

ToxoROP16_{I/III} 诱导 M2 型巨噬细胞 偏移抑制 M1 分泌炎性细胞因子的研究

徐永伟¹, 李 路¹, 武 艺¹, 章文慧¹, 邢瑞欣¹, 罗庆礼², 沈继龙², 陈 熙¹

摘要 目的 研究慢病毒介导弓形虫效应分子 ROP16_{I/III} (ToxoROP16_{I/III}) 经旁路途径诱导巨噬细胞 RAW264.7 (M ϕ) 向 M2 型巨噬细胞偏移 (M2), 抑制经典途径激活巨噬细胞 (M1) 炎性因子的产生。方法 构建表达 ROP16_{I/III} 的重组慢病毒, 转染 M ϕ , 通过激活旁路途径向 M2 型细胞偏移。脂多糖 (LPS) 诱导 M ϕ 通过经典途径向 M1 型巨噬细胞偏移。M1 和 M2 细胞进行混合培养。用 qRT-PCR 检测 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1、IL-10、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和精氨酸酶 1 (Arg-1) 的表达。Western blot 检测 ROP16_{I/III}、iNOS、Arg-1 和 PD-L2 的蛋白表达。结果 构建 ROP16_{I/III} 重组慢病毒并成功稳转 M ϕ , 观察可见绿色荧光表达; Arg-1、PD-L2 蛋白和 TGF- β 1、IL-10、Arg-1 的 mRNA 表达升高, 表明 ROP16_{I/III} 诱导了 M2 的偏移。LPS 刺激后, qRT-PCR 检测巨噬细胞的 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达上调, iNOS mRNA 和蛋白表达同时升高, 显示 M1 表型细胞特征。在 M1 和 M2 细胞混合培养中, M1 型细胞分泌的上述促炎因子表达显著降低。结论 ToxoROP16_{I/III} 可驱动巨噬细胞向 M2 型偏移, 能明显下调 M1 型细胞分泌炎性细胞因子。

关键词 ToxoROP16_{I/III}; 经典激活途径; 旁路激活途径; 偏移

中图分类号 R 385

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1354-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.005

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*, Tg) 是一种机会致病性的专性有核细胞内寄生原虫, 且全球广泛传播, 可以感染几乎所有温血动物。已知来源于北美及欧洲人兽弓形虫虫株主要有三个基因型, 即 Type I、II 和 III 型; 而中国则以 Chinese 1 (ToxoDB#

9) 型为优势基因型^[1]。弓形虫株毒力与不同基因型携带的效应分子多态性密切相关^[2]。弓形虫侵入宿主细胞后释放的多态性效应分子蛋白主要包括棒状体蛋白家族 (ROPs family, ROPs) 和致密体蛋白家族 (GRAs family, GRAs), 线状体和类锥体等多种毒力效应分子^[3]。弓形虫 I 和 III 型虫株分泌的 ROP16 蛋白可以通过旁路激活途径, 直接磷酸化信号传导与转录激活因子-3 (signal transducer and activator of transcription-3, Stat-3) 和信号传导与转录激活因子-6 (signal transducer and activator of transcription-6, Stat-6) 而激活巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞偏移, 增强精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 的合成增加, 并释放出大量的 IL-4、IL-10 和 TGF- β 1 等细胞因子, 使得 TNF- α 、IL-12 等的生成减少^[4-5], 并能诱导 Th2 型免疫应答。

有研究^[6]证实 LPS 和 IFN- γ 则通过经典途径诱导巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞偏移, 在机体抗感染、抗肿瘤免疫中发挥重要作用。但是过度的 M1 激活及其诱导的 Th1 应答也可导致组织的炎症反应, 且在自身免疫性疾病中造成病理损伤^[7]。有研究^[8]表明, M2 和 M1 细胞在机体的免疫环境中能够进行相互的转化偏移, 使得免疫反应处于一种动态平衡状态中, 影响着疾病的发生和发展。该研究旨在通过慢病毒介导 ToxoROP16_{I/III}, 稳转 RAW264.7 (M ϕ) 并驱动向 M2 型细胞偏移。经过与 M1 型细胞混合培养, 观察 M2 下调炎性细胞因子的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 (RAW264.7, M ϕ), 由安徽医科大学基础医学院微生物学实验室提供, 细胞在含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基中传代培养, 并在 -80 °C 液氮冻存。

1.1.2 重组质粒和慢病毒包装 ToxoROP16_{I/III} (2 124 bp, ToxoDB.org) 来源于 PRU 株 RNA 和 WH3 速殖子 RNA, 构建重组质粒 pEGFP, 定向克隆

2019-05-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81471983); 安徽省高校自然科学基金研究重点项目 (编号: KJ2017A202); 安徽省重点研究与开发计划项目 (编号: 201904a07020043)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院消化内科, 合肥 230022

²安徽医科大学基础医学院微生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 徐永伟, 男, 硕士研究生;

