

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.003

· 研究快报 ·

ATF6对骨肉瘤MCA205细胞免疫原性的调控作用及其机制的初步探索

黄恩厚^{1,2,3}, 李莫寒^{1,2,3}, 李培培^{2,3}, 夏琳^{2,3}, 马瑜婷^{1,2,3} (1. 南京医科大学 肿瘤个体化医学协同创新中心, 江苏 南京 211166; 2. 中国医学科学院 系统医学研究院, 北京 100005; 3. 苏州系统医学研究所, 江苏 苏州 215123)

[摘要] **目的:**探讨活化转录因子6(ATF6)对骨肉瘤细胞MCA205免疫原性的影响,初步解析其调控机制。**方法:**利用CRISPR-Cas9技术敲除MCA205细胞的 $Atf6$ 基因,借助CCK-8实验、细胞能量代谢检测、流式细胞术、ATP检测试剂盒、干扰素刺激响应元件(ISRE)-荧光素酶报告细胞实验和qPCR法分别检测野生型(WT)和 $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞在PBS或衣霉素(Tm)处理后的活力、线粒体耗氧速率(OCR)和胞外酸化速率(ECAR)、磷脂酰丝氨酸外翻和细胞膜通透性、胞内钙离子动员、胞内外ATP浓度、IFN- α/β 分泌和干扰素刺激基因(ISG)的表达水平。在免疫系统健全的小鼠皮下接种WT或 $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞,比较两者的成瘤速度、肿瘤组织基因转录图谱、局部抗肿瘤效应T细胞活化有无差异。将WT和 $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞分别接种于 nu/nu 小鼠背部两侧皮下,或将 $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞分别接种于免疫系统健全小鼠和 $Ifnar^{-/-}$ 小鼠皮下,记录肿瘤生长曲线。分别用Tm预处理的WT和 $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞对naïve小鼠(未经免疫刺激的小鼠)进行初次免疫,使肿瘤抗原特异性T细胞发生初次活化(prime),随后收集引流淋巴结细胞并进行体外再刺激(boost),分析特异性T细胞再次活化有无差异。按照不同的效靶比,将NK细胞与染料标记的WT和 $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞共培养,流式细胞术检测细胞杀伤情况。**结果:**PBS或Tm处理后,WT和 $Atf6^{-/-}$ 骨肉瘤细胞活力和增殖、氧化磷酸化和糖酵解、离子霉素触发的胞内钙离子动员、胞内外ATP和IFN- α/β 分泌均无显著差异。Tm处理后, $Atf6^{-/-}$ 细胞死亡比例低于WT细胞($P<0.01$)。在免疫系统健全的小鼠体内, $Atf6^{-/-}$ 肿瘤的生长速度明显低于WT肿瘤($P<0.05$)。然而,在缺乏T细胞的 nu/nu 小鼠体内,两种肿瘤生长速度的差异显著缩小。与免疫系统健全的小鼠相比, $Ifnar^{-/-}$ 小鼠体内 $Atf6^{-/-}$ 肿瘤的生长速度略快($P<0.05$)。 $Atf6^{-/-}$ 肿瘤内免疫应答相关基因的表达、效应T细胞的活化均显著高于WT肿瘤($P<0.05$)。与WT MCA205细胞相比, $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞与NK细胞共培养后死亡比例更高($P<0.05$)。在Tm刺激后, $Atf6^{-/-}$ MCA205细胞比WT细胞表达更多的 $Irf3$ 和 $Irf7$,前者在prime-boost实验中可刺激T细胞分泌更多的IFN- γ 。**结论:**阻断ATF6信号通路能显著增强MCA205细胞的免疫原性,促进免疫监视,阻碍肿瘤进展。

[关键词] 骨肉瘤;MCA205细胞;未折叠蛋白反应;肿瘤免疫原性;活化转录因子6;干扰素;T细胞;NK细胞

[中图分类号] R738.1;R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)08-0714-10

A preliminary study of ATF6-mediated regulation of the immunogenicity of MCA205 osteosarcoma cells and its underlying mechanisms

HUANG Enhou^{1,2,3}, LI Mohan^{1,2,3}, LI Peipei^{2,3}, XIA Lin^{2,3}, MA Yuting^{1,2,3} (1. Collaborative Innovation Center for Cancer Personalized Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China; 2. Institute of Systems Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; 3. Suzhou Institute of Systems Medicine, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impact of activating transcription factor 6 (ATF6) on the immunogenicity of osteosarcoma cells MCA205, and to preliminarily explore the underlying regulatory mechanisms. **Methods:** The CRISPR-Cas9 technology was utilized to knock out $Atf6$ gene in MCA205 cells. By using CCK-8 assays, cell energy metabolism assays, flow cytometry, ATP detection kits, interferon-sensitive response element (ISRE)-luciferase reporter cells and qPCR, we analyzed cell viability, mitochondrial oxygen consumption rate (OCR), extracellular acidification rate (ECAR), phosphatidylserine exposure and permeabilization of cell membranes, intracellular calcium mobilization, intracellular and extracellular ATP concentration, IFN- α/β secretion, and the expression of interferon-stimulated genes (ISG) in wild-type (WT) and $Atf6^{-/-}$ MCA205 cells after PBS or tunicamycin (Tm) treatment, respectively. WT or $Atf6^{-/-}$ MCA205 cells were subcutaneously inoculated in immunocompetent mice. Tumor growth

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目资助(No. 81972701);科技部科技创新2030重大项目资助(No. 2022ZD0205700);中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(No. 2021-I2M-1-074、2022-I2M-2-004)

[作者简介] 黄恩厚(1996—),男,硕士生,主要从事细胞应激相关研究,E-mail: enhouhuang@126.com

[通信作者] 马瑜婷,E-mail: yuting_ma1984@163.com

kinetics, gene transcription profiles in tumor tissues and activation of local anti-tumor effector T cells of the two groups were compared. WT and *Atf6*^{-/-} MCA205 cells were simultaneously inoculated on two sides of *nu/nu* mice. Alternatively, *Atf6*^{-/-} MCA205 cells were inoculated subcutaneously in immunocompetent mice and *Ifnar*^{-/-} mice. Tumor growth curves were recorded. Tm-pretreated WT and *Atf6*^{-/-} MCA205 cells were used to stimulate naïve mice (without any previous immunostimulation) and prime tumor antigen-specific T cells, respectively. Cells from draining lymph nodes were then collected and boosted *in vitro*. Activation of antigen-specific T cells of the two groups were compared. At different effector-target ratios, NK cells were mixed with fluorescent dye-prelabeled WT and *Atf6*^{-/-} MCA205 cells. NK cell-based killing was detected by flow cytometry. **Results:** Upon PBS or Tm treatment, we haven't observed any significant differences between WT and *Atf6*^{-/-} tumor cells in their viability and proliferation, oxidative phosphorylation and glycolysis, ionomycin-triggered intracellular calcium mobilization, intracellular and extracellular ATP content and IFN- α/β secretion. Upon Tm treatment, the death ratio of *Atf6*^{-/-} tumor cells was significantly lower than that of WT tumor cells ($P<0.01$). In immunocompetent mice, the growth of *Atf6*^{-/-} tumors was significantly slower than that of WT tumors ($P<0.05$). However, their differences in growth kinetics were largely diminished in *nu/nu* mice. The growth of *Atf6*^{-/-} tumors in *Ifnar*^{-/-} mice was slightly faster than that in immunocompetent mice ($P<0.05$). The expression of immune response-related genes and the activation of effector T cells in *Atf6*^{-/-} tumors were significantly higher than those in WT tumors ($P<0.05$). Compared with that of WT MCA205 cells, *Atf6*^{-/-} MCA205 cells were more sensitive to NK cell-mediated cytotoxicity. Upon Tm preconditioning, *Atf6*^{-/-} MCA205 cells expressed more *Irf3* and *Irf7* and can stimulate more IFN- γ production from T cells in the prime-boost setting than WT cells. **Conclusion:** Blocking ATF6 signaling pathway can significantly enhance the immunogenicity of MCA205 cells, promote immune surveillance and delay tumor progression.

