

## GR $\beta$ shRNA 稳定表达胶质瘤细胞株的构建及功能初探

王倩,邹健,谢平\*

(南京医科大学附属无锡人民医院中心实验室,江苏 无锡 214023)

**[摘要]** 目的:构建并鉴定糖皮质激素受体 $\beta$ (GR $\beta$ )RNA干扰稳定表达胶质瘤细胞株,研究GR $\beta$ 对胶质瘤细胞周期及增殖的影响。方法:根据GR $\beta$  mRNA序列设计特异性小干扰RNA(siRNA),以Lipofectamine™ 2000转染人胶质瘤细胞,RT-PCR及Western blot鉴定其有效性;体外合成该siRNA插入序列小发卡RNA(shRNA)并定向克隆至真核表达载体pGPH1/GFP/Neo,转染后,通过G418筛选稳定表达细胞株(G0306),Western blot检测GR $\beta$ 表达、MTS和流式细胞术检测GR $\beta$ 干扰对胶质瘤细胞增殖及细胞周期的影响。结果:GR $\beta$  siRNA能有效抑制GR $\beta$ 的表达,DNA测序证实合成并克隆入真核表达载体pGPH1/GFP/Neo的shRNA序列完全正确;GR $\beta$  shRNA稳定表达人胶质瘤细胞株阻滞于G1期、细胞增殖能力显著下降。结论:成功构建人GR $\beta$  shRNA稳定表达胶质瘤细胞株(G0306),初步表明GR $\beta$ 影响胶质瘤细胞的增殖,为后期研究GR $\beta$ 在中枢神经系统肿瘤中的作用及机制奠定了基础。

**[关键词]** 糖皮质激素受体 $\beta$ ;小干扰RNA;稳定表达;增殖;胶质瘤

**[中图分类号]** R739.41

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)07-883-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140706

## Establishment of glucocorticoid receptor $\beta$ shRNA stably transfected human glioma cell lines and its effect on cell proliferation

Wang Qian, Zou Jian, Xie Ping\*

(Department of Clinical Laboratory Science, the Affiliated Wuxi People's Hospital of NJMU, Wuxi 214023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct and identify glucocorticoid receptor  $\beta$  (GR $\beta$ ) shRNA stably transfected human glioma cell lines and investigate the effect of GR $\beta$  on glioma cell cycle and proliferation. **Methods:** The specific siRNA was designed according to human GR $\beta$  sequence and transfected into human glioma cells by Lipofectamine™ 2000 reagent. Knock down of GR $\beta$  by siRNA was measured by RT-PCR and Western blotting assays. The *in vitro* synthesized siRNA was inserted into shRNA sequence and directionally cloned into eukaryotic expression vector pGPH1/GFP/Neo. After transfection, the stable G0306 cell lines were selected by G418. Western blotting assays, MTS and flow cytometry were applied to detect the effect of GR $\beta$  interruption on glioma cell proliferation and cycle, respectively. **Results:** GR $\beta$  siRNA effectively inhibited the expression of GR $\beta$ . The inserted sequence of shRNA cloned into eukaryotic expression vector pGPH1/GFP/Neo was confirmed by DNA sequencing. The stable GR $\beta$  shRNA cell lines showed growth inhibition in G1 period, and the cell proliferation ability was significantly decreased. **Conclusion:** Stable GR $\beta$  knockdown glioma cell line (G0306) was constructed successfully and GR $\beta$  affected glioma cell proliferation, which laid a foundation for further study of the role and mechanism of GR $\beta$  in the central nervous system tumors.

