**学 号 ： 2 0 1 3 2 5 7 6**

**河北医科大学研究生毕业论文**

|  |  |
| --- | --- |
| **论** 文 题 目 | **KLF5 在通心络抑制血管内膜增**  **生中的作用及机制** |

|  |  |
| --- | --- |
| **二** 级 学 院 | **基 础 医 学 院** |

|  |  |
| --- | --- |
| **专** 业 名 称 | **生物化学与分子生物学** |

|  |  |
| --- | --- |
| **研 究 生 姓 名** | **姜文** |

|  |  |
| --- | --- |
| **导师姓名、职称** | **温进坤** **教授** |

|  |  |
| --- | --- |
| **研究起止日期** | **2014 年 3 月 - 2016 年 3 月** |

|  |  |
| --- | --- |
| **交** 稿 日 期 | **2016 年 3 月** |

**河北医科大学**

**学位论文使用授权及知识产权归属承诺**

本学位论文在导师（或指导小组）的指导下，由本人独立完成。本学位论文研究所获得的研究成果，其知识产权归河北医科大学所有。河北医科大学有权对本学位论文进行交流、公开和使用。凡发表与学位论文主要内容相关的论文，第一署名为单位河北医科大学，试验材料、原始数据、申报的专利等知识产权均归河北医科大学所有。否则，承担相应法律责任。

研究生签名： 导师签章： 二级学院领导盖章：

年 月 日

**河北医科大学研究Th学位论文独创性声明**

本论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，除了文中 特别加以标注和致谢等内容外，文中不包含其他人已经发表或撰写的研究 成果，指导教师对此进行了审定。本论文由本人独立撰写，文责自负。

研究生签名： 导师签章：

年 月 日

**目 录**

**KLF5在通心络抑制血管内膜增Th中的作用及机制**

摘 要

目的：巨噬细胞的增殖和迁移在血管内皮损伤诱发的内膜增生中发挥 重要作用，因此，有效抑制巨噬细胞增殖和迁移对预治以血管内膜增生为 特征的血管重构性疾病具有重要意义。

Krüppel -like factor 5(KLF5)是具有锌指结构多功能转录因子，在心血管、癌症等多种疾病中参与细胞增殖、迁移和凋亡的调控，然而，目前KLF5在巨噬细胞增殖和迁移中的作用及机制尚不十分清楚。

通心络（Tongxinluo, TXL）是根据络病理论研制的中药复方提取物，因其具有良好的血管保护作用，故临床上广泛应用于心脑血管疾病的治疗。近年虽然对通心络保护血管的作用机制进行了大量研究，但其抑制血管重构与KLF5表达及巨噬细胞增殖、迁移之间的关系尚有待阐明。本研究旨在探讨KLF5在通心络抑制巨噬细胞增殖、迁移及血管内膜增生中的作用及分子机制，诱导的巨噬细胞增殖的抑制作用及其分子机制，以期为通心络临床应用提供新的理论支持及实验依据。

方法：KLF5wt和巨噬细胞敲除KLF5（KLF5ly -/-）小鼠随机分为对照组、颈动脉结扎组和颈动脉结扎+通心络治疗组，苏木精-伊红染色评价内膜增生的形态学变化。免疫荧光双重染色观察Mac-2、KLF5和PCNA表达活性与观察巨噬细胞浸润及血管内膜增生的关系。

用TNF-α刺激体外培养的巨噬细胞RAW264.7，触发巨噬细胞炎症的炎症反应，同时给予通心络干预。Western bolt检测巨噬细胞中KLF5 和

PCNA的表达；伤口愈合（划痕）实验观察巨噬细胞的迁移能力；MTS测定巨噬细胞增殖活性。免疫共沉淀检测KLF5的苏素化/泛素化水平已及FBXW7与KLF5之间的相互作用及相关的信号通路。

结果：

# 1 通心络通过抑制巨噬细胞增殖和迁移而减轻颈动脉结扎诱导的内膜增生

将C57BL/6J小鼠随机分为对照组、颈动脉结扎组和颈动脉结扎+通心络治疗组。苏木精-伊红染色结果显示，与对照组（Con）相比，结扎组（Ligated）小鼠颈动脉内膜显著增生，其I/M比值明显增加；而颈动

脉

结扎+通心络（Ligated +TXL）组小鼠的动脉内膜增生明显少于结扎组。上述结果表明，通心络可以抑制颈动脉结扎诱导的血管内膜增生。

伤口愈合实验显示，TNF-α组明显高于对照组，而通心络预孵育后，迁移进划痕区的细胞较TNF-α组明显减少，说明通心络能够抑制TNF-α诱导的RAW264.7细胞的迁移。MTS结果显示，TNF-α显著诱导巨噬细胞增殖，通心络预处理后再给予TNF-α刺激，巨噬细胞增殖较TNF-α组明显下降，提示通心络能够逆转TNF-α刺激引起的巨噬细胞的增殖。

# 2 通心络通过下调KLF5表达而抑制TNF-α诱导的巨噬细胞增殖

Mac-2和KLF5免疫双荧光染色的结果显示，颈动脉结扎组Mac-2 及

KLF5染色阳性细胞数较多，而颈动脉结扎+通心络组明显少于结扎组，提示通心络可能通过阻抑KLF5的表达来抑制巨噬细胞的迁移与增殖。

RAW264.7细胞随机分为对照组、TNF-α组、通心络组（TXL）、TNF-α+通心络组（TNF-α+ TXL）。Western bolt结果显示，通心络预处理显著下调PCNA和KLF5蛋白表达。

# 3 KLF5介导巨噬细胞增殖、迁移和血管内膜增生

苏木精-伊红染色结果显示，与转染空载体pAd的小鼠相比，转染pAd-KLF5的小鼠血管内膜增生更为显著，内膜中膜比(I/M)值明显增大。通心络处理能逆转KLF5过表达对血管内膜增生的促进作用。免疫荧光结果显示，与pAd组相比，pAd-KLF5组的Mac-2和PCNA阳性染色细胞数明显增多，而在pAd-KLF5+通心络组，Mac-2和PCNA阳性染色细胞数量减少。

苏木精-伊红染色结果显示，与野生型（KLF5wt）小鼠相比，KLF5ly-/-小鼠的血管内膜增生显著减少。免疫荧光结果显示，KLF5 ly-/-小鼠，Mac-2和PCNA阳性染色细胞数明显少于野生型（KLF5wt）小鼠。以上结果提示，KLF5 介导巨噬细胞增殖、迁移和血管内膜增生，通心络通过下调

KLF5的表达抑制血管内膜增生。

# 4 通心络抑制KLF5过表达诱导的巨噬细胞增殖和迁移

Western blot 结果显示，与pAd 组相比，KLF5 过表达显著促进

RAW264.7细胞对PCNA的表达，通心络干预则逆转KLF5过表达诱导的

PCNA表达上调。MTS和伤口愈合实验结果显示，与pAd组相比，KLF5过表达显著促进巨噬细胞的增殖和迁移。用通心络预孵育RAW264.7细胞

24 h后，再转染pAd-KLF5，巨噬细胞增殖和迁移受到显著抑制。以上结果说明，KLF5过表达可以促进巨噬细胞的增殖和迁移，通心络通过阻抑

KLF5的表达而抑制巨噬细胞的增殖和迁移。

# 5 通心络通过PI3K/AKT和NF-κB信号通路，调节KLF5的苏素化和泛素化，进而促进KLF5降解。

为了进一步明确通心络抑制KLF5表达的分子机制，我们用免疫共沉淀（CoIP）检测KLF5在不同影响因素作用下的泛素化。结果显示，与对照组相比，TNF-α抑制KLF5的泛素化，TNF-α+通心络孵育组的KLF5泛素化水平显著增加，提示通心络通过促进KLF5泛素化，进而加速KLF5降解。Western blot结果显示，通心络既能够上调FBXW7蛋白的表达，也能促进KLF5与FBXW7之间的相互作用。

因为已知KLF5的苏素化抑制KLF5与FBXW7之间的相互作用，因此我们进一步观察TNF-α以及通心络对KLF5苏素化的影响。免疫共沉淀（CoIP）结果显示，与对照组相比，在TNF-α处理的细胞中，KLF5的苏素化水平显著升高，通心络干预使KLF5苏素化水平下降。

信号通路相关蛋白的检测发现，TNF-α可以上调p-AKT和p-NF-κB水平，说明TNF-α能激活AKT和NF-κB信号通路。用AKT和NF-κB特异性的抑制剂处理RAW264.7 细胞后，Western blotting 和免疫共沉淀

（CoIP）结果显示，KLF5的苏素化水平降低。这些结果表明，通心络通过激活PI3K/AKT和NF-κB信号通路来阻抑KLF5的苏素化，进而增加KLF5与FBXW7的相互作用及KLF5的泛素化，最终导致KLF5的稳定性降低。

结论:

1通心络通过抑制巨噬细胞增殖和迁移而减轻颈动脉结扎诱导的内膜增生。

2通心络通过下调KLF5表达而抑制TNF-α诱导的巨噬细胞增殖。

3 KLF5介导巨噬细胞增殖、迁移和血管内膜增生。

4通心络抑制KLF5过表达诱导的巨噬细胞增殖和迁移。

5通心络通过PI3K/AKT和NF-κB信号通路，调节KLF5的苏素化和泛素化，进而促进KLF5降解。

**关键词：**巨噬细胞； 通心络； 苏素化/泛素化； KLF5； 增殖； 内膜增

生

**Role and mechanism of actin of KLF5 and Tongxinluo in vascular neointima hyperplasia**

**Abstract**

目 录

[摘 要](#_Toc686692843) 3

[1 通心络通过抑制巨噬细胞增殖和迁移而减轻颈动脉结扎诱导的内膜增生](#_Toc686692844) 3

[2 通心络通过下调KLF5表达而抑制TNF-α诱导的巨噬细胞增殖](#_Toc686692845) 3

[3 KLF5介导巨噬细胞增殖、迁移和血管内膜增生](#_Toc686692846) 3

[4 通心络抑制KLF5过表达诱导的巨噬细胞增殖和迁移](#_Toc686692847) 3

[5 通心络通过PI3K/AKT和NF-κB信号通路，调节KLF5的苏素化和泛素化，进而促进KLF5降解。](#_Toc686692848) 3

[结论:](#_Toc686692849) 3

**[Abstract](#_Toc686692850)** 4

[前 言](#_Toc686692851) 6

[1 材料](#_Toc686692852) 7

[2 方法](#_Toc686692853) 11

[3 KLF5介导巨噬细胞增殖、迁移和血管内膜增生](#_Toc686692854) 14

[4 通心络抑制KLF5过表达诱导的巨噬细胞增殖和迁移](#_Toc686692855) 14

[5 通心络通过PI3K/AKT和NF-κB信号通路，调节KLF5的苏素化和泛素化，进而促进KLF5降解。](#_Toc686692856) 14

[结论](#_Toc686692857) 27

[参考文献](#_Toc686692858) 27

[参考文献](#_Toc686692859) 28

**Objective:** Proliferation and migration of macrophages during neointima formation induced by arterial injury representa critical component of restenosis after angioplasty of human coronary arteries. Therefore, elucidation of novel cellular and molecular mechanisms that influence the pathogenesis of neointima formation could lead to development of new therapeutic approaches and insight into disease pathophysiology. effective inhibition of macrophage proliferation is of great significance for the prevention of atherosclerosis.

