

## · 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.007

**TGF- $\beta$  不敏感前列腺癌特异性 CTLs 的制备及其抗癌作用**

杨 阔<sup>1</sup>, 徐 勇<sup>2\*</sup>, 曹现祥<sup>3</sup>, 张 婷<sup>1</sup>, 于明杰<sup>4</sup>, 畅继武<sup>1</sup>(1. 天津市泌尿外科研究所 天津市泌尿外科重点实验室, 天津 300211; 2. 天津医科大学 第二医院 泌尿外科, 天津 300211; 3. 济宁医学院 附属医院 泌尿外科, 济宁 272013; 4. 天津泰达医院 泌尿外科, 天津 300457)

[摘要] 目的: 制备 TGF- $\beta$  不敏感前列腺癌特异性 CTLs, 观察其对前列腺癌的治疗作用。方法: 分离前列腺癌患者外周血单个核细胞, 体外诱导 DCs; 制备该患者前列腺癌肿瘤抗原, 冲击 DCs 后诱导肿瘤特异性 CTLs; 用携带 T $\beta$ R II DNglytk 基因的慢病毒感染肿瘤特异性 CTLs; Western blotting 检测 T $\beta$ R II DNglytk 感染后 CTLs 对 TGF- $\beta$  的敏感性。分别以 TGF- $\beta$  敏感和不敏感 CTLs 治疗小鼠前列腺癌移植瘤, 比较其疗效。结果: 前列腺癌组织抗原冲击后 DCs 诱导的肿瘤特异性 CTLs 生长速度快于未冲击 DCs 组 ( $P < 0.01$ ), 其活化状态标志 CD25 的表达显著高于对照 CTLs ( $P < 0.01$ )。T $\beta$ R II DNglytk 慢病毒感染肿瘤特异性 CTLs 对 TGF- $\beta$  敏感性减弱。TGF- $\beta$  不敏感的 CTLs 可显著抑制荷瘤鼠前列腺癌的生长 ( $P < 0.01$ )。结论: 成功制备的 TGF- $\beta$  不敏感前列腺癌特异性 CTLs 对小鼠前列腺癌移植瘤有明显的治疗作用, 为前列腺癌免疫治疗奠定了一定的实验基础。

[关键词] 前列腺肿瘤; TGF- $\beta$ ; 慢病毒; CTLs; 树突状细胞

[中图分类号] R737.25; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0458-06

**Preparation of TGF- $\beta$  insensitive cytotoxic T lymphocyte against prostate cancer and its anti-tumor activity**

YANG Kuo<sup>1</sup>, XU Yong<sup>2\*</sup>, CAO Xian-xiang<sup>3</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, YU Ming-jie<sup>4</sup>, CHANG Ji-wu<sup>1</sup>(1. Institute of Urological Surgery of Tianjin, Key Urological Surgery Laboratory of Tianjin, Tianjin 300211, China; 2. Department of Urological Surgery, Second Affiliated Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 3. Department of Urological Surgery, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining 272013, Shandong, China; 4. Department of Urological Surgery, Taida Hospital of Tianjin, Tianjin 300457, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare TGF- $\beta$  insensitive cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against prostate cancer and to observe its therapeutic effect against prostate cancer. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells were obtained from prostate cancer patients, and were induced to differentiate into dendritic cells *in vitro*. Prostate cancer antigen was prepared from the same patients, and tumor antigen specific CTLs were induced by prostate tumor antigen impulsed-DCs. The tumor antigen specific CTLs were infected with lentivirus containing T $\beta$ R II DNglytk gene, and the response of T $\beta$ R II DNglytk transfected-CTLs to TGF- $\beta$  was examined by Western blotting analysis. Prostate cancer cell-inoculated mice were treated with TGF- $\beta$  sensitive and insensitive-CTLs separately, and the therapeutic results were compared. **Results:** CTLs induced by prostate tumor antigen impulsed-DCs grew significantly faster than those induced by non-impulsed-DCs ( $P < 0.01$ ). T $\beta$ R II DNglytk gene infection reduced the sensitivity of CTLs to TGF- $\beta$ . The reaction of CTLs infected by lentiviral vector to TGF- $\beta$  was significantly weaker than that of non-infected CTLs. TGF- $\beta$  insensitive CTLs significantly inhibited the growth of implanted prostate tumors in mice. **Conclusion:** TGF- $\beta$  insensitive prostate tumor antigen specific CTLs have apparent therapeutic effect against prostate cancer, which paves a way for immunotherapy of prostate cancer.

