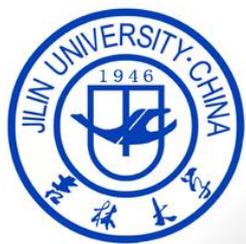


分类号: R392
研究生学号: 2015712032

单位代码: 10183
密 级: 公开



吉 林 大 学

硕 士 学 位 论 文

(学术学位)

TRIM59 表达的信号转导通路及其对巨噬细胞
生物学活性调控的研究

Signal pathway of TRIM59 expression and the regulation
of TRIM59 on biological activities of macrophages

作者姓名: 金争

专 业: 免疫学

研究方向: 分子免疫与肿瘤免疫

指导教师: 朱迅 教授

培养单位: 基础医学院

2018 年 5 月

TRIM59 表达的信号转导通路及其对巨噬细胞
生物学活性调控的研究

Signal pathway of TRIM59 expression and the regulation of
TRIM59 on biological activities of macrophages

作者姓名：金争

专业名称：免疫学

指导教师：朱迅 教授

学位类别：医学硕士

答辩日期：2018 年 5 月 29 日

未经本论文作者的书面授权,依法收存和保管本论文书面版本、电子版本的任何单位和个人,均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用(但纯学术性使用不在此限)。否则,应承担侵权的法律责任。

吉林大学博士(或硕士)学位论文原创性声明

本人郑重声明:所呈交学位论文,是本人在指导教师的指导下,独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外,本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体,均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名: 

日期: 2018 年 5 月

提 要

巨噬细胞是固有免疫的重要组成部分，参与机体多个生理及病理活动，在炎症、肿瘤、创伤修复、组织重建、抵抗病原微生物入侵等方面均发挥重要作用。TRIM59 属于 TRIM 蛋白家族，该家族是 E3 泛素连接酶中 RING 家族成员，结构高度保守，能特异性结合泛素交联酶，作为泛素连接酶参与抗病毒和调节免疫相关信号通路，与免疫应答密切相关。本课题组前期工作发现，BCG 刺激后的腹腔巨噬细胞经 1% 多聚甲醛固定后可以高效杀伤 MCA207 肿瘤细胞，同时检测到巨噬细胞膜上高表达 TRIM59，但是 BCG 怎样调控巨噬细胞表达 TRIM59 的信号通路未见报导。此外，TRIM59 与巨噬细胞直接接触杀伤功能密切相关，而对巨噬细胞的生物学活性如增殖、凋亡、表型、吞噬功能等调控作用并不清楚。

基于以上研究背景，我们研究了 BCG 调控 TRIM59 表达的信号通路，发现 BCG 通过 TLR2/4/IRF5 调控 RAW264.7 细胞上 TRIM59 的表达；通过转染建立高表达和低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞作为细胞模型，检测细胞增殖、凋亡、细胞因子分泌、吞噬功能，发现 TRIM59 能够促进抑炎细胞因子 IL-10 的分泌，抑制抗原提呈相关分子的表达，促进吞噬相关表面分子的表达，并促进 IgG 介导的吞噬和非调理性吞噬，抑制补体介导的吞噬；并且，TRIM59 能够促进 RAW264.7 细胞增殖，对细胞凋亡没有明显影响。

本研究探讨了 BCG 调控 TRIM59 表达的机制，阐述了 TRIM59 对巨噬细胞生物学活性的调节作用，明确了 TRIM59 在巨噬细胞中的表达意义，为阐明 TRIM59 调控巨噬细胞的功能提供新的实验依据和思路。

中文摘要

TRIM59 表达的信号转导通路及其对巨噬细胞

生物学活性调控的研究

巨噬细胞是重要的固有免疫细胞之一，表面表达多种模式识别受体、调理受体、细胞因子受体。巨噬细胞受多种因素如 LPS、IFN、BCG 等激活后，参与机体清除杀伤病原体及靶细胞，与炎症密切相关。巨噬细胞还是专职抗原提呈细胞，并且通过分泌多种细胞因子，参与免疫调节。TRIM59 是 BCG 激活巨噬细胞后上调表达的蛋白，该蛋白是 TRIM 蛋白家族的一员。TRIM 蛋白家族结构高度保守，因有 RING 结构而被归为 E3 泛素连接酶，参与泛素化进程，对固有免疫应答产生正向或负向调控。目前的研究表明 TRIM59 表达在内质网上，高表达于多种肿瘤细胞及组织，而本课题组前期工作发现，BCG 激活巨噬细胞后该蛋白为膜蛋白，用抗体封闭 TRIM59 后，巨噬细胞的直接接触杀伤作用明显降低，可见该蛋白在 BCG 活化巨噬细胞抗肿瘤效应中具有重要的作用。又有研究发现该蛋白可以和 ECSIT (Toll 途径进化保守信号介导因子) 结合调节固有免疫应答，发挥负性调节作用。然而，BCG 是怎样激活巨噬细胞从而上调表达 TRIM59 还不清楚，BCG 调控 TRIM59 在巨噬细胞膜上表达对巨噬细胞的生物学活性如增殖、凋亡、表型、吞噬功能有何影响也未见报导。

基于以上研究背景，本研究通过 BCG 刺激 RAW264.7 细胞，并通过转染建立高表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞 (TRIM59 细胞) 及其对照组细胞 (Vector 细胞) 以及低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞 (si-TRIM59 细胞) 及其对照组细胞 (Scramble 细胞) 作为细胞模型，从以下两个方面进行研究：

1. BCG 调控 TRIM59 表达的相关信号通路研究

为探究 BCG 刺激 RAW264.7 细胞中 TRIM59 的表达情况及表达机制，我们用 BCG 刺激 RAW264.7 细胞，并用 TLR2 和 TLR4 中和抗体进行封闭，接着用 siRNA 干扰 IRF5 的表达，结果发现 BCG 活化的 RAW264.7 细胞膜上高表达 TRIM59，这与体内实验结果一致，并发现 TRIM59 的高表达是通过 TLR2/4/IRF5 信号通路实现的。

2. TRIM59 对巨噬细胞生物学活性调控的研究

为了明确 TRIM59 对巨噬细胞的调控作用,我们构建了高表达和低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞,检测了细胞表面分子、细胞因子分泌、吞噬功能、自身增殖和凋亡的变化,发现与抗原提呈相关的表面分子 MHCII、CD86 表达降低,与非调理性吞噬相关的分子 CD172a、CD206 表达升高,与 IgG 介导吞噬相关的受体 CD16、CD32、CD64 表达升高,与补体介导吞噬相关的受体 CD11b 表达降低;并且,TRIM59 能够显著促进 IL-10 的表达,抑制 IFN- γ 的表达,对 TNF- α 有促进作用,对 IL-1 β 的作用具有时相性,对 IL-12 无明显作用;在吞噬方面,TRIM59 能够促进巨噬细胞非调理性吞噬及 IgG 介导的调理性吞噬,抑制补体介导的调理性吞噬;同时检测到 TRIM59 高表达后,G1 期细胞减少,S 期细胞增多,凋亡细胞无明显变化。以上结果说明 TRIM59 促进巨噬细胞分泌抑炎因子、促进巨噬细胞吞噬作用、促进巨噬细胞自身的增殖。

综上所述,本研究探讨了 BCG 调控巨噬细胞中 TRIM59 表达的机制,阐述了 TRIM59 对巨噬细胞自身增殖与凋亡的调节作用,探究了 TRIM59 对巨噬细胞表面分子、细胞因子及吞噬功能的调控,明确了 TRIM59 在巨噬细胞的表达意义,为研究 TRIM 蛋白家族对巨噬细胞的调控提供新的实验方法和思路。

关键词

BCG, TRIM59, 信号通路, 巨噬细胞, 调控, 生物学活性

Abstract

Signal pathway of TRIM59 expression and the regulation of TRIM59 on biological activities of macrophages

Macrophages are one of the most important natural immune cells, expressing multiple patterns of pattern recognition receptors, modality receptors, cytokines receptors. Macrophages are activated by various factors such as LPS, IFN, BCG, etc., and participate in the scavenging of pathogens and target cells, which are closely related to inflammation. Macrophages are also specialized antigen presenting cells, and are involved in immune regulation by secreting a variety of cytokines. TRIM59 is the protein that is expressed in the BCG activation of macrophages, and the protein is part of the family of the TRIM protein. The TRIM structure is highly conserved, and it is classified as E3 ubiquitin ligase due to the RING structure. It participates in the ubiquitination process and has a positive or negative effect on the intrinsic immune response. It is shown that TRIM59 is expressed on The endoplasmic reticulum and is highly expressed on a variety of tumors, and the previous work of our team found that the protein is a membrane protein of BCG activated macrophage, and the direct contact killing effect of macrophage is significantly reduced after blocking TRIM59 with antibody, so the protein plays an important role in the antitumor effect of BCG activated macrophage. It is also found that the protein can regulate the innate immune response and play a negative regulatory role in combination with ECSIT. However, it is not clear what roles the expression of TRIM59 on macrophage membrane by BCG regulation plays on the biological activity of macrophages such as proliferation, apoptosis, phenotype, phagocytosis, and how BCG activates macrophages so as to increase the expression TRIM59. Based on the above research background, cell models of this study were established by stimulating RAW264.7 cells with BCG, and transfection technology was used to produce highly TRIM59 expression RAW264.7 cells (TRIM59 cells) and their control cells (Vector cells), as well as the low TRIM59 expression cells (si-TRIM59 cells) and their control cells (Scramble cells). This study is carried out in two aspects as follows:

1. Signal pathways that participate in the BCG regulation of TRIM59 expression.

As to explore the expression mechanism and levels of TRIM59 in BCG stimulate RAW264.7 cells, we used the BCG stimulated RAW264.7 cells, and used TLR2 and TLR4 neutralizing antibody to block these two receptors, and then used siRNA to interfere the expression of IRF5, then found that TRIM59 was highly expressed on the membrane of BCG activated RAW264.7 cells, this is consistent with the experiment results in vivo, and found that high expression of TRIM59 is through TLR2/4/IRF5 signaling pathways.

2. Research on TRIM59 regulates macrophage biological activities.

In order to define the TRIM59 regulation function of macrophages, we used TRIM59 highly and lowly expression RAW264.7 cells as models, detected changes in cell surface molecules, cytokine secretion, phagocytosis, proliferation and apoptosis. We found that the antigen presenting related membrane molecular MHCII, CD86 is reduced, and the non-essential phagocytosis related molecular CD172a, CD206 is increased, the receptor mediated phagocytosis and IgG CD16, CD32, CD64 increases, and the complement mediated phagocytosis CD11b related receptors is reduced, Moreover, TRIM59 can significantly promote the expression of IL-10, inhibit the expression of IFN- γ , promote the expression of TNF- α , has time phase effect on the expression of IL-1 β , while no obvious effect was found on IL-12 expression. In terms of phagocytosis, TRIM59 can promote the non-essential phagocytosis and IgG inducing essential phagocytosis of macrophages, and inhibit the complement mediated essential phagocytosis. Moreover, after the high expression of TRIM59, the G1 phase cells decreased, the S-phase cells increased, and the apoptotic cells did not change significantly. These results indicated that TRIM59 could have a broad effect on macrophages, promoting the secretion of macrophages secreting inhibitory factors, promoting phagocytosis, and promoting the proliferation of macrophages themselves.

This study explored the mechanism of BCG regulation of TRIM59 expression, elaborated the regulation effect of TRIM59 on macrophages' own proliferation and apoptosis, and explored the regulation of TRIM59 on the membrane molecules, cytokines and phagocytic function of macrophages, clarified the expression

significance of TRIM59 in macrophages, and provided new experimental methods and thoughts for studying the regulation TRIM family protein in macrophages.

Key words

BCG; TRIM59; Signal pathway; Macrophages; Regulation; Biological activities

目 录

文献综述.....	1
1. TRIM 蛋白家族研究进展	1
1.1 TRIM 蛋白家族的结构	1
1.2 TRIM 蛋白家族的主要功能.....	4
2. TRIM59 的研究进展	6
2.1 TRIM59 的结构	6
2.2 TRIM59 的功能	6
3. 巨噬细胞的激活与功能的研究进展	7
3.1 巨噬细胞的激活	7
3.2 巨噬细胞的功能	8
3.3 巨噬细胞在疾病中的作用	8
4 TRIM 蛋白家族调节巨噬细胞的研究进展	10
4.1 TRIM 蛋白家族对巨噬细胞功能的促进作用	10
4.2 TRIM 蛋白家族对巨噬细胞功能的抑制作用	10
课题设计思路.....	12
第一部分 BCG 调控 TRIM59 表达的相关信号通路的研究	14
1. 材料和方法	14
1.1 实验对象	14

1.2	实验试剂	14
1.3	其他主要试剂的配制	15
1.4	主要仪器	16
1.5	实验方法	17
2.	实验结果	21
2.1	BCG 对 RAW264.7 细胞中 TRIM59 表达的影响	21
2.2	BCG 调控 RAW264.7 细胞中 TRIM59 表达相关信号通路的研究	23
第二部分 TRIM59 对巨噬细胞生物学活性调控的研究		26
1.1	材料和方法	26
1.1	实验对象	26
1.2	主要试剂	26
1.3	其他主要试剂的配制	27
1.4	主要仪器	27
1.5	实验方法	28
2.	实验结果	29
2.1	高表达、低表达 TRIM59 的巨噬细胞平台的建立	29
2.2	TRIM59 对巨噬细胞生物学活性的调控	31
讨 论		41

结 论.....	44
参考文献.....	45
作者简介及在学期间所取得的科研成果	54
致 谢.....	56

英文缩略词

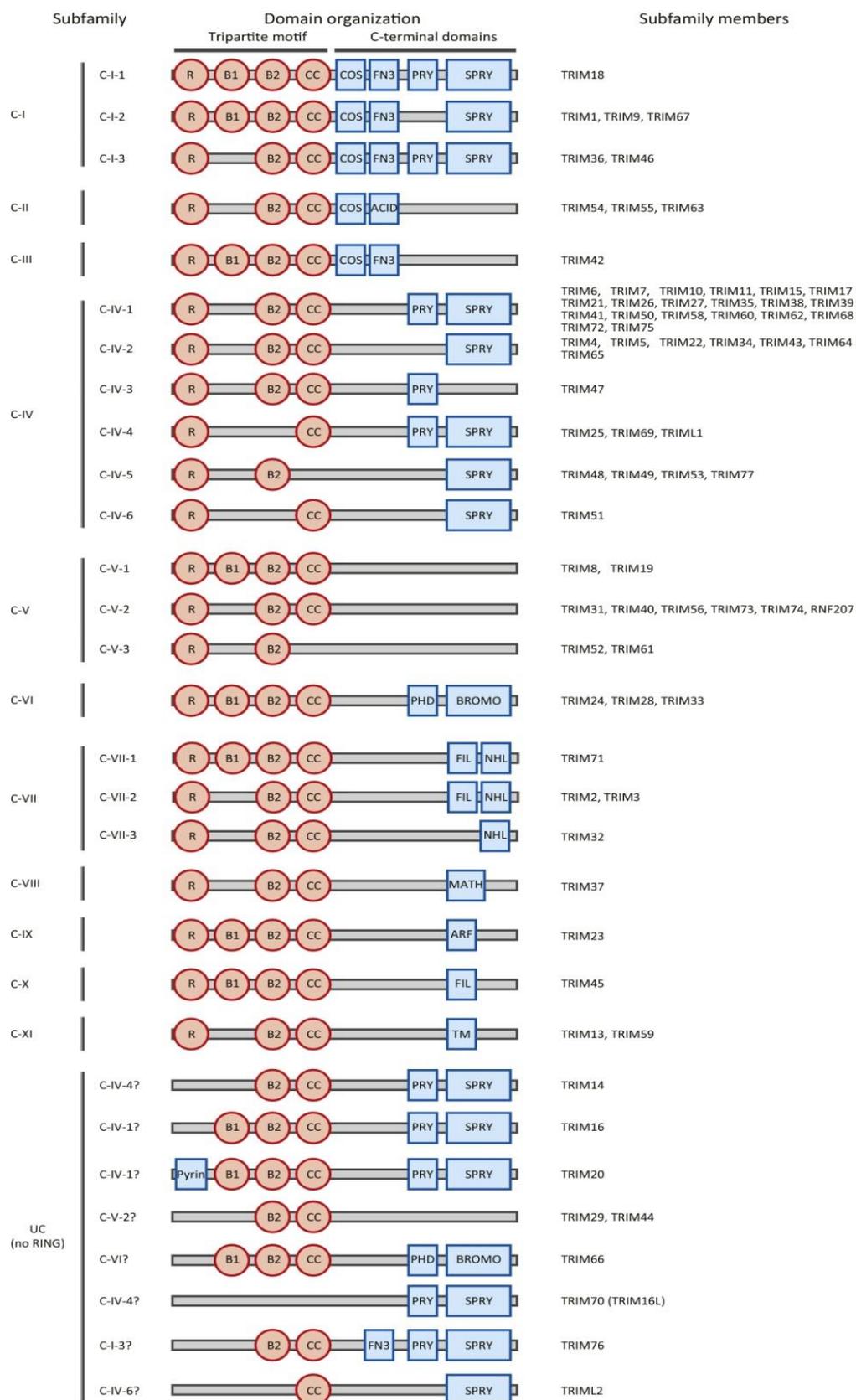
英文缩写	英文全称	中文全称
BCG	bacillus Calmette-Guérin	卡介苗
Caspase	Cysteinyl aspartate specific proteinase	含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶
CD11b	Cluster of Differentiation 11b	白细胞分化抗原 11b
CD16	Cluster of Differentiation 16	白细胞分化抗原 16
CD172a	Cluster of Differentiation 172a	白细胞分化抗原 172a
CD206	Cluster of Differentiation 206	白细胞分化抗原 206
CD23	Cluster of Differentiation 23	白细胞分化抗原 23
CD32	Cluster of Differentiation 32	白细胞分化抗原 32
CD80	Cluster of Differentiation 80	白细胞分化抗原 80
CD86	Cluster of Differentiation 86	白细胞分化抗原 86
IFN- γ	Interferon- γ	干扰素 γ
IL-10	Interleukin-10	白细胞介素 10
IL-12	Interleukin-12	白细胞介素 12
IL-1 β	Interleukin-1 beta	白细胞介素 1 β
MHCII	Major histocompatibility complex class II	MHCII 类分子
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	肿瘤坏死因子 α
TRIM	tripartite motif protein	三结构域蛋白

