

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.003

CpG/OX40 原位疫苗联合抗血管生成药物增强小鼠全身性抗肿瘤效应

魏晓芳¹, 徐淑华¹, 辛策², 赵鹏³, 孙伟红³ (1. 康复大学青岛中心医院暨青岛市中心医院 检验科, 山东 青岛 266042; 2. 康复大学青岛中心医院暨青岛市中心医院 口腔科, 山东 青岛 266042; 3. 康复大学青岛中心医院暨青岛市中心医院 生物治疗中心, 山东 青岛 266042)

【摘要】目的:探究 CpG 寡核苷酸和 OX40 激动剂抗体原位疫苗(CpG + OX40)联合抗血管生成药物安罗替尼(anlotinib)治疗小鼠卵巢癌的全身抗肿瘤效应及免疫机制。**方法:**建立双侧(原发侧和转移侧)ID8 细胞小鼠卵巢癌模型, 分组给予安罗替尼、CpG + OX40 或 CpG + OX40 + 安罗替尼(三联疗法)治疗。通过监测肿瘤体积和记录生存期评估各治疗组的抗肿瘤效果。采用流式细胞术和 ELISA 法检测肿瘤微环境中的免疫细胞和细胞因子变化, qRT-PCR 法检测移植瘤组织中反映血管密度和成熟度的分子的相对表达量。**结果:**与其他治疗组相比, 三联疗法显著抑制治疗侧(原发侧)和未治疗侧(转移侧)肿瘤的生长($P < 0.01$), 延长荷瘤鼠生存期($P < 0.05$)。流式术检测结果显示, 三联疗法显著提高原发侧和转移侧肿瘤内 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞浸润比例($P < 0.05$)。免疫细胞耗竭实验表明, 单独耗竭 CD4⁺ T、CD8⁺ T 或 NK 细胞时, 三联疗法对原发侧肿瘤的抑制作用无明显变化, 而转移侧的抗肿瘤作用显著减弱但仍强于 PBS 组($P < 0.01$)。仅当 3 种免疫细胞同时耗竭时, 肿瘤抑制效应与 PBS 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。ELISA 法检测结果显示, 与各治疗组相比, 三联疗法组原发侧和转移侧肿瘤内 Th1 细胞相关细胞因子明显增加($P < 0.05$), Th2 细胞相关细胞因子的表达显著降低($P < 0.05$)。qRT-PCR 法结果显示, 与对照组相比, 三联疗法组双侧移植瘤组织内的 CD31 表达显著降低($P < 0.0001$), 血管生成素(Ang)-1/Ang-2 的比值显著升高($P < 0.001$)。**结论:** CpG + OX40 原位疫苗联合安罗替尼具有更强的全身抗肿瘤效应, 适应性免疫和固有免疫及血管密度调控在其中发挥关键作用, 为晚期肿瘤患者提供潜在治疗选择。

【关键词】 原位疫苗; CpG/OX40; 安罗替尼; 肿瘤免疫微环境; 卵巢癌

【中图分类号】 R737.31; R730.51 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-385x(2025) 08-0806-08

CpG/OX40 *in situ* vaccine combined with anti-angiogenic drugs enhances the systemic anti-tumor effects against mouse ovarian cancer

WEI Xiaofang¹, XU Shuhua¹, XIN Ce², ZHAO Peng³, SUN Weihong³ (1. Department of Clinical Laboratory, Qingdao Central Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266042, Shandong, China; 2. Department of Stomatology, Qingdao Central Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266042, Shandong, China; 3. Biotherapy Center, Qingdao Central Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266042, Shandong, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the systemic anti-tumor effects and immune mechanisms of CpG oligonucleotide and OX40 agonist antibody *in situ* vaccine (CpG + OX40) combined with anti-angiogenic drug anlotinib in the treatment of mouse ovarian cancer. **Methods:** A bilateral (primary and metastatic) ID8 cell mouse ovarian cancer model was established. And tumor-bearing mice were treated with anlotinib, CpG + OX40, or CpG + OX40 + anlotinib (the triple treatment), respectively. The anti-tumor effects of different treatment groups were evaluated by monitoring tumor volume and survival time. The changes of immune cells and cytokines in the tumor microenvironment were detected using flow cytometry and ELISA. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the relative expression levels of molecules reflecting vascular density and maturity in tumor tissues. **Results:** Compared with other treatment groups, the CpG + OX40 + anlotinib treatment significantly inhibited tumors on the treatment side (primary side) and the untreated side (metastatic side) ($P < 0.01$), and significantly improved the survival time of tumor-bearing mice ($P < 0.05$). The flow cytometry analyses showed that the CpG + OX40 + anlotinib treatment significantly increased the proportion of tumor infiltrating CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in tumors at both the treated and untreated sides ($P < 0.05$). Immune cell depletion confirmed that when CD4⁺ T, CD8⁺ T, or NK cells were depleted alone, there was no significant difference in the inhibitory effects of

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目(No. 82072927); 青岛市 2022 年度医药卫生科研指导项目(No. 2022-WJZD065)

【作者简介】 魏晓芳(1982—), 女, 硕士, 主要从事分子免疫和肿瘤疫苗的研究

【通信作者】 孙伟红(扫码获取作者联系方式)



the triple treatment on primary-side tumors, while the anti-tumor effects on metastatic-side tumors were significantly weakened but were still stronger than those of the PBS group ($P < 0.01$). When all three types of immune cells were depleted simultaneously, there was no statistically significant difference in their tumor suppressive effects compared with the PBS group ($P > 0.05$). The ELISA results showed that compared with other treatment groups, the triple treatment group showed a significant increase in Th1-related cytokines in the primary-side and metastatic-side tumors ($P < 0.05$), and a significant decrease in the expression of Th2-related cytokines ($P < 0.05$). The qRT-PCR results showed that, compared with the control group, the triple treatment group exhibited significantly lower CD31 expression ($P < 0.0001$) and a significantly higher Ang-1/Ang-2 ratio ($P < 0.001$) in tumor tissues on both sides. **Conclusion:** The combination of CpG + OX40 *in situ* vaccine and anlotinib has stronger systemic anti-tumor effects. Adaptive immunity, innate immunity and vascular density regulation play a crucial role in its anti-tumor effects, which provide potential treatment options for advanced cancer patients.