[Key words] prostate neoplasms; TGF- $\beta$ ; lentivirus; CTL; dendritic cell

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 458-463]

[基金项目] 天津市科技计划资助项目 (No. 07ZCGYSF01000)。Supported by the Science and Technology Project of Tianjin (No. 07ZCGYSF01000)

[作者简介] 杨 阔 (1972-), 男, 山西省大同市人, 博士, 主治医师, 主要从事前列腺疾病基础与临床方面的研究

\* 通信作者 (Corresponding author)。E-mail: xuyong8816@sina.com

我国男性的前列腺癌发病以晚期为主,大部分患者在就诊时就已经失去根治性前列腺癌切除的机会<sup>[1]</sup>。肿瘤患者病情的发展与机体免疫功能下降、肿瘤逃避免疫系统的监控密切相关。转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )是肿瘤细胞所分泌的免疫抑制因子,在肿瘤的发展中起重要作用。另外,TGF- $\beta$  还是 CTLs( cytotoxic lymphocyte )分化的强抑制物,在体内影响肿瘤反应性 CTLs 的产生。肿瘤细胞通过分泌 TGF- $\beta$  抑制肿瘤反应性 CTLs 的功能是肿瘤实现免疫逃逸的重要机制之一<sup>[2-3]</sup>。T $\beta$ R II DNglytk 基因是由显性负相的 TGF- $\beta$  II 型受体(dominant negative TGF-beta Type II receptor)和 HSV-tk( herpes simplex virus thymidine kinase)构成的融合基因。研究<sup>[4]</sup>证实,携带 T $\beta$ R- II DNglytk 基因的慢病毒载体感染 CTLs 后,后者大量表达 T $\beta$ R- II DNglytk 融合蛋白,成为与 TGF- $\beta$  结合但无法启动下游 TGF 信号通路的受体;由于该受体与正常 TGF- $\beta$  受体竞争作用,可使 CTLs 对 TGF- $\beta$  失敏感,从而发挥其正常的免疫监视作用。

CTLs 要成为杀伤肿瘤的效应细胞,必须接受树突状细胞(dendritic cell, DCs)提呈的肿瘤抗原的刺激。DCs 细胞是重要的抗原提呈细胞,其膜表面高表达 MHC-I 和 MHC- II 类分子并高表达 B7 分子,从而获得提呈抗原刺激机体 CTLs 的能力<sup>[5]</sup>。MHC 限制性决定了只有 MHC 表型相同的免疫细胞才能有效地相互作用,这就极大地限制了肿瘤特异性 CTLs 的制备。本研究用同一患者来源的肿瘤提取蛋白作为刺激 CTLs 的抗原,用含有 T $\beta$ R II DNglytk 基因的慢病毒感染 CTLs,制备对 TGF- $\beta$  失敏感的肿瘤特异性 CTLs,探索对前列腺癌的个体化免疫治疗。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料和动物

分别携带 T $\beta$ R II DNglytk 基因和 TRANSglytk 基因的慢病毒载体由本研究所自行制备<sup>[6]</sup>。慢病毒感染相关试剂均购于 Invitrogen 公司。淋巴细胞分离液购自中国医学科学院血液学研究所,胎牛血清购自天津北辰盛达生物制品有限公司;rhIL-2、rhIL-4、植物血凝素(PHA)、rhGM-CSF 等细胞因子购自北京中杉公司。Western blotting 检测试剂盒、pS-MAD2/3 一抗等 Western blotting 检测相关试剂购自武汉博士德公司。裸鼠购于中国医学科学院医学实验动物研究所,动物合格证号为(SXCK11-00-0006)。

