

## E-cadherin 启动子的荧光示踪体系的建立及验证

谭拥军<sup>†</sup>, 吴东丽, 余雳, 陈燕

(湖南大学 生物学院, 湖南 长沙 410082)

**摘要:**为实现对肺癌 A549 细胞的 EMT 示踪, 构建了 E-cadherin 基因启动子的慢病毒质粒, 并与包装质粒 pVSVG、 $\Delta 8.91$  共转染 HEK293T 细胞, 包装成有活性的慢病毒, 收取病毒感染 A549 细胞, 利用流式细胞仪和 Western blot 检测感染成功. 进一步用 TGF- $\beta$  诱导感染成功的 A549 细胞, 通过在荧光显微镜下观察荧光变化、荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 GFP 和 E-cadherin 的变化, 发现在 TGF- $\beta$  诱导 48 h 后, A549 细胞形态由鹅卵石样变成长梭形. 并且荧光显微镜观察到相比较于未诱导的细胞, 诱导后的 A549 细胞绿色荧光明显变暗, 同时 GFP 和 E-cadherin 的 RNA 水平和蛋白质表达水平均降低. 以 E-cadherin 基因启动子为基础建立了 A549 细胞的 EMT 荧光示踪体系, 为进一步研究肺癌的 EMT 过程提供了材料.

**关键词:**启动子; E-cadherin; 示踪; 肺癌; 细胞

**中图分类号:**Q782

**文献标志码:**A

## Establishment and Validation of a Fluorescent Tracer System Based on E-cadherin Promoter

TAN Yongjun<sup>†</sup>, WU Dongli, YU Li, CHEN Yan

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** In order to trace EMT status of lung cancer A549 cells, we constructed a lentiviral plasmid carrying E-cadherin gene promoter, which was co-transfected with packaging plasmids pVSVG and  $\Delta 8.91$  into HEK 293T cells to produce active lentivirus. Then the A549 cells were infected by the collected lentivirus, and the success of infection was examined by flow-cytometry and Western blot. Afterwards, TGF- $\beta$  was used to treat the infected A549 cell, and the expression of GFP and E-cadherin in those cells was detected by the fluorescence observation, RT-PCR and Western blot. We found that after 48 hours of TGF- $\beta$  induction, the morphology of A549 cells changed from cobblestone to long fusiform. Fluorescence microscopy showed that fluorescence signal of A549 cells was significantly decreased in the induction group compared with untreated cells, and RNA levels and protein levels of GFP and E-cadherin were decreased as well. This indicated that the EMT tracer system was established successfully. In conclusion, we established a EMT tracer system using lentivirus in the A549 cells, providing materials for further study of EMT process of lung cancer.

**Key word:** promoter; E-cadherin; tracer; lung cancer; cell

\* 收稿日期:2019-11-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(84172718), National Natural Science Foundation of China(84172718)

作者简介:谭拥军(1967—),男,湖南长沙人,湖南大学教授,博士生导师

<sup>†</sup> 通讯联系人, E-mail: yjtan@hnu.edu.cn

上皮间质转化(Epithelial-Mesenchymal transition, EMT),是指上皮细胞程序性、可逆的转化为间质细胞的过程,根据EMT发生的特定生物学环境将其分为1型、2型和3型<sup>[1]</sup>。其中,1型主要与胚胎发育和器官形成相关;2型主要与组织再生和伤口愈合相关<sup>[2]</sup>;3型主要参与上皮细胞的恶性转化<sup>[3]</sup>。三种EMT类型共同的细胞学机制包括有细胞形态改变、极性丧失、粘附性下降、细胞迁移能力和侵袭能力的增加<sup>[4]</sup>。细胞的EMT进程除了可以受到TGF- $\beta$ 、Notch和Wnt的信号通路调控之外,也可以受到肿瘤微环境(如缺氧)的影响以及microRNA(miRNA)的差异表达的影响<sup>[5]</sup>。对于肺癌来说,EMT是恶性转化的起始,其中有许多标志物和转录因子的参与,主要表现为上皮标志物如E-cadherin的表达缺失及一些间质标志物如N-cadherin、vimentin的表达上升<sup>[6]</sup>。

