

文章编号:1000-5404(2012)09-0813-04

论著

## Runx3 基因对 HepG2 细胞顺铂耐药性的影响

郭元红,陈伟庆,房殿亮 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化内科)

**[摘要]** 目的 探讨 Runx3 基因对 HepG2 细胞耐药性的影响及可能机制。方法 取在 1.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  顺铂(CDDP)下生长良好的 HepG2 耐药细胞(HepG2/CDDP-1.6),建立耐药 HepG2/CDDP 的动态变化模型 HepG2/CDDP/2.0,并予以甲基转移酶抑制剂 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理;将 Runx3-shRNA 表达载体转染 HepG2/CDDP-1.6 细胞,RT-PCR 检测处理及转染前后细胞 Runx3 mRNA 的表达。MTT 法检测细胞的增殖活性,流式细胞仪分析细胞周期,Hoechst 33258 检测凋亡,Western blot 检测 P-gp 表达的变化。结果 在动态变化模型中随 CDDP 诱导时间的延长,Runx3 mRNA 的表达逐渐降低。5-Aza-CdR 处理后 Runx3 mRNA 的表达增加,细胞生长受到明显抑制,S 期细胞逐渐增加,凋亡细胞明显增多,细胞内 P-gp 的表达减少。转染 Runx3-shRNA 载体后 HepG2/CDDP-1.6 细胞对 CDDP 的耐受性增强, $G_1$  期细胞增加,P-gp 的表达增加。结论 Runx3 基因的表达可抑制 HepG2/CDDP 耐药的形成,提高 HepG2/CDDP 细胞对化疗药物的敏感性。

**[关键词]** Runx3;耐药;肝癌;DNA 甲基化;细胞周期;RNA 干扰

**[中图分类号]** R363.25; R735.7; R966

**[文献标志码]** A

## Runx3 improves chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells HepG2 to cisplatin

Guo Yuanhong, Chen Weiqing, Fang Dianliang (Department of Digestive Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of Runx3 in drug resistance against hepatocellular carcinoma cells. **Methods** HepG2/cisplatin(CDDP) kinetic anti-cancer drug resistance model was constructed using anti-cancer drug inducing method and treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) for different periods of time. Runx3-shRNA expression vectors were transfected into drug-resistant HepG<sub>2</sub> cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect Runx3 mRNA expression before and after transfection. Cell viability was evaluated by MTT assay, and apoptosis was analyzed using Hoechst 33258. Flow cytometry (FCM) was used to detect the cell cycle distribution, and Western blotting was used to measure the expression levels of P-gp and Runx3. **Results** The expression of Runx3 mRNA was decreased with the increasing drug resistance against HepG2 cells. However, it was increased gradually after treated with 5-Aza-CdR, and cell proliferation was inhibited obviously. The cells at S phase and apoptotic cells were increased. Also, 5-Aza-CdR resulted in a decrease of P-gp. Down-regulation of Runx3 in drug-resistant HepG<sub>2</sub> cells promoted the cell proliferation, the cell cycle arrested at  $G_1$ , and increased expression of P-gp, which indicated that it inhibited the drug sensitivity. **Conclusion** Runx3 may play an inhibitive role in drug resistance, and up-regulation of Runx3 might prove cancer cells more sensitive to chemotherapy.

**[Key words]** Runx3; drug resistance; hepatocellular carcinoma; DNA methylation; cell cycle; RNA interference

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BA5011) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Committee of Education (0200050174KJ090303). Corresponding author: Chen Weiqing, E-mail: chenweiqing506@yahoo.com

Runx3 是 Runx 家族的一员,定位于人染色体 1p36.1,有 P1、P2 两个启动子<sup>[1]</sup>。研究发现该基因在肺癌、食管癌、胃癌、肝癌等多种肿瘤中都存在启动子高甲基化而失活<sup>[2-5]</sup>。作为一个新发现的肿瘤抑制基

因,它在细胞的生长分化和凋亡、细胞周期的调控、细胞的信号转导等方面发挥重要作用<sup>[6]</sup>。但 Runx3 是否参与肿瘤耐药及与其关系如何却不清楚。因此,我们建立了 HepG2/顺铂(CDDP)耐药细胞株的动态变化模型,并用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理,另一方面,将 Runx3-shRNA 表达载体转染 HepG2 耐药细胞,观察 Runx3 的表达和细胞

