

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.001

• 基础研究 •

慢病毒载体沉默 ADAMTS6 人非小细胞肺癌稳转株的构建*

刘捷 施露露 刘春燕 帅 优 束永前[△]

(南京医科大学第一附属医院肿瘤科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:通过数据库预测 ADAMTS6 在非小细胞肺癌(Non-small-cell lung cancer, NSCLC)组织中的表达及其与 NSCLC 患者临床预后的关系,构建 ADAMTS6 的 shRNA 干扰载体并建立 ADMATS6 的 NSCLC 稳定敲减细胞株。**方法:**通过 Oncomine 数据库分析 ADAMTS6 在 NSCLC 组织和肺正常组织的表达差异,通过 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 ADAMTS6 的表达水平与临床 NSCLC 患者预后关系,设计合成 ADAMTS6 的 shRNA 干扰序列,shRNA 模板退火并与双酶切 pGLV3-GFP 线性化载体连接,转化挑取阳性菌落后送测序。干扰质粒进行病毒包装并感染人 NSCLC 细胞株 NCI-H358,使用嘌呤霉素进行稳定敲减细胞株筛选。荧光观察慢病毒感染细胞密度,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 ADAMTS6 的 mRNA 和蛋白水平的敲减效果。**结果:**Oncomine 数据库分析结果显示 NSCLC 组织中 ADAMTS6 mRNA 表达较正常肺组织显著升高($P<0.001$);Kaplan-Meier Plotter 数据库分析结果显示高表达 ADAMTS6 的 NSCLC 患者预后较低表达 ADAMTS6 的 NSCLC 患者差 ($P<0.05$);pGLV3-GFP 载体双酶切线性化后与 shRNA 退火模板连接成功,测序结果正确。荧光观察显示慢病毒感染细胞密度在 95% 左右,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 ADAMTS6 慢病毒干扰质粒已成功敲减 ADAMTS6 的 mRNA 和蛋白水平。**结论:**ADAMTS6 的高表达可能与 NSCLC 患者的不良临床预后密切相关。本研究构建了 ADAMTS6 的慢病毒感染质粒,并成功建立 NCI-H358 稳定敲减细胞株,为进一步研究 ADAMTS6 在 NSCLC 中的作用及机制奠定了基础。

关键词:ADAMTS6;慢病毒载体;肿瘤数据库;小发夹 RNA;非小细胞肺癌

中图分类号:R-33;Q78;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)08-1401-05

Construction of ADAMTS6 Stable Knockdown Non-small Cell Lung Cancer Cell Line Using Lentiviral Vector*

LIU Jie, SHI Lu-lu, LIU Chun-yan, SHUAI You, SHU Yong-qian[△]

(Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Jiangsu, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To predict the expression of ADAMTS6 in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissue and the prognosis of NSCLC patients via database, construct the ADAMTS6 shRNA vector and establish ADMATS6 stable knockdown cell line. **Methods:** The different expression of ADAMTS6 in NSCLC tissue and normal lung tissue was analyzed through the Oncomine database. The relationship between the expression level of ADAMTS6 and the prognosis of patients with NSCLC was analyzed by Kaplan-Meier Plotter database. Subsequently, the shRNA interference sequences of ADAMTS6 were designed and synthesized, and then was cloned into the pGLV3-GFP vector linearized by digestion with the restriction enzymes. The positive transformed bacteria were picked and sent for DNA sequencing. The lentiviral vector was subjected to virus packaging and then infected the NSCLC cell line NCI-H358. The stable knockdown cell line was selected through puromycin. The density of lentivirus-infected cells were observed by fluorescence microscope, and the knockdown effect of mRNA and protein levels of ADAMTS6 were detected by qRT-PCR and Western blot analysis, respectively. **Results:** The mRNA levels of ADAMTS6 were significantly higher in NSCLC tissue than in normal lung tissue according to the Oncomine database ($P<0.001$). Kaplan-Meier Plotter database analysis showed that NSCLC patients with high expression of ADAMTS6 had a poorer prognosis than patients with low expression ($P<0.05$). The shRNA annealing template was successfully cloned into the restriction digestion and linearized pGLV3-GFP vector. The DNA sequencing result was correct. Fluorescence observation showed that the density of lentivirus-infected cells was about 95%. The mRNA and protein levels of ADAMTS6 were successfully knocked down detected by qRT-PCR and Western blot analysis. **Conclusions:** The high expression of ADAMTS6 might be related to the poor clinical prognosis of NSCLC patients. We constructed the ADAMTS6 lentiviral vector and successfully established the stable knockdown cell line to lay the foundation for the future study of ADAMTS6 in NSCLC.

