

(6):4316-4322.

[J]. Science, 2010, 328(5985):1566-1569.

[17] Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis

(收稿日期:2014-01-02)

• 综 述 •

IL-12 家族抗肿瘤作用的研究进展*

陈倩倩¹, 黎霏霏¹综述, 曾今诚^{2,3}, 徐军发^{2,3} 审校

(1. 广东医学院医学检验学院, 广东东莞 523808; 2. 广东医学院检验医学研究所, 广东东莞 523808;

3. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808)

关键词: IL-12; IL-23; IL-27; IL-35; 肿瘤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)11-1453-03

IL-12 家族是一类结构相似、共价结合的异二聚体细胞因子家族, 目前其主要成员包括 IL-12、IL-23、IL-27 和 IL-35。IL-12 由 p35 和 p40 两个亚基通过二硫键结合形成, 是细胞免疫应答过程中的关键调节因子, 在激活 NK 细胞、T 细胞, 并诱使其分泌大量 IFN- γ , 抑制肿瘤血管生成等方面具有重要的作用。IL-23 由 p40 和 p19 亚基以二硫键结合形成, 在抗肿瘤及抗自身免疫病中发挥着重要作用。IL-27 由 p28 和 EBI3 亚基通过二硫键结合形成, 在维持机体免疫系统的自身稳定、抗感染及抗肿瘤中起着重要的作用。IL-35 由 p35 和 EBI3 亚基通过二硫键结合形成, 在抑制效应 T 细胞增殖、Th17 细胞分化和 IL-17 的合成方面发挥重要作用。随着 IL-12 家族成员的丰富, IL-12 家族成员的功能研究也越来越深入, 近年来大量研究认为 IL-12 家族在肿瘤的发生、发展中具有至关重要的作用, 因此, 本文就 IL-12 家族与其抗肿瘤作用的研究作一综述。

1 IL-12 与肿瘤

IL-12 是由不同基因编码的 p35 与 p40 亚基的两条肽链以二硫键结合形成的异二聚体分子。两个亚基单独存在时没有生物学活性, 只有结合成异二聚体后才具有生物学活性。已证实 IL-12 主要参与细胞免疫, 能够与 NK 细胞、T 淋巴细胞等协同发挥抗肿瘤效应, 也能够通过自身或诱导其他细胞因子如 IFN- γ 发挥抗肿瘤作用。

IL-12 对肿瘤遗传高危个体及癌前病变有预防作用。Boggio 等^[1]用不同剂量 IL-12 治疗 HER2/neu 转基因鼠乳腺癌, 发现 IL-12 可抑制乳腺癌发生和防止癌前病变。国内学者成凤等^[2]发现人 IL-12 腺病毒载体感染肝癌细胞 Hep3B 后可抑制其增殖, 且下调 TGF- β 的表达。Minkis 等^[3]发现 IL-12 转染黑色素瘤患者树突状细胞后, 可抑制 IL-4 及 IL-5 的分泌, 从而增强 Th1 型淋巴细胞的分化, 实现对黑色素瘤细胞增殖的抑制作用。此外, IL-12 通过促进 Th1 细胞的分化、增加 IFN- γ 产生, 增强 NK 细胞杀伤活性, 参与细胞介导的免疫应答。IL-12 对多种肿瘤(结肠癌、黑色素瘤、卵巢癌等)的生长和转移具有明显的抑制作用。IL-12 可上调肿瘤组织内 NK 细胞活化性受体表达, 下调抑制性受体表达, 从而抑制肿瘤的生长^[4]。IL-12 能上调 NK 细胞 NKG2D 和穿孔素的表达以提高 NK 细胞的细胞毒作用^[5], 并诱导不成熟树突状细胞(DC)分化为成熟 DC, 后者可以与 NK 细胞一起协同发挥抗肿瘤效

应^[6]。IL-12 还可直接上调 NK 细胞表面 CD2、CD11a 和 CD56 等黏附分子表达, 从而增强 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性^[7]。

