

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0042-05

· 论 著 ·

pIRApoptinHNIL18 对结肠癌细胞 HCT-116 的抑制效应

郑洪玲^{1,2}, 金宁一², 李 霄², 米志强², 连 海², 李 昌², 田明尧², 李雪梅², 孙丽丽³(1. 吉林大学农学部, 长春 130062; 2. 军事医学科学院全军基因工程重点实验室, 长春 130062; 3. 吉林大学白求恩医学部第二临床医院, 长春 130041)

[摘 要] **目的:** 探讨联合应用凋亡素(*apoptin*)基因、新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)血凝素-神经氨酸酶(hemagglutinin-neuraminidase, *HN*)基因及人白介素 18(*hIL-18*)基因体外对人结肠癌细胞 HCT-116 的抑制效应。**方法:** 重组质粒 pIRApoptinHNIL18 通过脂质体介导法体外转染人结肠癌细胞 HCT-116, 通过 Western blotting 和 RT-PCR 检测外源基因表达; 采用 AO/EB 染色法检测 pIRApoptinHNIL18 对人结肠癌细胞 HCT-116 抑制作用; 利用流式细胞术分析 pIRApoptinHNIL18 对人结肠癌细胞 HCT-116 线粒体膜电位(mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi$)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 采用 3,5-二羟甲基苯法测定唾液酸含量。**结果:** pIRApoptinHNIL18 转染人结肠癌细胞 HCT-116 后, 外源基因能够有效表达; 肿瘤细胞生长受到抑制; 线粒体 $\Delta\Psi$ 由(94.41 ± 8.17)% 下降到(30.70 ± 8.01)%($P < 0.05$); 唾液酸含量由(0.33 ± 0.06) mmol/L 下降到(0.09 ± 0.03) mmol/L($P < 0.01$); ROS 水平由(52.48 ± 6.09)% 升高到(68.98 ± 7.26)%($P < 0.05$)。**结论:** pIRApoptinHNIL18 可通过线粒体途径诱导细胞凋亡, 从而抑制人结肠癌细胞 HCT-116 的生长。

[关键词] 凋亡素基因; 血凝素-神经氨酸酶基因; 人白介素 18 基因; 结肠癌细胞; 线粒体; 凋亡

[中图分类号] R373.9; R730.5 [文献标志码] A

Anti-tumor effects of pIRApoptinHNIL18 on colon carcinoma cell HCT-116

ZHENG Hong-ling^{1,2}, JIN Ning-yi², LI Xiao², MI Zhi-qiang², LIAN Hai², LI Chang², TIAN Ming-yao², LI Xue-mei², SUN Li-li³(1. Faculty of Agriculture Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Genetic Engineering Laboratory of PLA, Military Medical Sciences of PLA, Changchun 130062, China; 3. The Second Affiliated Hospital, Bethune Faculty of Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130041, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the combined anti-tumor effects of *apoptin* gene, hemagglutinin-neuraminidase gene (*HN*) of newcastle disease virus (NDV), and human IL18 gene(*hIL-18*) on colon carcinoma cells HCT-116 *in vitro*. **Methods:** The recombinant plasmid pIRApoptinHNIL18 was introduced into human colon carcinoma cells HCT-116 by liposome-mediated transfection. The expression of the exogenous genes was detected by Western blotting and RT-PCR. The anti-tumor effects of pIRApoptinHNIL18 on HCT-116 cells were determined by AO/EB staining. The influence of pIRApoptinHNIL18 on mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$) and reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry (FCM). Sialic acid content was determined by using 3, 5-dihydroxytoluene. **Results:** pIRApoptinHNIL18 transfection resulted in expression of the exogenous genes, repression of HCT-116 cells, down-regulation of $\Delta\Psi$ [(94.41 ± 8.17)% *vs* (30.70 ± 8.01)%, $P < 0.05$] and Sialic acid content [(0.33 ± 0.06) mmol/L *vs* (0.09 ± 0.03) mmol/L, $P < 0.01$], and up-regulation of ROS [(52.48 ± 6.09)% *vs* (68.98 ± 7.26)% $P < 0.05$]. **Conclusion:** pIRApoptinHNIL18 may inhibit the growth of HCT-116 cells *via* mitochondrial pathway-induced apoptosis.

