

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.24.002

负向免疫调节分子 TIPE2 调控巨噬细胞亚型治疗狼疮小鼠的研究

李星军¹, 张瑜芬², 李 锋^{2△}, 朱小华², 黄 岚²

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院检验科, 上海 202150;

2. 复旦大学附属华山医院皮肤科, 上海 200040)

[摘要] **目的** 探讨肿瘤坏死因子诱导蛋白 8 样因子-2(TIPE2)调控系统性红斑狼疮(SLE)巨噬细胞极化的作用和对实验狼疮小鼠的治疗作用。**方法** 将小鼠分别用活化淋巴细胞来源的 DNA(ALD-DNA)诱导狼疮小鼠模型,分为 AAV-scr 组和 AAV-TIPE2 组,从小鼠尾静脉注射 AAV-TIPE2 或 AAV-scr 病毒溶液。检测极化的巨噬细胞 TIPE2 mRNA 和蛋白表达、小鼠血清抗 dsDNA 抗体滴度、尿蛋白及肾病理指数。**结果** (1)转染 AAV-TIPE2 细胞的 TIPE2 mRNA 和蛋白表达水平分别是 AAV-scr 组的(13.5±1.6)倍和(10.8±1.6)倍;(2)AAV-TIPE2 组 M2 巨噬细胞特异分子 MGL⁺ 为 59.6%,AAV-scr 组 MGL⁺ 细胞为 8.4%;AAV-TIPE2 与 AAV-scr 转染的巨噬细胞 M2/M1 比值之比为 16;(3)重组 TIPE2 基因的腺病毒相关载体在转染 HEK-293 中稳定表达,小鼠体内外实验证实 AAV-TIPE2 能诱导 ALD-DNA 狼疮小鼠巨噬细胞向 M2 极化;(4)AAV-TIPE2 组血清抗 dsDNA 抗体、尿蛋白及肾病理等活动指标明显低于 AAV-scr 组($P<0.01$)。**结论** TIPE2 诱导巨噬细胞极化为 M2 表型,缓解 ALD-DNA 诱导狼疮小鼠的病情,可以作为 ALD-DNA 诱导狼疮小鼠的一种有前景的治疗方法。

[关键词] 巨噬细胞;系统性红斑狼疮;腺病毒科;活化淋巴细胞来源的 DNA;肿瘤坏死因子诱导蛋白 8 样蛋白-2**[中图分类号]** R751.05**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)24-3318-03

Negative immune regulatory molecule TIPE2 for treating SLE mice through regulating macrophage subtype

Li Xingjun¹, Zhang Yufen², Li Feng^{2△}, Zhu Xiaohua², Huang Lan²

(1. Department of Clinical Laboratory, Chongming Branch Hospital, Affiliated Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 202150, China;

2. Department of Dermatology, Affiliated Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China.)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced protein 8-like 2 (TIPE2) for regulating the macrophage polarization in systemic lupus erythematosus and its curative effects on experimental SLE mice. **Methods** The mice were treated with activated lymphocytes derived DNA (ALD-DNA) for inducing mice model, randomly divided into AAV-scr control group and AAV-TIPE2 experimental group, and injected with AAV-TIPE2 or AAV-scr virus solution from the tail vein of mice. The expression of TIPE2 mRNA and protein in polarized macrophages, serum dsDNA antibody titer, urine protein and renal pathological index were detected. **Results** (1) The TIPE2 expression level of TIPE2 mRNA and protein in AAV-TIPE2-transfected cells was 13.5±1.6 times and 10.8±1.6 times of AAV-scr control group respectively. (2) M2 macrophage specific molecule MGL⁺ was 59.6% in AAV-TIPE2 group and MGL⁺ cells in the AAV-scr group was 8.4%. M2/M1 odds ratio of AAV-TIPE2 experimental group to AAV-scr control group was 16. (3) The recombinant TIPE2 adenovirus related vector could stably expressed in transfected HEK-293. In vitro and in vivo experiments confirmed that AAV-TIPE2 was able to induce M2 polarization of macrophages in ALD-DNA-induced lupus mice. (4) The serum anti-dsDNA antibody, urinary protein and renal pathology in the AAV-TIPE2 group were significantly lower than those in the AAV-scr group($P<0.01$). **Conclusion** TIPE2 alleviates the disease condition of ALD-DNA induced SLE mice through induction of macrophage polarization to M2 phenotype, which may be used as a promising therapeutic method for ALD-DNA induced SLE mice.