E-cadherin是钙离子依赖性的细胞表面蛋白,属于跨膜糖蛋白的一种,主要功能是参与细胞与细胞之间的紧密连接,促进上皮细胞之间的粘附<sup>[7]</sup>。研究表明,E-cadherin表达下调或缺失与EMT密切相关,E-cadherin表达的缺失被认为是肿瘤细胞EMT发生的关键步骤,其下调会导致肿瘤细胞侵袭性增加。因此,E-cadherin被认为是一种重要的EMT标志物<sup>[8]</sup>。此外,E-cadherin的丢失与各种肿瘤的恶性转移有关,如肺癌、胃癌、乳腺癌等<sup>[9]</sup>。

启动子是一段能够决定基因表达程度和表达频率的DNA序列。将E-cadherin基因的启动子与荧光蛋白相连,由于基因启动子的启动或丧失能够引起荧光信号的变化,进而根据荧光判断出EMT过程中E-cadherin的表达情况。利用启动子细胞荧光示踪是一种快速、简捷的方法,可以根据荧光的变化快速判断出大分子药物、小分子多肽等是否影响肿瘤细胞的EMT过程,进而用来进行对化学分子库、小分子药库进行快速筛选。我们通过构建E-cadherin基因启动子携带有绿色荧光蛋白的慢病毒载体,通过荧光的变化检测细胞的EMT过程,从而达到体外示踪的目的,为进一步研究肺癌的EMT过程提供了材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pLvX-EF1A-IRES-EGFP及包装质粒(pVSVG、 $\Delta$ 8.91)由本实验室保存;HEK293T细胞、肺癌A549细胞购自ATCC;XbaI、XhoI限制性内切酶购自美国

Thermo Scientific公司;ClonExpress II One Step Clonin购自南京诺维赞公司;EZ-trans转染试剂购自上海李记生物科技有限公司;感受态DH5 $\alpha$ 购自北京擎科新业生物技术有限公司;1kb DNA marker购自广东东盛科技公司;蛋白核酸分析仪来自Eppendorf公司;DMEM培养基购自GIBCO公司;胎牛血清(FBS)为Hyclone公司产品;PBS购自北京鼎国公司;polybrene助染试剂购自Merck-Millipore公司; $\beta$ -actin抗体购自abcam公司;GFP抗体购自上生工生物工程公司;Rabbit二抗购自碧云天生物技术公司;E-cadherin抗体购自cell signal-ling technology(CST)公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR扩增E-cadherin基因启动子

利用NCBI查找出E-cadherin的启动子(-2 500~100 bp)序列,利用primer5.0设计引物,上游引物为5'-GCAGAAATCCACTTTGGCTCGAGGATGAGCCAAGAACTCTGCT-3',下游引物为5'-GAGGGA-GAGGGGCGCGCTCTAGAAGCGGGCTG-GAGTCTGAAC-3',上下游引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

按照基因组提取试剂盒提取HEK293T细胞基因组,并以该基因组为模板进行PCR,反应体系为:45 ul mix酶,1 ul模板,上下游引物各2 ul。反应条件为:98 °C 2 min,98 °C 10 s,58 °C 10 s,72 °C 30 s,72 °C 5 min。反应完成后用1%琼脂糖凝胶进行电泳25 min,将得到的符合长度的片段用DNA凝胶试剂盒进行回收,用NanoDrop检测回收的DNA浓度。

#### 1.2.2 构建重组的慢病毒表达载体

将pLvX-EF1A-IRES-EGFP慢病毒载体用XhoI、XbaI两种限制性内切酶进行酶切,酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳20 min后,进行胶回收。取回收后的载体2  $\mu$ l,DNA片段5  $\mu$ l,酶2  $\mu$ l buffer 5  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l,37 °C孵育30 min后,冰上放置5 min。将5  $\mu$ l的连接产物加入到50  $\mu$ l的大肠杆菌感受态DH5 $\alpha$ 中,冰上30 min,42 °C热激90 s,加入200  $\mu$ l LB液体培养基于37 °C摇床振荡1 h,取适量的菌液均匀涂布于氨苄的培养皿上,过夜培养12~16 h。第二天,挑取单菌落于100 ul的LB培养基37 °C培养2 h,取1  $\mu$ l为模板,进行菌落PCR,挑取有条带的样品测序。

#### 1.2.3 细胞培养

HEK293T细胞和A549细胞均用含10%的FBS和1%双抗(100 mg/L青霉素和链霉素)的DMEM完

全培养基进行培养, 放置在 37 °C、5% 浓度 CO<sub>2</sub>、90% 相对湿度的细胞培养箱中进行培养, 当 HEK293T 细胞密度达到 80% 可以进行转染。

