

网络出版时间: 2019-12-2 13:42 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.006.html

鼠源 pEGFP-C1-TMEM88 真核表达质粒的构建及其功能研究

李良云¹, 潘林鑫², 杨俊发¹, 胡爽¹, 张濛³, 李俊¹, 徐涛¹

摘要 目的 构建鼠源真核表达载体 pEGFP-C1-跨膜蛋白 88 质粒(pEGFP-C1-TMEM88), 并观察其对 RAW264.7 细胞中炎症因子分泌的影响和对 RAW264.7 细胞增殖和凋亡的影响。方法 在小鼠正常肝细胞株(AML-12)中提取 RNA 并且逆转录为 cDNA, 同时将引物稀释到 10 μmol/L, 其余作为储备液。采用 PCR 技术扩增跨膜蛋白 88(TMEM88)并鉴定, 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物的纯化回收。再对 PCR 产物及载体进行酶切回收, 酶切片段连接后, 进行连接产物的转化、挑菌、摇菌、质粒抽提。酶切鉴定后, 送至测序鉴定。将构建好的质粒转染至小鼠单核巨噬细胞株 RAW264.7 细胞中, 通过 MTT 实验和流式细胞术检测其对细胞增殖和凋亡的影响, 并用 ELISA 技术检测炎症因子: 白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)在 RAW264.7 细胞中的表达。结果 测序结果显示 pEGFP-C1-TMEM88 真核表达质粒构建成功; MTT 实验结果显示: 48 h 后过表达 TMEM88 组细胞的增殖率为(0.71 ± 0.04), 显著低于对照组(0.94 ± 0.06) ($F = 21.55, P < 0.01$); 流式细胞术结果显示: 过表达 TMEM88 组细胞的凋亡率为(11.52 ± 1.43)% 显著高于对照组(7.78 ± 1.67)% ($F = 10.07, P < 0.05$); ELISA 检测结果显示: 转染 pEGFP-C1-TMEM88 质粒后的 RAW264.7 细胞中的 IL-6、TNF-α 表达较对照组升高。结论 TMEM88 能够显著抑制 RAW264.7 细胞的增殖并促进其凋亡, TMEM88 在 RAW264.7 细胞中炎症因子 IL-6、TNF-α 的表达升高, 为进一步了解 TMEM88 的功能奠定了基础。

关键词 pEGFP-C1-TMEM88; RAW264.7 细胞; 增殖; 凋亡; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子-α

中图分类号 R 364.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1865-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.006

跨膜蛋白 88(transmembrane protein 88, TMEM88)

2019-07-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81700522); 安徽省自然科学基金(编号:1808085MH235)

作者单位:¹ 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

³ 92752 部队卫生队, 合肥 230001

作者简介: 李良云, 女, 硕士研究生;

徐涛, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xutao@ahmu.edu.cn

发现于非洲爪蟾胚胎细胞的细胞膜上, 是一种潜在的 2 型跨膜型蛋白, 在人类干细胞的蛋白质分化和胚胎发育中起关键作用。研究^[1]表明, 非小细胞肺癌组织和多种上皮恶性肿瘤中均有 TMEM88 高表达现象, 并且主要定位于大多数癌症组织的细胞质和肺癌细胞株中。而炎症在癌症的发展和进展中具有重要的作用, 在调节免疫细胞在肿瘤微环境的进出中扮演关键角色, 在抗肿瘤免疫中扮演重要角色。肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)作为研究炎症的代表性细胞因子, 可以提高免疫功能, 增强抗肿瘤免疫力^[2]。课题组前期研究^[3]表明在肝脏炎症纤维化的模型中, TMEM88 可以改善在 I 型胶原 1 和 α-平滑肌肌动蛋白水平上转化生长因子-β1 诱导的肝星状细胞的活化和增殖^[3]。为进一步研究 TMEM88 对炎症因子分泌的影响, 课题组将通过构建 TMEM88 的真核质粒, 研究其在 RAW264.7 细胞中炎症因子(TNF-α、IL-6)的表达及其对细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 实验材料 RAW264.7 细胞株(中国科学院上海生命科学院); ELISA(TNF-α、IL-6)试剂盒(武汉基因美公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司); TMEM88 抗体(美国 SANTA CRUZ 公司); ECL 化学发光试剂盒(美国 Thermo scientific 公司); 细胞培养瓶、细胞培养板(美国 Corning Costar 公司); TRIzol Reagent RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司); PVDF 膜(北京索莱宝科技有限公司); 脱脂牛奶(上海光明公司); DMEM 培养基; 胎牛血清(美国 Gibco 公司); Hind III、Kpn I 内切酶、DL2000 DNA Marker、Lambda DNA Marker、T4 连接酶、质粒抽提试剂盒(美国 Axygen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 构建质粒 在小鼠正常肝细胞株(alpha mouse liver 12, AML-12)中提取 RNA, 逆转录后的 cDNA 于 -20 °C 保存。使用前, 将引物(上海生工

