

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0516-06

淫羊藿苷、黄芩苷联合多柔比星抑制肝癌细胞 APRIL 表达和逆转肿瘤免疫逃逸

唐菁¹, 张玲^{1*}, 顾洪涛¹, 李翠玲¹, 毛海婷¹, 杨尚军², 温培娥¹, 阴海鹏¹(1. 山东省医学科学院基础医学研究所, 山东省肿瘤免疫与中药免疫重点实验室, 山东省现代医用药物与技术重点实验室, 2. 山东省医学科学院药物研究所, 济南 250062)

[摘要] 目的: 探讨中药单体淫羊藿苷(icarrin, ICA)、黄芩苷(baicali, BAI)联合化疗药多柔比星(doxorubicin, 又称 ADM)抑制肝癌 HepG2 细胞增殖诱导配体(proliferation-inducing ligand, APRIL)的表达, 进而抑制肿瘤细胞的增殖和逆转肿瘤细胞免疫逃逸的作用和机制。方法: MTT 法检测 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ICA、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BAI、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADM 以及 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ICA + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADM、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BAI + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADM 等 5 个用药处理组与未用药对照组 HepG2 细胞的增殖活性; RT-PCR 检测 APRIL 及其受体 HSPG、凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达水平; MTT 法检测 CD3AK(anti-CD3 antibody induced activated killer cells)对用药处理组和未用药对照组 HepG2 细胞的杀伤活性。结果: ICA、BAI 以及 ADM 对 HepG2 细胞增殖具有明显的抑制作用, 且呈时间依赖效应; ICA、ADM、ICA + ADM、BAI + ADM 组作用 96 h 抑制率最高, 分别为(29.30 \pm 6.62)%、(63.60 \pm 1.35)%、(99.03 \pm 0.10)%、(98.89 \pm 0.18)%(均 $P < 0.01$)。HepG2 细胞高表达 APRIL 及其受体 HSPG mRNA。ICA、BAI 以及 ADM 下调 HepG2 细胞 APRIL mRNA 以及凋亡相关蛋白 bcl-2 mRNA 的表达水平。ICA、BAI、ADM 以及 ICA + ADM、BAI + ADM 能增加 HepG2 细胞对 CD3AK 细胞杀伤的敏感性, 杀伤率由对照组的(30.00 \pm 4.50)% 分别增加到(97.23 \pm 5.11)%、(93.12 \pm 9.88)%、(60.45 \pm 5.71)%、(43.87 \pm 8.2)%、(47.25 \pm 2.68)%(均 $P < 0.01$); 且经 CD3AK 作用后, HepG2 细胞 bcl-2 mRNA 的表达进一步下调。结论: ICA、BAI 联合 ADM 抑制 HepG2 细胞 APRIL、bcl-2 mRNA 的表达, 进而抑制肿瘤细胞增殖; 同时增强其对 CD3AK 细胞的杀伤敏感性, 逆转肿瘤细胞的免疫逃逸。

[关键词] 淫羊藿苷, 黄芩苷, 多柔比星; 增殖诱导配体; 肝癌细胞; 细胞增殖; 肿瘤逃逸

[中图分类号] R730.52; R735.7 **[文献标志码]** A

Icarrin combined with baicali and doxorubicin in inhibition of APRIL expression in hepatoma cells and in reversal of tumor immune escape

TANG Jing¹, ZHANG Ling¹, GU Hong-tao¹, LI Cui-ling¹, MAO Hai-ting¹, YANG Shang-jun², WEN Pei-e¹, YIN Hai-peng¹(1. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science; Key Medical Laboratory for Tumor Immunology and Chinese Medicine Immunology of Shandong Province; Key Laboratory of Modern Medicine and Technology of Shandong Province, 2. Institute of Pharmacology Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jínan 250062, China)