[Key words] osteosarcoma; MCA205 cell; unfolded protein response (UPR); tumor immunogenicity; activating transcription factor 6 (ATF6); interferon; T cell; NK cell

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(8): 714-723. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.003]

乳腺癌、胰腺癌、肺癌、皮肤癌、前列腺癌等多种实体肿瘤细胞中均可观察到内质网应激(ER stress, ERS)^[1],在晚期或化疗抵抗的肿瘤中尤为明显^[2]。未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)是高度保守的ERS响应机制。在UPR的3条分支通路中,活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)的研究进展相对缓慢。正常状态下,ATF6与葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)结合。当发生ERS时,大量错误折叠的蛋白可挤占结合GRP78,释放出游离的ATF6^[3]。ATF6从ER转移到高尔基体后,可被蛋白酶切割,产生含有碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)的转录因子,增强分子伴侣蛋白、折叠酶及内质网相关蛋白质降解效应分子的表达^[4-5],有利于维持蛋白质稳态和细胞存活。

ATF6通路的持续活化可帮助癌细胞抵抗ERS引发的细胞死亡^[6-8]、支持休眠癌细胞存活^[9]、促进化疗抵抗^[10]、诱导上皮细胞间质化^[11],以及增强血管新生^[12]。也有报道^[13]显示,ATF6是决定C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)表达的早期转录因子,因此也具有促凋亡活性。浸润肿瘤的髓系细胞也会发生ERS和UPR,可造成免疫抑制和免疫耐受,促进炎症,阻碍抗肿瘤免疫应答^[14-15]。条件性敲除髓系细胞的*Atf6*后,肿瘤内多核型髓源抑制性细胞的免疫抑制功能显著下降,肿瘤进展明显延缓^[16]。目前,ATF6通路对癌细胞免疫原性(即肿瘤细胞被免疫系统识别和清除的能力)的影

响尚属未知^[17]。本研究拟借助免疫健全和免疫缺陷小鼠模型,探索野生型(WT)和*Atf6*^{-/-}癌细胞的免疫原性和体内成瘤能力的差异,并初步挖掘相关调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

C57BL/6N和*nu/nu*小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号:20220107Abzz0619000267、20220107Abzz0619000765、20201209 Abzz0619000481)与B6.129S2-*Ifnar1*^{tm1Agt/Mmjax}小鼠(*Ifnar*^{-/-}, Jackson实验室)的饲养和实验均在中国医学科学院系统医学研究院/苏州系统医学研究所的SPF级实验动物中心完成,实验方案已获得苏州系统医学研究所实验动物使用与管理委员会的批准(批准号:ISM-IACUC-0072-R)。小鼠按随机数字表法随机分组,每组小鼠至少5只,年龄和性别匹配,均为雌性,6~7周龄,体质量为18~20 g。骨肉瘤细胞MCA205由法国国家健康与医学研究院Guido Kroemer实验室馈赠。表达ISRE-荧光素酶的成纤维细胞L929-ISRE由北京大学蒋争凡实验室馈赠。293FT细胞购自Thermo Fisher公司。所有细胞均培养于含有L-谷氨酰胺和HEPES的高糖DMEM培养基[BL304A购自Biosharp公司,额外添加含10%胎牛血清(FBS-12A,购自Capricorn Scientific公司)和100 U/mL的青霉素和链霉素双抗溶液(BL505A,购自Biosharp公司)]。LentiCRISPRv2

(52961)、psPAX2(12260)和pMD2.G(12259)质粒均购自Addgene公司。

细胞转染采用的FuGENE® HD Transfection Reagent (E2311)购自Promega公司,聚凝胺(polybrene, 107689)购自MERCK公司,嘌呤霉素(ant-pr)购自InvivoGen公司,细胞活力检测试剂盒CKK-8(BS350A)购自Biosharp公司,能量代谢检测试剂盒Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit (103020-100)和Cell Mito Stress Test Kit (103015-100)均购自Agilent Technologies公司,细胞死亡检测使用的PE Annexin V(640947)和DAPI(564907)分别购自BioLegend公司、BD BioScience公司,衣霉素(tunicamycin, Tm; 654380)购自Sigma-Aldrich公司。离子霉素(ionomycin; ab120116)和Rhod-4染料(ab112157)均购自Abcam公司,组织消化酶Liberase™ TL (05401020001)购自Roche公司, DNase I (260913)购自Millipore公司, IFN-γ 的ELISPOT试剂盒(551083)和ELISA试剂盒(430801)分别购自BD Bioscience和BioLegend公司, Dual-Luciferase® Reporter试剂盒(E1960)、胞内ATP检测试剂盒(G7571)均购自Promega公司,胞外ATP检测试剂盒(FLAA)购自Sigma-Aldrich公司,组织和细胞总RNA提取试剂盒(DP419)购自TIANGEN公司,逆转录试剂盒(RR047A)和基于SYBR Green的qPCR试剂盒(RR820A)均购自TaKaRa公司,CD90.2抗体(105310)购自BioLegend公司,Low-Tox®-M兔补体(CI3051)购自Cedarlane公司,IL-2(5 000 U/mL)购自江苏四环生物制药公司,荧光染料eFlour670(65-0840-85)购自eBioscience公司。

1.2 CRISPR-Cas9敲除MCA205细胞的*Atf6*基因

靶向*Atf6*基因的gRNA序列为5'-TCGACGTTGTTTGCTGAACT-3',合成正义和反义寡核苷酸,退火形成双链DNA片段,连接至线性化的LentiCRISPRv2载体。上述gRNA载体质粒、包装质粒psPAX2和pMD2.G按照21:15:6的比例共同转染293FT细胞。48 h后,收集病毒上清液并添加4 μg/mL聚凝胺后感染MCA205细胞。感染后48 h,用4 μg/mL嘌呤霉素筛选5 d。从存活的细胞中分选单克隆并逐一测序鉴定。

