

· 论 著 ·

## 重组腺病毒介导 Hsp70 基因表达对胰腺癌荷瘤小鼠的免疫功能影响\*

孙运良<sup>1#</sup>, 徐 灿<sup>1△</sup>, 苏长青<sup>2</sup>, 马建霞<sup>1</sup>, 吴红玉<sup>1</sup>(1. 第二军医大学附属长海医院消化内科, 上海 210043; 2. 第二军医大学附属东方肝胆外科  
医院分子肿瘤研究室, 上海 210043)

**摘要:**目的 观察重组腺病毒介导热休克蛋白 70(Hsp70)基因表达对胰腺癌荷瘤小鼠的治疗作用及其对免疫功能的影响。方法 建立胰腺癌荷瘤小鼠动物模型,随机分为荷瘤组、对照组和治疗组,对比不同时间点三组肿瘤大小,评价抑瘤效果。通过 Western blot 检测移植瘤组织 Hsp70 蛋白表达,流式细胞仪检测脾单核细胞中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例,ELISA 检测血清中细胞因子 IL-2、INF- $\gamma$ 、IL-4、IL10 的含量。结果 与荷瘤组和对照组相比,治疗组肿瘤生长受到明显抑制( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),脾单核细胞中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例明显增加( $P < 0.01$ )。治疗组血清中细胞因子 IL-2、INF- $\gamma$  含量较荷瘤组和对照组明显增加( $P < 0.01$ ),IL-10 含量则明显减少( $P < 0.01$ )。结论 重组腺病毒介导的 Hsp70 基因表达对荷瘤小鼠胰腺癌动物模型的肿瘤生长具有抑制作用,其机制与激发免疫系统功能有关。

**关键词:**重组腺病毒;胰腺肿瘤;Hsp70 热休克蛋白类;免疫功能

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.32.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)32-3353-03

## The immune function effect of recombinant adenovirus-mediated Hsp70 gene expression on tumor-bearing mice of pancreatic cancer\*

Sun Yunliang<sup>1#</sup>, Xu Can<sup>1△</sup>, Su Changqing<sup>2</sup>, Ma Jianxia<sup>1</sup>, Wu Hongyu<sup>1</sup>(1. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 210043, China;  
2. Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, the Second Military Medical  
University, Shanghai 210043, China)

**Abstract: Objective** To observe the therapeutic effect of recombinant adenovirus-mediated heat shock protein 70(Hsp70) gene expression on tumor-bearing mice of pancreatic cancer, and to investigate its influence on immune function. **Methods** Mouse tumor-bearing models of pancreatic cancer were established and were randomly divided into tumor-bearing group, control group and treatment group. Antitumor effect was evaluated by comparing tumor size of the three groups at different time points. Hsp70 protein expression in transplanted tumor tissue was analyzed by Western blot. ELISA method was used to detect cytokines IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 level in peripheral blood. The proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells of spleen mononuclear cells were evaluated by flow cytometry. **Results** Compared with the tumor-bearing group and the control group, tumor growth in the treatment group was significantly inhibited( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells ratio in the treatment group was significantly higher than those in the tumor-bearing group and the control group( $P < 0.01$ ). Serum cytokines IL-2, INF- $\gamma$  content in the treatment group increased significantly( $P < 0.01$ ) and IL-10 content reduced significantly( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Hsp70 gene expression mediated by recombinant adenovirus can inhibit tumor growth in mouse xenograft models of pancreatic cancer and its mechanism is related to stimulating the immune system.

