

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.005

· 基础研究 ·

## hCaMK II N $\alpha$ 对结肠肿瘤分泌免疫抑制因子的抑制作用

刘音,温巧莲,刘洋,王春梅(中国医学科学院基础医学研究所免疫学系,医学分子生物学国家重点实验室,北京,100005)

**[摘要]** **目的:**探讨钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶 II 抑制蛋白  $\alpha$ (human calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitory alpha, hCaMK II N $\alpha$ )对结肠肿瘤细胞分泌免疫抑制因子的影响及其作用机制。**方法:**将 hCaMK II N $\alpha$  基因表达载体(pK II N $\alpha$ )或 siRNA(si-K II N $\alpha$ )转染至结肠肿瘤细胞(LoVo 细胞、SW620 细胞和 HT29 细胞),形成过表达或干扰表达细胞。RT-PCR 检测结肠癌 LoVo 细胞过表达 hCaMK II  $\alpha$  后白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)mRNA 表达水平,ELISA 法检测转染 pK II N $\alpha$  或 si-K II N $\alpha$  对 SW620 和 LoVo 细胞中 VEGF、PGE<sub>2</sub>、IL-8 和 IL-10 分泌的影响。为观测细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)在 hCaMK II N $\alpha$  介导的细胞因子调控中的作用,利用 U0126 抑制 HT-29 细胞中 ERK1/2 活性后,检测 hCaMK II N $\alpha$  表达下调对 VEGF 和 IL-8 分泌的影响。**结果:**hCaMK II 可显著抑制结肠癌 LoVo 细胞中 VEGF、IL-8 和 IL-10 mRNA 水平的表达;可抑制 SW620 和 LoVo 细胞中 IL-8 和 VEGF 蛋白的分泌,但对 PGE<sub>2</sub> 和 IL-10 的分泌没有影响。相应地,利用 RNA 干扰技术下调 hCaMK II N $\alpha$  表达可显著上调 HT29 细胞中 IL-8 和 VEGF 的分泌;并且发现 MEK1/2 活性的抑制可完全阻断 hCaMK II N $\alpha$  对 IL-8 的影响,但只能部分阻断对 VEGF 的影响。**结论:**hCaMK II N $\alpha$  通过抑制 ERK 活性下调结肠肿瘤细胞 VEGF 和 IL-8 的分泌,在结肠肿瘤免疫逃逸中起到负相调控作用。

**[关键词]** 钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶 II 抑制蛋白;结肠肿瘤;LoVo 细胞;SW620 细胞;HT29 细胞;VEGF;IL-8;IL-10

**[中图分类号]** R735.3<sup>+</sup>5; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)03-0263-06

## The inhibitory effect of hCaMK II N $\alpha$ on the production of immunosuppressive factors in colon cancer cells *in vitro*

Liu Yin, Wen Qiaolian, Liu Yang, Wang Chunmei (National Key Laboratory of Medial Molecular Biology, Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of (human calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitory alpha (hCaMK II N- $\alpha$ )) on the production of immunosuppressive factors in colon cancer cells and the mechanisms underlying the effect *in vitro*. **Methods:** Overexpression and silencing of the hCaMK II N- $\alpha$  gene in human colon adenocarcinoma (LoVo, SW620 and HT29) cells were achieved by transfection with a hCaMK II N- $\alpha$ -expressing plasmid (pK II N- $\alpha$ ) and an siRNA (si-K II N- $\alpha$ ) vector, respectively. Messenger RNA levels of interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10) and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in LoVo cells transfected with pK II N- were analyzed by RT-PCR. Protein levels of IL-8, IL-10 and VEGF in SW620 and LoVo cells transfected with pK II N- and in HT29 cells transfected with si-K II N- were determined by ELISA. The differences in IL-8 and VEGF protein levels in HT29 cells transfected with pKIN- $\alpha$  in the presence or absence of U0126 (10 M), a selective ERK1/2 inhibitor, were analyzed to elucidate the role of ERK1/2 in hCaMK II N- $\alpha$ -mediated IL-8 and VEGF production. **Results:** Overexpression of hCaMK II N- significantly decreased the mRNA abundance and protein levels of VEGF and IL-8 ( $P < 0.05$ ) but not PGE<sub>2</sub> ( $P > 0.01$ ). Silencing of hCaMK II N- by siRNA significantly increased the secretion of VEGF and IL-8 in HT29 cells, but had no effect on the se-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 31270931)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31270931)