[Abstract] Objective: To study the inhibitory effect of icarrin (ICA) combined with baicali (BAI) and doxorubicin (ADM) on expression of APRIL in HepG2 cells, so as to study their inhibitory effect on HepG2 cell proliferation and their reversal effect on immune escape and the related mechanism. **Methods:** MTT assay was used to explore the effects of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ICA, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BAI, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADM, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ICA + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADM and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BAI + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADM on proliferation of HepG2 cells; untreated cells were taken as control. RT-PCR was used to examine the expression of APRIL, its receptor HSPG and apoptosis-associated gene bcl-2. MTT assay was also used to examine cytotoxicity activity of CD3AK(anti-CD3 antibody induced activated killer cells) effector cells on HepG2 cells treated and untreated with drugs. **Results:** ICA, BAI and ADM all had obvious inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells, and this inhibition was time dependent. The most severe inhibitions were seen 96 hours after treatment with ICA, ADM, ICA + ADM and BAI + ADM, with the inhibitory rate being (29.30 \pm 6.62)%, (63.60 \pm 1.35)%, (99.03 \pm 0.10)% and (98.89 \pm 0.18)%, respectively(all $P < 0.01$). APRIL and its receptor HSPG were strongly expressed in HepG2 cells. ICA, BAI

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30540041). Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30540041)

[作者简介] 唐菁(1980-), 女, 山东省东阿县人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫和免疫调控的研究, E-mail: tangjing0531@ yahoo. com. cn

* Corresponding author. E-mail: zhlnln@ tom. com

and ADM downregulated APRIL and bcl-2 mRNA expression compared with untreated HepG2 cells. ICA, BAI, ADM, ICA + ADM and BAI + ADM significantly enhanced the susceptibility of HepG2 cells to CD3AK, with the killing rates increased from (30.00 ± 4.50)% in the control group to (97.23 ± 5.11)%, (93.12 ± 9.88)%, (60.45 ± 5.71)%, (43.87 ± 8.2)% and (47.25 ± 2.68)%, respectively ($P < 0.01$). Treatment with CD3AK also decreased the bcl-2 mRNA expression. **Conclusion:** ICA combined with BAI and ADM can inhibit the expression of APRIL and bcl-2 on HepG2 cells and subsequently inhibit the proliferation of HepG2 cells; meanwhile, it makes HepG2 cell more sensitive to CD3AK cells and reverses the immune escape of tumors.

[Key words] icarrin; baicali; doxorubicin; proliferation-inducing ligand; hepatoma cells; cell proliferation; tumor immune escape [Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 516-521]

增殖诱导配体 (proliferation-inducing ligand, APRIL) 属肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 超家族成员之一, 在正常组织中表达很弱, 其主要功能为调节淋巴细胞增殖和体液免疫反应。但近年发现其在多种肿瘤细胞和肿瘤组织中却有高水平表达, 并且异位表达的 APRIL 具有促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡的活性^[1-3]。因此, 深入研究 APRIL 分子的作用机制及其抑制剂的筛选, 可为 APRIL 高表达相关的多种肿瘤治疗提供新型候选抑制剂和药物设计的新靶标。本课题组多年来研究中药单体、生物制剂和化疗药对肿瘤细胞的免疫修饰作用, 并且在诱导肿瘤细胞分化和凋亡方面取得一定成果^[4]。在此基础上, 本研究将中药单体淫羊藿苷 (icarrin, ICA)、黄芩苷 (baicali, BAI) 联合化疗药物多柔比星 (doxorubicin, 又称 ADM) 作用于肝癌 HepG2 细胞, 采用 MTT、RT-PCR 等方法从细胞、基因水平探讨这些药物抑制 HepG2 细胞 APRIL 的表达, 进而抑制肿瘤细胞的增殖和逆转肿瘤细胞免疫逃逸的作用, 为这些中药单体联合化疗药的临床抗肿瘤应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与主要试剂

人肝癌细胞株 HepG2 由本实验室长期保存和传代。ICA、BAI 由本课题组提纯, 纯度 >96%, ADM 系浙江海正药业股份有限公司产品。DMEM、胰蛋白酶为 Gibco 产品, MTT 系 Promega 公司产品, rhIL-2 系威海安捷医药生物技术有限公司产品, CD3McAb 系 eBioscience 公司产品。RT-PCR 试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。APRIL 基因上游引物 5'-TCTGTCCTGCACCTGGT-TCC-3', 下游引物 5'-CAGCAGATAA ACTCCAG-CATCCT-3', 扩增基因片段长度 150 bp; HSPG 基因上游引物 5'-TAGGC ACGCTCAAGGGAC-3', 下游引物 5'-TCCTAGCTCCCTGCGAAGCA-3', 扩增片段长

