论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201407194

HIFU 通过下调 miR-181a 进而促进 ICAM-1 表达增强小鼠抗肿瘤免疫

袁世梅[1],李 欢[1],杨 敏[1],段 亮[1],查 何[1],孙 晖[1],李雪茹[1],罗进勇[1],李崇雁[2],王智彪[2],何通川[1],周 兰[1] (400016 重庆,重庆医科大学:检验医学院[1],生物医学工程学院[2])

[摘要] **目的** 探讨 miR-181a 在高强度聚焦超声(high-intensity focused ultrasound,HIFU)增强机体抗肿瘤免疫中的作用及其机制。**方法** ①皮下构建供 HIFU 治疗的黑色素瘤移植瘤小鼠模型,采用简单随机法随机分为 HIFU 组与荷瘤组,每组 30 只,采用 MTT 方法检测各组脾淋巴细胞对 B16 细胞的杀伤活性,ELISA 检测小鼠血清及共培养上清中 TNF-α 及 IFN-γ 的表达水平;②qRT-PCR 检测 HIFU 组与荷瘤组脾淋巴细胞中的差异 miRNAs;③用生物信息学方法预测差异 miRNAs 的潜在靶基因,通过 RT-PCR 及 Western blot 验证靶基因的表达;④构建荧光素酶报告质粒进一步验证差异 miRNAs 的靶基因,再将差异 miRNAs 的 mimics 转染脾淋巴细胞,RT-PCR 及 Western blot 检测其靶基因表达的变化,以进一步确认差异 miRNAs 对靶基因表达的影响。**结果** ①HIFU 治疗能够抑制黑色素瘤生长,促进脾淋巴细胞分泌 TNF-α 和 IFN-γ,增强脾淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤活性;②HIFU 处理明显下调脾淋巴细胞中 miR-181a 的表达水平($P<0.01$);③生物信息学方法预测发现共刺激分子细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)可能是 miR-181a 的潜在靶基因,且 HIFU 处理明显促进脾淋巴细胞中 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白质的表达($P<0.01$);④miR-181a mimics 显著抑制 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$ 报告质粒荧光素酶的活性($P<0.01$),并下调脾淋巴细胞中 ICAM-1 的 mRNA($P<0.05$)和蛋白质的表达($P<0.01$)。**结论** HIFU 通过抑制 miR-181a 对共刺激分子 ICAM-1 的负调控作用从而增强荷瘤小鼠的抗肿瘤免疫。

[关键词] 高强度聚焦超声;抗肿瘤免疫;microRNA;细胞间黏附分子-1
[中图法分类号] R394.3; R454.3; R730.51 [文献标志码] A

Role and mechanism of miR-181a in high-intensity focused ultrasound-induced anti-tumor immunity in mice

Yuan Shimei[1], Li Huan[1], Yang Min[1], Duan Liang[1], Zha He[1], Sun Hui[1], Li Xueru[1], Luo Jinyong[1], Li Chongyan[2], Wang Zhibiao[2], He Tongchuan[1], Zhou Lan[1] ([1]College of Laboratory Medicine, [2]College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of miR-181a in anti-tumor immunity induced by high-intensity focused ultrasound (HIFU) in mice. **Methods** B16 melanoma models were established in C57BL/6J mice (aging 6 to 8 weeks, weighing 20 ~ 24 g), and the 60 tumor bearing mice (tumor mass 7 mm) were randomly divided into 2 groups: HIFU group and tumor-bearing group. The mice in the HIFU group were treated with HIFU (3 MHz, 4.5 W, for 10 s every time, totally 120 s) and those in the tumor-bearing group were treated with a sham-HIFU procedure. In 14 d after the treatment, 20 mice of each group were sacrificed and their blood, spleen and tumor tissues were harvested. MTT assay was used to detect the cytotoxicity of splenic lymphocytes against B16 melanoma cells, and ELISA was used to measure the contents of TNF-α and IFN-γ in the collected serum and in the supernatant of cocultured splenic lymphocytes

