

siRNA 沉默 Bmi-1 基因表达对宫颈癌细胞增殖的影响

张冬丽, 王 伟, 张红霞

(河南大学淮河医院妇产科, 河南 开封 475000)

【摘要】 目的 探讨 siRNA 沉默 B 细胞特异的莫洛尼白血病病毒插入位点 1 基因 (Bmi-1) 表达对宫颈癌细胞增殖的影响研究。**方法** 通过脂质体转染 siRNA Bmi-1 及阴性对照 (control) 到人宫颈癌 Hela 细胞, 采用 Realtime PCR 及 western blot 法检测细胞中 Bmi-1 的表达。MTT 法检测细胞活力, Annexin V-PI 流式双染及 Hoechst 染色检测细胞凋亡情况, 流式细胞术检测细胞周期, western blot 法检测细胞中 p16, p53, CyclinD1 及 Rb 的表达。**结果** 与 Control 组比较, siRNA Bmi-1 组细胞中 Bmi-1 蛋白及 mRNA 表达量皆显著降低 ($P < 0.01$), 同时细胞活力下降, 细胞凋亡率提高 ($P < 0.01$), 细胞周期阻滞在 G1 期 ($P < 0.01$), 细胞中 p16 表达量上调 ($P < 0.01$), p53 及 CyclinD1 表达量下调 ($P < 0.01$), Rb 磷酸化水平降低 ($P < 0.01$)。**结论** Bmi-1 具有抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖的作用, 可能与调控细胞周期相关蛋白表达有关。

【关键词】 关键词 B 细胞特异的莫洛尼白血病病毒插入位点 1 基因 (Bmi-1); 宫颈癌 Hela 细胞; 增殖

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0049-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.009

Effect of siRNA silencing Bmi-1 gene on cell proliferation of cervical cancer cells

ZHANG Dong-li, WANG Wei, ZHANG Hong-xia

(Department of Obstetrics and Gynecology of the Huaihe Hospital of Henan University, Henan Kaifeng, 475000, China)

【Abstract】 Objective To explore effect of siRNA silencing B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site (Bmi-1) gene expression on cell proliferation of cervical cancer cells. **Methods** Hela cells were transferred with control and siRNA Bmi-1. The expression of Bmi-1 in Hela cell was examined by Realtime PCR and western blot. The cell viability was detected by MTT. The cell apoptosis was examined by Annexin V-PI flow cytometry and Hoechst staining. Cell cycle was detected by flow cytometry. The expression of p16, p53, CyclinD1 and Rb was detected by western blot. **Results** Compared with control group, the expression of Bmi-1 protein and mRNA was down-regulated, the cell viability was decreased, cell apoptotic rate was increased, Cell cycle was arrested in the G1 phase, the expression of p16 was up-regulated, the expression of p53 and CyclinD1 down-regulated, the phosphorylation of Rb was inhibited in siRNA Bmi-1 group. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Bmi-1 inhibited Hela cell proliferation via regulation of expression of cell cycle related protein.

【Key words】 B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site (Bmi-1); Human cervical cancer Hela cells; Proliferation

