

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.004

· 专题报道 ·

米托蒽醌通过诱导钙网蛋白的表达抑制黑素瘤的生长

张峻岭¹, 李卫泊¹, 谢绍建², 李冬斌¹, 田青¹, 王英霞¹, 薛平¹, 蔡建辉¹(1. 河北医科大学第二医院胃肠外科, 河北石家庄 050000; 2. 河北医科大学第二医院肿瘤生物治疗科, 河北石家庄 050000)

[摘要] 目的: 观察米托蒽醌(mitoxantrone, MIT)对黑素瘤 B16 细胞钙网蛋白(calreticulin, CRT)表达的影响, 探讨高表达 CRT 的 B16 细胞膜抗原疫苗的免疫效果及其机制。方法: 不同剂量 MIT 处理 B16 细胞, 免疫荧光法检测 B16 细胞 CRT 的表达。以 B16 细胞建立小鼠荷瘤模型, 用不同剂量的 MIT 治疗荷瘤小鼠, 观察 MIT 对黑素瘤生长及肿瘤组织中 CRT 表达的影响。制备 B16 细胞膜蛋白和 MIT 处理后 B16 细胞膜蛋白作为疫苗分别免疫小鼠, 免疫组化检测小鼠移植瘤组织内免疫细胞的浸润情况, 流式细胞术检测荷瘤小鼠脾脏中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例的变化。结果: MIT 可剂量依赖性地上调 B16 细胞表面 CRT 的表达, 对照组 B16 细胞表面 CRT 为(29.40 ± 3.57)%, 高剂量 MIT 处理组为(72.20 ± 2.94)%($P < 0.05$); MIT 促进移植瘤组织中 CRT 的表达, 对照组为(3.21 ± 1.37), 高剂量 MIT 组为(9.17 ± 1.06)($P < 0.05$)。MIT 有效抑制小鼠黑素瘤的生长($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 B16 细胞膜蛋白疫苗相比, 高表达 CRT 的 MIT-B16 细胞膜蛋白疫苗可明显上调小鼠黑素移植瘤组织中的 DCs 和 T 细胞的数量, 以及脾脏细胞中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的比例($P < 0.05$)。结论: MIT 能够上调 CRT 在 B16 细胞表面的表达, 高表达 CRT 的 B16 细胞膜蛋白疫苗能够提高肿瘤组织中浸润 DCs 和 T 细胞的数量, 抑制黑素瘤的生长。

[关键词] 黑素瘤; 米托蒽醌; 钙网蛋白; 树突状细胞; 细胞毒性 T 细胞

[中图分类号] R739.5; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0019-06

Mitoxantrone inhibits growth of melanoma by increasing expression of calreticulin

ZHANG Jun-ling¹, LI Wei-bo¹, XIE Shao-jian², LI Dong-bin¹, TIAN Qing¹, WANG Ying-xia¹, XUE Ping¹, CAI Jian-hui¹(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 2. Department of Tumor Biotherapy, Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of mitoxantrone (MIT) on calreticulin (CRT) expression in B16 cells, and to observe the immune effect of B16-membrane antigen vaccine highly expressing CRT on B16 tumor-bearing mice.

Methods: The expression of CRT on membrane of B16 cells was detected by immunofluorescence after treatment with different concentrations of MIT. B16-implanted mouse model was established, and the growth of B16-implanted tumors and CRT expression in B16-implanted tumor tissues were observed after treatment with different concentrations of MIT. Membrane antigen vaccines from both normal B16 cells and MIT-treated B16 cells were prepared, and mice were immunized before B16 cell implantation. The infiltration of immune cells into B16 tumor tissues and the ratios of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen of B16 tumor-bearing mice were examined by immunohistochemistry and flow cytometry, respectively.

