

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0115-05

· 论 著 ·

重组腺病毒介导小鼠内皮抑素对荷骨肉瘤 MG-63 细胞裸鼠肺转移的抑制

梅 炯*, 窦 帮, 马晓辉, 童天朗, 蔡宣松 (同济大学附属同济医院 骨科, 上海 200065)

[摘要] 目的: 构建携小鼠内皮抑素(endostatin, *ES*) 基因的重组腺病毒载体, 观察其对荷骨肉瘤裸鼠肺转移的抑制, 探讨内皮抑素表达水平与骨肉瘤肺转移的关系。方法: 构建 pDC315-mEndo 表达质粒, 同源重组产生重组腺病毒 Ad-mEndo。裸鼠右前肢皮下注射骨肉瘤 MG-63 细胞建立移植瘤裸鼠模型; 随机分为 4 组: 小鼠内皮抑素腺病毒(Ad-mEndo) 组, 携带 EGFP 基因腺病毒(Ad-EGFP) 组, PBS 组, 未接种肿瘤细胞裸鼠空白对照组。各组裸鼠每周分别注射相应药物 200 μ l, 连续 5 次, 观察各组动物移植瘤体积、瘤组织病理, ELISA 法检测各组裸鼠血 ES 水平; 7 周后处死动物, 观察有无肺转移及肺转移灶病理。结果: Ad-EGFP 组肿瘤体积为(1.53 \pm 0.05) cm^3 , PBS 组为(1.56 \pm 0.07) cm^3 , Ad-mEndo 组为(0.91 \pm 0.03) cm^3 , Ad-mEndo 治疗的抑瘤率达 40.7%。Ad-mEndo 组裸鼠血内皮抑素表达水平明显高于 Ad-EGFP 组和 PBS 组($P < 0.05$)。Ad-mEndo 组裸鼠肺部未发现肿瘤转移灶, 其他两组肺部见大量散在转移灶, 肺转移率分别为 80% 和 90%。未发生肺转移裸鼠的 ES 水平显著高于发生肺转移的裸鼠($P < 0.05$)。结论: 腺病毒介导的小鼠内皮抑素显著抑制了荷骨肉瘤裸鼠肺转移, 内皮抑素表达水平与肺转移有着直接的关系。

[关键词] 骨肉瘤; 内皮抑素; 肺转移; 抗血管生成

[中图分类号] R738.1; R730.54

[文献标志码] A

Inhibitory effect of recombinant adenovirus-mediated mouse endostatin on pulmonary metastasis of osteosarcoma cell line MG-63 in nude mice

MEI Jiong*, DOU Bang, MA Xiao-hui, TONG Tian-lang, CAI Xuan-song (Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China)

[Abstract] **Objective:** To construct an adenovirus-mediated mouse endostatin vector (Ad-mEndo) and to observe its inhibitory effect on the pulmonary metastasis of osteosarcoma in nude mice, so as to discuss the relationship between ES expression and the pulmonary metastasis of osteosarcoma. **Methods:** Recombinant adenovirus plasmid pDC315-mEndo was constructed and used to prepare recombinant Ad-mEndo. Osteosarcoma MG-63 cells were subcutaneously injected into the right fore limbs to establish nude mouse model of osteosarcoma; and the models were randomly divided into 3 groups: Ad-mEndo group, Ad-EGFP group and PBS group; animals receiving no transplantation served as blank control. The corresponding agents were injected (20 μ l per time) for a consecutive of 5 times on a weekly basis. The tumor volumes, histopathological characteristics were observed; ELISA was employed to examine the serum ES level. Animals were sacrificed 7 weeks later and the pulmonary metastasis was observed. **Results:** Sixteen days later, the tumor volume was (1.53 \pm 0.05) cm^3 in Ad-EGFP group, (1.56 \pm 0.07) cm^3 in the PBS group, and (0.91 \pm 0.03) cm^3 in the Ad-mEndo group, with the tumor inhibitory rate being 40.7% in the last group. The serum ES level in the Ad-mEndo group was significantly higher than that of the other groups ($P < 0.05$). No pulmonary metastasis was noticed in the Ad-mEndo group, but extensive metastases were seen in the lungs of the other 2 groups, with the metastasis rates being 80% and 90%. Mice without metastasis had significantly higher levels of ES compared with those with metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion:** Adenovirus-mediated mouse endostatin can significantly inhibit the pulmonary metastasis of osteosarcoma in nude mice, indicating a directly link between expression of ES and pulmonary metastasis.

