

· 论 著 ·

## 重组变应原 rDer f 1 对哮喘小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞及肺部病理的作用\*

蔡红星, 周 鹰, 史卫红, 俞 敏, 崔玉宝<sup>△</sup>

(江苏省盐城卫生职业技术学院 224006)

**摘要:**目的 探讨粉尘螨变应原第 1 组分重组体 rDer f 1 对哮喘小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞及肺部病理的作用。方法 28 只小鼠随机等分为正常对照组(A),模型对照组(B),粗提浸液治疗组(C)和 rDer f 1 治疗组(D);B、C、D 组腹腔注射粉尘螨粗提浸液建立哮喘模型后,C、D 组分别予粉尘螨粗提浸液和 rDer f 1,A、B 组注射生理盐水。用流式细胞仪检测小鼠外周血单个核细胞膜表面 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>。回收小鼠一侧肺泡灌洗液(BALF)显微镜下计数并分类,用酶标仪检测其中 IL-4 和 IFN- $\gamma$  含量,取另一侧肺组织,镜下观察肺组织病理变化。**结果** 与 B 组相比,C、D 两组 CD3<sup>+</sup> T 细胞百分比增高( $P < 0.05$ ),但仍低于 A 组( $P < 0.05$ ),C、D 两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。A、B、C、D 4 个组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 依次为(5.31 $\pm$ 0.25)、(3.79 $\pm$ 0.19)、(4.39 $\pm$ 0.24)、(4.29 $\pm$ 0.33)%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ , $F = 42.117$ ),但 C、D 两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 B 组相比,C、D 组 BALF 中细胞总数下降,以 C 组下降的更为显著,但仍高于 A 组,A、B、C、D 组间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。A、B、C、D 4 组小鼠 IL-4 水平依次为(15.86 $\pm$ 0.55)、(163.95 $\pm$ 9.94)、(54.09 $\pm$ 3.49)、(113.97 $\pm$ 10.00) pg/mL,IFN- $\gamma$  水平依次为(762.66 $\pm$ 31.21)、(326.01 $\pm$ 18.71)、(653.50 $\pm$ 41.41)、(462.61 $\pm$ 26.08) pg/mL,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。A、B、C、D 组肺组织 Underwood 标准评分依次为(0.16 $\pm$ 0.01)、(3.28 $\pm$ 0.22)、(1.13 $\pm$ 0.07)、(2.36 $\pm$ 0.11),差异有统计学意义( $P < 0.01$ , $F = 760.51$ )。**结论** 重组变应原 rDer f 1 具有免疫调节作用,可以上调 Th1 反应,下调 Th2 反应,并能增加 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞数量,改善哮喘小鼠肺部炎症。

**关键词:**粉尘螨;重组变应原;哮喘;免疫治疗;病理

中图分类号:R365.563

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)23-2951-03

### Effects of recombinant allergen rDer f 1 on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and lung pathology in asthmatic mice

CAI Hong-xing, ZHOU Ying, SHI Wei-hong, et al.

(Yancheng Health Vocational &amp; Technical College, Yancheng, Jiangsu 224006, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of the recombinant allergen rDer f 1 on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and the lung pathology in asthmatic mice. **Methods** Twenty-eight mice were divided into four groups, i. e. group A, B, C and D. After the crude extract of dermatophagoides farinae was injected intraperitoneally into the mice in group B, C and D, the crude extract and rDer f 1 were given for the group C and D respectively, and the normal saline was given for the group A and B. Using flow cytometry, the CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> were detected on membrane surface of peripheral blood mononuclear cells. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was taken from one lung in mice for cell count and sorting under microscope, and detection of IL-4 and IFN- $\gamma$  content by enzyme mark instrument. And the other lung was taken for pathological examination. **Results** Compared with that in group B, the percentage of CD3<sup>+</sup> T cells was higher in the group C and D, which was still lower than that in Group A ( $P < 0.05$ ). The percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulation cell was (5.31 $\pm$ 0.25)%, (3.79 $\pm$ 0.19)%, (4.39 $\pm$ 0.24)% and (4.29 $\pm$ 0.33)% in group A, B, C and D with significant difference ( $P < 0.01$ ). The total cell numbers in BALF were lower in group C and D than those in group B, which were higher than that in group A. There was significant difference in the total cell numbers among group A, B, C and D ( $P < 0.01$ ). The contents of IL-4 in BALF were (15.86 $\pm$ 0.55), (163.95 $\pm$ 9.94), (54.09 $\pm$ 3.49) and (113.97 $\pm$ 10.00) pg/mL in group A, B, C and D, and the contents of IFN- $\gamma$  were (762.66 $\pm$ 31.21), (326.01 $\pm$ 18.71), (653.50 $\pm$ 41.41), (462.61 $\pm$ 26.08) pg/mL with significant difference ( $P < 0.01$ ). The Underwood scores were (0.16 $\pm$ 0.01), (3.28 $\pm$ 0.22), (1.13 $\pm$ 0.07) and (2.36 $\pm$ 0.11) in group A, B, C and D with significant difference ( $P < 0.01$ ,  $F = 760.514$ ). **Conclusion** The recombinant allergen rDer f 1 is demonstrated to have immunological regulation roles, which can up-regulate Th1 reaction, and downregulate Th2 reaction, and increase the numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulation cells, improve the pulmonary inflammation in asthmatic mice.

