

· 综 述 ·

钙网蛋白与抗肿瘤免疫的相关性研究新进展

熊辉强 综述, 李 黎, 张少容[△] 审校

(南昌大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 南昌 330006)

关键词: 钙网蛋白; 免疫; 吞噬细胞; 肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.15.040

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)15-1333-03

有研究发现,多种肿瘤细胞表面携带了自我毁灭的种子——钙网蛋白(calreticulin, CRT),其可发送信号招募吞噬细胞吞噬并消化这些肿瘤细胞,达到彻底清除肿瘤细胞的功效。CRT可作为某些肿瘤细胞表面一种有效的促吞噬信号,通过结合吞噬细胞表面的低密度脂蛋白-相关蛋白受体(low-density lipoprotein-related protein, LRP)使肿瘤细胞被吞噬,引起机体的抗肿瘤免疫反应^[1]。CRT具有多种生物学功能,其表达调控机制复杂,在抗肿瘤免疫过程中发挥重要作用,有望成为抗肿瘤免疫治疗新途径。现将 CRT 生物学功能、表达、调控及其与抗肿瘤免疫的相关性研究新进展作一综述。

1 CRT 的生物学功能及其表达

CRT 是一种相对分子质量为 4.6×10^4 Da Ca^{2+} 结合蛋白,主要位于非肌细胞粗面内质网和肌质网中,由人 19 号染色体上单一基因编码,包含 9 个外显子,具有高度的进化保守性^[2]。CRT 具有多种功能,参与伴侣分子活性及细胞内 Ca^{2+} 环境平衡的调节,细胞间黏附信号的调控,内质网中折叠和低聚反应过程中黏蛋白的合成,以及抑制血管生成和肿瘤细胞生长^[3-4]。此外, CRT 在主要组织相容性复合体 I(major histocompatibility complex I, MHC-I)的组合、类固醇介导的基因的调节以及 Zn^{2+} 的结合和储存中起重要作用^[5]。细胞核中的 CRT 能调节核蛋白迁移和影响信号经由核受体和整联蛋白^[6]。当用蒽环类抗生素、奥沙利铂、放射治疗及缺氧等处理,细胞表面的 CRT 暴露,并成为一种“来吃我”信号,招募树突状细胞(dendritic cells, DCs)和巨噬细胞,导致免疫反应^[7-8]。CRT 还与肿瘤的发生有关,通过增加细胞与细胞间、细胞与基质间的黏附能力^[9]或者减少 MHC-I 类抗原提呈发挥作用^[10]。

CRT 的表达已经在多种肿瘤中被发现,例如黑色素瘤、肝癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌及乳腺癌^[11-14]等。Chao 等^[15]研究表明, CRT 主要表达于恶性肿瘤细胞和凋亡细胞的表面,前者主要包括血液系统恶性肿瘤中的急性髓细胞白血病(acute myelocytic leukemia, AML)、急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)、慢性髓细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL),以及实体瘤中的恶性胶质瘤、膀胱癌和卵巢癌等,但是在对应的正常细胞中却很少表达。以往的研究还表明 CRT 亦存在于有活性的外周血 T 细胞和循环中的中性粒细胞^[16]。

2 CRT 表达的调控机制

CRT 正常位于细胞的内质网腔,其在细胞中发挥促吞噬信号功能需要经过系列的途径迁移至胞膜,并与 ERp57 以分子络合物的形式共同表达于细胞膜表面发挥作用。CRT 暴露迁移途径复杂,涉及的调控机制:内质网(endoplasmic reticu-

lum, ER) 应激性原理、细胞凋亡机制(caspase-8 及其底物 BAP31、Bax、Bak)、蛋白从 ER 至高尔基体的转运,以及 N-甲基马来酰胺敏感因子附着蛋白受体(soluble NSF attachment protein receptors, SNAREs)相关的胞吐作用等。

2.1 ER 应激性原理 在 Kepp 等^[17]的研究中,用蒽环类抗生素、奥沙利铂(抗肿瘤药)或者电离照射治疗一段时间的鼠 CT26 细胞、人类 HCT-16 结肠癌细胞,以及人类 HeLa 颈部癌细胞和鼠胚胎性成纤维细胞,发现 CRT 能够暴露于这些细胞的表面,该作用是伴随 ER 超微结构的破坏以及 ER 应激反应信号的产生,使内质网固定激酶 PERK 激活,真核起始因子(eukaryotic initiation factor 2α , eIF 2α)则变成了磷酸化的丝氨酸-51,并转化成一种鸟嘌呤核苷酸转换因子 eIF 2β 的抑制剂,从而影响 CRT 蛋白合成。同样地,敲除 PERK 也能废除 CRT 暴露。因此, CRT 的暴露需要 PERK 介导的 eIF 2α 磷酸化作用。而 Novoa 等^[18]研究表明, ER 应激还能产生一种由 2 个亚单位构成的 GADD34 抑制剂,通过与蛋白磷酸酶-1(PP1)的相互作用来介导 eIF 2α 磷酸化过程,影响 CRT 的暴露途径。

