

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.003

不同程度内质网应激对巨噬细胞自噬的影响*

马美娟 李妍[△] 张英梅 闫浩 刘敏 张乐
马颖 苑健 胡建华 纪兆乐 张荣庆 李聪叶 王海昌
(第四军医大学西京医院心内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:采用 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化模型,通过不同剂量衣霉素诱导巨噬细胞不同程度内质网应激,观察对其自噬的影响。**方法:**不同剂量衣霉素作用于小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,通过 TUNEL 染色检测其凋亡率,Western blot 检测内质网应激蛋白 GRP78,以及自噬标志蛋白 P62 的表达水平。**结果:**与 ox-LDL 组和大剂量衣霉素组相比,小剂量衣霉素组可以显著减少巨噬细胞的凋亡($P<0.01$);与 ox-LDL 组相比,小剂量衣霉素组上调内质网应激蛋白 GRP78 表达的同时,自噬标志蛋白 P62 适度下降($P<0.01$);大剂量衣霉素组更为显著地上调了内质网应激蛋白 GRP78 表达,但同时自噬标志蛋白 P62 也显著增加($P<0.01$)。**结论:**小剂量衣霉素引起一定程度的内质网应激,可以激活适度的自噬,从而减少巨噬细胞的凋亡,可能有助于降低动脉粥样硬化的程度。

关键词:巨噬细胞;内质网应激;自噬;GRP78;P62

中图分类号:Q593,R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)02-209-05

Effects of the Different Degree of the Endoplasmic Reticulum Stress on Macrophage's Autophagy*

MA Mei-juan, LI Yan[△], ZHANG Ying-mei, YAN Hao, LIU Min, ZHANG Le,

MA Ying, YUAN Jian, HU Jian-hua, JI Zhao-le, ZHANG Rong-qing, LI Cong-ye, WANG Hai-chang

(Department of Cardiology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: By using ox-LDL-induced macrophage foam cell model, we used different doses of tunicamycin to induce different degree of the endoplasmic reticulum stress, to observe the effects of it on autophagy. **Methods:** Different doses of tunicamycin were added to macrophage RAW264.7. The apoptosis rate was detected with TUNEL method. And the expression level of the endoplasmic reticulum stress marker protein GRP78 and autophagy marker protein P62 were detected by western blotting. **Results:** Compared with the ox-LDL group and the high-dose tunicamycin group, low-dose of tunicamycin significantly reduced the apoptosis of macrophage ($P<0.01$); compared with ox-LDL group, the endoplasmic reticulum stress marker protein GRP78 expression was remarkable increased in low-dose tunicamycin group; meanwhile, the autophagy marker protein P62 moderately decreased ($P<0.01$); in the high-dose tunicamycin group, there was more significant increase in the endoplasmic reticulum stress marker protein GRP78 expression, however the autophagy marker protein P62 also increased notably ($P<0.01$). **Conclusion:** Low-dose of tunicamycin caused a certain degree of endoplasmic reticulum stress, which activated moderate autophagy, decreasing macrophage apoptosis. It may help to reduce the extent of the atherosclerosis.

Key words: Macrophage; Endoplasmic reticulum stress; Autophagy; GRP78; P62

Chinese Library Classification(CLC): Q593, R541.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)02-209-05

前言

冠状动脉粥样硬化性心脏病是心血管疾病中致死率最高的心血管疾病之一,近年研究表明,巨噬细胞凋亡是造成动脉粥样硬化斑块不稳定的重要因素,在晚期动脉粥样硬化中,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与巨噬细胞凋亡密切相关^[1-3]。本课题组前期研究结果也显示 ERS 导致巨噬细胞凋亡,参与了动脉粥样硬化不稳定斑块形成过程^[4]。内质网应激(ERS)是指由于某种原因导致细胞内质网内稳态失衡、生理功

