

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0185-06

丁酸钠诱导 HT-29 结肠癌细胞凋亡及其对 *p53* 靶基因的调控

刘成霞¹, 张尚忠², 张孝卫³, 黄丽华³, 李铁军³, 张 静³, 王 兵³ (1. 滨州医学院附属医院消化科, 滨州 256603; 2. 山东大学齐鲁医院消化科, 济南 250012; 3. 山东省济南市医学科学研究所, 济南 250013)

[摘要] **目的:**分析丁酸钠对 HT-29 结肠癌细胞 *p53* 三个主要靶基因(*p21waf1*, *bax* 和 *gadd45*)的调控,并探讨其作用机制。**方法:**HT-29 细胞常规培养在含有和不含有丁酸钠的培养液中。分别用 MTT 和流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞增殖和细胞周期分布,通过形态学观察、亚 G_1 峰的检测和 AnnexinV-FITC 双标记观察细胞凋亡情况;RT-PCR 和 Western blot 分别检测丁酸钠对 *p21waf1*, *bax* 和 *gadd45* 三种基因 mRNA 和蛋白表达水平的影响。**结果:**丁酸钠以剂量和时间依赖的方式抑制 HT-29 细胞增殖和诱导凋亡,并阻滞细胞于 G_1 期。RT-PCR 和 Western blot 结果显示丁酸钠可以促进 *p21waf1* 和 *bax* 基因 mRNA 和蛋白的表达,而对 *gadd45* 基因的表达无明显影响。**结论:**2.5 mmol/L 以上浓度的丁酸钠可以抑制 HT-29 细胞增殖并诱导凋亡,该作用可能通过上调 *p21waf1* 和 *bax* 基因表达而实现。

[关键词] 丁酸钠; 结肠癌细胞; 细胞凋亡; *p53* 基因; *p21waf1*; *bax*

[中图分类号] R735.3 [文献标识码] A

Sodium butyrate induces apoptosis and regulates *p53* target genes in HT-29 colorectal cancer cells

LIU Cheng-xia¹, ZHANG Shang-zhong², ZHANG Xiao-wei³, HUANG Li-hua³, LI Tie-jun³, ZHANG Jing³, WANG Bing³ (1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China; 2. Department of Gastroenterology, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan 250012, China; 3. Ji'nan Institute of Medical Science, Ji'nan 250013, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory effects of sodium butyrate on *p53* target genes (*p21waf1*, *bax*, and *gadd45*) in HT-29 colorectal cancer cells and the related mechanisms. **Methods:** HT-29 cells were cultured in the absence or presence of sodium butyrate. The cell proliferation and cell cycle were studied by MTT and FCM, respectively. Apoptosis was assessed by observing cell morphology, percentage of sub- G_1 cells and AnnexinV-FITC. The effects of sodium butyrate on transcription of *p21waf1*, *bax* and *gadd45* were analyzed by RT-PCR and Western blot. **Results:** Sodium butyrate inhibited proliferation and induced apoptosis of HT-29 cells in a time- and dose-dependent manner, and it blocked HT-29 cell at G_1 phase. Sodium butyrate stimulated *p21waf1* and *bax* expression both at mRNA and protein level in HT-29 cells, but had little effect on the transcription of *gadd45*. **Conclusion:** Sodium butyrate can inhibit proliferation and induce apoptosis of HT-29 cells, which might be through up-regulating *p21waf1* and *bax* expression both at mRNA and protein levels.

[Key words] sodium butyrate; colon cancer cell; cell apoptosis; *p53* gene; *p21waf1*; *bax*

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 185-190]

p53 基因是与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,但在 50% 以上人类肿瘤中可以检测到 *p53* 基因的突变,突变后的 *p53* 丧失其抑癌功能。如果某些化学物质或食物成分能调控 *p53* 靶基因的表达,那么这些物质或许能够补偿 *p53* 的部分功能,起到预防肿瘤发生的作用。丁酸钠(sodium butyrate)是膳食纤维在肠道厌氧菌作用下产生的一种 4 碳短链脂肪酸(丁酸)的钠

盐。对丁酸钠的研究发现,丁酸钠可以通过不同的途径诱导多种肿瘤细胞的凋亡^[1-3]。本研究观察丁酸钠

[基金项目] 济南市科技局立项课题(济科合 2002 第 13 号)