1.3 CCK-8法检测*Atf6*缺失对MCA205细胞活力的影响

将WT或*Atf6*^{-/-}MCA205细胞接种在96孔板中(每孔 2×10^3 个细胞、100 μL培养基),用PBS或12 μmol/L的Tm处理细胞,在指定时间点向培养基中加入CCK-8试剂(10 μL),借助SpectraMax® i3x多功能微孔读板仪检测450 nm和600 nm处的光密度

(D)值,绘制细胞增殖或死亡曲线。

1.4 细胞能量代谢仪检测*Atf6*缺失对MCA205细胞OCR和ECAR的影响

在XF-24板中接种细胞(5×10^4 个/孔)并培养过夜,用12 μmol/L的Tm预处理细胞8 h,检测前将培养基更换为Seahorse XF基础培养基,37 °C培养1 h。借助Seahorse XFe24分析仪,按照试剂盒说明,依次注射10 mmol/L葡萄糖(GLU)、1 μmol/L寡霉素(Oligo)和100 mmol/L的2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)后检测细胞ECAR。依次注射1.5 μmol/L寡霉素,1 μmol/L线粒体氧化磷酸化解偶联剂(carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine, FCCP)和0.5 μmol/L鱼藤酮/抗霉素(Rot/AA)后检测细胞OCR。检测完成后立即消化获取每孔细胞,严格计数后用于数据的归一化处理。

1.5 流式细胞术检测*Atf6*缺失对MCA205细胞死亡的影响

在24孔板中接种WT或*Atf6*^{-/-}MCA205细胞(1×10^5 个/孔)。待细胞汇合度达到70%~80%时,用PBS或12 μmol/L的Tm处理细胞16 h,Annexin V和DAPI染色后用流式细胞仪(BD LSRFortessa™)分析ERS诱导的细胞死亡。

NK细胞体外培养与杀伤检测:收集新鲜骨髓细胞,借助红细胞裂解液、CD90.2抗体和Low-Tox®-M兔补体去除红细胞和T细胞。余下的细胞在含有5 000 U/mL IL-2和10% FBSR的PMI1640培养基中培养7 d,每天半量更换培养基。如此获得的NK细胞分别与eFlour670预染的WT或*Atf6*^{-/-}MCA205细胞按照不同的效靶比混合,共培养4 h后借助Annexin V和DAPI染色检测肿瘤细胞死亡。流式检测结果用FlowJo软件分析。

1.6 构建MCA205细胞小鼠移植瘤模型

在C57BL/6N、*nu/nu*或*Ifnar*^{-/-}小鼠背部两侧皮下标注部位同时分别注射 1×10^6 个WT或*Atf6*^{-/-}MCA205细胞,每隔2~3 d测量并记录肿瘤的最大直径及其垂直方向的肿瘤直径,用两者的乘积代表肿瘤大小,绘制生长曲线。

1.7 移植瘤组织及肿瘤细胞的基因转录水平分析

植瘤后7 d剥离和收集肿瘤组织,获取PBS或Tm(12 μmol/L)处理16 h的肿瘤细胞,分别提取样本总RNA,NanoDrop™2000分光光度计确定其浓度和纯度。肿瘤转录组测序委托苏州金唯智生物科技有限公司,由Illumina HiSeq X Ten平台完成。借助R语言程序包(DESeq2、FactoMineR、ComplexHeatmap和EnhancedVolcano)分析基因表达,绘制主成分分析、热图和火山图。*Atf6*^{-/-}较WT肿瘤组织中显著上调基

因的GO富集分析由Metascape在线工具完成。肿瘤细胞 mRNA 被逆转录为 cDNA 后,可借助如下引物(表1)对特定基因转录水平进行PCR检测。

表1 qPCR所用引物序列

基因	正向引物序列	反向引物序列
<i>Ppia</i>	GGTCCTGGCATCTTGTC	ACCACATGCTTGCCATCC
<i>Ifnb1</i>	CCTGGAGCAGCTGAATGGAA	TCTTGATGGCAAAGGCAGT
<i>Irf3</i>	TCGTACATCTGGGTGCCT	GCCATCAAATAACTTCGGTA
<i>Irf7</i>	CCCAAGGGGCCTTATTGCA	CTCCGTCTACACAGGCAGTC
<i>Cxcl10</i>	AAAGGTCTAAAAGGGCTCC	CCATCCACTGGGTAAAGG

1.8 ELISPOT 及 ELISA 实验检测 *Atf6* 缺失对效应 T 细胞活化的影响

小鼠皮下接种癌细胞 7 d 后,收集肿瘤组织并剪碎,用 Liberase TL (0.4 Wünsch units /mL)和 DNase I (200 U/mL)消化 30 min, 70 μm 滤器滤过后制备单细胞悬液。在预先包被了 IFN-γ 捕获抗体的多孔滤膜板中分配细胞悬液(1×10⁶个/孔),培养 16 h,反复清洗后,借助 IFN-γ 检测抗体、辣根过氧化物酶(HRP)和显色底物,依托 CTL-Immunospot S6 酶联免疫斑点分析仪对肿瘤内分泌 IFN-γ 的细胞进行定量分析。将 Tm 预处理的 WT 或 *Atf6*^{-/-}MCA205 细胞注射到小鼠后足掌皮下,7 d 后收集腭窝(引流)淋巴结制备单细胞悬液,上述细胞(1×10⁶个)与 Tm 预处理的 WT 型 MCA205 细胞(2×10⁴个)共培养 72 h,收集上清液并用 ELISA 试剂盒检测 IFN-γ 丰度。

1.9 流式细胞术检测 *Atf6* 缺失对胞内钙离子动员的影响

将 WT 和 *Atf6*^{-/-} MCA205 细胞接种于黑色光学底透微孔板(2×10⁴个/孔),PBS 或 Tm(12 μmol/L)处理 16 h 后,用不含 Ca²⁺的 HBSS 缓冲液制备 Rhod-4 染料溶液并与待测细胞混合,室温下放置 1 h。借助 SpectraMax[®] i3x(激发波长 540 nm,发射波长 590 nm),先记录本底信号 30 s,加入离子霉素(10 μmol/L)刺激后每 5 s 收集一次信号,绘制钙离子动员曲线。

1.10 化学发光法检测 *Atf6* 缺失对胞内外 ATP 浓度的影响

Tm 处理 WT 或 *Atf6*^{-/-}MCA205 细胞 16 h,收集细胞上清液,梯度稀释 ATP 标准品,将 50 μL 细胞上清液、标准品转移到全白 96 孔板,与等体积的检测工作液混合后立即用 SpectraMax[®] L 定量检测化学发光强度,计算胞外 ATP 浓度。为检测胞内 ATP 浓度,保留板孔底部细胞及 100 μL 细胞上清液,加入等体积检测工作液,室温振荡 10 min,吸取 100 μL 混合液转移至全白 96 孔板,用 SpectraMax[®] L 完成定量分析。

1.11 ISRE-荧光素酶报告细胞实验检测 *Atf6* 缺失对 IFNα/β 分泌的影响

将 L929-ISRE 细胞接种于 96 孔板中(5×10⁴个/孔)过夜,加入 Tm 预处理的 WT 或 *Atf6*^{-/-}MCA205 细胞(1×10⁵个/孔),共培养 4 h 后弃上清液,加入 80 μL 裂解液充分震荡 30 min,取其中 50 μL,采用 Dual-Luciferase[®] Reporter 试剂盒(Promega, E1960)由 SpectraMax[®] L 测定 IFNα/β 分泌水平。

