

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.008

· 基础研究 ·

## Ad5-CCL20 联合热疗对结肠癌 CT-26 细胞小鼠移植瘤生长的抑制作用

祝徐军, 苏宁, 姚骏, 徐楷, 李新星, 王伟军, 胡志前, 孙延平(第二军医大学附属长征医院 普外一科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:** 探讨重组腺病毒 Ad5-CCL20 联合热疗对结肠癌 CT-26 细胞小鼠移植瘤的抑制作用。**方法:** 将 Ad5-CCL20 转染 CT-26 细胞, 采用 ELISA 法和趋化实验分别检测 CT-26 细胞中 CCL20 的表达及其对 DC 的趋化作用。Western blotting 检测热激结肠癌 CT-26 细胞中 HSP70、GP96 的表达。用热激后细胞蛋白(Heat 组)对 DC 进行诱导, 并设对照组(Control 组)和阴性对照组(Unheat 组), 流式细胞术检测 DC 的表型。建立 CT-26 细胞移植瘤模型, 设 Ad5-CCL20/Heat、Heat、Ad5-CCL20、Ad5-GFP 和 Control 组, 观察各组荷瘤小鼠肿瘤生长和生存时间; 采用 ELISAPOT 法和 LDH 法分别检测脾组织 T 淋巴细胞分泌 IFN- $\gamma$  的能力和对 CT-26 细胞的 CTL 杀伤活性, 免疫组化法检测肿瘤组织 DC 浸润情况。**结果:** Ad5-CCL20 转染 CT-26 细胞后可高表达 CCL20, 且对 iDC、mDC 都具有趋化活性, 对 iDC 更为明显( $P < 0.05$ )。CT-26 细胞热激后可高表达诱导型 HSP70 和 GP96。与 Control、Unheat 组相比, Heat 组细胞蛋白诱导后 DC 的 CD80、CD86、CCR6 和 MHC-II 的表达率明显升高(均  $P < 0.01$ )。与 Control、Ad5-GFP、Ad5-CCL20 组和 Heat 组相比, 联合治疗组荷瘤小鼠的肿瘤抑制最为明显[( $876.8 \pm 108.7$ ) vs ( $2862 \pm 85.52$ )、( $2660 \pm 142.6$ )、( $2447 \pm 100.6$ )、( $1608 \pm 135.3$ )mm<sup>3</sup>, 均  $P < 0.01$ ], 生存时间明显延长(均  $P < 0.05$ )。联合治疗后的荷瘤小鼠脾组织 T 淋巴细胞的 CTL 活性要明显高于另外四组(均  $P < 0.05$ ), 其瘤组织中 CD11c<sup>+</sup> DC 的阳性率也明显增高(均  $P < 0.05$ )。**结论:** 重组腺病毒 Ad5-CCL20 联合热疗可招募并促进 DC 成熟和抗原提呈, 明显抑制肿瘤生长, 并延长荷瘤小鼠的生存期, 提示其对结肠癌有潜在的治疗作用。

**[关键词]** 趋化因子; CCL20; 腺病毒; 树突状细胞; 热疗; 结肠癌

**[中图分类号]** R735.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)05-0633-07

## Inhibitory effect of recombinant adenovirus Ad5-CCL20 combined with hyperthermia on colon carcinoma CT-26 cells xenografts in mice

ZHU Xujun, SU Ning, YAO Jun, XU Kai, LI Xinxing, WANG Weijun, HU Zhiqian, SUN Yanping (Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the inhibitory effect of recombinant adenovirus Ad5-CCL20 combined with hyperthermia on the growth of mouse colon carcinoma CT-26 cells in mice transplanted tumor. **Methods:** Colon carcinoma CT-26 cells were transfected with recombinant adenovirus Ad5-CCL20, the expression of chemokine CCL20 was assessed by ELISA method and its chemotaxis to dendritic cell (DC) was detected by chemotaxis assays. Western blotting was performed to detect the expression of HSP70 and GP96 after CT-26 cells heated. DC were induced with protein exosomes from heat-shock CT-26 cells (heat group), control group and negative group as controls. Phenotypes of DC were detected by flow cytometry. The CT-26 cells were subcutaneous inoculated into BALB/c mice, then the BALB/c mice was immunotherapied by intramuscular injection of recombinant adenovirus Ad5-CCL20 combined with treatment of heat (combined therapy group), and simultaneously set hyperthermia alone heat group, Ad5-CCL20 alone group, Ad5-GFP group and control group. The tumor volumes and survival rate of tumor-bearing in each group was observed. ELISAPOT method was used to examine the IFN- $\gamma$  production of spleen-derived T lymphocytes and the activity of cytotoxic T lymphocytes (CTL) was measured by lactate dehydrogenase (LDH) method. The infiltration of DC at the tumor site was examined with immunohistochemistry. **Results:** The CT-26 cells highly expressed chemokine CCL20 after the transfection of recombinant adenovirus

**[基金项目]** 上海市科委医学引导项目资助(No. 124119a3602)。Project supported by the Medical Guide Program of Science and Technology Committee of Shanghai (No. 124119a3602)