### 1.2 外周血单个核细胞(PBMC)采集、分离和培养

用 4 个 5 ml 已加肝素抗凝剂的真空采血管采取天津医科大学第二医院泌尿外科收住的某前列腺癌患者(患者知情同意)静脉血 20 ml。在 10 ml 离心管中加入淋巴细胞分离液和静脉血;2 500  $\times$  g 离心 15 min,轻轻吸取白色云雾状淋巴细胞层,用 DMEM 培养液洗涤 2 遍,得到人 PBMC。用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液调整细胞至  $5 \times 10^6$  个/ml,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内 2 h;吸出未贴壁细胞转至另一培养瓶中。加入 IL-2 至终活性浓度 1 000 U/ml,扩增 T 细胞;贴壁细胞用含有重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和 IL-4 各 1 000 U/ml 的培养液定向培养成 DCs。

### 1.3 前列腺癌肿瘤抗原的提取

无菌条件下取出同一前列腺患者手术切除的肿瘤组织块放入液氮冰冻,敲成小块;预冷研钵、药勺,加入液氮,捣碎样品,然后快速研磨;重复操作,使样品成白色干粉状。将干粉刮下转入裂解液中,再加裂解液于研钵中,将其中的黏附的样品洗下。将裂解物 12 000  $\times$  g 离心 10 min,取上清以 0.2  $\mu$ m 的滤器过滤即得肿瘤抗原。BCA(二喹啉甲酸)法测蛋白浓度,收集备用。

### 1.4 肿瘤特异性 CTLs 的制备

向定向培养了 5 d 的 DCs 细胞加入已经提取的 500  $\mu$ l 肿瘤抗原刺激(终质量浓度为 100  $\mu$ g/ml),37  $^{\circ}$ C 培养 4 h,加入 TNF- $\alpha$  至终活性浓度 1 000 U/ml,促进 DCs 成熟;48 h 后,收集 DCs 细胞,按 1:20 比例与自身 T 细胞混合培养 72 h,流式细胞仪检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞含量。用含 IL-2 1 000 U/ml、20% 胎牛血清的 DMEM 培养液隔天换液 1 次,于培养的第 4、7、11、15、19、23 天用锥虫蓝染色计数不同培养条件下活细胞数,并除以原始细胞数,求出增殖倍数;分别绘制增殖曲线。

### 1.5 慢病毒介导 TGF- $\beta$ 不敏感肿瘤特异性 CTLs 的制备

锥虫蓝染色计数 CTLs,按照 MOI = 10 分别加入携带 T $\beta$ R II DNglytk 和 TRANSglytk 的慢病毒液,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养 72 h 后,重复感染 1 次。携带 T $\beta$ R II DNglytk 的慢病毒滴度为  $5.85 \times 10^6$  TU/ml,携带 TRANSglytk 的慢病毒滴度为  $6.2 \times 10^6$  TU/ml。在每个培养瓶中加入 TGF- $\beta$ ,使其终质量浓度为 10 ng/ml。培养 24 h 后进行下一步鉴定。

### 1.6 Western blotting 检测 TGF- $\beta$ 失敏感的 CTLs 磷酸化 Smad2/3 的表达

慢病毒感染 CTLs 细胞 16 h 后将细胞收集,并用 RIPA 裂解液进行裂解,提取总蛋白;制作聚丙烯

酰胺凝胶,进行 SDS-PAGE,电泳结束后将蛋白质从凝胶中转印至硝酸纤维素膜上;用抗体稀释液稀释一抗,抗体浓度 0.2 ~ 1 μg/ml, 37 °C 封闭 2 h;用抗体稀释液 1:200 稀释相应的酶标二抗,37 °C 封闭 20 min;用 0.02 mol/L PBST 振荡洗涤膜 4 次,按每 2 ml 0.02 mol/L PBST 加 1 滴 DAB 浓缩液,另按 1:1 000 加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 混匀后加至膜上,室温显色,显色后蒸馏水洗涤。

### 1.7 对 TGF-β 失敏感的 CTLs 对小鼠前列腺移植瘤生长的影响

将前列腺癌手术中获得的组织标本无菌条件下切成 1.0 mm 小块,接种于 4 周龄、雄性的裸小鼠右腋侧皮下,待瘤块生长至 1.0 cm 大小后取下瘤块,切成小块再进行传代。第 3 代成瘤小鼠 12 只,随机分成 2 组:第一组以 TGF-β 不敏感的 CTLs 细胞治疗,第二组以 TGF-β 敏感的 CTLs 细胞治疗;两组分别于第 1、4、7 天通过鼠尾静脉注射相应的 1 × 10<sup>7</sup> 个 CTLs。每隔 3 d 观察记录小鼠瘤块生长情况。根据公式计算体积;第 30 天处死所有小鼠(第 23 天死亡 1 只小鼠,故处死 11 只小鼠),测量最终瘤块大小;将瘤块组织称重并记录,照相。

