

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.007

## 重组 TNF- $\alpha$ 慢病毒感染的脐血间质干细胞对胃癌移植瘤生长的抑制作用

马贵亮<sup>1</sup>, 张学斌<sup>2</sup>, 朱新红<sup>1</sup>, 李杨<sup>1</sup>, 毛伟征<sup>1</sup> (1. 青岛市市立医院 普外科, 山东 青岛 266071; 2. 无棣县人民医院 普外科, 山东 无棣 251900)

**[摘要]** **目的:**以脐血间质干细胞(umbilical cord blood mesenchyme stem cell, UCBMSC)作为肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )载体,研究重组 TNF- $\alpha$  慢病毒 Lv-TNF- $\alpha$  感染的 UCBMSC 对胃癌移植瘤生长的抑制作用。**方法:**人胃癌细胞 SGC-7901 注射到裸鼠腹股沟皮下建立胃癌移植瘤裸鼠模型。将表达 TNF- $\alpha$  的重组慢病毒 Lv-TNF- $\alpha$  和对照慢病毒 Lv-EGFP 分别感染 UCBMSC 后获得 Lv-TNF- $\alpha$  感染的 UCBMSC(UCBMSC-TNF- $\alpha$ )以及 Lv-EGFP 感染的 UCBMSC(UCBMSC-EGFP)。荷瘤裸鼠随机分为 3 组:分别注射 UCBMSC-TNF- $\alpha$ 、UCBMSC-EGFP 及生理盐水(NaCl),观察注射后瘤体生长情况,RT-PCR 和 ELISA 方法分别测定各组胃癌组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达;H-E 染色观察瘤体的坏死情况。**结果:**成功建立 SGC-7901 胃癌细胞裸鼠移植瘤模型。治疗后三组荷瘤裸鼠肿瘤体积分别为(0.51 $\pm$ 0.27)、(0.64 $\pm$ 0.36)和(1.21 $\pm$ 0.80) cm<sup>3</sup>, UCBMSC-TNF- $\alpha$  组肿瘤体积最小( $F=3.88, P<0.05$ );RT-PCR 法检测结果显示,3 组荷瘤裸鼠肿瘤组织 TNF- $\alpha$  mRNA 分别为(1.92 $\pm$ 0.12)、(1.21 $\pm$ 0.26)、(0.81 $\pm$ 0.22), UCBMSC-TNF- $\alpha$  组 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量最大( $F=54.82, P<0.01$ );ELISA 法检测结果显示,3 组荷瘤裸鼠肿瘤组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达分别为(148.29 $\pm$ 3.76)、(78.22 $\pm$ 6.24)、(42.80 $\pm$ 3.02) pg/ml, UCBMSC-TNF- $\alpha$  组表达量最大( $F=694.54, P<0.01$ );H-E 染色病理切片显示,UCBMSC-TNF- $\alpha$  治疗组肿瘤坏死面积最大。**结论:** TNF- $\alpha$  转基因 UCBMSC 可通过旁分泌 TNF- $\alpha$  抑制胃癌的生长。

**[关键词]** 慢病毒;TNF- $\alpha$ ;脐血间质干细胞;转基因治疗;胃癌

**[中图分类号]** R735.2; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)06-0604-05

## Inhibitory effect of umbilical cord blood mesenchymal stem cells infected with reconstructed lentivirus-TNF- $\alpha$ on growth of gastric cancer transplantation tumors