Krüppel -like factor 5 (KLF5) is a member of KLF family which have the structure of the zinc finger, and involved in cell proliferation, migration, apoptosis and tissue remodeling of many physiological and pathological processes in various diseases such as cardiovascular, cancer.

Tongxinluo (TXL) is a kind of compound extract of traditional Chinese medicine. It has been widely used in applications in clinical treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases, due to its good vascular protective effect. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect and its molecular mechanism of Tongxinluo on the proliferation and migration of macrophages induced by arterial injury, thus further providing a new theoretical and experimental basis for its clinical application.

**Methods:** KLF5wt and KLF5ly-/- (macrophage-specific KLF5 knockout) mice were randomly divided to control group, carotid artery ligation group and carotid artery ligation plus Tongxinluo group. Hematoxylin and eosin staining was used to evaluate the morphological changes. Mac-2, KLF5 and PCNA in the injured arterial tissues were determined by immunohistochemical and immunofluorescence staining.

In vitro cultured macrophage RAW264.7 were stimulated with TNF-alpha to induce macrophage inflammation, after cells were pretreated or

Not with Tongxinluo. The expression of KLF5 and PCNA in macrophages was detected by Western blot. The change of cell migration ability was observed by wound healing assay, and the cell proliferation was measured by MTS assay. The ubiquitination level of KLF5 as well as the signaling pathways that affect the interaction between FBXW7 and KLF5 were detected by immunoprecipitation.

**Results:**

1 TXL inhibits neointima hyperplasia induced by carotid ligation via reducing the proliferation and migration of macrophages

C57BL/6J mice were randomly divided to control group, carotid artery ligation group and carotid artery ligation plus Tongxinluo group. Hematoxylin and eosin staining showed that compared with the control group (Con), significant intimal hyperplasia occurred in ligation group (Ligated) and the I / M ratio was significantly increased. Conversly compared to the ligation group, Tongxinluo treatment obviously deseased intimal hyperplasia. The results showed that Tongxinluo can inhibit intimal hyperplasia induced by artery injury.

The wound healing assay showed that cell migration rate of TNF-αgroup was higher than that of control group, while cell migration of Tongxinluo group decreased significantly compared with TNF-αgroup, suggesting that Tongxinluo can inhibit the migration of RAW264.7 cells induced by TNF-α. MTS results showed that TNF-αcould significantly induce macrophage proliferation, however, its inducing effect on proliferation could be abrogated by Tongxinluo pretreatment. These results suggested that Tongxinluo could reverse proliferation of RAW264.7 cells induced by TNF-α.

2 TXL inhibits macrophage proliferation through suppressing KLF5 expression induced by carotid ligation and TNF-α

Double immunofluorescence staining of Mac-2 and KLF5 displayed that Mac-2 and KLF5 positive cells of carotid artery ligation group were significantly increased, while those in ligation plus Tongxinluo group were less than the ligation group. These results suggested that Tongxinluo inhibits

The migration and proliferation of macrophages through inhibiting the expression of KLF5 in inflammatory conditions.

In vitro cultured RAW264.7 cells were preincubated with Tongxinluo and then treated with TNF-α. Western blot results showed that the increased expression of PCNA and KLF5 induced by TNF-αcould be abolished by Tongxinluo treatment.

3 TXL inhibits neointima hyperplasia by decreasing the expression of KLF5

Hematoxylin and eosin staining showed that compared with the pAd transduced mice, the intima of pAd-KLF5 transduced mice was significantly thickened, intima-media ratio (I/M) increased obviously. Tongxinluo treatment could reverse the vascular intimal hyperplasia induced by carotid artery ligation. Immunofluorescence staining showed that compared with the pAd-transduced mice, positive cells of Mac-2 and PCNA staining increased significantly in pAd-KLF5 transduced mice, while Tongxinluo treatment reduced Mac-2 and PCNA positive cells.

KLF5ly-/- mice treated with ligation showed that compared with the wild type (KLF5wt), the intima hyperplasia of KLF5ly-/- mice was significantly decreased. Immunofluorescence staining revealed that positive staining cells for Mac-2 and PCNA in KLF5ly-/- mice were less than that of the wild type mice. These results suggested that KLF5 can promote macrophage proliferation and migration, while Tongxinluo treatment inhibits the intimal hyperplasia by inhibiting the expression of KLF5 in macrophages.

4 TXL inhibits KLF5 overexpression-induced proliferation and migration of macrophages

Western blot results showed that overexpression of KLF5 obviously promoted the expression of PCNA and KLF5 in RAW264.7 cells, but their expression level was downregulated in the Tongxinluo group. MTS and wound healing assay indicated that proliferation and migration of macrophage transfected with pAd-KLF5 were greatly increased compared with pAd transfected cells. Tongxinluo treatment markedly reduced the proliferation and

Migration of macrophages induced by KLF5 overexpression. These results suggest that overexpression of KLF5 can exerts the inhibilory effect on the proliferation and migration by decreasing the expression of KLF5.

5 TXL reduces the stability of KLF5 by regulating the ubiquitination and sumoylation of KLF5

To clarify the molecular mechanism of the inhibition of KLF5 expression by Tongxinluo, we detected the ubiquitination of KLF5 by co- immunoprecipitation (CoIP). The results indicated that, compared with the control group, the TNF-α inhibited the ubiquitination of KLF5, whereas Tongxinluo increased significantly KLF5 ubiquitination, suggesting that Tongxinluo can accelerate the degradation of KLF5 by promoting the KLF5 ubiquitination. Western blot and co- immunoprecipitation results showed that Tongxinluo could promote the expression of ubiquitin-related enzyme FBXW7 and its interaction with KLF5.

Further study found that sumoylation of KLF5 was greatly enhanced in TNF-αgroup, but was significantly reduced in Tongxinluo group. Tongxinluo could decrease sumoylation of KLF5 induced by TNF-α. The signal pathway-related proteins were detected by Western blotting, and the results showed that TNF-αcould promote the expression of p-Akt, p-NF- kappa B, thus activating these signaling pathways, and leading to upregulation of KLF5 expression. When PI3K/Akt and NF kappa B signaling pathway was blocked by their specific inhibitors, sumoylation level of KLF5 was reduced. These results indicated that, Tongxinluo could promotes the sumoylation of KLF5, enhances the interaction of KLF5 with Fbxw7 and reduces the KLF5 stability through the activation of PI3K/Akt and NF kappa B signaling pathway.

**Conclusions：**

1 TXL inhibits neointima hyperplasia induced by carotid ligation via reducing the proliferation and migration of macrophages.

2 TXL inhibits macrophage proliferation through suppressing KLF5 expression induced by carotid ligation and TNF-α.

3 TXL inhibits neointima hyperplasia by decreasing the expression of

KLF5.

4 TXL inhibits KLF5 overexpression-induced proliferation and migration of macrophages.

5 TXL reduces the stability of KLF5 by regulating the ubiquitination and sumoylation of KLF5.

**Keywords:** Macrophage; TXL; Ubiquitination; Sumoylation; KLF5; Proliferation and migration;; Inflammation

**英文缩写**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **英文全称** | **中文全称** |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole | 4',6- 二脒基-2- 苯基吲哚 |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| FITC-BSA | Fluorescein  Isothiiocyanate-bovine serum albumin | 异硫氰酸荧光素牛血清白蛋白 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| NP-40 | Nonylphenoxypoly ethanol | 壬基酚聚氧乙烯醚 |
| PAGE | Polyacrylamide gel  electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PMSF | Phenylmethanesulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 聚偏二氟乙烯 |
| TBS | Trihydroxyaminomethane  Buffered saline | 三羟甲基氨基甲烷缓  冲液 |
| Tris | Trihydroxyaminomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |
| TTBS | Trihydroxyaminomethane  Buffered saline-Tween | 三羟甲基氨基甲烷缓冲液吐温 |
| TXL | Tongxinluo | 通心络 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| TNF-α | Tumor necrosis factor α | 肿瘤坏死因子 α |
| I/M ratio | Intimal area/medial area ratio | 内膜与中膜面积比 |
| NF-κB | Nuclear factor kappa B | 核因子 κB |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |

**KLF5在通心络抑制血管内膜增Th中的作用及机制**

前 言

血管内膜增生是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等心血管疾病共同的病理生理特征代谢异常。机械应力、血管活性物质失衡等因素引起的血管内皮受损，可诱导单核/巨噬细胞、内皮细胞表达细胞因子、黏附分子及其他炎症介质。一方面，这些促炎细胞因子相互作用、相互影响， 形成复杂的网络体系，共同促进炎症进程。另一方面，炎症因子激活单核

/巨噬细胞，促进巨噬细胞向血管壁中的迁移和浸润，直接参与动脉粥样斑块和新生内膜的形成。

Krüppel -like factors (KLFs)是一类与DNA结合的具有多种重要功能的转录调控因子。它参与多种细胞的生理和病理过程，包括增殖、分化、 迁移和炎症。在心血管系统，KLF5在新生血管的平滑肌细胞中高表达，参与平滑肌细胞表型转化及血管重塑过程[[1]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915012008118?np=y&amp;bib1)。当血管受到损伤时，KLF5能够促进血管内膜增生。然而，在血管内膜增生过程中，KLF5在巨噬细胞增殖和迁移中的作用及机制尚不清楚。

已经证明，KLF5除在转录水平上受到严格的调控外，还在翻译后水平上受磷酸化、乙酰化、泛素化、苏素化的调节。泛素化（ubiquitination）是指底物蛋白的赖氨酸氨基与泛肽（又称泛素）C端的羧基，在泛素激活酶、泛素转移酶、泛素连接酶共同作用下形成异肽键，后续泛素以类似方式连接成串，完成对底物蛋白的多泛素化标记。被泛素化标记的蛋白一般认为被降解，但也有研究表明，泛素化还参与DNA修复的调控、蛋白的转运、信号的转导等[[2, 3]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915012008118?np=y&amp;bib1)。SUMO化(sumoylation)是指目标蛋白上特定的赖氨酸残基经由类似ubiquitination的过程与SUMO形成共价键的过程。SUMO（small ubiquitin-like modifier）是数种与泛素相类似的蛋白质中的一种。与泛素化不同的是，SUMO化并不会促进目标蛋白的降解，而是调控被修饰蛋白的细胞核转运，参与转录的调节，影响蛋白自身稳定性及蛋白之间的相互作用[[4]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915012008118?np=y&amp;bib1)。

