

研究论文

端粒酶抑制剂6-硫代-2'-脱氧鸟苷诱导肿瘤细胞免疫原性死亡

王梦真¹ 段彪^{1,2} 白婧¹ 罗逸铭^{1,2} 马雁冰^{1*}⁽¹中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650531; ²昆明医科大学, 昆明 650500)

摘要 该文主要探讨端粒酶抑制剂6-硫代-2'-脱氧鸟苷(6-Thio-2'-deoxyguanosine, 6-Thio-dG)是否诱导肿瘤细胞免疫原性死亡(immunogenic cell death, ICD), 并揭示所产生的ICD的免疫应答特征, 为利用6-Thio-dG诱导肿瘤细胞ICD开展免疫治疗提供基础。首先, 用不同浓度的6-Thio-dG处理小鼠黑色素瘤B16-F10、结肠癌CT26、宫颈癌相关肿瘤TC-1和乳腺癌4T1细胞, 在不同时间点用显微镜观察细胞死亡情况及形态特征; 利用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒定量分析细胞死亡情况; 以检测试剂盒以及酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)分析细胞死亡过程中免疫介质释放情况; 免疫荧光染色实验考察钙网蛋白(calreticulin, CALR)向细胞膜的迁移定位。进一步, 建立皮下移植TC-1小鼠肿瘤模型, 当肿瘤长至4~5 mm时, 注射6-Thio-dG对荷瘤小鼠进行治疗性干预, 通过酶联免疫斑点技术(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)与流式细胞术分析小鼠的细胞免疫应答情况; 免疫组化检测肿瘤组织中高迁移率组蛋白B1(high mobility group box protein B1, HMGB1)的释放情况。研究结果显示, 6-Thio-dG可诱导4种肿瘤细胞死亡, 死亡特征与细胞类型、药物剂量和处理时间有关; 肿瘤细胞经6-Thio-dG诱导后促进了发挥免疫刺激作用的“发现我”信号分子三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和HMGB1、炎症细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的释放, 以及“吃了我”信号分子CALR在细胞膜的聚集。在肿瘤模型中, 6-Thio-dG显著抑制了小鼠肿瘤生长, 提高了肿瘤组织中HMGB1水平, 增强了表达 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)的肿瘤抗原特异性的脾细胞应答, 降低了脾细胞中髓源性抑制细胞(myeloid derived suppressor cell, MDSC)的水平。该研究揭示了6-Thio-dG能够诱导肿瘤细胞ICD, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 增强了T细胞的抗肿瘤免疫应答能力, 为肿瘤免疫治疗提供了新思路。

关键词 6-Thio-dG; 免疫原性细胞死亡; 黑色素瘤; 宫颈癌; 结肠癌; 乳腺癌

The Telomerase Inhibitor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine Induced Immunogenic Death of Tumor Cells

WANG Mengzhen¹, DUAN Biao^{1,2}, BAI Jing¹, LUO Yiming^{1,2}, MA Yanbing^{1*}⁽¹Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650531, China; ²Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract This study focused on whether telomerase inhibitor 6-Thio-dG (6-Thio-2'-deoxyguanosine)

收稿日期: 2023-09-08 接受日期: 2023-11-29

国家自然科学基金(批准号: 82073371)资助的课题

*通信作者。Tel: 15087096498, E-mail: may@imbcams.com.cn

Received: September 8, 2023 Accepted: November 29, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82073371)

*Corresponding author. Tel: +86-15087096498, E-mail: may@imbcams.com.cn

induces ICD (immunogenic cell death) in tumor cells. The immune response characteristics of the generated ICD were revealed, which provided a basis for immunotherapy using 6-Thio-dG to induce ICD in tumor cells. Firstly, mouse melanoma B16-F10, colon cancer CT26, cervical cancer related tumor TC-1 and breast cancer 4T1 cells were treated with different concentrations of 6-Thio-dG, and the cell death and morphological characteristics were observed by microscope at different time points. The cell death was quantitatively analyzed by LDH (lactate dehydrogenase) kits. Assay kit and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) were used to analyze the release of immune mediators during cell death. The migration and localization of CALR (calreticulin) to the cell membrane were investigated by immunofluorescence staining. Further, the tumor model of subcutaneously transplanted TC-1 mice was established. When the tumor grew to 4-5 mm, 6-Thio-dG was injected into the tumorbearing mice for therapeutic intervention. ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay) and flow cytometry were used to analyze the immune response of mice cells. The release of HMGB1 (high mobility group box protein B1) in tumor tissues was detected by immunohistochemistry. The results showed that 6-Thio-dG induced the death of four kinds of tumor cells, and the death characteristics were related to cell type, drug dose and treatment time. Tumor cells induced by 6-Thio-dG promote the release of the immune-stimulating “find me” signaling molecules ATP (adenosine triphosphate) and HMGB1, as well as the inflammatory cytokine IL-1 β (interleukin-1 β), and the aggregation of the “eat me” signaling molecule CALR in the cell membrane. In the tumor model, 6-Thio-dG significantly inhibited tumor growth, increased the level of HMGB1 in tumor tissues, and enhanced tumor antigen-specific spleen cell response expressing IFN- γ (interferon- γ). The levels of MDSC (myeloid derived suppressor cell) in spleen cells were decreased. This study revealed that 6-Thio-dG can induce ICD of tumor cells, and enhance the anti-tumor immune response ability of T cells while killing tumor cells, providing a new idea for tumor immunotherapy.

Keywords 6-Thio-dG; immunogenic cell death; melanoma; cervical cancer; colon cancer; breast cancer

近年来, 随着人口增长和全球老龄化, 癌症成为许多国家过早死亡和预期寿命降低的主要原因^[1]。宫颈癌、结肠癌、乳腺癌、皮肤黑色素瘤是威胁人类生存的常见肿瘤类型, 对于这几种肿瘤的治疗面临诸多挑战。皮肤黑色素瘤是三大恶性的肿瘤类型之一, 倾向于转移并且对传统的临床治疗策略不敏感^[2]。中国是全球宫颈癌患者数量最多的国家之一, 2020年中国宫颈癌新发病例约10.6万例, 每年死亡病例约4.8万例^[3]。美国癌症协会发布的2022年癌症年度报告中预计2022年美国将有190万例新发癌症病例, 对于女性来说, 乳腺癌、肺癌、结直肠癌占有所有新发病例的51%^[4]。针对这些癌症, 目前主要的治疗手段如传统的手术、放疗和化疗等, 虽能起到一定的临床疗效, 但具有复发以及全身性毒性的缺陷, 难以达到完全治愈的目的^[5-6]。

肿瘤免疫治疗成为近年来肿瘤研究以及临床应用的热点, 正在改变传统肿瘤治疗的局限性。肿瘤免疫治疗能够激活机体的适应性抗肿瘤免疫应答, 这对于长效抗肿瘤具有重要意义。细胞免疫原性死亡(immunogenic cell death, ICD)是一种压力诱

导下的调节性细胞死亡(regulated cell death, RCD), 可以驱动损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)和炎症介质的释放, 激活机体的固有免疫并协同建立适应性免疫及长期免疫记忆^[7-8]。ICD过程中的DAMPs包括三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、钙网蛋白(calreticulin, CALR)、高迁移率组蛋白B1(high mobility group box protein B1, HMGB1)等^[9-11], 能与免疫细胞的模式识别受体结合引发一系列免疫应答。例如, 发生了ICD的濒死的肿瘤细胞分泌的ATP作为一种“发现我”信号, 与抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)上的受体结合, 可趋化APCs, 刺激APCs成熟, 促进炎症介质白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等的释放, 诱导抗肿瘤免疫反应^[12-13]。转位至肿瘤细胞膜表面的“吃掉我”信号如CALR, 可促进树突状细胞(dendritic cell, DC)的吞噬和成熟^[14]。HMGB1激活Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MYD88)通路, 激活DC, 增强DC对肿瘤抗原的摄取及向T细胞的交叉递呈能力^[15]。ICD介质的释放及作用对于

