

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.18.008

转录因子 SOX9 基因对脑胶质瘤干细胞干性维持的相关性研究 *

张磊^{1#} 涂艳阳^{1#} 张鹏幸¹ 杨安钢² 吴介恒² 缪吉玉³ 温伟红^{2△} 张永生^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院实验外科 陕西 西安 710038;

2 第四军医大学基础部免疫教研室 陕西 西安 710032; 3 第四军医大学基础部细胞生物教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:应用慢病毒干扰 SOX9 的表达,观察其对脑胶质瘤干细胞干性维持的影响。**方法:**设计 2 条针对 SOX9 转录短发夹 RNA(shRNA)的 DNA 序列,构建慢病毒并感染胶质瘤细胞系 U87、U251 细胞,利用嘌呤霉素筛选稳转细胞。在转录水平及蛋白水平检测 SOX9 的沉默效果,利用荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)及免疫荧光染色检测相应干细胞相关标志分子 SOX2、Nestin 的表达差异。比较诱导形成的胶质瘤干细胞成球能力(肿瘤干细胞成球的直径),同时利用荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)及免疫荧光染色对干细胞相关标志物 SOX2、Nestin 的表达水平进行比较。**结果:**SOX9 成功包装慢病毒并有效感染 U87、U251 细胞,实时荧光定量 PCR 检测其抑制率分别可降低 83.74 % 和 80.12 %。并且在稳转细胞系水平相关干细胞标志分子表达含量有明显下降。在干细胞层面沉默 SOX9 可以明显抑制胶质瘤细胞诱导成球的直径 ($P<0.01$),同时免疫荧光显示肿瘤干细胞相关干性分子 SOX2、Nestin 的表达水平较对照组明显降低。**结论:**慢病毒感染沉默 SOX9 基因可以抑制胶质瘤干细胞干性的维持,为胶质瘤的生物治疗提供了重要的靶点。

关键词:SOX9;慢病毒;胶质瘤干细胞

中图分类号:R739.41;Q75 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)18-3430-05

Knock-down SOX9 Gene Regulated the Stemness Maintenance of Glioma Stem Cell in Vitro*

ZHANG Lei^{1#}, TU Yan-yang^{1#}, ZHANG Peng-xing¹, YANG An-gang²,WU Jie-heng², MIAO Ji-yu³, WEN Wei-hong^{2△}, ZHANG Yong-sheng^{1△}

(1 Departments of Experimental Surgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Immunology, School of Preclinical Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Cell Biology, School of Preclinical Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032 China)

ABSTRACT Objective: To construct lentiviral expression vectors for silencing SOX9 and observe its effect on the stemness maintenance of stem cell in vitro. **Methods:** 2 types of transcription of the SOX9 short hairpin RNA (shRNA) sequences were designed and two types of corresponding lentivirals were packaged, which can be used to infect U87 and U251 glioma cell line. 2 types of stably transfected cells were screened by puromycin. The expression of SOX9 silenced at the level of transcription and protein level was detected by Western blot and qRT-PCR. Stem cell associated markers molecules SOX2, Nestin was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) expression and immunofluorescence staining. The ability of the stemness maintenance of glioma stem cells was compared with the diameter of spheres, and the expression of stem cell related markers of SOX2, Nestin was detected by immunofluorescence staining. **Results:** The lentiviral of SOX9 was successfully constructed, which was used to infect U87, U251 cells efficiently. The inhibitory rates of expression levels of SOX9 were 83.74 % and 80.12 % by qRT-PCR. The expression of related stem cell markers decreased obviously with knock-down the gene of SOX9 in the stably transfected cell lines. In the glioma stem cell, Knock-down SOX9 could inhibit the stemness maintenance of glioma stem cells obviously by sphere diameter ($P<0.01$), immunofluorescence showed the expression of glioma stem cell related molecules SOX2, Nestin decreased obviously compared with that in the control group. **Conclusions:** The silencing of the endogenous expression of SOX9 can inhibit the stemness maintenance of glioma stem cell, which laid a foundation of potential therapeutic targets.

