

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.0010

· 基础研究 ·

Notch3 siRNA 增强结肠癌细胞对托泊替康的化疗敏感性

姚 军¹, 钱翠娟^{2*} (1. 台州学院医学院, 浙江 台州 318000; 2. 台州市立医院 消化内科, 浙江 台州 318000)

[摘要] 目的: 探讨下调 Notch3 表达是否可增强结肠癌 SW620 细胞对化疗药托泊替康(topotecan)的敏感性。方法: 将 Notch3 siRNA 转染到 SW620 细胞中, Western blotting 检测转染后 SW620 细胞中 Notch3 的表达水平。转染后不同时间加入托泊替康, MTT 法检测 SW620 细胞的增殖; Hoechst 33342 染色和流式细胞仪检测 SW620 细胞的凋亡; Caspase-3 活化试剂盒检测 SW620 细胞中 caspase-3 的活化。结果: Notch3 siRNA 转染可明显抑制 SW620 细胞中 Notch3 蛋白的表达; 托泊替康作用于 Notch3 siRNA 转染组细胞的 IC₅₀ 较对照 Ctrl siRNA 转染组显著降低 ($P < 0.05$); 流式细胞仪检测显示沉默 Notch3 的表达可显著增强托泊替康诱导的结肠癌细胞凋亡 ($P < 0.05$) 和 caspase-3 活化 ($P < 0.05$)。结论: siRNA 沉默 Notch3 的表达可增强 SW620 细胞对托泊替康的化疗敏感性。

[关键词] Notch3; 托泊替康; 结肠肿瘤; 凋亡; 化疗敏感性

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0604-05

Notch3 siRNA enhances chemosensitivity of colon cancer cells to topotecan

YAO Jun¹, QIAN Cui-juan^{2*} (1. Medical School of Taizhou College, Taizhou 318000, Zhejiang, China; 2. Department of Gastroenterology, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the relationship between Notch3 expression and chemosensitivity of human colon carcinoma cell line SW620 to topotecan. **Methods:** Notch3 siRNA was transfected into SW620 cells, and the expression of Notch3 in SW620 cells was examined by Western blotting. After transfected with Notch3 siRNA for different time periods, SW620 cells were further treated with topotecan, and the proliferation of SW620 cells was detected by MTT assay; the apoptosis of SW620 cells was detected by Hoechst 33342 staining and flow cytometry. Caspase-3 activation in SW620 cells was examined by caspase-3 activation kit. **Results:** Notch3 siRNA transfection remarkably inhibited Notch3 protein expression in SW620 cells. The IC₅₀ of topotecan in Notch3 siRNA-transfected group was significantly decreased compared with that in the Ctrl siRNA group ($P < 0.05$). Silence of Notch3 expression in SW620 cells by Notch3 siRNA remarkably promoted apoptosis ($P < 0.05$) and caspase-3 activation ($P < 0.05$) of SW620 cells induced by topotecan. **Conclusion:** Notch3 down-regulation by siRNA in SW620 cells can enhance the chemosensitivity cells to topotecan.

[Key words] Notch3; topotecan; colonic neoplasms; apoptosis; chemosensitivity

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 604-608]

Notch 信号是介导细胞和细胞之间直接接触的主要信号分子之一^[1-2], Notch 受体和配体都是膜结合蛋白。目前, 在人或小鼠中已发现 4 种 Notch 受体(Notch1 ~ Notch4)^[3]。研究证实, Notch1 信号的异常激活与多种肿瘤发生、发展有关, 其中涉及的肿瘤包括肝癌、淋巴瘤、白血病等^[4-7], 但目前对 Notch 家族中其他分子的研究相对较少。研究发现, 过表达 Notch3 可导致某些肝癌细胞对凋亡产生抵抗^[8]; 而抗凋亡机制在肿瘤细胞发生、发展及多药耐药中起着很重要的作用^[9]。因此, Notch3 作为一信号转导分子, 可能在肿瘤细胞凋亡及化疗耐药中发挥重要作用。