[作者简介] 张冬丽 (1983 -), 女, 硕士生, 主治医师, E-mail: yjk20060701@163.com。

[通讯作者] 张红霞。

宫颈癌是常见妇科肿瘤,发病率居女性恶性肿瘤第二位,对女性身心健康造成严重危害,在我国,宫颈癌发病率及死亡率逐年上升,并呈现年轻化^[1-2]。宫颈癌发病机制复杂,是多种因素,多个阶段共同作用的结果。研究表明早婚早育,人乳头瘤病毒感染,遗传,环境,不健康性行为是导致宫颈癌发生的高危因素,除此之外,癌基因的激活与抑癌基因的失活也是宫颈癌发生的主要原因之一^[3]。B 细胞特异的莫洛尼白血病病毒插入位点 1 基因(B-cell specific moloney murine leukemia virus integration site, Bmi-1)是一种新近发现的被认为具有癌基因特性的基因,对于细胞衰老,永生化和细胞周期的调控具有重要作用^[4-6]。研究显示 Bmi-1 在多种肿瘤中皆呈现高表达状态,如乳腺癌,结肠癌,胃癌及肺癌等^[5, 7]。不无例外,国内外学者也在宫颈癌患者宫颈组织或者血浆中发现 Bmi-1 阳性表达皆高于正常宫颈组织,而且高表达的 Bmi-1 与临床分期,分化程度,肿瘤大小及淋巴结转移等密切相关,且证实 Bmi-1 是宫颈癌预后的独立影响因子^[8-11]。从而说明 Bmi-1 在宫颈癌中发挥着癌基因的作用,通过靶向 Bmi-1 可能可以作为宫颈癌治疗新的治疗方法。另外有研究证实下调宫颈癌 HeLa 细胞中 Bmi-1 表达,能显著的抑制肿瘤细胞克隆形成及小鼠体内成瘤^[12],但具体作用机制尚未见报道,所以本研究将在此基础上,利用 siRNA 干扰 HeLa 细胞中 Bmi-1 表达,进而探讨 Bmi-1 下调后,肿瘤细胞的增殖状况及相关机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

宫颈癌细胞 HeLa 购于中国科学院细胞库,目录号:TCHu187。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗 Bmi-1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);兔抗 p16, p53, CyclinD1, Rb, p-Rb, GAPDH 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Annexin V-PI 流式双染检测试剂盒, Hoechst 33258 染色试剂盒,细胞周期检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);siRNA Bmi-1 及 Control 订购于上海吉玛生物技术有限公司;四甲基偶氮唑盐(美国 Gibco 公司);胎牛血清,DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);Trizol 试剂盒,一步法 RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司)。迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪(北京六一仪

器厂);ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),AF6000 荧光显微镜(德国 Leica 公司),FACSCanto 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 siRNA Bmi-1 的转染

将宫颈癌细胞 HeLa 接种于 96、24 或 6 孔板,当细胞汇合度达到 50% 时,根据 Lipofectamine™2000 转染试剂盒将 siRNA Bmi-1 及 Control 转染到细胞中,转染 6 h 后,弃去转染液,并通过 Realtime PCR, western blot 检测转染效果。

1.4 Realtime PCR 检测 Bmi-1 mRNA 表达

采用 Trizol 法抽提细胞总 RNA,接着一步法 RT-PCR 逆转录,最后 Realtime PCR 检测。引物由上海生工生物工程有限公司合成,如下:Bmi-1 上游引物:5'-GAGGGTACTTCATTGATGCCACAA-3',下游引物:5'-GCTGGTCTCCAGGTAACGAACAATA-3',长度 357 bp;GAPDH 上游引物:5'-GCACCGTC AAGGCTGAGAAC-3',下游引物:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3',长度 402 bp。反转录体系为:总 RNA 模板 2 μL(1 μg)、dNTP 混合物 2 μL、MgCl₂ 2 μL、加 EDPC 补充蒸馏水至 25 μL。反应参数为:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环次数为 40。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 mRNA 相对值。

1.5 MTT 法检测 HeLa 细胞活力

按“1.3”进行操作后,分别于 24、48、72、96 h 后,加入 MTT,继续培养 4 h 后吸弃培养液,每孔加入 DMSO,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 490 nm 处测 OD 值,以 OD 值表示细胞相对活力。

1.6 Annexin V-PI 流式双染检测 HeLa 细胞凋亡

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,避光染色 30 min 上机检测。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.7 Hoechst 染色检测 HeLa 细胞凋亡

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,后按照 Hoechst 33258 染色试剂盒说明书进行操作,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 流式细胞术检测细胞周期

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,后按照细胞周期检测试剂盒说明书进行操作,在流式细胞仪中进行检测。

1.9 Western blot

按“1.3”进行操作后,48 h 后消化收集细胞,加

入 RIPA 裂解液,裂解细胞,吸取上清液即可获得总蛋白。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性并上样,进行 SDS 凝胶电泳 1~2 h,后湿法转膜 30~50 min。一抗 (Bmi-1, p16, p53, CyclinD1, Rb, p-Rb, GAPDH, 稀释度为 1:100) 孵育,4℃ 过夜;二抗室温孵育 1~2 h。在凝胶成像系统中曝光。并采用 “Quantity one” 软件分析各蛋白条带灰度值。

