

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.001

· 基础研究 ·

肿瘤细胞外泌体中融合基因的检测*

殷慧慧^{1,2} 郝永义² 吴晓洁² 谭招丽² 崔琮² 邵勇² 高丽华² 法云智¹胡显文² 王友亮^{2Δ} 孙兆增^{1Δ}

(1 军事医学科学院实验动物中心 北京 100071; 2 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 目的: 探究肿瘤细胞分泌的外泌体中是否可以检测到来源于源细胞的融合基因 mRNA。**方法:** 培养人非小细胞肺癌 NCI-H3122 细胞,采用外泌体试剂盒提取细胞上清中的外泌体,并用 Western Blot 实验验证外泌体是否提取成功。分别提取外泌体以及 H3122 细胞中的总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA,通过 PCR 反应扩增 v1 型 EML4-ALK 融合基因片段,经琼脂糖凝胶电泳确定目的条带后,将两种 PCR 产物送公司进行基因测序,最后对测序结果进行比对分析。**结果:** 从 H3122 细胞上清中成功提取了外泌体,并且在外泌体中检测到来源于 H3122 细胞的 mRNA;从 H3122 细胞外泌体中检测到 EML4-ALK 融合基因,并发现外泌体中的 EML4-ALK 融合基因的融合形式为 V1,与在 H3122 细胞中检测到的 EML4-ALK 融合基因的融合形式完全相同。**结论:** 肿瘤细胞分泌的外泌体中可以检测到肿瘤细胞来源的 mRNA,并且外泌体中的 mRNA 可以反映肿瘤细胞 mRNA 的基因融合情况等生物学特性。

关键词: 外泌体; EML4-ALK; 基因融合; mRNA

中图分类号: R-33; R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)17-3201-05

Detection of Fusion Genes in Tumor Cells-derived Exosomes*

YIN Hui-hui^{1,2}, XI Yong-yi², WU Xiao-jie², TAN Zhao-li², CUI Cong², SHAO Yong², GAO Li-hua², FA Yun-zhi¹,HU Xian-wen², WANG You-liang^{2Δ}, SUN Zhao-zeng^{1Δ}

(1 Laboratory Animal Center of Military Medical Science Academy of the PLA, Beijing, 100071, China;

2 Institute of Bioengineering of Military Medical Science Academy of the PLA, Beijing, 100071, China)

ABSTRACT Objective: To explore whether exosomes originated from tumor cells included parent cells-derived fusion gene mRNA.

Methods: Firstly, exosomes were extracted from the supernatant of H3122 cells by the ExoQuick kit and western blot analysis was adopted to verify that exosomes were successfully extracted. Secondly, Total RNA was extracted from both the cell lysate and exosomes of H3122 cells and reverse transcription was performed. Subsequently, qualitative PCR of cDNA was performed with the primer used to amplify EML4-ALK variant 1. Finally, the PCR products were sent to be sequenced and we blasted and analyzed the sequencing results.

Results: We successfully extracted exosomes produced from the H3122 cells, and detected EML4-ALK mRNA in the exosomes from the H3122 cells. The sequencing results showed that both the H3122 cells and the exosomes derived from the H3122 cells harbored EML4-ALK fusion variant 1, which also demonstrated that we could detect the mRNA or gene fusion of the tumor cells through the exosomes from the tumor cells. **Conclusion:** Exosomes secreted by tumor cells not only contain parent cells-derived mRNA but also reflect some biological characteristics including gene fusion of the parent cells.

Key words: Exosome; EML4-ALK; Gene fusion; mRNA

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3201-05

前言

外泌体 (Exosome) 由细胞内的多泡小体(Multi-vesicular bodies, MVB)与细胞膜融合后以外分泌的形式释放到细胞外的囊泡,直径约为 40 nm~100 nm^[1]。肿瘤细胞来源的外泌体可通

过微环境介导肿瘤细胞的增殖^[2]、血管形成^[3]和免疫耐受^[4],并可通过介导上皮-间质转化和胞内药物排斥反应等增加肿瘤细胞的化疗抵抗能力^[5]。在外泌体中可以检测到来源于肿瘤细胞的 microRNA^[6]、基因组 DNA^[7]、蛋白质^[8],和 mRNA^[9],但外泌体中是否存在融合基因的 mRNA 还未发现相关报道。