目前关于 Notch1 ~ Notch4 的研究主要集中在肿瘤细胞的信号调控机制方面, 在化疗药物如类放射线药物敏感性方面的研究很少。本研究采用特异性针对 Notch3 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 下调结肠癌细胞中的 Notch3 的表达,

[基金项目] 浙江省医药卫生科学研究基金立项资助项目(No. 2008B204)。Supported by the Medical and Health Scientific Foundation of Zhejiang Province (No. 2008B204)

[作者简介] 姚 军(1976-), 男, 湖南省湘潭市人, 博士研究生, 讲师, 主要从事细胞信号转导的基础研究。E-mail: yaojunzu@yeah.net

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: cuijuanqian@yeah.net

探讨 Notch3 在结肠癌细胞对类放射线药物化疗增敏中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

人结肠癌细胞株 SW620 购自 ATCC(ATCC 号: CCL227)。注射用盐酸托泊替康(topotecan; 商品名为和美新, Hycamtin; 规格: 每支 2 ml; 批号: 07060131)购自史克必成公司。抗 β -actin 抗体、抗 Notch3 抗体、Ctrl siRNA 和 Notch3 siRNA 购自 Santa Cruz 公司, Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司, T-PER 组织蛋白提取试剂和 BCA 蛋白分析试剂购自 Pierce 公司, PVDF 膜购自 Millipore 公司, MTT 购自 Sigma 公司, Caspase-3 活化试剂盒购自 Clontech 公司。

1.2 Notch3 siRNA 转染 SW620 细胞

结肠癌 SW620 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养。转染前 1 d, 将密度为 1.0×10^5 /ml 的细胞接种于 6 孔培养板, 培养过夜, 次日进行转染。实验分组: (1) 未转染组(untransfection): 未经任何处理的 SW620 细胞; (2) Ctrl siRNA 转染组: 转染 Ctrl siRNA 的 SW620 细胞; (3) Notch3 siRNA 转染组(Notch3 siRNA): 转染 Notch3 siRNA 的 SW620 细胞。转染方法如下: 取 2 只 1.5 ml 离心管, 分别加入 500 μ l 无抗生素、无血清的 RPMI 1640 培养基, 将 Notch3 siRNA 和 Lipofectamine™ 2000 分别加入两离心管中, 轻轻混匀, 于室温下静置 5 min, 然后将这两管并为 1 管, 混匀, 常温放置 20 min 后, 将混合液加入到 SW620 细胞的培养基中(Notch3 siRNA 终浓度为 50 nmol/L), 将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。以 Ctrl siRNA 作对照。转染后于不同时间胰酶消化收集细胞, 进行后续试验。

1.3 Western blotting 检测转染后 SW620 细胞中 Notch3 的表达

用 T-PER 组织蛋白提取试剂提取转染后 SW620 细胞的总蛋白, 14 000 \times g 离心 5 min 后, 吸取上清转移至新离心管。BCA 试剂分析测定蛋白浓度。经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至 PVDF 膜。用含 3% BSA 的 TBST 室温封闭 1 h, 经一抗(抗 Notch3 和 β -actin 抗体) 和酶标二抗作用后, 用 DAB 底物溶液显色。

1.4 MTT 法检测转染后 SW620 细胞增殖

取对数生长期转染后 SW620 细胞, 胰酶消化制备单细胞悬液, 以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔

板, 贴壁后换无血清培养基使细胞同步化, 然后加入不同浓度的托泊替康(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ mol/L), 每浓度设 6 复孔, 作用 12 h 后换成无药物的完全培养基继续培养 48 h。然后每孔加入 10 μ l MTT(终质量浓度为 5 mg/ml), 置于 37 °C 培养箱中培养 4 h, 每孔再加入 150 μ l DMSO, 充分振荡 10 min, 使结晶充分溶解。酶标仪测定各孔光密度值(D_{570}), 计算细胞增殖抑制率(%) = $(1 - D_{570} \text{ 实验孔} / D_{570} \text{ 对照孔}) \times 100\%$, 并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.5 Hoechst 33342 染色法检测 SW620 细胞的凋亡