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金(CSTC2010BA5011);重庆市教育委员会科学技术研究项目(0200050174KJ090303)

**[通信作者]** 陈伟庆, E-mail: chenweiqing506@yahoo.com

的生物学行为改变,初步探讨 Runx3 对肿瘤耐药的作用及可能调控机制,为逆转肿瘤耐药提供新的理论依据和治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌耐药 HepG2 由本课题组自行诱导建立<sup>[7]</sup>,胎牛血清和 RPMI1640 培养液(Gibco 公司),四氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)和 5-Aza-CdR(美国 Sigma 公司),Trizol、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司),细胞凋亡荧光 Hoechst 33258 检测试剂盒(南京凯基公司),Runx3-shRNA 表达载体(武汉晶赛公司),转染试剂 Polyjet(SignaGen 公司),兔抗人 Runx3 抗体、兔抗人 p-gp 抗体(Santa Cruz 公司),兔抗人  $\beta$ -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(碧云天)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌耐药 HepG2 细胞于含 10% 胎牛血清、1.6  $\mu$ g/ml CDDP 的 1640 培养基中,放置于 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养箱中,记为 HepG2/CDDP-1.6,3~4 d 换液传代 1 次。

1.2.2 5-Aza-CdR 处理 HepG2/CDDP 耐药细胞 取 HepG2/CDDP-1.6 细胞,加入含 2.0  $\mu$ g/ml CDDP 的培养液中继续培养 24、48、72 h,建立 HepG2/CDDP 耐药细胞的动态变化模型,记为 HepG2/CDDP/2.0。加入 5-Aza-CdR,使之浓度达 10  $\mu$ mol/L。每 24 小时换液,保持药物浓度同前。

1.2.3 细胞转染 取对数生长期 HepG2/CDDP-1.6 细胞按  $5 \times 10^5$  接种于 6 孔板,培养 24 h 后,细胞融合度达 70%~80%,根据转染试剂 Polyjet 的说明书操作,转染 Runx3-shRNA 表达载体(pRunx3-shRNA)和阴性对照 HK-shRNA 表达载体(pHK-shRNA),48 h 后荧光显微镜观察荧光。

1.2.4 RT-PCR 检测 Runx3 mRNA 的表达 Trizol 提取细胞中总 RNA,并检测其纯度和完整性,逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增。Runx3 引物:上游 5'-CTCGGAAGTGAACCCATTCTC-3',下游 5'-TCCCGTAGTAGAGGTGGTAGGG-3',产物大小 299 bp;GAPDH 引物:上游 5'-GAGCCAAAAGGTCATCATCTC-3',下游 5'-AAAGGTGGAGTGGGTCTC-3',产物大小 542 bp。反应条件:94  $^{\circ}$ C 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,58  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪成像,Quantity One 软件半定量分析。以目的基因/GAPDH 平均光密度表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.2.5 MTT 检测细胞的增殖活性 取对数生长期 HepG2/CDDP-1.6 细胞以每孔  $5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板中,每组设 4 个复孔,待贴壁生长 24 h 后,按前面所述分别用 10  $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR 处理或 pRunx3-shRNA 转染细胞。分别孵育 24、48、72 h 后,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 培养 4 h 后弃去培养液。每孔加入 150  $\mu$ l DMSO,酶标仪上于 490 nm 波长处读取光密度值[D(490)值]。以 D(490)值为纵坐标,时间为横坐标,绘制生长曲线,并计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率 = [对照组 D(490)值 - 处理组 D(490)值]/对照组 D(490)值  $\times$  100%。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期 0.25% 胰酶消化处理及转染前后各时间点的细胞,冷 PBS 漂洗 2 次,每个样本收集至少  $10^5$  细胞,加入 75% 冷乙醇,4  $^{\circ}$ C 固定 24 h,送第三军医大学中心实验室流式细胞仪室行细胞周期检测。采用 Cell Quest

software(Becton Dickinson)分析数据。

### 1.2.7 细胞凋亡荧光 Hoechst 33258 检测细胞的凋亡状态

加入 5-Aza-CdR 的 HepG2/CDDP/2.0 细胞培养 72 h 后,按说明书操作,用冷 Buffer A 洗涤细胞 2 次,加入 1 ml 的 4% 甲醛溶液,4  $^{\circ}$ C 固定 10 min。弃去固定液,加入 100  $\mu$ l Hoechst 33258 工作液,室温染色 10 min,水冲洗晾干。以紫外光 340 nm 波长激发,荧光显微镜下观察。

