

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.009

· 基础研究 ·

新型增殖型腺病毒 CNHK500-h γ 对肝癌细胞的杀伤作用

孙立臣¹, 张柏和², 张琪², 苏长青², 李根丛², 吴红平², 吴孟超², 钱其军²(1. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院肝胆外科, 山东烟台 264000; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因实验室, 上海 200438)

[摘要] 目的: 探讨一种新型增殖型腺病毒 CNHK500-h γ [腺病毒 E1A、E1B 基因分别由人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 启动子和缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 启动子双重调控的、并携带 hIFN- γ 的重组腺病毒] 对肝癌细胞的体外杀伤作用。方法: TCID₅₀ 法和 MTT 检测增殖型腺病毒 CNHK500-h γ 在两种端粒酶阳性肝癌细胞株 HepG2 和 Hep3B 以及一株端粒酶阴性的成纤维细胞株 BJ 中的扩增能力和对细胞的杀伤作用。用携带绿色荧光蛋白的 CNHK500-GFP 感染 BJ、Hep3B 和 HepG2 细胞, 观察其扩增情况。Western blotting 和 ELISA 法检测 CNHK500-h γ 感染后细胞和细胞上清中 hIFN- γ 的表达。结果: CNHK500-h γ 感染 HepG2、Hep3B 和 BJ 细胞 48 h 后, CNHK500-h γ 在 HepG2 和 Hep3B 细胞中的扩增是 BJ 细胞中的 16 003 和 2 116 倍, 对 BJ 细胞杀伤的 ED₅₀ 值分别是杀伤 HepG2 和 Hep3B 细胞的 500 和 10 000 倍 ($P < 0.01$), 且明显优于阳性对照增殖型腺病毒 ONYX-015。CNHK500-h γ 感染后 HepG2 及 Hep3B 细胞中 hIFN- γ 的表达显著高于非增殖型腺病毒 Ad-h γ 感染后细胞中 hIFN- γ 的表达 ($P < 0.01$)。结论: 增殖型腺病毒 CNHK500-h γ 可在肝癌细胞内特异性扩增, 高效表达 hIFN- γ 基因, 是一种具备治疗肝癌潜力的新型腺病毒。

[关键词] 肝癌; CNHK500-h γ ; 病毒治疗; 基因治疗; 端粒酶; 人干扰素- γ

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0635-06

Cytotoxicity of a novel replicative adenovirus CNHK500-h γ against hepatocellular carcinoma cells

SUN Li-chen¹, ZHANG Bai-he², ZHANG Qi², SU Chang-qing³, LI Gen-cong², WU Hong-ping², WU Meng-chao², QIAN Qi-jun²(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Yuhuangding Hospital, Medical College of Qingdao University, Yantai 264000, Shandong, China; 2. Laboratory of Virus Gene, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the cytotoxicity of the novel replicative adenovirus CNHK500-h γ , a recombinant adenovirus with the adenovirus E1A and E1B genes driven by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and hypoxia response element (HRE) promoters respectively and carrying the hIFN- γ , against hepatocellular carcinoma (HCC) cells *in vitro*. **Methods:** The amplification and cytotoxicity of replicating adenovirus CNHK500-h γ on two telomerase positive HCC cell lines (HepG2 and Hep3B) and one telomerase negative normal cell line (BJ) were analyzed by TCID₅₀ and MTT assays. BJ, Hep3B and HepG2 cells were infected with CNHK500-GFP carrying green fluorescent protein and the amplification of CNHK500-GFP was observed. The expressions of hIFN- γ in cells and cell supernatants after CNHK500-h γ infection were detected by Western blotting and ELISA assays. **Results:** Forty-eight hours after infection, the amplification of CNHK500-GFP in HepG2 and Hep3B cells were 16 003 and 2 116 times of that in BJ cells, and the cytotoxicity ED₅₀ of CNHK500-GFP against BJ cells was respectively 500 and 10 000 times of that against HepG2 and Hep3B cells, and superior to the positive control of replicative adenovirus ONYX-015. Furthermore, hIFN- γ expression in HepG2 and