陈 熙, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: ayfychenxi@163.com

pEGFP-ROP16_{I/III}, 重组含有绿色荧光蛋白和嘌呤霉素抗性标记的慢病毒载体。慢病毒由上海吉凯基因包装。

1.1.3 主要试剂 FBS(加拿大 Wistent 公司); 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、DMEM 培养基、甲醛、BCA 试剂盒、RIPA 细胞裂解液(上海碧云天公司); LPS(美国 Sigma 公司); TRIzol(美国 Invitrogen 公司); 硝酸纤维素膜(美国 Bilerica 公司); 小鼠抗兔 Arg-1、内参 β -actin 和山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体(武汉 Proteintech 公司); 兔抗鼠 iNOS 抗体(美国 Abcam 公司); 小鼠抗兔 PD-L2 抗体(美国 Santa Cruz 公司); 引物合成(上海 Sangon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 M ϕ 培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 当细胞达到 80% ~ 90% 时, 进行传代并冷冻。M ϕ 的正常状态是一种圆形的、未伸展的、未分化的状态, 称为初始状态细胞。

1.2.2 重组慢病毒 ROP16_{I/III} 稳转 M ϕ 在 6 孔培养板中每孔加入 1 ml 不含抗生素的完全培养基, 重悬细胞, 总数 2×10^6 个/每孔。设立正常组(M ϕ)、慢病毒空载对照组(Lv-M ϕ) 和慢病毒稳转细胞组(Lv-ROP16_{I/III}-M ϕ)。根据感染复数, 将慢病毒稀释至滴度为 1×10^8 TU/ml, 并加入细胞转染增强试剂进行慢病毒转染。转染后将细胞至于原有的条件下 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。8 ~ 12 h 以后根据细胞状态, 更换为新的完全培养基。在转染 2 ~ 3 d 后, 观察转染的细胞。因绿色荧光蛋白包含在 ROP16_{I/III} 的慢病毒质粒内, 则可在荧光显微镜下观察到细胞发出绿色荧光。

1.2.3 Western blot 检测 将上述细胞进行分组后, 收集经过稳定转染的 M ϕ , 将预冷的 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次, 根据说明书, 按照每孔 150 μ l 的体积加入细胞裂解液, 反复吹打, 同时在冰上敷 10 min, 然后 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 5 min, 上清液即细胞总蛋白溶液, BCA 法测蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 胶, 根据蛋白浓度进行上样, 电泳(60 V 50 min、110 V、60 min), 转模(110 V、90 min), 用溶于 TBST 的 5% 脱脂牛奶进行封闭, 并且在室温的条件下进行孵育 1 h 后, 加入 ROP16_{I/III} (1 : 500)、Arg-1 和 iNOS (1 : 1 000)、PD-L2 (1 : 1 500) 小鼠单克隆抗体, 室温孵育 1 h, 置于 4 °C 环境中过夜, 过夜后用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 随即加入相应二

抗(1 : 1 500), 室温孵育 1 h, 孵育完成后用 TBST 洗涤。加入显影液后, 进行拍照分析。并分析条带灰度值。

1.2.4 qRT-PCR 检测 mRNA 水平的变化 每组细胞收集后, 加入 PBS 重悬细胞进行清洗, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清液, 将细胞置于冰上提取细胞总 RNA, 每管加入 1 ml TRIzol 进行细胞裂解, 提取总 RNA 样品, 进行反转录获得 cDNA 等操作的方法均根据试剂盒说明书进行。反应条件为: 预变性(94 °C、变性 3 ~ 5 min), 变性(94 °C、变性 1 min), 退火(50 ~ 60 °C 退火 1 min), 延伸(70 ~ 75 °C、延伸 1 min), 循环重复变性至延伸步骤, 延伸补平(70 ~ 75 °C 延伸 10 min), 4 °C 终止。以 β -actin 为内参, 引物见表 1。