将洁净盖玻片置于 6 孔板内, 加入细胞进行培养, 当细胞生长达约 80% 融汇时, 用 4% 多聚甲醛固定, 然后加入 Hoechst 33342(终质量浓度 8 μ g/ml), 37 °C 染色 10 min 后, 在荧光显微镜下观察并照相。

1.6 流式细胞仪检测 SW620 细胞的凋亡

SW620 细胞接种于 6 孔板, 贴壁并长至 70% ~ 80% 融汇, 加入 0.2 μ mol/L 托泊替康作用 4 h 后换为无药的新鲜完全培养基, 并分别于加药后 24、48 及 72 h 收集细胞, 0.25% 胰酶消化制备单细胞悬液。75% 冰乙醇固定, -20 °C 过夜后离心, PBS 洗 1 遍; 800 \times g, 离心 5 min, 弃上清液, 加入约 60 μ l 磷酸-柠檬酸盐缓冲液, 充分混匀后, 室温静置 30 min; 再次洗涤后, 加 RNase A 至终质量浓度 0.5 g/L, 37 °C 温育 30 min, 加入碘化丙啶(PI) 染色剂至终质量浓度 50 mg/L, 室温避光放置 30 min。然后上流式细胞仪检测(美国 Becton-Dicknson 公司 FACScort 型流式细胞仪), Cell Quest 软件获取数据, Mod Fit 2.0 软件进行分析, 计算细胞凋亡率(sub G₁) 和细胞周期(G₁、S、G₂/M) 百分比。以上实验均重复 4 次。

1.7 Caspase-3 活化试剂盒检测 caspase-3 活化

收集各实验组细胞, 按照 caspase-3 活化试剂盒说明书检测各组细胞中的 caspase-3 的活化。其原理是根据底物 DEFD-pNA 被 caspase-3 酶分解后的 pNA 在 405 nm 处的光密度值(D), 反映 caspase-3 的活化。

1.8 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件分析, 常规进行方差齐性检验、正态性检验。单变量 2 组资料之间的比较采用 t 检验, 多组资料之间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 Notch3 siRNA 沉默 SW620 细胞中 Notch3 表达
Western blotting 检测发现, 与未转染组和 Ctrl

siRNA 转染组比较, 转染 Notch3 siRNA 的 SW620 细胞(48 h 后) 中 Notch3 蛋白水平明显降低(图 1), 而未转染组和 Ctrl siRNA 组 SW620 细胞中 Notch3 蛋白表达无明显差异。

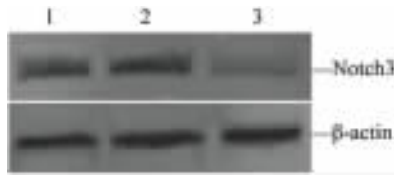


图 1 Notch3 siRNA 沉默 SW620 细胞中 Notch3 的表达

Fig. 1 Notch3 siRNA interfered Notch3 expression in SW620 cells

1: Untransfection; 2: Ctrl siRNA; 3: Notch3 siRNA

2.2 Notch3 siRNA 增强 SW620 细胞对托泊替康的敏感性

未转染组、Ctrl siRNA 组和 Notch3 siRNA 组(转染 48 h 后) 的 SW620 细胞经托泊替康作用后, 不同时间点用 MTT 法检测 SW620 细胞的增殖。结果(图 2)显示, 未转染组和 Ctrl siRNA 组 SW620 细胞的 IC₅₀ 分别为(0.28 ± 0.04) μmol/L 及(0.26 ± 0.05) μmol/L, 而 Notch3 siRNA 组 SW620 细胞的 IC₅₀ 为(0.12 ± 0.06) μmol/L, 较未转染组和 Ctrl siRNA 组细胞显著降低(P < 0.05)。