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2011CB707906)
[通信作者] 周 兰,E-mail:zhoulan0111@foxmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140930.1155.006.html(2014-09-30)

and B16 cells. qRT-PCR was used to identify the miRNAs levels of splenic lymphocytes from the HIFU group and the tumor-bearing group for the differentially expressed miRNAs. The target genes of the differentially expressed miRNAs were predicted by bioinformatics method, and then the mRNA and protein levels of the target genes were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. The luciferase report plasmids containing the sequences of 3′UTR or mutant 3′UTR of the target gene were constructed to verify the target gene of differentially expressed miRNAs. Splenic lymphocytes were transfected with the mimics or miR-NC of differentially expressed miRNA, and then the target gene was detected at mRNA and protein levels. **Results** HIFU treatment inhibited tumor growth and promoted the secretion of TNF-α and IFN-γ in splenic lymphocytes, which enhancing the cytotoxicity of splenic lymphocytes against B16 melanoma cells. HIFU obviously decreased the mRNA level of miR-181a ($P < 0.01$). By bioinformatics prediction, the co-stimulatory molecule, intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM 1), might be a potential target gene of miR-181a, and HIFU treatment significantly increased the expression of ICAM-1 at mRNA ($P < 0.01$) and protein levels in the splenic lymphocytes ($P < 0.01$). miR-181a mimics significantly inhibited the activity of $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$ luciferase ($P < 0.01$) in the HEK293 cells and significantly decreased the mRNA ($P < 0.05$) and protein ($P < 0.01$) level of ICAM-1 in the splenic lymphocytes. **Conclusion** HIFU inhibits the negatively regulatory role of miR-181a for costimulatory molecule ICAM-1 and then enhances the anti-tumor immunity in tumor bearing mice.

[**Key words**] high-intensity focused ultrasound; anti-tumor immunity; microRNA; intercellular adhesion molecule-1

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2011CB707906). Corresponding Author: Zhou Lan, E-mail: zhoulan0111@foxmail.com

高强度聚焦超声(high-intensity focused ultrasound, HIFU)是一种治疗实体肿瘤的非侵入性技术,其治疗肿瘤的原理是利用超声波具有良好的组织穿透能力并可以聚焦的物理特性,将体外电声换能器产生的多束超声波聚焦于体内肿瘤病灶,使靶区温度在0.5~1.0 s内达到65~100 ℃,从而使靶区的肿瘤组织出现凝固性坏死而对靶区周围组织无明显影响,实现对实体瘤的无创性"切除"[1]。近年研究发现HIFU不仅能切除原发肿瘤,抑制肿瘤再生和远处转移,还可以增强机体抗肿瘤免疫[2-4]。然而,HIFU增强机体抗肿瘤免疫的机制尚不清楚。

机体抗肿瘤免疫反应主要是T细胞依赖性的细胞免疫反应。目前认为T细胞的活化需要双信号刺激:第1信号由T细胞抗原受体(TCR)与抗原提呈细胞(APC)上的抗原肽—MHC分子复合物结合所提供;第2信号则由APC上的共刺激分子与T细胞上的相应配体结合所提供。研究表明,只有在双信号共同刺激下才能有效地激活T细胞,否则会导致T细胞免疫无能和凋亡[5-7]。而近年来,大量研究发现miRNAs在免疫细胞的产生、发育、免疫应答以及免疫耐受过程中均有着重要的作用[8-11]。因此,我们假设HIFU可能通过调节miRNAs的表达从而增强机体抗肿瘤免疫。为此,我们构建了HIFU治疗黑色素瘤模型,证实HIFU可以诱导机体产生抗肿瘤免疫,进一步研究HIFU对miRNAs表达的影响,初步探讨miRNAs在HIFU增强机体抗肿瘤免疫中的作用,从而为HIFU治疗肿瘤的临床应用提供更多的实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