2.2 细胞凋亡机制 有研究发现,细胞表面 CRT 的表达能被一般的半胱天冬酶(caspase)抑制剂所抑制,例如化学合成的假底物 Z-VAD-fmk 或者杆状病毒编码的 p35 蛋白^[19]。相应地,敲除 PERK 能废除由蒽环类抗生素诱导的 caspase-8 的蛋白水解成熟过程。敲除 caspase-8 基因(而不是 caspase-3, 7, 12)能废除 CRT 的暴露。然而在 caspase-8^{-/-}MEFs 显示出正常的 PERK 介导的 eIF 2α 磷酸化,表明 PERK 位于 caspase-8 的上游区。caspase-8 需要降解其底物 BAP31 发挥作用, BAP31 是一种 Bcl-2 结合蛋白^[20]。当用无裂解的 D164A/D238A BAP31 突变体转染 HeLa 癌细胞后丢失了 CRT 迁移能力,敲除 BAP31 类似于废除 CRT 暴露。Bcl-2 是细胞凋亡的一个显著性的抑制剂,能阻碍促吞噬因子的 Bax 和 Bak 的活性^[21]。在 MEFs 中敲除 Bax 或者 Bak 中的任何一个,或者在 HeLa 和 CT26 细胞中敲除 Bax、Bak 蛋白均能废除 CRT 的暴露。由此可见, caspase-8 及其裂解底物 BAP31、Bax、Bak 都是 CRT 暴露所必须的。

2.3 蛋白的转运与胞吐作用 CRT 的暴露需经过 ER 至高尔基体转运的过程, CRT 蛋白以小囊泡形式从高尔基体发出,与细胞膜融合,并以 SNAREs 依赖的胞吐方式分泌。布雷非德菌素 A(brefeldin A),一种顺行蛋白从 ER 至高尔基体转运的抑制剂,能阻断由蒽环类抗生素诱导的 CRT 暴露,敲除 SNAREs 同样能抑制 CRT 暴露。表明蛋白的转运过程和胞吐作用对于 CRT 释放起重要作用。

2.4 ERp57 ERp57 是一种固着的二硫化物异构酶,能在 ER 内相互干扰 CRT,共同转移 CRT 至细胞表面,应对免疫原性

的细胞死亡诱导。敲除了 ERp57 能完全废除 CRT 暴露,反之亦然,敲除 CRT 也能抑制 ERp57 暴露。用特异性 ERp57 逆转录 RNA 干扰的肿瘤细胞可减少 ERp57 表达,再用蕙环类药物处理只表现正常的凋亡,ERp57 低表达的肿瘤细胞不能引起 CRT 的移位。表明 CRT 与 ERp57 的相互作用是共迁移到细胞表面所必需的。Obeid^[22] 研究显示,CRT 的表达受到 ERp57 表达的控制,敲掉 ERp57 可抑制 CRT 的表达并被树突状细胞吞噬,从而消除了免疫原性,敲掉 CRT 或缺乏 CRT 可消除 ERp57 的表达,给予重组 ERp57 并不能恢复肿瘤细胞的免疫原性(与 v 重组 CRT 不同),ERp57 通过控制 CRT 的表达来控制肿瘤细胞的免疫原性。

3 CRT 与抗肿瘤免疫

有效地抗肿瘤治疗不单是杀死肿瘤细胞,更重要的是建立抗肿瘤免疫反应。肿瘤细胞表面 CRT 的表达能招募 DCs 和吞噬细胞,导致机体的抗肿瘤免疫反应。Xu 等^[23] 研究发现,CRT 不仅能够结合 E7 有效地促进 DCs 提呈 E7 抗原、诱导抗原特异性 CD8⁺ T 细胞,还能促使白细胞介素(IL)-2、IFN- γ 分泌,进而活化吞噬细胞、自然杀伤(NK)细胞,促使 CTL 增殖及抗肿瘤免疫作用。肿瘤细胞可以通过多种机制逃避免疫攻击而抵抗机体的免疫清除。最近有研究表明,肿瘤细胞通过下调促吞噬信号的 CRT 表达是细胞逃避吞噬反应的另外一种机制,通过这种机制肿瘤细胞可以逃避免疫监视。若能对某些因低水平表达 CRT 引起的肿瘤免疫逃避反应增加其细胞表面 CRT 的表达则能重新引起机体的抗肿瘤免疫,使肿瘤细胞被清除。Panaretakis 等^[24] 研究发现,用蕙环类抗生素——米托蒽醌(MTX)治疗高水平表达 CRT/ERp57 的鼠 CT26 癌细胞移植瘤时其能被治愈,而移植低水平表达 CRT/ERp57 的 CT26 癌细胞的小鼠移植瘤却未能被治愈。对于后者,当其瘤体内注射重组体 CRT 蛋白时又能使小鼠被治愈。因为注射重组体 CRT 蛋白后,其能吸附至肿瘤细胞表面,相当于增加了肿瘤细胞表面 CRT 的表达。为了证明细胞表面增加 CRT 表达能否促使吞噬作用进行了体外吞噬实验,在培养的骨髓细胞(normal bone marrow, NBM)中添加外源性重组体 CRT 蛋白,与对照组比较,用外源性 CRT 培养的 NBM 能够促使巨噬细胞的吞噬作用。这些结果表明机体的抗肿瘤免疫功能的发挥需要细胞表面 CRT 的存在。