度 225 bp; bcl-2 基因上游引物 5'-CGACGACTTCTC-CCGCCGCTACCGC-3', 下游引物 5'-CCGCATGCT-GGGGCCGTACAGTTCC-3', 扩增片段长度 318 bp; β -actin 上游引物 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 下游引物 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3', 扩增片段长度 506 bp; β -actin 上游引物 5'-ATCAT-GTTTGAGACCTTCAACA-3', 下游引物 5'-CATCTCT-TGCTCGAAGTCCA-3', 扩增片段长度 318 bp, 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 MTT 法检测 ICA、BAI 以及 ADM 对 HepG2 细胞增殖的影响^[5]

取对数生长期的 HepG2 细胞 5×10^4 /ml, 接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱孵育过夜。实验组细胞分别加入不同浓度的 ICA、BAI 以及 ADM, 作用终质量浓度分别为 ICA 200、100、50、25、12.5、6.25 μ g/ml; BAI 400、200、100、50、25、12.5 μ g/ml; ADM 32、16、8、4、2、1 μ g/ml; 对照组加 10% 小牛血清 DMEM 培养液。继续培养 48 h, 终止培养前 4 h 加入 MTT (5 mg/ml), 4 h 后置酶标仪下测定 D 值, 以 570 nm 为检测波长, 630 nm 为参考波长, 以计算结果 $D_{570} - D_{630}$ 值。

1.3 MTT 法检测 ICA、BAI 以及 ADM 对 HepG2 细胞增殖动力学的影响^[5]

取对数生长期 HepG2 细胞 5×10^4 /ml, 分别接种于 4 块 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 孵箱孵育过夜后, 每板实验组细胞分别加入终质量浓度为 25 μ g/ml ICA、200 μ g/ml BAI、2 μ g/ml ADM, 12.5 μ g/ml ICA + 1 μ g/ml ADM, 100 μ g/ml BAI + 1 μ g/ml ADM; 对照组加药同 1.2; 分别继续培养 24、48、72、96 h, 检测方法同 1.2。

1.4 RT-PCR 法检测 HepG2 细胞 APRIL mRNA 及其受体 HSPG mRNA 的表达^[6-7]

收集对数生长期的 HepG2 细胞 ($> 1 \times 10^6$), 按 TRIZOL Rengent 说明, 提取总 RNA, 定量后进行 RT-PCR。DNA 扩增产物以 β -actin 基因作内参照, 采用

Gel Dos 1 000 凝胶分析仪扫描分析。

1.5 RT-PCR 法检测 ICA、BAI 以及 ADM 处理后 HepG2 细胞 *APRIL* mRNA、*bcl-2* mRNA 表达的变化^[8]

收集处理 48 h 的对照、ICA 25 μg/ml、BAI 200 μg/ml、ADM 2 μg/ml、ICA 12.5 μg/ml + ADM 1 μg/ml、BAI 100 μg/ml + ADM 1 μg/ml 组 HepG2 细胞 (各 > 1 × 10⁶ 个),按 1.4 方法进行 RT-PCR 和 Gel Dos 1 000 凝胶分析仪扫描,测定各处理组和对照组 mRNA 的相对表达值。

1.6 MTT 法检测 ICA、BAI 以及 ADM 处理后 HepG2 细胞对 CD3AK (anti-CD3 antibody induced activated killer) 细胞杀伤敏感性的变化^[9]

常规制备人外周血单个核细胞,用含 10% 小牛血清的 1640 培养液调细胞密度至 1 × 10⁶/ml,加入 rhIL-2 100 U/ml,CD3 mAb 0.1 μg/ml 诱导 CD3AK 细胞,37 °C、5% CO₂ 孵箱孵育 5 d 后备用。收集药物处理 48 h 的 1.5 述各组 HepG2 细胞,调细胞密度 1 × 10⁵/ml,接种于 96 孔板 100 μl/孔,作为靶细胞。取培养 5 d 的 CD3AK 作为效应细胞,调细胞密度为 2.5 × 10⁶/ml、1.25 × 10⁶/ml、0.625 × 10⁶/ml、0.3125 × 10⁶/ml。按效靶比 25:1、12.5:1、6.25:1、3.125:1 加入各处理组和对照组靶细胞中,并设各密度效应细胞对照、未处理靶细胞对照、空白对照组,37 °C、5% CO₂ 孵箱孵育 24 h,检测方法同 1.2。计算杀伤率:杀伤率 (%) = [1 - (实验组 D 值 - 效应细胞对照组 D 值) / 靶细胞对照组 D 值] × 100%

