

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.016

· 基础研究 ·

细胞因子诱导的杀伤细胞对宫颈癌细胞的体内外杀伤效应

胡必成¹, 姜祥兵², 马 威¹, 崔天益¹(1. 武汉市第一医院 检验科, 湖北 武汉 430022; 2. 武汉市第一医院 妇产科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIKs)对宫颈癌 CasKi 和 HeLa 细胞的体内外杀伤效应。方法: 从宫颈癌患者的外周血分离单个核细胞, 以改良方法(不加 IFN- γ , 只加 IL-2 和 anti-CD3 抗体)刺激扩增得到 CIKs, 用流式细胞仪分析 CIKs 表型。ELISA 法检测 CIKs 培养上清中 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 的分泌水平。LDH 释放法检测 CIKs 对 CasKi 和 HeLa 细胞的杀伤作用。建立荷 CasKi 或 HeLa 细胞小鼠模型, 以 1×10^6 或 1×10^7 个 CIKs 小鼠静脉注射治疗, 每周 1 次, 连续治疗 3 周, 检测小鼠移植瘤的体积和重量。结果: 在抗 CD3 抗体和 IL-2 的刺激下, 宫颈癌患者外周血单个核细胞被诱导培养成 CIKs, 其中 CD3⁺CD56⁺ 细胞得到大量扩增。PHA 激活后, CIKs 产生大量的 IFN- γ 和 TNF- α , 而 IL-2 的分泌量较少。被激活的 CIKs 可显著地杀伤宫颈癌 CasKi 细胞和 HeLa 细胞, 最大杀伤率分别达 $(43.2 \pm 1.8)\%$ 和 $(46.2 \pm 1.5)\%$, 且呈剂量依赖性。体内抗肿瘤实验结果显示, CIKs 能显著抑制小鼠皮下宫颈癌移植瘤的生长 ($P < 0.01$)。结论: 本实验的改良方法能有效制备 CIKs, 该 CIKs 在体内外对宫颈癌 CasKi 和 HeLa 细胞有明显的杀伤效应。

[关键词] 宫颈肿瘤; CasKi 细胞; HeLa 细胞; 细胞因子诱导杀伤细胞

[中图分类号] R737.33; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0327-06

Anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells against cervical cancer cells *in vivo* and *in vitro*

HU Bi-cheng¹, JIANG Xiang-bing², MA Wei¹, CUI Tian-pen¹(1. Department of Clinical Laboratory, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells (CIKs) against cervical cancer cell lines, CasKi and HeLa *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The CIKs were induced from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with cervical cancer using an improved method, which only used IL-2 and anti-CD3 antibody, without IFN- γ ; CIKs were sorted using FACS. The levels of IFN- γ , IL-2 and TNF- α in culture supernatants of CIKs were determined by ELISA. The anti-tumor activities of CIKs against CasKi and HeLa cells were determined by LDH assay. The nude mouse xenograft models of cervical cancer cell lines, CasKi or HeLa cells, were established, and 1×10^6 or 1×10^7 CIKs were administered intravenously once a week for three weeks, then the tumor volumes and weights were measured. **Results:** CIKs were successfully induced from PBMCs of cervical cancer patients by IL-2 and anti-CD3 antibody, with CD3⁺CD56⁺ cells greatly expanded. CIKs produced significant amounts of IFN- γ and TNF- α , but few IL-2, after PHA stimulation. CIKs dose-dependently killed CasKi and HeLa cells with a maximum killing rate reaching 43% and 46%, respectively. In addition, the *in vivo* anti-tumor experiments demonstrated that CIKs remarkably inhibited the growth of subcutaneous tumors in nude mice ($P < 0.01$). **Conclusion:** The improved CIKs expansion method used in our study is feasible and the resultant CIKs have remarkable cytotoxicity against CasKi and HeLa cells both *in vivo* and *in vitro*.

