

MiR-382 对 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肺癌细胞活性的影响及机制研究

李杰(宁波市第二医院胸外科, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 探讨 $\gamma\delta$ T 细胞对肺癌细胞系 A549 的杀伤活性, 并研究 miR-382 在其中发挥的作用。方法 采用流式细胞术鉴别 $\gamma\delta$ T 细胞 LDH 释放实验检测 $\gamma\delta$ T 细胞和 miR-382 对 A549 的杀伤活性。荧光定量 PCR 检测 miR-382 在肺癌细胞系 A549 中的表达情况, Western blot 法检测 miR-382 对 c-FLIP 表达的影响。Western blot 试验检测 miR-382 及 $\gamma\delta$ T 细胞处理后 A549 细胞 Smac/DIABLO 和细胞色素 C 的释放及 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 的活化。结果 miR-382 处理能显著增强 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 的杀伤活性, 增强 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 的活化及细胞色素 C 和 Smac/DIABLO 的释放, 下调 A549 细胞中 c-FLIP 蛋白的表达。转染 c-FLIP 质粒能显著抑制 miR-382 对 $\gamma\delta$ T 细胞的协同效应。结论 MiR-382 通过下调肺癌细胞中 c-FLIP 的表达来增强 $\gamma\delta$ T 细胞对其的杀伤活性。

关键词: MiR-382; c-FLIP; $\gamma\delta$ T 细胞; 肺癌; caspase-8

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)01-0024-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.005

引用本文: 李杰. MiR-382 下调肺癌细胞中 c-FLIP 的表达增强 $\gamma\delta$ T 细胞对其的杀伤活性[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 24-28.

Effect and Mechanism of MiR-382 on Cytotoxicity of $\gamma\delta$ T Cells to Lung Cancer

LI Jie(Department of Thoracic Surgery, Ningbo NO.2 Hospital, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of miR-382 on regulating the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to lung cancer cell line A549. **METHODS** $\gamma\delta$ T cells amplified *in vitro* were identified by flow cytometry. LDH release assays were performed to detect the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells and miR-382 to A549. RT-qPCR assays were performed to detect the expression of miR-382 in lung cancer tissues and A549 cell line. Bioinformatics and Western blot analysis were used to determine whether the expression of c-FLIP was regulated by miR-382. Western blot assays were performed to evaluate the release of Smac/DIABLO and cytochrome C and the activation of caspase-8, caspase-9 and caspase-3. **RESULTS** MiR-382 significantly enhanced the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to A549. Furthermore, miR-382 enhanced the activation of caspase-8, caspase-9, caspase-3 and release of cytochrome C and Smac/DIABLO induced by $\gamma\delta$ T cells in A549 cells. In addition, transfection with miR-382 downregulated the expression of c-FLIP. Meanwhile, transfection with miR-382 abolished the synergistic effect of miR-382 on $\gamma\delta$ T cells. **CONCLUSION** MiR-382 enhances cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to lung cancer through downregulating the expression of c-FLIP.

KEY WORDS: miR-382; c-FLIP; $\gamma\delta$ T cells; lung cancer; caspase-8

肺癌是世界上发病率最高的恶性肿瘤, 患者预后差, 5 年生存率较低^[1]。对于早期肺癌, 手术治疗是最有效的治疗手段, 然而很大一部分患者在确诊肺癌时已发生转移, 对于这些患者而言, 化疗或免疫治疗是不可缺少的替代治疗手段^[2-3]。在肿瘤的免疫治疗中, 以免疫效应细胞为主体的治疗方法已经开始进行临床试验^[4]。 $\gamma\delta$ T 细胞是 T 细胞的一个功能性亚群, 其表面的 T 细胞受体由 $\gamma\delta$ 肽链组成。研究发现 $\gamma\delta$ T 细胞是一群效应性 T 细胞, 能直接杀伤肿瘤细胞而不依赖于 MHC 分子的抗原提呈, 因此 $\gamma\delta$ T 细胞被认为有良好的抗肿瘤作用^[5], 通过一些辅助治疗以提高肿瘤细胞对 $\gamma\delta$ T 细