6~8周龄雌性C57BL/6J近交系小鼠,体质量20~24 g,共60只(重庆医科大学实验动物中心),HIFU肿瘤治疗系统(重庆医科大学超声工程研究所),小鼠黑色素瘤B16细胞株(重庆医科大学超声工程研究所馈赠),人胚肾HEK293T细胞株(购于中国科学院上海细胞库),小鼠脾脏淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品责任有限公司),HE染液(上海恒远生物科技有限公司),鼠TNF-α和IFN-γ ELISA试剂盒(重庆博培公司),TRIzol(Invitrogen公司),SYBR Premix Ex*Taq*™ Ⅱ荧光定量PCR试剂盒(大连TaKaRa公司),鼠抗鼠ICAM-1单克隆抗体(美国Santa Cruz公司),荧光素酶载体质粒pMIR-REPORT™ System(重庆医科大学检验医学院柳满然老师馈赠),miR-181a模拟物(miR-181a mimics)及阴性对照(miR-NC)(上海吉玛公司),Lipofectamine™2000转染试剂(美国Invitrogen公司)。

1.2 细胞培养及黑色素瘤动物模型的构建

B16细胞用含10%胎牛血清(Hyclone公司)、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的RPMI1640培

养基(Hyclone 公司)在 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养,待其贴壁生长至 80% ~90% 融合率时,用含 0.25% 的胰酶消化,并制备单细胞悬液,调整其浓度为 5×10^6/mL,取 1×10^6/200 μL 单细胞悬液皮下接种于 C57BL/6J 小鼠,待肿瘤最大直径至 7 mm 时开始行 HIFU 治疗。

1.3 动物分组及处理

将 60 只荷瘤鼠采用简单随机方法分为 HIFU 组与荷瘤组,每组 30 只,HIFU 组用 9.3 MHz、4.5 W 的 HIFU 肿瘤治疗系统进行辐照,单次照射 10 s,总共照射 120 s;荷瘤组进行假照处理。HIFU 治疗后继续饲养 20 d,每隔 3 d 用游标卡尺测量小鼠瘤体直径,计算瘤体体积,瘤体体积 =(最小直径)^2 ×(最大直径)/2。在 HIFU 治疗 14 d 时,每组处死 20 只小鼠,收集血液、脾脏及肿瘤组织备用。

1.4 HE 染色

分离小鼠肿瘤组织,并进行石蜡包埋切片后行 HE 染色,具体操作按上海恒远生物科技有限公司操作说明书进行。

1.5 脾淋巴细胞与 B16 细胞共培养

采用小鼠脾脏淋巴细胞分离试剂盒分离小鼠脾淋巴细胞,将获得的脾淋巴细胞和 B16 细胞按 20∶1 的比例在含 1% FBS 的 RPMI1640 中混合,共孵育于 96 孔板,48 h 后分离共培养上清液保存于 -80 ℃冰箱备用,同时用 MTT 法检测存活的 B16 细胞,以酶标仪测 D(492)值,以反映各组脾淋巴细胞对肿瘤细胞的相对杀伤活性。

1.6 ELISA 检测

将上述各组小鼠血清及脾淋巴细胞与 B16 细胞共培养上清液于 -80 ℃冰箱保存。ELISA 方法检测 TNF-α 和 IFN-γ 的表达水平,按试剂盒说明书操作。

1.7 RNA 提取和 RT-PCR、qRT-PCR 检测

使用 TRIzol 法提取总 RNA,微量检测仪检测 RNA 的浓度,计算逆转录的 RNA 用量,即时进行 cDNA 转化;以合成的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 检测 miRNAs 的水平,RT-PCR 检测 ICAM-1 的 mRNA 水平。

1.8 Western blot 检测

提取脾淋巴细胞总蛋白,以 100 μg/孔的量上样,进行 SDS-PAGE 电泳,湿转法将电泳产物转移到孔径为 0.45 μm 的 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,滴加一抗(1∶1 000)4 ℃过夜,TBST 洗膜 15 min × 3 次,滴加二抗(1∶5 000)37 ℃孵育 2 h,TBST 洗膜 15 min × 3 次,按 ECL 试剂盒说明进行显色,GelDoc 凝胶成像仪采集图像,通过 Quantity-One 软件分析获得各阳性条带的灰度值。