Key words: ADAMTS6; Lentiviral vector; Tumor database; Short hairpin RNA; NSCLC

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)08-1401-05

* 基金项目:国家重点研究发展计划项目(ZDX2017ZL-01);南京医科大学高水平创新团队项目(JX102GSP201727)

作者简介:刘捷(1992-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤学,电话:18851720393,E-mail: liujienjmu@163.com

[△] 通讯作者:束永前(1962-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:肿瘤学,E-mail: shuyongqian@csc.org.cn

(收稿日期:2018-09-26 接受日期:2018-10-22)

前言

肺癌以其高发病率已成为影响我国居民健康的恶性肿瘤之一,其5年生存率低于18%^[1]。非小细胞肺癌(Non-small-cell lung cancer, NSCLC)占肺癌种类的85%,吸烟和遗传风险因素是导致NSCLC主要的发病因素^[2]。目前,NSCLC的治疗主要包括顺铂联合吉西他滨和多西紫杉醇等化疗方案,然而化疗导致患者的药物不良反应、患者机体免疫力下降和长期用药导致的肿瘤耐药性局限了临床药物的使用,寻找毒副作用小的手段成为了目前临床治疗NSCLC的热点^[3]。

解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)属于多域细胞外蛋白酶家族,主要由19个家族成员构成,其在组织形态发生、病理生理重塑、炎症和血管生物学中有着不同的功能^[4,5]。ADAMTS6由1117个氨基酸组成,位于染色体5q12.3位置, GeneCards数据库表明与ADAMTS6相关的疾病包括腹股沟疝和Weill-Marchesani综合征,其相关途径包括蛋白质代谢和O-连接糖基化^[6]。目前,有关于ADAMTS6在NSCLC中的研究尚未见报道,本研究拟采用慢病毒载体短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)技术构建ADAMTS6稳定敲减NSCLC细胞系,以期为进一步探索ADAMTS6在NSCLC中的作用机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人NSCLC细胞株NCI-H358购于上海中乔新舟生物科技有限公司;DMEM培养基、RPMI-1640培养基、0.25%胰蛋白酶和100×青霉素-链霉素双抗购于上海源培生物科技股份有限公司;胎牛血清FBS购于Gibco公司;ADAMTS6抗体购于Abcam公司;GAPDH抗体购于巴傲得生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记兔二抗购于Proteintech公司;pGLV3-GFP载体购于上海吉玛生物制药有限公司;蛋白裂解液RIPA购于南京凯基生物科技有限公司;qPCR SYBR Green Master Mix于上海翊圣生物科技有限公司;DNA质粒转染试剂Lipofectamine 2000和RNA裂解液Trizol购于Life Technologies公司;限制性内切酶BamHI/EcoRI、10×NEBuffer 3.1和T4 DNA Ligase购于NEB公司。

1.2 方法

1.2.1 敲减引物合成 针对ADAMTS6基因设计shRNA干扰片段shADAMTS正义链:5'-GATCCCCTGACTTATCTTGAACACTATTCAAGAGATAGTGTTCAGATAAGTCAGGTTT TTTG-3',反义链:5'-AATTCAAAAAACCTGACTTATCTTGAACACTATCTCTTGAATAGTGTTCAGATAAGTCAGGG-3'。

1.2.2 细胞培养 人NSCLC细胞株NCI-H358培养于添加10%胎牛血清和1%双抗的RPMI-1640培养基中,293T细胞培养于添加10%胎牛血清和1%双抗的高糖DMEM培养基中,细胞株均于5%CO₂的37℃培养箱中进行培养。

1.2.3 ADAMTS6慢病毒表达载体构建 将ADAMTS6干扰引物使用TE Buffer进行溶解后在PCR仪上进行退火,利用限制

性内切酶BamHI和EcoRI双酶切pGLV3-GFP载体过夜,快速琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行胶回收,紫外可见分光光度计Nano Drop测定DNA浓度。使用T4连接酶进行退火模板工作液与线性化载体进行4℃连接过夜,DH5α感受态进行转化,冰浴静置30 min,42℃放置90 sec,随后快速转移至冰上,冷却2 min,加入900 μL无菌不含抗生素培养基,37℃摇床振荡培养45 min,取100 μL已转化的感受态均匀涂在添加抗生素的LB固体琼脂糖培养基,37℃倒置培养12 h-16 h。挑取阳性单克隆摇菌并送DNA序列测序,取测序正确已插入shRNA片段菌液进行摇菌并使用无内毒素中提试剂盒进行质粒中提。

