

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.011

Survivin 基因 RNAi 对子宫颈癌裸鼠移植瘤生长与凋亡的影响

宋 晖¹, 辛晓燕^{1*}, 肖 锋², 赵海波¹, 张建芳¹, 王德堂¹(第四军医大学西京医院 1. 妇产科; 2. 放射治疗科, 陕西西安 710032)

[摘要] 目的: 观察 survivin 基因 RNAi 对宫颈癌裸鼠移植瘤生长与凋亡的影响。方法: 随机将 BALB/c 裸鼠分 4 组, 分别注射转染携 survivin RNAi 重组质粒的 HeLa-s2 细胞、转染阴性对照质粒细胞 HeLa-NC、转染空质粒细胞 HeLa-U6 neo 及宫颈癌 HeLa 细胞, 建立人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型。观察 survivin RNAi 对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响; 免疫组化法检测移植瘤组织中 survivin 蛋白的表达和微血管密度(MVD), H-E 染色及 TUNEL 染色观察 survivin RNAi 对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤凋亡的影响。结果: 成功建立人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型, HeLa-s2 组裸鼠瘤重明显小于其他 3 组($P < 0.05$); 肿瘤生长抑制率为 67.9%。免疫组化结果显示, HeLa-s2 组裸鼠移植瘤组织中 survivin 蛋白表达显著下降; MVD 值也显著降低($P < 0.05$); H-E 染色、TUNEL 染色结果显示, HeLa-s2 组裸鼠移植瘤组织细胞凋亡明显增多($P < 0.05$), AI 值达(22.73 ± 1.37)%。结论: Survivin 基因 RNAi 可通过下调移植瘤组织 survivin 蛋白表达和降低其 MVD 抑制移植瘤生长并促进其凋亡。

[关键词] survivin; RNAi; 子宫肿瘤; 裸鼠; 移植瘤; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)04-0374-05

Impact of survivin-targeted RNAi on growth and apoptosis of implanted human cervical carcinoma in mice

SONG Hui¹, XIN Xiao-yan^{1*}, XIAO Feng², ZHAO Hai-bo¹, ZHANG Jian-fang¹, WANG De-tang¹(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 2. Department of Radioactive Therapy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of RNAi targeting survivin gene (RNAi-survivin) on the growth and apoptosis of implanted human cervical carcinoma in mice. **Methods:** Nude mice were randomly divided into 4 groups, and the human cervical carcinoma HeLa cells transfected with pSilencer2.1-s2, pSilencer2.1-NC, pSilencer2.1-U6 neo or not transfected (the cells being HeLa-s2, HeLa-NC, HeLa-U6 neo and HeLa, respectively) were subcutaneously inoculated into flank tissues of mice to establish cervical carcinoma mouse models. The influence of survivin-RNAi on the implanted tumor growth was observed. Expression of survivin protein and microvessel density (MVD) in implanted cervical carcinoma tissues were examined by immunohistochemistry. Apoptosis of implanted cervical carcinoma cells was observed by H-E staining and TUNEL. **Results:** Implanted human cervical carcinoma mouse model was successively established. The tumor weight in HeLa-s2 group was markedly lower than those in HeLa-NC, HeLa-U6 neo and HeLa groups ($P < 0.05$). The tumor inhibitory rate in HeLa-s2 group was 67.9%. Survivin expression and MVD value in tumor tissues of HeLa-s2 group were significantly decreased as determined by immunohistochemistry (all $P < 0.05$). Apoptosis of implanted cervical carcinoma cells in HeLa-s2 group was significantly increased compared with those in other 3 groups (all $P < 0.05$), with AI being (22.73 ± 1.37)%. **Conclusion:** RNAi-survivin inhibits the growth and promote apoptosis of implanted human cervical carcinoma tumors by down-regulating survivin protein expression and MVD in tumor tissues.