能发生紊乱的一种亚细胞器的病过程。应激发生后,通过上调分子伴侣 GRP78 表达、抑制蛋白质合成、加速错误折叠和未折叠蛋白质降解等方式缓解 ERS。然而,持续或较严重的 ERS 则触发凋亡信号,诱导 CHOP、Caspase-12、JNK 等促凋亡子的表达及活化,导致细胞凋亡^[5,6]。自噬(Autophagy)是通过溶酶体系统降解长半衰期蛋白和细胞器的代谢通路,能被饥饿、细胞分化以及正常生长的调节所诱导,是用来维持细胞内环境稳定和存活的机制。P62 是自噬标志蛋白之一,自噬激活时 P62 的表达下降。但是,在动脉粥样硬化的发展过程中,内质网应激和

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170184);陕西省社会发展公共计划课题(2012SF2-02-3)

作者简介:马美娟(1987-),女,硕士,动脉粥样硬化, Tel: 13310988552, E-mail: dymameijuan@163.com

△ 通讯作者:李妍,电话:13892890227, E-mail: fireman.fimmu@edu.cn

(收稿日期:2013-09-06 接受日期:2013-09-30)

自噬的关系仍不明确。最新研究报道发现,在心肌缺血再灌注损伤过程中,ERS 可以诱导适度的自噬,从而减少缺血再灌注损伤^[7]。为此,本研究应用不同剂量衣霉素对巨噬细胞进行干预,探讨不同程度内质网应激对自噬及巨噬细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系和试剂

巨噬细胞系 RAW264.7 (中国科学院上海细胞库),高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),DMSO(美国 Sigma 公司),衣霉素(tunicamycin, TM, 美国 Sigma 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),Anti-GRP78 抗体(美国 Abcam 公司),Anti-P62 抗体(美国 CST 公司),Anti- β -actin 抗体(美国 Abcam 公司),TUNEL 凋亡试剂盒(美国 Roche 公司),BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究所),氧化低密度脂蛋白(ox-LDL,北京协生生物科技有限公司)。

1.2 巨噬细胞的培养与分组

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 培养于 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,条件:37℃、5%CO₂,每 2-3 天传代一次,传 3 代后的细胞可用于实验。细胞密度调整至 $1 \times 10^5/L$,加入 6 孔板中培养,脂蛋白诱导前用无血清 DMEM 培养基同步化 12 h,分为四组分别进行干预:(1)空白对照组:仅含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基共培养 24 h;(2)ox-LDL 诱导组:10%FBS 的 DMEM 高糖培养基 + ox-LDL (50 mg/L)共培养 24 h;(3)小剂量衣霉素组:10% FBS 的 DMEM 高糖培养基 + 小剂量衣霉素(0.1 $\mu g/mL$)共培养 24 h 后加入 ox-LDL (50 mg/L)培养 24 h;(4)大剂量衣霉素组:10% FBS 的 DMEM 高糖培养基 + 大剂量衣霉素(1.0 $\mu g/mL$)共培养 24 h 后加入 ox-LDL (50 mg/L)培养 24 h。处理完,收集细胞与培养液。

1.3 TUNEL 法检测巨噬细胞凋亡率

制备细胞爬片:取盖玻片置于 24 孔板内,用 0.25%胰酶消化细胞制成细胞悬液,并接种于盖玻片上;按上述分组处理细胞,每组设 3 个副孔,处理完毕,取出盖玻片,PBS 液洗片,5 min $\times$ 3 次;冷丙酮固定 20 min,PBS 液洗片,5 min $\times$ 3 次,晾干;将玻片置于冰上,0.1% Triton X-100 液浸泡 2 min,PBS 液洗片,5 min $\times$ 3 次,晾干;加入由核苷酸复合物, rTdT 酶组成的混合液 50 mL(9:1),避光 37℃ 孵育 60 min;DAPI 染色液室温避光孵育 10 min,PBS 液洗片,5 min $\times$ 3 次;50%甘油封片后在荧光显微镜下观察拍照。