[Key words] macrophages; systemic lupus erythematosus; adenoviridae; ALD-DNA; TIPE2

系统性红斑狼疮(SLE)是最为典型,并且迄今为止仍然是难治的慢性自身免疫性疾病,其病因和发病机制尚未明了,治疗仍然以糖皮质激素和免疫抑制剂为主,其严重的不良反应威胁着 SLE 患者的生命健康。基因、性激素、感染和免疫功能异常一直是 SLE 病因学研究的几个重要方面。免疫功能异常是影响 SLE 发生、发展的重要因素之一。巨噬细胞极化是近几年免疫学研究热点,笔者前期研究结果显示,骨髓来源的单核细胞体外诱导分化 M2, M2 回输活化淋巴细胞来源的 DNA (ALD-DNA)狼疮模型,可以减轻狼疮小鼠病情活动指标、降低 dsDNA 抗体滴度、改善肾病理指标^[1]。肿瘤坏死因子诱导蛋白 8 样因子-2(TIPE2)是一种新发现的负性免疫调节蛋白,它调控 Toll 样受体(TLR)的信号转导,在固有免疫反应和适应性免疫反应中均发挥负性调节作用,这种作用可能与 TIPE2

调控巨噬细胞极化有关^[2]。笔者构建 AAV-TIPE2 载体,通过体外和体内实验,探讨 TIPE2 促进 SLE 小鼠巨噬细胞极化及治疗 SLE 小鼠,为进一步细胞生物学治疗 SLE 打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 10 周龄 BALB/c 雌性小鼠,复旦大学实验动物科学部,许可证号:SYXK(沪)2014-0029。

1.2 方法

1.2.1 ALD-DNA 制备 ConA 活化或未活化小鼠脾细胞, S1 核酸酶及蛋白酶 K 处理后, UltraPure™ genomic DNA 纯化试剂盒(Shanghai SBS Genetech, China),按说明步骤提取 ALD-DNA, DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值>1.8, 260 nm 分光光度计测定 DNA 浓度。

1.2.2 动物免疫 10 只 BALB/c 小鼠分为 AAV-TIPE2 组和

AAV-scr 组(各 5 只)。分别给两组小鼠皮下注射 0.2 mL 含 ALD-DNA 的磷酸盐缓冲液(PBS)诱导狼疮小鼠^[1]。从两组小鼠尾静脉分别注射 AAV-TIPE2 或 AAV-scr 病毒溶液,每只小鼠注射 AAV 病毒数量为 10^8 PFU。免疫前和免疫后 1、2、3 和 4 周,分别取小鼠内眦静脉血和尿液。分离血清做 dsDNA 抗体和尿蛋白检测。4 周后,取小鼠肾做病理切片并消化分离巨噬细胞。

1.2.3 狼疮性肾炎严重程度的评估 小鼠肾小球病理变化由有经验的病理医师盲法评价,每只小鼠评估 100 个肾小球,6 个等级 6 分。正常无病变评分 0 分;I 级:小范围肾小球轻度肿胀,1 分;II 级:小范围肾小球中度肿胀,2 分;III 级:中度肿胀,但受累滤管区小于或等于 50%,3 分;IV 级:中度肿胀,但受累滤管区大于 50%,4 分;V 级:重度肿胀,多数肾单位均受累,外皮层也受累,5 分;VI 级:重度肿胀,多数肾单位受累,有疤痕形成,6 分。

1.2.4 尿蛋白的测定 考马斯亮蓝法检测^[3]。

1.2.5 血清 ssDNA、dsDNA 滴度检测 ELISA 方法检测^[3]。

1.2.6 骨髓来源的单核巨噬细胞(BMDM)分离、培养和诱导分化 10 周龄雌性小鼠,取 BMDM,与 FITC-F4/80 抗体孵育,FCM 分选阳性细胞,在 DEME/F12 培养,加入 10 mmol/mL L-谷氨酰胺,100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素和 100 U/mL 重组巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),体外分化实验如文献^[1,4]所述。

