

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0562-05

肺癌细胞致敏树突状细胞疫苗的体内外抗肿瘤作用

傅永强¹, 张在云^{2*}, 柳月安³, 李旭升⁴(1. 金华职业技术学院医学院内科, 浙江金华 321017; 2. 山东大学附属第二医院肿瘤科, 济南 250033; 3. 山东省肿瘤医院药剂科, 济南 250117; 4. 金华职业技术医学院基础医学部, 浙江金华 321017)

[摘要] 目的: 研究以 NCI-H460 肺癌细胞致敏的树突状细胞(Dendritic cells, DCs)疫苗的抗肿瘤作用。方法: 将 IL-18 基因转染的 NCI-H460 细胞及未转染 NCI-H460 细胞与 DC 融合作为转染融合 DC 组及融合 DC 组疫苗, 以 NCI-H460 细胞 RNA 冲击的 DC 为冲击 DC 组疫苗, 以未冲击的 DC 为 DC 组疫苗。以 MTT 法检测 4 组 DC 疫苗刺激 T 细胞增殖的作用, 用 ELISA 法测定 DC 疫苗上清液中 IL-12 的含量, 用 LDH 法测定 DC 疫苗对 NCI-H460 细胞的杀伤作用。裸鼠皮下接种 NCI-H460 细胞及 DC 疫苗, 观察成瘤时间及裸鼠存活情况; 荷瘤裸鼠瘤内注射 DC 疫苗, 比较肿瘤体积。结果: 4 组 DC 疫苗均能刺激 T 细胞增殖, 刺激作用强度为转染融合 DC 组 > 融合 DC 组 > 冲击 DC 组 > DC 组; 4 组均能分泌 IL-12, 转染融合 DC 组 IL-12 的分泌量高于融合 DC 组, 冲击 DC 组高于 DC 组; 转染融合、融合、冲击 DC 和 DC 组疫苗对 NCI-H460 细胞的杀伤率分别为 79.73%、50.68%、35.81% 及 4.05%。转染融合组裸鼠移植瘤成瘤时间[(12.82 ± 2.85)d]长于冲击 DC 组[(8.52 ± 1.97)d] ($P < 0.05$)和 DC 组[(8.33 ± 1.63)d] ($P < 0.01$); 移植瘤内注射疫苗后的肿瘤体积比较, 转染融合组 < 融合组 < 冲击 DC 组 < DC 组。结论: 以 NCI-H460 肺癌细胞致敏的 DC 疫苗在体外及裸鼠体内均显示了抗肿瘤作用, 转染融合 DC 疫苗抗肿瘤作用最强, 融合和 RNA 冲击 DC 疫苗次之, 单纯 DC 疫苗作用最弱。

[关键词] 树突状细胞; 疫苗; 肺癌细胞; 细胞融合; 白细胞介素-18

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

In vitro and *in vivo* anti-tumor effects of dendritic cell vaccines sensitized by NCI-H460 lung cancer cell line

FU Yong-qiang¹, ZHANG Zai-yun^{2*}, LIU Yue-an³, LI Xu-sheng⁴(1. Department of Internal Medicine, Medical College, Jinhua Vocational and Technical University, Jinhua 321017, China; 2. Department of Oncology, The Second Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250033, China; 3. Department of Pharmacy, Tumor Hospital of Shandong Province, Jinan 250117, China; 4. Basic Medical College, Jinhua Vocational and Technical University, Jinhua 321017, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effects of dendritic cell(DC) vaccines sensitized by NCI-H460 lung cancer cell lines. **Methods:** The study consisted of 4 groups: IL-18/fusion group, fusion group, pulsed DC group and DC group. IL-18 gene transfected or non-transfected NCI-H460 cells were fused with DC and the fused cells served as DC vaccines for IL-18/fusion group and fusion group, respectively. DC pulsed with RNA of NCI-H460 cells were used for pulsed DC group and non-pulsed DC for DC group. T cell proliferation after stimulation with 4 vaccines was tested. IL-12 levels in the supernatants of DC vaccines were measured with ELISA. LDH method was used to evaluate the *in vitro* anti-tumor effect of DC vaccines. NCI-H460 cancer cells and DC vaccines were subcutaneously injected to nude mice; the tumor growth and survival of nude mice were observed. Tumor-loaded nude mice were inoculated with DC vaccines and tumor sizes of the 4 groups were compared. **Results:** The T cell proliferation activity of the 4 groups was: IL-18/fusion group > fusion group > pulsed DC group > DC group. IL-12 secretion in IL-18/fusion group was higher than that in the fusion group, and IL-12 in the pulsed DC group was higher than that in the DC group. The *in vitro* killing rates of the 4 groups were 79.73%, 50.68%, 35.81% and 4.05%, respectively. Tumor forming time in IL-18/fusion group([12.82 ± 2.85]d) was longer than those in the pulsed DC group ([8.52 ± 1.97]d, $P < 0.05$) and DC group([8.33 ± 1.63]d, $P < 0.01$).