文献综述

1. TRIM 蛋白家族研究进展

1.1 TRIM 蛋白家族的结构

TRIM 蛋白家族成员众多，在所有的哺乳动物中广泛表达，人类大约表达 80 种 TRIM 蛋白^[1]。TRIM 蛋白家族最显著的特点是结构高度保守，从 N 端到 C 端依次是一个锌指结构域（RING domain）、一个或两个 B-Box 结构域（B-Box domain）、一个卷曲螺旋结构域（Coiled-coil domain）和 C 端的非特异性结构域（C-terminal domain），故 TRIM 蛋白也被称为 RBCC 蛋白^[2]。因 TRIM 蛋白具有 RING 结构域，故被归类于 E3 泛素连接酶。根据结构的不同，TRIM 蛋白被分为经典和非经典（RING 结构域缺乏）两大类（见图 1）^[3]。



Trends in Biochemical Sciences

图 1. TRIM 蛋白家族的分类

RING 结构域是由特定顺序排列的半胱氨酸和组氨酸残基整合两个锌原子组合而成,分为 H2 和 C2 两个亚类。C2 这类 RING 结构域在第五位结合位点为赖氨酸残基,TRIM 蛋白家族就属于这一类。也有一些蛋白没有 RING 结构,但其 B-Box 结构域和 Coiled-coil 结构域是按照相同的空间结构排列的,所以仍归于 TRIM 家族^[4]。TRIM 蛋白家族中的 RING 结构域由 10-20 个氨基酸构成,在介导泛素转移到底物的过程中发挥核心作用,因此也是 E3 泛素连接酶的重要组成部分^[5]。

与 RING 结构类似,B-Box 结构域也有两个锌原子,被分成 B-Box1 和 B-Box2 两类。B-Box 的排列也高度保守,如果蛋白含有两种 B-Box,一定是 B-Box1 排在 B-Box2 之前,如果只有一种 B-Box,一般是 B-Box2^[6],大多数 TRIM 家族的蛋白含 B-Box2。目前对 B-Box 的研究并不多,因与 RING 结构类似,有人认为它也可以作为 E2 的结合位点发挥 E3 泛素连接酶的作用,如 TRIM16 缺少 RING 结构域,在体外实验中,仍发挥 E3 泛素连接酶的作用^[7]。

Coiled-coil 结构域能够介导 TRIM 蛋白家族的同源二聚化的低聚反应,这对 TRIM 蛋白发挥作用至关重要^[2]。通过对 TRIM5 α 、TRIM25、TRIM69、TRIM20 的结构进行研究发现,Coiled-coil 采用反向平行的二聚体的方式,将 RING 和 B-box 结构域上的细长的中央螺旋干两侧连接起来,从而对整体的蛋白质结构进行限制。基于 Coiled-coil 序列的保守性,这种反向平行排列是 TRIM 家族蛋白的共同特征^[8]。

TRIM 蛋白 C 端的结构域往往能够介导特异性靶蛋白的识别。现有研究表明,大约 30 多种 TRIM 蛋白中 C 端的结构域是 PRY-SPRY,也就是 B30.2 结构域^[9],这个结构域主要介导蛋白之间的相互作用,尤其是在免疫信号通路中发挥重要作用^[10]。在 TRIM2、TRIM3 和 TRIM71 中,C 端的结构域是与 B30.2 类似的 NHL 结构域,这类 NHL 结构域被丝蛋白结构域包围,而在 TRIM32 中,NHL 结构域单独存在于 RBCC 之后。也有 TRIM 蛋白的 C 端结构域是特有的,如 TRIM23 的 C 端是 ARF (ADP-ribosylation factor) 结构域,TRIM37 是 MATH (Meperin and TRAF Homology) 结构域^[8]。

1.2 TRIM 蛋白家族的主要功能

TRIM 蛋白因有 RING 结构而被归为 E3 泛素连接酶中 RING 家族, 在泛素化中发挥作用^[1]。泛素化是泛素分子以共价键结合特异性目的蛋白的赖氨酸残基, 发生转录后修饰的过程。泛素活化酶 (E1)、泛素交联酶 (E2)、泛素连接酶 (E3) 是泛素化的重要组成部分, 其中 E3 的作用是将 E2 与目的蛋白连接^[11]。最初, 泛素化被认为是蛋白酶降解的一种机制^[11], 随着研究的深入, 人们发现泛素化也调节转录、蛋白质的运输, 在病理情况下, 参与感染性疾病、肿瘤、自身免疫紊乱等^[3]。

1.2.1 病毒感染

TRIM 家族蛋白在抗 HIV-1 病毒中发挥了重要的作用。HIV-1 能够引起获得性免疫缺陷综合症 (AIDS), 当 HIV-1 感染靶细胞 CD4⁺T 细胞和巨噬细胞时, 病毒包膜与细胞膜融合, RNA 病毒释放到细胞内。TRIM5 α 通过 PRY-SPRY 结构域识别 HIV-1, 促进病毒外壳过早脱壳, 抑制蛋白转录^[12]。虽然人 TRIM5 α 不能抑制 HIV-1 感染, 但对人 TRIM5 α 进行基因修饰成为治疗 HIV 的策略之一^[13]。TRIM22 能通过抑制 HIV 末端重复的 LTR (long terminal repeat) 序列来控制转录的启动子^[14], TRIM28 能够抑制 HIV-1 整合进宿主的基因组^[15]。不仅是抗 HIV-1, TRIM 蛋白家族也抗其他病毒。1994 年爆发在波多尼哥的登革热是病毒通过 K48 位泛素化降解 TRIM25 导致 RIG-I 受到抑制, I 型干扰素分泌减少所导致的^[16]。TRIM19 能结合一些由病毒产生的蛋白质, 如淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、拉沙热病毒、爱普斯病毒、巴尔病毒和猿类病毒 40, 并作为抑制病毒复制和传播的核因子而发挥抗病毒作用^[17]。

1.2.2 肿瘤

TRIM 蛋白能够调控多种肿瘤, 并且, 同一种肿瘤可以由多种 TRIM 蛋白调控, 一种 TRIM 蛋白也可以调节不同的肿瘤, 甚至同一种 TRIM 蛋白在不同类型的肿瘤中发挥不同的作用。

1) 促进肿瘤的发生发展 在肿瘤中, 促进肿瘤发生发展的 TRIM 蛋白很多。TRIM14 通过 NK- κ B 促进骨肉瘤的侵袭^[18], TRIM25 通过 p53 促进前列腺癌的增殖^[20], TRIM31 在肝癌中高表达并促进肿瘤的进程^[18], TRIM47 高表达与前列腺癌并与预后相关^[21]。TRIM24 在胶质母细胞瘤中是促癌基因^[19], 并在急性髓细胞性白血病的一些亚型中高表达, 参与染色体重组, 从而导致 8p11 骨髓增生综合症^[22]。

2) 抑制肿瘤的发生发展 现有的研究表明大量的 TRIM 蛋白抑制肿瘤。TRIM16 能够抑制膀胱癌^[23]、卵巢癌^[24]、神经母细胞瘤、乳腺癌^[25]、黑色素瘤^[26]。TRIM13 是公认的 B 细胞慢性淋巴细胞白血病中的肿瘤抑制基因^[27]。TRIM40 能够通过抑制 NF- κ B 通路负向调节胃肠肿瘤^[28]。TRIM62 被认为是许多肿瘤中一个肿瘤抑制基因, 包括抑制急性髓细胞性白血病等^[29]。

3) 双向调节肿瘤的发生发展 TRIM29 高表达于骨肉瘤^[30]、子宫颈癌^[31]、膀胱癌^[32]、甲状腺癌^[33]等, 促进肿瘤的侵袭与转移, 与疾病预后相关, 但也可以抑制肺鳞癌的增殖和转移^[34]。TRIM31 在非小细胞性肺癌中低表达, 是潜在的抑癌基因^[35], 而在卵巢癌中, TRIM31 的下调促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和耐药性^[24]。TRIM33 能够抑制慢性粒单核细胞白血病, 但在 B 细胞急性淋巴细胞白血病中, 起促进作用^[36]。

1.2.3 自身免疫疾病

在抗病毒及炎症中, TRIM 蛋白能促进或抑制干扰素及 IL-1 β 等细胞因子的分泌, 一旦分泌异常, 极易引起自身免疫性疾病。TRIM16 的高表达与大鼠模型中滑膜增生诱导的类风湿性关节炎呈正向相关^[37], 可能是因为 TRIM16 能够调节 TNF 介导的自身抗原波形蛋白的分泌, 从而促进风湿性关节炎的发生发展^[38]。TRIM21 在皮肤红斑狼疮中表达增加^[39], 大量实验数据说明 TRIM21 与 IRF 相互作用并调节了 IFN 的稳定性, 影响干扰素的转录。TRIM21 对 I 型干扰素及炎性细胞因子的产生和潜在的自身免疫来说是一个至关重要的因素^[38]。人内源性逆转录病毒序列 HERV 与 SLE 和其他自身免疫性疾病相关, TRIM28 能够招募蛋白甲基化相关的蛋白, 抑制 HERV 的表达^[40], 当 TRIM28 缺陷时, HERV 转录增强, 可能引起自身免疫疾病。在全基因组的研究中, TRIM27 和 Crohn's 病、类

风湿性关节炎、I型糖尿病有关,但是机制不清^[41]。总体来看,TRIM 蛋白家族抗炎抗病毒作用与自身免疫疾病的发生密切相关。

2. TRIM59 的研究进展

2.1 TRIM59 的结构

TRIM59 从 N 端到 C 端依次是 RING 结构域, B-Box2 结构域, Coiled-coil 结构域和跨膜结构域, 是典型的 TRIM 蛋白结构^[3, 42], 能泛素化 p53 发挥泛素连接酶的作用。有研究对 TRIM59 进行结构预测, 发现 TRIM59 胞外区较长, 可能参与细胞与细胞间黏附^[42]。与 TRIM 家族其他蛋白一样, TRIM59 在不同的细胞中发挥的作用不尽相同。

2.2 TRIM59 的功能

2.2.1 调控肿瘤的发生、发展

在肿瘤细胞中, TRIM59 主要促进肿瘤的发展。TRIM59 促进肝癌细胞的增殖、迁移及转移^[43], 通过抑制 STAT3 的 TC45 去磷酸化促进胶质瘤^[44], 并通过 PI3K/AKT 途径促进结肠直肠癌的转移^[45]。敲低 TRIM59 后, 子宫颈癌细胞和前列腺癌细胞的增殖与迁移都受到抑制^[46, 47]。TRIM59 高表达于骨肉瘤, 促进骨肉瘤细胞的增殖和迁移^[48], 同样, TRIM59 在胃癌高表达, 通过泛素化降解 p53, 促进肿瘤进程^[49]。在非小细胞性肺癌中, TRIM59 通过上调表达细胞周期相关的蛋白促进肿瘤细胞的增殖^[50]。TRIM59 能够调节多种肿瘤, 因此有人认为, TRIM59 可以作为肿瘤的标志物, 在肿瘤诊断和预后判断中发挥作用^[51], 而本课题组证明 TRIM59 高表达于 BCG 激活的巨噬细胞表面, 参与巨噬细胞直接杀伤 MCA207 纤维肉瘤细胞^[42]。

2.2.2 调控固有免疫应答

TRIM59 在固有免疫应答中也发挥作用。ECSIT 是 TLRs 介导的信号通路中的接头蛋白, 研究发现, TRIM59 可通过结合 ECSIT 调节 NF- κ B 和 IFN- β 的转录, TRIM59 高表达时, 转录受到抑制, 低表达时, 转录增强, 其中, RING 结构域发挥主要作用, 但并不是通过泛素化降解途径。研究还发现, TRIM59 抑制 IRF3/IRF7 的磷酸化和二聚体的形成。这些结果说明 TRIM59 可以多方面调控固有免疫应答^[52], 但 TRIM59 对固有免疫应答中巨噬细胞的调节作用还未见报导。

3. 巨噬细胞的激活与功能的研究进展

3.1 巨噬细胞的激活

巨噬细胞是重要的免疫细胞, 参与机体众多生理或病理活动, 具有显著的异质性和可塑性^[53, 54]。巨噬细胞在不同刺激物的激活下其表型及功能发生改变, 这种改变对维持体内平衡、抵御病原微生物入侵、抗原提呈、杀伤肿瘤等方面起到重要作用^[55]。

大多数研究将 Th1 型细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 及 LPS 诱导的巨噬细胞称为经典途径激活的 M1 型, 将 IL-4 和 IL-13 诱导的巨噬细胞称为替代途径激活的 M2 型^[56]。LPS 通过 TLR2/4 上调 IRFs 从而极化巨噬细胞为 M1 型, IL-4 和 IL-13 通过 IL-4 受体激活 STAT6, 使巨噬细胞向 M2 型极化。IL-10 也可以通过 IL-10 受体激活 STAT3 将巨噬细胞极化为 M2 型。

BCG 是减毒牛型结合杆菌活疫苗, 早在 1976 年就被应用于浅表膀胱癌的治疗, 随着研究的深入, 研究者发现 BCG 经灌注膀胱癌后, 肿瘤细胞周围浸润大量的巨噬细胞, 由此揭开了巨噬细胞抗肿瘤的序幕^[57]。此后的研究发现, BCG 通过巨噬细胞上 TLR2 亚家族 (TLR1、TLR2、TLR6、TLR10) 和 TLR4 以 MyD88/TRAF6 信号依赖途径激活了转录因子 NF- κ B、p38MAPK 及 JNK。BCG 作用于巨噬细胞后, 上调 TLR2 和 MyD88 的表达, 从而使 p38MAPK 和 I κ B- α 磷酸化, 激活了 NF- κ B 和 p38MAPK 通路, 同时通过 ASK1-MKK-JNK 通路, 促进巨噬细胞表达杀伤效应分子如 TNF- α 和 IL-1、和 IL-6 以及与杀伤有关的调

节因子，从而使其具有肿瘤杀伤活性^[58]。

3.2 巨噬细胞的功能

在生理和病理条件下，巨噬细胞都能通过其自身抗炎、抑炎、吞噬、杀伤、抗原提呈、ADCC作用等清除病原体，维持体内平衡，是免疫应答不可或缺的一部分。

M1型巨噬细胞合成和分泌更高水平的促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-23、COX-2、NO 和 ROS 参与炎症反应。因此，M1型巨噬细胞具有强大的抗微生物和抗凝血活性，并能调节组织的组织损伤，损伤组织再生和伤口愈合。为了防止这种组织损伤，炎症反应受到由 M2型巨噬细胞抗炎作用的抑制，并且 M1型巨噬细胞能够介导 Th1 和 Th17 细胞反应，高表达抗原提呈相关分子，具有更强的抗原提呈能力^[55]。另有研究证明，当细菌及病毒感染时，M1型巨噬细胞对感染细胞具有强大的细胞毒性作用，并能调节机体抗感染的能力^[59, 60]。

M2型巨噬细胞的特点是分泌高水平的 IL-10、TGF- β 和低水平的 IL-12^[61]。M2型巨噬细胞又分为 M2a、M2b 和 M2c，这三种细胞都有抑炎作用，M2a型巨噬细胞和 M2b型巨噬细胞参与免疫调节，介导 Th2型免疫应答，M2c型巨噬细胞则参与细胞外基质的重建^[62, 63]，并且，M2a型巨噬细胞和 M2c型巨噬细胞能够分泌生长因子，促进了血管生成和组织修复^[64]。Th2型免疫应答介导寄生虫感染，故 M2型巨噬细胞在寄生虫感染中起主要作用^[65]。总体来说，M2型巨噬细胞能够抑制炎症，具有强大的吞噬能力，能够快速清除碎片和凋亡细胞，促进组织修复和伤口愈合，并促进组织重塑、血管生成，参与免疫调节及肿瘤的发生发展^[66]。

3.3 巨噬细胞在疾病中的作用

3.3.1 过敏性哮喘

过敏性哮喘是慢性炎症引起的呼吸道疾病。哮喘患者的呼吸道中巨噬细胞浸

润在 Th2 型细胞因子的环境中, 包括 IL-4、IL-13 和 IL-33, 最终将巨噬细胞驯化成 M2 型。M2 型巨噬细胞反过来分泌更多的细胞因子招募嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和 Th2 细胞到肺部, 恶化疾病并引发并发症^[61]。不仅 M2 型巨噬细胞参与哮喘, M1 型巨噬细胞可能通过释放炎症细胞因子而导致哮喘的发病, 这一结果支持了恶化肺损伤和气道重构^[55]。

3.3.2 自身免疫疾病

巨噬细胞在自身免疫疾病中如类风湿性关节炎、自身免疫性脑脊髓炎、多发性硬化、Crohn's 病和炎症性肠病中都发挥重要的作用。TNF- α 是类风湿性关节炎的重要诱因, IL-23 促进联合自身免疫性炎症其他细胞因子如 IL-1 β 、IL-12、IL-18 和 IL-23 都被认为是慢性炎症和自体免疫疾病的重要媒介和驱动因素, 而巨噬细胞是这些炎症细胞因子的重要来源^[67]。

3.3.3 肿瘤

巨噬细胞在肿瘤的免疫治疗中扮演重要角色, 与肿瘤的生长退化密切相关。M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞在肿瘤方面的作用有所差异。M1 型巨噬细胞能够通过分泌 IFN- γ 介导 Th1 型免疫应答, 这种 Th1 型免疫应答促进巨噬细胞分泌 NO 从而非特异性抑制肿瘤。M1 型巨噬细胞介导的免疫反应占主导时, 肿瘤发病率更低^[68]。M2 型巨噬细胞能够通过分泌 TGF- β 和 IL-10, 促进 T 细胞分化为 Treg 及其他类型的 T 细胞, 介导非抗肿瘤免疫应答。M2 型巨噬细胞在肿瘤中占主导地位时, 能分泌更多的促生长因子, 加快肿瘤生长。但是, 将修复型的 M2 型巨噬细胞驯化为杀伤型的 M1 型巨噬细胞, 则能够抑制肿瘤的生长^[69]。巨噬细胞的应答也能预示肿瘤的预后, M1/M2 比例较高的肿瘤恶性程度较低^[68]。如果有特定的肿瘤抗原, 巨噬细胞介导的适应性免疫应答能够激活相应的杀伤性 T 细胞, 使 T 细胞能够识别和杀伤肿瘤细胞, 避免了巨噬细胞带来的非特异性损伤, 有利于 T 细胞及 B 细胞记忆性的形成^[70]。

