

用非特异性免疫促进剂开启抗病毒抗肿瘤治疗革命大门

——帕米卡®体外细胞生物学作用机理的研究

林海祥^{1*}, 吴叶丹², 刘芳¹, 孙晓林¹

¹信福(北京)医药科技有限公司, 北京

²中国医学科学院药物研究院, 北京

Email: *haixianglin510@163.com

收稿日期: 2020年12月23日; 录用日期: 2021年1月15日; 发布日期: 2021年1月26日

摘要

目的: 了解帕米卡体外细胞生物学水平的作用及其机理。方法: HEK-Blue hTLR3细胞、HEK-Blue hTLR4细胞经信号传导检定相应配体试验; RT-qPCR (实时荧光定量PCR技术)试验, 细胞活力试验, 单层细胞增殖试验, Annexin V和PI双染色法定量试验, 细胞分裂周期分析试验, 细胞划痕实验, 细胞迁移小室和侵袭试验。结果: 帕米卡是TLR3、4受体的配体, 极其显著地提高LL/2 and A540细胞TLR3 mRNA水平, 是对受体敏感性的标志, 极其显著地抑制肿瘤细胞存活率, 显著地减少肿瘤存活细胞数, 封闭肿瘤细胞在G1期继续分裂使肿瘤细胞凋亡, 显著降低肿瘤细胞的移动和侵袭, 抑制了肿瘤转移。结论: 帕米卡是一个能够引起非特异免疫响应显著增强机体抗肿瘤免疫的敏感性、抑制肿瘤细胞增殖、降低肿瘤细胞分裂和转移的有潜力的广谱抗癌抗病毒制剂。

关键词

帕米卡, 抗肿瘤, 抗感染、双链RNA, 非特异性免疫

Open the Therapeutic Revolution Door of Antiviral Antitumor by Improving Systemic Non-Specific Immunity

—The Study of Pamica® on Mechanism of Action at Cytobiology *in Vitro*

Haixiang Lin^{1*}, Yedan Wu², Fang Liu¹, Xiaolin Sun¹

*通讯作者。

文章引用: 林海祥, 吴叶丹, 刘芳, 孙晓林. 用非特异性免疫促进剂开启抗病毒抗肿瘤治疗革命大门——帕米卡®体外细胞生物学作用机理的研究[J]. 世界肿瘤研究, 2021, 11(1): 12-23. DOI: 10.12677/wjcr.2021.111003

¹XIN FU (Beijing) Pharmaceutical Technology Co. Ltd., Beijing

²Institute of Material Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

Email: *haixianglin510@163.com

Received: Dec. 23rd, 2020; accepted: Jan. 15th, 2021; published: Jan. 26th, 2021

Abstract

Purpose: To comprehend of Pamica on antiviral and antitumor mechanism of action at cytobiology *in vitro*. **Methods:** Screening of human TLR3 TLR4 agonist test with HEK-Blue hTLR3, HEK-Blue hTLR4 cells, RT-QPCR analysis, Cell viability assay, Monolayer cell proliferation, Annexin V-FITC double staining assay, Cell cycle analysis, Scratch wound healing assays, Transwell migration and invasion assays. **Results:** Pamica activates strongly TLR3 expressing cell and also TLR4 expressing cell; increase TLR3 mRNA expression in LL/2 and A540 cells, it is an indicator of susceptibility to Pamica; can inhibit LL/2 and A540 cells proliferation, promoting apoptosis, inhibit cell division, migration and invasion in G1 phase, prevent tumor cell metastasis *in vitro*. **Conclusion:** Pamica is a potential broad spectrum anticancer antiviral agent by enhancing TLR3 susceptibility, inhibiting tumor cell proliferation, division and metastasis.

Keywords

Pamica, Antiviruses, Antitumors, DSRNA, Non-Specific Immunity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

前两篇《帕米卡[®]制剂抗病毒抗肿瘤作用及展望》和《帕米卡[®]对几种荷瘤小白鼠的效果观察》报道了帕米卡概况、有效性、前景以及在肺癌、乳腺癌、黑色素瘤荷瘤小白鼠模型中的有效性($P < 0.05 \sim 0.0001$), 阐明了使用帕米卡非特异性免疫促进剂作为广谱抗肿瘤抗感染治疗的可行性[1] [2]。本篇通过细胞生物学水平实验研究进一步揭示了帕米卡是 TLR3 和 TLR4 的激动剂, 在体外能够引起非特异免疫响应显著活化对 TLR3 受体的敏感性, 抑制肿瘤细胞增殖和转移的作用及其机理, 增强了作为广谱抗癌抗病毒制剂的信心。本文实验是与 中国医学科学院药物研究院及香港 InvivoGen 公司协作完成。

2. 材料和方法

2.1. 帕米卡 TLR3、TLR4 配体检测

样品: 帕米卡 3 mg/ml 信福(北京)医药科技有限公司制备 2018.01.15; **细胞系:** 人肺癌细胞 A549 分化的双基因细胞(A549-dual cell)含有胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因和荧光素酶基因, 二者是稳定结合的报告基因结构。HEK-Blue hTLR3 细胞在 A549-dual cell 基础又携带人 TLR3 基因, 携带的分泌胚胎碱性磷酸酶(SEAP)报告基因通过 TLR3 激动剂活化 NK-kB 和 AP-1 (细胞内转录激活因子)产生 SEAP 产物和分泌荧光素酶检测活化活性; HEK-Blue hTLR4 能过表达人 TLR4 受体蛋白和 NK-kB 诱发的 SEAP 报告基因, 工作原理与 HEK-Blue hTLR3 细胞相同。

方法: 帕米卡 3 mg/ml 稀释至 1 mg/ml → 100 μg、25 μg、6.25 μg、1.56 μg、391 ng、97.7 ng、24.4 ng、6.1 ng, 从 100 μg/ml 开始。在 96 孔板中分别加入 20 μl/孔试验样品或参考品, HEK-Blue Null1 hTLR3 细胞、HEK-Blue hTLR4 细胞约 50,000 细胞, 总体积 200 μl/孔。置 37°C 5%CO₂ 温箱 16~24 小时, 使用酶标仪或分光光度计在 630 nm 检测读取 OD 值。

计算: OD 值 - 非诱导平均值 NI, 取平均值, 以直方图表示。

2.2. 帕米卡在肿瘤细胞的细胞生物学作用机理研究

样品: 帕米卡 3 mg/ml: 信福(北京)医药科技有限公司制备, 批号: 20171101; 阳性对照药: PD1: BioXcell 公司, 货号 BE0033-2 24MG 批号: 662817J3; CCK8 试剂盒: Dojindo 日本公司; Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡试剂盒: Neobioscience 公司; TUNEL-POD 试剂盒: Leica 公司。上述试剂均为分析级。LL2 鼠癌细胞、A549 人癌细胞: 中国医学科学院基础医学研究所提供, 细胞在 10%胎牛血清、1%青、链霉素 MEM 培养液中置 5%CO₂ 37°C 孵箱内培养。