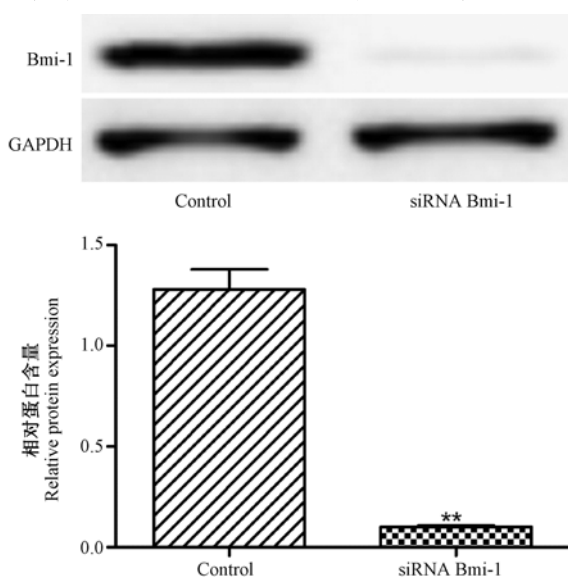
1.10 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 t 检验显著性差异,以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA Bmi-1 转染效果的检测

如图 1 及图 2 所示,Control 组及 siRNA Bmi-1 组细胞中 Bmi-1 蛋白及 mRNA 表达量分别为 $[(1.23 \pm 0.12) \text{ vs } (0.13 \pm 0.01)]$ 及 $[(1.17 \pm 0.11) \text{ vs } (0.08 \pm 0.01)]$,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

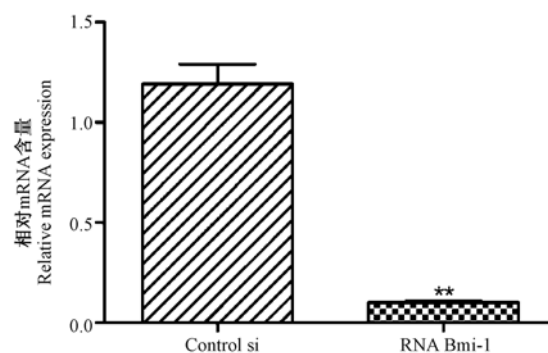
图 1 siRNA Bmi-1 转染后 Bmi-1 蛋白在 HeLa 细胞中的表达

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Expression of Bmi-1 protein in HeLa cells after transfection with siRNA Bmi-1

2.2 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞活力的影响

如图 3 所示,在作用 24、48、72、96 h 时,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组细胞活力显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。且在 48、72、96 h 时作用强度一致。

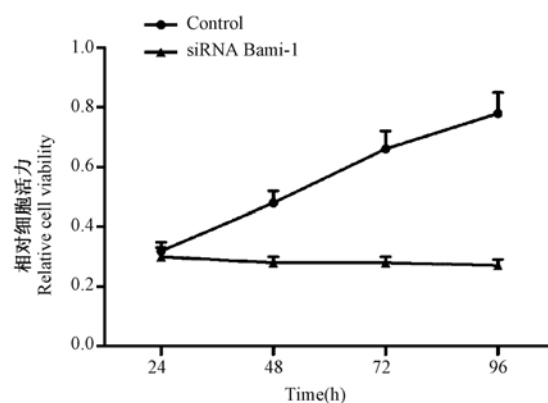


注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 siRNA Bmi-1 转染后 Bmi-1 mRNA 在 HeLa 细胞中的表达

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Expression of Bmi-1 protein in HeLa cells after transfection with siRNA Bmi-1



注:与 Control 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞活力的影响

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Fig. 3 Effect of siRNA Bmi-1 on HeLa cell viability

2.3 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞凋亡情况的影响

如图 4,图 5,表 2 所示,经流式双染及 Hoechst 染色发现,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组细胞凋亡率显著提高,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

