

信号蛋白 RasGRP4 对自然杀伤细胞干扰素- γ 分泌的调控作用

李昕 于珮 于德民 周赛君

【摘要】 目的 探讨 Ras 鸟苷酸释放蛋白 4 (RasGRP4) 是否直接参与自然杀伤细胞 (NK 细胞) 调控干扰素- γ 的分泌。**方法** 以 RasGRP4 基因敲除小鼠和 C57BL/6 野生型小鼠为研究对象, 共 24 只。根据随机数字法随机分为 C57BL/6 + 生理盐水组、C57BL/6 + 脂多糖组、RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组、RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组, 每组 6 只小鼠。采用流式细胞术微球阵列法分析两种小鼠在脂多糖免疫激活状态下血清干扰素- γ 等免疫炎症因子水平; 采用流式细胞术探讨 RasGRP4 基因敲除对小鼠外周血和脾细胞中主要干扰素- γ 分泌细胞 (NK 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞) 比例的影响, 以及在脂多糖激活 2.5 h 时干扰素- γ ⁺ NK 细胞、干扰素- γ ⁺ CD4⁺ T 细胞、干扰素- γ ⁺ CD8⁺ T 细胞的比例; 分别提纯两种小鼠的 NK 细胞, 比较其在脂多糖体外激活下干扰素- γ 分泌能力。**结果** 与 C57BL/6 + 生理盐水组和 RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组相比, C57BL/6 + 脂多糖组和 RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组白细胞介素 (IL)-12p70、IL-10、肿瘤坏死因子- α 、单核细胞趋化蛋白-1、IL-6、干扰素- γ 较脂多糖激活前均显著升高 ($t=2.823\ 7\sim6.310\ 3$, P 均 <0.01)。RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组血清中干扰素- γ 水平约是 C57BL/6 + 脂多糖组的 20% ($t=5.546\ 1$, $P<0.01$); 尽管 C57BL/6 + 生理盐水组和 RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组外周血、脾细胞中 NK 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞的比例差异均无统计学意义 (P 均 >0.05), 但在脂多糖激活状态下, RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组外周血干扰素- γ ⁺ 的 NK1.1 细胞比例仅为 C57BL/6 + 脂多糖组的 30% ($t=8.011\ 2$, $P<0.01$); 而脾脏细胞中干扰素- γ ⁺ NK1.1 的比例约为 C57BL/6 + 脂多糖组的 50% ($t=4.429\ 2$, $P<0.01$)。在体外实验中, RasGRP4^{-/-} 来源的 NK 细胞在脂多糖刺激下细胞上清中干扰素- γ 的水平为 C57BL/6 来源的 30% ($t=5.522\ 8$, $P<0.01$)。**结论** RasGRP4 在 NK 细胞分泌干扰素- γ 的过程中起重要调控作用。

【关键词】 Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; 自然杀伤细胞; 干扰素- γ ; 糖尿病

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81600643); 国家自然科学基金 (91746205); 天津市自然科学基金 (17JCYBJC2700)

Regulation of signaling protein RasGRP4 on the secretion of interferon- γ by natural killer cells Li Xin, Yu Pei, Yu Demin, Zhou Saijun. Department of Nephrology and Dialysis, Key Laboratory of Hormones and Development (Ministry of Health), Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, The Metabolic Diseases Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Corresponding author: Zhou Saijun, Email: zhousaijun0102@126.com

【Abstract】 Objective To explore whether Ras guanine releasing protein 4 (RasGRP4) is directly involved in the regulation of interferon- γ secretion by natural killer cell (NK cell). **Methods** RasGRP4 gene knockout mice and C57BL/6 wide type mice were used, and the total number is 24. These mice were randomly divided into C57BL/6 + normal saline group, C57BL/6 + lipopolysaccharide group, RasGRP4^{-/-} + normal saline group and RasGRP4^{-/-} + lipopolysaccharide group according to random number. Each group had 6 mice. Cytometer beads array technique was used to compare the levels of serum inflammatory cytokines between two type of mice challenged by lipopolysaccharide. Flow cytometry was used to investigate the effects of RasGRP4 gene knockout on the ratio of primary interferon- γ secreting cells (NK cells, CD4⁺ T cells, and

CD8⁺ T cells) in peripheral blood and splenocytes of mice, and the ratio of interferon- γ positive cells under stimulation of lipopolysaccharide for 2.5 h in both peripheral blood and splenocytes in the two mice strains were analyzed. NK cell was purified from both mice strains and the ability of interferon- γ production by both NK cell challenged by lipopolysaccharide were compared. **Results** Compared with C57BL/6 + normal saline group and RasGRP4^{-/-} + normal saline group, the levels of interleukin-12p70, interleukin-10, tumor necrosis factor- α , monocyte chemotactic protein-1, interleukin-6 and interferon- γ in both C57BL/6 + lipopolysaccharide group and RasGRP4^{-/-} + lipopolysaccharide group were all significantly increased after the activation of lipopolysaccharide ($t=2.823\ 7-6.310\ 3$, all $P<0.01$). The levels of interferon- γ in RasGRP4^{-/-} + lipopolysaccharide group was only 20% of that in C57BL/6 + lipopolysaccharide group ($t=5.546\ 1$, $P<0.01$). Although there was not any significant difference of the ration of NK cell, CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell between C57BL/6 + normal saline group and RasGRP4^{-/-} + normal saline group (all $P>0.05$), the interferon- γ ⁺ NK 1.1 cells from peripheral blood of RasGRP4^{-/-} + lipopolysaccharide group was about 30% of that from C57BL/6 + lipopolysaccharide group ($t=8.011\ 2$, $P<0.01$) under the condition of lipopolysaccharide; the interferon- γ ⁺ NK 1.1 cells from splenocytes of RasGRP4^{-/-} + lipopolysaccharide group was about 50% of that from C57BL/6 + lipopolysaccharide group ($t=4.429\ 2$, $P<0.01$). The interferon- γ level in NK cell supernatants from RasGRP4^{-/-} + normal saline groups stimulated by lipopolysaccharide was 30% of that from C57BL/6 + normal saline group ($t=5.522\ 8$, $P<0.01$). **Conclusion** RasGRP4 plays an important regulatory role in the secretion of interferon- γ by NK cell.

