

丙戊酸钠增强免疫细胞对人膀胱癌细胞的杀伤作用*

邓汪东¹ 杨峰涛² 丁国栋¹

[摘要] 目的:探讨丙戊酸钠(VPA)对膀胱癌细胞 MICA 表达的影响以及所产生的肿瘤免疫作用,以期防治膀胱癌复发和浸润提供新的治疗方法。方法:采用不同浓度 VPA 处理人膀胱尿路上皮癌 T₂₄ 细胞后,用半定量 RT-PCR 和流式细胞术检测癌细胞中 MICA mRNA 和蛋白表达。用乳酸脱氢酶法检测外周血单个核细胞(PBMCs)对经 VPA 处理的 T₂₄ 细胞的杀伤作用。结果:VPA 从 mRNA 和蛋白水平诱导 T₂₄ 细胞表达 MICA,并增强 T₂₄ 细胞对 PBMCs 细胞毒作用的敏感性。结论:VPA 能增强膀胱癌对免疫细胞杀伤作用的敏感性,可作为防治膀胱癌的辅助药物。

[关键词] 膀胱癌;丙戊酸钠;NKG2D;MICA

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2014.06.029

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A

Sodium valproate enhances the cytotoxicity of immune cells to human bladder cancer cells

DENG Wangdong¹ YANG Fengtao² DING Guodong¹

(¹Department of Urology, Affiliated Meizhou Hospital of SUN Yat-sen University, Meizhou, Guangdong, 514031, China; ²Department of Urology, First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College)

Corresponding author: YANG Fengtao, E-mail: dengziyang2003@163.com

Abstract Objective: To investigate the effect of sodium valproate (VPA) on the expression of MICA and PBMCs-mediated cytotoxicity in T₂₄ bladder cancer cells so as to provide a new method for treatment and prevention of recurrent and infiltrating bladder cancer. **Method:** T₂₄ cancer cells were treated with VPA and the expression of MICA at the mRNA and protein levels were analyzed by RT-PCR and flow cytometry. Cytotoxicity of PBMCs against the T₂₄ cells was investigated with the lactate dehydrogenase release assay. **Result:** VPA increased MICA expression in T₂₄ cells and sensitizes cancer cells to cytotoxicity of PBMCs. **Conclusion:** VPA sensitizes human bladder cancer cells to cytotoxicity of immune cells.

Key words bladder cancer; sodium valproate; NKG2D; MICA

卡介苗(BCG)膀胱灌注对预防膀胱癌术后复发、治疗原位癌和防止肿瘤进展方面有显著疗效。有研究报道 BCG 治疗膀胱癌的可能机制是能活化 NK/T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞,它们通过 NKG2D 受体与癌细胞的 MICA、MICB 蛋白结合,发挥细胞毒作用^[1]。然而,BCG 因其毒副作用较强、患者耐受较差而限制了其在临床的应用。因此,寻找毒副作用较少的免疫调节剂来替代或增强 BCG 的免疫刺激作用具有实际意义。近年来,组蛋白乙酰化在基因表达调控方面的作用备受关注,去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACIs)通过调控基因表达发挥抗肿瘤作用^[2]。丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)是一种常用的抗癫痫药,毒

副作用较少,具 HDACIs 功能。本研究探讨 VPA 对膀胱癌细胞 MICA 表达的影响以及所产生的抗肿瘤免疫作用,以期防治膀胱癌复发和浸润提供新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象与试剂

选用人膀胱尿路上皮癌细胞株 T₂₄ 为研究对象。主要试剂有高糖 DMEM 培养基(Gibco)、RNA 提取试剂盒(TRIZOL Reagent, Invitrogen)、逆转录试剂盒(Takara 宝生物有限公司)、PCR 扩增试剂盒(Takara 宝生物有限公司)、羊抗人 MICA 抗体(R & D Systems)、2-丙基戊酸钠(Sigma)、乳酸脱氢酶检测试剂盒(Sigma)。

1.2 研究方法

VPA 诱导实验:人膀胱尿路上皮癌细胞株 T₂₄,复苏后采用含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 培养基(Gibco)培养。按每皿 7×10^5 细胞密度将

* 基金项目:广东省科技计划项目资助(编号 2010B031600279);广东省医学科研基金资助项目(编号 A2010398)

¹ 中山大学附属梅州医院泌尿外科(广东梅州,514031)