Key words: SOX9; Lentiviral; Glioma stem cell

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272419)

作者简介:张磊(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:脑胶质瘤侵袭的临床与基础相关研究,E-mail:enjoyspring@126.com

涂艳阳(1976-),男,博士,硕士生导师,副教授,主要研究方向:胶质瘤的侵袭性研究,E-mail:tufmmu@188.com

为共同第一作者

△ 通讯作者:温伟红(1975-),女,博士,硕士生导师,副教授,主要研究方向:肿瘤的免疫靶向治疗,E-mail:wenweih@fmmu.edu.cn

张永生(1962-),男,硕士,教授,主要研究方向:肿瘤的表观遗传学,E-mail:zhangys_td@163.com

(收稿日期:2015-02-06 接受日期:2015-02-27)

Chinese Library Classification(CLC): R739.41;Q75 Document code :A

Article ID: 1673-6273(2015)18-3430-05

前言

脑胶质瘤是最常见的颅内恶性肿瘤之一,占脑肿瘤发病率的而且在颅内成浸润性生长,临床上手术不易完全切除,患者预后比较差,特别是恶性胶质瘤,其中为生存期不足1年^[1],手术化疗、放疗效果多无明显改善,且造成多种临床副反应。近年来脑胶质瘤的重要进展来自胶质瘤干细胞(GSCs)理论,认为肿瘤是一种干细胞稳态失调的疾病,在胶质瘤(GBM)的高复发性的主要是因为瘤体内有部分GSCs^[2,3]。有报道指出GSCs是GBM在放^[4]、化疗^[5]抵抗的内在原因,同时越来越多的证据证实脑胶质瘤较差的预后和的高复发率的根本原因在于肿瘤瘤体内少数肿瘤干细胞的生物学特性^[6,7]。

哺乳动物睾丸决定因子样HMG盒9(Sry related HMG box-9,SOX9)是SOX家族中最早发现内含子的基因,是与性别决定相关的关键基因^[8]。研究表明SOX9可以调控软骨的分化^[9],更为重要的是SOX9对神经干细胞的干性起着重要的调节作用^[10]。本研究主要探讨慢病毒沉默SOX9基因对于脑胶质瘤干细胞干性的影响,为后续脑胶质瘤的靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

脑胶质瘤U251和U87细胞系由第四军医大学基础部免疫教研室保存,DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)以及胰酶购于Gibco公司;嘌呤霉素购于Sigma公司;干细胞培养基DMEM-F12(1:1)购于Gibco公司;重组人碱性成纤维生长因子(bFGF)、重组人表皮生长因子(EGF)、N₂购于R&D公司,配置成含bFGF(20 μg/L)、EGF(20 μg/L)、2% N₂以及DMEM-F12的无血清干细胞培养基;低粘附培养板购于美国CORNING公司;PIPA高效蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购于西安宝信生物技术公司;TRIzol购于Invitrogen公司;RNA反转录试剂盒及SYBR® Green PCR试剂盒购于TaKaRa公司;兔源性SOX9、SOX2、Nestin多克隆抗体购自于Sigma公司,Cy3标记的荧光山羊抗兔二抗及牛血清白蛋白(BSA)封闭液购自于北京中山生物技术公司;实时定量PCR仪为Bio-Rad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 针对SOX9慢病毒的包装 针对人的SOX9分子的shRNA序列设计根据NCBI数据库中人的SOX9的mRNA序列,设计了两条针对SOX9基因的shRNA及其空白对照,分别命名为:LV3-sh-SOX9-1#,LV3-sh-SOX9-2#以及LV3-NC(表1),sh-SOX9载体的重构、慢病毒的包装由上海吉凯生物技术公司合成。

1.2.2 慢病毒液感染U87、U251细胞并建立稳转的细胞系 将脑胶质瘤U251以及U87细胞铺于24孔板,在其细胞汇合至60%时,每孔加入10 μL浓缩慢病毒液、200 μL新鲜培养基,常规培养24 h,后更换为含2 μg/mL嘌呤霉素的完全培养基培养进行抗性筛选,在药物选择压力下培养5 d后,按1:10进行

铺板传代,进行克隆筛选。1周后6 cm皿长满收获稳转细胞,期间定期进行换液,及时清除无抗性凋亡细胞。

表1 化学合成的针对SOX9基因的干涉序列及空白对照序列

Table 1 The gene sequences of SOX9 interference sequence and negative

control using chemical synthesis	
Vector Sequence	Hairpin Sequence
Lv3-sh-SOX9-1#	GCATCCTCAATTCTGTATA
Lv3-sh-SOX9-2#	GATAAGTGCATGACGGAACAA
Lv3-NC	TTCTCCGAACGTGTACAGT