[Key words] cervical neoplasms; CasKi cell; HeLa cell; cytokine-induced killer cell

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 327-332]

[基金项目] 武汉市创新人才开发基金资助项目(武人社函[2009]97号)。Project supported by the Development Foundation for Innovative Talents of Wuhan (No. 2009-97)

[作者简介] 胡必成(1972-),男,湖北省蕲春县人,硕士,主管技师,主要从事临床免疫学方面的研究。E-mail: hubicheng211@sina.com

[通信作者] 崔天益(CUI Tian-pen, corresponding author), E-mail: tianpencui@hotmail.com

宫颈癌在全球妇女中的发病率仅次于乳腺癌,世界上每年约有50万的宫颈癌新发病例,占有癌症新发病例的5%,其中80%的病例来自发展中国家^[1]。我国宫颈癌每年新发病例超过13万,占世界新发病例的28.8%^[2],且其发病呈年轻化倾向^[3]。Zur等^[4]首先提出人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)可能与宫颈癌发生有关。1995年国际癌症研究署专题讨论会将HPV感染为宫颈癌的主要病因,明确宫颈癌是一种感染性疾病^[5-6]。目前宫颈癌的治疗以手术切除、化疗和放疗为主,但治疗效果有限,且易复发。已上市的宫颈癌预防性疫苗不能治疗宫颈癌和乳头瘤病毒感染。因此,宫颈癌的生物治疗具有诱人的前景。研究者尝试用不同方法,包括蛋白、多肽、细胞因子、病毒对宫颈癌进行生物治疗,一些研究已进入临床前试验^[7-9]。

免疫细胞疗法治疗肿瘤主要是通过体外扩增和激活免疫细胞,然后回输到体内杀伤肿瘤细胞。细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIKs)表达CD3和CD56分子,有很强的肿瘤细胞杀伤活性^[10-11],且无MHC限制性^[12]。本课题旨在研究CIKs对宫颈癌CasKi细胞和HeLa细胞的体内外杀伤作用,为临床治疗宫颈癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

宫颈癌CasKi细胞(整合了HPV16基因组的上皮肿瘤细胞)和HeLa细胞(含HPV18基因组的上皮肿瘤细胞)购自武汉大学菌种保存中心,用MEDM培养基(含10%的胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素)按常规细胞培养方法进行培养。Lymphomedia培养基购自日本Lymphotech公司,抗CD3抗体购自达科为生物技术有限公司,血凝素(PHA)购自Sigma公司,NP-40购自Sigma公司。ELISA试剂盒购自RD公司,活细胞记数仪购自莱卡公司,流式细胞仪购自BD公司。

1.2 CIKs的诱导

宫颈癌患者来自武汉市第一医院妇产科(患者签署知情同意书,所有实验均遵守武汉市第一医院伦理道德委员会制定的伦理条例)。取宫颈癌患者外周血单个核细胞,然后用淋巴细胞分层液分离,PBS洗涤3次,用含10%胎牛血清的Lymphomedia培养基调整密度至 1×10^4 /ml。加入抗CD3抗体和重组人IL-2培养5 d,然后更换为含IL-2的Lymphomedia培养基,继续培养9 d,即获得CIKs,期间细胞的密度维持在 1×10^6 /ml。细胞培养时需补充旧的

细胞培养上清到细胞培养体系中,其中含自分泌的IFN- γ 和TNF- α 。细胞活体记数仪观察CIKs的活性,CIKs的活性通常在85%~95%。

1.3 流式细胞术检测CIKs的表型

取 1×10^6 个CIKs,用含1% BSA的PBS洗1次,再重悬到100 μl PBS/BSA的缓冲液中。加入anti-CD3-FITC、anti-CD4-FITC、anti-CD8-PE、anti-CD56-APC或anti-CD56-PE,4℃孵育20 min,然后加入400 μl PBS,洗涤后用流式细胞仪检测。

1.4 ELISA检测细胞因子的产生

体外诱导的CIKs用1~10 μg/ml的血凝素(PHA)刺激24 h,收集上清,用ELISA试剂盒检测上清中IL-2、TNF- α 和IFN- γ 的分泌水平。具体方法参照ELISA试剂盒说明书。

