

Sh-PLC ϵ 提高IL-2治疗肾癌疗效的研究

杨锦潇¹ 段李梅¹ 范佳鑫¹ 李婷¹ 范砚茹¹ 袁鸿玲¹ 吴小侯² 罗春丽^{1*}

¹重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

²重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

摘要 该实验旨在探讨磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C ϵ (phospholipase C ϵ , PLC ϵ)是否在白介素2(interleukin 2, IL-2)治疗肾癌的过程中发挥一定的作用。采用sh-PLC ϵ 慢病毒转染肾癌细胞株786-o。MTT法检测IL-2处理肾癌细胞最适浓度, 使用最适浓度IL-2处理细胞。流式细胞术检测细胞凋亡。DAPI染色观察细胞中凋亡小体。q-PCR、Western blot检测Fas/FasL以及Fas下游相关分子在基因水平以及蛋白水平的表达变化。将肿瘤细胞与淋巴细胞进行共培养, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示, 敲低PLC ϵ 后, Fas/FasL表达降低, 而IL-2处理后, 会逆转这种效果。检测Fas下游相关通路后发现, IL-2处理阴性对照(negative control, NC)组后, Fas下游凋亡抑制信号通路FADD/cFlip/Traf2启动, IL-2处理sh-PLC ϵ 组后, Fas下游凋亡信号通路FADD/Caspase8/Caspase3启动。共培养实验后流式细胞术结果显示, IL-2处理与sh-PLC ϵ 联用组细胞凋亡比例最高。该实验证明, sh-PLC ϵ 可以通过启动Fas下游凋亡信号通路, 抑制凋亡抑制信号通路来提高IL-2治疗肾癌的疗效。

关键词 肾癌; Fas/FasL; IL-2; 细胞凋亡; 免疫逃逸

Sh-PLC ϵ Improve the Efficacy of IL-2 in the Treatment of Renal Cell Carcinoma

YANG Jinxiao¹, DUAN Limei¹, FAN Jiabin¹, LI Ting¹, FAN Yanru¹, YUAN Hongling¹, WU Xiaohou², LUO Chunli^{1*}

¹Key Laboratory of Diagnostics Medicine of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The purpose of this study was to investigate whether PLC ϵ (phospholipase C ϵ) plays a role in the treatment of renal cell carcinoma with IL-2 (interleukin 2). We first built sh-PLC ϵ cell line by transfecting LV-sh-PLC ϵ into renal cancer cell 786-o. Cells were treated with the optimum concentration of IL-2 detected by MTT. Flow cytometry was used to detect apoptotic cells. DAPI staining was used to observe apoptotic bodies in cells. q-PCR and Western blot were used to detect Fas/FasL and Fas downstream molecules at mRNA level and protein level. Tumor cells and lymphocytes were co-cultured, then apoptotic cells were detected by flow cytometry. The results showed that the expression of Fas/FasL was decreased after knocking down PLC ϵ , but the effect was reversed after IL-2 treatment. Detecting the downstream pathway of Fas, we found that FADD/cFlip/Traf2 signaling pathway was initiated in NC (negative control) group treated with IL-2 and the Fas downstream signaling pathway FADD/Caspase8/Caspase3 was initiated in sh-PLC ϵ group after IL-2 treatment. The results of flow cytometry showed that the apoptotic rate was the highest in the group treated with IL-2 and sh-PLC ϵ . This study demonstrated that sh-PLC ϵ could improve the therapeutic effect of IL-2 on renal cell carcinoma by activating the downstream apoptotic signal-

收稿日期: 2019-07-05 接受日期: 2019-09-03

国家自然科学基金(批准号: 81072086)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68584890, E-mail: luochunli79@126.com

Received: July 5, 2019 Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81072086)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68584890, E-mail: luochunli79@126.com

网络出版时间: 2020-01-07 12:15:29

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200107.1215.002.html>

ing pathway of Fas and inhibiting the apoptotic inhibition signaling pathway.

Keywords renal cell carcinoma; Fas/FasL; IL-2; apoptosis; immune escape

肾癌(renal cell carcinoma, RCC)是起源于肾实质泌尿小管上皮系统的恶性肿瘤, 1998—2008年, 中国肿瘤登记地区RCC的死亡率总体呈增长趋势, 年均增长死亡率为7.63%。随后, 总体趋势趋于稳定。总的来说, 中国肾细胞癌死亡率的增长男性略高于女性, 城市地区低于农村地区^[1]。

磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C ϵ (phospholipase C ϵ , PLC ϵ)是利用酵母双杂交筛选技术在线虫中发现的一种磷脂酶C的同工酶^[2], 除了拥有磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C(phospholipase C, PLC)家族成员共享的保守的x和y催化基序外, 还包含一个扩展的N终端区域, 这使它具有了其他磷脂酶所不具备的特殊功能, 及可被H-ras癌基因的蛋白质表达产物(小G蛋白)和G蛋白双向调节^[3-4]。已有实验证明, 在泌尿系统肿瘤中, PLC ϵ 发挥一个致癌基因的作用。在前列腺癌中, PLC ϵ 通过PPAR β /twist1参与前列腺癌细胞的迁移和上皮-间充质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程^[5], 并可以通过Wnt/ β -catenin信号通路对比卡鲁胺耐药的前列腺癌的细胞增殖进行调控^[6]。在膀胱癌细胞中, PLC ϵ 可以通过CDC25A影响T24细胞的瓦伯格效应^[7], 同时, 对膀胱癌的EMT和迁移能力具有一定的促进作用^[8]。在肾癌中, PLC ϵ 与促炎细胞因子的释放存在一定的相关性^[9]。近年来, 免疫疗法因其具有副作用小、预后良好的优势, 在肾癌的治疗中得到重视。大剂量的白细胞介素-2(interleukin 2, IL-2)是最早使用的免疫疗法, 其主要通过淋巴细胞发挥作用^[10], 但对肿瘤细胞的影响目前尚不明确。PLC ϵ 在肾癌中可以

