



· 论 著 ·

DMRT1 促进肺腺癌细胞增殖能力及体内成瘤性的实验研究

毕亚彤¹, 朱 丽², 雷 鸣¹

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院, 上海 200125;
2. 上海交通大学转化医学研究院, 上海 200240

[摘要] 背景与目的: 肺腺癌发病率和死亡率居高不下, 严重威胁人类健康。双性和mab-3相关转录因子1 (double-sex and mab-3 related transcription factor 1, DMRT1) 与多种肿瘤相关。本研究旨在分析DMRT1在肺腺癌中的表达及其对患者不良预后的影响, 并探究其在肺腺癌细胞中的作用及相关机制。方法: 利用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中的肺腺癌样本数据, 分析DMRT1在肺腺癌组织中的表达及其与患者生存期的相关性。通过短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA) 技术构建敲低DMRT1的 (shRNA#1和shRNA#2)、shRNA阴性对照的A549和PC9细胞株, 同时构建DMRT1过表达A549细胞株 (OE-DMRT1), 利用IncuCyte™活细胞分析系统连续监测72 h细胞增殖、平板克隆培养14 d检测克隆形成能力及EdU染色实验温育2 h评估DNA合成水平, 并利用流式细胞术检测细胞周期分布与凋亡水平; 借助BALB/c裸鼠体内实验观察DMRT1对癌细胞成瘤性的影响。通过转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 技术探究DMRT1调控肺腺癌细胞增殖的潜在信号转导通路, 并采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 分析其对细胞周期及凋亡相关基因表达的影响。数据采用GraphPad Prism 10.0软件分析。本研究经上海交通大学医学院附属第九人民医院动物伦理专委会批准 (SH9H-2023-A871-1)。结果: TCGA数据库的分析结果表明, DMRT1在肺腺癌中异常高表达, 且其表达水平与肺腺癌患者的生存期呈负相关。敲低DMRT1可显著抑制细胞的增殖、克隆形成能力和DNA合成能力 ($P<0.001$), 过表达DMRT1可促进A549细胞增殖 ($P<0.05$)。敲低DMRT1也可引发细胞周期G₀/G₁期阻滞 ($P<0.001$)、诱导细胞凋亡 ($P<0.001$)。裸鼠体内成瘤实验进一步证实, DMRT1敲低可减慢肺腺癌细胞的体内增殖速度 ($P<0.01$)。DMRT1敲低使G₁/S期相关基因E2F转录因子1 (E2F transcription factor 1, E2F1)、MYC原癌基因 (MYC proto-oncogene, MYC)、细胞周期蛋白E2 (cyclin E2, CCNE2) 和细胞分裂周期蛋白6 (cell division cycle 6, CDC6) 的表达下调, 总Rb蛋白无明显变化, 而磷酸化pRb (Ser807/811) 水平降低; 同时抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调, Bcl-2相关X凋亡调节因子 (Bcl-2 associated X, apoptosis regulator, Bax) /Bcl-2比值、剪切型caspase-3及剪切型多聚ADP核糖聚合酶水平均上升。结论: DMRT1的高表达与肺腺癌患者的不良预后呈负相关, 其可能通过促进E2F介导的细胞周期进程及激活caspase-3凋亡通路, 进而增强肺腺癌细胞的增殖活性。

[关键词] 癌-睾丸抗原; 双性和mab-3相关转录因子1; 肺腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R734.2 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.06.001

基金项目: 国家自然科学基金 (31930063)。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

伦理批件: SH9H-2023-A871-1。

知情同意: 不需要。

引用本文: 毕亚彤, 朱丽, 雷鸣. DMRT1促进肺腺癌细胞增殖能力及体内成瘤性的实验研究 [J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(6): 533-544.

CC协议: CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: National Natural Science Foundation of China (31930063).

Conflicts of interest: All authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: SH9H-2023-A871-1.

Informed consent: Not required.

Cite this article: BI Y T, ZHU L, LEI M. Experimental study on DMRT1 promoting proliferation and *in vivo* tumorigenesis of lung adenocarcinoma cells [J]. Chin Oncol, 2026, 36(6): 533-544.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

Experimental study on DMRT1 promoting proliferation and *in vivo* tumorigenesis of lung adenocarcinoma cells BI Yatong¹, ZHU Li², LEI Ming¹ (1. Shanghai Institute of Precision Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China; 2. Institute of Translational Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Correspondence to: LEI Ming E-mail: leim@shsmu.edu.cn

[Abstract] Background and purpose: Lung adenocarcinoma remains a major threat to human health due to its high incidence and mortality. Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1) is associated with multiple malignancies. This study aimed to investigate the expression of DMRT1 in lung adenocarcinoma and its impact on poor prognosis of patients, as well as to explore its biological function and related mechanisms in lung adenocarcinoma cells. **Methods:** Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) lung adenocarcinoma cohort were used to analyze DMRT1 expression in lung adenocarcinoma tissues and its correlation with patient survival. A549 and PC9 cell lines with stable *DMRT1* knockdown (shRNA#1, shRNA#2) and shRNA negative control (sh-NC) were established via short hairpin RNA (shRNA) technology. Meanwhile, A549 cell line with DMRT1 overexpression (OE-DMRT1) was constructed. Cell proliferation was continuously monitored for 72 h using the IncuCyte™ live-cell imaging system, colony formation ability was assessed after 14 days of plate colony culture, and DNA synthesis was evaluated using 2-hour EdU staining. Flow cytometry was performed to detect cell cycle distribution and apoptosis, *in vivo* tumorigenesis assay in BALB/c nude mice was conducted to verify the role of DMRT1 *in vivo*. Subsequently, transcriptome sequencing (RNA-seq) was used to explore potential signaling pathways through which DMRT1 regulates lung adenocarcinoma cell proliferation. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot were applied to verify the expression of genes related to cell cycle and apoptosis. All data were analyzed using GraphPad Prism 10.0 software. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (SH9H-2023-A871-1). **Results:** TCGA database analysis revealed that DMRT1 was abnormally upregulated in lung adenocarcinoma, and its expression level was negatively correlated with overall survival of lung adenocarcinoma patients. *DMRT1* knockdown markedly suppressed cell proliferation, colony formation and DNA synthesis in both A549 and PC9 cells ($P < 0.001$). Specifically, the quantitative results of functional assays were as follows: cell proliferation, colony formation and DNA synthesis capacity, overexpression of DMRT1 promoted the proliferation of A549 cell line ($P < 0.05$). Knockdown of *DMRT1* also induced G₀/G₁ phase cell cycle arrest ($P < 0.001$), and promoted cell apoptosis ($P < 0.001$). Nude mouse xenograft assays further confirmed that *DMRT1* knockdown retarded the *in vivo* growth of lung adenocarcinoma cells ($P < 0.01$). Mechanistic experiments demonstrated that *DMRT1* knockdown downregulated the expression of G₁/S phase cell cycle-related genes, including E2F transcription factor 1 (E2F1), *MYC* proto-oncogene (*MYC*), cyclin E2 (CCNE2), and cell division cycle 6 (CDC6). The total retinoblastoma (Rb) protein level remained unchanged, while the level of phosphorylated p-Rb (Ser807/811) was decreased. Additionally, the anti-apoptotic protein Bcl-2 was reduced. Meanwhile, the Bax/Bcl-2 ratio, as well as the levels of cleaved caspase-3 and cleaved poly ADP-ribose polymerase (PARP), were all elevated. **Conclusion:** High expression of DMRT1 is negatively associated with prognosis in lung adenocarcinoma. DMRT1 may enhance the proliferative activity of lung adenocarcinoma cells by promoting E2F-mediated cell cycle progression and inhibiting the caspase-3-dependent apoptotic pathway.

