

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.008

· 临床研究 ·

5-Aza-CdR 联合 EBNA1-DC 疫苗诱导的淋巴细胞对鼻咽癌 C666-1 细胞的杀伤作用

谢云青, 黄丽洁, 林晓为, 陈莉, 陈珊珊(福建医科大学肿瘤临床医学院 福建省肿瘤医院 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 探讨EB病毒核抗原1(EBNA1) mRNA 修饰的DC(EBNA1-DC)诱导的淋巴细胞联合甲基化抑制剂5-Aza-CdR对鼻咽癌C666-1细胞的杀伤作用。**方法:** 以构建的EBNA1-pCDNA3.1质粒为模板, 体外转录获得EBNA1 mRNA, 通过脂质体转染至健康人外周血来源DC, 构建EBNA1-DC疫苗。流式细胞术检测转染后DC表型及5-Aza-CdR处理后的C666-1细胞凋亡情况。实时无标记动态细胞分析技术检测EBNA1-DC疫苗诱导的淋巴细胞联合5-Aza-CdR的特异性抗肿瘤活性。**结果:** 转染EBNA1 mRNA后EBNA1-DC表面EBNA1阳性率为(59.3±5.85)%, HLA-DR的表达与未转染DC相比显著升高[(84.9±5.5)% vs (68.0±5.8)%, $P=0.026$], CD80的表达也显著升高[(88.2±3.9)% vs (61.1±4.4)%, $P=0.015$]。低剂量5-Aza-CdR处理后的C666-1细胞凋亡情况与未处理的细胞相比无显著差异。经低浓度5-Aza-CdR预处理的C666-1细胞中IRF7基因表达与未处理的细胞相比显著升高($P=0.0001$)。与空载的DC相比, EBNA1-DC诱导的淋巴细胞对EBV阳性表达的C666-1细胞具有更强的特异性杀伤活性($P=0.049$); 经低浓度5-Aza-CdR预处理的C666-1细胞对EBNA1-DC诱导的特异性免疫杀伤更敏感($P=0.019$)。**结论:** 5-Aza-CdR与EBNA1-DC疫苗联合可显著增强对C666-1细胞的特异性免疫杀伤, 本研究为开拓以mRNA为基础的DC疫苗及其在临床综合治疗中的应用转化提供前期研究基础。

[关键词] EB病毒核抗原1; 甲基化抑制剂; 5-Aza-CdR; Epstein Barr病毒; DC疫苗; 鼻咽癌

[中图分类号] R979.1; R730.54; R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0701-06

Killing effects of 5-Aza-CdR combined with EBNA1-DC vaccine-induced lymphocytes on nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells

XIE Yunqing, HUANG Lijie, LIN Xiaowei, CHEN Li, CHEN Shanshan (Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Clinical Oncology School of Fujian Medical University & Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the killing effects of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) mRNA-modified DC (EBNA1-DC)-induced lymphocytes combined with methylation inhibitor 5-Aza-CdR on nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells. **Methods:** EBNA1-pCDNA3.1 plasmid was used as a template, and EBNA1 mRNA was obtained by *in vitro* transcription. Subsequently, EBNA1 mRNA was transfected into dendritic cells derived from peripheral blood from healthy donors by liposome to construct EBNA1-DC vaccine. Flow cytometry was used to detect the transfected DC phenotype and the apoptosis of C666-1 cells after 5-Aza-CdR treatment. Real-time cell analysis was used to detect the specific antitumor activity of EBNA1-DC vaccine-induced lymphocytes combined with 5-Aza-CdR. **Results:** The positive rate of EBNA1 on the surface of EBNA1-DC after transfection with EBNA1 mRNA was (59.3±5.85)%. The expression of HLA-DR was significantly higher than that of untransfected DC [(84.9±5.5)% vs (68.0±5.8)%, $P=0.026$]. The expression of CD80 was significantly improved from (88.2±3.9)% to (61.1±4.4)% ($P=0.015$). The apoptosis of C666-1 cells treated with low-dose 5-Aza-CdR was not significantly different from that of untreated cells. The expression of IRF7 gene in C666-1 cells pretreated with low-dose 5-Aza-CdR was significantly higher than that in untreated cells ($P=0.0001$). Lymphocytes induced by EBNA1-DC had stronger specific killing activity against EBV⁺C666-1 cells compared with untransfected DC ($P=0.049$). C666-1 cells pretreated with low dose 5-Aza-CdR were more sensitive to specific immune killing induced by EBNA1-DC ($P=0.019$). **Conclusion:** The combination of 5-Aza-CdR and EBNA1-DC vaccine can significantly enhance the specific immune killing effect on C666-1 cells. This study provides the preliminary research basis for the development of the mRNA-DC vaccine and its

