

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0143-05

· 论 著 ·

反义端粒酶 RNA 基因对肝癌细胞的抑制作用

赵淑磊, 刘吉勇, 马进财, 刘 娜 (山东大学 山东省立医院消化科, 济南 250021)

[摘 要] **目的:** 研究逆转录病毒载体介导的反义端粒酶 RNA 基因对肝癌细胞的抑制作用, 探讨通过抑制端粒酶活性治疗肝细胞癌的有效途径。**方法:** 采用电穿孔法将携带正反义端粒酶 RNA 基因的逆转录病毒载体导入 PT67 包装细胞, G418 筛选获得稳定产病毒细胞株, 收集逆转录病毒上清并感染人肝癌 HepG2 细胞, G418 筛选获得稳定转染细胞克隆并扩增培养, 经 PCR 鉴定后, 通过 MTT 法分别检测转染正反义端粒酶 RNA 基因组肝癌细胞(HepG2-hTR-EcoR I 和 HepG2-hTR-BamH I)以及未转染端粒酶 RNA 基因组细胞(HepG2)的生长, 免疫荧光化学检测肝癌细胞增殖, TRAP-PCR-ELISA 法检测细胞的端粒酶活性, 流式细胞术检测各组细胞所处的细胞周期及凋亡率。**结果:** 基因转染后经 PCR 扩增可于约 500 bp 处检测到目的基因的表达。转染反义端粒酶 RNA 基因的 HepG2-hTR-BamH I 组细胞生长受到明显抑制; 抗中性粒细胞核增殖抗原(PCNA)表达减少; 实验组端粒酶活性为(2.31 ± 0.16), 较 HepG2-hTR-EcoR I 组(3.24 ± 0.20)及 HepG2 组细胞(3.22 ± 0.17)明显下降($P < 0.01$); 流式细胞术检测显示实验组细胞的凋亡率为(9.58 ± 1.38)%, 与对照组相比差别具有显著性($P < 0.01$); 实验组细胞出现 G₂/M 期阻滞。**结论:** 端粒酶 RNA 是端粒酶活性表达的一个重要组成部分, 通过反义技术下调其表达能够抑制肝癌细胞生长增殖, 并诱导其凋亡。

[关键词] 端粒酶; 逆转录病毒载体; 反义 RNA; 肝细胞癌**[中图分类号]** R735.7 **[文献标志码]** A

Inhibitory effect of antisense human telomerase RNA(hTR) gene on hepatocellular carcinoma cells

ZHAO Shu-lei, LIU Ji-yong, MA Jin-cai, LIU Na (Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of retrovirus-mediated antisense human telomerase RNA (hTR) gene on hepatocellular carcinoma, so as to explore an effective way to inhibit telomerase activity in the treatment of hepatocellular carcinoma. **Methods:** Sense and antisense hTR gene were transfected into the packaging cell line PT67 by electroporation, and the stably transfected cells were selected with G418. The recombinant retroviral supernatant was collected and transfected into HepG2 cells. After G418 selection, PCR was used to verify the integration of the hTR gene. Cell growth curves were drawn using MTT assay and the expression of PCNA was determined by immunofluorescence. TRAP-PCR-ELISA was adopted to detect the telomerase activity; cell cycle and apoptosis were evaluated by flow cytometry (FCM). **Results:** The expression of hTR gene could be amplified in HepG2-hTR-EcoRI and HepG2-hTR-BamHI cells, but not in untransfected HepG2 cells. The antisense hTR complementary to the template region of telomerase inhibited growth and proliferation of HepG2 cells. The expression of neutrophil proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was decreased. Telomerase activity in the antisense hTR-treated group was (2.31 ± 0.16), which was significantly lower than those of the other 2 groups($P < 0.01$). FCM showed that the apoptosis rate of the experimental group was (9.58 ± 1.38)%, which was significantly different from those of the other 2 groups($P < 0.01$). G₂/M phase blockage was detected in the HepG2-hTR-BamHI cells. **Conclusion:** Telomerase RNA is an important component of telomerase; down-regulation of its expression through anti-technology can lead to the growth inhibition and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

[Key words] telomerase; retroviral vector; antisense RNA; hepatocellular carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 134-147]

人类主要靠端粒重复序列(TTAGGG)_n 来维持细胞分裂中染色体的稳定。然而, 在每次细胞分裂后端粒长度就会缩短一些, 最终导致细胞染色体的

[基金项目] 山东省医药卫生科研项目(No. CAIDBA3)**[作者简介]** 赵淑磊(1981-), 男, 山东临沂市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究**[通讯作者]** 刘吉勇, E-mail: liujiyong@medmail.com.cn