公司设计)取出适量稀释到 10 μmol/L,其余作为储备液。采用常规 PCR 扩增技术,反应体系:5 × PrimeSTAR Buffer、dNTP Mix(2.5 mmol/L)、上下游引物(10 μmol/L)、DNA、PrimeSTAR、高纯水。取出 5 μl PCR 产物进行 12% 的琼脂糖凝胶电泳,纯化回收,并用 Hind III、Kpn I 双酶切 PCR 产物和 pEGFP-C1 载体(分别置于紫外分析仪下观察结果,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物 TMEM88 于 0.5 ml 的离心管中混匀,37 °C 水浴 4 ~ 6 h)。先对酶切回收的载体进行克隆碱性磷酸酶处理,再进行粘性末端连接,然后进行连接产物的转化、挑菌、摇菌、质粒小抽,酶切鉴定后,送至上海生工公司鉴定测序。

1.2.2 转染 pEGFP-C1-TMEM88 质粒 6 孔板中培养 RAW264.7 细胞,待长至 60% 时,弃去培养基, PBS 清洗 3 次。在 1.5 ml EP 管中, A 液:200 μl 的 Opti-MEM 加 pEGFP-C1-TMEM88 真核表达质粒 1 μg; B 液:200 μl 的 Opti-MEM 加 Lipofectamine™ 2000 脂质体 4 μl 将 AB 液混匀静置 20 min 后加入细胞中,再用 Opti-MEM 补至 2 ml。转染 6 h 后,更换含血清培养基继续培养 48 h 后提取蛋白。

1.2.3 Western blot 实验 弃去 6 孔板中的培养基, PBS 清洗 3 遍,每孔用蛋白裂解液(RIPA 裂解液:PMSF 为 100 : 1) 200 μl 于冰上裂解细胞 30 min,提取蛋白。利用 Thermo NanoDrop 2000 分光光度计检测蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳,在恒流 200 mA 条件下湿转 60 min,5% 牛奶中封闭 3 h,孵育一抗 β-actin、TMEM88 过夜,室温孵育二抗 1 h,显影试剂盒 ECL 中 A 液与 B 液 1 : 1 混合后,即可显影拍照。

1.2.4 MTT 测细胞增殖 将 RAW264.7 细胞以每孔 5 000 的数量接种至 96 孔培养板中,待细胞长至 70 % 时开始转染。每孔转染约 70 ng pEGFP-C1-TMEM88 质粒 6 h 后更换培养基。再培养 48 h 后每孔加入 20 μl MTT 4 h 后,用 5 ml 注射器弃去培养基,每孔加入 150 μl DMSO,充分裂解 10 min 后,测定吸光度,计算细胞存活率。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 将 RAW264.7 细胞接种至 6 孔板中,分别转染对照组空载体和 pEGFP-C1-TMEM88 质粒。48 h 后收集细胞上清液, PBS 清洗 3 次,胰酶消化细胞并收集于 15 ml 离心管中。每组用 400 μl Binding Buffer 重悬细胞,并加入 5 μl Annexin V 染液,避光孵育 15 min,然后加入 10 μl PI,避光孵育 5 min,流式仪器检测细胞凋