1.4 Western-blot 检测内质网应激及自噬蛋白的表达

常规方法收集蛋白样品后,用 12%SDS、PAGE 胶,85 V 电泳 30 min 后将电压调至 125 V,待溴酚蓝跑出胶板时停止电泳。100 V、2 h 将蛋白样品转移至 NC 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入稀释后的抗体,anti-P62 (1:1000),anti-GRP78(1:1000),Anti- β -actin(1:1000),4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入荧光二抗(1:5000),室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,凝胶成像系统显色后,应用 Image J 软件半定量分析条带灰度,相对表达量以各样本与 β -actin 条带灰度比值计算。

1.5 统计学分析

实验数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,均以均值 $\pm$

标准差($\bar{X} \pm S$)表示。各组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量衣霉素对巨噬细胞凋亡率的影响

TUNEL 荧光染色及半定量分析结果显示(图 1),正常对照组巨噬细胞状态良好,凋亡率为 2.1%(图 1A.a,图 1B),加入 ox-LDL(50 mg/L)后细胞凋亡增加,凋亡率 31.0%(图 1A.b,图 1B)(ox-LDL 组 vs control 组, $P < 0.01$),在 ox-LDL 基础上增加小剂量衣霉素(0.1 $\mu g/mL$)预处理巨噬细胞,细胞凋亡减少,凋亡率为 12.3%(图 1A.c,图 1B),而大剂量衣霉素组(1.0 $\mu g/mL$)明显增加细胞凋亡数量,凋亡率为 40%(图 1A.d,图 1B)(小剂量衣霉素组 vs ox-LDL 组,大剂量衣霉素组 vs 小剂量衣霉素组, $P < 0.01$)。

2.2 不同剂量衣霉素对巨噬细胞 GRP78、P62 蛋白表达水平的影响

Western blot 法检测内质网应激蛋白 GRP78、自噬标志性蛋白 P62 表达水平。结果显示,与正常对照组相比,加入 ox-LDL (50 mg/L)后 GRP78、P62 表达水平均显著增加(ox-LDL 组 vs control 组, $P < 0.05$),与 ox-LDL 组相比,在 ox-LDL 基础上给予细胞小剂量衣霉素(0.1 $\mu g/mL$)干预后 GRP78 表达显著增加,而 P62 表达水平显著下降(小剂量衣霉素组 vs ox-LDL 组, $P < 0.05$),与小剂量衣霉素组相比,在 ox-LDL 基础上给予细胞大剂量衣霉素(1.0 $\mu g/mL$)干预,GRP78 表达水平进一步增加,同时 P62 蛋白表达水平也显著增加(大剂量衣霉素组 vs 小剂量衣霉素组, $P < 0.05$)(图 2)。

3 讨论

动脉粥样硬化性心血管疾病是对人类健康威胁最严重的疾病之一,是冠心病和缺血性脑卒中的主要原因。据报道全球范围内心血管疾病的病死率仅次于肿瘤的病死率,严重危害人类健康。近年来研究发现急性冠脉综合征(ACS)的发生主要与动脉粥样硬化斑块的稳定性相关,不稳定斑块破裂及继发血栓形成是 ACS 发生的主要原因^[8]。不稳定斑块也称易损斑块,多为偏心性,脂质坏死核心大,占斑块体积的 40%以上,纤维帽薄,可见大量炎症细胞浸润,以巨噬细胞、泡沫细胞居多,激活的 T 淋巴细胞及肥大细胞也增多,纤维帽基质耗竭增加,平滑肌细胞极少^[9-11]。最近研究显示,内质网应激参与动脉粥样硬化的发生发展。内质网应激是指由于某种原因导致细胞内质网内稳态失衡、生理功能发生紊乱的一种亚细胞器的病理过程。研究表明内质网应激反应是细胞的一种自我保护性机制,以恢复内质网稳态,维持生存。但是过强的或长时间的内质网应激反应可以引起细胞的凋亡^[12]。课题前期研究显示,ox-LDL 可以诱导内质网应激的发生,并且证实了内质网应激在不稳定性动脉粥样硬化中扮演至关重要的作用^[13]。因此,探索内质网应激与巨噬细胞凋亡以及与动脉粥样硬化的关系,对于动脉粥样硬化的防治及新药的研发有重要意义。

