

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0457-05

· 论 著 ·

抑制端粒酶活性对 As₂O₃ 诱导肝癌细胞凋亡的影响

邓志华, 韩子岩, 王琦, 师水生(山西医科大学附属第二医院消化科, 太原 030002)

[摘要] **目的:** 观察端粒酶反义寡核苷酸、As₂O₃ 对肝癌细胞生长的影响, 寻找低剂量、低毒、高效、安全的抗肝癌新疗法。**方法:** 自行设计合成靶向端粒酶模板区的 20 nt 硫代反义寡核苷酸, 观察端粒酶反义寡核苷酸与 As₂O₃ 对肝癌细胞端粒酶活性的影响及两者协同对肝癌细胞生长的影响, 采用 H-E 染色、流式细胞仪及 DNA 琼脂糖凝胶电泳观察端粒酶反义寡核苷酸与 As₂O₃ 对肝癌细胞的凋亡诱导作用, 以流式细胞术检测肝癌细胞的 Fas、Fas-L、bcl-2 蛋白的表达。**结果:** 5 μmol/L 的端粒酶反义寡核苷酸作用 24h 可显著抑制肝癌细胞端粒酶活性 ($P < 0.01$); 肝癌细胞端粒酶活性被抑制后对 As₂O₃ 诱导凋亡的敏感性显著增加, 表现为低浓度、短时间即可诱导肝癌细胞凋亡 ($P < 0.01$), 端粒酶反义寡核苷酸与 As₂O₃ 对肝癌细胞的凋亡诱导作用是通过 Fas、Fas-L 途径实现的。**结论:** 抑制肝癌细胞端粒酶活性可显著增强其对 As₂O₃ 诱导凋亡的敏感性, 减少砷剂用量, 两者协同有潜在的临床应用前景。

[关键词] 端粒酶; 反义寡核苷酸; As₂O₃; 肝癌细胞; 凋亡

[中图分类号] R331 **[文献标识码]** A

Effect of telomerase-antisense DNA on apoptosis of hepatoma cells induced by arsenic trioxide

DENG Zhi-hua, HAN Zi-yan, WANG Qi, SHI Shui-sheng (Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of telomerase-antisense DNA on apoptosis of hepatoma cells induced by arsenic trioxide, in an effort to look for a new anti-hepatic cancer agent with high efficiency, low cytotoxicity. **Methods:** We designed and synthesized a 20nt telomerase-antisense DNA targeting telomerase template and observed its influence on the telomerase activity of hepatoma cells. H-E staining, flow cytometry, and DNA agarose electrophoresis were used to study the preventive effect of telomerase-antisense DNA on hepatoma cells apoptosis induced by arsenic trioxide. Flow cytometry was used to detect the expression of Fas, Fas-L, and bcl-2. **Results:** Telomerase-antisense DNA (5 μmol/L) effectively inhibited the telomerase activity of hepatoma cells after 24 hours ($P < 0.01$). When telomerase activity was inhibited by telomerase-antisense DNA, the hepatoma cells became more sensitive to arsenic trioxide induced apoptosis, which was induced through Fas and Fas-L pathway. **Conclusion:** Inhibition of telomerase activity can obviously increase the apoptosis rate of hepatoma cells induced by arsenic trioxide, therefore reducing the quantity of the latter in treating HCC, indicating a future for the combined application of both in clinical practice.

[Key words] telomerase; antisense oligonucleotide; As₂O₃ hepatoma cell; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(6): 457-461]

80% ~ 90% 的肿瘤细胞(包括肝癌细胞)表达端粒酶活性, 而正常体细胞不表达。因此, 端粒酶激活不仅可作为肿瘤细胞的恶性特征而用于早期诊断及鉴别诊断, 而且靶向端粒酶的抑制剂有可能是一种特异地作用于肿瘤细胞而不影响正常细胞生长的新型抗肿瘤制剂^[1-3]。以前的研究发现, 一定浓度的 As₂O₃ 能通过诱导凋亡相关基因 Fas、Fas-L 表达诱导肝癌细胞凋亡^[4]。本研究进一步探讨端粒酶反义寡核苷酸对肝癌细胞端