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作重大项目资助 (No. 30120160823); 国家高技术研究发展“863”计划 (No. 2001AA217031)。Project supported by the International Cooperation Important Project of National Natural Foundation of China (No. 30120160824), and the National High Science and Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2001AA217031)

[作者简介] 孙立臣 (1965 -), 男, 山东省海阳县人, 博士, 教授, 主要从事肝胆外科肿瘤方面的研究。E-mail: sun-lichen@163.com

[通信作者] 钱其军 (QIAN Qi-jun, corresponding author), E-mail: qianqj@sino-gene.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20111111.1118.003.html>

Hep3B cells after CNHK500-h γ infection was significantly higher than that after non-replicative adenovirus Ad-h γ infection ($P < 0.01$). **Conclusion:** Replicative adenovirus CNHK500-h γ can specifically amplify in HCC cells and effectively express hIFN- γ gene, which holds potential for the treatment of HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; CNHK500-h γ ; viral therapy; gene therapy; telomerase; human interferon gamma

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 635-640]

由于一系列基因治疗临床试验导致肿瘤患者死亡或类白血病样反应等严重的并发症,使基因治疗经历了多年的沉寂^[1-3]。直至 2009 年末出现了如先天性黑矇症的基因治疗^[4]、帕金森症的基因治疗^[5],以及其他一些疾病基因治疗的成功范例^[7-11],基因治疗重新点燃了希望。肿瘤的基因治疗是基因治疗中的重中之重,而特异性靶向基因的筛选是肿瘤基因治疗成功的关键^[12]。本实验利用肿瘤的无限生长和缺氧微环境两大特性为双靶点,构建携带外源基因 hIFN- γ 的腺病毒 CNHK500-h γ ,观察其体外对肝癌细胞的杀伤作用。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

腺病毒载体 pXC1 和 pBHGE3 以及 293 细胞株购于加拿大 Microbix Biosystems 公司。腺病毒 E1A 基因受人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 启动子调控、E1B 基因受缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 启动子调控,并携带治疗基因 hIFN- γ 的增殖型腺病毒 CNHK500-h γ 、表达 GFP 的增殖型腺病毒 CNHK500-GFP、E1 区缺失的携带 hIFN- γ 的增殖缺陷型腺病毒 Ad-h γ 及野生型 5 型腺病毒 Wad5 均由本室构建^[13]。E1b-55 kD 蛋白缺失的腺病毒 ONYX-015 (DI1520) 由美国加州大学 Berk 教授惠赠,是目前公认的增殖型腺病毒,作为阳性对照。肝癌细胞株 HepG2 (端粒酶阳性)、Hep3B (端粒酶阳性) 和成纤维细胞株 BJ (端粒酶阴性) 购自美国 ATCC 公司。MTT 试剂盒购自 Roche 公司,小鼠抗 E1A 抗体、小鼠抗 E1B 抗体、大鼠抗 hIFN- γ 抗体及 HRP 标记的两种二抗 (羊抗小鼠、羊抗大鼠抗体) 均购自 R&D 公司。hIFN- γ ELISA 试剂盒购自美国 Chemicon International Inc 公司。

1.2 TCID₅₀ 法检测 CNHK500-h γ 病毒的体外增殖

分别用 CNHK500-h γ 、ONYX-015 和 Ad-h γ 病毒以 MOI = 1 感染在 6 孔板中单层培养的 HepG2、Hep3B 和 BJ 细胞,2 h 后吸去病毒液,换用含 5% 血清的培养液。病毒感染后 48 h 取细胞及细胞上清液。-80 °C 反复冻融 3 次,TCID₅₀ 法检测病毒滴度。