[Key words] osteosarcoma; endostatin; pulmonary metastasis; angiogenesis

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(2): 115-119]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30471760). Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471760)

[作者简介] 梅 炯(1964-), 男, 汉族, 贵州省贵阳市人, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事骨肿瘤基础和临床方面的研究

* Corresponding author. E-mail: meijiong@163.com

骨肉瘤占原发性恶性骨肿瘤的 22.4%，是青少年骨骼肿瘤中最常见的恶性骨肿瘤^[1-3]。骨肉瘤起病隐匿，恶性程度高，浸润转移早，早期诊断困难。近 30 年来，有关骨肉瘤的化疗、外科手术保肢治疗等报道很多，但疗效仍不尽人意，传统截肢或关节离断术治疗的 5 年生存率仅为 15% 左右。20% ~ 30% 的患者无论采取何种治疗，预后均极差；如发生转移，即使化疗之后 5 年生存率也只有 20%^[46]。肿瘤血管生成(angiogenesis)在肿瘤发生、发展过程中的重要作用是近年来有关肿瘤研究中的重要突破之一。肿瘤的快速生长、浸润和转移是肿瘤的主要特点，也是导致患者死亡的主要原因。如能有效抑制肿瘤血管生成，切断肿瘤血供，就有望达到抑制肿瘤生长、侵袭和转移的目的。

鉴于骨肉瘤的原发灶、转移灶与内皮抑素基因(endostatin, ES)可能有密切关系，本实验构建携带小鼠 ES 基因的腺病毒载体，干扰荷骨肉瘤裸鼠的肺转移，观察比较 ES 治疗组与对照组中裸鼠的肺转移程度、转移瘤数目及骨肉瘤细胞病理学的变化，并进一步探讨 ES 水平和骨肉瘤肺转移的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

BALB/c (nu/nu)裸小鼠由中科院上海实验动物所提供，实验动物合格证号[SCXK(沪)2004-0002]。腺病毒载体 pDC315 购自加拿大 Microbix Biosystems 公司，人血清 5 型腺病毒(WAd5)由本室保存。293 细胞购自加拿大 MICROBIX BIOSYSTEMS 公司，小鼠骨肉瘤细胞株 MG-63 购自武汉中国典型培养物保存中心。ELISA 内皮抑素试剂盒购自深圳晶美公司。

1.2 携带小鼠 ES 基因腺病毒载体的构建

将 ES 基因连接到腺病毒载体 pDC315 中，构建 pDC315-mEndo 表达质粒，将此表达质粒与腺病毒重组质粒 pBGHE3 通过 lipofectamine2000 共同转染 293 细胞，经同源重组产生重组腺病毒 Ad-mEndo，并测定病毒滴度。

1.3 荷骨肉瘤裸鼠动物模型的建立及分组

采用骨肉瘤细胞 MG-63 0.2 ml 细胞悬液(约 1×10^6 个细胞)注射裸鼠右前肢皮下，共 30 只，成瘤后随机分为 3 组，每组 10 只：PBS 组，Ad-EGFP 组，Ad-mEndo 组；另取未接种肿瘤细胞的裸鼠(10 只)作空白对照组。各组每周分别于瘤体边缘外 1 cm 处皮下注射相应药物 200 μ l/次，连续 5 次。

