

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.013

· 基础研究 ·

## 抗人 stathmin 单克隆抗体与紫杉醇联用对人肝癌细胞增殖的抑制作用

原少斐<sup>1</sup>, 杜红延<sup>2</sup>, 陈筱婷<sup>1</sup>, 汪森明<sup>1\*</sup>, 李明<sup>2\*</sup>(1. 南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广东广州 510282; 2. 南方医科大学生物技术学院, 广东广州 510515)

[摘要] 目的: 探讨抗人 stathmin 单克隆抗体和紫杉醇单用或联用对肝癌细胞系 HepG2 增殖的抑制作用。方法: 以不同浓度的抗人 stathmin 单克隆抗体、紫杉醇分别组成单药组和联合用药组, 另设不加药的空白对照组, 分别作用于 HepG2 细胞 24、48、72 和 96 h, 观察细胞数量和形态的变化, MTT 法检测各用药组对 HepG2 细胞增殖的抑制作用, AnnexinV/PI 双染法检测各组细胞凋亡率的改变。结果: 不同浓度的各组药物作用后细胞数量明显减少, 形态不规则, 部分细胞变圆、细胞核固缩和胞质减少, 而对照组细胞生长状态良好。抗人 stathmin 单克隆抗体、紫杉醇单药与联用均能抑制 HepG2 细胞增殖, 呈剂量-时间依赖效应, 联用组细胞增殖抑制率较单药组明显增高 ( $P < 0.05$ ), 两药联用有交互效应 ( $P < 0.05$ )。抗人 stathmin 单克隆抗体、紫杉醇单用与联用均能诱导 HepG2 细胞凋亡, 联合组作用更为明显 ( $P < 0.05$ )。结论: 抗人 stathmin 单克隆抗体、紫杉醇单药与联用均能抑制 HepG2 细胞增殖和诱导其凋亡, 两药联合使用具有协同作用。

[关键词] stathmin; 单克隆抗体; 紫杉醇; 肝肿瘤; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0165-05

## Inhibitory effects of anti-stathmin monoclonal antibody combined with paclitaxel against proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2

YUAN Shao-fei<sup>1</sup>, DU Hong-yan<sup>2</sup>, CHEN Xiao-ting<sup>1</sup>, WANG Sen-ming<sup>1</sup>, LI Ming<sup>2\*</sup>(1. Department of Oncology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. College of Biological Technology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of anti-stathmin monoclonal antibody combined paclitaxel on the proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines HepG2. **Methods:** HepG2 cells were treated with anti-stathmin monoclonal antibody, paclitaxel or their combinations; untreated cells served as control. 24, 48, 72, and 96 h after exposure, the numbers and morphology of cells in different groups were observed under inverted microscope. Proliferation and apoptosis of HepG2 cells in different groups were studied by MTT and Annexin V/PI staining, respectively. **Results:** The numbers of HepG2 cells were decreased in all treated groups; and the cells in these groups showed morphological changes: some with round shape, some with nuclear chromatin condensation; but HepG2 cells in the control group did not show abnormal morphology. Anti-stathmin monoclonal antibody, paclitaxel alone or in combinations dose-dependently inhibited the proliferation of HepG2 cells, and the inhibitory rate in the combination group was significantly higher than those in the two single drug groups ( $P < 0.05$ ), suggesting a synergistic effect between the two drugs ( $P < 0.05$ ). Anti-stathmin monoclonal antibody, paclitaxel alone or in combinations induced apoptosis of HepG2 cells, and the apoptosis in the combination group was higher than those in the two single drug groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Anti-stathmin monoclonal antibody, paclitaxel alone or in combination can inhibit proliferation and induce apoptosis of HepG2 cells, and a synergistic effect is observed between anti-stathmin monoclonal antibody and paclitaxel.