引起一定的免疫反应, 但是否在IL-2治疗中发挥一定的作用, 目前尚不清楚。本实验将使用sh-PLC ϵ 慢病毒敲减肾癌细胞株786-o中的PLC ϵ , 以此为基础来探讨PLC ϵ 在IL-2治疗中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肾癌细胞株786-o和人肾皮质近曲小管上皮细胞HK-2购于中国科学院上海细胞库, 保存于重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室。

1.2 慢病毒

PLC ϵ 干扰慢病毒(LV-sh-PLC ϵ)及通用阴性对照慢病毒(LV-shNC)由上海吉玛制药技术有限公司构建, 序列信息见表1。

1.3 主要试剂

细胞培养基RPMI-1640和胎牛血清购于Gibco公司; 嘌呤霉素购于北京索莱宝科技有限公司; q-PCR引物由Invitrogen公司合成, 引物信息见表2; RNA提取试剂盒Trizol、RT-PCR试剂盒和q-PCR试剂盒购于TaKaRa公司; 蛋白质提取试剂购于上海碧云天生物技术有限公司; 山羊抗兔多克隆抗体、山羊抗鼠多克隆抗体购于杭州联科生物技术股份有限公司; 兔抗人单克隆抗体(factor related apoptosis, Fas)、FADD、Caspase-3、C-Flip、Traf2和鼠抗人单克隆抗体Caspase-8购于Bioss生物技术公司; 细胞因子IL-2购于Novoprotein科技有限公司; MTT试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司; ficoll试剂购于通用电气医疗集团生命科学部(GE Healthcare Life Sciences); 新鲜的健康成年人外

表1 慢病毒序列

Table 1 Lentivirus sequence

病毒名称 Lentivirus name	病毒序列(5'→3') Lentivirus sequence (5'→3')
LV-sh-PLC ϵ 1	Sense: GCA GAT ATC TGA TGC CAT TGC Anti-sense: CGT CTA ACT ACG GTA ACG
LV-sh-PLC ϵ 2	Sense: GCT TCT TAA CAC GGG ACT TGG Anti-sense: CGA AGA ATT GTG CCC TGA ACC
LV-sh-PLC ϵ 3	Sense: GGT TCT CTC CTA GAA GCA ACC Anti-sense: CCA AGA GAG GAT CTT CGT TGG
LV-sh-NC	Sense: TTC TCC GAA CGT GTC ACG T Anti-sense: AAG AGG CTT GCA CAG TGC A

表2 PCR引物信息

Table 2 The sequence of primer for q-PCR

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>PLCε</i>	GGA GAA TCC TCG GTA G	GGT TGT CAG CGT ATG TCC
<i>Fas</i>	TCT GGT TCT TAC GTC TGT TGC	CTG TGC AGT CCC TAG CTT TCC
<i>FasL</i>	GGT TGC CTT GGT AGG ATT GGG	CCT TGA GTT GGA CTT GCC TGT TA
<i>FADD</i>	GCT GGC TCG TCA GCT CAA A	ACT GTT GCG TTC TCC TTC TCT
<i>Caspase-8</i>	GAA TGT TGG AGG AAA GCA ATC TC	TGA GCC CTG CCT GGT GTC T
<i>Caspase-3</i>	CAT GGA AGC GAA TCA ATG GAC T	CTG TAC CAG ACC GAG ATG TCA
<i>c-Flip</i>	CTT GGA CCT TGT GGT TGA GTT GG	CCT TGA GAT TCT TTT GGA TTG CTG
<i>Traf2</i>	CCT TCC CAG ATA ATG CTG CCC	GCT CTC GTA TTC TTT CAG GGT C
<i>β-actin</i>	GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC	ACG AGA CCA CCT TCA ACT CCA C

周血由本课题组同学友情提供。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 将肾癌细胞株786-o、人肾皮质近曲小管上皮细胞HK-2常规培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基,后置于37℃、5% CO₂的湿度饱和培养箱中培养,待细胞贴壁且生长至80%~90%时,以0.25%胰酶消化并进行传代。

1.4.2 转染sh-PLCε,筛选稳定细胞株 将肾癌细胞株786-o细胞消化后,接种于6孔板中(每孔5×10⁴个)待细胞生长融合度达40%~60%,更换培养基,同时分别在两个孔中加入2 μL Polybrene之后再分别加入5 μL的LV-NC、LV-sh-PLCε病毒原液,置于37℃、5% CO₂孵箱中孵育48 h后观察细胞状态和转染效率。细胞株感染病毒后继续传代3次,每次加1 μg/mL嘌呤霉素进行筛选,获得786-o-sh-PLCε、786-o-shNC稳定细胞株。

1.4.3 MTT检测IL-2处理细胞的最适浓度 在96孔板中每孔铺入200 μL细胞悬液(细胞个数约为1 500个/孔),使用RPMI-1640完全培养基配制IL-2溶液,设置IL-2浓度梯度分别为0、5、10、15、20、25、30、35、40 ng/mL,使用含不同浓度IL-2的培养基培养细胞,放置于37℃、5% CO₂孵箱分别培养24 h、48 h、72 h后,每孔加入10 μL MTT试剂,37℃、5% CO₂孵箱培养4 h终止培养,小心地将孔内上清完全吸出,弃去,每孔加100 μL DMSO,37℃振荡10 min,使甲臞充分溶解(设置5个对照组,只加入DMSO用以排除试剂影响),490 nm处测量吸光度(D)值,并绘制生长曲线。

1.4.4 实时定量PCR(q-PCR) 常规处理细胞72 h,待细胞生长至90%,用Trizol法提取细胞的总RNA,逆转录为cDNA后用SYBGreen法进行q-PCR(以β-actin为内参)。反应条件如下:95℃预变性3 min;