1.4 观察移植瘤生长情况

PBS 组、Ad-EGFP 组、Ad-mEndo 组分别在分组当日及之后每 2 d 测量肿瘤长、短径，并计算肿瘤体积，绘制生长曲线。肿瘤体积 = $1/2 AB^2$ (A 为肿瘤的最大长径，B 为肿瘤的横径)。抑瘤率(%) = (对照组肿瘤的平均体积 - 实验组肿瘤的平均体积) / 对照组肿瘤的平均体积 $\times 100\%$ 。

1.5 裸鼠荷瘤后肺转移的组织病理学观察

观察至第 7 周结束后，处死并解剖裸鼠观察有无肺部转移，计数肺转移结节。摘除肺脏称取湿重，将肺脏固定、包埋，连续切片(4 μ m)，行 H-E 染色。

1.6 裸鼠荷瘤后肺转移程度的分级

I 级：单个小转移灶 1 ~ 5 个(直径均在 1 mm 以下)；II 级：小转移灶在肺内呈弥散分布，有 6 ~ 10 个(直径均在 1 ~ 2 mm 之间)；III 级：小转移灶在肺内呈广泛分布(几乎分布所有肺叶)，或有几个大转移灶(直径均在 2 mm 以上)。

1.7 ELISA 法检测各组小鼠血 ES 的水平

裸鼠处死前采用眼球摘除取血法取血，用免疫酶联吸附法(ELISA 法)检测 ES 水平，用酶标分析仪测定 490 nm 处的 D 值。另取标准品配制系列浓度，以酶标仪测定 D_{490} ，绘制 ES 标准曲线。最后通过标准曲线计算各样品中的 ES 浓度。

1.8 统计学处理

用 Spss13.0 统计软件的一般线性模型中单因变量多因素方差分析进行各组之间两两比较，并对所有裸鼠中发生肺转移和未发生肺转移者之间进行 t 检验统计分析。

2 结果

2.1 Ad-mEndo 病毒鉴定及滴度测定

提取病毒 DNA，用 mEndo 引物做 PCR 鉴定，经酶切初步鉴定阳性的样品进行测序，证实克隆成功。50% 组织培养感染剂量法测定病毒滴度为 2.5×10^{10} PFU/ml，构建内皮抑素基因重组腺病毒载体构建成功。

2.2 Ad-mEndo 促进骨肉瘤细胞移植瘤裸鼠体内 ES 的表达

各组荷骨肉瘤移植瘤裸鼠经治疗后，取血检测 ES 的表达水平。结果显示，Ad-mEndo 组、PBS 组以及 Ad-EGFP 组裸鼠外周血中的 ES 水平分别为 (461.95 ± 50.19)、(176.29 ± 118.67)、(161.24 ± 97.77) ng/ml，Ad-mEndo 组裸鼠血的 ES 水平较其他两组显著升高 ($P < 0.01$)，证实裸鼠注射含 ES 基因的重组腺病毒载体后，其体内 ES 水平明显增加。

2.3 Ad-mEndo 对裸鼠移植骨肉瘤的抑制作用

3 组裸鼠在瘤细胞接种后 5~7 d 全部成瘤,观察 18 d 后,计算肿瘤体积并绘出生长曲线(图 1)。结果显示:Ad-EGFP 组和 PBS 组在接种后第 9 d 肿瘤体积增长明显,Ad-mEndo 组增长受到抑制。接种后 16 d Ad-EGFP 组肿瘤体积为(1.53±0.05) cm³, PBS 组为(1.56±0.07) cm³, Ad-mEndo 组为(0.91±0.03) cm³,其抑瘤率达 40.7%。