**[作者简介]** 刘音(1973-),女,北京市人,大专,主管技师,主要从事肿瘤免疫学研究。E-mail: liuyinbj@sina.com

**[通信作者]** 王春梅(Wang Chunmei, corresponding author), E-mail: wangcm1977@126.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.005.html>

cretion of PGE2 and IL-10. U0126 treatment resulted in a complete reversion of increased IL-8 secretion but only a partial reversion of increased VEGF secretion in HT29 cells overexpressing hCaMK II - $\alpha$ . **Conclusion:** Our observations suggest that hCaMK II - may inhibit the secretion of VEGF and IL-8 and thus down-regulate the immune response in rectal tumor cells through an ERK signaling pathway-dependent mechanism.

[ **Key words** ] human calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitory alpha ( hCaMK II N $\alpha$  ); colon carcinoma; LoVo cell; SW620 cell; H29 cell; VEGF; IL-8; IL-10

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 263-268 ]

钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶 II ( calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II ) 是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可调控机体多种生理及病理功能, 如细胞的分化和生长。为了深入研究 CaMK II 的功能, 人们利用 CaMK II 抑制剂对其进行研究。CaMK II 抑制剂主要通过结合 CaMK II 上的 Ca<sup>2+</sup>/CaM 结合位点或影响 CaMK II 催化功能来抑制 CaMK II 的活性。以往人们对 CaMK II 抑制剂的研究仅限于化学合成抑制剂如 KN62、KN93 及合成的抑制多肽 AIP 等<sup>[1]</sup>。近年来, 人们发现四种内源性的 CaMK II 抑制蛋白( CaMK II N ): 大鼠来源的 rCaMK II N $\alpha$  和 rCaMK II N $\beta$ , 人来源的 hCaMK II N $\alpha$  和 hCaMK II N $\beta$ <sup>[2-3]</sup>。这些特异性抑制剂可通过抑制 CaMK II 的活性, 诱导细胞发生凋亡或细胞周期的阻滞, 对神经细胞、心肌细胞以及肿瘤细胞等的功能产生影响<sup>[4]</sup>。

hCaMK II N $\alpha$  是 2002 年曹雪涛实验室从人胚胎脑及骨髓基质细胞中克隆到的一种新型 CaMK II N, 该基因编码 78 个氨基酸; 其与结肠肿瘤的进程呈负相关, 可通过诱导结肠癌细胞周期阻滞, 抑制结肠肿瘤在体内、体外的生长<sup>[3]</sup>。肿瘤的生长及进程不但与自身基因的改变有关, 肿瘤自身分泌的多种免疫抑制因子, 在肿瘤的局部形成一个较大的免疫抑制区, 抑制机体的抗肿瘤免疫, 可介导肿瘤免疫逃逸。肠道肿瘤可高分泌一些免疫抑制因子如 VEGF、IL-10、IL-8 和 PGE2 等<sup>[5-8]</sup>, 这些因子可通过抑制免疫细胞如 DC、T 细胞、NK 细胞的功能, 导致肿瘤的免疫逃逸的发生<sup>[9-10]</sup>。既然 hCaMK II N $\alpha$  可抑制结肠肿瘤细胞的体内、外生长, 那么它是否参与结肠肿瘤免疫逃逸呢? 本研究旨在明确 hCaMK II N $\alpha$  是否可通过调控免疫抑制因子来抑制结肠肿瘤的生长, 从而在介导肿瘤免疫逃逸过程中发挥一定的作用。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 主要试剂

VEGF、IL-8 和 IL-10 细胞因子 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司, 人 PGE2 ELISA 试剂盒购自 Cayman

