

PiggyBac在转基因小鼠制备中的应用

刘金焱¹ 庄 华² 孙瑞林² 费 俭^{1*}

(¹同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ²上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 受精卵雄原核裸DNA注射是目前制备转基因小鼠的主要技术, 而转基因表达成功率低是这种技术的主要缺点。piggyBac转座子系统已被报道用于制备转基因小鼠, 但这一方法是否能够提高转基因的表达成功率尚不清楚。为此, 我们利用毛色基因*agouti*为报告基因, 采用piggyBac转座子系统以C57/BL6小鼠为背景进行转基因小鼠的制备。结果表明, 将piggyBac转座酶cRNA和转基因载体进行受精卵雄原核共注射后, 转基因阳性率为18.4%, 转基因表达率为88.89%, 显著高于单独进行转基因载体DNA受精卵雄原核注射法。同时, 利用*agouti*基因作为报告基因, 可根据毛色变化直接对表达阳性的转基因小鼠进行初步筛选, 提高了筛选效率。

关键词 转基因小鼠; piggyBac; *agouti*基因; 基因表达; 受精卵雄原核共注射

Application of PiggyBac in Transgenic Mice

Liu Jinye¹, Zhuang Hua², Sun Ruilin², Fei Jian^{1*}

(¹School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;

²Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract Low transgene expression ratio in transgenic mice produced by male pronucleus injection of naked DNA into fertilized egg limits its application in various research purposes. In this paper, we used transposon piggyBac mediated transgenic method to prepare transgenic mice. The transgenic efficiency and transgene expression ratio were compared with that in traditional transgenic mouse preparation method. The *agouti* gene was chosen as transgene, driven by PGK promoter and cloned into the piggyBac transposon cassette of plasmid pB232. The transgenic positive rate was 18.4%. 8 of 9 transgenic mouse founders showed *agouti* fur color phenotype which was much higher in ratio than that of traditional method. The results also showed that *agouti* gene ectopic expression could lead to obesity which was consistent with previous study. In conclusion, our results indicated that comparing with the traditional naked DNA pronucleus microinjection, piggyBac-mediated transgenic mouse approach could significantly improve the expression of transgene in transgenic mice. Furthermore, using our report vector system, transgene expression positive transgenic mouse could be easily selected according to fur color.

Key words transgenic mice; piggyBac; *agouti* gene; gene expression; male pronucleus microinjection of fertilized eggs

制备基因修饰小鼠是研究基因功能、构建各种疾病小鼠模型的重要手段。1974年, 美国的

收稿日期: 2014-02-17 接受日期: 2014-03-31

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB945501)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65980334, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

Received: February 17, 2014 Accepted: March 31, 2014

This work was supported by the National Key Basic Research and Development Project (Grant No.2010CB945501)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65980334, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-02 10:55

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0044.html>

Jaenisch等^[1]首次将SV40病毒注入小鼠囊胚腔中, 得到部分组织中含有SV40 DNA的嵌合体小鼠; 1980年, 美国Yale大学的Gordon等^[2-3]把SV40 DNA显微注射到小鼠受精卵的原核中, 获得了两只转基因小鼠, 创建了受精卵雄原核显微注射转基因法; 1982年, Palmiter等^[4]用此方法将大鼠的生长激素基因导入小鼠受精卵, 获得了成年体重是对照组小鼠2倍的“超级鼠”, 证明了外源的异种基因可在小鼠中表达

为具有同样生物活性的产物。此后, 受精卵雄原核显微注射法成为制备转基因小鼠最通用的经典方法[5]。但之后的研究表明, 该技术存在转基因阳性率和转基因表达成功率较低、外源转基因片段容易发生缺失或多拷贝串联插入等缺点。

piggyBac转座子是1983年Fraser等^[6]用杆状病毒(*Baculovirus*)侵染粉纹夜蛾(*Trichop lusiani*) T N-368细胞株系时首次分离得到的, 最早被称为IFP2转座子, 之后发现其类似序列在50种以上的生物体中广泛分布^[7]。2005年, Ding等^[7]利用piggyBac转座子序列和piggyBac转座酶开发了一种小鼠基因组随机突变方法, 之后, 在此技术方法的基础上建立了基于piggyBac转座子插入诱变的小鼠突变体品系数据库——PBmice^[8]。2009年, 3个独立的研究组利用piggyBac转座系统成功地将转录因子导入小鼠的成纤维细胞, 产生了稳定的iPS细胞^[9-11]。Wu等^[12]利用piggyBac转座系统和Cre-loxP重组酶系统开发了一种多功能诱变策略, 可用于制作插入突变、大范围染色体缺失/重复或具有可回复突变的小鼠模型。而Rad、Katter、Friedel、Ni等^[13-16]的一系列研究证明了在小鼠中piggyBac转座子技术可有效地用于癌症相关基因的发现。Landrette等^[17]构建了一个含有piggyBac转座子和报告基因的载体, 用于在小鼠中进行体细胞基因突变, 并可以跟踪突变细胞。目前, piggyBac转座系统已成为一种遗传修饰和基因诱变的重要工具。但piggyBac的方法是否可以提高转基因小鼠的成功率及转基因的表达率尚缺乏系统的研究。

本文以C57BL/6J为背景, 以控制小鼠毛色的 *agouti* 基因作为报告基因, 以PGK启动子为表达调控元件, 利用piggyBac转座子介导转基因小鼠的制备, 并在转基因阳性率和外源基因表达成功率方面与裸DNA受精卵雄原核注射法进行比较, 旨在提高转基因效率和表达效率, 同时, 建立一种可通过毛色性状直接进行转基因阳性小鼠筛选的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

含有piggyBac转座子序列的PB232载体、piggyBac转座酶cDNA、PL451质粒由本实验室保存; *agouti* 全序列和各种引物均由Invitrogen公司合成; C57BL/6J小鼠由上海南方模式生物研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 PB-PGK-NEO-*agouti*载体的构建 以PL451质粒DNA为模板进行PCR, 得到引入酶切位点的PGK-Neo和PolyA元件, 以及加入2A组件的*agouti*基因。PCR所用引物见表1。经相应酶切、加入T4连接酶连接后, 与PB232质粒一起室温连接过夜, 得到PB-PGK-NEO-*agouti*质粒载体(*agouti*载体)。载体中插入部分组成如图1, PCR引物见表1。

1.2.2 转基因小鼠的获得和鉴定 选用5~6周龄超排、交配后的见栓C57BL/6J雌鼠, 取其单细胞期受精卵随机分为2组, 按常规受精卵雄原核显微注射法, 组1仅注射*agouti*载体DNA, 组2注射*agouti*载体DNA和piggyBac转座酶cRNA, 并分别移植到代孕母

表1 PCR所用引物
Table 1 The primers used in PCR

引物名称 Name of primers	序列 Primer sequence
agouti-F	5'-GGG GTC GAC GGT AGC GGA GCT ACT AAC TTC A-3'
Neo-A-R	5'-GGG AAG CTT TCA GCA GTT GGG GTT GAG TAC TC-3'
Neo-A-F	5'-TCC AGC CAA GCT AGC TTG GCT G-3'
Neo-R	5'-GGG CTC GAG GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG A-3'
polyA-F	5'-GGG AAG CTT GGG GAT CAA TTC TCT AGA GCT CG-3'
PolyA-R	5'-GCA CCT GTC GAG TAC TCA ACC CCA ACT GCT GAG GGG ATC AAT TCT CTA GAG CTC-3'

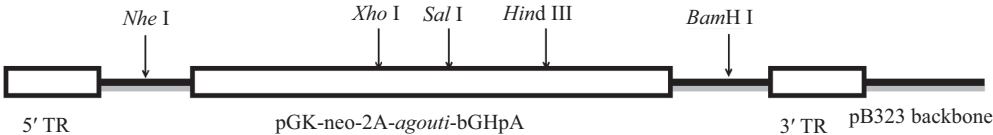


图1 *agouti*载体组件示意图
Fig.1 The schematic diagram of components of *agouti* vector

鼠体内,经分娩得到两组子代小鼠。

取2~4周龄的子代小鼠尾尖0.5 cm,提取其DNA,用PCR法检测*agouti*基因,并统计出生率和转基因阳性率,引物为ID-Agouti-F4-655(5'-TGC CGA ATA TCA TGG TGG AA-3')和ID-Agouti-R4-655(5'-GTG CAG GCG CTG CCG AAG AAA C-3'),反应体积为50 μL。

1.2.3 转基因小鼠的毛色、体重性状和*agouti*基因表达谱检测 对转基因阳性小鼠的毛色、体重进行观察和称量。转基因小鼠行安乐死处理后,迅速解剖出心、肝、脾、肺、肾、脑和睾丸,背部毛皮和腹部毛皮等组织,各取50 mg,抽提其总RNA,逆转录后进行Real-time PCR,以检测*agouti*基因在不同脏器和组织中的表达谱(以转基因阴性鼠为对照)。用Mastercycler Eppgradient软件进行分析。

1.2.4 转基因小鼠中piggyBac转座子侧翼序列测定和*agouti*基因拷贝数检测 用上述转基因阳性子代

小鼠尾尖DNA为模板,用PCR的方法检测两组*agouti*转基因阳性子代小鼠基因组中是否存在piggyBac转座子侧翼序列(piggyBac转座子以外转基因载体上的质粒序列);用Real-time PCR检测转基因阳性小鼠基因组中*agouti*基因的相对拷贝数。

1.2.5 转基因小鼠中*agouti*基因插入位点检测 取具有毛色表型变化的转基因小鼠DNA样本,参照TaKaRa Genome Walking Kit No.6018说明书,通过genomic walking的方法,鉴定转基因在小鼠中的插入方式和插入位点。

1.2.6 数据统计和分析 所得数据采用Origin-Pro-8.0软件进行*t*显著性检验并制图。

2 结果

2.1 转基因小鼠中的*agouti*转基因阳性率和表型变化

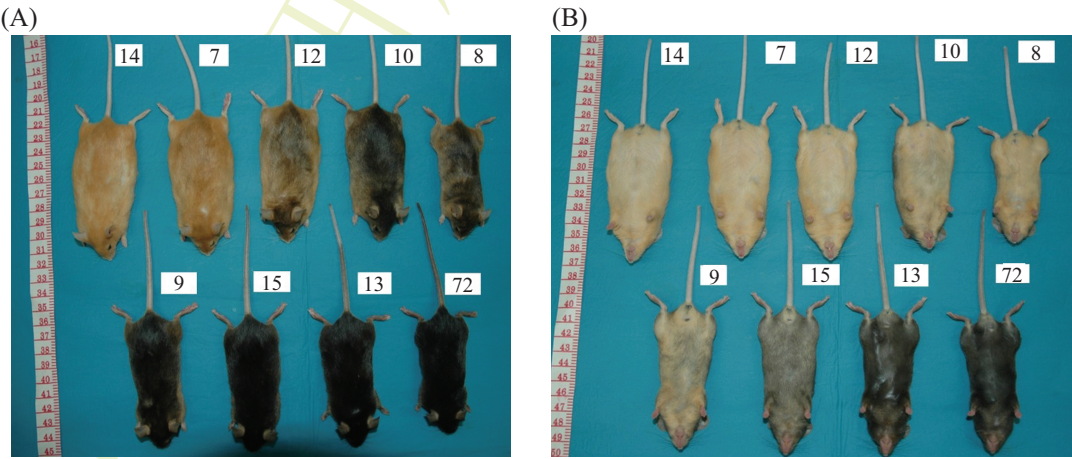
两组实验先后注射受精卵640个,得到成活

表2 子代小鼠出生率和*agouti*转基因阳性率统计结果

Table 2 Statistic results of the offspring natality and their *agouti* positive rate

组别	注射细胞数(个)	出生数 (只)	出生率 (%)	<i>agouti</i> 基因PCR检测阳性鼠(只)	<i>agouti</i> 基因PCR检测阳性率(%)	Agouti毛色阳性 (只)	Agouti毛色阳性率 (%)
Group	The number of cells injected	The number of birth	The birth rate (%)	The number of <i>agouti</i> positive mice	The rate of <i>agouti</i> positive mice (%)	The number of phenotype positive mice	The rate of phenotype positive mice (%)
Group 1	300	37	12.33	6	16.20	0	0
Group 2	340	49*	14.41	9	19.15	8	88.89

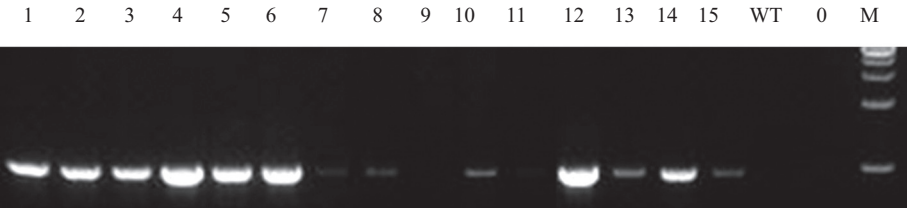
*有2只子代小鼠在出生后死亡,故统计*agouti*基因PCR检测阳性率时出生数按照47只计算。
*There are 2 offsprings died after birth, so the number of *agouti* positive mice are collected as 47.



毛色黄色的小鼠总体比毛色黑色的小鼠肥胖。14、7、12、10、8、9、15号小鼠为*agouti*毛色阳性小鼠;13为*agouti*基因检测阳性小鼠;72号为*agouti*基因检测阴性小鼠。
The mice with yellow coat were of bigger shape than the black coat mice. The mice marked as 14, 7, 12, 10, 8, 9, 15 are phenotype positive; The mouse marked as 13 were *agouti* positive; The mouse marked 72 is *agouti* negtive.

图2 *agouti*转基因鼠18周龄时的毛色情况

Fig.2 The coat color of 18-week-old *agouti* transgenic mice



WT为野生型; 0为水对照; M为1 Kb marker。1~6为组1小鼠样本, 7~15为组2小鼠样本。
WT: wild-type control; 0: blank control group; M: 1 Kb marker. The lines 1~6 were from the mice of group 1; The lines 7~15 were from the mice of group 2.

图3 *agouti*阳性小鼠基因组中piggyBac侧翼臂的鉴定

Fig.3 Identification of piggyBac flanking sequence in genome of *agouti* positive mice

表3 共注射组*agouti*转基因阳性小鼠的插入位点检测

Table 3 Identification of insertion site of positive transgenic *agouti* mice

编号	插入位点序列	染色体	插入位置
No	Flanking sequence	Chromosome	The location of the insert
7	AAC AAA ACT TTT AAA ATT TTT TTC (R)	Chr 10	Lactation elevated protein 1, between exon 11 and exon 12
	TCA TTT TTA TTT AAG ATA TCT ATA (L)	Chr 5	GPN-loop GTPase 1, between exon 2 and exon 3
8	AAC AAA ACT TTT AAA AAT CTA CTA (R)	Chr 1	Probable between alpha-ketoqlutarate-dependent dioxygenase ABH 5 and lethalqiant larvae protein homolog 1 isoform 1
	GAA GTA CAG TTT AAG ATA TCT ATA (L)	Chr 11	Between uncharacterized protein LOC432589 and uncharacterized protein LOC217122 precursor
9	TCA TTT TTA TTT AAG ATA TCT ATA (L)	Chr 5	GPN-loop GTPase 1, between 730 to 1 748 bp.
10	AAC AAA ACT TTT AAT CGC CTT GCA (R)	Chr 15	Between uncharacterized protein CXorf49 homolog and uncharacterized protein LOC399603
	TGG GCT TAC CTT AAG ATA TCT ATA (L)	Chr 6	Between polyhomeotic-like protein 1 isoform a and beta-citryl-glutamate synthase B
12	AAC AAA ACT TTT AAG ATA TAC TGA (R)	Chr 8	Between copine-7 and sulfotransferase family 5 A-member 1
	TTC CAC ATC CTT AAG ATA TCT ATA (L)	Chr 3	CLONE RP24-66H10
14	AAC AAA ACT TTT AAA CAC TTT GCA (R)	Chr 11	Ran binding protein 17, between exon 19 to exon 20
	GTA GAC TAG GTT AAG ATA TCT ATA (L)	Chr 18	Casein kinase I inform alpha, between exon 4 to exon 5
15	AAC AAA ACT TTT AAA GGA GAC TCC (R)	Chr 3	Between prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor and T cell surface antigen CD2 precursor

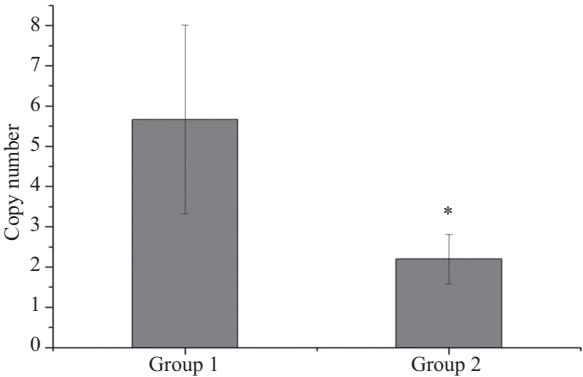
子代小鼠84只。*agouti*基因PCR检测和毛色表型观察的统计结果见表2。其中,“Agouti/棕色毛色阳性”指背部或腹部毛色表型为黄色或灰色。图2表示*agouti*转基因鼠18周龄时的毛色变化范围(从黄色到接近野生型的黑色)。发生毛色变化的样本均来自于组2,而组1小鼠的毛色均为黑色。以转基因检测阴性的72号样本作为对照。

2.2 *agouti*转基因阳性小鼠基因组中piggyBac转座子侧翼序列检测结果

两组得到的15只*agouti*转基因阳性小鼠基因组中piggyBac转座子侧翼序列检测结果如图3所示。组1样本检测均为强阳性,组2的9个样本中,检测出强阳性2个,弱阳性5个,阴性2个。

2.3 *agouti*转基因阳性小鼠中外源片段插入位点的检测

piggyBac共注射(组2)得到的9只*agouti*转基因



**P*<0.05, 与组1比较。

**P*<0.05 vs group 1.

图4 不同来源*agouti*转基因阳性小鼠中的转基因拷贝数
Fig.4 The copy number of transgene in positive transgenic *agouti* mice of different originate

小鼠中,有7只小鼠得到了Chromosome walking的检测结果(表3),证实转基因载体发生了piggyBac介导

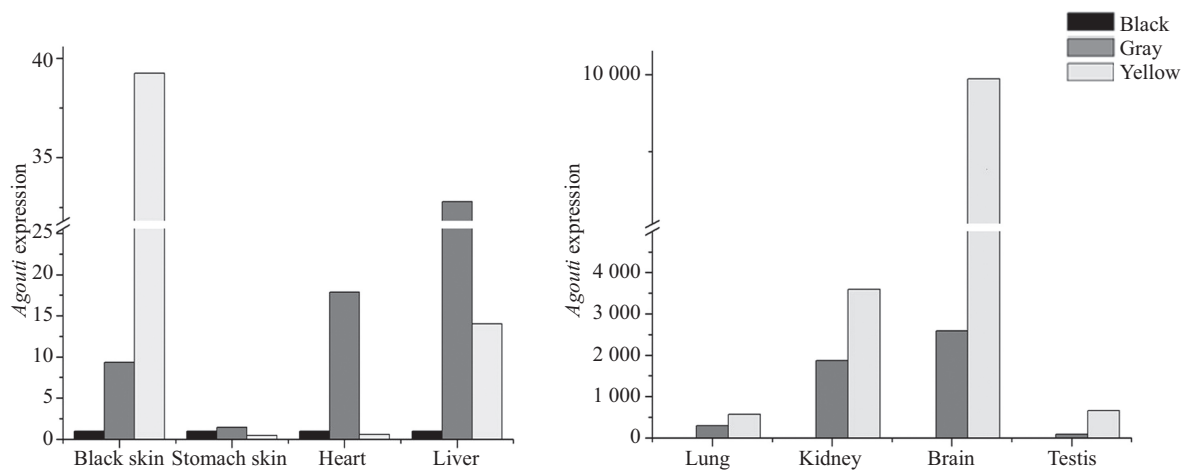


图5 黄色、灰色和黑色转基因阳性小鼠中不同部位的*agouti*基因表达谱

Fig.5 *agouti* gene expression profile from different fractions in yellow, grey and black positive transgenic mice

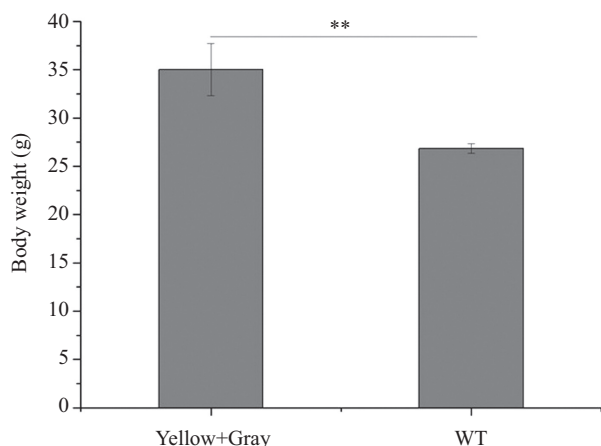


图6 *agouti*转基因阳性小鼠体重检测结果

Fig.6 The weight test result of positive transgenic *agouti* mice

的转座子插入。

2.4 *agouti*转基因阳性小鼠基因组中*agouti*基因拷贝数检测结果

*agouti*转基因阳性小鼠基因组中拷贝数检测结果如图4所示。数据表明单独注射*agouti*载体时,*agouti*拷贝数更高,与*agouti*载体+PB转座酶cDNA共注射样本的差异显著($P < 0.05$)。

2.5 转基因阳性小鼠中不同部位*agouti*基因的表达谱

不同毛色的转基因阳性子代小鼠(14号黄色、10号灰色、13号黑色)中,不同部位*agouti*的表达谱如图5所示。

从图中可见,肺、肾、脑、睾丸中*agouti*基因表达量均高于背部皮肤、腹部皮肤、心脏和肝。其中,毛色表型阳性小鼠(黄色和灰色)在肺、肾、脑、睾丸、

背部皮肤、肝脏中的表达量均高于黑色小鼠,而腹部皮肤中与黑色小鼠基本一致,在心脏中,黄色小鼠与黑色小鼠基本一致,而灰色小鼠表达量较高。

2.6 转基因阳性小鼠毛色与体重的关系

不同毛色转基因founder小鼠的体重统计结果如图6所示。*agouti*转基因阳性小鼠体重与WT对照组有显著差异($P < 0.01$)。其中表型为黄色和灰色的*agouti*转基因阳性小鼠为7只,WT小鼠为13只。

3 讨论

我们的实验结果表明,将*agouti*转基因载体和PB转座酶cRNA原核共注射能够实现依赖于piggyBac转座的*agouti*转基因,在所检测的9只founder小鼠中,除两只(11、13号)没有得到测序结果外,其余7只小鼠的插入位点序列均符合piggyBac转座特征。和传统的DNA原核注射方法相比,piggyBac介导的转基因方式大大提高了*agouti*转基因的表达效率(88.89%)。传统转基因小鼠的建立方法,常常导致转基因片段的串联整合,这种多拷贝的重复序列可能会引发转基因表达沉默。另外,载体上的原核质粒序列随转基因一同引入也会增加转基因被甲基化的风险,这也会引起转基因不表达。而利用piggyBac介导基因的转入,这些问题都可以避免。我们的实验也表明,piggyBac介导的转基因小鼠,其中的转基因片段拷贝数明显少于传统的转基因小鼠制备方法。序列测定也表明,由piggyBac转座体系介导的转基因确实没有带入驻子侧翼的质粒序列。应该说明的是,在我们的结果中可以看到,传统

的转基因插入方式(宿主基因组中带有piggyBac转座子侧翼序列)在共注射的实验组中也会同时发生,通过降低转基因DNA的注射量,调整其和piggyBac cRNA的比例也许可以减少这类非转座随机插入的发生。需要提醒的是,采用转座子介导的转基因方式仍然是一种随机的插入,因此仍需要和传统的转基因小鼠技术一样,即至少采用2个独立的首建者小鼠及其后代用于研究,并确认这两个小鼠的后代上获得相同的表型结果,以避免因为插入突变对表型研究的干扰。

在我们的实验中可看到,采用*agouti*基因作为报告基因,可以很方便地根据毛色判断转基因和转基因表达的成功。同时,由于本实验中采用了PGK作为*agouti*基因的启动子,因此该基因不仅在皮肤细胞中表达,也在其他脏器中表达,致使毛色偏黄的小鼠出现了肥胖表型,这与文献中报道的*agouti*异位过高表达可导致内分泌紊乱,引起肥胖等表型的结论^[29]基本一致。研究也发现,PGK虽然是一个广谱的启动子,但*agouti*基因在不同部位的表达量差异很大,可能的原因是在不同的细胞中,转录因子的资源是不同的,因此PGK启动子的活性必然受到细胞内转录因子资源的影响,而表现出表达量的不同;其次,转基因插入到小鼠染色体中,PGK启动子的表达可能受到插入位点附近染色体状况的影响,而不同细胞中,同一染色体区域的表现遗传修饰可能不一样,因此这也会影响PGK的转录效率。需要提出的是,*agouti*的表达虽然可以提供一个很好的识别标志,但它的异位表达会引发肥胖、糖尿病甚至肿瘤等表型,这会干扰转基因的研究。因此,可以采用皮肤细胞专一性的启动子来表达*agouti*基因,达到既能够根据毛色来判断转基因的成功,也能够避免出现肥胖表型的目的。

总之,我们的结果明确证明,采用piggyBac体系制备转基因小鼠可显著提高外源基因在转基因小鼠中的表达成功率,克服了传统转基因小鼠制备方法所具有的外源基因表达率低的问题;另外,本实验构建的报告载体系统可根据毛色变化直接对小鼠进行转基因阳性的筛选,大大提高了对转基因表达阳性小鼠的筛选效率。

参考文献 (References)

1 Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA

of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(4): 1250-4.

2 Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transfor-mation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(2): 7380-4.

3 Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981; 214(4526): 1244-6.

4 Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, *et al.* Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982; 300(6): 611-5.

5 谢莲萍. 转基因动物技术及其研究进展. 畜牧与饲料科学 (Xie Lianping. *Animal Husbandry and Feed Science*) 2009; 30(9): 77-8.

6 Fraser MJ, Smith GE, Summers MD. Acquisition of hostcell DNA sequences by baculoviruses: Relationship between host DNA insertions and FP mutants of autographa californica and galleria mellonella polyhedrosis viruses. *Virology* 1983; 47: 287-300.

7 Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 2005; 122(3): 473-83.

8 Sun LV, Jin K, Liu Y, Yang W, Xie X, Ye L, *et al.* PB mice: An integrated database system of piggyBac (PB) insertional mutations and their characterizations in mice. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(Database issue): D729-34.

9 Urschitz J, Kawasumi M, Owens J, Morozumi K, Yamashiro H, Stoytchev I, *et al.* Helper-independent PiggyBac plasmids for gene delivery approaches: Strategies for avoiding potential genotoxic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(18): 8117-22.

10 Despons C, Ding S. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Biol* 2010; 636: 207-18.

11 Vanden Drieseche T, Ivies Z, Izsvak Z. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood* 2009; 114(8): 1464-8.

12 Wu S, Ying G, Wu Q, Capecchi MR. Toward simpler and faster genome-wide mutagenesis in mice. *Nat Genet* 2007; 39(7): 922-30.

13 Burnight ER, Staber JM, Korsakov P, Li X, Brett BT, Scheetz TE, *et al.* A hyperactive transposase promotes persistent gene transfer of a PiggyBac DNA transposon. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012; 1: e50.

14 Katter K, Geurts A M, Hoffmann O, Mátés L, Landa V, Hiripi L, *et al.* Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *FASEB J* 2013; 27(3): 930-41.

15 Friedel RH, Friedel CC, Bonfert T, Shi R, Rad R, Soriano P. Clonal expansion analysis of transposon insertions by high-throughput sequencing identifies candidate cancer genes in a PiggyBac mutagenesis screen. *PLoS One* 2013; 8(8): e72338.

16 Ni TK, Landrette SF, Bjornson RD, Bosenberg MW, Bosenberg MW, Xu T. Low-copy PiggyBac transposon mutagenesis in mice identifies genes driving melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(38): E3640-9.

- 17 Landrette SF, Cornett JC, Ni TK, Marcus W Bosenberg, Tian Xu. PiggyBac transposon somatic mutagenesis with an activated reporter and tracker (PB-SMART) for genetic screens in mice. *PLoS One* 2011; 6(10): e26650.
- 18 杨云青, 高丹玫, 郭宗圣. Agouti和Agouti相关蛋白的一些生物学内涵. *动物学杂志*(Yang Yunqing, Gao Danmei, Guo Zongsheng. Agouti and Agouti-related proteins. *Chinese Journal of Zoology*) 2008; 43(5): 144-52.
- 19 Voisey J, Carroll L, van Daa I. A-melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets* 2003; 4(7): 586-97.
- 20 Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 1992; 71(1): 1195-204.
- 21 Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4(2): 223-30.
- 22 Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, *et al.* Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 1994; 371(6500): 799-802.
- 23 Abdel-Malek ZA, Scott MC, Furumura M, Lamoreux ML, Ollmann M, Barsh GS, *et al.* The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes. *J Cell Sci* 2001; 114: 1019-24.
- 24 Ollmann MM, Barsh GS. Down-regulation of melanocortin receptor signaling mediated by the amino terminus of Agouti protein in *Xenopus melanophores*. *J Biol Chem* 1999; 274(22): 15837-46.
- 25 Chhajlani V, Muceniec R, Wikberg JE. Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195(2): 866-73.
- 26 McNulty JC, Jackson PJ, Thompson DA, Chai B, Gantz I, Barsh GS, *et al.* Structures of the Agouti signaling protein. *J Mol Biol* 2005; 346(4): 1059-70.
- 27 Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992; 257(5074): 1248-51.

雄激素非依赖性前列腺癌细胞雄激素受体靶基因的筛选与初步鉴定

徐思琪^{1,2} 廖昭平^{1,2} 刘春华^{3,2} 程 玥² 季丽丽^{1,2} 段秀枝² 陈玉华² 陶志华^{1,2*}

(¹温州医科大学附属第一医院实验诊断中心, 温州 325000; ²浙江大学医学院附属第二医院临床检验中心, 杭州 310009; ³温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325000)

摘要 采用染色质免疫共沉淀技术在全基因组水平筛选雄激素非依赖性前列腺癌细胞LNCaP-AI的雄激素受体结合位点, 行高通量测序及生物信息学分析共得到2 876个peak(p -value $<1\times 10^{-5}$), peak平均长度为673 bp; 将peak序列定位到Hgl9基因组, 共有1 865个靶基因, 其中fold enrichment ≥ 10 的基因有425个。对peak相关基因进行GO分析发现, 与细胞、细胞组分、细胞过程、结合、细胞器相关的基因位列前五; 对peak相关基因进行通路分析发现, 与黏着斑、代谢通路、癌症中的转录错误调控、嘌呤代谢等信号通路相关的基因占大多数。筛选出7个候选AR靶基因, 采用Real-time qPCR技术分析它们在LNCaP-AI细胞和雄激素依赖性前列腺癌细胞LNCaP中对DHT刺激的反应性, 发现DHT刺激可改变7个候选AR靶基因在LNCaP-AI细胞中的表达, 为进一步研究雄激素依赖性前列腺癌向非依赖性前列腺癌发展的过程中雄激素受体及其调控的下游靶基因功能起着至关重要的作用。

关键词 前列腺癌; 雄激素非依赖; 染色质免疫共沉淀; 雄激素受体; 靶基因

The Screening and Identification of Androgen Receptor Target Genes in Androgen-independent Prostate Cancer Cell

Xu Siqu^{1,2}, Liao Zhaoping^{1,2}, Liu Chunhua^{3,2}, Cheng Yue², Ji Lili^{1,2}, Duan Xiuzhi², Chen Yuhua², Tao Zhihua^{1,2*}

(¹Department of Clinical Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;

²Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009,

China; ³School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract Chromatin immunoprecipitation assay was performed to screen the androgen receptor binding sites in androgen-independent prostate cancer cell LNCaP-AI in the whole genomic. Using high-throughput sequencing and bioinformatic analysis, there were 2 876 peaks (p -value $<1\times 10^{-5}$), and the average length of peaks was 673 bp; locating each peak in the Hgl9 genome, 1 865 genes were founded. There were 425 genes which the fold enrichment was more than 10. It could be founded that the top five genes were associated with cell, cell part, cellular process, binding and organelle by GO analysis of peak related genes. Genes associated with focal adhesion, metabolic pathways, transcriptional misregulation in cancer and purine metabolism were the majority by pathway analysis of peak related genes. Seven candidated AR target genes were selected to analyze the reactivity to DHT stimulation in LNCaP-AI cell and LNCaP cell by Real-time qPCR. The result showed that DHT stimulation could change the expression of seven candidated target genes in LNCaP-AI cell. Our data play a vital role in the further study on

收稿日期: 2014-02-20 接受日期: 2014-03-27

国家自然科学基金(批准号: 81271917)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87783752, E-mail: zrtzh@zju.edu.cn

Received: February 20, 2014 Accepted: March 27, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81271917)

*Corresponding author. Tel: +86-571-87783752, E-mail: zrtzh@zju.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-02 12:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0048.html>

androgen receptor and its regulated target genes in the process of androgen-dependent prostate cancer progress to androgen-independent prostate cancer.

Key words prostate cancer; androgen-independent; chromatin immunoprecipitation; androgen receptor; target gene

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是西方男性发病率最高的肿瘤^[1]。近年来,随着生活方式的改变,我国PCa的发病率呈逐年上升的趋势^[2-3]。去势治疗是PCa的主要治疗手段,早期PCa呈雄激素依赖性(androgen-dependent prostate cancer, ADPC),其治疗主要依赖手术去势;晚期PCa的治疗手段为手术去势联合雄激素去势。在2~3年缓解期后,大部分患者发展为极度恶性的雄激素非依赖性前列腺癌(androgen-independent prostate cancer, AIPC),预后极差^[4]。雄激素受体(androgen receptor, AR)为核受体超家族的成员之一,它对前列腺正常功能的发挥、PCa的发生发展以及ADPC向AIPC转化的过程都起着非常关键的作用^[4-5]。AR及其调控的靶基因的改变将导致AR信号通路的改变,寻找AIPC细胞中的关键AR靶基因对了解AIPC的发生有着重要意义。本研究使用染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)联合高通量测序技术(ChIP-seq)在全基因组水平对AIPC细胞LNCaP-AI^[6]的AR靶基因进行筛选与初步鉴定,初步探索在AIPC发生中可能起着关键作用的AR靶基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 常规培养细胞 ADPC细胞LNCaP购自中国科学院上海细胞库,培养于含10%胎牛血清(FBS)的F12培养液中。AIPC细胞LNCaP-AI为本实验室前期已诱导成功的雄激素非依赖性前列腺癌细胞株^[6],培养于含10%碳吸附处理FBS(CCS)的DMEM/F12无酚红培养液中。在5% CO₂、37 °C培养箱中培养,细胞传代后第3~4 d换液一次,7 d左右传代一次。

1.1.2 饥饿培养细胞 处于对数生长期的常规培养LNCaP-AI细胞用胰酶消化后传代于15 cm培养皿,待细胞生长至60%左右时换液一次,72 h后加入10 nmol/L DHT,24 h后收集细胞进行ChIP实验。处于对数生长期的常规培养LNCaP细胞和LNCaP-AI细胞用胰酶消化后传代于六孔板培养皿,待细胞生长至60%左右时用含10% CCS的DMEM/F12无酚红

培养液换液一次,72 h后加入10 nmol/L DHT,分别于0, 3, 6, 9, 24, 48 h后收集细胞进行实验。

1.1.3 主要试剂和仪器 EZ-Zyme™ Chromatin Prep Kit(Millipore公司); F12培养基、DMEM/F12无酚红培养基(Gibco公司); FCS、CCS(Biowest公司); anti-AR(Abcam公司); Protein G Magnetic Beads(Millipore公司); NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo公司); DHT(Sigma公司); 总RNA提取试剂Trizol(Invitrogen公司); Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche公司); PCR Purification Kit(QIAGEN公司); SYBR Green Master(Roche公司); CO₂培养箱(Thermo公司); 倒置显微镜(尼康公司); Stepone plus实时荧光定量PCR仪(ABI公司); 凝胶成像仪(BIO-RAD公司); 电泳仪(BIO-RAD公司); Nano drop紫外分光光度计(Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 LNCaP-AI细胞胞质和胞核AR含量的检测 收集经10 nmol/L DHT刺激24 h前后的LNCaP-AI细胞,按说明书进行操作,分别提取胞质和胞核蛋白,以BSA为标准品进行定量,100 °C 5 min将蛋白变性后以适量蛋白进行电泳、转膜、孵育一抗(anti-AR)、孵育二抗,最后进行显色、曝光,以GAPDH为内参比较AR蛋白含量。

1.2.2 LNCaP-AI细胞染色质免疫共沉淀 (1)ChIP方法富集LNCaP-AI细胞AR结合位点: LNCaP-AI细胞在饥饿培养+10 nmol/L DHT 24 h后收集细胞并按照Chromatin Prep Kit所述以80 U微球菌核酸酶对4×10⁷个细胞进行染色质片段化,上清(含染色质片段)按约4×10⁶细胞/tube进行分装并验证酶切效果。若染色质主片段集中在500 bp以下,即在每个Ep管中加入Dilution Buffer,混匀后取1%作为input储存于4 °C冰箱备用,在不同的Ep管中分别加入5 μg anti-AR和20 μL Protein G(ChIP实验组)、1 μg anti-RNA pol-II和20 μL Protein G(ChIP阳性对照组)、1 μg normal IgG和20 μL Protein G(ChIP阴性对照组),并置于旋转混匀器于4 °C层流柜过夜。按Massie等^[7]的操作进行免疫复合物洗涤,随后取出input管,

对input管和IP管同时进行洗涤及洗脱后,按照PCR Purification Kit说明进行纯化并用30 μ L DEPC水洗脱,所得离心液即含ChIP富集所得AR结合位点。

(2)染色质酶切效果验证:取适量染色质片段溶液,按照Chromatin Prep Kit所述进行过夜解交联后,将100 bp DNA laddering marker和待测样品同时上样进行2%琼脂糖凝胶电泳,85 V 30 min后将凝胶置于凝胶成像仪,判断DNA片段长度。

(3)富集物含量测定:使用Nano drop 2000进行DNA浓度、 D_{260}/D_{280} 测定。打开软件,初始化后用2 μ L DEPC水进行blank,在检测基座上加2 μ L待测定样品,检测结果显示于电脑界面。

(4)ChIP富集效果及富集效率判断:以ChIP阴性对照和阳性对照组DNA片段作为PCR模板, *GAPDH* 基因片段作为引物(表1),通过Real-time PCR结果来判断ChIP实验本身是否成功。用ChIP实验组DNA片段作为PCR模板,含ARE的*PSA Promotor*基因片段(表1)作为引物,通过Real-time PCR结果来初步判断anti-AR对靶基因的富集效率。PCR反应体系为:2.0 μ L DNA, 12.5 μ L SYBR Green mix, 1 μ L primer, 加DEPC水补足至25 μ L。PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 50个循环。PCR结束后调节基线至适宜处,基线与扩增曲线的交点即为Ct值。以input为基准,计算基因的相对富集效率(% of input)。第一步,将Ct(1% input)调整到Ct(100% input), $Ct(100\% \text{ input}) = Ct \text{ Input}(1\% \text{ input}) - 6.644$; 第二步, $\text{Percentage of input} = 2^{[Ct(100\% \text{ input}) - Ct \text{ IP}]} \times 100\%$ 。

1.2.3 高通量测序及生物信息分析 使用Illumina

HiSeq2000测序技术完成测序后,对原始数据进行去污染、去接头及去除低质量数据处理,即为clean data。使用SOAP软件将clean data与*Hg19*基因组序列进行比对,允许不超过2个碱基的错配,其中比对到基因组上唯一位置的reads(唯一比对reads)将用于后续的信息分析。将唯一比对reads与基因组参考数据库做比对,统计reads在基因间区、基因内含子区、基因外显子区、基因上游20 Kb和基因下游20 Kb的分布情况。使用MACS软件,基于Poisson分布模型在全基因组水平进行peak扫描($p\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$),可得到peak在基因组上的位置信息、peak区域序列信息等。最后进行peak相关基因筛选,并对相关基因进行GO功能聚类分析和pathway分析。

1.2.4 DHT刺激影响候选AR靶基因表达水平的检测

(1)细胞总RNA提取: LNCaP细胞和LNCaP-AI细胞经饥饿培养+10 nmol/L DHT, 0, 3, 6, 9, 24, 48 h后分别收集细胞,加入Trizol,经异丙醇沉淀和75%乙醇洗涤风干后,加入55 $^{\circ}$ C预热的DEPC水50 μ L溶解即可。(2)RNA浓度检测:使用Nano drop 2000按上述操作进行检测。(3)RNA逆转录:使用1 μ g RNA按Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit说明书操作,总反应体系为20 μ L。反应结束后将产物保存备用。(4)Real-time qPCR: 2.0 μ L cDNA, 12.5 μ L SYBR Green mix, 1.0 μ L primer, 加DEPC水补足至25 μ L。94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 50个循环。以*GAPDH*为内参,计算LNCaP细胞和LNCaP-AI细胞中各靶基因的相对表达量以及LNCaP-AI细胞相对于LNCaP细胞中各靶基因的相

表1 本实验所用引物序列列表

Table 1 List of primers used in the experiment

基因 Genes	上游引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primers (5'→3')
<i>GAPDH</i>	TAC TAG CGG TTT TAC GGG CG	TCG AAC AGG AGG AGC AGA GAG CGA
<i>AR</i>	GCC ACT CAG ACC CAC TTA GC	CCT CAC TCT TCG TCC ACA TCG
<i>PSA</i>	CCT AGA TGA AGT CTC CAT GAG CTA C	GGG AGG GAG AGC TAG CAC TTG
<i>PTGER3</i>	ACG GAG AAG CAG AAA GAA TG	GCA GGG TAA GGA GGT GGA
<i>FOXP2</i>	ACA CGC ATT GGA TGA CCG A	GTC TGA ATG TCG CCT TCG TAT G
<i>FN1</i>	ACA CGC ATT GGA TGA CCG A	ACA CGC ATT GGA TGA CCG A
<i>ZNF438</i>	AGT TGT CGG ATT TGT CGC	TTC GTC TGC CTG GTT TAG
<i>PDE9A</i>	CTA ACG AGG TCC GTC CAA	GGC GTC ATC TAT CCG CTT CA
<i>BDNF</i>	TTC TGC CCA TCC TGT CT	GCT TAT CCC TCA CCC TAC T
<i>PCDH15</i>	CCC AAA CCA ACA GAG CCA TCG	TCC TCC TTC CCC ATA ATA CGG
<i>GAPDH-ChIP</i>	TAC TAG CGG TTT TAC GGG CG	TCG AAC AGG AGG AGC AGA GAG CGA
<i>PSA-ChIP</i> ^[8]	CCT AGA TGA AGT CTC CAT GAG CTA C	GGG AGG GAG AGC TAG CAC TTG

对含量($2^{-\Delta\Delta Ct}$), 其中 $\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(GAPDH)$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{LNCaP-AI}) - \Delta Ct(\text{LNCaP})$ 。

2 结果

2.1 DHT刺激对LNCaP-AI细胞胞质和胞核中AR蛋白表达的影响

提取10 nmol/L DHT刺激前后LNCaP-AI细胞的胞浆和胞核蛋白, 利用anti-AR进行蛋白免疫印迹实验, 以GAPDH为内参判断AR蛋白的表达情况。由图1可以看出, LNCaP-AI细胞在DHT刺激后胞质AR减少, 胞核AR增多, 提示AR信号通路的经典途径在LNCaP-AI细胞中依然发挥着重要作用。

2.2 LNCaP-AI细胞染色质免疫共沉淀结果

2.2.1 LNCaP-AI细胞染色质片段合格性检测 (1) 染色质片段长度: ChIP-seq要求待检DNA片段应小于1 000 bp, 尽量控制在500 bp范围内。本实验采用微球菌核酸酶消化染色质使其片段化, 对交联的染

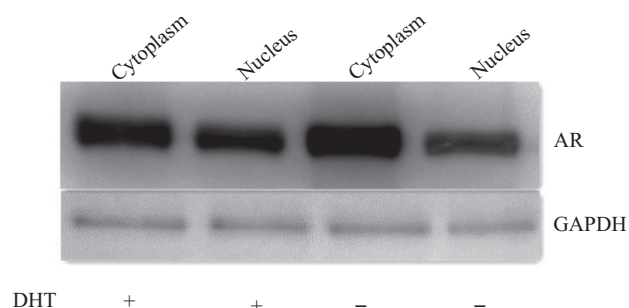
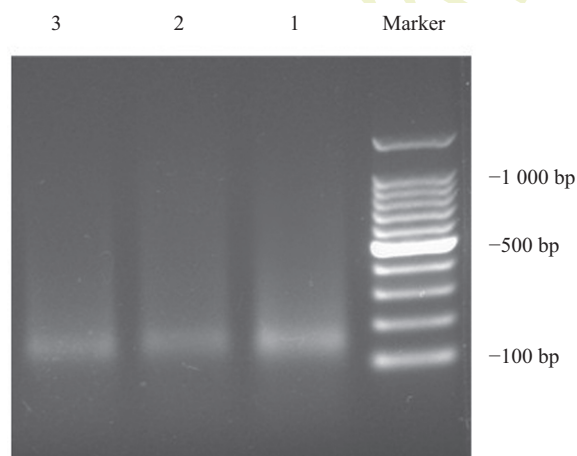


图1 DHT刺激对LNCaP-AI细胞AR蛋白核转移的影响

Fig.1 The effect of DHT stimulation on nuclear transfer of AR protein in LNCaP-AI cell



1、2、3泳道均为LNCaP-AI细胞染色质片段化后的结果。

Lane 1,2,3 were all the chromatin fragments of LNCaP-AI cells.

图2 LNCaP-AI细胞染色质片段长度

Fig.2 The length of chromatin fragments of LNCaP-AI cells

色质进行过夜解交联处理后, 用2%琼脂糖凝胶电泳判断片段长度, 结果如图2所示。

(2) ChIP富集物含量: 使用Qubit Fluorometer对LNCaP-AI细胞AR-ChIP后富集所得DNA样品的浓度及体积进行检测, 结果为: 3.46 ng/ μL , 135 μL , 总量为0.467 1 μg 。ChIP-seq要求待测样品总量不低于5 ng, 结合DNA片段长度, 本次ChIP-ed DNA符合测序建库要求。

2.2.2 ChIP富集效果和富集效率 以ChIP阴性对照组和阳性对照组富集物及相应的input对照组DNA作为PCR模板, *GAPDH*基因片段作为引物进行Real-time qPCR; 以ChIP实验组富集物及相应的input对照组DNA作为PCR模板, *PSA*基因片段作为引物进行Real-time qPCR。PCR结束后计算*GAPDH*和*PSA*的相对富集度(% of input)。ChIP阴性对照组的*GAPDH*基因相对富集度为0.64%, ChIP阳性对照组的*GAPDH*基因相对富集度为21.23%, ChIP实验组的*PSA*基因相对富集度为4.71%(图3)。

2.3 高通量测序和生物信息学分析结果

本次测序结果中reads长度为49 bp, 共得到11 416 877条reads, 总产量为559 426 973 bp。将其与*Hg19*基因组序列进行比对, 比对reads数为10 854 724条, 比对率95.08%, 唯一比对reads共10 056 037条, 唯一比对率为88.08%。唯一比对reads在各基因功能元件上的分布为: 基因间区58.26%, 基因内含子区38.96%, 基因上游20 Kb 11.98%, 基因下游20 Kb 11.66%, 基因外显子区2.11%(图4A)。使用MACS软件进行peak区扫描, Poisson分布模型进行检验, 共得到2 876个peak($p\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$), peak平均长

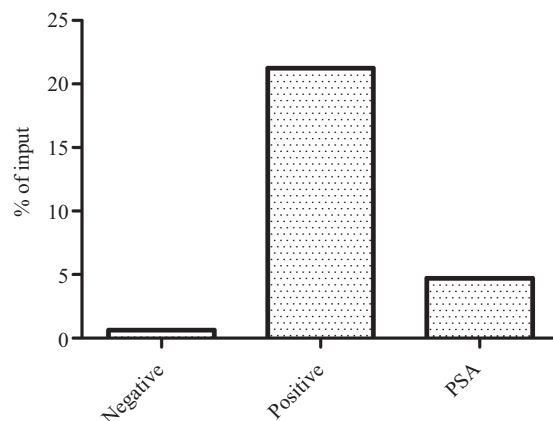


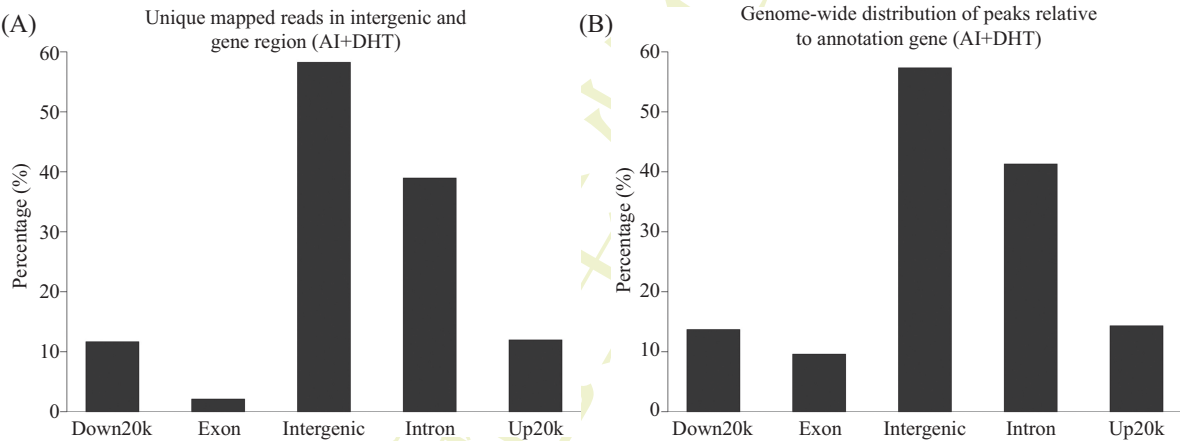
图3 染色质免疫共沉淀实验及*PSA*基因的富集效率

Fig.3 The efficiency of chromatin immunoprecipitation experiment and *PSA* gene enrichment

表2 LNCaP-AI细胞ChIP-seq得到的部分雄激素受体靶基因举例
Table 2 Some of androgen receptor target genes analysed by the ChIP-seq

基因 Genes	Peak在基因上的位置 Peak position in the gene	Peak数 Number of peak	P值 P value	相对富集度 Fold enrichment
COL1A1	Up20k, exon, intron	3	2.54×10^{-21}	16.54
TP53BP2	Up20k	2	1.16×10^{-11}	16.35
PTPRH	Up20k	2	1.48×10^{-6}	13.48
ETV7	Up20k	1	4.55×10^{-6}	13.24
MDM2	Up20k	1	3.48×10^{-6}	10.29
BDNF	Down20k	17	3.43×10^{-5}	7.29
FOXP2	Intron	9	2.88×10^{-5}	10
PCDH15	Intron	24	$3.94 \times 10^{-5}, 4.09 \times 10^{-5}$	8.75, 8.33
PDE9A	Up20k	20	1.09×10^{-6}	8.99
ZNF438	Intron	16	$9.31 \times 10^{-6}, 8.83 \times 10^{-5}$	7.5, 7.5

Up20k、Down20k、exon、intron分别表示peak位于基因上游20 Kb、下游20 Kb、外显子、内含子区域内。
Up20k, Down20k, exon, intron indicated that the peak was located in the region of upstream 20 Kb of gene, downstream 20 Kb of gene, exon of gene and intron of gene.



A: 唯一比对reads在基因组各功能元件上的分布; B: peaks在基因组各功能元件上的分布。
A: the distribution of unique mapped reads in the functional elements of the genome; B: the distribution of peaks in the functional elements of the genome.

图4 唯一比对reads和peaks在基因组各功能元件上的分布情况
Fig.4 The distribution of unique mapped reads and peaks in the functional elements of the genome

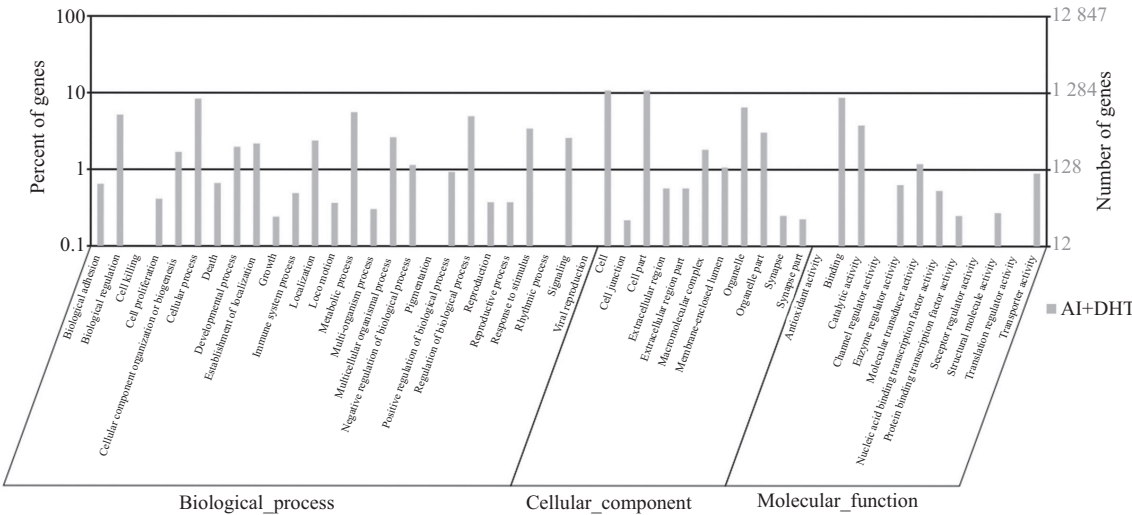


图5 peak相关基因的GO功能聚类分析
Fig.5 GO analysis of peak-related genes

度为673 bp, peak在各基因功能元件上的分布特征与唯一比对reads的分布类似(图4B)。将peak序列定位到基因组,共得到1 865个peak相关基因,其中fold enrichment ≥ 10 的基因有425个,大部分基因fold enrichment集中于5~10。对数据进行分析,我们发现一个peak可以匹配到至少一个基因,同时一个基因至少有一个peak的富集,平均每一个基因可有1.54个peak。表2列举了部分fold enrichment较高的基因以及peak较多的基因。对peak相关基因进行GO分析发现,与细胞、细胞组分、细胞过程、结合及细胞器相关的基因量位列前五(图5)。对1 495个peak相关基因进行信号通路的注释后,我们发现与黏着斑、代谢通路、癌症中的转录错误调控及嘌呤代谢等信号通路相关的靶基因占大多数(表3)。

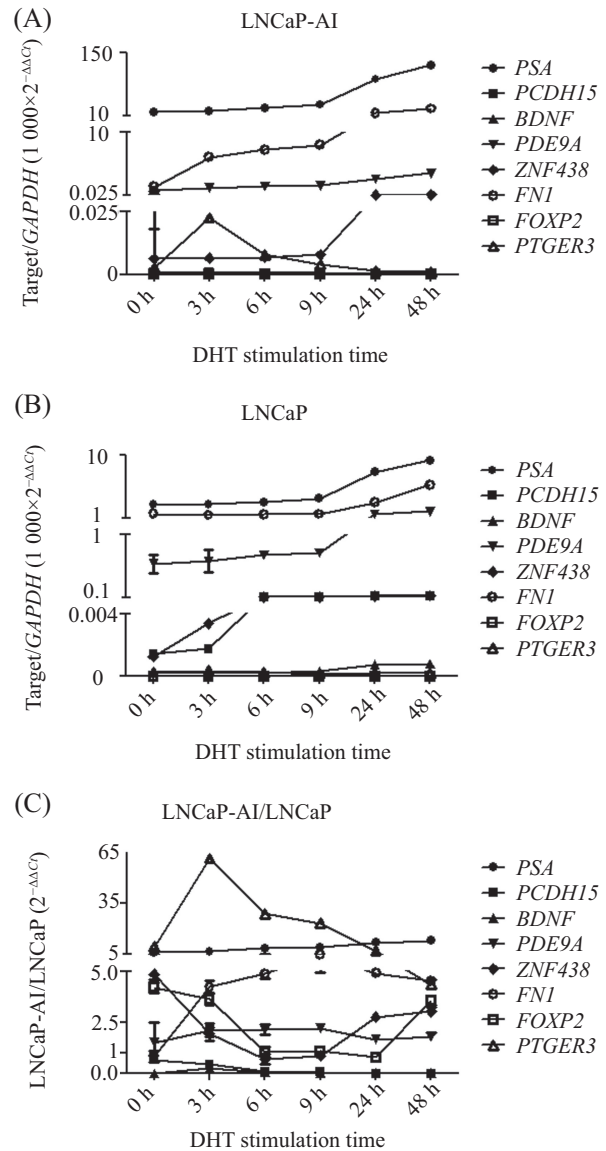
2.4 DHT刺激对候选AR靶基因表达情况的影响

我们推测,若某一基因能富集到的peak越多,其与LNCaP-AI细胞的关联性越大,与AIPC发生的相关性越高。我们的数据表明,某一基因所能富集到的peak数最大为24,富集peak数为1的基因有1 110个,富集peak数大于5的基因有99个,其中富集peak数大于9的基因有20个。我们以富集peak数大于9的20个基因为初步对象,结合文献报道筛选了其中的7个候选基因(*PTGER3*、*FN1*、*PDE9A*、*BDNF*、*PCDH15*、*FOXP2*、*ZNF438*)作为对象初步判断它们在LNCaP细胞和LNCaP-AI细胞中的表达情况及对DHT刺激的反应性。由图6可以看出,DHT刺激可改变7个候选AR靶基因在LNCaP-AI细胞中的表达,

表3 与peak相关基因有关的主要信号通路举例

Table 3 Some of the main pathways of peak-related genes

信号通路 Pathway	与通路相关的基因量(构成比) Constituent ratio of pathway related genes
Regulation of actin cytoskeleton	75 (5.02%)
Focal adhesion	65 (4.35%)
Tight junction	68 (4.55%)
Pathways in cancer	53 (3.55%)
Metabolic pathways	244 (16.32%)
Purine metabolism	113 (7.56%)
Cell cycle	13 (0.87%)
Transcriptional misregulation in cancer	108 (7.22%)
Prostate cancer	11 (0.74%)



A、B分别表示AR靶基因在LNCaP-AI细胞和LNCaP细胞的相对表达量; C: AR靶基因在LNCaP-AI细胞中相对于LNCaP细胞的表达量。A,B: the relative expression levels of AR target genes in LNCaP-AI and LNCaP cells; C: the expression levels of AR target genes in LNCaP-AI cells compared to those of LNCaP cells.

图6 不同DHT刺激时间下候选AR靶基因的表达情况

Fig.6 The expression levels of candidate AR target genes after DHT stimulation in indicated times

与DHT刺激0 h相比, DHT刺激时间越长候选靶基因表达差异越明显; 其中, *FN1*和*PDE9A* mRNA相对表达量相对较高。各候选靶基因的相对表达量在两株细胞间均具有差异, 其中差异最明显的为*PTGER3*和*BDNF*; 与LNCaP细胞相比, 表达升高的基因为*PTGER3*、*FN1*、*ZNF438*、*FOXP2*和*PDE9A*, 表达降低的基因为*BDNF*和*PCDH15*。

3 讨论

已明确AR作为转录因子在性别分化、前列腺正常功能的发挥、PCa的发生发展以及ADPC向AIPC转化的过程都起着非常关键的作用,但机制尚不明确,目前的研究热点主要包括AR调控基因的异常、AR过表达、AR突变、非雄激素依赖途径的出现等^[5]。LNCaP-AI细胞为模拟PCa的雄激素剥夺治疗诱导而成的细胞株,为AIPC细胞。本课题组前期研究显示^[9-10],AR蛋白和mRNA在LNCaP-AI细胞中的表达比LNCaP细胞高,DHT可刺激AR表达;使用siRNA干扰AR表达后对LNCaP-AI细胞生长的抑制率大于对LNCaP细胞的抑制率,且无论干扰前还是干扰后DHT对LNCaP-AI细胞生长的刺激作用都大于LNCaP细胞;DHT可刺激AR蛋白在胞核中的表达(图1),因此AR信号途径在LNCaP-AI细胞的发生中起着关键作用。根据前期研究结果,我们推测由AR调控的下游靶基因的改变参与了LNCaP细胞向LNCaP-AI细胞的转化,导致了两个细胞生物学功能的不同。

本实验使用AR-ChIP联合高通量测序技术在全基因组水平对LNCaP-AI细胞中的AR结合位点进行富集,并根据结合位点在基因组上的位置定位相应的基因。由图3我们得知,大部分peak位于功能尚不能明确的基因间区,其次约40%位于基因内含子区,AR很可能参与调控了这些基因的表达。本次AR-ChIP共得到1 865个基因,我们初步筛选了7个基因(*FNI*、*PDE9A*、*ZNF438*、*PTGER3*、*PCDH15*、*FOXP2*、*BDNF*)进行相对表达量检测,其中尚未见*FNI*、*PDE9A*、*ZNF438*与PCa的报道。

DHT刺激可改变AR靶基因在LNCaP-AI细胞中的相对表达量,且随着DHT刺激时间的延长表达差异越明显,这说明了它们可能为AR靶基因。前列腺素E2受体3(*PTGER3*)基因为前列腺素受体EP3,该基因广泛分布于多个组织系统,具有多种功能。在本实验中LNCaP-AI细胞*PTGER3* mRNA表达升高,与Kashiwagi等^[11]的研究结果相反,却与Miyata等^[12]的研究结果有着一致性。我们推测可能是由于*PTGER3*亚型不同或*PTGER3*与不同亲和力的配体结合产生不同的生物学功能导致的,DHT刺激会降低*PTGER3*的表达水平,说明*PTGER3*在LNCaP-AI细胞中可能通过非雄激素依赖的AR调控途径影响PCa的进展。*PCDH15*为钙黏着蛋白超家族的成员之一,

已有报道显示N-钙黏着蛋白增加和E-钙黏着蛋白减少(上皮-间质转化,EMT)在肿瘤的转移中起着重要作用^[13]。LNCaP-AI细胞中*PCDH15* mRNA的表达降低,可能通过编码E-钙黏着蛋白参与EMT对AIPC的发生起着一定作用。*FOXP2*在神经细胞的分化中有着一定的作用,FOX家族参与了多数肿瘤的发生,*FOXP2*与PCa的发生发展也有着密不可分的关系,尤其在*TMPRSS2-ERG*融合阴性的PCa中,*FOXP2*表达越高预后越差^[14]。本研究中*FOXP2*在LNCaP-AI细胞中表达升高,证实了其于PCa的发展及AIPC的转化有着不可分割的关系。*BDNF*为神经营养因子家族的成员之一,已明确了神经营养因子在男性生殖器官发育中的重要作用。Mirabella等^[15]的研究说明,*BDNF*在去势处理的小鼠中表达比正常小鼠高。本实验中,LNCaP-AI细胞*BDNF* mRNA的表达降低,与预期不符,还需进一步重复实验进行验证。*FNI*与黏着斑和迁移密切相关;*PDE9A*与细胞转导途径相关;*ZNF438*为一锌指蛋白,与众多基因表达的调控相关。LNCaP-AI细胞中它们的表达均与LNCaP细胞中的表达存在差异,暗示它们可能在PCa的发生以及AIPC的转化中起着重要作用。但是关于与PCa之间存在的关系以及它们在PCa的发生发展中所起的作用还需要更多的实验来说明。

另外,Wang等^[16]发现与细胞周期相关的基因,尤其是M期基因在AIPC的发展中起着重要作用。M期直接影响了细胞分裂,M期基因表达升高与肿瘤细胞的快速生长等特性有着密不可分的关系。由于G₂到M这个阶段正处在复杂活跃的分子水平变化的时期,容易受干扰,因此我们猜测LNCaP-AI细胞中也存在着某些调控G₂/M期转位的关键AR靶基因。AR-ChIP中我们富集了如*Cdc14*等与M期相关的AR靶基因,有望在下一步实验中进行深入的研究。另外,在与黏着斑、代谢通路、癌症中的转录错误调控及嘌呤代谢等信号通路明确相关的基因中我们还富集了较多基因,这些代谢途径在肿瘤的发生过程中都或多或少地发生了改变。

目前,我们正在着手对LNCaP细胞进行AR-ChIP及sequencing,旨在通过对两个细胞的ChIP-ed DNA进行差异分析后,期望找到不仅与PCa发生相关同时也与LNCaP-AI细胞转化密切相关的AR靶基因。另外,对筛选得到的LNCaP-AI细胞AR靶基因,我们下一步将使用siRNA干扰AR基因的表达后检测各靶

基因的表达,以验证其与AR的关联性;用凝胶迁移试验分析靶基因与AR是否存在直接结合作用。

综上所述,雄激素受体及其调控的靶基因在雄激素依赖性前列腺癌向雄激素非依赖性前列腺癌转化的过程中起着至关重要的作用,我们期待下一步的实验能筛选出某些关键的雄激素受体直接作用的下游靶基因,为雄激素非依赖性前列腺癌的治疗提供新靶点。

参考文献 (References)

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63(1):11-30.
- 2 赫捷,陈万青. 中国肿瘤登记年报2012, 北京: 军事医学科学出版社, 2012, 28-60.
- 3 李铭, 张思维, 马建辉, 陈万青, 那彦群. 中国部分市县前列腺癌发病趋势比较研究. *中华泌尿外科杂志* (Li Ming, Zhang Siwei, Ma Jianhui, Chen Wanqing. A comparative study on incidence trends of prostate cancer in part of cities and counties in China. *Chin J Urol*) 2009; 30(6): 368-70.
- 4 Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6): 1665-71.
- 5 Loneragan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog* 2011; 10: 20.
- 6 Xu G, Wu J, Zhou L, Chen B, Sun Z, Zhao F, *et al.* Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing. *PLoS One* 2010; 5(11): e15519.
- 7 Massie CE, Mills IG. Global identification of androgen response elements. *Methods Mol Biol* 2011; 776: 255-73.
- 8 Wang Q, Li W, Liu XS, Carroll JS, Janne OA, Keeton EK, *et al.* A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell* 2007; 27(3): 380-92.
- 9 朱小丽. LNCaP细胞株耐药性过程中雄激素受体分子改变研究. 温州医学院 2011.
- 10 韩秀翠. 雄激素非依赖性前列腺癌中雄激素受体的功能研究. 温州医学院 2012.
- 11 Kashiwagi E, Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, Inokuchi J, Uchiumi T, *et al.* Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20(3): 431-41.
- 12 Miyata Y, Ohba K, Matsuo T, Watanabe S, Hayashi T, Sakai H, *et al.* Tumor-associated stromal cells expressing E-prostanoid 2 or 3 receptors in prostate cancer: Correlation with tumor aggressiveness and outcome by angiogenesis and lymphangiogenesis. *Urology* 2013; 81(1): 136-42.
- 13 Jennbacken K, Tesan T, Wang W, Gustavsson H, Damber JE, Welen K. N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(2): 469-79.
- 14 Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, Simon R, Adam M, Becker A, *et al.* Strong expression of the neuronal transcription factor FOXP2 is linked to an increased risk of early PSA recurrence in ERG fusion-negative cancers. *J Clin Pathol* 2013; 66(7): 563-8.
- 15 Mirabella N, Squillacioti C, Paone I, Ciarcia R, Russo M, Paino G. Effects of castration on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the vas deferens and male accessory genital glands of the rat. *Cell Tissue Res* 2006; 323(3): 513-22.
- 16 Wang Q, Li W, Zhang Y, Yuan X, Xu K, Yu J, *et al.* Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell* 2009; 138(2): 245-56.