2.4 Ad-mEndo 对裸鼠移植骨肉瘤肺转移的抑制

空白对照组未见有肺转移情况。PBS 组和 Ad-EGFP 组分别有 8 只和 9 只裸鼠出现肺转移灶,肺转移率分别为 80% 和 90%。PBS 组肺转移灶在肺表面呈结节状广泛分布,直径均在 2 mm 以上,转移程度为 III 级。Ad-EGFP 组平均肺转移结节数皆大于 5,肺转移程度为 II 级。Ad-mEndo 组 10 只裸鼠皆未出现肺转移灶。肺转移情况见表 1。

所有荷瘤裸鼠中,发生肺转移鼠的 ES 为(126.71±19.22) ng/ml,未发生肺转移裸鼠的 ES

为(266.67±216.83) ng/ml,两者 ES 表达水平进行比较,*t* 值为 3.079,*P* < 0.05,说明发生肺转移裸鼠和未发生肺转移鼠之间 ES 水平有明显差异。

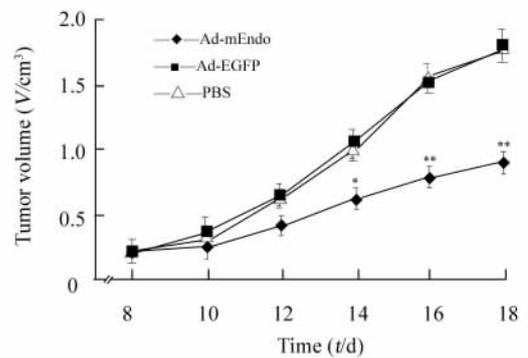


图 1 Ad-mEndo 对裸鼠移植骨肉瘤的抑制作用
Fig. 1 Inhibitory effect of Ad-mEndo against osteosarcoma in nude mice

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs Ad-EGFP or PBS group

表 1 Ad-mEndo 对荷骨肉瘤裸鼠肺转移的抑制

Tab. 1 Inhibitory effect of Ad-mEndo against lung metastasis of osteosarcoma in nude mice

Group	Body weight (m/g)	Lung metastasis		
		Node (n)	Metastasis grade	lung weight (m/g)
Ad-mEndo	20.09 ± 0.61	0	—	0.81 ± 0.01
PBS	18.89 ± 0.56	7.80	III	1.01 ± 0.01
Ad-EGFP	23.25 ± 0.34	5.20	II	0.85 ± 0.05
Control	21.16 ± 0.12	—	—	0.90 ± 0.02

2.5 Ad-mEndo 致裸鼠移植骨肉瘤组织和肺转移灶的病理改变

移植瘤组织病理观察发现,接受 Ad-mEndo 治疗的小鼠肿瘤组织出现大片坏死,血管密度减小;而对照组小鼠肿瘤组织生长良好,肿瘤中心部位出现小坏死灶,组织血管密度高。

对 Ad-EGFP 组裸鼠的肺转移病理切片进行观察,40 倍镜下观察发现肺周边部有大量癌巢融合;100 倍镜下观察下发现肿瘤细胞排列紊乱,没有层次和极向,紧密重叠或呈多层状,癌巢中可见坏死,与周围的正常肺组织细胞排列差异明显;400 倍镜下发现肿瘤细胞大小形态各异,可发现瘤巨细胞,核浆比明显增大,核膜增厚,核仁数目增多,核分裂增多,呈不对称、多极性和顿挫性(图 2)。

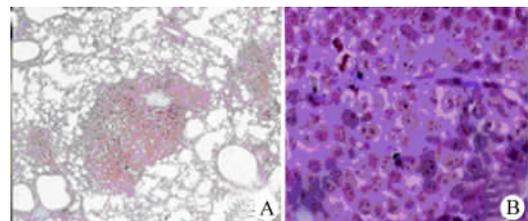


图 2 Ad-EGFP 组荷瘤裸鼠肺转移灶病理改变(H-E)
Fig. 2 Pathologic change of the pulmonary metastasis tissue in osteosarcoma cells-bearing nude mice(H-E)