【Key words】 Ras guanine nucleotide-releasing protein-4; Natural killer cell; Interferon- γ ; Diabetes mellitus

Fund program: National Science Foundation for Young Scientists of China (81600643); National Natural Science Foundation of China (91746205); Tianjin Natural Science Foundation of China (17JCYBJC2700)

近年来,糖尿病患者恶性肿瘤的患病风险明显增加^[1]。如何防止糖尿病患者机体防御能力下降是当今医学界面临的一大挑战。自然杀伤细胞(NK细胞)是机体主要的免疫监视细胞,具有分泌干扰素- γ 和细胞毒性作用两大主要功能^[2]。干扰素- γ 具有抗病毒、调理吞噬细胞的杀菌活性等重要作用^[3]。研究显示,2型糖尿病患者NK细胞干扰素- γ 分泌能力明显降低^[4]。研究发现,糖尿病患者和结肠癌患者NK细胞干扰素- γ 分泌能力均显著降低,而糖尿病合并新诊断结肠癌患者NK细胞功能下降更明显^[5]。该研究提示,NK细胞干扰素- γ 分泌受损可能是有别于糖尿病血管病变的又一大慢性并发症,而NK细胞承担着防御各种病原菌的侵害、监视和消灭恶性细胞的重要任务^[2]。因此,明确糖尿病患者NK细胞干扰素- γ 分泌受损的确切机制,是解决糖尿病感染防治问题的迫切要求,对降低糖尿病患者恶性肿瘤患病风险具有重要意义。

Ras鸟苷酸释放蛋白4(RasGRP4)是首次从肥大细胞中发现的新的信号蛋白,属于RasGRP家族,该家族是细胞内Ras激活蛋白,对调节细胞内信号通路的启闭起着重要的作用^[6]。该家族包含4个成员,分别为RasGRP1、RasGRP2、RasGRP3和RasGRP4,其中RasGRP4最初被认为是肥大细胞限

制性的信号蛋白^[7]。新近研究显示,RasGRP4可能在T细胞、中性粒细胞中有表达^[8]。亦有研究证实,RasGRP4参与小鼠的类风湿性关节炎、实验性结肠炎的发病机制,提示RasGRP4在免疫调节中发挥一定的作用^[9]。

本研究采用RasGRP4基因敲除C57BL/6小鼠动物模型,探讨该信号蛋白参与调控NK细胞分泌干扰素- γ 的机制,从而为揭示糖尿病患者免疫功能受损提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及饲养环境 9~12周龄雄性RasGRP4基因敲除小鼠(RasGRP4^{-/-}小鼠)及C57BL/6野生型小鼠均由南京大学模式动物研究所提供[许可证号:SYXK(苏)2015-0001,动物批号:XM708044]。两种小鼠均无特定病原体级(SPF级)的恒温、恒湿环境中(温度22℃~25℃,湿度55%±5%,12h明暗周期)单笼饲养,喂食标准饲料(碳水化合物占60%,粗蛋白占20%~21%,粗脂肪占5%),自由进食、饮水。

1.1.2 试剂与仪器 鼠炎症因子流式细胞术微球阵列法检测试剂盒、抗鼠CD16/CD32、NK1.1-FITC、CD3-V500单克隆抗体购自BD公司,干扰素- γ 分泌

检测试剂盒和磁珠分选缓冲液购自 MiltenyiBiotec 公司, RPMI-1640 培养基、谷氨酰胺、青霉素、链霉素、胎牛血清、脂多糖 (E. coli strain O111:B4)、PBS 缓冲液等购自 GIBCO 公司。NK 细胞阴性筛选试剂盒、EasySep™ Magnet 购自 Stemcell 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与处理 雄性 RasGRP4 基因敲除 C57BL/6 小鼠 (RasGRP4^{-/-} 小鼠) 及 C57BL/6 野生型小鼠各 12 只, 在适应性喂养 1 周后, 两种类型的小鼠分别按照称量体重从高到低编号, 即 1~12 号, 采用随机生成数字的方法进行随机抽取分组, 共分为 C57BL/6 + 生理盐水组、C57BL/6 + 脂多糖组、RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组、RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组, 每组 6 只小鼠。于小鼠前脚掌注射脂多糖, 给予剂量为 2 μg/g 体重或相应体积的生理盐水。给药后 2.5 h 后经 CO₂ 麻醉后处死并于左心室取血、迅速分离脾脏^[10]。

