

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.06

· 基础研究 ·

雷公藤内酯醇下调 *P53* 基因甲基化抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖

吴瑛¹, 刘芳^{2△}, 郭文渊², 肖亮², 阳揭宇², 谢江平², 丁国善²(1. 解放军第 85 医院 药剂科, 上海 200235; 2. 第二军医大学 长征医院 器官移植科, 上海 200003)

[摘要] 目的: 研究雷公藤内酯醇(triptolide, TP)对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响以及对 *P53* 基因的去甲基化作用。方法: MTT 法检测 TP 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响, 甲基特异性 PCR 检测 TP 对 SMMC-7721 细胞 *P53* 基因甲基化的影响, RT-PCR 检测 SMMC-7721 细胞甲基转移酶 *DNMT1*、*DNMT3a*、*DNMT3b* mRNA 的表达, Western blotting 检测 SMMC-7721 细胞中 *P53* 蛋白的表达。结果: TP 剂量依赖性抑制 SMMC-7721 细胞的增殖($P < 0.05$), 40 ng/ml 时的抑制率达(73.5 ± 3.02)%, 其半数抑制浓度(IC₅₀)约为 20 ng/ml。TP 显著抑制 SMMC-7721 细胞中 *DNMT1*、*DNMT3a*、*DNMT3b* mRNA 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$); TP 作用后 *P53* 基因的高甲基化被逆转, 并呈剂量依赖性; TP 可显著增强 SMMC-7721 细胞中 *P53* 蛋白的表达。结论: TP 可通过抑制甲基转移酶使 *P53* 基因去甲基化, 促进 *P53* 蛋白的表达, 从而抑制 SMMC-7721 细胞的增殖。

[关键词] 雷公藤内酯醇; *P53* 基因; 甲基化; SMMC-7721 细胞; 甲基转移酶

[中图分类号] R735.7; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0270-05

Triptolide down-regulates *P53* gene methylation and inhibits proliferation of hepatocarcinoma SMMC-7721 cells

WU Ying¹, LIU Fang², GUO Wen-yuan², XIAO Liang², YANG Jie-yu², XIE Jiang-ping², DING Guo-shan²(1. Department of Pharmacy, No. 85 Hospital of PLA, Shanghai 200235; 2. Organ Transplantation Center, Changzhang Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of triptolide (TP) on the proliferation of hepatocarcinoma SMMC-7721 cells and its effect on demethylation of *P53* gene. **Methods:** The effect of TP on proliferation of SMMC-7721 cells was measured by MTT method, the effect of TP on *P53* gene methylation in SMMC-7721 cells was analyzed by methylation specific PCR, the expressions of methyltransferase *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* mRNA in SMMC-7721 cells were measured by RT-PCR, and the protein expression of *P53* in SMMC-7721 cells was detected by Western blotting assay. **Results:** TP inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), with the inhibitory rate being (73.5 ± 3.02)% at 40 ng/ml TP, and IC₅₀ of TP was 20 ng/ml. TP significantly inhibited *DNMT1*, *DNMT3a*, and *DNMT3b* mRNA expressions in SMMC-7721 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and dose-dependently reversed the hypermethylation of *P53* gene and enhanced *P53* protein expression in SMMC-7721 cells. **Conclusion:** TP can inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells through the inhibiting methyltransferase expression, which augment the demethylation of *P53* gene and results in the increased expression of *P53* protein.

[Key words] triptolide; *P53* gene; methylation; SMMC-7721 cell; methyltransferase

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 270-274]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81072444)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072444)

[作者简介] 吴瑛(1973 -)女, 浙江省绍兴市人, 主管药师, 主要从事药理学研究。刘芳(1981 -)女, 山东省威海市人, 硕士, 主要从事免疫学研究。△共同第一作者

[通信作者] 丁国善(DING Guo-shan, corresponding author)。E-mail: dingguoshanmail@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1700.009.html>

