

大鼠免疫球蛋白样转录物 3 过表达腺病毒载体的构建及鉴定

周 恒 唐其柱 邓 伟 袁 园 倪 健 靳亚阁

摘 要 **目的** 构建免疫球蛋白样转录物 3 (immunoglobulin - like transcript 3, ILT3) 过表达腺病毒载体, 以期进一步研究 ILT3 基因功能及其在心血管疾病中的作用。**方法** 针对大鼠 ILT3 设计引物, 通过 PCR 扩增获取目的基因, 以琼脂糖凝胶电泳鉴定, 行胶回收与 PCR 产物纯化。使用限制性内切酶 BamH I 与 Age I 对载体质粒以及纯化后的 PCR 产物进行双酶切, 将酶切后的 PCR 产物与载体连接, 连接产物加入至感受态细胞培养后挑取菌落进行 PCR 鉴定、测序、比对及质粒抽提。将 ILT3 重组质粒与腺病毒辅助包装质粒共转染至 HEK293 细胞, 获取病毒粗提液并进行扩增、纯化, 终点稀释法进行病毒效价检测, 在荧光显微镜下观察腺病毒转染效率。**结果** PCR 与测序鉴定表明 GV314 - ILT3 重组质粒构建成功。终点稀释法测得病毒效价为 1×10^9 PFU/ml, 荧光显微镜下观察显示病毒转染效率较高。**结论** 携带 ILT3 基因的腺病毒载体构建成功, 获取的腺病毒具有较高的效价与转染效率。

关键词 免疫球蛋白样转录物 3 质粒 腺病毒 过表达 基因重组

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.008

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus Vector which Overexpresses Rat Immunoglobulin - like Transcript 3. Zhou Heng, Tang Qizhu, Deng Wei, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To construct recombinant adenovirus vector which overexpresses immunoglobulin - like transcript 3 (ILT3) in order to further study the function of ILT3 and its effect in cardiovascular diseases. **Methods** The primers of rat ILT3 were designed, and the target gene were amplified by PCR and identified by agarose gel electrophoresis. The gel was recovered and PCR products were purified. Digested plasmid vector and PCR products using restriction endonuclease BamHI and ageI were connected and added to competent cells, and the cultured colonies were identified by PCR and sequencing. ILT3 recombinant plasmid and adenovirus packaging plasmid were co - transfected into HEK293 cells, and the obtained adenovirus were amplified and purified. Virus titer were detected using the end-point dilution assay, and the transfection efficiency was observed under the fluorescence microscope. **Results** PCR and sequencing analysis showed that the recombinant plasmid of GV314 - ILT3 was successfully constructed. The virus titer was 1×10^9 PFU/ml and the transfection efficiency was high under fluorescence microscope. **Conclusion** The adenovirus vector which overexpresses ILT3 was constructed successfully, and the obtained adenovirus exhibited high titer and transfection efficiency.

Key words Immunoglobulin - like transcript 3; Plasmid; Adenovirus; Overexpression; Gene recombination

免疫球蛋白样转录物 3 (immunoglobulin - like transcript 3, ILT3) 属于抑制性受体 ILTs 家族成员, 可通过招募蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatases, PTPs) SHP - 1 与 SHP - 2, 介导细胞内多种信号分子的去磷酸化, 抑制细胞的信号转导, 减少炎症

因子的释放, 从而抑制炎症反应^[1, 2]。目前认为炎症反应不仅仅是机体对抗感染、损伤等刺激因素的防御机制, 还与肿瘤、自身免疫疾病密切相关, 甚至在糖尿病、冠心病、心力衰竭等心血管疾病中均发挥重要作用^[3-5]。调控炎症反应是多种慢性疾病的潜在治疗靶点, 发现炎症反应中的关键调节因子并阐明其功能具有重要的医学价值。ILT3 是炎症信号通路的重要抑制性受体, 但其生物学功能及在疾病中的作用研究尚不充分, 本实验通过基因重组技术构建 ILT3 过表达腺病毒载体, 旨在进一步研究 ILT3 基因功能及其在心血管疾病中的作用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81300070, 81270303, 81470516, 81530012); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20130141130010)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院心内科、武汉大学心血管病研究所