[基金项目] 金华市科技创新重点项目(No. 2004-2-302); Supported by the Science and Technology Innovation Program of Jinhua (No. 2004-2-302)

[作者简介] 傅永强(1960-), 男, 浙江浦江人, 副教授, 主要从事肿瘤防治的临床和基础研究

* Corresponding author. E-mail: hizzy@sina.com.cn

The tumor sizes of the 4 groups were: IL-18/fusion group < fusion group < pulsed DC group < DC group. **Conclusion:** DC vaccines sensitized by NCI-H460 lung cancer cell line have anti-tumor effects. Among the 4 vaccines, IL-18/fusion group have the most powerful anti-tumor activity, followed by fusion group. The anti-tumor activity of DC group is the weakest one.

[**Key words**] dendritic cells; vaccine; lung neoplasms; cell fusion; interleukin-18

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 562-566]

肺癌的发病率及病死率高,且其发病率仍在不断上升,多数患者诊断时即为晚期^[1]。传统的治疗方法如手术、放疗及化疗,创伤及毒性作用大,治疗效果不理想,亟待需要探索新的治疗方法。树突状细胞(Dendritic cells, DCs)是功能强大的抗原提呈细胞,是机体免疫的关键细胞^[2]。DC肿瘤疫苗借助DC的免疫刺激功能和肿瘤的抗原信号,激发机体的抗肿瘤免疫,是肿瘤免疫治疗的重要研究方向^[3]。DC肿瘤疫苗构建方法包括:DC体外扩增后回输、肿瘤细胞抗原或RNA冲击DC、肿瘤抗原基因修饰DC、细胞因子基因转染DC、肿瘤细胞与DC融合等^[4-7]。本研究比较了IL-18基因转染的肺癌细胞与DC融合、未转染的肺癌细胞与DC融合、肺癌细胞RNA冲击的DC及未冲击DC等4种疫苗体外及裸鼠体内诱导的抗肿瘤作用。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂

RPMI 1640 培养液为 Gibco 公司产品,Trizol 为 BioBasic 公司产品, DOTAP 购自 Roche 公司, GM-CSF 为美国先灵葆雅公司产品, TNF α 为 R&D 公司产品, IL-12 ELISA 试剂盒购自晶美公司产品, LDH 试剂盒购自南京建成公司。NCI-H460 肺癌细胞株购自中国科学院细胞研究所, IL-18 基因转染的 NCI-H460 肺癌细胞由本课题组制备^[8]。BALB/c 裸鼠购自浙江大学实验动物中心(实验动物合格证号:医动字 220010014)。磁性细胞分选器为 Miltenyi Biotec 公司产品,酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 NCI-H460 细胞 RNA 冲击 DC

用 Trizol 一步法提取 NCI-H460 细胞 RNA,以紫外分光光度仪检测纯度, $D_{260}/D_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 为合格。将 RNA 约 50 μg 干燥后,溶于 250 μl 无 RNA 酶的 MEM 培养基中,然后将 50 μl DOTAP (50 μg) 加入 200 μl MEM 培养基中,将两者混合后室温放置 20 min,混合物加至诱导培养 5 d 的 DC,然后用含 TNF- α 的培养基培养 72 h,作为 RNA 冲击的 DC。

