

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.16.011

shRNA 抑制活化诱导的胞苷脱氨酶(AID) 对前列腺癌细胞 C4-2 表型的影响 *

范进锋¹ 陈松强¹ 马哲¹ 李琦^{1,2} 周治彦¹ 金应霞³ 梁培育^{1Δ} 李浩勇^{1,2Δ}

(1 海南医学院第一附属医院泌尿外科 海南海口 570102;

2 武汉大学人民医院泌尿外科 湖北 武汉 430060; 3 武汉大学第一临床学院中心实验室 湖北 武汉 430060)

摘要 目的:探讨 AID 在前列腺癌中的表达情况, AID 对前列腺癌细胞 C4-2 的侵袭、迁移、增殖以及凋亡方面的影响。**方法:**应用靶向敲减 AID 的慢病毒对前列腺癌细胞 C4-2 进行干扰, 运用 Western-blot、免疫组化、平板克隆形成、流式、Transwell 实验对前列腺癌组织和前列腺癌细胞 C4-2 表型的变化情况进行研究。**结果:**临床前列腺癌样本中 AID 高表达, 良性前列腺增生组织中 AID 低表达, 正常前列腺组织不表达 (* $P<0.05$); shRNA 干扰以后的 shAICDA-C4-2 单克隆细胞株中 AID 的表达量显著降低, 其增殖、迁移和侵袭能力阳性对照组 (Monoclonal6) 与阴性对照组 (NC) 相比分别降低 49%、80%、63%, 凋亡率阳性对照组 (Monoclonal6) 为阴性对照组 (NC) 的 3.2 倍。**结论:**前列腺癌组织中 AID 高表达, AID 在促进前列腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭, 抑制前列腺自细胞的凋亡中具有极其重要的作用。AID 表达极可能与前列腺癌的进展、预后明显相关。

关键词:活化诱导的胞苷脱氨酶(AID); RNA 干扰技术(RNAi); 前列腺癌; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

中图分类号:R-33; R737.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)16-3062-06

Effects of shRNA Inhibition of Activation of Cytidine Deaminase (AID) on the Phenotype of Prostate Cancer Cell Line C4-2*

FAN Jin-feng¹, CHEN Song-qiang¹, MA Zhe¹, LI Qi^{1,2}, ZHOU Zhi-yan¹, JIN Ying-xia³, LIANG Pei-yu^{1Δ}, LI Hao-yong^{1,2Δ}

(1 Department of Urology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, 570102, China;

2 Department of Orthopedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China;

3 Wuhan University People's Hospital Central Laboratory, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of AID in prostate cancer and the effect of targeted knockdown on invasion, migration, proliferation and apoptosis of prostate cancer cell line C4-2. **Methods:** Using a lentivirus targeting knockdown of AID to interfere with prostate cancer cell line C4-2; western-blot, immunohistochemistry, flow cytometry and transwell assay were used to study the expression of AID in prostate tissue and the changes of the phenotype of prostate cancer cell line C4-2. **Results:** The relative expression level of AID in clinical prostate cancer samples was 9.02 ± 1.85 , which was significantly higher than that in benign prostatic hyperplasia tissues 1.89 ± 0.45 , and normal prostate tissues were not expressed (* $P<0.05$); the expression of AID in the shAICDA-C4-2 monoclonal cell line was significantly decreased after shRNA interference, and the positive control group (Monoclonal6) with proliferation, migration and invasion ability decreased by 49%, 80%, 63%, respectively, compared with the negative control group (NC), and the apoptotic rate of positive control group (Monoclonal6) was 3.2 times that of negative control group (NC). **Conclusions:** High expression of AID in prostate cancer tissues, AID plays an extremely important role in promoting the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells and inhibiting the apoptosis of prostate cancer cells. Therefore, its expression highly likely to be significantly associated with the progression and prognosis of prostate cancer.

Key words: Activation-induced cytidine deaminase (AID); RNA interference (RNAi); Prostate cancer; Proliferation; Apoptosis; Migration; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)16-3062-06

前言

活化诱导的胞苷脱氨酶 (Activation-induced cytidine

deaminase, AID)是针对胞嘧啶(C)的脱氨酶,属于 APOBEC 家族的成员,这些成员具有同源催化区^[1]。生理状态下, AID 通过脱氨基作用 dC 突变为 dU,从而引起 dU:dG 错配,进而调整第

* 基金项目:海南省自然科学基金项目(20158298);国家自然科学基金项目(81360357);海南省社会发展重大专项课题(2015SF31)

作者简介:范进锋(1990-),硕士研究生,主要研究方向:肿瘤学, E-mail: 769963801@qq.com,电话:15290805154

Δ 通讯作者:梁培育(1965-),硕士生导师,主要研究方向:肿瘤学, E-mail: 1076447336@qq.com,电话:13976616788

李浩勇(1974-),硕士生导师,主要研究方向:肿瘤学, E-mail: haoyli5118@126.com,电话:17764060728

(收稿日期:2018-12-06 接受日期:2018-12-30)