95℃变性10 s,退火(温度因基因不同而不同)30 s;72℃延伸20 s;共40个循环(RT-PCR为30个循环)。

1.4.5 Western blot检测细胞中相关蛋白质水平 37℃、5% CO₂条件下培养细胞72 h后,热裂解法提取总蛋白质,BCA法测定蛋白质浓度。用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide-electrophoresis, SDS-PAGE)分离样品;湿转法转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜;5%脱脂奶粉在室温封闭2 h,一抗4℃孵育过夜, TBST洗涤5次;辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的二抗室温孵育2 h; TBST洗涤5次, ECL化学发光,显影分析。

1.4.6 肿瘤细胞与淋巴细胞共培养 使用ficoll法提取健康成年人外周血淋巴细胞,与肿瘤细胞一起铺于6孔板中进行接触性共培养,72 h后,洗去悬浮的淋巴细胞,收集肿瘤细胞,流式细胞术检测共培养后肿瘤细胞凋亡情况。

1.4.7 统计学分析 实验结果采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验, P<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾癌细胞株786-o中PLCε呈现高表达状态

q-PCR和Western blot结果发现,与肾正常上皮细胞株HK-2对比,肾癌细胞株786-o中, PLCε表达呈过表达状态(P<0.01,图1)。

2.2 转染sh-PLCε慢病毒下调786-o细胞中PLCε的表达

q-PCR和Western blot结果发现,无论是mRNA

还是蛋白质水平, 感染sh-PLC ϵ 慢病毒组的PLC ϵ 表达均低于NC组($P < 0.01$, 图2); 而空白对照组和NC组的PLC ϵ 表达差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。结果表明, 转染sh-PLC ϵ 慢病毒成功下调786-o细胞内源性PLC ϵ 的表达, 为后续实验奠定基础。

2.3 转染sh-PLC ϵ 慢病毒后细胞凋亡水平增加

DAPI染色显示, 与NC组相比, sh-PLC ϵ 组的细胞开始出现凋亡小体(图3); 流式细胞术结果显示, NC组凋亡细胞比例为17.64%, sh-PLC ϵ 组凋亡细胞比例为25.27%, 重复3次实验后分析2组凋亡比例差异水平, 结果显示, 二者具有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。两个实验结果均证明, 敲减PLC ϵ 后, 细胞的凋亡水平开始增加。

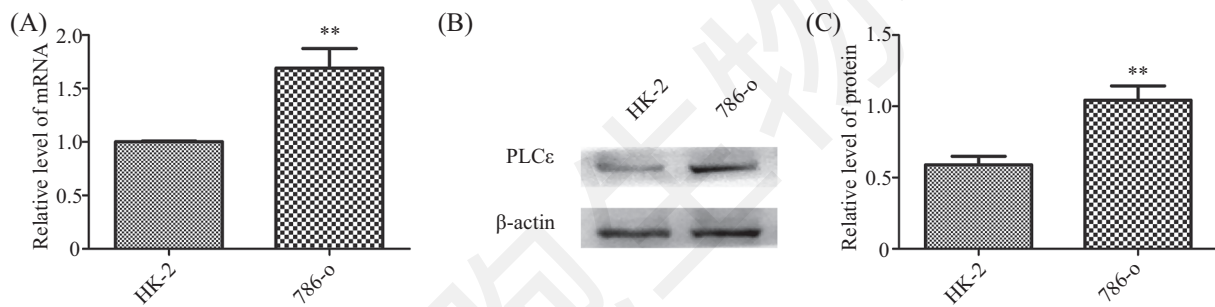
2.4 敲减PLC ϵ 后, Fas/FasL表达水平下降

使用q-PCR和Western blot实验检测敲减PLC ϵ 后, Fas/FasL的表达水平, 结果显示, 无论是在蛋白水

平还是mRNA水平, Fas、凋亡相关因子配体(fas ligand, FasL)表达水平均降低($**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 图4), 提示PLC ϵ 可能通过Fas/FasL途径来对肾癌细胞凋亡进行调控。

2.5 敲减PLC ϵ 后, 细胞凋亡信号增强, 凋亡抑制信号减弱

使用q-PCR和Western blot实验检测敲减PLC ϵ 后, Fas/FasL途径的下游分子, 包括接头蛋白FADD、凋亡相关的分子Caspase8、Caspase3以及凋亡抑制相关的分子cFlip、Traf2的表达水平。结果显示, 无论是在蛋白水平还是mRNA水平, 接头蛋白FADD表达差异无统计学意义($P > 0.05$, 图5), 凋亡相关分子Caspase8、Caspase3表达增高($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$, 图5); 凋亡抑制相关的分子cFlip、Traf2表达减低($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$, 图5), 提示sh-PLC ϵ 可能通过增

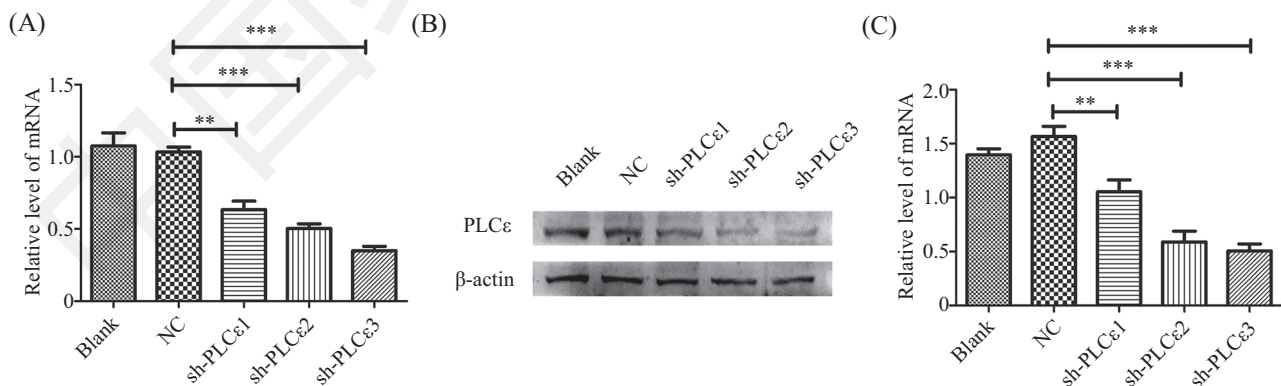


A: q-PCR检测HK-2细胞与786-o细胞中PLC ϵ mRNA表达水平; B: Western blot检测HK-2细胞与786-o细胞中PLC ϵ 蛋白表达水平; C: HK-2与786-o细胞蛋白表达灰度值相关水平。 $**P < 0.01$ 。

A: PLC ϵ mRNA expression detected by q-PCR; B: PLC ϵ protein expression detected by Western blot; C: relative protein level in 786-o and HK-2 cells. $**P < 0.01$.