² 汕头大学医学院第一附属医院泌尿外科

通信作者:杨峰涛, E-mail: dengziyang2003@163.com

T₂₄细胞接种于 60 mm 培养皿。培养 24 小时后按以下分组进行处理:空白对照组、0.5 mmol/L VPA 组、1 mmol/L VPA 组和 2 mmol/L VPA 组。VPA 处理 24 小时后加入 Trizol 提取总 RNA 或继续培养 48 小时后收集细胞行流式细胞术检测。

半定量 RT-PCR:按 TRIzol Reagent 说明书提取细胞总 RNA, cDNA 第一链的合成按逆转录试剂盒说明书操作:①PCR 扩增 MICA 基因, 采用 GAPDH 基因作内参照, 引物序列如下: MICA 为 5'-GTGCCCCAGTCCTCCAGAGCTCAG-3', 5'-GTGGCATCCCTGTGGTCACTCGTC-3'; GAPDH 为 5'-CACTGACACGTTGGCAGTGG-3', 5'-CATGGAGAAGGCTGGGGCTC-3'。②PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min; 循环条件为 95 °C 反应 40 s, 65 °C 反应 1 min, 72 °C 反应 1 min, 共 28 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。③采用图像分析软件 GeneGenius 对电泳结果进行半定量分析。以对照组的 MICA/GAPDH 灰度比值为基准, 计算各组 MICA/GAPDH 的相对灰度比值。

流式细胞术:收集细胞, 各取 100 μ l 细胞悬液 (约含 10⁶ 细胞) 加入 50 μ l 羊抗人 MICA 抗体和阴性对照羊单抗 IgG₁, 室温避光反应 30 min。用 PBS 洗涤后加入 50 μ l 的 FITC 标记兔抗羊 IgG, 室温暗处孵育 30 min。PBS 洗涤后加入 500 μ l 的 PBS, 上机观察。

乳酸脱氢酶法检测:采用此法检测 PBMCs 对膀胱癌细胞的细胞毒作用:①人外周血单个核细胞 (PBMCs) 分离。抽取 1.5 ml 健康人静脉血, 加入 1.5 ml Hank's 液, 混匀。试管内加入 2 ml 淋巴细胞分离液, 然后加入 3 ml 稀释血, 离心后观察液体的分层现象。吸取淋巴细胞层, 加入 Hank's 液后细胞计数。②乳酸脱氢酶法检测 PBMCs 对 T₂₄ 细胞的杀伤作用。按操作说明书进行操作。以每孔 3000 细胞密度将 T₂₄ 细胞接种于 96 孔板, 培养 24 小时后按以下分组处理:空白对照组、最大酶活性对照组、对照组 (无 VPA 处理)、1 mmol/L VPA 组、1 mmol/L VPA + 10 μ g/ml 兔 IgG 组、1 mmol/L VPA + 10 μ g/ml 兔抗人 MICA 单抗组。先用 1 mmol/L VPA 处理 48 h, 再加入兔 IgG₁ 或 MICA 单抗培养 30 min。除空白对照组和最大酶活性对照组外, 各组加入 PBMCs 共培养 4 h, 最大酶活性对照孔在共培养 3 小时后加入乳酸脱氢酶 (LDH) 释放剂。各孔加入 LDH 检测工作液, 孵育 30 min 后于 490 nm 处测定吸光度, 并计算细胞毒性。

1.3 统计学处理

使用统计学软件 SPSS13.0 进行统计学分析。两组间均数比较采用 Student's *t* 检验, 以 $P < 0.05$

定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VPA 增强膀胱癌细胞表达 MICA

不同浓度 VPA 处理 24 小时后, 采用半定量 RT-PCR 进行检测, 显示膀胱癌细胞 MICA mRNA 表达分别增加 1.25~2.14 倍 (图 1), 与对照组相比, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。VPA 处理 48 小时后, 采用流式细胞术进行检测, 显示细胞表面 MICA 蛋白表达也上调 (图 2), 且呈 VPA 处理浓度依赖性。表明 VPA 从 mRNA 和蛋白水平增强膀胱癌细胞 MICA 的表达。