2 IL-23 与肿瘤

IL-23 是由 p40 和 p19 亚基以二硫键连接而成的异二聚体细胞因子。它在结构上与 IL-12 共用 p40 亚基, 在功能上与 IL-12 既有相似之处, 亦存在不同。IL-23 与 IL-12 均具有调节 DC 的功能^[8], 但 IL-12 在体外只选择性作用于 CD8⁻ DC, 而 IL-23 可作用于 CD8⁻ 和 CD8⁺ DC, 从而使 DC 递呈抗原的能力更强, 在激活和调节 T 细胞应答中起主要作用^[9]。

IL-23/Th17 细胞免疫轴是机体炎症免疫的重要组成部分。已经发现 IL-23/IL-23R 通路对维持 Th17 细胞表型稳定、促进其增殖以及细胞分泌等方面发挥重要作用^[10]。Th17 细胞在抗自身免疫病、抗感染、抗肿瘤免疫等方面具有重要作用, 而 IL-23 则可以诱导活化的 Th17 细胞分泌 IL-17, 并刺激 Th17 细胞增殖, 因此 IL-23 是维持 Th17 细胞增殖的必要细胞因子^[10]。有研究揭示 IL-23 可以阻止 CD8⁺ T 细胞浸润肿瘤组织, 从而导致肿瘤细胞逃避免疫监视^[11]。同时有研究证实^[12], Th17 细胞存活因子和 IL-23 在小鼠和人类乳腺癌肿瘤组织中高表达。另外, 研究发现, IL-27 在肝细胞癌^[13], 前列腺癌^[14] 和 HPV 相关肛门癌^[15] 组织中过度表达。

IL-23 具有抗肿瘤及抗肿瘤转移作用。用编码单链 IL-23 (scIL-23) 的重组逆转录病毒载体转染小鼠结肠腺癌 CT26 细胞, 发现 70% 的小鼠肿瘤消失, 进一步选择性缺失不同淋巴细胞亚群, 发现 CD8⁺ T 细胞在 IL-23 介导的抗肿瘤活性中起关键作用^[16]。此外, 已证实向小鼠体内转导 IL-23 还能显著减少结肠癌 CT26 细胞和黑色素瘤 B16F1 细胞的肺转移^[16]。

3 IL-27 与肿瘤

IL-27 是由螺旋亚基 p28 和 EB 病毒诱导基因 3 (Ebi3) 通过二硫键连接而成的异二聚体细胞因子。IL-27 主要来源于活化的单核细胞和 DC, 在星状细胞和小胶质神经细胞等巨噬细胞也表达^[17]。目前, 已有研究表明, 对于免疫原性高的肿瘤细胞(如 C26 细胞、TBJ 细胞等), IL-27 可通过促进 CTL、IFN- γ 活化来发挥抗肿瘤作用, 而对于免疫原性低的肿瘤细胞(如 B16F10 细胞)主要通过抑制血管形成作用和促进 NK 细胞增生、活化发挥抗肿瘤效应。IL-27 基因修饰的 DC 所分泌的 IL-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273237); 广东省科技计划项目(2012KJXC0059); 东莞市科技计划项目(20131051010006); 广东医学院大学生创新实验重点项目(ZZDC002)。 作者简介: 陈倩倩, 女, 在读本科生, 主要从事免疫学研究。

27 和 IL-12 可充分活化 T 细胞,增强 T 细胞产生 IFN- γ 的能力,从而发挥非特异性抗肿瘤体液免疫,并起到协同抗肿瘤作用。

Tao 等^[18]研究发现,IL-12p40 和 IL-27p28 的缺失或低表达会导致食管癌的发生。王雷等^[19]通过 IL-27 基因转染食管癌患者 DC 发现 IL-27 基因修饰可增强 DC 免疫应答能力,改善肿瘤微环境低免疫应答状态,增强其诱导特异性 CTL 的肿瘤杀伤效能。同时 IL-27 能诱导 STAT1 和 STAT3 的活化,从而导致初始 CD4⁺ T 细胞增殖,促进早期 Th1 细胞分化,增强抗肿瘤免疫反应。Kambayashi 等^[20]通过比较研究角化棘皮瘤(KA)和皮肤鳞状细胞癌(SCC)对免疫调节的影响发现产生 IL-27 的细胞只在 KA 增加。另外,观察到 pSTAT1 只在 KA 肿瘤细胞中表达,结果表明,IL-27 在控制肿瘤恶性转化方面发挥一定的作用。IL-27 还对甲基胆蒽诱导的纤维肉瘤和 B16 黑色素移植瘤保护性免疫反应起关键作用。Natividad 等^[21]发现,IL-27 受体 α 缺陷小鼠移植瘤迅速增长。IL-27 信号损失可降低 Th1 和 Treg 细胞的产生,抑制抗肿瘤反应。