3.3.4 其他疾病

M1 型巨噬细胞通过分泌促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 等引起慢性炎症促进动脉粥样硬化和 2 型糖尿病, M2 型巨噬细胞通过分泌抑炎因子抑制疾病进程。M1 还可引起肥胖相关的炎症及胰岛素抵抗^[66]。总的来说, 巨噬细胞参与机体各方面的调节, 在维持机体稳态中发挥不可或缺的作用。

4 TRIM 蛋白家族调节巨噬细胞的研究进展

巨噬细胞作为固有免疫细胞, 在固有免疫应答及适应性免疫应答中发挥重要作用, 现有研究发现, TRIM 家族成员能够促进或者抑制巨噬细胞的功能。

4.1 TRIM 蛋白家族对巨噬细胞功能的促进作用

TRIM 蛋白可以激活巨噬细胞中多个转录因子, 增强免疫应答。TRIM12c 是 TRIM5 α 样蛋白, 能够结合 TRAF6, 促进 TRAF6 的泛素化, 激活 IFN 和 NF- κ B 信号通路, 增强固有免疫应答^[71]。TRIM22 也促进 NF- κ B 的激活和转录^[72]。TRIM31 通过 K63 多聚泛素化招募并激活 MAVS, 促进巨噬细胞抗病毒的功能^[73]。

4.2 TRIM 蛋白家族对巨噬细胞功能的抑制作用

TRIM 蛋白家族也能抑制巨噬细胞的功能。TRIM21^{-/-}小鼠与野生型小鼠的巨噬细胞或树突细胞受 TLR 配体、干扰素刺激时, 诱发的炎性细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 反应未见显著差异^[74], 说明 TRIM21 对其功能的调节起到负向调控的作用^[75]。IRF5 高表达于促炎性的 M1 型巨噬细胞, 促进巨噬细胞向 M1 型极化, 增强 Th1 和 Th17 介导的免疫应答, 而 TRIM28 可抑制 IRF5 的功能, 抑制巨噬细胞的免疫应答^[76]。敲除巨噬细胞中的 TRIM38 后, TLR3 和 TLR4 介导的 I 型干扰素和促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的分泌明显增多, 说明 TRIM38 能够抑制巨噬细胞的固有免疫应答及炎症反应^[77]。NAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1) 是 NF- κ B 激活酶相关的蛋白, 参与 TLRs 介导的 IRF3 的激活和 IFN- β 的分泌, TRIM38 通过 K48 多聚泛素化降解 NAP1, 抑制 TLR3/4 和 RIG-I 介导

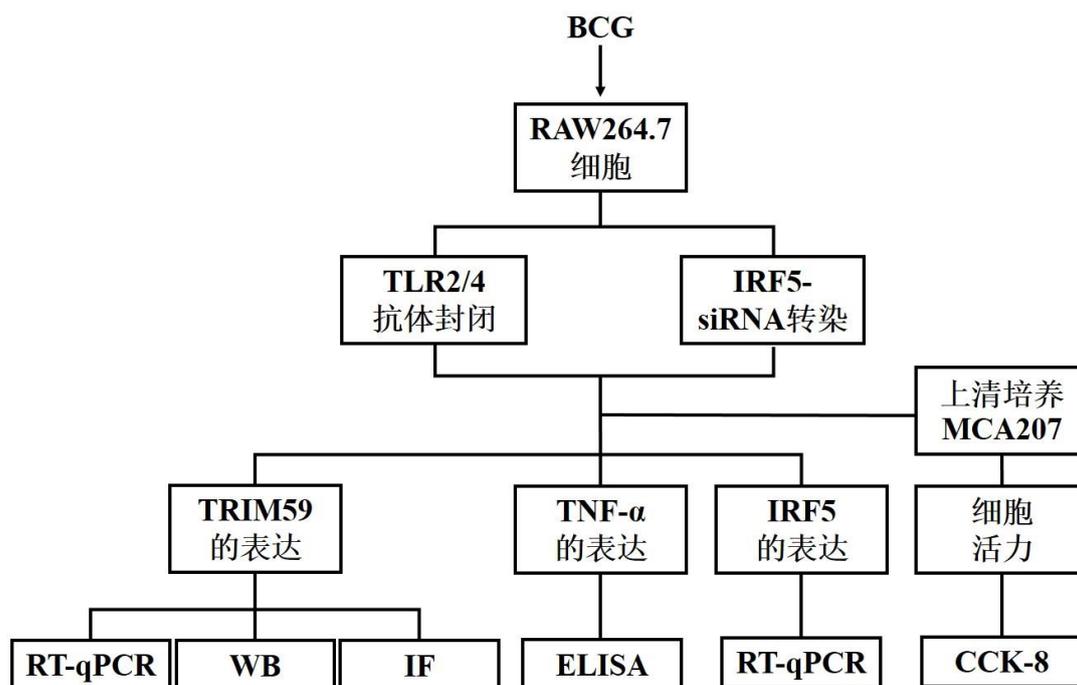
的 IFN- β 的产生和抗病毒反应^[78]。TRIM13 抑制 MAD5 介导的 I 型干扰素的产生^[79]，而 TRIM30 α 通过降解 TAB2/3 抑制 TLRs 介导的 NF- κ B 的激活^[75]。

2012 年的研究发现 TRIM59 通过结合 ECSIT 抑制 RLR 诱导的 IRF3/IRF7 和 NF- κ B 转录，提示 TRIM59 可以作为固有免疫信号的调节因子发挥负性调节的作用^[52]。那么，巨噬细胞受 BCG 刺激后高表达 TRIM59 是否通过 TLRs 介导，TRIM59 对巨噬细胞的调节作用又是怎样的呢，是否影响巨噬细胞表面分子表达、细胞因子分泌及其他功能，这些是本研究课题要解决的问题。

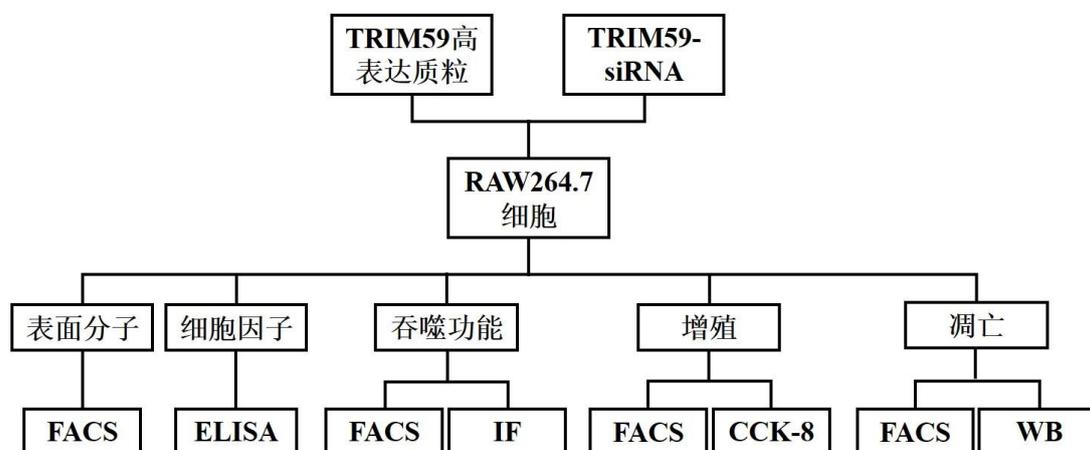
课题设计思路

如上所述，TRIM 家族的蛋白对固有免疫应答具有多种调节作用，并且 TRIM59 也被证实能调节固有免疫。巨噬细胞是固有免疫不可或缺的一部分，有着多种表型及多种功能，受多种因素影响，而现有研究鲜有报导 TRIM 蛋白及 TRIM59 对巨噬细胞的调节。课题组前期工作发现，TRIM59 高表达于 BCG 刺激后的巨噬细胞表面，这种 BCG 激活的巨噬细胞具有直接接触杀伤作用，但其高表达机制不清。因此，本研究欲先探讨 BCG 调控 TRIM59 表达的机制，然后再以高表达和低表达 TRIM59 的巨噬细胞为细胞模型，探讨 TRIM59 对巨噬细胞生物学活性的影响。

第一部分：BCG 调控 TRIM59 的信号转导通路研究



第二部分：TRIM59 对巨噬细胞生物学活性调控的研究



第一部分 BCG 调控 TRIM59 表达的相关信号通路的研究

1. 材料和方法

1.1 实验对象

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 来源于科室保存。

1.2 实验试剂

试剂名称	公司及产地
DMEM 培养基	美国 Sigma
胎牛血清	以色列 BI
胰酶	美国 Sigma
PBS	中国鼎国
RNAiso Plus	日本 Takara
Oligo	日本 Takara
M-MLV	日本 Takara
RNase 酶抑制剂	日本 Takara
dNTPs	日本 Takara
SYBR [®] Premix EX Taq [™]	日本 Takara
DNA Marker	北京全式金
蛋白酶抑制剂	德国 Roche
RIPA 蛋白裂解液	中国 Beyotime
蛋白 Marker	美国 Thermo
SDS	中国鼎国
过硫酸铵	中国鼎国
SDS-PAGE 配胶试剂盒	北京博奥龙
甘氨酸	中国鼎国

Tris-base	中国鼎国
脱脂奶粉	中国鼎国
PVDF 膜	美国 Millipore
抗 GAPDH 单克隆抗体	中国 Proteintech
抗 TRIM59 多克隆抗体	美国 Sigma
HRP 标记山羊抗小鼠抗体	中国 Proteintech
HRP 标记山羊抗兔抗体	中国 Proteintech
ECL 显色液	美国 Life Technology
TNF- α ELISA 检测试剂盒	美国 eBioscience
TLR2 中和抗体	美国 eBioscience
TLR4 中和抗体	美国 eBioscience
PEI Transfection Reagent	英国 Polysciences
IRF5-siRNA	中国锐博
Tween 20	中国鼎国
F4/80-FITC 抗体	美国 Sigma
SDS-PAGE 配胶试剂盒	北京博奥龙
5 \times Protein loading buffer	北京百奥森泰
20 \times Running buffer	美国 Thermo

1.3 其他主要试剂的配制

1. 10% SDS 溶液

称取 0.1g SDS 粉末于 EP 管，加入 1ml 高压的双蒸水，静置待溶解，现配现用。

2. 10%过硫酸铵溶液

称取 0.1g 过硫酸铵粉末于 EP 管，加入 1ml 高压的双蒸水，静置待溶解，现配现用。

3. 转膜缓冲液

试剂	用量
Tris-base	3.03g
甘氨酸	14.4g
甲醇	200ml
双蒸水	Up to 1L

1.4 主要仪器

仪器名称	厂家及产地
细胞用超净工作台	中国苏净安泰
低温高速离心机	美国 Thermo
低速离心机	中国君意
普通光学显微镜	日本 SANYO
蒸汽高压灭菌锅	日本 SANYO
细胞培养箱	日本 SANYO
恒温水浴箱	中国中和
4°C冰箱	中国海尔
-20°C冰箱	中国海尔
-80°C冰箱	日本 SANYO
电泳仪	中国君意
水平电泳槽	中国君意
转膜仪	中国君意
多功能酶标仪	美国 Bio-Rad
ECL 成像仪	美国 Gene
实时定量 PCR 仪	美国 ABI
PCR 仪	美国 PERKIN

1.5 实验方法

1.5.1 RT-PCR 及 RT-qPCR

1.5.1.1 RAW264.7 细胞总 RNA 提取

1. 向细胞中加入 1ml RNAiso Plus, 充分裂解后, 转移至 1.5ml Nase free 的 EP 管中, 室温下静置 5min, 加入 200 μ l 三氯甲烷, 用枪吹匀, 室温静置 10min 后, 于 4 $^{\circ}$ C 预冷的离心机中 12000g 离心 15min;
2. 将离心后的上层水相转移至新 EP 管中, 加入 0.5ml 异丙醇, 用 1ml 枪头吹匀, 室温静置 10min 后, 于预冷的 4 $^{\circ}$ C 离心机中, 以 12000g 的离心力离心 15min 后, 肉眼可见白色 RNA 沉淀;
3. 弃去上清, 向沉淀中缓慢加入 1ml DEPC 水配制的 75% 乙醇, 于 4 $^{\circ}$ C 离心机中 7500g 离心 1min;
4. 弃去上清, 室温干燥 RNA 沉淀 30min, 待白色沉淀开始变为无色透明时, 加 20 μ l DEPC 水, 并置于 55 $^{\circ}$ C 水中水浴 10min, 待 RNA 完全溶解后, 用酶标仪检测浓度。

1.5.1.2 RT 反应

1. 反应体系

试剂	用量
RNA	1 μ g
Oligo dT	1 μ l
5 \times RT buffer	4 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
M-MLV	1 μ l
dNTPs	2 μ l
高压双蒸水	Up to 20 μ l

2. 按以下条件进行逆转录

37 $^{\circ}$ C	5min
42 $^{\circ}$ C	60min
95 $^{\circ}$ C	10min

1.5.1.3 实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)

1. 引物序列:

TRIM59: Forward 5'-GCTTCTACTGGCATAGAATCCTTAC-3'

Reverse 5'-ACATCTGGGTGGTCTTCTTGCT-3'

GAPDH: Forward 5'-GACTTCAACAGCAACTCCACTC-3'

Reverse 5'-TAGCCGTATTCATTGTCATACCAG-3'

2. RT-qPCR 反应体系如下:

试剂	用量
cDNA	1 μ l
SYBR [®] Premix EX Taq [™]	10 μ l
上游引物	0.5 μ l
下游引物	0.5 μ l
高压双蒸水	8 μ l

反应条件:

Stage 1 预变性 1 cycle	95°C 5min
Stage 2 热循环 40 cycles	95°C 15s
	60°C 1min

1.5.2 Western blotting

1. 蛋白样品的制备

向细胞中加入预混的 300 μ l 蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂, 冰浴 30min, 期间每 10min 涡旋一次, 以保证细胞充分裂解, 冰浴结束后, 于预冷的 4°C 离心机 12000g 离心 30min, 取上清。

2. 蛋白浓度的测定

将待测样品稀释 4 倍, 按照 Beyotime 公司 BCA 法蛋白定量试剂盒进行操作。

3. SDS-PAGE 凝胶电泳及免疫印迹

- 1) 组装制胶器及玻璃板, 配制 10% 的分离胶, 注入两个玻璃板之间至顶端约 2cm 处, 然后注入 1ml 无水乙醇, 室温静置至凝固; 配制浓缩胶, 待分离胶凝固之后, 将浓缩胶加至分离胶上层, 插入梳子, 室温静置至凝固; 将凝固的凝胶放置于电泳槽中, 将 1 \times running buffer 倒满至内槽, 并向外槽加入电泳液没

- 过电极丝，缓慢拔出浓缩胶中的梳子；
- 2) 按照蛋白浓度调整蛋白上样量，加入 5× loading buffer 和 1× loading buffer，沸水浴 5min，使蛋白变性。
 - 3) 以 80V 恒压进行凝胶电泳，当溴酚蓝染料到达浓缩胶与分离胶的分界处时，更换电压至 120V 继续电泳，直至蛋白 marker 条带完全分离时停止电泳，然后将分离胶放于转膜缓冲液中，切下目的蛋白，裁剪适宜的 PVDF 膜和滤纸，PVDF 膜浸泡在甲醛中活化 30s 后放于转膜缓冲液中，滤纸和海绵浸泡于转膜缓冲液，从负极到正极依次放置：海绵-滤纸-凝胶-PVDF-滤纸-海绵，然后放入电转槽中，在 4℃冰箱进行转膜，转膜条件为 250mA 恒流 100min；
 - 7) 转膜结束后，取出 PVDF 膜放于含 5%脱脂牛奶的 PBST 中，室温摇床上封闭 1h；
 - 8) 孵育一抗：按照说明书配制适宜浓度的一抗，将封闭后的 PVDF 膜放入一抗中，4℃孵育过夜；
 - 9) 取出一抗封闭后的 PVDF 膜，用 PBST 浸泡并放置摇床上漂洗 3 次，10min/次；
 - 10) 孵育二抗：根据一抗的种属，按照说明书配制适宜浓度的二抗，将漂洗后的 PVDF 膜放入二抗中，室温摇床上孵育 1h；
 - 11) 取出二抗封闭后的 PVDF 膜，用 PBST 浸泡并放置摇床上漂洗 3 次，10min/次；
 - 12) ECL 显色：按照说明书配制 ECL 显色液，均匀滴加至 PVDF 膜上，避光放置 1-2min 后，于凝胶成像仪中拍照。

1.5.3 ELISA

收集细胞培养上清，稀释 2-4 倍后，按照 eBioscience 公司的 ELISA 试剂盒说明书进行操作，用酶标仪检测 570nm 处吸光值，按照标准品绘制标准曲线并计算待测样品的浓度。

1.5.4 siRNA 转染

1. 计数并调整 RAW264.7 细胞浓度，以 5×10^5 cell/well 接种于 6 孔板，放于细胞培养箱中过夜，待第二天细胞密度达到 60%-70%时转染；
2. 将 2 μ l siRNA 和 6 μ l PEI Transfection Reagent 分别溶于 50 μ l DMEM 中，轻轻

涡旋 3 下，再将后者轻轻滴加至前者，再轻轻涡旋三下，室温静置 30min。取出接种细胞的 6 孔板，PBS 轻轻洗 3 次，加入 2ml 完全培养液，然后将孵育好的混合物轻轻滴加到对应的孔中，轻轻晃动孔板使其分散均匀，放回细胞培养箱中继续培养 24-48h 后用于其他实验。