1.2.2 所有小鼠外周血细胞和脾细胞中干扰素-γ⁺ 细胞检测 将新鲜脾脏采用 1 ml 针芯研磨, 经 70 μmol/L 细胞筛过滤 2 次, 制备成单细胞悬液。采用干扰素-γ 分泌检测试剂盒对脾细胞和外周血细胞中干扰素-γ⁺ 细胞进行染色, 并采用抗鼠 CD3e-V500、NK1.1-PE、CD4-PE、CD8-PE 荧光抗体分别对 NK 细胞、T 细胞进行标记后, 于流式细胞仪上进行检测, 采用 FLOW-Jo 软件进行数据分析。

1.2.3 脾脏中 NK 细胞的提纯与培养 采用免疫磁珠分离技术和 NK 细胞阴性筛选盒提纯 NK 细胞, 重复 2 次。采用流式细胞术检测 NK 细胞纯度, 纯度达 95% 以上用于后续实验。将 200 μl NK 细胞

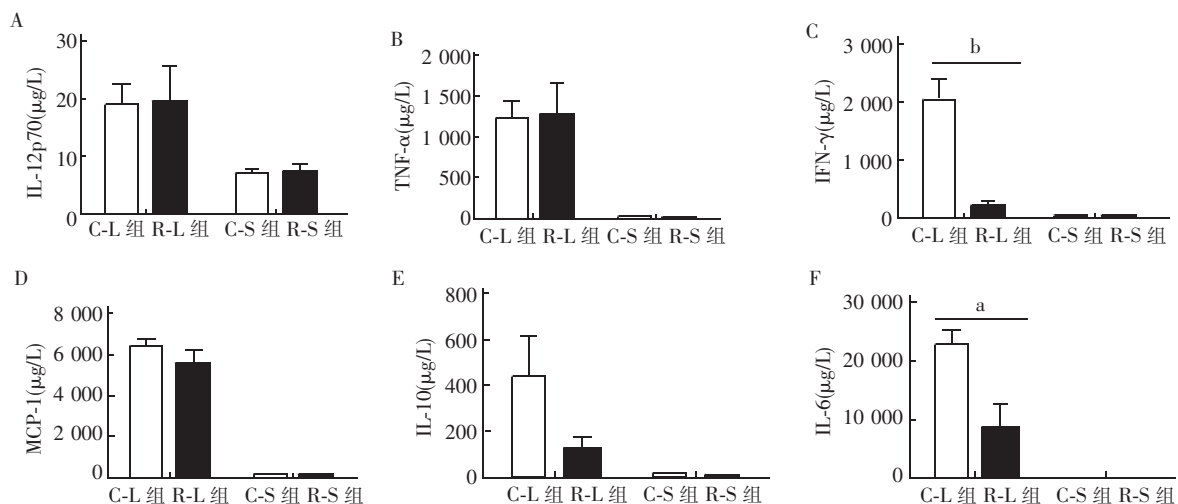
悬液按照 1 × 10⁶/ml 细胞浓度接种于 96 孔板, 分别向孔板加入 2 μl 100 g/L 的脂多糖或生理盐水, 使脂多糖的终浓度为 1 ng/L, 置于 37℃ 孵箱孵育 24 h。收集细胞上清测定炎症因子的水平。

1.2.4 血清和细胞上清中炎症因子检测 取 100 μl 血清或细胞上清, 采用 BD CBA 鼠炎症因子检测试剂盒检测血清、NK 细胞上清的白细胞介素-6、白细胞介素-10、肿瘤坏死因子-α、干扰素-γ、白细胞介素-12p70、单核细胞趋化蛋白-1 等。采用流式细胞仪检测, 数据分析采用 FCAP Array 软件。

1.3 统计学处理 所有数据应用 SPSS18.0 软件进行统计处理, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示并收集, 对每组数据进行正态性检验后, 各组洗脱前、后比较采用 *t* 检验, 3 组间均数比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RasGRP4 对小鼠脂多糖刺激下血清炎症因子水平的影响 C57BL/6 + 生理盐水组和 RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组在非免疫激活时, 血清白细胞介素-12p70、白细胞介素-10、肿瘤坏死因子-α、单核细胞趋化蛋白-1、白细胞介素-6、干扰素-γ 水平差异均未见统计学意义 (*P* 均 > 0.05)。而在脂多糖刺激 2.5 h 后, 以上炎症因子均较非激活前显著升高 (*t* = 2.923 4、6.310 3、4.103 2、2.810 9、2.823 7、5.961 5, *P* 均 < 0.01)。RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组血清干扰素-γ 水平是 C57BL/6 + 脂多糖组的约 20% (*t* = 5.546 1, *P* < 0.01), 此外, RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组血清白细胞介素-6 水平也明显低于 C57BL/6 + 脂多糖组 (*t* = 4.735 6, *P* < 0.01), 见图 1。



注: C-L 组: C57BL/6 + 脂多糖组; R-L 组: RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组; C-S 组: C57BL/6 + 生理盐水组; R-S 组: RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组; 与 R-L 组相比, **P* < 0.05, ^b*P* < 0.000 1; RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; IL-12p70: 白细胞介素-12p70; TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; IFN-γ: 干扰素-γ; MCP-1: 单核细胞趋化蛋白-1; IL-10: 白细胞介素-10; IL-6: 白细胞介素-6