* 基金项目:国家科技重大专项(2016ZX08006002-004);国家自然科学基金项目(31272387)

作者简介:殷慧慧(1990-),硕士研究生,研究方向:实验动物疾病模型,电话:010-6694841, E-mail: yinhuihui2014@163.com

Δ 通讯作者:王友亮,研究员,硕士生导师,研究方向:转化医学研究, E-mail: wang_you_liang@aliyun.com;

孙兆增,副研究员,硕士生导师,研究方向:实验动物疾病模型, E-mail: laxszz@aliyun.com

(收稿日期:2016-12-03 接受日期:2016-12-26)

棘皮动物微管相关蛋白样 4(echinoderm microtubule-associated-protein-like 4, EML4) 与间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK) 融合形成具有致癌作用的 EML4-ALK 融合基因^[10]。EML4-ALK 融合基因主要存在于非小细胞肺癌中,其出现频率约为 6.7 %^[11]。EML4 基因与 ALK 基因融合使后者异常激活,从而导致细胞发生癌变^[12]。EML4-ALK 融合基因的检测对肺癌的分子分型和早期诊断至关重要。本实验探究能否从外泌体中检测到来源于肿瘤细胞的融合基因 mRNA,为融合基因的检测提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

人非小细胞肺癌 NCI-H3122 细胞系购自南京科佰生物科技有限公司;人非小细胞肺癌 A549 细胞系为本实验室保存;外泌体提取试剂 ExoQuick-TCTM Exosome Precipitation Solution、兔抗 CD63 一抗购自美国 SBI 公司;0.2 μm 针式滤器购自美国 Life Sciences Acrodisc 公司;1640 无血清培养基购自美国 Hyclone 公司;TRIzol Reagent 购自美国 Life Technologies 公司;反转录试剂盒购自美国 Promega 公司;2× Taq Master Mix 购自上海近岸蛋白质科技有限公司;兔抗 TSG101 一抗购自英国 Abcam 公司;PCR 引物由上海英潍捷基有限公司合成。

1.2 细胞上清中外泌体的提取

使用含有 10 % FBS 的 1640 培养基和 DMEM/High Glucose 培养基分别培养人非小细胞肺癌 NCI-H3122 细胞和 A549 细胞,培养于 75 cm² 的细胞瓶中,置于 37 ℃,5 % CO₂,饱和湿度的细胞培养箱。当细胞密度达到 80 %时,更换细胞培养基,减少培养基至 13 mL。当细胞密度达到 95 %时,收集细胞上清,3000× g 离心 15 min,移除细胞及细胞碎片。转移上清至新的离心管中,1500× g 离心 15 min,进一步去除细胞碎片,再使用 0.2 μm 针式滤器过滤上清。按照 ExoQuick-TCTM 使用说明,加入 2 mL 沉淀剂,混合均匀后,4 ℃条件下孵育 12 h。将孵育好的样品 1500× g 离心 30 min,弃上清,再 1500× g 离心 5 min,进一步移去残留在管壁上的上清,留在管底的沉淀即为细胞上清中的外泌体。

1.3 Western Blot 验证提取的外泌体

用含蛋白酶抑制剂复合物的 RIPA 裂解液裂解提取的外泌体,吹打混匀,3000 rpm 离心 5 min,获得含有外泌体蛋白的上清。使用紫外分光光度检测法对获得的总蛋白进行蛋白定量,然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶的浓度 10 %,低温湿法转膜,将蛋白质转印到 PVDF 膜上,用 5 % 脱脂奶粉封闭 1 h,用 PBST 溶液洗三次膜,用一抗(依次使用 CD63 一抗、TSG101 一抗,稀释比例为 1:1000)于 4 ℃摇床孵育过夜,用 PBST 洗三次膜,HRP 标记二抗(稀释比例为 1:5000)室温孵育 1 h,PBST 洗三次膜,显影。

