

CpG ODN107 增强人鼻咽癌 CNE-2 细胞对 β 射线照射的敏感性

岑彦艳, 刘昱竹, 丁国富, 赵妍妍, 李斌, 周红* (第三军医大学药学院药理学教研室, 重庆 400038)

[摘要] 目的: 筛选能提高鼻咽癌 CNE-2 细胞对 β 射线放射敏感性的 CpG ODN 序列, 观察筛选获得的 CpG ODN 序列放射增敏的作用特点, 为寻找新的鼻咽癌放疗增敏剂提供实验依据。方法: 应用 MTT 实验筛选 21 种 CpG ODN 序列中对人鼻咽癌 CNE-2 细胞放射增敏作用最强的序列, 以 MTT 实验、集落形成实验、划痕实验和流式细胞术检测该最强作用序列与 β 射线联合作用对 CNE-2 细胞的增殖、集落形成、细胞迁移、细胞周期与凋亡的影响。结果: 筛选实验显示 CpG ODN107 对 CNE-2 细胞具有最高的增敏比 (1.59 ± 0.06), CpG ODN107 和 β 射线联合作用能以剂量依赖方式显著抑制 CNE-2 细胞的增殖, 抑制效应显著高于单纯照射 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 联合作用显著抑制 CNE-2 细胞集落形成和迁移能力, 显著诱导细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 显著增加细胞凋亡 ($P < 0.01$), 上述作用效应均明显强于单纯 β 射线照射 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: CpG ODN 107 可显著增强人鼻咽癌 CNE-2 细胞对 β 射线的照射敏感性, 其放射增敏作用可能与诱导细胞周期阻滞和凋亡有关。

[关键词] CpG ODN107; 人鼻咽癌细胞; 放射敏感性; 细胞增殖; 凋亡

[中图分类号] R739.6; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0538-05

CpG ODN107 enhances radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 to β -ray *in vitro*

CEN Yan-yan, LIU Yu-zhu, DING Guo-fu, ZHAO Yan-yan, LI Bin, ZHOU Hong* (Department of Pharmacology, College of Pharmacy, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective:** To screen for specific CpG ODN sequence which can enhance the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 cells to β -ray and to observe the sensitivity-enhancing characters of the screened CpG ODN sequence, so as to provide evidence for searching novel sensitizer of nasopharyngeal carcinoma to radiation. **Methods:** MTT assay was used to select the strongest sequence to sensitize CNE-2 cells to β -ray irradiation from 21 CpG ODN sequences. The effect of the selected sequence combined with β -ray irradiation were used to treat CNE-2 cells and the proliferation, colony forming, cell migration, cell cycle and apoptosis were all observed. **Results:** Screen assay found CpG ODN107 had the highest SER (1.59 ± 0.06) for CNE-2 cells. CpG ODN107 combined with β -ray irradiation inhibited CNE-2 cell proliferation in a dose-dependent manner, and the inhibitory effect was significantly higher than that of radiation alone ($P < 0.05$, $P < 0.01$). CpG ODN107 combined with β -ray irradiation significantly inhibited the formation and migration of CNE-2 cell colony, and induced G_0/G_1 arrest and significantly increased cell apoptosis compared with that of radiation alone ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion:** Our results suggest that CpG ODN107 can greatly enhance the radiosensitivities of human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 to β -ray radiation, which might be related to the induction of cell cycle arrest and apoptosis.