1.5 LDH释放法检测CIKs对肿瘤细胞的杀伤

2×10^6 个CIKs用PBS洗3次,再悬浮在10 ml含10%胎牛血清的RPMI培养基中。以 1×10^4 细胞/100 μl加入96孔圆底板中,每组3复孔。按照效应细胞(CIKs):靶细胞(肿瘤细胞)即效:靶比为1:1、3:1、10:1和30:1加入肿瘤靶细胞,37℃、5% CO₂孵育24 h。将96孔板200 × g离心5 min,收集每孔培养上清液100 μl。上清液中LDH的活性用Beckman生化分析仪进行检测,自发释放孔中只加入靶细胞,无效应细胞;最大释放孔中也只有靶细胞,没有效应细胞,但加入2% NP-40。杀伤率(%) = $[(LDH_{\text{实验}} - LDH_{\text{自发释放}}) / (LDH_{\text{最大释放}} - LDH_{\text{自发释放}})] \times 100\%$ 。

1.6 CIKs对小鼠移植瘤的杀伤疗效检测

BALB/c裸鼠(6~8周)购自湖北省疾病预防控制中心,实验动物合格证号为SCXK(鄂)-2008-0005。按实验要求随机分为6组,每组5只,在无病原体的条件下饲养。为除去NK细胞,小鼠在第1天用200 Gy全身照射。在第0天,将 6×10^6 个HeLa细胞或CasKi细胞经皮下接种到已被照射的小鼠,接着以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个CIKs每周(在0、7、14、21 d)静脉注射1次。然后测量移植肿瘤的体积。计算公式 = 长(mm) × 宽(mm) × 高(mm) / 2。在第28天处死小鼠,检测小鼠和肿瘤的质量。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用ANOVA(Prism, Graph-Pad Software, USA)统计软件进行处理,使用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CIKs的鉴定

人外周血中CD3⁺CD56⁺杀伤细胞稀少,但是

它们可在体外扩增。宫颈癌患者的外周血,体外细胞因子诱导培养2周后,CD3⁺CD56⁺细胞的数量增加大约246倍,即为CIKs。CIKs的存活率在第14天达85%~95%。新鲜外周血由56%的CD3⁺CD56⁻、5%的CD3⁻CD56⁺和6%的CD3⁺CD56⁺细胞组成(图1A)。用IL-2和抗-CD3抗体培养5d后,CD3⁺CD56⁻细胞群显著地增加到88%(图

1E),但是,CD3⁻CD56⁺和CD3⁺CD56⁺细胞没有增加。然而,继续用IL-2培养9d,CD3⁺CD56⁺细胞增加到35%(图1I),CD3⁺CD56⁺CIKs绝对数增加1230倍。此外,绝大多数的CD3⁺CD56⁺CIKs的表型为CD8⁺,不是CD4⁺(图1K、图1L)。在CIKs产生期间,CD3⁺CD56⁺细胞减少。形态学上扩增第14天的CIKs胞体较大,有颗粒,生长致密。