自噬是由溶酶体介导的一种降解途径,通过降解细胞器内受损及冗余成分为氨基酸、脂肪酸、核苷等小分子,供细胞再利用。因此,自噬在维持细胞内环境的稳定性起着十分重要的作用。

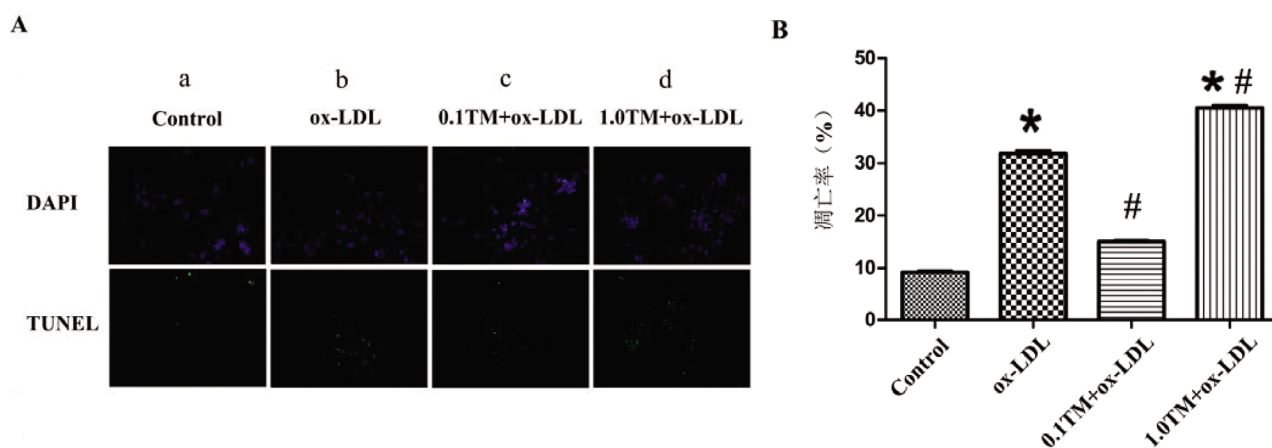


图1 TUNEL 法检测的各组细胞凋亡及半定量分析

A: TUNEL 染色: a.control, b.ox-LDL, c.0.1TM+ox-LDL, d.1.0TM+ox-LDL

B: 半定量分析, 注: * $P < 0.01$, ox-LDL 组 vs control 组; # $P < 0.01$, 0.1TM+ox-LDL 组 vs ox-LDL 组; *# $P < 0.01$, 1.0TM+ox-LDL 组 vs 0.1TM+ox-LDL 组