1.2.3 Western blot 检测沉默效果 待细胞汇合长满6 cm皿,胰酶消化收集稳转,用灭菌的PBS洗涤1次,离心并弃上清;加入100 μL预冷的高效RIPA冰上裂解30 min,期间用1 mL针管反复抽吸吹打;4℃、12000转高速离心15 min,取上清进行BCA蛋白定量;加入25 μL的上样缓冲液,经100℃、5 min沸水变性;按每孔20 μg蛋白进行上样经电泳分离;300 mA、1 h转至经甲醛浸泡过的PVDF膜;用含50 g/L脱脂奶粉溶液室温封闭90 min;兔抗人SOX9一抗、小鼠抗人内参分子β-actin经4℃孵育过夜;TBST溶液摇床洗涤3次,含HRP标记的羊抗兔或者羊抗鼠二抗室温孵育1 h,TBST摇床洗涤3次;加入超灵敏发光试剂进行发光拍照。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测相关分子的表达变化 TRIzol法抽提脑胶质瘤细胞系中的总RNA;取2 μL RNA溶液用NanoDrop进行定量;根据Takara公司的反转录试剂盒操作说明书进行反转录,按说明书进行稀释,获取cDNA样本;以GAPDH为内参,具体反应条件为:预变性95℃ 3 min,90℃ 30 s,56℃ 10 s,一共40个循环,每组设定3个复孔,重复3次。用于进行实时荧光定量PCR的引物如下:SOX9上游:5'-AGGT-GCTCAAAGGCTACGACT,下游为:5'-AGATGTGCG TCT-GCTCCGTG -3';GAPDH上游:5'-GCACCGTCAAGGCTG A-GAAC -3',下游:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3';Nestin上游:5'-AGCAGGAGGAGTTGGGTTCT,下游为:5'-AGTGG AGTCTGGAAGGGTCTC -3';SOX2上游:5'-ATGGGTTTCG-GTGGTCAAGT,下游为:5'-GCTCTGGTAGTGCTGGGACA -3'。上述引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.5 间接免疫荧光染色检测沉默效果以及相应干性分子的表达差异 U251胶质瘤细胞在覆盖有多聚赖氨酸的过酸灭菌的盖玻片上融合到90%时弃培养液,用预温的1×PBS摇床慢速洗3次,每次10 min;4%的甲醛室温固定15 min;PBS洗3次,每次10 min,0.2% Triton X-100透化5 min,1×PBS洗3次,每次5分钟,5% BSA室温封闭1 h,加一抗(专用抗体稀释液)湿盒内孵育,4℃过夜,1×PBS摇床洗3次,每次10 min。加二抗(用1% BSA稀释)避光室温孵育1 h。1×PBS上摇床洗3次,每次10 min。DAPI按照1:2000稀释,室温孵育5 min进行核衬染。抗淬灭剂封片荧光显微镜下观察。

1.2.6 干细胞培养基条件下胶质瘤干细胞的诱导 脑胶质瘤

细胞 U251 汇合到 60 %左右,胰酶消化后用无血清的培养基稀释离心后弃上清,用干细胞培养基重悬,用细胞计数板计数,调整成 7000 个细胞每孔,接种到含有干细胞培养基的低粘附的 6 孔板中,在孵箱中常规条件下悬浮培养,5-7 d 后观察干细胞球的形成情况,在培养诱导出典型的肿瘤干细胞球后,用胰酶消化成单细胞悬液后,重复上述操作铺板,重复 3 次。

1.2.7 脑胶质瘤干细胞球的免疫荧光染色 取培养到第 4 代的胶质瘤干细胞球及其细胞培养液,离心后弃部分培养基,重悬后用滴管低于包被有多聚赖氨酸的盖玻片上,静置等待细胞球贴附后用 4 %的多聚甲醛固定,0.2 % Triton X-100 处理 30 min,正常山羊血清封闭 1 h,兔抗人一抗湿盒内 4 °C 孵育过夜,1× PBS 洗 3 遍,每次 5 min,羊抗兔 Cy3 标记的二抗室温避光孵育 1 h,而后重复 1× PBS 洗 3 遍,每次 5 min,DAPI 以 1:2000 稀释后室温孵育 5 min。封片后在正置荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 17.0 进行统计分析,各数据组采用 t 检验进行分析两组样本之间的差异,其中 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒感染 U87、U251 细胞系中 SOX9 基因 mRNA 的转录水平

qRT-PCR 法检测结果显示,重组慢病毒感染的 U87、U251 细胞中对照组空载体病感染组是干涉组 SOX9 基因表达水平的 6 倍(图 1),提示慢病毒干扰在 mRNA 水平存在抑制作用。

