

· 专题报道 ·

## 塞来昔布通过阻断丝裂原活化蛋白激酶信号途径抑制多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖

许涛<sup>1</sup>, 曲巍<sup>2</sup>, 梅长林<sup>1\*</sup>, 叶朝阳<sup>1</sup>, 王素霞<sup>1</sup>, 付莉莉<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院肾内科, 解放军肾脏病研究所, 上海 200003; 2. 解放军器官移植研究所, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**探讨环氧合酶-2(COX-2)抑制剂塞来昔布(CXB)能否通过阻断丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径抑制多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖。**方法:**原代培养多囊肾囊肿衬里上皮细胞,以不同浓度CXB( $0, 2.5 \times 10^{-6}, 5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}, 3 \times 10^{-5}, 4 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-5}$  mol/L)处理细胞,采用BrdU法检测细胞增殖状态。ELISA法检测各组血管内皮生长因子(VEGF)的含量。荧光定量PCR技术检测增殖细胞核抗原(PCNA)、磷酸化MAPK的mRNA含量,Western印迹法检测PCNA、MAPK和磷酸化MAPK的表达。**结果:**CXB对囊肿衬里上皮细胞的增殖具有明显抑制作用,呈时间和剂量依赖性,其中 $2 \times 10^{-5}$  mol/L CXB作用24 h的抑制作用最强,抑制率为 $(63.9 \pm 1.2)\%$ ;CXB可减少囊肿衬里上皮细胞VEGF的分泌,而且抑制作用具有时间、浓度依赖性。CXB剂量依赖性减低PCNA和磷酸化MAPK的mRNA和蛋白表达。**结论:**CXB明显抑制囊肿衬里上皮细胞增殖,抑制细胞产生VEGF;其作用与干扰MAPK磷酸化,部分阻断MAPK信号转导通路有关。

**[关键词]** 塞来昔布;丝裂原活化蛋白激酶;囊肿衬里上皮细胞;多囊肾;常染色体显性

**[中图分类号]** R 692.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0585-05

### Celecoxib inhibits proliferation of polycystic kidney cyst lining epithelial cells through blocking mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways

XU Tao<sup>1</sup>, QU Wei<sup>2</sup>, MEI Chang-lin<sup>1\*</sup>, YE Chao-yang<sup>1</sup>, WANG Su-xia<sup>1</sup>, FU Li-li<sup>1</sup> (1. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Kidney Disease Research Institute of PLA, Shanghai 200003, China; 2. Organ Transplanting Research Institute of PLA, Shanghai 200003)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate whether celecoxib (CXB), a specific COX-2 inhibitor, can inhibit the proliferation of cyst lining epithelial cells through blocking mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway. **Methods:** Primarily cultured cells were treated with different concentrations of CXB ( $0, 2.5 \times 10^{-6}, 5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}, 3 \times 10^{-5}, 4 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-5}$  mol/L) and the proliferative status was evaluated by BrdU assay. The levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the production of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and phospho-MAPK were measured by real-time reverse transcription-PCR assay; and the expression of PCNA, MAPK and phospho-MAPK protein was detected by Western blotting. **Results:** BrdU assay revealed that CXB inhibited cell growth in a concentration-dependent manner; the maximum inhibition rate ( $[63.9 \pm 1.2]\%$ ) was found when cells were treated with  $2 \times 10^{-5}$  mol/L CXB for 24 h. VEGF secretion by cyst lining epithelial cell was reduced by CXB in a concentration and time-dependent manner. The mRNA and protein levels of PCNA, phospho-MAPK in CXB-treated group were lower than those in control group (with no CXB treatment). **Conclusion:** CXB can obviously inhibit the proliferation of cyst lining epithelial cell and the secretion of VEGF, which might be through interfering with the phosphorylation of MAPK and partly blocking MAPK signal transduction pathway.

