

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.010

## 5-Aza-CdR 诱导肿瘤细胞 NY-ESO-1 抗原的表达

陈裕庆, 黄丽, 汪晓军, 张文敏(福建医科大学基础医学院病理学系暨肿瘤研究室, 福建福州 350004)

**[摘要]** 目的: 探讨甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)对肿瘤细胞中 NY-ESO-1 抗原表达的诱导作用。方法: 常规培养人胃癌细胞株 SGC-7901、人肝癌细胞株 H2P 和 MHCC97-H、人结肠癌细胞株 HT-29 和 LoVo 及人脑胶质瘤细胞株 U251, RT-PCR 和免疫细胞化学法检测 5-Aza-CdR 作用前后肿瘤细胞中 NY-ESO-1 mRNA 和蛋白的表达。结果: RT-PCR 与免疫细胞化学检测仅见胃癌 SGC-7901 细胞阳性表达 NY-ESO-1, 其余 5 株肿瘤细胞不表达 NY-ESO-1。NY-ESO-1 阴性的肝癌细胞株 H2P、结肠癌细胞株 LoVo 及脑胶质瘤细胞株 U251 经 5-Aza-CdR(终浓度分别为 1、5 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 6 d 后, 细胞形态和生长速度均无明显改变, 而 NY-ESO-1 mRNA 和蛋白均被诱导为阳性表达, 并随 5-Aza-CdR 浓度增加而阳性表达逐渐增强。结论: 5-Aza-CdR 能诱导肝癌、结肠癌、脑胶质瘤等肿瘤细胞中 NY-ESO-1 抗原的表达, 为肿瘤免疫治疗提供了一条新思路。

**[关键词]** 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; NY-ESO-1; 肝癌; 结肠癌; 胶质瘤

**[中图分类号]** R735; R739.41; R730.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)05-0536-05

## 5-Aza-CdR induced expression of NY-ESO-1 antigen in tumor cells

CHEN Yu-qing, HUANG Li, WANG Xiao-jun, ZHANG Wen-min (Department of Pathology & Cancer Institute, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the role of a demethylating agent, 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), in inducing NY-ESO-1 antigen expression in tumor cells. **Methods:** Human gastric cancer cell line SGC-7901, hepatoma cell lines H2P and MHCC97-H, colon cancer cell lines HT-29 and LoVo, and glioma cell line U251 were used in the present study. NY-ESO-1 mRNA and protein expressions were detected by RT-PCR and immunocytochemistry in the above cell lines before and after 5-Aza-CdR treatment. **Results:** NY-ESO-1 antigen was positive only in gastric cancer cell line SGC-7901 as detected by RT-PCR and immunocytochemistry. The morphology and growth of hepatoma cell H2P, colon cancer cell LoVo and glioma cell U251 were not obviously affected after 5-Aza-CdR treatment (1  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) for 6 days; however, 5-Aza-CdR induced NY-ESO-1 mRNA and protein expressions in these cell lines in a dose-dependent manner. **Conclusion:** 5-Aza-CdR can induce the expression of NY-ESO-1 antigen in hepatoma, colon cancer and glioma cells, which casts new lights on tumor immunotherapy.

**[Key words]** 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR); NY-ESO-1; hepatoma; colon cancer; glioma

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 536-540]

肿瘤免疫治疗是近年来肿瘤治疗的热点, 寻找并鉴定肿瘤特异性抗原, 使它作为肿瘤疫苗的候选靶标, 一直是肿瘤免疫治疗的关键。近十几年来, 随着分子生物学、基因工程及免疫学方法的改进, 鉴定并克隆出的肿瘤抗原已逾百种, 其中肿瘤-睾丸(cancer-testis, CT)抗原广泛表达于多种组织来源的实体瘤中, 而在除睾丸和胎盘外的其他正常组织中均不表达。肿瘤组织因含有多种 CT 抗原的表位, 能通过 HLA 识别, 引起针对肿瘤的特异性免疫反应, 因此 CT 抗原已成为肿瘤免疫治疗最具有临床应用价值的肿瘤特异性抗原。NY-ESO-1 是迄今