1.5.5 CCK-8

1. 胰酶消化 RAW264.7 细胞，计数并调整细胞浓度，以 0.5×10^5 cell/well 接种于 12 孔板，待细胞贴壁后，加入 TLR2 和 TLR4 中和抗体，30min 后，或者于转染 IRF5-siRNA 24h 后，加入 BCG 0.3mg/ml 刺激 24h，取上清，离心后除去细胞碎片并过滤待用；
2. MCA207 细胞正常培养，并以 1×10^4 /well 接种于 96 孔板；待细胞贴壁后，加入经过上述处理的细胞培养上清 200 μ l/孔；
3. 48h 后按照说明掺入 CCK-8 试剂；
4. 加入 CCK-8 后，孵育 0.5h、1h 及 2h 后测定 450nm 处的吸光值，选择最佳条件。

1.5.6 免疫荧光

1. RAW264.7 细胞以 5×10^4 /well 接种于 12 孔板，待细胞贴壁，加入 TLR2 和 TLR4 中和抗体作用 30min 后，加入 BCG 0.3mg/ml 刺激 24h；
2. 刺激结束后，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，加入 4% 多聚甲醛 1ml/孔，固定 10min；
3. 固定结束后，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，加入 5% 脱脂奶粉 1ml/孔，37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 1h；
4. 孵育结束后，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，加入 TRIM59 和 F4/80 抗体，放入湿盒，4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜孵育；
5. 孵育结束后，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，用 DAPI 染核，室温避光孵育 5-10min；
6. 孵育结束后，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，于荧光显微镜下观察结果。

2. 实验结果

2.1 BCG 对 RAW264.7 细胞中 TRIM59 表达的影响

课题组前期结果发现, BCG 通过腹腔刺激巨噬细胞后, TRIM59 高表达, 但机制不清。为了明确 BCG 对巨噬细胞中 TRIM59 的调控机制, 我们用 0.3mg/ml BCG 刺激 RAW264.7 巨噬细胞系, 24h 后在基因水平和蛋白水平都检测到 TRIM59 高表达, ELISA 检测到 TNF- α 的分泌显著上调, 说明 BCG 刺激有效; 将 F4/80 和 TRIM59 进行免疫荧光共染, 发现二者的位置几乎重合, 而 F4/80 是公认的膜蛋白, 这说明 BCG 刺激 RAW264.7 细胞后 TRIM59 高表达在膜上, 结果见图 1.1。

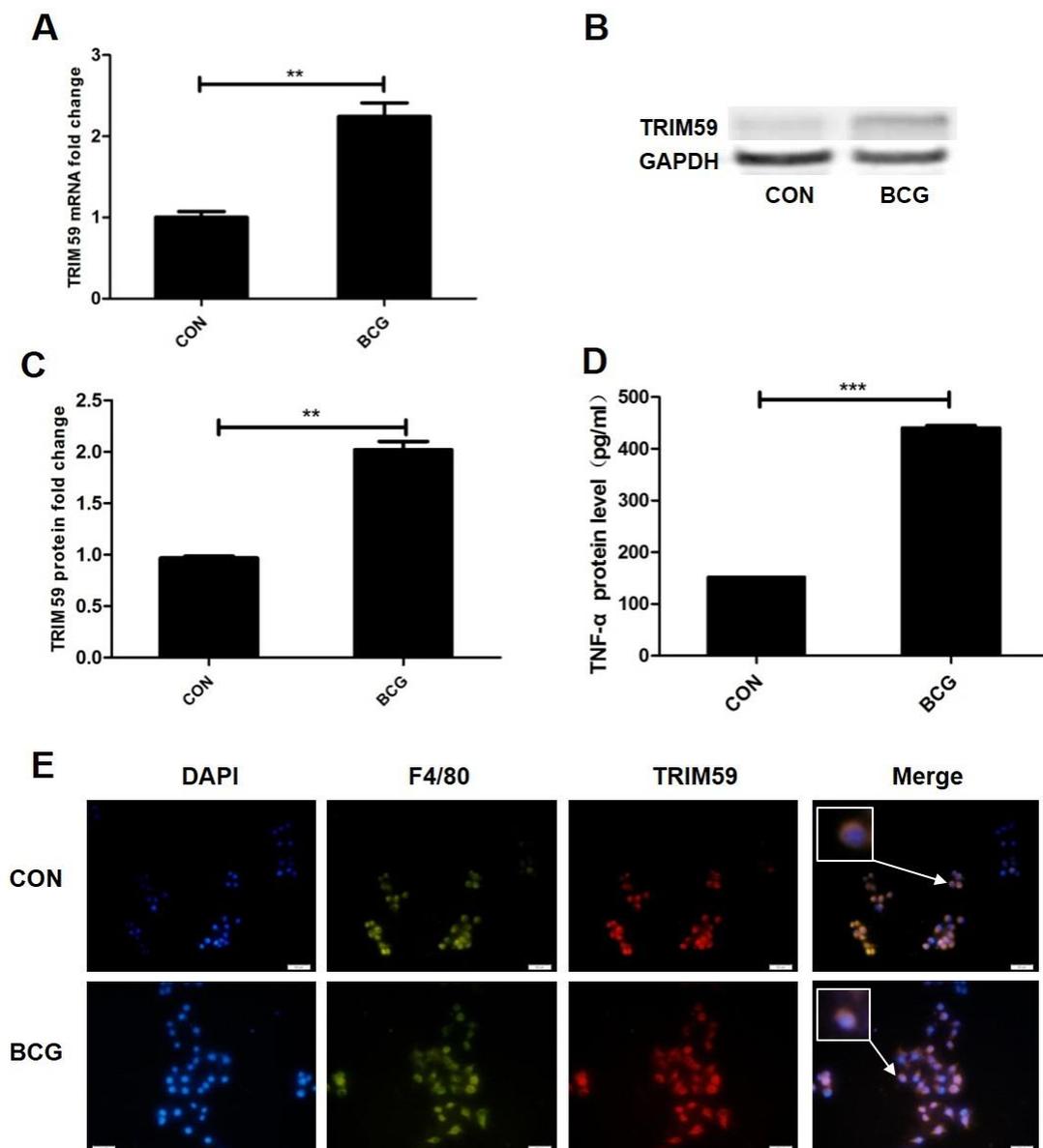


图 1.1 BCG 刺激 RAW264.7 细胞后 TRIM59 的表达情况

(A) RT-qPCR 检测 BCG 刺激 RAW264.7 细胞后 TRIM59 基因水平的表达；(B, C) Western blotting 检测 BCG 刺激 RAW264.7 细胞后 TRIM59 蛋白水平的表达，并进行蛋白灰度值统计；(D) ELISA 检测 BCG 刺激 RAW264.7 细胞后 TNF- α 的表达；(E) 荧光显微镜检测 BCG 刺激 RAW264.7 细胞后 TRIM59 的表达。

P<0.01, *P<0.001, ns: no significance.

2.2 BCG 调控 RAW264.7 细胞中 TRIM59 表达相关信号通路的研究

为了探究 BCG 上调 TRIM59 表达的作用机制,我们用 TLR2/4 中和抗体预先处理 RAW264.7 细胞 30min,然后再用 0.3mg/ml BCG 刺激细胞,24h 后收集细胞及上清,并将上清与 MCA207 细胞共培养 48h,用 RT-qPCR 和 Western blotting 检测 TRIM59 及 IRF5 的表达,用 ELISA 检测 TNF- α 的分泌作为 BCG 刺激有效的参照,用 CCK-8 检测 MCA207 细胞活力,结果如图 1.2。TLR2/4 中和抗体预先处理 RAW264.7 细胞后,TRIM59 的表达明显降低,尤其是 TLR2 封闭后,IRF5 和 TNF- α 的表达趋势与 TRIM59 一致,MCA207 细胞活力无明显变化。以上结果说 BCG 通过 TLR2/4 调控 TRIM59 的表达,其中 TLR2 占主导地位,并且 IRF5 也参与其中。

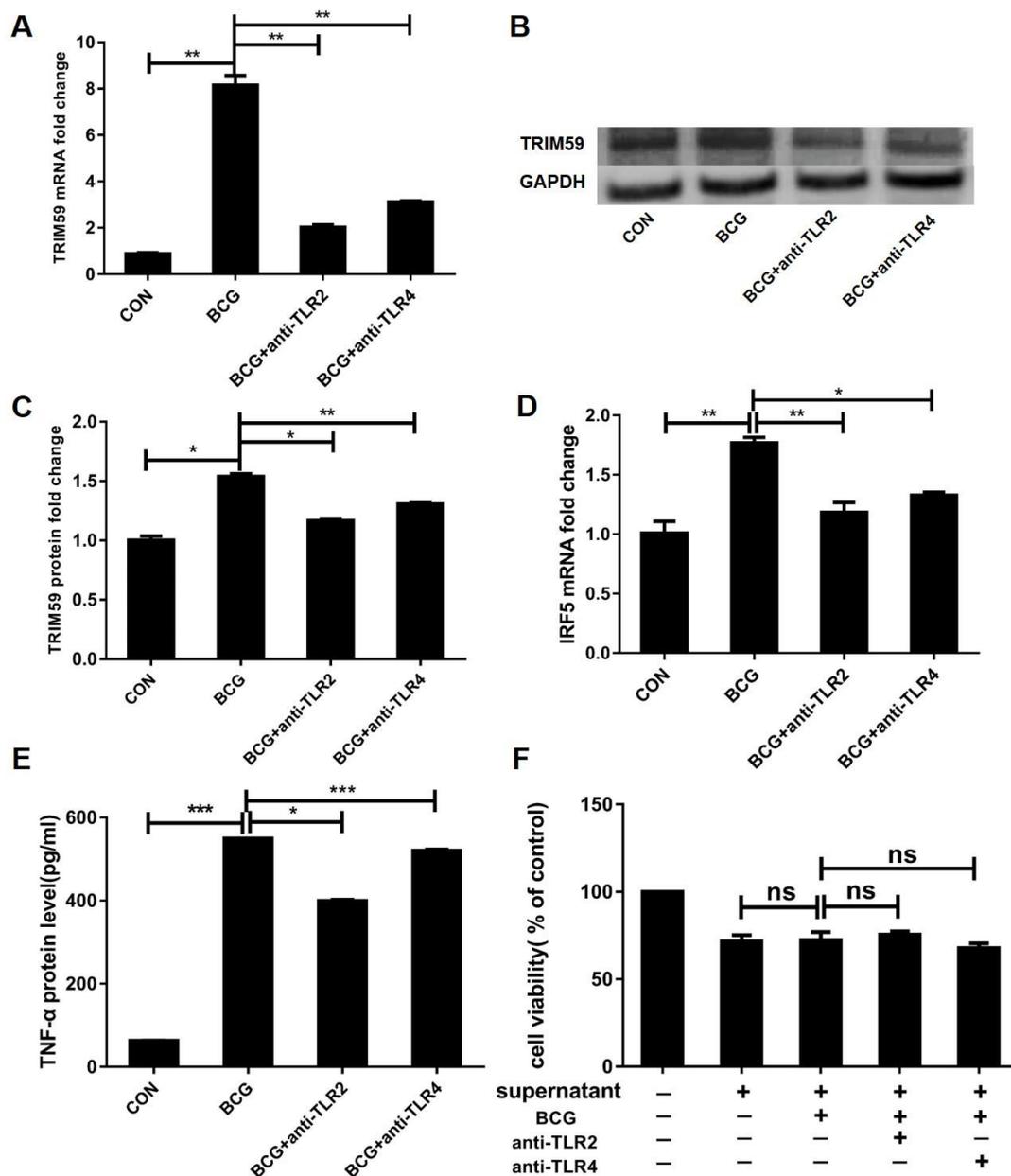


图 1.2 BCG 通过 TLR2/4 调控 TRIM59 的表达

(A) RT-qPCR 检测 TLR2/4 封闭 RAW264.7 后 BCG 刺激 TRIM59 的表达; (B, C) Western blotting 检测 TLR2/4 封闭 RAW264.7 后 BCG 刺激 TRIM59 的表达; 并进行蛋白灰度值统计; (D) RT-qPCR 检测 TLR2/4 封闭 RAW264.7 后 BCG 刺激 IRF5 的表达; (E) ELISA 检测 TLR2/4 封闭 RAW264.7 后 BCG 刺激 TNF- α 的表达; (F) CCK-8 检测 MCA207 细胞活力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: no significance.

为了进一步确认 IRF5 在 BCG 上调 TRIM59 的表达中扮演的角色,我们用 siRNA 干扰 RAW264.7 细胞中的 IRF5,然后用 0.3mg/ml BCG 刺激 24h,收集细胞与上清,并将上清与 MCA207 细胞共培养 48h,用 RT-qPCR 和 Western blotting 检测 TRIM59 及 IRF5 的表达,用 ELISA 检测 TNF- α 的分泌作为 BCG 刺激有效的参照,用 CCK-8 检测 MCA207 细胞活力,结果如图 1.3。siRNA 干扰 RAW264.7 细胞中 IRF5 后,IRF5 的表达明显降低,TRIM59 的表达也随着降低,但用 BCG 刺激后,TRIM59 的表达有所增加,TNF- α 的表达趋势与 TRIM59 一致,BCG 活化的 RAW264.7 细胞上清能明显降低 MCA207 细胞活力,IRF5 被干扰掉后,MCA207 细胞活力降低,这说明 BCG 通过 IRF5 调控 TRIM59 的表达,并且参与 BCG 活化的巨噬细胞的杀伤。

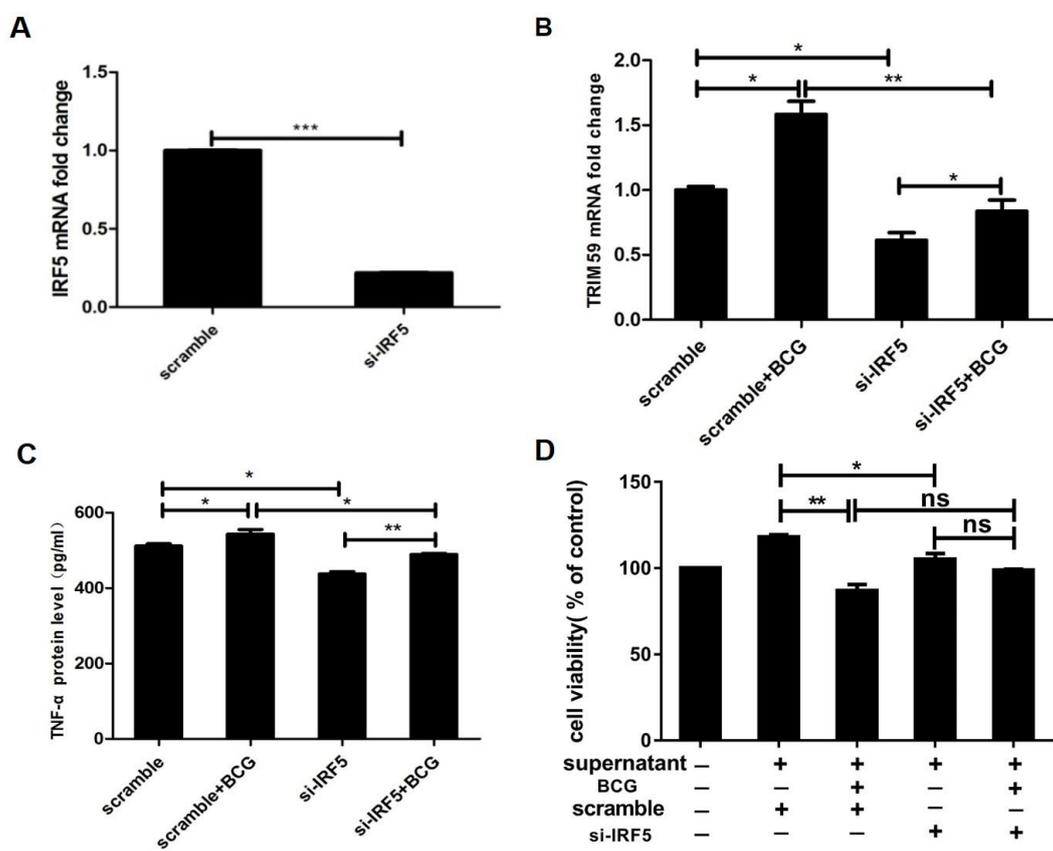


图 1.3 BCG 通过 IRF5 调控 TRIM59 的表达

(A) RT-qPCR 检测 IRF5 下调后 TRIM59 的表达; (B) RT-qPCR 检测 IRF5 下调后 BCG 刺激 RAW264.7 中 TRIM59 的表达; (C) ELISA 检测 IRF5 下调后 BCG 刺激 RAW264.7 分泌 TNF- α 的表达; (D) CCK-8 检测 MCA207 细胞活力。

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns: no significance.