胞的敏感性有十分重要的临床意义。

microRNAs(miRNAs)是一组非编码 RNA 寡聚核苷酸, 由 18~25 个核苷酸构成, 且其序列具有高度保守性。miRNAs 通过与目标 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3' UTR)发生互补配对从而抑制 mRNA 的翻译, 因此 miRNAs 能调控目标基因的蛋白的表达水平^[6]。文献报道 miRNAs 在肿瘤细胞中表达失调, 而 miRNAs 表达谱的改变往往促进肿瘤细胞的增殖和转移。另外, 文献也报道 miRNAs 表达的失调能导致肿瘤细胞对化疗的抵抗^[7-8]。然而, miRNAs 在肿瘤免疫治疗中发挥的作用至今仍不十分清楚, 本研究的目的是在

作者简介: 李杰, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: (0574)83871083

E-mail: ningbolijie2@sina.com

于探讨 $\gamma\delta$ T细胞对肺癌细胞系 A549 的杀伤活性并研究 miR-382 在其中发挥的作用。

1 材料

1.1 患者资料

收集 20 例 2014 年 3 月—2016 年 7 月肺癌患者的肿瘤组织及癌旁正常组织, 患者年龄 33~74 岁(平均年龄 51.2 岁)。标本的使用取得患者的知情同意。

1.2 细胞培养

人肺癌细胞系 A549(美国 ATCC)。细胞培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养环境为 37 °C 恒温培养箱, 并通入 5% CO_2 。人 $\gamma\delta$ T 细胞的体外扩增培养按文献所述进行^[9], 取 15 例健康人的全血, 采取密度梯度离心法获取单个核细胞, 并培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 加入 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\gamma\delta$ T 细胞特异性扩增剂 BrHPP 和每毫升 400 单位的 IL-2 培养 14 d。

1.3 试剂

乳酸脱氢酶检测试剂盒(批号: C0016)和线粒体分离试剂盒(批号: C3601)购于江苏碧云天生物技术有限公司。DMEM 培养基(美国 Gibco, 批号: 11995040); c-FLIP(批号: #8510)、cleaved caspase-8(批号: #9496)、cleaved caspase-9(批号: #20750)、cleaved caspase-3(批号: #9661)、细胞色素 C(批号: #11940)、Smac/DIABLO(批号: #15108)和 GAPDH(批号: #5174)抗体均购于美国 Cell Signaling。ECL 试剂盒(美国 Pierce, 批号: 32106)。Trizol 试剂(批号: 15596018)、pcDNA3.1 质粒(批号: V79020)和脂质体 2000(Lipofectamine 2000)(批号: 11668019)均购于美国 Invitrogen 公司。白细胞介素 2(IL-2, 批号: P60568)、TRAIL 中和抗体(批号: AF347)和 FasL 中和抗体(批号: MAB126)均购于美国 R&D system 公司。 $\gamma\delta$ TCR-PE 流式细胞抗体(批号: 562511)和 CD3-FITC 流式细胞抗体(批号: 558261)购于美国 BD Bioscience 公司。miR-382 (5'-AAUCAUUCACGGACAACACUU-3') 和对照寡聚核苷酸(NCO, 5'-UUCAACACACCAAGGUUUAAC-3')购于上海吉玛生物科技有限公司。SYBR Green 试剂(批号: RR820A)购于大连 TaKaRa。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2 方法

2.1 $\gamma\delta$ T 细胞的鉴别

培养的 $\gamma\delta$ T 细胞用带 PE 荧光标记的 $\gamma\delta$ TCR 流式细胞抗体和带 FITC 荧光标记的 CD3 流式细胞

抗体孵育 20 min, 用生理盐水将细胞清洗 3 次后用流式细胞仪进行检测, CD3 和 $\gamma\delta$ TCR 双阳性细胞即为 $\gamma\delta$ T 细胞。