1.7 RT-PCR 检测 CD3AK 作用后 HepG2 细胞凋亡相关基因 *bcl-2* mRNA 水平的变化^[9]

按照 1.6 的方法将 CD3AK 与各处理组、对照组 HepG2 细胞按 12.5:1 混合,共同培养 24 h,弃去悬浮 CD3AK,收集贴壁细胞 (> 1 × 10⁶)。按 1.4 方法进行 RT-PCR 和 Gel Dos 1 000 凝胶分析仪扫描分析,测定各处理组和对照组 *bcl-2* mRNA 的相对表达值。

1.8 统计学处理

采用 SPSS12 统计软件包进行 *t* 检验、χ² 检验。

2 结果

2.1 ICA、BAI 以及 ADM 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

如图 1 所示,不同质量浓度的 ICA (A)、BAI (B) 以及 ADM (C) 作用于 HepG2 细胞 48 h 后,对 HepG2 细胞具有增殖抑制作用,其中 ICA 25 μg/ml, BAI 400、200、100 μg/ml, ADM 16、8、4、2 μg/ml 组与未用药对照组 (0 μg/ml) 相比增殖抑制作用明显 (*P* < 0.01)。

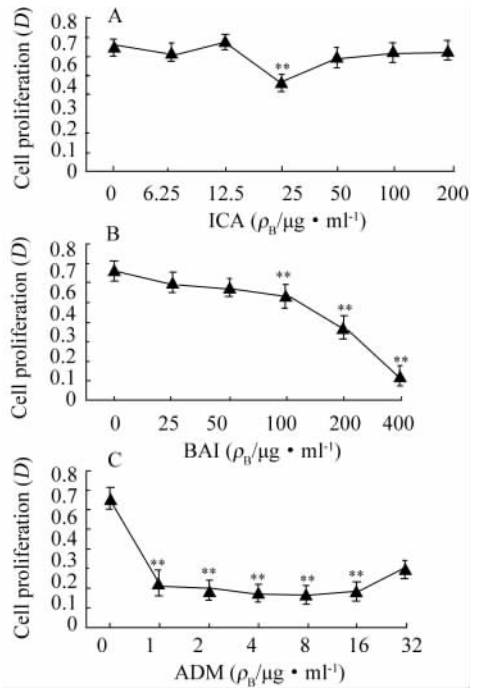


图 1 ICA (A)、BAI (B)、ADM (C) 对 HepG2 细胞增殖影响

Fig. 1 Influence of ICA (A), BAI (B), ADM (C) on HepG2 cells proliferation

** *P* < 0.01 vs 0 μg/ml treatment, *n* = 3

2.2 ICA、BAI 以及 ADM 对 HepG2 细胞增殖动力学的影响

如图 2 所示,各实验组与对照组相比,大多数作用点对 HepG2 细胞增殖具有明显的抑制作用,且 ICA、ADM、ICA + ADM、BAI + ADM 组的增殖抑制作用呈明显的时间依赖性;96 h 抑制率最高,抑制率分别为 (29.30 ± 6.62)%、(63.60 ± 1.35)%、(99.03 ± 0.10)%、(98.89 ± 0.18)% (均为 *P* < 0.01)。

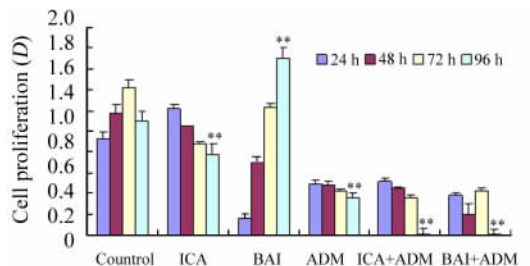


图 2 ICA、BAI、ADM 对 HepG2 细胞增殖抑制的动态观察

Fig. 2 Dynamic observation of inhibitory effect of ICA, BAI, and ADM on HepG2 cells proliferation