Chemical 公司。TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, cDNA 第一链合成试剂盒购自 TOYOBO 公司。预混的 PCR 反应体系 PreMix Ex Taq 购自 TaKaRa 公司。IKBa 和 p-IKBa 抗体购自 Santa Cruz 公司, 抗 actin 抗体购自 Sigma 公司。辣根过氧化物酶( HRP ) 标记的抗羊 IgG 抗体均购自 Santa Cruz 公司, HRP 标记的抗兔/鼠 IgG 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。MEK1/2 抑制剂 U0126 购自 Calbiochem 公司, BCA 蛋白定量试剂盒及化学发光检测底物购自 Pierce 公司。0.2  $\mu$ m 硝酸纤维素膜( Whatman, Schleicher & Schuell )、化学发光检测底物 Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate 购自 Pierce 公司。

hCaMK II N $\alpha$  特异性 siRNA( si-K II N $\alpha$  ) 和无关对照 siRNA( si-Non ) 由上海吉凯生物公司合成, 序列为: 5'-GCAAGCGGGUUGUUAUUGATT ( si-K II N $\alpha$  ) 及 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT( si-Non )。

#### 1.2 细胞株

人结肠腺癌细胞株 LoVo 和 SW620 细胞购自 ATCC 公司, 用 RPMI 1640( PAA )、10% FCS( PAA ) 培养; 人结肠腺癌细胞株 HT29 细胞购自 ATCC 公司, 用 McCoy's 5a( Invitrogen )、10% FCS 培养。

#### 1.3 hCaMK II N $\alpha$ 表达载体及 siRNA 的真核细胞转染

分别将 hCaMK II N $\alpha$  全长或 siRNA 转染至 LoVo、SW620 细胞或 HT29 细胞。主要步骤为: 待转染的质粒 DNA 或 siRNA 与脂质体 Lipofectine<sup>AM</sup>2000 按一定比例混合, 室温作用 15 ~ 20 min, 将 60 ~ 80% 汇合( confluent ) 生长待转染细胞用无血清培养基洗两遍后, 加入 DNA-脂质体混合物, 置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3 ~ 4 h, 用 10% 的完全培养基换液, 继续培养。转染后 48 ~ 72 h 收集细胞进行检测。

#### 1.4 RT-PCR 检测人 hCaMK II N $\alpha$ 对免疫抑制因子的表达

收集转染 pK II N $\alpha$  的 LoVo 和 SW620 细胞或转染 si-K II N $\alpha$  的 HT29 细胞( 1  $\times$  10<sup>7</sup> 个 ), 用 TRIzol 试

剂提取 RNA,取 1  $\mu$ g RNA 用反转录试剂盒进行逆转录,合成 cDNA。PCR 反应体系 20  $\mu$ l,引物浓度为 0.2  $\mu$ mol/L,dNTP 浓度为 200  $\mu$ mol/L,镁离子浓度为 1.5 mmol/L。人 Cox-2 上游引物为 5'-CGAG-GTGTATGTATGAGTGTG-3',下游引物为 5'-TCTAGCCAGAGTTTCACCGTA-3';IL-8 上游引物为 5'-ATACTTCCAAGCTGGCCGTGGC-3',下游引物为 5'-GCTTATGAATTCTCAGCCCTCT-3';IL-10 上游引物为 5'-ATCACAGCTCAGCACTGCTCTG-3',下游引物为 5'-GCTCAGTTTCGTATCTTCATFG-3';VEGF 上游引物为 5'-ATAACTTTCTGCTGTCTTGGGT-3',下游引物为 5'-GCTCACCGCTCGGCTTGTCAC-3'; $\beta$ -actin 上游引物为 5'-ACCACAGCTGAGAGGGAA-3',下游引物为 5'-GCTCGAAGTCTAGGGCAA-3'。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 20 s,57  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 40 s,30 个循环后 PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定细胞培养上清中细胞因子水平

收集 hCaMK II N $\alpha$  全长或 siRNA 转染的 LoVo、SW620、HT29 细胞培养上清,利用 ELISA 试剂盒测定 VEGF、PGE<sub>2</sub>、IL-8 和 IL-10 水平。为观测 ERK 在 hCaMK II N $\alpha$  介导的调控作用,将 hCaMK II N $\alpha$  特异性的 siRNA( si-K II N $\alpha$ )或对照 siRNA( si-Non)转染至 HT-29 细胞,24 h 后,U0126(10  $\mu$ mol/L)处理细胞 24 h,收集细胞培养上清,ELISA 方法检测 VEGF 和 IL-8 浓度。具体步骤按照其说明书操作。用标准曲线求得上清中细胞因子的浓度。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,实验组与对照组之间的统计学分析采用非配对 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hCaMK II N $\alpha$ 抑制结肠肿瘤细胞中多种免疫抑制因子 mRNA 表达

