

杨晨波,陆佳涵,丛喆,等. *FEM1B* 促进 TRAIL 诱导的 HIV 潜伏库细胞 ACH-2 的细胞凋亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (5): 1-7.

Yang CB, Lu JH, Cong Z, et al. *FEM1B* promotes cell apoptosis induced by TRAIL in HIV reservoir ACH-2 cell lines [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.001

FEM1B 促进 TRAIL 诱导的 HIV 潜伏库细胞 ACH-2 的细胞凋亡

杨晨波,陆佳涵,丛 喆,薛 婧*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 探究 *FEM1B* 对 HIV 潜伏库细胞 ACH-2 的凋亡影响及作用。**方法** 利用慢病毒转染构建 *FEM1B* 过表达的 ACH-2 细胞株,采用 FITC-Annexin-V/7-AAD 染色检测 *FEM1B* 过表达的 ACH-2 细胞株的细胞自发凋亡以及 TRAIL 作用 24 h 后的细胞凋亡情况,以及用 qPCR 检测 TRAIL 作用前后细胞上清病毒载量。**结果** *FEM1B* 过表达的细胞株的细胞自发凋亡没有显著变化,但在 TRAIL 作用下,过表达 *FEM1B* 的细胞株的凋亡率显著增加,同时 *FEM1B* 过表达后 TRAIL 作用下 ACH-2 的上清病毒载量明显上升。**结论** *FEM1B* 能够促进 TRAIL 作用下 HIV 潜伏细胞的细胞凋亡和病毒载量。

【关键词】 细胞凋亡; *FEM1B*; TRAIL; HIV 潜伏库

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0001-07

FEM1B promotes cell apoptosis induced by TRAIL in HIV reservoir ACH-2 cell lines

YANG Chenbo, LU Jiahao, CONG Zhe, XUE Jing*

(Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Remerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the role and effect of *FEM1B* in apoptosis of HIV reservoir ACH-2 cell lines. **Methods** A lentivirus used to overexpress *FEM1B* in ACH-2 cell lines. FITC-annexin-V/7-AAD staining was used to assess spontaneous cell apoptosis and cell apoptosis under TRAIL stimulation. Viral loads in culture supernatants were examined by qPCR. **Results** Spontaneous cell apoptosis remained unchanged in *FEM1B*-overexpressing cell lines. Cell apoptosis and viral loads in culture supernatants under TRAIL stimulation were significantly increased. **Conclusions** *FEM1B* increases TRAIL-mediated cell apoptosis and viral loads in culture supernatants of HIV reservoir cell lines.

【Keywords】 cell apoptosis; *FEM1B*; TRAIL; HIV reservoir

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金 (82222041, 82241068); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目 (2022-RC310-09)。

【作者简介】 杨晨波 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 艾滋病动物模型与致病机制研究。E-mail: 2844165492@qq.com

【通信作者】 薛婧 (1983—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 艾滋病动物模型与致病机制研究。E-mail: xuejing@cnilas.org

随着高效抗逆转录病毒疗法 (highly active antiretroviral therapy, HART) 的出现, 艾滋病 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 从一种致命的疾病变成了一种可控的慢性疾病。但 HART 的长期服用会增加心血管、肾和骨骼疾病的患病风险, 且患者需要终身服用, 难以实现人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 的根治, 因此, HIV-1 仍然是一个全球性的健康威胁。HIV-1 能够将前病毒整合到宿主的基因组中, 具有复制能力的病毒基因组能够长期存在于静息的 CD4⁺T 细胞中, 在细胞内持续保持低水平的转录而不被人体免疫系统识别抑或是被抗病毒药物杀死, 进而形成 HIV-1 潜伏库。潜伏库的持续存在是预防和治愈 HIV-1 感染的主要障碍^[1]。HIV-1 感染的 CD4⁺T 细胞是主要的 HIV-1 潜伏库细胞^[1]。因此, 研究积极寻求消除 HIV-1 潜伏库的技术, 目前正在研究诸如细胞因子、组蛋白去乙酰化酶抑制剂和奥兰诺芬等都具备消除的 HIV-1 潜伏库潜力^[2-3]。然而, 找到一种清除 HIV 潜伏库的方法是困难的。本研究旨在探究一种诱导 HIV-1 感染的细胞凋亡的策略。