图 1 RasGRP4 对小鼠血清炎症因子分泌的影响

2.2 RasGRP4 基因敲除对小鼠外周血和脾细胞中主要干扰素- γ 分泌细胞比例的影响 C57BL/6 + 生理盐水组和 RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组外周血、脾细胞中 NK 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的比例均无明显统计学差异 (P 均 >0.05), 见图 2.1、2.2。

2.3 RasGRP4 基因敲除对脂多糖免疫激活下, 小鼠外周血干扰素- γ 细胞比例的影响 RasGRP4^{-/-}

组小鼠在脂多糖刺激 2.5 h 时, 外周血 NK1.1 + 干扰素- γ ⁺细胞的比例仅为 C57BL/6 组的 30% [两组小鼠外周血分泌干扰素- γ 的 NK 细胞在 NK 细胞中所占比例分别为 $(3.79\% \pm 1.08\%)$ 比 $(12.3\% \pm 0.96\%)$, $t=8.0112$, $P<0.01$], 见图 3A、B。而 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞均未见明显干扰素- γ 的阳性染色, 见图 3C、D。

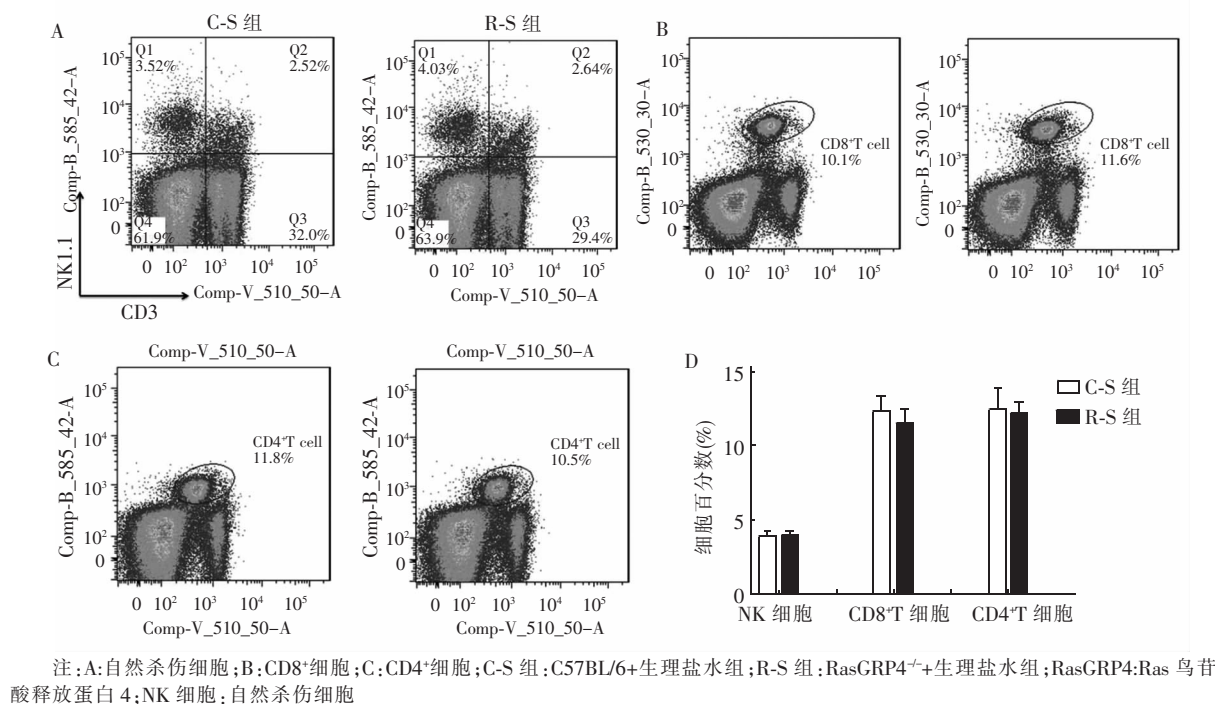


图 2.1 C57BL/6 + 生理盐水组和 RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组脾细胞中主要干扰素- γ 分泌细胞 (NK 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞) 比例的比较