** *P* < 0.01 vs control, *n* = 3

2.3 *APRIL* mRNA 及其受体 *HSPG* mRNA 在

HepG2 细胞的表达

如图 3A 所示,在泳道 2 中清晰可见 318 bp 的 β -actin 和 149 bp 的 APRIL 基因片段, APRIL 在 HepG2 细胞呈高水平表达。

如图 3B 所示,在泳道 3 中清晰可见 506 bp 的 β -actin 和 225 bp 的 HSPG 基因片段, APRIL 受体 HSPG mRNA 在 HepG2 细胞呈高水平表达。结果表明 APRIL 可能会通过作用于其相应受体 HSPG 促进肿瘤细胞增殖。

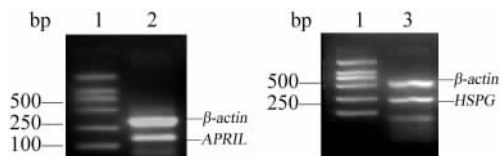


图 3 RT-PCR 检测 APRIL mRNA、HSPG mRNA 在 HepG2 细胞的表达

Fig. 3 Expression of APRIL mRNA and HSPG mRNA in HepG2 cells as detected by RT-PCR

1: Marker DL2 000; 2: APRIL mRNA; 3: HSPG mRNA

2.4 ICA、BAI 以及 ADM 处理后 HepG2 细胞 APRIL mRNA、bcl-2 mRNA 表达的变化

如图 4A 所示,在 2、3、4、5、6、7 泳道中清晰可见 318 bp 的 β -actin 和 149 bp 的 APRIL,与对照组相比,ICA、BAI、ADM、ICA + ADM 以及 BAI + ADM 处理后的 APRIL mRNA 表达减少,条带逐渐变浅,其相对定量值由对照组的 0.71 分别降至 0.69、0.68、0.47、0.43、0.42。

如图 4B 所示,在 2、3、4、5、6、7 泳道中清晰可见 506 bp 的 β -actin 和 318 bp 的 bcl-2 mRNA,与对照组相比,ICA、BAI、ADM、ICA + ADM 以及 BAI + ADM 处理后的 bcl-2 mRNA 表达减少,条带逐渐变浅,其相对定量值由对照组的 0.98 分别降至 0.77、0.79、0.81、0.70、0.69。

2.5 ICA、BAI 以及 ADM 处理后 HepG2 细胞对 CD3AK 杀伤敏感性的变化

如图 5 所示,在效靶比为 12.5:1 时,效应细胞和靶细胞相互作用 24 h 后,CD3AK 对 ICA、BAI、ADM、ICA + ADM 以及 BAI + ADM 处理后 HepG2 细胞的杀伤率分别为(97.23 ± 5.11)%、(93.12 ± 9.88)%、(60.45 ± 5.71)%、(43.87 ± 8.2)%、(47.25 ± 2.68)%、明显高于对照组的(30.00 ± 4.50)% (均 $P < 0.01$)。

2.6 CD3AK 对 HepG2 细胞凋亡相关基因 bcl-2 mRNA 水平的影响

如表 1 所示,CD3AK 作用后,HepG2 细胞 bcl-2 mRNA 相对表达量由对照组的 0.85 分别降至 0.65、0.74、0.51、0.65、0.61,与 CD3AK 作用前相比,HepG2 细胞 bcl-2 mRNA 相对表达值显著下降。

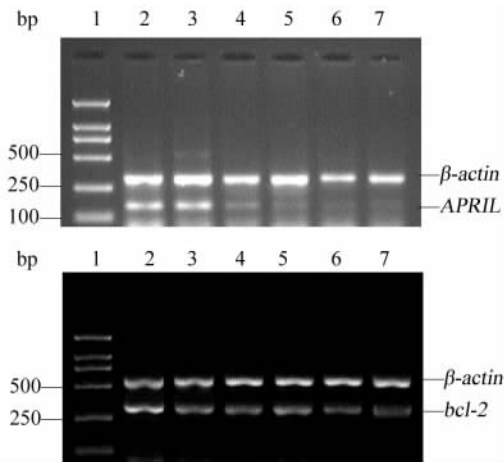


图 4 各组药物处理后 HepG2 细胞 APRIL mRNA、bcl-2 mRNA 的表达

Fig. 4 Expression of APRIL mRNA and bcl-2 mRNA in HepG2 cells after treatment with different drugs

