

佛波酯诱导 THP-1 细胞分化条件的优化及自噬模型的建立

陈亮 孙毅凡 陈涛 李海成 江振友 周琳 钟球

【摘要】 目的 探讨佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导 THP-1 细胞(人类单核/巨噬细胞)分化的最优条件,建立相关自噬模型,为基于细胞自噬模型的研究奠定实验基础。**方法** 采用 PMA 诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细胞;用表达融合蛋白 pcDNA3.1-YFP-LC3 质粒转染 THP-1 细胞,YFP 为黄绿色荧光蛋白,以追踪自噬体的形成。采用倒置显微镜观察不同浓度(0、10、20、50、100、200 ng/ml)、不同时间(0、24、48、60 h)PMA 分化细胞形态学变化;采用荧光显微镜示踪不同条件下 LC3 点聚集的增强;实时荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测自噬相关基因 mRNA 的表达。采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。mRNA 相对含量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。经比较 Ct 值法分析基因表达差异。Earle's balanced salts solution(EBSS,又称饥饿培养基),诱导细胞自噬相关基因 mRNA 表达量变化的比较采用 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** PMA 浓度为 100 ng/ml、诱导时间为 24~48 h 时,THP-1 细胞分化成巨噬细胞的形态学状态较理想。饥饿培养基 EBSS 处理分化的 THP-1 细胞,能增加自噬体 YFP-LC3 点聚集,其自噬相关基因 *LC3*、*Atg5*、*Atg7*、*Beclin1* 的 mRNA 表达水平显著增加($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值分别为 1.35 ± 0.16 、 1.18 ± 0.39 、 1.44 ± 0.12 、 1.08 ± 0.09 , *t* 值分别为 4.00、2.90、5.16、3.57, P 值均 < 0.05)。**结论** PMA 在浓度为 100 ng/ml、24~48 h 时诱导 THP-1 分化为巨噬细胞状态较理想;成功构建了 THP-1 源性细胞自噬模型。

【关键词】 白血病,单核细胞,急性;细胞系,肿瘤;十四酰佛波乙酯;自噬;模型,生物学

Optimization of culture for THP-1 derived macrophages induced by PMA and establishment of autophagy model
CHEN Liang*, SUN Yi-fan, CHEN Tao, LI Hai-cheng, JIANG Zhen-you, ZHOU Lin, ZHONG Qiu.

* Guangdong Center for Tuberculosis Control, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: ZHOU Lin, Email: gdtb_bg@vip.163.com; ZHONG Qiu, Email: zhongqiu@vip.163.com

【Abstract】 Objective To optimized the conditions of PMA to stimulate THP-1 cell differentiation in order to establish a cell model of autophagy, which provides a scientific basis for the researches related to cell autophagy. **Methods** THP-1 cells differentiated into macrophages induced by PMA. Fusion protein pcDNA3.1-YFP-LC3 plasmid was transferred into THP-1 cell, and YFP(Yellow fluorescent protein) can trace the formation of autophagosome. Morphological changes of differentiated cells were photographed by inverted microscope respectively at different PMA concentrations(0,10,20,50,100,200 ng/ml) and different times(0,24,48,60 h). LC3 protein was traced by fluorescence microscopy in different conditions. The mRNA expression levels of autophagy-related genes were detected by RT-qPCR(reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction). SPSS 17.0 was used to do statistical analyze, the relative amount $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of mRNA was showed as “ $\bar{x} \pm s$ ”, and the difference between gene expression was analyzed by Ct value. Paired *t*-test ($P < 0.5$) was used to analyse the expression of mRNA induced by EBSS(Earle's balanced salts solution). **Results** When the PMA concentration was 100 ng/ml and the induction time was 24—48 h, the state of THP-1 derived cells reached best condition. After deal with EBSS medium, the formulation of YFP-LC3 autophagy in THP-1 derived cells was enhanced, and the expression levels of autophagy-related genes *LC3*、*Atg5*、*Atg7*、*Beclin1* were increased at the same time, which indicated that autophagy cell model was successfully constructed ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ value were 1.35 ± 0.16 、 1.18 ± 0.39 、 1.44 ± 0.12 、 1.08 ± 0.09 , while *t* value were 4.00、2.90、5.16、3.57, $P < 0.05$). **Conclusion** The optimization culture conditions were 100 ng/ml PMA and 24—48 h induced time. Based on this condition, an ideal autophagy model was established, which providing a solid sci-