**[KEY WORDS]** celecoxib; mitogen-activated protein kinase; cyst lining epithelial cell; polycystic kidney; autosomal dominant

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 585-589]

囊肿衬里上皮细胞的增殖是造成常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 囊肿进行性扩大的主要原因, 而丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路在多种生长因子介导的囊肿衬里上皮细胞增殖的过程中发挥着极其重要的作用<sup>[1]</sup>。研究表明: 环氧合酶-2 (COX-2) 特异性抑制剂塞来昔布 (celecoxib, CXB) 能有效抑制多种肿瘤

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目 (30330640); 国家自然科学基金面上项目 (30271523); 国家自然科学基金 (30576867)。Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (30330640), General Program of National Natural Science Foundation of China (30271523) and National Natural Science Foundation of China (30576867)。

**[作者简介]** 许涛, 主治医师。E-mail: taoxu9@163.com

\* Corresponding author. E-mail: chlmei1954@126.com

的发生和发展<sup>[2~7]</sup>。多囊肾囊肿衬里上皮细胞具有类似恶性肿瘤的高增殖性<sup>[8]</sup>,如能抑制其增殖活性,必将阻滞囊肿的产生和增大,达到干预治疗的目的。目前国内外尚未有相关报道。本研究旨在观察 CXB 对囊肿衬里上皮细胞增殖的影响,并初步探讨其是否通过阻断 MAPK 信号转导途径来发挥作用。

### 1 材料和方法

**1.1 药物和试剂** CXB 为 Pfizer 产品,用 DMSO 配成  $10 \times 10^3$  mol/L 母液,置  $-20^\circ\text{C}$  备用。DMEM、F12、胎牛血清为 Gibco 公司产品,5-溴-2 脱氧尿苷酶联免疫吸附测定(BrdU ELISA)试剂盒为 Roche 公司产品,血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 检测试剂盒购自 Cayman 公司,增殖细胞核抗原(PCNA)单抗为 Santa Cruz 公司产品,MAPK 单抗为 Calbiochem 公司产品,磷酸化 MAPK 多抗为 Cell Signal 公司产品,二抗为北京中山公司产品,其他试剂均为 Sigma 及进口分析纯。

**1.2 BrdU 掺入法检测细胞增殖** 囊肿衬里上皮细胞由本科实验室原代培养<sup>[9]</sup>,取第 3 代对数生长期细胞,按  $3 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔板,细胞生长至 80% 融合时,加入无血清 DMEM+F12,同步化 24 h 后,加入不同浓度 CXB( $0, 2.5 \times 10^{-6}, 5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}, 3 \times 10^{-5}, 4 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-5}$  mol/L)置  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱(美国 Thermo Forma 公司产品)孵育 24、48、72 h,最后加入 BrdU 标记工作液  $10 \mu\text{l}$ /孔,按照试剂盒说明书操作,即依次加入预冷细胞固定液、核酸酶工作液、抗 BrdU-POD Fab 片段工

作液、工作缓冲液和过氧化物酶底物/增强剂,以 490 nm 为参照,于 405 nm 波长测定光密度值 ( $D_{405}$ )。同时锥虫蓝染色法检测每组拒染率。

**1.3 ELISA 法检测培养上清 VEGF 的含量** 多囊肾囊肿衬里上皮细胞按  $5 \times 10^4$ /孔接种于 3 块 6 孔板,每板设不同浓度( $0, 5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}$  mol/L) CXB 组,分为 12、24、48 h 3 个时间点。按 1.2 项下所述方法处理细胞,待终点收集每孔培养上清。按照 VEGF ELISA 试剂盒说明测定每组 VEGF 的 D 值。重复实验 3 次。