发现的免疫原性最强的一类 CT 抗原<sup>[1]</sup>。已经证实, NY-ESO-1 在多种肿瘤组织中有不同程度的表达, 但表达率均较低(<50%)<sup>[2-3]</sup>, 大大降低了其在

**[基金项目]** 福建省自然科学基金资助项目(No. C0610023), 福建医科大学教授基金资助项目(No. JS08006)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province(No. C0610023), and the Foundation for Professors in Fujian Medical University(No. JS08006)

**[作者简介]** 陈裕庆(1979-), 男, 福建省龙海市人, 在读医学硕士, 助教, 主要从事肿瘤病理方面的研究。E-mail: chenyuqing@live.com

**[通信作者]** 张文敏(ZHANG Wen-min, corresponding author), E-mail: wminz@163.com

肿瘤免疫治疗中的应用。因此,如何提高肿瘤细胞的 NY-ESO-1 表达率,成为应用 NY-ESO-1 进行肿瘤免疫治疗的一大难题。5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)是目前研究较多的去甲基化试剂,能逆转启动子和 CpG 位点的甲基化,使多种抑癌基因重新开放。能否应用该药物诱导肿瘤细胞 NY-ESO-1 基因的表达,提高 NY-ESO-1 抗原的表达率,增强特异性 CTL 对肿瘤细胞的杀伤能力呢?本课题通过观察 5-Aza-CdR 对多株 NY-ESO-1 阴性肿瘤细胞的诱导效果,研究诱导前后肿瘤细胞 NY-ESO-1 抗原的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 肿瘤细胞株

人胃癌细胞株 SGC-7901、人肝癌细胞株 H2P 和 MHCC97-H、人结肠癌细胞株 HT-29 和 LoVo 及人脑胶质瘤细胞株 U251 均由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒和 Taq DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司,即用型非生物素免疫组化 EliVision™ plus 检测试剂盒和 DAB 显色系统购自迈新公司,鼠抗人 NY-ESO-1 单克隆抗体(克隆号为 E978)购自 Zymed 公司,5-Aza-CdR 购自 Sigma 公司。氯仿、异丙醇、无水乙醇等均为国产分析纯。

### 1.3 RT-PCR 检测肿瘤细胞 NY-ESO-1 mRNA 的表达

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养胃癌细胞株 SGC-7901、人肝癌细胞株 H2P 和 MHCC97-H、人结肠癌细胞株 HT-29 和 LoVo 及人脑胶质瘤细胞株 U251,待长满瓶底后胰酶消化传代,收集 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞行 RT-PCR 检测 NY-ESO-1 mRNA 的表达。用 TRIzol 试剂提取各种肿瘤细胞总 RNA,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。按照逆转录试剂盒说明合成 cDNA,进行 PCR 反应。PCR 反应体系总体积 25 μl,其中 DEPC 水 17.5 μl、10 × Taq buffer 2.5 μl、MgCl<sub>2</sub> 2 μl、10 mol/L dNTP Mix 0.5 μl、上下游引物各 0.5 μl、Taq 酶(5 μg/μl) 0.5 μl、总 cDNA 1 μl。循环参数为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 30 s、60 °C 45 s、72 °C 45 s 进行 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。目的片段 NY-ESO-1 长度为 219 bp,上游引物为 5'-CGCCTGCTTGAGTTCTACCTC-3',下游引物为 5'-AGGGAAAGCTGCTGGAGACAG-3';β-actin 为内参,产物长度为 335 bp,上游引物为

5'-CTCGCGTACTCTCTCTTTCTGG-3',下游引物为 5'-GCTTACATGTCTCGAT CCCACTTAA-3';上述引物均由上海生工生物公司合成。最后取 PCR 产物 5 μl 行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 免疫细胞化学染色技术检测肿瘤细胞 NY-ESO-1 蛋白的表达