[Key words] survivin; RNA interference (RNAi); cervical neoplasms; nude mice; transplanted tumor; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 374-378]

Survivin 基因是凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis, IAP)家族新成员, 它的结构独特, 具有肿瘤特异性表达的特点, 从而成为肿瘤研究的热点之一。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)介导的序列特异

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(No. 2007c251)。Supported by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2007c251)

[作者简介] 宋 晖(1974-), 女, 河南省南阳市人, 主治医师, 博士, 主要从事妇科肿瘤的基因治疗方面的工作

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: xiaofeng@fmmu.edu.cn

性的转录后基因沉默,具有特异性强、抑制效率高、细胞摄取较容易等优点,目前已成为优于反义核酸和核酶的基因沉默疗法理想工具^[1-3]。宫颈癌是妇科高发恶性肿瘤,其发病率有增高趋势,且明显趋于年轻化,腺癌比例增加,故有待进一步提高其治疗效果^[4-5]。本课题前期工作^[6]证实 survivin 基因 RNAi 具有体外抑制 HeLa 细胞增殖、诱导凋亡和增加放射敏感性的作用。为进一步探讨 survivin 基因 RNAi 的在体生物学效应,本研究分别用 HeLa-s2、HeLa-NC、HeLa-U6 neo 和 HeLa 细胞建立人宫颈癌皮下移植瘤模型;观察在 survivin RNAi 作用下各组裸鼠成瘤情况、各组移植瘤 survivin 蛋白表达、微血管密度(MVD)及细胞凋亡状况,探讨以 survivin 基因为靶点的宫颈癌基因治疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

兔抗人 survivin 多克隆抗体购自 Chemicon 公司,小鼠抗人 FVIII Ag 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,TUNEL 检测试剂盒购自德国 Roche 公司,SP 免疫组化染色试剂盒、苏木精、核固红均为武汉博士德公司,小牛血清(杭州四季青产品)和 RPMI1640(Gibco 公司产品)由本室提供。

稳定转染细胞系 HeLa-s2(转染携 survivin RNAi 重组质粒 pSilencer2.1-s2)、HeLa-NC(转染阴性对照质粒 pSilencer2.1-NC)和 HeLa-U6 neo(转染空载质粒 pSilencer2.1-U6 neo)及未转染宫颈腺癌细胞系 HeLa 用含 100 ml/L 小牛血清的 RPMI 1640 于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养传代,由本室保存。与 HeLa-NC、HeLa-U6 neo 和未转染 HeLa 细胞比较,HeLa-s2 survivin mRNA 和蛋白表达明显下降,表达抑制率分别为 62.8% 和 60.1%^[7]。

4~6 周龄 BALB/c nu/nu 裸小鼠购自中科院上海实验动物研究所[实验动物合格证号为 SCXK(沪)2004-0002],雌性,每只重约 18 g,共 24 只,饲养于第四军医大学口腔医院 SPF 级动物实验室。

1.2 人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立

BALB/c nu/nu 裸小鼠 24 只,随机分为 4 大组,每组 6 只。用 200 ml 培养瓶同时平行取对数生长期 HeLa-s2、HeLa-NC、HeLa-U6 neo 和未转染 HeLa 细胞,调整细胞密度约为 5×10^6 /ml;按 200 μ l/只分别接种于各组裸鼠背部皮下,建立人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型。接种后,每天观察裸鼠一般状况及肿瘤生长情况,以观察 survivin 基因 RNAi 对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤生长和凋亡的影响。

1.3 Survivin 基因 RNAi 对人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响

接种细胞后继续培养 30 d,颈椎脱臼法统一处死裸鼠,通过肿瘤体积测量及瘤重称取,绘制肿瘤生长曲线并计算肿瘤生长抑制率。

1.4 免疫组化 S-P 法检测各组移植瘤组织中 survivin 蛋白表达情况

各组裸鼠移植瘤组织石蜡切片,常规脱蜡至水,采用免疫组化 SP 方法检测 survivin 蛋白在各组肿瘤标本中的表达,具体操作按说明书进行。一抗兔抗人 survivin 多克隆抗体稀释比例为 1:800;二抗为生物素标记羊抗兔 IgG。实验过程中以无关抗体代替一抗作阴性对照,以 0.01 mol/L PBS 代替一抗作空白对照,以已知 survivin 蛋白阳性染色爬片作阳性对照。