食蟹猴和恒河猴卵母细胞及早期胚胎玻璃化冻存

黄璋琼¹ 薛志刚² 高家红¹ 江勤芳¹ 吴正存¹ 李 聪¹ 罕园园¹ 曾 桥^{2*} 马开利^{1*}

¹中国医学科学院医学生物学研究所药物安全性评价研究中心, 昆明 650118;

²同济大学附属同济医院转化医学中心, 上海 200065)

摘要 为了节省经费和使转基因模型动物品种资源得到妥善保存, 该研究利用自制的梯度浓度冷冻液和解冻液结合玻璃化方式分别冷冻和解冻了非人灵长类动物的183个卵母细胞(GV期、MI期和MII期)、114个卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期)及25个桑椹期胚胎。其中食蟹猴卵母细胞67个, 卵裂期胚胎45个, 桑椹期胚胎11个; 恒河猴卵母细胞116个, 卵裂期胚胎69个, 桑椹期胚胎14个。复苏后存活率分别为56/67(83.58%)、36/45(80.00%)、9/11(81.82%)、102/116(87.93%)、55/69(79.71%)和11/14(78.57%)。结果表明, 快速玻璃化冷冻法简便且胚胎存活率高, 是一种较好的冷冻食蟹猴和恒河猴卵母细胞及胚胎的方法。

关键词 食蟹猴; 恒河猴; 卵母细胞; 胚胎; 玻璃化冻存

Vitrification of Oocytes and Embryos of *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*

Huang Zhangqiong¹, Xue Zhigang², Gao Jiahong¹, Jiang Qinfang¹, Wu Zhengcun¹,

Li Cong¹, Han Yuanyuan¹, Zeng Qiao^{2*}, Ma Kaili^{1*}

(¹Center for Drug Safety Evaluation and Research, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences,

Kunming 650118, China; ²Research Center for Translational Medicine, Shanghai Tongji Hospital,

Medical School of Tongji University, Shanghai 200065, China)

Abstract In order to retrench funds and preservation of variety resources of transgenic animal model, this study adopted vitrification method to cryopreserve and thaw 183 oocytes (at the GV, MI and MII stages), 144 embryos in cleavage stage (at the 2- to 8-cell stages) and 25 mulberry of the nonhuman primate with the solution prepared by ourselves. Including 67 oocytes, 45 embryos in cleavage stage and 11 mulberry of cynomolgus monkey; Including 116 oocytes, 69 embryos in cleavage stage and 14 mulberry of rhesus monkey. After thawing, the survival rate was respectively 83.58% (56/67), 80% (36/45), 81.82% (9/11), 87.93% (102/116), 79.71% (55/69) and 78.57% (11/14). The results showed that vitrification cryopreservation, simple and effective, is a good method to cryopreserve the oocytes and embryos of rhesus monkey and cynomolgus monkey.

Key words cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*); rhesus monkey (*Macaca mulatta*); oocyte; embryo; vitrification

收稿日期: 2014-02-12 接受日期: 2014-03-26

国家自然科学基金(批准号: 81301073)、高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(批准号: 20121106120056)、云南省应用基础项目(批准号: 2013FZ132, 2011FZ211)、协和青年基金-中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 3332013083、3332013146)和中国医学科学院医学生物学研究所所级一般项目(批准号: IMB2013YB01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-68408567, E-mail: zengqiao@cellpro.com.cn; E-mail: mklpumc@gmail.com

Received: February 12, 2014 Accepted: March 26, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81301073), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No.20121106120056), the Applied Basic Research on the Program Foundation of Yunnan Province (Grant No.2011FZ211, 2013FZ132), the PUMC Youth Fund and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.3332013083, 3332013146) and General Fund of Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.IMB2013YB01)

*Corresponding authors. Tel: +86-871-68408567, E-mail: zengqiao@cellpro.com.cn; E-mail: mklpumc@gmail.com

网络出版时间: 2014-07-02 11:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0039.html>

随着转基因和基因敲除动物模型的大量建立和广泛使用,其保存和繁育体系的建立愈显重要。其中,胚胎冷冻是体外受精(*In vitro fertilization*, IVF)工作中不可缺少的重要组成部分。非人灵长类动物胚胎的冷冻保存是由于其物种的稀有性和灵长类动物体外受精、胚胎培养和胚胎移植等技术条件的限制。目前,仅在狒狒、狨猴、食蟹猴和猕猴有相关的研究报道^[1-4],其中猕猴胚胎通过卵细胞浆内单精子注射术(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)获得并经冻融得到了后代。相对于精子和胚胎,非人灵长类动物的卵母细胞冷冻保存研究则更为罕见,目前共有3篇报道,仅限于松鼠猴^[5]、食蟹猴^[6]和猕猴^[7],但都没有提到玻璃化冷冻方式,并且仅有松鼠猴报道了复苏后的存活率为35.4%。而国内关于非人灵长类动物的卵母细胞和胚胎冷冻的研究较少,传统的慢速冷冻法需要严格控制冷冻和解冻过程中形成的冰晶数量,期望在各因素间保持精细的平衡,减少冰晶造成的损伤、渗透压改变造成的损伤、透明带和卵裂球破裂及细胞骨架的改变等,慢冻法比较费时,且需要昂贵的程序化冷冻仪才能完成。近年来应用的玻璃化冷冻技术是使用很高浓度的冷冻保护剂和极高的冷冻速度,使卵母细胞和胚胎在冷冻过程中呈玻璃状固化,与传统冷冻程序相比,玻璃化冷冻可以完全避免冰晶的形成,降低模型动物遗传漂变风险,有望获得更高的胚胎复苏率;具有简便、迅速、经济的优点,操作过程短,减少了卵母细胞在低温环境中的暴露时间;无需昂贵的程序化冷冻设备,并已成为卵母细胞冷冻保存的研究热点^[8-9]。用玻璃化冻存方法保存卵细胞和胚胎已在一些物种获得成功^[8,10-11],然而这个方法在非人灵长类动物卵母细胞和胚胎的应用几乎没有报道。与普通小鼠和转基因小鼠相比,转基因猴的胚胎显得更加珍贵与脆弱,胚胎数量往往不及前者。为了节省经费和使转基因模型动物品种资源得到妥善保存,以便为后续科研提供充足的资源,本研究对恒河猴、食蟹猴的卵母细胞和经ICSI及特定基因靶向修饰技术获得的不同发育期的早期胚胎进行玻璃化冻存保种及复苏技术进行了探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

食蟹猴6只,恒河猴13只,由中国医学科学院医

学生物学研究所提供,饲养于GLP中心。性成熟(4~6岁)的公猴和母猴单笼饲养,并给予12小时明/暗光控及16~22℃的温控,每天喂食三餐,每天给予一定量的水果。

1.2 试剂与仪器

人输卵管液(HTF)、卵母细胞体外操作液(HTF-HEPES)、代血清(SSS)、胚胎培养液、二甲亚砜(DMSO)购自美国IRVINE公司;TL-HEPES购由LONZA公司提供;庆大霉素、乙二醇及蔗糖购自美国SIGMA公司;玻璃化冷冻、解冻液自己配制;解剖显微镜和倒置显微镜购自日本NIKON公司;显微操作系统购自德国EPPENDORF公司;培养皿、巴斯德吸管购自美国FALCON公司;移液管购自德国EPPENDORF公司;三气培养箱购自美国FORMA公司;达必佳购自德国辉凌制药有限公司;注射用尿促性腺素(hMG)和注射用绒促性素(hCG)购自丽珠制药厂。

1.3 促排卵与卵母细胞采集

对性成熟母猴通过阴道观察月经并记录,月经首日皮下注射达必佳0.1 mg;月经第3 d开始,食蟹猴每天两次连续注射hMG 25 IU 7~8 d,随之注射hCG 1 500 IU;月经第3 d开始,恒河猴每天两次连续注射hMG 30 IU 7~8 d,随之注射hCG 2 000 IU。hCG注射后27~32 h采集卵母细胞。动物经氯胺酮麻醉后固定于手术台上,经下腹中央或两侧做小切口(1.5~2.0 cm),暴露卵巢,采用5 mL注射器负压抽吸卵泡,卵泡液收集到含有10 IU/mL肝素钠的卵子洗涤液中,在解剖镜下收集卵丘复合物。卵丘复合物在体外培养2~4 h后经透明质酸酶消化后去除颗粒细胞,观察卵子成熟情况,成熟卵子(MII期)直接进行ICSI,未成熟卵子则继续培养24~36 h,期间观察卵子成熟情况,若发现成熟卵子则行ICSI。

1.4 精液采集、ICSI及胚胎培养

性成熟公猴经肛门电刺激法采集精液。射出的精液在液化后采用HTF-HEPES溶液洗涤两次。分别将成熟卵子和精子置于10 μL的注射微滴中,活动精子在7%聚乙烯吡咯烷酮(*polyvinylpyrrolidone*, PVP)制动后,持卵针固定成熟卵母细胞,并将第一极体置于12点位置,注射针在3点位置传入卵母细胞,分别穿过透明带和卵膜,负压吸引轻轻破膜后缓缓将精子注入到卵母细胞中,再轻轻退针。卵母细胞经洗涤后培养于37℃、5% CO₂、5% O₂的三气培养箱中。

1.5 胚胎遗传学修饰

培养至1-细胞期, 利用显微程序注射仪注射RNA或DNA 1×10^{-5} μL , 继续培养。

1.6 卵母细胞及胚胎冷冻

分别对不同发育时期的卵母细胞(GV期、MI期、MII期)、经遗传修饰的卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期)和桑椹期胚胎进行冻存, 2~3个月后进行复苏鉴定。

1.6.1 冻存液配制 冻存液配方见表1。

1.6.2 冻存方法 分别用吸管吸出50 μL 的冻存1号液(ES液)、冻存2号液(VS液)于培养皿中。冻存1号液中孵育5~6 min, 冻存2号液中孵育30~60 s, 将胚胎和卵母细胞置于冻存叶片上, 吸取多余液体, 再将叶片置于液氮中, 套好套管后保存于液氮中。室温下操作, 将容器放在显微镜旁边, 方便操作。

1.6.3 解冻方法 解冻液配方见表1。分别用吸管吸取1 000 μL TS液、400 μL DS液和500 μL WS液于培养皿中, 其中TS液需37 $^{\circ}\text{C}$ 预热, 并做好标记。去掉叶片套管后, 分别按顺序将叶片直接置于解冻TS液中孵育1 min, DS液中孵育3~4 min, 解冻3号液(WS液)中孵育8~10 min, 再将胚胎和卵母细胞洗涤后转移至培养微滴内。

1.6.4 解冻效果观察 卵母细胞存活标准, 根据中国人类遗传资源卵母细胞冷冻保存技术规程(GB/T.1.1-2000)^[12]判断: 解剖镜下形态正常, 透明带和胞膜无损伤, 透明带和胞质之间没有空隙, 卵周间隙清楚, 无胞质外漏或卵母细胞萎缩, 大小正常, 则定为存活。

胚胎复苏存活标准: 根据Mohr等^[13]和Testart等^[14]报道的结果, 胚胎存活是指在倒置显微镜下观察, 解冻后有50%以上细胞形态完整(即超过一半以上的卵裂球存活)的胚胎可认为是成活的胚胎。胚胎破损是指有一个或一个以上的卵裂球破损。将部分成

活的胚胎移入盛有含10% SSS的HTF液的四孔培养皿中, 加盖矿物油, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养, 观察其囊胚的形成率, 少量胚胎进行移植。

2 结果

共对322个卵母细胞和胚胎进行了玻璃化冻存研究, 包括183个卵母细胞(GV期、MI期和MII期)、114个卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期)和25个桑椹期胚胎(表2)。

其中, 食蟹猴卵母细胞和胚胎共123个: 卵母细胞67个, GV期、MI期、MII期存活率分别为28/32(87.50%)、18/23(78.26%)和10/12(83.33%), 总体复苏后存活率为56/67(87.93%); 卵裂期胚胎45个, 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后存活率分别为14/17(82.35%)、10/13(76.92%)和12/15(80.00%), 总体复苏后存活率为36/45(80.00%), 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后破损率分别为3/17(17.65%)、5/13(38.46%)和6/15(40.00%), 总体破损率为14/45(31.11%); 桑椹期胚胎11个, 复苏后存活率为9/11(81.82%), 破损率为5/11(45.46%)(表2)。

其中恒河猴卵母细胞和胚胎共199个: 卵母细胞116个, GV期、MI期、MII期存活率分别为59/66(83.39%)、33/37(89.19%)和10/13(76.92%), 复苏后总体存活率为102/116(87.93%); 卵裂期胚胎69个, 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后存活率分别为23/29(79.31%)、19/23(82.60%)和13/17(74.67%), 复苏后总体存活率为55/69(79.71%), 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后破损率分别为6/29(20.69%)、9/23(39.13%)和7/17(41.18%), 总体破损率为22/69(31.88%); 桑椹期胚胎14个, 复苏后存活率为11/14(78.57%), 破损率为7/14(50.00%)(表2)。

不同时期的卵母细胞(GV期、MI期和MII期)、不同时期的卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期、8-细

表1 冻存液及解冻液成分

Table 1 Cryopreservation and thawing solution

	名称 Name	台氏缓冲液 TL-Hepes	庆大霉素 Gentamicin	二甲基亚砷 DMSO	乙二醇 Ethandiol	蔗糖 Sucrose	牛血清蛋白 BSA
Cryopreser- vation	ES	85%	10 mg/L	7.5%	7.5%	/	12 mg/mL
	VS	70%	10 mg/L	15%	15%	0.5 mol/L	12 mg/mL
Thawing solution	TS	100%	10 mg/L	/	/	1.0 mol/L	12 mg/mL
	DS	100%	10 mg/L	/	/	0.5 mol/L	12 mg/mL
	WS	100%	10 mg/L	/	/	/	12 mg/mL

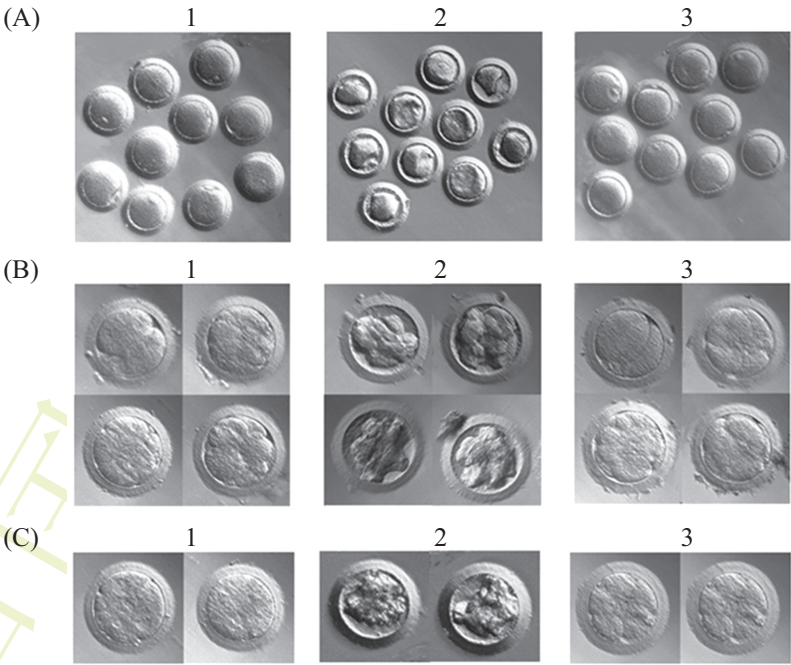
表2 食蟹猴和恒河猴卵母细胞与胚胎玻璃化冻存情况

Table 2 Cryopreservation cases of oocytes and embryos of cynomolgus monkey and rhesus monkey

动物种类 Animal species	发育阶段 Developmental stage	数量 Number	存活率(%) Survival rate (%)	破损率(%) Damage rate (%)
Cynomolgus monkey	GV stage	32	28/32(87.50)	4/32(12.50)
	MI stage	23	18/23(78.26)	5/23(21.74)
	MII stage	12	10/12(83.33)	2/12(16.67)
	2-cell stage	17 [#]	14/17(82.35)	3/17(17.65)
	4-cell stage	13	10/13(76.92)	5/13(38.46)
	8-cell stage	15	12/15(80.00)	6/15(40.00)
	morula stage	11	9/11(81.82)	5/11(45.46)
Rhesus monkey	GV stage	66	59/66(89.39)	7/66(10.61)
	MI stage	37	33/37(89.19)	4/37(10.81)
	MII stage	13	10/13(76.92)	3/13(23.08)
	2-cell stage	29 ^{##}	23/29(79.31)	6/29(20.69)
	4-cell stage	23	19/23(82.60)	9/23(39.13)
	8-cell stage	17	13/17(76.47)	7/17(41.18)
	morula stage	14	11/14(78.57)	7/14(50.00)

[#]: 5个胚胎用于移植; 9个胚胎继续体外培养, 其中3个发育成囊胚, 成囊率3/9(33.33%)。^{##}: 15个胚胎用于移植, 2只受体猴妊娠; 14个胚胎继续体外培养, 其中5个发育成囊胚, 成囊率5/14(35.71%)。

[#]: five embryos were transferred; nine embryos were cultured *In vitro*, three of them developed into blastocysts, and the rate of blastocysts forming was 33.33%. ^{##}: fifteen embryos were transferred, and two recipients pregnancy was determined by ultrasonography after 25 days; fourteen embryos were cultured *in vitro*, five of which developed into blastocysts, and the rate of blastocysts forming was 35.71%.

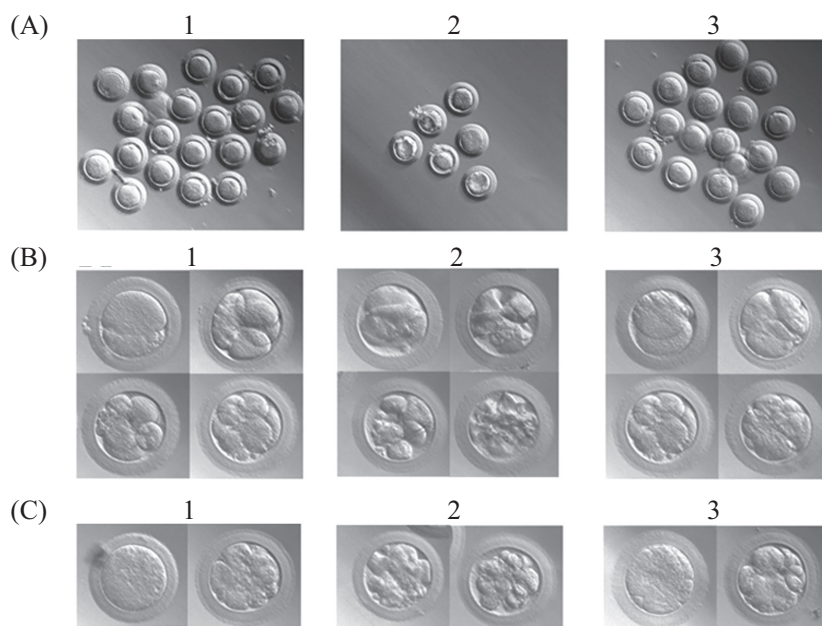


A1: 卵母细胞冻存前形态; A2: 卵母细胞在冻存液中的形态; A3: 卵母细胞解冻后的形态; B1: 卵裂期胚胎冻存前形态; B2: 卵裂期胚胎在冻存液中的形态; B3: 卵裂期胚胎解冻后的形态; C1: 桑椹期胚胎冻存前形态; C2: 桑椹期胚胎在冻存液中的形态; C3: 桑椹期胚胎解冻后的形态。A: 100×; B、C: 200×。

A1: oocytes morphology before freezing; A2: oocytes morphology of freezing stage; A3: oocytes morphology after thawing; B1: cleavage stage embryo morphology before freezing; B2: cleavage stage embryo morphology of freezing stage; B3: cleavage stage embryo morphology after thawing; C1: morula morphology before freezing; C2: morula morphology of freezing stage; C3: morula morphology after thawing. A: 100×; B,C: 200×.

图1 食蟹猴卵母细胞与胚胎璃化冻存前、冻存液孵育中与复苏后的形态

Fig.1 Oocytes and early embryos morphology of cynomolgus monkey before freezing, freezing stage and after thawing



A1: 卵母细胞冻存前形态; A2: 卵母细胞在冻存液中的形态; A3: 卵母细胞解冻后的形态; B1: 卵裂期胚胎冻存前形态; B2: 卵裂期胚胎在冻存液中的形态; B3: 卵裂期胚胎解冻后的形态; C1: 桑椹期胚胎冻存前形态; C2: 桑椹期胚胎在冻存液中的形态; C3: 桑椹期胚胎解冻后的形态。A: 100 $\times$; B、C: 200 $\times$ 。

A1: oocytes morphology before freezing; A2: oocytes morphology of freezing stage; A3: oocytes morphology after thawing; B1: cleavage stage embryo morphology before freezing; B2: cleavage stage embryo morphology of freezing stage; B3: cleavage stage embryo morphology after thawing; C1: morula morphology before freezing; C2: morula morphology of freezing stage; C3: morula morphology after thawing. A: 100 $\times$; B,C: 200 $\times$.

图2 恒河猴卵母细胞与早期胚胎玻璃化冻存前、冻存液孵育中与复苏后的形态

Fig.2 Oocytes and early embryos morphology of rhesus monkey before freezing, freezing stage and after thawing

胞期)和桑椹期胚胎在冻存过程中, 由于冻存液为高渗透压的溶液, 当卵母细胞或胚胎置于冻存液中后, 胚胎会立即出现皱缩现象(图1和图2中的A2、B2和C2), 经过梯度浓度的冻存液处理后, 尽可能地将卵母细胞或胚胎卵裂球中的自由水置换出来, 以避免在冻存和解冻过程中形成冰晶对细胞造成损害。复苏后的卵母细胞和胚胎经过浓度梯度的解冻液后, 形态逐渐恢复如初(图1和图2中的A3、B3和C3)。

3 讨论

玻璃化(vitrification)冷冻法是1985年发展起来的一种快速冷冻胚胎的方法^[15], 它的主要特点是使用快的冷冻和解冻速率以及使用高浓度的低温保护剂, 在超低温环境下凝固, 形成无规则的玻璃化固体, 无任何冰晶形成。这种固态物质能保持液态时的正常分子与离子分布, 而且在整个复温步骤中维持这种状态, 减少了由于细胞内冰晶形成所引起的一系列物理及化学损伤, 使存活率提高。其次是操作简单, 不需要昂贵的设备。慢速冷冻法使用的冷冻保护剂的浓度虽然较低, 但室温状态下冷冻保护

剂与胚胎接触的时间长达2~3 h, 而且随着细胞外冷冻保护液的结冰, 溶液中保护液的浓度会越来越高。而玻璃化冷冻法使用的冷冻保护液的浓度虽然较高, 但冷冻保护液与胚胎接触的时间短。室温条件下本研究严格控制玻璃化冷冻保护液与胚胎接触的总时间在极短的时间内(冻存过程中不超过6 min, 解冻过程中不超过15 min), 保证了胚胎的安全性。

尽管玻璃化冻存技术始于80年代, 但是真正的临床应用是在最近几年才发展起来的, 并且被证实玻璃化冻存是使用最小体积保存胚胎及卵母细胞最有效的方法^[8-9]。最初的玻璃化液是由20.5%二甲亚砜(DMSO)、15.5%乙酰胺、10%丙二醇、6%聚乙二醇组成的混合液称玻璃化液(VS), 用于冷冻小鼠8-细胞胚胎获得了成功。用这种方法冷冻胚胎不会形成冰晶, 但可对胚胎发生毒性和渗透性损伤, 为了控制这种有害作用, 胚胎必须分别暴露在含不同浓度、温度的玻璃液中平衡。此后, 科学家发现了许多冷冻保护剂的混合液如乙二醇与DMSO及乙二醇与聚蔗糖、蔗糖等均被证实是有效的玻璃化液。由于乙二醇的相对分子质量小(浓度为62.07 g/mol), 渗透

性好, 进出胚胎的速度快, 冷冻时能在短时间内产生玻璃化, 对胚胎产生的毒性最小, 解冻时容易从胚胎中渗出而不引起一序列渗透损伤。本研究在已有胚胎冷冻和体外受精技术基础上, 改进冷冻液和解冻液的配方比例, 其中DMSO、乙二醇在ES和VS中均是从7.5%升到15%, 蔗糖在这两溶液中从0变化到0.5 mol/L, 而在TS、DS、WS中, 蔗糖浓度呈梯度降低, 分别为1.0, 0.5, 0 mol/L。加入12 mg/mL的血清可促进玻璃化的形成, 并可降低渗性保护液的毒性, 增加细胞膜的稳定性; 同时, 蔗糖作为低分子化合物在冷冻时有助于细胞脱水, 使胚胎发生收缩, 复苏时有助于除去细胞内的冷冻保护液, 防止水分过快进入细胞而引起细胞渗透性休克。对于冷冻液中15%的DMSO浓度, 经我们反复地摸索, 复苏后对胚胎的毒性不大, 因为我们的冻融过程是在室温条件下完成的, 并且操作中严格控制卵母细胞和胚胎在不同浓度的冷冻液中的停留时间和速度, 大大降低了冷冻液对胚胎产生的毒性。2011年, Yamasaki等^[4]也是采用浓度梯度冷冻液和玻璃化冷冻法冻存食蟹猴的经ICSI得到的4-细胞、6-细胞、8-细胞的胚胎和囊胚, 冷冻液的主要成分是组织培养液TCM199, 其中包含乙醇、二甲基亚砷、蔗糖、SSS。从平衡液(ES)到冻存液(VS), 乙醇从7.5%升到15%, 二甲基亚砷从7.5%升到15%, 蔗糖从0升到0.5 mol/L, SSS恒定为20%; 解冻液主要成分也是组织培养液TCM199, 解冻液(TS)、稀释液(DS)、洗涤液(WS)中蔗糖浓度分别为: 1.0 mol/L、0.5 mol/L、0, SSS恒定为20%。其结果表明, 63个4~8-细胞胚胎冻融后有60个存活(95.2%), 其中37个胚胎移植到24个受体, 7个怀孕(29.2%)。本研究证实, 用冻存叶片(cryoleaf)对经过反向遗传修饰技术(CRISPR/Cas9)处理的食蟹猴、恒河猴的不同分裂期的胚胎进行冷冻和复苏取得初步成果(数据另文发表), 并且冷冻、复苏效率高, 缩小冷冻载体的结构, 减小样本体积, 使样本与液氮直接接触, 从而明显提高降温速度。提高降温速度有利于胚胎迅速通过危险温度地带减少损伤, 也有利于采用较低浓度的保护剂, 减少毒性和渗透性损伤。除了严格控制时间和技术娴熟外, 这个方法相对来说是简单快捷的。

卵子与其他发展阶段如卵裂期胚胎和囊胚相比, 细胞膜通透性和稳定性更差, 表面积与体积比更小, 加上透明带、细胞骨架、纺锤体的因素, 因而更

容易受冷冻损伤。本研究用自己配制的冷冻液和解冻液对食蟹猴和恒河猴的GV期、MI期、MII期卵母细胞冻融进行了初步研究, 镜下形态学观察结果表明, 复苏后卵母细胞的皮质颗粒较新鲜卵母细胞没有明显减少, 卵母细胞纺锤体形态和染色体排列没有受到明显影响, 初步证实此方法对食蟹猴和恒河猴的不同发育期卵母细胞冻融有效。由于非人灵长类动物的卵母细胞冷冻保存研究较少, 而人类卵母细胞冷冻保存研究虽然取得一定进展, 但结果并不一致。Mandelbaum等^[16]报道, 冷冻GV期和MII期卵母细胞的存活率并无显著差异; 也有报道表明, GV期卵母细胞的解冻复苏率比体外成熟的MII期卵母细胞的解冻复苏率明显降低^[17]。在本研究中, GV期卵母细胞的解冻复苏率与MII期卵母细胞的解冻复苏率相比无显著差异, 是否与样本量大小有关, 我们正在进一步研究中。另外, 有研究表明, 冻融后的卵母细胞可以应用ICSI技术克服卵母细胞透明带硬化对受精的影响, 冻融后的卵母细胞存活率和受精率可以达到99.4%和92.9%^[18]。非人灵长类动物卵母细胞的冷冻保存研究有如下意义: 供卵者不必行促排卵方案, 减少了费用和简化了供卵过程, 减少了对雌性猴的损伤; 在不影响卵母细胞存活率的条件下, 提高了受精率; 为建立非人灵长类卵子库提供了更为广阔的前景。

总之, 采用玻璃化冻存方式对非人灵长类动物卵母细胞和经ICSI及特定基因靶向修饰技术获得的早期分裂期胚胎的冻存获得成功, 将为我们下一步建立非人灵长类动物特有品系胚胎库和转基因胚胎库奠定坚实基础, 对进一步的医学生物学研究具有重要价值和意义。

参考文献 (References)

- 1 Pope CE, Pope VZ, Beck LR. Cryopreservation and transfer of baboon embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1986; 3(1): 33-9.
- 2 Summers PM, Shephard AM, Taylor CT, Hearn JP. The effects of cryopreservation and transfer on embryonic development in the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil* 1987; 79(1): 241-50.
- 3 Yeoman RR, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann-Browning AA, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 2001; 16(9): 1965-9.
- 4 Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Okahara J, Sankai T, Torii R. Vitrification and transfer of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2011; 76(1): 33-8.

- 5 DeMayo FJ, Rawlins RG, Dukelow WR. Xenogenous and *In vitro* fertilization of frozen/thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos. *Fertil Steril* 1985; 43(2): 295-300.
- 6 Younis AI, Toner M, Albertini DF, Biggers JD. Cryobiology of non-human primate oocytes. *Hum Reprod* 1996; 11(1): 156-65.
- 7 Karlsson JO, Younis AI, Chan AW, Gould KG, Eroglu A. Permeability of the rhesus monkeys oocyte membrane to water and common cryoprotectants. *Mol Reprod Dev* 2009; 76(4): 321-33.
- 8 Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67(1): 73-80.
- 9 Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Vitrification: An effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(5): 268-73.
- 10 Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85(1): 108-11.
- 11 Hashimoto S, Yarata Y, Kikkawa M, Sonoda M, Oku H, Murata T, *et al.* Successful delivery after the transfer of twice-vitrified embryos derived from *In vitro* matured oocytes: A case report. *Hum Reprod* 2007; 22(1): 221-3.
- 12 中国人类遗传资源卵母细胞冷冻保存技术规程(Technical Specification for the Refrigeration and Preservation of Megagameteocyte of Chinese Genetic Resources) GB/T.1.1-2000; 7-8.
- 13 Mohr LR, Trounson A, Freemann L. Deep-freezing and transfer of human embryos. *J In Vitro Fertil Embryo Trans* 1985; 2(1): 1-3.
- 14 Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Forman R, Hazout A, Volante M, *et al.* Human embryo viability related to freezing and thawing procedures. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157(1): 168-71.
- 15 Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 1985; 313(14): 573-5.
- 16 Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, *et al.* Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod* 1998; 13(Suppl 3): 161-74; discussion 167-75.
- 17 Gound A, Gound P, Qian C, van der Elst J, van Maele G, Dhont M. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and *In vitro* matured MII oocytes: Influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000; 74(3): 487-94.
- 18 Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(1): 72-9.

技术与方法

震惊反射系统在研究小鼠感觉运动门控功能中的应用

王皓月¹ 黄丹仪¹ 李俊² 吴文婷² 应悦¹ 王维刚² 费俭^{1,2*}⁽¹⁾同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ⁽²⁾上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 感觉运动门控功能异常与多种精神疾病相关, 前脉冲抑制是常用的测量感觉运动门控的重要行为学参数。该文介绍了用震惊反射系统测定C57BL/6J品系小鼠前脉冲抑制的实验方法, 并用N-甲基-D-天冬氨酸受体非竞争拮抗剂MK-801(Dizocilpine, 地卓西平)成功构建了药物诱发前脉冲抑制缺失的小鼠模型。

关键词 感觉运动门控; 听震惊反射; 前脉冲抑制; MK-801

Application of Startle Response System in Study of Sensorimotor Gating of Mice

Wang Haoyue¹, Huang Danyi¹, Li Jun², Wu wenting², Ying Yue¹, Wang Weigang², Fei Jian^{1,2*}⁽¹⁾School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ⁽²⁾Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract Dysfunction of sensorimotor gating is related to many kinds of psychiatric disorders. Prepulse inhibition, as a robust operational measure of sensorimotor gating, was tested in C57BL/6J mice using startle response system in this study. Furthermore, a mouse model of PPI disruption induced by MK-801, which is a non-competitive antagonist of the N-methyl-D-aspartate receptor, was successfully established.

Key words sensorimotor gating; acoustic startle reflex; prepulse inhibition; MK-801

震惊反射(startle reflex, SR)是动物对威胁性刺激的保护机制。在突发的强刺激(如声、光等)下, 动物产生全身肌肉屈曲伸直的反射, 即震惊反射, 在行为上表现为惊跳。听震惊反射(acoustic startle reflex, ASR)特指由强烈的声音刺激产生的震惊反射。震惊反射虽然能够使动物快速对威胁性刺激做出反应, 但是会干扰正常的行为活动和认知加工^[1-2]。中枢神经系统天然具有过滤和筛选信息的能力, 来保证思维的连贯性, 这个机制称为感觉运动门控(sensorimotor gating, SG)^[3]。Graham的“加

工-保护”理论认为, 感觉运动门控的意义在于大脑利用此机制对感觉信息进行过滤, 减少后出现的震惊刺激对前脉冲刺激的干扰, 保护对前脉冲刺激信号的早期知觉编码^[4]。具体来讲, 当多个刺激信号分先后出现时, 中枢神经系统优先处理先出现的刺激信号, 即使后出现的信号强度较大也会得到抑制, 这就是所谓的前脉冲抑制(prepulse inhibition, PPI)现象。

前脉冲抑制效率(PPI, %)是目前评估感觉运动门控功能是否完善的重要行为学参数。在强声音刺激之前的一定时间(几十至几百毫秒)内, 先出现一个弱的阈下声音刺激(即前脉冲), 会降低动物对强声音刺激的听震惊反射幅度(startle amplitude, SA), 对震惊反射幅度的抑制率即为PPI^[5]。对于啮齿类动物, 震惊反射幅度和PPI数值可以通过震惊反射系统

收稿日期: 2014-04-18 接受日期: 2014-05-30

*通讯作者。Tel: 021-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

Received: April 18, 2014 Accepted: May 30, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-21-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2014-06-16 15:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0132.html>

(startle response system)获得。当感觉运动门控功能正常时, 动物具有明显的PPI现象; 当该功能缺损时, PPI(%)的数值会显著下降, 称为PPI缺失。

在很多精神疾病中都发现有感觉运动门控失调和前脉冲抑制缺失的现象, 如精神分裂症^[6]、躁狂型抑郁症^[7]、强迫症^[8]、成年自闭症^[9]以及其他与皮质-纹状体-丘脑环路紊乱相关的精神疾病等。由于前脉冲抑制在哺乳动物中是保守的神经生物学过程^[10], 因此可以采用啮齿类动物模型研究感觉运动门控和前脉冲抑制失调的机制, 这对研究和治疗此类精神疾病有重要意义。本文中我们以C57BL/6J小鼠品系为例, 建立了用震惊反射系统(即惊恐箱, startle box)测定小鼠震惊反射和前脉冲抑制的实验方法, 并构建了药物诱发PPI缺失的小鼠模型, 为研究感觉运动门控机制及其相关精神疾病提供了基础数据和技术支持, 也为筛选治疗PPI缺失的药物提供了良好的实验平台。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 动物 6~8周雄性C57BL/6J小鼠, 体重22~30 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司。实验动物饲养和操作均符合AAALAC标准, 并获得上海南方模式生物研究中心伦理委员会的批准。动物饲养于SPF级动物房中, 12 h/12 h黑白交替(7:00~19:00亮/19:00~次日7:00暗), 自由摄取食水。实验完成后, 小鼠安乐死方式为CO₂窒息。

1.1.2 试剂 地卓西平马来酸盐((+) MK-801, hydrogen maleate)购自Sigma公司。

1.1.3 仪器 震惊反射测试系统购自MED Associates公司, 由隔音箱、扩音器、小鼠固定笼、重力感应器(PHM-255A和PHM-250B)和Startle Reflex 5软件系统等主要模块构成(图1)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药 对照组($n=10$): 生理盐水(10 μ L/g); 给药组($n=10$): MK-801(0.25 mg/kg, 生理盐水溶解, 工作液浓度为0.025 mg/mL), 给药方式为腹腔注射, 给药10 min后启动前脉冲抑制测试程序。

1.2.2 输入输出测试(input/output test) 参数设置: 适应时间2 min。Block I设置为14个trials。背景噪音white noise, 65 dB, 全程打开。每个trail之间的间隔在10~30 s之间随机变化。无prepulse stimulus。Startle stimulus设置为white noise, 65~130 dB渐变, 渐变阶梯5 dB; 刺激持续时间20 ms。

1.2.3 短期习惯性测试(short-term habituation test) 参数设置: 背景噪音white noise, 65 dB, 全程打开。适应时间2 min。Block I设置为30个trials。每个trail之间的间隔在10~30 s之间随机变化。无prepulse stimulus。Startle stimulus设置为white noise, 105 dB; 刺激持续时间20 ms。

短期习惯指数计算公式:

$$\text{Habituation index} = \frac{\text{average startle amplitude}_{\text{the last 10 trials}}}{\text{average startle amplitude}_{\text{the first 2 trials}}} \times 100\%$$

1.2.4 前脉冲抑制测试(PPI test) 实验程序设置: 实验程序如图2所示, 在实验阶段背景噪音(white noise, 65 dB)全程打开, 分为适应期、Block I和Block II三个阶段。

参数设置: 适应期持续时间2 min。Block I设置

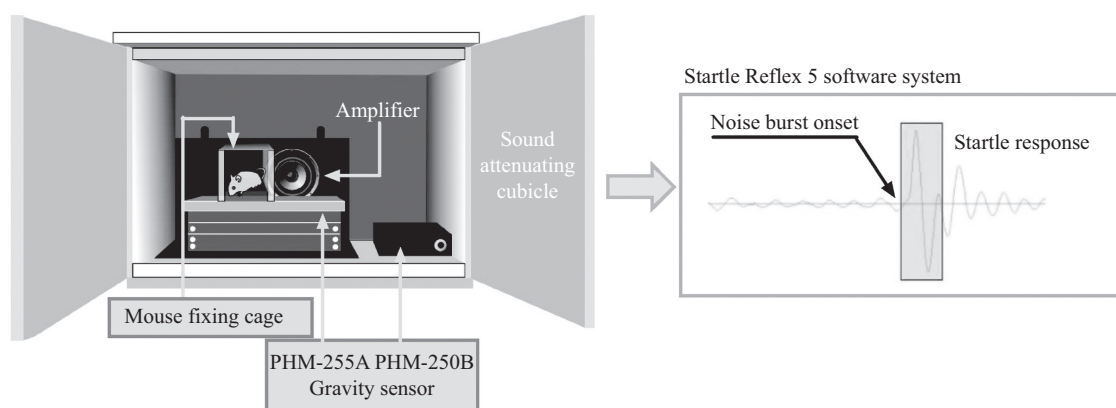


图1 震惊反射系统

Fig.1 Startle response system

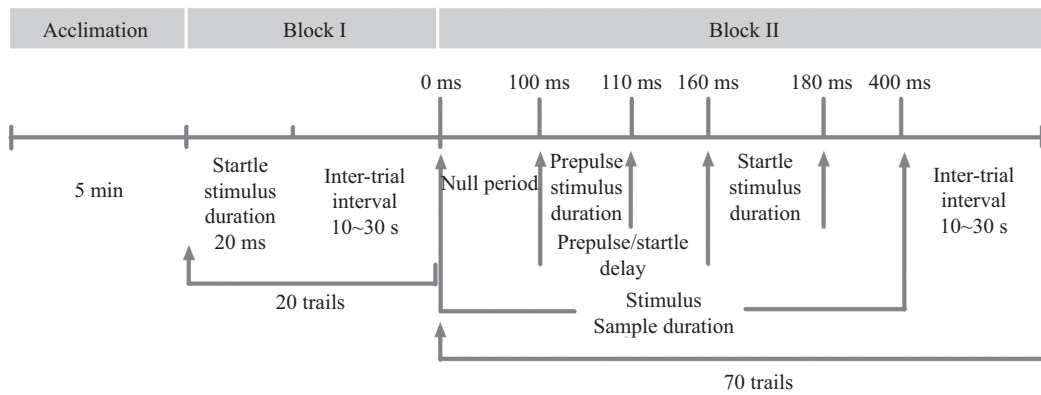


图2 前脉冲抑制测试时间轴

Fig.2 Time line for PPI test

表1 PPI测试Block II参数设置

Table 1 Parameters for Block II of PPI test

前脉冲刺激 Prepulse stimulus	前脉冲刺激与震惊刺激 起始间隔时间 Prepulse/startle delay	震惊刺激 Startle stimulus	震惊反射振幅符号 Startle amplitude symbol
0 dB, 10 ms	60 ms	105 dB, 20 ms	SA _{startle-only} (no prepulse stimulus, no inhibition, negative control)
68 dB, 10 ms	60 ms	105 dB, 20 ms	SA _{68 dBpp}
71 dB, 10 ms	60 ms	105 dB, 20 ms	SA _{71 dBpp}
74 dB, 10 ms	60 ms	105 dB, 20 ms	SA _{74 dBpp}
77 dB, 10 ms	60 ms	105 dB, 20 ms	SA _{77 dBpp}
80 dB, 10 ms	60 ms	105 dB, 20 ms	SA _{80 dBpp}
80 dB, 10 ms	60 ms	0 dB, 20 ms	SA _{pp-only} (no startle stimulus, positive control)

为20个trials; 每个trail无prepulse stimulus; startle stimulus设置为white noise, 105 dB; 刺激持续时间20 ms; Trail之间的间隔在10~30 s之间随机变化。Block II设置为70个trials; 每个trail之间的间隔在10~30 s之间随机变化。Block II中的刺激类型分为7种, 具体组合方式见表1。每种刺激类型在70次trail中出现10次, 出现顺序随机。Prepulse stimulus设置为0, 68(+3), 71(+6), 74(+9), 77(+12), 80(+15) dB, white noise, 持续时间10 ms。Prepulse/startle stimulus delay设置为60 ms。Startle stimulus设置为white noise, 105 dB, 刺激持续时间20 ms。

PPI计算公式:

$$PPI_{\text{dB}}(\%) = (1 - \frac{SA_{\text{dBpp}}}{SA_{\text{startle-only}}}) \times 100\%$$

$$PPI_{\text{pp}}(\%) = (1 - \frac{SA_{\text{pp-only}}}{SA_{\text{startle-only}}}) \times 100\%$$

$$PPI(\%) = (1 - \frac{SA_{\text{pp}}}{SA}) \times 100\%$$

1.2.5 数据统计 实验数据以mean±S.E.M.形式表示。数据统计用GraphPad Prism 5软件进行。显著性差异分析采用t-test, $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 C57BL/6J小鼠品系震惊反射阈值

在设计前脉冲抑制实验方案之前, 我们首先需对C57BL/6J品系小鼠进行输入输出测试, 以明确该品系小鼠能够产生显著震惊反射的声音强度阈值。小鼠放置于重力感应器之上的固定笼中, 在背景噪音65 dB的环境下适应2 min后, 从低到高连续听65~130 dB的声音刺激, 其震惊反射幅度由重力感应器采集。结果显示, 随着声音响度的增强, 小鼠的震惊反射幅度逐步上升, 呈现出S形曲线(图3)。对于C57BL/6J小鼠, 65~80 dB的声音刺激不会引起显著的震惊反射, 从85 dB开始出现显著的震惊反射, 并且随着刺激强度增加, 震惊反射幅度上升。

当刺激强度大于100 dB时, 震惊反射幅度进入平台期。鉴于以上结果, 我们在后续实验中选用处于稳定平台期的105 dB作为震惊反射的刺激强度; 在前脉冲抑制实验中选用低于80 dB的声音刺激(阈下刺激)作为前脉冲刺激强度。

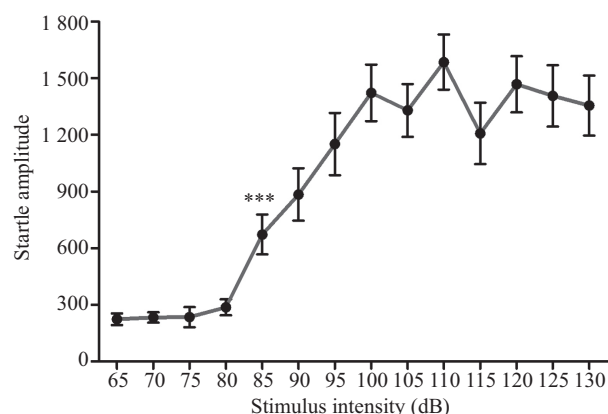
2.2 C57BL/6J小鼠短期习惯指数

动物连续经历多次强声音刺激时, 其震惊反射幅度会逐渐下降, 这一现象被称为短期习惯性(short-term habituation)。测试短期习惯性时, 小鼠连续经历30次相同的强声音刺激(105 dB), 记录每次的震惊反射强度。结果显示, 随着经历刺激次数的增加, C57BL/6J小鼠的震惊反射略有下降, 短期习惯性指数仅为 $(87.64 \pm 7.82)\%$ ($n=16$), 约经历20次刺激后进入平台期(图4)。

2.3 C57BL/6J小鼠前脉冲抑制测定

根据输入输出测试结果, 我们选择了105 dB作为震惊刺激的强度, 选择了 ≤ 80 dB的5种阈下刺激68, 71, 74, 77, 80 dB(分别比背景噪声65 dB高出3, 6, 9, 12, 15 dB)作为前脉冲刺激。根据短期习惯性测试结果, 我们在Block I设置20次重复强刺激。前脉冲抑制实验的方案及具体参数见图2和表1。

实验结果显示, 5种强度的前脉冲刺激均能显著抑制105 dB刺激产生的震惊反射振幅(图5A)。如图5B所示, 随着前脉冲刺激的强度由68 dB增加到80 dB, 前脉冲抑制效率从 $(24.83 \pm 5.37)\%$ 增加到 $(34.67 \pm 5.30)\%$ 。但是与 $PPI_{68 \text{ dBpp}}$ 相比, 只有 $PPI_{77 \text{ dBpp}}$ 与



在不同强度的声音(65~130 dB)刺激下产生的震惊反射幅度。数据表述为平均值±标准误差。实验小鼠数量为20只。SA_{85 dB} vs SA_{65 dB}, *** $P < 0.001$; SA_{80 dB} vs SA_{65 dB}, 无显著性差异。

Startle amplitudes at different stimulus intensity (65~130 dB) were shown. Mean±S.E.M., $n=20$. SA_{85 dB} vs SA_{65 dB}, *** $P < 0.001$; SA_{80 dB} vs SA_{65 dB}, no significant difference.

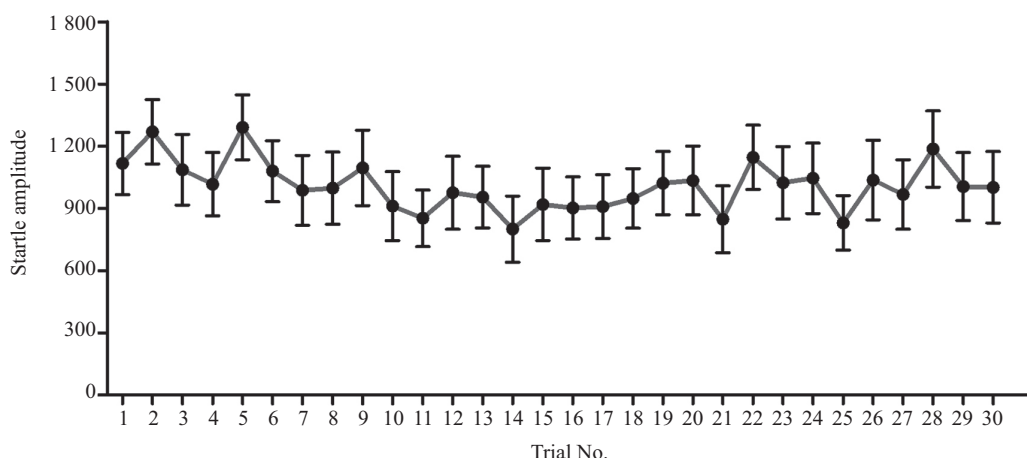
图3 C57BL/6J小鼠输入输出曲线

Fig.3 Input/output curve of C57BL/6J mice

之有显著性差异(图5B)。

2.4 药物诱发C57BL/6J小鼠前脉冲抑制缺失

我们在以上实验平台基础上构建了药物MK-801诱发PPI缺失的小鼠模型。实验结果表明, 在PPI测试之前的10 min腹腔注射MK-801, 68, 71, 74, 80 dB的前脉冲刺激均不能够显著抑制105 dB刺激产生的震惊反射振幅(图6A)。在68 dB到80 dB前脉冲刺激条件下, 注射MK-801的C57BL/6J小鼠, 其PPI均显著低于同等条件下注射生理盐水组的PPI(图6B)。

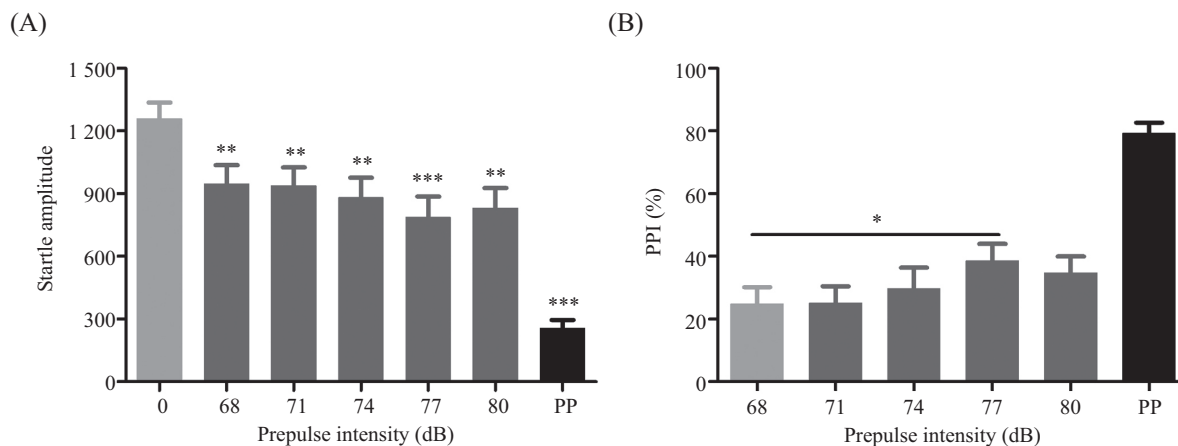


C57BL/6J小鼠连续30次在105 dB声音刺激下产生的震惊反射幅度。数据表述为平均值±标准误差, 实验小鼠数量为16只。

Startle amplitudes of C57BL/6J mice in response to 30 startle stimulus (105 dB) were shown. Mean±S.E.M., $n=16$.

图4 C57BL/6J小鼠短期习惯性曲线

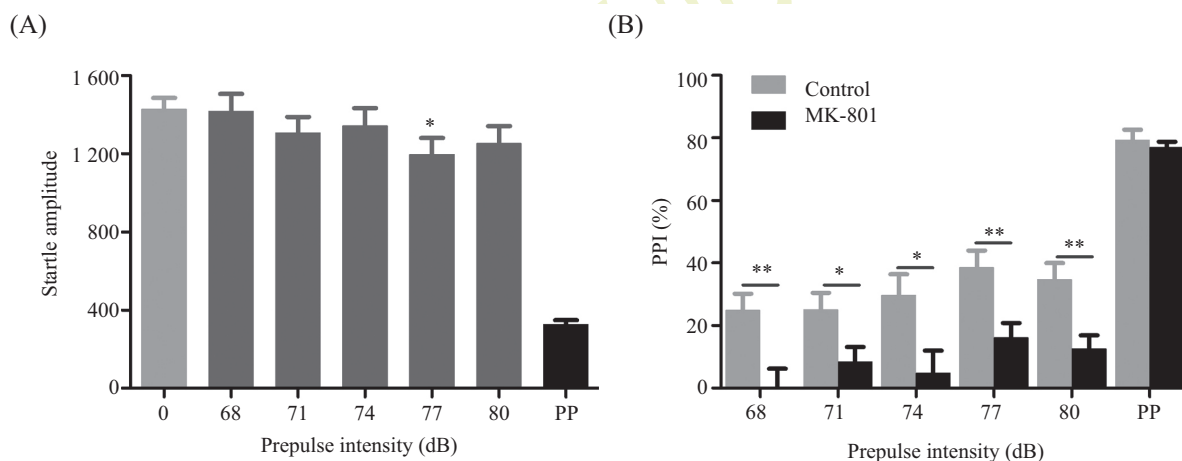
Fig.4 Short-term habituation curve of C57BL/6J mice



A: 不同前脉冲刺激条件下的震惊反射幅度, 对照为0 dB前脉冲刺激组; B: 不同前脉冲刺激条件下的PPI值, 对照为68 dB前脉冲刺激组。数据表述为平均值±标准误差。实验小鼠数量为10只。PP: 只有80 dB前脉冲刺激, 没有震惊刺激。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: startle amplitudes at different prepulse intensity, 0 dB prepulse condition as control; B: PPIs at different prepulse intensity, 68 dB prepulse condition as control. Mean±S.E.M., $n=10$. PP: 80 dB prepulse only and no startle stimulus. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 C57BL/6J小鼠前脉冲抑制效果
Fig.5 Prepulse inhibition of C57BL/6J mice



A: 注射MK-801后不同前脉冲刺激条件下的震惊反射幅度, 对照为0 dB前脉冲刺激组; B: 不同前脉冲刺激条件下的PPI值。Control: 生理盐水; MK-801: 0.25 mg/kg MK-801。数据表述为平均值±标准误差。实验小鼠数量为每组10只。PP: 只有80 dB前脉冲刺激, 没有震惊刺激。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: startle amplitudes at different prepulse intensity after MK-801 intraperitoneal injection, 0 dB prepulse condition as control; B: PPIs at different prepulse intensity. Control: saline; MK-801: 0.25 mg/kg MK-801. Mean±S.E.M., $n=10$. PP: 80 dB prepulse only and no startle stimulus. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图6 MK-801诱导C57BL/6J小鼠前脉冲抑制缺失
Fig.6 Prepulse inhibition of C57BL/6J mice deficit induced by MK-801

3 讨论

本文建立了C57BL/6J小鼠听震惊反射前脉冲抑制的测量方法, 结果表明, 震惊反射可以被比背景噪声高出3, 6, 9, 12, 15 dB的5种前脉冲刺激显著抑制。由于物种、品系及年龄等因素的影响, PPI的测定方案中, 很多参数(如震惊刺激强度与时间、前脉冲刺激强度与时间、前脉冲刺激与震惊刺激起始时间间隔等)是难以统一的^[11-13]。在我们的研究中, 确

立了雄性C57BL/6J小鼠能够有效产生PPI的一系列重要参数, 为今后研究该品系背景小鼠的感觉运动门控功能提供了良好的实验平台。

我们采用MK-801作为诱导剂, 构建了药物诱发PPI缺失的小鼠模型。MK-801(Dizocilpine, 地卓西平)作用于中枢神经谷氨酸能系统, 是N-甲基-D-天冬氨酸受体非竞争性拮抗剂^[14]。该药物常常被用于构建啮齿类精神分裂症动物模型, 可以有效地引起

动物多动、刻板行为和PPI缺失^[15]。在本研究中,我们采用一次性腹腔注射MK-801水溶液的方法,确定了C57BL/6J小鼠在0.25 mg/kg MK-801作用下能够引起PPI显著缺失,说明该PPI检测系统的结果可靠。与文献结果比较,引起昆明种小鼠和C57BL/6J小鼠PPI显著缺失的MK801剂量均为0.25 mg/kg^[16],高于WS品系和SD品系大鼠需要的剂量(0.05 mg/kg)^[17]。

在短期习惯性实验中,我们发现30次连续重复刺激下,C57BL/6J小鼠的震惊反射下降幅度很小,短期习惯性指数仅为(87.64±7.82)%。而文献中报道的昆明种小鼠的短期习惯性指数可以达到58%^[16]。我们推测这种差异可能由小鼠品系特异性引起的。在选择prepulse stimulus音量时,我们遵循不引起小鼠震惊反射的原则,因此选择了85 dB以下的68, 71, 74, 77和80 dB,得到了显著的PPI效果。特别值得注意的是,MK-801可以提高小鼠的震惊反射幅度。如果prepulse stimulus音量过大会使注射了MK-801的小鼠对prepulse stimulus产生震惊反射,反而增强对startle stimulus的震惊反射,出现PPI呈负值的现象。而我们测定PPI的实验方案避免了C57BL/6J品系小鼠在注射MK-801后的PPI出现负值。

PPI检测实验平台可以在研究感觉运动门控机制方面提供实验证据。PPI是一种不经过大脑皮层的快速自主神经反应,涉及的神经环路集中于耳蜗神经核、下丘脑、脑桥脚被盖核和脑桥尾部网状核,直接作用于感觉运动中枢^[18]。海马、前额叶皮层、基底外侧杏仁核和伏隔核等边缘系统参与PPI的调节^[19]。当小鼠以上脑区损伤或有特异性基因缺陷时,可能引起PPI异常。

PPI异常还与很多精神疾病相关。目前,与PPI缺失关系最密切的精神疾病是精神分裂症。精神分裂症是一种病因复杂的恶性精神疾病,近年来研究显示,该疾病主要根源在于感觉运动门控功能缺陷^[20]。精神分裂症患者正是因为不能够对环境纷繁复杂的感觉信息进行有效筛选,即PPI缺失,造成大脑过度刺激,引起幻觉、刻板行为、不良情绪及认知缺陷等症状。多项研究显示,精神分裂症患者有PPI缺失的症状^[6,21-25]。因此,如果在实验动物上发现刻板行为、焦虑、注意力和认知缺陷等行为现象时,可以考虑进行PPI检测,以判断其是否因感觉运动门控缺失造成以上行为表型。

此外,强迫症和图雷特氏综合征(Gilles de la

Tourette's syndrome, GTS)中,感觉运动门控紊乱和PPI缺失的症状也已经明确^[18]。也有报道显示,焦虑症、自闭症、脆性X综合征(fragile X syndrome)等精神疾病也与PPI缺失相关^[18,26]。因此,以上我们建立的实验系统可以用于挖掘转基因或基因敲除小鼠与此类精神疾病相关的表型,或可以用于筛选治疗以上疾病的药物。

参考文献 (References)

- 1 Foss JA, Ison JR, Torre JP Jr, Wansack S. The acoustic startle response and disruption of aiming: I. Effect of stimulus repetition, intensity, and intensity changes. *Hum Factors* 1989; 31(3): 307-18.
- 2 Foss JA, Ison JR, Torre JP Jr, Wansack S. The acoustic startle response and disruption of aiming: II. Modulation by forewarning and preliminary stimuli. *Hum Factors* 1989; 31(3): 319-33.
- 3 Braff DL, Geyer MA. Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry* 1990; 47(2): 181-8.
- 4 Fendt M, Li L, Yeomans JS. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 156(2/3): 216-24.
- 5 Cadenhead KS, Carasso BS, Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Prepulse inhibition and habituation of the startle response are stable neurobiological measures in a normal male population. *Biol Psychiatry* 1999; 45(3): 360-4.
- 6 Parwani A, Duncan EJ, Bartlett E, Madonick SH, Efferen TR, Rajan R, *et al.* Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000; 47 (7): 662-9.
- 7 Perry W, Minassian A, Feifel D, Braff DL. Sensorimotor gating deficits in bipolar disorder patients with acute psychotic mania. *Biol Psychiatry* 2001; 50(6): 418-24.
- 8 Ahmari SE, Risbrough VB, Geyer MA, Simpson HB. Impaired sensorimotor gating in unmedicated adults with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37(5): 1216-23.
- 9 Perry W, Minassian A, Lopez B, Maron L, Lincoln A. Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol Psychiatry* 2007; 61(4): 482-6.
- 10 Li L, Du Y, Li N, Wu X, Wu Y. Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci Biobehav Rev* 2009; 33(8): 1157-67.
- 11 Bullock AE, Slobo BS, Vazquez V, Collins AC. Inbred mouse strains differ in the regulation of startle and prepulse inhibition of the startle response. *Behav Neurosci* 1997; 111(6): 1353-60.
- 12 Grillon C, Baas J. A review of the modulation of the startle reflex by affective states and its application in psychiatry. *Clin Neurophysiol* 2003; 114(9): 1557-79.
- 13 Yeomans JS, Bosch D, Alves N, Daros A, Ure RJ, Schmid S. GABA receptors and prepulse inhibition of acoustic startle in mice and rats. *Eur J Neurosci* 2010; 31(11): 2053-61.
- 14 Kovacic P, Somanathan R. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): Electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3(1): 13-22.

