

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.011

· 临床研究 ·

胃癌组织中 *SRY-Box2* 基因的表达与其甲基化的关系

郭艳丽, 郭伟, 邝钢, 杨植彬, 董稚明(河北医科大学第四医院, 河北省肿瘤研究所 病理研究室, 河北, 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**检测干细胞转录因子 *SRY-Box2* 基因在胃癌 MKN74、MKN45 细胞株及人胃癌组织标本中的 mRNA 表达水平与甲基化情况,分析其与胃癌发生及临床病理特征之间的相关性。**方法:**选取河北医科大学第四医院胸外科 2007 至 2012 年收治的胃癌患者 86 例,取癌组织原发灶及其癌旁组织;分别用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-Dc)与曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)处理胃癌 MKN74、MKN45 细胞,检测甲基化与乙酰化对细胞内 *SRY-Box2* mRNA 表达的影响;甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)、RT-PCR 分别检测 MKN74、MKN45 细胞和胃癌、癌旁组织中 *SRY-Box2* 基因的甲基化状态及 mRNA 的表达情况;分析甲基化状态与临床病理特征之间的相关性和对 *SRY-Box2* mRNA 表达水平的影响。**结果:**MKN45 细胞中 *SRY-Box2* 基因 mRNA 表达呈阳性, MKN74 细胞呈阴性;5-Aza-Dc 处理 MKN74 细胞使 *SRY-Box2* mRNA 改变为阳性表达,而 TSA 处理对其无影响;MKN74 细胞中 *SRY-Box2* 基因富含 CpG 岛并存在甲基化。胃癌组织中 *SRY-Box2* mRNA 表达缺失率(19.8% vs 7.0%; $\chi^2 = 69.073, P = 0.014$)、CpG 岛甲基化水平(14.0% vs 1.2%; $\chi^2 = 10.069, P = 0.002$)显著高于癌旁组织,且两者显著相关($\chi^2 = 50.878, P = 0.000$);*SRY-Box2* 基因 CpG 岛的甲基化水平与淋巴结转移情况相关($\chi^2 = 3.947, P = 0.047$),与临床分期、病理学分级及浸润深度均无关(均 $P > 0.05$)。**结论:**基因 CpG 岛甲基化是 *SRY-Box2* 基因表达下调的机制之一,并可能在胃癌的发生中发挥了一定的作用。

[关键词] *SRY-Box2* 基因;甲基化;胃癌

[中图分类号] R735.2; R730.59

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)02-0175-06

Expression aberration and methylation of *SRY-Box2* gene in gastric tumor tissues

Guo Yanli, Guo Wei, Kuang Gang, Yang Zhibin, Dong Zhiming (Pathology Laboratory, Cancer Institute of Hebei Province, the Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To determine mRNA levels and methylation status of stem cell transcription factor *SRY-Box2* in gastric cancer (GC) cell lines (MKN74, MKN45) and tissue specimens in association with pathogenesis and clinicopathological features of GC. **Methods:** Eighty-six gastric cancer patients diagnosed in the Thoracic Surgery of the Fourth Hospital of Hebei Medical University between 2007 and 2012 were recruited. Biopsy specimens were collected from primary tumors and the corresponding adjacent tissues. The gastric cancer cell lines (MKN74, MKN45) were treated respectively with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-Dc) and trichostatin A (TSA). Levels of CpG methylation of the *SRY-Box2* promoter and *SRY-Box2* mRNA were assessed by methylation specific PCR (MSP) and RT-PCR, respectively, in MKN74, MKN45 cells after drug treatments and in biopsy specimens. The relevance of *SRY-Box2* gene methylation to and clinicopathological features of the cancer and to changes in *SRY-Box2* mRNA abundance was analyzed. **Results:** *SRY-Box2* mRNA was detected in MKN45 cells but not in MKN74 cells. Treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-Dc, a demethylation agent) significantly increased *SRY-Box2* mRNA abundance but trichostatin A (TSA) had no effect in MKN45 cells. Hypermethylation of *SRY-Box2* gene containing a CpG island was observed in MKN74 cells. The frequency of expression loss of the *SRY-Box2* gene (19.8% vs 7.0%; $\chi^2 = 69.073, P = 0.014$) and the level of hypermethylation (14.0% vs 1.2%; $\chi^2 = 10.069, P = 0.002$) were all significantly higher in the cancer tissue as compared with adjacent non-cancerous tis-