基金项目:广东省自然科学基金(WSTJJ20120319130623198210011211);“十二五”国家科技重大专项(2012ZX10004903);广东省“十二五”医学重点实验室

作者单位:510630 广州,广东省结核病控制中心门诊部(陈亮),参比实验室(陈涛、李海成),主任办(周琳、钟球);暨南大学微生物与免疫教研室(孙毅凡、江振友)

通信作者:周琳, Email: gdtb_bg@vip.163.com; 钟球, Email: zhongqiu@vip.163.com

tific foundation for autophagy-related research.

【Key words】 Leukemia, monocytic, acute; Cell line, tumor; Tetradecanoylphorbol acetate; Autophagy; Models, biological

细胞自噬是从酵母到人类都很保守的古老代谢过程^[1],传统观点认为自噬已进化为一种重复利用路径,即其可使真核细胞在饥饿状态下通过降解受损或废弃的细胞器及蛋白质而获得营养^[2-3]。近年研究显示,自噬可作为天然免疫、获得性免疫和炎症反应的调控子发挥协助调节免疫系统的功能^[4-5],此外,自噬广泛参与多种疾病的发生发展^[6-7],包括癌症、神经退行性病变,以及心血管和肺部疾病等。

早在 20 世纪 50 年代在哺乳动物细胞中就已鉴定到自噬的形态学,随后详尽的形态学和药理学研究使得自噬过程的基本步骤逐渐明确。目前已鉴定 30 余个自噬相关基因 (autophagy associated gene, ATG)^[5,8], Atg8/LC3 是一种类似于泛素蛋白的蛋白质,可与磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合。LC3 (light chain 3) 是目前公认的自噬分子标志物。哺乳动物中有 3 种 LC3,包括 LC3A、LC3B、LC3C,它们在自噬过程中存在相关的翻译后修饰。LC3B 标记荧光蛋白 (如 GFP、GFP-LC3) 已被用于间接免疫荧光或直接荧光显微镜的方法测定 LC3 或 GFP-LC3 点聚集的增加量来监测自噬通量。Atg5 和 Atg7、Beclin1 均是重要的自噬调控基因,其编码的相应蛋白在自噬体的形成、泛素样蛋白通路等多个过程中可发挥重要作用。自噬的诱导可伴随着某些自噬基因 mRNA 水平的增加,可利用 northern 印迹或实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 方法检测 LC3 等自噬相关基因的 mRNA 的水平变化。

近年来,自噬相关领域的研究已成为热点。自噬模型也成为研究者常常涉及到的研究模型,本研究在前人研究的基础上,优化了 PMA 诱导人类单核/巨噬细胞 (THP-1) 细胞分化的条件,建立了较好的自噬模型,旨在为以 THP-1 细胞为基础的自噬模型构建及相关功能研究提供实验基础。

材料和方法

一、材料和试剂来源

佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 购于 Sigma 公司 (美国); 孔板和抗生素等购于广州唯民生物科技有限公司; 感受态细菌 DH5 α 购于 Transgene 公司 (中国); THP-1 细胞购于中山大学细胞库; pcDNA3.1-YFP-LC3 质粒 (简称为“YFP-LC3 质粒”) 为广东省结核病控制中心参比实

验室保存 (由中山大学肿瘤防治中心朱孝峰教授馈赠); 胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI 1640 培养基 (简称为“1640 培养基”) 和 First-Strand cDNA synthesis M-MLV Kit 购于 Invitrogen 公司 (美国); E. Z. N. A. EndoFree Plasmid Mini Kit 购于 Omega 公司 (美国); LipofectamineTM 2000 购于 Invitrogen 公司 (美国); Opti-MEM[®] I Medium 购自 Gibco 公司 (美国); TRIzol[®] Reagent 购自 Invitrogen 公司 (美国)。PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。反转录普通 PCR 仪 (SENSOR)、荧光定量 PCR 仪 (CFX96) 购自 BIO-RAD 公司 (美国); 低速离心机和高速离心机、细胞培养箱购自 Thermo 公司 (美国); 倒置相差显微镜购自 OLYMPUS 公司 (日本); 倒置荧光显微镜 IX-73 购自 OLYMPUS 公司 (日本); NanoDrop 2000 分光光度计购自 Thermo Scientific 公司 (美国)。