[Key words] *in situ* vaccines; CpG/OX40; anlotinib; tumour immune microenvironment; ovarian cancer

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(8): 806-813. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.003]

卵巢癌为致死率较高的妇科恶性肿瘤之一,约70%的患者确诊已是晚期,5年生存率低于25%^[1]。目前,包括抗血管治疗在内的常规疗法疗效已进入平台期,亟须探索新的治疗策略和模式。肿瘤原位疫苗是针对实体瘤极具前景的免疫治疗手段,具有制备简单、成本低等优点。原位疫苗研发已成为研究热点,并已显示出良好的抗肿瘤效果。已有研究在淋巴瘤小鼠模型中证实,原位肿瘤疫苗CpG和抗OX40抗体组合可以清除注射和未注射部位的肿瘤。TEMIZOZ等^[2]发现,在EG-7和B16细胞小鼠肿瘤模型中,CpG和cGAMP瘤内注射可有效抑制肿瘤生长。目前,CpG + OX40的组合已在全球多国开展临床试验。本课题组前期研究发现,CpG + OX40治疗远处肿瘤效果有限。因此,本项目拟在小鼠卵巢癌模型中,应用原位疫苗和血管内皮生长因子受体(VEGFR)抑制剂安罗替尼(anlotinib)联合治疗免疫“冷肿瘤”,探究CpG + OX40 + 安罗替尼组合的抗肿瘤效应及其机制,为免疫“冷肿瘤”的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株、实验动物及主要试剂

C57BL/6小鼠来源的卵巢上皮低分化腺癌ID8细胞购自ATCC。细胞在含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素的1640培养基(购自Gibco公司)中,置于37 °C、CO₂体积分数为5%及饱和湿度的培养箱中培养。6~8周龄、体质量(21 ± 18) g的雌性C57BL/6小鼠购自北京维通利华公司[SCXK(京)2016-0002]。小鼠饲养于青岛大学医学院实验动物中心(SPF级),饲养环境温度为22~25 °C、湿度为45%~50%,光照周期为12 h光照/12 h黑暗。小鼠的饲料、饮水和垫料经过高压灭菌,每3 d更换一次。实验方案经青岛大学医学部伦理委员会批准(伦理审批号:QDU-AEC-2021180)。

CpG-ODN 2395购自苏州泓迅生物科技有限公司,抗OX40抗体(αOX40,克隆OX-86)购自美国GenScript公司,抗CD4(克隆GK1.5)、抗CD8(克隆

2.43)和抗NK(克隆PK136)单克隆清除抗体购自美国BioXcell公司,安罗替尼购自美国InvivoChem公司,抗小鼠CD3-FITC/PC5、CD4-PE/Cy7, CD8-PE/ECD, CD16/56-PE单克隆流式荧光抗体购自美国BD公司,细胞因子ELISA检测试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司, RNA纯化试剂盒、反转录试剂盒、SYBR Green荧光定量PCR预混液均购自美国EZBioscience公司。

1.2 双侧(原发侧和转移侧)ID8细胞小鼠卵巢癌模型的建立及分组处理

收集对数期生长的ID8细胞,将 5×10^6 个细胞皮下接种于雌性C57BL/6小鼠的左侧腹部(原发部位)。2 d后,对小鼠的右侧腹部(继发部位)进行同样的操作。当原发部位的肿瘤生长到20~30 mm³时,将小鼠随机分成4组(8只/组):①PBS组,灌胃给予PBS(50 μL/只)和超纯水(200 μL/只);②CpG + OX40组,肿瘤原位注射CpG(50 μg/只)和OX40(30 μg/只);③安罗替尼组,灌胃给予安罗替尼(3 mg/kg/只);④CpG + OX40 + 安罗替尼(三联疗法)组,肿瘤原位注射CpG(50 μg/只)和OX40(30 μg/只),同时通过灌胃给予安罗替尼(3 mg/kg/只)。CpG和OX40每隔1天注射1次,共3次;安罗替尼每天灌胃给药,共2周。所有治疗仅对原发侧肿瘤进行。给药后,每2~3 d测量小鼠的肿瘤体积和体质量,观察小鼠状态。肿瘤体积 = (长径 × 短径²)/2。连续观察直到小鼠死亡或任何一侧的肿瘤体积大于1 500 mm³,对小鼠施行安乐死。观察期间详细记录小鼠的生存状态、经口体质量和生存时间。

1.3 流式细胞术检测肿瘤移植瘤组织中浸润淋巴细胞

原位疫苗最后一次注射后7 d,获取小鼠移植瘤组织,制备单细胞悬浮液,用PBS重悬细胞至 1×10^7 个/mL。向流式检测管中加入100 μL细胞悬液,按检测需求加入FITC-CD3、PE-CD8、PE-CD4或PE-CD16/56荧光抗体,室温避光反应30 min,然后用PBS洗涤2次。之后加入200 μL PBS重新悬浮细胞,用贝克曼

(BECKMAN)DxFLEX流式细胞仪检测分析。

1.4 流式细胞术检测移植瘤组织中CD4⁺T、CD8⁺T和NK细胞耗竭情况

在治疗前2天和1天、治疗开始当天以及治疗开始后5、8和19天分别注射抗CD4、抗CD8、抗NK单克隆抗体或同型对照抗体,注射的剂量在治疗前为200 μg/只,治疗后100 μg/只。流式细胞术检测细胞耗竭情况。

1.5 ELISA法检测移植瘤组织中细胞因子水平

在最后一次治疗后7 d,取移植瘤组织并用裂解缓冲液匀浆。根据使用说明书,用ELISA试剂盒测定移植瘤组织中的细胞因子,包括TNF-α、IFN-γ、IL-10、IL-13、IL-2和IL-12。

