

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0228-05

· 论 著 ·

Livin 异构体特异性 shRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响

于利利, 王泽华* (武汉华中科技大学 同济医学院 附属协和医院 妇产科 武汉 430022)

[摘要] 目的: 应用构建成功的 *Livin* 异构体 (*BIRC71*, *BIRC72*) 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 真核表达载体转染 HeLa 细胞, 探讨其对 *Livin* 基因的沉默效应及诱导 HeLa 细胞凋亡的作用。方法: 采用脂质体转染法转染 HeLa 细胞, 荧光实时定量 PCR、Western blotting 检测转染前后宫颈癌 HeLa 细胞 *Livin* 基因拷贝数和蛋白表达的变化, 将 shRNA 表达载体流式细胞术检测不同时间 (24、48、72 h) 的细胞凋亡率。结果: 真核表达载体的转染效率 48 h 较 24、72 h 高; 转染 pGenesil-1-BIRC71、pGenesil-1-BIRC72 后 HeLa 细胞中 *Livin* 拷贝数明显减少 ($P < 0.05$), 蛋白质表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 流式细胞术检测 24、48、72 h 凋亡率, 转染 *Livin* shRNA 组细胞的凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 随时间延长 (24→72 h) 凋亡率相应增加。结论: 靶向 *Livin* 的 shRNA 真核表达载体可以有效特异地阻断 *Livin* 基因的表达, 明显诱导宫颈癌细胞凋亡。

[关键词] *Livin* 基因; 短发夹 RNA; 宫颈癌; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

Apoptosis of cervical cancer cell line HeLa induced by *Livin* isoform-specific shRNA

YU Li-li, WANG Ze-hua* (Department of Obstetrics and Gynecology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To transfect a recombinant short hairpin RNA (shRNA) expression vector targeting *Livin* gene isoform (*BIRC71*, *BIRC72*) into the cervical cancer cell line (HeLa cell), in an attempt to observe RNAi-mediated silencing on *Livin* gene and the induction of HeLa apoptosis. **Methods:** HeLa cells were transfected with the recombinant plasmid pGenesil-1-BIRC71, pGenesil-1-BIRC72 and pGenesil-1-HK via Lipofectamine™ 2000. The expression levels of *Livin* was determined in HeLa cells before and after transfection by fluorescence quantitative real-time PCR and Western blotting. The apoptosis rate of cells was determined by FCM 24, 48 and 72 h after transfection. **Results:** The transfection efficiency at 48 h was higher than those at 24 and 72 h. After transfection with pGenesil-1-BIRC71 and pGenesil-1-BIRC72, gene and protein levels of *Livin* were significantly reduced ($P < 0.05$). The apoptosis rate of *Livin* shRNA transfection group was significantly higher than that of the control group, and increased with the prolongation of time (24, 48, and 72 h; $P < 0.05$). **Conclusion:** pGenesil-1-BIRC71 and pGenesil-1-BIRC72 can effectively reduce *Livin* gene expression and induce apoptosis of HeLa cells.

[Key words] *Livin* gene; short hairpin RNA (shRNA); cervical cancer; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 228-232]

宫颈癌是全球发病率和病死率仅次于乳腺癌的居第二位的妇科恶性肿瘤^[1]。目前对于宫颈癌的治疗多是以手术和放射治疗为主、以化疗为辅的综合治疗措施。但这些治疗方式会给患者带来很大的痛苦,而且宫颈癌细胞对化疗药物存在耐药性,其5年存活率仅为30%~50%,因此迫切需要研究一种既能提高抗肿瘤效果同时毒性又低的治疗方法。

目前关于宫颈癌治疗的研究较多,其中基因治疗被认为是最有前途和挑战性的研究方向,而目前基因治疗研究热点是RNA干扰(RNA interference,

RNAi)技术。研究表明,在哺乳动物细胞中只有长度为19~22个核苷酸的短双链RNA才具有RNA干扰功能,RNA干扰的特异性及高效性使其可能成为一前景光明的治疗方法^[2]。