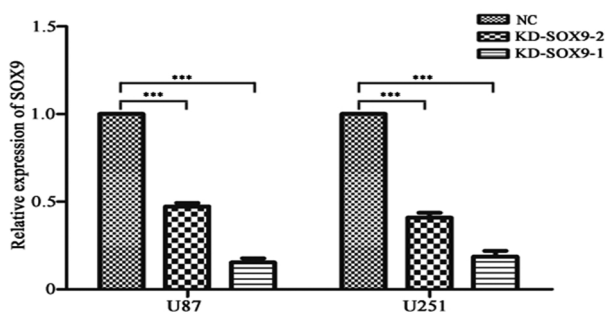


图 1 qRT-PCR 检测感染后 U87 和 U251 细胞中 SOX9 基因的 mRNA 水平变化

Fig.1 The mRNA expression of SOX9 in glioma cell lines analyzed by qRT-PCR (infected U87 and U251)

Note: *** $P < 0.001$, compared with NC group.

2.2 慢病毒感染 U87、U251 细胞系中 SOX9 基因翻译水平

用 Western blot 法检测结果显示,重组慢病毒感染的 U87、U251 细胞中基因的翻译水平较对照组空载体病感染组的 SOX9 表达含量明显降低(图 2),提示慢病毒干扰在 SOX9 mRNA 翻译水平存在抑制作用。

2.3 沉默 SOX9 的稳转细胞系干性标志物分子水平的差异

将慢病毒感染的 U251 胶质瘤细胞系进行细胞免疫荧光染色,沉默 SOX9 的稳转胶质瘤细胞系的干性相关分子的表达水平较对照组明显下降(图 3)。

2.4 胶质瘤干细胞球的条件诱导

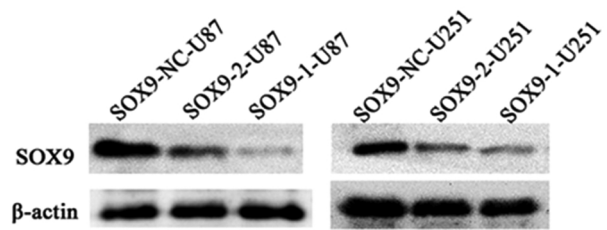


图 2 Western blot 检测感染后 U87 和 U251 细胞中 SOX9 基因的蛋白水平变化

Fig.2 The protein expression level of SOX9 in glioma cell lines detected by Western blot analysis, including infected U87 and U251

将 U87 细胞计数后接种至无血清的干细胞培养基中,4 h 后观察 U87 细胞呈悬浮生长,第 4 d 后显微镜下观察细胞聚成球团,形状较不规则,7 d 后镜下观察,可见规则的球形干细胞球,胰酶消化后,4-6 d 可见镜下重新形成干细胞球,折光性好,细胞之间连接紧密。同时取诱导前后的细胞,qRT-PCR 法检测诱导后干细胞球的 SOX9 以及其干细胞相关分子的表达水平明显升高(图 4)。

2.5 沉默 SOX9 对于诱导胶质瘤干细胞成球生长作用的影响

将慢病毒感染筛选的稳转 U87 细胞系在无血清的干细胞培养基的条件下诱导,第 6 d 后统计沉默 SOX9 诱导形成的胶质瘤干细胞球组较对照组空载体病感染组形成胶质瘤干细胞球组的直径明显减小($P < 0.01$)(图 5)。

2.6 沉默 SOX9 的稳转细胞系无血清干细胞培养条件下诱导成球后干性的差异

将稳转沉默 SOX9 的 U251 脑胶质瘤细胞系诱导成球后进行细胞免疫荧光染色,观察发现沉默 SOX9 的胶质瘤干细胞组的干性相关分子的表达水平较对照组明显下降(图 6)。

3 讨论

SOX 基因家族是一类与 SRY (sex determination region of Y chromosome)基因为代表构的同源基因家族,特点是包含一个高度保守的同源 HMG-box DNA 的结合域,参与胚胎的分化、发育的过程,影响多种组织器官的发育^[11]。到目前为止发现了哺乳动物内存在 24 个 SOX 基因家族的亚型。其中多个 SOX 基因家族成员与胚胎发育、干性调节后及肿瘤恶性程度有关,其中有亚型如 SOX2 和 SOX15 等多种亚型被广泛报道,在胚胎干细胞的干性维持中起重要作用^[12,13]。