**[作者简介]** 祝徐军(1989-),男,江西上饶人,硕士生,主要从事大肠癌的肿瘤免疫治疗及机制研究, E-mail: 425834049@qq.com

**[通信作者]** 孙延平(SUN Yanping, corresponding author), E-mail: sunyanping2003@163.com

Ad5-CCL20. CCL20 showed obviously chemotaxis activity both to iDC and mDC, especially iDC ( $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that the expression of HSP70 and GP96 were detected in CT-26 cells after heat shock, but not in pure CT-26 cells. Compared with control and unheat group, flow cytometry demonstrated that the protein from heat-shocked CT-26 cells could significantly up-regulate expressions of CD80, CD86, CCR6 and MHC-II molecules on the DC ( $P < 0.01$ ). Compared with all other groups, the growth of tumor in Ad5-CCL20/heat group was significantly inhibited ( $[876.8 \pm 108.7]$  vs  $[2862 \pm 85.52]$ ,  $[2660 \pm 142.6]$ ,  $[2447 \pm 100.6]$ ,  $[1608 \pm 135.3]$  mm<sup>3</sup>,  $P < 0.01$ ), and the survival time of tumor-bearing mice was prolonged ( $P < 0.05$ ). Results of ELISAPOT and LDH respectively showed that the CTL activity of spleen-derived T lymphocytes in Ad5-CCL20/heat group was higher as compared with all other groups ( $P < 0.05$ ). The immunohistochemical assay also showed that the infiltration proportion of CD11c<sup>+</sup> DC was obviously increased in the Ad5-CCL20/heat group compared with Control group, Ad5-GFP group, Ad5-CCL20 group and Hyperthermia group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Recombinant adenovirus Ad5-CCL20 combined with hyperthermia significantly inhibited tumor growth and prolonged the survival time of tumor-bearing mice by recruiting and promoting DC maturation and antigen presentation, which could be a potential therapy for colon cancer.

[ **Key words** ] chemokine; CCL20; dendritic cells; hyperthermia; colon cancer

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 633-639. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.008 ]

肿瘤是威胁人体健康的重要疾病之一。随着生活水平的提高,大肠癌的发病率呈增长趋势,发病人群呈现年轻化<sup>[1]</sup>。对于部分年轻的大肠癌患者而言,肿瘤具有生长速度快、恶性程度高等特点,对放疗化疗不敏感,且初次诊断时已处于晚期,丧失了手术机会。肿瘤免疫治疗以其良好的疗效使得其地位在肿瘤治疗领域逐渐凸显,给晚期大肠癌患者带来了希望。DC疫苗是目前研究最多也是相对最成熟的免疫治疗方法,但有研究<sup>[2]</sup>发现,肿瘤部位的DC数量有限,且大部分处于非成熟或失能状态,无法有效提呈抗原,影响发挥抗肿瘤作用。因此本实验通过趋化因子CCL20趋化DC至肿瘤位点,联合热疗,打破肿瘤微环境的抑制作用,探讨该两者联合治疗对肿瘤生长的抑制作用及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

重组腺病毒 Ad5-CCL20 购自北京本元正阳公司, RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, FBS、EDTA-Trypsin 购自杭州四季青公司, ELISA、ELIASPOT 试剂盒、抗 HSP70、GP96 抗体购自上海达科为生物技术有限公司, 流式抗体 PE-CD80(克隆号 MEM-233)、PE-CD86(克隆号 145-2C11)、PE-CCR6(克隆号 29-2L17)、APC-MHC-II(克隆号 AF6-120-1)均购自上海优宁维生物技术有限公司, EDTA 抗原修复液、PBS 缓冲液、苏木精染液、一抗 CD11c、二抗 HRP-山羊抗兔购自武汉谷歌生物有限公司, BSA 购自 Solarbio 公司, Transwell 小室购自北京优尼康生物科技有限公司, 小鼠结肠癌 CT-26 细胞购自上海

中科院, BALB/c 小鼠购自上海实验动物中心[动物合格证号 SCXK(沪)2012-0002]。

### 1.2 Ad5-CCL20 转染结肠癌 CT-26 细胞后的表达检测

CT-26 细胞接种于六孔板, 每孔 2 ml, 细胞数为  $5 \times 10^5$  个, 培养过夜。次日, 50 MOI 的 Ad5-CCL20、Ad5-GFP 分别转染 CT-26 细胞, 未转染 CT-26 细胞为对照组。每 12 h 收取上清一次, 共 6 次。按 ELISA 试剂盒操作说明检测两组细胞上清中 CCL20 水平。

### 1.3 小鼠骨髓来源 DC 的制备和培养

无菌条件下取 BALB/c 小鼠股骨骨髓, 冲洗骨髓细胞, Tris-NH<sub>4</sub>Cl 去除红细胞, 加入含 GM-CSF (10 ng/ml)、IL-4 (1 ng/ml) 和 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬, 于六孔板 ( $1 \times 10^6$  细胞/孔) 中培养, 隔天补液, 第 5 天收集半贴壁细胞用于实验。