1.2.7 流式细胞仪(FACS)分选不同亚型巨噬细胞 贴壁培养的 BMDM,用 0.25% Trypsine solution 分离,PBS 清洗 3 次、重新悬浮,用异硫氰酸荧光素(FITC)-F4/80 抗体和 APC-MGL 抗体,分选巨噬细胞、M1 和 M2 亚型。数据通过 FlowJo Software 分析、定量^[4]。

1.2.8 细胞培养和目标基因的转染 人 HEK293 细胞(ATCC, Rockville, MD, USA)和小鼠巨噬细胞用 DMEM 培养基(DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),加 15% 胎牛血清(FBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)在 5% CO₂, 37 °C 培养箱培养。HEK293 和 BMDM 转导 AAV(血清型 8)-pCMV-PITE2 和 AAV-pCMV-scr^[5-6]。步骤为:选取基因文库人 TIPE2 cDNA(编号 NM_001014039.1),前端和尾端分别加入 *EcoR* I 和 *Nhe* I 限制性酶切位点。亚克隆到带有 50-*EcoR* I 位点和尾端 30-*Nhe* I 位点的 pAAV-CMV-GFP 质粒载体(Clontech, Mountain View, CA, USA),在 TIPE2/scr 和 GFP 基因之间构建 2A 多肽-ORF-多个顺向表达基因载体,2A 多肽有利于高效、功能区蛋白组装完成。3 个质粒共同转染:包括 pAAV-pCMV-TIPE2-GFP 或对照 pAAV-pCMV-scr-GFP 质粒(Clontech, Mountain View, CA, USA),R2C8(包括 AAV2 Rep 和 AAV8 cap 基因)和 plAd5(包括腺病毒辅助基因)(Applied Viromics, LLC, Fremont, CA, USA)通过 Lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen)转染到 HEK293 细胞,组装合成带有目标基因的 AAV。病毒纯化采用 CsCl 密度离心,滴度采用定量光密度斑点实验定量。HEK293 及原代小鼠巨噬细胞加入 AAV(MOI 为 100)培养 12 h。

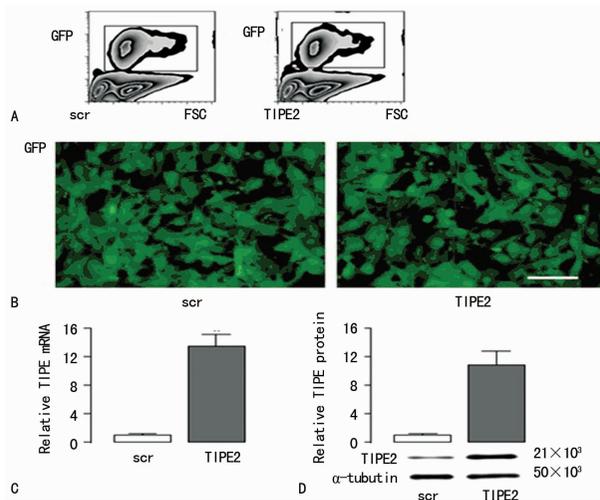
1.2.9 实时定量 PCR 巨噬细胞分选后,抽提 RNA,合成 cDNA,取 1:4 稀释的 cDNA,进行实时定量 PCR(Quantitect SyBr green PCR system, Qiagen)。引物为:TIPE2 正向 5'-GAC TGA CCA CAT ACC CCA CTC-3',反向 5'-TCA CCA AAG CTA AGT GCC GT-3';CD163 正向 5'-TCC ACA CGT CCA GAA CAG TC-3',反向 5'-CCT TGG AAA CAG AGA CAG GC-3';CD206 正向 5'-CAG GTG TGG GCT CAG GTA GT-3',反向 5'-TGT GGT GAG CTG AAA GGT GA-3';iNOS

正向 5'-CAG AGG ACC CAG AGA CAA GC-3',反向 5'-TGC TGA AAC ATT TCC TGT GC-3';Arginase 正向 5'-GCT GTC TTC CCA AGA GTT GGG-3',反向 5'-ATG GAA GAG ACC TTC AGC TAC-3'; α -tubulin 正向 5'-CCA AGC TGG AGT TCT CTA-3',反向 5'-CAG AGT GCT CCA GG-3'。数据收集和分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,定量 mRNA 相对表达水平,先与 α -tubulin 比值,再与对照比较。