亡率,观察并记录。

1.2.6 ELISA 检测炎症因子 将 RAW264.7 细胞接种至 6 孔板中,分别转染对照组空载体和 pEGFP-C1-TMEM88 质粒。每孔转染 1 μg 的 pEGFP-C1-TMEM88 质粒 6 h 后换成含血清的培养基,48 h 后收集细胞上清。用 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中炎症细胞因子 IL-6、TNF-α 的表达。

1.2.7 实验分组 正常组(N 组):不经任何处理的正常细胞分组;对照组(Control 组):转染空载体 pEGFP-C1 的对照组;TMEM88 组:转染 pEGFP-C1-TMEM88 质粒的过表达组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验两两比较,多组比较采用单因素方差分析检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pEGFP-C1-TMEM88 真核表达质粒构建成功

在小鼠肝细胞 AML-12 中提取 RNA,逆转录后 PCR 扩增 TMEM88 的编码序列(coding sequence, CDS),利用 Hind III、Kpn I 双酶切扩增产物和 pEGFP-C1 载体,并用 T4 DNA 连接酶连接两产物。将其转化到感受态大肠杆菌 TG1,用抽提试剂盒提取质粒。酶切鉴定(Hind III、Kpn I 双酶切)结果显示,重组质粒酶切后得到两条亮带,一条大小约 4 700 bp,大小与 pEGFP-C1 的酶切产物基本一致,另一条大小约 480 bp,大小与 TMEM88 的 PCR 产物基本一致,表明 pEGFP-C1-TMEM88 质粒连接成功,将阳性克隆送至上海生工公司鉴定测序, pEGFP-C1-TMEM88 质粒成功构建,见图 1。

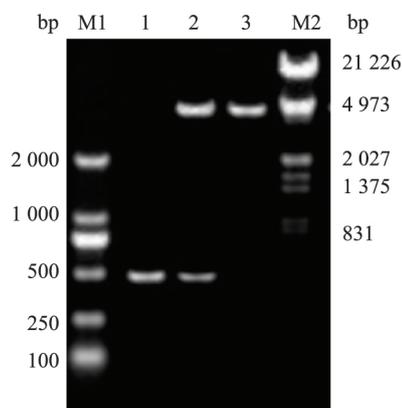


图 1 重组质粒 pEGFP-C1-TMEM88 的酶切鉴定

M1:DL2000 DNA Marker; M2:Lambda DNA Marker;1:TMEM88 的 PCR 产物;2:pEGFP-C1-TMEM88 的酶切鉴定;3:pEGFP-C1 的酶切鉴定

2.2 pEGFP-C1-TMEM88 真核表达质粒的表达

将 pEGFP-C1-TMEM88 表达质粒转染至 RAW264.7 细胞中,利用 Western blot 检测其蛋白表达情况。结果显示,过表达质粒组的 TMEM88 的蛋白表达量明显高于 Control 组 ($F = 134.64, P < 0.01$);当用 TMEM88 抗体免疫印迹时,过表达 TMEM88 组分别在约 17 ku (内源性 TMEM88) 和 44 ku (GFP-TMEM88 过表达,即 27 ku + 17 ku) 显现蛋白印迹,而 Control 组仅在约 17 ku (内源性 TMEM88) 的显现蛋白印迹,表明 pEGFP-C1-TMEM88 能够成功表达,见图 2。

