

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0183-06

腺病毒介导 CDES 融合基因对乳腺癌细胞的抑制作用

李秋香, 李冬田, 佟惠春, 尹冰楠, 李光明 (天津医科大学微生物学教研室, 天津 300070)

[摘要] **目的:** 构建一种重组腺病毒 rAdCDES, 在体内外进行抑瘤和放疗增敏作用实验研究。**方法:** 用细菌内同源重组法与腺病毒骨架质粒重组构建出重组腺病毒质粒, 经脂质体介导转染 293 包装细胞扩增获取重组腺病毒 rAdCDES。用测定生长曲线和 MTT 法检测其对入乳腺癌细胞株 MCF-7 的生长抑制情况; 建立津白号鼠乳腺癌模型, 观察 rAdCDES 和放疗对瘤体大小及鼠存活期的影响。**结果:** 成功构建了 rAdCDES; rAdCDES 对 MCF-7 细胞生长抑制率达 $(83.1 \pm 8.1)\%$, 与对照 rAdLacZ $(19.2 \pm 7.8)\%$ 相比较有显著性差异 ($P < 0.01$); 体内 rAdCDES 对小鼠乳腺癌 MA737 细胞有明显生长抑制作用, 延长了小鼠的存活期, 且对放疗有肯定的增敏作用。**结论:** 本文所构建的 rAdCDES 在体内外对乳腺癌细胞均有明显的抑制作用和对放疗的增敏作用。

[关键词] 乳腺癌; 腺病毒; 基因疗法; CDES 基因

[中图分类号] R730.59 **[文献标识码]** A

The Inhibitory Effect of CDES Gene on Mammary Cancer Mediated by Adenovirus

LI Qiou-xiang, LI Dong-tian, TONG Hui-chun, YIN Bing-nan, LI Guang-ming (Department Of Microbiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a recombinant adenovirus (rAdCDES) which is capable of both direct and indirect treatment to mammary cancer and enhancement to the antitumor effect of radiation. **Methods:** A method of homologous recombination in bacteria was used to construct prAdCDglyES. The recombination adenovirus was transfected to 293 cells by liposome, in which rAdCDES was packaged and generated. The growth curve and MTT methods was used to detect the growth inhibition effect of rAdCDES on MCF-7; rAdCDES was directly injected into established MA737 tumors-bearing mice for observing difference in tumor size and survival days of mice and enhancement of the antitumor effect of radiation. **Results:** The inhibiting rate of rAdCDES on MCF-7 cell was $(83.1 \pm 8.1)\%$ and had significant difference compared with control was $(19.2 \pm 7.8)\%$ ($P < 0.01$). We observed also that there was a significant difference in tumor size and survival days in mice between the therapy group and control group and rAdCDES had enhancement of the antitumor effect of radiation. **Conclusion:** rAdCDES is capable of growth inhibition effect on mammary cancer *in vivo* and *in vitro* and enhancement of the antitumor effect of radiation.

[Key words] mammary cancer; adenovirus; gene therapy; CDES gene

在生物疗法中基因治疗是最具潜力的。目前, 将多种目的基因融合后行肿瘤基因治疗已为众多学者所关注。本研究将胞嘧啶脱氨酶 (CD) 基因和内皮抑素 (ES) 基因经甘氨酸序列连接融合成重组腺病毒 rAdCDES, 观察其在体内外对乳腺癌细胞生长抑制作用, 以期对乳腺癌的基因治疗提供新的研究方向。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

含 CD 基因的质粒 pBluescriptCD、含 ES 基因的分泌型质粒 PEZZ18-ES 为本室购建; 腺病毒穿梭质粒 PAdTrack-CMV、腺病毒骨架质粒 PAdEasy-1 和宿主菌 BJ5183、DH10B 购自 Stratagene 公司。

[基金项目] 天津市自然科学基金(编号:013615811)

[作者简介] 李秋香(1946-), 女, 教授, 河北人, 主要从事病毒学的分子生物学及基因治疗的研究

E-mail: liqx@tjmu.edu.cn

1.2 限制性内切酶

Hind III, Bgl II, Xba I, BamH I 购自 NEB 公司; TaqE 购自 Promega 公司。

1.3 细胞系和动物

293 细胞为本室保存;人脐静脉血管内皮细胞株由中国医学科学院血液病研究所提供;人乳腺癌细胞株 MCF-7 和小鼠乳腺癌细胞株 MA737 由天津医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究室提供。津白号近交纯系小鼠由天津医科大学实验动物中心提供(7 周龄,雄性,体重 18~22 g)。