**Key words:** dermatophagoides farinae; recombinant allergen; asthma; immunotherapy; pathology

目前,临床采用尘螨粗提浸液诊治 I 型变态反应性疾病,但该浸液组成复杂,除 30 余种可与 IgE 发生特异性结合的变应原,还含有非过敏性蛋白和其他活性物质,其治疗过程中

可引起红晕、肿胀、硬结、坏死等局部反应和休克、喉头水肿、支气管痉挛、荨麻疹、血管性水肿、全身性红斑等全身反应<sup>[1-2]</sup>。且由于缺乏统一的生产标准,不同单位研制的尘螨粗提浸液中

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30660166, No. 30860261);盐城市科技发展计划(YK2008079)。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 0515-88159270, 15950229059; E-mail: ybcui1975@hotmail.com.

变应原组成和含量也不一样。粗提浸液还有可能被其他种类变应原污染,或因水解蛋白酶的存在导致变应原成分降解或丢失。采用尘螨粗提浸液进行免疫诊断,亦无法明确引起机体致敏的物质。

随着分子生物学技术的发展和成熟,研制基因工程变应原成为变态反应学研究的主流。最近 10 年来,已有 19 种尘螨变应原组分基因被克隆,已报道的宿主菌有大肠杆菌、酵母菌、昆虫杆状病毒体系及植物体内,并已证实基因工程技术制备的变应原与天然变应原活性相似<sup>[3]</sup>。作者在以前的研究中成功获得了粉尘螨变应原第 1 组分的原核表达产物 rDer f 1<sup>[4]</sup>,本研究将此重组变应原腹腔注射哮喘小鼠体内,观察其对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞及肺部病理的作用,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂和仪器 雌性 C57BL/6 小鼠,5~6 周龄,体质量(20±2)g,购自中科院上海实验动物中心,清洁条件饲养于上海第二军医大学实验动物中心。Al(OH)<sub>3</sub> 分析纯,上海生物试剂有限公司。粉尘螨粗提浸液、粉尘螨变应原第 1 组分重组体(rDer f 1)由本文作者以前制备<sup>[3]</sup>,荧光素标记的抗小鼠 CD3、CD4、CD8、CD25 单克隆抗体为美国 BD Pharmingen 公司产品,小鼠 IFN-γ、IL-4 ELISA 检测试剂盒购自深圳晶美公司。FACSCalibur 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品,酶标仪 ELx800 为美国 BIO-TEK 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 C57BL/6 小鼠 28 只,采用数字随机分组法分为 4 组,每组 7 只,将实验动物随机分为 4 组,正常对照组(A),模型对照组(B),粗提浸液治疗组(C),rDer f 1 治疗组(D),每组 7 只。哮喘模型建立和干预措施:B、C、D 组于第 1、7 天腹腔注射粉尘螨粗提浸液 50 L/只致敏小鼠,第 15 天至第 18 天,每天用 0.5%戊巴比妥 0.1mL 腹腔注射麻醉小鼠后,用粉尘螨粗提浸液 50μL/(次·天)缓慢滴鼻激发。第 31 天至第 33 天,以 C、D 组分别腹腔注射粉尘螨粗提浸液和 rDer f 1, A、B 组注射生理盐水,第 39 天、第 46 天时 B、C、D 组予粉尘螨粗提浸液鼻腔滴入方式激发, A 组生理盐水滴鼻。