二、LC3 点聚集示踪细胞自噬模型的建立

(一) PMA 诱导 THP-1 细胞分化

根据细胞生长状态和形态取 2~4 代细胞进行实验。收集形态典型、生长状态良好的 THP-1 进行实验 [THP-1 细胞呈单个圆形悬浮, 密度约 $(5\sim 10)\times 10^6/\text{ml}$, 分布均匀, 折光度较好]。THP-1 细胞使用含有 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 双抗 (青霉素和链霉素配制) 的 1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养, 每 12~16 h 观察一次。待细胞到达对数生长期时 (培养约 24~36 h 后), 用 1640 培养基调整细胞浓度为 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 加入 PMA, 调整 PMA 最终浓度依次为 0、10、20、50、100、200 ng/ml, 最后补充 1640 培养基至 2 ml, 以 0 ng/ml PMA 孔作为阴性对照孔。培养 24 h 后观察各孔细胞贴壁、形态变化情况并摄影。当细胞形态由单个圆形悬浮细胞, 逐渐变为贴壁、形态不规则并伸出伪足, 综合观察比较各孔分化形态和分化比例, 以确定 PMA 诱导 THP-1 分化的优化浓度, 以分化细胞比例大的和巨噬细胞形态典型的为优。确定最优 PMA 浓度后, 使用此 PMA 浓度分别诱导 THP-1 细胞 0、24、48、60 h 后再次观察各孔细胞形态变化并摄影, 综合观察比较各孔分化形态和分化比例, 以确定 PMA 诱导 THP-1 分化的优化作用时间, 其中 0 h 作用孔作为阴性对照孔。细胞培

养严格无菌操作,若有污染则弃去细胞,重新复苏。

(二)细胞的转染与筛选

1. YFP-LC3 质粒 DNA 的制备:首先使用本室保存的构建好的质粒(pcDNA3.1-YFP-LC3 质粒)转化感受态细菌 DH5 α ,然后将转化的感受态细菌 DH5 α 均匀涂在含卡那霉素的 LB 固体琼脂培养基上,干燥后,倒置平板,37℃恒温培养 12~16 h。挑取单克隆菌落经鉴定后进行扩大培养。收集菌液,使用去内毒素法,按照 E. Z. N. A. EndoFree Plasmid Mini Kit 说明书步骤提取 YFP-LC3 质粒,NanoDrop 2000 分光光度计测定浓度,-20℃保存备用。YFP 为黄绿色荧光蛋白,本研究用表达融合蛋白 YFP-LC3 质粒转染细胞,以示踪自噬体的形成。

2. THP-1 细胞的转染:脂质体法转染 YFP-LC3 质粒至 THP-1 细胞。使用无抗生素培养基以 2.5 $\times 10^5$ 个/孔密度接种 THP-1 细胞至 24 孔细胞培养板,加入培养基至 500 μ l。使用 100 ng/ml 的 PMA 诱导 THP-1 细胞 48 h,设置未加入 PMA 孔作为阴性对照。当细胞形态由单个圆形悬浮细胞,逐渐变为贴壁、形态不规则并伸出伪足,认为 THP-1 已分化为巨噬细胞。当细胞分化为贴壁的巨噬细胞、判断贴壁细胞占孔板达到 90%~95%时进行后续操作。具体的操作严格按照脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 的操作说明书进行。