2.3 Notch3 siRNA 增强托泊替康对 SW620 细胞的致凋亡作用

用 Hoechst 33342 染色对各转染组细胞(转染 48 h 后) 的细胞核形态进行观察, 未用托泊替康处理的 Notch3 siRNA 组和 Ctrl siRNA 组 SW620 细胞(图 3)未发现凋亡的形态学改变。0.2 μmol/L 托

泊替康作用 48 h 后, Notch3 siRNA 组与 Ctrl siRNA 组部分 SW620 细胞出现细胞核碎裂、染色质浓集等凋亡的形态学改变, 且 Notch3 siRNA 组凋亡的程度显著高于 Ctrl siRNA 组(P < 0.05)。进一步采用流式细胞仪检测细胞凋亡, 结果(图 3)显示, 0.2 μmol/L 托泊替康作用 SW620 细胞 24 h 后, Notch3 siRNA 组 SW620 细胞凋亡率为(7.68 ± 0.51)%, 显著高于未转染组(5.33 ± 0.94)% 及 Ctrl siRNA 组(5.43 ± 0.58)% (P < 0.05); 作用 48 h 后, Notch3 siRNA 组细胞凋亡率为(13.70 ± 1.16)%, 显著高于未转染组(9.36 ± 0.79)% 及 Ctrl siRNA 组(9.45 ± 0.99)% (P < 0.05); 作用 72 h 后, Notch3 siRNA 组细胞凋亡率为(21.73 ± 0.86)%, 显著高于未转染组(15.17 ± 1.23)% 及 Ctrl siRNA 组(16.27 ± 1.17)% (P < 0.05)。

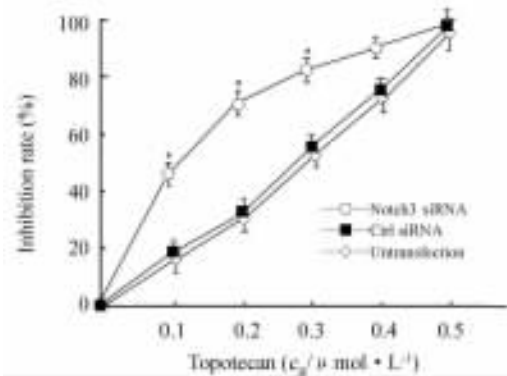


图 2 Notch3 siRNA 增强 SW620 细胞对托泊替康的敏感性

Fig. 2 Notch3 siRNA enhanced chemosensitivity of SW620 cells to topotecan

* P < 0.05 vs untransfection or Ctrl siRNA group

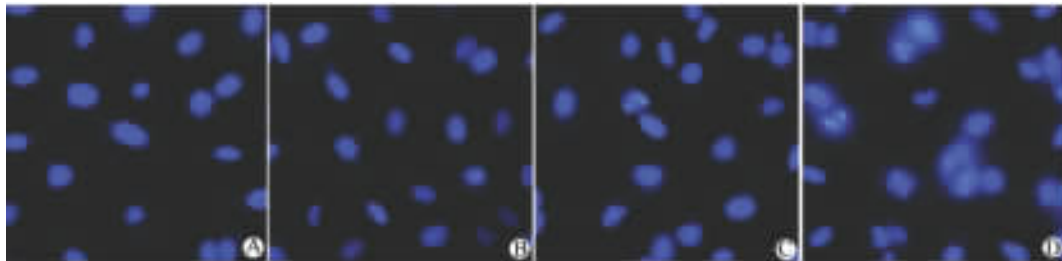


图 3 Notch3 siRNA 增强托泊替康诱导的 SW620 细胞凋亡(×400)

Fig. 3 Notch3 siRNA increased apoptosis of SW620 cells induced by topotecan(×400)