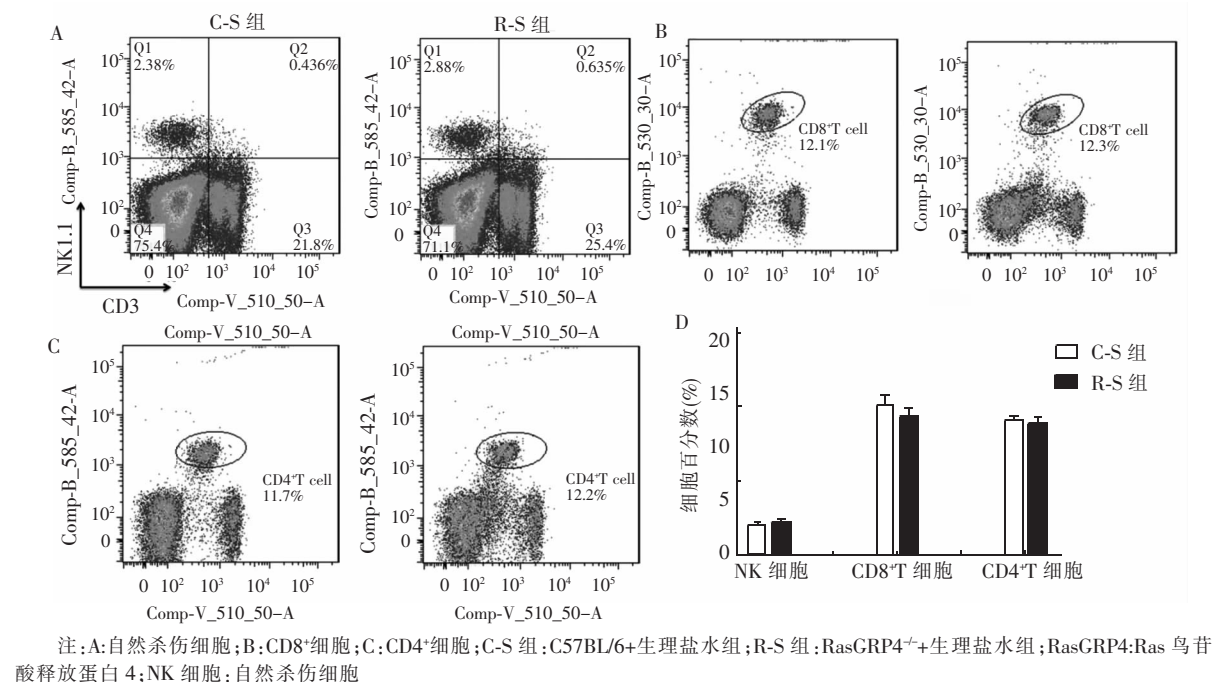
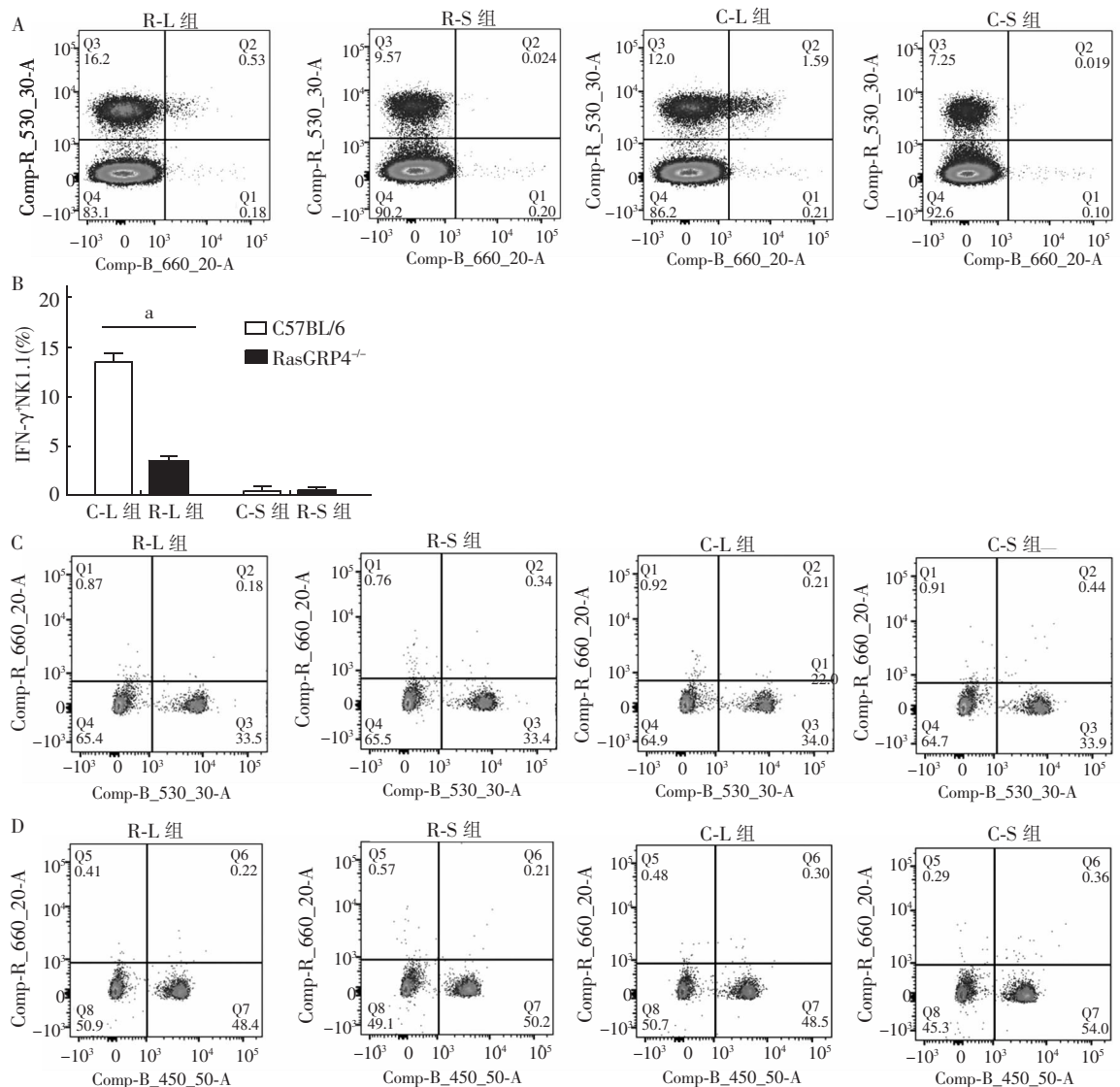


图 2.2 C57BL/6 + 生理盐水组和 RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组外周血中主要干扰素- γ 分泌细胞 (NK 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞) 比例的比较