[**Key words**] *apoptin* gene; hemagglutinin-neuraminidase gene; human interleukin-18 gene; colon carcinoma cell; mitochondrion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(1): 42-46]

恶性肿瘤是一种由多因素、多基因协同作用导致的疾病,单一因素的纠正难以达到预期的治疗效果,多基因联合应用的治疗策略已成为肿瘤基因治疗的研究热点。肿瘤基因工程治疗性疫苗的成功应

[基金项目] 吉林省科技发展计划资助项目(No. 20060566)

[作者简介] 郑洪玲(1978-),女,内蒙古赤峰人,硕士研究生,讲师,主要从事分子病毒学和肿瘤生物治疗研究

[通讯作者] 金宁一, E-mail: ningyij@yahoo.com.cn

用不仅取决于其有效性,特异性、靶向性和安全性具有同等重要的地位。研究表明,Apoptin 具有特异性诱导肿瘤细胞凋亡的作用,而对正常细胞无影响,其凋亡诱导功能不依赖 p53 分子,且 bcl-2、BAG-1、bcr-abl 等凋亡抑制分子不仅对 Apoptin 的功能没有影响,反而会增强其作用^[1-4];新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)血凝素-神经氨酸酶(hemagglutinin-neuraminidase, HN)基因具有神经氨酸酶活性,可水解肿瘤细胞表面唾液酸,暴露肿瘤表面抗原,成为刺激机体产生肿瘤特异性免疫的“清道夫”^[5-9];hIL-18 具有增强 NK 和 CTL 细胞活性、促进 T 细胞增殖活化、增强 Fas 介导的细胞毒作用等多种生物学功能,是一种具有应用潜力的抗肿瘤细胞因子^[9-12]。因此,apoptin 基因、HN 基因与 hIL-18 基因的联合应用,能够在杀伤肿瘤细胞的同时增强机体的肿瘤特异性免疫功能,阻滞肿瘤转移与再生,从而实现“防治结合”。本研究以真核表达质粒 pIRES 为载体,构建共表达 apoptin 基因、HN 基因与 hIL-18 基因的重组质粒 pIRApoptinHNIL18,并针对其抑瘤作用进行了研究,以期对肿瘤的基因治疗提供新的研究策略。

1 材料与方 法

1.1 质粒、细胞与试剂

重组质粒 pIRApoptinHNIL18 由本室构建并保存^[9],质粒载体 pIRES、pIRApoptin 由本室保存。人结肠癌 HCT-116 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所。脂质体 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司。鼠抗人 IL-18 单克隆抗体购自 MBL 公司,碱性磷酸酶(AP)标记兔抗鼠 IgG、NBT、BCIP 购自 Promega 公司,鼠抗新城疫病毒 HN 蛋白单克隆抗体由扬州大学动物医学院所赠。TRIZOL Reagent 购自 Gibco 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Amersherm 公司,PCR 引物由大连宝生物公司合成,Rho123 和 DCFA 购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养和质粒转染

HCT-116 细胞在 RPMI 1640 培养液(含 10% 胎牛血清,100 U/L 青霉素,100 U/L 链霉素)中,于 37 °C,5% CO₂ 条件下,培养至对数生长期,0.25% 胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液,调整细胞密度至 1 × 10⁵/ml,分别接种于 96 孔(150 μl/孔)和 6 孔(2 ml/孔)细胞培养板,培养 24 h 后,通过脂质体介导法^[6]分别将 10 μg 重组质粒 pIRApoptinHNIL18 和载体质粒 pIRES 转染 HCT-116 细胞。