Chao 等^[15] 研究表明,多数肿瘤细胞“促吞噬信号”CRT 的表达常伴有“抗吞噬信号”CD47 的表达,以此来防护 CRT 介导的吞噬作用。当 CRT-阻断肽阻断靶细胞表面 CRT 与吞噬细胞表面的受体 LRP 间的相互作用,吞噬活性被完全废除,从而引起肿瘤的免疫逃避。同样地,若能下调“抗吞噬信号”CD47 的表达水平,此时相当于上调了 CRT 的水平,则同样能引起吞噬细胞对肿瘤的吞噬作用。为了证明这一假说,他们用慢病毒-shRNAs 敲除 Raji 细胞(一种 Burkitts NHL 细胞系)中 CD47 基因的表达,细胞表面 CRT 的表达没有受 shRNA 介导的 CD47 基因敲除的影响,当其置于人类吞噬细胞中一起培养,与对照组比较,Raji 细胞能大量被人类吞噬细胞吞噬。当用抗-CD47 单克隆抗体结合肿瘤细胞表面的 CD47 分子,同样能使肿瘤细胞中的抗吞噬信号(CD47)被抑制,暴露出促吞噬信号(CRT),促使了吞噬细胞的吞噬作用。从上述研究可见,肿瘤细胞表面 CRT 和 CD47 的平衡表达,对机体的抗肿瘤免疫起重要的作用。CRT 作为多种人类癌症组织中的主要促吞噬信号,为用重组体 CRT 及沉默 CD47 基因对肿瘤的靶向治疗提供依据。

Peng 等^[25] 研究表明,结肠癌中 CRT 的表达和 CD45RO⁺ T 细胞的浸润密切相关,与 CD3⁺ T 细胞的浸润及患者的其他参数(年龄、性别、肿瘤位置)无相关性。CD45RO⁺ T 细胞为一种记忆性 T 细胞,其表面黏附分子表达强,能直接向抗原部位移动,当再次抗原刺激时,即刻发生强烈的免疫反应^[26]。CD45RO⁺ T 细胞在结直肠癌组织中的浸润,能减缓肿瘤的进展^[27]。CRT 的抗肿瘤免疫功能可能与刺激 CD45RO⁺ T 细胞的增殖、浸润有关。尚需更多的研究进一步证实并发现其相关作用机制。

4 展 望

肿瘤发生的一个重要因素就是突变的肿瘤细胞能够下调一些分子的表达来逃避免疫反应,而这些分子在细胞识别和吞噬过程中起重要的作用^[28]。期望通过改变细胞表面相关分子的表达来恢复或者刺激机体的免疫反应,以此来完成一种有效的肿瘤预防和治疗。CRT 作为某些恶性肿瘤组织中的主要“促吞噬信号”,其在肿瘤细胞中的移位暴露引发了免疫反应,为抗肿瘤传统治疗方法联合免疫治疗提供新的契机。CRT 的促吞噬作用能被细胞表面“抗吞噬信号”的 CD47 分子所抵抗,敲除 CD47 基因或者用抗-CD47 单克隆抗体疗法同样可以达到治疗效果,表明肿瘤免疫过程中促吞噬和抗吞噬信号平衡表达的重要性。其他恶性肿瘤组织中是否均存在 CRT 的表达,其如何与 CD47 共同作用于肿瘤的发生、发展,以及其相关作用机制,这些都亟待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Gardai SJ, McPhillips KA, Frasn SC, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte[J]. *Cell*, 2005, 123(2): 321-334.
- [2] Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(19): 3641-3651.
- [3] Garg AD, Nowis D, Golab J, et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1805(1): 53-71.
- [4] Villagomez M, Szabo E, Podcheko A, et al. Calreticulin and focal-contact-dependent adhesion[J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87(4): 545-556.
- [5] Solheim JC, Class I. MHC molecules: assembly and antigen presentation[J]. *Immunol Rev*, 1999, 172: 11-19.
- [6] Mesaeli N, Phillipson C. Impaired p53 expression, function, and nuclear localization in calreticulin-deficient cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(4): 1862-1870.
- [7] Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin[J]. *Oncogene*, 2010, 29(4): 482-491.
- [8] Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death[J]. *EMBO J*, 2009, 28(5): 578-590.
- [9] Alur M, Nguyen MM, Eggen SE, et al. Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis[J]. *Ame J Pathol*, 2009, 175(2): 882-890.
- [10] Howe C, Garstka M, Al-Balushi M, et al. Calreticulin-de-