1: Marker DL2000; 2: Control; 3: ICA; 4: BAI; 5: ADM; 6: ICA + ADM; 7: BAI + ADM

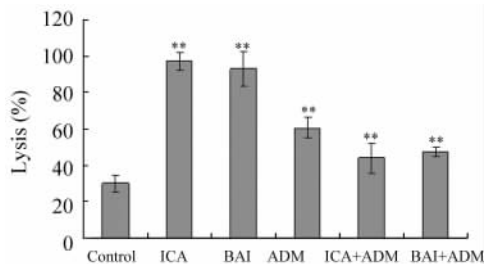


图 5 ICA、BAI 以及 ADM 处理后 HepG2 细胞对 CD3AK 杀伤敏感性的变化

Fig. 5 Effects of ICA, BAI and ADM on sensitivity of HepG2 cells to CD3AK lysis

** $P < 0.01$ vs control, $n = 3$

表 1 CD3AK 处理前后 HepG2 细胞 bcl-2 mRNA 相对表达值的比较

Tab. 1 Comparison of mRNA expression of bcl-2 in HepG2 cells before and after treatment with CD3AK

Group	Control	ICA	BAI	ADM	ICA + ADM	BAI + ADM
Before treatment	0.98	0.77	0.79	0.81	0.70	0.69
After treatment	0.85	0.65	0.74	0.51	0.65	0.61

3 讨论

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的疾患,为其寻找有效治疗药物和有效治疗手段一直是人们致力解决的热点和难点问题。增殖诱导配体 APRIL 也称为 TALL22 或 TRDL-1,是 TNF 配体家族的新成员。1998 年,首先由 Hahne^[1] 等发现并克隆成功。APRIL 是由 250 个氨基酸组成的 II 型跨膜单链糖蛋白,其编码基因位于染色体 17p13.1^[10]。APRIL 在正常组织表达,其功能与调节淋巴细胞增殖和体液免疫反应等有关。研究发现,APRIL 在多种肿瘤细胞(如结肠癌、肝癌、神经胶质瘤、多发性骨髓瘤等)中有高水平表达^[11-12],并且异位表达的 APRIL 会以自分泌、旁分泌或内分泌的形式与其相应受体 BCMA、TACI 或 HSPG 结合,促进肿瘤细胞增殖^[13-14]。本课题以高表达 APRIL 的肝癌细胞株 HepG2 为研究对象,观察到 APRIL 及其受体 HSPG 在 HepG2 细胞中高表达,表明在 HepG2 细胞中 APRIL 可能是以自分泌形式作用于自身受体 HSPG 发挥其促肿瘤细胞增殖的活性。ICA、BAI 以及 ADM 作用于 HepG2 细胞 48 h 后,对 HepG2 细胞具有明显的增殖抑制作用,且 ICA、ADM、ICA + ADM、BAI + ADM 组的增殖抑制作用呈明显的时间依赖性,96 h 抑制率最高,分别为(29.30 ± 6.62)%、(63.60 ± 1.35)%、(99.03 ± 0.10)%、(98.89 ± 0.18)%。ICA、BAI 以及 ADM 抑制 HepG2 细胞增殖的同时,也降低了 APRIL mRNA 在 HepG2 细胞的表达水平,因此阐明了 ICA、BAI 以及 ADM 下调 APRIL mRNA,可能是抑制肿瘤细胞增殖的机制之一。

Haiat^[15] 等研究发现,在非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)中,APRIL 会通过作用于其受体 BCMA、TACI 和 HSPG,激活 NF- κ B,上调 *bcl-2* 基因的表达来抵抗肿瘤细胞的凋亡。本研究发现,ICA、BAI 以及 ADM 处理后的 HepG2 细胞 *bcl-2* 基因的 mRNA 表达明显下降,相对定量值由对照组的 0.98 分别降至 0.77、0.79、0.81、0.70、0.69。表明 ICA、BAI 以及 ADM 在降低 APRIL 基因表达的同时也降低了 *bcl-2* 基因的表达,从而起到抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