粒酶活性的影响, 在此基础上观察 As₂O₃ 对肝癌细胞的凋亡诱导作用, 为砷剂及端粒酶反义制剂联合用于临床提供实验依据。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672405), 山西省青年科学基金(No. 20001028)

[作者简介] 邓志华(1963-), 女, 山西省大同市人, 医学博士, 主任医师, 主要从事肝癌的基因治疗研究

[通讯作者] 邓志华, Email: ykdzh@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中科院上海细胞生物技术研究所; As_2O_3 为 Sigma 公司产品, 相对分子质量为 197.84, 用 PBS 配成 $10 \mu\text{mol/L}$ 贮备液, 4°C 保存; 鼠抗人 Fas 单抗、抗人 Fas-L 单抗及相应的羊抗鼠二抗均购自 Immunotech 公司。DMEM 培养液、小牛血清、琼脂糖均为华美公司产品。端粒酶试剂为宝灵曼公司产品: (1) TRAP 反应细胞裂解液: 0.5% CHAPS, $10 \mu\text{mol/L}$ Tris-HCl (pH8.0), $1 \mu\text{mol/L}$ $MgCl_2$, $1 \mu\text{mol/L}$ EGTA, $0.1 \mu\text{mol/L}$ 苯甲基磺酰氟, $5 \mu\text{mol/L}$ 巯基乙醇, 10% 甘油。 (2) PCR 反应液: $20 \mu\text{mol/L}$ Tris-HCl (pH8.3), 5 mmol/L $MgCl_2$, 63 mmol/L KCl, 0.005% Tween-20, 1 mmol/L EGTA, $50 \mu\text{mol/L}$ dNTP, 0.1 mg TS 寡核苷酸, 序列为 $5'$ -AATCCGTCGAGCAGAGTT- $3'$, Taq 酶 2 U 、牛血清白蛋白 0.1 mg/ml , 0.03 mg CX 引物, 序列为 $5'$ -CCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA- $3'$ 。 (3) ELISA 试剂: ① 变性液: 0.5 mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl, ② 杂交液: 地高辛标记端粒探针, $20 \times$ SSC, 10% SDS, 5 mg/ml ssDNA (变性断裂鲑精)。③ 终止液 5% 硫酸; 抗地高辛过氧化物酶: 0.5 mg/ml ; TMB 底物液。 (4) 聚丙烯酰胺银染试剂: 氯仿-异戊醇 ($24:1$), $5 \times$ TBE, 3 mol/L 乙酸钠, 10% 过硫酸胺, 40% 聚丙烯酰胺。 (5) 银染试剂: 10% 乙酸, 10% 乙醇, 1% 硝酸, 硫代硫酸钠 (10 mg/ml), 硝酸银 ($AgNO_3$), 无水碳酸钠 ($NaCO_3$)。

1.2 端粒酶反义 DNA 的设计与合成

选择近端粒酶 RNA 模板区的 20 nt 为反义靶位, 美国 ABI 公司 391 DNA 合成仪合成与纯化, 纯度达 98% 以上。端粒酶反义 DNA 序列为: $3'$ -GTTAGGGT-TAGACAAAAAAT- $5'$ ($36 \sim 56$)。

1.3 端粒酶反义寡核苷酸及 As_2O_3 对肝癌细胞端粒酶活性的影响

1×10^6 SMMC-7721 肝癌细胞株培养于 Nunclon 24 孔板, 细胞 1×10^6 /孔, 培养液 1 ml (含 10% 热灭活小牛血清, 50 U/ml 青霉素, 50 mg/ml 链霉素), 培养条件为 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 。分别加入端粒酶反义 DNA 及 As_2O_3 , 终浓度前者为 $5 \mu\text{mol/L}$, 后者为 $1 \mu\text{mol/L}$, 不加药为对照组, 每一药物设 3 复孔, 作用时间分别为 $12, 24, 36, 48, 60 \text{ h}$ 。培养结束后以 0.25% 胰酶消化细胞, 冷 PBS 清洗 2 次, TRAP-ELISA 法定量测定端粒酶活性。