1.12 WB 检测 *Atf6* 缺失对肿瘤内死亡相关通路活化的影响

用含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(A32959,购自 Thermo Fisher Scientific 公司)的裂解液(P0013,购自 Beyotime 公司)提取 WT 和 *Atf6*^{-/-}MCA205 肿瘤组织的总蛋白,与上样缓冲液混合后煮沸变性。用 12.5% SDS-PAGE 分离蛋白样本,将蛋白印记电泳条带转移至硝酸纤维素(NC)膜,与如下抗体(1:1 000 稀释)4 °C 反应过夜:GSDMD(ab209845)和 GSDME(ab21519,购于 Abcam 公司)、Caspase3(14220)和 cleaved caspase3 抗体(9661,购自 Cell Signaling Technology 公司)。β-actin(HRP-60008,购自 Proteintech 公司)用作内参对照。之后,NC 膜与 HRP 标记的二抗室温反应 2 h,反复洗涤后用 Amersham[™] ECL[™]Prime 试剂(RPN2232,GE 公司)在 ChemiDoc[™] 成像系统(Bio-Rad 公司)中进行半定量分析。

1.13 ATF6 基因表达与肿瘤临床预后的相关性分析

借助 TCGA 数据库,分析 ATF6 表达水平与多种癌症患者总体生存率的关联,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,计算风险比(HR)、95% 置信区间(CI)和 Log-rank 检验 P 值。

1.14 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据作图和统计学分析。实验至少有 3 个平行重复,所有实验至少独立重复 2 次,计量数据以平均值±标准误(SEM)来表示。对于体内成瘤实验,首先计算每只小鼠肿瘤

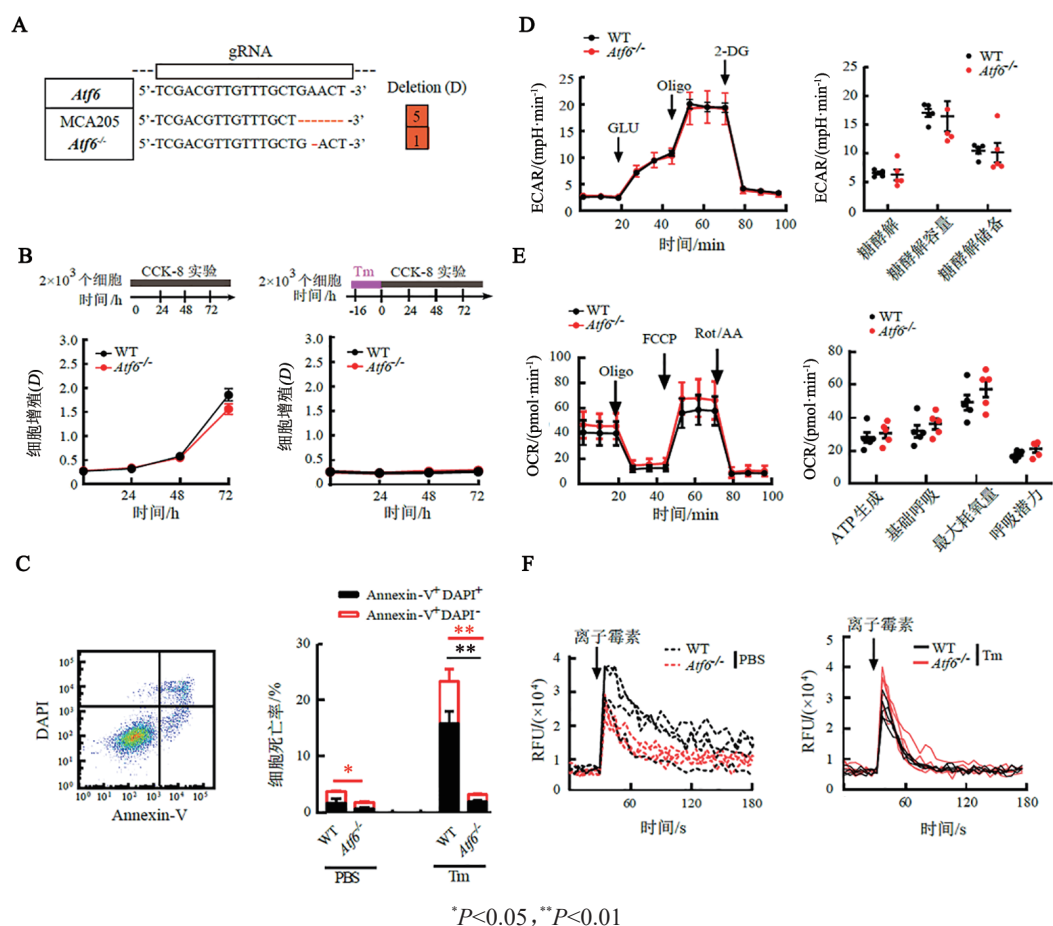
生长曲线下面积(AUC),之后分析不同组别小鼠AUC间的差异。采用Log-rank检验分析不同组患者Kaplan-Meier生存曲线的差异。其他数据均采用双尾非参数Mann-Whitney *U*检验。 $P<0.05$ 则表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Atf6* 缺失对MCA205细胞生物学特性的影响

借助CRISPR-Cas9技术对MCA205骨肉瘤细胞的*Atf6*进行基因编辑,通过多轮DNA测序筛选出基因序列的缺失的细胞单克隆(图1A)。CCK-8法检测结果(图1B)显示,WT和*Atf6*^{-/-}细胞在体外的活力和增殖速度相当;Tm预处理16 h,两种细胞的活力均受到明显抑制,且撤药后两者的活力均无法恢复。流

式细胞术分析结果(图1C)显示,Tm处理后,*Atf6*^{-/-}细胞死亡比例低于WT细胞($P<0.01$)。细胞能量代谢分析结果(图1D、E)显示,Tm预处理后,WT和*Atf6*^{-/-}细胞的糖酵解(用ECAR表征)和氧化磷酸化(用OCR表征)水平没有明显差异。内质网Ca²⁺动员是高度灵敏的ERS标志物,且与细胞死亡密切相关^[18-19],可借助Rhod-4对其进行实时监测。本研究发现,对经PBS及Tm预处理的肿瘤细胞,离子霉素可快速诱导其胞内Ca²⁺动员,之后逐步恢复稳态,而上述过程不受*Atf6*缺失的影响(图1F)。上述结果提示,*Atf6*缺失不影响PBS和Tm处理后肿瘤细胞的活力和增殖、能量代谢、以及离子霉素引发的内质网Ca²⁺动员,但可降低Tm诱导的细胞死亡。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