图1 HK-2与786-o细胞中PLC ϵ mRNA以及蛋白表达水平

Fig.1 PLC ϵ mRNA and protein levels in HK-2 and 786-o cells

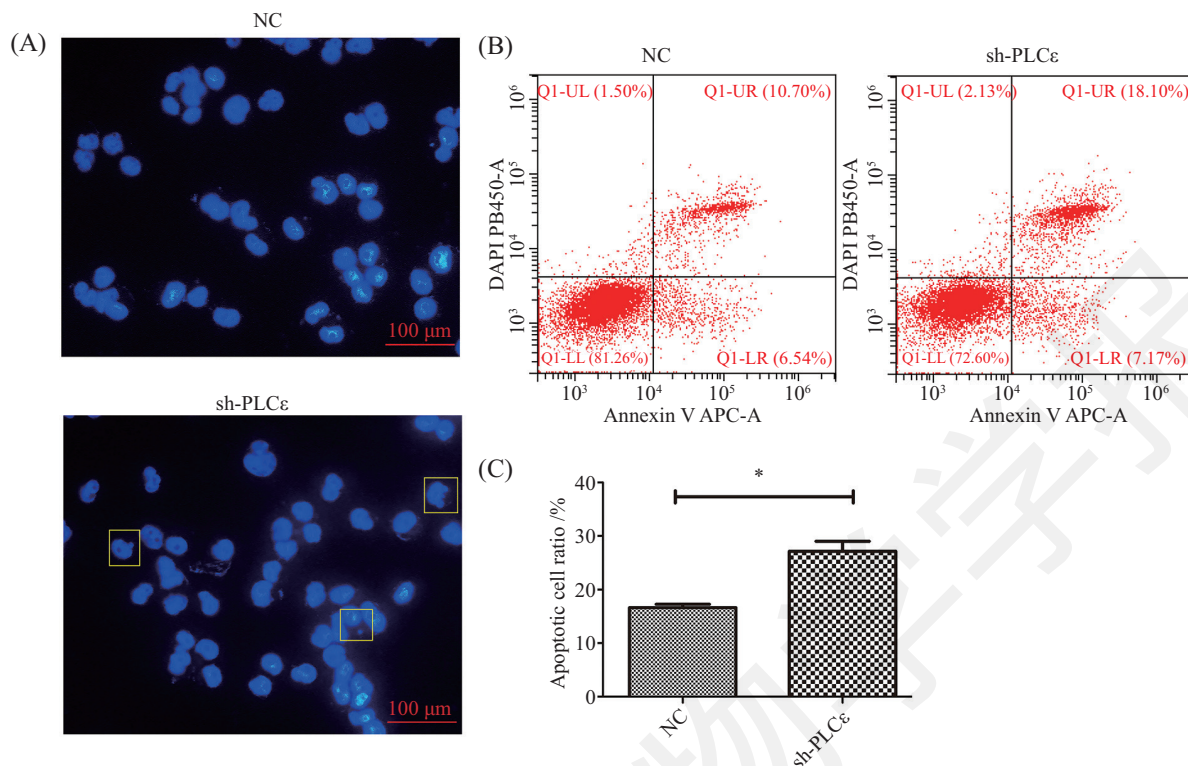


A: q-PCR检测转染3种sh-PLC ϵ 慢病毒后, 786-o细胞中PLC ϵ mRNA表达水平; B: Western blot检测转染3种sh-PLC ϵ 慢病毒后786-o细胞中PLC ϵ 蛋白表达水平; C: 786-o细胞蛋白表达灰度值相关水平。 $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

A: PLC ϵ mRNA expression detected by q-PCR; B: PLC ϵ protein expression detected by Western blot; C: relative protein level in 786-o cells. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

图2 转染sh-PLC ϵ 慢病毒后, 786-o细胞中PLC ϵ mRNA以及蛋白表达水平

Fig.2 PLC ϵ mRNA and protein levels in 786-o cells treated with sh-PLC ϵ lentivirus transfection

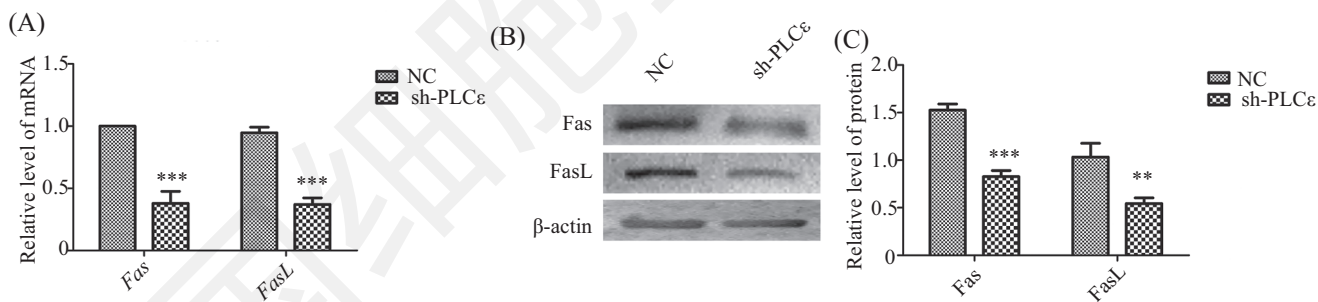


A: 786-o细胞NC组、sh-PLCε组DAPI染色,框出部分为凋亡小体; B: 786-o细胞NC组、sh-PLCε组流式细胞术检测细胞凋亡; C: 细胞凋亡比例统计分析。*P<0.05。

A: staining of 786-o cells in NC group, sh-PLCε group, the framed part is apoptotic body; B: Flow cytometry of 786-o cells in NC group, sh-PLCε group; C: statistical analysis of apoptosis ratio. *P<0.05.