#### 1.2.4 慢病毒的包装和感染

当 HEK293T 的细胞密度达到 80% 左右, 就可以进行转染实验, 加样体系如下: pLv<sub>x</sub>-pE-cadherin-EGFP 质粒 12 μg、pVSVG 质粒 6 μg、Δ8.91 质粒 9 μg, 采用 Ez-trans 共转染 HEK293T 细胞, 8 h 后进行细胞换液。转染 48 h 和 72 h 后分别收取培养皿中的培养基至 15 ml 离心管, 4 °C、1 000 r/min 条件下离心 5 min, 0.45 μm 滤器过滤去除细胞碎片, 存储于 -80 °C 低温冰箱。选取生长状态良好的 A549 细胞, 将 2 mL 的 pLv<sub>x</sub>-pE-cadherin-EGFP 慢病毒上清加入其中进行感染, 按 1:1 000 加入助染试剂 polybrene 培养 48 h 后换取新鲜培养基, 观察感染效果, 反复三次加入慢病毒上清进行感染, 直到看到明显的绿色荧光, 进行扩大培养。

#### 1.2.5 流式细胞仪检测细胞绿色荧光比例

在荧光显微镜下观察感染成功的 A549 细胞, 进行拍照。并以绿色荧光为标志物, 以未感染的 A549 细胞作为阴性对照, 取 10<sup>4</sup> 个感染成功的 A549 细胞用 PBS 悬浮, 于 488 nm 的激发光条件下检测发出绿色荧光的细胞所占的细胞比例。

#### 1.2.6 mRNA 表达水平鉴定

将带有绿色荧光的 A549 细胞一组加入 10 ng/mL TGF-β, 培养 48 h 后, 于显微镜下观察荧光的变化并记录; 1% 的胰酶消化、富集荧光较亮的细胞, 采用 RNA 提取试剂盒, 提取细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA, RT-PCR 检测 E-cadherin 和 GFP 的基因表达情况。RT-PCR 引物如下:

hE-cadherin-S: CGGGAATGCAGTTGAGGATC

hE-cadherin-AS: AGGATGGTGTAAAGCGATGC

hGFP-S: GACAACCACTACCTGAGCAC

hGFP-AS: CAGGACCATGTGATCGCG

#### 1.2.7 蛋白表达水平鉴定

收取 A549 细胞, 1×PBS 洗两遍, 刮取细胞进入 2 ml EP 管中, 4 °C 离心 1 000 r/min, 5 min, 加入合适体积的 RIPA 裂解液, 按 1:100 的比例加入蛋白酶抑制剂, 冰上放置 1 h 后, 12 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 上清即为所需的蛋白溶液, 用蛋白核酸分析仪测量蛋白浓度。经 SDS-PAGE 分离, 湿转法转移至硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入 GFP 抗体 (1:2 500), E-cadherin 抗体 (1:2 000 稀释), 及 β-actin 抗体 (1:5 000 稀释), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗

3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体 (1:2 000), 室温孵育 2 h; TBST 洗 3 次, ECL 发光显色。

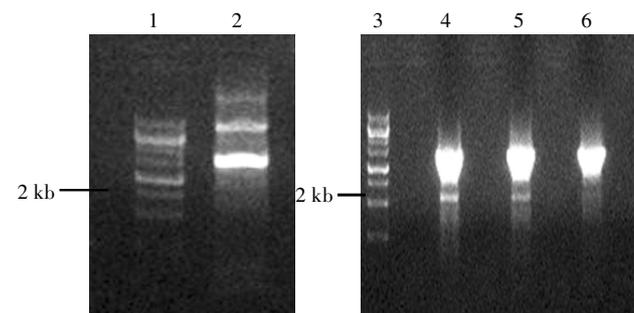
## 2 结果

### 2.1 生物信息学

首先在 NCBI 网站及 UCSC 网站比对确认 E-cadherin 的启动子区域。运用 EPD The Eukaryotic Promoter Database (<https://epd.epfl.ch/cgi-bin/>) 预测转录起始位点上游约 3 000 bp 区域, 发现该区域具有很强的活性。将 -2 746 bp~+74 bp 区域作为启动子的候选区域, 根据此区域的 DNA 序列设计引物。