[Key words] CpG ODN107; nasopharyngeal neoplasms; radiosensitivity; cell proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 538-542]

鼻咽癌原发于鼻咽黏膜被覆上皮的恶性肿瘤, 是我国常见的恶性肿瘤之一。由于鼻咽部位置的特殊性, 手术操作困难, 且鼻咽癌对放疗较敏感, 所以放疗是治疗鼻咽癌的主要手段。但经过一段时间放疗后, 鼻咽癌细胞对射线产生耐受影响治疗效果。为提高放射治疗效果, 国内外开展了大量有关肿瘤放疗增敏剂研究。CpG 寡核苷酸 (CpG oligodeoxy nucleotides,

CpG ODNs) 是一种人工合成的具有免疫调节作用、含 CpG 基序的 DNA 序列, 能模拟原核生物 DNA 刺激机

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30271512)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30271512)

[作者简介] 岑彦艳 (1980-), 女, 重庆市人, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤放射增敏药物的研究

* Corresponding author. E-mail: Zhouh64@163.com

体的免疫系统,激活多种免疫细胞,产生多种细胞因子,抑制肿瘤的生长^[1-2]。据报道^[3-4],CpG ODNs 可作为放射增敏剂提高放疗效果。

本实验室前期工作发现,CpG ODN107 可特异性地增强人脑胶质瘤 CHG-5 细胞放射增敏性^[4]。本实验探讨 CpG ODN107 对鼻咽癌细胞株 CNE-2 放射敏感性的促进作用,为寻找新的鼻咽癌放疗增敏剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人鼻咽癌细胞 CNE-2 细胞系由第三军医大学防原教研室惠赠。RPMI 1640 购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;MTT、二甲基亚砜(DMSO) Sigma 公司;CpG ODN(全骨架硫代修饰)由英骏试剂公司合成。医用直线加速器 2300C/D 型 β 射线机购自美国瓦里安公司。

1.2 21 种 CpG ODN 序列对 CNE-2 细胞放射增敏性能的筛选

调整人鼻咽癌 CNE-2 细胞密度为 1×10^4 /ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 0.2 ml,培养 4 h 后,加入不同种序列的 CpG ODN(101~110,201~210)使终浓度为 10 μ g/ml,再培养 12 h;经 β 射线 20Gy 照射后继续培养 24 h;于每孔中加入 20 μ l 新鲜配置的 MTT 溶液,培养 4 h,弃上清,加入 150 μ l DMSO 作用 15 min 后,在 490 nm 处测定光密度值 D 。计算细胞活性抑制率、存活分数(survival fraction, SF)及放射增敏比(emission sensitizing enhancement ratio, SER)。细胞活性抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值} / \text{对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$;SF(%) = $(\text{实验组 } D \text{ 值} / \text{对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$;SER = 未加药组 D 值/加药组 D 值。每组实验为 5 个复孔,重复 3 次以上。

1.3 MTT 法检测 CpG ODN107 对 CNE-2 细胞照射后增殖活性的影响

调整 CNE-2 细胞密度为 1×10^4 /ml,接种于 96 孔培养板,每孔 0.2 ml,培养 4 h 后,加入不同浓度的筛选实验获得的增敏比最高的 CpG ODN107(终浓度为 1、3、10、30、60 μ g/ml),再培养 12 h;经 20 Gy 剂量 β 射线照射后继续培养 24 h;MTT 法检测细胞增殖活性并计算细胞活性抑制率,方法同 1.2。

1.4 集落形成实验检测 CpG ODN107 对 CNE-2 细胞集落形成的影响

将 1 000 个 CNE-2 细胞接种于 60 mm 培养皿中,每皿 5 ml,培养 4 h,加入 30 μ g/ml 的 CpG ODN107,再孵育 12 h;经 β 射线照射后继续培养 7

~10 d,中间更换 1 次培养液。培养结束后,弃培养液,PBS 洗涤、甲醇固定、瑞氏吉姆萨染色后计数集落,含 50 个细胞以上的定义为 1 个集落。计算集落形成率及集落形成抑制率,集落形成率(%) = 集落数/接种细胞数 $\times 100\%$,集落形成抑制率(%) = $(\text{对照组集落形成数} - \text{实验组集落形成数}) / \text{对照组集落形成数} \times 100\%$ 。每组实验为 5 个复孔,重复 3 次以上。