DNA 甲基化在细胞增殖、分化过程中发挥重要的作用^[1-3]。近年来发现,肝癌相关抑癌基因启动子区域的 CpG 岛甲基化,在肝癌的发生、发展过程中起着重要的作用^[4-6]。雷公藤内酯醇(triptolide, TP, 又称雷公藤甲素)是从雷公藤根中分离出的二萜类化合物,不但在抗炎和免疫抑制等方面具有较好的疗效^[7-9],而且具有较强的抑制白血病等恶性肿瘤生长的作用,能与多种化疗药物协同作用,增强化疗效果或逆转肿瘤细胞耐药^[10-13]。因此,雷公藤的抗炎、免疫抑制和抗肿瘤作用在肝癌后肝脏移植的免疫抑制治疗中具有特殊的意义,备受移植界的关注,但 TP 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的作用以及能否通过 DNA 去甲基化发挥抗肿瘤作用目前国内外鲜有文献报道。本课题主要研究 TP 对 SMMC-7721 细胞生长的影响及对 P53 基因去甲基化的作用,为临床肝癌后肝脏移植的抗排斥及肿瘤复发的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞株

TP 购自美国 Sigma 公司,纯度 >98%。TP 以二甲亚砜配制成质量浓度为 1 mg/ml 的储存液, -20 °C 保存。胎牛血清(FCS)、RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品; TRIzol RNA 提取试剂、DNA 抽提试剂盒、DNA 标准参照物和 PCR 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品,逆转录试剂盒为 Promega 公司产品, Bisulfite 试剂盒为 Qiagen 公司产品, DNA 甲基化试剂盒(EZ DNA Methylation Kit)为美国 ZYMO Research 公司产品。引物合成由上海生工生物工程有限公司合成。

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由本实验室保存。SMMC-7721 细胞培养于含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 2 ~ 4 d 更换培养基 1 次, 常规传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2 MTT 法检测 SMMC-7721 细胞的增殖

取对数生长期 SMMC-7721 细胞, 按 2×10^5 /ml 密度接种于 96 孔培养板。实验设阴性对照组、不同剂量 TP 处理组(根据预实验结果, 选定 10、20、40 ng/ml), 另以培养液作为空白对照组。每组设 3 个平行孔。37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养, 48 h 后, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 10 μ l, 37 °C 条件下继续培养 4 h, 每孔加入 100 μ l DMSO, 酶标仪检测每组光密度值(D)。细胞生长抑制率(%) = (阴性对照组 D 值 - 处理组 D 值) / 阴性对照组 D 值 \times 100% 。

1.3 RT-PCR 检测甲基转移酶 mRNA 的表达

用 TRIzol 提取不同质量浓度 TP 作用 48 h 后的 SMMC-7721 细胞 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度与纯度, -70 °C 保存备用。用反转录所得 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 引物序列: 甲基转移酶 DNMT1 [DNA (5-cytosin) -methyltransferase 1]。上游引物为 5'-ACCATCACATCTCATTTTGC-3', 下游引物为 5'-GGTTTGACTTCGGAGTCTCT-3'; DNMT3a 上游引物为 5'-TATTGATGAGCGCACAAGAGAGC-3', 下游引物为 5'-GGGTGTTCCAGGTAACATTGAG-3'; DNMT3b 上游引物为 5'-CGGGATCCAAGGGAGACACCAGGCATCTC-3', 下游引物为 5'-GCGAATTCTCACACCTCCTGGTCTGGCTC-3'。内参照 β -actin 上游引物为 5'-AAAGACCTGTACGCCAACAC-3', 下游引物为 5'-GTCATACTCCTGCTTGCTGAT-3'。95 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 45 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.4 甲基化特异性 PCR 检测 P53 基因甲基化水平

甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)检测 P53 基因甲基化水平^[14]。自行设计 3 对引物即甲基化引物(M)、非甲基化引物(U)及与甲基化无关的引物(BS), 序列如下: P53-M 上游引物为 5'-GGCGATTACTTGCCCTTAC-3', 下游引物为 5'-AGCCCGTGACTCAGAGAGGAC-3'; P53-U 上游引物为 5'-ATGTCGAGATGGAGGAGCCGAGTCA-3', 下游引物为 5'-AAGTAAGCTTTCAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3'; P53-BS 上游引物为 5'-GTC-CAC CGCAAATGCT TCTA-3', 下游引物为 5'-GCT-GCTATCACCTCCCCT-3'。反应步骤如下: 94 °C 预变性 10 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环, 最后 72 °C 再延伸 10 min。同时, 以正常人外周血淋巴细胞为阴性对照, 水作空白对照。最后, 取 PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳, 在 Tanon 4200 凝胶图像分析仪上观察并照相。