通心络（Tongxinluo, TXL）是由赤芍、蝉蜕、降香、全蝎、人参、水蛭、檀香、土鳖虫、蜈蚣等组成的中药复方提取物。传统上认为通心络 是抗心绞痛的药物，它能降低急性心肌梗死的发生率及某些心脏手术并发

症[[5-9]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915012008118?np=y&amp;bib1)。近年来研究表明，通心络可以降低血压，改善高血压症状；与阿司匹林联用，改善阿司匹林抵抗（AR）[[10]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915012008118?np=y&amp;bib1)；还可以改善血管内皮功能[[11]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915012008118?np=y&amp;bib1)。通心络的众多血管保护作用都是以抗炎、抗氧化为主，但其对巨噬细胞增殖、迁移有何影响，以及对KLF5的泛素化/苏素化是否具有调节作用，至今未见报道。本研究旨在探讨KLF5在通心络抑制巨噬细胞增殖、迁移及血管内膜增生中的作用与机制，以期为通心络临床应用提供新的理论支持和实验依据。

**材料与方法**

# 1 材料

## 1.1 实验动物

健康C57BL/6J小鼠，雄性，体重约20 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。KLF5 Knock-out（KLF5ly-/-）由德国Matsumoto Nearo教授馈赠，本实验室繁殖。两种小鼠均于SPF级动物室中饲养。环境温度

23~25℃，自由进食进水。

## 1.2 试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗 PTEN 多克隆抗体 | Proteintech 公司 |
| 兔抗 KLF5 多克隆抗体 | Epitomics 公司 |
| 兔抗 UB 多克隆抗体 | Abcam 公司 |
| 兔抗 FBXW7 多克隆抗体 | Abcam 公司 |
| 兔抗 AKT 多克隆抗体 | ABGENT 公司 |
| 兔抗 P-AKT 多克隆抗体 | Millipore 公司 |
| 兔抗 NF-κB 多克隆抗体 | Novus 公司 |
| 兔抗 P-NF-κB 多克隆抗体 | Epitomics 公司 |
| 鼠抗 β-actin 多克隆抗体兔抗 SUMO-1 多克隆抗体 | Proteintech 公司  Abcam 公司 |
| 兔抗 PCNA 多克隆抗体 | Santa Cruz 公司 |
| HRP 兔二抗 | Abcam 公司 |
| Protein A- Sepharose | Santa Cruz 公司 |
| pAd-GFP | Invitrogen 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| Ad-KLF5 腺 病 毒 载 体 （Ad- KLF5） | Invitrogen 公司 |
| 通心络 | 以岭药业公司 |
| 异氟烷 | 鲁南贝特制药有限公司 |
| 青霉素 | 华北制药股份有限公司 |
| 苏木精/伊红染液 | 碧云天生物科技有限公司 |
| 中性树脂 | 上海懿洋仪器有限公司 |
| 抗荧光衰减封片剂 | Solarbio 公司 |
| TRITC 荧光二抗 | Invitrogen 公司 |
| FITC-荧光二抗 | Invitrogen 公司 |
| 10 % ft羊血清 | KPL 公司 |
| 细胞裂解液 | Solarbio 公司 |
| MTS 试剂 | Promega 公司 |
| RPMI 1640 培养基 | Gibco 公司 |
| 丙烯酰胺、双丙烯酰胺 | Bio-Rad 公司 |
| 过硫酸胺（APS）、四甲基二乙胺（TEMED） | 上海生工公司 |
| MTS 试剂 | Signalway Antibody 公司 |
| RIPA 蛋白裂解液 | 碧云天生物技术公司 |
| 化学发光试剂盒 | Millipore 公司 |

## 1.3 主要仪器

|  |  |
| --- | --- |
| Fresco 17 低温离心机 | Thermo 公司 |
| 冰冻切片机 | Leica 公司 |
| 酶标仪 | Thermo 公司 |
| 电泳仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 半干式蛋白质印迹转膜槽 | 美国 Bio-Rad 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 超低温冰箱 | 三洋公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| PVDF 膜 | Millipore 公司 |
| 恒温摇床 | Thermo 公司 |
| 电子天平 | 德国 Sartorius 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 超声清洗机 | 昆ft市超声仪器有限公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 气体麻醉装置 | MATRX 公司 |
| 正置显微镜 | Leica 公司 |
| LRH-250 生化培养箱 | 上海一恒科学仪器公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 化学发光仪 | Vilber lourmat 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 高速低温离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 高速低温离心机 | 德国 Eppendorf 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 多功能显微镜 | Leica 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 激光共聚焦显微镜 | 美国 Leica 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 数字式酸度计型 | 瑞士 Mettler Toledo 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 制冰机 | SANYO 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 漩涡振荡器 | Thermo 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 电热恒温水浴箱 DR-HW-1 型 | 北京西城医疗器械厂 |

|  |  |
| --- | --- |
| 超纯水净化装置 | Milli-Qufplus 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 显微器械 | 宁波医用缝针有限公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 二氧化碳细胞培养箱 | Forma Scientific 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| 超净工作台 | Forma Scientific 公司 |

# 2 方法

## 2.1 药物配置

### 2.1.1 通心络溶液：

中剂量灌胃通心络：7.5 g通心络溶于50 ml双蒸水中，超声溶解30

min后分装，于-20°C保存。中灌胃量为5μl溶液/ g小鼠（例如20 g

的小鼠灌胃100μl通心络溶液即为所需剂量）.

体外实验所用通心络溶液的配置：通心络取适量超微粉混悬于培养基 或双蒸水，超声30 min，滤纸初滤，0.22µm滤膜过滤，-20°C冷冻保存，备用，避免反复冻融。

2.1.2 PBS溶液：800 ml双蒸水中溶解8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g

Na2HPO4, 0.24 g KH2PO4，用盐酸调节pH值在7.2-7.4，加双蒸水定容至1 L。高压蒸汽灭菌，4°C保存。

2.1.3 10 %过硫酸铵（APS）溶液：1 g APS溶于10 ml双蒸水中，震荡使其溶解，4°C保存。

2.1.4 30 % PAGE（丙烯酰胺）：120 ml双蒸水中溶解57 g丙烯酰胺，3 g NN'-亚甲双烯酰胺，用双蒸水定容至200 ml，4°C保存。

2.1.5 Tris·HCl（pH 8.8）缓冲液：200 ml超纯水中溶解Tris Base 45.43 g，之用6 N盐酸调pH至8.8，最后用超纯水定容至250 ml，高温灭菌后室温下保存。

2.1.6 Tris·HCl（pH 6.8）缓冲液：200 ml超纯水中溶解Tris Base 15.14 g，之用6 N盐酸调pH至6.8，最后用超纯水定容至250 ml，高温灭菌后室温下保存。

2.1.7电泳缓冲液（25 mmol/L Tris, 0.25 mol/L甘氨酸，0.1% SDS）：800 ml双蒸水中加入3.04 g Tris碱，18.77 g甘氨酸，SDS 1 g，充分溶解后补水定容至1000 ml，室温保存。

2.1.8转移缓冲液（48 mmol/L Tris, 39 mmol/L甘氨酸，20%甲醇）：5.8 g Tris碱，2.9 g甘氨酸，充分溶解于800 ml双蒸水中，加入200 ml甲醇混匀至总量1000 ml，室温保存。

2.1.9 TBS缓冲液（100 mmol/ L Tris·HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl）：

1 mol/ L Tris·HCl (pH 7.5) 10 ml和NaCl 8.8 g，蒸馏水定容至1000 ml。

### 2.1.10 TBST缓冲液（含0.05% Tween 20的TBS缓冲液）: 20% Tween 20

1.65 ml, 加入到700 ml TBS中。

### 2.1.11 封闭液（含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液）：脱脂奶粉5 g溶解于

100 ml TBST中，4°C保存。

## 2.2 小鼠颈动脉结扎模型的建立与实验分组

### 2.2.1 按照Kumar等报道的方法建立小鼠颈动脉结扎模型[17]，方法如下：

2.2.1.1 8-10周龄的雄性C57BL/6小鼠用2 %的异氟烷进行吸入性麻醉；

2.2.1.2固定小鼠于无菌手术台上，颈部伸直呈仰卧位，将手术部位皮肤去毛，碘伏局部消毒；

2.2.1.3用高压灭菌的剪刀沿颈正中线剪开皮肤，切口0.5 cm，显微弯镊钝性分离甲状腺和肌肉，从近心端向远心端钝性分离并暴露左侧颈总动

脉；

2.2.1.4在颈外动脉和颈内动脉分叉点下用6号无菌手术线结扎左侧颈总动脉；

2.2.1.5未结扎对照组是仅把6号无菌手术线置于左侧颈总动脉分叉点下而不结扎；

2.2.1.6手术伤口用青霉素处理后用6号可吸收手术线缝合；

2.2.1.7术后将小鼠置于无菌热垫上苏醒后置入动物房单笼喂养。

### 2.2.2 实验分组如下：

2.2.2.1 C57BL/6小鼠适应性喂养一周后随机分为3组：未结扎组

（unligated）；结扎组（ligated）；通心络灌胃组（TXL+ ligated, 0.75 g kg－1 day－1）。通心络灌胃组于手术前3天开始在每天固定时间给药，每日一次；未结扎组和结扎组于手术前3天开始在每天固定时间灌胃水，每日一次。于术后30天处死小鼠，快速留取结扎处颈动脉用以后续实验。

2.2.2.2为了观察KLF5及通心络在血管结扎后给予的干预作用，再将

C57BL/6小鼠随机分为4组：感染Ad-null组（Ad-null）；感染Ad-KLF5组

（Ad-KLF5）；感染Ad-null+通心络组；感染Ad-KLF5+通心络组；每组各三只，通心络灌胃组于手术前3天开始在每天固定时间给药，每日一次；感染Ad-null组（Ad-null）和感染Ad-KLF5组（Ad-KLF5）于手术前3天开始在每天固定时间灌胃水，每日一次；于术前一天分别尾静脉注射病毒，每隔7天注射一次，共注射4次。于术后30天处死小鼠，快速留取结扎处颈动脉用以后续实验。

2.2.2.3体重约25 g的健康雄性KLF5基因敲除（KLF5-/-+ly）小鼠按照随机分为未结扎组（unligated）；结扎组（ligated）；通心络灌胃组（TXL+ ligated,0.75 g kg－1 day－1）。通心络灌胃组于手术前3天开始在每天固定时间给药，每日一次；未结扎组和结扎组于手术前3天开始在每天固定时间灌胃水，每日一次。于术后30天处死小鼠，快速留取结扎处颈动脉用以后续实验。