**1.4 实时荧光定量 PCR 检测 PCNA、磷酸化 MAPK 的 RNA 含量** 囊肿衬里上皮细胞按  $5 \times 10^4$ /孔接种于 3 个直径 6 cm 培养皿,设不同浓度( $0, 5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}$  mol/L) CXB 组,孵育 48 h 后,冰 PBS 洗涤  $5 \text{ min} \times 3$  次,RNAiso Reagent TRIzol(TaKaRa)提取每组细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 完整性。取总 RNA  $2 \mu\text{g}$  逆转录合成 cDNA,反应总体积  $20 \mu\text{l}$ 。采用 Applied Biosystems 公司的 7700 型实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR,引物由复旦悦达生物公司合成(表 1)。PCR 反应体系: $10 \times \text{RT-PCR}$  缓冲液  $2.5 \mu\text{l}$ 、 $250 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$   $0.3 \mu\text{l}$ 、 $25 \text{ mmol/L dAGCU}$   $0.3 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$  引物  $1.0 \mu\text{l}$ 、 $25 \times \text{SYBR Green I}$   $0.8 \mu\text{l}$ 、 $10^{-3} \times \text{Calibration}$   $1.0 \mu\text{l}$ 、 $5 \text{ U}/\mu\text{l}$  *Taq-E*  $0.25 \mu\text{l}$ 、 $1 \text{ U}/\mu\text{l}$  *UNG*  $0.4 \mu\text{l}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O}$   $17.45 \mu\text{l}$ 、模板 cDNA  $1.0 \mu\text{l}$ 、总体积  $25 \mu\text{l}$ 。PCR 参数:预变性  $94^\circ\text{C}$  2 min,  $94^\circ\text{C}$  15 s,  $55^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  45 s,共 50 个循环。结果以目的基因和内参照 GAPDH 的比值表示。

表 1 荧光定量 RT-PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence of real-time reverse transcription-PCR assay

| Primer       | Primer sequence                         | Fragment length(bp) |
|--------------|---|---------------------|
| PCNA         | F:5'-TCA TTA CAC TAA GGG CCG AAG-3'     | 170                 |
|              | R:5'-TTC ACC AGA AGG CAT CTT TAC T-3'   |                     |
| Phospho-MAPK | F:5'-GAA GGT GGC GGT GAA GAA G-3'       | 217                 |
|              | R:5'-CTG GCA CTT GAC GAT GTT GT-3'      |                     |
| GAPDH        | F:5'-GGT ATC GTG GAA GGA CTC ATG AC-3'  | 188                 |
|              | R:5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3' |                     |

**1.5 Western 印迹法检测 PCNA 和 MAPK、磷酸化 MAPK 的蛋白表达** 取对数生长期细胞按  $5 \times 10^4$ /孔的密度接种于 4 个直径 6 cm 培养皿,设不同浓度( $0, 5 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}$  mol/L) CXB 组,孵育 48 h 后,参照文献<sup>[10]</sup>方法裂解细胞,抽提蛋白,用 BCA 蛋白测定试剂盒(美国 Pierce 公司产品)测定每组蛋白浓度,取  $40 \mu\text{g}$  蛋白行 SDS-PAGE,积

层胶的浓度 5%,分离胶的浓度 10%,80 V 电泳至积层胶和分离胶分界处,调高电压至 100 V 直至电泳结束,100 V 电转 2 h 至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入小鼠抗人 PCNA (1:200)、小鼠抗人 MAPK(1:2000)和兔抗人磷酸化 MAPK IgG (1:1000)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,洗膜,分别加入 HRP 兔抗小鼠和羊抗兔二抗(1:2000),室温轻摇 2 h,

洗膜,加入 ECL 反应液,暗室显色 5 min,压片 3 min,显影、定影后,将胶片扫描,计算机定量分析。

1.6 统计学处理 每组实验至少重复 3 次,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SAS 6.12 统计软件进行 *t* 检验、方差分析和相关分析。

## 2 结果

### 2.1 CXB 抑制囊肿衬里上皮细胞增殖 由表 2 可

表 2 BrdU 法检测不同浓度 CXB 对细胞的增殖影响

Tab 2 Effect of CXB at different concentrations on cell proliferation measured by BrdU assay

