

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.002

· 研究快报 ·

吉西他滨化疗联合树突状细胞瘤内注射对小鼠巨大淋巴瘤的治疗作用

胡守友¹, 朱学军^{2*}, 范振芳², 孔祥图², 陈玉超¹, 陈健一², 季建敏², 孙雪梅² (1. 江苏省中医院 肿瘤科, 江苏 南京 210029; 2. 江苏省中医院 血液科, 江苏 南京 210029)

专家点评 肿瘤疫苗的研究,在基础研究中取得了理想的效果,但临床疗效欠佳。一个重要的原因就是肿瘤获得了多种逃逸机体免疫的方法。近来研究发现髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)与肿瘤免疫逃逸密切相关。肿瘤诱导产生的 MDSC 可以通过多种途径抑制机体的获得性和天然性抗肿瘤免疫,介导肿瘤免疫逃逸,促进肿瘤发展。逆转 MDSC 的免疫抑制作用将有助于打破肿瘤免疫耐受,提高肿瘤疫苗的疗效。

树突状细胞(dendritic cells, DCs)在肿瘤免疫治疗中的应用一直以来受到免疫学和肿瘤学科研和临床工作者的高度关注,DCs 为基础的肿瘤疫苗显示出很好的临床应用前景,但 DCs 治疗最终被批准进入临床还需解决许多问题。DCs 的肿瘤免疫治疗作用主要是基于其增强机体的免疫应答能力的特性,但单凭增强免疫应答能力尚不足以克服肿瘤这一老大难问题,其关键在于机体的免疫功能是免疫增强与免疫抑制的博弈,任何一方均不能忽视。肿瘤微环境中的 MDSC 即是一重要的免疫抑制因素。

本期刊登胡守友医师等人的文章,作者从两个方面来探讨肿瘤的治疗策略。他们将 DCs 免疫治疗与“吉西他滨”化疗相结合,用于治疗小鼠 B 细胞淋巴瘤,取得了较好的实验结果。吉西他滨是核苷酸还原酶抑制剂,通过抑制肿瘤细胞 DNA 合成发挥抗肿瘤作用,被广泛用于实体瘤的化疗。该研究提示,吉西他滨可通过诱导荷瘤小鼠脾脏中 MDSC 凋亡,选择性清除 MDSC,解除免疫抑制;同时用 DCs 瘤体内注射,增强机体的免疫应答,双管齐下,提高抗肿瘤免疫效果,取得了很好的协同效应,显示出“免疫细胞治疗-化疗”这种新的“生物化疗”模式在肿瘤治疗中的优势和临床应用前景。同时,该研究也提示吉西他滨的疗效不能完全归因于其对肿瘤细胞的直接杀伤作用,还应注意注意到其对 MDSC“可能”的选择性杀伤作用,尽管其中机制还有待进一步的研究。

总之,该文通过吉西他滨对 MDSC 的抑制作用,联合 DCs 的免疫功能,从而实现化疗联合生物治疗的协同效应,为生物化疗模式在肿瘤治疗中的应用提供了实验依据,将推进生物化疗模式在临床肿瘤治疗中的较好应用。

南方医科大学附属南方医院副院长兼肿瘤中心主任

中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会副主任委员

中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会副主任委员

[摘要] 目的:观察吉西他滨对荷 B 细胞淋巴瘤小鼠脾脏中髓源抑制性细胞(myeloid derived suppressor cell, MDSC)的影响,以及吉西他滨化疗联合树突状细胞(dendritic cells, DCs)治疗巨大淋巴瘤的疗效。方法:小鼠皮下接种 A20 淋巴瘤细胞,30 d 后形成巨大肿瘤,流式细胞仪分析吉西他滨化疗前后荷瘤小鼠脾脏中 Gr-1⁺ CD11b⁺ MDSC 的比例,免疫磁珠纯化的脾脏 MDSC 体外加入吉西他滨共培养后,Annexin-V/PI 标记法检测细胞凋亡;观察荷瘤小鼠接受吉西他滨化疗联合 DCs 瘤内注射后肿瘤生长情况及小鼠存活期。结果:荷 A20 淋巴瘤小鼠脾脏中 MDSC 的比例显著上调,是正常小鼠脾脏中的 10 倍以上。体外吉西他滨时间依赖性诱导 MDSC 凋亡与坏死;荷瘤小鼠体内注射吉西他滨后,脾脏中绝大部分的 MDSC 被清除。单独吉西他滨注射或 DCs 瘤内注射对肿瘤生长产生一定的抑制作用,小鼠平均存活天数分别为(48.8 ± 3.6)d 和(47.2 ± 7.4)d,而对照组小鼠平均存活天数为(38.8 ± 2.2)d;吉西他滨化疗联合 DCs 瘤内注射后瘤体持续显著缩小,60% 小鼠存活时间均超过 90 d。结论:吉西他滨可有效清除荷瘤小鼠脾脏 MDSC,吉西他滨化疗与 DCs 瘤内注射免疫治疗具有协同效应,可以提高对巨大淋巴瘤的疗效,本实验为应用生物化疗综合治疗模式治疗复发、难治性淋巴瘤提供了实验依据。