1.2.4 ADAMTS6慢病毒包装 将293T细胞种板至10 cm培养皿,当细胞长至60~70%密度时,将ADAMTS6敲减质粒与慢病毒包装质粒按照比例与无血清培养基和Lipofectamine 2000进行混合,根据说明书共转染293T细胞系,于37℃,5%CO₂培养箱中进行培养,6 h后换10%FBS的DMEM的新鲜培养基,转染48 h后收集上清培养基至无菌离心管中,4000 rpm离心5 min,将上清倒至新无菌离心管,使用0.45 μm过滤器进行过滤,分装后放置于-80℃冰箱进行保存。

1.2.5 NCI-H358细胞感染及筛选 感染前24 h将细胞以每孔4×10⁴密度接种于6孔板中,含有10%FBS的RPMI-1640培养基中进行培养,待细胞贴壁后长至50%左右密度进行慢病毒感染,在6孔板中加入已滤病毒液,于5%CO₂的37℃培养箱中培养,病毒感染48 h后使用荧光显微镜进行观察,感染细胞出现绿色荧光,使用添加嘌呤霉素的10%FBS RPMI-1640培养基进行筛选,获得稳定敲减细胞系。

1.2.6 实时荧光定量qRT-PCR检测 取处于对数生长期的NCI-H358对照和敲减细胞系,使用Trizol收取细胞RNA裂解液,按照说明书提取RNA,测定RNA浓度,逆转录RNA成cDNA后进行qRT-PCR检测,ADAMTS6正向引物:5'-TTT GAGCCTCATCATGGCTTC-3',反向引物:5'-AGGGTCCAT-ACTCCGTCTTCT-3';内参基因GAPDH正向引物:5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3',反向引物:5'-TGGACTCCA CGACGTACTCA-3';使用2^{-ΔΔCT}算法处理原始CT数值。

1.2.7 蛋白提取与免疫印迹Western blot检测 取处于对数生长期的NCI-H358对照和敲减细胞系,小心弃去上清培养基,使用PBS清洗两遍,将细胞使用已加蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液RIPA刮下收集在1.5 mL EP管中,冰上裂解30 min,4℃离心取上清使用BCA浓度定量试剂盒进行定量,加入5×SDS loading buffer在95℃进行蛋白变性,随后使用10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳,5%脱脂牛奶封闭2 h,1:1000比例稀释一抗ADAMTS6兔多克隆抗体4℃孵育过夜,次日PBS-T洗涤三次后,1:5000比例稀释HRP标记二抗山羊抗兔抗体,室温孵育2 h,PBS-T洗涤三次,ECL化学发光显影,以GAPDH作为内参。

1.2.8 ADAMTS6在NSCLC表达情况数据库预测 使用大型肿瘤基因芯片数据库Oncomine网站(www.oncomine.org)^[7],进行预测ADAMTS6在临床NSCLC患者的表达情况。

1.2.9 ADAMTS6表达水平在临床患者中预后分析 使用Kaplan-Meier Plotter网站(<http://kmplot.com/analysis/>)^[8],进行

ADAMTS6 在临床 NSCLC 患者中预后分析。

1.3 统计学分析

数据使用 GraophPad Prism5.0 软件进行统计学分析,各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间进行双尾 t 检验,以 $P<0.05$ 认为有统计学差异。

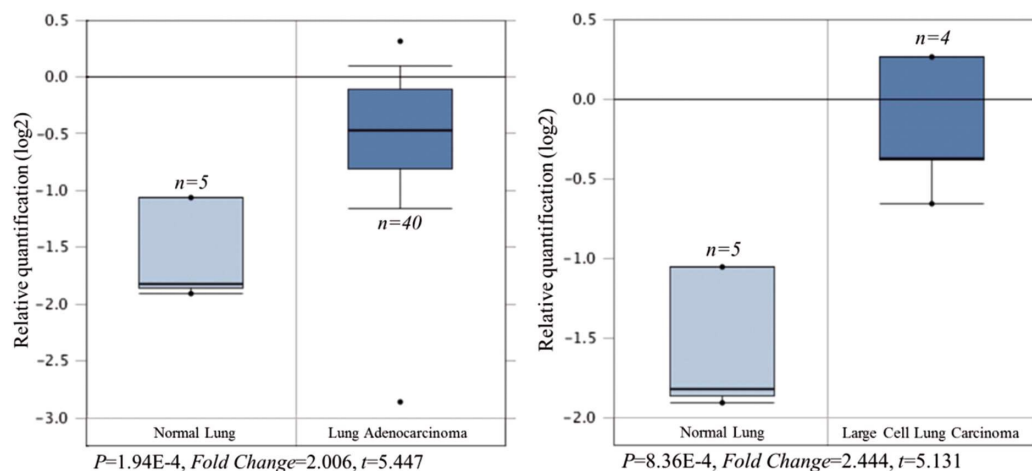


图 1 NSCLC 组织与肺正常组织中 ADAMTS6 mRNA 的表达差异

Fig.1 The different mRNA expression of ADAMTS6 in NSCLC tissue and normal lung tissue