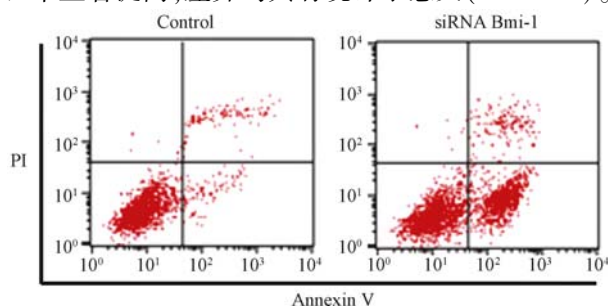


图 4 流式双染检测 siRNA Bmi-1 对 HeLa 细胞凋亡的影响

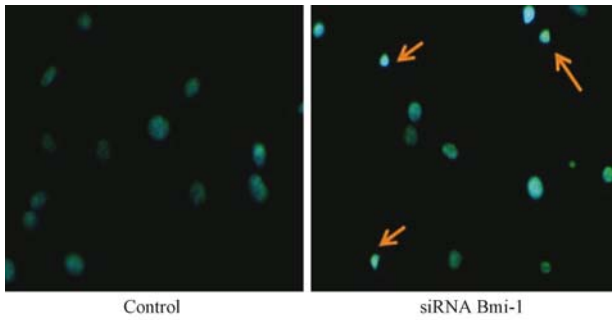
Fig. 4 Effect of siRNA Bmi-1 on HeLa cell apoptosis by flow cytometry double staining

表 1 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞凋亡情况的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of siRNA Bmi-1 on Hela cell apoptosis

组别 Group	流式细胞术检测结果(%) Results of flow cytometry (%)		Hoechst 染色结(%) Results of Hoechst staining (%)
	早期凋亡 Early apoptosis	晚期凋亡 Late apoptosis	
对照组 Control group	2. 26 ± 0. 16	4. 40 ± 0. 35	5. 98 ± 0. 52
siRNA Bmi-1 组 siRNA Bmi-1 group	5. 49 ± 0. 40 **	37. 82 ± 3. 73 **	39. 96 ± 4. 00 **

注:与 Control 组比较, ** $P < 0. 01$ 。
Note: Compared with control group, ** $P < 0. 01$.



注:→,细胞凋亡。

图 5 Hoechst 染色检测 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞凋亡的影响(× 20)

Note: →, cell apoptosis.

Fig.5 Effect of siRNA Bmi-1 on Hela cell apoptosis by Hoechst staining (× 20)

2.4 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞周期的影响

如图 6 所示,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组使细胞周期阻滞在 G1 期。

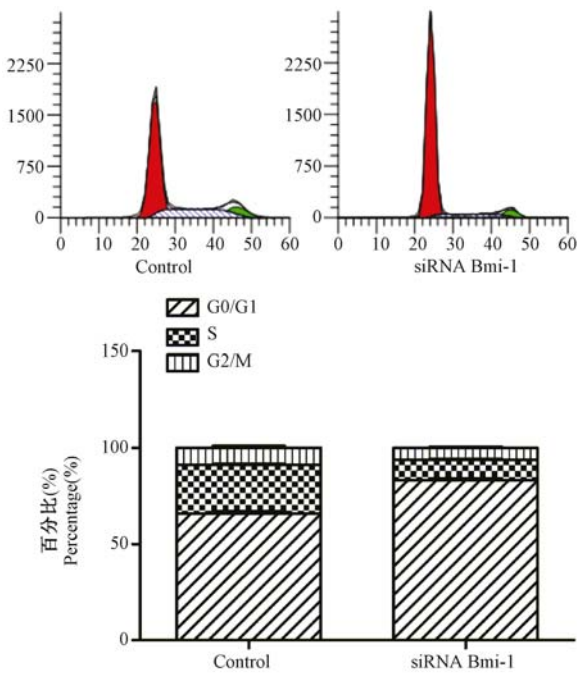
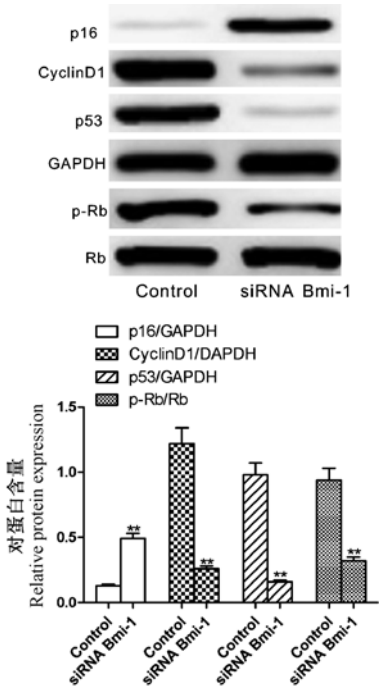


