|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分类号 |  | 密级 |  |
| U D C |  | 编号 |  |



博士学位论文

**LIGHT-LTβR 信号通路在**

**NOD 小鼠中的作用**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 研 究 生 姓 名 | ： | 曹朝晖 |
| 导 师 姓 名、职 称 | ： | 尹卫东 教授 |
| 学 科 、 专 业 名 称 | ： | 病理学与病理生理学 |
| 研 究 方 向 | ： | 糖尿病的分子机制 |

2014 年 5 月

南华大学学位论文原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南华大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 年 月 日

南华大学学位论文版权使用授权书

本学位论文是本人在南华大学攻读 博 （博/硕）士学位期间在导师和第三军医大学免疫研究所指导老师指导下完成的学位论文。本论文的研究成果归南华大学与第三军医大学所有，本论文的研究内容不得以其它单位的名义发表。本人同意南华大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文， 允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保留学位论文；学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》， 并按《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定享受相关权益。同意授权中国科学信息技术研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》， 并通过网络向社会公众提供信息服务。对于涉密的学位论文，解密后适用该授权。

作者签名： 导师签名：

年 月 日 年 月 日

目 录

主要缩略语中英文索引 3

**中文摘要** 6

英文摘要：11

第一部分LIGHT及受体的表达随NOD小鼠糖尿病病情发展的变化

1. 前言 17

2. 实验材料 19

3. 实验方法 20

4. 实验结果 26

5. 讨论 31

6. 小结 34

第二部分LIGHT途径信号缺失对NOD小鼠糖尿病病情的影响

目 录

[Abstract](#_Toc686199594) 9

[第一部分 LIGHT及受体的表达随NOD小鼠糖尿病病情发展的变化](#_Toc686199595) 10

[1.前言](#_Toc686199596) 10

[第二部分 LIGHT途径信号缺失对NOD小鼠糖尿病病情的影响](#_Toc686199597) 17

[前言](#_Toc686199598) 17

[第三部分 LIGHT-LTβR信号通路对胰岛细胞凋亡的影响](#_Toc686199599) 21

[前言](#_Toc686199600) 21

[第四部分 LIGHT-LTβR信号通路诱导胰岛细胞凋亡的分子机制](#_Toc686199601) 26

[前言](#_Toc686199602) 26

[结 论](#_Toc686199603) 31

[参考文献](#_Toc686199604) 31

[参考文献](#_Toc686199605) 38

主要缩略语中英文索引

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩写词 | 英文全称 | 中文全称 |
| LT | Lymphotoxin | 淋巴毒素 |
| TNFSF | Tumor necrosis factor superfamily | 肿瘤坏死因子超家族 |
| TNFRSF | Tumor necrosis factor receptor superfamily | 肿瘤坏死因子受体超家族 |
| LIGHT | T-cell-restricted ligand, homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression,competes with herpesvirus glycoprotein D for herpesvirus entry mediator on T-cells(TNFSF14,CD258) | 肿瘤坏死因子 14 |
| LTβR | Lymphotoxin beta receptor | 淋巴毒素 β 受体 |
| HVEM | Herpes virus entry mediator | 疱疹病毒进入介质 |
| DcR3 | Decoy receptor 3 | 诱饵受体 3 |
| rmLIGHT | Recombinant mice LIGHT | 重组鼠 LIGHT |
| sLIGHT | Soluble LIGHT | 可溶的 LIGHT |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| LIGHT-/- | LIGHT gene knock out | LIGHT 基因敲除 |
| NF-κB | Nuclear factor kappa B | 核因子 κB |
| FADD | Fas-associated death domain | Fas 相关的死亡结构域 |
| DEPC | Diethypyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| Cyto C | Cytochrome C | 细胞色素 C |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| WB | Western blot | 蛋白质印迹 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩写词 | 英文全称 | 中文全称 |
| DISC | Death-inducing signaling complex | 死亡诱导信号传递复合体 |
| IRF-1 | Interferon regulatory factor 1 | 干扰素调节因子 1 |
| HE | Hematoxylin-Eosin | 苏木素-伊红 |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanes ul-fonic acid | 羟乙基哌秦乙硫磺酸 |
| APC | Antigen Presenting Cell | 抗原呈递细胞 |
| FCM | Flow cytometry | 流式细胞分析技术 |
| STAT-1 | Signal transducers and activators of transcription 1 | 信号传导和转录激活物 1 |
| IFN-γ | Interferon-gamma | γ-干扰素 |
| IL-4 | Interleukin-4 | 白细胞介素 4 |
| L-Glu | L-glutamine | L-谷氨酰胺 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| JAK | C-Jun N-terminal kinase/Janus | c-Jun 氨基末端激酶/蛋白酪氨酸激酶 |
| FBS | Fetal Bovine Serum | 胎牛血清 |
| MTT | 3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylt etrazoliumbromide | 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2，  5-二苯基四氮唑溴盐 |
| FITC | Isothiocyanate fluorescin | 异氰酸荧光素 |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附试验 |
| Flud | Fludarabine | 氟达拉滨 |
| PUMA | P53 up-regulated modulator of apoptosis | P53 上调的凋亡调节子 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩写词 | 英文全称 | 中文全称 |
| TRAF | Tumor necrosis factor receptor-associated  factor | 肿瘤坏死因子受体相关因  子 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| mAb | Monoclonal antibody | 单克隆抗体 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 聚偏氟乙烯 |
| Real-time PCR | Real-time quantitative PCR | 实时定量 PCR |
| DMEM | Dulbecco modified eagle medium | DME 培养基 |
| FBG | Fasting blood glucose | 空腹血糖 |
| T1DM | Type 1 Diabetes Mellitus | 1 型糖尿病 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide;dimethyl sulphoxide | 二甲基亚砜 |
| NOD mice | Nonobese diabetic mice | 非肥胖糖尿病小鼠 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| MHC | Major histocompatibility complex | 主要组织相容性复合物 |
| PDTC | Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate | 焦赖氨酸二硫代氨基甲酸  铵 |
| TUNEL | Terminal dUTP nick-end labelling | TdT 介导的dUTP 缺口末端标记技术 |
| SPF | Specefic pathogen Free | 无特定病原体 |
| DTZ | Dithizone | 双硫腙 |

LIGHT- LTβR信号通路在NOD小鼠中的作用

研究生：曹朝晖

导师：尹卫东教授

专业：病理学与病理生理学

**中文摘 要**

1型糖尿病（Type 1 diabetes mellitus, T1DM）是一种以长期慢性炎症和胰岛β细胞大量损伤而导致胰岛素分泌不足，引起机体糖脂代谢紊乱为特征的器官特异性自身免疫疾病。T1DM的发病率呈逐年递增趋势，其严重的并发症已成为儿童、青少年致残和早亡的重要因素。因此，T1DM 是当今急需解决的健康问题之一。引起

T1DM的因素多而复杂，其中T细胞持续活化而导致胰岛β细胞损伤是T1DM病情发展中的重要一环。T细胞中的CD8+T细胞致β细胞死亡的作用已有深入研究，但由CD4+T细胞或巨噬细胞等产生的细胞因子，尤其是参与T细胞活化的共刺激分子在该病中的作用机制仍不是很清楚。深入研究导致T细胞活化的共刺激分子在β细胞免疫损伤中的作用机制，对于发展有效的T1DM防治策略具有重要的理论意义和实际价值。

早期的研究发现合理封闭一些共刺激途径可以降低T1DM的发生。LIGHT-HVEM/LTβR是20世纪末发现的共刺激分子，多个研究小组报道LIGHT信号通路通过参与T细胞的活化，诱导细胞凋亡等在类风湿性关节炎和自身免疫性肝炎等多种自身免疫疾病的病理发生中起着积极的作用。已有报道认为，LIGHT-

LTβR信号途径可促进胰腺内淋巴结的发育而募集活化T淋巴细胞对β细胞造成免疫损伤而导致糖尿病的产生；用LTβR-Ig治疗NOD小鼠，早期给药可预防胰岛炎和TIDM 的发生，胰岛炎晚期给药可逆转胰岛炎和延缓糖尿病发生，提示

LIGHT信号通路在TIDM 的发生、发展中发挥重要作用。但LIGHT信号通路在

T1DM的胰岛细胞凋亡中的直接作用及相关分子机制，尚未见报道。

针对上述研究现状，本课题结合现代分子遗传学、细胞学和免疫学等学科的前

沿技术与方法，以LIGHT-/-NOD小鼠为模式动物和以MIN6细胞株为主要细胞模型，从在体（*in vivo*）和离体（*in vitro*）等多个方面，探讨LIGHT信号通路在T1DM发生、发展中的作用及机制，拟解决以下几个问题：1、动态检测NOD小鼠胰组织LIGHT及其受体HVEM、LTβR的表达以及外周血中相关细胞因子的分泌情况，探讨LIGHT信号通路以及有关细胞因子的分泌与T1DM病情发展的相关性；2、建立LIGHT-/- NOD 小鼠动物模型，通过生化指标检测、胰腺病理分析、小鼠糖尿病发病情况统计、细胞因子分泌等观察LIGHT信号缺失（LIGHT-/-NOD小鼠）时，NOD小鼠糖尿病病情变化。通过对比分析，明确LIGHT途径在胰岛β细胞免疫损伤中的作用；3、以NOD小鼠胰岛素瘤细胞株MIN6和Bal b/c小鼠的原代胰岛细胞为模型，分别用rmLIGHT和rmIFN-γ单独或联合处理细胞，利用MTT、FCM等技术观察LIGHT途径对胰岛细胞存活及凋亡的影响；4、采用Western blot或免疫细胞化学等技术检测目标基因（STAT1、NF-κB、Bcl-2家族、Caspase家族、PARP等）的蛋白表达水平，研究阐明LIGHT信号通路诱导胰岛β细胞凋亡的分子机制。预期的研究结果不但有助于阐明胰岛β细胞的有关损伤机制，并且可为T1DM的临床治疗研究提供新的思路和方法。

第一部分LIGHT及受体的表达随NOD小鼠糖尿病病情发展的变化目的：探讨LIGHT及受体HVEM、LTβR的表达以及细胞因子IFN-γ和IL-4

的分泌变化与T1DM发生、发展的关系。

方法：4周龄雌性NOD小鼠（n=30）饲养于SPF级动物房，在无任何干预条件下，定期监测血糖、胰岛素水平。一周内连续两次检测非空腹血糖水平

≥13.8mmol/L的小鼠诊断为糖尿病，观察NOD小鼠自发产生糖尿病的情况；分别随机取未产生糖尿病、糖尿病发病1周、糖尿病发病2周、糖尿病发病4周的NOD小鼠各3只，处死收集血清并提取小鼠胰腺总RNA和总蛋白，采用Real-time PCR和Western blot技术检测LIGHT及其受体HVEM、LTβR的表达；ELISA法检测血清炎症相关细胞因子（IFN-γ、IL-4）分泌。

结果：30周龄时，NOD小鼠糖尿病累积发病率为81.5％（22/27）；Real-time

PCR和Western blot结果显示，糖尿病发病4周的NOD小鼠胰腺组织LIGHT、LTβR和HVEM的表达较未产生糖尿病组明显上调（*P* <0.05）。血清中Th1细胞因子IFN-γ分泌明显增加，而Th2细胞因子IL-4分泌减少。

结论：NOD小鼠发生糖尿病时，LIGHT、LTβR和HVEM表达明显上调，血清中促炎症细胞因子IFN-γ分泌增加，抑制炎症细胞因子IL-4分泌减少，上述因素与T1DM的发生发展相关。

第二部分LIGHT途径信号缺失对NOD小鼠糖尿病病情的影响

目的：观察LIGHT信号缺失时NOD小鼠（LIGHT-/- NOD小鼠）糖尿病病情变化，通过对比分析明确LIGHT途径在胰岛β细胞损伤中的作用。

方法：将LIGHT-/（- LIGHT KO）小鼠与NOD小鼠进行配对得到LIGHT+/-NOD

子代，再将其与NOD小鼠连续回交十代以上，LIGHT+/-NOD子代再自交，即可得到LIGHT-/- NOD小鼠。4周龄LIGHT-/- NOD小鼠（n=25）和对照同龄NOD小鼠

（LIGHT＋/＋NOD小鼠）（n=25）饲养26周，动态检测2组小鼠的体重、血糖，利用腹腔注射葡萄糖耐量试验（Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT）分析小鼠体内胰岛素活性情况，并统计小鼠的糖尿病累积发病率。两组随机取11周龄和20周龄小鼠各5只处死，收集血清，采用ELISA法检测血清细胞因子IFN-γ、IL-4的分泌；HE法染色胰腺组织对胰岛炎进行分级；胰岛原位细胞凋亡检测技术（TUNEL法）观察胰岛细胞凋亡情况。

结果：LIGHT-/- NOD小鼠与LIGHT+/+ NOD小鼠相比，糖尿病的累积发病率显著降低（LIGHT-/- NOD组: 13.3％, 2/15; LIGHT+/+ NOD组: 73.3％, 11/15）；LIGHT-/- NOD小鼠腹腔注射葡萄糖耐量试验无异常，而对照组IPGTT明显减退；LIGHT-/- NOD小鼠胰岛绝对数目明显多于对照组，胰岛炎以零级、一级为主，对照组胰岛炎以二至四级为主；LIGHT-/- NOD小鼠未见明显的胰岛细胞凋亡；LIGHT-/-

NOD小鼠血清中，与1型糖尿病的发病机制密切相关的炎性细胞因子IFN-γ水平显著低于对照组，保护β细胞的抑制炎症细胞因子IL-4水平稍高于对照组。

结论：（1）LIGHT信号通路信号缺失时可降低炎性细胞因子IFN-γ的分泌，改善NOD 小鼠的胰岛炎症；（2）LIGHT信号缺失时可减轻胰岛细胞凋亡程度，改善葡萄糖耐量异常，降低NOD小鼠糖尿病的发病率。

第三部分LIGHT-LTβR信号通路对胰岛细胞凋亡的影响

目的：探讨LIGHT是否直接参与炎性细胞因子诱导的胰岛细胞凋亡。

方法：培养NOD 小鼠胰岛素瘤MIN6 细胞株和原代胰岛细胞。分别用

rmLIGHT和rmIFN-γ单独或联合处理细胞，以rmTNF-α为阳性对照。采用MTT法检测细胞存活情况；Hoechst33258染色细胞核，激光共聚焦显微镜观察细胞核形态变化；FCM检测细胞凋亡百分率；DNA ladder电泳检测细胞DNA的片段化等，以此分析LIGHT对胰岛细胞凋亡的影响。运用抗LTβR或HVEM多抗阻断LIGHT途径，用MTT和FCM法观察胰岛细胞活力和凋亡的变化，进一步明确LIGHT途径对胰岛细胞凋亡的影响。

结果：LIGHT或IFN-γ单独作用时，仅对胰岛细胞产生轻微的毒性作用，但LIGHT联合IFN-γ处理细胞，两者的作用增强具有协同性且呈时间依赖性地明显抑制了细胞活力。MIN6细胞经LIGHT和IFN-γ联合处理后，细胞形态由不规则瓦片状变圆甚至漂浮，细胞密度显著降低；细胞核固缩、呈致密浓染，出现凋亡小体；细胞核内基因组DNA出现明显的片段化；细胞早期凋亡率显著增加，但坏死或晚期凋亡率变化不明显。运用抗LTβR的多抗阻断LIGHT途径后，能明显增加胰岛细胞的活力，降低LIGHT联合IFN-γ诱导的细胞凋亡率。

结论：LIGHT主要结合受体LTβR，直接参与了炎症细胞因子IFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡；LIGHT与IFN-γ的作用存在协同效应。

第四部分LIGHT-LTβR信号通路诱导胰岛细胞凋亡的分子机制

目的：探讨LIGHT-LTβR通路介导的胰岛细胞凋亡中所涉及的下游基因表达变化，进一步明确LIGHT途径致胰岛细胞凋亡的分子机制。

方法：培养NOD小鼠胰岛素瘤MIN6细胞株，分别用rmLIGHT和rmIFN-γ单独或联合处理细胞，采用Western blot或免疫细胞化学等技术检测转录因子NF-κB和STAT1的蛋白表达水平；检测线粒体内Cyto C的释放；分析凋亡调节因子Bcl-2家族（Bcl-2、Bcl-XL、Bax、Bak和Bid）以及凋亡执行者Caspase家族（Caspase-3, -8, -9）和Caspase作用底物PARP等基因在不同时相点的蛋白表达变化。分别利用NF-κB、STAT1、Caspase、Caspase-3的特异抑制剂PDTC、Fludarabine、Z-VAD-FMK、Ac-DEVD-CHO预先处理细胞影响信号传递，再用相应细胞因子处理，MTT、FCM等技术检测细胞的存活或凋亡情况，Western blot技术检测Bcl-2家族主要成员的蛋白表达变化；利用Caspase-3活性测定试剂盒检测Caspase-3活性。免疫组织化学法观察LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞内Bax的表达和Caspase-3的活化情况。

结果：LIGHT联合IFN-γ作用于MIN6细胞，能明显激活转录因子NF-κB和STAT1；凋亡调控因子Bcl-2家族的抗凋亡成员Bcl-XL表达下调，促凋亡成员Bak和Bax上调；凋亡执行者Caspase家族成员Caspase-3, -8, -9被剪切活化，Caspase作用底物PARP被裂解失活；NF-κB、STAT1的特异抑制剂PDTC、Fludarabine逆转了由细胞因子诱导的Bcl-XL的表达下调和Bax、Bak的表达上调，细胞活力明显增强。LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞内Bax表达下调，Caspase-3的活化被抑制。

结论：（1）LIGHT途径诱导胰岛细胞凋亡的分子机制可能与其协同另一炎症细胞因子IFN-γ，激活转录因子NF-κB和STAT1有关；（2）活化的NF-κB、STAT1下调Bcl-XL，上调Bax/Bak，促进了线粒体Cyto C释放，激活Caspase-9, -3，导致细胞凋亡。

关键词：LIGHT； LTβR；细胞凋亡； 1 型糖尿病

**The Role of LIGHT- LTβR pathway in NOD mice**

Abstract

Type 1 diabetes is an organ-Specific autoimmune disorder characterized by chronic inflammation and pancreatic insulin-producing beta-cell destruction. T1DM usually occurs in children or young adults and is accompanied with severe complication which may result in early death of children. Thus, the prevention and treatment of T1DM have become an important topic in medical study areas. The pathogenic factors of T1DM are complicated. T cells activation is an important factor forβcells destruction in T1DM. βcells death is mainly triggered through apoptosis, which is mediated by CTL, cytokines, oxygen-derived free radidicals, and so on. Although the roles of CTL and oxygen-derived free radidicals are rather clearly defined, it is far from clear how cytokines especially co-stimulatory moleculars play roles in T1DM. For developing the valid therapy strategy in T1DM, it is significant for us to understand the molecular mechanisms of T cell activation resulting inβcells destruction.

Direct evidence shows the bloekede of co-stimulatory signals inhlbits T cell activation and decreases the incidence of T1DM. LIGHT-HVEM/LTβR is a novel co-stimulatory pathway. They belong to members of TNFSF/TNFRSF. It was reported that LIGHT pathway played an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and autoimmune hepatitis through inducing T cell activation and promoting cell apoptosis. Precious study showed LIGHT-LTβR pathway Recruited and activated Naive T cells in the islets by LTβR-dependent tertiary lymphoid structure for the onset of diabetes; LTβreceptor-immunoglobulin fusion protein (LTβR–Ig) was administered to nonobese diabetic mice (NOD mice). Early treatment with LTβR–Ig prevented insulitis and IDDM and LTβR–Ig treatment at a late stage of insulitis also dramatically reversed insulitis and prevented diabetes, which suggested that LIGHT pathway played a critical role in T1DM development. However, the intracellular molecular mechanism that LIGHT pathway affectsβcells apoptosis has not yet been studied.

In the present project, the expression of LIGHT, HVEM and LTβR and cytokines secretion at 1, 2, 4w after NOD mice producing diabetes were studied. To further

Understand the effect of LIGHT pathway inβcells loss, we established LIGHT knock out NOD mice model for blockading LIGHT-HVEM/LTβR signalling. Then, we observed diabetic pathogenetic condition in LIGHT knockout NOD mice through detecting blood glucose, IPGTT, cytokines secretion as well as essaying pancreatic histopathology and the incidence rate of T1DM. We studied the function about LIGHT in vitro. MIN6 cells or primary islet cells were treated with rmLIGHT and rmIFN-γalone or in combine, respectively. The role of LIGHT on islet cells apoptosis was investigated with MTT, FCM methods. To interpret the molecular mechanism, the protein expression of apoptosis-related genes was detected by Western blot or immunohistochemisty.

**Part I: The expression alloeosis of LIGHT/HVEM/LTβR during the initiation and progress of diabetes in NOD mice**

**Aims:** To investigate the expression of LIGHT/HVEM/LTβR and secretion of cytokines during the development of diabetes in NOD mice.

**Methods:** Female NOD mice (n=30) at 4 weeks of age were maintained under specific pathogen–free conditions. Blood glucose in mice were measured weekly from 5 to 30 weeks of age. Diabete was monitored by levels of blood glucose. Animals were considered diabetic after two consecutive measurements of≥13.8mmol/L of blood glucose levels in a week. After three mice with non-diabetes or 1, 2, 4w of diabetes were put to death, Total RNA and protein were extracted from fresh pancreatic tissue. The mRNA levels of LIGHT/HVEM/LTβR were determined by real-time quantitative PCR and protein levels of LIGHT/HVEM/LTβR were assayed by Western blot. The secretion of inﬂammatory cytokines including IFN-γ, IL-4 was examined with ELISA.

**Results:** At 30 weeks of age, the cumulative incidence of diabetes was 81.5％

(22/27). Real-time PCR and Western blot results showed the expression level of LIGHT, LTβR and HVEM in pancreatic tissue was significantly increased in 4-week-diabete mice. The serumal concentration of IFN-γ in diabetic mice was obviously higher than that in non-diabetic group, but the level of IL-4 decreased.

**Conclusion:** The expression of LIGHT, LTβR and HVEM was upregulated in NOD

Mice with diabetes. The production of IFN-γ/ IL-4 was increased /reduced in diabetic mice. These data indicated LIGHT pathway and cytokines such as IFN-γ, IL-4 were involved in the initiation and progress of T1DM.

**Part II: Effects of LIGHT-HVEM/LTβR signal deficiency on the development of T1DM in NOD mice**

**Aims:** To observe the pathogenetic condition alleosis of T1DM in LIGHT-/- NOD mice and identify the role of LIGHT pathway on insularβcells loss through contrastive analysis.

**Methods:** LIGHT-/- mice were paired with NOD mice. Their descendants were

Backcrossed with NOD mice beyond ten generations, whose offsprings were LIGHT-/- NOD mice. LIGHT-/- NOD mice at 4w of age (n=25) and control NOD mice at 4w of age (n=25) were maintained for 26 weeks. Body weight and blood glucose were regularly detected and the incidence of diabetes was added up. We also performed intraperitoneal

Glucose tolerance test to analyze insulin activity in vivo. Five of 11-week-old mice or five of 20-week-old mice from above-mentained two groups were executed. Then, the serum was collected. Pancreatic histopathology was observed with microscope. The inflammation of islets was graded. Apoptotic islet cells were observed with TUNEL in situ end-labelling method. Serum IFN-γand IL-4 were measured by ELISA.

**Results:** At 30 weeks of age, compared with control group, the incidence rate of T1DM in LIGHT-/- NOD mice group was lower ( LIGHT-/- NOD group: 13.3%, 2/15; LIGHT+/+ NOD group: 73.3％, 11/15). Glucose tolerance in LIGHT-/- NOD group was

Normal, while that in control NOD group obviously decreased. The absolute number of islets in control NOD group was less than that in LIGHT-/- NOD group because of the islets being destroyed. In LIGHT-/- NOD group, the insulitis grade was most zero or first grade of lymphocytic inflammation in islets; while in control NOD group, the insulitis grade was most second, third or four grade of insulitis. The percentage of apoptosis notably decreased in LIGHT-/- NOD group. Deficiency of LIGHT-HVEM/LTβR signalling significantly reduced the production of IFN-γ.

**Conclusion:** Deficiency of LIGHT signalling can reduce the secretion of cytokines such as IFN-γand alleviate inflammation extent of islets to prevent cytokine-mediatedβcells destruction; Deficiency of LIGHT signalling can alleviate cell apoptosis, improve glucose tolerance abnormal and decrease the incidence rate of T1DM in NOD mice.

**Part III: Effects of LIGHT-LTβR signalling on islet cells apoptosis**

**Aims:** To observe whether LIGHT pathway directly participates in cytokines-mediated islet cells apoptosis.

**Methods:** MIN6 cells (SV40 T-transformed insulinoma cells derived from NOD mice) and primary islet cells from Bal b/c mice were grown in DMEM containing 15% FBS, 2mM glutamine and penicillin-streptomycin. Cells were treated with rmLIGHT (5μg/ml) and rmIFN-γ(100ng/ml) alone or in combination. Then, Cell viability was measured by MTT assay. Several types of cell death are recognized, including necrosis, apoptosis. To further investigate which form of cell death was induced by LIGHT and IFN-γin MIN6 cells. Morphological changes in the nuclear chromatin of cells undergoing apoptosis were detected by staining with 2.5 mg/ml DNA-binding bis-benzimide Hoechst 33258 fluorochrome, followed by an examination on a confocal laser scanning microscope. Cells were double stained with Annexin-V–FITC apoptosis dectection Kit and 7-AAD according to the manufacturer's suggested protocols. The percentage of cells apoptosis was analyzed by flow cytometry. Genomic DNA in MIN6 cells was isolated and isolated genomic DNA was electrophoresed on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide to detect internucleosomal cleavage. After the blockade of LIGHT pathway by anti-LTβR Ab or anti-HVEM Ab, MTT assay detected the cell viability and FCM analyzed the cell apoptosis percentage.

**Results:** A combination of LIGHT and IFN-γ, but neither cytokine alone, induced cell death in time dependent manners as measured by MTT assay. LIGHT or IFN-γhad just slight cytotoxic action on cells, but LIGHT/IFN-γsynergism was responsible for cell apoptosis in vitro. Morphological changes of MIN6 cells were further detected by the phase contrast microscope. Cells shape changed gradually from tile to round, even floating and cell density decreased after LIGHT and IFN-γtreatment. Cytokines-treated

Cells displayed apoptotic nuclear morphological changes, including formation of apoptotic bodies, chromatin condensation and thickly staining. Genomic DNA in MIN6 cells presented DNA fragmentation. The percentage of early apoptosis notably augmented, while the percentage of advanced apoptosis or necrosis had no obvious change. These data suggested islet cell death did not result from necrosis but cell apoptosis. The blockade of LIGHT pathway through LTβR Abs could obviously increase the cell viability and reduce the cell apoptosis percentage.

**Conclusion:** LIGHT may directly participate in cytokines-mediated islet cells apoptosis by interacting with LTβR; Synergetic effect on islet cells apoptosis may lie in between LIGHT and IFN-γ .

**PartⅣ: Molecular mechanism of LIGHT-LTβR pathway on islet cell apoptosis**

**Aims:** To investigate the protein expression of downstream genes involved in islet cell apoptosis induced by LIGHT-LTβR pathway and further study the molecular mechanism of LIGHT-LTβR pathway on islet cell apoptosis in NOD mice.

**Methods:** MIN6 Cells were seeded in 6-well plates and treated with rmLIGHT (5μg/ml) and rmIFN-γ(100ng/ml) combination at different time point. In some experiments, cells were pre-incubated with or without 50μM NF-κB inhibitor PDTC or 50μM STAT1 inhibitor Flud for 1 h and then treated with or without LIGHT and IFN-γcombination for 12 h. At the end of culture, Total protein was extracted from cells including the floating and attached cells. The protein concentration in samples was measured using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Then, the protein expression of transcription factor NF-κB (p65) and STAT1, Caspase-3, Cleaved Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, CytoC, Bcl-2, Bcl-XL, Bak, Bax, Bid and PARP was detected by Western blot. Relative protein levels were calculated in comparison toβ-actin as standard. Cells were seeded on coverslips of flat bottom 6-well microtiter plates and treated with LIGHT and IFN-γin combination. NF-κB activation was measured by immunofluorescence Staining. Cleaved Caspase-3 and Bax were measured by immunocytochemistry Staining. To further

Identify the effect of NF-κB, STAT1, Caspase in cell apoptosis induced by LIGHT and IFN-γ, MIN6 Cells were pretreated with or without 50μM NF-κB inhibitor PDTC, 50μM STAT1 inhibitor Flud or Caspase inhibitor Z-VAD-FMK for 1 h and then treated with LIGHT and IFN-γ. Cell viability was detected with MTT. The percentage of cells apoptosis was analyzed by FCM. Western blot detected Bcl-XL, Bak and Bax expression. Caspase-3 activity was measured with a commercial Caspase-3 Colorimetric assay kit according to the manufacturer's suggested protocols. Immunohistochemical method observed the expression of Bax and Caspase-3 in LIGHT knockout NOD mice.