- 15 Guo C, Yang Y, Su Y, Si T. Postnatal BDNF expression profiles in prefrontal cortex and hippocampus of a rat schizophrenia model induced by MK-801 administration. *J Biomed Biotechnol*; 2010: 783297.
- 16 Yan H, Li SL, Su RB, Gong ZH. Establishment and application of a mouse model for drug-induced schizophrenia. *Acta pharmaceutica Sinica* 2013; 48(4): 484-8.
- 17 Bast T, Zhang W, Feldon J, White IM. Effects of MK801 and neuroleptics on prepulse inhibition: Re-examination in two strains of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67(3): 647-58.
- 18 Kohl S, Heekeren K, Klosterkötter J, Kuhn J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders—apart from schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2013; 47(4): 445-52.
- 19 Larrauri J, Schmajuk N. Prepulse inhibition mechanisms and cognitive processes: A review and model. *EXS* 2006; 98: 245-78.
- 20 Quednow BB, Frommann I, Berning J, Kuhn KU, Maier W, Wagner M. Impaired sensorimotor gating of the acoustic startle response in the prodrome of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2008; 64(9): 766-73.
- 21 Minassian A, Feifel D, Perry W. The relationship between sensorimotor gating and clinical improvement in acutely ill schizophrenia patients. *Schizophr Res* 2007; 89(1/2/3): 225-31.
- 22 Weike AI, Bauer U, Hamm AO. Effective neuroleptic medication removes prepulse inhibition deficits in schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 2000; 47(1): 61-70.
- 23 Lehtinen EK, Ucar E, Glenthøj BY, Oranje B. Effects of melatonin on prepulse inhibition, habituation and sensitization of the human startle reflex in healthy volunteers. *Psychiatry Res* 2014; 216(3): 418-23.
- 24 Takahashi H, Iwase M, Ishii R, Ohi K, Fukumoto M, Azechi M, *et al.* Impaired prepulse inhibition and habituation of acoustic startle response in Japanese patients with schizophrenia. *Neurosci Res* 2008; 62(3): 187-94.
- 25 Wang ZR, Tan YL, Yang FD, Zhang WF, Zou YZ, Tan SP, *et al.* Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in Chinese patients with first-episode, medication-naïve schizophrenia. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(3): 526-31.
- 26 Nielsen DM, Derber WJ, McClellan DA, Crnic LS. Alterations in the auditory startle response in *Fmr1* targeted mutant mouse models of fragile X syndrome. *Brain Res* 2002; 927(1): 8-17.

初断乳大鼠视网膜微血管周细胞的分离培养

杨密清^{1#} 刘光辉^{2#} 王 航¹ 黄陈稳³ 郑永征² 任秉仪² 周子鑫² 杨 巍¹ 纪斌峰¹ 孟 春^{1*}

(¹福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108; ²福建中医药大学附属人民医院, 福州 350004;

³同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 探讨、优化初断乳大鼠视网膜微血管周细胞(retinal microvascular pericytes, RMPs)的分离、培养方案。分别从15只初断乳大鼠及15只成年大鼠中剝取眼球, 采用眼科显微手术器械分离获取视网膜, 经碎化、消化、过滤处理, 收集视网膜微血管片段, 予接种培养。MTT法测绘RMPs生长曲线, 通过倒置显微镜观察RMPs形态, 免疫荧光法鉴定周细胞标记物。比较2组之间视网膜分离操作时间、完整性、原代细胞数量、周细胞形态和表面标记物表达。结果显示, 初断乳大鼠视网膜均成功分离, 其中24眼视网膜呈整片分出, 6眼视网膜破裂呈碎片状, 单个眼球视网膜分离时间为14.3~45.5 s。视网膜分离操作时间及完整性与成年大鼠差异无统计学意义($P>0.05$), 初断乳大鼠原代RMPs细胞产量较成年大鼠高, 细胞增殖能力强, 细胞形态及表面标记物与成年大鼠一致。研究表明, 初断乳大鼠视网膜是一种可用于RMPs培养的良好组织原料, 该实验成功建立了初断乳大鼠RMPs分离培养体系。

关键词 初断乳大鼠; 视网膜微血管; 周细胞; 分离; 培养

Isolation and Cultivation of Retinal Microvascular Pericytes from Weanling Rats

Yang Miqing^{1#}, Liu Guanghui^{2#}, Wang Hang¹, Huang Chenwen³, Zheng Yongzheng², Reng Bingyi², Zhou Zixin², Yang Wei¹, Ji Binfeng¹, Meng Chun^{1*}

(¹College of Biological Science and Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

²Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China;

³School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract The aim of this work was to culture retinal microvascular pericytes (RMPs) from weanling rat and optimize the protocol for isolation and cultivation of rat RMPs. The retinas were obtained separately from weanling rats ($n=15$) and adult rats ($n=15$) by ophthalmic microsurgery instruments. RMPs were isolated from the retinas by mechanical morcel, enzymatic digestion and filtration, and were cultivated. Cell growth was assessed by MTT. Morphological examination of RMPs was performed by inverted microscopy, and further characterization was analyzed by immunofluorescence. The differences in isolating-time, integrity-ratio, total-numbers, morphol-

收稿日期: 2013-12-10 接受日期: 2014-03-07

国家自然科学基金(批准号: 81102619)和福建省自然科学基金(批准号: 2011J01197)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0591-22866379, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

Received: December 10, 2013 Accepted: March 7, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81102619) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2011J01197)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-591-22866379, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

网络出版时间: 2014-06-26 14:30 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0410.html>

ogy, and marker-expression were observed. All retinas of weanling rats were successfully isolated. 24 of them were intact and 6 of them were broken fragmentarily. The time for isolating retina from a single eye was about 14.3~45.5 seconds. The isolating-time, integrity-ratio of 2 groups showed no significant difference ($P>0.05$). There was no significant difference in morphology and marker expression between the 2 groups. But the total numbers of primary RMPs and the proliferative ability of the cells from weanling rats were higher than those from adult rats. These results suggested that the retinas of weanling rats were favorable tissue source for RMPs culture. Here we established a protocol for the isolation and cultivation of RMPs from weanling rats.

Key words weanling rat; retinal microvessel; pericytes; isolation; cultivation

视网膜微血管周细胞(retinal microvascular pericytes, RMPs)是视网膜微血管的重要组成部分,与内皮细胞及基底膜共同构成微血管壁。RMPs因其在微血管发生、成熟、稳定、重塑等生理病理过程中发挥重要的调控作用^[1-2]而日益受到关注。既往RMPs体外相关研究多采用人源^[3-5]、猴源^[6]或牛源性^[7-9]细胞。但是受人、猴、牛视网膜获取不便的影响,研究的开展受到了一定的限制。自2003年来,已有学者探索从转基因或普通成年大鼠中分离培养RMPs并取得了成功^[10-11],但是分离、培养的过程仍有待优化。本实验拟在前期研究的基础上比较探讨初断乳大鼠在RMPs分离培养中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验采用健康清洁级雄性SD大鼠30只,分为初断乳大鼠组和成年大鼠组2组。其中3周龄初断乳大鼠15只,体重 40 ± 5 g;6周龄成年大鼠15只,体重 200 ± 5 g。购买自上海斯莱克实验动物有限责任公司。实验动物的使用遵循国家科学技术委员会1988年颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂 低糖(1 g/L)型DMEM培养基(Hyclone公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone公司),I型胶原酶(Sigma公司), α 型平滑肌肌动蛋白小鼠抗大鼠单克隆抗体(α -smooth muscle actin, α -SMA, Sigma公司),血小板源性生长因子受体- β (platelet-derived growth factor receptor- β , PDGFR- β)兔多克隆抗体(Santa Cruz公司),胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)小鼠抗大鼠单克隆抗体(Santa Cruz公司),vWF(von Willebrand Factor, vWF)兔多克隆抗体(Santa Cruz公司)。

1.1.3 主要耗材及仪器 六孔板(Corning公司),眼科显微剪、镊、虹膜恢复器(苏州六六视觉科技股

份有限公司),CO₂细胞培养箱(Nuaire公司),倒置显微镜(重庆光学仪器公司),佳能600D数码相机(Cannon公司),酶标仪Model550(Tecan公司),TCS SP5激光共聚焦显微镜(Leica公司)。

1.2 方法

1.2.1 RMPs的分离培养 按既往报道方式^[5,12]进行,所有实验相关器械均经灭菌处理,所有操作都在无菌的环境中进行,视网膜分离碎化等相关操作均在PBS中进行。(1)予大鼠脱椎处死后立即摘取眼球,将其置于含有1%青链双抗的PBS中。10 min后将眼球转移至75%酒精中浸泡消毒60 s,取出再次置入PBS中冲洗3次。于视神经根部处夹持固定眼球,沿角巩膜缘处剪开眼球,用显微虹膜恢复器自视神经根部起轻轻推出视网膜,去除眼前节内容物及玻璃体,在PBS中轻轻漂洗3次去除残留玻璃体等杂质,备用。以上操作由同一实验人员进行,操作过程中统计眼球直径及单个眼球视网膜分离时间和完整性。(2)将视网膜反复剪切至呈均匀细小片状。加入2~3 mL 2 g/L的I型胶原酶,轻轻吹打均匀,37 °C细胞培养箱中消化25 min。加入含有20% FBS的DMEM终止消化。过55 μ m滤网,翻转滤网,冲洗收集含微血管片段洗脱液,4 °C 250 g离心5 min。吸除上清液,加入适量DMEM将沉淀轻轻吹打混匀,接种于6孔板。

将6孔板置于5% CO₂的细胞培养箱中37 °C下培养。72 h内禁止移动培养板。72 h后开始更换培养基,每3 d更换1次培养基。换液时,禁止吹打以免影响贴壁的微血管碎片。当细胞长满孔底的80%~90%时即行消化传代。弃旧培养基,以PBS清洗1次,加入0.25%胰蛋白酶37 °C下消化1~2 min。在显微镜下观察消化进程,见杂质细胞开始收缩变圆而RMPs尚变化不明显时,吸除胰蛋白酶,加入DMEM终止消化。吹打培养板孔底以促进杂质细胞

脱壁, 弃培养基并以PBS清洗2次。再次加入胰蛋白酶消化2~3 min。细胞回缩变圆时, 吸除胰蛋白酶终止消化, 加入DMEM吹打促进细胞脱壁, 细胞计数板计数细胞密度, 统计两组原代RMPs总量。消化后按1:2的比例接种培养次代细胞, 次代细胞培养改用含10% FBS的DMEM。

取第3代近融合的RMPs, 消化后调整细胞密度为 $1\times 10^4/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 接种于96孔板中, 每孔接种100 μL , 每3 d换液1次。按文献[11]的方法测绘细胞生长曲线。

1.2.2 细胞鉴定 形态学鉴定在倒置显微镜下进行, 观察细胞的生长形态, 依据细胞形态对RMPs进行初步鉴定。免疫荧光鉴定在激光共聚焦显微镜下进行, 参照文献[13]的方法以周细胞标记物 $\alpha\text{-SMA}$ 和PDGFR- β 、内皮细胞标记物vWF、神经胶质细胞标记物GFAP等相关抗体进行鉴定。

1.2.3 统计方法 用SPSS 11.5进行数据处理。定量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示, 其中正态分布比较采用 t 检验。

定性资料的比较采用 χ^2 检验(精确概率法)。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠眼球视网膜的分离制备

初断乳大鼠眼球较成年大鼠小($P<0.05$), 视网膜的分离操作较成年大鼠难度大, 但是采用本方法进行处理, 两组间的分离时间及完整性相较无统计学差异(表1)。两组均全部成功分离出视网膜。初断乳大鼠组中24眼视网膜呈整片分出, 6眼视网膜破裂呈碎片状且耗时较长, 单个眼球视网膜分离时间为14.3~45.5 s。成年大鼠组中29眼视网膜呈整片分出, 1眼视网膜破裂呈碎片状且耗时最长, 单个眼球视网膜分离时间为13.7~49.7 s。

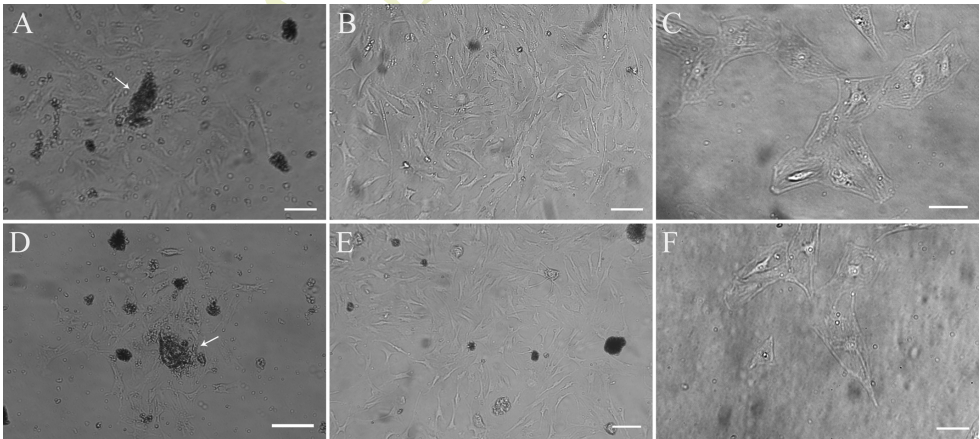
2.2 初断乳大鼠RMPs生长特性的研究

两组视网膜微血管碎片在接种后24 h内即可贴壁。RMPs在接种后24~48 h开始游溢出微血管片段, 以微血管片段为中心贴壁生长。此时细胞较

表1 眼球直径、视网膜完整性及分离时间的比较
Table 1 Comparison of eye diameter, integrity and isolating-time of retina

组别 Group	眼数(n) Cases (n)	眼球直径(mm) Eye diameter (mm)	分离时间(s) Isolating-time (s)	完整性(%) Integrity (%)
Weanling rat group	30	$4.1\pm 0.3^*$	27.0 ± 8.9	80
Adult rat group	30	6.0 ± 0.3	23.3 ± 6.7	96.7

* $P<0.05$, 与成年大鼠组比较。
* $P<0.05$ compared with adult rat group.



A~C: 初断乳大鼠组; D~F: 成年大鼠组。A、D: RMPs从微血管碎片(箭头)中移出, 绕其周边生长(孵育72 h); B、E: RMPs细胞集落示细胞排列紧密, 形态难辨, 期间夹杂少量杂质细胞(孵育10 d); C、F: 部分散在生长的RMPs胞体宽大扁平, 呈不规则三角形, 伴有多个突起。标尺=100 μm 。
A~C: weanling rat group; D~F: adult rat group. A,D: RMPs migrated out of and grew from a central retinal microvascular fragment (white arrow) at 72 h; B,E: RMPs appeared as colonies of dense cells with illegible outline mixed with a few of contaminating cells (on day 10); C,F: some sparsely spreading cells presented with large flat irregular triangular cell bodies with multiple long processes. Scale bar=100 μm .

图1 大鼠原代RMPs
Fig.1 Primary RMPs of rat

小, 呈不规则三角形(图1A和图1D)。在96 h时, 镜检见初断乳大鼠组游溢出的细胞群落数较成年大鼠多。原代RMPs生长缓慢, 约7 d后形成中等大的细胞集落(图1B和图1E), 14~16 d后可以达到近融合状态(80%~90%融合)。近融合时, 细胞集落处细胞排列紧密, 无接触性抑制, 可见多层重叠生长而难辨形态。部分散在生长的RMPs胞体宽大、扁平(图1C和图1F)。14 d时消化、统计原代RMPs每孔总数(共统计了5个批次实验统计数据), 其中初断乳大鼠组原代RMPs平均约 7.4×10^4 /孔, 成年大鼠组平均约 4.2×10^4 /孔, 两组间原代细胞数量的差异具有统计学

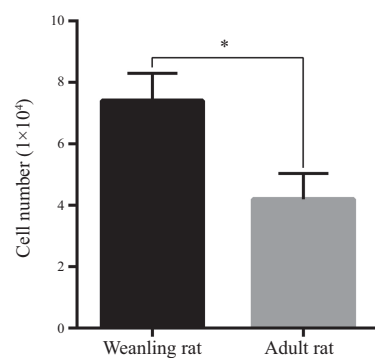
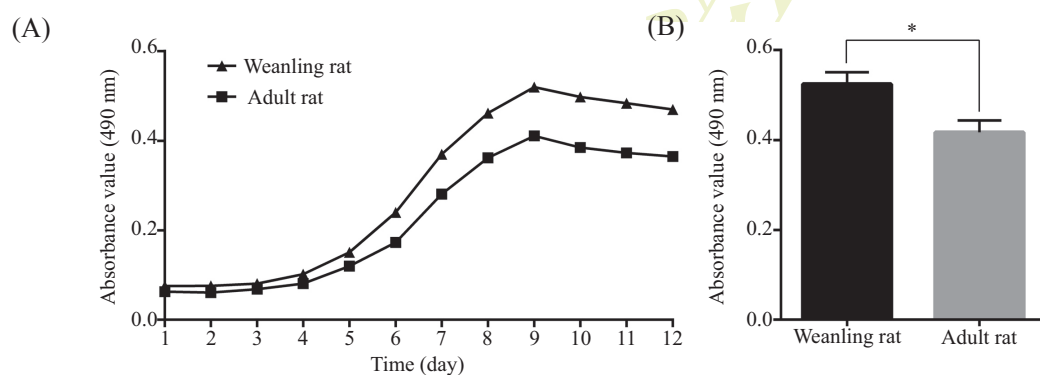
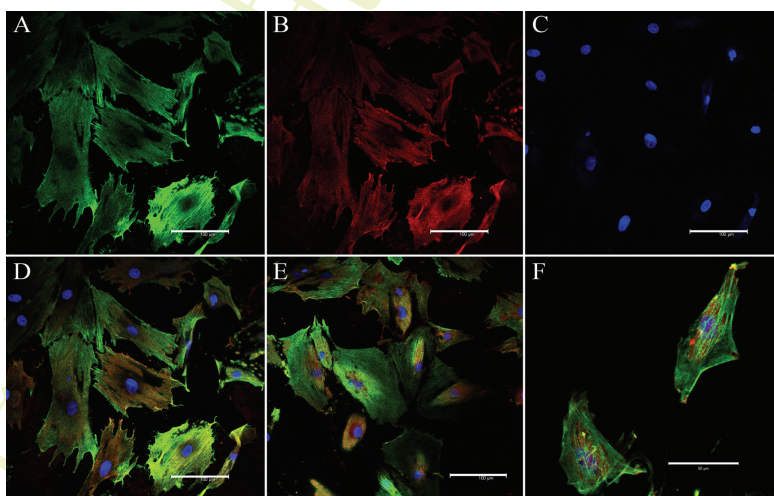


图2 原代RMPs平均总量(每孔)
Fig.2 Average total numbers of primary RMPs (per well)



A: RMPs生长曲线。吸光度值表示RMPs的相对细胞量。RMPs 4~7 d进入对数生长期, 10~12 d进入平台期; B: 第9 d时两组吸光度值比较。
A: growth curve of RMPs. Absorbance value indicated the relative cell number of RMPs. The cells entered log phase by day 4~7, and transitioned to stationary phase by day 10~12; B: comparison of absorbance value on the 9th day.

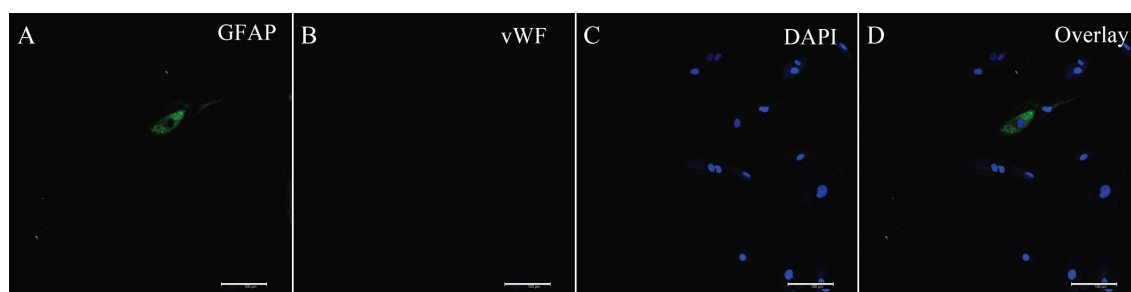
图3 RMPs生长特性
Fig.3 Growth feature of RMPs



A~D: 初断乳大鼠第3代RMPs免疫荧光染色。A: α -SMA阳性表达; B: PDGFR- β 阳性表达; C: DAPI核染; D: A~C复合图; E: 成年大鼠第三代RMPs免疫荧光染色复合图(α -SMA+PDGFR- β +DAPI); F: 初断乳大鼠原代RMPs孵育48 h免疫荧光染色复合图(α -SMA+PDGFR- β +DAPI)。A~E: 标尺=100 μ m, F: 标尺=50 μ m。

A~D: immunofluorescence of weanling rat RMPs at passage 3. A: positive staining of α -SMA; B: positive staining of PDGFR- β ; C: nuclear DAPI staining; D: overlay of A to C; E: immunofluorescence of adult rat RMPs at passage 3 (Overlay: α -SMA+PDGFR- β +DAPI); F: immunofluorescence of weanling rat RMPs at 48 h (Overlay: α -SMA+PDGFR- β +DAPI). A~E: scale bar=100 μ m, F: scale bar=50 μ m.

图4 RMPs免疫荧光鉴定
Fig.4 Immunofluorescence of RMPs



A: 极少量细胞GFAP阳性表达, 呈绿色荧光, 为神经胶质细胞; B: 内皮细胞标记物vWF阴性表达; C: DAPI核染; D: A-C复合图。A~D: 标尺=100 μ m。

A: little positive staining of GFAP of glial cell with green fluorescence; B: negative staining of vWF, marker of endothelial cell; C: nuclear DAPI staining; D: overlay of A to C. A~D: scale bar=100 μ m.

图5 RMPs培养中杂质细胞的鉴定
Fig.5 Identification of impure cells in RMPs culture

意义($P<0.05$)(图2)。

传代后RMPs在4 h内开始贴壁, 细胞由圆形伸展为不规则三角形, 4~6 d后细胞生长增殖形成片状, 8~10 d后形成密集的细胞层, 胞体较窄。10~12 d后细胞铺满整个孔板, 致密排列, 重叠多层。传代细胞生长速度较原代明显加快, 绘测生长曲线显示次代RMPs 5~7 d进入对数生长期, 至10~12 d进入平台期(图3A)。其中初断乳大鼠RMPs增殖速度与能力较成年大鼠强($P<0.05$)(图3B)。

2.3 初断乳大鼠RMPs的鉴定及表征

胞体扁平呈不规则三角形或多角形并伴有多个突起者初步判定为RMPs。两组细胞形态无明显差异, 呈典型RPMs形态, 并可以传代至第9代无明显形态变化。免疫荧光鉴定显示, 呈RMPs形态的细胞其原代及传代细胞均表达周细胞标记物 α -SMA和PDGFR- β (图4), 未见表达阴性者。RMPs不表达内皮细胞特异性标记物vWF、胶质细胞特异性标记物GFAP(图5)。两组RMPs免疫荧光结果无明显差异。所有细胞中未见vWF阳性表达的细胞, 极少量细胞GFAP表达阳性(图5), 96%以上的细胞同时表达RMPs标记物 α -SMA和PDGFR- β 。

3 讨论

周细胞是微血管的重要组成部分, 其在微血管生理病理活动中扮演了重要角色^[14]。研究表明, RMPs与糖尿病视网膜病变等视网膜新生血管相关性疾病具有密切的关联^[2]。因此, 进行体外RMPs培养有助于研究RMPs在视网膜新生血管相关性疾病中的病理机制。

当前, RMPs研究日益受到重视, 但是因组织原

料(视网膜)来源受限及纯化培养不易等因素^[15]的限制, RMPs的相关研究受到了一定的影响, 而远远落后于内皮细胞。既往RMPs体外培养研究所用的组织材料——视网膜多来源于人^[3-5]、猴^[6]或牛^[7-9]。其中人源性组织材料十分珍贵, 多从捐献的尸眼上取得, 获取非常不易, 而且人眼的应用还涉及一定的伦理道德问题, 目前, 以人RMPs为基础的报道极为罕见。猴为非常规的模型动物, 猴源性组织材料亦十分稀少, 研究成本高昂, 不为常用。牛视网膜是既往研究中最常见的组织材料, 因为单位眼球内视网膜组织较其他属动物眼球的多, 只需少量眼球即可以提供足量的RMPs, 故常用于分离培养RMPs。但是牛源性组织材料往往由屠宰场提供, 在获取、保鲜运输上不甚方便。同时, 牛眼的色素膜较厚, 在分离视网膜的过程中去除色素膜的操作较为复杂。此外, 牛属非糖尿病模型动物, 虽然当前大部分体外RMPs研究多基于牛源性RMPs, 但是研究显示, 牛源性RMPs与人源性RMPs在体外高糖实验中表现具有一定的差异性^[16], 影响了牛源性RMPs在体外实验中的应用及相关实验结论的精确性。

考虑到人、猴、牛等上述组织材料的缺陷, 自本世纪初, 人们开始探索以大鼠为组织原料培养RMPs。大鼠是实验室常用的标准模型动物, 也是常见的糖尿病模型动物。其购买、运输或自行饲养均十分方便, 而且他们的基因和表型稳定统一, 易于实验室进行标准化操作。但是大鼠眼球的直径相对较小, 难于操作, 既往很少用于RMPs的体外研究。2003年, 日本学者Kondo等^[10]首次采用转基因大鼠利用温敏激活法成功建立了RMPs细胞株, 并使用克隆法对细胞株进行了纯化。但是Kondo培养的为细

胞株,其所采用的组织原料及方法均非常规,不具有普遍适用性。2005年,我国学者王应利等^[11]采用免疫磁珠法从大鼠中首次成功纯化培养出原代RMPs。该法采用免疫磁珠吸附视网膜消化处理后所得的单个免疫阳性的细胞,活细胞产量偏低,成本高昂,且磁珠与细胞结合后难以分离,对细胞的生长有一定影响^[17]。2012年,我们基于成年大鼠视网膜微血管片段建立一种简便的原代RMPs的培养方案^[12]。但是我们发现,成年大鼠细胞增殖能力稍差,因此有必要继续探讨、优化大鼠RMPs培养方案。

与上述实验采用成年大鼠的视网膜做为组织材料不同,我们在本次研究中选用了3周龄初断乳大鼠视网膜作为主要组织原料。此周龄段的大鼠正值断乳,已经具有独立的存活能力,比新生大鼠更易于运输,获取方便。更为重要的是,大鼠视网膜微血管网一般在出生后15 d左右发育成熟^[18],3周龄初断乳大鼠的视网膜微血管网较更小年龄的大鼠已经充分发育成熟,不论是细胞成熟性还是细胞量均更适合分离培养的需求,而且相较成年大鼠而言,此周龄段的低龄大鼠细胞活性更高,增殖能力更强^[19]。但是初断乳大鼠眼球相对偏小,视网膜分离的难度较牛及成年大鼠均要大,既往用于成年大鼠眼球及牛眼的常规器械已经不能适应于此。本实验选择了眼科显微剪、镊、虹膜恢复器等显微手术器械用于操作。这些器械用于初断乳大鼠视网膜分离时,无需既往报道所需的体视解剖显微镜等额外设备的辅助,在超净台上直视下即可进行。成功解决初断乳大鼠眼球较小而不利于操作的缺点,降低了视网膜分离的技术要求。结果显示,初断乳大鼠视网膜的分离时间、完整度与成年大鼠相比并无统计学意义,仍然能够在短时间内完成足量的视网膜分离操作。

在操作中需要注意以下几个要点:(1)在前期剝取眼球时,尽可能获得连带视神经的眼球,以便后期操作中能夹持视神经辅助固定眼球。(2)初断乳大鼠眼球壁较薄,在75%的酒精中浸泡灭菌时间不宜过长,以免影响组织活性。(3)在解剖眼球时,可以使用显微剪刀沿最初的剪切口方向扩展切口,宽度至少为球周的2/3,以方便视网膜的完整娩出。(4)在夹持眼球娩出视网膜时,夹持点为视神经的根部,虹膜恢复器的推起点也在视神经的根部,力度不宜过大,以免造成视网膜受压过甚而乳化。一旦出现视网膜嵌顿,需及时调整虹膜恢复器的推动方向,使推动方向

朝向切口,切忌在嵌顿时强行推挤。(5)分离获得视网膜后,将其在PBS中轻轻漂洗,以清除附着的玻璃体等杂质组织。

视网膜组织是一种多细胞成分的组织,RMPs培养容易混杂内皮细胞及神经胶质细胞^[11,20]。因此,细胞鉴定是RMPs培养过程中一个重要内容。从形态学而言,初断乳大鼠的RMPs在刚游溢出微血管片段时较小,呈三角细条状,经发育后呈扁平不规则三角形或多角形,与成年大鼠及既往报道的其他种属的RMPs无明显差异^[5,11,20]。免疫学鉴定较形态学鉴定具有更高的可靠性,但是当前RMPs缺少特异性标记物。我们采用免疫荧光双标法提高了RMPs鉴定的准确性和特异性。 α -SMA和PDGFR- β 是最常用的周细胞标记物^[13],本研究结果显示,培养的RMPs纯度在96%以上,初断乳大鼠的RMPs免疫荧光 α -SMA及PDGFR- β 双染阳性,与成年大鼠源性RMPs无明显差异,与其他种属源性RMPs亦相类似^[3,9]。并且我们首次鉴定了其在接种48 h自微血管片段中游溢出后标记物 α -SMA及PDGFR- β 的表达,发现这两种标记物呈强阳性表达,与在RMPs组织原位鉴定时的结果相同^[21]。上述形态学及免疫荧光的鉴定证明了初断乳大鼠源性RMPs具有稳定的传代能力,同时基于初断乳大鼠视网膜组织原料培养获得的原代RMPs细胞活力强、数量多,表明初断乳大鼠用于RMPs的体外分离培养研究更具优势。本实验基于初断乳大鼠视网膜建立的RMPs分离培养体系将为后期的RMPs相关研究提供极大的方便。

参考文献 (References)

- 1 Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011; 55(3): 261.
- 2 Motiejunaite R, Kazlauskas A. Pericytes and ocular diseases. *Exp Eye Res* 2008; 86(2): 171-7.
- 3 Berrone E, Beltramo E, Buttiglieri S, Tarallo S, Rosso A, Hammes HP, *et al.* Establishment and characterization of a human retinal pericyte line: A novel tool for the study of diabetic retinopathy. *Int J Mol Med* 2009; 23(3): 373.
- 4 Miller AG, Smith DG, Bhat M, Nagaraj RH. Glyoxalase I is critical for human retinal capillary pericyte survival under hyperglycemic conditions. *J Biol Chem* 2006; 281(17): 11864-71.
- 5 刘洪雷,王雨生,刘军,惠延年.人视网膜微血管周细胞原代培养及鉴定. *国际眼科杂志*(Liu Honglei, Wang Yusheng, Liu Jun, Hui Yannian. Primary culture and characterization of microvascular pericytes from human retina. *International Journal of Ophthalmology*) 2005; 5(1): 55-8.
- 6 Buzney SM, Frank RN, Robison WJ. Retinal capillaries: Proliferation of mural cells *in vitro*. *Science* 1975; 190(4218): 985-6.

- 7 Walshe TE, Connell P, Cryan L, Ferguson G, Gardiner T, Morrow D, *et al.* Microvascular retinal endothelial and pericyte cell apoptosis *in vitro*: Role of hedgehog and Notch signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(7): 4472-83.
- 8 匡洪宇, 段 鹏, 马丽丽, 朱雪磊, 江 红, 康英英, 等. 高浓度葡萄糖对牛视网膜血管周细胞凋亡及凋亡调节基因表达的影响. *中华老年医学杂志(Kang Hongyu, Duan Peng, Ma Lili, Zhu Xuelei, Jiang Hong, Kang Yingying, et al. Apoptosis and apoptotic genes expressions of bovine retinal pericytes cultured with high glucose concentration. Chinese Journal of Geriatrics)* 2008; 27(3): 213-6.
- 9 Schor AM, Schor SL. The isolation and culture of endothelial cells and pericytes from the bovine retinal microvasculature: A comparative study with large vessel vascular cells. *Microvasc Res* 1986; 32(1): 21-38.
- 10 Kondo T, Hosoya K, Hori S, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, *et al.* Establishment of conditionally immortalized rat retinal pericyte cell lines (TR-rPCT) and their application in a co-culture system using retinal capillary endothelial cell line (TR-iBRB2). *Cell Struct Funct* 2003; 28(3): 145-53.
- 11 王应利, 郭 斌, 惠延年, 张晓光, 陈立军, 马吉献. 免疫磁珠法原代分离培养大鼠视网膜微血管周细胞. *眼科新进展(Wang Yingli, Guo Bin, Hui Yannian, Zhang Xiaoguang, Chen Lijun, Ma Jixian. Primary isolation of rat retinal microvascular pericytes with immuomagnetic beads. Recent Advances in Ophthalmology)* 2005; 25(6): 498-502.
- 12 刘光辉, 孟 春, 徐朝阳, 刘 安, 黄以鹏, 黄陈稳. 大鼠视网膜微血管周细胞的选择性培养. *中华实验眼科杂志(Liu Guanghui, Meng Chun, Xu Chaoyang, Liu An, Huang Yipeng, Huang Chenwen. Selective culture of rat retinal microvascular pericytes. Chinese Journal of Experimental Ophthalmology)* 2014; 32(1): 18-22.
- 13 Mogensen C, Bergner B, Wallner S, Ritter A, d'Avis S, Ninichuk V, *et al.* Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 201(4): 413-26.
- 14 Smith SW, Chand S, Savage CO. Biology of the renal pericyte. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27(6): 2149-55.
- 15 Dore-Duffy P. Pericytes: Pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 2008; 14(16): 1581-93.
- 16 Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25(6): 566-76.
- 17 毛羽翔, 林少芬, 曾美珍, 田景毅, 唐仕波. 改良的人视网膜血管内皮细胞的培养与鉴定方法. *中华实验眼科杂志(Mao Yuxiang, Lin Shaofen, Zeng Meizhen, Tian Jingyi, Tang Shibo. A novel method for culture and identification of primary human retinal microvascular endothelial cells. Chinese Journal of Experimental Ophthalmology)* 2013; 31(1): 8-12.
- 18 Ashton N. Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina. *Ophthalmologica* 1970; 160(1): 54-71.
- 19 Du M, Li P, Cai Y, Zou Y, Tang Y, Qin L, *et al.* Proliferation characteristics of adipose-derived stem cells from neonatal suckling rats and adult ones. *Chin J Neuromed* 2012; 8(11): 770-6.
- 20 Nayak RC, Herman IM. Bovine retinal microvascular pericytes: Isolation, propagation, and identification. *Methods Mol Med* 2001; 46: 247-63.
- 21 Hughes S, Chan-Ling T. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(8): 2795-806.

临床细胞生物学

肝癌肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)体外扩增及特性研究

江珊珊 唐 艳 潘 科 翁德胜 赵靖靖 何 佳 夏建川*

(中山大学附属肿瘤医院生物治疗中心, 广州 510060)

摘要 探讨从原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者的术后肿瘤组织中分离肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL), 并进行体外大量扩增的方法。在该研究工作中, 组织标本来源于术后的肿瘤旁组织, 经过组织破碎、酶消化后, 采用不连续密度梯度离心分离其中淋巴细胞。分离的淋巴细胞先采用大剂量重组人白介素2(IL-2)(2 000 U/mL)进行引发, 然后采用同种异体的外周血单核细胞作为饲养细胞进行扩增。针对9例原发性肝癌术后标本, 所分离的TIL均能成功进行培养扩增, 扩增后细胞数为 $(1\sim5.5)\times 10^9$ 。扩增倍数为111~572。扩增后的TIL, 表型检测发现CD3+细胞的比例为 $(90.3\pm9.4)\%$, CD3+CD4+细胞的比例为 $(24.9\pm14.1)\%$, CD3+CD8+细胞的比例为 $(56.4\pm20.2)\%$, CD3+CD56+细胞的比例为 $(14.8\pm12.6)\%$ 。杀伤检测结果显示, 肝癌TIL对非自体肿瘤细胞系HepG2和Bel-7402有较强的杀伤作用。因此, 采用该改良的方法, 原发性肝癌的TIL在体外可以成功进行培养扩增, 并具有较强抗肿瘤活性, 可以作为肝癌术后巩固性免疫治疗的一种手段。

关键词 肝癌; 肿瘤浸润性淋巴细胞; 免疫治疗; 体外扩增培养

In Vitro Culturing and Characteristics of Tumor-infiltrating Lymphocyte of Hepatocellular Carcinoma

Jiang Shanshan, Tang Yan, Pan Ke, Weng Desheng, Zhao Jingjing, He Jia, Xia Jianchuan*

(Department of Biotherapy Center, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract The aim was to investigate the methods of *ex vivo* expansion of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) obtained from hepatocellular carcinoma (HCC) biopsy specimens with a rapid expansion protocol. In this study, the specimen of primary liver cancer came from adjacent carcinoma tissues. After crushing and enzymatic digestion, the lymphocytes in the single-cell slurry were separated by density centrifugation. The isolated lymphocytes were triggered with high dose of recombinant human interleukin 2 (IL-2) (2 000 U/mL), then were expanded in large-scale using peripheral blood allogeneic mononuclear cells as feeder cells. Nine primary HCC samples were used to try to isolate and culture the TIL *in vitro*. After two-step culturing, the number of TIL could achieve $(1.0\sim5.5)\times 10^9$ cells, and the expansion fold was 111 to 572. After expansion, the ratio of CD3+ T cells was $(90.3\pm9.4)\%$, the ratio of CD3+CD4+ T cells was $(24.9\pm14.1)\%$, the ratio of CD3+CD8+ was $(56.4\pm20.2)\%$, and the ratio of CD3+CD56+ was $(14.8\pm12.6)\%$. Moreover, the TIL showed strong killing activity to HepG2 and Bel-

收稿日期: 2013-11-07 接受日期: 2014-03-18

广东省自然科学基金(批准号: 2011A030400004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-87343404, E-mail: xiajch@mail.sysu.edu.cn;

Received: November 7, 2013

Accepted: March 18, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.2011A030400004)

*Corresponding author. Tel: +86-20-87343404, E-mail: xiajch@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-01 16:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0367.html>

7402 cell lines *in vitro*. Taken together, the TIL from hepatocellular carcinoma can be successfully cultured and expanded *in vitro*, and with strong anti-tumor activity. It can be served as a means of the candidate immunotherapy for postoperative HCC patients.

Key words hepatocellular carcinoma; tumor-infiltrating lymphocyte; immunotherapy; *ex-vivo* expansion culture

原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一。根据最新统计,全世界每年新发肝癌患者约六十万,居恶性肿瘤的第五位。在我国,肝癌的发病率在十大恶性肿瘤中排名第三,是严重危害人们身心健康的重大疾病之一。肝癌的治疗方法包括手术治疗、介入治疗、化疗、靶向治疗等多种方式,对部分患者有一定疗效,但总体治疗效果并不理想。肝癌患者的生存率目前仍维持在较低水平,手术后五年生存率仅为15%~40%,两年内有62%~82%的患者复发,并最终因为疾病进展而死亡^[1]。因此,探索新的治疗肝癌的有效手段具有重要的临床意义。

免疫治疗是新兴的一种肿瘤治疗方式,已经被列为继手术、放疗、化疗后的第四种治疗方式,在肿瘤的综合治疗中逐渐发挥重要作用^[2]。2010年,美国FDA批准世界上第一个细胞免疫治疗产品Provenge上市,用于晚期前列腺癌的治疗,充分显示出细胞免疫治疗在肿瘤治疗中的价值^[3]。对于肝癌的治疗,一些初步的临床研究表明,细胞免疫治疗对于部分肝癌患者有一定的疗效。因此,在肝癌的综合治疗中,细胞免疫治疗也是一个很有发展潜力的方向。肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)是存在于肿瘤间质内的以淋巴细胞为主的异质性淋巴细胞群体,大多聚集在肿瘤周围或其间质呈套状围绕癌巢。其主要成分是存在于肿瘤间质内的T淋巴细胞,小部分为MHC非限制性的NK细胞,其共同特征为表达T细胞受体(T cell receptor, TCR)。TIL来自肿瘤组织区域,可特异识别自体肿瘤,具有特异的MHC限制性溶解肿瘤活性^[4]。美国NCI的Rosenberg等^[5]首次证实,从实体瘤组织分离的TIL在体外经IL-2激活并大量扩增后,可用于晚期黑色素瘤患者的治疗。其治疗效果远远高于之前发展的LAK(lymphokine activated killer cells)细胞治疗技术。近年来发表的多篇II期临床试验报道显示, TIL细胞免疫治疗可治愈20%~40%的晚期黑色素瘤患者,充分显示出TIL作为一种细胞免疫治疗手段在肿瘤治疗中的潜力^[6]。

目前,由于针对肝癌所鉴定的抗原非常少,因此

发展特异性免疫治疗受到很大限制。之前的研究明确显示,肝癌组织中存在TIL,并且其组成及含量与患者的预后显著相关^[7-8]。由于肝癌组织中的TIL已经接受了肝癌细胞抗原的刺激,具有一定的抗原特异性,因此从肝癌组织中分离TIL,并在体外进行活化及扩增后,可作为一种实用有效的针对肝癌患者的特异性免疫治疗手段。目前,关于肝癌TIL体外激活扩增的报道不多。在本研究中,我们将探讨从肝癌肿瘤组织中分离纯化TIL,并摸索体外大量扩增培养的方法,同时对扩增的TIL进行分子表型及抗肿瘤活性检测,为将来建立肝癌TIL细胞免疫治疗方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 肝癌组织标本和肝癌细胞系

取自外科手术切除的新鲜肝癌组织,选取毗邻肿瘤边界的癌旁组织,共9例,肿瘤组织均有明确的病理诊断。人肝癌细胞株HepG2和Bel-7402来自于中国科学院上海细胞库,采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基进行传代培养。

1.2 试剂和仪器

X-VIVO-15培养基购自Lonza公司;磷酸缓冲液(PBS)、RPMI1640培养基、CD3单抗、CD28单抗购自Gibco公司;人AB型血清由广州市血液中心提供; rIL-2购自北京四环生物制药公司;胶原酶IV型购自Sigma公司;淋巴细胞分离液购自天津美德太平洋公司;鼠抗人PC5-CD3、PE-CD4、FITC-CD8、PC7-CD56、FITC-CD25等单克隆抗体购自美国BD Biosciences公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂购自美国Promega公司。12孔细胞培养板购自美国Costar公司;CO₂细胞培养箱购自美国Forma Scientific公司;倒置显微镜购自日本Olympas公司。

1.3 实验方法

1.3.1 TIL细胞的分离 取手术切除的无菌新鲜肿瘤癌旁组织浸泡于PBS中,剔除周围的血块、脂肪及坏死组织, PBS清洗一遍,剪成1 mm³大小,浸入

0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的IV型胶原酶(Sigma-Aldrich)溶液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化2 h。消化完毕后用100 μm 孔径的网筛过滤, 用PBS冲洗组织块, 收集滤液。细胞滤液在室温下离心, 1 500 r/min $\times$ 5 min。弃上清, 加入1 mL的PBS制成少量细胞悬液后, 用淋巴细胞分离液作不连续密度梯度离心。离心结束后收取下层界面的淋巴细胞, 经PBS清洗后, 按 $1\times 10^6/\text{mL}$ 的浓度悬浮于含10%人AB型血清和rIL-2(2 000 IU/mL)的X-VIVO-15培养基内, 接种于12孔板上, 3 mL/孔。置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养, 每3~5 d换液一次。

1.3.2 TIL细胞的培养和扩增 当孔里的淋巴细胞生长至 1×10^7 时, 将其转入含有30 ng/mL的抗CD3单抗、30 ng/mL的抗CD28单抗和 1×10^8 同种异体的经辐照灭活的健康供者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的培养瓶内。健康供者PBMC的辐射剂量是180 Gy。刺激后的第2天加入IL-2, 并调整其在培养液中的浓度为4 000 IU/mL, 于 CO_2 培养箱中进行连续培养。培养过程中每隔2~3 d半量更换含同等浓度IL-2的新鲜培养基, 培养22~25 d后收获体外扩增的TIL。

1.3.3 流式细胞术检测TIL的免疫表型 取扩增后的TIL细胞, 约 1×10^6 , 经PBS洗涤2次, 200 μL 的PBS悬浮, 分别加入4 μL 荧光素标记的鼠抗人CD3、CD4、CD8、CD56、CD25及同型对照IgG1的单克隆抗体, 混匀后室温避光孵育20 min, PBS液洗2次, 最后加入4%的多聚甲醛固定, 于流式细胞仪上进行检测。

1.3.4 细胞毒检测 扩增后的TIL细胞和消化的肝癌细胞, 分别计数, 按效靶比30:1、10:1的比例进行混合, 于96孔圆底板内进行培养, 同时设置自发释放

孔和最大释放孔。培养时间约为18 h。取混合培养的细胞上清, 采用LDH检测试剂盒检测LDH释放水平。按照试剂盒说明书的方法计算杀伤活性。

2 结果

2.1 肝癌TIL的体外扩增培养情况

在活化阶段, 应用含有中等剂量IL-2(2 000 IU/mL)和10% AB血清的培养基培养后, 从9例肝癌组织标本中分离的TIL均能在体外适度扩增, 细胞数量达到 $10^6\sim 10^7$ 数量级。在扩增阶段, 采用抗CD3、CD28单抗和灭活的健康供者的PBMC作为饲养细胞进行刺激培养后, 经过22~25 d的培养, 9例肝癌患者的TIL能快速增长到 $(1.0\sim 5.5)\times 10^9$ 。在本研究中, TIL的扩增倍数大约为111~572。9例患者的TIL的扩增情况见表1。

2.2 大量扩增后肝癌TIL的免疫表型

9例经两步法扩增的TIL, 经流式细胞分析检测发现, CD3 $^{+}$ 细胞的比例为 $(90.3\pm 9.4)\%$, CD3+CD4 $^{+}$ 细胞的比例为 $(24.9\pm 14.1)\%$, CD3+CD8 $^{+}$ 细胞的比例为 $(56.4\pm 20.2)\%$, CD3+CD56 $^{+}$ 细胞的比例为 $(14.8\pm 12.6)\%$ (表1)。在TIL前期体外活化(IL-2: 2 000 IU/mL)的第12 d, CD4+CD25 $^{+}$ 的百分率是23.8%。在扩增阶段(IL-2: 4 000 IU/mL), 采用抗CD3、CD28单抗和灭活的健康供者的PBMC作为饲养细胞进行刺激培养后, 第17 d CD4+CD25 $^{+}$ 的百分率是78.3%, 第20 d CD4+CD25 $^{+}$ 的百分率是79.8%, 第24 d CD4+CD25 $^{+}$ 的百分率是67.8%(图1)。以CD4 $^{+}$ 为主的TIL扩增后的表型为, CD3+CD4 $^{+}$: 82.8%; CD3+CD8 $^{+}$: 11.8%; CD3+CD56 $^{+}$: 1.4%(图2)。以CD8 $^{+}$ 为主的TIL扩增后的表型为: CD3+CD4 $^{+}$:

表1 各例肝癌TIL的细胞数目、快速扩增倍数及细胞表型

Table 1 Cell number, rapid expansion and phenotype of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with hepatocellular carcinoma (HCC)

TIL编号 TIL No.	扩增倍数 Expansion fold	细胞数目($\times 10^6$) Cell number ($\times 10^6$)		细胞表型(占细胞总数的百分比) Cell phenotype (% of final cells)			
		Initial	Final	CD3	CD4	CD8	CD56
1	111	9	1 000	82.6	3.4	70.5	41.2
2	375	4	1 500	98.9	37.8	56.6	14.5
3	572	7	4 000	98.7	16.8	82	2.2
4	360	15	5 400	98.4	18	75.4	5.7
5	200	10	2 000	83.8	28	29.7	14.7
6	500	5.0	2 500	97	41.3	47.4	9.6
7	196	8.7	1 700	88.8	13.3	61.6	23.9
8	200	6.0	800	74	40.4	27.7	6.9
9	267	7.5	2 000	96	82.8	11.8	1.4

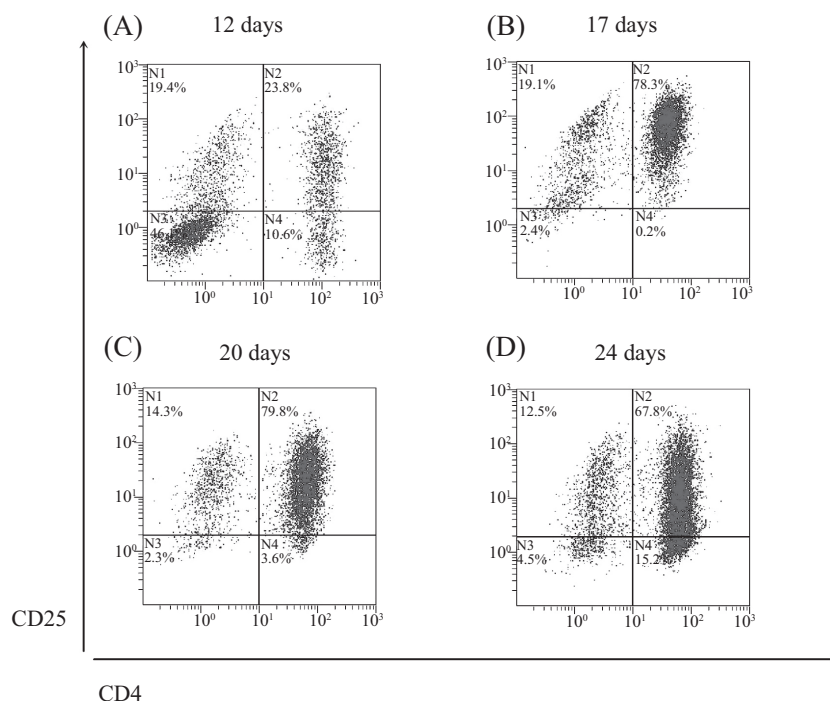
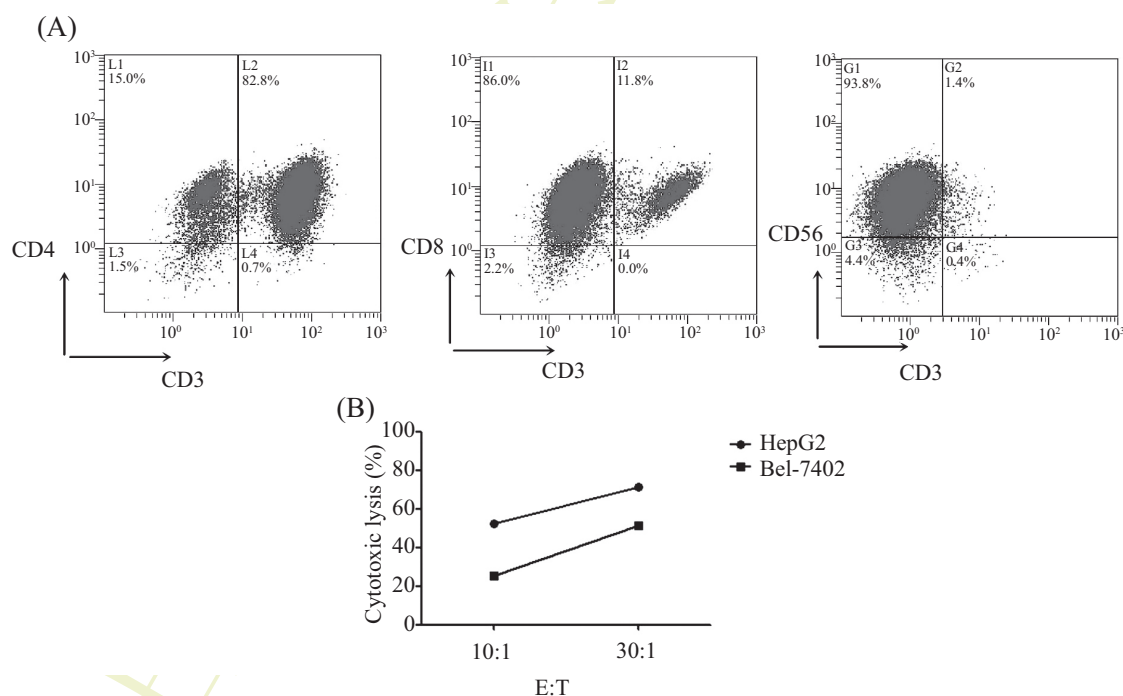


图1 肝癌患者不同天数不同IL-2剂量时TIL细胞中CD4+CD25+的百分率

Fig.1 The percentage of CD4+CD25+ TIL varying with different days and doses of IL-2

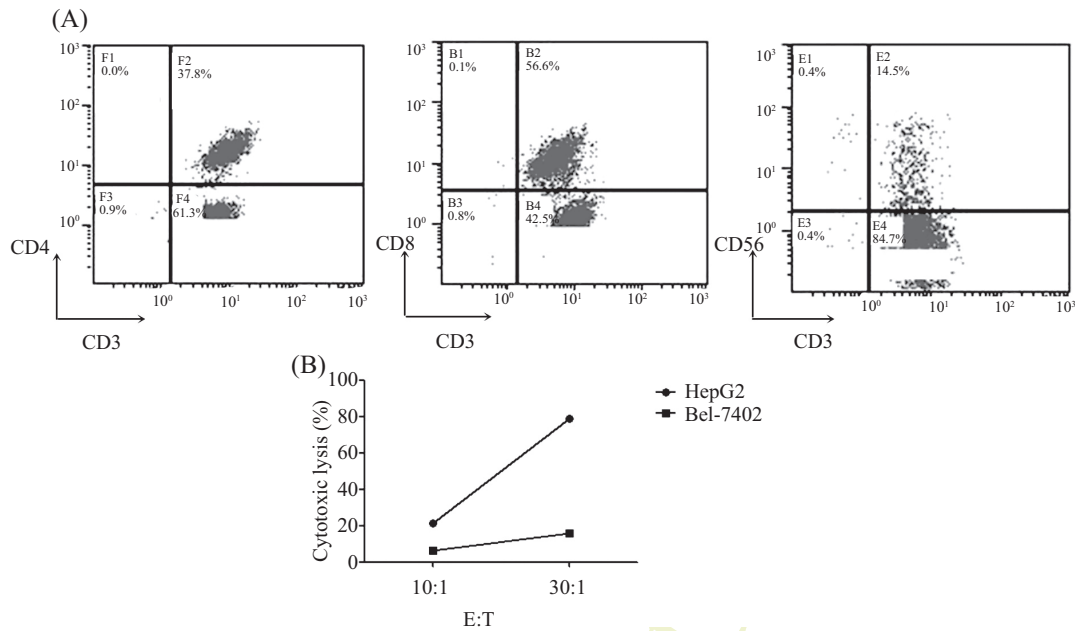


A: 流式细胞仪检测以CD4+为主的TIL细胞的表面抗原CD3、CD4、CD8、CD56的表达; B: 以CD4+为主的TIL对肝癌细胞系的杀伤检测。以CD4+为主的TIL与肝癌细胞系Bel-7402和HepG2混合培养18 h, 用LDH释放水平检测杀伤活性。

A: the expressions of CD3, CD4, CD8 and CD56 of CD4⁺ TIL analyzed by flow cytometer; B: cytotoxic activity of CD4⁺ TIL to target HCC cell line. CD4⁺ TIL was incubated with HCC cells Bel-7402 and HepG2 as indicated for 18 h and used for cytotoxicity by LDH assay.

图2 以CD4+为主的TIL的细胞表型和对肝癌细胞系的杀伤检测

Fig.2 Cell phenotype from CD4+ TIL and cytotoxic activity of TIL from a HCC patient to target HCC cell line



A: 流式细胞仪检测以CD8+为主的TIL细胞的表面抗原CD3、CD4、CD8、CD56的表达; B 以CD8+为主的TIL对肝癌细胞系的杀伤检测。以CD8+为主的TIL与肝癌细胞系Bel-7402和HepG2混合培养18 h, 用LDH释放水平检测杀伤活性。

A: the expressions of CD3, CD4, CD8 and CD56 of CD8+ TIL analyzed by flow cytometer; B: cytotoxic activity of CD8+ TIL to target HCC cell line. CD8+ TIL was incubated with HCC cells BEL-7402 and HepG2 as indicated for 18 h and used for cytotoxicity by LDH assay.

图3 以CD8+为主的TIL的细胞表型和对肝癌细胞系的杀伤检测

Fig.3 Cell phenotype from CD8+ TIL and cytotoxic activity of TIL from a HCC patient to target HCC cell line

37.8%; CD3+CD8+: 56.6%; CD3+CD56+: 14.5%(图3)。

2.3 肝癌TIL对 HepG2、Bel-7402细胞株的杀伤作用

采用LDH释放法检测培养24 d的分别以CD4+和CD8+为主的肝癌TIL在效靶比例分别为10:1, 30:1时对肝癌细胞HepG2和Bel-7402的杀伤活性。如图2、图3所示, TIL对非自体瘤细胞也有较强的杀伤作用, 在以CD4+为主的TIL细胞中, 杀伤率在10:1和30:1时分别为52.45%、71.2%(HepG2)和25.3%、51.54%(Bel-7402); 而以CD8+为主的TIL细胞中, 杀伤率在10:1和30:1时分别为21.4%、78.6%(HepG2)和6.4%、15.8%(Bel-7402)。

3 讨论

肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)是继LAK细胞后发现的又一类具有抗癌活性的免疫效应细胞, 其细胞来源是肿瘤组织及癌旁组织中分离的浸润淋巴细胞。TIL的表型以CD4和CD8为主, 因此主要是T淋巴细胞。新鲜分离的TIL抗肿瘤活性低下, 而经过IL-2体外培养或体内激活, TIL的活性可明显增加。在体外IL-2

的刺激下, TIL细胞可快速增殖并可长期传代培养, 所扩增出的细胞80%~90%为成熟的T细胞^[9]。

在国内90年代初期, 宝建中等^[10]在《中华实验外科学杂志》发表的文章中介绍了其培养出肿瘤浸润淋巴细胞的方法, 使用这种方法可以成功地培养出TIL, 但培养出的TIL细胞数还远远不能满足于临床应用。Topalian等^[5]提出一种快速扩增法, 在TIL的培养过程中称为REP(rapid expansion protocol)。这种方法可以使TIL细胞在短期内达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 数量级。其主要是使用OKT3(anti-CD3)抗体、IL-2以及经过辐照灭活后的健康供者的单个核细胞作为饲养细胞进行刺激。这种方法可以使TIL的数量达到临床治疗的数量级, 目前在大多数晚期黑色素瘤治疗的临床试验中被采纳。

在本研究中, 我们通过两步法培养建立了一个新的体外大量扩增肝癌TIL的方法。主要是降低了IL-2的用量。有报道指出, 高剂量的IL-2(6 000 IU/mL)作用虽然能够有效地扩增TIL, 但是后续进行回输的时候也必须要辅助注射高剂量的IL-2来维持这些细胞在体内的活性。同时, 高剂量的IL-2容易扩增CD56+的抗原非特异性NK细胞, 而抗原特异性的CD8+的T

细胞含量会相对减少, 这可能不利于TIL在体内发挥更好的抗肿瘤作用。如果能够降低IL-2的用量, 这些问题能够得到一定的解决。我们采用改进的方法进行培养的TIL, 表型检测发现主要以CD3+CD4+细胞和CD3+CD8+细胞为主, 其中以CD8+细胞更甚, 表明我们的培养方法获得了更多抗原特异性的效应T细胞。在癌症患者免疫状况与预后的研究中, 有报道认为, 癌症组织内浸润的CD8+细胞的数量与患者预后呈正相关, 其数量越多, 预后就越好^[1]。Rosenberg等^[12]发现, 富集CD8+ T细胞可以提高TIL细胞杀伤黑色素瘤细胞的功能, 而这些结果提示了我们扩增出来的TIL有很好的抗肿瘤活性。

为了进一步研究肝癌TIL抗肿瘤免疫应答的作用, 我们进行了扩增后肝癌TIL对肝癌细胞株HepG2、Bel-7402的杀伤实验。结果显示, 通过二步法体外扩增出来的TIL不仅能够刺激以CD8+细胞为主的T细胞的大量扩增, 而且对异体肝癌细胞有一定的杀伤活性, 证实我们体外扩增培养的TIL是具有抗肿瘤活性的细胞。

TIL具有抗肿瘤作用强并有一定的靶细胞特异性等优点, 被誉为是继LAK细胞之后的第二代抗肿瘤效应细胞, 有着广阔的临床应用前景。我们后期将在此基础上, 进一步开展原发性肝癌患者术后TIL过继性免疫治疗的临床试验研究, 观察术后患者采用自体TIL进行巩固治疗后, 在预防复发、延长生存时间、改善生活质量等方面的作用, 从而为肝癌患者提供新的治疗手段。

参考文献 (References)

- 1 Zhu AX. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: How hopeful should we be? *Oncologist* 2006; 11(7): 790-800.
- 2 Lizée G, Overwijk WW, Radvanyi L, Gao J, Sharma P, Hwu P. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu Rev Med* 2013; 64: 71-90.
- 3 Schellhammer PF, Chodak G, Whitmore JB, Sims R, Frohlich MW, Kantoff PW. Lower baseline prostate-specific antigen is associated with a greater overall survival benefit from sipuleucel-T in the immunotherapy for prostate adenocarcinoma treatment (IMPACT) trial. *Urology* 2013; 81(6): 1297-302.
- 4 Halapi E. Oligoclonal T cells in human cancer. *Med Oncol* 1998; 15(4): 203-11.
- 5 Topalian SL, Muul LM, Solomon D, Rosenberg SA. Expansion of human tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials. *J Immunol Methods* 1987; 102(1): 127-41.
- 6 Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; 233(4770): 1318-21.
- 7 Chew V, Tow C, Teo M, Wong HL, Chan J, Gehring A, *et al.* Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2010; 52(3): 370-9.
- 8 Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25(18): 2586-93.
- 9 June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* 2007; 117(6): 1466-76.
- 10 宝建中, 王 一, 詹 洲, 陈 汉, 吴孟超. 人肿瘤浸润淋巴细胞的体外抗瘤活性及其表型特征. *中华实验外科杂志*(*Bao Jianzhong, Wang Yi, Zhan Zhou, Chen Han, Wu Mengchao. Research of cytotoxicity and phenotypic features of tumor-infiltrating lymphocytes from human hepatocarcinoma. Chinese Journal of Experimental Surgery*) 1995; 12(3): 147-8.
- 11 Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(51): 18538-43.
- 12 Dudley ME, Gross CA, Langhan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC, *et al.* CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16(24): 6122-31.

小鼠围着床期子宫内膜甲基化CpG结合域蛋白2的表达规律

周一青 何俊琳 陈雪梅 王应雄 刘学庆 丁裕斌*

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学教研室, 重庆 400016)

摘要 为研究甲基化CpG结合域蛋白2(methyl-CpG binding domain protein 2, MBD2)在围植入期小鼠子宫内膜的表达规律, 通过采用实时荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)、Western blot和免疫组化技术检测未孕小鼠(d0)和不同孕天小鼠子宫MBD2的表达情况。qPCR结果显示, d0至d7的小鼠子宫内膜组织均有MBD2 mRNA表达, 在d5至d7高表达。MBD2蛋白在子宫内膜的表达规律与qPCR结果相符。MBD2蛋白在孕d1到d4中度表达于腔上皮、腺上皮和基质细胞, 在d5至d7基质细胞表达增强, 主要表达于蜕膜区。假孕小鼠子宫内膜中, MBD2在腔上皮、腺上皮和基质细胞中中度表达, d5至d7基质细胞表达明显减弱。动物模型中, 宫角注射MBD2基因反义寡聚脱氧核苷酸, 可抑制MBD2的表达, 降低人工诱导蜕膜化反应和蜕膜化标志物PRL的表达。MBD2在早孕小鼠子宫内膜的表达模式提示其可能参与了蜕膜化过程。

关键词 甲基化CpG结合域蛋白2; 小鼠; 蜕膜化

The Expression Pattern of Methyl-CpG Binding Domain Protein 2 (MBD2) in Mouse Endometrium during Preimplantation

Zhou Yiqing, He Junling, Chen Xuemei, Wang Yingxiong, Liu Xueqing, Ding Yubin*

(Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health and Management,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The experiment was aim to explore the expression pattern of Methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) during peri-implantation in the mouse endometrium. Expression of *MBD2* mRNA and MBD2 protein in the non-pregnant and pregnant mouse endometrium from d0 to d7 was examined by Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), Western blot and immunohistochemistry. *MBD2* mRNA expressed in uterine endometrium of the non-pregnant (d0) and pregnant mouse (d1 to d7). *MBD2* mRNA increased gradually from d5 to d7. Western blot analysis showed that the protein expression of MBD2 in mouse endometrium had the similar expression pattern to its mRNA that detected by Real-time fluorescence quantitative PCR. Moreover, from pregnant d1 to d4, MBD2 was expressed in epithelium, glandular cells and stromal cells in the endometrium. On d5 to d7, MBD2 was more intensely expressed in stromal cells, especially in the decidual zone. The expression of MBD2 in the pseudopregnant on d1 and d4 was expressed in epithelium, glandular cells and stromal cells in the endometrium. But it was significantly lower in the stromal on d5 to d7. Using artificial decidualization and treatment with

收稿日期: 2014-02-19 接受日期: 2014-04-29

国家自然科学基金(批准号: 81370731)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485008, E-mail: dingyb@gmail.com

Received: February 19, 2014 Accepted: April 29, 2014

This work was supported by National Science Foundation of China (Grant No.81370731)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485008, E-mail: dingyb@gmail.com

网络出版时间: 2014-07-02 14:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0046.html>

antisense oli-godexynucleotides of *MBD2*, the expression of *MBD2* in the uterus was remarkably inhibited and the level of decidualization was decreased. These results suggested that *MBD2* was involved in modulating the decidualization of mouse uterine.