[基金项目] 河北自然科学基金资助项目(No. H2013206315)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province(No. H2013206315)

[作者简介] 郭艳丽(1980-),女,河北省邯郸市人,博士生,主要从事肿瘤病因学的研究。E-mail: yanli800224@163.com

[通信作者] 董稚明(Dong Zhiming, corresponding author), E-mail: dongzhiming2000@gmail.com

sues. and hypermethylation was significantly correlated with expression loss in the *SRY-Box2* gene ($\chi^2 = 50.878, P < 0.001$). Furthermore, *SRY-Box2* gene hypermethylation status was also correlated with lymph node metastasis ($\chi^2 = 3.947, P = 0.047$), but not with clinical stage, pathological grade and depth of invasion ($P > 0.05$). **Conclusion:** CpG hypermethylation may be one of the mechanisms responsible for the expression loss of the *SRY-Box2* gene and may play some role in the pathogenesis of gastric cancer.

[**Key words**] *SRY-Box2* gene; methylation; gastric cancer

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 175-180]

性别决定基因(sexdetermining region Y, *SRY*)家族是一类具有高迁移率组(high mobility group, HMG)特征性结构域的转录因子家族。HMG 是 DNA 结合区域,其基因序列在真核细胞内高度保守。目前,共发现 20 种 *SRY* 基因,分为 10 个亚类。干细胞转录因子 *SRY-Box2* 基因属 SOXB 家族成员之一,是细胞核内蛋白基因^[14]。有研究表明,该基因的突变和表达异常与肿瘤的发生发展及其恶性生物学行为息息相关,目前已发现,在黑素瘤^[5]、肺癌^[6-7]、食管癌^[8]、胰腺癌^[9]、宫颈癌^[10]等多种恶性肿瘤中均有该基因的异常表达,但该基因的表达与胃癌发生的关系及引起其表达异常的具体机制还未完全阐明。本研究通过检测胃癌细胞株及胃癌组织标本中 *SRY-Box2* 基因甲基化状态及 mRNA 表达,了解胃癌中该基因的表达情况,探讨引起该基因表达异常的可能机制及与胃癌发生的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象和主要试剂

选择河北医科大学第四医院胸外科 2007 年至 2012 年收治的胃癌患者 86 例,其中男性 56 例、女性 30 例,中位年龄 53.0 岁(41~78 岁)。全部患者术前均未经化疗和放疗。每例患者均取癌组织原发灶及距癌组织 2~5 cm 处的癌旁组织,手术切除标本一部分保存在 -80 °C 低温冰箱用于提取 DNA 及 RNA,另一部分进行石蜡包埋。常规 H-E 染色,证实癌旁均为非肿瘤组织,并确定癌组织标本的组织学类型均为胃腺癌。患者的临床分期及组织学分级情况见表 1。本研究中所有患者均签署知情同意书。

胃癌 MKN74 细胞由日本大阪大学分子病理研究室惠赠, MKN45 细胞由河北医科大学第四医院生物标本库保存。

5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-Dc)、曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)、氢醌、亚硫酸氢钠均购自 Sigma 公司,蛋白酶 K 购自 Merck 公司, Wizard DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公

司。引物由北京赛百胜公司合成。

1.2 细胞培养及 5-Aza-Dc 处理

胃癌细胞株 MKN74、MKN45 培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 1640 培养液中,在 37 °C、饱和湿度和 5% CO₂ 的培养箱中传代培养。取对数生长期细胞,用 5 μmol/L 5-Aza-Dc 及 200 ng/ml TSA 处理细胞株作为实验组,72 h 后更换无药培养液继续培养。未经药物处理的细胞作为对照组。