肿瘤坏死因子凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 属于 II 型膜 TNF 配体家族^[4], 其家族中的全长受体 TRAIL-R1 和 TRAIL-R2 是表达最广泛的 TRAIL 受体并负责介导细胞凋亡。当与 TRAIL 结合后, TRAIL-R1/R2 会发生寡聚化并形成死亡诱导信号复合体 (death-inducing signalling complex, DISC), DISC 包含 Fas 相关死亡结构域 (FAS-associated protein with death domain, FADD), FADD 募集启动子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (cysteiny aspartate specific proteinase8, caspase8), 随后 caspase8 将通过泛素化被激活。活化的 caspase8 一方面可以直接剪切并激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase3, caspase3), 另一方面活化的 caspase8 能够将 bh3 相互作用域死亡激动剂 (Bcl2 homology domain 3-interacting domain death agonist, BID) 切割成截短形式 (tBID), tBID 转位到线粒体, 激活 BAX/BAK, 释放细胞色素 C, 导致线粒体外膜通透性增加, 引起内源性细胞凋亡^[5]。

FEM1B 是秀丽隐杆线虫性别决定基因 *fem-1* 的同源基因^[6]。研究发现, *FEM1B* 编码的蛋白 *FEM1B* 可以通过与上游的凋亡诱导死亡受体 Fas

和肿瘤坏死因子受体 1 (tumour necrosis factor receptor1, TNFR1) 或下游的凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic protease-activating factor 1, apaf1)^[7] 相互作用参与细胞凋亡, 而 Fas、TNF 和 TRAIL 是 TNF 超家族中密切相关的成员。目前尚不明确 *FEM1B* 是否参与了 TRAIL 介导的细胞凋亡, 而在免疫细胞中, *FEM1B* 的促凋亡功能也未得到证实。因此, 在该研究中我们使用 HIV 潜伏库细胞株 ACH-2 探究 *FEM1B* 对 TRAIL 诱导的免疫细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞

人胚肾传代细胞系 293T (中国医学科学院医学实验动物研究所), 用于慢病毒转染实验; HIV 潜伏库细胞株 ACH-2 (中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心马丽英研究员馈赠)。

1.2 主要试剂与仪器

FEM1B polyclonal antibody (货号: PA5-88764) 购自 Thermo Fisher 公司; GAPDH (D16H11) Rabbit mAb (货号: 5174) 购自 Cell Signaling technology 公司; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (货号: ZB-2301) 购自中杉金桥公司; 蛋白预制胶 Tris-Glycine, 4% ~ 15%, 10 孔, 1.5 mm (货号: BL573A) 购自白鲨公司; Annexin-V-FITC/7-AAD Apoptosis Detection Kit (货号: APK10448-F) 购自 SinoBiological 公司; Human TRAIL/Apo2L 重组蛋白 (货号: HY-P7306) 购自 MedChemExpress 公司; pWPXL、pMD2. G、psPAX2 慢病毒转染质粒 (由 Dr. Didier Trono 馈赠); 高效真核转染试剂 Vigofect 购自威格拉斯生物技术公司; 聚乙烯感染/转染试剂 (货号: TR-1003) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 人 *FEM1B* 全长质粒购自擎科生物科技有限公司; PrimeScriptTM RT Reagent Kit (货号: RR037A); TB Green Premix EX TaqTM (货号: RR820A) 购自 TaKaRa 公司; 流式细胞仪 Accuri C6 购自 BD Biosciences 公司; Multiskan SkyHigh 酶标仪购自 Thermo Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

添加 10% 胎牛血清和 2% 双抗的 DMEM 培养 293T 细胞; 添加 10% 胎牛血清和 2% 双抗的 RPMI-1640 用于培养 ACH-2 细胞, ACH-2 及 293T 细胞均置于 60 mm 平皿内培养, 培养条件: 37℃、5% CO₂, 待细胞密度生长至 70% ~ 80% 后用于后续实验。

1.3.2 慢病毒转染构建 *FEM1B* 过表达细胞系

用 0.9% NaCl 溶液稀释慢病毒包装质粒 pWPXL-*FEM1B*, pMD2. G 和 psPAX2 : 1 : 2 (总质量 10 μ g), 加入稀释后的 VifoFect 溶液混匀, 放置 15 min, 后加入 293T 细胞, 混匀后置于细胞培养箱, 6~8 h 后更换新鲜培养基, 24 h 后收集上清, 与新鲜的完全培养基 1 : 1 混合。将混合后的培养基用于感染 ACH-2 细胞, 12 h 后更换新鲜培养基。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 *FEM1B* 表达

