

·论著·

降低 B7-H3 蛋白对受照肺癌细胞 A549 细胞周期和凋亡的影响

董佳丽 罗丹 李源 肖惠文 路璐 崔明 樊赛军

300192 天津, 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津

通信作者: 樊赛军, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.03.007

【摘要】目的 观察用小干扰 RNA (siRNA) 敲降 B7-H3 蛋白的表达对人肺癌细胞 A549 的细胞周期和凋亡的影响。**方法** 培养人肺癌 A549 细胞, 将 B7-H3 蛋白 siRNA 瞬时转染于 A549 细胞(称为 siB7-H3 转染组)。实验分为 4 组, 即对照组、siB7-H3 转染组、照射组、照射+siB7-H3 转染组。采用 ^{137}Cs γ 射线一次性照射, 照射剂量为 4 Gy; 用 Western blotting 法和实时定量 PCR 分别检测 B7-H3 蛋白和 mRNA 的表达; 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡的改变。**结果** 与对照组相比, siB7-H3 转染组的 B7-H3 蛋白水平明显降低, mRNA 表达量也明显低于对照组且差异有统计学意义 ($t=-4.222$, $P=0.013$)。siB7-H3 转染组细胞的 G0/G1 期细胞阻滞, S 和 G2/M 期细胞数量减少; 与对照组相比, 照射组出现轻微的 G0/G1 期阻滞和明显的 G2/M 期细胞阻滞, 照射+siB7-H3 转染组的 G0/G1、G2/M 期均有明显的阻滞。照射后 48 h, 与对照组相比, 照射组细胞的坏死率和凋亡率明显升高, siB7-H3 转染组和照射+siB7-H3 转染组的坏死率和凋亡率均无明显改变。**结论** 降低肺癌 A549 细胞中 B7-H3 蛋白表达水平可明显增加辐射诱导的 G0/G1 期阻滞, 从而提示 B7-H3 表达水平的改变可能通过调节 G0/G1 细胞周期检查点而对肺癌细胞放射敏感性产生重要的调节功能。

【关键词】 肺肿瘤; 癌, 非小细胞肺; 细胞周期; 细胞凋亡; B7-H3; siRNA

基金项目: 国家自然科学基金 (81572969); 科技部科研院所开发项目 (2014E6150134); 天津市科技支撑项目 (14ZCZDSY00001)

Study on the effects of B7-H3 down-regulation on cell cycle and apoptosis of lung cancer A549 cells

Dong Jiali, Luo Dan, Li Yuan, Xiao Huiwen, Lu Lu, Cui Ming, Fan Saijun

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Fan Saijun, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

【Abstract】Objective To explore the effects of B7-H3 down-regulation on cell cycle and apoptosis in lung cancer A549 cells. **Method** Human lung cancer cell line A549 were cultured. siB7-H3 RNA which can specifically silence the expression of B7-H3 protein was transfected into A549 cells. ^{137}Cs γ -ray irradiation was used with a single dose of 4 Gy. Experiments included control group, siB7-H3 transfected group, irradiation group, and irradiation+siB7-H3 transfected group. After transfected with siB7-H3, Western blotting and quantitative real-time PCR assays were used to detect the expression of B7-H3 protein and mRNA in A549 cells. The cell cycle and apoptosis of A549 cells following 4 Gy irradiation were detected by flow cytometry. **Results** The protein and mRNA expression of B7-H3 were significantly decreased in A549 cells transfected with siB7-H3 compared with the control group, and the differences between the two groups were statistically significant ($t=-4.222$, $P=0.013$). siB7-H3 transfection induced significant effect on cell cycle with increase of G0/G1 phase arrest and reduction of S and G2/M phase population. A mild enhanced G0/G1 phase arrest and an obvious enhanced G2/M phase arrest of irradiation group were detected compared with the control group. An enhanced G0/G1 and G2/M phase arrest of irradiation+siB7-H3 transfected group were detected compared with the control group. Compared with the control group, the necrosis and apoptosis

induction of the irradiated group significantly increased at 48 h after irradiation. However, No significant alterations of necrosis and apoptosis induction were observed between irradiation group and irradiation+siB7-H3 transfected group. **Conclusions** Down-regulation of B7-H3 can significantly elevated the G0/G1 arrest in A549 cells following radiation. This conclusion indicated that the alteration of B7-H3 expression could play a key role in the regulation of the radiosensitivity of lung cancer via mediating the G0/G1 check point.