采用双盲法阅片。Survivin 免疫组化阳性为瘤细胞胞质和(或)胞核呈棕黄色染色,其蛋白表达阳性率在 400 倍视野下观察,每例组织切片在免疫反应最强的区域选择 5~10 个视野,使用目镜网格测微尺计数 1 000 个细胞,计算 survivin 阳性表达细胞所占百分数即为 survivin 蛋白表达阳性率。

1.5 移植瘤组织微血管密度(MVD)测定

采用免疫组化 S-P 法检测八因子相关抗原(factor VIII related antigen, FVIII Ag)在各组肿瘤标本中的表达,具体操作步骤同上。一抗小鼠抗人 FVIII Ag 单抗稀释比例为 1:400;二抗为生物素标记兔抗小鼠 IgG,以无关抗体代替一抗作阴性对照,以 0.01 mol/L PBS 代替一抗作空白对照,以已知 FVIII Ag 阳性染色爬片作阳性对照。微血管密度(microvessel density, MVD)评定采用 Leon 等^[8]的方法,即首先在 100 倍视野下观察,确定微血管密度最大的热点(hotspot)区域,然后在 200 倍视野下计数,以染色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为一个微血管标记,以一个 200 倍视野(0.7386 mm²)范围内微血管的绝对数作为每例标本的 MVD。

1.6 H-E 染色观察 survivin 基因 RNAi 作用后移植瘤细胞的凋亡

各组肿瘤切片常规脱蜡至水,PBS 浸洗 3 min,苏木精染色 5 min,自来水冲洗 1 min,盐酸酒精液分化 20 s,自来水冲洗 5 min,1% 伊红液染色 2 min,自来水冲洗 15 min。常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜检并照相。

1.7 TUNEL 法检测 survivin 基因 RNAi 作用后移植瘤组织细胞的凋亡

石蜡切片常规脱蜡至水,蒸馏水振洗,蛋白酶 K

消化,按 TUNEL 检测试剂盒说明进行操作。以存在明显凋亡细胞的组织作为阳性对照,用不含末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)的试剂 2(脱氧核苷酸混合物)代替 TUNEL 反应混合物作为阴性对照。

1.8 统计学处理

各组间率的比较用 χ^2 检验,各组肿瘤的近似体积、AI 和 MVD 用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较用方差分析,方差分析中两组间均数的比较用 q 检验,采用 SPSS10.0 软件包进行分析。

2 结果

2.1 Survivin RNAi 抑制人宫颈癌裸鼠移植瘤生长

成功建立 4 组人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型,以皮下瘤结节体积达 0.1 cm³ 为成瘤标准,4 组的成瘤率均为 100%。HeLa-s2 组裸鼠肿瘤体积明显小于 HeLa 组裸鼠肿瘤体积($P < 0.05, P < 0.01$;图 1),HeLa-U6 neo 组裸鼠、HeLa-NC 组裸鼠肿瘤体积和 HeLa 组裸鼠肿瘤体积相比无明显差异($P > 0.05$,图 1)。结果表明 HeLa-s2 组裸鼠肿瘤生长明显受抑。HeLa-s2 组裸鼠瘤重明显小于 HeLa 组裸鼠瘤重[(0.369 ± 0.043)g vs (1.150 ± 0.136)g, $P < 0.05$],HeLa-s2 组裸鼠肿瘤生长抑制率为 67.9%。HeLa-U6 neo 组、HeLa-NC 组和 HeLa 组裸鼠瘤重相比无明显差异,分别为(1.179 ± 0.271)g 和(1.139 ± 0.204)g($P > 0.05$)。

以上结果说明 survivin RNAi 抑制了人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤生长。