将已灭菌处理的玻片放在消毒的培养皿中,用 DAKO 笔划一直径约 15 mm 的圆圈,将收集的细胞悬液(密度为 1 × 10<sup>5</sup>/ml)滴入圆圈中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱过夜,取出玻片,PBS 洗涤后冷丙酮固定 10 min,行 Elivision 二步法检测,按照试剂盒说明进行操作,一抗为鼠抗人 NY-ESO-1 单克隆抗体(工作质量浓度为 3 μg/ml),4 °C 孵育过夜,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。正常睾丸组织为阳性对照,PBS 替代第一抗体为阴性对照。染色阳性信号为细胞质染成棕黄色。

### 1.5 5-Aza-CdR 诱导肿瘤细胞株 NY-ESO-1 的表达

培养 NY-ESO-1 抗原阴性的肿瘤细胞株 H2P、LoVo 和 U251,分别加入含 5-Aza-CdR(终浓度分别为 1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L)的 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养,每隔 2 ~ 3 d 换液 1 次,共培养 6 d,观察细胞形态与生长速度。待长满瓶底后收集细胞,分别行 RT-PCR 和免疫细胞化学染色,检测 NY-ESO-1 mRNA 和蛋白的表达。取 PCR 产物 5 μl 行 1% 琼脂糖凝胶电泳,利用 GeneTools 软件(SynGene, Version 4.01)对各凝胶电泳条带进行分析,结果以目的条带与内参条带的光密度比值(NY-ESO-1/β-actin)表示,分析不同终浓度下各处理组的 NY-ESO-1 mRNA 表达强度。

## 2 结果

### 2.1 各种肿瘤细胞中 NY-ESO-1 基因和蛋白的表达

常规培养上述 6 种肿瘤细胞株,经 RT-PCR 检测和电泳分析,除胃癌细胞株 SGC-7901 可见一条约 219 bp 的特异性条带(图 1)外,肝癌细胞株 H2P 和 MHCC97-H、结肠癌细胞株 HT-29 和 LoVo 及大脑胶质瘤细胞株 U251 均未见特异性条带。免疫细胞化学检测结果显示,H2P、LoVo、U251 细胞 NY-ESO-1 蛋白亦呈阴性表达(图 2)。

### 2.2 5-Aza-CdR 诱导各肿瘤细胞 NY-ESO-1 的表达

分别用含不同浓度 5-Aza-CdR(终浓度分别为 1、5、10 μmol/L)的培养液常规培养 NY-ESO-1 阴性的肝癌细胞株 H2P、结肠癌细胞株 LoVo 及脑胶质瘤细胞株 U251,倒置显微镜观察肿瘤细胞形态和生

长速度与 5-Aza-CdR 处理前无明显改变,6 d 后收集细胞。RT-PCR 检测观察,经 1  $\mu\text{mol/L}$  的 5-Aza-CdR 处理后,各肿瘤细胞 NY-ESO-1 mRNA 呈弱阳性表达,而经 5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  的 5-Aza-CdR 处理后,各细胞 NY-ESO-1 mRNA 均呈较强的阳性表达(图 3)。利用 GeneTools 软件分析凝胶电泳条带,5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  两个处理组的 NY-ESO-1 mRNA 表达程度明显强于 1  $\mu\text{mol/L}$  处理组(表 1)。

以 Elivision 二步法免疫细胞染色检测 5-Aza-CdR 处理前后 H2P、LoVo、U251 细胞 NY-ESO-1 蛋白的表达,结果显示,经 5-Aza-CdR 处理后该 3 种肿瘤细胞质均呈棕黄色阳性染色(图 2),说明 5-Aza-CdR 能明显诱导 3 种肿瘤细胞 NY-ESO-1 蛋白的表达。

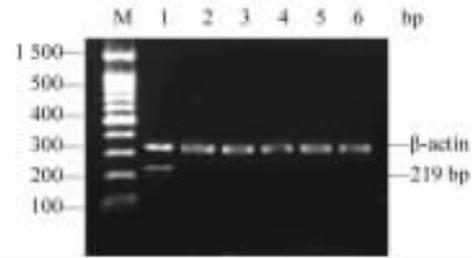


图 1 RT-PCR 检测 6 种肿瘤细胞株 NY-ESO-1 mRNA 的表达

Fig.1 NY-ESO-1 mRNA expressions in six different tumor cell lines as detected by RT-PCR