【 Key words】 Lung neoplasms; Carcinoma, non-small-cell lung; Cell cycle; Apoptosis; B7-H3; siRNA

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81572969); Technology and Development and Research Projects for Research Institutes, Ministry of Science and Technology (2014EG150134); Tianjin Science and Technology Support Plan Project (14ZCZDSY00001)

肺癌是最常见的恶性肿瘤,其中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌中最高发的(约占80%)。放疗是治疗NSCLC的一种主要治疗方式,但是,辐射抵抗是限制放疗被广泛应用的主要原因^[1-2]。改变肿瘤细胞中特定的基因表达水平以影响肿瘤的放射敏感性是提高放疗疗效的一个有效方法,基因治疗与放疗联合使用会成为有前景的肿瘤治疗策略^[3-4]。B7-H3蛋白于2001年首次被发现并被克隆,其是B7共刺激分子家族中的一员,具有调节T细胞介导的免疫反应的功能^[5]。越来越多的研究揭示B7-H3蛋白可以抑制T细胞的增殖,减少其细胞因子的释放和转录因子的活化^[6-7]。在正常组织中,B7-H3蛋白低表达^[8]而在多种恶性肿瘤中都呈高表达,包括胰腺癌^[9]、前列腺癌^[10-11]、肾细胞癌^[12-13]、NSCLC^[14]等。但B7-H3蛋白在NSCLC中的临床意义和预后价值仍存在一定争议^[15-17]。我们通过研究人为降低B7-H3基因表达对 γ 射线辐射诱导的人类肺癌A549细胞的凋亡和细胞周期的影响,探讨B7-H3在调节肺癌细胞放射敏感性中的作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人肺癌A549细胞(由中国医学科学院肿瘤医院詹启敏教授实验室馈赠)用含10%胎牛血清的DMEM培养液在5% CO₂的37℃恒温培养箱中培养,待细胞生长浓度约为80%时进行传代亚培养。选择处于对数生长期的A549细胞进行实验。

1.2 B7-H3蛋白小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)转染A549细胞

转染前1d,将细胞接种于六孔板中,每孔加入2 mL无抗生素培养基,使细胞密度达到50%;取2 μ L/孔 Lipofectamine 3000 与 50 μ L Opti-MEM(减血

清培养基)混匀,室温下孵育5 min;取2 μ L/孔 siRNA 与 50 μ L Opti-MEM 混匀,室温孵育5 min。将以上2种混合液混匀,室温放置30 min,即为siRNA转染液。将siRNA转染液加入待转染A549细胞液中,轻轻混匀,培养6 h后将培养基换成含血清的完全培养基。转染成功的细胞称为siB7-H3转染组。

1.3 分组与照射条件

实验分为4组,即对照组、siB7-H3转染组、照射组、照射+siB7-H3转染组。其中,对照组为转染了阴性siB7-H3的A549细胞;siB7-H3转染组为转染了靶向B7-H3蛋白siRNA的A549细胞;照射组为经过照射的A549细胞;照射+siB7-H3转染组为经过照射的转染了靶向B7-H3蛋白siRNA的A549细胞。照射组、照射+siB7-H3转染组的照射条件为¹³⁷Cs γ 射线照射源(AutoCell40,加拿大原子能有限公司),一次性照射,照射剂量为4 Gy,剂量率为1 Gy/min。

1.4 Western blotting法检测B7-H3蛋白的改变

将对照组、siB-H3转染组的细胞用细胞裂解液冰上裂解,提取总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量。取各组等量蛋白用SDS-PAGE凝胶电泳分离,恒流180 mA湿转1 h至PVDF膜,用含5%脱脂奶粉的TBST(Tris-HCl缓冲盐溶液+非离子型去污剂Tween)缓冲液室温封闭1 h后,分别加入小鼠抗人B7-H3蛋白抗体(1:1000稀释)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(1:6000稀释)内参抗体,4℃孵育过夜。次日用TBST洗涤3次,每次10 min,并在摇床上振荡,加入辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(1:5000稀释),室温孵育1 h后TBST洗涤3次,每次10 min。用化学发光法显色,凝胶成像系统采集成像(ChemiDoc MP型号,美国BIO-RAD公司)。以

