喘患儿痰样本中PDE4D呈明显高表达趋势;但在哮喘小鼠模型的整个肺组织中PDE4D呈明显低表达趋势;而与对照组相比,在致敏的RBL-2H3肥大细胞中,PDE4D明显高表达。

综上所述,现有哮喘GWAS中已将PDE4D鉴定为哮喘易感基因,且现有相关研究已验证PDE4D在小鼠哮喘模型支气管平滑肌中高表达。本研究对2套GEO哮喘痰基因表达芯片数据分析结果显示哮喘组PDE4D的表达上调且在收取的人群痰样本中得到验证,但在哮喘小鼠模型的整个肺组织中PDE4D的表达下调。正常人痰液有少量柱状上皮细胞及中性粒细胞,哮喘患者痰液中嗜酸性粒细胞增多。因此提出,哮喘病例中PDE4D在上皮细胞及嗜酸性粒细胞中高表达,在其他部分肺脏细胞中低表达,而在致敏的肥大细胞中PDE4D明显表达上调,提示PDE4D是否通过影响肥大细胞而参与哮喘的发展。

[参考文献]

- [1] Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(5):926-938
- [2] Clough E, Barrett T. The Gene Expression Omnibus Database[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1418:93-110
- [3] Suzuki A, Horie T, Numabe Y. Investigation of molecular biomarker candidates for diagnosis and prognosis of chronic periodontitis by bioinformatics analysis of pooled microarray gene expression datasets in Gene Expression Omnibus(GEO)[J]. *BMC Oral Health*, 2019, 19(1):52
- [4] Gan TQ, Chen WJ, Qin H, et al. Clinical value and prospective pathway signaling of microRNA-375 in lung adenocarcinoma: a study based on the cancer genome atlas (TCGA), gene expression omnibus (GEO) and bioinformatics analysis[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23:2453-2464
- [5] Lavoie-Charland E, Berube JC, Boulet LP, et al. Asthma susceptibility variants are more strongly associated with clinically similar subgroups[J]. *J Asthma*, 2016, 53(9):907-913
- [6] Garcia-Sanchez A, Isidoro-Garcia M, Garcia-Solaesa V, et al. Genome-wide association studies (GWAS) and their importance in asthma [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2015, 43(6):601-608
- [7] Kauffmann F, Demenais F. Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(6):1229-1240
- [8] Liu AH. Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(4):860-865
- [9] Allaerts W, Chang TW. Skewed exposure to environmental antigens complements hygiene hypothesis in explaining the rise of allergy [J]. *Acta Biotheor*, 2017, 65(2):117-134
- [10] Yazici S, Gunes S, Kurtulus-Cokboz M, et al. Allergen variability and house dust mite sensitivity in pre-school children with allergic complaints [J]. *Turk J Pediatr*, 2018, 60(1):41-49
- [11] Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, et al. Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: A mechanistic review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(5):e1033
- [12] Wood LG. Diet, obesity, and asthma [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2017, 14(Supplement 5):S332-S338
- [13] Han YY, Forno E, Holguin F, et al. Diet and asthma: an update [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2015, 15(4):369-374
- [14] Carroll W. Asthma genetics: pitfalls and triumphs [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2005, 6(1):68-74
- [15] Vijverberg SJH, Farzan N, Slob EMA, et al. Treatment response heterogeneity in asthma: the role of genetic variation [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2018, 12(1):55-65
- [16] Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma [J]. *Nature*, 2007, 448(7152):470-473
- [17] 章素芬,金蕊,周国平. 丙戊酸钠对哮喘相关基因ORMDL3的作用及其机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(12):1587-1590
- [18] Chen J, Miller M, Unno H, et al. Orosomucoid-like 3 (ORMDL3) upregulates airway smooth muscle proliferation,

- contraction, and Ca(2+) oscillations in asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(1): 207-218
- [19] Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(13): 1211-1221
- [20] Chapoval SP, David CS. Identification of antigenic epitopes on human allergens: studies with HLA transgenic mice [J]. *Environm Health Perspect*, 2003, 111(2): 245-250
- [21] Zoltowska Nilsson AM, Lei Y, Adner M, et al. Mast cell-dependent IL-33/ST2 signaling is protective against the development of airway hyperresponsiveness in a house dust mite mouse model of asthma [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(3): L484-L492
- [22] Himes BE, Hunninghake GM, Baurley JW, et al. Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene [J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 84(5): 581-593
- [23] Tulah AS, Holloway JW, Sayers I. Defining the contribution of SNPs identified in asthma GWAS to clinical variables in asthmatic children [J]. *BMC Med Genet*, 2013, 14: 100
- [24] Mehats C, Jin SL, Wahlstrom J, et al. PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction [J]. *FASEB J*, 2003, 17(13): 1831-1841
- [25] Lin AH, Shang Y, Mitzner W, et al. Aberrant DNA methylation of phosphodiesterase [corrected] 4D Alters Airway Smooth Muscle Cell Phenotypes [J]. *Am J Respir Cell Mol Biology*, 2016, 54(2): 241-249
- [26] Nieuwenhuis MA, Vonk JM, Himes BE, et al. PTTG1IP and MAML3, novel genomewide association study genes for severity of hyperresponsiveness in adult asthma [J]. *Allergy*, 2017, 72(5): 792-801
- [27] Hu A, Diener BL, Josephson MB, et al. Constitutively active signaling by the G protein betagamma-subunit mediates intrinsically increased phosphodiesterase-4 activity in human asthmatic airway smooth muscle cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118712
- [收稿日期] 2019-02-17

(上接第1560页)

- idiopathic pulmonary fibrosis therapy [J]. *Am J Med Sci*, 2019, 357(5): 370-373
- [3] 罗振国, 朱国琴, 许海尘, 等. 胃泌素通过 JAK2/STAT3 信号通路调控胃癌细胞上皮间质转化 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(12): 1557-1561
- [4] 韩 姣, 曾凡军, 陈世雄. 上皮间质转化相关信号通路在肺纤维化发生发展中的作用 [J]. *山东医药*, 2015, 55(17): 101-103
- [5] Choi SH, Hong ZY, Nam JK, et al. A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(16): 3716-3726
- [6] 刘伊扬, 钱 健, 徐爱民, 等. 长链非编码 RNA BX357664 对肾透明细胞癌细胞上皮间质转化过程的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(1): 25-30
- [7] Li Z, Liu X, Wang B, et al. Pirfenidone suppresses MAPK signaling pathway to reverse epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis; pirfenidone inhibits renal EMT via MAPK pathway [J]. *Nephrology*, 2017, 22(8): 589-597
- [8] Meng J, Chen S, Han JX, et al. Twist1 regulates vimentin through cul2 circular RNA to promote EMT in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(15): 4150-4162
- [9] Huang Q, Liang C, Wei L, et al. Raf kinase inhibitory protein exacerbates hepatic fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cell Physio Biochem*, 2016, 40(1-2): 49-61
- [10] Burgess S, Echeverria V. Raf inhibitors as therapeutic agents against neurodegenerative diseases [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(1): 120-127
- [11] Jensen HA, Bunaciu RP, Varner JD. GW5074 and PP2 kinase inhibitors implicate nontraditional c-Raf and Lyn function as drivers of retinoic acid-induced maturation [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(8): 1666-1675
- [12] Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(5): 281-298
- [收稿日期] 2019-02-11