图3 786-o细胞NC组、sh-PLCε组细胞凋亡检测

Fig.3 Apoptotic detection of 786-o cells in NC group and sh-PLC epsilon group



A: q-PCR检测786-o细胞中Fas、FasL表达水平; B: Western blot检测786-o细胞中Fas、FasL蛋白表达水平; C: 786-o蛋白表达灰度值相关水平。***P<0.01, ****P<0.001, 与NC组比较。

A: Fas, FasL mRNA expression detected by q-PCR; B: Fas, FasL protein expression detected by Western blot; C: relative protein level in 786-o cells. **P<0.01, ****P<0.001 vs NC group.

图4 786-o细胞中Fas、FasL mRNA以及蛋白表达水平

Fig.4 Fas, FasL mRNA and protein levels in 786-o cell

强凋亡信号通路,抑制凋亡抑制信号通路来促进肾癌细胞凋亡。

2.6 MTT法检测IL-2处理细胞的最适条件

使用0、5、10、15、20、25、30、35和40 ng/mL, 9个浓度的IL-2来处理786-o细胞。分别在24 h、48 h、72 h 3个时间点来检测细胞的存活率,结果显示,在

25 ng/mL浓度,72 h处理细胞为IL-2处理细胞的最适条件(图6)。

2.7 加入IL-2后Fas、FasL表达增高

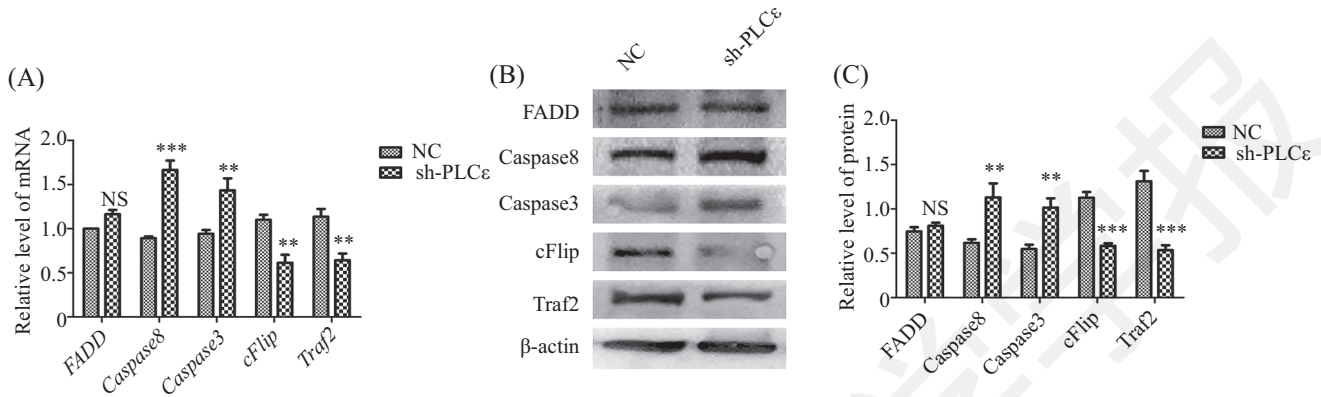
使用q-PCR和Western blot实验检测IL-2处理NC组、sh-PLCε组后,Fas、FasL的表达水平,结果显示,无论是在蛋白水平还是mRNA水平,Fas、FasL表达

水平均增高($P < 0.01$, 图7), 提示IL-2可能会通过Fas/FasL来影响细胞。

2.8 加入IL-2后, 影响Fas/FasL下游分子的表达

使用q-PCR和Western blot实验检测IL-2处理NC

组、sh-PLCε组后, Fas/FasL途径的下游分子, 包括接头蛋白FADD、凋亡相关的分子Caspase8、Caspase3以及凋亡抑制相关的分子cFlip、Traf2的表达水平, 结果显示, 无论是在蛋白水平还是mRNA水平, 接头



A: q-PCR检测786-o细胞中FADD、Caspase8、Caspase3、cFlip、Traf2 mRNA表达水平; B: Western blot检测786-o细胞中FADD、Caspase8、Caspase3、cFlip、Traf2蛋白表达水平; C: 786-o细胞蛋白表达灰度值相关水平。NS: $P > 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
A: FADD, Caspase8, Caspase3, cFLIP, Traf2 mRNA expression detected by q-PCR; B: FADD, Caspase8, Caspase3, cFLIP, Traf2 protein expression detected by Western blot; C: relative protein level in 786-o cells. NS: $P > 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 786-o细胞中FADD、caspase8、caspase3、cFlip、Traf2 mRNA以及蛋白表达水平
Fig.5 FADD, caspase8, caspase3, cFlip, Traf2 mRNA and protein levels in 786-o cell

