基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0298-04

靶向 Livin 的 RNA 干扰对食管癌 Eca-109 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的影响

陈 力,李 凡,任国胜

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨靶向 Livin 的 RNA 干扰对食管癌凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9 的影响。方法:采用慢病毒载体转染 Livin 高表达的食管癌 Eca-109 细胞株,从而有效地进行靶向 Livin 的 RNA 干扰。分别采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测各组细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 和蛋白表达情况。结果:与空白对照组和阴性组相比,实验组中 Livin 的 mRNA 及其蛋白的表达都明显降低($P<0.01$),而 Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 及其蛋白的表达都明显增加($P<0.01$)。结论:针对 Livin 的 RNA 干扰可有效降低 Livin 高表达的食管癌 Eca-109 细胞株中 Livin mRNA 和蛋白水平。同时,与细胞凋亡相关的信号分子 Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 和蛋白水平均明显升高。

【关键词】RNA 干扰;食管癌;细胞凋亡;Livin;Caspase

【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-09

Effect of RNA interference targeted to Livin on the expressions of apoptotic related proteins Caspase-3 and Caspase -9 in esophageal Eca-109 carcinoma cell

CHEN Li, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of RNA interference targeted to Livin on the expressions of apoptotic related proteins Caspase-3 and Caspase-9 in esophageal Eca-109 carcinoma cell. *Methods*: Transfection of lentiviral vector was employed to perform effective RNA interference targeted to Livin. Fluorescent quantitative PCR and Western blot was used to determine the mRNA and protein levels of Livin, Caspase-3 and Caspase-9 in groups. *Results*: The expression of mRNA and protein level of Livin in experimental group was significantly lower than that in normal control group and negative control group ($P<0.01$). The expression of mRNA and protein levels of Caspase-3 and Caspase-9 in experimental group were significantly higher than those in normal control group and negative control group ($P<0.01$), respectively. *Conclusion*: RNA interference targeted to Livin could decrease the expression of Livin effectively. Meanwhile, the mRNA and protein of apoptosis related signal molecules such as Caspase-3 and Caspase-9 were enhanced significantly.

【Key words】RNA interference; esophageal carcinoma; apoptosis; livin; Caspase

随着对疾病分子机制认识的加深及生物技术的发展,基因治疗手段已越来越多地应用于各类疾病,尤其是针对恶性肿瘤治疗的新焦点。

现在可用作肿瘤基因治疗的载体,主要有病毒学载体和非病毒学载体两类。已用于人体试验的肿瘤基因治疗方案中,绝大多数是以病毒学方法进行基因转移的,其中以逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和慢病毒载体较为成熟。慢病毒载体介导 RNA 干扰,就是将慢病毒载体高效感染和整合的特性,与 RNA 干扰特异性抑制同源基因表达的作用相结合。慢病毒载体不但可以感染非分裂期细胞,同时其转染效率高,还具有容纳外源性目的基因片段大、免疫反应小等优点,在基因治疗中具有广泛的应用前景。

本研究利用慢病毒载体构建 shRNA-Livin 干扰系统转染食管癌 Eca-109 细胞,探讨靶向 Livin 的 RNA 干扰对食管癌细胞凋亡相关信号分子 Caspase-3 和 Caspase-9 的影响,从而进一步明确 Livin 在食管癌发生发展中的作用及对细胞凋亡的影响。

作者介绍:陈 力(1973-),男,副教授,博士,

研究方向:胸部肿瘤。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

前期实验筛选所得到的高表达 Livin 的人食管癌 Eca-109 细胞株；大肠杆菌菌株 DH5α、胎牛血清、胰蛋白酶购于 Invitrogen；包装细胞 293T 细胞株购于中科院上海细胞所；限制性内切酶、1 kb/100 bp ladder 购于 Fermentas；T4 DNA 连接酶购于 NEB；质粒 DNA 提取试剂盒购于 Axygen；制备感受态试剂盒购于 BIOSCIENCES；凝胶回收试剂盒购于 Qiagen。