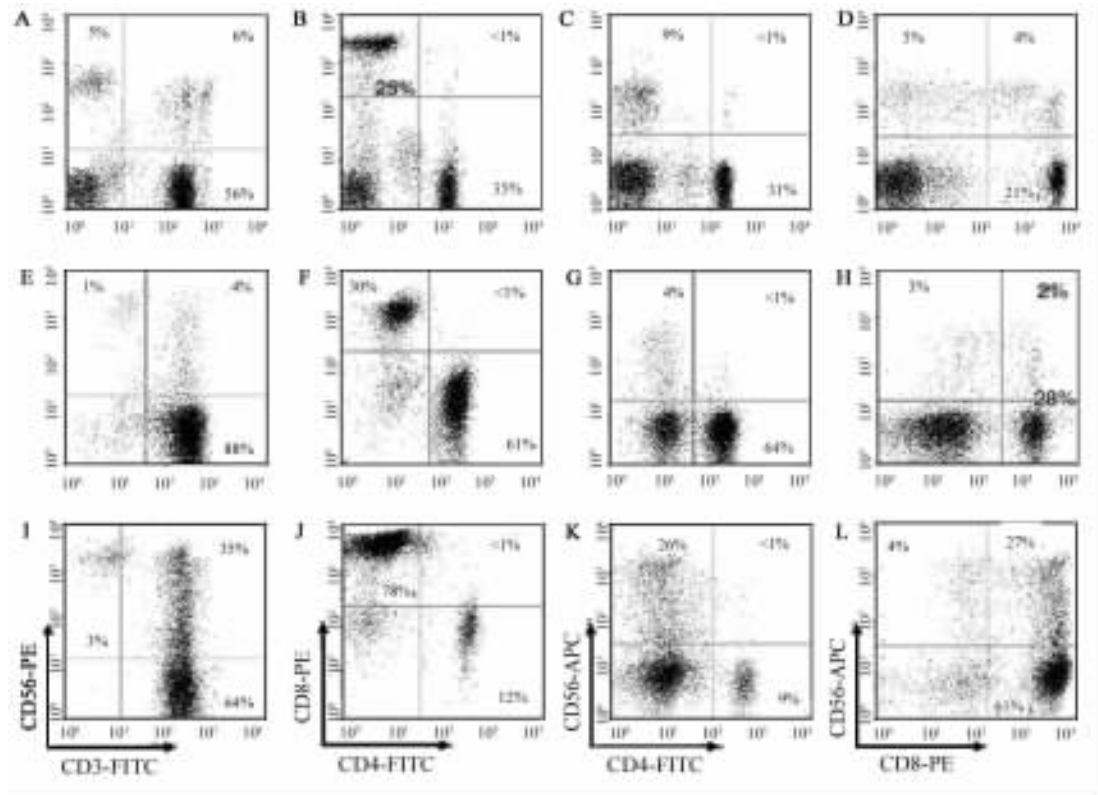


图1 CIKs的表型特征

Fig.1 Phenotypic characterization of CIKs

A-D: PBMCs; E-H: PBMCs cultured with anti-CD3 and IL-2 for 5 d; I-L: PBMCs cultured with anti-CD3 and IL-2 for 14 d

2.2 PHA 激活 CIKs 分泌 IFN- γ 和 TNF- α

收获诱导培养第14天的CIKs,用1、5和10 $\mu\text{g/ml}$ 的PHA激活24h后,收集上清,用ELISA检

测CIKs分泌的IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的水平。结果(图2)显示,PHA激活后,CIKs产生大量的IFN- γ 和TNF- α ,而IL-2的分泌量较少。

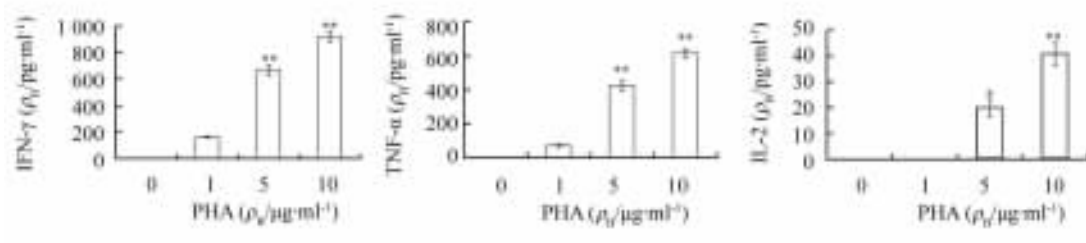


图2 CIKs产生的细胞因子IFN- γ 、TNF- α 和IL-2

Fig.2 IFN- γ , TNF- α and IL-2 produced by CIKs

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ PHA

2.3 CIKs 剂量依赖性地杀伤 CasKi 和 HeLa 细胞

CIKs 以 MHC 非依赖的方式发挥细胞毒作用。用 LDH 释放实验检测健康志愿者外周血的 PBMC 和 CIKs 对 HeLa 和 CasKi 细胞的细胞毒作用, 同预

期结果一致, 新鲜的 PBMC 不能杀伤 CasKi 靶细胞, 但被激活的 CIKs 可显著地杀伤 CasKi 和 HeLa 靶细胞, 最大杀伤率分别达(43.2 ± 1.8)% 和(46.2 ± 1.5)%, 且呈剂量依赖性(图3)。