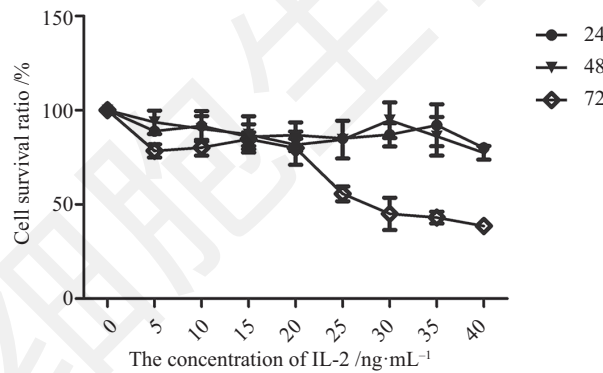
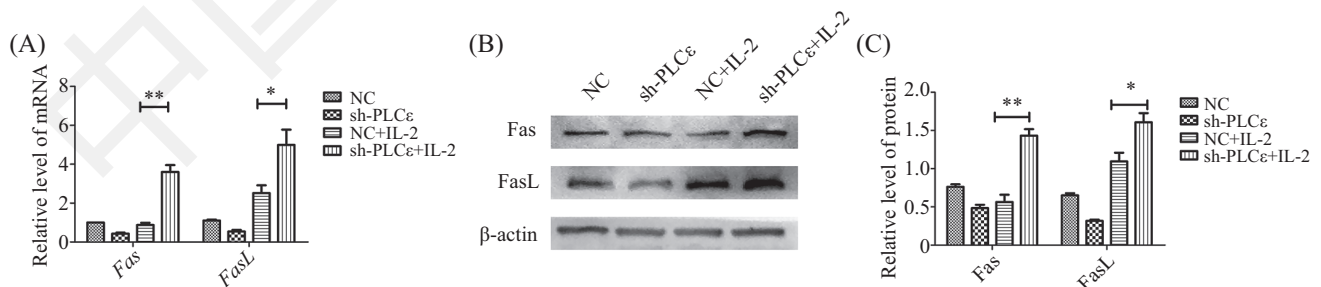
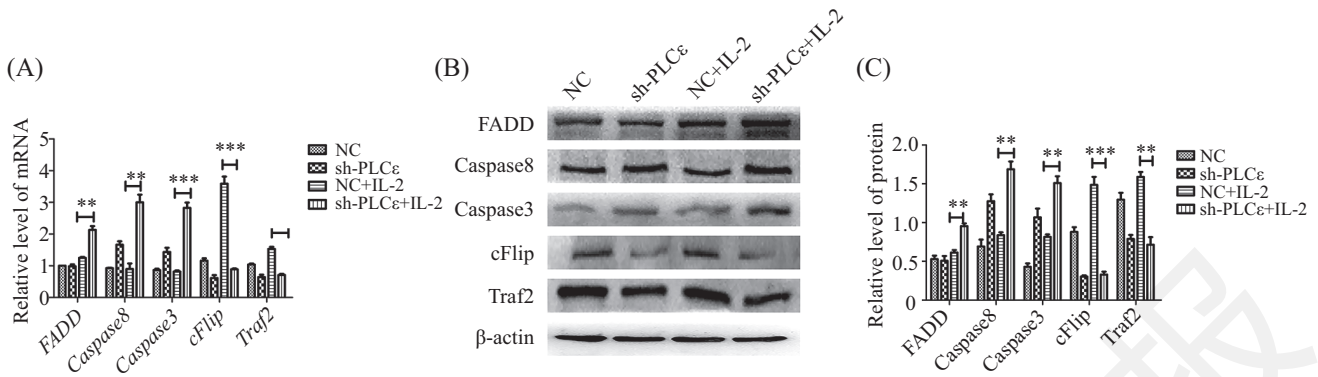


图6 MTT法检测IL-2处理细胞的最适条件
Fig.6 Optimum conditions of IL-2 treatmenting cells measured



A: q-PCR检测786-o细胞中Fas、FasL mRNA表达水平; B: Western blot检测786-o细胞中Fas、FasL蛋白表达水平; C: 786-o细胞蛋白表达灰度值相关水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
A: Fas, FasL mRNA expression detected by q-PCR; B: Fas, FasL protein expression detected by Western blot; C: relative protein level in 786-o cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图7 IL-2处理后, 786-o细胞中Fas、FasL mRNA以及蛋白表达水平
Fig.7 Fas, FasL mRNA and protein levels in 786-o cells treated with IL-2



A: q-PCR检测786-o细胞中FADD、Caspase8、Caspase3、cFlip、Traf2 mRNA表达水平; B: Western blot检测786-o细胞中FADD、Caspase8、Caspase3、cFlip、Traf2蛋白表达水平; C: 786-o细胞蛋白表达灰度值相关水平。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
A: FADD, Caspase8, Caspase3, cFlip, Traf2 mRNA expression detected by q-PCR; B: FADD, Caspase8, Caspase3, cFlip, Traf2 protein expression detected by Western blot; C: relative protein level in 786-o cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图8 IL-2处理后, 786-o细胞中FADD、caspase8、caspase3、cFlip、Traf2 mRNA以及蛋白表达水平
Fig.8 FADD, caspase8, caspase3, cFlip, Traf2 mRNA and protein levels in 786-o cells treated with IL-2

蛋白FADD表达水平增高($P < 0.01$, 图8), 凋亡相关分子Caspase8、Caspase3表达增高($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$, 图8); 凋亡抑制相关的分子cFlip、Traf2表达减低($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$, 图8), 方差分析sh-PLCε转染与IL-2处理2种处理因素对相关分子表达的影响, 5个分子中, 只有cFlip存在拮抗作用($P < 0.05$)。结果提示, IL-2可以通过促进Fas/FasL下游凋亡信号通路, 抑制Fas/FasL下游凋亡抑制信号通路来调控肾癌细胞的凋亡情况, 并且在cFlip分子的调控上, IL-2处理与sh-PLCε转染起拮抗作用。