1.5 划痕实验检测 CpG ODN107 对 CNE-2 细胞迁移能力的影响

调整细胞密度为 5×10^5 /ml,接种于 6 孔板中,每孔 2 ml。培养 4 h 待细胞贴壁后,加入 CpG ODN107(30 μ g/ml)培养 12 h 后,用移液管头部沿培养板底部呈“—”字形划痕,更换培养液,经 β 射线照射后继续培养 24 h,倒置显微镜下观察细胞通过划痕处的迁移情况。

1.6 流式细胞仪(FCM)检测 CpG ODN107 对 CNE-2 细胞周期和凋亡的影响

调整细胞密度为 1×10^6 /ml,接种于 6 孔板中,培养 4 h 待细胞贴壁后,加入终浓度为 CpG ODN107(30 μ g/ml),培养 12 h,经 β 射线照射后,继续放置 24 h,弃掉培养液,PBS 清洗,加入 0.25% 胰蛋白酶消化,吸出液体,加入 2~3 ml 培养液把细胞吹打均匀,800 $\times g$,5 min 离心;再加入 PBS 清洗 2 次,弃掉 PBS,加入 75% 的酒精将细胞吹打均匀,放于离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 24 h;PBS 洗 2 次除尽乙醇,加 RNase A 至终浓度 0.5 g/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ PI 染液至终浓度 50 mg/L 暗室孵育 1 h,流式细胞术检测 DNA 亚二倍体的形成及细胞周期的变化。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组组间差异的比较用 LSD t 检验。其他两样本均数的比较用独立样本 t 检验。检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 21 种 CpG ODN 序列对 CNE-2 细胞放射增敏能力的筛选结果

CNE-2 细胞经不同 CpG ODN 序列(101-110;201-211)处理后,其中 CpG ODN106、211 对 CNE-2 细胞增殖有抑制,与空白组比较有统计学意义($P < 0.05$);单纯 β 射线照射对 CNE-2 细胞增殖有抑制,与未照射组比较有统计学意义($P < 0.05$)。预先用 CpG ODN 处理后再用 β 射线照射,细胞增殖受到明显抑制;较单纯照射组比较,CpG ODN101、102、103、

104、105、106、107、108、109、201、208、210、211 对细胞增殖抑制率明显增高, 其中以 CpG ODN107 抑制效果最为显著, 增敏能力最强, 其增敏比为 1.59 ± 0.06 (表 1)。

表 1 不同 CpG ODN 序列对 CNE-2 细胞的放射增敏比 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Emission sensitizing enhancement ratio (SER) of different CpG ODN sequences on CNE-2 cells treated with β -ray radiation

Group	Inhibition rate(%)	SER
CpG ODN + β -ray		
CpG ODN101	$12.40 \pm 0.06^{\Delta\Delta}$	1.14 ± 0.08
CpG ODN102	$11.60 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$	1.30 ± 0.05
CpG ODN103	$26.00 \pm 0.03^{\Delta}$	1.35 ± 0.06
CpG ODN104	$11.20 \pm 0.03^{\Delta\Delta}$	1.25 ± 0.05
CpG ODN105	$15.20 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$	1.33 ± 0.02
CpG ODN106	$14.00 \pm 0.04^{\Delta\Delta}$	1.13 ± 0.06
CpG ODN107	37.20 ± 0.04	$1.59 \pm 0.06^*$
CpG ODN108	$24.00 \pm 0.02^{\Delta}$	1.30 ± 0.03
CpG ODN109	$20.00 \pm 0.04^{\Delta}$	1.25 ± 0.07
CpG ODN201	$20.00 \pm 0.06^{\Delta}$	1.25 ± 0.09
CpG ODN208	$12.80 \pm 0.06^{\Delta}$	1.13 ± 0.08
CpG ODN210	$21.20 \pm 0.05^{\Delta}$	1.26 ± 0.02
CpG ODN211	$22.00 \pm 0.03^{\Delta}$	1.26 ± 0.06
β -ray	$7.3 \pm 0.05^{\Delta\Delta}$	-