2.2 荧光定量 PCR 检测 miR-382 的表达

患者组织细胞及 A549 细胞总 RNA 用 Trizol 试剂提取。采用茎环 RT-qPCR 法对 miR-382 进行特异性逆转录, 并用 SYBR Green 试剂对逆转录产物进行 PCR 扩增, 以 U6 snRNA 作为内参计算 miR-382 的相对表达水平^[10]。

2.3 c-FLIP 过表达质粒构建和转染

将 c-FLIP 基因的开放阅读框架序列经 PCR 扩增后以分子克隆的方法与 pcDNA3.1 连接后构建 c-FLIP 重组过表达质粒。c-FLIP 过表达质粒用 Lipofectamine 2000 按试剂操作说明书步骤进行转染, 将 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ c-FLIP 表达质粒转染入 A549 细胞中。

2.4 线粒体分离去除

用线粒体分离试剂盒按试剂说明书步骤将处理后的 A549 细胞的线粒体从细胞质中分离出来, 取无线粒体的细胞质进行后续的 Western blot 试验。

2.5 乳酸脱氢酶释放实验检测 $\gamma\delta$ T 细胞的杀伤活性

按不同的效靶细比(效应 $\gamma\delta$ T 细胞数: 目标 A549 靶细胞数, E:T)将 A549 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞用 transwell 小室进行共培养, 12 h 后用乳酸脱氢酶检测试剂盒按说明书步骤检测 A549 细胞乳酸脱氢酶(LDH)的释放, LDH 释放水平越高则表示 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞的杀伤活性越强。A549 杀伤率用以下公式表示: $\text{A549 杀伤率} = \frac{(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{对照组}})}{(\text{OD}_{\text{细胞 LDH 最大释放}} - \text{OD}_{\text{对照组}})} \times 100\%$ 。

2.6 乳酸脱氢酶释放实验检测 miR-382 对 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性的影响

将 A549 细胞接种在 transwell 小室中, 按照实验设计将 $50 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 NCO 或 miR-382 及 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 c-FLIP 质粒用 Lipofectamine 2000 试剂转染入 A549 细胞中, 培养 24 h, 然后更换新鲜培养基加入 E:T 为 2.5:1 的 $\gamma\delta$ T 细胞继续共培养 12 h。 $\gamma\delta$ T 细胞和 A549 共培养完成后, 按 2.5 项下方法进行 LDH 释放实验检测 miR-382 对 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性的影响。

2.7 Western blot 试验

将 A549 细胞接种在 transwell 小室中, 按照实验设计将 $50 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 NCO 或 miR-382 及 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 c-FLIP 质粒用 Lipofectamine 2000 试剂转染入 A549 细胞中, 培养 24 h, 然后更换新鲜

培养基加入 E : T 为 2.5 : 1 的 $\gamma\delta$ T 细胞继续共培养 12 h。细胞处理完后用蛋白提取液提取 A549 细胞中的总蛋白质。将等量的总蛋白质用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离。分离完后通过电转方法将蛋白质从分离胶上转到 PVDF 膜上, 用 c-FLIP、cleaved caspase-8、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、细胞色素 C、Smac/DIABLO 和 GAPDH 抗体孵育过夜, 之后再用带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h, 蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光, 并用 Image J 软件处理计算灰度值。目标蛋白相对表达水平=灰度值_{目标蛋白}/灰度值_{GAPDH}。

2.8 统计学处理

所有实验重复 3 次, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 SPSS 14.0 统计分析软件进行处理, 统计学方法采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行处理, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 miR-382 增强 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞的杀伤活性

流式细胞术进行鉴定结果发现, 培养得到的 $\gamma\delta$ T 细胞高表达 CD3 和 $\gamma\delta$ TCR, 纯度为 95.3%, 见图 1A。将这些 $\gamma\delta$ T 细胞和 A549 细胞按不同的效靶比 (E : T) 进行共培养, LDH 释放实验结果显示 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞有杀伤活性, 且 E : T 越高, $\gamma\delta$ T 细胞的抗肺癌活性越强, 见图 1B。RT-qPCR 实验结果显示肺癌组织及 A549 肺癌细胞系的 miR-382 表达水平显著低于正常组织, 见图 1C, 表明 miR-382 在肺癌中可能起肿瘤抑制作用。LDH 释放实验结果显示转染 miR-382 后, $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 的杀伤率显著上升, 见图 1D, 表明 miR-382 能提高 $\gamma\delta$ T 细胞的抗肺癌活性。