表 1 引物序列

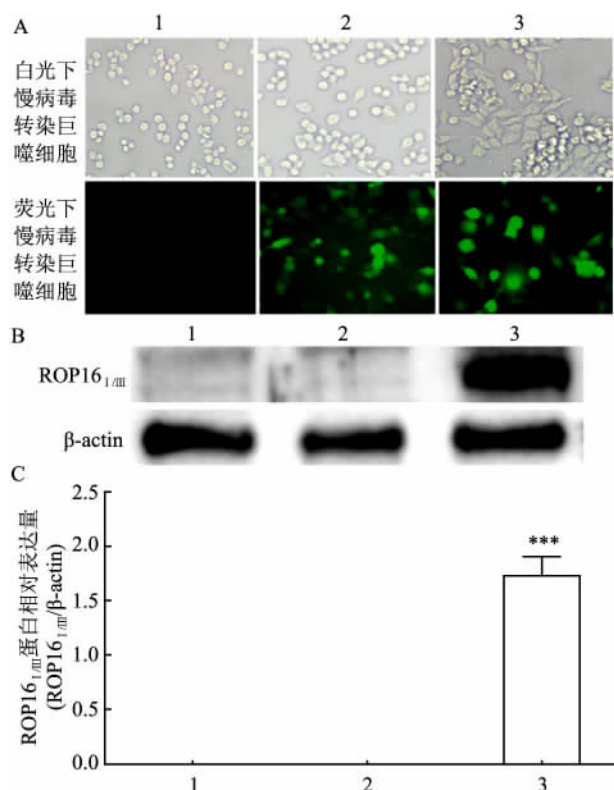
基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
IL-10	GCTCCTAGAGCTGCGGACT TGTGTGCCAGCTGGTCCTTT	71
TGF- β 1	CTGGATACCAACTACTGCTTCAG TTGGTTGTAGAGGGCAAGGACCT	126
TNF- α	ACGGCATGGATCTCAAAGAC TTGGTTGTAGAGGGCAAGGACCT	161
IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG CATTTCCACGATTTCCAGAG	145
IL-1 β	GCTGCTTCCAAACCTTTGAC AGCTTCTCCACAGCCACAAT	126
iNOS	CACCTTGGAGTTTACCCACT ACCACTCGTACTTGGGATGC	127
Arg-1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG AGGAGCTATCATTAGGGACATC	185
β -actin	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC TAAACCGCAGCTCAGTAACACTCCG	189

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA) 对组间同一参数进行比较, 以 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒 ROP16_{I/III} 转染 M ϕ 使用空载慢病毒和重组慢病毒 ROP16_{I/III} 稳定转染入 M ϕ 细胞, 并使用荧光显微镜观察荧光蛋白表达情况以及通过 Western blot 技术分析, Lv-ROP16_{I/III} 成功转入细胞内。通过灰度值进行计算, 与空载慢病毒组比较, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 1。

2.2 LPS 刺激 M ϕ 偏移 提取细胞总蛋白和细胞总 RNA 进行检测分析, 其中 Western blot 结果显示,

图1 重组慢病毒 ROP16_{I/III} 稳定转染 Mφ 细胞

A: 荧光显微镜下观察慢病毒稳转情况 ×40; B: Western blot 检测慢病毒 ROP16_{I/III} 转入细胞内; C: 灰度值计算慢病毒 ROP16_{I/III} 稳转; 1: Mφ 组; 2: Lv-Mφ 组; 3: Lv-ROP16_{I/III}-Mφ 组; 与 Mφ 组比较: *** $P < 0.001$

与正常组 (Mφ 组) 比较, LPS + Mφ 组中 iNOS (1 :

1 500) 表达显著升高, 差异有统计学意义 ($F = 285.3$, $P < 0.01$)。通过 qRT-PCR 检测 LPS + Mφ 细胞组中的 TNF-α ($F = 39.74$, $P < 0.001$)、IL-1β ($F = 30.9$, $P < 0.001$) 和 iNOS ($F = 12.2$, $P < 0.001$) 的 mRNA 的表达显著升高, 差异有统计学意义。表明 LPS 刺激 Mφ 向 M1 型炎性细胞方向偏移。见图 2。

2.3 重组慢病毒 Lv-ROP16_{I/III} 稳转 Mφ 偏移 提取细胞总蛋白和细胞总 RNA 进行检测分析, 其中 Western blot 结果显示 Lv-ROP16_{I/III}-Mφ 细胞组中的 Arg-1 (1 : 1 500) 见图 3A, PD-L2 (1 : 1 000) 见图 3B, 与空载慢病毒组 Lv + Mφ 组比较, Arg-1 ($F = 5.8$, $P < 0.05$) 和 PD-L2 ($F = 4.15$, $P < 0.1$) 显著增高, 差异有统计学意义。通过 qRT-PCR 检测 Lv-ROP16_{I/III}-Mφ 组中的 IL-10、TGF-β1 和 Arg-1 的 mRNA 的表达, 与空载慢病毒组的 Lv-Mφ 组比较, IL-10 ($F = 43.1$, $P < 0.01$)、TGF-β1 ($F = 30.2$, $P < 0.01$) 和 Arg-1 ($F = 29.4$, $P < 0.01$) 表达显著升高, 差异有统计学意义。表明重组慢病毒 Lv-ROP16_{I/III} 稳转 Mφ 向 M2 型巨噬细胞偏移。见图 3。

2.4 Western blot 测 M1 和 M2 混合培养 iNOS、Arg-1 和 PD-L2 表达 M1 和 M2 细胞进行混合培养, 通过 Western blot 检测 M1 + M2 混合培养细胞组中的 Arg-1 和 PD-L2 的蛋白表达稳定, 与 LPS + Mφ 组比较, Arg-1 ($F = 37.33$, $P < 0.001$) 和 PD-L2 ($F = 303.3$, $P < 0.001$) 表达明显升高, 差异有统计学意义, 而与 LPS + Mφ 组比较, iNOS 蛋白表达降低 ($F = 179.3$, $P < 0.01$),