A: Ctrl siRNA; B: Notch3 siRNA; C: Ctrl siRNA + Topotecan; D: Notch3 siRNA + Topotecan

2.4 Notch3 siRNA 促进托泊替康诱导 SW620 细胞 caspase-3 的活化

检测托泊替康处理后各组 SW620 细胞中

caspase-3 的活性, 结果(图 4)显示, 0.2 μmol/L 托泊替康作用 48 h 后, 各转染组 SW620 细胞中 caspase-3 活性均有一定程度的增加; 然而, Notch3

siRNA 组细胞的 caspase-3 活性上升显著超过未转染组和 Ctrl siRNA 组 ($P < 0.05$)。

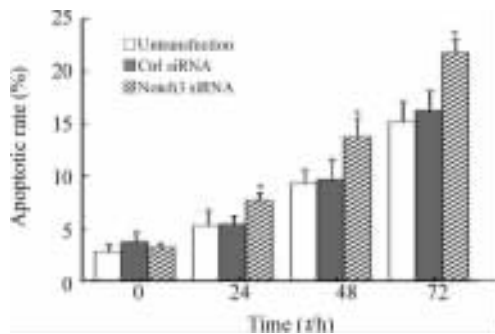


图4 Notch3 siRNA 增强托泊替康诱导的 SW620 细胞 caspase-3 活化

Fig. 4 Notch3 siRNA increased caspase-3 activation in SW620 cells induced by topotecan

* $P < 0.05$ vs untransfection or Ctrl siRNA

3 讨论

在肿瘤的综合治疗中,以 siRNA 为手段的基因治疗已引起了广泛的关注。siRNA 是近年来发现的一种调节 mRNA 的生物学现象,靶基因 mRNA 的表达能够被相应的双链 RNA 分子抑制,其抑制效果要强于反义 RNA^[10-12]。siRNA 最主要的功能在于可以调节和关闭靶基因的表达,进而调控细胞的生命活动^[13]。因此,通过 siRNA 特异性地抑制某些导致肿瘤耐药的基因或相关信号调控分子的表达,可以达到增强肿瘤细胞化疗敏感性的目的^[14-15]。本研究采用特异性针对 Notch3 的 siRNA,转染结肠癌 SW620 细胞,Western blotting 检测 Notch3 蛋白表达水平,转染 Notch3 siRNA 的 SW620 细胞中 Notch3 蛋白水平受到明显抑制,从而证实 Notch3 siRNA 已成功转染入结肠癌细胞中,并能特异性下调 Notch3 的表达,提示 Notch3 siRNA 可作为研究 Notch3 在结肠癌细胞化疗耐药中作用的有力工具。

凋亡失控是肿瘤细胞耐药性的关键因素之一,在肿瘤发生、发展和化疗耐药中起着重要的作用^[16-18]。MTT 检测发现,Notch3 siRNA 转染的结肠癌 SW620 细胞经托泊替康处理后,癌细胞增殖受到明显抑制,SW620 细胞的 IC₅₀ 显著降低,提示 Notch3 表达下调后托泊替康对 SW620 细胞的细胞毒性显著增加。有趣的是,单独转染 Notch3 siRNA 并不足以诱导结肠癌细胞凋亡,然而 Notch3 的下调可显著增强托泊替康的凋亡诱导作用,且与托泊替康作用时间密切相关。由此提示 Notch3 过表达或过度活

化可能是结肠癌细胞凋亡失控的重要因素之一,并进而导致结肠癌细胞产生化疗耐药,而通过 Notch3 siRNA 转染干扰 Notch3 的表达,可增强结肠癌细胞对化疗药物的敏感性。