1.2.2 外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 及 T 细胞亚群检测 最后 1 次滴鼻 24h 后,0.5%戊巴比妥钠 0.1mL 腹腔注射,小鼠麻醉后,摘眼球取血。取试管,分别加入荧光素标记的抗小鼠 CD3、CD4、CD8、CD25 单克隆抗体后,每管加入 100μL 抗凝全血后混匀避光孵育 30min,溶血后用 PBS 洗涤 2 次,用流式细胞仪检测小鼠外周血单个核细胞膜表面 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞占总淋巴细胞的百分比及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)回收、细胞分类计数及细胞因子检测 最后 1 次滴鼻 24h 后,0.5%戊巴比妥钠 0.1mL 腹腔注射,小鼠麻醉后,分离气管,套管针插管,然后打开胸腔,结扎右主支气管。PBS 溶液 0.3mL/(只·次),灌洗 3 次,肺泡灌洗液(BALF)回收率大于 80%。将 BALF 置 4℃ 3 000r/min 离心 5min,弃上清,用 1mL PBS 重悬沉淀细胞,混匀,取 20μL 置血细胞计数板,显微镜下计数。另取 0.5mL 再次离心后涂片,瑞氏-吉姆萨染色,光镜下计数 200 个细胞并分类。用酶标仪检测 BALF 中 IL-4 和 IFN-γ 含量,操作按说明书进行。

1.2.4 肺组织病理学检测 切取小鼠支气管与未灌洗侧肺组织,10%福尔马林溶液固定大于或等于 24h,常规石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色。显微镜下观察肺组织病理变化。

1.3 统计学方法 结果用 EXCEL 录入,用 SPSS11.0 统计软件包进行处理,各组间比较根据方差齐性与否分别采用方差分析或者非参数检验,两组均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 及 T 细胞亚群检测结果 B、C、D 组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞的百分比以及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值均比 A 组低 (P<0.05);与 B 组相比,C、D 两组 CD3<sup>+</sup> T 细胞百分比增高 (P<0.05),但仍低于 A 组 (P<0.05),C、D 两组间差异无统计学意义 (P>0.05)。C、D 组间比较,CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞百分比及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值差异无统计学意义 (P>0.05)。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比,以 A 组最高,B 组最低,C、D 两组间差异无统计学意义 (P>0.05)。

表 1 哮喘小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 及 T 细胞亚群检测结果 (%)

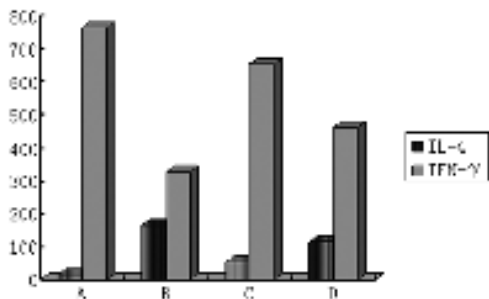
组别	n	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>
A 组	7	44.41±2.78	28.18±1.50	21.85±1.53	1.29±0.11	5.31±0.25
B 组	7	26.73±1.50	19.31±1.89	18.05±0.88	1.01±0.04	3.79±0.19
C 组	7	35.15±1.92 <sup>△</sup>	22.91±1.90 <sup>△</sup>	20.01±1.44 <sup>△</sup>	1.10±0.04 <sup>△</sup>	4.39±0.24 <sup>△</sup>
D 组	7	33.84±2.41 <sup>△</sup>	20.13±0.69	18.65±1.04	1.09±0.03 <sup>△</sup>	4.29±0.33 <sup>△</sup>
F 值		76.011	45.205	12.621	22.939	42.117

△: P<0.05,与 B 组比较。

表 2 哮喘小鼠 BALF 中细胞计数及分类结果 (×10<sup>7</sup>/L)

组别	n	细胞总数	中性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞	嗜酸性粒细胞
A 组	7	5.70±0.30	0.38±0.02	5.06±0.30	0.26±0.02	0
B 组	7	46.56±1.60	10.21±0.63	16.82±0.83	6.03±0.34	13.50±0.74
C 组	7	17.99±0.68	5.86±0.26	8.53±0.57	1.62±0.09	1.98±0.15
D 组	7	30.45±1.31	7.97±0.36	11.86±1.03	3.78±0.24	6.86±0.24
F 值		1780.911	820.822	322.962	961.985	1618.586