[基金项目] 福建省科技厅自然科学基金项目(No. 2022J011055);福建省卫生健康委员会青年基金项目(No. 2020QNB008);福建省肿瘤医院院内课题(No. 2021YN07);福建省肿瘤医院院内课题(No. 2021YN11);厦门市医疗卫生指导性项目(No. 3502Z202009075)

[作者简介] 谢云青(1972—),女,硕士,主任技师,主要从事肿瘤细胞免疫治疗及肿瘤分子生物学研究, E-mail: 1249826653@qq.com

[通信作者] 陈珊珊, E-mail: 19933686@qq.com

application in clinical comprehensive therapy.

[Key word] Epstein Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1); methylation inhibitor; 5-Aza-CdR; Epstein Barr virus (EBV); DC vaccine; nasopharyngeal carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(8): 701-706. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.008]

鼻咽癌是中国高发恶性肿瘤之一,以南部地区为高发区^[1]。由于其临床症状的非特异性,确诊时约70%的患者已进入晚期^[2]。放化疗是晚期鼻咽癌主要治疗方式,尽管有积极的临床结果,但效果差,5年生存率不到10%,而且可能会产生严重的副作用^[3]。因此,晚期鼻咽癌患者迫切需要新的治疗方式,以尽量减少治疗相关并发症,提高目前的生存率。95%的非角化和未分化的鼻咽癌与EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染密切相关^[4]。EBV以潜伏感染的形式持续生存,并由细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)控制。基于此基础,现有的EBV-CTL过继细胞治疗方式或EBV癌症疫苗得以发展,并已被证实具有良好的安全性^[5]。负载肿瘤抗原的树突状细胞(dendritic cell, DC)是启动并激活特异性CTL反应的关键抗原提呈细胞^[6]。目前肿瘤抗原负载DC的方式不仅不受MHC限制,而且由于确保了抗原表位表达的完整性,使得负载后的DC可以扩大免疫反应,同时还避免了整合到宿主基因组的风险,显示出良好的临床应用前景^[7-9]。DNA甲基化参与了EBV感染的整个过程,并促进了EBV相关疾病的发展^[10]。DAVID等^[11]研究证实,使用低剂量去甲基化试剂5-Aza-CdR可在上皮肿瘤中引发局部炎症反应,诱导I型干扰素(IFN- I)表达上调。而IFN-I是招募和激活DC的关键因素^[12]。因此,本研究通过构建EBV核抗原1(Epstein Barr virus nuclear antigen 1, EBNA1) mRNA转染的DC疫苗,体外研究低浓度5-Aza-CdR与之联合杀伤鼻咽癌C666-1细胞的作用,以期为提高晚期鼻咽癌患者免疫治疗疗效寻找抗原靶标及联合治疗思路奠定前期实验基础。

1 资料与方法

1.1 主要试剂与仪器

EBV阳性鼻咽癌细胞C666-1购自上海名劲生物科技有限公司,EBNA1-pCDNA3.1(+)质粒由上海生工合成并克隆。限制性内切酶*Stu* I购自Qiagen公司,质粒提取试剂盒购自天根生化有限公司,5-Aza-CdR购自Sigma公司,DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶均购自Gibco公司,人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子rhGM-CSF、IL-4及CD3单抗均购自Peprotech公司,GT-T551 H3培养基购自北京宝日生物技术有限公司,淋巴细胞分离液购自美国

General Electric公司,qPCR引物由上海生工合成,TRIzol试剂购自Invitrogen公司,GoTaq®1-StepRT-qPCR试剂盒购自Promega公司,ABI7500 qPCR仪购自ABI公司,流式细胞仪(Beckman Coulter FC500)购自Beckman公司,实时无标记动态细胞分析(real time cellular analysis,RTCA)技术所用的xCELLigence RTCA实时细胞分析仪和E-plate检测板均购自美国Agilent公司,CD80-FITC/HLA-DR-ECD/EBNA1-PE流式抗体购自BD公司。