通讯作者: 唐其柱, 电子信箱: qztang@whu.edu.cn

材料与方法

1. 实验材料:主要仪器设备为 PCR 仪(2720 thermal cycler)、全自动 DNA 测序仪(3730XL)购自美国 Applied Biosystems 公司,稳压 DNA 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,凝胶成像仪购自上海天能公司,细菌培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司,高速离心机(TGL-16G)购自日本 Hitachi 公司,荧光显微镜(micropublisher 3.3RTV)购自日本 Olympus 公司,CO₂ 培养箱(MCO-175)购自日本 Sanyo 公司,超速离心机(XE-90)购自美国 Beckman 公司。过表达质粒载体为 GV314,元件顺序 CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP,克隆位点 BamH I/Age I,由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。腺病毒辅助包装质粒为 pBHG loxΔE1,3 Cre,购自加拿大 Microbix 公司。腺病毒包装细胞为 HEK293 株,购自美国 ATCC 公司。主要试剂为 In-Fusion™ PCR Cloning Kit(639626)、腺病毒纯化试剂盒(631533)购自美国 Clontech 公司,PrimeSTAR HS DNA polymerase (#R010B)、dNTP(D4030A)购自日本 TaKaRa 公司,Taq polymerase(E001-02B)购自上海 SinoBio 公司,限制性内切酶购自美国 NEB 公司,质粒抽提试剂盒(A1460)购自美国 Promega 公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209-03)购自北京 Tiangen 公司,1kb DNA ladder Marker(#SM0311)购自美国 Fermentas 公司,250bp DNA ladder Marker(DL250+,100T)购自上海 GeneRay 公司,胎牛血清(A11-102)购自上海微科生化试剂有限公司,DMEM(12800-017)购自美国 Hyclone 公司,胰酶(T4665)购自上海化学试剂公司,脂质体 Lipofectamine 2000(11668-019)购自美国 Invitrogen 公司。

2. 实验方法:(1)ILT3 目的基因片段的获取:根据 Pubmed 数据库中大鼠 ILT3 的 cDNA 序列,由上海捷瑞生物工程有限公司设计并合成引物,包含交换配对碱基、酶切位点、以及目的基因 5'端部分序列用于 PCR 钓取目的基因(表 1)。PCR 反应体系为:ddH₂O 32.5μl、5×PS Buffer 10μl、dNTP Mix 4μl、上游引物(10μmol/L) 1μl、下游引物(10μmol/L) 1μl、模板(10ng/μl) 1μl、PrimeSTAR HS DNA polymerase 0.5μl。反应条件:98℃ 预变性 5min,98℃ 变性 10s、55℃ 退火 10s、72℃ 延伸 60s、共 32 个循环,72℃ 延伸 8min。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,进行胶回收与 PCR 产物的纯化。(2)重组质粒的构建、鉴定及测序:使用限制性内切酶 BamH I 与 Age I 对载体质粒以及纯化后的 PCR 产物进行双酶切,将酶切后的

PCR 产物与载体连接。连接产物加入至感受态细胞中,轻弹管壁以混匀,在冰上放置 30min,42℃ 热激 90s,冰水浴孵育 2min,加入 500μl LB 培养基,置于 37℃ 摇床振荡培养 1h。取适量菌液均匀涂布在含有相应抗生素的平板上,于恒温培养箱中倒置培养 12~16h。挑取菌落至 20μl 鉴定体系(ddH₂O 9.2μl、2×Taq Plus Master Mix 10μl、上游引物 0.4μl、下游引物 0.4μl)中,进行 PCR 鉴定,鉴定引物(表 2)上下游分别位于目的基因和载体中,以鉴定阳性转化子。将鉴定出的阳性转化子接种于 LB 培养基中,37℃ 培养 12~16h,取适量菌液进行测序,并与目的基因序列进行比对分析。将测序正确的菌液转接于 LB 培养基中,37℃ 培养过夜,使用无内毒素质粒抽提试剂盒进行质粒抽提。(3)腺病毒包装及转染鉴定:将 HEK293 细胞接种于细胞培养瓶中,37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,待细胞密度达到 50%~60% 时即可用于转染。将 GV314-ILT3 重组质粒 5μg、辅助包装质粒 5μg 与 DMEM 混匀,调整总体积为 50μl,室温下温育 5min;取 10μl Lipofectamine 2000 试剂与 50μl DMEM 混合,室温下温育 5min;将稀释后的质粒 DNA 溶液与 Lipofectamine 2000 轻轻混匀,室温下温育 20min,形成 DNA/Lipofectamine 2000 转染复合物。将转染复合物缓慢滴加至 HEK293 细胞培养液中,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。转染后约 10~15 天,显微镜下观察 HEK 293 细胞是否开始飘落,出现细胞病变(CPE),待大部分细胞显示典型 CPE,并有 50% 细胞脱壁时,收集细胞并重悬于 DMEM 中,-70℃/37℃ 反复冻融 3 次,4℃、7000×g 离心 5min,收集病毒上清,将得到的病毒粗提液进行扩增、纯化,分装保存于 -70℃,终点稀释法进行病毒效价检测。将腺病毒转染 HEK293 细胞,在荧光显微镜下观察,以鉴定 ILT3 重组质粒与腺病毒是否包装成功。