上所用试剂均购自英国 Abcam 公司。

1.5 实时定量 PCR 检测 B7-H3 蛋白 mRNA 的表达

收集瞬时转染 24 h 的 A549 细胞，Trizol 法提取细胞总 RNA，用反转录试剂盒反转录 mRNA 生成 cDNA，用 PCR 扩增试剂盒检测对照组、siB7-H3 转染组中 B7-H3 mRNA 的表达，选择 GAPDH 作为 mRNA 的内参。扩增条件：恒温段：50℃、2 min，95℃、10 min；循环段：95℃、15 s，60℃、1 min；熔解段：95℃、15 s，60℃、1 min，95℃、15 s，循环 40 次，数据采用 2- $\Delta\Delta C_t$ 法进行分析。以下为引物序列：

GAPDH 引物

正向:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'

反向:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

B7-H3 引物

正向:5'-AGGGCAGCCTATGACATTCCC-3'

反向:5'-AGCTCCTGCATTCTCCTCCTCA-3'

1.6 细胞周期分析

经过照射的细胞继续培养 48 h。将对照组、siB7-H3 转染组、照射组、照射+siB7-H3 转染组的细胞弃掉培养液，胰酶消化后将细胞吹打均匀，4℃下离心(离心半径 10 cm，2000 r/min)10 min 后弃上清。使用预冷 PBS 洗 2 遍，加入预冷 75%乙醇充分重悬细胞，4℃条件固定过夜。离心(离心半径 10 cm，2000 r/min)10 min 后弃上清，收集固定细胞，预冷 PBS 洗 2 遍。用 0.5 mL PBS 重悬细胞，加入浓度为 10 mg/mL 核糖核酸酶 A 10 μ L 于 37℃水浴中消化 30 min，再加入浓度为 1 mg/mL 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)(购自美国 BD 公司)10 μ L 后，在冰浴中避光染色 30 min，流式细胞仪检测。

1.7 细胞凋亡检测

经过照射的细胞继续培养 48 h，将对照组、siB7-H3 转染组、照射组、照射+siB7-H3 转染组的细胞弃掉培养液，用不含 EDTA 的胰酶消化，离心(离心半径 10 cm，2000 r/min)10 min 后收集悬浮细胞，预冷 PBS 洗涤细胞，调整每管细胞浓度为 1×10^6 个/mL，依次加入 Annexin V-FITC(磷脂结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素)和 PI 试剂，室温避光 15 min，流式细胞仪(BD Accuri C6 型号，美国 BD 公司)检测。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示，数据均符合正态分布且方差齐，两组间比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 转染降低细胞 B7-H3 表达水平

Western blotting 法和实时定量 PCR 方法检测 B7-H3 蛋白和 mRNA 的改变，如图 1 中 A 所示，与对照组相比，siB7-H3 转染组细胞中的 B7-H3 蛋白水平明显降低。实时定量 PCR 结果经 2- $\Delta\Delta C_t$ 分析后显示，siB7-H3 转染组细胞中的 siB7-H3 mRNA 表达量也明显低于对照组细胞(图 1 中 B)，且表达量的差异有统计学意义(*t* = -4.222, *P* = 0.013)。这些实验结果表明，siB7-H3 转染确实可以有效地降低 siB7-H3 蛋白和 mRNA 表达水平。

2.2 siB7-H3 转染细胞的细胞周期改变

如图 2 所示，流式细胞仪分析结果显示，B7-H3 表达水平的降低导致 A549 细胞的 G0/G1 期细胞阻滞，S 和 G2/M 期细胞数量减少(图 2 中 B)。正如预期的，4 Gy γ 射线照射后 48 h，A549 细胞出现轻微的 G0/G1 期阻滞和明显的 G2/M 期细胞阻滞(图 2 中 C)。而在 siB7-H3 转染的细胞，照射后不仅导致明显的 G2/M 周期阻滞，而且也有明显的 G0/G1 期阻滞(图 2 中 D)。

2.3 siB7-H3 转染细胞的细胞凋亡改变

采用 Annexin-V 和 PI 双染色的流式细胞检测方法观察了 B7-H3 降低对 A549 细胞辐照引起细胞凋亡的影响。Annexin-V 和 PI 双染色流式细胞检测典型结果解析为：左下为活细胞，左上为坏死细