**Results:** LIGHT/IFN-γsynergism could obviously activate cytoplasmic transcription factor NF-κB (p65) and STAT1. Cyto C was released because of mitochondrial membrane permeation. Caspase-3, -8, -9 were activated in LIGHT and IFN-γ-induced apoptosis of MIN6 cells. Caspase specific substrate PARP was cleaved into inactive pattern. Bcl-2 family is involved in the regulation of apoptosis. It was found that Bcl-XL expression was downregulated with a time-dependent manner after the LIGHT and IFN-γtreatment, while the protein expression of proapoptosic genes including Bak and Bax was upregulated. Cytokines-induced Bcl-XL downregulation/ Bak and Bax upregulation were reversed by PDTC / Flud. Cell viability was significantly increased in the PDTC / Flud pretreating cells. Cleaved Caspase-3 and Bax were obviously downregulated in LIGHT knockout NOD mice.

**Conclusion:** ①Molecular mechanism of LIGHT and IFN-γ-induced islet cell

Apoptosis may be relevant to transcription factor NF-κB and STAT1 activation. ②

Mitochondrial pathway may be involved in cell apoptosis.

**Keywords:** LIGHT; LTβR; Apoptosis; T1DM

# 第一部分 LIGHT及受体的表达随NOD小鼠糖尿病病情发展的变化

1.前言

糖尿病（Diabetes mellitus, DM）是一种内分泌疾病，常伴有严重的并发症，已成为继肿瘤、心血管疾病之后第三大严重威胁人类健康的非传染流行病。糖尿病分为1型糖尿病（Type 1 Diabetes mellitus, T1DM）和2型糖尿病（Type 2 Diabetes

mellitus，T2DM），其中T1DM 也被称为自身免疫性糖尿病，所占的比例呈逐年递增趋势，而且部分T2DM有转变为T1DM的趋势[1, 2]。中国T1DM流行形式严峻，人群数量在全球范围内居首位[3]。T1DM患者多数为儿童和青少年，如不及时治疗，可引发肾衰、失明和心血管疾病等并发症，成为儿童和青少年致残及早亡的重要原因。T1DM免疫致病机制是：患者机体T细胞对胰岛β细胞表达的多种自体抗原的免疫耐受状态被打破，活化的CD4+T细胞和CD8+T细胞对患者胰岛β细胞产生不可逆免疫损伤，引起β细胞大部分死亡，导致胰岛素分泌不足，血糖浓度过高而引起糖尿病[4-7]。由于T1DM患者产生糖尿病时大部分胰岛β细胞被破坏，所以终身需要胰岛素治疗，但如果使用方法或剂量不当易引起低血糖、过敏反应、水肿、胰岛素耐受或酮症酸中毒等副作用[8]，给病人带来极大痛苦，甚至危及生命。因此，探寻新而有效的治疗手段成为T1DM研究的重点。针对T1DM的免疫损伤机制，人们试图在T1DM的发病前期即胰岛炎阶段或发病中，应用免疫干预治疗阻止胰岛的自身免疫进程，以期达到预防或延缓T1DM的目的。这一策略日趋成为T1DM研究的热点。

T1DM病程大致分两个时期：糖尿病前驱期（即胰岛炎阶段）和显性糖尿病期，进入显性糖尿病期前，经历长时隐蔽的胰岛炎阶段，此阶段胰岛β细胞被大量破坏。

T细胞持续活化是β细胞破坏中重要的一环，T细胞中的Th1细胞过度活化而Th2细胞被抑制。相应地，Th1型细胞因子如IL-1、IL-2、IL-12、IFN-γ等分泌增多，而Th2细胞因子如IL-4、IL-10、TGF-β等表达降低，因此CTL、NK细胞和巨噬细

胞被激活，从而产生大量促炎症细胞因子如TNF-α、IL-1β等，还有氧自由基和NO，对胰岛β细胞产生直接毒性，最终导致T1DM的发生。胰岛β细胞死亡主要是一种由CTL、细胞因子或自由基介导的细胞凋亡过程[8-11]. CTL或自由基在β细胞死亡中的作用已有深入研究，但细胞因子，尤其是其中参与T细胞活化的共刺激分子在该病的发病及病程中的作用机制仍不是很清楚。因此，深入了解导致T细胞活化的共刺激分子在β细胞免疫损伤中的作用机制，对发展新的T1DM治疗方法或策略具有重要的理论意义和实际价值。

正常T细胞持续活化需要两种信号，第一信号是T细胞受体（T-cell receptor,

TCR）识别多肽抗原与主要组织相容性复合物（Major histocompatibility complex, MHC）产生的；第二信号也叫共刺激信号是T 细胞的共刺激分子与抗原递呈细胞

（Antigen-presenting cells, APCs）上的受体相互作用产生。缺乏共刺激信号的抗原刺激将引起T 细胞的耐受（Tolerance），T 细胞不能进入增殖分化阶段而呈现失能或凋亡[12,13]。LIGHT（全称为: lymphotoxin like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes）是上个世纪末发现的一种功效多样的共刺激分子，如它与某些肿瘤细胞上表达的受体——淋巴毒素β受体（lymphotoxin beta receptor, LTβR）发生相互作用可诱导肿瘤细胞凋亡[14-23]；与T细胞上表达的受体——疱疹病毒进入介质（Herpes virus entry mediator, HVEM）结合则参与T细胞活化和调节免疫反应[24-30]；而与可溶性受体DcR3相连能反馈调节LIGHT自身功能[31-33]。目前已有报道[34-36]，LIGHT及其受体在非肥胖糖尿病小鼠（Nonobese diabetic mice, NOD mice）1型糖尿病的发生、发展中起重要作用，但具体的作用机制仍不清楚。

NOD小鼠因其遗传背景清楚，与人类T1DM在免疫学特征、病理过程和临床特征等多个方面具有相似之处。因此，近三十年来，NOD小鼠一直是人们研究T1DM病理机制和药物干预治疗的理想模型[37]。通常NOD小鼠的胰岛炎发生于出生后第4-5周，而显性糖尿病发生于出生后第12-25周。雌鼠在40周龄时，糖尿病的发病率约为90%，而雄鼠仅为20%，雌鼠糖尿病发生的易感性明显强于雄鼠。本研究以NOD雌鼠为动物模型分析LIGHT及其受体的表达在T1DM发生、发展中的动态变化，揭示它们的表达是否与T1DM的病程存在相关性，为探索能否用该信号通路

阻断剂来预防或延缓T1DM的发生发展提供实验数据。此外，本研究还动态分析了相关细胞因子的分泌变化，为证明上述因素在T1DM病程中的作用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

NOD小鼠购自北京中国医学科学院动物研究所，饲养于SPF级动物房。

### 1.2 主要试剂

One touch ultra稳豪型血糖仪及配套血糖试纸购自美国强生公司；小鼠IFN-γ、IL-4 ELISA试剂盒购自美国Biolegend公司；

小鼠胰岛素(INS) ELISA试剂盒购自北京华耐特生物科技有限公司；

DEPC购自美国Amersco公司；

Trizol试剂盒购自美国Gibco公司；

定量PCR引物序列由上海生工生物工程有限公司合成；

Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-)购自日本TakaRa公司；

SYBR®Premix DimerEraser™(Perfect Real Time)购自日本TakaRa公司；

T-PER Tissue protein extraction reagent及蛋白酶抑制剂药片购自Roche公司；

BSA购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；

预染蛋白分子量标准购自碧云天生物技术研究所；

PVDF膜购自美国Millipore公司；

ft羊抗小鼠LIGHT、LTβR、β-actin一抗购自美国Santa Cruz公司；

ft羊抗小鼠HVEM一抗购自美国RD公司；

辣根过氧化物酶标记的兔抗ft羊二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司；

Western blot检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所；其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器

电子天平，美国Sartorius公司产品；

各种型号微量加样器，德国Eppendorf公司产品；

Rotor-GeneTM 6000实时荧光定量PCR仪，澳大利亚Corbett公司产品；

SpectraMax®Paradigm®多功能读板机，美国Beckman公司产品；凝胶成像分析系统，美国BD公司产品；

高速离心机，德国Eppendorf公司产品（5804型、5804R型）；NanoDrop 2000分光光度计，美国Thermo Scientific公司产品；超低温冰箱，日本三洋公司产品；

Nanopure超纯水制备系统，美国Barnstead公司产品；

Mini PROTEAN®3 cell型SDS-PAGE电泳器材，美国Bio-Rad公司产品；转膜仪，美国Millipore公司产品；

9700型PCR仪，美国ABI公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 动物饲养与处理

30只4周龄10~15g NOD小鼠编号后分笼饲养于12小时光照周期，温度为

（22±2）℃，相对湿度为（54±2）％的SPF级动物房内，在无任何干预条件下，喂饲经高压灭菌的普通营养饲料和纯净水。

从第5周龄开始，每周定时测定小鼠体重、血糖，观察至30周龄。分别取未

产生糖尿病（11周龄鼠）、糖尿病发病1周、糖尿病发病2周、糖尿病发病4周的

NOD小鼠各3只，拔眼球取血后处死，全血离心（5000rpm×10min, 4℃），收集血清保存于－20℃以备测定血清细胞因子水平。小鼠处死后马上摘取胰腺，用锡箔纸包好置液氮或-70℃保存备用。

### 2.2 观察指标的检测

（1）血糖：用剪尾法取小鼠全血一滴，采用One touch ultra稳豪型血糖仪测定非空腹血糖，一周内连续两次非空腹血糖水平≥13.8mmol/L的小鼠诊断为糖尿病，分析糖尿病发病率和发病时间。

（2）血清细胞因子IFN-γ和IL-4含量测定：采用双抗夹心ELISA法检测细胞因子水平，实验步骤按照Biolegend公司提供的试剂盒说明书进行。具体操作如下（以IFN-γ为例）：

a. 做ELISA前一天，加100μl稀释的包被抗体于96孔板，包好，4℃下孵育 1

6～18h或过夜；

b. 提前将所有试剂从4℃中拿出，平衡至室温。加样（所有标准品和样品做两个或三个复孔）；

c. 用每孔至少300μl洗涤buffer，洗板4次后，甩掉洗涤buffer再在吸水纸上扣净孔中残余的buffer。后续的洗涤操作与此步相同；

d. 加200μl封闭buffer，包好板，室温下在摇床上（200rpm×1h）孵育，封闭非特异结合并减轻背景；

e. 洗板4次；

f. 加100μl已按一定比例稀释的标准品或样品于相应的孔内。1000pg/ml的标准品用封闭buffer按1: 2比例稀释6次，得各标准品终浓度为1000pg/ml、5

00pg/ml、250pg/ml、125pg/ml、62.5pg/ml、31.25pg/ml和15.6pg/ml. 样品如有必要也可用封闭buffe稀释。包好，室温缓慢摇动孵育2h；

h. 洗板4次；

i. 加100μl检测抗体，包好，室温摇动孵育1h；

j. 洗板5次，最后一次洗涤，让洗涤buffer在各孔内停留30s~1min，降低背景；

k. 加100μl新配的TMB底物液，避光孵育20min。阳性孔颜色变蓝色；

l. 加100μl终止反应液终止反应，阳性孔由蓝色变为黄色；

m. 0min内，在SpectraMax® Paradigm® 多功能读板机读出OD值，

OD值＝OD450－OD570.

n. 以标准品的浓度为x轴，相应的OD值为y轴制做标准曲线，通过各样品的

OD值查出相应的浓度。

（3）血清胰岛素含量测定：采用ELISA法检测，实验操作按照华耐特公司提供的

ELISA试剂盒说明书进行

（4）胰腺总RNA的提取

a. 实验物品准备：无RNase匀浆器、Ep管、Tip头；剪刀、镊子（0.1% DEPC水浸泡过夜，150℃烤箱烤干，高压灭菌）；Trizol；液氮罐（冻存NOD小鼠胰腺组织）；氯仿，异丙醇，75％乙醇（用0.1% DEPC水配制），无RNase H2O。

b. 实验步骤：从液氮罐中取冻存的小鼠胰腺组织，放置于预先加入Trizol的匀浆器中，在冰上研磨匀浆后，用移液器将匀浆液转移至1.5ml无RNase Ep管内。匀浆液在室温下孵育15min，加入氯仿，涡旋震荡混匀并在冰上孵育15min，离心（12000rpm×15min, 4 ℃），取上清液至另一干净Ep管内，加等体积预冷的异丙醇，颠倒震荡混匀，－20℃孵育20min以上，离心（12000rpm×10min, 4 ℃）。去上清液，冷75％乙醇洗涤沉淀，离心（12000rpm×5min, 4 ℃）。去除上清液，晾干沉淀，用适量的无RNase H2O溶解沉淀。NanoDrop 2000分光光度计测定RNA溶液OD260/OD280值和RNA浓度或取lμl RNA溶液跑1.0%的琼脂糖凝胶电泳，鉴定RNA的完整性。将抽提好的RNA分装至无RNase

PCR管内，保存于－70℃。

（5）实时定量RT-PCR检测LIGHT、HVEM、LTβR的mRNA水平

a. 引物设计与合成

Genebank上查出小鼠LIGHT、HVEM、LTβR基因序列，利用Primer Premier

6.0引物分析软件设计引物，引物序列见下表，由上海生工生物技术有限公司合成。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 基因 | 引物序列 | 目的片段长度（bp） |
| β－actin | 上游：GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG  下 游 ：CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T | 154 |
| LIGHT | 上游：AAC GCC AGC TTG ATA GGT ATT G  下 游 ：GCT GCA TTT GGA GTA CAC ATA | 142 |
| HVEM | 上 游 ：TGT CCC CCA CAG ACA TAT ACC  下游：CTC ACA GAA GTA GCC TGG GAT | 153 |
| LTβR | 上游：GCC CCT GTG ACA TTG TGC T  下游：GGC AGA GTA CAA GCC GCT C | 147 |

b. 逆转录合成cDNA（RT）：实验步骤参照Takara公司Reverse Transcriptase M- MLV (RNase H-) Kit（Code No.2641A）提供的protocol，具体操作如下：无R Nase PCR管内配制6μl体系模板RNA/引物混合液(2μg模板RNA+2μl Oligo(d T) 12-18Primer(50μM) + RNase free H2O→6μl)，70℃保温10min后立即至冰上急冷2min以上。离心数秒，在上述PCR管中按下表配制反转录混合液：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂名称 | 用量（μl） |
| 5×M-MLV buffer | 2 |
| RNase Inhibitor(40U/μl) | 0.25 |
| DNTP Mixture ( 各 10mM) | 0.5 |
| RTase M-MLV (RNase H-)(200U/μl) | 1 |
| 模板 RNA/引物变性液 | 6 |
| RNase free H2O | 0.25 |

配制完成，42℃保温1h，70℃保温15min，冰上冷却得到cDNA溶液，立即

PCR或－20℃保存。

C. Real-time PCR

采用日本TakaRa公司的SYBR®Premix DimerEraser™(Perfect Real Time)剂盒，以Rotor-Gene 6000荧光定量PCR仪进行Real-time PCR分析。

PCR反应体系参照TakaRa公司的SYBR® Premix DimerEraser™(Perfect Real

Time）试剂盒提供的protocol配制，PCR反应体系总体积为25μl，按下表加试剂：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂名称 | 用量（μl） |
| Premix DimerEraser （2×） | 12.5 |
| PCR Forward Primer(20μM) | 0.5 |
| PCR Reverse Primer(20μM) | 0.5 |
| cDNA 模板 | 2.5 |
| dH2O | 9 |
| Total | 25 |

进行PCR反应，采用3 Step PCR标准流程：

Stage 1: 预变性（95℃30秒20℃/秒，共1 Cycle ）

Stage 2: PCR反应(95℃10秒20℃/秒，60℃(LIGHT) /58℃(LTβR) / 57℃(HVEM) 15秒20℃/秒，72℃20秒20℃/秒，共30 Cycles )

Stage 3: 融解曲线分析（95℃0秒20℃/秒，65℃15秒20℃/秒，95℃0 秒

0.1℃/秒 )

实验结果分析：确认Real-time PCR的熔解曲线和扩增曲线，制作标准曲线，

PCR定量分析采用ΔΔCt法，以β-actin的表达为内参照。

（6）Western blot检测LIGHT、HVEM、LTβR的蛋白水平

a. 胰腺组织总蛋白提取及含量测定

从液氮罐取出胰腺置于研钵，加入500μL的蛋白裂解液研磨，用移液器将匀浆液转移至1.5ml Ep管内，冰浴20 min，每5 min涡旋一次，共4次，离心（12000 rpm×1 5 min,4℃）。取上清液转移到另一个干净EP管内，利用NanoDrop 2000分光光度计检测各组蛋白质浓度，将抽提好的蛋白分装保存于-20℃。

b. SDS-PAGE电泳

SDS-PAGE凝胶配制：按碧云天的[SDS-PAGE凝胶配制试剂盒](http://www.beyotime.com/sds-page-kit.htm)的要求配制。

样品处理：在收集的蛋白样品中加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液，

100℃或沸水浴加热3-5分钟，置于冰上，使蛋白充分变性。

上样与电泳：变性的蛋白样品冷却至室温，把该样品加到SDS-PAGE胶加样孔内，[同时将预染蛋白质分子量标准](http://www.beyotime.com/prestained-protein-marker.htm)加入相应孔中。电泳时，跑上层胶使用低电压电泳，

而在溴酚蓝进入下层胶时使用高电压电泳。低电压设置在60-80V，高电压设置在

120V左右。根据预染蛋白质分子量标准的电泳情况，预计目的蛋白已经被适当分离后停止电泳。

c. 转膜(Transfer)

使用Bio-Rad的标准湿式转膜装置，将胶上的蛋白转印至[PVDF膜](http://www.beyotime.com/expendable.htm#20)上，转膜电流和转膜时间根据目的蛋白的大小而定。在转膜过程中，转膜槽放置在冰浴中进行转膜。

d. 封闭

转膜完毕，立即把蛋白膜放置于预先准备好的[Western洗涤液](http://www.beyotime.com/western-wash-buf.htm)中，漂洗1-2分钟，洗去膜上的转膜液。加入[Western封闭液](http://www.beyotime.com/western-blocking-buf.htm)，在摇床上缓慢摇动，室温封闭60分钟。对于一些背景较高的抗体，4℃封闭过夜。

e. 孵育一抗

参考一抗的说明书，按照适当比例用[Western一抗稀释液](http://www.beyotime.com/western-1st-ab-dilution-buf.htm)稀释一抗。加入稀释好的一抗，根据抗体的说明选择适当的孵育温度和时间。加入[Western洗涤液](http://www.beyotime.com/western-wash-buf.htm)，洗涤4～5次。

f. 孵育二抗

参照二抗的说明书，按照适当比例用[Western二抗稀释液](http://www.beyotime.com/western-2nd-ab-dilution-buf.htm)稀释辣根过氧化物酶

（HRP）标记的二抗。加入稀释好的二抗，根据抗体的说明选择适当的孵育温度和时间。加入[Western洗涤液](http://www.beyotime.com/western-wash-buf.htm)，洗涤3次。

h. 蛋白检测

使用[BeyoECL Plus](http://www.beyotime.com/beyoecl.htm)等ECL类试剂检测蛋白。X光片用[柯达X-OMAT BT胶片](http://www.beyotime.com/expendable.htm#20)，压片在专用的[压片暗盒](http://www.beyotime.com/expendable.htm#20)内进行。利用显影、定影试剂盒自行配制显影液和定影液，进行手工洗片。

### 2.3 统计分析

采用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析，所有的数据用均数±标准差（*X*±S）表示。数据经方差齐性检验后，采用非配对的t检验分析，*P* <0.05为差异具有显著性。

## 3 结果

### 3.1 观察T1DM模型NOD小鼠的相关Th化指标变化

3.1.1 NOD小鼠在自然条件下的糖尿病累积发病率

NOD 雌鼠在无任何干预条件下，30 周龄时，糖尿病累积发病率为81.5％

（22/27），见Figure 1.1.

**100**

**Cumulative Incidence(%)**

**80**

**60**

**40**

**20**

**0**

**0** 5 **10** 15 20 25 30 **35**

**Age(wk)**

图1.1 NOD小鼠自然条件下的DM累积发病率

Figure 1.1 Cumulative incidence of DM in NOD mice

3.1.2不同发病时期NOD鼠非空腹血糖、胰岛素水平的变化

如Figure1.2所示，糖尿病发病1，2，4w的NOD小鼠非空腹血糖水平远高于未发生糖尿病组（0（11w of age）），*P* <0.01；胰岛素水平明显低于未发病组（0（11w of age））。提示NOD小鼠出现显性糖尿病时，产生的低胰岛素、高血糖症是由于胰岛β细胞已被破坏，导致胰岛素的合成及分泌不足，机体调节血糖的能力降低。

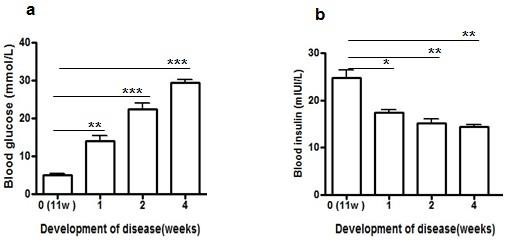


图1.2 不同发病时期NOD鼠的血糖、胰岛素水平变化（n=3）

Figure 1.2 Alleosis of blood glucose and insulin levels with development of disease in NOD mice(n=3)

**\*:** *P*<0.05, **\*\*:** *P*<0.01, **\*\*\*:** *P*<0.0001, νs 0(11w of age) 组

注: a: the blood glucose level; b: the blood insulin level

以上数据表明，本研究选用的NOD雌性小鼠糖尿病发病率高，此动物模型可用于后续实验。

### 3.2 血清IFN-γ和IL-4水平随NOD鼠糖尿病病程进展的变化

NOD小鼠随糖尿病发病周数的增加，血清IFN-γ的分泌增加，发病4周的NOD小鼠IFN-γ水平十分明显高于未发病组（0（11w of age）），P=0.002；而血清IL-4水平呈下降趋势，发病4周的小鼠IL-4含量显著低于未发病组，P=0.0018 (Figure 1.3)。说明随着NOD鼠糖尿病病程的进展，Th1细胞因子IFN-γ的分泌增加，而Th2细胞分子IL-4的分泌减少。



图1.3 血清IFN-γ、IL-4 水平随NOD 鼠病情的变化（n=3）

Figure 1.3 Change of serum IFN-γand IL-4 levels with development of disease in NOD mice (n=3)

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, νs 0(11w of age) 组

注：a: the serum IFN-γlevel; b: the serum IL-4 level

### 3.3 NOD小鼠出现糖尿病时LIGHT、LTβR、HVEM的表达变化

分别采用Real-time PCR和Western blot技术观察NOD小鼠糖尿病不同发病时期胰腺组织LIGHT及受体LTβR和HVEM的mRNA和蛋白水平表达变化。如Figure 1.4 所示，NOD小鼠胰腺组织提取的总RNA的28S、18S和5.8S

rRNA的条带清晰可见，用Nanodrop 2000分光光度计测得总RNA的OD260/OD280

值介于1.8～2.0 之间，说明总RNA提取完整，纯度较高，质量好。



图1.4 胰腺组织总RNA的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1.4 Agarose gel electrophoresis of RNA in pancreatic tissue

实时荧光定量PCR和Western blot结果如图Figure 1.5、1.6及1.7所示，LIGHT和LTβR的表达水平随NOD鼠糖尿病病情的发展而上升明显，尤其是LTβR，糖尿病发病4周的小鼠胰腺LTβR表达水平与未发病组相比，差异具有显著性，*P*<0.01；而HVEM的表达水平在发病1、2周的小鼠胰腺组织中有下降趋势，但发病4周的小鼠，又明显上升，提示LIGHT信号途径尤其是LIGHT-LTβR途径可能直接参与了NOD鼠糖尿病的发生、发展。



图1.5 NOD鼠糖尿病不同发病时期胰腺组织LIGHT mRNA和蛋白水平的变化（n=3）

Figure 1.5 Change of LIGHT mRNA and protein levels in pancreatic tissue with development of disease of NOD mice(n=3)

**\*:** *P*<0.05, νs 0 (11w of age) 组

注：a: the mRNA level of LIGHT; b: the protein level of LIGHT



图1.6 NOD鼠糖尿病不同发病时期胰腺组织LTβR mRNA和蛋白水平的变化（n=3）Figure 1.6 Change of LTβR mRNA and protein levels in pancreatic tissue with development of disease of NOD mice (n=3)

**\*:** *P*<0.05, **\*\*:** *P*<0.01, νs 0 (11w of age) 组

注：a: the mRNA level of LTβR; b: the protein level of LTβR



图1.7 NOD鼠糖尿病不同发病时期胰腺组织HVEM mRNA和蛋白水平的表达变化（n=3）Figure 1.7 Change of HVEM mRNA and protein levels in pancreatic tissue with development of disease of NOD mice (n=3)

**\*:** *P*<0.05, νs 0(11w of age) 组

注：a: the mRNA level of HVEM; b: the protein level of HVEM

## 4 讨论

自身免疫性糖尿病的产生主要是由于T淋巴细胞介导对胰岛β细胞特异性损伤所致。该疾病模型的胰岛病理切片免疫组化分析显示，胰岛中存在大量活化的

CD4+T细胞和CD8+的CTL细胞。CD4+T细胞的Th1细胞亚群和Th2细胞亚群比例失调可能在糖尿病的发病中起重要作用，Th1 细胞及其分泌的细胞因子促进

T1DM的发生、发展，而Th2细胞和Th2细胞因子则保护胰岛β细胞免遭破坏；

Th1细胞或Th2细胞由Th0细胞发育分化而来，Th0是尚未分化成熟的Th亚群，经胰岛β细胞合成的特异抗原如GAD、胰岛素和IA-2等的刺激，加上胰岛内特异APC细胞上的MHCⅡ分子对抗原的递呈，激活Th0分化为Th1和Th2[38-41]。针对胰岛β细胞自身抗原的CD4+和CD8+ T细胞的活化是T1DM发生、发展的关键[42]。

初始T细胞活化除需要抗原刺激信号（第一信号）外，还需要第二信号即共刺激信号，缺乏共刺激信号的抗原刺激引起T细胞无反应性或免疫耐受。但如共刺激信号刺激过度，则可能导致自身反应性T细胞活化，产生自身免疫疾病。因此，合理封闭相关的共刺激途径可应用于自身免疫性疾病的治疗[43, 44]。对于T1DM发病机制的研究，多个课题组报道了CD28和CD40等共刺激途径在T1DM中的作用。其中Arreaza等[45, 46]和Balasa等[47]分别用CD28和CD40L阻断性单抗治疗NOD小鼠自发产生的糖尿病，发现这些试剂对防止2-4周大的NOD小鼠发生胰岛炎和糖尿病有效，但对5-7周大的小鼠无效。这些结果提示当T1DM表现出临床症状时，CD28和CD40L等提供的共刺激信号并不重要，在维持着T细胞的杀伤效应上，可能存在其他的共刺激途径。

有关T细胞活化的共刺激信号研究一直是人们关注的焦点之一[48,49]。在T细胞活化的不同阶段或者不同的疾病发展过程中，不同共刺激分子所起的作用不同。联系到T1DM患者体内免疫应答的特点：T1DM是一种慢性病，病人体内存在大量活化的T细胞；Th1/Th2平衡控制着T1DM的发展，Th1应答起恶化作用，而Th2应答能拮抗Th1的毒性作用。干预CD28和CD40L等共刺激途径的局限性可能在于这些共刺激途径只在初始T细胞的活化阶段上发挥重要作用，而

对患者体内已经活化的T细胞没有作用。

最近几年TNF超家族的共刺激分子LIGHT-LTβR/HVEM 信号通路在调节T细胞功能、维持外周耐受和诱导细胞凋亡方面的重要进展引起我们极大的关注。LIGHT及其受体是上个世纪末发现的共刺激分子，分别属于肿瘤坏死因子超家族/肿瘤坏死因子受体超家族（TNF superfamily, TNFSF/ TNF receptor superfamily, TNFRSF）成员。LIGHT主要诱导表达于活化的T 细胞、NK 细胞和未成熟DC上，是一种独立于CD28外的强大共刺激分子[50,51]。LIGHT 是一种典型的二型跨膜分子，是LTβR和HVEM的配体。HVEM在T、B细胞、NK 细胞和DC等免疫细胞和非血源细胞如粘膜上皮细胞上均有表达，而LTβR主要表达于非淋巴细胞的间质细胞上。根据受体在靶细胞上不同的表达方式，LIGHT可触发不同的生物学效应。LIGHT与表达于T细胞的受体HVEM结合时，可促进T细胞的增殖、分化和Th1细胞因子IFN-γ和GM-CSF等的产生，在T细胞介导的抗肿瘤和移植物抗宿主疾病中起着重要作用；若信号通过表达于非血源性细胞上的受体LTβR或HVEM时则诱导细胞的凋亡[51]。LIGHT 在T 细胞的表达可诱导外周T 细胞的大量活化和增殖，打破外周耐受，导致自身免疫疾病的发生[52]。已有研究结果表明，LIGHT信号通路通过参与T细胞的活化在类风湿性关节炎和自身免疫性肝炎等多种自身免疫疾病的病理发生中起着重要的作用[53, 54]。动物实验证实，阻断

LIGHT途径可在一定程度上预防或延缓胰岛炎和T1DM的发生[34-36]，但其具体的作用机制尚未见报道。本研究动态观察了LIGHT及其受体LTβR 和HVEM 在