1.4 小鼠放疗仪器设备

小鼠放疗固定器由中国医学科学院实验动物研究所提供;6MV-X 线直线加速器为瑞典医科达公司产品。

1.5 引物

CD 上游引物: 5'-GAAGATCTAGGCTAGCAATGT CGAATAACGCT-3',

下游引物: 5'-CCCAAGCCTGGGGTACCTCCAC GTTTGTAATCGAT-3';

ES 上游引物: 5'-CGGGGTACCGAGGAGGAG-GAGGAGGAGGAGGAGGAGGATTTATGCACAGCCACCG CGA CTT-3',

下游引物: 5'-GCTCTAGATCACTTGGAGGCAGT-CAT-3',均由上海生工合成。

1.6 重组腺病毒 AdCDES 的构建

首先以 pBluescriptCD 为模板,用 CD 上下游引物扩增出 CD 基因,小量制备腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV,用 Bgl II 和 Hind III 酶切后按 pAdTrack-CMV: CD 为 1:3 分子比混合,16℃ 连接 30 min,构建成穿梭质粒 pAdTrack-CMV-CD,转化 DH5 α 细胞。以 pEZZ18-ES 质粒为模板,用 glyES 上下游引物扩增出 ES 基因,经 Bgl II 和 Xba I 双酶切后插入质粒 pAdTrackCMV-CD 的 CD 基因下游构成 pAdTrack-CMV-CDglyES。然后按 He 等^[1]细

菌内同源重组法略加改进构建成 PrAdCDglyES,用脂质体介导转染 293 细胞扩增 rAdCDglyES,利用 GFP 报告基因监控转染,连续传代,病毒经 CsCl₂ 梯度离心纯化,-70℃ 保存,用常规法滴定重组腺病毒滴度。

1.7 乳腺癌细胞的抑制实验

首先,将生长良好的 MCF-7 细胞接种 96 孔板培养成单层。第 1 列空白对照,第 2 列为细胞对照,第 3 列后依次为 rAdLacZ, rAdCD 和 rAdCDES 3 种重组腺病毒;每种 3 列,置 37℃,5% CO₂ 孵箱培养 24 h,吸去液体,分别加入 RPMI-1640 营养液和 2 g/L 5-FC,0.1 ml/孔,37℃,5% CO₂ 孵箱培养 48 h 后,用 MTT 法测定细胞抑制率并按下述公式计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率 = (1 - 实验 A570/正常 A570) × 100% 数据分析统计采用 $\bar{x} \pm s$,用单因素方差分析。其次,还做了生长曲线的测定,按常规方法^[2]用 rAdCDES, rAdCD, rAdLacZ 分别处理 MCF-7 细胞;以 RPMI-1640 为空白对照,每日定时间点分别收集各组细胞,以台盼蓝拒染实验计数细胞,并绘制出细胞生长曲线。

1.8 血管内皮细胞抑制试验

将生长良好的 ECV-304 细胞消化成单个细胞,用内皮细胞生长因子(ECGF)5 mg/L 的 1640 营养液稀释成 2 × 10⁸ 细胞/L,接种 96 孔板,培养成单层,第 1 列为空白对照,第 2 列细胞对照,第 3 列后分别加入 25% 的 rAd-CD 和 rAdCDES 细胞培养上清液的浓缩液及后者的未浓缩液,每种 3 列,每孔 0.2 ml,37℃,5% CO₂ 培养 68 h。用 MTT 法测定细胞抑制率并按 1.7 方法计算细胞生长抑制率

1.9 对小鼠模型乳腺癌细胞的抑制作用

将在小鼠体内传代的 MA737 乳腺癌细胞用生理盐水配成 1 × 10⁷ 个/ml 的细胞悬液。在每只小鼠右后肢腓肠肌接种 0.2 ml MA737 细胞悬液,按表 1 的方法将荷瘤小鼠随机分为 7 组。