### 1.4 Transwell 法检测 CCL20 对 DC 的趋化作用

将培养至第 5 天的 DC 分为两组, 一组为未予任何处理的未成熟 DC (iDC), 另一组为在培养结束前 24 h 予 LPS 诱导的成熟 DC (mDC)。采用 Transwell 趋化小室, 下室各加入 600  $\mu$ l CT-26 细胞培养上清, 上室分别加入 100  $\mu$ l (细胞数  $1 \times 10^6$ ) iDC 和 mDC, 于 37  $^{\circ}$ C、5% 培养箱中孵育 4 h, 计数下室上清中的细胞数。

### 1.5 DC 的成熟诱导

将 CT-26 细胞分为两组 ( $1 \times 10^6$  个/组), 其中 Heat 组于 43  $^{\circ}$ C 条件下热激 1 h, Unheat 组不予处理, 提取各组细胞蛋白, Western blotting 检测 HSP70(诱导型)、GP96 的表达情况。收集制备的 iDC ( $5 \times 10^5$ /ml), 以

2 ml/孔细胞悬液接种至六孔板中, 分别加入 20  $\mu$ l Heat 组和 Unheat 组细胞蛋白(5 mg/ml), 加入等体积 PBS 为 Control 组, 37  $^{\circ}$ C 恒温孵育 24 h。

### 1.6 流式细胞术检测 DC 表型

将各组  $5 \times 10^5$  个 DC 重悬于 50  $\mu$ l PBS 中, 加入荧光标记抗体 PE-CD80、PE-CD86、PE-CCR6、APC-MHC-II 抗体, 4  $^{\circ}$ C 下 30 min, PBS 洗 3 遍, 用流式细胞仪检测。

### 1.7 Ad5-CCL20 联合热疗对荷瘤小鼠的治疗方法

将 6~8 周龄的雄性 BALB/c 小鼠通过左侧皮下按每只接种  $5 \times 10^5$  个 CT-26 细胞建立荷瘤小鼠模型。将成瘤小鼠随机分为 Control 组、Ad5-GFP 组、Ad5-CCL20 组、Heat 组、Ad5-CCL20/Heat 组, 每组小鼠各 10 只。Ad5-GFP 组、Ad5-CCL20 组和 Ad5-CCL20/Heat 组分别于接种后第 7 天瘤内注射空载体病毒 Ad5-GFP 和重组腺病毒 Ad5-CCL20(50  $\mu$ l/只)。Heat 组和 Ad5-CCL20/Heat 组于接种后第 8 天开始第一次热疗, 采用恒温水浴锅(42~43  $^{\circ}$ C)局部水浴 1 h, 每 3 d 热疗 1 次, 共 3 次; Control 组、Ad5-GFP 组和 Ad5-CCL20 组继续观察。用游标卡尺测量肿瘤长短径, 每 2 d 测 1 次, 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) = 长径(mm)  $\times$  短径(mm)<sup>2</sup>/2, 绘制肿瘤生长曲线。实验重复 3 次。

### 1.8 ELISAPOT 法检测分泌 IFN- $\gamma$ 的 T 淋巴细胞数

治疗结束后第 5 天, 无菌下取各组荷瘤小鼠脾脏, 200 目尼龙网轻轻碾磨, Tris-NH<sub>4</sub>Cl 去除红细胞, 用尼龙毛柱分离制备单个核细胞, 即为所需的 CTL 效应细胞。参照 ELISAPOT 试剂盒使用说明书进行检测。调整 CTL 至  $1 \times 10^6$ /ml、CT-26 细胞至  $1 \times 10^5$ /ml, 以效靶比 60:1 加入预包被 IFN- $\gamma$  抗体的 96 孔板中, 37  $^{\circ}$ C 24 h。以 ELISAPOT 分析仪检测色斑数目。

### 1.9 LDH 法检测 CTL 的杀伤效应

将上述效应和靶细胞按效靶比为 25:1、50:1、75:1、100:1 加入 96 孔 U 型板中, 靶细胞每孔  $1 \times 10^4$  个, 自发释放孔不加细胞, 最大释放孔中加 1% NP40, 37  $^{\circ}$ C、4 h, 200  $\times$  g 离心 4 min。每孔吸上清 50  $\mu$ l 转移至 96 孔平底板中, 加入 50  $\mu$ l LDH 底物液, 常温 30 min, 加入 50  $\mu$ l 终止液, 酶标仪 450 nm 处测 D 值。按公式计算 CTL 杀伤效应, 杀伤率(%) = (实验组释放孔 D 值 - 效应细胞自发释放孔 D 值 - 靶细胞自发释放孔 D 值) / (靶细胞最大释放孔 D 值 - 靶细胞自发释放孔 D 值)  $\times$  100%。