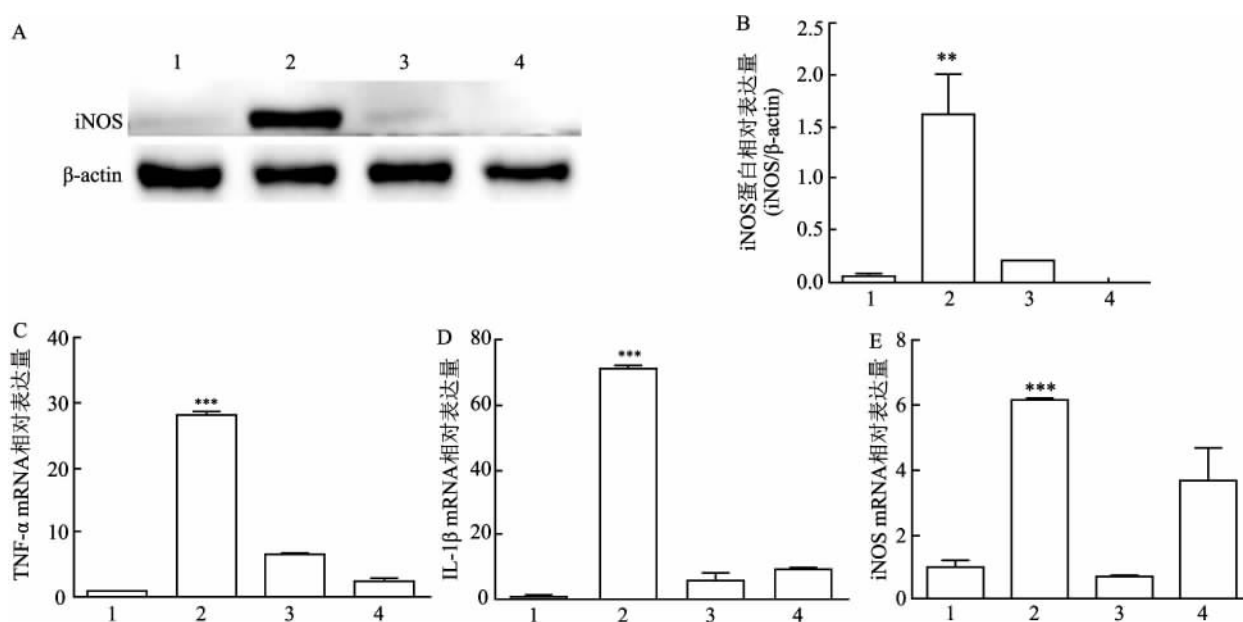
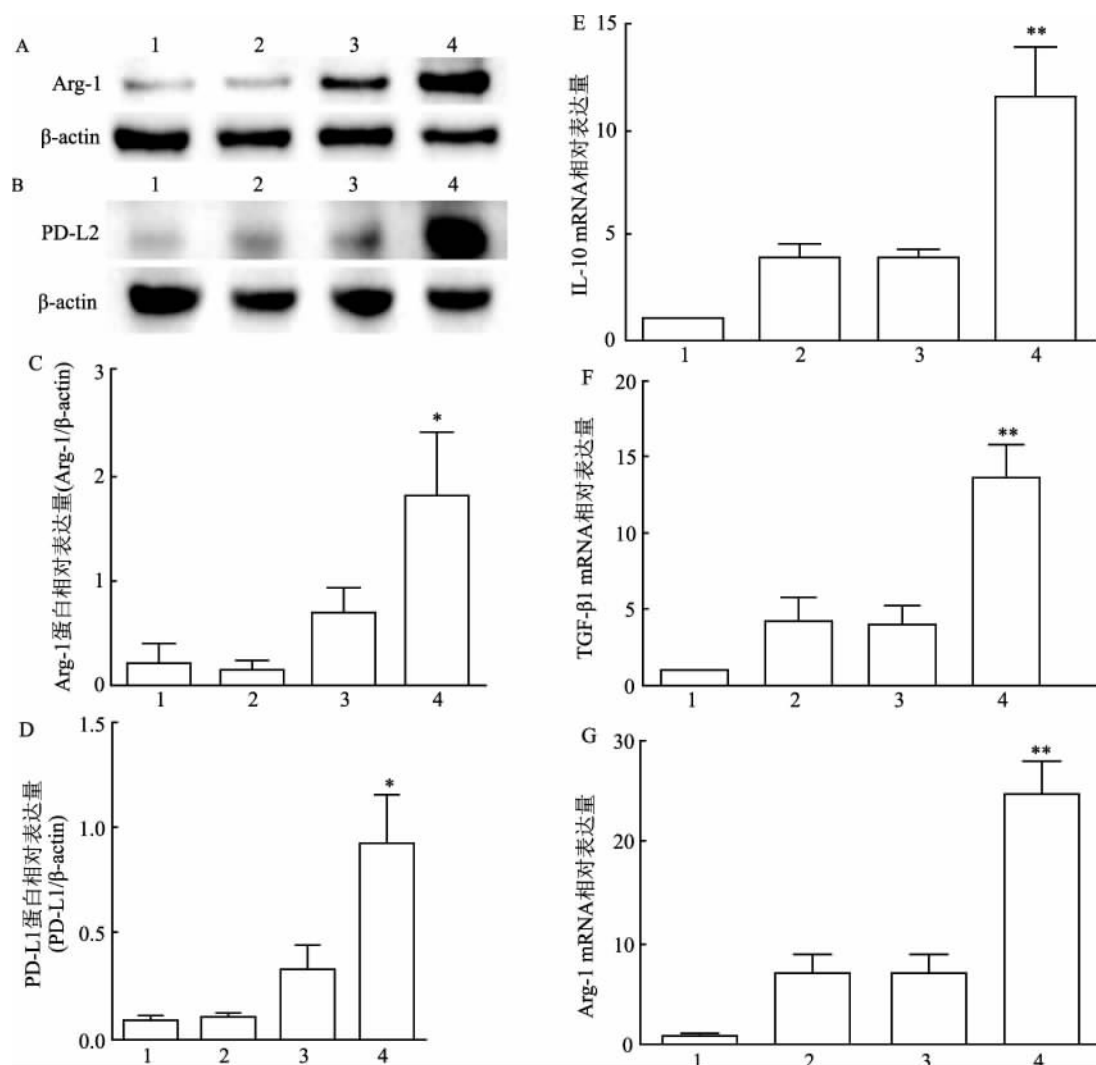