1.4 端粒酶反义寡核苷酸及 As_2O_3 协同作用对肝癌细胞生长及凋亡的影响

1×10^6 /孔 SMMC-7721 细胞与 $5 \mu\text{mol/L}$ 端粒酶反义 DNA 共育 24 h 后, 加入 As_2O_3 , 使终浓度为 $0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 \mu\text{mol/L}$, 培养不同时间; 以未加端粒酶反义 DNA 的相应浓度的 As_2O_3 为对照, 每一浓度设 3 复孔。H-E 染色、透射电镜观察细胞凋亡的形态学变化, 细胞 PI 染色流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.5 TRAP-PCR-ELISA 检测肿瘤细胞端粒酶活性

1.5.1 TRAP-PCR 取 1×10^6 培养肿瘤细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 加裂解液 $200 \mu\text{l}$ 混匀, 冰浴 120 min , $16\ 000 \times g$ 低温离心 20 min , 取上清 $175 \mu\text{l}$, 置液氮保存, 同时测蛋白含量。

细胞抽提液 $2 \mu\text{l}$, 加入 TRAP 反应液 $25 \mu\text{l}$, DEPC 水 $23 \mu\text{l}$, 混匀, 按以下步骤进行 PCR 扩增: 25°C 30 min , 94°C 5 min 循环 1 次; 再以 94°C 30 s , 50°C 30 s , 72°C 90 s 共循环 30 个周期, 72°C 延伸 10 min 。

1.5.2 端粒酶活性定性检测 (聚丙烯酰胺凝胶-银染法) PCR 产物加等量氯仿-异戊醇抽提, 乙酸钠、无水乙醇沉淀, 双蒸水溶解 DNA 后电泳硝酸银显色。

1.5.3 ELISA 端粒酶活性定量检测 取 PCR 产物 $5 \mu\text{l}$, 加变性液 $20 \mu\text{l}$ 室温作用 10 min , 加入杂交液 $225 \mu\text{l}$ 充分混匀, 取出 $100 \mu\text{l}$ 加入 MTP 包被的微量反应板中, 300 r/min 摇床 37°C 孵育 2 h , 弃杂交液, PBS 洗 3 次; 向每一孔加 $100 \mu\text{l}$ 抗地高辛过氧化物酶, 室温 20 min 后加终止液, 30 min 内在酶标仪上测 450 nm 、 690 nm 光密度值, 端粒酶活性等于 $D_{450} - D_{690}$, 该值 > 0.2 为阳性。

1.6 流式细胞仪检测肿瘤细胞 Fas、Fas-L、bcl-2 蛋白

1×10^6 细胞加 anti-Fas 或 anti-Fas-L 单抗 $20 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{g/ml}$), 非特异性同型 IgG (20 ml) 为阴性对照, 4°C 30 min , PBS 洗 2 次, 加 FITC-anti-鼠 IgM $20 \mu\text{l}$, 4°C 共育 30 min , PBS 洗 1 次, 加 PBS 0.5 ml 悬浮细胞进行 FCM 检测, 计数 $10\ 000$ 个细胞。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件包, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 、 χ^2 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 端粒酶反义寡核苷酸及 As_2O_3 对肝癌细胞端粒酶活性的抑制作用

由表 1 可以看出端粒酶反义寡核苷酸作用 24 h , 肝癌细胞端粒酶活性开始下降 ($P < 0.01$), 且酶活性的下降具有时间依赖性, 而 As_2O_3 对肝癌细胞端粒酶活性则无抑制作用。TRAP-ELISA-PAGE 银染法进行的端粒酶活性定性检测显示, 端粒酶阳性时出现 6 bp 递增的 Ladder (图 1)。

表 1 端粒酶反义寡核苷酸及 As₂O₃ 对肝癌细胞端粒酶活性的影响Tab. 1 Effect of anti-sense-telomerase oligonucleotide and As₂O₃ on HCC cell line telomerase activities($\bar{x} \pm s, D$)

Groups	Effective time(t/h)					
	0	12	24	36	48	60
Control	2.036 ± 0.009	2.026 ± 0.011	2.022 ± 0.015	2.007 ± 0.005	2.001 ± 0.011	2.007 ± 0.014
As ₂ O ₃	2.023 ± 0.012	2.012 ± 0.007	2.019 ± 0.018	2.201 ± 0.023	2.022 ± 0.010	2.052 ± 0.020
Anti-sense	2.010 ± 0.023	1.945 ± 0.044	1.269 ± 0.108**	0.463 ± 0.074**	0.107 ± 0.015**	0.003 ± 0.001**