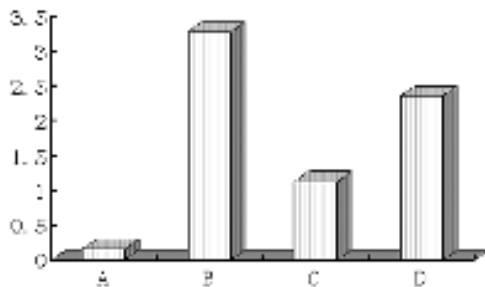
**2.2 BALF 中细胞分类计数及细胞因子检测结果** 4 个组小鼠细胞总数按 B>D>C>A 减少, 差异有统计学意义 ( $P<0.001, F=1780.911$ )。A 组以单核细胞为主, B 组中性粒细胞和嗜酸性粒细胞明显增多; 与 B 组相比, C、D 组细胞总数下降, 以 C 组下降的更为显著, 但仍高于 A 组, 具体见表 2。BALF 中细胞因子检测结果见图 1, B 组小鼠 Th2 型细胞因子 IL-4 水平为 (163.95±9.94) pg/mL, 高于 A 组 (15.86±0.55) pg/mL, 差异有统计学意义 ( $t=39.360, P<0.01$ ); 经过治疗后的 C、D 组间差异有统计学意义 [(54.09±3.49) vs (113.97±10.00),  $t=14.960, P<0.01$ ], 且 C、D 组 IL-4 水平均低于 B 组, 差异有统计学意义 ( $t=27.5939, 9.379, P<0.01$ )。B 组 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  水平为 (326.01±18.71) pg/mL, 明显低于 A 组的 (762.66±31.21) pg/mL, 差异有统计学意义 ( $t=31.751, P<0.01$ ), C、D 两组间差异有统计学意义 [(653.50±41.41) vs (462.61±26.08),  $t=10.320, P<0.01$ ]。C、D 组 IFN- $\gamma$  水平均高于 B 组 ( $t=19.068, 11.259, P<0.01$ ), 见图 1。



A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 粗提浸液治疗组; D: rDer f 1 治疗组。

图 1 哮喘小鼠 BALF 中 IL-4 和 INF- $\gamma$  水平

**2.3 小鼠肺组织病理学检查结果** A 组小鼠肺组织病理切片中, 支气管和肺泡壁结构完整, 气道上皮无细胞脱落, 无充血水肿, 无炎性细胞浸润; 与 A 组比较, B 组小鼠肺组织, 细支气管黏膜、黏膜下层及伴行血管周围可见炎性细胞浸润, 管腔内渗出物增加, 水肿明显, 支气管管腔内可见黏液栓, 黏膜皱壁增厚或断裂, 杯状细胞增生, 肺泡间隔呈不同程度的增宽。与 B 组相比, C 和 D 组肺组织切片显示其炎症有所减轻, 以 C 组改变更为明显, 镜下可见支气管、细支气管及伴行血管周围炎症细胞浸润程度减轻, 嗜酸性粒细胞减少, 水肿状况改善, 具体见 (彩插 II 图 12)。A、B、C、D 组肺组织 Underwood 标准评分依次为 (0.16±0.01)、(3.28±0.22)、(1.13±0.07)、(2.36±0.11), 差异具有统计学意义 ( $P<0.01, F=760.514$ ), 见图 2。



A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 粗提浸液治疗组; D: rDer f 1 治疗组。

图 2 哮喘小鼠肺组织病理评分 (n=7)

**3 讨 论**

近年来研究发现, 机体存在一种新的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群,

即 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (Treg 细胞), 其不仅对维持自身免疫耐受、抑制自身免疫性疾病具有重要作用, 而且可以抑制 Th2 细胞和巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等, 在变态反应过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。本次研究中, 作者以尘螨粗提浸液制备哮喘小鼠模型, 结果发现 B 组小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 明显低于 A 组, 这与国内祖莹等 (2006 年) 报道急性发作期哮喘患儿 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞百分率明显低于同龄对照组的结果相一致, 进一步证实 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 参与哮喘病发生的结论。予粉尘螨粗提浸液、rDer f 1 的 C、D 组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 均有所提高, 尽管没有达到正常对照组的水平。

CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比例关系是机体免疫调控网络的重要枢纽<sup>[6]</sup>。本组建模后, B 组小鼠 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞的百分比以及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值低于 A 组, 提示 T 细胞在哮喘的发生发展中具有重要作用, 经予粉尘螨粗提浸液、rDer f 1 的 C、D 组 CD3<sup>+</sup> T 细胞百分比增高。本次研究中, B 组小鼠 Th2 型细胞因子 IL-4 水平高于 A 组, 经过治疗后的 C、D 组均有所下降; 而 B 组 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  水平明显低于 A 组, C、D 组 IFN- $\gamma$  水平均高于 B 组。提示 rDer f 1 与粉尘螨粗提浸液一样, 具有使机体 T 细胞增加的作用, 并可以抑制 Th2 反应, 增强 Th1 反应, 从而改善哮喘病程进展。