1.3 Western blotting 检测 HNIL18 融合基因的表达

收集质粒转染 48 h 的 HCT-116 细胞,提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE,并电转移至硝酸纤维素膜。经 5% 脱脂乳封闭后,分别与鼠抗人 IL-18 单克隆抗体和鼠抗新城疫病毒 HN 蛋白单克隆抗体于 37 °C 作用 2 h 后,与碱性磷酸酶(AP)标记兔抗鼠 IgG 于 37 °C 作用,并于 NBT/BCIP 试剂中显色。

1.4 RT-PCR 检测 apoptin 基因的表达

收集质粒转染 48 h 的 HCT-116 细胞,利用 TRIZOL Reagent 提取细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒说明书,以 95 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,72 °C 10min,30 个循环的程序进行 RT-PCR。产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 显微镜观察转染后 HCT-116 细胞的形态变化

质粒转染 HCT-116 细胞 48 h 后,吸弃培养液,置光镜下观察并拍照。收集 25 μl 质粒转染细胞(0.5 × 10⁵ ~ 2 × 10⁶ 个细胞),与 1 μl AO/EB 染色液(100 μg/ml AO 与 100 μg/ml EB 的 PBS 溶液)轻微混合,立即置于荧光显微镜下观察。

1.6 唾液酸含量检测

收集质粒转染 48 h 的 HCT-116 细胞,PBS 洗涤 2 次,500 μl 双蒸水重悬后超声波破碎细胞,并采用 3,5-二羟基甲苯法测定唾液酸含量。紫外分光光度计在 560 nm 处测定样品的吸光度 D₅₆₀ 值,按下式计算唾液酸含量:唾液酸含量 = [测定管 D₅₆₀ 值/标准管 D₅₆₀ 值] × 1.94。

1.7 流式细胞术检测 HCT-116 细胞线粒体膜电位(ΔΨ)和活性氧(ROS)

收集 1 × 10⁶ 个质粒转染 48 h 的 HCT-116 细胞,PBS 洗涤 1 次,分别在相应样本中加入 DCFA(5 μmol/ml)和 Rhodamine123(2 μg/ml),于 37 °C 避光作用 30 min,PBS 洗涤 3 次后用流式细胞仪检测荧光阳性细胞数,间接测定 ΔΨ 和 ROS 的变化。

1.8 统计学处理

所得数据应用 SPSS10.0 统计软件包采用非参数检验进行处理,以 P < 0.05 为显著性差异。

2 结 果

2.1 HNIL18 融合基因在 HCT-116 细胞中的表达

在转染 pIRApoptinHNIL18 的细胞蛋白提取物中,抗人 IL-18 单克隆抗体和抗 HN 单克隆抗体均能检测到 81 000 的特异性蛋白反应条带,结果表明 HNIL18 融合基因获得有效表达(图 1)。

2.2 apoptin 基因在 HCT-116 细胞中的表达

用 apoptin 基因特异引物对转染 pIRApoptinHNIL18 的细胞总 RNA 提取物进行 RT-PCR 扩增,可

以见到约 366 bp 的 DNA 条带(图 2),表明 *apoptin* 得到有效转录。

2.3 pIRApoptinHNIL18 转染对 HCT-116 细胞的抑制作用

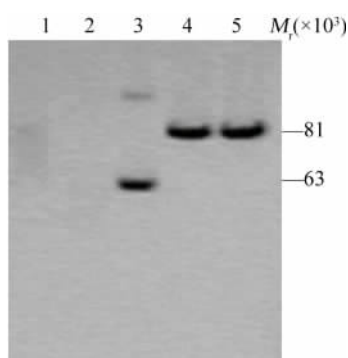


图 1 HNIL18 蛋白在 HCT-116 细胞中的表达

Fig. 1 HNIL18 protein expression in HCT-116 cells

- 1: pIRES negative control (incubated with anti-hHL18 mAb);
- 2: pIRES negative control (incubated with anti-HN mAb);
- 3: NDV positive control (incubated with anti-HN mAb);
- 4: pIRApoptinHNIL18 transfected HCT-116 cells (incubated with anti-hHL18 mAb);
- 5: pIRApoptinHNIL18 transfected HCT-116 cells (incubated with anti-HN mAb)