** $P < 0.01$ vs control group; As₂O₃: 1 $\mu\text{mol/L}$; Anti-sense: Anti-sense-telomerase oligonucleotide 5 $\mu\text{mol/L}$

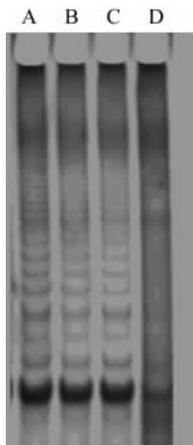


图 1 端粒酶反义寡核苷酸及 As₂O₃ 对肝癌细胞端粒酶活性的影响

Fig.1 Effect of anti-sense oligonucleotide targeted telomerase and As₂O₃ on HCC telomerase activities

A: Positive; B: Control; C: As₂O₃; D: Anti-sense

2.2 端粒酶反义寡核苷酸及 As₂O₃ 协同作用对肝癌细胞凋亡的影响

先以 5 $\mu\text{mol/L}$ 端粒酶反义 DNA 处理 SMMC-7721 细胞 24 h, 以抑制肝癌细胞端粒酶活性, 再用不同浓度 As₂O₃ 对癌细胞进行处理, 通过透射电镜可以观察到肝癌细胞形态呈现凋亡的特征性变化: 细胞变小、变圆、胞质浓缩、细胞核染色质浓缩边集、核碎裂形成凋亡小体(图 2)。在此过程中抽提 1×10^6 细胞的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳形成凋亡特征性梯形条带(图略)。流式细胞仪检测发现联合处理组与单独处理组相比细胞凋亡出现的时间明显提前, 细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$, 表 2)。

2.3 As₂O₃ 及端粒酶反义寡核苷酸对 Fas、Fas-L 及 bcl-2 蛋白表达的影响

SMMC-7721 表达 Fas 的基础阳性率为(19.86 ± 7.01)%, 不表达 Fas-L。1 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 作用 2 d, SMMC-7721 细胞 Fas 和 Fas-L 的阳性表达率分别为(41.1 ± 3.57)%、(10.78 ± 2.37)%, 而端粒酶反义

DNA + As₂O₃ 处理组 Fas 和 Fas-L 的阳性表达率为(52.2 ± 7.63)%、(18.92 ± 2.33)%, 显著高于单独应用 As₂O₃ 组($P < 0.01$)。SMMC-7721 表达 bcl-2 蛋白的基础阳性率为(38.25 ± 4.62)%, 1 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 作用 2 d, bcl-2 阳性率下降为(37.65 ± 6.33)%, 相同培养的不加药组为(39.60 ± 7.01)%, 两者相比差异无显著性($P > 0.05$); 端粒酶反义 DNA + As₂O₃ 组为(23.56 ± 4.38)%; 显著低于单独 As₂O₃ 处理组($P < 0.05$)。培养 4 d 时不加药组 bcl-2 的表达率为(38.72 ± 5.56)%, 单独 As₂O₃ 处理组下降至(20.30 ± 4.63)%, 两者相比差异有显著性($P < 0.01$); 端粒酶反义 DNA + As₂O₃ 组为(13.24 ± 2.43)%, 与单独 As₂O₃ 处理组相比差异有显著性($P < 0.01$)。同一浓度 As₂O₃ 作用不同时间 bcl-2 的表达随着药物作用时间的延长而下降。

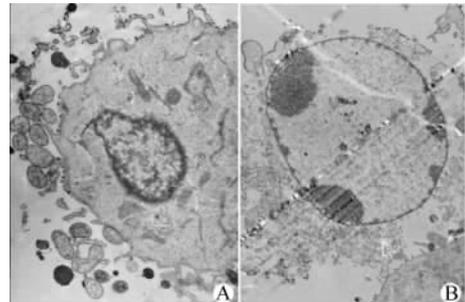


图 2 端粒酶反义寡核苷酸与 As₂O₃ 诱导肝癌细胞的凋亡(×4000)