Sinclair 等^[14]于 1990 年发现了 SOX9 基因,其作为性别发育中的一个重要的转录基因,其基因定位于染色体 17q24.1-I-25.1 区域内,通过转录调控下游基因的表达进而影响发育的进程。由于近年来肿瘤来源理论指出肿瘤是一种来源于干细胞或者是前体多能干细胞稳态失衡的疾病,所以越来越多的研究者将研究方向集中于 SOX 基因家族这样的分子在肿瘤的代谢通路中的作用。其中 SOX9 是 SOX 家族最早被发现的分化和发育相关的亚型分子,受多条信号通路的调节。Ling S^[15]等人发现在从膀胱慢性损伤向膀胱癌进展的过程中,作为 EGFR 通路信号传递过程中重要的转录因子,通过激活 EGFR 受体以及配体参与 EGFR-ERK-SOX9 信号轴来调节这一代谢的重要通路。

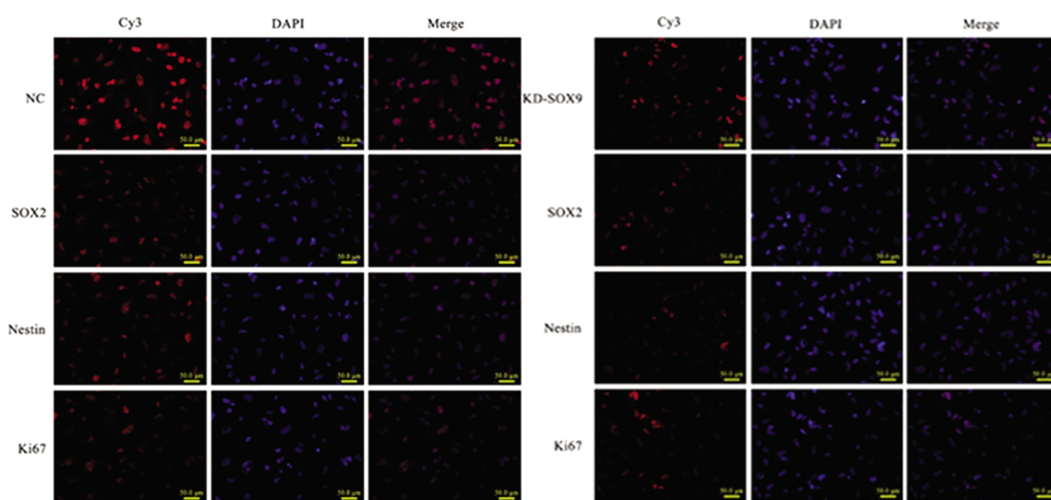


图3 免疫荧光实验检测U251细胞水平沉默SOX9对于干性相关分子Nestin和SOX2和Ki67表达的影响(其中目的分子SOX9、Nestin、SOX2以及Ki67为红色荧光,DAPI核衬染为蓝色荧光。图示刻度为50 μm。左侧组为对照组,右侧组为干扰组)

Fig.3 The influence of SOX9, Nestin, SOX2 and Ki67 (red) detected by immunofluorescence analysis. DAPI(blue) was used to stain nuclei in glioma cell line of U251

Note: Scale bar, 50 μm. The left group is negative control group, the right group is intervention group.

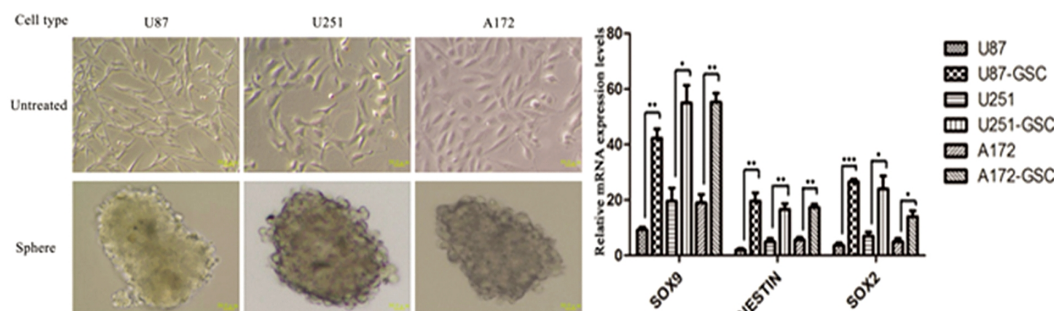


图4 诱导前后3种胶质瘤细胞系中SOX9以及干性相关分子的表达水平的变化

(其中*为 $P<0.05$,**为 $P<0.01$,***为 $P<0.001$ 。图示刻度为50 μm)