( $n=3, \bar{x} \pm s, D_{405}$ )

| CXB<br>( $c_B/\times 10^{-6}, \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | Time of CXB treatment( <i>t</i> /h) |               |               |
|---|-------------------------------------|---------------|---------------|
|   | 24                                  | 48            | 72            |
| 0   | 1.829±0.196                         | 1.516±0.147   | 1.328±0.113   |
| 2.5   | 1.609±0.323*                        | 1.243±0.122*  | 1.165±0.126   |
| 5   | 1.329±0.230*                        | 1.105±0.079*  | 1.063±0.085*  |
| 10  | 1.209±0.232**                       | 0.938±0.086** | 0.826±0.051** |
| 20  | 0.660±0.076**                       | 0.843±0.064** | 0.745±0.061** |
| 30  | 0.729±0.098**                       | 0.881±0.083** | 0.785±0.113*  |
| 40  | 1.138±0.319*                        | 1.102±0.133*  | 0.916±0.116*  |
| 50  | 0.988±0.225*                        | 1.077±0.157   | 0.884±0.109*  |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 mol/L group

2.2 CXB 减少培养上清 VEGF 的含量 CXB 能显著抑制体外培养囊肿衬里上皮细胞释放 VEGF。其中  $2 \times 10^{-5}$  mol/L CXB 作用细胞 48 h 的抑制作用最强( $P < 0.01$ )。而且抑制作用具有时间和剂量依赖性, $2 \times 10^{-5}$  mol/L CXB 作用细胞 12、24、48 h 的抑制率分别为 41.1%、54.0%和 60.5%,组间差异显著( $P < 0.05$ )。孵育 48 h 时, $0.5 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $2 \times 10^{-5}$  mol/L 组的抑制率分别为 42.1%、53.1%和 60.5%,组间差异显著( $P < 0.05$ ),见图 1。

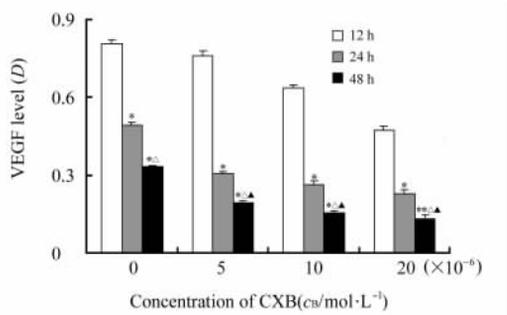


图 1 ELISA 法检测囊肿衬里上皮细胞培养上清 VEGF 的含量

Fig 1 Level of VEGF in supernatant of culture solution of cyst liner epithelial cells measured by ELISA

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 12 h;  $\Delta P < 0.05$  vs 24 h;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs with no CXB(0 mol/L) group; $n=3, \bar{x} \pm s$

见,不同浓度 CXB 作用于细胞 24 h,均能显著抑制细胞增殖,抑制率分别为 12.0%、27.3%、33.9%、63.9%、60.1%、37.7%、45.9%。说明 CXB 在  $2.5 \times 10^{-6}$  至  $5 \times 10^{-5}$  mol/L 范围对囊肿衬里上皮细胞的抑制作用具有剂量依赖性。 $2 \times 10^{-5}$  mol/L CXB 作用细胞 24 h 的抑制率最大,说明该浓度的抑制细胞增殖的作用最强。锥虫蓝染色检测每组拒染率  $< 5\%$ ,说明 CXB 抑制增殖作用不依赖其细胞毒作用。