1.3 MTT 法检测 CNHK500-h γ 对 HepG2、Hep3B 和 BJ 细胞的杀伤作用

收集对数生长期的 HepG2、Hep3B 或 BJ 细胞,用相应的培养液将细胞配成密度为 1×10^5 /ml 的单细胞悬液,铺 96 孔板,100 μ l/孔,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内 24 h。用无血清培养液稀释病毒,以 MOI = 0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100,针对不同细胞采用不同梯度滴度的病毒液感染细胞,并设置 MOI = 0 为无病毒感染的空白对照,对应于每个 MOI 值设 8 个复孔,加入病毒 100 μ l/孔,每种细胞对应病毒均设置 3 块复板,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 7 d。弃去培养液,以 200 μ l/孔加入 PBS 溶液,清洗 1 次,先后加入 PBS 液 100 μ l/孔和 MTT 10 μ l/孔,轻拍混匀,放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱内,4 ~ 6 h 后加入细胞裂解液 (10% SDS + 0.01 mol/L HCl) 100 μ l/孔,轻拍 96 孔板边缘 5 min,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内。8 ~ 24 h 后镜下观察细胞全部裂解及四氮唑盐结晶全部溶解后,用酶联免疫检测仪测定每孔的光密度值 (D),测定波长 570 nm,校正波长为 655 nm。

1.4 荧光显微镜下观察 CNHK500-GFP 感染后细胞的增殖

分别用对数生长期的 Hep3B、HepG2 和 BJ 细胞铺 6 孔板, 1×10^6 /孔,放入 37 °C、5% CO₂ 孵箱孵育。待细胞生长汇合后以 MOI = 0.001 用病毒 CNHK500-GFP 感染上述细胞。2 h 后,用 PBS 液清洗培养细胞并用 1.25% 的琼脂糖覆盖,分别在病毒感染后的 1、3、7、10 d 用倒置荧光显微镜观察培养细胞的增殖情况。

1.5 Western blotting 检测病毒感染后细胞 hIFN- γ 蛋白的表达

收集对数生长期的 HepG2、Hep3B 和 BJ 细胞并计数,加入病毒 CNHK500-h γ 和 Ad-h γ 培养 48 h,经鉴定后,-80 °C 冻存储备。蛋白表达的检测:在 9 ml 分离胶溶液加入 TEMED 溶液 4 μ l,在 4 ml 积层胶中加入 4 μ l TEMED,取出冻存标本,按顺序加样并电泳;电转移 1.5 h;取出酸纤维膜,观察蛋白转膜情况;洗膜 3 次,每次 5 min;室温下与大鼠抗 hIFN- γ 单克

隆抗体反应 1 ~ 1.5 h,加入相应二抗工作液,加入显色液,在暗室内立即放入 X 线胶片盒内;取出胶片显影定影,晾干后用扫描仪扫描胶片,获取图像。

1.6 ELISA 检测病毒感染后细胞上清中 hIFN-γ 的表达

收集对数生长期的 HepG2 和 BJ 细胞并计数,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养 24 h;收集病毒未感染的细胞培养上清液, -80 °C 冻存;以 MOI = 1 分别用 CNHK500-hγ 和 Ad-hγ 感染上述细胞,分别在病毒感染后的第 1、3、7 天取细胞培养上清液, -80 °C 冻存备用。取上述冻存标本稀释 1 000 倍;分别将 hIFN-γ 蛋白标准品、阳性对照或样品加至反应孔中,每孔加入 100 μl 显色剂,分光光度计 450 nm(参考波长 570 nm)测定光密度值(D)。根据所测标准品的 D 值绘制双对数曲线,应用直线回归方法建立 ELISA 检测 hIFN-γ 标准曲线的直线回归方程,通过回归方程计算各样品 hIFN-γ 的浓度。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 软件,两组数据间比较采用 t 检验,重复测量的实验中两组数据的比较采用 ANOVA 分析。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CNHK500-hγ 在肝癌细胞中特异性扩增

以 0 h 的病毒滴度为基准,算出感染 48 h 后病毒扩增倍数。HepG2 和 Hep3B 细胞中增殖型腺病毒 CNHK500-hγ 的扩增倍数分别是(20 100 ± 6 570)和(2 380 ± 1 820),是在正常成纤维细胞 BJ 中增殖的 16 003 倍和 2 116 倍;阳性对照 ONYX-015 腺病毒在 HepG2 和 Hep3B 细胞中的扩增倍数分别是(9 966 ± 350)和(1 230 ± 240),在正常成纤维细胞 BJ 中的扩增倍数为(1.456 ± 0.23);增殖缺陷型腺病毒 Ad-hγ 在这 3 种细胞株中均无明显的增殖。