Fig.4 The expression of SOX9 and related stem cell molecules, Nestin and SOX2 was detected by qRT-PCR between Untreated glioma cell lines(U87, U251, A172) and sphere group(induce from the corresponding glioma cell line)

Note: Scale bar, 50 μm. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, compared with Untreated group.

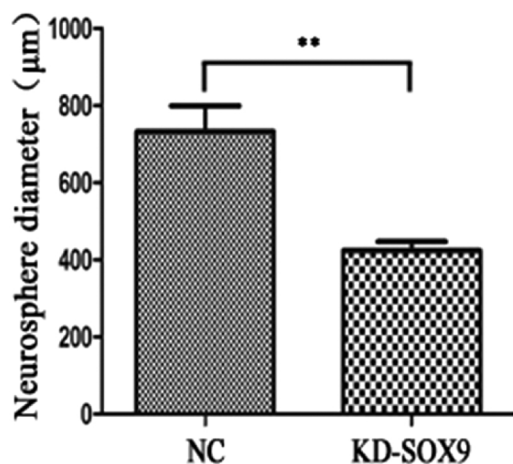


图5 沉默SOX9表达及其对照组在干细胞培养基条件下诱导的胶质瘤干细胞球的直径(其中**为 $P<0.01$)

Fig.5 The diameter of glioma stem cell spheres were induced in stem cell culture medium, which compared between Knock-down SOX9 group (KD-SOX9) and the negative control(NC) group

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

Pine SR^[6]等人在研究中发现 Notch1 可以直接调控 SOX9,参与肺癌演变过程中的表皮间质化这一过程。Bruun J^[7]等人发现 SOX9 和 WNT 通路密切相关来影响结肠癌患者的预后。Lin L^[8]等人发现 SOX9 参与 SHH 通路参与软骨的分化。Raspaglio G^[9]等人发现 SOX9 通过调节缺氧环境中的关键分子 Hif-2α 以及 TUBB3 影响卵巢癌的进展过程。而又有研究指出,胶质瘤干细胞(GSCs)的干性特征与 EGFR, Notch 等通路的激活相关^[20-21],SOX9 作为上述通路的下游基因存在共同的作用节点,其作为转录因子的作用来参与这些通路中调节肿瘤干细胞的干性来发挥作用。

为明确转录因子 SOX9 在调控脑胶质瘤干细胞干性维持过程中的作用,考虑到肿瘤干细胞本身的转染效率较低,以及在诱导过程中脑胶质瘤干细胞的诱导时间比较长,短期的小干扰会在后期效果明显下降,针对目的分子 SOX9 设计了2条干涉的短发卡序列,包装感染慢病毒。在脑胶质瘤细胞系 U87、U251 上进行感染,取得了良好的干涉效果,构建了沉默 SOX9 基因的稳转胶质瘤细胞系。Western blot 及实时荧光定量 PCR 检测干涉效果明显。同时在沉默 SOX9 基因后在细胞系水平发