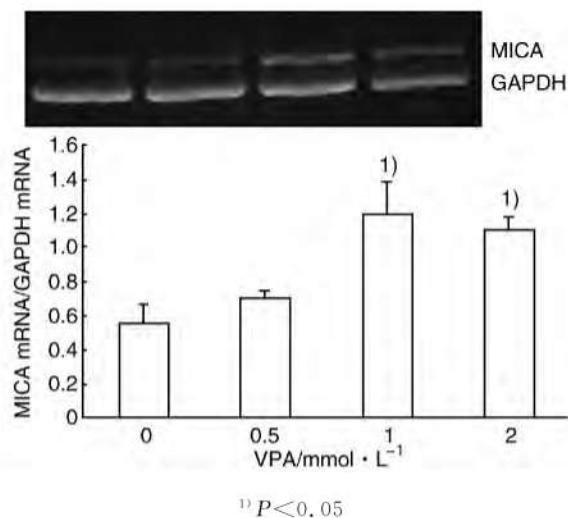
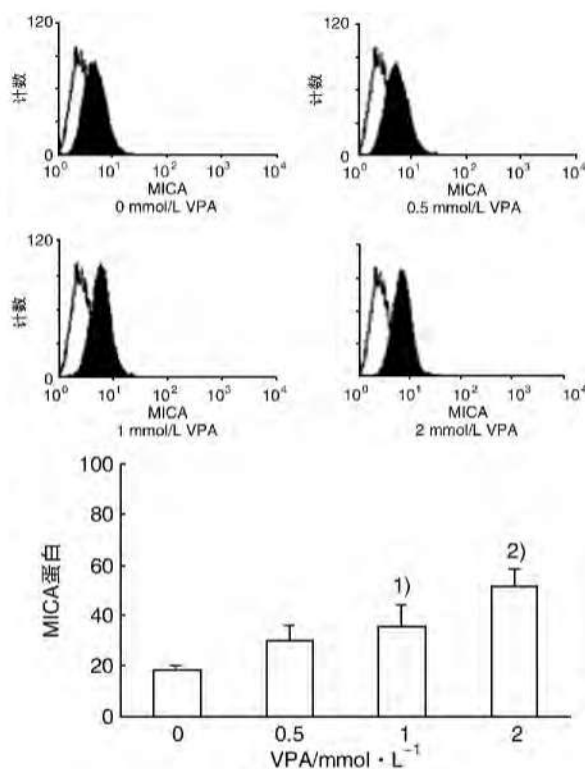


图 1 VPA 对膀胱癌细胞 MICA mRNA 表达的影响

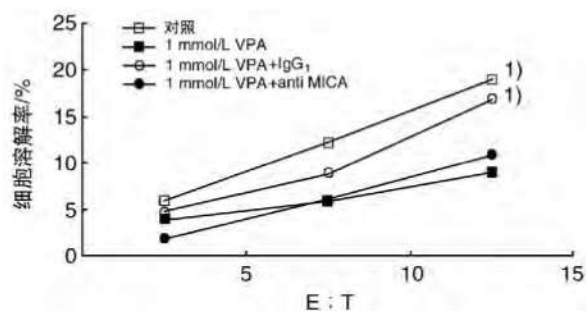


¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 2 VPA 对膀胱癌细胞 MICA 蛋白表达的影响

2.2 VPA 增强膀胱癌细胞对细胞毒作用的敏感性

PBMCs 对经 1 mmol/L VPA 处理 48 小时的癌细胞溶解率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 采用单克隆抗体封闭癌细胞表面的 MICA 蛋白后, 细胞溶解率下降 ($P < 0.05$)。研究结果提示, VPA 能增强膀胱癌细胞对 PBMCs 细胞毒作用的敏感性, 而且该致敏作用依赖于 MICA 蛋白的表达(图 3)。



¹⁾ $P < 0.05$

图3 PBMCs 对膀胱癌细胞的杀伤作用

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 术后易复发, 而且随着每次复发, 肿瘤的恶性程度也不断升高。为预防浅表性膀胱癌术后复发, 目前主要采用术后膀胱灌注治疗。BCG 膀胱灌注对预防膀胱癌术后复发和防止肿瘤进展方面有显著疗效。BCG 的具体抗癌机制尚不清楚, 可能与 BCG 诱发的迟发性免疫反应进而激活非特异性和特异性抗肿瘤免疫反应有关。最近有研究报道, BCG 治疗膀胱癌的可能机制是能活化 NK/T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞, 它们通过 NKG2D 受体与癌细胞的 MICA、MICB 结合而发挥细胞毒作用, 而其他受体可能主要与免疫细胞的活化有关^[1]。因此, NKG2D-MICA 介导的免疫监视可能在膀胱癌的防治方面起较重要作用, 可作为膀胱癌的免疫治疗靶。