图 6 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞周期的影响

Fig.6 Effect of siRNA Bmi-1 on Hela cell cycle

2.5 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞周期相关蛋白表达的影响

如图 7 所示,与 Control 组比较,siRNA Bmi-1 组细胞中 p16 表达量显著上调,CyclinD1 及 p53 表达量显著下调,Rb 磷酸化水平降低,差异均具有统计学意义($P < 0. 01$)。



注:与 Control 组比较, ** $P < 0. 01$ 。

图 7 siRNAB mi-1 对 Hela 细胞周期相关蛋白表达量的影响

Note: Compared with control group, ** $P < 0. 01$.

Fig.7 Effect of siRNA Bmi-1 on the expression of cell cycle related protein in Hela cell

3 讨论

宫颈癌同大多数肿瘤一样,是一种以细胞过度增殖及无限生长为特征性疾病,具体表现为肿瘤细胞增殖过度活跃,肿瘤组织生长异常迅速,进而恶性程度加剧,过程中最为主要的因素就是癌基因的

激活及抑癌基因的失活。Bmi-1 是 1991 年荷兰癌症中心在研究鼠淋巴瘤细胞中发现的一种核蛋白,属于多梳基因家族中的一员,并具有癌基因特性,因而被认为是一种原癌基因。Bmi-1 被认为可以通过多种途径参与细胞的自我更新,衰老及永生,其在多种肿瘤中高表达,并与肿瘤的发生,发展密切相关^[4-6]。近些年国内外研究发现 Bmi-1 与宫颈癌的发生,发展,转移,预后等一系列病理过程密切相关。如国内学者杨伟洪等^[8],桂影等^[9]发现宫颈癌患者宫颈组织中 Bmi-1 阳性率显著高于正常宫颈组织,且与临床分期,组织分化程度,淋巴结转移密切相关。国外 Tong 等^[10],Zhang 等^[11]研究证实宫颈癌患者宫颈组织及血浆中 Bmi-1 蛋白及 mRNA 表达量皆显著高于正常宫颈组织,且高表达的 Bmi-1 与临床分期,淋巴结转移,血管侵袭及人乳头瘤感染密切相关,同时高表达的 Bmi-1 预示着宫颈癌患者预后差。上述研究提示了 Bmi-1 与宫颈癌的发生发展密切相关,在宫颈癌的形成及进展中起着癌基因的作用。此外 Zhang 等^[13]不仅证实了 152 例宫颈癌组织中 Bmi-1 高表达,阳性表达量高达 63.2%,高表达的 Bmi-1 与肿瘤大小,临床分期局部淋巴结转移密切相关。且通过 western blot 证实了 4 株宫颈癌细胞 (Hela, SiHa, Caski 及 C33A) 中 Bmi-1 表达高于正常宫颈上皮细胞。同时 Min 等^[12]研究表明 RNA 干扰介导的 Hela 细胞中 Bmi-1 表达量的下调,能显著的抑制 Hela 细胞生长,克隆形成,并抑制小鼠体内肿瘤形成。从而说明了 Bmi-1 作为宫颈癌的原癌基因,通过靶向下调其表达,能显著的抑制肿瘤的细胞增殖及进展。所以本研究在此基础上进一步探讨 siRNA Bmi-1 对 Hela 细胞增殖的影响及相关机制,首先通过 MTT 法,Annexin V-PI 流式双染及 Hoechst 染色证实 siRNA Bmi-1 能显著的降低 Hela 细胞活力,同时提高细胞凋亡率,说明下调 Hela 细胞中 Bmi-1 的表达,能显著的遏制肿瘤细胞的增殖,并诱导其凋亡,与 Min 等^[12]研究结果一致。

Bmi-1 作为一种癌基因,能通过调控其下游靶基因如 INK4a/ARF 的表达,从而抑制基因的转录。INK4a 是 Bmi-1 的负性调节位点,其编码 p16 INK4a (p16) 的表达,此蛋白是细胞周期依赖性蛋白抑制因子,当 Bmi-1 表达下调或者缺失时,通过上调 p16,能够抑制细胞周期蛋白 CyclinD1 与细胞周期素依赖蛋白激酶 4/6 (CDK4/6) 的结合,进而阻止