Fig.2 Apoptosis induced by telomerase anti-sense-oligonucleotide and As₂O₃

A: Control; B: Anti-sense-oligonucleotide + As₂O₃

3 讨论

现有化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时对正常细胞特别是增殖活跃的细胞也具强烈的杀伤作用, 以致于许多患者因不能耐受化疗副作用而终止治疗^[5]。因此肿瘤治疗的理想药物应对肿瘤细胞具有最大的杀伤作

用而不影响正常细胞的生长。长期以来,肿瘤工作者在这方面一直进行着不懈的努力。

基础医学研究结果的进步给肿瘤治疗带来了新的希望。许多研究结果证实,肿瘤细胞表达端粒酶活性而正常体细胞不表达,这就为肿瘤靶向治疗提供了特异靶点,我们有理由尝试通过对肿瘤细胞端粒酶活性的抑制而达到靶向抑制肿瘤生长的目的^[6]。Komata

等^[7]用端粒酶抑制剂对神经胶质瘤细胞的恶性生物学特性进行研究,发现端粒酶活性被抑制后神经胶质瘤细胞对顺铂诱导凋亡的敏感性显著增加,即低剂量顺铂即可达到抑制神经胶质瘤细胞生长和诱导凋亡的作用;进一步体内研究显示,端粒酶活性被抑制后,低剂量、短疗程化疗可有效抑制神经胶质瘤体的生长,初步证明了靶向端粒酶抗肿瘤的体内外效果。

表 2 端粒酶反义寡核苷酸与 As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响(%)

Tab.2 Apoptosis rate after SMMC-7721 cells were treated with of As₂O₃ and anti-sense oligonucleotide (%)

Groups	Concentration of As ₂ O ₃ (c _B /μmol·L ⁻¹)				
	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0
As ₂ O ₃	5.0 ± 2.3	8.2 ± 3.4	17.4 ± 3.2	29.1 ± 4.2	60.2 ± 3.5
As ₂ O ₃ + Anti-sense	59.5 ± 7.0*	72.3 ± 5.1*	83.4 ± 4.0*	90.6 ± 4.3*	97.4 ± 5.2*

* P < 0.01 vs As₂O₃ group; Anti-sense: Anti-sense oligonucleotide 5 μmol/L

许多对肿瘤细胞具有强烈杀伤作用的制剂对肿瘤细胞端粒酶活性却无抑制作用,这可能是其抗癌谱广、副作用大的毒理学原因。Ku 等^[8]对人鼻咽癌细胞株 NPC-076 的研究表明,干扰细胞微管聚集的药物(紫杉醇、长春新碱)、细胞周期阻滞剂(甲氨喋呤、氟尿嘧啶)、DNA 抑制剂(顺铂、紫外线照射)、Top II 抑制剂(依托泊苷、柔红霉素)均不影响细胞端粒酶活性。国内大量研究发现,As₂O₃ 能抑制白血病细胞的生长并诱导其凋亡,临床上已用于白血病的治疗并取得了初步成果^[9]。以前的研究表明,As₂O₃ 属于 DNA 损伤剂,高浓度时(> 2 μmol/L)在诱导肝癌细胞凋亡的同时对正常肝细胞的生长也显示强烈的抑制作用。正常肝细胞株 L-02 能耐受 1 μmol/L 的 As₂O₃,超过此浓度,L-02 细胞的生长受抑制,并出现不同程度的凋亡。目前 As₂O₃ 只用于急性粒细胞性白血病的治疗,对于实体瘤,因其对正常增殖活跃的细胞的抑制而限制了应用。怎样应用 As₂O₃ 才能达到有效抑制肿瘤细胞而不影响正常细胞的功能是我们亟待解决的课题。

反义寡核苷酸常作为基因探针针对未知基因序列进行检测^[10]。本研究在已知端粒酶模板区序列的基础上合成反义序列旨在对端粒酶模板区序列进行在复制、转录水平的抑制,即基因封闭,使肿瘤细胞不能合成端粒序列而失去无限增殖的物质基础,由“永生”转为“有限增殖”或凋亡^[11-12]。研究结果表明,靶向端粒酶模板区的反义 DNA 能不同程度地抑制肝癌细胞端粒酶活性,酶活性的下降具有时间依赖性和浓度依赖性,反义 DNA 可能是通过识别并与端粒酶 RNA 分子以碱基配对结合而使端粒酶失活。如果将端粒酶被