* $P < 0.05$ vs other CpG ODN; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CpG ODN + β -ray; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CpG ODN107 + β -ray

2.2 CpG ODN107 和 β 射线联合作用对 CNE-2 细胞增殖抑制的量效关系

CNE-2 细胞经 CpG ODN107 (1、3、10、30、60 $\mu\text{g/ml}$) 处理, 再经 β 射线 20 Gy 照射后, 与单纯照射组细胞 (20 Gy) 比较, 1、3、10、30、60 $\mu\text{g/ml}$ CpG ODN107 处理的 CNE-2 细胞的活力受到显著抑制 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且与 CpG ODN107 的剂量呈显著的量效关系 (图 1), 但当 CpG ODN107 的浓度达到 30 $\mu\text{g/ml}$ 后, 细胞的增殖抑制增加不明显 ($P > 0.05$), 故在后续实验中采用 30 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度。

2.3 CpG ODN107 和 β 射线联合作用对 CNE-2 细胞集落形成的抑制

CNE-2 细胞经 CpG ODN107 (30 $\mu\text{g/ml}$) 处理, 细胞集落形成受到显著抑制 ($P < 0.01$); CNE-2 细

胞经 CpG ODN107 处理后、再以 20 Gy β 线照射, 照射组细胞与未照射组比较, 照射组细胞集落形成进一步受到显著抑制 ($P < 0.01$, 表 2)。

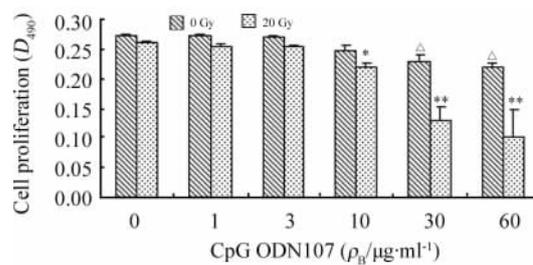


图 1 CpG ODN107 对 β 射线照射后 CNE-2 细胞增殖的抑制作用 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Fig.1 Inhibitory effect of CpG ODN107 combined with β -ray on proliferation of CNE-2 cells

$\Delta P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ CpG ODN107; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ CpG ODN107 + 20 Gy β -ray

2.4 CpG ODN107 和 β 射线联合作用对 CNE-2 细胞迁移的抑制

未经任何处理的 CNE-2 细胞贴壁良好, 呈梭形, 折光性好, 划痕处爬满迁移的细胞 (图 2A); 仅经 20 Gy β 线照射的 CNE-2 细胞形态无明显改变, 但细胞数量明显减少, 划痕处无细胞迁移 (图 2B); CNE-2 细胞经 CpG ODN107 (30 $\mu\text{g/ml}$) 处理后可见细胞数量减少, 划痕处少量细胞迁移, 划痕处周围细胞数量也明显减少 (图 2C)。细胞经 CpG ODN107 处理和 β 线 20 Gy 照射后细胞团形成明显, 细胞数量明显减少, 折光性差, 划痕处以及划痕处周围均未见细胞迁移 (图 2D)。

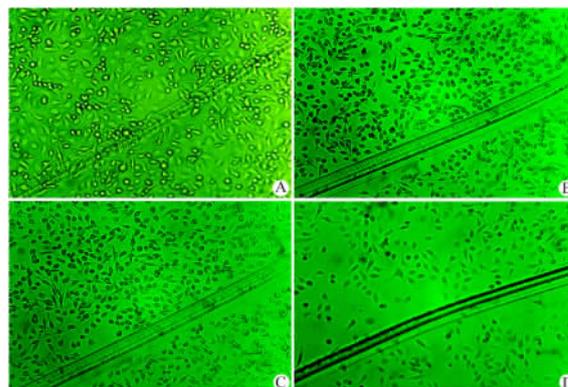


图 2 CpG ODN107 对照射后 CNE-2 细胞迁移的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of CpG ODN107 on migration of CNE-2 cells exposed to β -ray irradiation ($\times 100$)