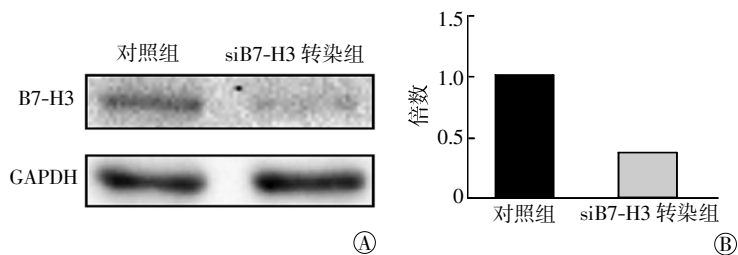


图 1 转染 siB7-H3 对肺癌 A549 细胞的 B7-H3 蛋白和 mRNA 表达的影响 图中，A：用 Western blotting 法检测 B7-H3 蛋白；B：实时定量 PCR 检测 mRNA；siB7-H3 转染组：转染了靶向 B7-H3 蛋白 siRNA 的肺癌 A549 细胞；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

Fig.1 Effects of siB7-H3 transfection on the expression of B7-H3 protein(A) and mRNA (B) in lung cancer A549 cells

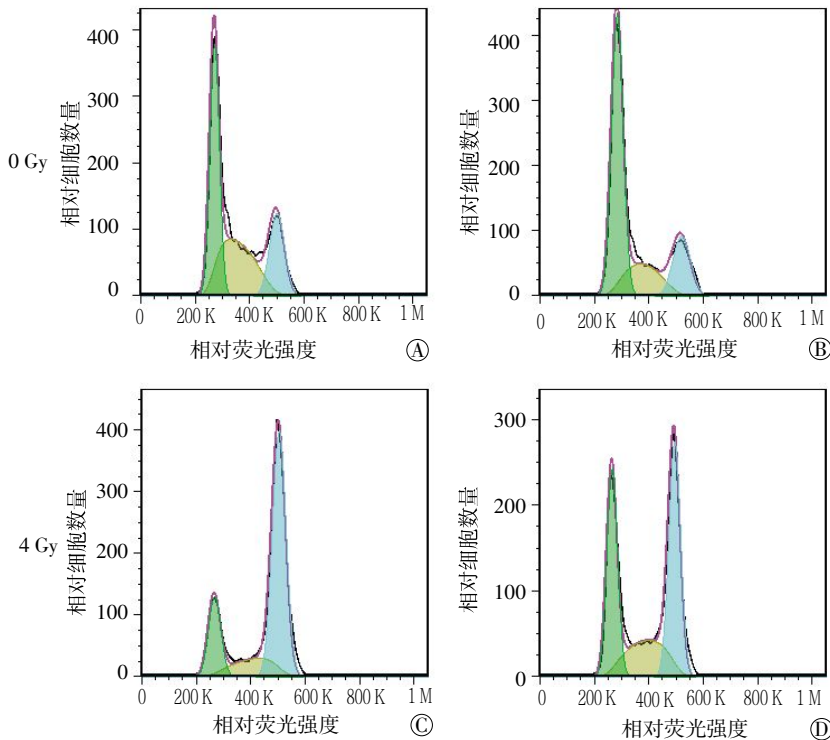


图2 流式细胞仪检测 siB7-H3 对肺癌 A549 细胞的细胞周期的影响 图中, A: 对照组; B: siB7-H3 转染组; C: 照射组; D: 照射+siB7-H3 转染组。

Fig. 2 Effects of siB7-H3 on cell cycle progression of lung cancer A549 cells with flow cytometer. Un-irradiated (A) and 4Gy-irradiated (C) A549 cells without transfection; Un-irradiated (B) and 4Gy-irradiated (D) A549 cells transfected with siB7-H3.