**[Key words]** glucocorticoid receptor  $\beta$ ; siRNA; stable expression; proliferation; glioma

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 883-888]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81000527);无锡市科技发展指令性计划(CSEY1N1101)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xieping1115@163.com

糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)是核激素受体超家族成员之一,属于核转录因子,激活后通过与核内靶基因上特定的DNA序列结合,参与多种基因的转录调控,影响细胞增殖、炎症、代谢等过程<sup>[1]</sup>。人类GR基因含9个外显子,第9个外显子

的剪切方式不同可产生两类蛋白形式——GR $\alpha$  和 GR $\beta$ , 二者 N 端前 727 个包含 DNA 结合区和转录激活区的氨基酸组成完全相同, 只在 C 端的糖皮质激素结合区有所差异<sup>[2]</sup>。研究发现 GR $\alpha$  主要参与介导糖皮质激素效应, GR $\beta$  则可能作为 GR $\alpha$  负性调控因子抑制 GR $\alpha$  的功能活性<sup>[3]</sup>。但 GR $\alpha$  与 GR $\beta$  在胶质瘤细胞中活化情况的研究相对较少。本室研究发现 GR $\beta$  在人胶质瘤组织与细胞中高表达, GR $\alpha$  基本恒定<sup>[4]</sup>, 故设想 GR $\beta$  可能与胶质瘤的生物学行为相关。为证实这一设想, 我们针对人 GR $\beta$  基因构建了特异性 shRNA 真核表达载体并转染胶质瘤细胞, 构建稳定表达细胞株, 初步证实干扰 GR $\beta$  可阻滞细胞周期、抑制胶质瘤细胞增殖, 为深入研究 GR $\beta$  在胶质瘤中的功能和作用机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 标本来源

人胶质瘤细胞取自南京医科大学附属无锡人民医院恶性胶质瘤患者手术标本, 经本院病理科依据 WHO 诊断标准诊断为额叶星形细胞瘤 III~IV 级。

#### 1.1.2 试剂

DMEM 培养液、胎牛血清 (FBS)、Opti-MEM、TRIzol、Lipofectamine™2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Bbs* I 购自美国 Fermentas 公司; RNA 逆转录、Cell Titer 96®AQueous One Solution Cell (MTS) 试剂盒购自美国 Promega 公司; 兔抗人 GR $\beta$  单抗购自美国 GeneTex 公司; 鼠抗人 Nestin 单抗、兔抗人 GR $\alpha$  多抗购自美国 Abcam 公司; 鼠抗人  $\beta$ -actin 多抗购自美国 Abmart 公司; 兔抗人 GFAP 多抗、鼠抗人  $\beta$ -Tubulin 单抗购自美国 Sigma 公司; ECL 发光液购自美国 PIERCE 公司; pGPH1/GFP/Neo shRNA 表达载体为上海吉玛制药有限公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 胶质瘤细胞的分离与培养

新鲜肿瘤组织清洗, 在体视显微镜下去除脑膜和血管, PBS 中锐性切碎后用吸管反复吹打机械消化。差速离心后收集细胞于 10% FBS 完全培养基中, 经差速贴壁 20 min 以去除成纤维细胞, 在收集到的悬浮细胞中加入抗 Nestin 免疫磁珠, 充分混悬, 避光结合 30 min。安置 MACS 设备于超净台, 固定 MS 分离柱, 加分选缓冲液于分离柱。待样本流空后取下分离柱加缓冲液冲出 Nestin 阳性结合细胞,

置培养基中 37°C、5% CO<sub>2</sub> 继续培养。为获得较高纯度细胞可行二次分选。

#### 1.2.2 免疫荧光染色鉴定

取 Nestin 分选后传至第 2 代的胶质瘤细胞制作细胞爬片, 培养 48 h 后经 4% 多聚甲醛固定、封闭。滴加兔抗人 GFAP 和鼠抗人 Nestin 抗体, 4°C 孵育过夜。PBS 洗片 3 次, 每次 5 min 后滴加 Dy-light488 标记的羊抗兔和 Dy-light594 标记的羊抗鼠二抗, 室温孵育 1 h。PBS 洗片, 含 DAPI 的甘油封片剂封片。

