

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.003

舒尼替尼诱导耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞表达 NKG2DLs 的机制

黄宇贤¹, 王 杨², 李玉华¹, 杨玉莲¹, 赵同峰¹, 何庆梅¹, 卢惠芳¹, 贺艳杰¹, 黄 睿¹, 郭坤元¹(1. 南方医科大学珠江医院 血液科, 广东 广州 510282; 2. 广东省人民医院 肺癌研究所, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的:初步探讨舒尼替尼诱导高、低表达 ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2)分子的耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞(简称 ABCG2^{high}CNE2/DDP 细胞、ABCG2^{low}CNE2/DDP 细胞)中 NKG2D 配体(natural killer group 2 member D ligands, NKG2DLs)表达的分子机制。方法:Caspase-8 活化试剂盒和线粒体膜电位法分别检测 NK 细胞处理后 ABCG2^{high}CNE2/DDP 细胞和 ABCG2^{low}CNE2/DDP 细胞 caspase-8 活化水平和线粒体膜电位。RT-PCR 检测舒尼替尼处理前后两种 CNE2/DDP 细胞 DNA 损伤修复系统相关信号分子 mRNA 的表达。结果:CNE2/DDP 细胞 + NK 细胞组中两种 CNE2/DDP 细胞 caspase-8 活性均明显增强;舒尼替尼处理后的 ABCG2^{low}CNE2/DDP 细胞 + NK 细胞组和 ABCG2^{high}CNE2/DDP 细胞 + NK 细胞组中 caspase-8 的活性是处理前的 2~2.5 倍($P < 0.01$)。舒尼替尼预处理后, CNE2/DDP 细胞和 NK 细胞共培养体系中两种 CNE2/DDP 细胞的线粒体膜电位分别为(76.58 ± 2.32)% 和(73.11 ± 1.93)%, 较舒尼替尼处理前明显降低($P < 0.05$)。舒尼替尼可上调两种 CNE2/DDP 细胞中 ATR、CHK1 和 CHK2 mRNA 的表达, 并诱导 P53 和 NF-κB mRNA 的表达。结论:舒尼替尼可能通过激活 DNA 损伤修复系统相关信号分子和 NF-κB 的表达, 诱导耐药鼻咽癌 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 的表达, 同时经由死亡受体信号通路和线粒体信号通路增强 NK 细胞诱导的肿瘤细胞凋亡。

[关键词] 舒尼替尼;鼻咽肿瘤;NKG2D 配体;自然杀伤细胞;DNA 损伤

[中图分类号] R730.54; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0256-06

Mechanism of sunitinib inducing NKG2DLs expressions in multidrug resistant nasopharyngeal carcinoma CNE2/DDP cells

HUANG Yu-xian¹, WANG Yang², LI Yu-hua¹, YANG Yu-lian¹, ZHAO Tong-feng¹, HE Qing-mei¹, LU Hui-fang¹, HE Yan-jie¹, HUANG Rui¹, GUO Kun-yuan¹(1. Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Lung Cancer Institute, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism by which sunitinib induces up-regulation of NKG2D ligands (NKG2DLs) expressions in nasopharyngeal carcinoma CNE2/DDP cells with high or low ABCG2 expression (ABCG2^{high}CNE2/DDP cells or ABCG2^{low}CNE2/DDP cells). **Methods:** Caspase-8 activity and mitochondrial membrane potential were detected by caspase-8 activity kit and mitochondrial membrane potential assay kit in ABCG2^{high}CNE2/DDP cells or ABCG2^{low}CNE2/DDP cells after co-cultured with NK cells. Expressions of signal molecules involved in DNA damage and repair system were detected by RT-PCR in ABCG2^{high}CNE2/DDP cells and ABCG2^{low}CNE2/DDP cells before and after sunitinib treatment. **Results:** Caspase-8 activities in ABCG2^{high}CNE2/DDP cells and ABCG2^{low}CNE2/DDP cells were significantly increased after co-cultured with in NK cells. After treatment with sunitinib, caspase-8 activities in the co-culture system were 1-1.5 times higher than those in the untreated ABCG2^{high} and ABCG2^{low}CNE2/DDP cells ($P < 0.01$). Sunitinib inhibited mitochondrial membrane potentials of ABCG2^{high} and ABCG2^{low}CNE2/DDP cells in NK cell co-culture systems, with the potentials in two kinds of sunitinib-treated CNE2/DDP cells decreased to (76.58 ± 2.32)% and (73.11 ± 1.93)%, respectively, which were markedly lower than those in the untreated ABCG2^{high} and ABCG2^{low}CNE2/DDP cells.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30973454);广东省自然科学基金重点项目(No. 9251051501000007)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30973454), and the Key Program of Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 9251051501000007)