[Key words] Cancer-testis antigen; DMRT1; Lung adenocarcinoma; Cell proliferation; Apoptosis

研究^[1]显示,肺癌的新发病例和癌因死亡人数居高不下,构成极其严峻的公共卫生挑战。作为肺癌最常见的组织学亚型,肺腺癌虽已有放射治疗、化疗及免疫治疗等多种治疗手段,但总体疗效仍不尽如人意^[2-3]。从外科临床进展角度,早期精准分层并实施个体化干预是改善肺腺癌患者预后的关键突破口^[4]。

癌—睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA)基因是一类在正常睾丸组织中特异性表达而在多种恶性肿瘤中异常激活的基因^[5]。双性和mab-3相关转录因子1(double-sex and mab-3 related transcription factor 1, DMRT1)于2013年被证实为CTA^[6]。DMRT1与果蝇*dsx*基因和线虫*mab-3*基因同源,属于DMRT家族。DMRT蛋白由

*DMRT*基因编码,参与调控多种生理过程,尤其在性别分化与决定中发挥关键作用^[7]。有研究^[8]显示,人类*DMRT*基因的表达异常与多种肿瘤的发生、发展存在显著关联,DMRT1参与生殖细胞瘤的发生、发展,DMRT2参与调控前列腺癌、神经母细胞瘤的发生、发展^[9-10],DMRT3可能参与乳腺癌的发生、发展^[11]。但是,DMRT1在肺腺癌中的作用及其机制尚不明确。本研究分析DMRT1在肺腺癌中的表达及意义,探究DMRT1促进肺腺癌细胞增殖的作用以及相关分子机制,旨在为寻找新的治疗策略和药物靶点提供参考。

1 资料和方法

1.1 公共数据来源与分析

本研究的数据来源与分析包括：使用TIMER 3.0 在线分析网站 (<https://compbio.cn/timer3/>) 分析DMRT1 mRNA在泛癌中的表达水平。基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库获取肺腺癌转录组数据, 分析DMRT1 mRNA在肿瘤组织与癌旁组织中的表达水平。使用Kaplan-Meier plotter生存分析网站 (<http://kmplot.com/analysis/>) 探究DMRT1 mRNA表达水平与肺腺癌患者总生存期(overall survival, OS)的关联。

1.2 细胞、质粒、主要试剂及仪器

人肺腺癌细胞系A549 (FH0045)、PC9 (FH0083) 和人胚肾细胞系HEK-293T (FH0244) 购自上海富衡生物有限公司, A549细胞为KRAS突变型, PC9细胞为EGFR突变型; 所有细胞均经STR分型鉴定合格, 实验使用第3~15代细胞, 细胞系验证时间为2024年6月。

质粒构建使用的pLKO.1质粒购自美国Addgene公司 (#8453), 慢病毒包装中使用的dR8.9、VSVG质粒为本实验室保存, 嘌呤霉素购自上海碧云天生物技术股份有限公司 (ST551-250 mg), 纯度 $\geq 98\%$ (HPLC), 储存浓度为10 mg/mL, 聚凝胺购自上海碧云天生物技术股份有限公司 (C0351)。

DMEM培养基、RPMI-1640培养基购自上海源培生物科技有限公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶均购自美国Thermo Fisher公司, 氨苄青霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 高保真PCR预混液、Phanta Max Master Mix PCR预混液均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 兔源DMRT1抗体购自美国Novus Biologicals公司, 鼠源GAPDH抗体购自美国Proteintech Group公司, 兔源cleaved PARP抗体、兔源pro-caspase-3抗体、兔源cleaved caspase-3抗体均购自杭州华安生物技术有限公司, 兔源Bcl-2抗体、兔源Bax抗体购自成都正能生物技术有限责任公司, 兔源Rb抗体、兔源pRb (Ser807/811) 抗体、兔源CCNE2抗体、兔源MYC抗体购自美国CST公司, 内毒素质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, Lipofectamine™ 3000细胞转染试剂盒购自美国Invitrogen公司, 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(C1052) 购自上海碧云

天生物技术股份有限公司, 碘化丙啶PI (40755ES) 和Annexin V-FITC/PI试剂盒(40302ES) 均购自翌圣生物科技(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

A549、PC9细胞使用含10%FBS的RPMI-1640培养基进行培养; HEK-293T细胞使用含10%FBS的DMEM培养基进行培养, 所有细胞均置于37℃、CO₂体积分数为5%的恒温培养箱中培养。采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 对所有培养细胞进行支原体检测, 仅选取检测结果为阴性的细胞用于后续实验, 以确保细胞无支原体污染, 保障实验结果的可靠性。实验前采用台盼蓝拒染法检测细胞活力, 筛选活力 $>95\%$ 的细胞用于后续实验, 排除活力不足细胞对实验结果的干扰。各实验所用细胞密度及融合度严格遵循以下标准, 其中IncuCyte™活细胞分析系统成像实验采用48孔板, 细胞密度为 6×10^3 /孔; 平板克隆形成实验采用12孔板, 细胞密度为 2×10^3 /孔; EdU染色实验采用96孔板, 细胞密度为 1×10^4 /孔。细胞处于对数生长期的判断标准为: 细胞形态完整、排列均匀, 无明显脱落及衰老现象; 细胞增殖速度稳定, 细胞密度达到培养瓶底面积的50%~80%, 此时细胞代谢活跃、增殖能力强, 适用于各类实验操作。

1.3.2 构建敲低及过表达DMRT1的细胞株

利用赛默飞在线设计工具 (<https://rnaidesigner.thermofisher.com>), 针对DMRT1基因的开放阅读框(ORF)及非翻译区(UTR)设计短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列, 设定GC含量范围为30%~60%、解链温度约60℃; 设计过程中排除序列重复区域及经生物信息学预测的二级结构区域。筛选工具评分较高的候选shRNA序列, 通过NCBI数据库的BLAST比对程序进行人全基因组同源性比对, 剔除存在非特异性结合的序列, 确保候选序列的靶向特异性, 共筛选得到5条特异性shRNA序列, 分别为shRNA#1: CGTATGGTCATCCAGGATATT; shRNA#2: GTTGTAACCTTAGGTTGTAAT; shRNA#3: GAGTGCTCGCACTTCTCCTAG; shRNA#4: TCTTACTACCCGCCTCCCTCT; shRNA#5: GCCACAAGCGCTTCTGCATGT; 同时设计sh-NC: CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAG

CGAGGGCGACTTAACCTTAGG作为阴性对照,经预实验检测各候选序列对*DMRT1*基因的敲低效率,最终选择shRNA#1和shRNA#2为最优靶向序列进行后续实验。

利用shRNA进行质粒构建:分别将特异性靶向DMRT1的shRNA片段与线性化的pLKO.1-Puro载体连接,构建沉默*DMRT1*基因的敲低质粒。同时,使用无靶向效应的序列插入pLKO.1-Puro载体作为阴性对照。

构建DMRT1过表达质粒:提取A549细胞总RNA,反转录获得cDNA,以cDNA为模板,采用特异性引物扩增全长DMRT1编码区序列;将扩增纯化后的目的片段与经限制性内切酶线性化的pLVX-IRES-mCherry慢病毒过表达载体进行同源重组连接,构建携带红色荧光标记的DMRT1过表达重组质粒(OE-DMRT1);同时将空载pLVX-IRES-mCherry作为过表达阴性对照(NC)。经测序验证插入序列无突变、读码框正确,确保过表达质粒构建成功。

将上述构建好的敲低质粒及对照质粒sh-NC、过表达质粒OE-DMRT1及空载对照NC,分别与dR8.9、VSVG质粒转染至HEK-293T细胞中,在48 h和72 h收集含有慢病毒的上清液,其滴度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ TU/mL。将过滤后的慢病毒上清液

分别加入A549、PC9细胞中,并加入聚凝胺(终浓度为8 $\mu\text{g/mL}$),48 h后加入嘌呤霉素(终浓度为1.5 $\mu\text{g/mL}$)筛选,该浓度经预实验验证为最小致死浓度(设置0.5、1.0、1.5和2.0 $\mu\text{g/mL}$ 梯度筛选,确定1.5 $\mu\text{g/mL}$ 可有效地杀死未感染细胞且对感染细胞毒性最小),同时通过荧光显微镜观察mCherry红色荧光表达筛选过表达细胞。72 h后使用蛋白质印迹法(Western blot)和RTFQ-PCR实验对DMRT1的表达进行检测,以验证细胞系构建是否成功。验证完成后继续用嘌呤霉素(终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$)持续筛选7~14 d。

1.3.3 RTFQ-PCR检测

使用TRIzol提取细胞总RNA,通过NanoDrop微量紫外分光光度计测定浓度后取1 μg RNA利用反转录试剂盒反转录获得cDNA。使用SYBR试剂盒按照说明书进行RTFQ-PCR检测。所有结果均以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内部参考进行归一化处理,每种基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值表示(以目的基因与内参基因的CT差值计算 ΔCT ,再以处理组与对照组 ΔCT 差值计算 $\Delta\Delta\text{CT}$,最终目的基因相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)。检测基因的引物序列见表1,所有实验均重复3次。

