

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720081152618

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

重组人胸腺素 α 原抗肿瘤活性及机理研究

Study on the Effects and Mechanisms of Recombinant

Human Prothymosin α of antitumor activity

韩 伟

指导教师姓名: 周克夫 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(周克夫和刘升发)课题(组)的研究成果,获得(周克夫)课题(组)经费或实验室的资助,在(刘升发和周克夫)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要.....	1 -
英文摘要.....	2 -
第一章 前言.....	4 -
1.1 胸腺素 α 原概述.....	4 -
1.2 白介素-2 和干扰素- γ 简介.....	9 -
1.3 裸鼠简介.....	10 -
1.4TLRs 简介.....	11 -
第二章 ProT α 抑制肿瘤生长实验.....	14 -
2.1 ProT α 分别联合 IL-2 和 IFN 对小鼠肉瘤 S180 的抑制作用.....	14 -
2.1.1 实验药品和实验动物.....	14 -
2.1.2 实验步骤.....	14 -
2.1.3 实验结果.....	15 -
2.2 重复 ProT α 分别联合 IL-2 和 IFN 对小鼠肉瘤 S180 的抑制作用.....	16 -
2.2.1 实验药品和实验动物.....	16 -
2.2.2 实验步骤.....	16 -
2.2.3 实验结果.....	17 -
2.3 ProT α 联合 IL-2 抑制人肝癌细胞株 HepG2 裸鼠皮下移植瘤.....	19 -
2.3.1 实验药品、实验动物和实验仪器.....	19 -
2.3.2 实验步骤.....	20 -
2.3.3 实验结果.....	20 -
2.4 ProT α 联合 IL-2 抑制人肺癌细胞株 A549 裸鼠皮下移植瘤.....	22 -
2.4.1 实验药品、实验动物和实验仪器.....	22 -
2.4.2 实验步骤.....	23 -
2.4.3 实验结果.....	24 -
第三章 肿瘤组织 H&E 染色.....	26 -
3.1 实验药品、实验材料和使用仪器.....	26 -
3.2 实验方法.....	26 -
3.3 实验步骤.....	27 -
3.4 实验结果.....	27 -
第四章 MTT 法检测外源 ProT α 对肿瘤细胞生长的影响.....	29 -
4.1 实验药品、实验材料和实验仪器.....	29 -
4.2 实验方法.....	29 -
4.3 实验步骤.....	30 -
4.4 实验结果.....	31 -
第五章 ELISA 法检测荷瘤小鼠血清中 TNF- α 和 IFN- γ 含量.....	32 -
5.1 实验药品、实验材料和实验仪器.....	32 -
5.2 实验方法.....	32 -
5.3 实验步骤.....	32 -
5.4 实验结果.....	33 -
第六章 半定量 PCR 法检测荷瘤裸鼠组织中 TLR2 和 TLR4 含量.....	39 -
6.1 实验药品、实验材料和实验仪器.....	39 -
6.2 实验方法.....	39 -

6.3 实验步骤.....	- 40 -
6.4 实验结果.....	- 42 -
第七章 讨论.....	- 45 -
参考文献.....	- 47 -
致谢.....	- 54 -