方法:

RT-qPCR (实时荧光定量 PCR 技术): 用 Invitrogen 公司生产的 Trizol 试剂溶解帕米卡处理和未处理细胞, 用 DNA 酶 1 (Fermentas 公司)消化样品中的 DNA, 提取细胞 RNA, 经反转录酶 M-MLV 转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 用罗氏公司的 2 × TaqMix480II 预混液, 按照如下条件试验: 95°C 5 分钟, 95°C 15 秒 → 65°C 30 秒, 经 45 周期, 以荧光检测扩增合成目的片段。TLR3 引物为: 5'-CCAGACCTAGC ACAACTGACTCC-3' (forward) and 5'-AGCAGCCAGAAGCAGAACTACAGA-3' (reverse); β-actin, 5'-GAGATTACTGCTCTGGCTCCTA-3' (forward) and 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCTTG-3' (reverse) [3], 通过三次重复试验分析 qPCR 产物。该技术是在反应体系中加入荧光集团, 利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。

细胞活性试验: LL2 细胞以 7×10^3 /孔、A549 细胞以 5×10^3 /孔, 加入 96 孔板中, 培养液为 10%胎牛血清 DMEM, 置 37°C 孵箱 24 小时, 换液加入不同浓度的帕米卡及设对照组和空白孔, 继续置 37°C 孵箱 24、48 小时后所有细胞孔换入含 10% CCK8 试剂(Dojindo 日本公司)的无血清维持液, 在黑暗处孵育 2 小时, 分别在 450 和 650 nm 通过微板阅读器(美国 BioTek 公司)读取 OD 值, 细胞存活% = $(OD \text{ 试验值} - OD \text{ 空白值}) / (OD \text{ 对照值} - OD \text{ 空白值}) \times 100\%$ 。

单层细胞增殖试验: LL2 细胞、A549 细胞以 5×10^4 /孔, 加入 6 孔板中, 培养液为 10%胎牛血清 DMEM, 置 37°C 孵箱 24 小时, 换液加入帕米卡 100 μg/ml 和不加帕米卡的无血清 MEM 维持液, 继续置 37°C 孵箱 48 小时后每 24 小时测定细胞总数。每孔收集细胞用台酚蓝(美国 Solarbio 公司)染色, 用血细胞仪计数比较。

Annexin V 和 PI 双染色法定量检测细胞凋亡试验: LL2 细胞、A549 细胞以 1×10^5 /孔加入 6 孔板中, 培养液为 10%胎牛血清 DMEM, 置 37°C 孵箱 24 小时, 换液加入帕米卡 100 μg/ml 无血清 MEM 维持液, 同时设不加帕米卡对照组继续置 37°C 孵箱 48 小时, 收集细胞, 用冷 PBS 洗 2 次, 用结合缓冲液重悬浮细胞, 用 Annexin V 和 PI 双染色法标记细胞(试剂盒, 欣博盛科技公司, 中国), 细胞凋亡通过美国 BD 公司流式细胞仪和细胞寻找软件(Cell Quest Software)分析。

细胞分裂周期分析试验: LL2 细胞、A549 细胞以 1×10^5 /孔接种在 6 孔板中, 培养液为 10%胎牛血清 DMEM, 置 37°C 孵箱 24 小时, 换液加入帕米卡 100 μg/ml 无血清 MEM 维持液和 DMEM 孔作为对照, 继续置 37°C 孵箱 48 小时, 收集细胞, 置 75%乙醇中-20°C 24 小时, 用冷 PBS 洗 2 次, 加入 100 μl RNA 酶(美国 Solarbio 公司)重悬浮细胞, 37°C 水浴 30 分钟, 所有细胞用 400 μl PI 试剂(美国 Solarbio 公司)标记, 置 4°C 黑暗处 30 分钟, 用流式细胞仪(美国 BD 公司)在波长 488 nm 检测红色荧光。

细胞划痕试验: 当细胞长成单层时, 在融合的单层上人为制造一个空白区域, 称为划痕, 划痕边缘

的细胞会逐渐进入空白区域使划痕愈合，模拟了体内细胞迁移过程，以研究细胞迁移的体外实验方法。分别将约 5×10^4 LL2 细胞、A549 细胞/孔接种到 12 孔板中，置 37°C CO_2 温箱培养 24 小时，成片的细胞用 $200 \mu\text{l}$ 枪头划痕，PBS 冲洗 2 次。设加入帕米卡 $100 \mu\text{g/ml}$ 实验组和未加帕米卡对照组，于 0、24、48 小时捕获划痕位置，用映像软件测量缝隙距离。

细胞迁移小室试验：LL2 细胞、A549 细胞分别加入帕米卡 $100 \mu\text{g/ml}$ 无血清 MEM 维持液试验组和仅加 MEM 维持液对照组，置 37°C 孵箱培养 48 小时，收集细胞，用无血清 MEM 悬浮细胞，加入 5×10^4 细胞/孔至含有嵌入物的 24 孔膜板(3422 美国康宁公司)即细胞迁移小室中，同时在小室膜板下方加 10% 胎牛血清作为诱导剂孵育 24 小时。除去小室膜上未迁移细胞，无水甲醛固定迁移至小室膜下细胞，用结晶紫在暗处染色 30 分钟，在显微镜下对不同视野拍照。迁移率(%) = (A 样品 - A 空白/A 对照 - A 空白) $\times 100\%$

侵袭试验：用无血清 MEM1:5 稀释基质凝胶加入到上述细胞迁移小室，置 37°C 孵箱培养过夜。定量测定方法：用 33% 乙酸溶解结晶紫染色的细胞，在分光光度计 570 nm 处测定 OD 值，结果帕米卡处理与未处理的 LL2 细胞、帕米卡处理与未处理的 A549 细胞比较。侵袭率 = (A 样品 - A 空白/A 对照 - A 空白) $\times 100\%$ 。

3. 实验结果

3.1. 帕米卡是具有强烈作用的 hTLR3 激动剂

HEK-Blue hTLR3 是 A549 (人肺癌细胞)携带人 TLR3 和 SEAP 报告基因与荧光素酶的 HEK-Blue Null1 细胞。图 1 结果表明帕米卡能通过激活 NK-kB 和 AP-1 通路引起 HEK-Blue hTLR3 细胞激活的分泌碱性磷酸酶的 SEAP 报告基因和通过激活干扰素调节因子基因分泌荧光素酶，检测效果优于阳性对照药 Poly(I:C) HMV。证明帕米卡是具有较阳性对照药更强烈作用的 hTLR3 激动剂。