[作者简介] 黄宇贤(1980-),男,广东省揭阳市人,博士,南方医科大学附属珠江医院细胞治疗中心负责人,主要从事 NK 细胞受、配体调控和肿瘤免疫调控相关研究, E-mail: hyx6610@163.com

[通信作者] 郭坤元(GUO Kun-yuan, corresponding author), E-mail: gzyuan@pub.guangzhou.gd.cn

DDP cells ($P < 0.05$). Sunitinib could increase mRNA expressions of ATR, CHK1 and CHK2 in ABCG2^{high} and ABCG2^{low} CNE2/DDP cells, and induce P53 and NF- κ B mRNA expressions. **Conclusion:** Sunitinib can up-regulate NKG2DLs expressions in CNE2/DDP cells by activating signaling molecules related to DNA damage and repair system and NF- κ B, and enhance NK cell-induced apoptosis of tumor cells through death receptor and mitochondrial pathways.

[**Key words**] sunitinib; nasopharyngeal neoplasms; natural killer groups 2 member D ligand (NKG2DL); natural killer cell; DNA damage

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 256-261]

随着肿瘤分子生物学、免疫学的发展和人们对肿瘤治疗观念的改变,三大传统治疗方法已经不能满足肿瘤治疗的需要,肿瘤治疗逐渐走向“微创低毒”的时代。特别是晚期肿瘤患者更需要寻找一种毒性作用低且能延长“带瘤生存时间”的治疗方法。过继性细胞免疫治疗和分子靶向治疗应运而生^[1]。

NK 细胞是体内抗肿瘤免疫的重要效应细胞,对耐药性鼻咽癌细胞具有杀伤作用^[2]。NKG2D (natural killer group 2 member D) 是 NK 细胞表面的受体分子。NKG2D 配体 (NKG2D ligands, NKG2DLs) 包括非经典 MHC 样分子 (MICA/B) 和 UL16 结合蛋白家族成员 (ULBP1 ~ ULBP3), 无或弱表达于多种肿瘤细胞表面,可反映肿瘤细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性^[3-6]。有研究^[7-8]发现,低剂量分子靶向药物作用于肿瘤细胞,可引起肿瘤细胞 DNA 损伤,激活 DNA 损伤修复系统相关信号分子,如运动失调性毛细血管扩张症基因突变体 (ataxia telangiectasia mutated, ATM), 或运动失调性毛细血管扩张症基因突变体和 Rad3 相关基因 (ATM- and Rad3-related gene, ATR), 这些分子可促进肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达。本研究以高、低表达三磷酸腺苷 (ATP) 结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2) 的耐药鼻咽癌细胞株 CNE2/DDP 作为细胞模型,选用诱导 CNE2/DDP 细胞 NKG2DLs 表达作用最强的分子靶向药物舒尼替尼 (sunitinib), 检测其对 CNE2/DDP 细胞凋亡途径和 DNA 损伤修复系统相关信号分子表达的影响,初步探讨分子靶向药物诱导肿瘤细胞 NKG2DLs 表达的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料及器材

抗 CD56 免疫磁珠、抗 PE 免疫磁珠购自 Miltenyi Biotec 公司,PE 标记的鼠抗人 ABCG2 单抗购自 eBioscience 公司,TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,cDNA 合成和 PCR 试剂购自 Fermentas 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,RPMI 1640 购自 Gibco 公

司。Caspase-8 活性检测试剂盒、细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒购自南京凯基公司。引物由上海英俊公司合成。倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司,Biophotometer 生物分光光度计购自美国 Eppendorf 公司,PE9700 PCR 仪购自美国 PE 公司,水平核酸电泳仪购自美国 One Lambda 公司,UVI 凝胶成像系统购自德国 Bio-Rad 公司。