Rb 信号通路的激活,失去磷酸化形式的 Rb 能够与转录因子 E2F 结合,进而抑制基因转录,最终使得细胞周期停滞在 G1 期^[14]。另外 ARF 编码 p14 ARF 蛋白,此蛋白通过介导 MDM2,进而激活 p53。p53 不仅能够直接调节细胞凋亡相关蛋白表达从而影响细胞的增殖与凋亡,也能够通过调节细胞周期进而影响细胞的增殖状态。崔学江等^[15]研究表明 siRNA Bmi-1 对膀胱癌 EJ 细胞增殖的抑制作用,是通过上调 p16 及 p14 蛋白及 mRNA 表达实现的。刘霞等^[16]研究也表明 siRNA Bmi-1 能通过上调 p16 及端粒酶逆转录酶表达,从而抑制食管癌细胞株 EC9706 的增殖^[16]。Zheng 等^[17]研究表明 siRNA Bmi-1 能通过 p16/CyclinD1 信号通路抑制胰腺癌细胞增殖。但也有研究显示 siRNA Bmi-1 能显著的抑制肺腺癌细胞 SPC-A1 增殖,并使细胞周期阻滞在 G1 期,但此过程并不依赖于 p16 所介导的 CyclinD1 来实现的^[18]。我们的研究显示 siRNA Bmi-1 不仅能下调 p16 表达,还能显著的下调 CyclinD1 表达及 Rb 磷酸化水平,同时下调 p53 表达,最终使得细胞周期阻滞在 G1 期,此结论与大多数研究一致^[15-17, 19],从而说明 siRNA Bmi-1 能通过 p16/CyclinD1/Rb 及 p53 信号通路,从而遏制 Hela 细胞的增殖。

综上所述,siRNA Bmi-1 能显著的降低宫颈癌 Hela 细胞活力,抑制细胞增殖,并诱导细胞凋亡,可能与调节其下游信号通路 p16/CyclinD1/Rb 及 p53 有关。同时有文献也报道 Bmi-1 也可通过 PI3K/AKT 信号通路影响胰腺癌细胞的增殖^[20],且此信号通路是经典的抗凋亡通路,本课题组可以进一步探讨 Bmi-1 是否也可以通过此信号通路影响宫颈癌细胞的增殖,凋亡等生物学行为。

参考文献:

- [1] 王妍,何慧仪. 宫颈癌相关基因的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(16):1316-1320.
- [2] Larmour LI, Jobling TW, Gargett CE. A Review of Current Animal Models for the Study of Cervical Dysplasia and Cervical Carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2015, 25(8): 1345-1352.
- [3] 刘冬菊,姚宇,黄文革. 姜黄素抑制人宫颈癌 CaSki 细胞裸鼠移植瘤的生长[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(2):7-10.
- [4] 莫利花,凌文,陈赛. BMI-1 基因与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国当代医药,2013,20(30):14-16.
- [5] 陈圣霖,陈念平. Bmi-1 基因与恶性肿瘤相关性研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(7):626-629.