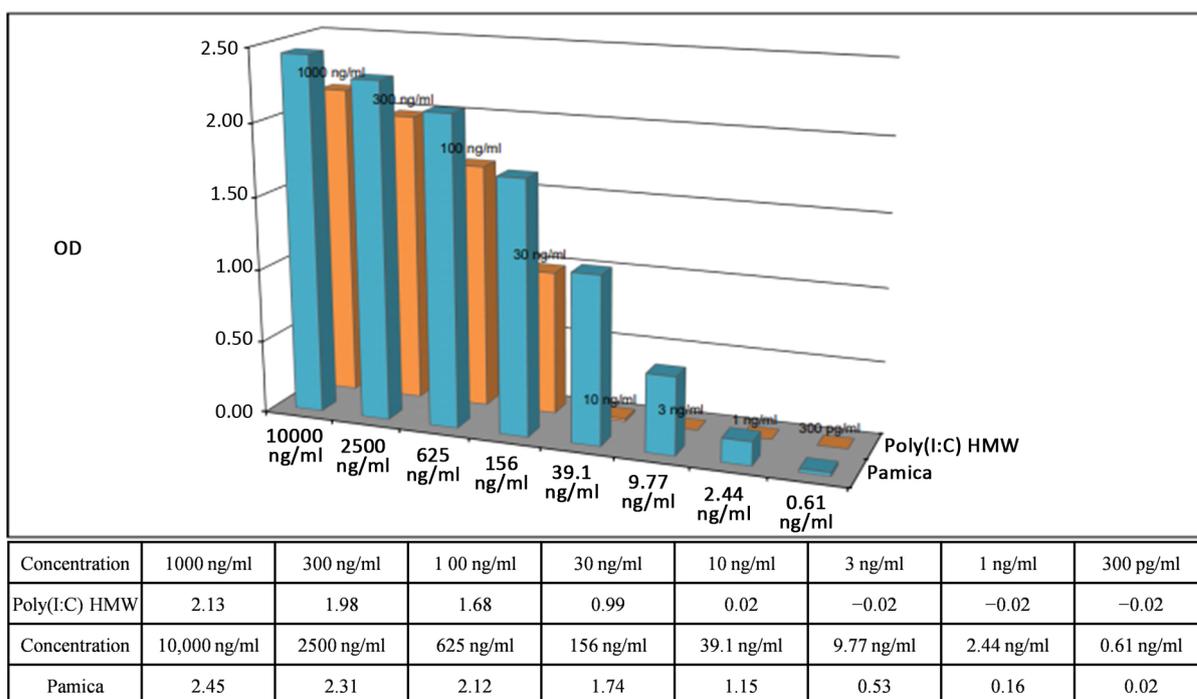


Figure 1. Effect of action of Pamica and Poly(I:C) HMV (positive control drug) in HEK-Blue hTLR3 cells

图 1. 阳性对照药 Poly(I:C) HMV 和帕米卡在 HEK-Blue hTLR3 细胞作用效果

3.2. 帕米卡也是 hTLR4 激动剂

HEK-Blue hTLR4 细胞是 A549 细胞携带人 TLR4 基因和 SEAP 报告基因与荧光素酶的 HEK-Blue Null2 细胞, 图 2 结果表明帕米卡能通过 NK-kB 和 AP-1 信号传导也能引起 HEK-Blue hTLR4 细胞分泌碱性磷酸酶的 SEAP 报告基因和干扰素调节因子基因分泌荧光素酶, 效果不如阳性对照药脂多糖, 但优于 Poly(I:C) HMV, 表明帕米卡也是 hTLR4 激动剂。