1.2 DC的诱导培养

抽取健康献血者50~100 mL外周静脉血(伦理审批号:SQ2021-171-01),经Ficoll密度梯度离心分离出单个核细胞(PBMC),加入GT-T551 H3培养基,以密度 2×10^6 个/mL接种于75 cm²规格细胞培养瓶,摇匀后平放入37 °C、5%CO₂培养箱,培养2 h后,收集上清液中的悬浮淋巴细胞,冻存。贴壁细胞加入20 mL GT-T551 H3培养基(含GM-CSF 500 ng/mL, IL-4 100 ng/mL),隔天补液1次,于第7天收集成熟DC进行转染。

1.3 人EBNA1 mRNA的体外扩增

利用*Stu*I酶切位点将人EBNA1-pCDNA3.1质粒线性化,回收酶切后的线性化质粒,以此为模板,通过mMESSAGE mMACHINE T7 Kit进行EBNA1 mRNA的体外扩增,并采用Licl回收的方法进行mRNA纯化回收,琼脂糖凝胶电泳鉴定回收的mRNA, NANODROP 2000c分光光度计检测mRNA的浓度。试剂盒中pTRI-Xef control mRNA做为阳性对照。

1.4 流式细胞术检测EBNA1 mRNA转染后的DC表型

采用Lipofectamine™2000试剂盒进行mRNA的转染。3 μg EBNA1 mRNA与脂质体按1:2的比例混合后加入1 mL无抗生素培养基,混匀,室温静置30 min,离心收集培养5 d后的DC,用上述1 mL脂质体混合物重悬细胞,加入12孔板,置于37 °C培养箱内静置6 h,加入1 mL GT-T551H3培养基(含500 ng/mL GM-CSF、100 ng/mL IL-4)。24 h后,收集转染后的DC,加入EBNA1\HLA-DR\CD80荧光抗体进行标记,流式细胞术检测比较转染前后的DC表型。

1.5 RCTA技术检测DC对淋巴细胞的免疫诱导能力及其特异杀伤活性

复苏冻存的淋巴细胞,加入GT-T551 H3培养基,72 h后,收集淋巴细胞并分为3组:①EBNA1-DC诱导

组;②未转染 DC 诱导组;③单纯淋巴细胞组。其中①、②组中 DC 与淋巴细胞以 1:20 的比例进行混合诱导培养,3 d 后收集各组淋巴细胞作为效应细胞。

0.25% 胰酶消化所培养的 C666-1 细胞,收集细胞,按 1×10^4 个/孔加入 E-Plate 检测板内作为靶细胞,培养 24 h,按效靶比 20:1 的比例分别加入上述各组淋巴细胞做为效应细胞,无效应细胞组(阴性对照组)加入生理盐水,RTCA 技术检测各组淋巴细胞对 C666-1 细胞的的特异杀伤活性,实验重复 3 次。RTCA 读出细胞指数 (cell index, CI) 值,它代表 E-Plate 板电阻抗的相对变化,在相同的生理条件下,贴附在此孔电极表面的细胞越多,CI 值越高,通过 CI 值计算细胞杀伤率:细胞杀伤率 = $(1 - CI_{\text{实验组}} / CI_{\text{阴性对照组}}) \times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测低剂量 5-Aza-CdR 对 C666-1 细胞凋亡的影响

参照文献[9]的实验方法,5-Aza-CdR 组 C666-1 细胞用 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 进行预处理,每天换液,3 d 后弃药液,停药 5 d 后加入 0.25% 的胰酶消化细胞,离心收集细胞。取部分细胞加入 $1 \times$ 结合缓冲液重悬,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 流式抗体混匀后,室温避光反应 15 min;流式检测前 5 分钟再加入 $5 \mu\text{l}$ 的 PI 溶液染色,流式检测细胞凋亡,以未处理的 C666-1 细胞作为对照组,实验重复 3 次。

1.7 qPCR 检测 5-Aza-CdR 处理后的 C666-1 细胞中 IRF7 基因表达变化

TRIzol 提取上述 1.6 中 5-Aza-CdR 处理后(实验组)及未处理的 C666-1 细胞(对照组)总 RNA。然后采用一步法 GoTaq[®]1-StepRT-qPCR 试剂盒的操作说明书,使用 qPCR 仪检测各细胞 IRF7 基因表达 CT 值,以 GAPDH 基因为内参照,所有样品均重复 3 次,阴性对照以 DEPC 水为模板检测。IRF7 基因引物为 F: 5'-TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA-3', R: 5'-GATGTCGTCATAGAGGCTGTTGG-3';GAPDH 基因引物为 F: 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', R: 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min,共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 IRF7 基因的相对表达量。