抑制的肝癌细胞继续培养,细胞增殖被抑制并显示出凋亡^[13],这种凋亡需肿瘤细胞端粒序列消耗殆尽才能出现,因此需时间较长^[14]。As₂O₃ 虽不能抑制肝癌细胞端粒酶活性,但以端粒酶反义寡核苷酸处理的肝癌细胞其端粒酶活性已被不同程度地抑制,此时 As₂O₃ 即可在短时间、低浓度下诱导细胞凋亡。说明抑制肝癌细胞端粒酶活性可使癌细胞对 As₂O₃ 诱导凋亡的敏感性增加,两者协同作用能缩短端粒酶反义 DNA 诱导肝癌细胞凋亡所需的时间、降低 As₂O₃ 诱导肝癌细胞凋亡所需的浓度,这对加强 As₂O₃ 的抗癌效果、拓展其临床应用、降低毒副作用有重要意义。

Ku 等^[8]认为蛋白激酶 C 抑制剂(bisindolylmaleimide I H7)能抑制鼻咽癌细胞株 NPC-076 端粒酶活性而不影响细胞活力及蛋白合成,对端粒酶活性的抑制是通过抑制能激活端粒酶发挥作用所需的效应分子而实现的,端粒酶反义寡核苷酸是否对蛋白激酶 C 有影响值得进一步研究。

Fas、Fas-L 的表达与细胞凋亡有直接的关系,两者同时表达就意味着凋亡的启动^[15];bcl-2 位于细胞浆、线粒体、核膜附近,具有抗凋亡、促进细胞增殖的作用,下调 bcl-2 蛋白表达,可干扰细胞能量代谢而影响细胞增殖^[16]。实验表明 1 μmol/L As₂O₃ 作用后 Fas、Fas-L 阳性细胞随着作用时间的延长逐渐增多,细胞凋亡率增加;而细胞表达 bcl-2 蛋白逐渐降低,也具有时间依赖性及浓度依赖性,说明 As₂O₃ 诱导肝癌细胞凋亡是通过诱导凋亡相关基因 Fas、Fas-L 的表达、抑制 bcl-2 的表达而实现的。As₂O₃ 诱导肝癌细胞凋亡可因端粒酶反义 DNA 对端粒酶活性的抑制而显著增强。

[参考文献]

- [1] Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: Molecular pathways and new therapeutic targets [J]. *Semin Liver Dis*, 2005, 25 (2): 212-225.
- [2] Folini M, Zaffaroni N. Targeting telomerase by antisense-based approaches: Perspectives for new anti-cancer therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(9): 1105-1117.
- [3] 卫立辛, 吴孟超. 端粒酶: 肿瘤治疗研究的新希望 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(5): 325-328.
- [4] 邓志华, 蔡洪培, 李石, 等. As₂O₃ 对正常肝细胞及肝癌细胞株的影响 [J]. *中华消化杂志*, 1999, 19(4): 227-229.
- [5] Cormier JN, Thomas KT, Chari RS, *et al.* Management of hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastrointest Surg*. 2006, 10(5): 761-780.
- [6] Gan L, Yang XL, Liu Q, *et al.* Inhibitory effects of thioredoxin reductase antisense RNA on the growth of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 96(3): 653-664.
- [7] Komata T, Kanzawa T, Kondo Y, *et al.* Telomerase as a therapeutic target for malignant gliomas [J]. *Oncogene*, 2002, 21; 21(4): 656-663.
- [8] Ku WC, Cheng AJ, Wang TC, *et al.* Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997, 29; 241(3): 730-736.
- [9] 吴耀辉, 邹萍, 刘芳, 等. 多种化疗药对凋亡抑制蛋白 survivin 在 HL-60 细胞中表达的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(2): 347-350.
- [10] Lin RX, Tuo CW, Lu QJ, *et al.* Inhibition of tumor growth and metastasis with antisense oligonucleotides (Cantide) targeting hTERT in an in situ human hepatocellular carcinoma model [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(6): 762-768.
- [11] 孙玲, 王峰, 孙慧, 等. hTERT 反义寡核苷酸对 HL-60 细胞增殖的端粒酶活性的抑制作用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(4): 649-653.
- [12] Olausson KA, Dubrana K, Domont J, *et al.* Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 57(3): 191-214.
- [13] 邓志华, 王琦, 韩子岩. 端粒酶反义寡核苷酸对肝癌细胞生长的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(6): 455-456.
- [14] Wu P, Meng L, Wang H, *et al.* Role of hTERT in apoptosis of cervical cancer induced by histone deacetylase inhibitor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 16; 335(1): 36-44.
- [15] Kamiyama H, Kurosaki K, Kurimoto M, *et al.* Herpes simplex virus-induced, death receptor-dependent apoptosis and regression of transplanted human cancers [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(12): 990-998.
- [16] Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, *et al.* Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203(2): 124-131.