图2 LPS 刺激 Mφ 向 M1 型细胞偏移

A: Western blot 检测 iNOS 蛋白的表达; B: 灰度值计算 iNOS 的值; C、D、E: 检测 M1 型细胞中 TNF-α、IL-1β、iNOS 的 mRNA 表达情况; 1: Mφ 组; 2: LPS + Mφ 组; 3: Lv-Mφ 组; 4: Lv-ROP16_{I/III}-Mφ 组; 与 Mφ 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图3 Lv-ROP16_{I/III} 稳转 Mφ 向 M2 型细胞偏移

A: Western blot 检测 Arg-1 蛋白的表达; B: Western blot 检测 PD-L1 蛋白的表达; C、D: 分别使用灰度值计算 Arg-1 和 PD-L1 的值; E、F、G: 检测 M2 型细胞中 IL-10、TGF-β1 和 Arg-1 的 mRNA 表达; 1: Mφ 组; 2: LPS + Mφ 组; 3: Lv-Mφ 组; 4: Lv-ROP16_{I/III}-Mφ 组; 与 Lv-Mφ 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

差异有统计学意义。见图 4。

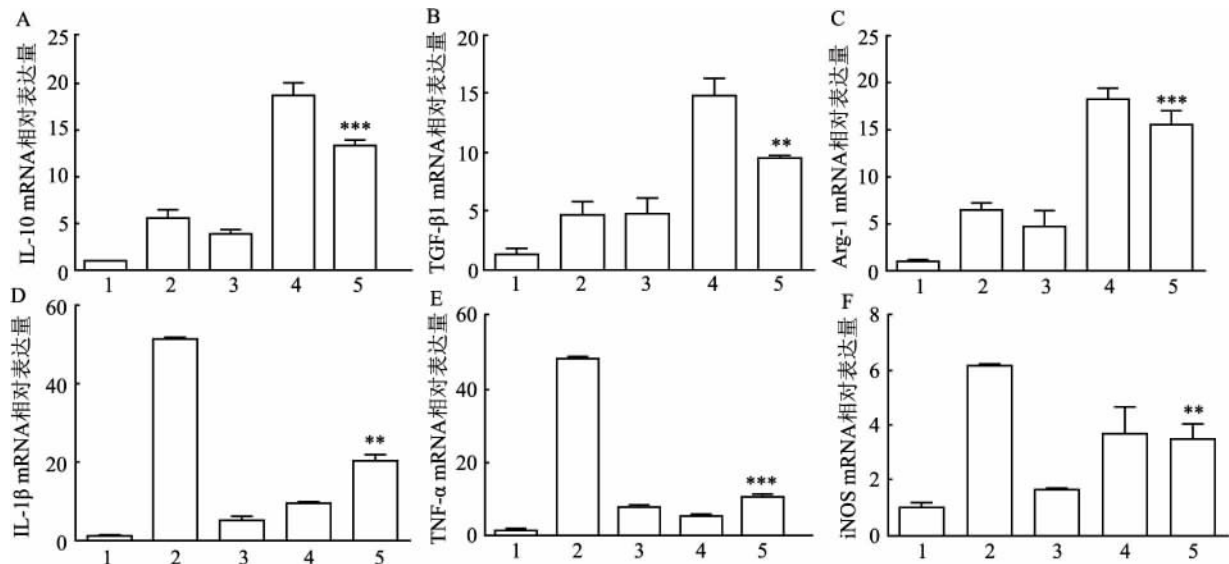
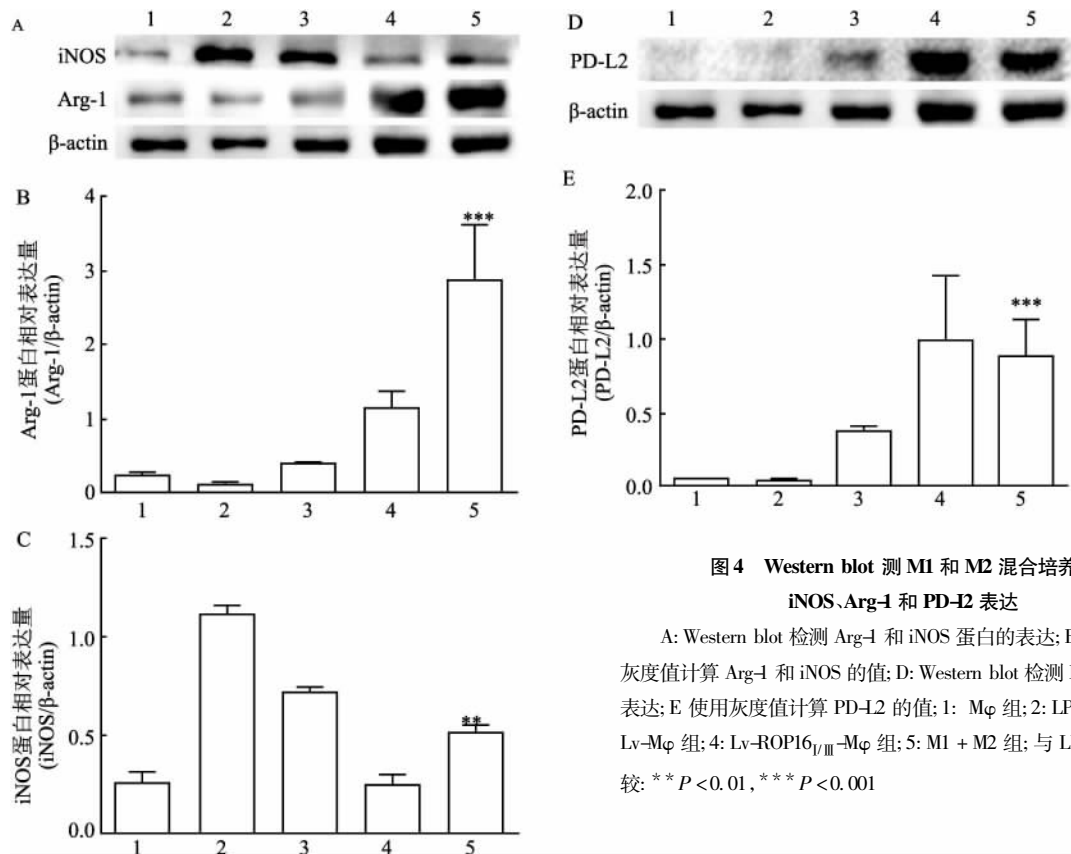