MA Gui-liang<sup>1</sup>, ZHANG Xue-bin<sup>2</sup>, ZHU Xin-hong<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, MAO Wei-zheng<sup>1</sup> (1. Department of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Department of General Surgery, Wudi County Hospital, Wudi 251900, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the inhibitory effect of umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCBMSCs) infected with reconstructed lentivirus-TNF- $\alpha$  on growth of gastric cancer transplantation tumors, based on UCBMSC as a TNF- $\alpha$  carrier. **Methods:** The human gastric cancer SGC-7901 cells were injected into nude mice subcutaneously groin. The model of transplanted SGC-7901 cells in nude mice was set up. The reconstructed lentivirus (Lv-TNF- $\alpha$ ) and empty lentivirus (Lv-EGFP) were added to UCBMSC, and UCBMSC-TNF- $\alpha$  cells and control UCBMSC-EGFP cells were obtained. Tumor-bearing nude mice were separated into three groups randomly: a UCBMSC-TNF- $\alpha$  group, an UCBMSC-EGFP group and a NaCl group. The nude mice in these three groups were injected around the tumor with UCBMSC-TNF- $\alpha$  cells, UCBMSC-EGFP cells or NaCl. The transplanted gastric cancer volume and weight was observed; the expressions of TNF- $\alpha$  mRNA and protein in the three groups were determined by RT-PCR and ELISA; and the necrosis areas in the tumors were observed by H-E staining. **Results:** The transplantation tumor model was established in the nude mice successfully. The transplanted tumor average volume in the three groups were (0.51 $\pm$ 0.27), (0.64 $\pm$ 0.36) and (1.21 $\pm$ 0.80) cm<sup>3</sup>, and the transplanted tumor average volume in the UCBMSC-TNF- $\alpha$  group was minimum ( $F=3.88, P<$

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30772542)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30772542)

**[作者简介]** 马贵亮(1983-),男,山东省青岛市人,硕士,主要从事胃肠道肿瘤的诊治研究工作。E-mail: mgl-8568097@163.com

**[通信作者]** 毛伟征(MAO Wei-zheng, corresponding author), E-mail: maoweizheng@hotmail.com

0.05); The expressions of *TNF- $\alpha$*  mRNA in the three groups were (1.92  $\pm$  0.12), (1.21  $\pm$  0.26) and (0.81  $\pm$  0.22), and the expression of *TNF- $\alpha$*  mRNA in the UCBMSC-*TNF- $\alpha$*  group was maximum ( $F = 54.82$ ,  $P < 0.01$ ); The expressions of *TNF- $\alpha$*  protein in the three groups were (148.29  $\pm$  3.76), (78.22  $\pm$  6.24) and (42.80  $\pm$  3.02) pg/ml, and the expression of *TNF- $\alpha$*  protein in the UCBMSC-*TNF- $\alpha$*  group was maximum ( $F = 694.54$ ,  $P < 0.01$ ); H-E stained biopsy revealed that the largest tumor necrosis was in the UCBMSC-*TNF- $\alpha$*  treatment group. **Conclusion:** Transgenic UCBMSCs can paracrine *TNF- $\alpha$* , which has an inhibitory effect on gastric cancer.

[ **Key words** ] lentivirus; *TNF- $\alpha$* ; umbilical cord blood mesenchymal stem cell; transgenesis therapy; gastric cancer

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 604-608 ]

近年来研究<sup>[1]</sup>显示,肿瘤坏死因子- $\alpha$ ( tumor necrosis factor-alpha, *TNF- $\alpha$* )是对胃癌、乳腺癌、结肠癌细胞体外杀伤有效的细胞因子之一,但其体内注射不良反应较大,因此寻找一种可以在肿瘤组织局部释放 *TNF- $\alpha$*  的方法成为研究热点。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有自我更新以及可以趋向移动到肿瘤组织构成间质的特性<sup>[2-3]</sup>,脐血间质干细胞(umbilical cord blood MSC, UCBMSC)具有 MSC 所有特性,并具有来源广泛、免疫原性低的优点。因此本研究通过携带 *TNF- $\alpha$*  重组慢病毒体外感染 UCBMSC,探讨转基因 UCBMSC 对胃癌移植瘤生长的抑制作用,为生物治疗胃癌提供实验依据<sup>[4-5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和实验动物

胃癌 SGC-7901 细胞来源于青岛市市立医院中心实验室。人 UCBMSC 取自青岛大学医学院附属医院干细胞中心,重组 *TNF- $\alpha$*  慢病毒(Lv-*TNF- $\alpha$* )以及对照慢病毒(Lv-EGFP)取自青岛市市立医院中心实验室。*TNF- $\alpha$*  RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,人 *TNF- $\alpha$*  ELISA 试剂盒购自青岛福林生物化学有限公司,TRIzol 购自 TaKaRa 公司,低糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,琼脂糖购自赛百盛公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,Primer 购自上海吉凯基因技术有限公司。BALB/c 裸鼠 15 只,雄性,4 周龄,15 ~ 20 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,实验动物批号为 SCXK(沪)2007-0005。