### 1.8 统计学处理

应用 SPSS 统计软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤特异性 CTLs 的增殖情况

从培养的第 7 天起 CTLs 开始大量扩增,培养 23 d 后,CTLs 扩增可达到(98.34 ± 9.95)倍;而经负载肿瘤组织裂解物 DCs 刺激的 CTLs 细胞扩增可达到(240.65 ± 12.56)倍;锥虫兰染色检测活细胞比例均高于 95%。经配对样本资料 *t* 检验,对照组与肿瘤抗原刺激组肿瘤特异性 CTLs 扩增倍数相比差异有统计学意义(图 1, *P* < 0.01)。

### 2.2 肿瘤特异性 CTLs 的 CD25 表型变化

在 CTLs 培养过程中观察到,标志细胞活化状态的 CD25(IL-2 受体)的表达随着时间的延长而逐渐上升,至第 7 天达到峰值,随后逐渐下降;肿瘤抗原刺激的 CTLs 培养组没有下降,仍保持高的 CD25 表达率;从培养的第 11 天到 23 天,两组比较差异有显著的统计学意义(*P* < 0.05;图 2,表 1)。

### 2.3 对 TGF-β 不敏感肿瘤特异性 CTLs 的制备

在肿瘤特异性 CTLs 培养的第 11 天,根据所测的病毒滴度与细胞计数的结果,按照有效病毒与细胞数 10:1 的比例,相隔 72 h 加入携带 TβR II DNg-

lytk 和 TRANSglytk 的慢病毒液,然后观察细胞生长情况。结果显示,细胞形态变化不大,并继续扩增,扩增倍数及 CD25 表型变化跟未加病毒的肿瘤特异性 CTLs 无统计学差异(*P* > 0.05,如图 3、4 所示)。

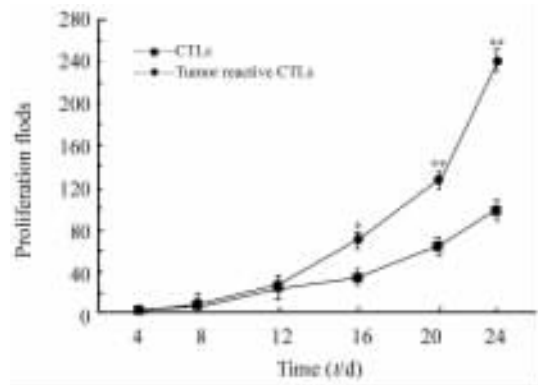


图 1 CTLs 和肿瘤特异性 CTLs 增殖的比较

Fig. 1 Proliferation of CTLs and tumor antigen specific CTLs

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs CTLs

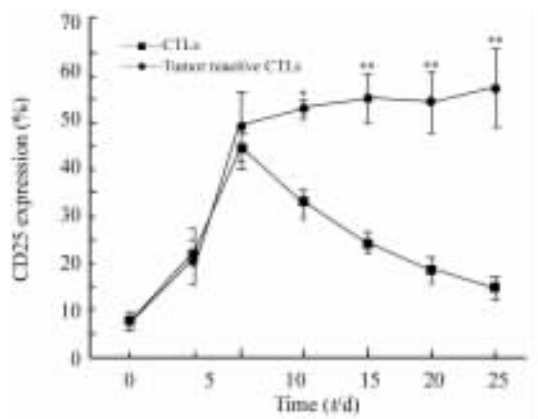


图 2 CTLs 和肿瘤特异性 CTLs 表面 CD25 表达的变化

Fig. 2 Changes of CD25 expression on CTLs and tumor antigen specific CTLs

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.05 vs CTLs

### 2.4 TGF-β 不敏感性肿瘤特异性 CTLs 的验证

用 10 ng/ml 的 TGF-β 分别与 TβR II DNglytk RANSglytk 转染及无转染的肿瘤特异性 CTLs 作用 24 h 后,用 Western blotting 检测磷酸化的 Smad2/3 的表达情况。结果显示,10 ng/ml TGF-β 与转染 TβR II DNglytk 的 CTLs 孵育后,磷酸化的 Smad2/3 表达量明显减少;对照组及转染 TRANSglytk 的 CTLs 则仍可以检测到磷酸化 Smad2/3 的明显表达(图 5)。结果证实,感染携 TβR II DNglytk 的 CTLs 对 TGF-β 的作用不敏感。