1.4 H3122 细胞和 A549 细胞及其外泌体中融合基因的检测

用 TRIzol 试剂提取 H3122 细胞、A549 细胞及该两种细胞的外泌体中的总 RNA。按照 Promega 反转录试剂盒的使用说明对 RNA 进行反转录,得到 cDNA。以 cDNA 为模板,在 2× Taq Master Mix 作用下分别使用 EML4-ALK v1、GAPDH 和 Notch1 的引物(表 1)进行 PCR 扩增(PCR 反应流程:95 ℃预变

性 2 min;94 ℃ 变性 30 s;58 ℃ 退火 30 s;72 ℃ 延伸 90 s;共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min)。取部分 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶浓度为 3 %,在紫外灯下鉴定后拍照,将剩余的 PCR 产物送上海英潍捷基有限公司测序。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences

Genes	Primer Sequence (5'-3')	Product Size (bp)
EML4-ALK v1	GGGGAATGGAGATGTTCTTACTG	173
	GAGCTTGCTCAGCTGTACTCAG	
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT	224
	CTGGAAGATGGTGATGGGATT	
Notch1	GCTGGACTGTGCGGAGCATGT	112
	CTCCCGCAGGAAGTGAAGGA	

2 结果

2.1 细胞中融合基因的检测结果

以 H3122、A549 细胞 mRNA 反转录后得到的 cDNA 为模板,首先使用 GAPDH 引物对 cDNA 进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示 H3122、A549 细胞中都可检测到目的条带(图 1B),说明本次反转录实验成功,然后采用针对 EML4-ALK 融合基因 v1 融合形式所设计的一对特异性引物进行 PCR 扩增,利用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物的大小,结果显示所扩增的片段长度为 173 bp(图 1A),与预期的目的片段的长度相符。对 PCR 产物的测序结果进行比对分析,结果显示 H3122 细胞中 EML4-ALK 的融合形式为 v1,即 EML4 的第 13 外显子与 ALK 的第 20 外显子发生融合(图 2)。

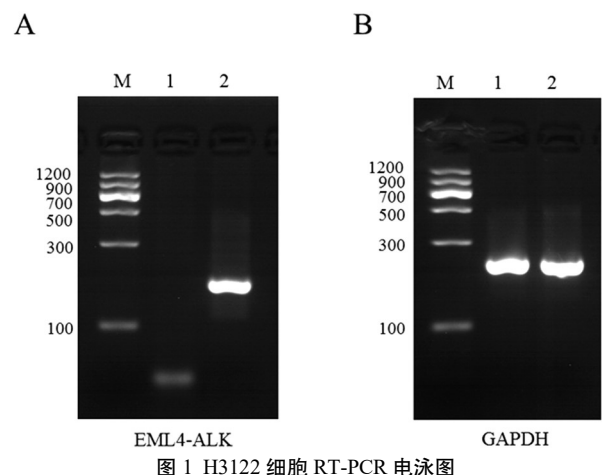


图 1 H3122 细胞 RT-PCR 电泳图
Fig.1 RT-PCR measurement of EML4-ALK fusion gene in A549 and H3122 cells

Note: A was the result of EML4-ALK fusion gene; B was the result of GAPDH as internal control. The lane M was a strip of Marker II, which followed by the size of 1200 bp, 900 bp, 700 bp, 500 bp, 300 bp, 100 bp; lane 1 was A549 and lane 2 indicated H3122.

2.2 外泌体的提取鉴定

采用 ExoQuick 试剂盒提取 H3122 细胞上清中外泌体,对

提取的外泌体进行蛋白质定量后,取 2 μ g 外泌体蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,分别用抗 CD63 和 TSG101 抗体进行免疫印迹实验(图 3),实验结果显示:用抗 CD63 抗体进行孵育后,在 H3122 细胞上清外泌体的 45 kDa 处出现一条特异性条带,而在提取过外泌体的细胞上清中没有条带,说明外泌体蛋白中含有 CD63;用 TSG101 抗体进行孵育后在 H3122 细胞上清外泌体的 55 kDa 处出现一条特异性条带,而在提取过外泌体的细胞上清中没有条带,说明外泌体蛋白中含有 TSG101。CD63 和 TSG101 是外泌体的两种特异性标记物^[13],这一实验结果证明我们成功提取到细胞上清中的外泌体。