2.9 淋巴细胞与786-o细胞共培养后, 细胞凋亡比例增加

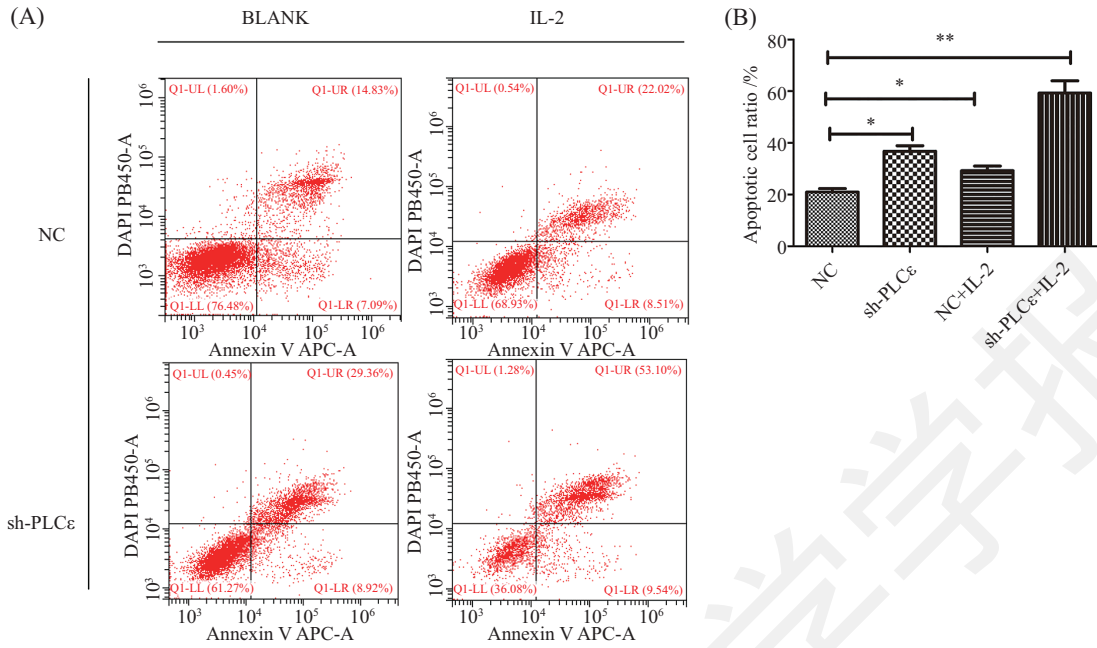
Ficoll法提取健康成年人外周血的淋巴细胞, 与786-o细胞进行共培养。流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡情况, 结果显示, NC组凋亡细胞比例为21.92%, sh-PLCε组凋亡细胞比例为38.28%, 加入IL-2后, NC组凋亡细胞比例为30.52%, sh-PLCε组凋亡细胞比例为62.64%(图9)。sh-PLCε转染和IL-2处理组的凋亡比例最高, 对结果进行方差分析得, sh-PLCε转染和IL-2处理对细胞的凋亡影响存在协同作用($P < 0.05$)。进一步证明了转染sh-PLCε可以提高IL-2对肾癌的疗效。

3 讨论

凋亡相关因子Fas是一种定位于多种细胞表面的死亡受体(death receptor, DR), 它可以触发凋亡信号转导通路, 导致细胞凋亡^[11-12]。FasL是肿瘤坏死因子家族的一种细胞表面分子, 与Fas受体结合, 诱导Fas阳性细胞凋亡。Fas表达在多种细胞的细胞膜, 而FasL主

要在活化的T细胞中表达。在免疫系统中, 由活化的T淋巴细胞表达的FasL既可以诱导细胞介导的细胞毒性, 也可能导致T淋巴细胞自身的凋亡性自杀^[13-14], 这取决于Fas下游启动的是凋亡信号通路, 还是凋亡抑制信号通路^[15-19]。外周T细胞的稳态主要由3种机制维持: T细胞无反应、调节性T细胞抑制和活化诱导的细胞死亡(activation induced cell death, AICD)^[20]。AICD是通过Fas介导的凋亡反复刺激TCR来控制效应T细胞群^[21]。此外, AICD可以通过Fas和FasL之间的相互作用, 诱导表达Fas和FasL的活化T细胞通过自杀或相互作用被杀死^[22-23]。Fas/FasL介导的免疫调节具有双重特征, 诱导有益或有害的影响, 这与免疫紊乱的发生发展相关^[24]。本课题证明, 转染sh-PLCε可以抑制肾癌细胞株786-o细胞中Fas、FasL的表达, 但在IL-2处理后, 会逆转这种作用, 奇怪的是, 在二者联用组Fas、FasL的表达反而是最高的, 这其中的机制通路目前尚不清楚, 但流式细胞术显示, 二者联用组的肿瘤细胞凋亡比例最高, 这就说明, 肿瘤细胞的Fas、FasL表达增高会增加肿瘤细胞自身的凋亡。

IL-2可以激活肿瘤特异性T细胞, 并以此来抵抗肿瘤的发生发展已经成为一种有效的免疫疗法^[10]。1985年, Rosenberg等^[25]在向患者注射IL-2后观察到了侵袭性人类癌症的消退, 这首次证明操纵人类免疫系统可重复导致肿瘤消退。自1992年起, 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已陆续批准IL-2可用于治疗转移性肾癌和黑色素瘤, 并在治疗肾癌^[26]黑色素瘤的临床试验上取得了



A: IL-2处理786-o细胞后,流式细胞术检测细胞凋亡情况; B: 细胞凋亡比例统计分析, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: Flow cytometry of 786-o cells treated with IL-2; B: statistical analysis of apoptosis ratio, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图9 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig.9 Flow cytometry of 786-o cells

较好的结果^[27], 因此大剂量的IL-2治疗已成为临床上最早批准投入临床使用的免疫疗法之一, 并具有较好的临床治疗效果^[28-29]。但是IL-2治疗癌症存在剂量限制性的毒副作用^[25], 部分患者会出现钠水潴留, 全身性毛细血管渗漏综合征等毒副作用。故如何减低大剂量IL-2治疗的毒副作用就成了目前所面临的主要问题, 本课题研究证明, IL-2虽主要作用于淋巴细胞^[10], 但同时也会使肿瘤细胞相应的抗凋亡信号通路FasL/Fas/FADD/cFlip/Traf2激活, 使细胞对IL-2的治疗产生一定的抵抗作用, 这也许会是IL-2须使用较大剂量的原因之一, 转染sh-PLCε则可以抑制此抗凋亡通路的激活, 相反地, 激活凋亡蛋白Caspase8, 启动凋亡信号通路FasL/Fas/FADD/Caspase8/Caspase3。故将转染sh-PLCε与IL-2联合使用, 可以提高IL-2的治疗效果, 为了证明我们的观点, 我们将健康成年人外周血的淋巴细胞与肿瘤细胞进行了共培养, 我们发现, 二者连用组的肿瘤细胞凋亡比例最高, 于是我们可以得出结论: sh-PLCε可以提高IL-2的治疗效果, 进而可以达到减少使用剂量, 降低IL-2毒副作用的目的。