表1 RTFQ-PCR引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RTFQ-PCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>DMRT1</i>	CAGAGGGACGTATGGTCATCC	AAGTCACCGTCAAGGTGATTTT
<i>GAPDH</i>	CCTCAACGACCACTTTGTCAAG	TCTTCCTCTTGCTCTTGCTG
<i>CDC6</i>	TGTTCTCCTCGTGAAAAGCC	GGGGAGTGTTGCATAGGTTGT
<i>CCNE2</i>	GGAACCACAGATGAGGTCCAT	CCATCAGTGACGTAAGCAAAC
<i>MYC</i>	GTCAAGAGGCGAACACACAAC	TTGGACGGACAGGATGTATGC
<i>E2F1</i>	ACGCTATGAGACCTCACTGAA	TCCTGGGTCAACCCCTCAAG
<i>CDKN1A</i>	CGATGGAAGTTCGACTTTGTCA	GCACAAGGGTACAAGACAGTG
<i>CDKN2A</i>	GGGTTTTCGTGGTTCATCC	CTAGACGCTGGCTCCTCAGTA

1.3.4 Western blot检测

在细胞稳定培养24~48 h后,弃培养基,预冷磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤2次,加入含1% PMSF、1%磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液冰上裂解30 min,12 000×g、4 °C离心15 min取上清液,95 °C煮20 min变性。RIPA裂解液配方为50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、1%脱氧胆酸钠、0.1%十二烷基硫酸钠、1 mmol/L乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA),使用前现加1 mmol/L PMSF和1:100

稀释的磷酸酶抑制剂Cocktail。采用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法进行蛋白定量,按30 μg /孔上样,使用4%~12%的预制蛋白胶分离蛋白,浓缩胶80 V电泳30 min,分离胶120 V电泳90 min。电泳结束后采用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF),甲醇浸泡10~15 s激活,转膜条件为300 mA恒流、90 min(可4 °C进行),转膜后使用5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭1 h,然后加入一抗(目的蛋白为1:1 000稀释,内参GAPDH为1:5 000稀释)

4℃温育过夜，用含有吐温-20三乙醇胺缓冲盐溶液（Tris-buffered saline Tween, TBST）洗3次（每次10 min）后室温温育二抗（HRP标记，兔源一抗配山羊抗兔IgG，鼠源一抗配山羊抗小鼠IgG，1:5 000稀释）1 h，TBST再次清洗后，加入1:1混合的ECL化学发光试剂温育1~2 min，放入Amersham Imager 600凝胶成像系统采集条带图像，后续进行灰度分析。

1.3.5 IncuCyte™活细胞分析系统成像细胞增殖实验

在48孔板中按 6×10^3 个/孔接种细胞，设置3个复孔，待细胞贴壁后，置于IncuCyte™分析系统中，在37℃、CO₂体积分数为5%的条件下培养。每间隔12 h对生长中的细胞进行一次拍摄，连续拍摄4 d，使用IncuCyte™系统软件分析细胞成像和增殖情况。

1.3.6 平板克隆实验

在12孔板中按 2×10^3 个/孔接种细胞，置于37℃、CO₂体积分数为5%的细胞培养箱中培养。7 d后取出细胞并使用PBS清洗后，加入1 mL 4%多聚甲醛溶液固定，后用结晶紫染料染色20 min，清洗晾干后使用ZEISS Zoom.V16显微镜观察并采集图像。使用Fiji/ImageJ软件处理图像，计算图像中单个孔的面积和克隆形成面积，单个集落中细胞数大于50个定义为克隆，并利用克隆形成率（克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%）量化评估细胞的克隆形成能力。

1.3.7 EdU增殖实验

在96孔板中按 1×10^4 个/孔接种细胞，待细胞贴壁后，加入含有10 μmol/L的EdU培养基溶液，温育1 h后使用4%多聚甲醛室温固定30 min，加入Click反应液后使用高内涵成像分析系统拍摄并分析EdU结果，随机选取视野，计数每个视野下EdU阳性细胞数（红色荧光阳性）与总细胞数（蓝色荧光阳性），以阳性细胞数/总细胞数×100%计算阳性率。

1.3.8 细胞周期检测

收集各组稳转细胞，经消化、PBS洗涤后，用预冷的70%乙醇于4℃固定2 h以上。弃去固定液，PBS重悬洗涤，加入碘化丙啶染色液（含RNase A）避光37℃温育30 min。随后使用BD LSRFortessa流式细胞仪在488 nm激发光波长下检测红色荧光，同时检测光散射情况，每样本获取10 000个有效细胞。首先在FSC-SSC散点图圈定完整细胞群体，排除细胞碎片与杂质，再通过FSC-A/FSC-H散点图去除双联体细胞，细胞周期

分布采用FlowJo 10.8.1软件进行分析，通过软件拟合计算G₀/G₁期、S期及G₂/M期细胞占总细胞的比例。

1.3.9 细胞凋亡检测

收集各组稳转细胞，用预冷PBS洗涤后，加入100 μL 1×结合缓冲液重悬。依次加入5 μL Annexin V-FITC与10 μL PI染色液，避光室温温育10 min，再加入400 μL 1×结合缓冲液混匀，于1 h内上机进行流式细胞术检测，采用BD LSRFortessa流式细胞仪检测，每样本获取10 000个细胞，检测前进行补偿设置，采用单染管（分别单独标记FITC、PI）进行补偿调节，圈门策略为：通过FSC-A/SSC-A散点图圈出单个细胞群体，排除细胞碎片及粘连细胞，再对目标单细胞群体绘制Annexin V-FITC/PI双参数散点图，依次圈门并计算Annexin V-PI-正常活细胞、Annexin V⁺PI-早期凋亡细胞、Annexin V⁺PI⁺晚期凋亡细胞及Annexin V-PI⁺坏死细胞比例，同时以早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞比例之和计算总凋亡率。

1.3.10 转录组测序与生物信息学分析

收集对照组与稳定敲低DMRT1的细胞样本，用RNAiso Plus处理，重复3份，使用VAHTS Total RNA-seq (H/M/R) Library Prep Kit构建测序文库，测序平台为真迈5000。使用OmicsTools (1.1.7版本)及R软件(4.3.1版本)对RNA测序的数据进行分析，使用R语言DESeq2包进行差异表达基因（differentially expressed gene, DEG）分析，筛选标准为 $|\log_2FC| > 1$, $P_{\text{adjust}} < 0.05$ 。使用微生信在线平台（<https://www.bioinformatics.com.cn>）对敲低组和对照组间的DEG进行聚类分析、GO富集分析和基因集富集分析（Gene Set Enrichment Analysis, GSEA）。其中RNA测序和数据清洗由上海旭燃生物科技有限公司完成。

1.3.11 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

雄性SPF级BALB/c裸鼠，4~6周龄，体重16~22 g，购自上海吉辉实验动物饲养有限公司[实验动物生产许可证号为SCXK（沪）2022-0009；实验动物质量合格证编号：20220009028453]，饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院SPF级动物房，实验动物使用许可证号为SYXK（沪）2020-0025；饲养环境条件：温度（22±2）℃、湿度50%±10%、光照周期12 h/12 h明暗交替，每笼饲养5只。所有实验操作均经上海交通大学医学院附属第九人民医院动物伦理专委会批准（批准号：SH9H-2023-

A871-1)。适应性饲养1周后开始实验。取对数生长期 A549 细胞, 弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 完全培养基终止消化后收集细胞。4 °C、300×g 离心 5 min, 弃上清液; PBS 重悬洗涤 2 次。用无血清培养基或 PBS 重悬细胞, 调整浓度至 4×10^7 个细胞/mL。

用 75% 酒精消毒腋下注射部位。左手捏起裸鼠颈背部皮肤固定, 右手持胰岛素注射器, 针头斜刺入皮下 1 cm 深, 左右滑动确认在皮下层, 缓慢注射 100 μ L 细胞悬液, 避免气泡和漏液。轻压注射点 10 s 防止回流。

接种后每日观察裸鼠一般状况 (精神、活动、饮食、体重), 人道终点标准: 移植瘤最大直径 ≥ 15 mm 或体积 $\geq 2\,000$ mm³、体重较初始下降 $\geq 20\%$ 、出现明显疼痛行为 (如弓背、脱毛、活动受限)、精神萎靡或濒死状态, 达到任一标准即提前终止实验。自接种后第 9 d 起, 每 3 d 用游标卡尺测量移植瘤的长径 (a) 和短径 (b), 按公式 $V=0.5 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积。实验全程严格遵循动物伦理要求, 于接种 21 d 后将小鼠以符合 AVMA 指南的颈椎脱臼法处死。肿瘤组织使用液氮冻存或多聚甲醛固定。