由此可见, CNHK500-hγ 在肝癌细胞株 HepG2 和 Hep3B 中的扩增倍数明显高于 ONYX-015 病毒(P < 0.05,图 1),而 3 种病毒在 BJ 正常细胞中的扩增无明显差异。

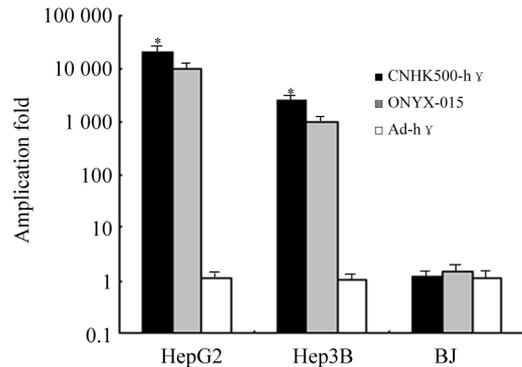


图 1 TCID₅₀ 法检测 CNHK500-hγ 病毒的体外扩增

Fig. 1 Amplification of CNHK500-hγ virus

in vitro as detected by TCID₅₀ assay

* P < 0.05 vs ONYX-015

2.2 CNHK500-hγ 有效杀伤肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞

结果(图 2)显示, CNHK500-hγ 对 HepG2、Hep3B 和 BJ 细胞杀伤的 ED₅₀ 分别是 MOI = 0.204、MOI = 0.011 和 MOI > 100,对正常 BJ 细胞杀伤的 ED₅₀ 分别是对两株肝癌细胞 ED₅₀ 的 500 倍和 10 000 倍以上。ONYX-015 对 3 种细胞株的杀伤 ED₅₀ 分别是 MOI = 0.501、MOI = 0.2 和 MOI > 100,对正常 BJ 细胞杀伤的 ED₅₀ 分别是对两株肝癌细胞 ED₅₀ 的 200 倍和 500 倍以上。可重复双因素 ANOVA 分析表明,增殖型腺病毒 CNHK500-hγ 对肝癌细胞的杀伤能力优于阳性对照 ONYX-015 腺病毒, CNHK500-hγ 对正常 BJ 细胞杀伤作用近似于增殖缺陷型腺病毒 Ad-hγ,而对 HepG2、Hep3B 两种肝癌细胞的杀伤作用明显强于 Ad-hγ。

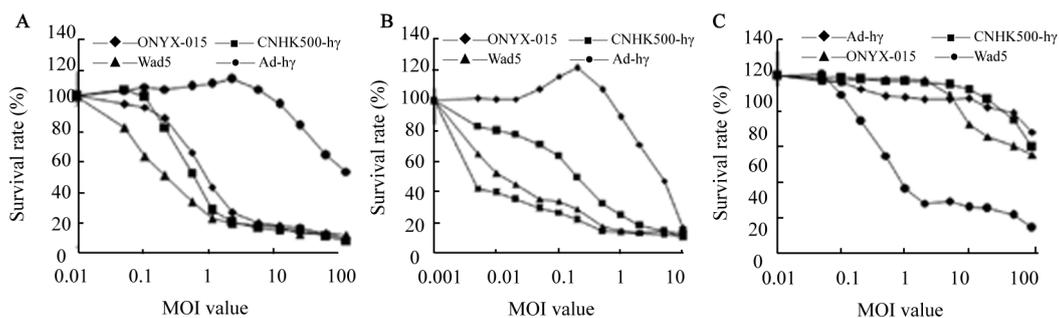


图 2 MTT 法检测 CNHK500-hγ 对 HepG2、Hep3B 和 BJ 细胞的杀伤作用

Fig. 2 Cytotoxicity of CNHK500-hγ on HepG2, Hep3B and BJ cells as detected by MTT assay