1.3 甲基化特异性 PCR(MSP)检测胃癌组织与细胞株中 *SRY-Box2* 基因甲基化状态

采用酚/氯仿抽提法,提取胃癌组织及细胞株中 DNA,进行定量后,取适量 DNA 用 2 mol/L 的氢氧化钠变性处理,与 10 mmol/L 氢醌和 3 mmol/L 亚硫酸氢钠 50 °C 反应 16 h,再用 DNA 纯化试剂盒纯化变性 DNA 标本。经亚硫酸盐处理后,单链 DNA 的未甲基化胞嘧啶可被亚硫酸氢盐脱去氨基而转变成尿嘧啶,而甲基化胞嘧啶不能被修饰。根据此原理分别设计该基因的甲基化及非甲基化引物,分别扩增进行 MSP 检测。甲基化引物:上游 5'-GGTCGGGTTTCGGTATAGT-3',下游 5'-CCGCCGCGATAAAATTACCG-3';非甲基化引物:上游 5'-GGTTGGGTTTGTGTATAGT-3',下游 5'-CCACCACAATAAAATTACCA-3'(图 1 红色部分标出)。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 10 min 后,94 °C 变性 45 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,40 个循环后,72 °C 继续延伸 10 min。若仅有甲基化引物扩增出条带,则认为该基因发生了甲基化;若仅有非甲基化条带扩增出了条带,则认为该基因未发生甲基化;若甲基化及非甲基化引物均扩增出了条带,则认为该基因发生了不完全甲基化。同时用经甲基化酶(*Sss* I)处理以后的基因组 DNA 作为甲基化的阳性对照,用无消化系统肿瘤及其他系统肿瘤的正常人外周血 DNA 作为非甲基化的阳性对照,阴性对照则用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。另随机选取 10% 标本进行重复实验以验证结果的可

靠性。

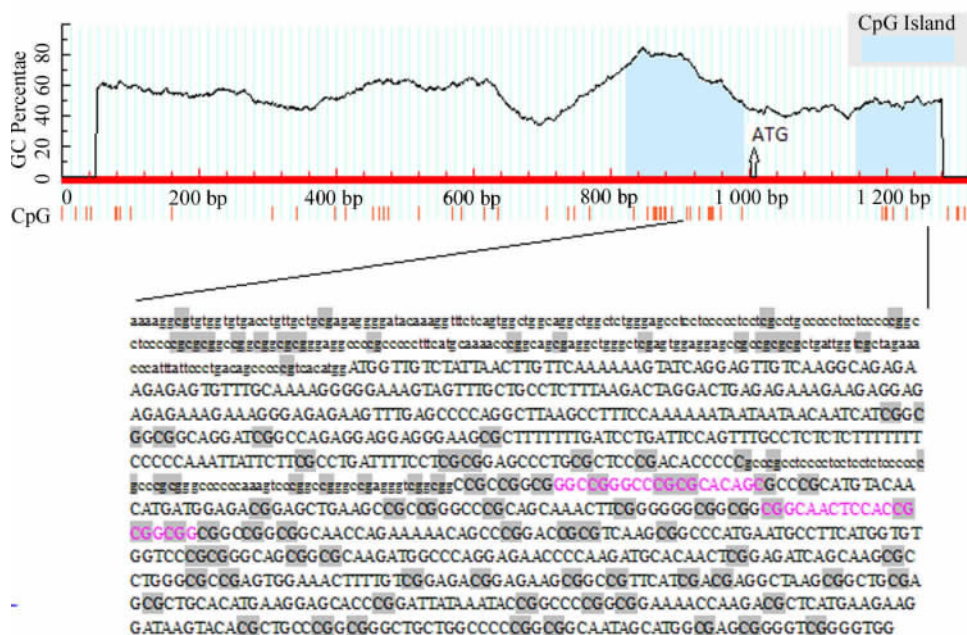


图1 *SRY-Box2* 基因启动子及第一外显子 CpG 岛分布图

Fig. 1 Details of the *SRY-Box2* gene promoter and exon 1 region sequence

MSP primers were highlighted in red

1.4 RT-PCR 检测 *SRY-Box2* mRNA 的表达

按 TRIzol 试剂说明书提取胃癌组织及细胞总 RNA,并参照逆转录试剂盒(reverse transcription system A3500, Promega 公司)说明将 RNA 逆转录成 cDNA。用于检测 *SRY-Box2* 基因 mRNA 的正向引物为 5'-TACAGCATGTCCTACTCGCAG-3',反向引物为 5'-GAGGAAGAGGTAACCACAG GG-3'(110 bp);内参照 *GAPDH* 的正向引物为 5'-GAAGGTGAAG-GTCGGAGTC-3',反向引物为 5'-GAAGAT GGTGAT-GGGATTTC-3'(226 bp)。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 3 min 后,94 °C 变性 45 s,57 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,共 35 个循环;最后 72 °C 继续延伸 5 min。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,*GAPDH* 作为内参照。