2.2 ADAMTS6 表达与 NSCLC 临床患者预后的关系

Kaplan-Meier Plotter 网站分析 Der 等研究者结果显示^[10]:红色代表 ADAMTS6 mRNA 水平高表达,黑色代表 ADAMTS6 mRNA 水平低表达,ADAMTS6 mRNA 高表达组生存率明显低于 ADAMTS6 mRNA 低表达组,且差异具有统计学意义($P=0.035$)。见图 2。

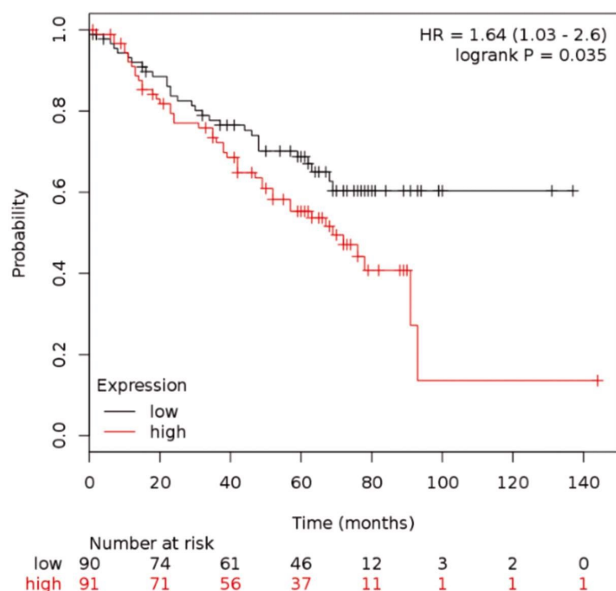


图 2 NSCLC 患者 ADAMTS6 mRNA 表达与总生存期分析

Fig.2 Analysis of ADAMTS6 mRNA expression and overall survival in patients with NSCLC

2.3 ADAMTS6 慢病毒敲减质粒构建测序验证

pGLV3-GFP 载体使用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切后,DNA 琼脂糖电泳结果显示,pGLV3-GFP 载体酶切成功,

2 结果

2.1 数据库分析 ADAMTS6 mRNA 在 NSCLC 的表达情况

Oncomine 数据库根据 Garber 等研究者结果预测显示^[9]:NSCLC 组织 ADAMTS6 表达显著高于正常肺组织,差异具有统计学意义($P<0.001$),见图 1。

而阳参质粒未被酶切。测序结果显示 ADAMTS6 敲减片段已成功插入 pGLV3-GFP 载体上,说明 ADAMTS6 慢病毒干扰质粒构建成功,见图 3。

2.4 ADAMTS6 敲减慢病毒感染 NCI-H358 细胞株绿色荧光观察

荧光显微镜下观察 ADAMTS6 对照细胞株和敲减株荧光表达情况,通过明场 DIC 观察荧光密度约为 95 %左右,说明慢病毒感染 NCI-H358 细胞株成功,见图 4。

2.5 ADAMTS6 慢病毒感染 NCI-H358 细胞株对 ADAMTS6 mRNA 水平抑制效果验证

ADAMTS6 慢病毒感染 NCI-H358 获得稳定细胞株,通过三次独立 qRT-PCR 实验检测 NCI-H358 稳转株 ADAMTS6 敲减效果,结果显示与 shADAMTS6 阴性对照稳转株相比,shADAMTS6 干扰序列 ADAMTS6 的 mRNA 水平显著降低,具有统计学差异 ($P<0.01$),表明慢病毒敲减 ADAMTS6 基因 NCI-H358 稳定细胞株构建成功,见图 5。

2.6 ADAMTS6 慢病毒敲减感染 NCI-H358 细胞株蛋白敲减效果验证

通过 Western blot 检测 ADAMTS6 干扰质粒在非小细胞肺癌 NCI-H358 细胞株中对 ADAMTS6 蛋白的抑制效果,结果显示:较对照组相比,ADAMTS6 慢病毒敲减感染 NCI-H358 细胞株 ADAMTS6 蛋白水平显著降低($P<0.05$),见图 6。