提取细胞内总 RNA, 逆转录获取 cDNA, 利用实时荧光定量 PCR 分析。引物序列 (5' - 3') : *FEM1B*-F: CCGCAATGGACACGCAAAGG; *FEM1B*-R: CTGCACACCAAAGAGCACTGG; GAPDH-F: CTGTTCGAGAGTCAGCCGCA; GAPDH-R: AGGCGCCCAA TACGACCAAA; HIVgag-F: GGTGCGAGAGCGTCAG TATTAAG; HIVgag-R: AGCTCCCTGCTTGCCCAT A。退火温度 60 $^{\circ}$ C, $\Delta\Delta$ CT 法计算各样品基于内参基因的相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测 *FEM1B* 蛋白表达

RIPA 裂解并提取细胞蛋白, BCA 测定蛋白浓度。取 35 μ g 蛋白上样, 室温下 80 V 电泳 2 h, 在冰浴中 300 mA 电转 75 min。电转后将膜置于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h 后一抗 (1 : 1000) 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。二抗 (1 : 3000) 室温孵育 1 h, 利用全波长酶标仪进行检测。Image J 软件 (National Institutes of Health, v1.53k) 分析蛋白相对表达量。

1.3.5 细胞凋亡刺激实验

将 5×10^5 个生长旺盛的 ACH-2 细胞接种于 24 孔板中, 加入 1 mL 完全培养基, 加入 TRAIL 重组蛋白, 终浓度为 50 ng/mL, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 取细胞用于后续实验。

1.3.6 细胞凋亡的检测

取 5×10^5 个细胞于流式管中, 加入 2 mL 预冷的 PBS, 1400 r/min, 5 min 离心, 加入 2 mL 1 $\times$ Annexin-V Binding Buffer, 1400 r/min, 5 min 离心。加入 5 μ L FITC-Annexin-V 和 5 μ L 7-AAD, 室温避光孵育 15 min。加入 400 μ L 1 $\times$ Annexin-V Binding Buffer, 300 目筛网过滤后在 1 h 内流式上机, 检测细胞凋亡情况。

1.3.7 qPCR 检测 ACH-2 细胞上清 HIV 病毒载量

取 2×10^6 个 ACH-2 细胞均分布于 24 孔板, 加入终浓度为 100 ng/mL 的 TRAIL, 混匀后 37 $^{\circ}$ C、5%

CO₂ 孵箱中培养 24 h; 取孔板内细胞上清 200 μ L, 提取上清病毒 RNA, 使用实时荧光定量 PCR 仪进行分析。

1.4 统计学方法

使用 FlowJo (v10) 和 GraphPad (8.0.1) 进行统计分析和作图, 对不同组别实验数据进行差异分析, 统计学方法采用 *T*-tests、One-way ANOVA 及 Dunnett's multiple comparisons, 以 $P < 0.05$ 界定组间数据有统计学差异。

2 结果

2.1 过表达 *FEM1B* 细胞系的构建

以 HIV 潜伏库细胞 ACH-2 为细胞模型。细胞稳定转染全长 *FEM1B*。使用 *FEM1B* 引物进行 qPCR (图 1A) 以及抗 *FEM1B* 抗体进行免疫印迹 (图 1B) 来确定 *FEM1B* 转染的效果, 结果表明 *FEM1B* 在 ACH-2 细胞中转染成功。在本研究中, 我们使用转染空载体 pWPXL 的细胞作为对照细胞。接下来, 我们检测了转染后的细胞自发凋亡。Annexin-V/7-AAD 染色结果表明, *FEM1B* 过表达后的 ACH-2 细胞未出现细胞自发凋亡的增加 (图 1C)。