1.2 免疫磁珠法分选细胞及实验分组

人耐药鼻咽癌细胞株 CNE2/DDP 由本实验室冻存,复苏后用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 3 μ mol/L DDP 的 RPMI 1640 培养基常规培养。实验中所用细胞均处于对数生长期。收集 CNE2/DDP 细胞,PBS 洗涤 2 次,计数细胞,重悬于 PBS 中。按 1×10^6 /ml 细胞加 0.5 μ g PE 标记的鼠抗人 ABCG2 单抗,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。离心,弃上清,重悬,按 1×10^7 /ml 细胞加入 20 μ l anti-PE 免疫磁珠,作细胞阳性分选。高表达 ABCG2 的 CNE2/DDP 细胞记为 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞,低表达 ABCG2 的 CNE2/DDP 细胞记为 ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞。ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞中 ABCG2 表达率为 75% 以上,ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞中 ABCG2 表达率为 15% 以下。

NK 细胞的分选方法:常规密度梯度离心法分离健康人外周血单个核细胞,PBS 洗涤 2 次,计数细胞,然后加入抗 CD56 磁珠作阳性细胞分选。分选后 NK 细胞中 CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 细胞的纯度达 90% 以上,且细胞状态良好,可以用于后续实验。

实验分组如下: NK 细胞组, ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞组, ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞组, NK 细胞 + ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞组 (ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞与 NK 细胞孵育 4 h), ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞 + NK 细胞组 (ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞与 NK 细胞孵育 4 h), NK 细胞 + 舒尼替尼 + ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞组 (ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞先经舒尼替尼处理 24 h, 再与 NK 共孵育 4 h), NK 细胞 + 舒尼替尼 + ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞组

(ABCG2^{high}CNE/DDP 细胞先经舒尼替尼处理 24 h, 再与 NK 共孵育 4 h)。

1.3 Caspase-8 活性检测试剂盒检测 caspase-8 的活性

收集各处理组细胞, PBS 洗涤 2 次, 离心、计数, 每 3×10^6 个细胞加入 50 μ l 冷裂解缓冲液, 吹打均匀, 置于冰上裂解 60 min, 其间涡旋震荡 3~4 次, 每次 10 s, 或冻融 2~3 次。3 000 \times g 离心 5 min, 小心吸取上清转移至新的离心管中, 置冰上待用。BCA 法测定样品的蛋白浓度。吸取 50 μ l 含 100~200 μ g 蛋白的细胞裂解上清, 加入 50 μ l 的反应缓冲液及 5 μ l caspase-8 底物, 并于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h。用酶标仪在 $\lambda = 450$ nm 和 $\lambda = 590$ nm 处测定各组样品的光密度值(*D*), 计算 caspase-8 的活性。caspase-8 活性 = D_{450}/D_{590} 。

1.4 流式细胞术检测线粒体膜电位

JC-1 是一种阳离子脂质荧光染料, 正常线粒体的膜电位($\Delta\psi_m$)具有极性, JC-1 被迅速摄入线粒体内, 在线粒体内形成多聚体, 多聚体发射光为红色荧光, 可用流式细胞仪的红色通道(FL-2)检测; 而细胞发生凋亡时, 线粒体膜电位去极化, JC-1 以单体的形式存在于胞质内, 发绿色荧光, 可用流式细胞仪的绿色通道(FL-1)检测。收集各处理组细胞, 用

PBS 洗涤 2 次, 离心、计数细胞, 每 5×10^5 个细胞加入 500 μ l JC-1 工作液。吹打均匀, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育 20 min。3 000 \times g 离心 5 min, 收集细胞, 用孵育缓冲液洗涤细胞 2 次, 再用 500 μ l 孵育缓冲液重悬细胞, 用流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化。

1.5 RT-PCR 检测 DNA 损伤修复系统相关信号分子 mRNA 的表达

收集各处理组细胞, 用 RNA 试剂盒提取细胞总 RNA, 电泳鉴定 RNA 纯度。逆转录合成 cDNA, 反应体系总体积为 50 μ l。反应条件如下: 50 $^{\circ}$ C、20 min, 99 $^{\circ}$ C、5 min, 5 $^{\circ}$ C、5 min。PCR 反应按试剂盒说明书进行, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 8 μ l PCR 产物和 2 μ l 上样缓冲液, 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外分光光度计下观察, 并用凝胶图像分析仪照相。DNA 损伤修复系统相关信号分子引物序列见表 1。