NOD鼠糖尿病发生、发展中的表达变化，以期确定它们的变化是否与糖尿病发生、发展存在相关性，为寻求T1DM的免疫干预治疗策略提供新的思路。

通过监测NOD小鼠血糖，观察记录其自发产生糖尿病的病程过程。糖尿病鼠诊断依据为一周内连续两次随机非空腹血糖水平≥13.8mmol/L。采用Real-time PCR和Western blot技术对糖尿病发病前（11周龄），糖尿病发病1、2、4周的NOD鼠胰腺组织LIGHT、LTβR和HVEM的mRNA和蛋白水平进行了检测。结果表明，

NOD鼠糖尿病的发生、发展可能与LIGHT途径信号传递有关，具体表现为LIGHT和LTβR的表达水平随糖尿病病情的发展而上升明显。尤其是LTβR，糖尿病发病4周的NOD鼠与未发病组（0（11w of age））相比差异具有统计学意义（P＜0.01）；

而HVEM的表达水平在发病1、2周时，有下降趋势，但发病4周时，又有一定程度上升。提示，LIGHT信号途径尤其是LIGHT-LTβR途径可能直接参与了NOD鼠糖尿病病情的发展。胰腺组织LIGHT的表达量随NOD鼠病情的发展显著增加，是由于大量活化的T细胞被募集至胰岛所致；受体HVEM的表达先下降而后又显著上升的原因可能与被募集至胰岛的静息T细胞发生活化，而随后又有大量外周静息

T细胞迁移至胰岛有关；受体LTβR的表达明显增加，是否与大量进入胰岛的T细胞诱导其在β细胞上表达有关，有待深入研究。

Th1细胞因子的功能主要表现在以下两个方面：促进DC成熟，使黏附分子表达上调，增强细胞毒性T细胞、NK细胞、巨噬细胞杀伤活性，直接诱导细胞凋亡；诱导Th0细胞分化成Th1细胞，促进Th1活化与增殖及Th1细胞因子的分泌，同时影响Th2细胞/细胞因子的形成。大量研究表明[55-60]，活化的T细胞分泌的Th1细胞因子如IFN-γ、TNF-α和IL-1β在T1DM的发生、发展中发挥重要作用，Th1细胞因子促进DM的发展，而Th2因子如IL-4、IL-10、TGF-β可降低DM的发生率。本研究中，我们在对NOD鼠Th1细胞因子IFN-γ和Th2细胞因子IL-4的动态检测中发现，血清IFN-γ含量随着糖尿病发病周数的增加而增加，发病4周时，IFN-γ含量明显高于未发病组；而血清IL-4水平呈下降趋势，在发病4周时，其含量显著低于未发病组。监测这两种细胞因子的表达变化，可在一定程度上预测NOD鼠体内自身反应性T细胞是否活化及糖尿病的发生。

综上所述，LIGHT- LTβR/HVEM信号通路，尤其是LIGHT- LTβR途径与NOD鼠T1DM的病情发展存在相关性，即随着NOD鼠糖尿病病程的进展，LIGHT及其受体表达上调，促炎症细胞因子IFN-γ分泌增加，而抑制炎症细胞因子IL-4分泌减少。

## 5 小结

NOD小鼠发生糖尿病时，LIGHT、LTβR和HVEM表达上调，促炎症细胞因子IFN-γ分泌明显增加，抑制炎症因子IL-4分泌减少，上述因素与T1DM的发生、发展相关。但是LIGHT- LTβR/HVEM信号通路导致DM产生的机制等问题尚不清楚，值得深入研究。

# 第二部分 LIGHT途径信号缺失对NOD小鼠糖尿病病情的影响

前言

如前所述，T淋巴细胞的活化除需要APC细胞上的MHCⅡ分子对抗原的递呈（第一信号）外，还要需要第二信号——共刺激信号的刺激。共刺激信号主要由表达于T细胞上的共刺激分子与其受体相互作用而产生，有的属正性刺激，活化T细胞；有的为负性刺激，抑制T细胞的活化。LIGHT-HVEM/LTβR途径促进T细胞活化、增殖、Th1细胞因子分泌及CTL的毒性效应。

基因敲除动物技术自从上个世纪七、八十年代诞生以来，已成为现代生命科学领域研究和药物研发不可或缺的一项重要技术。该技术的原理是将含有同源序列的外源基因导入动物胚胎干细胞，通过同源重组使其基因序列发生变化，再将带有外源基因的阳性胚胎干细胞导入动物囊胚，导致动物自身的某一基因功能散失，从而获得研究特定基因功能的基因敲除动物模型。基因敲除技术是迄今为止最直接、最有效的研究基因功能的前沿技术之一[61,62]。

第一部分研究中，我们发现LIGHT-HVEM/LTβR途径与NOD鼠糖尿病病情的发展存在相关性。为了进一步明确LIGHT途径在胰岛β细胞损伤中的作用，我们建立了LIGHT基因敲除（LIGHT-/-）NOD小鼠即将LIGHT-/-小鼠与NOD小鼠进行配对得到LIGHT+/- NOD子代，再将其与NOD小鼠连续回交十代以上而建立。以同龄的NOD鼠（LIGHT+/+）做对照，通过相关生化指标、胰腺病理、小鼠存活情况等分析，观察LIGHT信号缺失时NOD小鼠（LIGHT-/-NOD小鼠）糖尿病病情的变化。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

LIGHT基因敲除（LIGHT-/-）小鼠[63]（C57 BL/6背景）由德国Pfeffer博士惠赠，饲养于SPF级动物房。

### 1.2 主要试剂

One touch ultra稳豪型血糖仪及配套血糖试纸购自美国强生公司；小鼠IFN-γ、IL-4 ELISA试剂盒购自美国Biolegend公司；

小鼠全血基因组DNA提取试剂盒购自美国Promega公司；

BSA购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；

TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（显色法） 购自碧云天生物技术研究所；

PCR引物序列由上海生工生物工程有限公司合成；

PCR试剂盒购自碧云天生物技术研究所；

DNA分子量标准购自碧云天生物技术研究所；

苏木素、伊红、中性树脂购自北京中杉金桥生物技术有限公司其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器

电子天平，美国Sartorius公司产品；

各种型号微量加样器，德国Eppendorf公司产品；

SpectraMax®Paradigm®多功能读板机，美国Beckman公司产品；凝胶成像分析系统，美国BD公司产品；

台式高速冷冻离心机，德国Eppendorf公司产品；超低温冰箱，日本三洋公司产品；

Milli-Q超纯水系统，美国Millipore公司产品；

倒/正置荧光显微镜，日本OLYmpus (BXS1型) /德国Leica公司产品；

PCR仪，美国Perkin Elmer公司产品；

切片机，德国Leica仪器有限公司产品（型号：RM2016）；摊片机，德国Leica仪器有限公司产品（型号：HI1210）。

## 2 实验方法

### 2.1 LIGHT-/- NOD小鼠的建立

2.1.1 PCR技术鉴定LIGHT-/- NOD小鼠基因型

6~7周龄NOD小鼠，用于与LIGHT-/-小鼠配对及回交。即将LIGHT-/-小鼠与

NOD小鼠进行配对得到LIGHT+/- NOD子代，再将其与NOD小鼠连续回交12代去除C57 BL/6背景，最后自交得到LIGHT-/- NOD小鼠，利用PCR技术鉴定其基因型。操作如下：

取小鼠尾血，采用全血基因组DNA提取试剂盒提取小鼠基因组DNA作为常规PCR模板。

引物序列为[63]：

MLIGHT type1: ACGCATGTGTCCTGCGTGTGG mLIGHT type2: CGACAGACATGCCAGGAATGG Pneo1: GACGTAAACTCCTCTTCAGAC

反应体系（25μl）：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×PCR Buffer | 2.5μl |
| MgCl2 | 1.5μl |
| dNTP | 0.5μl |
| 引物 1 | 0.5μl（mLIGHT2） |
| 引物 2 | 1.0μl（mLIGHT1） |
| 引物 3 | 0.5μl（pneo1） |
| 模板 DNA | 0.5μl |
| Taq 酶 | 0.125μl |
| 灭菌超纯水 | 18.875μl |

PCR条件：94℃, 4min；94℃30s, 60℃30s, 72℃45s, 共30cycles；72℃, 10min。

2.1.2动物饲养与处理

LIGHT-/- NOD小鼠（n=20）和对照NOD小鼠（n=20）饲养26周，动态检测小鼠体重、血糖，计算小鼠的糖尿病累积发病率，两组随机取11和20周龄小鼠各

5只做腹腔注射葡萄糖耐量试验（Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT）分析小鼠体内胰岛素活性情况。IPGTT实验完成后次日处死小鼠，收集血清，分离胰腺固定于4％多聚甲醛，4℃保存。

2.1.3腹腔注射葡萄糖耐量试验

两组随机取11和20周龄小鼠各5只，禁食不禁水过夜。次日上午8时左右于尾部取一滴血用快速血糖仪检测空腹血糖，按2g/kg体重/只的剂量腹腔注射50％葡萄糖，分别于注射葡萄糖后第0.5、1和2h，取尾血测血糖。葡萄糖耐量减退（IGT）的判断标准参照WHO关于DM诊断颁布的IGT标准[64]，即糖负荷后2h血糖水平> 7.8mmol/L，但<11.1mmol/L。糖负荷后2h血糖水平> 11.1mmol/L可诊断为糖尿病。

### 2.2 胰腺组织石蜡切片的制作、HE染色及胰岛炎的观察

取出固定于4%多聚甲醛固定液中的胰腺，脱水后，石蜡包埋，连续切片得6～

10μm的胰腺组织石蜡切片，用于HE染色和胰岛原位细胞凋亡检测。

石蜡切片放置60℃烤箱烘烤2h，经二甲苯脱蜡，再经无水乙醇、90％、80％、

70％乙醇水化后，即可进行HE染色。切片用苏木素染色8-10min，流水冲洗，再用l%盐酸对其进行分化，流水冲洗后用伊红染色1-2min，流水冲洗。37℃烤箱烤干，中性树脂封片，二甲苯透明，正置荧光显微镜下观察同时拍照。

两位病理专业老师用盲法读片计数，每组统计5只小鼠的胰岛数，对胰岛炎进行分级[65,66]：胰岛无淋巴细胞浸润为零级；淋巴细胞仅浸润胰岛周围，但未侵入胰岛内部，为一级（即胰岛周围炎）；浸润至胰岛内的范围≤25%，为二级；25%<浸润程度<75%，为三级；胰岛炎末期，剩余胰岛数<20%者，为四级。

### 2.3 胰岛原位细胞凋亡检测技术（TUNEL法）

胰腺组织石蜡切片脱蜡水化后，按照碧云天研究所提供的TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（显色法）内的使用说明进行操作，即在切片上滴加蛋白酶K孵育20-30分钟，

PBS洗3次，加3% H2O2孵育8min. PBS 洗3次，加生物素标记液（末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, TdT)＋生物素(Biotin)标记的dUTP (Biotin-dUTP)），37℃孵育1.5 h. PBS 洗1次，加反应终止液孵育8min. PBS洗3次，加Streptavidin-HRP工作液孵育25min. PBS洗3次，加DAB显色液，孵育10-20min. PBS洗3次，苏木素染色细胞核。PBS洗3次，95%乙醇、100%乙醇，甲苯透明，封片观察。染色结果观察，TUNEL染色阳性的凋亡细胞为棕色，蓝色是苏木素染色的非凋亡细胞的细胞核或浸润的淋巴细胞。

### 2.4 ELISA法检测血清IFN-γ、IL-4水平

参见第一部分2.2

### 2.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析，所有的数据用均数±标准差（*X*±S）表示。组间比较采用单因素方差分析或非配对t检验分析，*P* <0.05为差异具有显著性。

## 3 实验结果

### 3.1 LIGHT-/- NOD小鼠模型的建立

LIGHT-/-小鼠（C57 BL/6背景）和NOD小鼠配对生下的子代基因型全为LIGHT+/-，鼠毛色为灰褐色。将其雄鼠与NOD雌鼠配对，得到的后代基因型存在3种可能：LIGHT+/-，LIGHT+/+，LIGHT-/-，鼠毛色也有2种可能：浅灰褐色和白色。选取基因型为LIGHT+/-的雄鼠与LIGHT+/+ NOD雌鼠回交十二代，每次回交后代的基因型只有2种可能即LIGHT+/-和LIGHT+/+。回交十二代后选择LIGHT+/-的雌鼠和雄鼠自交，最终得到去除C57 BL/6背景的LIGHT-/- NOD小鼠，后代毛色全为白色

（Figure 2.1）。



图2.1 LIGHT-/- NOD小鼠模型的建立

Figure 2.1 Creation of LIGHT-/- NOD mice model

3.1.1 LIGHT-/- NOD小鼠基因型的鉴定

采用PCR技术对小鼠的LIGHT基因型进行鉴定，如Figure2.2所示，1泳道出现2条带，大片段约为494bp，小片段约为290bp，为LIGHT+/-NOD小鼠的PCR

产物电泳图。2泳道和3泳道各只有一条带，分别为494bp的大片段和290bp的小片段，为LIGHT+/+ NOD小鼠和LIGHT-/- NOD小鼠的PCR产物电泳图。



图2.2 小鼠基因型鉴定的电泳图

Figure 2.2 Electropherogram of mouse genotype assessment

注：1：LIGHT+/-NOD小鼠；2：LIGHT+/+NOD小鼠；3：LIGHT-/-NOD小鼠。

3.1.2 LIGHT敲除后对NOD小鼠体重的影响

动态检测LIGHT-/- NOD小鼠和野生型LIGHT+/+ NOD小鼠的体重，两组小鼠 5

－10周龄时体重增长迅速，10周龄后，LIGHT-/- NOD小鼠体重增长趋于平缓，而对照野生型LIGHT+/+ NOD小鼠体重有下降趋势，到30周龄时下降明显（*P*<0.05）

（Figure 2.3）。提示LIGHT敲除后可预防或延缓NOD小鼠因产生糖尿病而导致的体重减轻。



图2.3 LIGHT-/- NOD小鼠体重的变化（n=5）

Figure 2.3 Body weight alloeosis in LIGHT-/- NOD mice (n=5)

**\*:** *P*<0.05, νs LIGHT+/+ NOD小鼠组

3.1.3 LIGHT敲除后对NOD小鼠血糖的影响

如Figure2.4所示，对照LIGHT+/+ NOD小鼠从15周龄起，非空腹血糖水平上升较快；而LIGHT-/- NOD鼠血糖水平在30周龄的观察期内，始终保持较平缓状态，第20周龄后，明显低于LIGHT+/+ NOD小鼠，*P* <0.05。



图2.4 LIGHT-/- NOD鼠血糖水平的变化（n=5）

Figure 2.4 Blood glucose level Alloeosis in LIGHT-/- NOD mice (n=5)

**\*:** *P*<0.05, νs LIGHT+/+ NOD小鼠组

3.1.4 LIGHT-/- NOD小鼠葡萄糖耐量的变化

Figure 2.5. a和Figure 2.5. b分别为11周龄和20周龄LIGHT-/- NOD小鼠和对照小鼠在糖负荷不同时相点血糖水平随时间变化的曲线。由Figure 2.5. a和b可见，两组动物血糖水平在注射葡萄糖后0.5h出现最大值，随后血糖含量降低，LIGHT-/- NOD小鼠在2h左右恢复至空腹血糖水平。而对照LIGHT+/+ NOD小鼠在11周龄时，糖负荷1h的血糖水平下降幅度明显低于LIGHT-/- NOD小鼠组（*P*<0.01），2h的血糖水平介于7.8mmol/L与11.1mmol/L之间，提示对照组可能出现糖耐量减退；20周龄时，对照LIGHT+/+ NOD小鼠糖负荷后1h、2h的血糖水平下降幅度均明显低于LIGHT-/- NOD小鼠（*P*<0.05），且2h的血糖水平大于11.1mmol/L，提示对照LIGHT+/+

NOD小鼠可能出现糖尿病。以上数据说明，LIGHT敲除后，能改善NOD小鼠的糖

耐量异常。



图2.5 LIGHT-/- NOD鼠的糖耐量变化（n=5）

Figure 2.5 Glucose tolerance alloeosis in LIGHT-/- NOD mice (n=5)

**\*:** *P*<0.05, **\*\*:** *P*<0.01, νs LIGHT+/+ NOD小鼠组注：a:11周龄；b:20周龄.

3.1.5 LIGHT-/-NOD小鼠的糖尿病累积发病率

30周龄时，与对照组NOD小鼠相比，LIGHT-/- NOD小鼠糖尿病的累积发病率显著降低（LIGHT-/- NOD组: 13.3％, 2/15; LIGHT+/+ NOD组: 73.3％, 11/15），发病时间也明显推迟（Figure 2.6）。



图2.6 LIGHT-/- NOD鼠的累积发病率

Figure 2.6 Cumulative incidence of DM in LIGHT-/- NOD mice

### 3.2 LIGHT-/-NOD小鼠血清IFN-γ和IL-4水平的变化

LIGHT敲除后，NOD小鼠血清IFN-γ含量明显低于对照NOD小鼠，*P*<0.01；血清IL-4水平略高于对照组，但差异无统计学意义（Figure2.7）。



图2.7 LIGHT-/- NOD鼠的IFN-γ和IL-4水平变化（n=5）

Figure 2.7 Serum IFN-γand IL-4 levels Alloeosis in LIGHT-/- NOD mice (n=5)

**\*\*:** *P*<0.01, **\*\*\*:** *P*<0.001, νs LIGHT+/+ NOD小鼠组

注：a: the serum IFN-γlevel; b: the serum IL-4 level

### 3.3 LIGHT敲除对NOD小鼠胰岛炎的影响

如Figure 2.8所示，11周龄LIGHT-/- NOD小鼠胰岛形态正常，境界清楚，胰岛绝对数目明显多于对照组，无淋巴细胞浸润，胰岛炎为零级；20周龄时，胰岛周缘有少量淋巴细胞浸润，胰岛炎以零级、一级为主；而对照LIGHT+/+ NOD小鼠11周龄时，淋巴细胞浸润明显，浸润面积在50％以上，胰岛炎以二至三级为主；20周龄时，胰岛淋巴细胞浸润面积为75％以上，胰岛炎以三至四级为主。



图2.8 LIGHT敲除对NOD小鼠胰岛炎的影响（×40, n=5）Figure 2.8 Effect of LIGHT knockout on insulitis in NOD mice (×40, n=5)

注：a: LIGHT-/- NOD (11w of age); b: LIGHT+/+ NOD (11w of age);

C: LIGHT-/- NOD (20w of age); d: LIGHT+/+ NOD (20w of age).

### 3.4 LIGHT敲除对NOD小鼠胰岛细胞凋亡的影响

由Figure 2.9可见，11周龄LIGHT-/- NOD小鼠胰岛内未见明显的凋亡细胞，对照LIGHT+/+ NOD小鼠出现少量的凋亡细胞；20周龄时，LIGHT-/- NOD小鼠胰岛内仍未见明显的凋亡细胞，而对照LIGHT+/+ NOD小鼠出现大部分细胞凋亡。提示敲除LIGHT基因，可减轻NOD小鼠胰岛细胞凋亡程度。



图2.9 NOD小鼠胰岛原位细胞凋亡检测（×40, n=5）Figure 2.9 Islet cells apoptosis detection in situ in NOD mice (×40, n=5)

注：棕色为TUNEL染色阳性的凋亡细胞。

A: LIGHT-/- NOD (11w of age); b: LIGHT+/+ NOD (11w of age); c: LIGHT-/- NOD (20w of age); d: LIGHT+/+ NOD (20w of age).

## 4 讨论

T淋巴细胞活化需要的第一信号即抗原信号是T细胞的TCR-CD3分子与主要组织相容性复合体（MHC）-抗原肽复合物相结合而产生，T细胞只有第一信号不能活化，还必须接受第二信号即共刺激信号的刺激才能激活。T细胞对于缺乏共刺激信号的第一信号刺激，处于无反应状态[67]。因此，阻断或使共刺激信号缺失，T细胞因接受抗原刺激时仅有第一信号而对抗原刺激产生免疫耐受。这一策略可预防或减缓自身免疫疾病的产生。Wu等报道[34]，对于3-4周龄或6-7周龄已发生胰岛炎的NOD小鼠，用LTβR-Ig治疗阻断LIGHT通路能预防糖尿病的发生；且在NOD鼠的胰岛炎晚期（10或14周龄）阻断该途径，可延缓糖尿病的发生；但LTβR-Ig对已产生糖尿病的NOD鼠进行治疗没有作用，不能逆转糖尿病。提示LIGHT途径在T1DM的发生中起关键作用。LTβR-Ig融合蛋白的使用并不能完全阻断LIGHT通路，这是构建融合蛋白技术在研究特定基因功能方面的缺点，而基因敲除技术恰好弥补了这一缺陷，所以我们建立了LIGHT-/- NOD小鼠研究LIGHT基因功能。

本部分研究，采用LIGHT敲除鼠与NOD鼠回交十代以上再自交建立LIGHT敲除NOD鼠，观察胰岛炎、血糖、糖耐量、胰岛细胞凋亡、糖尿病累积发病率等指标分析LIGHT信号对NOD鼠糖尿病病情的影响。我们发现LIGHT敲除后，NOD小鼠胰岛炎症状明显改善；26周的观察期内，LIGHT-/- NOD鼠的血糖水平明显低于对照NOD鼠，糖耐量正常，胰岛细胞凋亡现象不明显，糖尿病发病率显著降低。以上数据表明，干预LIGHT途径信号传递能预防或延缓胰岛炎及糖尿病的发生。

NOD小鼠的胰岛炎及糖尿病是环境和遗传因素相互作用，由T细胞介导而产生[68]。早期凋亡的β细胞及某些β细胞凋亡所释放出来的胰岛素、GAD等可能成为自身抗原，由APC和MHC一起将它们呈递给T细胞，T细胞同时接受共刺激分子传递来的共刺激信号，启动了针对NOD鼠β细胞的自身免疫反应。β细胞凋亡在

1型糖尿病的发生、发展中发挥重要作用。T细胞接受双信号刺激后，功能可能出现一系列变化，如激活、增生、细胞因子分泌和CTL作用等。T细胞、炎症细胞因子和自由基等诸多因素通过直接或间接的方式参与了β 细胞破坏的全程，通常认为

Th1细胞因子开启了胰岛的级联炎症反应，最终促使了β细胞的死亡[74]。Thl细胞

因子可能经以下途径损伤β细胞：通过CTL的穿孔素/颗粒酶B通路和Fas－FasL通路损伤β细胞，促进β细胞凋亡；Th1细胞因子如IFN-γ连同活化的巨噬细胞产生的促炎症性细胞因子IL-1β、TNF-α以及对β细胞有很强毒性的氧/氮自由基，通过诱导与细胞凋亡相关的蛋白家族如Bcl-2、Caspases等直接破坏β细胞。作为共刺激分子的LIGHT除通过激活T细胞间接参与β细胞的破坏外，是否也直接参与对β细胞的损伤过程尚未见报道，值得进一步研究。

NOD小鼠因Thl/Th2细胞及其细胞因子的平衡被打破而导致糖尿病发生。Thl细胞激活产生大量Th1细胞因子，而Th2细胞及Th2细胞因子被抑制，从而致使β细胞损伤死亡。众多的研究认为，Thl和Th2细胞因子的变化与自身免疫疾病的产生有着十分紧密的联系。在T1DM的发生和发展过程中，常伴随Thl细胞因子的表达增加而Th2细胞因子分泌减少。正常机体处于免疫耐受时，则呈现相反的结果，这可能与受抗原肽刺激的T细胞特异性迁移至靶器官，并使局部免疫抑制性的Th2细胞活化及Th2细胞因子表达增加，从而导致免疫耐受的产生有关[69-72]. NOD小鼠经免疫耐受治疗后，由胰岛炎及糖尿病发生时产生的大量Th1细胞因子转变为IL-4、IL-10等Th2细胞因子的分泌急增，提示Th亚型的转变诱导了免疫耐受[73]。本研究发现T细胞共刺激途径LIGHT途径信号缺失后，NOD小鼠血清中Th1细胞因子IFN-γ水平较对照组明显降低，而Th2细胞因子IL-4的分泌略有增加，与对照组比较，差异无显著性。提示LIGHT通路信号缺失预防或延缓糖尿病的发生，可能与其抑制了T细胞活化及Thl细胞因子的分泌急剧减少有关。

## 5 小结

（1）LIGHT信号通路信号缺失时可降低炎性细胞因子IFN-γ的分泌，改善NOD

小鼠的胰岛炎症；

（2）LIGHT信号缺失时可减轻胰岛细胞凋亡程度，改善葡萄糖耐量异常，降低NOD小鼠糖尿病的发病率；

（3）上述结果进一步证明了LIGHT信号通路与NOD鼠糖尿病病情的发展存在相关性。

# 第三部分 LIGHT-LTβR信号通路对胰岛细胞凋亡的影响

前言

胰岛β细胞死亡是T1DM复杂发病机制的关键一环。引起细胞死亡的原因包括细胞凋亡、坏死和自噬等，而β细胞死亡主要由细胞凋亡引起[55, 75, 76]。引起β细胞凋亡的因素较多，其中活化的自身反应性T淋巴细胞、巨噬细胞入侵胰岛是主要的诱因。目前较多学者认为浸润的T淋巴细胞、巨噬细胞等释放的促炎症细胞因子如γ-干扰素(interferon-γ, IFN-γ)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-1β( interleukin-1β, IL-1β) 连同Fas 配体（FasL）、穿孔素和颗粒酶B是导致β细胞凋亡、早期胰岛炎的形成及T1DM发展的主要因素。IFN-γ、TNF-α、IL-1β等各种炎症细胞因子主要是通过协同效应而非单独作用诱导β细胞凋亡，且不同动物模型或个体中各种炎症因子的组合方式和分布存在差异[7, 56, 57]。因此，更加全面地了解胰岛β细胞中不同细胞因子组合对β细胞损伤的影响及机制，对于防治T1DM实施个性化诊疗策略有着十分重要的意义。

前二部分的研究结果表明，LIGHT及其受体在NOD小鼠糖尿病的发生发展中起重要作用。另据报道，作为活化T细胞的强大共刺激分子LIGHT单独作用于肿瘤细胞未见明显的毒性作用，但与另一促炎症细胞因子IFN-γ联合作用能显著诱导肿瘤细胞的凋亡，提示LIGHT途径直接参与了细胞凋亡的过程[14-19]。那么，LIGHT是否单独或连同由Th1细胞活化所分泌的炎症因子IFN-γ一起对胰岛细胞直接造成杀伤力，尚未见报道。

针对尚未弄清楚LIGHT途径是否直接参与胰岛细胞凋亡过程这一研究现状，我们以来源于NOD小鼠的胰岛素瘤细胞株MIN6细胞和胰岛原代细胞为模式细胞，建立重组鼠LIGHT（recombinant mouse LIGHT, rmLIGHT）、重组鼠IFN-γ

（recombinant mouse LIGHT, rmIFN-γ）刺激细胞模型，从形态学、免疫学等多方面来研究LIGHT信号途径对胰岛β细胞凋亡的影响，并用抗LTβR或HVEM多抗阻断该信号通路，明确LIGHT途径在胰岛β细胞凋亡中的作用。

## 1 实验材料

### 1.1 培养细胞及主要试剂

30只7～8周龄Bal b/c小鼠购自北京中国医学科学院动物研究所，饲养于IVC

级动物房，用于提取胰岛细胞；

胰岛素瘤MIN6细胞株来源于转染了SV40大T抗原的NOD小鼠，由北京同仁医院内分泌科张奋博士惠赠；

DMEM高糖培养基、F12K培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司；小牛血清购自杭州四季清生物工程材料有限公司；

rmLIGHT、rmIFN-γ、rmTNF-α购自美国Peprotech公司；

Annexin V－FITC细胞凋亡检测试剂盒、7-氨基放线菌素D(7-Aminoactinomycin

D,7－AAD）购自美国eBioscience公司；

四甲基偶氮唑盐（MTT）、Hoechst33258、DMSO、双硫腙（DTZ）、Ficoll-400、胶原酶Ⅺ购自美国Sigma公司；

拮抗的ft羊抗小鼠LTβR、HVEM多克隆抗体和对照IgG单抗购自美国R&D

Systems公司；

Mouse Insulin Allophycocyanin mAb购自美国R&D Systems公司；

胰酶、青/链霉素、谷氨酰胺、细胞凋亡DNA-lader提取试剂盒购自碧云天生物技术研究所；

Hank's购自美国Hyclone公司；

HEPES、琼脂糖、2-巯基乙醇购自美国Invitrogen公司；

TAE购自上海生物工程有限公司；

10×Loading buffer购自日本Takara公司；

Gold view购自赛百盛生物有限公司；其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器

HF90/249 CO2培养箱为Heal Force公司产品；电子天平为美国Sartorius公司产品；

倒置荧光显微镜，日本Olympus公司（型号BX51）；多功能读板机为德国Beckman公司产品；

恒温水浴箱为上海医疗器械七厂产品；

共聚焦激光扫描电镜为美国BD公司产品；流式细胞仪为美国BD公司产品；

凝胶成像仪为美国BIO-RAD公司产品；超低温冰箱为日本三洋公司产品；

高压蒸汽灭菌容器为上海申安医疗器械厂产品；超净工作台为苏州净化设备有限公司产品；

pH计为北京赛多利斯科学仪器有限公司产品；

微量加样器（2μl、20μl、100μl、1000μl）为德国Eppendorf公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