激活机体的免疫应答和提高抗肿瘤治疗的效果至关重要。

临床研究发现,某些化疗药物如蒽环类药物不仅能够直接对肿瘤细胞产生杀伤,还能诱导肿瘤细胞发生ICD而增强T细胞的抗肿瘤免疫应答^[16-17],相较于其他传统化疗药物具有明显的抗肿瘤优势。但是,实现ICD所需要的药物大剂量使用所带来的副作用,显著限制了ICD诱导策略在临床上的治疗应用。因此,寻找能够诱导ICD并且副作用小的治疗药物具有重要意义。近年来,基于癌细胞需要端粒酶作用维持生长而正常细胞不需要这一认知,靶向端粒酶的治疗策略日益引起人们的重视。端粒酶抑制剂6-硫代-2'-脱氧鸟苷(6-Thio-2'-deoxyguanosine, 6-Thio-dG)是一种端粒酶底物前体核苷类似物,被认为是癌症治疗领域极具潜力的一种肿瘤特异治疗候选药物。6-Thio-dG可通过端粒酶并入从头合成的端粒中诱导端粒DNA损伤^[18],在许多肿瘤衍生异种移植模型中可导致肿瘤快速缩小或生长停滞,且副作用小^[19-20]。与直接端粒酶抑制剂相比,这种端粒靶向疗法最重要的优点是6-Thio-dG对肿瘤的杀伤作用没有长的滞后期,它的作用独立于初始端粒长度,通过劫持肿瘤端粒酶来制造不稳定的端粒^[21]。目前,已经在不同类型的癌症中对6-Thio-dG进行了研究,其中包括非小细胞肺癌、黑色素瘤、结肠癌和儿童脑肿瘤^[22]。最近,有研究表明6-Thio-dG能够增强DC的抗原交叉递呈能力,其治疗效果与CD8⁺T细胞有关,且表现出干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)通路依赖性^[23]。这一研究提示,6-Thio-dG具有诱导肿瘤细胞发生ICD的潜力。

本研究首先在不同肿瘤细胞系中对6-Thio-dG诱导肿瘤细胞死亡后的关键ICD指标进行考察,之后利用TC-1小鼠肿瘤模型,观察药物干预对小鼠肿瘤生长及抗肿瘤免疫的影响。研究结果表明,6-Thio-dG能诱导肿瘤细胞ICD,激发T细胞的抗肿瘤免疫应答。本研究为基于ICD诱导这一策略的抗肿瘤免疫治疗提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 TC-1细胞是共转染了人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV) 16型的E6/E7蛋白和

Ras基因而发生癌变的C57BL/6小鼠肺上皮细胞;小鼠黑色素瘤细胞B16-F10是来源于C57BL/6J小鼠的自发性肿瘤细胞,是小鼠皮肤组织的B16肿瘤细胞系的亚系;CT26细胞是利用*N*-亚硝基-*N*-甲基脲烷(ethyl *N*-methyl-*N*-nitrosocarbamate, NNMU)诱导得到的未分化的小鼠结肠癌细胞;4T1细胞来源于BALB/C小鼠的自发性乳腺肿瘤,带有上皮细胞的性质,并且能耐受6-硫鸟嘌呤。细胞由中国医学科学院医学生物学研究所分子免疫室保存。

1.1.2 实验动物 6~8周龄雄性、体重16~18 g、SPF级的C57BL/6J小鼠购自中国医学科学院医学生物学研究所(IMBCAMS)中心动物护理服务中心,动物许可证编号:SYXK(滇)K2019-0002。所有动物护理和实验程序均经IMBCAMS动物护理和福利伦理委员会批准(伦理批准文号:DWSP202004026)。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI1640、含酚红的胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;细胞培养瓶、细胞培养板和细胞培养皿均购自NEST公司;4%多聚甲醛购自Biosharp公司;CCK8检测试剂购自上海慧隆生物科技有限公司;ATP检测试剂盒和LDH检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;6-Thio-dG购自MCE公司;羊抗鼠IgG H&L(Alexa Fluor[®] 647)(ab150115)、DAPI染液(ab104139)、IL-1 β (ab241673)抗体购自英国Abcam公司;HMGB1检测试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司;CALR抗体购自美国Santa Cruz公司;基质胶和70 μ m无菌细胞筛网购自美国Bioscience公司;小鼠淋巴细胞分离液购自北京达科为生物技术有限公司;流式抗体购自美国Biolegend公司;ELISPOT试剂盒购自瑞典Mabtech公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 B16-F10、TC-1、CT26与4T1肿瘤细胞的培养采用RPMI1640培养基(含10%胎牛血清、1% 100 U/mL青霉素和0.1 mg/L链霉素),并于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温细胞培养箱中进行培养。

1.2.2 显微镜观察肿瘤细胞形态 将B16-F10、TC-1、CT26与4T1肿瘤细胞以每孔 1×10^6 个/mL的密度接种至6孔板,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温培养箱培养过夜,然后加入40 μ mol/L 6-Thio-dG处理细胞,以未处理的细胞作为对照,进一步培养24 h后于显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 CCK8法检测细胞活力 将B16-F10、TC-1、

CT26、4T1肿瘤细胞以 3×10^4 个/mL的密度按100 μ L/孔接种至96孔板, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱培养过夜, 以0、10、20、40、60、80与100 $\mu\text{mol/L}$ 的不同浓度6-Thio-dG处理细胞, 以不含细胞只加培养基的孔作背景空白对照, 未进行药物处理的细胞作为样品对照, 将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱培养, 分别于24 h与48 h后将配好的CCK8检测溶液(100 μ L完全培养基中加入10 μ L CCK8检测试剂)加入培养板中, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱内孵育1.5 h, 利用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(D)值。并按下式计算细胞活力: 细胞活力 $=[(D_{\text{加药}}-D_{\text{空白}})/(D_{0\text{加药}}-D_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

1.2.4 LDH试剂盒检测细胞培养上清中LDH的含量 将B16-F10、TC-1、CT26、4T1肿瘤细胞(密度为 3×10^5 个/mL)按300 μ L/孔接种至48孔板, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱培养过夜, 以0、10、20、40、60、80和100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度的6-Thio-dG处理细胞24 h及48 h后收取上清, 收取上清前1 h, 在未经药物处理的用于后续裂解的细胞孔中加入10%培养基体积的LDH释放剂以获得最大酶活性。将所收上清进行离心(4 $^{\circ}$ C、400 \times g、5 min)。取120 μ L加入新的96孔板中, 再加入60 μ L检测工作液(乳酸溶液:酶溶液:INT(1 \times)溶液体积比为1:1:1)混匀后室温避光孵育30 min, 于490 nm处测定吸光度(D)值, 按下式计算细胞死亡率: 细胞死亡率 $=(D_{\text{加药}}-D_{\text{对照}})/(D_{\text{最大酶活}}-D_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

1.2.5 ELISPOT检测脾脏中表达IFN- γ 的T细胞水平 在培养板中加入细胞悬液(5×10^5 个/100 μ L), 按最终浓度5 $\mu\text{g/mL}$ 之后加入合成的HPV16细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位肽E749-57(5 $\mu\text{g/mL}$, RAHYNIVTF), 之后以铝箔纸包住培养板后放入37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中培养24 h。细胞经用PBS清洗5次后, 在其中加入用含0.5%胎牛血清的PBS稀释至1 $\mu\text{g/mL}$ 的检测抗体(anti-mouse IFN- γ monoclonal, R4-6A2), 用含0.5%胎牛血清的PBS, 室温孵育2 h。经PBS清洗后, 加入链霉亲和素标记的酶溶液(100 μ L/孔), 在室温条件下孵育1 h。再次用PBS清洗5次, 之后将通过0.45 μm 过滤器过滤好的衬底溶液(BCIP/NBT-PLUS)按100 μ L/孔加入培养板, 孵育至出现明显斑点后用自来水洗涤终止颜色发展。最后, 以ELISPOT读取器计数斑点。