[作者简介] 刘成霞(1965-),女,山东省滨州市,副教授,医学博士,主要从事大肠肿瘤的基础与临床方面的研究。
E-mail: bzlcx@yahoo.com.cn

对 HT-29 结肠癌细胞的作用及对 *p53* 三个重要靶基因 *p21waf1*, *bax* 和 *gadd45* 的调控,旨在进一步探讨其抗肿瘤机制,为丁酸钠作为化学预防剂对人类大肠癌的预防研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要药物和试剂

丁酸钠 (Sigma) 用 0.1 mol/L 磷酸盐溶液 (PBS) 配制成 0.4 mol/L 的储存液 (pH 7.2), 冰盒保存备用。MTT (Sigma): 用 0.1 mol/L PBS 配制成 5 mg/ml 的应用液, 冰盒保存备用。AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒 (晶美生物有限公司)。引物由上海博亚生物公司合成。P21waf1 鼠单克隆抗体 SC-6246、Gadd45 兔多克隆抗体 SC-797、Bax 兔多克隆抗体 SC-493 均为 SantaCraze 产品。羊抗小鼠二抗、羊抗兔二抗均购自北京中山生物有限公司。

1.2 细胞培养

结肠癌细胞株 HT-29 购自山东省医学科学院细胞培养室, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640, 在 37°C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中常规培养。

1.3 MTT 试验检测细胞活力绘制生长曲线

收集对数生长期的 HT-29 细胞, 0.25% 的胰蛋白酶消化, 以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液调细胞密度为 5×10^4 /ml, 加到 96 孔板内, 每孔加入 200 μ l。培养 24 h 后, 实验组加入不同浓度的丁酸钠, 使孔内丁酸钠终浓度分别为 1.25、2.5、5、10 mmol/L。对照组分别加入等量的 PBS。同时设只加培养液不加细胞的空白对照。每个浓度、时间接种 8 个复孔。经丁酸钠处理 12、24、48、72 h 后, 每孔加入 MTT 20 μ l, 37°C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中继续培养 4 h, 吸弃上清, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μ l, 振荡 10 min, 使各孔结晶充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的光密度值, 以时间为横轴, 光密度值为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

1.4 扫描电镜观察 HT-29 细胞形态和超微结构变化

收集细胞接种于内置盖玻片的 24 孔板内, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 孔内分别加入丁酸钠 (终浓度 5 mmol/L) 和等量 PBS, 继续培养 24 h, 取出长有细胞的盖玻片, 经 3% 的戊二醛前固定和 1% 的四氧化锇后固定 1 h, PBS 冲洗, 乙醇梯度脱水, 醋酸异戊酯置换, CO₂ 临界点干燥、粘托、喷金, JSM-T300 扫描电镜 15 000 V 电压观察。

1.5 流式细胞仪分析细胞周期

细胞培养同前。收集不同浓度丁酸钠作用 0、24、48、72 h 的细胞, 70% 的冰乙醇固定, -20°C 过夜。调

整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 加入碘化丙啶染色液 1 ml, 室温避光染色 30 min, 流式细胞仪检测各组细胞 DNA 含量的变化。应用细胞周期分析软件计算出细胞各时相分布的百分比。

1.6 Annexin-V/PI 检测细胞凋亡

按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明操作。离心收集 5×10^5 个细胞后, 悬浮于 500 μ l 的结合缓冲液中, 加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 和 5 μ l 的 PI, 室温避光孵育 5 min, 上机分析。

1.7 RT-PCR 检测 *p53* 三个主要靶向基因的 mRNA 表达

按照产品说明书, 分别提取经 5 mmol/L 丁酸钠作用 0、24、48 h 的 HT-29 细胞的总 RNA, 取 5 μ g RNA 进行逆转录反应合成 cDNA。以 β -actin 为内参照, 分别取 3 μ l 模版进行 PCR 反应。各取上述 PCR 产物 10 μ l 上样, 1.2% 的琼脂糖凝胶, 105 V 电泳 20 ~ 30 min, 将电泳条带用捷达 801 专业数码凝胶成像与分析系统 3.3 软件进行分析, 比较 *p21waf1*、*gadd45*、*bax* 和 β -actin 扩增条带的灰度值。

