

山麦冬皂苷 B 调节 DAMPs 释放诱导免疫源性细胞死亡的抗肿瘤机制研究

臧海洋¹, 杨君伶², 陈秋峰¹, 曹培¹, 杨晓慧¹

(1. 南通市中医院, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学附属医院, 江苏 南通 226001)

摘要:目的 探讨 Spicatoside B 对肺癌细胞的增殖、凋亡和 DAMPs 释放的影响, 并明确凋亡与 DAMPs 释放之间的关系。方法 将不同浓度的 SP-B 作用于 A549 和 H1299 细胞株 24 h, CCK8 检测细胞增殖活性; 根据 CCK8 结果, 选取药物浓度, 干预细胞 24 h, 流式细胞仪检测细胞凋亡; ATP 试剂盒检测 ATP 细胞外分泌; 流式细胞仪检测 CRT 表达; ELISA 检测 HMGB1、HSP70、HSP90 的细胞外分泌; 凋亡抑制剂抑制凋亡后, 再次检测 CRT、ATP、HMGB1 和 HSP70/90 的表达。结果 SP-B 显著抑制 A549 和 H1299 细胞的增殖活性, IC_{50} 值分别为 73.11 μ M 和 51.461 μ M; 选取 40 μ M 浓度干预细胞, 可显著促进凋亡; 药物作用后显著提高了 CRT 的阳性比率, 增加了 ATP、HMGB1、HSP70、HSP90 的细胞外释放。抑制凋亡后, CRT、ATP、HMGB1 和 HSP70/90 的表达随之减少。结论 Spicatoside B 可抑制增殖, 促凋亡, 并显著促进 DAMPs 的释放, 诱导免疫源性细胞死亡, 其中凋亡对 DAMPs 的释放发挥着重要作用。

关键词:肺癌; Spicatoside B; 凋亡; DAMPs; ICD

中图分类号: R256.13 文献标志码: A 文章编号: 1000-1719(2024)11-0150-04

Antitumor Effect of Spicatoside B Based on Regulating DAMPs Release to Induce Immunogenic Cell Death

ZANG Haiyang¹, YANG Junling², CHEN Qiufeng¹, CAO Pei¹, YANG Xiaohui¹

(1. Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, Jiangsu, China;

2. Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Spicatoside B on the proliferation, apoptosis and DAMPs release of lung cancer cells and to clarify the relationship between apoptosis and DAMPs release. **Methods** Different concentrations of SP-B were applied to A549 and H1299 cell lines for 24 hours, and the cell proliferation activity was detected by CCK8. According to the results of CCK8, the drug concentration was selected, the cells were intervened for 24 hours, and the cell apoptosis was detected by flow cytometry. ATP extracellular secretion was detected by ATP kit. CRT expression was detected by flow cytometry. The extracellular release of HMGB1, HSP70 and HSP90 was detected by ELISA. After the apoptosis was inhibited, the expressions of CRT, ATP, HMGB1 and HSP70/90 were detected again. **Results** SP-B significantly inhibited the proliferation activity of A549 and H1299 cells and the IC_{50} values were 73.11 μ M and 51.461 μ M; 40 μ M concentration of the drug can significantly promote the apoptosis, significantly increased the positive ratio of CRT and increased the extracellular release of ATP, HMGB1, HSP70 and HSP90. After inhibiting the apoptosis, the expressions of CRT, ATP, HMGB1 and HSP70/90 were decreased. **Conclusion** Spicatoside B can inhibit the proliferation, promote the apoptosis and significantly promote the release of DAMPs to induce immunogenic cell death. Apoptosis plays an important role in the release of DAMPs.

Keywords: lung cancer; Spicatoside B; apoptosis; DAMPs; ICD

免疫源性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD) 是在细胞死亡的同时, 垂死细胞主动释放损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs)^[1-2], 使其暴露于免疫系统, 激活抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) 对肿瘤相关抗原重新

识别, 最终激活宿主特异性抗肿瘤免疫, 发挥直接杀伤肿瘤细胞和激活免疫进一步杀伤肿瘤的双重作用^[3-4], 是肿瘤治疗的新策略^[5]。其中, DAMPs 的释放是 ICD 的重要条件。

中医药治疗肿瘤主张“扶正与祛邪并举”, 许多补

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目 (82004279); 南通市第六期江海英才培养项目 (通委人才办〔2022〕12 号); 南通市青年医学重点人才项目 (通卫科教〔2021〕15 号)