Key words *MBD2*; mouse; decidualization

胚胎着床是人类和哺乳动物生殖过程中的关键环节。成功的胚胎着床受到子宫内膜容受性的形成、囊胚的同步发育以及母胎同步对话等多因素的影响^[1-3]。近来研究发现, 围着床期子宫内膜功能性变化(如受性建立、内膜细胞的增殖和分化)受到表观遗传修饰的调控(如DNA甲基化、组蛋白乙酰化和siRNA等)^[4]。DNA甲基化修饰作用是生理活动中最常见的表观遗传修饰方式之一, 它通过DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的作用, 可在基因启动子CpG二核苷酸富集区域的胞嘧啶(C)的5'端添加甲基基团, 从而达到抑制基因转录的效果。Yamagata等^[5]和Vincent等^[6]研究发现, *DNMT1*和*DNMT3a* mRNA在整个月经周期子宫内膜有规律性表达, 并且DNMT1、DNMT3a、DNMT3b受类固醇激素调控。这表明, DNA甲基化在子宫内膜月经周期发挥作用。

Logan等^[7]用DNMT抑制剂5'-AZA处理人子宫内膜基质细胞第9 d, 诱发生成纤维细胞样细胞转化为蜕膜样细胞, 第10 d蜕膜化标志基因*prolactin*和*IGFBP-1*表达上调。提示DNA甲基化参与子宫内膜的蜕膜化过程。

DNMT1、DNMT3a和DNMT3b在小鼠早孕期子宫内膜呈现规律性表达, 即在容受态前期表达逐步升高, d3表达至峰值, 此后在容受期和着床期表达逐步下降, 且三种DNMT在胚胎着床点的表达较着床点旁降低, DNMT3a呈现显著性降低^[8]。0.5 μm/kg和5 μm/kg 5-AZA(DNMT抑制剂)腹腔注射假孕小鼠2~4 d, 胚胎移植实验发现高剂量组能够明显抑制假孕d5小鼠子宫内膜DNMT1和DNMT3a的表达, 并影响胚胎的植入^[9]。DNMT在子宫内膜特定时空的低表达, 将引发基因或基因组被动去甲基化, 有利于子宫内膜容受性的建立和蜕膜化。这均提示, 子宫内膜表达的一些基因的甲基化修饰亦可能受到激素的调控, 并参与调控胚胎植入前后子宫的发育、内膜细胞的增殖和分化。

甲基化CpG结合蛋白(methyl-CpG binding domain, MBD)家族是一类与甲基化CpG二核苷酸结合的核

蛋白, *MBD2*作为该家族成员, 能有机地将DNA甲基化和组蛋白修饰藕联起来, 在表观遗传学中发挥中枢纽带作用。部分研究认为, *MBD2*还具有去甲基化酶活性^[10]。

*MBD2*在小鼠围植入期的表达如何以及是否参与子宫内膜功能的调控, 目前还不清楚。为此, 本研究利用小鼠着床模型, 分析了*MBD2*的表达规律, 以探索其在胚胎着床中的功能。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 动物 由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号: SCXK(渝)2012-0001] 30只8~10周龄SPF级昆明雌小鼠, 5只同品系雄小鼠, 体重18~22 g。饲养于重庆医科大学动物中心动物房, 控制温度适度、湿度, 给予自由饮食和饮水, 12 h光照。

1.1.2 试剂 Trizol裂解液、逆转试剂盒、实时荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)试剂盒购自大连宝生物(大连)有限公司; *MBD2*和β-actin引物由上海生工生物工程有限公司合成; RIPA蛋白裂解液购自江苏碧云天生物技术有限公司; 预制胶购自上海文渊阁科技生物有限公司; 兔来源多克隆一抗*MBD2*和PRL购自Santa Cruz公司; β-actin一抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 二抗、SP9001免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 孕小鼠模型的建立 选择性成熟的小鼠, 按雄雌比例1:2合笼, 次日晨7点有阴栓者记为妊娠(d1)。未孕小鼠计为孕d0。将正常成年雄鼠输精管结扎后饲养14 d, 按1:2与雌鼠合笼交配, 次日发现有阴栓者记为假孕第1 d(pd1)。取pd4小鼠, 于上午9:00在子宫角一侧注入10 μL芝麻油, 另一侧子宫角注射PBS, 作为对照。于pd8获得人工诱导蜕膜化子宫。

1.2.2 siRNA沉默小鼠子宫*MBD2*基因表达 *MBD2*基因反义片段(A-ODNs)和正义片段(S-ODNs)由上海博尚生物技术有限公司设计并合成(表1)。将

表1 qPCR引物和MBD2干扰序列

Table 1 Primer sequences for qPCR and short interfering RNA (siRNA) sequences for MBD2

引物 Primer	序列 Sequence
MBD2 forward primer	5'-CCT GGG AAA TGC TGT TGA-3'
MBD2 reverse primer	5'-CCT TAT TGC TCG GGT GGT-3'
β -actin forward primer	5'-CCT GAG GCT CTT TTC CAG CC-3'
β -actin reverse primer	5'-TAG AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG T-3'
MBD2 A-ODNs	5'-GTC GAC TCC AAA TGA AGA CTT CAG CTG AGG TTT ACT TCT GAA-3'
MBD2 S-ODNs	5'-AGG GTT AGA GAA GGG CTC ACG TGA GCC CTT CTC TAA CCC TGA-3'

MBD2 A-ODNs(或S-ODNs) 10 μ g溶于100 μ L芝麻油中,取10 μ L MBD2 A-ODNs或S-ODNs注射到pd4小鼠子宫一侧,另一侧子宫角注射PBS,作为对照,在pd8早晨9:00将小鼠处死,收集两侧子宫角,解剖镜下拍摄其形态。称重后石蜡包埋或液氮冻存,用于其他实验。

1.2.3 qPCR检测MBD2的表达 子宫内膜总RNA的提取采用Trizol裂解液抽提,氯仿萃取,异丙醇沉淀,乙醇洗涤,RNase-free水溶解总RNA沉淀,紫外分光光度计测总RNA的D值,取部分RNA做琼脂糖凝胶电泳检测完整性,-80 $^{\circ}$ C保存备用。cDNA合成按照TaKaRa试剂盒(大连宝生物工程有限公司)说明书逆转录。qPCR检测MBD2 mRNA表达反应体系:SYBR green mix 5 μ L,引物上下游各0.3 μ L,cDNA 1 μ L,RNase-free H₂O 3.4 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,循环40次,65~95 $^{\circ}$ C的条件下检测溶解曲线,相应的PCR引物见表1。采用 β -actin作为内参,进行归一化处理。每一实验重复3次,每次3个复孔。

1.2.4 免疫组织化学 4%多聚甲醛固定小鼠子宫20 h,经70%、80%、95%、100%梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,进行组织切片(厚度4 μ m)。按常规实验步骤进行免疫组化染色:二甲苯I和二甲苯II各20 min脱蜡;流动自来水冲洗5 min,蒸馏水冲洗后入PBS浸洗3 min;微波炉煮沸置在枸橼酸盐缓冲液中的切片,热修复抗原15 min;3%的双氧水室温孵育10 min灭活内源性酶;PBS浸洗3次,每次3 min;湿盒内加入MBD2一抗(Santa Cruz公司)(1:100)4 $^{\circ}$ C过夜;二步法免疫组化检测试剂盒(中杉金桥公司)检测一抗表达,37 $^{\circ}$ C孵育20 min,PBS冲洗,2 min $\times$ 3次;DAB溶液显色,苏木精复染细胞核,脱水树胶封片。显微镜观察并用奥林巴斯(日本)图像采集系统拍摄,IPP医学图像分析管理系统(Media Cybernetics,

美国)分析每张切片阳性表达的灰度值和阳性细胞比例。

1.2.5 蛋白提取及Western blot 根据RIPA裂解液说明书提取组织总蛋白,用BCA蛋白定量法测定总蛋白浓度。预制胶恒压电泳,待分离后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h后,一抗4 $^{\circ}$ C过夜,PBST洗3次,辣根过氧化物酶标记二抗孵育1 h后,PBST洗3次,ECL法显影。Quantity One(Bio-Rad公司)软件对Western blot结果图像进行灰度分析。

1.3 统计学分析

实验数据采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。qPCR实验结果和Western blot结果均采用单因素方差分析,各组之间相互比较采用LSD-*t*法。每个实验至少重复3次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qPCR检测MBD2 mRNA在围植入期子宫内膜的表达

结果显示,MBD2 mRNA在d0到d7小鼠子宫内膜组织中均有表达。与d0相比较,d1到d4表达差异均无显著性;至d5,MBD2的表达达到最高峰,d6和d7的表达呈逐渐下降的趋势,但仍显著高于d0(图1)。

2.2 MBD2蛋白在围植入期子宫内膜的表达及定位

不同孕天小鼠子宫内膜的免疫组化染色结果显示,MBD2在d1~d5的腔上皮和腺上皮的表达均为中度染色。MBD2在d1~d5的基质细胞中染色逐渐加深,即从d1的弱表达至d5的强表达。d5~d8,MBD2在基质细胞中的表达主要位于蜕膜区,即在d5点和d6点围绕胚胎的子宫基质发生蜕膜化形成初级蜕膜区高表达,随着蜕膜化的进行,在d7和d8,逐渐表达在胚胎周围为次级蜕膜区域(图2)。

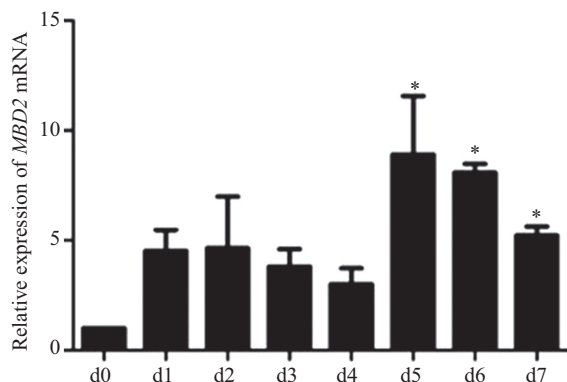
2.3 妊娠小鼠子宫内膜组织MBD2蛋白表达

Western blot结果显示,MBD2蛋白在d0~d7小

鼠子宫内膜组织中均有表达, 且组间表达有差异 ($P<0.05$)。与d0比较, 在妊娠d1~d5, 随着妊娠天数的递增, MBD2蛋白质的表达量逐渐升高, d1~d4均无显著性差异。妊娠d5达到高峰, 随后的d6~d7持续高表达(图3)。

2.4 假孕小鼠子宫内膜组织MBD2的表达

通过免疫组织化学检测了MBD2在假孕小鼠不



* $P<0.05$, 与d0比较。

* $P<0.05$ vs d0 group.

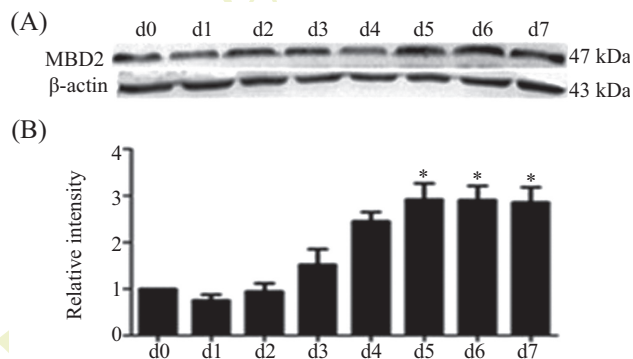
图1 qPCR检测MBD2 mRNA在小鼠子宫内膜孕的表达

Fig.1 The expression of MBD2 mRNA in mice endometria during d0~d7 pregnancy analyzed by qPCR

同孕天子宫内膜组织中的表达, 结果显示: MBD2在pd1的基质细胞和腔上皮、腺上皮微弱表达, pd4时在腔上皮和腺上皮、基质细胞的表达有所增加, 在pd5~pd7基质细胞的表达明显减弱, 腔上皮, 腺上皮表达微弱减少(图4)。

2.5 MBD2对小鼠子宫蜕膜化的影响

pd4宫腔注射芝麻油溶解的MBD2反义寡聚脱

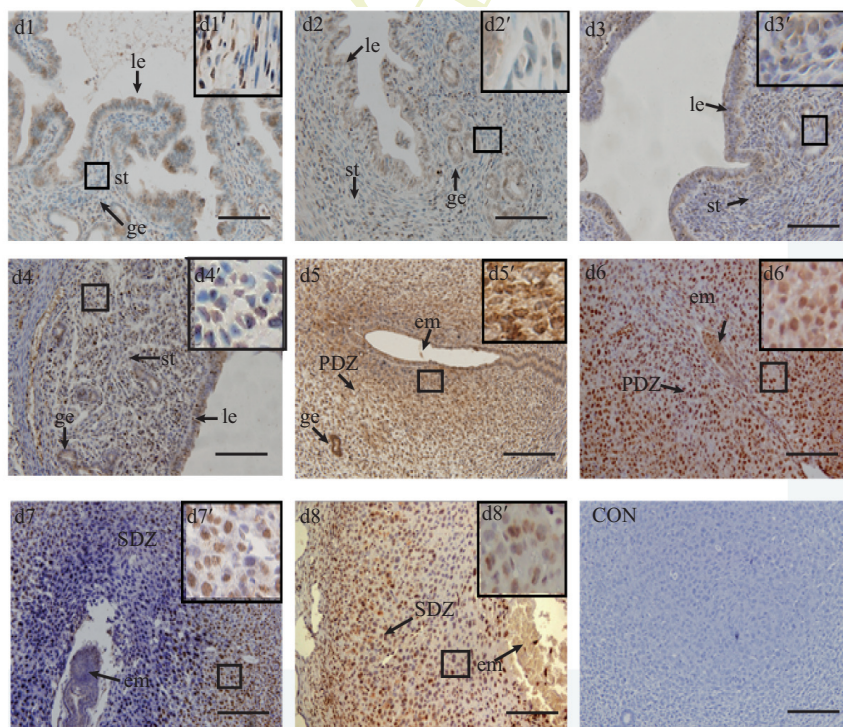


A: Western blot检测MBD2蛋白表达; B: MBD2蛋白表达定量分析。
* $P<0.05$, 与d0比较。

A: Western blot analysis of MBD2 expression; B: densitometric analysis of MBD2 protein. * $P<0.05$ vs d0 group.

图3 MBD2蛋白在围植入期子宫内膜的表达

Fig.3 Expression of MBD2 protein during pre-implantation

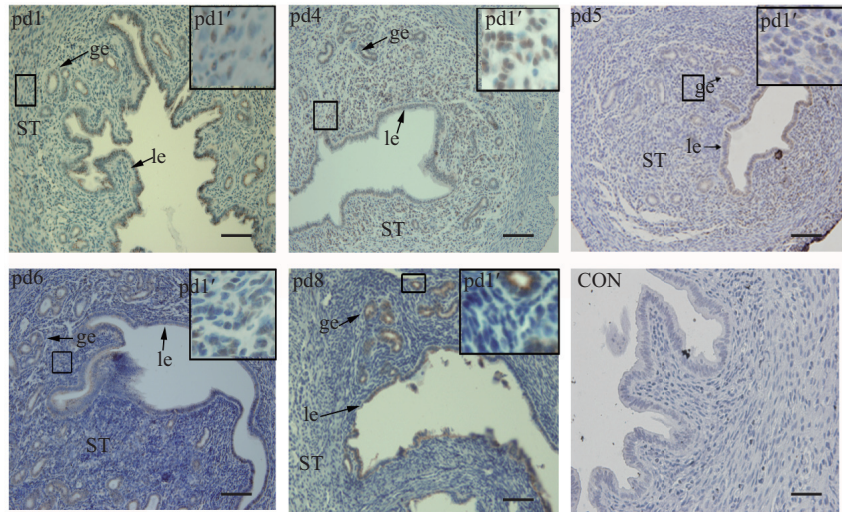


le: 腔上皮; ge: 腺上皮; st: 基质; em: 胚胎; PDZ: 初级蜕膜区; SDZ: 次级蜕膜区。棕色为阳性染色。d1' 到d8' 为该图中所框出区域的局部放大 (400×)。标尺=200 μm。

le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; st: troma; em: embryo; PDZ: primary decidual zone; SDZ: secondary decidual zone. Positive cells appeared in brown. d1' to d8' for the frame out local amplification area (400×). Scale bar=200 μm.

图2 MBD2在小鼠不同孕天子宫内膜的免疫组化染色

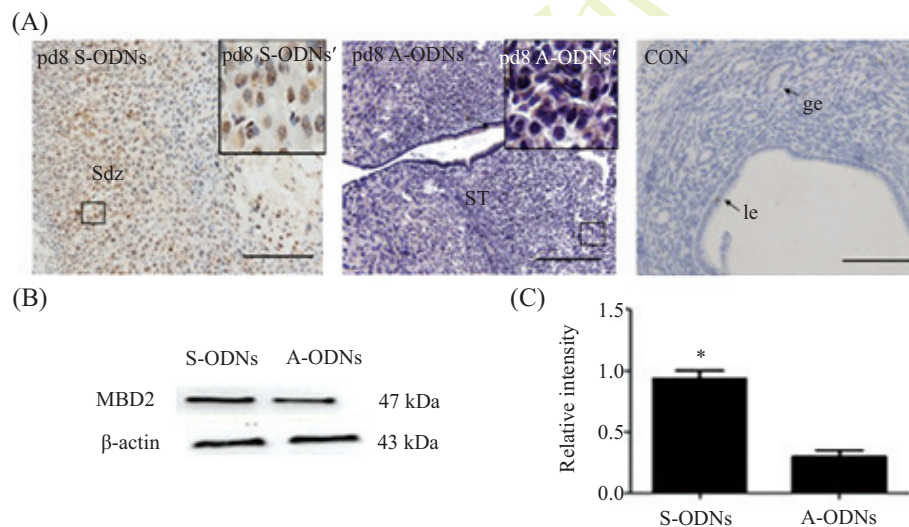
Fig.2 Immunohistochemistry staining of MBD2 antibody in mice endometrium on different pregnant days



棕色为阳性染色。Pd1'、pd4'、pd5'~pd7'为所框出区域的局部放大(400×)。标尺=200 μm。
Positive cells appeared in brown. pd1', pd4', pd5' to pd7' for the frame out local amplification area (400×). Scale bar=200 μm.

图4 免疫组织化学检测MBD2在假孕小鼠子宫内膜中的表达

Fig.4 Immunohistochemistry of MBD2 in mice endometria during pseudopregnancy



A: 免疫组化检测人工诱导蜕膜化小鼠子宫分别注射MBD2 A-ODNs和MBD2 S-ODNsMBD2后MBD2的表达; 棕色为阳性染色。pd8 S-ODNs'和pd8 A-ODNs'为所框出区域的局部放大(400×)。标尺=200 μm; B: Western blot检测MBD2蛋白表达; C: MBD2蛋白表达定量分析。* $P<0.05$, 与A-ODNs比较。

A: immunohistochemistry staining of artificial decidualization mice endometrium by MBD2 after S-ODNs: sense oligodeoxynucleotides; and A-ODNs: antisense oligodeoxynucleotides. Positive cells appeared in brown. pd8 S-ODNs' and pd8 A-ODNs' for the frame out local amplification area (400×). Scale bar=200 μm; B: Western blot analysis of MBD2 expression; C: densitometric analysis of MBD2 protein.* $P<0.05$ vs A-ODNs group.

图5 反义寡聚脱氧核苷酸沉默子宫MBD2的表达

Fig.5 MBD2 protein expression suppressed by ODNs

氧核苷酸(A-ODNs)和对照MBD2正义链(S-ODNs), 免疫组织化学结果显示, 子宫内膜基质细胞MBD2表达降低(图5A)。Western blot结果显示, MBD2 A-ODNs显著降低MBD2表达(图5B和图5C)。

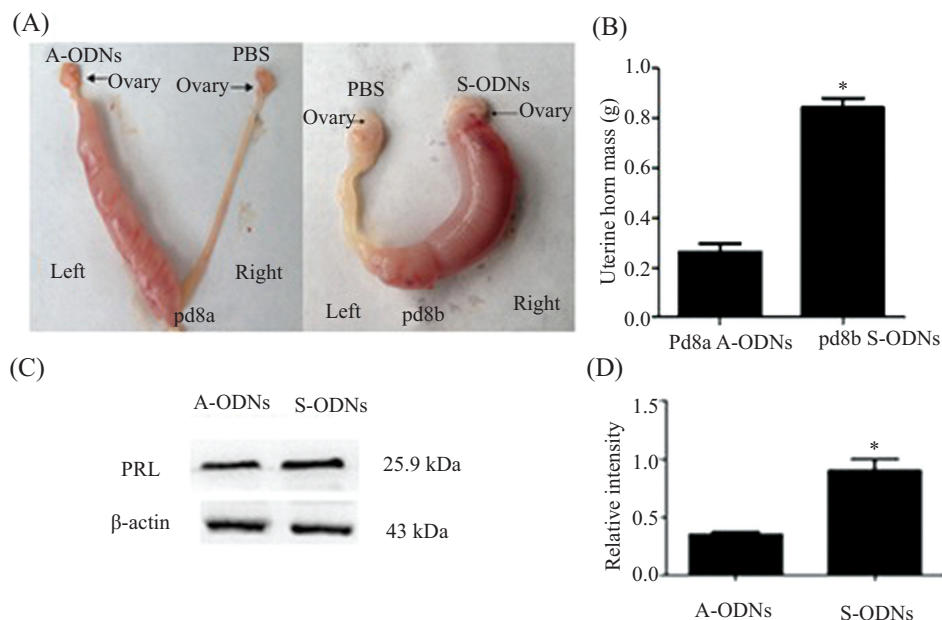
注射MBD2 A-ODNs后的一侧子宫湿重显著降低($P<0.05$), 子宫内膜蜕膜化受到明显抑制(图6A和图6B)。Western blot进一步检测了蜕膜化标志分子泌乳素(prolactin, PRL)的表达显著降低($P<0.05$)(图

6C和图6D)。

3 讨论

胚胎植入过程子宫内膜的程序性变化主要受甾体激素的调节, 同时有诸多遗传学水平调控的基因参与。近来研究发现, DNA甲基化可能在胚胎着床过程子宫内膜程序性变化中担负重要角色。

MBD2是MBD蛋白家族成员之一, 是一类与甲



A: 人工诱导蜕膜化的小鼠子宫外形图。pd8a为左侧子宫注射玉米油溶解的MBD2反义寡聚脱氧核苷酸(A-ODNs), 右侧注射PBS; pd8b为右侧注射玉米油溶解的MBD2正义寡聚脱氧核苷酸(S-ODNs), 左侧注射PBS; B: 人工诱导蜕膜化注射A-ODNs一侧和注射S-ODNs一侧子宫重量。* $P < 0.05$, 与pd8 A-ODNs比较; C: Western blot检测PRL蛋白表达; D: PRL蛋白表达定量分析。* $P < 0.05$, 与A-ODNs比较。

A: artificial decidualized uterus. In pd8a, the left horn was injected with MBD2 A-ODNs dissolved in maize oil and the right horn was injected with PBS. In pd8b, the left horn was injected with PBS and the right horn was injected with MBD2 S-ODNs dissolved in maize oil. * $P < 0.05$ vs pb8 A-ODNs group; B: the weight of artificial decidualized uterus injected with MBD2 A-ODNs or MBD2 S-ODNs; C: Western blot analysis of PRL expression; D: densitometric analysis of PRL protein. * $P < 0.05$ vs A-ODNs group.

图6 MBD2反义寡聚脱氧核苷酸(ODNs)对小鼠子宫蜕膜化的影响

Fig.6 The effects of antisense oligo-deoxynucleotide (ODNs) of MBD2 on decidualization in mouse

基化CpG二核苷酸结合的核蛋白, 它位于18q21的保守区域, 有6个外显子和一个长约50 Kb的无编码的外显子^[11], 它可与启动子区域甲基化的DNA结合招募组氨酸去乙酰化酶, 导致染色质重塑, 从而抑制转录, 抑制基因表达^[12]; 另一方面, MBD2有去甲基化酶的功能^[13]。MBD2虽然不能直接导致某种疾病的发生, 但其通过甲基化等表观遗传沉默方式参与了生物体多种重要的生物功能。

van Kaam等^[14]的结果显示, MBD2在子宫内膜的分泌期表达水平高于增殖期和月经期, 这说明MBD2的表达与子宫内膜的周期性变化相关联。此外, 体外培养的增生期子宫内膜组织加入雌、孕激素诱导后, 可上调MBD2和DNMT1的表达^[12-13]。这从另一个侧面证明了MBD2参与妊娠过程中子宫内膜发育和分化的调控, 且可能与激素的调控相关。

现已知孕激素在妊娠的建立和维持中发挥了重要作用^[15]。孕激素的生物活性是通过细胞内孕激素受体发挥作用的^[16-17], 孕激素受体在d1表达极低, d2在上皮细胞和基质细胞有微弱的表达, d3和d4在上皮细胞表达略有增强而在基质细胞表达显著增

强, 着床后期在基质细胞的表达继续增强, 显著高于着床前期^[18-19]。已有研究证实, MBD2能结合于甲基化和非甲基化的孕激素受体-β启动子区, 从而调控孕激素受体表达^[20]。本文研究发现, MBD2表达与孕激素的波动趋势相似, 在d5胚胎着床时到达高峰, 并持续高表达至d6和d7, 这显示MBD2表达存在的时空差异可能与小鼠围床期子宫内膜的孕激素动态波动有关联。此外, 在我们的研究中还发现, MBD2的表达在d5表达达到高峰, 可能与胚胎的出现、促进了MBD2的表达有关。

本文探讨了胚胎着床前后子宫内膜中MBD2的表达模式, 免疫组化结果显示, MBD2在子宫内膜发生蜕膜化(d6、d7)时, 基质细胞增殖分化明显, 并开始形成大量蜕膜细胞, 提示该基因可能参与胚胎着床后子宫内膜的增殖与分化。MBD2在假孕小鼠子宫内膜中发现pd5到pd7基质细胞表达明显减少, 已知假孕pd5到pd7没有胚胎的植入, 因而不能发生蜕膜化。推测MBD2可能和子宫内膜的蜕膜化相关。通过人工诱导蜕膜化模型, 发现注射MBD2反义寡聚脱氧核苷酸后, 在妊娠pd8子宫内膜蜕膜化程度减

弱。进一步证明, MBD2的表达与子宫内膜的蜕膜化相关。此外, 蜕膜化的标志分子PRL在MBD2的敲低表达后, 其表达亦随之减弱, 进一步揭示MBD2可能参与了子宫内膜的蜕膜化过程。但是MBD2对子宫内膜蜕膜化的调控是通过影响基质细胞的增殖还是分化仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, *et al.* Embryo implantation. *Dev Biol* 2000; 223(2): 217-37.
- Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6): 731-46.
- Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online* 2007; 15(6): 728-39.
- Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(5): 297-310.
- Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, *et al.* DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod* 2009; 24(5): 1126-32.
- Vincent ZL, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Expression and regulation of DNA methyltransferases in human endometrium. *Fertil Steril* 2011; 95(4): 1522-5.
- Logan PC, Ponnampalam AP, Rahnema F, Lobie PE, Mitchell MD. The effect of DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine on human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 2010; 25(11): 2859-69.
- Ding YB, He JL, Liu XQ, Chen XM, Long CL, Wang YX. Expression of DNA methyltransferases in the mouse uterus during early pregnancy and susceptibility to dietary folate deficiency. *Reproduction* 2012; 144(1): 91-100.
- Ding YB, Long CL, Liu XQ, Chen XM, Guo LR, Xia YY, He JL, Wang YX. 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to reduced embryo implantation and reduced expression of DNA methyltransferases and essential endometrial genes. *PLoS One* 2012; 7(9): e45364.
- Detich N, Theberge J, Szyf M. Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* 2002; 277(39): 35791-4.
- Hendrich B, Abbott C, McQueen H, McQueen H, Chambers D, Cross S, Bird A. Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes. *Mamm Genome* 1999; 10(9): 906-12.
- Snape A. MBDs mediate methylation, deacetylation and transcriptional repression. *Trends Genet* 2000; 16(1): 20.
- Wade P A, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23(1): 62-6.
- van Kaam KJ, Delvoux B, Romano A, D'Hooghe T, Dunselman GA, Groothuis PG. Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 2011; 95(4): 1421-7.
- Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004; 128(6): 679-95.
- Bagchi IC, Cheon YP, Li Q, Bagchi MK. Progesterone receptor-regulated gene networks in implantation. *Front Biosci* 2003; 9: s852-61.
- Lydon JP, Demayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 56: 67-77.
- Finn CA, Martin L. The control of implantation. *J Rep Fert* 1974; 39(1): 195-206.
- Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006; 7(3): 185-99.
- 张广化. 子宫内膜癌细胞孕激素受体基因表观遗传学调控的研究-DNA甲基化及鸟大沉默相关的染色质成分变化. 天津医科大学(Zhang Guanghua. Study on the epigenetic regulation of progesterone receptor in endometrial cancer cells-chromatin composition alterations associated with DNA methylation and expression silencing. Tianjin Medical University) 2010.

Galectin-7与MMP-9在食管鳞状细胞癌中的表达与术后早期复发转移的关系

何从文 汪 斌* 向小勇

(重庆医科大学附属第一医院心胸外科, 重庆 400016)

摘要 通过免疫组织化学法检测半乳糖凝集素-7(Galectin-7)与基质金属酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织和癌旁组织中的蛋白表达, 分析其表达与食管鳞癌的临床病理参数及早期复发转移(≤ 1 年)的关系。结果显示, Galectin-7和MMP-9在食管鳞癌组织中的阳性表达率增高。Galectin-7和MMP-9蛋白表达与TNM分期、浸润深度以及淋巴结转移密切相关, 二者表达呈正相关。联合检测MMP-9和Galectin-7对于预测术后早期的复发转移的灵敏度、特异度高于单独检测Galectin-7和MMP-9。Galectin-7和MMP-9在食管鳞癌的发生发展过程中可能起着重要的协同作用, 联合检测二者可为预测食管鳞癌的复发转移提供帮助。

关键词 食管鳞状细胞癌; 半乳糖凝集素-7; 基质金属酶-9; 侵袭转移; 复发转移

Expression of Galectin-7 and MMP-9 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and It's Relationship with Early Postoperative Recurrence

He Congwen, Wang Bin*, Xiang Xiaoyong

(Department of Caridiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Examined the expressions of Galectin-7 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma ($n=50$) and noncancerous specimens ($n=38$) by immunohistochemistry to analyze the relationship between the expressions of Galectin-7, MMP-9 and the clinicopathological features. The expressions of Galectin-7 and MMP-9 were increased in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). The expressions of Galectin-7 and MMP-9 were correlated with TNM stages, invasive depths and lymph node metastasis. Positive correlation between Galectin-7 and MMP-9 were found in ESCC. For prognosis of early recurrence and metastasis, the specificity and sensitivity of combined detection of Galectin-7 and MMP-9 were both higher than detecting Galectin-7 or MMP-9 alone. Galectin-7 and MMP-9 might play an important role in the pathogenesis and progress of ESCC. Combined detection of Galectin-7 and MMP-9 could be helpful for prognosis of early recurrence and metastasis in ESCC.

Key words esophageal squamous cell carcinom; Galectin-7; matrix metalloproteinase-9; invasion and metastasis; recurrence

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一。在中国大陆地区, 食管癌的主要类型为鳞状细胞癌, 发病

率居全国恶性肿瘤第五位, 死亡率居第四位^[1]。食管鳞癌与大多数侵袭性和致死性肿瘤一样, 对周围组织的浸润与转移是影响预后的主要因素。Lou等^[2]研究发现, 食管癌术后复发转移主要集中在术后1~2年, 复发率从第一年27%开始, 很快下降到第二年的17%, 随后呈逐年递减的趋势, 到第6年只有4%。Balon等^[3]通过对439例接受了食管癌根治术的

收稿日期: 2014-02-25 接受日期: 2014-04-14

*通讯作者。Tel: 023-89011132, E-mail: 18908399668@189.cn

Received: February 25, 2014 Accepted: April 14, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011132, E-mail: 18908399668@189.cn

网络出版时间: 2014-07-02 14:28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0055.html>

患者随访研究发现,一共有230例术后出现了复发转移,其中有105例(45.7%)发生在术后一年以内。因此,食管癌早期术后复发转移(≤ 1 年)对于整个预后有着重要的影响。半乳糖凝集素-7(Galectin-7)是半乳糖凝集素族(Galectins)的成员,在不同类型肿瘤的发生发展中起着促进或抑制的作用^[4]。基质金属酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是基质金属蛋白酶的一种,与肿瘤浸润转移关系密切。本研究通过免疫组化法检测了食管鳞癌中Galectin-7和MMP-9的表达,探讨二者的表达与临床病理参数和早期复发转移的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集重庆医科大学附属第一医院胸外科2012年3月至2013年3月50例食管鳞癌者术后标本,同时收集其中38例距癌组织5 cm以外的食管上皮组织。其中男性38例,女性12例,年龄44岁~83岁,平均年龄60.12岁;美国肿瘤联合会(American Joint Committee on Cancer)食管癌TNM临床分期(2010年标准): I期11例, II期20例, III期19例;组织分化程度中低分化35例,高分化15例;伴有淋巴结转移者27例,无转移者13例;有侵及外膜者23例,无外膜侵及者27例,排除身体其他部位原发性肿瘤。所选患者术前均未使用化疗药物及免疫增强药物,患者术后第1年,每3个月复查胸部增强CT、全身骨显像、头颅CT、腹部彩超等以判断是否出现复发转移。术后第2年,每半年复查一次。患者随访时间12~24个月,平均随访时间16.5个月。

1.1.2 试剂 兔抗人Galectin-7蛋白多克隆抗体、兔抗人MMP-9蛋白多克隆抗体均购自Proteintech公司。二抗山羊抗兔SABC试剂盒及DAB染色试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 免疫组化采用链霉亲和素-生物素复合物法(strept avidin-biotin complex, SABC),兔抗人Galectin-7一抗、兔抗人MMP-9一抗均以1:200比例稀释, PBS代替一抗作为阴性对照。使用ImagePro Plus软件观察免疫组化染色结果,采用二级计分法:阳性细胞数 $< 5\%$ 为0分, $5\% \sim 20\%$ 为1分, $20\% \sim 50\%$ 为2分, $51\% \sim 75\%$ 为3分, $> 75\%$ 为4分;阳性强度:淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3

分,不着色为0分。两者分数相加, < 3 分为阴性(-), ≥ 3 分为阳性(+)^[5]。同时使用ImagePro Plus软件检测MMP-9和Galectin-7的平均光密度值,每张切片随机取5个高倍镜视野,检测每个视野下阳性细胞的平均光密度值。

1.2.2 统计学分析 应用SPSS 17.0统计软件对数据进行分析处理,蛋白表达比较用卡方检验,配对资料的相关性分析采用Pearson检验。平均光密度值以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间比较采用 t 检验,相关性采用Spearman相关性分析。对诊断方法的判断使用ROC曲线分析。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Galectin-7和MMP-9在食管鳞癌组织及癌旁组织中的表达

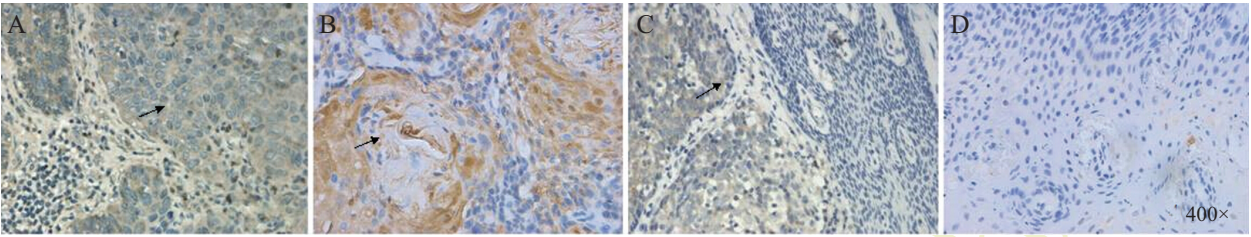
免疫组化结果显示, Galectin-7阳性染色表现为淡黄色至深棕色颗粒,定位于细胞浆。MMP-9阳性染色表现淡黄色至棕褐色颗粒,定位于胞浆及间质(图1和图2)。食管鳞癌组织Galectin-7、MMP-9表达阳性率高于癌旁组织,差异有统计学意义(表1)。Galectin-7、MMP-9在食管鳞癌组织中的平均光密度值与癌旁组织中的平均光密度值差异有统计学意义(表2)。

2.2 食管鳞癌组织中Galectin-7和MMP-9的表达与临床病理参数的关系

食管鳞癌中, Galectin-7表达阳性率在有淋巴结转移病例中明显高于无淋巴结转移病例($\chi^2=6.269$, $P=0.012$)、在III期病例中表达阳性率明显高于I/II期病例($\chi^2=15.787$, $P=0.000$),在侵及外膜的病例中表达阳性率明显高于未侵及外膜病例($\chi^2=16.689$, $P=0.000$)。而且MMP-9在有淋巴结转移病例阳性表达率高于无淋巴结转移病例($\chi^2=4.836$, $P=0.028$)、在III期病例中阳性表达率明显高于I期/II期病例($\chi^2=16.486$, $P=0.000$)、在中低分化病例中的阳性表达率高于高分化病例($\chi^2=5.357$, $P=0.021$),而二者蛋白表达与性别、年龄之间均无相关性($P > 0.05$, 表3)。分析二者的平均光密度值与临床病理参数的关系,也得到了一致的结果(表4)。

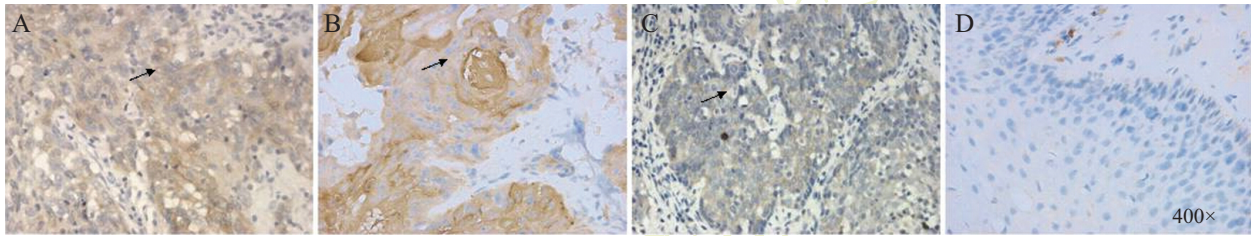
2.3 Galectin-7和MMP-9表达的相关性分析

对Galectin-7和MMP-9的表达进行的关联性分析(Pearson关联性分析),结果呈显著正相关性($r=1.000$, $P=0.000$)(表5)。对MMP-9和Galectin-7表



A: Galectin-7在低分化食管鳞癌中的表达; B: Galectin-7在中分化食管鳞癌中的表达; C: Galectin-7在高分化食管鳞癌中的表达; D: Galectin-7在癌旁组织中的表达。图中箭头所指黄色部分为阳性区域。
A: expression of Galectin-7 in poor differentiated ESCC; B: expression of Galectin-7 in moderate differentiated ESCC; C: expression of Galectin-7 in well differentiated ESCC; D: expression of Galectin-7 in noncancerous specimens. Positive areas were indicated by arrows in pictures.

图1 Galectin-7在食管鳞癌与癌旁组织中的表达
Fig.1 Expression of Galectin-7 in ESCC and noncancerous specimens



A: MMP-9在低分化食管鳞癌中的表达; B: MMP-9在中分化食管鳞癌中的表达; C: MMP-9在高分化食管鳞癌中的表达; D: MMP-9在癌旁组织中的表达。图中箭头所指黄色部分为阳性区域。
A: expression of MMP-9 in poor differentiated ESCC; B: expression of MMP-9 in moderate differentiated ESCC; C: expression of MMP-9 in well differentiated ESCC; D: expression of MMP-9 in noncancerous specimens. Positive areas were indicated by arrows in pictures.

图2 MMP-9在食管鳞癌及癌旁组织中的表达
Fig.2 Expression of MMP-9 in ESCC and noncancerous specimens

表1 食管鳞癌组织及癌旁组织中Galectin-7和MMP-9蛋白表达情况的比较

Table 1 Comparison of Galectin-7 and MMP-9 expressions between noncancerous specimens and ESCC							
组织类型	例数	Galectin-7阳性	χ^2 值	P值	MMP-9阳性	χ^2 值	P值
Tissue type	n	Galectin-7 positive	χ^2 value	P value	MMP-9 positive	χ^2 value	P value
Noncancerous specimens	38	2	33.250	0.000	4	25.539	0.000
ESCC specimens	50	33			32*		

* $P<0.01$, 与癌旁组织比较。
* $P<0.01$ vs noncancerous specimens.

表2 食管鳞癌组织及癌旁组织Galectin-7和MMP-9平均光密度值的比较

Table 2 Comparison of the MOD of Galectin-7 and MMP-9 expressions between noncancerous specimens and ESCC							
组织类型	例数	Galectin-7平均光密度值	t值	P值	MMP-9平均光密度值	t值	P值
Tissue type	n	MOD of Galectin-7 ($\bar{x}\pm s$)	t value	P value	MOD of MMP-9 ($\bar{x}\pm s$)	t value	P value
Noncancerous specimens	38	0.013 7 $\pm$ 0.096 7	10.430	0.000	0.014 3 $\pm$ 0.011 0	9.448	0.000
ESCC specimens	50	0.150 6 $\pm$ 0.0921 6			0.137 5 $\pm$ 0.091 0		

达的平均光密度值进行Spearman相关性分析, 结果($r=0.430, P=0.002$)与Pearson关联性分析一致, 二者表达呈正性相关。

2.4 食管鳞癌组织中联合检测Galectin-7和MMP-9对食管癌早期复发转移的预测作用

50例患者中, 19例术后出现复发转移, 其中复

发伴肝转移2例, 复发伴肺转移5例, 复发伴骨转移2例, 纵隔淋巴结转移3例, 复发伴胸膜转移1例, 吻合口复发6例。其中I期0例, II期3例, III期9例。12例复发转移均发现于术后一年以内(第6~12月), 平均发生时间为第10.25月, 截止最后一次随访日(2014-04-02), 已有7例患者死亡。19例复发转移患者Galec-

表3 食管鳞癌组织中Galectin-7和MMP-9的表达与临床病理参数的关系

Table 3 Relationship of Galectin-7 and MMP-9 expressions with clinical pathological parameters in ESCC

临床病理参数 Clinical parameter	例数 <i>n</i>	Galectin-7		χ^2 值 χ^2 value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	MMP-9		χ^2 值 χ^2 value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
		阳性 Positive	阴性 Negative			阳性 Positive	阴性 Negative		
TNM stage									
I/II	31	14	17	15.787	0.000	13	18	16.486	0.000
III	19	19	0			19	0		
Invasive depths									
T3/T4	23	22	1	16.689	0.000	22	1	18.521	0.000
T1/T2	27	11	16			10	17		
Lymph node metastasis									
N ₀	27	22	5	6.269	0.012	21	6	4.836	0.028
N ₁₋₂	23	11	12			11	12		
Differentiation									
Low/medium	35	24	11	0.235	0.558	26	9	5.357	0.021
High	15	9	6			6	9		

表4 食管鳞癌组织中Galectin-7和MMP-9平均光密度值与临床病理参数的关系

Table 4 Relationship of the MOD of Galectin-7 and MMP-9 with clinical pathological parameters in ESCC

临床病理参数 Clinical parameter	例数 <i>n</i>	Galectin-7平均光密度($\bar{x}\pm s$) MOD of Galectin-7 ($\bar{x}\pm s$)		<i>t</i> 值 <i>t</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	MMP-9平均光密度($\bar{x}\pm s$) MOD of MMP-9 ($\bar{x}\pm s$)		<i>t</i> 值 <i>t</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
TNM stage									
I/II	31	0.112	60±0.092 11	4.986	0.000	0.097	±0.086	5.378	0.000
III	19	0.212	6±0.049 4			0.203	6±0.054 0		
Invasive depths									
T3/T4	23	0.194	5±0.070 8	3.217	0.002	0.195	1±0.062 3	4.933	0.000
T1/T2	27	0.118	3±0.096 0			0.091	3±0.086 0		
Lymph node metastasis									
N ₀	27	0.176	40±0.085 28	2.234	0.030	0.176	4±0.085 2	2.234	0.030
N ₁₋₂	23	0.091	3±0.924 4			0.120	2±0.924 4		
Differentiation									
Low/medium	35	0.156	9±0.090 3	1.708	0.094	0.166	3±0.080 5	4.048	0.000
High	15	0.107	9±0.100 7			0.068	6±0.076 6		

表5 食管鳞癌组织中Galectin-7和MMP-9表达的相关性

Table 5 Expression correlation of Galectin-7 and MMP-9 in ESCC

Galectin-7的表达 Expression of Galectin-7	MMP-9的表达 Expression of MMP-9		合计 Total	<i>r</i> 值 <i>r</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
	+	—			
+	26	7	33	1	0.000
—	6	11	17		
Total	32	18	50		

tin-7和MMP-9表达均阳性, 单阳性患者及双阴性患者均未出现复发转移。将Galectin-7和MMP-9的平均光密度值做为预测术后早期复发的检测指标, 通过ROC曲线分析(图3), Galectin-7的灵敏度为89.5%,

特异度为71%; MMP-9的灵敏度94.7%, 特异度为77.4%; 联合MMP-9和Galectin-7的灵敏度为94.7%, 特异度为96.8%, 说明联合检测MMP-9和Galectin-7对于独立检测MMP-9或Galectin-7有更高的诊断价

值(表6和图3)。

3 讨论

Galectin-7是一种β-半乳糖苷结合蛋白,在多种类型的肿瘤中存在着过表达,但是在不同肿瘤中的作用有差异,甚至完全相反。在多数鳞癌中,Galectin-7与肿瘤的浸润转移有着密切的关系^[6-8]。Cada等^[9]通过免疫组化分析表皮、口咽和喉上皮的正常组织和鳞状细胞癌组织中Galectin-7的表达,结果表明,在正常组织中Galectin-7表达缺失,而癌组织中表达升高并且与肿瘤的临床分期相关。Saussez等^[10]应用免疫组化方法检测了IV期下咽喉癌组织中Galectin-7的表达情况,结果表明,在下咽鳞癌中Galectin-7的高表达与下咽喉癌的快速复发率有关。Zhu等^[11]使用比较蛋白质组学分析食管鳞癌组织和正常食管组织的差异表达蛋白后发现,Galectin-7是十二个表达上调的蛋白之一。而Shugo等^[12]研究发现,转染了Galectin-7的结肠癌DLD-1V细胞株的侵袭转移能力反而下降。本研究证实了Galectin-7在食管鳞癌中呈强阳性表达,而在癌旁组织中呈低表

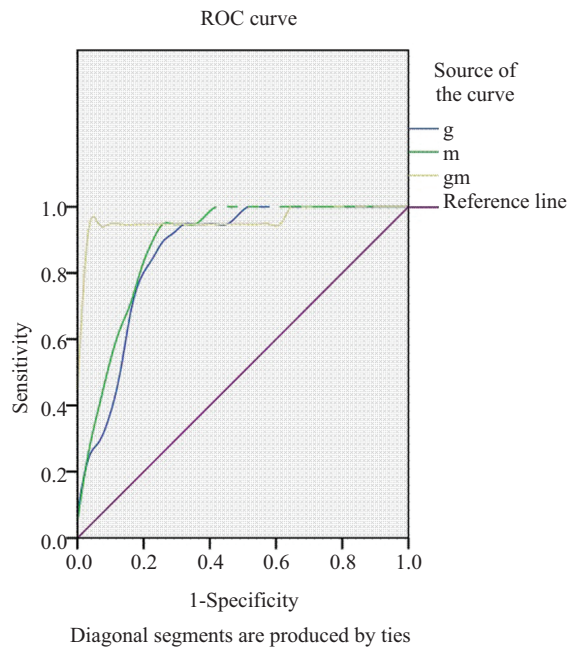


图3 单独检测Galectin-7、MMP-9与联合检测Galectin-7、MMP-9预测术后早期复发转移的ROC曲线分析
Fig.3 The ROC curve for separate detections of Galectin-7, MMP-9 and combine detection of Galectin-7 and MMP-9 for predicting the recurrence and metastasis of ESCC

表6 单独检测Galectin-7、MMP-9与联合检测Galectin-7、MMP-9对预测食管鳞癌的早期复发转移的ROC曲线分析结果

Table 6 The result of ROC analysis for separate detections of Galectin-7、MMP-9 and combine detection of Galectin-7 and MMP-9 at predicting the recurrence and metastasis of ESCC				
检测指标	曲线下面积	最佳工作点	灵敏度	特异度
Detect biomarker	AUC	Cut-off point	sensitivity	specificity
MMP-9	0.865	0.162	89.5%	71.0%
Galectin-7	0.889	0.138	94.7%	77.4%
Galectin-7+MMP-9	0.965	0.292	94.7%	96.8%

达。而且Galectin-7在有淋巴结转移者的食管鳞癌组织中的表达高于无转移者,侵及食管外膜者高于未侵及食管外膜者,III期患者高于I-II期者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。我们通过分析Galectin-7表达的平均光密度值与食管鳞癌临床参数之间的关系也得出了一致的结论,这表明,Galectin-7与食管鳞癌的侵袭、浸润、转移有着密切的关系。

大量研究表明,基质金属蛋白酶(MMPs)对肿瘤的侵袭转移起重要作用。MMP-9在基质金属酶家族中都属于明胶酶类,是MMPs家族中分子量最大的酶。大量研究发现,MMP-9在多种恶性肿瘤中过度表达^[13],提示其与肿瘤的发生发展有着密切的关系。

Suzuki等^[14]在利用Elisa法检测了四种侵袭能力不同的食管癌细胞培养液中基质金属蛋白酶的表达后发现,四种细胞株均表达MMP-9、MMP-2,但只有MMP-9的表达量与食管癌细胞株的侵袭能力相关,说明MMP-9在食管癌的侵袭转移中可能发挥着更加重要的作用,更具有成为血清标志物的潜质。本研究发现,MMP-9在食管鳞癌组织中表达阳性率与癌旁组织有显著差异($P<0.01$),可能与癌细胞直接分泌或促进MMP-9分泌有关。而外膜浸润者阳性表达率显著高于无外膜浸润者,有淋巴结转移者高于无淋巴结转移者($P<0.05$),由此说明,MMP-9的表达上升可能是食管癌浸润和转移机制中重要的一环。

Saussez等^[15]在利用免疫组化检测喉癌组织中Galectin-7及MMP-9的表达时发现, Galectin-7与MMP-9在喉癌组织中都存在过表达, 并且二者的表达呈正相关, 这一发现提示内源性凝集素对于MMP-9的表达有潜在的诱导作用。在本研究中, 50例食管鳞癌组织中Galectin-7和MMP-9的表达呈显著正相关, 这说明Galectin-7和MMP-9在食管鳞癌中的发生发展中存在着协同作用。PARK等^[16]研究发现, 在HeLa宫颈癌细胞中转染Galectin-7后, 转染组MMP-9的表达较空载体组显著升高, 并且MAPK通路蛋白P38也显著上升, 说明Galectin-7通过MAPK P38通路促进MMP-9的表达。Zheng等^[17]也发现, 在食管鳞癌中磷酸化的P38也存在着过度表达, 在食管鳞癌的恶性转化中具有重要作用。

在本研究中, 通过检测MMP-9与Galectin-7的表达, 分析二者表达与患者术后早期复发转移的关系, 我们发现联合检测MMP-9和Galectin-7对于预测食管鳞癌早期复发转移具有较高的灵敏度和特异度, 并且优于单独检测MMP-9和Galectin-7, 说明联合检测MMP-9和Galectin-7可作为预测食管鳞癌早期复发转移的指标, 并且比单独检测MMP-9及Galectin-7更具诊断价值。

本研究表明, 在食管鳞癌中Galectin-7和MMP-9蛋白存在正相关性, 且均与肿瘤的转移密切相关, 提示二者可能存在某种内在联系, 共同影响了食管鳞癌的生物学行为。联合检测Galectin-7和MMP-9可有助于食管鳞癌早期复发转移的预测。但Galectin-7是否通过MAPK p38信号通路参与食管鳞癌中MMP-9蛋白的合成, 尚待进一步探讨。

参考文献 (References)

- 赫捷, 邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及未来对策. 中国癌症杂志(He Jie, Shao Kang. The epidemiology, current status of management, challenge and future strategy for esophageal cancer in China. China Oncology) 2011; 21(7): 501-4.
- Lou F, Sima CS, Adusumilli PS, Bains MS, Sarkaria IS, Rusch VW, *et al.* Esophageal cancer recurrence patterns and implications for surveillance. J Thorac Oncol 2013; 8(12): 1558-62.
- Balon JM, Piessen G, Fabre S, van Seuning I, Triboulet JP. Pattern of recurrence following complete resection of esophageal carcinoma and factors predictive of recurrent disease. Cancer 2003; 97(7): 1616-23.
- St-Pierre Y, Campion CG, Grosset AA. Distinctive role for galectin-7 in cancer? Front Biosci 2012; 17: 438-50.
- Ma Y, Ma L, Guo Q, Zhang S. Expression of bone morphogenetic protein-2 and its receptors in epithelial ovarian cancer and their influence on the prognosis of ovarian cancer patients. J Exp Clin Cancer Res 2010; 29: 85.
- Demers M, Biron-Pain K, Hébert J, Lamarre A, Magnaldo T, St-Pierre Y. Galectin-7 in lymphoma: Elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. Cancer Res 2007; 67(6): 2824-9.
- Matsui Y, Ueda S, Watanabe J, Kuwabara I, Ogawa O, Nishiyama H. Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. Cancer Res 2007; 67(3): 1212-20.
- Demers M, Rose AA, Grosset AA, Siegel PM, St-Pierre Y. Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. Am J Pathol 2010; 176(6): 3023-31.
- Cada Z, Chovanec M, Smetana K, Betka J, Lacina L, Plzák J, *et al.* Galectin-7: Will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous cell and basal cell carcinomas? Histol Histopathol 2009; 24(1): 41-8.
- Saussez S, Cucu DR, Decaestecker C, Chevalier D, Kaltner H, André S, *et al.* Galectin 7 (p53-induced gene 1): A new prognostic predictor of recurrence and survival in stage IV hypopharyngeal cancer. Ann Surg Oncol 2006; 13: 999-1009.
- Zhu X, Ding M, Yu ML, Feng MX, Tan LJ, Zhao FK. Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. BMC Cancer 2010; 10: 290.
- Ueda S, Kuwabara I, Liu FT. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. Cancer Res 2004; 64: 5672-6.
- Rytönen AK, Vaara M, Nathaniel T. Distinctive activities of DNA polymerases during human DNA replication. Febs J 2006; 273(13): 2984-3001.
- Suzuki T, Kuwabara Y, Iwata H. Role of matrix metalloproteinase-9 in *in vitro* invasion of esophageal carcinoma cells. J Surg Oncol 2002; 81(2): 80-6.
- Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Chevalier D, Mortuaire G, Kaltner H, *et al.* Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. Histopathology 2008; 52(4): 483-93.
- Park JE, Chang WY, Cho M. Induction of matrix metalloproteinase-9 by galectin-7 through P38 MAPK signaling in HeLa human cervical epithelial adenocarcinoma cells. Oncol Rep 2009; 22(6): 1373-9.
- Zheng ST, Zhang CS, Qin X, Gen YH, Liu T, Sheyhidin I, *et al.* The status of phosphorylated p38 in esophageal squamous cell carcinoma. Mol Biol Rep 2012; 39(5): 5315-21.

88例卵巢上皮性癌行ATP-TCA 体外药敏试验结果分析

崔颖* 周丹 李叶 申桂华 张斯由
(北京医院妇产科, 北京 100730)

摘要 该研究是探讨三磷酸腺苷生物荧光肿瘤抗癌药物药敏性分析实验(ATP-TCA)在卵巢癌患者化疗中的应用。研究选取88例卵巢上皮性癌新鲜组织行ATP-TCA体外药敏试验, 分析结果、计算各种化疗药物敏感性, 并与48例对照组患者进行临床近期有效率的比较。结果显示, 在体外药敏试验敏感性最强的单药为紫杉醇(51.9%), 敏感性强弱依次为: 紫杉醇>卡铂>顺铂>吉西他滨>拓泊替康>多西他赛>依托泊苷>环磷酰胺>博来霉素, 联合用药方案敏感性较单药增加。药敏组患者临床近期有效率(85.23%)高于对照(68.75%)。ATP-TCA是一种有效的抗癌药物敏感性分析实验, 可为卵巢癌患者临床化疗提供个体化的指导方案。

关键词 原发卵巢上皮性癌; ATP-TCA; 个体化治疗

Analysis Results of ATP-Tumor Chemosensitivity Assay In Vitro of 88 Cases of Epithelial Ovarian Cancer

Cui Ying*, Zhou Dan, Li Ye, Shen Guihua, Zhang Siyou

(Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract In this research, we demonstrated the feasibility of ovarian cancer patients in clinical individualized chemotherapy using ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA) *in vitro*. We examined the heterogeneity of chemosensitivity in ovarian cancer specimens ($n=88$) using an *ex vivo* ATP-TCA. The short-term effectiveness of chemotherapy was compared between ATP group and control group. We found that the most active single agent tested was paclitaxel, to which 51.9% of samples were sensitive. The order of the sensitivity is paclitaxel > carboplatin > cisplatin > gemcitabine > topotecan > docetaxel > etoposide > cyclophosphamide > bleomycin. Combinations of agents showed more strong sensitivity cases. The short-term effectiveness rates in ATP group (85.23%) and control group (68.75%) were significantly different. Chemosensitivity testing may provide a practical method of testing new regimens before clinical trials in ovarian cancer patients.