A: HepG2 cells; B: Hep3B cells; C: BJ cells

2.3 CNHK500-GFP 在 HepG2、Hep3B 细胞中的扩增

荧光显微镜下 CNHK500-GFP 感染后的 HepG2、Hep3B 和正常 BJ 细胞的荧光照片(图 3)可见,在 HepG2、Hep3B 肝癌细胞感染后的第 3 天出现荧光,其后随时间延长荧光不断增多,成散在的片状分布,在感染 7 d 后荧光渐渐融合,到 10 d 左右荧光融合更加明显,表明病毒在不断地扩增;而在成纤维 BJ 细胞中随时间延长,荧光并无增多,在第 10 天时仍只能见到少量散在的荧光。上述结果直观地说明, CNHK500-GFP 病毒在两种肝癌 HepG2、Hep3B 细胞中的扩增能力强于在正常成纤维 BJ 细胞中的扩增能力,其所携带的基因的表达量也高于在正常 BJ 细胞中的表达量。

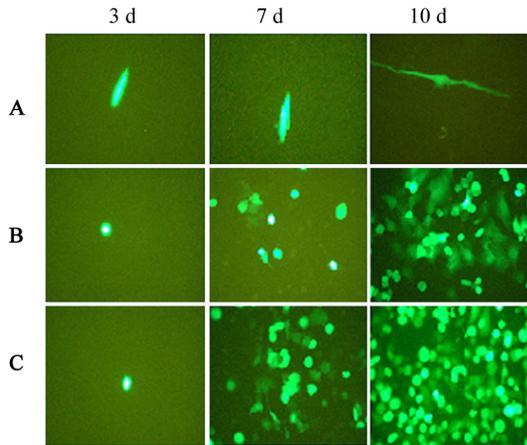


图 3 荧光显微镜下观察 CNHK500-GFP 在细胞中的扩增(×100)
Fig. 3 Amplification of CNHK500-GFP in cells under fluorescence microscope (×100)
 A: BJ cells; B: Hep3B cells; C: HepG2 cells

2.4 CNHK500-hγ 介导肝癌细胞中 hIFN-γ 的表达

Western blotting 半定量分析结果(图 4)显示,增殖型腺病毒 CNHK500-hγ 和增殖缺陷型腺病毒 Ad-hγ 在两种肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 中均有 hIFN-γ 表达,但前者表达条带比后者浓厚;两者在正常 BJ 细胞中的表达相似。由此可见, CNHK500-hγ 可以在两种肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 中选择性地高表达 hIFN-γ,在正常 BJ 细胞中表达量很少,且 CNHK500-hγ 优于 Ad-hγ。ELISA 结果(图 5)进一步显示,增殖型腺病毒 CNHK500-hγ 感染 HepG2 细胞的 7 d 内,随时间延长细胞培养上清液中 hIFN-γ 蛋白浓度不断增高;在感染后的第 7 天,表达量达到 442 ng/ml,明显高于增殖缺陷型腺病毒 Ad-hγ 感染 HepG2 细胞 7 d 时细胞培养上清中 hIFN-γ 的浓度

(120 ng/ml, $P < 0.01$)。

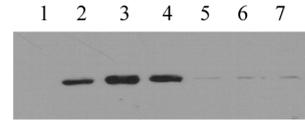


图 4 Western blotting 检测 CNHK500-hγ 和 Ad-hγ 感染后细胞中 hIFN-γ 的表达
Fig. 4 Expression of hIFN-γ in cells after CNHK500-hγ or Ad-hγ infection as detected by Western blotting

1: Control; 2,4: CNHK500-hγ infected HepG2 or Hep3B cells; 3: CNHK500-hγ infected 293 cells; 5: CNHK500-hγ infected BJ cells; 6,7: Ad-hγ infected HepG2 or Hep3B cells