1.8 低剂量 5-Aza-CdR 处理联合 EBNA1-DC 诱导的淋巴细胞对 C666-1 细胞增殖的影响

低剂量 5-Aza-CdR 处理及未处理的 C666-1 细胞分别加入 E-Plate 做为靶细胞, 10^4 /孔,并分组为:①对照组(C666-1 细胞+生理盐水);②5-Aza-CdR 组(5-Aza-CdR 处理 C666-1 细胞+生理盐水);③EBNA1-DC 诱导组(C666-1 细胞+EBNA1-DC 诱导的淋巴细

胞);④5-Aza-CdR+EBNA1-DC 诱导组(5-Aza-CdR 处理 C666-1 细胞+EBNA1-DC 诱导的淋巴细胞)。其中加效应淋巴细胞的效靶比为 20:1,RTCA 连续检测 72 h 后,比较各组的杀伤效应,共重复 3 次。

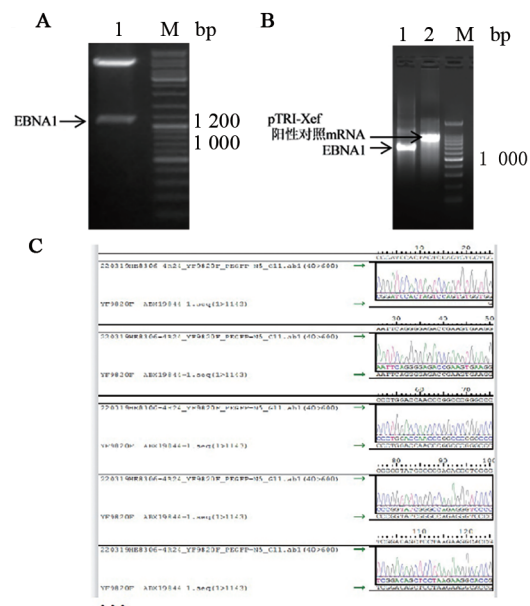
1.9 统计学处理

主要实验均独立重复 3 次。采用 SPSS25.0 统计软件进行数据处理和统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外转录 EBNA1 mRNA 全长基因

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,所构建的人 EBNA1-pCDNA3.1(+)质粒经 *Xho*I/*Eco*RI 双酶切,获得约 1.1 kb 的基因片段,大小与 EBNA1 全长基因相符(图 1A);利用 mMESSAGE mMACHINE T7 Kit 所扩增的阳性对照 pTRI-Xef mRNA 片段约 1.8 kb,EBNA1 mRNA 片段约 1.1 kb,与预估片段大小相符(图 1B)。测序结果(图 1C)显示,体外转录、扩增的 EBNA1 mRNA 全长基因序列与 EBNA1 编码序列相符。



A: EBNA1-pCDNA3.1(+)质粒经 *Xho*I/*Eco*RI 双酶切、琼脂糖凝胶电泳鉴定[M: 蛋白质分子量标准;1: 酶切后 EBNA1-pCDNA3.1(+)]; B: 以 *Stu*I 酶切后的线性 EBNA1-pCDNA3.1(+)质粒为模板体外合成转录 EBNA1 基因片段(M: 蛋白质分子量标准;1: EBNA1 mRNA;2: pTRI-Xef 阳性对照 mRNA)。图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定人 EBNA1-pCDNA3.1(+)质粒鉴定及体外扩增的 EBNA1 mRNA 片段

2.2 转染后 EBNA1-DC 表面 EBNA1 和 HLA-DR 水平升高

流式细胞术检测 *EBNA1* mRNA 转染前后 DC 细胞表面分子表达水平, 结果显示, 与未转染组相比, 转染后 *EBNA1*-DC 表面 *EBNA1*[(59.3±5.85)% vs (0.07±0.06)% , $P<0.001$]、*HLA-DR*[(84.9±5.5)% vs (68.0±5.8)% , $P=0.026$] 和 *CD80*[(88.2±3.9)% vs (61.1±4.4)% , $P=0.015$] 的水平均显著升高, 说明

EBNA1 mRNA 转染 DC 后, 转录翻译的 *EBNA1* 抗原肽可与 DC 表面 *HLA-DR* 分子结合并提呈在 DC 细胞表面, 同时抗原 mRNA 转染后可促进 DC 的成熟, 表现在 DC 成熟标志物分子 *CD80* 表达的提高。说明肿瘤抗原以 mRNA 的形式负载 DC 后可促进其成熟并被提呈。