Fig.1 The apoptosis of each group detected by TUNEL method

A: TUNEL staining. a.control, b.ox-LDL, c.0.1TM+ox-LDL, d.1.0TM+ox-LDL

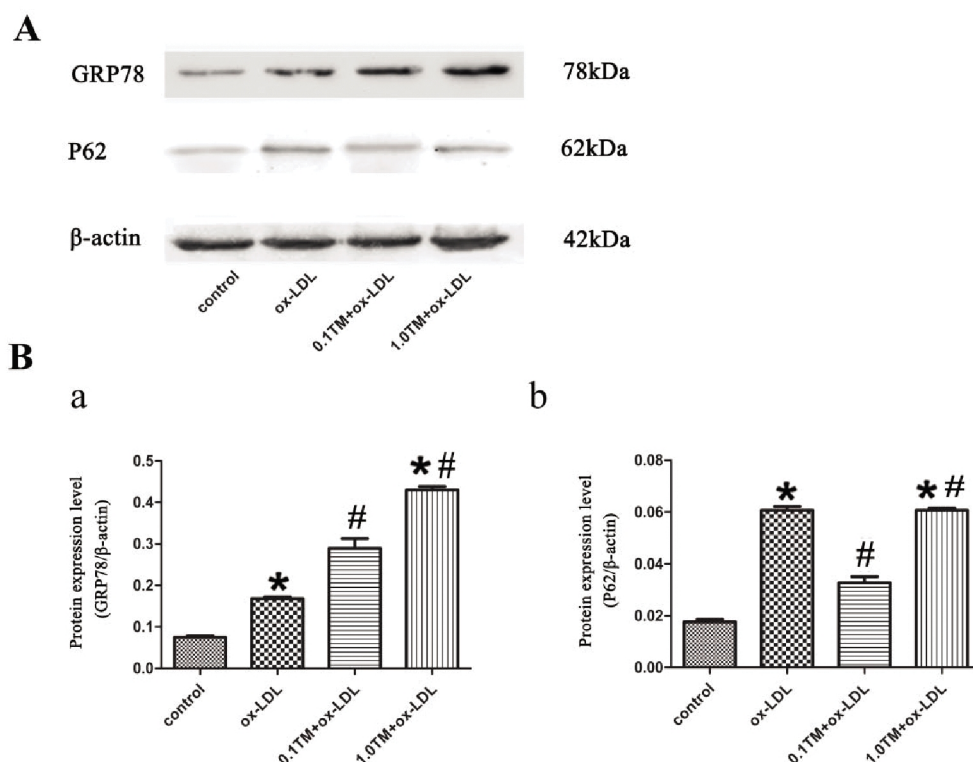
B: Semi-quantitative analysis, Note: * $P < 0.01$, ox-LDL group compared with control group; # $P < 0.01$, (0.1TM+ox-LDL) group compared with ox-LDL group; *# $P < 0.01$, (1.0TM+ox-LDL) group compared with (0.1TM+ox-LDL) group

图2 Western blotting 检测各组细胞 GRP78、P62 蛋白的表达及半定量分析

A: 各组细胞 GRP78、P62 蛋白的表达

B: 半定量分析, 注: * $P < 0.01$, ox-LDL 组 vs control 组; # $P < 0.01$, 0.1TM+ox-LDL 组 vs ox-LDL 组; *# $P < 0.01$, 1.0TM+ox-LDL 组 vs 0.1TM+ox-LDL 组

Fig.2 The protein expression level of GRP78 and P62 of each group detected by Western blotting

A: The protein expression level of GRP78 and P62 of each group

B: Semi-quantitative analysis, Note: * $P < 0.01$, ox-LDL group compared with control group; # $P < 0.01$, (0.1TM+ox-LDL) group compared with ox-LDL group; *# $P < 0.01$, (1.0TM+ox-LDL) group compared with (0.1TM+ox-LDL) group.

用。自噬一般被认为是细胞在氧化应激及营养匮乏等条件下的一种自我保护机制。通常情况下,自噬维持在较低水平,但是当 ATP 能量耗竭、活性氧的释放,线粒体膜通道的开放都会导致

自噬活性迅速升高^[14]。自噬过程受严格调控,除 mTOR 途径和 PI3K/Akt(PKB)途径两条经典途径外,近来发现内质网应激途径也是自噬的重要调控通路^[15]。自噬的主要标志蛋白有 P62、

Atg7、LC3 等,自噬的上调或下调参与肝脏疾病、心肌病、肿瘤和神经变性等多个系统疾病的发生^[16-19]。最近,不断有研究发现,自噬可能参与了动脉粥样硬化时细胞死亡和存活的调控。选择性抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能诱导巨噬细胞自噬,减少斑块巨噬细胞的浸润,抑制炎症反应进而稳定动脉粥样硬化易损斑块^[20]。

