

肠道益生菌对靶向 bFGF 的肿瘤疫苗抗小鼠黑色素瘤的影响

李能莲,张秋菊,张立,李亚玲,舍雅莉,方玲,张小平
(甘肃中医药大学,甘肃兰州 730000)

摘要: [目的] 探讨肠道益生菌对碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)疫苗抗黑色素瘤的影响。[方法] 小鼠分别用嗜酸乳杆菌、双歧杆菌、粪肠球菌灌胃,同时皮下注射 bFGF 抗原进行免疫,每周一次,共免疫 5 次后,皮下接种 B16-F10 黑色素瘤细胞,观察对肿瘤生长的抑制和肺转移的影响,接种瘤细胞前对抗体的表达、细胞因子的释放、肠道微生物的变化、相关基因的表达分别进行检测。[结果] 三种微生物中双歧杆菌能有效增加 T 细胞活化和 DC 细胞成熟相关基因的表达,促进 IFN- γ 的分泌,有效提升细胞免疫应答,加强免疫治疗疗效。[结论] 双歧杆菌有助于 CD8⁺T 细胞功能活化,提升机体对抗原的应答,提高免疫治疗疗效,未来临床有一定的潜在应用价值。

关键词: 益生菌;免疫治疗;黑色素瘤;bFGF

中图分类号:R739.5 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2020)04-0316-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2020.04.A013

Effect of Probiotics on bFGF Antigen Vaccine in Treatment of Murine Melanoma

LI Neng-lian,ZHANG Qiu-ju,ZHANG Li,LI Ya-ling,SHE Ya-li,FANG Ling,
ZHANG Xiao-ping

(Gansu University of Chinese Medicine,Lanzhou 730000,China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of intestinal probiotics on bFGF antigen vaccine in treatment of murine melanoma. [Methods] Lactobacillus acidophilus,Bifidobacterium and Enterococcus faecalis were given to C57BL/6 mice by gavage. The mice were subcutaneously injected with bFGF antigen vaccine once a week for 5 weeks,then B16-F10 melanoma cells were inoculated subcutaneously. The inhibition of tumor growth and lung metastasis were observed. The expression of antibodies,the release of cytokines,the changes of intestinal microorganisms and related genes were examined before and after the tumor cell inoculation.[Results] Bifidobacterium increased the expression of genes related to T cell activation and DC cell maturation,promoted the secretion of IFN- γ ,enhanced the cellular immune response,and improved the efficacy of immunotherapy. [Conclusion] Bifidobacterium can promote the activation of CD8⁺T cells,enhance the response of the tumor bearing mice to bFGF vaccine,and improve the efficacy of immunotherapy,which may have potential clinical application value.

Key words: probiotics;immunotherapy;melanoma;bFGF

微生物菌群在形成系统免疫反应中起着重要作用,许多研究已经显示肠道微生物菌群的成分差异能影响肿瘤对治疗的反应,肠道微生物可通过先天性免疫和获得性免疫,可提高免疫治疗疗效^[1-2]。同时临床实践证明免疫治疗对不同患者疗效差异的原因之一,是患者肠道微生物菌群的不同^[1]。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)是成纤维细胞生长因子家族成员,作为一种有效的血管生成因子参与了多种肿瘤微血管的形成。虽然黑色素细胞不表达 bFGF,但是黑色素瘤细胞表达 bFGF^[3],因此我们前期的研究通过靶向 bFGF 的免疫有效抑制了小鼠黑色素瘤微血管生成的同时也抑制了肿瘤生长^[4]。本研究在我们前期研究的基础上,进一步探讨肠道益生菌对肿瘤免疫治疗的影响。

收稿日期:2019-12-01;修回日期:2020-03-04
基金项目:国家自然科学基金(81360345)
通信作者:张小平,E-mail:Profpxzhang@gmail.com

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

50只6周龄雌性C57BL/6小鼠(购自甘肃中医药大学SPF级实验动物中心)随机平均分为5组:对照组(正常生理盐水处理)、单独免疫组(bFGF抗原免疫)、嗜酸乳杆菌(bFGF抗原免疫+嗜酸乳杆菌灌胃)、双歧杆菌组(bFGF抗原免疫+双歧杆菌灌胃)和粪肠球菌组(bFGF抗原免疫+粪肠球菌灌胃)。每日灌胃2次,每次0.4mg益生菌(嗜酸乳杆菌、双歧杆菌、粪肠球菌分别购自通化金马药业集团、丽珠集团、武汉天惠生物工程公司)。小鼠黑色素瘤细胞株B16-F10购自ATCC,用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养。