### 1.10 免疫组化检测肿瘤组织中 DC 的浸润

免疫组化技术检测 CD11c<sup>+</sup> DC 浸润。肿瘤组

织切片脱腊水化, 于 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 9.0)中抗原修复, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温避光孵育, 3% BSA 封闭。抗体稀释液稀释兔抗鼠 CD11c 抗体(1:100)、HRP-山羊抗兔抗体(1:200)。加一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜(以 PBS 代替一抗作为阴性对照), 加二抗室温孵育, DAB 显色, 光镜观察, 阳性为棕黄色。

双盲法读片。每切片任选取 5 个视野, 400 倍下计算 CD11c<sup>+</sup> DC 阳性细胞和总细胞数目。以 5 个高倍视野下 CD11c<sup>+</sup> DC 阳性细胞百分比代表 DC 浸润程度, 每组小鼠各计数 30 张切片。

### 1.11 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间两两比较采用 *t* 检验, Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染 Ad5-CCL20 后 CT-26 细胞 CCL20 的表达

ELISA 结果(图 1)显示, 与未转染的 CT-26 细胞(Control 组)和转染空载体的 CT-26 细胞(Ad5-GFP 组)相比, 转染 Ad5-CCL20 的 CT-26 细胞可高表达趋化因子 CCL20( $P < 0.01$ )。

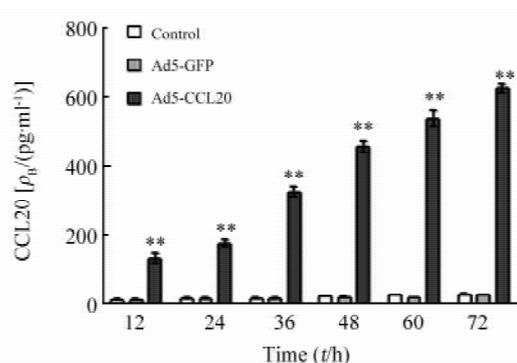


图 1 Ad5-CCL20 转染后 CT-26 细胞 CCL20 的表达  
Fig.1 Expression of CCL20 after CT-26 cell transfected by Ad5-CCL20

\*\*  $P < 0.01$  vs control or Ad5-GFP group

### 2.2 趋化因子 CCL20 对 DC 的趋化作用

Transwell 检测结果(图 2)显示, 与 Control 组和 Ad5-GFP 组相比, Ad5-CCL20 组培养上清对 iDC、mDC 都具有明显趋化作用( $P < 0.01$ ), 且对 iDC 的趋化作用更加明显( $P < 0.05$ )。

### 2.3 热激促进 CT-26 细胞表达诱导型 HSP70、GP96

Western blotting 检测结果(图 3)显示, 与单纯的 CT-26 细胞相比, 经 43  $^{\circ}$ C 热诱导 1 h 的 CT-26 细

胞可高表达诱导型 HSP70、GP96。

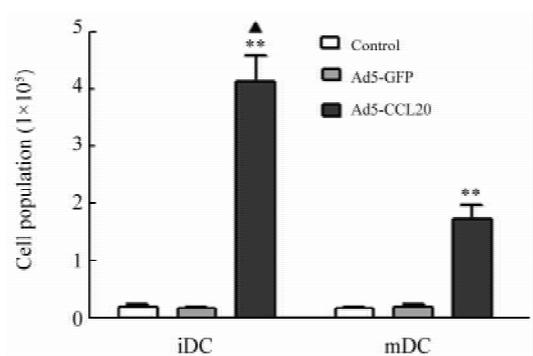


图 2 趋化因子 CCL20 对 iDC、mDC 的趋化活性

Fig. 2 Chemotactic activity of chemokine CCL20 to iDC and mDC

\*\*  $P < 0.01$  vs Control or Ad5-GFP;  
<sup>▲</sup>  $P < 0.05$  vs mDC

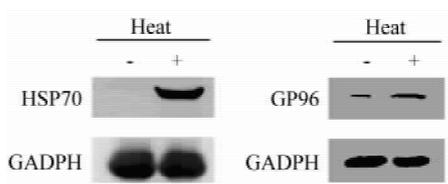


图 3 CT-26 细胞热激后诱导型 HSP70、GP96 的表达

Fig. 3 Expressions of induced HSP70 and GP96 in the CT-26 cells after treatment of heat

#### 2.4 热激后的 CT-26 细胞蛋白上调 DC 表型分子的表达

流式细胞术检测结果显示:与 Control 组、Un-heat 组相比, Heat 组诱导的 DC 表型分子 CD80 [ ( 88.80 ± 0.69 )% vs ( 46.17 ± 3.60 )%、( 42.43 ± 6.91 )% ], CD86 [ ( 82.07 ± 1.70 )% vs ( 49.37 ± 1.41 )%、( 48.93 ± 3.74 )% ], CCR6 [ ( 61.47 ± 6.75 )% vs ( 16.03 ± 4.42 )%、( 17.47 ± 3.04 )% ], MHC-II [ ( 72.77 ± 5.41 )% vs ( 52.33 ± 3.63 )%、( 51.1 ± 2.07 )% ] 的表达率明显升高(均  $P < 0.01$ ),提示通过热休克促进结肠癌 CT-26 细胞产生的 HSPs,可诱导 DC 成熟。