不稳定,并诱导细胞进入危机期,从而诱发凋亡。据报道^[1],在大约 90% 以上的肿瘤细胞中可以检测到端粒酶活性。人端粒酶主要由端粒酶 RNA (hTR)、端粒酶逆转录酶 (hTERT) 和端粒酶相关蛋白 (hTP1) 构成,它能够以 hTR 为模板,在 hTERT 的催化作用下向端粒末端添加 (TTAGGG)_n 重复序列,从而使肿瘤细胞的端粒长度得到维持^[2]。端粒酶在一些肿瘤细胞的高表达使其成为一个很具有吸引力的基因治疗靶点,通过对其各个组分的干预可以达到抑制肿瘤细胞生长增殖,促进其凋亡的目的。

随着分子生物学和遗传工程的发展,基因治疗应运而生,反义 RNA 技术就是其中一种,其原理是通过重组技术将目的基因反向插入到质粒载体构建反义表达载体,从而通过转录合成反义 RNA 来封闭靶细胞 mRNA 的表达以达到治疗肿瘤的目的。本研究以逆转录病毒载体携带反义端粒酶 RNA 基因转染 HepG2 肝癌细胞,旨在探讨其对于肝癌细胞生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人肝癌细胞 HepG2、PT67 包装细胞及 NIH3T3 细胞均由山东省立医院中心实验室保存。携带正、反义端粒酶 RNA 基因逆转录病毒真核表达质粒 (PLXSN-hTR-EcoR I 和 PLXSN-hTR-BamH I) 由刘吉勇教授构建^[3]。基因组 DNA 抽提试剂盒购自 TIANGEN 公司,鼠抗人 PCNA 单克隆抗体及 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗均购自北京中杉金桥生物技术公司,端粒酶 TRAP-PCR-ELISA 检测试剂盒购自 Roche 公司,碘化丙啶 (PI) 为 Sigma 公司产品,Annexin-V 凋亡检测试剂盒购自晶美生物工程公司。

1.2 细胞培养

HepG2、PT67 和 NIH3T3 细胞均采用含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液置于 37 °C 含 5% CO₂ 的孵箱内培养,每 2 d 换液 1 次。

1.3 逆转录病毒的包装及病毒收集

采用电转染法分别将已构建的正义和反义端粒酶 RNA 基因逆转录病毒真核表达载体导入 PT67 包装细胞,并通过 G418 筛选获得稳定产病毒细胞株,分别命名为 PT67-hTR-EcoRI 和 PT67-hTR-BamHI; 收集细胞培养液上清,0.45 μm 针头过滤器过滤,2 × 10⁴ r/min 离心 2 h,弃上清,加培养液吸打,-80 °C 冰箱保存备用。

1.4 逆转录病毒滴度的检测

具体方法参考文献[4]。

1.5 逆转录病毒感染靶细胞

HepG2 细胞生长至 50% ~ 60% 汇合时,分别用携带正义和反义端粒酶 RNA 基因的逆转录病毒上清感染,加入 polybrene 至终质量浓度 8 μg/ml,感染 8 h,换含有 300 μg/ml G418 的选择性培养液维持筛选,14 d 后可见 G418 抗性克隆形成,挑取单个克隆在含有 G418 的选择性培养液中进行扩大培养 4 周,分别命名为 HepG2-hTR-EcoR I 和 HepG2-hTR-BamH I。

1.6 PCR 鉴定目的基因整合到靶细胞基因组 DNA

按试剂盒说明进行基因组 DNA 的抽提。设计引物:上游引物 P1,5'-GGCCGCTCCCTTTATAAGC-3'; 下游引物 P2,5'-CATGTGTGAGCCGAGTCCT-3',PCR 扩增端粒酶 RNA 基因,电泳检测。

1.7 MTT 法检测 HepG2 细胞的生长

细胞通过胰酶消化后,以 2 × 10³/孔的密度接种于 96 孔板内,采用 MTT 法检测细胞的增殖情况,酶标仪检测各孔 490 nm 处的光密度值。

1.8 免疫荧光化学检测细胞增殖抗原

细胞接种于预先放置盖玻片的 12 孔板内,每孔约 2 × 10⁴ 个细胞,待细胞生长至单层取出细胞爬片,PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次,0.2% TritonX-100 作用 20 min 用于细胞打孔。然后用 10% 山羊血清封闭非特异性抗原,滴加 1:100 稀释的小鼠抗人 PCNA 一抗,37 °C 湿盒孵育 1 h,PBS 冲洗后滴加 1:50 稀释的 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗,37 °C 湿盒避光孵育 1 h,PBS 洗 5 次,50% 缓冲甘油封片,荧光显微镜观察照相。采用 Image Pro Plus 5.0 图像处理软件分析各组细胞的平均荧光灰度值。