1.2 抗原的制备及小鼠免疫

根据文献[5],胆固醇溶于氯仿后加入脂质体(Liposome2000,购自美国Invitrogen公司)混匀,37℃至氯仿挥发后,将人源重组bFGF抗原蛋白(购自Nanhai longtime Pharmaceutical Co. Ltd. China)于4℃加入,二甲基亚砷溶解黄芪皂苷(购自上海源叶生物公司)后滴加,注射器吹打混匀(10μg bFGF抗原蛋白、5μg黄芪皂苷、10μg胆固醇和100μg脂质体)后。每周皮下注射免疫1次,共5次,第5次免疫7天后,小鼠断尾取血,离心分离血清,-80℃保存检测抗体。

1.3 bFGF特异性抗体的ELISA检测

溶解在50mmol/L的碳酸盐缓冲液的10μg/ml的bFGF加入96孔微量滴定板(Falcon)(50μl/孔)中4℃过夜后,用含0.1%吐温的PBS洗3次,5%脱脂牛奶37℃封闭1h,清洗后将等比稀释的小鼠血清加到微量孔(100μl/孔),37℃孵育2h。洗涤后,加入结合辣根过氧化物酶的羊抗鼠二抗(Sigma)37℃孵育1h,洗涤后加入DAB显色,20min后,用0.5mol/L硫酸终止,405nm测光吸收值。

1.4 细胞因子的释放

处死免疫过的小鼠,用淋巴细胞分离液无菌分离淋巴细胞,细胞培养基中重新悬浮(4×10^6 个细胞/200μl),用10μg/ml的bFGF抗原蛋白37℃刺激培养48h后,根据ELISA试剂盒(Rockford,IL)说明测定上清液中IFN-γ和IL-4的含量。

1.5 皮下瘤模型

5次免疫后,小鼠腋下皮下接种 1×10^5 个B16-

F10细胞(悬浮在200μl的DMEM无血清培养基中)。每3天用游标卡尺测量一次肿瘤大小,肿瘤体积按公式计算:宽²×长×0.52。同时,通过小鼠尾静脉注射 0.5×10^4 个B16-F10细胞/100μl建立黑色素瘤的肺转移模型,两周后处死小鼠,取肺组织统计肺转移结节。

1.6 小鼠粪便总DNA的提取和PCR扩增检测

接种皮下瘤前取小鼠混合软湿粪便,CTAB-SDS法提取小鼠粪便总基因组DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和纯度,然后用无菌水将DNA稀释至1ng/μl扩增16S rRNA基因的V3+V4可变区并测序。16S rRNA/18S rRNA/ITS基因的不同部分(16S V4/16S V3/16S V3-V4/16S V4-V5,18S V4/18S V9,ITS1/ITS2,Arc V4等)用带有barcode的特异引物(如16S V4:515F-806R,18S V4:528F-706R,18S V9:1380F-1510R等)扩增。扩增体系为:15μl Phusion®超保真PCR Master Mix(New England Biolabs),0.2μmol/L的正向和反向引物,10ng模板DNA,总体积为30μl。PCR扩增条件为:98℃预变性1min;98℃变性10s,50℃退火30s,72℃延伸30s,最后72℃,5min,共30个循环。

1.7 qPCR检测相关基因表达

采用Trizol试剂从细胞中提取总RNA,检测RNA含量和纯度($A_{260}/A_{280}=1.8 \sim 2.0$),以1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性(28S和18S RNA条带比值 ≥ 2.0)。提取完成后,进行逆转录反应,反应条件如下:37℃ 15min,85℃ 5s;而后进行PCR反应,条件:预变性95℃ 10s,变性95℃ 15s,退火60℃ 20s,40个循环。扩增反应结束后进行溶解曲线分析,判断产物是否有非特异性扩增;分析扩增曲线,计算Ct值,以β-actin作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组间mRNA表达水平差异(对照组基因表达量设为1)(Table 1)。

1.8 数据处理和统计

使用Uparse软件进行序列分析,相似性 $\geq 97\%$ 的序列聚类成为聚类图(operational taxonomic units, OTUs),对每个OTU的代表序列进行进一步筛选注释,使用MUSCLE软件比对OTUs之间优势种的差异。所有数据使用SPSS 22.0统计软件进行分析,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析比较各组间的统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