1.3.12 实验设计与流程

本研究采用 A549 和 PC9 细胞系, 各设阴性对照及 *DMRT1* 敲低组 (shRNA#1 和 shRNA#2), 每组 3 个技术复孔、3 次生物学重复, 初始共 18 个样本。实验过程中排除 2 个样本 (1 例支原体污染、1 例蛋白降解检测失败), 最终纳入分析 16 例。本研究样本量依据预实验确定, 主要指标变异系数 $CV < 15\%$, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 检验效能 $Power = 0.8$; 每组设置 3 个技术复孔, 均进行 3 次独立生物学重复, 总样本量为技术重复 $\times$ 生物学重复。细胞分组采用随机数字表法, 由独立人员完成, 并按细胞批次进行分层随机; 分层因素为细胞系类型, 分为 A549 细胞和 PC9 细胞两个层

级, 以控制混杂因素。结果评估采用单盲设计, 图像及流式分析人员对分组不知情, 通过样本编码维持盲法。为控制偏倚, 各组均使用同批次试剂并同步检测; 实验前校准仪器并绘制标准曲线; 统一细胞密度及培养条件; 所有指标及分析流程均预先设定, 避免选择性报告偏倚 (图 1)。

1.4 统计学处理

使用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验。符合正态分布的连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不符合正态分布的连续变量以中位数 (四分位数) 表示。对于符合正态分布的数据, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 事后多重比较采用 Bonferroni 检验, 细胞增殖动力学 (生长曲线) 采用双因素重复测量方差分析; 对于不符合正态分布的数据, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线法绘制生存曲线, log-rank 检验进行组间差异比较; 采用 Cox 比例风险回归模型分析影响因素, 并计算风险比 (hazard ratio, HR) 及 95% CI。Cohen's d 为两组 t 检验的效应量, η^2 为单因素方差分析的效应量; 统计量两组比较报告 t 值, 多组比较报告 F 值。所有显著性检验均为双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞基线特征与数据概况

处理前各组 A549、PC9 细胞形态正常、贴壁良好, 接种密度统一, 细胞活力均 $> 95\%$, 细胞周期分布差异无统计学意义, 组间基线具有可比性 ($P > 0.05$)。实验过程中共剔除 2 例样本, 1 例因支原体污染、1 例因蛋白降解致 Western blot 检测失败, 缺失数据予以剔除, 最终纳入统计分析的有效样本量为 16 例。

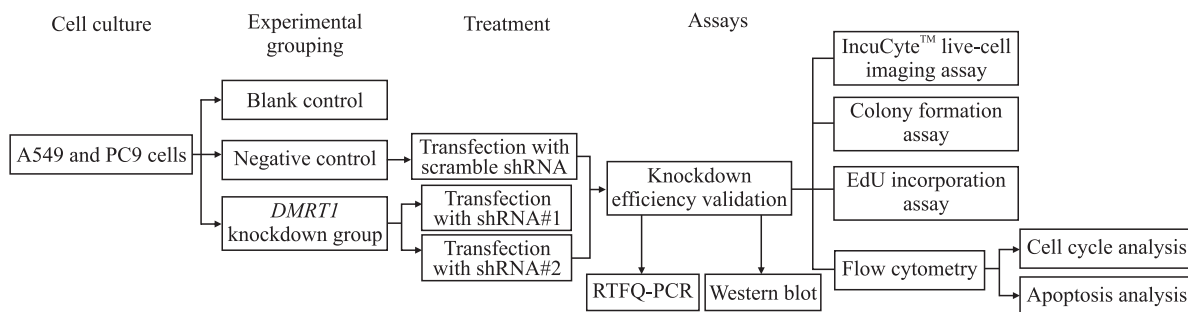


图 1 研究流程图

Fig. 1 Flowchart of the study

2.2 DMRT1在肺腺癌中高表达与患者OS的关系

利用TIMER 3.0在线平台分析TCGA数据库内DMRT1 mRNA在不同癌种中的表达水平,结果显示,与癌旁组织相比,DMRT1 mRNA在浸润性乳腺癌、结肠腺癌、头颈鳞状细胞癌和肺腺癌等肿瘤中高表达 ($P<0.001$,图2A)。使用

TCGA肺腺癌数据库中531例肺腺癌组织、59例癌旁组织及58对配对组织的转录组数据进行分析,结果显示,与癌旁组织相比,肺腺癌组织中DMRT1 mRNA表达显著上调 ($P<0.001$,图2B、C)。生存分析显示,在肺腺癌中,DMRT1 mRNA高表达组患者的OS显著短于低表达组 [HR=1.54 (1.29~1.83), $P<0.001$,图2D]。

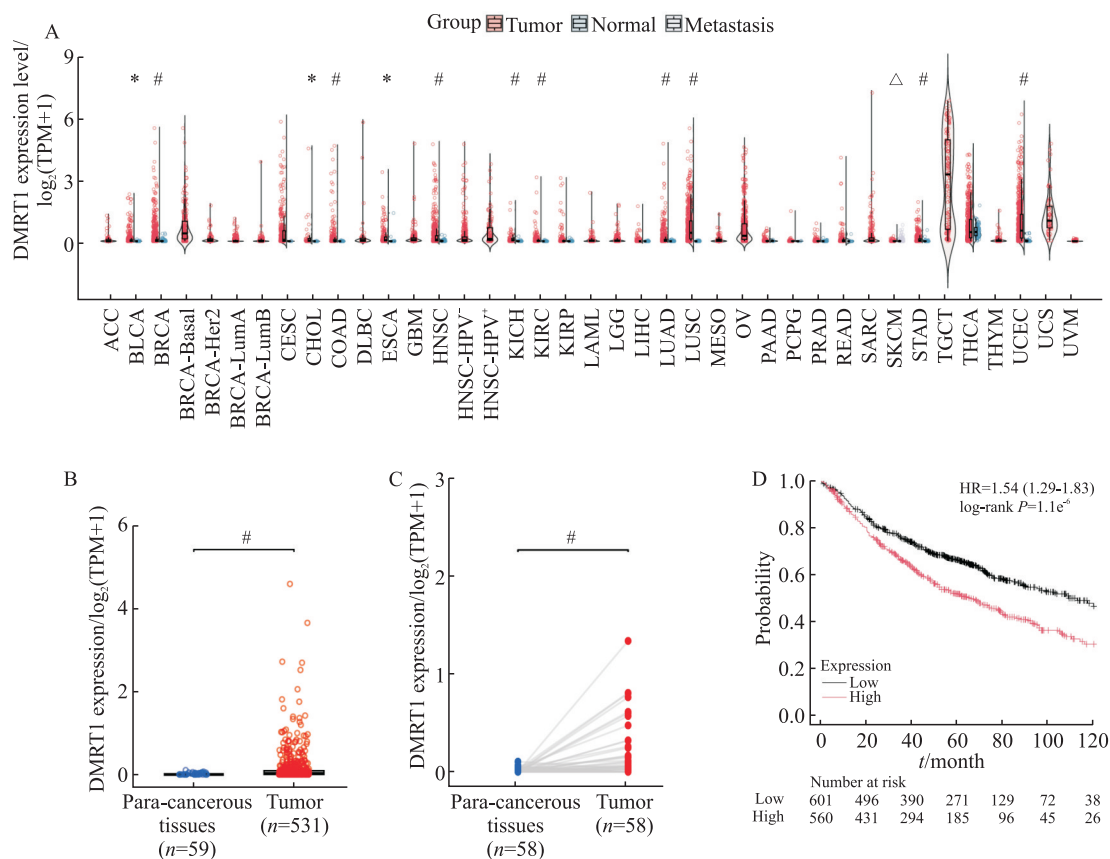


图2 DMRT1 mRNA在泛癌中表达及其与肺腺癌患者OS的相关分析

Fig. 2 Expression of DMRT1 mRNA in pan-cancer and its correlation with OS in lung adenocarcinoma patients

A: Pan-cancer analysis of DMRT1 mRNA expression levels. B: Comparison of DMRT1 mRNA expression between para-cancerous tissues and lung adenocarcinoma tissues. C: Paired analysis of DMRT1 mRNA expression in tumor and para-cancerous tissues from the same lung adenocarcinoma patients. D: Kaplan-Meier analysis of OS in lung adenocarcinoma patients stratified by high versus low DMRT1 mRNA expression. *: $P<0.01$; #: $P<0.001$; Δ : $P<0.05$. COAD: Colon adenocarcinoma; HNSC: Head and neck squamous cell carcinoma.