表 1 荷瘤鼠分组情况表

Tab. 1 Different treatment modes of mice with carcinoma

Groups	Contents	Intramuscular injection	Intraperitoneal injection	radiation (6MV - x)
1	Control	DMEM 0.1 ml	NS 1 ml	—
2	Radiation	DMEM 0.1 ml	NS 1 ml	14 Gy
3	rAdCDES	rAdCDES 0.1 ml	NS 1 ml	—
4	Radiation + rAdCDES	rAdCDES * * 0.1 ml	—	14 Gy
5	rAdCDES + 5-FC	rAdCDES * * 0.1 ml	5-FC * 1 ml	—
6	Radiation + rAdCDES + 5-FC	rAdCDES * * 0.1 ml	5-FC * 1 ml	14 Gy
7	Radiation + rAdCDES + 5-FC	rAdCDES * * 0.1 ml	5-FC * 1 ml	7 Gy

* 5-FC:500 mg/kg · d; * * : rAdCDES:10⁹TCID₅₀/ml

在荷瘤后的第 4 天起开始治疗,按分组要求分别给 rAdCDES 或 DMEM 液,第 6~9 天重复治疗。从荷瘤第 5 天开始,按分组要求腹腔注射 5-FC 液或生理盐水。荷瘤的第 7 天按分组要求给予 6MV-x 线,放疗时在小鼠放疗固定器表面加 1.5 cm 厚蜡膜,荷瘤第 6 天开始每日测量计算各组小鼠瘤体的重量^[3],方法为用游标卡尺测瘤体的二横径或二横径加长径,按公式 $G = D^3 - 0.36 \times Dmg$ (D 为瘤体平均径,G 为瘤体重量,以 mg 为计量单位)计算瘤重,逐日连续测量直至瘤体重量达 8 000 mg,连续观察每组小鼠直至各组出现半数死亡,记录每组小鼠中位生存期,数据结果用 spss 统计软件做方差分析,两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 构建的 pAdTrackCMVCDglyES 质粒的鉴定

经 Bgl II 和 Xba I 双酶切后可见 9.2 和 1.9 kb 的特异条带(图 1),后者符合 CDglyES 大小,证实质粒中确实插入 CD 和 ES 基因。

图 1 pAdTrackCMV-CDglyES 双酶切电泳图
Fig.1 Electrophoresis of pAdTrackCMV-CDglyES digested with Bgl II and Xba I

1:λDNA/Hind III + DL2000 Marker; 2: pAdTrackCMV-CDglyES digested with Bgl II and Xba I ;
3: pAdTrackCMV digested with Bgl II

2.2 同源重组腺病毒后 prAdCDglyES 的鉴定

分别用 Pac I 和 BamH I 酶切电泳可见重组质粒略大于 pAdEasy-1 质粒,并且可以切下一小片段(图 2)。证实同源重组成功。

2.3 rAdCDES 滴定结果

纯化后 rAdCDES 的滴度为 $1 \times 10^{10.3}$ TCID₅₀/ml。

2.4 rAdCDES/5-FC 系统对 MCF-7 细胞生长抑制作用结果见表 2 和图 3。

表(2)和图(3)表明 3 种重组病毒对 MCF-7 细胞生长的影响有差别,且 rAdCDES 组和 rAdCD 组对肿瘤细胞抑制均明显高于 rAdLacZ 组,差别均有统计学意义($P < 0.01$)。这一结果证实在 CDglyES 融合基因中,基因的融合未影响 CD 基因活性。

图 2 重组腺病毒 prAdCDglyES 分别用 Pac I 和 BamH I 双酶切鉴定图
Fig.2 Identification of prAdCDglyES digested with Pac I and BamH I

1: DL15000 Marker; 2: prAdCDglyES; 3-6: Unrecombinant plasmid; 7: pAdTrackCMV; 8: pAdEasy-1

表 2 AdLacZ, rAdCD 及 rAdCDES 对 MCF-7 细胞生长抑制率的比较

Tab.2 Comparison of growth inhibition rate of MCF-7 treated with AdLacZ, rAdCD and rAdCDES

Groups	n	Cell growth inhibition rate	Statistics	
			Agrou:Group	q
rAdlacZ1	55	19.2 ± 7.8	1:2	27.2*
rAdCD 2	35	68.7 ± 9.2	1:34	1.4*
rAdCDES 3	35	83.1 ± 8.1	2:3	9.6*
F		359.6	* P < 0.01	

rAdCDES 细胞培养上清液对 ECV-304 内皮细胞的影响见表 3。

结果表明,2 种重组腺病毒表达产物对经 ECGF 处理的 ECV-304 细胞增殖有不同程度影响。rAdCDglyES 表达产物 10 倍浓缩液抑制率与其他 2 组相比有显著差异($P < 0.01$)。rAdCDES 表达产物对经 ECGF 处理