Table 1 Primer sequence

Genes	Primer	Sequence
CD40	Forward	5'-GCTGCTGGTGGTGTATTACTGTG-3'
	Reverse	5'-CTGGTCCGTGTGTGAAGGAC-3'
Relb	Forward	5'-AACCTGGGCATCCAGTGTGTTAG-3'
	Reverse	5'-TGCAGATGTCCCTGCTGGTC-3'
Rab27a	Forward	5'-GTACAGAGCCAATGGGCCAGA-3'
	Reverse	5'-AAACCCATAGCGTCCCTGAAGA-3'
Cxc19	Forward	5'-CCGAGGCACGATCCACTACA-3'
	Reverse	5'-AGTCCGGATCTAGGCAGGTTTG-3'

2 结果

2.1 菌群组成

在门的水平上,相对于对照组和单独免疫组,益生菌灌胃各组 Firmicutes(厚壁菌门)相对丰度均下降,Bacteroidetes(拟杆菌门)相对丰度均增加;嗜酸乳杆菌组 Bacteroidetes(拟杆菌门)丰度升高,双歧杆菌组 Actinobacteria(放线菌门)丰度明显高于其他各组,粪肠球菌组 Bacteroidetes(拟杆菌门)丰度高于其他各组(Figure 1)。

2.2 抗体的产生

5次免疫后,ELISA 检测血清抗体,除了对照组,其他各组均诱导出高水平的 bFGF 特异性抗体,微生物灌胃各组单独免疫组最终抗体滴度在 1:12000~1:12800 之间,没有显著差异 ($P>0.05$) (Figure 2),证明肠道益生菌对抗体的生成影响不大。

2.3 细胞因子的释放

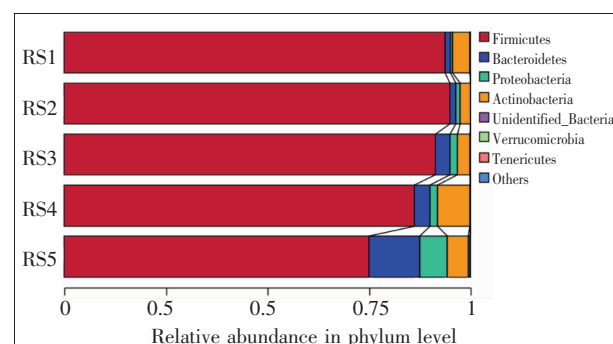
为探讨对小鼠细胞免疫和体液免疫(即 Th1 和 Th2 型免疫)的影响,抗原蛋白体外刺激培养免疫小鼠脾细胞后检测培养上清液中细胞因子 IFN- γ (代表 Th1 型免疫)和 IL-4(代表 Th2 型免疫)的含量。结果显示,IFN- γ 的分泌在双歧杆菌组[(40.76 $\pm$ 5.67)pg/ml]和粪肠球菌组[(38.43 $\pm$ 7.24)pg/ml],均明显高于其他各组 ($P<0.05$);而 IL-4 除了空白对照组,益生菌灌胃联合免疫和单独免疫组之间没有明显差异 ($P>0.05$)。说明益生菌能加强 Th1 型免疫(即细胞免疫)而不是体液免疫(Figure 3)。

2.4 小鼠脾脏的变化

免疫结束后对小鼠脾脏 HE 染色发现,免疫过的小鼠脾脏均出现可见的生发中心(Figure 4),双歧杆菌组、粪肠球菌组小鼠生发中心更加明显,数量更多(Figure 4D、4E)。

2.5 对肿瘤生长的影响

肿瘤生长的统计显示 (Figure 5), 相对于对照组,双歧杆菌组对肿瘤生长抑制效果最明显 ($P<0.01$),单独免疫组、嗜酸乳杆菌组、粪肠球菌组也有明显的抑制 ($P<0.05$)。不同组别之间比较发现,双歧



Notes:RS1:control group;RS2:simple immune group;RS3:lactobacillus acidophilus group;RS4:bifidobacterium group;RS5:enterococcus faecalis group