由于 caspase-3 是级联激活反应死亡受体途径和线粒体依赖途径的共同效应酶^[19-21],因而 caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,并且托泊替康可诱导非小细胞肺癌 caspase-3 的活化^[22],为此,本研究检测了经托泊替康处理的各转染组结肠癌 SW620 细胞的 caspase-3 活性。caspase-3 在托泊替康诱导的 SW620 细胞凋亡过程中被明显活化,且沉默 Notch3 表达的 SW620 细胞经托泊替康处理后,其 caspase-3 活性显著提高,提示下调 Notch3 能显著增强托泊替康诱导的 caspase-3 活化,这与本实验中下调 Notch3 能显著增强托泊替康的凋亡诱导作用相符,提示 caspase-3 活性增强可能是 Notch3 siRNA 干扰导致托泊替康的凋亡诱导作用增强的重要机制之一。

总之,本实验通过 siRNA 转染技术成功地沉默了结肠癌细胞内 Notch3 的表达。Notch3 siRNA 通过增强托泊替康的凋亡诱导作用,增加托泊替康对结肠癌细胞的细胞毒性,使结肠癌 SW620 细胞对托泊替康的敏感性增加。本研究为进一步探索 Notch3 信号调控大肠癌细胞凋亡的具体机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Kovall RA. More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes [J]. *Oncogene*, 2008, 27(38): 5099-5109.
- [2] Fortini ME. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(5): 633-647.
- [3] Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms [J]. *Oncogene*, 2008, 27(38): 5132-5137.
- [4] Talora C, Campese AF, Bellavia D, et al. Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782(9): 489-497.
- [5] Wang M, Xue L, Cao Q, et al. Expression of Notch1, Jagged1 and beta-catenin and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma [J]. *Neoplasma*, 2009, 56(6): 533-541.
- [6] Palomero T, Ferrando A. Therapeutic targeting of Notch1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2009, 9(Suppl 3): S2005-S2010.
- [7] Real PJ, Ferrando AA. Notch inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2009, 23(8): 1374-1377.
- [8] Giovannini C, Gramantieri L, Chicco P, et al. Selective ablation

- of Notch3 in HCC enhances doxorubicin's death promoting effect by a p53 dependent mechanism [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(5): 969-979.
- [9] Schulze-Bergkamen H, Weinmann A, Moehler M, *et al.* Novel ways to sensitise gastrointestinal cancer to apoptosis [J]. *Gut*, 2009, 58(7): 1010-1024.
- [10] Dykxhoorn DM. RNA interference as an anticancer therapy: a patent perspective [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2009, 19(4): 475-491.
- [11] Thompson AJ, Patel K. Antisense inhibitors, ribozymes, and siRNAs [J]. *Clin Liver Dis*, 2009, 13(3): 375-390.
- [12] Juliano R, Alam MR, Dixit V, *et al.* Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(12): 4158-4171.
- [13] López-Fraga M, Martínez T, Jiménez A. RNA interference technologies and therapeutics: from basic research to products [J]. *Bio Drugs*, 2009, 23(5): 305-332.
- [14] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(10): 850-862.
- [15] Cai M, Wang GB, Tao KX, *et al.* Enhanced chemotherapy sensitivity of human colon cancer cells to 5-fluorouracil by siRNA recombinant expression vector targeting survivin gene [J]. *Chin Med Sci J*, 2009, 24(2): 97-101.
- [16] Savage P, Stebbing J, Bower M, *et al.* Why does cytotoxic chemotherapy cure only some cancers [J]? *Nat Clin Pract Oncol*, 2009, 6(1): 43-52.
- [17] Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(7): 501-507.
- [18] Portugal J, Bataller M, Mansilla S. Cell death pathways in response to antitumor therapy [J]. *Tumori*, 2009, 95(4): 409-421.
- [19] Conrad D, Robichaud M, Mader J, *et al.* 2-Chloro-2'-deoxyadenosine-induced apoptosis in T leukemia cells is mediated via a caspase-3-dependent mitochondrial feedback amplification loop [J]. *Int J Oncol*, 2008, 32(6): 1325-1333.
- [20] 吴枝娟, 许建华, 黄秀旺, 等. 慢病毒介导 bcr/abl 基因 RNAi 对白血病 K562 细胞生物学特性的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(2): 145-150.
- [21] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 414:13-21.
- [22] Giovannetti E, Mey V, Danesi R, *et al.* Interaction between gemcitabine and topotecan in human non-small-cell lung cancer cells: effects on cell survival, cell cycle and pharmacogenetic profile [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(4): 681-689.
- [收稿日期] 2009 - 10 - 20 [修回日期] 2009 - 12 - 05
[本文编辑] 徐红梅