[基金项目] 湖北省科技厅自然科学基金资助项目(No. 4-306)。Supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province(No. 4-306)

[作者简介] 于利利(1975-),女,山东省青岛市人,博士,主要从事妇科肿瘤方面的研究

* Corresponding author. E-mail: zehuawang@163.net

Livin 基因是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的一个新成员,其在人类多种肿瘤细胞系中高表达,包括黑素瘤、淋巴瘤、大肠癌、前列腺癌、宫颈癌、乳腺癌等。该基因与肿瘤细胞抗凋亡效应密切相关^[3-6],可能作为诱导肿瘤细胞凋亡治疗的一个新靶点。Ashhab 等^[4]明确了该基因存在 2 个剪接变体(*BIRC71* 和 *BIRC72*),分别命名为 *Livin α* , *Livin β* 。

本研究根据 *Livin* 高表达于宫颈癌以及 RNAi 高效特异抑制目的基因表达的特点,将 *Livin* 两种异构体(*Livin α* 和 *Livin β*)的短发夹 RNA(short hairpin, shRNA)真核表达载体分别转染入宫颈癌 HeLa 细胞,观察其抑制 *Livin* 基因表达及介导宫颈癌细胞凋亡的效果,为探索宫颈癌的基因治疗方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

脂质体 Lipofectamine™ 2000 为美国 promega 公司产品,Trizol 溶液、小牛血清、DMEM 为 Gibco 公司产品,SupperScript 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒为 Fermentas 公司产品,兔抗人 *Livin* 多克隆抗体及鼠抗兔二抗为 ebioscience 公司产品,SYBR Green I 荧光染料为美国 Biotium 公司产品,Oligo(dT18)为上海英骏 Invitrogen 公司产品,dNTP 和 Taq 酶为大连宝生物工程有限公司产品,人 Annexin-FITC 试剂盒为晶美公司产品。重组含人 *Livin* shRNA 真核表达质粒载体(*pGenesil-1-BIRC71*, *pGenesil-1-BIRC72*)及阴性对照(*pGenesil-1-HK*)由作者^[7]构建,它在 *pGenesil-1* 的 U6 启动子下游 *Bam*H I 和 *Hind* III 两酶切位点插入干扰序列,具有卡那霉素和新霉素抗性,大小约为 4.9 kb。

1.2 HeLa 细胞培养

宫颈癌 HeLa 细胞由协和医院妇科实验室保存,为贴壁细胞。用含 100 ml/L 小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、0.1 g/L 链霉素的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度温箱中培养传代,倒置显微镜下观察细胞生长状况。

1.3 *pGenesil-1-BIRC71*, *pGenesil-1-BIRC72*, *pGenesil-1-HK* 转染 HeLa 细胞

实验用细胞均处于对数生长期。转染前将 HeLa 细胞接种在 6 孔板中,每孔为 8×10^5 个细胞,将细胞换成无血清无抗生素的 DMEM 培养液,按 Lipofectamine™ 2000 试剂说明操作。

1.4 荧光实时定量 RT-PCR 检测肿瘤细胞 *Livin* 基

因拷贝数

参照文献[8]略加改动。收取各组转染(*pGenesil-1-BIRC71* 和 *pGenesil-1-BIRC72*、*pGenesil-1-HK*)和未转染的 HeLa 细胞约 1×10^6 个/组,提取细胞总 RNA,将 mRNA 逆转录为稳定的 cDNA。PCR 反应体系中加入内对照为 β -actin。*Livin* 引物序列为上游:5'-ACAGAGGAGGAAGAGGAGGAG-3';下游:5'-GCAGTCAGCGGCCAGTCATAG-3',扩增产物长度为 116 bp。 β -actin 引物序列为上游:5'-GAACGGT-GAAGGTGACAG-3';下游:5'-TAGAGAGAAGT-GGGGTGG-3',扩增产物长度为 168 bp。反应条件 94 °C 3 min;(94 °C 30 s 57 °C 30 s, 72 °C 30 s)45 个循环。对 *Livin* 及内对照 β -actin 分别进行实时荧光定量 PCR,同时设置无 cDNA 的阴性对照。结果以 Ct 值表示,其含义为:每个反应管内荧光强度达到系统认为的有目的 DNA 合成时的循环数(以阴性对照作参照)。