后快速增殖的 ECV-304 的抑制率达 78.7% 与其他两组抑制率 24.2% 和 28.2% 相比有显著差异 ($P < 0.01$), 因而证实融合的 rAdCDES 仍具有 ES 基因活性, 其能对经 ECGF 处理的像肿瘤血管内皮一样快速增殖的 ECV-304 细胞有明显的抑制作用, 但需有一定浓度。

重, 生长最为迅速, 按分组要求相应处理后各组肿瘤均表现出不同程度的生长延迟, 其中第 6 组生长延迟最为明显, 远高于其他各组, 肿瘤平均重量也远小于其他各组。

图 3 不同处理组作用后 MCF-7 细胞的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of MCF-7 cell treated with AdLacZ, rAdCD and rAdCDES

表 3 rAdCD 和 rAdCDglyES 细胞培养上清对 ECV-304 内皮细胞的生长抑制率的比较

Tab.3 Comparison of growth inhibition rate of ECV-304 cells treated with supernatant of 293 cells treated by rAdCDES and rAdCD respectively

Groups	n	Cell growth inhibition rate	Statistics	
			Group: Group	q
1**	9	24.2 ± 9.7	1:2	2.1
2**	9	28.8 ± 6.3	1:3	24.4*
3**	9	78.7 ± 1.8	2:3	22.3
F		180.277	*P < 0.01	

* * Group 1: 10 × rAdCD; Group 2: 1 × rAdCDglyES; Group 3: 10 × rAdCDglyES

2.6 rAdCDES 对小鼠乳腺癌模型的抑制结果

2.6.1 各组小鼠平均瘤重的比较

图 4 内数据为给药后 1 ~ 20 天各组小鼠肿瘤重量的均值(单位 mg)。自第 17 天开始, 第 1 组小鼠的肿瘤开始出现破溃, 并逐日出现鼠死亡, 故未再记录肿瘤重量。

2.6.2 各组小鼠肿瘤质量达 8 000 mg 时所用时间(图 5)。

从图(4)和图(5)可以看出空白对照组的肿瘤最

图 4 各组小鼠按分组要求处理后 20 d 内肿瘤生长的比较 (mg)

Fig. 4 Comparison of tumor weight after treating the mice (mg)

图 5 不同组小鼠肿瘤质量达到 8 000 mg 时所需时间的比较

Fig. 5 Times for the weight of tumor growing to 8 000 mg

2.6.3 各组小鼠中位生存期比较(图 6)

图(6)结果表明第 1 组平均中位生存期最短, 而第 6 组平均中位生存期明显长于其余各组 ($P < 0.01$)。证明了 rAdCDES 有明显抑制体内乳腺癌细胞生长和放疗增敏作用。

3 讨论

肿瘤基因治疗已成为肿瘤治疗研究的热点。在国际上已得到批准用于临床的基因治疗方案 60% 以上是针对肿瘤的。尽管肿瘤基因治疗在实验室获得很好的效果, 但多数临床效果尚不能令人满意。有的学者认为原因如下: (1) 多数治疗仅插入单一目的基因(2)

载体缺乏靶向性(3)载体转染效率、安全性以及可插入外源基因容量等还存在问题。鉴于此种考虑,本研究选用了腺病毒5型为载体,根据其具较其他载体病毒更易于培养及纯化,重组后理化性质较稳定,宿主范围广,转染效率高,且病毒DNA一般存在于细胞染色体外,整合突变致癌的可能性小的特点而构建了含自杀基因CD和内皮抑素基因ES的双基因重组腺病毒rAdCDES,其中CD基因的产物为胞嘧啶脱氨酶可使胞嘧啶转化为尿嘧啶,因而可使无细胞毒性的抗真菌药物5-氟胞嘧啶(5-FU)转化成对细胞有毒性的5-氟尿嘧啶(5-FU)而杀死肿瘤细胞^[46]。而新生血管的形成对肿瘤的生长,浸润和转移有重要意义,ES基因的产物为内皮抑素,其能特异性抑制内皮细胞增生、转移和新生血管的生成,是最近发现的最具潜力的抗肿瘤新生血管形成抑制剂^[79]。设想如将rAdCDES导入瘤体后其表达产物既能杀伤肿瘤细胞又能阻断肿瘤新生血管的形成,终止对肿瘤的营养和氧的供应,从而抑制肿瘤的生长及转移,全方位破坏瘤组织,达到更好的直接、间接双重的抑瘤和杀瘤的效果。研究结果表明我们已成功构建了rAdCDES,且融合rAdCDES同时具有CD和ES的生物学功能。rAdCDES/5-FU系统对体外培养的人MCF-7乳腺癌细胞和体内小鼠乳腺癌MA737细胞有明显的生长抑制作用($P < 0.01$),体外对人MCF-7细胞的抑制率平均达83%,且rAdCDES抑制作用比rAdLacZ要强的多($P < 0.01$)。体内小鼠乳腺癌MA737细胞可以看到经AdCDES/5-FU系统处理后表现出肿瘤生长均有延迟,中位生存期延长,证明了rAdCDES有明显抑制体内乳腺癌细胞生长作用。