作者简介:臧海洋 (1979-), 男, 山西大同人, 副主任中医师, 硕士, 研究方向: 经方理论及临床研究。

通讯作者:杨晓慧 (1981-), 女, 河南平顶山人, 副主任中医师, 博士, 研究方向: 中医药防治恶性肿瘤研究, E-mail: 1312221115@163.com。

益的中药成分也同时具有细胞毒作用和免疫增强作用^[6]。麦冬为养阴润肺之上品,在肺癌的治疗中,一直占有重要地位,其主要成分被广泛研究,如麦冬皂苷 B (Ophiopogonin B)。而同为麦冬一种的山麦冬的主要成分山麦冬皂苷 B (Spicatoside B) 的抗肿瘤作用却较少报道。本研究发现,Spicatoside B (SP-B) 有良好的抗肿瘤增殖和促凋亡作用,并可显著促进肺癌细胞 DAMPs 的释放,可诱导免疫原性细胞死亡,其中凋亡对 DAMPs 的释放发挥着重要作用。

1 材料

1.1 细胞株

A549 和 H1299 细胞株均购自中国科学院上海细胞库。用含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养基培养于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中。当细胞密度达到 80% 时,换含 Spicatoside B (40 μM) 或 (和) Z-VAD-FMK (50 μM) 的完全培养基,继续培养 24 h 后备用。

1.2 药物与试剂

Spicatoside B (E-1198), CAS 号 87425-34-1, 购自同田生物公司, Z-VAD-FMK (#S7023), 购自 Selleck 公司, 均用 DMSO 溶解配制成 20mM 母液, 4 °C 存放备用。CCK8 试剂购自碧云天生物公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (A211-01) 购自诺唯赞生物公司; Alexa Fluor 488-Calreticulin (#ab196158), 购自 abcom 公司, 人 HMGB-1 ELISA KIT (#ARG81351) 购自 Arigo; ATP 检测试剂盒 (#S0026) 购自碧云天生物公司; 人 HSP70 ELISA Kit (ADI-EKS-700B)、人 HSP90 ELISA Kit (ADI-EKS-895) 购自 ENZO 公司。

1.3 主要仪器

细胞培养箱 (美国 thermo electron corporation 公司), 流式检测仪 (美国 BECKMAN COULTER), 多功能酶标仪 (上海百基生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 CCK8

取对数生长期的细胞, 常规消化、计数, 500 个细胞/孔铺 96 孔板, 次日换含有不同浓度 Spicatoside B 的完全培养基继续培养 24 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK8 溶液, 培养箱中继续放置 3 h 后酶标仪测 450 nm 处细胞吸光度值。Spicatoside B 药物浓度设为 0 μM、20 μM、40 μM、60 μM、80 μM、100 μM, 另设空白对照组, 每组设 5 个复孔, 周围每孔滴加 100 μL PBS, 实验重复 3 次, SPSS 统计 3 次实验结果。

2.2 凋亡检测

采用 Annexin V-FITC/PI 双染法, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 收取细胞沉淀, 预冷的 PBS 清洗并重悬、计数, 取 1×10^5 个细胞 (100 μL) 入流式管, 加入含有 2.5 μL Annexin-V 试剂的 Binding Buffer 混合液 50 μL, 混匀, 避光静置 10 ~ 15 min, 加入含有 5 μL PI 试剂的 Binding Buffer 混合液 250 μL, 混匀, 避光静置 5 min, 流式细胞仪检测凋亡情况。

2.3 CRT 检测

用不含 EDTA 的胰酶消化收集待测细胞, 用预冷

的 PBS 洗涤 2 次, 然后将其用含有 Alexa Fluor 488 荧光 Anti-Calreticulin 抗体的 100 μL FACS 缓冲液 4 °C 避光孵育 1 h, CRT 抗体以 1:100 稀释, 通过流式细胞仪分析 CRT 阳性细胞比例。

2.4 ATP 检测

按 ATP 检测试剂盒说明配制工作液, 收集待测样本细胞上清液, 4 °C 3000 r/min 离心 5 min 除去垂死的漂浮细胞。将 100 μL 工作液加入到 96 孔板 (黑板) 中, 室温放置 5 min; 之后加入待测细胞上清液, 100 μL/孔, 混匀, 同时检测标准品, 绘制标准曲线, 使用多功能酶标记仪检测生物发光, 根据标准曲线, 获得上清液的 ATP 浓度。