### 2.2 E-cadherin 基因启动子的扩增及鉴定

以 HEK293T 基因组为模板进行 PCR, 条带预计长度为 2 800 bp 左右, 图 1 中可看出有条带位置正确。将 pLv<sub>x</sub>-EF1A-IRES-EGFP 慢病毒载体进行双酶切线性化之后, 与目的片段进行连接、转化, 挑取单克隆, 进行菌落 PCR 鉴定。



1, 3: 1 kb DNA marker; 2: pE-cadherin PCR 产物;

3, 4, 5, 6: 菌落 PCR 鉴定

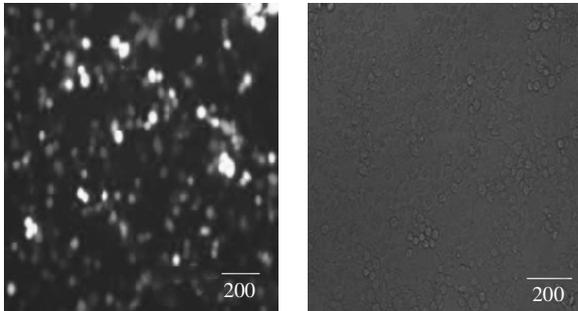
图 1 E-cadherin 基因启动子 PCR 产物及菌落 PCR 鉴定

Fig.1 Identification of PCR product and colony PCR of E-cadherin gene promoter

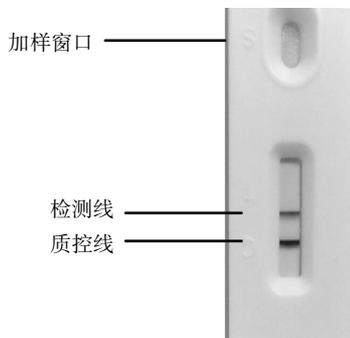
### 2.3 慢病毒载体的包装和感染

培养 HEK293T 细胞, 在细胞长至 70%~80% 左右, 将 pLv<sub>x</sub>-pE-cadherin-EGFP 质粒、pVSVG 质粒、Δ8.91 质粒共同进行转染, 48 h 后于荧光显微镜下观察到有绿色荧光, 说明慢病毒包装成功, 见图 2(a)。分别于 48 h 和 72 h 收集上清, 将上述收集的慢病毒上清离心后并用 0.45 μm 的无菌过滤头进行过滤, 除去杂质, 得到的上清用慢病毒滴度快速检测卡快速检测, 结果显示病毒滴度大概为 1.25 × 10<sup>6</sup> TU/ml, 见 (图 2(b)(c))。当 A549 细胞生长密度达到 30% 左右时进行感染, 反复感染 3 次, 于荧光显微镜下观察到有绿色荧光, 结果如图 3(a)。说明慢病毒成功感染

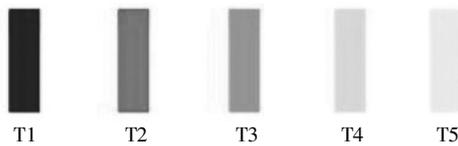
A549 细胞,命名为 A549-p-E-cadherin;并通过流式细胞仪进行分析,发现 GFP 的阳性细胞比例达到 4.2%. 结果见图 3(b);收集细胞进行 Western blot 检测,确定有 GFP 的表达,结果见图 3(c).



(a)pLvX-pE-cadherin-EGFP 载体转染 293T 细胞  
荧光显微镜观察( $\times 200$ )



(b)慢病毒滴度检测卡检测结果

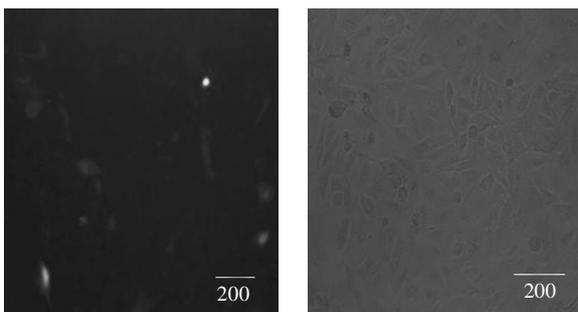


| 条带编号   | T1                    | T2                    | T3                    | T4                    | T5                    |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| P24 浓度<br>( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 500 ng/ml             | 100 ng/ml             | 50 ng/ml              | 10 ng/ml              | 1 ng/ml               |
| LPs/ml*                                      | $6.25\times 10^9$     | $1.25\times 10^9$     | $6.25\times 10^8$     | $125\times 10^8$      | $1.25\times 10^7$     |
| TU/ml  | $6.25\times 10^{6-7}$ | $1.25\times 10^{6-7}$ | $6.25\times 10^{5-6}$ | $1.25\times 10^{5-6}$ | $1.25\times 10^{4-5}$ |