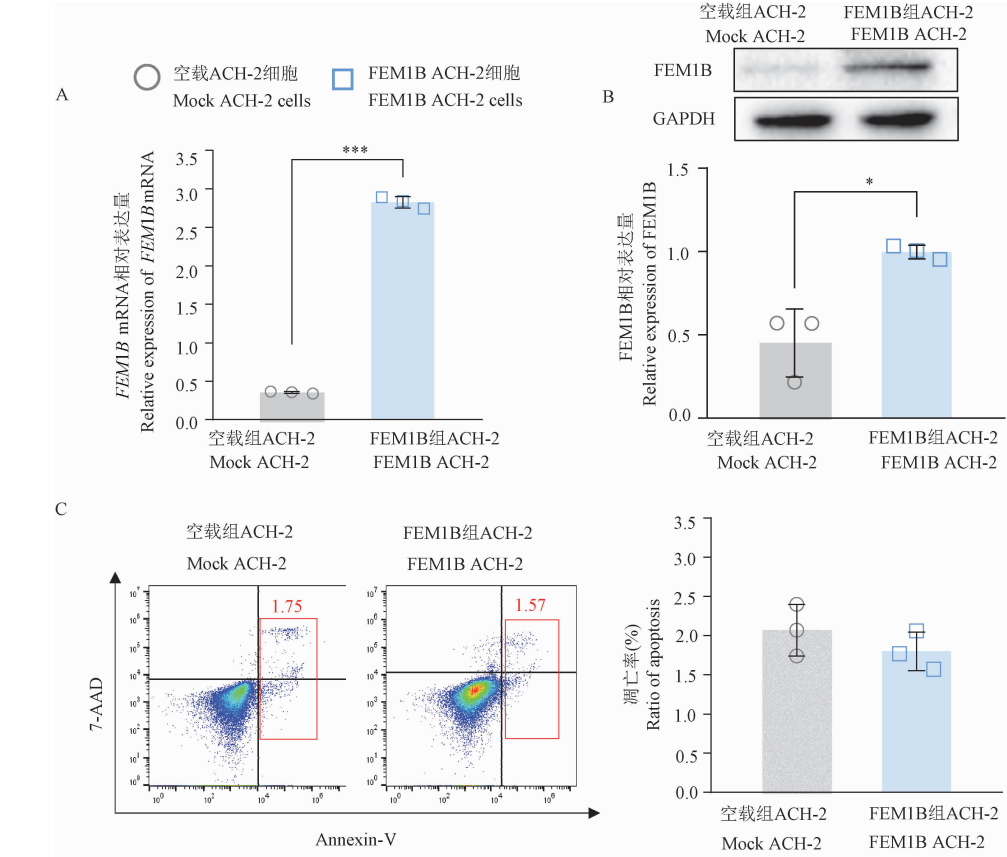
2.2 不同浓度 TRAIL 对 ACH-2 细胞凋亡的影响

TRAIL 的浓度梯度分别设置为 0、25、50、100、150、300 ng/mL。结果表明, ACH-2 细胞在 TRAIL 的刺激下出现了不同程度的细胞凋亡。Annexin-V/7-AAD 染色结果显示 ACH-2 细胞的凋亡率随 TRAIL 浓度上升而上升 (图 2), 当 TRAIL 浓度达到 100 ng/mL 时, TRAIL 诱导凋亡的效果接近饱和状态。因此我们认为在 ACH-2 细胞在 100 ng/mL 浓度下的 TRAIL 作用 24 h 后, 细胞的凋亡效果最佳。

2.3 *FEM1B* 通过 caspase 途径促进 ACH-2 细胞在 TRAIL 作用下的细胞凋亡

接下来, 我们验证了 *FEM1B* 过表达后是否能增强 TRAIL 诱导 ACH-2 细胞凋亡 (图 3)。Annexin-V/7-AAD 染色显示, 过表达 *FEM1B* 后的 ACH-2 细胞凋亡率 (30.42% $\pm$ 7.00%) 相较于空载组显著提高 (20.10% $\pm$ 6.24%) ($P < 0.01$, 图 3A), 差异有统计学意义。尽管 ACH-2 细胞系在 TRAIL 刺激前的细胞自发凋亡率并没有显著提高, 但过表达 *FEM1B* 后可增强 ACH-2 细胞系对 TRAIL 的敏感性, 从而促进 ACH-2 细胞的细胞凋亡。