1.6 qRT-PCR法检测移植瘤组织中CD31、Ang-1、Ang-2的表达

采用RNA纯化试剂盒提取总RNA,取每个样本取500 ng进行反转录。接下来,使用SYBR Green荧光定量PCR预混液扩增互补DNA(cDNA)。对数据进行分析,并采用2^{-ΔΔCT}法计算相对表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因进行归一化处理。所有反应均设置3个生物学重复,每次分析包含3个技术重复。引物序列参照文献[3]设计。

1.7 统计学处理

统计图和生存曲线均由Graphpad Prism 9.0和SPSS 16.0软件生成。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,多组肿瘤体积比较采用Mann-Whitney U 检验。生存分析采用Kaplan-Meier法。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三联疗法对小鼠转移性卵巢癌移植瘤的抑制作用更强

为了评估CpG + OX40联合安罗替尼的系统性抗肿瘤效应,建立了小鼠转移性卵巢癌ID8细胞移植瘤模型,治疗方案见图1A,所有治疗仅对原发侧移植瘤进行。观察各组治疗效果,安罗替尼组、CpG + OX40组和三联疗法组的原发侧移植瘤生长速度明显慢于PBS组($P < 0.001$),且三联疗法组的抑瘤效果显著优于安罗替尼组($P < 0.001$)和CpG + OX40组($P < 0.01$)。对于转移侧肿瘤,安罗替尼组和CpG + OX40组的肿瘤生长速度与PBS组无显著差异($P > 0.05$),而三联疗法组的肿瘤抑制作用明显强于PBS组($P < 0.001$) (图1B)。此外,安罗替尼协同CpG + OX40明显延长了荷瘤鼠生存时间,其中位生存期比PBS组延长40 d(65 vs 32 d, $P < 0.001$),

比安罗替尼组延长33 d(65 vs 32 d, $P < 0.01$),比CpG + OX40组延长30 d(65 vs 35 d, $P < 0.05$) (图1C)。治疗后各组小鼠的体质量没有显著差异(图1D),表明该治疗组合没有明显的不良反应。

2.2 三联疗法系统性增加肿瘤微环境中T淋巴细胞的浸润

最后一次原位疫苗治疗后7 d,收集原发侧和转移侧移植瘤组织,流式细胞术分析组织内肿瘤浸润淋巴细胞。结果显示,在原发侧肿瘤中,安罗替尼组、CpG + OX40组和三联疗法组的肿瘤浸润CD4⁺T细胞($t = 2.85, P < 0.05; t = 13.72, P < 0.001; t = 17.49, P < 0.001$)和CD8⁺T细胞($t = 3.13, P < 0.01; t = 10.35, P < 0.001; t = 10.29, P < 0.001$)的数量明显高于PBS组。特别是三联疗法组,其CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞数量比单用安罗替尼($t = 14.75, P < 0.001; t = 8.32, P < 0.001$)或CpG + OX40($t = 2.88, P < 0.05; t = 2.61, P < 0.05$)显著增加(图2A、B)。转移侧的肿瘤浸润T细胞的增加趋势与原发侧一致,而且三联疗法组比CpG + OX40组浸润CD4⁺T和CD8⁺T细胞增加更加显著($t = 3.52, P < 0.01; t = 4.04, P < 0.01$) (图2C、D)。

2.3 三联疗法的抗肿瘤效应依赖于固有免疫和适应性免疫

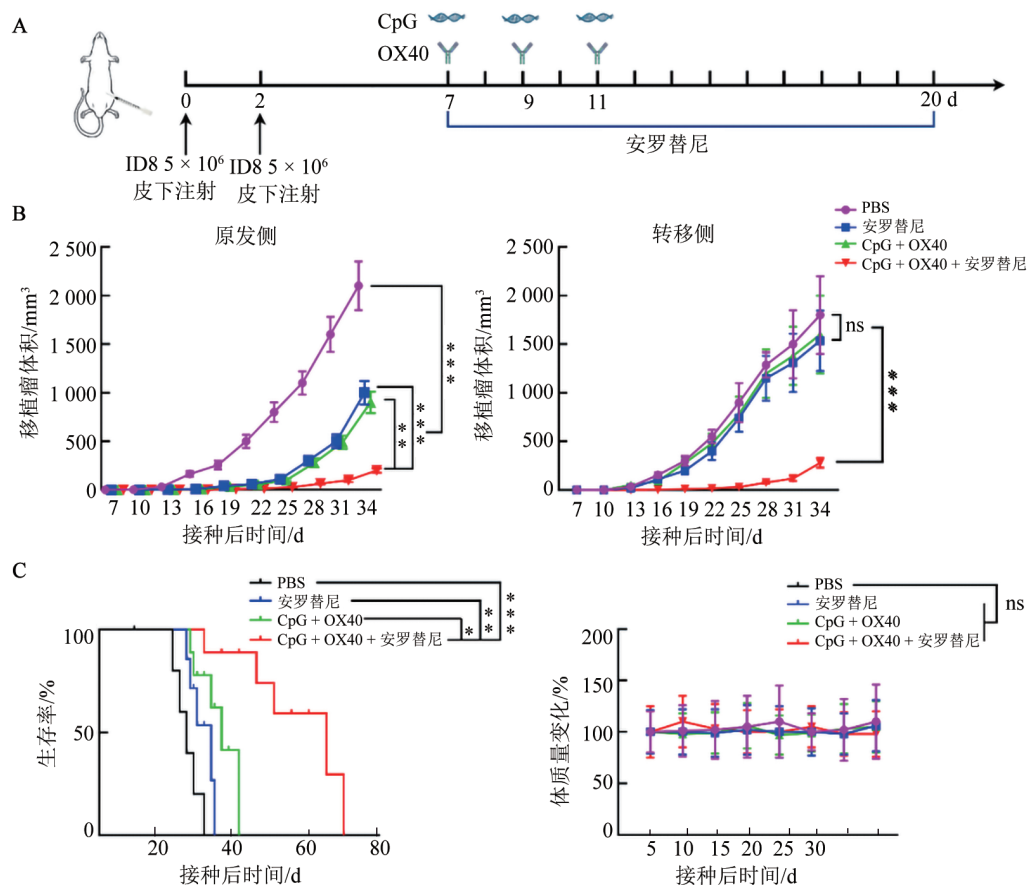
为了进一步探讨三联疗法的抗肿瘤免疫机制,使用相应的抗体耗竭小鼠体内的CD4⁺T、CD8⁺T细胞或NK细胞,流式细胞术检测耗竭效果见图3A。无论单耗竭哪种细胞类型,在原发侧,三联疗法的单免疫细胞耗竭组对移植瘤仍然有很强的抑制作用,其移植瘤体积与未耗竭组相比无明显差异($P > 0.05$) (图3B),而在转移侧,三联疗法的疗效明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.05$),但依然强于PBS组($P < 0.001$) (图3C)。免疫细胞联合耗竭实验显示,同时耗竭CD4⁺T和CD8⁺T细胞时,三联疗法对原发侧和转移侧移植瘤的疗效比未耗竭组显著降低(原发侧: $P < 0.05$;转移侧: $P < 0.01$),但依然强于PBS组($P < 0.001$)。只有当CD4⁺T、CD8⁺T细胞和NK细胞都耗竭时,三联疗法的抗移植瘤作用才消失,移植瘤生长迅速,与PBS组的趋势相当($P > 0.05$) (图3D、E)。