1.3 统计学处理 采用 IBM SPSS19.0 统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,双尾 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染重组病毒细胞中 TIPE2 的过表达 制备 AAV-TIPE2 目标基因在 CMV 启动子控制下,空白对照带有无功能序列,两个病毒都带有 GFP 报告基因。病毒先感染 HEK293 细胞,通过 FCM 检测 GFP 荧光,分离和纯化转导细胞。目标基因和对照基因 AAV 病毒颗粒转染 HEK293 细胞,均能够表达强 GFP 荧光(图 1A、B)。采用实时定量 PCR 和蛋白印迹检测转导细胞 TIPE2 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示其表达水平为 AAV-scr 对照的 (13.5 ± 1.6) 倍和 (10.8 ± 1.6) 倍(图 1C、D)。



A: FCM 检测细胞 GFP 荧光强度,并纯化细胞;B: AAV-scr 和 AAV-TIPE2 组受感染细胞表达 GFP 强荧光;C: AAV-scr 和 AAV-TIPE2 受感染细胞 mRNA 的表达;D: AAV-scr 和 AAV-TIPE2 受感染细胞蛋白质的表达

图 1 TIPE2- AAV 过度表达载体的制备

2.2 TIPE2 对体外培养的巨噬细胞极化的影响 用 FCM 分选狼疮小鼠 BMDM,获得 F4/80⁺ 细胞(图 2),结果显示,AAV-TIPE2 组 MGL⁺ 细胞为 59.6%,MGL⁺/MGL⁻ 比值为 1.44;而 AAV-scr 组 MGL⁺ 细胞为 8.4%,MGL⁺/MGL⁻ 比值为 0.09。AAV-TIPE2 组与 AAV-scr 组巨噬细胞 M2/M1 比值之比为 16(图 2D)。RT 显示,M2 表达 CD163、CD206 和 Arginase 等分子,M1 表达 iNOS 分子(图 2E)。

2.3 AAV-TIPE2 对狼疮小鼠 M2 表达 TIPE2 的影响 AAV-TIPE2 处理小鼠 F4/80 双阳性巨噬细胞 TIPE2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著高于 AAV-scr 处理组(8 倍,图 3)。

2.4 AAV-TIPE2 在狼疮小鼠体内促进巨噬细胞向 M2 极化 AAV-TIPE2 处理狼疮小鼠模型 MGL⁺/F4/80⁺ 比值 (40 ± 10) 明显高于 AAV-scr 组的 (8 ± 2) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。狼疮小鼠模型体内实验也证实 TIPE2 可以诱导巨噬细胞向 M2 亚型极化。