Results: Flow cytometry results showed that MIT dose-dependently increased CRT expression on B16 cell membrane, with CRT expression in control and high dosage MIT groups being (29.40 ± 3.57)% and (72.20 ± 2.94)%($P < 0.05$), respectively. MIT also increased CRT expression in B16 tumor tissues, with those in the control and high dosage MIT groups being 3.21 ± 1.37 and 9.17 ± 1.06($P < 0.05$), respectively. MIT effectively inhibited the growth of B16 tumors($P < 0.05$). Compared with normal B16 cell membrane antigen vaccine, the vaccine highly expressing CRT increased the

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划资助项目(No.09276418D-26);河北省医学适用技术跟踪项目(No.GL200928)。Project supported by the Science and Technology Research and Development Program of Hebei Province(No.09276418D-26), and the Medical Practical Technology Program of Hebei Province(No.GL200928)

[作者简介] 张峻岭(1983-),男,河北省唐山市人,硕士研究生,主要从事胃肠肿瘤生物治疗的研究。E-mail: areostation@163.com

[通信作者] 蔡建辉(CAI Jian-hui, corresponding author),E-mail: jianhuicai2001@163.com

numbers of DCs and T cells in B16 tumors tissues and the ratios of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen ($P < 0.05$).

Conclusion: MIT can increase CRT expression on membrane of B16 cells. B16-membrane antigen vaccine highly expressing CRT can enhance the infiltration of DCs and T cells in melanoma, thus improving the immune effect of B16-membrane antigen vaccine.

[**Key words**] melanoma; mitoxantrone (MIT); calreticulin (CRT); dendritic cell; cytotoxic T lymphocyte

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 19-24]

肿瘤生物治疗作为继手术、放疗、化疗等传统治疗之后的第四大疗法越来越被人们所关注。除了胸腺肽、IFN- γ 、IL-2 等一些细胞因子外, 树突状细胞 (dendritic cells, DCs)、细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs)、细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer cell, CIK) 等免疫细胞治疗也越来越受到重视, 成为治疗肿瘤的重要辅助手段^[1-2]。

免疫编辑学说^[3]认为: 肿瘤细胞在被机体免疫识别杀伤的过程中不断改造自身基因以避免免疫攻击, 突变后的抗原最终不能被机体识别, 形成肿瘤。因此, 肿瘤抗原的缺失、机体对肿瘤的免疫耐受是肿瘤逃避机体免疫系统监视的主要原因^[4]。如何打破肿瘤的免疫耐受, 提高机体抗肿瘤免疫应答成为肿瘤生物治疗迫切需要解决的问题^[5]。葱环类化疗药物、射线、紫外光等处理后的肿瘤细胞可迅速凋亡, 凋亡细胞能被机体免疫细胞, 特别是被 DCs 所摄取, 诱发机体免疫系统对肿瘤细胞的攻击^[6]。肿瘤细胞的这类能被免疫系统识别并攻击的凋亡称为肿瘤细胞免疫原性死亡 (immunogenic cell death)^[7-8]。米托蒽醌 (mitoxantrone, MIT) 能够诱导结肠癌 CT26 细胞的凋亡, 同时使肿瘤细胞胞质中的钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 发生快速膜转位, 促进 DCs 对抗原的识别, 因此肿瘤细胞 CRT 高表达是激活机体免疫系统特别是 DCs 的关键因素^[9-10]。

本实验观察了 MIT 对小鼠黑素瘤 B16 细胞 CRT 表达的影响, 探讨高表达 CRT 的 B16 细胞膜蛋白疫苗的免疫效果及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂

MIT 购自江苏恒瑞医药股份有限公司, RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所。CRT 一抗 (兔抗鼠多克隆抗体) 购自美国 Santa Cruz 公司, CD4-FITC、CD8-PE、CD11c-FITC 抗体 (均为大鼠抗小鼠) 购自美国 eBioscience 公司。IL-2、IL-4、GM-CSF 购自美国 Sigma 公司, CD3 抗体、兔抗鼠 CD11c 抗体、FITC-二抗 (羊抗兔), 和 SP 法免疫组化试剂盒均购自武