1.5 Western blotting 检测 SMMC-7721 细胞中 P53 蛋白的表达

TP 作用 SMMC-7721 细胞 48 h, 按 1×10^6 细胞/ 100 μ l 裂解液 + 1 μ l 酶抑制剂的比例裂解细胞, 抽提蛋白, 并测定蛋白浓度, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜, 加入 1:1 000 稀释 anti-P53 孵育 2 h 后, 用 TBST 洗涤 2 次, 在加入 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育 1 h, 最后显影并曝光。

1.6 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 差异

具有统计学意义。

2 结果

2.1 TP 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用

SMMC-7721 细胞与不同剂量的 TP (10、20、40 ng/ml) 共同培养 48 h, MTT 法检测细胞的增殖。结果如表 1 所示, 不同质量浓度 TP 对 SMMC-7721 细胞生长有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), TP 处理组的细胞增殖抑制率随 TP 浓度增加而升高, 呈剂量依赖性, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 约为 20 ng/ml。

表 1 TP 剂量依赖性抑制 SMMC-7721 细胞的增殖
Tab.1 TP dose-dependently inhibited proliferation of SMMC7721 cells

TP ($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	D value	Inhibitory rate (%)
0	0.691 ± 0.071	-
10	$0.480 \pm 0.043^*$	30.5 ± 6.15
20	$0.342 \pm 0.032^{**}$	50.5 ± 4.63
40	$0.183 \pm 0.021^{**}$	73.5 ± 3.02

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 ng/ml

2.2 TP 对 SMMC-7721 细胞 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 表达的影响

TP 处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 测定 SMMC-7721 细胞甲基转移酶 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 的表达。结果(图 1)显示, 未处理 SMMC-7721 细胞中 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA 的表达较正常淋巴细胞增高。不同质量浓度 TP (10、20、40 ng/ml) 处理组 SMMC-7721 细胞中 DNMT1、DNMT3a mRNA 的表达都下调, 且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$); 20 ng/ml TP 对 DNMT3b mRNA 表达的抑制作用不明显, 但 40 ng/ml TP 可明显抑制 DNMT3b mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。

2.3 TP 抑制 SMMC-7721 细胞 P53 基因甲基化

TP 未处理组 SMMC-7721 细胞可扩增出特异性高亮度 P53-M 条带, 而 P53-U 扩增结果为阴性, 提示 SMMC-7721 细胞中 P53 基因呈高甲基化状态, 而正常淋巴细胞组 P53-M 为阴性(图 2A)。20 ng/ml 的 TP 明显抑制 SMMC-7721 细胞中 P53-M 的表达, 并明显增强 P53-U 的表达(图 2B), 提示 TP 处理后可降低 SMMC-7721 细胞 P53 基因的甲基化, 促进 P53 基因的去甲基化, 逆转 P53 基因高甲基化。