表 1 目的基因 PCR 引物

引物	序列(5'→3')
ILT3-F	AGGTCGACTCTAGAGGATCCCGCCACCAT-
	GATCTCCATGCTCACCATG
ILT3-R	TCCTTGTAAGTCCATACCGCGGTTGTCATATTCCTGAGTC

表 2 转化子 PCR 鉴定引物

引物	序列(5'→3')
上游引物	GATTTCATTCTGATCCAGGACG
下游引物	CCTTATAGTCCTTATCATCGTC

结 果

1. 目的基因的获取与鉴定结果:对 PCR 扩增得

到的目的基因,通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,PCR产物大小为 1055bp,与目的基因一致(图 1)。

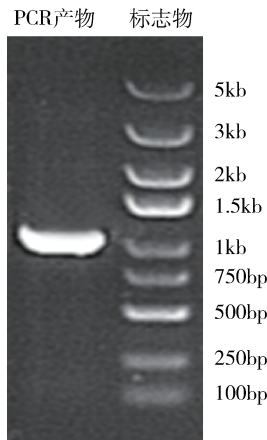


图 1 目的基因 PCR 扩增产物鉴定

2. GV314 - ILT3 重组质粒转化子鉴定结果:将 ILT3 重组质粒转化入感受态细胞,获取菌落进行 PCR 鉴定,筛选阳性转化子(图 2)。将阳性转化子进行测序,与大鼠 ILT3 基因序列比对,比对结果一致(图 3)。

3. 病毒效价检测及转染鉴定:包装完成的腺病毒经扩增、纯化后,以终点稀释法检测病毒效价,结果为 1×10^9 PFU/ml。病毒转染 HEK293 细胞后,荧光显微镜下观察,发出绿色荧光者即为病毒转染阳性细胞,结果显示病毒具有较高的转染效率(图 4)。

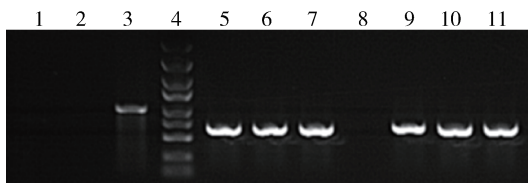


图 2 ILT3 重组质粒转化子鉴定结果

1. 阴性对照(ddH₂O);2. 阴性对照(空载自连对照组);3. 阳性对照(GAPDH);4. 标志物,自上而下依次为 5kb、3kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp;5~11. ILT3 1~7 号转化子

讨 论

ILT3 属于抑制性受体 ILTs 家族成员,又名白细胞免疫球蛋白样受体亚家族 B 成员 4 (LILRB4)或白细胞免疫球蛋白样受体 5 (LIR5),为分子质量 49kDa 的跨膜蛋白,由胞外的 2 个 C-2 型免疫球蛋白样结构域(Ig-like domain)、跨膜区、以及胞内的免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIMs)组成^[6,7]。其 ITIMs 能够与含有 Src 同源 2 (SH-2) 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTPs) SHP-1 与

SHP-2 结合,将其招募至胞膜并使其解除自身抑制而激活,激活后的 SHP-1 与 SHP-2 可通过去磷酸化作用使多种下游底物失活,包括 MAPKs、PI₃K/Akt、JAK-STAT、NF- κ B 等信号通路的相关分子,从而抑制细胞内的信号转导^[1,2]。