哮喘是一种由肥大细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞等多种细胞参与的慢性气道炎症, 其组织病理学改变涉及到气道、肺间质血管及肺泡等<sup>[7]</sup>。本研究以粉尘螨粗提浸液腹腔注射致敏小鼠后, B 组小鼠细支气管和小血管周围见明显炎性细胞浸润, 管腔内渗出物增加, 水肿明显, 证实哮喘动物模型构建成功。正常小鼠 (A 组) BALF 中细胞总数较少, 细胞分类以单核细胞为主; 而哮喘小鼠 (B 组) BALF 中细胞总数明显增多, 细胞分类以中性粒、嗜酸性粒细胞等炎症细胞为主。采用粉尘螨粗提浸液和 rDer f 1 免疫治疗哮喘小鼠后, 小鼠 BALF 中细胞总数减少, 肺部嗜酸性粒细胞减少, 说明哮喘症状得到改善。组织病理学检查结果与上述免疫学检测结果相符合。本研究中, rDer f 1 改善肺部炎症的效果比不上粉尘螨粗提浸液, 可能是因为作者采用了粉尘螨粗提浸液致敏小鼠构建哮喘模型, 该浸液除 Der f 1 外还有许多其他成分。

综上所述, 作者制备的 rDer f 1 具有免疫调节作用, 其可以增强 Th1 反应, 抑制 Th2 反应, 并可以使 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞增加, 肺部组织病理学观察也提示其具有改善肺部炎症的功能。

(致谢: 感谢上海交通大学附属第一人民医院检验科李莉研究员、孔存权老师, 中国人民解放军第二军医大学崔淑芳老师在本文实验工作中给予的帮助。)

**参考文献:**

[1] Linhart B, Valenta R. Molecular design of allergy vaccines [J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(6): 646.  
 [2] Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, et al. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(3): 409.  
 [3] Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, et al. Characterization and Immunology of house dust mite allergens [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2002, 129(1): 1.  
 [4] Cui YB, Zhou P, Peng J, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen, Der f 1, in Escherichia (下转第 2956 页)

### 3 讨 论

ABC 超家族是一种由多种转运体组成的、在机体内广泛表达的大家族,参与许多物质如离子、糖、氨基酸、多肽、蛋白质、磷脂、毒素和药物的转运。ABCG2 作为 ABC 转运体家族的成员之一,最早被定义为多药耐药转运蛋白,是从 MCF-7 乳腺癌耐药细胞株克隆出来的,因此又称作 BCRP1,与典型的 ABC 转运蛋白不同的是只含有一个 ATP 结合结构域和一个疏水性的跨膜结构域,因此称其为半转运蛋白。研究发现,ABCG2/BCRP1 是导致哺乳类细胞耐药的主要转运子之一,其底物包括多种抗肿瘤药,如盐酸米托蒽醌、甲氨蝶呤及喜树碱等,致使肿瘤细胞对这些药物不敏感<sup>[3]</sup>。早期研究发现,用 Hoechst 33342 荧光染色对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时,通过紫外激发检测双波长分别为 450nm 的蓝色荧光和 675nm 的红色荧光,发现不到 0.1% 的细胞发出极弱的蓝光和红光,这群细胞被称为“侧群”(side population, SP)细胞,进一步证实 ABCG2/BCRP1 与这种 SP 细胞表型密切相关。目前在乳腺癌 MCF27 细胞系、胶质瘤细胞系<sup>[4]</sup>、肝癌细胞系 Huh7<sup>[5]</sup>、间充质肿瘤细胞<sup>[6]</sup>、前列腺肿瘤<sup>[7]</sup>均发现并分离了表达 ABCG2 的 SP 细胞,这些小于 2% 的细胞表现出干细胞特性,具有肿瘤起始的潜能。