1.7.1 逆转录反应体系及条件 OligodT 1 μ l、0.1 mol/L DTT 2 μ l、5 \times Buffer 4 μ l、10 mmol/L dNTP 1 μ l、样品 RNA 1 μ g、逆转录酶 1 μ l、DEPC H₂O 8 μ l、4°C 离心 10 min (12 000 r/min), 置于 PCR 仪, 37°C 1 h; 4°C 保存备用。

1.7.2 引物序列 *p21waf1* (497 bp): 上游: GGAT-TACTTGGCCCTCTTGG; 下游: ATGTCAGAACCCGGAT-GCTGGG。*gadd45* (500 bp): 上游: ATGACTTTGGAG-GAATTCTCGG; 下游: CCATCACCGTTCAGGGAGATA。*bax* (656 bp): 上游: TCAGACACGTAAGGAAAACGC; 下游: TGGACGGGTCCGGGGAGCAGC。 β -actin (317 bp): 上游: TCATGTTTGGAGACCTTCAAA A; 下游: CATCTCT-TGCTCGAAGTCCA。

1.7.3 RCR 反应体系 10 \times PCR Buffer 5 μ l、50 mmol/L MgCl₂ 4 μ l、10 mmol/L dNTP 1 μ l、Primer P1 0.5 μ l、P2 0.5 μ l、Tag 1 μ l、cDNA 3 μ l、DEPC H₂O 35.5 μ l、4°C 离心 10 min (12 000 r/min), 置 PCR 仪。

1.7.4 PCR 反应条件 *p21waf1*: 94°C 5 min、34 \times (94°C 1 min、58°C 1 min、72°C 1 min)、72°C 7 min; *gadd45*: 94°C 5 min、34 \times (94°C 1 min、58°C 1 min、72°C 1 min)、72°C 7 min; *bax*: 94°C 5 min、34 \times (94°C 1 min、56°C 1 min、72°C 1 min)、72°C 7 min; β -actin: 94°C 5 min、34 \times (94°C 1 min、58°C 1 min、72°C 1 min)、72°C 7 min。

1.8 Western blot 检测 *p53* 三个主要靶向基因的蛋白表达

分别提取经 5 mmol/L 丁酸钠作用 0、24 和 48 h 后 HT-29 细胞的总蛋白及核蛋白, MULTISKAN 酶标仪、562 nm 测定蛋白浓度后,取 50 μ g 蛋白上样, SDS-PAGE 40 ~ 60 min(105 V), 30 mA 电流转膜 4 h, 5% 的脱脂牛奶封闭 3 ~ 4 h, 加一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜后加二抗, 室温孵育 1 h, DAB 显色。捷达 801 专业数码凝胶成像系统 3.3 拍照。

1.9 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件对数据进行 *t* 检验分析, 以 $P < 0.05$ 判定为有统计学差异。

2 结果

2.1 丁酸钠作用致 HT-29 细胞形态学变化

丁酸钠作用 24 h 时用倒置显微镜观察 HT-29 细胞形态学变化。丁酸钠 1.25 mmol/L 浓度组, 细胞形态无明显变化, 细胞生长活跃, 可见处于不同分裂期的细胞。5 mmol/L 浓度组, 近 1/3 的细胞固缩变成圆形, 脱壁, 漂浮于培养液中。10 mmol/L 浓度组, 约超过半数的细胞脱壁漂浮, 并出现核碎裂和凋亡小体。

2.2 丁酸钠对 HT-29 细胞增殖的影响

MTT 实验显示, 与对照组相比, 2.5 mmol/L 以上丁酸钠浓度组对 HT-29 细胞生长的抑制呈现浓度、时间依赖性 ($P < 0.01$) (图 1)。