#### 1.2.3 GR $\beta$ 特异性 siRNA 的设计与合成

将 GenBank 中人 GR $\beta$  核苷酸序列 (NM\_001020825) 输入 Genescript 公司 siRNA 在线设计软件 siRNA Target Finder, 软件自动分析并显示候选 siRNA。根据文献报道的 siRNA 设计原则和经验进一步筛选最佳者, 并在 Blast 中对靶序列进行同源性分析, 排除非特异作用于其他基因片段的可能, 最终确定 siRNA 序列为 5'-GGCUUUUCAU-UAAAUGGGATT-3', 其乱序对照序列为 5'-AU-UAUAGACGGUCGGUUAUTT-3'。上述序列送上海吉玛公司合成。

#### 1.2.4 siRNA 转染人胶质瘤细胞

胶质瘤细胞于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 常规培养。参照 Lipofectamine™2000 试剂说明书及相关文献报道<sup>[5]</sup>取指数生长期细胞按 5 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种至 6 孔板, 每孔加入 2 ml DMEM, 待细胞融合达 80% 时进行转染。转染前更换 Opti-MEM 无血清培养基。分组: ① siRNA 转染组 (GR $\beta$  siRNA), 即 Opti-MEM 中含有已用脂质体包埋的 GR $\beta$  siRNA (100 nmol/L); ② 空白对照组 (blank), 即未经任何处理的胶质瘤细胞; ③ 乱序 siRNA 组 (scramble), 即 Opti-MEM 中含有已用脂质体包埋的 scramble siRNA (100 nmol/L)。转染 48 h 后检测干扰效率。

#### 1.2.5 RT-PCR、Western blot 鉴定 siRNA 干扰效率

收集细胞, 以 TRIzol 提取细胞总 RNA, 取 1  $\mu$ g 于 20  $\mu$ l 反应体系中逆转录。加 1  $\mu$ l cDNA 模板至 25  $\mu$ l 反应体系中进行 PCR, 其中  $\beta$ -actin 为内参基因, 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳。引物序列如下: GR $\alpha$  上游: 5'-TGTGTTTTGCTCCTGATCTGA-3', 下游: 5'-CAGCTAACATCTCGGGGAAT-3'; GR $\beta$  上游: 5'-TGTGTTTTGCTCCTGATCTGA-3', 下游: 5'-TGAGATGTGCTTTCTGGTTTT-3';  $\beta$ -actin 上游: 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3', 下游: 5'-GCTGT-

CACCTTCACCGTTCC-3'。同时以 Western blot 检测 GR $\beta$  蛋白含量。裂解细胞收集蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白变性后按 25  $\mu\text{g}$ /孔上样,经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,其中  $\beta$ -actin 为内参蛋白, TBST 洗 3 遍,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 4 遍,ECL 检测蛋白印迹。

### 1.2.6 GR $\beta$ shRNA 真核表达载体的构建

根据确定的 siRNA 构建 GR $\beta$  shRNA 表达序列为 5' -CACCGGCTTTTCATTAATGGGATTCAAGA-GATCCCATTAAATGAAAAGCCTTTTTTG-3',该序列由正义链、环(loop)和反义链组成,并在 3' 端加入了终止信号 TTTTTT,两端加入 BamH I 和 Bbs I 酶切位点,其反向互补序列为 5'-GATCCAAAAAAGG-CTTTTCATTAATGGGATCTCTTGAATCCATT-TA-ATGAAAAGCC-3'。乱序对照序列为 5'-CACCATTATAGACGGTCGGTTATTTCAAGAGACTAAC-CGACCGTCTATAATTTTTTG-3',其反向互补序列为 5'-GATCCAAAAAATTATAGACGGTCGGTTAGTCTCTTGA-AATAACCGACCGTCTATAAT-3'。上述 shRNA 插入序列由上海生工生物工程公司合成。将配对的两条序列分别稀释成 1 g/L,各取 1  $\mu\text{l}$ ,加 20 $\times$ SSC 1  $\mu\text{l}$ ,补水至总体积 20  $\mu\text{l}$ ,95 $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min,取出置室温 1 h 令其退火。退火后的双链 shRNA 插入序列与 BamH I 和 Bbs I 酶切后的载体 pGPH1/GFP/Neo 以摩尔比 3:1 用 T4 连接酶 16 $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。连接产物转化 *E.coli* DH5a 感受态细菌,并在卡那霉素平板上筛选抗性菌落。扩增单克隆抗性菌并提取质粒送上海博亚公司测序。