1.2.6 流式细胞术检测脾脏中MDSC的水平 将计

数后的细胞悬液(1×10^7 个/100 μ L)加入U型96孔细胞培养板中, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱培养3~6 h, 于室温、500 \times g离心5 min后弃上清, 用200 μ L染色缓冲液洗涤2次, 加入总体积为100 μ L含Gr-1-PE和CD11b-APC抗体的染色缓冲液, 在4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 经500 \times g室温离心5 min, 去上清后用200 μ L染色缓冲液洗涤2次, 再用100 μ L染色缓冲液重悬细胞, 最后用流式细胞仪检测。

1.2.7 统计学分析 使用Graphpad Prism 9.5软件对数据进行整理分析及图形绘制。样本数据采用非配对/配对双尾 t 检验或Two Way ANOVA检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 6-Thio-dG对肿瘤细胞活性的影响

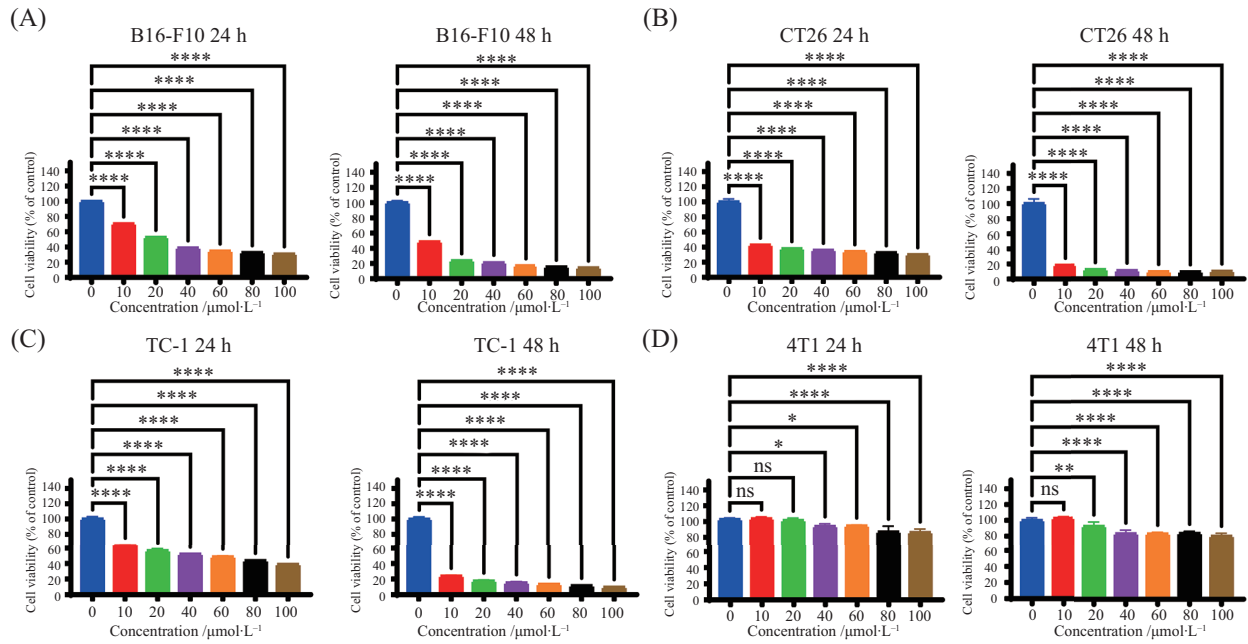
肿瘤细胞经不同浓度的6-Thio-dG处理, 随着6-Thio-dG浓度和处理时间的增加, 四种肿瘤细胞的活性下降, 且细胞的活性改变在不同细胞间存在差异, 其中, 4T1细胞对6-Thio-dG的敏感性较差(图1)。40 $\mu\text{mol/L}$ 6-Thio-dG处理24 h后的细胞经显微镜观察显示, B16-F10、CT26、TC-1肿瘤细胞增殖速度变慢, 同时形态发生改变, 细胞皱缩变圆(图2A~图2C), 而4T1肿瘤细胞密度和形态与对照组相比无明显变化(图2D), 这与细胞活力检测结果一致。进一步, 对培养上清中LDH含量的检测结果显示, 随着6-Thio-dG浓度和处理时间的增加, 细胞死亡率随之增加(图3)。

2.2 6-Thio-dG处理的肿瘤细胞的培养上清中ATP的释放情况

肿瘤细胞发生ICD时, 胞内能量介质ATP被释放到胞外, 作为“发现我”的信号刺激机体产生免疫应答。肿瘤细胞经不同浓度6-Thio-dG处理后, 以试剂盒检测24 h、48 h后肿瘤细胞培养上清中释放的ATP水平。结果显示, 低药物诱导浓度下ATP的释放量没有明显上升, 随着诱导浓度和时间的增加, ATP的释放水平随之升高, 与对照组相比具有显著差异(图4)。

2.3 6-Thio-dG对肿瘤细胞中的CALR从内质网向细胞膜转移的影响

CALR是位于内质网内的一种高度保守的多功能钙结合蛋白, 当肿瘤细胞发生ICD时, CALR会从内质网腔内向细胞膜表面转位, 从而暴露在细胞膜

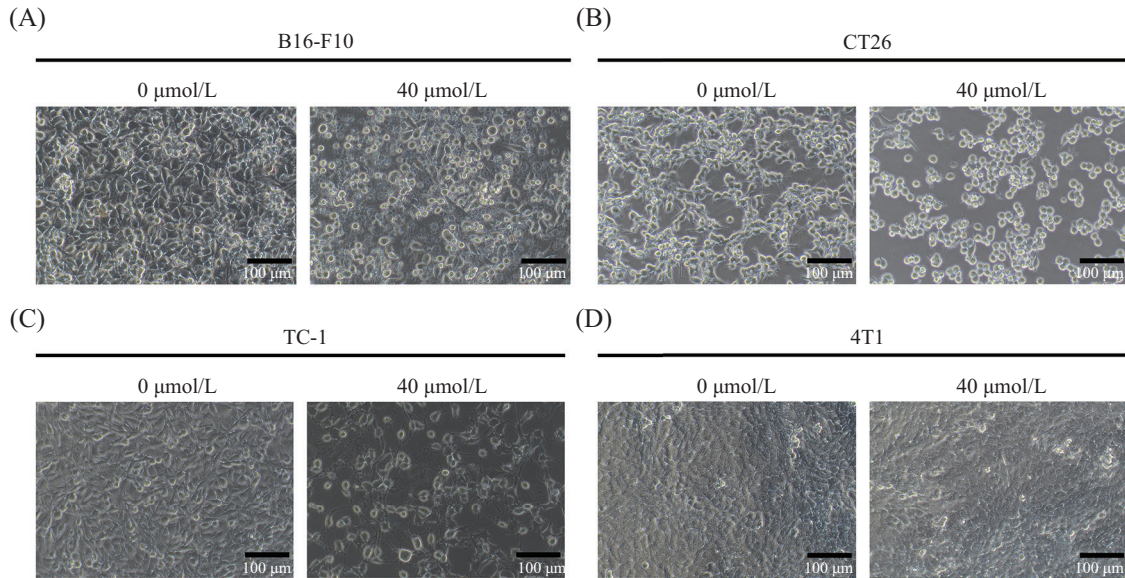


A: B16-F10细胞; B: CT26细胞; C: TC-1细胞; D: 4T1细胞。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

A: B16-F10 cells; B: CT26 cells; C: TC-1 cells; D: 4T1 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

图1 CCK8法检测6-Thio-dG对肿瘤细胞活力的影响

Fig.1 Effects of 6-Thio-dG on the viability of the tumor cells detected by CCK8 assay



A: B16-F10细胞; B: CT26细胞; C: TC-1细胞; D: 4T1细胞。

A: B16-F10 cells; B: CT26 cells; C: TC-1 cells; D: 4T1 cells.