A: ×100; B: ×400

3 讨论

骨肉瘤转移是一个多步骤、多分子参与的癌细胞与宿主细胞间相互作用的复杂过程,大致可以分

为两个阶段:第一,原发病灶的肿瘤血管生成;第二,转移的肿瘤细胞在到达目的器官后必须重新经历血管生成过程,建立自身的血管系统,该部位细胞克隆处于高增殖和高凋亡相互抵消的蛰伏状态。

目前发现的肿瘤血管生成因子及抑制因子有 40 多种,抑制因子中以 ES 最为典型。本研究利用含有 ES 基因片段的重组腺病毒注射裸鼠移植瘤体,致裸鼠体内高效表达内皮抑素蛋白,从而抑制种植瘤生长和肺转移。

在接种肿瘤细胞观察 7 周后,治疗组肺转移发生率(0)明显低于对照组的 80% 和 90% ($P < 0.01$),肺湿重及肺转移结节数也明显低于对照组。同时通过对各组裸鼠血 ES 含量的检测发现,Ad-mEndo 治疗组裸鼠 ES 呈高表达,而出现肺转移的对照组裸鼠 ES 明显低表达,证实了重组携带 ES 基因片段的腺病毒 Ad-mEndo 具有抑制肿瘤远处转移的作用,ES 表达水平与肺转移有直接的关系。

ES 的 N 末端结合一个锌离子,与 ES 成 1:1 复合物,有人认为这是 ES 活性所必须的^[7],也有人提出 ES 是否结合锌离子对它的抗血管活性并不重要,突变了不能结合锌的 ES 抗血管活性没有受到影响^[8],因此认为锌是 ES 的结构基因而非功能基因^[9]。但最新研究表明锌结构位点对于保持 ES 结构和功能都是必不可少的^[10]。O'Riordan 等^[11]发现 ES 及不对称二甲基精氨酸和连接组织生长因子等可通过抑制 NOS 启动内皮-间质细胞分化。Zia 等^[12]发现,来源于血液或血管瘤的人类内皮祖细胞被血管生成抑制因子所刺激,表明当内皮祖细胞和成熟内皮细胞对血管生成或抗血管生成信号的反应是不同的。有研究表明 ES 除了有抗血管生成作用外,本身也有直接的抗肿瘤作用^[13]。

Brigit 等^[14]发现 ES 的抗血管生成作用取决于给药的方式和表达的部位。内皮抑素病毒基因治疗一般是通过小鼠尾静脉注射给药,但全身治疗的弱点在于选择性、特异性不高。对大多数实体肿瘤而言,局部给药可能有助于解决这一缺陷^[15]。除此之外,病毒基因存在一定的组织毒性,全身给药剂量范围有限,而局部治疗全身毒性反应相对较轻,安全性较好,故用药剂量范围大^[16]。本实验中发现,荷瘤裸鼠能接受局部高滴度 Ad-mE 治疗,且能耐受良好,并能表达出高水平的 ES;使得 ES 随血流到肺脏,抑制肺转移灶的血管生成。

通过抑制血管内皮细胞而达到抗肿瘤血管形成是肿瘤治疗的全新领域,虽然尚处于实验阶段,但已取得了令人鼓舞的结果^[17-18]。与传统直接杀伤肿

瘤的化疗相比,抑制血管内皮细胞抗肿瘤血管形成来治疗肿瘤具有无可比拟的优点,但同时也存在一些亟待解决的问题,如基因治疗的机体不受控性、缺乏靶向性、病毒载体抗原性以及导入基因的表达与调控等问题。联合治疗有可能提高效率^[17,19]。Schmidt 等^[20]发现 ES 有血管生成调节作用,而不是先前认为的抗血管生成的作用。其他研究者也有类似发现^[21-22]。相信随着肿瘤血管形成机制研究的不断深入,目前存在的问题一定会逐一得到解决,抗肿瘤血管形成将成为肿瘤治疗的重要手段。

[参考文献]