4 IL-35 与肿瘤

IL-35 是一种具有免疫抑制功能的细胞因子,由 p35 和 EB13 亚基组成的异源二聚体分子。IL-35 主要表达于 Treg 细胞,使 Treg 细胞发挥最大的抑制活性。在体外无抗原提呈细胞(APC)的培养物中 IL-35 直接抑制效应性 T 细胞(Teff)增殖。当 EB13 或 p35 缺陷时,Treg 细胞的体外调节活性明显减弱,不能控制 Teff 的增殖及阻止免疫性肠炎的发生,这提示 Treg 细胞需要 IL-35 来介导免疫耐受,使初始 T 细胞转化为产生 IL-35 的新型调节性 T 细胞(iTr35 细胞)^[22-23]。IL-35 还能抑制 Th1 和 Th17 细胞增殖,促进 CD4⁺ T 细胞 CD39 表达^[21]。

Wang 等^[24]发现 IL-35 在 B 细胞淋巴瘤、鼻咽癌和黑色素瘤等多种肿瘤组织中异常表达。本课题组也发现,IL-35 在低分化结肠癌患者组织中异常高表达,并在招募 Treg 细胞到肿瘤微环境中具有重要作用^[25]。为确定肿瘤源性 IL-35 在肿瘤发生及肿瘤免疫的作用,Wang 等^[24]发现 IL-35 转染的不仅不影响肿瘤在体外的生长和生存,还通过增加在肿瘤微环境 CD11b⁺ Gr1⁺ 骨髓细胞的积累和肿瘤血管生成,促进肿瘤细胞的生成,提示 IL-35 并不直接抑制肿瘤抗原特异 CD8⁺ T 细胞活化、分化和效应功能,而是增加了 gp130 的表达和减低了 CTL 作用。此外,也有学者报道 IL-35 过表达可在体外抑制癌细胞生长,诱导细胞 G₁ 期阻滞,并介导细胞凋亡^[26]。最近,Jin 等^[27]报道胰腺导管腺癌患者外周血循环 IL-35 水平增高,并与患者的淋巴结转移及肿瘤大小呈正相关。因此,IL-35 在肿瘤的发生、发展过程具有重要作用。

5 小 结

利用 IL-12 家族细胞因子提高宿主免疫能力,破坏肿瘤细胞的免疫逃逸功能是肿瘤生物治疗的重要策略。IL-12 对肿瘤遗传高危个体及癌前病变有预防作用,能通过上调肿瘤组织内 NK 细胞活化性受体、IL-12、IFN- γ 的表达,下调抑制性受体的表达,抑制肿瘤的生长与转移;IL-23 通过刺激 Th17 细胞增殖,强化 DC 抗原呈递能力和阻止 CD8⁺ T 细胞浸润肿瘤组织,与多种肿瘤关系密切,具有抗肿瘤及抗肿瘤转移作用。IL-27 可通过促进 CTL 和 IFN- γ 的活化及产生来发挥抗肿瘤作用,还可通过抑制血管形成作用和促进 NK 细胞增生、活化发挥抗癌效应。肿瘤源性 IL-35 是免疫抑制性细胞因子,在肿瘤免疫逃逸过程中发挥重要作用。因此,IL-12 家族细胞因子的