2.4 TP 对 SMMC-7721 细胞 P53 mRNA 及蛋白表达的影响

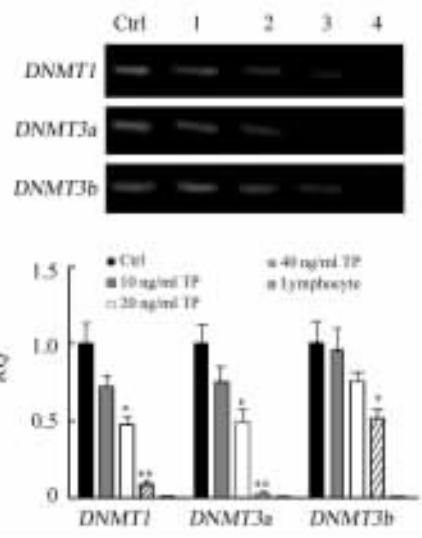


图 1 TP 抑制 SMMC-7721 细胞 DNMT mRNA 的表达

Fig.1 TP inhibited DNMT mRNA expression in SMMC-7721 cells

1: Ctrl; 2: 10 ng/ml TP; 2: 20 ng/ml TP; 3: 40 ng/ml TP; 4: Lymphocyte

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl

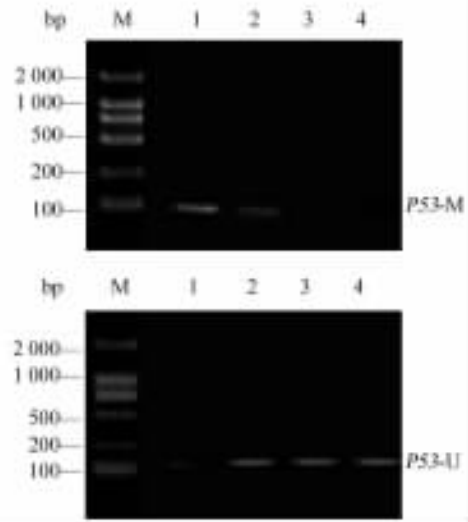


图 2 TP 抑制 SMMC-7721 细胞 P53 基因的甲基化

Fig. 2 TP inhibited methylation of P53 gene in SMMC-7721 cells

M: Marker; 1: Ctrl; 2: 20 ng/ml TP; 3: Lymphocyte; 4: H₂O

TP 处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 测定 P53 mRNA 的表达。结果(图 3A)显示, 正常淋巴细胞明显表达 P53 mRNA, 而未处理组 SMMC-7721 细胞未见 P53 mRNA 的表达; 经 TP (10 ng/ml) 处理后可见 P53 mRNA 弱表达, 并随 TP 浓度增加 P53 mRNA 表达也增强。可见 TP 能够诱导 SMMC-7721 细胞 P53

mRNA 的表达。Western blotting 测定 SMMC-7721 细胞中 P53 蛋白的表达水平,结果(图 3B)显示,TP 未处理组 SMMC-7721 细胞中未见 P53 蛋白表达,而经 TP(20 ng/ml)处理后可见 P53 蛋白表达,提示 TP 能够诱导 SMMC-7721 细胞中 P53 蛋白的表达。

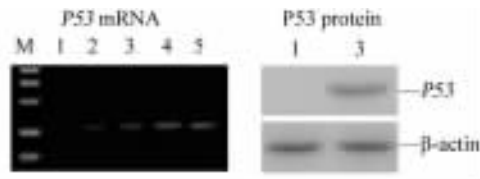


图 3 TP 促进 SMMC-7721 细胞中 P53 mRNA 和蛋白的表达

Fig. 3 TP promoted P53 mRNA and protein expressions in SMMC-7721 cells

1: Ctrl; 2: 10 ng/ml TP; 3: 20 ng/ml TP;
4: 40 ng/ml TP; 5: Lymphocyte

3 讨论

雷公藤系卫矛科雷公藤属木质藤本植物,为我国传统驱风、杀虫、解毒中药。20 世纪 70 年代从雷公藤中分离出雷公藤内酯醇(triptolide, TP)、雷公藤内酯酮(triptonide)和雷公藤内酯二醇(tripdiolide)3 个活性二萜类化合物^[10]。其中,TP 的生物活性最强。近年来的研究^[15]证实,TP 具有广谱抗肿瘤作用,对人 T 淋巴细胞瘤细胞株 Jurkat 及人骨髓白血病细胞株 HL-60 均有明显的抑制作用。研究^[16]显示,TP 除直接抑制肿瘤细胞的生长外,主要通过诱导细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用。其可能的机制是 TP 影响凋亡通路中重要的上游信号分子的功能,特别是 TP 可影响抑癌基因 P53 基因的表达,在调节细胞周期和引发细胞凋亡中发挥关键作用。Chang 等^[17]的实验表明,TP 可上调肿瘤细胞内的 p53 的表达,从而下调 P53 下游基因 P21 的表达,因此可阻断多柔比星引起的 P21 上调及 P21 介导的 G₀/M 期阻滞,引起肿瘤细胞凋亡,从而增强肿瘤细胞对多柔比星的敏感性。但 TP 如何上调 P53 表达的机制不清楚,是否通过 P53 DNA 去甲基化发挥抗肿瘤作用是值得研究的问题。