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

ABSTRACT IN CHINESE	- 1 -
ABSTRACT IN ENGLISH.....	- 2 -
Chapter I Rreface	- 4 -
1.1 Summarize of ProTα.....	- 4 -
1.2 Brief introduction of IL-2 and IFN-γ	- 9 -
1.3 Brief introduction of nude mice	- 10 -
1.4 Brief introduction of TLRs	- 11 -
Chapter II ProTα inhibit tumor growth.....	- 14 -
2.1 Treat S180 bearing tumor mice with ProTα combined IL-2&IFN-γ -	14 -
2.1.1 Experimental drugs and animal	- 14 -
2.1.2 Experimental Procedure	- 14 -
2.1.3 Experimental result.....	- 15 -
2.2 Repeat Experiment above	- 16 -
2.2.1 Experimental drugs and animal	- 16 -
2.2.2 Experimental Procedure	- 16 -
2.2.3 Experimental result.....	- 17 -
2.3 Treat HepG2 bearing tumor nude mice with ProTα combined IL-2-	19 -
2.3.1 Experimental drugs、 animal and instrument.....	- 19 -
2.3.2 Experimental Procedure	- 20 -
2.3.3 Experimental result.....	- 20 -
2.4 Treat A549 bearing tumor nude mice with ProTα combined IL-2..	- 22 -
2.4.1 Experimental drugs、 animal and instrument.....	- 22 -
2.4.2 Experimental Procedure	- 23 -
2.4.3 Experimental result.....	- 24 -
Chapter III H&E staining of tumor tissue	- 26 -
3.1 Experimental drugs material instrument	- 26 -
3.2 Experimental methods	- 26 -
3.3 Experimental Procedure	- 27 -
3.4 Experimental result	- 27 -
Chapter IV ProTα's effect on tumor cell's growth with MTT assay	- 29 -
4.1 Experimental drugs material instrument	- 29 -
4.2 Experimental methods	- 29 -
4.3 Experimental Procedure	- 30 -
4.4 Experimental result	- 31 -
Chapter V Detect concentration of IL-2&IFN-γ with ELISA assay	- 32 -
5.1 Experimental drugs material instrument	- 32 -
5.2 Experimental methods	- 32 -
5.3 Experimental Procedure	- 32 -
5.4 Experimental result	- 33 -
Chapter VI Detect expression of TLR2&TLR4 with SqRT-PCR assay	- 39 -
6.1 Experimental drugs material instrument	- 39 -
6.2 Experimental methods	- 39 -

6.3 Experimental Procedure	- 40 -
6.4 Experimental result	- 42 -
ChapterVII Discussion	- 45 -
References	- 47 -
AcknoWledgmnts	- 54 -

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

胸腺素 α 原 (Prothymosin α , ProT α) 是胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$) 的前体蛋白, 在哺乳动物细胞中广泛分布, 在淋巴组织及非淋巴组织均可找到。在细胞内, ProT α 作为一种核蛋白, 参与对细胞周期的调节, 促进细胞增殖; 在细胞外, 胸腺素 α 原通过潜在的膜受体调节免疫应答, 促进 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 等细胞因子的产生, 进而增强细胞和体液免疫应答。

胸腺素 α 原作为一种免疫调节因子, 对抑制肿瘤生长有一定效果。本实验主要研究胸腺素 α 原分别联合白介素-2 和 γ -干扰素, 对荷瘤小鼠的肿瘤抑制效果, 实验结果证明胸腺素 α 原联合白介素-2 的抑瘤效果优于单独使用。对肿瘤组织进行 H&E 染色, 观察肿瘤细胞, 可看出被抑制肿瘤细胞的凋亡状况。另外, 通过 MTT 法证明, 在体外环境中加入胸腺素 α 原, 不能促进或是抑制肿瘤细胞生长, 说明它是通过调节免疫功能达到间接抑制肿瘤的效果。分离获得肿瘤抑制实验中的小鼠血清样品, 通过 ELISA 方法分析其中 γ -干扰素和肿瘤坏死因子- α , 发现使用胸腺素 α 原联合白介素-2 的小鼠血清样品, 这两种细胞因子含量均较其他组高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明胸腺素 α 原联合白介素-2 后, 增强了机体免疫能力, 抑制了肿瘤生长。TLRs 信号通路可导致肿瘤细胞逃脱免疫监视, 进而促进肿瘤细胞增长, 通过分离肿瘤抑制实验中的小鼠肿瘤组织, 采用半定量反转录-聚合酶链反应方法检测肿瘤组织中 TLR2 和 TLR4 的表达量。在本实验中, 发现胸腺素 α 原联合白介素-2 的小鼠肿瘤组织中, TLR2 和 TLR4 表达量均较其他组低, 同样说明胸腺素 α 原联合白介素-2 通过某种发生抑制了 TLR2 和 TLR4 的表达。具有显著性差异 ($P < 0.05$)。本研究从分子, 免疫和蛋白水平揭示从中国健康青年人外周血淋巴细胞克隆表达的人胸腺素 α 原作为一种免疫调节因子, 在动物体内有效抑制动物和人肿瘤细胞株的生长的作用机制, 为进一步研究开发 ProT α 作为抗肿瘤药物提供科学依据。

关键词 胸腺素 α 原 肿瘤 白介素-2 γ -干扰素 肿瘤坏死因子- α Toll 样受体

Abstract

Prothymosin alpha (ProTα) is the precursor protein of thymosin α 1 (T α 1), it is a small molecule of natively unstructured acid protein. It widely exists in mammalian tissues. It could be found in lymphoid tissue as well as in non-lymphoid tissues. In the exterior of cell, Prothymosin alpha, as a nucleoprotein, participate in the regulation of cell cycle, promote Cell Proliferation; But in extra cellular the ProTα could regulate immune response through potential membrane receptor, promote production of many kinds of cytokines, such as IFN- γ 、TNF- α 、IL-2, then enhance cellular immunity and humoral immunity.