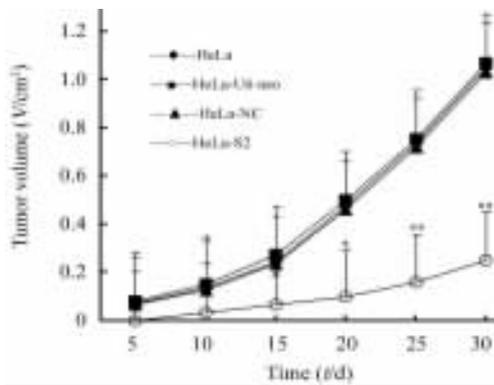


图 1 Survivin RNAi 对人宫颈癌裸鼠移植瘤生长的影响
Fig.1 Effect of survivin-RNAi on growth of implanted human cervical carcinoma in nude mice

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HeLa, HeLa-U6 neo or HeLa-NC

2.2 Survivin 基因 RNAi 对移植瘤组织 survivin 蛋白表达的抑制

免疫组化结果显示,HeLa-s2 组较 HeLa 组瘤组织 survivin 蛋白表达明显减弱,而 HeLa-U6 neo 组、HeLa-NC 组、HeLa 组瘤组织 survivin 蛋白均高表达,3 组间无明显差异(图 2)。说明 survivin 基因 RNAi 有效地抑制了瘤组织中 survivin 蛋白表达。

2.3 Survivin 基因 RNAi 作用致移植瘤组织微血管密度(MVD)的降低

免疫组化检测结果显示,与 HeLa 组肿瘤组织 MVD 比较,HeLa-s2 组 MVD 明显降低,分别为 23.38 ± 3.14 和 51.40 ± 4.35 ($P < 0.05$);而 HeLa-U6 neo 组、HeLa-NC 组 MVD 分别为 52.46 ± 3.38 和 50.09 ± 1.80 ,与 HeLa 组无差异($P > 0.05$,图 3)。

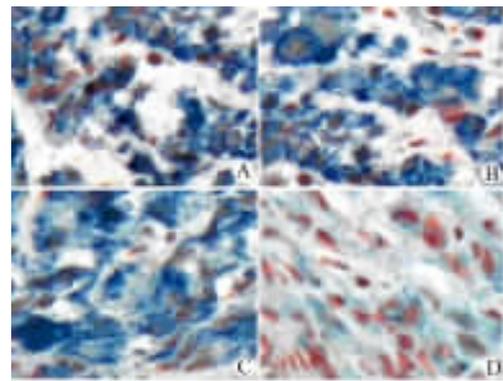


图 2 Survivin 基因 RNAi 对移植瘤组织 survivin 蛋白表达的抑制(SP, ×400)

Fig.2 Inhibitory effect of survivin-RNAi on expression of survivin in implanted human cervical carcinoma tissues (×400)

A. HeLa; B. HeLa-U6 neo; C. HeLa-NC; D. HeLa-s2

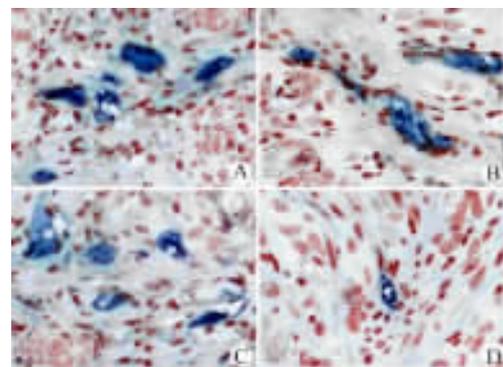


图 3 Survivin 基因 RNAi 作用后移植瘤组织微血管密度(MVD)的降低(SP, ×400)

Fig.3 Survivin-RNAi decreased MVD in implanted human cervical carcinoma tissues (×400)