MIN6细胞培养于含15％FBS, 2mM Gln和100U/ml青/链霉素的高糖DMEM培养基中。细胞呈单层贴壁生长，当细胞出现70～80％汇合度时，用含ETDA-Na2的0.25%胰蛋白酶消化传代，每3-4 d传代一次。

### 2.2 小鼠胰岛细胞的制备

采用胶原酶消化技术，分离禁食过夜的Bal b/c小鼠的胰岛。具体操作如下：将2.5ml的胶原酶Ⅺ（0.8mg/ml）注射入已麻醉小鼠的胆总管内，随即轻轻将肿胀的胰腺取出来，去除其他附着的组织，将充满胶原酶的胰腺置于37℃摇床上轻轻摇动孵育15min，加入预冷HBSS终止消化。胰腺组织接着用400μm的筛网过滤去除结缔组织，滤液经25, 23,20,11％Ficoll-400梯度离心。收集主要处于20％与23％

Ficoll界面之间的胰岛，F12K培养基洗涤，用微量移液器将胰岛挑选出来。挑选出来的胰岛利用台盼蓝染色鉴定细胞活性，DTZ特异染色鉴定是否为胰岛。用含ETDA-Na2的胰酶消化胰岛产生单个胰岛细胞，采用APC标记的抗小鼠胰岛素单抗对胰岛β细胞进行染色，流式细胞术分析胰岛β细胞数占总胰岛细胞数的百分比。对单个胰岛细胞计数，调整胰岛细胞密度用于后续试验。

### 2.3 MTT

取对数生长期的MIN6细胞（3×10 4个/孔），胰岛细胞（1×10 4个/孔），分别接种到96 孔细胞培养板内，置于37 ℃，5% CO2 培养箱中培养过夜。为了观察

rmLIGHT 剂量对小鼠胰岛素瘤MIN6 细胞活力的影响，我们采用rmIFN-γ（100

ng/ml）＋不同浓度的rmLIGHT联合刺激MIN6细胞48h, MTT法检测细胞活力变化，以TNF-α（10 ng/ml）作为阳性对照，选出LIGHT的最佳浓度用于后续实验。LIGHT（5μg/ml）＋IFN-γ（100 ng/ml）单独或联合刺激MIN6细胞12,24,48,72

h或刺激原代胰岛细胞48h。另一些实验中，预先分别用拮抗的LTβR多抗（5μg/ml）和HVEM多抗（5μg/ml）孵育MIN6细胞1h，再用LIGHT和IFN-γ联合刺激细胞

48h，然后进行MTT检测。

MTT检测步骤：：每孔加20μl MTT (5 g/L)，于37℃、5 % CO2培养箱中培养4 h。接着移去各孔内培养基，尽可能地保留结晶沉淀，每孔加150μl DMSO。待结晶完全溶解，利用多功能读板机检测各孔在波长为490 nm的OD值，以Untreated组做对照，设定Untreated组的OD490对应的细胞活力为100％，计算各实验组细胞的相对活力。上述实验重复2-3次。

### 2.4 凋亡细胞的形态学分析

细胞因子处理MIN6 细胞后，用倒置相差显微镜分别于不同时相点，观察

MIN6细胞形态的变化并拍照；用DNA结合的双苯甲亚胺Hoechst33258荧光染料染色MIN6细胞核，观察凋亡细胞核的变化。步骤如下：MIN6细胞接种于已放置盖玻片的六孔板各孔内，置于37℃，5% CO2培养箱中培养过夜，加IFN-γ（100 ng/ml）＋LIGHT（5μg/ml）刺激MIN6细胞24,48 h。取出盖玻片，PBS洗涤。

4%多聚甲醛固定20 min左右，PBS洗涤，加Hoechst33258染色液（5μg/ml），避光染色10min左右，PBS洗涤。载玻片上加抗荧光淬灭的封片液，盖上贴有细胞的盖玻片，激光共聚焦显微镜观察各组MIN6细胞的细胞核形态变化并拍照。上述实验用不同批次细胞重复2次。

### 2.5 DNA琼脂糖凝胶电泳

LIGHT（5μg/ml）和IFN-γ（100 ng/ml）单独或联合刺激MIN6细胞后，参照碧云天的细胞凋亡DNA-ladder提取试剂盒说明书提取MIN6细胞DNA. 即MIN6细胞在55℃经细胞裂解液(10mM Tris-HCl(pH8.0),0.1M EDTA,0.5%SDS,100mM

NaCl）裂解过夜，随后用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀，离心（12000 rpm×10 min, 4 ℃），弃上清，沉淀用含0.1mg/ml RNase A的超纯水溶解。分离的基因组DNA进行1.5％琼脂糖凝胶电泳，荧光染料Gold view染色DNA检测核小体的裂解情况。凝胶成像仪观察并拍照。上述实验用不同批次细胞重复2次。

### 2.6 Annexin-V/7-AAD染色法与FCM检测细胞的凋亡百分率

MIN6 细胞（1×10 5个/孔），胰岛细胞（3×10 4个/孔），分别接种到24孔细胞培养板内，置于37℃，5% CO2培养箱中培养过夜。分别用不同细胞因子处理细胞后，再用Annexin-V/7-AAD对细胞进行染色。具体操作根据Annexin-V/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒上提供的使用说明书实施。即胰酶消化收集细胞，PBS洗涤，加入Annexin V-FITC（5μl /管）混匀，室温避光孵育10分钟，加入7-AAD（50μg/ml）染色液，轻轻混匀，随即通过流式细胞仪检测凋亡细胞的百分率。在另一些实验中，

LIGHT（5μg/ml）和IFN-（γ 100 ng/ml）联合刺激细胞48h 之前，分别用拮抗的LTβR

多抗（5μg/ml）和HVEM多抗（5μg/ml）孵育1h，再利用流式细胞术检测。上述实验用不同批次细胞重复3次。

### 2.7 Western blot

MIN6细胞(3×10 5个/孔)接种6孔板，培养24 h后或LIGHT＋IFN-γ联合刺激细胞6 h，收获细胞，预冷PBS 洗2 遍，用细胞裂解液（150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 % Triton X-100, 1%脱氧胆酸钠, 0.1 % SDS)裂解细胞，提取细胞总蛋白，用NanoDrop ND-1000微型分光光度计测定蛋白质含量。每组蛋白样品取35

μg进行SDS-PAGE 电泳分离，采用电转移中的湿转法将凝胶中的蛋白质转印至

PVDF膜上，用含5% 脱脂牛奶的封闭液封闭2 h，用一定比例稀释的LTβR、

HVEM和β-actin一抗室温孵育2 h或4℃孵育过夜，再用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育0.5-1 h, ECL显色，胶片显影。以β-actin为参照分析目的蛋白的相对含量。上述实验用不同批次细胞重复2次。

### 2.8 统计分析

采用Graph Pad Prism 5.0 软件进行统计分析，所有的数据用均数±标准差

（*X*±S）表示。组间比较采用one-way ANOVA分析或非配对的t检验，*P* <0.05为差异具有显著性。

## 3 结果

### 3.1 rmLIGHT联合rmIFN-γ对NOD小鼠胰岛素瘤MIN6细胞凋亡影响

3.1.1 rmLIGHT联合rmIFN-γ对MIN6细胞活力的影响

MTT结果显示，浓度为2500、5000ng/ml的rmLIGHT结合rmIFN-γ能显著降低MIN6细胞活力，其中5000ng/ml的rmLIGHT＋100ng/ml的rmIFN-γ抑制细胞活力的能力与阳性对照rmTNF-α+rmIFN-γ相当，因此我们选用rmLIGHT的浓度为

5000ng/ml进行后续实验（Figure3.1）。



图3.1 rmLIGHT对NOD小鼠胰岛素瘤MIN6细胞活力的影响

Figure 3.1 Effect of different rmLIGHT on MIN6 cells viability

rmLIGHT（5μg/ml）和rmIFN-γ（100ng/ml）分别单独或联合刺激MIN6细胞

48h，结果如图Figure3.2所示，与未处理组相比，LIGHT组和IFN-γ组的细胞活力轻微下降，但LIGHT和IFN-γ两者的联合刺激非常明显降低细胞的活力（IFN-γ& LIGHT＋IFN-γ: *P*＝0.0061；LIGHT & LIGHT＋IFN-γ: *P*＝0.0026)。



图3.2 rmLIGHT与rmIFN-γ单独或联合处理对MIN6细胞活力的影响（n=3）

Figure 3.2 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γalone or in combines on viability of MIN6 cells

(n=3)

**\*\*:** *P*<0.01, νs IFN-γ或LIGHT 组

进一步用rmLIGHT和rmIFN-γ单独或联合刺激MIN6细胞12,24,48,72h. MTT结果表明，24h以后，LIGHT＋IFN-γ联合处理组细胞活力下降明显，提示rmLIGHT联合rmIFN-γ对MIN6细胞的毒性作用具有时间依赖性（Figure3.3）。



图3.3 不同时相点rmLIGHT与rmIFN-γ单独或联合处理对MIN6细胞活力的影响

Figure 3.3 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γalone or in combines on viability of MIN6 cells

At different time point

3.1.2 rmLIGHT联合rmIFN-γ对MIN6细胞形态的影响

rmLIGHT和rmIFN-γ 联合处理MIN6 细胞24,48h，倒置显微镜下观察发现，随着处理时间的增加，细胞形态由不规则瓦片状变圆甚至漂浮，细胞密度明显降低，细胞之间空隙增加（Figure 3.4Ⅰ）；用Hoechst33258染色细胞核，激光共聚焦显微镜扫描检测发现，未处理组细胞核染色质分布均匀、呈正常的低密度蓝染。LIGHT+IFN-γ联合处理组细胞核内染色质固缩、呈致密浓染，出现凋亡小体（Figure

3.4Ⅱ）。

继续用琼脂糖凝胶电泳分析rmLIGHT 联合rmIFN-γ 对MIN6 细胞作用

48h，基因组DNA的形态变化，结果如Figure 3.5所示，与其他三组相比，LIGHT 和

IFN-γ联合处理组出现了明显的DNA梯度条带。



图3.4 rmLIGHT联合rmIFN-γ对MIN6细胞形态的影响（×20）

Figure 3.4 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γin combines on morphous of MIN6 cells (×20)

注：箭头指示的表示凋亡小体



图3.5 LIGHT单独或联合IFN-γ对MIN6细胞基因组DNA形态的影响

Figure 3.5 Effect of LIGHT and IFN-γalone or in combines on genomic DNA morphous of

MIN6 cells

3.1.3 LIGHT联合IFN-γ对MIN6细胞凋亡百分率的影响

LIGHT和IFN-γ单独或联合刺激MIN6细胞24, 48h，用Annexin-V和7-AAD对细胞进行双染色，再采用流式细胞术检测细胞凋亡百分率。结果显示，LIGHT或IFN-γ单独作用MIN6细胞24h诱导的早期凋亡率（Annexin-V+/ 7-AAD-）低于7％，

48h诱导的早期凋亡率低于15％。而二者联合刺激细胞，细胞早期凋亡率从24 h的28.8 %增加到48 h的55.3 %；四组细胞的坏死或晚期凋亡率（Annexin-V+/ 7-AAD+）均低于7.0 % （Figure3.6）。



图3.6 不同时相点rmLIGHT与rmIFN-γ单独或联合处理对MIN6细胞凋亡百分率的影响

Figure 3.6 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γalone or in combines on apoptotic percentage of MIN6 cells at different time point

上述结果表明，LIGHT和IFN-γ单独作用于MIN6细胞，仅对细胞产生轻微的毒性，但两者联合毒性作用明显增强，这种联合作用主要诱导了细胞凋亡而非细胞坏死。

### 3.2 阻断LIGHT信号通路MIN6细胞活力的变化

3.2.1 LTβR和HVEM在MIN6细胞上的表达

为进一步证明LIGHT信号通路对NOD小鼠胰岛素瘤MIN6细胞具有毒性作用，首先需明确MIN6细胞是否表达LIGHT的两个受体：LTβR和HVEM以及LIGHT诱导的凋亡是否涉及这两个受体表达的改变。Western blot结果表明，细胞因子刺激前，MIN6细胞上有LTβR和HVEM表达，LTβR的表达高于HVEM；细胞因子刺激后，两个受体的蛋白表达均被诱导，且LTβR 的诱导表达能力明显强于HVEM

（Figure3.7）。提示LIGHT信号传递增加了MIN6细胞上LTβR和HVEM的表达。



图3.7 HVEM和LTβR在rmLIGHT和rmIFN-γ联合处理MIN6细胞前、后的表达变化

Figure 3.7 Protein expression diversity of HVEM and LTβR before or after rmLIGHT and rmIFN-γtreatment

注：a： 细胞因子刺激前HVEM的表达；b: 细胞因子刺激后HVEM的表达；

c：细胞因子刺激前LTβR的表达；d: 细胞因子刺激后LTβR的表达

3.2.2阻断LIGHT信号通路对MIN6细胞活力的影响

既然MIN6细胞上有LTβR和HVEM表达，是否这两个受体一起协同参与对

MIN6细胞的损伤过程？我们用抗小鼠LTβR或HVEM的多克隆抗体阻断该通路，再通过MTT法观察MIN6细胞活力的变化。MTT结果显示，拮抗的LTβR抗体能够显著抑制LIGHT＋IFN-γ的诱导活性，提高细胞存活率；而拮抗的HVEM抗体不能有效抑制LIGHT和IFN-γ诱导的细胞死亡（Figure3.8）。



图3.8 阻断LIGHT途径对MIN6细胞活力的影响

Figure 3.8 Effect of blockage of LIGHT pathway on MIN6 cells viability

3.2.2阻断LIGHT信号通路对MIN6细胞凋亡百分率的影响

48h的FCM结果显示，阻断LIβR后，与对照组（LIGHT+IFN-γ）相比，细胞的早期凋亡率明显降低（47.4％＆8.12％），而阻断HVEM，不能明显抑制LIGHT+IFN-γ对MIN6细胞凋亡的诱导（47.4％＆43.3％），实验结果见Figure3.9。



图3.9 阻断LIGHT途径对MIN6细胞凋亡率的影响

Figure 3.9 Effect of blockage of LIGHT pathway on apoptotic rate of MIN6 cells

上述数据表明，LIGHT介导的MIN6细胞死亡主要是通过受体LTβR而非HVEM

进行信号转导。

### 3.3 LIGHT联合IFN-γ对小鼠原代胰岛细胞凋亡的影响

3.3.1胰岛的特异性鉴定

胰岛包埋于胰腺组织的内部，难于与胰腺外分泌部分离。我们采用了胶原酶Ⅺ消化，Ficoll-400密度梯度离心并在显微镜下手挑的方法对胰岛进行了分离纯化。显微镜下观察，完整的胰岛周沿光滑，细胞排列紧密，有一定的遮光性。台盼蓝染色细胞活性好，用胰岛特异的染色方法DTZ溶液对其进行染色呈猩红色，而外分泌腺细胞不着色。胰酶消化胰岛后得到胰岛细胞用FCM检测其中β细胞所占的百分比，结果显示，β细胞约占胰岛细胞总数的40％左右（Figure 3.10）。



图3.10 胰岛细胞的鉴定

Figure 3.10 Identification of islet cells

注：a: DTZ特异性染色后，胰岛呈红色（×100）；

b： 用APC标记的胰岛素抗体染色，FCM检测胰岛β细胞的百分比

3.3.2 LIGHT联合IFN-γ对小鼠原代胰岛细胞活力的影响

LIGHT和IFN-γ存在协同的细胞毒性作用是否也适用于原代胰岛细胞？如Figure 3.11所示，与LIGHT或IFN-γ单独处理组相比，LIGHT/IFN-γ联合处理组细胞相对活力明显降低（IFN-γ& LIGHT＋IFN-γ: *P*＝0.0126; LIGHT & LIGHT＋IFN-γ: *P*＝0.0029）。用细胞因子刺激来源于Bal b/c小鼠的原代胰岛细胞的MTT试验结果也表明LIGHT和IFN-γ存在协同毒性作用，与我们在细胞系检测的结果一致。



图3.11 rmLIGHT与rmIFN-γ单独或联合处理对小鼠原代胰岛细胞活力的影响（n=3）

Figure 3.11 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γalone or in combines on viability of primary islet cells (n=3)

**\*:** *P*<0.05,νs IFN-γ组；**\*\*:** *P*<0.01,νs IFN-γ或LIGHT 组

3.3.3 LIGHT联合IFN-γ对小鼠原代胰岛细胞凋亡百分率的影响

我们用FCM技术观察了LIGHT联合IFN-γ处理Bal b/c小鼠胰岛细胞48h，胰岛细胞凋亡率的变化。结果如Figure 3.12所示，LIGHT联合IFN-γ处理组细胞凋亡率明显高于未处理组（LIGHT＋IFN-γ组: 46.1％＆Untreated组: 11.1％），提示LIGHT联合IFN-γ同样诱导了小鼠原代胰岛细胞凋亡。



图3.12 rmLIGHT与rmIFN-γ联合处理对小鼠原代胰岛细胞凋亡百分率的影响

Figure 3.12 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γin combines on apoptotic percentage of primary islet cells

## 4 讨论

T1DM是在遗传基础上，加上诸多环境因素如细菌、病毒和药物等触发，由T淋巴细胞介导产生的自身免疫疾病。其主要病理生理特征为CD4+ 和CD8+ T细胞、B细胞、巨噬细胞等浸润形成胰岛炎，胰岛β细胞选择性死亡以及胰岛素分泌不足或缺乏产生糖尿病。在T1DM的进程中，T细胞的活化是关键事件。共刺激分子LIGHT在T细胞的表达可诱导外周T细胞的大量活化和增殖，打破外周耐受，导致自身免疫疾病发生。尽管已有研究表明，LIGHT 的受体LTβR 涉及NOD鼠糖尿病的发生与发展，但LIGHT信号通路是否是调节T细胞持续活化及直接参与胰岛β 细胞损伤过程的重要共刺激途径？目前尚未见报道。

关于LIGHT在T细胞活化中的作用是本课题组长期从事的课题。我们首次在硕大利什曼原虫（L. Major）感染动物的一个疾病模型中发现，阻断LIGHT通路，抗性的小鼠变为敏感，Th1细胞因子IL-12 和IFN-γ 显著降低，表明LIGHT通过促进Th1应答在利什曼感染抗性中发挥重要作用[77]。从引起免疫应答的方面比较，L. Major感染动物和T1DM动物模型极其相似：一、T1DM 与L. major 感染动物体内诱发应答的抗原相似，前者抗原为利什曼原虫抗原，后者为胰岛β细胞表面自体抗原，两者均可引发T细胞的持续活化；二、两种疾病的免疫效应机制相同。L. major感染动物和T1DM患者体内均诱导了一种优势的Th1应答，前者借助Th1细胞因子激活巨噬细胞起到清除L. Major 的作用；后者在Th1 细胞因子IFN-γ的作用下，激活CTL和巨噬细胞，它们分别通过Fas/FasL和促炎症因子损伤β细胞。LIGHT在L. Major感染中的作用提示其可能有别于其他共刺激分子的功能，在T细胞持续活化导致β 细胞免疫损伤中起着重要的作用。

那么，LIGHT-LTβR/HVEM信号通路可能通过哪些效应机制介导胰岛β细胞的免疫损伤呢？我们推测该信号通路可能通过以下三个方面介导胰岛β细胞的死亡：1、诱导Th1细胞的极化，促进Th1细胞因子如IFN-γ的分泌。T1DM的发展取决于Th1/Th2的平衡，Th1细胞及细胞因子促进β细胞的杀伤，而Th2 细胞及细胞因子对病情起保护作用。已证明，LIGHT作为共刺激分子，在Th1极化及调控细胞因子的分泌中发挥重要作用[51, 77]；2、调节T细胞的活化。T1DM 是一

种慢性疾病，患者体内存在大量活化的自身反应性T细胞，这些细胞在β细胞的免疫损伤中发挥重要作用。研究表明，LIGHT对活化后的T细胞存活起着关键的作用，LIGHT-HVEM途径缺陷可促进自身反应性T细胞的凋亡[78]；3、LIGHT在致糖尿病的T 细胞上诱导表达，而其受体LTβR、HVEM 在胰岛细胞上高表达

[35,36,79], LIGHT作为一个具有裂解活性的分子[51]，可能通过与其在胰岛细胞上的受体结合直接参与对β细胞的损伤作用。前两种推测本课题组已有初步研究，但第三可能至今未见报道。

本部分的研究目的是探讨细胞因子LIGHT是否直接对胰岛细胞具有毒性作用。促炎症细胞因子，尤其是TNF-α结合IFN-γ或结合IL-1β被指涉及T1DM的胰岛β 细胞损伤，且胰岛β 细胞的死亡主要是促炎症细胞因子协同作用的结果

[80,81]. 与TNF-α同属于一个家族的LIGHT是否也具有同样的功能和特点？这是我们感兴趣的问题。本研究以来自Bal b/c小鼠的原代胰岛细胞和NOD小鼠胰岛素瘤细胞株MIN6 细胞为模型，观察rmLIGHT对细胞存活和细胞凋亡的影响。

MIN6细胞株来源于转基因表达SV40大T抗原的NOD小鼠的胰岛肿瘤细胞，具有分泌胰岛素的功能，是体外研究胰岛细胞生物学活性理想的细胞模型[82]。我们首先用MTT 实验分析了LIGHT 对MIN6 细胞活力的影响，结果发现

LIGHT或另一Th1细胞因子IFN-γ（主要由活化的T细胞和NK细胞产生）单独处理细胞时，仅对MIN6 细胞具有轻微的毒性作用，但它们的结合明显降低了

MIN6 细胞的活力（Figure3.2）。此外，随着作用时间的延长（从24h 到72h），它们对细胞活力的抑制作用越强烈，呈现明显的时间依赖性（Figure3. 3）。LIGHT 和IFN-γ联合刺激MIN6细胞的细胞形态学观察也证实这两种细胞因子的联合作用对MIN6 细胞产生了明显的毒性作用（Figure3.4和Figure3.5）。

LIGHT联合IFN-γ诱导MIN6细胞死亡究竟是由于细胞凋亡引起还是源于细胞坏死？只依靠MTT的实验结果无法得出结论，我们利用流式细胞术检测细胞凋亡情况即用AnnexinV-FITC/7-AAD双荧光染料对细胞因子处理后的MIN6细胞进行染色，FCM检测细胞的凋亡率。AnnexinV、7-ADD染色凋亡细胞的原理是凋亡细胞的磷脂酰丝氨酸由细胞膜的内侧外翻；AnnexinV可结合外翻到MIN6细胞表面的磷脂酰丝氨酸。AnnexinV也可以进入到细胞质内，与仍停留在细胞膜内侧的磷脂酰丝

氨酸结合而染色坏死细胞。7-ADD只对丧失完整细胞膜的坏死细胞染色。因此，这种双染色分析法可区分凋亡的细胞（AnnexinV+/7-AAD-）和坏死的细胞

（AnnexinV+/7-AAD+）。FCM结果表明，LIGHT和IFN-γ联合处理组细胞早期凋亡率从24 h的28.8 %增加到48 h的55.3 %，但坏死或晚期凋亡率均低于7.0 %

（Figure3.6）。提示LIGHT联合IFN-γ诱导的主要是细胞凋亡而非细胞坏死。

为进一步证明LIGHT信号通路对MIN6细胞的毒性作用，我们用抗LTβR 或

HVEM的多克隆抗体阻断该通路，再通过MTT和FCM观察MIN6细胞活力及细胞凋亡的变化。LIGHT主要有两个受体：LTβR和HVEM，是否这两个受体一起协同参与对MIN6细胞的损伤过程？我们的结果表明，拮抗的LTβR抗体能够显著抑制

LIGHT和IFN-γ的活性，而拮抗的HVEM抗体不能有效抑制LIGHT和IFN-γ诱导的细胞死亡（Figure3.8）；48h的FCM结果表明，阻断LTβR后，与对照组

（LIGHT+IFN-γ）相比，细胞的早期凋亡率明显降低（47.4％＆8.12％）；而阻断

HVEM，不能明显抑制LIGHT+IFN-γ对MIN6细胞凋亡的诱导（47.4％＆43.3％）

（Figure3.9）。以上结果提示，LIGHT介导的MIN6细胞死亡主要是通过受体LTβR而非HVEM进行信号转导。在MIN6细胞株中观察到的现象同样也出现于小鼠原代胰岛细胞。我们在用细胞因子处理来自Bal b/c小鼠的原代胰岛细胞的MTT试验中，同样观察到了LIGHT和IFN-γ的协同毒性作用（IFN-γ& LIGHT＋IFN-γ: *P*＝0.0126; LIGHT & LIGHT＋IFN-γ: *P* ＝0.0029） （Figure3.11）。提示，LIGHT/IFN-γ协同诱导了NOD小鼠胰岛细胞死亡。我们用FCM技术观察了LIGHT联合IFN-γ处理Bal

b/c小鼠胰岛细胞48h，胰岛细胞凋亡率的变化。LIGHT＋IFN-γ处理组细胞凋亡率明显高于未处理组（LIGHT＋IFN-γ组: 46.1％＆Untreated组: 11.1％），提示LIGHT联合IFN-γ诱导了小鼠原代胰岛细胞凋亡（Figure 3.12）。

本研究结果表明，LIGHT和Th1细胞因子IFN-γ单独处理胰岛细胞仅产生轻微毒性，但两者联合毒性作用明显增强，具有协同效应，且这种协同作用有一定的时间依赖性。LIGHT联合IFN-γ诱导了胰岛细胞死亡主要由细胞凋亡引起，其具体的分子机制是什么？尚不清楚，值得深入细致的研究。

## 5 小结

LIGHT主要结合受体LTβR直接参与了细胞因子IFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡；

LIGHT与IFN-γ之间存在协同效应。

# 第四部分 LIGHT-LTβR信号通路诱导胰岛细胞凋亡的分子机制

前言

LIGHT是T细胞活化重要的共刺激分子，在T1DM的作用可能涉及以下两个方面：1、诱导T细胞活化，促进Th1细胞的极化及Th1细胞因子的分泌而介导对胰岛β细胞的免疫损伤；2、LIGHT直接参与IFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡，但具体的分子机制是什么，尚不清楚。

胰岛β细胞死亡主要源自关键转录因子如NF-κB和STAT1等的激活和基因网络调控的应激反应，这些应激诱导了下游的信号转导途径[83]。下游激活的转导信号可能通过以下几种机制触发β细胞凋亡：线粒体途径、死亡受体途径和内质网应激[83]。线粒体途径涉及Bcl-2蛋白家族的调节、线粒体功能障碍和Caspase活化[84-86]。线粒体结构和功能的完整性受Bcl-2蛋白家族的调节[87-90]，Bcl-2蛋白家族的转录、转录后水平调节及蛋白质－蛋白质相互作用决定了细胞命运[91-93]。

众多研究认为，促炎症细胞因子如TNF-α、IFN-γ主要通过凋亡的线粒体通路诱导胰岛β细胞死亡。IFN-γ 和TNF-α 联合诱导了大鼠RINm5F 细胞线粒体膜的去极化，促进了大鼠胰岛细胞线粒体Cyto C的释放并活化Caspase-9[94-95]. Suk等[79]报道，转录因子STAT1/IRF-1在IFN-γ 和TNF-α协同作用诱导的胰岛β细胞死亡中起关键作用，IFN-γ诱导了STAT1/IRF-1的活化，Caspase 作为IRF-1的下游被活化。Chang等[96]研究认为，IFN-γ和TNF-α作用于小鼠MIN6 细胞，增加了线粒体Cyto C的释放，促进了Caspase活化并诱导细胞死亡。STAT1 敲除小鼠的胰岛细胞能对抗由IFN-γ+TNF-α诱导的Cyto C释放和细胞凋亡激活[100]。此外，另有几个研究小组发现在胰岛细胞中几种Bcl-2成员的表达被IL-1β 或TNF-α诱导的NF-κB调节，因此，推测Bcl-2 成员在细胞因子诱导的β 细胞死亡中起作用，NF-κB决定着细胞的生与死[97, 103]。抗凋亡的Bcl-2成员过表达能保护胰岛β细胞避免促炎症细胞因子的细胞毒性效应[94, 98, 99]。那么，作为与TNF-α 同属于一

个基因家族的细胞因子LIGHT诱导胰岛细胞凋亡的分子机制是什么？LIGHT信号传递是否涉及线粒体途径？尚未见报道。

已有研究表明，在一些肿瘤细胞中，LIGHT通过线粒体途径或死亡受体途径致敏IFN-γ介导的细胞凋亡[14-17]。本课题组前期工作证明了LIGHT主要结合受体

LTβR参与IFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡，其具体的凋亡分子机制是我们接下来要研究的问题。

本部分分别以NOD小鼠胰岛素瘤MIN6细胞株为细胞模型以及以LIGHT-/- NOD小鼠为动物模型，研究阐明LIGHT联合IFN-γ诱导胰岛细胞凋亡可能的分子机制。