#### 2.5 Ad5-CCL20 联合热疗明显抑制肿瘤的生长和延长荷瘤小鼠生存时间

荷瘤小鼠治疗结果(图 4)显示,CT-26 荷瘤小鼠经热疗或 Ad5-CCL20 联合热疗后,肿瘤生长速度明显减慢,荷瘤 30 d 后,瘤体积明显小于 Control 组、Ad5-GFP 组和 Ad5-CCL20 组 [ ( 876.8 ± 108.7 )、( 1 608 ± 135.3 ) vs ( 2 862 ± 85.52 )、( 2 660 ±

142.6 )、( 2 447 ± 100.6 )mm<sup>3</sup>,均  $P < 0.01$  ],且联合治疗要比单纯热疗的抑瘤效果更加明显(  $P < 0.01$  )。另外,联合治疗组或热疗组荷瘤鼠生存时间明显长于 Control 组、Ad5-GFP 组和 Ad5-CCL20 组 [ ( 83 ± 19 )、( 58 ± 7 ) vs ( 48 ± 8 )、( 46 ± 6 )、( 49 ± 9 ) d,  $P < 0.05$  ],而联合治疗组的生存时间又显著长于单纯热疗组(  $P < 0.05$  )。

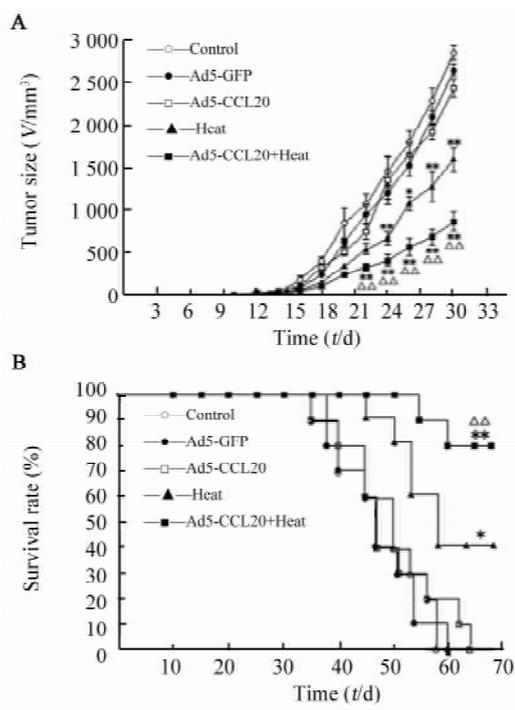


图 4 各处理组结肠癌 CT-26 细胞荷瘤小鼠的肿瘤体积和存活率

Fig. 4 Tumor volume and survival rate of tumor-bearing mice with colorectal carcinoma CT26 in various treatment groups

A: Growth curve of colorectal carcinoma;

B: Survival curve of the tumor-bearing mice

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control or Ad5-GFP or Ad5-CCL20 group; <sup>△△</sup>  $P < 0.05$  vs heat group

#### 2.6 联合治疗后荷瘤小鼠脾组织 T 淋巴细胞分泌 IFN-γ 的细胞数增多

ELISAPOT 法检测显示,联合治疗组分泌 IFN-γ 的 T 细胞斑点数目明显多于 Control、Ad5-GFP、Ad5-CCL20 和 Heat 组 [ ( 624 ± 55 ) vs ( 90 ± 25 )、( 102 ± 29 )、( 133 ± 38 )、( 421 ± 35 )个,  $P < 0.01$  ],间接证明了联合治疗能够显著增强荷瘤小鼠体内的免疫效应,有效激发 CTL 分泌 IFN-γ。

#### 2.7 联合治疗后荷瘤小鼠脾淋巴细胞的细胞毒活性明显增强

细胞毒活性检测结果(图 5)显示,与 Control、

Ad5-GFP、Ad5-CCL20 和 Heat 组相比, 联合治疗组小鼠脾细胞对 CT-26 细胞具有更强的杀伤活性, 且随着效应细胞的增加, 杀伤活性明显增强[ E: T = 100: 1 时, ( 56 ± 5. 29 )% vs ( 10. 67 ± 1. 79 )%、( 6. 33 ± 1. 53 )%、( 7. 67 ± 2. 08 )%、( 26. 33 ± 3. 22 )%, 均  $P < 0.01$  ]。

2.8 联合治疗促进肿瘤组织中 DC 的浸润

免疫组化结果( 图 6、7 )显示, Control、Ad5-GFP 和 Ad5-CCL20 这三组的 CD11c<sup>+</sup> DC 阳性率分别为 ( 26. 08 ± 6. 25 )%、( 28. 68 ± 9. 65 )%、( 29. 47 ± 7. 39 )%, 组间差异无意义(  $P > 0.05$  )。与 Ad5-CCL20 组比较, Heat 组的 CD11c<sup>+</sup> DC 阳性细胞率要稍高[ ( 34. 59 ± 9. 38 )% vs ( 29. 47 ± 7. 39 )%,  $P < 0.05$  ], 而联合组的 CD11c<sup>+</sup> DC 阳性率明显高于 Heat 组[ ( 63. 14 ± 10. 32 )% vs ( 34. 59 ± 9. 38 )%,  $P < 0.01$  ]。结果表明, Ad5-CCL20 联合热疗有效地招募 DC 至肿瘤区域并促进其进一步成熟。