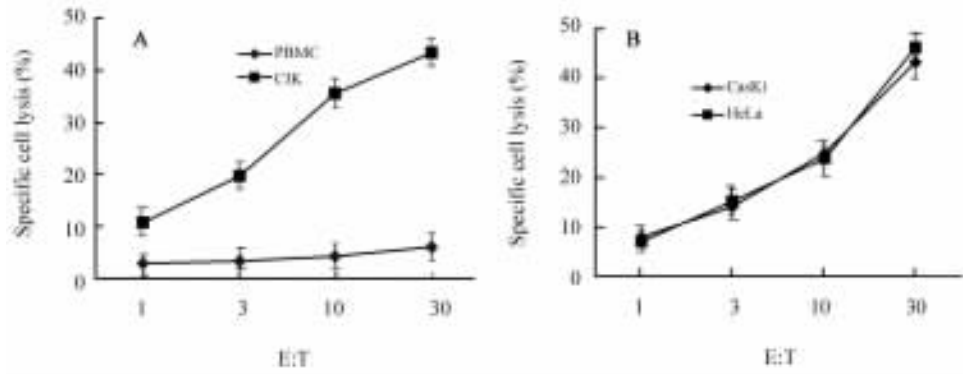


图3 CIKs 剂量依赖性地杀伤 CasKi 细胞和 HeLa 细胞

Fig. 3 CIKs killed CasKi and HeLa cells in a dose-dependent manner

A: PBMCs and CIKs against CasKi cells; B: CIKs against CasKi and HeLa cells

2.4 CIKs 在体内的抗肿瘤效应

照射除去裸鼠内源性 NK 细胞, 6 × 10⁶ 个 CasKi 或 HeLa 细胞皮下接种小鼠, 移植后第 27 天肿瘤分别长到(430 ± 11.37) mm³ 和(410 ± 7.15) mm³(图4)。

CIKs 以每周 1 × 10⁶ 或 1 × 10⁷ 个细胞给予小鼠静脉注射, 结果显示, 体内肿瘤分别被抑制(60.7 ± 5.7)% 和(66.6 ± 5.3)% (图4, P < 0.01)。5-氟尿嘧啶(10 mg/kg)能抑制肿瘤的生长, 作为阳性对照。

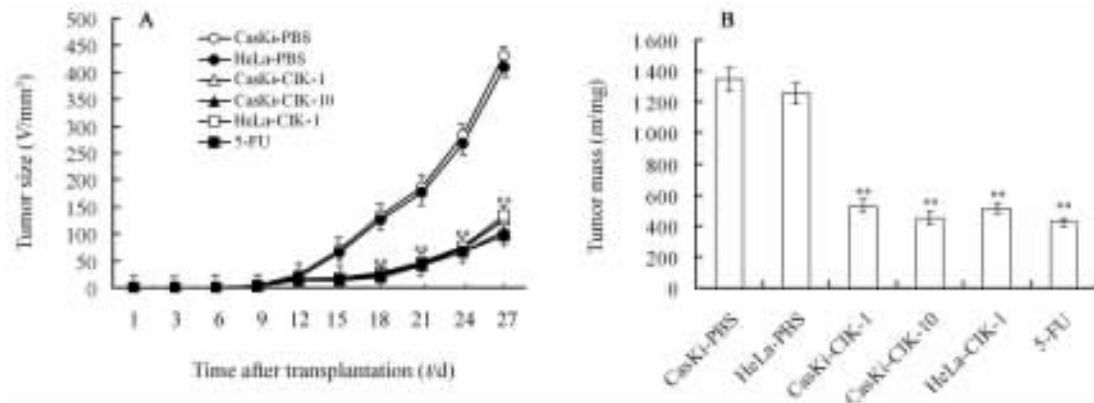


图4 CIKs 在裸鼠体内的抗肿瘤效应

Fig. 4 Anti-tumor activity of CIKs against CasKi and HeLa cells in nude mouse xenograft models

** P < 0.01 vs CasKi + PBS or HeLa + PBS

3 讨论

肿瘤的免疫细胞治疗策略依赖于肿瘤相关抗原的鉴定, 但肿瘤相关抗原仅在一小部分的肿瘤细胞中表达。CIKs 是人外周血细胞和小鼠脾细胞在体外用 IFN-γ、CD3 特异性抗体和 IL-2 刺激后扩增的细胞。CIKs 具有 NK 细胞和 T 细胞的表型, 表达 NK 细胞受体 NKG2D, 通过识别肿瘤细胞表面表达