As an immunological regulation factor, ProTα has obvious effect to inhibit tumor-growing. The present experiments were mainly paid attention to studying the anti-tumor effect that ProTα combined with IL-2 or TNF- α . The results indicates that the tumor mass treated by ProTα and IL-2 were smaller than those control group and the group treated with ProTα and IL-2 separately. H&E staining with tumor tissue to observe the tumor cell's apoptosis. For the more, through MTT assay, when ProTα was added in culture medium, it could not inhibit nor enhance tumor cells growth. The result proved that the mechanism of ProTα did not inhibit the tumor cell directly.

Therefore we analyzed the regulation effect of ProTα to immunity function, especially to the cellular immunity, The ELISA assay was used to detect the concentration of IFN- γ and TNF- α in blood serum come from the mice with tumor. The result indicated that the mice treated with ProTα and IL-2 had higher concentration of IFN- γ and TNF- α than those of control group and treat with only ProTα and IL-2 separately, and also much better than those of treated with ProTα combined with TNF- α these results proved that the combination of ProTα and IL-2 could enhance immunity and inhibit tumor growth. The SqRT-PCR assay was used to detect the expression level of TLR2 and TLR4 in tumor tissue. The result indicated that the mice treated with ProTα and IL-2 had lower expression level of TLR2 and TLR4 than that of other groups, which means ProTα and IL-2 could inhibit the expression of TLR2 or TLR4 through certain signal pathway.

In conclusion, as an immunological regulation factor, ProTα could inhibit tumor's growth through enhance the cellular immunity and other signal pathway. The present

results provided evidences to reveal the mechanism of ProT α that inhibit the tumor growth, it would benefit to further study and development the inhibit drug with combining ProT α in clinic application.

Key words prothymosin α tumor IL-2 IFN- γ TNF- α Toll-like receptor

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 胸腺素 α 原概述

胸腺素 (thymosin), 是由胸腺分泌的一类促细胞分裂的具有生理活性的多肽激素。可诱导造血干细胞发育为 T 淋巴细胞, 具有增强细胞免疫功能和调节免疫平衡等作用。临床上常用的胸腺素是从小牛胸腺发现并提纯的有非特异性免疫效应的小分子多肽。其中含有 40 余种肽类。胸腺素作为药物在临床应用已有数十年的历史, 随着研究的深入, 人们已经将研究重点转向胸腺素中的单一肽, 以期发现更有效的临床治疗药物。胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$) 是胸腺素中最先被纯化出来的一种含有 28 个氨基酸残基的多肽^[1], 并被证明是胸腺素中的主要成分^[2,3]。胸腺素 α 原 (prothymosin α , ProT α) 的 N 端含有完整的 T $\alpha 1$ 28 肽。ProT α 具有与 T $\alpha 1$ 相似甚或更高的免疫调节活性。胸腺素 α 原是胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$) 的前体蛋白。胸腺素 α 原相对分子质量只有 12.5k, 一级结构十分简单, 由于不含含硫氨基酸和芳香族氨基酸残基, 因此在波长 280 处没有吸收峰。而且由于胸腺素 α 原含有大量的酸性氨基酸残基, 约占总数的 50% (18 个天冬氨酸和 39 个谷氨酸残基), 且大部份成簇分布于分子中部^[4], 因此使得蛋白酸性很强 (pI=3.55) 并高度亲水, 被认为是真核生物中酸性最强的肽类之一。由于胸腺素 α 原缺乏疏水性氨基酸密集区域^[5], 因此不可能形成信号肽结构, 也就不能以常规方式向胞外分泌。同时, 在胸腺素 α 原分子 C 端存在可疑的核蛋白结合位点^[6] (氨基酸残基 87-88 和 101-104), 次位点由 KKQK 和 KRAA 两部分串联组成, 中间间隔约 10 个氨基酸残基, 是胸腺素 α 原核定位以及携带与之共价结合的非核蛋白进入细胞核的充分必要条件。胸腺素 α 原进入核内, 与某些核内组分紧密结合, 参与转录调节^[7]。胸腺素 α 原除了存在于核内, 也间歇地在细胞质中出现, 然后再被泵入核内^[8]。由此可以推测胸腺素 α 原具有一定的可扩散性, 是一种穿梭蛋白。这与前面提到的分子中部的高酸性区 (被认为是组蛋白的结合位点) 一起为胸腺素 α 原作为一种核蛋白提供了依据。天然的胸腺素 α 原 N 端是乙酰化的。胸腺素 α 原没有糖基化位点。当体内胸腺素 α 原被高度磷酸化修饰时, 磷酸化位点位于分子中成簇分布的谷氨酸残基上^[9]。在体内, 谷氨酸是胸腺素 α 原的惟一磷酸化位点, 但磷酸化的胸腺素 α 原在体内的半衰期只有 80min 左右。由于磷酸化的谷氨酸极不稳定, 有很高的自由