汉博士德公司。胞膜蛋白和胞质蛋白提取试剂盒和考马斯亮蓝染色试剂盒购自南京凯基生物科技公司。黑素瘤细胞株 B16 购自中国医学科学院上海细胞库。4~6 周龄雌性 C57/BL 小鼠购自中国医学科学院动物实验中心 [动物合格证号 SCXK(90)2004-0001]。

1.2 免疫荧光染色检测 B16 细胞中 CRT 的表达

在含 B16 细胞爬片的 6 孔板中加入不同浓度的 MIT (RPMI 1640 完全培养基配制; 高、中、低剂量组分别为 0.25、1.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 孵育 24 h。70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h; 0.1% Triton X-100 孵育 1 h, 3% 过氧化氢孵育 10 min; 5% 山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 加入 CRT (1:250) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入荧光标记二抗 (羊抗兔 1:45), 0.1% 伊文氏蓝衬染 30 s 后荧光显微镜下观察。

1.3 B16 膜抗原和 MIT-B16 膜抗原的制备

根据膜蛋白提取试剂盒说明书分别提取 B16 细胞膜蛋白和 4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIT 处理 24 h 后的 B16 细胞膜蛋白。简要步骤: 收集 5×10^8 细胞, 用冷 PBS (pH7.4) 洗涤 2 次, 加入 1 ml 裂解液后制匀浆, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 $\times g$ 离心 10 min。取沉淀, 加入 1 ml 冷抽提缓冲液振荡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 $\times g$ 离心 10 min, 取上清。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 28 000 $\times g$ 离心 5 min, 取下层加入 500 μl 冰冷灭菌水, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min。重复样品水浴和离心步骤 2 次, 取下层即为膜蛋白提取物。考马斯亮蓝法测定蛋白含量为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.4 荷瘤小鼠模型的建立及其免疫方法

小鼠背部皮下注射对数生长期的 B16 细胞 2×10^5 个/200 μl , 约 10 d 后肿瘤最长径约为 0.4 cm、体积约为 0.01 cm^3 , 此日设为小鼠肿瘤模型建立 0 d (第 0 天)。取体重相似小鼠 10 只为一组, 共 7 组, 处理方法如下: 健康对照组、荷瘤对照组分别在 1 d、7 d 腹腔注射 0.4 ml PBS; MIT 低、中、高剂量组在 1 d、7 d 分别腹腔注射 2.0、4.0、8.0 mg/kg MIT。抗原免疫组小鼠在 -16 d、-13 d、-11 d、-6 d、-3 d、-1 d、1 d、6 d、12 d 腹部皮下及肿瘤周围注射 MIT-B16 膜抗原和 B16 膜抗原 250 μg 。观察各组小鼠肿瘤生长情况, 测量肿瘤长径 (L) 和短径

(W),用 Still 公式^[12]计算肿瘤体积, $V = 1/2LW^2$,绘制肿瘤生长曲线。在 14 d 处死小鼠,取肿瘤组织及脾脏进行后续检测。

1.5 免疫组化法检测小鼠黑素瘤组织中 CD3⁺T 细胞及 CD11c⁺DC 细胞的数量

取小鼠肿瘤组织,依次固定、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,4 μm 连续切片,制备石蜡切片。石蜡切片脱蜡至水,加入 5% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭后,加入 CD3(1:150 比例稀释)和 CD11c(1:120 比例稀释)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,具体步骤按照 SP 法免疫组化试剂盒说明书操作。CD3、CD11c 染色阳性细胞计数:每例标本分别在 400 倍光镜下观察,胞膜及胞质染色明显者计为阳性,计数阳性细胞数^[13]。每实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测肿瘤组织中 CRT 的表达和小鼠脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞的比例

分别取各组小鼠肿瘤组织和脾脏,网搓法制备单细胞悬液,脾脏单细胞悬液 100 μl (含 1×10^6 个细胞)分别加入荧光标记的 CD4、CD8 单抗 20 μl ,室