3.2 MiR-382 通过抑制 c-FLIP 的表达增强 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 的杀伤活性

miRNA 靶点预测公共数据库 TargetScan (www.targetscan.org) 显示 c-FLIP 基因可能是 miR-382 的靶点, 能与 miR-382 发生碱基互补配对, 见图 2A。Western blot 试验结果显示肺癌组织细胞和 A549 细胞的 c-FLIP 表达水平显著高于癌旁正常组织, 见图 2B, 提示 miR-382 和 c-FLIP 存在负相关关系。为了明确 miR-382 调控 c-FLIP 的表达, 在 A549 细胞中转染 miR-382 模拟物, 结果显示转染 miR-382 能显著抑制 A549 细胞中 c-FLIP 的表达, 见图 2C, 表明 c-FLIP 是 miR-382 的靶基因。LDH 释放实验结果显示转染 c-FLIP 过表达质

粒能显著抑制 $\gamma\delta$ T 细胞联合 miR-382 对 A549 的杀伤活性, 见图 2D, 表明 miR-382 通过抑制 c-FLIP 的表达增强 $\gamma\delta$ T 细胞的抗肺癌活性。

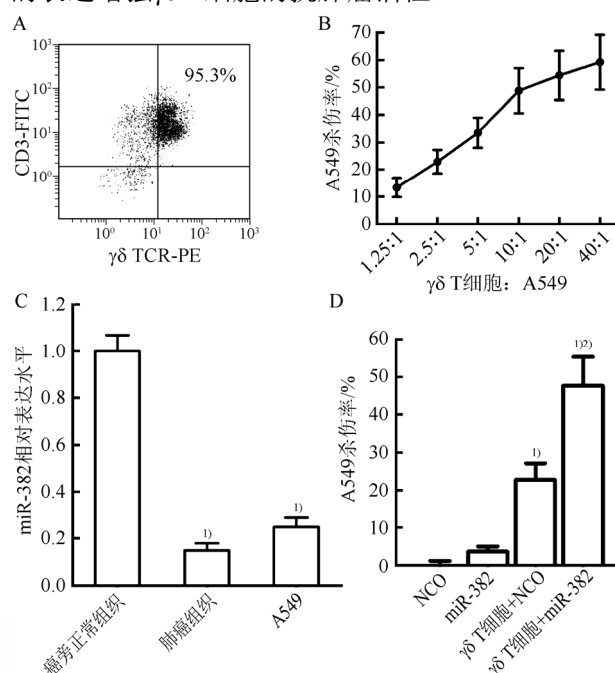


图 1 miR-382 增强 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞的杀伤活性 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-体外扩增培养的 $\gamma\delta$ T 细胞高表达 CD3 和 $\gamma\delta$ TCR; B- $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞的杀伤活性; C-肺癌组织细胞及 A549 细胞的 miR-382 表达水平显著低于癌旁正常组织细胞 ($n=20$, $\bar{x} \pm s$), 与癌旁正常组织相比, $^{1)}P < 0.05$; D-转染 miR-382 提高 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 的杀伤活性, 与 NCO 组相比, $^{1)}P < 0.05$; 与 $\gamma\delta$ T 细胞+NCO 组相比, $^{2)}P < 0.05$ 。

Fig. 1 miR-382 enhanced the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to A549 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A- $\gamma\delta$ T cells amplified *in vitro* highly expressed CD3 and $\gamma\delta$ TCR; B-cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to A549; C-relative expression of miR-382 in lung cancer tissue cells and A549 cells was significantly higher than that in the normal lung tissue cells ($n=20$, $\bar{x} \pm s$). Compared with lung normal tissue cells, $^{1)}P < 0.05$. D-transfection with miR-382 increased the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to A549. Compared with NCO group, $^{1)}P < 0.05$; Compared with $\gamma\delta$ T cells + NCO group, $^{2)}P < 0.05$.