### 1.2.7 细胞转染 GR $\beta$ shRNA 及稳转细胞株的筛选

将对数生长期的胶质瘤细胞以  $4 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,待细胞融合达 70% 时,用 HBSS 和 Opti-MEM 洗细胞并换上 Opti-MEM 无血清培养基。转染步骤与方法按试剂说明书进行。以 GR $\beta$  shRNA 乱序载体(scramble)转染细胞作为阴性对照。按文献报道方法<sup>[6]</sup>,用 800  $\mu\text{g}$ /L G418 培养基筛选阳性转染细胞。筛选 3 周后接种 96 孔板,连续稀释,挑选单克隆细胞扩增。流式细胞仪检测细胞绿色荧光蛋白(GFP)的表达,挑选 GFP 阳性率大于 90% 单克隆进行后续试验。

### 1.2.8 稳转细胞株 GR $\beta$ 蛋白的检测

将上述两种细胞株培养 24 h 后提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后进行 Western blot 分析, $\beta$ -tubulin 为内参蛋白,方法详见 1.2.3 项。

### 1.2.9 MTS 法检测 GR $\beta$ 对细胞增殖的影响

采用 MTS 法<sup>[7]</sup>将细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板,每组设 8 个复孔,分 0、24、48、72 h 4 个时间点进行检测,每个时间点单独 1 块 96 孔板。检测时每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTS 试剂,直接于 570 nm 波长处读取吸光度值。以各细胞株培养 0 h 的吸光度值为 1,绘制细胞生长曲线。

### 1.2.10 流式细胞术检测 GR $\beta$ 对细胞周期的影响

采用碘化丙啶(PI)流式细胞术检测细胞周期<sup>[4]</sup>。消化收集各组细胞,加入预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$  固定过夜。PBS 清洗 2 次,加 PI 重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$  避光染色 30 min。流式细胞仪检测细胞周期,观察不同周期细胞比例。

### 1.3 统计学方法

数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用 SPSS10.0 软件包,对处理组和对照组的比较采用 *t* 检验和单因素方差分析(ANOVA)进行统计学处理。 $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胶质瘤细胞表面标志物的检测

免疫荧光分析显示筛选获得的细胞表达神经干细胞标记物 Nestin 蛋白和星形胶质细胞标记物 GFAP(图 1),具有胶质瘤细胞典型标记物并可连续传代,命名为 G0306。后续试验采用第 3~6 代细胞。

### 2.2 GR $\beta$ siRNA 特异性下调 G0306 细胞中 GR $\beta$ 的表达

转染 48 h 后 RT-PCR 检测 GR $\alpha$ 、GR $\beta$  mRNA 表达水平。如图 2 所示,干扰组(GR $\beta$  siRNA 组) GR $\beta$  表达明显下降 ( $P < 0.01, n = 3$ ); GR $\alpha$  mRNA 无明显变化。蛋白检测结果亦显示,干扰组 GR $\beta$  蛋白较空白对照组明显下调 ( $P < 0.01, n = 3$ ), GR $\alpha$  无明显变化(图 3)。表明 GR $\beta$  siRNA 可特异性抑制细胞 GR $\beta$  的表达,对 GR $\alpha$  表达无影响。