pIRApoptinHNIL18 重组质粒转染 HCT-116 肿瘤细胞 48 h, 光镜下观察到肿瘤细胞变圆并脱落(图 3)。正常 HCT-116 细胞经 AO/EB 染色后呈现均匀绿色;pIRApoptinHNIL18 转染细胞因发生细胞凋亡而失去膜完整性,被 AO/EB 染成橙红色(图 3)。

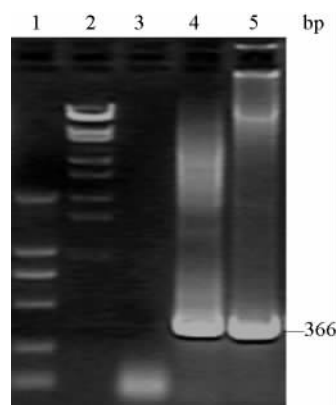


图 2 Apoptin 基因在 HCT-116 细胞中的表达

Fig. 2 Apoptin expression in HCT-116 cells

- 1: DL2000 marker; 2: λ-EcoT digested marker;
- 3: pIRES negative control; 4: pIRApoptin positive control;
- 5: pIRApoptinHNIL18 transfected HCT-116 cells

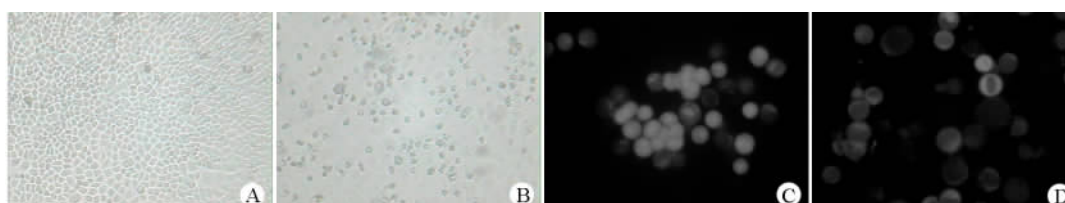


图 3 pIRApoptinHNIL18 转染对 HCT-116 细胞的影响

Fig. 3 Microscopic images of pIRApoptinHNIL18 transfected HCT-116 cells

- A: Normal HCT-116 cells (×100); B: pIRApoptinHNIL18 transfected HCT-116 cells(×100)
- C: Normal HCT-116 cells (AO/EB, ×400); D: pIRApoptin HNIL18 transfected HCT-116 cells (AO/EB, ×400)

2.4 pIRApoptinHNIL18 转染对 HCT-116 细胞唾液酸含量的影响

与正常的 HCT-116 细胞和 pIRES 转染的 HCT-116 肿瘤细胞相比, pIRApoptinHNIL18 感染能够显著降低 HCT-116 肿瘤细胞表面唾液酸含量 [(0.33 ± 0.06)、(0.25 ± 0.08)、(0.09 ± 0.03) mmol/L, (P < 0.01)], 这表明 *HN* 基因在肿瘤细胞中表达的同时, 同样具有神经氨酸酶活性(图 4)。

2.5 pIRApoptinHNIL18 转染对 HCT-116 细胞 ROS 和 ΔΨ 的影响

HCT-116 肿瘤细胞转染 pIRApoptinHNIL18 后, 其 ROS 水平较 pIRES 对照组显著上调, 由 (52.48 ± 6.09)% 升高到 (68.98 ± 7.26)% (P < 0.05)。与

HCT-116 对照组相比, pIRApoptinHNIL18 转染可显著下调 ΔΨ [由 (94.41 ± 8.17)% 下降到 (30.70 ± 8.01)% (P < 0.01)]。pIRES 对照组 ΔΨ 较 HCT-116 组低, 可能是由脂质体破坏膜结构完整性所致(图 5)。