首先利用 RT-PCR 检测了 hCaMK II N $\alpha$  对结肠肿瘤细胞中免疫抑制因子表达的影响。结果(图 1)显示,LoVo 细胞在转染 hCaMK II N $\alpha$  真核表达载体 24 h 后,VEGF mRNA 的水平低于对照载体组,在 36 和 48 h 下调更显著;IL-8 mRNA 的水平在转染后 48 h 明显低于对照组;同样,IL-10 mRNA 的水平在转染后 36 h 低于对照组,在 48 h 下降更明显。上述研究提示,hCaMK II N $\alpha$  抑制结肠肿瘤细胞中 VEGF、IL-8 和 IL-10 mRNA 的表达。

### 2.2 hCaMK II N $\alpha$ 抑制结肠肿瘤细胞免疫抑制因子

的分泌

进一步检测 hCaMK II N $\alpha$  对结肠肿瘤细胞中免疫抑制因子分泌的影响,ELISA 检测结果显示,空白对照组(control)和实验对照组(mock)的 SW620 细胞培养上清中 IL-8 含量,分别为  $675.67 \pm 9.71$  和  $660.00 \pm 15.10$ ,VEGF 为  $673.00 \pm 14.53$  和  $635.33 \pm 8.50$ ,但在 hCaMK II N $\alpha$  过表达的 SW620 细胞中,IL-8 和 VEGF 的分泌量明显降低:IL-8 为  $446.67 \pm 8.08$  ( $P = 0.0004$ ),VEGF 为  $404.67 \pm 6.03$  ( $P = 0.0002$ )。在 hCaMK II N $\alpha$  过表达的 LoVo 细胞培养上清中,IL-8 和 VEGF 的含量同样明显低于空白对照组和实验对照组:IL-8 含量空白对照组为  $535.33 \pm 8.33$ ,实验对照组为  $505.00 \pm 8.54$ ,pK II N $\alpha$  组为  $294.00 \pm 7.12$ ;VEGF 含量空白对照组为  $524.67 \pm 14.01$ ,实验对照组为  $513.00 \pm 8.19$ ,pK II N $\alpha$  组为  $191.67 \pm 8.02$  ( $P = 0.0003$ )。由此可见,hCaMK II N $\alpha$  过表达可显著抑制 SW620 和 LoVo 细胞中 IL-8(图 2A)和 VEGF(图 2B)的分泌,但对 PGE<sub>2</sub> 和 IL-10 的分泌没有影响(图 2C)。

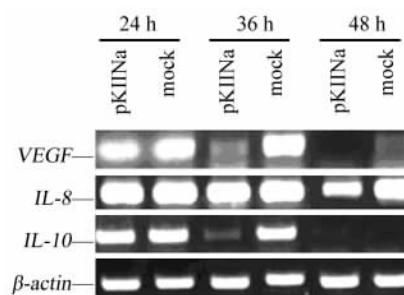


图 1 RT-PCR 检测 hCaMK II 对结肠肿瘤免疫抑制因子基因 mRNA 表达的影响  
Fig. 1 RT-PCR analysis for the effect of hCaMK II N $\alpha$  on the mRNA expressions of several immunosuppressive factors in colon tumor cells

### 2.3 hCaMK II N $\alpha$ 表达下调促进结肠肿瘤细胞中 IL-8 和 VEGF 的分泌

为进一步验证 hCaMK II N $\alpha$  对免疫抑制因子产生的影响,利用 hCaMK II N $\alpha$  特异性 siRNA( si-K II N $\alpha$ )干扰其表达,ELISA 检测结果显示,siRNA 干扰所导致的 hCaMK II N $\alpha$  表达下调可显著上调 HT29 细胞中 IL-8 和 VEGF 的分泌(图 3A 和 3B),对 PGE<sub>2</sub> 和 IL-10 的分泌同样没有明显影响(图 3C),这进一步证实了 hCaMK II N $\alpha$  对 IL-8 和 VEGF 分泌的抑制作用。