### 2.3 GR $\beta$ shRNA 表达载体的鉴定

以 GR $\beta$  siRNA 为基础构建的 GR $\beta$  shRNA 重组质粒经测序表明插入的目的序列完全正确。目的片段测序结果峰图附录如下(图 4)。

### 2.4 稳定转染 GR $\beta$ shRNA 下调 G0306 细胞中 GR $\beta$ 的表达

将筛选获得的 GR $\beta$  shRNA、GR $\beta$  scrambled shRNA 稳转亚克隆细胞株分别命名为 GFP-siGR $\beta$ -G 和 GFP-scGR $\beta$ -G。Western blot 检测细胞 GR $\beta$  蛋白水平,结果如图 5 所示,相对 GFP-scGR $\beta$ -G1 和

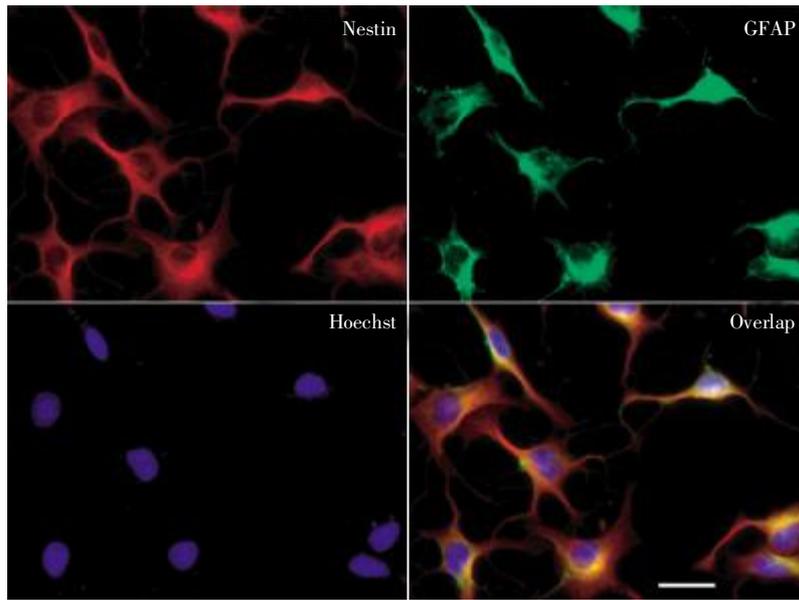
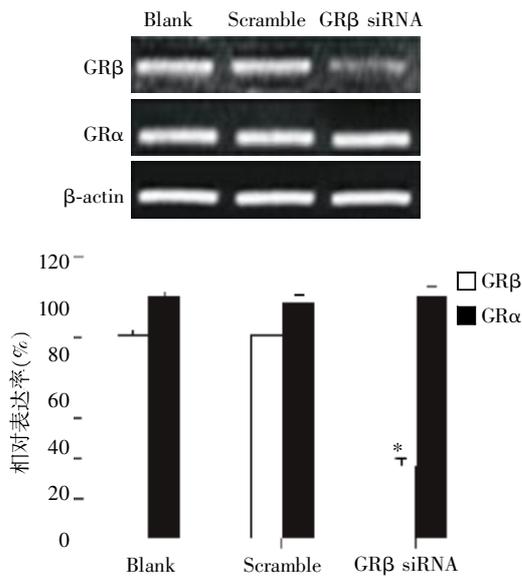


图 1 免疫荧光双标显示 Nestin 和 GFAP 在 G0306 胶质瘤细胞中的表达(标尺为 20 μm)