### 1.2 重组慢病毒 Lv-*TNF- $\alpha$* 和对照慢病毒 Lv-EGFP 感染 UCBMSC 并筛选稳转细胞株

分别用慢病毒载体穿梭质粒 pGC-FU-*TNF- $\alpha$* , 在脂质体 Lipofectamine 2000 介导下与结构质粒 pHelper 1.0 和包膜质粒 pHelper 2.0 共转染 293T 细胞,获得重组慢病毒 Lv-*TNF- $\alpha$* 。Lv-*TNF- $\alpha$*  和对

照慢病毒 Lv-EGFP 感染 UCBMSC 后获得 Lv-*TNF- $\alpha$*  感染的 UCBMSC(UCBMSC-*TNF- $\alpha$* )、Lv-EGFP 感染的 UCBMSC(UCBMSC-EGFP)<sup>[6]</sup>。

### 1.3 小鼠实验检测重组 Lv-*TNF- $\alpha$* 慢病毒感染的 UCBMSC 对鼠胃癌移植瘤生长的抑制作用

将培养好的胃癌 SGC-7901 细胞(0.5 ml,  $1 \times 10^8$ /ml)种植于裸鼠右侧腹股沟皮下,约在 3 d 后出现肿瘤皮下结节,种植后第 15 天全部达到成瘤标准(直径大于 0.5 cm)。种植 3 d 后第一次用游标卡尺测量肿瘤的长径 a 与短径 b,以后逐日观察荷瘤裸鼠肿瘤大小与外观。随机将荷瘤裸鼠分 3 组,每组 5 只。实验分为 NaCl 对照组、UCBMSC-EGFP 组和 UCBMSC-*TNF- $\alpha$*  组,瘤旁约 0.5 cm 处分别注射注射 NaCl、UCBMSC-EGFP 细胞悬液、UCBMSC-*TNF- $\alpha$*  细胞悬液,0.2 ml/只,隔日 1 次,注射 3 次。注射后测量肿瘤长径(a),短径(b),按  $V = a \times b^2/2$  求得肿瘤的近似体积。计算抑瘤率(tumor inhibition rate, TIR),  $TIR(\%) = (\text{对照组肿瘤体积} - \text{实验组肿瘤体积}) / \text{对照组肿瘤体积} \times 100\%$ 。

### 1.4 RT-PCR 法检测胃癌移植瘤组织中 *TNF- $\alpha$* mRNA 的表达

分别抽提 3 组荷瘤小鼠胃癌移植瘤组织中的总 RNA,逆转录获 cDNA,加入 *TNF- $\alpha$*  引物序列(*TNF- $\alpha$*  F: 5'-GCCTCTTCTCCTTCCTGATCGF-3'; *TNF- $\alpha$*  R: 5'-GGTTTGCTACAACATGGCTACA-3')和 GAPDH 引物序列(GAPDH F: 5'-AACAGCCTCAAGATCATCAGCAA-3'; GAPDH R: 5'-GACTGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'),预变性 95  $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,PCR 反应 95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 s,退火延伸 60  $^{\circ}\text{C}$ 、40 s,共进行 40 个循环。2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 120 mV、30 min,凝胶用紫外线图像仪成像。每组随机读取 5 次灰度值分析数据。

### 1.5 ELISA 法测定荷瘤小鼠胃癌移植瘤组织中 *TNF- $\alpha$* 蛋白的表达

3 组荷瘤小鼠胃癌组织取材后用生理盐水洗去血迹及污物,适量取样约 100 mg,加入 1 ml 生理盐

水,研磨(冰上操作), $12\ 000 \times g$ ( $4\ ^\circ\text{C}$ )离心 15 min,离心后取上清液实验备用。将标准品各  $50\ \mu\text{l}$  依次加入一排孔中,处理后的标本按每孔  $50\ \mu\text{l}$  加入,并做好标记。在标准品孔及待测样本孔中分别加入  $50\ \mu\text{l}$  酶联亲合物,充分混匀, $37\ ^\circ\text{C}$  温育 60 min,充分弃尽各孔内液体,用稀释好的洗涤液反复冲洗 5 次并扣干孔内剩余水分。每孔依照次序,分别加入显色液 A、B 各  $50\ \mu\text{l}$ ,充分混匀,在室温下避光反应 15 min。每孔加入终止液  $50\ \mu\text{l}$ ,充分混匀,终止反应。检测不同浓度 TNF- $\alpha$  标准品及各组胃癌组织上清液在 450 nm 处的光密度值( $D$ ),根据  $D$  值计算各组上清液 TNF- $\alpha$  含量。