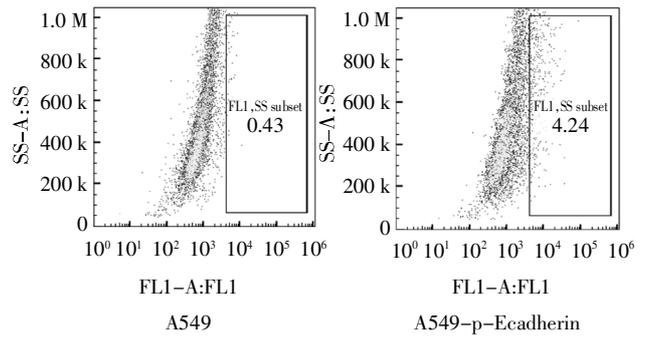
(c)滴度检测比色卡

图 2 慢病毒的包装及滴度测定

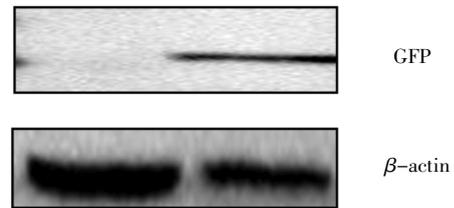
Fig.2 Packaging of lentivirus and determination of lentivirus tit



(a)A549 病毒感染荧光显微镜观察( $\times 200$ )



(b)感染成功的 A549 细胞的流式检测 GFP 比例  
A549 A549-p-Ecadherin



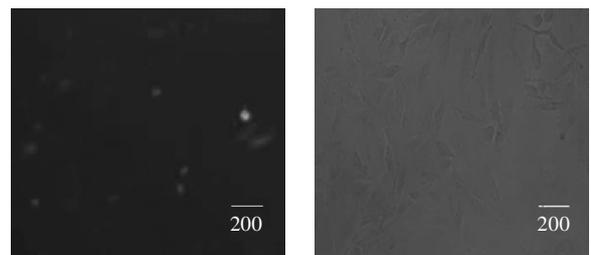
(c)感染成功的 A549 western blot 验证

图 3 慢病毒成功感染 A549 细胞的验证

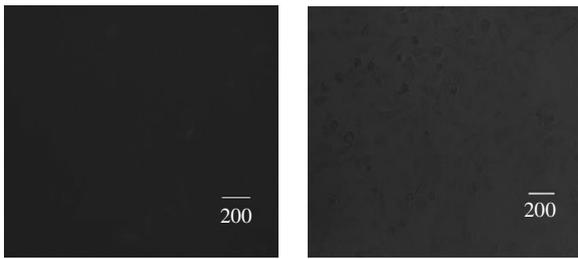
Fig.3 Verification of successful infection  
of A549 cells with Lentivirus

### 2.4 EMT 示踪体系的验证

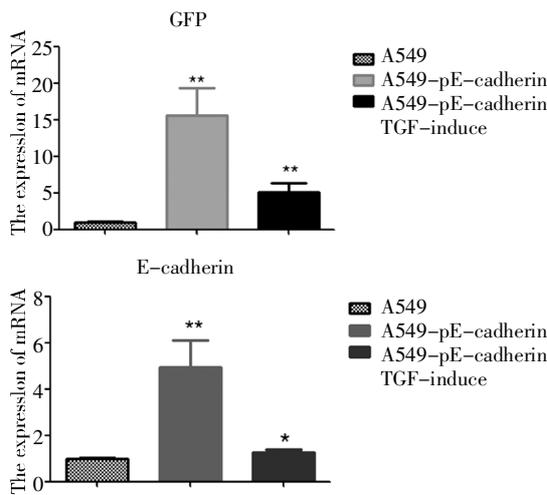
感染成功的 A549 细胞,理论上来说 GFP 的变化和 E-cadherin 的变化应该保持一致. TGF- $\beta$  是一种能够诱导肿瘤上皮型细胞向间质型细胞转化的细胞因子,因此选用 TGF- $\beta$  来验证该示踪体系是否有效. 当用 10 ng/ml 的 TGF- $\beta$  诱导 48 h 后,可以看到成功感染慢病毒的 A549 细胞的绿色荧光强度相较于未诱导的细胞有明显的减弱,并且观察到 A549 细胞的形态发生明显改变,细胞形态由纺锤形变为细长型,结果见图 4(a) 和 4(b). 收集未诱导和诱导后细胞进行 RT-PCR 和 Western blot 检测,发现经诱导后的细胞内的 E-cadherin 和 GFP 的 mRNA 水平和蛋白水平均降低,并且二者的变化趋势一致,结果见图 4(c) 和 4(d). 因此可以用细胞内绿色荧光的变化来代表 E-cadherin 的变化,说明该示踪系统是有效的.