[关键词] 淋巴瘤;吉西他滨;髓源抑制性细胞;树突状细胞;生物化疗

[中图分类号] R733.1; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0557-07

[基金项目] 江苏省医学重点人才基金资助项目(No. RC2007002)。Supported by the Key Project of Outstanding Medical Talents of Jiangsu Province (No. RC2007002)

[作者简介] 胡守友(1962-),男,安徽省宁国市人,硕士,副主任医师,主要从事肿瘤的中西医结合治疗及生物靶向治疗。E-mail:hsy9378@sina.com

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail:zhuxj2@sina.com

Gemcitabine chemotherapy combined with intratumoral injection of dendritic cells in treatment of mouse large lymphoma

HU Shou-you¹, ZHU Xue-jun^{2*}, FAN Zhen-fang², KONG Xiang-tu², CHEN Yu-chao¹, CHEN Jian-yi², JI Jian-min², SUN Xue-mei²(1. Department of Oncology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. Department of Hematology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effect of gemcitabine on myeloid derived suppressor cells (MDSC) in the spleen of B lymphoma cell-bearing mice, and the therapeutic effect of gemcitabine combined with intratumoral injection of dendritic cells (DCs) in treatment of large B lymphoma. **Methods:** BALB/c mice were inoculated subcutaneously with B lymphoma A20 cells; large tumors were formed 30 d after inoculation. Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC proportion in the spleen was analyzed by flow cytometry before and after gemcitabine treatment. Splenic MDSC sorted by immunomagnetic beads was further treated with gemcitabine, and then the apoptosis of MDSC was examined by Annexin-V/PI staining. Tumor growth and survival time of A20 tumor-bearing mice were observed after treatment with gemcitabine and intratumoral injection of DCs. **Results:** Splenic Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC ratio in A20 cell-bearing mice was 10 times higher than that in the normal mice. Gemcitabine induced apoptosis and necrosis of purified MDSC *in vitro* in a time-dependent manner. The percentage of MDSC in the spleen of A20 tumor-bearing mice was decreased after injection of a single dose of gemcitabine. Gemcitabine or intratumoral injection of DCs alone inhibited growth of tumor to a certain degree, with the mean survival periods of mice in the gemcitabine, DCs, and untreated groups being (48.8 ± 3.6) d, (47.2 ± 7.4) d, and (38.8 ± 2.2) d, respectively. Gemcitabine chemotherapy combined with intratumoral DC injection resulted in continuous shrink of the tumors, and 60% of the mice survived for more than 90 d. **Conclusion:** Gemcitabine can effectively eliminate splenic MDSC in tumor-bearing mice. Gemcitabine chemotherapy and DCs immunotherapy can work synergistically in the treatment of huge lymphoma. These results provide an experimental basis for the comprehensive chemotherapy and immunotherapy of relapsed or refractory lymphoma.

[**Key words**] lymphoma; gemcitabine; myeloid derived suppressor cell; dendritic cell; chemotherapy-immunotherapy
[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 557-563]

复发、难治性淋巴瘤目前仍缺乏有效的治疗方法。应用树突状细胞(dendritic cells, DCs)疫苗免疫治疗淋巴瘤的方法曾一度被寄予很大的希望,但数项临床试验均未能收到预期的疗效^[1]。DCs 疫苗免疫治疗的机制在于提高机体的免疫识别能力,以诱导和扩增肿瘤特异性 CTL^[2-3]。但肿瘤表达的抗原决定簇免疫原性较弱,近年来的相关临床试验结果并不令人满意,部分原因在于体内肿瘤相关的免疫耐受根深蒂固,导致现有的免疫治疗策略较难奏效,因此必需改进目前的治疗策略^[4-6]。

近年来研究^[7]发现,在多种类型荷瘤小鼠及部分类型肿瘤患者体内均存在大量的髓源抑制性细胞(myeloid derived suppressor cell, MDSC),荷瘤小鼠脾脏中 MDSC 的数量可以达到脾脏有核细胞的 10% ~ 40%。MDSC 主要通过一氧化氮(NO)、L-精氨酸(ARG1)等分子介导其免疫抑制作用,包括遏制 T 细胞表达 CD3 ζ 链,阻断 T 细胞的激活^[8],下调

T 细胞表面 L-Selectin 的表达^[9],抑制抗原提呈细胞在淋巴结中对 T 细胞的致敏^[10],诱导 T 细胞失能,诱导调节性 T 细胞的生成^[11],抑制自然杀伤细胞(NK)细胞及 NKT 细胞的杀伤活性^[12-13]等。此外, MDSC 也参与肿瘤的血管生成^[14]。清除 MDSC 将有助于提高肿瘤免疫治疗的疗效^[15]。