Key words primary epithelial ovarian cancer; ATP-tumor chemosensitivity assay; individual chemotherapy

卵巢上皮性癌的特点是起病隐匿, 发现时大多为晚期、易盆腔内种植转移、手术难以根治, 因而化疗在卵巢癌的综合治疗中占有相当重要的地位。对化疗药物的敏感程度直接影响到患者的生存率、

复发率。但由于肿瘤本身存在异质性, 不同的个体, 即使组织来源与分期相同, 对化疗药物的敏感谱亦会不同, 而原发耐药与复发耐药又是制约卵巢癌临床疗效的关键因素^[1]。如果仅依照临床固定的方案进行化疗, 一部分患者不但对化疗药物无效, 而且会产生副反应及耐药性。因此, 近年来许多学者致力于探讨化疗药物敏感性测定, 对卵巢癌患者进行个体化治疗, 目的是提高疗效、减少毒副反应、防止

收稿日期: 2014-04-10 接受日期: 2014-06-11

*通讯作者。Tel: 010-85136112, E-mail: cuiy9906@163.com

Received: April 10, 2014 Accepted: June 11, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-10-85136112, E-mail: cuiy9906@163.com

网络出版时间: 2014-07-02 10:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0124.html>

多重耐药性的诱导。三磷酸腺苷法肿瘤化学敏感检测(ATP-tumor chemosensitivity assay, ATP-TCA)法是目前技术较为稳定、结果相对可靠、操作简便的药敏测定法。本文对近一年多来我院88例卵巢上皮性癌用ATP-TCA技术行化疗药物敏感性检测的结果进行分析,探讨了卵巢肿瘤患者的临床个体化化疗的可行性,以期提高疗效,降低毒副作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

研究对象为北京医院2013年1月~2014年2月收治并行手术治疗的卵巢上皮性癌患者,根据患者意愿将患者随机分为药敏组(88例)及对照组(48例)(表1)。药敏组88例,术中留取新鲜肿瘤组织采用ATP-TCA技术行化疗药物敏感性检测;对照组48例,

表1 患者资料

Table 1 The basic information of the patients

分组 Groups	例数 Number of cases	平均年龄(岁) Average age (years)	分期 Stage grouping			
			Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
ATP group	88	49.6	6	16	48	18
Control group	48	50.3	4	9	21	14

未行药物敏感性检测。所有患者均经病理证实为卵巢上皮性癌。

1.2 试剂与仪器

ATP生物荧光肿瘤药物敏感性检测试剂盒购自湖州海创生物科技有限公司。

1.3 化疗药物

紫杉醇(PTX, 意大利百时美施贵宝公司, 批号: G00084)、顺铂(DDP, 江苏豪森药业股份有限公司, 批号: 111103)、卡铂(CBP, 意大利百时美施贵宝公司, 批号: 2G01278)、拓泊替康(TPT, 大连美仑生物技术有限公司, 批号: 20111001)、吉西他滨(GEM, 法国礼来公司, 批号: A812353C)、依托泊苷(VP-16, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 12010331)、多西他赛(TXT, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: H20020543)、博来霉素(BLM, 日本化药株式会社, 批号: Y20262)、环磷酰胺体内活化物(4-HC, 加拿大TORONTO公司, 批号: 3-JBZ-104-1)。

1.4 试验流程

全过程需在无菌操作条件下进行。

1.4.1 标本制备 将新鲜卵巢肿瘤组织样本剪碎, 经抗生素浸泡、消化酶消化、37℃孵育2 h, 消化完毕后, 混合液离心5~8 min, 用200目细胞筛过滤未分解的肿瘤组织, 得到细胞悬液, 进行细胞分离、计数。

1.4.2 准备待测化疗药物 参照制药商的说明书或药典中的化疗药物血浆峰值浓度(peak plasma concentration, PPC), 设定5个药物测试浓度(test drug

concentration, TDC): 0%, 100%, 50.0%, 25.0%, 12.5% PPC。每个TDC做2个平行对照孔, 重复3次。培养板上剩下的孔可以用于MO(未加化疗药的细胞)和空白孔(未加细胞)对照测试。100%实验药物测试浓度配置见表2。

1.4.3 肿瘤细胞和药物共培养 计数后, 确定接种细胞量, 将培养板置于37℃、5% CO₂、湿度>95%的培养箱培养, 培养至第5 d时即可进行ATP检测。

1.4.4 数据分析 ATP的提取后进行荧光检测, 绘制ATP标准曲线, 完成数据自动传输和分析。

1.5 药敏检测结果判定

体外药物敏感度根据以下四种进行分类。强敏感: IC₉₀≤100% TDC和IC₅₀≤25% TDC; 中度敏感: IC₉₀>100% TDC和IC₅₀≤25% TDC; 轻度敏感:

表2 各种药物100% TDC配置表

Table 2 The 100% TDC of the drugs

抗癌药物 Anticancer drugs	100% TDC (μg/mL)
PTX	13.8
DDP	6.3
CBP	25
TPT	0.14
GEM	25
VP-16	20
TXT	10
BLM	0.6
4-HC	1

$IC_{90} \leq 100\%$ TDC和 $IC_{50} > 25\%$ TDC; 耐药: $IC_{90} > 100\%$ TDC和 $IC_{50} > 25\%$ TDC。其中, IC_{90} 为抑制90%肿瘤细胞生长时的血浆峰值浓度(PPC), 即本实验中的测试药物浓度(TDC), IC_{50} 为抑制50%肿瘤细胞生长时的血浆峰值浓度。

1.6 临床近期疗效评价

临床近期疗效主要参考Rustin等^[2]的评价标准: 治疗前1周内血清CA125异常升高的患者, 术后CA125转阴为完全缓解(CR); 降低 $>50\%$ 为部分缓解(PR); 降低 $<50\%$ 或增高 $<25\%$ 为稳定(SD); 增高 $>25\%$ 为进展(PD)。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行卡方分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ATP-TCA法卵巢癌标本评价

88例卵巢肿瘤组织标本中, 5例因消化后细胞数量过少无法检测, 3例因标本污染无法检测, 其余80例均顺利完成ATP-TCA药敏检测, 可评价率为90.91%(80/88)。

2.2 剂量-效应关系

通过1例卵巢癌标本ATP-TCA结果得出抗癌药物的剂量-效应曲线(图1), 可以看出, 不同药物及同种药物不同浓度对卵巢癌细胞的抑制率不同; 也可以看出单药和联合药物对卵巢癌细胞抑制率的差异符合药物的体内药代动力学。

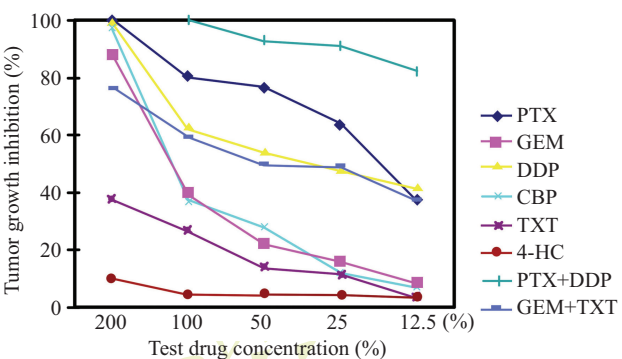


图1 抗癌药物不同药物浓度下对1例卵巢癌细胞抑制率的剂量-效应曲线

Fig.1 The dose-effect curve of the inhibition of the anticancer drugs to the cancer cells of one case

2.3 卵巢癌细胞对各种抗癌药物的敏感度

癌细胞对各种抗癌药物的敏感度各有不同, 单药在体外药物敏感性强弱依次为: 紫杉醇 $>$ 卡铂 $>$ 顺铂 $>$ 吉西他滨 $>$ 拓泊替康 $>$ 多西他赛 $>$ 依托泊苷 $>$ 环磷酰胺 $>$ 博来霉素, 联合用药方案敏感性较单药增加(表3)。卵巢癌细胞对目前临床上常用的紫杉醇联合顺铂(PTX+DDP)方案敏感度更高, 与PTX、DDP单药的敏感度相比具有显著性差异($\chi^2=17.72$, $P < 0.01$), 显示出联合用药良好的药物协同效应。

2.4 临床近期疗效评价

88例药敏组患者术后根据药敏试验结果选择化疗药物, 48例对照组患者根据临床经验用药, 治疗后均评价疗效(表4)。完全及部分缓解(CR+PR)为临床治疗有效, 计算两组患者临床治疗有效率。药敏组

表3 12种(组)抗癌药物对80例卵巢癌患者体外药敏情况

Table 3 The chemosensitivity of the ovarian cancer of 80 cases to 12 groups of anti-cancer drugs *in vitro*

药物 Drugs	例数 Number of cases	敏感 Sensitive cases	轻度敏感 Lightly sensitive cases	耐药 Resistant cases
PTX	79	41(51.90%)	34(43.04%)	4(5.06%)
DDP	16	4(25.00%)	5(31.25%)	7(43.75%)
CBP	62	17(27.42%)	29(46.77%)	16(25.81%)
TPT	78	14(17.95%)	31(39.74%)	33(42.31%)
GEM	79	15(18.99%)	24(30.38%)	40(50.63%)
VP-16	72	5(6.94%)	8(11.11%)	59(81.94%)
TXT	69	10(14.49%)	26(37.68%)	33(47.83%)
4-HC	57	2(3.51%)	22(38.60%)	33(57.89%)
BLM	52	0(0%)	3(5.77%)	49(94.23%)
PTX+DDP	41	30(73.17%)	5(12.19%)	6(14.63%)
GEM+TXT	39	13(33.33%)	18(46.15%)	8(20.51%)
TPT+VP-16	39	13(33.33%)	26(66.67%)	0(0%)

表4 临床治疗效果

Table 4 The clinical efficacy of the treatment

分组 Groups	完全缓解 CR	部分缓解 PR	稳定 SD	进展 PD
ATP group (cases)	61	14	10	3
Control group (cases)	23	10	11	4

临床治疗有效率为85.23%, 对照组有效率为68.75%, 差异有统计学意义($\chi^2=5.158$, $P<0.05$), 说明根据药敏试验选择治疗方案可提高临床治疗有效率。

3 讨论

ATP-TCA肿瘤体外药敏检测技术诞生于20世纪70年代中后期。1983年, Moyer等^[3]提出通过检测三磷酸腺苷(ATP)的数量可以反映相应细胞的活性度。1988年, Sevin等^[3]将ATP生物的荧光检测技术应用于卵巢癌, 进行体外卵巢癌的药物敏感性检测实验。ATP-TCA肿瘤体外药敏检测技术的检测原理是: 内源性ATP是活体的细胞能量来源的基本途径, 在细胞死亡、细胞膜破裂时, ATP迅速地水解。因此, 我们可以通过检测细胞内源性ATP的含量来反映活细胞数量和细胞的活性。ATP在相关酶的作用下, 可以和相关的荧光素结合, 并释放出波长为562 nm的荧光。检测荧光强度, 由此测出ATP含量, 进而反应活细胞数。肿瘤细胞通过在体外给药培养一段时间后, 测定其ATP的含量, 并与未加药对照组加以比较, 并计算出化疗药物的各个系列浓度对培养细胞不同的抑制率, 并参照相应的判断指标评估该化学治疗药物对肿瘤细胞的杀伤程度^[4]。这项技术高度敏感, 只需50个细胞就能测出有荧光强度的改变, 进而测出ATP的量^[5]。而且, 当ATP含量为 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ mol/L时, 活细胞的对数值与ATP发光值的对数值之间存在极好的线性关系, 从而达到精确定量^[6]。ATP-TCA法可评价率高, 本研究可评价率为90.91%, 与既往研究相比, 高于MTT法(四唑蓝显色反应法)。在评估细胞活力方面, ATP-TCA检测法比软琼脂集落形成实验和MTT法具有更高的敏感性和特异度^[7]。

上世纪80年代, 随着紫杉碱类药物的发现, 紫杉醇进入了卵巢上皮性癌的一线化疗。目前, 国际妇产科联盟(FIGO)和美国国家综合癌症网(NCCN)等国际权威机构及多数妇科肿瘤中心制定的临床癌症诊治指南中, 一致推荐紫杉醇和铂类(TP)联合方案为卵巢上皮性癌的标准一线化疗方案。本研究中,

单药中敏感性最高为紫杉醇, 其次为铂类, 且二者联合应用时敏感性增加。从体外药敏实验角度证实, 紫杉醇联合铂类为原发性卵巢癌的一线化疗方案。目前, 紫杉醇和铂类联合化疗治疗卵巢癌是首选方案, 并已广泛应用^[8]。卵巢癌经过肿瘤细胞减灭术联合紫杉醇、铂类辅助化疗, 虽然治疗后有60%~70%的患者获得临床完全缓解, 但其余30%~40%的患者仍有肿瘤残存甚至肿瘤进展, 预后很差^[9]。原因是其中一部分患者为紫杉醇、铂类耐药患者。本研究中, 紫杉醇联合铂类耐药率为18.18%。不同个体的体内代谢环境在现有的体外实验技术下尚无法建模。Fruehauf等^[10]认为, 在体外给予最适宜的药物及作用环境, 肿瘤标本如果已经是完全耐药的话, 那么体内因为肿瘤血供不良和(或)快速的药物失活, 更有可能导致治疗失败, 即通过体外药敏试验预测治疗失败的准确性更高。如果能够预测卵巢癌患者对紫杉醇、铂类化疗的敏感性, 则可使那些耐药患者免于不必要的化疗及由此带来的化疗副反应及经济浪费, 争取宝贵的治疗时间, 使患者从中获益。赵丹等^[11]通过对59例原发性卵巢癌患者的无瘤生存时间和总生存时间的分析显示, 体外药敏试验紫杉醇、铂类敏感组患者的中位无瘤生存时间和总生存时间分别为26个月和39个月, 均较体外药敏试验紫杉醇、铂类耐药组患者的无进展生存时间(10个月)和总生存时间(25个月)显著延长($P<0.01$)。这说明, ATP-TCA检测不仅可以预测多种化疗方案的敏感性, 同时可以与手术病理分期、病理分化程度等经典的预后因素一样, 是有效的预测卵巢癌患者复发及预后的影响因素。本研究中, 药敏组患者术后根据药敏试验结果选择化疗药物, 避免应用体外试验耐药药物, 临床上取得了较好的近期疗效, 与根据经验用药的对照组比较临床有效率差异明显, 说明体外药敏试验对临床治疗方案的选择有良好的指导作用。

对于复发及难治性卵巢上皮性癌, 二线化疗疗效低, 且无标准治疗方案供临床参考, 探索有效的、有针对性的二线化疗方案成为当务之急。本研究中, 作为二线化疗药物的吉西他滨、拓泊替康、多西他赛体外药物试验敏感性接近20%, 个体差异较大。若仅凭经验用药, 可能出现化疗无效, 而且会产生化疗副反应、降低生活质量、增加治疗费用等问题。本研究中, 依托泊苷、环磷酰胺、博来霉素体外药敏试验敏感性均低于10%, 且博来霉素耐药率达

到94.23%, 临床不适合单独应用。但体外药敏试验为轻度敏感的药物联合用药可增加敏感性。高克非等^[12]观察发现, 卵巢癌满意减灭术后应用TP(紫杉醇、卡铂/顺铂)方案和CBP(环磷酰胺、博来霉素、卡铂/顺铂)方案为一线化疗的两组患者, 其3年生存率、3年无瘤生存率、3年内复发病例的无进展生存期、3年生存分析和无瘤生存分析, 两组间比较均无显著性差异, 说明虽然单独用药敏感性低, 但联合用药可提高有效率。联合用药在提高有效率的同时, 也会增加药物的毒副作用, 所以临床仍应选择针对不同患者敏感性高的药物。因本研究中病例观察时间较短, 未对两组患者生存期及无瘤生存期进行比较, 有待进一步观察复发患者根据药敏结果选择化疗药物治疗的有效率。

化疗在卵巢上皮性癌的综合治疗中占有相当重要的地位, 在接受相同化疗方案治疗的个体中, 仍有相当一部分患者经过标准方案治疗并未从中获益。源于患者体内药物代谢酶的遗传性和肿瘤的异质性导致了肿瘤对多种抗肿瘤药物敏感性的差异。当某种抗肿瘤药物根据临床经验估计或盲目应用于临床治疗时, 化疗表现出明显的疗效差异。有时, 正在治疗中的肿瘤仍进展较快, 并发生严重的毒副反应而未收到预期的疗效。针对临床这种状况, 采用ATP-TCA法进行体外药物敏感性试验, 实行化疗药物筛选, 进行个体化治疗是可行而且必要的。

参考文献 (References)

- 1 Liu J, Matulonis UA. New advances in ovarian cancer. *Oncology* 2010; 24(8): 721-8.
- 2 Rustin GJ, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Pujade-Lauraine E, Jakobsen A, *et al.* Re: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (ovarian cancer). *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(6): 487-8.
- 3 Sevin BU, Peng ZL, Perras JP, Ganjei P, Penalver M, Averette HE. Application of an ATP bioluminescence assay in human chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol* 1988; 31(1): 191-204.
- 4 Fu Jun, Zhang Wei. Progression of tumor chemosensitivity assay with ATP bioluminescence in clinical application. *Chin J Clin Oncol Rehabil* 2004; 11(3): 274-7.
- 5 傅 军, 张 伟. ATP生物荧光肿瘤体外药敏检测技术及其临床应用研究进展. *中国肿瘤临床与康复* (Fu Jun, Zhang Wei. *Chin J Clin Oncol Rehabil*) 2004; 11(3): 274-7.
- 6 Sevin BU, Perras JP, Averette HE, Donato DM, Penalver M. Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer* 1993; 71(4 Suppl): 1613-20.
- 7 O'Meara AT, Sevin BU. Predictive value of the ATP chemosensitivity assay in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001; 83(2): 334-42.
- 8 Tian Haimei, Shi Xiaoyan, Fu Jun, Cao Dongyan, Zhan Kai, Wu Lingying, *et al.* Correlation between ATP bioluminescence tumor chemosensitivity assay and clinical response in ovarian cancer. *Chin J Oncol* 2005; 27(5): 296-8.
- 9 田海梅, 石晓燕, 傅 军, 曹冬艳, 张 凯, 吴令英, 等. ATP抗肿瘤药物敏感性检测技术与卵巢癌临床治疗的相关性研究. *中华肿瘤杂志* (Tian Haimei, Shi Xiaoyan, Fu Jun, Cao Dongyan, Zhang Kai, Wu Lingying, *et al.* Correlation between ATP bioluminescence tumor chemosensitivity assay and clinical response in ovarian cancer. *Chin J Oncol*) 2005; 27(5): 296-8.
- 10 Teo MY, Power DG, Tew WP, Lichtman SM. Doublet chemotherapy in the elderly patient with ovarian cancer. *Oncologist* 2012; 17(11): 1450-60.
- 11 Daly MB, Ozols RF. Symptoms of ovarian cancer—where to see the bar? *JAMA* 2004; 291(22): 2755-6.
- 12 Fruehauf JP, Alberts DS. Assay-assisted treatment selection for women with breast or ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 161: 126-45.
- 13 赵 丹, 吴令英, 王小兵, 李晓光, 李 莱, 李艳芬, 等. 三磷酸腺苷-肿瘤体外药敏试验在预测原发性卵巢上皮癌化疗敏感度中的应用价值. *中华肿瘤杂志* (Zhao Dan, Wu Lingying, Wang Xiaobing, Li Xiaoguang, Li Mo, Li Yanfen, *et al.* Application of ATP-tumor chemosensitivity assay in primary epithelial ovarian cancer. *Chin J Oncol*) 2010; 32(5): 368-72.
- 14 高克非, 刘富元, 陈福进, 冯艳玲. 上皮性卵巢癌满意减灭术后TP、CBP方案化疗的疗效比较. *癌症* (Gao Kefei, Liu Fuyuan, Chen Fujin, Feng Yanling. Comparison of therapeutic efficacy between TP regimen and CBP regimen on epithelial ovarian cancer after optimal cytoreductive operation. *Chinese Journal of Cancer*) 2007; 26(4): 431-4.

综 述

肝癌家族聚集性发病的分子遗传学研究进展

张存圳^{1,2} 程玉强³ 郭卫星² 程树群^{2*}(¹苏州大学研究生院, 苏州 215006; ²第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438; ³解放军234医院, 朝阳 122000)

摘要 许多研究表明, 肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)呈家族聚集性发病的倾向比较明显, 肝癌家族史阳性的人群罹患肝癌的风险远超阴性人群。但关于肝癌聚集性发病的机制并未得到全面的阐释。该文对近几年来与肝癌家族聚集性发病相关的研究作出综述, 以期对肝癌家族聚集性发病的研究提供一定的理论依据。

关键词 肝癌; 家族聚集性; 分子遗传

Advances in Familial Aggregation of Hepatocellular Carcinoma in Molecular Genetics

Zhang Cunzhen^{1,2}, Cheng Yuqiang³, Guo Weixing², Cheng Shuqun^{2*}(¹Graduate College, Soochow University, Suzhou 215006, China; ²Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; ³234th Hospital of PLA, Chaoyang 122000, China)

Abstract Many studies have shown that the incidence of cancer and heredity are closely related. For hepatocellular carcinoma (HCC), the incidence of familial aggregation tendency is also obvious, and studies have shown that the people having a positive family history of HCC suffered from HCC far more than the chance of the negative ones, but the mechanism of HCC clusters of disease has not been fully explained. This paper reviewed the published papers about the familial aggregation of HCC to provide a theoretical basis for the research of the incidence of HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; familial aggregation; molecular genetics

肝癌是严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤之一, 全世界每年肝癌的新发病例超过26万人之多, 其中43.7%分布在我国^[1-2]。我国的肝癌死亡率为20.4/10万(高发地区达30/10万以上), 占全部恶性肿瘤死亡的18.8%, 在男性中占癌症病死率的第2位, 女性中为第3位。据流行病学调查研究显示, 肝癌的家族聚集性发病倾向也很明显, 阳性肝癌家族史人群可能发生肝癌的的机率要远高于阴性人群, 而相关的分子流行病学研究也认为遗传易感基因在肝癌的

发病危险因素中有重要作用^[1-5]。本文主要就肝癌家族聚集性发病研究进展作一综述。

1 肝癌的家族聚集性发病

家族聚集性(familial aggregation)是指一个家族中的各级亲属都呈现某种共同的特性。自1913年Warthin首次对胃癌的家族聚集现象开始描述以来, 许多研究均表明多数肿瘤与遗传因素有着高度密切的关系^[6-10]。近年来研究者发现, 肝癌的发生也有家

收稿日期: 2013-11-26 接受日期: 2014-03-11

国家传染病重大专项(批准号: 2012zx10002016016003)、国家杰出青年基金(批准号: 81125018)、上海市新百人计划(批准号: XBR2011025)和上海市优秀学科带头人基金(批准号: 10XD1405800)资助的课题

*通讯作者: Tel: 021-81875251, Fax: 021-65562400, E-mail: chengshuqun@aliyun.com

Received: November 26, 2014 Accepted: March 11, 2014

This work was supported by the State Key Project on Infectious Diseases of China (Grant No.2012zx10002016016003), China National Funds for the Distinguished Young Scientists (Grant No.81125018), New Excellent Talents Program of Shanghai Municipal Health Bureau (Grant No.XBR2011025) and New Excellent Talents Program of Shanghai Science and Technology Committee (Grant No.10XD1405800)

*Corresponding author. Tel: +86-21-81875251, Fax: +86-21-65562400, E-mail: chengshuqun@aliyun.com

网络出版时间: 2014-06-17 10:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0392.html>

族聚集倾向。一般认为, 满足肝癌家族聚集性的条件有: (1)患者亲属患病率高于对照组; (2)家族史阳性的家庭成员经统计学验证患病的危险性高于阴性人员; (3)发病率随亲缘关系密切程度的不同而不同^[1]。

根据Turati等^[5]的研究显示, 肝癌家族史是增加罹患肝癌风险的独立危险因素, 且肝癌家族史并有乙肝病毒(HBV)和/或丙肝病毒(HCV)感染者, 其患肝癌的风险比无肝癌家族史者增加70倍。另据Donato等^[4]做的一项包括287例HCC患者和450例对照者(无任何肝脏疾病)的病例对照研究表明, 肝癌家族史与肝癌具有明显的相关性(OR值2.4, 95% CI为1.2~4.7)。而Hassan等^[12]的研究(包括347例HCC病人和1 075例健康受试者为对照)也显示, 相对肝癌家族史阴性人群, 在调整消除了包括年龄、性别、种族、教育、吸烟、饮酒、饮食及病毒性肝炎等众多因素的影响后, 肝癌患者的一级亲属患HCC的相对危险度增加3.9倍(95% CI为1.4~11.5); 并且, 对不伴病毒性肝炎的一级亲属做多因素分析还发现, 有肝癌家族史者患HCC的相对危险增加4.1倍(95% CI为1.3~12.9)。类似的结论在Gao等^[2](包括202例HCC家庭和202例对照家庭)和Yu等^[13]的研究(包括553例HCC病人和4 684例对照)也有体现。由此可见, 肝癌的发病有明显的家族聚集倾向, 家族史是肝癌发生的独立危险因素, 而这极可能是由遗传易感性所引起的。

2 肝癌家族聚集性发病的分子遗传学研究

2.1 其他肿瘤的分子遗传学研究

与肝癌一样, 其他许多肿瘤的发病也表现有家聚集性。除某些遗传性肿瘤外, 遗传因素在其发生过程中较为明确的被列为危险因素的肿瘤有很多, 常见的主要包括乳腺癌、胃癌、鼻咽癌、肺癌、前列腺癌以及腺瘤性息肉病等。在家族聚集性胃癌的分子遗传学中, Guilford等^[14]找到了一个与家族性胃癌相关的基因——E-Cadherin, 并用SSCP和DNA测序的方法检测到E-Cadherin基因第7外显子的最后一个核苷酸由G→T, 从而影响了mRNA的正常剪接, 导致缩短蛋白的形成。Gayther等^[15]在其他家族的研究中也发现了E-Cadherin基因突变, 从而排除了血统相关性。而在家族聚集性乳腺癌的相关研究中, BRCA1/2基因是研究最深入的。家族性乳腺癌中BRCA1突变的频率在20%~30%, 女性BRCA1突变导致罹患乳腺癌的终生风险为11%~12%, 超过70岁则

可达65%^[16]。此外, Staff等^[17]的研究发现, 11%的散发乳腺癌中存在BRCA1启动子区域的甲基化, 45%存在BRCA1拷贝数的缺失; Hughes-Davies等^[18]也发现, 13%的散发性乳腺癌中存在EMSY扩增, 而EMSY是和BRCA1/2相结合的。这也间接提示, BRCA1/2基因在乳腺癌的发生中起作用。据此也能说明, 不同的肿瘤可能具有相对较特异的一个或一些基因的改变, 而就是这部分基因的改变才导致了该肿瘤的发生。

2.2 肝癌的分子遗传学研究

很多研究都表明, 肝癌的发生发展是一个多因素、多阶段渐进的过程, 主要涉及到的分子遗传机制包括染色体易位、数目结构的异常、脆性部位的改变、细胞信号转导通路的异常、基因的突变如癌基因的激活及抑癌基因的失活等。这其中, 遗传易感性则主要表现在染色体的不稳定性。据Shen等^[3]的一项研究显示, 家族聚集性发病的HCC人群中存在一个高度易感的外显性染色体阴性基因(该易感等位基因的频率为0.25)。该研究中指出, 当遗传易感性存在时, HBV感染人群中男性患HCC的累积风险从0.09上升到0.85, 女性则从0.01升高到0.46; 年龄超过40岁的男性HBV感染人群中, 具有遗传易感性的人群患HCC的风险是没有者的9倍。Wang等^[19]用比较基因组杂交技术对60对肝癌样本的所有22个常染色体进行对比分析发现, 染色体17p、9p21-23、4q、13q、8p21-p23等存在等位基因缺失, 而1q、17q和8q24等存在基因组扩增(表1)。类似的研究中, Midorikawa等^[20]利用基因芯片技术分析了36例肝癌样本中基因组DNA拷贝数的水平, 发现1q、5p、5q、6p、7q、17q等染色体有扩增, 而1p、4q、6q、8p、16p、16q、17p等有杂合缺失区。Tarleton等^[21]在分析有肿瘤家族史的病例中发现, 8q24的异质性与肝癌的发生有密切的关联(OR值为2.80; 95% CI为1.15~6.80)。

除染色体异常改变之外, 部分基因及蛋白等分子的改变也与肝癌的聚集发病关系密切。Zhong等^[1]的研究显示, 包括多数的载脂蛋白家族(ApoA1、ApoA2、ApoC3和ApoE)和血清淀粉样A蛋白等的9个蛋白在家族聚集性肝癌患者中存在突变, 且有6个蛋白位点(m/z 6432.94、8478.35、9381.91、17284.67、17418.34和18111.04)与肝癌家族聚集性有关。Calvisi等^[24]对6例正常肝组织和30对肝癌和癌旁组织基因组甲基化水平进行检测发现, 肝癌组织DNA甲基化水平明显低于癌旁组织和正常肝组

表1 肝癌家族聚集发病相关的变异分子
Table 1 Molecular variation associated with
familial aggregation of HCC

分子类型	名称	参考文献
Type of molecule	Name	References
Chromosome	1p	[20]
	1q	[19-20]
	4q	[19-20]
	5p	[20]
	5q	[20]
	6p	[20]
	6q	[20]
	7q	[20]
	8p	[20]
	8p21-p23	[19]
	8q24	[19,21]
	9p21-23	[19]
	13q	[19]
	16p	[20]
	16q	[20]
	17p	[19-20]
	17q	[19]
Gene	miRNA-34a	[22-23]
	LMNA	[22-23]
	GFAP	[22-23]
	MACF1	[22-23]
Protein	ApoA1、ApoA2、 ApoC3、ApoE	[1]

织。许多研究还表明, DNA低甲基化在致使染色体不稳定、转座软件激活、惰性基因的激活表达等过程中也有重要的作用^[25-27]。另外, 在蛋白表达异常方面的研究中, Cheng等^[28]通过观察转染miRNA-34a的HepG2细胞引起的肝癌细胞整体蛋白表达的改变情况去分析miRNA-34a的生物学作用, 发现了一个蛋白调控网络。这个网络中的15个下调的蛋白可能均是miRNA-34a的靶蛋白; 并且, 与该网络相关的p53信号通路和细胞周期通路包括的许多蛋白如LMNA、GFAP、MACF1等就是通过miR-34a调控的。同时, 也有文献报道, P450-2E1、p53抗体表达异常也与肝癌家族聚集性发病有关^[22-23]。这些研究均明确地显示, HCC家族聚集性发病现象背后所蕴含的染色体改变和相关基因调控作用的密切关系。

3 肝癌家族聚集性发病的其他相关因素研究

除分子水平改变直接与肝癌的家族聚集性发病有关以外, 其他具有家族聚集性发病性质的疾病也与肝癌的家族聚集性有关。目前已经确定与HCC高度相关的危险因素有HBV及HCV慢性感染、酗酒、吸烟、

肥胖和糖尿病等^[29-32]。尽管相关疫苗已经得到了广泛的应用, 慢性HBV及HCV感染仍然是引起HCC的重要原因^[33-35]。据Yu等^[36]针对我国台湾地区的一项研究显示, 在感染乙肝病毒HBV的人群中, 有家族史的群组罹患肝癌的累积风险比无家族史群组更高($P=0.001$), 而在无乙肝病毒HBV感染的情况下, 肝癌家族史与罹患肝癌无明显的相关性。Yang等^[37]的研究还发现, 在一个家族中与HBV感染者亲缘关系的远近与肝硬化及肝癌的发病率呈递减关系, 亲缘关系越远风险越小。而在HCV与肝癌的相关研究中则发现, 感染HCV者第一代亲属罹患肝硬化及肝癌的风险增大^[38]。

4 展望

肝癌的家族聚集发病现象越来越受到研究者的关注, 引起这一表现的遗传易感因素在其发生发展过程中所起到的作用仍有待深入的研究取证。迄今为止报道的与肝癌有关的相关基因虽有很多, 但均无绝对的证据证明某一个或某类基因的作用, 其具体的调控机制仍不清楚。如能将各相关基因在家族聚集性肝癌患者和非家族聚集性肝癌患者之间以及肝癌家族聚集性发病的家族成员之间进行筛选比较, 很有可能发现与肝癌相关的特异性易感基因, 并可作为肝癌易感人群的早期筛查指标, 从而对减少肝癌的发病或对肝癌的早期治疗产生重要的意义。

参考文献 (References)

- Zhong DN, Ning QY, Wu JZ, Zang N, Wu JL, Hu DF, *et al.* Comparative proteomic profiles indicating genetic factors may involve in hepatocellular carcinoma familial aggregation. *Cancer Sci* 2012; 103(10): 1833-8.
- Gao Y, Jiang Q, Zhou X, Ding B, Wang R, Zhao G, *et al.* HBV infection and familial aggregation of liver cancer: An analysis of case-control family study. *Cancer Causes Control* 2004; 15(8): 845-50.
- Shen FM, Lee MK, Gong HM, Cai XQ, King MC. Complex segregation analysis of primary hepatocellular carcinoma in Chinese families: Interaction of inherited susceptibility and hepatitis B viral infection. *Am J Hum Genet* 1991; 49(1): 88-93.
- Donato F, Gelatti U, Chiesa R, Albertini A, Bucella E, Boffetta P, *et al.* A case-control study on family history of liver cancer as a risk factor for hepatocellular carcinoma in North Italy. *Brescia HCC Study. Cancer Causes Control* 1999; 10(5): 417-21.
- Turati F, Edefonti V, Talamini R, Ferraroni M, Malvezzi M, Bravi F, *et al.* Family history of liver cancer and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 55(5): 1416-25.
- Marcos-Pinto R, Dinis-Ribeiro M, Carneiro F, Machado JC, Figueiredo C, Reis CA, *et al.* First degree relatives and familial aggregation of gastric cancer: Who to choose for control in case-control studies? *Fam Cancer* 2012; 11(1): 137-43.

- 7 Goldin LR, Kristinsson SY, Liang XS, Derolf AR, Landgren O, Bjorkholm M. Familial aggregation of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2012; 30(2): 179-83.
- 8 de Klerk N, Alfonso H, Olsen N, Reid A, Sleith J, Palmer L, *et al.* Familial aggregation of malignant mesothelioma in former workers and residents of Wittenoom, Western Australia. *Int J Cancer* 2013; 132(6): 1423-8.
- 9 Kicinski M, Vangronsveld J, Nawrot TS. An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: A meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6(10): e27130.
- 10 Frings A, Geigl JB, Liegl-Atzwanger B, Leithner A. Familial aggregation of urinary tract and bone tumors: Searching for a syndrome. *Case Rep Med* 2012; 2012: 107894.
- 11 Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, *et al.* Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295(1): 65-73.
- 12 Hassan MM, Spitz MR, Thomas MB, Curley SA, Patt YZ, Vauthey JN, *et al.* The association of family history of liver cancer with hepatocellular carcinoma: A case-control study in the United States. *J Hepatol* 2009; 50(2): 334-41.
- 13 Yu MW, Chang HC, Chen PJ, Liu CJ, Liaw YF, Lin SM, *et al.* Increased risk for hepatitis B-related liver cirrhosis in relatives of patients with hepatocellular carcinoma in northern Taiwan. *Int J Epidemiol* 2002; 31(5): 1008-15.
- 14 Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, *et al.* E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392(6674): 402-5.
- 15 Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, *et al.* Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 1998; 58(18): 4086-9.
- 16 Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72(5): 1117-30.
- 17 Staff S, Isola J, Tanner M. Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63(16): 4978-83.
- 18 Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, Fuks F, Bye J, Chin SF, *et al.* EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell* 2003; 115(5): 523-35.
- 19 Wang G, Zhao Y, Liu X, Wang L, Wu C, Zhang W, *et al.* Allelic loss and gain, but not genomic instability, as the major somatic mutation in primary hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31(3): 221-7.
- 20 Midorikawa Y, Yamamoto S, Ishikawa S, Kamimura N, Igarashi H, Sugimura H, *et al.* Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene* 2006; 25(40): 5581-90.
- 21 Tarleton HP, Chang SC, Park SL, Cai L, Ding B, He N, *et al.* Genetic variation at 8q24, family history of cancer, and upper gastrointestinal cancers in a Chinese population. *Fam Cancer* 2014; 13(1): 45-56.
- 22 庞 裕, 李国坚, 吴继周, 吴健林, 陈务卿, 宁秋悦, 等. P53抗体与广西肝癌家族聚集性的相关性研究. *中华医学遗传学杂志* (Pang Yu, Li Guojian, Wu Jizhou, Wu Jianlin, Chen Wuqing, Ning Qiuyue, *et al.* Correlation between serum anti-P53 and familial clustering of hepatocellular carcinoma in Guangxi. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*) 2012; 29(2): 206-9.
- 23 盛 鹰, 黄天壬, 张振权, 邓 伟, 余家华, 张春燕, 等. 广西壮族人群肝癌家族聚集与细胞色素P450 2E1基因多态性等因素关系的研究. *中华流行病学杂志* (Sheng Ying, Huang Tianren, Zhang Zhenquan, Deng Wei, Yu Jiahua, Zhang Chunyan, *et al.* Study on the relationship between familial clustering of hepatocellular carcinoma and polymorphism of cytochrome P450 2E1 gene in Zhuang population, Guangxi. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*) 2009; 30(2): 151-5.
- 24 Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, *et al.* Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2713-22.
- 25 Yamada Y, Jackson-Grusby L, Linhart H, Meissner A, Eden A, Lin H, *et al.* Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(38): 13580-5.
- 26 Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30(7): 306-9.
- 27 Nambu S, Inoue K, Sasaki H. Site-specific hypomethylation of the c-myc oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78(7): 695-704.
- 28 Cheng J, Zhou L, Xie QF, Xie HY, Wei XY, Gao F, *et al.* The impact of miR-34a on protein output in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Proteomics* 2010; 10(8): 1557-72.
- 29 Ohishi W, Fujiwara S, Cologne JB, Suzuki G, Akahoshi M, Nishi N, *et al.* Risk factors for hepatocellular carcinoma in a Japanese population: A nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(4): 846-54.
- 30 Ayub A, Ashfaq UA, Haque A. HBV induced HCC: Major risk factors from genetic to molecular level. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 810461.
- 31 Franceschi S, Montella M, Polesel J, La Vecchia C, Crispo A, Dal Maso L, *et al.* Hepatitis viruses, alcohol, and tobacco in the etiology of hepatocellular carcinoma in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(4): 683-9.
- 32 Hassan MM, Spitz MR, Thomas MB, El-Deeb AS, Glover KY, Nguyen NT, *et al.* Effect of different types of smoking and synergism with hepatitis C virus on risk of hepatocellular carcinoma in American men and women: Case-control study. *Int J Cancer* 2008; 123(8): 1883-91.
- 33 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350(11): 1118-29.
- 34 Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118(12): 3030-44.
- 35 Marinho RT, Barreira DP. Hepatitis C, stigma and cure. *World J Gastroenterol* 2013; 19(40): 6703-9.
- 36 Yu MW, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Liu CJ, *et al.* Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(14): 1159-64.
- 37 Yang Y, Jin L, He YL, Wang K, Ma XH, Wang J, *et al.* Hepatitis B virus infection in clustering of infection in families with unfavorable prognoses in northwest China. *J Med Virol* 2013; 85(11): 1893-9.
- 38 Pasta L, Marrone C, D'Amico M, Bevacqua EA, D'Amico G, Pagliaro L. Familial clustering of HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2005; 37(9): 716-7.

Rho小G蛋白相关激酶的结构与功能

闫慧娟 勿呢尔 莫日根 范丽菲*

(内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘要 Rho小G蛋白家族是Ras超家族成员之一, 人类Rho小G蛋白包括20个成员, 研究最清楚的有RhoA、Rac1和Cdc42。Rho小G蛋白参与了诸如细胞骨架调节、细胞移动、细胞增殖、细胞周期调控等重要的生物学过程。在这些生物学过程的调节中, Rho小G蛋白的下游效应蛋白质如蛋白激酶(p21-activated kinase, PAK)、ROCK(Rho-kinase)、PKN(protein kinase novel)和MRCK(myotonin-related Cdc42-binding kinase)发挥了不可或缺的作用。迄今研究发现, PAK可调节细胞骨架动力学和细胞运动, 另外, PAK通过MAPK(mitogen-activated protein kinases)参与转录、细胞凋亡和生存通路及细胞周期进程; ROCK与肌动蛋白应力纤维介导黏附复合物的形成及与细胞周期进程的调节有关; 哺乳动物的PKN与RhoA/B/C相互作用介导细胞骨架调节; MRCK与细胞骨架重排、细胞核转动、微管组织中心再定位、细胞移动和癌细胞侵袭等有关。该文简要介绍Rho小G蛋白下游激酶PAK、ROCK、PKN和MRCK的结构及其在细胞骨架调节中的功能, 重点总结它们在真核细胞周期调控中的作用, 尤其是在癌细胞周期进程中所发挥的作用, 为寻找癌症治疗的新靶点提供理论依据。

关键词 Rho小G蛋白; 激酶; 细胞周期调控; 癌症

The Structure and Functions of Small Rho GTPase Associated Kinases

Yan Huijuan, Wunier, Morigen, Fan Lifei*

(School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract Small Rho GTPase protein family is a member of the Ras superfamily. The human Rho family of small GTPase is comprised of 20 members, of which RhoA, Rac1 and Cdc42 are best-studied. Small Rho GTPases are involved in many important biological processes, such as cell cytoskeleton regulation, cell migration, cell proliferation and cell cycle regulation. The downstream effectors (PAK, ROCK, PKN and MRCK) of small Rho GTPases play indispensable roles during the regulation of these biological processes. PAK regulates actin cytoskeleton dynamics and cell movement, and also is involved in MAPK mediated transcription, apoptosis and cell cycle progression; ROCK induces actin stress fiber and focal adhesion formation, and is a regulator of cell cycle progression as well; PKN regulates cell cytoskeleton rearrangement downstream of RhoA/B/C; MRCK is a central regulator in several physiological processes, like cell cytoskeleton rearrangement, nuclei rotation, microtubule organizing center relocation, cell movement and cancer cell invasion. Here, we summarize the current understanding of the structure information and

收稿日期: 2014-01-15 接受日期: 2014-03-26

内蒙古自然科学基金(批准号: 2013MS0505)、内蒙古大学高层次人才科研任务启动费(批准号: 30105-125128)、内蒙古大学博士后研究人员科研项目(批准号: 30105-135112)和内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJZY14005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992971; E-mail: fanlifei95@gmail.com

Received: January 15, 2014 Accepted: March 26, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2013MS0505), Program of Higher-level Talents of Inner Mongolia University (Grant No.30105-125128), Postdoctoral Foundation of Inner Mongolia University (Grant No.30105-135112) and Higher Scientific Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJZY14005)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992971; E-mail: fanlifei95@gmail.com

网络出版时间: 2014-07-02 10:44 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0007.html>

functions of small Rho GTPase associated kinases in cell cytoskeleton rearrangement, highlighting the contribution of these kinases on the eukaryotic cell cycle regulation, especially the roles in cancer cell cycle progression. We are hoping to shed light on the cancer treatment via identifying some new therapeutic targets.

Key words small Rho GTPase; kinases; cell cycle regulation; cancer

1 Rho小G蛋白家族及效应蛋白质

1.1 Rho小G蛋白家族

Rho小G蛋白家族是Ras超家族中的一员, 人类Rho小G蛋白家族由20个成员组成, 分别是RhoA、RhoB、RhoC、Rac1、Rac2、Rac3、Cdc42、RhoD、Rnd1、Rnd2、RhoE/Rnd3、RhoG、TC10、TCL、RhoH/TTF、Chp、Wrch-1、Rif、RhoBTB1和RhoBTB2^[1]。Rho小G蛋白参与细胞中多种生物学过程的调控, 在细胞骨架动力学、细胞移动、细胞增殖、细胞周期进程中具有重要作用^[2]。

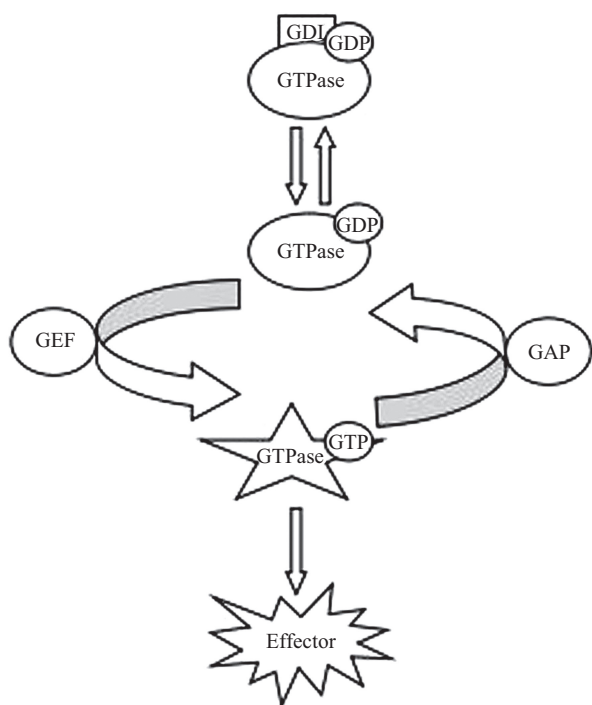
Rho小G蛋白是一类核苷酸依赖型分子开关, 它能用一种简要的机制来控制复杂的细胞生理过程。Rho小G蛋白具有两种结合状态, 一种是结

合GTP的激活状态, 另一种是结合GDP的非激活状态。在激活状态时, GTPase能识别目标蛋白, 即效应蛋白质, 产生反应应答直至GTP水解转变为GDP结合状态。这种活性由鸟嘌呤核苷酸转换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)控制。鸟嘌呤核苷酸转换因子催化GDP转变为GTP从而激活开关。GTPase活化蛋白(GTPase activating proteins, GAPs)刺激激活的GTPase转化为非激活状态, 鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂(guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)抑制GTPase的自发激活。因此, 由这三种蛋白质来调节Rho小G蛋白的活性, 其具体转化方式如图1^[3]。

1.2 Rho小G蛋白效应蛋白质分类

在GTP结合状态下, Rho小G蛋白可以结合其下游效应蛋白质并激活它们, 起始下游信号转导途径并重组肌动蛋白细胞骨架^[5]。到目前为止, 通过亲和纯化实验或酵母双杂交系统已鉴定出30多种Rho小G蛋白效应蛋白质。这些蛋白质根据其保守的GTP结合基序可分为三类, 这些保守的GTP结合基序分别是Cdc42/Rac相互作用结合基序(Cdc42/Rac interactive binding motif, CRIB)、ROCK-I/Kinectin同源结构域(ROCK-I/Kinectin homology region, RKH)和Rho效应蛋白质基序(Rho effector motif, REM)^[6]。

CRIB结构域存在于与Rac和Cdc42结合的效应蛋白质中, 如激活的Cdc42相关酪氨酸激酶(activated Cdc42-associated tyrosine kinase, ACK)、Wiskott-Aldrich综合症蛋白(Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP)、N-WASP(neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein)和p21激活激酶(p-21 activated kinases, PAKs)。有研究表明, CRIB结构域是效应蛋白质与GTPase结合必需的, 但其与GTPase的结合并不紧密^[6]。针对与Cdc42形成复合物的ACK或WASP的结构研究表明, 存在于Rac和Cdc42开关I中(即激活状态下的Rac和Cdc42中)的Asp³⁸对含CRIB的蛋白质是一个必不可少的氨基酸残基。在所有的含“CRIB的效应蛋白”中, 两个保守的His残基与Rac/Cdc42小G蛋白开关I中的Asp³⁸相互作用。这种特殊



Rho小G蛋白具有激活形式和非激活形式。Rho小G蛋白由GEFs、GAPs和GDIs三种调节因子调节其活性。激活的Rho小G蛋白通过与其效应蛋白质相互作用诱导下游反应。

Rho GTPases cycle between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form. There are three factors (GEFs, GAPs and GDIs) to regulate activity of Rho GTPases. Active GTPases interact with effector proteins and induce downstream responses.

图1 GTPase循环(根据参考文献[4]修改)

Fig.1 The GTPase cycle (modified from reference [4])

的识别机制将Rac的含“CRIB的效应蛋白”与Cdc42的含“CRIB的效应蛋白”加以区分。通过开关I中所含的特殊氨基酸残基,使不同的效应蛋白质与不同的Rho小G蛋白结合。

第二类Rho小G蛋白效应器是包含ROCK/Kinectin同源结构域的蛋白质。这类效应器含有的C-端螺旋基序,在ROCK、香木槲激酶(citron-kinase)和驱动链接蛋白(kinectin)中均有发现。ROCK由一个N-端丝氨酸/苏氨酸激酶结构域、一个位于中心的长 α 螺旋区域、一个C端PH结构域和一个半胱氨酸富集区域以及位于C端的长度为934~1 015残基的Rho结合结构域组成。

蛋白激酶N(protein kinase N, PKN)是典型的第三类Rho小G蛋白效应激酶,可通过其N端Rho效应蛋白质基序(Rho effector motif, REM)与RhoA结合。PKN的REM结合结构域由类似亮氨酸拉链基序的三个重复串联组成[HR1a(homology region 1a)、HR1b和HR1c]。HR1a和HR1b都能独立的结合Rho,但只有HR1a和RhoA之间的相互作用是GTP依赖的^[7]。Rho效应蛋白rothekin与rhopilin含一个N-端HR1结构域(具有RhoA结合能力),因此属于含REM结构域的Rho效应器蛋白质。对RhoA-GTP与PKN N-端形成的复合物的结构研究表明,当HR1a与RhoA的特异区域结合时,HR1a区域形成一个反向平行螺旋(an antiparallel coiled-coil finger fold, ACC)指状折叠^[8]。

1.3 Rho小G蛋白效应激酶的结构与基本功能

1.3.1 PAK PAKs是第一个被发现的Rho小G蛋白调节的激酶,属于STE20丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员。PAKs在很多组织中都有表达,在多种癌细胞中均过量表达。PAKs可分为两组,第一组(group I)包含PAK1、PAK2和PAK3;第二组(group II)包含PAK4、PAK5和PAK6。第一组PAKs通过GTPase依赖或非GTPase依赖的形式受细胞外信号激活;第二组PAKs通常是持续激活的^[9]。

Rac、Cdc42的GTP结合形式会与PAK相互作用(图2)。人类的PAK包含6个亚型分别为PAK1、PAK2、PAK3^[10-11]、PAK4、PAK5和PAK6。在体外,PAK1会受Rac1 GTP和Cdc42 GTP刺激,并被磷酸化激活。激活的PAK可磷酸化肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)从而抑制其对肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)的活性,导致

应力纤维的减少。另外,效应蛋白质LIM激酶(LIM domain kinase, LIMK)位于PAK的下游,PAK通过磷酸化LIMK的激活环内的Thr-508氨基酸残基激活LIMK,激活的LIMK磷酸化丝切蛋白(一种肌动蛋白结合蛋白),抑制F-肌动蛋白解聚活性,从而调节肌动蛋白动力学和细胞迁移^[12-15]。

PAK1结合Rac1、Rac2、Rac3和Cdc42,并由此被激活,但PAK1不会与RhoA、RhoB、RhoC、RhoE、Rif和Ras结合。位于PAK1 N端p21结合结构域(p21-binding domain, PBD)内的保守残基可通过与Rho GTPase结合激活PAK1。PAK可以通过CRIB与Rac和Cdc42结合,PAK上的激酶抑制结构域(kinase inhibition, KI)对PAK具有重要的抑制作用,在CRIB上游的赖氨酸束对Rac GTPase结合十分重要^[16]。哺乳动物的PAK1-PAK3 C-端的催化结构域序列相似性较高。PAKs还含有2个保守的PXXP SH3结合基序以及一个保守的非典型SH3结合基序。第一种保守的SH3结合蛋白为Nck,第二种SH3结合Grb2,PAK可以通过Nck和Grb2而被富集到膜上使激酶活性受到刺激,参与脂类(如:鞘氨醇)的相互作用等,此特点也说明,三种PAKs在多种信号转导通路中发挥相同的作用(图2)。

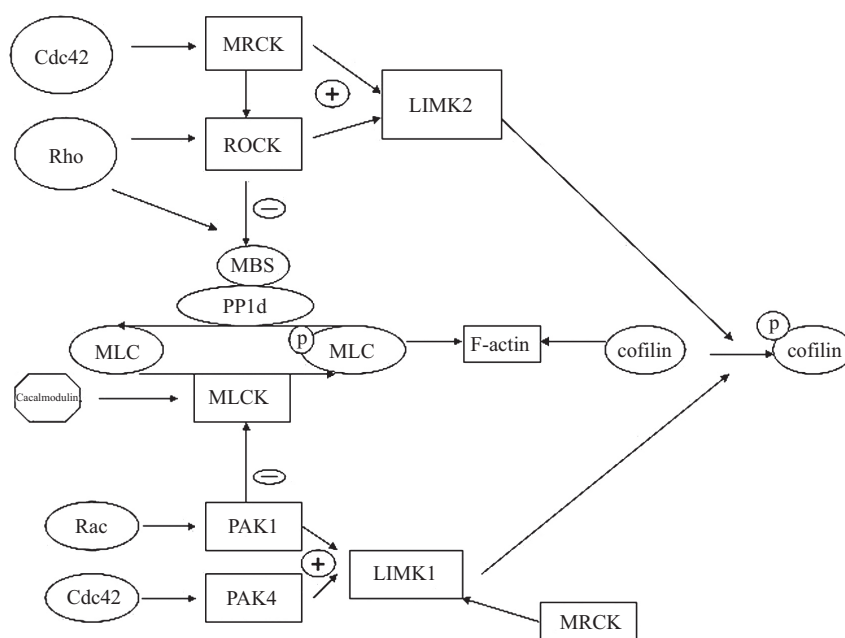
PAK分子水平的调节已研究得较清楚。PAK1在溶液和细胞中具有同源二聚体结构,存在反式抑制构象,PAK1的KI结构域可包被另一个PAK1的催化结构域,从而抑制催化结构域。在这种抑制作用中,PAK1的KI结构域残基发挥着重要的作用^[17]。结构分析和生物化学研究表明,GTPase结合PAK1导致KI结构域的构象发生重要变化,这种变化会破坏KI结构域与催化结构域的相互作用,导致自动磷酸化使全酶激活。位于激活环内催化结构域的单个残基(PAK1的Thr-423)的自动磷酸化,对维持或解除自动抑制以及对外源基质的催化功能具有重要作用。另外,PAK1的Ser-144的自动磷酸化有助于激酶激活,从而PAK1的Ser-198/203的自动磷酸化会下调PIX-PAK(PAK-interacting exchange factor)的相互作用,而降低PIX-PAK在Cdc42调节的趋化白细胞方向感知中的作用^[18]。PIX是一种Cdc42/Rac1鸟嘌呤核苷酸转换因子(GEF),与黏着斑有关,PIX-PAK的相互作用会由于Rac GTP或Cdc42 GTP的局部激活而强烈激活PAK。

1.3.2 ROCK ROCK是第一个被发现的RhoA

下游激酶。ROCK与RhoA的活性有直接关系(图2)。ROCK有2种亚型: ROCK α (ROCKII)和ROCK β (ROCKI/p160ROCK)。ROCKI和ROCKII的功能不同, ROCKI主要在炎症细胞中发挥作用, 而ROCKII主要在血管平滑肌细胞中发挥作用^[19]。在分布上, ROCKI主要存在于肺、肝、脾、肾和睾丸中, ROCKII主要在大脑、肌肉和心脏中表达^[20-21]。在哺乳动物体内, 均存在两种ROCK基因, ROCKI位于18号染色体上, ROCKII基因位于2号染色体上^[22]。前人研究表明, ROCK α /ROCKII是一个独立的Rho结合蛋白。RhoA、RhoB和RhoC可以激活其下游的ROCK分子。ROCK可以磷酸化一系列肌动蛋白细胞骨架调节因子(包括MLCK和LIMK), 激活的LIMK参与丝切蛋白的磷酸化调节, 从而调节细胞骨架和细胞收缩^[23]。另外, ROCKs在有丝分裂中具有多重作用,

如ROCKII磷酸化中间丝蛋白波形蛋白、角质纤维酸性蛋白和神经丝蛋白大亚基, 使局部的中间丝状体分解^[24], 这在有丝分裂后期子细胞分离时是必要的。

ROCKs是一类具有多个结构域的丝氨酸/苏氨酸激酶, 分子量为160 kDa。在其N端存在丝氨酸/苏氨酸激酶结构域。两种ROCK亚型的激酶结构域有高达92%的相似性^[25]。在ROCKs中, 有一个很长的螺旋结构。ROCKII晶体结构显示, 同源二聚体的螺旋结合RhoA·GTP, 此螺旋位于C端的10/13个氨基酸残基的区域^[26]。与Rac1和Cdc42相比, ROCKs与Rho的相互作用与RhoA的Phe-39、Tyr-66、Leu-69残基有关。ROCK的PH结构域被一个富含半胱氨酸的结构中断。ROCK的自我抑制结构域位于激酶的C-端, 在结合Rho·GTP后会解除抑制。自我抑制需要

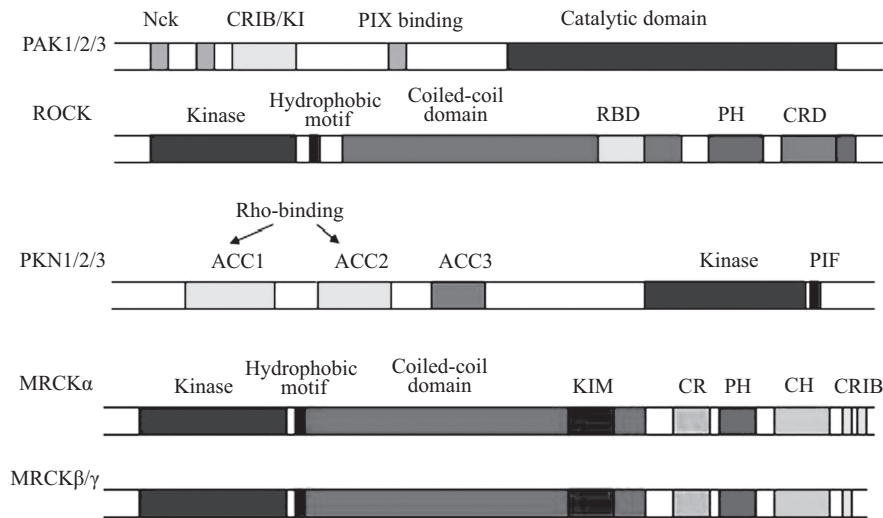


RhoA、Rac1和Cdc42具有数种激酶效应蛋白质。RhoA磷酸化MBS, 导致PP1受到抑制, 促进R-MLC磷酸化, 然而, ROCK却可以使PP1 δ 受到阻滞。ROCK、ROCK、MRCK和PAK调节LIMK的活性, 使其磷酸化而使cofilin失活。当cofilin磷酸化后将不再绑定F-actin, 这些蛋白质可催化F-actin的解聚和活性消失。MLCK是一种钙调激酶, 其可维持MLC复合物处于激活状态, 但PAK可以对MLCK其负调控作用。PAK1通过抑制MLCK的活性调节R-MCL, 另外, PAK1可以结合和调节LIMK1。与PAK相比, Rho和Cdc42与LIMK2的活性关系更紧密。因此, RhoA和Cdc42通过其信号通路中的下游激酶协同或单独发挥作用。

RhoA, Rac1 and Cdc42 have several kinase effectors. RhoA phosphorylates MBS and leads to inhibition of PP1, increasing R-MLC phosphorylation, however, PP1 δ is blocked by ROCK. ROCK, MRCK and PAK regulate LIMK activity, which inactivates cofilin by phosphorylation. Once phosphorylated, cofilin no longer binds to F-actin, and the ability of these proteins to catalyse both F-actin depolymerization and severing is inhibited. Myosin light chain kinase (MLCK) is a calcium/calmodulin-responsive enzyme that maintains the myosin heavy chain (MLC) complex in an active state, but is negatively regulated by PAK. PAK1 regulates R-MLC by inhibition of MLCK activity and also PAK1 can bind to and regulate LIMK1 activation loop downstream of Rac1. Rho and Cdc42 are more closely linked to the effects of LIMK2. Thus the Rac and Cdc42 signalling pathways, acting via PAKs, can function either co-operatively with or antagonistically to Rho/ROCK.

图2 Rho小G蛋白相关激酶在非肌细胞的细胞骨架调节中的作用(根据参考文献[5]修改)

Fig.2 Rho-associated kinases in non-muscle cell cytoskeletal regulation (modified from reference [5])



PAK、ROCK、PKN和MRCK是Rho小G蛋白的下游效应蛋白质。它们具有一些保守的结构域, 这些结构域使其具有了相识的功能。同时也具有不同的结构域, 使其可以结合不同的Rho小G蛋白(这些结构域中, CRIB是Cdc42/Rac相互作用结合基序, KI具有抑制激酶的功能, PIX是PAK相互作用交换基序, RBD是Rho结合结构域, CRD是半胱氨酸富集结构域, PH表示PH结构域, ACC是反向平行螺旋区域, 可与Rho小G蛋白结合, PIF是一种疏水基序, CR是半胱氨酸富集结构域, CH表示香木槎同源结构域)。

PAK, ROCK, PKN and MRCK are downstream effectors of small Rho GTPases. They have some conservative domains, which associate with their similar function. And they also contain some various domain structures through which they can bind to different small Rho GTPases (CRIB: Cdc42/Rac interactive binding motif. KI: kinase inhibition; PIX: PAK-interacting exchange factor; RBD: Rho-binding domain; CRD: cysteine-rich region/domain; PH: PH domain; ACC: anti-parallel coiled-coil; PIF: a hydrophobic motif; CR: cysteine-rich domain; CH: citron homology domain).

图3 PAK、ROCK、PKN和MRCK的结构(根据参考文献[5]修改)

Fig.3 Domain structures of PAK, ROCK, PKN and MRCK (modified from reference [5])

PH/半胱氨酸富集结构域, 它可以激活N-端激酶区域^[27]。由于ROCKII的N-端二聚体结构域对其激酶活性至关重要, 这对其激酶结构域二聚化和反式自身磷酸化必不可少。ROCK的C-端缺失会导致组成型激活^[28](图3)。

1.3.3 PKN PKN又叫PKC依赖激酶(PKC-related kinase, PRK), 具有三个家族成员, 分别是PKN1、PKN2和PKN3。哺乳动物的PKNs既可以与RhoA/B/C相互作用, 也可以与Rac1相互作用^[29]。PKN和PKC催化结构域的结构相似性较大, PKN能有效地磷酸化缩氨酸底物PXS/TXR/K。Rho和PKN1的相互作用有利于PDK1介导的PKN1活化环的磷酸化。PKN1活化环的磷酸化(发生在PKN1的Thr-774残基和PKN2的Thr-816残基)对PKN1的活性是必需的。

PKN的C-端激酶结构域与PKCs的激酶结构域类似, 含有Ser/Thr激酶结构域, N-端含有与Rho相互作用的重复结构域, 例如重复的三个反向平行螺旋(anti-parallel coiled-coil, ACC), 前两个ACC直接参与与Rho的结合, 目前认为, ACC1和ACC2能通过不同的结合模式与RhoA或Rac1结合(图2)。在PKN催化结构域约130个氨基酸的位置, 与PKC的C2结构域

有微弱的相似性, 可能有自动抑制作用, 并对脂质敏感, 例如花生四烯酸^[30]。与其他GTPase相关联的激酶一样, Rho与ACC1/2的相互作用会解除PKN分子内部的自动抑制作用, 进而激活PKN。RhoA竞争性的结合ACC1指状结构域可以脱去PKN的催化结构域^[31]。另外, PKN的ACC结构域能与其他蛋白质相结合, 如锚定蛋白CG-NAPA(centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein)。

1.3.4 MRCK MRCKs是与Cdc42/Rac结合的丝氨酸/苏氨酸激酶, 由MRCK α 、MRCK β 和MRCK γ 三种亚型组成。MRCK α 能结合Cdc42·GTP和Rac·GTP, 其中结合Cdc42·GTP的能力强于对Rac·GTP的结合。它作为Cdc42的受体具有促进细胞骨架重排的能力, 参与肌动蛋白重组和丝状伪足形成(图2)。MRCK的GTPase结合结构域与PAK相似, 但是激酶结构域与Rho的效应蛋白ROCK/CRK(citron kinase)相近。MRCK α 具有一个二酰基甘油类似物PMA(benzenetetracarboxylic acid)的结合位点, 可通过其与Cdc42发生相互作用^[32]。

人类的MRCK α 基因位于1q42.1, 长度大约是250~300 Kb^[33]。研究表明, MRCK γ 基因更简洁, 其

产物具有MRCK α 和MRCK β 的所有特点。在哺乳动物体内, MRCK的表达是普遍的, 在脑中的表达量最高。Ivan等^[34]利用基因组和cDNA序列, 综合分析了人类MRCK α 基因芯片的特点。MRCK α 的CRIB1(外显子36)和CRIB2(外显子37)位于同一个转录单元。在功能上, CRIB1会优先结合Cdc42·GTP, CRIB2可以增强MRCK与Rac·GTP的相互作用。MRCK α 的外显子21~24表达一个可变区, 已经检测到有13种亚型, 位于N-端70个氨基酸残基的保守区是激酶结构域, 该结构域对激酶活性至关重要。延伸到中心的螺旋结构域, 有1个激酶抑制基序(kinase inhibition motif, KIM)^[33]。PH结构域和CH结构域的生物学术功能目前仍不清楚, 这些结构域在其独立表达时, 会抑制MRCK的生物学术活性。不同于ROCK, MRCK活性的调节不包含PH结构域, 而是KIM通过配合和抑制MRCK的催化结构域发挥负向调节功能。MRCK γ 的KIM共表达会抑制MRCK α 和MRCK γ 的活性(图3)。

在Hela和PC12细胞中, MRCK α 参与Cdc42调节的肌动蛋白形成和神经突的生成。另外, MRCK α 可以调节细胞骨架重建, 其机制是通过磷酸化蛋白磷酸酶1(protein phosphatase 1, PP1)和肌球蛋白轻链(MLC2)的肌球蛋白结合亚单位来发挥作用的。MRCK可以调节与细胞突触有关的肌动蛋白活性。MRCK和肌球蛋白II相关的肌球蛋白18A(myosin 18A, MYO18A), 通过接头蛋白LRAP35a(leucine-rich adaptor protein 35a)形成三元复合物。具体的, LRAP35a通过其亮氨酸重复1(leucine Repeat 1, LR1)与MRCK结合, 通过LRAP35a上保守的PDZ-结合基序(PDZ-binding motif)与MYO18A相互结合^[35]。这个三元复合物对薄片肌动蛋白发挥作用。LRAP35a激活MRCK, 通过与MYO18A相互作用而作用于肌动蛋白, 导致薄片RMLC磷酸化和MYO2(myosin 2)依赖的肌动蛋白组装。在LRAP35a激活MRCK过程中, 主要是通过MRCK上的KIM结构域相互作用而激活MRCK。具体作用是这样的, KIM是MRCK分子内的自动抑制结构域, 通过与MRCK上的催化结构域结合来抑制MRCK的活性。LRAP35a与KIM结合导致自动抑制机制解除而使MRCK激活。

MRCK除参与上述的调节外, 还与核转动和微管组织中心(microtubule-organizing center, MTOC)

再定位有关。在迁移的细胞中, MRCK通过F-肌动蛋白逆流(actomyosin retrograde flow)的激活, 从而促进核转动和微管组织中心(microtubule-organizing center, MTOC)再定位。血清中有一种称为溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)的血清因子。在LPA的刺激下细胞内Cdc42的水平升高。Cdc42刺激下游的MRCK和Par6/PKC两条通路, 第一, MRCK调节肌球蛋白II和F-肌动蛋白流促进核移动, 最终使微管组织中心重新定位; 第二, Par6/PKC与MRCK均可使Dynein/Dynactin在移动的细胞前缘富集, 富集的Dynein/Dynactin使微管组织中心位于细胞中心, 进而使微管组织中心重新定位^[36]。

2 Rho、Cdc42和Rac及其激酶调节肌动蛋白/肌球蛋白II动力学

在多种细胞中, Rho、Cdc42和Rac通过其相关激酶调节具有收缩性的肌动蛋白/肌球蛋白II细丝使细胞迅速的变形。例如, 血管平滑肌细胞通过收缩和舒张控制血流, 而能够刺激血管平滑肌细胞收缩和舒张的生理刺激就包括RhoA/ROCK^[37]。在非肌细胞中, 类似的收缩性部分是由肌动蛋白细丝/肌球蛋白II装配形成的, 在这个过程中需要原肌球蛋白和钙调蛋白等附属蛋白的参与。肌球蛋白磷酸化依赖两种酶的动态平衡: Ca²⁺依赖的调节肌球蛋白轻链激酶(regulatory myosin light chain kinase, R-MLCK)和调节肌球蛋白轻链磷(regulatory myosin light chain phosphatase, R-MLC)。肌动蛋白II的R-MLC的磷酸化导致其与肌动蛋白相互作用, 由此激活肌球蛋白ATPase, 导致细胞收缩性提高。R-MLC磷酸酶由三部分组成: 催化亚单位(protein phosphatase type 1, PP1)、肌球蛋白结合亚基(myosin-binding subunit, MBS)和一个小的非催化亚基。MBS中心区域磷酸化会抑制PP1, 同时增加磷酸化的R-MLC。MBS的N端和C端均可具有结合肌球蛋白的结合位点^[38], C端具有RhoA结合位点。

在体外, ROCK可以磷酸化R-MLC的Ser-19, 相反, 磷酸酶可以抑制R-MLC脱磷酸化。ROCK磷酸化MBS130发生在Thr-697、Ser-854和Thr-855三个氨基酸位点。Thr-855的磷酸化诱导磷酸酶从肌球蛋白上解离下来, 而更重要的是, 在与磷酸酶结合的MBS130的抑制基序中Thr-697的改变会促进MBS130直接结合和抑制PP1。与PAK相似, ROCK可以磷酸化

LIMKs激酶结构域, 如LIMK2的Thr-505, 提高LIMK2磷酸化cofilin的能力。PKN和PAK可以通过一种MBS/PP1抑制剂—蛋白质激酶C抑制剂17(protein kinase C-potentiated inhibitor of 17 kDa, CPI-17), 磷酸化MBS的Thr-38位点并抑制MBS的活性^[39]。肌动蛋白轻链激酶MLCK是一种钙/钙调蛋白(calmodulin)调节的酶, 它受到Ca²⁺的调节后, 可使R-MLC处于活化状态, 磷酸化活化状态的MLC促进F-肌动蛋白组装, 而Rac下游的PAK1对其有负调控作用。位于Cdc42、Rho和Rac下游的MRCK、ROCK、PAK可以磷酸化激活LIMK, 激活的LIMK磷酸化cofilin蛋白N端三个丝氨酸/苏氨酸残基, 抑制其解聚肌动蛋白丝^[40]。

3 Rho小G蛋白效应激酶与细胞周期调控

3.1 PAK与细胞周期调控

PAKs是细胞骨架动力学和细胞运动的重要调节者。另外, PAKs通过MAPK参与转录、细胞凋亡、幸存通路及细胞周期进程^[41]。因此, PAKs在很多病理学调节和细胞形态变化中发挥作用。

细胞中的PAK1定位于中心体、纺锤体和收缩环处, 通过影响细胞周期进程对细胞增殖发挥作用。PAK1参与肿瘤的发生, 在某些癌症, 如乳腺癌、直肠癌、胃癌和卵巢癌细胞中, PAK1的表达均上调。在乳腺癌细胞中, 通过siRNA干扰抑制PAK1的表达能降低cyclinD1的表达量, 说明PAK1有促进细胞增殖的作用^[42]。在成胶质细胞瘤细胞中, PAK1磷酸化与细胞存活时间的降低有关, 敲除PAK1会抑制成胶质细胞瘤的侵袭性^[43]。PAK1的表达会伴随恶性直肠癌肿瘤发生的进程而增加, 敲除PAK1会降低直肠癌的生长速度及其肿瘤体积, 其机制是PAK1下调能延迟细胞周期, 并阻滞细胞周期在G₁期, 从而降低结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)细胞的增殖能力。

PAK1降低结肠直肠癌细胞的增殖能力的具体的机制是这样的, PAK1能调节cyclinD1:Cdk4/Cdk6的表达。细胞从G₀期进入G₁期与cyclinD1:Cdk4/Cdk6的表达和激活有关, cyclinD1:Cdk4/Cdk6在G₁期时磷酸化和钝化视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma, Rb)。Rb的磷酸化可与E2F转录因子结合, 这对细胞周期进程及G₁/S转变是必需的。在多种细胞中, JNK(c-Jun N-terminal kinase)通路是细胞增殖和诱导细胞从G₀期进入G₁期的重要通路, 这

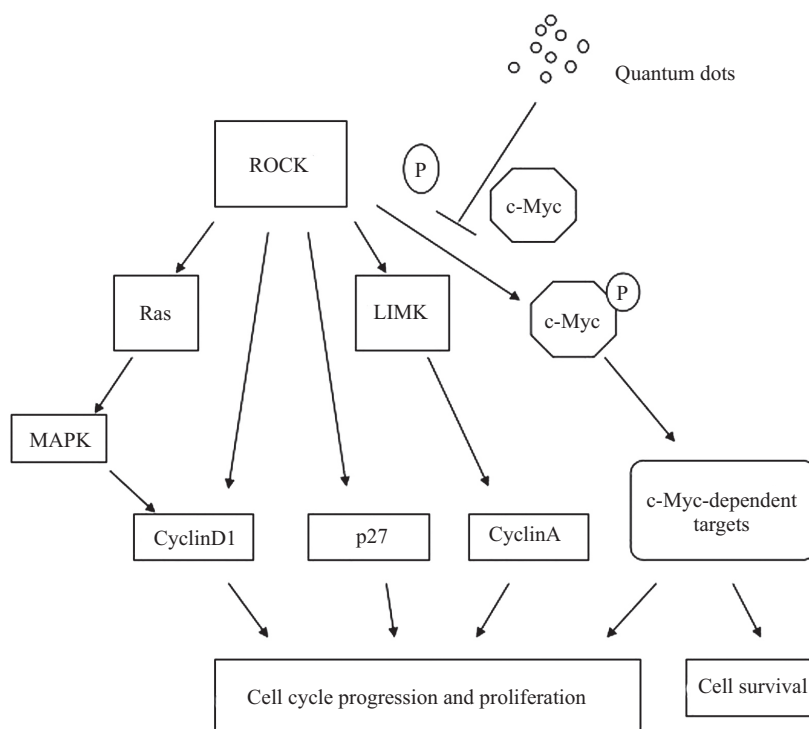
条通路与细胞凋亡关系密切, 它调节cyclinD1/Cdk4的表达。敲除PAK1将使JNK通路受到抑制, 通过降低细胞周期导致G₁期阻滞达到降低癌细胞的增殖的效果。化学抑制剂SP600125可以抑制JNK的活性, 通过PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)的积累, 减弱PAK1对结肠直肠癌增殖的影响。PTEN可能会抑制PAK1/JNK调节的细胞增殖和有丝分裂^[44]。

PAK4在细胞凋亡、细胞骨架重排、细胞周期等生物学活动中发挥重要功能, 主要调节诸如: 细胞凋亡调节蛋白(apoptotic regulatory protein, BAD)、细胞骨架效应物蛋白LIMK、Rho GTPase、激活鸟苷酸转换因子-H1(activator guanine nucleotide, GEF-H1)等蛋白质来发挥作用。有研究者在实验中证明, 在裸鼠中过表达激活的PAK4导致癌变, 抑制细胞凋亡, 同时促进细胞增殖, 删除PAK4将产生相反的生物学效应。在HeLa细胞中, PAK4的表达会阻止TNF α 诱导的细胞凋亡^[45]。另有研究发现, PAK5的表达能调节直肠癌细胞的黏附、转移, 促进恶性直肠癌转移^[46]。PAK6是第一个被发现的雄性激素受体(AR)相互作用蛋白质, 在早期前列腺癌细胞和转移性前列腺癌细胞中, PAK6会过量表达^[47]。

近期研究发现, PAK4的ATP竞争性抑制剂PF-3758309能抑制细胞独立锚定生长和增殖, 诱导细胞凋亡和细胞骨架重排。因此, PF-3758309成为一种潜在的治疗人类癌症的药物^[48]。除此之外, 对于第一组PAK来说, 变构抑制剂IPA-3可以抑制PAK1的活性, 一些小分子抑制剂(如CEP-1347、SRC)和酪氨酸激酶(tyrosine kinase, ETK)抑制剂(如AG879、FK228)都能有效地抑制PAK的活性。而对于持续性激活的第2组PAK来说, 还没能找到其有效的抑制剂^[49]。

3.2 ROCK与细胞周期调控

ROCKs与众多的疾病发生有关, 如心血管疾病、神经系统紊乱、癌症以及糖尿病并发症等。在许多肿瘤细胞中, RhoA和RhoC蛋白的表达量较高; 在某些癌细胞中, 如食道鳞状上皮细胞癌、睾丸生殖细胞癌和膀胱癌等, RhoA和RhoC表达量的上升增加了ROCKI和(或)ROCKII的表达量水平。而Rho和ROCK表达量的增加有利于癌细胞的转移, 促进癌细胞的增殖^[50]。有研究表明, 在Swiss3T3细胞中, 高水平的RhoA诱导G₁/S期进程。在NIH3T3细胞中, 激活的ROCK-雌激素受体蛋白(ROCK-estrogen



ROCK通过不同的信号通路调节细胞周期进程、细胞增殖和细胞存活。ROCK激活Ras和MAPK, 提高cyclinD1的表达。ROCK激活LIMK2, 提高cyclinA的表达。另外, ROCK的激活可使p27蛋白质水平降低。ODs通过抑制ROCK的活性降低c-Myc蛋白的稳定性, 提高对c-Myc蛋白的磷酸化抑制, 从而影响细胞周期进程和细胞增殖。

ROCK can regulate cell cycle progression, proliferation and cell survival through different signaling pathways. ROCK activates Ras and MAPK, which along with an additional independent pathway, leading to elevation of cyclinD1 expression. CyclinA is independently elevated in response to ROCK activation via LIMK2. Reduced p27 protein levels were observed following ROCK activation, independent of the effect on cyclinD1, cyclinA. ODs can reduce c-Myc protein stability through inhibiting ROCK activity and impose inhibition on the phosphorylation of c-Myc that takes the principle responsibility for cell cycle progression and proliferation.