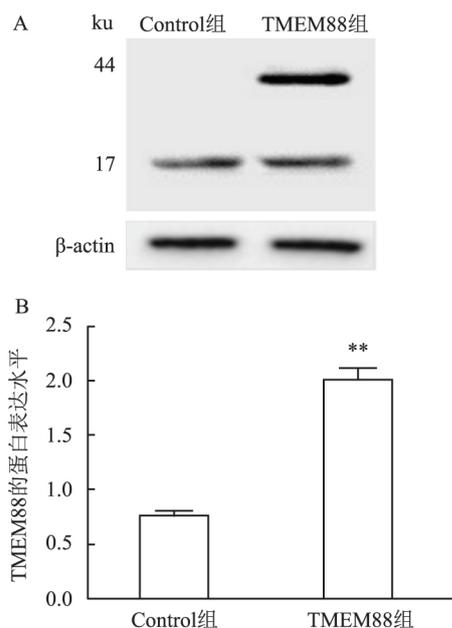


图2 重组质粒 pEGFP-C1-TMEM88 的蛋白表达

A: Western blot 检测重组质粒 pEGFP-C1-TMEM88 的蛋白表达;
B: TMEM88 蛋白表达图;与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 TMEM88 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

MTT 检测将 pEGFP-C1-TMEM88 表达质粒转染至 RAW264.7 细胞后的细胞增殖情况。结果显示 48 h 后 N 组和 Control 组的细胞增殖率分别为 (0.95 ± 0.05) 和 (0.94 ± 0.06) ,过表达 TMEM88 组的细胞增殖率为 (0.71 ± 0.04) ,显著低于 N 组和 Control 组 ($F = 21.55, P < 0.01$),见图 3。

2.4 TMEM88 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响

将生长对数期的 RAW.264.7 细胞中转染 pEGFP-C1-TMEM88 质粒 48 h 后用凋亡试剂盒在流式仪上检测细胞凋亡率。结果显示, N 组的细胞凋亡率为 $(6.72 \pm 0.92)\%$, Control 组的细胞凋亡率为 $(7.78 \pm 1.67)\%$,过表达 TMEM88 组的细胞凋亡率为

$(11.52 \pm 1.43)\%$,显著高于 Control 组 ($F = 10.07, P < 0.05$),结果显示,过表达 TMEM88 后,能够促进 RAW.264.7 细胞的凋亡,见图 4A、4B。

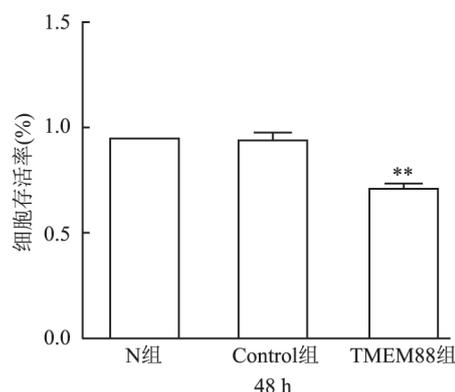


图3 重组质粒 pEGFP-C1-TMEM88 对 RAW264.7 细胞增殖影响与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

2.5 TMEM88 在 RAW264.7 细胞中对炎症因子分泌的影响

在 RAW264.7 细胞中转染 pEGFP-C1-TMEM88 质粒,ELISA 检测细胞上清液中 IL-6、TNF- α 炎症因子的表达。转染后的过表达组中的 IL-6 表达较 Control 组升高 ($F = 18.78, P < 0.05$);TNF- α 的表达较 Control 组升高 ($F = 22.77, P < 0.05$),表明在 RAW264.7 细胞中, TMEM88 促进炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达。见图 5。

3 讨论

TMEM88 是一种定位在 17 号染色体,分子量约为 17 ku 的双跨膜蛋白,其 CDS 序列长度为 477 bp,由 159 个氨基酸残基组成的编码^[4-5]。通过抑制 Wnt/ β -连环蛋白经典通路^[6],抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,从而抑制肿瘤的形成等^[7]。而肿瘤又与炎症密切相关^[2],所以课题组探究在 RAW264.7 细胞中, TMEM88 对炎症因子 IL-6、TNF- α 表达及其对细胞增殖凋亡的影响。RAW264.7 细胞是研究病原菌感染吞噬、自噬、黏附后递呈抗原的常用细胞株^[8],具有很强的黏附和吞噬抗原的能力,其中主要研究的炎症细胞因子有 IL-6、TNF- α ^[9]。TNF- α 可由单核巨噬细胞、中性粒细胞、脂肪组织、肝细胞、Kupffer 细胞等多种组织和细胞分泌。体内 IL-6 可由免疫细胞、内皮细胞、脂肪细胞、肝细胞分泌^[10]。综上, IL-6 和 TNF- α 与炎症的发生发展有关。大量实验表明抑制这些炎症因子的分泌有助于炎症的治疗^[11]。