吉西他滨为新一代阿糖胞苷类似物,是一种具有广谱抗实体瘤活性的新的核苷酸类似物,其在细胞内通过核苷酸激酶作用被转化为二磷酸双氟胞苷和三磷酸双氟胞苷,主要作用于 DNA 合成期和晚 G₁ 期,抑制 DNA 复制和修复,从而起到细胞毒作用,对非小细胞肺癌、胰腺癌、乳腺癌、淋巴瘤等实体瘤均有效。研究^[16]发现吉西他滨能够显著减少间皮瘤荷瘤小鼠脾脏 MDSC 的数量,并诱导体内肿瘤特异性 CTL 和 NK 细胞扩增。吉西他滨联合 IFN- β 基因治疗可以使巨大肿瘤明显消退;另有报道^[17]吉西他滨也可以通过去除体内 MDSC 提高 DCs 疫苗治

疗小鼠胰腺癌的疗效,近期一项应用吉西他滨联合免疫细胞回输治疗进展型胰腺癌的研究已经进入临床试验^[18]。

本研究建立小鼠 B 细胞淋巴瘤模型,验证了此荷淋巴瘤小鼠脾脏也聚集大量的 MDSC,体外吉西他滨能够诱导脾脏中分离的 MDSC 凋亡;体内注射吉西他滨能够使肿瘤部分缩小,并清除大部分脾脏 MDSC。DCs 瘤内注射联合吉西他滨化疗优于单一治疗,可以对已经形成的巨大淋巴瘤产生较好的疗效。本研究为复发、难治性淋巴瘤的生物化疗治疗模式提供了新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

mGM-CSF、mIL-4 购自 Peprotec 公司,抗小鼠 Gr-1-PC5、CD11b-PE、CD11c-PE 及同亚型对照抗体购自 eBioscience 公司,Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒购自杭州隆基公司,Mini-MACS 磁性分离架、吸附柱及羊抗大鼠 IgG 交联磁珠购自 Miltenyi Biotec 公司,吉西他滨购自江苏豪森药业公司,RPMI 1640、胎牛血清购自 PAA 公司。

1.2 动物与细胞株

BALB/c 小鼠(H-2d),雄性,6 周龄,购自扬州大学比较医学动物中心(动物合格证号:2003402;许可证号:SCXK 苏 2007-0001)。小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞株 A20 由本室常规传代保存。

1.3 小鼠骨髓 DCs 的体外培养扩增

颈椎脱位法处死小鼠,无菌取股骨,冲洗出骨髓细胞,加入 Tris-NH₄Cl 裂解液室温作用 3 min 溶除红细胞,PBS 洗涤细胞 3 次,骨髓细胞(1×10^6 /ml)用含 10% 胎牛血清、重组小鼠 GM-CSF(30 ng/ml)、重组小鼠 IL-4(1 ng/ml)的 RPMI 1640 培养基,置 5% CO₂ 孵箱培养,培养至第 3 天,补充 30 ml 新鲜的完全培养基。培养至第 5 天、7 天,收集培养上清,离心去除培养基后将细胞返回培养瓶。加入 30 ml 完全培养基继续培养。细胞培养至第 9 天,收集全部悬浮细胞及疏松贴壁的细胞,转入新的培养瓶,培养过夜后收集悬浮细胞,即为骨髓 DCs。流式细胞仪分析表明 CD11c⁺ 的 DCs 纯度 >95%。

1.4 小鼠荷淋巴瘤模型制备及脾脏 MDSC 的检测

收集培养后处于对数生长期的 A20 细胞,每只小鼠右侧肋下皮下接种 2×10^5 细胞,30 d 后形成巨大(最大直径 >2.0 cm)肿瘤。处死荷瘤小鼠及未荷瘤小鼠各 5 只,分别无菌取脾脏,称取重量后,经 200 目钢网研磨后收取单细胞悬液,Tris-NH₄Cl 裂解

去除红细胞,PBS 液洗细胞 3 次,用 PBA(PBS + 1% BSA + 0.02% 叠氮钠)悬浮为 5×10^6 /ml,加入离心管,100 μ l/管,再加入 PBA 稀释的 Gr-1-PC5 + CD11b-PE 抗体 100 μ l(单抗标记终质量浓度均为 5 μ g/ml),震荡混匀后置 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加入 PBA 洗细胞 2 次,将标记后的细胞悬于 500 μ l PBA 中进行流式细胞仪检测分析。

1.5 免疫磁珠法分选脾脏 MDSC

取上述制备的荷瘤小鼠脾细胞悬液,离心去除全部上清后加入 MACS 标记液(pH 7.2 PBS,含 0.5% BSA, 2 mmol/L EDTA)0.3 ml/ 1×10^8 细胞,震荡悬浮细胞后,先后加入非特异性抗体阻断液 100 μ l、Gr-1-PC5 抗体 100 μ l,10 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,用 10 ml 标记液洗细胞 1 次,标记液重悬细胞后,加入羊抗大鼠 IgG 交联磁珠 200 μ l 轻轻混匀,10 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,经磁性细胞分离柱分选,收集阳性富集细胞。以 CD11b-PE 抗体标记后,流式细胞仪分析分选的 MDSC 纯度。