## 2.3 尾部静脉注射腺病毒，具体操作

于实验台固定小鼠

↓

尾静脉扩张

小鼠尾部浸入40°C水浴15秒，迅速取出，翻转调整固定器，使一侧尾静脉朝向正上方，拇指和食指捏住距尾根部1/2 处

↓注射

注射操作者在实验台边上将小鼠尾端向下压低倾斜5度，使之平直，采用胰岛素无痛注射器从静脉正上方平行静脉斜向下刺入血管后再平行进针约2 mm，稍微回撤见有回血说明刺中血管，再轻推无阻力后缓慢匀

速注射病毒液

↓止血

棉签压住注射针头，撤离注射器压迫针眼止血10 秒

## 2.4 形态学检测

### 2.4.1 组织取材

2.4.1.1在术后30天，小鼠麻醉处死，脉管系统立即用预冷的生理盐水

（0.9 % NaCl）灌注冲洗约5分钟。随后分离结扎处颈总动脉，NEG 50冰冻包埋剂包埋，-80℃保存（至少24小时）。

2.4.1.2切片：4μm连续切片，同时与显微镜下观察，找到结扎线后，粗切至500μm处后每隔30μm连续切片8张，直至结扎线后2 mm结束。置于切片盒中-80℃保存。

### 2.4.2 苏木精-伊红染色

自来水浸泡约5分钟

↓

苏木精染色10秒，流水浸水1-2分钟×3 次

↓

1%盐酸酒精稍分化1-2秒，流水浸水1-2分钟×3次伊红染色7秒，流水浸水1-2分钟×3 次

↓

常规梯度乙醇脱水，即：依次放入70 %，80 %，90 %，无水乙醇I, 1-2秒/道，无水乙醇II III中、2分钟/道

↓

二甲苯透明2分钟×3次，中性树胶封片

↓

镜下观察、照相，进行图像学分析

### 2.4.3 免疫荧光双重染色

室温放置30分钟

↓

PBS冲洗5分钟×3 次

↓

滴加正常ft羊血清工作液，室温孵育30-45分钟，进行封闭

↓

倾去血清，滴加适当比例稀释的一抗，包括：鼠抗mac-2单克隆抗体

（1: 50）、兔抗KLF5多克隆抗体（1: 50）、兔抗PCNA多克隆抗体（1 :

50），片子平放保湿盒中4°C过夜

↓

第二日室温30分钟后0.5% Triton/PBS冲洗5分钟×3 次

↓

PBS冲洗5分钟×3 次

↓

滴加TRITC荧光二抗和FITC-荧光二抗混合液（1: 50），避光室温

孵育1小时

↓

0.5% Triton/PBS冲洗5分钟×3 次

↓

PBS冲洗5分钟×3 次

↓

DAPI（1: 2000），避光室温孵育10分钟

↓

PBS冲洗5分钟×3 次

↓

防衰减封片剂封片

↓

镜下观察、照相

显微镜下随机选取3个视野，计数mac-2、PCNA、KLF5的阳性细胞数。实验结果判定：以细胞中出现绿色荧光标记作为判定阳性细胞的标准。

## 2.5 细胞培养

小鼠RAW264.7细胞在含10 % FBS的高糖DMEM培养基于37℃，

5 % CO2饱和湿度下培养，每隔1天换液一次，至细胞生长至汇合后传代。待生长至70 %~80 %融合时，给予中等浓度通心络预孵育后，再给于不同刺激，收集细胞进行实验。

## 2.6 细胞总蛋白提取、定量，样品制备与Western blot分析

收集各组细胞，用预冷PBS洗涤3次后，将细胞重悬于细胞裂解液

（1 % NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 %甘油，1 mM Na3VO4, 1 mM PMSF, 1 mM DTT）中，剧烈震荡30 min（期间边震荡边冰浴），使细胞充分裂解。4℃，8000 rpm离心10 min，上清液移至另一微量离心管中，-70℃保存。

依据改良的Bradford法，蛋白质与染料考马斯亮蓝G-250相结合，在一定线性范围内，反应液在595 nm处吸光度的变化量与反应蛋白量成正比，因此测定595 nm处吸光度即可进行蛋白定量。标准蛋白购于Sigma公司，浓度为2 mg/ml，用生理盐水稀释至1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml和0.0625 mg/ml，以配制成不同浓度。再从各浓度溶液中分别取出125μl到定量小管中，按体积比1: 1的比例加入显色剂，充分混匀，用酶标仪于595 nm波长下测定吸光度值。以标准蛋白的浓度

（mg/ml）为纵坐标，以595 nm波长下的吸光度值为横坐标，绘制标准曲线。通过预实验将待测蛋白样品稀释至合适浓度，按照上述相同的方法， 测定出各待测样品在595 nm波长下的吸光度值。根据蛋白标准曲线，计算出样品中蛋白质的含量，结果以每毫升样品含有的蛋白质的量(mg/ml)表示。

样本蛋白处理：取30-50μg蛋白质溶液，用5×SDS上样缓冲溶液稀释（pH 6.8 Tris·HCl 100 mmol/L, SDS 4%, β-巯基乙醇10%, 甘油20%, 溴酚蓝0.1%），充分混合均匀，100℃水浴5分钟使蛋白充分变性，冷却备用。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)：灌制10%的分离胶和5%的浓

缩胶。分别取等量各组蛋白提取液，用RIPA裂解液补齐体积，与5×SDS上样缓冲液（0.1 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20%甘油, 0.1%溴酚蓝, 10 %β-巯基乙醇, 4% SDS）混合均匀，100℃沸水浴加热5 min使蛋白变性。自然冷却后，用微量加样器上样于凝胶加样孔内。90 V稳压电泳约30 min，待溴酚蓝进入分离胶后，换用120 V稳压电泳，至溴酚蓝前缘移动到凝胶底部，停止电泳，取出凝胶。

半干转膜：SDS-PAGE完毕后，切去浓缩胶，在分离胶的底部切角标记，剪取与胶同等大小的PVDF膜，用甲醇处理10 s之后，与滤纸、凝胶一起浸入转膜缓冲液（48 mM Tris, 39 mM甘氨酸, 1.3 mM SDS, 20 %甲醇, pH 9.2），平衡至少15 min。半干式转膜槽阴极在上，阳极在下。在转膜仪按从下到上的顺序，依次放置滤纸、PVDF膜、凝胶、滤纸，各层之间避免留有气泡。缓冲液为连续缓冲液，蛋白质移动方向由上而下， 按照PVDF膜位于转膜仪正极，凝胶位于转膜仪负极的方向，恒压25 V转膜，将蛋白转至PVDF膜，转膜时间依据检测蛋白分子量大小而定。

封闭：转膜完毕，取出PVDF膜，置于含5%脱脂奶粉的TTBS( 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)封闭液中，于37℃ 封

闭2 h。

一抗结合：将封闭后的PVDF膜置入一抗稀释液适当稀释的一抗溶液中，4℃过夜。

洗膜：取出PVDF膜放入盛有适量TTBS的平皿中，室温洗膜，每次

5 min，共5次。

二抗结合：将PVDF膜置入适量以TTBS 1:20000稀释的HRP标记的相应二抗溶液中，于室温反应1-2 h。

洗膜后，用化学发光仪检测PVDF膜上抗原抗体结合区带。

## 2.7 免疫共沉淀

用RIPA裂解液裂解收集的不同分组的细胞样品，4℃12000 r/min离心10 min，收集上清，用改良的Lowry法进行蛋白定量。取上清（约200µg蛋白）分别与2µg KLF5抗体混合，4℃摇动2 h后加入25µl蛋白A–Sepharose，4℃摇动过夜，12000 r/min 4℃离心2 min，收集蛋白A-抗原-抗体三元复合物，依次用IPH washing buffer（50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.1 mM PMSF）洗涤

5次，洗涤后用35μl 2×SD S上样缓冲液悬浮沉淀，100℃煮沸12 min，室温12000 r/min离心1 min，取上清进行SDS-PAGE、转膜、5%脱脂奶粉封闭2-3小时，将封闭后的PVDF膜置入TTBS适当稀释的一抗溶液中，4℃过夜。第二天取出PVDF膜放入盛有适量TTBS的平皿中，室温洗膜，每次5 min，共5次。然后将PVDF膜置入适量以TTBS 1: 20000稀释的HRP标记的相应二抗溶液中，于室温反应1-2 h。洗膜后，用化学发光仪检测PVDF膜上抗原抗体结合区带。

## 2.8 细胞感染腺病毒

Ad-KLF5 腺病毒表达载体委托于Invitrogen 公司构建。小鼠

RAW264.7细胞生长至80-90%融合时在完全培养基中加入Ad-KLF5或空病毒载体50 pfu/细胞，感染24小时后换液进行后续实验。

## 2.9 MTS比色法测定细胞存活率

MTS实验是常用的检测细胞生存率、筛选处理因素浓度的方法，活细胞能将溴MTS还原为一种蓝紫色的甲臢化合物，而死细胞则不能，该甲臢化合物在490 nm处有较强的吸收峰，且此吸收值与活细胞数成较好的线性关系。方法如下：

用RPMI 1640培养基调整BMMs单细胞悬液浓度，使其终浓度为2×104个细胞/ml，接种于96孔培养板内，每孔体积100μl。24小时后小心吸掉上清液，加入1%的RPMI 1640培养基，同步化处理24小时后，更换新鲜的10% RPMI 1640培养基，同时给予中等浓度通心络预孵育处理，

每个实验组设5个副孔，继续培养。培养12或24小时后每孔换为RPMI

1640培养基加入MTS 20μl，继续培养1-4小时，用多功能酶标仪测定各个孔在490 nm处的OD值，并通过下列公式计算细胞存活率：细胞存活率（%）=（实验组OD490值/对照组OD490值）×100%。

## 2.10 伤口愈合实验

2.10.1培养板接种细胞之前先用marker笔在6孔板背面画横线标记。

2.10.2小鼠RAW264.7细胞消化后接入6孔板，数量以贴壁后铺满板底为宜。

2.10.3细胞铺满板底后，用1 ml枪头垂直于孔板制造细胞划痕，尽量保证各个划痕宽度一致。

2.10.4吸去细胞培养液，用PBS冲洗孔板三次，洗去划痕产生的细胞碎

片。

### 2.10.5 加入PBS缓冲液，拍照记录。

2.10.6将培养板放入培养箱培养，每隔4-6小时取出拍照。

## 2.11 统计学方法与数据分析

上述实验均重复三次，取其均值。所有实验数据均采用SPSS 13.0软件，计量资料以均数±标准差表示。组间比较采用t检验和单因素方差分析（one way ANOVA），所有统计以*P*<0.05为差异有统计学意义。所选图表为重复实验的结果之一。