温避光孵育 30 min,待检。取肿瘤组织细胞悬液 100 μl (含 1×10^6 个细胞),加入 CRT 单抗 20 μl ,室温孵育 30 min,洗涤细胞,加入荧光二抗 10 μl ,室温避光孵育 30 min。样本上流式细胞仪检测, System II 软件系统进行分析。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 12.0 统计软件,采用单因素方差分析和配对 t 检验,组间差异比较采用 One-way ANOVA 或非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIT 以剂量依赖方式抑制黑素移植瘤的生长

不同剂量的 MIT 作用于荷黑素瘤小鼠, MIT 2.0、4.0、8.0 mg/kg 组小鼠肿瘤生长曲线低平,3 组小鼠肿瘤在第 14 天的体积分别为(4.07 \pm 0.77)、(2.35 \pm 0.54)、(1.21 \pm 0.39) cm^3 ,明显小于荷瘤对照组肿瘤体积(6.94 \pm 0.81) cm^3 ($P < 0.01$, 表 1),且 3 组体积呈剂量依赖性($P < 0.01$)。

表 1 MIT 剂量依赖性地抑制黑素移植瘤的生长

Tab. 1 MIT dose-dependently inhibited growth of implanted-B16 tumor

MIT ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Volume of tumor(V/cm^3)					
	d 6	d 8	d 10	d 12	d 13	d 14
0	0.04 \pm 0.02	0.31 \pm 0.27	1.29 \pm 0.56	3.13 \pm 0.45	4.59 \pm 0.60	6.94 \pm 0.81
2.0	0.04 \pm 0.02	0.21 \pm 0.12	0.81 \pm 0.37*	1.72 \pm 0.84**	2.02 \pm 0.98**	4.07 \pm 0.77**
4.0	0.04 \pm 0.03	0.15 \pm 0.08*	0.50 \pm 0.15**	0.99 \pm 0.51**	1.72 \pm 0.45**	2.35 \pm 0.54**
8.0	0.03 \pm 0.02	0.09 \pm 0.07**	0.10 \pm 0.40**	0.39 \pm 0.22**	0.81 \pm 0.41**	1.21 \pm 0.39**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 mg/kg MIT

2.2 MIT 以剂量依赖方式促进黑素移植瘤组织中 CRT 的表达

小鼠荷瘤后,用不同剂量 MIT 进行治疗,取治疗后各组小鼠黑素瘤组织,制备单细胞悬液,流式细胞仪检测肿瘤组织中 CRT 的表达。各组 CRT 表达量平均荧光值分别为:对照组为 3.21 \pm 1.37;低、中、高剂量 MIT 组的 CRT 分别为 5.13 \pm 0.95、7.40 \pm 0.86、9.17 \pm 1.06,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。提示 MIT 以剂量依赖方式促进肿瘤组织中 CRT 的表达。

2.3 MIT 以剂量依赖方式促进黑素瘤 B16 细胞表面 CRT 的表达

结果显示,各组 B16 细胞 CRT 的表达阳性率:对照组为(29.40 \pm 3.57)%,低、中、高剂量 MIT 组

CRT 分别为(42.80 \pm 4.59)%、(56.20 \pm 5.55)%、(72.20 \pm 2.94)%。MIT 处理后 B16 细胞各组 CRT 阳性表达显著高于对照组($P < 0.05$,图 2),MIT 以剂量依赖方式上调 B16 细胞 CRT 的表达。进一步提取高剂量 MIT 组、对照组 B16 细胞的膜蛋白, Western blotting 检测发现,高剂量 MIT 处理后 B16 细胞膜 CRT 相对表达为 472.43 \pm 23.1,对照组 B16 细胞膜 CRT 相对表达为 117.25 \pm 18.2($P < 0.01$,图 3),提示 MIT 可上调 B16 细胞表面 CRT 的表达。