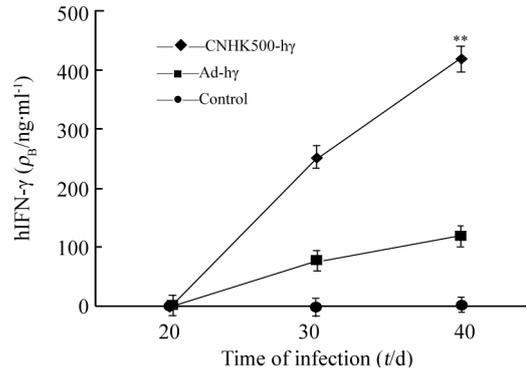


图 5 ELISA 检测 CNHK500-hγ 感染后细胞上清中 hIFN-γ 的表达
Fig. 5 Expression of hIFN-γ in cell supernatants after CNHK500-hγ infection as detected by ELISA
 ** $P < 0.01$ vs Ad-hγ

3 讨论

利用肿瘤或组织特异性启动子控制腺病毒必需基因的表达,使腺病毒只能在肿瘤细胞内特异性增殖,而在正常细胞中不增殖,是病毒—基因治疗的靶向策略之一^[14]。Yu 等^[15]使用前列腺组织特异性增强子和启动子控制 *E1B* 基因的表达而构建的腺病毒 CV764 在 PSA 阳性前列腺癌细胞中的扩增能力远高于在 PSA 阴性的卵巢癌和乳腺癌细胞中的扩增。Hallenbeck 等^[16]使用肿瘤特异性的甲胎蛋白(alpha-fetal protein, AFP)启动子控制 *E1A* 表达构建的腺病毒能在 AFP 阳性的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞株中扩增,而在 AFP 阴性的细胞株中几乎不扩增。

端粒酶是目前所报道的最为广谱的肿瘤分子生物学标记物,在原发性肝癌中阳性率高达 85%^[17]。

以端粒酶逆转录酶启动子 *hTERT* 控制腺病毒 *E1A* 基因并携带血管内皮抑素的病毒 CNHK300-mE 可在端粒酶阳性的肿瘤细胞中特异性扩增,杀伤肿瘤细胞^[18-19]。但是以 *hTERT* 调控的重组病毒系统存在对人体的端粒酶阳性的正常细胞(造血干细胞、生殖细胞等)的潜在毒性作用。肿瘤细胞的扩增过程中可形成肿瘤内缺氧微环境。缺氧进而可诱导缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor 1, *HIF-1*)的形成,*HIF-1* 在多种肿瘤中广泛存在^[20]。利用恶性肿瘤的无限增殖和肿瘤内缺氧微环境这两大特性为双靶点,构建出重组病毒系统 CNHK500-h γ ^[13]。

实验结果表明,与 E1b-55 kD 蛋白缺失腺病毒 ONYX-015 一样,随着时间的延长,增殖型 CNHK500-h γ 在肿瘤细胞 HepG2 和 Hep3B 中的扩增倍数不断增高,明显高于增殖缺陷型 Ad-h γ 。而在正常细胞中 CNHK500-h γ 明显减毒。CNHK500-h γ 在两种肝癌细胞株中的扩增倍数明显高于 ONYX-015 ($P < 0.05$),这说明 CNHK500-h γ 比阳性对照 ONYX-015 腺病毒更具有广谱性及在肿瘤细胞中特异扩增的能力,而 Ad-h γ 在 3 种细胞株中均无明显的扩增。综合分析实验结果可以得出,扩增型 CNHK500-h γ 具有在肝癌细胞中选择性扩增并杀灭肿瘤细胞的能力,其扩增效能强于 ONYX-015。

为了进一步观察增殖型 CNHK500-h γ 的扩增情况,本研究在构建这种病毒的同时还构建了 CNHK500-GFP,方法是在病毒基因组的同一位置上用报告基因 *GFP* 替代治疗基因。本研究发现,CNHK500-GFP 具有在肝癌细胞中选择性扩增的能力,间接地预示着治疗基因 *hIFN- γ* 在肝癌细胞中随着病毒的复制其表达也明显放大。