1.6 吉西他滨诱导 MDSC 凋亡的检测

经免疫磁珠分选获得的脾脏 MDSC,用含 10% 胎牛血清、重组小鼠 mGM-CSF(3 ng/ml)的 RPMI 1640 培养基悬浮,调节细胞密度为 2×10^5 /ml,3 ml/孔加入 6 孔培养板,实验组加入生理盐水配制的吉西他滨至终质量浓度 10 mg/L,对照组加入等量生理盐水,各 3 个复孔,置 5% CO₂ 孵箱培养 12 h 或 24 h 后,分别离心收集各孔细胞,以 Annexin-V-FITC/PI 双标后,流式细胞仪分析细胞凋亡及坏死。

1.7 DCs 瘤内注射联合吉西他滨治疗荷瘤小鼠

将小鼠随机分为 4 组,每组 5 只,按前述方法给小鼠荷瘤 30 d 后,实验组小鼠予腹腔注射吉西他滨 120 mg/kg,48 h 后予 DCs 瘤内注射 5×10^5 /只;对照组仅接受单一吉西他滨治疗、DCs 瘤内注射或生理盐水注射。肿瘤体积 = ($\pi \times$ 短轴 \times 短轴 \times 长轴)/6,同时观察荷瘤小鼠治疗后生存时间。

1.8 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 *t* 检验分析,所有统计分析利用 SPSS 软件包完成。

2 结果

2.1 A20 淋巴瘤荷瘤小鼠脾脏聚集大量 MDSC

皮下接种 A20 淋巴瘤细胞的小鼠,在 20 d 左右出现可触及的皮下肿瘤灶,30 d 后均形成巨大的肿瘤(最大直径 >2.0 cm)。荷瘤小鼠脾脏显著增大,平均重量明显增加。流式细胞仪检测脾脏细胞显示,Gr-1⁺ CD11b⁺ 的 MDSC 比例显著增加,达

22.3% ~ 35.8% ($n = 10$), 平均为 $(26.8 \pm 6.0)\%$; 而未荷瘤对照组小鼠脾脏的 MDSC 比例较低, 为 2.1% ~ 4.2% ($n = 10$), 平均为 $(2.2 \pm 0.9)\%$ ($P < 0.01$, 图 1); 荷瘤小鼠脾脏中 MDSC 的数量是正常小鼠的 10 倍以上。

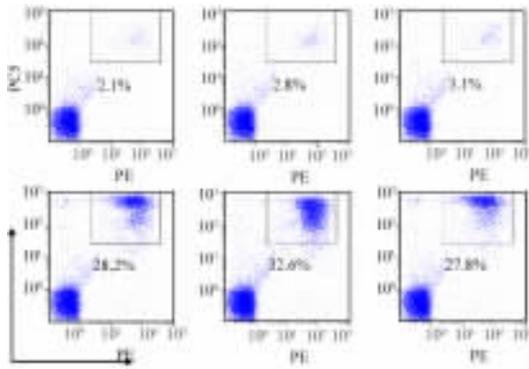


图 1 正常小鼠与 A20 荷瘤小鼠脾脏 Gr-1⁺ CD11b⁺ MDSC 的比例

Fig. 1 Percentage of Gr-1⁺ CD11b⁺ MDSC in spleen of normal mice and A20-bearing mice

A: Normal mice; B: A20-bearing mice

2.2 吉西他滨体外诱导荷瘤小鼠脾脏 MDSC 凋亡

荷瘤小鼠脾细胞经 Gr-1 抗体标记后, 以免疫磁珠分选获得的细胞, 流式细胞仪检测显示 Gr-1⁺ CD11b⁺ 细胞 > 98%, 表明获得的细胞为高纯度的 MDSC(图 2)。经免疫磁珠分选获得的 MDSC 以吉西他滨 10 mg/L 培养 24 h 后, 流式细胞仪结果显示吉西他滨诱导了 $(83.2 \pm 1.8)\%$ 的 MDSC 发生凋亡与坏死, 培养 48 h 后 $(92.0 \pm 3.1)\%$ 的细胞发生凋亡及坏死(图 3), 而生理盐水对照组 MDSC 细胞未发生凋亡。

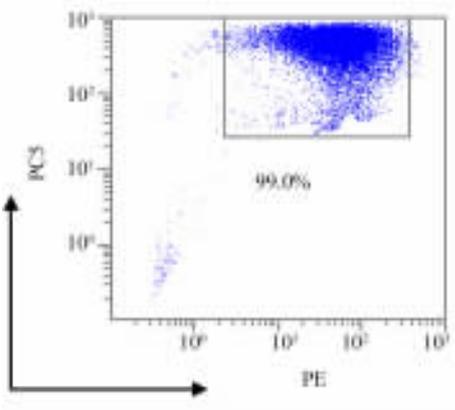


图 2 荷瘤小鼠脾脏经免疫磁珠分选获得的 MDSC 的纯度
Fig. 2 Purity of MDSC sorted by immunomagnetic beads from spleen of tumor-bearing mice