2.5 HMGB1 检测

按 HMGB1 ELISA 试剂盒说明操作, 收集待测样本细胞上清液, 离心除去垂死的漂浮细胞。将 50 μL 细胞上清液加入检测板孔中, 继续加入 50 μL Assay buffer, 4 °C 孵育 16 h; 之后吸出每孔液体, 专用清洗液清洗 3 次, 末次纸巾吸干, 加入 100 μL 的 HRP-抗体结合物, 37 °C 孵育 1 h, 再次清洗 3 次后加入 100 μL TMB 底物, 室温避光孵育 10 min, 最后, 加入 50 μL 终止液, 混匀后上机检测 450 处的吸光度值, 同时检测标准品, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算 HMGB1 值。

2.6 HSP70/90 检测

按照 HSP70/90 ELISA 检测试剂盒说明, 收集待测样本细胞上清液, 离心除去垂死的漂浮细胞, 同时按试剂盒说明准备标准品。将 100 μL 的每个标准品和样品添加到适当的孔中孵育 1 h。洗涤后加入相应的检测抗体 100 μL, 孵育后洗涤, 加入偶联抗体 100 μL, 再次孵育后洗涤, 之后依次加入 100 μL 的 TMB 底物溶液, 孵育后加入 100 μL 终止液, 上机检测 450 处的吸光度值, 根据标准品测得值绘制标准曲线, 计算检测样本含量。

2.7 统计分析

以 Graphpad Prism 5.0 和 SPSS 21.0 软件作图和统计分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, 以 $P < 0.01$ 表示差异有显著的统计学意义。

3 结果

3.1 Spicatoside B 抑制肺癌细胞增殖

首先我们采用 CCK8 检测 SP-B 对 A549 和 H1299 细胞的增殖抑制作用。结果显示, 20 μM 的 SP-B 对两种细胞株均显示了明显的抑制增殖作用, 细胞活性分别为 $(87.48 \pm 1.18)\%$ ($P = 0.001$), 和 $(86.05 \pm 0.82)\%$ ($P = 0.000$), 随着药物浓度的增加, 细胞活性随之下降, 当 60 μM 时, A549 的细胞活性下降至 $69.94 \pm 2.66\%$, H1299 活性下降至 $(41.51 \pm 0.42)\%$, 当 100 μM 浓度时, 两种细胞株的活性降至 $(28.98 \pm 7.29)\%$ 和 $(13.54 \pm 1.86)\%$, IC₅₀ 值分别为 73.11 μM 和 51.461 μM (图 1)。整体而言, SP-B 对 H1299 的抑制作用较 A549 更强。由此, 选择后续的药物浓度为 40 μM。

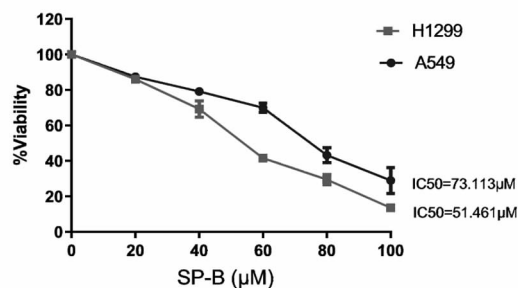


图 1 CCK8 检测 SP-B 对细胞增殖活性的影响

3.2 Spicatoside B 诱导肺癌细胞凋亡

根据 CCK8 实验结果,选取 40 μM 药物浓度作用于 A549 和 H1299 细胞,药物作用 24 h 后,收取细胞,Annexin V-FITC/PI 双染标记,流式细胞仪检测,结果提示 SP-B 可明显促进两种细胞株的凋亡。对 A549 细胞,药物作用后总凋亡率为 $(26.1 \pm 2.88)\%$,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P=0.001$),其中以晚调为主,晚调率为 $(17.17 \pm 4.46)\%$, $P=0.01$ 。对 H1299 的促凋亡作用则更加强劲,总调率为 $(32.27 \pm 2.15)\%$, $P=0.000$,其中早调率、晚调率与对照组相比均差异有统计学意义,凋亡率分别为 $(18.53 \pm 7.34)\%$ 和 $(13.73 \pm 5.67)\%$ 。具体见插页 II 图 2。