1.2 慢病毒载体转染食管癌 Eca-109 细胞株

1.2.1 shRNA 载体构建与克隆 PLL3.7 用 *Hpa* Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切；目的靶点基因片断利用 3' 和 5' 的引物退火获得：体系包括 2 μl 10×T4 Buffer、3.5/5 μl S/F、8 μl H_2O；配好以上体系后，放入沸水中煮沸（100℃）10 min；煮沸后放入 68℃水浴锅 30 min；PLL3.7（*Hpa* Ⅰ/*Xho* Ⅰ）双酶切，37℃酶切，3 h 后胶回收；把处理好的目的片段 Livin shRNA 与载体 PLL3.7（*Hpa* Ⅰ/*Xho* Ⅰ）连接：10×T4 Buffer：1.5 μl；T4 ligase：1 μl；PGK-rfp：1 μl；目的基因片段：2 μl；H_2O：9.5 μl，总计 15 μl；以上连接液在 4℃过夜，转化（感受态细胞：DH5a）。

1.2.2 将连接产物转化大肠杆菌 取 -80℃保存的 DH5α 感受态细菌，冰浴放置 5~10 min，使之冰中融化；将 5μl 连接产物加入感受态细菌，用移液枪缓慢混匀，冰浴放置 30 min；将混有连接产物的感受态细菌放入 42℃水浴中，热浴 90 s，冰浴 2 min；将转化产物加入 800μl 的 LB 培养基中，37℃、185 r/min 摇床培养 1 h；6 000 r/min离心 2 min，吸出弃去 800 μl 上清，剩余液体重悬细菌涂布 Amp+LB 平板。

1.2.3 质粒抽提 挑取阳性菌落使用 Axygen 质粒抽提试剂盒提取质粒，根据 Axygen 试剂盒说明书质粒抽提。

1.2.4 慢病毒包装与纯化

1.2.4.1 慢病毒生产实验步骤 ①慢病毒包装细胞转染用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞，细胞密度为 0.5×10^5 时重新接种于 25 ml 的 15 cm 细胞培养皿，37℃，50 ml/L CO_2 培养箱内培养；制备慢病毒包装系统中 4 种质粒 DNA溶液：pRsv-REV：10 μg；pMDlg-pRRE：15 μg；pMD2G：7.5 μg；干扰质粒：20 μg。②加入无菌水定容至 1 800 μl，再加入 $CaCl_2$（2.5 mol/L）溶液 200 μl，混匀，加入 2×BBS 缓冲盐溶液 2 000 μl，室温放置 20~30 min。③当细胞密度达 60%~70%时转染。将 DNA 和磷酸钙混合液转移至含单层细胞的培养液中，混匀，培养 12 h 后弃去含有转染混和物的培养液，加入 PBS 15 ml，轻摇后弃去，重复该步骤 3 次。④每瓶细胞中加入含100 ml/L 小牛血清的细胞培养液 15 ml，继续培养 48 h。⑤收集转染 72 h 的 293T 细胞上清液；将收集的上清液于 4℃，4 000 g 离心 10 min，收集上清液；将各种不同 RNA 干扰质粒上清液以 0.45 μm 滤器过滤。⑥于 40 ml 超速离心管中，4℃，25 000 r/min 离心 20 min；而后以冰 PBS 液，分别溶于 500 μl DMEM 和 500 μl PBS 重悬病毒沉淀于 4℃ 溶解过夜。

1.2.4.2 转染 Eca-109 细胞 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液，对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液，感染 Eca-109 细胞。实验分组为未转染组、阴性对照组（空载体组）、阳性对照组（实验组）。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测被转染的 Eca-109 细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平

RNA 抽提与 cDNA 的合成按试剂盒说明书进行，产物置于 -20℃冰箱内存放。荧光 PCR 扩增：PCR 反应体体系的反应体积为 25 μl，cDNA 2 μl，引物浓度 10 μmol，Taq 酶 1.25 U。引物序列：Livin，正义链：5'-TCTGCCTGTTCTGGACTGTG-3'，反义链：5'-TACAGTTAAGCCATCCCCCA-3'；Caspase-3：正义链 5'-TAGCGGATGGGTGCTATTGT-3'，反义链 5'-CGGATACACAGCCACAGGTA-3'；Caspase-9：正义链：5'-TAACAGGCAAGCAGCAAAGT-3'，反义链 5'-CATGCTCAGGATGTAAGCCA-3'；阳性对照：β-actin：正义链：5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3'，反义链 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'。首先配置标准品，标准品为 β-actin 的 1 段序列，梯度稀释为 1×10^1、1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^5，起始拷贝数分别为 10^5、10^4、10^3、10^2、10^1。反应条件：94.0℃ 1 min→（94.0℃ 10 s→52.0℃ 20 s→72.0℃ 20 s）×40→95.0℃ 1 min→55.0℃ 1 min→（72.0℃~95.0℃）×47，最后 47 个循环中每 2 个循环后升高 0.5℃。反应结束后，计算机将样本的扩增曲线与标准曲线对比，并结合内参自动计算出各样本 Livin 基因相对表达量。