M: 100 bp DNA ladder; 1: Gastric cancer cell line SGC-7901; 2: Hepatoma cell line MHCC97-H; 3: Hepatoma cell line H2P; 4: Colon cancer cell line HT-29; 5: Colon cancer cell line LoVo; 6: Glioma cell line U251

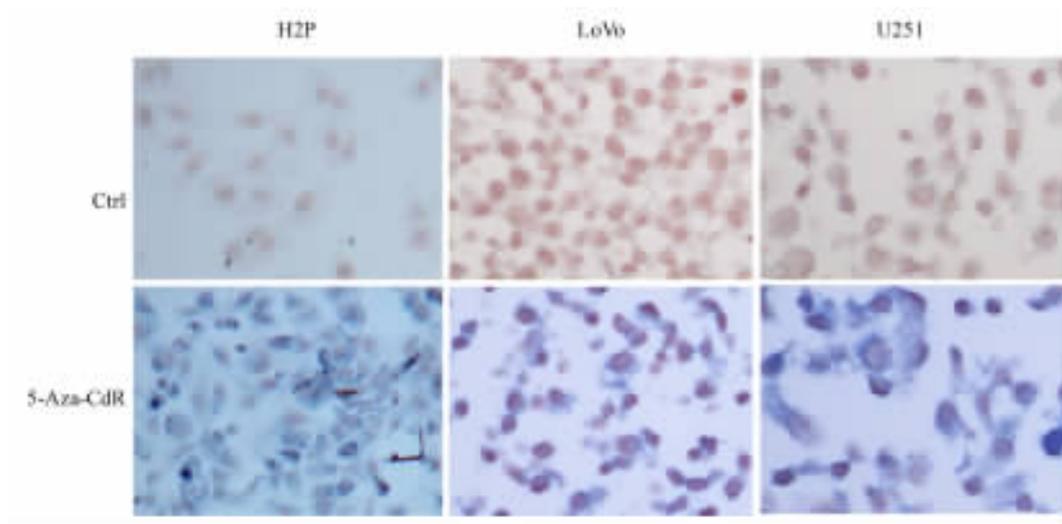


图 2 5-Aza-CdR 处理后 H2P、LoVo 和 U251 细胞中 NY-ESO-1 蛋白的表达(×200)

Fig.2 NY-ESO-1 protein expressions in H2P, LoVo and U251 cells after 5-Aza-CdR treatment (×200)

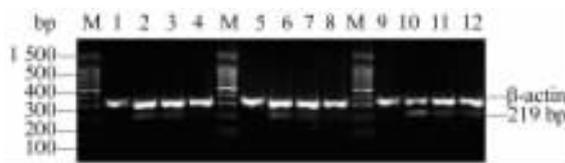


图 3 不同浓度 5-Aza-CdR 处理前后 U251、LoVo、H2P 细胞中 NY-ESO-1 mRNA 的表达

Fig.3 NY-ESO-1 mRNA expressions in U251, LoVo and H2P cells before and after treatment with different concentrations of 5-Aza-CdR

M: 100 bp DNA ladder; 1-4: U251 cells; 5-8: LoVo cells; 9-12: H2P cells; 1, 5, 9: Before treatment; 2-4, 6-8, 10-12: Cells treated with 10, 5 and 1 mol/L 5-Aza-CdR, respectively

### 3 讨论

恶性肿瘤是我国最常见的疾病死因,虽然有手术、化疗以及放疗等常规治疗方法,但肿瘤的转移率和复发率高、预后差,因此,有必要探索和寻求新的治疗方法。近年来,随着免疫学、分子生物学的发展,以肿瘤免疫治疗为代表的生物治疗已成为肿瘤治疗的热点。