3.3 $\gamma\delta$ T 细胞联合 miR-382 诱导 A549 细胞 caspases 的活化

$\gamma\delta$ T 细胞的抗肿瘤效应主要依赖于其所分泌的 TRAIL 和 FasL 等细胞因子对肿瘤细胞的杀伤^[11]。LDH 释放试验结果显示在 $\gamma\delta$ T 细胞和 A549 共培养体系中加入 TRAIL 中和抗体和 FasL 中和抗体后, miR-382 联合 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞的杀伤活性受到明显抑制, 见图 3A, 表明 $\gamma\delta$ T 细胞分泌的 TRAIL 和 FasL 是其发挥抗肺癌活性的重要因子。TRAIL 和 FasL 通过激活肿瘤细胞 caspase-8 诱导细胞发生凋亡^[11], Western blot 试验结果显示 miR-382 能显著增强 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞 caspase-8 的活化, 而

转染 c-FLIP 质粒则能抑制 miR-382 的活性, 见图 3B, 表明 miR-382 是通过下调 c-FLIP 的表达促进 $\gamma\delta$ T 细胞依赖的 caspase-8 的活化。同时, Western blot 试验结果也显示 miR-382 能显著促进 $\gamma\delta$ T 细胞依赖的细胞色素 C 和 Smac/DIABLO 从线粒体中释放到细胞质中, 见图 3C, 最终使 A549 细胞发生 caspase-9 和下游 caspase-3 的活化, 见图 3D, 诱导细胞发生凋亡。

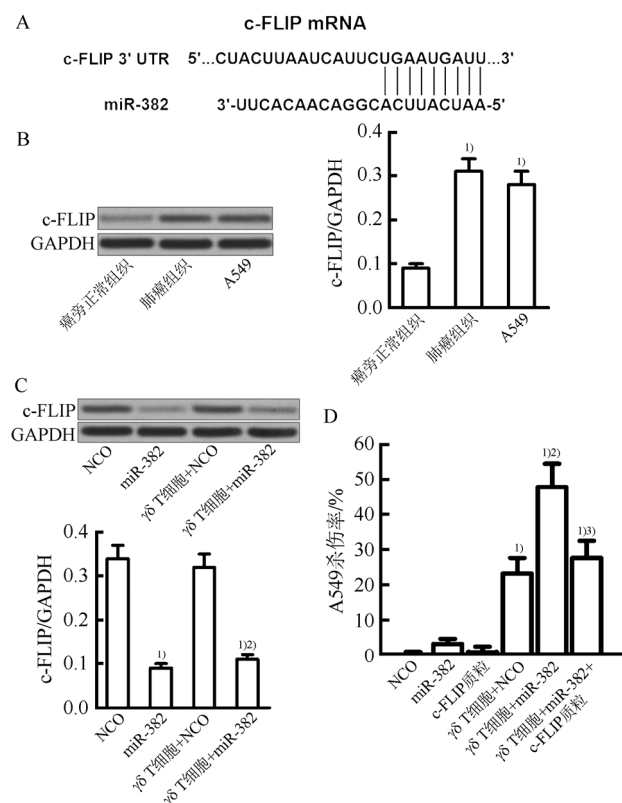


图 2 miR-382 通过抑制 c-FLIP 的表达增强 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 的杀伤活性 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-TargetScan 公共数据库表明 c-FLIP 可能是 miR-382 的靶点; B-肺癌组织细胞及 A549 细胞的 c-FLIP 表达水平显著高于癌旁正常组织细胞 ($n=20$, $\bar{x} \pm s$); 与癌旁正常组织相比, $^{1)}P<0.05$; C-miR-382 下调 A549 细胞中 c-FLIP 蛋白的表达; 与 NCO 组相比, $^{1)}P<0.05$; 与 $\gamma\delta$ T 细胞+NCO 组相比, $^{2)}P<0.05$; D-转染 c-FLIP 质粒抑制 miR-382 对 $\gamma\delta$ T 细胞的协同抗肿瘤效应; 与 NCO 组相比, $^{1)}P<0.05$; 与 $\gamma\delta$ T 细胞+NCO 组相比, $^{2)}P<0.05$; 与 $\gamma\delta$ T 细胞+miR-382 组相比, $^{3)}P<0.05$ 。