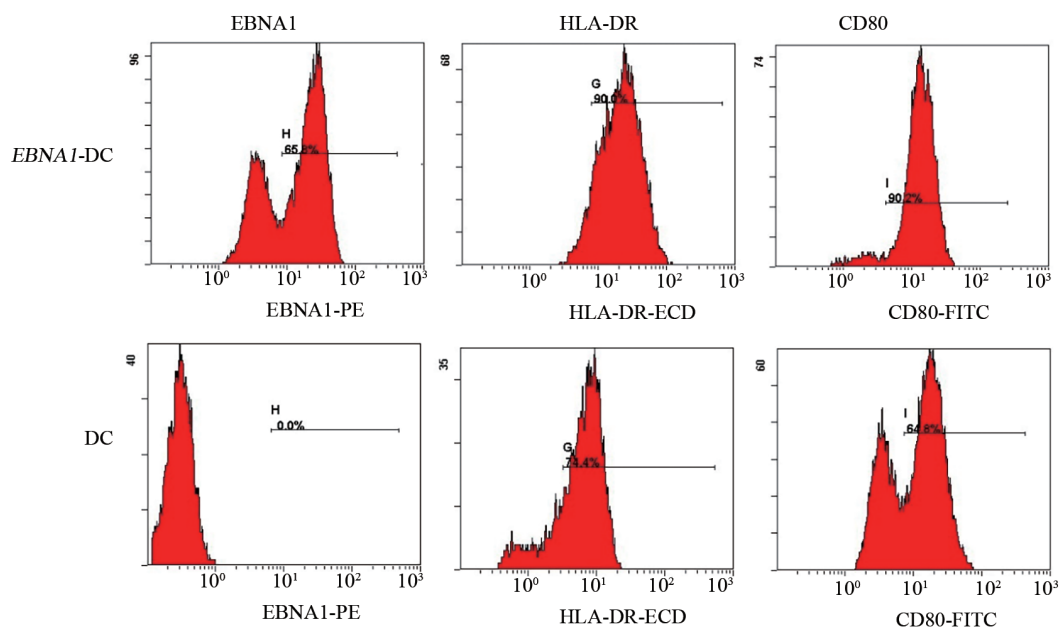


图2 转染 *EBNA1* mRNA 提高 DC 表面 *EBNA1*、*HLA-DR* 和 *CD80* 的水平

2.3 RTCA 检测 *EBNA1*-DC 诱导的特异性肿瘤杀伤效应

RTCA 技术检测结果(图3)显示, *EBNA1*-DC 诱

导组淋巴细胞对靶细胞的杀伤率显著高于未转染 DC 诱导组和单纯淋巴细胞组 [(47.0±13.7)% vs (21.3±8.0)%、(11.7±4.9)% , $P=0.049$ 、 $P=0.013$]。

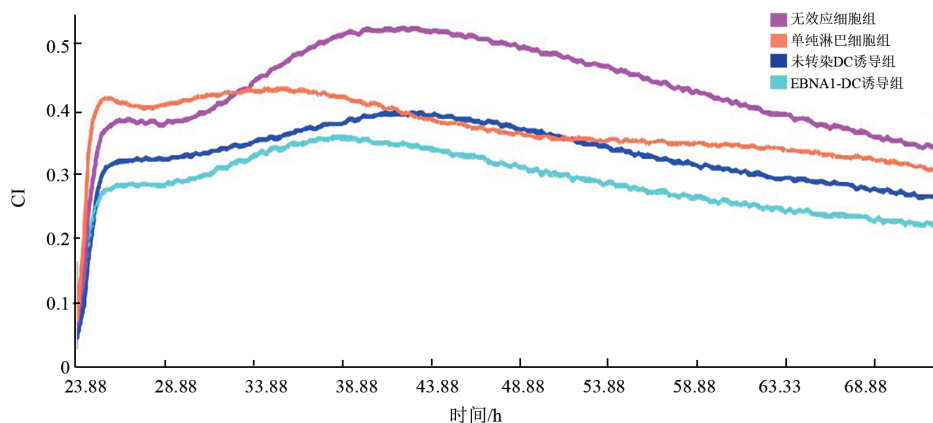


图3 RTCA 检测各组 DC 诱导的淋巴细胞的特异性杀伤效应

2.4 低剂量 5-Aza-CdR 处理不影响 C666-1 细胞的凋亡

流式细胞术检测细胞凋亡结果(图4)显示, 低剂量 5-Aza-CdR 处理后的 C666-1 细胞凋亡率(Annexin-V*PI)为(7.62±3.04)% , 与未经 5-Aza-CdR 处理的 C666-1 细胞凋亡率(5.22±2.40)% 相比, 无显著差异