2.3 DMRT1对肺腺癌细胞增殖能力的影响

为探究DMRT1对肺腺癌细胞增殖的调控作用,我们在A549与PC9细胞系中构建DMRT1敲低模型,RTFQ-PCR与Western blot检测结果显示,实验组细胞中DMRT1的mRNA ($P<0.001$)及蛋白水平均较对照组显著下调(图3A~F),同时在A549细胞中构建DMRT1过表达模型,结果显示A549细胞中DMRT1蛋白表达升高,表明细胞模型构建成功。IncuCyte™活细胞分析系统动态成像分析显示,DMRT1敲低组细胞的增殖速率显著减缓 [A549: sh-NC (3.90 ± 0.64)、shRNA#1 (1.53 ± 0.13)、shRNA#2 (1.89 ± 0.19), $F(12, 42)=884.4$; PC9: sh-NC (3.70 ± 0.52)、

shRNA#1 (1.47 ± 0.10)、shRNA#2 (2.04 ± 0.19), $F(12, 42)=1156$; $P<0.001$,图3C、F];而过表达DMRT1可促进A549细胞增殖 [NC (3.67 ± 0.52)、OE-DMRT1 (4.83 ± 0.33), $F(6, 28)=1470$; $P<0.05$]. 平板克隆形成实验结果表明,敲低组的克隆形成面积显著减少 [A549: sh-NC (2.83 ± 0.34)、shRNA#1 (0.55 ± 0.05)、shRNA#2 (0.96 ± 0.08), $F(2, 6)=107.9$; PC9: sh-NC (2.32 ± 0.16)、shRNA#1 (0.17 ± 0.06)、shRNA#2 (0.13 ± 0.08), $F(2, 6)=112.4$; $P<0.001$,图3G~I]; A549过表达组克隆形成能力增强 [NC (1.91 ± 0.07)、OE-DMRT1 (2.43 ± 0.19), $F(1, 4)=16.09$;图3L~M]。

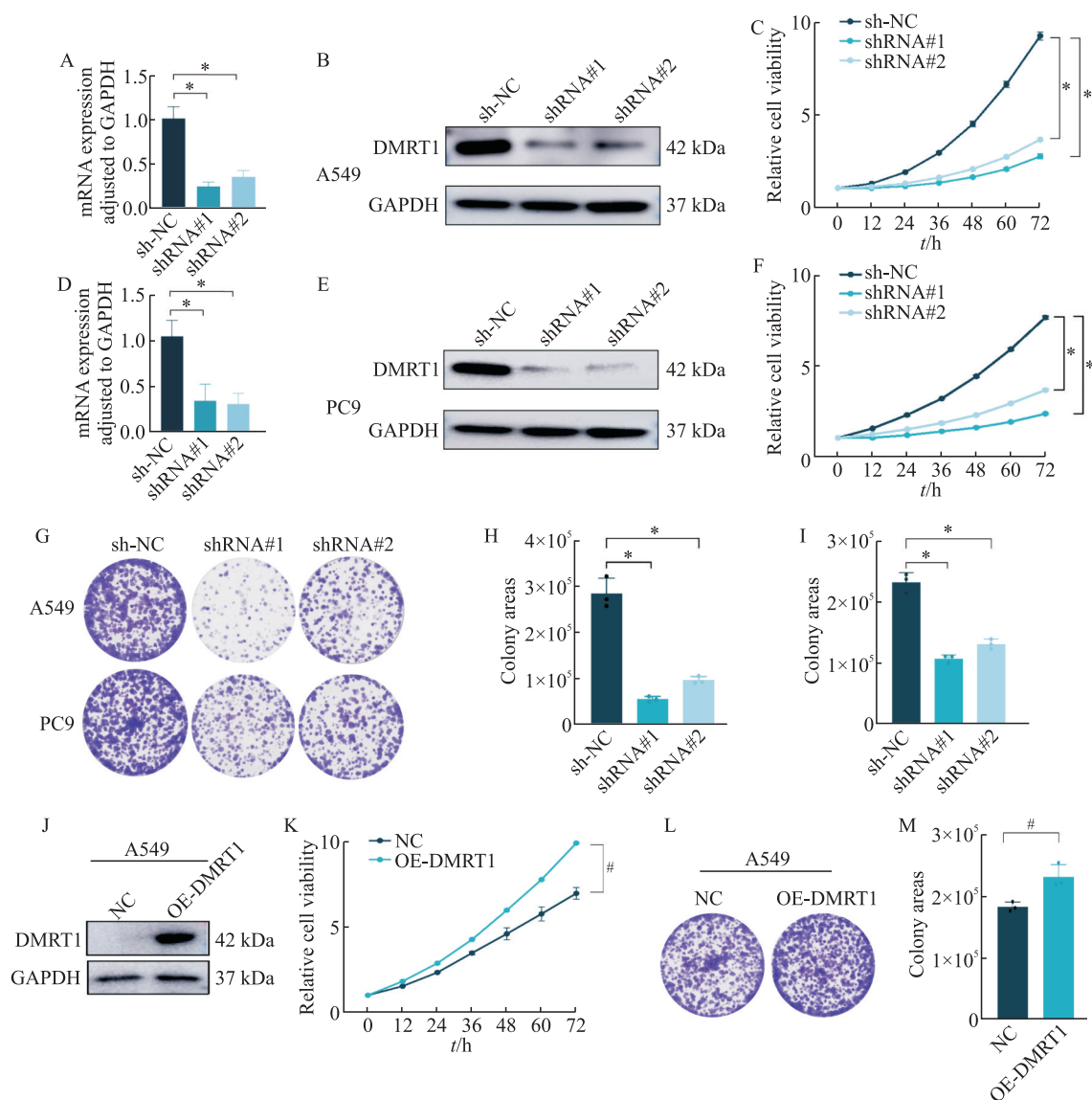


图3 DMRT1对肺腺癌细胞增殖能力的影响

Fig. 3 Effect of DMRT1 on the proliferative phenotype of lung adenocarcinoma cells

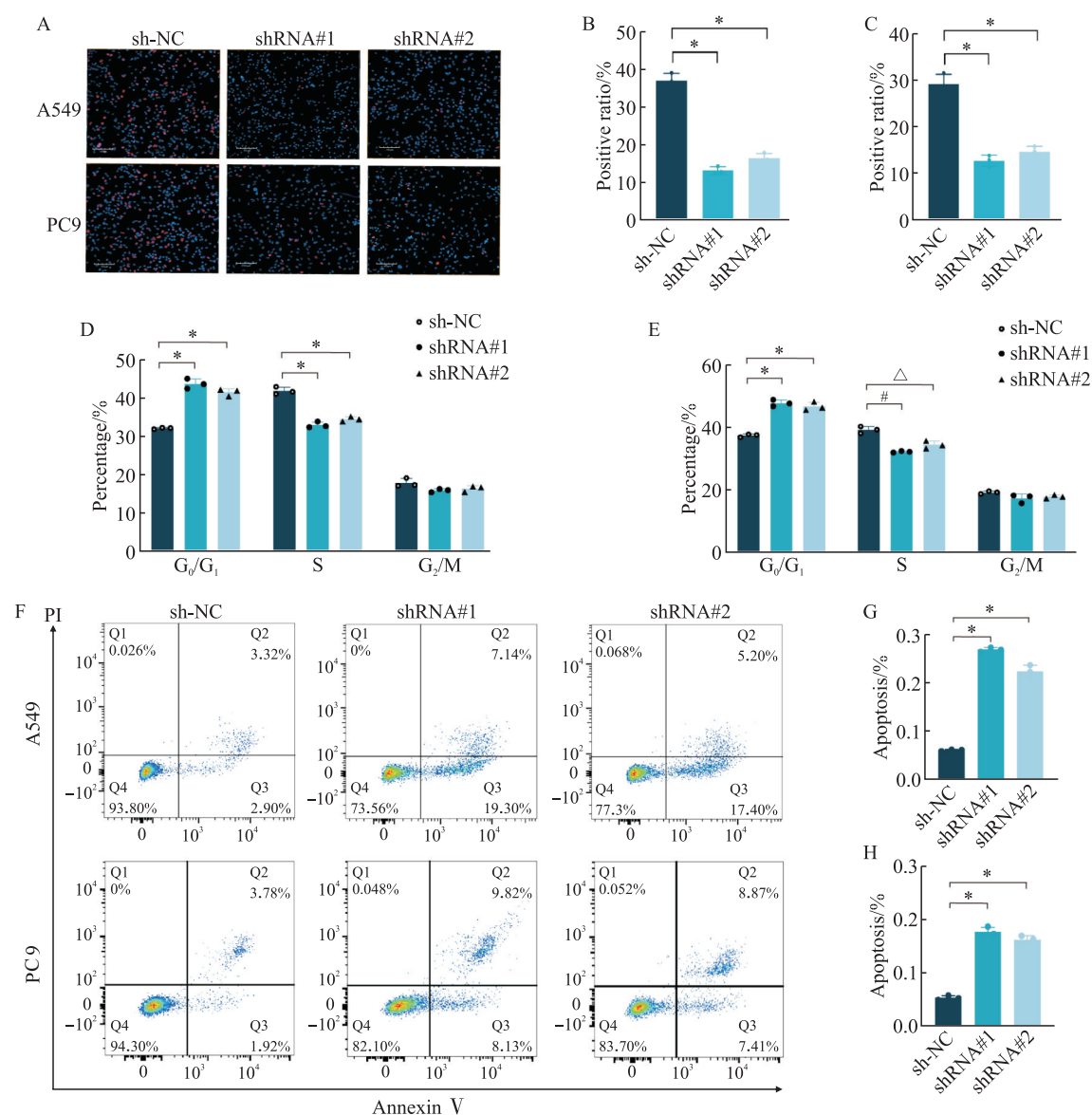
A-C: mRNA and protein expression levels of DMRT1 and the internal reference protein GAPDH in A549 cells infected with sh-NC and shDMRT1 lentivirus and relative cell viability. D-F: mRNA and protein expression levels of DMRT1 and the internal reference protein GAPDH in PC9 cells infected with sh-NC and shDMRT1 lentivirus and relative cell viability. G-I: Colony formation of A549 and PC9 cells in the knockdown and control groups and statistical analysis of the plate clone area for A549 and PC9 cells. J: Protein expression level of DMRT1 and the internal reference protein GAPDH in A549 cells with NC and DMRT1 overexpression (OE-DMRT1). K: Growth curves of DMRT1-overexpressing cell lines. L: Representative images of colony formation; M: Statistical analysis of plate clone area. *: $P < 0.001$; #: $P < 0.05$.