[收稿日期] 2006 - 10 - 08

[修回日期] 2006 - 11 - 20

[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

TRAF6 通过抑制 T 细胞自发活化参与免疫自稳的维持

接头蛋白 TRAF6 分子通过介导 TNF 受体超家族和 IL-1R/TLR 超家族信号转导在调节天然免疫应答中起重要作用。作者研究发现, 活化后 T 细胞 TRAF6 mRNA 和蛋白表达水平迅速上调, 提示 TRAF6 还可能参与 T 细胞免疫应答。进一步研究显示特异性 T 细胞敲除 TRAF6 分子可引起小鼠多器官炎症, 表现为肠道、肝脏、肺脏、肾脏单个核细胞浸润。缺陷的 T 细胞活化后产生较高水平的 IL-4 和 IL-5, 提示 Th2 型细胞免疫反应。不仅如此, TRAF6 特异性 T 细胞缺陷小鼠血清中 IgG1、IgE 和 IgM 以及抗 DNA 自身抗体水平明显升高, 提示出现较高的体液免疫应答。TRAF6 缺陷 T 细胞对自身脾细胞抗原的混和淋巴细胞反应显著高于正常非缺陷 T 细胞对照组, 反映出自身反应性 T 细胞的活化。因此 TRAF6 特异性 T 缺陷可影响小鼠的免疫自稳维持, 出现自身免疫病的表现。TRAF6 特异性 T 敲除不影响小鼠胸腺细胞发育以及外周免疫器官中 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 的比例和 Foxp3 表达。体外研究 TRAF6 分子特异缺陷 T 细胞的功能发现, 正常小鼠 Treg 细胞不能抑制缺陷小鼠的 T 细胞增殖, 而来自缺陷小鼠的 Treg 细胞能抑制正常小鼠的 T 细胞增殖。体内实验也发现正常小鼠 Treg 细胞不能改善缺陷小鼠 T 细胞诱发的大肠炎。因此体内外实验证实, TRAF6 缺陷 T 细胞可有效对抗 Treg 的抑制性调节作用。T 细胞完全活化依赖抗 CD3 诱导的 TCR 活化信号和 CD28 活化诱发的共刺激信号, 但单独抗 CD3 即可刺激 TRAF6 敲除 T 细胞增殖活化, 说明 TRAF6 特异性 T 细胞敲除小鼠的 T 细胞活化可不依赖 CD28 共刺激信号。信号转导机制研究发现, 虽然 TRAF6 缺陷不影响 T 细胞 MAPK 和 NF- κ B 的活化, 但活化的 TRAF6 缺陷 T 细胞其胞内 PI3K/Akt 磷酸化明显强于未缺陷 T 细胞, 而且抑制 PI3K 活化可使 TRAF6 缺陷 T 细胞恢复对 Treg 抑制作用的敏感性。本研究发现 TRAF6 分子通过调节 PI3K/Akt 活化, 从而有效地接受 Treg 的调控, 抑制 T 细胞的自发活化, 这是一种以前从未意识到的新功能, 即 TRAF6 不仅参与调节天然免疫应答, 而且与 T 细胞外周免疫耐受的维持密切相关。

[徐红梅 摘译. King CG, Kobayashi T, Cejas PJ, *et al.* *Nat Med*, 2006, 12(9): 1088-1092]