**结 果**

1通心络通过抑制巨噬细胞增殖和迁移而减轻颈动脉结扎诱导的内膜增生

将C57BL/6J小鼠随机分为对照组、颈动脉结扎组和颈动脉结扎+通心络治疗组。其中颈动脉结扎+通心络治疗组于手术前3天开始给予通心络（7.5 mg/10 g）超微粉悬液灌胃，结扎组予以等量生理盐水灌胃。30天后取结扎处颈动脉进行苏木精-伊红染色，结果显示，与对照组（Con）相比，结扎组（Ligated）小鼠颈动脉内膜显著增生（Fig. 1A），其I/M比值明显增加（Fig. 1B）；而颈动脉结扎+通心络（Ligated +TXL）组小鼠的动脉内膜增生明显少于结扎组（Fig. 1A和B）。上述结果表明，通心络可以抑制颈动脉结扎诱导的血管内膜增生。

小鼠RAW264.7细胞随机分为对照（Con）组、TNF-α刺激组、通心络（TXL）组和TNF-α+通心络（TXL）组。伤口愈合实验结果显示，TNF-α组有大量细胞迁移到划痕区域，通心络预孵育后，迁移进划痕区的细胞较TNF-α 组明显减少（Fig. 1B），说明通心络能够抑制TNF-α 诱导的

RAW264.7细胞的迁移。在此基础上，我们进一步检查了通心络对TNF-α诱导的RAW264.7细胞增殖的影响。MTS结果显示，TNF-α显著诱导巨噬细胞增殖，通心络预处理后再给予TNF-α刺激，巨噬细胞增殖较TNF-α组明显下降（Fig. 1C），提示通心络能够逆转TNF-α刺激引起的巨噬细胞的增殖。

2通心络通过下调KLF5表达而抑制TNF-α诱导的巨噬细胞增殖

小鼠随机分为三组：对照组、颈动脉结扎组、颈动脉结扎+通心络组。 颈动脉切片进行Mac-2和KLF5免疫双荧光染色的结果显示，颈动脉结扎组Mac-2及KLF5染色阳性细胞数较多，而颈动脉结扎+通心络组明显少于结扎组（Fig. 2A），提示通心络可能通过阻抑KLF5表达来抑制巨噬细胞的迁移与增殖。

RAW264.7细胞随机分为对照组、TNF-α组、通心络组（TXL）、TNF-α+通心络组（TNF-α+ TXL），用Western bolt检测KLF5和PCNA的表达。结果显示，通心络预处理显著下调PCNA和KLF5蛋白表达（Fig. 2B），在细胞水平上进一步表明，通心络通过阻抑KLF5表达而抑制巨噬细胞增殖。

# 3 KLF5介导巨噬细胞增殖、迁移和血管内膜增生

为了进一步明确KLF5在血管内膜增生中的作用，我们研究KLF5过表达（转染pAd-KLF5）和KLF5在巨噬细胞中缺失（KLF5 ly-/-小鼠）对颈动脉结扎诱导的内膜增生的影响。苏木精-伊红染色结果显示，与转染空载体pAd的小鼠相比，转染pAd-KLF5的小鼠血管内膜增生更为显著，内膜中膜比(I/M)值明显增大（Fig. 3A）。通心络处理能逆转KLF5过表达对血管内膜增生的促进作用（Fig. 3A）。免疫荧光结果显示，与pAd组相比，pAd-KLF5组的Mac-2和PCNA阳性染色细胞数明显增多，而在pAd-KLF5+通心络组，Mac-2和PCNA阳性染色细胞数量减少（Fig. 3B）。

结扎巨噬细胞特异性敲除KLF5（KLF5ly-/-）小鼠的后，颈动脉结扎术后血管内膜的增生情况，结果显示，与野生型（KLF5wt）小鼠相比，KLF5ly-/-小鼠的血管内膜增生显著减少，I/M 比值（2.02±0.48 vs

0.92±0.31）明显降低（Fig. 3C）。免疫荧光结果显示，KLF5 ly-/-小鼠，Mac-2和PCNA阳性染色细胞数明显少于野生型（KLF5wt）小鼠（Fig. 3D）。以上结果提示，KLF5介导巨噬细胞增殖、迁移和血管内膜增生，通心络通过下调KLF5的表达抑制血管内膜增生（Fig. 3）。

# 4 通心络抑制KLF5过表达诱导的巨噬细胞增殖和迁移

将小鼠RAW264.7细胞，随机分为pAd转染组、pAd-KLF5转染组及其对应的通心络干预组。Western blot结果显示，与pAd组相比，KLF5过表达显著促进RAW264.7细胞对PCNA的表达，通心络干预则逆转KLF5过表达诱导的PCNA表达上调，说明通心络能抑制KLF5过表达诱

导的巨噬细胞增殖（Fig.4A）。MTS 和伤口愈合实验结果显示，与pAd组相比，KLF5过表达显著促进巨噬细胞的增殖和迁移（Fig.4B和C）。用通心络预孵育RAW264.7细胞24 h后，再转染pAd-KLF5，巨噬细胞增殖和迁移收到显著抑制（Fig.4B和C）。以上结果说明，在细胞水平上，

KLF5过表达可以促进巨噬细胞的增殖和迁移，通心络通过阻抑KLF5的表达而抑制巨噬细胞的增殖和迁移。

# 5 通心络通过PI3K/AKT和NF-κB信号通路，调节KLF5的苏素化和泛素化，进而促进KLF5降解。

为了进一步明确通心络抑制KLF5表达的分子机制，我们将体外培养的RAW264.7细胞随机分为对照组、TNF-α组、通心络组（TXL）和TNF-α+通心络组（TNF-α+ TXL）组，用免疫共沉淀（CoIP）检测KLF5在不同影响因素作用下的泛素化。结果显示，与对照组相比，TNF-α抑制KLF5的泛素化，TNF-α+通心络孵育组的KLF5泛素化水平显著增加（Fig. 5A），提示通心络通过促进KLF5泛素化，进而加速KLF5降解。为进一步研究其分子机制，我们用Western blot 检测通心络对KLF5 泛素化相关酶

FBXW7表达以及KLF5与FBXW7的相互作用。结果显示，与对照组相比，TNF-α抑制FBXW7蛋白表达，使KLF5与FBXW7之间的相互作用减弱；相反，在TNF-α+通心络孵育组的细胞中FBXW7蛋白水平显著上调，KLF5与FBXW7之间的相互作用增强（Fig. 5B）。这些结果提示，通心络既能够上调FBXW7蛋白的表达，也能促进KLF5与FBXW7之间的相互作用。

因为已知KLF5的苏素化抑制KLF5与FBXW7之间的相互作用，因此我们进一步观察TNF-α以及通心络对KLF5苏素化的影响。免疫共沉淀（CoIP）结果显示，与对照组相比，在TNF-α处理的细胞中，KLF5的苏素化水平显著升高，通心络干预使KLF5苏素化水平下降（Fig. 5C），说明通心络通过抑制TNF-α 诱导的KLF5 的苏素化而促进KLF5 与

FBXW7之间的结合。

信号通路相关蛋白的检测发现，TNF-α可以上调p-AKT和p-NF-κB水平，说明TNF-α能激活AKT和NF-κB信号通路（Fig. 5D）。用AKT和NF-κB特异性的抑制剂处理RAW264.7细胞后，Western blotting和免疫共沉淀（CoIP）结果显示，用PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002 阻

断AKT信号通路后，KLF5的苏素化水平比TNF-α组降低（Fig. 5F）。用NF-κB信号通路抑制剂CAY10512阻断NF-κB信号通路后（Fig. 5E），KLF5的苏素化水平也明显下降（Fig. 5F）。这些结果表明，通心络通过抑制

PI3K/AKT和NF-κB信号通路来阻抑KLF5的苏素化，进而增加KLF5 与

FBXW7的相互作用及KLF5的泛素化，最终导致KLF5的稳定性降低。

**附 图**

A

Con Ligated Ligated+TXL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |

**15000**



\*

#

**10000**

**I/M ratio**

**5000**

**0**

B



Con TNF-αTXL TNF-α+TXL

**0 h**

**24 h**



\*\*

\*\*\*

**8**

**Area recovered by cells （%）**

**(vs. 0 h)**

**6**

**4**

**2**

**0**

C

\*\* ##



**4**

**3**

**Optical density(OD)**

**2**

**1**

**0**

Fig. 1 TXL inhibits neointima hyperplasia induced by carotid ligation via reducing the proliferation and migration of macrophages

(A) Neointima hyperplasia 14 days after carotid ligation. Magnification, ×200 (Upper panel). Morphometric quantification of I/M ratio (Lower panel),

\**P*<0.01 vs. Con group; # *P*<0.01 vs. Ligated group. (B) Wound-healing assay

For macrophage migration. Data represent the means±SD. \*\* *P*<0.05 vs. Con group; \*\*\**P*<0. 01 vs. TNF-αgroup. All experiments were performed in triplicate. (C) The proliferation of macrophages was determined by MTS assay.

\*\* *P*<0.05 vs. Con group, ##*P*<0.01 vs. TNF-αgroup.



DAPI

Mac2

KLF5

Merge

Con

Ligated

Ligated+TXL

A



DAPI

Mac2

PCNA

Merge

**Con**

**Ligated**

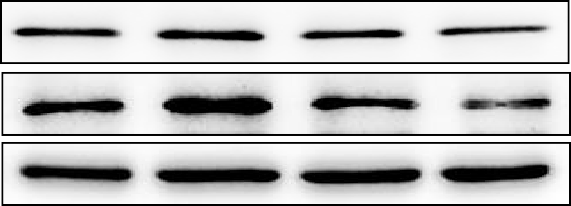
**Ligated+TXL**



B

PCNA KLF5

β-actin



Con TNF-αTXL TNF-α+TXL

**1.5**

**1.0**

\*\*

## KLF5

PCNA



**0.5**

**0.0**

Fig. 2 TXL inhibits macrophage proliferation through suppressing KLF5 expression induced by carotid ligation and TNF-α.

(A) The expression of KLF5 and Mac-2 in the ligated carotid artery was detected by immunofluorescence staining. (B) The expression of KLF5 and PCNA in RAW264.7 cells was detected by Western blotting. \*\* P<0.05 vs. TNF-α group.

A



Ligated

Ligated+TXL

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **pAd** | **pAd-KLF5** | **pAd** | **pAd-KLF5** |



\*\*

\*\*\*

**30000**

**20000**

**I/M ratio**

**10000**

**0**

B



DAPI

Mac2

KLF5

Merge

pAd

pAd-KLF5

pAd+TXL

pAd-KLF5+TXL



DAPI

Mac2

PCNA

Merge

pAd

pAd-KLF5

pAd+TXL

pAd-KLF5+TXL

C

**Ligated**

**Unligated**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KLF5wt | KLF5wt | KLF5 **ly-/-** |

\*\*

\*

**8000**

**6000**

**4000**

**I/M ratio**

**2000**

**0**

D



DAPI

Mac2

KLF5

Merge

KLF5wt ,Unligated

KLF5wt,Ligated

KLF5 **ly-/-**,Ligated



DAPI

Mac2

PCNA

Merge

KLF5wt,Unligated

KLF5wt,Ligated

KLF5 **ly-/-**,Ligated

Fig. 3 TXL inhibits neointima hyperplasia by decreasing the expression of KLF5

(A) Hematoxylin and eosin staining analysis for the degree of intimal hyperplasia of carotid artery injured by ligation. \*\* *P*<0.05 vs. pAd group;

\*\*\**P*<0.01 vs. pAd-KLF5 group. (B) Immunofluorescence analysis for

Expression of KLF5, PCNA and Mac-2 in the ligated carotid artery transfected or not with pAd-KLF5. (C) Hematoxylin and eosin staining analysis for the degree of intimal hyperplasia of carotid artery injured by ligation. \*\* *P*<0.01 vs. KLF5wt+unligated group; \* *P*<0.05 vs. KLF5wt+ligated group. (D) Immunofluorescence analysis for expression of KLF5, PCNA and Mac-2 in the ligated carotid artery from KLF5wt and KLF5ly-/-mice.