表 1 CTLs 与肿瘤特异性 CTLs 表面 CD25 的变化  
Tab.1 Changes of CD25 expressions on CTLs and tumor antigen specific CTLs

Group	PBMC	Tumor antigen specific CTLs					
		4 d	7 d	11 d	15 d	19 d	23 d
CTLs	7.37 ± 1.83	21.46 ± 5.92	44.37 ± 3.74	32.53 ± 3.08	24.40 ± 2.36	18.47 ± 2.65	14.40 ± 2.28
Tumor-CTLs	7.37 ± 1.83	20.28 ± 4.62	49.20 ± 7.35	53.04 ± 1.95*	55.10 ± 5.02**	54.40 ± 6.55**	57.40 ± 8.49**

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs CTLs

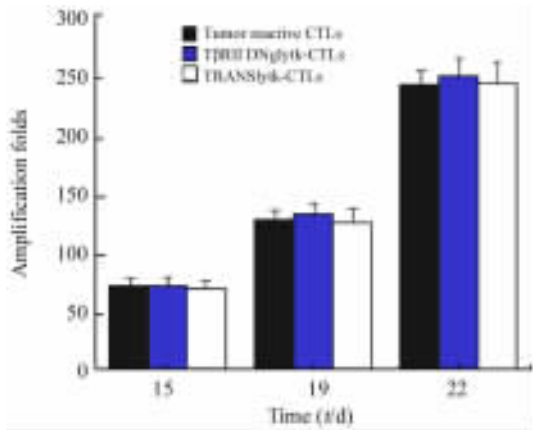


图 3 慢病毒感染对肿瘤特异性 CTLs 扩增的影响  
Fig.3 Effect of lentivirus infection on proliferation of tumor antigen specific CTLs

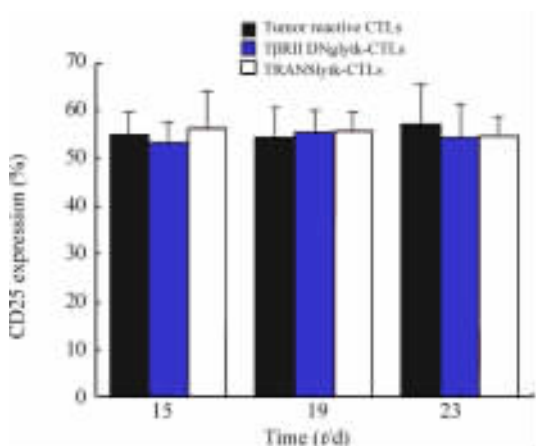


图 4 慢病毒感染对肿瘤特异性 CTLs CD25 表达的影响  
Fig.4 Effect of lentivirus infection on CD25 expression of tumor antigen specific CTLs

2.5 TGF-β 不敏感肿瘤特异性 CTLs 对小鼠前列腺癌移植瘤的抑制

分别以 TGF-β 敏感和 TGF-β 不敏感的 CTLs 治疗人前列腺癌移植瘤鼠,结果发现,TGF-β 不敏感 CTLs 治疗组移植瘤生长显著减慢,其肿瘤体积显著小于 TGF-β 敏感 CTLs 治疗小鼠( P < 0.05 或 P < 0.01,

图 6)。治疗至第 30 天处死全部小鼠,TGF-β 不敏感 CTLs 治疗组小鼠移植瘤的体积和重量均明显小于 TGF-β 敏感 CTLs 治疗组[( 1.17 ± 0.57 )vs ( 2.05 ± 0.13 )cm<sup>3</sup>;( 1.23 ± 0.60 ) vs ( 2.35 ± 0.24 ) g。均 P < 0.01 ],说明该治疗对肿瘤生长有明显的抑制作用。