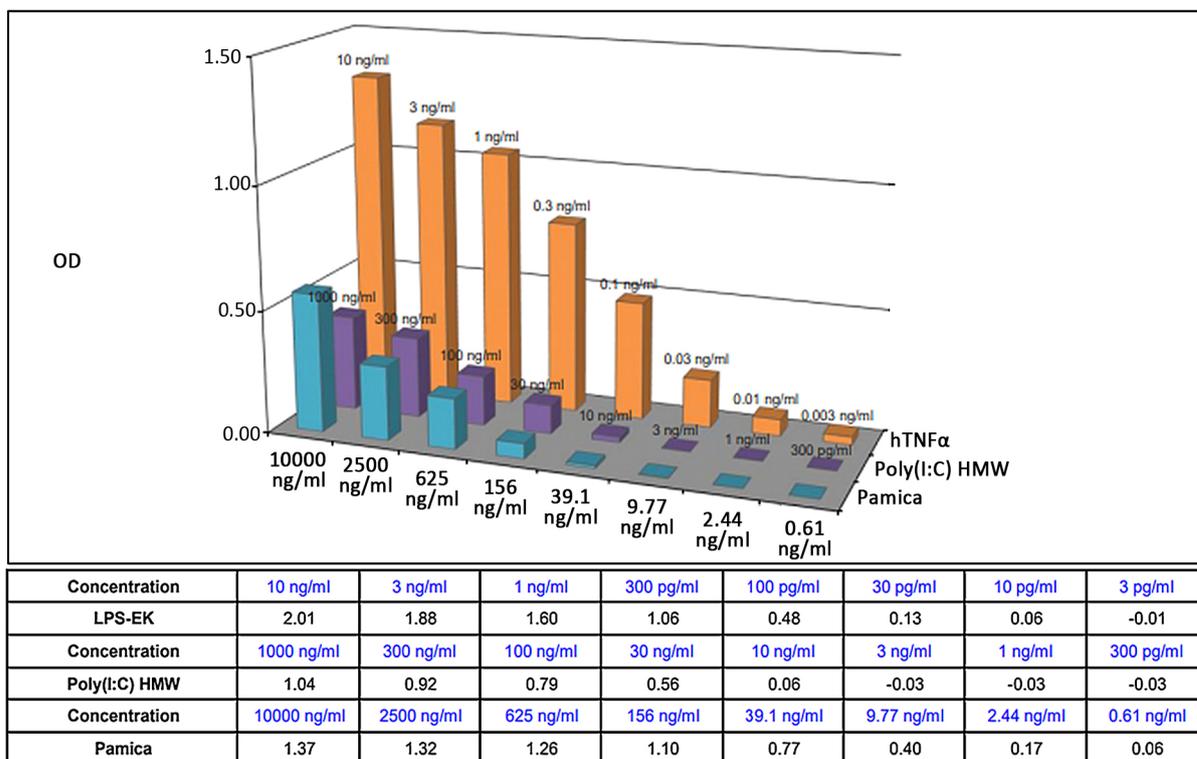


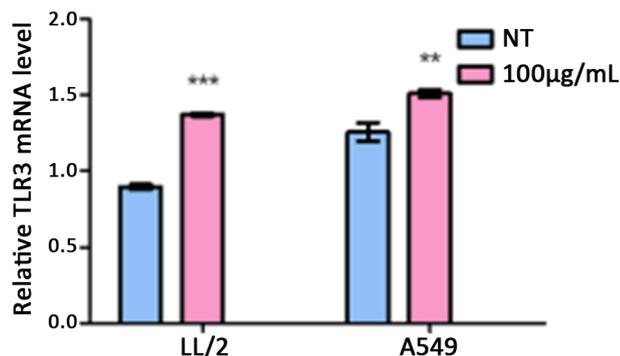
Figure 2. Effect of action of Pamica and LPS-EK (positive control drugs), Poly(I:C) HMV in HEK-Blue hTLR4 cells
图 2. 阳性对照药脂多糖及 Poly(I:C) HMV 和帕米卡在 HEK-Blue hTLR4 细胞作用效果

3.3. RT-QPCR(实时荧光定量 PCR)分析

在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时检测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析, 将 RNA 的反转录和 c DNA 的聚合酶链式扩增相结合检测细胞中基因表达水平。用对起始模板定量分析方法检测帕米卡在体外对 LL-2 和 A549 细胞 TLR3 的扩增。图 3 结果表明 RT-QPCR 检测帕米卡经 24、48 小时处理细胞后上调 A549 人癌细胞 TLR3 mRNA 含量, 从 1.26 至 1.52, $P < 0.01$; 上调 LL/2 鼠癌细胞 TLR3 mRNA 含量, 从 0.90 至 1.37, $P < 0.001$, 极其显著地促进细胞 TLR3 mRNA, 表明帕米卡对 TLR3 受体具有极其显著的敏感性。

3.4. 帕米卡在体外抑制 LL-2 和 A549 细胞增殖

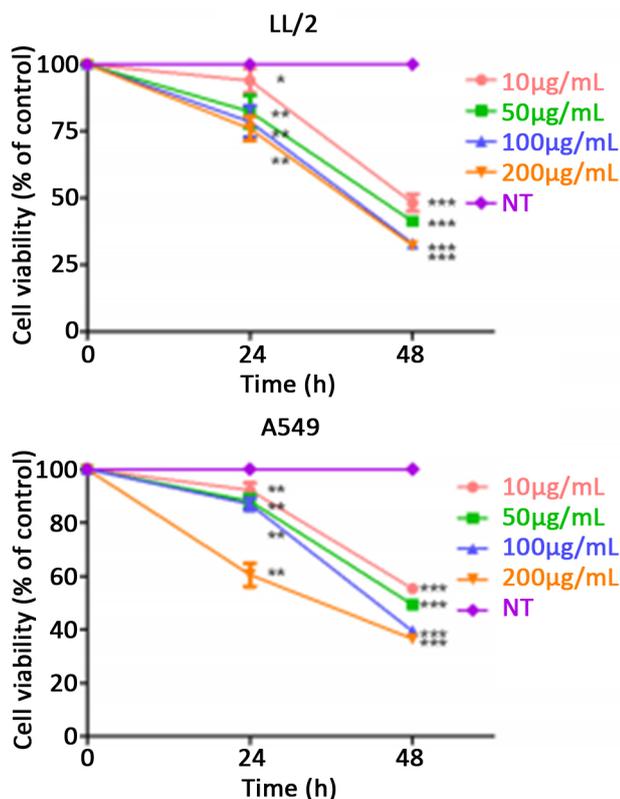
用 CCK8 试剂按照细胞存活试验方法检测, 图 4 表明帕米卡经 24、48 小时以不同剂量处理细胞, 24 小时抑制 LL/2 细胞存活数 20%, 抑制 A549 细胞数 13%, 均 $P < 0.01$; 48 小时抑制 LL/2 鼠癌细胞存活数 52%~67%, 抑制 A549 人癌细胞数 45%~61%, $P < 0.001$, 显示帕米卡能极其显著地抑制肿瘤细胞存活率, 而剂量依赖性不明显。本文有关研究均采用帕米卡剂量为 100 $\mu\text{g/ml}$ 。



X ± S, N = 3, **P < 0.01, ***P < 0.001

Figure 3. RT-QPCR analysis of TLR3 mRNA levels in LL-2 and A549 cells treated by Pamica in vitro

图3. 实时荧光定量PCR分析帕米卡在体外对LL-2和A549细胞TLR3 mRNA水平的影响

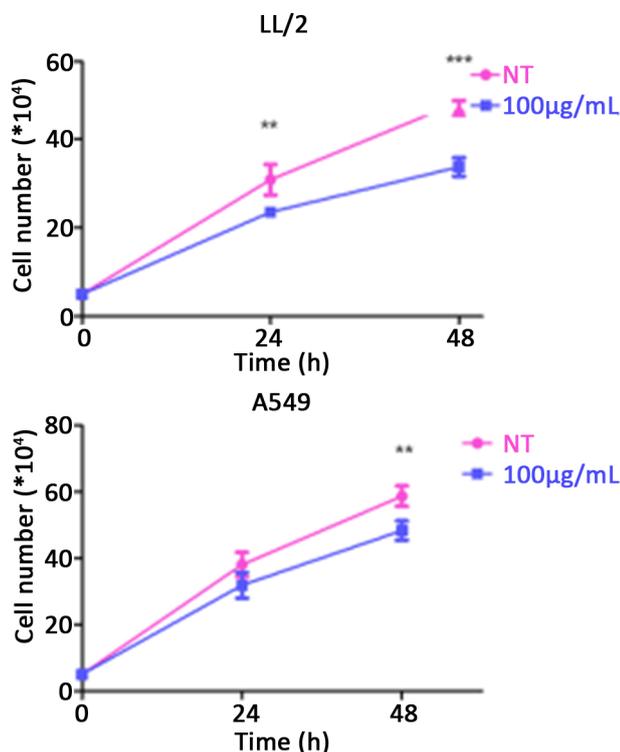


X ± S, N = 4, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

Figure 4. Viability of A549 and LL/2 cells treated by Pamica with different concentrations (10, 50, 100, 200 µg/ml)