[Key words] stathmin; monoclonal antibody; paclitaxel; liver neoplasms; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 165-169]

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(No.2006AA02A311)。Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA02A311)

[作者简介] 原少斐(1984-), 男, 山西省运城市人, 硕士, 主要从事肿瘤内科治疗工作

\* 通讯作者( Corresponding author). E-mail: mingli@fimmu.com; E-mail: wsenming@126.com

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率居各种肿瘤的第2位,并且近10年来一直呈上升趋势。目前肝癌的治疗仍以外科手术为首选,但复发率相当高,5年生存率不足30%,因此寻找新的肝癌治疗手段具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。Stathmin是脊椎动物细胞中普遍存在、高度保守的胞质磷蛋白,可以使细胞内微管系统的平衡破坏,从而控制细胞周期,以此改变细胞的增殖、分化、活性等生物学行为<sup>[3]</sup>。在多种恶性肿瘤如乳腺癌、肺癌、白血病等中均可检测到stathmin的高水平表达,通过抑制其表达可以干扰恶性细胞的分裂,逆转肿瘤细胞的恶性表型<sup>[4-5]</sup>,stathmin提供了一个肿瘤基因治疗的新靶点。紫杉醇是从红豆杉树皮中分离提取的具有高效抗肿瘤活性的天然产物,促进微管聚合并稳定微管结构,阻止其解聚成亚单位,进而影响微管聚合与解聚的动态平衡,导致细胞周期停滞于G<sub>2</sub>/M期,快速分裂的肿瘤细胞出现生长抑制而死亡<sup>[6]</sup>。本研究探讨抗人stathmin单克隆抗体联合紫杉醇作用于人肝癌HepG2细胞的抑制作用,为进一步的体内实验与临床应用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞与主要试剂

人肝癌细胞系HepG2为南方医科大学抗体工程研究所实验室传代保存。紫杉醇注射液购自北京华素制药股份有限公司, stathmin单克隆抗体由南方医科大学抗体工程研究所制备<sup>[7]</sup>, RPMI 1640培养液购自Gibco公司, 噻唑蓝(MTT)、分析纯二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司, AnnexinV/PI双染试剂盒购自深圳精美公司。CO<sub>2</sub>孵箱为Thermo公司产品, 倒置相差显微镜为日本Olympus公司产品, 全自动酶标仪为Anthos公司产品, 流式细胞仪为Becton Dickinson公司产品。

### 1.2 细胞培养

人肝癌HepG2细胞在含10%灭活小牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640中置于37℃、5%的CO<sub>2</sub>孵箱中培养。细胞为上皮样细胞,每3~4 d传代1次,并取对数生长期的细胞用于实验。

### 1.3 倒置显微镜观察HepG2细胞形态的变化

取对数生长期HepG2细胞, 2 × 10<sup>5</sup>/孔接种于6孔板, 4 h后分别加入不同质量浓度的stathmin单克隆抗体(10、20、40、80、160 μg/ml)和紫杉醇(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μg/ml), 以及两者联合用药, 药物

处理后24、48、72、96 h在倒置显微镜下观察细胞形态学变化。

### 1.4 MTT法检测stathmin单克隆抗体联合紫杉醇对HepG2细胞增殖的抑制作用

取对数生长期HepG2细胞, 以5 × 10<sup>3</sup>/孔的密度接种于96孔板, 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养4 h后加入药物。实验分组: stathmin单克隆抗体组(10、20、40、80、160 μg/ml), 紫杉醇组(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μg/ml), 联合用药组, 另设不加药的对照组, 每个剂量设5个复孔。分别培养24、48、72、96 h后每孔加入MTT(5 mg/ml) 20 μl, 继续培养4 h。终止培养, 弃上清, 每孔加150 μl DMSO, 振荡10 min, 使结晶物充分融解, 用酶标仪(波长490 nm)测定各孔的D值, 计算细胞增殖抑制率。抑制率(%) = (对照组D<sub>490</sub>值 - 实验组D<sub>490</sub>值)/对照组D<sub>490</sub>值 × 100%。

### 1.5 流式细胞术检测stathmin单克隆抗体联合紫杉醇对HepG2细胞的凋亡作用

取对数生长期HepG2细胞, 2 × 10<sup>5</sup>/孔接种于6孔板, 4 h后加入不同质量浓度的stathmin单克隆抗体、紫杉醇以及两者联合, 另设不加药的对照组, 每一药物浓度设4个复孔; 药物处理后24、48、72、96 h胰酶消化收集全部细胞, AnnexinV/PI双染, FCM分析细胞凋亡率。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS13.0软件处理系统进行统计学分析。均数比较采用One-way ANOVA、post hoc test, 交互效应分析采用factorial分析。