二抗体的多样性。但,近期的研究发现在某些病理状态下比如慢性炎症^[2]、病毒感染^[3]发生时,则可引起原癌基因/抑癌基因异常表达,最终导致恶性疾病的发生^[3,4]。

DNA 表达的调控受到表观遗传修饰的影响。现一般认为 DNA 的脱甲基化促进基因的表达,而过度甲基化则作用相反。DNA 的甲基化通常发生在 CpG 岛上,有学者指出,AID 可能通过其脱氨基作用使 CpG 岛上的 5-甲基胞嘧啶(5-mC)突变为 5-甲基尿嘧啶(5-mU),进而启动 DNA 的错配修复机制,利用 dC 取代 5-mU,最终使 5-mC 转换成 dC,从而完成脱甲基作用^[5]。虽然 AID 脱甲基作用的机制尚不完全明确,但此发现为 AID 导致恶性疾病的研究提供了新的思路。目前,尚无针对 AID 对前列腺癌进展相关性的研究,本研究旨在探讨 AID 在前列腺癌组织中的表达以及降低其表达对前列腺癌细胞 C4-2 的增殖、凋亡、迁移和侵袭等方面的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

前列腺癌 C4-2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司 RPMI Medium 1640 培养基(1×)、胎牛血清购自 Gibco 公司,胰蛋白酶购自杭州吉诺生物医药技术有限公司,青霉素-链霉素双抗购自 Gibco 公司,SDS-PAGE 电泳凝胶试剂购自上海维奥生物科技有限公司,小鼠 AID、 β -actin 一抗购自 CST 公司,山羊抗小鼠二抗购自 LICOR 公司, LV-AICDA-RNAi (5'-TGACTTACGAGACGCATTT-3')和 CON077 (5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'),PE Annexin V 凋亡检测试剂盒购自 BD Pharmingen 公司。

1.2 方法

1.2.1 人体样本 临床样本来自武汉大学人民医院病理科 2016 年 2 月至 2017 年 7 月收集的 4 例根治性前列腺癌切除的组织样本,8 例膀胱癌联合前列腺切除的组织样本(前列腺均无肿瘤转移,其中有 4 例为正常前列腺组织,4 例为良性前列腺增生组织)。样本取出后送至病理科切取部分组织用于 Western-blot 实验,剩余组织做病理诊断和石蜡包埋切片用于免疫组化。

1.2.2 细胞培养 C4-2 人前列腺癌细胞系使用含 10%胎牛血清及 1%青霉素的 RPMI-1640 培养基,在 37℃,5%CO₂ 浓度的恒温细胞培养箱内进行培养,2-3 天传代一次,当细胞生长达对数期时进行实验处理。

1.2.3 细胞转染及单克隆挑选 将处于对数生长期的 C4-2 细胞以 5000 个/孔种在 24 孔板内,培养过夜;靶向敲减 AID 的慢病毒以 MOI100:1 的比例对 C4-2 前列腺癌细胞系进行转染,然后将 Polybrene 以 1 μ L/孔的量分别加入两组细胞转染过夜;24 小时后更换新鲜培养基,继续培养两天;三天后于倒置荧光显微镜下观察细胞的转染情况和转染效率,消化细胞,细胞计数后以 200 个/皿种于大皿内。间隔 3-4 天根据细胞贴壁情况续加或更换新鲜培养基,直至长出肉眼可见的细胞集落,在荧光显微镜下观察带有荧光的细胞集落并做标记,将标记好的细胞集落挑出来种在 6 孔板或者培养瓶中继续培养用于后续实验。

1.2.4 蛋白质提取及 Western Blot 实验 组织蛋白提取:随机

从 12 例样本中的分别取部分组织进行称量,液氮冷冻后将组织研磨成粉末状装入 1.5 mL EP 管中,然后以 4 μ L·g⁻¹ 的量将配置好的裂解液(RIPA1000:COCKTAIL40:PMSF10)分别加入 EP 管中冰上裂解 30 分钟,然后用超声混悬仪将所得液体进行进一步裂解 30 秒。将粉碎好的样品放入低温离心机 12000×,4℃,离心 20 分钟,吸取少许上清用于测蛋白浓度,剩余的上清转移到新的 EP 管中,加 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,100℃煮 5 分钟,冷却以后用于做 Western Blot 或者 -80℃冻存用于后续实验;细胞蛋白提取:将处于对数生长期的细胞消化下来,离心,加裂解液,后续的步骤与组织蛋白提取相同。

配置 SDS-PAGE 电泳凝胶(配置方法按照试剂盒说明书配置)、电泳缓冲液和电转缓冲液,将提取的组织蛋白按 60 μ g/孔的量加入,细胞蛋白按 40 μ g/孔的量加入配置好的凝胶中进行电泳分离,然后转膜、封闭、孵一抗(抗体稀释比例按抗体说明书)4℃摇床过夜,二抗常温孵育 1 小时,避光洗膜后用 Licor dyssey 双通道红外成像系统(美国 Li-COR 公司)检测杂交信号。