能, 在体外分离过程中, 谷氨酰胺磷酸会迅速水解, 并将磷酸基团转移到 N 端第 1 位乙酰化的 Ser 残基上 (人胸腺素 α 原) 或转移到 N 端前 14 位非特异的 Thr 残基上 (大鼠胸腺素 α 原)^[10], 所以体外提取到的胸腺素 α 原大部分都是普通的 Ser、Thr 残基磷酸化。这个特殊的蛋白是目前哺乳动物体内发现的惟一个谷氨酸磷酸化的蛋白。

胸腺素 α 原基本上广泛分布在哺乳动物的各种组织中, 尤其是在胸腺和脾中的含量最高, 并且在种属间高度保守。以前认为 ProT α 原只存在哺乳动物细胞中, 近年在非哺乳脊椎动物 *Rana esculenta* 蛙的睾丸和哈德氏腺体中也发现了呈时空性表达的胸腺素 α 原, 与哺乳动物胸腺素 α 原具有高度的同源性^[11, 12]。人胸腺素 α 原由 109 个氨基酸残基组成, 与大鼠的胸腺素 α 原序列有 6 个位点的差异, 包括 4 个位点的替代和 2 个位点的缺失^[13-16]。牛胸腺素 α 原也由 109 个氨基酸残基组成的, 与人的胸腺素 α 原序列相比较只有 2 个位点的差异, 其 31 位和 83 位的氨基酸残基分别由 Glu 和 Ala 替代了 Asp 和 Ser^[17]。山羊和猪的胸腺素 α 与人和牛的胸腺素 α 原也有很高的同源性^[18, 19]。

胸腺素 α 原虽然不含信号肽结构, 却可以在血清和胸腺细胞体外培养的上清液中检测到胸腺素 α 原的存在。人们推测它是一种可以以某种未知机制进行分泌的蛋白质。然而胸腺素 α 原分子结构中含有核蛋白结合位点, 并且利用分子生物学技术、免疫荧光技术^[20]也直接证明了胸腺素 α 原主要分布在细胞核内。这些结果提示, 胸腺素 α 更可能是一种核定位蛋白, 这两方面的矛盾就是人们对于胸腺素 α 原的定位所存在的主要争议。后来的实验发现人淋巴细胞表面存在胸腺素 α 原受体^[21], 这个发现也为胸腺素 α 原的胞外存在和细胞外功能提供了可信的证据。Cordero^[22]等用 ¹²⁵I 标记胸腺素 α 原的方法研究了 2 类人淋巴细胞亚群 (YT 淋巴细胞和淋巴母细胞) 上的胸腺素 α 原受体, 发现在人淋巴母细胞膜表面存在 2 类胸腺素 α 原受体, 一类是高亲和力受体, 另一类是低亲和力受体。而另一类淋巴细胞 YT 淋巴细胞只有高亲和力的胸腺素 α 受体。研究还发现, 胸腺素 α 原通过非 T α 1 序列与其受体结合, T α 1 对其没有竞争性抑制作用, 但胸腺素 α 原抗体能拮抗这种结合, 同时发现这种结合与温度和时间有关。经过进一步研究发现, 在 PHA 诱导的淋巴母细胞上存在的高特异性受体, 主要包括由相对分子质量分别为 31000、29000 和 19000 的 3 种蛋白