1.6 统计学处理

以上各实验均重复 3 次。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS13.0 软件进行数据处理, 各组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 DNA 损伤修复系统相关信号分子的引物
Tab. 1 Primers of signal molecules involved in DNA damage and repair system

Gene	Primer	Sequence	Size (bp)
ATM	sense	5'-ATTTGCTTAGCAGGAGG-3'	697
	antisense	5'-CGTAATGCCCACTTC-3'	
ATR	sense	5'-GCCACTTCTCAACATGAATG-3'	125
	antisense	5'-GCAAGTTTTACTGGACTAGG-3'	
CHK1	sense	5'-AATTGCCATGGACCAACC-3'	145
	antisense	5'-CTAGAGGAGCAGAATCGATT-3'	
CHK2	sense	5'-ATCACCTCCTACCAGTCTGTGC-3'	260
	antisense	5'-GCAAGTTCAACATTATCCCTTT-3'	
NF- κ B	sense	5'-TCAATGGCTACACAGGACCA-3'	680
	antisense	5'-TCTTGAGCTGGCAGTGTT-3'	
P53	sense	5'-TCTGTGACTGCACGTAATC-3'	480
	antisense	5'-CACGGATCTGAAGGGTGAAA-3'	
GSK3	sense	5'-AAGCTTTAACTGAGACTCGC-3'	450
	antisense	5'-TACCTCTAGCCTCTAGTCTA-3'	
β -actin 1	sense	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	410
	antisense	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3'	
β -actin 2	sense	5'-TTGCCAGCGCAAGCCACGT-3'	200
	antisense	5'-ACCTCTGACAGCAGGCAGGAATTT-3'	

2 结果

2.1 舒尼替尼诱导 CNE2/DDP 细胞 caspase-8 活化

Caspase-8 活性检测结果(表 2)显示,单纯的 ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞、ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞和 NK 细胞 caspase-8 的活性均较低,分别为 0.104 ± 0.019 、 0.106 ± 0.013 和 0.110 ± 0.026 。当 NK 细胞和 CNE2/DDP 靶细胞共孵育后,靶细胞 caspase-8 的活性增强,NK 细胞 + ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞组和 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞 + NK 细胞组 caspase-8 活性分别上升到 0.272 ± 0.019 和 0.309 ± 0.047 。舒尼替尼对 CNE2/DDP 靶细胞进行预处理后,NK 细胞 + 舒尼替尼 + ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞组和 NK 细胞 + 舒尼替尼 + ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞组的两种靶细胞 caspase-8 活性分别上升到 0.414 ± 0.030 和 0.513 ± 0.083 ($P < 0.01$)。结果说明,舒尼替尼可增强 CNE2/DDP 细胞对 NK 细胞杀伤的敏感性,两种 CNE2/DDP 靶细胞的 caspase-8 活性增强,且 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞的 caspase-8 活性较 ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞的更高。

表 2 不同处理组 CNE2/DDP 靶细胞 caspase-8 的活性

Tab. 2 Caspase-8 activities of CNE2/DDP target cells in different treatment groups

Group	Caspase-8 activity
NK cell	0.110 ± 0.026
ABCG2 ^{low} CNE2/DDP	0.104 ± 0.019
ABCG2 ^{high} CNE2/DDP	0.106 ± 0.013
ABCG2 ^{low} CNE2/DDP + NK	$0.272 \pm 0.019^*$
ABCG2 ^{high} CNE2/DDP + NK	$0.309 \pm 0.047^\Delta$
ABCG2 ^{low} CNE2/DDP + sunitinib + NK	$0.414 \pm 0.030^{**}$
ABCG2 ^{high} CNE2/DDP + sunitinib + NK	$0.513 \pm 0.083^{\Delta\Delta}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ABCG2^{low} CNE2/DDP;