(三)细胞自噬的检测

1. YFP-LC3 点聚集示踪自噬体的形成:Earle's balanced salts solution(EBSS,又称饥饿培养基),可诱导多种细胞发生自噬。将细胞进行如下处理:先用优化的 PMA 作用浓度和作用时间诱导 THP-1 分化为巨噬细胞,再分别收集未转染 YFP-LC3 质粒 THP-1 细胞、转染 YFP-LC3 质粒 THP-1 细胞及转染后用 EBSS 处理的 THP-1 细胞(即用饥饿培养基培养 2 h 后,再换成普通培养基),利用荧光显微镜观察黄绿色荧光及 YFP-LC3 点聚集在细胞中的分布情况并摄影。

2. RT-qPCR 检测自噬相关基因:收集上述三组细胞,PBS 洗 2 次后,使用 TRIzol® Reagent 裂解细胞,具体操作严格按照 TRIzol® Reagent 说明书步骤进行。以 NanoDrop 2000 分光光度计进行浓度测定和纯度判断, $A_{260/280}$ 在 1.9~2.1 之间,可认为 RNA 纯度较好^[5]。根据 First-Strand cDNA synthesis M-MLV Kit 说明书进行 cDNA 的合成,使用 20 μ l 反应体系,以 β -actin 和 GAPDH 作为内参扩增相关基因(引物序列见表 1),其中 β -actin、GAPDH、LC3 基因上下游引物用 Primer Premier 5.0 软件设

计,*Beclin1*、*Atg5*、*Atg7* 基因上下游引物参考文献[9]进行设计。反应步骤为:94℃,2 min 预变性;94℃,15 s 变性;58℃,30 s 退火;68℃,1 min 延伸,共 40 个循环。使用比较 Ct 值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)方法进行 mRNA 表达差异分析。自噬相关基因 *LC3*、*Beclin1*、*Atg5*、*Atg7* 基因 mRNA 的表达增加,可在一定程度上提示自噬通量增强。

表 1 不同目的基因的荧光定量 PCR 引物序列

目的基因	引物序列(5'→3')	
<i>β-actin</i>	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	F
	CTAGAAGCATTTCGCGGTGGACGATGGA	R
<i>GAPDH</i>	GTCTTCACCACCATTGGAG	F
	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	R
<i>LC3</i>	CCACACCCAAAGTCCTCACT	F
	CACTGCTGCTTTCGGTAACA	R
<i>Beclin1</i>	ACAGTGGACAGTTTGGCACA	F
	CGGCAGTCTCCTTAGATTTGT	R
<i>Atg5</i>	GGCCATCAATCGGAAACTCAT	F
	AGCCACAGGACGAAACAGCTT	R
<i>Atg7</i>	TCGAAAGCCATGATGTCGTCTT	F
	CCAAAGCAGCATTGATGACCA	R

注 F:正向引物;R:反向引物

(四)数据的统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。经比较 Ct 值法分析 mRNA 表达差异,mRNA 相对含量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。对于 EBSS 是否诱导细胞自噬相关基因 mRNA 表达量的变化采用 *t* 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

三、相关定义

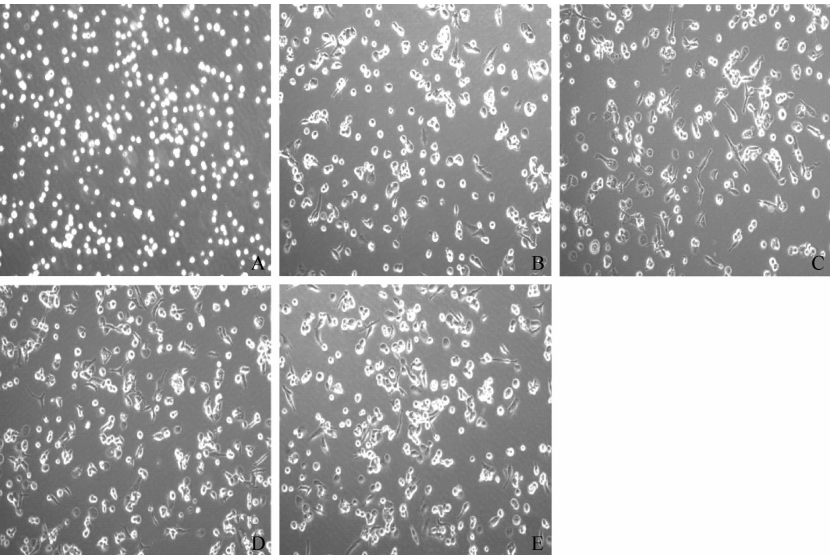
1. 自噬通量:指自噬的完整过程,包括底物向溶酶体的传送及其后续分解和回收利用等。