2.5 qRT-PCR 测 M1 和 M2 混合培养 IL-1β、TNF-α 和 iNOS 表达 提取细胞总 RNA, 通过 qRT-PCR 法进行检测分析, M1 + M2 细胞组中 IL-10、TGF-β1 和 Arg-1 的 mRNA 表达与转染慢病毒组相比, 表达稳定。与 LPS + Mφ 组相比, IL-1β ($F = 9.3$, $P < 0.01$)、TNF-α ($F = 2.27$, $P < 0.001$) 和 iNOS ($F = 87.6$, $P < 0.01$) 表达明显降低, 差异有统计学意义。见图 5。

3 讨论

巨噬细胞在机体固有免疫和适应性免疫应答中发挥着关键的作用, 在抵抗病原感染的过程中最先发挥吞噬、降解、抗原递呈以及杀伤病原体等重要作用, 是机体中免疫反应中重要的免疫细胞^[9]。巨噬细胞具有

高度的异质性和可塑性^[10], 在多种病变组织中, 如肿瘤、烧伤、炎症、感染、某些自身免疫性疾病及肥胖等, 都可见大量的 M1/Th1 炎性细胞。这些炎性细胞与疾病的发生、发展及并发症的产生密切相关。

已知单核巨噬细胞在不同的组织微环境状态下, 可向 M1 型或者 M2 型细胞偏移或极化^[11-12]。巨噬细胞极化的状态不同, 在免疫应答中发挥着不同的作用。极化的 M1 型巨噬细胞以分泌促炎因子为主, 如 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-12 等, 具有强大的抗原提呈及吞噬能力, 促进 Th1 免疫应答, 发挥抗胞内病原菌和抗肿瘤的作用, 同时在机体的免疫应答中发挥促炎作用^[13], 但也会对机体造成损伤。M2 型巨噬细胞分泌抗炎细胞因子如 IL-10、IL-13、TGF-β1 以及表达 Arg-1 等, 具有抗炎的免疫调控作用, 能促进组织修复和伤口愈合^[14]。