1.9 生物信息学预测 miRNAs 的靶基因

用 miRBase、PicTar 和 TargetScan 数据库预测差异 miRNAs 的靶基因。

1.10 构建荧光素酶报告质粒及荧光素酶报告基因实验

通过生物信息学方法预测到差异 miRNAs 的靶序列,并人工合成靶序列双链(靶基因的 3′UTR 和 Mut 3′UTR)插入到载体质粒 pMIR-REPORT™ System,经菌落 PCR 筛选阳性菌落扩增,质粒提取纯化后的产物进行 *Hin*dⅢ和 *Spe* Ⅰ双酶切及基因测序鉴定证实获得 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$ 及 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}Mut\ 3'UTR}$ 后,大量抽提高纯度质粒,置 -80 ℃冰箱保存备用。

将对数生长期 293 细胞种入 24 孔板,待细胞贴壁 50% 时,按照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书将荧光素酶报告质粒和 miR-181a mimics 进行共转染,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.11 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,组间差异采用单因素方差分析,均作双侧检验。

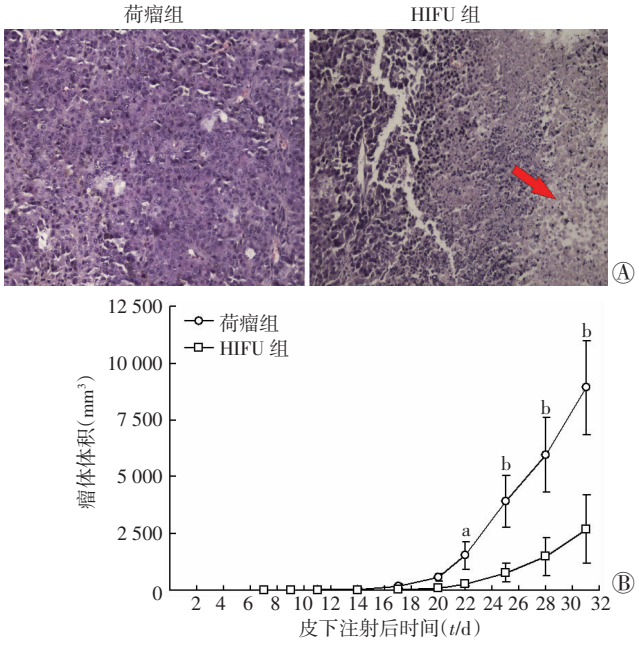
2 结果

2.1 HIFU 治疗能够破坏肿瘤组织、抑制肿瘤生长和增强机体抗肿瘤免疫

HIFU 治疗 0 d 时取出肿瘤组织,经 HE 染色显示 HIFU 治疗可以引起靶区肿瘤组织发生凝固性坏死(图 1A 红色箭头示)而不影响周围其他组织。小鼠瘤体生长曲线显示,HIFU 治疗 11 d 以后 HIFU 组瘤体体积明显小于荷瘤组,且随着饲养时间的延长,统计学差异更加明显(图 1B)。在 HIFU 治疗 14 d 时处死小鼠,收集小鼠血液及脾脏组织。将纯化后的小鼠脾淋巴细胞与 B16 细胞进行体外共培养 48 h,MTT 法检测脾淋巴细胞对 B16 细胞的杀伤活性,结果显示 HIFU 组 D(492)值明显低于荷瘤组(0.309 ±0.025 *vs* 0.338 ±0.019,$P<0.05$),即 HIFU 组脾淋巴细胞杀伤活性明显强于荷瘤组。ELISA 检测血清及共培养上清中 TNF-α 及 IFN-γ 的表达水平,结果发现 HIFU 组小鼠血清及共培养上清中 IFN-γ 的表达水平明显高于荷瘤组($P<0.05$),TNF-α 的表达水平较荷瘤组也有所升高(表 1)。