内质网应激与自噬的关系也备受关注,但目前研究尚无定论。Li 等^[21]发现下调内质网转录分子伴侣 - 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)可使内质网扩张和瓦解,进而抑制细胞的自噬,但同时下调 GRP78 和 X- 盒 - 结合蛋白 - 1 (XBP-1)可恢复自噬的水平。徐治^[22]等人对宫颈癌 HeLa 细胞进行缺糖缺氧,发现缺糖缺氧应激可以诱导细胞发生自噬,这种自噬可能来源于内质网应激 - 自噬信号通路。也有研究发现诱导自噬通过减弱内质网应激从而促进牛胚胎的黏附发展^[23]。然而,在动脉粥样硬化的发展过程中,两者的关系仍不清楚。

本实验应用不同剂量的内质网应激的诱导剂衣霉素体外培养的巨噬细胞系 RAW264.7,采用 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化模拟动脉粥样硬化模型,应用 TUNEL 染色法检测巨噬细胞的凋亡率,观察到与 ox-LDL 组和大剂量衣霉素组相比,小剂量衣霉素组显著地减少了巨噬细胞的凋亡。为了进一步观察内质网应激和自噬在巨噬细胞凋亡中的关系,采用 Western blot 检测了内质网应激标志蛋白 GRP78 以及自噬标志蛋白 P62 表达水平,发现小剂量衣霉素组与大剂量衣霉素组相比,引起内质网应激的同时激活了适度的自噬,而大剂量衣霉素虽引起更大程度的内质网应激却削弱了自噬。本实验首次证实,小剂量衣霉素引起适度内质网应激的同时,可以激活适度的自噬,从而减少巨噬细胞的凋亡,可能有助于减轻动脉粥样硬化程度。

综上所述,本实验利用 ox-LDL 诱导的泡沫化巨噬细胞模型,首次证实小剂量衣霉素可引起的一定程度的内质网应激,同时激活了适度的自噬,从而减少了巨噬细胞的凋亡,可能有助于减轻动脉粥样硬化的进程。

参考文献(References)