1.2.5 免疫组织化学染色 委托武汉大学人民医院病理科对所取得的 12 例临床样本进行包埋切片和免疫组化处理。处理流程如下:将刚切下来的临床样本用多聚甲醛固定,脱水,然后用石蜡包埋切片,制片,接下来进行脱蜡和水化,然后进行热抗原修复,灭活内源酶活性,封闭非特异性位点,甩掉封闭液,孵一抗 4℃过夜,二抗孵育,DAB 显色,苏木素复染,1%盐酸酒精分化,自来水冲洗,脱水,中性树胶封片,晾干即可拍照,将处理过的切片在正置显微镜下观察并拍照。

1.2.6 细胞平板克隆形成实验 将处于对数生长期的细胞用胰酶消化下来,计数,然后以 500 个/孔的量种在 6 孔板中,放入培养箱培养,直至有肉眼可见的细胞集落出现(期间每隔 3-4 天更换一次新鲜培养基)。吸去旧培养基用 PBS 漂洗两遍,将入 500 μ L/孔的多聚甲醛固定 20 分钟,吸去多聚甲醛,PBS 漂洗两遍。加入 1/1000 的结晶紫染色 15 分钟,PBS 漂洗三遍,待其在室温下晾干后进行拍照,用 ImageJ2x 软件进行统计学分析。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 将处于对数生长期的细胞消化下来,离心后重悬,将细胞悬液按 1:5 的比例加入 6 孔板中培养过夜。第二天更换无血清培养基进行饥饿处理过夜。后续实验按照凋亡试剂盒说明书进行。最后用流式细胞仪进行检测。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力 Transwell 迁移实验:消化细胞,离心后用无血清培养基重悬、计数,上室加 1×10⁵ 个细胞用 200 μ L 无血清培养基稀释,下室加 600 μ L 20%FBS 培养基,放置恒温细胞培养箱 48 小时,75%酒精固定 20 分钟,PBS 洗 3 次,每次 3 分钟,0.1%结晶紫染色 30 分钟,PBS 洗 3 次,每次 3 分钟,室温晾干后于正置显微镜下拍照。

Transwell 侵袭试验:将 BD Matrixgel 基质胶与无血清培养基按 1:8 的比例混匀后均匀铺于 Transwell 小室内,放置 37℃培养箱中 5 小时,后续实验同上(注:Transwell 侵袭试验上室加入 2×10⁵ 个细胞)。上述实验重复三次。

1.3 统计方法

通过 GraphPad Prism7 软件对数据进行分析,每种实验均经过三次重复,实验数据使用平均值(mean)±标准差(SD),其

中 T 检验或单因素方差分析用于数据的处理, 当 P 值 <0.05 时, 视为具有统计学差异。

2 结果

2.1 AID 在前列腺正常组织、前列腺增生组织、前列腺癌组织中的表达

Western Blot 和免疫组化的结果显示 AID 在正常及前列腺增生组织中的表达量要明显低于前列腺癌组织中的表达量。在收集的 12 例临床样本中除了正常前列腺组织以外其他组织均有 AID 的表达。Western Blot 实验结果显示: 前列腺癌中 AID 高表达, 其相对表达量 9.02 ± 1.85 , 前列腺良性增生组织中 AID 表达量明显降低, 其相对表达量 1.89 ± 0.45 , 正常前列腺组织中 AID 不表达 (图 1A、B), 组间差异显著 ($P < 0.05^*$, T test)。在免疫组化实验中 (图 1C), 由于单纯计算阳性区域面

积会忽略强度对结果的影响, 所以我们使用 Image Pro Plus 对图片阳性染色部分进行平均光密度值检测 (图 1D), 其中癌组织的平均光密度值为 0.605 ± 0.057 , 良性增生组织的平均光密度值为 0.237 ± 0.028 , 正常组织的平均光密度值为 0.149 ± 0.029 , 组间差异显著 ($P < 0.05^*$, T test), 并且根据染色情况可以看出在癌变的腺上皮细胞中 AID 的表达量最高, 人体良性增生的前列腺组织 AID 的表达量显著低于前列腺癌组织 ($*P < 0.05$), 而显著高于正常前列腺组织 ($*P < 0.05$), 见图 1。

2.2 转染后 AID 的表达

将设计的 shRNA 序列通过慢病毒载体对 C4-2 细胞中 AID 的表达进行干扰 (图 2A), 随后对慢病毒转染后的 C4-2 细胞进行了单克隆筛选, 筛选出抑制效果最明显的单克隆细胞株。其中 shAICDA-C4-2 为实验组, NC-C4-2 为阴性对照组 (图 2A)。对转染后的细胞进行了单克隆筛选并通过 Western Blot