课题组前期构建了人源 pEGFP-C2-TMEM88 真

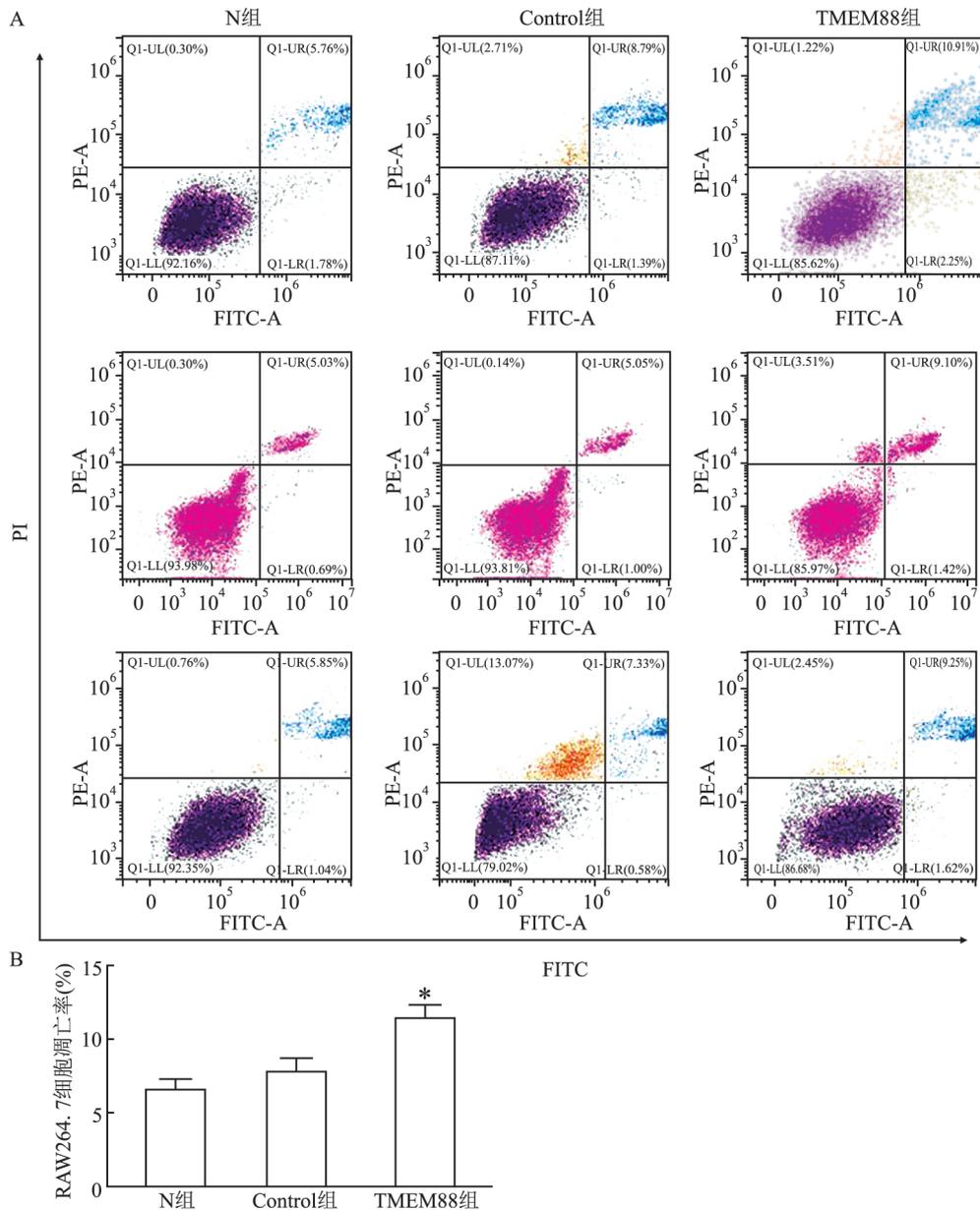


图4 重组质粒 pEGFP-C1-TMEM88 对 RAW264.7 细胞凋亡的影响

A: 过表达 TMEM88 流式细胞术检测结果; B: 细胞凋亡率柱状图; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

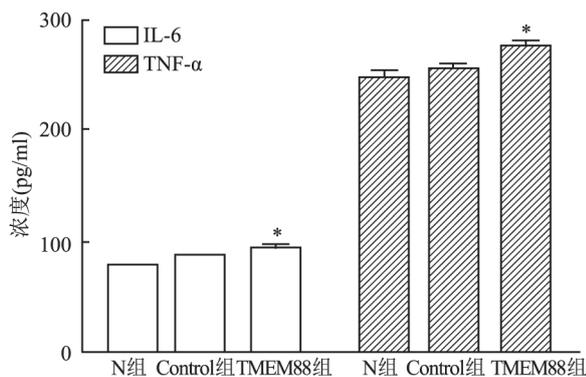


图5 重组质粒 pEGFP-C1-TMEM88 转染后 ELISA 检测炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达

与 Control 组比较: * $P < 0.05$

核表达质粒, 研究了其对肝癌细胞增殖和凋亡的影响, 并已发表^[7]。在此基础上为了深入了解 TMEM88 的功能, 该研究构建了鼠源 pEGFP-C1-TMEM88 的真核表达质粒, 质粒构建酶切图和 Western blot 结果显示质粒成功构建和表达, 接下来研究 TMEM88 对细胞增殖的影响。MTT 结果显示 48 h 后, N 组的细胞增殖率为 (0.95 ± 0.05) ; Control 组的细胞增殖率为 (0.94 ± 0.06) ; 过表达 TMEM88 组的细胞增殖率为 (0.71 ± 0.04) , 显著低于 N 组 ($F = 21.55, P < 0.01$)。结果表明, 过表达 TMEM88 能够明显抑制 RAW264.7 细胞的增殖。细胞凋亡检