$\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ABCG2^{high} CNE2/DDP

2.2 舒尼替尼对 CNE2/DDP 细胞线粒体膜电位的影响

细胞线粒体膜电位检测结果(图 1)显示,单纯的 ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞和 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞线粒体膜电位分别为 $(86.53 \pm 3.09)\%$ 和 $(86.45 \pm 3.04)\%$; 与 NK 细胞共孵

育后,两种 CNE2/DDP 细胞线粒体膜电位分别为 $(83.08 \pm 3.85)\%$ 和 $(80.95 \pm 2.33)\%$ ($P < 0.05$)。当 CNE2/DDP 靶细胞经舒尼替尼处理后再与 NK 细胞共孵育时,两种 CNE2/DDP 靶细胞线粒体膜电位分别为 $(76.58 \pm 2.32)\%$ 和 $(73.11 \pm 1.93)\%$,与未处理 CNE2/DDP 细胞 + NK 细胞组相比,线粒体膜电位明显降低($P < 0.05$)。结果说明,舒尼替尼预处理能促进 NK 细胞诱导的 CNE2/DDP 靶细胞凋亡,且耐药程度较高的 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞对舒尼替尼诱导的凋亡反应更敏感。

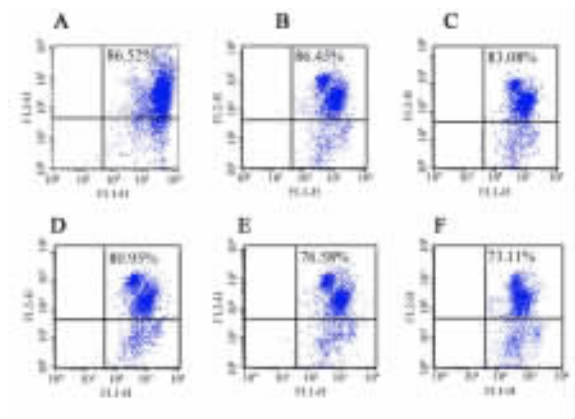


图 1 舒尼替尼对 NK 细胞诱导的 CNE2/DDP 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 1 Effect of sunitinib on mitochondrial membrane potential in CNE2/DDP cells induced by NK cells

A: ABCG2^{low} CNE2/DDP cells; B: ABCG2^{high} CNE2/DDP cells; C: NK + ABCG2^{low} CNE2/DDP cells; D: NK + ABCG2^{high} CNE2/DDP cells; E: NK + sunitinib + ABCG2^{low} CNE2/DDP cells; F: NK + sunitinib + ABCG2^{high} CNE2/DDP cells

2.3 舒尼替尼促进 DNA 损伤修复系统相关信号分子 mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果(图 2)显示,未经舒尼替尼处理的 ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞与 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞各扩增出 3 个片段,分别为 ATR、CHK1 和 CHK2 mRNA。两种 CNE2/DDP 细胞经舒尼替尼处理后,各扩增出 5 个片段,分别为 ATR、CHK1、CHK2、P53 和 NF- κ B mRNA。经舒尼替尼处理后,CNE2/DDP 细胞的 ATR、CHK1 和 CHK2 mRNA 表达量高于未处理组。结果表明,舒尼替尼可诱导 CNE2/DDP 细胞 P53 和 NF- κ B mRNA 的表达,且增强信号分子 ATR、CHK1 和 CHK2 mRNA 的表达。

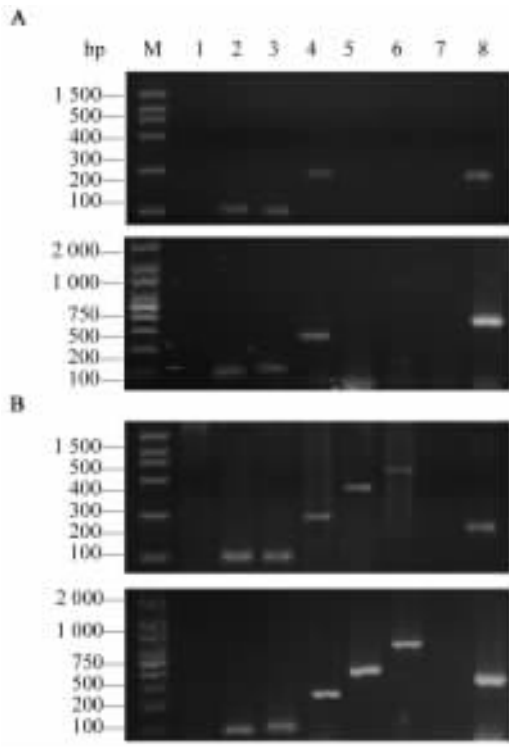


图2 舒尼替尼促进 CNE2/DDP 细胞中 DNA 损伤修复系统相关信号分子 mRNA 的表达

Fig.2 Sunitinib increased mRNA expressions of signal pathway molecules involved in DNA damage and repair system