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物与细胞

12周龄LIGHT-/- NOD小鼠由本课题组培育即NOD小鼠与LIGHT-/-小鼠回交去除LIGHT-/-小鼠的背景以后，再自交得到。

见第二部分2.1

12周龄NOD小鼠购自北京中国医学科学院动物研究所；

NOD小鼠胰岛素瘤MIN6细胞由北京同仁医院内分泌科张奋博士惠赠。

### 1.2 主要试剂

牛血清白蛋白购自北京鼎国生物技术有限公司；

rmLIGHT、rmIFN-γ和rmTNF-α 购自美国Peprotech公司；

DMEM培养基购自美国Gibco公司；胎牛血清购自美国Hyclone公司；

蛋白提取的细胞裂解液及蛋白酶抑制剂购自美国Roche公司；

PVDF膜购自美国Millipore公司；

Caspase-3、cleaved Caspase-3、STAT1、p-Tyr(701) STAT1、Bid一抗购自Cell Signaling Technology公司；

STAT1特异抑制剂Fludarabine购自Sigma公司；

细胞色素C（Cytochrome C, Cyto C）和细胞色素C氧化酶Ⅳ型亚基（COX4）一抗购自美国BD Pharmingen公司；

Caspase-8,9、Bcl-2、Bcl-XL、Bax、Bak、多聚ADP-核糖聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase，PARP)、IκB、NF-κBp65和β-actin 一抗、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、ECL试剂盒、预染蛋白分子量标准、Caspase抑制剂Z-VAD-FMK、Caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO、NF-κB抑制剂PDTC、Caspase-3活性检测试剂盒，购自碧云天研究所；

辣根过氧化物酶标记二抗，通用型SP免疫组化染色试剂盒，DAB染色试剂盒，苏木素，中性树脂，多聚赖氨酸及多聚赖氨酸处理的载玻片购自北京中杉金桥生

物技术有限公司；

Cy3标记驴抗兔二抗购自美国Biolegend公司；其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器

Mini PROTEAN®3 cell型SDS-PAGE电泳器材，美国Bio-RAD公司产品；转膜仪，美国Millipore公司产品；

HF90/249 CO2培养箱为Heal Force公司产品；电子天平为美国Sartorius公司产品；

多功能读板机为德国Beckman公司产品；恒温水浴箱为上海医疗器械七厂产品；

共聚焦激光扫描电镜为美国BD公司产品；流式细胞仪为美国BD公司产品；

超低温冰箱为日本三洋公司产品；

超净工作台为苏州净化设备有限公司产品；

微量加样器、高速冷冻离心机为德国Eppendorf公司产品；

Milli-Q超纯水系统，美国Millipore公司产品；

倒/正置荧光显微镜，日本OLYmpus (BXS1型) /德国Leica公司产品；切片机，德国Leica仪器有限公司产品（型号：RM2016）；

摊片机，德国Leica仪器有限公司产品（型号：HI1210）。

## 2 实验方法

### 2.1 实验动物的饲养与处理及细胞培养

见第二部分2.1及第三部分2.1

### 2.2 Western blot

MIN6细胞(3×10 5个/孔)接种6孔板，于不同时相点用LIGHT (5μg/ml)和IFN-γ(100 ng/ml)单独或联合处理细胞。另一些实验中，细胞用LIGHT和IFN-γ联合处理细胞12 h之前，用STAT1特异的抑制剂Flud 或NF-κB的抑制剂PDTC预处理1h。收获细胞，提取细胞总蛋白并测定蛋白质含量。SDS-PAGE电泳分离蛋白样品，将凝胶中的蛋白质转印至PVDF膜上。采用一定比例稀释的Caspase-3、

cleaved Caspase-3、STAT1、pSTAT1、Cyto C、Caspase-9、Bcl-2、Bax、Bak和PARP，β-actin 一抗孵育PVDF膜，再利用一定比例稀释的二抗孵育PVDF 膜，ECL显色，胶片显影。以β-actin为参照。上述实验重复2-3次。

Western blot实验步骤祥见第三部分2.7

### 2.3 免疫细胞化学

MIN6细胞（4×105个/孔）接种于多聚赖氨酸处理的盖玻片上，盖玻片置于六孔板内，细胞培养按前述方法进行。用LIGHT（5μg/ml）＋IFN-γ（100 ng/ml）刺激

MIN6细胞16～24 h。取出盖玻片，PBS洗涤。4%多聚甲醛固定20 min左右，PBS

洗涤。滴加含0.5％Triton x-100的5％BSA，通透15min左右，PBS 洗涤。滴加3％

H2O2避光孵育15min，PBS洗涤。滴加按一定浓度稀释的一抗，4℃孵育过夜，PBS洗涤。滴加按一定浓度稀释的二抗，孵育0.5～1h，PBS洗涤。滴加DAB底物液，自来水冲洗，滴加苏木素复染细胞核，自来水冲洗。干燥后封片，镜检并拍照。

NF-κB活化的免疫荧光染色检测操作如下：MIN6细胞被LIGHT（5μg/ml）

＋IFN-γ（100 ng/ml）处理45min后，取出盖玻片，PBS洗涤，固定，通透，用兔抗小鼠NF-κBp65一抗染色，接着用Cy3标记驴抗兔二抗染色，最后用Hoechst33258染细胞核，激光共聚焦扫描显微镜分析并拍照。上述实验重复2-3次。

### 2.4 免疫组织化学

石蜡切片制作及脱蜡、水化参见第二部分。将切片置于0.01M的枸橼酸钠溶液中进行抗原修复，PBS洗涤。加3％H2O2避光孵育20min，PBS洗涤。滴加5％BSA孵育30min，滴加按一定浓度稀释的一抗，4℃孵育过夜，PBS洗涤。滴加按一定浓度稀释的二抗，孵育0.5～1h，PBS洗涤。滴加DAB底物液，自来水冲洗，用苏木素复染细胞核，自来水冲洗。干燥后封片，镜检并拍照。

### 2.5 MTT法检测细胞活力

MIN6细胞用50μM的NF-κB抑制剂PDTC或50μM的STAT1特异的抑制剂氟达拉滨Flud或不同浓度Caspase抑制剂Z-VAD-FMK、Caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO预处理1h，再用LIGHT+IFN-γ处理48h，MTT检测各组细胞活力。

MTT法操作详见第三部分2.3。

### 2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

用LIGHT+IFN-γ处理MIN6细胞48h之前，先用不同浓度的Caspase抑制剂Z-VAD-FMK或Caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO预处理细胞1h，FCM检测细胞凋亡率。FCM操作见第三部分2.4.

### 2.7 Caspase-3活性检测

Caspase-3活性检测操作步骤参见Caspase-3比色测定试剂盒提供的说明书，即收集被细胞因子处理后的MIN6细胞裂解液，加Caspase-3底物(Ac-DEVD-pNA)与细胞裂解液一起在37℃至少孵育2h。多功能读板机读出由Ac-DEVD-pNA释放出来的pNA在400nm的OD值。用不同浓度的pNA标准品对应OD400值绘制标准曲线，Caspase-3活性通过其催化生成的产物的OD400值，查标准曲线而得出。上述实验重复2-3次。

### 2.8 统计学分析

采用GraphPad Prism 5.0统计软件进行分析，数据以（*x*±s）表示，统计方法采用方差齐性分析和非配对的t检验，以P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 rmLIGHT＋rmIFN-γ促进了线粒体内Cyto C的释放

NOD小鼠胰岛素瘤MIN6细胞经rmLIGHT和rmIFN-γ联合处理后，于不同时相点收集细胞质蛋白，采用Western blot技术检测细胞质中Cyto C的水平，以线粒体蛋白COX4做Cyto C的定位对照[56]。结果表明，与未处理时（即0时）相比，随着处理时间的增加，细胞质中Cyto C的水平逐渐增加，1时以后升高明显，差异具有统计学意义（结果见Figure 4.1），提示rmLIGHT联合rmIFN-γ能促进线粒体内Cyto C的释放。



图4.1 rmLIGHT+rmIFN-γ对MIN6细胞质中Cyto C 含量的影响（n=3）

Figure 4.1 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γon cytoplasmic Cyto C content in MIN6 cells (n=3)

**\*:** *P*<0.05, **\*\***: *P*<0.01, νs 0 时

### 3.2 多种Caspase活化发Th于rmLIGHT＋rmIFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡

3.2.1 rmLIGHT＋rmIFN-γ对MIN6细胞Caspase蛋白裂解的影响

几条细胞凋亡信号通路中，半胱氨酸蛋白水解酶（Caspase）起着凋亡执行者的作用。通常凋亡刺激剂或促炎症细胞因子与受体结合诱导了死亡信号传递复合体

（death-inducing signaling complex, DISC）的形成，DISC再激活相关的凋亡信号通路。DISC的活化导致了起始Caspase（Caspase-2, -8, -9, -12）的募集，这些起始Caspase被裂解活化放大凋亡信号，然后激活效应Caspase（Caspase-3, -6, -7）。效应Caspase通过降解数百种调节蛋白引起核酸内切酶和其他蛋白的活化而执行凋亡程序。为了探讨Caspase活化是否涉及LIGHT+IFN-γ诱导的MIN6细胞凋亡，我们用Western blot技术检测了Caspase-3, -8, -9的表达及分析Caspase活化。Caspase-3活化时将出现19KD和17KD的裂解片段，Caspase-8形成45KD和18KD裂解片段，Caspase-9出现39KD和37KD裂解片段。如图Figure 4.2所示，Caspase-3, -8, -9在LIGHT和IFN-γ联合处理0.5时以后出现明显的裂解片段，且随着处理时间的增加，裂解片段含量越多。以上结果提示，LIGHT和IFN-γ的处理诱导了Caspase-3, -8, -9的活化，Caspase-8, -9的活化表明LIGHT和IFN-γ可能通过死亡受体途径和线粒体途径进行信号传递。



图4.2 rmLIGHT+rmIFN-γ对MIN6细胞Caspase裂解的影响

Figure 4.2 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γon Caspase cleavage in MIN6 cells

3.2.2抑制Caspase活性对rmLIGHT＋rmIFN-γ诱导的MIN6细胞凋亡的影响

为了证实Caspase活化在rmLIGHT+rmIFN-γ诱导的细胞凋亡中的作用，我们用LIGHT+IFN-γ处理MIN6细胞48h之前，预先用不同浓度的广谱Caspase抑制剂Z-VAD-FMK或Caspase-3特异抑制剂Ac-DEVD-CHO预处理细胞1h, MTT法检测细胞活力变化，FCM检测细胞凋亡率。结果见Figure 4.3，LIGHT+IFN-γ诱导的细胞死亡在一定程度上，被Caspase抑制剂Z-VAD-FMK和Caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO抑制，且Caspase抑制剂Z-VAD-FMK的抑制作用更明显（（LIGHT

＋IFN-γ组细胞早期凋亡率：59.3％＆LIGHT＋IFN-γ＋50μm Z-VAD-FMK组细胞早期凋亡率：31.5％＆LIGHT＋IFN-γ＋50μmAc-DEVD-CHO 组细胞早期凋亡率：

47.4％），但细胞凋亡率仍处于较高水平。提示LIGHT+IFN-γ 诱导的细胞凋亡有

Caspase参与，但也可能存在非依赖Caspase，特别是非依赖Caspase-3的其他形式参与这种细胞凋亡。



图4.3 抑制Caspase活性对rmLIGHT+rmIFN-γ诱导的细胞凋亡的影响

Figure 4.3 Effect of inhibiting Caspase activity on rmLIGHT + rmIFN-γ-induced MIN6 cell

apoptosis

注：a: 不同浓度的Caspase抑制剂Z-VAD-FMK或Caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO预处理细胞1h，再用LIGHT+IFN-γ处理MIN6细胞48h, MIN6细胞活力的变化；

b: 50μM的Caspase抑制剂Z-VAD-FMK或Caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO预处理细胞1h，再用LIGHT+IFN-γ处理MIN6细胞48h, MIN6细胞凋亡率的变化。

3.2.3 rmLIGHT＋rmIFN-γ对MIN6细胞的Caspase-3活性的影响

为进一步明确Caspase的活性在LIGHT+IFN-γ诱导的MIN6细胞凋亡中所起的重要作用，我们用比色法检测了下游的效应Caspase之一即Caspase-3的活性。结果显示，LIGHT+IFN-γ处理细胞1h后，细胞内Caspase-3的活性明显增加（Figure 4.4）。用免疫细胞化学的方法也证实LIGHT+IFN-γ处理细胞16h，细胞内出现明显的Caspase-3裂解片段，即Caspase-3被活化（Figure 4.5）。



图4.4 rmLIGHT+rmIFN-γ对Caspase-3活性的影响（n=3）

Figure 4.4 Effect of rmLIGHT + rmIFN-γon Caspase-3 activity in MIN6 cells (n=3)

**\*:** *P*<0.05, **\*\***: *P*<0.01, νs 0 时



图4.5 LIGHT+IFN-γ对MIN6细胞cleaved Caspase-3水平的影响（×200）

Figure 4.5 Effect of LIGHT and IFN-γon cleaved Caspase-3 in MIN6 cells (×200)

注：箭头指示的棕色表示cleaved Caspase-3

3.2.4 LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞内cleaved Caspase-3的水平

进一步用免疫组化法观察12周龄LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞内裂解的Caspase-3水平。结果如Figure 4.6所示，LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞未见明显的cleaved Caspase-3，对照LIGHT＋/＋NOD小鼠胰岛内淋巴细胞浸润明显，周缘有清晰可见的棕色着色，说明对照NOD小鼠胰岛的部分细胞内已出现Caspase-3活化，LIGHT敲除后，Caspase-3活化被抑制。提示Caspase-3可能参与了NOD小鼠胰岛细胞凋亡过程，它的激活可能与LIGHT信号传递有关。



图4.6 LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞内Caspase-3未活化（×20） Figure 4.6 Caspase-3 inactivation in islet cells of LIGHT-/- NOD mice (×20)注：箭头指示的棕色表示cleaved Caspase-3

以上数据表明，Caspase参与了LIGHT+IFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡，Caspase-3可能是涉及的主要Caspase之一。

### 3.5 效应Caspase的作用底物PARP在MIN6细胞中被裂解

效应Caspase如Caspase-3, -7得到从线粒体或死亡受体传来的凋亡信号，裂解活化，然后将信号转导至PARP，引起PARP的裂解失活。PARP是DNA修复酶，PARP裂解将失去修复DNA的正常功能，从而激活细胞内受PARP负调控的核酸内切酶，核酸内切酶降解DNA导致核小体DNA断裂[101]。Western blot结果表明，PARP在LIGHT+IFN-γ的作用下发生裂解，LIGHT+IFN-γ处理1h后，PARP即出现明显的裂解片段（Figure 4.7）。提示，PARP 的裂解从另一方面说明Caspase 在LIGHT+IFN-γ诱导的MIN6细胞凋亡中被激活。



图4.7 PARP在rmLIGHT+rmIFN-γ诱导的MIN6细胞凋亡中被裂解

Figure 4.7 PARP was cleaved in rmLIGHT + rmIFN-γ-induced MIN6 cell apoptosis

### 3.6 Bcl-2基因家族成员在LIGHT＋IFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡中的表达变化

3.6.1 Bcl-2基因家族成员在LIGHT＋IFN-γ诱导MIN6细胞凋亡中的蛋白表达变化

Bcl-2蛋白家族是细胞凋亡的线粒体途径中起决定作用的调控者，直接调节线粒体内Cyto C的释放。为证实Bcl-2家族是否涉及LIGHT+IFN-γ 诱导的MIN6细胞凋亡途径，我们采用Western blot、免疫细胞化学法观察主要Bcl-2基因家族成员的蛋白表达水平变化。结果显示，抗凋亡的Bcl-2基因的蛋白表达随处理时间

的增加，变化不明显，在24h稍有下降。另一抗凋亡基因Bcl-XL从0.5h起蛋白表达明显降低，而促凋亡基因Bax、Bak表达上调。另一促凋亡蛋白Bid全长片段（22KD）含量从1h 起呈下降趋势，但其裂解片段（15KD）水平有一定的增加

（Figure 4.8）。



图4.8 Bcl-2蛋白家族成员在rmLIGHT+rmIFN-γ 诱导的MIN6细胞凋亡中的变化 Figure 4.8 Alleosis of Bcl-2 family members protein expression in rmLIGHT + rmIFN-γ-induced MIN6 cell apoptosis

继续用免疫细胞化学法检测线粒体功能障碍的主要调节者——促凋亡基因Bax在LIGHT+IFN-γ处理MIN6细胞16h的蛋白质表达，染色结果提示，细胞内Bax在LIGHT+IFN-γ的作用下表达增加（Figure 4.9）。



图4.9 rmLIGHT+rmIFN-γ对MIN6细胞Bax蛋白表达的影响（×200）

Figure 4.9 Effect of rmLIGHT and rmIFN-γon Bax protein expression in MIN6 cells (×200)

注：箭头指示的棕色表示Bax

3.6.2 Bax基因在LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞中的蛋白表达

制作小鼠胰腺组织石蜡切片，进一步用免疫组化法检测胰岛细胞内Bax基因的蛋白质表达。结果显示，与对照NOD小鼠相比，LIGHT-/- NOD小鼠胰岛仅有少量的棕色着色；而对照组有明显的淋巴细胞浸润，棕色着色明显增加（Figure 4.10）。提示，LIGHT信号传递与Bax基因的表达存在一定相关性。



图4.10 Bax在LIGHT-/- NOD小鼠胰岛细胞中的表达（×200）Figure 4.10 Protein expression of Bax in LIGHT-/- NOD mice (×200)注：箭头指示的棕色表示Bax

以上数据表明，Bcl-2蛋白家族主要成员涉及LIGHT途径诱导的胰岛细胞凋亡。细胞凋亡过程中，抗凋亡分子Bcl-XL下调，促凋亡分子Bax上调是主要的变化。

### 3.7 IFN-γ/LIGHT诱导转录因子STAT1活化，调节Bax、Bak表达

转录因子STAT1是IFN-γ信号途径的一种重要的上游分子，其是否在LIGHT/IFN-γ协同诱导MIN6细胞的凋亡中发挥作用，是否能调节Bcl-2基因家族成员的表达？Western-blot技术检测细胞被rmIFN-γ＋rmLIGHT联合处理后，细胞内STAT1和p-Tyr(701) STAT1的蛋白表达。结果显示，STAT1及其磷酸化形式在rmLIGHT+rmIFN-γ 处理1h表达最强，之后有所降低（Figure 4.11 A）；单独rmLIGHT作用不能诱导STAT1 的磷酸化。受rmIFN-γ 激活而磷酸化的STAT1，在有

rmLIGHT 存在时，STAT1 磷酸化水平有增加趋势（Figure 4.11 B），提示rmLIGHT

增强了rmIFN-γ对STAT1 磷酸化作用的诱导。



图4.11 rmIFN-γ/rmLIGHT诱导MIN6 细胞的STAT1 表达及STAT1 磷酸化

Figure 4.11 STAT1 protein expression and STAT1 phosphorylation induced by rmIFN-γ+ rmLIGHT in MIN6 cells

为考察STAT1是否涉及调节Bcl-2家族主要促凋亡基因的蛋白表达，我们用50μM STAT1特异的抑制剂Flud [102]预先处理MIN6细胞1h，再用IFN-γ＋LIGHT处理细胞1h, Western blot法检测Bcl-2家族主要促凋亡基因Bax、Bak的表达变化。如Figure 4.12所示，Flud明显降低了STAT1的表达及磷酸化STAT1的水平（*P*<0.05）；与对照c组（IFN-γ＋LIGHT组）相比，b组（Flud＋IFN-γ＋LIGHT组）的Bax、

Bak 表达下调（*P*<0.05），但b 组Bax、Bak 蛋白水平仍高于a 组（正常对照组即

PBS+Flud组）。提示STAT1可能具有促进Bax、Bak表达上调的作用，运用STAT1特异的抑制剂Flud部分地抑制了Bax、Bak表达上调，可能由于Bax、Bak的表达还受其他转录因子的调节。





图4.12 Flud抑制了rmIFN-γ/rmLIGHT诱导的Bax、Bak的上调（n=3）

Figure 4.12 Flud inhibited upregulation of Bax and Bak induced by rmIFN-γ+ rmLIGHT（n=3）

**\*:** *P*<0.05, **\*\***: *P*<0.01，νs c 组

注：a组: PBS+Flud; b组: IFN-γ+LIGHT+Flud; c组: IFN-γ+LIGHT

继续用Flud预处理MIN6细胞1h，再用IFN-γ＋LIGHT处理细胞48h, MTT

法分析rmIFN-γ/rmLIGHT诱导转录因子STAT1的活化被Flud抑制后，MIN6细胞

活力变化。由Figure 4.13可见，与对照LIGHT+IFN-γ组相比，Flud＋IFN-γ＋LIGHT组细胞活力明显增加，*P*=0.0317，但未达到正常对照组水平。



图4.13 Flud部分抑制了rmIFN-γ/rmLIGHT对MIN6细胞的毒性作用（n=3）

Figure 4.13 Flud partly inhibited the toxic effect induced by rmIFN-γ+ rmLIGHT in MIN6 cells

（n=3）

**\*:** *P*<0.05, νs LIGHT+IFN-γ 组

以上数据表明，STAT1介导促凋亡蛋白Bax、Bak的上调可能涉及LIGHT+IFN-γ

诱导的MIN6细胞凋亡，Bax、Bak的表达还可能受其他转录因子的调节。

### 3.8 LIGHT /IFN-γ诱导激活转录因子NF-κB，调节Bcl-XL、Bax的表达

3.8.1 LIGHT /IFN-γ诱导激活转录因子NF-κB

促炎症细胞因子如TNF-α、IL-1β激活转录因子NF-κB活跃地参与了胰岛β细胞存活与死亡[103]。在HT-29细胞中，IFN-γ促进LIGHT途径诱导的NF-κB信号传递而促使了细胞死亡[17]。那么，LIGHT途径是否能诱导胰岛素瘤MIN6细胞的NF-κB活化且其信号传递是否受IFN-γ的影响，是否涉及β细胞死亡？为了进一步探讨LIGHT /IFN-γ诱导β细胞凋亡的上游事件，我们采用Western blot法检测了细胞质中NF-κB p65亚单位和调控NF-κB活化的关键蛋白IκB-α的蛋白水平。如Figure 4.14所示，细胞质中NF-κB的调控蛋白IκB-α和NF-κB p65亚单位随着LIGHT+IFN-γ处理时间的增加，含量逐渐降低。用LIGHT和IFN-γ单独或联合处理细胞1h，Western

blot结果显示，与Untreated组相比，IFN-γ对NF-κB p65亚单位的细胞质水平无影响，而LIGHT组和LIGHT+IFN-γ组明显低于Untreated组（Figure 4.14）。提示，转录因子NF-κB的活化与LIGHT途径的信号传递有关。



图4.14 LIGHT/IFN-γ 诱导MIN6 细胞转录因子NF-κB 的活化

Figure 4.14 NF-κB activation induced by LIGHT and IFN-γin MIN6 cells

进一步用免疫荧光法检测NF-κB p65亚单位核转移的情况，免疫荧光染色结果显示，与未处理组（0h）相比，MIN6细胞经LIGHT/IFN-γ处理1h，细胞核中NF-κB

p65亚单位水平明显增加（Figure 4.15）。提示，在LIGHT/IFN-γ的作用下，NF-κB p65

亚单位进行了核转移。



图4.15 受LIGHT/IFN-γ活化的NF-κB p65亚单位从细胞质向细胞核转移

Figure 4.15 Activated NF-κB p65 subunit transferred from cytoplasm to nucleus

以上数据表明，LIGHT/IFN-γ可能促进了IκB-α和NF-κB的分离及IκB-α的降解，同时也诱导了活化的NF-κB从细胞质向细胞核转移。

3.8.2活化的转录因子NF-κB调节Bcl-XL、Bax的表达

上述Figure 4.7结果显示，LIGHT /IFN-γ处理MIN6细胞后，Bcl-XL的表达明显下调并具有时间依赖性。文献报道，胰岛β细胞中NF-κB活化与Bcl-XL的表达密切相关[104]。为了探讨受LIGHT /IFN-γ激活的NF-κB是否能调节Bcl-XL、Bax基因的表达，我们用50μM NF-κB的有效抑制剂PDTC[105]预先处理细胞1h，再用LIGHT＋IFN-γ处理细胞12 h, Western blot检测细胞质中NF-κB p65与Bcl-XL、Bax的蛋白表达。结果显示，与a组（LIGHT＋IFN-γ组）相比，b组（PDTC＋LIGHT

＋IFN-γ组）细胞质中NF-κB p65与Bcl-XL水平明显增加，而Bax表达下调（*P*<0.05）

（Figure 4.16）。提示PDTC的预处理一定程度上抑制了NF-κB的活化，增加了Bcl-XL

的表达，下调Bax。



图4.16 PDTC对MIN6细胞质NF-κB p65与Bcl-XL蛋白表达的影响（n=3）

Figure 4.16 Effect of PDTC on NF-κB p65 and Bcl-XL protein expression in MIN6 cells (n=3)

**\*:** *P*<0.05, νs a 组

注：a: LIGHT+IFN-γ；b: LIGHT+IFN-γ+PDTC; c: PBS +PDTC

继续用PDTC预处理MIN6细胞1h，IFN-γ＋LIGHT处理细胞48h, MTT法分析，LIGHT/IFN-γ诱导的转录因子NF-κB的活性被抑制后，MIN6细胞活力的变化。如Figure 4.17所示，与对照LIGHT+IFN-γ组相比，PDTC＋IFN-γ＋LIGHT组细胞活力明显增加，*P*<0.05。但未恢复到未处理组水平。



图4.17 PDTC部分抑制了rmIFN-γ/rmLIGHT对MIN6细胞的毒性作用（n=3）

Figure 4.17 PDTC partly inhibited the toxic effect induced by rmIFN-γ+ rmLIGHT in MIN6 cells

（n=3）

**\*:** *P*<0.05, νs IFN-γ＋LIGHT 组

以上数据表明，转录因子NF-κB介导的抗凋亡蛋白Bcl-XL下调、促凋亡蛋白

Bax上调可能涉及LIGHT+IFN-γ诱导的MIN6细胞凋亡。

## 4 讨论

促炎症细胞因子和它们的相互作用在T1DM的发生和发展中可能出现不同的变化，更好而全面了解β细胞中不同细胞因子组合诱导的凋亡机制将有利于未来个性化治疗开展。LIGHT是T细胞活化的主要共刺激分子之一，同时又兼有对细胞的毒性作用。文献报道，LIGHT途径参与胰岛β细胞的破坏，但其分子机制尤其是对细胞毒性作用机制仍不清楚。本部分研究，我们主要探讨LIGHT联合活化的T细胞、NK细胞等分泌的促炎症因子IFN-γ诱导胰岛细胞凋亡的分子机制。

胰岛β细胞死亡主要由细胞凋亡引起，凋亡是一种自主的程序性细胞死亡形式，Caspase蛋白家族在凋亡过程中起着关键作用[106]。Caspases家族分为两类：起始（上游）Caspase和效应（执行）Caspase，起始Caspase（如Caspase-2, -8, -9等）通过裂解效应Caspase无活性酶原形式而激活效应Caspase；效应Caspase如Caspase-3, -6, -7依次裂解细胞内其他蛋白底物如PARP、DFF等引起蛋白底物活性发生变化，如PARP被裂解失活，致使细胞内受PARP负调控的核酸内切酶被激活而引起核小体DNA断裂，触发细胞凋亡程序[107-109]。

经典的细胞凋亡途径包括死亡受体途径、内质网途径和线粒体途径。其中线粒体途径信号传递路径为：信号传递汇聚至线粒体，导致线粒体膜通透化，Cyto C从线粒体基质中释放出来。Cyto C一旦进入细胞质，便与凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)结合，从而使Caspase-9与Apaf-1解聚并激活Caspase-9 [110,111], Caspase-9再激活效应Caspase触发细胞凋亡。

线粒体结构和功能的完整性受Bcl-2蛋白家族的调节。Bcl-2家族成员根据在细胞凋亡中的功能不同也可分为两类，一类是抗凋亡蛋白如：Bcl-2、Bcl-XL等；另一类是促进凋亡蛋白如：Bax、Bak、Bid、Bad等。通常认为，正常细胞内抗凋亡蛋白通过与促凋亡蛋白形成异源二聚体，抑制促凋亡蛋白形成寡聚体改变线粒体结构而预防凋亡发生，如果抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白解聚易导致凋亡的发生[112, 113]。

本研究中，我们以MIN6细胞和LIGHT-/- NOD小鼠为研究对象，rmLIGHT和rmIFN-γ联合作用NOD小鼠胰岛素瘤细胞株MIN6细胞，通过时间梯度获得蛋白质，进行Western blot 或免疫细胞化学分析．随着作用时间的增加，细胞内Bcl-XL

水平明显降低，Bax 、Bak 含量显著增加，Bid被裂解（Figure 4.7, Figure 4.8），随之Cyto C 释放也相应增加（Figure 4.1），导致线粒体通路下游的Caspase-9 和Caspase-3 相应被激活（Figure 4.2, Figure 4.3, Figure 4.4, Figure 4.5）。Caspase-3 是

Caspase级联反应中一种共同的下游效应分子，是凋亡的执行者，激活后引起PARP的裂解（Figure4.7）。LIGHT-/- NOD小鼠胰腺的免疫组化结果也显示缺失LIGHT途径，主要促凋亡基因Bax表达下调，Caspase-3活性被抑制。以上数据提示内在的线粒体凋亡途径在LIGHT/IFN-γ介导的β细胞凋亡中发挥积极作用。我们还在MIN6细胞中观察到Caspase-8前体明显裂解，Caspase-8活化后可通过裂解Bid调节线粒体功能[101]。此外，Caspase-8的活化还受死亡受体途径信号传递的调控。LIGHT/IFN-γ介导的β细胞凋亡途径也可能存在外在的死亡受体途径，至于死亡受体途径中的Fas及FasL的表达有何变化，有待进一步研究。