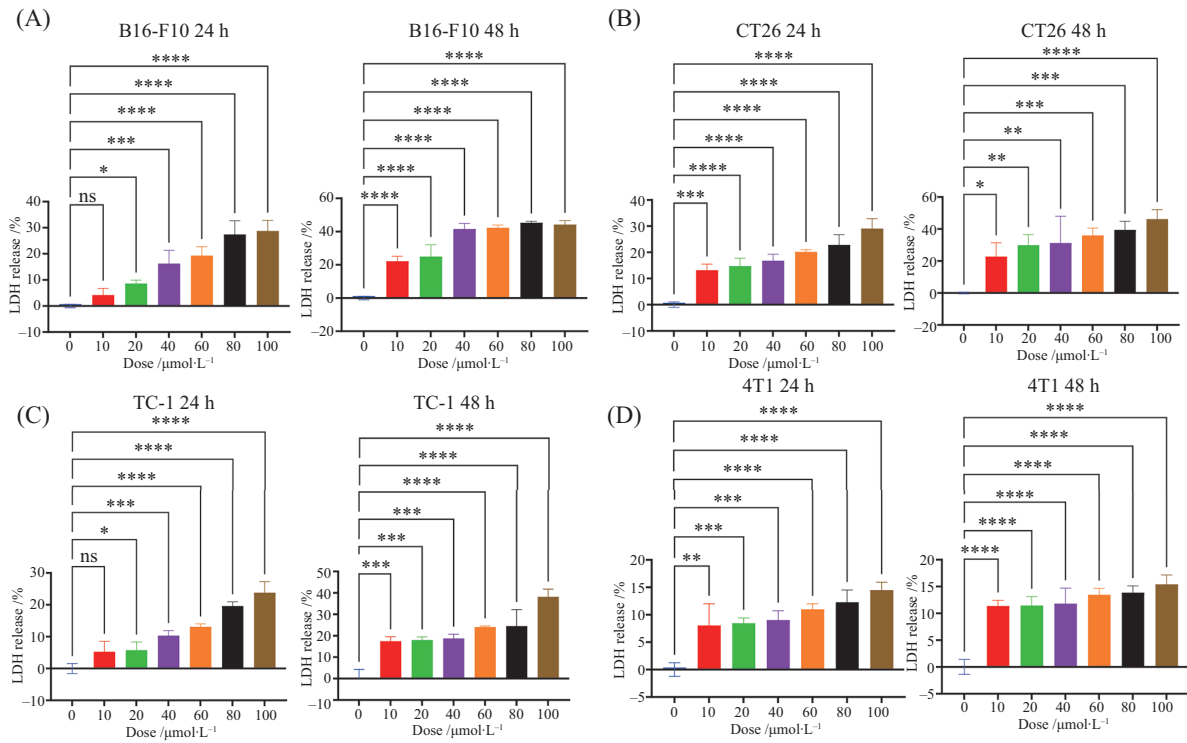
图2 显微镜观察40 μmol/L 6-Thio-dG处理24 h后肿瘤细胞的形态变化

Fig.2 Microscopical observation of the morphology changes of the tumor cells treated with 40 μmol/L 6-Thio-dG for 24 h

表面。肿瘤细胞经20 μmol/L的6-Thio-dG处理48 h后,免疫荧光法针对CALR的检测结果显示,四种肿瘤细胞都呈现出荧光强度在细胞膜上的加强,表明经6-Thio-dG诱导后CALR向细胞膜发生了转移定位(图5)。

2.4 6-Thio-dG处理的肿瘤细胞的培养上清中HMGB1的释放情况

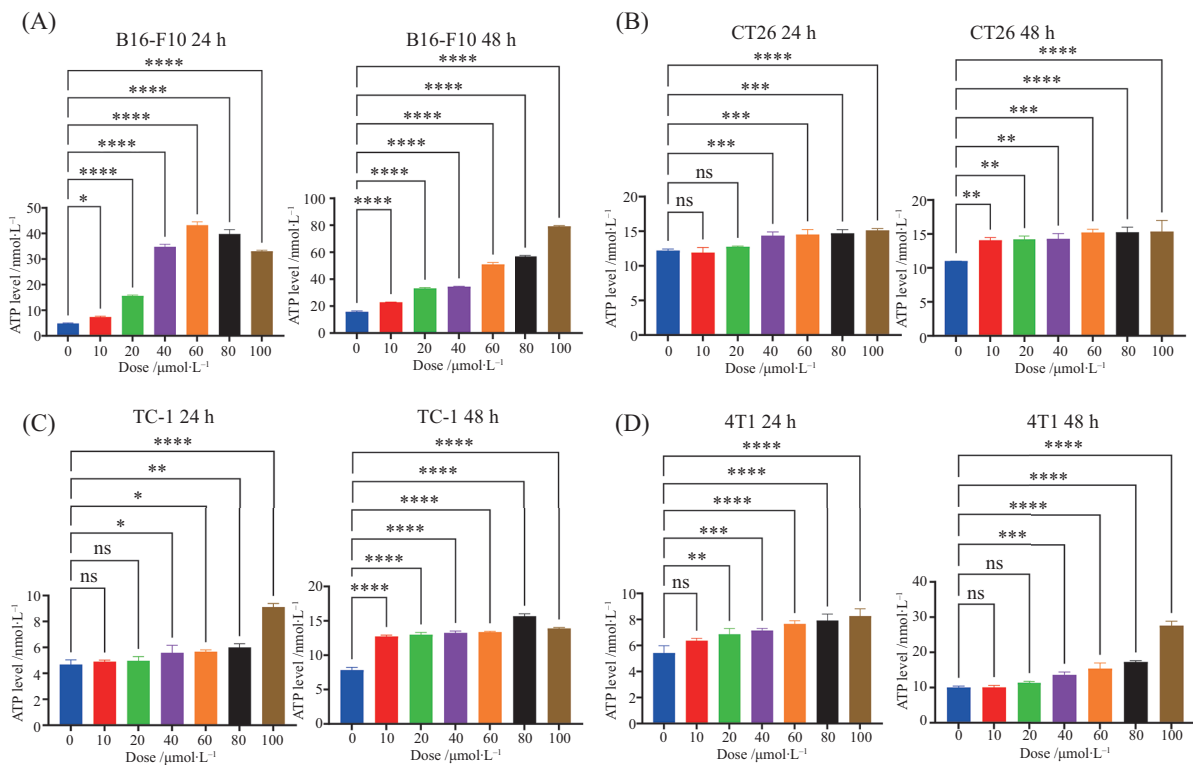
HMGB1的分泌发生在肿瘤细胞ICD的晚期,胞外释放的HMGB1能增强濒死的肿瘤细胞激发的免疫反应。肿瘤细胞经40 μmol/L的6-Thio-dG处理后,



A: B16-F10细胞; B: CT26细胞; C: TC-1细胞; D: 4T1细胞。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns $P > 0.05$ 。
A: B16-F10 cells; B: CT26 cells; C: TC-1 cells; D: 4T1 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns $P > 0.05$ 。