随后, 我们探究了 caspase 抑制剂对 *FEM1B* 过

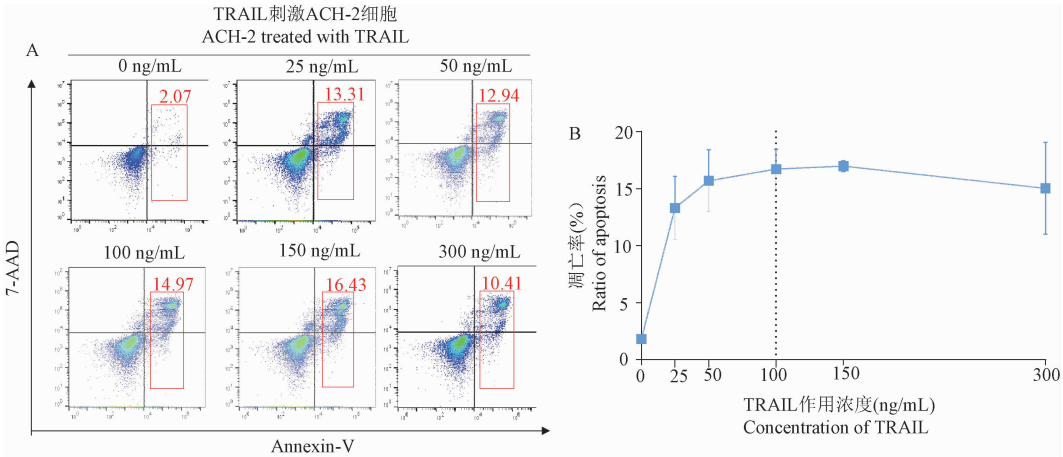


注:A:qPCR检测ACH-2细胞在慢病毒转染后FEM1B的mRNA表达水平;B:免疫印迹检测ACH-2细胞在慢病毒转染后FEM1B的蛋白表达水平;C:Annexin-V/7-AAD检测转染后细胞自发凋亡。FEM1B过表达细胞与空载细胞相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

图1 慢病毒转染后FEM1B mRNA和蛋白相对表达量及细胞自发凋亡率

Note. A, mRNA relative expression of FEM1B in ACH-2 cells after lentivirus infection, examined by qPCR. B, Protein relative expression of FEM1B in ACH-2 cells after lentivirus infection, examined by Western blot. C, Spontaneous cell apoptosis of lentivirus infected cells, examined by Annexin-V/7-AAD staining. Compared between FEM1B overexpressed cells and mock cells, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 1 mRNA and protein relative expression of FEM1B in lentivirus infected cell lines and the spontaneous cell apoptosis ratio

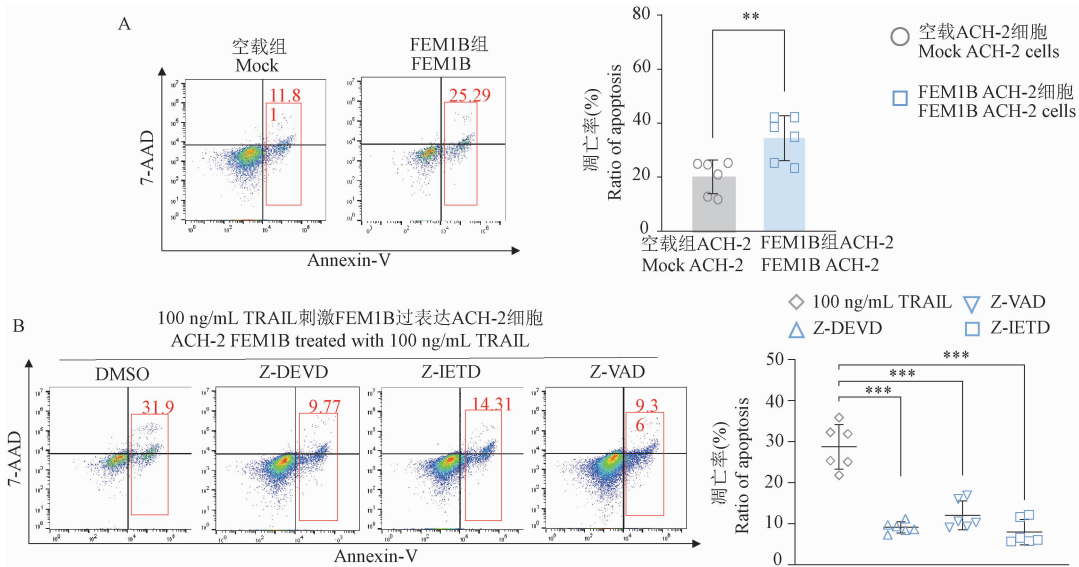


注:A:Annexin-V/7-AAD检测ACH-2细胞在不同浓度TRAIL刺激下细胞凋亡情况;B:细胞凋亡率与TRAIL浓度变化图。

图2 不同浓度TRAIL诱导ACH-2细胞凋亡情况

Note. A, ACH-2 cell apoptosis examined by Annexin-V/7-AAD under different concentration of TRAIL stimulation. B, cell apoptosis and TRAIL concentration gradient.