的 NKG2DL 介导对肿瘤细胞的杀伤^[13-14], 因此, CIKs 对肿瘤的杀伤不依赖肿瘤相关抗原。传统的方法诱导 CIKs, 以人 PBMC 在含 IFN-γ 的培养基中孵育 1 d, 然后加入抗 CD3 抗体、IL-2 和 IL-1β 继续培养 20 d。其中抗 CD3 抗体能启动 T 细胞增殖; IFN-γ、IL-1β 和 TNF-α 则可增加 CIKs 的细胞毒作用; 作为诱导 CIKs 的关键细胞因子, IL-2 能增加 CIKs 的数量和细胞毒作用。需指出的是, 需在加入

IL-2 前加入 IFN- γ , 反之则导致 CIKs 细胞毒减弱, 这表明 IFN- γ 可能诱导 PBMC 表达 IL-2 受体。CD3⁺CD56⁺ 细胞在尚未扩增前占细胞总数的 5%, 扩增后可达到 30% 左右; CD3⁺CD56⁺ 细胞数量经细胞因子诱导后在 30 d 内能扩增大约 1 000 倍。

本研究简化 CIKs 培养方法, 首先用 700 U/ml 的 IL-2 和抗-CD3 抗体培养 5 d, 再继续用 IL-2 诱导 9 d。结果显示, 增殖所得由不同种类的效应细胞组成的群体即为 CIKs, 其中表型为 CD3⁺CD56⁺ 的细胞具有抗肿瘤效应, 第 14 天的数量占总数的 35% (图 1), 其绝对数扩增 1 000 ~ 1 500 倍, 表明此方法可以产生足够数量的 CIKs, 本实验数据证明其在体外亦能够保持较高的细胞毒活性(图 3)。本研究所采用的方法不需要加 IFN- γ , 主要由于用含 IL-2 的新鲜培养基直接加到原有的培养上清中, 原培养上清中有细胞自分泌的细胞因子, 主要是 IFN- γ 和 TNF- α , 并可调节 CIKs 的细胞毒活性。因此, 用这种方法培养 CIKs, 比较经济, 具有临床推广的价值。

本研究在动物模型上证明了 CIKs 治疗宫颈癌的可行性。在 HPV 引起的宫颈癌中, HPV16 和 HPV18 感染占到 65% ~ 70%^[15]。用 CIKs 治疗荷瘤小鼠, 小鼠的体重变化不明显, 这可能与 CIKs 产生 IFN- γ 有关, 这与 Kim 等^[16] 研究显示的 CD3⁺CD56⁺ 细胞比 CD3⁺CD56⁻ 细胞产生更多 IFN- γ 的结果相吻合。因为 IFN- γ 能减弱移植抗宿主病 (GVHD) 的反应。同种动物的脾细胞和骨髓细胞联合使用, 能诱导受体小鼠的 GVHD, 其特征为体重减轻并在移植后 9 d 内死亡^[17]。但是 CIKs 不易诱导 GVHD, 甚至在用 10 倍于对照脾细胞量的 CIKs 治疗时亦未发现明显的 GVHD, GVHD 反应的减轻可能与 CIKs 释放 IFN- γ 有关。用不能产生 IFN- γ 的 IFN- γ 基因敲除的 CIKs 治疗时可引起急性致死的 GVHD, 而用可释放 IFN- γ 的 IFN- γ ^{+/+} 的 CIKs 时则不易引起 GVHD^[10]。IFN- γ 还可诱导原发性慢性淋巴细胞白血病细胞表达 CD54 (ICAM-1), 同时使 CIKs 增加, 而 CIKs 又可分泌 IFN- γ , CD54 与 CD18 (LFA-1) 结合, 介导 CIKs 与慢性淋巴细胞白血病细胞接触, 促使慢性淋巴细胞白血病细胞凋亡^[18]。CIKs 还可通过 CD40/CD40L 的结合, 逆转肿瘤细胞对 Fas 介导的凋亡途径的抗性而介导其凋亡^[19]。