有关 ABCG2 在膀胱移行细胞癌中的研究尚少,其是否是膀胱癌细胞系或组织中存在肿瘤干细胞的一个标志? 本实验结果发现 ABCG2 蛋白在膀胱癌细胞系和组织中表达较丰富,按照干细胞理论及相关研究,不论用何方法,所标记出的细胞应该只是整体中的极少数,因此,其不适合作为膀胱移行细胞癌干细胞的标志物。但本研究发现 ABCG2 蛋白的表达强度随膀胱癌病理分级升高而增强,故可将 ABCG2 作为膀胱移行细胞癌病理分级的参考指标。牛海艳等<sup>[8]</sup>对 ABCG2 在肺癌组织及肺癌细胞系中的定性、定量分析中也得到了类似的结果和结论。

ABCG2 在正常组织中高表达于胎盘合体滋养层细胞的顶浆面、小肠和结肠上皮细胞的肠腔面、肝细胞膜胆小管面、乳腺导管和小叶以及脑和前列腺组织等,它可以泵出细胞内毒物,保护组织免受损伤。也有研究发现其在正常膀胱移行上皮中呈弱阳性或阴性表达<sup>[9]</sup>,与本研究中正常膀胱组织的阴性结果稍有差异,考虑到实验设计的不完全相同,仍可以认为 ABCG2 蛋白在正常膀胱组织中难以检测,而在膀胱癌细胞中显著表达。关于这种差异的产生,可以假设为正常膀胱移行上皮细胞也存在 ABCG2 基因,但是处于关闭或者低表达状态以至于蛋白水平的检测阳性表达低,而当正常细胞突变为肿瘤细胞时该基因受某些因素影响活化,致使蛋白表达增加。Krishnamurthy 等<sup>[10]</sup>发现低氧环境诱导 ABCG2 的高表达,并且不仅在体外培养的干细胞如此,在小静脉的正常低氧细胞环境下也是如此。这一现象主要通过 HIF- $\alpha$  介导,正常情况下 HIF- $\alpha$  结合于抑癌基因 VHL(von hippel-lindau, VHL)蛋白,通过蛋白酶降解途径灭活,但当环境缺氧时 HIF- $\alpha$  是稳定的,并催化启动因子激活低氧效应元件 HRE(hypoxia response elements,

HRE)启动 ABCG2 的相应转录和翻译。因此可以推论,在肿瘤细胞生长的过程中,基因突变以及肿瘤细胞快速生长所造成的缺氧环境使 HIF- $\alpha$  含量增加,进而上调 ABCG2 的表达。已有研究证实 HIF- $\alpha$  在动物及人体许多肿瘤中(包括膀胱肿瘤)大量表达,对肿瘤的生长、血管形成、转移、凋亡及耐药皆有影响<sup>[11]</sup>,如果能进一步证实 ABCG2 与 HIF- $\alpha$  的相关性,不仅能证明上述推论,也可为 ABCG2 与肿瘤耐药的研究提供依据。

### 参考文献:

- [1] Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, et al. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(19): 3701.
- [2] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> cancer cells are similarly tumorigenic[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207.
- [3] Robey RW, Polgar O, Deeken J, et al. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 39.
- [4] Kondo T, Setoguchi T, Taga T, et al. Persistence of a small subpopulation of cancer stemlike cells in the C6 glioma cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(3): 781.
- [5] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell like properties[J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240.
- [6] Wu C, Wei Q, Utomo V, et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8216.
- [7] Brown MD, Gilmore PE, Hart CA, et al. Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations[J]. *Prostate*, 2007, 67(13): 1384.
- [8] 牛海艳, 申洪. ABCG2 作为肺癌干细胞标志的意义探讨[J]. *数理医药学杂志*, 2008, 21(2): 145.
- [9] Fetsch PA, Abati A, Litman T, et al. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues[J]. *Cancer Lett*, 2006, 235(1): 84.
- [10] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(23): 24218.
- [11] 宗建, 吴诚义. HIF- $\alpha$  的生物学机制及在肿瘤研究中的进展[J]. *重庆医学*, 2004, 33(5): 780.

(收稿日期: 2009-07-29)

(上接第 2953 页)

- coli [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2008, 41(5): 380.
- [5] Nouri-Aria KT, Durham SR. Regulatory T. Cells and allergic disease [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008, 7(4): 237.
  - [6] 崔玉宝, 李朝品, 王健. 粉尘螨浸液免疫治疗螨性哮喘患者的免疫功能观察[J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2003, 16

(5): 305.

- [7] 桂芹, 孔祥英, 白家骊. 哮喘缓解期豚鼠经低压缺氧处理后 BALF 中一氧化氮及肺组织病理的变化[J]. *重庆医学*, 2004, 33(4): 497.

(收稿日期: 2009-07-13)