肿瘤干细胞–DC 疫苗联合白介素–2 治疗小鼠恶性黑色素瘤的研究

陈　心，伍　龙，褚玉新，宋启斌
（武汉大学人民医院，湖北 武汉 430060）

摘　要：［目的］研究荷载肿瘤干细胞（CSCs）抗原的树突状细胞疫苗联合白介素-2（IL-2）治疗小鼠恶性黑色素瘤。［方法］利用 Aldefluor 染料从小鼠恶性黑色素瘤细胞系 D5 中分选出肿瘤干细胞，将 CSCs 制备成细胞裂解液加载在 DC 细胞上制备成 CSCs-DC 疫苗。将 D5 细胞接种至 C57BL/6 小鼠皮下建立小鼠恶性黑色素瘤模型，随机分成磷酸盐缓冲液组（PBS）、白介素-2 组（IL-2）、CSCs-DC 疫苗组（CSCs-DC）、CSCs-DC 疫苗联合白介素-2 组（CSCs-DC+ IL-2），并给予相应的治疗。测量并记录各组肿瘤大小变化和小鼠生存期，实验终点取小鼠脾脏，体外培养激活后利用 ELISA 法测定 B 细胞分泌 IgG 水平，LDH 细胞毒性实验测定细胞毒性淋巴细胞（CTL）活性。［结果］CSCs-DC+IL-2 组肿瘤生长明显慢于 PBS 组，IL-2 组及 CSCs-DC 组（$P<0.05$）。小鼠生存期 CSCs-DC+IL-2 组最长为 58.33±1.67 天，CSCs-DC 组为 51.67±0.33 天，较 IL-2 组 43.33±2.40 天长，PBS 组平均生存时间最短，为 34.00±1.53 天。CSCs-DC+IL-2 组小鼠脾脏中 B 细胞分泌 IgG 水平和 CTL 活性最高，CSCs-DC 组次之，IL-2 组较 CSCs-DC 组和 CSCs-DC+IL-2 组低，但较 PBS 组高，差异有统计学意义（$P<0.01$）。［结论］CSCs-DC 疫苗联合 IL-2 方案在治疗恶性黑色素瘤的小鼠模型中效果较 CSCs-DC 疫苗组和 IL-2 组好，与 IL-2 提高 T/B 细胞活性有关。

主题词：恶性黑色素瘤；肿瘤干细胞；树突状细胞；疫苗
中图分类号：R738.6　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1671–170X（2017）11–0955–04
doi：10.11735/j.issn.1671–170X.2017.11.B004

Cancer Stem Cells-DC Vaccine Combined with Interleukin-2 in Treatment of Malignant Melanoma in Mice

CHEN Xin，WU Long，CHU Yu-xin，et al.
（*Wuhan University*，*Renmin Hospital*，*Hubei Wuhan*，430060，*China*）

Abstract：［Objective］To study the therapeutic effect and mechanism of cancer-stem-cells-antigen-loaded dendritic cell vaccine combined with interleukin-2 in treating mouse malignant melanoma.［Methods］CSCs were sorted out from malignant melanoma cell lines（D5）using Aldefluor. bone-marrow derived DCs were pulsed with CSCs lysate to generate CSCs-DC vaccine. The C57BL/6 mice were challenged with subcutaneous injection of heterogeneous D5 tumor cells. The mice having tumor were divided into four groups：PBS，interleukin-2（IL-2），CSCs-DC vaccine（CSCs-DC），and CSCs-DC vaccine+IL-2（CSCs-DC+ IL-2）. Tumor size was measured，and survival was monitored and recorded as the percentage of survivors after tumor inoculation. At the end of the experiment，spleens in mice were harvested，cultured，and activated. IgG levels secreted by B cells were measured using ELISA，the cytotoxic lymphocyte（CTL）activity was measured using LDH cytotoxicity assay.［Results］The tumor size in the CSCs-DC+ IL-2 group was significantly smaller than those in the PBS group，the IL-2 group，and the CSCs-DC group（$P<0.05$）. The average survival time of the CSCs-DC+ IL-2 group（58.33±1.67d）was the longest among the four groups and that of the PBS group（34.00±1.53d）was the shortest；and the average survival time of the CSCs-DC（51.67±0.33d）group was longer than that of the IL-2 group（43.33±2.40d）. Levels of IgG secreted by B cell and CTL activity in mice spleen were the highest in the CSCs-DC+ IL-2 group，followed by the CSCs-DC group，IL-2 group，and the PBS group. These differences were statistically significant（all $P<0.01$）.［Conclusion］CSCs-DC vaccine combined with IL-2 in treating mouse malignant melanoma is more effective than IL-2 treatment and CSCs-DC vaccine used alone.