1.5 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,各组间的差异用 χ^2 检验及 Kruskal-Wallis 进行统计分析,双侧检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌细胞株中 *SRY-Box2* 基因甲基化状态及 mRNA 表达情况

MKN45 细胞株中 *SRY-Box2* mRNA 呈阳性表

达,而 MKN74 细胞呈阴性表达;5-Aza-Dc 处理后, MKN74 细胞中 *SRY-Box2* mRNA 改为阳性表达,而 MKN45 细胞无明显变化;TSA 处理后,两细胞均无明显变化(图 2)。利用 UCSC 序列检索发现,*SRY-Box2* 基因的启动子区及第一外显子富含 CG 两核苷酸序列(图 1),故考虑基因高甲基化可能是引起基因表达下调的机制之一。MSP 检测结果(图 3)显示,MKN74 细胞可扩增出甲基化条带,5-Aza-Dc 处理后,甲基化条带消失;MKN45 细胞处理前后均无甲基化条带出现。

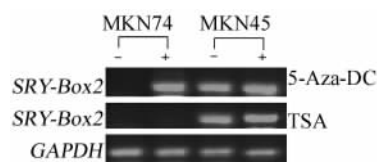


图2 *SRY-Box2* mRNA 在胃癌细胞株中的表达情况

Fig. 2 The expression of *SRY-Box2* mRNA in gastric carcinoma

- : Before exposure to 5-Aza-Dc/TSA;

+ : After exposure to 5-Aza-Dc/TSA

2.2 胃癌组织标本中 *SRY-Box2* 基因甲基化状态

MSP 检测结果(图 4)显示:(1)Case1,肿瘤组织

发生完全甲基化,癌旁组织发生不完全甲基化;(2) Case2,肿瘤组织特异性甲基化,即仅肿瘤组织出现了甲基化条带;(3) Case3,肿瘤组织及非肿瘤组织均未发生甲基化。将不完全甲基化计入甲基化进行统计,则胃癌组织中 *SRY-Box2* 基因的甲基化率为 14.0%(12/86),而相应癌旁非肿瘤组织中仅有 1 例发现有该基因甲基化现象,甲基化率为 1.2%(1/86)。癌组织中该基因的甲基化率明显高于癌旁组织($\chi^2 = 10.069, P = 0.002$)。该基因的甲基化频率与肿瘤患者的淋巴结转移情况相关($\chi^2 = 3.947, P = 0.047$),而与患者的临床分期($\chi^2 = 2.761, P = 0.430$)、病理学分级($\chi^2 = 0.541, P = 0.763$)及浸润深度($\chi^2 = 4.986, P = 0.173$)均无关(表 1)。



图 3 MSP 法检测 *SRY-Box2* 基因在胃癌细胞株中甲基化情况

Fig.3 The methylation status of *SRY-Box2* gene in gastric cancer cell lines by MSP

- : Before exposure to 5-Aza-Dc; + : After exposure to 5-Aza-Dc; M: Methylated gene; U: Unmethylated gene

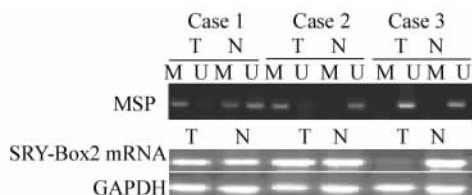


图 4 *SRY-Box2* 基因甲基化分析及其 mRNA 表达情况

Fig.4 Methylation analysis and the mRNA expression of *SRY-Box2* gene

T: Tumor tissue; N: Adjacent tissue;

M: Methylated genes; U: Unmethylated genes

2.3 胃癌组织中 *SRY-Box2* mRNA 表达情况及其与基因甲基化状态的关系

在 86 例胃癌组织标本中,有 17 例 *SRY-Box2* 基因的表达缺失,缺失率为 19.8%(17/86),明显高于癌旁非肿瘤组织[7.0%,(6/86); $\chi^2 = 69.073, P = 0.014$](图 4)。13 例发生甲基化的组织标本全部发生在 *SRY-Box2* 基因表达缺失的标本中,其中 12 例发生在胃癌组织,1 例发生在癌旁非肿瘤组织。在 *SRY-Box2* 基因 mRNA 表达缺失的胃癌组织标本

中,该基因甲基化发生率明显高于有该基因表达的胃癌组织,该基因甲基化状态和其在 mRNA 水平上的表达缺失有明显的相关性($\chi^2 = 50.878, P = 0.000$;表 2)。