测结果显示: N 组的细胞凋亡率为 (6.72 ± 0.92)% , Control 组的细胞凋亡率为 (7.78 ± 1.67)% , 过表达 TMEM88 组的细胞凋亡率 (11.52 ± 1.43)% , 显著高于 Control 组 ($F = 10.07$, $P < 0.05$) 过表达 pEGFP-C1-TMEM88 后的细胞凋亡率显著高于 N 组。表明过表达 TMEM88 能够显著促进 RAW.264.7 的凋亡。ELISA 结果显示: 过表达 TMEM88 后, IL-6、TNF- α 的表达升高。表明 TMEM88 促进炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达。据文献^[12]显示, TNF- α 和 IL-6 有明显的肝脏毒性, 可引起肝细胞坏死, 造成肝功能损伤。因为 IL-6 和 TNF- α 二者均能激活 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞, 单核巨噬细胞和自然杀伤细胞与肝细胞膜受体发生免疫应答反应, 造成肝细胞坏死。因此研究 IL-6 和 TNF- α 的表达对今后研究 TMEM88 在肝脏上炎症的表达奠定了基础。该研究结果表明 TMEM88 在 RAW264.7 细胞的增殖和凋亡中起关键作用, 抑制细胞的增殖并促进细胞的凋亡, 且对炎症具有一定的促进作用。这为今后炎症的治疗打下了坚实的基础, 课题组将继续深入探讨 TMEM88 与炎症的关系及机制。

参考文献

- [1] Zhang X, Yu X, Jiang G, et al. Cytosolic TMEM88 promotes invasion and metastasis in lung cancer cells by binding DVLS [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(21):4527-37.
- [2] Karan D. Inflammasomes: emerging central players in cancer im-