3 讨论

肺癌已成为危害全球人类健康的恶性肿瘤之一,随着吸烟、大气污染和粉尘颗粒物等环境问题,肺癌的发病率还在逐年升高^[11]。有报道我国的肺癌发病率增长迅速,在我国男性恶性肿瘤中排名第一位,在女性恶性肿瘤中排名第二,仅次于乳腺癌^[12]。因此,寻找可行有效的方法抑制肺癌的发生和发展

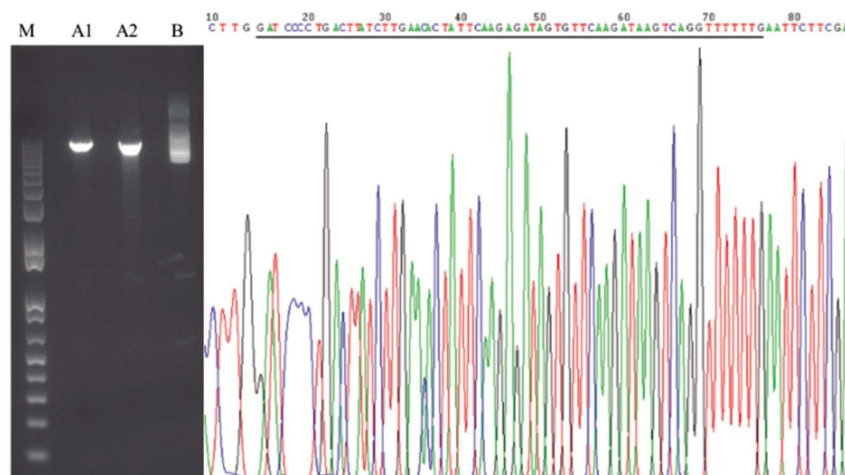


图3 pGLV3-GFP 载体双酶切 DNA 胶电泳和 ADAMTS6 慢病毒干扰质粒 DNA 测序结果(M 为 1kb DNA Marker; A1 和 A2 为 pGLV3-GFP 载体双酶切样品; B 为 pGLV3-GFP 载体未酶切样品; DNA 测序结果加下划线部分为 shRNA 插入片段)

Fig.3 Digital image of DNA gel electrophoresis of pGLV3-GFP vector restriction enzyme and results of ADAMTS6 lentivirus interfering plasmid DNA sequencing (M is 1kb DNA Marker; A1 and A2 are pGLV3-GFP vector double enzyme digested samples; B is the undigested sample of pGLV3-GFP vector; DNA sequencing results underlined is shRNA insertion fragment.)

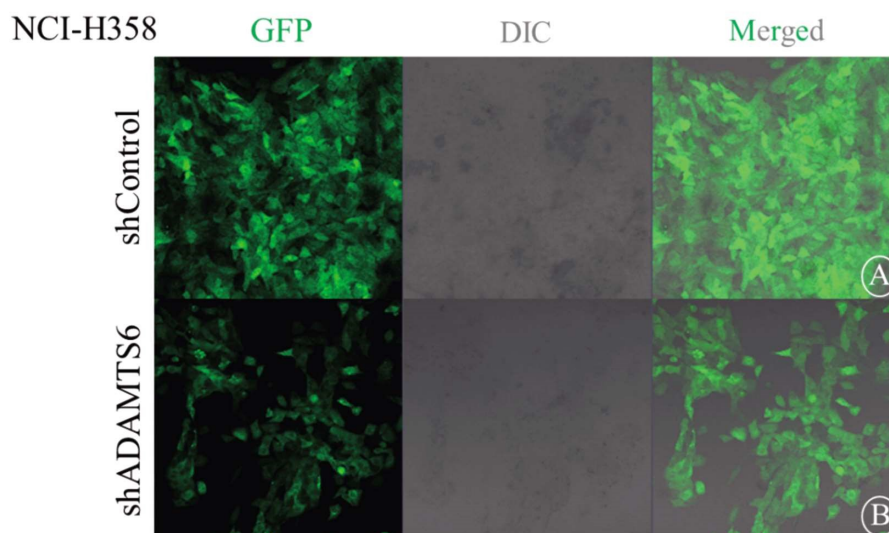


图4 非小细胞肺癌 NCI-H358 细胞株荧光密度观察(A 为 NCI-H358 阴性对照稳转株; B 为 NCI-H358 敲减 shADAMTS6 稳转株)

Fig.4 The fluorescence density observation of NCI-H358 cell line(A: NCI-H358 negative control stable strain; B: NCI-H358 ADAMTS6 stable knockdown strain)