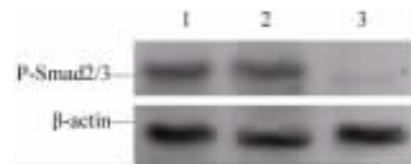


图 5 Western blotting 检测慢病毒感染后肿瘤特异性 CTLs 磷酸化 Smad2/3 的表达  
Fig.5 Phosphorylation of Smad2/3 in tumor antigen specific CTLs after lentivirus infection as detected by Western blotting analysis

1: CTLs; 2: CTLs transfected with TRANSglytk; 3: CTLs transfected with TβRII DNglytk

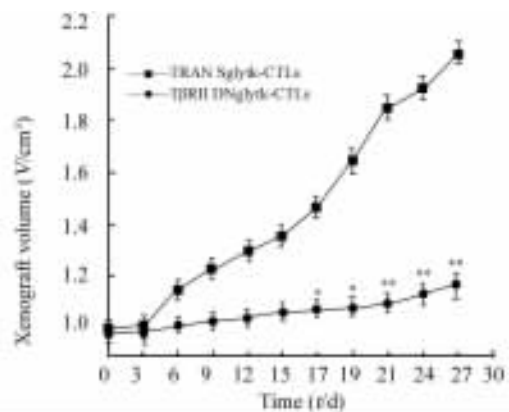


图 6 TGF-β 不敏感肿瘤特异性 CTLs 对小鼠前列腺癌移植瘤的抑制  
Fig.6 TGF-β insensitive tumor antigen specific CTLs inhibited growth of implanted prostate tumors in mice

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs TRANSglytk-CTLs

3 讨论

在肿瘤发生与发展的过程中,机体的免疫系统

发挥着重要的免疫监视功能,其中 T 细胞介导的细胞免疫起关键性作用。因此,在肿瘤免疫治疗方案中,基于 T 细胞的肿瘤免疫治疗一直是研究热点<sup>[7-8]</sup>。在肿瘤免疫中,细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)是体内杀伤肿瘤的主要效应细胞,与 B 细胞对抗原的识别不同,T 细胞不能识别完整的天然抗原分子,需要 APC 先将抗原降解为肽段,并由 MHC 分子递送到细胞表面才能识别。

T 细胞能识别 APC 表面由 MHC 分子提交的抗原肽,依赖于 APC 对蛋白质抗原进行处理和加工,并将抗原肽在细胞表面展示供 TCR 识别<sup>[8-9]</sup>。在本研究中,由于将肿瘤组织裂解提取总蛋白作为抗原,加入到分离培养的 DCs 中时,被 APC 摄取,与 MHC-I、MHC-II 两类分子结合并被提呈到细胞表面,然后激活 CD8<sup>+</sup> CTLs。被活化的 CTLs 细胞会有多种表面分子的表达和可溶性因子的分泌,来完成对靶细胞的杀伤作用。

用肿瘤溶浆作为抗原用于 CTLs 的刺激,则可以在体外绕过 MHC I 类分子在抗原提呈过程中肿瘤细胞的限制,有效促进肿瘤特异性 CTLs 的成熟分化。同时以外源性抗原的形式被 APC 细胞的 MHC-I、MHC-II 两类分子提呈到细胞表面,有效激活 CTLs<sup>[10]</sup>。

抗原肽和 MHC 分子间的相互作用能否实现,是由 MHC 等位基因抗原结合槽的结构特点及进入该结合槽的抗原肽是否符合其接纳抗原肽的公用基序,以及这些肽可能显示的抑制性残基的部位和类型所决定的<sup>[11]</sup>。MHC 等位基因的差异(多态性)体现在个体之间,因而,抗原肽-MHC 相互作用的不同格局,有可能直接参与构成不同个体对同一抗原应答格局的差异。另外,在 TCR-pMHC 的相互作用中,MHC 的等位基因特异性也具有决定性的意义。Zinkernagel 和 Doherty<sup>[12-13]</sup>最先揭示了 T 细胞识别细胞表面抗原肽的同时还需要特异性地识别提交抗原肽的 MHC 等位基因分子。这种具有同一 MHC 表型的免疫细胞才能有效地相互作用的现象即为 MHC 的限制性。