1.2.8 Western blot 检测 Runx3 蛋白和 P-gp 的表达 提取细胞中总蛋白,BCA 法蛋白定量,10% SDS-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入兔抗人 Runx3 抗体(1:100 稀释)、兔抗人 P-gp 抗体(1:100 稀释)和兔抗人  $\beta$ -actin 抗体(1:1 000 稀释)4  $^{\circ}$ C 过夜,加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释)室温孵育 2 h,ECL 显影,Quantity One 软件半定量分析。以目的基因/ $\beta$ -actin 平均光密度值表示目的基因蛋白的相对表达量。

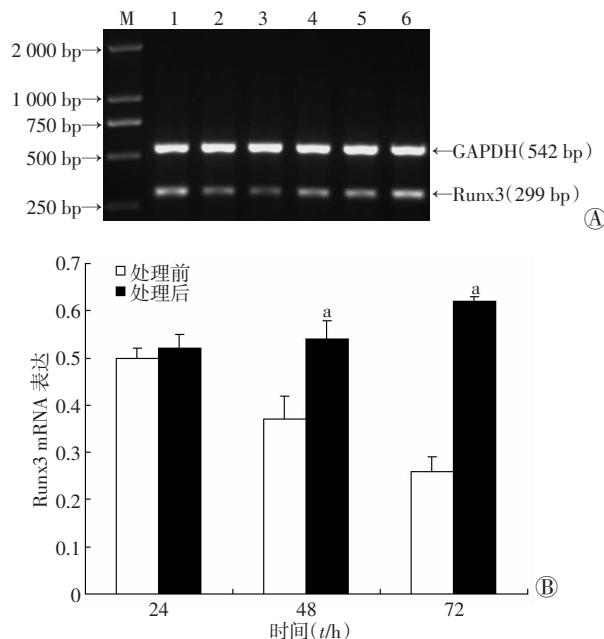
### 1.3 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,多样本比较采用单因素方差分析,两样本比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 5-Aza-CdR 对 Runx3 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示:处理后各时间点 Runx3 mRNA 的表达均高于处理前。在建立的 HepG2/CDDP 耐药细胞的动态变化模型 HepG2/CDDP/2.0 中,Runx3 mRNA 的表达随着 CDDP 诱导时间的增加而逐渐降低( $P < 0.05$ );经 10  $\mu$ mol/L 的 5-Aza-CdR 处理后,Runx3 mRNA 的表达逐渐增强( $P < 0.05$ ,图 1)。



A: RT-PCR 检测 M:标准;1~3:处理前 24、48、72 h;4~6:处理后 24、48、72 h;B:半定量分析 a: $P < 0.05$ ,与处理前同时相点比较

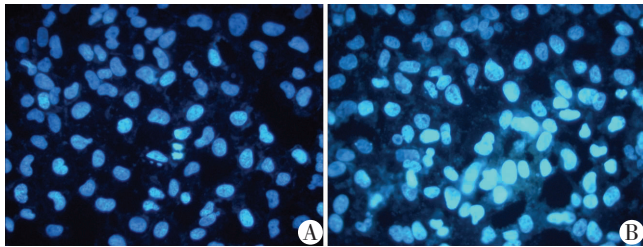
图 1 5-Aza-CdR 处理前后 Runx3 mRNA 的表达

### 2.2 5-Aza-CdR 抑制 HepG2/CDDP/2.0 的生长

5-Aza-CdR 处理 HepG2/CDDP/2.0 细胞后,0、24、48、72 h 的细胞生长逐渐被抑制,抑制率分别为(0  $\pm$  1.51)%、(23.26  $\pm$  1.83)%、(29.82  $\pm$  2.26)%、(37.60  $\pm$  1.65)% ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 细胞凋亡荧光 Hoechst 33258 检测

HepG2/CDDP/2.0 细胞培养 72 h 经染色后,荧光显微镜观察可见:未处理细胞呈微弱蓝色荧光,其间有少量强蓝色荧光,而处理后细胞呈大片强蓝色荧光,提示 5-Aza-CdR 处理后细胞凋亡增加(图 2)。