2.4 CpG + OX40 + 安罗替尼诱导更强的细胞因子产生

采用ELISA法分别检测原发侧和未治疗移植瘤组织中细胞因子的变化,与PBS组相比,原发侧安罗替尼组、CpG + OX40组和三联疗法组Th1相关细胞因子明显增加:TNF-α($t = 3.76, P < 0.01; t = 8.32, P < 0.001, t = 7.49, P < 0.001$)、IFN-γ($t = 2.63, P < 0.05;$

$t = 4.85, P < 0.001, t = 6.83, P < 0.001$)、IL-2 ($t = 3.51, P < 0.01; t = 9.88, P < 0.001, t = 10.50, P < 0.001$), IL-12 ($t = 3.60, P < 0.01; t = 6.33, P < 0.001, t = 8.16, P < 0.001$); 而 Th2 相关细胞因子的表达显著降低: IL-10 ($t = 2.16, P < 0.05; t = 7.01, P < 0.001, t = 9.06, P < 0.001$)、IL-13 ($t = 2.72, P < 0.05; t = 5.06, P < 0.001, t = 6.11, P < 0.001$)。特别是三联疗法组, Th1 相关细胞因子分别比安罗替尼组、CpG + OX40 组显著升高: TNF- α ($t = 5.47, P < 0.001; t = 2.53, P < 0.05$)、IFN- γ ($t = 4.91, P < 0.001; t = 2.15, P < 0.05$)、IL-2 ($t = 8.94, P < 0.001; t = 2.26, P < 0.05$), IL-12 ($t = 6.20, P < 0.001; t = 2.26, P < 0.05$); 而 Th2 相关细胞因子的表达, 与安罗替尼组相比降低: IL-10 ($t = 6.80, P < 0.001$)、IL-13 ($t = 3.48, P < 0.001$), 与 CpG + OX40 组相比无明显变化 ($t = 1.77; t = 1.84, P > 0.05$) (图 4A)。在转移侧, 与 PBS 组相比, Th1 相关细胞因子安罗替尼组和三联疗法组都明显增加: TNF- α ($t = 2.58, P < 0.05; t = 4.09, P < 0.01$)、

IFN- γ ($t = 3.92, P < 0.01; t = 5.87, P < 0.001$)、IL-2 ($t = 2.15, P < 0.05; t = 3.83, P < 0.01$), IL-12 ($t = 2.64, P < 0.05; t = 4.62, P < 0.001$); Th2 相关细胞因子的表达显著降低: IL-10 ($t = 2.30, P < 0.05; t = 4.41, P < 0.001$)、IL-13 ($t = 2.49, P < 0.05; t = 4.30, P < 0.001$)。而 CpG + OX40 组与 PBS 组相比, 不论 Th1 相关细胞因子还是 Th2 相关细胞因子都无显著变化 ($P > 0.05$)。这些结果与 CpG + OX40 的远隔效应不佳相一致。另外, 在转移侧, CpG + OX40 + 安罗替尼治疗分别与安罗替尼组、CpG + OX40 组相比, Th1 相关细胞因子明显升高: TNF- α ($t = 2.24, P < 0.05; t = 3.39, P < 0.01$)、IFN- γ ($t = 2.19, P < 0.05; t = 4.25, P < 0.001$)、IL-2 ($t = 2.19, P < 0.05; t = 3.83, P < 0.01$), IL-12 ($t = 2.26, P < 0.05; t = 3.30, P < 0.01$); Th2 相关细胞因子的表达显著降低: IL-10 ($t = 2.31, P < 0.05; t = 3.12, P < 0.01$)、IL-13 ($t = 2.24, P < 0.05; t = 4.55, P < 0.001$) (图 4B)。



A: ID8 细胞小鼠模型治疗流程图; B: 原发侧和转移侧(转移部位)移植瘤生长曲线; C: 不同治疗组各时间点荷瘤鼠生存率; D: 不同治疗对小鼠体质量的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计学意义。