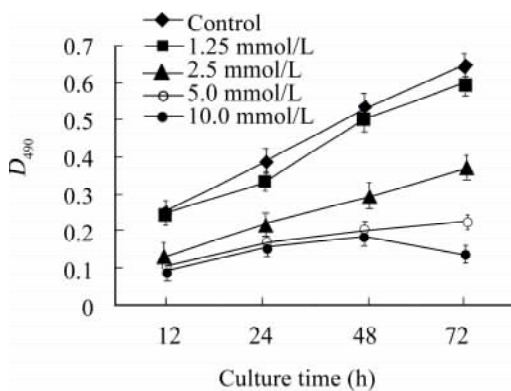


图 1 不同浓度丁酸钠对 HT-29 细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of sodium butyrate at different concentrations on growth curves of HT-29 cells

2.3 丁酸钠对 HT-29 细胞周期分布的影响

经丁酸钠 1.25 mmol/L 作用 48 h, G_0/G_1 期细胞比例与对照组无明显区别 ($t = 1.818, P = 0.086 > 0.05$)。随着丁酸钠浓度的升高, 越来越多的 HT-29 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期(与对照组比较 $P < 0.05, P < 0.01$, 表 1); 同时, HT-29 细胞的 G_0/G_1 期阻滞随丁酸钠作用时间的延长而更加明显。

表 1 不同浓度丁酸钠作用 48 h 后 HT-29 细胞周期的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Effects of sodium butyrate concentration on growth cycle of HT-29 cells after 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Sodium butyrate (mmol/L)	Growth cycle(%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	51.28 \pm 4.92	29.96 \pm 2.07	18.76 \pm 5.16
1.25	54.92 \pm 3.99*	21.03 \pm 1.12	24.05 \pm 4.38
2.5	67.08 \pm 3.65*	10.47 \pm 0.98*	22.45 \pm 4.23
5	85.49 \pm 3.63**	6.05 \pm 0.25**	8.46 \pm 3.82*
10	91.88 \pm 2.61**	5.04 \pm 0.17**	3.18 \pm 2.58**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

2.4 丁酸钠诱导 HT-29 细胞凋亡

2.4.1 电镜观察 扫描电镜观察到, 丁酸钠 2.5 mmol/L 以上浓度作用 24 h 后, 细胞形态开始发生变化, 主要表现为细胞固缩, 细胞表面细长的微绒毛足突减少或消失; 待培养至 48 h, 细胞表面的微绒毛卷曲成小球状, 并可见凋亡小体的形成(图 2)。

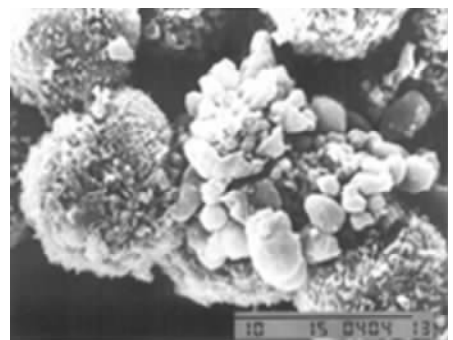


图 2 5 mmol/L 丁酸钠作用 48 h 致 HT-29 细胞凋亡 ($\times 4 600$)

Fig. 2 Apoptosis of HT-29 cells affected by 5 mmol/L sodium butyrate after 48 h ($\times 4 600$)

2.4.2 流式细胞仪检测 HT-29 细胞亚 G_1 峰 通过流式细胞仪对细胞 DNA 含量进行检测, 可以发现位于 G_0/G_1 期前的凋亡峰。对照组和 5 mmol/L 丁酸钠组的 HT-29 细胞, 分别培养 24、48、72 h, 通过亚 G_1 峰检测其凋亡率分别为 (6.22 \pm 0.32)% 和 (30.68 \pm 3.37)%、(12.00 \pm 1.21)% 和 (34.60 \pm 1.83)%、(14.31 \pm 1.17)% 和 (41.88 \pm 3.97)% , 有显著差异 ($P < 0.01$)。本实验各其他浓度组凋亡率较对照组均明显升高 ($P < 0.01$) (图 3)。

2.4.3 Annexin-V/PI 检测 HT-29 细胞凋亡 培养 24

h 后, Annexin-V/PI 检测到, 对照组早期凋亡细胞占 1.79%, 晚期凋亡细胞占 4.21%, 总凋亡率为 6.00%。5 mmol/L 丁酸钠组早期凋亡细胞占 12.53%, 晚期凋亡细胞占 19.81%, 总凋亡率为 32.34%。两组差异有显著性 ($t = 22.811, P < 0.01$) (图 4)。