深入研究将会为肿瘤生物治疗的发展提供更广阔的思路。

参考文献

- [1] Boggio K, Di Carlo E, Rovero S, et al. Ability of systemic interleukin-12 to hamper progressive stages of mammary carcinogenesis in HER2/neu transgenic mice [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (2): 359-364.
- [2] 成凤, 匡文斌, 王秦, 等. 携人 IL-12 基因腺病毒的构建及其对 Hep3B 细胞增殖及 TGF- β 表达的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(5): 402-406.
- [3] Minkis K, Kavanagh DG, Alter G, et al. Type 2 bias of T cells expanded from the blood of melanoma patients switched to type 1 by IL-12p70 mRNA-transfected dendritic cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22): 9441-9450.
- [4] 周智锋, 江金华, 李洁羽, 等. IL-12 诱导肝癌微环境中 NK 细胞活化发挥抗肿瘤作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(1): 93-98.
- [5] Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, et al. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies [J]. *Immunol Res*, 2012, 52(1/2): 139-156.
- [6] Nguyen-Pham TN, Yang DH, Nguyen TA, et al. Optimal culture conditions for the generation of natural killer cell-induced dendritic cells for cancer immunotherapy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9 (1): 45-53.
- [7] Dowell AC, Oldham KA, Bhatt RI, et al. Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56dim NK cells to a CD56 bright phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(5): 615-628.
- [8] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23(3): 683-747.
- [9] Belladonna ML, Renauld JC. IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2002, 168(11): 5448-5454.
- [10] Bonini MG, Rota C, Tomasi A, et al. The oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophecy? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(6): 968-975.
- [11] Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(3): 676-689.
- [12] Qian X, Gu L, Ning H, et al. Increased Th17 cells in the tumor microenvironment is mediated by IL-23 via tumor-secreted prostaglandin E2 [J]. *J Immunol*, 2013, 190(11): 5894-5902.
- [13] 彭契六, 覃彦平, 易珍, 等. 白介素 23 受体基因多态性与乙肝相关肝细胞癌的易感性研究 [J]. *微循环学杂志*, 2012, 22(4): 21-24.
- [14] Blando J, Moore T, Hursting S, et al. Dietary energy balance modulates prostate cancer progression in Hi-Myc mice [J]. *Cancer Prev Res*, 2011, 4(12): 2002-2014.
- [15] Yaghoobi M, Le Gouvello S, Aloulou N, et al. FoxP3 overexpression and CD1a⁺ and CD3⁺ depletion in anal tissue as possible mechanisms for increased risk of human papillomavirus-related anal carcinoma in HIV infection [J]. *Colorectal Dis*, 2011, 13(7): 768-773.
- [16] Cugno M, Zanichelli A, Foiuni F, et al. C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress [J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(2): 69-78.
- [17] Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, et al. Suppressive effect of IL-27

- on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2007, 179(5):3268-3275.
- [18] Tao YP, Wang WL, Li SY, et al. Associations between polymorphisms in IL-12A, IL-12B, IL-12R beta 1, IL-27 gene and serum levels of IL-12p40, IL-27p28 with esophageal cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(11):1891-1900.
- [19] 王雷, 单保恩, 刘亮, 等. 抗原致敏及白细胞介素 27 基因修饰的树突状细胞诱导抗食管癌免疫的体外研究[J]. 肿瘤, 2011, 31(7):601-607.
- [20] Kambayashi Y, Fujimura T, Aiba S. Comparison of immunosuppressive and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Acta Derm Venereol, 2013, 93(6):663-668.
- [21] Natividad KDT, Junankar SR, Redzwan NM, et al. Interleukin-27 signaling promotes immunity against endogenously arising murine tumors[J]. PLoS One, 2013, 8(3):e57469.
- [22] Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, et al. Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance[J]. J Immunol, 2011, 186(12):6661-6666.
- [23] Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, et al. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional[J]. Nat Immunol, 2012, 13(3):290-315.
- [24] Wang ZH, Liu JQ, Liu ZZ, et al. Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis[J]. J Immunol, 2013, 190(5):2415-2423.
- [25] Zeng JC, Zhang Z, Li TY, et al. Assessing the role of IL-35 in colorectal cancer progression and prognosis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(9):1806-1816.
- [26] Long J, Zhang X, Wen M, et al. IL-35 over-expression increases apoptosis sensitivity and suppresses cell growth in human cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(1):364-369.
- [27] Jin P, Ren H, Sun W, et al. Circulating IL-35 in pancreatic ductal adenocarcinoma patients[J]. Hum Immunol, 2014, 75(1):29-33.