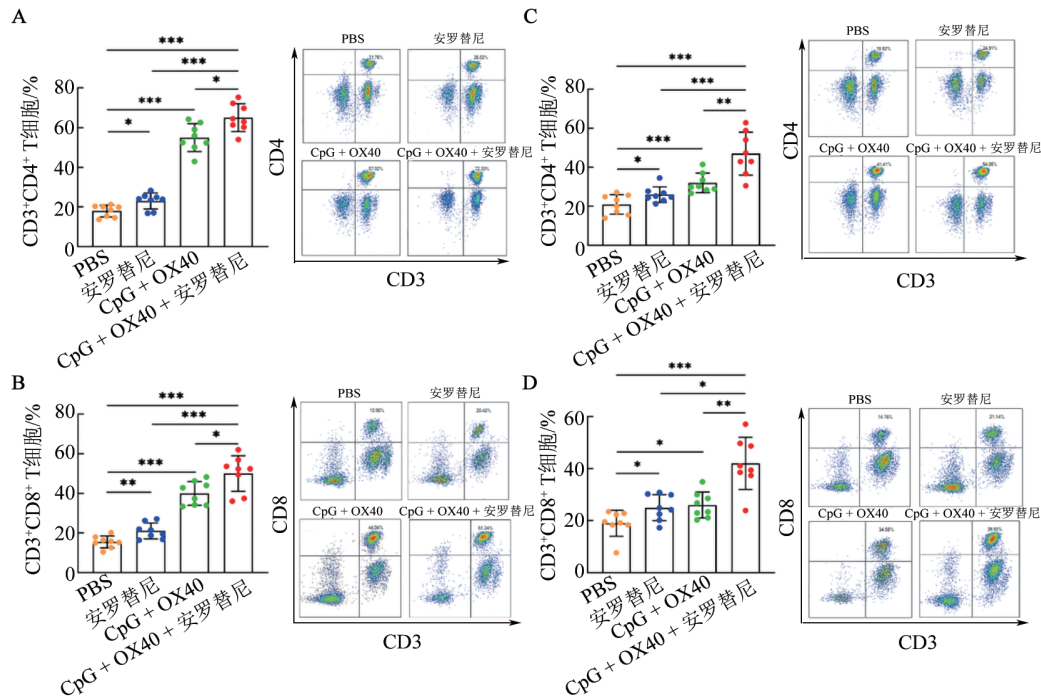
图 1 原位疫苗治疗小鼠 ID8 细胞卵巢癌移植瘤

2.5 三联疗法具有更强的血管抑制作用 qRT-PCR 法检测移植瘤组织中与血管密度和成

熟度相关分子的基因表达情况, 结果显示, 无论是原发侧还是转移侧, 各治疗组的 CD31 的表达都比 PBS

组低(原发侧, 安罗替尼: $t = 4.06, P < 0.01$; CpG+OX40: $t = 3.15, P < 0.01$; 转移侧, 安罗替尼: $t = 3.56, P < 0.01$; CpG + OX40: $t = 2.24, P < 0.05$), 其中三联疗法组最显著(原发侧: $t = 5.58, P < 0.001$; 转移侧: $t = 4.14, P < 0.01$)(图5A), 这说明, 三联疗法的血管抑制作用最强。血管生成素(angiotensin, Ang)-1和Ang-2比值能反映血管成熟度和密度, 比值越低表示血管成熟度越差。qRT-PCR法检测结果显示, 原发侧

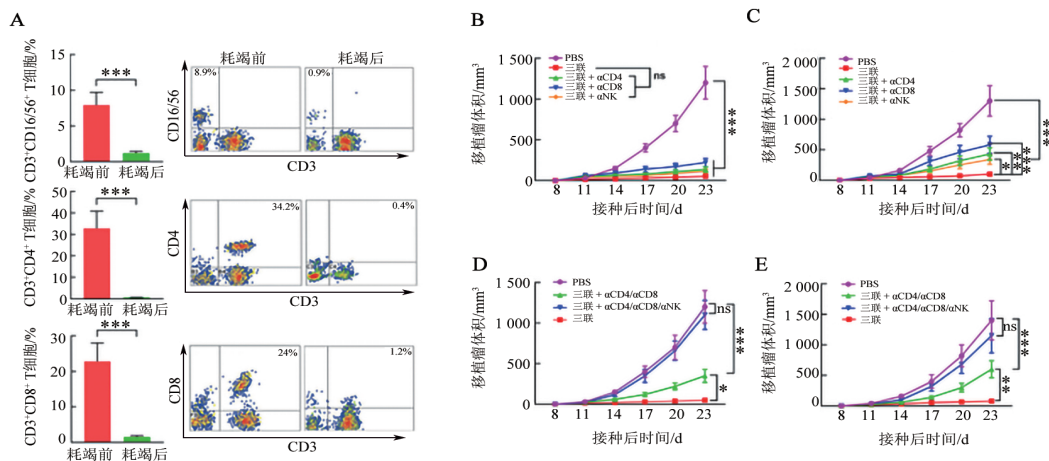
各治疗组的Ang-1/Ang-2比值明显高于PBS组(安罗替尼: $t = 3.68, P < 0.01$; CpG + OX40: $t = 3.48, P < 0.01$), 特别是三联组的差异最显著($t = 8.13, P < 0.0001$)。转移侧安罗替尼组和三联疗法组的Ang-1/Ang-2比值明显高于PBS组($t = 2.94, P < 0.05$; $t = 4.80, P < 0.001$)。而CpG + OX40组与PBS组相比无显著变化($t = 2.04, P > 0.05$)(图5B)。



A: 原发侧肿瘤CD4⁺T细胞浸润百分比及代表性流式图; B: 原发侧肿瘤CD8⁺T细胞浸润百分比及代表性流式图; C: 转移侧肿瘤CD4⁺T细胞浸润百分比及代表性流式图; D: 转移侧肿瘤CD8⁺T细胞浸润百分比及代表性流式图。