3.3 Spicatoside B 诱导 DAMPs 释放

ICD 依赖于 DAMPs 的释放,DAMPs 包括三磷酸腺苷(ATP)的细胞外分泌、钙网蛋白(calreticulin,CRT)从内质网到细胞表面的移位^[7]、高迁移率基团 B1(high motility group box-1 protein, HMGB1)从细胞核的释放^[8]和细胞表面的热休克 70/90 蛋白(heat shock proteins, HSP70/90)的表达^[9]。这些 DAMPs 作为激活剂,与先天免疫细胞表面受体相互作用,刺激 APC 抗原呈递,最终触发 T 细胞对癌症特异性抗原的免疫应答^[1]。

3.3.1 SP-B 作用 24 h 后 我们用 SP-B 干预肺癌 A549 和 H1299 细胞 24 h 后,取上清液,检测 ATP 的释放,发现细胞上清液中的 ATP 表达明显升高,A549 细胞中,从对照组的 (13.01 ± 0.94) nM 升高至 (40.18 ± 5.63) nM, H1299 细胞中,对照组为 (14.47 ± 1.48) nM,药物作用后升至 (48.39 ± 5.62) nM,差异均有显著性 ($P=0.001$)。见插页 II 图 3。

3.3.2 SP-B 对细胞 CRP 的影响 Spicatoside B 干预细胞 24 h 后,流式细胞仪检测 CRT 表达,发现 SP-B 可以将 A549 细胞 CRT 阳性率从 $(4.44 \pm 0.78)\%$ 提高至 $(27.27 \pm 1.46)\%$;将 H1299 细胞的 CRP 阳性率从对照组的 $(8.47 \pm 3.07)\%$ 提高至 $(28.11 \pm 3.23)\%$ 。差异均具有统计学意义 ($P=0.000$)。见插页 II 图 4。

3.3.3 SP-B 作用后 HMGB1、HSP70、HSP90 的释放

同样,经 40 μM 的 Spicatoside B 作用 24 h 后,ELISA 检测 A549、H1299 细胞上清中的 HMGB1 和 HSP70/90 释放,发现,SP-B 同样可显著提高三者的表达。SP-B 作用后,A549 和 H1299 细胞上清中的 HMGB1 分别从 (0.48 ± 0.16) ng/mL 和 (0.33 ± 0.15) ng/mL 升高至 (1.56 ± 0.53) ng/mL 和 (1.96 ± 0.22) ng/mL。HSP70 从 (1.24 ± 0.41) ng/mL 和 (1.691 ± 0.84) ng/mL 升

高至 (10.719 ± 2.2) ng/mL 和 (11.844 ± 2.17) ng/mL; HSP90 从 (83.425 ± 13.76) pg/mL 和 (70.022 ± 9.05) pg/mL 升至 (142.398 ± 24.14) pg/mL 和 (177.692 ± 19.43) pg/mL。差异均有统计学意义。具体见插页 III 图 5。

3.4 抑制凋亡逆转了 Spicatoside B 诱导的 DAMPs 释放

通过一系列检测后,我们确定了 SP-B 可抑制细胞增殖并促进凋亡,同时增加 DAMPs 的释放,诱导 ICD。既往研究发现,细胞的凋亡性质可能对 ICD 的诱导有重要作用^[10],在 SP-B 诱导的 DAMPs 释放中,凋亡是否起到关键作用?为此,我们抑制凋亡后,再次检测 DAMPs 的表达,发现抑制凋亡可以逆转 SP-B 诱导的 DAMPs 释放。

3.4.1 用 Z-VAD-FMK 抑制 SP-B 诱导的凋亡后

流式细胞仪检测凋亡变化。与单纯 SP-B 组比较,抑制剂组细胞凋亡率明显降低。A549 的总凋亡率从 $(24.43 \pm 2.4)\%$ 降至 $(11.53 \pm 1.37)\%$, H1299 的总凋亡率由 $(35.83 \pm 1.97)\%$ 降至 $(19.57 \pm 1.72)\%$,差异均具有统计学意义 ($P=0.000$)。见插页 III 图 6。

3.4.2 抑制凋亡后 再次检测细胞外 ATP 的释放,

结果提示,随着凋亡的成功抑制,A549 和 H1299 细胞株的 ATP 细胞外释放随之减少,分别由 (52.82 ± 6.73) nM 和 (53.86 ± 7.64) nM 降至 (32.24 ± 3.08) nM 和 (33.77 ± 3.22) nM,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见插页 III 图 7。