1.5 Western blotting 检测肿瘤细胞 *Livin* 蛋白表达

重组质粒转染 48 h 后,分别收获各组 HeLa 细胞各 1×10^6 ,提取细胞总蛋白,进行 5% SDS-PAGE 凝胶电泳,电转移至硝酸纤维素膜,*Livin* 抗体 1:500 稀释封闭过夜,鼠抗兔二抗 1:5 000 稀释孵育 1 h,化学发光法显色,发光成像仪取像。目的蛋白 *Livin* 及 β -actin 用 BandScan5.0 软件进行灰度扫描,分析蛋白表达的相对值。

1.6 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡

取转染 24、48、72 h 的 HeLa 细胞,消化细胞,转入 5 ml 离心管中, $1\ 000 \times g$ 4 °C 离心 10 min,收集细胞,弃上清。用 4 °C 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,用 250 μ l 结合缓冲液重新悬浮细胞,并使其密度为 1×10^6 个/ml。加入 5 μ l Annexin-FITC 和 10 μ l 20 μ g/ml 的碘化丙锭(propidium iodide, PI)溶液,混匀后于室温避光孵育 15 min。在反应管中加 100 μ l PBS,流式细胞仪分析。

1.7 统计学处理

SPSS10.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析各组间差异, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 *Livin* shRNA 表达载体对 HeLa 细胞的成功转染

转染 24 h 后,倒置荧光显微镜下可见转染细胞有绿色荧光蛋白表达,未转染细胞未见荧光,证实转染成功。48 h 左右荧光表达最强,72 h 后绿色荧光蛋白的表达逐渐减弱(图 1)。

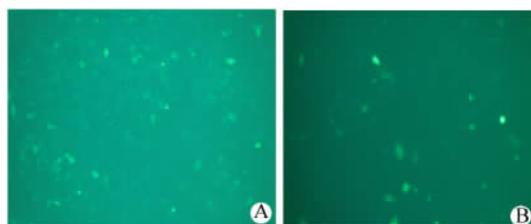


图1 荧光显微镜观察 HeLa 细胞转染 48 h (A)、72 h (B)后绿色荧光蛋白的表达(× 100)

Fig. 1 Expression of green fluorescent protein in HeLa cells at 48 h (A),72 h (B) after transfection under fluorescence microscope (× 100)

2.2 重组质粒转染后 HeLa 细胞 *Livin* 基因的表达
HeLa 细胞经特异性 shRNA 表达载体 pGenesil-1-*BIRC71/BIRC72* 作用后, 24、48、72 h, *BIRC71/*

BIRC72 基因的 Ct 值均明显增加,提示 HeLa 细胞在重组质粒转染后 *BIRC71/BIRC72* 基因 mRNA 拷贝数明显降低;阴性对照组及空白对照组 *BIRC71/BIRC72* 基因 Ct 值无明显变化(表 1)。

2.3 重组质粒转染后 HeLa 细胞 *Livin* 蛋白表达

细胞转染 48 h 后,两实验组、对照组 *Livin* 蛋白的相对表达量分别为(1.3 ± 0.65)、(1.0 ± 0.37)、(2.3 ± 0.13),两实验组与阴性对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。由此证实,本实验设计的 shRNA 能有效地特异性沉默 *Livin* 基因,抑制其蛋白表达。

2.4 重组质粒转染后 HeLa 细胞的凋亡

细胞转染 24、48、72 h 后,两实验组与阴性对照组和空白对照组细胞相比,凋亡率明显增加($P < 0.05$),进一步说明 pGenesil-1- *BIRC71/BIRC72* shRNA 有明显促进 HeLa 细胞凋亡的作用(表 2)。