Fig. 2 miR-382 enhanced the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to A549 through suppressing the expression of c-FLIP ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-public database of targetscan suggested that c-FLIP was the target of miR-382; B-expression of c-FLIP was significantly higher in lung cancer tissue cells and A549 cells than that in the lung normal tissue cells ($n=20$, $\bar{x} \pm s$); compared with lung normal tissue cells, $^{1)}P<0.05$; C-miR-382 decreased the expression of c-FLIP in A549 cells; compared with NCO group, $^{1)}P<0.05$; compared with $\gamma\delta$ T cells+NCO group, $^{2)}P<0.05$; D-transfection with c-FLIP plasmid inhibited synergistic effect of miR-382 on promoting the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells to lung cancer; compared with NCO group, $^{1)}P<0.05$; compared with $\gamma\delta$ T cells + NCO group, $^{2)}P<0.05$; compared with $\gamma\delta$ T cells + miR-382 group, $^{3)}P<0.05$ 。

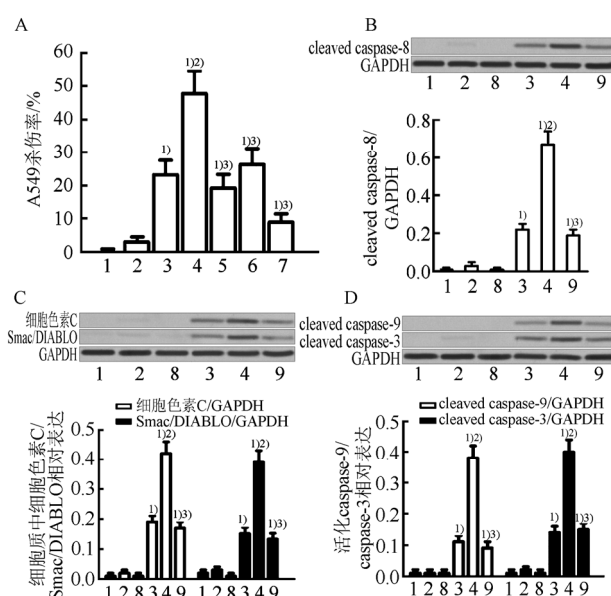


图 3 $\gamma\delta$ T 细胞联合 miR-382 诱导 A549 细胞 caspases 的活化 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-TRAIL 和 FasL 中和抗体抑制 miR-382 联合 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞的杀伤活性; B-miR-382 促进 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞 caspase-8 的活化; C-miR-382 促进 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞 Smac/DIABLO 和细胞色素 C 的释放; D-miR-382 促进 $\gamma\delta$ T 细胞对 A549 细胞 caspase-9 和 caspase-3 的活化; 1-NCO; 2-miR-382; 3- $\gamma\delta$ T 细胞+NCO; 4- $\gamma\delta$ T 细胞+miR-382; 5- $\gamma\delta$ T 细胞+miR-382+TRAIL 抗体; 6- $\gamma\delta$ T 细胞+miR-382+FasL 抗体; 7- $\gamma\delta$ T 细胞+miR-382+TRAIL 抗体+FasL 抗体; 8-c-FLIP 质粒; 9- $\gamma\delta$ T 细胞+miR-382+c-FLIP 质粒; 与 NCO 组相比, $^{1)}P<0.05$; 与 $\gamma\delta$ T 细胞+NCO 组相比, $^{2)}P<0.05$; 与 $\gamma\delta$ T 细胞+miR-382 组相比, $^{3)}P<0.05$ 。