Subject words：cancer stem cells；malignant melanoma；dendritic cell；vaccine

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81302133，81670123）；中央高校基本科研业务费专项基金资助项目（2042014kf0149）
通讯作者：宋启斌，主任医师，教授，博士；武汉大学人民医院肿瘤中心，湖北省武汉市武昌区张之洞路 99 号（430060）；E–mail：qibingsong@163.com
收稿日期：2017–09–13

恶性黑色素瘤(malignant melanoma,MM)是一种黑色素细胞肿瘤,多发生于皮肤组织,也可发生于眼内、外阴、消化道、中枢神经系统以及淋巴结等皮肤外组织。近年来已经成为发病率增长最快的肿瘤之一[1]。预期2015年我国黑色素瘤新发病例数为8000例,死亡病例为3200例[2]。肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)是肿瘤细胞中一小群具有自我更新和无限增殖分化的多潜能细胞群体,具有很强的成瘤性和侵袭迁移潜能,CSCs对传统的放化疗不敏感,是肿瘤发生发展以及复发转移的根源,是最终导致患者死亡的关键因素,也是成功控制肿瘤的关键[3]。目前以CSCs为治疗靶点的研究方向主要包括:(1)干扰CSCs的信号传导通路,例如针对Wnt通路、NF-κβ通路的调节;(2)破坏肿瘤微环境来达到消除CSCs;(3)利用CSCs特异性抗原蛋白制备疫苗靶向杀伤CSCs。尤其是利用CSCs-DC疫苗治疗肿瘤的研究在结肠癌、膀胱癌、头颈部鳞癌和恶性黑色素瘤等多种恶性肿瘤中陆续开展。由于肿瘤微环境的抑制作用,CSCs-DC疫苗的作用有限。国外有研究探索CSCs-DC疫苗与化疗药物联合治疗恶性黑色素瘤,临床治愈率为18%[4]。在本研究中,我们通过制备CSCs-DC疫苗并将其联合白介素-2(interleukin-2,IL-2)治疗恶性黑色素瘤小鼠,观察其疗效及疫苗与IL-2相互的影响,为恶性黑色素瘤的治疗探索新手段。

1 材料与方法

1.1 材 料

C57BL/6小鼠,雌性,8周,购自武汉大学实验动物中心,SPF级条件下饲养,符合伦理委员会认可(动物合格证号:SCXK(鄂)2014-0004,使用许可证号:SYXK(鄂)2015-0027)。Aldefluor干细胞试剂盒购自美国Stem Cell公司,纯化抗小鼠CD3和CD28、抗小鼠CD40、白介素-2和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)购自Ebioscience公司,IgG ELISA试剂盒购自赛默飞公司,LDH释放试剂盒购自普洛麦格生物技术有限公司,RPMI 1640培养液、胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶消化液和青霉素/链霉素购自Gibco公司。小鼠恶性黑色素瘤细胞系D5购自武汉大学生命科学研究院细胞库,细胞于含10%胎牛血清的1640培养基中生长,置于37℃、5% CO_2、95%湿度条件下传代培养。

1.2 CSCs分选和抗原获得

采用Aldefluor™试剂盒分选CSCs:收集对数生长期D5细胞,制备成单细胞悬液体,计数细胞并用Aldefluor缓冲液重悬细胞,使其终浓度为1×10^6/ml,加入Aldefluor染料,7-AAD和DEAB作为对照组,水浴孵育后行流式分选ALDH+ D5细胞,将分选收集ALDH+D5(CSCs)细胞,置于液氮中浸泡5 min,而后37℃水浴中放置5 min,如此反复3次;获得CSCs裂解液即CSCs抗原。

1.3 CSCs-DC疫苗的制备

无菌条件下,取8周龄雌性C57BL/6小鼠股骨和胫骨骨髓,在1640培养基和GM-CSF环境下培养10d,收获成熟DC细胞,将方法1.2中收集的裂解液以1:3的比例加入DC细胞中,培养过夜,获得加载CSCs抗原的DC疫苗。