Figure 1 Microbial classification at phylum level

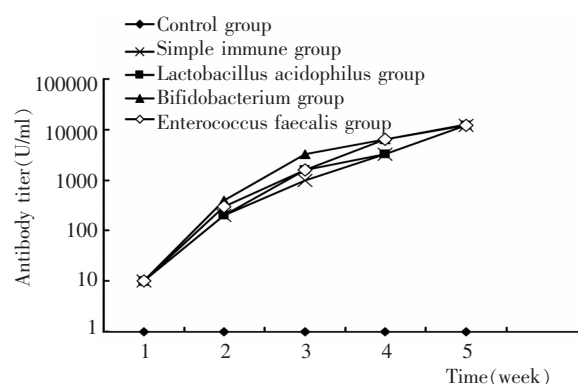
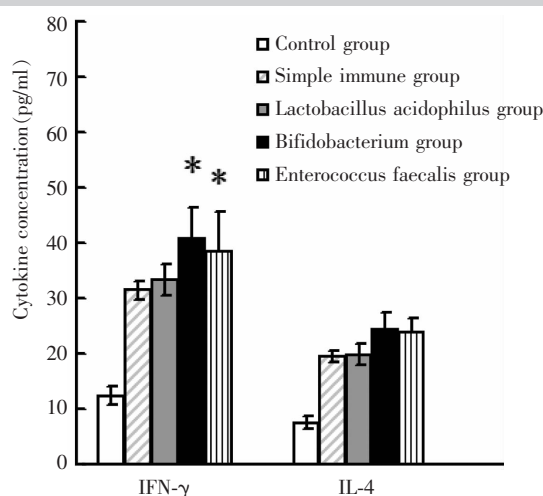
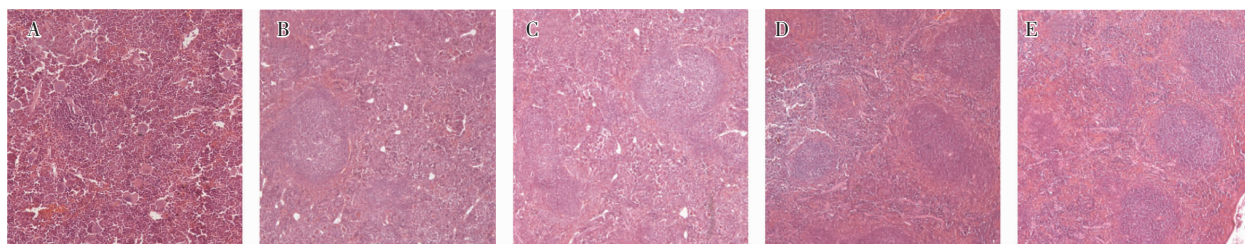


Figure 2 Expression of antibodies



Note: *: $P<0.05$ vs the other groups

Figure 3 The release of cytokines



Notes: A: control group; B: simple immune group; C: lactobacillus acidophilus group; D: bifidobacterium group; E: enterococcus faecalis group

Figure 4 Pathological observation of mice spleens

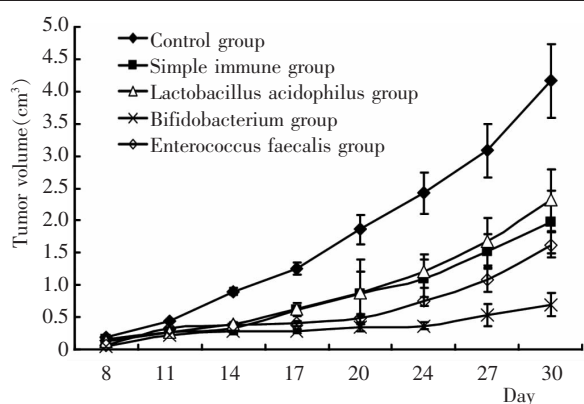
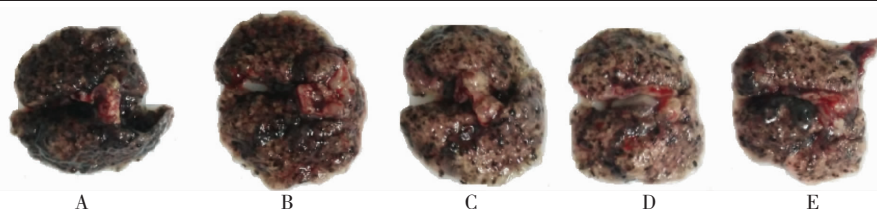