A. HeLa; B. HeLa-U6 neo; C. HeLa-NC; D. HeLa-s2

2.4 Survivin 基因 RNAi 作用致移植瘤组织细胞凋亡的增加

H-E 染色结果显示,HeLa 组肿瘤细胞异形性明显,细胞大小不一,形状各异,瘤细胞生长致密。HeLa-s2 组较 HeLa 组肿瘤组织凋亡细胞增多;凋亡细胞表现为细胞变圆、固缩、胞膜出泡、染色质浓集、核深染(图 4)。而 HeLa-U6 neo 组、HeLa-NC 组肿瘤标本凋亡细胞少见,与 HeLa 组无明显差异。

2.5 Survivin 基因 RNAi 作用致移植瘤细胞的凋亡指数升高

TUNEL 法检测结果显示,与 HeLa 组肿瘤组织 AI 比较,HeLa-s2 组 AI 明显升高,两者分别为 $(22.73 \pm 1.37)\%$ 和 $(3.82 \pm 0.75)\%$ ($P < 0.05$),而 HeLa-U6 neo 组、HeLa-NC 组肿瘤组织 AI 与 HeLa 组 AI 相比均无明显差异,分别为 $(3.98 \pm 0.62)\%$ 和 $(3.73 \pm 0.57)\%$ ($P > 0.05$,图 5)。

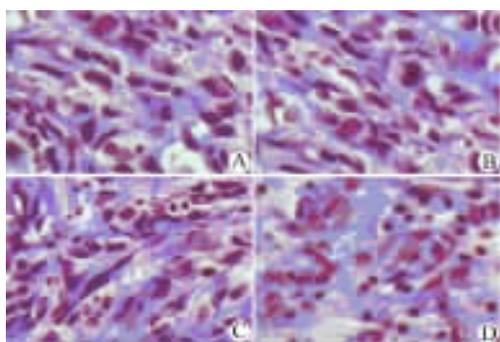


图 4 Survivin 基因 RNAi 作用后移植瘤组织细胞的凋亡(H-E, $\times 400$)

Fig. 4 Apoptosis of implanted human cervical carcinoma cells after treatment with survivin-RNAi ($\times 400$)

A: HeLa; B: HeLa-U6 neo; C: HeLa-NC; D: HeLa-s2

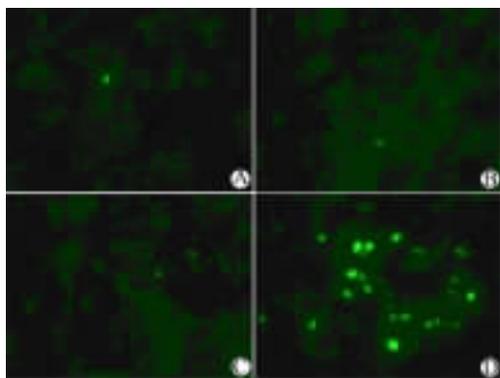


图 5 TUNEL 检测 survivin 基因 RNAi 对移植瘤细胞致凋亡作用($\times 400$)

Fig. 5 Apoptosis of implanted human cervical carcinoma cells after treatment with survivin-RNAi in mice as detected by TUNEL ($\times 400$)

A. HeLa; B. HeLa-U6 neo; C. HeLa-NC; D. HeLa-s2

3 讨论

自 1969 年 Rygaard 等^[9]首次将人结肠癌细胞转移至裸鼠获得成功,裸鼠开始广泛地应用于人类肿瘤的基础理论及临床治疗的实验研究中。由于移植肿瘤能够良好生长和传代,且可保持原肿瘤的生物行为,故裸鼠肿瘤移植模型是研究恶性肿瘤的良好材料,为肿瘤基因治疗过渡到临床应用起到了重要的作用。本研究采用直接细胞悬液接种法建立了 4 种宫颈癌 HeLa 细胞的裸鼠皮下移植瘤模型,均能很好成瘤,成瘤率达 100%。而且此法具有操作简单,皮下形成肿瘤时间短,潜伏期一致的特点。成瘤形态为实体瘤,生长稳定,容易观察和测定肿瘤成长速度,便于工作开展和实验应用。