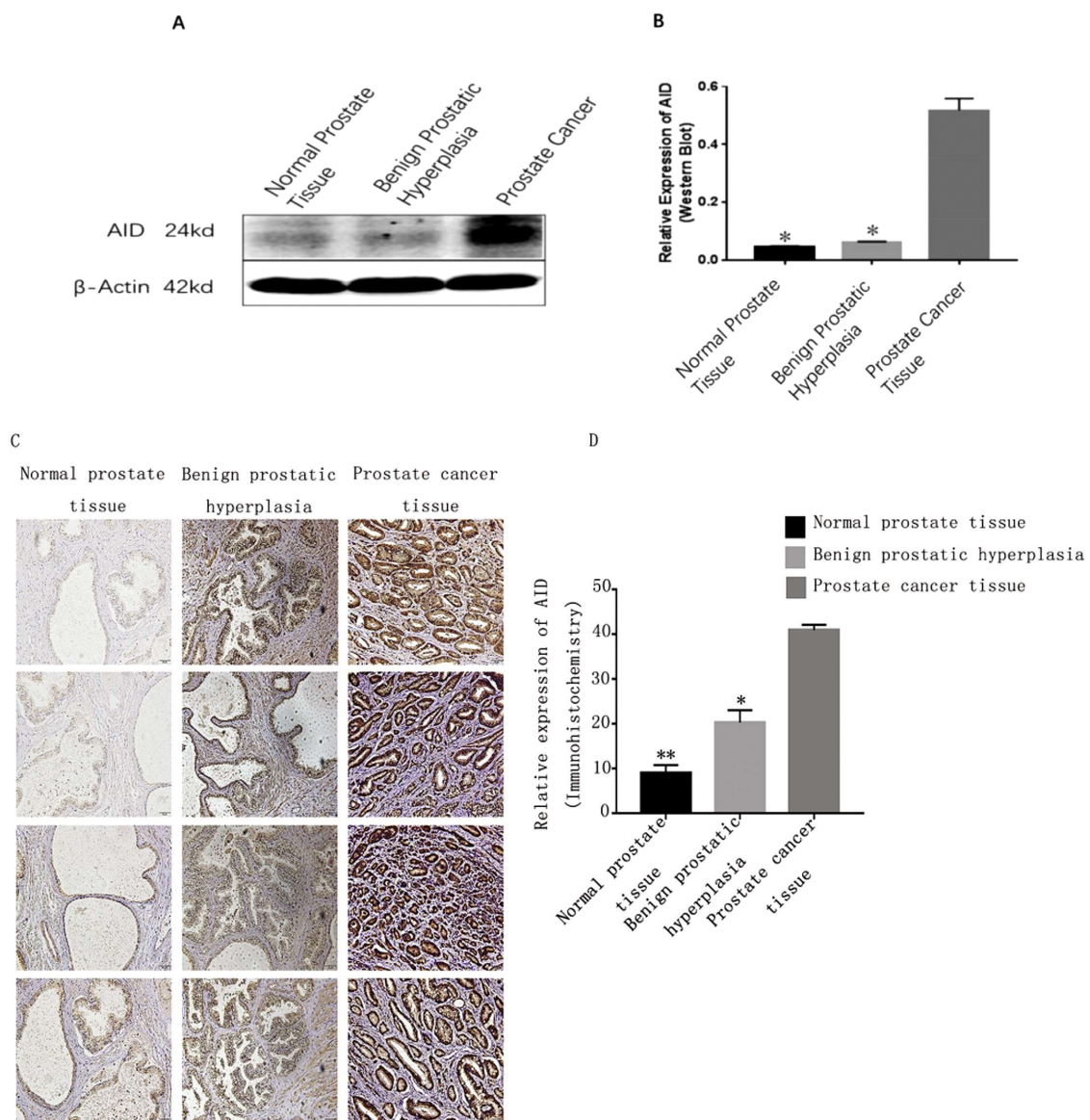


图 1 AID 在前列腺癌、前列腺良性增生以及正常前列腺组织中的表达情况, 分别通过 Western Blot 和免疫组织化学染色实验进行检测

Fig.1 The expression of AID in prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, and normal prostate tissues was detected by Western Blot and immunohistochemical staining experiments, respectively

Note: Data were expressed as Mean $\pm$ SD, $n=12$. ** $P < 0.05$, comparison between prostate cancer tissue, normal prostate tissue and benign prostatic hyperplasia.

(图 2B、C)对 AID 的表达量进行检测和分析。从 Western Blot 结果和统计分析图中可以看出筛选的单克隆细胞株中除了单克隆细胞株 2(Monoclonal2)没有被敲低以外,其它单克隆均明显降低,其中单克隆 6(Monoclonal6)敲低效果最显著,相对于空白对照组下降了约 60%, 相对于阴性对照组下降了约 56%,

而空白对照组和阴性对照组不存在统计学差异 ($P>0.05$, T test),而实验组(除了单克隆细胞株 2(Monoclonal2))和空白对照组与阴性对照组之间存在统计学差异($*P<0.05$)。因此筛选出了单克隆 3(Monoclonal3)和单克隆 6(Monoclonal6)这两株实验组细胞进行随后实验。见图 2。