1.9 TRAP-PCR-ELISA 检测端粒酶活性

收集各组细胞,分别转移 2 × 10⁵ 个细胞至 EP 管内(每组设 3 个平行样本管),3 000 × g 离心 10 min,PBS 洗 1 次;然后按 TRAP-PCR-ELISA 试剂盒说明进行操作,并以试剂盒所提供的人胚肾 293 细胞提取物为阳性对照,阳性对照 85 °C 水浴灭活 10 min 作为阴性对照;结果判定,采用酶标仪检测样本 450 nm 及 690 nm 处的光密度值(D),以 ΔD 代表端粒酶活性,ΔD = D₄₅₀ - D₆₉₀。

1.10 流式细胞术检测各处理组 HepG2 细胞的细胞周期

各处理组细胞生长至对数生长期,胰酶消化后制成单细胞悬液,调整密度至 1 × 10⁶/ml,75% 乙醇固定,检测前离心去除乙醇,加入 250 mg/L PI 0.2

ml, 暗处放置 30 min, 流式细胞术检测细胞周期。

1.11 流式细胞术检测各组 HepG2 细胞的凋亡

收集各组细胞, 调整密度至 1×10^6 /ml, 采用 Annexin-V 和 PI 双标记, 操作步骤按试剂盒说明进行, 冰上避光孵育, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。

1.12 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 SPSS11.0 统计软件进行 t 检验, 分析不同处理组间差异的显著性。

2 结果

2.1 逆转录病毒滴度的检测

携带正、反义端粒酶 RNA 基因的逆转录病毒滴度分别为 0.95×10^6 和 1.1×10^6 CFU/ml。

2.2 逆转录病毒转染癌细胞后目的基因对靶细胞基因组的整合

如图 1 所示, 分别转染正、反义端粒酶 RNA 的 HepG2-hTR-EcoRI 和 HepG2-hTR-BamHI 组细胞的基因组 DNA 中扩增出约 500 bp 的目的基因片段。

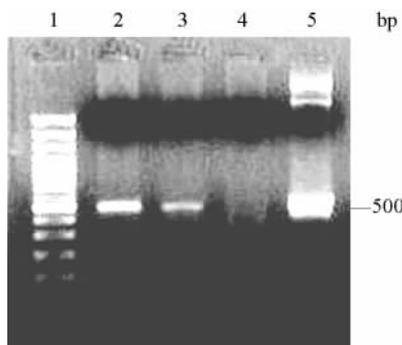


图 1 靶细胞 HepG2 中端粒酶 RNA 基因的表达
Fig.1 Identification of hTR gene expression in genomic DNA of HepG2 cells

1: DNA marker; 2: HepG2-hTR-BamHI; 3: HepG2-hTR-EcoRI; 4: HepG2; 5: Positive control

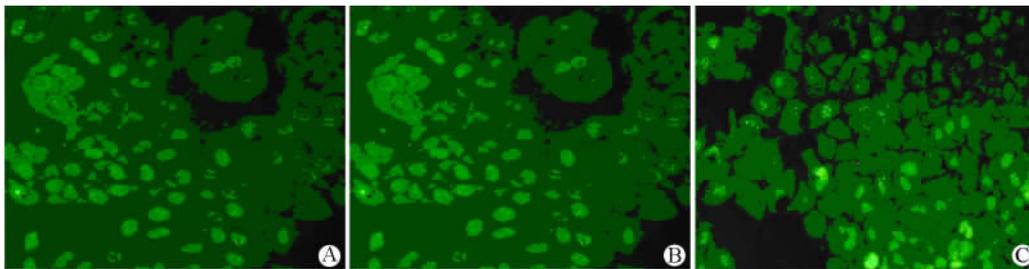


图 3 反义端粒酶 RNA 基因对 HepG2 细胞增殖抗原表达的抑制

Fig. 3 Inhibitory effect of antisense hTR gene on the expression of PCNA ($\times 20$)