2.4 CRT 提高 B16 膜抗原疫苗的免疫保护作用

提取 B16 细胞和 MIT 处理后 B16 细胞膜抗原,制备膜抗原疫苗,免疫小鼠后荷瘤,观察 CRT 高表达对抗原疫苗效果的影响。结果(表 2)显示:高表达 CRT 的 MIT-B16 膜抗原疫苗和 B16 膜抗原疫苗免疫

均能抑制黑素瘤的生长 ($P < 0.01$), 其中 MIT-B16 膜抗原疫苗能更有效地抑制黑素瘤生长 ($P < 0.05$)。

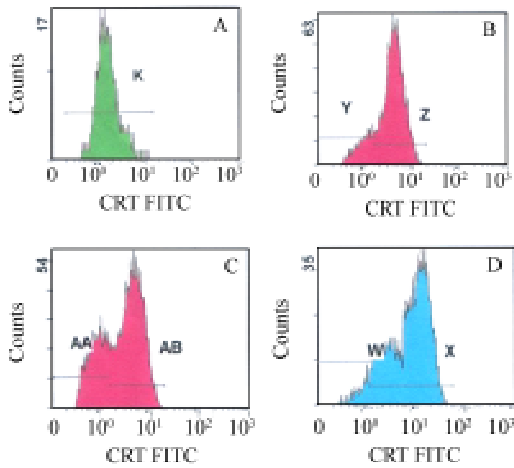


图 1 MIT 以剂量依赖方式诱导黑素瘤组织中 CRT 的表达

Fig. 1 MIT dose-dependently induced expression of CRT in B16 melanoma tissues

A: Ctrl; B: MIT 2.0 mg/kg;
C: MIT 4.0 mg/kg; D: MIT 8.0 mg/kg

2.5 CRT 提高 B16 膜抗原疫苗免疫后黑素瘤组织中 CD11c⁺ DCs 和 CD3⁺ T 细胞的数量

MIT-B16 膜抗原疫苗和 B16 膜抗原疫苗免疫小鼠, 然后荷瘤, 观察疫苗的免疫效果。结果(图 4)显示, MIT-B16 膜抗原疫苗免疫组小鼠黑素瘤组织中 CD11c⁺ DCs 和 CD3⁺ T 细胞数量显著高于未免疫荷瘤对照组 ($P < 0.01$), B16 膜抗原疫苗免疫组中 DCs 和 T 细胞的数量虽然比未免疫荷瘤对照组稍高, 但

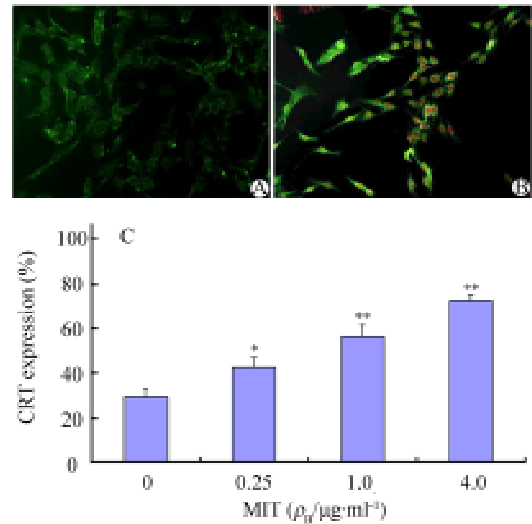


图 2 MIT 诱导 B16 细胞 CRT 的表达 (×200)

Fig. 2 MIT induced CRT expression in B16 cells

A: Ctrl; B: MIT 4 μg/ml; C: MIT dose-dependently induced CRT expression in B16 cells
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μg/ml MIT

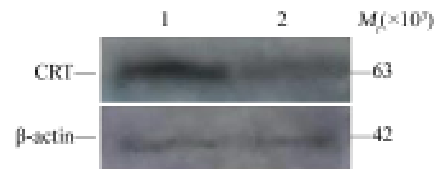


图 3 Western blotting 检测 MIT 诱导 B16 细胞膜 CRT 的表达

Fig. 3 Expression of CRT induced by MIT in membrane of B16 cells as detected by Western blotting