2.2 HIFU 治疗引起脾淋巴细胞中 miRNAs 出现差异表达

通过阅读文献筛选了 6 个与免疫密切相关的 miRNAs:miR-34、miR-106a、miR-126a、miR-155、miR-181a 和 miR-221。qRT-PCR 检测结果发现,HIFU 组脾淋巴细胞中 miR-155 和 miR-181a 的表达水平明显低于荷瘤组($P<0.05$, $P<0.01$),miR-34 的表达水平明显高于荷瘤组($P<0.05$),其中 miR-181a 的表达差异最为显著($P<0.01$,图 2)。miR-106a、miR-126a 和 miR-222 的 qRT-PCR 结果显示 $C_t>35$,在脾淋巴细胞中几乎不表达。



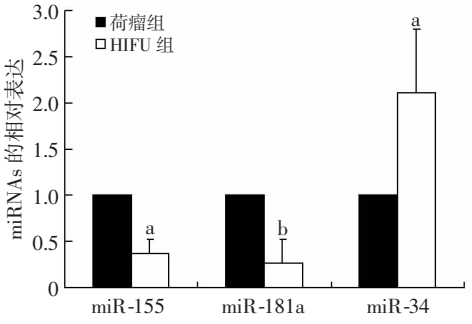
A:肿瘤组织 HE 染色(×100);B:瘤体生长曲线 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 HIFU 组比较

图 1 HIFU 治疗对肿瘤组织及肿瘤生长的影响

表 1 ELISA 检测血清及共培养上清中 TNF-α 及 IFN-γ 的表达($n=20,\bar{x}\pm s$)

组别	IFN-γ(pg/mL)		TNF-α(ng/mL)	
	血清	共培养上清	血清	共培养上清
荷瘤组	34.0±12.1	53.4±11.8	65.0±11.3	105.6±11.1
HIFU 组	59.7±11.5[a]	79.0±10.2[a]	73.6±13.3	127.0±55.2

a:$P<0.05$,与荷瘤组比较

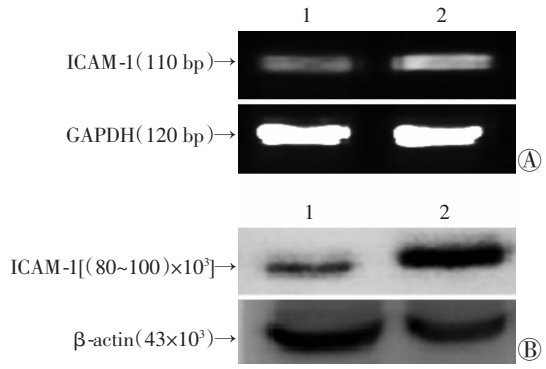


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与荷瘤组比较

图 2 qRT-PCR 检测脾淋巴细胞中 miRNAs 的相对表达

2.3 HIFU 治疗促进脾淋巴细胞中 ICAM-1 的表达

利用生物信息学分析差异表达 miRNAs 的靶基因,发现 miR-181a 可以靶向作用于共刺激分子 ICAM-1,因此,我们分别从基因及蛋白水平检测脾淋巴细胞中 ICAM-1 的水平。结果显示,HIFU 组小鼠脾淋巴细胞中 ICAM-1 的 mRNA(1.27±0.24,$P<0.05$,图 3A)及蛋白表达(1.69±0.60,$P<0.01$,图 3B)均明显高于荷瘤组。