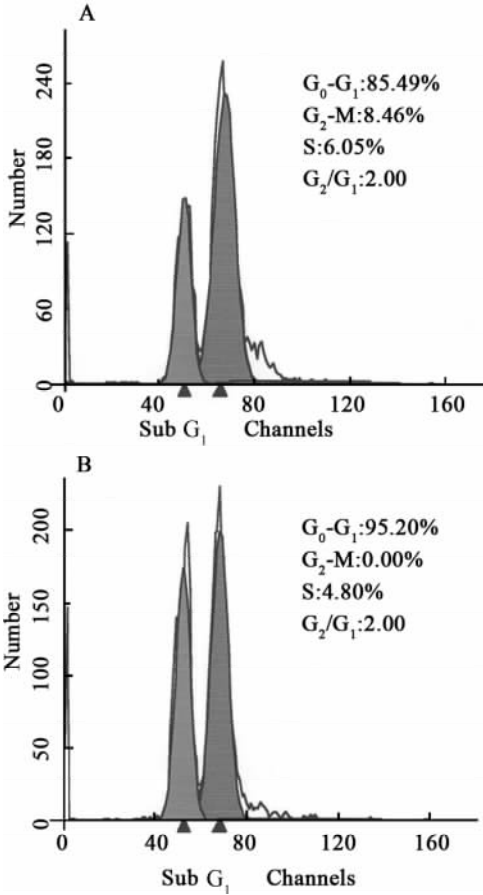


图 3 5 mmol/L 丁酸钠作用 24h (A)、72h (B)HT-29 细胞的 DNA 含量分布图

Fig. 3 DNA contents of HT-29 cell treated by 5 mmol/L sodium butyrate after 24 h (A) and 72 h (B), respectively

2.5 丁酸钠作用对 p53 三个主要靶向基因 mRNA 表达的影响

丁酸钠可以明显促进 HT-29 细胞 *p21 waf1* 和 *bax* mRNA 的表达, 这种作用呈现出浓度、时间依赖性, 但对 *gadd45* 表达的影响不明显(图 5)。

2.6 丁酸钠作用对 p53 三个主要靶向基因编码的蛋白表达水平的影响

丁酸钠可以促进 HT-29 细胞 P21 waf1 和 Bax 蛋白的表达, 其中对 P21 waf1 蛋白的表达影响更明显。这种作用也呈现浓度时间依赖性。未检测到 Gadd45 蛋白的表达(图 6)。

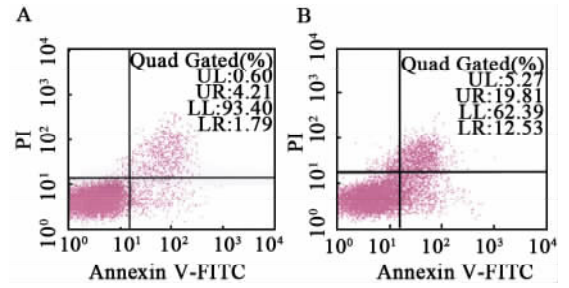


图 4 Annexin-V/PI 双染法检测对照组 (A) 和 5 mmol/L 丁酸钠组 (B) 培养 24h 后 HT-29 细胞的凋亡率

Fig. 4 Apoptosis rate of HT-29 cells in 5 mmol/L sodium butyrate group (B) compared with control group (A) 24 h after Annexin-V/PI staining

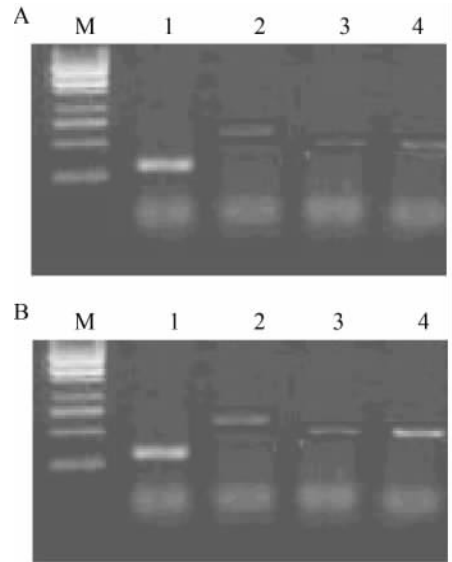


图 5 对照组 (A) 和 5 mmol/L 丁酸钠组 (B) 实验 48 h *p21 waf1*, *bax* 和 *gadd45* 的 mRNA 表达水平

Fig. 5 Expression of *p21 waf1*, *bax* and *gadd45* mRNA in control group (A) and 5 mmol/L sodium butyrate group (B) after 48 h