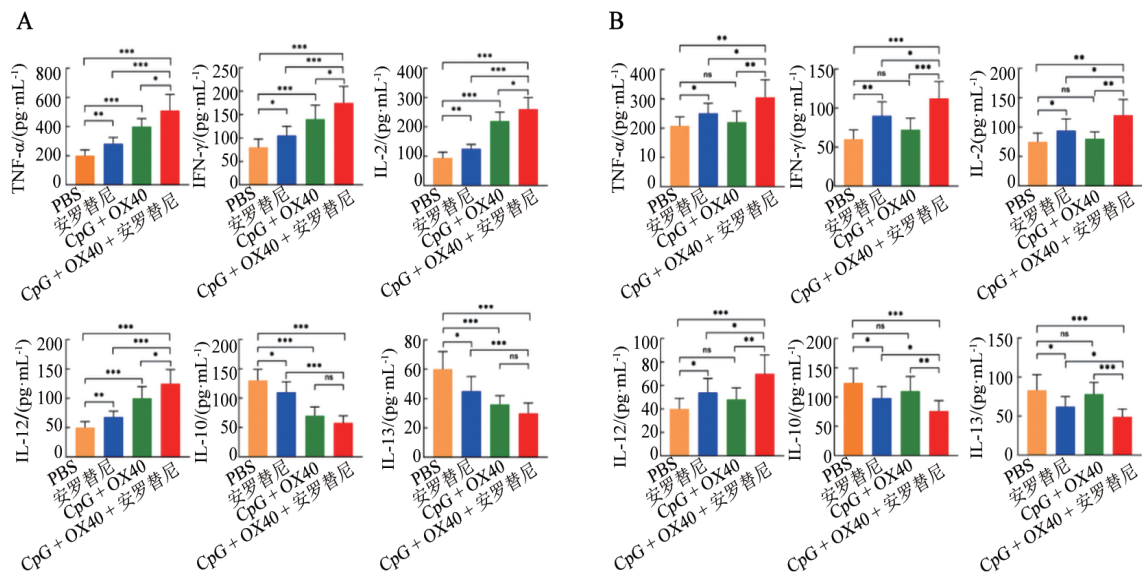
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计意义。

图2 三联疗法治疗后移植瘤微环境中免疫细胞的浸润



A: 流式细胞术分析NK细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的耗竭效果。B、C: 当CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或NK细胞被敲除时, 原发侧(B)和转移侧(C)的肿瘤生长曲线; D、E: 当CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞或所有CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞都被敲除时, 原发侧(D)和转移侧(E)的肿瘤生长曲线。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计意义。三联: CpG + OX40 + 安罗替尼组; α CD4: 抗CD4单抗; α CD8: 抗CD8单抗; α NK: 抗NK细胞抗体。

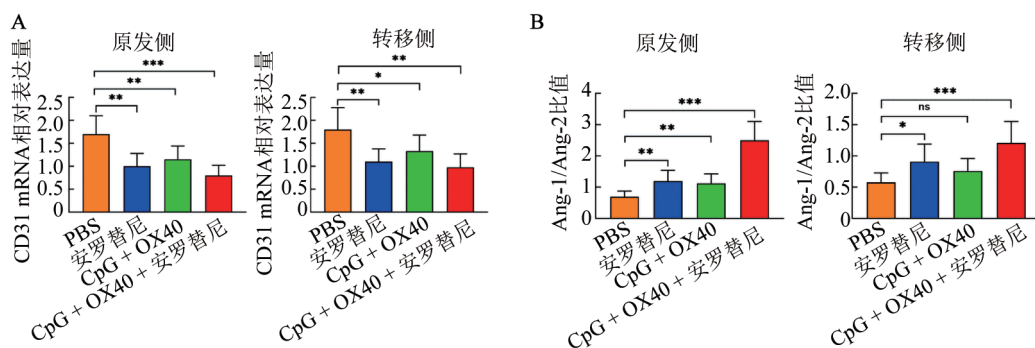
图3 CD4/CD8/NK细胞耗竭对CpG + OX40 + 安罗替尼抗肿瘤的影响



A: 原发侧肿瘤微环境中Th1和Th2相关细胞因子水平; B: 转移侧肿瘤微环境中Th1和Th2相关细胞因子水平。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计意义。

图4 三联疗法促进移植瘤微环境中细胞因子的产生



A: 两侧移植瘤组织中CD31 mRNA的相对表达; B: 两侧移植瘤组织中Ang-1和Ang-2 mRNA相对表达的比值。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 差异无统计意义。

图5 三联疗法抑制移植瘤血管生成

3 讨论

采用CpG寡核苷酸和OX40激动剂抗体原位疫苗联合抗血管生成药安罗替尼治疗小鼠卵巢癌,可显著抑制荷瘤鼠原发侧和转移侧肿瘤的生长,延长小鼠的存活期。上述结果表明,原位疫苗联合血管生成抑制剂可显著增强全身抗肿瘤效应。

肿瘤原位疫苗是一种极具前景的实体瘤治疗策略,用免疫激动剂原位处理肿瘤,可激发局部和全身的抗肿瘤效应^[4];然而,该联合方案对有些肿瘤效果不理想,如PD-1耐药的恶性肿瘤或免疫“冷”肿瘤^[5]。本研究结果显示,CpG + OX40组合对原发侧肿瘤有明显的抑制作用,但对转移侧的肿瘤抑制作用不明显。有研究^[6]证明,抗血管生成药能增强肿瘤的免疫治疗效果。本研究中,三联疗法除了能抑制原发侧

的肿瘤生长,对转移侧肿瘤也有明显的抑制作用,说明安罗替尼可协同CpG + OX40显著增强全身抗肿瘤效应。提示联合抗血管生成药物应用有望克服仅用CpG + OX40治疗的局限性。

既往研究证实,用免疫激动剂在原位处理肿瘤能改变肿瘤的免疫微环境,将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”。用TLR激动剂和针对OX40的激活抗体的组合可放大肿瘤微环境中预先存在的T细胞,诱导它们在全身产生肿瘤抑制作用^[7]。安罗替尼也可以改变肿瘤微环境,增加免疫细胞浸润^[6]。研究^[8]发现,全身抗肿瘤反应需要CD4⁺T和CD8⁺T细胞同时存在。本研究显示,CpG + OX40治疗后其原发侧和转移侧肿瘤内CD4⁺T和CD8⁺T细胞的均明显增加,联合安罗替尼后,CpG + OX40在转移侧诱导的免疫细胞浸润更为显著。尽管既往研究指出CD8⁺T细胞是疫苗诱导肿瘤排斥的关键^[9],且在瘤内注射的情况下,抗原