CD3AK 是抗 CD3 单抗和 IL-2 共同激活的杀伤细胞,具有强体外增殖能力,高效细胞毒活性,是异质性 T 细胞群体。大量的研究认为 CD3AK 可能通过对靶细胞的直接杀伤而发挥其抗肿瘤的作用,类似 CTL 的直接杀伤^[17]。但是在肿瘤微环境中,肿瘤细胞可通过多种机制逃逸 CTL 的特异性杀伤效应。

肿瘤细胞往往高表达多种癌基因产物如 *bcl-2* 家族等,这些分子能抵抗由活化 CTL 介导的瘤细胞凋亡,利于瘤细胞异常增生^[18]。

本研究发现,HepG2 细胞经 ICA、BAI、ADM 以及 ICA + ADM、BAI + ADM 处理 24 h 后,在效靶比为 12.5 : 1 时,CD3AK 细胞的杀伤率分别为(97.23 ± 5.11)%、(93.12 ± 9.88)%、(60.45 ± 5.71)%、(43.87 ± 8.2)%、(47.25 ± 2.68)% ,都显著高于未用药对照组的(30.00 ± 4.50)% ,表明在凋亡抵抗基因 *bcl-2* mRNA 表达明显下降的同时,各用药组 HepG2 细胞对 CD3AK 的杀伤敏感性增强。并且,CD3AK 作用后与 CD3AK 作用前的 HepG2 细胞相比,凋亡相关基因 *bcl-2* mRNA 表达水平进一步明显下降,相对定量值对照组由 0.98 降至 0.85; ICA、BAI、ADM 以及 ICA + ADM、BAI + ADM 组分别由 0.77、0.79、0.81、0.70、0.69 进一步降至 0.65、0.74、0.51、0.65、0.61。表明 CD3AK 的杀伤机制与下调靶细胞 *bcl-2* mRNA 表达水平有关。因此,ICA、BAI 以及 ADM 可以显著地降低凋亡抵抗基因 *bcl-2* 的表达,增强 HepG2 细胞对 CD3AK 的杀伤敏感性,逆转肿瘤细胞的免疫逃逸作用。

另外,ICA、BAI 组与 ICA + ADM、BAI + ADM 组在对 HepG2 的抑制作用和 HepG2 对 CD3AK 杀伤敏感性上,前者 2 组稍弱和稍强;后者 2 组稍强和稍弱,但是两者在作为杀伤机制下调 HepG2 *bcl-2* mRNA 水平上,相对定量值相似,似乎与上述强弱的相关性不明显。因此其中存在的其他机制有待于进一步探讨。

化学疗法在治疗肿瘤细胞的同时杀伤正常细胞,造成严重的不良作用。本研究将小剂量 ADM 配合中药单体,亦能达到高剂量 ADM 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用。因此,本研究结果为临床化疗药配合中药治疗减轻化疗药不良反应、提高综合治疗疗效提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] Hahne M, Kataoka T, Schroter M, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth [J]. J Exp Med, 1998, 188(6): 1185-1190.
- [2] Yu G, Boone T, Delaney J, et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity [J]. Nat Immunol, 2000, 1(3): 252-256.
- [3] Roth W, Wagenknecht B, Klumpp A, et al. APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2001, 8(4): 403-410.
- [4] 张玲,王芸,毛海婷,等. 淫羊藿苷抑制肿瘤细胞端粒酶活性及其调节机制的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(3):

191-194.