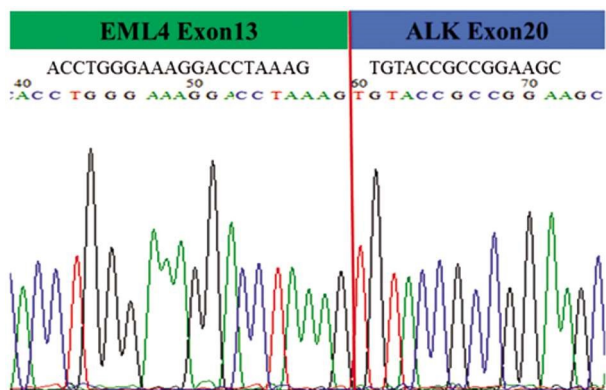


图 2 H3122 细胞 RT-PCR 部分测序结果示意图

Fig.2 Part of the sequencing results schematic of the H3122 cell PCR product

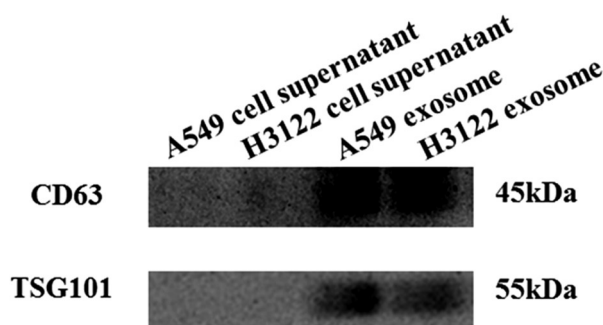


图 3 Western Blot 验证提取的外泌体

Fig.3 Verification of extracted exosomes by Western Blot

2.3 细胞上清外泌体中融合基因的检测结果

分别提取 H3122 和 A549 细胞上清外泌体的总 RNA,并进行总 RNA 的反转录,以获得的 cDNA 为模板,用 GAPDH 和 Notch1 的特异性引物对 cDNA 进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳分析,在 H3122 和 A549 细胞外泌体中都可检测到目的条带,说明本次反转录实验成功(图 4B 和 4C)。用 EML4-ALK 融合基因的特异性引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳分析显示所扩增的片段长度为 173 bp (图 4A),符合预期目的片段长度。将 PCR 产物测序结果进行分析,证实 H3122 细胞上清外泌体中 EML4-ALK 的融合形式为 v1,与在 H3122 细胞中融合基因的检测结果是一致的(图 5)。A549 细胞上清外泌体中则检测不到该融合基因。