Fig. 3 Combination with miR-382 and $\gamma\delta$ T cells induced activation of caspases in A549 cells ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A-TRAIL and FasL neutralizing antibodies inhibited the cytotoxicity of miR-382 and $\gamma\delta$ T cells co-treatment in A549 cells; B-miR-382 promoted activation of caspase-8 induced by $\gamma\delta$ T cells in A549 cells; C-miR-382 promoted release of Smac/DIABLO and cytochrome c induced by $\gamma\delta$ T cells in A549 cells; D-miR-382 promoted activation of caspase-9 and caspase-3 induced by $\gamma\delta$ T cells in A549 cells; 1-NCO; 2-miR-382; 3- $\gamma\delta$ T cells+NCO; 4- $\gamma\delta$ T cells+miR-382; 5- $\gamma\delta$ T cells+miR-382+TRAIL; 6- $\gamma\delta$ T cells+miR-382+FasL; 7- $\gamma\delta$ T cells+miR-382+TRAIL+FasL; 8-c-FLIP; 9- $\gamma\delta$ T cells+miR-382+c-FLIP; compared with NCO group, $^{1)}P<0.05$; compared with $\gamma\delta$ T cells+NCO group, $^{2)}P<0.05$; compared with $\gamma\delta$ T cells+miR-382 group, $^{3)}P<0.05$ 。

4 讨论

$\gamma\delta$ T 细胞已被报道对多种肿瘤细胞都有良好的杀伤活性^[12-13], 因此 $\gamma\delta$ T 细胞现已考虑作为一种免疫治疗药物进行临床试验。MiR-382 被报道能抑制包括肺癌在内的多种肿瘤细胞的增殖和转移, 并且 miR-382 也能增强肿瘤细胞对化疗的敏感性, 因此 miR-382 是一种潜在的抗肿瘤辅助药物^[14-17]。然而, miR-382 是否能增强肿瘤细胞对 $\gamma\delta$ T 细胞的治疗敏感性, 至今还未充分报道。在本研究中, 实验结果发现 miR-382 在肺癌细胞中表达水平明显低于肺正常组织细胞, 这与文献报道一致。更

重要的是, 当用 miR-382 进行辅助治疗后, $\gamma\delta$ T 细胞对肺癌细胞的杀伤活性显著提高, 表明增强肿瘤细胞中 miR-382 的表达水平可能是提高免疫治疗疗效的一个新的策略。

C-FLIP 是属于 Bcl-2 蛋白家族的抗凋亡蛋白成员, 研究表明 c-FLIP 是 caspase-8 的类似物, 能竞争性地抑制 caspase-8 的功能却不具备 caspase-8 的生物活性, 因此肿瘤细胞中的 c-FLIP 是 caspase-8 依赖的凋亡途径的抑制蛋白^[18-19]。人类肿瘤细胞中 c-FLIP 往往会发生过表达, 这可能是肿瘤细胞对抗凋亡信号的重要机制。通过辅助治疗降低肿瘤细胞中 c-FLIP 的表达水平可以有效提高其对药物治疗的敏感性^[20-21], 因此 c-FLIP 可以作为肿瘤治疗的一个重要靶点。在 $\gamma\delta$ T 细胞介导的凋亡信号通路中, 其分泌的凋亡诱导因子 TRAIL 和 FasL 能引起细胞色素 C 和 Smac/DIABLO 等凋亡活性物质从线粒体中释放到细胞质中, 从而导致 caspase-9 和 caspase-3 的活化, 最终导致凋亡的发生^[22-23]。