(收稿日期:2014-01-24)

• 综 述 •

SARS-CoV 核衣壳蛋白表达方法的研究进展

黄 莉 综述, 车小燕[△] 审校

(南方医科大学珠江医院检验医学部/广东省病原微生物重点实验室, 广东广州 510282)

关键词: 严重急性呼吸综合征; SARS 冠状病毒; 核衣壳蛋白; 杆状病毒**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.035**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2014)11-1455-04

2012 年引起中东呼吸综合征的新型冠状病毒 hCoV-EMC, 与 2003 年引起广东暴发性流行的严重急性呼吸综合征的 SARS-CoV 同属于 β 冠状病毒, 两种病毒存在许多相似之处^[1-2]。研究表明 SARS-CoV 核衣壳蛋白(SARS-CoV N 蛋白)可诱导产生强烈的体液和细胞免疫, 是主要的抗原分子^[3]和临床诊断的最佳靶标^[4]。获得重组 SARS-CoV N 蛋白, 是进一步研究 SARS-CoV、hCoV-EMC 以及其他可能出现的新型人冠状病毒 N 蛋白之间关系的前提。本文将目前研究 SARS-CoV N 蛋白的重组表达体系、表达蛋白的特性及存在问题等进行了综述。

1 SARS-CoV N 蛋白的分子特性

SARS-CoV 包含至少 11 个开放读码框(ORFs), 由 29 727 个核苷酸组成, 其中 5 个主要的 ORFs 主要用于编码复制酶(Rep)、刺突糖蛋白(S)、包膜小蛋白(E)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)^[5-6]。SARS-CoV N 蛋白是 SARS-CoV 最为丰富的结构蛋白之一, 与病毒 RNA 结合形成核衣壳, 参与 SARS-CoV 的复制, 是主要的抗原分子^[3,7]; 与其他冠状病毒 N 蛋白的同源性为 20%~30%^[8], 由 SARS 冠状病毒第 9 个 ORF 编码的, 由 422 个氨基酸残基组成, 高度磷酸化, 相对分子质量 48×10^3 ^[8]。

2 SARS-CoV N 蛋白表达方法及研究进展

2.1 原核系统表达 自 1977 年, 研究者成功地在大肠杆菌中表达了一种哺乳动物的肽类激素-生长激素抑制素后^[9], 首次实现了外源基因在原核细胞中的体外表达。原核表达系统具有培养操作简单、周期短、价格低廉、转化和转导效率高、外源

基因表达产物高等优点, 是迄今研究最为成熟、应用最为广的表达系统^[9]; 原核系统包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和链霉菌等表达系统, 其中以大肠杆菌表达系统最常见。

2003 年 SARS 暴发流行初期, 国内外研究者首选了大肠杆菌表达系统重组 SARS-CoV N 蛋白。据报道, Shi 等^[10]和 Woo 等^[11-12]在 pET 载体上成功构建重组质粒, 获得重组蛋白, 并在此基础上建立了高特异性和高灵敏性的 ELISA 方法。Sun 等^[13]在 pRSET 载体上构建了重组质粒; 而 Guan 等^[14]则在带 GST 标签的质粒载体上构建, 建立了一种病毒裂解液和重组 N 蛋白结合的免疫印迹方法, 用以检测患者血清抗体。Pei 等^[15]甚至尝试了在公认为安全的食品级微生物乳酸乳球菌上表达 SARS-CoV N 蛋白, 作为口服活疫苗。

然而原核表达系统本身具有许多固有的缺点, 如高效表达易形成包涵体、不能产生 N-和 O-端糖基化、脂肪酸酰化、磷酸化以及形成二硫键等翻译后修饰, 使其所产生的重组蛋白的生物活性、功能和结构与天然蛋白存在较大差别。因而, 在该类蛋白基础上建立的临床诊断方法与健康人血清中的某些抗体存在一定程度的交叉反应。Leung 等^[16]和 Shin 等^[17]均报道了原核表达的 SARS-CoV N 蛋白与健康人血清存在的交叉反应。

2.2 真核表达系统 真核表达系统的翻译后修饰功能, 如糖基化、磷酸化等, 使蛋白的生物活性、功能、结构与天然蛋白更接近, 适合于来自高等生物的外源基因的表达。真核系统包括丝状真菌、酵母、昆虫细胞、动物和哺乳类细胞等系统。近年来, 常用的重组 SARS-CoV N 蛋白的表达系统主要包括酵母