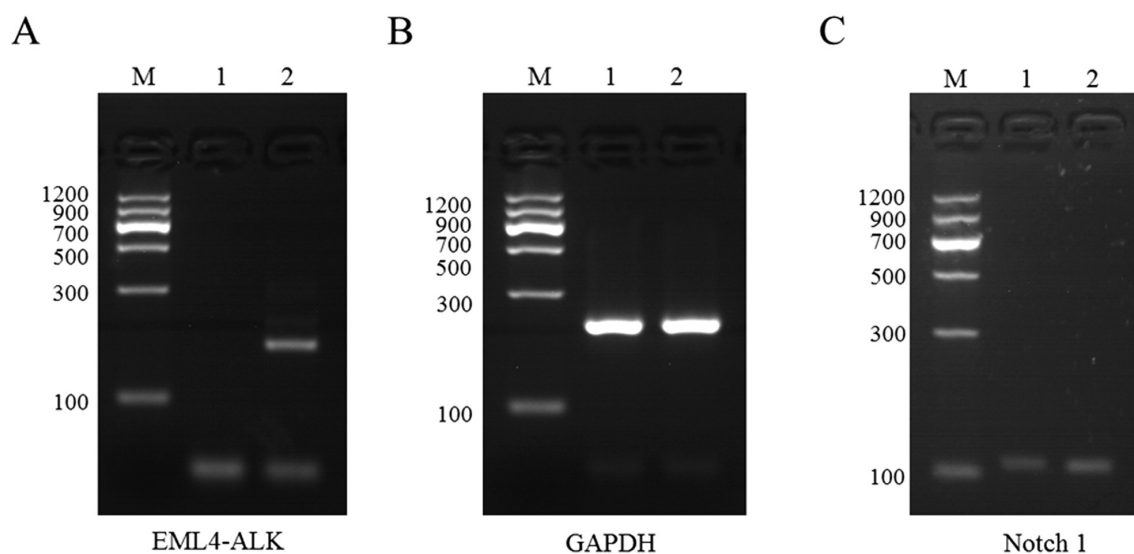


图 4 H3122 细胞外泌体 RT-PCR 电泳图

Fig.4 RT-PCR measurement of EML4-ALK fusion gene in A549 and H3122 cell exosomes

Note: A was the result of EML4-ALK fusion gene; B was the result of GAPDH; C was the result of Notch1. The lane M was a strip of Marker II, which followed by the size of 1200 bp, 900 bp, 700 bp, 500 bp, 300 bp, 100bp; lane 1 was A549 and lane 2 indicated H3122.

3 讨论

肿瘤在发生发展过程中会连续不断地将外泌体释放到细胞微环境中,进一步进入体液循环中。目前,在许多体液中都检测到外泌体的存在,如血液^[14]、恶性肿瘤形成的胸腔积液、尿液^[15]、羊水、乳汁^[16]和唾液^[16]等,这些临床样本收集方法简便,提高了使用外泌体作为临床检测的可行性。外泌体中含有来源于

分泌细胞的多种蛋白质、信使 RNA(mRNA)、微 RNA(microRNA)、DNA 片段等信号分子,这些信号分子能够提供源细胞的相关信息,甚至包含细胞病变相关的特征信息,可以实时监测肿瘤细胞生理机能的变化,并且来源于肿瘤细胞的外泌体中的信号分子含量高于正常细胞。因此,外泌体中的信号分子有可能成为肿瘤早期诊断或者肿瘤相关检查的生物标记物^[17]。检测外泌体中蛋白质、mRNA、microRNA 和 DNA 等信号分子用于

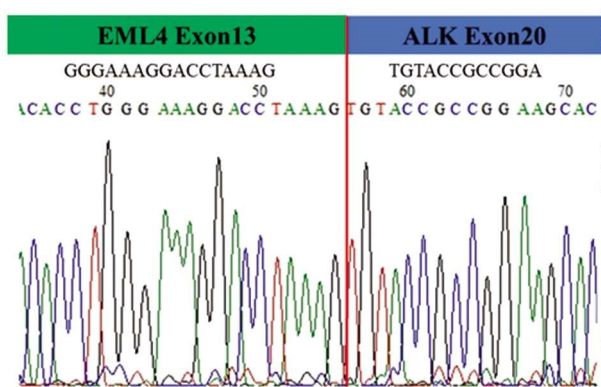


图5 H3122 细胞上清外泌体 RT-PCR 部分测序结果示意图

Fig.5 Part of the sequencing results schematic of the H3122 cell supernatant exosome PCR product

肿瘤辅助诊断、疗效检测以及预后预测均有文献报道,如在蛋白质方面,胰腺癌血清中外泌体携带胰腺癌干细胞标记物,外泌体 GPC1 的检测能区分慢性胰腺炎患者与早期和晚期胰腺癌患者^[18]。外泌体中的 Dicer 也极有可能成为一个针对乳腺癌诊断治疗的标志物之一^[19]。在 RNA 方面,血清外泌体中 miR-21 的表达量与食管鳞状细胞癌患者的预后相关,并且血液外泌体中 miR-21 有望作为食管鳞状细胞癌的生物标记物之一^[20]。血清外泌体中长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) CRNDE-h 可能作为结直肠癌早期诊断与不良预后的标志物之一,并且对于结直肠癌来说,外泌体中 CRNDE-h 具有一定的诊断意义^[21]。在 DNA 方面,来源于胃液的外泌体中含有 BARHL2,外泌体中 BARHL2 甲基化水平极有可能用于检测早晚期胃癌^[22]。外泌体能在 4℃ 保存 168 小时,室温情况下存放 48 小时,能耐受反复冻融三次以上,其中 DNA 的含量和功能仍然保持稳定。外泌体的良好的稳定性,也为其能够作为癌症诊断和预后的指标提供了保障^[23]。