1.6 H-E 染色检测 3 组荷瘤小鼠胃癌组织中的坏死面积

3 组小鼠在胃癌 SGC-7901 细胞接种后 4 周断颈处死,取胃癌组织行常规病理切片,H-E 染色,观察各组荷瘤小鼠胃癌瘤体组织的坏死区域。

1.7 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 统计软件,数据间比较采用方差分析,两两比较采用  $q$  检验。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UCBMSC-TNF- $\alpha$  治疗抑制荷瘤裸鼠胃癌移植瘤的生长

胃癌 SGC-7901 细胞移植瘤裸鼠模型成功构建 2 周后,分别注射 UCBMSC-TNF- $\alpha$ 、UCBMSC-EGFP 或 NaCl,至接种后 4 周处死裸鼠。UCBMSC-TNF- $\alpha$  组、UCBMSC-EGFP 组和 NaCl 组裸鼠胃癌移植瘤平均体积分别为( $0.51 \pm 0.27$ )、( $0.64 \pm 0.36$ )和( $1.21 \pm 0.80$ ) $\text{cm}^3$ ,3 组比较差异具有统计学意义( $F = 3.88, P < 0.05$ ,图 1)。结果说明,UCBMSC-TNF- $\alpha$  明显抑制荷瘤裸鼠胃癌移植瘤的生长。

2.2 UCBMSC-TNF- $\alpha$  治疗促进胃癌组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示,186 bp 处有特异条带,与预计产物大小一致,表明 3 组荷瘤小鼠胃癌组织中均有 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达,其中 UCBMSC-TNF- $\alpha$  组为  $1.92 \pm 0.12$ ,UCBMSC-EGFP 组为  $1.21 \pm 0.26$ ,NaCl 组为  $0.81 \pm 0.22$ ,3 组比较差异有显著意义( $F = 54.82, P < 0.01$ ,图 2)。结果说明 UCBMSC-TNF- $\alpha$  治疗组荷瘤小鼠胃癌组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量最多,UCBMSC-TNF- $\alpha$  靶向到达胃癌组织,并较 UCBMSC-EGFP 以及 NaCl 治疗组在胃癌组织中

表达大量 TNF- $\alpha$  mRNA。

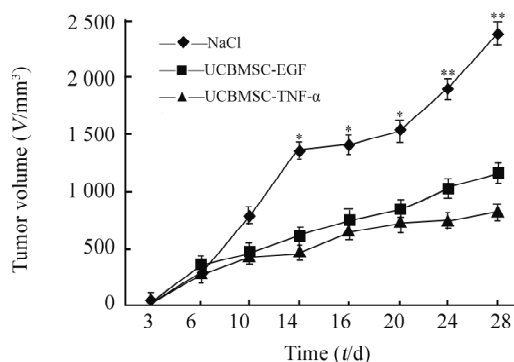


图 1 重组 Lv-TNF- $\alpha$  慢病毒感染的 UCBMSC 细胞对胃癌 SGC-7901 细胞小鼠移植瘤生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of UCBMSCs infected by reconstructed Lv-TNF- $\alpha$  on growth of gastric cancer SGC-7901 cell-transplanted tumors in mice

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs UCBMSC-EGFP group

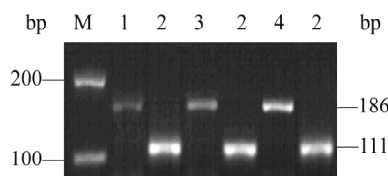


图 2 RT-PCR 法检测 3 组荷瘤小鼠胃癌组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达

Fig. 2 TNF- $\alpha$  mRNA expression in gastric tissues of tumor-bearing mice in the three groups detected by RT-PCR