本研究用同一患者来源的 PBMC、肿瘤抗原及肿瘤细胞进行体外 CTLs 的激活和分化,用体外克隆扩增的 CTLs 用于裸鼠异种肿瘤移植模型的体内治疗实验,解决了 MHC 的限制性问题,合理地维持了肿瘤免疫反应的完整性。

携带有 T $\beta$ R II DNglytk 基因的慢病毒载体由本研究室制备,慢病毒载体通过病毒衣壳糖蛋白与细胞膜上特异性的受体结合,病毒膜和细胞膜融合。

病毒颗粒结合的基质和衣壳蛋白分解,核蛋白复合物被转运到细胞内,在胞浆中开始逆转录,以 tRNA 为引物,单链 RNA 为模板合成双链线性 DNA。一旦线性病毒 DNA 的合成完成,病毒整合酶在 3'端和 5'端特异性切割和催化,将之整合到宿主基因组中,成为宿主永久的遗传成分<sup>[4]</sup>。当病毒质粒整合到 CTLs 细胞基因组,宿主细胞中整合基因的表达很快启动,并在 CMV 启动子的作用下呈持续、稳定、高强度表达。大量表达的 T $\beta$ R II DNglytk 融合蛋白,镶嵌到细胞膜结构,成为能与 TGF- $\beta$  结合但无法启动下游 TGF 信号转导途径的受体,此受体与正常 TGF- $\beta$  受体进行竞争性配体结合。此时,CTLs 细胞即由对 TGF- $\beta$  敏感变为不敏感,从而可以不受肿瘤分泌的 TGF- $\beta$  水平的抑制,发挥正常的免疫功能。

本研究以 TGF- $\beta$  分别作用于表达 T $\beta$ R II DNglytk、TRANSglytk 和无慢病毒感染的 3 种 CTLs 细胞,然后通过 Western blotting 检测 TGF- $\beta$  作用后 CTLs 对 TGF- $\beta$  信号通路下游蛋白磷酸化 Smad2/3 的表达情况,发现携带 T $\beta$ R II DNglytk 慢病毒感染后磷酸化 Smad2/3 的表达显著下降,几乎测不到,而另外两种 CTLs 细胞仍可以测到表达增高的 P-Smad2/3 蛋白<sup>[14]</sup>,证实所制备细胞对 TGF- $\beta$  作用的不敏感。

将表达 T $\beta$ R II DNglytk 基因的 CTLs 用于前列腺癌免疫治疗,能抑制前列腺癌生长。本研究中观察到:T $\beta$ R II DNglytk 组的瘤块显著小于 TRANSglytk 组,说明通过慢病毒载体诱导的对 TGF- $\beta$  不敏感的 CTLs 能够抑制肿瘤的生长,阻断 TGF- $\beta$  对 CTLs 的抑制作用可能是一条有效的肿瘤免疫治疗途径<sup>[15]</sup>。

## [参考文献]

- [1] 叶定伟. 前列腺癌的流行病学和中国的发病趋势[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(6): 362-364.
- [2] Zhang Q, Jang TL, Yang X, *et al.* Infiltration of tumor-reactive transforming growth factor-beta insensitive CD8<sup>+</sup> T cells into the tumor parenchyma is associated with apoptosis and rejection of tumor cells[J]. Prostate, 2006, 66(2): 235-247.
- [3] Zhang Q, Yang XJ, Kundu SD, *et al.* Blockade of transforming growth factor-beta signaling in tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells activates the antitumor immune response cycle[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(7): 1733-1743.
- [4] Maddon PJ, McDougal JS, Clapham PR, *et al.* HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4[J]. Cell, 1988, 54(6): 865-874.
- [5] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Danna EA, *et al.* Antagonists of tumor-specific immunity: tumor-induced immune suppression and