图3 6-Thio-dG处理引起的肿瘤细胞LDH释放

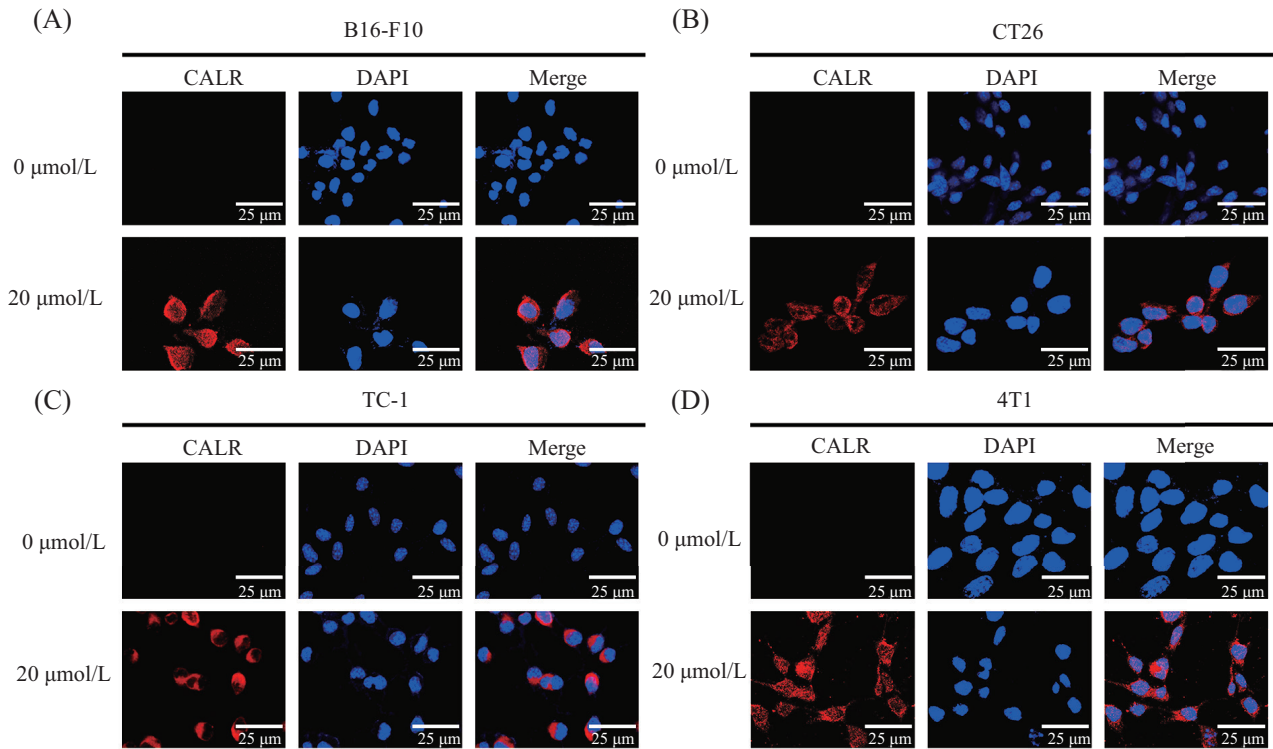
Fig.3 LDH release in the tumor cells treated with 6-Thio-dG



A: B16-F10细胞; B: CT26细胞; C: TC-1细胞; D: 4T1细胞。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns $P > 0.05$ 。
A: B16-F10 cells; B: CT26 cells; C: TC-1 cells; D: 4T1 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns $P > 0.05$ 。

图4 6-Thio-dG处理引起肿瘤细胞ATP释放

Fig.4 ATP release in the tumor cells treated with 6-Thio-dG

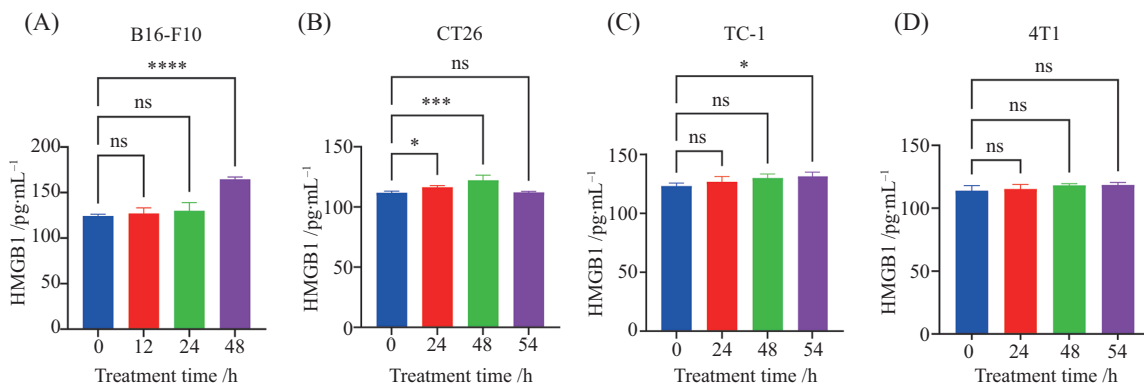


A: B16-F10细胞; B: CT26细胞; C: TC-1细胞; D: 4T1细胞。

A: B16-F10 cells; B: CT26 cells; C: TC-1 cells; D: 4T1 cells.

图5 以20 μmol/L 6-Thio-dG处理48 h的肿瘤细胞的CALR向细胞膜迁移的情况

Fig.5 Translocation of CALR to cell membrane in the tumor cells treated with 20 μmol/L 6-Thio-dG for 48 h



A: B16-F10细胞; B: CT26细胞; C: TC-1细胞; D: 4T1细胞。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns $P > 0.05$ 。

A: B16-F10 cells; B: CT26 cells; C: TC-1 cells; D: 4T1 cells. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns $P > 0.05$ 。

图6 以40 μmol/L 6-Thio-dG处理的肿瘤细胞HMGB1的释放情况

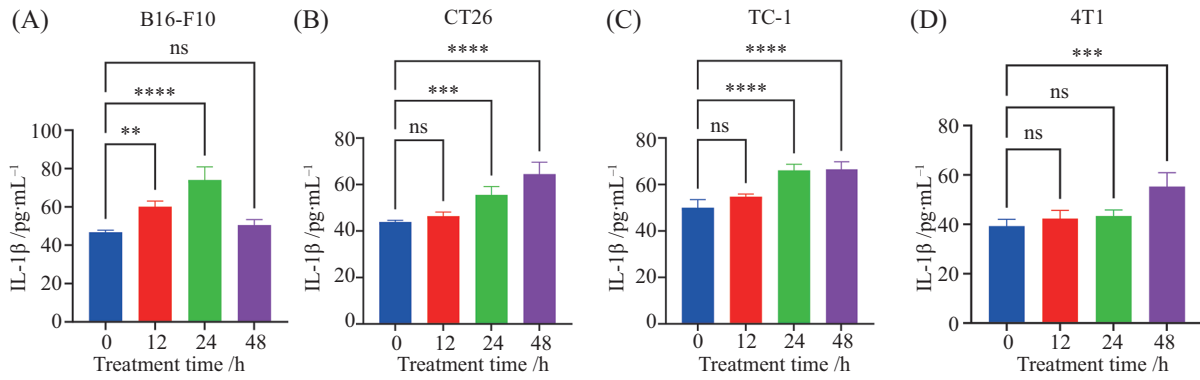
Fig.6 HMGB1 release in the tumor cells treated with 40 μmol/L 6-Thio-dG

在不同时间点检测细胞培养上清中HMGB1的含量, 结果显示, 随着诱导时间的增加, B16-F10、CT26、TC-1细胞释放的HMGB1增多, 而4T1细胞释放的HMGB1水平没有明显上升(图6)。

2.5 6-Thio-dG处理的肿瘤细胞的培养上清中IL-1β的释放情况

肿瘤细胞发生ICD时不仅会释放DAMPs, 还可

以诱导免疫刺激因子, 如IL-1β、I型IFN、CXCL10、IL-17等的产生。这些因子对调控肿瘤免疫微环境中固有免疫和适应性免疫细胞的组成和功能具有重要作用。经40 μmol/L的6-Thio-dG处理后的细胞在不同时间点以ELISA检测培养上清中IL-1β的含量, 结果显示, 随着诱导时间的增加, 细胞上清中IL-1β的释放量也随之增加(图7)。