· 科技动态 ·

DCs 中 NLRP3 炎性复合体活化诱导 IL-1 依赖的获得性抗肿瘤免疫应答

细胞死亡有多种形式,可以分为免疫性的和非免疫性的。正常细胞更新中的细胞死亡可认为是非免疫性的;而放射治疗或者化学治疗药物引起的细胞死亡是免疫性的,可以引起免疫应答,并且对于治疗效应是必须的。后者可能和细胞死亡过程中活化 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)及 NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)有关。网织蛋白(calreticulin)的暴露以及 HMGB1(high mobility group box-1)的释放是免疫性细胞死亡的标志,因为它们可以促进抗原提呈细胞如树突状细胞(dendritic cells, DCs)摄取、提呈抗原,诱导免疫应答。然而重组的网织蛋白以及 HMGB1 并不能引起 DCs 提呈肿瘤抗原,这提示存在其他的尚未鉴定的信号。论文作者发现,化疗药物引起肿瘤细胞的死亡过程中,伴随着 ATP 的释放,ATP 能够作用于 DCs 表面的 P2X7R,从而诱导细胞中 NLRP3 炎性复合体(inflammasome)的活化,继而引起 Caspase-1 的活化以及 IL-1 的成熟释放。IL-1 释放后作用于 T 淋巴细胞促进 T 细胞的活化,从而参与特异性的抗肿瘤免疫应答。实验结果为固有免疫和获得性免疫之间添加了一个重要的桥梁。

研究首先发现,化疗效应依赖于 CD8⁺T 淋巴细胞以及 IFN- γ ;而一旦炎性复合体缺失,化疗效应几乎被阻断。结果提示化疗药物的发挥治疗效应依赖于炎性复合体成分。作者在体外用化疗药物作用于肿瘤细胞,结果发现化疗药物能引起大量 ATP 释放,并能被 ATP 合成抑制剂以及 ATPase 所抑制。进一步通过多种实验在多种缺陷小鼠模型上证明了 ATP 释放后作用于 DCs 的 P2X7R,从而引起 DCs 中 NLRP3 炎性复合体的活化。利用荧光共聚焦技术也证明了化疗药物处理过的肿瘤细胞可以引起 DCs 中 NLRP3 炎性复合体的活化,并可以被 ATP 拮抗剂所抑制;DCs 中炎性复合体活化后引起 Caspase-1 的活化以及 IL-1 的成熟释放。作者又用缺陷小鼠模型证明了 CD8⁺T 淋巴细胞的活化依赖于 NLRP3 炎性复合体以及 DCs 释放的 IL-1;另外,IL-1 的中和抗体能够阻断化疗药物的抗肿瘤效应。在临床肿瘤患者中,P2X7R 突变的患者更容易发生肿瘤转移,更加支持炎性复合体在抗肿瘤免疫应答中的作用。

综上,论文作者发现 DCs 中 NLRP3 炎性复合体的激活对于化疗效应的发挥以及抗肿瘤免疫应答是决定性的,从而发现了天然免疫和获得性免疫之间的一个新的联结点。本研究为肿瘤患者的化学治疗提供了新思路,为新的化疗策略提供了实验基础。

[刘海波 摘译, 李楠 审阅. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, *et al.* *Nat Med*, 2009, 15(10):1170-1178.]