1: Membrane of MIT-treated B16 cells; 2: Membrane of B16 cells

表 2 MIT-B16 膜抗原疫苗有效抑制黑素瘤的生长

Tab. 2 MIT-B16 vaccine effectively inhibited growth of melanoma

Group	Volume of tumor(V/cm^3)					
	d 6	d 8	d 10	d 12	d 13	d 14
Ctrl	0.04 ± 0.02	0.31 ± 0.27	1.29 ± 0.56	3.13 ± 0.45	4.59 ± 0.60	6.94 ± 0.81
B16 vaccine	0.04 ± 0.02	0.30 ± 0.32	0.75 ± 0.41 *	1.13 ± 0.45 **	2.11 ± 0.78 **	4.15 ± 0.57 **
MIT-B16 vaccine	0.04 ± 0.03	0.14 ± 0.05 *	0.40 ± 0.18 **△	0.67 ± 0.29 **△	1.39 ± 0.37 **△	1.67 ± 0.33 **△

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl; △ $P < 0.05$ vs B16 vaccine

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果说明: CRT 高表达可提高 B16 膜抗原疫苗免疫后黑素瘤组织中浸润 T 细胞和 DCs 的数量。

2.6 CRT 提高 MIT-B16 膜抗原疫苗免疫后黑色素瘤小鼠脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的比例

MIT-B16 膜抗原疫苗和 B16 膜抗原疫苗免疫小

鼠,流式术检测小鼠脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例,结果(表 3)显示,MIT-B16 膜抗原疫苗组中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例显著高于对照组($P < 0.01$),而 B16 膜抗原疫苗组中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例虽然都比对照组稍高但无统计学意义($P > 0.05$)。说明,MIT-B16 膜抗原疫苗可以有效地提高小鼠脾脏中 T 细胞特别是 CD8⁺ T 细胞的比例,B16 膜抗原疫苗则不影响 T 细胞的比例。

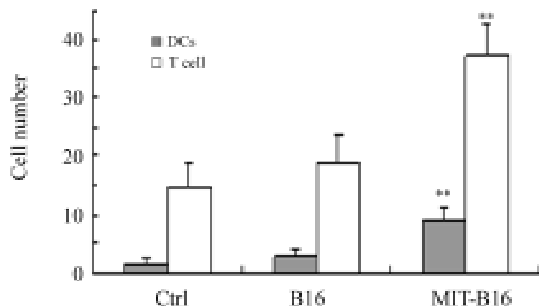


图 4 MIT-B16 膜抗原疫苗有效提高黑素瘤组织中浸润 T 细胞和 DCs 的数量

Fig. 4 MIT-B16 vaccine increased numbers of T cells and DCs in melanoma tissues

** $P < 0.01$ vs Ctrl

表 3 MIT-B16 膜抗原疫苗增加黑素瘤小鼠脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的比例(%)

Tab.3 MIT-B16 vaccine increased ratios of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleen of mice(%)

Group	CD4 ⁺ T cells	CD8 ⁺ T cells
Ctrl	9.98 ± 3.29	11.01 ± 2.33
B16 vaccine	12.33 ± 3.27	14.52 ± 3.91
MIT-B16 vaccine	19.31 ± 4.89**	22.77 ± 2.16**

** $P < 0.01$ vs Ctrl

3 讨论

肿瘤细胞逃避免疫监视的主要原因有:(1)缺乏有效的抗原性表位;(2)诱导机体免疫耐受;(3)肿瘤抗原被覆盖;(4)肿瘤细胞 MHC-I 类分子表达减少;(5)缺乏协同刺激信号;(6)肿瘤抗原的加工提呈发生障碍^[14-15]等等。因此,激发有效的 T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应是提高肿瘤免疫治疗效果的关键。根据 T 淋巴细胞活化的双信号理论,单纯的抗原不能活化 T 淋巴细胞,抗原必须经过能够提供辅助信号的抗原提呈细