免疫细胞如 NK、LAK、CTL 和 DC 治疗肿瘤, 各有其局限性: NK 和 LAK 细胞抗肿瘤活性较低^[20]; CTL 杀伤作用有 MHC 限制性, 含肿瘤相关性抗原和肿瘤特异性抗原的 CTL 体外不易扩增^[21]; 异体 DC 细胞不易激活效应 T 细胞, 等等。相比较而言, CIKs

有以下几个优势: 容易从肿瘤患者的 PBMC 诱导产生较多数量的 CIKs; CIKs 较 NK/LAK 细胞具有更强的抗肿瘤活性; CIKs 杀伤作用无 MHC 限制性; CIKs 是终末效应细胞, 能够直接杀伤肿瘤细胞; CIKs 不易诱导 GVHD^[22-23]。尽管 CIKs 具有上述优势, 但 CIKs 仍不能完全使肿瘤消退, 需要与其他方法联合使用, 包括融瘤病毒^[24]、树突状细胞共培养^[25]、用基因工程的方法对 CIKs 进一步修饰等^[26]。

总之, 本研究显示改良培养法有效制备 CIKs, CIKs 可在体内和体外有效地杀死宫颈癌细胞模型 (整合 HPV16 基因组的 CasKi 细胞或整合 HPV18 基因组的 HeLa 细胞), CIKs 是宫颈癌细胞免疫疗法有前途的候选细胞。

[参考文献]

- [1] Valdespino VM, Valdespino VE. Cervical cancer screening: State of the art [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2006, 18(1): 35-40.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(2): 153-156.
- [3] 乔友林, 章文华, 李凌, 潘秦镜, 杨玲, 吴令英, 等. 子宫颈癌基因筛查方法的横断面比较研究 [J]. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(1): 50-53.
- [4] Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancer [J]. *Cancer*, 1987, 59(10): 1692-1696.
- [5] Walboomers JM, Jacobs MV, Monas MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12-19.
- [6] 郎景和. 迎接子宫颈癌预防的全球挑战与机遇 [J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(3): 129-131.
- [7] 杨峥嵘, 马原栋, 万骏, 郑义, 王海峰, 赵洁, 等. HPV16, 18, 58mE67 重组腺病毒的构建及克隆表达 [J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(4): 459-463.
- [8] Zheng Y, Zhang YJ, Ma YD, Wan J, Shi CF, Huang LQ. Enhancement of immunotherapeutic effects of HPV16E7 on cervical cancer by fusion with CTLA4 extracellular region [J]. *J Microbiol*, 2008, 46(6): 728-736.
- [9] Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer [J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008, 5(1): 24-31.
- [10] Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production [J]. *Blood*, 2001, 97(10): 2923-2931.
- [11] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent *in vivo* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency [J]. *J Immunol*, 1994, 153(4): 1687-1696.
- [12] Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A

phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11(3): 181-187.

[13] Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells [J]. Blood, 2004, 103(8): 3065-3072.

[14] 黄文荣, 张伯龙. 细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞的研究现状 [J]. 肿瘤防治研究, 2000, 27(2): 157-159.

[15] Sankaranarayanan R. HPV vaccination: The promise & problems [J]. Indian J Med Res, 2009, 130(3): 322-326.

[16] Kim HM, Lim J, Yoon YD, Ahn JM, Kang JS, Lee K, et al. Anti-tumor activity of *ex vivo* expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(13): 1793-1801.

[17] Han SB, Lee CW, Yoon YD, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, et al. Effective prevention of lethal acute graft-versus-host disease by combined immunosuppressive therapy with prodigiosin and cyclosporine A [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(10): 1518-1526.

[18] Kornacker M, Moldenhauer G, Herbst M, Weilguni E, Tita-Nwa F, Harter C, et al. Cytokine-induced killer cells against autologous CLL: Direct cytotoxic effects and induction of immune accessory molecules by interferon-gamma [J]. Int J Cancer, 2006, 119(6): 1377-1382.

[19] Yu J, Zhang W, Jiang H, Li H, Cao S, Ren X. CD4⁺ T cells in CIKs (CD4⁺ CIKs) reversed resistance to fas-mediated apoptosis through CD40/CD40L ligation rather than IFN-gamma stimulation [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(3): 342-354.