抑制性受体 ILT3 在免疫反应中具有重要的调控作用,可识别主要组织相容性复合体(MHC) I 类分子,负性调控抗原递呈细胞对抗原的获取与递呈,抑制炎症信号的激活^[6,8]。Kuroiwa 等^[1]最初通过亲和免疫印迹技术发现 ILT3 与 SHP-1 及 SHP-2 的结合,而 Chang 等^[9]使用免疫共沉淀技术进一步验证了 ILT3 与 SHP-1 的相互作用,并且发现 ILT3 可通过 SHP-1 抑制 NF- κ B 与 MAPKp38 的活性,进而调节 IL-1 β 与 IL-6 等多种促炎细胞因子的表达以及活化的 T 细胞迁移。另外,ILT3 能够使多种细胞信号分子去磷酸化,包括酪氨酸激酶 Lck、Syk 以及 MAPKs 家族成员 ERK,从而阻断 IgG Fc 段受体 CD64 所诱导的单核细胞激活,减少 TNF- α 的产生^[10]。在血管内皮细胞中过表达 ILT3 可抑制 T 细胞的增殖,并且 ILT3 介导了 IL-10 对内皮依赖的 T 细胞激活的抑制作用^[11]。ILT3 的炎症信号抑制作用对促进器官移植的免疫耐受以及自身免疫疾病如多发性硬化的免疫调节具有重要影响^[12,13]。上述结果证实 ILT3 具有重要的炎症抑制作用,但其生物学功能及在疾病中的作用仍未阐明,尚需更为深入的研究。

通过基因修饰使目的基因过表达或缺失,是目前研究基因功能的重要方法,而适当的载体是将目的基因导入拟研究的实验动物或细胞中的必要工具。其中腺病毒载体具有宿主范围广、致病性低,在增殖和非增殖细胞中均可感染和表达、扩增效率与病毒效价高、不整合至染色体中、无插入致突变性等优点,是基因修饰的首选载体之一。本实验选用 AdMax 腺病毒包装系统进行病毒包装,将含目的基因的穿梭质粒与携带腺病毒大部分基因组的辅助包装质粒共转染 HEK293 细胞,利用 Cre-loxP 重组酶切割系统,即可产生表达目的基因的重组腺病毒,该包装系统操作简便,具有高效重组、病毒高产率以及目的基因高表达等优点。实验所用穿梭质粒 GV314 为真核表达载体,其元件顺序为 CMV-MCS-3FLAG-SV40-EGFP,包含强启动子 CMV 以保证目的基因的顺利表达,同时含有增强子 SV40 以增强启动子转录活性。多克隆位点 MCS 包含多个限制性酶切位点,可进行 BamH I/Age I 双酶切,能够选择性的供 ILT3 基因插