仍是提高我们居民公共健康的主要任务。

RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)以其靶向性高在肿瘤的基因治疗中呈现出极大的优势,小发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)是人工合成的一段茎环发卡结构沉默基因的表达^[13]。目前,已有多项临床药物研究表明 shRNA 治疗肿瘤的安全有效性。例如,Gradalis 公司研制的 FANG 疫苗针对设计转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 的 shRNA 对治疗晚期癌症有效^[14]。Marina Biotech 公司研发的 CEQ508 药物针对 β -catenin 设计 shRNA 对家族性腺瘤性息肉病和结直肠癌有着抑制作用^[15]。ADAMTS 是分泌多结构基质相关的锌金属内肽酶,根据其已知靶向的基质可以分为 19 个家族成员,其主要功能是参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构的调控,对关节炎、肿瘤和心血管疾病的发生发展有着重要的作用^[16]。

目前,有多篇报道关于 ADAMTS 家族成员与多种大肠癌、乳腺癌、脑胶质瘤、胰腺癌和急性淋巴细胞白血病等肿瘤的发生密切相关。例如, Yu 等研究表明在大肠癌中通过 qRT-PCR 检测 60 对大肠癌临床样品发现 ADAMTS5 的 mRNA 水平在大肠癌样本较对照样本显著增高,ADAMTS5 受 miR-140 调控导致蛋白和 mRNA 水平的降低从而导致大肠癌 HCT116 和 RKO 细胞迁移和侵袭能力降低^[17]。Masui 等研究表明在胰腺癌中 ADAMTS1 表达的增高与严重的淋巴结转移或者腹膜后浸润相关,并且 ADAMTS1 高表达表现为较差的临床预后^[18]。Janka 等研究表明 ADAMTS5 的 mRNA 和蛋白水平在人类胶质母细胞瘤中表达升高,并且免疫荧光实验证明 ADAMTS5 与胶质细胞瘤中细胞外蛋白聚糖 Brevican 存在共定位现象,研究者推断 ADAMTS5 蛋白酶与有助于增加胶质细胞瘤的侵袭能力^[19]。Li 等研究表明在乳腺癌中 miR-365 处于高表达状态而

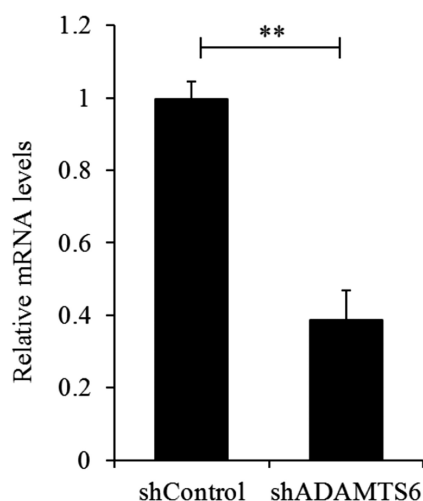


图 5 通过 qRT-PCR 进行 ADAMTS6 敲减 mRNA 抑制效果检测

Fig.5 The detection of ADAMTS6 mRNA inhibition by qRT-PCR

Note: ** $P < 0.01$, compared with shControl group.

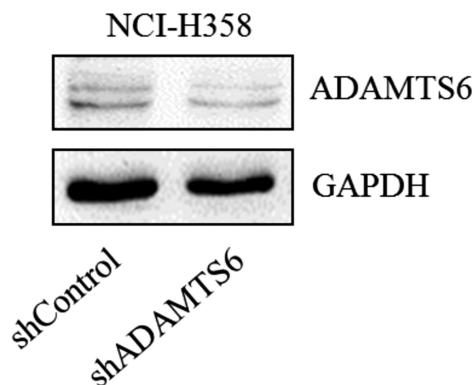


图 6 通过 Western blot 进行慢病毒敲减 ADAMTS6 蛋白效果检测

Fig.6 The detection of ADAMTS6 protein inhibition by Western blot

ADAMTS1 表达下调,miR-365 表达的下调可以抑制乳腺癌细胞体外的增值,在乳腺癌细胞 MCF7 和 MDA-MB-231 中过表达 miR-365 抑制剂可以诱导细胞 G0/G1 期阻滞和抑制细胞侵袭,通过 Western blot 和报告基因实验证明 ADAMTS1 是 miR-365 的直接靶点,作者由此认为过表达 miR-365 可以通过靶向 ADAMTS1 促进乳腺癌细胞的增值和侵袭能力^[20]。Liu 等研究者通过比较 35 例急性淋巴细胞白血病患者和 30 名健康对照者的血浆中 ADAMTS13 水平发现 ADAMTS13 在急性淋巴细胞白血病患者中处于低表达状态且与 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)呈负相关状态,ADAMTS13 的表达水平与急性淋巴细胞白血病的危险分层有着密切关系^[21]。