第二部分 TRIM59 对巨噬细胞生物学活性调控的研究

1. 材料和方法

1.1 实验对象

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 来自于科室保存。

1.2 主要试剂

一般试剂见第一部分，其他试剂如下表：

试剂名称	公司及产地
CD16/32-PE 抗体	美国 eBioscience
CD23-PerCP cy5.5 抗体	美国 eBioscience
CD64-PE 抗体	美国 BD
CD11b-FITC 抗体	美国 BD
CD36-APC 抗体	美国 BD
CD68-PE 抗体	美国 BD
CD172a-FITC 抗体	美国 BD
CD206-PE 抗体	美国 BD
MHCII-APC 抗体	美国 eBioscience
CD80-PerCP cy5.5 抗体	美国 BD
CD86-APC 抗体	美国 BD
IL-12 ELISA 检测试剂盒	美国 eBioscience
IL-10 ELISA 检测试剂盒	美国 eBioscience
IL-1 β ELISA 检测试剂盒	美国 eBioscience
IFN- γ ELISA 检测试剂盒	美国 eBioscience
抗 Caspase-3 多克隆抗体	美国 CST
Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒	中国三箭
细胞周期检测试剂盒	中国三箭

CCK-8 试剂盒	日本东仁
BSA	中国鼎国
FluoSpheres® Microsphere	美国 Life Technology
小鼠血清	中国博奥森
小鼠 IgG	中国博奥森
4%多聚甲醛	中国鼎国
琼脂糖	英国 OXOID
胰蛋白胨	英国 OXOID
酵母提取物	英国 OXOID
G418	美国 MARESCO
质粒提取盒	中国 Genemark
TRIM59-siRNA	中国锐博
JSH-23	美国 Sigma

1.3 其他主要试剂的配制

LB 液体培养基

试剂	用量
胰蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g
高压双蒸水	Up to 1L

1.4 主要仪器

一般仪器见第一部分，其他仪器如下表：

仪器名称	厂家及产地
BD FACS Calibur 流式细胞仪	美国 BD
涡旋器	美国 Vortex Genie
超声破碎仪	中国宁波新芝仪器

1.5 实验方法

1.5.1 质粒提取

质粒提取步骤按照 Genemark 质粒提取试剂盒说明说进行操作。

1.5.2 RAW264.7 细胞转染

1. 转染方法见第一部分；
2. G418 筛选浓度 450 μ g/ml，加入上述转染质粒 pCMV6 及 pCMV6-TRIM59 的 RAW264.7 细胞，隔天换液，出现抗性克隆细胞后，在显微镜下挑取单克隆细胞，并扩大培养，用于鉴定；

1.5.3 FACS

1. 细胞正常培养，待长至 90%时，用 1ml PBS 漂洗 3 遍后将细胞轻轻刮下；
2. 调整细胞浓度至 1×10^7 /ml，并取出 100 μ l 于新的 EP 管，加入抗体，冰浴 40min 后，用 1ml PBS 洗 3 次后，于 30min 内用流式细胞仪进行检测。

1.5.4 荧光微球吞噬

1. RAW264.7 细胞以 2×10^5 /well 接种于 12 孔板，待细胞完全贴壁；
2. 配制 5% BSA DMEM，50% 小鼠血清和 DMEM，10mg/ml DMEM，按照巨噬细胞：荧光微球=1：20 的比例在上述配好的溶液及 DMEM 中加入荧光微球，用枪混匀后，放在细胞培养箱避光孵育 30min，然后用超声破碎仪超声 5min，间隔 1s；
3. 孵育荧光微球期间，取出贴壁的巨噬细胞，弃去培养液，PBS 漂洗 3 次后每孔加入 1ml 培养液，放入细胞培养箱饥饿培养 30min；
4. 饥饿培养 30min 后，按照巨噬细胞：荧光微球=1：20 的比例加入荧光微球，放入细胞培养箱避光共培养 30min；
5. 共培养结束后，弃去细胞上清，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，用 4% 多聚甲醛固定细胞 10min 后，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，在倒置荧光显微镜下观察巨噬细胞的吞噬荧光微球的情况；刮下细胞，收集细胞悬液，用流式细胞仪检测巨噬细胞的吞噬效率。按照以下公式计算巨噬细胞吞噬效率及吞噬指数：吞噬效率=100 个细胞中吞噬荧光微球的巨噬细胞数/100 \times 100%；吞噬指数=100 个细胞中被吞噬的荧光微球的总数/100 \times 100%。

2. 实验结果

2.1 高表达、低表达 TRIM59 的巨噬细胞平台的建立

2.1.1 高表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞系的建立

为了了解 TRIM59 的表达对于巨噬细胞的意义，我们用高表达和低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞系研究 TRIM59 对巨噬细胞生物学活性的调控。为获得稳定高表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞系，我们分别转染了空载质粒 pCMV6 及重组质粒 pCMV6-TRIM59 于 RAW264.7 细胞(分别称作 Vector 细胞和 TRIM59 细胞)，48h 后加入 450 μ g/ml G418 进行抗性筛选，2 周后镜下可见单细胞集落形成，随机挑取单克隆细胞群，并扩大培养，通过 RT-PCR 鉴定不同克隆细胞株中 TRIM59 的表达情况，从中挑选出 TRIM59 表达量最高的 7 号克隆，进一步用 RT-qPCR 及 Western blotting 鉴定，结果如图 2.1 所示。

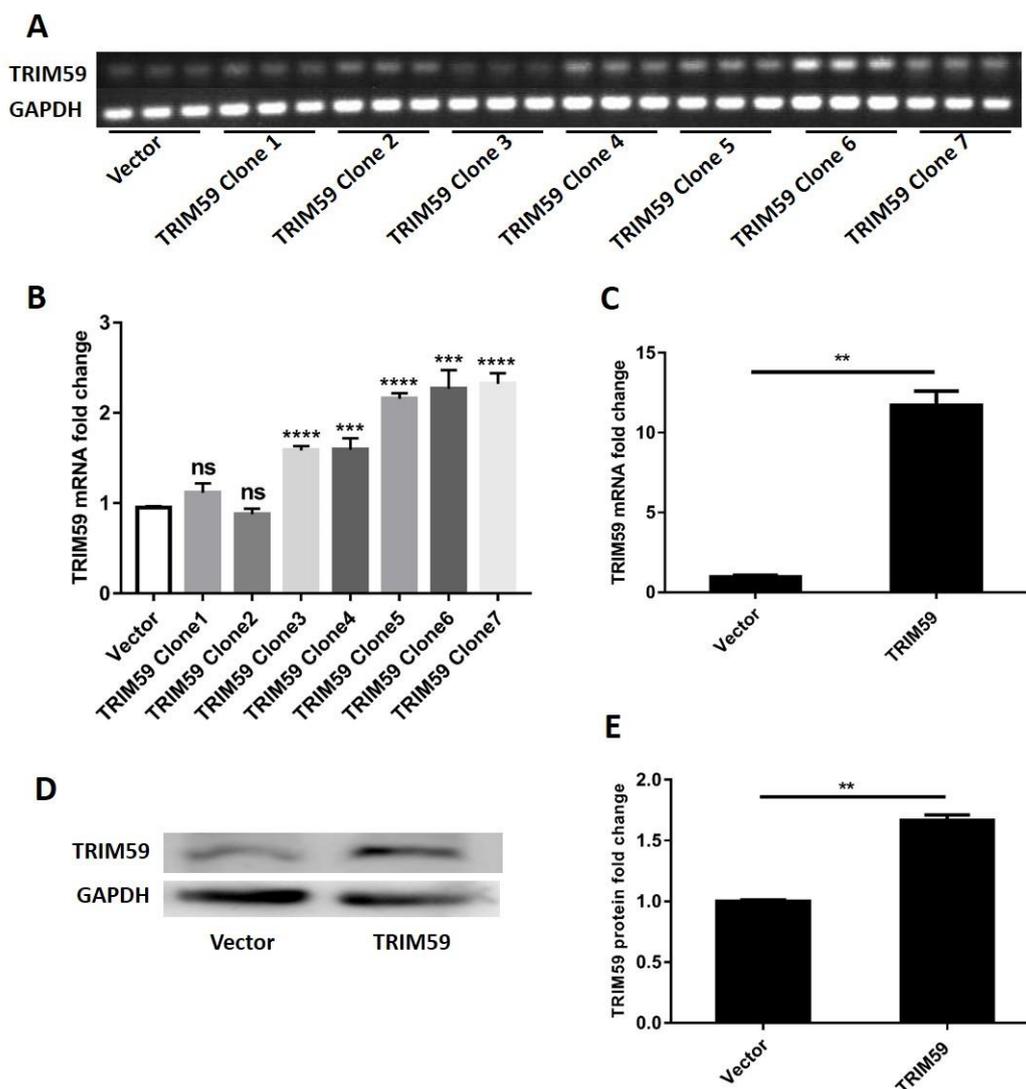


图 2.1 稳定高表达 TRIM59 的转染细胞株的鉴定

(A) TRIM59 和 GAPDH 基因的 PCR 产物电泳结果；(B) 根据 (A) 图中条带的灰度值计算 TRIM59 与 GAPDH 的比值并做归一化处理；(C) RT-qPCR 鉴定 TRIM59 基因水平的表达；(D, E) Western blotting 鉴定 TRIM59 蛋白水平的表达，并进行蛋白灰度值统计。 $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ ，ns: no significance。

2.1.2 低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞系的建立

为了获得低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞系,我们分别转染了 non-silencing siRNA 和干扰 TRIM59 的 4 种 siRNA 序列于 RAW264.7 细胞(分别称作 Scramble 细胞和 si-TRIM59 细胞),48h 后用 RT-PCR 检测干扰效率,结果发现,4 号 siRNA 的干扰效率最高,接着用 RT-qPCR 检测 4 号 siRNA 的干扰效率,如图 2.2 所示。

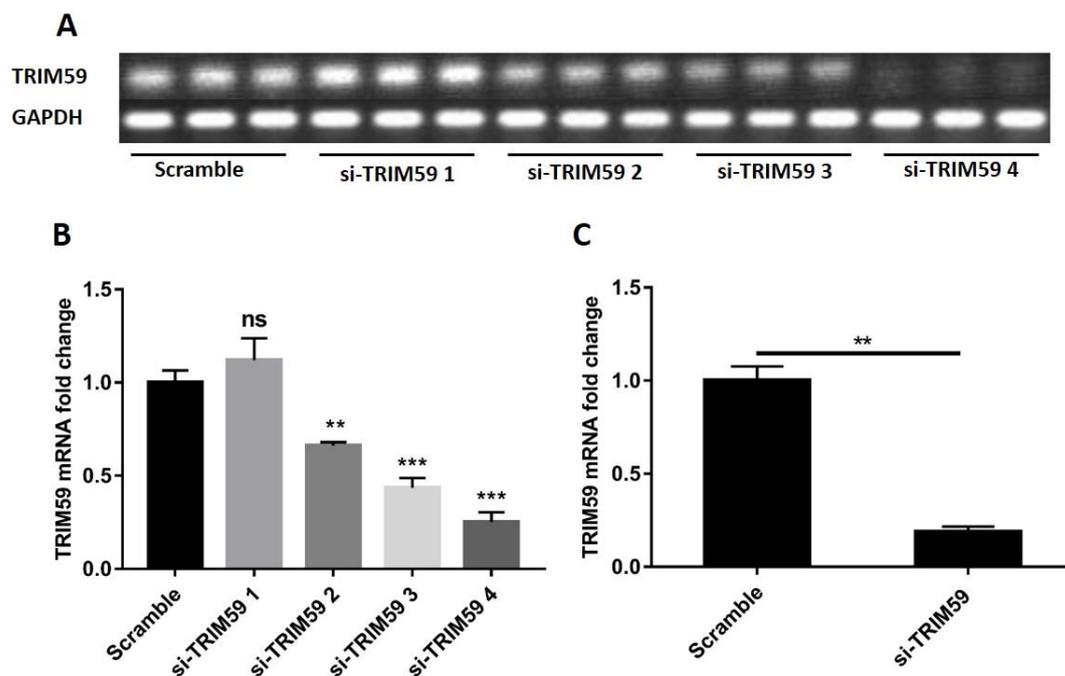


图 2.2 低表达 TRIM59 的转染细胞的构建

(A) TRIM59 和 GAPDH 基因的 PCR 产物电泳结果; (B) 根据 (A) 图中条带的灰度值计算 TRIM59 与 GAPDH 的比值并做归一化处理; (C) RT-qPCR 鉴定 TRIM59 基因水平的表达。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: no significance。

2.2 TRIM59 对巨噬细胞生物学活性的调控

2.2.1 TRIM59 对巨噬细胞表面分子的调控

为了证实 TRIM59 是否能够调控巨噬细胞表面分子,我们用流式细胞术检测了 Vector 细胞和 TRIM59 细胞表面与调理性相关吞噬相关的分子(CD16/32、CD64、CD11b)、与非条调性相关吞噬相关的分子(CD36、CD68、CD172a、CD206)、

与抗原提呈相关的分子 (MHCII、CD80、CD86、CD23) 的表达情况, 如图 2.3。结果发现, TRIM59 高表达后, 介导 IgG 调理性吞噬的 CD16/32、CD64 表达上调, 介导补体调理性吞噬的 CD11b 表达下调; 介导非调理性吞噬的分子中, CD36 表达下调, CD68 无明显变化, 而 CD172a、CD206 表达上调; 与抗原提呈相关的分子中, MHCII、CD86 下调, CD80、CD23 无明显变化。

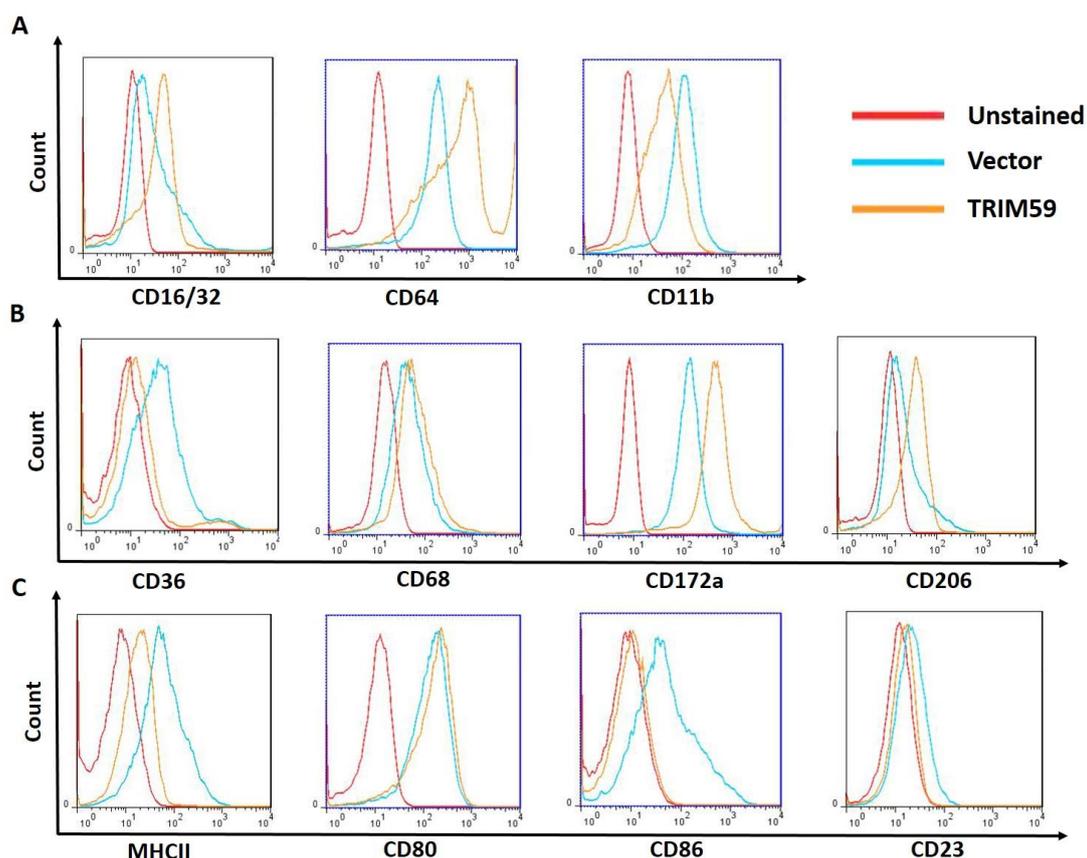


图 2.3 TRIM59 对巨噬细胞表面分子的调控

(A) 应用流式细胞术检测 Vector 细胞和 TRIM59 细胞表面与调理性相关吞噬相关的分子 CD16/32、CD64、CD11b 的表达; (B) 与非调理性相关吞噬相关的分子 CD36、CD68、CD172a、CD206 的表达; (C) 与抗原提呈相关的分子 MHCII、CD80、CD86、CD23 的表达。

2.2.2 TRIM59 对巨噬细胞分泌细胞因子的调控

为了验证 TRIM59 对巨噬细胞分泌细胞因子的调控, 我们用 ELISA 检测了高表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-12、IL-10 的水平, 结果如图 2.4。TRIM59 高表达后, TNF- α 在第 24h 的分泌增多, IFN- γ 在第 12h、24h 表达下调, IL-1 β 在第 6h、48h 显著下调, 第 24h 上调, IL-12 无明显变化, IL-10 在第 6h、24h 和 48h 上调。

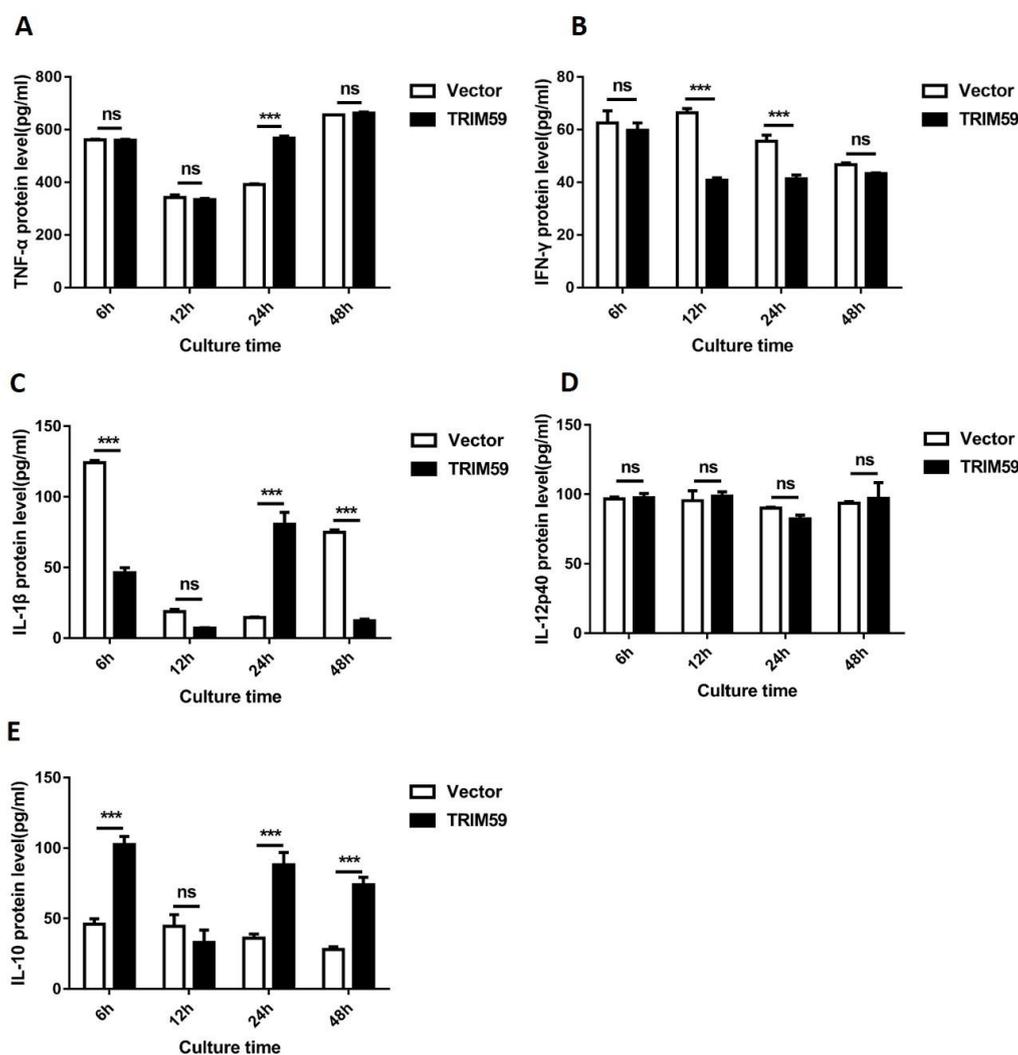


图 2.4 上调 TRIM59 对巨噬细胞分泌细胞因子的调控

(A) ELISA 检测上调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 TNF- α 的影响; (B) 上调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IFN- γ 的影响; (C) 上调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IL-1 β 的影响; (D) 上调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IL-12 的影响; (E) 上调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IL-10 的影响。***P<0.001。