A: HepG2; B: HepG2-hTR-EcoRI; C: HepG2-hTR-BamHI

2.5 逆转录病毒感染后端粒酶活性的抑制

转染反义端粒酶 RNA 基因 HepG2-hTR-BamHI

2.3 逆转录病毒感染对肝癌细胞增殖的抑制

根据种板第 1、2、3、4、5 天所测得的 490 nm 处的光密度值 (D_{490}) 绘制 3 组细胞的生长曲线, 可以观察到转染反义端粒酶 RNA 基因的 HepG2-hTR-BamHI 组细胞的生长受到明显抑制(图 2)。

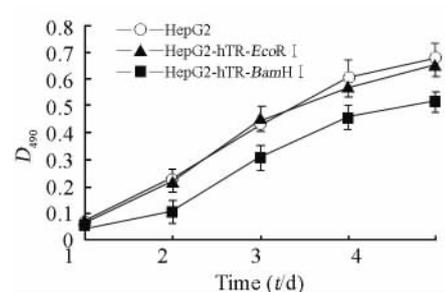


图 2 反义端粒酶 RNA 基因对肝癌细胞增殖的抑制
Fig.2 Inhibitory effect of antisense hTR gene on proliferation of hepatocellular carcinoma cells

2.4 反义端粒酶 RNA 基因对于肝癌细胞增殖抗原表达的抑制

免疫细胞荧光化学显示 PCNA 阳性信号主要在细胞核内表达。作为对照的 HepG2 及转染正义端粒酶 RNA 基因的 HepG2-hTR-EcoRI 组细胞的阳性信号表达率高, 荧光信号较强; 而转染反义端粒酶 RNA 基因的 HepG2-hTR-BamHI 组细胞的 PCNA 表达明显减少, 荧光信号较对照组弱。HepG2 及 HepG2-hTR-EcoRI 组细胞的 PCNA 平均荧光灰度值分别为 (36.14 ± 2.79) 和 (33.51 ± 3.15), 而 HepG2-hTR-BamHI 组细胞 PCNA 平均荧光灰度值为 (25.22 ± 3.78), 与 HepG2 组细胞比较 $P < 0.01$, 与 HepG2-hTR-EcoRI 组细胞比较 $P < 0.05$, 差异均具有统计学意义(图 3)。

组细胞的端粒酶活性为 (2.31 ± 0.16)。转染正义端粒酶 RNA 基因 HepG2-hTR-EcoRI 细胞的端粒酶

活性为(3.24 ± 0.20),未转染端粒酶 RNA 基因 HepG2 细胞的端粒酶活性为(3.22 ± 0.17),与实验组相比较,差别具有统计学意义(*P* 均 < 0.01),而两对照间的端粒酶活性无明显的差异(*P* > 0.05)。

2.6 逆转录病毒感染后 HepG2 细胞周期的改变

流式细胞术检测细胞周期结果显示,转染反义端粒酶 RNA 基因的 HepG2-hTR-BamH I 组细胞与作为对照的 HepG2 及 HepG2-hTR-EcoR I 组细胞相比,*G*₀/*G*₁ 期分布无显著性差异(*P* > 0.05);但细胞的 S 期所占比例明显下降(*P* < 0.01),*G*₂/*M* 期细胞比例升高(*P* < 0.01),并且 *G*₀/*G*₁ 期前可见亚二倍体凋亡峰,而对照组无明显凋亡峰(图 4,表 1)。

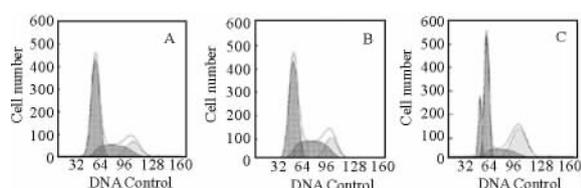


图 4 逆转录病毒感染对于 HepG2 肝癌细胞周期分布的影响

Fig. 4 Effects of retroviral infection on the cell cycle distribution of HepG2 cells

A: HepG2; B: HepG2-hTR-EcoR I; C: HepG2-hTR-BamH I

表 1 反义端粒酶 RNA 基因对 HepG2 细胞周期分布的影响

Tab. 1 Effects of antisense hTR gene on the cell cycle distribution of HepG2 cells

Groups	<i>G</i> ₀ / <i>G</i> ₁	S	<i>G</i> ₂ / <i>M</i>
HepG2	55.6 ± 4.4	26.4 ± 2.8	18.0 ± 2.0
HepG2-hTR-EcoRI	54.5 ± 3.8	29.1 ± 2.7	16.4 ± 2.5
HepG2-hTR-BamHI	51.5 ± 2.4	16.5 ± 2.2**	32.1 ± 3.3**