[20] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity [J]. J Exp Med, 1991, 174(1): 139-149.

[21] Grabert RC, Cousens LP, Smith JA, Olson S, Gall J, Young WB, et al. Human T cells armed with Her2/neu bispecific antibodies divide, are cytotoxic, and secrete cytokines with repeated stimulation [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2): 569-576.

[22] Nishimura R, Baker J, Beilhack A, Zeiser R, Olson JA, Segal EI, et al. *In vivo* trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity [J]. Blood, 2008, 112(6): 2563-2574.

[23] Sangiolo D, Martinuzzi E, Todorovic M, Vitaggio K, Vallario A, Jordaney N, et al. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIKs) cells: Implications for their infusion across major HLA barriers [J]. Int Immunol, 2008, 20(7): 841-848.

[24] Thorne SH, Negrin RS, Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy [J]. Science, 2006, 311(5768): 1780-1784.

[25] 李世俊, 张连生, 柴 晔, 张玉芬, 张彦明, 曾鹏云, 等. 树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共培养对多药耐药肿瘤细胞系的杀伤活性 [J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(10): 733-737.

[26] Wang K, Gao X, Pang J, Liu X, Cai Y, Zhang Y, et al. Dendritic cells transduced with a PSMA-encoding adenovirus and cocultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against prostate cancer cells [J]. Urol Oncol, 2009, 27(1): 26-32.

[收稿日期] 2010 - 02 - 15 [修回日期] 2010 - 04 - 06
[本文编辑] 王 莹

• 科技动态 •

USP10 通过去泛素化 P53 调控 P53 的定位和稳定性

P53 作为一种重要的肿瘤抑制因子,在肿瘤细胞的生长、凋亡、细胞周期和衰老等过程中发挥着重要调控作用。P53 表达和定位决定其生物学功能的发挥。P53 的表达主要受翻译后调控,如磷酸化、甲基化和泛素化等,其中 E3 泛素连接酶 Mdm2 在调控 P53 的表达和定位中起重要作用,Mdm2 通过泛素化 P53, 导致 P53 的出核,在胞质内发生蛋白酶体依赖的降解。蛋白在去泛素化的同时还可被细胞内的去泛素化酶去泛素化。目前,关于 P53 去泛素化的研究较少,到目前为止,只发现一种去泛素化酶 Hausp 可在核内去泛素化稳定 P53 的表达。但进入胞质内的泛素化 P53 的命运如何,是否可被去泛素化,再次入核发挥生物学效应有待证实。

梅奥医院肿瘤研究和病理研究部的科学家们发现了一种泛素特异性蛋白酶 USP10 可直接结合并去泛素化胞质内的 P53, 稳定 P53 表达,并诱导其再次入核,调控 P53 介导的功能,逆转了 Mdm2 诱导的 P53 转运和降解过程。P53 是 DNA 损伤的重要反应元件。作者发现在 DNA 损伤后,USP10 和 P53 表达明显上调,但当干扰 USP10 表达后,DNA 损伤不影响 P53 的表达,这提示在 DNA 损伤情况下,USP10 同样可以稳定 P53 的表达。DNA 损伤介导的信号主要发生在细胞核内,而 USP10 定位在胞质中,USP10 是怎样参与调控 P53? 作者在实验中观察到 DNA 损伤时,USP10 由胞质向胞核移位,并且该 USP10 表达的上调和核移位受 ATM 介导的磷酸化调控。他们还发现,USP10 在肾肿瘤细胞和肿瘤组织中的表达明显低于正常肾细胞和组织,提示 USP10 可能抑制肾癌的发生;作者利用克隆形成实验证实,USP10 可抑制野生型 P53 肾透明细胞癌的生长。因此,作者提出了 USP10 可作为一种肾肿瘤抑制因子的概念。综上所述,作者发现 USP10 可去泛素化 P53,从而稳定 P53 及其定位,调控其介导的生物学活性。因此,USP10 是一种新的 P53 调控因子。

(王春梅, 李楠 审阅. Yuan J, Luo K, Zhang LZ, Cheville JC, Lou ZK, et al. Cell, 2010, 140(3), 384-396)