所组成的不同复合体，其中相对分子质量是 31000 和 29000 成分是低亲和力受体的主要组成部分^[23]。毫无疑问，对于胸腺素 α 原的受体及其信号传导机制的研究，将为其进一步的功能研究和临床试验提供重要的理论依据。

胸腺素 α 原具有 2 种不同的功能活性，胞外的免疫调节活性和在胞内促进细胞增值的作用。其中，对细胞增殖及基因的转录的调控是胸腺素 α 原行使其多种功能的基础，分子作用机制成为近年来胸腺素 α 原研究的重点。虽然已证实胸腺素 α 原是一种核蛋白，但是仍不能排除胸腺素 α 原细胞外存在的可能性。许多体外实验表明胸腺素 α 原蛋白具有调节免疫和抗癌活性。一些研究者认为细胞外的胸腺素 α 原源于死亡破裂的细胞，并且在人淋巴细胞表面发现了胸腺素 α 原的受体^[24]。当胸腺素 α 原以外源形式用于体外实验时，胸腺素 α 原能够增加脾细胞分泌干扰素（IFN- γ 、IFN- α ）和肿瘤坏死因子（TNF- γ ）^[25]。由于干扰素能够通过诱导 STAT3 转录因子（调节急性期基因表达）酪氨酸磷酸化来调整各种基因的表达，而胸腺素 α 原可与酪氨酸磷酸化的 STAT3 转录因子的氨基末端相结合，因此能够在免疫防御反应中起关键性的作用^[26]。Skopeliti 等^[27]最近发现，在凋亡细胞中，胸腺素 α 原被 caspases 切割产生的多个 C 末端的片段，具有刺激外周血单核细胞增殖、自体混合淋巴细胞反应、自然杀伤（NK）淋巴因子激活的杀伤细胞活性，促使胞内穿孔素产生，上调粘附分子和 CD25 的表达以及淋巴细胞活化等免疫调节活性。胸腺素 α 原在核内和胞外的作用机制可能不同。胸腺素 α 原与 T α 1 一样具有免疫调节作用。与小鼠胸腺素 α 原相比，人胸腺素 α 原的作用要弱，其中原因可能是其 C 端氨基酸残基序列的差别。胸腺素 α 原能刺激单核细胞释放转移抑制因子（MIF），其作用比 T α 1 强 10-20 倍^[28]。随后研究发现，胸腺素 α 原可以促进 RF/J 小鼠脾脏 T 细胞产生特异性抗体的，并且锌能加强这种作用^[29]。胸腺素 α 原具有抗癌作用。胸腺素 α 原可以明显延长大部分白血病模型 DBA/2 小鼠的存活期，对小鼠进行当腹腔注射胸腺素 α 原后，具有能够增强腹膜内巨噬细胞的杀瘤作用，提高 NK 细胞、LAK 细胞的活性，并诱导 IL-2 和 TNF- α 的产生，从而产生非特异性肿瘤杀伤作用的效果；同时胸腺素 α 原激活肿瘤特异性细胞毒 T 细胞（CD8+）和辅助性 T 细胞（CD4+）的特异性抗肿瘤作用^[30]。在体外，胸腺素 α 原能够增强多发性硬化^[31]和系统性红斑狼疮^[32]病人的异体和自身混合淋巴细胞

反应,说明 ProT α 能够恢复自身免疫系统的 T 淋巴细胞的功能,从而可以调节产生自身抗体的 B 细胞的免疫功能。同样,胸腺素 α 原能够诱导癌症病人淋巴细胞的细胞介导的细胞毒活性,增强自然杀伤性细胞的活性。胸腺素 α 原通过诱导 CD4+T 淋巴细胞产生 IL-2 和 IL-2R (IL-2 受体),调节分泌 PGE₂,从而恢复癌症病人受到抑制的 T 淋巴细胞的功能。胸腺素 α 原还可以增强淋巴细胞对 PHA 刺激的反应活性,提高细胞的增殖反应^[33]。