### 2.4 hCaMK II N $\alpha$ 通过抑制 ERK1/2 活性下调免疫

抑制因子的分泌

本实验室以往的研究显示, hCaMK II N $\alpha$  抑制结肠肿瘤细胞中 ERK1/2 的活化。本实验 ELISA 检测结果显示, MEK1/2 活性抑制可完全逆转 hCaMK II N $\alpha$  介导的对 IL-8 的下调(图 4A); 而对于 VEGF, ERK1/2 活性抑制仅可部分逆转 hCaMK II N $\alpha$  介导

的对 VEGF 的下调(图 4B)。上述结果提示, hCaMK II N $\alpha$  介导的 IL-8 抑制是完全依赖于 ERK1/2 活性的抑制, 而 VEGF 抑制是部分依赖于 ERK1/2 活性抑制。因此推测可能有其他信号通路也参与了 hCaMK II N $\alpha$  对 VEGF 的调控。

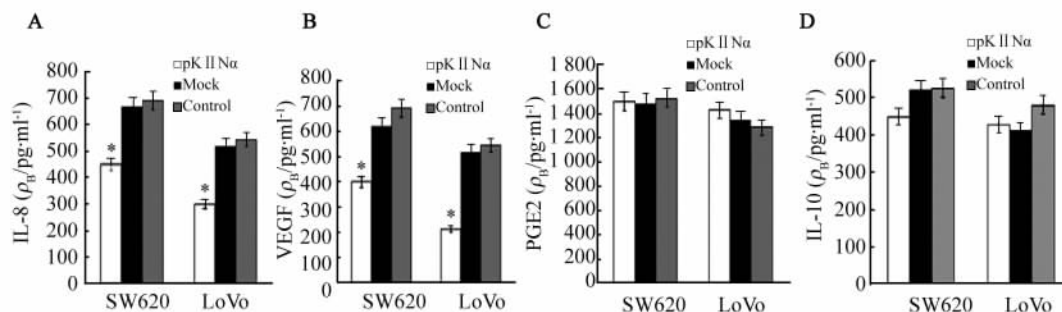


图 2 ELISA 法检测 hCaMK II N $\alpha$  对结肠癌细胞培养上清中 IL-8、VEGF、PGE2 和 IL-10 表达的影响  
 Fig. 2 Effect of hCaMK II N $\alpha$  on expressions of IL-8, VEGF, PGE2 and IL-10 in colon carcinoma detected by ELISA analysis

A: IL-8; B: VEGF; C: PGE2; D: IL-10

\*  $P < 0.05$  vs mock or control

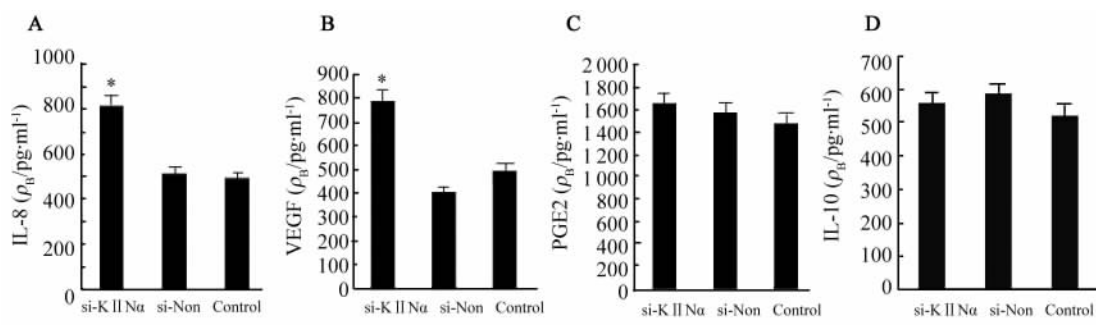


图 3 干扰 hCaMK II N $\alpha$  表达对 IL-8、VEGF、PGE2 和 IL-10 分泌的影响

Fig. 3 Effect of silencing of hCaMK II N $\alpha$  on the secretion of IL-8, VEGF, PGE2 and IL-10