1.3 NCI-H460 细胞与 DC 融合培养

收集对数生长期的 NCI-H460 细胞,分别和 IL-18 基因转染及未转染的 NCI-H460 细胞按 1:2 比例与培养第 5 天的 DC 混合,加 50% 聚乙二醇 (MW3500)使其融合,洗涤细胞后,再加入 GM-CSF 150 ng/ml、TNF α 10 ng/ml 继续培养。细胞融合后第 3 天,收集细胞,加入 FITC 标记的 CD83 抗体及抗 FITC 磁珠,用磁性细胞分选器分选融合细胞。

1.4 MTT 法检测疫苗对 T 细胞增殖的影响

分别以 IL-18 基因转染的融合细胞、未转染的融合细胞、RNA 冲击的 DC 及未冲击 DC 设转染融合组、融合组、冲击 DC 组及 DC 组疫苗,经丝裂霉素灭活后作为刺激细胞,人外周血 T 细胞为反应细胞,用 96 孔培养板,每组 3 复孔,每孔加 1×10^5 T 细胞及 1×10^4 刺激细胞,另设单纯 T 细胞孔(含 1×10^5 T 细胞),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 96 h。然后加入 MTT 继续培养 4 h,加入 DMSO 振荡 10 min,用酶标仪测 490 nm 光密度值 (D_{490})。计算刺激指数 (%) = (反应组 D - T 细胞组 D) / T 细胞组 $D \times 100\%$ 。

1.5 ELISA 法检测 DC 疫苗 IL-12 的分泌水平

同上设转染融合组、融合组、冲击 DC 组及 DC 组,将 4 组细胞各 5×10^6 用含 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 的 RPMI 1640 液培养 24 h,按 IL-12 ELISA 试剂盒操作说明测定上清中 IL-12 的含量,实验重复 3 次。

1.6 LDH 法检测疫苗体外杀伤肿瘤细胞的作用

将 4 组细胞分别与 5×10^6 T 细胞按 1:20 混合培养 3 d,作为效应细胞。NCI-H460 细胞为靶细胞,用 96 孔培养板,每组 2 复孔,按效靶比 5:1 与效应细胞混合;另设最大释放组和自然释放组,自然释放组只加靶细胞,最大释放组加 Triton-100 2 μl ;各孔终体积 200 μl ,培养 72 h。用 LDH 法测定疫苗对肿瘤细胞的杀伤作用,实验重复 3 次,以(测定管 D 值 - 空白管 D 值)为每组的反应 D 值。 D 波长 490 nm,杀伤率 = (实验组 D 值 - 自然释放组 D 值) / 最大释放孔 D 值 $\times 100\%$ 。

1.7 肺癌细胞裸鼠皮下移植成瘤实验

取 18 ~ 20 g 裸鼠 24 只,雌雄均可,随机分为转染融合组、融合组、冲击 DC 组及 DC 组,每组 6 只,

将上述 DC 疫苗细胞 5×10^6 个一侧背部皮下注射,对侧背部皮下注射 5×10^6 个 NCI-H460 细胞,观察肿瘤的生长情况及裸鼠的存活情况。

1.8 移植瘤块内疫苗注射的抗肿瘤效果

取 15 ~ 20 g 裸鼠 33 只,雌雄不拘,背部皮下接种约 2 mm^3 大小的瘤块,接种后第 7 天,取肿瘤大小均匀的裸鼠 24 只,同上分为 4 组,每组 6 只。每只裸鼠瘤内注射 DC 疫苗细胞 5×10^6 个,第 14 天重复注射 1 次。瘤块接种后第 7 天开始每 3 d 测肿瘤的长径(A)及横径(B)1 次,计算肿瘤的体积($V = 0.5 \times A \times B^2$)。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS13.0 软件统计分析,采用单因素方差分析,组间比较用 LSD 方法,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 DC 疫苗刺激 T 细胞增殖的作用

经 MTT 法检测,以反应组 D 值与 T 细胞组 D 值为反应值统计分析。结果显示,4 组细胞均能刺激 T 细胞增殖,但作用强度存在差异,转染融合组作用强于融合组($P < 0.01$),融合组作用强于冲击 DC 组($P < 0.05$),冲击 DC 组的刺激作用强于 DC 组($P < 0.01$),DC 组刺激 T 细胞增殖的作用最弱(表 1)。

表 1 4 组 DC 疫苗刺激 T 细胞增殖的作用 ($n = 9, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 T cell proliferation stimulated by 4 kinds of DC vaccines