可以完全交叉提呈, CD4⁺ T细胞在诱导及维持 CD8⁺ T细胞抗肿瘤反应中起关键作用^[10], 但本研究的细胞耗竭实验结果显示, 三联疗法在原发侧的抗肿瘤效应并没有因 CD4⁺ T或 CD8⁺ T细胞耗竭而显著减弱, 只在两者都耗竭时明显降低。尽管不管哪种 T细胞耗竭, 其在转移侧的肿瘤抑制作用都比未耗竭的明显降低, 但仍显著优于 PBS 组, 这说明三联疗法的抗肿瘤效应除了适应性免疫外还有其它因素参与。有研究^[11]证实, NK 细胞在肿瘤形成的早期阶段和清除对 CD8⁺ T细胞耐受的肿瘤过程中起着重要作用。本研究中 NK 细胞的耗竭实验显示, 其在原发侧和转移侧的肿瘤抑制效果与 T细胞耗竭类似。另外发现, 只有当 CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞和 NK 细胞同时被耗竭时, 三联疗法的全身抗肿瘤作用才消失, 表明 CpG + OX40 原位疫苗在安罗替尼的协助下不仅激活了适应性免疫, 还激活了固有免疫, 两者都是抗肿瘤作用不可或缺的, 这些发现为原位疫苗和血管药物的联合应用提供了新的见解。

已有研究^[8]发现, CpG/OX40 治疗可增加细胞因子 IL-12、TNF 和 IFN 的表达。LUO 等^[12]报道, 安罗替尼诱导 Th1 相关细胞因子 IL-12 和 CD8⁺ T 细胞来源的 IFN- γ 显著上调, 这与本研究结果相一致。因此推测, 三联疗法充分调动了各种细胞因子, 包括 Th1 和 Th2 细胞因子, 而这些细胞因子在调节固有免疫和适应性免疫中起关键作用。

血管系统和免疫系统都会影响肿瘤微环境。此外, 免疫抑制和持续性血管生成在实体肿瘤中较为常见^[13]。有研究^[14-15]证实, 异常血管网络抑制肿瘤内的免疫反应, 而免疫功能受抑会促进异常血管的形成。TIAN 等^[16]发现, 使用免疫检查点抑制剂可以重新激活免疫细胞并促进血管的正常化。CD31 是常用的血管内皮细胞标志物。Ang-2 在多种肿瘤中高表达, 阻断 Ang-2 可抑制肿瘤生长和肿瘤血管生成^[17]。此外, 阻断 Ang-2 还能抑制肿瘤淋巴管生成^[18] 并促使血管表型趋于正常, 而这种血管正常化又依赖于 Ang-1 的作用^[19]。据报道^[20], 工程化 Ang-1 变体 COMP-Ang1 能在肿瘤同种移植模型中诱导肿瘤血管正常化, 从而改善血管灌注。因此 Ang-1 和 Ang-2 的表达, 特别是 Ang-1/Ang-2 的比值可以一定程度上反映出肿瘤组织的血管成熟度、密度等情况^[21-23]。本研究发现, 双侧肿瘤组织中三联疗法组 CD31 表达降低且 Ang-1/Ang-2 比值升高, 与本研究所观察到的肿瘤预后相一致。另外, HATA 等^[24]证实, 在人卵巢癌中 Ang-1/Ang-2 比值与肿瘤血管密度和不良预后成正相关, 与本研究结果一致。

在免疫疗法和血管抑制剂的影响下, 肿瘤患者

的死亡风险和疾病进展风险明显降低^[25], 显示了抗血管药物联合免疫治疗治疗癌症方面的优势。CpG + OX40 + 安罗替尼的原位注射引发了有效的抗肿瘤免疫反应, 限制了全身暴露和相关毒性的风险, 不仅改变了注射部位的肿瘤微环境, 还产生了系统性免疫反应, 抑制了远处肿瘤的进展。本研究还有一些局限性: 首先, 只有当肿瘤足够大且可接近时, 才能进行原位注射, 这导致了原位疫苗应用的实际局限性; 其次, 对三联疗法抗肿瘤机制的分析不够深入, 特别是免疫细胞耗竭实验所展示的原发侧和转移侧结果的差异, 提示两侧的抗肿瘤机制可能不尽相同。因此, 原位疫苗的应用方法和效应机制还需要在未来的研究中进一步探索。

总之, 本研究提出一种有效且安全的晚期卵巢癌原位疫苗联合血管抑制剂方案。CpG + OX40 联合安罗替尼不仅改变了肿瘤微环境, 促使其由非免疫原性向免疫原性转化, 并且诱导并放大了原发侧和转移侧的抗肿瘤免疫反应, 提高了抑制肿瘤生长和延长了生存期的效应, 为晚期“冷”肿瘤的治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] 吴小华, 李温, 刘邹, 等. 2023 年中国卵巢癌诊疗现状白皮书[J]. 中国实用妇科与产科杂志. 2023, 39(12): 1225-1232. DOI: 10.19538/j.fk.2023120116.
- [2] TEMIZOZ B, KURODA E, OHATA K, *et al.* TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type- II IFN[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(4): 1159-1169. DOI:10.1002/eji.201445132.
- [3] JIANG C, RUAN L, ZHANG J, *et al.* Inhibitory effects on retinal neovascularization by ranibizumab and sTie2-fc in an oxygen-induced retinopathy mouse model[J]. Curr Eye Res, 2018, 43(9): 1190-1198. DOI:10.1080/02713683.2018.1484144.
- [4] SUN Z C, CHU Y H, XIAO J, *et al.* Enhanced systemic tumor suppression by *in situ* vaccine combining radiation and OX40 agonist with CpG therapy[J/OL]. J Transl Med, 2023, 21(1): 619 [2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37700338/>. DOI: 10.1186/s12967-023-04504-w.
- [5] CAI L Y, DU X D, ZHANG C, *et al.* Robust immune response stimulated by *in situ* injection of CpG/ α OX40/cGAMP in α PD-1-resistant malignancy[J]. Cancer Immunol Immunother, 2022, 71(7): 1597-1609. DOI:10.1007/s00262-021-03095-z.
- [6] SONG F, HU B, LIANG X L, *et al.* Anlotinib potentiates anti-PD1 immunotherapy *via* transferrin receptor-dependent CD8⁺ T-cell infiltration in hepatocellular carcinoma[J/OL]. Clin Transl Med, 2024, 14(8): e1738[2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39095323/>. DOI:10.1002/ctm2.1738.
- [7] GALON J, BRUNI D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(3): 197-218. DOI:10.1038/s41573-018-0007-y.
- [8] SAGIV-BARFI I, CZERWINSKI D K, LEVY S, *et al.* Eradication