A

**PCNA KLF5**

**β-actin**

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |

p**Ad** **pAd-KLF5**



**PAd +TXL pAd-KLF5+ TXL**

**2.0**



**1.5**

\* \*\*

KLF5 PCNA

**1.0**

**0.5**

**0.0**

B pAd pAd-KLF5 pAd+TXL pAd-KLF5+ TXL

0H 24h



C



**4**

\*

\*\*

**3**

**2**

**1**

**0**

**Area recovered by cells（%） (vs. 0 h)**



\*

\*\*

**4**

**3**

**Optical density(OD)**

**2**

**1**

**0**

Fig. 4 TXL inhibits KLF5 overexpression-induced proliferation and migration of macrophages

(A) Western blot analysis for expression of KLF5 and PCNA in RAW264.7 cells transfected or not with pAd-KLF5. \**P*<0.05 vs. pAd group; \*\**P*<0.01 vs. pAd-KLF5 group. (B) Wound-healing assay for macrophages migration. Data represent the means± SD. \**P*<0.01 vs. pAd group; \*\**P*<0.05 vs. pAd-KLF5 group. (C) MTS assay for the proliferation of macrophages transfected or not with pAd-KLF5. \* *P*<0.01 vs. pAd group, \*\**P*<0.01 vs, pAd-KLF5 group.

A

Input IgG Con TNF-αTXL TNF-α+TXL



IP: KLF5 WB: Ub



BIP: KLF5 WB: KLF5



#

\*

**1.5**

**1.0**

**0.5**

**0.0**

B

FBXW7

β-actin



Con TNF-αTXL TNF-α**+** TXL



#

\*

**1.5**

**1.0**

**0.5**

**0.0**

Input IgG Con TNF-αTXL TNF-α+TXL



IP: KLF5 WB: FBXW7



IP: KLF5 WB: KLF5

#



\*

**1.5**

**1.0**

**0.5**

**0.0**

Input IgG Con TNF-αTXL TNF-α+ TXL



IP: KLF5 WB: SUMO-1



IP: KLF5 WB: SUMO-1



\*

#

**1.5**

**1.0**

**0.5**

**0.0**

D

AKT p-AKT NF-κB

p-NF-κB

Con TNF-αTXL TNF-α+TXL

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |
|  |





\* \*

#

#

**1.5**

p-AKT



p-NF-B



**1.0**

**0.5**

**0.0**

E

AKT p-AKT

NF-κB p-NF-κB

Con TNF-a

Con TNF-α

Ly294002



Con TNF-a

CAY10512



Con TNF-α

F

Input

IgG

Ly294002

Con TNF-αCon TNF-α

CAY10512

Con TNF-α



IP: KLF5 WB: SUMO-1



IP: KLF5 WB: SUMO-1



\*

#

#

**3**

**2**

**1**

**0**

Fig. 5 TXL reduces the stability of KLF5 by regulating the ubiquitination and sumoylation of KLF5

(A) Immunoprecipitation assay for the ubiquitination of KLF5. \**P*<0.05 vs. Con group; #*P*<0.05 vs. TNF-αgroup. (B) Western blot and immunoprecipitation assay for the expression and interaction of FBXW7 and KLF5. \**P*<0.05 vs. Con group; #*P*<0.05 vs. TNF-αgroup (C) Immunoprecipitation assay for the sumoylation of KLF5. \**P*<0.05 vs. Con group; #*P*<0.05 vs. TNF-αgroup (D) Western blot analysis for AKT, p-AKT, NF-κB and p-NF-κB. \**P*<0.05 vs. Con group; #*P*<0.05 vs. TNF-αgroup (E) Western blot analysis for AKT, p-AKT, NF-κB and p-NF-κB in macrophages after treated with specific inhibitors of AKT and NF-κB. (F) Immunoprecipitation assay for sumoylation of KLF5 in macrophages treated with specific inhibitors of AKT and NF-κB.

**讨论**

动脉粥样硬化是一个复杂的动态的病理过程，其特征是脂质浸润和血管壁的慢性炎症。动脉内膜中浸润的单核细胞及其分化成的血管常驻民--巨噬细胞被认为是动脉粥样硬化的发展标志[12]。巨噬细胞在动脉粥样硬化形成的整个过程中，都发挥着至关重要的作用，从斑块形成初期，到斑块破裂、脱落，再到出现临床症状，它决定着动脉粥样硬化的预后及转归。

通心络作为一种由十多种纯中药成分提取、浓缩组成的复方提取物， 近年来已被广泛应用于心血管及其他疾病的治疗。通心络内含有的有效活性成分，能够减低急性心肌梗死和某些心脏手术并发症的发生率[5-9]，降低血压，改善血管内皮的功能[13,14]。那么通心络对巨噬细胞又有哪些影响呢？本研究选用TNF-α诱导和颈动脉结扎的方法来模拟动脉粥样硬化的病理特征，营造相似的病灶处微环境，在细胞水平及整体水平观察巨噬细胞的增殖及迁移的变化，结果发现在炎症环境中，不但巨噬细胞表现出活跃的增殖和浸润行为，血管内膜也增生明显。但是，这种活跃的生物学行为却能够被通心络所抑制？其具体的机制到底是什么呢？

KLF5作为KLFs家族中重要的一员，参与调节细胞分化、增殖、迁移和细胞凋亡。近年的研究表明KLF5在心血管疾病的组织重构，如动脉粥样硬化，再狭窄，心脏肥大中发挥重要作用。之前有文献报道，KLF5的表达与心血管疾病中的平滑肌增殖有密切的关系[15]。所以我们推论KLF5同样能够促进巨噬细胞的增殖和迁移。为验证这一推论，我们选用KLF5ly-/-小鼠及尾静脉注射pAd-KLF5的C57BL/6J小鼠，给予颈动脉结扎；同时在细胞水平也过表达KLF5，并给予TNF-α刺激。结果发现，KLF5的表达直接影响巨噬细胞的增殖和迁移，而通心络能够显著降低蛋白KLF5的表达，从而抑制巨噬细胞的促增殖及迁移作用。那么，通心络降低蛋白KLF5的表达，是通过什么机制实现的呢？

泛素化是指在一系列酶的作用下，完成对底物蛋白的多泛肽化标记， 被泛素化标记的蛋白一般认为被降解。我们由此设想，TNF-α和通心络是否通过影响KLF5的泛素化，进一步影响KLF5的表达，最终影响巨噬细胞的增殖和迁移？我们用免疫共沉淀的方法来检测TNF-α刺激24 h后的巨噬细胞内KLF5与UB相互作用的情况。结果发现，TNF-α能够抑制二者的相互作用，而通心络的作用与其相反。F-box and WD repeat domain

containing 7 (FBXW7)，又称作Fbw7或Fbw7hcdc4，是SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3连接酶复合体中重要的一种F-盒蛋白。

FBXW7能够特异性地识别靶蛋白并与之结合，导致靶蛋白发生泛素化和蛋白酶体降解[16]。那么，通心络促进KLF5与UB的相互作用是否与FBXW7有关呢？我们进一步研究发现，TNF-α能够降低FBXW7的表达水平，说明TNF-α通过影响FBXW7的表达水平，间接影响KLF5的泛素化。为进一步证实该推论，我们用免疫共沉淀来检测细胞水平KLF5与FBXW7相互作用的情况。结果再次发现，通心络能够促进KLF5与FBXW7的相互作用。因此我么得出结论，通心络通过增加FBXW7的表达，促进KLF5与FBXW7的相互作用，促进KLF5的泛素化，使得KLF5的降解增加，KLF5的表达水平降低。

SUMO化( sumoylation)是能够影响蛋白自身稳定性及蛋白之间的相互作用的类泛素化过程，最近又有文献报道通心络能够影响血管内皮细胞中KLF5的SUMO化水平[13]，所以接下来，我们又用免疫共沉淀来检测KLF5与SUMO-1的相互作用情况。结果显示，通心络可以抑制KLF5与SUMO-1的相互作用，进而影响KLF5与FBXW7的相互作用。

我们都知道，当细胞里要发生某种反应时，必然是有信号分子从细胞外向细胞内传递了一种信息，细胞要根据这种信息来做出相应的反应，即 信号转导。所以接下来我们想知道通心络是经过哪条信号通路将信号传达 给细胞，引起这一系列的生物效应的。我们用Western bolt检测细胞水平与SUMO化相关的信号通路蛋白AKT、NF-κB及其活性形式P-AKT、P-NF-κB表达水平的变化，结果显示，TNF-α能够促进AKT、NF-κB的活化，促进KLF5的苏素化。

综上所述，本实验从多方面证实了通心络能够抑制TNF-α诱导的巨噬细胞增殖，其可能通过以下机制：通心络通过激活PI3K/AKT和NF-κB信号通路，增强KLF5苏素化，促进KLF5与FBXW7的相互作用，加速KLF5的泛素化降解。

结**论**

1通心络可以抑制炎症因子诱导的巨噬细胞的增殖和迁移。

2 KLF5调控血管内膜巨噬细胞的增殖。

3通心络通过降低KLF5的表达水平抑制巨噬细胞增殖和迁移。

4通心络通过促进KLF5泛素化加速KLF5的降解。

5通心络通过激活PI3K/AKT和NF-κB信号通路，增强KLF5苏素化，促进KLF5与FBXW7的相互作用。

参考文献

[1] Koritschoner NP, Bocco JL, Panzetta-Dutari GM, et al. A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. The Journal of biological chemistry, 1997, 272: 9573-9580.

[2] Chen ZJ, Sun LJ. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. Molecular cell, 2009, 33: 275-286.

[3] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. Science, 2007, 315: 201-205.

[4] Zhao J. Sumoylation regulates diverse biological processes. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2007, 64: 3017-3033.

[5] Liu JX, Shang XH, Wang G. Effect of tongxinluo capsule on experimental myocardial ischemia, arrhythmia and hyperlipidemia. Chinese journal of integrated traditional and western medicine, 1997, 17: 425-428.