Group	D_{490}	Stimulating index(%)
IL-18/Fusion	$1.063 \pm 0.087^{**}$	95.76 ^{**}
Fusion	$0.930 \pm 0.085^{\Delta}$	71.21 ^{\Delta}
Pulsed DC	$0.868 \pm 0.085^{\blacktriangle\blacktriangle}$	59.79 ^{\blacktriangle\blacktriangle}
DC	0.785 ± 0.063	44.57

** $P < 0.01$ vs fusion; ^{\Delta} $P < 0.05$ vs pulsed DC; ^{\blacktriangle\blacktriangle} $P < 0.01$ vs DC

2.2 各组 DC 疫苗分泌 IL-12 的比较

经 ELISA 法检测,4 组 DC 疫苗均能分泌 IL-12,转染融合组、融合组、冲击 DC 组及 DC 组 IL-12 分泌量分别为(38.50 ± 3.54)pg/ml、(32.83 ± 2.99)pg/ml、(44.16 ± 3.69)pg/ml 及(29.33 ± 2.95)pg/ml。转染融合组高于融合组($P < 0.05$),冲击 DC 组高于融合组及 DC 组($P < 0.01$)。

2.3 DC 疫苗对 NCI-H460 肺癌细胞的杀伤作用

经 LDH 法测定显示,4 组 DC 疫苗对 NCI-H460 细胞都具有杀伤作用。DC 组效应细胞的杀伤作用微弱,转染融合组、融合组、冲击 DC 组细胞作用强于 DC 组($P < 0.05$),以转染融合组作用最强(表 2)。

2.4 DC 疫苗对裸鼠皮下移植肺癌细胞成瘤的影响

4 组裸鼠皮下注射 NCI-H460 细胞及效应细胞后全部有肿瘤长出,转染融合组、融合组及 RNA 冲击 DC 组及 DC 组的成瘤时间分别为(12.82 ± 2.85)、(9.50 ± 2.07)、(8.52 ± 1.97)及(8.33 ± 1.63)d。转染融合组的成瘤时间长于 RNA 冲击 DC 组($P < 0.05$)和 DC 组($P < 0.01$)。肿瘤细胞接种后 70 d,RNA 冲击 DC 组和 DC 组裸鼠全部死亡,融合组有 1 只存活,转染融合组有 2 只存活;转染融合组裸鼠的生存时间长于其余 3 组,4 组裸鼠的存活曲线见图 1。

表 2 4 组 DC 疫苗对 NCI-H460 细胞的杀伤作用($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab.2 NCI-H460 cells killed by DC vaccines

Group	D_{490}	Kill rate(%)
IL-18/Fusion	0.221 ± 0.032	79.73 ^{**\Delta}
Fusion	0.178 ± 0.018	50.68 ^{**\blacktriangle}
Pulsed DC	0.156 ± 0.011	35.81 ^{**}
DC	0.109 ± 0.010	4.05

** $P < 0.01$ vs DC group; ^{\Delta} $P < 0.05$ vs fusion group; ^{\blacktriangle} $P < 0.05$ vs pulsed DC group

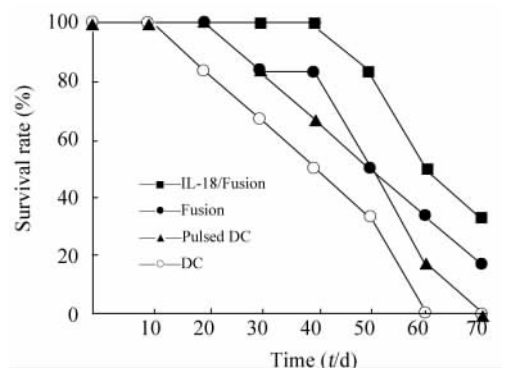


图 1 DC 疫苗对 NCI-H460 细胞移植瘤裸鼠生存的影响
Fig.1 Effects of DC vaccines on survival of nude mice implanted with NCI-H460 cells