2.3 CXB 抑制 PCNA、磷酸化 MAPK 的 mRNA 表达 检测发现 CXB  $1 \times 10^{-5}$  和  $2 \times 10^{-5}$  组作用囊肿衬里上皮细胞 48 h 细胞中的 PCNA mRNA 水平显著低于不加 CXB 对照组( $P < 0.05$ ),CXB  $1 \times 10^{-5}$  和  $2 \times 10^{-5}$  组作用囊肿衬里上皮细胞 48 h 细胞中磷酸化 MAPK mRNA 水平显著低于不加 CXB 对照组( $P < 0.05$ ),见图 2。

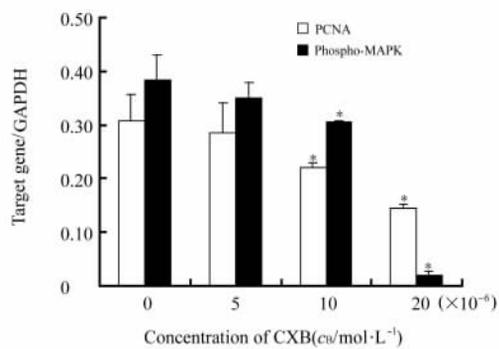


图 2 荧光定量 RT-PCR 检测囊肿衬里上皮细胞 PCNA 和磷酸化 MAPK 的 mRNA 含量

Fig 2 mRNA levels of PCNA and phospho-MAPK in cyst liner epithelial cells measured by real-time reverse transcription-PCR assay

\*  $P < 0.05$  vs with no CXB(0 mol/L) group; $n=3, \bar{x} \pm s$

2.4 CXB 抑制 MAPK、磷酸化 MAPK 和 PCNA 的蛋白表达 应用 GAPDH 作内参,不同剂量组的 CXB 均能抑制磷酸化 MAPK 的表达,与不加 CXB 对照组相比较差异显著 ( $P < 0.05$ ),而对总 MAPK 的表达无显著影响。随 CXB 剂量逐渐增大,细胞 PCNA 的蛋白表达逐渐减低,与不加 CXB 对照组相比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

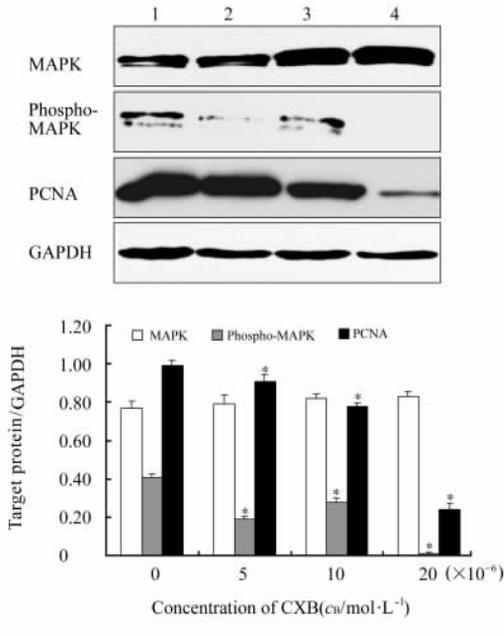


图 3 囊肿衬里上皮细胞 MAPK、磷酸化 MAPK 和 PCNA 蛋白表达

Fig 3 Expression of protein of MAPK, phospho-MAPK and PCNA

1: With no CXB; 2: With  $5 \times 10^{-6}$  mol/L CXB; 3: With  $1 \times 10^{-5}$  mol/L CXB; 4: With  $2 \times 10^{-5}$  mol/L CXB. \*  $P < 0.05$  vs with no CXB (0 mol/L) group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

ADPKD 是最常见的遗传性肾脏病,全世界发病率约为 1/400~1/1 000,作为基因突变导致的遗传性疾病,临床上至今仍无有效干预措施和治疗药物<sup>[11]</sup>。COX-2 在 ADPKD 囊肿的发生、发展中起着重要作用<sup>[12]</sup>。特异性 COX-2 抑制剂目前已成为抗肿瘤的研究热点<sup>[13]</sup>,但是,国内外还未将此类药物用于干预和治疗 ADPKD。