Figure 2 apoptosis of ACH-2 cell lines under different concentration of TRAIL stimulation



注:A: Annexin-V/7-AAD 检测过表达 *FEM1B* 的 ACH-2 细胞及其空载细胞在 100 ng/mL 浓度 TRAIL 刺激下细胞凋亡情况;B: Annexin-V/7-AAD 检测过表达 *FEM1B* 的 ACH-2 细胞在 caspase 抑制剂作用下细胞凋亡情况。*FEM1B* 过表达细胞与空载细胞相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 TRAIL 和 caspase 抑制剂作用下 *FEM1B* 过表达 ACH-2 细胞系凋亡情况

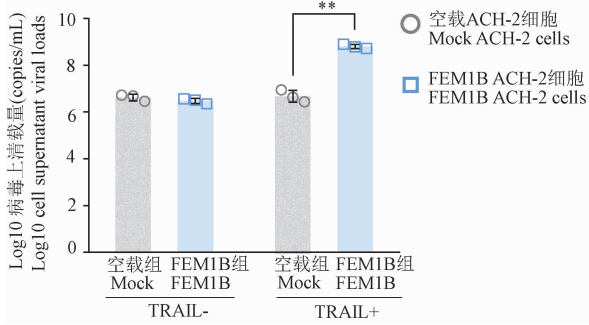
Note. A, *FEM1B* overexpressed and mock ACH-2 cell apoptosis examined by Annexin-V/7-AAD under 100 ng/mL TRAIL stimulation. B, Cell apoptosis of *FEM1B* overexpressed ACH-2 examined by Annexin-V/7-AAD staining under caspase inhibitor treatment. Compared between *FEM1B* overexpressed cells and mock cells, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Apoptosis of *FEM1B* overexpressed ACH-2 cell lines under TRAIL or caspase inhibitor

表达增强细胞凋亡影响。如图 3A 所示,分别用 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 caspase3 抑制剂 Z-DEVD-FMK、caspase8 抑制剂 Z-IETD-FMK 和泛 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 处理细胞 1 h 后加入 TRAIL 刺激细胞 24 h, annexin-V/7-AAD 染色结果表明,Z-DEVD-FMK、Z-IETD-FMK 和 Z-VAD-FMK 均抑制了 TRAIL 刺激下 *FEM1B* 过表达增强的 ACH-2 细胞凋亡(图 3B)。

2.4 *FEM1B* 过表达对 ACH-2 细胞上清病毒载量的影响

最后,我们探究了 *FEM1B* 过表达对 HIV-1 潜伏感染细胞上清病毒载量的影响。在没有 TRAIL 刺激的情况下,ACH-2 的上清病毒载量在过表达 *FEM1B* 及空载细胞中的差异无统计学意义,表明 *FEM1B* 的过表达后不会改变 HIV 潜伏感染细胞的病毒释放;而在 TRAIL 作用下,过表达 *FEM1B* 的 ACH-2 细胞上清病毒相较于空载组显著提高(图 4),差异有统计学意义($P<0.01$)。该实验结果表明 *FEM1B* 的过表达可以促进 TRAIL 作用下 HIV 潜伏感染细胞中 HIV 病毒的释放,提示 *FEM1B* 可能在诱导 HIV 潜伏感染细胞的病毒活化中起到一定的作用。



注:*FEM1B* 过表达细胞与空载细胞相比, ** $P<0.01$ 。

图 4 *FEM1B* 过表达及空载 ACH-2 细胞系在 TRAIL 作用前后细胞上清病毒载量

Note. Compared between *FEM1B* overexpressed cells and mock cells, ** $P<0.01$.

Figure 4 Cell supernatant viral loads of *FEM1B* overexpressed ACH-2 cell lines before or after TRAIL stimulation

3 讨论

FEM1B 目前已被发现与多种疾病具有相关性。遗传谱和转录组的相关分析表明,*FEM1B* 的表达与 II 型糖尿病^[8]、二氧化硅诱导的肺纤维化^[9]、多囊卵巢综合征^[10]以及阿尔茨海默病^[11]有关。然而,到目前为止,其基本机制尚未阐明。*FEM1B* 编码的

蛋白 FEM1B 主要参与的生物学过程是细胞凋亡和泛素化。最近的研究发现 FEM1B 可以于 Cullin-2 形成泛素连接酶复合物,并参与对 Folliculin-interacting protein 1 (FNIP1) 的降解,在还原性应激反应中发挥重要作用^[12-13]。而之前与泛素化相关的研究发现其他蛋白,如 Gli1^[14]、Ankrd37^[15],也是 FEM1B 作用的靶蛋白,但这些蛋白的功能仍未被阐明。尽管 FEM1B 已被证明是一种促凋亡蛋白,但其增加细胞凋亡的直接功能在免疫细胞上还没有得到证实。据报道,研究人员在过表达 RACK1 的 T 细胞急性淋巴细胞白血病的细胞系中发现了 FEM1B 的表达下降,从而减轻了细胞凋亡。