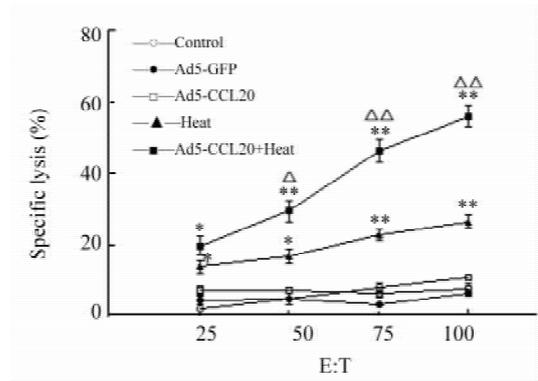


图 5 不同处理组荷瘤小鼠脾 T 淋巴细胞的 CTL 杀伤活性

Fig. 5 CTL activity of spleen-derived T lymphocyte in the tumor-bearing mice of various treatment groups

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control or Ad5-GFP or Ad5-CCL20 group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs heat group

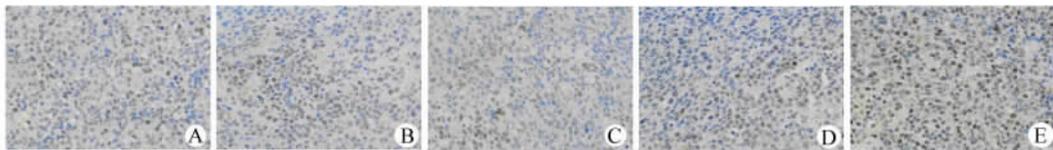


图 6 免疫组化检测不同处理组荷瘤小鼠肿瘤组织中 DC 的浸润情况( ×400 )

Fig. 6 Infiltration situations of DC in tumor tissues of the tumor-bearing mice from various treatment groups examined by immunohistochemical staining assay ( ×400 )

A: Control group; B: Ad5-GFP group; C: Ad5-CCL20 group; D: Heat group; E: Ad5-CCL20 + heat group

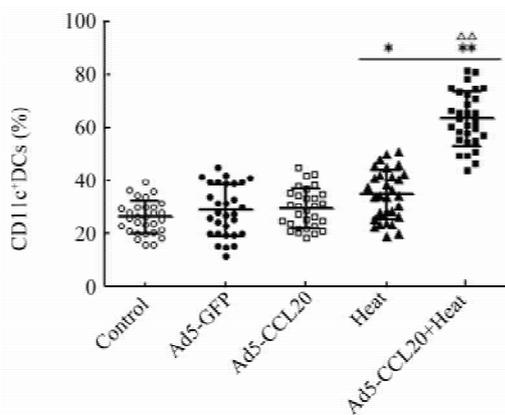


图 7 各处理组荷瘤小鼠肿瘤组织 CD11c<sup>+</sup> DC 的比例

Fig. 7 Percentages of DC with CD11c<sup>+</sup> molecule in tumor tissues of the tumor-bearing mice from various treatment groups

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control or Ad5-GFP or Ad5-CCL20 group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs heat group

3 讨论

免疫学机制认为, 人体肿瘤的发生和发展是宿主免疫系统对肿瘤细胞免疫监视失败的结果<sup>[3,4]</sup>。在免疫系统中, DC 是免疫系统最有效的抗原提呈细胞, 将摄取、加工过的抗原通过 MHC- I 或 MHC- II 类分子提呈给原始 T 淋巴细胞, 激活宿主细胞毒性反应<sup>[5-8]</sup>。然而, 研究<sup>[9-10]</sup>提示肿瘤患者体内的 DC 细胞数量明显减少, 抗原提呈功能受到抑制, 这是肿瘤患者体内抗肿瘤反应失败的主要原因之一。

有研究<sup>[11-12]</sup>指出, DC 可浸润至肿瘤局部, 如胃癌、前列腺癌、乳腺癌、黑色素瘤等, 并且 DC 的浸润程度与预后有明显的正相关。机体能够自行招募 DC 至肿瘤区域, 趋化因子 CCL20 在其中扮演着重要的角色, 因为 CCL20 的配体 CCR6 主要分布于 iDC、效应 T 细胞、记忆 B 和 T 细胞。本实验通过将重组腺病毒 Ad5-CCL20 转染结肠癌 CT-26 细胞, 转