表 1 重组质粒转染后 HeLa 细胞 *BIRC71* 和 *BIRC72* 的 Ct 值

Tab. 1 Ct value of *BIRC71* and *BIRC72* in HeLa cells after transfection by recombinant plasmids

Group	<i>BIRC71</i> Ct			<i>BIRC72</i> Ct		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48h	72h
Control group	22.15 ± 0.31	22.53 ± 0.28	22.86 ± 0.19	21.13 ± 0.25	21.56 ± 0.15	21.80 ± 0.24
pGenesil-1- <i>BIRC71</i>	25.64 ± 0.65*	30.64 ± 0.72*	31.58 ± 0.83*	24.54 ± 0.87*	28.76 ± 0.75*	30.28 ± 0.92*
pGenesil-1- <i>BIRC72</i>	24.86 ± 0.79*	28.88 ± 0.67*	30.53 ± 0.86*	26.78 ± 0.86*	30.79 ± 0.88*	29.65 ± 0.87*
pGenesil-1-HK	22.24 ± 0.23	22.76 ± 0.32	23.02 ± 0.27	22.12 ± 0.20	22.69 ± 0.3	23.03 ± 0.22

* $P < 0.05$ vs control group, pGenesil-1-HK group at the same time point, respectively

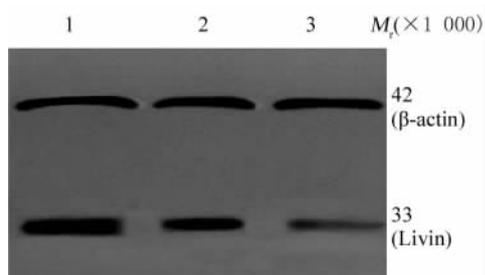


图 2 Western blotting 检测重组质粒转染后肿瘤细胞中 *Livin* 蛋白表达

Fig. 2 Expression of *Livin* protein in transfected HeLa cells as detected by Western blotting
1: pGenesil-1-HK; 2: pGenesil-1- *BIRC71* ;
3: pGenesil-1- *BIRC72*

生物学最活跃的领域之一。*Livin* 是最近发现的 IAP 家族的新成员,近年来对 *Livin* 的研究不断增多。研究表明 *Livin* 可通过多种途径抵抗细胞凋亡、抑制 caspase 活性、参与肿瘤坏死因子(TNF)介导的信号转导、与核转录因子 κ B 相互作用等,较其它的 IAP 家族成员具有更为特殊的地位。

表 2 重组质粒转染后不同时间 HeLa 细胞的凋亡率(%)

Tab. 2 Apoptotic rate of HeLa cells after transfection by recombinant plasmids at different time points(%)

Group	24 h	48 h	72 h
Control	0.2 ± 0.11	0.5 ± 0.20	0.8 ± 0.25
pGenesil-1- <i>BIRC71</i>	5.85 ± 1.32*	10.87 ± 2.1*	14.9 ± 3.48*
pGenesil-1- <i>BIRC72</i>	6.78 ± 1.45*	12.75 ± 2.23*	16.92 ± 4.05*
pGenesil-1-HK	0.83 ± 0.13	1.65 ± 0.32	2.89 ± 0.39

* $P < 0.05$ vs pGenesil-1-HK group at the same time point, respectively

3 讨论

近年来,凋亡相关基因的研究已成为肿瘤分子

RNAi 以降解特异的 mRNA 为目标,不影响非同源基因 mRNA 的稳定性,具有稳定性高、抑制作用强、细胞摄取相对容易等优点^[9]。本研究构建的 pGenesil-1/BIRC71 和 pGenesil-1/BIRC72 shRNA 真核表达载体,有效克服了直接向细胞内导入 shRNA 基因维持时间短、体内运载难和效果不稳定等问题^[10]。Kasof 等^[11]将带有 *Livin* 反义序列及 GFP 标记的 pTracer 质粒协同转染表达 *Livin* 的 HeLa、G361 细胞系及不表达 *Livin* 的 SW480 细胞系,发现反义序列使前两种细胞系的 GFP 阳性细胞较对照组减少了 80% ~ 90%,而对后一种的影响却微乎其微。说明 *Livin* 反义序列仅对 *Livin* 表达阳性的细胞起促凋亡作用。与本研究结果一致。