本研究将 HeLa-s2、HeLa-NC、HeLa-U6 neo 和 HeLa 细胞分别接种于裸鼠背部皮下,建立人宫颈癌裸鼠皮下移植瘤模型。结果显示,与接种 HeLa 细胞的裸鼠相比,接种 HeLa-s2 细胞的裸鼠肿瘤形成时间延迟,肿瘤生长缓慢,肿瘤体积及瘤重均明显减小(P 均 < 0.05);与 HeLa 组比较,HeLa-s2 组肿瘤抑制率达 67.9%,说明 survivin 基因 RNAi 通过抑制 HeLa 细胞增殖降低了其成瘤能力。另外,免疫组化染色显示 HeLa-s2 组肿瘤组织 survivin 蛋白表达明显下调,而 HeLa-NC、HeLa-U6 neo 和 HeLa 组肿瘤组织 survivin 蛋白表达无明显差异,均呈高表达,提示 shRNA 在裸鼠体内仍能够稳定表达,并介导对 survivin 基因的特异性 RNAi 反应,使得 survivin 蛋白表达明显下调,进而抑制裸鼠体内移植瘤的生长。

王晓春等^[10]将针对人乳头瘤病毒 16 型-E6 的 siRNA 转染人宫颈癌 HeLa 细胞,关键等^[11]将 survivin 反义 RNA 逆转录病毒表达载体转染人神经母细胞瘤 SK-N-MC 细胞,其他学者^[12-14]将 survivin siRNA 腺病毒表达载体转染后均显示转染组肿瘤细胞在裸鼠体内成瘤性减弱,移植瘤生长受到明显抑制,但上述报道均未研究移植瘤组织内细胞凋亡和血管形成的水平。本研究进一步通过采用免疫组化方法检测了 FVIII RAg 在移植瘤组织中的表达,计算了各组肿瘤的 MVD。结果显示,与 HeLa 组肿瘤相比,HeLa-s2 组肿瘤 MVD 明显降低($P < 0.05$)。各组肿瘤标本 HE 染色结果提示,HeLa-s2 组肿瘤组织凋亡样细胞明显增多,进一步采用 TUNEL 方法定性及半定量检测凋亡细胞,结果显示,与 HeLa 组肿瘤相比,HeLa-s2 组肿瘤 AI 显著升高($P < 0.05$)。上述研究结果提示,survivin 基因 RNAi 可通过下调移植瘤组织 survivin 蛋白表达,降低其 MVD,从而抑制

移植瘤生长并促进其凋亡。本研究为进一步探讨宫颈癌治疗新途径提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang YC, Taylor MM, Samson WK, *et al.* Antisense inhibition: oligonucleotides, ribozymes, and siRNAs [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 106 (1): 11-34.
- [2] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13 (12): 1097-1101.
- [3] Yuan J, Wang X, Zhang Y, *et al.* shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell [J]. *Mol Biol Rep*, 2006, 33(1): 43-49.
- [4] 曹泽毅. 子宫颈癌治疗的变迁和思考 [J]. *中华妇产科杂志*, 2004, 39(3): 212-215.
- [5] Duenas-Gonzalez A, Cetina L, Mariscal I, *et al.* Modern management of locally advanced cervical carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2003, 29(2): 389-399.
- [6] Song H, Xin XY, Xiao F, *et al.* Survivin gene RNA interference inhibits proliferation, induces apoptosis, and enhances radiosensitivity in HeLa cells [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 136(1): 83-89.
- [7] 宋 晖, 辛晓燕, 肖 锋, 等. Survivin 段发夹状 RNA 真核表达载体的构建及其对宫颈癌细胞 survivin 表达的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2008, 21(8): 795-799.
- [8] Leon SP, Folkner RD, Black PM. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors [J]. *Cancer*, 1996, 77(2): 362-372.
- [9] Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice [J]. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1969, 77(4): 758-760.
- [10] 王晓春, 张阳德, 陈卫群. 靶向人乳头瘤病毒 16 型-E6 的 siRNA 对宫颈癌肿瘤生长的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(24): 3705-3708.
- [11] 关 键, 陈 杰, 罗玉凤, 等. 反义 bcl-2 和反义 survivin 对人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞生长的作用 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(22): 1536-1540.
- [12] 张 燕, 孙 婷, 曹祥荣. Survivin 基因特异性 siRNA 腺病毒介导的肿瘤放射增敏作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 13(1): 59-63.
- [13] 杨彤涛, 李存孝, 高 杰, 等. 靶向 survivin 的 siRNA 对骨肉瘤细胞 MG63 的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 14(2): 125-128.
- [14] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2004, 10 (1): 162-171.