2.5 DC 疫苗移植瘤内注射的抗肿瘤作用

计算肿瘤体积,在疫苗接种前,4 组裸鼠肿瘤体

积无显著性差异,自疫苗接种第 13 天起,冲击 DC 组肿瘤体积开始小于 DC 组($P < 0.05$),转染融合组体积小于其余 3 组($P < 0.01$),直至实验结束;第 25 天及第 28 天,融合组肿瘤体积小于冲击 DC 组($P < 0.05$,图 2)。

3 讨论

DC 是专职性的抗原提呈细胞,能高效加工处理抗原,表达丰富的共刺激分子和黏附分子,提供 T 细胞活化的双信号,能有效刺激 T 细胞增殖,并能活化初始型 T 细胞,是机体免疫的强有力的启动者和参与者^[9-10]。肿瘤患者 DC 功能缺陷,DC 肿瘤疫苗可以将肿瘤抗原与 DC 的抗原呈递功能相结合,是颇具前景的肿瘤治疗方法^[11-12]。

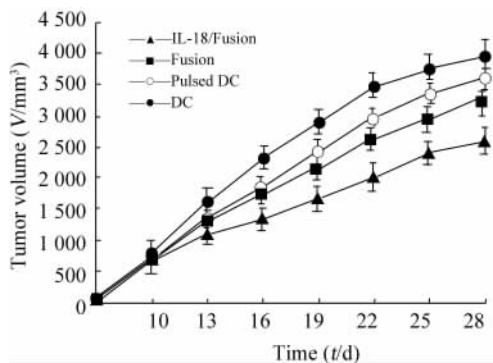


图 2 DC 疫苗瘤内注射对荷瘤裸鼠肿瘤体积的影响

Fig. 2 Effects of intratumor injection of DC vaccines on tumor volume of tumor-loaded mice

IL-12 是 DC 发挥作用的重要因子,具有明显的抗肿瘤作用^[13-14]。它能诱生 IFN- γ ,刺激巨噬细胞产生大量一氧化氮,引起肿瘤细胞程序性死亡;诱导 NK/LAK 细胞和 T 细胞的增殖,增强它们的溶解细胞作用,抑制肿瘤血管形成而抑制肿瘤生长^[15-16]。在本研究中,IL-18 基因转染的融合细胞分泌 IL-12 的量高于未转染的融合细胞,RNA 冲击 DC 分泌 IL-12 的量高于未冲击的 DC;在刺激 T 细胞增殖及体外杀伤肿瘤细胞方面均与上述结果一致。

IL-18 是多效性的细胞因子,能促进 T 细胞增殖,直接活化 CTL,刺激 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ ,通过 FasL 途径和穿孔素途径增进 NK 细胞和 Th1 细胞的细胞毒活性,是抗肿瘤免疫的重要因子^[17-18]。实验显示 IL-18 基因修饰可增强 DC 疫苗诱导的抗肿瘤作用^[19-20]。

在本研究中,4 组 DC 疫苗均能刺激 T 细胞增殖,分泌 IL-12,在体外对肺癌细胞具有杀伤作用;效

应细胞免疫接种在裸鼠体内能抑制肿瘤生长,4 组疫苗的作用强度存在差异,转染融合组成瘤期长于融合组、冲击 DC 组及 DC 组;荷瘤裸鼠瘤内注射 DC 疫苗,转染融合组肿瘤体积明显小于融合组、冲击 DC 组及 DC 组,表明 IL-18 基因转染的融合细胞 DC 疫苗抗肿瘤作用最强。经 IL-18 基因转染的 NCI-H460 细胞与 DC 融合,可以将肿瘤抗原、DC 的抗原提呈功能和 IL-18 的免疫刺激功能有机结合,可更有效促进 T 细胞增殖,诱导杀伤性 T 细胞经 FasL 及穿孔素途径杀伤肿瘤细胞,因而效力更强。RNA 冲击方法简便,也可诱导有效的抗肿瘤作用;但融合细胞表达肿瘤细胞的 DC 的双表型,可以全面利用肿瘤细胞的抗原,因而抗肿瘤效果更明显。

本研究显示,用 NCI-H460 肺癌细胞致敏的 DC 疫苗在体外及裸鼠体内均能诱导抗肿瘤作用,转染融合组 DC 疫苗抗肿瘤作用最强,融合组次之,DC 组作用最弱。

[参 考 文 献]