2. 比较 Ct 值法:Ct 值法是基因表达调控研究中最常用的两种相对定量方法之一。该方法同时扩增目的基因片段和内参基因片段,一般设 1~2 个内参基因。比较 Ct 值法与标准曲线法的相对定量的不同之处在于其运用了数学公式来计算相对量,前提是假设每个循环增加 1 倍的产物数量,在 PCR 反应的指数期得到 Ct 值来反应起始模板的量,一个循环的不同相当于起始模板数 2 倍的差异^[10]。测得两者的 Ct 值之差,即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。通过扩增标准曲线判断扩增效率,通过数学公式来计算相对量。本研究通过比较 Ct 值法的相对定量来评价细胞自噬相关基因 mRNA 表达量的变化。

结 果

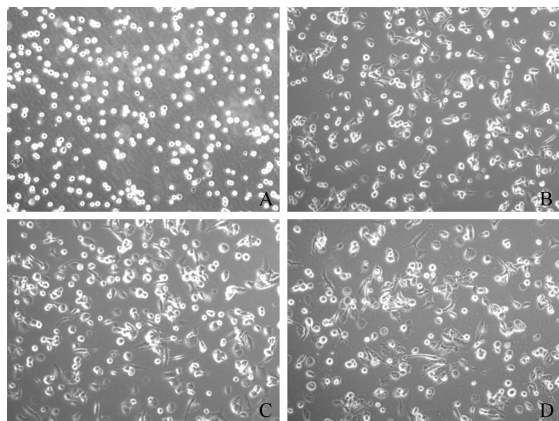
一、THP-1 诱导分化的条件优化

为获得 THP-1 源性巨噬细胞(MΦ),本研究优化了 THP-1 细胞分化成 MΦ 的诱导条件。笔者采用 0、10、20、50、100、200 ng/ml 不同浓度 PMA 诱导分化细胞 24 h,并用同一浓度 PMA 诱导 THP-1 细胞 0、24、48、60 h(图 1,2)。结果显示,未加入诱导剂 PMA 时,观察细胞形态无明显变化,即几乎没有细胞被诱导分化贴壁(图 1A,图 2A);随着 PMA 诱导浓度增加,THP-1 分化为 MΦ 比例增多,即细胞形态由单个圆形悬浮细胞,逐渐变为贴壁、形态不规则并伸出伪足(图 1B~E)。同一浓度 PMA 刺激时,随着诱导时间的增加,贴壁细胞增多(图 2B~D)。综合分析发现,在 PMA 浓度为 100 ng/ml 和诱



A:0 ng/ml(对照组);B:20 ng/ml;C:50 ng/ml;D:100 ng/ml;E:200 ng/ml

图 1 倒置显微镜观察不同浓度 PMA 诱导 THP-1 24 h 的分化情况(直接可见光下观察,×100)



A:0 h(对照组);B:12 h;C:48 h;D:60 h

图 2 倒置显微镜观察 100 ng/ml PMA 诱导 THP-1 不同作用时间的分化情况(直接可见光下观察,×100)

导时间 24~48 h 之间时,细胞贴壁最多,形态不规则且伪足明显,即巨噬细胞样细胞状态最理想(图 3),故选择此条件为 PMA 诱导 THP-1 细胞分化的最佳条件。