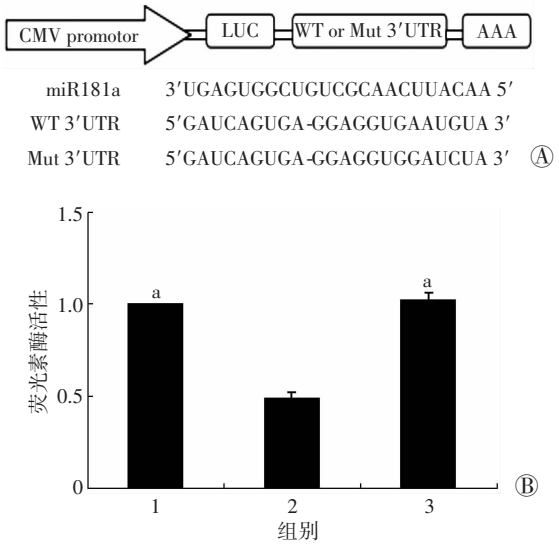


A:RT-PCR 检测 ICAM-1 的 mRNA 表达;B:Western blot 检测 ICAM-1 的蛋白表达 1:荷瘤组;2:HIFU 组

图 3 HIFU 促进脾淋巴细胞中 ICAM-1 的 mRNA 及蛋白表达

2.4 荧光素酶活性实验鉴定 ICAM-1 是 miR-181a 的靶基因

人工合成的靶基因 3′UTR 和 Mut 3′UTR 被分别克隆到载体质粒 pMIR-REPORT™ System,构建为荧光素酶报告质粒 pLUC-ICAM-1-3′UTR 和 pLUC-ICAM-1-Mut 3′UTR(图 4A)。再将 miR-NC 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$、miR-181a mimics 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$、miR-181a mimics 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}Mut\ 3'UTR}$分别共转染 HEK293 细胞,48 h 后,裂解细胞并检测荧光素酶活性。结果显示,miR-181a mimics 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$组的荧光强度相比对照组显著降低($P<0.01$,图 4B),证实 miR-181a mimics 对 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$的表达有抑制作用,并且发挥该抑制功能是通过 miR-181a mimics 与 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$3′UTR 结合实现的,提示 ICAM-1 是 miR-181a 的靶基因。

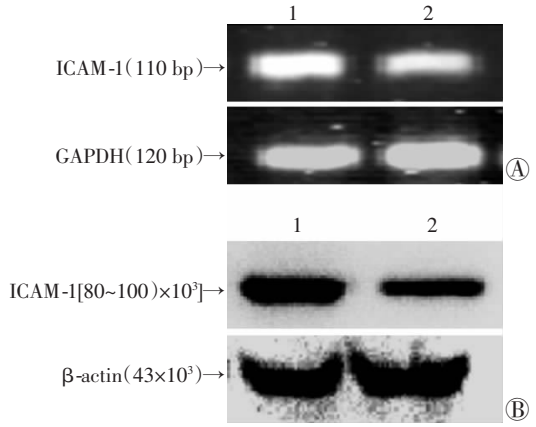


A:荧光素酶报告质粒构建示意图;B:荧光素酶活性 1:miR-NC 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$;2:miR-181a mimics 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$;3:miR-181a mimics 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}Mut\ 3'UTR}$;a:$P<0.01$,与 miR-181a mimics 和 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$比较

图 4 miR-181a mimics 抑制 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$荧光素酶活性

2.5 miR-181a 抑制脾淋巴细胞中 ICAM-1 的表达

为进一步证明 miR-181a 对共刺激分子 ICAM-1 的调控作用,我们分别用 miR-NC 及 miR-181a mimics 转染脾淋巴细胞,48 h 后用 RT-PCR 和 Western blot 实验检测细胞中 ICAM-1 mRNA 和蛋白质水平。qRT-PCR 结果显示,当转染 miR-181a mimics 后,细胞中 miR-181a 的表达水平相较于 miR-NC 组平均高出 2 276 倍,表明转染成功($P<0.01$)。RT-PCR 检测细胞中 ICAM-1 的 mRNA 水平,结果显示 miR-181a mimics 组(0.82 ±0.08)明显低于 miR-NC 组($P<0.05$,图 5A);同时,ICAM-1 蛋白质水平(0.65 ±0.44)也显著低于 miR-NC 组($P<0.01$,图 5B)。表明在脾淋巴细胞中 miR-181a 可以下调 ICAM-1 的表达。



A:RT-PCR 检测转染 miR-181a mimics 后 ICAM-1 的 mRNA 水平;B:Western blot 检测转染 miR-181a mimics 后 ICAM-1 的蛋白水平 1:miR-NC 组;2:miR-181a mimics 组