染 Ad5-CCL20 的 CT-26 细胞可持续、大量地表达趋化因子 CCL20, 且趋化实验证明 CCL20 对 iDC、mDC 具有明显的趋化作用, 尤其是 iDC。推测通过瘤内注射 Ad5-CCL20, 可使肿瘤部位高效、持续地表达 CCL20, 招募大量自体 iDC、mDC 至肿瘤区域。这种方法与目前大多数仍处于实验和临床前期研究阶段的负载肿瘤抗原的 DC 疫苗相比, 其优点在于无需考虑肿瘤抗原变异、DC 寿命长短等缺点, 并可有效地解决肿瘤位点 DC 数量不足这一问题。然而, 有研究<sup>[13]</sup>认为, 招募至肿瘤位点的 DC 依然处于整个机体的免疫抑制微环境中, 低水平表达 MHC 类分子和共刺激分子, 而且抗原提呈功能弱可使肿瘤部位浸润的 T 淋巴细胞绝大多数依然处于幼稚期。

热疗是将肿瘤相关部位的温度升至 40 ~ 43 °C 治疗肿瘤的一种新方法, 热疗的作用机制主要包括: (1) 高热对肿瘤细胞有直接的不可逆性损伤, 对肿瘤细胞的杀伤作用表现为抑制 RNA、DNA、蛋白质的合成, 细胞酶活性的改变以及对细胞周期的影响等<sup>[14]</sup>; (2) 热疗还能对肿瘤细胞起间接杀伤作用, 表现为 NK 细胞在肿瘤位点增多, 而 IL-10、TNF- $\gamma$ 、IL-12 等免疫抑制因子下调<sup>[15]</sup>; (3) 热疗诱导产生的热激蛋白(heat shock protein, HSP)可增强抗肿瘤免疫应答。

本实验通过将温度维持在 43 °C 条件下对结肠癌 CT-26 细胞加热 1 h, CT-26 细胞 HSP70、GP96 表达明显增加。HSP70 和 GP96 等分子可以和肿瘤中的抗原肽结合, 形成 HSP-抗原肽复合物, 促进抗原交叉提呈至 DC 表面 MHC I 分子, 被 CD8<sup>+</sup> T 细胞识别引起其活化。同时, HSP 也可与 DC 表面的相关受体结合, 诱导 DC 表达多种细胞因子、趋化因子及受体, 增强 DC 的抗原提呈功能, 特异性激活肿瘤抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 引起抗原特异性 CTL 应答杀伤肿瘤<sup>[16]</sup>。将热激后提取的细胞蛋白与 BALB/c 小鼠骨髓来源的 DC 共培养 24 h, Heat 组诱导后的 DC 表型分子 CD80、CD86、CCR6、MHC-II 的表达率明显升高( $P < 0.01$ )。Bendz 等<sup>[17]</sup>证实, HSP-肽复合物可促进未成熟的 DC 交叉提呈抗原, 同时诱导其成熟, 上调共刺激因子 CD80、CD86 以及 MHC II 类分子的表达, 并分泌细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ , 且这些细胞因子又可以反过来诱导 iDC 成熟。这也说明本实验通过热疗不仅可以打破肿瘤位点的区室化作用, 同时诱导肿瘤细胞产生热激蛋白, 促进趋化因子 CCL20 招募至肿瘤区域的 DC 细胞成熟。

本实验通过建立结肠癌 CT-26 细胞肿瘤模型, 采用瘤内注射重组腺病毒 Ad5-CCL20 并联合热疗,

结果发现, 联合治疗比单纯的热疗更能显著地抑制肿瘤生长, 并延长荷瘤小鼠生存时间。有研究<sup>[19]</sup>报道, 瘤内注射重组腺病毒 CCL20 能够通过招募 DC 至肿瘤位点, 达到抑制肿瘤生长的效果; 但由于肿瘤微环境的免疫抑制作用, 招募至肿瘤区域的 DC 仍处于失能状态, 未能有效地诱导肿瘤特异性免疫应答。因此, 本实验瘤内注射重组腺病毒 Ad5-CCL20 未能达到抑制肿瘤生长的疗效, 可能原因有: (1) 建立肿瘤模型时, 接种肿瘤细胞过量, 肿瘤生长过快; (2) 实体瘤内注射腺病毒困难, 实际注射量不够; (3) 肿瘤体积测量误差, 后期实验可采用比较肿瘤重量的方法。通过免疫组化进一步检测肿瘤组织中 DC 的浸润程度, 结果显示联合治疗组肿瘤组织中 CD11c<sup>+</sup> DC 浸润最为明显。在抗肿瘤免疫反应中, 有效地激活 T 细胞免疫是 DC 与原始 T 淋巴细胞相互作用的结果。DC 激活 T 细胞需要借助其细胞表面分子的相互作用, 一是通过 DC 表面 MHC 分子-抗原肽复合物与 T 细胞表面受体特异性结合; 二是通过 DC 表面共刺激分子(如 CD80/86)与 T 细胞表面黏附分子(如 CD28)相互作用, 充分发挥抗原提呈作用, 有效地激活初始 T 淋巴细胞, 诱导机体产生特异性免疫应答<sup>[20]</sup>。T 细胞主要有 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 两类, 是抗肿瘤活性中重要的效应细胞, IFN- $\gamma$  的分泌水平是 CD8<sup>+</sup> 细胞活性主要指标<sup>[21]</sup>。本实验中联合治疗后的小鼠脾脏来源 T 淋巴细胞的 CTL 活性最强。