Ashhab 等^[4]发现 *Livin* 的两种不同异构体的抗凋亡作用与两者间相差的 18 个氨基酸有关,*Livin* α (而非 *Livin* β)能够抑制星状孢子素(staurosporine)诱导的凋亡,相反鬼臼乙甙诱导的凋亡却只能被 *Livin* β 所抑制。

本研究发现 pGenesil-1/BIRC71 和 pGenesil-1/BIRC72 均可诱导 HeLa 细胞凋亡,其诱导凋亡的效应无明显差异,推测 *Livin* α 和 *Livin* β 均在在宫颈癌的抗凋亡过程中发挥作用。

Livin 基因作为 IAP 家族的一个重要成员,其发挥抗细胞凋亡作用的主要途径有:(1)在 Fas/caspase-8 诱导的死亡受体途径中及在细胞色素-C/Apaf-1 作用的线粒体途径直接抑制 caspase-3。(2) *Livin* 与 TAK1/JNK1 途径有关。Sanna 等^[11]发现 XIAP、*NIAP*、*Livin* 可通过转化生长因子激活激酶 1 和丝裂原激活蛋白 3 依赖的方式激活 C-JUN N-末端激酶 1、2、3,明显抑制由白介素-1 β 转化酶或 Fas 诱导的细胞凋亡。(3) *Livin* 通过诱导核转录因子 κ B 激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶途径,以钙离子结合蛋白等方式发挥抗凋亡作用。(4)通过与 TNF 受体结合,抑制该凋亡途径。Kasof 等^[12]将带有 *Livin* mRNA 反义序列转染表达 *Livin* 的 HeLa 和 G361 细胞系及不表达 *Livin* 的 SW480 的细胞系,减少 *Livin* 的表达能够降低细胞的存活率,而 SW480 的细胞系几乎不受影响,表明 *Livin* mRNA 表达减少可促使 caspase 活性增加及肿瘤细胞凋亡,提示以 *Livin* 为靶点治疗肿瘤的可行性。

Crnkovic 等^[13]探讨了抗凋亡蛋白 *Livin* 基因在肾癌细胞中抗凋亡的作用。在肾癌肿瘤组织中 *Livin* 的表达显著升高(92.9%),在肿瘤细胞系中也是如此(80.0%)。通过 siRNA 进行 *Livin* 基因表达干扰后肾癌细胞对化疗(etoposide, 5-fluorouracil 和 vin-

blastine)或是放疗的敏感性显著提高。在肾癌中以 *Livin* 为靶点的治疗有着潜在临床应用前景。

RNAi 技术有瞬时转染和稳定转染两种技术^[14],本研究为瞬时转染。在多数哺乳动物中瞬时转染基因抑制的高峰时间为转染后 48 ~ 72 h。虽然本研究中细胞凋亡率和蛋白质的抑制率在转染后 48 ~ 72 h 明显增加,但瞬时转染不适合动物体内的研究,因此本研究需要进一步构建 *Livin* 的 shRNA 质粒载体转染 HeLa 细胞,建立稳定转染的细胞系,从而可能长久抑制蛋白质的表达^[15-16]。总之本课题所构建的靶向 *Livin* 基因的 shRNA 真核表达载体具有高度特异性,可以有效地阻断 HeLa 细胞 *Livin* 基因的表达,诱导 HeLa 细胞凋亡。*Livin* α 和 β 两种异构体在宫颈癌抗凋亡中的作用大体上相似,因此 *Livin* α 和 β 两种异构体均能作为诱导宫颈癌凋亡的分子靶点。研究提示,靶向 *Livin* 的 RNAi 技术在宫颈癌的治疗中具有潜在的应用价值,为今后进一步研究提供了必要的实验基础。