图 5 miR-181a 降低脾淋巴细胞中 ICAM-1 mRNA 和蛋白质水平

3 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类健康,有相当一部分患者死于肿瘤复发或转移。因此,在有效摧毁原发癌灶的同时增强机体抗肿瘤免疫、控制肿瘤复发和转移是提高患者预后的一条重要途径。近几年来,HIFU 已逐渐成为治疗子宫肌瘤、前列腺癌、肝癌等实体肿瘤的有效手段之一,且周鞏等[12]研究发现 HIFU 在有效治疗局部肿瘤时,还可以诱发宿主抗肿瘤免疫功能的活化,诱导小鼠产生抗同源肿瘤的免疫力。然而,HIFU 改善患者免疫功能的机制至今未明。

近年来相关研究表明 miRNAs 参与机体免疫应答与免疫耐受,如 miR-155 可以通过调控干扰素信号调节 $CD8^+$ T 细胞的反应[13],miR-126 可以通过调节 PI3K-AKT 信号通路诱导和维持 Treg 细胞的免疫抑制功能[14],miR-222 和 miR-339 通过抑制肿瘤细胞表面 ICAM-1 的表达从而下调 CTL 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性[15]等。本研究前期结果显示,HIFU 可以使靶区肿瘤组织出现凝固性坏死而对靶区周围组织无明显影响,进而抑制肿瘤生长,增加血液及共培养上清中 TNF-α 及 IFN-γ 的表达,明显增强脾淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。这与国内外相关研究结果一致[16-17],证实 HIFU 可以抑制原发肿瘤生长和增强机体抗肿瘤免疫力。此外,我们通过阅读文献筛选了 6 个与免疫密切相关的 miRNAs:miR-34, miR-106a, miR-126a, miR-155, miR-181a 和 miR-221,研究 HIFU 对 miRNAs 表达的影响。结果显示 HIFU 可以调控脾淋巴细胞中 miR-155,miR-34,miR-181a 的表达,且通过生物信息学分析发现 miR-181a 可以靶向作用于 ICAM-1。ICAM-1 是免疫球蛋白超家族成员之一[18],属于共刺激分子中的一种,可分布在淋巴细胞、内皮细胞、单核细胞等多种细胞表面[19],其中 APC 表面的 ICAM-1 与 T 细胞表面受体淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)的特异性结合可协同促进淋巴细胞活化、增殖和分化,增强机体免疫应答[20]。因此,我们推测 HIFU 可以通过下调 miR-181a 的表达水平,调控脾淋巴细胞表面 ICAM-1 的表达,从而增强机体产生抗肿瘤免疫。

为初步验证假设,我们分别从基因及蛋白水平检测在 HIFU 治疗 14 d 时脾淋巴细胞中 ICAM-1 的表达含量。结果表明 HIFU 可以诱导增强脾淋巴细胞表达 ICAM-1。那么,ICAM-1 表达含量的增加与 miR-181a 下调之间是否存在相关性? 为此,我们构建了 $p^{LUC\text{-}ICAM\text{-}1\text{-}3'UTR}$ 荧光素酶报告质粒,并根据实验结果得到初步结论,即 miR-181a 可以直接靶向作用于 ICAM-1 的 3′-UTR。为进一步验证该结论,我们将 miR-181a mimics 转染脾淋巴细胞,发现 miR-181a mimics 可以明显下调脾淋巴细胞中 ICAM-1 的 mRNA 及蛋白水平,进一步确认 miR-181a 对共刺激分子 ICAM-1 具有负性靶向调控作用。

本研究表明,HIFU 可增强荷瘤小鼠体内的抗肿瘤免疫能力,其机制可能是通过下调脾淋巴细胞中 miR-181a 的水平,抑制 miR-181a 对靶基因 ICAM-1 的负调控作用,增强淋巴细胞表面共刺激分子 ICAM-1 的表达,影响 ICAM-1 与 T 细胞表面受体 LFA-1 的特异性

结合,促进淋巴细胞活化、增殖和分化来实现的。该实验虽然初步证实了 miR-181a 在 HIFU 增强机体抗肿瘤免疫力中的作用,但参与机体免疫应答的 miRNAs 较多,故在 HIFU 治疗过程中是否有其他 miRNAs 的参与仍需进一步探讨。

参考文献:

[1] 王智彪. 肿瘤治疗新方法-高强度聚焦超声肿瘤治疗技术[J]. 世界医疗器械, 1995, 5(11): 35-38.