1.4 统计学处理

采用统计分析软件 SPSS11.0 与 SAS8.1 进行数据分析。所有计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组资料之间比较用单因素方差分析或者秩和检验；使用方差分析条件的各组两两比较直接采用了 SNK-q 法，使用秩和检验的各组间的两两比较采用秩转换后的方差分析，多重比较采用了 SNK-q 法。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 标准曲线的绘制

将不同稀释度的阳性标准模板同时进行定量 PCR 检测，用 Ct 值与其对应的不同定量模板的对数拟合作图，其中横坐标代表不同定量模板起始拷贝数的对数（log10），纵坐标代表 Ct 值，得出一条定量标准曲线。Livin 在（10^3~10^4）拷/ml 范围内，Ct 值与起始模板浓度具有良好的线性关系。Livin 标准曲线相关系数达 0.971 2，直线方程为 y=-4.155 7x+40.484（图 1、2）。

2.2 转染后 Eca-109 细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 基因扩增曲线

反应结束后，各样本的扩增曲线（图 3）与标准曲线对比，结合内参自动计算出各样本 Livin、Caspase-3、Caspase-9 基因相对表达量（/actin）。结果显示，经过靶向 Livin RNA 干扰后，

实验组细胞中 Livin 基因 mRNA 表达水平较空白对照组和阴性组明显降低，且差异均具有统计学意义(P<0.01)；而与促进细胞凋亡相关的 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平均较空白对照组和阴性组明显升高，差异均具有统计学意义(P<0.01)(表 1)。

2.3　Western blot 检测转染后 Eca-109 细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白相对表达水平

Western blot 结果提示，经过靶向 Livin RNA 干扰后，实验组细胞中 Livin 基因蛋白表达水平较空白对照组和阴性组明显降低，且差异均具有统计学意义(P<0.01)；而与促进细胞凋亡相关的 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平均较空白对照组和阴性组明显升高，差异均具有统计学意义(P<0.01)(图 4、表 2)。

3　讨　论

Caspases 是一组半胱氨酸蛋白酶家族，其家族成员在细胞凋亡过程中起着重要的作用。Caspases 平时以无活性酶原形式存在于细胞质当中，诱导细胞凋亡的各种信号可能通过不同的信号传导系统激活 Caspases，使其裂解维持细胞生存的蛋白，从而导致细胞凋亡。

1994 年 Fernandez-Alnemri 等在 BenBank 表达序列标记(Expression sequence tag，EST)数据库中找到一段 ICE/CED-3 活性中心同源的序列，用它合成探针后，筛选人 Jurkat T 淋巴细胞 cDNA 文库，从中克隆到 1 种新基因，因其编码分子量