2.3 吉西他滨体内清除大部荷瘤小鼠脾脏 MDSC

荷瘤小鼠体内注射 120 mg/kg 吉西他滨, 2 d 后处死小鼠取脾脏制备脾细胞悬液, 流式细胞仪检测 Gr-1⁺ CD11b⁺ MDSC 的比例, 结果显示 Gr-1⁺ CD11b⁺ 细胞比例显著下降, 平均为 $(5.9 \pm 0.9)\%$ ($n = 3$), 略高于正常小鼠的水平, 表明治疗剂量的吉西他滨可以快速清除荷瘤小鼠脾脏内的绝大部分 MDSC(图 4)。

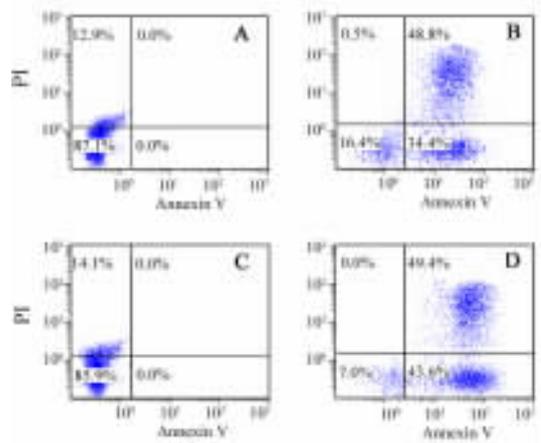


图 3 吉西他滨体外诱导 MDSC 的凋亡

Fig. 3 Apoptosis of MDSC induced by gemcitabine *in vitro*

A: NS control for 24 h; B: Gemcitabine for 24 h;

C: NS control for 48 h; D: Gemcitabine for 48 h

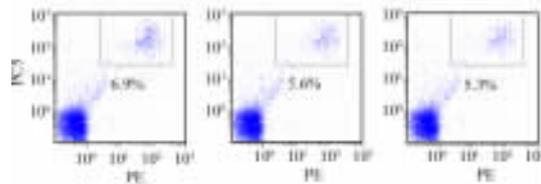


图 4 吉西他滨体内清除荷瘤小鼠脾脏中大部分 MDSC

Fig. 4 Gemcitabine eliminated most MDSC in spleen of tumor-bearing mice

2.4 吉西他滨化疗联合 DCs 瘤内注射对巨大淋巴瘤的治疗效果

吉西他滨注射 2 d 后, 可以观察到小鼠瘤体略有缩小、变软, 表明吉西他滨对淋巴瘤产生了化疗作用, 杀伤了部分肿瘤细胞, 但 1 周后肿瘤再次快速生长并较快导致小鼠死亡, 平均存活天数为 (48.8 ± 3.6) d, 而生理盐水对照组小鼠平均存活天数为 (38.8 ± 2.2) d。单独以 DCs 瘤内注射对肿瘤生长也产生一定的抑制作用, 瘤体缩小不明显, 但生长速度明显减慢, 小鼠生存期较生理盐水对照组延长, 平均存活天数为 (47.2 ± 7.4) d。而应用吉西他滨

化疗 2 d 后联合 DCs 瘤内注射, 瘤体持续显著缩小(图 5), 小鼠生存期显著延长, 60% 小鼠存活时间均超过 90 d(图 6)。表明吉西他滨化疗联合 DCs 瘤内注射的疗效优于其单一治疗, 可以对已经形成的巨大淋巴瘤产生较好的疗效, 使瘤体显著缩小, 并显著延长小鼠的生存期。

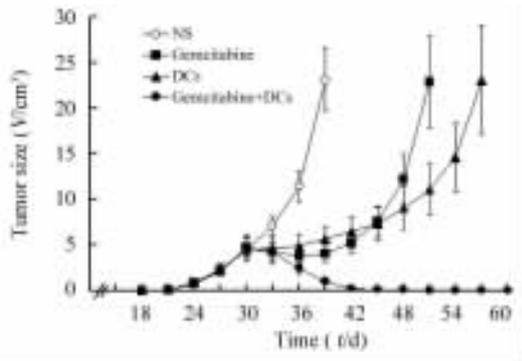


图 5 吉西他滨化疗联合 DCs 瘤内注射对移植瘤生长的抑制
Fig. 5 Gemcitabine combined with intratumoral injection of DCs inhibited tumor growth

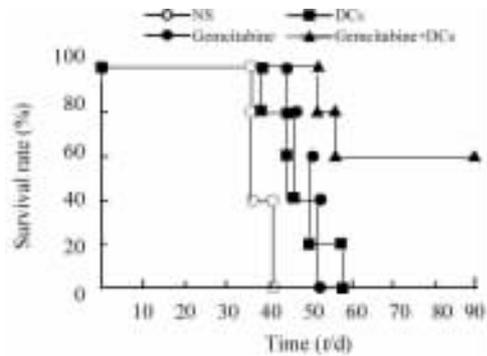


图 6 吉西他滨化疗联合 DCs 瘤内注射对小鼠存活期的影响
Fig. 6 Survival time of mice treated with gemcitabine combined with DCs