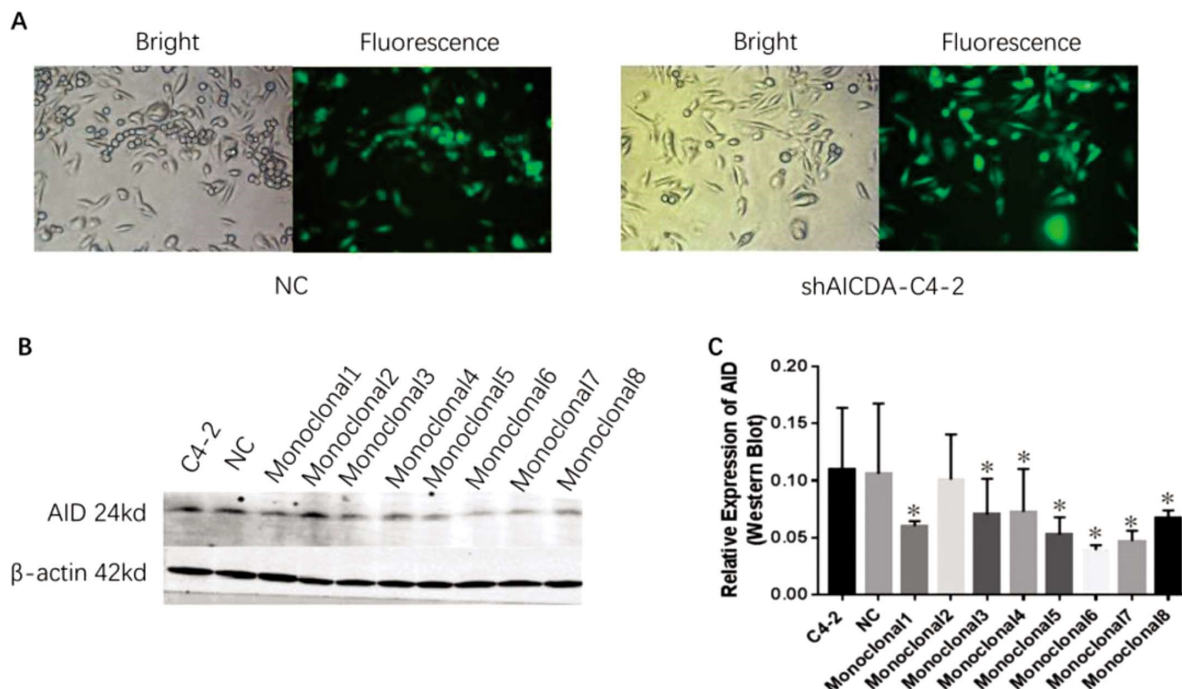


图 2 通过 shRNA 抑制 C4-2 细胞中 AID 的表达,通过筛选单克隆,挑选出抑制效果最好的单克隆细胞株,通过 Western Blot 检测抑制前后 AID 的相对表达量

Fig.2 The shRNA was used to inhibit the expression of AID in C4-2 cells. The single clone was selected to select the best clonal cell line.

The relative expression of AID before and after inhibition was detected by Western Blot

Note: $**P<0.05$, the silencing effect of monoclonal 6 in these eight monoclonals was the best compared with other monoclonals, the blank control and negative control.

2.3 AID 对前列腺癌细胞株(C4-2)的增殖和凋亡的影响

通过平板克隆形成对转染了 shRNA 单克隆细胞株 (Monoclonal3,6)的增殖情况与空白组 (C4-2)和阴性对照组 (NC)进行对比(图 3A、B),从图中可以明显的看出 AID 敲低以后的单克隆细胞株与空白组 (C4-2)和阴性对照组 (NC)相比增殖能力显著降低 ($*P<0.05$)。根据此实验结果,显示抑制 AID 的表达导致 C4-2 细胞增殖能力明显下降。利用流式细胞术对 C4-2、NC、Monoclonal3 和 Monoclonal6 四组细胞的凋亡情况进行检测(图 3C)。结果显示,在早期凋亡、晚期凋亡以及总体凋亡率方面,实验组(即单克隆组)细胞株均明显高于空白组和阴性对照组细胞株的凋亡率($*P<0.05$, T test),并且凋亡主要集中在晚期。见图 3。

2.4 AID 对前列腺癌细胞株 C4-2 迁移和侵袭能力的影响

通过 Transwell 小室对 C4-2、NC、Monoclonal3 和 Monoclonal6 细胞的迁移和侵袭能力进行检测。在迁移实验中(图 A、B),实验组 (Monoclonal3 和 Monoclonal6)的迁移能力明显低于空白对照组 (C4-2)和阴性对照组 (NC),而空白对照组 (C4-2)和阴性对照组 (NC)之间无显著性差异。Transwell 侵袭实验中(图 C、D)实验组 (Monoclonal3 和 Monoclonal6)的侵袭能力明显低于空白对照组 (C4-2)和阴性对照组 (NC),而空白