- [6] 杨晓霞,孙世仁. Bmi-1 基因研究进展[J]. 医学综述,2016,22(5):890-892.
- [7] Gavrilescu MM, Todosi AM, Anitei MG, *et al.* Expression of bmi-1 protein in cervical, breast and ovarian cancer [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2012, 116(4): 1112-1117.
- [8] 杨伟洪. Bmi-1、P 选择素在宫颈癌组织中的表达[J]. 白求恩医学杂志,2014,12(6):587-588.
- [9] 桂影,黄志红,王丽娟. 老年宫颈癌患者 Bmi-1 蛋白检测的临床意义[J]. 中国老年学杂志,2013,33(7):1656-1657.
- [10] Tong YQ, Liu B, Zheng HY, *et al.* Overexpression of BMI-1 is associated with poor prognosis in cervical cancer [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2012, 8(4): e55-e62.
- [11] Zhang X, Wang C, Wang L, *et al.* Detection of circulating Bmi-1 mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for uterine cervical cancer [J]. Int J Cancer, 2012, 131(1): 165-172.
- [12] Min L, Dong-Xiang S, Xiao-Tong G, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of Bmi-1 expression in human cervical cancer [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2011, 90(7): 737-745.
- [13] Zhang X, Wang CX, Zhu CB, *et al.* Overexpression of Bmi-1 in uterine cervical cancer: correlation with clinicopathology and prognosis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(9): 1597-1603.
- [14] 姚尧,邹扬. Bmi-1、p16 基因与实体瘤关系的研究进展[J]. 实用医学杂志,2009,25(18):3162-3164.
- [15] 崔学江,朱定军,韩金利,等. siRNA 干扰 BMI-1 基因对膀胱癌 EJ 细胞增殖的调控作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(8):1519-1524.
- [16] 刘霞,曹关义,程慧敏,等. Bmi-1-siRNA 对食管癌细胞株 EC9706 的影响[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(1):8-12.
- [17] Zheng X, Wang Y, Liu B, *et al.* Bmi-1-shRNA inhibits the proliferation of lung adenocarcinoma cells by blocking the G1/S phase through decreasing cyclin D1 and increasing p21/p27 levels [J]. Nucleic Acid Ther, 2014, 24(3): 210-216.
- [18] 王艺芳,刘奔,刘纯青,等. Bmi-1-siRNA 抑制肺腺癌 SPC-A1 细胞的增殖及其机制[J]. 中国癌症杂志,2014,24(5):333-341.
- [19] 郑翔宇,朱杰,王艺芳,等. Bmi-1-siRNA 对肺腺癌 A549 细胞体外增殖能力的影响[J]. 中国癌症杂志,2013,23(7):505-511.
- [20] Wang MC, Jiao M, Wu T, *et al.* Polycomb complex protein BMI-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer stem cells by activating PI3K/AKT signaling, an ex vivo, in vitro, and in vivo study [J]. Oncotarget, 2016, 7(8): 9586-9599.

[修回日期]2016-06-28

(下接第 71 页)

- [9] Castellani M L, Anogeianaki A, Felaco P, *et al.* IL-35, an anti-inflammatory cytokine which expands CD4⁺ CD25⁺ Treg Cells [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(2): 131-135.
- [10] Cross AH, Stark JL. Humoral immunity in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunol Res, 2005(32):85-97.
- [11] Kennard S, Liu H, Lilly B. Transforming growth factor-beta (TGF-1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression[J]. J Biol Chem, 2008, 283(3):1324-33.
- [12] Delgado M, Robledo D, Rueda B, *et al.* Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4):1010-1019.
- [13] Youjin Lee, Amit Awasthi, Nir Yosef, *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells[J]. Nat Immunol, 2012, 13(10): 991-999.
- [14] Xie S, Li J, Wang JH, *et al.* IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to up regulate the expression of regulators of G-protein signaling 16 [J]. J Immunol, 2010, 184(5): 2289-2296.
- [15] Peron J P, Yang K, Chen M L, *et al.* Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice[J]. J Neuroimmunol, 2010, 227(1-2): 10-17.
- [16] Haile Y, Simmen KC, Pasichnyk D, *et al.* Granule-derived granzyme B mediates the vulnerability of human neurons to T cell-induced neurotoxicity [J]. J Immunol, 2011, 187(9): 4861-72.
- [17] Han Y, Yang Y, Chen Z, *et al.* Human hepatocellular carcinoma-infiltrating CD4⁺ CD69⁺ Foxp3⁻ regulatory T cell suppresses T cell response via membrane-bound TGF-β1 [J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(5):539-50.
- [18] ka AgnieszBaranowska-Bik, Jan Kochanowski, Dorota Uchman, *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in humans with multiple sclerosis[J]. Journal of Neuroimmunology, 2013, 263(8):159-161.
- [19] Yadav, M, Rosenbaum, J, Goetzl, E. J. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile[J]. J. Immunol, 2008, 180(2), 2772-2776.
- [20] Jimeno, R, Leceta, J, Martínez, C, *et al.* Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells [J]. Mol. Neurosci, 2014, 54(6): 512-525.

[修回日期]2016-07-28