Figure 5 Tumor growth statistics

杆菌组相比单独免疫组 P 值为 0.013, 而嗜酸乳杆菌组和粪肠球菌组与单独免疫组比较 P 值分别是 0.752、0.321, 证明只有双歧杆菌能有效提升免疫治疗疗效。

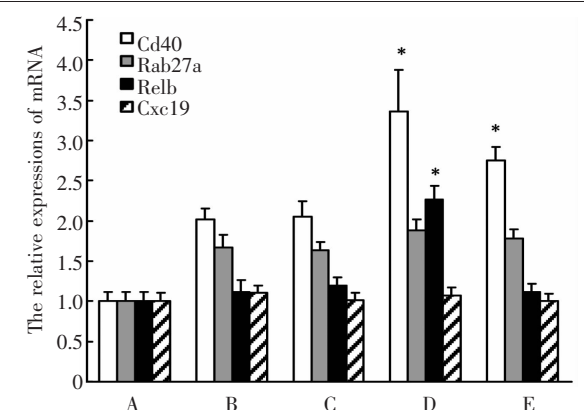
2.6 对癌细胞肺转移的影响

癌细胞的肺转移模型 (Figure 6), 对照组肺转移结节数为 253 ± 3.2 , 单独免疫组、嗜酸乳杆菌组、双歧杆菌组、粪肠球菌组分别为: 237 ± 4.32 、 211 ± 6.5 、 204 ± 7.24 、 217 ± 5.74 (相对于对照组 P 值均小于 0.01), 肺转移结节均减少, 而双歧杆菌组减少最为明显。



Notes: A: control group; B: simple immune group; C: lactobacillus acidophilus group; D: bifidobacterium group; E: enterococcus faecalis group

Figure 6 Lung metastasis of cancer cells



Notes: A: control group; B: simple immune group; C: lactobacillus acidophilus group; D: bifidobacterium group; E: enterococcus faecalis group

Figure 7 Expression of related genes

2.7 相关基因的表达情况

qPCR 扩增结果显示 (Figure 7), 双歧杆菌组 $CD8^+$ T 细胞活化相关基因 Cd40 和 DC 细胞 (树突状细胞) 成熟相关基因 Relb 的表达均高于其他各组 ($P < 0.01$), 粪球菌组 Cd40 的表达略低于

双歧杆菌组, 但高于其他组。研究涉及的抗原呈递相关基因 Rab27a 的表达在免疫各组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 介导免疫细胞向肿瘤微环境的募集相关基因 Cxcl9 的表达在所有各组之间表达量差别不大 ($P > 0.05$)。

3 讨论

bFGF 能调节多种细胞的生长、分化、迁移, 它还参与多种类型的肿瘤例如黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卡波西肉瘤、乳腺和肺肿瘤的血管生成。对于黑色素瘤, bFGF 是重要的自分泌生长因子, 通过其有丝分裂作用促进黑色素瘤血管生成^[6], 同时它总是在黑

色素瘤细胞中能够表达^[3]。因此,我们前期的研究通过诱导bFGF 特异性 CTL 反应,特异性杀伤黑色素瘤细胞和破坏肿瘤微血管的形成,达到一种双重抗癌的目的^[4]。本研究基于微生物对免疫系统的重要影响,通过增加小鼠肠道益生菌的方式力图进一步提升抗癌疗效。

肿瘤疫苗的主要目的是诱导可持续的抗肿瘤 CTL 反应^[7],由于颗粒形式的抗原比可溶性抗原具有更大的免疫原性,有利于与抗原呈递细胞相互作用,从而在疫苗接种后有利于提升 CD8⁺ T 细胞活化而增强 CTL 反应。Demana 等^[8]发现,将脂质体包裹皂树皂苷和抗原蛋白会形成颗粒态的抗原粒子,能很好地提高疫苗免疫原性。因此,我们在前人研究的基础上,用脂质体包裹黄芪皂苷形成的佐剂复合物使抗原变成颗粒态的形式,这种抗原粒子有效提升了抗原特异性 CTL 反应^[5]。因此在本研究中我们使用同样的佐剂复合物,诱发了高水平的 IFN- γ 的释放(Figure 3)和明显的脾脏生发中心(Figure 4),证明有效激发了细胞免疫应答。