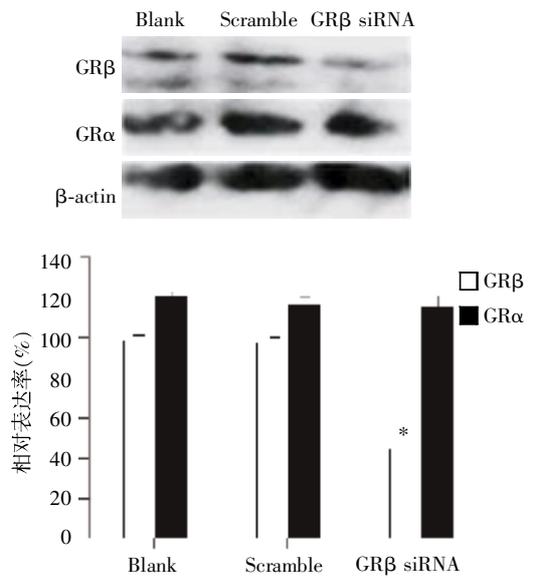
Figure 1 Double immunostaining showed the expression of Nestin and GFAP in G0306 glioma cells (Scale bar, 20 μm)



与阴性对照组比较, \* $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

图 2 GRβ siRNA 干扰效率的 RT-PCR 鉴定

Figure 2 RT-PCR analysis of GRβ and GRα mRNA expression after GRβ siRNA transfection



与阴性对照组比较, \* $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

图 3 GRβ siRNA 干扰效率的 Western blot 鉴定

Figure 3 Western blot analysis of GRβ and GRα protein expressions after GRβ siRNA transfection

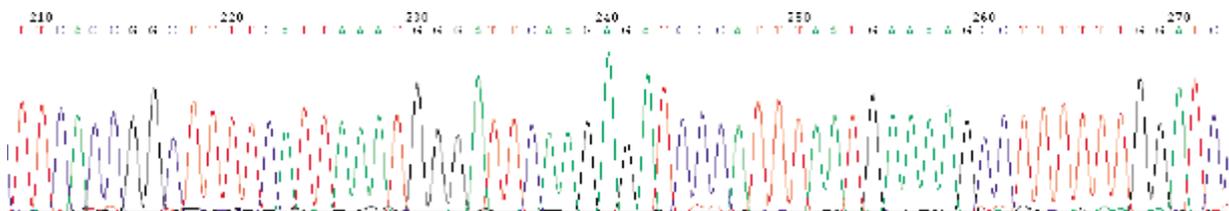
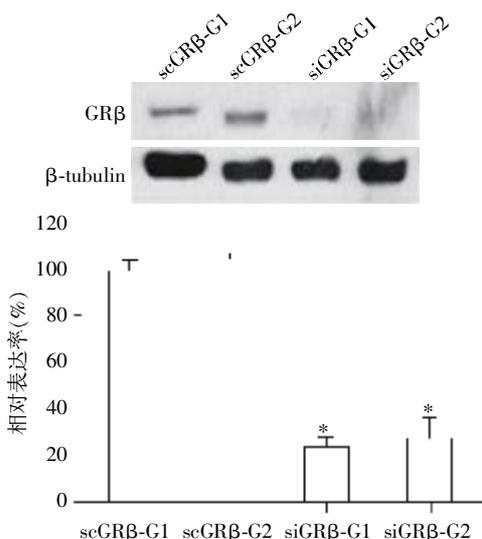


图 4 GRβ shRNA 真核表达载体目的片段测序峰图

Figure 4 The sequences of inserted shRNA in GRβ shRNA eukaryotic expression vector



与对照组 scGR $\beta$ -G1、scGR $\beta$ -G2 比较, \* $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

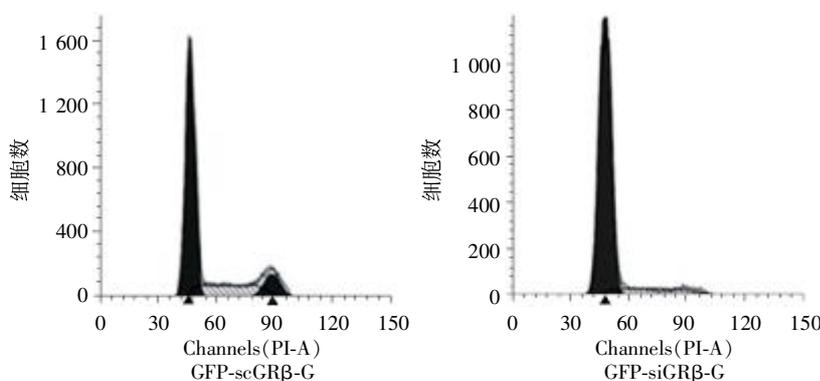
图 5 Western blot 检测稳定转染 GR $\beta$  shRNA 细胞中 GR $\beta$  的表达