在某些特定的微环境中,由于巨噬细胞可塑性的特性,可诱导其偏移,从而发挥免疫调节的作用。

弓形虫是一种细胞内寄生虫,具有多样的遗传结构。在动物和人类的调查中发现 Chinese 1 是中国的

优势基因型^[1]。已知I/III型弓形虫分泌的激酶效应分子 ROP16_{I/III}能够直接磷酸化 STAT3/STAT6 转录因子,经旁路激活途径诱导巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化^[15]。在 Th2 炎症反应过程中有 M2 型巨噬细胞聚

集,例如蠕虫感染和哮喘。这些免疫反应与 IL-4 和 IL-13 的产生、嗜酸细胞增多有关^[10]。此外,M2 型巨噬细胞在抑制 Th1 型免疫应答发挥重要作用。

本实验以 LPS 诱导巨噬细胞 M ϕ 向 M1 极化,后者表达炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS mRNA 的表达与正常组相比明显增高;以 ROP16_{I/III} 驱动巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞偏移,后者分泌表达的 IL-10、TGF- β 1 和 Arg-1 的 mRNA 与空载慢病毒相比显著升高,差异有统计学意义。通过体外建立巨噬细胞可塑性模型,探讨虫源性多肽诱导的 M2 对过度的 M1 应答发挥调解作用,旨在为 M1-Th1 型应答相关的炎症以及某些自身免疫性疾病的免疫治疗提供新的思路和策略。

在 M1 和 M2 细胞的混合培养中,ROP16_{I/III} 诱导的 M2 型巨噬细胞分泌的抗炎因子,如 TGF- β 1 和 IL-10 明显升高;而 M1 型炎性细胞分泌的促炎因子如 IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达明显降低,抑制了炎症因子的分泌。这可能与 M2 型细胞逆转 M1 型细胞的偏移有关,而发挥 M2 型细胞的抗炎免疫调节作用^[16]。

本研究中以慢病毒介导的弓形虫棒状体分泌的 ROP16_{I/III} 稳转巨噬细胞,可驱动其向 M2 型巨噬细胞极化,持续分泌抑炎症因子,调解炎症反应。与 IL-4 和 IL-13 相比,ROP16_{I/III} 激活 M2 巨噬细胞偏移更具有靶向性和更高的安全性,因此对于研究 M1-Th1 型免疫应答相关的炎症病理及其干预具有重要理论意义和潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Kang H, Suzuki Y. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain [J]. Infect Immun, 2001, 69(5): 2920-7.
- [2] Cheng W, Wang C, Xu T, et al. Genotyping of polymorphic effectors of *Toxoplasma gondii* isolates from China [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1): 580.
- [3] Taylor S, Barragan A, Su C, et al. A secreted serine-threonine kinase

- determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii* [J]. Science, 2006, 314(5806): 1776-80.
- [4] Behnke M S, Khan A, Wootton J C, et al. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(23): 9631-6.
- [5] Ong Y C, Reese M L, Boothroyd J C. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6 [J]. J Biol Chem, 2010, 285(37): 28731-40.
- [6] Zhou X, Li W, Wang S, et al. YAP aggravates inflammatory bowel disease by regulating M1/M2 macrophage polarization and gut microbial homeostasis [J]. Cell Rep, 2019, 27(4): 1176-89.
- [7] Chkhaidze I, Zirakishvili D, Shavshvishvili N, et al. Prognostic value of TH1/TH2 cytokines in infants with wheezing in a three year follow-up study [J]. Pneumonol Alergol Pol, 2016, 84(3): 144-50.
- [8] Sheu B C, Lin R H, Lien H C, et al. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer [J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2972-8.
- [9] Gordon S. The macrophage: past, present and future [J]. Eur J Immunol, 2007, 37 Suppl 1: S9-17.
- [10] Gordon S, Taylor P R. Monocyte and macrophage heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(12): 953-64.
- [11] Chylikova J, Dvorackova J, Tauber Z, et al. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2018, 162(2): 79-82.
- [12] Soldano S, Pizzorni C, Paolino S, et al. Alternatively activated (M2) macrophage phenotype is inducible by endothelin-1 in cultured human macrophages [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166433.
- [13] Murray P J, Allen J E, Biswas S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20.
- [14] Pello O M, De Pizzol M, Mirolo M, et al. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology [J]. Blood, 2012, 119(2): 411-21.
- [15] Liu Y C, Zou X B, Chai Y F, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(5): 520-9.
- [16] Wynn T A, Chawla A, Pollard J W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease [J]. Nature, 2013, 496(7446): 445-55.