3 讨论

淋巴瘤是对 DCs 免疫治疗较为敏感的肿瘤之一^[19-22]。近年来笔者实验室开展了一系列应用 DCs 治疗淋巴瘤的基础与临床研究, 已经证实淋巴瘤组织冻融抗原负载的 DCs 疫苗皮下接种, 可以诱导机体产生抗淋巴瘤的免疫效应, 而应用无抗原负载的未成熟 DCs 瘤内注射产生的抗肿瘤效应优于抗原负载的 DCs 皮下注射(另文发表)。临床应用这两种免疫方法治疗复发、难治性淋巴瘤, 观察到部分患者在接种 DCs 后 4~10 d 瘤体显著缩小达一半以上, 但其后 2~4 周肿瘤再次快速生长。因此需要进

一步改进目前的策略, 提高 DCs 免疫治疗的疗效。

关于 MDSC 的最初描述, 是 70 年代末在新生期小鼠脾脏发现的自然抑制(natural suppressor, NS)细胞, NS 细胞可以抑制同种混合淋巴细胞反应和有丝分裂原刺激的 T 细胞增殖, 并被确定为主要由早期髓系细胞组成^[23]。Young 等^[24]发现荷瘤小鼠脾脏内存在大量早期髓系细胞, 能够抑制 T 细胞功能; Young 等^[25]发现人头颈部癌患者外周血存在大量髓系抑制细胞。人 MDSC 也具有不成熟的髓系表型, 即 CD14⁻ HLA-DR⁻ CD34⁺ CD15⁺ CD11b⁺ CD33⁺ CD13⁺。MDSC 积聚在荷瘤小鼠的脾脏及肿瘤患者体内, 通过抑制 T 细胞的功能和促进肿瘤血管生成等多种机制促进肿瘤生长。去除体内 MDSC 可以减轻肿瘤诱导的免疫抑制, 增强免疫应答, 明显提高肿瘤疫苗在小鼠肿瘤模型中的治疗效果^[7]。然而去除体内 MDSC 缺少有效的办法, 手术切除脾脏对于大多数转移性肿瘤患者是不可行的; 利用抗 Gr-1 抗体可以去除体内大部分 MDSC, 但是这也会耗尽所有成熟粒细胞, 导致严重的免疫缺陷; 有报道^[26]应用全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)、IL-4 可以诱导 MDSC 分化为成熟的髓系细胞, 增强肿瘤疫苗的效应, 但笔者的研究发现, ATRA、IL-4 及 LPS 等均不能诱导 Ly6G⁺ MDSC 体外分化, 小鼠淋巴瘤模型应用 ATRA 也未能观察到增强 DCs 疫苗的抗肿瘤效应(另文发表)。

2005 年 Suzuki 等^[16]报道给间皮瘤荷瘤小鼠注射化疗药物吉西他滨(剂量相当于临床肿瘤的治疗剂量), 能够显著减少脾脏的 MDSC 数量, 而 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞及 B 细胞无显著减少, 并可诱导体内肿瘤特异性 CTL 和 NK 细胞扩增。吉西他滨联合 Ad-IFN- β (表达 IFN- β 的重组腺病毒)基因治疗可以使巨大肿瘤明显消退。近期 Le 等^[27]报道 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠接受吉西他滨治疗能够去除体内 MDSC, 显著抑制肿瘤的生长。Mukherjee 等^[28]报道黏蛋白 1(MUC1)疫苗联合 COX-2 抑制剂(塞来昔布)及低剂量吉西他滨化疗, 能够有效地防止上皮性癌前病变进展为侵袭性胰腺导管腺癌。2009 年首次临床试验^[18]报道显示, 5 例不能手术的晚期胰腺癌患者, 接受吉西他滨化疗(1 g/m²)后, 超声内镜引导下肿瘤区域细针注射免疫激活剂 OK432, 以及静脉过继回输细胞因子激活的杀伤细胞(CD3-LAK), 研究期间患者无严重治疗相关的不良反应, 5 例患者中有 3 例观察到有效的反应, 1 例部分缓解, 2 例患者病情长期稳定 6 个月以上, 表明联合疗法具有协同效应。