A:DNA测序验证CRISPR-Cas9技术对*Atf6*基因的编辑效果;B-F:WT和*Atf6*^{-/-}细胞分别用PBS或Tm处理,借助CCK-8试剂盒检测细胞增殖和活力(B),借助Annexin-V和DAPI染色和流式细胞术分析细胞死亡(C),借助ECAR和OCR检测细胞能量代谢(D、E),借助Rhod-4探针和微孔板读板仪检测离子霉素引发的细胞内钙动员(F)

图1 *Atf6*对肿瘤细胞活力、增殖、死亡、能量代谢和钙动员的影响

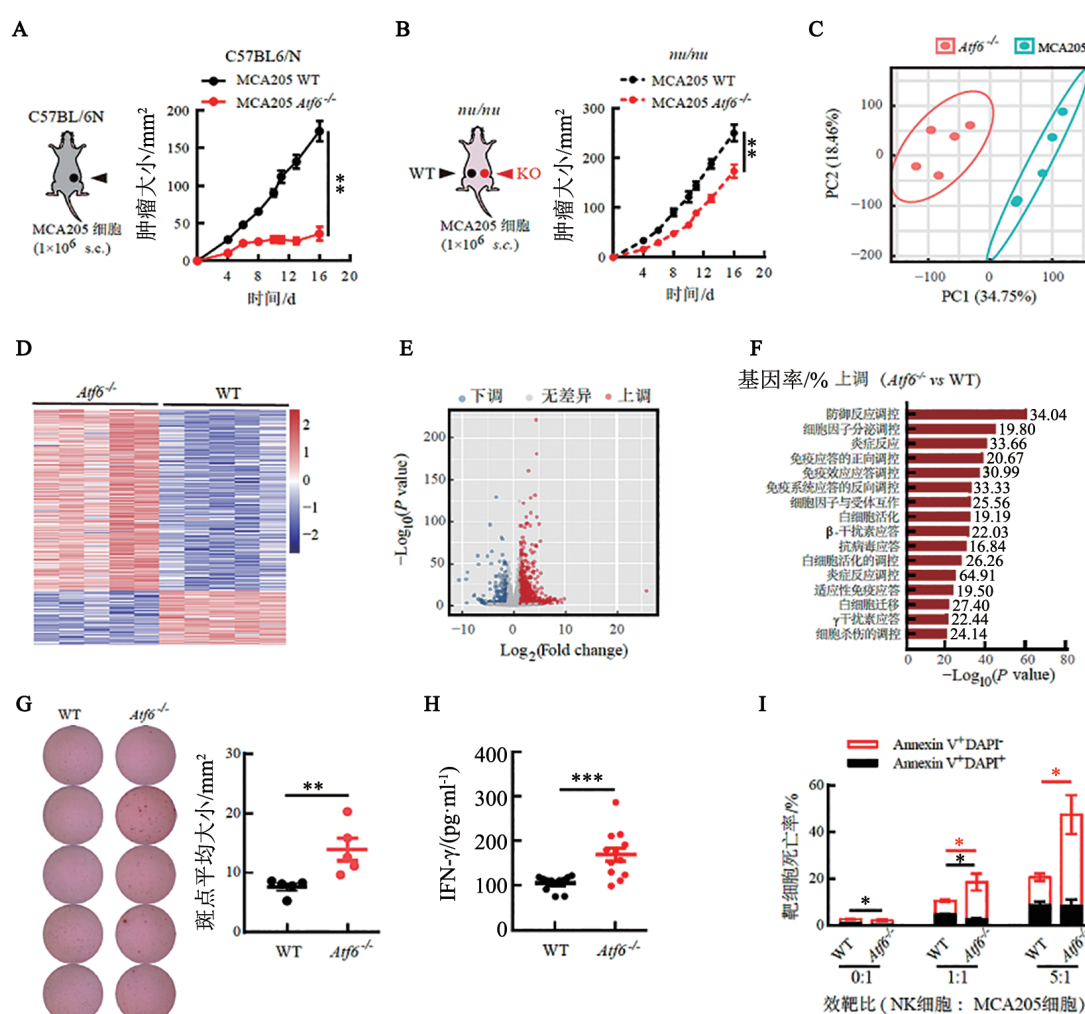
2.2 *Atf6* 缺失可增强MCA205骨肉瘤的免疫原性

在免疫健全的C57BL/6N小鼠皮下接种WT或*Atf6*^{-/-}骨肉瘤细胞,可观察到WT肿瘤迅速生长,而*Atf6*^{-/-}肿瘤的生长则明显滞后(图2A)。出乎意料的

是,在免疫缺陷的nu/nu小鼠(T细胞发育受阻)背部两侧皮下同时接种这两种癌细胞时,虽然*Atf6*^{-/-}肿瘤的生长仍略慢于WT肿瘤,但是两者均可快速生长(图2B)。上述现象提示,免疫健全小鼠体内*Atf6*^{-/-}肿

瘤的滞长与T细胞激活密切相关。C57BL/6N小鼠接种瘤细胞后第7天, WT与*Atf6*^{-/-}肿瘤大小刚刚显示出差异, 收集此时的肿瘤组织并进行转录组测序, 随后进行主成分分析并绘制差异基因热图和火山图, 结果都显示, 两者的基因转录谱图存在明显差异(图2C、E)。GO富集分析结果(图2F)提示, 与WT肿瘤相比, *Atf6*^{-/-}肿瘤微环境中免疫防御应答、细胞因子分泌、炎症反应、免疫细胞活化和迁移、I型和II型IFN应答、细胞杀伤相关的基因表达均显著增强。ELISPOT实验结果(图2G)显示, 与WT肿瘤相比, *Atf6*^{-/-}肿瘤内分泌IFN- γ 的抗肿瘤效应细胞显著增多($P<0.01$)。将经Tm预处理的WT与*Atf6*^{-/-}癌细胞注射到C57BL/6N小鼠后足掌皮下, 可刺激肿瘤抗原特异性T细胞, 使其在引流淋巴结(drain lymph

node, DLN)中初次活化(prime)。收集上述DLN并制备混合细胞悬液, 用Tm预处理的WT癌细胞在体外再次刺激(boost), 可诱导肿瘤抗原特异性T细胞的再次活化并分泌IFN- γ 。检测结果(图2H)显示, 与对照组相比, 被Tm预处理的*Atf6*^{-/-}癌细胞初次活化过的小鼠, 其DLN内T细胞经体外再次刺激后, IFN- γ 分泌水平显著升高($P<0.001$)。在体外按照1:1和5:1的效靶比将NK细胞分别与WT与*Atf6*^{-/-}癌细胞共培养, 结果(图2I)显示, *Atf6*^{-/-}癌细胞比WT癌细胞更易被NK细胞杀伤(均 $P<0.05$)。上述结果提示, *Atf6*缺失可增强肿瘤的免疫原性, 促进效应T细胞和NK细胞的免疫监视功能, 塑造出抗肿瘤的免疫微环境。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