接着，我们用 ELISA 检测了低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞分泌上述细胞因子的水平，结果如图 2.5，除了 TNF- α 和 IL-12 有下调外，其他细胞因子均无变化。

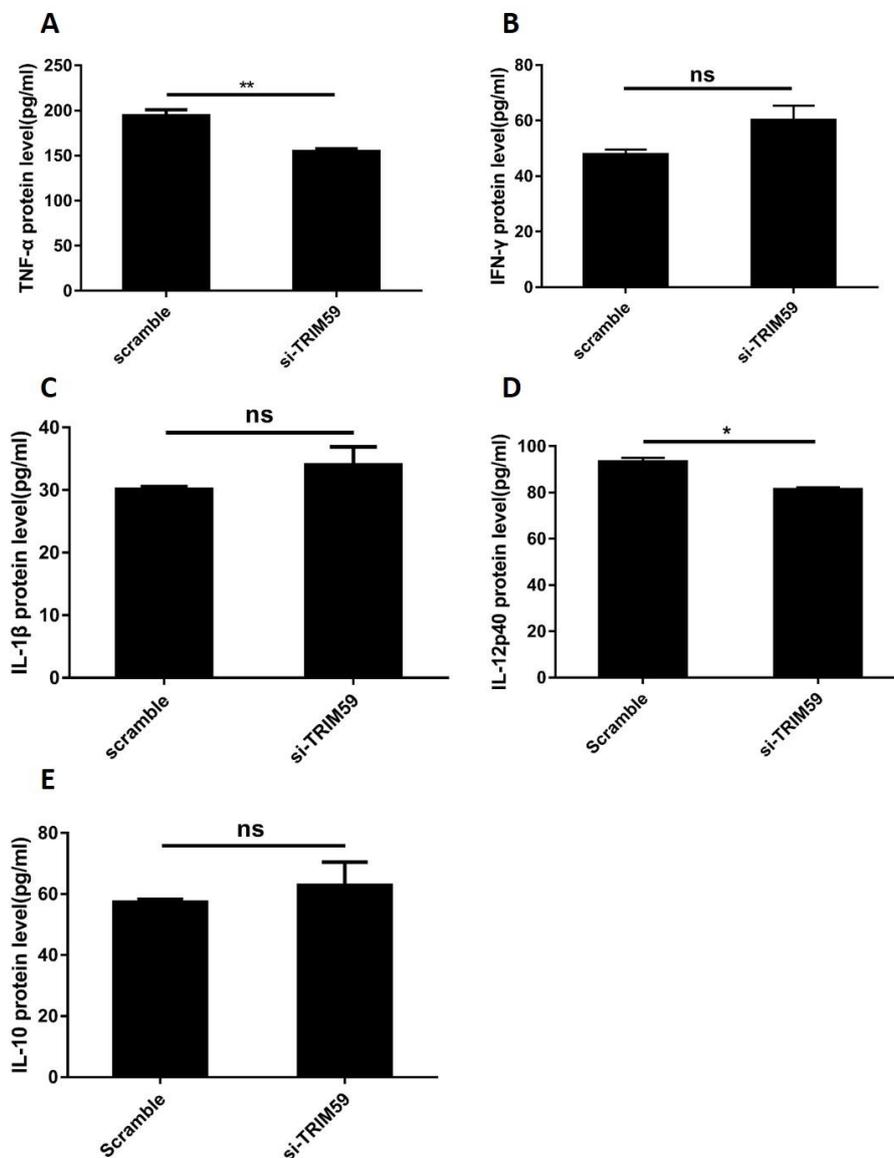


图 2.5 下调 TRIM59 对巨噬细胞分泌细胞因子的调控

(A) ELISA 检测下调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 TNF- α 的影响；(B) 下调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IFN- γ 的影响；(C) 下调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IL-1 β 的影响；(D) 下调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IL-12 的影响；(E) 下调 TRIM59 对巨噬细胞分泌 IL-10 的影响。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，ns: no significance。

2.2.3 TRIM59 对巨噬细胞吞噬功能的调控

上述研究证实了介导非调理性吞噬的 CD172a、CD206 分子表达上调,介导 IgG 调理性吞噬的 CD16/32、CD64 分子表达上调,介导补体调理性吞噬的 CD11b 分子表达下调,提示 TRIM59 对巨噬细胞的吞噬功能有影响。为了证明这个猜想,我们将荧光微球分别与 BSA、小鼠 IgG、小鼠血清孵育后再与 TRIM59 表达水平不同的 RAW264.7 细胞进行共孵育。流式细胞术检测到 RAW264.7 细胞中 TRIM59 高表达后显著提高对荧光微球的吞噬能力,尤其是 IgG 介导的吞噬和非调理性吞噬,而补体介导的吞噬明显下降(如图 2.6);荧光显微镜检测 TRIM59 高表达后 RAW264.7 细胞的吞噬能力,结果与流式细胞术检测的一致(如图 2.7);TRIM59 下调后,用荧光显微镜检测到 RAW264.7 细胞吞噬能力明显下降(如图 2.8)。

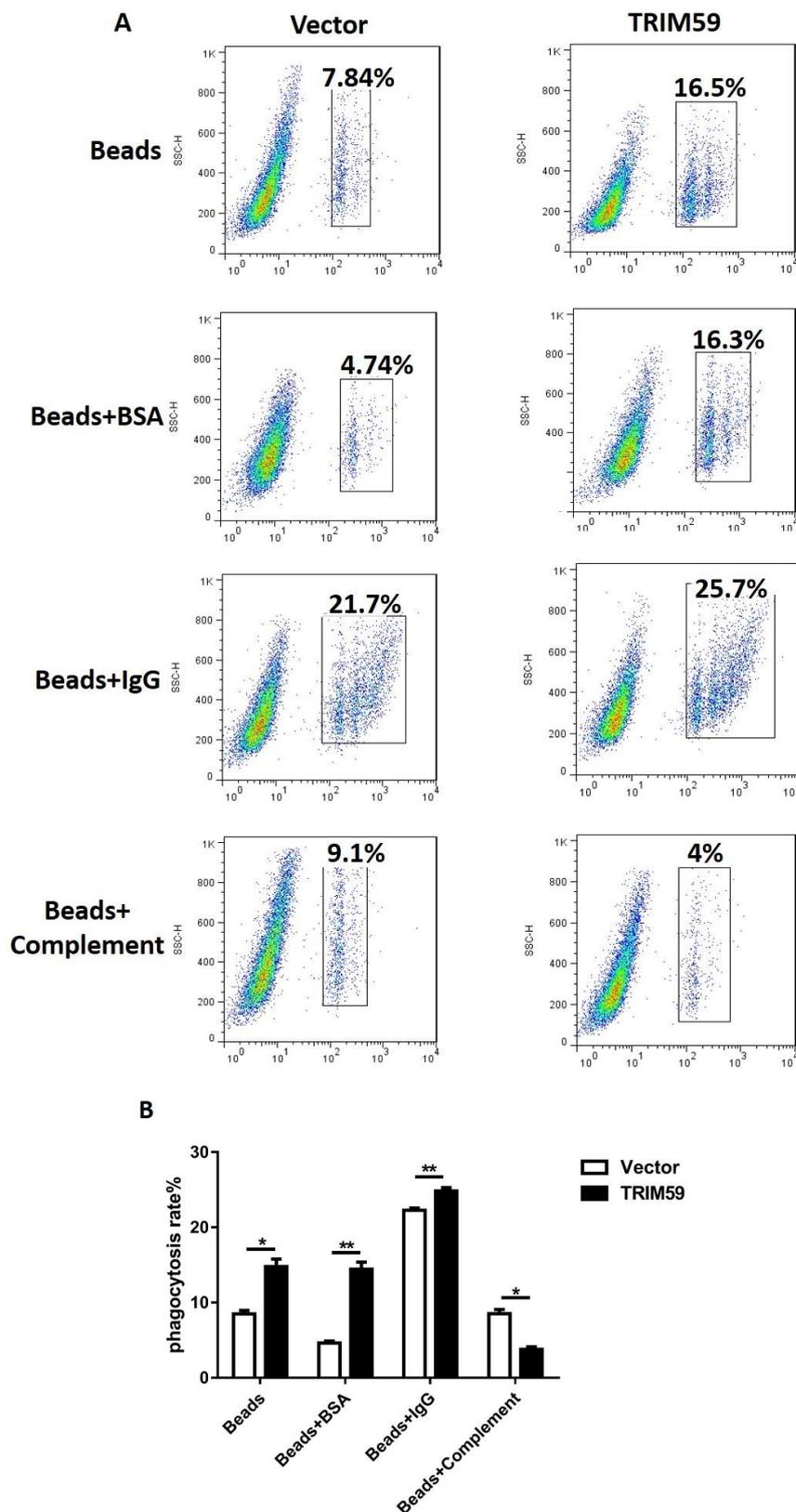


图 2.6 上调 TRIM59 对巨噬细胞吞噬功能的调控

(A) 流式细胞术检测高表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞表面不同分子介导吞噬的能力；(B) 对图 (A) 的统计结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

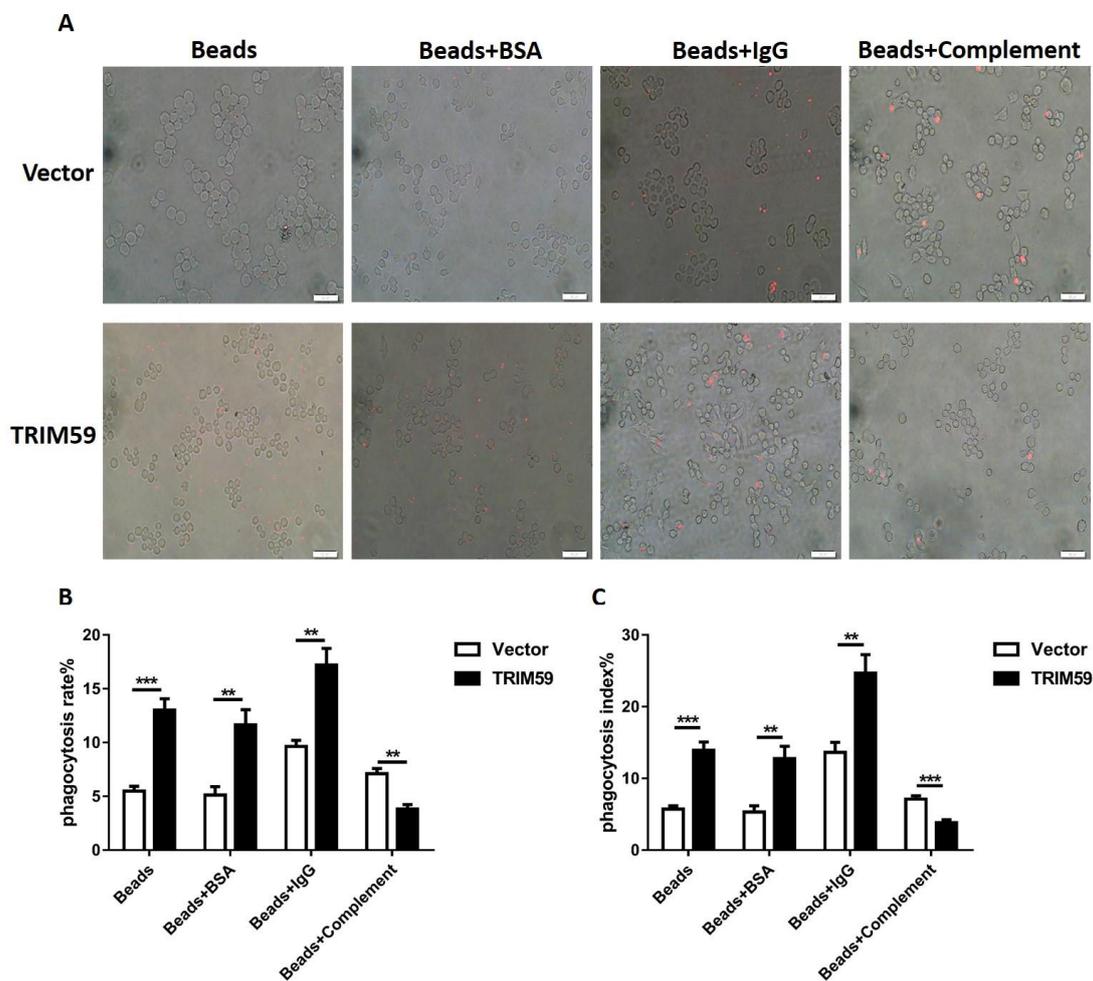


图 2.7 上调 TRIM59 对巨噬细胞吞噬功能的调控

(A) 荧光显微镜检测高表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞表面不同分子介导吞噬的能力；(B) 对图 (A) 中巨噬细胞吞噬效率进行统计的结果；(C) 对图 (A) 中巨噬细胞吞噬指数进行统计的结果。** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

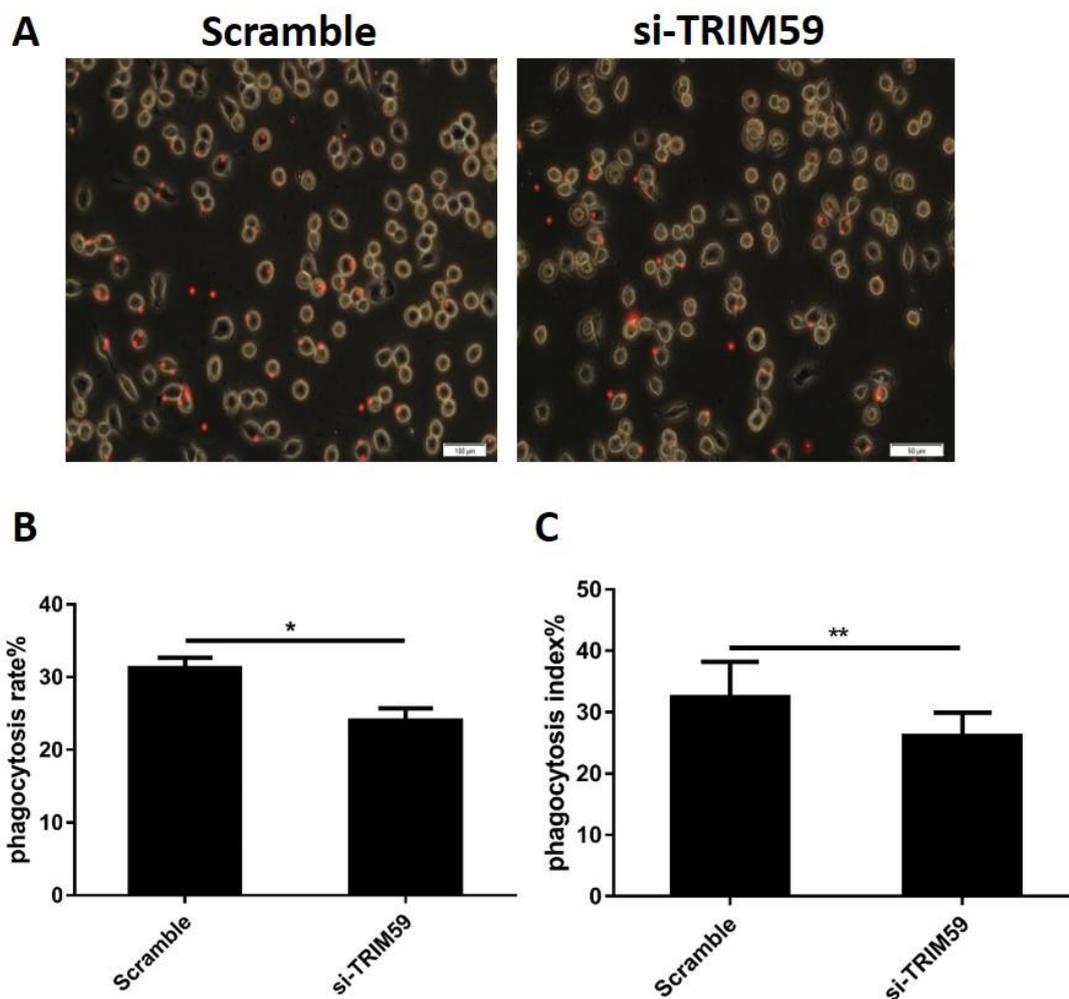


图 2.9 下调 TRIM59 对巨噬细胞吞噬功能的调控

(A) 荧光显微镜检测低表达 TRIM59 的 RAW264.7 细胞的吞噬能力；(B) 对图 (A) 中巨噬细胞吞噬效率进行统计的结果；(C) 对图 (A) 中巨噬细胞吞噬指数进行统计的结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2.4 TRIM59 对巨噬细胞增殖的调控