吉西他滨在复发、难治淋巴瘤的治疗中有一定的疗效,与DCs免疫治疗联合,是化学治疗与生物治疗结合的全新肿瘤综合治疗模式,将可能产生更好的治疗效应^[29]。通过吉西他滨化疗一方面可以杀伤肿瘤细胞,另一方面可以清除体内可能存在的MDSC;选择DCs瘤内注射的方法,可以更好地摄取被杀伤肿瘤细胞释放出的肿瘤抗原并获得危险信号,促进其CTL激活效应。本研究证实,小鼠B细胞淋巴瘤细胞A20荷瘤小鼠脾脏也存在大量的Gr-1⁺CD11b⁺MDSC聚集,其比例达22.3%~35.8%,是正常小鼠的10倍以上。经免疫磁珠分选获得的荷瘤小鼠脾脏MDSC以吉西他滨10 mg/L培养24 h后,(83.2±11.8)%的MDSC发生凋亡与坏死,培养48 h后(92.0±3.1)%的MDSC发生凋亡及坏死。荷瘤小鼠体内注射120 mg/kg吉西他滨,2 d后脾脏中MDSC比例显著下降至5.9%,表明治疗剂量的吉西他滨可以快速清除荷瘤小鼠脾脏内的绝大部分MDSC。单独吉西他滨注射后小鼠瘤体略有缩小、变软,表明吉西他滨杀伤了部分肿瘤细胞,但1周后肿瘤再次快速生长并较快导致小鼠死亡;单独以DCs瘤内注射对肿瘤生长也产生一定的治疗作用;而应用吉西他滨化疗2 d后联合DCs瘤内注射,则使瘤体持续显著缩小,小鼠生存期显著延长,表明吉西他滨化疗与DCs瘤内注射免疫治疗具有协同效应,可以提高对巨大淋巴瘤的疗效。本研究为复发、难治性淋巴瘤的吉西他滨化疗联合DCs免疫治疗的综合治疗模式提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 刘丽,范振芳,朱学军. 树突状细胞疫苗治疗恶性淋巴瘤的进展[J]. 淋巴瘤,白血病,2009,18(8): 502-505.
- [2] Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells[J]. *Immunity*, 2008, 29(3): 372-383.
- [3] Gilboa E. DC-based cancer vaccines[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1195-1203.
- [4] Vieweg J, Su Z, Dahm P, et al. Reversal of tumor-mediated immunosuppression[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(2Pt2): 727s-732s.
- [5] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines[J]. *Nat Med*, 2004, 10(9): 909-915.
- [6] 朱学军. 树突状细胞疫苗治疗恶性肿瘤:挑战与希望[J]. 内科理论与实践,2008;3(2): 33-36.
- [7] Serafini P, Borrello I, Bronte V, et al. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression[J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(1): 53-65.
- [8] Bronte V, Wang M, Overwijk WW, et al. Apoptotic death of CD8⁺ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1⁺/Gr-1⁺ cells[J]. *J Immunol*, 1998, 161(10): 5313-5320.
- [9] Hanson EM, Clements VK, Sinha P, et al. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 937-944.
- [10] Watanabe S, Deguchi K, Zheng R, et al. Tumor-induced CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes[J]. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3291-3300.
- [11] Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 1123-1131.
- [12] Li H, Han Y, Guo Q, et al. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK Cells through membrane-bound TGF-β[J]. *J Immunol*, 2009, 182(1): 240-249.
- [13] Liu C, Yu S, Kappes J, et al. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host[J]. *Blood*, 2007, 109(10): 4336-4342.
- [14] Zumsteg A, Baeriswyl V, Imaizumi N, et al. Myeloid cells contribute to tumor lymphangiogenesis[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7067-7074.
- [15] 刘秋燕,曹雪涛. MDSC与肿瘤免疫逃逸[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2009,16(4): 319-324.
- [16] Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, et al. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(18): 6713-6721.
- [17] Bauer C, Bauernfeind F, Sterzik A, et al. Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model[J]. *Gut*, 2007, 56(9): 1275-1282.
- [18] Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, et al. A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2009, 38(3): e69-74.
- [19] Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells[J]. *Nat Med*, 1996, 2(1): 52-58.
- [20] Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients[J]. *Blood*, 2002, 99(5): 1517-1526.
- [21] Adam C, Mysliwicz J, Mocikat R, et al. Specific targeting of whole lymphoma cells to dendritic cells *ex vivo* provides a potent antitumor vaccine[J]. *J Transl Med*, 2007, 5(1): 16-26.
- [22] Di Nicola M, Zappasodi R, Carlo-Stella C, et al. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study[J]. *Blood*, 2009, 113(1): 18-27.
- [23] Strober S. Natural suppressor(NS) cells, neonatal tolerance, and

- total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 113(1): 18-27.
- [24] Young MR, Wright MA, Matthews JP, *et al.* Suppression of T cell proliferation by tumor- induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide [J]. *J Immunol*, 1996, 156(5): 1916-1922.
- [25] Young MR, Wright MA, Lozano Y, *et al.* Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34⁺ natural suppressor cells [J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(1): 69-74.
- [26] Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, *et al.* All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4441-4449.
- [27] Le HK, Graham L, Cha E, *et al.* Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(7-8): 900-909.
- [28] Mukherjee P, Basu GD, Tindler TL, *et al.* Progression of pancreatic adenocarcinoma is significantly impeded with a combination of vaccine and COX-2 inhibition [J]. *J Immunol*, 2009, 182(1): 216-224.
- [29] 罗荣城,姚广裕. 肿瘤分子靶向治疗与生物化疗进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(2): 101-105.
- [收稿日期] 2009 - 10 - 29 [修回日期] 2009 - 11 - 18
[本文编辑] 徐红梅