Figure 5 Western blot analysis of GR $\beta$  expression in GR $\beta$  shRNA stably transfected cells

GFP-scGR $\beta$ -G2, GFP-siGR $\beta$ -G1 和 GFP-siGR $\beta$ -G2 细胞株中 GR $\beta$  明显减弱( $P < 0.01, n = 3$ )。

### 2.5 GR $\beta$ 表达下调对 G0306 细胞增殖的影响

MTS 法检测细胞增殖能力并绘制生长曲线, 设



与对照组 GFP-scGR $\beta$ -G 比较, \* $P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

图 7 GR $\beta$  表达下调对稳转细胞株周期的影响

Figure 7 Effect of GR $\beta$  knocking-down on cell cycle of stable cell lines

## 3 讨论

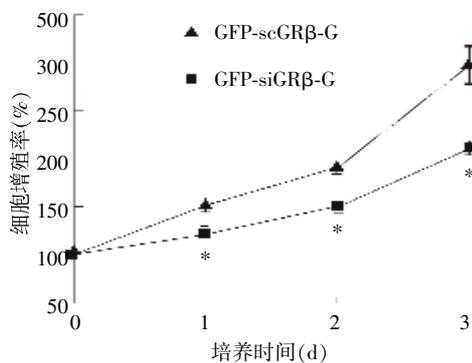
胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤, 约占颅内肿瘤的 46%, 可发生于各年龄层, 恶性程度高, 呈浸润性生长, 生物学特性复杂。就目前的治疗条件下手术较难完全将其切除, 且术后复发率高, 平均生存时间小于 3 年, 因此其治疗一直是医学界的一大难题<sup>[8]</sup>。

糖皮质激素是一类调节物质代谢和应激反应,

定各细胞株接种 0 h 的吸光度值为 1。统计结果显示, 与 GFP-scGR $\beta$ -G 相比, GFP-siGR $\beta$ -G 在 24、48、72 h 时的增殖能力明显下降, 差异具有统计学意义( $P < 0.01, n = 3$ , 图 6)。

### 2.6 GR $\beta$ 表达下调对 G0306 细胞周期的影响

细胞周期流式细胞术检测结果显示 GFP-siGR $\beta$ -G 处于 G1 期的细胞数显著高于 GFP-scGR $\beta$ -G, 而处于 S 期和 G2 期的细胞数明显减少 ( $P < 0.05, n = 3$ )。表明下调 GR $\beta$  可抑制胶质瘤细胞株从 G1 期进入 S 期(图 7)。



与对照组 GFP-scGR $\beta$  比较, \* $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

图 6 G0306 细胞株增殖曲线

Figure 6 Cell proliferation curve of G0306 stable cell lines

具有抗炎、抗增殖、促凋亡<sup>[9]</sup>作用的甾体类激素, 其参与多种生理病理功能的调节, 是机体最重要的内分泌激素之一, 其功能效应主要由 GR 介导。其中 GR $\alpha$  亚型介导糖皮质激素的主要生理作用<sup>[10]</sup>, 启动或抑制相应基因的转录。GR $\beta$  亚型与 GR $\alpha$  拥有相同的氨基酸肽链 N 端和中间 DNA 结合区, 但 C 端激素结合区缺失, 不能与糖皮质激素结合, 但能与 DNA 结合因而可对 GR $\alpha$  产生负性调节作用<sup>[11]</sup>, 抑制 GR $\alpha$  介导的糖皮质激素效应<sup>[12-13]</sup>。