胞(antigen-presenting cell, APC)提呈,才能有效地诱导 CTLs 形成,发挥抗癌效应。

DCs 是体内功能最强大的 APC,在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用。非淋巴组织内定居的未成熟 DCs 具有强大的抗原摄取功能,是机体进行免疫监视的前哨细胞^[16]。DCs 通过其表面的 CD36、CD40、CD91、清道夫受体(scavenger receptor)、TLR2/4 和 LOX1 等受体识别并吞噬肿瘤抗原^[17],经抗原处理相关转运体(transporter associated with antigen processing, TAP)途径将抗原肽转运到内质网腔内,与 MHC-II, MHC-I 分子形成复合物,通过分泌泡转运到 DCs 表面。在此过程中 DCs 在受体 CCR7 的诱导下经淋巴管进入淋巴结(或组织)的 T 细胞区,提呈抗原,激活 CD4⁺ T 细胞,并使 CD8⁺ T 细胞活化为 CTLs 细胞^[18-19]。CTLs 通过与靶细胞接触产生脱颗粒作用,穿孔素与靶细胞膜结合导致其死亡。肿瘤特异性 CTLs 表面 Fas 配体与肿瘤细胞表面的 Fas 分子结合,向肿瘤细胞内传导死亡信号引起肿瘤细胞凋亡。

一些学者发现,蒽环类化疗药物、射线、紫外光等处理后的肿瘤细胞可迅速凋亡,且凋亡的细胞能通过凋亡小体表达及分泌 CRT、热休克蛋白、高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box protein 1, HMGB-1)等蛋白分子^[20-21],它们被 DCs 所摄取并激活 CTLs 导致对肿瘤细胞形成有效攻击^[6]。因此某些化疗、放疗等诱导的肿瘤细胞的免疫原性死亡能够通过“旁观者效应”杀伤对化疗药物抵抗的肿瘤细胞和肿瘤干细胞。Obeid 等^[22]研究发现免疫原性死亡细胞膜高表达的 CRT 能够激活并诱导 DCs 成熟,提高 DCs 识别肿瘤抗原的能力,促进肿瘤特异性 CTLs 产生和 INF- γ 的分泌。如用中和抗体阻断 CRT,或 siRNA 技术下调 CRT 的表达,都能显著抑制蒽环类药物处理的肿瘤细胞被 DCs 识别,而重组 CRT 蛋白能够逆转此作用^[9,23]。研究^[24]发现,CRT 表达缺失的肿瘤细胞,不能使蒽环类药物的体外抗肿瘤作用消失或减低;而在动物体内,与正常表达 CRT 的肿瘤细胞相比,CRT 表达缺失的肿瘤细胞对蒽环类药物不敏感。

本实验结果显示:(1)MIT 能够以剂量依赖方式上调体外培养的 B16 细胞膜表面 CRT 的表达,在荷瘤小鼠模型中也具有这种作用。MIT 通过提高肿瘤 CRT 表达为 DCs-CTL 过继免疫治疗创造了良好条件;(2)高表达 CRT 的肿瘤细胞膜蛋白疫苗能够上调肿瘤组织中 DCs、CD3⁺ T 细胞的数量,而不表达 CRT 的膜蛋白疫苗则几乎不能上调 DCs、CD3⁺ T

细胞的数量。

CRT对DCs的成熟及其对肿瘤的认识起到至关重要的作用,继而能够刺激T细胞的增殖和分化^[16,22],提高肿瘤组织中CD3⁺T细胞数量及小鼠外周免疫系统中CD8⁺T细胞的比例,为蒽环类化疗药物抗肿瘤机制提供了新的解释。近年来,肿瘤疫苗在生物治疗中占据重要地位,以肿瘤的免疫原性死亡及CRT、HSPs、HMGB-1等抗原为基础,用某些化疗药诱导提高癌灶中能被DCs识别的抗原表达,或是制备肿瘤疫苗,能够有效地提高抗肿瘤治疗疗效,为肿瘤完全缓解带来新的希望。