- munology and immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:3028.
- [3] Cai S P, Cheng X Y, Chen P J, et al. Transmembrane protein 88 attenuates liver fibrosis by promoting apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells [J]. *Mol Immunol*, 2016, 80:58-67.
- [4] Ge Y X, Wang C H, Hu F Y, et al. New advances of TMEM88 in cancer initiation and progression, with special emphasis on Wnt signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1):79-87.
- [5] Palpant N J, Pabon L, Rabinowitz J S, et al. Transmembrane protein 88: a Wnt regulatory protein that specifies cardiomyocyte development [J]. *Development*, 2013, 140(18):3799-808.
- [6] Gao C, Chen Y G. Dishevelled: the hub of Wnt signaling [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(5):717-27.
- [7] 倪升丽, 胡富勇, 李增, 等. TMEM88 真核表达质粒的构建及其功能研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(6):839-42.
- [8] 方瑶, 毛旭虎. 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的培养技巧及经验总结 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(22):4358-9.
- [9] 陈哲林, 许金诚. 心力衰竭患者血清肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 6 和白细胞介素 6 受体水平的测定及临床意义 [J]. *广东医学院学报*, 2002, 20(4):276-81.
- [10] 王璞, 刘江文, 仝德峰, 等. 15-脱氧前列腺素 J2 对脂肪肝大鼠肝组织过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 表达的影响 [J]. *临床荟萃*, 2013, 28(4):412-5, 356.
- [11] Zeng T, Zhang C L, Xiao M, et al. Critical roles of kupffer cells in the pathogenesis of alcoholic liver disease: from basic science to clinical trials [J]. *Front Immunol*, 2016, 7:538.
- [12] 吴泽建, 雷正明, 黎靖, 等. TNF- α 、IL6 与肝储备功能关系的探讨 [J]. *泸州医学院学报*, 2001, 24(6):483-5.

Construction and functional analysis of mouse pEGFP-C1-TMEM88 eukaryotic expression plasmid

Li Liangyun¹, Pan Linxin², Yang Junfa¹, et al

(¹The School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²The School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct a mouse derived pEGFP-C1-TMEM88 expression plasmid and observe its expression of inflammatory factors in RAW264.7 cells and its effect on cell proliferation and apoptosis. **Methods** RNA was extracted from AML-12 cells and reversely transcribed into cDNA. At the same time, the primers were diluted to 10 $\mu\text{mol/L}$ and the rest were used as storage fluid. TMEM88 was amplified by PCR technology and identified. The AxyPrep DNA gel recovery kit was used for the purification and recovery of PCR products. The PCR products and carriers were recovered by enzyme digestion. After enzyme digestion and identification, it was sent to be sequenced. The constructed plasmids were transfected into RAW264.7 cells. The effects of TMEM88 on cell proliferation and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry, and the expressions of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in RAW264.7 cells were detected by ELISA. **Results** Sequencing results showed that pEGFP-C1-TMEM88 eukaryotic expression plasmid was successfully constructed. The results of MTT assay showed

半乳糖凝集素-1 对 LTA 诱导巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的抑制及机制探讨

陈方方, 王木子, 吕允相, 刘荣玉

摘要 目的 研究半乳糖凝集素-1 (Gal-1) 对金黄色葡萄球菌脂磷壁酸 (LTA) 诱导 Raw264.7 细胞 NLRP3 炎症小体活化的影响及初步机制。方法 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色 (MTT) 法检测不同浓度重组小鼠源半乳糖凝集素-1 (rmGal-1) 对细胞活力的影响; 建立 LTA 诱导的小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 炎症模型, 分别用 rmGal-1 和 NF- κ B 抑制剂 JSH-23 预处理 Raw264.7 细胞。激光共聚焦显微镜观察细胞内 P-p65 及 NLRP3 的表达; Western blot 法进一步检测细胞中 p65、P-p65、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 Pro-Caspase-1 的蛋白表达水平。结果 rmGal-1 浓度 0.04 μ g/ml ~ 0.4 μ g/ml 时对 Raw264.7 细胞活力无明显影响; 在 LTA 刺激的 Raw264.7 巨噬细胞中, 内源性 Gal-1 和 NLRP3 的蛋白表达水平呈时间性依赖增加, 并在 3 h 到达高峰; rmGal-1 预处理后显著抑制 P-p65、NLRP3、ASC 及 Caspase-1 表达。同样地, 作为阳性对照, JSH-23 预处理后, P-p65、NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的表达水平显著下调。结论 Gal-1 可能通过 NF- κ B-NLRP3 信号通路抑制 LTA 诱导的巨噬细胞炎症。