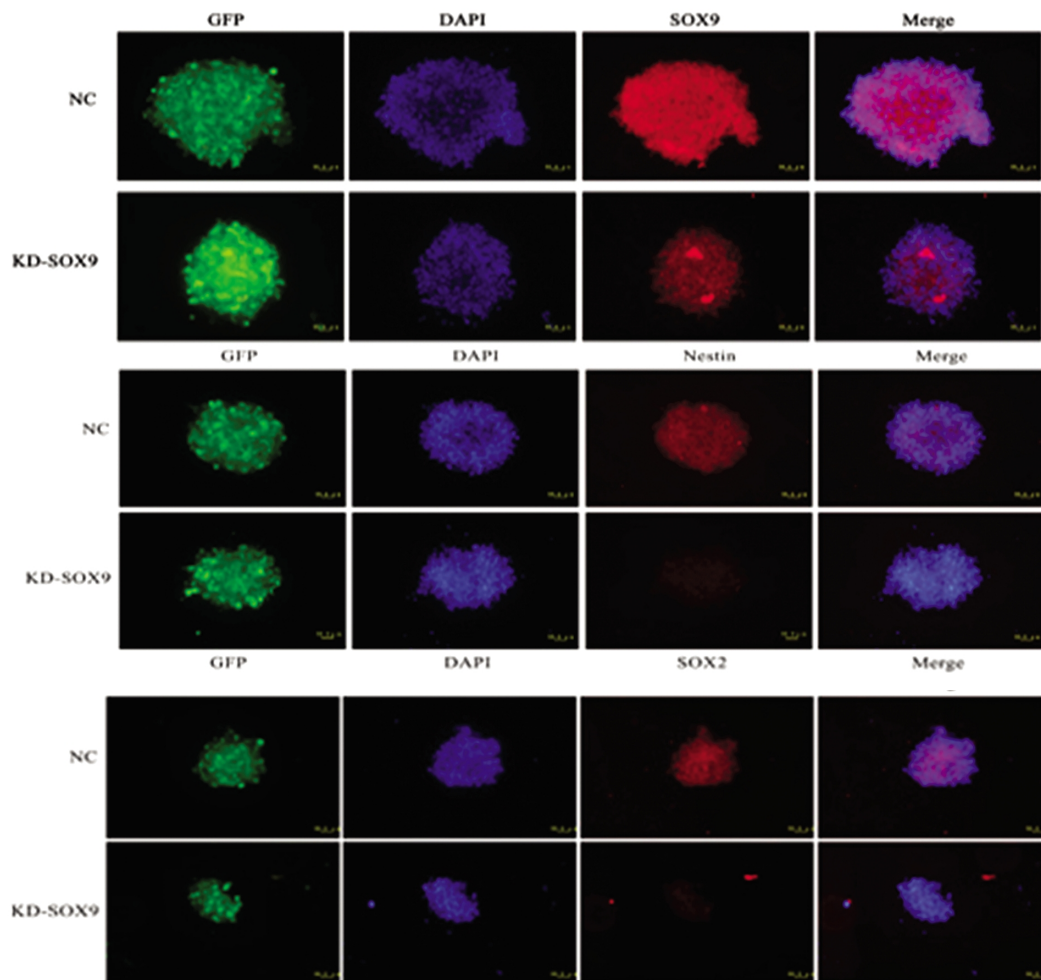


图6 免疫荧光实验检测肿瘤干细胞中水平沉默 SOX9 对于干性相关子表达的影响(图示刻度为 50 μ m,其中目的分子 SOX9, Nestin 及 SOX2 为红色荧光,DAPI 核衬染为蓝色荧光,GFP 本身为绿色荧光)

Fig.6 The effect of SOX9, Nestin, SOX2 and Ki67(red) analyzed by immunofluorescence. DAPI(blue) was used to stain nucle in the glioma neurospheres.

Note: Scale bar, 50 μ m.

现其干性相关分子的表达水平也相应下降。在进行干细胞诱导后,沉默 SOX9 组的成球能力以及成球直径较对照组明显下降。免疫荧光技术检测发现沉默 SOX9 基因后在胶质瘤干细胞水平相应的干性分子的表达水平也会相应的降低。

综上所述,SOX9 在组织、胚胎的分化和发育过程起重要作用,其收到多种代谢通路的调节,同时也被多个通路所调节,在众多通路所构成的网络中,SOX9 作为其共同的作用节点,在干细胞的分化和肿瘤的恶性转归过程中起关键作用。本实验证明了 SOX9 在胶质瘤干细胞干性维持的过程中起重要作用。SOX9 基因可以在不同细胞水平和多种通路中影响肿瘤的恶性表型,可以为脑胶质瘤手术后辅助放化疗以外的生物治疗(分子靶向免疫治疗)的关键靶点以及成为脑胶质瘤临床预后的指标之一,可为胶质瘤的诊断和治疗提供帮助。

参考文献(References)