二、荧光显微镜观察 YFP-LC3 质粒转染至 THP-1 源性 MΦ

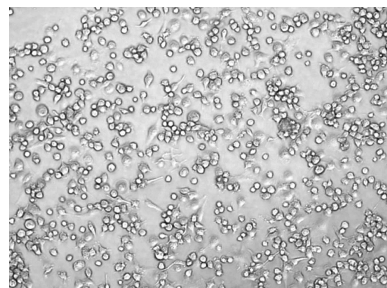
结果显示,未转染 YFP-LC3 质粒的细胞未见荧光发出,而转染 YFP-LC3 质粒的巨噬细胞可见荧光发出,说明 YFP-LC3 质粒已成功转染至 THP-1 源性的巨噬细胞,可用于后续示踪自噬的检测(图 4 A、B)。THP-1 分化的 MΦ 经 EBSS 处理后,LC3 点聚集现象增强,提示 EBSS 增加了自噬通量(图 4C)。

三、RT-qPCR 检测 EBSS 诱导 MΦ 后 LC3、Atg5、Atg7、Beclin1 的 mRNA 表达水平

使用 EBSS 诱导细胞后,用 RT-qPCR 检测自噬相关基因的 mRNA 表达水平,以检测 EBSS 是否可诱导 THP-1 源性巨噬细胞发生自噬。结果提示,EBSS 处理 PMA 诱导 THP-1 分化的巨噬细胞后,自噬相关基因 *LC3*、*Atg5*、*Atg7*、*Beclin1* 的 mRNA 表达水平显著增加, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值均值分别为 1.35 ± 0.16 、 1.18 ± 0.39 、 1.44 ± 0.12 、 1.08 ± 0.09 , (t 值分别为 4.00、2.90、5.16、3.57, P 值均 <0.05) (图 5),说明 EBSS 能明显诱导 THP-1 源性 MΦ 细胞的自噬过程。

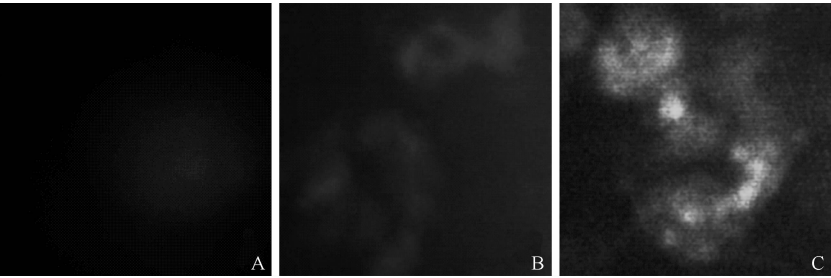
讨 论

“自噬”的概念由比利时科学家 Christian de Duve 在 1963 年溶酶体国际会议上首先提出,是指细胞受到刺激后吞噬自身的细胞质或细胞器,最终



PMA 浓度为 100 ng/ml 和诱导时间 24~48 h 之间时,细胞贴壁最多,形态不规则且伪足明显,即巨噬细胞样细胞状态最理想

图 3 倒置显微镜观察 100 ng/ml PMA 诱导 THP-1 分化的巨噬细胞(直接可见光下观察,×100)



A:未转染 YFP-LC3 质粒的 MΦ, B:转染 YFP-LC3 质粒的 MΦ, C:EBSS 处理转染 YFP-LC3 质粒的 MΦ

图 4 荧光显微镜观察 YFP-LC3 质粒转染至 THP-1 源性 MΦ 的情况(×100)

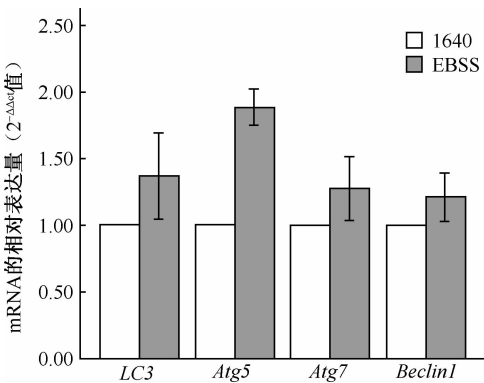


图 5 EBSS 处理 THP-1 源性 MΦ 后自噬相关基因 *LC3*、*Atg5*、*Atg7*、*Beclin1* 的 mRNA 表达水平变化(*t* 值分别为 4.00、2.90、5.16、3.57, *P* 值均<0.05)