目前,有关于 ADAMTS6 与 NSCLC 的研究尚未见报道,本次研究首先通过数据库分析了 ADAMTS6 在 NSCLC 组织和肺正常组织的表达,结果显示较肺正常组织而言,ADAMTS6 在 NSCLC 组织中处于显著高表达,且 ADAMTS6 高表达 NSCLC 患者的预后较差。两种数据库的预测结果提示 ADAMTS6 在 NSCLC 的发生和发展起着促进的作用。随后我们设计 ADAMTS6 的干扰序列并进行敲减载体构建,使用 pGLV3-GFP 载体且经过双酶切结果显示载体已经成功线性化,通过干扰序列与载体连接后进行测序,结果显示干扰发卡

结构已成功连接到载体上,接着使用干扰质粒进行慢病毒包装感染 NCI-H358 细胞株,通过嘌呤霉素进行稳定细胞系筛选,观察绿色荧光后我们发现荧光密度在 95 %以上,说明细胞已被慢病毒感染成功,为了验证我们 ADAMTS6 的干扰序列的敲减效果,我们进行 qRT-PCR 和 Western blot 实验,验证敲减细胞较对照细胞中 ADAMTS6 的 mRNA 和蛋白水平,结果显示 ADAMTS6 被敲减成功。

总之,本研究通过数据库预测了 ADAMTS6 与 NSCLC 的密切关系并建立了 ADAMTS6 稳定敲减 NSCLC 细胞系模型,为日后研究 ADAMTS6 在 NSCLC 的功能及机制奠定了良好的基础。

参考文献(References)

- [1] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances[J]. Translational lung cancer research, 2016, 5(3): 288-300
- [2] Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, et al. Non-small-cell lung cancer[J]. Nature reviews Disease primers, 2015, 1: 15009
- [3] Chan BA, Hughes BG. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future [J]. Translational lung cancer research, 2015, 4(1): 36-54
- [4] Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family[J]. Genome biology, 2015, 16(1): 113
- [5] Dubail J, Apte SS. Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics[J]. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2015, 44-46: 24-37
- [6] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses[J]. Current protocols in bioinformatics, 2016, 54(1): 1.30.1-1.30.13
- [7] Rhodes DR, Yu J, Shanker K, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform [J]. Neoplasia (New York, NY), 2004, 6(1): 1-6
- [8] Lanczky A, Nagy A, Bottai G, et al. miRpower: a web-tool to validate survival-associated miRNAs utilizing expression data from 2178 breast cancer patients [J]. Breast cancer research and treatment, 2016, 160(3): 439-446
- [9] Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001; 98(24): 13784-13789
- [10] Der SD, Sykes J, Pintilie M, et al. Validation of a histology-independent prognostic gene signature for early-stage, non-small-cell lung cancer including stage IA patients [J]. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 2014, 9(1): 59-64
- [11] Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention[J]. Clinics in chest medicine, 2011, 32(4): 605-644
- [12] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Epidemiology of lung cancer in China[J]. Thoracic cancer, 2015, 6(2): 209-215
- [13] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. Genes & development, 2002, 16(8): 948-958

(下转第 1415 页)