EdU检测发现,处于DNA合成期(S期)的细胞比例显著降低[A549: sh-NC (36.87 ± 1.10)、shRNA#1 (12.98 ± 0.60)、shRNA#2 (16.28 ± 0.71), $F(2, 6) = 243.5$; PC9: sh-NC (28.99 ± 1.24)、shRNA#1 (12.56 ± 0.70)、shRNA#2 (14.48 ± 0.69), $F(2, 6) = 95.45$; $P < 0.001$,图4A~C];流式细胞术分析显示敲低DMRT1使细胞周期阻滞于G₀/G₁期($P < 0.001$,图4D、E),细胞凋亡率显著增加[A549: sh-NC (6.06 ± 0.06)、shRNA#1 (26.89 ± 0.60)、shRNA#2 (22.31 ± 1.32), $F(2, 6) = 544.1$; PC9: sh-NC (5.25 ± 0.04)、shRNA#1 (17.66 ± 0.83)、shRNA#2 (16.13 ± 0.86), $F(2, 6) = 203.0$; $P < 0.001$,

图4F~H]。

2.4 敲低DMRT1对裸鼠皮下成瘤的影响

本研究构建A549细胞裸鼠皮下移植瘤模型,分为阴性对照组(sh-NC)与DMRT1敲低组(sh-DMRT1),监测并检测移植瘤生长情况(体积重量)及蛋白表达。结果显示,与sh-NC组相比,sh-DMRT1组裸鼠皮下移植瘤体积更小、瘤体重量更小;肿瘤生长曲线结果显示,随着饲养时间延长,sh-NC组肿瘤快速增长,而敲低DMRT1可显著抑制移植瘤的生长速度($P < 0.01$);肿瘤重量统计结果表明,sh-DMRT1组移植瘤平均重量显著低于sh-NC对照组(图5A~C, $P < 0.01$);Western blot结果显示,sh-DMRT1组

图4 敲低 *DMRT1* 对肺腺癌细胞的DNA复制、细胞周期及凋亡水平影响Fig. 4 Effects of *DMRT1* knockdown on DNA replication, cell cycle progression and apoptosis levels in lung adenocarcinoma cells

A-C: The DNA synthesis ability of the A549 and PC9 knockdown groups and the control groups was detected by EdU staining, the cell nuclei were stained blue, and the EdU positive signals were stained red. D-E: Statistical bar chart of cell cycle distribution of A549 and PC9 cells. F: Flow cytometry scatter plots of A549 cells. G: Flow cytometry scatter plots of PC9 cells. H: Statistical graph of apoptosis rates in the two groups. *: $P < 0.001$; #: $P = 0.002$; △: $P = 0.016$.

移植瘤组织中 *DMRT1* 蛋白表达水平低于 sh-NC 组, 表明体内模型中 *DMRT1* 敲低效果稳定 (图 5D)。敲低 *DMRT1* 能够在体内抑制肺腺癌 A549 细胞移植瘤的生长。

2.5 敲低 *DMRT1* 的转录组测序分析及验证

转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 数据的分析结果显示, 敲低 *DMRT1* 共导致了 952 个基因显著上调, 709 个基因显著下调 (图 6A); 将这些基因进行聚类分析后发现, 敲低 *DMRT1* 的细胞呈现明显的基因表达模式差异 (图 6B); 而后, 我们对上述 DEG 进行 GO 富集分析、GSEA 富集分析, 结果显示上调基因主要与凋亡等信号转导通路相关 (图 6C、D), Western blot 结果表明, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 促凋亡

蛋白 Bax 与 Bcl-2 的比值升高 (sh-NC: 1.70, sh-*DMRT1*: 2.26, $P < 0.01$), 同时 cleaved caspase-3 及 cleaved PARP 的蛋白水平均明显升高 (图 6E)

其中下调基因主要与细胞周期等相关 (图 7A、B)。敲低 *DMRT1* 后, *E2F1* 及下游 G₁/S 期周期相关基因 *CCNE2*、*CDC6* 的 mRNA 水平均显著下调, 核心癌基因 *MYC* 的转录水平也显著下调 ($P < 0.05$, 图 7C)。Western blot 结果显示, 敲低 *DMRT1* 后, 总 Rb 蛋白无明显变化, 但磷酸化 pRb (Ser807/811) 水平降低; 同时 *E2F1* 下游增殖靶蛋白 *MYC*、*CCNE2* 表达均下调 (图 7D), mRNA 表达与蛋白水平趋势一致, 提示 *DMRT1* 可能调控 p16/pRb/*E2F1* 轴进而影响下游增殖、凋亡通路。

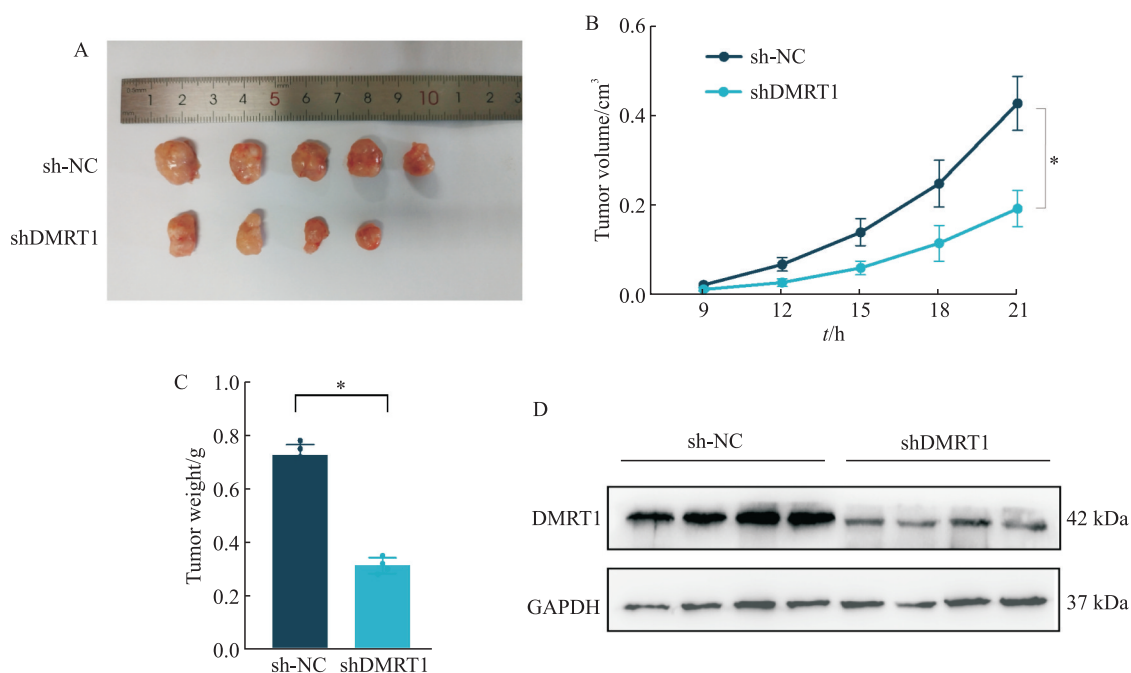


图5 DMRT1敲低对A549细胞裸鼠皮下成瘤能力的影响

Fig. 5 Effects of *DMRT1* knockdown on subcutaneous tumorigenicity of A549 cells in nude mice