表 1 *SRY-Box2* 基因甲基化状态与胃癌病理指标的关系(n)
Tab. 1 The relationship between *SRY-Box2* gene methylation status and clinicopathologic features of gastric tumor(n)

Group	ESCC			χ^2	P
	N	M	U		
Histological grade					
Well	18	2	16	0.541	0.763
Moderate	28	5	23		
Poor	40	5	35		
TNM stage					
I	5	1	4	2.761	0.430
II	34	7	27		
III	30	2	28		
IV	17	2	15		
Lymph node metastasis					
+	53	11	42	3.947	0.047
-	33	1	32		
Invasion					
T1	6	1	5	4.986	0.173
T2	21	3	18		
T3	42	3	39		
T4	17	5	12		

M: Methylated genes; U: Unmethylated genes

表 2 在表达及不表达 *SRY-Box2* 基因的胃癌组织中该基因甲基化发生情况(n)

Tab. 2 The frequency of *SRY-Box2* gene methylation in mRNA expression and non-mRNA expression GC(n)

<i>SRY-Box2</i> mRNA	N	M	U	χ^2	P
+	69	0	69	50.878	0.000
-	17	12	5		

3 讨论

胃癌是常见的上消化道恶性肿瘤。我国是胃癌的高发国,尤其是河北省太行山区是胃癌和食管癌

的高发区。尽管多种环境因素如 *HP* 感染、嗜烟酒、亚硝酸盐类食物的过多摄入、维生素和微量元素缺乏、霉菌及病毒感染等与胃癌的发病有关^[11-12], 却仅有少数暴露于这些因素中的个体患病, 说明遗传因素在肿瘤的形成过程中起着不可估量的作用。因此, 寻找与遗传相关的肿瘤标记物对于胃癌病因分子机制的明确, 为基因治疗提供有效的分子靶点有重大意义。

SRY-Box 基因家族是一类具有 HMG 特征性结构域的转录因子家族, HMG 是 DNA 结合区域, 其基因序列在真核细胞内高度保守^[1]。*SRY-Box2* 基因属 *SRY-Box* 家族成员。研究^[13-14]发现, *SRY-Box2* 基因对维持胚胎干细胞的全能性及自我更新中发挥重要的作用。干细胞和肿瘤都具有自我更新等共同特性, 在干细胞起关键作用的基因在肿瘤的发生和发展中也可能扮演一定的角色。*SRY-Box2* 基因已被发现在多种肿瘤中表达异常, 表明其在人类恶性肿瘤的形成中可能发挥着一定的作用。

本研究通过对 MKN45、MKN75 两株胃癌细胞株及来自河北省太行山脉上消化道肿瘤高发区胃癌患者肿瘤标本的研究, 了解高发区胃癌患者肿瘤组织及相应癌旁非肿瘤组织标本中 *SRY-Box2* 基因的表达情况及引起表达异常的可能机制, 探讨该基因在胃癌中可能扮演的角色。研究结果显示, MKN45 细胞株中 *SRY-Box2* mRNA 表达呈阳性, 而 MKN74 细胞呈阴性。应用去甲基化药物 5-Aza-Dc 处理细胞株后, MKN45 细胞 *SRY-Box2* mRNA 表达无明显变化, 而 MKN74 细胞恢复阳性表达; 而用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理后, 两细胞株中该基因表达均无明显变化, 提示表观遗传学修饰中基因的甲基化可能在该基因表达下调中起一定的作用, 而基因的乙酰化可能对该基因的表达沉默无影响。并且, 利用 UCSC 序列检索发现, *SRY-Box2* 基因的启动子区及第一外显子富含 CG 二核苷酸序列含有 CpG 岛。MSP 检测该基因甲基化情况, 结果显示, 胃癌细胞株 MKN74 可扩增出甲基化条带, 5-Aza-Dc 处理后, 甲基化条带消失; MKN45 细胞株处理前后均无甲基化条带出现, 进一步验证了基因甲基化对该基因表达沉默的影响。随后利用 RT-PCR 及 MSP 的方法对 86 例胃癌及相应癌旁非肿瘤组织中 *SRY-Box2* 基因的表达及甲基化状态进行了分析, 发现癌组织中 *SRY-Box2* 基因的表达缺失率明显高于癌旁非肿瘤组织, 提示该基因可能作为候选抑癌基因在胃癌的发生中起到了一定的作用。Li 等^[15]用 *SRY-Box2* 多克隆抗体检测 *SRY-Box2* 在正常胃黏膜、肠