[参考文献]

- [1] Srdjan N, Vida S, Andreja K, Alojz I, Barbara JN. Preventive and therapeutic antitumor effect of tumor vaccine composed of CpG ODN class C and irradiated tumor cells is triggered through the APCs and activation of CTLs [J]. *Vaccine*, 2007, 25(49): 8241-8256.
- [2] Alberto B, Davide B, Eva M, Gabriella C, Peter B, Alessio N. Immunotherapy with dendritic cells for cancer [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(2): 173-183.
- [3] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting [J]. *Immunity*, 2004, 21(2): 137-48.
- [4] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three ES of cancer immunoeediting [J]. *Ann Rev Immunol*, 2004, 22: 329-360.
- [5] Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(5): 353-363.
- [6] Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, *et al.* Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(10): 1848-1850.
- [7] Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, Kroemer G. The immunogenicity of tumor cell death [J]. *Curr Opin Oncol*, 2009, 21(1): 71-76.
- [8] Brusa D, Garetto S, Chiorino G, Scatolinib M, Migliorea E, Camussi G, *et al.* Post-apoptotic tumors are more palatable to dendritic cells and enhance their antigen cross-presentation activity [J]. *Vaccine*, 2008, 26(50): 6422-6432.
- [9] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Per-fettini JL, *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death [J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 54-61.
- [10] Obeid M, Tesniere A, Panaretakis T, Tufi R, Joza N, van Endert P, *et al.* Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy [J]. *Immunol Rev*, 2007, 220: 22-34.
- [11] 巴德年. 当代免疫学技术与应用 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 156.
- [12] Rosato A, Zoso A, Dalla Santa S, Milan G, Del Bianco P, De Salvo GL, *et al.* Predicting tumor outcome following cancer vaccination by monitoring quantitative and qualitative CD8⁺T cell parameters [J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1999-2006.
- [13] 周业江, 梁建群, 蔡晓龙, 熊玉霞, 易国平, 李显蓉, 等. 胃癌树突状细胞浸润的临床意义及与肿瘤血管生成的相关性 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(17): 1914-1920.
- [14] Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoeediting and immunosculpting pathways to cancer progression [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(4): 275-287.
- [15] Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoeediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity [J]. *Adv Immunol*, 2006, 90: 1-50.
- [16] 柯奇周, 王娅兰. 树突状细胞在肿瘤中的研究进展 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2006, 33(3): 179-182.
- [17] Binder RJ, Vatner R, Srivastava PK. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions [J]. *Tissue Antigens*, 2004, 64(4): 442-451.
- [18] Sharma S, Stolina M, Zhu L, Lin Y, Batra R, Huang M, *et al.* Secondary lymphoid organ chemokine reduces pulmonary tumor burden in spontaneous murine bronchoalveolar cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(17): 6406-6412.
- [19] Molenkamp BG, van Leeuwen PA, van den Eertwegh AJ, Sluijter BJ, Scheper RJ, Meijer S, *et al.* Immunomodulation of the melanoma sentinel lymph node: a novel adjuvant therapeutic option [J]. *Immunobiology*, 2006, 211(6-8): 651-661.
- [20] Calderwood SK, Mambula SS, Gray-PJ Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(19): 3689-3694.
- [21] Dumitriu IE, Blanchi ME, Bacci M, Manfredi AA, Rovere-Querini P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1): 84-91.
- [22] 杨静悦, 曹大勇, 刘文超, 斯小明. IL-18基因增强肿瘤抗原致敏DC诱导的CTLs特异性杀伤肝癌细胞 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(1): 55-58.
- [23] Obeid M, Panaretakis T, Tesniere A, Joza N, Tufi R, Apetoh L, *et al.* Lever aging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 7941-7944.
- [24] Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, *et al.* The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(9): 1499-1509.

[收稿日期] 2009-10-29 [修回日期] 2009-12-18

[本文编辑] 徐红梅