M: Marker; 1: β-actin; 2: GSK-3; 3: P53; 4: NF-κB; 5: CHK2; 6: CHK1; 7: ATR; 8: ATM

A: ABCG2^{low} CNE2/DDP cells; B: ABCG2^{high} CNE2/DDP cells

3 讨论

肿瘤细胞膜上 NKG2DLs 表达水平的高低随着环境和刺激因素不同而改变,当细胞受到病原体感染、药物刺激或放射损伤时,均可能上调 NKG2DLs 表达。不同环境和刺激因素的强度不同,NKG2DLs 上调表达的种类和表达幅度均不同。NKG2DLs 表达的多样性使机体能够应对不同刺激因素和环境的需要^[5,9]。由于“刺激诱导”表达的多样性,目前仍未有一种理论能完全阐明其中的规律^[10]。有研究^[11-12]发现,刺激因素诱发的 DNA 损伤修复反应可以激活相关信号分子,是诱导细胞 NKG2DLs 表达的主要机制。DNA 损伤修复反应可以活化 ATM 或 ATR 激酶,这两种激酶进一步活化下游 CHK1、CHK2 激酶和其他凋亡相关分子,从而诱导 ULBPs (一类 NKG2DLs)的表达^[13-14]。

本研究中单纯的 ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞和 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞 caspase-8 活性均较弱,当

两种 CNE2/DDP 靶细胞与 NK 细胞孵育后,CNE2/DDP 靶细胞的 caspase-8 活性明显提高。当两种靶细胞先经舒尼替尼处理后再进行 NK 细胞杀伤实验,两种 CNE2/DDP 细胞中 caspase-8 活性提高 1 ~ 1.5 倍。Caspase-8 是死亡受体信号通路关键的激酶,CNE2/DDP 细胞经舒尼替尼预处理后,caspase-8 活性明显增强,说明舒尼替尼可能通过死亡受体信号通路诱导 CNE2/DDP 细胞凋亡。

同样,单纯的 ABCG2^{low} CNE2/DDP 细胞和 ABCG2^{high} CNE2/DDP 细胞线粒体膜电位分别为 (86.53 ± 3.09)% 和 (86.45 ± 3.04)%,当两种 CNE2/DDP 细胞与 NK 细胞共孵育后,细胞线粒体膜电位分别下降到 (83.08 ± 3.85)% 和 (80.95 ± 2.33)%。当两种 CNE2/DDP 靶细胞先用舒尼替尼处理再与 NK 细胞共孵育时,两种细胞线粒体膜电位分别为 (76.58 ± 2.32)%、(73.11 ± 1.93)%,与未处理靶细胞 + NK 细胞组相比,线粒体膜电位明显降低。线粒体膜电位的改变是细胞凋亡的重要标志,一旦细胞线粒体电位发生变化,细胞就进入不可逆的凋亡过程。CNE2/DDP 靶细胞经舒尼替尼处理后再与 NK 细胞共孵育后,线粒体膜电位明显降低,说明舒尼替尼可能通过线粒体信号通路诱导 CNE2/DDP 细胞凋亡。