上皮化生的胃黏膜以及胃癌组织标本中的表达情况, 发现 *SRY-Box2* 在正常胃黏膜中有明显表达, 在肠上皮化生及胃癌组织标本中表达明显减少, 与本实验的研究结果相同。但同时也有研究表明, 该基因在乳腺癌^[16-17]、肺癌^[6-7]、黑素瘤^[5]、肝癌^[18]等多种恶性肿瘤中异常高表达, 与胃癌组织的检测结果相反。提示 *SRY-Box2* 在不同类型的肿瘤中发挥着不同的作用, 但其具体机制还未完全阐明。可能由于 *SRY-Box2* 除了是重要的干细胞因子, 维持细胞的多潜能性外, 还与它参与消化道发育有关。*SRY-Box2* 可以控制胃黏膜上皮的分化, 故在正常胃黏膜中高表达, 而其表达缺失可能影响了上皮组织的正常分化, 促进了肿瘤的发生。同时, 此次研究还发现, 该基因 mRNA 表达缺失与该基因甲基化状态有明显的相关性, 进一步在组织标本中验证了基因启动子区 CpG 岛甲基化是引起该基因表达沉默的机制之一, 同时提示 *SRY-Box2* 基因由于甲基化而引起的转录抑制可能在胃癌的发生中扮演着重要的角色。Alonso 等^[19]在对成胶质细胞瘤的研究中发现, 用 5-Aza-Dc 处理 *SRY-Box2* 基因阴性的胶质瘤细胞株, 其蛋白恢复阳性表达, 同时在对胶质瘤组织标本的检测中也发现肿瘤组织的低甲基化与该基因的过表达密切相关, 与本研究的结果一致。且该基因甲基化状态与肿瘤患者的淋巴结转移相关, Junko 等^[20]在对胃癌的研究中也得到了相同的结果, 提示 *SRY-Box2* 基因甲基化状态对于肿瘤组织的预后有一定的指导意义。

本研究结果揭示了 *SRY-Box2* 基因在胃癌可能是候选抑癌基因, 基因启动子区高甲基化是引起其表达沉默的机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] Foster JW, Dominguez steglich MA, Guioli S, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an *SRY*- related gene [J]. *Nature*, 1994, 372(6506): 525-530.
- [2] Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: Versatile regulators of stem and progenitor cell fate [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(1): 15-30.
- [3] Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: Regulators of cell fate specification and differentiation [J]. *Development*, 2013, 140(20): 4129-4144.
- [4] Castillo SD, Sanchez-Cespedes M. The SOX family of genes in cancer development: Biological relevance and opportunities for therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(9): 903-919.
- [5] Laga AC, Zhan Q, Weishaupt C, et al. SOX2 and nestin expression in human melanoma: An immunohistochemical and experimental study [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(4): 339-345.

- [6] Sholl LM, Barletta JA, Yeap BY, et al. Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma [J]. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(8): 1193-1198.
- [7] 许伟, 位云艳, 谭瑶曦, 等. 干细胞转录因子 Sox2 在肺癌中的表达和意义 [J]. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(11): 591-595.
- [8] Gen Y, Yasui K, Nishikawa T, et al. SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma through the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(7): 810-816.
- [9] Herreros-Villanueva M, Zhang JS, Koenig A, et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells [J]. *Oncogenesis*, 2013, 2: e61.
- [10] Ji J, Zheng PS. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis [J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(10): 1438-1447.
- [11] Shibata W, Maeda S. Mechanism of *H. pylori*-induced gastric inflammation and carcinogenesis *Nihon Rinsho* [J]. 2013, 71(8): 1346-1351.
- [12] Xu GP, So PJ, Reed PI. Hypothesis on the relationship between gastric cancer and intragastric nitrosation: N-nitrosamines in gastric juice of subjects from a high-risk area for gastric cancer and the inhibition of N-nitrosamine formation by fruit juices [J]. *Eur J Cancer Prev*, 1993, 2(1): 25-36.
- [13] Maucksch C, Jones KS, Connor B. Concise review: The involvement of SOX2 in direct reprogramming of induced neural stem/pre-cursor cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(8): 579-583.
- [14] Liu K, Lin B, Zhao M, et al. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1264-1271.
- [15] Li XL, Eishi Y, Bai YQ, et al. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(2): 257-263.
- [16] Wu F, Ye X, Wang P, et al. Sox2 suppresses the invasiveness of breast cancer cells via a mechanism that is dependent on Twist1 and the status of Sox2 transcription activity [J/OL]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 317.
- [17] Ling GQ, Chen DB, Wang BQ, et al. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(6): 1264-1268.
- [18] Zheng YW, Nie YZ, Taniguchi H. Cellular reprogramming and hepatocellular carcinoma development [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(47): 8850-8860.
- [19] Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, et al. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e26740.
- [20] Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, et al. Role of the stemness factors Sox2, Oct3/4, and nanog in gastric carcinoma [J]. *J Surg Res*, 2012, 174(1): 130-135.
- [收稿日期] 2013 - 11 - 15 [修回日期] 2014 - 02 - 26
[本文编辑] 黄静怡