胞, 而右象限均为凋亡细胞, 其中右上象限为晚凋, 右下为早凋(图3)。如图3所示, 当对数生长的 A549 细胞受到 4 Gy γ 射线照射, 细胞的坏死率(从 2.59% 上升至 14.88%)和凋亡率(从 7.73% 上升至 17.94%)明显增加(表1)。siB7-H3 转染组与对照组相比, 降低 B7-H3 蛋白表达, A549 细胞的坏死率和凋亡率无明显改变; 照射+siB7-H3 转染组与照射组相比, B7-H3 蛋白的降低没有明显改变辐照诱导的细胞坏死率和凋亡率(图3 和表1)。

表1 siB7-H3 对肺癌 A549 细胞凋亡的影响

Table 1 Effects of siB7-H3 on apoptosis of irradiated lung cancer A549 cells

组别	活细胞率/%	坏死率/%	凋亡率/%
对照组	89.68	2.59	7.73
siB7-H3 转染组	89.77	2.51	7.71
照射组	67.18	14.88	17.94
照射+ siB7-H3 转染组	69.67	11.34	18.99

注: siB7-H3 转染组为转染了靶向 B7-H3 蛋白的 siRNA 的肺癌 A549 细胞。

4 讨论

放疗通过电离辐射直接或间接损伤细胞的

DNA, 导致 DNA 双链断裂, 进而启动一系列生物效应导致细胞死亡。然而, 无论是正常细胞还是肿瘤细胞都有完善的 DNA 损伤修复系统, 该系统既是正常细胞维持自身基因组稳定的保护和防御机制, 同时也是肿瘤细胞对放疗抵抗的重要机制之一^[18]。分子靶向治疗是现阶段肿瘤治疗的一个新趋向, 将其与放疗结合, 可以在增强放射敏感性的同时减少不良反应, 改善患者预后, 降低病死率^[19]。

本研究结果显示, 给予 A549 肺癌细胞 4 Gy γ 射线的照射, 细胞发生了轻微的 G0/G1 期检查点阻滞和明显的 G2/M 期检查点阻滞, 提示辐照导致的细胞 DNA 损伤启动了典型的细胞周期阻滞, 允许细胞在进入下一个细胞周期分裂之前

前进行 DNA 损伤修复。而非常有趣的是敲降 B7-H3 的 A549 细胞, 给予相同剂量照射, 除了细胞发生了明显的 G2/M 期阻滞外, 也出现明显的 G0/G1 期阻滞。显然, 照射导致敲降 B7-H3 的 A549 细胞有明显的 G0/G1 期阻滞的可能性有 2 种情况: (1) B7-H3 表达水平的降低可能直接作用 G0/G1 细胞周期, 解除了其对细胞 G0/G1 检查点其他控制蛋白的抑制作用, 从而提示 B7-H3 可能是 G0/G1 检查点的重要调节蛋白。(2) B7-H3 表达水平的降低可能导致辐射引起的 G2/M 检查点的中断(disruption), 换句话说, 辐照敲降 B7-H3 的 A549 细胞出现的 G0/G1 期细胞数量的增加可能原因是来自辐照导致的第一个细胞周期的 G2/M 检查点阻滞中断而进入第二个细胞周期的 G0/G1 期。我们已知, 细胞调控周期蛋白异常、细胞周期检查点缺陷是肿瘤发生的根本原因, 通过对它的研究, 将帮助我们在临床上实现对肿瘤的预测、预警及早期诊断。G2/M 检查点是由 p53 激活 Gadd45 α (生长抑制及 DNA 损伤诱导基因 45 α) 蛋白所控制的, 在没有 p53 的肺癌细胞中, hnRNPA0 (人异质性胞核糖核蛋白) 可稳