2.5 AAV-TIPE2 减轻狼疮小鼠模型狼疮病情活动指标 检测狼疮小鼠血清抗 dsDNA 抗体、尿蛋白及肾病理活动指标,

结果显示 AAV-TIPE2 组血清抗 dsDNA 抗体、尿蛋白及肾病理活动指标明显低于 AAV-scr 组(表 1)。

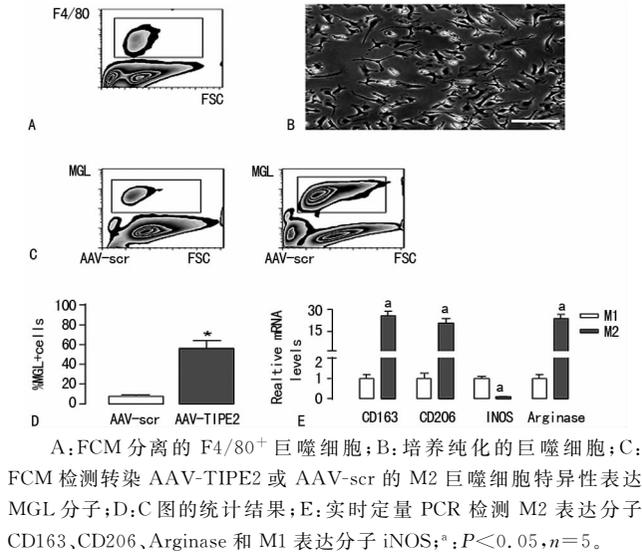


图 2 体外实验证实 TIPE2 诱导巨噬细胞极化

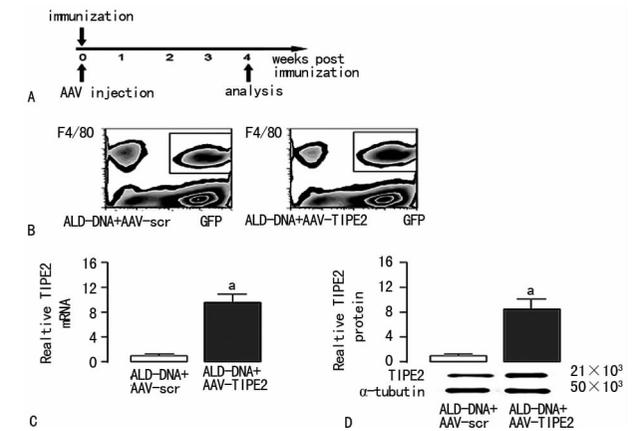


图 3 AAV-TIPE2 对狼疮小鼠 M2 表达 TIPE2 的影响

表 1 4 周后检测狼疮小鼠病情活动指标 (*n* = 10)

组别	尿蛋白 (mg/L)	肾病理 指数(分)	抗 dsDNA 抗体(OA)
AAV-TIPE2 组	3.80 ± 1.00	0.80 ± 0.63	0.44 ± 0.10
AAV-scr 组	14.90 ± 2.80	3.50 ± 0.53	0.78 ± 0.07
<i>t</i>	11.63	10.00	14.40
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01

3 讨论

巨噬细胞是机体的重要免疫细胞,具有吞噬、抗原递呈和分泌多种细胞因子等功能,在病原微生物与衰老细胞的清除、促进炎症反应、适应性免疫反应的诱发及损伤组织重构与修复过程中起关键作用。近年来,其在 SLE 等自身免疫性疾病的免疫调节方面的作用也受到了极大的关注。巨噬细胞大体可分为两种类型,即 M1 和 M2 型。M1 表达 iNOS 表型特征分子,并能够高效递呈抗原、高水平合成促炎细胞因子,是激活

Th1 细胞反应的效应细胞,具有抗病原微生物和肿瘤细胞的作用;M2 巨噬细胞以 CD163⁺、CD206⁺ 和 Arginase⁺ 为其表型特征,抗原递呈功能弱,特征为低表达白细胞介素(IL)-12、高表达 IL-10,具有抑制 Th1 免疫反应,具有调节免疫反应的作用。

笔者前期采用 ALD-DNA 诱导狼疮样小鼠。取骨髓来源的单核细胞, FACS 分选 F4/80⁺ 细胞,加入干扰素-γ(IFN-γ) 或 IL-4 体外培养,通过特异性分子表达(M2 特异性分子 CD163、CD206、Arginase 和 M1 特异性分子 iNOS)筛选 M1、M2。FACS 和实时定量 PCR 检测 CD163、CD206、Arginase 和 iNOS 表达^[1,4]。纯化的 M2 进行移植治疗狼疮小鼠结果显示:(1)氯磷酸盐清除巨噬细胞后,狼疮模型小鼠病情加重,给 M2 治疗后狼疮活动指数和肾病理改变明显改善。而单独注射 M1 则不能改善狼疮小鼠病情。(2)M2 直接注射治疗可减轻狼疮模型小鼠病情。(3)M1 过继移植可以加重狼疮模型小鼠病情活动指标^[1]。

TIPE2 可能是一种很强的 M1/M2 极化调节分子^[7],最新研究显示 TIPE2 可抑制 iNOS 表达,阻止 NO 和氧自由基(ROS)产生,而抑制炎症反应。但它在 SLE 中的调节作用目前尚少见报道。带着这个问题,应用已建立的 ALD-DNA 诱导的狼疮小鼠模型,研究 TIPE2 对 SLE 巨噬细胞极化的影响,并进一步探讨其治疗作用及机制。为了验证 TIPE2 促狼疮小鼠 M/M1 向 M2 极化,设计了 AAV-TIPE2-GFP 病毒载体,通过体外和体内实验,结果显示 TIPE2 基因的腺病毒相关载体在转染 HEK293 中稳定表达。在体外, TIPE2 对体外培养的巨噬细胞,促进其 M2 分子 CD163、CD206、Arginase 表达, AAV-TIPE2 处理小鼠 GFP⁺ P4/80⁺ 双阳性巨噬细胞 TIPE2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著高于 AAV-scr 组。狼疮小鼠模型体内实验证实 M2 巨噬细胞高表达 TIPE2 分子,同时也证实小鼠肾的巨噬细胞极化为表达 MGL 的 M2 亚型。AAV-TIPE2 能诱导 ALD-DNA 狼疮小鼠巨噬细胞向 M2 极化,并且改善狼疮小鼠病情活动指标。本研究表明, TIPE2 可以减轻 ALD-DNA 诱导的狼疮小鼠的狼疮活动指数,缓解狼疮病情。