A: 处理前;B: 处理后

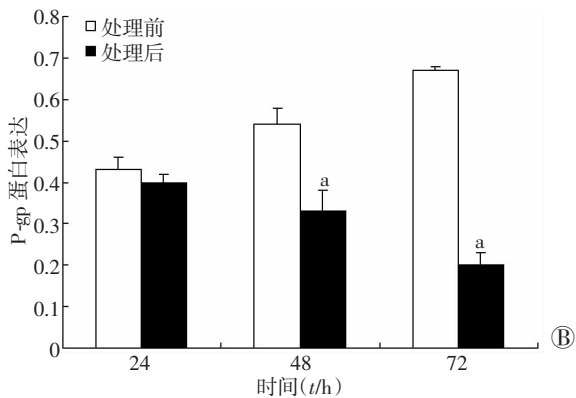
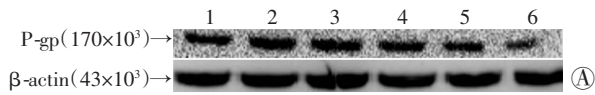
图 2 5-Aza-CdR 处理前、后 72 h 细胞凋亡荧光 Hoechst 33258 染色 (×400)

### 2.4 流式细胞仪检测各组细胞的细胞周期

5-Aza-CdR 处理 HepG2/CDDP/2.0 细胞,24、48、72 h 时 S 期细胞比例分别为 29.0%、34.1%、45.7%,提示随处理时间延长,S 期细胞逐渐增加( $P < 0.05$ )。

### 2.5 Western blot 检测 5-Aza-CdR 对 P-gp 表达的影响

5-Aza-CdR 处理前,在 HepG2/CDDP/2.0 细胞中 P-gp 的表达随 CDDP 诱导时间的增加而逐渐增加( $P < 0.05$ );经 5-Aza-CdR (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理后,P-gp 的表达呈明显下降趋势( $P < 0.05$ ,图 3)。

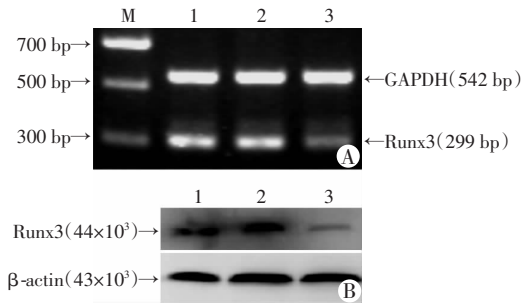


A: Western blot 检测 1~3: 处理前 24、48、72 h;4~6: 处理后 24、48、72 h;B: 半定量分析 a:  $P < 0.05$ , 与处理前同时时间点比较

图 3 5-Aza-CdR 处理前后 HepG2/CDDP/2.0 细胞中 P-gp 的表达

### 2.6 pRunx3-shRNA 转染对 Runx3 mRNA 和 Runx3 蛋白表达的影响

pRunx3-shRNA 转染 HepG2/CDDP-1.6 细胞 48 h 后,RT-PCR 检测(图 4)显示:转染 pRunx3-shRNA 组中 Runx3 mRNA 的表达( $0.39 \pm 0.05$ )明显低于未转染组( $0.78 \pm 0.02$ )和转染 pHK-shRNA 组( $0.79 \pm 0.06$ , $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示 pRunx3-shRNA 转染后( $0.13 \pm 0.08$ )抑制 Runx3 蛋白的表达(未转染组及转染 pHK-shRNA 组分别为  $0.35 \pm 0.06$ 、 $0.37 \pm 0.05$ , $P < 0.05$ )。

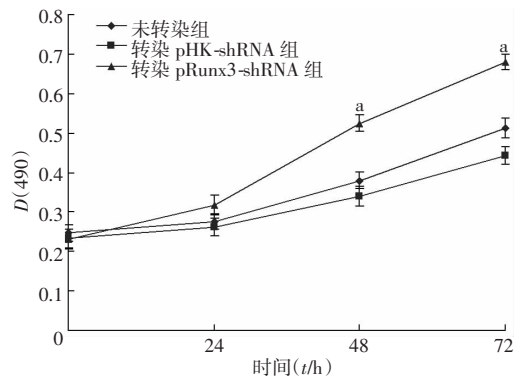


M: 标准;1: 未转染组;2: 转染 pHK-shRNA 组;3: 转染 pRunx3-shRNA 组  
A: RT-PCR 检测;B: Western blot 检测