## 2 结 果

### 2.1 抗人stathmin单克隆抗体联合紫杉醇作用后HepG2细胞形态的改变

加药前对照组与实验组HepG2细胞数量和形态基本一致。加药24、48、72、96 h后, 对照组细胞生长良好, 数量随生长时间增长而增多, 细胞呈多边形, 大小均匀、形态一致; 高倍镜下可见细胞染色质疏松、胞质丰富。实验组细胞培养48 h后, 各实验组均可见细胞数量明显减少, 细胞大小不一, 形态不规则, 部分细胞变圆, 高倍镜可见细胞核固缩、胞质减少以及胞质内出现空泡, 部分细胞脱壁呈半悬浮状态, 以上细胞数量及形态改变程度随药物作用时间延长和浓度加大而加剧(图1)。

### 2.2 单用抗人stathmin单克隆抗体对HepG2细胞增殖的抑制作用

单用抗人stathmin单克隆抗体对HepG2细胞

增殖的抑制作用呈时间和浓度依赖性,随浓度的增加和作用时间的延长,其对细胞增殖的抑制作用逐渐增强。作用 72 h 后,对 HepG2 细胞增殖的最大抑制率为(30.3 ± 1.6)% (表 1)。

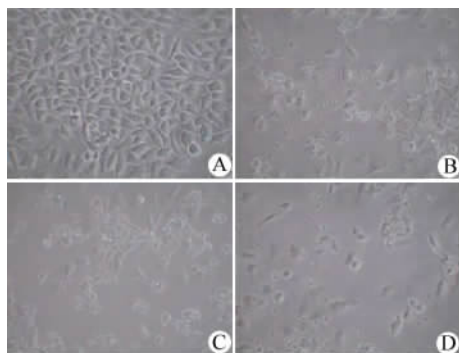


图 1 Stathmin 单克隆抗体联合紫杉醇作用致 HepG2 细胞的形态变化(×100)

Fig. 1 Morphological changes of HepG2 cells after treatment with anti-stathmin and paclitaxel in different groups(×100)

A: Control group; B: anti-stathmin antibody, 48 h; C: paclitaxel, 48 h; D: anti-stathmin antibody combined with paclitaxel, 48 h

表 1 单用抗人 stathmin 单克隆抗体对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

Tab. 1 Inhibitory effect of anti-stathmin monoclonal antibody on proliferation of HepG2 cells

mAb ( $\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Proliferation inhibition rate (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
10	10.1 ± 0.9	13.4 ± 1.2	14.6 ± 1.1	16.2 ± 1.4
20	12.5 ± 1.1	17.6 ± 1.4	18.1 ± 1.3	19.3 ± 1.7
40	14.0 ± 1.1	21.5 ± 1.4	23.0 ± 1.3	23.9 ± 1.6
80	16.1 ± 1.3	23.7 ± 1.3	26.7 ± 1.2	28.1 ± 2.0
160	20.3 ± 1.2	25.0 ± 1.5	30.3 ± 1.6	33.1 ± 2.0

### 2.3 单用紫杉醇对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

表 3 抗人 stathmin 单克隆抗体和紫杉醇联用对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

Tab. 3 Inhibitory effects of anti-stathmin monoclonal antibody combined with paclitaxel on proliferation of HepG2 cells

Mb ( $\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Paclitaxel ( $\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Proliferation inhibition rate (%)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
10	0.1	30.3 ± 1.7	36.4 ± 1.5	45.4 ± 1.8	52.6 ± 2.0
20	0.2	33.9 ± 1.8	40.6 ± 2.1	50.5 ± 2.0	58.3 ± 1.9
40	0.4	38.2 ± 1.9	46.3 ± 1.8	58.0 ± 2.1	64.9 ± 2.1
80	0.8	42.3 ± 1.6	55.7 ± 2.1	65.7 ± 1.6	69.1 ± 2.2
160	1.6	50.9 ± 1.9	63.0 ± 1.9	72.3 ± 2.2	77.2 ± 2.0

单用紫杉醇对 HepG2 细胞增殖的抑制作用亦呈时间和浓度依赖性。作用 72 h 后对 HepG2 细胞增殖的最大抑制率为(60.7 ± 2.0)% (表 2)。

表 2 单用紫杉醇对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

Tab. 2 Inhibitory effect of paclitaxel on proliferation of HepG2 cells

Paclitaxel ( $\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Proliferation inhibition rate (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0.1	20.1 ± 1.7	28.4 ± 1.6	36.4 ± 1.6	42.6 ± 1.4
0.2	23.5 ± 1.6	31.6 ± 1.7	40.9 ± 1.4	48.3 ± 1.7
0.4	29.1 ± 1.9	36.5 ± 1.6	49.0 ± 1.9	52.9 ± 1.9
0.8	34.3 ± 1.8	41.7 ± 1.9	54.7 ± 1.6	57.1 ± 2.1
1.6	38.0 ± 1.9	49.8 ± 2.0	60.7 ± 2.0	67.2 ± 1.9