注:A: NK1.1 细胞干扰素- γ 染色; B: 分泌干扰素- γ NK 细胞的比例; C: CD8⁺ T 细胞干扰素- γ 染色; D: CD4⁺ T 细胞干扰素- γ 染色; RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白 4; NK 细胞: 自然杀伤细胞; IFN- γ : 干扰素- γ ; 与 R-L 组相比, $^a P < 0.0001$; C-L 组: C57BL/6 + 脂多糖组; R-L 组: RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组; C-S 组: C57BL/6 + 生理盐水组; R-S 组: RasGRP4^{-/-} + 生理盐水组

图 3 各组小鼠在脂多糖激活 2.5 h 时外周血主要干扰素- γ 细胞分泌细胞 (NK 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞) 比例的比较

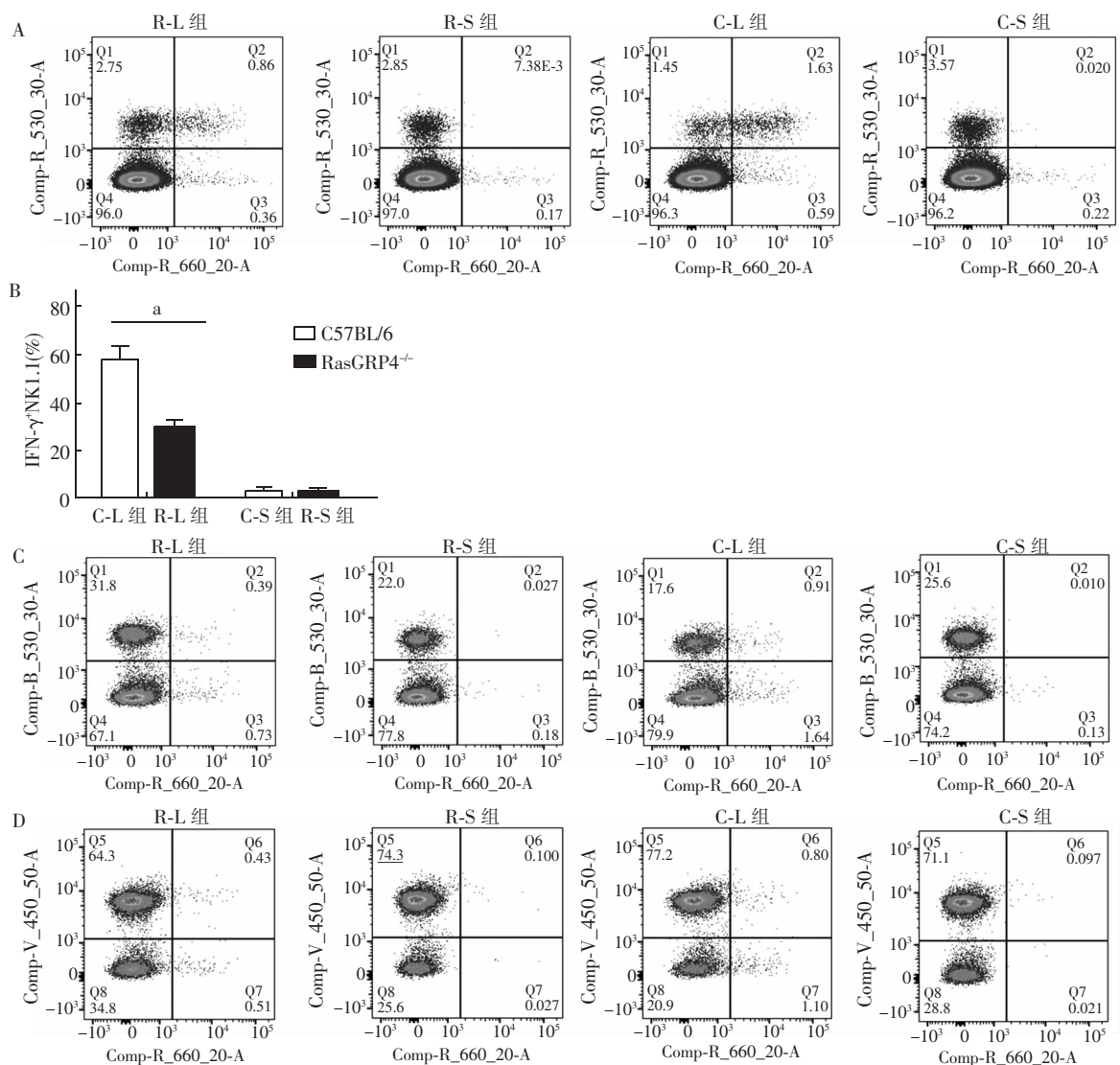
2.4 RasGRP4 基因敲除对脂多糖免疫激活下, 小鼠脾细胞干扰素- γ 细胞比例的影响 RasGRP4^{-/-} + 脂多糖组干扰素- γ NK 细胞和 C57BL/6 + 脂多糖组干扰素- γ NK 细胞比例分别为 (24.3% \pm 2.7%) 和 (58.7% \pm 4.1%), 差异具有统计学意义 ($t = 4.4292$, $P < 0.01$), 见图 4A、B。两种小鼠在脂多糖刺激 2.5 h 时, CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞的干扰素- γ 染色均未见明显差异, 如图 4C、D。