大量研究表明, TRIM 蛋白作为泛素连接酶调控细胞的增殖与凋亡。为了验证 TRIM59 对巨噬细胞的生长有无影响, 我们用流式细胞术检测了 Vector 细胞和 TRIM59 细胞的细胞周期, 结果如图 2.9A、B。结果显示 TRIM59 对 G0/S 期细胞无明显影响, 但是 TRIM59 能促进细胞进入 G2 期, 增殖指数 $=[(S+G2/M)/(G1+S+G2/M)]$; 用 CCK-8 检测了 RAW264.7 细胞的细胞活力, 结果如图 2.9C, 结果提示 TRIM59 能增强 RAW264.7 细胞的细胞活力。

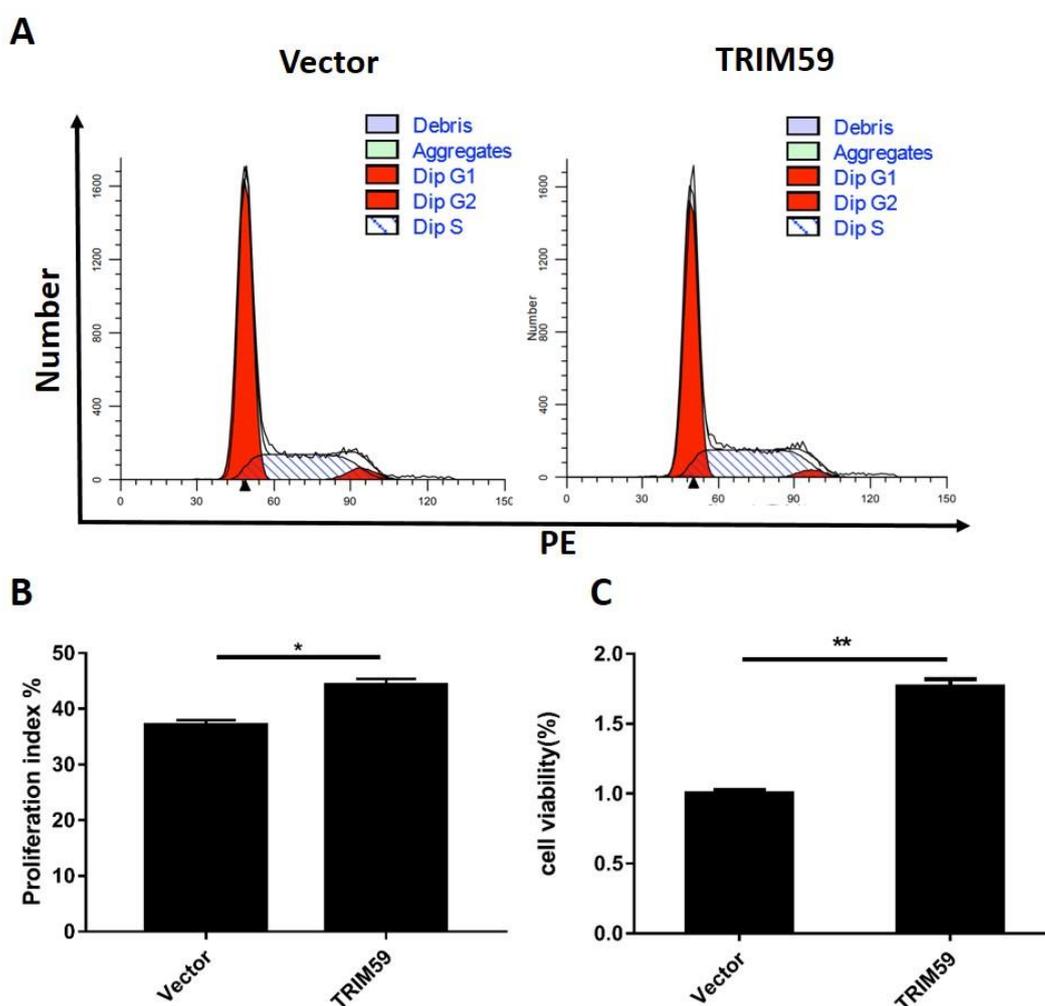


图 2.9 TRIM59 对巨噬细胞增殖的调控

(A) 流式细胞术检测 Vector 细胞和 TRIM59 细胞周期; (B) 根据 (A) 计算细胞的增殖指数; (C) CCK-8 检测 Vector/TRIM59 细胞培养 48h 时的细胞活力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2.5 TRIM59 对巨噬细胞凋亡的调控

我们用流式细胞术检测了 Vector 细胞和 TRIM59 细胞的凋亡情况，结果如图 2.10A，Vector 细胞和 TRIM59 细胞的凋亡率没有显著差别；用 NF- κ B 抑制剂 JSH-23 处理后的 Vector 和 TRIM59 细胞作阳性对照，用 Western blotting 检测 Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 的表达情况，结果如图 2.10B，Vector 细胞和 TRIM59 细胞不表达 Cleaved Caspase-3。

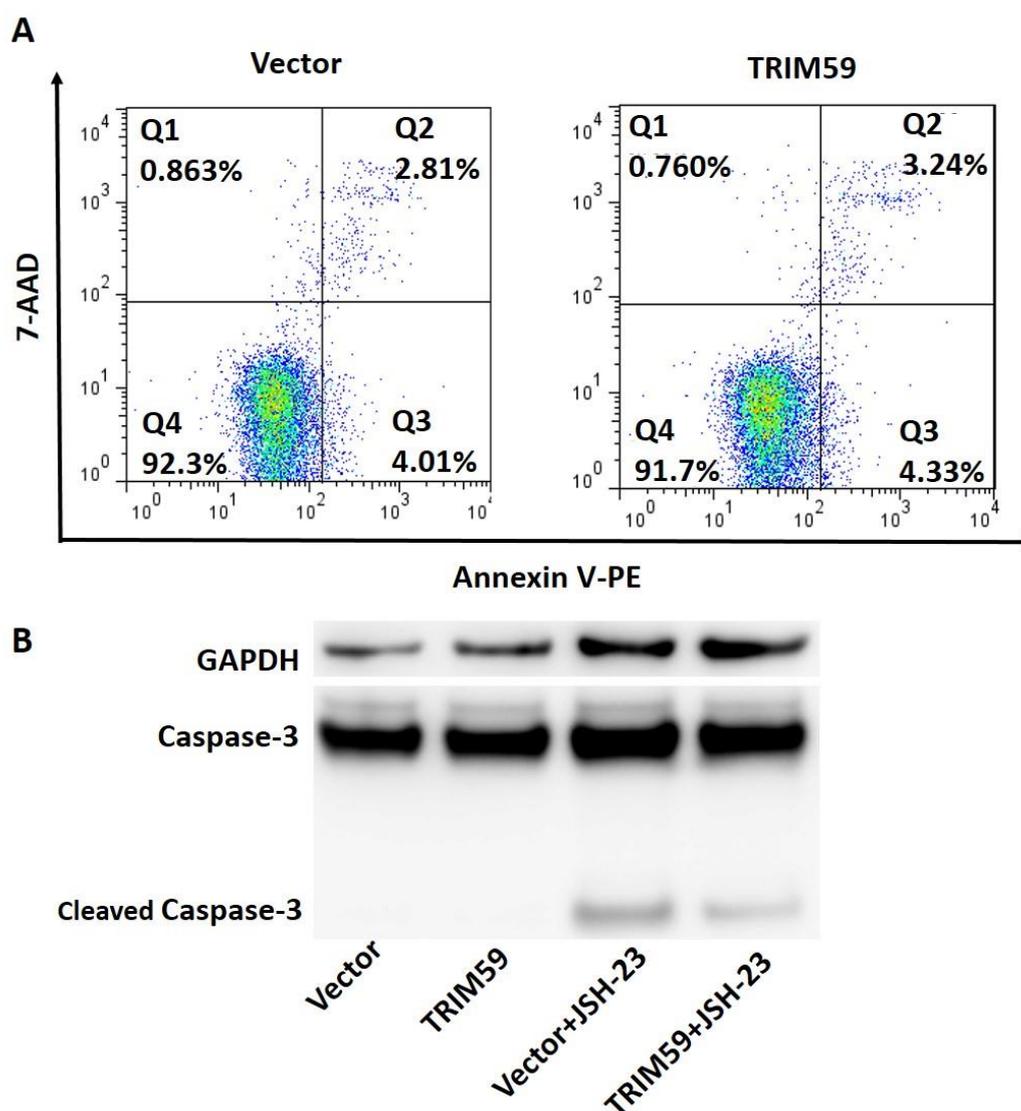


图 2.10 TRIM59 对巨噬细胞凋亡的调控

(A) 流式细胞术检测 Vector 细胞和 TRIM59 细胞的凋亡情况；(B) Western blotting 检测 Vector 细胞和 TRIM59 细胞 Caspase-3 及 Cleaved Caspase-3 的表达情况。

讨 论

固有免疫被认为是机体抵御病原体的第一道防线。最新研究表明,参与固有免疫应答的受体也是组织损伤和代谢异常的传感器,并且固有免疫细胞如巨噬细胞和中性粒细胞可以激活并调节适应性免疫应答,体现了固有免疫应答也可以调节适应性免疫应答^[80]。巨噬细胞是固有免疫的重要组成部分,在炎症和宿主防御中起核心作用。巨噬细胞具有多样性和可塑性,不同的刺激如病原微生物、受损细胞、活化的淋巴细胞等可使巨噬细胞转化成不同的表型,发挥相应的功能^[61]。

TIRM 蛋白家族成员众多,功能广泛。与 TRIM59 结构类似的 TRIM13 在 RAW264.7 细胞中可以通过 K29 位泛素化 TRAF6 而激活 TLR2 介导的 NF- κ B^[81]。在骨髓来源的巨噬细胞中,TRIM13 抑制 MDA5 介导的 I 型干扰素的产生^[79],但是 TRIM59 对巨噬细胞的调节作用还未见报导。

课题组前期工作发现 BCG 刺激腹腔巨噬细胞后 TRIM59 高表达,但其调控机制并不清楚。为了探究调控机制,我们用 BCG 活化 TLR2/4 封闭及 IRF5 下调的 RAW264.7 细胞,检测 TRIM59 的表达,最终发现 BCG 通过 TLR2/4/IRF5 信号通路调控 TRIM59。现有的研究发现,BCG 活化的巨噬细胞相关的分子表达一般以 TLR4 介导为主,在我们的研究中,虽然 TLR4 有参与 BCG 上调的 TRIM59 的表达,但是是以 TLR2 介导为主。研究还发现,TLR2 和 TLR4 中和抗体封闭 RAW264.7 细胞后,BCG 刺激的 TRIM59 仍有部分表达,这说明还存在其他通路。目前有研究报导 TRIM59 存在于内质网^[52],而我们发现,BCG 活化的巨噬细胞中 TRIM59 表达在细胞膜上,那么 TRIM59 本身存在于多个位置,还是 BCG 刺激后 TRIM59 从内质网转移至细胞膜还有待进一步研究。

LPS 及 IFN- γ 活化的巨噬细胞为 M1 型巨噬细胞,能够分泌大量促炎因子(如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-12)及 NO,促进 Th1 型免疫应答,具有强大的抗微生物及抗肿瘤能力。M1 型巨噬细胞表面高表达 MHCII、CD80、CD86 等共刺激因子,具有较强的抗原提呈能力,是固有免疫应答和适应性免疫应答的枢纽。IL-4 及 IL-13 活化的巨噬细胞为 M2 型巨噬细胞,参与寄生虫免疫、组织修复及肿瘤转移。M2 型巨噬细胞能够分泌大量抑炎因子 IL-10、TGF- β ,高表达清道夫受体、甘露糖受体及半乳糖受体,具有强大的吞噬功能^[63]。IL-10 是典型

的抑炎因子，能够抑制 Th1 细胞分泌 IL-1、IL-3、IL-6、IL-12、CSF、TNF- α ，促进 B 细胞的增殖与分化，加强 CTL 的活性^[82]。

BCG 刺激巨噬细胞后 TRIM59 高表达，但 TRIM59 的表达对于巨噬细胞自身的意义并不明确。为了阐明 TRIM59 对巨噬细胞生物活性的影响，本研究通过改变 TRIM59 在 RAW264.7 细胞中的表达水平，检测了 TRIM59 高表达的 RAW264.7 细胞表面分子的变化，结果显示，与 IgG 介导的吞噬相关的分子 CD16/32、CD64 表达升高，而与补体介导吞噬相关的分子 CD11b 表达降低，与非调理性相关吞噬相关的分子 CD36、CD68、CD172a、CD206 表达程度不一，CD206 作为甘露糖受体表达升高，而与抗原提呈相关的分子 MHCII、CD86 明显降低，CD86、CD23 无明显变化，以上结果提示，TRIM59 可能促进非调理性吞噬及 IgG 介导的巨噬细胞吞噬，抑制补体介导的吞噬，抑制巨噬细胞的抗原提呈功能，这与 M2 型巨噬细胞某些特征类似。

我们同时发现 TRIM59 能够显著促进 IL-10 的表达分泌，抑制 IFN- γ 的分泌，促进 TNF- α 的分泌，对 IL-1 β 分泌的调控具有时相性，对 IL-12 无明显作用，这说明 TRIM59 对巨噬细胞的调控作用并不是单一的，同时具有促进 M1 型和 M2 型巨噬细胞表型分子表达的作用，但是促进巨噬细胞向 M2 型分化的作用占主导因素。IL-10 的表达明显增多，能够抑制巨噬细胞的抗原提呈功能，这可能与 MHCII、CD86 表达降低有关，并且 IL-10 促进巨噬细胞吞噬，吞噬相关的表面分子也高表达，所以我们进一步检测了 TRIM59 对巨噬细胞的吞噬的影响，结果发现，IgG 介导的吞噬增强，补体介导的吞噬明显下降，非调理性吞噬增强，这与细胞表面分子及细胞因子表达一致，说明 TRIM59 高表达的巨噬细胞偏向于 M2 型，但 TRIM59 是否促进巨噬细胞向 M2 型极化，是否具有抑炎作用及抑制抗原提呈作用还需要大量实验验证。

现有研究表明，TRIM 蛋白家族对细胞的增殖和凋亡有一定的调节作用，如 TRIM44 能够促进人卵巢畸胎瘤细胞和畸胎瘤细胞的增殖和迁移，抑制这两种细胞的凋亡^[83]。为了探究 TRIM59 对巨噬细胞增殖和凋亡的调节作用，我们检测了 TRIM59 高表达的 RAW264.7 细胞的细胞活力与周期、凋亡及活化的 Caspase-3 的表达，结果显示 TRIM59 能够促进 RAW264.7 细胞增殖，对凋亡没有明显的影响，这说明 TRIM59 对巨噬细胞的增殖分化起正性调节作用，对固有免疫应答有

利。

最近有研究证明, TRIM59 可以通过 PI3K (磷酸肌肽 3-激酶) 抑制 PI3K/Akt 信号通路^[45]。PI3K 是胞内的激酶, 通过调控可逆的磷酸化肌醇脂质, 影响各种细胞内通路的信号转导介质, 最终调节哺乳动物细胞的表现型和功能, 几乎在所有的哺乳动物细胞周期、迁移中都扮演着重要角色^[84]。在巨噬细胞中, PI3K/Akt 信号通路受到抑制时, 促炎因子如 TNF- α 分泌降低, NO 合成减少^[85-87]。PI3K/Akt 也影响巨噬细胞极化, 当 Akt1 缺失时, 巨噬细胞向 M1 型极化, Akt2 缺失时, 巨噬细胞向 M2 型极化^[88]。在我们的研究中, TRIM59 高表达后, 促炎因子表达降低, 抑炎因子增高, 吞噬功能增强, 与抗原提呈相关的分子表达降低, 巨噬细胞偏向于 M2 型, 可能是由于 TRIM59 作用于 PI3K/Akt 信号通路, 引起巨噬细胞一系列的生物学活性的变化。

综上, BCG 通过 TLR2/4/IRF5 信号通路上调 TRIM59 的表达, 并且 TRIM59 高表达的巨噬细胞能够促进巨噬细胞分泌抑炎因子, 抑制抗原提呈相关分子的表达, 促进巨噬细胞吞噬作用和巨噬细胞增殖, 上述研究明确了 BCG 调控 TRIM59 的信号通路, 丰富了 TRIM59 和巨噬细胞之间的关系。但 TRIM59 在巨噬细胞抑炎及抗原提呈过程中的作用还需要进一步验证, 并且, 调控这些作用的机制也是我们今后要研究的方向。

结 论

1. BCG 通过 TLR2/4/IRF5 信号通路上调巨噬细胞中 TRIM59 的表达；
2. TRIM59 促进巨噬细胞分泌抑炎因子，上调非调理性吞噬相关分子及 IgG 介导吞噬相关受体的表达，抑制补体介导吞噬相关受体和抗原提呈相关分子的表达；
3. TRIM59 促进非调理性吞噬及 IgG 介导的吞噬功能，抑制补体介导的吞噬功能；
4. TRIM59 促进巨噬细胞增殖，对巨噬细胞凋亡无明显影响。

参考文献

- [1] KAWAI T, AKIRA S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins [J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(9): 513-527.
- [2] NAPOLITANO L M, MERONI G. TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation [J]. *IUBMB life*, 2012, 64(1): 64-71.
- [3] HATAKEYAMA S. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 297-311.
- [4] MERONI G, DIEZ-ROUX G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases [J]. *Bioessays*, 2005, 27(11): 1147-1157.
- [5] JOAZEIRO C A, WEISSMAN A M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity [J]. *Cell*, 2000, 102(5): 549-552.
- [6] TAO H, SIMMONS B N, SINGIREDDY S, et al. Structure of the MID1 tandem B-boxes reveals an interaction reminiscent of intermolecular ring heterodimers [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(8): 2450-2457.
- [7] NISHIKAWA H, KITA R, KIMURA T, et al. Transcatheter arterial embolic therapies for hepatocellular carcinoma: a literature review [J]. *Anticancer research*, 2014, 34(12): 6877-6886.
- [8] ESPOSITO D, KOLIOPOULOS M G, RITTINGER K. Structural determinants of TRIM protein function [J]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(1): 183-191.
- [9] SARDIELLO M, CAIRO S, FONTANELLA B, et al. Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties [J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8(225).
- [10] WOO J S, IMM J H, MIN C K, et al. Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain [J]. *EMBO J*, 2006, 25(6): 1353-1363.
- [11] PETRE E N, SOFOCLEOUS C T, SOLOMON S B. Ablative and catheter-directed therapies for colorectal liver and lung metastases [J]. *Hematology/*