### 2.4 抗人 stathmin 单克隆抗体和紫杉醇联用对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

抗人 stathmin 单克隆抗体和紫杉醇联合作用于 HepG2 细胞后,对细胞增殖的抑制作用较两药单独使用时明显增强,具有统计学意义( $P < 0.05$ );作用 72 h 对 HepG2 细胞增殖的最大抑制率为(72.3 ± 2.2)%。用 factorial analysis 分析两药联用的性质,结果显示为两药联用具有交互效应( $P < 0.05$ ),且为协同作用(表 3)。

### 2.5 抗人 stathmin 单克隆抗体和紫杉醇联用对 HepG2 细胞的致凋亡作用

联合用药作用 24、48、72、96 h 后,各实验组均出现不同程度的细胞凋亡增加,经统计学处理,证实细胞凋亡率变化也呈时间( $r = 0.636, P = 0.001$ )和剂量( $r = 0.746, P = 0.000$ )依赖性趋势;比较各组凋亡率,各组作用 24、48、72、96 h 后,各实验浓度组与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );在相同时间段,各不同浓度组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );纵向比较,相同浓度作用 48、72 和 96 h 与作用 24 h 相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ) (表 4、5、6)。

表4 抗人 stathmin 单克隆抗体作用后 HepG2 细胞凋亡率的改变

Tab. 4 Apoptosis rate of HepG2 cells after treated with anti-stathmin monoclonal antibody

mAb ( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	Apoptosis rate (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
10	5.1 ± 0.4	6.4 ± 0.6	7.6 ± 0.7	8.2 ± 0.6
20	6.5 ± 0.3	7.6 ± 0.5	9.1 ± 0.5	10.3 ± 0.8
40	7.4 ± 0.5	8.5 ± 0.4	10.6 ± 0.6	12.9 ± 0.3
80	8.2 ± 0.3	10.7 ± 0.4	12.7 ± 0.6	14.1 ± 0.5
160	9.6 ± 0.8	12.1 ± 0.6	15.3 ± 1.1	19.5 ± 1.5

表5 紫杉醇作用后 HepG2 细胞凋亡率的改变

Tab.5 Apoptosis rate of HepG2 cells after treated with paclitaxel

Paclitaxel ( $\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	Apoptosis rate (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0.1	5.1 ± 0.3	6.4 ± 0.4	8.3 ± 0.5	10.6 ± 0.4
0.2	6.5 ± 0.3	8.6 ± 0.6	10.4 ± 0.4	12.3 ± 0.4
0.4	8.1 ± 0.6	10.5 ± 0.8	12.1 ± 0.6	14.6 ± 0.7
0.8	9.3 ± 0.8	12.7 ± 0.6	14.6 ± 0.8	17.9 ± 0.9
1.6	10.7 ± 1.1	14.5 ± 0.9	17.3 ± 0.9	22.4 ± 1.3

表6 抗人 stathmin 单克隆抗体和紫杉醇单用或联用后 HepG2 细胞凋亡率的改变

Tab.6 Apoptosis rate of HepG2 cells after treated with anti-stathmin monoclonal antibody combined with paclitaxel

Group	Apoptosis rate (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.5	8.2 ± 0.6	12.0 ± 0.8
mAb (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	9.6 ± 0.8	12.1 ± 0.6	15.3 ± 1.1	19.5 ± 1.5
Paclitaxel (1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	10.7 ± 1.1	14.5 ± 0.9	17.3 ± 0.9	22.4 ± 1.3
mAb + Paclitaxel	13.5 ± 1.4	18.4 ± 2.0	21.8 ± 2.3	25.3 ± 2.0

### 3 讨论

原发性肝癌为我国常见恶性肿瘤之一,常隐匿起病,出现症状后病情进展迅速,极易出现肝内播散、远处转移。传统外科手术、放疗、化疗治疗后复发率仍相当高,分子靶向治疗为肝癌的治疗提供了新的思路和希望<sup>[8]</sup>。Stathmin 是从淋巴瘤中筛选出