A: IL-8; B: VEGF; C: PGE2; D: IL-10

\*  $P < 0.05$  vs control or si-Non

3 讨论

肿瘤细胞可通过分泌免疫抑制因子抑制机体的抗肿瘤免疫效应, 逃逸机体的免疫清除, 如何抑制肿瘤免疫逃逸是目前研究的热点。本研究发现, 内源性 CaMK II 抑制蛋白 hCaMK II N $\alpha$  可通过抑制 MEK/ERK 显著抑制结肠肿瘤细胞 VEGF 和 IL-8 的分泌, 提示 hCaMK II N $\alpha$  可能对肿瘤免疫逃逸起阻断作用, 为结肠肿瘤治疗提供新的靶点。

VEGF 作为最重要的促血管形成因子可发挥一

定的肿瘤免疫抑制作用, 在肿瘤的形成及免疫逃逸过程中发挥重要作用。目前研究认为 VEGF 主要通过以下几个方面抑制机体的免疫功能: (1) VEGF 通过影响 DC 的分化与成熟, 降低其抗原提呈能力; (2) VEGF 可以抑制 T 细胞的活化及增殖; (3) VEGF 可诱导免疫抑制细胞的产生, 抑制机体的免疫功能; (4) VEGF 可通过自分泌方式影响肿瘤细胞自身一些基因的表达<sup>[11-14]</sup>。本研究发现, hCaMK II N $\alpha$  不但可通过抑制结肠肿瘤细胞周期的进程, 抑制肿瘤的生长, 同时它可抑制结肠肿瘤细胞 VEGF 的

分泌。还发现 hCaMK II N $\alpha$  介导的 VEGF 抑制是部分依赖于 ERK 活性,ERK 信号在调控 VEGF 的表达过程中起着不可替代的作用。有研究<sup>[15]</sup>表明,ERK 信号的抑制可下调 VEGF 的表达,这与本研究结果是一致的。此外,hCaMK II N $\alpha$  介导的 VEGF 抑制可能存在着其他信号通路的参与。

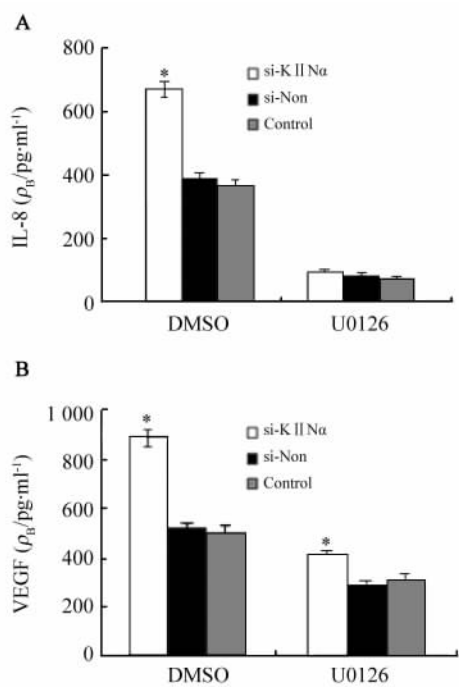


图4 MEK/ERK 信号抑制对 hCaMK II N $\alpha$  介导的肿瘤细胞 IL-8 和 VEGF 分泌的影响

Fig. 4 Effect of MEK/ERK signals suppression on hCaMK II N $\alpha$ -mediated production of IL-8 and VEGF

A: IL-8; B: VEGF

\*  $P < 0.05$  vs control

IL-8 是  $\alpha$  型趋化因子,对多种白细胞有趋化、激活作用,在炎症、免疫反应、动脉硬化及 DIC 中发挥一定的病理作用,同时它也是促血管生成因子,与肿瘤血管新生及肿瘤的侵袭转移有密切关系<sup>[17-18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>发现,IL-1 可通过活化 ERK 和 p38 通路诱导 IL-8 的表达。本研究中发现,hCaMK II N $\alpha$  抑制结肠肿瘤 IL-8 的分泌,并且这种抑制作用是完全依赖于 MEK/ERK 活性。本研究结果与已有的文献报道结果一致:Choi 等<sup>[20]</sup>发现,铁螯合剂可诱导人内皮细胞 IL-8 的转录,这种诱导方式依赖于 ERK1/2 和 p38 MAPK。因此,可以认为 hCaMK II N $\alpha$  对 ERK 活性的抑制不但导致了 p27 的累积,而且可能同时造成 IL-8 的表达及分泌抑制;因 IL-8 有较强的促血管生成作用,hCaMK II N $\alpha$  介导的 IL-8 抑制可能抑