M: Marker; 1: NaCl; 2: GAPDH; 3: UCBMSC-EGFP; 4: UCBMSC-TNF- $\alpha$

2.3 UCBMSC-TNF- $\alpha$  治疗对荷瘤小鼠胃癌组织上清液中 TNF- $\alpha$  含量的影响

ELISA 检测三组荷瘤小鼠胃癌组织上清液中 TNF- $\alpha$  浓度,结果显示 UCBMSC-TNF- $\alpha$  组为( $148.29 \pm 3.76$ ) $\text{pg/ml}$ ,UCBMSC-EGFP 组为( $78.22 \pm 6.24$ ) $\text{pg/ml}$ ,NaCl 组为( $42.80 \pm 3.02$ ) $\text{pg/ml}$ ,3 组比较差异有显著意义( $F = 694.54, P < 0.01$ )。结果说明,UCBMSC-TNF- $\alpha$  组胃癌组织中 TNF- $\alpha$  蛋白表达量最多,UCBMSC-TNF- $\alpha$  可靶向到达胃癌组织中大量表达 TNF- $\alpha$  蛋白。

2.4 UCBMSC-TNF- $\alpha$  治疗后荷瘤小鼠胃癌组织的坏死情况

治疗后三组荷瘤小鼠胃癌组织病理切片进行常

规 H-E 染色,光镜下观察发现,NaCl 组胃癌细胞核固缩、碎裂、溶解,深染较少,说明肿瘤坏死面积较少;UCBMSC-EGFP 组肿瘤坏死面积较多;UCBMSC-TNF- $\alpha$  组胃癌细胞核固缩、碎裂、溶解,深染最多,并出现空泡现象,说明肿瘤坏死面积最多,提示 UCBMSC-TNF- $\alpha$  治疗组对胃癌组织的抑制作用最明显(图 3)。

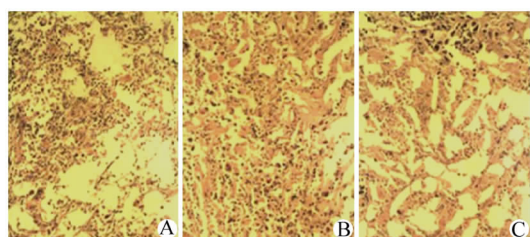


图 3 H-E 染色检测 3 组小鼠胃癌组织的坏死情况(×100)

Fig. 3 Necrosis area in gastric tissues of tumor-bearing mice in the three groups detected by H-E staining(×100)

A: NaCl group; B: UCBMSC-EGFP group;  
C: UCBMSC-TNF- $\alpha$  group

### 3 讨论

近年来细胞因子基因靶向治疗成为肿瘤研究的热点,靶向治疗利用能够导向肿瘤生长部位的细胞携带细胞因子基因,使细胞因子准确地送到肿瘤部位。这些细胞包括神经原细胞、间叶细胞<sup>[7]</sup>、自然杀伤细胞<sup>[8-9]</sup>、细胞因子诱导的杀伤细胞、T 细胞<sup>[10]</sup>、UCBMSC 等,其中又以 UCBMSC 具有低免疫原性<sup>[11]</sup>、诱导免疫耐受、可分化成肿瘤间质,并可以自我更新等特点,成为肿瘤靶向治疗的新的细胞载体工具<sup>[12]</sup>。美国 Akira 等<sup>[13]</sup>对神经胶质瘤小鼠进行体内实验,从健康志愿者的骨髓中分离出 MSC,用荧光标记后注射到颅内移植有人类 U87 神经胶质瘤的小鼠颈动脉中,不管注射在同侧或者是对侧颈动脉,MSC 只集中在肿瘤处,具有靶向移动的特性,且应用能释放干扰素- $\beta$  的 MSC 治疗颅内人类 U87 神经胶质瘤,比对照组明显延长小鼠生存时间。

TNF- $\alpha$  是常见的杀伤肿瘤细胞的细胞因子<sup>[14]</sup>。在体外培养的肿瘤细胞中加入 TNF- $\alpha$ <sup>[15]</sup>,或用携带有 TNF- $\alpha$  基因或联合 IL-2 基因的质粒直接转染肿瘤细胞<sup>[16]</sup>,可使肿瘤细胞自分泌 TNF- $\alpha$ ,但这些方法的缺点是局限于体外直接作用肿瘤细胞,或转染效率较低,外源性基因表达短暂,不能稳定表达。