本研究以 ACH-2 为细胞模型,建立 FEM1B 稳定转染的细胞系。研究已证实 FEM1B 表达水平的提高会诱导结肠癌细胞 SW620、HCT-116 和 DLD-1 的自发凋亡^[7]。然而,在本研究中,我们没有观察到过表达 FEM1B 的 ACH-2 细胞有任何诱导细胞自发凋亡的情况。上述结肠癌细胞系和本研究中使用的 T 淋巴细胞系之间的区别在于结肠癌细胞系具有抗凋亡特性。缺乏这一特征是否导致了 FEM1B 不能诱导细胞自发凋亡,仍需要通过进一步研究来证实。

TRAIL 在癌症领域的研究较为成熟,包括其引发的凋亡途径和治疗中的抗肿瘤功能^[16-17]。然而,TRAIL 的广泛表达和促凋亡功能意味着 TRAIL 不只是用于癌症治疗。TRAIL 如何调节免疫细胞和帮助防御病原体也同样重要^[18-19]。本研究结论得出,FEM1B 蛋白可以促进 ACH-2 细胞系中 TRAIL 诱导的细胞死亡。在秀丽隐杆线虫中,FEM-1 被证明是 CED-3 的底物^[20],CED-3 是一种与 caspase 同源的蛋白,并与 apaf1 参与的凋亡通路相关^[21]。研究发现,FEM1B 可以与 mFAS 和 TNFR1 结合,导致人乳腺癌细胞系 MCF7 的凋亡^[22]。然而,FEM1B 是否能与 TRAIL 的受体相互作用仍不清楚。在本研究中,通过 Annexin-V 和 7-AAD 染色,我们发现 TRAIL 诱导的细胞凋亡可以通过过表达 FEM1B 而增强。同时,通过对细胞采用 caspase 抑制剂,我们发现 FEM1B 参与的细胞凋亡可能是 caspase 依赖的。然而,其机制尚不明确,由于 FEM1B 缺乏死亡结构域,其 ANK 结构域与其他蛋白结合可能导致了细胞凋亡的上升。

最后,本研究进一步探讨了 FEM1B 过表达对于 HIV 潜伏感染细胞病毒复制的影响。我们测定

了在 TRAIL 作用前后过表达 FEM1B 及空载 ACH-2 细胞的上清病毒载量,结果表达 ACH-2 在过表达 FEM1B 后,在 TRAIL 的作用下,上清病毒载量显著提高,因此,激活 FEM1B 靶点促进细胞凋亡可能是刺激潜伏库活化的新策略。

综上所述,一方面,本研究发现了 FEM1B 能够促进 HIV 潜伏库细胞 ACH-2 的细胞凋亡,另一方面,在 TRAIL 的作用下,FEM1B 能够活化 ACH-2 细胞中的病毒潜伏库。通过深入探讨针对 FEM1B 在 HIV 和凋亡中的研究,能够为清除病毒潜伏库提供新的思路。

参考文献:

- [1] Ghosn J, Taiwo B, Seedat S, et al. HIV [J]. Lancet, 2018, 392(10148): 685-697.
- [2] Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview [J]. Ann Ist Super Sanita, 2010, 46(1): 5-14.
- [3] Ndung'u T, McCune JM, Deeks SG. Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved [J]. Nature, 2019, 576(7787): 397-405.
- [4] Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL) [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(21): 3621-3630.
- [5] von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: trail in cancer biology and therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(6): 352-366.
- [6] Ventura-Holman T, Maher JF. Sequence, organization, and expression of the human FEM1B gene [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267(1): 317-320.
- [7] Subauste MC, Ventura-Holman T, Du L, et al. RACK1 down-regulates levels of the pro-apoptotic protein Fem1b in apoptosis-resistant colon cancer cells [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(23): 2295-2303.
- [8] Ewens KG, Stewart DR, Ankener W, et al. Family-based analysis of candidate genes for polycystic ovary syndrome [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(5): 2306-2315.
- [9] Crist AM, Hinkle KM, Wang X, et al. Transcriptomic analysis to identify genes associated with selective hippocampal vulnerability in Alzheimer's disease [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2311.
- [10] Manford AG, Rodríguez-Pérez F, Shih KY, et al. A cellular mechanism to detect and alleviate reductive stress [J]. Cell, 2020, 183(1): 46-61. e21.
- [11] Manford AG, Mena EL, Shih KY, et al. Structural basis and regulation of the reductive stress response [J]. Cell, 2021, 184(21): 5375-5390.