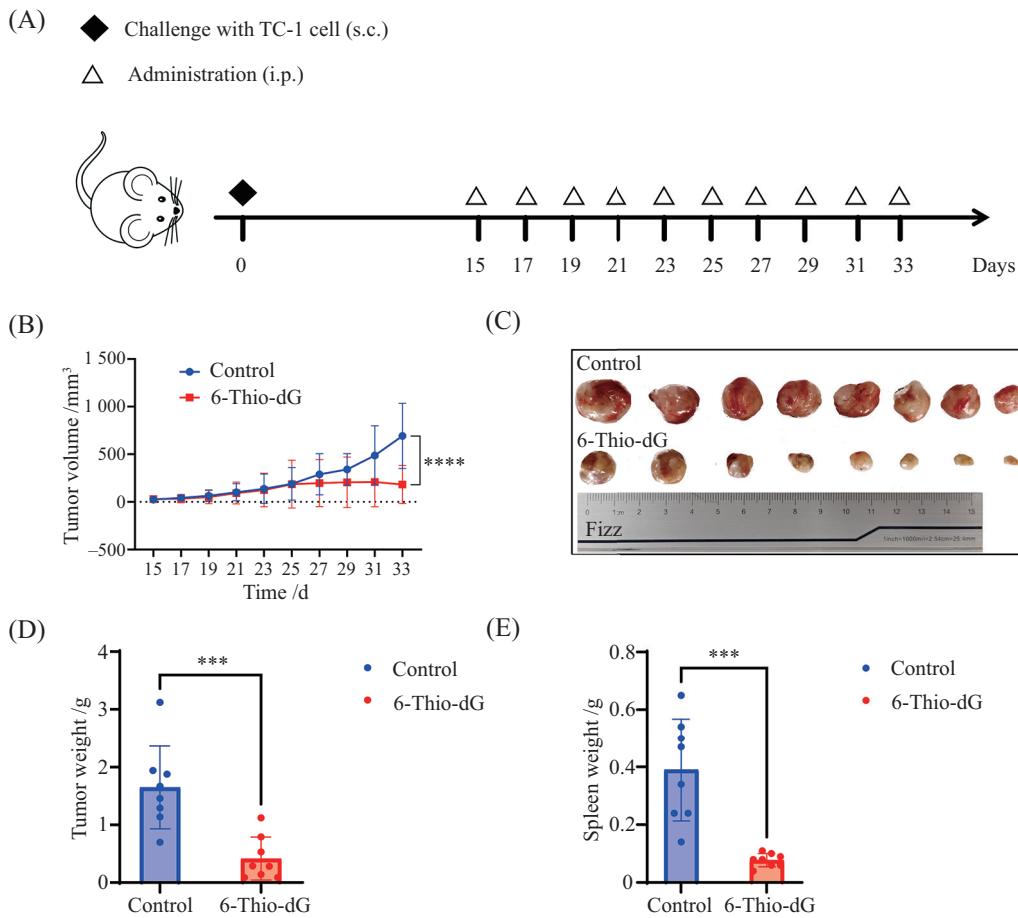


A: B16-F10细胞; B: CT26细胞; C: TC-1细胞; D: 4T1细胞。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

A: B16-F10 cells; B: CT26 cells; C: TC-1 cells; D: 4T1 cells. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

图7 以40 μmol/L 6-Thio-dG处理的肿瘤细胞IL-1β的释放情况

Fig.7 IL-1β release in the tumor cells treated with 40 μmol/L 6-Thio-dG



A: 小鼠的疫苗免疫程序; B: 肿瘤生长曲线; C: 肿瘤块大小; D: 肿瘤质量; E: 脾脏质量。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: vaccination procedure in C57 mice; B: tumor growth curves; C: size of tumor masses; D: tumor weight; E: spleen weight. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图8 6-Thio-dG对小鼠肿瘤生长的抑制作用

Fig.8 Inhibitory effect of 6-Thio-dG on the tumor growth in mice

2.6 6-Thio-dG治疗性干预抑制小鼠肿瘤生长

于小鼠背部右侧皮下接种 TC-1 肿瘤细胞建立移植瘤模型, 当肿瘤长至 4~5 mm 时, 6-Thio-

dG (3 mg/kg) 以腹腔注射的方式对荷瘤小鼠进行治疗性干预 (图 8A); 在此期间, 每隔一天测量肿瘤大小, 监测小鼠肿瘤生长情况。统计结果显示,

6-Thio-dG给药组小鼠肿瘤体积显著小于对照组(图8B);在实验终点处死小鼠后分离肿瘤和脾脏,与小鼠肿瘤生长曲线统计结果一致,6-Thio-dG给药组小鼠肿瘤体积较对照组明显缩小(图8C),肿瘤质量显著下降(图D),相应地,脾脏质量也显著下降(图E),反映出因肿瘤生长刺激的脾肿大受到抑制。

2.7 6-Thio-dG治疗提高小鼠肿瘤组织中HMGB1的水平

肿瘤组织经加工处理制备组织切片,然后针对

HMGB1进行免疫组化染色,组织切片在显微镜下的观察结果显示,与对照组相比,6-Thio-dG治疗提高了小鼠肿瘤组织中HMGB1的水平(图9),提示肿瘤部位可能发生了肿瘤细胞免疫原性死亡。

2.8 6-Thio-dG治疗提高小鼠脾脏组织中的分泌IFN- γ 的T细胞水平

抗原特异性分泌IFN- γ 的T细胞是发挥抗肿瘤免疫的重要效应细胞。小鼠脾脏分离得到的淋巴细胞经肿瘤特异的E7₄₉₋₅₇肽刺激后,经ELISPOT检测,

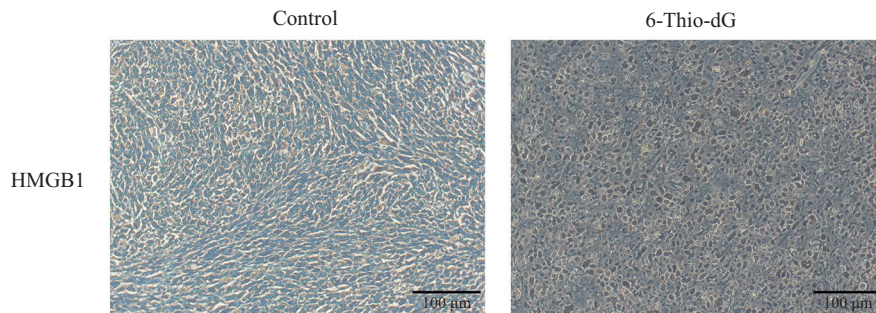
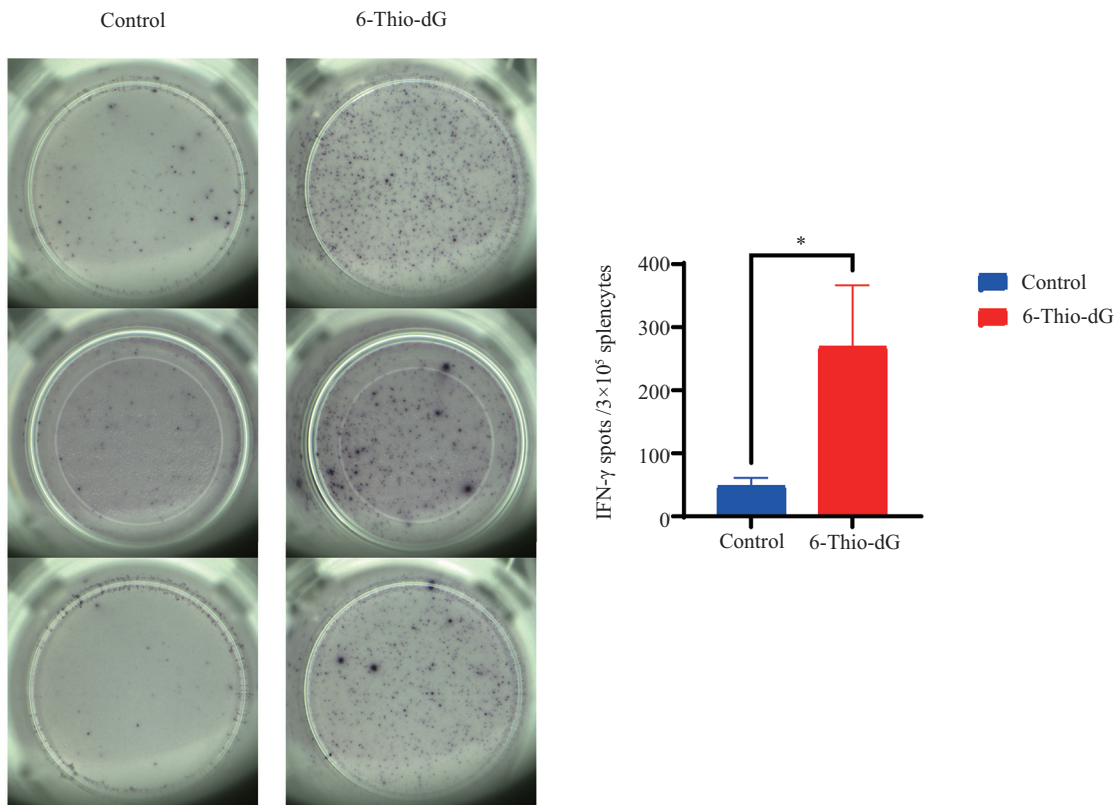