M: Marker; 1: β -actin; 2: Bax; 3: Gadd45; 4: P21 waf1

3 讨论

本研究发现 2.5 mmol/L 以上浓度的丁酸钠可以明显抑制 HT-29 细胞的生长, 并将其阻滞在 G₀/G₁ 期, 与 Nakano^[4], Heerdt^[5] 和 Miyake^[6] 的研究结果相似。研究也从不同的层次观察丁酸钠对 HT-29 细胞凋亡的影响, 扫描电镜观察到丁酸钠作用后 HT-29 细胞的形态学变化, 流式细胞仪检测到明显的 Sub G₁ 凋亡峰, Annexin-V/PI 双染色更敏感、更直观地观察到细胞凋亡的分布情况, 得出与 Hague^[7] 相似的结论。

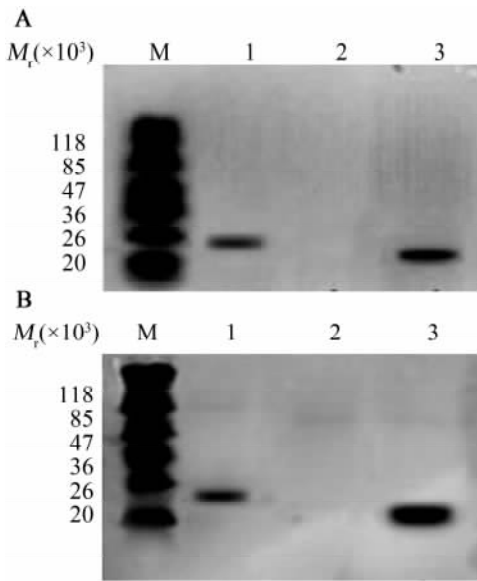


图6 对照组 (A)和丁酸钠组 (B)实验 48 h P21 waf1, Bax 和 Gadd45 的蛋白表达水平
Fig. 6 Expression of P21 waf1, Bax and Gadd45 protein in control group (A) and 5mmol/L sodium butyrate group (B) after 48 h
M: Marker; 1: Bax; 2: Gadd45; 3: P21 waf1

P21 waf1 作为细胞周期依赖性蛋白 (cyclin-dependent kinase, CDK) 的抑制剂,在细胞周期的调控中起着重要作用。本研究用带有突变 p53 的 HT-29 结肠癌细胞株进行实验,发现丁酸钠可以诱导 HT-29 细胞 p21 waf1 的表达,与 Archer^[8]、Siavoshian^[9]的研究结果一致。推测丁酸钠通过诱导 HT-29 细胞 p21 waf1 的表达,使细胞停滞在 G₀/G₁ 期,并由此抑制细胞增生是其抗肿瘤作用的重要机制之一。

bax 是最重要的促凋亡基因之一,但目前有关丁酸钠对 bax 基因调控及 bax 在丁酸钠诱导的细胞凋亡中作用的研究结果不尽一致。在对葡萄膜黑色素瘤 UM 细胞^[10]、人胶质瘤细胞 T98G、U251MG、U877MG 细胞^[11]的研究中均未观察到丁酸钠对 bax 表达的影响。本研究采用 RT-PCR 和 Western blot,在 HT-29 细胞中检测到丁酸钠作用前后 HT-29 结肠癌细胞 bax 基因 mRNA 表达和蛋白表达变化,得出与 Menzel^[12]、Levy^[13]、Yan^[14]相似的结论,提示诱导肿瘤细胞凋亡可能是丁酸钠发挥抗肿瘤作用另一重要机制。

gadd45 基因是 DNA 修复基因^[15]。作为 p53 的下游调控基因,gadd45 在抑制细胞生长、参与细胞周期监测点调控等多种细胞活动中起重要作用。如 Maeda 等^[16]研究发现,角化细胞在紫外线照射下,gadd45 通过激活 cdc2 基因促进 G₂/M 期生长停滞,提高基因组