肠道微生物群对机体免疫有很重要的影响,DC 细胞通过识别肠道细菌,激活有关信号通路而产生不同的细胞因子,增强 DC 功能和 Th1 型免疫反应,进而引起肿瘤组织及肠道 CD8⁺T 细胞增殖和活化^[9-11]。我们的研究结果显示,所有免疫组均诱导出高水平的抗体表达,但单独免疫组和益生菌灌胃联合免疫组之间抗体水平没有表现出明显的差异(Figure 2),说明微生物灌胃的对体液免疫的影响不是很大。但是,对于细胞免疫而言,在我们研究使用的三种微生物中双歧杆菌组表达出高水平的 IFN- γ (Figure 3),证明双歧杆菌能很好地促进 Th1 型免疫反应,这对于肿瘤的免疫治疗非常有利,同时这个组肿瘤生长的抑制相比明显优于单独免疫组和其他各组(Figure 5),同时减少的肺转移结节数(Figure 6),说明双歧杆菌有利于提高 CTL 反应,有效提升了免疫治疗疗效。

相关基因的表达检测显示,双歧杆菌灌胃小鼠 CD8⁺T 细胞活化相关基因 Cd40 和 DC 细胞成熟有关的基因 Relb 的表达增加(Figure 7)。López 等^[12]发现双歧杆菌可直接诱导 DC 细胞成熟和细胞因子产生,它在肠道内形成了一个特定的隔间,使其能够与宿主细胞相互作用,宿主细胞对调节 DC 细胞的功能至关重要,通过释放可溶因子导致 DC 细胞功能

的改善。而抗原呈递相关基因 Rab27a 和免疫细胞向肿瘤微环境的募集相关基因 Cxcl9 的表达在免疫各组之间无显著差异(Figure 7),说明双歧杆菌主要通过活化 T 细胞增殖而增强 CTL 反应。

综上所述,我们认为双歧杆菌主要能增强细胞免疫,通过增强细胞免疫而提升的 CTL 反应促进免疫治疗疗效。未来随着研究的不断深入,通过改变黑色素瘤患者体内双歧杆菌的丰度可能能够达到增加免疫治疗疗效的目的,期望我们的研究为临床的治疗提供一定的参考价值。

参考文献:

- [1] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J]. *Science*, 2018, 359(6371):97-103.
- [2] Zhang BH, Yue HY. Mechanism and pattern of microbial therapy for tumor[J]. *Journal of Lanzhou University(Medical Sciences)*, 2019, 45(5):1-4.[张百红,岳红云.肿瘤微生物治疗的机制和模式[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2019, 45(5):1-4.]
- [3] Al-Alousi S, Carlson JA, Blessing K, et al. Expression of basic fibroblast growth factor in desmoplastic melanoma[J]. *J Cutaneous Pathol*, 1996, 23(2): 118-125.
- [4] Zhang XP, Li NL, Guo C, et al. A vaccine targeting basic fibroblast growth factor elicits a protective immune response against murine melanoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(98):518-524.
- [5] Zhang XP, Li Y, Luo L, et al. Astragalus saponins and liposome constitute an efficacious adjuvant formulation for cancer vaccines [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2018, 33(2):25-31.
- [6] Shih IM, Herlyn M. Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma[J]. *Vivo*, 1994, 8(1): 113-123.
- [7] Ali OA, Emerich D, Dranoff G, et al. In situ regulation of DC subsets and T cells mediates tumor regression in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2009, 1(8):8ra19.
- [8] Demana PH, Fehske C, White K, et al. Effect of incorporation of the adjuvant Quil A on structure and immune stimulatory capacity of liposomes [J]. *Immunol Cell Biol* 2004, 82(5):547-554.
- [9] Blacher E, Levy M, Tatrovsky E, et al. Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity[J]. *J Immunol*, 2017, 198(2):572-580.
- [10] Gao C, Ganesh B P, Shi Z et al. Gut microbe-mediated suppression of inflammation-associated colon carcinogenesis by luminal histamine production[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(10):2323-2336.
- [11] Wang T, Zhou LH, Li Q, et al. Effect of intestinal flora on tumor and research progress of traditional Chinese medicine regulation [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese medicine*, 2019, 37(11):2704-2707.[王婷,周利红,李琦,等.肠道菌群对肿瘤的影响及中医药调节作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(11):2704-2707.]
- [12] López P, Gueimonde M, Margolles A, et al. Distinct bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro[J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 138(1):157-165.