图4. 不同剂量帕米卡(10, 50, 100, 200 µg/ml)经24、48小时处理对A549和LL/2细胞存活率的影响

用测定细胞数的方法进一步检测帕米卡抑制癌细胞的作用：用单层细胞增殖试验方法收集细胞，用台酚蓝染色计算细胞数。图5表明帕米卡经24小时处理、降低LL/2细胞总数至1.47倍，降低A549细胞总数至1.24倍；经48小时处理细胞后，降低LL/2细胞总数2.07倍，降低A549细胞总数2.07倍，均P < 0.01，表明帕米卡能显著地减少肿瘤细胞数。



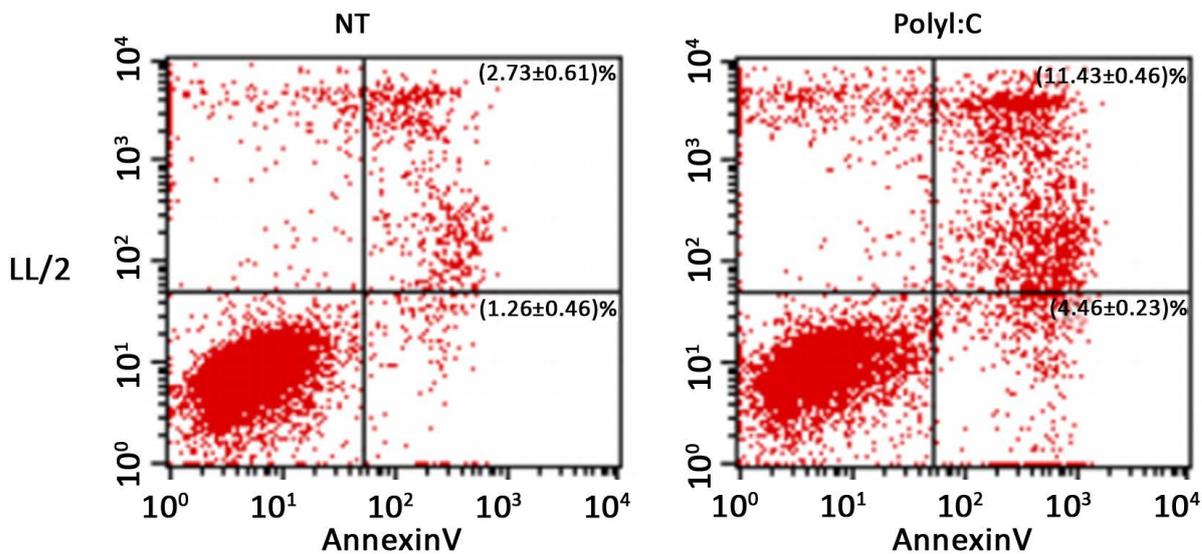
X ± S, N = 3, **P < 0.01, ***P < 0.001

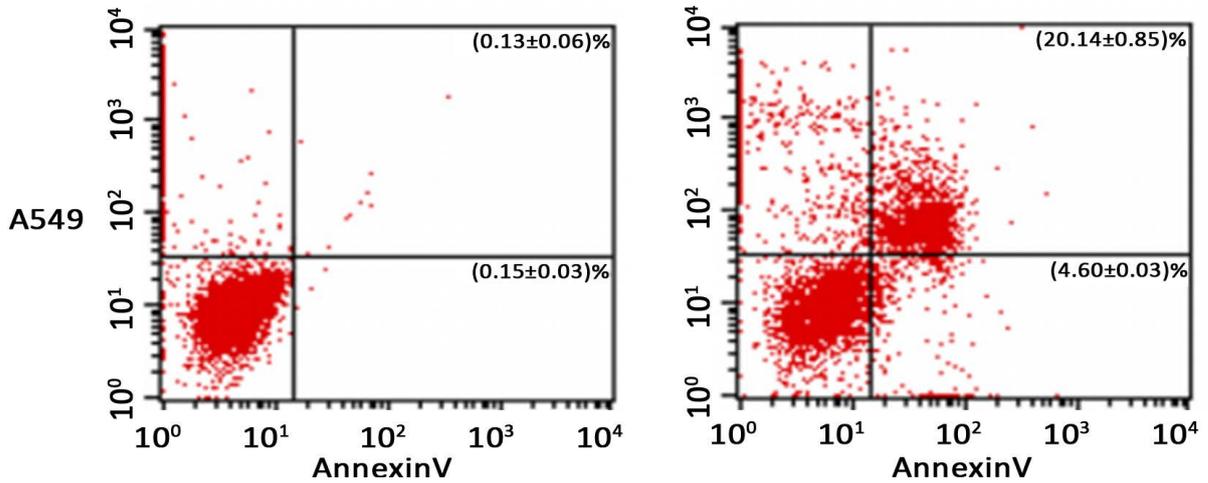
Figure 5. Total cell number of A549 and LL/2 cells treated by Pamica with 24, 48 hours

图 5. 帕米卡处理 24、48 小时对降低 LL/2 和 A549 细胞总数的影响

3.5. 帕米卡对 LL/2 和 A549 细胞凋亡及细胞分裂周期的影响

用 Annexin V 和 PI 双染色法定量检测帕米卡对 LL/2 和 A549 细胞凋亡及分裂周期的影响。图 6 表明帕米卡处理 48 小时后细胞凋亡率 LL/2 细胞为 11.43% ± 0.46%，对照组为 2.73% ± 0.61，A549 细胞 20.04% ± 0.85%，对照组为 0.13% ± 0.06%，统计学测定均 P < 0.001。





Data are expressed as $\pm S$, $n = 3$

Figure 6. Apoptosis of LL/2 and A549 cells were quantificationally determined with Annexin V/PI staining assay after 48 hours administrated with Pamica

图 6. 用 Annexin V 和 PI 双染色法定量检测帕米卡处理 48 小时后对 LL/2 和 A549 细胞分裂周期及凋亡的影响($\pm S$, $n = 3$)