· 科技动态 ·

Peli1 分子促进 TRIF 依赖的 TLR 信号和炎性细胞因子的产生

近年来,关于天然免疫(innate immunity)的识别机制成为了一个研究热点,其主要涉及抗原提呈细胞(DCs、B 细胞以及巨噬细胞)、NK 细胞、粒细胞等如何识别病毒、细菌等病原体感染以及随后触发的免疫与炎症过程和相关调控机制。

天然免疫反应的介导主要是通过能够识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)来完成,包括 Toll 样受体(Toll like receptors, TLR)、NLR (NOD2 like receptor)以及细胞内的病毒 RNA 识别受体 RIG-I (retinoic acid inducible gene I)和 MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5)。该论文作者重点关注的是 TLR,作为一种重要的 PRR,目前至少已经报道了 11 种人 TLR 和 13 种小鼠 TLR;根据不同的亚细胞定位,TLRs 可以分为细胞表面的 TLR(主要包括 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 等)和细胞内的 TLR(目前发现的有 TLR3、TLR7/8、TLR9)两大类。公认的 TLR 信号转导通路分为 MyD88 依赖和 TRIF 依赖(或者称为 MyD88 非依赖)两条不同的信号转导途径。大部分的 TLR 是通过 MyD88 依赖转导信号的,然而 TLR3 和 TLR4 还存在另外一种 TRIF 依赖信号途径。值得一提的是 TLR2 和 TLR4,它们不能像其他 TLR 分子一样直接与 MyD88 接头,而需要 TIRAP(Mal)共接头分子的参与;此外,虽然 TLR4 也可以通过 TRIF 依赖途径介导,但它也不能像 TLR3 一样直接作用于 TRIF(TICAM-1),同样需要共接头分子 TRAM(TICAM-2)的参与。MyD88 主要通过其死亡结构域(death domain, DD)与 IRAK(IL21 receptor2 associated kinase)家族蛋白分子结合成为信号转导复合物。该复合物继续募集并活化下游 TRAF6 分子,最终通过激活 MAPK 和 NF- κ B 等转录因子,激活相关促炎因子和 I 型干扰素的基因表达。而 TRIF 主要通过募集 TRAF3 和 TRAF6 分别通过 TBK1 和 TAK1 来引起 NF- κ B 的晚期活化和 IRF23 的核转位,调控炎性因子和 I 型干扰素的表达。

Peli 分子最早发现于果蝇(dPellino),它能与 Pelle(接头分子微管和丝苏氨酸激酶,类似于哺乳动物体内的 IRAK 分子)相互作用,于是人们在哺乳动物体内发现了 Peli,随后就 Peli 展开了一系列研究,发现它与 TLR/IL-1R 信号通路中的多种分子关系密切。Peli 分子具有 E3 泛素化连接酶的作用也早已被证实。论文作者基于 TLR3--RIP1-I κ B--NF- κ B 这条通路展开研究,首先构建了 Peli1 基因敲除的大鼠,发现此种大鼠虽然有着正常的淋巴细胞发育,但在 LPS 或者 poly(I: C)诱导的感染性休克模型中起着保护作用;作者通过检测 Peli1^{-/-}小鼠 TNF 等炎性细胞因子的产生发现,较 WT 小鼠,这些炎性细胞因子随着 Peli1 分子的缺失也一同减少了;随后作者通过体外实验发现,Peli1 缺失后炎性因子下调只针对 TLR4 的配体 LPS 和 TLR3 的配体 poly(I: C),而 TLR3 和 TLR4 均能由 TRIF 途径介导,范围进一步缩小,TRIF 下游信号通路可以分别由 TAK1 和 RIP1 介导。已经报道了 TRAF6 可以泛素化 TAK1,从而活化下游信号通路,而 RIP1 的研究较少。作者联想到是否 Peli1 也像 TRAF6 调控 TAK1 一样对 RIP1 产生调控作用呢? 作者通过免疫共沉淀、激酶分析、凝胶电泳迁移率变动分析等手段验证了这一假设,为了使实验更有说服力,作者又在无细胞系统进一步验证了 Peli1 确实可以介导 RIP1 的泛素化,且是 Peli1 的环状结构域依赖的。

综上所述,作者发现了 Peli1 作为泛素化连接酶,缺失后可以降低 TLR3 和 TLR4 介导的炎性细胞因子产生,并在感染性休克中起到保护作用。Peli1 是 TLR3 介导的 I κ B 及下游信号活化所必须的,但是其他 TLR 受体和 IL-1R 作用不显著,重要的是 Peli1 可以连接并泛素 RIP1(介导 TLR3 和 TLR4 活化的 TRIF 依赖的 IKK 活化的重要信号分子),从而证明 Peli1 作为泛素化连接酶在 TRIF 依赖 TLR 信号通路中至关重要。

[白 易 摘译,钱 程 审阅. Chang M, Jin W, Sun SC. *Nat Immunol*, 2009, 10(10): 1089-1095.]