3.4.3 抑制凋亡后 流式细胞仪检测两种细胞株

CRT 的表达,发现 A549 细胞中 CRT 表达阳性细胞从单纯 SP-B 组的 $(28.85 \pm 3.16)\%$ 变为 $(17.36 \pm 1.34)\%$, H1299 细胞株从 $(33.59 \pm 9.52)\%$ 变为 $(13.35 \pm 1.76)\%$,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),提示凋亡的抑制减少了 CRT 的表达。具体见插页 IV 图 8。

3.4.4 抑制凋亡后 再次检测 HMGB1 和 HSP70、

HSP90 的表达变化。结果提示,抑制凋亡同样对 SP-B 诱导的三者的释放有逆转作用。A549 和 H1299 细胞株的 HMGB1 的含量分别从单纯 SP-B 组的 (1.55 ± 0.226) ng/mL 和 (1.716 ± 0.218) ng/mL 降至 (0.911 ± 0.195) ng/mL 和 (1.017 ± 0.251) ng/mL。HSP70 含量分别从 (11.641 ± 2.194) ng/mL 和 (13.126 ± 1.316) ng/mL 降至 (7.051 ± 1.356) ng/mL 和 (8.851 ± 1.051) ng/mL; HSP90 分别从 (128.245 ± 31.143) pg/mL 和 (151.534 ± 30.751) pg/mL 降至 (71.888 ± 7.853) pg/mL 和 (85.861 ± 6.492) pg/mL,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见插页 IV 图 9。

4 讨论

麦冬滋阴润肺,是肺癌治疗的重要药物,其主要成分之一的 Ophiopogonin B 已被大量研究,而本研究中 Spicatoside B 是山麦冬的主要成分,对其抗肿瘤作用的报道较少。本研究发现,SP-B 可显著抑制细胞增殖,并促进凋亡。当 20 μM 浓度时,即显著抑制 A549 和 H1299 两种肺癌细胞株的增殖活性,100 μM 浓度时细胞活性最低降至 $(13.54 \pm 1.86)\%$,其 IC_{50} 值分别为 73.11 μM 和 51.461 μM,显示出了强大的抑制增殖

活性。当 40 μM 浓度作用于 A549 和 H1299 细胞株时,可显著诱导凋亡,总凋亡率达 $(26.1 \pm 2.88)\%$ 和 $(32.27 \pm 2.15)\%$ 。SP-B 显著抑制肺癌细胞增殖并诱导凋亡,显现出显著的抗肿瘤作用。

ICD 是垂死细胞释放 DAMPs,使其暴露于免疫系统,从而激活宿主特异性抗肿瘤免疫,发挥直接杀伤肿瘤细胞和激活免疫进一步杀伤细胞的双重作用^[3-4]; ICD 依赖于 DAMPs 的释放,DAMPs 中 ATP 的细胞外分泌,被认为是“发现我”的信号,充当 DC 的化学引诱物前体^[11],是 ICD 的重要条件。本研究中,SP-B 作用于肺癌细胞后,细胞外液 ATP 含量明显升高,与对照组比较,差异均具有统计学意义。CRT 被认为是提供“吃我”的信号来促进 DC 的吞噬作用^[12-13],从而活化特异性免疫应答,是 ICD 的另一个重要条件。我们的实验发现,SP-B 可显著诱导 CRT 的表达,流式检测两种细胞株中 CRT 阳性细胞率由药物作用前的 $(4.44 \pm 0.78)\%$ 、 $(8.47 \pm 3.07)\%$ 提高至作用后的 $(27.27 \pm 1.46)\%$ 、 $(28.11 \pm 3.23)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。另外,高迁移率族 B1 (HMGB1) 蛋白由细胞核经细胞质释放到细胞外后,可结合免疫细胞上的多个表面受体^[14],HSP70/90 可与肿瘤特异性抗原肽形成 HSP-肽复合物,将肿瘤抗原呈递给 DC 表面的 MHC-I 分子,诱导肿瘤特异性免疫应答^[15],三者均发挥重要的促炎性介质的作用,是 DAMPs 的重要部分。实验证实 SP-B 作用后,明显增高了 HMGB1 和 HSP70/90 的细胞外分泌,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些结果提示 SP-B 可有效诱导 DAMPs 的释放。