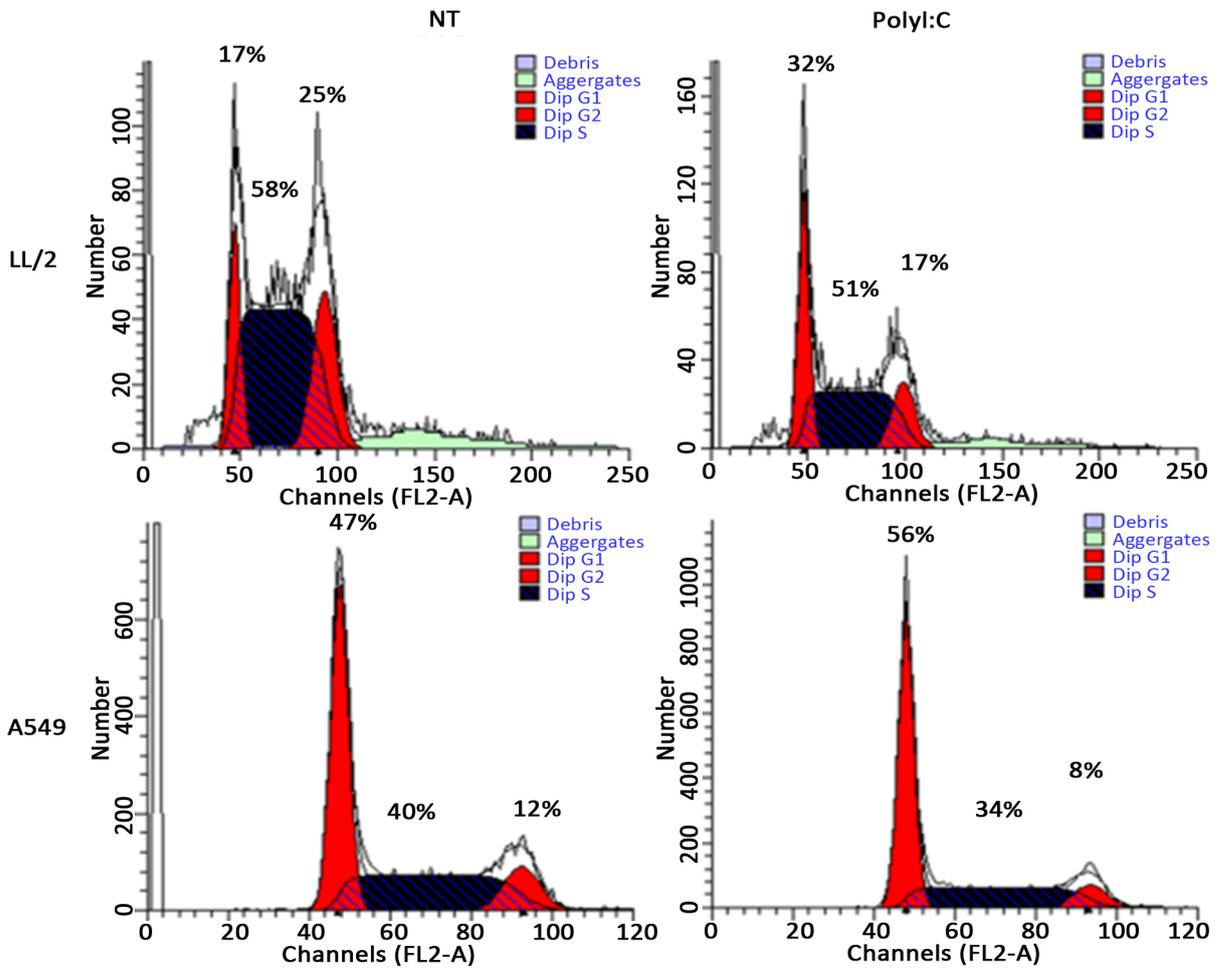


Figure 7. Influence of Cell cycle of LL/2 and A549 cells were analyzed by flow cytometry after 48 hours administrated with Pamica. Data are expressed as $\pm S$, $n = 3$

图 7. 用流式细胞仪分析帕米卡处理 LL/2 和 A549 细胞 48 小时后对细胞分裂周期的影响($\pm S$, $n = 3$)

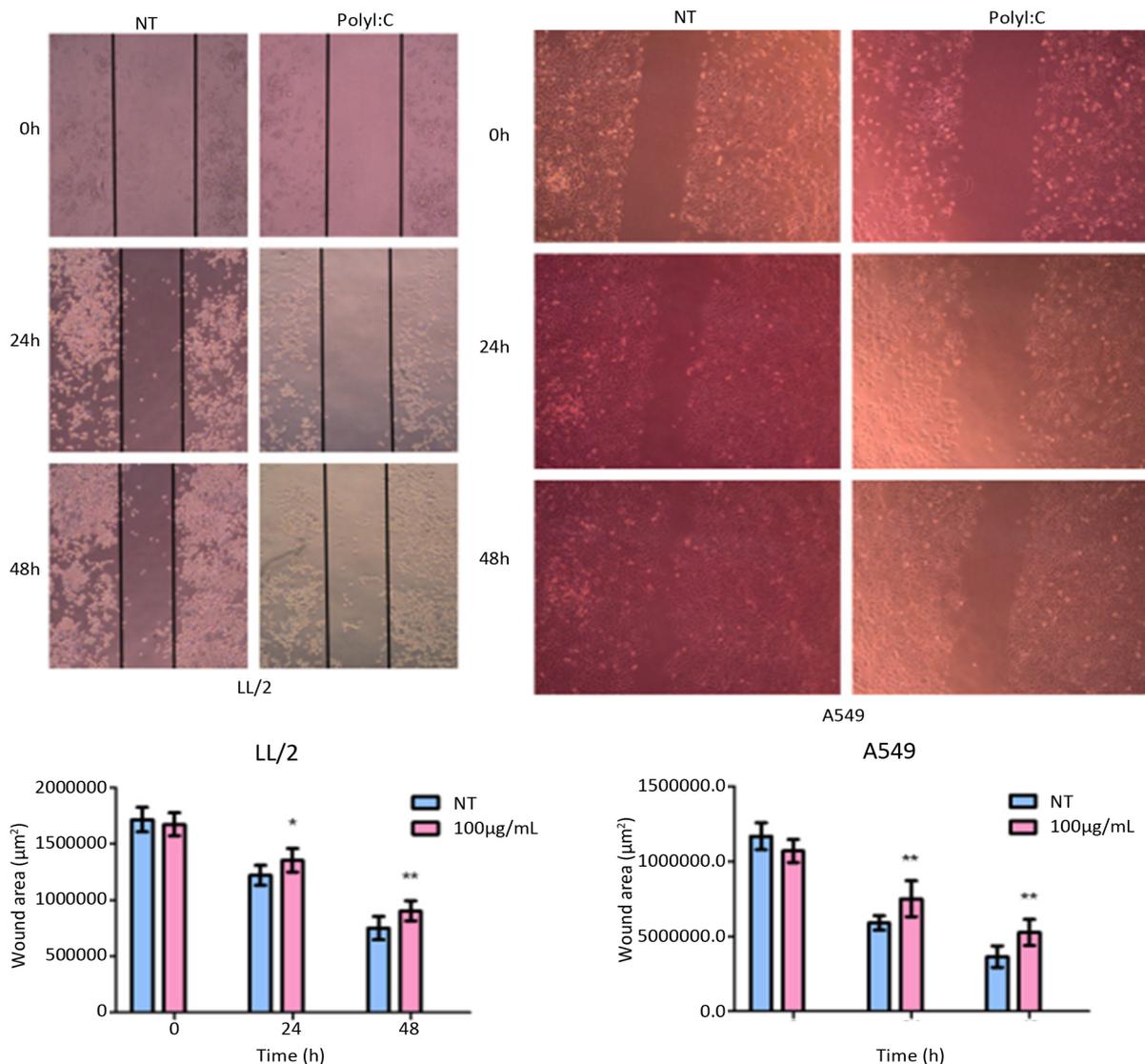
为了进一步观察帕米卡是如何影响细胞分裂周期，通过 PI 染色，用流式细胞仪分析，如图 7 所示，表明帕米卡处理 48 小时后 LL/2 细胞积聚在 G1 期，而在 S 和 G2 期显著降低，抑制总率 $32.01\% \pm 0.09\%$ ，对照组为 $17.11\% \pm 1.12\%$ $P < 0.001$ ；A549 细胞抑制总率 $55.16\% \pm 0.97\%$ ，对照组为 $46.52\% \pm 0.58\%$ $P < 0.001$ 。表明帕米卡极其显著地抑制了细胞在 G1 期继续分裂，引起细胞凋亡降低了细胞增殖。