本实验表明,CXB 对囊肿衬里上皮细胞具有增殖抑制作用,呈时间和剂量依赖性,其作用不是由于药物的毒性反应,因为在 CXB 作用过程中细胞死亡率  $< 5\%$ 。实时荧光定量 PCR 检测 PCNA 发现 CXB 作用囊肿衬里上皮细胞 48 h 细胞中的 PCNA mRNA 水平显著低于无血清对照组,Western 印迹

法检测囊肿衬里上皮细胞 PCNA 蛋白表达证明 CXB 能下调细胞 PCNA 的蛋白表达,以上说明,CXB 能抑制细胞增殖的标记物 PCNA 的基因转录和蛋白表达。

研究表明:多种细胞因子在多囊肾囊肿上皮形成、囊液分泌、细胞外基质增生和血管极性改变等病理生理过程中发挥着极其重要的作用,而 VEGF 在细胞因子网络中居核心地位<sup>[14,15]</sup>。Bello-Reuss 等<sup>[16]</sup>证明在体外培养的多囊肾囊肿衬里上皮分泌 VEGF165。本实验表明:不同浓度 CXB 能抑制体外培养囊肿衬里上皮细胞释放 VEGF,其中  $2 \times 10^{-5}$  mol/L CXB 作用细胞 48 h 的抑制作用最强,而且该抑制作用具有时间和剂量依赖性。

MAPKs 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。研究证实,MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内,在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有至关重要的作用。在哺乳类细胞目前已发现存在着下述 3 条并行的 MAPKs 信号通路:ERK (extracellular signal-regulated kinase) 信号通路、JNK/SAPK 通路和 p38MAPK 通路,其中与 ERK 相关的细胞内信号转导途径被认为是经典 MAPK 信号转导途径<sup>[17]</sup>。研究证实,VEGF 能与囊肿衬里上皮表面受体(VEGFR1,2,3)结合,从而激活 ERK 信号转导途径<sup>[16]</sup>。ERKs 为脯氨酸导向的丝/苏氨酸激酶,可以磷酸化与脯氨酸相邻的丝/苏氨酸。在丝裂原刺激后,ERKs 接受上游的级联反应信号,可以转位进入细胞核。因此,ERKs 不仅可以磷酸化胞质蛋白,而且可以磷酸化一些核内的转录因子如 c-fos、c-Jun、Elk-1、c-myc 和 ATF2 等,从而参与细胞增殖与分化的调控。本实验研究采用实时荧光定量 PCR 检测磷酸化 MAPK 的含量,证实 CXB 能减低囊肿衬里上皮细胞中磷酸化 MAPK mRNA 水平,干扰 MAPK 的磷酸化;应用蛋白免疫印迹法检测总 MAPK 和磷酸化 MAPK 蛋白水平,表明不同剂量组的 CXB 均能下调磷酸化 MAPK 的表达,而对总 MAPK 的表达无显著影响。根据以上研究推断,CXB 能下调 VEGF 的表达,使 VEGF 与其受体结合减少,抑制 MAPK 的基因转录,干扰 MAPK 蛋白磷酸化,从而部分阻断 MAPK 信号转导通路,起到抑制囊肿衬里上皮细胞增殖的作用。