对照组 (C4-2)和阴性对照组 (NC)之间无显著性差异。见图 4。

3 讨论

AID 作为胞苷脱氨酶家族(APOBEC)的成员之一,它们具有相同的同源催化区^[6]。在生理情况下 AID 主要在外周淋巴组织的生发中心里面的活化的 B 细胞中产生,主要的作用是作用在免疫球蛋白基因使其发生体细胞高频突变(SHM)和类别转换重组(CSR),产生针对特定抗原的特异性高亲和力抗体^[7]。但是在某些病理情况下,比如慢性炎症、病原微生物感染等,也会导致 AID 发生异位表达^[8]。AID 主要在细胞核发挥催化作用,催化细胞核基因 DNA 中的 dC 转化成 dU,导致 U:G 错配和 DNA 双链的断裂^[9]。这种错配可以被基因损伤修复系统完全修复,但是当 DNA 复制发生在基因修复之前,那么这个突变就会被复制下来产生基因突变^[10]。NF-κB(核因子 κB)作为一个连接炎症和肿瘤之间的一个重要的分子,在慢性炎症引起的基因突变从而导致肿瘤发生的过程中发挥了非常重要的作用^[11]。最近的研究已经证实 NF-κB 作为一个细胞核因子可以结合在 AID 基因(AICDA)的基因启动子区的区段 1(region1)的位置作为一个基因转录的启动因子参与 AID 的转录^[12]。AID 作为一个核苷酸编辑的酶在很多情况下可以引起染色体基因发生突变,由

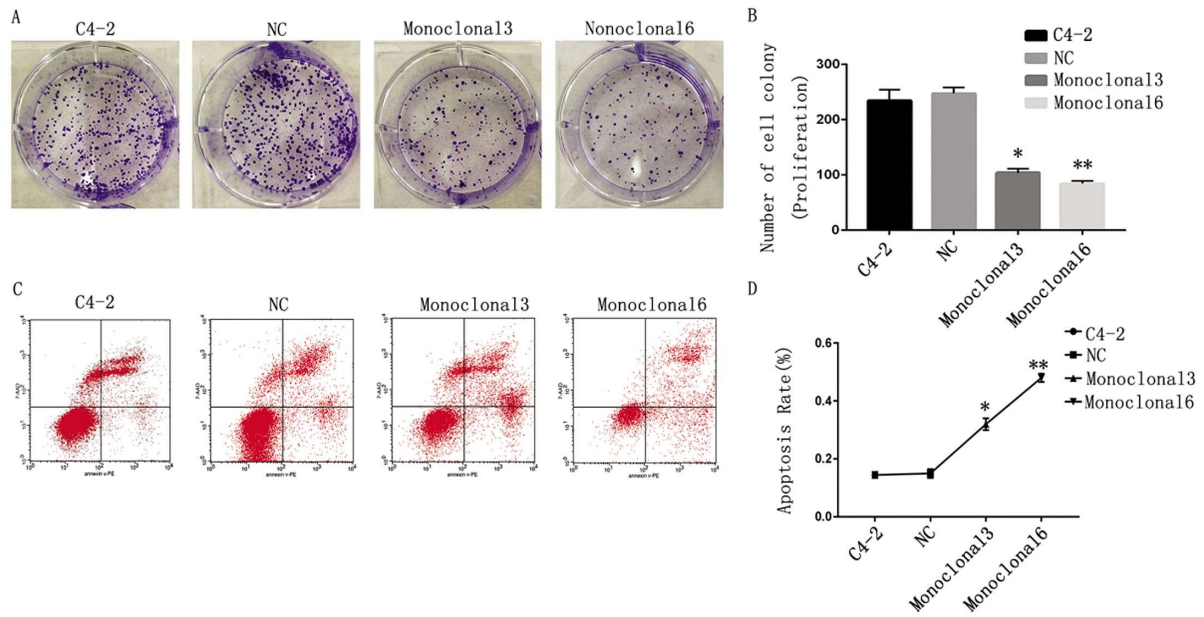


图3 转染后 C4-2 细胞的增殖以及凋亡情况

Fig.3 Proliferation and Apoptosis of C4-2 Cells after Transfection

Note: The cell proliferation rate of the two monoclonal groups was significantly lower than that of the blank control and negative groups, ** $P < 0.05$; the apoptotic rate of shAICDA-C4-2 cells was significantly higher than that of the blank control and the negative control groups, ** $P < 0.05$.