1.4 小鼠恶性黑色素瘤模型的建立与分组

正常C57BL/6小鼠随机分成4组,3只/组。将对数生长期的D5细胞调整细胞浓度至5×10^6/ml,接种0.1ml于每只小鼠右侧腹部皮下,每日观察肿瘤生长情况。扪及肿瘤直径为6~9mm时随机分为4组,磷酸盐缓冲液组(PBS):PBS 0.1ml腹腔注射,$d_{1\text{-}5}$,每日1次;IL-2组(IL-2):IL-2 1×10^5 U,皮下注射,$d_{1\text{-}5}$,每日1次;CSCs-DC疫苗组(CSCs-DC):CSCs-DC疫苗,皮下注射,$d_{1,7}$,每日1次;CSCs-DC疫苗联合IL-2组(CSCs-DC+IL-2):CSCs-DC疫苗,皮下注射,$d_{1,7}$,每日1次;IL-2 1×10^5 U,皮下注射,$d_{1\text{-}5}$,每日1次。

1.5 肿瘤大小和小鼠生存期观测

进行药物处理后每日规定时间进行观察,自D5细胞接种后,每3天测1次肿瘤最长径(a)及与之垂直的横径(b),直至实验结束,并根据公式$V=1/2ab^2$计算瘤体积,绘制移植瘤生长曲线。记录小鼠生存时间,绘制生存曲线。

1.6 活化B细胞培养液上清中IgG含量检测

采用ELISA法。实验结束时收集各组小鼠脾脏,B细胞被LPS和anti-CD40激活,包被缓冲液稀释亲和素纯化抗体,每孔加入100μl,4℃过夜包被酶标板。洗板3次。以ELISA封闭液,每孔200μl,室温封闭1h。封闭结束后,弃去封闭液,洗板,加入待测样品(以标准品制作标准曲线)100μl,室温孵育1h。洗板,每孔加入HRP标记的检测抗体100μl,室

温孵育 1h。洗板,每孔加入 TMB 底物溶液 100μl,室温避光显色 30min 后, 每孔加入 2mol/L H_2SO_4 50μl 终止反应。用酶标仪在 450nm 处检测 OD 值。绘制标准曲线,通过标准曲线计算样品浓度。

1.7 CTL 细胞毒效应实验

实验结束时收集各组小鼠脾脏,T 细胞被 anti-CD3/anti-CD28 激活和 IL-2 扩增为细胞毒性淋巴细胞,靶细胞为分选的 ALDH+D5 细胞,利用 LDH 释放试剂盒检测 CTL 细胞对靶细胞的杀伤作用。将效应细胞和靶细胞在圆底 96 孔板中共同孵育 6h,转移上清至一个新的 96 孔平底酶分析板, 加入底物,中止反应后 1h 内用酶标仪在 492nm 处检测 OD 值。根据以下公式计算出细胞毒性百分比。

$$\text{CTL 细胞毒性}(\%)=\frac{(\text{实验孔 OD 值}-\text{效应细胞自发 OD 值}-\text{靶细胞自发 OD 值})\times 100}{(\text{靶细胞最大 OD 值}-\text{靶细胞自发 OD 值})}$$

1.8 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组对小鼠肿瘤生长情况比较

D5 细胞接种小鼠后,PBS 组肿瘤生长较快,曲线陡直,而 IL-2 组、CSCs-DC 组和 CSCs-DC+IL-2 组生长曲线较平缓,但未停滞。第 27 天,PBS 组与治疗组(IL-2 组、CSCs-DC 组和 CSCs-DC+IL-2 组)肿瘤体积出现差异,治疗组(IL-2 组、CSCs-DC 组和 CSCs-DC+IL-2 组)肿瘤体积小于 PBS 组 (*P*<0.05)。第 36 天,IL-2 组与 CSCs-DC 组、CSCs-DC+IL-2 组分别比较, 肿瘤体积出现差异,CSCs-DC 组和 CSCs-DC+IL-2 组肿瘤体积均小于 IL-2 组(*P*<0.05)。第 48 天,CSCs-DC 组和 CSCs-DC+IL-2 组肿瘤体积出现差异,CSCs-DC+IL-2 组肿瘤体积小于 CSCs-DC 组 (*P*<0.05)。根据肿瘤生长体积与时间关系绘制肿瘤生长曲线 Figure 1。

2.2 各组小鼠生存期比较

PBS 组、IL-2 组、CSCs-DC 组和 CSCs-DC+IL-2 组平均生存期分别为 34.00±1.53 天、43.33±2.40 天、51.67±0.33 天和 58.33±1.67 天,组间比较差异有统计学意义 (*F*=120.9,*P*<0.01)。CSCs-DC+IL-2 组较 PBS 组,IL-2 组和 CSCs-DC 组生存期延长(*P*<0.05)。CSCs-DC 组生存期仅次于 CSCs-DC+IL-2 组,较 IL-2 组和 PBS 组生存期均延长(*P*<0.05),IL-2 组生存期短于 CSCs-DC 组, 但较 PBS 组延长(*P*<0.05)。