肿瘤免疫治疗的关键是寻找并鉴定肿瘤特异性抗原。CT 抗原是 90 年代发现的肿瘤特异性抗原,具有免疫原性强、肿瘤分布广泛以及表达特殊等特点,是肿瘤免疫治疗的理想靶标。现已发现,该类抗原中有 MAGE、NY-ESO-1、BAGE 等 10 多种类抗原

亚家族,其中 MAGE 和 NY-ESO-1 已用于临床实验。特别是 NY-ESO-1 抗原具有 20 多种针对 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的抗原表位,并不断有新的表位发现<sup>[4-5]</sup>,在多种肿瘤患者体内均出现针对 NY-ESO-1 的特异性免疫反应<sup>[6-7]</sup>,使得 NY-ESO-1 成为肿瘤免

疫治疗的候选靶标。但与 MAGE 相比,NY-ESO-1 在多种肿瘤中的表达率均较低( < 50% )<sup>[2-3]</sup>,且呈异质性表达,限制了其在临床上的应用。因此,如何提高肿瘤 NY-ESO-1 的表达率,成为应用 NY-ESO-1 进行肿瘤免疫治疗的瓶颈。

表 1 不同浓度 5-Aza-CdR 处理后 3 种肿瘤细胞 NY-ESO-1 mRNA 的表达

Tab.1 NY-ESO-1 mRNA expressions in U251, LoVo and H2P cells after treatment with different concentrations of 5-Aza-CdR

| Tumor cell line | 10 $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR |                |       | 5 $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR |                |       | 1 $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR |                |       |
|-----------------|--------------------------|----------------|-------|-------------------------|----------------|-------|-------------------------|----------------|-------|
|                 | NY-ESO-1                 | $\beta$ -actin | Ratio | NY-ESO-1                | $\beta$ -actin | Ratio | NY-ESO-1                | $\beta$ -actin | Ratio |
| U251            | 16 897.11                | 123 685.98     | 0.14  | 13 125.99               | 119 478.52     | 0.11  | 2 408.87                | 107 838.70     | 0.02  |
| LoVo            | 17 762.37                | 130 272.88     | 0.14  | 12 155.00               | 126 659.59     | 0.10  | 3 966.53                | 105 517.98     | 0.04  |
| H2P             | 28 139.21                | 105 158.30     | 0.27  | 17 063.76               | 107 133.76     | 0.16  | 7 025.18                | 108 958.02     | 0.06  |

目前发现多种肿瘤存在基因的甲基化,从而引起基因转录异常,最终导致功能蛋白的下调或缺失,促进肿瘤的发生和发展<sup>[8]</sup>。因此,运用甲基化抑制剂使甲基化的基因去甲基化,恢复基因活性,有可能成为一种新的肿瘤治疗途径。研究发现,NY-ESO-1 在肿瘤细胞中的低表达率可能与基因的高甲基化有关。Coral 等<sup>[9]</sup>发现,DNA 甲基转移酶抑制剂能诱导肾癌细胞株持续表达 NY-ESO-1,因而认为基因组去甲基化能使处于沉默状态的 NY-ESO-1 抗原重新表达。那么,能否通过这种方法提高肿瘤 NY-ESO-1 的表达率,使 NY-ESO-1 成为肿瘤免疫治疗的理想靶标呢?此观点的文献报道极少。

目前研究较多的甲基化抑制剂是胞苷类似物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR),它能与 DNA 甲基转移酶共价结合,降低 DNA 甲基转移酶的生物活性,在体外具有逆转基因甲基化、恢复基因转录活性的作用<sup>[10-11]</sup>。目前已成功应用 5-Aza-CdR 逆转了 Rb、VHL、p15、p16、APC、RASSF1A、MGMT 及 RAR- $\beta$  等多个抑癌基因启动子的甲基化状态,使不同的抑癌基因得以开放<sup>[12-15]</sup>。本实验应用 5Aza-dc 处理 NY-ESO-1 阴性的肿瘤细胞株,经过 6 d 的作用,使得多种肿瘤细胞重新表达 NY-ESO-1 抗原,从而证实了 5Aza-dc 是 NY-ESO-1 基因表达有效的诱导剂。NY-ESO-1 的表达与基因的甲基化有关,但这不能完全解释 NY-ESO-1 在肿瘤组织中表达的异质性,该问题有待于进一步探讨。