A: Medium; B: CpG107 (30 $\mu\text{g/ml}$); C: 20 Gy β -ray; D: CpG107 (30 $\mu\text{g/ml}$) + 20 Gy β -ray

2.5 CpG ODN107 和 β 射线联合作用对 CNE-2 细胞凋亡的促进作用
CNE-2 细胞经 CpG ODN107 处理和 β 线 20 Gy

照射后,细胞周期各相均有影响,细胞集聚于 G_0/G_1 期; CpG ODN107 联合 β 射线后,可检测到凋亡峰的增高(表 3)。

表 2 CpG ODN107 对 CNE-2 细胞集落形成的抑制作用($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of CpG ODN107 on cell colony forming of CNE-2 cells($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Medium		CpG ODN107	
	Colony forming	Inhibitory rate(%)	Colony forming	Inhibitory rate(%)
0 Gy	467.0 \pm 16.0	0.0 \pm 0.03	256.0 \pm 39.6 ^{**}	43.0 \pm 0.18 ^{**}
20 Gy	378.0 \pm 28.0	19.0 \pm 0.04	180.0 \pm 60.20 ^{$\Delta\Delta$}	62.0 \pm 0.13 ^{$\Delta\Delta$}

^{**} $P < 0.01$ vs medium; ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$ vs 0 Gy or medium

表 3 CpG ODN107 对 CNE-2 细胞周期与凋亡的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.3 Effects of CpG ODN107 on CNE-2 cell cycle and apoptosis

Group	G_0/G_1	S	G_2/M	Apoptosis(%)
Medium	36.67 \pm 1.79	45.23 \pm 1.81	16.98 \pm 1.03	1.98 \pm 0.95
β -ray(20 Gy)	43.15 \pm 0.57 [*]	15.25 \pm 0.82 [*]	6.45 \pm 0.80 [*]	7.36 \pm 2.13 [*]
CpG107	45.65 \pm 3.36 [*]	19.97 \pm 1.67 [*]	8.56 \pm 2.30 [*]	2.95 \pm 0.92
CpG107 + β -ray (20 Gy)	68.07 \pm 0.61 ^{$\Delta\Delta$**}	24.60 \pm 1.75 ^{Δ*}	5.86 \pm 1.47 ^{**}	20.09 \pm 1.13 ^{$\Delta\Delta$**}

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs medium group; ^{Δ} $P < 0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$ vs 20 Gy β -ray group

3 讨论

对于鼻咽癌的治疗目前以放疗为主。根据文献报道^[8],早期鼻咽癌患者经放射治疗(x 射线和 β 射线)后,其 5 年生存率约为 40% ~ 50%,而第 2 次放疗仅 25% 患者有效,5 年生存率下降为 12% ~ 23%,且放射损害大,肿瘤细胞对第 3 次放疗基本失去敏感性,因此探讨增强鼻咽癌对放疗敏感性的方法及提高鼻咽癌的放射治疗效果有重要的临床意义。

近年来放射增敏剂研究和应用为提高放疗效果带来了新的途径。人工合成的含有未甲基化 CpG 基序的寡脱氧核苷酸(CpG ODN)能活化机体的天然免疫细胞,有利于机体获得性免疫反应的建立,可提高肿瘤细胞对化疗药物和放射治疗的敏感性^[6]。本实验室前期设计并筛选得到大量的具有免疫活性的 CpG ODNs^[8],研究^[5]发现 CpG ODN107 对人脑胶质瘤 CHG-5 细胞具有显著的放射增敏作用。