将吞噬物在溶酶体内降解的过程。广义上的自噬包括巨自噬 (macroautophagy)、微自噬 (micro-autophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA) 3 种类型, 通常所说的自噬指巨自噬。THP-1, 即人类急性单核细胞白血病细胞, 可被 PMA 诱导分化为 MΦ, 形态上由单个圆形的悬浮细胞分化为贴壁生长、形态不规则且伸出伪足的 MΦ 样细胞^[6]。THP-1 源性 MΦ 属于人类细胞系, 是研究炎症相关巨噬细胞功能的经典细胞模型, 也是研究 Mtb 与宿主细胞相互作用的常用细胞株^[11-13], 且已用于结核分枝杆菌感染中自噬作用的研究^[14-15]。然而, 虽然由 THP-1 诱导分化的巨噬细胞是重要的工具细胞, 但已往文献报道中关于诱导剂 PMA 的诱导浓度和诱导时间存在较大差异, 导致诱导条件不一致。PMA 的诱导浓度从 50~200 ng/ml 不等, 诱导时间跨度也达 12~72 h, 这可能受实验中 THP-1 培养状态、所用 PMA 的质量和纯度等的影响^[6, 12-13], 但 THP-1 诱导分化条件的不确定性, 常常导致研究者对研究结果的质疑, 甚至引起同行争议。因此, 对 THP-1 细胞诱导分化条件的优化是当前研究亟需解决的问题, 统一、可靠的诱导条件是进

行后续科学研究的坚实基础。本研究在前人研究的基础上, 优化了 PMA 对 THP-1 细胞的诱导分化条件, 通过综合分析 PMA 在不同诱导浓度和诱导时间下对 THP-1 的诱导作用, 发现 100 ng/ml 的 PMA 诱导 THP-1 细胞 24~48 h 后分化形成的 MΦ 形态特征明显, 且状态较好。因此, 确定 100 ng/ml PMA 作用 24~48 h 是最佳诱导条件。

在此诱导条件下, 笔者还构建了 EBSS 诱导 THP-1 源性 MΦ 的自噬模型, 通过荧光显微镜观察 YFP-LC3 点聚集示踪自噬, 发现经 EBSS 培养基处理后, 细胞发生自噬并增加了自噬通量。RT-qPCR 对自噬相关基因 (*LC3*、*Atg5*、*Atg7*、*Beclin1*) mRNA 的表达水平进行检测, 发现由 EBSS 处理后的 MΦ 细胞中自噬相关基因 mRNA 表达水平明显增加。以上实验结果均提示 EBSS 可增加 THP-1 源性 MΦ 的自噬通量。这部分实验中有关键的两点, 分别是 PMA 的质量和 THP-1 的生长状态。对于诱导剂 PMA, 本研究采用的是 Sigma 的产品, 制成的工作液避光保存于 -20℃ 冰箱并在 1 个月内用完。本研究中发现, 只要操作者有熟练的细胞培养经验, 选取对数生长期的细胞和合格质量的 PMA 就能以稳定的诱导条件得到巨噬细胞。

总之, 本研究结合已有文献报道, 优化了 PMA 诱导 THP-1 细胞分化的条件, 为后续相关实验提供了可靠的诱导条件。除此之外, 笔者还构建了较理想的自噬模型, 为基于细胞自噬模型进行的实验提供了科学依据。例如研究以细胞免疫为主的相关疾病的致病机制、机体免疫机制, 常见应用于传染性疾病 (结核病等)、肿瘤等相关疾病的研究。

参 考 文 献

[1] Meijer WH, Van der Klei IJ, Veenhuis M, et al. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy*, 2007, 3 (2): 106-116.

[2] Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, et al. Association of a polymorphism in the *P2X7* gene with tuberculosis in a Gambian population. *J Infect Dis*, 2002, 186(10):1458-1462.

[3] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(10): 1102-1109.

[4] Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(6):527-549.

[5] Huang J, Klionsky DJ. Autophagy and human disease. *Cell Cycle*, 2007, 6(15):1837-1849.

[6] Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimu-

lated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. PLoS One,2010, 5(1): e8668.

[7] Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. N Engl J Med, 2013,368(7): 651-662.