- [12] Gilder AS, Chen YB, Jackson RJ, et al. Fem1b promotes ubiquitylation and suppresses transcriptional activity of Gli1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(3): 431-436.
- [13] Shi YQ, Liao SY, Zhuang XJ, et al. Mouse Fem1b interacts with and induces ubiquitin-mediated degradation of Ankrd37 [J]. Gene, 2011, 485(2): 153-159.
- [14] Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(10): 782-798.
- [15] Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(11): 876-885.
- [16] Benedict CA, Ware CF. TRAIL: not just for tumors anymore? [J]. J Exp Med, 2012, 209(11): 1903-1906.
- [17] Krüger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis [J]. Exerc Immunol Rev, 2014, 20: 117-134.
- [18] Ventura-Holman T, Seldin MF, Li W, et al. The Murine Fem1 Gene family: homologs of the *Caenorhabditis elegans* Sex-determination protein FEM-1 [J]. Genomics, 1998, 54(2): 221-230.
- [19] Chan SL, Yee KSY, Tan KML, et al. The *Caenorhabditis elegans* sex determination protein FEM-1 is a CED-3 substrate that associates with CED-4 and mediates apoptosis in mammalian cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(24): 17925-17928.
- [20] Vanamee ES, Faustman DL. On the TRAIL of better therapies: understanding TNFRSF structure-function [J]. Cells, 2020, 9(3): 764.
- [21] Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death [J]. Immunol Rev, 2017, 277(1): 76-89.
- [22] Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey [J]. Blood, 2012, 119(3): 651-665.

[收稿日期]2023-01-12

神经元特异性 Isca1 敲除多发性线粒体功能障碍综合征大鼠模型建立和机制研究

线粒体是真核生物中至关重要的细胞器,当线粒体 DNA 或者由核 DNA 编码的线粒体相关蛋白的基因发生突变,就会导致一系列严重的临床疾病。多发性线粒体功能障碍综合征 (multiple mitochondrial dysfunction syndrome,MMDS) 是一种在临床上死亡率极高的遗传性线粒体疾病,与线粒体铁硫簇合成缺陷相关,可造成线粒体结构、代谢、功能的损伤。临床症状为神经系统损伤、肌肉张力下降、呼吸功能不全等。MMDS 发病机制复杂且并未被阐明,目前没有有效的治疗方案。Isca1 基因编码蛋白参与线粒体铁硫簇生物合成中铁的募集和传递,该基因的纯合突变是 MMDS5 的致病突变,临床病例发现患者携带 Isca1 突变。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心基因工程技术课题组的研究人员,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 Isca1^{fllox/fllox} 与 NeuN-Cre 两种大鼠并进行杂交,繁育得到能在神经元中特异性敲除 Isca1 基因的 Isca1^{fllox/fllox}-NeuN-Cre (CKO) 大鼠。通过 Racine's scale 评价敲除大鼠的癫痫表型。通过步态分析、旷场实验、Y 迷宫实验和食物迷宫实验分析其行为异常和认知记忆障碍。核磁共振成像观察 CKO 大鼠的大小脑结构变化。通过 HE 染色、尼氏染色、高尔基染色分析神经元结构和病理变化。通过透射电镜 (TEM)、免疫印迹和 ATP 含量检测判断线粒体结构和分子损伤情况。通过小麦胚芽凝集素的免疫荧光法标记神经元胞膜形态,检测神经元死亡情况。

结果显示,Isca1 缺失后导致大鼠发育迟缓,Isca1 缺失后导致大鼠在 4 周龄出现癫痫、痉挛,并随年龄恶化。Isca1 缺失后的大鼠出现运动障碍和记忆受损。MRI 显示小脑严重萎缩,侧脑室扩张明显。大、小脑切片中空泡数量明显增加,核固缩、胞体肿胀;Nissl 体减少,大量神经元丢失;神经元树突棘数量减少;线粒体超微结构异常,空泡化、膜碎裂、嵴断裂等病变。在线粒体中,呼吸链复合物蛋白 NDUF9、NDUFS3、SDHB 含量降低、ATP 生成减少等症状。

综上,本研究建立了 MMDS5 神经系统症状的大鼠模型,可以较好的模拟临床病例中的痉挛、癫痫、发育迟缓、记忆受损、小脑萎缩等症状。同时,与人 MMDS5 相比,大鼠模型可存活至 8 周龄,有效延长了临床治疗研究的窗口期,也可用于其他线粒体疾病的神经症状的研究和治疗。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (Animal Model Exp Med. 2023,6(2):156-167, doi: 10.1002/ame2.12318)。