关键词 LTA; NLRP3 炎症小体; Gal-1; NF- κ B; 巨噬细胞

中图分类号 R 392.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1870-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.007

2019-07-31 接收

基金项目: 安徽省重点实验室计划项目 (编号: 1206c0805028); 国家临床重点专科建设项目 (编号: 卫办医政函[2012]649号)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院老年呼吸内科, 合肥 230022

作者简介: 陈方方, 女, 硕士研究生;

刘荣玉, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: RongyuLiu@163.com

炎症小体是细胞在感染或应激情况参与机体先天免疫防御的一种分子平台, 在协助机体抵御病原体感染和组织损伤中发挥重要作用^[1]。目前已发现的炎症小体主要有 4 种, 即 NLRP1、NLRP3、IPAF 和 AIM2。研究^[1]认为 NLRP3 炎症小体是目前最具有特征的炎症小体, 是由 NLRP3、ASC (PYCARD) 和 Caspase-1 组成。NLRP3 炎症小体通过识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 或者宿主来源的危险信号分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMP) 招募和激活促炎症蛋白酶 Caspase-1; 活化的 Caspase-1 切割 IL-1 β 和 IL-18 的前体, 产生相应的成熟细胞因子 IL-1 β 和 IL-18, 诱导炎症发生。因此, 基于 NLRP3 炎症小体的抗炎药物开发及作用机制的研究对于炎症相关疾病的防治具有重要意义。

半乳糖凝集素-1 (galectin-1, Gal-1) 是动物半乳糖凝集素家族中的一员, 可通过识别 β -半乳糖来发挥广泛的抗炎及免疫调节作用^[2], 近年来研究^[3]发现在先天性免疫反应中, Gal-1 通过抑制促炎症细胞因子的合成, 抑制中性粒细胞运输, 靶向抑制嗜酸性粒细胞迁移并促进其凋亡, 抑制肥大细胞脱颗粒, 并且可以通过控制 L-精氨酸的代谢及减少 NO 的产生诱导骨髓巨噬细胞向 M2 型分化, 从而发挥抗炎作用。Gal-1 在巨噬细胞炎症中具有广泛的抗炎作用, 但具体的分子机制仍不明了。因此, 该研究拟通过探讨重组鼠源性半乳糖凝集素-1 (recomblant mouse galectin-1, rmGal-1) 干预对金黄色葡萄球菌脂

that the cell proliferation rate of the TMEM88 overexpressed group (0.71 ± 0.04) significantly lower than that in control group (0.94 ± 0.06) ($F = 21.55$, $P < 0.01$) after 48 hours of transfection. The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of TMEM88 overexpressed cells group (11.52 ± 1.43)% was significantly higher than that in control group (7.78 ± 1.67)% ($F = 10.07$, $P < 0.05$). ELISA results showed that the expressions of IL-6 and TNF- α in RAW264.7 cells transfected with pEGFP-C1-TMEM88 plasmid was higher than that in normal group. **Conclusion** TMEM88 can significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of RAW264.7 cells. Moreover, TMEM88 promotes the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in RAW264.7 cells, laying a foundation for further understanding the function of TMEM88.

Key words pEGFP-C1-TMEM88; RAW264.7; proliferation; apoptosis; interleukin 6; tumor necrosis factor- α