- pendent recycling in the early secretory pathway mediates optimal peptide loading of MHC class I molecules [J]. EMBO J, 2009, 28(23):3730-3744.
- [11] Kageyama S, Isono T, Matsuda S, et al. Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma [J]. Int J Urol, 2009, 16(5):481-486.
- [12] Seliger B, Stoehr R, Handke D, et al. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(4):529-540.
- [13] Eric, Juranic Z, Milovanovic Z, et al. Effects of humoral immunity and calreticulin overexpression on postoperative course in breast cancer [J]. Pathol Oncol Res, 2009, 15(1):89-90.
- [14] Bergner A, Kellner J, Tufman A, et al. Endoplasmic reticulum Ca²⁺-homeostasis is altered in small and non-small cell lung cancer cell lines [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28(1):25-31.
- [15] Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47 [J]. Sci Transl Med, 2010, 2(63):1-9.
- [16] Ghiran I, Klickstein LB, Nicholson-Weller A. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule [J]. J Biol Chem, 2003, 278(23):21024-21031.
- [17] Kepp O, Senovilla L, Galluzzi L, et al. Viral subversion of immunogenic cell death [J]. Cell Cycle, 2009, 8(6):860-869.
- [18] Novoa I, Zeng H, Harding HP, et al. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha [J]. J Cell Biol, 2001, 153(5):1011-1022.
- [19] 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.
- [20] Nq FW, Nquyen M, Kwan T, et al. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL-and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum [J]. J Cell Biol 1997, 139(2):327-338.
- [21] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death [J]. Physiol Rev, 2007, 87(1):99-163.
- [22] Obeid M. ERp57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin [J]. J Immunol, 2008, 181(4):2533-2543.
- [23] Xu Y, Cheng H, Zhao KJ, et al. HPV DNA vaccines expressing recombinant CRT/HPV 6bE7 fusion protein inhibit tumor growth and angiogenic activity [J]. Bing Du Xue Bao, 2007, 23(6):466-470.
- [24] Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, et al. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(9):1499-1509.
- [25] Peng RQ, Chen YB, Ding Y, et al. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage III B colon cancer [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(19):2428-2434.
- [26] 肖刚, 赵刚, 许晓东, 等. 结肠癌患者外周血中 CD4⁺CD45RA⁺T 和 CD4⁺CD45RO⁺T 细胞的变化及其意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(4):362-364.
- [27] Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(35):5944-5951.
- [28] Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, et al. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment [J]. Apoptosis, 2009, 14(4):364-375.

(收稿日期:2011-12-23 修回日期:2012-02-08)

· 综 述 ·

椎管内麻醉后寒战的影响因素及治疗

孟庆花 综述, 徐咏梅 审校

(哈尔滨医科大学第二附属医院麻醉科 150086)

关键词: 椎管; 麻醉; 寒战; 治疗; 预防

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.13.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)13-1335-04

寒战是机体骨骼肌的不随意的、快速节律性收缩,是机体对寒冷刺激的体温调节反应。寒战也是麻醉中常见的并发症,发生率为 5%~65%,其中椎管内麻醉后寒战的发生率明显高于全身麻醉^[1]。寒战反应虽然是机体的一种保护性反应,但是不能自控的肌肉颤动带来的不适感会加重患者在围术期的焦虑,对患者的心理和生理方面都产生不良影响。而且寒战的发生不仅可使眼压、颅内压升高,还可显著增加机体的代谢和耗氧量,使 CO₂ 和乳酸生成增多,机体通过加强呼吸和心脏做功来取得代偿,心脏因此负荷增加,这对于心、肺功能正常的患者

影响不大,但是对于心、肺储备功能低下的患者或危重患者,得不到有效代偿,会加重患者的病情,甚至心、肺功能衰竭。再者,术中发生寒战还会影响手术操作和麻醉中监测。故本文综述近年来有关椎管内麻醉后寒战的影响因素与预防和治疗的措施。

1 影响因素

1.1 体温调节机制 人的体温调节机制分成 3 个部分:温度感受器、传入神经通路和传出神经通路。下丘脑、脑干、网状结构和脊髓等存在温度敏感神经元,可以感知温度信息,对其进