药物为什么能诱导肿瘤细胞表达 NKG2DLs,一直是学者研究的重点。根据 DNA 损伤修复反应诱导 NKG2DLs 表达的理论^[15],药物作用会启动肿瘤细胞 DNA 损伤修复反应,如低剂量的药物刺激可上调 ATR 的表达,下调 ATM 的表达;而高剂量的药物刺激下调 ATR 的表达,上调 ATM 的表达^[16]。本研究中,未经舒尼替尼药物处理时,两种 CNE2/DDP 细胞 ATR、CHK1 和 CHK2 mRNA 的表达较弱;经低剂量舒尼替尼处理后,两种 CNE2/DDP 细胞中 ATR、CHK1 和 CHK2 mRNA 表达量升高,且扩增出两个新片段,分别是 NF-κB 和 P53。NF-κB 是一种多功能的转录因子,广泛参与多种基因的转录调控^[17]。Robert 等^[18]认为在 NKG2DLs 的启动子序列中有 NF-κB 等的结合位点,这些结合位点对 NKG2DLs 的诱导表达发挥重要作用。本研究中,两种未处理的 CNE2/DDP 细胞,RT-PCR 不能扩增出 NF-κB mRNA,经舒尼替尼处理后可扩增出 NF-κB mRNA,考虑到舒尼替尼可上调两种 CNE2/DDP 细胞中 5 种 NKG2DLs 的表达,提示这些信号分子和转录因子参与肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达。舒尼替尼处理还可上调肿瘤细胞 P53 的表达,可能通过 P53 增强肿瘤细胞 caspase-8 的活性或诱导线粒体膜电

位的改变,启动死亡受体信号通路和线粒体信号通路,引起肿瘤细胞凋亡。但舒尼替尼是否通过 NF- κ B 诱导肿瘤细胞 NKG2DLs 的表达,以及是否通过 P53 基因促进细胞凋亡,还需进一步实验验证。

[参 考 文 献]

[1] Frazier JL, Han JE, Lim M, Olivi A. Immunotherapy combined with chemotherapy in the treatment of tumors [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2010, 21(1): 187-194.

[2] Merlo A, Turrini R, Dolcetti R, Zanovello P, Amadori A, Rosato A. Adoptive cell therapy against EBV-related malignancies: A survey of clinical results [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(9): 1265-1294.

[3] Dranoff G. Targets of protective tumor immunity [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1174(33): 74-80.

[4] van Belle TL, von Herrth MG. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity [J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(1): 8-11.

[5] Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity [J]. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5944-5958.

[6] Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells [J]. *Immunol Rev*, 2006, 214: 130-142.

[7] Gasser S. DNA damage response and development of targeted cancer treatments [J]. *Ann Med*, 2007, 39(6): 457-464.

[8] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease [J]. *Nature*, 2009, 461(7267): 1071-1078.

[9] Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: Immunobiology and clinical implications [J]. *Immunol Res*, 2008, 40(1): 18-34.

[10] Butler JE, Moore MB, Presnell SR, Chan HW, Chalupny NJ, Lutz CT. Proteasome regulation of ULBP1 transcription [J]. *J Immunol*, 2009, 182(10): 6600-6609.

[11] González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. NKG2D ligands: Key targets of the immune response [J]. *Trends Immunol*, 2008, 29(8): 397-403.

[12] Cimprich KA, Cortez D. ATR: An essential regulator of genome integrity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(8): 616-627.

[13] Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKCs to sites of DNA damage [J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 605-611.

[14] Kato N, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Iba M. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICCA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemia cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells [J]. *Leukemia*, 2007, 21(10): 2103-2108.

[15] Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands for the NKG2D receptor [J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1186-1190.

[16] Gasser S, Raulet DH. The DNA damage response arouses the immune system [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 3959-3962.

[17] Janssens S, Tschopp J. Signals from within: The DNA-damage-induced NF-kappaB response [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(5): 773-784.

[18] Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKG2D ligand gene expression [J]. *Hum Immunol*, 2006, 67(3): 159-169.

[收稿日期] 2009 - 12 - 12

[修回日期] 2010 - 01 - 20

[本文编辑] 徐红梅

· 读者 · 作者 · 编者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102. 8 - 93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: ^{60}Co , ^{32}P , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: N^{14} , Co^{60} 等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: H^+ , Cl^- , O^{2-} , Mg^{2+} , Al^{3+} , PO_4^{3-} 等,不应写成 O^{-2} , O^{--} , Mg^{+2} , Mg^{++} , Al^{+++} , PO_4^{-3} 等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用 * ; 核子激发态用正体 m, 也可用 *)标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$, $^{110}\text{Ag}^*$, He^* , NO^* 等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: H_2 , FeSO_4 等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$, $_{26}\text{Fe}$ 等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锕)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(钚),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)