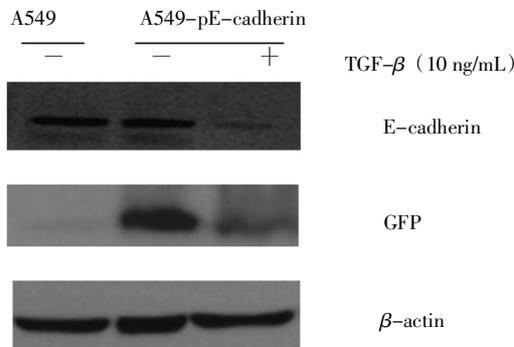
(a)慢病毒感染的 A549 细胞荧光显微镜观察( $\times 200$ )



(b)慢病毒感染 A549 细胞经 TGF-β 诱导后的荧光显微镜观察(×200)



(c)GFP 和 E-cadherin mRNA 水平检测



(d)GFP 和 E-cadherin 蛋白水平检测

图 4 A549 细胞 EMT 示踪体系的验证

Fig.4 Verification of A549 cell EMT tracer system

### 3 讨论

已有临床组织学表明,有近一半的非小细胞肺癌组织中 E-cadherin 基因的 RNA 水平比正常组织中明显下降,主要与其启动子区域的甲基化水平有关<sup>[10]</sup>.而 E-cadherin 由于其在细胞粘附中的重要作用,被认为是肺腺中的抑制基因,研究发现 E-cadherin 基因启动子区甲基化模式与肺癌的分期进展

直接相关<sup>[11]</sup>.在肺癌中,E-cadherin 可以受其他转录因子的调控,如 snail、slug 可以结合 E-cadherin 启动子上的 E-box 原件抑制 E-cadherin 的表达,进而抑制 EMT 进程<sup>[12]</sup>.而 GFP 是一种小分子的绿色荧光蛋白,已经广泛用于多种细胞的示踪<sup>[13]</sup>.本实验中,我们构建了带有 E-cadherin 启动子的慢病毒载体,进而感染 E-cadherin 高表达的上皮型的 A549 细胞,荧光显微镜下观察到大量的绿色荧光,在经细胞因子诱导 EMT 之后,绿色荧光减少,并且 E-cadherin 的表达也随之下降.根据绿色荧光的变化实现对肺癌细胞 EMT 过程的示踪,简单方便,有利于对肿瘤细胞 EMT 早期进行监控,并且适合对 EMT 治疗药物的筛选,是一个快速、方便的筛选平台.

TGF-β 与肿瘤的生长和转移密切相关,其诱导细胞发生 EMT 过程中,有多条信号通路如 TGF-β-Smad 信号、Wnt/β-catenin、Notch 信号等参与<sup>[14]</sup>.其中,TGF-β 信号通路是诱导 EMT 的经典途径,其信号调控通过 Smad 和非 Smad 两种途径诱导和维持细胞的 EMT<sup>[15]</sup>.此外,研究发现在 TGF-β 诱导 EMT 的过程中,可以通过 SMAD3 和 ERK-MAPK 途径诱导 Notch 通路中配体 Jagged1 的合成,从而激活 Notch 信号通路,而激活的 Notch 通路则可以促进 TGF-β 信号诱导 EMT 的过程<sup>[16]</sup>.此外,TGF-β 与 Wnt 信号通路之间也存在相互联系,如 Wnt 信号通路的下游分子 Axin 通过与 Smad 蛋白相互作用促进其与 I 型 TGF-β 受体结合,进而激活 TGF-β 信号通路<sup>[17]</sup>.因此,TGF-β 被认为是经典的诱导 EMT 的细胞因子.