2.5 NK 细胞干扰素- γ 分泌依赖于 RasGRP4 RasGRP4^{-/-} 小鼠来源 NK 细胞在脂多糖刺激 24 h 时分泌的干扰素- γ 水平是 C57BL/6 野生型小鼠来源的 NK 细胞的约 30% ($t = 5.5228$, $P < 0.01$), 见图 5。

3 讨论

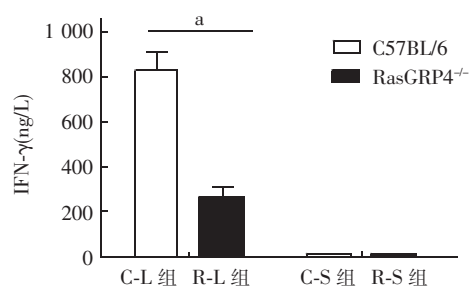
糖尿病患者的感染具有多发性、复杂性和难控制性等特点, 近年来, 糖尿病患者恶性肿瘤患病风险的明显增加。最新数据显示, 2 型糖尿病患者结核的感染风险增加 3 ~ 5 倍; 结肠癌、子宫内膜癌的患病风险增加 2 ~ 4 倍^[1-2]。因此, 如何预防糖尿病患者机体防御能力的下降是亟待解决的课题。NK 细胞是机体防御各种病原菌的侵害、消灭恶性细胞的重要卫士。明确 NK 细胞发挥功能的机制, 对揭示糖尿病患者 NK 细胞功能下降的确切机制具有重要意义。

信号蛋白 RasGRP4 在免疫调节和炎症反应过程中起重要作用^[11-12]。干扰素- γ 是参与免疫调节和



注: A: NK1.1 细胞干扰素- γ 染色; B: 分泌干扰素- γ NK 细胞的比例; C: CD8⁺T 细胞干扰素- γ 染色; D: CD4⁺T 细胞干扰素- γ 染色; NK 细胞: 自然杀伤细胞; IFN- γ : 干扰素- γ ; 与 R-L 组相比, * $P < 0.0001$; C-L 组: C57BL/6+脂多糖组; R-L 组: RasGRP4^{-/-}+脂多糖组; C-S 组: C57BL/6+生理盐水组; R-S 组: RasGRP4^{-/-}+生理盐水组; RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白 4

图 4 两种小鼠在脂多糖激活 2.5 h 时脾细胞中主要干扰素- γ 分泌细胞 (NK 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞) 比例的比较



注: IFN- γ : 干扰素- γ ; 与 R-L 组相比, * $P < 0.01$; C-L 组: C57BL/6+脂多糖组; R-L 组: RasGRP4^{-/-}+脂多糖组; C-S 组: C57BL/6+生理盐水组; R-S 组: RasGRP4^{-/-}+生理盐水组; NK: 自然杀伤细胞; RasGRP4: Ras 鸟苷酸释放蛋白 4

图 5 两种小鼠来源的 NK 细胞在脂多糖免疫激活下细胞上清中干扰素- γ 的表达水平

炎症反应机制中的重要因子,具有抗病毒、抗原递呈以及调节机体免疫等重要作用^[13]。而 NK 细胞、

T 细胞是产生干扰素- γ 的主要免疫细胞。本研究以 RasGRP4 信号蛋白为切入点,探讨其对 NK 细胞、T 细胞干扰素- γ 分泌是否有调控作用。本研究首先分析了 RasGRP4 基因敲除对小鼠外周血和脾细胞中 NK 细胞比例的影响,结果显示,两种小鼠无论是在自然状态下还是在脂多糖激活状态下,外周血细胞和脾细胞中 NK 细胞所占比例均未见明显统计学差异。因此, RasGRP4 基因敲除对小鼠 NK 细胞的数量不产生明显的影响,提示 RasGRP4 可能不参与小鼠 NK 细胞的分化和发育。

RasGRP4 虽然对肥大细胞的分化不起主要作用,但在调控肥大细胞脱颗粒等过程中起重要作用。RasGRP4 是否仅参与调控 NK 的功能,如干扰素- γ 的产生和分泌呢? 本研究以脂多糖作为免疫激活剂,

观察两种小鼠在脂多糖刺激下炎症因子的分泌情况。结果显示,C57BL/6小鼠和 RasGRP4^{-/-}小鼠脾细胞在脂多糖的刺激下,血清白细胞介素-10、肿瘤坏死因子- α 和单核细胞趋化蛋白-1水平均明显升高,但差异无统计学意义,提示 RasGRP4 不参与调控白细胞介素-10、肿瘤坏死因子- α 以及单核细胞趋化蛋白-1等分泌,或至少不是必需的。而 RasGRP4^{-/-}组血清白细胞介素-6水平较对照组降低,差异有统计学意义。白细胞介素-6是重要的致炎因子,该结果可能部分解释 RasGRP4^{-/-}小鼠对实验性结肠炎和关节炎的保护作用^[11]。笔者首次发现,RasGRP4^{-/-}小鼠外周血细胞和脾细胞中分泌干扰素- γ NK1.1 细胞的比例显著降低,并且均降低至 C57BL/6 组的约 30%。NK 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞是分泌干扰素- γ 的主要细胞。仅有 RasGRP4^{-/-}小鼠分泌干扰素- γ 的 NK1.1 细胞显著减少,而两组小鼠外周血和脾脏 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞尚无显著激活并分泌干扰素- γ ,可能的解释是,NK 细胞是机体免疫反应中的早期反应细胞,在 NK 细胞的激活早于 CD⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞^[13-14]。该结果尚不能排除 RasGRP4 对 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞分泌干扰素- γ 的影响,但是证实了 RasGRP4 对小鼠 NK1.1 细胞在脂多糖刺激下分泌干扰素- γ 起重要作用,激活的 NK1.1 细胞分泌干扰素- γ 依赖于 RasGRP4 的存在和参与。