图4 ROCK和细胞周期调控(根据参考文献[52-53]修改)

Fig.4 ROCK and cell cycle regulation (modified from references [52-53])

receptor, ROCK-ER)可刺激G₁/S细胞周期进程。来自海蜗牛的Rho可使NIH3T3细胞癌化转变^[51]。另外, ROCK通过Ras和MAPK的激活来提高cyclinD1和p21的表达水平, 通过LIMK提高cyclinA的表达水平, 也可以降低p27的表达水平^[52]。ROCK还可以通过调节致癌基因c-Myc活性来调节癌细胞周期^[53]。因此, ROCK能通过多种机制调节细胞周期和控制肿瘤生长。

在众多癌细胞中, Rho/ROCK的激活和ROCK的过量表达会提高癌细胞的侵袭和转移。因此, 抑制ROCK的活性可以抑制癌细胞的转移和增殖。寻找ROCK的抑制剂, 对其进行抑制成为了治疗这些疾病的新方向。目前研究发现, 量子点(Quantum dots, QDs)通过阻碍癌基因c-Myc对细胞增殖的作用, 达到抑制肿瘤细胞生长, 但其不会使细胞死亡。而且, QD通过抑制ROCK活性, 降低c-Myc蛋白的稳定性, 并减弱c-Myc激活其靶基因的能力^[53]

(图4)。Nakabayashi等^[54]发现, Fasudil通过Rho-ROCK和促分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, MEK/ERK)信号通路抑制神经胶质瘤诱导的血管再生, 使Fasudil成为一种治疗神经胶质瘤的潜在药物。另外有研究表明, Fasudil可阻止小细胞肺癌细胞NCIH446的增殖和转移^[55]。除此之外, 近年来研究者还发现了很多的ROCKs抑制剂, 如Y-27632, 它是一种通过与ATP竞争ROCKI和ROCKII的催化位点的非特异抑制剂, 可以抑制血管平滑肌的收缩^[56]。还有一些吡啶类(如SR-1459、SR-899)和吡啶类的抑制剂也正在进行研发^[57]。

3.3 MRCK与细胞周期调控

有研究表明, MRCK参与癌细胞侵袭。细胞侵袭所需的肌动蛋白收缩力的产生依赖于Cdc42-MRCK信号^[58]。另外, 在间叶细胞侵袭过程中, ROCK和MRCK单独或协同参与调节过程, 并且

ROCK和MRCK能单独或协同促进癌细胞的侵袭。因此,单独抑制ROCK和MRCK或同时抑制ROCK和MRCK均能抑制癌细胞的侵袭,有数据显示,同时抑制ROCK和MRCK对抑制癌细胞侵袭的效果更好。经筛选发现,有3种抑制剂(Y-27632、Fasudil、TPCA-1)对MRCK α 和MRCK β 的抑制效果显著。Y-27632和Fasudil同时也是ROCK抑制剂^[59]。因此,对MRCK参与癌细胞侵袭过程的研究,有望成为开发治疗癌症新药的一个研究方向。

4 问题与展望

目前,对于Rho小G蛋白下游激酶(PAKs、ROCKs、PKNs和MRCKs)的研究多集中在这些激酶的结构、基于保守结构域而发挥的功能(如细胞骨架重排、细胞移动、细胞周期和增殖等方面)以及Rho小G蛋白下游激酶抑制剂开发等方面。

通过前文介绍,这些激酶在其结构上既有相似性也有差异性,而这些结构上的相似性和差异性决定了其功能上的相似性和差异性。例如,ROCK和MRCK在其N-端激酶结构域内有45%~50%的相似性,而在其C-端则有很大的差异性。这些激酶的不同亚型具有更高的相似度,例如ROCKI和ROCKII的激酶结构域相似性高达92%,MRCK α 和MRCK β 在其激酶结构域的相似性达77%。这些激酶结构域的相似性保证其能与相同或相似的底物发生作用,从而使其有相同或相似的生物学作用,例如ROCK、MRCK具有相同的磷酸化底物,而肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)和肌球蛋白磷酸酶的肌球蛋白结合亚基^[60](myosin-binding subunit of myosin phosphatase, MYPT1)均可在形成F-肌动蛋白丝参与细胞骨架重排过程中发挥作用。这些激酶的差异性也使其各自具有多样化的功能,例如MRCK α 还能通过调节转铁蛋白受体,胞吞/胞内体交换(依赖于细胞骨架)参与转铁蛋白的吸收。同时,MRCK α 活性受细胞内铁水平的调节,形成一种分子反馈调节机制^[61]。

对于Rho小G蛋白及其效应蛋白质在细胞骨架重排方面作用的研究已经相当深入,近年来的研究热点转向于Rho小G蛋白及其效应蛋白质在癌症的发生和发展过程中的作用。癌细胞的形成、扩散及侵袭涉及细胞骨架动力学、细胞周期进程、细胞逃逸等生理学过程,Rho小G蛋白及其效应蛋白质在癌细胞周期进程中的作用日益凸显,尤其是Rho小G蛋

白效应激酶分子大多是原癌基因,激酶分子的敲除和抑制能有效地抑制癌细胞的增殖和转移。因此,筛选激酶分子抑制剂有重要的理论和临床意义。研究证明,PAK4抑制剂PF-3758309能抑制细胞独立锚定生长和增殖,诱导细胞凋亡和细胞骨架重排;化学抑制剂SP600125可以间接减弱PAK1对结肠直肠癌增殖的影响;Fasudil、Y-27632、Quantum dots等ROCK抑制剂可以通过抑制ROCK的作用而抑制制肿瘤细胞生长;联合使用Fasudil和Y-27632可以同时抑制ROCK和MRCK,进而增强对癌细胞侵袭的抑制作用。

效应激酶是Rho小G蛋白发挥作用不可缺少的组分,对其深入的研究是阐明Rho小G蛋白信号通路的重要途径,前人对于PAK、ROCK激酶的研究已经比较深入,但是对于MRCK的研究仍不完善,例如MRCK在细胞周期调控中的具体信号通路、MRCK在不同癌症发生发展过程中的作用以及MRCK抑制剂的筛选与研发都是亟待解决的科学问题。

参考文献 (References)

- 1 Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 247-69.
- 2 范丽菲, 闫慧娟, 莫日根. Rho小G蛋白介导的细胞周期调控. *中国生物化学与分子生物学报*(Fan Lifei, Yan Huijuan, Morigen. The roles of small Rho GTPases in cell cycle regulation. *Chin J Biochem Mol Biol*) 2013; 29(7): 619-28.
- 3 Ridley AJ. Rho family proteins: Coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001; 11(12): 471-77.
- 4 Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G₁-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(5): 355-66.
- 5 Zhao ZS, Manser E. PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 2005; 386(Pt 2): 201-14.
- 6 Bishop A, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348(2): 241-55.
- 7 Flynn P, Mellor H, Palmer R, Panayotou G, Parker PJ. Multiple Interactions of PRK1 with RhoA functional assignment of the HR1. *J Biol Chem* 1998; 273(5): 2698-705.
- 8 Maesaki R, Ihara K, Shimizu T, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T. The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol Cell* 1999; 4(5): 793-803.
- 9 Molli PR, Li DQ, Murray B, Rayala SK, Kumar R. PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene* 2009; 28(28): 2545-55.
- 10 Manser E, Chong C, Zhao ZS, Leung T, Michael G, Hall C, et al. Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem* 1995; 270(42): 25070-8.

- 11 Bagrodia S, Taylor SJ, Creasy CL, Chernoff J, Cerione RA. Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J Biol Chem* 1995; 270(39): 22731-37.
- 12 Bagheri-Yarmand R, Mazumdar A, Sahin AA, Kumar R. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* 2006; 118(11): 2703-10.
- 13 Davila M, Frost AR, Grizzle WE, Chakrabarti R. LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(38): 36868-75.
- 14 Yoshioka K, Foletta V, Bernard O, Itoh K. A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(12): 7247-52.
- 15 Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1999; 1(5): 253-9.
- 16 Knaus UG, Wang Y, Reilly AM, Warnock D, Jackson JH. Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem* 1998; 273(34): 21512-8.
- 17 Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, Tan L, *et al.* PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1998; 1(2): 183-92.
- 18 Chong C, Tan L, Lim L, Manser E. The mechanism of PAK activation autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* 2001; 276(20): 17347-53.
- 19 Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: Important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(2): H287-H296.
- 20 Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, Shen X. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: A potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage. *Int J Ophthalmol* 2011; 4(6): 652.
- 21 Shahin R, Al-Qtaishat S, Taha MO. Elaborate ligand-based modeling reveal new submicromolar Rho kinase inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* 2012; 26(2): 249-66.
- 22 Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(5): 387-98.
- 23 Spiering D, Hodgson L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* 2011; 5(2): 170-80.
- 24 Kosako H, Amano M, Yanagida M, Tanabe K, Nishi Y, Kaibuchi K, *et al.* Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(16): 10333-6.
- 25 Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, *et al.* The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 1996; 15(8): 1885.
- 26 Dvorsky R, Blumenstein L, Vetter IR, Ahmadian MR. Structural insights into the interaction of ROCKI with the switch regions of RhoA. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 7098-104.
- 27 Chen XQ, Tan I, Ng CH, Hall C, Lim L, Leung T. Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha: Implication of the pleckstrin homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies. *J Biol Chem* 2002; 277: 12680-8.
- 28 Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4): 346-52.
- 29 Mukai H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *J Biochem* 2003; 133(1): 17-27.
- 30 Flynn P, Mellor H, Casamassima A, Parker PJ. Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(15): 11064-70.
- 31 Kitagawa M, Shibata H, Toshimori M, Mukai H, Ono Y. The role of the unique motifs in the amino-terminal region of PKN on its enzymatic activity. *J Biochem* 1996; 220(3): 963-8.
- 32 Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 1998; 18(1): 130-40.
- 33 Moncrieff CL, Bailey ME, Morrison N, Johnson KJ. Cloning and chromosomal localization of human Cdc42-binding protein kinase beta. *Genomics* 1999; 57: 297-300.
- 34 Tan I, Cheong A, Lim L, Leung T. Genomic organization of human myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha reveals multiple alternative splicing and functional diversity. *Gene* 2003; 304: 107-15.
- 35 Tan I, Yong J, Dong JM, Lim L, Leung T. A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. *Cell* 2008; 135(1): 123-36. (除提示外的页码重新修改过)
- 36 Gomes ER, Jani S, Gundersen G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 2005; 121(3): 451-63.
- 37 Sakurada S, Okamoto H, Takuwa N, Sugimoto N, Takuwa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(2): C571-C578.
- 38 Hartshorne DJ, Ito M, Erdo F. Myosin light chain phosphatase: Subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 1998; 19(4): 325-41.
- 39 Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non - muscle myosin II. *J Physiol* 2000; 522(2): 177-85.
- 40 Stanyon CA, Bernard O. LIM-kinase 1. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 389-94.
- 41 Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Ann Rev Biochem* 2003; 72(1): 743-81.
- 42 Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, Wang RA, Pestell RG, Vadlamudi RK, *et al.* p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279(2): 1422-8.
- 43 Aoki H, Yokoyama T, Fujiwara K, Tari AM, Sawaya R, Suki D, *et al.* Phosphorylated Pak1 level in the cytoplasm correlates with shorter survival time in patients with glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13(22): 6603-9.
- 44 Qing H, Gong W, Che Y, Wang X, Peng L, Liang Y, *et al.* PAK1-dependent MAPK pathway activation is required for colorectal cancer cell proliferation. *Tumor Biol* 2012; 33(4): 985-94.
- 45 Ye DZ, Field J. PAK signaling in cancer. *Cell Logist* 2012; 2(2): 105-16.
- 46 Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgleish GL, Hunter

- C, Bignell G. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446(7132): 153-8.
- 47 Yang F, Li X, Sharma M, Zarnegar M, Lim B, Sun Z. Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 15345-53.
- 48 Murray B W, Guo C, Piraino J, Westwick JK, Zhang C, Lamerdin J, *et al.* Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(20): 9446-51.
- 49 Molli PR, Li DQ, Murray BW, Rayala SK, Kumar R. PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene* 2009; 28(28): 2545-55.
- 50 Schofield AV, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013; 48(4): 301-16.
- 51 Perona R, Esteve P, Jiménez B, Ballesterio RP, Ramóns Cajal S, Lacal JC. Tumorigenic activity of rho genes from *Aplysia californica*. *Oncogene* 1993; 8: 1285-92.
- 52 Croft DR, Olson MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2006; 26(12): 4612-27.
- 53 Chen L, Qu G, Zhang C, Zhang S, He J, Sang N, *et al.* Quantum dots (QDs) restrain human cervical carcinoma HeLa cell proliferation through inhibition of the ROCK-c-Myc signaling. *Integr Biol* 2013; 5(3): 590-6.
- 54 Nakabayashi H, Shimizu K. HA1077, a Rho kinase inhibitor, suppresses glioma-induced angiogenesis by targeting the Rho-ROCK and the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signal pathways. *Cancer Sci* 2011; 102(2): 393-9.
- 55 Yang X, Di J, Zhang Y, Zhang S, Lu J, Liu J. The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation and metastasis of small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2012; 66(3): 221-7.
- 56 Dong M, Liao J K, Yan B, Li R, Zhang M, Yu CM. A combination of increased Rho kinase activity and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predicts worse cardiovascular outcome in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2012; 167(6): 2813-9.
- 57 Guan R, Xu X, Chen M, Hu H, Ge H, Wen S, *et al.* Advances in the studies of roles of Rho/Rho-kinase in diseases and the development of its inhibitors. *Eur J Med Chem* 2013; 70: 613-22.
- 58 Wilkinson S, Paterson H F, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol* 2005; 7(3): 255-61.
- 59 Heikkilä T, Wheatley E, Crighton D, Schroder E, Boakes A, Kaye SJ, *et al.* Co-crystal structures of inhibitors with MRCK β , a key regulator of tumor cell invasion. *PLoS One* 2011; 6(9): e248252.
- 60 Tan I, Ng CH, Lim L, Leung T. Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2001; 276(24): 21209-16.
- 61 Cmejla R1, Ptackova P, Petrak J, Savvulidi F, Cerny J, Sebesta O. Human MRCK α is regulated by cellular iron levels and interferes with transferrin iron uptake. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 395(2): 163-7.

非典型E2F转录因子对细胞周期的调控及其功能

漆倩荣 杨增明*

(汕头大学生物系, 汕头 515063)

摘要 E2F家族转录因子是细胞周期调控网络中的重要环节之一, 对细胞的增殖、分化和凋亡进行调节, 并参与多种生理和病理过程。近年来, 关于哺乳动物中E2F转录因子的生物学作用研究取得了很大进展, 并鉴定出两个非典型的E2F家族成员: E2F7和E2F8。与典型的E2F转录因子相比, 非典型E2F蛋白结构中含有两个相同的DNA结合域, 对靶基因转录的调控不依赖于二聚化蛋白。非典型E2F蛋白进入细胞核后, 通过与经典的E2F靶基因启动子结合, 发挥转录抑制作用并调节细胞周期的进程, 从而对细胞的大小、多倍化、增殖、分化和凋亡进行调控。随着基因敲除模型的建立和完善, 使得进一步研究非典型E2F转录因子在不同组织或器官中的生物学作用成为可能。非典型E2F在胚胎发育、血管发生及造血系统中均发挥重要作用。另外, 肿瘤细胞中典型E2F和非典型E2F的表达比例发生改变, 说明非典型E2F成员还参与肿瘤的发生发展。该文综述了近年来关于非典型E2F转录因子的表达、调节及其生理病理作用的研究进展。

关键词 E2F 转录因子; 多倍化; 增殖; 凋亡

Atypical E2F Transcription Factors Contributed to Cell Cycle Regulation

Qi Qianrong, Yang Zengming*

(Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract E2F transcription factors are important elements in cell cycle regulatory network that regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis, consequently involved in many physiological and pathological processes. The biological function of E2Fs has been widely investigated in mammals. The recent identified atypical E2F family members of E2F7 and E2F8 in mammals develop a new insight of cellular E2Fs function. Compared to the typical E2Fs, atypical E2F proteins have the duplication of DNA-binding domain and regulate gene expression independent of dimerization partner protein. Nuclear localized atypical E2F proteins act as transcription inhibitory factors on typical E2F-driven target genes and modulate cell cycle progression, and play a crucial role in cell size determination, polyploidization, cell proliferation, differentiation and apoptosis. The establishment and improvement of knockout mice model make it possible for us to study the physiological function of atypical E2Fs in specific tissues and organs. Atypical E2Fs function in regulating embryonic development, angiogenesis and hematopoiesis. In addition, change of the expression levels of typical E2Fs and atypical E2Fs correlates with tumorigenesis in humans. This review summarized the latest advances in the studies on expression, regulation and function of atypical E2F transcription factors in physiological and pathological processes.

Key words E2F transcription factors; polyploidization; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2014-02-12 接受日期: 2014-03-19

*通讯作者: Tel: 020-85282010, E-mail: zmyang@scau.edu.cn

Received: February 12, 2014 Accepted: March 19, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-20-85282010, E-mail: zmyang@scau.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-01 15:42 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0036.html>

E2F家族蛋白作为一类重要的转录因子,普遍存在于高等真核生物中,包括哺乳动物、蠕虫、果蝇和植物等,在进化上具有保守性^[1-4]。在哺乳动物中,已经鉴定出六个典型的E2F转录因子,其蛋白结构主要包括二聚化结构域(dimerization domain)和高度保守的DNA结合域(DNA-binding domain, DBD)。E2F蛋白通过二聚化结构域与二聚化(dimerization partner, DP)蛋白形成异源二聚体,从而使E2F/DP能够进入细胞核并获得与特异性DNA序列结合的能力^[5]; DBD能够与特异性的DNA序列结合,对靶基因的转录进行调节^[6]。典型E2F转录因子对细胞增殖相关基因的转录调节与视网膜母细胞瘤(retinal blastoma, RB)家族蛋白紧密相关, RB蛋白通过与E2F蛋白的反式激活结构域结合,抑制E2F分子的转录活性^[7]。根据E2F蛋白对基因转录的调节作用,将其分为转录激活型(E2F1-E2F3)和转录抑制型(E2F4-E2F6)。激活型E2F转录因子主要调控细胞周期过程中的G₁~S期转换,使细胞进入S期^[8]。E2F4和E2F5通过募集囊蛋白(pocket proteins)以及组蛋白修饰酶,抑制E2F靶基因的表达^[9-10]。E2F6蛋白结构中缺乏与RB蛋白结合的反式激活结构域,因此其转录抑制作用不依赖于RB蛋白^[11]。E2F1^{-/-}E2F2^{-/-}E2F3^{-/-}三敲除(E2F¹⁻³-TKO)小鼠的胚胎成纤维细胞不能进入S期及进行有丝分裂,并且E2F靶基因表达明显下调^[12]。但后来的研究发现, E2F¹⁻³-TKO的小鼠胚胎干细胞、胚胎和小肠细胞表现为正常的细胞分裂过程。正在分化的细胞中, RB蛋白与E2F1-E2F3结合从而抑制

E2F靶基因的表达,并使细胞退出细胞周期。分化细胞中RB蛋白失活后,则使E2F1-E2F3从转录抑制因子转变为转录激活因子,从而促进靶基因的表达和细胞分裂过程,说明E2F分子的转录激活或抑制作用取决于细胞的增殖或分化状态,从而调控各种细胞的增殖及分化过程^[13]。

近年来通过基因组分析,在哺乳动物、果蝇和植物中均发现了一类新的E2F转录因子,根据其特殊的结构特点,定义为非典型E2F转录因子^[14-15]。哺乳动物中已鉴定出两个非典型E2F转录因子(E2F7和E2F8)(图1)。与典型的E2F蛋白相比,非典型E2F蛋白在结构、功能和作用机制上有着明显的差异^[16-17]。目前对小鼠敲除模型及人类肿瘤的研究,已经确定非典型E2F转录因子参与了哺乳动物胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡以及肿瘤发生等过程。本文对近年来关于非典型E2F转录因子在哺乳动物中的生理及病理作用进行了综述。

1 非典型E2F转录因子的结构特点

在对拟南芥基因组进行测定时,发现还存在一类与典型E2F分子结构不同的E2F转录因子,并命名为DP-E2F-Like(包括DEL1、DEL2及DEL3)^[18-19]。在筛选人类和小鼠中E2F调节的靶基因时,也发现了不同于典型E2F家族成员的转录因子,并命名为E2F7,其蛋白结构与拟南芥中鉴定的DEL蛋白相似^[17]。后来又鉴定出另一个非典型E2F家族成员并命名为E2F8。E2F8的结构与E2F7相似,并且E2F7和

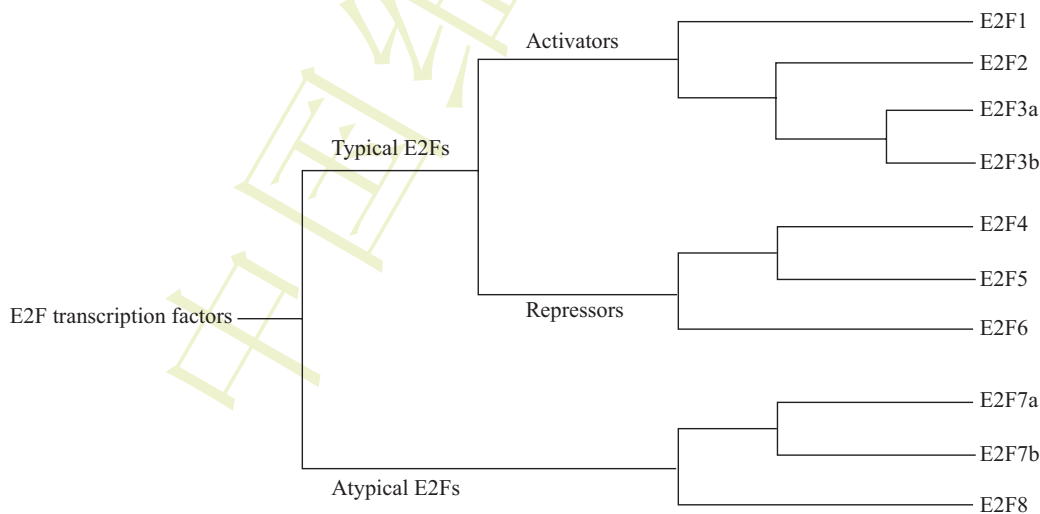


图1 哺乳动物E2F家族转录因子进化分支图谱

Fig.1 Phylogenetic tree of mammalian E2F family

E2F8可能以协同作用的方式共同参与细胞增殖的调控过程^[16,20]。

在蛋白结构上, 典型的E2F家族分子中含有一个高度保守的DBD和一个二聚化结构域, 而非典型E2F蛋白的结构特点是具有两个DBD^[21-23]。另外, E2F1-E2F5的蛋白结构中还含有能够与RB蛋白结合的保守性反式激活结构域, 而E2F6-E2F8蛋白中不存在这种结构。非典型E2F蛋白第二个DBD中也含有DNA结合区域与二聚化结构域。为验证非典型E2F蛋白是否能与DP蛋白形成二聚体, 在细胞中同时过表达带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的DP蛋白(DP-GFP)和E2F1, 可在细胞核内观察到DP-GFP的信号, 说明E2F1与DP蛋白结合后进入细胞核发挥转录调节作用。然而同时过表达DP-GFP和E2F7发现, DP-GFP信号仍位于细胞质中, 说明非典型E2F蛋白进入细胞核并不需要与DP结合^[22]。通过对E2F7和E2F8立体结构的分析, 证实其蛋白中两个DBD的空间位置与E2F/DP二聚体中DBD和二聚化蛋白之间的位置相似。推测非典型E2F蛋白的第二个DBD在结构上可能与E2F/DP二聚体形成的DNA结合表面相似, 可替代二聚化蛋白促进E2F7和E2F8与特异性DNA序列结合^[15]。但从进

化的角度, 目前尚未确定非典型E2F是由典型的E2F基因复制而来, 或是由于非典型的E2F发生DBD丢失而形成典型E2F蛋白(图2)。

尽管含有两个DBD, 但非典型E2F基因敲除后可导致典型E2F靶基因的上调, 说明非典型E2F蛋白主要作为转录抑制因子。E2F7和E2F8可竞争性地与激活型E2F的靶基因结合, 从而抑制典型E2F分子的转录激活作用^[24]。另外, 非典型E2F分子中缺乏与RB蛋白结合的反式激活结构域, 因此非典型E2F蛋白的转录活性不依赖RB信号通路^[25]。通过构建GFP报告载体证实E2F7和E2F8蛋白主要定位在细胞核。所有的E2F家族蛋白中均含有核定位序列(nuclear localization signal), 然而典型E2F蛋白只在N端含有一个核定位序列, 而非典型的E2F蛋白在C端含有一个双向的核定位序列, 但这种结构上的差异在功能上的意义尚不明确^[16,26]。在人细胞中, E2F7和E2F8可形成同源或异源二聚体, 其中以E2F7同源二聚体形式为主, 其次是E2F7/E2F8异源二聚体, 最后是E2F8同源二聚体。E2F7^{+/-}E2F8^{-/-}敲除鼠(可形成E2F7同源二聚体)表现为正常表型, 而E2F7^{-/-}E2F8^{+/-}小鼠(只存在E2F8同源二聚体)在出生后存在发育缺陷^[27]。E2F7和E2F8二聚体的形成依赖蛋白分子中

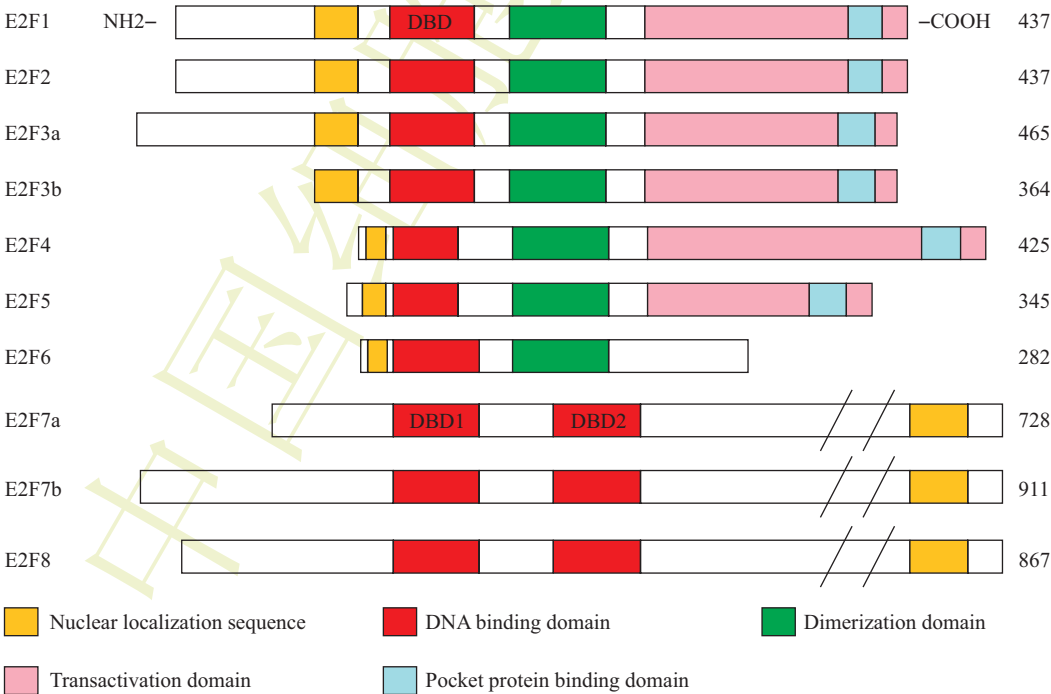


图2 哺乳动物E2F家族蛋白结构示意图
Fig.2 The protein structure of mammalian E2F family

DBD结构的完整性, E2F7和E2F8分子中任意一个DBD的结构发生突变, 都可导致与靶基因的结合发生障碍^[28]。

2 非典型E2F转录因子的转录调节

激活型E2F转录因子的表达受细胞周期的影响, 主要在G₁~S期转换时高表达, 而典型的抑制型E2F分子在整个细胞周期中表达不变。非典型E2F基因的表达具有细胞周期依赖性, E2F7和E2F8的转录在G₁~S期转换时被激活, *E2F7*和*E2F8*的mRNA水平在S~G₂期达到高峰^[29]。作为典型E2F蛋白的靶基因, 非典型E2F基因的表达主要受RB/E2F/DP信号通路的调节。在HeLaS3细胞中, 抑制RB-E2F信号通路可上调E2F7和E2F8的表达。另外, 非典型E2F启动子上含有E2F结合位点, 染色质免疫共沉淀(ChIP)结果显示, E2F1/3/4/7可结合在E2F7和E2F8的启动子上^[17,20]。哺乳动物中E2F7和E2F8的表达模式相似, 在小鼠胚胎发育过程中, E2F7和E2F8在妊娠中期的胚胎和胎盘中高表达; 小鼠成年之后, 主要在皮肤和胸腺中高表达, 其次是脾脏、小肠和睾丸。因此, 哺乳动物中非典型E2F基因主要在增殖性组织中表达^[27]。尽管E2F7和E2F8是作为E2F1的靶基因发现的, 但E2F7和E2F8也可结合在E2F1的启动子上, 对E2F1的转录进行调控。作为E2F7和E2F8的靶基因, *E2F1*在细胞周期中的表达与E2F7和E2F8的表达呈互补模式, E2F7和E2F8同时敲除可改变E2F1在细胞周期中的表达模式^[27]。因此, 在E2F转录因子调控网络中, 典型E2F与非典型E2F的转录调节存在复杂的反馈系统, 主要受到细胞周期进程的调控。

3 非典型E2F转录因子的生物学功能

3.1 非典型E2F转录因子对细胞有丝分裂周期的调控

E2F家族转录因子主要参与调节细胞周期相关基因的表达, 对细胞增殖、凋亡、分化和DNA修复进行调控。典型的E2F蛋白主要调节与DNA复制、合成相关基因的表达, 参与细胞周期中G₁~S期和G₂~M期的转换过程, 从而促进细胞周期的进程^[30]。非典型E2F分子主要在增殖性组织中表达, 可能与典型E2F分子一起参与细胞周期的调控, 尤其是细胞增殖过程。例如, E2F7在S期的中期和末期高表达, 并结合在G₁~S期相关基因的启动子上, 抑制基因的

转录。染色体免疫共沉淀测序(ChIP-seq)分析发现, E2F7识别的特异性DNA序列为TTC CCG CC, 与典型E2F识别位点相似。E2F7可结合到89个靶基因的启动子上行使转录抑制调节, 其中大部分的基因为激活型E2F蛋白的靶基因, 并参与了DNA复制和修复过程。另外, 在G₀~G₁~S期诱导E2F7的表达可将细胞阻滞在S期, 并造成DNA损伤。然而在G₂~M期诱导E2F7表达对细胞周期进程不会造成影响。因此, E2F7在细胞周期中的作用可能是抑制G₁~S期相关基因的表达, 从而使细胞离开S期^[31]。E2F7和E2F8功能缺失可导致滋养层巨细胞的DNA复制过程异常。通过基因表达谱和ChIP分析显示, 大部分E2F7和E2F8的直接靶基因在功能上参与了细胞周期的调控, 尤其是G₁~S转换时期的DNA复制过程^[15]。以上结果说明, 典型与非典型E2F转录因子共同参与了正常细胞的有丝分裂过程。

3.2 非典型E2F转录因子对细胞核内复制周期的调控

有丝分裂普遍存在于哺乳动物的发育过程, 是产生体细胞的主要机制, 但在发育过程中, 部分增殖细胞将退出细胞周期并分化成为特化细胞而发挥特殊的功能^[32]。细胞退出有丝分裂周期常伴随着细胞周期的改变, 其中包括核内复制周期。核内复制周期的特征是细胞只在S期和G期之间转换, 而不进入分裂期, 经过多次基因组复制过程, 细胞内DNA含量显著上升, 产生多倍体细胞。最初在植物中观察到核内复制的过程, 后来在多细胞动物中也证实存在核内复制。在哺乳动物中, 核内复制通常发生于一些特定的组织或器官中, 形成多倍体细胞, 例如胎盘、肝脏和巨核细胞^[33]。核内复制的生理作用目前尚不明确。在植物中, 核内复制可能是决定细胞大小的主要机制^[34]。核内复制周期可能是为了满足细胞代谢需求的增加, 并参与细胞对DNA应激的耐受过程。由于发生核内复制的细胞含有更多的基因拷贝数, 因此能够更好地抵抗有害突变和凋亡, 促进遗传多样性及肿瘤发生等过程^[35-36]。

所有的哺乳动物在发育和衰老的过程中均会发生程序性多倍化, 滋养层巨细胞(trophoblast giant cell, TGC)是发育过程中最早进行核内复制及形成多倍体的细胞。TGC开始形成于第4.5 d的胚胎时期, 通过连续的DNA复制, 而不进行细胞核分裂或胞质分裂, 其基因组含量可达到1 000 C以上^[37]。由于E2F

家族转录因子是调节细胞周期的主要因素, 更多的研究关注了E2F基因在哺乳动物核内周期中的生理作用。小鼠胎盘TGC中E2F1和E2F2的mRNA在整个胎盘发育阶段表达较低, 但E2F3在第8.5~13.5 d的胎盘表达较高, 在胎盘发育过程中, E2F7和E2F8在TGC中均有表达, 并且E2F7和E2F8蛋白定位在部分TGC的细胞核中。最近通过条件性敲除模型, 对典型的激活型E2F转录因子和非典型E2F转录在哺乳动物细胞多倍化过程的作用进行了研究。在TGC中将典型的激活型E2F(E2F1-E2F3)敲除后(E2F¹⁻³TKO), 表现为多倍体细胞比例增加。而将两个非典型E2F基因同时敲除后(E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}), 则表现为多倍体细胞比例下降, 并且E2F7^{-/-}E2F8^{-/-} TGC的DNA含量不会超过64C。与正常组织相比, E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}组织中上调的基因明显多于下调的基因, 说明E2F7和E2F8对靶基因的转录主要起抑制作用。另外, E2F7和E2F8表达缺失可导致G₂~M期(*cyclin A2*)和M期(*cyclin B1*)特异性表达的基因上调, 并且大部分TGC表现为分裂中期或分裂后期^[38]。

啮齿类动物的肝脏细胞在断奶后即启动多倍化过程, 多倍体肝细胞的比例随着年龄的增长而增加^[39]。在肝细胞中, E2F1和E2F2的表达在胚胎发育阶段较高, 出生后逐渐下降, E2F3在出生后表达逐渐下降, 断奶后不表达。而E2F7和E2F8在断奶之后即开始表达。与TCG相似, 在肝细胞中将E2F1特异性敲除(E2F1^{-/-})后, 表现为多核肝细胞比例增加, 而同时将E2F7和E2F8特异性敲除(E2F7^{-/-}E2F8^{-/-})则呈现相反的表现。检测发现, E2F7和E2F8表达缺失可使典型E2F靶基因的表达增加, 促进细胞的有丝分裂和增殖过程, 从而抑制了肝细胞的多倍化过程^[38]。另外, 同时敲除E2F1可恢复E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}小鼠肝细胞中多倍体细胞的比例^[38,40]。尽管目前关于多倍体细胞的生物优势尚不明确, 肝细胞中特异敲除E2F7及E2F8的小鼠在肝功能、肝细胞再生等方面与正常小鼠无明显差异, 但非典型E2F蛋白参与了哺乳动物细胞的多倍化过程(图3)。

3.3 非典型E2F转录因子在细胞增殖、分化和凋亡中的作用

E2F7和E2F8作为E2F1的靶基因, 同时也可调节E2F1的转录, 发挥转录抑制作用, 说明E2F家族分子中存在负反馈调节。在G₁~S期转换时, E2F1可激活E2F7和E2F8的表达, 然后在S~G₂期转换时E2F7

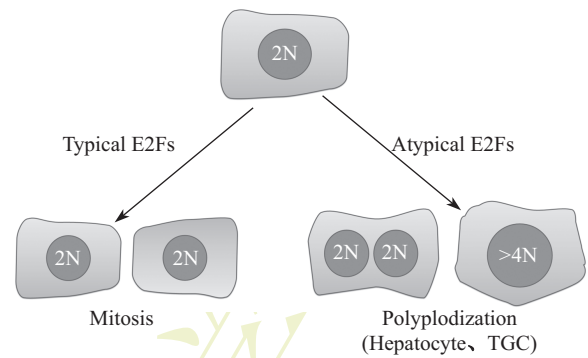


图3 E2F转录因子对细胞周期转换的调控

Fig.3 The regulation of E2F family on cell cycle alternation

和E2F8可抑制E2F1的表达, 从而控制E2F1在细胞周期中的活性。E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}小鼠胚胎在第11.5 d死亡, 检测发现E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}胚胎并不存在增殖障碍, 但第10.5 d的胚胎表现为广泛的细胞凋亡。另外, E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}胚胎中E2F1、p53和其他应激相关基因的表达上调, 同时敲除E2F1或p53可减少凋亡细胞的数量, 说明E2F7和E2F8在胚胎发育过程中可抑制E2F1或p53介导的凋亡信号通路, 起抗凋亡的作用^[27]。用DNA损伤试剂处理各种肿瘤细胞及小鼠胚胎成纤维细胞, 可诱导E2F7和E2F8蛋白的表达, 并且在E2F1启动子上可检测到E2F7和E2F8的募集。过表达E2F7和E2F8可抑制E2F1的表达, 而E2F7和E2F8表达缺失或降低使E2F1在G₂期持续高表达, 导致细胞对凋亡信号更加敏感, 抵抗损伤的能力下降。除直接抑制E2F1的表达之外, E2F7和E2F8还可竞争性地结合E2F1的靶基因, 抑制早期凋亡反应^[28]。以上结果说明, 在DNA损伤/E2F1介导的细胞凋亡过程中, E2F7和E2F8是调节E2F1活性的关键因素, 并能够防止细胞凋亡。

在角质细胞中, 典型E2F蛋白功能被抑制是启动鳞状细胞分化的关键步骤。皮肤组织中, E2F7选择性高表达于增殖能力较强的角质细胞中, 并且可以拮抗E2F1诱导的增殖和凋亡作用。尽管E2F7在角质细胞中主要起抗增殖和促分化的作用, 但E2F7并不能拮抗E2F1诱导的分化抑制作用, 说明E2F7在角质细胞中通过抑制E2F1通路来调节细胞增殖, 但E2F7诱导的细胞分化并不依赖于E2F1。另外, 在体外培养的角质细胞中, 细胞的增殖、分化和凋亡依赖于E2F1和E2F7的相对比例。因此, E2F7和E2F1参与了角质细胞的增殖和分化过程^[41]。

3.4 非典型E2F转录因子在胎盘发育中的作用

E2F7和E2F8在胎盘中的表达明显高于胚胎组织,且胎盘中E2F8的表达与糖原滋养层细胞(glycogen trophoblast cells)的增殖有关。另外,E2F7和E2F8蛋白主要定位在胎盘迷路滋养层细胞(labyrinth trophoblasts, LT)、海绵体状滋养层细胞(spongiotrophoblasts, ST)和TGC中。与正常小鼠相比, $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠胎盘组织的体积明显减少,形态学上表现为滋养层细胞聚集成簇,不能有效侵入母体蜕膜组织;血管网形成缺陷,胎儿组织血管附近很少观察到母体来源的血窦。TGC和ST中DNA复制和有丝分裂标志分子表达增加,并且ST中凋亡细胞比例明显上升,说明E2F7和E2F8参与了小鼠胎盘的发育过程。为确定E2F7和E2F8调节胎盘发育的作用机制,已建立了小鼠不同胚外滋养层细胞E2F7和E2F8同时敲除的模型,发现单独敲除ST或TGC中的E2F7和E2F8,以及ST和TGC中同时敲除E2F7和E2F8,对小鼠各个时期的胎盘发育及分娩无任何影响;但若将整个胎盘组织中的E2F7和E2F8敲除(包括滋养层前体细胞, trophoblast progenitor cells),则表现为明显的胎盘发育障碍和血管形成缺陷,并导致胚胎死亡,说明在胎盘组织中,主要是滋养层前体细胞中表达的E2F7和E2F8对胎盘发育进行调节。基因表达谱分析结果显示,典型的激活型E2F3a转录因子是拮抗E2F7和E2F8功能的关键分子。同时敲除E2F3a可纠正 $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠胎盘中基因的表达模式,恢复正常的胎盘发育,并能使E2F7和E2F8表达缺失的胚胎存活至分娩^[42]。因此,典型E2F与非典型E2F分子的转录调控网络与胎盘的发育及胚胎的存活能力紧密相关。

3.5 非典型E2F转录因子在血管发生中的作用

E2F7和E2F8作为新的E2F家族成员,对E2F靶基因主要起转录抑制作用。 $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠胚胎表现为广泛的细胞凋亡及严重的血管形成缺陷。同时敲除p53或E2F1可挽救细胞凋亡过程,但仍存在血管发育障碍,说明E2F7和E2F8可能通过其他方式参与了血管生成的调节,并是胚胎发育时期血管生成的关键因素^[27]。血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)可激活血管内皮细胞上的VEGF受体FLK1和KDR,从而促进内皮细胞的增殖。VEGFA敲除小鼠表现为胚胎致死和严重的血管缺陷,说明VEGFA是血管生成过程中的关

键因子^[43]。 $E2F7^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠中VEGFA表达明显下降。与传统的转录抑制作用不同,E2F7和E2F8可激活VEGFA的表达。实验证实,E2F7和E2F8可直接结合在VEGFA的启动子上,并不依赖于典型的E2F结合元件,而是直接通过与缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor 1, HIF1)形成转录复合物并结合在VEGFA的启动子上,激活VEGFA的转录,从而促进血管生成^[44](图4)。

3.6 非典型E2F转录因子在造血系统中的作用

RB除了作为经典的肿瘤抑制因子之外,还参与调节造血作用,包括红细胞生成过程。RB敲除($RB^{-/-}$)小鼠表现为轻度的贫血和外周血出现大量未成熟的有核红细胞^[45]。造血干细胞中RB特异性敲除小鼠表现为轻度贫血、中度脾肿大、脾脏中有核红细胞比例增加、骨髓增生和B淋巴细胞增殖受到抑制^[46-47]。另外,红系细胞特异性敲除模型证实,RB可使细胞退出细胞周期并参与线粒体的生物合成来促进红细胞生成^[48]。在静止期细胞,RB蛋白通过与E2F蛋白中的反式激活结构域结合,从而抑制E2F对S期相关基因的转录激活作用^[7]。非典型E2F成员可通过与HIF形成复合体而与RB蛋白发生相互作用,共同参与造血系统的功能调节^[49],其中E2F8表达缺失可加重 $RB^{-/-}$ 小鼠的贫血症状。 $RB^{-/-}E2F8^{-/-}$ 小鼠造血干细胞表现为红细胞生成明显不足以及轻度的溶血症状,尽管造血系统仍进行细胞再生和红细胞生成过程,但仍出现严重的贫血症状。然而,将与E2F8具有相似生物学功能的E2F7敲除后,却不会加重 $RB^{-/-}$ 小鼠的贫血症状,说明在造血系统中,非典型E2F转录因子中只有E2F8与RB蛋白相互作用,确保正常的红细胞生成,可能的作用机制是促进红系细胞的终末分化(图4)。另外,E2F8还可能参与维持红系细胞膜的完整性,从而防止发生溶血^[50]。

3.7 非典型E2F转录因子在肿瘤发生中的作用

在人体中,部分E2F分子在多种肿瘤细胞中表达下调,而E2F蛋白对靶基因转录的激活或抑制作用,以及对细胞增殖和凋亡的调控取决于细胞类型^[13]。癌基因激活诱导的细胞衰老是一种抵抗异常增殖的程序性应激反应,可作为一种保护机制来抑制细胞发生不可调控的增殖而导致肿瘤形成。肿瘤抑制因子p53和RB蛋白信号通路可调节细胞进行自发性癌基因诱导的细胞衰老程序,p53/RB信号通路异常可促进致癌性转变。p53能够与特异性的DNA序列结

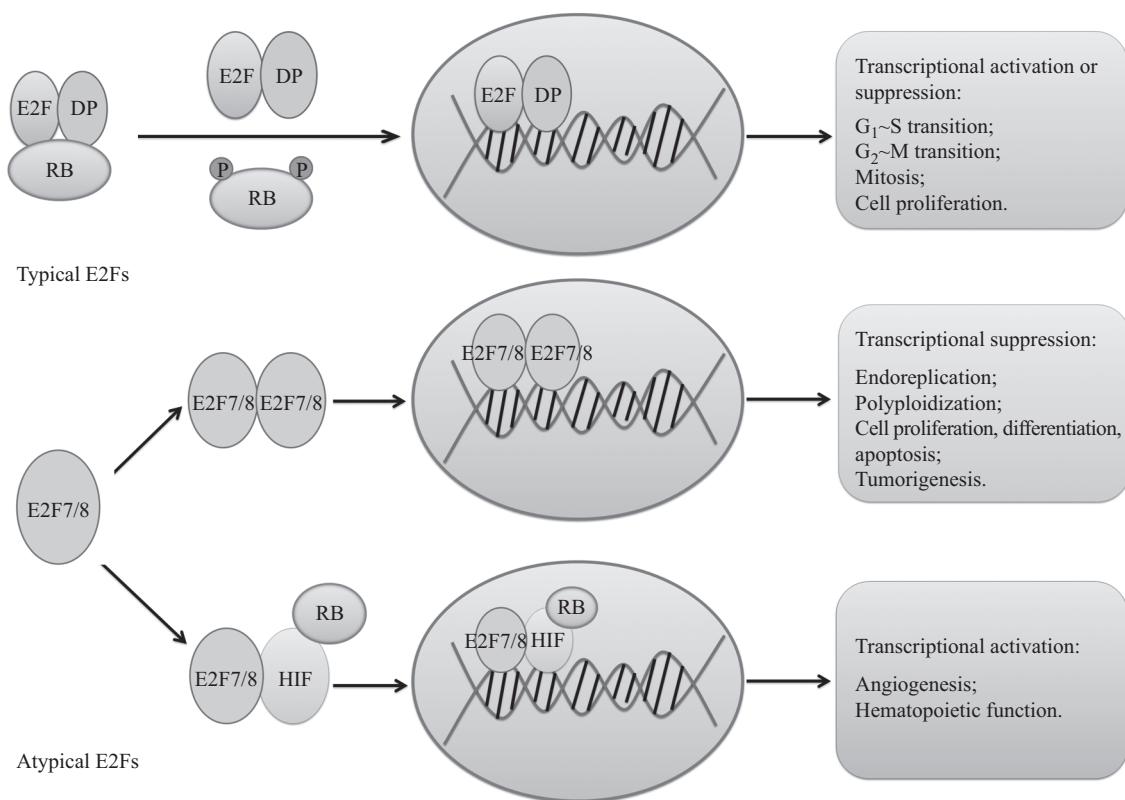


图4 E2F转录因子的转录调节作用

Fig.4 The transcriptional regulatory function of E2F family

合,从而诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21的表达,p21通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的活性,使得RB蛋白不能被磷酸化,从而抑制E2F对靶基因的转录激活作用。另一方面,RB蛋白还可通过改变染色体的结构来抑制增殖相关基因的表达,p53/RB信号通路激活能够促进细胞衰老过程^[51]。在细胞衰老过程中,E2F7的表达逐渐增加,并且在E2F7的启动子上检测到p53蛋白的募集,说明p53可调节E2F7的转录活性。E2F7被激活后,可与典型的E2F靶基因结合,并与RB蛋白共同作用使细胞进入静止期。另外,RB蛋白表达缺失时,E2F7的表达可代偿性增加,并抑制与细胞有丝分裂相关的靶基因的表达,说明E2F7可能参与了p53/RB介导的细胞衰老过程,从而抑制细胞发生致癌性转变^[52]。

在人肝细胞癌中,E2F1和E2F3的表达均上调^[53-54]。E2F1通过抑制c-Myc介导的凋亡过程,从而在肝癌细胞中起关键的抗凋亡作用^[55]。另外,在肝癌细胞中E2F8的表达也明显上调。E2F8表达的异常增加可促进细胞增殖、集落形成以及肿瘤发生等过程。可能机制是E2F8通过促进cyclin D1的表达,使S期细

胞比例增加,从而促进肝癌的发生过程。在Huh-7、Focus、Hep3B和YY-8103等人肝癌细胞系中,降低E2F8的表达可抑制肿瘤细胞的增殖^[56]。另外,在皮肤鳞状细胞癌组织中,E2F1和E2F7的表达均上调,抑制鳞状细胞癌中E2F7的表达使癌细胞对紫外线和阿霉素诱导的细胞凋亡更加敏感^[41]。因此,非典型E2F转录因子可能也参与了部分肿瘤的发生过程,并可作为肝癌、皮肤鳞状细胞癌等肿瘤新的药物治疗靶点。

4 结语与展望

非典型E2F转录因子作为E2F家族中重要的进化分支,自发现以来一直是细胞周期、胚胎发育、肿瘤发生等领域研究热点。非典型E2F蛋白结构的特殊性赋予其新的生物学功能,E2F7和E2F8在E2F调控网络中发挥抑制型转录因子的作用,但也可对部分靶基因起转录激活作用。最近通过各种小鼠敲除模型证实,哺乳动物的胚胎发育、细胞多倍化、血管发生和造血过程等依赖于非典型E2F转录因子的存在,而且E2F7和E2F8也参与部分肿瘤的发生过程。尽管E2F7和E2F8在结构和功能上相似,且

具有协同效应,但在不同的组织或细胞中可能具有特异的生理或病理功能。例如, E2F7/RB通路主要参与癌基因诱导的细胞衰老过程,而E2F8/RB通路则对红细胞生成和溶血进行调控。然而,目前关于典型与非典型E2F转录因子在进化上的生理意义、非典型E2F如何抑制靶基因的转录以及靶基因的特异性、非典型E2F对哺乳动物TGC和肝细胞多倍化的调控机制以及促进和抑制肿瘤发生的作用机制都尚未研究清楚。因此,需要进一步对E2F调控网络机制进行研究,从而更好地阐述非典型E2F基因的生理意义。

参考文献 (References)

- Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(1): 11-20.
- Kirienko NV, Fay DS. Transcriptome profiling of the *C. elegans* Rb ortholog reveals diverse developmental roles. *Dev Biol* 2007; 305(2): 674-84.
- Milet C, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, Guenal I. The *Drosophila* retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 2010; 9(1): 97-103.
- Weimer AK, Nowack MK, Bouyer D, Zhao X, Harashima H, Naseer S, *et al.* Retinoblastoma related1 regulates asymmetric cell divisions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012; 24(10): 4083-95.
- Korenjak M, Anderssen E, Ramaswamy S, Whetstone JR, Dyson NJ. RBF binding to both canonical E2F targets and noncanonical targets depends on functional dE2F/dDP complexes. *Mol Cell Biol* 2012; 32(21): 4375-87.
- Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(5): 297-306.
- Burke JR, Liban TJ, Restrepo T, Lee HW, Rubin SM. Multiple Mechanisms for E2F binding inhibition by phosphorylation of the retinoblastoma protein C-terminal domain. *J Mol Biol* 2014; 426(1): 245-55.
- Nevins JR. E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992; 258(5081): 424-9.
- Beshiri ML, Holmes KB, Richter WF, Hess S, Islam AB, Yan Q, *et al.* Coordinated repression of cell cycle genes by KDM5A and E2F4 during differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(45): 18499-504.
- Kolupaeva V, Basilico C. Overexpression of cyclin E/CDK2 complexes overcomes FGF-induced cell cycle arrest in the presence of hypophosphorylated Rb proteins. *Cell Cycle* 2012; 11(13): 2557-66.
- Westendorp B, Major JL, Nader M, Salih M, Leenen FH, Tuana BS. The E2F6 repressor activates gene expression in myocardium resulting in dilated cardiomyopathy. *FASEB J* 2012; 26(6): 2569-79.
- Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, *et al.* The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 2001; 414(6862): 457-62.
- Chong JL, Wenzel PL, Saenz-Robles MT, Nair V, Ferrey A, Hagan JP, *et al.* E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature* 2009; 462(7275): 930-4.
- Vlieghe K, Boudolf V, Beemster GT, Maes S, Magyar Z, Atanassova A, *et al.* The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endo-cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 2005; 15(1): 59-63.
- Lammens T, Li J, Leone G, de Veylder L. Atypical E2Fs: New players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol* 2009; 19(3): 111-8.
- Maiti B, Li J, de Bruin A, Gordon F, Timmers C, Opavsky R, *et al.* Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280(18): 18211-20.
- Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J* 2003; 22(23): 6289-98.
- Morkel M, Wenkel J, Bannister AJ, Kouzarides T, Hagemeyer C. An E2F-like repressor of transcription. *Nature* 1997; 390(6660): 567-8.
- Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; 408(6814): 796-815.
- Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, *et al.* Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(17): 5458-70.
- de Bruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R, Leone G. Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 2003; 278(43): 42041-9.
- Logan N, Delavaine L, Graham A, Reilly C, Wilson J, Brummelkamp TR, *et al.* E2F-7: A distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* 2004; 23(30): 5138-50.
- Logan N, Graham A, Zhao X, Fisher R, Maiti B, Leone G, *et al.* E2F-8: An E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* 2005; 24(31): 5000-4.
- Cohen M, Vecsler M, Liberzon A, Noach M, Zlotorynski E, Tzur A. Unbiased transcriptome signature of *in vivo* cell proliferation reveals pro- and antiproliferative gene networks. *Cell Cycle* 2013; 12(18): 2992-3000.
- Weijts BG, van Impel A, Schulte-Merker S, de Bruin A. Atypical E2fs Control Lymphangiogenesis through Transcriptional Regulation of Ccbe1 and Flt4. *PLoS One* 2013; 8(9): e73693.
- Apostolova MD, Ivanova IA, Dagnino C, D' Souza SJ, Dagnino L. Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. *J Biol Chem* 2002; 277(37): 34471-9.
- Li J, Ran C, Li E, Gordon F, Comstock G, Siddiqui H, *et al.* Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev Cell* 2008; 14(1): 62-75.
- Zalmas LP, Zhao X, Graham AL, Fisher R, Reilly C, Coutts AS, *et al.* DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep* 2008; 9(3): 252-9.
- Talluri S, Dick FA. Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere. *Cell Cycle* 2012; 11(17): 3189-98.

- 30 Polager S, Ginsberg D. E2F-at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 2008; 18(11): 528-35.
- 31 Westendorp B, Mokry M, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, Cuppen E, de Bruin A. E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(8): 3511-23.
- 32 Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 2013; 140(12): 2535-47.
- 33 Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: Insights into development and disease. *Development* 2013; 140(1): 3-12.
- 34 Sawin KE. Cell cycle: Cell division brought down to size. *Nature* 2009; 459(7248): 782-3.
- 35 Pandit SK, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 2013; 23(11): 556-66.
- 36 Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Hanlon Newell AE, Lenzi ML, Olson SB, *et al.* The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* 2010; 467(7316): 707-10.
- 37 Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, *et al.* Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 2003; 114(4): 431-43.
- 38 Pandit SK, Westendorp B, Nantasanti S, van Liere E, Tooten PC, Cornelissen PW, *et al.* E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2012; 14(11): 1181-91.
- 39 Gentric G, Desdouets C, Celton-Morizur S. Hepatocytes polyploidization and cell cycle control in liver physiopathology. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 282430.
- 40 Chen HZ, Ouseph MM, Li J, Pecot T, Chokshi V, Kent L, *et al.* Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat Cell Biol* 2012; 14(11): 1192-202.
- 41 Endo-Munoz L, Dahler A, Teakle N, Rickwood D, Hazar-Rethinam M, Abdul-Jabbar I, *et al.* E2F7 can regulate proliferation, differentiation, and apoptotic responses in human keratinocytes: Implications for cutaneous squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res* 2009; 69(5): 1800-8.
- 42 Ouseph MM, Li J, Chen HZ, Pecot T, Wenzel P, Thompson JC, *et al.* Atypical E2F repressors and activators coordinate placental development. *Dev Cell* 2012; 22(4): 849-62.
- 43 Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells* 2003; 21(1): 118-9.
- 44 Weijts BG, Bakker WJ, Cornelissen PW, Liang KH, Schaftenaar FH, Westendorp B, *et al.* E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J* 2012; 31(19): 3871-84.
- 45 Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, *et al.* Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992; 359(6393): 288-94.
- 46 Walkley CR, Sankaran VG, Orkin SH. Rb and hematopoiesis: Stem cells to anemia. *Cell Div* 2008; 3: 13.
- 47 Iavarone A, King ER, Dai XM, Leone G, Stanley ER, Lasorella A. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature* 2004; 432(7020): 1040-5.
- 48 Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* 2007; 129(6): 1081-95.
- 49 Bakker WJ, Weijts BG, Westendorp B, de Bruin A. HIF proteins connect the RB-E2F factors to angiogenesis. *Transcription* 2013; 4(2): 62-6.
- 50 Hu T, Ghazaryan S, Sy C, Wiedmeyer C, Chang V, Wu L. Concomitant inactivation of Rb and E2f8 in hematopoietic stem cells synergizes to induce severe anemia. *Blood* 2012; 119(19): 4532-42.
- 51 Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 2013; 494(7437): 361-5.
- 52 Aksoy O, Chicas A, Zeng T, Zhao Z, McCurrach M, Wang X, *et al.* The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev* 2012; 26(14): 1546-57.
- 53 Huang Y, Tai AW, Tong S, Lok AS. HBV core promoter mutations promote cellular proliferation through E2F1-mediated up-regulation of S-phase kinase-associated protein 2 transcription. *J Hepatol* 2013; 58(6): 1068-73.
- 54 Liu L, Liu Y, Liu J, Zhai X, Wen J, Xie K, *et al.* Genetic variants in pseudogene E2F3P1 confer risk for HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *J Biomed Res* 2013; 27(3): 215-9.
- 55 Ladu S, Calvisi DF, Conner EA, Farina M, Factor VM, Thorgerisson SS. E2F1 inhibits c-Myc-driven apoptosis via PIK3CA/Akt/mTOR and COX-2 in a mouse model of human liver cancer. *Gastroenterology* 2008; 135(4): 1322-32.
- 56 Deng Q, Wang Q, Zong WY, Zheng DL, Wen YX, Wang KS, *et al.* E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res* 2010; 70(2): 782-91.