在本研究中, 实验结果发现 c-FLIP 是 miR-382 的靶基因, 当用重组真核过表达质粒上调肺癌细胞中 c-FLIP 的蛋白水平后, miR-382 对 $\gamma\delta$ T 细胞的协同抗肿瘤作用受到明显抑制, 证明 miR-382 是通过降低肺癌细胞中 c-FLIP 蛋白的表达促进 $\gamma\delta$ T 细胞介导的凋亡。综上所述, 本研究证明了 miR-382 能有效提高 $\gamma\delta$ T 细胞对肺癌的杀伤活性, 增强 $\gamma\delta$ T 细胞治疗效果。这些研究为肿瘤免疫治疗提供了更有效的策略和思路。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] IMAKITA T, FUJITA K, MIO T, et al. Small cell lung cancer transformation during immunotherapy with nivolumab: A case report [J]. *Respir Med Case Rep*, 2017(21): 52-55.
- [3] YASUKAWA M, NAKAZAWA T, TANIGUCHI S, et al. Minodronic acid in combination with $\gamma\delta$ T cells induces apoptosis of non-small cell lung carcinoma cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(11): 5883-5886.
- [4] DOKOUHAKI P, SCHUH N W, ZHANG L, et al. NKG2D regulates production of soluble TRAIL by *ex vivo* expanded human $\gamma\delta$ T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(12): 3175-3182.
- [5] LI Z. Potential of human gammadelta T cells for immunotherapy of osteosarcoma [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 427-437.
- [6] AN X, SARMIENTO C, ZHU H, et al. Regulation of

- multidrug resistance by microRNAs in anti-cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(1): 38-51.
- [7] IORIO M V, CROCE C M. MicroRNA involvement in human cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6): 1126-1133.
- [8] YE Z, HAO R, HUANG G, et al. Knockdown of miR-221 promotes the cisplatin-inducing apoptosis by targeting the BIM-Bax/Bak axis in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4509-4515.
- [9] GONNERMANN D, OBERG H H, WESCH D, et al. Resistance of cyclooxygenase-2 expressing pancreatic ductal adenocarcinoma cells against $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(3): e988460.
- [10] XU Y, CUI J H, CHEN C H, et al. Antisense nucleic acids of miR-24 promoted the doxorubicin-induced apoptosis via BIM-Smac/DIABLO pathway in colon cancer [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2016, 33(2): 175-181.
- [11] ZHANG Y P, KONG Q H, CHANG K J, et al. Inhibition of c-FLIP by RNAi enhances sensitivity of the human osteogenic sarcoma cell line U2OS to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2251-2256.
- [12] RONG L, LI K, LIU X Y, et al. World J Gastroenterol. Analysis of tumor-infiltrating gamma delta T cells in rectal cancer [J]. 2016, 22(13): 3573-3580.
- [13] PAUL S, LAL G. Regulatory and effector functions of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(5): 976-985.
- [14] CHEN T, REN H, CHEN M, et al. miR-382 inhibits tumor progression by targeting SETD8 in non-small cell lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(86): 248-253.
- [15] ZHANG W, LIU J, WANG H, et al. MicroRNA-382 inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis through targeting COUP-TFII [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3707-3715.
- [16] ZHOU B, SONG J, WANG Y, et al. MiR-382 inhibits cell growth and invasion by targeting NR2F2 in colorectal cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(12): 2260-2267.
- [17] XU M, JIN H, WANG Y, et al. miR-382 inhibits tumor growth and enhance chemosensitivity in osteosarcoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19): 9472-9483.
- [18] ZANG F, WEI X, SUN B, et al. C-FLIP(L) contributes to TRAIL resistance in HER2-positive breast cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 267-273.
- [19] HUANG Y, YANG X, CHANG K J, et al. Overcoming resistance to TRAIL-induced apoptosis in solid tumor cells by simultaneously targeting death receptors, c-FLIP and IAPs [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(1): 153-163.
- [20] MATTOO AR, ZHANG J, JESSUP J M, et al. Inhibition of NANOG/NANOGP8 down regulates c-FLIP in colorectal cancer cells and enhance the therapeutic efficacy of BH3 mimetics [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(21): 5446-5455.
- [21] LV X Q, QIAO X R, CHEN S Z, et al. Honokiol inhibits EMT-mediated motility and migration of human non-small cell lung cancer cells *in vitro* by targeting c-FLIP [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(12): 1574-1586.
- [22] ZOU C, ZHAO P, FU L, et al. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8900-8909.
- [23] HUANG G, CHEN X, XING C, et al. miR-20a-directed regulation of BID is associated with the TRAIL sensitivity in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 571-578.

收稿日期: 2017-04-14

(本文责编: 李艳芳)