A: Representative images of subcutaneous xenograft tumors in nude mice of sh-NC control group and sh-DMRT1 knockdown group; B: Dynamic tumor growth curves of the two groups; C: Statistical quantitative analysis of tumor weight in the two groups; D: DMRT1 protein expression levels in xenograft tumor tissues of the two groups. *: $P < 0.01$.

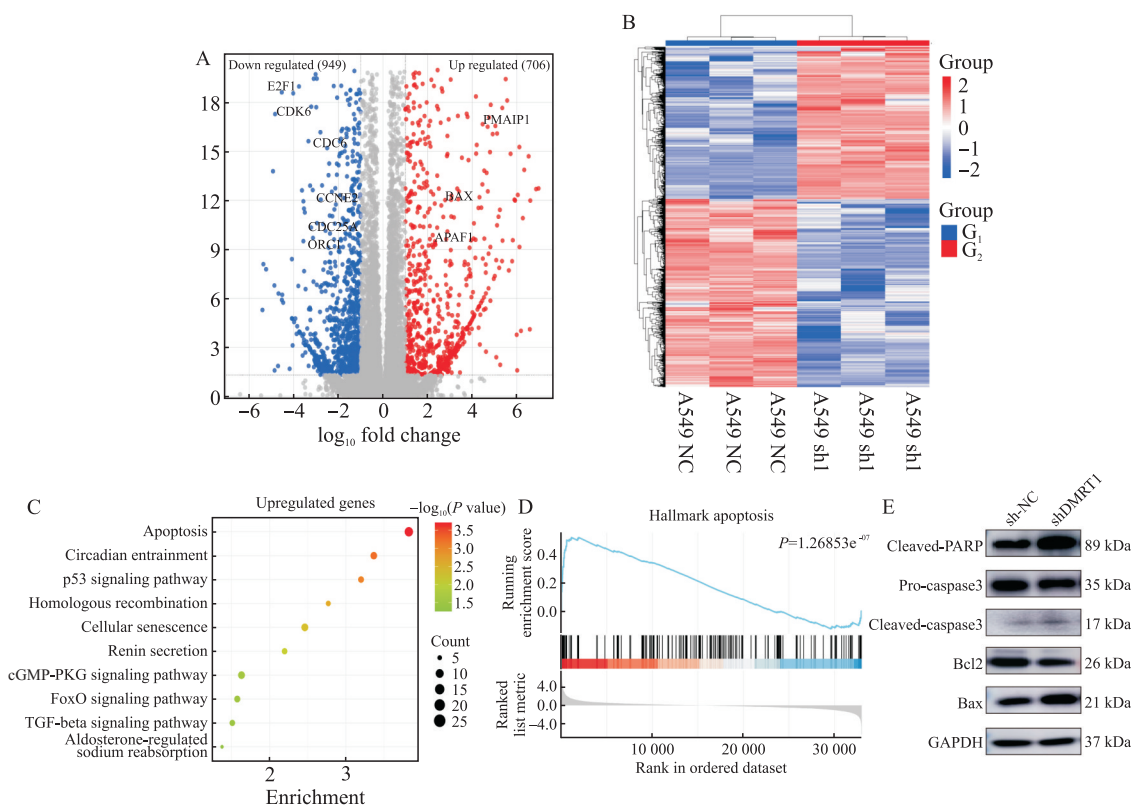


图6 DMRT1介导细胞凋亡调控的功能富集分析及验证

Fig. 6 Functional enrichment analysis and experimental validation of DMRT1-mediated apoptosis regulation

A: Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs) between the control group and the knockdown group of A549 cells based on RNA-seq data. B: Heatmap of differentially expressed genes between the control group and the knockdown group of A549 cells. C: Results of Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis for the significantly upregulated differentially expressed genes between the two groups. D: GSEA enrichment analysis diagram of the apoptosis pathway. E: Western blot to detect expression changes of apoptosis-related proteins (cleaved-PARP, pro-caspase-3, cleaved-caspase-3, Bcl-2, Bax) and the internal reference protein GAPDH in A549 cells. Sh1: sh-RNA1.

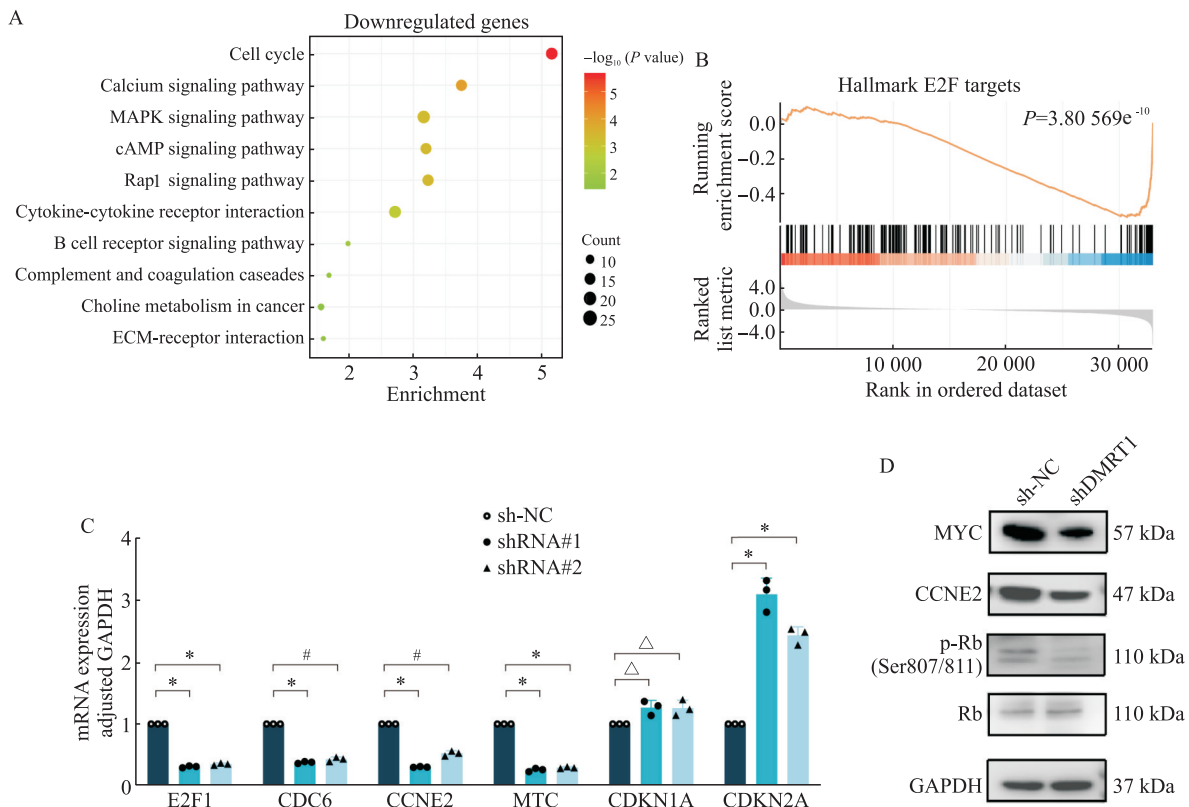


图7 DMRT1介导细胞周期调控的功能富集分析及验证

Fig. 7 Functional enrichment analysis and experimental validation of DMRT1-mediated cell cycle regulation

A: Results of GO functional enrichment analysis for the significantly downregulated differentially expressed genes between the two groups. B: GSEA enrichment analysis diagram of E2F transcription factors and their target genes. C: mRNA expression levels of cell cycle-related genes detected by RTFQ-PCR in A549 cells. D: Protein expression changes of cell cycle-related proteins [MYC, CCNE2, phosphorylated Rb (p-Rb), total Rb] and the internal reference protein GAPDH in A549 cells. *: $P<0.001$; #: $P<0.01$; Δ: ns, no significance.