**Key words:** recombinant adenovirus; pancreatic neoplasms; HSP70 heat-shock proteins; immune function

热休克蛋白 70(heat shock protein 70, Hsp70)是一类广泛存在于各种生物体内的进化上高度保守的细胞应激蛋白。研究已证实,肿瘤细胞来源的 Hsp70 不仅可作为抗原提呈的辅助分子参与肿瘤抗原肽的加工和处理,增强肿瘤抗原的稳定性和免疫原性,而且可作为抗原呈递分子直接将肿瘤抗原肽递呈给 T 细胞,特别是细胞毒性 T 细胞,从而诱导机体产生强大的抗肿瘤免疫效应<sup>[1-3]</sup>。近年来,以 Hsp70 为基础的肿瘤疫苗受到了学者的广泛关注,本研究利用前期构建的表达 Hsp70 基因的重组腺病毒治疗胰腺癌荷瘤小鼠动物模型,观察该重组腺病毒对荷瘤小鼠移植瘤生长的抑制作用及其对免疫功能的影响,现报道如下。

## 1 材料与方

1.1 材料 人胰腺癌细胞株 BxPC-3 为长海医院消化内科实

实验室保存, BxPC-3 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 培养液中含青霉素、链霉素各 10 U/mL。表达 Hsp70 基因的重组腺病毒 Ad5-pCEA-Hsp70 以及对照病毒 Ad5-control 为本研究前期所构建<sup>[4]</sup>。小鼠抗人 Hsp70 单克隆抗体购自 Stressgen 公司; FITC 标记的抗小鼠 CD4、CD8 单克隆抗体为 eBioscience 公司产品; IL-2、INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 ELISA 检测试剂盒购自 BD 公司, 清洁级健康雄性的 C57BL/6 小鼠 24 只, 体质量(20±2)g, 6~8 周龄, 购于上海中科院斯莱克动物中心, 第二军医大学动物实验中心饲养。

## 1.2 方法

1.2.1 胰腺癌荷瘤小鼠动物模型的建立 常规培养 BxPC-3 细胞, 收集处于对数生长期的细胞, 调整细胞浓度, 将总量为  $5 \times 10^6$  的细胞接种于 C57BL/6 小鼠腹部皮下。每周两次观察

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801106)。 # 现工作单位:江苏省赣榆县人民医院消化内科。 △ 通讯作者, Tel:(021) 81873249; E-mail:shsmmu@hotmail.com。

荷瘤小鼠皮下瘤的生长情况,以游标卡尺测量瘤体的长径和短径,通过  $a \times b_2 / 2$  ( $a$  为长径,  $b$  为短径) 计算移植瘤的大小<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 实验分组及处理** 待小鼠皮下形成直径约 0.5 cm 的移植瘤后,随机将小鼠分为荷瘤组、对照组和治疗组,每组共 8 只动物。其中荷瘤组不作任何治疗;对照组给予腹腔注射溶于 100  $\mu$ L PBS 的对照病毒  $2 \times 10^8$  PFU,每隔 1 d 1 次,共注射 5 次;治疗组给予腹腔注射溶于 100  $\mu$ L PBS 的重组腺病毒  $2 \times 10^8$  PFU,每隔 1 d 1 次,共注射 5 次。

**1.2.3 抑瘤效果和抑瘤率的评价** 每周两次观察荷瘤小鼠的皮下瘤的生长情况,绘制肿瘤生长曲线,评价抑瘤效果。当荷瘤组肿瘤体积长至约 1 000 mm<sup>3</sup> 时,以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉各组实验动物,通过摘除眼球取血后处死动物,剥离皮下移植瘤,电子天平称质量,计算肿瘤抑制率。抑瘤率 = [(荷瘤组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量) / 荷瘤组平均瘤质量]  $\times$  100%。

**1.2.4 Western blot 检测移植瘤组织 Hsp70 蛋白表达** 用 RIPA 裂解液制备移植瘤组织蛋白,蛋白分析系统 (Bio-Rad) 测定蛋白浓度,上样于 20% SDS-PAGE 电泳,电转染到硝酸纤维素膜。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 1  $\times$  PBS 封膜 2 h。加入 Hsp70 单克隆抗体,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h, ECL 显影。结果用凝胶图像软件分析系统对胶片扫描,与内参照  $\beta$ -actin 进行比较,计算其比值。