细胞骨架和cAMP/PKA信号通路的互动效应调控 细胞行为的研究进展

黄帅帅 王宇多 王 萍*

(宁波大学医学院, 宁波大学转化医学中心; 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 细胞骨架的运动变化是一个多蛋白和多步骤参与的复杂过程。研究表明, 环状腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)作为第二信使, 参与调控多种细胞信号转导, 从而调控细胞骨架重排过程及其介导的细胞分裂、迁移、分化和黏附等。然而, 另有文献报道, 细胞骨架纤维排列首先通过影响信号通路中蛋白激酶的活性, 进而影响细胞行为。该文结合课题组的实验结果就细胞骨架和cAMP信号通路互动效应调控细胞行为的研究进展作一综述。

关键词 cAMP; 细胞骨架; 细胞行为; 信号通路

Interactive Effects Between Cytoskeleton and cAMP/PKA Signaling Pathway in Regulation of Cell Behavior

Huang Shuaishuai, Wang Yuduo, Wang Ping*

(Center for Translational Medicine, Ningbo University School of Medicine; Zhejiang Provincial Key
Laboratory of Pathophysiology, Ningbo 315211, China)

Abstract Cytoskeleton arrangements are complex processes, which involved many proteins and multi-steps. Cytoskeleton rearrangement-mediated cell behaviors are regulated by the protein kinases in cAMP signaling pathway, whereas, the contrast results are showed in some reports. Combined with our research, this review summarized the interactive effects between cytoskeleton and cAMP signaling pathway in regulation of cell behavior.

Key words cAMP; cytoskeleton; cell behavior; signaling pathway

细胞骨架作为真核细胞中的动态蛋白纤维网状结构, 由微丝(microfilaments, MF)、微管(microtubules, MT)和中间纤维(intermediate filaments, IF)构成。MF是由肌动蛋白聚合而成的多聚体, 广泛存在于真核细胞应力纤维、黏着斑、伪足和收缩环中, 其结构组成单元球状肌动蛋白(globular actin, G-actin)在ATP和多种微丝相关蛋白的作用下, 通过与丝状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)不断组装和解聚的转换,

参与调控细胞形态改变、黏附、迁移和胞质分裂等行为。MT由 α -tubulin和 β -tubulin聚合组成, 在微管相关蛋白的作用下组装形成中空管状结构, 在细胞内物质运输与胞质分裂中扮演重要角色。早期研究认为, MF和MT在细胞中发挥的功能相对独立。然而近年来大量文献表明, MF和MT细胞骨架相互联系、相互依赖, 共同参与调控细胞行为。MT的重排影响黏着斑和应力纤维结构的装配^[1], MT受解聚

收稿日期: 2014-02-19 接受日期: 2014-03-24

国家自然科学基金(批准号: 81071653、81372209)和浙江省自然科学基金(批准号: LY13H160038)资助项目

*通讯作者。Tel: 0574-87609595, E-mail: pinoav@hotmail.com

Received: February 19, 2014 Accepted: March 24, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81071653, 81372209) and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LY13H160038)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609595, E-mail: pinoav@hotmail.com

网络出版时间: 2014-07-01 16:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0047.html>

剂诺考达唑(nocodazole)的强力解聚导致巨噬细胞中伪足结构的破坏^[2]。Shirasaka等^[3]为了研究MF和MT在破骨细胞中的作用,观察到MF大量聚集于破骨细胞的褶皱边缘,而正常情况下MT有两种分布形态:一种是从微管组织中心(microtubule organizing center, MOTC)向细胞四周发射的丝状网络结构,另一种则是与肌动蛋白丝形成环状分布于细胞外围,包绕着整个细胞;然而有趣的是, MF破坏剂cytochalasin D处理细胞后,分布于细胞基质的MT丝状网络结构聚集形成环状结构,而环绕于细胞外围的MT结构发生破坏;使用MT解聚剂作用于破骨细胞后, MF和MT结构均发生明显破坏。由此可见, MF和MT结构网络在维持细胞行为中密不可分。

MF和MT不仅在稳定细胞形态、承受外力刺激、维持细胞内部结构有序性中起重要作用,而且还参与调控细胞迁移、黏附、分裂以及细胞内信号传递。其中, cAMP介导的信号通路 with 细胞骨架之间存在的互动效应与细胞增殖、凋亡、黏附、迁移等细胞行为密切相关, cAMP依赖的蛋白激酶A(cAMP-dependent protein kinase, PKA)作为cAMP依赖的主要靶向蛋白,参与了这些过程。研究发现, cAMP/PKA信号与肿瘤发生发展密切相关,并且参与介导缺氧环境诱导的肿瘤细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程^[4]。然而, Huynh等^[5]发现, PKA参与介导肿瘤抑制因子TGF β 抑制的早期肿瘤转移和浸润过程。Mckenzie等^[6]在研究中发现, 迁移的卵巢癌SKOV-3 EOC细胞伪足前缘部位有大量的活性PKA聚集;然而, PKA活性抑制剂H89作用后, 细胞迁移显著性下调;进一步通过三维细胞外基质培养模型(three-dimensional extracellular matrix)证明, PKA锚定于伪足前缘并且呈活化状态是维持细胞迁移运动所必需的。Tkachenko等^[7]的研究进一步阐述了PKA介导的伪足收缩运动机制,他们认为, PKA通过磷酸化作用激活RhoA, RhoA激活后除了进一步激活下游通路外,还增强与Rho二磷酸鸟苷解离抑制因子(Rho guanosine diphosphate dissociation inhibitor, RhoGDI)的结合能力,从而反向抑制RhoA活性。因此,这种调控RhoA活性的平衡机制为调控迁移细胞行为奠定基础。此外,小RNA技术抑制PKA基因表达,细胞减数分裂期纺锤丝遭破坏,细胞周期受阻,诱导细胞走向凋亡^[8-9]。

我们的前期研究发现,抗肿瘤药物通过诱导

凋亡细胞内Ca²⁺内流,调控细胞骨架MF的解聚和质膜下“环状”MT结构的形成^[10],抑制cAMP/PKC/MARK/CREB信号通路,从而抑制其下游蛋白cyclin A、cyclin D1和Bcl-2基因的表达^[11-12],抑制细胞增殖和侵袭能力^[13],最终诱导细胞凋亡;同时,细胞骨架actin和tubulin亚型基因的表达也被显著抑制^[14](图1)。由此可见, cAMP和细胞骨架纤维排列之间存在紧密的联系。本文就cAMP信号通路 with 细胞骨架纤维排列之间的互动效应作一综述。

1 cAMP/PKA信号通路对细胞骨架的调控

1.1 PKA结构

PKA是由两个催化亚基(PKA-cat)和两个调节亚基(PKA-reg)组成的变构酶。细胞未受刺激时, PKA-cat与PKA-reg结合, PKA活性受抑制;细胞受刺激后,第二信使cAMP与PKA-reg结合并通过构型改变释放PKA-cat,从而实现其催化作用^[15]。PKA调节的活性十分广泛,尤其是对MF、MT和细胞骨架相关蛋白的调节^[16]。

1.2 cAMP/PKA/MLC途径

肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)在细胞形态改变、细胞运动和肌肉收缩中扮演重要的作用。MLC受肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiledcoil forming protein kinase, ROCK)磷酸化,通过与F-actin相互作用,参与诱导应力纤维形成和黏着斑装配,从而调控细胞内伪足运动^[17-18]。有研究表明, cAMP/PKA信号通过调节MLCK和ROCK活性,参与调控MLC介导的细胞运动。一方面, cAMP/PKA信号通过磷酸化 β -磷脂酶C(β -PLC),抑制三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-triphosphate, IP3)受体活性,参与调节细胞内Ca²⁺释放,从而形成Ca²⁺/钙调素,结合并上调MLCK活性,最终诱导MLC磷酸化水平上调^[19];另一方面, cAMP介导的PKA激活也可以通过抑制RhoA活性,下调其下游效应分子ROCK的活性,从而抑制MLC的去磷酸化^[20]。因此, MLCK和ROCK活性受PKA信号调控,通过调节MLC磷酸化水平影响其介导的细胞骨架运动。

Bogatcheva等^[21-22]在研究MLC与内皮细胞通透性之间的关系时发现,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通过诱导MLC磷酸化,促进细胞通透性增加,下调诱导内皮屏障功能;然而,小RNA技术沉默

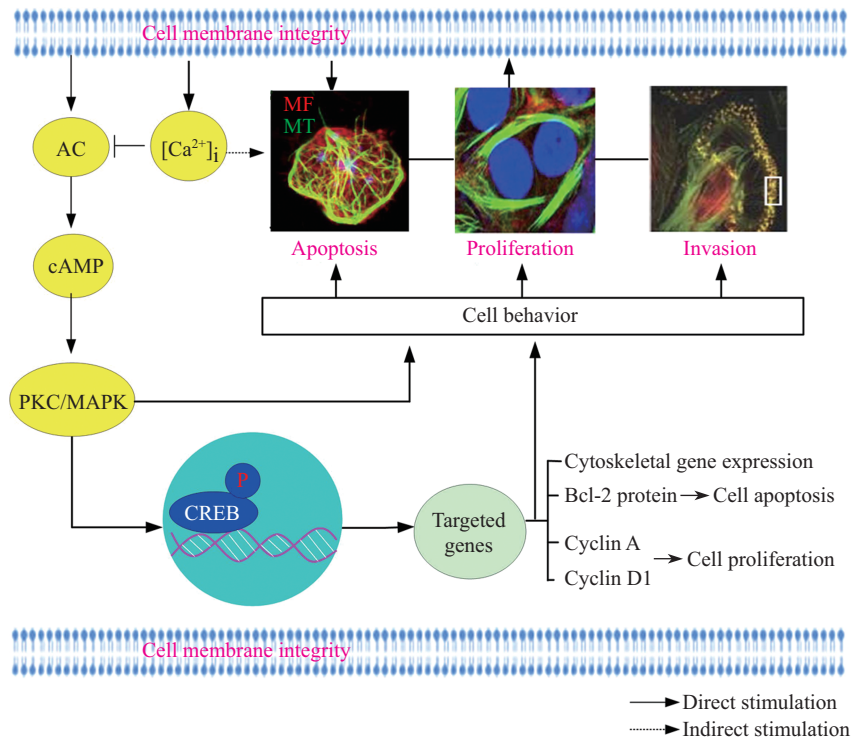


图1 CREB介导的细胞行为
Fig.1 CREB mediated cell behavior

*MLCK*或*ROCK2*基因表达后, *MLC*磷酸化水平下调, 内皮细胞通透性也显著性下调, 因此, 他们初步认为LPS通过*MLCK*和*ROCK2*激活*MLC*调控细胞骨架重排, 下调内皮细胞通透性, 从而增强内皮细胞屏障功能; 进一步研究发现, *AC/PKA*激活剂逆转了LPS诱导的上述过程。由此可见, *cAMP/PKA*信号通过调控*MLCK*或*ROCK*活性, 进而改变*MLC*磷酸化水平, 激发细胞骨架重排, 促进内皮细胞屏障功能。

1.3 *cAMP/PKA/ Rac1*途径

*Rac 1*参与调控生长因子诱导的actin细胞骨架动态平衡, 诱导膜突触与片状伪足的形成^[23]。为了研究*Rac 1*介导的细胞骨架重排机制, Logue等^[24]使用免疫荧光技术标记HEK 293细胞内的F-actin, 发现只有在 Ca^{2+} 升高到一定浓度时, 受A型激酶锚定蛋白(A-kinase anchoring protein, AKAP)锚定的PKA才会参与磷酸化含IQ基元的GTP酶激活蛋白2(IQ motif containing GTPase activating protein 2, IQGAP2), 招募*Rac 1*蛋白参与形成PKA/IQGAP2/*Rac 1*信号复合体, 从而调节actin细胞骨架。

*Rac1*蛋白虽然不受PKA的直接磷酸化, 但PKA可以通过其作用底物蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP-PEST)

活性的改变来调节*Rac1*活性^[25-26]。Sastry等^[25]在研究中发现, 成纤维细胞中PTP-PEST过表达后*Rac1*活性下调, 从而抑制血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)诱导的细胞膜突触形成和细胞流动性增加。Espejo等^[26]在此基础上进一步研究发现, *PTP-PEST*基因敲除后, *Rac1*活性显著性增加, 细胞的迁移能力增强, 细胞之间的黏着连接减弱; 相反, *PTP-PEST*过表达则抑制*Rac1*的活性, 从而抑制上皮细胞运动。因此认为, PKA通过调节PTP-PEST, 从而调节*Rac1*介导的细胞骨架改变。

此外, 最新研究表明, 除了PTP-PEST, PKA还可以通过刺激P21活化激酶(p21-activated kinase, PAK)来调节*Rac1*活性^[27-28]。PAK作为一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在肿瘤组织中呈高表达状态, 其N-端的CRIB结构域受Cdc42/*Rac1*活化, 诱导肿瘤细胞骨架纤维重组, 并促进细胞浸润和转移^[29]。蔡松旺等^[30]为了研究PAK在肺癌A549细胞侵袭及迁移中的作用, 使用小RNA干扰技术抑制细胞内PAK基因表达, 发现细胞骨架应力纤维丝明显减少, actin皱缩, 癌细胞的扩散和侵袭能力下调。此外, Baumer等^[31]和Del等^[32]发现, $\beta 1$ -PAK交换因子($\beta 1$ -PAK-interacting exchange

factor, $\beta 1$ -Pix)通过与PAK结合后形成复合体, 激活下游分子Cdc-42和Rac1, 诱导丝状伪足形成, 从而介导肿瘤细胞的扩散和侵袭。Chahdi等^[27]使用定点突变载体W43K(丧失与PAK结合能力的 $\beta 1$ -Pix SH3m)和L238R/L239S(丧失GEF活性的 $\beta 1$ -Pix DHm)处理人肾小球系膜HMC细胞, 发现Cdc-42和Rac1蛋白均不能被激活, 进一步通过PKA定点突变位点研究发现, PKA通过磷酸化 $\beta 1$ -Pix Ser-516与Thr-526位点, 从而结合PAK发挥功能。这些结果表明, PAK受PKA活化并通过调控其下游分子Rac1, 在肿瘤细胞的浸润和转移中发挥重要作用。

1.4 cAMP/PKA/RhoA途径

Ras同源基因家族成员A(Ras homolog gene family member A, RhoA)作为一个小GTP酶蛋白, 通过激活其下游激酶ROCK信号, 参与调控细胞伪足运动, 从而诱导细胞迁移^[33]。

RhoA诱导的细胞迁移与MF重排密切相关。早期研究报道, RhoA在细胞迁移中参与调控细胞应力纤维的形成, 其Ser-188位点可以直接受PKA磷酸化。新近文献表明, PKA抑制细胞内应力纤维的聚合和组装, 从而诱导细胞形态和运动的改变, 然而, 这种作用被G14V RhoA组成型激活突变体所逆转^[34-35]。Jones等^[36]在研究中发现, 前列腺癌上皮细胞中, PKA介导的RhoA Ser-188磷酸化诱发神经内分泌样表型(neuroendocrine-like phenotype)快速分化; 然而, 这种变化受ROCK抑制剂Y-27632所逆转。他们因此认为, PKA通过磷酸化RhoA Ser-188位点抑制RhoA活性, 从而进一步抑制ROCK活性, 最终诱导前列腺肿瘤上皮细胞分化成神经内分泌样表型。Jia等^[37]在研究植物雌激素染料木黄酮改善血管内皮细胞发生功能的分子机制中发现, 该药物显著性抑制了thrombin诱导的cAMP水平下调、MLC磷酸化水平增加和应力纤维形成, 从而下调单层内皮细胞通透性, 维护内皮细胞屏障功能; 然而, 这些作用被RhoA或ROCK抑制剂所逆转。他们因此认为, 木黄酮通过刺激cAMP/PKA信号, 从而抑制RhoA/ROCK活性, 最终逆转thrombin诱导的内皮细胞紊乱功能。这些报道表明, RhoA/ROCK信号在PKA调控细胞行为改变过程中扮演了重要角色。

深入研究发现, 在迁移细胞中RhoA活化并向细胞膜褶皱样运动部位聚集, 活化的RhoA通过调节下游底物ROCK的活性, 从而激活单丝氨酸蛋白激

酶(LIM kinase, LIMK), 最终激活丝切蛋白(cofilin), 介导应力纤维聚合和组装^[38-39]。Aslam等^[20]发现, cAMP/PKA通过抑制CPI-17和RhoA/ROCK信号分子, 激活MLCK, 调节MLC去磷酸化, 进而抑制内皮细胞收缩, 增强内皮细胞屏障功能。深入研究发现, 血浆中介素(intermedin)通过下调人脐静脉内皮细胞HUVECs的RhoA/ROCK通路的活性, 进而诱导MLC磷酸化和应力纤维丝的减少, 导致内皮细胞屏障功能的失活。由此可见, cAMP/PKA通过RhoA/ROCK信号通路介导了细胞的收缩抑制。

1.5 cAMP/PKA/VASP途径

血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)是Ena/VASP蛋白家族的主要成员, 作为一种肌动蛋白结合蛋白, 通过参与肌动蛋白丝的解聚和聚合, 介导细胞迁移和黏着等过程。王婷婷等^[40]报道, VASP主要位于细胞间连接处、黏着连接处以及细胞膜上动态性较高的区域, 参与调节细胞骨架相关的各种细胞行为, 如成纤维细胞的迁移、血小板的聚集和神经细胞轴突的形成等。

VASP作为PKA的一个重要底物, 在actin细胞骨架重塑和细胞迁移中扮演重要角色。Zhang等^[41]在研究PKA调控的VASP在细胞迁移中的作用机制中发现, 趋化因子PDGF通过磷酸化VASP Ser157位点激活VASP, 并且伴随着PKA的激活和内皮细胞迁移率的显著性上调; 然而, 转染VASP-S157A后逆转了上述现象, 因此, 他们初步认为, PDGF通过激活PKA, 进而增加VASP磷酸化水平, 促进细胞迁移。通过免疫荧光技术进一步发现, 片状伪足数量显著增加, VASP大量聚集于迁移细胞片状伪足前缘, 若破坏PKA和AKAP的结合, PDGF诱导的这些现象被逆转。因此, 他们认为, PKA与AKAP结合并活化, 促进VASP磷酸化和定位于伪足前缘, 参与介导PDGF诱导的内皮细胞迁移。由此可见, VASP在PKA介导的细胞行为调控中发挥重要作用。

Lee等^[42]为了研究VASP在二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导胶质细胞膜褶皱样运动和趋化性中的作用, 首先使用ADP作用于胶质细胞, 发现ADP能够快速上调细胞内的cAMP水平, 并且诱导VASP的Ser-153位点磷酸化, 同时伴随着胶质细胞膜褶皱样运动的形成和趋化性增强。其次, 他们分别使用PKA抑制剂H89和PKA信号通路激动剂forskolin作用于BV2胶质细胞, 发现H89可显著抑制VASP

的磷酸化和细胞趋化性;相反, forskolin活化PKA后, VASP的磷酸化水平升高, 细胞膜褶皱样运动和趋化性显著下调。最后, 他们通过小RNA技术沉默*VASP*基因表达, 发现ADP诱导的细胞膜褶皱样运动被显著抑制, 表明VASP受PKA磷酸化调控, 在ADP诱导的细胞膜褶皱样运动的形成和趋化性中起重要作用。

Lebrand等^[43]为了研究Ena/VASP蛋白在片状伪足和丝状伪足形成中所发挥的作用, 首先根据Ena/VASP蛋白的EVH1结构域, 构建与其特异性结合的FP4配体基元载体, 并在此基础上分别构建FP4-Mito(将胞内Ena/VASP移位至线粒体)、FP4-CAAX(将胞内Ena/VASP移位至细胞膜)和AP4-Mito突变载体(FP4的苯丙氨酸位点突变成丙氨酸, 丧失功能), 转染至海马神经元细胞并通过免疫荧光定位观察。结果发现, FP4-Mito转染后, 细胞丝状伪足和actin肌动蛋白丝数量与野生型相比均显著下调, 而在FP4-CAAX转染后效果相反; 进一步研究发现, AP4-Mito转染后促进forskolin诱导的丝状伪足生长, 相反, FP4-Mito处理后呈现抑制作用。由此可见, Ena/VASP参与PKA介导的actin细胞骨架网络调控。

1.6 cAMP/PKA/LASP1途径

LIM与SH3结构域蛋白1(LIM and SH3 protein 1, LASP1)作为一个肌动蛋白结合蛋白, 其Ser-146位点受cAMP/PKA信号磷酸化, 参与调控细胞骨架纤维排列^[44]。Zhang等^[45]在研究中发现, 通过基因敲除技术构建*LASP1*^{-/-}基因敲除小鼠模型, 该模型小鼠与对照组*LASP1*(+/+)相比, 损伤修复能力与肿瘤形成能力较强, 并且来源于*LASP1*^{-/-}小鼠的成纤维细胞(embryonic fibroblasts, MEFs)在体外培养时迁移能力与贴壁能力显著增强, 黏着蛋白表达水平显著升高。因此, 他们认为, *LASP1*在MF介导的细胞黏着和迁移过程中, 存在负性调节作用。Butt等^[46]为了研究*LASP1*和细胞转移之间的关系, 通过构建*LASP1* S146D模拟磷酸化突变体, 转染至乳腺癌PTK-2细胞系后, 再通过细胞迁移实验发现, *LASP1* S146D模拟磷酸化突变体导入的细胞迁移率与对照组相比下调了25%。进一步研究发现, *LASP1* S146D模拟磷酸化突变体转染的细胞株, *LASP1*蛋白从伪足前缘和黏着连接处迁移至胞质溶胶。Keicher等^[47]在研究*LASP1*和PKA的关系时也发现了类似的现象, 他们使用PKA激活剂处理PTK-2细胞后发现, *LASP1*

蛋白从黏着连接处移位至胞质溶胶, 而肌动蛋白丝排列结构并未发生任何改变; 此外, 他们通过构建*LASP1* T156E模拟磷酸化突变体, 转染至细胞后发现, *LASP1*与F-actin的结合能力显著下降。综上所述, *LASP1*受PKA磷酸化, 从而通过改变其细胞内定位, 发挥细胞骨架重组和细胞迁移的功能。

*LASP1*还可以与黏着斑蛋白Krp或细胞骨架结合蛋白palladin结合, 从而介导伪足生长和细胞迁移运动。Spence等^[48]在研究中发现, 缺失SH3结构域的*LASP1*突变体细胞, 其伪足长度与对照相比显著缩短, 并且不能参与延伸运动, 细胞的迁移能力显著性下降; 有趣的是, 通过小RNA干扰技术沉默*Krp1*或者*LASP1*基因表达后也发生了上述现象; 通过免疫荧光技术进一步研究发现, *Krp1*和*LASP1*结合并聚集于富含F-actin的区域。因此, 他们推测, *LASP1*通过其SH3结构域与Krp结合, 参与调控细胞的伪足延伸运动。Rachlin等^[49]在研究中发现, *LASP1*通过和actin相关蛋白palladin相互作用, 介导细胞形态变化和细胞运动。他们使用小RNA技术沉默*palladin*基因表达, 发现*LASP1*聚集于黏着斑, 而不能与肌动蛋白丝相结合, 伪足的延伸运动也受抑制。由此可见, *LASP1*通过与palladin结合, 介导伪足生长和细胞迁移运动。

1.7 cAMP/PKA/adducin途径

内收蛋白(adducin)作为一种细胞膜骨架蛋白, 与血影蛋白spectrin-actin复合体具有较强的结合活性, 并且被认为是spectrin-actin介导的细胞膜骨架组装的调控蛋白^[50]。研究表明, 内收蛋白受PKA磷酸化后能够阻断肌动蛋白的聚合, 扮演着类似封端蛋白的功能。Matsuoka等^[51]为了研究内收蛋白介导的蛋白激酶调控actin细胞骨架的机制, 通过体外实验证明PKA和PKC均能磷酸化内收蛋白; 进一步研究发现, PKA磷酸化内收蛋白后可显著下调内收蛋白与胞衬蛋白fodrin/actin复合体的结合活性, 并促进胞衬蛋白与actin的相互作用, 而PKC磷酸化内收蛋白后却无此功能。因此, PKA通过磷酸化内收蛋白抑制其与胞衬蛋白形成复合体, 从而增强了spectrin与F-actin的结合作用。

1.8 cAMP/PKA/ $\alpha 4$ integrin 途径

$\alpha 4$ 整合素($\alpha 4$ integrin)作为一种介导细胞核与细胞外基质连接的跨膜受体, 通过与细胞骨架桩蛋白(paxillin)等配体作用, 介导细胞迁移运动。Liu等^[52]

研究发现, $\alpha 4$ 整合素细胞质内结构域与信号受体蛋白整合素结合, 诱导细胞骨架MF纤维排列发生改变, 显著上调细胞迁移率。然而, 破坏 $\alpha 4$ 整合素和桩蛋白复合体后, 细胞迁移能力显著下调。Han等^[53]在研究 $\alpha 4$ 整合素和细胞迁移的关系时发现, $\alpha 4$ 整合素Ser-988位点参与调控其与桩蛋白的结合。他们通过构建 $\alpha 4$ 整合素模拟磷酸化突变体 $\alpha 4$ 整合素S988D, 转染细胞后发现, $\alpha 4$ 整合素和桩蛋白的结合能力下调, 迁移能力受抑制。因此, $\alpha 4$ 整合素受磷酸化调节后与桩蛋白的结合活性下调, 最终抑制细胞迁移。

Goldfinger等^[54]在此基础上经过深入研究发现, $\alpha 4$ 整合素受PKA磷酸化后, 聚集于迁移细胞前缘伪足, 并且与桩蛋白的结合活性显著下调, 细胞迁移能力增强。他们首先使用特异性的磷酸化 $\alpha 4$ 整合素抗体, 发现荧光主要聚集于迁移细胞前缘伪足中, 而非磷酸化的 $\alpha 4$ 整合素蛋白则随机分布于整个细胞体和伪足中。其次, 他们通过构建负显性突变体 $\alpha 4$ 整合素(S988A)抑制其磷酸化水平, 发现伪足延伸至划痕处的细胞数显著下降, 细胞迁移率显著下调; 同时, 使用PKA活性抑制剂Rp-cAMP或者H89处理正常细胞株, 磷酸化的 $\alpha 4$ 整合素蛋白表达量显著下调, 然而, 在Rp-cAMP或者H89处理表达负显性突变体 $\alpha 4$ 整合素(S988A)的细胞株中却未发现此现象。最后, 他们通过 $\alpha 4$ 整合素和桩蛋白共染色进一步发现, 桩蛋白与 $\alpha 4$ 整合素共同定位于侧向边缘区(lateral edge)和尾部边缘区(trailing edge); 有趣的是, 桩蛋白并未定位于磷酸化 $\alpha 4$ 整合素聚集的伪足前缘(leading edge); 最后, 他们通过构建融合蛋白技术证明, $\alpha 4$ 整合素受磷酸化后抑制其与桩蛋白的结合活性, 从而促进细胞迁移。因此, PKA通过磷酸化作用使 $\alpha 4$ 整合素从 $\alpha 4$ 整合素/桩蛋白复合体中释放, 转移至伪足前缘, 在细胞迁移中扮演着十分重要的角色。

1.9 cAMP/PKA/MAP4途径

有研究表明, 微管相关蛋白4(microtubule-associated protein 4, MAP4)促进MT组装, 在细胞分裂间期抑制MT解聚。MAP4作为微管相关蛋白, 具有促进MT组装和聚合的功能^[55]。MAP4受PKA磷酸化后与MT的结合能力下降, 导致MT稳定性的破坏。Ou等^[56]的最新研究表明, 膀胱癌的恶性程度与MAP4的表达水平呈正相关。为了进一步研究MAP4与膀胱癌转移之间的关系, 使用cAMP激活剂dbcAMP作用于人膀胱癌细胞T24和UM-UC-3细胞, 通过划痕实验发

现, 细胞转移和侵袭能力显著下调, MT骨架网路破坏, 同时发现MAP4磷酸化水平升高; 然而上述现象被PKA或者MAP4的小RNA干扰作用所逆转。因此, cAMP/PKA信号通过磷酸化MAP4, 从而导致MT细胞骨架网络破坏, 抑制膀胱癌细胞转移和侵袭能力。

1.10 cAMP/PKA/DCX途径

双皮质素(doublecortin, DCX)作为微管相关蛋白, 在体内和体外实验中已被发现具有稳定MT、导致MT聚合的作用^[57]。Toriyama等^[58]在研究中发现, PKA促进神经迁移, 在此过程中受DCX所介导。进一步研究发现, PKA激活剂处理后, DCX Ser-47位点磷酸化, 伴随着与MT的结合能力下降, 细胞迁移能力增加。因此认为, PKA通过促进DCX磷酸化, 降低DCX与MT的结合能力, 从而促进细胞迁移。

然而, 我们的研究发现, PKA并不参与凋亡细胞内特殊MT结构的形成。凋亡细胞内 β -tubulin聚集于细胞质膜下方, 形成环状MT结构并且包绕着凋亡小体和片段化的细胞核^[14]; 其次, Ca^{2+} 内流参与调节凋亡细胞内特殊环状MT结构的形成; 最后, Ca^{2+} 内流抑制了AC活性和cAMP水平, 然而, 这种抑制现象被PKC激活剂而非PKA激活剂所逆转^[10]。由此可见, 细胞内cAMP/PKC, 而非cAMP/PKA信号在细胞凋亡和增殖中起重要作用。

2 细胞骨架纤维排列对cAMP/PKA信号通路的影响

传统观点认为, 细胞内信号分子通过调控细胞骨架及其蛋白基因, 从而改变细胞骨架的组成成分和装配方式, 最终诱导细胞骨架网络发生改变。然而, 与传统观点不同的是, 细胞骨架MF纤维排列和相关蛋白的改变能影响细胞内cAMP/PKA信号通路。细胞骨架结构受解聚剂破坏后, 伴随着cAMP/PKA下游效应分子的变化, 然而, 这种变化通常只受MF纤维排列的影响, MT完整性的破坏并不起作用。COOK等^[59]为了研究MF和MT对表皮角化细胞(normal human epidermal keratinocytes, NHEK)中层黏连蛋白B2(laminin B2)的影响, 分别使用MF解聚剂(cytochalasin D)和MT解聚剂(nocodazole)作用于NHEK细胞, 发现只有cytochalasin D作用后, laminin B2合成显著增加, 而MT解聚剂加入无影响。因此, MF细胞骨架纤维排列的破坏影响laminin B2的合成和分泌, 而MT细胞骨架并无影响。

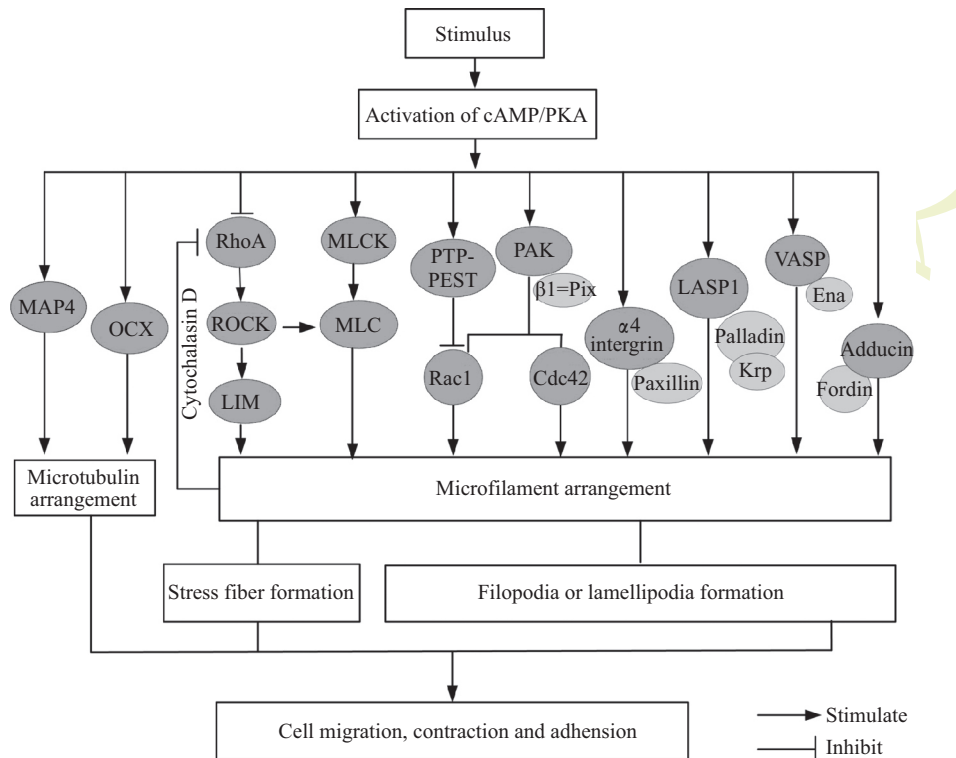


图2 cAMP信号通路调控的细胞骨架相关蛋白在细胞迁移、收缩和黏附中的作用

Fig.2 Effects of cAMP-mediated cytoskeleton related protein on cell migration, contraction and adhesion

不同的细胞骨架状态对cAMP/PKA/RhoA/ROCK信号具有反馈调节作用。Bhadriraju等^[60]在研究中发现,细胞骨架张力状态的改变通过刺激cAMP/PKA/RhoA/ROCK信号通路,介导MLC磷酸化水平改变。他们使用蛋白印章技术在聚二甲基硅氧烷材质(polydimethylsiloxane, PDMS)的小皿中,加入微量纤连蛋白,制作一些供悬浮细胞黏附、但不足以使细胞完全铺展的“微型小岛”,用以限制细胞骨架张力。结果发现,细胞骨架张力受限制时,ROCK活性和MLC磷酸化水平均呈较低状态,然而,若使细胞充分铺展,ROCK与肌球蛋白活性恢复至正常水平。深入研究发现,细胞骨架张力破坏剂(cytochalasin D或blebbistatin)处理后,ROCK活性受抑制,然而这个过程并没有被组成型突变载体RhoA-V14的转染所逆转。由此可见,细胞骨架张力和RhoA/ROCK信号之间存在反馈调节机制,在细胞外力与细胞内化学信号的转化中起重要作用。我们的前期研究表明,使用cytochalasin D破坏MF细胞骨架后,RhoA活性显著性下调;相反,我们使用RhoA负显性抑制剂RhoAT19N降低活化的RhoA水平,发现细胞骨架排列无明显改变。因此,细胞骨架纤维排列的改变对RhoA信号通路具有直接调控作用。

综上所述,细胞骨架MF纤维排列改变对cAMP/PKA信号通路具有负性调控作用。

3 小结与展望

cAMP/PKA作为一条既保守又经典的信号通路,通过调控多种下游通路介导细胞迁移、收缩和黏附等细胞行为(图2)。不同通路之间相互交联,构成缤纷复杂的调控体系,然而,这些交联的调控作用最终指向了以MF和MT为基础的骨架网络,参与调控肿瘤细胞的发生、发展过程;同时,细胞骨架排列改变对细胞骨架调控蛋白及其信号通路也具有反馈调节作用。因此,深入研究肿瘤发生、发展过程中AMP和细胞骨架之间的互动效应,并分析其对癌症靶向研究的分子机制,将为探索疾病的分子机制奠定基础,同时也为人类寻找克服相关疾病的靶向药物提供新思路。

参考文献 (References)

- 1 Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* 1999; 146(5): 1033-44.
- 2 Linder S, Hufner K, Wintergerst U, Aepfelbacher M. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in

- primary human macrophages. *J Cell Sci* 2000; 113(23): 4165-76.
- 3 Shirasaka Y, Kawasaki M, Sakane T, Omatsu H, Moriya Y, Nakamura T, *et al.* Induction of human P-glycoprotein in Caco-2 cells: Development of a highly sensitive assay system for P-glycoprotein-mediated drug transport. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21(5): 414-23.
- 4 Shaikh D, Zhou Q, Chen T, Ibe JC, Raj JU, Zhou G. cAMP-dependent protein kinase is essential for hypoxia-mediated epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in lung cancer cells. *Cell Signal* 2012; 24(12): 2396-406.
- 5 Huynh QK, Wise SJ, Koch KA, Castonguay LA, Reid BG, Pagratis EE, *et al.* Screening and identification of a novel class of TGF-beta type 1 receptor kinase inhibitor. *J Biomol Screen* 2011; 16(7): 724-33.
- 6 McKenzie AJ, Campbell SL, Howe AK. Protein kinase A activity and anchoring are required for ovarian cancer cell migration and invasion. *PLoS One* 2011; 6(10): e26552.
- 7 Tkachenko E, Sabouri-Ghomi M, Pertz O, Kim C, Gutierrez E, Machacek M, *et al.* Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13(6): 660-7.
- 8 Hensley HH, Hannoun-Levi JM, Hachem P, Mu Z, Stoyanova R, Khor LY, *et al.* PKA knockdown enhances cell killing in response to radiation and androgen deprivation. *Int J Cancer* 2011; 128(4): 962-73.
- 9 Duncan FE, Moss SB, Williams CJ. Knockdown of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) type Ialpha regulatory subunit in mouse oocytes disrupts meiotic arrest and results in meiotic spindle defects. *Dev Dyn* 2006; 235(11): 2961-8.
- 10 Wang P, Xu S, Zhao K, Xiao B, Guo J. Increase in cytosolic calcium maintains plasma membrane integrity through the formation of microtubule ring structure in apoptotic cervical cancer cells induced by trichosanthin. *Cell Biol Int* 2009; 33(11): 1149-54.
- 11 Wang P, Xu J, Zhang C. CREB, a possible upstream regulator of Bcl-2 in trichosanthin-induced HeLa cell apoptosis. *Mol Biol Rep* 2010; 37(4): 1891-6.
- 12 Wang P, Yan H, Li JC. CREB-mediated Bcl-2 expression in trichosanthin-induced Hela cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(1): 101-5.
- 13 Jiang Q, Bai T, Shen S, Li L, Ding H, Wang P. Increase of cytosolic calcium induced by trichosanthin suppresses cAMP/PKC levels through the inhibition of adenylyl cyclase activity in HeLa cells. *Mol Biol Rep* 2011; 38(4): 2863-8.
- 14 Wang P, Li JC. Trichosanthin-induced specific changes of cytoskeleton configuration were associated with the decreased expression level of actin and tubulin genes in apoptotic Hela cells. *Life Sci* 2007; 81(14): 1130-40.
- 15 Caretta A, Mucignat-Caretta C. Protein kinase A in cancer. *Cancers (Basel)* 2011; 3(1): 913-26.
- 16 Howe AK. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692(2/3): 159-74.
- 17 Wilson CA, Tsuchida MA, Allen GM, Barnhart EL, Applegate KT, Yam PT, *et al.* Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature* 2010; 465(7296): 373-7.
- 18 Butt T, Mufti T, Humayun A, Rosenthal PB, Khan S, Molloy JE. Myosin motors drive long range alignment of actin filaments. *J Biol Chem* 2010; 285(7): 4964-74.
- 19 Sriwai W, Zhou H, Murthy KS. G(q)-dependent signalling by the lysophosphatidic acid receptor LPA(3) in gastric smooth muscle: Reciprocal regulation of MYPT1 phosphorylation by Rho kinase and cAMP-independent PKA. *Biochem J* 2008; 411(3): 543-51.
- 20 Aslam M, Hartel FV, Arshad M, Gunduz D, Abdallah Y, Sauer H, *et al.* cAMP/PKA antagonizes thrombin-induced inactivation of endothelial myosin light chain phosphatase: Role of CPI-17. *Cardiovasc Res* 2010; 87(2): 375-84.
- 21 Bogatcheva NV, Zemskova MA, Kovalenkov Y, Poirier C, Verin AD. Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability. *J Cell Physiol* 2009; 221(3): 750-9.
- 22 Bogatcheva NV, Zemskova MA, Poirier C, Mirzapoiazova T, Kolosova I, Bresnick AR, *et al.* The suppression of myosin light chain (MLC) phosphorylation during the response to lipopolysaccharide (LPS): Beneficial or detrimental to endothelial barrier? *J Cell Physiol* 2011; 226(12): 3132-46.
- 23 Tsang SM, Brown L, Gadmor H, Gammon L, Fortune F, Wheeler A, *et al.* Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics. *Exp Cell Res* 2012; 318(18): 2269-83.
- 24 Logue JS, Whiting JL, Scott JD. Sequestering Rac with PKA confers cAMP control of cytoskeletal remodeling. *Small GTPases* 2011; 2(3): 173-6.
- 25 Sastry SK, Lyons PD, Schaller MD, Burridge K. PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 22): 4305-16.
- 26 Espejo R, Rengifo-Cam W, Schaller MD, Evers BM, Sastry SK. PTP-PEST controls motility, adherens junction assembly, and Rho GTPase activity in colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(2): C454-63.
- 27 Chahdi A, Miller B, Sorokin A. Endothelin 1 induces beta 1Pix translocation and Cdc42 activation via protein kinase A-dependent pathway. *J Biol Chem* 2005; 280(1): 578-84.
- 28 Manchanda PK, Jones GN, Lee AA, Pringle DR, Zhang M, Yu L, *et al.* Rac1 is required for Prkar1a-mediated NF2 suppression in Schwann cell tumors. *Oncogene* 2013; 32(30): 3491-9.
- 29 贺丽芳, 张国君. p21活化激酶4与肿瘤的研究进展. 国际肿瘤学杂志(He Lifang, Zhang Guojun. p21 activated kinase 4 and tumor. *Int J Oncol* 2012; 39(1): 15-8.
- 30 蔡松旺, 谢迭来, 翁毅敏, 温星桥, 张军航. p21活化激酶6对人非小细胞肺癌A549细胞侵袭及迁移能力的影响. 中国病理生理杂志(Cai Songwang, Xie Dielai, Weng Yimin, Wen xingqiao, Zhang Junhang. Effects of p21-activated kinase 6 on invasion and migration of human non-small-cell lung cancer A549 cells. *Chinese Journal of Pathophysiology* 2013; 29(9): 1637-40.
- 31 Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J. cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol* 2008; 129(6): 765-78.
- 32 Del Valle-Perez B, Martinez VG, Lacasa-Salavert C, Figueras A, Shapiro SS, Takafuta T, *et al.* Filamin B plays a key role in vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility through its interaction with Rac-1 and Vav-2. *J Biol Chem* 2010; 285(14): 10748-60.

- 33 O' Connor K, Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* 2013; 4(3): 141-7.
- 34 Oishi A, Makita N, Sato J, Iiri T. Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDIalpha. *J Biol Chem* 2012; 287(46): 38705-15.
- 35 Newell-Litwa KA, Horwitz AR. Cell migration: PKA and RhoA set the pace. *Curr Biol* 2011; 21(15): R596-8.
- 36 Jones SE, Palmer TM. Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal* 2012; 24(8): 1504-14.
- 37 Jia Z, Zhen W, Velayutham Anandh Babu P, Liu D. Phytoestrogen genistein protects against endothelial barrier dysfunction in vascular endothelial cells through PKA-mediated suppression of RhoA signaling. *Endocrinology* 2013; 154(2): 727-37.
- 38 O' Connor KL, Nguyen BK, Mercurio AM. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol* 2000; 148(2): 253-8.
- 39 Kreisberg JJ, Ghosh-Choudhury N, Radnik RA, Schwartz MA. Role of Rho and myosin phosphorylation in actin stress fiber assembly in mesangial cells. *Am J Physiol* 1997; 273(Pt 2): F283-8.
- 40 王婷婷, 李 柯, 魏 蕾. 血管扩张刺激磷蛋白在细胞骨架调节中的作用. *生理科学进展*(Wang tingting, Li Ke, Wei Lei. Roles of vasodilator-stimulated phosphoprotein in the regulation of cytoskeleton. *Process in Physiological Sciences*) 2006; 37(1): 27-30.
- 41 Zhang D, Ouyang J, Wang N, Zhang Y, Bie J. Promotion of PDGF-induced endothelial cell migration by phosphorylated VASP depends on PKA anchoring via AKAP. *Mol Cell Biochem* 2010; 335(1/2): 1-11.
- 42 Lee S, Chung CY. Role of VASP phosphorylation for the regulation of microglia chemotaxis via the regulation of focal adhesion formation/maturation. *Mol Cell Neurosci* 2009; 42(4): 382-90.
- 43 Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, Lanier LM, Krause M, Svitkina TM, *et al.* Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* 2004; 42(1): 37-49.
- 44 Mihlan S, Reiss C, Thalheimer P, Herterich S, Gaetzner S, Kremerskothen J, *et al.* Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene* 2013; 32(16): 2107-13.
- 45 Zhang H, Chen X, Bollag WB, Bollag RJ, Sheehan DJ, Chew CS. Lasp1 gene disruption is linked to enhanced cell migration and tumor formation. *Physiol Genomics* 2009; 38(3): 372-85.
- 46 Butt E, Gambaryan S, Gottfert N, Galler A, Marcus K, Meyer HE. Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15601-7.
- 47 Keicher C, Gambaryan S, Schulze E, Marcus K, Meyer HE, Butt E. Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(1): 308-16.
- 48 Spence HJ, McGarry L, Chew CS, Carragher NO, Scott-Carragher LA, Yuan Z, *et al.* AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins. *Mol Cell Biol* 2006; 26(4): 1480-95.
- 49 Rachlin AS, Otey CA. Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 6): 995-1004.
- 50 Zhao KN, Masci PP, Lavin MF. Disruption of spectrin-like cytoskeleton in differentiating keratinocytes by PKCdelta activation is associated with phosphorylated adducin. *PLoS One* 2011; 6(12): e28267.
- 51 Matsuoka Y, Hughes CA, Bennett V. Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *J Biol Chem* 1996; 271(41): 25157-66.
- 52 Liu S, Kiosses WB, Rose DM, Slepak M, Salgia R, Griffin JD, *et al.* A fragment of paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits alpha 4-mediated cell migration. *J Biol Chem* 2002; 277(23): 20887-94.
- 53 Han J, Rose DM, Woodside DG, Goldfinger LE, Ginsberg MH. Integrin alpha 4 beta 1-dependent T cell migration requires both phosphorylation and dephosphorylation of the alpha 4 cytoplasmic domain to regulate the reversible binding of paxillin. *J Biol Chem* 2003; 278(37): 34845-53.
- 54 Goldfinger LE, Han J, Kiosses WB, Howe AK, Ginsberg MH. Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. *J Cell Biol* 2003; 162(4): 731-41.
- 55 Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 1995; 75(4): 835-64.
- 56 Ou Y, Zheng X, Gao Y, Shu M, Leng T, Li Y, *et al.* Activation of cyclic AMP/PKA pathway inhibits bladder cancer cell invasion by targeting MAP4-dependent microtubule dynamics. *Urol Oncol* 2014; 32(1): 47.e21-48.
- 57 Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, *et al.* Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* 1999; 8(9): 1599-610.
- 58 Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Tago K, Itoh H. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem* 2012; 287(16): 12691-702.
- 59 Cook JR, van Buskirk RG. Disruption of microfilaments alters laminin synthesis but not laminin trafficking in NHEK *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32(5): 300-6.
- 60 Bhadriraju K, Elliott JT, Nguyen M, Plant AL. Quantifying myosin light chain phosphorylation in single adherent cells with automated fluorescence microscopy. *BMC Cell Biol* 2007; 8: 43.

蛋白质翻译后修饰研究进展

阮班军¹ 代 鹏¹ 王 伟¹ 孙建斌¹ 张文涛¹ 颜 真^{1*} 杨静华^{2*}

(¹肿瘤生物学国家重点实验室, 第四军医大学药学院药物基因组学教研室, 西安 710032; ²美国波士顿大学
肿瘤外科实验室及VA临床蛋白组学实验室, 波士顿 02130, 美国)

摘要 蛋白质是执行细胞功能的基本功能单元, 其表达受基因组和表观遗传学的调控。通常, 蛋白质在表达以后还需要经过不同程度的修饰才能发挥所需要的功能。这种翻译后修饰过程受到一系列修饰酶和去修饰酶的严格调控, 使得在某一瞬间细胞中蛋白质表现出某种稳定或动态的特定功能。最新的研究表明, 真核细胞中存在着各种各样的蛋白质修饰过程, 其中大约70%目前还无法解释。有理由认为, 这种经过了特定修饰的蛋白质, 更客观地反映了细胞的各种生理以及病理过程。因此, 除了基因组所编码的“裸”蛋白质组的表达以外, 更需要对经过翻译后修饰的蛋白质及蛋白质组的调控过程进行深入的研究。该文对常见翻译后修饰以及研究方法进行了综述。

关键词 蛋白质组; 蛋白质翻译后修饰; 基因组; 分子鉴定

Progress on Post-translational Modification of Proteins

Ruan Banjun¹, Dai Peng¹, Wang Wei¹, Sun Jianbin¹, Zhang Wentao¹, Yan Zhen^{1*}, Yang Jinghua^{2*}

(¹The State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Pharmacogenomics, School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; ²Department of Surgery, VA Boston Healthcare System, Boston University School of Medicine, Boston MA02130, USA)

Abstract Although protein expression is regulated through genetics and epi-genetics, its function is determined by many factors, of which post-translational modification (PTM) is particularly important. Protein modifications are precisely regulated through a variety of modifiers and de-modifiers, most of which are yet to be defined. Most physiological or pathological processes are usually regulated through typical but complex and dynamic PTM patterns and networks. Reasonably, proteome of PTM is more precise to describe the physiological or pathological processes of cells at the molecular level to clarify protein functions and easy to find out biomarkers and molecule targets for disease diagnosis and drug development. Here we reviewed some common types of modifications of proteins and methods in PTM research.

Key words proteomics; post-translational modification; genomics; molecular identification

蛋白质是执行细胞功能的基本功能单元, 其表达受基因组、表观遗传学和翻译后修饰多个层次的调控。基因组学的主要任务是研究生物基因组的组成以及组内各基因的精确结构、相互关系与表达调控; 表观基因组^[1]则指示了每种细胞类型及其基因

组中的独特基因表达程序。以上两种学科的研究都只是停留在基因的层面, 然而蛋白质作为生命活动的直接执行者, 还需要经过不同程度的加工和修饰才能发挥功能。最新的研究表明, 真核细胞中存在着各种各样的蛋白质修饰方式, 调控着细胞的各种

收稿日期: 2013-10-13 接受日期: 2014-03-26

国家自然科学基金(批准号: 81071369、30928031、81272276)和国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2010CB933902)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-84772368, E-mail: yanzhen@fmmu.edu.cn; jyang@bu.edu.cn

Received: October 13, 2013 Accepted: March 26, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81071369, 30928031, 81272276) and the National Key Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2010CB933902)

*Corresponding authors. Tel: +86-29-84772368, E-mail: yanzhen@fmmu.edu.cn; jyang@bu.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-02 10:25 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0299.html>

生理以及病理过程, 因此对经过翻译后修饰的蛋白质和蛋白质组需要更为深入的研究。本文对常见的蛋白质翻译后修饰、多种修饰的功能协同作用对生理和病理的影响以及蛋白翻译后修饰的常用研究方法进行了综述。

1 蛋白质翻译后修饰概述

早在HGP实施期间的1995年, 蛋白质组(proteome)一词就由澳大利亚学者Williams和Wilkins^[2]提出, 该词源于蛋白质(protein)与基因组(genome)两个词的组合, 意指“proteins expressed by a genome”, 即“一个细胞或一个组织基因组所表达的全部蛋白质”。其对应于基因组的所有蛋白质构成的整体, 将研究从个别蛋白质扩展到从整体水平研究蛋白质。然而, 对于蛋白质组的功能实现却远比想象中的复杂。研究发现, 蛋白质组处于一个新陈代谢的动态变化过程中, 蛋白质的合成在不同时空下受到不同因素的调控, 同一种细胞的生长与活动, 因不同时期、不同条件其蛋白质组也在不断变化过程中, 病理或疾病治疗过程中的细胞蛋白质组及其变化也与正常生理过程不同^[3]。即虽然高等生物体内所有细胞仅拥有一个相同的基因组, 但不同分化的组织细胞却拥有不同的蛋白质组。

其中, 蛋白质翻译后修饰作为蛋白质功能调节

的一种重要方式, 对蛋白质的结构和功能至关重要, 也是蛋白质组复杂性的主要原因之一。据估计, 人体内50%~90%的蛋白质发生了翻译后修饰, 有的是肽链骨架的剪接, 有的是在特定氨基酸侧链上添加新的基团, 还有的是对已有基团进行化学修饰^[4]。生物体通过种类繁多的修饰方式直接调控蛋白质的活性, 也大大扩展了蛋白质的化学结构和功能, 显著增加了蛋白质的多样性和复杂性, 使可编码的蛋白质种类大大超过了20种天然氨基酸的组合限制。因此, 经典的一个基因一个蛋白的对应关系早已经被打破, 据估计人类基因组可编码蛋白质的2万个基因, 可表达超过20万个功能蛋白质。目前已经确定的翻译后修饰方式超过400种, 常见修饰过程有磷酸化、泛素化、甲基化、乙酰化、糖基化、SUMO化、亚硝基化、氧化等等, 表1列出了Swiss-Prot Knowledgebase更新至2014年6月所收集的以实验方法发现的蛋白质翻译后修饰的种类和频率。然而, 我们已掌握的蛋白修饰过程还非常有限, 至少70%还不为人知, 包括未知的修饰种类、未知的修饰蛋白质、未知的蛋白修饰位点等。蛋白质修饰分为可逆和不可逆两种方式, 不可逆的如O位的羧基端甲基化, 而磷酸化、N-位甲基化、N-乙酰化修饰均属于可逆的修饰, 会随着细胞的生理状态和外界环境变化而改变, 从而起到细胞内外信号传递、酶原激活的作用,

表1 蛋白质翻译后修饰频率(<http://selene.princeton.edu/PTMCuration/>)

Table 1 Frequency of post-translational modification of proteins (<http://selene.princeton.edu/PTMCuration/>)

频率 Frequency	修饰类型 Modification	频率 Frequency	修饰类型 Modification
39 818	Phosphorylation	156	ADP-ribosylation
9 119	Acetylation	140	Citrullination
5 976	N-linked glycosylation	82	Farnesylation
3 181	Amidation	81	S-nitrosylation
1 774	Methylation	63	Deamidation
1 698	Hydroxylation	62	Geranyl- geranylation
1 338	O-linked glycosylation	57	Formylation
1 136	Ubiquitylation	52	Nitration
921	Pyrrolidone Carboxylic Acid	39	GPI anchoring
595	Sulfation	33	Bromination
503	Sumoylation	29	S-diacylglycerol cysteine
413	Gamma-Carboxyglutamic Acid	21	FAD
348	Palmitoylation	9 571	Others
184	Myristoylation	67 975	Total characterized
156	C-linked glycosylation	77 546	Total processed

因此可以作为蛋白质构象和活性改变的调控开关, 一旦发生异常的修饰常常导致疾病的发生。正因如此, 对蛋白质序列及其多样化的修饰尚待更为深入的探究, 以阐明蛋白质多样化的动态修饰对蛋白质功能和细胞功能的影响及其分子机制。

2 常见的蛋白质翻译后修饰

2.1 磷酸化

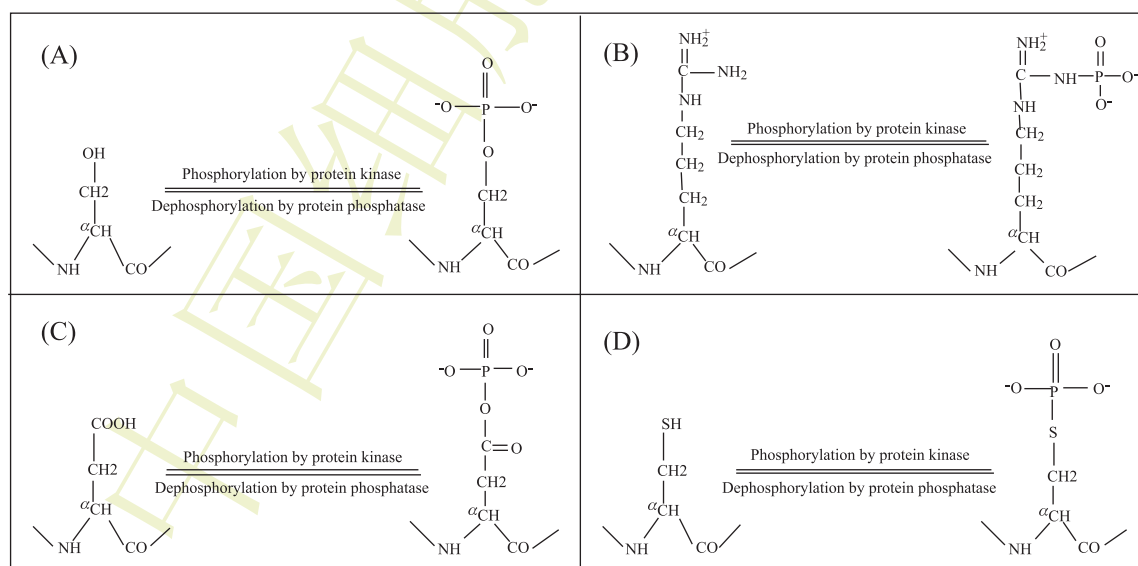
作为研究最广泛以及体内最为常见的蛋白质翻译后修饰——蛋白质磷酸化修饰, 在蛋白激酶的作用下, 将一个ATP或GTP上 γ 位的磷酸基转移到底物蛋白质的氨基酸残基上, 影响了人类细胞中超过1/3的蛋白质的功能。磷酸化发生的位点通常是Ser、Thr、Tyr侧链的羟基或是His、Arg、Lys侧链的氨基, 少数发生在Asp和Gln的侧链羧基或Cys的侧链巯基, 因此, 可将磷酸化蛋白质分为O-磷酸化、N-磷酸化、酰基磷酸化和S-磷酸化四类(图1)^[5]。研究发现, His位点发生磷酸化修饰的频率高于Tyr^[6]。近年来, 随着磷酸化肽段富集手段和高精度生物质谱发展, 蛋白质磷酸化修饰位点的鉴定从数量和精度上得到了长足发展, 然而如何将这些磷酸化蛋白质与催化其磷酸化的蛋白质激酶——对应成为了近年来该领域的热点和难点问题。Tian等^[7]在一项研究中首次从蛋白质组学层面对嗜热四膜虫的蛋白质

磷酸化修饰进行分析, 该研究以具有1 069个蛋白质激酶(人类仅为518个)的单细胞真核模式生物——嗜热四膜虫为研究对象, 利用TiO₂对磷酸化肽段进行了富集, 并利用2D(SCX/RP)-nanoLC-MS/MS技术鉴定得到了1 008个蛋白质的2 238个磷酸化修饰位点。

磷酸化修饰几乎发生在生命活动的各个过程, 如细胞膜上的Na⁺-K⁺-ATP酶泵的磷酸化控制钠离子和钾离子的胞内浓度; Src家族Tyr激酶的磷酸化是它激活的“开关”, 将使其构象改变从而能识别下游蛋白^[8]; 在细胞周期调控中, CDKs(cyclin-dependent protein kinases)这一类Ser/Thr激酶是否能激活Cyclins并形成复合物, 决定了细胞周期是否阻滞^[7]。磷酸化也是细胞呼吸过程的重要参与者, 线粒体中氧化磷酸化的过程需要NADPH氧化酶的磷酸化调控, 电子传递链中蛋白分子之间的相互作用由磷酸化调控^[8]。此外, 蛋白质降解也需要依赖于ATP参与的磷酸化修饰。

2.2 糖基化

在生物体内, 糖类一般并不单独存在, 而是连接在蛋白质或脂类分子上分别构成糖蛋白和糖脂, 其中以己糖最为多见, 包括葡萄糖半乳糖和甘露糖以及它们的一些简单修饰形式, 如葡萄糖的 α -羟基被酰化氨基取代生成N-乙酰葡萄糖胺。根据蛋白质



A: O-磷酸化; B: N-磷酸化; C: 酰基磷酸化; D: S-磷酸化。

A: O-phosphorylation; B: N-phosphorylation; C: acetyl-phosphorylation; D: S-phosphorylation.