图6 各组小鼠平均中位生存期比较

Fig. 6 Comparison of survival days of different groups

在肿瘤的常规治疗中,放疗是一不可缺失的手段。

据统计,在所有肿瘤患者中,约65%~75%需要进行放疗^[10]。而放疗的原则应是给瘤体局部足够的辐射剂量,而尽可能减轻正常组织的局部和全身损伤,但治疗肿瘤的有效剂量往往造成严重的正常组织损伤,且有些肿瘤对辐射不敏感或对辐射产生抗性而不能根治^[11],因此对放疗增敏剂的研究是肿瘤临床工作者的研究热点。以前所用增敏剂不尽人意,目前尚无法定药物。Shi等^[12]用腺相关病毒介导的重组鼠ES基因联合放疗人类结、直肠癌细胞系模型(H129),联合治疗组肿瘤生长延迟明显长于单独治疗组,证明其可以增强射线的抗肿瘤作用。而本研究中rAdCDES/5-FU系统对放疗的增敏作用也是明显的,第6组的中位生存期明显延长,是第1组的1.99倍,是第2组的1.56倍,是第5组的1.45倍。总之,第6组生存期与任意一组相比,差异均有统计学意义,因而可以认为第6组有较为满意的抑瘤效果是多种因素共同作用的结果。首先射线作用于肿瘤细胞的DNA使其断裂,导致肿瘤细胞死亡;其次是CD基因转化产生的5FU在肿瘤局部发挥直接杀伤作用,并能干扰发生断裂的DNA链的修复,从而发挥一定的放疗增敏作用;再次,ES基因表达产生的内皮抑素抑制肿瘤新生血管的形成,导致肿瘤细胞因缺乏营养物质而死亡,也能抑制肿瘤细胞的远端转移,并通过某种作用机制发挥放射增敏作用。这点从联合放疗的治疗组的疗效均优于任何单一治疗组,也证实了AdCDES/5-FU系统对放疗有肯定的增敏作用。

该项研究成功构建了rAdCDES,并证实融合rAdCDES同时具有CD和ES的各自生物学功能;rAdCDES/5-FU系统在体内对外对乳腺癌细胞有抑制作用;今后应继续在体内外做更多深入研究,如抑瘤作用与rAdCDES和5-FU用量的相关性等。另外也证实了rAdCDES对放疗有增敏作用,今后应进一步探讨联合使用放疗的最佳时间、剂量,以及何种形式的基因对放疗增敏作用强弱的比较。相信随着研究的不断深入,基因治疗与放射治疗的理想结合可望为恶性肿瘤治疗提供新思路、新方法,新途径。

[参考文献]

- [1] He TC, Zhou S, da Costa LT, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [2] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995, 156-158.
- [3] Alfieri AA, Hahn EW. An *in situ* method for estimating cell survival in a solid tumor[J]. Cancer Res, 1978, 38(9): 3006-3011.

- [4] Deonarain MP, Spooner RA, Epenetos AA. Genetic delivery of enzymes for cancer therapy[J]. *Gene Ther*, 1995, 2(4): 235-244.
- [5] Mullen CA. Metabolic suicide genes in gene therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 1994, 63(2): 199-207.
- [6] Hirschowitz EA, Ohwada A, Pascal WR, *et al.* *in vivo* adenovirus-mediated gene transfer of the *E. coli* cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine[J]. *Hum Gene Ther*, 1995, 6(8): 1055-1063.
- [7] Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin *in vivo* results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(9): 4802-4807.
- [8] Hohenester E, Sasaki T, Mann K, *et al.* Variable zinc coordination in endostatin[J]. *J Mol Biol*, 2000, 297(1): 1-6.
- [9] 李菲, 李冬田. 内皮抑素抗肿瘤作用研究进展[J]. *天津医科大学学报*, 2002, 8(增刊): 67-68.
- [10] 殷蔚伯, 古钺之, 主编. *肿瘤放射治疗法*[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002.
- [11] 刘树铮. 恶性肿瘤放射治疗的新思考[M]. *中国实验诊断学*, 2001, 5(3): 143-144.
- [12] Shi W, Teschendorf C, Muzyczka N, *et al.* Gene therapy delivery of endostatin enhances the treatment efficacy of radiation[J]. *Radiother Oncol*, 2003, 66(1): 1-9.
- [收稿日期] 2004-09-28 [修回日期] 2005-05-01
[本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