Li 等^[8]对 39 例 SLE 患者外周血单个核细胞 TIPE2 基因的表达进行了检测, SLE 患者外周血单个核细胞 TIPE2 表达较正常对照组显著下调,且活动期比静止期下调更明显。同时, TIPE2 的表达与 SLE 病情活动性指标 SLEDAI 之间存在高度的负相关,该结果表明 TIPE2 在 SLE 患者病情发展过程中可能具有一定的调节作用。

张有斌等^[6]通过成功构建体内、体外都能稳定表达 TIPE2 的重组腺病毒载体,应用该载体使同种异体心脏移植大鼠受体体内过表达 TIPE2,能下调肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IFN-γ、IL-2 表达水平,上调 IL-4、IL-10 的表达水平,减轻急性排斥反应,显著延长供体在受体内的存活时间。Sun 等^[9]在自身免疫性脊髓炎中明确证实 TIPE2 的负向免疫调节作用。有研究发现 TIPE2+/+ 表达质粒明显提升大鼠佐剂型关节炎成纤维样滑膜细胞的 TIPE2 蛋白表达水平, TIPE2 对 DR5 介导细胞凋亡有重要作用^[10]。TIPE2 是一种新发现的免疫负调控分子,优先表达在正常小鼠的髓系和淋巴系细胞,而在人体分布更加广泛。TIPE2 可以调控 T 细胞受体和 TLR 的信号转导,从而对固有性免疫应答和适应性免疫应答进行免疫负调控,以便维持免疫自稳; TIPE2 还可以通过直接结合 caspase-8 后,抑制激活蛋白-1 和核因子-κB 的活化等途径发挥其促细胞凋亡作用^[2]。腺病毒相关载体则以其转染效率高,免疫原性低,长时稳定表达,定点整合无致癌隐患等独有的优势,在近(下转第 3323 页)

作用及机制。

本研究发现在胃癌细胞高表达 CDH17 时,细胞 TGF- β 的表达及分泌均较高,而抑制 CDH17 表达后,TGF- β 的表达及分泌均明显减少,提示 CDH17 可能对胃癌细胞 TGF- β 的分泌发挥作用。尽管 CDH17 是钙黏蛋白家族成员,通常被作为下游蛋白受上游分子信号调节。但近来研究表明,采用 siRNA 干扰技术,抑制 CDH17 的基因表达,可抑制上游 β -catenin/Wnt 和 Ras/MEK 信号通路活化,进而影响胃癌细胞的侵袭^[5-6]。本研究则发现,CDH17 高表达伴随的 TGF- β 高表达可增加 Smad3 磷酸化水平,而沉默 CDH17 表达后,在 TGF- β 产生减少的同时,Smad3 磷酸化水平也显著下降,表明 CDH17 也可介导上游 TGF- β /Smad3 信号通路活化,进而促进胃癌细胞侵袭。

TGF- β /Smad3 信号通路在介导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)中发挥最重要功能^[7]。而 EMT 通过细胞表型向间质转化,使细胞高表达基质金属蛋白酶,从而易于分解细胞外基质,利于细胞迁移;同时通过间质转化本身,细胞内骨架重排,迁移能力增强也有利于细胞迁移力及侵袭性增强^[8]。前期研究证实,CDH17 可通过诱导胃癌细胞 EMT 促进其侵袭。本研究也发现,Smad3 磷酸化水平与胃癌细胞侵袭性相关,无论抑制 CDH17 表达或直接抑制 Smad3 活化均可显著减少胃癌细胞侵袭。进一步证实 TGF- β /Smad3 信号通路可能通过诱导 EMT 在介导胃癌细胞侵袭性中发挥重要作用。