*Toxo*ROP16_{I/III} induces polarization to M2 phenotype of macrophages to inhibit M1 inflammatory cytokines study

Xu Yongwei, Li Lu, Wu Yi, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate lentivirus mediated *Toxoplasma gondii* ROP16_{I/III} (*Toxo*ROP16_{I/III}) induced RAW264.7 macrophage polarization to M2-type macrophage by alternatively activated macrophages cells (M2) inhibits classically activated macrophages cells (M1) inflammatory cytokines. **Methods** Construction of recombinant lentivirus expressed ROP16_{I/III}, transfection of RAW264.7 by activated of the alternatively activated to M2 pheno-

网络出版时间: 2019-8-12 17:30 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190812.1006.006.html>

FAM64A 在肾癌发生发展中的分子机制

张 洋^{1,2}, 李维清², 王 燕^{2,3,4}, 毛龙毅², 周颖琛², 员海超², 桂耀庭^{1,2,3}, 李贤新^{1,2,5}, 欧龙华⁶, 史本涛⁶

摘要 目的 探讨 FAM64A 在肾癌(RCC)组织中异常表达对 RCC 细胞生长的影响及与患者病理分期及预后的关系。**方法** 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 RCC 组织和细胞系中 FAM64A 的表达水平;并通过 χ^2 检验分析了肿瘤基因组图谱(TCGA)数据库 510 例 RCC 病例中 FAM64A 水平与患者病理特征及预后的相关性。通过细胞增殖实验 CCK-8 和 Western blot 方法检测了 FAM64A 对 RCC 细胞增殖和周期及相关标志分子的影响。**结果** FAM64A 在 RCC 组织中的表达量明显高于其配对癌旁组织($P < 0.05$);通过对 TCGA 数据库中 FAM64A 数据分析显示 FAM64A 的表达量与

患者的性别、肿瘤分级及预后有明显的相关性,但与患者的年龄无明显相关性。FAM64A 的沉默可降低 RCC 细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)的表达,延迟细胞 G₂ 期向 M 期转换,进而减慢细胞生长。**结论** FAM64A 在 RCC 中表达明显上调,可能通过调控 Cyclin B1 参与 RCC 的发生。

关键词 FAM64A; Cyclin B1; 肾癌; 细胞增殖; 细胞周期

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1360-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.006

2019-04-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81602229); 深圳市科创委资助项目(编号: JCYJ20170307161640543); 深圳市卫生计生科研项目(编号: SZBC2017021)

作者单位: ¹安徽医科大学北京大学深圳医院临床学院, 深圳 518000

²北京大学深圳医院泌尿外科, 深圳 518000

³广东省男性生殖与遗传重点实验室, 深圳 518000

⁴深圳北京大学香港科技大学医学中心, 深圳 518000

⁵深圳孙逸仙心血管医院特诊科, 深圳 518000

⁶深圳市第二人民医院, 深圳 518000

作者简介: 张 洋, 男, 硕士研究生;

李贤新, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xianxinli@163.com;

桂耀庭, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: guiyaoxing2007@aliyun.com

肾癌(renal cell carcinoma, RCC)是全球范围内十分常见的肿瘤之一,发病率占有所有恶性肿瘤的 3%~4%^[1],约占肾脏恶性肿瘤的 90%^[2],每年超过 20 万例新发病例及 10 万例死亡病例,严重影响人类健康^[3-4]。有研究^[5]认为 RCC 的发生与遗传因素及环境因素相关,但是 RCC 发生发展的分子机制尚不清楚。人类 FAM64A 基因(磷脂酰肌醇结合网格蛋白相互作用有丝分裂调节因子, phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein interacting mitotic regulator, 又名 RCS1 或 CATS),最初研究^[6]显示 FAM64A 基因在小鼠胚胎时期的心肌细胞中高表达,并证明 FAM64A 作为有丝分裂的调节因子调节细胞周期;研究^[7]表明 FAM64A 与细胞增殖密切相关,可能作为一个新的细胞增殖标志物。仅有

type macrophages. Lipopolysaccharide(LPS) induces RAW264.7 polarization to M1 phenotype macrophages by the classically activated pathway. M1 and M2 cells were mixed cultured. Expression of TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1, IL-10, inducible nitric oxide(iNOS) and Arg-1 were detected by qRT-PCR. Expression of ROP16_{I/III}, iNOS, arginine 1(Arg-1) and PD-L2 were detected by Western blot. **Results** Recombinant lentivirus ROP16_{I/III} was stably transformed RAW264.7 and observed green fluorescent expression. The protein of Arg-1 and PD-L2 increased expression and TGF- β 1, IL-10 and Arg-1 mRNA indicated that ROP16_{I/III} induced to M2 cells. TNF- α and IL-1 β mRNA in macrophage were detected by qRT-PCR after stimulation with LPS, and iNOS mRNA and protein were up-regulated at the same time, which showed that induced to M1 phenotype macrophages. In the mixed culture of M1 and M2 cells, the above proinflammatory factors secreted by M1 cells decreased significantly. **Conclusion** ToxoROP16_{I/III} can induce macrophages to M2 cells and down regulate the secretion of inflammatory cytokines by M1 cells.

Key words *Toxoplasma gondii* ROP16_{I/III}; classically activated macrophage; alternatively activated macrophage; polarization