肿瘤的抑癌基因沉默为肿瘤发生原因之一,抑癌基因广泛地存在于多种恶性肿瘤中,而启动子区高甲基化将导致抑癌基因转录失活而引起沉默。本研究发现,TP 可明显抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,该作用呈现剂量依赖性。采用甲基化特异性 PCR 检测 P53 基因甲基化水平,发现 SMMC-7721 细胞

P53 基因呈高甲基化状态。经过 20 ng/ml 的 TP 处理后,可明显降低 SMMC-7721 细胞 P53 基因的甲基化程度,促进 P53 基因的去甲基化,逆转 P53 基因高甲基化,并进而促进 P53 mRNA 和蛋白的表达。提示 TP 可通过促进 P53 基因的去甲基化,抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,发挥抗肿瘤的作用。

虽然肝癌细胞发生甲基化异常的模式目前仍不清楚,但 DNA 甲基转移酶 DNMTs(包括 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 等)已被证实在肝癌细胞内存在表达异常^[18-12]。其中 DNMT1 在正常细胞 S 期复制过程中具有维持甲基化的功能,多数表现为散在的 C 被甲基化,而 CpG 岛未被甲基化。DNMT1 高表达是 CpG 岛甲基化紊乱的重要因素之一。本研究发现,SMMC-7721 细胞高表达 DNMT1、DNMT3a 及 DNMT3b mRNA,不同浓度 TP 处理后,SMMC-7721 细胞中 DNMT1、DNMT3a mRNA 的表达均明显降低,且高浓度的 TP(40 ng/ml)也可抑制 DNMT3b mRNA 的表达。提示抑制 DNMTs 表达可能是 TP 作用的机制之一。因此,雷公藤的免疫抑制和抗肿瘤作用是否可作为肝癌后肝脏移植的抗排斥及防治肿瘤复发的待选药物,值得进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Huang K, Fan G. DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: An emerging systematic view [J]. Regen Med, 2010, 5(4): 531-544.
- [2] Infantino S, Benz B, Waldmann T, et al. Arginine methylation of the B cell antigen receptor promotes differentiation [J]. J Exp Med, 2010, 207(4): 711-719.
- [3] Dansranjav T, Krehl S, Mueller T, et al. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation [J]. Cell Cycle, 2009, 8(6): 916-924.
- [4] De Zhu J. The altered DNA methylation pattern and its implications in liver cancer [J]. Cell Res, 2005, 15(4): 272-280.
- [5] Calvisi DF, Simile MM, Ladu S, et al. Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: Relationship with genomic instability and prognosis [J]. Int J Cancer, 2007, 121(11): 2410-2420.
- [6] Du YP, Peng JS, Sun A, T et al. Assessment of the effect of beta-ine on p16 and c-myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model [J]. BMC Cancer, 2009, 9: 261.
- [7] Liu Y, Chen Y, Liu FQ, et al. Combined treatment with triptolide and rapamycin prolongs graft survival in a mouse model of cardiac transplantation [J]. Transpl Int, 2008, 21(5): 483-494.
- [8] Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, et al. Triptolide, a constituent of immunosuppressive Chinese herbal medicine, is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking [J]. Blood, 2005, 106(7): 2409-2416.

- [9] Liu Q, Chen T, Chen G, et al. Triptolide impairs dendritic cell migration by inhibiting CCR7 and COX-2 expression through PI3-K/Akt and NF-kappaB pathways [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44 (10): 2686-2696.
- [10] Lu L, Kanwar J, Schmitt S, et al. Inhibition of tumor cellular proteasome activity by triptolide extracted from the Chinese medicinal plant 'thunder god vine' [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 1-10.
- [11] Shamon LA, Pezzuto JM, Graves JM, et al. Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Cancer Lett*, 1997, 112(1): 113-111.
- [12] Yang S, Chen J, Guo Z, et al. Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(1): 65-72.
- [13] Kupchan SM, Court WA, Dailey RG Jr, et al. Triptolide and triptolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii* [J]. *J Am Chem Soc*, 1972, 94(20): 7194-7195.
- [14] Uccella S, Cerutti R, Placidi C, et al. MGMT methylation in diffuse large B-cell lymphoma: Validation of quantitative methylation-specific PCR and comparison with MGMT protein expression [J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(8): 715-723.
- [15] Chan EW, Cheng SC, Sin FW, et al. Triptolide induced cytotoxic effects on human promyelocytic leukemia, T cell lymphoma and human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 122(1): 81-87.
- [16] Kiviharju TM, Lecane PS, Sellers RQ, et al. Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(8): 2666-2674.
- [17] Chang Z, Kang JJ, Lee K et al. Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis. A role for the p53 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(3): 2221-2227.
- [18] Oh BK, Kim H, Park HJ, et al. DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20 (1): 65-73.
- [19] Nagai M, Nakamura A, Makino R, et al. Expression of DNA (5-cytosin) -methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas [J]. *Hepatol Res*, 2003, 26(3): 186-191.
- [20] Cui X, Wakai T, Shirai Y, et al. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(3): 298-311.
- [收稿日期] 2011-04-10 [修回日期] 2011-05-15
[本文编辑] 徐红梅