慢病毒是一种基因工程中普遍使用的逆转录载体,相较于其他的逆转录载体,慢病毒载体不仅具有容纳外源片段大、无毒性且不易诱发免疫反应安全性好等特点,而且还有感染谱广、效率高等优势<sup>[18]</sup>.基于其以上优点,慢病毒载体被广泛应用于基因改造的临床治疗中,如目前的 CAR-T 疗法,就是通过向患者的 T 细胞转导 CAR 序列以达到对患者的 T 细胞进行改造的目的<sup>[19]</sup>.我们通过对慢病毒的载体进行改造,切去其原有的启动子,换上 E-cadherin 基因的启动子,进而感染肺癌 A549 细胞,使绿色荧光蛋白能够稳定长期表达,并根据绿色荧光的变化判断出 E-cadherin 的变化过程,进而完成对肺上皮细胞 EMT 示踪.

综上所述,我们选择以带有绿色荧光的慢病毒为载体,将其原有启动子替换为 E-cadherin 基因的启动子,构建 E-cadherin 基因启动子的慢病毒质粒.在 HEK293T 细胞中包装成慢病毒颗粒,并成功感染肺腺上皮细胞 A549 细胞,经 TGF- $\beta$  诱导后验证该细胞能有效示踪 EMT 过程,为肺癌的 EMT 的研究提供了材料.

## 参考文献

- [1] PRAT A,PEROU C M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer[J]. *Mol Oncol*,2011,5(1):5—23.
- [2] TAUBE J H,HERSCHKOWITZ J I,KOMUROV K,*et al.* Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2010,107(35):15449—15454.
- [3] MICALIZZI D S,FORD H L. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer [J]. *Future Oncol*,2009,5(8):1129—1143.
- [4] BOYER B,VALLES A M,EDME N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Biochem Pharmacol*,2000,60(8):1091—1099.
- [5] TAYLOR M A,PARVANI J G,SCHIEMANN W P. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- $\beta$  in normal and malignant mammary epithelial cells[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,2010,15(2):169—190.
- [6] HELDIN C H,Vanlandewijck M,Moustakas A. Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer[J]. *FEBS Lett*,2012,586(14):1959—1970.
- [7] NOLLET F,KOOLS P,VAN R F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members[J]. *J Mol Biol*,2000,299(3):551—572.
- [8] WONG T S,GAO W,CHAN J Y. Transcription regulation of E-cadherin by zinc finger E-box binding homeobox proteins in solid tumors[J]. *Biomed Res Int*,2014,2014:921564.
- [9] MICHALIDI C,THEOCHARIS S,TSOUROUFLIS G,*et al.* Expression and promoter methylation status of hMLH1, MGMT, APC, and CDH1 genes in patients with colon adenocarcinoma [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*,2015,240(12):1599—1605.
- [10] ZHENG S Y,HOU J Y,ZHAO J,*et al.* Clinical outcomes of down-regulation of E-cadherin gene expression in non-small cell lung cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2012,13(4):1557—1561.
- [11] SHARGH S A,SAKIZLI M,KHALAJ V,*et al.* Downregulation of E-cadherin expression in breast cancer by promoter hypermethylation and its relation with progression and prognosis of tumor [J]. *Med Oncol*,2014,31(11):250.
- [12] PAN Y,LI J,ZHANG Y,*et al.* Slug-upregulated miR-221 promotes breast cancer progression through suppressing E-cadherin expression[J]. *Sci Rep*,2016,6:25798.
- [13] SUZUKI H,SAKABE T,HIROSE Y,*et al.* Development and evaluation of yeast-based GFP and luciferase reporter assays for chemical-induced genotoxicity and oxidative damage [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2017,101(2):659—671.
- [14] XU J,LAMOUILLE S,DERYNCK R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Res*,2009,19(2):156—172.
- [15] DERYNCK R,ZHANG Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling[J]. *Nature*,2003,425(6958):577—584.
- [16] ZAVADIL J,CERMAK L,SOTO N N,*et al.* Integration of TGF- $\beta$ /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *EMBO J*,2004,23(5):1155—1165.
- [17] GUO X,RAMIREZ A,WADDELL D S,*et al.* Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling[J]. *Genes Dev*,2008,22(1):106—120.
- [18] COCKRELL A S,KAFRI T. Gene delivery by lentivirus vectors[J]. *Mol Biotechnol*,2007,36(3):184—204.
- [19] LI J,LI W,HUANG K,*et al.* Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors:lessons learned and strategies for moving forward[J]. *J Hematol Oncol*,2018,11(1):22.