EML4-ALK 融合基因是非小细胞肺癌,特别是肺腺癌的一个新的驱动基因^[24]。目前,用于 ALK 融合基因的检测方法主要有:(1)荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)。荧光原位杂交技术的操作方法复杂,耗时长,价格昂贵,并且还需要实验室配备相关的实验仪器。FISH 检测方法不能够确认参与融合的基因,也不能够区分不同的融合类型,可能会错失发生率低或者较为复杂的重排形式的融合基因^[25]。但由于 FISH 检测具有较高的特异度,FISH 的检测结果一直以来作为鉴定 EML4-ALK 融合基因的“金标准”。(2)免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC):与 FISH 相比,是一种相对快速、价格适宜的检测方法,并且一般实验室都具备实施 IHC 的条件和资格。因此,IHC 是目前临床上使用较普遍的一种检测手法。IHC 检测方法能够检测出 ALK 融合基因中 ALK 蛋白质的表达情况,但是不能够检测出融合基因的类型^[26]。IHC 的结果是由人眼辨别切片的着色强度,并通过计分制判定结果,其中存在人为因素干扰,某些情况下,需要联合 IHC 和 FISH 两种方法做出判定结果。(3)逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR):与以上两种方法相比,RT-PCR 操作简单,特异度较高,特别是当扩增已知的互补 DNA(combination DNA, cDNA)区域时,RT-PCR 技术可以作

为一种筛选某一特定类型的融合基因的检测手法^[25]。但是当进行临床标本取材时,由于组织样本中 RNA 极易降解,取材后需要对组织进行迅速处理和检测,并且在取材时要注意避免取材器械的重复使用,否则由于 RT-PCR 方法的灵敏度较高,极易造成结果假阳性。以上这些检测方法都是针对手术或者活检取材后的肿瘤组织进行的,是有创操作,会引起患者的身体不适,甚至引起并发症。对于某些部位不易进行活检取材,难以用于常规检查。如何简单无创地获得肿瘤遗传物质,进行 EML4-ALK 融合基因快速筛选、检测,常规筛查 ALK 融合基因,进行肺癌的早期诊断及肺癌患者靶向药物治疗近来逐渐受到关注,并开始成为热点问题。由于外泌体在形成过程中含有源细胞的特定信号分子,外泌体的双层膜结构可以避免存在于其中的信号分子被体液中有关酶类降解,从而提高了外泌体的稳定性,使外泌体与游离在体液中的核酸或者其他小分子物质相比具有更大潜能成为生物标记物。因此,我们尝试分离细胞外泌体,并从外泌体中检测 EML4-ALK 融合基因,实验结果表明 EML4-ALK 融合基因的 mRNA 可以经细胞分泌到外泌体中,检测外泌体的 EML4-ALK 融合基因的表达可以反应源细胞的相应分子信息。这一结果有望为 EML4-ALK 融合基因的检测提供一种无创、操作简单的新型检测方法,可以快速、准确、直观地检测出肺癌相关 EML4-ALK 融合基因,为肺癌的分子分型提供参考依据;也可用于 EML4-ALK 融合基因的筛查,为肺癌的早期诊断提供参考依据,有望大规模推广应用。

参考文献(References)