- [1] Liao X, Sluimer J C, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis [J]. Cell Metab, 2012, 15 (4): 545-553
- [2] 崔淑华, 康勤慧. 动脉粥样硬化中巨噬细胞凋亡与内质网应激机制 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(4): 315-318
Cui Shu-hua, Tuo Qin-hui. Macrophage apoptosis and the mechanisms of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis [J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2011, 31(4): 315-318
- [3] Martinet W, De Meyer G R. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential [J]. Circ Res, 2009, 104(3): 304-317
- [4] 郑晓慧, 高雪, 李妍, 等. 冷应激建立家兔动脉粥样硬化不稳定斑块模型的方法和评价 [J]. 中华老年医学杂志, 2012, 31(4): 330-334
Zheng Xiao-hui, Gao Xue, Li Yan, et al. Establishment and evaluation of rabbit unstable atherosclerotic plaque model induced by cold stress [J]. Chin J Geriatr, 2012, 31(4): 330-334
- [5] 张峰娟, 边云飞, 刘金帅. 内质网应激与动脉粥样硬化的相关研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(1): 94-96
Zhang Feng-juan, Bian Yun-fei, Liu Jin-shuai. The related research of endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis [J]. Chinese journal of integrative medicine on cardio-/cerebrovascular disease, 2011, 9(1): 94-96
- [6] 毛刘锋, 董晓光, 周晓莹, 等. 内质网应激与动脉粥样硬化相关性研究进展 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2009, 3(2): 75-78
Mao Liu-feng, Dong Xiao-guang, Zhou Xiao-ying, et al. The correlation research progress of endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis [J]. Chin J Clinicians (Electronic Edition), 2009, 3(2): 75-78
- [7] Petrovski G, Das S, Juhasz B, et al. Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(11): 2191-2200
- [8] 张丹丹, 董小黎, 杨黎明, 等. 不稳定动脉粥样硬化斑块的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(25): 4961-4963
Zhang Dan-dan, Dong Xiao-li, Yang Li-ming, et al. The Research of Unstable Atherosclerotic Plaque [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(25): 4961-4963
- [9] 徐宝华, 赵慧颖. 动脉粥样硬化不稳定斑块的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2005, 26(5): 498-501
Xu Bao-hua, Zhao Hui-ying. Progress in Research On Atherosclerotic Unstable Plaque [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2005, 26(5): 498-501
- [10] 陈永福, 王绿娅, 吕树铮, 等. 动脉粥样硬化不稳定斑块的药物治疗进展 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(8): 1599-1602
Chen Yong-fu, Wang Lu-ya, Lu Shu-zheng, et al. Advances on Medication for Vulnerable Plaque of Atherosclerosis [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(8): 1599-1602
- [11] 夏效东, 凌文华. 动脉粥样硬化不稳定斑块的研究现状 [J]. 中国心血管杂志, 2005, 10(2): 139-141
Xia Xiao-dong, Ling Wen-hua. Current status in research of vulnerable atherosclerotic plaque [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Medicine, 2005, 10(2): 139-141
- [12] 娄利霞, 唐朝枢. 内质网应激与心血管疾病 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2005, 5(2): 496-499
Lou Li-xia, Tang Zhao-shu. Endoplasmic reticulum stress and the cardiovascular disease [J]. Molecular Cardiology of China, 2005, 5(2): 496-499
- [13] 闫浩, 李妍, 马美娟, 等. 胰岛素在巨噬细胞泡沫化过程中对 Toll 样受体 4 表达的影响及其机制 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13 (09): 1605-1608
Yan Hao, Li Yan, Ma Mei-juan, et al. Effect and Mechanism of Insulin on the Expression of Toll-Like Receptor 4 in Macrophage-driven Foam Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(09): 1605-1608
- [14] 赵金香, 李耀华. 自噬在缺血再灌注中的作用 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(4): 798-800
Zhao Jin-xiang, Li Yao-hua. The Role of the Autophagy under Ischemia and Reperfusion [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(4): 798-800
- [15] Yorimitsu T, Klionsky D J. Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy [J]. Autophagy, 2007, 3(2): 160-162
- [16] Straniero S, Cavallini G, Donati A, et al. Stimulation of autophagy by antilipolytic drugs may rescue rodents from age-associated hypercholesterolemia [J]. Rejuvenation Res, 2009, 12(2): 77-84

- [17] Sadoshima J. The role of autophagy during ischemia/reperfusion[J]. Autophagy, 2008, 4(4): 402-403
- [18] Wang D, Ma Y, Li Z, et al. The role of AKT1 and autophagy in the protective effect of hydrogen sulphide against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Autophagy, 2012, 8(6): 954-962
- [19] 包灵洁, 易晓芳. 自噬在卵巢癌中的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2013, (1): 54-56
- Bao Ling-jie, Yi Xiao-fang. Updates in the Study of Autophagy in Ovarian Cancer[J]. J Int Obstet Gynecol, 2013, (1): 54-56
- [20] 王和峰, 翟纯刚, 庞文会, 等. PI3K/Akt / mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 390-397
- Wang He-feng, Zhai Chun-gang, Pang Wen-hui, et al. Roles of PDK/Akt/mTOR signaling pathway in macrophage autophagy and atherosclerotic plaque instability[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2013, 29(3): 390-397
- [21] Li J, Ni M, Lee B, et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(9): 1460-1471
- [22] 徐冶, 李晓宁, 钟加滕, 等. 缺糖缺氧经内质网应激途径诱导宫颈癌 Hela 细胞自噬[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(26): 4089-4091
- Xu Ye, Li Xiao-ning, Zhong Jia-teng, et al. Oxygen-glucose deprivation (OGD) induce autophagy of cervical carcinoma Helacell line by endoplasmic reticulum stress pathway[J]. China's maternity and child care, 2011, 26(26): 4089-4091
- [23] Song B S, Yoon S B, Kim J S, et al. Induction of autophagy promotes preattachment development of bovine embryos by reducing endoplasmic reticulum stress[J]. Biol Reprod, 2012, 87(1): 8, 1-11