**1.2.5 脾指数测定** 摘取小鼠的脾脏,用滤纸吸干残血后,电子天平称质量,计算脾脏指数。脾脏指数 = [脾脏质量 (mg) / 小鼠体质量 (g)]  $\times$  100%。

**1.2.6 流式细胞仪检测脾单核细胞中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例** 分离小鼠脾脏,制备单细胞悬液,经 FITC 标记的抗小鼠 CD4、CD8 单克隆抗体标记后,通过流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例。

**1.2.7 ELISA 测定外周血中细胞因子的含量** 取各组实验动物的外周血,离心后收集血清,按 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测细胞因子 IL-2、INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 的含量。

**1.2.8 酶法检测各组动物肝、肾功能** 采用酶法通过 HITA-CHI-7150 型自动生化分析仪测定各组动物血清天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、尿素氮 (BUN) 以及肌酐 (Cr) 含量。

**1.3 统计学处理** 所有数据均应用 SPSS11.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用  $t$  检验,多组均数比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 重组腺病毒对荷瘤小鼠皮下移植瘤的生长抑制作用** C57BL/6 小鼠皮下接种 BxPC-3 细胞后,5~7 d 后可以看见并能触及瘤结节,成瘤率 100%。荷瘤组和对照组瘤体生长迅速,两组之间各个时间点肿瘤体积均差异无统计学意义;治疗组肿瘤生长则受到明显抑制,与荷瘤组和对照组各个时间点肿瘤体积相比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),见图 1。实验终止时,治疗组的肿瘤质量为  $(0.62 \pm 0.18)$  g,显著低于荷瘤组和对照组 [ $(1.32 \pm 0.27)$  g,  $(1.27 \pm 0.29)$  g;  $P < 0.01$ ];治疗组的肿瘤抑制率为 53.1%,而对照组的肿瘤抑制率为 3.79%。

**2.2 重组腺病毒对荷瘤小鼠皮下移植瘤 Hsp70 蛋白表达的影响** Western blot 结果显示 (图 2),重组腺病毒能够较好的介导 Hsp70 蛋白在荷瘤小鼠皮下移植瘤表达,治疗组 Hsp70

蛋白相对表达量为  $0.97 \pm 0.18$ ,显著高于对照组与荷瘤组 ( $0.31 \pm 0.09, 0.27 \pm 0.07$ ;  $P < 0.01$ )。

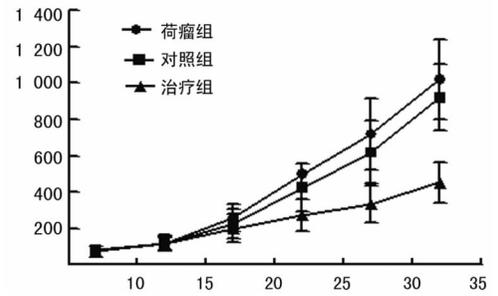
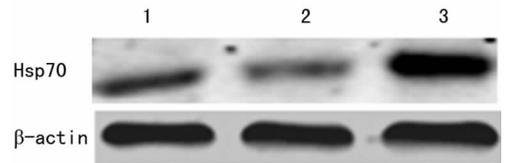


图 1 重组腺病毒对胰腺癌荷瘤小鼠皮下移植瘤生长的影响



1: 荷瘤组; 2: 对照组; 3: 治疗组

图 2 Western blot 检测 Hsp70 蛋白表达

**2.3 重组腺病毒对荷瘤小鼠脾指数和 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例的影响** 治疗组脾指数为  $12.4 \pm 2.6$ ,显著高于荷瘤组和对照组 ( $P < 0.05$ )。治疗组脾单核细胞 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例分别为  $(17.3 \pm 2.5)\%$  和  $(20.5 \pm 3.2)\%$ ,与荷瘤组和对照组相比,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 重组腺病毒对荷瘤小鼠脾指数和 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	脾指数	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)
荷瘤组	8	9.61 $\pm$ 1.8	11.8 $\pm$ 2.8	9.8 $\pm$ 2.1
对照组	8	10.50 $\pm$ 2.1	12.1 $\pm$ 2.6	10.9 $\pm$ 1.9
治疗组	8	12.40 $\pm$ 2.6 <sup>ac</sup>	17.3 $\pm$ 2.5 <sup>bd</sup>	20.5 $\pm$ 3.2 <sup>bd</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与荷瘤组相比; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>d</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