综上所述, 本实验揭示了敲减PLCε可以通过减少细胞的凋亡抑制, 增强细胞凋亡信号的启动, 来降

低肾癌细胞对IL-2治疗的抵抗作用。这为改善IL-2临床使用的副作用, 提高IL-2的疗效提供新的思路。

参考文献 (References)

- 1 韩苏军, 王栋, 寿建忠, 李长岭, 邢念增, 张思维. 跨世纪十年中国肾癌死亡趋势分析. 癌症进展(Han Sujun, Wang Dong, Shou Jianzhong, Li Changling, Xing Nianzeng, Zhang Siwei. Analysis of the trend of death of kidney cancer in China in the past ten years. Oncology Progress) 2019; 17(10): 1143-6.
- 2 Shibatohe M, Kariya K, Liao Y, Hu CD, Watari Y, Goshima M, *et al*. Identification of PLC210, a Caenorhabditis elegans phospholipase C, as a putative effector of Ras. J Biol Chem 1998; 273(11): 6218-22.
- 3 Nakhaeizadeh H, Amin E, Nakhaei-Rad S, Dvorsky R, Ahmadian MR. The RAS-effector interface: isoform-specific differences in the effector binding regions. PLoS One 2016; 11(12): e0167145.
- 4 Kelley GG, Reks SE, Smrcka AV. Hormonal regulation of phospholipase Cepsilon through distinct and overlapping pathways involving G12 and Ras family G-proteins. Biochem J 2004; 378(Pt 1): 129-39.
- 5 范佳鑫, 李罗, 牛凌芳, 范砚茹, 高英英, 吴小侯, 等. sh-PLCε通过PPARβ/twist1抑制前列腺癌细胞的迁移和EMT过程. 中国细胞生物学学报(Fan Jiaxin, Li Luo, Niu Lingfang, Fan Yanru, Gao Yingying, Wu Xiaohou, *et al*. sh-PLCε Can Inhibit Cell Migration and EMT of Prostate Cancer Cell via PPARβ/twist1. Chinese Journal of Cell Biology) 2018; 40(05): 665-74.
- 6 李罗, 范佳鑫, 牛凌芳, 范砚茹, 高英英, 张尧, 等. PLCε沉默后通过Wnt/β-catenin信号通路抑制比卡鲁胺耐药的前列腺癌细胞增殖. 肿瘤(Li Luo, Fan Jiaxin, Niu Lingfang, Fan Yanru, Gao

- Yingying, Zhang Yao, *et al.* *Tumor* 2018; 38(8): 761-71+791.
- 7 郝燕妮, 李婷, 范佳鑫, 李罗, 牛凌芳, 欧俐苹, 等. shPLCε通过下调CDC25A抑制T24细胞的瓦伯格效应. 中国生物工程杂志(Hao Yanni, Li Ting, Fan Jiaxin, Niu Lingfang, Ou Liping, *et al.* shPLCε inhibits the Warburg effect of T24 cells by down-regulating CDC25A. *China Biotechnology* 2018; 38(5): 33-9.
- 8 赵燕, 郝燕妮, 刘南京, 李婷, 吴小候, 罗春丽. miR-145通过下调PLCε抑制膀胱癌EMT和迁移及其机制研究. 中国生物工程杂志(Zhao Yan, Hao Yanni, Liu Nanjing, Li Ting, Wu Xiaohou, Luo Chunli. miR-145 inhibits bladder cancer EMT and migration by down-regulating PLCε and its mechanism. *China Biotechnology* 2017; 37(3) 27-36.
- 9 Yang X, Ou L, Tang M, Wang Y, Wang X, Chen E, *et al.* Knockdown of PLCε inhibits inflammatory cytokine release via STAT3 phosphorylation in human bladder cancer cells. *Tumour Biol* 2015; 36(12): 9723-32.
- 10 Lotze MT, Matory YL, Ettinghausen SE, Rayner AA, Sharrow SO, Seipp CA, *et al.* *In vivo* administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells *in vivo* with recombinant IL 2. *J Immunol* 1985; 135(4): 2865-75.
- 11 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, *et al.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66(2): 233-43.
- 12 Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, *et al.* Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; 267(15): 10709-15.
- 13 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267(5203): 1449-56.
- 14 Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 2003; 15(3): 167-76.
- 15 Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 2009; 10(4): 348-55.
- 16 Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ* 2012; 19(1): 36-41.
- 17 Kataoka T, Tschopp J. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2004; 24(7): 2627-36.
- 18 Van Parijs L, Refaeli Y, Abbas AK, Baltimore D. Retraction. Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity* 2009; 30(4): 612.
- 19 Kirchhoff S, Muller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 2000; 165(11): 6293-300.
- 20 Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010; 11(1): 21-7.
- 21 Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003; 193: 70-81.
- 22 Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, *et al.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 181(1): 71-7.
- 23 Varadhachary AS, Perdow SN, Hu C, Ramanarayanan M, Salgame P. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(11): 5778-83.
- 24 Yamada A, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Front Immunol* 2017; 8: 403.
- 25 Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, *et al.* Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313(23): 1485-92.
- 26 Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, *et al.* A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987; 316(15): 889-97.
- 27 Smith FO, Downey SG, Klapper JA, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, *et al.* Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clin Cancer Res* 2008; 14(17): 5610-8.
- 28 Dillman RO, Church C, Oldham RK, West WH, Schwartzberg L, Birch R. Inpatient continuous-infusion interleukin-2 in 788 patients with cancer. The National Biotherapy Study Group experience. *Cancer* 1993; 71(7): 2358-70.
- 29 Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am* 2000; 6 Suppl 1: S55-7.