Score	Expect	Identities	Gaps
1869 bits(1012)	0.0	1012/1012(100%)	0/1012(0%)
Query 77	CATGATCTCCATGCTCACCATGCTGCTGTACCTTGGTCTCATT	136	
Sbjct 9	CATGATCTCCATGCTCACCATGCTGCTGTACCTTGGTCTCATT	68	
Query 137	AATACAGGCAGGACACCTTCCAAGGCCCATCATCTGGGCCGAGCCAGGCTCTATGATTGC	196	
Sbjct 69	AATACAGGCAGGACACCTTCCAAGGCCCATCATCTGGGCCGAGCCAGGCTCTATGATTGC	128	
Query 197	CATTATACATCTGTGACTATCTGGTGTCAAGGGTCTTGGGAGGCCAGAAGTATCATCT	256	
Sbjct 129	CATTATACATCTGTGACTATCTGGTGTCAAGGGTCTTGGGAGGCCAGAAGTATCATCT	188	
Query 257	GTATAAAGAGGGAAATGTAATCCTTGGGACACTCAACTCCCTCTGAAACCAGGAATAA	316	
Sbjct 189	GTATAAAGAGGGAAATGTAATCCTTGGGACACTCAACTCCCTCTGAAACCAGGAATAA	248	
Query 317	GGCTAAGTTCAACATTCAATACATGACAACCACTTATGCAGACACATATAAGTGTTACTA	376	
Sbjct 249	GGCTAAGTTCAACATTCAATACATGACAACCACTTATGCAGACACATATAAGTGTTACTA	308	
Query 377	TGAGAGTGCTGCTGGTTTTTCAGAGCACAGTGATGCCATGGAGCTGGTGATGACAGGAGC	436	
Sbjct 309	TGAGAGTGCTGCTGGTTTTTCAGAGCACAGTGATGCCATGGAGCTGGTGATGACAGGAGC	368	
Query 437	CTATACAAATCCCAGCCTGTCAGTCTGGCCAGTTCTGATGTGACCTCTGGAGTTTCCAT	496	
Sbjct 369	CTATACAAATCCCAGCCTGTCAGTCTGGCCAGTTCTGATGTGACCTCTGGAGTTTCCAT	428	
Query 497	AGCCTTTAAGTGTAGCTCATCCATGGGATTTGGCAGATTCAITCTGATCCAGGACGGAAA	556	
Sbjct 429	AGCCTTTAAGTGTAGCTCATCCATGGGATTTGGCAGATTCAITCTGATCCAGGACGGAAA	488	
Query 557	AGACAGCTTTTCGATGGACCCTGGACTCACAAACGACATGACAACCAACCATTCATGCTAC	616	
Sbjct 489	AGACAGCTTTTCGATGGACCCTGGACTCACAAACGACATGACAACCAACCATTCATGCTAC	548	
Query 617	TTTTGTCTGGACACTGTTACTCCCAACCAATGGAACATTCAGATGCTATGGCTCTTT	676	
Sbjct 549	TTTTGTCTGGACACTGTTACTCCCAACCAATGGAACATTCAGATGCTATGGCTCTTT	608	
Query 677	TAGAAATGAACCACATTTGTGGTCGAAATCAAGTGATCCCCTTGTCCTCATGGTATCAGA	736	
Sbjct 609	TAGAAATGAACCACATTTGTGGTCGAAATCAAGTGATCCCCTTGTCCTCATGGTATCAGA	668	
Query 737	AACCAAGAACCAGTCTCCTACACACACTGAAGATGCTCAAAGAGATGCCAATTACAATT	796	
Sbjct 669	AACCAAGAACCAGTCTCCTACACACACTGAAGATGCTCAAAGAGATGCCAATTACAATT	728	
Query 797	GACTTCAGGGGTTCCAGAAACAACATACAGAGATAGACTCCACCAGAAGAGCTCCAGCCC	856	
Sbjct 729	GACTTCAGGGGTTCCAGAAACAACATACAGAGATAGACTCCACCAGAAGAGCTCCAGCCC	788	
Query 857	AGATGCTACCATCAATGAAAAATACCTGTATGCTTCTGTGAAAAACACACAATCTGAGGA	916	
Sbjct 789	AGATGCTACCATCAATGAAAAATACCTGTATGCTTCTGTGAAAAACACACAATCTGAGGA	848	
Query 917	CAATGGAGAGCTGGACAGTTGGAACCCACCTGATAAAGACCCCCATGGAATTGTGTACGC	976	
Sbjct 849	CAATGGAGAGCTGGACAGTTGGAACCCACCTGATAAAGACCCCCATGGAATTGTGTACGC	908	
Query 977	CCAGGTGAAACCTCCAGACTTCGGAAGGATACTACATCCTGGAGACCCAAAGAGACCCA	1036	
Sbjct 909	CCAGGTGAAACCTCCAGACTTCGGAAGGATACTACATCCTGGAGACCCAAAGAGACCCA	968	
Query 1037	GTTTGTAACTACGCCAGTTGTGCAGCAGGACTCAGGAATATGACAACCGC	1088	
Sbjct 969	GTTTGTAACTACGCCAGTTGTGCAGCAGGACTCAGGAATATGACAACCGC	1020	

图 3 ILT3 重组质粒测序比对结果

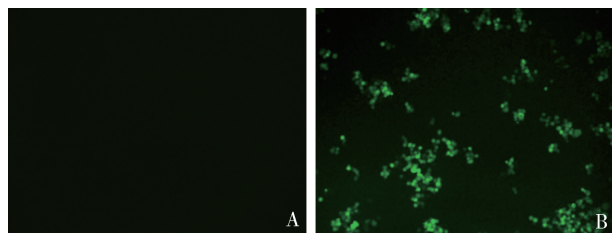


图4 ILT3重组腺病毒转染HEK293细胞(×100)