本实验针对 NY-ESO-1 抗原在多种肿瘤中表达率较低的问题,在体外应用甲基化抑制剂 5-Aza-CdR 有效逆转了肿瘤细胞 NY-ESO-1 的表达,为提

高肿瘤细胞 NY-ESO-1 抗原的表达率,进而进行肿瘤免疫治疗提供了一条新思路。然而,5-Aza-CdR 作为一种药物,对细胞有较高的毒性和诱变性,这使其应用受到限制。因此,寻找毒性作用小的去甲基化药物,有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: Definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(2): 265-270.
- [2] Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Yamaguchi H, Nagashima H, Inoue H, et al. Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(5): 713-720.
- [3] Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, et al. Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: New markers for early recurrence [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(7): 1551-1555.
- [4] Derré L, Bruyninx M, Baumgaertner P, Ferber M, Schmid D, Leimgruber A, et al. Distinct sets of alphabeta TCRs confer similar recognition of tumor antigen NY-ESO-1157-165 by interacting with its central Met/Trp residues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(39): 15010-15015.
- [5] Matsuzaki J, Qian F, Luescher I, Lele S, Ritter G, Shrikant PA, et al. Recognition of naturally processed and ovarian cancer reactive CD8<sup>+</sup> T cell epitopes within a promiscuous HLA class II T-helper region of NY-ESO-1 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(8): 1185-1195.
- [6] Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, Mhawech-Fauceglia P, Andrews C, Hoffman EW, et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class L/II specificities induces integrated humoral and T cell

responses in ovarian cancer [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104( 31 ): 12837-12842.

[ 7 ] Adams S, O'Neill DW, Nonaka D, Hardin E, Chiriboga L, Siu K, et al. Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant [ J ]. J Immunol, 2008, 181( 1 ): 776-784.

[ 8 ] Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development [ J ]. Folia Histochem Cytobiol, 2006, 44( 3 ): 143-154.

[ 9 ] Coral S, Sigalotti L, Altomonte M, Engelsberg A, Colizzi F, Cattarossi I, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma; Immunotherapeutic implications [ J ]. Clin Cancer Res, 2002, 8( 8 ): 2690-2695.

[ 10 ] Bovenzi V, Momparler RL. Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta and estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells [ J ]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 8( 1 ): 71-76.

[ 11 ] Uesugi H, Uzawa K, Kawasaki K, Shimada K, Moriya T, Tada A, et al. Status of reduced expression and hypermethylation of the APC tumor suppressor gene in human oral squamous cell carcinoma [ J ]. Int J Mol Med, 2005, 15( 4 ): 597-602.

[ 12 ] Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunningham HT, et al. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli ( APC ) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas [ J ]. Clin Cancer Res, 2001, 7( 7 ): 1998-2004.

[ 13 ] Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines [ J ]. Cancer Res, 1998, 58( 1 ): 95-101.

[ 14 ] Shen WJ, Dai DQ, Teng Y, Liu HB. Regulation of demethylation and re-expression of RASSF1A gene in gastric cancer cell lines by combined treatment of 5-Aza-CdR and NaB [ J ]. World J Gastroenterol, 2008, 14( 4 ): 595-600.

[ 15 ] 杨振华, 蔡映云, 于坚, 孙丽华, 乔岩, 揭志军, 等. 启动子甲基化对抑癌基因转录的影响及其 5-Aza-CdR 干预作用的研究 [ J ]. 临床基础研究, 2009, 23( 3 ): 207-209.