GR $\alpha$ 与GR $\beta$ 在包括神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞等神经系统组织中均有表达<sup>[2]</sup>。研究发现甲泼尼龙可抑制脊髓损伤后星形胶质细胞反应性增生<sup>[14]</sup>和胶质瘢痕的形成,地塞米松通过GR依赖途径抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭<sup>[15]</sup>,证实了GR参与星形胶质细胞增生及胶质瘤的形成发展,但其间作用的GR亚型及其相互作用机制尚未明确。鉴于本课题组前期研究发现GR $\beta$ 在胶质瘤细胞中高表达,且随着肿瘤的恶性程度增高呈递增趋势,GR $\alpha$ 表达则相对恒定;星形胶质细胞划痕损伤模型中GR $\beta$ 与 $\beta$ -catenin高表达且共定位于胶质细胞胞核<sup>[4]</sup>。故设想GR $\beta$ 可能在胶质瘤形成及 $\beta$ -catenin/TCF通路中发挥重要作用。基于此,本实验设计并验证了GR $\beta$ 特异性siRNA,构建GR $\beta$ shRNA真核表达载体,并转染胶质瘤细胞构建GR $\beta$ shRNA稳定表达细胞株。初步的功能研究表明GR $\beta$ 下调可阻滞细胞于G1期,抑制胶质瘤细胞增殖,为进一步探讨GR $\beta$ 在胶质瘤中的作用提供了细胞模型,为后续体外及动物实验中以GR $\beta$ 为靶点的抗肿瘤研究奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(5): 3177-3184
- [2] Yan P, Xu J, Li Q, et al. Glucocorticoid receptor expression in the spinal cord after traumatic injury in adult rats [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(21): 9355-9363
- [3] Volden PA, Conzen SD. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 30(Suppl): S26-31
- [4] Yin Y, Zhang X, Li Z, et al. Glucocorticoid receptor  $\beta$  regulates injury-mediated astrocyte activation and contributes to glioma pathogenesis via modulation of  $\beta$ -catenin/TCF transcriptional activity [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 59: 165-176
- [5] Zheng D, Song T, Zhongliu X, et al. Downregulation of transforming growth factor- $\beta$  type II receptor prohibit epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 1238-1246
- [6] 孟越, 谢苗苗, 林振, 等. 甲状旁腺素受体真核表达载体的构建及稳定转染HEK293细胞系的建立[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(7): 956-961
- [7] 刘春兴, 殷莹, 张滨, 等. 内源性谷氨酰胺合成酶对C6胶质瘤细胞体外增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(10): 1197-1201
- [8] Pugliese F, Barbagallo R. Multislice computed tomography in the diagnosis of coronary anomalies with superimposed coronary artery disease [J]. *J Cardiovasc Med*, 2011, 12(5): 351-352
- [9] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(16): 1711-1723
- [10] Maeda Y, Rachez C, Hawel L, et al. Polyamines modulate the interaction between nuclear receptors and vitamin D receptor-interacting protein 205 [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(7): 1502-1510
- [11] Kino T, Manoli I, Kelkar S, et al. Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(4): 671-675
- [12] Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, et al. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(6): 2435-2441
- [13] Gross KL, Oakley RH, Scoltock AB, et al. Glucocorticoid receptor alpha isoform-selective regulation of antiapoptotic genes in osteosarcoma cells: a new mechanism for glucocorticoid resistance [J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(7): 1087-1099
- [14] Liu WL, Lee YH, Tsai SY, et al. Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes [J]. *Glia*, 2008, 56(13): 1390-400
- [15] Liu H, Huang X, Wang H, et al. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates SSeCKS expression in C6 rat glioma cell line [J]. *Brain Res*, 2009, 1265: 1-12

[收稿日期] 2013-11-25