通过计算出 ED_{50} 值从量化角度评价 CNHK500-h γ 的选择性扩增能力,与 Wad5 相比,CNHK500-h γ 和 ONYX-015 对肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞和正常 BJ 细胞的杀伤力均减弱,这说明外源基因的导入或基因的缺失影响了病毒对细胞的杀伤能力。实验结果还显示,CNHK500-h γ 对肝癌细胞的杀伤强于阳性对照 ONYX-015 腺病毒和非增殖型病毒 Ad-h γ ,对正常肝细胞杀伤近似于 Ad-h γ 。综合分析细胞杀伤实验的结果可以得出,经过基因改造的携带 *hIFN- γ* 治疗基因的双重调控的增殖型腺病毒 CNHK500-h γ 对肝癌细胞的特异性杀伤力高于 ONYX-015,同时其杀伤力亦明显强于携带 *hIFN- γ* 的非增殖型腺病毒 Ad-h γ 。

Western blotting 分析表明,CNHK500-h γ 感染的肝癌细胞和正常细胞的上清液中均存在 *hIFN- γ* 的

表达,但在肝癌细胞中的 *hIFN- γ* 蛋白量高于正常细胞,在正常细胞中 *hIFN- γ* 蛋白量与非增殖型腺病毒 Ad-h γ 相似。结果提示,与 Ad-h γ 相比,CNHK500-h γ 介导的治疗基因 *hIFN- γ* 表达量在肝癌细胞中得到了放大,而在正常细胞中没有此放大作用。ELISA 结果进一步表明,在 CNHK500-h γ 感染 HepG2 细胞的 7 d 内,随时间延长细胞培养上清液中 *hIFN- γ* 蛋白浓度不断增高;而 Ad-h γ 介导的 *hIFN- γ* 表达量则无明显增高。因此,相对于非增殖型病毒 Ad-h γ ,增殖型病毒 CNHK500-h γ 介导的 *hIFN- γ* 治疗基因的表达得到了放大,并且这种放大作用只存在于肝癌细胞中。

总之,本研究证实增殖型腺病毒 CNHK500-h γ 具有在肝癌细胞中特异性增殖并杀伤细胞的能力,它所介导的 *hIFN- γ* 表达在肝癌细胞中也得到特异性地放大,CNHK500-h γ 具备治疗肝癌的潜力。

[参考文献]

- [1] Yarborough M, Sharp RR. Public trust and research a decade later: What have we learned since Jesse Gelsinger's death [J]. *Mol Genet Metab*, 2009, 97(1): 4-5.
- [2] Kaiser J. Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial [J]. *Science*, 2003, 299(5606): 495.
- [3] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 [J]. *Science*, 2003, 302(5644): 415-419.
- [4] Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: A phase 1 dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2009, 374(9701): 1597-1605.
- [5] Jarraya B, Boulet S, Ralph GS, et al. Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia [J]. *Sci Transl Med*, 2009, 1(2): 2-4.
- [6] Khromova N, Kopnin P, Rybko V, et al. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms [J]. *Oncogene*, 2011. doi: 10.1038/onc.2011.330.
- [7] Raica M, Cimpean AM, Ceausu R, et al. Lymphatic microvessel density, VEGF-C, and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(5): 1757-1764.
- [8] Sun X, Vale M, Jiang X, et al. Antisense HIF-1 α prevents acquired tumor resistance to angiostatin gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(8): 532-540.
- [9] Planchard D. Bevacizumab in non-small-cell lung cancer: A review [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(8): 1163-1179.
- [10] He X, Liu J, Yang C, et al. 5/35 fiber-modified conditionally replicative adenovirus armed with p53 shows increased tumor-suppressing capacity to breast cancer cells [J]. *Hum Gene Ther*,