的特征性基因的表达产物,是一种高度保守的胞质磷蛋白。细胞内、外有多种细胞因子、癌基因及抑癌基因表达产物直接或间接与 stathmin 作用引起细胞生物学改变。Stathmin 蛋白的下游作用靶点是对细胞分裂起关键作用的微管蛋白、微管及纺锤体等细胞器,通过调节微管系统的动力学平衡达到控制细胞周期的作用,并以此改变细胞的生物学行为,在细胞的增殖和分化及肿瘤发生中有十分重要的作用<sup>[9-10]</sup>。

近年来研究证实多种恶性肿瘤中 stathmin 都有高水平表达。stathmin 基因治疗在实验中不断取得成功,通过应用反义核酸、核酶、stathmin 蛋白抑制剂及丝氨酸位点突变体等方法封闭该基因表达后均证实,抑制其表达可使细胞受阻于 G<sub>2</sub>/M 期,同时还可以使恶性肿瘤表型发生逆转<sup>[11]</sup>。但关于其单克隆抗体的治疗研究甚少。单抗药物是当前生物制药领域甚为活跃的部分,针对特定的分子靶点(抗原),单抗有高度特异性,针对各种不同的抗原,可以制备为数众多的、各不相同的单抗,因此作为药物来源,单抗又具有高度多样性。由于其特异性和多样性,研制单抗药物有巨大的潜力。迄今为止,很多靶向药物已经在临床起到极其重要的作用。有些已经按照循证医学的原则进入了国际肿瘤学界公认的标准治疗方案和规范<sup>[12-13]</sup>。本实验室成功制备抗 stathmin 单克隆抗体,为本实验奠定基础。紫杉醇是一种具有独特结构和独特作用机制的抗肿瘤药物,从红豆杉属植物紫杉的树皮和树干中提取并开发利用的天然抗癌新药,也是目前唯一的具有独特抗微管作用机制的广谱抗癌新药。紫杉醇的抗肿瘤机制是通过促进微管聚合形成稳定的微管聚合物并抑制其解聚从而使游离的微管数量显著减小,抑制纺锤体向两极分离,进而抑制增殖细胞的有丝分裂;紫杉醇亦可使细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期并诱导细胞凋亡。

本实验利用 MTT 法观察抗 stathmin 单克隆抗体、紫杉醇以及两者联合对肝癌细胞增殖的影响,结果表明两者单用及联用对 HepG2 肝癌细胞的增殖都具有明显的抑制作用,随着药物浓度的增加和作用时间的延长,这种抑制作用也逐渐增强,呈现一定的时间和剂量的依赖关系;而且联用比单用显示出更强的抑制作用,两者有明显的协同作用。同时细胞凋亡检测显示细胞凋亡率变化也呈时间和剂量依赖趋势。结果提示抗 stathmin 单克隆抗体和化疗药物联用有着良好的应用前景,为临床治疗提供新的思路。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 汤钊猷. 肝癌诊治现状与前景[ J ]. 中国普外基础与临床杂志, 2003, 10( 3 ): 191.
- [ 2 ] Di Maio M, De Maio E, Perrone F, *et al.* Hepatocellular carcinoma; systemic treatments[ J ]. J Clin Gastroenterol, 2002, 35( 5 Suppl 2 ): S109- S114.
- [ 3 ] Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle [ J ]. J Cell Biochem, 2004, 93( 2 ): 242-250.
- [ 4 ] Jeha S, Luo XN, Beran M, *et al.* Antisense RNA inhibition of phosphoprotein p18 expression abrogates the transformed phenotype of leukemic cells [ J ]. Cancer Res, 1996, 56( 6 ): 1445-1450.
- [ 5 ] Zhang HZ, Wang Y, Gao P, *et al.* Silencing stathmin gene expression by survivin promoter-driven siRNA vector to reverse malignant phenotype of tumor cells [ J ]. Cancer Biol Ther, 2006, 5( 11 ): 1457-1461.
- [ 6 ] Milross CG, Mason KA, Hunter NR, *et al.* Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel [ J ]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88( 18 ): 1308-1314.
- [ 7 ] 黄 湘, 潘华政, 王穗海, 等. 抗 PSMA7 单克隆抗体的制备和初步鉴定[ J ]. 解放军医学杂志, 2008, 33( 2 ): 180-183.
- [ 8 ] Sawyers C. Targeted cancer therapy [ J ]. Nature, 2004, 432( 7015 ): 294-297.
- [ 9 ] Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers [ J ]. Curr Opin Cell Biol, 2002, 14( 1 ): 18-24.
- [ 10 ] Gadea BB, Ruderman JV. Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103( 12 ): 4493-4498.
- [ 11 ] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy [ J ]. Mol Interv, 2002, 2( 3 ): 158-167.
- [ 12 ] Dickler MN, Rugo HS, Eberle CA, *et al.* A phase II trial of erlotinib in combination with bevacizumab in patients with metastatic breast cancer [ J ]. Clin Cancer Res, 2008, 14( 23 ): 7878-7883.
- [ 13 ] Lamanna N, Kalaycio M, Maslak P, *et al.* Pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab is an active, well - tolerated regimen for patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia [ J ]. J Clin Oncol, 2006, 24( 10 ): 1575-1581.