### [参考文献]

[1] Yamaguchi T, Nagao S, Wallace DP, et al. Cyclic AMP acti-

- vates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys[J]. 2003,63:1983-1994.
- [2] Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, et al. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib[J]. *FASEB J*, 2001,15:2742-2744.
- [3] Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor suppress the growth of gastric cancer xenografts *via* induction of apoptosis in nude mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1998,274:G1061-G1067.
- [4] Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK, et al. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis[J]. *Int J Cancer*, 2001,93:497-506.
- [5] Sun SY, Schroeder CP, Yue P, et al. Enhanced growth inhibition and apoptosis induction in NSCLC cell lines by combination of celecoxib and 4HPR at clinically relevant concentrations[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005,4:407-413.
- [6] Hsu AL, Ching TT, Wang DS, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 11397-11403.
- [7] Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, et al. Celecoxib inhibits N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female fischer-344 rats[J]. *Cancer Res*, 2000,60:5599-5602.
- [8] Hanaoka K, Guggino WB. cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000,11:1179-1187.
- [9] 徐成钢,梅长林,张黎明. 多囊肾病囊肿衬里上皮细胞系的建立和鉴定[J]. *肾脏病与透析移植杂志*, 2000,9:142-146.
- [10] Sambrook J, Fritsch IF, Maniatis T 著. 分子克隆实验指南 [M]. 2版. 金冬雁,黎孟枫译. 北京:科学出版社, 1992:881-898.
- [11] Peter I, Stefan S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002,13:2384-2398.
- [12] Aukema HM, Adolphe J, Sishra S, et al. Alterations in renal cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in polycystic kidney disease[J]. *FASEB J*, 2003,17:298-300.
- [13] Raz A. Is inhibition of cyclooxygenase required for the anti-tumorigenic effects of anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [J]? *Biochem Pharmacol*, 2002,63:343-347.
- [14] Merta M, Tesao V, Zima T, et al. Cytokine profile in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Biochem Molec Biol Int*, 1997,41:619-624.
- [15] Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis[J]. *J Cell Biol*, 1995,129:895-898.
- [16] Bello-Reuss E, Holubec K, Rajaraman S. Angiogenesis in autosomal-dominant polycystic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2001,60:37-45.
- [17] Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs[J]. *Trends Biochem Sci*, 1995,20:117-122.
- [收稿日期] 2006-03-29 [修回日期] 2006-05-20
- [本文编辑] 孙岩

## Effects of epitopes combination and adjuvants on immune responses to anti-Alzheimer disease DNA vaccines in mice

He Y, Sun SH, Chen RW, Guo YJ, He XW, Huang L, Chen ZH, Shi K, Zhu WJ (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by neuropathological hallmarks including deposits of the  $\beta$ -amyloid peptide (AssP). Studies have shown that immunization with A $\beta$ 42 peptide reduces both the spatial memory impairments and Alzheimer disease-like neuropathologic changes in Alzheimer disease transgenic mice, but can cause side effect of a cell-mediated autoimmune meningoencephalitis. Recently, some studies showed that DNA vaccination could be used to generate an antibody response to A $\beta$  without the adverse cell-mediated immune effect. In the current study, we generate four DNA vaccine plasmids (pV-GE1, pV-GE2, pV-GE3, and pV-GE4) against Alzheimer disease by separately fusing A $\beta$  epitope sequences (coding for EFGH, DA EFGH, EFGH+EFGH, and EFGH+DA EFGH) with IgG heavy chain coding region of mouse. Meanwhile, the full-length gene A $\beta$  encoding plasmid (pV-A $\beta$ ), empty vector (pVAX) and synthetic AssP were also included as control. The sera of BALB/c mice immunized via intramuscular with plasmids and peptide were tested by indirect ELISA for auto-AssP immunoreactivity. The results showed that all the DNA vaccine plasmids induced AssP-specific antibodies; moreover pV-GE2 and pV-A $\beta$  constructs elicited higher antibody titers than other constructs ( $P < 0.05$ ). To further enhance the immune response, GM-CSF encoding plasmid (pGM-CSF) and purified BCG-DNA were used as molecular adjuvants. BCG-DNA could enhance humoral and cellular immune responses simultaneously and did not alter the phenotype of the immune responses, whereas pGM-CSF showed no obvious effect on immune response. These results suggest that this immunization strategy of using A $\beta$  epitope encoding plasmid plus BCG-DNA adjuvant may serve as the basis for developing anti-Alzheimer disease vaccines.

[Alzheimer Dis Assoc Disord, 2005, 19: 171-177]