3.6. 帕米卡对 LL/2 和 A549 细胞转移的影响

下述两项试验从细胞横向和竖向移动试验显示帕米卡抗肿瘤转移效果。文献报道肿瘤细胞在体外的移动和侵袭表明可引起肿瘤的转移[3]。

3.6.1. 细胞划痕伤口愈合试验

图 8 划痕试验表明 A549 对照组细胞几乎完全愈合，但 LL/2 细胞愈合不明显，表明 A549 细胞具有



Data are expressed as $\pm S$, $n = 3$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 8. Cell motility measured using wound healing assay after 48 hours administrated Pamica treated and non-treated cell wound area were compared (magnification: $\times 200$)

图 8. 帕米卡通过 48 小时比较对处理与未处理 LL/2 和 A549 细胞划痕域运动的作用(图片放大 200 倍)

较好的转移性质。帕米卡处理 LL/2 细胞 48 小时后,划痕域 LL/2 细胞从 $1,673,025 \mu\text{m}^2$ 减少至 $902,610 \mu\text{m}^2$, 对照组从 $1,714,904 \mu\text{m}^2$ 减少至 $749,944 \mu\text{m}^2$, 统计学测定帕米卡处理 24 小时 $P < 0.05$, 处理 48 小时 $P < 0.01$; 帕米卡处理 A549 细胞 48 小时后划痕域从 $1,067,701 \mu\text{m}^2$ 减少至 $525,084 \mu\text{m}^2$, 对照组从 $1,166,710 \mu\text{m}^2$ 减少至 $363,945 \mu\text{m}^2$, 帕米卡处理 A549 细胞 24 和 48 小时, 均 $P < 0.01$ 。表明帕米卡处理的细胞明显降低了细胞的移动。

3.6.2. 细胞迁移小室和细胞侵袭试验

这两项试验检测帕米卡抑制 LL/2 和 A549 细胞纵向移动的作用。图 9 的左边图表明上述细胞能跨过迁移小室膜, 移至小室膜外的作用, 在对照组细胞 100% 未移动下, 帕米卡抑制 LL/2 细胞跨膜移动作用是对照组的 $85.80\% \pm 3.31\%$; 帕米卡抑制 A549 人癌细胞跨膜移动作用是对照组的 $82.96\% \pm 1.27\%$, 统计学测定均 $P < 0.01$ 。

帕米卡抑制肿瘤细胞的侵袭试验即在细胞迁移小室底部加入基底膜胶观察细胞的侵袭能力。图 9 的右边图表明在对照组细胞 100% 未有侵袭作用下, 帕米卡降低 LL/2 细胞侵袭至对照组的 $58.09\% \pm 1.34\%$; 降低 A549 人癌细胞的侵袭至对照组的 $82.26\% \pm 2.24\%$, 统计学测定均 $P < 0.01$ 。

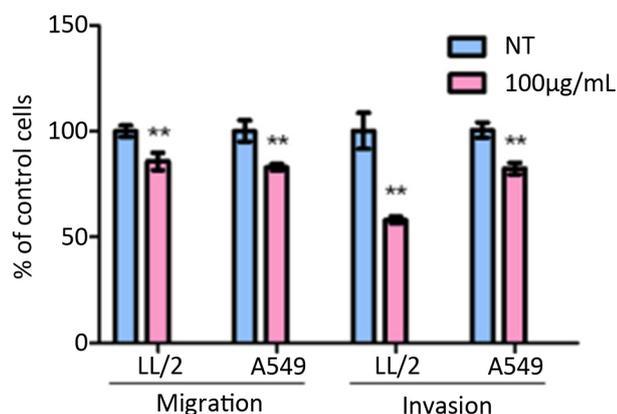


Figure 9. The influence of transwell migration and invasion of LL/2 and A549 cells treated with Pamica (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)
图 9. 帕米卡对 LL/2 和 A549 细胞移动和侵袭作用的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

4. 讨论

癌细胞具有不死性、迁移性和失去接触抑制性, 其细胞分裂周期失控不受正常生长调控系统的控制, 能持续地分裂与增殖, 尤其具有局部移动、浸润和远处转移能力是致人死地最重要的生物学特性。本篇研究揭示帕米卡极其显著有效地抗击肿瘤这些特性:

1) 帕米卡能显著抑制肿瘤细胞存活数及细胞总数: 通过 CCK8 试剂盒细胞活性检测表明帕米卡显著降低肿瘤细胞存活率, 通过单层细胞增殖用台酚蓝染色细胞计数也表明帕米卡显著抑制肿瘤细胞总数, 克服了肿瘤细胞无限增殖的问题。

2) 帕米卡对肿瘤细胞分裂周期的影响试验证明帕米卡能促进 LL/2 和 A549 细胞凋亡, 统计学测定 $P < 0.001$; 又进一步通过染色经流式细胞仪分析, 表明帕米卡能封闭 LL/2 和 A549 人细胞在 G1 期继续分裂, 统计学测定 $P < 0.001$, 表明帕米卡是封闭了肿瘤细胞在 G1 期继续分裂引起细胞凋亡, 抑制了细胞增殖。进一步揭示了帕米卡能够减少肿瘤细胞、缩小肿瘤体积和抑制了肿瘤细胞无限增殖的作用机理。