[ 收稿日期 ] 2008 - 12 - 24

[ 修回日期 ] 2009 - 02 - 25

[ 本文编辑 ] 王 莹

## · 科技动态 ·

## mRNA 稳定性影响炎性分子基因被诱导的时间顺序

mRNA 的稳定性对于基因表达的调控起着很重要的作用。David Baltimore 小组在 2009 年 3 月的 Nature Immunology 上撰文指出, TNF- $\alpha$  诱导出的 mRNA 转录本的内在稳定性强烈影响了代表炎症反应不同时期基因的有序表达。炎症介质 mRNA 的内在稳定性由其 3'UTR 决定, 参与指导炎症过程的触发、持续和消退。

炎症是对组织损伤(包括物理、化学和微生物诱导的损伤)的一个程序化的反应过程, 经过既定的程序对损伤组织进行修复和重建。这些过程需要招募不同免疫效应细胞, 产生可溶性的炎症介质。这些顺序性事件被精确调控并和谐地对刺激反应作出最优化的炎症反应。TNF- $\alpha$  是炎症反应起始过程中起重要作用的炎性因子, 诱导激活了转录因子 NF- $\kappa$ B, 从而导致一系列炎症效应蛋白基因的表达。论文作者用基因芯片技术定量检测了在小鼠 MEF 细胞和巨噬细胞中用 TNF- $\alpha$  诱导的 180 种基因在不同时间点的表达情况。他们分析后确定了基因的 3 种表达动力学: TNF- $\alpha$  刺激后, 第一类基因( 25 个) 在 0.5h 达到基因表达峰值, 第二类基因( 57 个) 表达峰值是 2 h, 而第三类基因( 98 个) 表达峰值是 12 h。用放线菌素 D 处理后定量检测每类基因的 mRNA 半衰期, 结果显示这些基因的半衰期与基因表达动力学有非常强的相关性: 第一类基因的半衰期为 0.2 ~ 0.9 h, 第二类基因为 1 ~ 8 h, 而第三类基因的半衰期超过 4 h。考虑到很多短寿命 mRNA 的 3'UTR 区有 ARE (AU rich element), 其作用为促进 mRNA 降解。作者假设这三类基因是否在 ARE 数目上有所不同。实验发现: 第一类基因大致有 4 ~ 10 个 ARE 区域, 第二类基因有 2 ~ 4 个, 而第三类基因只有 0 ~ 1 个。总结这些结果, 表明 mRNA 的稳定性影响了 TNF- $\alpha$  诱导的转录本的表达动力学。

作者同时注意到 mRNA 稳定性和 TNF- $\alpha$  诱导蛋白功能上有中度的相关性。第一类基因包括编码急性期炎症的血管内皮调节因子; 第二类基因包括编码使炎症持续的细胞因子和趋化因子; 第三类基因编码包括组织重建和伤口愈合的调节因子, 这些因子可能参与了慢性期炎症。这些结果说明内在的 ARE 介导的 mRNA 稳定性决定了基因表达的时间顺序, 而这些基因的顺序表达是炎症过程特定时期所必须的。

mRNA 的转录后调节机制非常复杂, 研究 ARE 结合蛋白等因子对免疫基因时间上的具体调控机制将会是一个非常重要的领域。该研究通过发现 TNF- $\alpha$  是炎症反应的指挥者而 ARE 可以作为 mRNA 表达量的一个评价指标, Hao 和 Baltimore 打开了免疫学家对炎症反应的新视角。

[ 马 烽 摘译, 李 楠 审阅. Hao S, Baltimore D. Nat Immunol, 2009, 10( 3 ): 281-288 ]