[6] Cheng YT, Yang YJ, Zhang HT, et al. Pretreatment with Tongxinluo protects porcine myocardium from ischaemia/reperfusion injury through a nitric oxide related mechanism. Chinese medical journal, 2009, 122: 1529-1538.

[7] Xu GC, Gao RL, Wu YL. Clinical study on tongxinluo capsule in treatment of patients with angina pectoris caused by coronary heart disease. Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi, 1997, 17: 414-416.

[8] You SJ, Yang YJ, Chen KJ, et al. The protective effects of Tong-xin-luo on myocardium and microvasculature after reperfusion in acute myocardial infarction. Zhonghua xin xue guan bing za zhi, 2005, 33: 433-437.

[9] Zhang HT, Jia ZH, Zhang J, et al. No-reflow protection and long-term efficacy for acute myocardial infarction with Tongxinluo: a randomized double-blind placebo-controlled multicenter clinical trial (ENLEAT Trial). Chinese medical journal, 2010, 123: 2858-2864.

[10] Liu AJ, Li HQ, Li JH, et al. Chinese herbal medicine for aspirin resistance: a systematic review of randomized controlled trials. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2014,

2014: 890-950.

[11] Li LM, Zheng B, Zhang RN, et al. Chinese medicine Tongxinluo increases tight junction protein levels by inducing KLF5 expression in microvascular endothelial cells. Cell biochemistry and function, 2015, 33: 226-234.

[12] Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A [Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12476646/) J Interv Cardiol, 2002, 15(6): 439-446.

[13] Zheng CY, Song LL, Wen JK, Li LM, Guo ZW, Zhou PP et al. Tongxinluo (TXL), a traditional Chinese medicinal compound, improves endothelial function after chronic hypoxia both in vivo and in vitro. Journal of cardiovascular pharmacology 2015; 65: 579-586.

[14] Li LM, Zheng B, Zhang RN, Jin LS, Zheng CY, Wang C et al. Chinese medicine Tongxinluo increases tight junction protein levels by inducing KLF5 expression in microvascular endothelial cells. Cell biochemistry and function 2015; 33: 226-234.

[15] Zheng B, Han M, Shu YN, Li YJ, Miao SB, Zhang XH et al. HDAC2 phosphorylation-dependent Klf5 deacetylation and RARalpha acetylation induced by RAR agonist switch the transcription regulatory programs of p21 in VSMCs. Cell research 2011; 21: 1487-1508.

[16] Wang Z, Inuzuka H, Zhong J, Wan L, Fukushima H, Sarkar FH et al. Tumor suppressor functions of FBW7 in cancer development and progression. FEBS letters 2012; 586: 1409-1418.

**综述**

**TLRs的研究进展**

机体遭受病原体入侵时会启动一系列防御机制，这些防御机制构成了机体的固有免疫力，也被称为先天免疫[1]。先天免疫作为机体识别入侵的病原体的第一道防线，发挥着至关重要的作用：它能够迅速感知入侵的致病菌，并做出适当的反应控制感染。先天免疫主要通过一定数量的模式识别受体（PRRs，一类主要表达于天然免疫细胞表面非克隆性分布、可识别一种或多种PAMP的识别分子。）识别病原相关分子模式（PAMPs，即病原微生物表面某些共有的高度保守的分子结构）来激活一系列信号通路， 最终实现其功能[2]。TLRs（Toll-like receptors）作为模式识别受体家族中的一员，最初是作为一个决定着果蝇的背腹侧分化的基因，即Toll基因而被发现的[3]，后来的研究还表明它在昆虫的免疫系统中发挥重要的作用

[4]，从此为后序Toll受体免疫学意义的研究拉开序幕。近年来因其与自身免疫系统疾病、心脑血管疾病、肿瘤等发生发展都有着密切的关系而备受 关注。

[1] TLRs的结构及分布

TLRs的结构是1型跨膜糖蛋白，其胞外区的特征是不同数量的富含亮氨酸重复序列（LRRs）组成的一个“马蹄”结构，该结构是TLRs与核酸及蛋白质配体相互作用的功能承担者[5]。LRR结构是由19-25个重复序列单元串联组成，其中每个单元长度约24-29个氨基酸且包含xLxxLxLxx模式，空间结构是由一个β链和一个α螺旋连接的循环组成。TLRs结构的胞内区是与白介素1受体高度同源的结构域，称为Toll/IL-1R (TIR)。它可以识别各种成分的配体如：细菌、真菌、原生动物以及病毒的配体。配体与TLRs结合后，通过PAMP-TLR的相互作用使受体发生寡聚化，同源二聚化和异源二聚化，随后触发细胞内一系列信号转导。目前人类基因组数据库记载的TLRs家族成员共有11名[6]，按照其各自的主要功能和结构，可以将它们划分为五亚科：TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5和TLR-9[7]. TLR-2亚科中包括TLR-1, TLR-2, TLR-6和TLR-10，它们均高度同源且以成对的方式与其各自的配体结合；TLR-9 亚科包括TLR-7, TLR-8 和

TLR-9; TLR-3, TLR-4和TLR-5各自自成一个亚科，它们既可以独立发挥作用也可以联合其它受体或分子共同发挥作用。TLRs在机体广泛分布于各种类型细胞的细胞膜上，例如免疫细胞，包括巨噬细胞、肥大细胞、B细胞、树突状细胞、中性粒细胞、NK细胞、T细胞，和非免疫细胞如成纤维细胞、呼吸道和肠道上皮细胞，等等。又依照其各自所识别的PAMP的性质不同定位于细胞内的不同部位，例如：TLR-2, TLR-4和TLR-5三个亚科主要分布于细胞膜上，因此它们主要负责识别胞外配体；TLR-3和TLR-9亚科主要定位于细胞内的囊泡膜，例如内体的膜上。有研究发现，机体大部分组织均至少表达一种TLR的mRNA，有几种组织甚至含有全部TLRs的mRNA [8]。

[2] TLRs的配体及信号通路

哺乳动物所有的TLRs中，TLR-2所能识别的PAMP的种类是最多的，包括G+细菌和G-细菌，分支杆菌，病毒，寄生虫及真菌[9]。TLR-2这种特性主要是因为它可以与TLR-1或者TLR-6形成异源二聚体。这也使得TLR-2在抗感染治疗方面具有重要的临床意义。TLR-4能够识别G-细菌细胞膜外的脂多糖（LPS）[8]。TLR-5能够识别鞭毛蛋白[11]。TLR-3, TLR-7 TLR-8和TLR-9能够识别微生物或宿主细胞的寡核苷酸：TLR-3能够识别病毒的双链DNA[12,13]; TLR-7和TLR-8能够与病毒及病毒的单链DNA结合[14]；而TLR-9能够识别单纯性疱疹病毒（HSV）及细菌和病毒的非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤核苷酸结构[15, 16]。

其实，不同的TLR与其各自相应的配体结合后所引发的信号转导途径也是各不相同的，不同的接头蛋白的选择是这一特性的结构基础，这也是TLRs具有多种功能与多种病理生理过程都有关联的基础。但是抛开中间各自的特点，它们拥有共同的一个“核心”信号通路：为与TIR结构域结合而对接头蛋白进行二聚化以及空间结构的改变[17]。髓样分化因子88

（MyD88）是首先发现的接头蛋白[17]，它普遍存在于除TLR-3以外的所有TLRs信号通路中（TLR-4能激活依赖或不依赖MyD88的信号途径）。

MyD88介导的信号通路与IL-1介导的信号通路相类似，MyD88能够激活IL-1受体激酶4（IRAK4），从而使IRAK1发生磷酸化，进一步激活肿瘤坏死因子受体家族6（TRAF6）介导的两条信号转导途径。其中一条途径是由MAPKs活化AP-1，另一条途径是活化的IKK导致NF-κB的易位，

无论AP-1或NF-κB都能诱导炎症因子的释放[19,20]。TLR-2，-4，-5，-7和-9激活的是依赖MyD88的信号通路，其中TLR-2, -4和-5可以使核转录因子（NF-κB）活化，进而激活IL-1受体激酶和TRAF6，促进炎症基因的表达；TLR-7和-9能够促进1型IFN的释放。依赖MyD88信号通路是受TRIF调节的[21]，它能够使干扰素调节因子3和7（IRF-3, IRF-7）发生磷酸化，形成同源或异源二聚体，进入细胞核内促进1型IFN的生成[22, 23]。

另外，在TLR-4的非依赖MyD88信号通路也有TRIF的参与，它还是

TLR-3的一个接头分子。

3 TLRs在肿瘤中的研究进展

许多血液恶性肿瘤发生都是由于TLR接头蛋白MyD88蛋白发生突变导致TLRs的异常激活引起的。例如活化的B细胞型弥漫性大B细胞淋巴瘤(ABC-DLBCL)，一个恶性度特别高的DLBCL的亚型，其发病机制就是MyD88基因突变长期积累。39%的肿瘤样本发生MyD88基因突变，值得注意的是，29%的突变是265位置(L265P)的亮氨酸变化为脯氨酸[24]。有文献报道敲除淋巴细胞中的MyD88对其生存及NF-κB的活性有很明显的影响[24]。L265P突变的影响包括NFκB活性增强以及增加JAK-STAT3信号转导和促炎细胞因子如白细胞介素6、IL10，IFN-β的分泌[24]。这些细胞因子的生产进一步激活JAK-STAT3信号作为自分泌环的一部分，延长淋巴瘤细胞存活时间[25,26]。许多其他人类恶性肿瘤中也已经出现MyD88基因突变，例如：几乎100%的巨球蛋白血(WM)，2 - 10%的慢性淋巴细胞白血病(CLL)，69%的皮肤弥漫性大B细胞淋巴瘤和38%的原发性中枢神经系统淋巴瘤(PCNSL)（以前文献报道[27]。

然而，单一MyD88 L265P突变只是肿瘤发生的其中一个诱因，其他潜在因素的积累同样可以引发恶性克隆，例如炎症。炎症造成如基因组不稳 定、增殖异常，基质环境的变化[28]，极易使得众多关键的细胞和因子发生癌变。虽然炎症促进肿瘤的机制尚未被完全理解，但很显然，在很多情况下，肿瘤的发展是与慢性炎症密切相关的[29, 30]，例如持续性幽门螺杆菌感染与胃癌相关联以及乙肝和丙肝病毒感染与肝细胞癌相关联等病原微生物通过持续刺激TLRs,导致NF-κB和STAT3的转录因子活性持续增强，通过下游多种效应器使组织细胞向癌细胞转化[31, 32, 33]。而且，由宿主体内的炎

症免疫细胞（包括巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞，T和B淋巴细胞）建立的持续的炎症微环境中的多种细胞因子，能够活化转录因子，这样就形成了一个促进细胞增殖，抑制细胞凋亡的前馈放大环路。例如：NF-κB和STAT3既能够促进Bcl-2及Bcl-XL的表达，又能够促进c-IAP1, c-IAP2, Mcl-1, c-FLIP及survivin的表达[34, 35]。