- [1] Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes[J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 29(1): 16-25
- [2] Zhang H G, Grizzle W E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions[J]. Am J Pathol, 2014, 184(1): 28-41
- [3] Chowdhury R, Webber JP, Guney M, et al. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts[J]. Oncotarget, 2014, 6(2): 715-731
- [4] Ma B, Yang J Y, Song W J, et al. Combining Exosomes Derived from Immature DCs with Donor Antigen-Specific Treg Cells Induces Tolerance in a Rat Liver Allograft Model[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32971
- [5] Rahman MA, Barger JF, Lovat F, et al. Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition [J]. Oncotarget, 2016, 7(34): 54852-54866
- [6] Okoye I S, Coomes S M, Pelly V S, et al. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells[J]. Immunity, 2014, 41(1): 89-103
- [7] Thakur B K, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection [J]. Cell Res, 2014, 24(6): 766-769
- [8] Pieters B C, Arntz O J, Bennink M B, et al. Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF-beta[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121123
- [9] Skog J, Wurdinger T, Rijn S V, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers [J]. Nature Cell Biology, 2008, 10(12): 1470-1476

- [10] Mano H. The EML4-ALK oncogene: targeting an essential growth driver in human cancer [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2015, 91(5): 193-201
- [11] Koivunen J P, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13): 4275-4283
- [12] Bayliss R, Choi J, Fennell D A, et al. Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 2016, 73(6): 1-16
- [13] Atay S, Godwin A K. Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression [J]. *Commun Integr Biol*, 2014, 7(1): e28231
- [14] Kumar D, Gupta D, Shankar S, et al. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells Possible implications for biomarker and treatment of cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 6 (5): 3280-3291
- [15] Rak J. Extracellular vesicles - biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2013, 4: 21
- [16] Yang J, Wei F, Schafer C, et al. Detection of tumor cell-specific mRNA and protein in exosome-like microvesicles from blood and saliva[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e110641
- [17] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4): 431-437
- [18] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523 (7559): 177-182
- [19] Melo S A, Sugimoto H, O'Connell J T, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 707-721
- [20] Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2013, 119(6): 1159-1167
- [21] Liu T, Zhang X, Gao S, et al. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016
- [22] Yamamoto H, Watanabe Y, Oikawa R, et al. BARHL2 Methylation Using Gastric Wash DNA or Gastric Juice Exosomal DNA is a Useful Marker For Early Detection of Gastric Cancer in an H. pylori-Independent Manner[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7(7): e184
- [23] Jin Y, Chen K, Wang Z, et al. DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16 (1): 753
- [24] Fukuyoshi Y, Inoue H, Kita Y, et al. EML4-ALK fusion transcript is not found in gastrointestinal and breast cancers[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(9): 1536-1539
- [25] Teixido C, Karachaliou N, Peg V, et al. Concordance of IHC, FISH and RT-PCR for EML4-ALK rearrangements[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2014, 3(2): 70-74
- [26] Zhang Y G, Jin M L, Li L, et al. Evaluation of ALK rearrangement in Chinese non-small cell lung cancer using FISH, immunohistochemistry, and real-time quantitative RT-PCR on paraffin-embedded tissues[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64821

(上接第 3215 页)

- [13] Kim S W, Kim E S, Moon C M, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 2011, 60(11): 1527-1536
- [14] Zhang X, Yu P, Wang Y, et al. Genetic polymorphisms of interleukin 17A and interleukin 17F and their association with inflammatory bowel disease in a Chinese Han population[J]. *Inflamm Res*, 2013, 62 (8): 743-750
- [15] Hueber W, Sands B E, Lewitzky S, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial[J]. *Gut*, 2012, 61(12): 1693-1700
- [16] Ito R, Kita M, Shin-Ya M, et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 12-16
- [17] Huang X, Zhang X, Fei X, et al. Effects of *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant on Th17 cell and IL-17A in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice [J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2015, 40(12): 1320-1326
- [18] Ogawa A, Andoh A, Araki Y, et al. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. *Clin Immunol*, 2004, 110(1): 55-62
- [19] O'Connor W J, Kamanaka M, Booth C J, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(6): 603-609
- [20] Benedetti G, Bonaventura P, Lavocat F, et al. IL-17A and TNF-alpha Increase the Expression of the Antiapoptotic Adhesion Molecule Amigo-2 in Arthritis Synoviocytes[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 254
- [21] Roussel P, Cunha P, Porcherie A, et al. Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during *Escherichia coli* mastitis[J]. *Vet Res*, 2015, 46: 56