[ 收稿日期 ] 2010 - 07 - 10 [ 修回日期 ] 2010 - 08 - 30

[ 本文编辑 ] 王莹

• 科技动态 •

### 糖原合酶-3 对免疫应答的调节作用

近年来,糖原合酶-3( glycogen synthase kinase-3, GSK-3 ) 已经从一个含糊的、很少在免疫学文献中出现的名词,变成了受免疫学家瞩目的焦点蛋白,其在固有免疫、获得性免疫应答中发挥着重要作用。这些作用包括:( 1 ) 无论在外周还是中枢免疫系统中,GSK-3 都是一个平衡抗炎因子与促炎因子表达量的重要调控因子,因此 GSK-3 抑制物,如锂离子,可以用于减少炎症反应。( 2 ) GSK-3 可影响 T 细胞的活化和分化。( 3 ) GSK-3 可调控多种转录因子的功能,如 NF- $\kappa$ B、NFAT 和 STATs。因此,GSK-3 抑制剂可用于败血症、关节炎、肠炎、多发性硬化以及其他一些自身免疫病的治疗。

GSK-3 分为两个亚型:GSK-3 $\alpha$  和 GSK-3 $\beta$ ,均在体内高表达,同源性高,具有相同或相似的生物学功能。GSK-3 不同于大多数的蛋白激酶,其通过抑制丝氨酸的磷酸化发挥调控作用,其中 GSK-3 $\alpha$  的激活需要第 21 位的丝氨酸磷酸化,GSK-3 $\beta$  的激活则需要第 9 位丝氨酸磷酸化,一些激酶介导此激活过程,如 Akt/PKB、PKC 和 PKA。

GSK-3 对固有免疫的调节作用主要体现在活化的 GSK-3 参与 TLR 诱导单核细胞产生促炎因子。例如 IFN- $\gamma$  可以增强 LPS 诱导的促炎因子产生,这种作用依赖于活化的 GSK-3 对 IL-10 的抑制作用和对 STAT3 的激活作用。抑制 GSK-3 还可以促进 LPS 诱导 IFN- $\beta$  的产生。此外,GSK3 也可调节 NK 细胞、肥大细胞以及树突状细胞中的促炎因子的表达。

GSK-3 对获得性免疫的调节作用主要表现为调节 T 细胞的活化。T 细胞的活化需要 TCR/CD3 复合体提供的第一信号,以及共受体 CD28 提供的第二信号。CD28 激活 PI3K,PI3K 通过抑制丝氨酸磷酸化抑制 GSK-3 的活性。维持 GSK-3 的抑制状态对于 T 细胞的活化具有重要意义。对于初次免疫应答,CD4<sup>+</sup> T 细胞的激活需要有效地抑制 GSK-3 的活性,而记忆 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化则不需要过多抑制 GSK-3 的活性。此外,GSK-3 会导致 CD8<sup>+</sup> T 细胞数量减少,抑制 TCR 介导的 IL-2 产生。抑制 GSK-3 的活性后,CD4<sup>+</sup> T 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞分泌的 IL-2 增加,与此同时,促炎细胞因子的分泌减少,而抗炎因子 IL-10 的表达会相应增加。因此,活化的 GSK-3 可抑制 T 细胞的活化,但是否与 GSK-3 诱导底物磷酸化有关还有待证明。

此外,一些转录因子在 GSK-3 调控 T 细胞的功能中起着很重要的作用,GSK3 可以通过调节 NF- $\kappa$ B、CREB、AP-1、STATs、NFAT、Smads 和  $\beta$ -catenin 等转录因子来调节获得性免疫应答。例如 Wnt 诱导 GSK-3 从 GSK-3- $\beta$ -catenin 复合物上分离,导致  $\beta$ -catenin 激活,提高 T 淋巴细胞前体的分化、增生; $\beta$ -catenin 也可以增强 CD8<sup>+</sup> 记忆性 T 细胞的增殖,提供了一种 GSK-3 抑制物负调节 T 细胞免疫应答的可能机制。

正是由于这些作用的存在,使 GSK-3 获得了免疫学家越来越多的关注,GSK-3 为靶点的免疫治疗为自身免疫病等的防治提供新的思路。

[ 陈 坤 摘译,徐红梅 审阅. Beurel E, Michalek SM, Jope RS. Trends Immunol, 2010, 31( 1 ): 24-31. ]