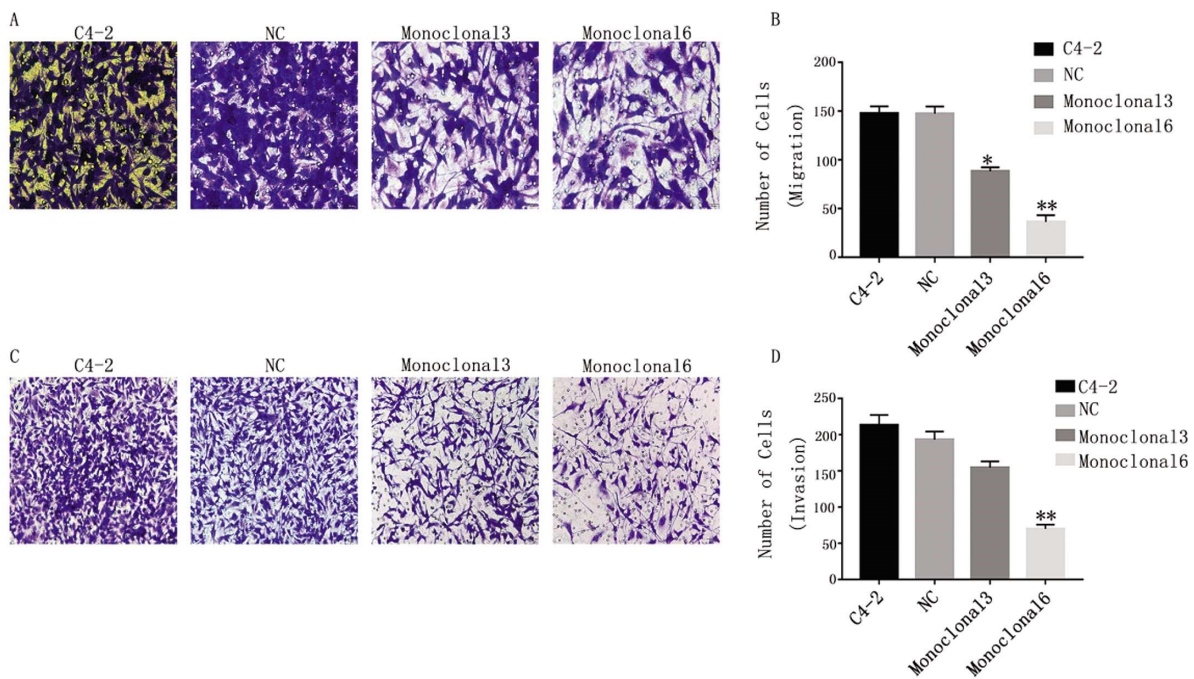


图4 正置显微镜下观察到的实验组(Monoclonal3 和 Monoclonal6)与空白对照组(C4-2)和阴性对照组(NC)的细胞迁移和侵袭情况以及根据实验结果进行的统计学分析

Fig.4 Cell migration and invasion of the experimental groups (Monoclonal3 and Monoclonal6) observed with the inverted microscope, blank control group (C4-2) and negative control group (NC), and statistical analysis based on the experimental results

Note: The invasion and migration ability of the two monoclonal groups were significantly lower than that of the blank control and negative control groups, ** $P < 0.05$.

慢性炎症引起的组织的恶变主要是通过 NF- κ B 这条信号通路,引起下游的靶基因 AICDA 表达上调,导致肿瘤相关基因发生突变,例如:C-Myc^[13]、TP53^[14]等,致使基因组稳定性降低,肿瘤易感性增加。在肿瘤组织中 AID 的表达量也是增高的,在肿瘤组织当中有可能是 AID 导致 TP53 基因发生点突变,突变以

后的 TP53 基因产生的蛋白具有新的功能而且与肿瘤的发生和发展有关,影响肿瘤细胞的恶性生物学功能,例如:增殖、凋亡、侵袭和迁移^[15]。因此,可以推测 AID 不仅在肿瘤的形成过程中发挥了重要的作用,而且在肿瘤形成以后的各种生物学行为的维持方面也产生了积极地影响。

研究发现 AID 在胚胎发育以及炎症引起的肿瘤细胞中表达对维持胚胎干细胞与肿瘤干细胞的特性,促进肿瘤细胞的增殖具有非常重要的作用^[16,17], 另外也有研究发现诱导上皮-间质转化(EMT)发生的细胞因子也是诱导 AID 表达从而促进了 EMT 的发生有助于肿瘤细胞的侵袭和转移^[18]。本研究实验结果显示了 AID 在肿瘤组织中的能表达量明显高于良性前列腺增生和前列腺正常组织中的表达量。前列腺癌细胞 C4-2 细胞株高表达 AID, 因此本研究选取 C4-2 构建实验模型。使用 shAICDA 对 C4-2 细胞中的 AID mRNA 进行敲低。通过单克隆挑选筛选出沉默效果最明显的细胞株进行后续的实验,结果发现 AID 敲低的单克隆细胞株其增殖、侵袭、迁移能力与对照组相比明显降低,凋亡率同对照组相比明显增高。因此推断 AID 在维持前列腺癌细胞的各种恶性表型方面发挥了非常重要的作用。之前的研究中本研究小组发现了人类免疫球蛋白 G (IgG)具有促进膀胱癌细胞增殖并抑制其凋亡的作用^[19],但是其调控机制目前还不清楚。AID 作为一个核苷酸编辑酶,特别是在 B 淋巴细胞当中发生 CSR 产生不同类型的免疫球蛋白^[20]。AID 可由 NF- κ B 通路诱导产生,而 NF- κ B 是由 BCR 和 TCR 协同作用刺激其表达,这些过程发生在 B 淋巴细胞上最终导致 CSR 和 SHM^[21]。当 BCR 被其 mAb 阻断以后,AID 表达量明显降低,并且由此而产生的 IgG1,尤其是 sIgG1 也随之降低^[22]。综合本次实验和之前的研究推测在前列腺上皮细胞癌中也存在这一条通路,即 BCR 和 TCR 协同作用激活 NF- κ B,NF- κ B 进一步激活 AID,刺激 IgG1 的表达从而促进了前列腺癌的进展。