本实验采用上述具有自主知识产权的 CpG ODN 序列^[9]作用于 CNE-2 细胞,结果显示 CpG ODN107 能增强 CNE-2 细胞对 β 射线放射敏感性,随着 CpG ODN 浓度的增加放射增敏性增强,对 CNE-2 细胞具有降低肿瘤 SF、抑制细胞增殖和迁移的作用。当 CpG ODN107 的浓度达到 30 μ g/ml 时,

SF 值下降趋势甚微,可能与 CpG ODN 作用达到平台期有关^[10]。

肿瘤细胞增殖是反映肿瘤细胞生物学行为的重要指标之一。肿瘤的发生、浸润和转移均与细胞增殖的程度有关。本实验结果显示,CpG ODN107 联合 β 射线照射后,集落数目减少,细胞的迁移能力降低,可能是降低了细胞有丝分裂能力,使有丝分裂的次数减少,从而抑制细胞增殖。通过流式细胞术发现 CpG ODN107 联合射线照射后,S 期和 G_2/M 期的细胞的比率下降,细胞被阻滞于 G_0/G_1 期。 G_1 期是细胞周期的重要调控点,决定着细胞周期能否启动进行细胞增殖。有文献报道^[11],照射后能停滞于 G_1 期的细胞与放射敏感性相关。 G_1 期阻滞是细胞增殖抑制的重要环节,细胞不能进入 S 期,DNA 合成无法完成,干扰了蛋白质代谢,从而抑制肿瘤细胞的分裂,促进细胞凋亡^[12]。因此,实验推测 CpG ODN107 的放射增敏作用可能与引起细胞周期 G_1 阻滞有关,是否与影响细胞周期阻滞的 P53、P21、P16 蛋白表达增多有关^[13-16],其详细机制则有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] Moldoveanu Z, Love-Homan L, Huang WQ, et al. CpG DNA, a

novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus [J]. *Vaccine*, 1998, 16(11-12): 1216-1224.

[2] Dorn A, Kippenberger S. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2008, 10(1): 10-20.

[3] Meng Y, Carpentier AF, Chen L, *et al*. Successful combination of local CpG-ODN and radiotherapy in malignant glioma [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(6): 992-997.

[4] Milas L, Mason KA, Ariga H, *et al*. CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (15): 5074-5077.

[5] 颜 伟, 丁国富, 李 斌, 等. CpG ODN107 增强人脑胶质瘤细胞放射敏感性的研究 [J]. *中国肿瘤防治杂志*, 2007, 14 (7): 481-484.

[6] Milas L, Mason KA, Ariga H, *et al*. CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (15): 5074-5077.

[8] 王素贤, 赵恩洪. 放射治疗 65 例早期鼻咽癌的预后因素分析 [J]. *医疗装备*, 2006(4):35-36.

[9] 王良喜, 鲁永玲, 丁国富, 等. 拮抗细菌 DNA 的 CpG N ODN 筛选 [J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32 (1): 53-56.

[10] 周 红, 王良喜, 郑 江. 高免疫活性的 CpG-S ODN 和拮抗 CpG-S ODN 作用的 CpG-sODN 的基因序列及其应用: 中国, CN200410034787 [P]. 2004-05-17.

[11] Rupnow BA, Murtha AD, Ailarcon RM, *et al*. Direct evidence that apoptosis enhances tumor responses to fractionated radiotherapy [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1779- 1784.

[12] Biade S, Stobbe CC, Chapman JD. The intrinsic radiosensitivity of some human tumor cells throughout their cell cycles [J]. *Radiat Res*, 1997, 147(4): 416-421.

[13] Bucher N, Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(3): 523-528.

[14] Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, *et al*. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening [J]. *Radiat Res*, 2001, 155(1pt 2): 248-253.

[15] Ju GZ, Wang XM, Fu SB, *et al*. Effect of ionizing radiation on the expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes and splenocytes [J]. *Bionmed Environ Sci*, 2003, 16(1): 47-52.