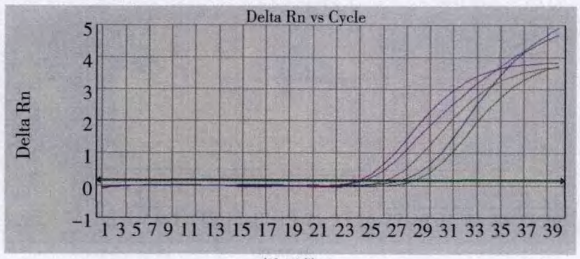


图 1　标准品扩增图谱

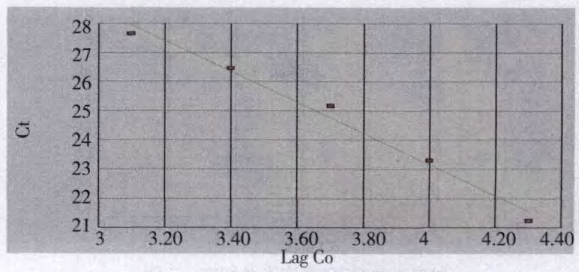


图 2　实时荧光定量 PCR 标准曲线

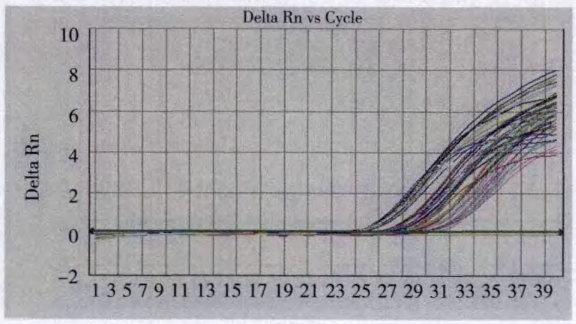
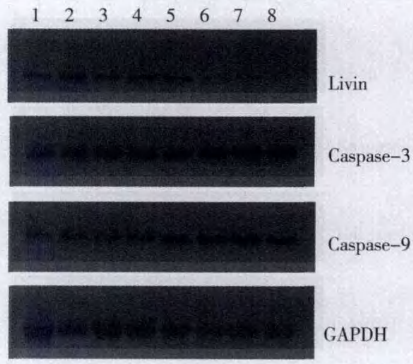


图 3　转染的 Eca-109 细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 扩增图谱



Line 1~3. 空白对照组; Line 4、5. 阴性组; Line 6~8. 实验组

图 4　各组 Eca-109 细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达情况

表 1　各组细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 基因 mRNA 相对表达水平

分组	Livin mRNA (/β-actin)	Caspase-3 (/β-actin)	Caspase-9 (/β-actin)
对照组	0.280 0 ± 0.010 0	0.316 7 ± 0.011 9	0.249 4 ± 0.007 0
阴性组	0.268 7 ± 0.014 0	0.296 0 ± 0.001 1	0.242 0 ± 0.006 0
试验组	0.088 0 ± 0.007 0 [a,b]	0.378 7 ± 0.004 9 [a,b]	0.332 6 ± 0.012 3 [a,b]

注：[a] P<0.01 与对照组相比；[b] P<0.01 与阴性组相比

表 2　各组细胞中 Livin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白相对表达水平

分组	Livin protein (/GAPDH)	Caspase-3 protein (/GAPDH)	Caspase-9 protein (/GAPDH)
对照组	0.301 0 ± 0.020 4	0.327 0 ± 0.012 1	0.198 0 ± 0.008 8
阴性组	0.290 0 ± 0.021 8	0.333 0 ± 0.006 1	0.212 0 ± 0.010 4
试验组	0.065 0 ± 0.045 4 [a,b]	0.562 0 ± 0.041 1 [a,b]	0.326 0 ± 0.009 9 [a,b]

注：[a] P<0.01 与对照组相比；[b] P<0.01 与阴性组相比

为 32 kD 的半胱氨酸蛋白酶而称之为 CPP32(Cysteine protease protein, 32 kD)。随后,其它学者独立地将这一蛋白基因克隆出来,并分别命名为 prICE、apopain(凋亡素)和 Yama(印度传说中的死亡之神)。1996 年这种蛋白酶被命名为 Caspase-3。现在一般认为 Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,也是 CTL 细胞杀伤机制的重要组成部分。

pro-Caspase-3 含有 277 个氨基酸残基,分子量约 32 kD,与 ICE 有 30%同源性,与 CED-3 有 35%同源,是 Caspase家族中与 CED-3 同源性最高的,不论从结构同源性还是从底物特异性来看都与 CED-3 很相似,所以有人认为它是 CED-3在哺乳动物中的同源蛋白。Caspase-3 的原结构域明显短于 ICE,只有 28 个氨基酸残基,但蛋白酶活性中心和与结合底物有关的保守氨基酸均与 ICE 一致。pro-Caspase-3 在活化过程中从 Asp28~Ser29 和 Asp175~Ser176 两处被剪切,形成 P17(29~175)和 P10(182~277)2 个片段,相当于 ICE 的 P20 和 P10,2 种亚基再组成活性形式的 Caspase-3。pro-Caspase-3 本身并没有催化活性,在活化时首先由颗粒酶 B(GrzB)或Caspase-10在 D175 剪切下小片段后它才被部分活化,随后则可进行下一步的自我催化。在剪切原结构域时可能还有其它 Caspase如 ICE 的参与。

Caspase-3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用,Caspase-3 基因转染昆虫 sf9 细胞后,引起细胞凋亡,这个过程可以被 Bcl-2 阻断; 在发生凋亡的细胞提取液中去除 Caspase-3 后,这些提取液就失去了诱导细胞凋亡的能力;再加入纯化的 Caspase-3,它就又恢复了致凋亡的功能。Caspase-3 可以被多种因素活化,在 CTL 细胞的杀伤作用中,它既可被Fas/FasL 途径活化,也可以通过颗粒酶 B 途径活化。颗粒酶 B 是 CTL 细胞颗粒中的一种丝氨酸酯酶,是哺乳动物中 Caspase蛋白酶外唯一的在 Asp 后剪切的蛋白酶,它可以特异性剪切 ICE家族蛋白酶催化亚单位 C 端的 IxxD 序列,并活化Caspase 2、3、6、7、8、9、10。ICE 也可以被颗粒酶剪切,但剪切后并不被活化。