胸腺素 α 原是细胞增殖分裂过程中不可或缺的物质^[34]。胸腺素 α 原在正常人体内的表达具有时序性,随着年龄增长,其含量会急剧下降,然而在恶性生长的肿瘤细胞中,胸腺素 α 原含量远远超过正常水平。通过对细胞周期的研究发现,胸腺素 α 原在细胞周期不同阶段的表达情况基本是一致的^[35]。胸腺素 α 原能够缩短细胞周期,主要是缩短细胞分裂的 G₁ 期,促进细胞增殖^[36]。某些激素及其受体的复合物也调节胸腺素 α 原基因转录。用乳腺癌细胞研究发现^[37,38],ProT α 是雌激素引起生物反应的原初基因。雌激素及其受体的复合物可结合胸腺素 α 原转录起始点上游-750 和-1051 处的两个半回文序列,提高胸腺素 α 原基因的表达水平。大量表达的胸腺素 α 原蛋白又能够作为诱导物,与雌激素及其受体抑制子结合,消除其对雌激素及其受体和转录共活化因子结合的阻遏效应,从而增强雌激素及其受体的转录活性。因此,雌激素引起细胞的增殖癌变与胸腺素 α 原基因的转录诱导及表达产物的反馈调控密切相关,胸腺素 α 原的这两个半回文雌激素反应基序也是一个重要的转录调节元件。表达后的胸腺素 α 原的活性受其磷酸化水平的直接影响。目前已经找到胸腺素 α 原的磷酸化激酶,位于细胞质中,其磷酸化位点是 N 端第 7, 12 和 13 位的苏氨酸或第 8 和 9 位的丝氨酸羟基。人,鼠,猴等哺乳动物的胸腺素 α 原中谷氨酸羧基也具有磷酸化活性,当细胞增殖癌变时这些磷酸化基团很快被水解或转移至附近的 S/T 残基上,且不受磷酸抑制剂的影响。这说明胸腺素 α 原对细胞增殖的调节活性还与其磷酸基团的转移有关

胸腺素 α 原作为一种典型的肿瘤相关蛋白,其在细胞增殖核凋亡调控方面的深入研究有助于揭示细胞癌变的发生机理,对肿瘤临床医学的诊断预测和治疗药物的鉴定筛选也能够发挥重要作用。胸腺素 α 原是一种程序性细胞死亡相关蛋白,癌细胞中高水平的胸腺素 α 原蛋白产物不仅维持细胞处于高度增殖状

态,还保护细胞避免进入凋亡途径。体外实验发现,在凋亡细胞中,胸腺素 α 原被 caspase-3 切割而发生断裂^[39],导致核定位信号遭到破坏,进而使断裂的胸腺素 α 原从细胞核转移到胞浆和胞外,由于胸腺素 α 原不能在核内积聚而削弱了其核内与增殖相关的功能。这种现象并不见于正常细胞。细胞核和细胞质定位的胸腺素 α 原衍生物对肿瘤坏死因子诱导的 HeLa 细胞凋亡均有抵抗作用^[40]。胸腺素 α 原的抗凋亡作用是通过抑制凋亡小体的形成,对 caspase-9 的活化进行负调节来实现的^[41]。胸腺素 α 原还可通过对氧化应激、保护性基因表达的调节作用避免细胞受凋亡和氧化应激的影响,起到保护细胞的作用^[42]。另外,胸腺素 α 原也可以通过 Bcl-2 抗凋亡途径促进细胞存活^[43]。最新研究发现,天然无结构蛋白 P8 和胸腺素 α 原蛋白相互作用形成 P8/ProT α 异源二聚体复合物具有抗凋亡作用,而单个蛋白则无该活性^[44]。这一结果也显示,天然无结构蛋白很可能通过一种多蛋白复合体来发挥作用。关于胸腺素 α 原在凋亡中的作用也有不同的报道。研究显示,胸腺素 α 原在活性氧和细胞色素 C 介导的凋亡的发展中起作用。在细胞凋亡早期,被 caspase-3 切割的胸腺素 α 原从核中转移至细胞质,带负电的胸腺素 α 原与带正电的细胞色素 C 在细胞质中相遇时结合成复合体,从而使细胞色素 C 的抗氧化功能丧失,促进凋亡。然而,细胞是否发生凋亡取决于胸腺素 α 原在胞浆中的水平,在某个临界浓度下可通过增加活性氧物质,抑制细胞色素 C,促进凋亡发生;但如果高于此浓度则可能与胞质中的细胞色素 C 竞争凋亡酶激活因子 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1),从而抑制细胞凋亡^[45]。