3 讨 论

DMRT1在多种肿瘤中表达^[12-13]，与患者不良预后有关^[14]，但其作用仍不明确。本研究发现，DMRT1 mRNA高表达的肺腺癌患者预后差，且DMRT1可促进肺腺癌细胞增殖，敲低DMRT1后可阻滞细胞周期并诱导凋亡，体内裸鼠成瘤实验进一步证实，敲低DMRT1可显著抑制肺腺癌细胞在体内的成瘤能力，提示其可作为肺腺癌治疗的新靶点。

DMRT1作为CTA家族成员，本研究证实其可调控肺腺癌细胞增殖、细胞周期及凋亡，进一步表明CTA不仅可作为肿瘤免疫治疗靶点，还能调控肿瘤核心生物学行为，打破了其仅为“免疫靶点”的单一认知^[15-18]。研究^[19]证实，DMRT1可通过调控细胞周期进程、抑制周期检查点分子促进生殖细胞增殖；同时，DMRT1作为多能性调控的关键因子，能够维持肿瘤干性相关基因（如OCT4、SOX2、NANOG）的表达，增强肿瘤细胞的恶性表型^[20]。此外，DMRT1还可通过介导基因组甲基化修饰、重塑染色质开放状态等表观遗传重编程方式调控下游基因表达，

并通过Nodal/Notch、FGF/MAPK等信号通路影响细胞增殖活性^[13]。本研究选用A549和PC9肺腺癌细胞系，在不同基因背景下验证了DMRT1的促癌作用，其可通过调控E2F1通路实现促增殖、抑凋亡。这也为在其他肺腺癌细胞系及其他DMRT1阳性肿瘤中的外推验证，以及其作为泛肿瘤潜在靶点的后续研究提供了实验依据。

DMRT1高表达与肺腺癌患者不良预后相关，可作为潜在的预后预测标志物。后续我们将扩展至临床样本、优化检测方法，结合多种标志物提升预测肺腺癌的准确性。基于DMRT1致癌作用及CTA特性，可通过沉默其表达、开发肿瘤疫苗、联合免疫治疗^[21-22]、探索下游通路抑制剂^[23]等方式寻找新的治疗策略。未来临床试验可分阶段推进，聚焦于靶向药物的安全性与疗效，筛选优势人群，同时可设计联合治疗临床试验并拓展至其他DMRT1高表达肿瘤。

然而，本研究仍存在一些局限。DMRT1调控肺腺癌细胞周期与凋亡的直接下游靶基因及具体调控信号轴尚未完全阐明；同时本研究仅依托细胞与动物模型开展，尚未开展临床队列验证及药物干预探索，存在一定选择偏倚，研究结果向

临床诊断与靶向治疗转化的条件尚不成熟。因此, 后续研究将结合双荧光素酶报告基因实验等技术深入挖掘DMRT1的下游靶基因及核心调控通路, 扩大临床样本验证, 为确立靶向DMRT1的肺腺癌精准治疗策略奠定更坚实的理论与实验基础。

综上所述, 本研究揭示了DMRT1在肺腺癌的功能和分子机制, 有望为肺腺癌的临床诊断、患者预后评估及精准治疗提供新的理论依据与潜在分子靶点。

第一作者:

毕亚彤 (ORCID: 0009-0006-6436-2301), 硕士研究生。

通信作者:

雷鸣 (ORCID: 0000-0002-1153-4791), 研究员、博士研究生导师, E-mail: leim@shsmu.edu.cn。

作者贡献声明:

毕亚彤: 完成所有实验, 收集、分析处理数据, 撰写论文; 朱丽: 制定实验计划, 并进行实验指导; 雷鸣: 设计并指导整个课题研究。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12–49.
- [2] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299–311.
- [3] 潘莹莹, 周 斐, 周彩存. 肺癌免疫治疗的前景与挑战[J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(4): 241–249.
PAN Y Y, ZHOU F, ZHOU C C. The prospects and challenges of immunotherapy for lung cancer [J]. *Chin Oncol*, 2019, 29(4): 241–249.
- [4] 曹 航, 张 扬, 陈海泉. 2025年肺癌外科领域重要进展[J]. *中国癌症杂志*, 2026, 36(1): 35–40.
CAO H, ZHANG Y, CHEN H Q. Important progress in the surgical treatment of lung cancer in 2025 [J]. *China Oncol*, 2026, 36(1): 35–40.
- [5] SIMPSON A J G, CABALLERO O L, JUNGBLUTH A, et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(8): 615–625.
- [6] LIU M X, HU Z B, QI L, et al. Scanning of novel cancer/testis proteins by human testis proteomic analysis [J]. *PROTEOMICS*, 2013, 13(7): 1200–1210.
- [7] HONG C S, PARK B Y, SAINT-JEANNET J P. The function of DMRT genes in vertebrate development: It is not just about sex [J]. *Dev Biol*, 2007, 310(1): 1–9.
- [8] LOOIJENGA L H J, HERSMUS R, GILLIS A J M, et al. Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: Primary spermatocyte as tumorigenic precursor and *DMRT1* as candidate chromosome 9 gene [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 290–302.

- [9] WU Y P, LIN X D, CHEN S H, et al. Identification of prostate cancer-related circular RNA through bioinformatics analysis [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 892.
- [10] LI H H, YANG F, HU A P, et al. Therapeutic targeting of circ-CUX1/EWSR1/MAZ axis inhibits glycolysis and neuroblastoma progression [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(12): e10835.
- [11] JØRGENSEN A, NIELSEN J E, BLOMBERG JENSEN M, et al. Analysis of meiosis regulators in human gonads: A sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of DMRT1 in meiotic entry [J]. *Mol Hum Reprod*, 2012, 18(11): 523–534.
- [12] YE L X, LU L X, FENG D C, et al. DMRT1 could serve as a prognostic biomarker for bladder cancer [J]. *Asian J Surg*, 2024, 47(11): 4968–4970.
- [13] TAGUCHI J, SHIBATA H, KABATA M, et al. DMRT1-mediated reprogramming drives development of cancer resembling human germ cell tumors with features of totipotency [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 5041.
- [14] NASEEM M, CAO S, YANG D Y, et al. Random survival forests identify pathways with polymorphisms predictive of survival in *KRAS* mutant and *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer patients [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 12191.
- [15] NARDIELLO T, JUNGBLUTH A A, MEI A N, et al. MAGE-a inhibits apoptosis in proliferating myeloma cells through repression of bax and maintenance of survivin [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13): 4309–4319.
- [16] SHANG B, GAO A, PAN Y, et al. CT45A1 acts as a new proto-oncogene to trigger tumorigenesis and cancer metastasis [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(6): e1285.
- [17] HEMMINGER J A, TOLAND A E, SCHARSCHMIDT T J, et al. Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma [J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(9): 1238–1245.
- [18] NICHOLS B A, OSWALD N W, MCMILLAN E A, et al. HORMAD1 is a negative prognostic indicator in lung adenocarcinoma and specifies resistance to oxidative and genotoxic stress [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(21): 6196–6208.
- [19] KRENTZ A D, MURPHY M W, KIM S, et al. The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(52): 22323–22328.
- [20] KRENTZ A D, MURPHY M W, ZHANG T, et al. Interaction between DMRT1 function and genetic background modulates signaling and pluripotency to control tumor susceptibility in the fetal germ line [J]. *Dev Biol*, 2013, 377(1): 67–78.
- [21] YANG P, MENG M, ZHOU Q S. Oncogenic cancer/testis antigens are a hallmarker of cancer and a sensible target for cancer immunotherapy [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188558.
- [22] SCANLAN M J, GURE A O, JUNGBLUTH A A, et al. Cancer/testis antigens: An expanding family of targets for cancer immunotherapy [J]. *Immunol Rev*, 2002, 188: 22–32.
- [23] GOEL S, DECRISTO M J, WATT A C, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 471–475.

(收稿日期: 2026-02-13 修回日期: 2026-05-31)

(责任编辑: 王琳辉)