- host genes that co-opt the anti-tumor immune response [ J ]. *Breast Dis*, 2009, 20( 1 ): 127-135.
- [ 6 ] 杨阔,张婷,刘妍,等. 人真核表达慢病毒载体 plenti6/V5-D-TOPO<sup>®</sup>-T $\beta$ R II DNglytk 的构建及意义 [ J ]. *天津医药*, 2009, 37( 7 ): 565-567.
- [ 7 ] Shanker A, Brooks AD, Jacobsen KM, *et al.* Antigen presented by tumors in vivo determines the nature of CD8<sup>+</sup> T-cell cytotoxicity [ J ]. *Cancer Res*, 2009, 69( 16 ): 6615-6623.
- [ 8 ] Riquelme E, Carreño LJ, González PA, *et al.* The duration of TCR/pMHC interactions regulates CTLs effector function and tumor-killing capacity [ J ]. *Eur J Immunol*, 2009, 39( 8 ): 2259-2269.
- [ 9 ] Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, *et al.* Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines [ J ]. *Eur J Immunol*, 2002, 32( 8 ): 2237-2245.
- [ 10 ] Yamamoto M, Kamigaki T, Yamashita K, *et al.* Enhancement of anti-tumor immunity by high levels of Th1 and Th17 with a combination of dendritic cell fusion hybrids and regulatory T cell depletion in pancreatic cancer [ J ]. *Oncol Rep*, 2009, 22( 2 ): 337-243.
- [ 11 ] 宋哲,刘涛,刘伟,等. 抗原肽与 MHC 分子相互作用的 QSAR 模型研究 [ J ]. *物理化学学报*, 2007, 23( 2 ): 198-205.
- [ 12 ] Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system [ J ]. *Nature*, 1974, 248( 450 ): 701-702.
- [ 13 ] Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis [ J ]. *Nature*, 1974, 251( 5475 ): 547-548.
- [ 14 ] Go JH. Altered expression of Smad proteins in T or NK-cell lymphomas [ J ]. *Cancer Res Treat*, 2008, 40( 4 ): 197-201.
- [ 15 ] Petrausch U, Jensen SM, Twitty C, *et al.* Disruption of TGF-beta signaling prevents the generation of tumor-sensitized regulatory T cells and facilitates therapeutic antitumor immunity [ J ]. *J Immunol*, 2009, 183( 6 ): 3682-3689.
- [ 收稿日期 ] 2009-07-05 [ 修回日期 ] 2009-09-10  
[ 本文编辑 ] 韩丹

## · 科技动态 ·

### Tank 分子通过负向调控 TLRs 信号途径预防自身免疫性肾炎

Toll-like receptors( TLRs )作为免疫系统识别病原微生物的重要受体家族,以其在免疫应答尤其是天然免疫中发挥的重要作用受到免疫学界的广泛关注。TLRs 信号途径受到许多蛋白分子的精确调控,以保证其下游引发的基因表达直至免疫应答全过程的适时和适度,TLRs 途径的负向调控对于机体产生协调、有利的免疫应答具有重要作用。在 2009 年 9 月的《*Nature Immunology*》上,来自东京大阪大学的 Shizuo Akira 及他的同仁们发表了他们的最新研究成果——《Tank 分子作为 TLRs 信号途径的负向调节蛋白,对于预防自身免疫性肾炎的发生发挥关键作用》,发现了 TLRs 途径的又一个重要的负向调节蛋白。虽然 Tank 分子过去被认为能正向调控转录因子 IRF-3 及 NF- $\kappa$ B,作者充分证明了 Tank 分子能够负向调控由 TLR 信号诱导的促炎因子的产生。Tank 分子敲除小鼠来源的巨噬细胞和 B 细胞表现出更强的由 TLR 及 BCR 激活的经典 NF- $\kappa$ B 活化。Tank 敲除的巨噬细胞经 TLR 激活后表现出 TRAF6 泛素化的上调,提示 Tank 分子通过控制 TRAF 泛素化进而抑制 TLR 信号。同时, Tank 分子敲除小鼠患有自身免疫性肾炎,清除体内的 IL-6 或 Myd88,或者抗生素治疗均能够有效降低病鼠体内自身抗体的产生,提示肠道共生菌导致的固有的 TLR 信号激活产生的 IL-6 对疾病的发展起了重要作用。论文完整阐述了 Tank 分子对 TLRs 信号途径的负向调节作用及相关机制,为基于 Tank 分子的细胞靶向性抑制或修饰以控制过度的免疫应答产生的治疗方法提供了新的视角。

[ 刘娟摘译,刘书逊审阅. Kawagoe T, Takeuchi O, Takabatake Y, *et al.* *Nat Immunol*, 2009, 10( 9 ): 965-972. ]

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》