DNA 修复,对提高基因组的完整性起重要作用。这与 Song 等^[17]对乳腺癌细胞株 BRCA1 的研究结论一致。本研究应用 RT-PCR 未检测到 HT-29 细胞 gadd45 的 mRNA 表达,经 5 mmol/L 丁酸钠作用 48 h 后,只检测到微弱的 gadd45 mRNA 表达,但 Western blot 未检测到 Gadd45 蛋白。由此推测,在丁酸钠诱导的 HT-29 细胞的生长抑制、细胞周期的 G₁ 期停滞和细胞凋亡的过程中,gadd45 可能不发挥作用。但是目前有关丁酸钠与 gadd45 关系研究报道较少,有必要继续研究两者之间的相互作用,进一步探索丁酸钠的抗肿瘤机制。

综上所述,本研究的结果表明丁酸钠可以明显抑制结肠癌 HT-29 细胞的增生,促进凋亡,并可导致 HT-29 细胞的 G₁ 期生长阻滞。这些作用呈现出明显的浓度、时间依赖性。丁酸钠对 HT-29 细胞的生物学作用可能与其上调 p21 waf1 和 bax 基因的表达有关。有关丁酸钠和 gadd45 基因的关系尚需继续深入研究。

[参考文献]

- [1] Wilson AJ, Arango D, Mariadason JM, et al. TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis [J]. Cancer Res, 2003, 63(17): 5401-5407.
- [2] Rueemle FM, Schwartz S, Seidman EG, et al. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway [J]. Gut, 2003, 52(1): 94-100.
- [3] Inoue H, Shiraki K, Ohmori S, et al. Histone deacetylase inhibitors sensitize human colonic adenocarcinoma cell lines to TNF-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis [J]. Int J Mol Med, 2002, 9(5): 521-525.
- [4] Nakano K, Mizuno T, Sowa Y, et al. Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line [J]. J Biol Chem, 1997, 272(35): 22199-22206.
- [5] Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function [J]. Cell Growth Differ, 1997, 8(5): 523-532.
- [6] Miyake H, Hara S, Arakawa S, et al. Overexpression of Bcl-2 regulates sodium butyrate and/or docetaxel-induced apoptosis in human bladder cancer cells both in vitro and in vivo [J]. Int J Cancer, 2001, 93(1): 26-32.
- [7] Hague A, Elder DJ, Hicks DJ, et al. Apoptosis in colorectal tumor cells: Induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate [J]. Int J Cancer, 1995, 60(3): 400-406.
- [8] Archer SY, Meng S, Shei A, et al. p21 (WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(12): 6791-6796.
- [9] Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, et al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation and differentiation of human in-

- testinal epithelial cells: Induction of cyclin D3 and p21 expression [J]. Gut, 2000, 46(4): 507-514.
- [10] Klisovic DD, Katz SE, Efron D, *et al.* Depsipeptide (FR901228) inhibits proliferation and induces apoptosis in primary and metastatic human uveal melanoma cell lines [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(6): 2390-2398.
- [11] Sawa H, Murakami H, Ohshima Y, *et al.* Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein bad [J]. Brain Tumor Pathol, 2001, 18(2): 109-114.
- [12] Menzel T, Schaubert J, Kreth F, *et al.* Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells [J]. Eur J Cancer Prev, 2002, 11(3): 271-281.
- [13] Levy P, Robin H, Bertrand F, *et al.* Butyrate-treated colonic Caco-2 cells exhibit defective integrin-mediated signaling together with increased apoptosis and differentiation [J]. J Cell Physiol, 2003, 197(3): 336-347.
- [14] Yan J, Xu YH. Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 660-664.
- [15] Zhu RL, Graham SH, Jin J, *et al.* Kainate induces the expression of the DNA damage inducible gene: GADD45, in the rat brain [J]. Neuroscience, 1997, 81: 707-720.
- [16] Maeda T, Hanna AN, Sim AB, *et al.* Gadd45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and death in keratinocytes following ultraviolet exposure [J]. J Invest Dermatol, 2002, 119(1): 22-26.
- [17] 宋咏梅, 童形, 付明, 等. Gadd45 介导抑癌基因 BRCA1 诱导的 G₂/M 期阻滞 [J]. 癌症, 2004, 23(5): 517-521.
- [收稿日期] 2006-02-13 [修回日期] 2006-05-10
[本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