[16] Mukherjee B, Camacho CV, Tomimatsu N, *et al*. Modulation of the DNA-damage response to HZE particles by shielding [J]. *DNA Repair(Amst)*, 2008, 7(10): 1717-1730.

[收稿日期] 2008 - 10 - 07 [修回日期] 2008 - 11 - 01

[本文编辑] 王 莹

• 科技动态 •

MicroRNA 调控由 NKG2D 受体介导的应激所致的免疫反应

MICB 是 NK 细胞活化受体 NKG2D 的配基,可在应激作用下与 NKG2D 作用,在 NK 细胞对病毒感染细胞和肿瘤细胞的杀伤作用的有效发挥中具有重要的作用。以色列的一个研究小组在 2007 年 7 月的《science》上报道,在病毒感染过程中,人巨细胞病毒 miRNA (hcmv-miR-UL112)可以特异地下调 MICB 的表达,导致其与 NKG2D 结合的下降,从而减弱了 NK 细胞的杀伤作用。该揭示了一种新的免疫逃避的机制,这种建立在 miRNA 基础上的机制被认为可能在人巨细胞病毒感染的过程中起作用。

该小组在进一步研究中发现:MICB 基因 3'UTR 上能被 hcmv-miR-UL112 调控的位点在不同人种的 MICB 等位基因中保守,并在 MICA 的 3'UTR 也存在一个相似的结合位点;已有报道称 MICA 和 MICB mRNA 水平和蛋白水平表达差异。这些现象使作者提出这样一个假设:这些位点应该不是作为病毒 microRNA 靶标而如此保守,MICA 和 MICB 3'UTR 中与 hcmv - miR - UL112 的靶位点相似的区域很可能被体内的 microRNA 所调控,继而在各种生理病理状态下调控 MICA 和 MICB 的表达。针对这几个可能的调控位点,作者先进行计算机预测,得到一组可能调节 MICA 和 MICB 表达的内源性 microRNA;然后用荧光素酶报告基因的实验体系证明,其中的 miR17-5p、miR20a、mi93、mi106b、mi373、mi520d 确实对 MICA 和 MICB 3'UTR 上的两个位点有作用,其中的一个位点正好与 hcmv-miR-UL112 结合位点有重叠。

这组内源性的 microRNA 广泛地存在于各人体组织和细胞系中,正常细胞经短时间的应激后,MICA 和 MICB 的 mRNA 表达超过了 microRNA 的抑制能力后,细胞表面的 MICA 和 MICB 的蛋白表达就上调,表明在一定的阈值下,这些 microRNA 可以抑制 MICA 和 MICB 的表达并有助于在受到细胞应激时 MICA 和 MICB 表达上调。作者发现该组 microRNAs 在许多肿瘤组织中过量表达,从而下调肿瘤细胞 MICA 和 MICB 的表达,以避免被 NKG2D 受体介导的杀伤作用,利于肿瘤的免疫逃逸。因此,这个研究小组通过近一年多来的工作证明了一个新的模型:细胞内源性的 microRNA 抑制了 MICA 和 MICB 这两个 NKG2D 配基的表达,防止自身细胞被 NKG2D 受体识别而被 NK 细胞杀伤;受到应激后细胞、死亡细胞、某些肿瘤细胞和病毒感染细胞, MICA 和 MICB mRNA 水平超过了内源性 microRNA 所能抑制的阈值,细胞表面的 MICA 和 MICB 蛋白表达上调,从而被 NK、T 细胞上的 NKG2D 受体介导杀伤并清除;某些病毒和肿瘤细胞通过编码病毒 miRNA 或者上调细胞内源性 miRNA 的机制,抑制了 MICA、MICB 的表达,从而避免被免疫系统识别,实现免疫逃逸。

[马 烽 摘译,刘星光 审阅. Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, *et al*. *Nat Immunol*, 2008,9(9):1065-1073]