UCBMSC 与骨髓 MSC 的特点相似,能够构成肿瘤间质,具有自我复制能力,易于携带外源基因且具

有明显的组织特异性,是一种理想的靶向治疗肿瘤的载体<sup>[19-20]</sup>。研究<sup>[21]</sup>表明,慢病毒在携带目的基因,或感染 UCBMSC 方面都较腺病毒存在着优势。在慢病毒以及 UCBMSC 载体工具介导下,细胞因子可以靶向到达肿瘤间质,通过近距离旁分泌作用杀伤肿瘤细胞。

本研究通过携带 TNF- $\alpha$  的慢病毒 Lv-TNF- $\alpha$  感染 UCBMSC,建立稳定表达 TNF- $\alpha$  的 UCBMSC 细胞,并在裸鼠移植瘤旁注射。裸鼠体内实验发现,UCBMSC-TNF- $\alpha$  组荷瘤裸鼠平均肿瘤体积较 UCBMSC-EGFP 组与 NaCl 组明显缩小;UCBMSC-TNF- $\alpha$  组胃癌组织中与其余两组比较,TNF- $\alpha$  mRNA 和 TNF- $\alpha$  蛋白的表达显著增多;UCBMSC-TNF- $\alpha$  组肿瘤生长较对照组明显减慢。结果说明,胃癌组织中的 TNF- $\alpha$  表达可抑制肿瘤的生长。病理切片证实,UCBMSC-TNF- $\alpha$  组的胃癌坏死面积较其他两组大,说明 TNF- $\alpha$  转基因的 UCBMSC 可以靶向到达胃癌组织,并在胃癌组织中旁分泌高表达 TNF- $\alpha$ ,起到杀伤胃癌细胞的作用。

本研究方法为肿瘤生物治疗提供了新思路,尤其是 UCBMSC 以及慢病毒作为工具携带外源杀伤基因为靶向治疗胃癌提供了新方法。

### [参考文献]

- [1] Ghavami S, Eshraghi M, Kadkhoda K, et al. Role of BNIP3 in TNF-induced cell death—TNF up regulates BNIP3 expression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(3): 546-560.
- [2] Yagi T, Yoshioka H, Wakai T, et al. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning [J]. *Brain Res*, 2011, 1422: 39-45.
- [3] 赵宝成,王振军,毛伟征,等. 脐血间质干细胞靶向胃癌移植瘤的实验研究 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2011, 23(1): 4-7.
- [4] Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue [J]. *J Periodontol*, 2010, 81(6): 917-925.
- [5] Xu F, Shi J, Yu B, et al. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas *in vitro* [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(6): 1561-1567.
- [6] 马贵亮,毛伟征,杨堃,等. 人 TNF- $\alpha$  重组慢病毒载体构建及其脐血间质干细胞表达 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2010, 46(3): 189-192, 195.
- [7] Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, et al. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(4): 389-404.
- [8] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368.
- [9] Jiang JT, Shen YP, Wu CP, et al. Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in