活化性受体 NKG2D 表达于 NK 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)、记忆 T 细胞和 δ T 细胞表面。NK 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞通过 NKG2D 受体与肿瘤细胞的 NKG2DL 结合而直接被激活并杀伤肿瘤细胞; CTL 的激活需要双重刺激信号, NKG2D 受体与 NKG2DL 结合可为 CTL 提供第二刺激信号。免疫监视系统对转化细胞的识别和清除是机体防御肿瘤发生的重要防线。因此, NKG2D-NKG2DL 介导的免疫监视在抗肿瘤免疫中扮演重要角色。NKG2DL 有多种, 其中 MHC I 类链相关蛋白 A (MHC class-I-chain-related protein A, MICA) 是人类主要的 NKG2D 配体。多数上皮组织几乎不表达或弱表达 MICA, 当上皮细胞发生恶生转化

时可出现 MICA 过度表达。免疫细胞可通过 NKG2D 受体与 MICA 的结合识别恶生转化的上皮细胞, 发挥杀伤作用, 并产生抗肿瘤免疫记忆^[3]。我们对 75 例膀胱尿路上皮癌中 MICA 蛋白表达的研究发现 48% 膀胱癌阳性表达 MICA 蛋白, 显著高于正常膀胱黏膜, 而且 MICA 蛋白在浸润性膀胱癌 ($T_1 \sim T_4$ 期) 的表达低于非浸润性膀胱癌 (T_a 期), 提示 MICA 蛋白表达上调可能与膀胱尿路上皮癌的发生有关, 而 MICA 蛋白表达缺失可能与膀胱癌的浸润有关^[4]。此外, 阳性表达 MICA 蛋白的膀胱癌多数同时伴有较多淋巴细胞浸润。然而, 膀胱癌的持续存在提示肿瘤内浸润的淋巴细胞并不能通过 MICA-NKG2D 介导的免疫监视作用来有效清除肿瘤。MICA-NKG2D 介导的抗肿瘤免疫取决于肿瘤细胞表面 MICA 蛋白的表达和免疫效应细胞表面 NKG2D 受体的密度。上调效应细胞 NKG2D 受体或肿瘤细胞 MICA 表达都取得良好的肿瘤预防和治疗效果^[5,6]。然而, 基因转染技术在人体的应用因为靶向性、转染率低和安全性等问题受到限制, 利用靶向性高、毒副作用少的药物来上调肿瘤 MICA 的表达具有更好的实际应用性。

近年来, 组蛋白乙酰化在基因表达调控方面的作用备受关注, 组蛋白乙酰化促进基因转录, 而去乙酰化抑制基因转录。组蛋白乙酰化程度主要受乙酰化酶和去乙酰化酶调节。去乙酰化酶抑制剂 (HDACIs) 通过增加组蛋白的乙酰化诱导肿瘤细胞生长停滞、调亡和分化, 而且这些生物学作用只选择性作用于肿瘤细胞。此外, HDACIs 具有免疫调节功能, 可诱导肿瘤细胞表达 MHC I、II 类抗原, 共刺激分子 CD40、B7 和细胞粘附分子 ICAM-1, 调节免疫细胞的细胞因子表达如 IFN- γ 、IL-12 和 IL-10, 具有增强免疫识别和免疫效应细胞活性作用^[7,8]。因此, HDACIs 有希望作为新的抗癌药物。VPA 是一种常用的抗癫痫药, 毒副作用较少, 病人的耐受性较好。近年来研究表明, 该药是一种强的 HDACIs, 能针对地抑制肿瘤细胞的增殖、浸润, 诱导肿瘤细胞分化、调亡和抑制血管生长, 具有抗肿瘤作用^[2]。在泌尿生殖系统肿瘤方面, VPA 可以抑制膀胱癌及前列腺癌细胞的生长和浸润, 协同使用能明显增加丝裂霉素、顺铂和阿霉素的抗癌作用^[9,10]。Armeanu 等^[11]报道 VPA 可诱导肝癌细胞表达 MICA、MICB 蛋白, 通过与 NK 细胞的 NKG2D 受体结合激发和增强 NK 细胞对肝癌细胞的杀伤作用, 而且 VPA 对 MICA、MICB 蛋白的诱导只针对肝癌细胞, 对正常肝细胞不起作用。除肝癌外, VPA 还可通过诱导骨肉瘤、多发性骨髓瘤、白血病、肾细胞癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌等肿瘤表达 MICA 和其它 NKG2D 配体, 增强 NK 细

胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[12~15]。表明 VPA 的抗肿瘤免疫作用具有广谱性,不受限于肿瘤的组织学类型。为探讨 VPA 对膀胱癌细胞是否具有类似作用,我们采用不同浓度 VPA 处理人膀胱癌 T₂₄ 细胞,研究结果显示 VPA 能诱导膀胱癌细胞表达 MICA,而且能增强膀胱癌细胞对外周血单个核细胞的细胞毒作用的敏感性;采用抗 MICA 单抗封闭癌细胞表面 MICA 蛋白后,能不同程度地阻断外周血单个核细胞对膀胱癌细胞的杀伤作用。Suzuki 等^[16] 也发现 VPA 能上调人膀胱癌细胞的 MICA 表达,增强 $\gamma\delta$ T 细胞对膀胱癌细胞的杀伤作用。因此,VPA 能增强 MICA-NKG2D 介导的免疫监视作用。与其它 HDACIs 相比,VPA 具有毒副作用较低、半衰期长、患者耐受性好的优点,可作为防治膀胱癌的新辅助药物。

MICA-NKG2D 介导的免疫监视作用受多种因素影响。除依赖于肿瘤细胞 MICA 和免疫细胞 NKG2D 表达外,还受这两个分子的立体构象、结合位点的亲和力等多种因素影响。要利用 MICA-NKG2D 介导的免疫监视作用达到防治肿瘤目的,需要更深入了解这两个分子表达、结合及效能发挥的机制。

[参考文献]

- Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, et al. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(8): 1245—1255.
- Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, et al. Valproic acid as epigenetic cancer drug: pre-clinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(3): 206—222.
- Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity[J]. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5944—5958.
- 卢善明,邓汪东,杨峰涛. 膀胱尿路上皮癌中 MHC I 类链相关蛋白的表达及临床意义[J]. *汕头大学医学院学报*, 2010, 23(1): 29—31.
- Barber A, Zhang T, DeMars L R. Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 5003—5008.
- Busche A, Goldmann T, Naumann U, et al. Natural killer cell-mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic overexpression of major histocompatibility complex class I chain-related gene A[J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(2): 135—146.
- Carafa V, Miceli M, Altucci L, et al. Histone deacetylase inhibitors: a patent review (2009 — 2011)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23(1): 1—17.
- Khan A N, Tomasi T B. Histone deacetylase regulation of immune gene expression in tumor cells[J]. *Immunol Res*, 2008, 40(2): 164—78.
- Byun S S, Kim F J, Khandrika L, et al. Differential effects of valproic acid on growth, proliferation and metastasis in HTB5 and HTB9 bladder cancer cell lines[J]. *Cancer Lett*, 2009, 281(2): 196—202.
- Chen C L, Sung J, Cohen M, et al. Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(2): 533—542.
- Armeanu S, Bitzer M, Lauer U M. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(14): 6321—6329.
- Yang F, Shao Y, Yang F, et al. Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression and enhances susceptibility of human renal carcinoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity[J]. *Arch Med Sci*, 2013, 9(2): 323—331.
- Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, et al. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, augments the expression of cell-surface NKG2D ligands, MICA/B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(6): 1621—1627.
- Chávez-Blanco A, De la Cruz-Hernández E, Domínguez G I, et al. Upregulation of NKG2D ligands and enhanced natural killer cell cytotoxicity by hydralazine and valproate[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(6): 1491—1499.
- Pfeiffer M M, Burow H, Schleicher S, et al. Influence of Histone Deacetylase Inhibitors and DNA-Methyltransferase Inhibitors on the NK Cell-Mediated Lysis of Pediatric B-Lineage Leukemia[J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 99.
- Suzuki T, Terao S, Acharya B, et al. The antitumour effect of $\{\gamma\}\{\delta\}$ T-cells is enhanced by valproic acid-induced up-regulation of NKG2D ligands[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(11): 4509—4513.

(收稿日期:2014-04-13)