- [1] Pirozynski M. 100 years of lung cancer[J]. Respir Med, 2006, 100(12): 2073-2084.
- [2] Fazle Akbar SM, Abe M, Yoshida O, *et al.* Dendritic cell-based therapy as a multidisciplinary approach to cancer treatment: present limitations and future scopes[J]. Curr Med Chem, 2006, 13 (26): 3113-3119.
- [3] Yamanaka R, Honma J, Tsuchiya N, *et al.* Tumor lysate and IL-18 loaded dendritic cells elicits Th1 response, tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T cells in patients with malignant glioma[J]. J Neurooncol, 2005, 72(2): 107-113.
- [4] Hu J, Yuan X, Belladonna ML, *et al.* Induction of potent antitumor immunity by intratumoral injection of interleukin 23-transduced dendritic cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8887-8896.
- [5] Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, *et al.* Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (8): 3017-3024.
- [6] Trevor KT, Cover C, Ruiz YW, *et al.* Generation of dendritic cell-tumor cell hybrids by electrofusion for clinical vaccine application[J]. Cancer Immunol Immunother, 2004, 53(8): 705-714.
- [7] Inzkirweli N, Gückel B, Sohn C, *et al.* Antigen loading of dendritic cells with apoptotic tumor cell-preparations is superior to that using necrotic cells or tumor lysates[J]. Anticancer Res, 2007, 27 (4B): 2121-2129.
- [8] 张在云,吴金民,王林波,等.分泌型人白细胞介素 18 重组质粒的构建及其真核表达[J].实用肿瘤杂志,2003,18(3):181-184.
- [9] O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer[J]. Blood, 2004, 104(8): 2235-2246.

- [10] Sakai Y, Morrison BJ, Burke JD, *et al.* Vaccination by genetically modified dendritic cells expressing a truncated neu oncogene prevents development of breast cancer in transgenic mice[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 8022-8028.
- [11] Pinzon-Charry A, Ho CS, Maxwell T, *et al.* Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early-and late-stage breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(9): 1251-1259.
- [12] Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, *et al.* Immunotherapy of murine colon cancer using receptor tyrosine kinase EphA2-derived peptide-pulsed dendritic cell vaccines[J]. *Cancer*, 2007, 110(7): 1469-1477.
- [13] Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, *et al.* Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity[J]. *Gene Ther*, 2007, 14(11): 863-871.
- [14] Ojima T, Iwahashi M, Nakamura M, *et al.* Successful cancer vaccine therapy for carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing colon cancer using genetically modified dendritic cells that express CEA and T helper-type 1 cytokines in CEA transgenic mice[J]. *Int J Cancer*. 2007, 120(3): 585-593.
- [15] Molenda M, Mukkamala L, Blumenberg M. Interleukin IL-12 blocks a specific subset of the transcriptional profile responsive to UVB in epidermal keratinocytes[J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(12): 1933-1940.
- [16] Vujanovic L, Ranieri E, Gambotto A, *et al.* IL-12p70 and IL-18 gene-modified dendritic cells loaded with tumor antigen-derived peptides or recombinant protein effectively stimulate specific Type-1 CD4⁺ T-cell responses from normal donors and melanoma patients *in vitro*[J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(8): 798-805.
- [17] Robertson MJ, Mier JW, Logan T, *et al.* Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(14 Pt 1): 4265-4273.
- [18] Shiratori I, Suzuki Y, Oshiumi H, *et al.* Recombinant interleukin-12 and interleukin-18 antitumor therapy in a guinea-pig hepatoma cell implant model[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(12): 1936-1942.
- [19] Xia D, Li F, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-18 gene-modified tumor cells and dendritic cells induces enhanced antitumor immunity[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(3): 322-330.
- [20] Cao DY, Yang JY, Dou KF, *et al.* Alpha-fetoprotein and interleukin-18 gene-modified dendritic cells effectively stimulate specific type-1 CD4⁺ and CD8⁺ mediated T-Cell response from hepatocellular carcinoma patients *in vitro*[J]. *Hum Immunol*, 2007, 68(5): 334-341.