- 2010, 22(3): 283-392.
- [11] Wilson AA, Murphy GJ, Hamakawa H, et al. Amelioration of emphysema in mice through lentiviral transduction of long-lived pulmonary alveolar macrophages [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 379-389.
- [12] Luo H, Rankin GO, Juliano N, et al. Kaempferol inhibits VEGF expression and *in vitro* angiogenesis through a novel ERK-NF κ B-cMyc-p21 pathway [J]. *Food Chem*, 2012, 130(2): 321-328.
- [13] 孙立臣, 张柏和, 苏长青, 等. 新型的病毒-基因治疗系统 CNHK500-h γ 的构建 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(1): 57-59.
- [14] Eager RM, Nemunaitis J. Clinical development directions in oncolytic viral therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(5): 305-317.
- [15] Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, et al. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(10): 1721-1733.
- [16] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [J]. *Nat Med*, 2000, 6(8): 879-885.
- [17] Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, et al. Telomerase activity in human liver tissues: Comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(13): 2734-2736.
- [18] Zhang Q, Nie M, Sham J, et al. Effective gene-viral therapy for telomerase-positive cancers by selective replicative-competent adenovirus combining with endostatin gene [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5390-5397.
- [19] Li GC, Yang JM, Nie MM, et al. Potent antitumoral effects of a novel gene-viral therapeutic system CNHK300-mEndostatin in hepatocellular carcinoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(3): 179-185.
- [20] 张琪, 钱其军, 吴孟超. 缺氧诱导因子-1-肿瘤治疗的新靶点 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(4): 298-300.
- [收稿日期] 2011-08-12 [修回日期] 2011-10-20
- [本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

NLRX1——过度炎症反应的负向调控因子

NLR(nucleotide binding domain and leucine-rich-repeat-containing proteins)分子的功能是近年来免疫学研究的热点,该分子的功能不仅限于免疫识别,而且广泛参与免疫反应的调节,特别是炎症反应的调节。

病毒或者细菌感染过程中,机体依赖模式识别受体触发固有免疫反应。目前已发现的有 3 类模式识别受体—Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR)、RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptors, RLR)、NLR。病原体相关模式分子 (pathogen associated molecular patterns, PAMP)同模式识别受体结合后,会引起 IRF3 和 (或)NF- κ B 的活化,进而促进抗病毒和促炎细胞因子的产生,如 IFN- β 和 IL-6。同时,这些抗病毒和促炎细胞因子的产生也必须处于精细的控制中,以防止自身免疫性疾病的发生。2011 年 3 月 26 日出版的 *Immunity* 杂志上刊登了两个实验室的研究论文,他们利用各自制备的 NLRX1(nucleotide binding domain and leucine-rich-repeat-containing proteins X1)缺陷小鼠,深入研究了 NLRX1 对 RLR 和 TLR 下游的 IRF3 和 NF- κ B 通路的负向调节,并且对其负向调控的分子机制进行了探讨。

NLRX1 是 NLR 家族中的一个成员,之前的体外实验已显示,NLRX1 作用于 RLR 下游的关键分子 MAVS(mitochondrial antiviral signaling),从而负向调控 RLR 信号通路。Jenny 实验室发现,用病毒刺激 NLRX1 缺陷小鼠的成纤维细胞后 IFN- β 和 IL-6 显著上升。由于 IFN- β 的增加,禽流感病毒感染的体内模型中,缺陷小鼠肺部组织匀浆液的病毒滴度比野生小鼠显著下降,但同时肺部的炎症损伤也更严重。RIG-I 识别病毒的反应是通过 MAVS 引起的 IRF3 和 NF- κ B 的活化,缺陷小鼠的细胞中 RIG-I 和 MAVS 呈现组成型结合,说明 NLRX1 的负向调控发生在 RIG-I 和 MAVS 的结合这一环节。研究还发现,用 TLR 配体刺激巨噬细胞后,缺陷小鼠来源的巨噬细胞分泌的 IFN- β 和 IL-6 显著上升,说明 NLRX1 不仅可以调控 RLR,也是 TLR 的负向调控子。此外,实验还发现了 NLRX1 调控 TLR4 的机制:NLRX1 结合 TRAF6,进而抑制下游的 NF- κ B 通路。

该研究全面揭示了 NLRX1 如何抑制抗病毒和促炎细胞因子的产生。迄今为止,NLR 家族分子除了扮演免疫识别受体的角色外(如 NALP1、NALP3、IPAF、AIM2),还对其他免疫识别受体有重要的负向调控作用(如 NLRX1)。

[郁茜 摘译,李楠 审阅. Irving CA, Jenny PT. *Immunity*, 2011, 34(6): 854-865.]