图9 免疫组化分析小鼠肿瘤组织中HMGB1水平

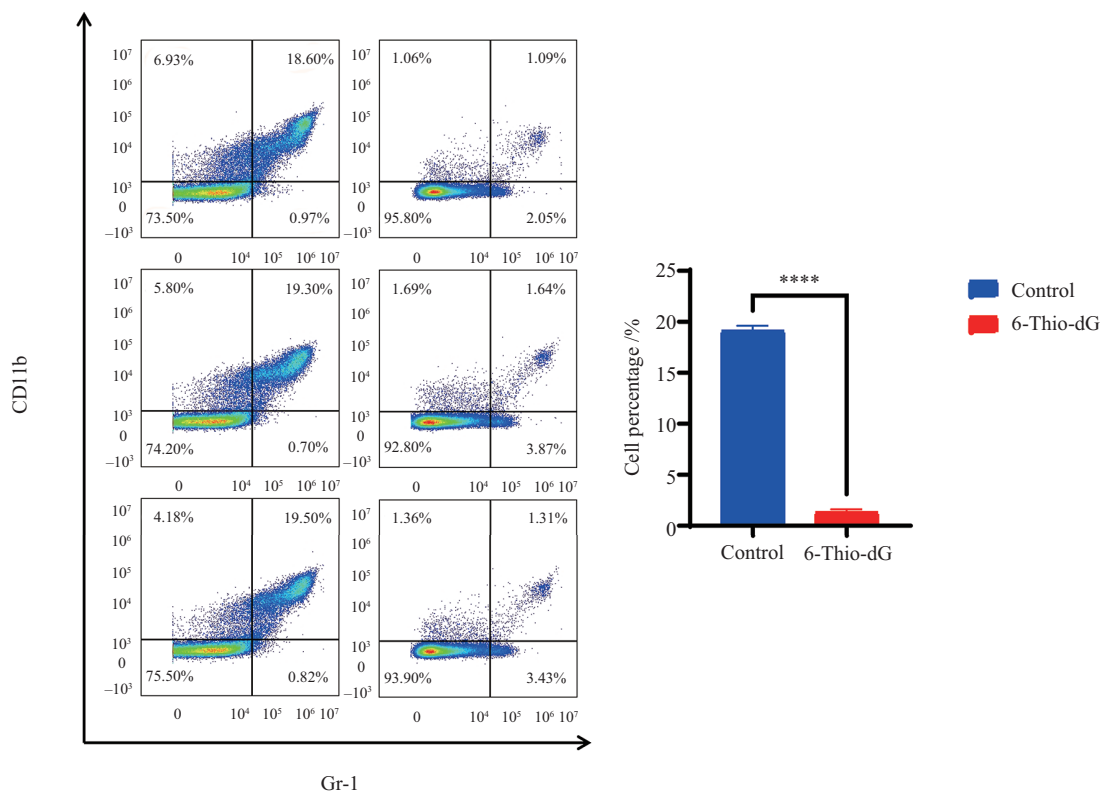
Fig.9 Immunohistochemistry analysis on the level of HMGB1 in the tumor tissues



* $P < 0.05$.

图10 ELISPOT分析分泌IFN- γ 的脾细胞水平

Fig.10 ELISPOT analysis on the level of IFN- γ -secreting splenocytes



**** $P < 0.0001$.

图11 流式细胞术分析小鼠脾细胞中MDSCs水平

Fig.11 Flow cytometry analysis on the level of MDSCs in mouse splenocytes

对斑点进行计数的结果显示, 6-Thio-dG给药组小鼠脾细胞中分泌IFN- γ 的细胞水平与对照组相比显著升高(图10), 提示6-Thio-dG治疗导致肿瘤特异的效应细胞免疫应答得到加强。

2.9 6-Thio-dG治疗降低小鼠脾细胞中抑制性细胞MDSC的水平

免疫抑制细胞MDSC会阻碍效应细胞的功能发挥, 促进肿瘤免疫逃逸及肿瘤生长。荷瘤小鼠脾细胞中MDSC的水平经流式细胞术分析显示, 6-Thio-dG给药组小鼠脾细胞中的CD11b⁺Gr-1⁺细胞水平显著低于对照组(图11), 提示6-Thio-dG给药治疗拮抗了免疫抑制细胞MDSC的应答。

3 讨论

化疗是目前临床治疗恶性肿瘤常用的一种手段, 化疗药物往往具有较大的副作用, 不仅能杀伤肿瘤细胞, 也会误伤代谢旺盛的正常细胞^[24], 此外, 容易引起耐药性, 导致治疗无效及肿瘤复发。研究发现, 一些化疗药物能在杀伤肿瘤细胞的同时引起肿瘤细胞ICD, 导致更好的治疗效果, 究其原因, 可归

结于肿瘤细胞的ICD刺激机体产生了抗肿瘤的固有及适应性免疫应答。FDA已经批准了多种ICD诱导型化疗药物, 这些药物对于晚期癌症治疗效果显著, 但其疗效和剂量有明显的相关性, 而大剂量药物对机体的副作用限制了其临床使用^[25]。值得注意的是, 不同化疗药物杀伤肿瘤细胞的作用靶点与机制不同, 可能导致其诱导ICD的机制不同, 肿瘤细胞的响应性不同, 诱导ICD的免疫应答特点不同等, 因此, 寻找低毒高效的ICD诱导剂对于发展基于ICD诱导的抗肿瘤免疫治疗策略具有重要意义。

6-Thio-dG是端粒酶的竞争性抑制剂, 可靶向端粒酶阳性的肿瘤细胞, 而对端粒酶沉默的正常细胞无影响。6-Thio-dG可通过端粒酶并入新合成的端粒中, 其疗效并不取决于端粒的长度, 因此, 对普遍的肿瘤细胞有潜在疗效。6-Thio-dG引起的端粒相关DNA损伤可激活宿主细胞溶质DNA感应STING/IFN I通路, 提高晚期癌症免疫治疗的疗效^[23]。研究发现, 6-Thio-dG在胶质瘤中具有抗肿瘤活性^[22]; 能够增强对耐药性黑色素瘤的疾病控制^[26]; 对结肠癌细胞有一定的抑制作用^[23]; 能够克服非小细胞肺癌化疗耐

药^[19];与端粒酶靶向化合物Imetelstat在高危神经母细胞瘤模型中有很好的协同作用^[27]。上述研究表明,端粒酶抑制剂6-Thio-dG在多种肿瘤模型中都具有高效抗肿瘤和低副作用的特点,其激活STING通路的作用机制提示6-Thio-dG具有诱导肿瘤细胞发生ICD的潜力。