- [5] 薛兴奎,张玲,王芸,等. ICA/PJA 逆转人高转移肺癌细胞 Fas/FasL 途径免疫逃逸机制的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(2): 102-105.
- [6] Kern C, Cornuel JF, Billard C, *et al.* Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway[J]. *Blood*, 2004, 103(2): 679-688.
- [7] Sung YK, Hwang SY, Farooq M, *et al.* Growth promotion of HepG2 hepatoma cells by antisense-mediated knockdown of glypican-3 is independent of insulin-like growth factor 2 signaling[J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(4): 257-262.
- [8] 荆雪宁,张玲,王芸. CD44 反义寡核苷酸对肿瘤细胞表面抗原和对 CD3AK 杀伤敏感性的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(2): 137-144.
- [9] 朱慧芬,张悦,王晓林,等. MTT 比色法检测 IL-2 和杀伤细胞活性的研究[J]. 免疫学杂志, 1994, 10(1): 48-51.
- [10] Rennert P, Schneider P, Cachero TG, *et al.* A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhabits tumor cell growth[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(11): 1677-1684.
- [11] Okano H, Shiraki K, Yamanaka Y, *et al.* Functional expression of a proliferation-related ligand in hepatocellular carcinoma and its implications for neovascularization[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(30): 4650-4654.
- [12] Novak AJ, Darce JR, Arendt BK, *et al.* Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival[J]. *Blood*, 2004, 103(2): 689-694.
- [13] Mackay F, Schneider P, Rennert P, *et al.* BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 231-264.
- [14] Mhawech-Fauceglia P, Kaya G, Sauter G, *et al.* The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(4): 697-704.
- [15] Haiat S, Billard C, Quiney C, *et al.* Role of BAFF and APRIL in human B-cell chronic lymphocytic leukaemia[J]. *Immunology*, 2006, 118(3): 281-292.
- [16] 陈宝安,陈苏宁,李翠萍,等. 自体及异体 CD3 单克隆抗体激活杀伤细胞对正常造血细胞的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2001, 9(4): 338-342.
- [17] Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, *et al.* Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(7): 1482-1486.
- [18] Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P, *et al.* Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer[J]. *Blood*, 2005, 105(2): 728-734.

[收稿日期] 2007-09-12

[修回日期] 2007-11-04

[本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

肝细胞癌易患人群的性别差异与 MyD88 依赖的 IL-6 产生有关

肝细胞癌是最为常见的原发性肝癌,一般是由一些慢性肝病发展而来,如乙肝(HBV)、丙肝(HCV)的感染,酒精性肝病,血色素沉着病,脂肪肝等,HCV 的感染可能使肝细胞癌高发,但在患者中也不过占到 7%。而肝细胞癌主要发生于男性,男性发病是女性的 3~5 倍。利用化学致癌物二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱导小鼠肝细胞癌模型,发现也存在性别相关的发病规律,即在雄性小鼠中肝细胞癌多发。给予雄性小鼠雌性激素,能够有效地抑制 DEN 诱导的小鼠肝细胞癌的发生。但是这种肝细胞癌的发生与性别之间关系的机制尚未知。

炎症是肝细胞癌发生的一个重要因素,IL-6 是一种重要的炎症因子。本研究发现, DEN 诱导后,雄性小鼠产生的 IL-6 远远多于雌性小鼠。而在雌性小鼠或者 IL-6 缺陷的小鼠,则不易于发生 DEN 诱导的肝细胞癌。这说明性别因素可能与小鼠对 DEN 刺激发生的炎症反应有关。进一步分别用雌性、雄性小鼠、IL-6 缺陷小鼠、雌激素受体(estrogen receptor, ER)缺陷的雄性小鼠实验发现,性别和 IL-6 因素对于肝脏损伤和修复有着重要的影响,即雄性的肝脏损害和增殖性修复更加明显,同时伴随着 STAT-3 的明显磷酸化,而雌性、IL-6 缺陷、ER 缺陷则都会有效地抑制肝细胞的凋亡和增生, STAT-3 磷酸化不明显。在上述 DEN 诱导的 IL-6 升高,造成肝脏炎症性损害,从而导致肝癌的过程中,髓样分化蛋白 88(myeloid differentiation protein 88, MyD88)是必须的分子,因为如果 MyD88 缺陷则上述的肝脏损害和导致肝细胞癌的效应将被阻断。实验结果表明炎症或者急性毒素侵袭与肝细胞癌的发生密切相关,肝脏损伤和修复与 IL-6 密切相关。因为已有研究表明, Kupffer 细胞产生 IL-6 要依赖于 MyD88, 可以设想炎症因素通过 MyD88 信号刺激产生 IL-6, IL-6 再通过 JNK-STAT 途径激活 STAT3, 从而引发免疫抑制, 肝细胞凋亡和组织修复等一系列反应,并最终导致癌症的发生。

这一研究成果解释了为什么男性比女性更容易患肝癌。如果事实如此,那么可以用雌性激素的类似化合物来有效地抑制 IL-6 的产生,并由此抑制慢性肝病的恶性进展,因此该研究具有较大的临床应用价值。

[张明刚 摘译,韩岩梅 审阅. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, *et al.* *Science*, 2007, 317(5834):121-124]