2.3 各组 CTL 杀伤 CSCs 效率比较

四组 CTL 杀伤 CSCs 效率组间比较差异有统计学意义(*F*=234.1,*P*<0.01)。组内比较显示,CSCs-DC+IL-2 组中 CTL 杀伤 CSCs 效率最高, 为 30.03±1.47%,显著性高于 PBS 组 3.61±0.96%(*P*<0.01),IL-2 组 10.01 ±0.48% (*P* <0.05) 和 CSCs-DC 组 18.18 ±1.83% (*P* < 0.01)。而 IL-2 组中 CTL 的杀伤效率高于 PBS 组(*P*<0.01),CSCs-DC 组 CTL 杀伤 CSCs 的作用高于 PBS 组和 IL-2 组(*P*<0.05),但较 CSCs-DC+IL-2 组低,差异有统计学意义(*P*<0.01)。

2.4 各组 B 细胞分泌 IgG 抗体水平的比较

各组 B 细胞分泌 IgG 抗体水平组间比较差异有统计学意义 (*F*=133.9,*P*<0.01)。组内比较显示,CSCs-DC+IL-2 组中 B 细胞分泌 IgG 含量最高,为 258.9±13.47ng/ml,明显高于其他三组(*P*<0.05),IL-2 组和 CSCs-DC 组中 IgG 含量次之, 分别为 78.28±3.76ng/ml 和 183.8±10.41ng/ml, 高于 PBS 组 34.17±2.29ng/ml (*P*<0.01),CSCs-DC 组和 IL-2 组比较 IgG 含量较高,差异有统计学意义(*P*<0.01)。

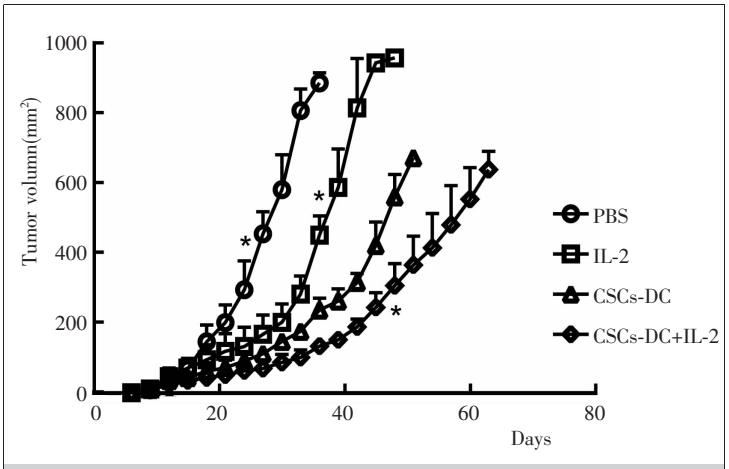

Figure 1 Tumor growth curve in mice

3 讨 论

恶性黑色素瘤恶性程度高,死亡率高,预后差,尽管随着诊疗手段的不断发展, 总体 5 年生存率仍低于 10%,晚期患者 5 年生存率不足 5%。早期手术切除原发灶是恶性黑色素瘤的首选治疗方法, 但若发生了转移或对重要器官浸润性的生长, 则无法进行手术治疗。由于恶性黑色素瘤对放疗、化疗不敏感,传统放化疗的治疗效果也十分有限。随着生物技术的发展, 生物治疗在恶性黑色素瘤的临床应用中取得突飞猛进的发展[5],树突状细胞(dendritic cells, DC)作为专职抗原呈递细胞,因其抗原呈递功能及免疫佐剂作用,可诱导出高效而特异的抗肿瘤免疫。除了能刺激初始型 T 细胞活化和增殖,还能诱导机体的体液免疫,激活 NK、NK-T 细胞,参与非特异性免疫。DC 疫苗在恶性黑色素瘤治疗中的应用越来越受到人们的关注, 其中 DC 荷载的肿瘤抗原是决定疫苗效果的关键。