($P=0.34$)。

2.5 低剂量 5-Aza-CdR 处理促进 C666-1 细胞中 *IRF7* 基因的表达

qPCR 检测结果显示, 低剂量 5-Aza-CdR 预处理后的 C666-1 细胞中干扰素调节因子 *IRF-7* 基因与未

处理的 C666-1 细胞相比的相对表达量显著升高 (11.1 ± 1.15 vs 2.19 ± 0.11 , $P=0.0001$), 表明低剂量 5-Aza-CdR 处理 C666-1 细胞后, 可诱导细胞中 I 型干扰素通路的上游关键基因 IRF7 的上调, 可能与其免疫反应的调节能力相关。

2.6 5-Aza-CdR 联合 EBNA1-DC 诱导的淋巴细胞能够靶向杀伤 C666-1 细胞

如图 5A-B 所示, 5-Aza-CdR+EBNA1-DC 诱导组对 C666-1 细胞的杀伤活性显著高于 EBNA1-DC 诱导组及 5-Aza-CdR 组 [$(71.6 \pm 12.2)\%$ vs $(37.2 \pm 9.7)\%$ 、 $(11.1 \pm 7.8)\%$, $P=0.019$ 、 $P=0.001$]。5-Aza-CdR 组 C666-1 细胞 CI 值与对照组相比无显著差异 [$(0.23 \pm$

$0.09)\%$ vs $(0.11 \pm 0.02)\%$, $P=0.09$], 提示低剂量 5-Aza-CdR 对 C666-1 肿瘤细胞的增殖无显著影响。