制了肿瘤血管的生成,从而抑制肿瘤的生长。但 IL-8 有较强的趋化作用,可趋化一些免疫细胞至肿瘤部位,发挥抗肿瘤效应,因此,对于 hCaMK II N $\alpha$  介导的 IL-8 抑制在促肿瘤与抗肿瘤之间的关系还需进一步探讨。

综上,本研究认为 hCaMK II N $\alpha$  能够抑制肿瘤细胞 VEGF 和 IL-8 的分泌,可能在结肠肿瘤免疫逃逸中起到负相调控作用,该结果为 CaMK II 参与肿瘤免疫调节提供了新的线索与实验依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Mockett BG, Guévremont D, Wutte M, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent protein synthesis and long-term depression in rat hippocampus [ J ]. J Neurosci, 2011, 31( 20 ): 7380-7391.
- [ 2 ] Chang BH, Mukherji S, Soderling TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein: Localization of isoforms in rat brain [ J ]. Neuroscience, 2001, 102( 4 ): 767-777.
- [ 3 ] Wang C, Li N, Liu X, et al. A novel endogenous human CaMK II inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest via p27 stabilization [ J ]. J Biol Chem, 2008, 283( 17 ): 11565-11574.
- [ 4 ] Erickson JR, Pereira L, Wang L, et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMK II and arrhythmias by O-linked glycosylation [ J ]. Nature, 2013, 502( 7471 ): 372-376.
- [ 5 ] Koon HW, Zhao D, Zhan Y, et al. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation [ J ]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314( 3 ): 1393-1400.
- [ 6 ] Ahluwalia A, Jones MK, Szabo S, et al. Aberrant, ectopic expression of VEGF and VEGF receptors 1 and 2 in malignant colonic epithelial cells. Implications for these cells growth via an autocrine mechanism [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 437( 4 ): 515-520.
- [ 7 ] Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, et al. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer [ J ]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007, 82( 1/4 ): 147-154.
- [ 8 ] Sato Y, Takahashi S, Kinouchi Y, et al. IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD [ J ]. Carcinogenesis, 2006, 27( 5 ): 1068-1073.
- [ 9 ] Tougeron D, Fauquembergue E, Latouche JB. Immune response and colorectal cancer [ J ]. Bull Cancer, 2013, 100( 3 ): 283-294.
- [ 10 ] Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Angiogenesis in colorectal cancer: Prognostic and therapeutic implications [ J ]. Am J Clin Oncol, 2006, 29( 4 ): 408-417.
- [ 11 ] Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, et al. SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion [ J ]. Cancer Lett, 2006, 236( 1 ): 39-45.
- [ 12 ] Mimura K, Kono K, Takahashi A, et al. Vascular endothelial

- growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2 [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56( 6 ): 761-770.
- [ 13 ] Zhang J, Silva T, Yarovinsky T, et al. VEGF blockade inhibits lymphocyte recruitment and ameliorates immune-mediated vascular remodeling [ J ]. *Circ Res*, 2010, 107( 3 ): 408-417.
- [ 14 ] Li B, Lalani AS, Harding TC, et al. Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12( 22 ): 6808-6816.
- [ 15 ] Milkiewicz M, Mohammadzadeh F, Ispanovic E, et al. Static strain stimulates expression of matrix metalloproteinase-2 and VEGF in microvascular endothelium via JNK- and ERK-dependent pathways [ J ]. *J Cell Biochem*, 2007, 100( 3 ): 750-761.
- [ 16 ] Tong Q, Zheng L, Lin L, et al. VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway [ J ]. *Respir Res*, 2006, 2( 7 ): 37-51.
- [ 17 ] Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, et al. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells [ J ]. *Cancer Res*, 2011, 71( 15 ): 5296-5306.
- [ 18 ] Chang KK, Liu LB, Jin LP, et al. NME1 suppression of endometrial stromal cells promotes angiogenesis in the endometriotic milieu via stimulating the secretion of IL-8 and VEGF [ J ]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6( 10 ): 2030-2038.
- [ 19 ] Kawano Y, Furukawa Y, Karakida S, et al. Regulation of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production by amnion-derived ( WISH ) cells [ J ]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2012, 39( 1 ): 43-48.
- [ 20 ] Choi EY, Park ZY, Choi EJ, et al. Transcriptional regulation of IL-8 by iron chelator in human epithelial cells is independent from NF-kappaB but involves ERK1/2- and p38 kinase-dependent activation of AP-1 [ J ]. *J Cell Biochem*, 2007, 102( 6 ): 1442-1457.
- [ 收稿日期 ] 2013 - 12 - 26 [ 修回日期 ] 2014 - 03 - 25
- [ 本文编辑 ] 阮芳铭

· 科技动态 ·

## 自身免疫调节因子 AIRE 借助于 ATF7ip-MBD1 抑制复合体来诱导免疫耐受

自身免疫调节因子 AIRE( autoimmune regulator, AIRE )是一种转录因子。Aire 发生变异可导致人类出现 APECED( autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy )疾病,患者表现为多种内分泌器官的特异性自身免疫性破坏,另外还有慢性皮肤黏膜念珠菌病和外胚层退行性病变等。AIRE<sup>-/-</sup>小鼠具有与 APECED 患者相似的自身免疫缺陷。

2002 年, Mark Anderson 教授第一次明确了 AIRE 可以调节多种组织特异性抗原( TSA )在胸腺髓质上皮细胞( mTECs )的转录,从而启动阴性选择,维持 T 细胞的中枢耐受,解释了单一基因的突变却导致了多器官的免疫性损伤。AIRE 是怎样特异地调控多种 TSA 在 mTECs 的表达,仍是一个未解的难题。2014 年 3 月份, Mark Anderson 教授课题组发表在 *nature immunology* 的文章,介绍了 AIRE 是通过与 ATF7ip( MBD1-containing, chromatin-associated factor )-MBD1( 甲基化 CpG 结合域蛋白 1 )复合体相结合,借助于 MBD1 结合 DNA 的特异性,从而特异地结合在 TSA 基因的启动子区,启动 TSA 基因的表达。

作者首先选用酵母双杂交的方法,寻找与 AIRE 相结合的蛋白,结果得到了 ATF7ip 蛋白。已知 ATF7ip 与 MBD1、组蛋白甲基转移酶( ESET-SETDB1 )形成复合体,从而抑制基因的表达。作者进一步证明 AIRE 也可以与 MBD1 相结合,并且 AIRE 调控 TSA 基因的表达依赖于 ATF7ip 与 MBD1。CHIP 实验证实 AIRE 和 MBD1 都能结合在 TSA 基因的启动子区; 亚硫酸氢盐测序证明 TSA 基因的启动子区含有 MBD1 特异性结合的序列 TCpGCA or TGCpGC。

MBD1 缺陷的小鼠在 30 周左右自发自身免疫性疾病,主要表现为泪腺和唾液腺中大量的单核细胞浸润。胸腺移植实验证实是胸腺髓质上皮细胞缺失 MBD1 导致了自身免疫性疾病的发生。最后作者通过 Mbd1<sup>-/-</sup> mTECs 和 Mbd1<sup>+/+</sup> mTECs 的基因表达芯片分析,发现受 MBD1 调控的前 20 个基因中有一半是 TSA 基因。

总之,作者证实了 AIRE 通过与 ATF7ip-MBD1 复合体相结合,实现 TSA 基因表达的特异性调控,从而解释了 AIRE 是怎样特异性调控多种 TSA 在 mTECs 的表达这一难题。

[ 李志清 摘译, 刘书逊 审阅. Waterfield M, Khan IS, Cortez JT, et al. *Nat Immunol*, 2014, 15( 3 ): 258-265. ]