[参考文献]

- [1] Massad SL, Markwell S, Cejtin HE, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia among young women with abnormal screening cytology [J]. J Low Genit Tract Dis, 2005, 9(4): 225-229.
- [2] Nguyen T, Menocal EM, Harborth J, et al. RNAi therapeutics: an update on delivery [J]. Curr Opin Mol Ther, 2008, 10(2): 158-167.
- [3] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. Curr Biol, 2000, 10(21): 1359-1366.
- [4] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, et al. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern [J]. FEBS Lett, 2001, 495(1-2): 56-60.
- [5] Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, et al. Detection of anti-*Livin* antibody in gastrointestinal cancer patients [J]. Clin Chem, 2003, 49(7): 1206-1208.
- [6] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of *Livin*, *Survivin* and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. Ann Oncol, 2003, 14(1): 85-90.
- [7] 于利利,王泽华. 凋亡抑制蛋白 *Livin* shRNA 真核表达载体的构建 [J]. 华中科技大学学报:医学版, 2007, 36(5): 489-491.
- [8] Varela-Ledo E, Romero-Yuste S, Ordóñez-Barbosa P, et al. CMV DNA detection in plasma using real-time PCR based on the SYBR-Green I dye method [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2006, 24(9): 541-545.
- [9] Zhang YC, Taylor MM, Samson WK, et al. Antisense inhibition: oligonucleotides ribozymes and siRNAs [J]. Methods Mol Med, 2005, 106: 11-34.

- [10] 朱 静,王应熊,张晓萍,等. Gcn5 基因 shRNA 的载体构建及其对干细胞分化中组蛋白乙酰化修饰的干扰作用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(1): 43-46.
- [11] Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, *et al.* IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(6): 1754-1766.
- [12] Kasof GM, Gomes BC. *Livin*, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(5): 3238-3246.
- [13] Crnkovic-Mertens I, Semzow J, Hoppe-Seyler F, *et al.* Isoform-specific silencing of the *Livin* gene by RNA interference defines *Livin* beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells [J]. *J Mol Med*, 2006, 84(3): 232-240.
- [14] Hannon GJ, Conklin DS. RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 257: 255-266.
- [15] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553.
- [16] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 6047-6052.
- [收稿日期] 2008-02-28 [修回日期] 2008-04-15
[本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

磷脂酰丝氨酸受体 TIM4 的克隆鉴定

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是表达在凋亡细胞表面的一种重要标志分子。它是第一个被鉴定出的细胞发生凋亡时表达发生变化的配体。目前很多研究表明, PS 可以通过与一些特定分子相结合从而介导吞噬细胞对凋亡细胞的识别和摄取, 其中大部分 PS 结合分子都为一些“桥联分子”。

腹腔巨噬细胞能有效的吞噬凋亡细胞, 并且这种效应能被桥联分子 MFG-E8 的突变体 D89E 明显抑制。但 MFG-E8 主要表达在巯基醋酸盐诱导的腹腔巨噬细胞、淋巴结脾脏中的可染小体巨噬细胞及朗格汉斯细胞表面, 腹腔巨噬细胞仅表达低水平的 MFG-E8, 似乎并不能直接影响这类细胞的吞噬功能。因此为鉴定何种分子参与这种抑制效应, 作者用小鼠腹腔细胞免疫仓鼠得到 1 200 多种杂交瘤抗体, 并且发现其中的单克隆抗体 KAT5-18 能呈剂量依赖性抑制腹腔巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬作用。随后通过流式分析发现大部分 MAC1⁺ 腹腔细胞能被 KAT5-18 结合, 表明腹腔巨噬细胞表达该抗体的抗原。随后, 为鉴定 KAT518 所识别的抗原, 作者采用了逆转录病毒介导的表达克隆策略, 通过几次独立实验发现在 KAT5-18 阳性分选得到的细胞中, 插入的外源片段都包含有 TIM4 CDNA。为验证表达克隆的结果, 作者将 TIM4 CDNA 片段转入 BA/F3 细胞中, 发现这种细胞结合 KAT518 的能力很强, 由此确定 TIM4 是 KAT518 特异识别的抗原。