- [1] Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, 397: 40-52.
- [2] Frassica FJ, Frassica DA, Wold LE, et al. Postradiation sarcoma of bone[J]. Orthopedics, 1993, 16(1): 105-106.
- [3] Rosen G, Caparros B, Huvos AG, et al. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy[J]. Cancer, 1982, 49(6):1221-1230.
- [4] Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, et al. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors[J]. Clin Orthop, 1996, 324: 86-97.
- [5] La Quaglia MP. Osteosarcoma. Specific tumor management and results[J]. Chest Surg Clin N Am, 1998, 8(1): 77-95.
- [6] Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, et al. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma[J]. J Bone Joint Surg Am, 1998, 80(7): 1020-1033.
- [7] Boehm T, O'reilly MS, Keough K, et al. Zinc-binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 252(1): 190-194.
- [8] Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding[J]. EMBO J, 1999, 18(16): 4414-4423.
- [9] Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, et al. Collagen XVIII /endostatin structure and functional role in angiogenesis[J]. Cell Struct Funct, 2000, 25(2): 97-101.
- [10] Tjin Tham Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, et al. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH2-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity[J]. Cancer Res, 2005, 65(9):3656-3663.
- [11] O'Riordan E, Mendelev N, Patschan S, et al. Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(1): H285-H294.
- [12] Khan ZA, Melero-Martin JM, Wu X, et al. Endothelial progenitor cells from infantile hemangioma and umbilical cord blood display unique cellular responses to endostatin [J]. Blood, 2006, 108(3): 915-921.
- [13] Dkhissi F, Lu H, Soria C, et al. Endostatin exhibits a direct anti-

- tumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(10): 997-1008.
- [14] Schaffhauser B, Veikkola T, Strittmatter K, *et al.* Moderate anti-angiogenic activity by local, transgenic expression of endostatin in Rip1 Tag2 transgenic mice [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(4): 669-676.
- [15] Boehm T, Folkman J, Browder T, *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. [J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 404-407.
- [16] Berger AC, Feldman AL, Gnant MF, *et al.* The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. [J]. *J Surg Res*, 2000, 91(1): 26-31.
- [17] Dirkx AE, oude Egbrink MG, Castermans K, *et al.* Anti-angiogenesis therapy can overcome endothelial cell anergy and promote leukocyte-endothelium interactions and infiltration in tumors [J]. *FASEB J*, 2006, 20(6): 621-630.
- [18] Schumacher JJ, Dings RP, Cosin J, *et al.* Modulation of angiogenic phenotype alters tumorigenicity in rat ovarian epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3683-3690.
- [19] Li X, Raikwar SP, Liu YH, *et al.* Combination therapy of androgen-independent prostate cancer using a prostate restricted replicative adenovirus and a replication-defective adenovirus encoding human endostatin-angiostatin fusion gene [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(3): 676-684.
- [20] Schmidt A, Addicks K, Bloch W. Opposite effects of endostatin on different endothelial cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(11): 1162-1168.
- [21] Schmidt A, Wenzel D, Ferring I, *et al.* Influence of endostatin on embryonic vasculo- and angiogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2004, 230(3): 468-480.
- [22] Wenzel D, Schmidt A, Reimann K, *et al.* Endostatin, the proteolytic fragment of collagen XVIII, induces vasorelaxation [J]. *Circ Res*, 2006, 98(9): 1203-1211.
- [收稿日期] 2007-11-08 [修回日期] 2008-02-15
[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

Toll 样受体 4 内吞后诱导干扰素 β 的产生

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是目前研究最清楚的一类模式识别受体, 募集一类含有 TIR 结构域的接头分子, 激活下游的 IRAK 和 MAPK 家族信号分子以及 E3 泛素连接酶 TRAF 分子, 活化 NF- κ B 和干扰素调节因子 (IRF) 等转录因子, 最终诱导炎症因子和 I 型干扰素的产生。目前 TIR 接头分子共发现 5 个成员: MyD88, MAL (TIRAP), TRIF (TICAM1), TRAM (TICAM2) 和 SARM。TLR 信号通路主要分为 MyD88 依赖和 TRIF 依赖两类通路, TLR4 是唯一同时利用两条通路的 TLR 受体, 且同时募集除 SARM 以外的其余 4 种 TIR 接头分子。