[收稿日期] 2009-02-24

[修回日期] 2009-04-09

[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

HIN-200 蛋白可调控胞质外源性 DNA 诱导的 caspase 活化

在天然免疫中,细胞通过各种模式识别受体来识别病原体相关的相应分子。病毒来源的双链 DNA 可以诱导细胞的抗病毒反应,而转染进入胞质外源性双链 DNA 可以诱导干扰素 β 的分泌、炎性复合体(inflammasome)的活化以及细胞的死亡。目前已知的识别双链 DNA 的模式识别受体只有 Toll 样受体 9(TLR9),它可以特异性地识别内体(endosome)中的包含非甲基化 CpG 的双链 DNA。澳大利亚昆士兰大学的 Tara 等发现 HIN-200 蛋白家族的成员 p202 和 AIM2 可以与转染到胞质的外源性双链 DNA 结合,其中 AIM2 可以促进 caspase 的活化,而 p202 起抑制 caspase 活化的作用。实验首先发现转染双链 DNA 可以引起小鼠骨髓来源的巨噬细胞死亡与 caspase3 的活化,而且这一现象是 TLR9 非依赖的。然后实验用 EMSA 技术确证了细胞内存在一类可以与转染的双链 DNA 结合的蛋白,而且这种结合是双链 DNA 特异性的和 DNA 长度依赖的。之后实验又利用磁珠沉淀外源 DNA 结合的蛋白,并通过质谱检测确定了这一蛋白就是 HIN-200 家族的成员 p202。激光共聚焦的结果也显示 p202 蛋白在胞质内和外源双链 DNA 有其定位。实验用干扰 RNA 抑制蛋白表达发现 HIN-200 家族的另一个成员 AIM2 正向调节外源 DNA 诱导的 caspase1、caspase3 活化,而 p202 蛋白是作为负向调节蛋白参与这一过程的。最后,实验检测了 NZB、C57BL/6 和 BALB/c 3 种小鼠骨髓来源巨噬细胞中 AIM2 和 p202 表达水平以及 DNA 诱导 caspase 活化情况,发现 p202 高表达在 NZB 小鼠体内起负向调节 AIM2 介导的双链 DNA 引起的 caspase 活化的作用,而且这一现象可能与小鼠自身免疫疾病系统性红斑狼疮(SLE)有相关性。

总之,该研究小组发现,HIN-200 蛋白家族的一些成员可作为模式识别受体来识别胞质中的外源性双链 DNA,其中 AIM2 可以促进而 p202 可以抑制 DNA 引起的 caspase 活化。在这一研究发表的同期,其他几个研究小组关于 AIM2 作为识别双链 DNA 的受体参与 inflammasome 活化的研究也发表在 *Nature* 和 *Nature immunology* 等杂志上,可见关于模式识别受体及其相关机制研究依然是当前免疫学领域的一个热点,这方面的工作对天然免疫以及自身免疫性疾病分子机制的研究有重要的意义。

[金 晶 摘译, 陈涛涌 审阅. Roberts TL, Idris A, Dunn JA, *et al.* *Science*, 2009, 323(5917): 1057-1060.]