胸腺素 α 原和肿瘤的关系也是目前研究的热点。胸腺素 α 原 mRNA 的表达受到原癌基因 c-myc 编码的转录因子的调控作用,是 c-myc 作用的靶基因之一。通过 ELISA 方法可以检测到胸腺素 α 原的表达量在结肠癌、乳腺癌以及肝癌组织中均较临近正常组织中高^[46]。另外,胸腺素 α 原对肿瘤可以产生免疫调节作用。胸腺素 α 原作为一种核蛋白,在胞内表达时可以促进细胞的增殖,尚未有实验证明在培养基中添加胸腺素 α 原是否能够促进肿瘤细胞生长。相反,由于胸腺素 α 原所具有的胞外免疫调节作用,胸腺素 α 原在疾病早期可以通过增加淋巴细胞与肿瘤靶细胞的结合进而增加 IFN- γ 和 IL-2 分泌,进一步刺激淋巴细胞产生杀瘤活性,同时胸腺素 α 原也可以恢复癌症病人受到抑止的淋巴细

胞功能而产生抗癌效应，促进外周血单核细胞的抗癌作用和趋化作用。胸腺素 α 原能够增加来自癌症病人的外周血单核细胞的细胞毒作用。单独使用胸腺素 α 原或与 IFN- γ 等细胞因子联用，都会提高淋巴细胞的抗肿瘤活性^[47]。另外，胸腺素 α 原可以降低由 TNF- β 1 诱发的 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达，但并不影响 ELAM-1 的表达^[48]。现在，胸腺素 α 原已作为一种新型的抗癌药物进入到临床前期的研究阶段^[49]。

1.2 白介素-2 和干扰素- γ 简介

在本课题以往的实验研究中，单独使用胸腺素 α 原抑制小鼠荷瘤效果并不十分理想，鉴于胸腺素 α 原的免疫调节作用，考虑将其联合其它细胞因子共同抑制小鼠荷瘤，本实验选用白介素-2 (IL-2) 和干扰素- γ (IFN- γ)。

IL-2 的免疫调节作用及其抗肿瘤作用主要表现在，能够激发机体特异和非特异抗肿瘤免疫反应，可分别作用于免疫反应中抗原提呈细胞和免疫效应细胞等相同或不同环节，联合运用可产生协同抗肿瘤效应^[50]。

IL-2 能增强 T 细胞的杀伤活性，在体外与 IL-3，IL-5 和 IL-6 一起共同诱导细胞毒性 T 细胞 (Tc) 的产生，并使其活性大大增强；在体内 IL-2 也能增强抗原诱导的 Tc 活性，增强其抗肿瘤效果，同时还可诱导 T 细胞分泌 IFN- γ ，TNF，CSF 等细胞因子。IL-2 可促进 NK 细胞增殖，在体内、外均能增强 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。还能促进 NK 细胞分泌 IFN- γ ，增加其表达 IL-2R α 亚基等。IL-2 可促进 LAK、TIL 细胞的体外存活、扩增及活化淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK)，具有高效的抗肿瘤作用。IL-2 可促进 B 细胞表达 IL-2R，促使 B 细胞增殖和产生免疫球蛋白，并刺激巨噬细胞提高其吞噬能力^[51, 52]。

IFN- γ 是一种糖蛋白，具有抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等多种生物学功能，尽管其抗肿瘤机理尚不十分清楚，但已广泛应用治疗多种肿瘤。现认为 IFN- α 体内主要通过两种途径发挥效应，一是通过激活 T 细胞、NK 细胞等免疫活性细胞攻击肿瘤，二是对肿瘤细胞的直接作用。其可能的抗肿瘤机制包括抑制肿瘤病毒繁殖；阻遏癌基因的表达，提高抗癌基因的功能；抑制肿瘤细胞分裂增殖；改变肿瘤细胞表面的性能和去恶性作用；抑制肿瘤血管生长；免疫调节作用等方面。

IFN- γ 的抗肿瘤细胞增殖、抑制血管生成和免疫调节效应使之成为一个受

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库