** *P* < 0.01 vs HepG2 or HepG2-hTR-EcoR I

2.7 反义端粒酶 RNA 基因诱导肝癌细胞的凋亡

流式细胞术细胞凋亡分析结果显示,转染反义端粒酶 RNA 基因的 HepG2-hTR-BamH I 细胞 Annexin-V 标记细胞所占比例明显增多,凋亡率为(9.58 ± 1.38)%,而对照 HepG2 及 HepG2-hTR-EcoRI 组细胞的凋亡率分别为(4.70 ± 1.10)% 和 (5.20 ± 0.74)%,实验组与对照组差别具有统计学意义(*P* 均 < 0.01)。

3 讨论

在人类肿瘤细胞中,端粒酶活性的提高是肿瘤受其端粒状态影响的标志.端粒酶活性的高低可能

与恶性肿瘤细胞的转移和侵袭性有关^[5]。Counter 等^[6]最早在转移性卵巢癌患者腹水中检测到了端粒酶活性。端粒酶抑制剂可以作为恶性肿瘤治疗的细胞毒药物的理论很早就被提出^[7-8]。由于绝大多数正常人体细胞不具有端粒酶的活性,因此对端粒酶活性抑制剂的最大优点在于它们可能不会对正常细胞产生毒性作用。目前对于端粒酶活性的抑制主要在于它的 3 个组分(hTR、hTERT 和 hTP1),方法包括反义技术、RNA 干扰及免疫治疗等^[2]。与传统的治疗方法不同,端粒酶抑制剂对于细胞增殖的抑制及凋亡诱导作用需要多次的细胞分裂使细胞端粒长度达到一定的程度才能够实现。Feng 等^[9]报道通过转染反义端粒酶 RNA 进入 HeLa 细胞内,从而抑制了端粒酶的活性,并观察通过 23 ~ 26 个细胞倍增周期后端粒长度缩短,部分细胞进入危机期,并且出现细胞死亡。

逆转录病毒为单链 RNA 病毒,进入细胞后逆转录为 DNA 前病毒,它能有效地将目的基因整合至被感染的细胞基因组。本实验采用的逆转录病毒载体 PLXSN 是由 Moloney 小鼠白血病病毒(murine leukaemia virus, MLV)的前病毒 RNA 构建而来,它对快速分裂的细胞具有很高的转染效率,并可以持久表达,而且仅具有一次感染的能力,安全性高,是基因治疗最常用的载体之一。以逆转录病毒为载体将反义端粒酶 RNA 基因导入 HepG2 肝癌细胞内,并以扩增端粒酶 RNA 基因的引物进行 PCR 鉴定,可于约 500 bp 处检测到目的基因的表达,这与理论设计一致,表明基因转染成功;利用 MTT 绘制细胞生长曲线,可见转染反义端粒酶 RNA 基因组细胞生长明显迟缓,生长曲线相对较低平;同时免疫荧光化学显示该组细胞抗中性粒细胞核增殖抗原(PCNA)表达减少,且阳性信号较弱,与对照组相比差异具有显著性。

在多数肿瘤细胞中都可以检测到端粒酶活性,表明端粒长度的维持对于肿瘤细胞生长的重要性。采用反义技术封闭端粒酶 RNA,使其失去模板作用,不能向端粒末端添加(TTAGGG)_n 重复序列,可导致端粒长度的缩短和细胞染色体的不稳定,并诱导细胞凋亡。本实验证实转染反义端粒酶 RNA 基因组 HepG2 肝癌细胞端粒酶活性明显下调;在细胞培养过程中,凋亡细胞所占比例增加,同空白对照及转染正义 hTR 基因组相比差异明显。

端粒酶 RNA 是端粒酶活性的重要组成部分,而端粒酶活性与细胞周期分布密切相关。Zhu 等^[10]报道端粒酶在细胞周期的 S 期活性最高, *G*₂/*M* 期

活性最低。有研究^[11-13]认为肿瘤细胞的 G₂/M 期阻滞与端粒酶活性的下调具有很高的相关性。本实验细胞周期检测结果表明, HepG2 肝癌细胞在转染反义端粒酶 RNA 基因后, 细胞周期中 S 期所占比例下降, G₂/M 期比例增加, 细胞滞留于 G₂/M 的关卡处不能够再继续分裂或走向凋亡。