总之，MyD88发生突变或者TLRs的异常活化，均能导致NF-κB信号通路的激活，决定了许多恶性肿瘤的预后不良。因此，以该途径为靶点， 可作为多种恶性肿瘤尤其是血液恶性肿瘤综合治疗的一部分。我们希望通过联合使用转录因子以及信号通路的抑制剂还有细胞因子、趋化因子的阻断剂，减少免疫及炎症细胞的数量，达到治疗恶性肿瘤的目的。在某些淋巴肿瘤中NF-κB表现出高的活性，这表明该信号通路对肿瘤的生存至关重要，因此可以将其作为抗肿瘤药物的新靶点[34,35,36,37]。然而在大多数情况下，该方法只有与更传统的方法联合采用才有效果，而且，基因毒性治疗可以激活残留的肿瘤细胞内的NF-κB的活性，所以，两者联合使用可以抵抗耐药性的产生。但是，长期阻断可导致严重的免疫缺陷，并且可引发中性粒细胞增多症及因IL1β分泌增多导致的急性炎症，同时也增加了肝损伤的倾向，这些并发症限制了NFκB和IKKβ的临床应用。另一个可替代它们的治疗靶点是STAT3及其信号通路。有文献报道了几种STAT3和JAK2的抑制剂，并且证明它们能够抑制多种表现出高STAT3活性的肿瘤[38,39]。值得注意的是，暂时没有文献报道使用STAT3和JAK2的抑制剂能够产生类似NF-κB抑制剂的并发症。但是，单独使用NF-κB 和

STAT3信号通路的抑制剂并不能使肿瘤细胞向正常细胞转化，但是将其与诱导细胞凋亡的药物或细胞因子联用具有很好的疗效。肿瘤细胞NF-κB的选择性抑制剂能够阻断TNF的作用并且使细胞更容易受TRAIL诱导走向凋亡，从而实现肿瘤病程的逆转[40,41]。NF-κB抑制剂与抗-TNF治疗，联合TRAIL或者IFN的使用可以成为肿瘤免疫调节疗法的新方案。有文献报道，联合使用BTK抑制剂依鲁替尼和雷利度胺治疗ABC-DLBCL，可导致细胞周期停滞、细胞凋亡[42, 43]。联合治疗方案有其独特的优势：NF-κB抑制剂能够减轻某些IFN产生的副作用，使肿瘤细胞微环境的平衡转向促进肿瘤细胞向正常细胞的转化。

尽管普遍认为抑制TLR的活性及抗炎对肿瘤的治疗也是有益的，但

是有证据表明TLR的激动剂也是很好的抗肿瘤药物。用TLR9激动剂，B型CpG 寡脱氧核苷酸(CpG-B ODNs)及CLLB 细胞，选择性的激活

TLR9，能够活化STAT1、减少Bcl-xl生存蛋白并且增加Fas及Fas配体，从而极大程度促进凋亡的发生[44]。TLR9介导的凋亡是通过改变淋巴细胞中NF-κB的状态来实现的。而且，TLR受体激动剂能够激活同源的免疫系统对抗肿瘤细胞[45-47]. TLRs在淋巴系统恶性肿瘤中所起到的作用，更类似“双刃剑”：在某些方面能够促进疾病的发展，而另一些方面又发挥抑制的作用。之前有文献报道，存在MyD88突变而异常激活TLRs的淋巴瘤患者，预后不良。但，近来又有文献报道，有一小部分年轻的CLL患者，虽然存在相同突变，但是生存率有所改善[48]。

4小结

模式识别受体保护机体不受有害刺激的伤害，但是，这些信号转导通路的异常活化可以引发癌症。当接头蛋白MyD88发生突变后，TLRs甚至可以利用机体自身的DNA促进癌变细胞生长。该结论只是Virchow假说（即慢性炎症与恶性肿瘤的发展密切相关）总多论据中的一个。针对

TLR信号通路中突变位点的研究，极大地推进了我们对TLRs在恶性肿瘤中发挥的作用的认知，但是，以TLRs为靶点的抗癌治疗仍有很多未知领域等待我们进一步探索。通常TLRs在恶性肿瘤中扮演着“双刃剑”的角色：一方面，异常活化的TLR信号通路为癌细胞的增殖创造了必需的微环境；另一方面，TLR的激动剂能够抑制癌细胞的生长。更好的理解TLRs在恶性肿瘤中的作用，能够帮助我们在促癌和抑癌的平衡之间找到切入点，并且为抗癌治疗的新方法找到理论依据。

参考文献

[1] Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell, 1997, 91: 295-298.

[2] Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunological reviews, 2000, 173: 89-97.

[3] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, et al. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive

Immunity. Nature, 1997, 388: 394-397.

[4] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell, 1996, 86: 973-983.

[5] Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. Nature, 1995, 374: 183-186.

[6] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. Curr Protoc Immunol, 2007, Chapter 14: Unit 14.12

[7] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335-376.

[8] Zarember KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. Journal of immunology, 2002, 168: 554-561.

[9] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 2006, 124: 783-801.

[10] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, 1998, 282: 2085-2088.

[11] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature, 2001, 410: 1099-1103.

[12] Wang T, Town T, Alexopoulou L, et al. Toll-like receptor 3 mediates west nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. Nature medicine, 2004, 10: 1366-1373.

[13] Hardarson HS, Baker JS, Yang Z, et al. Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-inducedcardiac injury. American journal of physiology heart and circulatory physiology, 2007, 292: H251-258.

[14] Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science,

2004, 303: 1529-1531.

[15] Krug A, Luker GD, Barchet W, et al. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. Blood, 2004, 103: 1433-1437.

[16] Lund J, Sato A, Akira S, et al. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. The Journal of experimental medicine, 2003, 198: 513-520.

[17] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nature reviews immunology, 2007, 7: 353-364.

[18] Burns K, Martinon F, Esslinger C, et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. The Journal of biological chemistry, 1998, 273: 12203-12209.

[19] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. International immunology, 2005, 17: 1-14.

[20] Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. Current opinion in immunology, 2000, 12: 13-19.

[21] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. Science, 2003, 301: 640-643.

[22] Akira S. Innate immunity and adjuvants. Philosophical transactions of the royal society of London series B, Biological sciences, 2011, 366: 2748-2755.

[23] Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling ininnate immune defenses. Clinical microbiology reviews, 2009, 22: 240-273.

[24] Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. Nature, 2011, 470: 115-119.

[25] Lam LT, Wright G, Davis RE, et al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- {kappa} B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma.

Blood, 2008, 111: 3701-3713.

[26] Ding BB, Yu JJ, Yu RY, et al. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. Blood, 2008, 111: 1515-1523.

[27] Wang JQ, Jeelall YS, Horikawa K. Emerging targets in human lymphoma: targeting the MYD88 mutation. Blood Lymphat Cancer, 2013, 2013: 53–61.

[28] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 2011, 144: 646-674.

[29] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell, 2010, 140: 883–899.

[30] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature, 2008, 454: 428–435.

[31] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature, 2006, 441: 431-436.

[32] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity, 2011, 34: 637-650.

[33] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumor microenvironment. Nature reviews Immunology, 2007, 7: 41-51.

[34] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature, 2006, 441: 431-436.

[35] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. Nature reviews Immunology, 2007, 7: 41-51.

[36] Mackenzie GG, Queisser N, Wolfson ML, et al. Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin'slymphoma cells. International journal of cancer, 2008, 123: 56-65.

[37] Coppo P, Gouilleux-Gruart V, Huang Y, et al. STAT3 transcription

Factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma. Leukemia, 2009, 23: 1667-1678.

[38] Hedvat M, Huszar D, Herrmann A, et al. The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. Cancercell, 2009, 16: 487-497.

[39] Lin L, Amin R, Gallicano GI, et al. The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF-beta signaling. Oncogene, 2009, 28: 961-972.

[40] Kim YS, Schwabe RF, Qian T, et al. TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappaB inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells. Hepatology, 2002, 36: 1498-1508.

[41] Braeuer SJ, Buneker C, Mohr A, et al. Constitutively activated nuclear factor-kappaB, but not induced NF-kappaB, leads to TRAIL resistance by up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells. Molecular cancer research: MCR, 2006, 4: 715-728.

[42] Yang Y, Shaffer AL, 3rd, et al. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. Cancer cell, 2012, 21: 723-737.

[43] Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature, 2005, 434: 772-777.

[44] Liang X, Moseman EA, Farrar MA, et al. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood, 2010, 115: 5041-5052.

[45] Vacchelli E, Galluzzi L, Eggermont A, et al. Trial watch: FDA-approved Toll-likereceptoragonistsforcancer therapy. Oncoimmunology, 2012, 1: 894–907.

[46] Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, et al. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. Oncoimmunology, 2012, 1: 699-716.

[47] AdamsS. Toll-likereceptoragonistsincancertherapy. Immunotherapy, 2009, 1: 949-964.

[48] Martinez-TrillosA, PinyolM, NavarroA, etal. Mutationsin TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic

Leukemia patients with favorable outcome. Blood, 2014, 123:

3790-3796.

致**谢**

衷心感谢我的导师温进坤教授。感谢温老师在忙碌的工作中挤出时间来审查、修改我的论文。温老师渊博的专业知识，认真、严谨的治学态度诲人不倦的高尚师德，严于律己、宽以待人的崇高风范，朴实无华、平易 近人的人格魅力令我非常钦佩和感动，不仅授我以文，而且教我做人，虽 历时三载，却是终生受益无穷之道。本文从选题到完成，倾注了导师大量 的心血，在此谨向导师表示崇高的敬意和衷心的感谢！

衷心感谢姜玲玲教授和郑斌教授。谢谢两位老师在实验探索与进行的 过程中给予的耐心、细致的指导和无私的帮助，两位老师对研究的认真负 责和敏捷的思维值得我们学习，谢谢姜老师和郑老师。

衷心感谢科室所有老师给予的关心和帮助，实验室各位老师尽责的管理和维护为我们创造了良好的研究条件，谢谢各位老师。

衷心感谢师兄师姐和科室的所有同学在实验中给予的指导和帮助，谢

谢。

衷心感谢求学路上给予我无私帮助的每一个人，谢谢大家！

**个人简历**

**一、一般情况**

姓名姜文性别女民族汉族

出生年月1987年3月8日籍贯辽宁省沈阳市大东区

**二、个人经历**

2005.9~2010.6甘肃中医药大学临床医学专业获学士学位

2013.9~2016.6河北医科大学生物化学与分子生物学获硕士学位

**三、获奖情况**

2006-2010年度甘肃中医药大学三等奖学金

2010年甘肃中医药大学优秀毕业生

2014~2015年度河北医科大学学业三等奖学金

**四、承担或主研课题情况**

营卫“由络以通，交会生化”异常与微血管病变相关性及微观病理特征研究(2012CB518601)，国家973项目。