既然线粒体通路在LIGHT/IFN-γ介导的β细胞凋亡中发挥重要作用，那么，线粒体通路如何被调节即LIGHT/IFN-γ途径信号传递的可能下游事件是什么，是我们下一步想要明确的问题。转录因子STAT1是IFN-γ信号转导途径中重要的一员，充当生长抑制子和凋亡促进子。IFN-γ与受体结合通过JAK2使STAT1磷酸化，STAT1的磷酸化诱导自身二聚化而活化，向细胞核转移并与DNA结合调节相关基因表达，在IFN-γ诱导的细胞凋亡中起关键作用[11]。本研究中，IFN-γ和LIGHT联合处理MIN6细胞，磷酸化和非磷酸化的STAT1水平在1h表达最强，随后有下降趋势；单独的LIGHT处理不能诱导STAT1表达，但与IFN-γ联合能增强IFN-γ对STAT1的诱导（Figure 4.10）。以上结果表明STAT1的活化参与了IFN-γ和LIGHT诱导的细胞凋亡。STAT1是否调节Bcl-2家族的蛋白表达参与凋亡的线粒体途径？我们在用细胞因子处理MIN6细胞之前，先用STAT1特异的抑制剂Flud对细胞预先处理，

Flud逆转了Bax和Bak的上调（Figure 4.11），增加了细胞活力（Figure 4.12），表明STAT1调节Bcl-2家族成员Bax和Bak表达与IFN-γ/LIGHT诱导的细胞凋亡有关。至于STAT1是直接调节Bcl-2家族基因的表达，还是通过其它分子如IFN-γ调节因子-1（IFN regulatory factor -1, IRF-1）的作用而间接调节？单独的IFN-γ处理为什么仅对细胞产生轻微的毒性作用？有待深入研究。

我们在第三部分的研究中发现LIGHT单独作用于MIN6细胞仅对细胞产生轻

微的毒性作用，但LIGHT与IFN-γ结合毒性明显增强。这种协同效应的机制除了IFN-γ途径诱导STAT1活化上调促凋亡蛋白Bax和Bak外，LIGHT途径的下游事件和它是否能调控Bcl-2基因家族主要成员的表达是我们接下来感兴趣的问题。LIGHT与受体LTβR结合通过TNF受体相关因子（TRAF）2,3,4,5激活转录因子NF-κB[114-115]。激活的NF-κB在胰岛β细胞存活与死亡中起重要作用[103]。尽管目前对于NF-κB在T1DM中的作用已在动物模型的免疫系统和β细胞中进行了一定的研究，但NF-κB活化究竟是促进β细胞死亡还是抑制β细胞死亡存在争议，机制仍然不是很清楚。一般认为不同的细胞因子经不同途径活化的NF-κB，在决定β细胞生死的命运上可能起着截然相反的作用。如单独受TNFα激活的NF-κB是通过促进抗凋亡基因Bcl-XL、c-flip、XIAP、A20的表达而对细胞起保护作用。但有IFN-γ存在时，TNFα和IFN-γ对细胞的毒性作用明显增强具有协同效应，可能由于转录因子STAT1进一步活化，上调了促凋亡基因的表达或者受IFN-γ的影响，活化的NF-κB抑制抗凋亡基因表达上调所致[116]；受IL-1β激活的NF-κB通过上调Fas、iNOS的表达而诱导细胞死亡[116]。那么，LIGHT途径是否能诱导胰岛素瘤MIN6细胞的NF-κB活化且其信号传递是否涉及β细胞死亡？目前没有报道。

NF-κB是一种能被炎症细胞因子、趋化因子等多种因素激活的常见转录因子，亚基包括p65(即RelA)、RelB、C-Rel、p50和p52. NF-κB常以p65/p50或p65/p65形式形成同源或异源二聚体，未被激活时与IκB-α形成复合物，存在于胞浆中。受刺激剂的刺激，IκB-α发生磷酸化后易被泛素-蛋白酶体途径降解。NF-κB与IκB-α解聚后，暴露出核定位序列，被转运至细胞核内促进NF-κB依赖的基因转录。我们采用Western blot法检测了细胞质中调控NF-κB的关键蛋白IκB-α和NF-κB p65亚单位的水平并用免疫荧光法检测p65亚单位核转移的情况。细胞质中NF-κB的调控蛋白IκB-α和NF-κB p65亚单位随着LIGHT /IFN-γ处理时间的增加，含量逐渐降低，IFN-γ对NF-κB p65亚单位含量无影响（Figure 4.13）。通过免疫荧光染色检测NF-κB的主要亚基p65被转移到细胞核内的情况，可判断NF-κB是否被激活。我们的免疫荧光染色结果显示，与未处理组（0时）相比，MIN6细胞经LIGHT /IFN-γ处理1h，细胞核中NF-κB p65亚单位水平明显增加（Figure 4.14）。为了进一步探讨NF-κB活化与Bcl-XL、Bax的表达是否存在相关性，我们用NF-κB的有效抑制剂PDTC[105]

预先处理细胞，细胞质中NF-κB p65与Bcl-XL水平明显增加，Bax表达下调（*P*<0.05）

（Figure 4.14），增加了细胞活力（Figure 4.15），说明PDTC的预处理抑制了NF-κB的活化，上调Bcl-XL和下调Bax。提示LIGHT /IFN-γ可能促进了IκB-α和NF-κB的分离及IκB-α的降解，同时诱导了活化NF-κB的从细胞质向细胞核转移，一定程度上抑制了Bcl-XL的表达，增加了Bax的表达。单独的LIGHT处理细胞仅具轻微毒性，是否也和TNF-α一样，通过诱导NF-κB活化提高抗凋亡基因的表达而保护细胞？需要深入研究。

综上所述，LIGHT联合IFN-γ作用胰岛β细胞，激活了转录因子STAT-1和NF-κB，使Bcl-XL、Bax、Bak、Cyto C、Caspase-8, -9, -3、PARP的表达及活性都呈时间依赖性发生相应改变，最终导致细胞凋亡的发生。因此，我们推测，LIGHT和IFN-γ可能主要通过转录因子STAT-1和NF-κB介导线粒体途径而诱导胰岛β细胞凋亡（Figure 4.18）。以上研究提示，转录因子STAT-1或NF-κB可能作为抑制炎症细胞因子破坏胰岛细胞的有效靶点，对T1DM的防治具有重要意义。



图4.18 STAT1 /线粒体途径和NF-κB /线粒体途径涉及LIGHT和IFN-γ诱导的β细胞凋亡Figure 4.18 STAT1/Mitochondria and NF-κB/Mitochondria pathways are involved inβcell apoptosis induced by LIGHT and IFN-γ

IFN-γsignaling triggers STAT1-mediated mitochondrial pathway through upregulation of Bax and Bak as well as LIGHT signaling activates NF-κB-mediated mitochondrial pathway via downregulation of Bcl-XL and upregulation of Bax, followed with Cyto C release and caspase-9 activation. Caspase-9 then activates Caspase-3. The signal from Caspase-3 is transmitted to PARP. Besides, Caspase-8 is activated by death receptor pathway. Caspase-8 is involved in mitochondrial pathway through cleaving Bid, too.

## 5 小 结

（1）LIGHT 途径介导胰岛细胞凋亡的分子机制可能与其协同另一炎症细胞因子

IFN-γ，激活转录因子NF-κB和STAT1有关。

（2）LIGHT/LFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡主要通过调节内在的线粒体凋亡途径实现即下调Bcl-XL，上调Bax、Bak，促进线粒体Cyto C释放，激活Caspase-9, -3。

结 论

1. LIGHT信号通路信号传递增加了炎症细胞因子IFN-γ的分泌，促进了NOD小鼠胰岛炎及胰岛细胞凋亡的形成。

2. 细胞因子LIGHT主要结合受体LTβR直接参与了炎症因子IFN-γ诱导的胰岛细胞凋亡，LIGHT与IFN-γ之间存在协同作用。

3. LIGHT与IFN-γ协同作用诱导胰岛细胞凋亡的分子机制与转录因子STAT1和NF-κB，以及Bcl-XL、Bax、Bak、Cyto C、Caspase-8, -9, -3、PARP等诸多蛋白的表达及活性的改变有关。

参考文献

[1] Dejkhamron P, Menon RK, Sperling MA. Childhood diabetes mellitus: recent advances & future prospects[J]. Indian J Med Res. 2007, 125(3): 231-50.

[2] World Health Report 2010. Url: http://www. who. int/whr2012/2012/archives/2010/en/index. htm

[3] Zhou Z, Xiang Y, Ji L, et al. Frequency, immunogenetics, and clinical characteristics of latent autoimmune diabetes in China (LADA China study): a nationwide, multicenter, clinic-based cross-sectional study[J]. Diabetes, 2013, 62(2): 543-550.

[4] Ahraham RS, Wen L, Marientta EV, et al. Type 1 diabetes-predisposing MHC alleles influence the selection of glutamic acid decarboxylase 65-specific T cells in a transgenic mode[J] J Immunol, 2001, 166(2): 1370-1389.

[5] Phillips JM, Harach SZ, Parish NM, et al. Nondepleting Anti-CD4 has an immediate action on diabetogenic effector cells, halting their destruction of pancreaticβcells[J]. J Immunol, 2000, 165(4): 1949-1958.

[6] Hill NJ, Van Gunst K, Sarvetnick N. Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet- reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice[J]. J Immunol, 2003, 170(4): 1649-1658.

[7] Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes[J]. Nat Rev Endocrinol, 2009, 5(4): 219-26.

[8] Buzasi K, Sapi Z, Jermendy G. Acanthosis nigricans as a local cutaneous side effect of repeated human insulin injections[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 94(2): e34-36.

[9] Mathis D, Venee L, Benoist C. Beta-cell death during Progression to diabetes[J]. Nature, 2001, 414(6865): 792-798.

[10] Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, et al. Neonatalpβ-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes[J]. Diabetes, 2000, 49(1): 1-7.

[11] Kim KA, Lee MS. Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines[J]. Front Biosci, 2009, 14(1): 657-664.

[12] Reiser H, Stedeeker MJ. Costimulatory B7 molecules in the Pathogenesis of infeetious and autoimmune diseases[J]. N Engl J, 1996, 335(18): 1369-1377.

[13] Dong C, Nurieva RI, Prasad DV. Immune regulation by novel costimulatory

Moleeules[J]. Immunol Res, 2003, 28(1): 39-48.

[14] Chen MC, Hsu TL, Luh TY, et al. Overexpression of bcl-2 enhances LIGHT- and interferon-gamma -mediated apoptosis in Hep3BT2 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(49): 38794-38801.

[15] Zhang M, Guo R, Zhai Y, et al. LIGHT sensitizes IFNgamma-mediated apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells leading to down-regulation of anti-apoptosis Bcl-2 family members[J]. Cancer Lett, 2003, 195(2): 201-210.

[16] Zhang MC, Liu HP, Demchik LL, et al. LIGHT sensitizes IFN-gamma-mediated apoptosis of HT-29 human carcinoma cells through both death receptor and mitochondria pathways[J]. Cell Res, 2004, 14(2): 117-124.

[17] ChangYH, Chao Y, Hsieh SL, et al. Mechanism of LIGHT/interferon-gamma-induced cell death in HT-29 cells[J]. J Cell Biochem, 2004, 93(6): 1188-1202.

[18] You RI, Chen MC, Wang HW, et al. Inhibition of lymphotoxin-beta receptor-mediated cell death by survivin-DeltaEx3[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3051-3061.

[19] Li J, Shen F, Wu D, et al. Expression level of Bcl-XL critically affects sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to LIGHT-enhanced and interferon-gamma-induced apoptosis [J]. Oncol Rep, 2007, 17(5): 1067-1075.

[20] Yang D, Ud Din N, Browning DD, et al. Targeting lymphotoxin beta receptor with tumor-specific T lymphocytes for tumor regression[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(17): 5202-5210.

[21] Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, et al. A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2009, 16(4): 295-308.

[22] Kanodia S, Da Silva DM, Karamanukyan T, et al. Expression of LIGHT/TNFSF14 combined with vaccination against human papillomavirus Type 16 E7 induces significant tumor regression [J]. Cancer Res, 2010, 70(10): 3955-3964.

[23] Han B, Wu LQ, Ma X, et al. Synergistic effect of IFN-gamma gene on LIGHT-induced apoptosis in HepG2 cells via down regulation of Bcl-2 [J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2011, 39(4): 228-238.

[24] Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation[J]. Immunol Rev, 2011, 244(1): 169-187.

[25] Wang Y, Zhu M, Yu P, et al. Promoting immune responses by LIGHT in the face of abundant regulatory T cell inhibition [J]. J Immunol, 2010, 184(3): 1589-1595.

[26] Pasero C, Truneh A, Olive D. Cosignaling molecules around LIGHT-HVEM-BTLA: from immune activation to therapeutic targeting [J]. Curr Mol Med, 2009, 9(7): 911-927.

[27] del Rio ML, Lucas CL, Buhler L, et al. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation [J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(2): 223-235.

[28] Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation [J]. Immunol Rev, 2009, 229(1): 244-258.

[29] Fan Z, Yu P, Wang Y, et al. NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8+ T-cell immunity to reject established tumors [J]. Blood, 2006, 107(4): 1342-1351.

[30] Granger SW, Rickert S. LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(3-4): 289-296.

[31] Gill RM, Hunt JS. Soluble receptor (DcR3) and cellular inhibitor of apoptosis-2 (cIAP-2) protect human cytotrophoblast cells against LIGHT-mediated apoptosis [J]. Am J Pathol, 2004, 165(1): 309-317.

[32] Han B, Wu J. DcR3 protects islet beta cells from apoptosis through modulating Adcyap1 and Bank1 expression [J]. J Immunol, 2009, 183(12): 8157-8166.

[33] Zhan C, Patskovsky Y, Yan Q, et al. Decoy strategies: the structure of TL1A: DcR3 complex [J]. Structure, 2011, 19(2): 162-71.

[34] Wu Q, Salomon B, Chen M, et al. Reversal of Spontaneous Autoimmune Insulitis in Nonobese Diabetic Mice by Soluble Lymphotoxin Receptor [J]. J Exp Med, 2001, 193(11): 1327-1332.

[35] Ettinger R, Munson SH, Chao CC, et al. A critical role for lymphotoxin-beta receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice [J]. J Exp Med, 2001, 193(11): 1333-1340.

[36] Lee Y, Chin RK, Christiansen P, et al. Recruitment and activation of naive T cells in the islets by lymphotoxin beta receptor-dependent tertiary lymphoid structure [J]. Immunity, 2006, 25(3): 499-509.

[37] Driver JP, Serreze DV, Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1

Diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease[J]. Semin Immunopathol, 2011, 33(1): 67-87.

[38] Hill NJ, Van Gunst K, Sarvetnick N. Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet- reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice[J]. J Immunol, 2003, 170(4): 1649～1658.

[39] Karlsson MG, Lawesson SS, Ludvigsson J. Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients[J]. Diabetologia, 2000, 43(6): 742-749.

[40] Chung YH, Jun HS, Son M, et al. Cellular and molecular mechanism for Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in DR-BB rats[J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2866-2876.

[41] Kukreja A, Maclaren NK. Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: immune-mediated (type 1) diabetes[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(4): 534-541.

[42] Hirai H, Kaino Y, Ito T, et al. Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets if nonobese diabetic mice[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2000, 13(1): 91-98.

[43] Vincenti F. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation[J]. J Allergy Clin Immunol. 2008, 121(2): 299-306.

[44] Vincenti F, Luggen M. T cell costimulation: a rational target in the therapeutic armamentarium for autoimmune diseases and transplantation[J]. Annu Rev Med. 2007, 58(1): 347-58.

[45] Arreaza GA, Cameron MJ, Jaramillo A, et al. Neonatal activation of CD28 signaling overcomes T cell anergy and prevents autoimmune diabetes by an IL-4-dependent mechanism[J]. J Clin Invest, 1997, 100(9): 2243-2253.

[46] Cameron MJ, Arreaza GA, Delovitch TL. Cytokine- and costimulation-mediated therapy of IDDM[J]. Crit Rev Immunol. 1997, 17(5-6): 537-544.

[47] Balasa B, Krahl T, Patstone G, et al. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulitis and diabetes in nonobese diabetic mice[J]. J Immunol, 1997, 159(9): 4620-4627.

[48] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2002,

20(1): 29-53.

[49] Kroczek R, Hamelmann E. T-cell costimulatory molecules: optimal targets for the treatment of allergic airway disease with monoclonal antibodies[J]. J Allergy Clin Immunol. 2005, 116(4): 9006-9009.

[50] Zhai Y, Guo R, Hsu TL, et al. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer[J]. J Clin Invest, 1998, 102(6): 1142-1151.

[51] Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, et al. Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway[J]. Nat Med, 2000, 6(3): 283-289.

[52] Wang J, Lo JC, Foster A, et al. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cellderived LIGHT[J]. J Clin Invest, 2001, 108(12): 1771-1780.

[53] Ishida S, Yamane S, Ochi T, et al. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor[J]. J Rheumatol, 2008, 35(6): 960-968.

[54] Anand S, Wang P, Yoshimura K, et al. Essential role of TNF family molecule LIGHT as a cytokine in the pathogenesis of hepatitis[J]. J Clin Invest, 2006, 116(4): 1045-1051.

[55] Gurzov EN, Germano CM, Cunha DA, et al. p53 Up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(26): 19910–19920.

[56] Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF, et al. Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells[J]. Diabetes, 2009, 58(8): 1807–1815.

[57] McKenzie MD, Dudek NL, Mariana L, et al. Perforin and Fas induced by IFN-γand TNF-αmediate beta cell death by OT-I CTL[J]. International Immunology, 2006, 18(6): 837–846.

[58] Suk K, Kim S, Kim YH, et al. IFN-γ/TNF-αsynergism as the final effector in autoimmune diabetes: A key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death[J]. Journal of Immunology, 2001, 166(7), 4481–4489.

[59] Mandke R, Singh J. Cationic nanomicelles for delivery of plasmids encoding

Interleukin-4 and interleukin-10 for prevention of autoimmune diabetes in mice[J]. Pharm Res, 2012, 29(3): 883-897.

[60] Mishra PK, Patel N, Wu W, et al. Prevention of type 1 diabetes through infection with an intestinal nematode parasite requires IL-10 in the absence of a Th2-type response[J]. Mucosal Immunol, 2013, 6(2): 297-308.

[61] Scheu S, Alferink J, Potzel T, et al. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis[J]. J Exp Med, 2002, 195(12): 1613–1624.

[62] 张蕙芬. 实用糖尿病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 43-51, 195-222, 236-245.

[63] Bownman MA, Leiter EH, Atkinson MA. Prevention of diabetes in the NOD mice: implications for therapeutic intervention in human disease[J]. Immunol Today, 1994, 15(3): 115-120.

[64] Leiter EH. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Current Protocols in Immunology, 2001, 15(1): Unit 15.9.

[65] Matzinger P. An iunate sense of danger[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 961(1): 341-342.

[66] Hutchings P, Cooke A. Protection from insulin dependent diabetes mellitus afforded by insulin antigens in incomplete Freund'5 adjuvant depends on route of administration[J]. J Autoimmun, 1998, 11(2): 127-30..

[67] Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari Angela, Noelle IU, et al. Analysis of the requirements for the induction of CD4+T cell alloantigen hyporesponsiveness by ex vivo anti-CD40 ligand antibody[J]. J Immunol, 2000, 164(2): 612-622.

[68] McDyer JF, Li Z, John S, et al. IL-2 receptor blockade inhibits late, but not early, IFN-gamma and CD40 ligand expression in human T cells: disruption of both IL-12-dependent and-independent pathways of IFN-gamma production[J]. J Immunol, 2002, 169(5): 2736-2746.

[69] Cai Y, Zhou PJ, Tang XD. Anergic cells induced by the blockade of CD40-CD154 and CD28-B7 costimulatory pathways act as potent immunoregulatory cells in vitro and vivo[J]. Chin Med J, 2004, 117(8): 1178-1183.

[70] Hsu TL, Wu YY, Chang YC, et al. Attenuation of Th1 response in decoy receptor 3 transgenic mice[J]. J Immunol, 2005, 175(8): 5135-5145.

[71] Serreze DV, Chapman HD, Post CM, et al. Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese

Diabetic mice: sometimes an outeome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by irmmunostimulation[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 1352-1359.

[72] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Biochem pharmacol, 1998, 55(8): 1139-1149.

[73] Lightfoot Y L, Chen J, Mathews CE. Role of the mitochondria in immune-mediated apoptotic death of the human pancreaticβcell line bLox5[J]. Plos One, 2011, 6(6): e20617.

[74] Barthson J, Germano CM, Moore F, et al. Cytokines tumor necrosis factor-αand interferon-γinduce pancreaticβ-cell apoptosis through STAT1-mediated Bim protein activation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(45): 39632–39643.

[75] Xu G, Liu D, Okwor I, et al. LIGHT Is Critical for IL-12 Production by Dendritic Cells, Optimal CD4+ Th1 Cell Response, and Resistance to Leishmania[J]. J Immunol, 2007, 179(10): 6901-6909.

[76] Xu Y, Flies AS, Flies DB, et al. Selective targeting of the LIGHT-HVEM costimulatory system for the treatment of graft-versus-host disease[J]. Blood, 2007, 109(9): 4097-4104.

[77] Pakala SV, Ilic A, Chen L, et al. TNF-alpha receptor 1 (p55) on islets is necessary for the expression of LIGHT on diabetogenic T cells[J]. Clin Immunol, 2001, 100(2): 198-207.

[78] Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF, et al. Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells[J]. Diabetes, 2009, 58(8): 1807-1815.

[79] Suk K, Kim S, Kim YH, et al. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death [J]. J Immunol, 2001, 166(7): 4481-4489.

[80] Nakashima K, Kanda Y, Hirokawa Y, et al. MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones [J]. Endocr J, 2009, 56(1): 45-53.

[81] Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis[J]. Diabetologia, 2001, 44(12): 2115-2133.

[82] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805):

770–776.

[83] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points [J]. Cell, 2004, 116(2): 209-215.

[84] Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis [J]. Nat Immunol, 2003, 4(5): 404-409.

[85] Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(3): 437-444.

[86] Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis [J]. Genes Dev, 2003, 17(20): 2481-2495.

[87] Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death [J]. Science, 2001, 292(5517): 727-730.

[88] Zha J, Harada H, Yang E, et al. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-XL[J]. Cell, 1996, 87(4): 619-628.

[89] Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death [J]. Cell, 1995, 80(2): 285–291.

[90] del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt [J]. Science, 1997, 278(5338): 687-689.

[91] Wang HG, Pathan N, Ethell IM, et al. Ca2+-induced apoptosis through calcineurindephosphorylation of BAD [J]. Science, 1999, 284(5412): 339-343.

[92] Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, et al. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3[J]. J Cell Biol, 2005, 170(2): 295-304.

[93] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts [J]. Genes Dev, 1999, 13(22): 2905-27.

[94] Barbu A, Welsh N, Saldeen J. Cytokine-induced apoptosis and necrosis arepreceded by disruption of the mitochondrial membrane potential (∆ψ(m))in pancreatic R1Nm5F cells: prevention by Bcl-2[J]. Mol Cell Endocrinol 2002, 190(1-2): 75–82.

[95] Papaccio G, Graziano A, Valiante S, et al. Interleukin (IL) -1βtoxicity toisletβcells: efaroxan exerts a complete protection[J]. J Cell Physiol, 2005, 203(1): 94–102.

[96] Chang I, Cho N, Kim S, et al. Role of calcium in pancreatic islet cell death by

IFN-gamma/TNF-alpha[J]. J Immunol, 2004, 172(11): 7008–7014.

[97] Kutlu B, Cardozo AK, Darville MI, et al. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells[J]. Diabetes, 2003, 52(11): 2701–2719.

[98] Saldeen J. Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells[J]. Endocrinology, 2000, 141(6): 2003–2010.

[99] Klein D, Ribeiro MM, Mendoza V, et al. Delivery of Bcl-XL or its BH4 domain by protein transduction inhibits apoptosis in human islets[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(2): 473–478.

[100] Kim S, Kim HS, Chung KW, et al. Essential role for signal transducer and activator of transcription-1 in pancreaticβ-cell death and autoimmune type 1 diabetes of nonobese diabetic mice[J]. Diabetes, 2007, 56(10): 2561–2568.

[101] Perchellet EM, Wang Y, Weber RL, et al. Synthetic 1, 4-anthracenedione analogs induce cytochrome c release, caspase-9, -3, and -8 activities, poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage and internucleosomal DNA fragmentation in HL-60 cells by a mechanism which involves caspase-2 activation but not Fas signaling[J]. Biochemical Pharmacology, 2004, 67(3): 523–537.

[102] Torella D, Curcio A, Gasparri C, et al. Fludarabine prevents smooth muscle proliferation in vitro and neointimal hyperplasia in vivo through specific inhibition of STAT-1 activation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6): H2935-2943.

[103] Melloul D. Role of NF-kappaB in beta-cell death[J]. Biochemical Society Transactions, 2008, 36(3): 334–339.

[104] Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways ofβ-cell death and dysfunction [J]. Trends in Cell Biology, 2011, 21( 7): 424–431.

[105] DangLi R, HeKong W, JiQin L, et al. ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H2O2/NF-κB signaling pathway in vascular endothelial inflammation[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 359(1-2): 183-191.

[106] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770–776.

[107] Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family:

Regulators of cellular homeostasis [J]. Nat Immunol, 2003, 4(5): 404–409.

[108] Huang Q, Shen HM. To die or to live: the dual role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage [J]. Autophagy, 2009, 5(2): 273-276.

[109] J Park S, KimJ A, Choi S. Superoxide is a potential culprit of caspase-3 dependent endothelial cell death induced by lysophosphatidylcholine [J]. Physiol Pharmacol, 2010, 61(4): 375-385.

[110] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points [J]. Cell, 2004, 116(2): 205–219.

[111] Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(3): 437–444.

[112] Tan CB, Dlugosz PJ, Peng J. Auto-activation of the apoptosis protein BAX increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by BCL-2[J]. J Biol Chem, 2006, 281(21): 14764–14775

[113] Kumar A, Singh RL, Babu GN. Cell death mechanisms in the early stages of acute glutamate neurotoxicity[J]. Neuroscience Research, 2009, 66(3), 271–282.

[114] Kim YS, Nedospasov SA, Liu ZG. TRAF2 plays a key, nonredundant role in LIGHT-lymphotoxin beta receptor signaling[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(6): 2130-2137.

[115] Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, et al. Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1[J]. J Biol Chem, 1997, 272(22): 14029-14032.

[116] Zhao Y, Krishnamurthy B, Mollah ZU, et al. NF-kappaB in type 1 diabetes[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2011, 10(3): 208-217.

综述

LIGHT/LTβR-HVEM信号通路及其在自身免疫疾病中的作用研究进展

曹朝晖综述尹卫东审校

**【摘要】**LIGHT（TNFSF14）的两个主要受体：HVEM和LTβR，均为TNFR超家族成员。LIGHT-HVEM途径是重要的T细胞共刺激信号途径，而LIGHT-LTβR在改变树突细胞和间质细胞的功能方面发挥重要作用。HVEM还可与两个免疫球蛋白基因超家族成员即抑制T细胞活化的BTLA和CD160相互作用。HVEM在刺激和抑制信号之间充当一种分子开关。人和实验动物模型研究显示LIGHT-LTβR/HVEM途径在自身免疫疾病的炎症反应和病理发生、发展中起重要作用。因此，在免疫相关疾病的免疫干预治疗中，LIGHT可能是一种良好的潜在靶标。本文就LIGHT及其受体的结构、表达、信号转导、生物学功能及在免疫相关疾病中的影响的最新研究进展做一综述，以期进一步明确LIGHT-LTβR/HVEM途径在自身免疫疾病中的作用和意义。

【关键词】LIGHT； LTβR； HVEM； T 细胞； 自身免疫疾病

**Advances on LIGHT-LTβR/HVEM pathway and auto-immunity diseases**

CAO Zhao-Hui reviewed, YIN Wei-Dong edited.

**Abstract:** LIGHT (TNFSF14) activates two cell surface receptors: the Herpesvirus Entry Mediator (HVEM) and the Lymphotoxin-βReceptor, which belong to TNFRSF. LIGHT-HVEM pathway is an important cosignaling pathway for T-Cells, whereas

LIGHT-LTβR modifies the functions of dendritic cells and stromal cells. HVEM also binds two Ig superfamily members, B and T lymphocyte attenuator (BTLA) and CD160 that inhibit T-Cell activation. Thus, HVEM serves as a molecular switch between stimulatory and inhibitory signaling. Studies in humans and experimental animal models reveal that LIGHT-LTβR/HVEM pathway contributes to inflammation and pathogenesis in auto-immunity diseases. LIGHT is accessible to biologic-based therapeutics, which can be used to target this molecule during immune associated diseases. This paper reviews the recent advances in the LIGHT and its receptors on the structure, expression, biological function, signal transduction and the role of LIGHT signaling in auto-immunity diseases.