[8] Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev Cell, 2003, 5(4): 539-545.

[9] Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, et al. Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Res, 2009, 69(23): 8844-8852.

[10] 赵焕英,包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(4): 492-497.

[11] Fontán P, Aris V, Ghanny S, et al. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. Infect Immun, 2008, 76(2): 717-725.

[12] Iona E, Pardini M, Gagliardi MC, et al. Infection of human THP-1 cells with dormant *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect, 2012, 14(11): 959-967.

[13] Riendeau CJ, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. Infect Immun, 2003, 71(1): 254-259.

[14] Harris J, De Haro SA, Master SS, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. Immunity, 2007, 27(3): 505-517.

[15] Dutta RK, Kathania M, Raje M, et al. IL-6 inhibits IFN-γ induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(6): 942-954.

(收稿日期:2013-09-29)

(本文编辑:张晓进)

• 书讯 •

我国第一部《中国防痨史》已由人民卫生出版社出版

2009 年 4 月,中华人民共和国卫生部疾病预防控制局委托中国防痨协会负责组织编写《中国防痨史》。经过 3 年多的努力,我国第一部《中国防痨史》的编撰工作全部完成,于 2013 年 3 月由人民卫生出版社出版。

《中国防痨史》由原卫生部副部长、中国工程院院士王陇德担任主审,原卫生部疾病预防控制局司长、中国防痨协会名誉理事长戴志澄教授,以及疾病预防控制局肖东楼专员、中国防痨协会副理事长兼秘书长万利亚担任主编。全国政协副主席、中国科协主席、中国科学院院士韩启德为该书题词“以史为鉴,以人为镜”,原卫生部部长张文康题词“总结历史经验,启迪当代防痨”,原副部长殷大奎题词“弘扬先辈防痨精神,防治结核造福人类”。

全国人大常委会副委员长、原卫生部部长、中国科学院院士陈竺为本书题写序言。他在“序言”中指出,纵观历史,我国人民与结核病搏斗了数千年,一代又一代防痨人不懈地努力奋斗,结核病防治工作取得了显著进展,结合我国实际,创建了具有中国特色的结核病防治体系,为全球控制结核病做出了巨大的贡献。《中国防痨史》是一部具有很高参考价值的医学史书,是我国医学发展史的重要组成部分。本书的出版,体现了中国防痨界团结协作和敢于开拓创新的精神,厚载着中国防痨界沉甸甸的历史文化底蕴。本书作为历史与当代的结合,结核病管理与相关技术的合成,适合全国预防医学工作者、临床医师、医学史研究者、卫生管理人员及广

大医学生阅读和参考,也可作为广大结核病防治工作者上岗培训的参考教材。

盛世修史是中华民族优良传统。中国防痨协会精心组织老、中、青年专家和学者,本着尊重史实、承上启下、继往开来、服务当代和有益后世的原则,通过收集、回忆、记述并查阅大量的历史文献,经过反复核实和修改,历时 3 年多的艰辛,终于完成了我国首部《中国防痨史》。全书共 13 章 95 万字,140 余幅珍贵的历史照片,资料翔实,图文并茂,真实、系统地记述和反映了各个历史时期人们对结核病的认识、预防、治疗方法、防治策略和实践经验与教训,展现了不同时代无数防痨工作者及社会各界人士与结核病斗争的光辉历程。同时,还收集了全国各省、自治区、直辖市防痨简史,以及中国防痨界泰斗级人物的光辉事迹。广大读者,特别是从事结核病防治和预防保健的工作者,可从书中感受防痨前辈的教诲,体味中国防痨事业的辉煌与坎坷。

本书单价 120 元(含邮费),款到发货,邮局汇款或银行转账均可。

地址:北京市东四西大街 42 号 210 室,邮编:100710;电话:010-65257475,传真:010-65257475、010-65257509;联系人:朱桂林,电话:13520348637,Email:zglxnyx@163.com。

银行汇款:户名:中国防痨协会;开户行:工行北京崇文支行永定门分理处;账号:0200001509217905165。

(中国防痨协会秘书处)