3 讨论

恶性肿瘤是威胁人类生命的主要疾病之一, 传统的手术治疗只能去除原发病灶, 不能杜绝其再生, 而放疗化疗常伴有较严重的不良反应。随着分子生物学和基因工程技术的发展, 特别是治疗性疫苗概念的提出, 为肿瘤的基因治疗提供了新的发展空间。然而恶性肿瘤的发生、发展是多因素、多基因交互作

用的结果,单一因素的纠正难以达到预期的治疗效果。因此,多基因联合应用的治疗策略成为肿瘤基因治疗成功应用的理想选择。

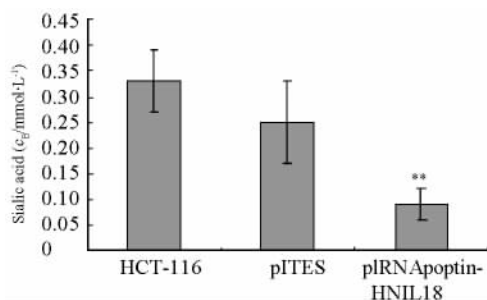


图4 pIRApoptinHNIL18 对 HCT-116 细胞唾液酸含量影响

Fig. 4 Effect of pIRApoptinHNIL18 on sialic acid contents of HCT-116

** $P < 0.01$ vs HCT-116 or pIRES; $n = 5$

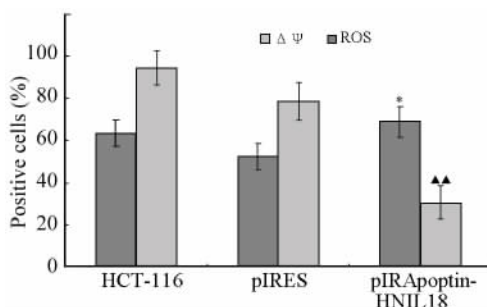


图5 pIRApoptinHNIL18 对结肠癌细胞 HCT-116 细胞的 ROS 和 $\Delta\Psi$ 的影响

Fig. 5 Effects of pIRApoptinHNIL18 on ROS and $\Delta\Psi$ in colon carcinoma cells HCT-116

* $P < 0.05$ vs pIRES; ** $P < 0.01$ vs HCT-116 or pIRES; $n = 5$

肿瘤的发生发展不仅是细胞增殖失控和细胞分化异常的结果,同时也与细胞凋亡失调有关。细胞凋亡是机体清除变异和恶变细胞的一种主动、程序化生理过程。许多刺激因子诱导细胞凋亡依赖 p53 信号转导途径,且很多肿瘤在其发生过程中常伴随 p53 突变,从而影响治疗效果。研究^[14]表明,鸡贫血病病毒的 *apoptin* 基因可有效抑制多种肿瘤,具有以非 p53 依赖性途径特异性诱导人肿瘤细胞或转化细胞发生凋亡的作用,且其凋亡诱导作用不受 *bcl-2* 的抑制。NDV 的抗肿瘤作用已众所周知,HN 蛋白是 NDV 的主要结构蛋白,以 N 末端疏水区与病毒外膜相连,不仅能够介导受体识别,还具有水解这些受体中唾液酸成分的神经氨酸酶活性。以前的研究表明,HN 蛋白在抗肿瘤免疫反应中发挥佐剂功能,

具有活化树突状细胞(DC)、巨噬细胞、自然杀伤细胞(NK)、稳定活化的 T 细胞、刺激细胞产生 IL-12 受体的 β 链等作用^[59],并且能够诱导 DC 等外周血单核细胞释放大量 IFN- α (较其他血细胞高 1 000 倍)。IL-18 具有增强 NK 和 CTL 细胞活性、促进 T 细胞增殖活化、增强 Fas 介导的细胞毒作用等多种生物学功能,另外它还具有强烈的 IFN- γ 诱生能力,是一种应用前景较好的抗肿瘤细胞因子^[10-12]。本研究通过脂质体介导法将 pIRApoptinHNIL18 导入人结肠癌细胞 HCT-116,探讨了以真核表达质粒 pIRES 为载体的 *apoptin* 基因、*HNIL18* 融合基因对 HCT-116 细胞的抑制作用。实验结果表明,体外转染真核表达质粒 pIRApoptinHNIL18 能够通过诱导细胞凋亡有效抑制 HCT-116 肿瘤细胞的生长。