ICD 中 DAMPs 的释放与凋亡和自噬密切相关。研究发现 DAMPs 中 CRP 和 HMGB1 的释放需要凋亡过程,CRP 的暴露依赖于 ER 途径的凋亡^[16],主要发生在细胞凋亡的前一阶段;而 HMGB1 从细胞核中释放出来,转移到细胞外则发生在细胞凋亡的后期^[17]。同时有研究认为自噬是诱导 ICD 的必要条件^[18],影响多种 DAMPs 的释放,认为 ATP 的细胞外分泌是自噬依赖性的,是通过自噬小体形成及之后的溶酶体和质膜的融合最终通过胞吐作用释放到细胞外。此外,CRP 的细胞膜移位和 HMGB1 的释放也需自噬参与^[19];因此,为明确 SP-B 诱导的 DAMPs 释放与凋亡的关系,抑制凋亡后再次检测各项 DAMPs 的表达,发现抑制凋亡可显著逆转其诱导的各项 DAMPs 的释放,CRT 阳性率由 $(28.85 \pm 3.16)\%$ 和 $(33.59 \pm 9.52)\%$ 降至 $(17.36 \pm 1.34)\%$ 和 $(13.35 \pm 1.76)\%$,HMGB1 的细胞外浓度由 $(1.55 \pm 0.226)\text{ng/mL}$ 和 $(1.716 \pm 0.218)\text{ng/mL}$ 降至 $(0.911 \pm 0.195)\text{ng/mL}$ 和 $(1.017 \pm 0.251)\text{ng/mL}$ 。差异有统计学意义 ($P < 0.01$);除 CRT 和 HMGB1 外,ATP 和 HSP70/90 的细胞外分泌也随着凋亡的抑制被显著逆转,提示 SP-B 诱导的 DAMPs 释放中,凋亡发挥着关键作用。

免疫源性细胞死亡在细胞死亡的同时触发免疫反应,发挥两种不同模式的抗肿瘤作用,是肿瘤治疗的新策略。本研究发现,SP-B 可有效抑制增殖、促进凋亡并诱导 DAMPs 释放,触发 ICD,其中凋亡发挥着关键作用,具有潜在的研究价值,值得进一步的深入研究。

参考文献

- [1] L GALLUZZI, A BUQUÉ, O KEPP, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17: 97-111.
- [2] G KROEMER, L GALLUZZI, O KEPP, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 51-72.
- [3] Z ASADZADEH, E SAFARZADEH, S SAFAEI, et al. Current Approaches for Combination Therapy of Cancer: The Role of Immunogenic Cell Death [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 1047.
- [4] D V KRYSKO, A D GARG, A KACZMAREK, et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 860-875.
- [5] J ZHOU, G WANG, Y CHEN, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 4854-4865.
- [6] MENG YAO SUN, YING YE, LING XIAO, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg3 (Review) [J]. *Int J Mol Med* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28098857/>. 2017, 39(3): 507-518.
- [7] M OBEID, A TESNIERE, F GHIRINGHELLI, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 54-61.
- [8] L APETO, F GHIRINGHELLI, A TESNIERE, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 1050-1059.
- [9] D MASSÉ, F EBSTEIN, G BOUGRAS, et al. Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy [J]. *Int J Cancer*, 2004, 111: 575-583.
- [10] A D GARG, P AGOSTINIS, Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses [J]. *Immunol Rev*, 2017, 280(1): 126-148.
- [11] M MICHAUD, I MARTINS, A Q SUKKURWALA, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice [J]. *Science*, 2011, 334: 1573-1577.
- [12] J BANCHEREAU, R M STEINMAN. Dendritic cells and the control of immunity [J]. *Nature*, 1998, 392: 245-252.
- [13] X SHAO, X WANG, X GUO, et al. STAT3 Contributes To Oncolytic Newcastle Disease Virus-Induced Immunogenic Cell Death in Melanoma Cells [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 436.
- [14] J M PITT, G KROEMER, L ZITVOGEL. Immunogenic and Non-immunogenic Cell Death in the Tumor Microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1036: 65-79.
- [15] T G SANTOS, V R MARTINS, G N M HAJJ. Unconventional Secretion of Heat Shock Proteins in Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 946.
- [16] K PRIETO, Y CAO, E MOHAMED, et al. Polyphenol-rich extract induces apoptosis with immunogenic markers in melanoma cells through the ER stress-associated kinase PERK1 [J]. *Cell Death Discov*, 2019, 5: 134.
- [17] L MENDER, E VACCHELLI, S ADJEMIAN, et al. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(143): 143ra199.
- [18] I MARTINS, Y WANG, M MICHAUD, et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(1): 79-91.
- [19] T YE, K JIANG, L WEI, et al. Oncolytic Newcastle disease virus induces autophagy-dependent immunogenic cell death in lung cancer cells [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(8): 1514-1527.