**2.4 重组腺病毒对荷瘤小鼠血清 Th1/Th2 细胞因子水平的影响** 经重组腺病毒治疗后,与荷瘤组和对照组相比,治疗组血清中细胞因子 IL-2、INF- $\gamma$  含量明显增加 ( $P < 0.01$ ), IL-10 含量则明显减少 ( $P < 0.01$ ),而 IL-4 含量无明显变化,见图 3。

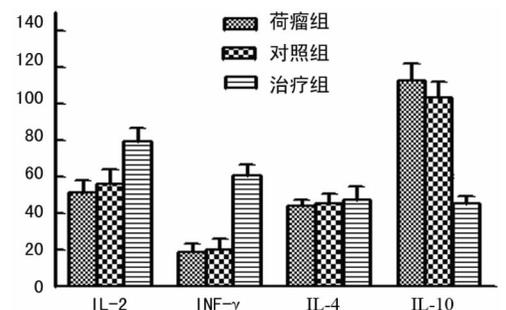


图 3 重组腺病毒对荷瘤小鼠血清 Th1/Th2 细胞因子水平的影响

**2.5 重组腺病毒对荷瘤小鼠肝、肾功能的影响** 与荷瘤组和

对照组相比,经重组腺病毒治疗后,各组小鼠之间的肝、肾功能指标差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。

表 2 重组腺病毒对荷瘤小鼠肝肾功能的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr( $\mu$ mol/L)
荷瘤组	8	21.4 $\pm$ 3.2	59.4 $\pm$ 7.2	4.3 $\pm$ 1.5	45.9 $\pm$ 7.7
对照组	8	22.5 $\pm$ 3.5	61.5 $\pm$ 5.9	4.8 $\pm$ 1.7	47.3 $\pm$ 6.9
治疗组	8	23.0 $\pm$ 2.8	63.7 $\pm$ 7.5	5.5 $\pm$ 2.2	46.2 $\pm$ 6.3

### 3 讨 论

近年来,随着分子生物学和肿瘤免疫学的发展,免疫基因治疗已成为胰腺癌综合治疗的研究方向一。由于 Hsp70 能同时激活机体特异性免疫应答和固有免疫应答,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用,因此以 Hsp70 为基础的肿瘤疫苗受到了学者的广泛关注<sup>[6-9]</sup>。近年来,随着 DNA 重组技术的应用和对 Hsp70 基因的深入研究,使人类可在基因水平构建以 Hsp70 为基础的肿瘤疫苗成为现实,促进了 Hsp70 肿瘤疫苗进行广泛应用的可能性。本研究利用前期构建的表达 Hsp70 基因的重组腺病毒治疗胰腺癌荷瘤小鼠,结果显示,治疗组的肿瘤生长受到明显抑制,且对肝、肾功能无明显影响,表明本研究所构建的重组腺病毒是一种较好的治疗胰腺癌的肿瘤疫苗。

目前关于 Hsp70 诱导机体抗肿瘤免疫反应的确切机制尚未完全明确,多数研究认为,Hsp70 可与肿瘤细胞内的抗原多肽结合,进而通过与抗原递呈细胞相作用,激活特异性的免疫应答。Hsp70 可与抗原递呈细胞表面的特异性高亲和受体相结合,介导抗原肽进入抗原提呈细胞,然后抗原肽与细胞内 MHC 分子形成复合物,并在抗原提呈细胞表面呈现,通过该复合物所递呈的抗原激活特异的免疫应答,活化 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞,特别是细胞毒性杀伤细胞,激发抗肿瘤细胞特异性反应<sup>[10-11]</sup>。本研究也显示,经重组腺病毒治疗后,荷瘤小鼠脾指数以及脾单核细胞中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例均明显增加,证实 Hsp70 在诱导机体特异性的抗肿瘤免疫中具有重要的作用。