图 4 pRunx3-shRNA 对 HepG2/CDDP-1.6 细胞 Runx3 mRNA 和 Runx3 蛋白表达的影响

### 2.7 转染 pRunx3-shRNA 后对 HepG2/CDDP-1.6 细胞生长的影响

转染 pRunx3-shRNA 组 HepG2/CDDP-1.6 细胞的生长速度显著快于转染 pHK-shRNA 组和未转染组( $P < 0.05$ ,图 5)。



a:  $P < 0.05$ , 与未转染和转染 pHK-shRNA 相应时间点比较

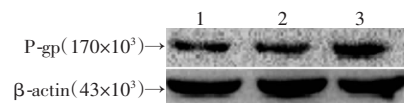
图 5 转染后细胞的生长曲线分析

### 2.8 转染 pRunx3-shRNA 后对 HepG2/CDDP-1.6 细胞周期的影响

未转染细胞、转染 pHK-shRNA 细胞和转染 pRunx3-shRNA 细胞 48 h 时 S 期细胞比例分别为 32.5%、31.5%、19.7%, $G_1$  期细胞比例分别为 46.3%、49.0%、57.2%。提示转染 pRunx3-shRNA 后使 S 期细胞减少, $G_1$  期细胞增加( $P < 0.05$ )。

### 2.9 pRunx3-shRNA 转染 HepG2/CDDP-1.6 细胞 48 h 后对 P-gp 表达的影响

Western blot 结果显示,转染 pRunx3-shRNA 48 h 后 P-gp 的表达水平( $0.63 \pm 0.02$ )高于未转染( $0.35 \pm 0.04$ )组和转染 pHK-shRNA 组( $0.33 \pm 0.06$ , $P < 0.05$ ,图 6)。



1: 未转染组;2: 转染 pHK-shRNA 组;3: 转染 pRunx3-shRNA 组

图 6 Western blot 检测转染 pRunx3-shRNA 48 h 后 P-gp 的表达变化

## 3 讨论

肿瘤细胞耐药性的产生是影响化疗效果的一个关键因素,这是困扰临床的重要难题。关于耐药性产生

机制的研究非常广泛,既往研究表明,肿瘤细胞发生耐药时,常伴随有细胞周期阻滞、耐药相关蛋白 P-gp 表达升高等。P-gp 是一种 ATP 依赖的跨膜转运蛋白,它可将化疗药物从细胞内排到细胞外,从而降低对肿瘤细胞的杀伤作用,使之逃避凋亡<sup>[8]</sup>。能耐受抗癌药物诱导凋亡的肿瘤细胞最终形成耐药。但是,哪些基因参与、调控该过程报道甚少。

Runx3 是一个新发现的抑癌基因,其 5' CpG 岛甲基化是 Runx3 失活的主要机制。将野生型 Runx3 基因转染 MKN74 细胞,可明显抑制细胞克隆的形成,而转染突变型 Runx3 和空载体则不能抑制胃癌细胞的生长<sup>[9]</sup>。Yamamura 等<sup>[10]</sup>发现 Runx3 基因敲除小鼠的胃黏膜上皮细胞在裸鼠体内可以形成肿瘤,提示 Runx3 可能与肿瘤的发生、发展密切相关。Runx3 是否还参与肿瘤耐药等过程,目前尚不十分清楚。

本实验首先构建了 HepG2/CDDP 耐药细胞的动态变化模型,发现随着 CDDP 诱导时间的延长,Runx3 mRNA 的表达逐渐减低,提示 Runx3 参与了 HepG2 细胞耐药过程。采用甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理后,细胞的 Runx3 mRNA 表达逐渐增强,表明 5-Aza-CdR 可能通过逆转 Runx3 启动子区域高甲基化而使其表达增加。这在肺癌 NCI-H1437 细胞、结肠直肠癌 Lovo 细胞和肝癌 SNU-368 等细胞中也得到证实<sup>[2,11]</sup>。本实验结果表明 5-Aza-CdR 还能抑制 HepG2/CDDP/2.0 细胞的生长,诱导凋亡。而流式细胞仪检测发现处理后 G<sub>1</sub> 期细胞减少, S 期细胞增多。本实验还发现 5-Aza-CdR 可使 HepG2/CDDP 耐药细胞的 P-gp 表达逐渐减少。