入。EGFP为绿色荧光蛋白,可为判断重组质粒转染效率提供依据,3FLAG标签则有利于目的蛋白表达后的检测。

本实验通过PCR扩增目的基因,以BamH I/Age I双酶切法将目的基因连接至穿梭质粒GV314,使用AdMax腺病毒包装系统进行病毒包装,成功构建Ad-ILT3重组腺病毒,扩增、纯化后的病毒具有较高的效价与转染效率,为进一步研究ILT3的基因功能以及其在心血管疾病中的作用提供了良好的工作基础。

参考文献

- 1 Kuroiwa A, Yamashita Y, Inui M, *et al.* Association of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, inositol 5-phosphatase SHIP with gp49B1, and chromosomal assignment of the gene[J]. J Biol Chem, 1998, 273(2):1070-1074
- 2 Daeron M, Jaeger S, Du Pasquier L, *et al.* Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future[J]. Immunol Rev, 2008, 224:11-43
- 3 Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(6):465-476
- 4 Schror K, Huber K. Platelets, inflammation and anti-inflammatory drugs in ACS and CAD[J]. Thromb Haemost, 2015, 114(3):446-448

- 5 Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, *et al.* Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers[J]. Cardiology, 2012, 122(1):23-35
- 6 Cella M, Dohring C, Samaridis J, *et al.* A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing[J]. J Exp Med, 1997, 185(10):1743-1751
- 7 Katz HR. Inhibition of pathologic inflammation by leukocyte Ig-like receptor B4 and related inhibitory receptors[J]. Immunol Rev, 2007, 217:222-230
- 8 Breslow RG, Rao JJ, Xing W, *et al.* Inhibition of Th2 adaptive immune responses and pulmonary inflammation by leukocyte Ig-like receptor B4 on dendritic cells[J]. J Immunol, 2010, 184(2):1003-1013
- 9 Chang CC, Liu Z, Vlad G, *et al.* Ig-like transcript 3 regulates expression of proinflammatory cytokines and migration of activated T cells[J]. J Immunol, 2009, 182(9):5208-5216
- 10 Lu HK, Rentero C, Raftery MJ, *et al.* Leukocyte Ig-like receptor B4 (LILRB4) is a potent inhibitor of FcγRI-mediated monocyte activation via dephosphorylation of multiple kinases[J]. J Biol Chem, 2009, 284(50):34839-34848
- 11 Gleissner CA, Zastrow A, Klingenberg R, *et al.* IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells[J]. Eur J Immunol, 2007, 37(1):177-192
- 12 Cortesini R, Suci N, Foca N. ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells in transplantation[J]. Transplantation, 2006, 82(1 Suppl):S30-32
- 13 Jensen MA, Yanowitch RN, Reder AT, *et al.* Immunoglobulin-like transcript 3, an inhibitor of T cell activation, is reduced on blood monocytes during multiple sclerosis relapses and is induced by interferon beta-1b[J]. Mult Scler, 2010, 16(1):30-38

(收稿日期:2016-01-23)

(修回日期:2016-01-27)

冬凌草甲素对神经母细胞瘤抗肿瘤的作用研究

张李迪 高丰厚 姜斌

摘要 目的 在体内体外水平探讨冬凌草甲素(oridonin)对神经母细胞瘤的抗肿瘤作用。方法 CCK-8法检测冬凌草甲素对细胞增殖的影响;AO/EB双荧光染色后荧光显微镜观察细胞凋亡情况;免疫印迹检测细胞内活化的caspase-3和剪切的PARP表达水平;构建SHSY-5Y神经母细胞裸鼠异种移植瘤模型,Ki-67免疫组化染色分析冬凌草甲素对肿瘤组织增殖的影响。结果 冬凌草甲素作用SHSY-5Y和SK-N-MC细胞24h后,可以剂量依赖性抑制细胞增殖。不同浓度冬凌草甲素处理24h后AO/EB双荧光染色显示,随着药物浓度增加细胞凋亡明显增多。免疫印迹结果证实冬凌草甲素可以浓度依赖性增加活化的caspase-3和剪切的PARP蛋白的表达。冬凌草甲素处理组裸鼠移植瘤体积增量显著小于对照组,Ki-67免疫组化显示冬凌草甲素处理组肿瘤组织增殖受到抑制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302006)

作者单位:201999 上海交通大学医学院附属第三人民医院肿瘤科

通讯作者:姜斌,主任医师、教授、博士生导师,电子信箱:jiangbinwcr@sjtu.edu.cn