**Key words**: LIGHT; LTβR; HVEM; T cells; Auto-immunity diseases

自身免疫性疾病(autoimmune disease, AID)发病过程中存在淋巴细胞突变，自身反应性T、B淋巴细胞异常活化和扩增，循环系统中出现大量的细胞因子和炎症介质释放等现象。肿瘤坏死因子( tumor necrosis factor, TNF)相关细胞因子和其受体介导的信号传递参与调节免疫和炎症应答。自身免疫性疾病的发病中, T细胞启动、活化需要识别双信号系统即除了需要T细胞受体(T cell antigen receptor, TCR)识别抗原多肽与MHC（主要组织相容复合物）产生的第一信号，还有赖于抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC) 与T 细胞表面的共刺激分子相互作用而产生的第二信号即共刺激信号。缺乏第二信号的抗原刺激则引起T细胞的耐受。TNF的第14号成员LIGHT(全称为：lymphotoxin like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes)，又名TNFSF14 ( tumor necrosis factor superfamily 14), 或称为HVEM-L ( Herpesvirus entry ediator-Ligand) [1,2]，是近年来发现的一个TNF超家族(TNF super family, TNFSF)的新成员，也是一种强大的共刺激分子，通过参与共刺激信号传递促进T细胞活化。

合理封闭T细胞的一些共刺激途径已应用于自身免疫性疾病的实验治疗并取得良好效果[3]。近10年来涉及树突细胞(dendritic cell, DC)和T细胞之间的受体和配体相互作用引起研究者广泛兴趣和极大热情。有关T细胞共刺激信号的研究取得了

许多新进展[4]。TNF超家族的共刺激分子LIGHT信号通路在调节T细胞功能和维持外周耐受方面有了重要进展，可能在免疫干预治疗中作为潜在靶标而出现，为临床的诊断和治疗提供新的思路，故越来越引起人们的重视。本文主要针对共刺激分子LIGHT及其受体的结构、表达、信号转导、生物学功能及在免疫相关疾病中的作用最新研究进展做一综述。

**1 LIGHT及其受体的结构和表达**

LIGHT及其受体分别属于TNF配体和和受体超家族成员。尽管TNF超家族成员氨基酸残基序列相似性较低，但多重晶体结构研究发现配体和受体的三维立体结构是高度保守的。建立这种立体结构的主要氨基酸残基定义了该家族特有的结构域。LIGHT的受体的每一个富含半胱氨酸结构域（cysteine-rich domain, CRD），均含有半胱氨酸残基，可形成二硫键，二硫键的形成对于建立受体的三级结构是至关重要的。单纯疙疹病毒侵入介质(Herpesvirus entry Mediator, HVEM)在胞外区有三个CRDs区，而淋巴毒素β受体( lymphotoxinβreceptor, LTβR)有四个CRDs区。受体还有一个死亡结构域（Death domain, DD）。受体通常以三聚体形式与配体连接

（图1）。

另一方面，尽管用氨基酸特征性结构来对TNF家族配体进行分类是各不相同的，然而一个共同之处是TNF家族配体的TNF同源结构域（TNF homology domain, THD）已被认定是与受体的CRDs区相互作用的部位[5]。TNF 配体家族成员如LIGHT的分子结构是一种反向平行的β-折叠拓扑构型。Banner等在研究LTα结合TNFR1的结构时发现，TNF 家族配体的A'→A“环和D→E环是与相应受体的CRDs区相互作用的部位[6]。配体与受体之间相互联系位点上的氨基酸残基序列各不相同，但可以根据它们在分子中的位置来预测建立分子模型。Rooney等也证实特定的LIGHT氨基酸残基是LIGHT–HVEM结合所必需的。如果LIGHT的A'→A”环和D→E环引入点突变将改变其与受体的结合特性[7]。LIGHT的119位点(G→E)只改变一个氨基酸会破坏LIGHT–HVEM结合，但不会影响LIGHT 与LTβR 的结合，而如果改变的残基在174位点(Y→F)将影响这两种受体与LIGHT的结合。这一研究表明LIGHT以一种常规的形式结合HVEM, LIGHT结构发生细小的变化

可能有区别地影响其与每一个受体的结合。相反，根据HSV包裹gD 结合HVEM

胞外区的晶体结构分析，gD 以一种非常规方式结合HVEM，是在TNFR1 的同源

LTα 结合位点的相对的一面上[8]。

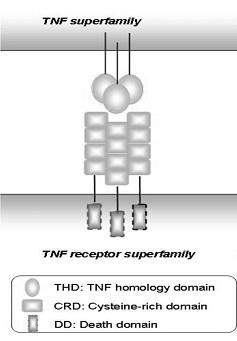


图1 TNF-TNFR的组织结构

TNF配体被描述为同源三聚体II型跨膜蛋白，TNFR被描述为I型跨膜蛋白单体，以三聚体形式与它们的配体相互作用。

Fig1 Structural organization of the TNF-TNFR

The tumor necrosis factor (TNF) ligands are shown as homotrimeric type II transmembrane proteins. The TNF receptor (TNFR) -family molecules are depicted as type I transmembrane monomers that are thought to associate in trimers when interacting with their ligands.

**1.1 LIGHT**

1997年，Mauri[9]等研究单纯疮疹病毒(Herpesvirus, HSV)对活化T淋巴细胞感染的过程时，发现了HVEM的一个新配体，该配体可与HSV的糖蛋白D(gD)竞争结合T细胞表面的HVEM，从而抑制HSV对T细胞的入侵。Mauri 根据这一分子发现的过程和已知功能，将其命名为LIGHT，即T细胞上可诱导表达的，与HSV的糖蛋白D竞争结合HVEM的淋巴毒素类似物。1998年Harrop等用HVEM-Fc融合蛋白在EST数据库中筛选新的TNFSF时，也发现了TNFSF14，并将其命名为HVEM-L[1]。

LIGHT的基因组定位于19pl3.3, LIGHT-cDNA序列全长可编码240个氨基酸，包含一个位于N端，由37个氨基酸组成的细胞内区域、一个由22个疏水的氨基酸残基组成的跨膜区和一个由181个氨基酸组成的胞外区，其第102个氨基酸残基为N-端糖基化位点，具有典型的Ⅱ型膜蛋白的特征[10]。LIGHT在其C 端的胞外区与

TNF超家族其他成员如LTβ( 34 %)、Fas Ligand ( 31 %)、TRAIL ( 28 %)、LTα(27 %)、TNF-α(27 %)具有同源性，其序列的同源性主要存在于形成β折叠结构的氨基酸残基上。LIGHT的C-端TNF同源区可折叠成一个反向平行的β折叠结构并形成同源三聚体[11, 12](图2)。由于剪切方式或酶切位点的不同，通常LIGHT在细胞内有3种存在形式：全长包含240个氨基酸残基，相对分子质量（Mr）约为29000的Ⅱ型跨膜糖蛋白；细胞表面金属酶剪切作用下，以可溶性蛋白（sLIGHT）的形式存在；由204个氨基酸残基组成，缺少跨膜区并仅激活T淋巴细胞的非糖基化蛋白[2, 12]。

LIGHT多以三聚体的形式诱导表达于活化的T、B淋巴细胞、NK细胞和选择性地表达于未成熟DC上[13, 14]。LIGHT和HVEM在T细胞表面于不同时相点表达。RT-PCR结果表明，通过TCR 结合或佛波酯和钙离子载体处理，T 细胞活化后1－2小时内即可检测到LIGHT转录产物存在。T 细胞活化后4小时仍可检测到细胞表面LIGHT水平，峰值出现于24－48时，第5天逐渐降低[15, 16]。与LIGHT在活化的T细胞上诱导表达相比，LIGHT组成性表达于未成熟树突细胞(DCs)，未成熟DCs由脂多糖（LPS）刺激诱导成熟后LIGHT表达立刻下调[14]。未成熟DCs来源于外周血单核细胞，外周血单核细胞培养在含有白介素－4(interleukin (IL) -4)和粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的培养基中。一旦成熟，DCs的表型从高效的外周抗原加工细胞转变成抗原呈递细胞(APCs)，迁移至外周淋巴器官促进淋巴细胞的启动、活化。尽管LIGHT–HVEM信号传递已被认为增加了TCR介导的T cell增殖[14]，但LIGHT不表达于成熟DCs上似乎意味着LIGHT不可能在DC介导的T细胞共刺激中起关键作用。但这并非事实。体外封闭LIGHT减少了DC依赖的T细胞增殖，同种异体移植物T细胞反应需要表达于未成熟DCs上的LIGHT[14]. LIGHT这一活性的机制仍然未明确，Tamada 等[14]对于这种矛盾的解释是DCs 成熟后，从DCs 细胞表面脱落的LIGHT 以可溶的活性形式参与

了T细胞增殖。

近期研究进展已明确了LIGHT 基因转录的启动子和T 细胞活化上诱导

LIGHT基因转录所必需的元件[15]。当T细胞通过TCR活化时，启动一种信号级联放大效应将涉及许多已定义明确的信号传递途径，最终加速转录激活因子NFAT，NF-κB和JNK/AP-1家族成员的激活。Castellano等采用LIGHT启动子的不同元件体外诱变技术和引入显性失活的转录激活因子，发现Jurkat T细胞中NFAT DNA结合活性主要对LIGHT的可诱导转录负责[15]。与这一发现一致的是，用钙神经素抑制剂预处理T细胞，环孢菌素A（cyclosporin A, CsA）封闭NFAT的诱导，有效地预防LIGHT在活化之后的转录诱导[15]。另一些转录激活因子如转录调控因子(E26 transformation-specific 1, ETS-1)和激活物蛋白-1 (activator proteins-1, AP-1)的结合位点被发现对于LIGHT基础性组成式表达更重要[15]，如同在未成熟DCs 上观察的一样[14]。

目前发现LIGHT 主要有3个天然受体[16-18]: HVEM，LTβR 和可溶性诱饵受体3 (soluble decoy receptor 3, DcR3)，它们均为TNFR 超家族成员（图3）。与LIGHT 结合的受体还可与其他配体结合，这些配体被称为瞬时TNF 家族亚群包括TNF，

LTα，LTβ，FasL和TL1A[19]. LIGHT与LTα，LTβ，FasL的氨基酸序列具有高度的同源性，这种同源性反映在LIGHT的受体结合特性类似于LTβR 结合LTαβ，

HVEM 结合LTα，DcR3 结合FasL和TL1A[20]。

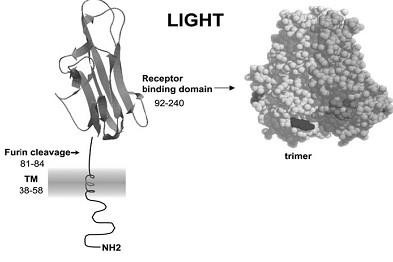


图2 LIGHT的分子模型

Fig 2 Molecular model of LIGHT

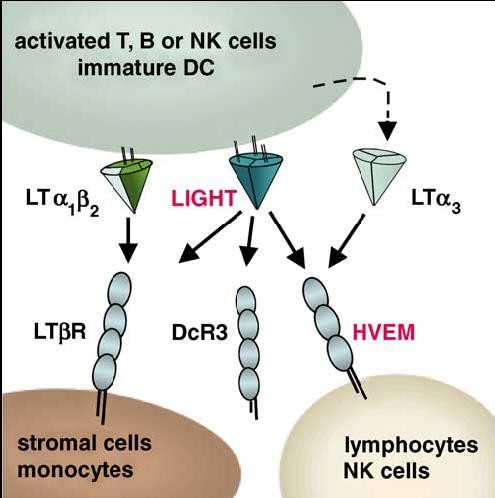


图3 LIGHT结合瞬时TNF超家族受体图示

细胞表面TNF受体超家族成员以单体形式出现，胞外段具有半胱氨酸富集区域（CRD），与受体特异结合的LIGHT的存在形式是三聚体。

Fig3 Schematic representation of LIGHT-binding receptors of the immediate TNF superfamily Cell surface TNF receptor superfamily members are represented as monomers with each extracellular cysteine-rich domain (CRD) defined. Ligands that share receptor specificity with LIGHT are shown as trimers.

**1.2 LIGHT的受体**

**1.2.1 HVEM**

HVEM基因定位于染色体1p36.2-3，在六个TNF受体超家族成员：CD30，OX40, 4-1BB，DR3, AITR和TNFR2的侧面。HVEM的表达广泛分布于造血细胞如T、B细胞、NK细胞和非造血细胞如粘膜上皮细胞的细胞膜上，是典型的I型跨膜糖蛋白。人和鼠类HVEM分别包含283和276个氨基酸残基，具有由4个富含半胱氨酸结构域（cysteine-rich domain, CRD）组成的胞外结构域[21]。它的CRD2 和

CRD3结构域与LIGHT相互作用，产生的效应不依赖CD28共刺激途径，产生的信号主要作用于T 细胞活化的克隆扩增阶段，共刺激诱导以IFN-γ、GM-CSF 及

IL-12等分泌为主的Thl型免疫应答并激发特异性CD8+CTL反应[22]。HVEM与配体的结合关系较复杂，除了LIGHT这个配体外，还可与LTα和gD结合。HVEM与这三个配体结合的部位不同，HSVgD的结合部位位于CRD1和CRD2结构域，而LIGHT与LTα作用于CRD2和CRD3区，尽管它们作用的部位有交叉，但不存在竞争性抑制[21,22]。此外，HVEM还可与两个免疫球蛋白超基因家族成员BTLA和CD160连接来抑制T细胞的活化。BTLA和CD160与HSVgD竞争结合HVEM的CRD1[21]. T细胞上的HVEM与不同的受体结合传递不同的信号，促进或抑制T细胞活化。那么，HVEM与表达于DC或其他活化T细胞上的LIGHT直接结合而传递至T细胞的共刺激信号，以及T细胞上共抑制受体BTLA和／或CD160与表达于DC或Tregs上的HVEM 连接对T细胞转导负性信号，共刺激信号和共抑制性信号谁占优势呢？这可能取决于配体／受体亲和力以及细胞分化不同阶段细胞类型上这些分子表达模式的差异。LIGHT，BTLA和CD160在本质上有不同的亲和力，且与HVEM相互作用的空间位点不同，因此，HVEM在刺激和抑制信号之间充当一种分子开关蛋白。当以上不同受体和配体同时存在时，LIGHT/HVEM和HVEM/BTLA/CD160相互作用的净效应决定反应的结果[21]。

HVEM在静息的T淋巴细胞上高表达，随着T细胞活化的进行而快速降低。当LIGHT水平增加时，而HVEM水平以大致相当的程度降低。T细胞活化后第五天，LIGHT水平下降至基线，HVEM又开始出现于细胞表面，到第6－7天逐渐达到静息水平[23]。因此，LIGHT和HVEM这种短暂彼此相反的表达是否调节新生的活化T细胞之间的LIGHT-HVEM信号传递，仍有待进一步证明。此外，据报道LIGHT可能直接涉及调节T细胞表面HVEM的表达[23]。LIGHT和HVEM之间可能存在负反馈回路，这种负反馈回路可能对于调节LIGHT-HVEM介导的T细胞刺激的持续时间是很重要的。

**1.2.2 LTβR**

LTβR也被称为TNFCR，D12S370，TNFR-RP，TNFRSF3，TNFR2-RP，LT-

BETA-R或TNF-R-III，定位于染色体12p13. LTβR是LIGHT的另一种受体，也是一种I型跨膜糖蛋白，包含435个氨基酸残基，其胞外区有四个CRDs. LTβR 特

异结合淋巴毒素α1β2（LTα1β2）和LIGHT[18]（图2）。尽管HVEM 和LTβR 共有配体LIGHT，但它们有不同的表达形式，HVEM广泛表达于造血细胞，而LTβR主要表达于非血源细胞如大多数器官的间质细胞和实质细胞、肿瘤细胞[24]。LTβR也表达于一些骨髓谱系细胞以及一些单核巨噬细胞[25-27]、树突细胞[28]。T、B细胞，不管是初始，活化还是记忆T、B细胞，可能表达一些或几乎所有TNFRs但不表达LTβR[29]。由于这一原因，LTβR 被认为不是一种直接的共信号分子。然而LTβ

R 通过调节抗原呈递的树突细胞（DCs）、肥大细胞、巨噬细胞和间质细胞分化来间接影响T细胞活化。LTβR-LTβ信号在淋巴组织的形成和维持中发挥重要作用。此外，LIGHT-HVEM信号传递诱导募集TNF受体相关因子2 (TNF receptor associa ted factor2, TRAF2)和TRAF5，而LTβR可通过募集活化TRAF3，随之活化细胞质中细胞凋亡执行者——天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶（cysteine-containing aspa rtate-specific proteases, Caspases），直接诱导细胞凋亡并介导IL-12、RANTES 的分泌[7]。目前发现，许多肿瘤细胞上都有LTβR表达，LIGHT通过与之结合可以直接诱导肿瘤细胞凋亡[29]。

**1.2.3 DcR3**

DcR3基因定位于20q13.3, DcR3-cDNA编码300个氨基酸，相对分子质量约35000，N端前29个氨基酸为信号肽序列，随后是四个CRDs区，有一个N糖基化位点，缺乏跨膜区，是一种分泌型分子。DcR3作为可溶性诱饵受体主要表达于胃、结肠、淋巴结和脾脏以及肺和结肠来源的肿瘤细胞等，通过竞争结合sLIGHT干扰或阻断LIGHT- LTβR/HVEM 信号通路所引发的免疫生物学效应，调节免疫应答和免疫自稳，抑制细胞凋亡，并可作为肿瘤免疫逃逸的手段之一而发挥作用[30,31]。DcR3也能结合FasL并预防FasL介导的细胞凋亡[24]。

**2 LIGHT-HVEM / LTβR的信号转导**

LIGHT信号主要来自活化的T淋巴细胞或未成熟DC表面，再转导至有HVEM或LTβR表达的细胞。作为一个共信号系统，表达于抗原呈递DCs上的LIGHT 与初始T 细胞表面的HVEM 结合，随着抗原的识别，增加初始T 细胞

增殖和分化成效应细胞。而LTβR通过与表达于活化T细胞上的LTαβ或LIGHT结合，控制淋巴器官内DCs的增殖[32]。因此，阻断LTαβ或LIGHT信号传递可能减少涉及T细胞活化的DCs数量，从而减轻炎症的发生。

此外，LIGHT及其受体的信号传递可诱导细胞凋亡的发生。TNFR家族成员如Fas和TNFR1等通过其细胞内的死亡结构域激活Caspase的链式反应，最终引起细胞的凋亡。而不含死亡结构域的TNFR成员如TNFR2、CD40、HVEM和LTβR等可通过TRAF家族成员进行信号传导。HVEM和LTβR在胞质内均包含短肽修饰片段PXQT和IPEEGD的胞质结构域，PXQT和IPEEGD是TRAF的转换接头。HVEM和LTβR的PXQT和IPEEGD能够结合TRAF到配体诱导的受体聚合物上。因此，LIGHT通过与不同靶受体（HVEM、LTβR和TR6）相互作用可触发不同的生物学效应。LIGHT-HVEM通路是T细胞活化重要的共信号传递途径；LIGHT-LTβR通路则通过创建促进免疫反应的组织微环境来调节树突细胞和间质细胞的功能，或通过NF-κB 或JNK/AP-1 通路诱导细胞凋亡。HVEM 和

LTβR 通过与TRAF 相关的信号传导途径激活TRAF1、TRAF2、TRAF3 和

TRAF5, TRAF 再进一步激活NF-κB或JNK/AP-1 通路而发挥作用[33, 34]。同时，

Kim等[43]证明了TRAF2在LIGHT-LTβR介导的转录因子NF-κB和丝裂原激活蛋白激酶JNK的活化中起关键作用。LIGHT-LTβR 信号途径通过募集接头蛋白

TRAF3激活死亡受体通路、线粒体通路等导致的细胞凋亡，而HVEM因不能募集TRAF3而不能诱导细胞凋亡[7](图4)。

Hsu等报道，HVEM可直接与TRAF2和TRAF5相互作用[33]，通过TRAF2和TRAF5使下游的NF-κB和JNK/AP21途径活化，最终导致细胞增殖、分化和细胞因子的产生等[1,33-37]。已有研究表明，用重组人LIGHT作用于静息状态的T细胞，发现可诱导下游的NF-κB通路的活化，并且在TCR的参与下能使NF-κB的活性增强[30]。这一条信号途径中，LIGHT结合HVEM，再与TRAF2/5结合，活化NF-κB 诱导激酶(NFκB-inducing kinase, NIK)，使NF-κB 活化。其具体过程是

NIK通过抑制性κB激酶( the inhibitoryκB kinase, IKK) 1和IKK2 使IκB-NF-κB复合物中的抑制性κB亚单位( the inhibitoryκB, IκB)磷酸化。IκB磷酸化后即与NF-κB 分离，释放出NF-κB 的活性形式并进入细胞核内，从而促进受NF-κB 调

节的基因转录。此外，TRAF2/5也可通过结合凋亡信号调节激酶1 (apoptosis signal-regulating kinase-1, ASK-1)激活依赖JUN的级联，再依次活化转录因子AP-1

[18,39]. TNFR家族成员HVEM除了能与LIGHT结合外，还能与CD28家族成员

BTLA高亲和力结合形成三重复合物，且BTLA和HVEM之间存在直接的特异性相互作用[35]。HVEM 和LIGHT 相互作用促进T细胞的活化，另一方面，HEVM 很可能通过与共抑制性受体BTLA结合来抑制T细胞的活化。迄今为止，LIGHT-HVEM 信号通路在体内功能的研究进展不多，有待于进一步深入研究。

LIGHT-LTβR 信号通路通过募集TRAF3，使细胞质中细胞凋亡的执行者

Caspases活化而导致细胞死亡[7,13,38-42]. Rooney等[7]研究LIGHT与LTβR 结合诱导肿瘤细胞凋亡的下游信号传导途径时，将一个N端去除一段序列的TRAF3突变体转染HT29 细胞，发现LIGHT 对肿瘤细胞的毒性作用减弱。随后，他们将

TRAF2、TRAF3、TRAF5和HVEM或LTβR 共同转染293T细胞，发现HVEM定位于细胞膜，并诱导细胞质内的TRAF2和TRAF5重新分布，但对TRAF3的分布没有影响；而LTβR则与3个TRAFs结合后定位于细胞核附近，HVEM不能诱导细胞的凋亡是由于其不能与TRAF3相互作用。因此，换句话说，LIGHT-LTβR信号通路通过募集接头蛋白TRAF3激活Caspases通路而诱导细胞死亡，而HVEM因不能募集TRAF3而不能引起细胞凋亡。Zhang等[38]在对MDA-MB-231 breast肿瘤细胞的研究中发现了LIGHT诱导的特殊凋亡信号通路。他们发现LIGHT可轻微诱导MDA-MB-231细胞凋亡，但在有另一促炎症细胞因子IFN-γ存在时，其凋亡诱导作用明显增强。进一步的研究发现LIGHT和IFN-γ所诱导的凋亡分子机制与细胞内促凋亡蛋白家族——Bcl-2家族成员表达的变化有关。抗凋亡基因Bcl-2、Bcl-XL、Bag-1和Mcl-1表达下调，而促凋亡基因Bak、p-Bad(Ser112)在MDA-MB-231细胞内表达上调，Caspase-3, -6, -7, -8, -9相继被活化。应用Caspase酶的抑制剂尤其是Caspase-3抑制剂，可以降低MDA-MB-231细胞对LIGHT-IFN-γ 诱导凋亡的敏感性，但不能完全逆转LIGHT-IFN-γ介导的凋亡。表明LIGHT-IFN-γ 诱导产生的凋亡过程，与经典的凋亡途径不同，可能经非依赖Caspase的信号传导途径诱导细胞凋亡。LIGHT结合LTβR 或HVEM 信号传递通过TRAF3 如何到达Caspase-8或线粒体，引起Bcl-2 家族成员表达变化，仍然不清楚。再者，抑制性受体DcR3

的表达是否下调，有待进一步研究。



图4 HVEM和LTβR信号转导途径图示

在配体诱导的信号传递过程中，受体聚集成三聚体。每个受体相连的接头蛋白对于信号转导是必要的。

Fig 4 Representation of the HVEM and LTβR signaling pathways

Receptors are shown as trimers, aggregated during the ligand-induced signaling process. Intracellular adapter proteins necessary for the transduction of signals are shown below each receptor.

**3 LIGHT-HVEM / LTβR主要的生物学功能**

**3.1促进T细胞活化、增殖**

T细胞活化除了需要TCR识别结合抗原多肽与MHC产生的第一信号外，还有赖于APC与T细胞表面的共刺激分子相互作用而产生的第二信号即共刺激信号。T细胞应答过程中，如果仅有第一信号而缺乏第二信号，将导致T细胞失能。据此，诱导或阻断T 细胞活化的第二信号可成为干预某些疾病免疫病理过程

（如肿瘤、移植排斥反应、自身免疫疾病等）的策略。已知的共刺激分子包括

B7/CD28, LFA-3/CD2, ICAM-1/LFA-1, OX40–OX40L, 4-1BB–4-1BBL 和

LIGHT–HVEM 等，它们之间相互作用可为T 细胞的活化提供共刺激信号。对于

LIGHT–HVEM共刺激T细胞的早期研究发现，使用HVEM单克隆抗体可明显减少CD3/CD28引起的T细胞增殖和细胞因子的产生，表明HVEM信号传递可能在T细胞活化中起作用[1]。Harrop研究小组进一步观察sLIGHT在混合淋巴细胞反应中的作用，发现它能显著增强T细胞的增殖能力[44]。Tamada等[14]报道，LIGHT显著促进了T细胞的增殖，并诱导IFN-γ和GM-CSF等炎症细胞因子的产生，而用LIGHT单克隆抗体或HVEM-Ig/LTβR-Ig可完全阻断这一效应。该研究直接证实了LIGHT-HVEM对T细胞的共刺激作用不依赖于CD3/CD28途径。此外，还有多个研究小组也证实LIGHT-HVEM信号转导在TCR介导的T细胞增殖中起共刺激作用[30, 45, 46]。

**3.2参与炎症反应**

Shaikh等用人LIGHT 转基因鼠作为动物模型研究LIGHT 转基因鼠淋巴组织结构和淋巴细胞亚群分布，发现异于非转基因对照鼠，同时在肠道出现严重的炎症症状，并伴随生殖器官组织破坏。这可能与LIGHT转基因鼠T细胞活化并且粘膜T细胞分泌Th1细胞因子作用增强有关[56]。LIGHT-HVEM 共刺激T细胞活化产生的细胞因子主要参与Th1免疫反应。这些细胞因子主要包括IFN-γ、GM-CSF。

Ye等研究了LIGHT基因敲除鼠中IFN-γ水平，发现IFN-γ水平降低了[47]。此外，转基因模型中，人或鼠LIGHT的组成性表达导致了复杂的炎症表型并且提高了粘膜T细胞内的Th1细胞因子活性，通过LIGHT信号传递产生的促炎症细胞因子分布如预期的一样[48, 49]。以上研究表明，T细胞上LIGHT转基因的表达引起了淋巴组织结构和淋巴细胞亚群分布的异常化。转基因动物在肠道显示的炎症是一种慢性的显型特征。因此，粘膜T细胞LIGHT的表达可调节肠道炎症。LTβR虽不表达于T、B细胞上，但在DCs 上可检测到它的存在，作为共信号传递的一部分，

LTβR结合LTαβ或LIGHT可控制淋巴器官内DCs的增殖[50]。因此，封闭LTαβ或LIGHT可减少T细胞活化中DC的数量，从而减弱炎症的发生。以LTβR为靶标，治疗两种需要T细胞过继转移的炎性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)模型鼠，发现能明显减轻大肠炎症状。一种大肠炎疾病模型是将CD45RBhi T细胞转移免疫缺陷SCID受体鼠，诱导CD45RBhi T细胞增殖和活化，依次引起炎症从而

产生肠炎。而LTβR-Ig的给药显著减轻炎症并预防了这种模型消耗性疾病的产生。另一种模型将正常骨髓移植入T细胞/ NK细胞缺陷的tgε6鼠，移植的CD4+T细胞扩增并诱导了肠炎。这种模型也被LTβR-Ig和抗TNF-α单抗治疗逆转[51]。以上研究提示，抑制LTαβ/LIGHT 信号通路可有效防止依赖T细胞转移而产生的两种

IBD模型的形成。Stopfer等用葡聚糖硫酸酯口服给药诱导了小鼠慢性结肠炎，再用LTβR-Ig治疗，发现治疗效果与大肠内炎症细胞因子TNF-α、IL-1和IL-6水平降低以及粘附分子MAdCAM-1表达减少有关[52]。说明LIGHT- LTβR信号传递可能促进炎症细胞因子的产生，参与炎症反应。

**3.3诱导肿瘤细胞凋亡**

早期研究发现[13]，LIGHT(sHVEM-L) 在刺激活化的外周血淋巴细胞分泌IFN-γ的同时，主要对肿瘤细胞(HT29、MDA-MB-231、PC3-1、Jurkat细胞)具有轻微的毒性作用。这种毒性效应在有IFN-γ存在时大大增强，可被HVEM-Fc或LTβR-Fc以剂量依赖方式特异地阻断。进一步研究发现，肿瘤细胞上受体的表达影响LIGHT诱导的细胞凋亡。LTβR和HVEM受体涉及LIGHT介导的抑制肿瘤细胞生长，触发