TLR 同源分子 RP105 对 TLR4 信号通路的负向调控作用

Toll 样受体(Toll-like Receptors, TLRs)识别病原微生物的保守配基以激活机体的免疫应答是诱导抗感染免疫的关键,但是这样的反应需要在机体精细地调控。TLRs 信号及其负调控分子的研究是当前免疫学研究的热点。RP105 蛋白最早发现是 B 细胞所特有的 TLR 同源体,活化后可诱导 B 细胞增殖。与其它 TLRs 不同,其分子胞内段缺乏可磷酸化的保守酪氨酸位点。但 RP105 分子在抗原递呈细胞上(antigen presenting cell, APC)的表达及其功能目前并不十分清楚。

该研究发现,人的单核细胞和骨髓来源的树突状细胞(dendritic cells, DCs)上均有 RP105 蛋白的表达,同时这些细胞也表达 TLR4。但是,在不表达 TLR4 的人 pDC 上不表达 RP105 蛋白。在 小鼠,表达 TLR4 的腹腔巨噬细胞、脾脏 DCs 以及骨髓来源的 DCs 上都可检测出 RP105 的表达。因此,RP105 分子不是 B 细胞所特有的,它在 APC 上的表达与 TLR4 密切相关。

体外,瞬时转染实验表明 LPS 可刺激外源高表达 TLR4-MD-2 的 HEK293 细胞分泌 IL-8,却不能活化高表达 RP105-MD-1 复合物的 HEK293 细胞产生 IL-8。因此 LPS 不能通过 RP105-MD-1 传递活化信号。但是进一步研究发现,RP105-MD-1 的表达能显著抑制 LPS 诱导 IL-8 的产生,且与其抑制细胞的 NF- κ B 转录活化相关。同时在 HEK293 细胞上也验证了 RP105 蛋白对 TLR4 信号的抑制作用需依赖 MD-1 存在。RP105 不抑制 IL-1 或 TLR2 激活细胞产生的 IL-8,提示 RP105 蛋白是 TLR4 通路特异的负调控分子。

为确定 RP105 发挥作用的功能域,作者合成了仅含胞外段的可溶性 RP105 突变体,共表达 MD-1 和 RP105 蛋白胞外段也能充分地抑制 TLR4 信号通路,即 RP105 主要通过其胞外段来负向调控 TLR4 信号通路。TLR4-MD-2 与 RP105-MD-1 能相互作用形成复合体,其中 MD-1 可直接与 MD-2 结合,提示 RP105-MD-1 和 TLR4-MD-2 的结合主要是通过 MD-1 和 MD-2 间的直接作用。用生物素标记的 LPS 进行免疫沉淀,发现 RP105-MD-1 可抑制 LPS 与 TLR4-MD-2 地结合,从而阻断 LPS 的活化效应。此外,利用 RP105 缺陷型小鼠,该研究发现,LPS 刺激 RP105 缺陷型小鼠来源的 Dcs 所产生的 TNF- α , IL-12, IL-6, IP-10 明显高于正常对照小鼠,进一步证实 RP105 可抑制 LPS 诱导的炎症反应。

体内实验发现,小剂量 LPS 腹腔注射,RP105 缺陷型小鼠血清中 TNF- α 的分泌水平明显高于正常小鼠;而腹腔注射大剂量 LPS,与正常小鼠相比,RP105 缺陷型小鼠也产生更强的内毒素毒性反应。因此,RP105 是一种对 LPS 起负向调控的生理性因子。

总之,RP105 通过抑制 LPS 结合 TLR4-MD-2,对 TLR4 信号通路起负向调控作用,有利于机体内稳态的保持。作为一种生理性、内源性的 TLR4 信号通路的抑制分子,RP105 将可能成为许多感染性疾病和自身免疫性疾病治疗的潜在新靶点。