近年来肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的研究日益引起人们的关注,并提出肿瘤干细胞假说。CSCs 学说认为:CSCs 多在静止期,大多数化疗药物主要作用于处在细胞周期中的肿瘤细胞,CSCs 具有耐药特性,导致耐药<sup>[12]</sup>。由此推测,Runx3 的表达可能通过调控细胞周期,促进细胞进入对顺铂敏感的 S 期,并降低 P-gp 的表达,增加化疗药物对肿瘤细胞的毒性作用,介导其发生凋亡,从而逆转肿瘤耐药。为了进一步证明 Runx3 在肿瘤耐药过程中的作用,我们采用 RNA 干扰技术使 Runx3 基因沉默。Runx3-shRNA 转染 HepG2/CDDP-1.6 细胞后,发现细胞的生长速度明显增快,处于 G<sub>1</sub> 期细胞增多, S 期细胞减少,并且高表达 P-gp,与诱导 Runx3 表达后得到的结果相反<sup>[13-14]</sup>。由此可见,Runx3 与肿瘤的发生、发展、耐药等过程密切相关。

既往研究表明,Runx3 蛋白是 TGF-β 信号通路下游的一个转录因子,在 TGF-β 信号转导过程中,被激活的 Smad 复合物须与 Runx3、P300、CBP 等转录辅助因子一起,才能将信号从细胞质转入核内特异性靶位点,共同调节相关下游基因的转录表达<sup>[15]</sup>。Runx3 表

达失活可以导致 TGF-β 信号通路紊乱,引发细胞的凋亡障碍,从而导致肿瘤产生以及耐药性的形成<sup>[16]</sup>。

综上所述,本实验通过调节 Runx3 的表达来探讨其与肿瘤耐药的关系,结果证实 Runx3 可抑制细胞生长,参与细胞周期的调控,降低 P-gp 的表达,诱导凋亡等方式来增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。Runx3 与肿瘤耐药密切相关,并对耐药形成具有抑制作用。本实验为以后肿瘤耐药的基因治疗提供了一个新思路。

### 参考文献:

- [1] Bangsow C, Rubins N, Glusman G, et al. The RUNX3 gene—sequence, structure and regulated expression [J]. *Gene*, 2001, 279 (2): 221–232.
- [2] Sato K, Tomizawa Y, Iijima H, et al. Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(1): 129–135.
- [3] 龙超众, 贺大璞, 王元星, 等. 5-氮杂胞苷对 Eca109 细胞增殖及 RUNX3 基因表达的影响 [J]. *南华大学学报: 医学版*, 2010, 38 (3): 345–349.
- [4] Chen W, Gao N, Shen Y, et al. Hypermethylation downregulates Runx3 gene expression and its restoration suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p27 and caspase3 in human gastric cancer [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(4): 823–831.
- [5] Nakanishi Y, Shiraha H, Nishina S, et al. Loss of runt-related transcription factor 3 expression leads hepatocellular carcinoma cells to escape apoptosis [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 3.
- [6] Bae S C, Choi J K. Tumor suppressor activity of Runx3 [J]. *Oncogene*, 2004, 23(24): 4336–4340.
- [7] 唐鹏, 陈伟庆, 沈文拥. p38MAPK 磷酸化对 HepG2 细胞耐药的影响及其意义 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(8): 604–608.
- [8] Rivera E, Gomez H. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12 Suppl 2: S2.
- [9] Guo W H, Weng L Q, Ito K, et al. Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by Runx3, a novel tumor suppressor [J]. *Oncogene*, 2002, 21(54): 8351–8355.
- [10] Yamamura Y, Lee W L, Inoue K, et al. RUNX3 cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(8): 5267–5276.
- [11] 房殿亮, 陈伟庆. p15 基因干扰对肝癌耐药的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(16): 1695–1699.
- [12] 黄卫彤. 肿瘤干细胞与肿瘤耐药研究进展 [J]. *右江医学*, 2008, 36(3): 351–353.
- [13] Guo C, Ding J, Yao L, et al. Tumor suppressor gene Runx3 sensitizes gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs by downregulating Bel-2, MDR-1 and MRP-1 [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(1): 155–160.
- [14] 朴瑛, 谢晓东, 洪流, 等. Runx3 基因对人乳腺癌细胞 BCAP-37 药物敏感性作用的实验研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15 (10): 750–754.
- [15] Zaidi S K, Sullivan A J, van-Wijnen A J, et al. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(12): 8048–8053.
- [16] Fainaru O, Woolf E, Lotem J, et al. Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation [J]. *EMBO J*, 2004, 23(4): 969–979.

(收稿:2011-10-25;修回:2011-11-15)

(编辑 汪勤俭)