· 科技动态 ·

疫苗活化的 GCN2 增强 DC 的抗原提呈能力

黄热病疫苗 (yellow fever vaccine, YF)-17D 是一种非常成功的减毒活疫苗, 在全世界广泛使用, 但其诱导机体产生保护性免疫反应的机制尚未明确。2014 年 1 月发表在 *Science* 杂志上的一篇文章, 作者用系统生物学的方法筛选到了与该作用机制有关的分子——一般性调控阻遏蛋白激酶 2 (general control nonderepressible 2 kinase, GCN2), 并进行了深入的机制探究。

GCN2 是氨基酸饥饿的感受分子, 参与细胞的应激反应, 可通过自我磷酸化和磷酸化 eIF2 α 影响细胞的蛋白质合成, 在机体代谢、抵抗应激、肿瘤细胞增殖以及免疫反应中发挥重要作用。当细胞应对饥饿时, GCN2 还能启动自噬, 通过消耗自身的结构或者大分子来释放营养成分, 供应细胞合成代谢所需, 保障细胞正常功能的维持; 自噬还能影响 DC 的抗原提呈能力, 从而影响机体的免疫应答。GCN2 缺陷后, 酵母不能启动自噬, 提示 GCN2 与自噬是相关联的。上述研究结果均说明 GCN2 具有重要的免疫调控功能。

作者运用系统生物学的方法对接种 YF-17D 后 PBMC 中的应激分子和自噬分子进行筛查, 发现 GCN2 与自噬相关基因的表达和疫苗引起的特异性 CD8⁺ T 细胞应答反应密切相关。在体外, YF-17D 引起 DC 中产生应激颗粒; 在体内, GCN2^{-/-} 小鼠接种 YF-17D 后引起的特异性 T 细胞应答也明显减弱, 并且在条件性敲除 DC 中 GCN2 的小鼠也得到了相同的结果, 表明 GCN2 对于机体产生 YF-17D 特异性的 T 细胞应答是必须的。作者发现, GCN2 缺失与否并不影响 DC 分泌细胞因子、表达共刺激分子以及摄取可溶性抗原的能力, 而 YF-17D 引起了 DC 中氨基酸消耗, 游离氨基酸的浓度明显降低。进一步研究发现, YF-17D 引起 GCN2^{-/-} DC 自噬能力减弱, 说明 YF-17D 诱导 DC 自噬依赖于 GCN2。作者进一步探讨了 GCN2 在 DC 提呈抗原中的作用, 通过体外的抗原交叉提呈实验, 发现 GCN2^{-/-} 的 DC 交叉提呈 YF-17D 抗原的能力显著减弱, 且 Atg5^{-/-} 和 Atg7^{-/-} DC 获得的结果与 GCN2^{-/-} DC 相一致, 这些结果进一步表明, YF-17D 可以增强 DC 交叉提呈抗原的能力, 这一机制依赖于 GCN2 和自噬。作者还发现, 这一机制对流感减毒活疫苗同样适用。

该项研究将应激、代谢、自噬和抗原提呈联系起来, 并在 DC 中进行了有机整合, 揭示了 GCN2 的重要功能, 提供了感知病原体的新思路, 尤其对疫苗的研究具有指导意义。

[张华 摘译, 韩超峰 审阅. Ravindran R, Khan N, Nakaya HI, et al. *Science*, 2014, 343(6168): 313-317.]