线粒体功能的变化是细胞凋亡信号转导过程的中心环节。在细胞凋亡过程中,胞膜、胞质和线粒体等细胞结构中的信号分子被激活,通过参与氧化还原反应、能量代谢和 Bcl-2 家族分子表达的调控等方式激活凋亡程序。线粒体在接受上述信号分子刺激后,向胞质内释放细胞色素 C 等凋亡信号因子,通过激活 Caspase 导致细胞发生凋亡。本研究通过流式细胞术分析方法,探讨了 pIRApoptinHNIL18 对 $\Delta\Psi$ 、ROS 等线粒体凋亡途径信号转导关键控制点的影响。 $\Delta\Psi$ 降低是细胞通过线粒体途径凋亡的早期事件,随之即可出现不可逆的细胞凋亡。研究结果显示,pIRApoptinHNIL18 能够下调 HCT-116 细胞 $\Delta\Psi$,说明 pIRApoptinHNIL18 干预了线粒体的正常功能。ROS 的增加或内源性抗氧化剂的减少可导致细胞内氧化-还原作用平衡失调,对细胞凋亡有促进作用,是细胞凋亡发生的一个中心环节^[13]。本实验采用 DCFA 染色的方法检测了 pIRApoptinHNIL18 作用后细胞内 ROS 水平变化情况。研究结果显示,pIRApoptinHNIL18 进入 HCT-116 肿瘤细胞后细胞活性氧水平升高,说明 pIRApoptinHNIL18 诱导的 HCT-116 细胞凋亡与细胞内线粒体途径密切相关。结合 pIRApoptinHNIL18 对体外培养 HCT-116 细胞抑制作用研究结果,可以认为 pIRApoptinHNIL18 作用于线粒体,造成 ROS 的释放,激活细胞凋亡下游信号分子,最终通过线粒体凋亡途径诱导 HCT-116 细胞凋亡,从而实现了对 HCT-116 细胞的抑制作用。

[参考文献]

- [1] Li X, Jin N, Mi Z, et al. Antitumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing Apoptin *in vivo* and *in vitro* [J]. Int J Cancer, 2006, 119(12): 2948-2957.

- [2] Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, *et al.* Cancer-selective therapy of the future: Apoptin and its mechanism of action [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(1): 10-19.
- [3] Burek M, Maddika S, Burek CJ, *et al.* Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent [J]. *Oncogene*, 2006, 25(15): 2213-2222.
- [4] 李 霄, 金宁一, 连 海, 等. *Apoptin* 基因对人胃癌细胞 BGC-823 的抑制效应及与凋亡信号转导的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(31): 2991-2996.
- [5] 李 霄, 金宁一, 连 海, 等. 表达新城疫病毒血凝素-神经氨酸酶基因重组禽痘病毒的构建及其抑瘤作用 [J]. *科学通报*, 2006, 51(19): 2252-2257.
- [6] 李雪梅, 金宁一, 李 霄, 等. 表达新城疫病毒 HN 基因重组鸡痘病毒的构建及其抑瘤作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(2): 112-115.
- [7] 连 海, 金宁一, 李 霄, 等. 新城疫病毒 HN 基因诱导人肺癌细胞 SPC-A1 凋亡的作用机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(3): 222-227.
- [8] 孙迎春, 金宁一, 米志强, 等. 新城疫病毒 HN 基因诱导肝癌细胞 SMMC 7721 凋亡的作用机制[J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(5): 279-282.
- [9] 李 霄, 金宁一, 米志强, 等. 联合应用凋亡素基因、新城疫病毒 HN 基因及 IL-18 基因对黑色素瘤的抑制效应研究 [J]. *高技术通讯*, 2004, 14(12): 33-36.
- [10] 连 海, 金宁一, 李 霄, 等. 鸡贫血病毒 VP3 基因与人 IL-18 基因的共表达对入肝癌细胞 BEL-7402 的作用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2006, 19(3): 229-232.
- [11] Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1): 11-22.
- [12] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells[J]. *Nature*, 1995, 378(6552): 88-91.
- [13] Ko CH, Shen SC, Hsu CS, *et al.* Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: Roles of protein kinase C, cytochrome C, and caspase cascade [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(6): 913-927.
- [收稿日期] 2006 - 10 - 24 [修回日期] 2006 - 12 - 19
- [本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