Th 细胞根据功能和产生细胞因子的不同可分为 Th1 和 Th2 两大类,其中 Th1 细胞产生 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$  和 IL-2,参与细胞介导的免疫反应;而 Th2 细胞产生 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13,参与体液介导的免疫反应。机体的抗肿瘤效应,主要依靠 Th1 类细胞因子的作用。肿瘤患者体内 Th2 类细胞因子多处于优势状,易产生免疫耐受,成为肿瘤逃避免疫攻击的机制之一。因此,Th1/Th2 类型细胞因子之间的漂移对肿瘤免疫具有重要的影响<sup>[12-14]</sup>。本研究发现,重组腺病毒介导的 Hsp70 表达,可增加荷瘤小鼠体内 Th1 类细胞因子 IL-2、IFN- $\gamma$  的含量,降低 Th2 类细胞因子 IL-10 的水平,从而抑制荷瘤小鼠皮下移植瘤的生长。Chen 等<sup>[15]</sup>研究也发现,热处理肿瘤细胞后所产生的 Hsp70,可促进巨噬细胞以及树突状细胞趋化至肿瘤细胞,并可刺激 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子的分泌,从而发挥抗肿瘤免疫反应。

本研究发现以腺病毒介导 Hsp70 表达可对胰腺癌荷瘤小鼠皮下移植瘤的生长具有明确的抑制作用,其机制与增加 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞比例,促进 IL-2、IFN- $\gamma$  并抑制 IL-10 的分泌有关。但关于 Hsp70 诱导机体抗肿瘤免疫的确切机制尚有待于进一步明确;很多宿主体内存在抗腺病毒抗体,可以中和或清除腺病毒,降低疗效。如何进一步解决上述问题,提高该重组腺病毒治疗胰腺癌的疗效和安全性,将是今后研究的主要方向。

### 参考文献:

- [1] Ueda G, Tamura Y, Hirai I, et al. Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes(CTLs) and tumor immunity[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(3): 248-253.
- [2] Chan T, Chen Z, Hao S, et al. Enhanced T-cell immunity induced by dendritic cells with phagocytosis of heat shock protein 70 gene-transfected tumor cells in early phase of apoptosis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(4): 409-420.
- [3] Figueiredo C, Wittmann M, Wang D, et al. Heat shock protein 70(HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cells [J]. *Blood*, 2009, 113(13): 3008-3016.
- [4] 孙运良,徐灿,苏长青,等. CEA 启动子驱动下表达 Hsp70 基因的重组腺病毒的构建及鉴定[J]. *中华胰腺病杂志*, 2011, 11(8): 251-254.
- [5] Liu Y, Ye T, Sun D, et al. Tumor-specific therapeutic effect induced by an oncolytic adenoviral vector containing heat shock protein 70 and prodrug activation genes[J]. *Gene Ther*, 2006, 13(16): 1235-1243.
- [6] Bolhassani A and Rafat S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(8): 1185-1199.
- [7] Ren Z, Ye X, Fang C, et al. Intratumor injection of oncolytic adenovirus expressing HSP70 prolonged survival in melanoma B16 bearing mice by enhanced immune response[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(2): 191-195.
- [8] Li JL, Liu HL, Zhang XR, et al. A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients [J]. *Gene Ther*, 2009, 16(3): 376-382.
- [9] Di Paolo NC, Tuve S, Ni S, et al. Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 960-969.
- [10] Mambula SS, Calderwood SK. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes [J]. *J Immunol*, 2006, 177(11): 7849-7857.
- [11] Harmala LE, Ingulli EG, Curtsinger JM, et al. The adjuvant effects of mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in vivo[J]. *J Immunol*, 2002, 169(10): 5622-5629.
- [12] Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokine balance in favor of Th2 versus Th1/Th17[J]. *Blood*, 2011, 117(26): 7021-7031.
- [13] Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi LA, et al. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance[J]. *J Immunol*, 2009, 183(12): 7752-7760.
- [14] Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, (下转第 3359 页)