Caspase-3 最主要的底物是多聚(ADP- 核糖)聚合酶PARP (ADP-ribose) polymerase,该酶与 DNA 修复、基因完整性监护有关。在细胞凋亡启动时,116 kD 的 PARP 在Asp216~Gly217 之间被 Caspase-3 剪切成 31 kD 和 85 kD 2 个片段,使 PARP 中与 DNA 结合的 2 个锌指结构与羧基端的催化区域分离,不能发挥正常功能。结果使受 PARP 负调控影响的 Ca^{2+}/Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶的活性增高,裂解核小体间的 DNA,引起细胞凋亡。这种裂解过程可被 Caspase-3 的特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 所抑制,但不能被 CrmA 抑制。Caspase 3 还可以剪切 U1-70K、DNA-PK、PKCd 和 PKCq 。PKCd 和 PKCq 都属于新型 PKC(novel PKC,nPKC),当被Caspase-3 剪切后,可以切除调节区域,而成为活性形式的PKC。另外实验还证明,过量表达 PKCd 和 PKCq 均可以引起细胞凋亡,说明它们都参与了细胞凋亡的诱导。

Caspase-9 也是一种促凋亡因子,它同样是 Caspase 系统中引起细胞凋亡的最关键成分之一。Caspase 引起细胞凋亡的途径,通常是死亡受体接受死亡信号后,引起 pro-Caspase-9 激活,最终导致 Caspase-3 激活,导致凋亡[4]。Livin 能够在凋亡起始点干扰 pro-Caspase-9 或者直接干扰 Caspase-9 的活性以达到抑制凋亡[5]。

Livin 抑制细胞凋亡作用,主要通过其 BIR 区与 Caspase 结合,抑制 Caspase 活性,尤其是抑制 Caspase-3、7、9 的活性,达到阻断凋亡受体及以线粒体为基础的凋亡途径而起作用。在本实验中,我们将重点探讨靶向 Livin 干扰后,对 Caspase-3 及 Caspase-9 活性的影响。Livin 与 Caspase 的结合具有高度的亲和性和特异性,这有赖于其 BIR 结构域的完整。BIR 结构域内单个氨基酸的突变即可导致 Livin Caspase 结合能力及 Livin抗凋亡作用明显降低甚至完全丧失。另外,除影响Caspase 通路外,Livin 还可通过 TAK 使丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK) JNK1 和JNK2 活化,而 Livin 对 JNK1 的激活作用强于 JNK2,这是 Livin 对抗 TNFα 和 ICE 介导的细胞凋亡作用的 1 条重要途径[6]。也有研究表明,第二个线粒体激活因子(Second mitochondria derived activator of caspases,SMAC)可下调 Livin 的抗凋亡活性,直接与 Livin 结合成 Smac Livin 复合物,使 Livin 的 BIR 功能区失去活性,从而下调其抗凋亡活性[7]。

Crnkovic-Mertens 等[8]利用 siRNA 干扰技术,有效地阻滞了内源性的 Livin 后,发现 Caspase-3 及 Caspase-9 的活性明显增强,并且提高了肿瘤细胞的凋亡率。但是也有研究者发现,Caspase 3/7 在 Asp-52 位点裂开 Livin,即使 Livin 含有BIR 结构域和 RING 环,Livin 裂解后的亚单位反而获得了促进凋亡的能力,同时 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性也被抑制[9]。这种现象表明,Livin 对于 Caspases 蛋白有复杂的调节机制,也表明了 Livin 结构的完整性,是Livin 发挥抗凋亡作用的前提条件[10]。在我们的实验中,同样也观察到,在采用 RNA 干扰技术后,可显著升高食管癌高表达细胞株 Eca-109 中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达,说明 Livin 的存在抑制了 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达。这充分说明,作为凋亡抑制因子,Livin 功能的完整与 Caspase-3 和 Caspase-9 的失活状态密切相连;一旦解除了 Livin 这一凋亡抑制因素,Caspase-3 和 Caspase-9 即触发了凋亡的发生。这提示,抑制食管癌中的 Livin 基因,可能成为治疗食管癌有效的途径之一。

参 考 文 献

[1] Lin J H, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279 (3):820-831.