钙网蛋白膜转位表明免疫原性肿瘤细胞的死亡

诱导免疫原性肿瘤细胞死亡是抗肿瘤化疗药物的目标之一,该作用可以通过免疫系统的“旁观者效应”根除对化疗药物抵抗的肿瘤细胞和肿瘤干细胞。蒽环类化疗药物(anthracyclin)在激发机体免疫原性的抗肿瘤反应方面具有显著的效应,但 DNA 损伤类化疗药物如依托泊苷(etoposide)和丝裂霉素 C(mitomycin C)则不能有效地诱导免疫原性的细胞死亡。蒽环类化疗药物是如何使机体免疫系统能够识别肿瘤细胞,继而激发机体抗肿瘤效应呢? 该研究的结果表明,蒽环类化疗药物能够快速诱导促凋亡的钙网蛋白(calreticulin, CRT)从胞质转位到胞膜,从而被树突状细胞表面的受体识别、吞噬,继而将肿瘤抗原加工、呈递给 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,激发机体的抗肿瘤免疫应答。抗体阻断或 siRNA 下调肿瘤细胞钙网蛋白的表达,能够显著抑制蒽环类化疗药物处理的肿瘤细胞被树突状细胞的吞噬作用,并抑制荷瘤小鼠体内激发的免疫原性的抗肿瘤反应;补充外源性的重组钙网蛋白,能够提高钙网蛋白阴性药物如依托泊苷和丝裂霉素 C 等处理的肿瘤细胞的免疫原性抗肿瘤效应;体内特异性清除树突状细胞,将明显降低机体的抗肿瘤效应。进一步研究表明,蒽环类化疗药物能够快速磷酸化肿瘤细胞的 eIF2 α , 抑制蛋白磷酸酶 1/GADD34 复合物的形成,能够模拟蒽环类化疗药物处理的钙网蛋白的膜转位; siRNA 下调肿瘤细胞蛋白磷酸酶 1 的表达;蛋白磷酸酶 1/GADD34 的抑制剂如互变霉素(tautomycin)、花萼海绵诱癌素(calyculin A)等能够促进钙网蛋白的膜转位。体内抗肿瘤实验表明,重组钙网蛋白或蛋白磷酸酶 1/GADD34 的抑制剂与依托泊苷和丝裂霉素 C 等非免疫原性的化疗药物联合使用,可以重建依托泊苷和丝裂霉素 C 激发的免疫原性的细胞死亡,提高它们的体内抗肿瘤作用;胸腺缺陷小鼠和 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的清除实验显示,化疗药物诱导的免疫原性抗肿瘤作用缺失,该结果进一步旁证了化疗药物的免疫原性的抗肿瘤作用。上述结果表明,钙网蛋白膜转位是决定化疗药物是否能够激发机体免疫原性的抗肿瘤效应的关键因素,为人类抗肿瘤免疫原性的化学疗法揭示了新的机制。

[刘秋燕 摘译,于益芝 审阅. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, *et al.* , *Nat Med*, 2007,13(1): 54-61.]