在生理情况下,AID 在免疫系统当中发挥的作用已经研究了很长时间现在已经比较清楚。但是在某些病理情况下,比如:炎症、感染等的情况下 AID 会引起基因组染色体不稳定,可能诱发肿瘤的发生,目前,对 AID 引起的肿瘤性突变尚未完全研究清楚。本研究表明了 AID 在维持前列腺癌 C4-2 细胞的增殖、侵袭、迁移、和凋亡方面发挥了重要的作用。通过对 AID 的研究有可能为临床治疗前列腺癌提供一个有效靶点。

参考文献(References)

- [1] Shen H M, Bozek G, Pinkert C A, et al. Expression of AID transgene is regulated in activated B cells but not in resting B cells and kidney[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(7): 1883-1892
- [2] Mechtcheriakova D, Svoboda M, Meshcheryakova A, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) linking immunity, chronic inflammation, and cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(9): 1591-1598
- [3] Ren W, Ye X, Su H, et al. Genetic landscape of hepatitis B virus-associated diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2018, 131(24): 2670-2681
- [4] Mu Y, Zelazowska MA, McBride KM. Phosphorylation promotes activation-induced cytidine deaminase activity at the Myc oncogene [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(12): 3543-3552
- [5] Franchini D M, Schmitz K M, Petersen-Mahrt S K. 5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group [J]. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 419-441
- [6] Zan H, Casali P. Regulation of Aicda expression and AID activity[J]. *Autoimmunity*, 2013, 46(2): 83-101
- [7] Qiao Q, Wang L, Meng F L, et al. AID Recognizes Structured DNA for Class Switch Recombination[J]. *Mol Cell*, 2017, 67(3): 361-373
- [8] Shimizu T, Marusawa H, Endo Y, et al. Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(7): 1201-1206
- [9] Bastianello G, Arakawa H. A double-strand break can trigger immunoglobulin gene conversion[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1): 231-243
- [10] Liu M, Schatz D G. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation[J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(4): 173-181
- [11] Mohri T, Nagata K, Kuwamoto S, et al. Aberrant expression of AID and AID activators of NF- κ B and PAX5 is irrelevant to EBV-associated gastric cancers, but is associated with carcinogenesis in certain EBV-non-associated gastric cancers [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4133-4140
- [12] Xu Z, Pone E J, Al-Qahtani A, et al. Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination[J]. *Crit Rev Immunol*, 2007, 27(4): 367-397
- [13] Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, et al. Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression [J]. *International Journal of Cancer*, 2008, 123(12): 2735-2740
- [14] Bahjat M, Guikema JEJ. The Complex Interplay between DNA Injury and Repair in Enzymatically Induced Mutagenesis and DNA Damage in B Lymphocytes [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(9): 1876
- [15] Tanaka T, Watanabe M, Yamashita K. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(22): 16234-16247
- [16] Ao X, Sa R, Wang J, et al. Activation-induced cytidine deaminase selectively catalyzed active DNA demethylation in pluripotency gene and improved cell reprogramming in bovine SCNT embryo [J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(6): 2637-2648
- [17] 奥旭东. AID 基因的表达调节及其在牛早期胚胎发育中的主动去甲基化作用[D]. 内蒙古大学, 2016
- [18] Munoz D P, Lee E L, Takayama S, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is necessary for the epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(32): E2977-E2986
- [19] Liang P Y, Li H Y, Zhou Z Y, et al. Overexpression of immunoglobulin G prompts cell proliferation and inhibits cell apoptosis in human urothelial carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3): 1783-1791
- [20] Liu Y, Liu H, Peng Y, et al. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy: do toll like receptor 9-B cell activation factor-IgA class switching recombination signaling axis induce Ig A hyperproduction?[J]. *Ren Fail*, 2014, 36(6): 970-973
- [21] Hauser J, Grundstrom C, Kumar R, et al. Regulated localization of an AID complex with E2A, PAX5 and IRF4 at the Igh locus [J]. *Mol Immunol*, 2016, 80: 78-90
- [22] Seidl T, Whittall T, Babaahmady K, et al. B-cell agonists up-regulate AID and APOBEC3G deaminases, which induce IgA and IgG class antibodies and anti-viral function [J]. *Immunology*, 2012, 135(3): 207-215