· 科技动态 ·

一个细胞内 DNA 的天然免疫识别受体——IFI16

识别细胞内的微生物 DNA 是天然免疫应答的首要节点,但目前关于这种 DNA 如何被识别仍然所知有限。论文作者揭示了一个可介导 β -干扰素(IFN- β)产生的胞内 DNA 识别受体——PYHIN 蛋白家族成员 IFI16。一个有效的病毒免疫应答依赖于宿主细胞因子和 I 型干扰素的诱导产生,而这主要是由胞内模式识别受体,通过检测出病毒核酸如病毒 RNA 和 DNA、病毒复制中间物和转录产物而引发的。关于病毒 RNA 的天然免疫应答已经有较完整的研究理论体系,而对 DNA 病毒如疱疹病毒和痘病毒的细胞内 DNA 识别受体尚知之甚少,这类受体可介导 IFN- α 、IFN- β 及细胞因子的产生。虽然,已知在 MEFs 等单核细胞起源的细胞内,non-AT-rich dsDNA 激活的 IFN- β 应答途径包括 STING、TBK1 和 IRF3,但对其上游偶联的 DNA 识别受体依然知之甚少。目前已知有两个此类 DNA 识别受体:DAI 和 RNA 聚合酶 III,并确知此外还至少存在一种可诱导 IFN- β 产生的 DNA 识别受体。

为寻找其它 DNA 识别受体,该研究使用了一段可诱导 IFN- β 产生的痘病毒 DNA 基序(VACV 70mer),从胞质液中亲和纯化出 DNA 结合蛋白——IFI16。IFI16 是 PYHIN 蛋白家族成员,含有一个 pyrin 结构域和两个与 DNA 结合的 HIN 结构域。IFI16 直接与 IFN- β 的病毒 DNA 诱导基序结合,并在 DNA 刺激后募集 STING 蛋白。使用干扰 RNA 降低 IFI16 及其小鼠同源蛋白 P204 的表达,可抑制 DNA 和 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)诱导的转录因子 IRF3 和 NF- κ B 的基因诱导和激活作用,对 RNA 和 RNA 病毒的诱导效应则没有影响。

IFI16 (P204)是目前所知涉及 IFN- β 诱导的第一个 PYHIN 蛋白,其 HIN 结构域和 VACV 70mer、HSV 60mer 等 DNA 结合,但关于此相互作用的 dsDNA 特征及如何激活 IFI16 募集 STING 尚有待进一步研究。似乎 DNA 长度对 IFI16 的寡聚化的作用较 DNA 序列本身更为重要。AIM2 是另一个可识别 DNA 和 DNA 病毒的 PYHIN 蛋白家族成员,但其 pyrin 结构域和炎症复合体相作用,通过中间蛋白 ASC 激活 caspase-1。将 PYHIN 蛋白 IFI16 和 AIM2 组成一个天然 DNA 识别受体的新家族,称之为“AIM2 样受体”(ALRs)。IFI16 对胞内感染细菌 DNA 也有识别作用。在自身免疫疾病如系统性红斑狼疮(SLE)中,会出现抗 IFI16 抗体和 IFI16 表达增高的现象。因此,IFI16 作为胞内 DNA 识别受体,在抗病毒天然免疫应答、细菌病原体感染和自身免疫疾病中发挥着重要作用。

[王蕾 摘译,陈涛涌 审阅. Unterholzner L, Keating SE, Baranl M, et al. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 997-1004.]