[收稿日期] 2007 - 08 - 01

[修回日期] 2007 - 10 - 29

[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

肿瘤诱导产生的 CD11b⁺ Gr1⁺ 髓样抑制细胞介导 anti-VEGF 治疗的抵抗

VEGF 与机体生理和病理条件下的血管形成密切相关。在小鼠荷瘤模型和临床肿瘤患者治疗中发现, anti-VEGF 单克隆抗体可显著抑制肿瘤的生长。但是在实验中也发现, 不同的肿瘤对 anti-VEGF 治疗的敏感性有显著差别。小鼠黑素细胞瘤 (B16F1)、淋巴瘤 (TIB6) 对 anti-VEGF 敏感, 而小鼠 lewis 肺癌 (LLC) 和淋巴瘤 (EL4) 则不敏感。作者提出假设, 机体骨髓来源的抑制性细胞可能介导了对 anti-VEGF 的抵抗。

为阐明机体骨髓来源细胞的作用, 作者构建了 GFP 嵌合体小鼠, 将 C57/Bl6 来源的小鼠用致死剂量的⁶⁰Co 射线照射后, 尾静脉注射 GFP 小鼠来源的骨髓单个核细胞 (BMMNCs), 重建骨髓系统; 2 周后皮下接种肿瘤, 流式观察示踪 GFP 阳性细胞, 观察不同肿瘤中浸润 GFP 阳性细胞的差异。结果发现, anti-VEGF 治疗抵抗组与敏感组相比, 其肿瘤内 GFP 阳性细胞比例更高, 将 B16F1、TIB6 与抵抗组肿瘤内分离出的 GFP 阳性细胞一同接种小鼠, 结果 B16F1、TIB6 对 anti-VEGF 也表现出抵抗。BMMNCs 来源的细胞能介导了 anti-VEGF 的抵抗, 究竟是哪群细胞参与其中呢? 作者认为可能就是骨髓来源的髓样抑制细胞 (MSCs)。流式分析比较发现, 对 anti-VEGF 治疗不敏感的 LLC、EL4 与敏感的 B16F1、TIB6 相比能更好地动员、诱导骨髓前体细胞向 MSCs 分化, LLC、EL4 肿瘤中可见有更多 MSCs 的浸润; 与之相应的 LLC、EL4 荷瘤小鼠骨髓中 DC、B 细胞显著减少。从抵抗组肿瘤 LLC、EL4 中流式分选出来的 CD11b⁺ Gr1⁺ MSCs 与 B16F1、TIB6 一起接种到小鼠皮下, 结果这两种肿瘤也表现出对 anti-VEGF 治疗的抵抗。用 anti-Gr1 抗体清除 MSCs 后, anti-VEGF 的治疗作用明显增强。所有的结果都证明, LLC、EL4 对 anti-VEGF 抵抗与肿瘤 MSCs 浸润有关。为阐明 LLC、EL4 和 B16F1、TIB6 对 anti-VEGF 治疗敏感性不同的分子机制, 作者用 micro-array 的方法分析了两类不同肿瘤基因表达的差异, 结果发现, 抵抗组肿瘤 LLC、EL4 高表达 MCP-1、G-CSF 等动员和促进骨髓前体细胞向 MSCs 分化的细胞因子。接种了 LLC、EL4 的荷瘤小鼠, 其骨髓中 MSCs 与 B16F1、TIB6 荷瘤小鼠相比, 其促血管生成因子和炎症因子也显著增加。这些结果揭示了不同来源的肿瘤对 anti-VEGF 敏感性的差异在于肿瘤动员、募集机体 MSCs 能力上的差异。肿瘤细胞对 anti-VEGF 治疗的抵抗性与 MSCs 的浸润相关, 那么 MSCs 的浸润是否也介导了肿瘤化疗的抵抗性呢, 结果发现他们之间没有一致性。对 anti-VEGF 抵抗的 LLC、EL4 对化疗敏感, 对 anti-VEGF 敏感的 B16 对化疗抵抗。进一步分析化疗后小鼠体内 MSCs 的变化, 发现化疗药物 5-FU 和吉西他滨可显著清除小鼠体内 MSCs, 此结果提示 anti-VEGF 联合化疗对临床治疗肿瘤更加有效。

[张永亮 摘译, 安华章 审阅. Shojaei F, Wu X, Malik AK, *et al.* *Nat biotechnol*, 2007, 25(8): 911-920]