综上, 重组腺病毒 Ad5-CCL20 联合热疗可招募并促进 DC 成熟和抗原提呈, 明显抑制结肠癌细胞移植瘤的生长, 并延长荷瘤小鼠的生长期, 实验结果可为结肠癌治疗提供一条新途径。

## [参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] ZHANG J X, LI B L, LIN Z Q, et al. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in patients with intracranial large artery atherosclerosis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11495-11502.
- [3] CHOW M T, MOLLER A, SMYTH M J. Inflammation and immune surveillance in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(1): 23-32. DOI: 10.1016/j.semcancer.2011.12.004.
- [4] PERANZONI E, RIVAS-CAICEDO A, BOUGHERARA H, et al. Positive and negative influence of the matrix architecture on antitumor immune surveillance [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(23): 4431-4448. DOI:10.1007/s00018-013-1339-8.
- [5] TURNIS M E, ROONE C M. Enhancement of dendritic cells as

- vaccines for cancer [ J ]. *Immunotherapy*, 2010, 2( 6 ): 847-862. DOI:10.2217/IMT.10.56.
- [ 6 ] GUILLIAMS M, GINHOUX F, JAKUBZICK C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14( 8 ): 571-578. DOI:10.1038/nri3712.
- [ 7 ] HEESTERS B A, MYERS R C, CARROLL M C. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14( 7 ): 495-504. DOI:10.1038/nri3689.
- [ 8 ] PALUCKA K, BANCHEREAU J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12( 4 ): 265-277. DOI: 10.1038/nrc3258.
- [ 9 ] ZONG J, KESKINOV A A, SHURIN G V, et al. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65( 7 ): 821-833. DOI: 10.1007/s00262-016-1820-y.
- [ 10 ] ORSINI G, LEGITIMO A. Quantification of blood dendritic cells in colorectal cancer patients during the course of disease [ J ]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 20( 2 ): 267-276. DOI:10.1007/s12253-013-9691-4.
- [ 11 ] SABADO R L, BHARDWAJ N. Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move [ J ]. *Nature*, 2015, 519( 7543 ): 300-301. DOI:10.1038/nature14211.
- [ 12 ] GULUBOVA M V, ANANIEV J R, VLAYKOVA T I, et al. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer [ J ]. *Int J Colorectal Dis*, 2012, 27( 2 ): 159-169. DOI: 10.1007/s00384-011-1334-1.
- [ 13 ] VERMI W, BONECCHI R, FACCHETTI F, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells ( plasmacytoid monocytes ) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas [ J ]. *J Pathol*, 2003, 200( 2 ): 255-268. DOI:10.1002/path.1344.
- [ 14 ] HILGER I, RAPP A, GREULICH K O, et al. Assessment of DNA damage in target tumor cells after thermoablation in mice [ J ]. *Radiology*, 2005, 237( 2 ): 500-506. DOI: 10.1148/radiol.2372041451.
- [ 15 ] AHLERS O, HILDEBRANDT B, DIEING A. Stress induced changes in lymphocyte subpopulations and associated cytokines during whole body hyperthermia of 41.8-42.2 degrees C [ J ]. *Eur J Appl Physiol*, 2005, 95( 4 ): 298-306. DOI: 10.1007/s00421-005-0009-4.
- [ 16 ] CHEN T, GUO J, HAN C, et al. Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway [ J ]. *J Immunol*, 2009, 182( 3 ): 1449-1459. DOI:10.4049/jimmunol.182.3.1449.
- [ 17 ] BENDZ H, RUHLAND S C, PANDYA M J, et al. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling [ J ]. *J Biol Chem*, 2007, 282( 43 ): 31688-31702. DOI:10.1074/jbc.M704129200.
- [ 18 ] KATSUYOSHI F, LUIS S, EDGAR G E, et al. Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs [ J ]. *J Clin Invest*, 2004, 113( 5 ): 774-783. DOI: 10.1172/JCI200419762.
- [ 19 ] KAPINA M A, RUBAKOVA E I, MAJOROV K B, et al. Capacity of lung stroma to educate dendritic cells inhibiting mycobacteria-specific T-cell response depends upon genetic susceptibility to tuberculosis [ J/OL ]. *PLoS One*, 2013, 8( 8 ): e72773 [ 2016-08-20 ] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744498/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0072773.
- [ 20 ] SCHIAVONI G, GABRIELE L, MATTEI F. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players [ J ]. *Front Oncol*, 2013, 3: 90. DOI:10.3389/fonc.2013.00090.
- [ 21 ] MOSOIAN A. Intracellular and extracellular cytokine-like functions of prothymosin  $\alpha$ : implications for the development of immunotherapies [ J ]. *Future Med Chem*, 2011, 3( 9 ): 1199-1208. DOI: 10.4155/fmc.11.72.
- [ 收稿日期 ] 2016-08-28 [ 修回日期 ] 2016-09-14  
[ 本文编辑 ] 党瑞山