- [1] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996
- [2] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432(7015):396-401
- [3] Mao XG, Zhang X, Zhen HN, et al. Progress on potential strategies to target brain tumor stem cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(2): 141-155
- [4] Wang JL, Yu JP, Sun SP, et al. Radiobiological characteristics of cancer stem cells from esophageal cancer cell lines [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(48): 18296-18305
- [5] Zhu TZ, Li XM, Liang GB, et al. β -elemene inhibits stemness, promotes differentiation and impairs chemoresistance to temozolomide in glioblastoma stem-like cells [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(2): 699-709
- [6] He Q, Liu Z, Wang A, et al. Bmi1 Drives Stem-Like Properties and is Associated with Migration, Invasion, and Poor Prognosis in Tongue Squamous Cell Carcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(1): 1-10
- [7] Shibahara I, Sonoda Y, Tominaga T, et al. The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence[J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(9): 1151-1159
- [8] Elzaat M, Jouneau L, Pannetier M, et al. High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(6): 153, 1-14
- [9] Gruber HE, Norton HJ, Ingram JA, et al. The SOX9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration[J]. *Spine*, 2005, 30(6): 625-630 (下转第 3465 页)

- [11] Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S, et al. PHarmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y₁₂ antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(9): 1038-1047
- [12] 王热华,林峰,陈诗泉,等.血栓弹力图评估阿司匹林和氯吡格雷血小板抑制率的临床应用 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(17): 4111-4112
- Wang Re-hua, Lin Feng, Chen Shi-quan, et al. Thrombelastogram to assess aspirin and clopidogrel platelet inhibition rate of clinical application[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2013, 33(17): 4111-4112
- [13] 高阅春,何继强,姜腾勇,等.冠心病患者冠状动脉病变程度与冠心病危险因素的相关分析[J]. *中国循环杂志*, 2012, 27(3): 178-181
- Gao Yue-chun, He Ji-qiang, Jiang Teng-yong, et al. Relationship of Coronary Stenosis Severity with its Risk Factors in Patients of Coronary Atery Disease [J]. *Chinese Circulation Journal*, 2012, 27(3): 178-181
- [14] Anderson SD, Shah NK, Yim J, et al. Efficacy and safety of ticagrelor: a reversible P2Y₁₂ receptor antagonist. [J]. *Ann Pharmacother*, 2010, 44(3): 524-537
- [15] Antman EM, Hand M, Armstrong PW, et al. 2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[R]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(2): 210-247
- [16] Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(11): 1045-1057
- [17] Jernberg T, Payne CD, Winters KJ, et al. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(10): 1166-1173
- [18] Wallentin L, Varenhorst C, James S, et al. Prasugrel achieves greater and faster P2Y₁₂ receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29: 21-30
- [19] Bernlochner I, Byrne RA, Kastrati A, et al. The future of platelet function testing to guide therapy in clopidogrel low and enhanced responders[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2011, 9(8): 999-1014
- [20] Cannon CP, Harrington RA, James S, et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study[J]. *Lancet*, 2010, 375(9711): 283-293
- [21] Cattano D, Altamirano AV, Kaynak HE, et al. Perioperative assessment of platelet function by thromboelastograph platelet mapping in cardiovascular patients undergoing non-cardiac surgery [J]. *Thromb Thrombolysis*, 2013, 35(1): 23-30

(上接第 3434 页)

- [10] Scott CE, Wynn SL, Briscoe J, et al. SOX9 induces and maintains neural stem cells[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(10): 1181-1189
- [11] Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 2013, 140 (20): 4129-4144
- [12] Nishino K, Toyoda M, Umezawa A, et al. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e13017
- [13] Zhou HY, Katsman Y, Mitchell JA, et al. A Sox2 distal enhancer cluster regulates embryonic stem cell differentiation potential [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(24): 2699-2711
- [14] Kent J, Wheatley SC, Sinclair AH, et al. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination[J]. *Development*, 1996, 122(9): 2813-2822
- [15] Ling S, Chang X, Schultz L, et al. An EGFR-ERK-SOX9 signaling cascade links urothelial development and regeneration to cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3812-3821
- [16] Capaccione KM, Hong X, Pine SR, et al. Sox9 mediates Notch1-induced mesenchymal features in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 2014, 5(11): 3636-3650
- [17] Bruun J, Kolberg M, Lothe RA, et al. Prognostic Significance of β -Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series [J]. *Front Oncol*, 2014, 118 (4): 1-16
- [18] Lin L, Shen Q, Yu C, et al. Sonic hedgehog improves redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes for articular cartilage repair[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88550
- [19] Raspaglio G, Petrillo M, Ferlini C, et al. Sox9 and Hif-2 α regulate TUBB3 gene expression and affect ovarian cancer aggressiveness[J]. *Gene*, 2014, 542(2): 173-181
- [20] Golding SE, Morgan RN, Adams BR, et al. Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 730-738
- [21] Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1):17-28