- [11] Chen Jian-li, Chen Jun-mao, Wang Xiao-tao, et al. Ligustrazine alleviates acute pancreatitis by accelerating acinar cell apoptosis at early phase via the suppression of p38 and Erk MAPK pathways[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 82: 1-7
- [12] Gao Cheng-jin, Liu Yu-hao, Ma Li-jie, et al. Effects of Ligustrazine on pulmonary damage in rats following scald injury[J]. *Burns*, 2012, 38(5): 743-750
- [13] Wang Rong, Ma Chun-hua, Zhou Fan, et al. Siwu decoction attenuates oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016, 14 (7): 499-507
- [14] Cheng Xian-Chao, Liu Xin-yong, Xu Wen-Fang, et al. Design, synthesis, and biological activities of novel Ligustrazine derivatives [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15(10): 3315-3320
- [15] Zou Jin-mi, Gao Ping, Hao Xia, et al. Recent progress in the structural modification and pharmacological activities of ligustrazine derivatives [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 147: 150-162
- [16] 国家药典委员会. 中国药典 2010 年版第二增补本[P]. 348
- [17] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准新药转正标准第 78 册 [P]. 148-149
- [18] Lin Zheng, Gong Zi-peng, Lu Yuan, et al. A UPLC MSMS method for simultaneous determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, rosmarinic acid, and ligustrazine in rat plasma, and its application to pharmacokinetic studies of Shenxiong glucose injection in rats[J]. *Journal of Chromatography. B*, 2015, 997(5): 210-217
- [19] Chen Hong-ping, Gao Guan-wei, Liu Ping-xiang, et al. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry for the determination of fipronil and its metabolites in tea and chrysanthemum [J]. *Food Chemistry*, 2018(246): 328-334
- [20] Dou Li-li, Duan Li, Guo Long, et al. An UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of quercetin 3-O-rutinoside, kaempferol 3-O-rutinoside, isorhamnetin 3-O-rutinoside, bilobalide and ligustrazine in rat plasma, and its application to pharmacokinetic study of Xingxiong injection [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2017, 15(9): 710-720
- [21] Izabela Matysiak, Maria Balcerzak, Rajmund Michalski. Ion chromatography with conductometric detection for quantitation of formic acid in Polish bee honey[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 73(7): 55-59
- [22] Qiu Hui-min, Geng Jin-ju, Han Chao, et al. Determination of Phosphite, Phosphate, Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid by Two-Dimensional Ion Chromatography System Coupled with Capillary Ion Chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(12): 1910-1914
- [23] Han C, Geng J, Xie X. Determination of phosphite in a eutrophic freshwater lake by suppressed conductivity ion chromatography [J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(19): 10667-10674
- [24] Segawa H, Yamanaka S, Ito M, et al. Internalization of renal type IIc Na-Pi cotransporter in response to a highphosphate diet[J]. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 2005, 288(3): 587-596
- [25] Miyamoto K, Ito M, Tatsumi S, et al. New aspect of renal phosphate reabsorption: the type IIc sodium-dependent phosphate transporter[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 27(5): 503-515
- [26] Narchi H. Hyperostosis with hyperphosphatemia: evidence of familial occurrence and association with tumoral calcinosis [J]. *Journal of Pediatrics*, 1997, 99(5): 745-748
- [27] McClatchie S, Bremner AD. Tumoral calcinosis: an unrecognized disease[J]. *British Medical Journal*, 1969, 1(5637): 153-155
- [28] Hacihanefioglu U. Tumoral calcinosis. A clinical and pathological study of eleven unreported cases in Turkey [J]. *Journal of bone and joint surgery*, 1978, 60(8): 1131-1135
- [29] Adams WM, Laitt RD, Davies M, et al. Familial tumoral calcinosis: association with cerebral and peripheral aneurysm formation [J]. *Journal of Neuroradiology*, 1999, 41(5): 351-355
- [30] Goldenstein PT, Neves PD, Balbo BE, et al. Dialysis as a treatment option for a patient with normal kidney function and familial tumoral calcinosis due to a compound heterozygous FGF23 mutation [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2018, 72(3): 457-461

(上接第 1405 页)

- [14] Senzer N, Barve M, Kuhn J, et al. Phase I trial of "bi-shRNAi(furin)/GMCSF DNA/autologous tumor cell" vaccine (FANG) in advanced cancer [J]. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2012, 20(3): 679-686
- [15] Trieu V, Hwang L, Ng K, et al. 515P First-in-human Phase I study of bacterial RNA interference therapeutic CEQ508 in patients with familial adenomatous polyposis (FAP)[J]. *Annals of Oncology*, 2017, 28(suppl_5): mdx393.041-mdx393.041
- [16] Kelwick R, Desantis I, Wheeler GN, et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family[J]. *Genome biology*, 2015, 16(1): 113
- [17] Lee S, Yoon DS, Paik S, et al. microRNA-495 inhibits chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by targeting Sox9 [J]. *Stem cells and development*, 2014, 23(15): 1798-1808
- [18] Masui T, Hosotani R, Tsuji S, et al. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer [J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2001, 7 (11): 3437-3443
- [19] Held-Feindt J, Paredes EB, Blomer U, et al. Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas[J]. *International journal of cancer*, 2006, 118(1): 55-61
- [20] Li M, Liu L, Zang W, et al. miR365 overexpression promotes cell proliferation and invasion by targeting ADAMTS-1 in breast cancer [J]. *International journal of oncology*, 2015, 47(1): 296-302
- [21] Liu C, Zhao L, Zhao J, et al. Decreased ADAMTS-13 level is related to inflammation factors and risk stratification of acute lymphoblastic leukemia patients[J]. *Medicine*, 2017, 96(7): e6136