- of spontaneous malignancy by local immunotherapy[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(426): eaan4488[2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29386357/>. DOI:10.1126/scitranslmed.aan4488.
- [9] DETRÉS ROMÁN C R, ERWIN M M, RUDLOFF M W, *et al.* Vaccination generates functional progenitor tumor-specific CD8 T cells and long-term tumor control[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(10): e009129[2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39362791/>. DOI:10.1136/jitc-2024-009129.
- [10] YARCHOAN M, GANE E J, MARRON T U, *et al.* Personalized neoantigen vaccine and pembrolizumab in advanced hepatocellular carcinoma: a phase 1/2 trial[J]. *Nat Med*, 2024, 30(4): 1044-1053. DOI:10.1038/s41591-024-02894-y.
- [11] NICOLAI C J, WOLF N, CHANG I C, *et al.* NK cells mediate clearance of CD8⁺ T cell-resistant tumors in response to STING agonists[J/OL]. *Sci Immunol*, 2020, 5(45): eaaz2738[2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32198222/>. DOI: 10.1126/sciimmunol.aaz2738.
- [12] LUO J, CHENG K B, JI X X, *et al.* Anlotinib enhanced CD8⁺ T cell infiltration *via* induction of CCL5 improves the efficacy of PD-1/PD-L1 blockade therapy in lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2024, 591: 216892[2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38621459/>. DOI:10.1016/j.canlet.2024.216892.
- [13] ZHENG W W, QIAN C, TANG Y, *et al.* Manipulation of the crosstalk between tumor angiogenesis and immunosuppression in the tumor microenvironment: insight into the combination therapy of anti-angiogenesis and immune checkpoint blockade[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1035323[2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36439137/>. DOI:10.3389/fimmu.2022.1035323.
- [14] BRANDTZAEG P. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and periodontal disease have similar immunopathogenesis?[J]. *Acta Odontol Scand*, 2001, 59(4): 235-243. DOI:10.1080/00016350152509265.
- [15] PAN X, LI X, DONG L, *et al.* Tumour vasculature at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2024, 632(8024): 429-436. DOI: 10.1038/s41586-024-07698-1.
- [16] TIAN L, GOLDSTEIN A, WANG H, *et al.* Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming[J]. *Nature*, 2017, 544(7649): 250-254. DOI:10.1038/nature21724.
- [17] BYERS V W, BRISTOW D C. Audiological evaluation of nonspeaking, physically challenged populations[J]. *Ear Hear*, 1990, 11(5): 382-386. DOI:10.1097/00003446-199010000-00010.
- [18] HOLOPAINEN T, SAHARINEN P, D'AMICO G, *et al.* Effects of angiotensin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104(6): 461-475. DOI:10.1093/jnci/djs009.
- [19] FALCÓN B L, HASHIZUME H, KOUMOUTSAKOS P, *et al.* Contrasting actions of selective inhibitors of angiotensin-1 and angiotensin-2 on the normalization of tumor blood vessels[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5): 2159-2170. DOI:10.2353/ajpath.2009.090391.
- [20] HWANG J A, LEE E H, KIM H W, *et al.* COMP-Ang1 potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil by improving tissue perfusion in murine Lewis lung carcinoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(12): 1920-1927. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-09-0041.
- [21] EKLUND L, SAHARINEN P. Angiotensin signaling in the vasculature[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(9): 1271-1280. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.03.011.
- [22] JIA L S, LI X Z, SHEN J Y, *et al.* Ang-1, Ang-2, and Tie2 are diagnostic biomarkers for Henoch-Schönlein Purpura and pediatric-onset systemic lupus erythematosus[J/OL]. *Open Life Sci*, 2024, 19(1): 20220812 [2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38465338/>. DOI:10.1515/biol-2022-0812.
- [23] WANG Y H, FANG J W, NIU T, *et al.* Serum Ang-1/Ang-2 ratio may be a promising biomarker for evaluating severity of diabetic retinopathy[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2023, 261(1): 49-55. DOI:10.1007/s00417-022-05745-z.
- [24] HATA K, NAKAYAMA K, FUJIWAKI R, *et al.* Expression of the angiotensin-1, angiotensin-2, Tie2, and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 93(1): 215-222. DOI:10.1016/j.ygyno.2003.12.031.
- [25] JIN Z C, CHEN J J, ZHU X L, *et al.* Immune checkpoint inhibitors and anti-vascular endothelial growth factor antibody/tyrosine kinase inhibitors with or without transarterial chemoembolization as first-line treatment for advanced hepatocellular carcinoma (CHANCE2201): a target trial emulation study[J/OL]. *EClinicalMedicine*, 2024, 72: 102622[2025-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38745965/>. DOI:10.1016/j.eclinm.2024.102622.

[收稿日期] 2025-02-21

[修回日期] 2025-07-02

[本文编辑] 黄静怡