Real-Time PCR 分析发现, TIM4 RNA 主要表达在定居腹腔巨噬细胞中, 在巯基醋酸盐诱导的腹腔巨噬细胞和骨髓来源的未成熟 DC 中没有表达; 在组织中主要表达在脾脏、胸腺、淋巴结、唾液腺中, 且仅表达在 MAC1⁺ 细胞中。

为检测 TIM4 在凋亡细胞内吞过程中的作用, 作者通过逆病毒转染建立了 2 种转化细胞株 NIH3T3/DNASE II 和 NIH3T3/DNASE II/TIM4, 与不同数量的凋亡 CAD^{-/-} 胸腺细胞共孵育一定时间后检测 TUNEL⁺ 吞噬细胞的百分比, 发现稳定表达 TIM4 的细胞组吞噬凋亡细胞的能力明显较对照组增强。此外, 表达 DNASE II 和 TIM4 的 NIH3T3 细胞并不吞噬正常细胞, 而且对凋亡细胞的吞噬作用也可以被 KAT518 抗体剂量依赖性所抑制。进一步确定了 TIM4 能增强表达 DNASE II 的 NIH3T3 细胞的吞噬功能。为确定 TIM4 在体内的功能, 作者用 KAT518 和对照抗体分别作用于 CAD^{-/-} 小鼠, 随后用地塞米松诱导胸腺细胞凋亡。发现 KAT518 组中的吞噬作用明显弱于对照组, 说明 TIM4 在体内也可以促进凋亡细胞的吞噬。

为研究这 TIM4 促进吞噬的分子机制, 作者构建了 TIM4 胞外段和 FC 的融合蛋白。结果发现该融合蛋白可以通过类似与 Annexin V 的方式结合凋亡细胞; 进一步发现 TIM4-FC 可以结合 PS, 但不能结合其他磷脂。作者随后又构建了 TIM1、TIM2 和 TIM3 的 FC 融合蛋白, 通过脂质重叠实验分析发现, 只有 TIM1-FC 融合蛋白能特异结合 PS。吞噬实验结果与 TIM4 相似, TIM1 的表达也可以促进 NIH3T3/DNASE II 转化细胞对凋亡细胞的吞噬功能。为确定是哪一个结构域参与 TIM1 和 TIM4 结合 PS, 作者又构建了一系列嵌合蛋白。将 TIM1 和 TIM2 及 TIM4 和 TIM2 的 IGV 和 MUSIN 结构域互换后并与 FC 融合表达, 发现只有含 TIM1 或 TIM4 IGV 结构域的嵌合蛋白能高效结合 PS, 表明 TIM1 或 TIM4 与 PS 的结合位点应处于 IGV 结构域中。

哺乳动物细胞都能产生外体, 外体的外表面也表达 PS。为研究外体是否可结合表达 TIM1 或 TIM4 的细胞, 作者建立了两稳定转染细胞株 BA/F3-TIM1 和 BA/F3-TIM4; 发现与 BA/F3 细胞相比, 生长中的这两种细胞株都可以结合 AnnexinV; 电镜观察发现这两种细胞都能与类外体的颗粒相作用。作者将 TIM4-FC 和 BA/F3-TIM4 细胞共孵育, 同时用 Annexin V 处理, 发现 Annexin V 能明显抑制两者的结合能力。作者用包被 TIM4-FC 的微球体与 TIM1-FC 相作用检测两者结合力, 发现结合力很低, 而来源与 BAF3 细胞的外体能呈剂量依赖性促进两者的结合, 表明 TIM1 和 TIM4 的相互作用是由外体介导的。

[柳国燕 摘译, 于益芝 审阅. Miyanishi M, Tada K, Koike M, *et al.* *Nature*, 2007, 450(7168): 435-439.]