本研究发现为 CDH17 在调节胃癌细胞侵袭性中的作用提供了又一新的分子细胞生物学机制,较以往的研究不仅关注分子信号机制本身,结合前期研究更进一步揭示分子信号与侵袭终效应间的细胞生物学行为联系。但由于 β -catenin/Wnt 和 Ras/MEK 等信号通路也在 CDH17 介导的胃癌细胞侵袭中发挥重要作用,且细胞信号本身存在多种信号交联机制。因此进一步深入探寻信号交联分子在其中的作用,更有助于进一步阐明胃癌细胞侵袭转移机制。同时 CDH17 介导上游信号通路的活化调节是直接作用还是需要中间分子机制参与是下一个

研究目标。

参考文献

- [1] Park SS,Kang SH,Park JM,et al. Expression of liver-intestine cadherin and its correlation with lymph node metastasis in gastric cancer;can it predict N stage preoperatively? [J]. *Ann Surg Oncol*,2007,14(1):94-99.
- [2] Zavadil J,Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions [J]. *Oncogene*,2005,24(37):5764-5774.
- [3] 蔡洪培,高勇,张翼翔. 人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞 TGF- α 的自分泌[J]. 第二军医大学学报,2001,22(4):393-394.
- [4] 洪祖蓓,狄文,丁传伟. TGF- α /EGFR 自分泌环调控卵巢癌细胞增殖转移的分子机制[J]. 中国癌症杂志,2006,16(11):899-902.
- [5] Qiu HB,Zhang LY,Ren C,et al. Targeting CDH17 suppresses tumor progression in gastric cancer by downregulating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *PLoS One*,2013,8(3):e56959.
- [6] Wang J,Kang WM,Yu JC,et al. Cadherin-17 induces tumorigenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer through activation of NF κ B signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*,2013,14(3):262-270.
- [7] Micalizzi DS,Farabaugh SM,Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer:parallels between normal development and tumor progression[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,2010,15(2):117-134.
- [8] Yang J,Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis [J]. *Dev Cell*,2008,14(6):818-829.

(收稿日期:2016-12-19 修回日期:2017-03-07)

(上接第 3320 页)

些年的研究中得到了长足的发展^[11]。AAV 载体可操作性强,许多 AAV 已在临床中应用。因此,AAV-TIPE2 载体在 SLE 及其他自身免疫性疾病中应用,将有着无限广阔的前景。

参考文献

- [1] Li F,Yang Y,Zhu X,et al. Macrophage polarization modulates development of systemic lupus erythematosus[J]. *Cell Physiol Biochem*,2015,37(4):1279-1288.
- [2] Sun H,Gong S,Carmody RJ,et al. TIPE2,a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis[J]. *Cell*,2008,133(3):415-426.
- [3] 黄雯,吴厚生,冯树芳. 活化淋巴细胞的 ENA 免疫原性分析[J]. 中华皮肤科杂志,2003,36(2):82-84.
- [4] Davis BK. Isolation, culture, and functional evaluation of bone marrow-derived macrophages[J]. *Methods Mol Biol*,2013,1031(1):27-35.
- [5] Koerber JT,Maheshri N,Kaspar BK,et al. Construction of diverse adeno-associated viral libraries for directed evolution of enhanced gene delivery vehicles[J]. *Nat Protoc*,2006,1(2):701-706.

- [6] 张有斌,余云生,沈振亚,等. 过表达大鼠 TIPE2 基因重组腺病毒载体的构建[J]. 中国组织工程研究,2014,18(11):1743-1748.
- [7] Lou Y,Zhang G,Geng M,et al. TIPE2 negatively regulates inflammation by switching arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase[J]. *PLoS One*,2014,9(5):e96508.
- [8] Li D,Song L,Fan Y,et al. Down-regulation of TIPE2 mRNA expression in pheral blood mononuclear cells from Patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Immunol*,2009,133(3):422-427.
- [9] Sun H,Zhuang G,Chai L,et al. TIPE2 controls innate immunity to RNA by targeting the phosphatidylinositol 3-kinase-Rac pathway[J]. *J Immunol*,2012,189(6):2768-2773.
- [10] 石春燕,何琼,杨晶晶,等. TIPE2 过表达质粒转染大鼠佐剂型关节炎滑膜成纤维样细胞及分析[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(12):1240-1243,1253.
- [11] 李安琪,翟静. 腺相关病毒载体介导的肿瘤基因治疗研究进展[J]. 世界临床药物,2010,31(11):687-690.

(收稿日期:2016-12-18 修回日期:2017-03-06)