为进一步证实 RasGRP4 在调控 NK 细胞产生干扰素- γ 中的关键作用,本研究分别从 RasGRP4^{-/-} C57BL/6 小鼠和 C57BL/6 对照组小鼠脾细胞中提纯 NK 细胞,通过体外实验探讨两种小鼠来源的 NK 细胞在脂多糖激活下产生干扰素- γ 能力的变化情况。结果显示,RasGRP4^{-/-} 的 NK 细胞在脂多糖激活下,干扰素- γ NK 细胞的比例显著低于 C57BL/6 对照组来源的 NK 细胞,并且细胞上清中干扰素- γ 水平约为对照组的 30%。进一步证实了 RasGRP4 对 NK 细胞干扰素- γ 产生过程中起重要作用。

综上所述,RasGRP4 并非肥大细胞特异性的信号蛋白,本研究采用 RasGRP4 基因敲除动物模型,首次探讨并揭示了该信号蛋白可能不参与 NK 细胞的分化和发育,但是在 NK 细胞产生和分泌干扰素- γ 过程中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Kong AP, Yang X, Luk A, et al. Severe hypoglycemia identifies vulnerable patients with type 2 diabetes at risk for premature death and all-site cancer: the Hong Kong diabetes registry [J]. Diabetes Care, 2014, 37(4): 1024-1031. DOI: 10.2337/dc13-2507.
- [2] Ohshio Y, Teramoto K, Hanaoka J, et al. Cancer-associated fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based vaccine [J]. Cancer Sci, 2015, 106(2): 134-142. DOI: 10.1111/cas.12584.
- [3] Harms Pritchard G, Hall AO, Christian DA, et al. Diverse roles for T-bet in the effector responses required for resistance to infection [J]. J Immunol, 2015, 194(3): 1131-1140. DOI: 10.4049/jimmunol.1401617.
- [4] Menart-Houtermans B, Rütter R, Nowotny B, et al. Leukocyte profiles differ between type 1 and type 2 diabetes and are associated with metabolic phenotypes: results from the german diabetes study (GDS) [J]. Diabetes Care, 2014, 37(8): 2326-2333. DOI: 10.2337/dc14-0316.
- [5] Berrou J, Fougeray S, Venot M, et al. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62418. DOI: 10.1371/journal.pone.0062418.
- [6] Li L, Yang Y, Wong GW, et al. Mast cells in airway hyporesponsive C3H/HeJ mice express a unique isoform of the signaling protein Ras guanine nucleotide releasing protein 4 that is unresponsive to diacylglycerol and phorbol esters [J]. J Immunol, 2003, 171(1): 390-397.
- [7] Hashimoto T, Yasuda S, Koide H, et al. Aberrant splicing of the hRasGRP4 transcript and decreased levels of this signaling protein in the peripheral blood mononuclear cells in a subset of patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(5): R154. DOI: 10.1186/ar3470.
- [8] Souza-Fonseca-Guimaraes F, Parlato M, de Oliveira RB, et al. Interferon- γ and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor production by natural killer cells involves different signaling pathways and the adaptor stimulator of interferon genes (STING) [J]. J Biol Chem, 2013, 288(15): 10715-10721. DOI: 10.1074/jbc.M112.435602.
- [9] Suire S, Lécureuil C, Anderson KE, et al. GPCR activation of Ras and PI3Kc in neutrophils depends on PLCb2/b3 and the RasGEF RasGRP4 [J]. EMBO J, 2012, 31(14): 3118-3129. DOI: 10.1038/emboj.2012.167.
- [10] Zanon I, Spreafico R, Bodio C, et al. IL-15 cis presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions [J]. Cell Rep, 2013, 4(6): 1235-1249. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.021.
- [11] Adachi R, Krilis SA, Nigrovic PA, et al. Ras guanine nucleotide-releasing protein-4 (RasGRP4) involvement in experimental arthritis and colitis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(24): 20047-20055. DOI: 10.1074/jbc.M112.360388.
- [12] Kono M, Yasuda S, Stevens RL, et al. Ras guanine nucleotide-releasing protein 4 is aberrantly expressed in the fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and controls their proliferation [J]. Arthritis Rheumatol, 2015, 67(2): 396-407. DOI: 10.1002/art.38924.
- [13] Coursey TG, Bohat R, Barbosa FL, et al. Desiccating stress-induced chemokine expression in the epithelium is dependent on upregulation of NKG2D/RAE-1 and release of IFN- γ in experimental dry eye [J]. J Immunol, 2014, 193(10): 5264-5272. DOI: 10.4049/jimmunol.1400016.
- [14] Yang Y, Zhu Y, Cao JZ, et al. Risk-adapted therapy for early-stage extranodal nasal-type NK/T-cell lymphoma: analysis from a multicenter study [J]. Blood, 2015, 126(12): 1424-1432. DOI: 10.1182/blood-2015-04-639336.

(收稿日期: 2018-04-09)