[2] Salvesen G S, Duckett C S. IAP p roteins: Blocking the road to death' sdoor[J]. Nat RevMol Cell Biol, 2002, 3 (6): 401- 410.

[3] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant exp ression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apo tosis p rotein family, Livin /ML2IAP in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (3): 1000-1009.

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0302-04

糖皮质激素对儿童重症肌无力 Th1/Treg 细胞转录因子表达的影响及机制研究

黄志新[1],黄 志[2]

(1.儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室;2.重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨糖皮质激素治疗对儿童重症肌无力(Myasthenia gravis,MG)Th1/Treg 细胞转录因子表达及相关细胞因子的影响。方法:应用 RT-PCR 技术检测 52 例 MG 患儿和 20 例健康对照者外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell,PBMC)T-bet 和 FOXP3 mRNA 的表达情况,应用 ELISA 法检测相关细胞因子干扰素 -γ(Interferon-gamma,IFN-γ)、白细胞介素 -6(Interleukin-6,IL-6)及转化生长因子 -β1(Transforming growth factor-β1,TGF-β1)的浓度变化情况。结果:与健康对照组比较,患儿 T-bet mRNA 的表达显著增高($P<0.05$),而激素治疗前组与治疗后组比较无显著性差异。激素治疗前组 FOXP3 mRNA 的表达显著高于健康对照组($P<0.05$),激素治疗后组与健康对照组比较,差异无统计学意义,激素治疗前后组无显著性差异。T-bet mRNA 与 FOXP3 mRNA 的表达比值,激素治疗前组显著高于健康对照组($P<0.05$)。激素治疗后组与健康对照组及治疗前组比较,IFN-γ 的浓度显著升高($P<0.05$),而健康对照组与治疗前组比较无显著性差异。3 组之间,IL-6 和 TGF-β1 的浓度无显著性差异。结论:T-bet mRNA 和 FOXP3 mRNA 在 MG 患儿中表达异常,表明 Th1 和 Treg 细胞参与了 MG 的发病,经激素治疗后免疫功能有所恢复;本组患儿 IL-6 和 TGF-β1 的浓度无明显异常,提示这些患儿免疫功能紊乱程度较轻,未达到显著差异水平;而在一定情况下,IFN-γ 在治疗后其水平升高可能对机体发挥着一定的保护作用。

【关键词】儿童重症肌无力;T-bet;FOXP3;干扰素 -γ

【中国图书分类法分类号】R746.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-01

The impact of glucocorticoid treatment to Th1/Treg cell transcription factor expression in children with myasthenia gravis and its mechanism research

HUANG Zhi-xin, et al

(*Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of glucocorticoid treatment on the expression of Th1/Treg cell transcription factor and related cytokines in children with myasthenia gravis (MG). *Methods*: RT-PCR was used to detect the expressions of T-bet and FOXP3 mRNA in children's peripheral blood mononuclear cells of 52 MG patients and 20 healthy children; ELISA was applied to analyze related cytokines IFN-γ, IL-6 and TGF-β1 concentration changes. *Results*: Compared with the healthy control group, the T-bet mRNA expression was significantly higher ($P<0.05$) in children with MG, while the groups before and after hormone treatment were

作者介绍:黄志新(1985-),男,硕士,

研究方向:小儿神经系统免疫性疾病和惊厥性疾病。

通信作者:黄 志,男,教授,Email:huangzhi3500@yahoo.com.cn。

[4] Altieri D C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(12): 542-547.

[5] Vucic D, Stennicke H R, Pisabarro M T, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. Curr Biol, 2000, 10 (21): 1359 - 1366.

[6] Sanna M G, Correia J D S, Ducrey O, et al. IAP Suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1 /JNK1 signaling cascade and caspase inhibition[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (6): 1754-1766.

[7] Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, et al. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML2IAP) [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (14): 12275-12779.

[8] Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. Oncogene, 2003, 22(51):8330-8336.

[9] Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, et al.Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma[J].Cancer Res, 2003, 63(19): 6340-6349.

[10] Nachmias B, Lazar I, Elmalech M, et al. Subcellular localization determines the delicate balance between the anti-and pro-apoptotic activity of Livin[J]. Apoptosis, 2007, 2 (9):9-15.

(责任编辑:冉明会)