自然杀伤细胞介导的 T 细胞与 B 细胞非依赖性适应性免疫

针对感染性或损害性因素的免疫反应一般分为固有性免疫和适应性免疫两种。固有性免疫的特点是反复暴露于相同的攻击并不会改变随即出现的免疫反应的性能。相比而言,针对先前遭遇的攻击的适应性免疫反应与首次遭遇相比在质量上和(或)数量上有所增强。而且,适应性免疫反应还具有抗原特异性和丰富的多样性,其多样性是在淋巴细胞发育中由重排激活基因(*Rag1* 和 *Rag2*)编码的蛋白质协同作用产生的 *V*、*D*、*J* 基因随机重排引起,从而产生大量抗原特异性的 T 细胞和 B 细胞。初始 T 细胞对病原相关抗原的免疫启动需要与次级淋巴器官内特异的抗原提呈细胞相遇并促发大量 T 细胞增殖,随后获得 T 细胞效应功能。效应 T 细胞部分变成长期存在的对再次感染抵抗增强的记忆性 T 细胞。由于只有 T 细胞和 B 细胞具备抗原受体基因体细胞重排的部件,一般认为适应性免疫严格依赖于 T 细胞和 B 细胞的存在。这种观点已经受到了非脊椎动物上的研究结果的挑战。然而,目前没有任何证据表明在哺乳动物中 T 细胞和 B 细胞外的任何细胞可介导适应性免疫反应。基于此,作者采用适应性免疫的经典实验模型,即半抗原诱导的接触性过敏反应,发现半抗原诱导的接触性过敏反应并非严格依赖于 T 细胞和 B 细胞,而可被致敏的 T 细胞和 B 细胞缺陷小鼠肝脏内一种自然杀伤细胞亚群所独立介导。该发现对传统观念提出了严重的挑战。

该研究发现,与野生型小鼠类似, *Rag2*^{-/-} 小鼠(T 细胞和 B 细胞缺陷小鼠)可激发接触性过敏反应,这种反应具备适应性免疫的所有功能特点,即需要预先致敏、抗原特异性和持久的记忆性。炎症组织细胞分析发现小鼠致敏后半抗原激发可诱导快速及确切的 NK 细胞积聚。随后采用 NK 细胞缺陷的小鼠及 NK 细胞相关抗体处理的研究发现, NK 细胞可介导 T 细胞非依赖的接触性过敏反应。进一步采用过继转移的方法,发现致敏的 *Rag2*^{-/-} 小鼠肝脏 NK 细胞可有效介导未致敏的 *Rag2*^{-/-} *IL2rg*^{-/-} 受体鼠(T 细胞、B 细胞及 NK 细胞缺陷小鼠)激发接触性过敏反应,而且这些肝脏 NK 细胞主要是 *Ly49C-I*⁺ 的 NK 细胞亚群,但是脾脏 NK 细胞没有相应的功能。最后该研究发现 NK 细胞介导的适应性免疫的机制分别是在致敏期 L-选择素可参与 NK 细胞介导的接触性过敏反应,而在激发期 P-选择素、E-选择素及 NK 细胞激活性受体 *NKG2D* 可参与 NK 细胞介导的接触性过敏反应。

总之,该研究已确定了 NK 细胞一种先前不为人知的功能,即介导半抗原特异性免疫。NK 细胞所介导的这种出人意料的功能表现为一种可维持数周且能够精巧地区分不同半抗原的具有记忆性的免疫反应。由此, NK 细胞介导的接触性过敏反应具备适应性免疫的三个基本特征:获得性、长期存在的记忆性以及抗原特异性。尽管有几个研究已经表明在低等动物中固有免疫系统能够产生获得性免疫反应,但该研究是在高等脊椎动物中 T 细胞和 B 细胞非依赖型的适应性免疫反应的首次报道。