[2] Huang X, Yuan F, Liang M, *et al*. M-HIFU inhibits tumor growth, suppresses STAT3 activity and enhances tumor specific immunity in a transplant tumor model of prostate cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41632.

[3] Xia J Z, Xie F L, Ran L F, *et al*. High-intensity focused ultrasound tumor ablation activates autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. Ultrasound Med Biol, 2012, 38(8): 1363-1371.

[4] Xu Z L, Zhu X, Lu P, *et al*. Activation of tumor-infiltrating antigen presenting cells by high intensity focused ultrasound ablation of human breast cancer[J]. Ultrasound Med Biol, 2009, 35(1): 50-57.

[5] Melero I, Bach N, Chen L. Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens[J]. Life Sci, 1997, 60(23): 2035-2041.

[6] Jindra P T, Bagley J, Godwin J G, *et al*. Costimulation-dependent expression of microRNA-214 increases the ability of T cells to proliferate by targeting Pten[J]. J Immunol, 2010, 185(2): 990-997.

[7] Parameswaran N, Suresh R, Bal V, *et al*. Lack of ICAM-1 on APCs during T cell priming leads to poor generation of central memory cells[J]. J Immunol, 2005, 175(4): 2201-2211.

[8] Chen C Z, Schaffert S, Fragoso R, *et al*. Regulation of immune responses and tolerance: the microRNA perspective [J]. Immunol Rev, 2013, 253(1): 112-128.

[9] Vigorito E, Kohlhaas S, Lu D, *et al*. miR-155: an ancient regulator of the immune system[J]. Immunol Rev, 2013, 253(1): 146-157.

[10] Podshivalova K, Salomon D R. MicroRNA regulation of T-lymphocyte immunity: modulation of molecular networks responsible for T-cell activation, differentiation, and development[J]. Crit Rev Immunol, 2013, 33(5): 435-476.

[11] Bronevetsky Y, Ansel K M. Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system[J]. Immunol Rev, 2013, 253(1): 304-316.

[12] 周鞏, 苏立, 傅敏, 等. 高强度聚焦超声制备肿瘤疫苗对小鼠抗肿瘤免疫增强作用的研究[J]. 中国超声医学杂志, 2012, 28(7): 591-594.

[13] Gracias D T, Stelekati E, Hope J L, *et al*. The microRNA miR-155 controls CD8(+) T cell responses by regulating interferon signaling[J]. Nat Immunol, 2013, 14(6): 593-502.

[14] Qin A, Wen Z, Zhou Y, *et al*. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(2): 252-264.

[15] Ueda R, Kohanbash G, Sasaki K, *et al*. Dicer-regulated microRNAs222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(26): 10746-10751.

[16] den-Brok M H, Sutmuller R P, van-der-Voort R, *et al*. In situ tumor ablation creates an antigen source for the generation of antitumor immunity[J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 4024-4029.

[17] Wu F, Wang Z B, Lu P, *et al*. Activated anti-tumor immunity in cancer patients after high intensity focused ultrasound ablation[J]. Ultrasound Med Biol, 2004, 30(9): 1217-1222.

[18] Pietruczuk M, Pietruczuk A, Pancewicz S, *et al*. ICAM-1: structure, biological role and clinical significance[J]. Pol Merkur Lekarski, 2004, 17(101): 507-511.

[19] van-de-Stolpe A, van-der-Saag P T. Intercellular adhesion molecule-1[J]. J Mol Med (Berl), 1996, 74(1): 13-33.

[20] Gonzalez P A, Carreno L J, Cespedes P F, *et al*. Modulation of tumor immunity by soluble and membrane-bound molecules at the immunological synapse[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 450291.

(**收稿**:2014-07-30;**修回**:2014-08-31)

(编辑 汪勤俭)