- oncology clinics of North America, 2015, 29(1): 117-133.
- [12] GRUTTER M G, LUBAN J. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling [J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(2): 142-150.
- [13] NAKAYAMA E E, SHIODA T. Impact of TRIM5alpha in vivo [J]. *AIDS*, 2015, 29(14): 1733-1743.
- [14] TISSOT C, MECHTI N. Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(25): 14891-14898.
- [15] ALLOUCH A, DI PRIMIO C, ALPI E, et al. The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration [J]. *Cell host & microbe*, 2011, 9(6): 484-495.
- [16] MANOKARAN G, FINOL E, WANG C, et al. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness [J]. *Science*, 2015, 350(6257): 217-221.
- [17] BONILLA W V, PINSCHEWER D D, KLENERMAN P, et al. Effects of promyelocytic leukemia protein on virus-host balance [J]. *J Virol*, 2002, 76(8): 3810-3818.
- [18] LI Y J, ZHANG G P, ZHAO F, et al. Target therapy of TRIM-14 inhibits osteosarcoma aggressiveness through the nuclear factor-kappaB signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3): 2365-2373.
- [19] LV D, LI Y, ZHANG W, et al. TRIM24 is an oncogenic transcriptional co-activator of STAT3 in glioblastoma [J]. 2017, 8(1): 1454.
- [20] TAKAYAMA K I, SUZUKI T, TANAKA T. TRIM25 enhances cell growth and cell survival by modulating p53 signals via interaction with G3BP2 in prostate cancer [J]. 2018,
- [21] FUJIMURA T, INOUE S, URANO T, et al. Increased Expression of Tripartite Motif (TRIM) 47 Is a Negative Prognostic Predictor in Human Prostate Cancer [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2016, 14(4): 298-303.
- [22] BELLONI E, TRUBIA M, GASPARINI P, et al. 8p11 myeloproliferative syndrome with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and

- TIF1 genes [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, 42(3): 320-325.
- [23] QI L, LU Z, SUN Y H, et al. TRIM16 suppresses the progression of prostate tumors by inhibiting the Snail signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(6): 1734-1742.
- [24] TAN H, QI J, CHU G, et al. Tripartite Motif 16 Inhibits the Migration and Invasion in Ovarian Cancer Cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(4): 551-558.
- [25] KIM P Y, TAN O, LIU B, et al. High TDP43 expression is required for TRIM16-induced inhibition of cancer cell growth and correlated with good prognosis of neuroblastoma and breast cancer patients [J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(2): 315-323.
- [26] SUTTON S K, KOACH J, TAN O, et al. TRIM16 inhibits proliferation and migration through regulation of interferon beta 1 in melanoma cells [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(20): 10127-10139.
- [27] KAPANADZE B, MAKEEVA N, CORCORAN M, et al. Comparative sequence analysis of a region on human chromosome 13q14, frequently deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia, and its homologous region on mouse chromosome 14 [J]. *Genomics*, 2000, 70(3): 327-334.
- [28] NOGUCHI K, OKUMURA F, TAKAHASHI N, et al. TRIM40 promotes neddylation of IKKgamma and is downregulated in gastrointestinal cancers [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(7): 995-1004.
- [29] CRAWFORD L J, JOHNSTON C K, IRVINE A E. TRIM proteins in blood cancers [J]. *Journal of cell communication and signaling*, 2018, 12(1): 21-29.
- [30] ZENG S X, CAI Q C, GUO C H, et al. High expression of TRIM29 (ATDC) contributes to poor prognosis and tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1645-1654.
- [31] XU R, HU J, ZHANG T, et al. TRIM29 overexpression is associated with poor prognosis and promotes tumor progression by activating Wnt/beta-catenin pathway in cervical cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28579-28591.

- [32] TAN S T, LIU S Y, WU B. TRIM29 Overexpression Promotes Proliferation and Survival of Bladder Cancer Cells through NF-kappaB Signaling [J]. *Cancer Res Treat*, 2016, 48(4): 1302-1312.
- [33] XU J, LI Z, SU Q, et al. TRIM29 promotes progression of thyroid carcinoma via activating P13K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1555-1564.
- [34] LIU C, HUANG X, HOU S, et al. Silencing of tripartite motif (TRIM) 29 inhibits proliferation and invasion and increases chemosensitivity to cisplatin in human lung squamous cancer NCI-H520 cells [J]. *Thoracic cancer*, 2015, 6(1): 31-37.
- [35] RAJSBAUM R, VERSTEEG G A, SCHMID S, et al. Unanchored K48-linked polyubiquitin synthesized by the E3-ubiquitin ligase TRIM6 stimulates the interferon-IKKepsilon kinase-mediated antiviral response [J]. *Immunity*, 2014, 40(6): 880-895.
- [36] ALFONSO A, MONTALBAN-BRAVO G, TAKAHASHI K, et al. Natural history of chronic myelomonocytic leukemia treated with hypomethylating agents [J]. 2017, 92(7): 599-606.
- [37] LEADBETTER E A, RIFKIN I R, HOHLBAUM A M, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors [J]. *Nature*, 2002, 416(6881): 603-607.
- [38] JEFFERIES C, WYNNE C, HIGGS R. Antiviral TRIMs: friend or foe in autoimmune and autoinflammatory disease? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(9): 617-625.
- [39] OKE V, VASSILAKI I, ESPINOSA A, et al. High Ro52 expression in spontaneous and UV-induced cutaneous inflammation [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(8): 2000-2010.
- [40] ROWE H M, JAKOBSSON J, MESNARD D, et al. KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2010, 463(7278): 237-240.
- [41] BARANZINI S E. The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(6): 596-605.
- [42] ZHAO X, LIU Q, DU B, et al. A novel accessory molecule Trim59 involved in

- cytotoxicity of BCG-activated macrophages [J]. *Mol Cells*, 2012, 34(3): 263-270.
- [43] SUN G, SUI X, HAN D, et al. TRIM59 promotes cell proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Pharmazie*, 2017, 72(11): 674-679.
- [44] SANG Y, LI Y, SONG L, et al. TRIM59 promotes gliomagenesis by inhibiting TC45 dephosphorylation of STAT3 [J]. *Cancer Res*, 2018,
- [45] SUN Y, JI B, FENG Y, et al. TRIM59 facilitates the proliferation of colorectal cancer and promotes metastasis via the PI3K/AKT pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(1): 43-52.
- [46] GUBERNATOROVA E O, TUMANOV A V. Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin in Regulation of Intestinal Inflammation [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81(11): 1309-1325.
- [47] AIERKEN G, SEYITI A, ALIFU M, et al. Knockdown of Tripartite-59 (TRIM59) Inhibits Cellular Proliferation and Migration in Human Cervical Cancer Cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(3): 381-388.
- [48] LIANG J, XING D, LI Z, et al. TRIM59 is upregulated and promotes cell proliferation and migration in human osteosarcoma [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 5200-5206.
- [49] ZHOU Z, JI Z, WANG Y, et al. TRIM59 is up-regulated in gastric tumors, promoting ubiquitination and degradation of p53 [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(5): 1043-1054.
- [50] ZHAN W, HAN T, ZHANG C, et al. TRIM59 Promotes the Proliferation and Migration of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Upregulating Cell Cycle Related Proteins [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142596.
- [51] KHATAMIANFAR V, VALIYEVA F, RENNIE P S, et al. TRIM59, a novel multiple cancer biomarker for immunohistochemical detection of tumorigenesis [J]. *BMJ open*, 2012, 2(5):
- [52] KONDO T, WATANABE M, HATAKEYAMA S. TRIM59 interacts with ECSIT and negatively regulates NF-kappaB and IRF-3/7-mediated signal pathways [J].

- Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(3): 501-507.
- [53] PORTA C, RIBOLDI E, IPPOLITO A, et al. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation [J]. *Semin Immunol*, 2015, 27(4): 237-248.
- [54] EPELMAN S, LAVINE K J, RANDOLPH G J. Origin and functions of tissue macrophages [J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 21-35.
- [55] SICA A, ERRENI M, ALLAVENA P, et al. Macrophage polarization in pathology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(21): 4111-4126.
- [56] MURRAY P J. Macrophage Polarization [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79(541-566).
- [57] KAWAI K, MIYAZAKI J, JORAKU A, et al. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(1): 22-27.
- [58] KUMAR P, TYAGI R, DAS G, et al. Mycobacterium indicus pranii and Mycobacterium bovis BCG lead to differential macrophage activation in Toll-like receptor-dependent manner [J]. *Immunology*, 2014, 143(2): 258-268.
- [59] PATEL U, RAJASINGH S, SAMANTA S, et al. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation [J]. *Drug discovery today*, 2017, 22(1): 186-193.
- [60] BURDO T H, WALKER J, WILLIAMS K C. Macrophage Polarization in AIDS: Dynamic Interface between Anti-Viral and Anti-Inflammatory Macrophages during Acute and Chronic Infection [J]. *J Clin Cell Immunol*, 2015, 6(3):
- [61] SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795.
- [62] MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(12): 677-686.
- [63] MCWHORTER F Y, DAVIS C T, LIU W F. Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 72(7): 1303-1316.

- [64] JETTEN N, VERBRUGGEN S, GIJBELS M J, et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(1): 109-118.
- [65] BESCHIN A, DE BAETSELIER P, VAN GINDERACHTER J A. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 186-197.
- [66] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018,
- [67] UDALOVA I A, MANTOVANI A, FELDMANN M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis [J]. *Nature reviews Rheumatology*, 2016, 12(8): 472-485.
- [68] MILLS C D, LENZ L L, HARRIS R A. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(3): 513-516.
- [69] DE PALMA M, LEWIS C E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3): 277-286.
- [70] MILLS C D. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages [J]. *Front Immunol*, 2015, 6(212).
- [71] CHANG T H, YOSHIMI R, OZATO K. Tripartite Motif (TRIM) 12c, a Mouse Homolog of TRIM5, Is a Ubiquitin Ligase That Stimulates Type I IFN and NF-kappaB Pathways along with TNFR-Associated Factor 6 [J]. *J Immunol*, 2015, 195(11): 5367-5379.
- [72] YU S, GAO B, DUAN Z, et al. Identification of tripartite motif-containing 22 (TRIM22) as a novel NF-kappaB activator [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(2): 247-251.
- [73] LIU B, ZHANG M, CHU H, et al. The ubiquitin E3 ligase TRIM31 promotes aggregation and activation of the signaling adaptor MAVS through Lys63-linked polyubiquitination [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(2): 214-224.
- [74] YOSHIMI R, CHANG T H, WANG H, et al. Gene disruption study reveals a

- nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappaB-dependent cytokine expression in fibroblasts [J]. *J Immunol*, 2009, 182(12): 7527-7538.
- [75] SHI M, DENG W, BIE, et al. TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(4): 369-377.
- [76] EAMES H L, SALIBA D G, KRAUSGRUBER T, et al. KAP1/TRIM28: an inhibitor of IRF5 function in inflammatory macrophages [J]. *Immunobiology*, 2012, 217(12): 1315-1324.
- [77] HU M M, XIE X Q, YANG Q, et al. TRIM38 Negatively Regulates TLR3/4-Mediated Innate Immune and Inflammatory Responses by Two Sequential and Distinct Mechanisms [J]. *J Immunol*, 2015, 195(9): 4415-4425.
- [78] ZHAO W, WANG L, ZHANG M, et al. Tripartite motif-containing protein 38 negatively regulates TLR3/4- and RIG-I-mediated IFN-beta production and antiviral response by targeting NAP1 [J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5311-5318.
- [79] NARAYAN K, WAGGONER L, PHAM S T, et al. TRIM13 is a negative regulator of MDA5-mediated type I interferon production [J]. *J Virol*, 2014, 88(18): 10748-10757.
- [80] LOCATI M, MANTOVANI A, SICA A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity [J]. *Adv Immunol*, 2013, 120(163-184).
- [81] HUANG B, BAEK S H. Trim13 Potentiates Toll-Like Receptor 2-Mediated Nuclear Factor kappaB Activation via K29-Linked Polyubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91(4): 307-316.
- [82] GEGINAT J, LARGHI P, PARONI M, et al. The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 30(87-93).
- [83] YAMADA Y, TAKAYAMA K I, FUJIMURA T, et al. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in

- testicular germ cell tumor [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(1): 32-41.
- [84] POMPURA S L, DOMINGUEZ-VILLAR M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function [J]. *J Leukoc Biol*, 2018,
- [85] CHOI H W, SHIN P G, LEE J H, et al. Anti-inflammatory effect of lovastatin is mediated via the modulation of NF-kappaB and inhibition of HDAC1 and the PI3K/Akt/mTOR pathway in RAW264.7 macrophages [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 1103-1109.
- [86] YANG Y, XING R, LIU S, et al. Immunostimulatory effects of sulfated chitosans on RAW 264.7 mouse macrophages via the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 108(1310-1321).
- [87] ZHAO M, LI C, SHEN F, et al. Naringenin ameliorates LPS-induced acute lung injury through its anti-oxidative and anti-inflammatory activity and by inhibition of the PI3K/AKT pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2228-2234.
- [88] ZHU J, WANG M, HE J, et al. Polymorphisms in the AKT1 and AKT2 genes and oesophageal squamous cell carcinoma risk in an Eastern Chinese population [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(4): 666-677.

作者简介及在学期间所取得的科研成果

1 作者简介

姓名：金争 性别：女 出生年月：1992年5月

硕士研究生：2015年9月—2018年6月

专业：免疫学

指导老师：朱迅 教授 闫东梅 副教授

培养单位：吉林大学基础医学院

2 科研成果

目前已发表4篇SCI文章（第1作者、第3作者、第4作者、第5作者各一篇），1篇中文核心综述（第1作者），一篇会议论文（第一作者）。

【发表论文】

1. **Jin Zheng**, Tian Yuan, Li Dong, Yan Dongmei Zhu Xun*, BCG Increased Membrane Expression of TRIM59 Through the TLR2/TLR4/IRF5 Pathway in RAW264.7 Macrophages. *Protein & Peptide Letters*, 2017, 24:765-770.
2. **金争**, 田媛, 李冬, 闫东梅*, 朱迅*, TRIM 蛋白家族调节 NF- κ B 信号通路的研究进展. *中国免疫学杂志*, 2017, 33 (6): 925-930.
3. Xiaomin Liu, Zhongqi Fan, Li Zhang, **Zheng Jin**, Dongmei Yan, Youlin Zhang, Xiaodan Li, Langping Tu, Bin Xue, Yulei Chang*, Hong Zhang*, Xianggui Kong*, Bcl-2 Inhibitor Uploaded Upconversion Nanophotosensitizers to Overcome the Photodynamic Therapy Resistance of Cancer through Adjuvant Intervention Strategy. *Biomaterials*. 2017. 08. 010. 144:73-83.
4. Yan Dongmei, Sun Shiming, **Jin Zheng**, Tian Yuan, Liu Qihui, Li Dong, Zhu Xun*, Construction, expression and purification of recombinant HBcAg-MAGE-A3 therapeutic cancer vaccine. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2016, 9(6):9108-9113.
5. Yan Dongmei, Han Weiwei, Dong Zehua, Liu Qihui, **Jin Zheng**, Chu Dong, Tian Yuan, Zhang Jinpei, Song Dandan, Wang Dunhuang, Zhu Xun, Homology modeling and docking studies of ENPP4: a BCG activated tumoricidal macrophage protein. *Lipids in Health and Disease*. 2016, 15:19.

6. 金争, 田媛, 李冬, 闫东梅, 朱迅, BCG 通过 TLRs 上调 RAW264.7 细胞中 TRIM59 蛋白表达的研究. 2016 年第十一届全国免疫学学术大会

【参加学术会议】

2016 年世界生命科学大会

【获奖情况】

1. 吉林大学 2015-2016 学年一等研究生优秀奖学金、优秀研究生
2. 吉林大学 2016-2017 学年研究生学业奖学金
3. 吉林大学 2016-2017 学年吉林大学国家奖学金

致 谢

研究生的生活已经接近尾声，回首这三年的时光，我收获了知识，收获了成长，收获了陪伴，也收获了一路的欢笑与感动。感谢这段经历对我的磨练，让我自信而勇敢的面对今后的学习和生活。

在这里，我要感谢我的导师朱迅教授，您不仅指导我的课题，启发我细致全面地看待事物，还一次又一次给我以精神的洗礼。每一次跟您交流后，都感觉醍醐灌顶，之前的阴霾一扫而光，转而如沐春风，全身又充满了活力，重新投入到下一阶段的学习和生活中。您的教导使我终身受益，在今后的学习和工作中，我将铭记您的教导继续前行。

我还要感谢和蔼可亲的李一教授，在这三年中给我无尽的关心和照顾。在成长的路上，您以身作则，教导我诚信做人，踏实做事，细致严谨地对待科研。这些道理我会一直深埋在心，并时时想起以鞭策自己，以期不辜负您对我的谆谆教诲。

感谢闫东梅老师和李冬老师对我的悉心教导。你们不仅在学习上耐心的指导我，不断帮助我跨过科研中一个个难题，还在生活上给我无微不至的照顾。谢谢你们给我的一次又一次无尽的关心和爱护，让我在寒冷的北方又有了一个温暖的家。

感谢免疫教研室的每一位老师，谢谢你们对我过去三年每一点每一滴的关心和帮助，让我的三年更加顺畅，也谢谢你们营造了一个温馨的免疫大家庭，让我自由快乐的成长。

我还要感谢朝夕相处的师兄师姐师弟师妹，感谢你们的陪伴，让我的三年不孤单，更感谢你们给予的帮助与鼓励，让我的三年不再坎坷，反而充满了欢声与笑语。

最后，我还要感谢我的父母，谢谢我的爸爸，从不给我任何压力，谢谢我的妈妈，对我的每一天嘘寒问暖。谢谢我的家人给我足够的时间和空间做科研，一如既往的支持我。谢谢你们在我遇到困难的时候及时的鼓励与疏导，让我走过一段快乐的旅程。