- gastric cancer patients [ J ]. World J Gastroenterol, 2010( 48 ): 6155-6162.
- [ 10 ] Yotnda P, Savoldo B, Charlet-Berguerand N, et al. Targeted delivery of adenoviral vectors by cytotoxic T cells [ J ]. Blood, 2004, 104( 8 ): 2272-2280.
- [ 11 ] Yang SH, Park MJ, Yoon IH, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10 [ J ]. Exp Mol Med, 2009, 41( 5 ): 315-324.
- [ 12 ] Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, et al. Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents [ J ]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96( 21 ): 1593-1603.
- [ 13 ] Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas [ J ]. Cancer Res, 2005, 65( 8 ): 3307-3318.
- [ 14 ] Lyu MA, Rosenblum MG. The immunocytokine scFv23/TNF sensitizes HER-2/neu-overexpressing SKBR-3 cells to tumor necrosis factor ( TNF ) via up-regulation of TNF receptor-1 [ J ]. Mol Cancer Ther, 2005, 4( 8 ): 1205-1213.
- [ 15 ] 邹卫, 王丽君, 张乃衡. TNF- $\alpha$  基因转染对胃癌细胞系的生长抑制效应 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4( 1 ): 47-49.
- [ 16 ] 刘雪丰, 张连峰, 孙涛, 等. IL-2 和 TNF 融合基因在小鼠前胃癌细胞中的表达及对肿瘤细胞生长和致瘤性的影响 [ J ]. 中国实验动物学杂志, 1996, 8( 1 ): 1-6.
- [ 17 ] Cetrulo CJ Jr. Cord-blood mesenchymal stem cells and tissue engineering [ J ]. Stem Cell Rev, 2006, 2( 2 ): 163-168.
- [ 18 ] Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: Expression of bone, fat, and neural markers [ J ]. Biol Blood Marrow Transplant, 2001, 7( 11 ): 581-588.
- [ 19 ] Sato H, Kuwashima N, Sakaida T, et al. Epidermal growth factor receptor-transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors [ J ]. Cancer Gene Ther, 2005, 12( 9 ): 757-768.
- [ 20 ] Brown AB, Yang W, Schmidt NO, et al. Intravascular delivery of neural stem cell lines to target intracranial and extracranial tumors of neural and non-neural origin [ J ]. Hum Gene Ther, 2003, 14( 18 ): 1777-1785.
- [ 21 ] 马晓生, 姜建元, 吕飞舟, 等. 腺病毒和慢病毒载体感染骨髓间质干细胞的比较 [ J ]. 中华医学杂志, 2006, 86( 47 ): 3340-3344.
- [ 收稿日期 ] 2012 - 08 - 22 [ 修回日期 ] 2012 - 10 - 02  
[ 本文编辑 ] 王莹

· 科技动态 ·

## 磷酸化修饰对 NLRC4 炎性复合体活化的调节作用

NLR( nucleotide binding domain and leucine-rich-repeat-containing protein )分子的功能是近年来免疫学研究的热点, NLR 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过程, 特别是炎症反应的调节过程。

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 receptor, TLR)、RIG- I 样受体( RIG- I-like receptor, RLR)、NLR。病原体相关模式分子( pathogen associated molecular pattern, PAMP)同模式识别受体结合后, 会引起 IRF3 和/或 NF- $\kappa$ B 的活化, 进而促进抗病毒和促炎细胞因子的产生, 如 IFN- $\beta$  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和炎症的发生。蛋白的翻译后修饰是信号通路调控的重要机制之一。2012 年 10 月 25 号出版的《自然》杂志上刊登了著名的 Vishva M. Dixit 实验室的论文, 论文介绍了利用定量蛋白质组学和转基因小鼠发现 NLRC4 磷酸化调节 NLRC4 炎性复合体活化的研究工作。

NLRC4 炎性复合体识别的是活体病原菌, 如沙门菌等, 已发现其活化依赖于菌体自身的鞭毛蛋白和分泌系统的识别, 但对 NLRC4 的修饰尚没有报道。此研究首先构建了带 FLAG 标签的 NLRC4 转基因小鼠, 通过对刺激组和对照组的定量蛋白质谱比对获取了 NLRC4 在沙门菌刺激后磷酸化变化的关键位点 Ser533, 然后用经典的抗体技术和拯救实验多角度证明了该位点对于 NLRC4 炎性复合体活化的重要性。此外, 该研究还进一步用层析和质谱偶联技术分离到了介导 Ser533 位磷酸化的激酶 PKC $\delta$  和 PAK2。高通量筛选以后, 作者进而应用体内和体外实验证明 PKC $\delta$  是介导 Ser533 位磷酸化的关键性激酶, 完整地展示了 NLRC4 在活化前后的磷酸化修饰过程。

该研究深入和全面地揭示了 NLRC4 炎性复合体活化过程中磷酸化修饰的重要作用, 这是炎性复合体研究领域突破性进展, 该研究不仅描绘了 NLRC4 磷酸化的过程, 还应用传统和现代筛选技术相结合的手段获取了 NLRC4 磷酸化的关键性位点以及关键性激酶, 并应用多种基因缺陷鼠证实了该激酶的生理意义。

[ 郁茜摘译, 韩超峰审阅. Qu Y, Misaghi S, Izrael-Tomasevic A, et al. Nature, 2012, 490( 7421 ): 539-542. ]