3) 帕米卡阻碍肿瘤细胞移动和侵袭试验是从肿瘤细胞横向和竖向移动和侵袭证实了帕米卡具有阻

碍肿瘤细胞移动、侵袭。文献报道肿瘤细胞在体外的移动和侵袭可引起体内肿瘤的转移[4]。在前篇荷瘤小白鼠试验中, 帕米卡体内阻止肿瘤转移效果优于传统化疗药紫杉醇和靶向药 PD-1 [2], 这一作用是十分重要的, 因为移动和侵袭而致转移是肿瘤细胞最重要特征, 90%肿瘤患者死亡是由于肿瘤转移造成的。

4) 试验证实帕米卡是 TLR3、4 受体的激动剂。本试验是通过激活 HEK-Blue hTLR3 和 HEK-Blue hTLR4 细胞 NF- κ B 和 A1 信号通路证实帕米卡是 TLR3、4 膜式识别受体的配体。由此, 不仅证实了帕米卡是 TLR3、4 受体的配体, 也证明了帕米卡与 TLR3、4 受体结合后激活了 NF- κ B 和 A1 (蛋白激酶-1, activator protein 1, AP-1)信号通路, 该通路在调节抗肿瘤抗感染的免疫应答中促进巨噬细胞、NK 细胞、T 细胞功能特别倾向诱导肿瘤细胞发生凋亡, 并诱导 IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、白细胞介素等细胞因子的分泌, 引起一系列促进非特异性免疫的效果。文献也报道 NF- κ B 和 A1 等的活化, 具有发挥抗病毒抗肿瘤作用[5] [6]。Bruce BA [7]和 Hoffmann JA [8]发现 TLRs 膜式识别受体可以与微生物基本成分结合活化非特异性免疫而获得 2011 年诺贝尔生理学 and 医学奖。该试验奠定了帕米卡作用机理的基础。

5) RT-qPCR 试验(实时荧光定量 PCR 技术)证实帕米卡上调 A549 人癌细胞和 LL/2 鼠癌细胞 TLR3 mRNA, 统计学测定 $P < 0.01 \sim 0.001$, 该结果显示的是帕米卡对 TLR3 的启动具有极其显著的基因敏感性, 这是帕米卡又一重要特性, 因为在治疗中需要机体对药物反应的高度敏感性才能达到治疗目的。另外, TLR3 广泛存在于上皮细胞和树突状细胞里, 还存在 NK、T、巨噬细胞中, 也在几种肿瘤细胞中表达, 有文献报道肿瘤细胞 TLRs 携带肿瘤抗原, 可唤起初次抗肿瘤免疫反应[9], 又通过去除肿瘤抗原防止形成炎症肿瘤环境[10]。结合上一条试验结果表明帕米卡在具有刺激机体细胞水平的免疫力效果基础上又进一步扩大了作为 TLR3 受体的敏感性, 则进一步说明了帕米卡抗肿瘤抗病毒的作用机理。

6) 本试验所使用的细胞包括 LL/2 鼠癌细胞、A549 人癌细胞包括转基因细胞 HEK-Blue hTLR3 细胞、HEK-Blue hTLR4 细胞, 再次证明帕米卡具有广谱抗肿瘤抗病毒效果。

2020.12.28 中国新闻网报道: 六国出现七种新冠变异病毒, 全人类或许到了最凶险的时候。提到只要疫情得不到控制, 全球将会变成巨大的病毒培养皿, 病毒不断变异, 不断有新的亚型诞生。笔者大胆提出不管病毒如何变异提高机体系统非特异性的免疫制剂也许就是当前治疗新冠病毒变异的一条出路。

帕米卡细胞生物学作用机理的研究确定了帕米卡是 TLR3、4 的配体, 确定了能激活 Nk-B 和 A1 信号传导通路、确定了具有激活 TLR3 受体的高度敏感性, 确定了促进肿瘤细胞的凋亡降低细胞数、确定了使肿瘤细胞在 G1 间期降低继续分裂、确定了减少肿瘤细胞移动和侵袭从而抑制了肿瘤细胞的转移。帕米卡在这抗肿瘤这些关键处都给予了肯定回答并具有极其显著的效果, 特别是这种效果是非特异的而具有重要的现实意义, 进一步增强了用非特异性免疫促进剂开启抗病毒抗肿瘤治疗性革命大门的信心和希望。

参考文献

- [1] 林海祥, 刘芳, 孙晓林. 用非特异性免疫促进剂开启抗病毒抗肿瘤治疗革命大门——帕米卡帕米卡[®]制剂抗病毒抗肿瘤作用及展望[J]. 自然科学, 2020, 8(5): 435-441.
- [2] 林海祥, 刘芳, 陈丽青, 孙晓林. 用非特异性免疫促进剂开启抗病毒抗肿瘤治疗革命大门——帕米卡[®]对几种荷瘤小白鼠的效果观察[J]. 世界肿瘤研究, 2020, 10(4): 65-77.
- [3] Wu, Y.D., Huang, W., Chen, L.Q., *et al.* (2019) Anti-Tumor Outcome Evaluation Against Non-Small Cell Lung Cancer *in vitro* and *in vivo* Using PolyI:C as Nucleic Acid Therapeutic Agent. *American Journal of Translational Research*, **11**, 1919-1937.
- [4] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- [5] Ridnour, L.A., Cheng, R.Y., Switzer, C.H., *et al.* (2013) Molecular Pathways: Toll-Like Receptors in the Tumor Microenvironment—Poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity. *Clinical Cancer Research*, **19**, 1340-1346.

-
- <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0408>
- [6] 张树政, 金城, 杜昱光. 糖生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012.
- [7] Hoffmann, J.A. (1995) Innate Immunity of Insects. *Current Opinion in Immunology*, **7**, 4-10. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80022-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80022-0)
- [8] Steunman, R.M. and Cohn, Z.A. (1973) Identification of Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *Journal of Experimental Medicine*, **137**, 1142-1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- [9] Ito, T., Amakawa, R., Fukuhara, S., *et al.* (2002) Roles of Toll-like Receptors in Natural Interferon-Producing Cells as Sensors in Immune Surveillance. *Human Immunology*, **63**, 1120-1125. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(02\)00750-4](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(02)00750-4)
- [10] Pisetsky, D.S., Gauley, J. and Ullal, A.J. (2011) HMGB1 and Microparticles as Mediators of the Immune Response to Cell Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, **15**, 2209-2219. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3865>