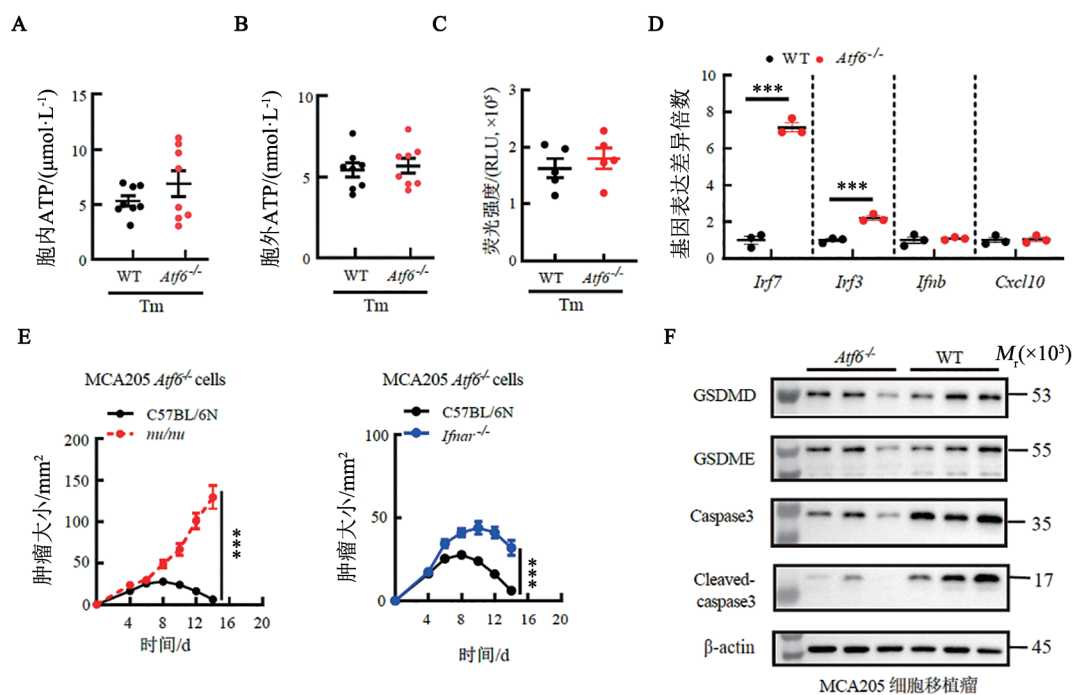
A-B: WT和*Atf6*^{-/-}肿瘤细胞在免疫健全的C57BL/6N小鼠(A)或免疫缺陷的*nu/nu*小鼠(B)体内的生长曲线; C-F: 基于RNAseq对WT和*Atf6*^{-/-}肿瘤组织绘制转录组图谱, 分别进行了主成分分析(C)、差异基因的热图(D)和火山图(E)分析; *Atf6*^{-/-}较WT肿瘤显著上调的基因的GO富集分析(F); G: ELISPOT检测肿瘤组织内分泌IFN- γ 的效应细胞; H: Prime-boost实验中, 借助ELISA检测DLN中抗原特异性T细胞分泌IFN- γ 的水平; I: NK细胞杀伤WT或*Atf6*^{-/-}肿瘤细胞能力的比较

图2 *Atf6*缺失可增强MCA205细胞移植瘤的免疫原性

2.3 影响 *Atf6*^{-/-} MCA205 细胞免疫原性的可能因素

细胞应激后释放的“危险信号分子”ATP和IFN- α/β 是决定肿瘤免疫原性的重要因素^[20-21]。Tm刺激16 h可诱导细胞发生ERS。本研究分别检测了WT与 *Atf6*^{-/-} MCA205 细胞的胞内ATP、释放至胞外的ATP及IFN- α/β 的分泌水平,均未发现明显差异(图3A~C)。因此, *Atf6* 缺陷并不影响MCA205细胞在ERS状态下释放ATP和IFN- α/β 。基因表达分析结果(图3D)显示, Tm刺激下 *Irf7*和 *Irf3* 转录本的丰度在 *Atf6*^{-/-} 细胞内显著增加(均 $P < 0.001$)。 *Irf7*和 *Irf3* 是决定IFN- α/β 及诸多ISG表达的关键转录因子基因。 *Irf3* 在IFN- α/β 转录的启动阶段发挥了核心作用,但其蛋白可被快速降解。IFN- α/β 与其受体IFNAR结合后,可促进 *Irf7* 的转录,进一步增强IFN- α/β 的表达。因此, *Irf7* 密切参与了IFN- α/β 的正反馈调控^[22]。本研究提示,ATF6可抑制ERS触发的 *Irf7*和 *Irf3* 表达。Tm刺激后,虽然两种细胞内 *Ifnb*和 *Cxcl10* 转录本的丰度相当(图3D),但是 *Irf7*和 *Irf3* 在 *Atf6*^{-/-} 癌细胞内的上调仍然可能促进IFN- α 和多种ISG的表达,而这可能会增强肿瘤细胞的免疫原性。此外,本研

究还探索了宿主因素对 *Atf6*^{-/-} 肿瘤免疫原性的影响,重点关注抗肿瘤的效应T细胞和IFNAR信号通路^[23-25]。虽然ATF6缺陷型肿瘤在免疫健全小鼠体内会出现滞长,甚至自发消退,但其在缺乏T细胞的 *nu/nu* 小鼠体内可快速生长。接种于 *Ifnar*^{-/-} 小鼠皮下的 *Atf6*^{-/-} 肿瘤仍然会出现滞长和自发消退,但与接种在WT小鼠皮下的 *Atf6*^{-/-} 肿瘤相比,其开始消退的“拐点”时间会明显推迟,肿瘤生长的峰值也会更大(图3E)。上述结果提示:机体免疫系统监视和清除 *Atf6*^{-/-} 肿瘤的过程中,T细胞是关键效应细胞,而宿主的IFNAR信号通路也发挥了一定作用。本研究还借助WB法,比较了WT和 *Atf6*^{-/-} 肿瘤组织内细胞死亡相关分子的表达水平和活化程度。 *Atf6*^{-/-} 肿瘤组织中的caspase3总量、切割后活化的caspase3的丰度都明显低于WT肿瘤。作为介导焦亡的关键分子,焦孔素GSDME和GSDMD在WT和 *Atf6*^{-/-} 肿瘤组织中的表达水平相当,且两者N端片段的切割均未能检测到(图3F)。上述结果提示, *Atf6* 缺失肿瘤的滞长和消退并非由于凋亡或焦亡通路的增强,更可能是因为抗肿瘤免疫应答的激活。



*** $P < 0.001$

A-D: Tm刺激16 h后,分别检测WT和 *Atf6*^{-/-} 肿瘤细胞的胞内ATP(A)、胞外释放ATP(B)、分泌IFN- α/β (C)和若干IFN应答相关基因的表达(D);E:比较 *Atf6*^{-/-} 肿瘤细胞在C57BL/6N小鼠、*nu/nu*小鼠、*Ifnar*^{-/-}小鼠皮下的生长曲线;