(上接第 208 页)

- [5] Zhao Y, Wang QJ, Yang S, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity [J]. J Immunol, 2009, 183(9): 5563-5574
- [6] Zhou Q, Schneider IC, Edes I, et al. T-cell receptor gene transfer exclusively to human CD8 (+) cells enhances tumor cell killing[J]. Blood, 2012, 120(22): 4334-4342
- [7] Kessels HW, Wolkers MC, van den Boom MD, et al. Immunotherapy through TCR gene transfer[J]. Nat Immunol, 2001, 2(10): 957-961
- [8] Linnemann C, Schumacher TN, Bendle GM. T-cell receptor gene therapy: critical parameters for clinical success[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(9): 1806-1816
- [9] Clay TM, Custer MC, Spiess PJ, et al. Potential use of T cell receptor genes to modify hematopoietic stem cells for the gene therapy of cancer[J]. Pathol Oncol Res, 1999, 5(1): 3-15
- [10] Clay TM, Custer MC, Sachs J, et al. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 507-513
- [11] Hillerdal V, Nilsson B, Carlsson B, et al. T cells engineered with a T cell receptor against the prostate antigen TARP specifically kill HLA-A2+ prostate and breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(39): 15877-15881
- [12] Shen H, Shao HW, Chen XH, et al. Identification of a novel HLA-A2-restricted mutated Survivin epitope and induction of specific anti-HCC CTLs that could effectively cross-recognize wild-type Survivin antigen [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(2): 393-403
- [13] Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Application of adoptive T-cell therapy using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer for the treatment of human leukemia [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 521248
- [14] 吴世康. 绿色荧光蛋白质(GFP)的发现、表达和发展[J]. 影像科学与光化学, 2009, 27(1): 69-78
- Wu Shi-kang. The Discovery and Development of the Green Fluorescent Protein[J]. Imaging science and photochemistry, 2009, 27(1): 69-78
- [15] 胡丽彩, 邱曙东, 黄树林, 等. TCR V β 7.1 基因修饰 T 细胞对乳腺癌杀伤作用的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(2): 97-99
- Hu Li-cai, Qiu Shu-dong, Huang Shu-lin, et al. The experimental study of the cytotoxicity to breast cancer cell line using modified T lymphocyte by TCRV β 7. 1 gene [J]. Chinese journal of immunology, 2003, 19(2): 97-99
- [16] 王俊伟, 张巨峰, 张文峰, 等. 共表达 TCR α 12-2 和 TCRV β 7.1 重组腺病毒载体的构建及其杀伤肝癌细胞作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(11): 2001-2004
- Wang Jun-wei, Zhang Ju-feng, Zhang Wen-feng, et al. Construction of recombinant adenovirus vector Ad. TCR α 12-2-IRES-V β 7. 1 and its cytotoxicity in hepatoma [J]. Progress in modern biomedicine, 2008, 8(11): 2001-2004
- [17] 尹青松, 谭荻, 杨力建, 等. TCR V α 23-V β 13 基因修饰 T 细胞及其特异性细胞毒活性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(2): 260-267
- Yin Qing-song, Tan Huo, Yang Li-jian, et al. Specific cytotoxicity of TCR V α 23 - V β 13 gene-modified T-cells [J]. Chinese journal of pathophysiology, 2011, 27(2): 260-267