白通过多种途径杀灭肿瘤细胞,其中最重要的就是增加细胞凋亡<sup>[18]</sup>。因此,本实验将低浓度丙戊酸盐和 VCR 联用后流式检测细胞凋亡的变化,结果发现:与未处理组相比,单独丙戊酸盐或 VCR 处理细胞均可诱导凋亡但比例较低,而两药联用时耐药细胞 SGC-7901/VCR 细胞的凋亡率明显增加。因此,丙戊酸盐通过抑制去乙酰化酶增加乙酰化组蛋白(如 AcH3)的表达,进而通过一系列机制促进细胞凋亡逆转耐药。

目前,许多组蛋白去乙酰化酶抑制剂类药物进入了临床实验和一线治疗,如 MS-275、他地那兰、belinostat、vorinostat、帕比司他等,均显示了较好的抗肿瘤效果<sup>[19]</sup>。作为一种新型非细胞毒的广谱抗肿瘤药物,HDACi 具有良好的临床应用前景和价值,作为其中的一种,由于丙戊酸盐作用时间长、安全范围大等特点,特别是联合其他化疗药物时对化疗疗效的促进作用,将会使其应用得到越来越多的重视。

#### 参考文献:

- [1] Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment[J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(2): 31-36.
- [2] Sasako M. Principles of surgical treatment for curable gastric cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(23 Suppl): 274-275.
- [3] Kowalski P, Stein U, Scheffer GL, et al. Modulation of the atypical multidrug resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2[J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(7): 579-586.
- [4] Pastan I, Cottesman MM. Multidrug resistance[J]. *Annu Rev Med*, 1991, 42: 277-286.
- [5] Eong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, et al. Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition[J]. *FEBS Lett*, 2003, 542(1/2/3): 74-78.
- [6] Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, et al. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36734-36741.
- [7] Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells[J]. *EMBO J*, 2001, 20(24): 6969-6978.
- [8] Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(15):

1210-1216.

- [9] Perez-Tomas R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment[J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1859-1876.
- [10] Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies [J]. *Cancer Res*, 1970, 30(4): 1174-1184.
- [11] Lin XS, Rui M, Rong L, et al. Reversal effect of tyrosyl-valine(YSV) tripeptide on multi-drug resistance in resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-FU[J]. *Cancer Letters*, 2008, 269(1): 101-110.
- [12] Kim JH, Choi YK, Yang HK, et al. Downregulation of gelsolin and retinoic acid receptor beta expression in gastric cancer tissues through histone deacetylase 1[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(2): 218-224.
- [13] Huang C, Sloan EA, Boerkoel CF. Chromatin remodeling and human disease[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(3): 246-249.
- [14] Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, et al. Functional significance of histone deacetylase diversity[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(2): 162-166.
- [15] Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(15): 1210-1216.
- [16] Vandermeers F, Hubert P, Delvenne P, et al. Valproate, in combination with pemetrexed and cisplatin, provides additional efficacy to the treatment of malignant mesothelioma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(8): 2818-2828.
- [17] Keshelava N, Davicioni E, Wan Z, et al. Histone Deacetylase 1 Gene Expression and Sensitization of Multidrug-Resistant Neuroblastoma Cell Lines to Cytotoxic Agents by Dipeptide[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(14): 1107-1119.
- [18] Burgess A, Ruefli A, Beamish H, et al. Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(40): 6693-6701.
- [19] 焦杰, 徐文方. 新型抗肿瘤药组蛋白脱乙酰基抑制剂的临床研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2009, 28(3): 161-163.

(收稿日期: 2012-02-11 修回日期: 2012-07-01)

(上接第 3355 页)

et al Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1263-1271.

- [15] Chen T, Guo J, Han C, et al. Heat shock protein 70, re-

leased from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway[J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1449-1459.

(收稿日期: 2012-02-09 修回日期: 2012-06-12)