LIGHT介导的细胞毒性需要HVEM和LTβR双重受体。LIGHT信号通路对于仅仅表达两种受体的一种的正常细胞和肿瘤细胞，如Jurkat(LTβR+)和PC-3(HVEM+)细胞生长，无明显影响。HVEM-Fc或LTβR-Fc可抑制LIGHT介导的肿瘤细胞凋亡，证明HVEM和LTβR受体在LIGHT介导的肿瘤细胞凋亡中具有协同作用。仍无证据证明LIGHT-LTβR和LIGHT-HVEM这两条信号途径在LIGHT介导的肿瘤细胞死亡是否起同样重要的作用。此外，尽管LIGHT不直接结合Fas, DR3, DR4或DR5，也不能排除LIGHT同其他已知的或未知的死亡受体相互作用。LTβR和HVEM信号途径可能通过TRAFs活化共同的信号通路，但LIGHT-LTβR和LIGHT-HVEM信号途径可能触发不同的生物学效应。HVEM的胞质尾区没有死亡结构域，LIGHT-HVEM信号传递不介导死亡信号，但可能引起宿主免疫系统的共刺激反应。HVEM mRNA表达于多种人组织，相对组成性高表达于造血细胞系，包括静息和活化的CD3+、CD4+、CD8+T细胞，B细胞，单核细胞和中性粒细胞。LTβR和HVEM的不同组织和细胞表达模式进一步支持了LIGHT的双信号假说。LTβR表达于各种

肿瘤细胞系，但在T、B淋巴细胞上缺乏[53,54]。LTβR在控制淋巴结发育和细胞免疫反应方面起关键作用。此外，LTβR可能通过TRAF3依赖的信号途径活化诱导细胞凋亡[55]。LIGHT还可通过作用于NK细胞上的HVEM受体而间接发挥抗肿瘤活性，

LIGHT在浸润肿瘤组织的T、B淋巴细胞上表达引起NK细胞在肿瘤组织的增多，

LIGHT与NK细胞表面受体HVEM结合，促进NK细胞的活化、分化和IFN-γ的分泌，IFN－γ诱导针对肿瘤抗原的CTL反应，抑制肿瘤的生长[57]。因此，LIGHT可能在诱导凋亡和免疫调节方面起关键作用并可能成为抗肿瘤的治疗靶标。LIGHT诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制是什么？Chen等[34]认为LIGHT的细胞毒性效应可能来自它能促进活化T细胞分泌IFN-γ，LIGHT和IFN-γ对肿瘤细胞的杀伤具协同效应。

LIGHT和IFN-γ诱导Hep3BT2细胞凋亡与它们协同地激活了Caspase-3和过表达Bcl-2有关。随着Bcl-2的裂解，去除了BH4结构域，导致Bcl-2的功能发生逆转，从抗凋亡分子变成了促凋亡分子。同时还证明了自由基的产生是LIGHT和IFN-γ介导的细胞凋亡促使Caspase-3活化的上游事件。Zhang等[38]用MDA-MB-231做细胞模型研究LIGHT诱导细胞凋亡的机制，发现LIGHT处理导致抗凋亡Bcl-2家族成员：Bcl-2, Bcl-X(L), Bag-1和Mcl-1表达下调；而促凋亡Bcl-2家族成员：Bak和phosphor-Bad (Ser 112)表达上调。LIGHT 处理也引起Caspase-3, Caspase-6，

Caspase-7, Caspase-8, Caspase-9, DFF45和PARP活化。然而用caspase-3抑制剂和

caspase抑制剂不能完全封闭MDA-MB-231细胞中LIGHT和IFNgamma诱导的凋亡，说明这种凋亡诱导方式是非依赖于Caspase (尤其是Caspase-3)。

**3.4在自身免疫疾病中的作用**

LIGHT在T细胞的表达可诱导外周T细胞的大量活化和增殖，打破外周耐受，导致自身免疫疾病的发生[58]。来自不同研究小组的研究结果表明，LIGHT-HVEM/LTβR信号途径通过参与T细胞的活化在自身免疫性肝炎、类风湿性关节炎、胰岛素依赖性糖尿病等多种自身免疫疾病的病理发生中起着重要的免疫调节作用[59,70-72]。

**3.4.1自身免疫性肝炎**

近年来，各课题组已在多种自身免疫疾病鼠类模型中研究了共刺激分子LIGHT

和其受体功能的关联性。LIGHT缺失的直接后果是通过HVEM和LTβR传递的共刺激信号失能，这将导致T细胞活化减少，不但表现在CTL亚群，而且CD4+T细胞亚群减少更多[60]。T细胞介导的免疫反应在自身免疫性肝炎，病毒感染，肝毒素等诱导的肝细胞损伤中起决定性作用。肝内检测到活化的CD4+T细胞，通过分泌促炎症细胞因子和抗炎症细胞因子而发挥作用，促炎症细胞因子例如TNF-α和IFN-γ的高水平表达导致肝损伤。TNF超家族的几个成员在淋巴细胞活化，免疫调节中起重要作用。Wang 等[61]运用HVEM 基因敲除鼠模型研究发现，在体内用

ConA处理的HVEM基因敲除鼠的自身免疫肝炎和它相关的症状比同样处理的野生型小鼠更严重，这可能与HVEM在T细胞上充当抑制性受体有关。HVEM缺乏，共抑制受损导致T细胞增殖增加。而Mao-Mao等[62]发现在ConA诱导的自身免疫性肝炎中，有NF-κB的活化和过表达。NF-κB活化诱导了TNF-α等炎症细胞因子产生，TNF-α介导了ConA诱导的肝细胞凋亡并且通过Fas(CD95)的活化呈现出一个促细胞凋亡效应。而用LTβR-Ig融合蛋白处理可明显改善ConA诱导的肝炎，说明LIGHT-HVEM/LTβR信号通路可能参与ConA诱导的肝炎的发病机制。LTβR-Ig作为一种竞争性抑制剂封闭该信号通路，结果导致CD4+T细胞浸润减少以及下调NF-κB活化与表达，抑制了促炎症细胞因子产生，最终小鼠被保护从而免遭ConA诱导的肝损伤。LIGHT-LTβR/HVEM信号通路在自身免疫性肝炎中的具体机制仍有待进一步研究。

**3.4.2类风湿性关节炎**

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因不明的慢性多发性关节滑膜炎，组织学上表现为滑膜细胞明显增生，有新血管形成。因活化的T细胞和巨噬细胞在关节里积聚以及类风湿分子(rheumatoid factor, RF)自身抗体和Th1型细胞因子IFN-γ、IL-1、IL-6和TNF-α等的存在，提示RA是一种以Th1细胞反应为主的自身免疫性疾病。Won-Jung等[63]证实RA患者关节中主要是CD68阳性巨噬细胞表达了LIGHT和HVEM，LIGHT信号通路涉及RA的发病机制可能是通过刺激巨噬细胞产生促炎症细胞因子IL-1, IL-6, IL-8和TNF-α，这些促炎症细胞因子在滑膜慢性炎症的发生和发展中起重要作用。此外，LIGHT还可能直接活化NF-κB诱导基质金属蛋白酶-9（MMP-9）的表达，MMP-9可降解细胞外基质（ECM）促

进炎症发生。Pierer等[64]研究也发现，RA患者滑膜组织和滑液中均有LIGHT及其受体的表达，但CD4T细胞是LIGHT表达的主要细胞类型，可溶性LIGHT上调RA滑液成纤维细胞MMP-9, ICAM-1和IL-6表达并诱导NF-κB活性。体外实验表明重组人LIGHT 的存在有抗FasL 诱导的细胞凋亡效应。以上现象说明

LIGHT信号途径可能参与了RA的发病过程。

**3.4.3胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)**

胰岛素依赖性糖尿病( Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)是一种T细胞介导的具有遗传倾向的慢性进行性自身免疫疾病。患者或疾病模型往往在出现胰岛炎数周或数月后，由于胰岛β细胞功能减弱和障碍而引发糖尿病。临床上对于

IDDM治疗的最常用方法是胰岛素替代疗法，这种治疗方法可以改善症状，但不能阻止和逆转自身免疫疾病的发展进程。鉴于此，研究者初期的设想是在自身免疫疾病的早期采用免疫抑制剂，希望抑制胰岛炎的发生发展。然而临床结果提示只有少数患者疾病症状得到轻微缓解，且没有长期效用。再者由于抑制剂具有较强的毒副作用不能长期使用，可能导致病情反复。针对T细胞在IDDM的发病机制中所起的重要作用，研究者们逐渐将目光聚集于T细胞活化所需的共刺激作用。这一研究领域的热点最开始集中于CD28和CD40等共刺激途径在IDDM中的作用。Arreaza 等

[65]和Balasa 等[66]分别用CD28 和CD40L 阻断性mAb 治疗NOD( nonobese

diabetic）小鼠自发产生的糖尿病，发现这些试剂对防止2～4周大的NOD小鼠发生胰腺炎和IDDM有效，但对5～7周大的小鼠无效。这些结果提示当IDDM 表现出临床症状时，CD28和CD40L等提供的共刺激信号并不重要，在维持T细胞的持续杀伤效应上，可能存在其他的共刺激途径。TNF超家族的共刺激分子LIGHT-LTβR/HVEM信号通路在调节T细胞功能和维持外周耐受方面的重要进展引起研究者极大的关注，但迄今为止，LIGHT 途径在IDDM 中的作用研究进展不多。

Pakala等研究表明胰岛TNF-α受体1 (p55)可影响LIGHT及HVEM在T细胞上的表达，LIGHT-HVEM相互作用对于IDDM具有一定意义。Ettinger等[67]将表达LTβR-Fc融合蛋白的转基因小鼠回交至NOD小鼠背景，胰岛试验显示融合蛋白表达虽对胰岛炎的进展无显著影响但明显改变了小鼠脾脏结构，意味着抑制了有效的

LIGHT途径。LTβR-Fc 融合蛋白表达后尽管仍然能观察到胰岛炎，但阻止了糖尿病

的发展。针对胰腺自身抗原，谷氨酸脱羧酶(GAD)的体外T细胞增殖实验和IFN-γ分泌实验，发现表达融合蛋白小鼠有T细胞增殖和IFN-γ分泌减少的趋势。Wu等在早期给予NOD小鼠LTβR-Ig发现可以阻止胰岛炎和IDDM的发生，在疾病的末期给予LTβR-Ig可能在疾病的12周将严重的胰岛炎逆转，并阻止糖尿病的发生，说明LIGHT-LTβR途径在IDDM的发生、发展中具有积极意义。但以上研究未对LTβR-Ig融合蛋白对胰岛炎发展中的作用显示出差异的原因做出解释。Wang[61]等研究证明HVEM-Ig给药糖尿病前驱期雌性NOD鼠，能有效预防IDDM的发展，体现了LIGHT 在糖尿病发展中不依赖LTβR 的LTαβ 信息传递的一些活性。但

Pierer等[68]用HVEM-Ig融合蛋白给药胶原诱发性关节炎模型小鼠后，发现疾病病程加重，关节组织破坏的严重性增加，宿主对抗II型胶原的细胞和体液反应增强。因此，提示HVEM-Ig融合蛋白应用于胶原诱发性关节炎，不是自身免疫病合适的治疗方法，这可能是封闭了抑制的HVEM/BTLA/CD160。此外，Sung等[69]在NOD鼠的胰岛β细胞中特异表达了受人胰岛素增强子控制的诱饵受体3 (DcR3)，一种可溶的TNF超家族受体。NOD鼠中DcR3转基因表达显著阻止了这些小鼠产生自发糖尿病和环磷酰胺诱导的糖尿病。这一实验结果进一步提示LIGHT在糖尿病疾病进程中的作用。

**4小结**

LIGHT是TNF超家族的第十四号成员，主要表达于活化的T细胞、NK细胞和未成熟DCs，越来越多的研究表明其在自身免疫疾病的发病中起着重要作用。

LIGHT在T细胞上的持续表达与受体结合可诱导外周T细胞大量活化和增殖，打破外周耐受导致AID; LIGHT通过增强活化的T细胞分泌IFN-γ，而促进IFN-γ介导的细胞凋亡。选择性干预LIGHT共刺激信号通路可减轻或延缓某些AID的发生、发展。LIGHT信号通路有可能成为AID免疫干预治疗的潜在靶标。因此，深入研究LIGHT信号通路的生物学功能及在自身免疫性疾病中的作用机制，对于进一步探讨AID的发病机理以及寻找新的治疗方法具有积极意义。

参考文献

[1] Harrop JA, Medonnell PC, Brigham Burke M, et al. Her-pesvirusentry mediator ligand(HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates Proliferation of T eells and inhibits HT29 cell growth[J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27548-27556.

[2] Granger SW, Butrovich KD, Houshmand P, et al. Genomic characterization of LIGHT reveals linkage to an immune response locus on chromosome 19p13. 3 and distinct isoforms generated by alternate splicing or proteolysis[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 5122-5128.

[3] Vincenti F. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(2): 299-306.

[4] Kroczek R, Hamelmann E. T-cell costimulatory molecules: optimal targets for the treatment of allergic airway disease with monoclonal antibodies[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116(4): 9006-9009.

[5] Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(1): 19–26.

[6] Banner DW, D'Arcy A, Janes W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation[J]. Cell, 1993, 73(3): 431–445.

[7] Rooney IA, Butrovich KD, Glass AA, et al. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14307-14315.

[8] Xu Y, Tamada K, Chen L. LIGHT-related molecular network in the regulation of innate and adaptive immunity[J]. Immunol Res, 2007, 37(1): 17-32.

[9] Mauri DN, Ebner R, Montgnmery RI, et al. LIGHT, a new member of the TNFsuperfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator[J]. Immunity, 1998, 8(1): 21-30.

[10] Morel Y, Truneh A, Sweet RW, et al. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity[J]. J Immunol, 2001, 167 (5): 2479-2486.

[11] Ware CF. Targeting the LIGHT-HVEM pathway[J]. Adv Exp Med Biol, 2009, 647(2):

146-155.

[12] Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(1): 19-26.

[13] Zhai Y, Guo R, Hsu TL, et al. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxinβreceptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer[J]. J Clin Invest, 1998, 102(6): 1142-1151.

[14] Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, et al. LIGHT, a TNF like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4105-4110.

[15] Castellano R, Van Lint C, Peri V, et al. Mechanisms regulating expression of the tumor necrosis factor-related light gene. [J]. J Biol Chem, 2002, 277(45): 42841-42851.

[16] Phillips TA, Ni J, Hunt JS. Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placentae, cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines[J]. Placenta, 2001, 22(8-9): 663-672.

[17] Yu KY, Kwon B, Ni J, et al. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis[J]. J Biol Chem, 1999, 274(20): 13733-13736.

[18] Granger SW, Rickert S. LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14 (34): 289-296.

[19] Sarrias MR, Whitbeck JC, Rooney I, et al. The three HVEM receptor ligands, gD, LT-alpha and LIGHT bind to distinct sites on HVEM[J]. Mol Immunol, 2000, 37(11): 665-673.

[20] Sarrias MR, Whitbeck JC, Rooney I, et al. Inhibition of herpes simplex virus gD and lymphotoxin-alpha binding to HVEM by peptide antagonists[J]. J Virol, 1999, 73 (7): 5681-5687.

[21] Del Rio ML, Lucas CL, Buhler L, et al. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation[J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(2): 223-225.

[22] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology[J]. Cell, 2001, 104(4): 487–501.

[23] Morel Y, Schiano de Colella JM, Harrop J, et al. Reciprocal expression of the TNF

Family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor[J]. J Immunol, 2000, 165(8): 4397- 4404.

[24] Zhang J, Salcedo TW, Wan X, et al. Modulation of T-cell responses to alloantigens by TR6/DcR3[J]. J Clin Invest, 2001, 107(11): 1459-1468.

[25] Mackay F, Majeau GR, Lawton P, et al. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(8): 2033-2042.

[26] Rennert PD, Browning JL, Mebius R, et al. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs[J]. J Exp Med, 1996, 184(5): 1999-2006.

[27] Christine Pasero, Alemseged Truneh, Daniel Olive. Cosignaling Molecules Around LIGHT-HVEM-BTLA: From Immune Activation to Therapeutic Targeting[J]. Current Molecular Medicine, 2009, 9(7): 911-927.

[28] Murphy M, Walter BN, Pike-Nobile L, et al. Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues[J]. Cell Death Differ, 1998, 5(6): 497-505.

[29] Force WR, Walter BN, Hession C, et al. Mouse lymphotoxin-beta receptor, Molecular genetics, ligand binding, and expression[J]. J Immunol, 1995, 155(11): 5280-5288.

[30] Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, et al. Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway[J]. Nat Med, 2000, 6(3): 283-289.

[31] 李文珠, 庄国洪, 陶惠然. 作为免疫相关性疾病靶点的DcR3的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13 (1): 67-69, 76.

[32] Kabashima K, Banks TA, Ansel KM, et al. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells[J]. Immunity, 2005, 22(4): 439-450.

[33] Hsu H, Solovyev I, Colombero A, et al. ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5[J]. J Biol Chem, 1997, 272 (21): 13471-13474.

[34] Chen MC, Hsu TL, Luh TY, et al. Overexpression of bcl-2 enhances LIGHT and interferon-gamma mediated apoptosis in Hep3BT2 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275

(49): 38794-38801.

[35] Gonzalez LC, Loyet KM, Calemine Fenaux J, et al. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (4): 1116-1121.

[36] Marsters SA, Ayres TM, Skuatch M, et al. Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1[J]. J Biol Chem, 1997, 272(22): 14029–32.

[37] Arch R, Gedrich R, Thompson C. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) --a family of adapter proteins that regulates life and death[J]. Genes Dev, 1998, 12(18): 2821-2830.

[38] Zhang M, Guo R, Zhai Y, et al. LIGHT sensitizes IFNgamma-mediated apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells leading to down-regulation of anti-apoptosis Bcl-2 family members[J]. Cancer Lett, 2003, 195(2): 201-210.

[39] Chen MC, Hwang MJ, Chou YC, et al. The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in lymphotoxin-beta receptor-mediated cell death[J]. J Biol Chem, 2003, 278(18): 16073-16081.

[40] Aebischer J, Cassina P, Otsmane B, et al. IFNgamma triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(5): 754-768.

[41] Han B, Wu LQ, Ma X, et al. Synergistic effect of IFN-gamma gene on LIGHT-induced apoptosis in HepG2 cells via down regulation of Bcl-2[J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2011, 39(4): 228-238.

[42] 翟志芳, 郝飞. LIGHT 在自身免疫性疾病中的作用研究进展[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(3): 55-58.

[43] Kim YS, Nedospasov SA, Liu ZG. TRAF2 plays a key, nonredundant role in LIGHT-lymphotoxin beta receptor signaling[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(6): 2130-2137.

[44] Harrop JA, Reddy M, Dede K, et al. Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines[J]. J Immunol, 1998,

161(4): 1786-1794.

[45] Scheu S, Alferink J, Potzel T, et al. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis[J]. J Exp Med, 2002, 195(12): 1613-1624.

[46] Wang J, Lo JC, Foster A, et al. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT[J]. J Clin Invest, 2001, 108(12): 1771-1780.

[47] Ye Q, Fraser CC, Gao W, et al. Modulation of LIGHT-HVEM costimulation prolongs cardiac allograft survival[J]. J Exp Med, 2002, 195(6): 795–800.

[48] Shaikh RB, Santee S, Granger SW, et al. Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6330–6337.

[49] Wang J, Chun T, Lo JC, et al. The critical role of LIGHT, a TNF family member, in T cell development[J]. J Immunol, 2001, 167(9): 5099–5105.

[50] Kabashima K, Banks TA, Ansel KM et al. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells[J]. Immunity, 2005, 22(4): 439-450.

[51] Mackay F, Browning JL, Lawton P, et al. Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis[J]. Gastroenterology, 1998, 115(6): 1464-1475.

[52] Stopfer P, Obermeier F, Dunger N, et al. Blocking lymphotoxin-beta receptor activation diminishes inflammation via reduced mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) expression and leucocyte margination in chronic DSS-induced colitis[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(1): 21-29.

[53] Crowe PD, Van Arsdale TL, Walte BN, et al. A lymphotoxin-beta-specific receptor[J]. Science, 1994, 264(5159): 707-710.

[54] Browning JK, Miatkowski I, Sizing D, et al. Signaling through the lymphotoxinβreceptor induces the death of some adenocarcinoma tumor lines[J]. J Exp Med, 1996, 183(3): 867-878.

[55] VanArsdale TL, VanArsdale SL, Force WR, et al. Lymphmotoxin-βreceptor signaling complex: role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor kB[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(6):

2460-2465.

[56] Shaikh RB, Santee S, Granger SW, et al. Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6330-6337.

[57] Fan Z, Yu P, Wang Y, et al. NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8+ T-cell immunity to reject established tumors[J]. Blood, 2005, 107(4): 1342-1351.

[58] Ishida S, Yamane S, Ochi T, et al. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor[J]. J Rheumatol, 2008, 35(6): 960-968.

[59] Scheu S, Alferink J, Potzel T, et al. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxinβin mesenteric lymph node genesis[J]. J Exp Med, 2002, 195(12): 1613-1624.

[60] Kang YM, Kim SY, Kang JH, et al. LIGHT up-regulated on B lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis mediates cellular adhesion and metalloproteinase production by synoviocytes[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(4): 1106-1117.

[61] Wang Y, Subudhi SK, Anders RA, et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 711-717.

[62] Mao-Mao AN, Ke Xin FAN, Yong-Bing Cao, et al. LymphtoxinβReceptor-Ig protects from T-cell-mediated liver injure in Mice through blocking LIGHT/HVEM signaling[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(10): 2025-2030.

[63] Won-Jung Kim, Yoon-Joong Kang, Eun-Mi Koh, et al. LIGHT is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis byinducing the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9 in macrophages[J]. Immunology, 2005, 114(2): 272-279.

[64] Pierer M, Brentano F, Rethage J, et al. The TNF superfamily member LIGHT contributes to Survival and activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology, 2007, 46(7): 1063-1070.

[65] Arreaza GA, Cameron MJ, Jaramillo A, et al. Neonatal activation of CD28 signaling overcomes T cell anergy and prevents autoimmune diabetes by an IL-4-dependent mechanism[J]. J Clin Invest, 1997, 100(9): 2243-2253.

[66] Balasa B, Krahl T, Patstone G, et al. CD40 ligand -CD40 interactions are necessary for the initiation of insulitis and diabetes in nonobese diabetic mice[J]. J Immunol, 1997, 159(9): 4620–4627.

[67] Ettinger R, Munson SH, Chao CC, et al. A critical role for lymphotoxin beta receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice[J]. J Exp Med, 2001, 193(2): 1333-1340.

[68] Pierer M, Schulz A, Rossol M, et al. Herpesvirus entry mediator-Ig treatment during immunization aggravates rheumatoid arthritis in the collagen-induced arthritis model[J]. J Immunol, 2009, 182(5): 3139–3145.

[69] Sung HH, Juang JH, Lin YC, et al. Transgenic expression of decoy receptor3 protects islets from spontaneous and chemical-induced autoimmune destruction in nonobese diabetic mice[J]. J Exp Med, 2004, 199(1): 1143-1151.

[70] Pasero C, Speiser DE, Derre L, et al. The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy[J]. Curr Opin Pharmacol, 2012, 12(4): 478-85.

[71] Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation[J]. Immunol Rev, 2011, 244(1): 169-87.

[72] Ware CF. Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways[J]. Immunol Rev. 2008, 223(1): 186-201.

攻读博士学位期间所获得的科研成果

攻读学位期间发表论文

1. **Zhao-hui Cao（曹朝晖）**, Wei-dong Yin, Quan-you Zheng, Shao-long Feng, Gui-lian Xu, Ke-qin Zhang. Caspase-3 is Involved in IFN-γ- and TNF-α-Mediated MIN6 Cells Apoptosis via NF-κB/Bcl-2 Pathway[J]. Cell Biochem Biophys,

2013,67(3):1239-1248. (SCI收录)

2. Shaolong Feng, **Zhaohui Cao（曹朝晖）**, Xinming Wang. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in Cancer[J]. BBA - Reviews on Cancer, 2013, 1836(2):197-210. (SCI收录)

3. Shaolong Feng, **Zhaohui Cao（曹朝晖）**, Yun Yang, Gangjian Wei, Xin Ming Wang. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Heavy Metals, and Genotoxicity of the Suburban Soils from Guangzhou, China. Polycyclic Aromatic Compounds, 2013, 33:501–518.

（SCI收录）

4. **曹朝晖**，覃剑，董世访，郑权友，杨菲，谭雨龙，尹卫东，李桂清. IFN-γ和TNF-α联合对MIN6细胞Caspase-3活化的影响[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(1): 17-20.

5. **曹朝晖**，董世访，江伟凡，尹卫东， 许桂莲. 自身免疫疾病中的LIGHT-LTβR/HVEM信号通路的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(12)：1382-1384. （第一作者）

6. **曹朝晖**，封少龙，董世访，江伟凡， 李邦良， 胡小波.甲壳低聚糖对饲高糖高脂大鼠血糖的调节作用[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(3)：241-243.（第一作者）

7. 董世访，**曹朝晖（共同第一）**, 江伟凡，李桂清，姜曼，胡小波，许桂莲. IFN-γ和TNF-α协同对胰岛瘤细胞株MIN6凋亡的影响[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(2)：195-198.

（并列第一作者）

8. **曹朝晖**，封少龙，江伟凡，董世访， 李邦良， 胡小波. 甲壳低聚糖对2型糖尿病造模大鼠胰岛β细胞的保护作用[J].中国海洋药物杂志, 2011, 30(5)：8-11. （第一作者）

9. **曹朝晖**，李邦良，胡小波. 羧甲基壳聚糖－锌络合物的制备及对大鼠血清SOD活性的影响[J]. 微量元素与健康研究, 2011, 28(4)：4-6. （第一作者）

10. 江伟凡，杨菲，董世访，**曹朝晖**，陈戬，李桂清，蒋涛，许桂莲. C5a/C5aR通路在硕大利什曼原虫易感小鼠免疫病理发生中的作用及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(3)：219-222. （第四作者）

11. 宋天喜，**曹朝晖**，江伟凡，董世访， 杨桦. gp350及gp350-C3d3融合基因真核载体的构建及其免疫功能研究[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(5)：390-393. （第二作者）

12. 尚宇航，姜曼，杨菲，**曹朝晖**，董世访，江伟凡，陈戬，吴玉章，许桂莲. LIHGT-HVEM/LTbR途径缺陷诱导T细胞的失能[J]. 免疫学杂志，2010, (9):747-750. （第四作者）

攻读学位期间编写专著

1. 《生命科学实验（全国高等院校实验教学系列规划教材），2010第一版，北京： 科学出版社， 副主编.

2. 《生物化学学习指导》. 2012第二版， 吉林： 吉林科学技术出版社， 副主编.

攻读学位期间申请的国家发明专利

李邦良，王爱勤，黄春林，**曹朝晖**.一种甲壳低聚糖水溶液的制备方法，2009，中国，CN102101894 A. （第四作者）

致谢

光阴荏苒，时间飞逝，转眼间已是本人攻读博士学位的第五个年头。值博士学习即将结束之际，本人在此衷心感谢我的导师——尹卫东教授和指导老师——第三军医大学免疫研究所许桂莲副教授在学习和生活上给予的关心和帮助。五年来，从文献查阅、综述撰写、论文选题论证、课题设计、试验实施，到结果分析、论文写作、论文修改和文章发表等方方面面，都得到他们大量细致的指教和全力支持。正是在他们的严格要求下，我才能顺利完成博士论文工作。五年的博士学习，在导师的精心指导和培育下，我的科研态度、思维方式和实践能力均得到质的飞跃，为今后从事科研工作打下了坚实的基础。再次衷心感谢恩师们为我所做的一切，我的丝毫进步都离不开您的无私奉献！我将以导师严谨认真的治学态度，勤奋务实的工作作风为榜样，努力投身今后的学习和工作中。

学习期间，衷心感谢南华大学、药科院领导及生物技术系龙石银博士等全体同仁对我的支持和理解。感谢南华大学病理与病理生理学博士学位点的所有老师给予的支持和帮助！特别感谢我的好朋友、好同事胡小波博士给予的大力支持以及精神上的极大鼓舞。感谢封少龙博士对我课题设计和实验操作的指导。

感谢第三军医大学免疫研究所主任吴玉章教授为我提供良好的实验环境和条件；感谢郭波副教授、实验技术员杨菲老师、李桂清老师等人对我课题实施的帮助！

感谢本课题组的各位同学在我课题实施过程中给予的帮助和支持，衷心的感谢你们！

非常感谢德国Pfeffer博士惠赠本课题组的LIGHT KO小鼠，同时也感谢北京同仁医院张奋博士赠与的MIN6细胞！

最后，感谢我的父母对我家庭和孩子的精心照顾，感谢我的丈夫和儿子对我的全力支持！他们是我能够勇往直前，不畏困难，顺利完成学业的坚强支柱！

再次诚挚感谢所有关心和帮助我的人！

曹朝晖

2014年5 月

**课题资 助**

本研究得到国家自然科学基金面上项目（项目批准号：30971394和81170695）、湖南省教育厅资助项目（项目批准号：12C0359）、湖南省科技厅资助项目（项目批准号：2013SK3121）、湖南省衡阳市科技局资助项目（项目批准号：2013KS22）共同资助，在此特别予以致谢！