本研究利用6-Thio-dG对小鼠宫颈癌相关肿瘤细胞TC-1、黑色素瘤细胞B16-F10等四种肿瘤细胞进行了体外处理,对处理后的细胞形态、免疫介质和炎症因子进行了考察,发现了6-Thio-dG能够有效诱导细胞死亡。但各类细胞的应答存在差异性,我们推测可能跟药物的作用机制以及各肿瘤细胞的特点,如药物摄取与转运效率、药物细胞内代谢动力学、端粒酶活性在肿瘤细胞生长中的重要性,以及药物是否存在尚未揭示的作用途径等有关。4T1肿瘤细胞表现出对6-Thio-dG的较不敏感性,因其能耐受肿瘤药物6-硫鸟嘌呤,而6-Thio-dG是6-硫鸟嘌呤的前体药物,因此一定程度上4T1肿瘤可能以相似的机制造成对6-Thio-dG的不敏感。

本研究基于体外细胞实验,揭示6-Thio-dG可诱导肿瘤细胞ICD,进一步利用小鼠模型考察了其体内激发ICD的可能。对荷瘤小鼠进行药物干预发现,6-Thio-dG治疗能够显著抑制小鼠肿瘤生长。值得注意的是,6-Thio-dG治疗后小鼠肿瘤组织中HMGB1的表达水平增加,脾脏组织中分泌IFN- γ 的T细胞水平升高,而免疫抑制的MDSC水平降低。这些结果提示,6-Thio-dG在荷瘤小鼠体内直接杀伤肿瘤细胞的同时,可能诱导了肿瘤细胞ICD,刺激了小鼠的抗肿瘤免疫应答。其机制过程可简单描述为,6-Thio-dG引起肿瘤细胞ICD,释放“发现我”信号如ATP与HMGB1能够刺激机体产生强效的免疫应答,促进APCs等固有免疫细胞的趋化、抗原摄取与递呈、细胞的成熟与促炎性介质释放等,刺激效应T细胞的分化与增殖,同时改变的肿瘤微环境有利于产生的效应细胞向肿瘤组织浸润并保持肿瘤杀伤活力,最终导致肿瘤生长抑制。

现有研究表明,6-Thio-dG对一系列肿瘤细胞甚至耐药肿瘤细胞系具有杀伤活性。但是,6-Thio-dG的临床应用仍面临挑战,例如,6-Thio-dG在体内的可能作用及机制尚未被完全揭示,尤其潜在副作用的机制需要深入探讨;此外,6-Thio-dG体内药代特征需更全面深入的了解;对于某些肿瘤类型来说,

6-Thio-dG治疗仅对较小肿瘤(小于100 mm³)有效,即虽能减缓体内肿瘤的生长,但不能完全消除肿瘤,可能原因是诱导端粒功能障碍促进了适应性或代偿性的生存机制激活。考虑到肿瘤耐药的复杂性,将6-Thio-dG与其他治疗方法联用可能产生协同效应,在减少药物用量的情况下增强抗肿瘤效果,具有较好的临床开发前景。我们基于本文的研究发现,提出了可能的进一步研究方向:与其他药物组合,更有效的广谱的诱导肿瘤细胞ICD,并使其产生激发更有利抗肿瘤免疫产生的ICD特征,同时,这一策略有助于克服肿瘤细胞耐药性问题;利用6-Thio-dG体外诱导的ICD细胞构建新型的肿瘤疫苗;6-Thio-dG治疗与其他策略如肿瘤疫苗联合,发挥6-Thio-dG的肿瘤微环境免疫调控作用。

综上所述,本研究发现端粒酶抑制剂6-Thio-dG能够诱导肿瘤细胞ICD,为基于肿瘤细胞ICD诱导的相关免疫治疗研究及临床应用提供新思路。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] WEISS W A, CHESLER L. Tumor models in cancer research [J]. *Drug Discov*, 2002, 7(19): 997.
- [3] LEI J, PLONER A, ELFSTRÖM K M, et al. HPV vaccination and the risk of invasive cervical cancer [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(14): 1340-8.
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [5] ZHAO D L, WANG L Z, CAO H, et al. Clinical characteristics and treatment of myoepithelial carcinoma of head and neck [J]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2019, 33(11): 1085-8.
- [6] GUTTMANN D M, MITRA N, BEKELMAN J, et al. Improved overall survival with aggressive primary tumor radiotherapy for patients with metastatic esophageal cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(7): 1131-42.
- [7] POL J, VACCHELLI E, ARAND A F, et al. Trial watch: immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(4): e1008866.
- [8] GALLUZZI L, BUQUÉ A, KEPP O, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(2): 97-111.
- [9] APETHO L, GHIRINGHELLI F, TESNIERE A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anti-cancer chemotherapy and radiotherapy [J]. *Nat Med*, 2007, 13(9): 1050-9.
- [10] GHIRINGHELLI F, APETHO L, TESNIERE A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β

- dependent adaptive immunity against tumors [J]. *Nat Med*, 2009, 15(10): 1170-8.
- [11] OBEID M, TESNIERE A, GHIRINGHELLI F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death [J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 54-61.
- [12] ELLIOTT M R, CHEKENI F B, TRAMPONT P C, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance [J]. *Nature*, 2009, 461(7261): 282-6.
- [13] GALLUZZI L, PIETROCOLA F, BRAVO-SA PEDRO J M, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression [J]. *EMBO J*, 2015, 34(7): 856-80.
- [14] GARG A D, KRYSKO D V, VERFAILLIE T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death [J]. *EMBO J*, 2012, 31(5): 1062-79.
- [15] SHIRATSUCHI A, WATANABE I, TAKEUCHI O, et al. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages [J]. *J Immunol*, 2004, 172(4): 2039-47.
- [16] LADOIRE S, MIGNOT G, DABAKUYO S, et al. *In situ* immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival [J]. *J Pathol*, 2011, 224(3): 389-400.
- [17] CORREALE P, ROTUNDO M S, DEL VECCHIO M T, et al. Regulatory FoxP3⁺ T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemioimmunotherapy [J]. *J Immunother*, 2010, 33(4): 435-41.
- [18] MENDER I, GRYAZNOV S, DIKMEN Z G, et al. Induction of telomere dysfunction mediated by the telomerase substrate precursor 6-thio-2'-deoxyguanosine [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(1): 82-95.
- [19] MENDER I, LARANGER R, LUITEL K, et al. Telomerase-mediated strategy for overcoming non-small cell lung cancer targeted therapy and chemotherapy resistance [J]. *Neoplasia*, 2018, 20(8): 826-37.
- [20] SENGUPTA S, SOBO M, LEE K, et al. Induced telomere damage to treat telomerase expressing therapy-resistant pediatric brain tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(7): 1504-14.
- [21] MENDER I, GRYAZNOV S, SHAY J W. A novel telomerase substrate precursor rapidly induces telomere dysfunction in telomerase positive cancer cells but not telomerase silent normal cells [J]. *Oncoscience*, 2015, 22, 2(8): 693-5.
- [22] YU S N, WEI S Y, SAVANI M, et al. A modified nucleoside 6-thio-2'-deoxyguanosine exhibits antitumor activity in gliomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(24): 6800-14.
- [23] MENDER I, ZHANG A, REN ZH, et al. Telomere stress potentiates sting-dependent anti-tumor immunity [J]. *Cancer Cell*, 2020, 14; 38(3): 400-11.
- [24] SCHIRRMACHER V. From chemotherapy to biological therapy: a review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(2): 407-19.
- [25] LEONARDI V, SAVIO G, LAUDANI A, et al. New approaches to breast cancer: oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and folinic acid in pretreated advanced breast cancer patients: preliminary reports [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 963: 91-7.
- [26] ZHANG G, WU L W, MENDER I, et al. Induction of telomere dysfunction prolongs disease control of therapy-resistant melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 1, 24(19): 4771-84.
- [27] FISCHER-MERTENS J, OTTE F, RODERWIESER A, et al. Telomerase-targeting compounds Imetelstat and 6-thio-dG act synergistically with chemotherapy in high-risk neuroblastoma models [J]. *Cellular Oncol*, 2022, 45(5): 991-1003.