图1 磷酸化反应过程示意图

Fig.1 Schematic diagram of phosphorylation

被糖类修饰形式的不同把蛋白质糖基化分成N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化和糖基磷脂酰肌醇锚定连接四类^[9]。最近几年,对糖基转移酶的研究大幅度增加,主要针对这些酶的三维空间结构与反应机制,在对N-糖基化、O-糖基化的研究中发现,在受体激活过程中存在一些不常见的折叠方式与化学机制^[10]。另外,来自上海交通大学系统生物医学研究院的研究人员首次提出了内质网中可能存在新的蛋白质O-乙酰半乳糖胺(GalNAc)糖基化调控机制,挑战了教科书上关于蛋白质的O-GalNAc糖基化过程只发生在高尔基体中这一传统观念^[11]。N-糖基化是最为常见的糖基化修饰,该修饰是由多糖与蛋白质的Asn残基的酰氨基连接形成,糖链为N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc),发生在特定的氨基酸模序Asn-X-Ser/Thr或Asn-X-Cys上。根据单糖的位置,N-糖基化修饰可以进一步划分为复杂型多糖(图2A)、混合型多糖(图2B)和高甘露糖型多糖(图2C),研究表明,三种类型的糖链具有共同的生物合成起源,即高甘露糖聚合物前体^[12]。

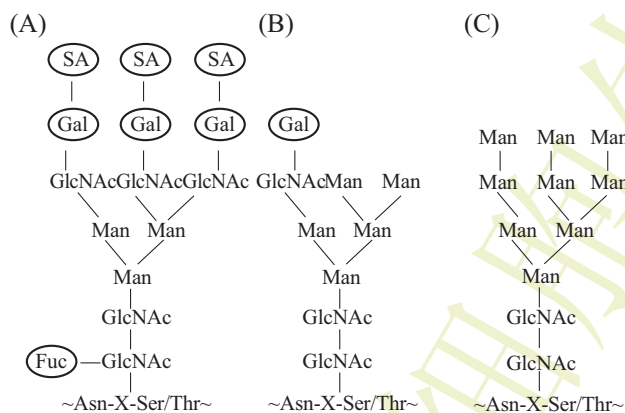


图2 三种不同N-糖基化修饰类型的结构示意图
(根据参考文献[12]改编)

Fig.2 Schematic diagram of three different N-glycosylation type (modified from reference [12])

糖基化是真核生物蛋白质功能调节的基本环节,异常糖基化往往伴随着生理病理过程的异常。有研究发现,N-GlcNAc可以通过Ser或Thr残基,以单糖分子连接到蛋白质上,生成O-GlcNAc。该种修饰可发生在许多与癌变相关的蛋白分子上,如 β 2连环蛋白、p53、pRb家族等。O-GlcNAc化也与糖尿病^[13]、神经退变性疾病^[14]等疾病有关。因此,O-GlcNAc可以作为临床上这些疾病诊断的分子标志物。目前,已经有超过600种蛋白质被鉴定发生了O-GlcNAc化,但

其中只有低于15%的修饰位点得到了鉴定,大多数来自于脑和脊髓组织。O-GlcNAc修饰的重要性及与磷酸化修饰之间的联系,正在成为继磷酸化修饰之后的又一个蛋白质翻译后修饰研究热点^[15]。

2.3 泛素化

泛素是一种含76个氨基酸的多肽,存在于除细菌外的许多不同组织和器官中,具有标记待降解蛋白质的功能。被泛素标记的蛋白质在蛋白酶体中被降解。由泛素控制的蛋白质降解具有重要的生理意义,它不仅能够清除错误的蛋白质,还对细胞周期调控、DNA修复、细胞生长和免疫功能等都有重要的调控作用。

泛素蛋白C末端的Gly通常都经由异肽键与底物蛋白的氨基连接在一起,最常见的连接是与底物蛋白Lys的 ϵ 氨基相连以及与底物蛋白的N末端相连。最近还发现,可以与Cys、Ser和Thr相连^[16]。泛素控制蛋白质水解的整个过程是通过泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)进行的^[17],介导了真核生物体内80%~85%的蛋白质降解。去泛素化酶(deubiquitin, DUB)可以将靶蛋白上的泛素蛋白水解下来。由于DUB酶的存在,泛素化作用只能是暂时的。这种动态修饰过程构成了一个可逆的“开关”,来控制底物蛋白的不同功能状态,调控细胞内的多种生理活动^[18](图3)。

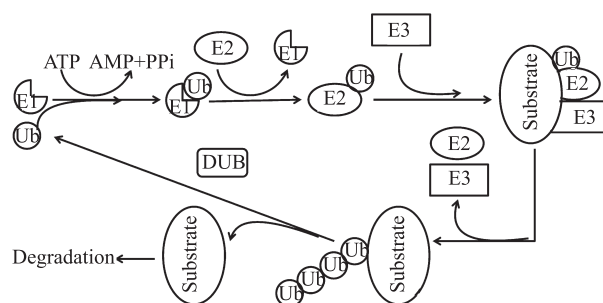


图3 蛋白质的泛素化修饰过程示意图

Fig.3 Schematic diagram of protein ubiquitination process

内质网相关的降解过程能清除错误折叠蛋白的分泌途径,同时介导一些内质网残留蛋白的调控降解过程。研究发现,一种蛋白与一种泛素连接酶之间相互作用的细微增加,都能引发信号底物的降解,一项最新的研究解析了其中的作用机制,指出去泛素化可以作为一种信号放大器,放大信号,从而进行下游调控^[19]。

泛素化修饰途径在人体免疫调节过程中发挥着重要的作用, 其不仅能够通过降解免疫调控蛋白的方式来抑制免疫反应, 也能通过多泛素化修饰作用激活NF- κ B和IRF途径中的激酶来启动一些免疫反应。随着能确定蛋白类型及其修饰状况的质谱检测等高灵敏度检测技术的进步, 我们能够更容易地发现泛素化途径的底物, 并且近年来发现了多种UBD蛋白, 因此我们更容易地弄清楚泛素化修饰途径在机体免疫调控中发挥的真正作用, 这将有助于我们对免疫性疾病的诊疗技术研究^[20]。

细胞内很多受泛素途径修饰的蛋白质都参与控制细胞内肿瘤发生相关生理或病理进程, 比如细胞周期调控、凋亡、受体下调以及基因转录等多种重要的细胞进程, 所以一旦泛素修饰系统出了问题就很有可能引起人体各种肿瘤的发生。因此, UBL系统也是治疗肿瘤的靶点之一, 有望开发出更多有效的抗癌疗法和药物^[21]。

2.4 SUMO化

随着泛素化的研究, 科学家们相继发现了一些类泛素蛋白, 其中小泛素相关修饰物(small ubiquitin-related modifier, SUMO)是最受瞩目的一类。SUMO化与泛素化修饰过程相似, 也是一个多酶参与的酶联反应, 但两个途径参与的酶则完全不同。首先, SUMO化修饰比泛素化修饰多一步成熟化的过程, 即SUMO前体在SUMO蛋白酶(如Ulp1)的作用下, C-端的4个(或多个)氨基酸残基被切除, 生成成熟的SUMO并露出C-端2个Gly残基。接着, 在SUMO化活化酶E1、结合酶E2和连接酶E3的作用下完成SUMO化修饰过程, 并且这个过程是可逆的, 称为去SUMO化^[22-23](图4)。

2012年, 来自德国马普生物化学研究院的研究人员以DNA双链断裂修复作为例, 解析了类泛素蛋白SUMO的作用新机制, 指出蛋白之间的SUMO化修饰稳定相互作用是由DNA结合SUMO连接酶催化, 并由单链DNA开启的, 而且只有整体清除几种修复蛋白的SUMO化修饰, 才会通过大量减慢DNA修复, 影响同源重组途径。因此, 研究人员认为SUMO能协同作用于几种蛋白, 单个修饰叠加促进有效修复, 这也就是说, SUMO化修饰过程也许常常能靶向一组蛋白, 而不是单个蛋白, 局部修饰酶和高度特异性启动则能确保特异性^[24]。

SUMO化修饰不介导蛋白质的降解, 但依然对许多生理过程产生重要作用。例如, 通过调节蛋白质之间的相互作用、影响靶蛋白在细胞内的分布、阻碍泛素蛋白对靶蛋白的共价修饰、提高靶蛋白的稳定性等。此外, SUMO还借助各种方式参与DNA复制和修复以及转录调控过程^[25]。

Akt基因是一种原癌基因, 其表达产物蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)具有Ser/Thr激酶活性, 作为磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)信号转导通路下游的信息分子, 已在许多常见肿瘤的研究中发现其过量表达, 而研究人员已证实, SUMO化修饰是一种新型的Akt激活机制, 因此, Akt的SUMO化可能为肿瘤的治疗提供新的靶点^[23]。

2.5 乙酰化

蛋白质的乙酰化修饰影响着细胞生理的各个方面, 主要集中在对染色体结构的影响以及对核内转录调控因子的激活方面, 参与了包括转录调控、信号通路调控、蛋白质稳定性调控、细胞代谢和病原微生物感染调控等多个生理病理过程而被广泛

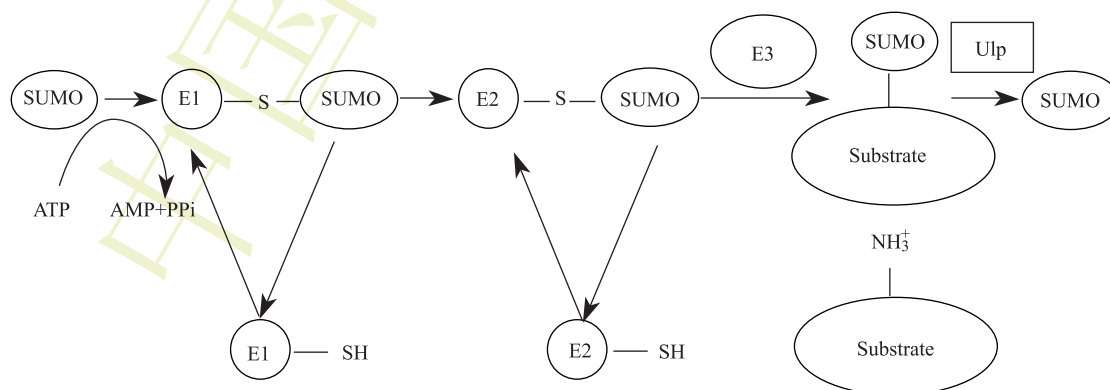


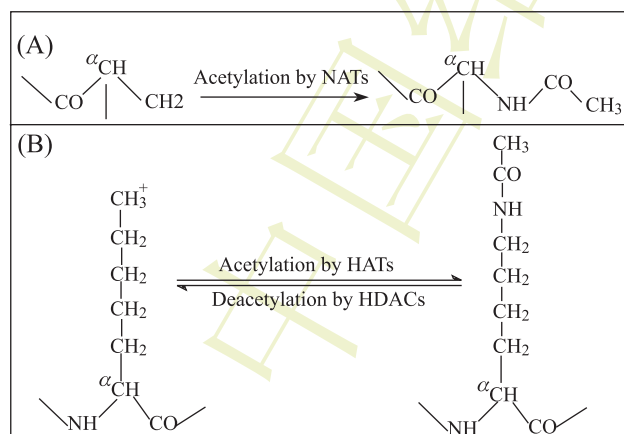
图4 蛋白质的SUMO化修饰过程示意图

Fig.4 Schematic diagram of protein SUMOylation process

关注。2012年, 清华大学生命学院俞立教授课题组在*Science*杂志发表文章, 揭示了蛋白质乙酰化修饰对细胞自噬调控的分子机制, 指出组蛋白乙酰化酶Esa1以及去乙酰化酶Rpd3通过调节自噬发生关键蛋白Atg3的乙酰化水平, 从而实现对自噬过程的动态调控^[26]。

目前文献报道的乙酰化修饰主要有三大类: N-端 α 氨基乙酰化修饰(图5A)、Lys的位氨基乙酰化(图5B)和Ser/Thr的乙酰化修饰。2006年, Mukherjee等^[27]通过研究鼠疫耶尔森菌分泌的毒力因子Yop J对细胞MAPK通路和NF κ B信号通路的阻断作用发现了乙酰化修饰可以发生在磷酸化修饰的Ser位点上, 从而竞争磷酸化修饰来干扰宿主细胞信号转导通路。此类非氨基乙酰化修饰很有可能是一种未被发现的存在于真核生物细胞自身的一种新的修饰类型, 为乙酰化修饰在生理调控领域开拓了新的空间。

科学界早期一般认为, 乙酰化修饰功能主要集中在对细胞染色体结构的影响以及对核内转录调控因子的激活方面。但是, 复旦大学的科研人员通过通量化的蛋白质组研究和不同物种的代谢通路研究发现, 在生理状况下, 存在着大量非细胞核的蛋白被乙酰化修饰。中国科学院上海生命科学院赵国屏院士和复旦大学赵世民领导的科研团队发现, 在沙门氏菌(*Salmonella*)中, 作为对不同碳源的响应, 中心代谢酶被广泛而有差异地可逆乙酰化, 并伴随着细胞生长和代谢流的变化, 可逆代谢酶乙酰化确保细胞可以通过即时感应细胞能量状态和灵活地改变反应速率或方向来响应环境变化^[28-29]。



A: N-端 α 氨基乙酰化; B: 赖氨酸 ϵ 氨基乙酰化。

A: N $^{\epsilon}$ -terminal acetylation; B: ϵ -amino group of lysine acetylation.

图5 乙酰化反应过程示意图

Fig.5 Schematic diagram of acetylation

2.6 甲基化

甲基化是指从活性甲基化合物(如S-腺苷基甲硫氨酸)上将甲基催化转移到其他化合物的过程, 底物包括核酸、蛋白、激素和脂类。1964年, Allfrey等^[28]首次报道了Arg甲基化, 在随后的研究中人们发现其在信号转导、转录活化、蛋白质分拣等生命过程中发挥着重要作用。

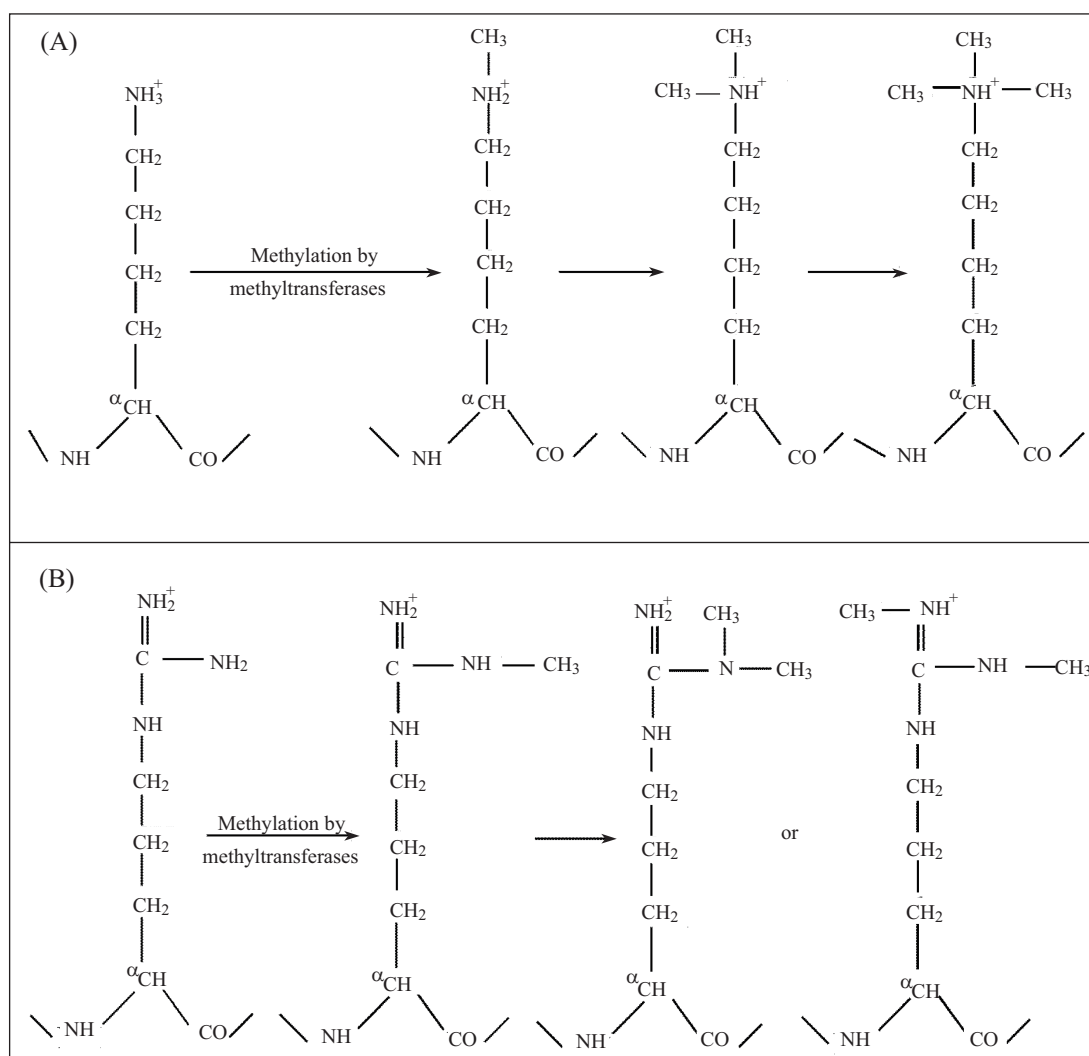
蛋白质甲基化修饰是在蛋白质甲基转移酶的作用下, 将甲基转移至特定的氨基酸残基。常见的甲基化发生在Lys(图6A)和Arg(图6B)上, 分为组蛋白Lys/Arg甲基化^[29]和非组蛋白Lys/Arg甲基化^[30], 分别由相应的蛋白质Lys甲基化酶和Arg甲基化酶介导反应。甲基化是一种可逆的修饰过程, 去甲基化酶主要有Lys特异性去甲基化酶和包含Jumonji结构域的蛋白质去甲基化酶家族。

蛋白质的甲基化修饰增加了立体阻力, 并且取代了氨基酸残基上的氢, 影响了氢键的形成。蛋白质发生甲基化后, 变换了肽链原来的结构顺序, 可以编码出更多的信息, 从而调控信号分子间和信号分子与目标蛋白之间的相互作用, 进而参与多种生命调控过程, 如转录调控、RNA加工和运输、蛋白翻译、信号转导、DNA修复、蛋白质相互作用、细胞发育与分化等, 并与一些疾病(如肿瘤^[31]、心血管疾病)的发生发展密切相关。

3 蛋白质修饰的协同与动态调控网络

在生物体内, 各种蛋白质的修饰种类繁多, 并且存在“时空特异性”, 即蛋白质修饰类型和程度随着生物发育过程、生存环境与内在状态的变化而不断发生变化, 使蛋白质的修饰成为一个动态变化的过程, 而且往往各种修饰不是孤立存在的, 同一生理或病理过程的发生, 需要各种修饰的蛋白质共同作用, 同一个蛋白质又可以同时拥有一种以上的蛋白质修饰过程, 彼此之间相互影响、相互协调。

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)^[32]是一种以记忆力损害和认知障碍为主的中枢神经系统退行性疾病, 在AD中扮演重要角色的淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)可以被SUMO1和SUMO2修饰, 该修饰可以降低 β -淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)的积聚。推测AD患者中可能存在APP代谢过程中的SUMO化失调^[33-34], 但失调的SUMO是否是AD的潜在危险因素以及能



A: Lys甲基化; B: Arg甲基化。

A: lysine methylation; B: arginine methylation.

图6 甲基化反应过程示意图

Fig.6 Schematic Diagram of Methylation

否成为治疗AD的靶蛋白,尚需要更多的临床研究。另外,在AD的发病机制中存在另一个重要的蛋白质——tau蛋白。tau蛋白是一种微管结合蛋白,也是泛素E3连接酶的底物,可经UPS途径降解。已知tau蛋白上有多个磷酸化位点,其中有21个Ser/Thr位点可能发生过度磷酸化。正常的tau蛋白每分子只含有2~3个磷酸化基团,而AD患者的tau蛋白每分子会含有5~9个磷酸基团,使其构型发生改变,不能与微管结合而形成不溶性沉积^[35]。Dorval等^[36]发现,tau蛋白也为SUMO的底物蛋白,通过Lys340与SUMO1共价结合参与SUMO化过程,和泛素化处于一种动态平衡状态,推测SUMO化直接拮抗泛素或者通过阻止泛素与蛋白酶体的

结合而产生抑制tau蛋白降解的作用。另外,tau蛋白SUMO化位点Lys340恰好位于其微管结合位点的第4个重复序列上,应用磷酸酶抑制剂增加tau蛋白的磷酸化,能刺激tau蛋白SUMO化,提示tau蛋白SUMO化可能与其磷酸化有关。还有研究表明,AD患者的脑组织中tau蛋白也有过度糖基化的发生,其异常修饰的顺序有可能是先糖基化,再磷酸化,最后泛素化^[37],构成了一个复杂调控网络。

近年来发现,蛋白质巯基亚硝基化(S-nitrosylation, SNO)与AD也有着密切的关系。研究发现,发动蛋白相关蛋白1(dynamin-related protein 1, Drp1)^[38-39]、载脂蛋白E(apolipoproteinE, ApoE)^[40]、细胞周期依赖蛋白激酶(cyclin-dependent kinase,

Cdk)^[41]、10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)^[42]、热休克蛋白90(heat shock protein90, Hsp90)^[43]等多种蛋白质巯基亚硝基化与AD的病理机制存在诸多广泛的联系。

组蛋白是另一个研究较多的常见的多修饰蛋白质。四种常见组蛋白(H2A、H2B、H3和H4)的游离氨基端具有多个修饰位点,包括乙酰化/去乙酰化、甲基化/去甲基化、泛素化/去泛素化^[44]、磷酸化^[45]以及SUMO化、生物素化等,其最基本的作用是调控基因表达,例如组蛋白甲基化多导致基因沉默,去甲基化则相反;乙酰化一般使转录激活,去乙酰化则相反。这些修饰方式及其作用的发挥并不是相互独立的,很多时候它们通过协同或拮抗来共同发挥作用,形成多亚基复合物,与核小体重修复合物(NuRcs,如Swi/Snf、RSC、NURF)相互作用,重修复合染色质^[46]。有证据表明,这些重修复合物通过组蛋白尾部由这些复合物所调节的启动子处不同乙酰化方式的因子募集和识别而联合起作用。另外,修饰的发生受细胞生理状态的影响,如DNA复制或转录时常会发生组蛋白的去甲基化与乙酰化,激活基因的表达。

可见,单纯的单一蛋白质、单一修饰的研究难以阐明生理病理机制,只有运用组学的方法,对生理病理状态下的蛋白质修饰动态网络进行研究,才有可能找到问题的答案。

4 蛋白质翻译后修饰常用的研究方法

蛋白质翻译后修饰的常用方法,包括蛋白质分离技术、以生物质谱(mass spectrum, MS)为代表的鉴定技术、蛋白质相互作用分析技术以及生物信息学技术等,用于对蛋白质的高级结构、修饰、定位、活性、相互作用以及功能的研究。

4.1 蛋白质的分离技术

双向凝胶电泳技术(two dimensional gel electrophoresis, 2D-PAGE)是常用的蛋白质分离技术,由O'Farrell于1975年创立,用于分离细胞或组织蛋白质粗提物、构建特定组织或细胞的蛋白质“二维参考图谱”,分析特定条件下病理与生理蛋白质的表达差异。2D-PAGE结合MS分析可以实现较大规模的蛋白质分离和鉴定,特别适用于修饰后蛋白质(如糖基化、磷酸化、脱氨等)的发现和

鉴别。然而该技术也存在很多不足,如对极酸或极碱性蛋白质、疏水性蛋白质、极大或极小蛋白质以及低丰度蛋白质难以有效分离,胶内酶解过程费时、费力,难以与质谱联用实现自动化等^[47]。

双向荧光差异凝胶电泳(two dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)是同时分离多个由不同荧光标记的样品,并以荧光标记的样品混合物为内标,对每个蛋白质点和每个差异都进行统计学分析的蛋白质组学凝胶定量代表性技术。这一技术具有以下优点:(1)精确,可以检测到<10%的样品间差异,可信度>95%;(2)标准化,内标最大程度地降低偏差,得出精确的实验结论;(3)高重复性,极佳的定量重复性和准确的量化蛋白表达数据;(4)高效,多个样品在同一块胶上同时分离,减少实验时间;(5)简化,易于使用,可以完全整合到蛋白质组工作流程中^[48]。

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC),基于样品分子在固定相和流动相之间的特殊相互作用而实现样品分离,无须变性处理样品,可实现上样、收集、与质谱联用(LC/MS)、在线分析的自动化。与双向电泳相比,具有快速、分辨率高的优点^[49]。

4.2 蛋白质的鉴定技术

生物质谱技术是蛋白质鉴定的主要技术,通过测定样品的质荷比(m/z)进行高分子物质成分和结构的精确分析,基于电离方法的不同,可分为基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix assisted-laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)与电喷雾-串联质谱(ESI-MS/MS)^[50-52]。ESI-MS使分析物从溶液相中电离,适合与液相分离手段(如液相色谱和毛细管电泳)联用分析复杂样品。而MALDI是在激光脉冲的激发下,使样品从基质晶体中挥发并离子化,适于分析简单的肽混合物。液质联用(LC/MS)、串联质谱(MS/MS)的应用,不仅可获得蛋白质的肽谱图,更可获得蛋白质氨基酸序列信息和精确的修饰信息。

EThtD(electron-transfer and higher-energy collision dissociation)是2012年Christian等^[53]提出的在串联质谱法中使用的一种新的碎片化方案。通过组合电子转移解离(ETD)和更高的能量碰撞解离(HCD)生成双碎片离子系列,并促进广泛的肽骨架碎片。在电子转移解离步骤之后,所有的离子,包括未反

应的前体离子, 进行碰撞在单一的频谱诱导解离产生b/y-和c/z-型碎片离子。相较于一般的破碎方法, EThcD方案提供了更丰富的MS/MS谱图, 大大增加了肽序列覆盖面, 可以进行确切的肽测序和PTM定位^[54]。

蛋白质基因组学(proteo-genomics)是一种全新的分析方法, 最早由哈佛大学Jaffe等^[55]于2004年提出, 是蛋白质组学与基因组学的新兴交叉, 指运用蛋白质组技术注释基因组, 以弥补以往依赖DNA及RNA序列信息注释基因组的不足。除此之外, 蛋白质基因组学技术还可以进行蛋白质翻译后修饰的研究, 这主要归功于串联质谱技术已经发展成熟, 实现了对蛋白质组的高覆盖, 使得利用串联质谱数据进行基因组注释成为可能, Gupta等^[56]因此成功绘制出了*S. oneidensis* MR-1的蛋白质翻译后修饰全图谱, 包括对蛋白质的化学修饰、信号肽的切割以及N末端甲硫氨酸的切割等, 这项技术的应用将给蛋白质翻译后修饰的研究提供更直观、更全面的信息。

4.3 蛋白质相互作用分析技术

目前, 已建立了包括酵母双杂交系统、免疫共沉淀(Co-IP)、串联亲和纯化(TAP)技术、表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)、荧光共振能量转移(FRET)、GST-Pull-down实验以及蛋白质芯片等多种研究方法, 这些方法各有所长, 为蛋白质相互作用的研究提供了有效的分析方法, 也为蛋白质组学研究奠定了坚实的基础^[57]。表面等离子共振技术(SPR)是目前蛋白质相互作用研究中的新手段, 其利用一种纳米级的薄膜吸附上诱饵蛋白, 当待测蛋白与诱饵蛋白结合后, 薄膜的共振性质会发生改变, 通过检测便可知这两种蛋白的结合情况。SPR技术的优点是不需标记物或染料, 反应过程可

实时监控, 测定快速且安全, 还可用于检测蛋白-核酸及其他生物大分子之间的相互作用^[58]。

4.4 生物信息学技术

生物信息学是在生命科学、计算机科学和数学的基础上逐步发展而形成的一门新兴交叉学科, 是以理解各种数据的生物学意义为目的, 运用数学与计算机科学手段进行生物信息的收集、加工、存储、传播、分析与解析的科学。生物信息学虽然以基因组信息学为核心, 但其在蛋白质组学研究中的作用日显突出。通过二维凝胶电泳、生物质谱、蛋白质微阵列等方法所获得的大量数据最终都必须依赖生物信息学的方法和手段才能实现对蛋白质的种类、数量、结构和功能的最后确定, 被称为蛋白质组研究的百科全书。常用的数据库有: Swiss-Prot^[59]、GenBank、PhosphoELM^[60]、Phosphosite^[61]、O-glycbase等^[62](表2), 修饰相关数据库多集中在磷酸化和糖基化, 其中SwissProt是高质量的非冗余蛋白数据库, 同时也有多种翻译后修饰的注释信息, 而PhosphoELM和Phosphosite详细收录了实验验证的磷酸化数据。

5 结论与展望

2007年, Dai和Rasmussen^[63]在干细胞分化研究中首次应用“表观蛋白质组(epi-proteome)”一词来特指组蛋白的CpG甲基化修饰及其形成的特殊图谱, 认为是干细胞分化中基因表达调控的关键。事实上, 除了组蛋白之外, 细胞中绝大多数蛋白质在表达以后都需要经过不同程度的修饰才能发挥相应的功能。这种翻译后修饰过程受到严格的调控, 使得在某一瞬间细胞中蛋白质表现出某种稳定或动态的特定功能。因此我们认为, 这种经过了特定修饰的与

表2 蛋白质翻译后修饰相关数据库
Table 2 Protein post-translational modification databases

数据库 Databases	网址 Websites	功能 Functions
SwissProt	http://www.ebi.ac.uk/swissprot/	Information on post-translational modification of proteins
PhosphoELM	http://phospho.elm.eu.org/	A database of S/T/Y phosphorylation sites
Phosphosite	http://www.phosphosite.org/homeAction.do	A database of phosphorylation sites
PROSITE	http://prosite.expasy.org/	Information on post-translational modification of proteins
HPRD	http://www.hprd.org/	Integrated database
RESID	http://www.biomedsearch.com/sci/RESID-database/0032931901.html	Information on post-translational modification of proteins
O-GlycBase	http://www.cbs.dtu.dk/databases/OGLYCBASE/	A database of O-glycosylation
dbPTM	http://dbptm.mbc.nctu.edu.tw/	Information on post-translational modification of proteins

时间和空间相关联的蛋白质组,已超越了组蛋白的单一甲基化修饰,可以称之为表观蛋白质组。基于这个概念之上的研究很可能形成一个新的组学概念和领域——表观蛋白质组学(epi-proteomics),它可以更客观地反映细胞的各种生理以及病理过程。最新的研究表明,真核细胞中存在的蛋白质修饰过程的大约70%目前还无法解释。可以预见,对经过翻译修饰后的而非“裸”蛋白质及蛋白质组的调控过程进行深入研究将更加关键,能够更深层地揭示蛋白质的多样性和活性状态以及发挥作用的方式和机理,并最终为重大疾病的诊断和治疗奠定基础。

参考文献 (References)

- Rivera CM, Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell* 2013; 155(1): 39-55.
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, *et al.* From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996; 14(1): 61-5.
- Zhao Y, Jensen ON. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 2009; 9(20): 4632-41.
- Doyle HA, Mamula MJ. Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol* 2001; 22(8): 443-9.
- Rao RS, Moller IM. Large-scale analysis of phosphorylation site occupancy in eukaryotic proteins. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824(3): 405-12.
- Ciesla J, Fraczyk T, Rode W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: Important but easily missed. *Acta Biochim Pol* 2011; 58(2): 137-48.
- Tian M, Chen X, Xiong Q, Xiong J, Xiao C, Ge F, *et al.* Phosphoproteomic analysis of protein phosphorylation networks in *Tetrahymena thermophila*, a model single-celled organism. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13(2): 503-19.
- Cole PA, Shen K, Qiao Y, Wang D. Protein tyrosine kinases Src and Csk: A tail's tale. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7(5): 580-5.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004; 4(6): 1633-49.
- Hurtado-Guerrero R, Davies GJ. Recent structural and mechanistic insights into post-translational enzymatic glycosylation. *Curr Opin Chem Biol* 2012; 16(5/6): 479-87.
- Li X, Wang J, Li W, Xu Y, Shao D, Xie Y, *et al.* Characterization of ppGalNAc-T18, a member of the vertebrate-specific Y subfamily of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 2012; 22(5): 602-15.
- Balzarini J. Targeting the glycans of glycoproteins: A novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(8): 583-597.
- Wang Z, Park K, Comer F, Hsieh-Wilson LC, Saudek CD, Hart GW. Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker(s) for diabetes. *Diabetes* 2009; 58(2): 309-17.
- Markkova E, Albahri Z, Valis M. Microheterogeneity of some serum glycoproteins in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 2012; 314(1/2): 20-5.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 825-58.
- Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(9): 679-90.
- Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology* 2006; 66(2 Suppl 1): S7-19.
- Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(9): 679-90.
- Brodsky JL. Just a trim, please: Refining ER degradation through deubiquitination. *Cell* 2013; 154(3): 479-81.
- Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009; 458(7237): 430-7.
- Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 2009; 458(7237): 438-44.
- Wimmer P, Schreiner S, Dobner T. Human pathogens and the host cell SUMOylation system. *J Virol* 2012; 86(2): 642-54.
- Dohmen RJ. SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695(1/2/3): 113-31.
- Psakhye I, Jentsch S. Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* 2012; 151(4): 807-20.
- Zhao J. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(23): 3017-33.
- Yi C, Ma M, Ran L, Zheng J, Tong J, Zhu J, *et al.* Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science* 2012; 336(6080): 474-7.
- Mukherjee S, Hao YH, Orth K. A newly discovered post-translational modification—the acetylation of serine and threonine residues. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(5): 210-6.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 51: 786-94.
- Greer EL, Shi Y. Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 2012; 13(5): 343-57.
- Xu Y, Ding J, Huang Q, Deng NY. Prediction of protein methylation sites using conditional random field. *Protein Pept Lett* 2013; 20(1): 71-7.
- He Y, Korboukh I, Jin J, Huang J. Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2012; 44(1): 70-9.
- Bi X. Alzheimer disease: Update on basic mechanisms. *J Am Osteopath Assoc* 2010; 110(9 Suppl 8): S3-9.
- Li Y, Wang H, Wang S, Quon D, Liu YW, Cordell B. Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(1): 259-64.
- Neve RL. A new wrestler in the battle between alpha- and beta-secretases for cleavage of APP. *Trends Neurosci* 2003; 26(9): 479-81.

- 461-3.
- 35 Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(12): 6923-8.
- 36 Dorval V, Fraser PE. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2006; 281(15): 9919-24.
- 37 Mayeux R, Lee JH, Romas SN, Mayo D, Santana V, Williamson J, *et al.* Chromosome-12 mapping of late-onset Alzheimer disease among Caribbean Hispanics. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 237-43.
- 38 Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, *et al.* S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 2009; 324(5923): 102-5.
- 39 Padayachee E, Ngqwala N, Whiteley CG. Association of beta-amyloid peptide fragments with neuronal nitric oxide synthase: Implications in the etiology of Alzheimers disease. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2012; 27(3): 356-64.
- 40 Abrams AJ, Farooq A, Wang G. S-nitrosylation of ApoE in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 2011; 50(17): 3405-7.
- 41 Qu J, Nakamura T, Cao G, Holland EA, Mckercher SR, Lipton SA. S-Nitrosylation activates Cdk5 and contributes to synaptic spine loss induced by beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(34): 14330-5.
- 42 Kwak YD, Ma T, Diao S, Zhang X, Chen Y, Hsu J, *et al.* NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 2010; 5: 49.
- 43 Martinez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez DOC, Lopez-Ferrer D, Higuera MA, Tarin C, *et al.* S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(24): 8525-30.
- 44 Vissers JH, Nicassio F, van Lohuizen M, Di Fiore PP, Citterio E. The many faces of ubiquitinated histone H2A: Insights from the DUBs. *Cell Div* 2008; 3: 8.
- 45 Shimada M, Nakadai T, Fukuda A, Hisatake K. cAMP-response element-binding protein (CREB) controls MSK1-mediated phosphorylation of histone H3 at the c-fos promoter *in vitro*. *J Biol Chem* 2010; 285(13): 9390-401.
- 46 Logie C, Tse C, Hansen JC, Peterson CL. The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry* 1999; 38(8): 2514-22.
- 47 Ong SE, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng* 2001; 18(5): 195-205.
- 48 Lilley KS, Dupree P. Methods of quantitative proteomics and their application to plant organelle characterization. *J Exp Bot* 2006; 57(7): 1493-9.
- 49 Romijn EP, Krijgsveld J, Heck AJ. Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics. *J Chromatogr A* 2003; 1000(1/2): 589-608.
- 50 Ochi H, Horiuchi I, Araki N, Toda T, Araki T, Sato K, *et al.* Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett* 2002; 528(1/2/3): 197-202.
- 51 Gehanne S, Cecconi D, Carboni L, Righetti PG, Domenici E, Hamdan M. Quantitative analysis of two-dimensional gel-separated proteins using isotopically marked alkylating agents and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16(17): 1692-8.
- 52 Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu XL, Knox JP, *et al.* Proteomic analysis of the Arabidopsis thaliana cell wall. *Electrophoresis* 2002; 23(11): 1754-65.
- 53 Frese CK, Altelaar AF, van den Toorn H, Nolting D, Griep-Raming J, Heck AJ, *et al.* Toward full peptide sequence coverage by dual fragmentation combining electron-transfer and higher-energy collision dissociation tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2012; 84(22): 9668-73.
- 54 Frese CK, Zhou H, Taus T, Altelaar AF, Mechtler K, Heck AJ, *et al.* Unambiguous phosphosite localization using electron-transfer/higher-energy collision dissociation (ETHcD). *J Proteome Res* 2013; 12(3): 1520-5.
- 55 Jaffe JD, Berg HC, Church GM. Proteogenomic mapping as a complementary method to perform genome annotation. *Proteomics* 2004; 4(1): 59-77.
- 56 Gupta N, Tanner S, Jaitly N, Adkins JN, Lipton M, Edwards R, *et al.* Whole proteome analysis of post-translational modifications: applications of mass-spectrometry for proteogenomic annotation. *Genome Res* 2007; 17(9): 1362-77.
- 57 Fenselau C. A review of quantitative methods for proteomic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 855(1): 14-20.
- 58 Szunerits S, Maalouli N, Wijaya E, Vilcot JP, Boukherroub R. Recent advances in the development of graphene-based surface plasmon resonance (SPR) interfaces. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405(5): 1435-43.
- 59 Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: Frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 2011; 1; doi: 10.1038/srep00090.
- 60 Diella F, Cameron S, Gemund C, Linding R, Via A, Kuster B, *et al.* Phospho.ELM: A database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: 79.
- 61 Hornbeck PV, Chabra I, Kornhauser JM, Skrzypek E, Zhang B. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics* 2004; 4(6): 1551-61.
- 62 Chen C, Huang H, Wu CH. Protein bioinformatics databases and resources. *Methods Mol Biol* 2011; 694: 3-24.
- 63 Dai B, Rasmussen TP. Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells. *Stem Cells* 2007; 25(10): 2567-74.

植物多酚通过microRNA调控脂质代谢研究进展

苏东晓^{1,2} 张名位¹ 张瑞芬^{1*}

(¹广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610; ²华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

摘要 microRNA(简称miRNA)是长度18~25个核苷酸的非编码RNA分子, 具有调控mRNA的翻译和/或稳定性的功能, 从而在转录后水平调节不同基因的表达。人体内约60%编码蛋白的基因的表达受到miRNA调节, 其中包括脂质代谢调控相关基因。植物多酚具有良好的生物活性, 可以通过调节脂质代谢相关miRNAs, 如miR-122和miR-33的表达进而发挥降血脂等活性。该文综述了miRNA调控脂质代谢相关mRNA的作用机制以及植物多酚在这一过程中的可能作用。

关键词 miRNA; miR-122; miR-33; 多酚; 脂质代谢

Review: Plant Polyphenols Modulate Lipid Metabolism by Regulating MicroRNA

Su Dongxiao^{1,2}, Zhang Mingwei¹, Zhang Ruifen^{1*}

(¹Sericultural and Agri-food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China;

²Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract MicroRNA (miRNA) is small non-coding RNA molecule, about 21~25 nucleotides in length, which regulates gene expression at the post transcriptional level by decreasing the translation and/or stability of messenger RNA. Approximately 60% genes encoding proteins in human are modulated by miRNAs, including genes modulating lipids metabolism. Plant polyphenols can exert hypolipidemic activity by regulating the lipid metabolism related miRNAs, such as miR-122 and miR-33. This paper reviewed the advances in action mechanism by which miRNAs modulate lipids metabolism related mRNAs and the possible effect of plant polyphenols in such a bioprocess.

Key words microRNA; miR-122; miR-33; polyphenols; lipids metabolism

前言

MicroRNA(简称miRNA)是长度为18~25个核苷酸的非编码单链RNA, 它由DNA转录而来, 但不翻译合成蛋白质, 而是通过与靶基因mRNA 3'UTR(untranslated regions)序列互补结合从而降解mRNA和/或抑制蛋白合成来调节转录后基因的

表达^[1-4]。最近有报道发现, miRNA也可以通过与5'UTR(untranslated regions)或者基因蛋白编码外显子结合来抑制mRNA翻译^[5-7]。单个miRNA可以调节多个靶向mRNA的表达, 而某一特定基因的转录翻译也可能被多个miRNA共同调控^[8-9]。miRNA在调节细胞关键进程, 如细胞发育、分化、代谢、生长、

收稿日期: 2013-12-30 接受日期: 2014-03-19

国家自然科学基金(批准号: 31171680)、广州市珠江科技新星专项(批准号: 2011J2200031)、国家自然科学基金-广东联合基金重点项目(批准号: U1301211)、国家973项目(批准号: 2012CB722904)和广东省国际合作项目(批准号: 2011B050400002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-87237376, E-mail: ruifenzhang@163.com

Received: December 30, 2013

Accepted: March 19, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31171680), the Pearl River Science and Technology Star Fund (Grant No.2011J2200031), the Joint Fund of the NSFC and Guangdong Provincial Government (Grant No.U1301211), the Special Prophase Project of the National Basic Research Program of China (Grant No.2012CB722904) and the International Cooperation Research Project (Grant No.2011B050400002)

*Corresponding author. Tel: +86-20-87237376, E-mail: ruifenzhang@163.com

网络出版时间: 2014-07-02 12:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0437.html>

增殖和凋亡等方面具有重要作用^[4,10-11]。miRNA参与多个代谢途径,如胰岛素分泌、碳水化合物和脂质代谢等^[12],它可能通过调节转录因子、分泌因子、受体和转运子等来影响所有的生命过程。

miRNA自身的表达也受到多种因素的调节,许多生物活性物质可以通过改变miRNA的表达水平从而间接调节其靶基因mRNA的表达^[13-19]。植物多酚是自然界最常见的一大类植物活性物质,近年来的研究发现,植物多酚的健康保护作用与其调节miRNA的表达有关^[20-28]。已有大量的研究表明,植物多酚对改善脂质代谢有显著效果^[29-32],作用机制与其调节肝脏酶活进而影响胆固醇吸收、调控甘油三酯合成和分泌以及抑制血浆低密度脂蛋白氧化等有关^[33-34]。随着对miRNA研究的逐步深入,研究者发现,植物多酚改善脂质代谢作用与其调节miRNA的表达水平有重要关系,如黄酮类化合物通过调节脂代谢相关miRNA的表达水平来调控编码脂代谢相关蛋白质的基因的表达,进而发挥其调节脂质代谢和降低血压的作用^[14,35]。因此,有科学家指出,miRNA可以作为预防和治疗脂质代谢相关疾病的潜在生物标记。本文主要综述了miRNA调控脂质代谢的作用机制和植物多酚对脂质代谢调控相关miRNA的影响,探讨多酚调控脂质代谢的分子机制。

1 miRNA与脂质代谢

miRNA是通过对脂质代谢相关基因和/或转录因子的转录后调控来实现对脂类物质代谢的调节。已报道与脂质代谢调控相关的miRNA有很多,如miR-122、miR-370、miR-33、miR-103、miR-107、miR-758、miR-106b和miR-146a等,其中研究较多的是miR-122和miR-33。

1.1 miR-122与脂质代谢

miR-122是第一个被鉴定具有调节脂质代谢功能的miRNA,它在成人肝脏组织中表达丰度最高,占肝脏总miRNA表达量的72%^[36]。动物实验研究发现,miR-122可影响机体胆固醇和脂肪酸代谢^[37-38]。Esau等^[37]采用反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)技术研究miR-122的功能,发现处理组小鼠与对照组比较血液中脂肪酸含量增加,而胆固醇含量下降,同时肝脏脂肪酸和胆固醇合成速度下降。进一步研究发现,miR-122缺失会导致调控脂肪酸代谢相关酶FAS(fatty acid synthase)、

ACC1(acyl-CoA carboxylase 1)、ACC2(acyl-CoA carboxylase 2)、SCD1(stearoyl-CoA desaturase 1)、ACLY(ATP citrate lyase)和胆固醇代谢相关蛋白SREBP-1c(sterol regulatory element-binding protein -1c)等含量降低,从而导致脂肪酸和胆固醇合成减少。抑制miR-122基因表达后,翻译脂肪酸代谢酶FAS、ACC1和ACC2等的mRNA表达水平降低^[37]。Elmén等^[38]采用ASO技术抑制灵长类动物非洲绿猴肝脏miR-122表达,发现血浆中总胆固醇含量随抑制剂剂量增加而减少。也有研究报道,miR-122受到抑制会导致胆固醇合成关键控制酶HMGCR(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)活性降低,进而影响胆固醇合成^[39]。这些研究表明,miR-122参与脂质代谢调控。

1.2 miR-370与脂质代谢

miR-370在脂质代谢调控方面与miR-122作用相似,它是通过调节miR-122的表达水平来调节脂质代谢^[40]。人肝癌细胞HepG2转染miR-370后,细胞中miR-122表达水平上调;而抑制miR-370表达则会降低miR-122水平。HepG2细胞转染miR-370后,细胞内SREBP-1c、FAS、DGAT2和ACC1等的表达水平明显降低,而用ASO处理细胞后,上述基因的表达水平则明显提高^[40]。进一步通过ASO抑制HepG2细胞miR-122表达后,发现细胞内miR-370对上述基因表达的影响就会消失。此外,miR-370也能与Cpt1a(carnitine palmitoyltransferase 1a)基因3'UTR区靶向结合,进而使Cpt1a基因表达下调,脂肪酸 β 氧化率降低。这些研究结果表明,miR-370参与调节脂质代谢。

1.3 miR-33与脂质代谢

miR-33位于SREBP基因的内含子中,在调节脂质代谢平衡中起重要作用^[41-43]。它是维持细胞内胆固醇和脂肪酸动态平衡的关键转录后调节因子^[41-44]。

miR-33通过靶向调节ABCA1、ABCG1和NPC1等基因的表达来调控胆固醇动态平衡。Marquart等^[41]研究miR-33对细胞内胆固醇含量的影响,发现转染编码miR-33的质粒于HEK293细胞,miR-33过表达细胞内氘标记的胆固醇流向ApoA I减少,而ASO静默miR-33后,细胞内胆固醇外流增加。Najafi-Shoushtari等^[42]报道了胆固醇含量对细胞内miR-33表达的影响,增加巨噬细胞和肝细胞内胆固醇含量,胞内miR-33表达下调;而胞内胆固醇含量降低时,miR-33表达上

调。Marquart等^[41]进一步分析了小鼠肝脏*ABCA1*基因及其相关蛋白的表达,发现miR-33通过靶向调节*ABCA1*来调控胆固醇动态平衡。Rayner等^[17]研究证实,抑制灵长类动物非洲绿猴miR-33表达可以提高肝脏*ABCA1*水平。也有研究发现,miR-33同时还调控另一胆固醇转运体*ABCG1*^[43]。这些研究结果表明,miR-33调节细胞内胆固醇动态平衡。

miR-33还通过调节脂肪酸 β 氧化相关mRNA的表达调控脂质代谢。Dávalos等^[44]从细胞和动物水平研究抑制内源性miR-33的表达对脂肪酸 β 氧化相关基因的影响,发现抑制miR-33表达可以增加脂肪酸 β 氧化关键酶CROT、CPT1a、HADHB和AMPK α 等的含量。灵长类动物实验也证实,抑制miR-33表达上述脂肪酸 β 氧化相关基因及蛋白含量增加,同时脂肪酸合成相关基因*SREBP1*、*FAS*、*ACLY*和*ACACA*等下降。同时,还观察到小鼠实验未发现的现象—血浆VLDL甘油三酸酯水平显著降低^[17]。

1.4 其他miRNA与脂质代谢

miR-103、miR-107、miR-758和miR-106b等也参与脂质代谢的调控。Ramirez等^[45]通过ASO静默人神经胶质瘤细胞(H4)和小鼠巨噬细胞(J774)中的miR-758,发现*ABCA1*表达上调,细胞内胆固醇含量下降。Kim等^[46]发现,miR-106b通过调控小鼠神经元细胞中*ABCA1*表达进而阻止细胞中胆固醇外流。可见,miR-758和miR-106b通过调节转录后*ABCA1*基因的表达来调节胆固醇动态平衡,其作用方式与miR-33类似。

*miR-103*和*miR-107*位于PANK(pantothenate kinase)内含子中。旁系同源基因*miR-103*和*miR-107*与泛酸激酶共同作用,通过抑制*FAS*等基因的表达来调节脂肪酸含量^[47]。此外,Yang等^[48]发现,巨噬细胞内miR-146a过表达可显著降低细胞内低密度脂蛋白胆固醇含量。

2 多酚对脂质代谢相关miRNA的调节

多酚具有抗氧化、抗炎、调节代谢、保护心血管、抑制神经退化和抗癌等生物活性^[49-50]。过去认为,抗氧化功效是其生物活性作用机制^[51]。而近年来文献报道了多酚生物活性的miRNA水平作用机制。姜黄素通过干扰细胞信号通路表现其抗肿瘤活性^[52]。最新研究发现,摄入姜黄素,小鼠黑色素瘤组织变小,剂量组肿瘤细胞中miR-205-5p表达较对照

组显著提高^[28]。因此,推测姜黄素可能是通过改变细胞信号来调节miRNA的表达,进而体现其抗癌活性。有文献报道,芹菜素通过抑制MAPK(mitogen-activated protein kinase)Erk来降低TRBP(TAR-binding protein)磷酸化进而抑制miRNA由前体向成熟体转变从而抑制miRNA表达^[53]。多酚与细胞信号相互作用发生级联反应,调节转录因子活性,从而影响基因表达^[50-51]。然而关于多酚调控miRNA表达作用机制的研究报道较少,文献报道较多的是多酚对miRNA表达水平变化的研究。

植物多酚能够调节生物机体miRNA的表达水平,而且不同酚类化合物影响miRNA的种类及水平差异较大。Milenkovic等^[21]通过miRNA和mRNA表达谱基因芯片技术研究了槲皮素、橙皮甙、柚皮素、花青素、儿茶素、姜黄素、原花色素、咖啡酸和阿魏酸等9种植物多酚对高脂膳食喂饲的*apoE*^{-/-}小鼠体内miRNA的影响,结果发现,酚酸、黄酮和花青素等不同酚类物质对小鼠miRNA种类数量和表达水平的影响差异较大(表1)。摄入黄酮类化合物无论是上调、下调还是总数发生变化的miRNA均较酚酸类化合物多。需要指出的是,实验所选酚酸种类较少,有待进一步考查其他酚酸调节miRNA情况。另外,酚类化合物所调节的miRNA自身的功能也不能忽视。也有研究报道多酚对某些特定miRNA的调节情况。An等^[54]报道没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)通过下调特异性miRNA表达来保护紫外光诱导的人类真皮成纤维细胞损伤。Kumazaki等^[55]发现,采用20 μ mol/L白藜芦醇处理结肠癌细胞DLD-1能显著提高细胞内miR-

表1 不同酚类物质调节*apoE*基因敲除小鼠体内miRNA的数量(根据参考文献[21]修改)

Table 1 The numbers of miRNA regulated by different phenolics in *apoE* knockout mice (modified from reference [21])

多酚	下调	上调	总计
Polyphenols	Down	Up	Total
Quercetin	22	25	47
Hesperidin	53	44	97
Narangin	33	36	69
Anthocyanin	30	15	45
Catechin	36	44	80
Proanthocyanin	37	18	55
Caffeic acid	18	11	29
Ferulic acid	17	22	39
Curcumin	55	11	66

34a(2.5倍)和let-7a(2倍)的表达, 进而下调其靶基因细胞周期调控因子E2F3及其下游基因脂肪细胞和肌细胞调控因子*Sirt1*(Sirtuin type 1)。

目前已有研究发现, 植物多酚单体及提取物通过上调或下调脂肪酸和胆固醇等代谢相关miRNA的表达水平, 进而调控脂类代谢相关酶的表达, 从而实现其调节脂质代谢的作用。植物多酚调节miRNA影响脂质代谢相关的研究报道归纳如表2。

2.1 植物多酚通过调控miRNA调节脂肪酸代谢

植物多酚提取物具有调节miRNA水平的作用。Joven等^[25]发现, 持续摄入玫瑰茄多酚提取物可以降低高脂饲料喂养的LDL受体缺陷小鼠肝脏甘油三酯和中性脂肪水平, 同时提高其多不饱和脂肪酸与单不饱和脂肪酸构成比例。分析其机理发现, 高脂膳食刺激动物体内*miR-103*和*miR-107*基因高表达, 而摄入玫瑰茄多酚提取物能够使*miR-103*和*miR-107*降低至与对照组相当的水平, 同时还显著抑制*miR-122*的表达, 从而调控脂肪酸代谢相关基因*FAS*、*SREBP-1c*和*AMPK*(AMP-activated protein kinase)等的表达, 起到降脂作用。不同植物源多酚调节的miRNA不同。Baselga-Escudero等^[56]对葡萄籽原花青素提取物调节*miR-122*及其靶基因进行系统研究发现, 摄入葡萄籽原花青素提取物可以快速

暂时性下调大鼠肝脏以及体外培养的肝细胞中*miR-122*水平, 从而抑制其靶基因*FAS*表达, 减少脂肪酸合成。在此基础上比较了长期摄入葡萄籽原花青素提取物对血脂代谢异常模型组和剂量组脂肪酸代谢情况的影响, 分析发现大鼠肝细胞中*miR-122*含量显著降低, 靶基因*FAS*被显著抑制, 另一靶基因*Pparβ/δ*表达上调, 脂肪酸含量降低^[57]。Murase等^[58]在高脂膳食诱导的C57BL/6肥胖小鼠肝脏中发现, 咖啡多酚通过下调*FAS*、*ACCI*、*SCD1*、*SREBP-1c*、*ACC2*和*PDK4*等基因的表达减少肝脏脂肪蓄积。他们进一步利用小鼠肝癌Hepa 1-6细胞验证了上述结果, 同时还发现经咖啡多酚处理的Hepa 1-6细胞中*miR-122*的表达水平提高了35%。因此, 推测植物多酚通过调节miRNA表达水平的方式调控脂肪酸代谢。

2.2 植物多酚通过调控miRNA调节胆固醇代谢

植物多酚通过调节*miR-33*和*miR-122*表达水平来调控胆固醇代谢。Baselga-Escudero等^[56]设计了雄性Wistar大鼠摄入猪油(2.5 mL/kg体重)或含有葡萄籽原花青素提取物猪油(250 mg/kg体重)的急性实验(0, 1, 3 h采集血液, 摘取肝脏), 研究发现葡萄籽原花青素能够显著降低大鼠血液中甘油三酯含量, 肝脏中总胆固醇和总甘油三酯含量, 进一步分子水平研究发现剂量组肝脏中*miR-33*的表达较对

表2 多酚通过调节miRNA表达对脂代谢的调控作用

Table 2 The modulation of polyphenols on lipid metabolism by regulating the expression of miRNA					
小RNA miRNA	多酚 Polyphenol	上/下调 Up-/down- regulation	实验情况 Experimental condition	代谢通路 Metabolic pathway	参考文献 References
miR-33	Grape seed proanthocyanidins	Down	250 mg/kg, 1 h Male Wistar rats liver 25 mg/L, 1 h, FAO	Cholesterol efflux HDL biogenesis, and VLDL levels. Fatty acid oxidation	[56]
miR-103/107	Polyphenol extract (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Up	28.6 mg/kg/day 10 weeks Male C57BL/6J (LDLr ^{-/-}) mice liver	TG storage in adipocytes	[25]
miR-122	Polyphenol extract (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Down	28.6 mg/kg/day, 10 weeks Male C57BL/6J (LDLr ^{-/-}) mice liver	Cholesterol synthesis Bile acid biosynthesis Fatty acid oxidation	[25,56,58-59]
	Quercetin	Up	2 mg/g diet, 6 weeks, Female C57BL/6J mice liver		
	Coffee polyphenols	Up	0.5%~1.0% for 2-15 weeks Male C57BL/6J mice liver 2.5 g/mL, 24 h, Hepa		
	Grape seed proanthocyanidins	Down	250 mg/kg, 1 h Male Wistar rats liver 25 mg/L, 1 h, FAO		
miR-370	Ellagitannin	Down	15 µg/mL, 6 h, HepG2	Fatty acid oxidation	[60]

照组降低, *ABCA1*表达水平提高, 高密度脂蛋白含量显著增加, 同时还采用葡萄籽原花青素孵育大鼠肝细胞FAO验证上述*miR-33*和*ABCA1*的表达情况, 得到与动物实验相似的结果。这些结果提示, 葡萄籽原花青素通过下调*miR-33*基因表达, 提高其靶基因*ABCA1*的表达水平, 实现对胆固醇代谢的调节。在急性实验基础上, Baselga-Escudero等^[57]进一步考察长期摄入葡萄籽原花青素提取物对血脂代谢异常雄性肥胖Wistar大鼠脂代谢的影响, 发现剂量组(25 mg GSPE/kg)与模型组比较, 能够显著降低血浆中总甘油三酯和低密度脂蛋白含量, 肝脏中总脂肪、总甘油三酯和总胆固醇含量; 基因分析发现*miR-33*表达被抑制, 其调控的靶基因*ABCA1*和*Cpt1a*水平显著升高。此外, 通过外周血单细胞的验证实验也有类似发现。也有研究报道, 植物多酚通过调节*miR-122*表达, 调控胆固醇代谢。Boesch-Saadatmandi等^[59]发现, 摄入含有槲皮素(2 mg/g饲料)的半合成西式膳食的雌性C57BL/6J小鼠肝脏*miR-122*水平较模型组提高61%, 而肝脏中总胆固醇含量显著降低。Wen等^[60]发现, 经植物多酚Ellagitannin处理后6 h, HepG2细胞中*miR-370*表达提高2.4倍, 并且随时间延长表达量增加。综上, 植物多酚能够通过调节miRNA调控机体胆固醇代谢。

3 存在的问题

机体内超过60%的细胞水平的转录和翻译受到miRNA的调控, 而植物多酚具有调节肝脏脂肪代谢相关miRNA表达的作用, 这将为阐释多酚改善机体健康作用提供新的研究视角。然而, 仍有许多问题需要进一步深入研究: (1)目前, 尚缺乏多酚调节miRNA分子机制的直接证据。有研究表明, 多酚可以结合在mRNA和蛋白上, 故多酚也可能与miRNA或miRNA前体结合进而调节其表达水平和稳定性; 而对于来自于内含子的miRNA, 多酚也有可能通过调节宿主基因的表达, 进而调节miRNA的表达。(2)目前的研究还仅局限于对多酚调节miRNA现象的报道, 关于这一作用与不同种类多酚之间的构效关系还未涉及。多酚种类繁多, 结构复杂, 明确其调节miRNA的构效关系对深入了解和利用多酚的生物活性有重要意义。(3)当前的研究集中在验证多酚对单一miRNA及其靶基因的影响, 缺少多酚对调节脂代谢相关的miRNA网络系统的研

究。机体内各miRNA的表达并非孤立, 相互之间可能存在协同作用, 因此从生物学功能角度探讨多酚对miRNA网络的调控可能会更接近其作用的本质。上述问题还需要更多基于细胞和动物体内的研究, 以便更加广泛、深入地评估多酚的靶向miRNA及其作用的分子机制。

参考文献 (References)

- 1 Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4): 642-55.
- 2 Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution. *Cell* 2005; 123(6): 1133-46.
- 3 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.
- 4 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- 5 Forman JJ, Collier HA. The code within the code: microRNAs target coding regions. *Cell Cycle* 2010; 9(8): 1533-41.
- 6 Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008; 30(4): 460-71.
- 7 Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(23): 9667-72.
- 8 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- 9 Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- 10 Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 175-205.
- 11 Lynn FC. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrin Met* 2009; 20(9): 452-9.
- 12 Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2012; 13(4): 239-50.
- 13 Bae S, Lee EM, Cha H, Kim K, Yoon Y, Lee H, et al. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cells* 2011; 32(3): 243-9.
- 14 Lecour S, Lamont K. Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini-Rev Med Chem* 2011; 11(14): 1191-9.
- 15 Mannaerts GP, van Veldhoven PP, Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via β - and α -oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* 2000; 32(1-3): 73-87.
- 16 Ramsay RR, Gandour RD. Selective modulation of carnitine long-chain acyltransferase activities. Kinetics, inhibitors, and active sites of COT and CPT-II. *Adv Exp Med Biol* 1999; 466: 103-9.
- 17 Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* 2011; 478(7369): 404-7.
- 18 Ahn J, Lee H, Jung CH, Ha T. Lycopene inhibits hepatic steatosis

- via microRNA-21-induced downregulation of fatty acid-binding protein 7 in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56(11): 1665-74.
- 19 Alvarez-Díaz S, Valle N, Ferrer-Mayorga G, Lombardía L, Herrera M, Domínguez O, *et al.* MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Hum Mol Genet* 2012; 21(10): 2157-65.
- 20 Parasramka MA, Ho E, Williams DE, Dashwood RH. MicroRNAs, diet, and cancer: New mechanistic insights on the epigenetic actions of phytochemicals. *Mol Carcinog* 2012; 51(3): 213-30.
- 21 Milenkovic D, Deval C, Gouranton E, Landrier JF, Scalbert A, Morand C, *et al.* Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: A new mechanism of the action of polyphenols. *PLoS One* 2012; 7(1): e29837.
- 22 Lançon A, Kaminski J, Tili E, Michaille JJ, Latruffe N. Control of MicroRNA expression as a new way for resveratrol to deliver its beneficial effects. *J Agric Food Chem* 2012; 60(36): 8783-9.
- 23 Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215(1): 1-8.
- 24 Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(12): 1771-92.
- 25 Joven J, Espinel E, Rull A, Aragonès G, Rodríguez-Gallego E, Camps J, *et al.* Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(7): 894-9.
- 26 Arola-Arnal A, Blade C. Proanthocyanidins modulate microRNA expression in human HepG2 cells. *PLoS One* 2011; 6(10): e25982.
- 27 Noratto GD, Kim Y, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Flavonol-rich fractions of yaupon holly leaves (*Ilex vomitoria*, Aquifoliaceae) induce microRNA-146a and have anti-inflammatory and chemopreventive effects in intestinal myofibroblast CCD-18Co cells. *Fitoterapia* 2011; 82(4): 557-69.
- 28 Dahmke IN, Backes C, Rudzitis-Auth J, Laschke MW, Leidinger P, Menger MD, *et al.* Curcumin intake affects miRNA signature in murine melanoma with mmu-miR-205-5p most significantly altered. *PLoS One* 2013; 8(12): e81122.
- 29 Matsumoto N, Okushio K, Hara Y. Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1998; 44(2): 337-42.
- 30 Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, *et al.* Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr* 2005; 135(8): 1911-7.
- 31 Gorinstein S, Bartnikowska E, Kulasek G, Zemser M, Trakhtenberg S. Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol. *J Nutr* 1998; 128(11): 2023-7.
- 32 Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56(11): 317-33.
- 33 Lee JS, Jeon SM, Park EM, Huh TL, Kwon OS, Lee MK, *et al.* Cinnamate supplementation enhances hepatic lipid metabolism and antioxidant defense systems in high cholesterol-fed rats. *J Med Food* 2003; 6(3): 183-91.
- 34 Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005; 135(10): 2291-4.
- 35 Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(1): 37-59.
- 36 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12(9): 735-9.
- 37 Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3(2): 87-98.
- 38 Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, *et al.* LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008; 452(7189): 896-9.
- 39 Norman KL, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance and the isoprenoid biosynthesis pathway by microRNA miR-122 involves distinct mechanisms. *J Virol* 2010; 84(1): 666-70.
- 40 Iliopoulos DI, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J Lipid Res* 2010; 51(6): 1513-23.
- 41 Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(27): 12228-32.
- 42 Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, *et al.* MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328(5985): 1566-9.
- 43 Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, *et al.* MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328(5985): 1570-3.
- 44 Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriar NP, Andreo U, *et al.* miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(22): 9232-7.
- 45 Ramirez CM, Dávalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warriar N, Cirera-Salinas D, *et al.* MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(11): 2707-14.
- 46 Kim J, Yoon H, Ramírez CM, Lee SM, Hoe HS, Fernández-Hernando C, *et al.* miR-106b impairs cholesterol efflux and increases Aβ levels by repressing ABCA1 expression. *Exp Neurol* 2012; 235(2): 476-83.
- 47 Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: A review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 2007; 91(3): 209-17.
- 48 Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, *et al.* MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 2011; 585(6): 854-60.
- 49 Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(5): 727-47.
- 50 Milenkovic D, Jude B, Morand C. miRNA as molecular target of

- polyphenols underlying their biological effects. *Free Radic Biol Med* 2013; 64: 40-51.
- 51 Ei Gharas H. Polyphenols: Food sources, properties and applications—a review. *Int J Food Sci Tech* 2009; 44(12): 2512-8.
- 52 Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett* 2008; 267(1): 133-64.
- 53 Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, *et al.* The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. *Sci Rep* 2013; 3: 2553.
- 54 An IS, An S, Park S, Lee SN, Bae S. Involvement of microRNAs in epigallocatechin gallate-mediated UVB protection in human dermal fibroblasts. *Oncol Rep* 2013; 29(1): 253-9.
- 55 Kumazaki M, Noguchi S, Yasui Y, Iwasaki J, Shinohara H, Yamada N, *et al.* Anti-cancer effects of naturally occurring compounds through modulation of signal transduction and miRNA expression in human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 2013; 24(11): 1849-58.
- 56 Baselga-Escudero L, Bladé C, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó MJ, Arola L, *et al.* Grape seed proanthocyanidins repress the hepatic lipid regulators miR-33 and miR-122 in rats. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56(11): 1636-46.
- 57 Baselga-Escudero L, Arola-Arnal A, Pascual-Serrano A, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó MJ, *et al.* Chronic administration of proanthocyanidins or docosahexaenoic acid reverses the increase of miR-33a and miR-122 in dyslipidemic obese rats. *PLoS One* 2013; 8(7): e69817.
- 58 Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, *et al.* Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300(1): E122-33.
- 59 Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Wolfram S, Rimbach G. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver *in vivo*—role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. *Pharmacol Res* 2012; 65(5): 523-30.
- 60 Wen XY, Wu SY, Li ZQ, Liu ZQ, Zhang JJ, Wang GF, *et al.* Ellagitannin (BJA3121), an anti-proliferative natural polyphenol compound, can regulate the expression of MiRNAs in HepG2 cancer cells. *Phytother Res* 2009; 23(6): 778-84.