F: WT和 *Atf6*^{-/-} 肿瘤组织内凋亡、焦亡相关蛋白的表达和活化水平比较

图3 *Atf6*^{-/-} MCA205细胞免疫原性的可能影响因素

2.4 ATF6低表达的肿瘤患者预后更好

为了验证小鼠肿瘤模型中上述发现是否具有临床相关性,本研究对肿瘤公共数据库进行了挖掘。

在肺鳞癌(495例患者)、头颈鳞癌(363例患者)、宫颈鳞癌(304例患者)、膀胱癌(404例患者)队列中,均发现ATF6表达低患者的总体生存期更长(图4)。

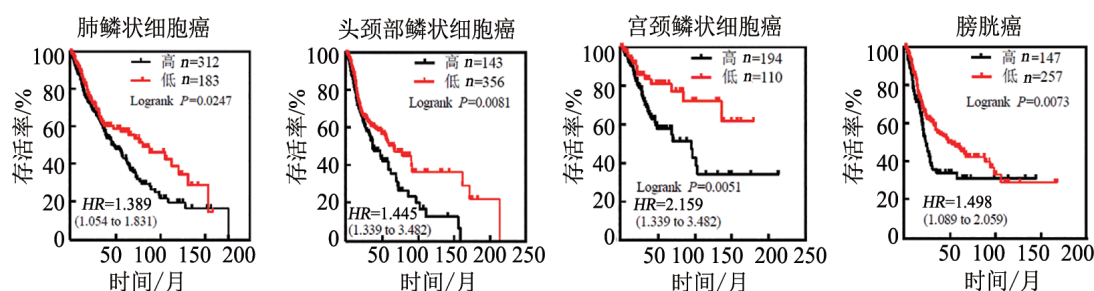


图4 肿瘤ATF6表达水平的临床预后价值分析

3 讨论

肿瘤发生、发展和治疗过程中,多种不利的微环境因素可造成癌细胞的稳态失衡、激活自噬、UPR、氧化应激等高度保守的细胞应激反应,通过降解自身组分产生营养物质、减缓转录翻译、降解错误折叠蛋白和抑制脂质过氧化物生成等,缓解癌细胞的生存压力,帮助其存活、扩增及产生治疗抵抗。当不利刺激因素持续存在,或应激反应不足以减弱或逆转细胞损伤时,凋亡、程序性坏死、焦亡和铁死亡等信号通路可被激活,启动细胞的死亡程序^[26]。

近年来,随着“免疫原性细胞死亡”(immunogenic cell death, ICD)概念的提出,细胞应激和死亡通路对肿瘤免疫原性的影响成为新兴的研究热点。多项研究证实:放化疗导致肿瘤细胞自噬、UPR、凋亡、程序性坏死,上述信号通路的激活可触发危险信号分子的释放,对增强肿瘤细胞的免疫原性至关重要。其中,ATG5、ATG7、caspase、RIP3或MLKL的缺失或阻断可抑制ATP的释放,RIP3或MLKL的缺失可降低HMGB1的释放,均不利于抗肿瘤免疫的启动^[27]。化疗还可促进STAT3的磷酸化,该信号通路的活化不仅可以促进癌细胞的存活,还能抑制其I型干扰素应答,阻碍抗肿瘤免疫的活化^[28]。

UPR对肿瘤细胞免疫原性的影响仍然存在较大的认知空白。化疗可激活癌细胞的蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase-like ER-resident kinase, PERK)通路,该UPR分支可促进钙网蛋白(calreticulin, CALR)由ER转移到细胞膜外表面,增强癌细胞的免疫原性,帮助DC摄取和提呈肿瘤抗原,激活效应T细胞^[29]。本研究重点关注ATF6信号通路对肿瘤细胞免疫原性的影响,及其对机体自发(并非治疗引发)的免疫监视功能的调控作用。虽然敲除Atf6不影响MCA205细胞在体外的增殖和能量代谢,但是Atf6^{-/-}MCA205细胞在免疫健全小鼠体内的成瘤速度显著降低,可出现滞长甚至自发消退。Atf6^{-/-}肿瘤MCA205细胞在Ifnar^{-/-}小鼠体内仍然会出

现滞长和自发消退,但其生长峰值和彻底消退所需时间均高于其在免疫健全小鼠内的对应参数。在nu/nu小鼠体内,WT和Atf6^{-/-}MCA205细胞均可快速成瘤,两者生长的差异显著降低。值得注意的是,与WT肿瘤相比,Atf6^{-/-}移植瘤组织内凋亡、焦亡通路的活化并未增强,甚至还有一定程度的减弱。上述现象提示,Atf6^{-/-}MCA205细胞体内成瘤减缓并非依赖于凋亡或焦亡通路的活化,其主要原因是效应T细胞的激活,肿瘤宿主的IFNAR信号通路也发挥了一定的促进作用。肿瘤组织的转录谱图分析提示,ATF6的缺失引发了肿瘤免疫微环境的重塑,IFN-α/β相关应答、IFN-γ通路、NK细胞杀伤力、免疫细胞的活化和迁移均显著增强。ELISPOT实验也证实Atf6^{-/-}肿瘤微环境中分泌IFN-γ的效应T细胞的丰度明显提升。

借助Tm预处理模拟不利微环境因素的刺激,可观察到I型IFN应答的关键转录因子Irf7和Irf3的表达在Atf6^{-/-}MCA205细胞中显著高于WT细胞。诱导肿瘤细胞ERS后用于prime-boost实验,发现Atf6缺失可促进肿瘤抗原特异性T细胞的活化,增强其IFN-γ分泌。此外,Atf6^{-/-}MCA205细胞对NK细胞的杀伤更敏感。上述现象表明,ATF6是限制肿瘤细胞免疫原性的重要瓶颈。具体的分子机制有待在后续研究中深入挖掘。ATF6是分子伴侣、折叠酶、ERAD相关基因表达的重要调控因子^[5],其缺失可能加剧蛋白错误折叠,引发新生抗原表位的暴露。此外,IFN-α/β和IFN-γ可促进I类和II类MHC分子的表达^[30-31],增强抗原的交叉提呈^[32],有助于增强肿瘤抗原的提呈。在黑色素瘤中,IRE1α-XBP1和PERK通路的活化可能会抑制MICA、MICB、B7H6等应激诱导配体分子的表达,从而抑制NK细胞的杀伤功能。Atf6是否也能发挥类似的调控作用值得进一步探索。总之,敲除Atf6不仅能降低肿瘤细胞抵御不利环境的存活能力,还能增强其免疫原性,通过激活抗肿瘤免疫应答有效预防和治疗肿瘤。对于多个癌种而言,ATF6低表达的患者,其总体生存时间更长。因此,针对该靶点开发抑制剂分子具有较好的应用前景。

[参考文献]