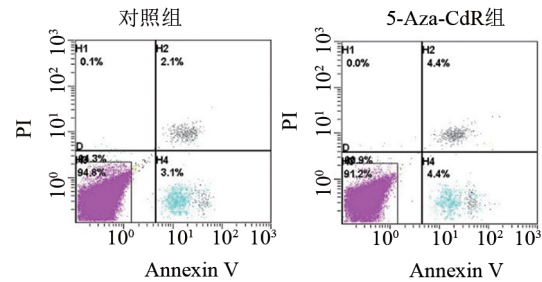


图 4 低剂量 5-Aza-CdR 处理不影响 C666-1 细胞的凋亡

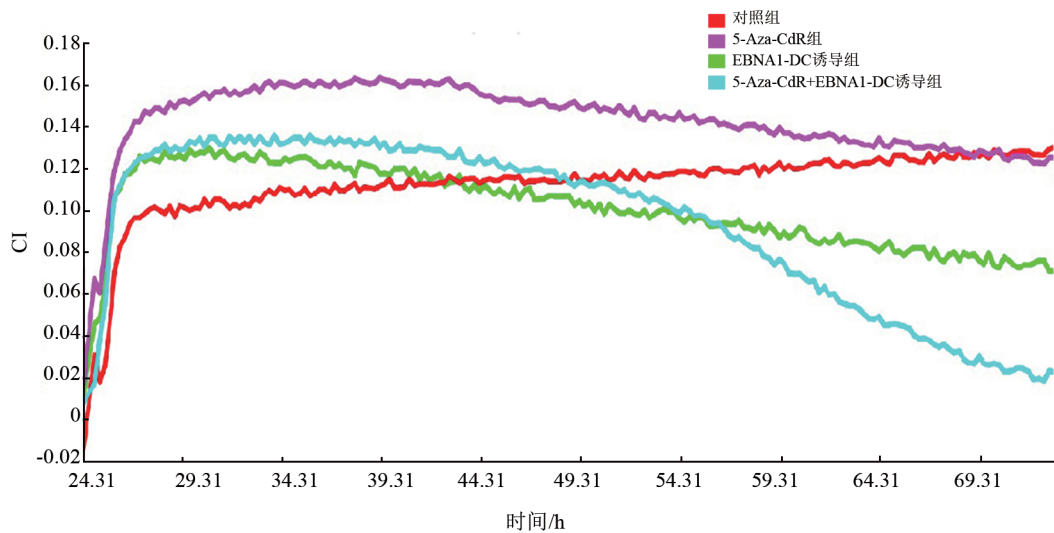


图 5 5-Aza-CdR 联合 EBNA1-DC 诱导的淋巴细胞能够靶向杀伤 C666-1 细胞

3 讨论

绝大多数的鼻咽癌发生发展与 EBV 感染相关。与其他类型的癌症不同, 病毒相关恶性肿瘤通过 MHC 分子表达外源表位, 可被 CTL 识别。因此, 潜伏病毒蛋白的免疫原性和激活抗原特异性 CTL 的策略已成为近几十年来针对病毒相关恶性肿瘤免疫治疗的重点^[13]。EBV 相关抗原负载的 DC 在启动激活 EBV-CTL 抗鼻咽癌免疫治疗中起重要作用^[5]。

目前, DC 的抗原负载方式有: 肿瘤抗原肽、肿瘤抗原 DNA、肿瘤细胞裂解物、病毒载体及肿瘤抗原 mRNA 等, 其中肿瘤抗原 mRNA 代替多肽进行负载 DC 可能导致诱导范围更广的 T 细胞库, 代表了一种新的和有效的策略来刺激体外和体内的 CTL 反应, 具有以下优势: (1) 在基因表达方面, mRNA 转染绕过了复杂的转录调控问题, 进入细胞后很容易进入细胞质翻译机制; (2) 不会整合到宿主基因组内, 具有安全性; (3) 易于生产, 成本低; (4) 肿瘤抗原

mRNA 负载 DC 的方式, 可通过 RIG/MDA5 途径激活 DC, 促进 DC 成熟和交叉递呈功能, 从而引发更有效的抗癌免疫应答^[7]。本研究通过体外转录的方法获得编码 EBNA1 全长基因组 mRNA, 并使用脂质体转染的方法负载 DC, 构建 EBNA1-DC 疫苗。通过体外流式检测方法及细胞杀伤实验, 证明了用 mRNA 转染 DC 的方式可促进 DC 成熟并诱导有效的靶向 CTL 免疫反应。

EBV 感染是一种表观遗传驱动因子, 与 CpG 岛的甲基化 (CpG island methylator phenotype, CIMP) 密切相关^[14]。EBV 表达的病毒抗原主要有 EBNA1、LMP-1 和 LMP-2A/B 等, 并最终是以 HLA 限制性形式存在于细胞膜上。EBNA1 表达高度稳定, 在所有未分化鼻咽癌中均有表达, 且作为转录因子, 可将潜伏膜蛋白 (latent membrane protein, LMP) 的表达提高 200 倍^[15]。

5-Aza-CdR 是目前唯一被 FDA 批准的 DNA 甲基转移酶药物, 用于血液恶性肿瘤的治疗^[16]。DAVID

等^[11]证明了低剂量 5-Aza-CdR 的持久抗肿瘤作用实际上是通过诱导 dsRNA 和激活 MDA5 RNA 识别受体, 随后激活下游 MAVS、干扰素调节因子 IRF7 和 III 型 IFN, 上调干扰素应答基因, 从而触发免疫应答。此外, 在非小细胞肺癌、乳腺癌和结直肠癌患者中使用低剂量 5-Aza-CdR 的临床试验也发现了干扰素应答基因的上调^[17-18]。5-Aza-CdR 与免疫治疗的组合已在不同实体肿瘤类型患者中取得了显著的效果^[19-20]。本研究结果也证实低剂量 5-Aza-CdR 处理鼻咽癌 C666-1 细胞后, 可提高 IRF7 的表达, 并促进 EBNA1-DC 诱导的特异性免疫杀伤效应, 这为提高 EBV-CTL 在晚期鼻咽癌中的治疗疗效奠定了研究基础。

综上所述, 本研究结果表明, 肿瘤抗原以 mRNA 的形式负载 DC 可促进其成熟并诱导有效的靶向 CTL 免疫反应, 同时低剂量 5-Aza-CdR 可显著增强 EBNA1-DC 疫苗的肿瘤特异性免疫杀伤效果, 这为开拓以 mRNA 为基础的 DC 疫苗及其在临床综合治疗中的应用转化提供前期研究基础。下一步本课题组将从分子机制上进一步探讨两者联合的抗肿瘤机制, 为晚期鼻咽癌患者寻找一种高效低毒的联合治疗模式提供理论基础。