总之, 端粒酶 RNA 是肿瘤基因治疗的一个重要的靶点。本研究通过体外实验证实反义端粒酶 RNA 基因能够抑制肝癌细胞的端粒酶活性, 为肝细胞癌的基因治疗提供了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011-2015.
- [2] 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.
- [3] 王丛笑, 刘吉勇, 赵跃然, 等. 正反义人端粒酶 RNA 组分(hTR)逆转录病毒真核表达载体的构建[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12(1): 51.
- [4] 曹亚. 实用分子生物学操作指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 196.
- [5] Sato N, Machara N, Mizumoto K, *et al.* Telomerase activity of cultured human pancreatic carcinoma cell lines correlates with their potential for migration and invasion[J]. *Cancer*, 2001, 91(3): 496-504.
- [6] Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, *et al.* Telomerase activity in human ovarian carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(8): 2900-2904.
- [7] Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, *et al.* Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity[J]. *EMBO J*, 1992, 11(5): 1921-1929.
- [8] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts[J]. *Nature*, 1990, 345(6274): 458-460.
- [9] Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase[J]. *Science*, 1995, 269(5228): 1236-1241.
- [10] Zhu X, Kumar R, Mandal M, *et al.* Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6091-6095.
- [11] Zhang RG, Zhang RP, Wang XW, *et al.* Effects of cisplatin on telomerase activity and telomere length in BEL-7404 human hepatoma cells[J]. *Cell Res*, 2002, 12(1): 55-62.
- [12] Zhang F, Jia Z, Wei Y, *et al.* *In vitro* modulation of telomerase activity, telomere length and cell cycle in MKN45 cells by verbascoiside[J]. *Planta Med*, 2002, 68(2): 115-118.
- [13] Satra M, Tsouqos I, Papanikolaou V, *et al.* Correlation between radiation-induced telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in HeLa cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82(6): 401-409.

[收稿日期] 2006 - 12 - 11

[修回日期] 2007 - 01 - 30

[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

TLR7 介导耐受的恶性 B 淋巴细胞对化疗药物敏感

TLR 信号通路的慢性活化状态在很多病理环境下存在, 但是有关这方面的研究并没有像 TLR 通路的活化及调节那样受到更多的关注。人 TLR7 主要表达在 B 细胞和某些树突状细胞(DC)上, 如浆细胞样树突状细胞(Plasmacytoid dendritic cells, pDC)。TLR7 的天然配体为病毒的单链 RNA 和氧化的鸟嘌呤核苷, 它的活化可被合成的咪唑喹啉(imidazoquinoline)类衍生物 S28690 模拟。人 PBMC 在 S28690 初始刺激后分泌炎症因子 TNF α , 但是再次刺激时 TNF α 的产生显著降低, 表现为耐受。TLR7 诱导的耐受具有特异性, 佛波脂刺激 TLR7 耐受的人慢性 B 淋巴细胞白血病细胞(CLL), 可再次刺激 TNF α 的表达。尽管 TLR7 耐受的 CLL 在 S28690 再次刺激时 TNF α 的表达下降, IL-6、IL-10 的表达没有改变, 由此表明 TNF α /IL-10 表达水平的失衡可能是 TLR7 再次刺激时耐受的原因。TLR7 诱导的耐受与 S28690 的初始剂量有关, 其诱导耐受的最低剂量为 0.1 μ g/ml, 初次刺激诱导的耐受状态至少可持续 5 d。作者以 CLL 作为模型研究 TLR7 诱导 B 细胞耐受分子基础, 发现这种耐受状态与细胞 TLR7 受体以及 TLR7 通路下游信号分子 IRAK1 的表达下调有关。TLR7 耐受的 CLL 细胞表现为 SAPK、NF- κ B 信号通路活化的抑制, 这个过程可被放线菌素 D 抑制, 是基因转录调节依赖的。此外, TLR7 的耐受还表现为 ERK 信号通路的持续活化。研究发现耐受的 CLL 细胞对化疗药物长春新碱更加敏感, 这可能与 SAPK 的再次激活有关, SAPK 的特异性抑制剂 SP600125 可显著抑制长春新碱诱导的细胞死亡。因此, TLR7 诱导的细胞耐受, 在临床恶性 B 淋巴细胞肿瘤的治疗中可能有重要的应用前景, 咪唑喹啉类药物可以作为该类肿瘤化疗的免疫佐剂。

[张永亮 摘译, 刘书逊 审阅. Shi Y, White D, He L, *et al.* *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1823-1831]