- [1] WANG M, KAUFMAN R J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 581-597. DOI:10.1038/nrc3800.
- [2] CUBILLOS-RUIZ J R, BETTIGOLE S E, GLIMCHER L H. Tumorigenic and immunosuppressive effects of endoplasmic reticulum stress in cancer[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 692-706. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.004.
- [3] RUTKOWSKI D T, KAUFMAN R J. A trip to the ER: coping with stress[J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(1): 20-28. DOI: 10.1016/j.tcb.2003.11.001.
- [4] HETZ C, ZHANG K Z, KAUFMAN R J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 421-438. DOI:10.1038/s41580-020-0250-z.
- [5] ADACHI Y, YAMAMOTO K, OKADA T, *et al.* ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic Reticulum[J]. *Cell Struct Funct*, 2008, 33(1): 75-89. DOI:10.1247/csf.07044.
- [6] TAY K H, LUAN Q, CROFT A, *et al.* Sustained IRE1 and ATF6 signaling is important for survival of melanoma cells undergoing ER stress[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(2): 287-294. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.008.
- [7] SICARI D, FANTUZ M, BELLAZZO A, *et al.* Mutant p53 improves cancer cells' resistance to endoplasmic reticulum stress by sustaining activation of the UPR regulator ATF6[J]. *Oncogene*, 2019, 38(34): 6184-6195. DOI:10.1038/s41388-019-0878-3.
- [8] LIU C Y, HSU C C, HUANG T T, *et al.* ER stress-related ATF6 upregulates CIP2A and contributes to poor prognosis of colon cancer[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(10): 1706-1717. DOI:10.1002/1878-0261.12365.
- [9] SCHEWE D M, AGUIRRE-GHISO J A. ATF6 α -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10519-10524. DOI: 10.1073/pnas.0800939105.
- [10] BENEDETTI R, ROMEO M A, ARENA A, *et al.* ATF6 prevents DNA damage and cell death in colon cancer cells undergoing ER stress[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 295[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35752616/>. DOI: 10.1038/s41420-022-01085-3.
- [11] LIU F, CHANG L, HU J L. Activating transcription factor 6 regulated cell growth, migration and inhibited cell apoptosis and autophagy *via* MAPK pathway in cervical cancer[J/OL]. *J Reprod Immunol*, 2020, 139: 103120[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32234634/>. DOI:10.1016/j.jri.2020.103120.
- [12] CHO J, MIN H Y, PEI H L, *et al.* The ATF6-EGF pathway mediates the awakening of slow-cycling chemoresistant cells and tumor recurrence by stimulating tumor angiogenesis[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(7): 1772[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32630838/>. DOI:10.3390/cancers12071772.
- [13] YANG H, NIEMEIJER M, VAN DE WATER B, *et al.* ATF6 is a critical determinant of CHOP dynamics during the unfolded protein response [J/OL]. *iScience*, 2020, 23(2): 100860[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32058971/>. DOI:10.1016/j.isci.2020.100860.
- [14] MOHAMED E, SIERRA R A, TRILLO-TINOCO J, *et al.* The unfolded protein response mediator PERK governs myeloid cell-driven immunosuppression in tumors through inhibition of STING signaling[J]. *Immunity*, 2020, 52(4): 668-682. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.004.
- [15] CUBILLOS-RUIZ J R, MOHAMED E, RODRIGUEZ P C. Unfolding anti-tumor immunity: ER stress responses sculpt tolerogenic myeloid cells in cancer[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5: 5[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28105371/>. DOI:10.1186/s40425-016-0203-4.
- [16] TCYGANOV E N, HANABUCHI S, HASHIMOTO A, *et al.* Distinct mechanisms govern populations of myeloid-derived suppressor cells in chronic viral infection and cancer[J/OL]. *J Clin Invest*, 2021, 131(16): e145971[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34228641/>. DOI:10.1172/JCI145971.
- [17] SALVAGNO C, MANDULA J K, RODRIGUEZ P C, *et al.* Decoding endoplasmic reticulum stress signals in cancer cells and antitumor immunity[J/OL]. *Trends Cancer*, 2022, Jul 8[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35817701/>. DOI: 10.1016/j.trecan.2022.06.006.
- [18] LEBEAU P F, PLATKO K, BYUN J H, *et al.* Calcium as a reliable marker for the quantitative assessment of endoplasmic reticulum stress in live cells[J/OL]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100779[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34000299/>. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100779.
- [19] CARRERAS-SUREDA A, PIHÁN P, HETZ C. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses[J]. *Cell Calcium*, 2018, 70: 24-31. DOI:10.1016/j.ceca.2017.08.004.
- [20] MA Y T, ADJEMIAN S, MATTAROLLO S R, *et al.* Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells[J]. *Immunity*, 2013, 38(4): 729-741. DOI:10.1016/j.immuni.2013.03.003.
- [21] SISTIGU A, YAMAZAKI T, VACCHELLI E, *et al.* Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy[J]. *Nat Med*, 2014, 20(11): 1301-1309. DOI:10.1038/nm.3708.
- [22] NING S, PAGANO J S, BARBER G N. IRF7: activation, regulation, modification and function[J]. *Genes Immun*, 2011, 12(6): 399-414. DOI:10.1038/gene.2011.21.
- [23] PICAUD S, BARDOT B, DE MAEYER E, *et al.* Enhanced tumor development in mice lacking a functional type I interferon receptor [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22(4): 457-462. DOI:10.1089/10799900252952244.
- [24] LU C W, KLEMENT J D, IBRAHIM M L, *et al.* Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 157[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31228946/>. DOI:10.1186/s40425-019-0635-8.
- [25] KROEMER G, SENOVILLA L, GALLUZZI L, *et al.* Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer[J]. *Nat Med*, 2015, 21(10): 1128-1138. DOI:10.1038/nm.3944.
- [26] FULDA S, GORMAN A M, HORI O, *et al.* Cellular stress responses: cell survival and cell death[J/OL]. *Int J Cell Biol*, 2010, 2010: 214074 [2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20182529/>. DOI:10.1155/2010/214074.
- [27] MA Y T, PITT J M, LI Q Q, *et al.* The renaissance of anti-neoplastic

- immunity from tumor cell demise[J]. Immunol Rev, 2017, 280(1): 194-206. DOI:10.1111/imr.12586.
- [28] YANG H, YAMAZAKI T, PIETROCOLA F, *et al.* STAT3 inhibition enhances the therapeutic efficacy of immunogenic chemotherapy by stimulating type 1 interferon production by cancer cells[J]. Cancer Res, 2015, 75(18): 3812-3822. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1122.
- [29] OBEID M, TESNIERE A, GHIRINGHELLI F, *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death[J]. Nat Med, 2007, 13(1): 54-61. DOI:10.1038/nm1523.
- [30] KALBASI A, TARIVERANMOSHABAD M, HAKIMI K, *et al.* Uncoupling interferon signaling and antigen presentation to overcome immunotherapy resistance due to JAK1 loss in melanoma [J/OL]. Sci Transl Med, 2020, 12(565): eabb0152[2022-08-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33055240/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.abb0152.
- [31] PROPPER D J, CHAO D, BRAYBROOKE J P, *et al.* Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 84-92.
- [32] DUONG E, FESSENDEN T B, LUTZ E, *et al.* Type I interferon activates MHC class I-dressed CD11b⁺ conventional dendritic cells to promote protective anti-tumor CD8⁺ T cell immunity[J]. Immunity, 2022, 55(2): 308-323.e9. DOI:10.1016/j.immuni.2021.10.020.
- [收稿日期] 2022-08-02 [修回日期] 2022-08-20
[本文编辑] 黄静怡