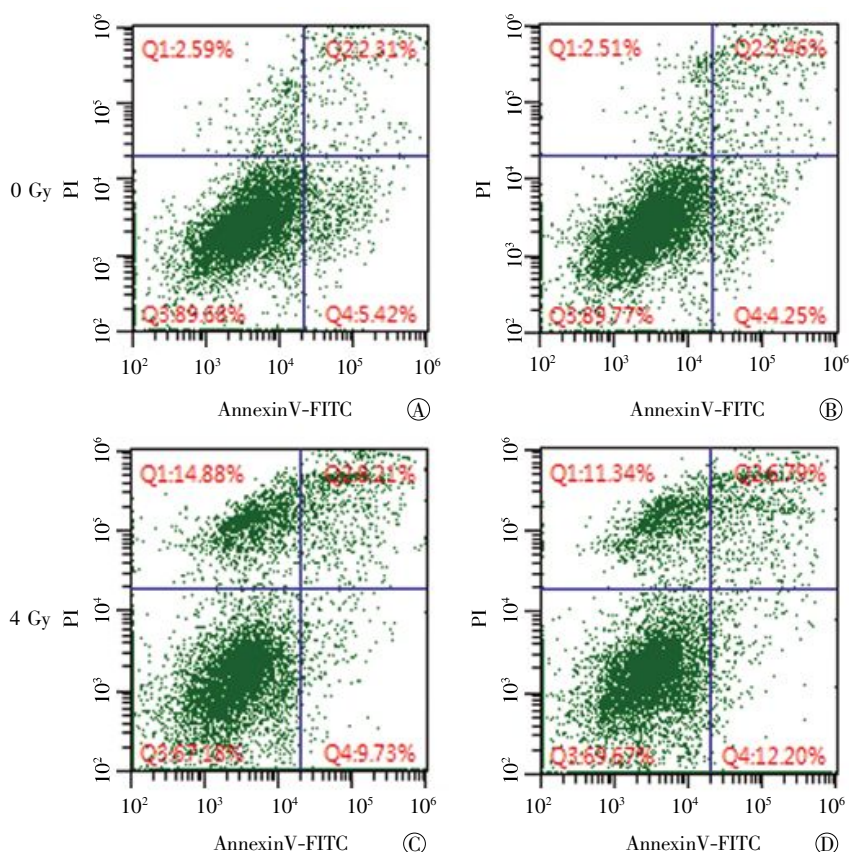


图3 流式细胞仪检测 siB7-H3 对肺癌 A549 细胞凋亡的影响 图中, A: 对照组; B: siB7-H3 转染组; C: 照射组; D: 照射+siB7-H3 转染组; AnnexinV-FITC: 磷脂结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素; PI: 碘化丙啶。

Fig. 3 Effects of siB7-H3 on apoptosis of irradiated A549 cells with flow cytometer. Un-irradiated (A) and 4Gy-irradiated (C) A549 cells without transfection; Un-irradiated (B) and 4Gy-irradiated (D) A549 cells transfected with siB7-H3.

定编码 Gadd45 α 的 mRNA。而启动 G1/S 的检查点, p53 激活 p21 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂蛋白。当 p53 缺失时, hnRNPA0 可稳定编码 p27 (p21 的一个备份) 蛋白的 mRNA。总之, Gadd45 α 和 p27 可帮助癌细胞中止细胞周期, 并修复 DNA, 继续分裂。因此, 我们目前正在开展的工作就是通过分别采用 G0/G1 期驱动蛋白抑制剂以及 M 期驱动蛋白抑制剂, 深入研究 B7-H3 是影响 G0/G1 检查点还是影响 G2/M 检查点, 从而导致 G2/M 检查点阻滞的中断。在机制研究方面, B7-H3 是直接影响细胞周期检查点, 还是通过 p53 依赖或者 p53 非依赖性信号通路调节而影响细胞周期检查点, 这也是我们研究的内容。实际上, 已有研究结果揭示 B7-H3 与 p53 之间确实存在密切关系^[20]。

辐射导致敲降 B7-H3 的 A549 细胞明显的 G0/G1 期阻滞, 提示 B7-H3 在调节肺癌细胞放射敏感性上存在两种截然不同的作用。如果是发生第一种

假设的细胞周期阻滞, B7-H3 可能参与提高辐照导致 DNA 损伤的修复, 则导致细胞辐射耐受性的增加。但是, 如果是第二种细胞周期阻滞改变的发生, 由于 B7-H3 导致辐照诱导的 G2/M 期阻滞中断, 则可能导致肺癌细胞放射敏感性的提高。因此, 无论是哪一种情况的发生都提示了 B7-H3 通过参与辐射诱导的肿瘤细胞周期阻滞, 从而在肿瘤细胞的放射敏感性调节中起到重要作用。

此外, 我们也发现 B7-H3 蛋白水平的降低并不对辐射诱导的细胞坏死和凋亡产生明显的影响, 而 B7-H3 蛋白是否参与辐射诱导的细胞自噬等其他细胞凋亡模式的发生, 这是我们目前正在进行的研究。