目前, 所有已知诱导产生 I 型干扰素的受体信号都是胞内膜结构触发的, 唯一例外的 TLR4, 被认为是从胞膜上通过 TRAM-TRIF 通路诱导干扰素 β 的产生。然而, 论文作者利用 TRAM 缺失小鼠模型并构建 TRAM 不同片段缺失体、突变体和不同细胞定位的融合蛋白, 揭示了 TLR4 在 Dynamin 依赖的内吞后在 Rab5 标记的早期内体上触发 TRAM-TRIF 途径, 最终产生干扰素 β 。

该研究证明了 TLR4 在 LPS 刺激后 30 min 内通过 Dynamin 依赖的方式内吞到 Rab5 标记的早期内体中。LPS 刺激 Dynamin 特异性抑制剂 Dynasore 提前处理的细胞, TLR4 的内吞受到明显抑制, 同时 TRAM-TRIF 信号通路以及该通路诱导的炎症因子 RANTES、IL-6 和干扰素 β 的产生都受到明显抑制, 而 MAL-MyD88 通路基本未受影响。葡聚糖内吞共聚焦定位证实了活化后的 TLR4 以及 TRAM 能和被内吞的葡聚糖共定位早期内体中。对 TRAM 不同片段缺失体和序列进行分析, 鉴定出了 1~20 氨基酸残基的二级定位序列, 该二级定位序列由 7 个氨基酸残基的豆蔻酰化基序跟随 13 个多碱性和芳香族残基基序组成。其中, 豆蔻酰化基序决定了 TRAM 的内体定位, 而碱性基序则决定了其胞膜定位。豆蔻酰化基序点突变明显抑制了 LPS 诱导的 IL-6 和 RANTS 的产生, 碱性基序的点突变抑制了 TRAM 和大多数酸性磷酸肌醇以及磷脂酸的结合。共聚焦显示, TRIF 和 MyD88 共同的下游信号分子 TRAF3 主要分布于胞质溶胶中, PLC-TRAF3 融合蛋白包含胞膜定位信号磷脂酶 C 的 PH 结构域, 该蛋白过表达能诱导提高 NF- κ B 的转录活性和干扰素激活反应原件 (ISRE) 的活性。稳定表达 PLC-TRAF3 的 Raw264.7 细胞株能通过刺激 TLR2 产生干扰素 β , 在野生型 TRAF3 稳定株中却不能, 而炎症因子 IL-1 β 并未有明显变化。抑制 TLR4 的内吞和破坏内体定位的 TRAM 突变体抑制 LPS 诱导干扰素 β 的产生; 胞膜定位的 TRAF3 能使 TLR2 信号通路产生干扰素 β , 提示了 TRAF3 可能是限制 LPS 诱导的干扰素 β 从细胞内触发产生的关键。

该研究论证了只有活化的 TLR4 内吞到 TRAM 定位的早期内体中, 两者结合后才能向下游传递信号, 其中关键因素之一则是胞质溶胶定位的 TRAF3。该研究否定了学术界之前公认的 TLR4-TRAM-TRIF 是唯一的能从胞膜上触发产生干扰素 β 的信号通路。同时, TRAM 的二级定位基序 (7 个氨基酸残基的豆蔻酰化基序跟随 13 个多碱性和芳香族残基基序) 是一种控制蛋白在细胞膜和细胞器内循环迁移的定位基序。

[姚 鸣 摘译, 陈涛涌 审阅. *Kagan JC, Su T, Horng T, et al. Nature Immunol*, 2008, 9(4): 361-368]