[参考文献]

- [1] WANG F H, ZHANG X T, LI Y F, *et al.* The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO): clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer, 2021[J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(8): 747-795. DOI: 10.1002/cac2.12193.
- [2] MOHAMMED M A, GHANI M K A, Hamed R I, *et al.* Review on Nasopharyngeal Carcinoma: concepts, methods of analysis, segmentation, classification, prediction and impact: a review of the research literature[J]. *J Comput Sci*, 2017, 21: 283-298. DOI: 10.1016/j.jocs.2017.03.021.
- [3] GUAN S Z, WEI J R, HUANG L K, *et al.* Chemotherapy and chemo-resistance in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2020, 207: 112758 [2023-03-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32858472/>. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112758.
- [4] HUANG J L, FOGG M, WIRTH L J, *et al.* Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for recurrent, metastatic nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*, 2017, 123(14): 2642-2650. DOI: 10.1002/cncr.30541.
- [5] LI J, CHEN Q Y, HE J, *et al.* Phase I trial of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy following concurrent chemoradiotherapy in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2015, 4(2): e976507 [2023-03-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4404907/>. DOI: 10.4161/23723556.2014.976507.
- [6] WCULEK S K, CUETO F J, MUJAL A M, *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(1): 7-24. DOI: 10.1038/s41577-019-0210-z.
- [7] BECK J D, REIDENBACH D, SALOMON N, *et al.* mRNA therapeutics in cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 1-24. DOI: 10.1186/s12943-021-01348-0.
- [8] LORENTZEN C L, HAANEN J B, MET Ö, *et al.* Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(10): e450-e458 [2023-03-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36174631/>. DOI: 10.1016/S1470-2045(22)00372-2.
- [9] CAFRI G, GARTNER J J, ZAKS T, *et al.* mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11): 5976-5988. DOI: 10.1172/JCI134915. 2020,130(11):5976-5988.
- [10] ZHANG L L, WANG R, XIE Z D. The roles of DNA methylation on the promotor of the Epstein-Barr virus (EBV) gene and the genome in patients with EBV-associated diseases[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(12): 4413-4426. DOI: 10.1007/s00253-022-12029-3.
- [11] DAVID R, HELEN L Y, RAJAT S, *et al.* DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts[J]. *Cell*, 2015, 162(5): 961-973. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.056.
- [12] KRATKY W, SOUSA C R E, OXENIUS A, *et al.* Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8⁺ T-cell priming and tumor vaccination[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(42): 17414-17419. DOI: 10.1073/pnas.1108945108.
- [13] LE Q T, COLEVAS A D, O'SULLIVAN B, *et al.* Current treatment landscape of nasopharyngeal carcinoma and potential trials evaluating the value of immunotherapy[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2019, 111(7): 655-663. DOI: 10.1093/jnci/djz044.
- [14] YAMADA H, TAKESHIMA H, FUJIKI R, *et al.* ARID1A loss-of-function induces CpG island methylator phenotype[J/OL]. *Cancer Lett*, 2022, 532: 215587 [2023-03-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35131383/>. DOI: 10.1016/j.canlet.2022.215587.
- [15] BROOKS L, YAO Q Y, RICKINSON A B, *et al.* Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts[J]. *J Virol*, 1992, 66(5): 2689-2697. DOI: 10.1128/JVI.66.5.2689-2697.1992.
- [16] KAMINSKAS E, FARRELL A, ABRAHAM S, *et al.* Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3604-3608. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-04-2135.
- [17] BARETTI M, AZAD N S. The role of epigenetic therapies in colorectal cancer[J]. *Curr Probl Cancer*, 2018, 42(6): 530-547. DOI: 10.1016/j.currprobcancer.2018.03.001.
- [18] JUERGENS R A, WRANGLE J, VENDETTI F P, *et al.* Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(7): 598-607. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0214.
- [19] CHIAPPINELLI K B, STRISSEL P L, DESRICARD A, *et al.* Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses[J]. *Cell*, 2015, 162(5): 974-986. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.011.
- [20] CHEN X, PAN X H, ZHANG W X, *et al.* Epigenetic strategies synergize with PD-L1/PD-1 targeted cancer immunotherapies to enhance antitumor responses[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(5): 723-733. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.09.006.

[收稿日期] 2023-03-23

[修回日期] 2023-07-20

[本文编辑] 黄静怡