综上所述, 通过本研究, 我们首次发现 B7-H3 蛋白参与了调控辐射诱导的细胞周期阻滞, 提示 B7-H3 在肺癌细胞放射敏感性的调节中起着重要作用。

细胞周期调控蛋白异常和细胞周期检查点缺陷或中断是肿瘤发生和发展的关键因素, 也可作为临床肿瘤诊断的重要标志物。同时, 细胞周期检查点缺陷或中断也是研究包括放疗在内的肿瘤特异性治疗的靶点。因此, 深入研究 B7-H3 蛋白作为重要的肿瘤放射治疗敏感性调控的新靶点具有重要意义和临床价值。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 董佳丽负责收集数据、统计、撰写论文; 罗丹负责设计实验方案、收集数据、统计、撰写及修订论文; 李源和肖惠文负责设计实验方法并协助进行实验操作; 路璐和崔明负责技术帮助和实验指导; 樊赛军负责论文审阅。

参 考 文 献

[1] Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, et al. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes

- [J/OL]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 94[2017-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3751356/pdf/1476-4598-12-94.pdf>. DOI: 10.1186/1476-4598-12-94.
- [2] 李景涛, 邓垒, 张文珏, 等. 广泛期小细胞肺癌胸部 IMRT 后发生放射性肺炎的危险因素分析[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2016, 40(2): 100-105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114. 2016.02.003.
- Li JT, Deng L, Zhang WJ, et al. Risk factor analysis for predicting radiation pneumonitis in extensive stage small cell lung cancer patients receiving IMRT thoracic radiotherapy[J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2016, 40(2): 100-105.
- [3] Ma W, Ma CN, Li XD, et al. Examining the effect of gene reduction in miR-95 and enhanced radiosensitivity in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(2/3): 66-71. DOI: 10.1038/cgt.2016.2.
- [4] Torres-Roca JF, Stevens CW. Predicting response to clinical radiotherapy: past, present, and future directions[J]. *Cancer Control*, 2008, 15(2): 151-156.
- [5] Chapiroval AI, Ni J, Lau JS, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(3): 269-274. DOI: 10.1038/85339.
- [6] Ling V, Wu PW, Spaulding V, et al. Duplication of Primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss[J]. *Genomics*, 2003, 82(3): 365-377. DOI: 10.1016/S0888-7543(03)00126-5.
- [7] Prasad DV, Nguyen T, Li Z, et al. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells[J]. *J Immunol*, 2004, 173(4): 2500-2506. DOI: 10.4049/jimmunol.173.4.2500.
- [8] Sun M, Richards S, Prasad DV, et al. Characterization of mouse and human B7-H3 genes[J]. *J Immunol*, 2002, 168(12): 6294-6297. DOI: 10.4049/jimmunol.168.12.6294.
- [9] Yamato I, Sho M, Nomi T, et al. Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer[J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(10): 1709-1716. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605375.
- [10] Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, et al. B7-H3 ligand expression by prostate cancer: A novel marker of prognosis and potential target for therapy[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7893-7900. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1068.
- [11] Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(49): 19458-19463. DOI: 10.1073/pnas.0709802104.
- [12] Crispin PL, Sheinin Y, Roth TJ, et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(16): 5150-5157. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0536.
- [13] Qin XJ, Zhang HL, Ye DW, et al. B7-H3 is a new cancer-specific endothelial marker in clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Oncotargets Ther*, 2013, 6: 1667-1673[2017-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833620/pdf/ott-6-1667.pdf>. DOI: 10.2147/OTT.S53565.
- [14] Sun Y, Wang Y, Zhao J, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2006, 53(2): 143-151. DOI: 10.1016/j.lungcan.2006.05.012.
- [15] Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, et al. Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment by upregulating B7-H3[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(7): 1162-1168. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31821c-421d.
- [16] Boland JM, Kwon ED, Harrington SM, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(2): 157-163. DOI: 10.1016/j.clcc.2012.05.006.
- [17] Jin YJ, Zhang P, Li J, et al. B7-H3 in combination with regulatory T cell is associated with tumor progression in primary human non-small cell lung cancer[J/OL]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 13987-13995 [2017-02-01]. <http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC4713496&blobtype=pdf>.
- [18] Ding J, Miao ZH, Meng LH, et al. Emerging cancer therapeutic opportunities target DNA-repair systems[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(6): 338-344. DOI: 10.1016/j.tips.2006.04.007.
- [19] Kaliberov SA, Kaliberova LN, Yari H, et al. Retargeted adenoviruses for radiation-guided gene delivery[J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(9): 303-314. DOI: 10.1038/cgt.2016.32.
- [20] Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, et al. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7864-7871. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6538.

(收稿日期: 2017-02-06)