目前认为肿瘤干细胞是肿瘤增殖、复发转移的关键[6],靶向杀伤 CSCs 是成功控制肿瘤的关键[3]。近年来,研究发现在肺癌、前列腺癌、头颈部鳞状细胞癌和恶性黑色素瘤等多种肿瘤中, 乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase,ALDH) 都可以作为肿瘤干细胞标志物来鉴定和分离肿瘤干细胞。恶性黑色素瘤组织中的 ALDH+细胞能形成小球并自我更新,在异体移植中具有很强的成瘤性, 对常规化疗药物耐药, 均说明 ALDH+细胞具有肿瘤干细胞的特性[7]。ALDH 与恶性黑色素瘤的预后呈负相关,ALDH+患者较 ALDH-患者死亡相对危险度为 1.76[8]。因此,利用 Aldefluor 染料染色,然后通过流式细胞技术分选出 ALDH+细胞是可靠的分离恶性黑色素瘤干细胞的方法 [9]。分离出 CSCs 后, 然而通过冻融法获得 CSCs 抗原并将特异性的抗原加载在 DC 细胞上启动特异性的免疫应答。

随着观测时间的延长,我们观察到 CSCs-DC 疫苗的效果也存在局限性, 考虑原因与肿瘤微环境密切相关,肿瘤微环境由肿瘤细胞、肿瘤浸润细胞、间质细胞、微血管及肿瘤细胞或基质细胞分泌的多种细胞因子等共同组成, 这些受到癌细胞的募集而聚合在一起的各种不同类型的细胞, 形成了一个抑制免疫细胞活性却适合癌细胞生长的环境[10],这种环境不但会影响 DC 细胞的功能,更重要是抑制了 T、B 细胞活性,从而使 CSCs-DC 疫苗的功能受到了限制。IL-2 是辅助型 T 淋巴细胞活化产生的细胞因子,其作用主要表现在刺激自然杀伤细胞和 T 细胞的增殖和活化,促进 B 细胞增殖和分泌抗体,激活巨噬细胞,从而发挥其抗肿瘤活性[11],但 IL-2 治疗恶性黑色素瘤的实际疗效并非期待中那样令人满意,总体有效率在 10%~20%。

在本研究中我们利用 CSCs-DC 疫苗联合 IL-2 治疗恶性黑色素瘤小鼠, 结果发现联合治疗组小鼠的肿瘤生长较单独疫苗组,IL-2 组和 PBS 组缓慢,小鼠生存期延长,B 细胞分泌抗体水平提高,T 细胞的细胞毒性增强,推测 IL-2 可能通过活化 T、B 细胞的功能,增强了 CSCs-DC 疫苗的疗效。本研究为恶性黑色素瘤的治疗提供了新的线索, 在今后的研究中我们将进一步探讨 CSCs-DC 疫苗联合 IL-2 治疗对肿瘤微环境中其他细胞的影响以及治疗的安全性和不良反应。

参考文献:

[1] Ferlay J,Soerjomataram I,Dikshit R,et al. Cancer incidence and mortality worldwide:sources,methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer,2015,136(5):E359-E386.

[2] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.

[3] Pan Q,Li Q,Liu S,et al. Concise review:targeting cancer stem cells using immunologic approaches[J]. Stem Cells,2015,33(7):2085-2092.

[4] Nitschke NJ,Bjoern J,Iversen TZ,et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and survivin peptide vaccine combined with temozolomide in metastatic melanoma[J]. Stem Cell Investig,2017,4:77.

[5] Liu HL,Hu WG,Song QB. Advance of immune checkpoint inhibitors in treatment of melanoma [J]. Journal of Chinese Oncology,2016,22 (12):1062-1067.[刘华丽,胡伟国,宋启斌. 免疫检测点阻滞剂治疗黑色素瘤的研究进展[J]. 肿瘤学杂志,2016,22(12):1062-1067.]

[6] Shima H,Yamada A,Ishikawa T,et al. Are breast cancer stem cells the key to resolving clinical issues in breast cancer therapy?[J]. Gland Surg,2017,6(1):82-88.

[7] Tao H,Lu L,Xia Y,et al. Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10 [J]. European Journal of Immunology,2015,45(4):999-1009.

[8] Charafejauffret E,Ginestier C,Iovino F,et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer[J]. Clin Cancer Res,2010,16(1):45.

[9] Leng Z,Yang Z,Li L,et al. A reliable method for the sorting and identification of ALDHhigh cancer stem cells by flow cytometry[J]. Exp Ther Med,2017,14(4):2801-2808.

[10] Schatton T,Schutte U,Frank NY,et al. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells[J]. Cancer Res,2010,70(2):697-708.

[11] Boyman O,Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system [J]. Nat Rev Immunol,2012,12(3):180-190.