

· 基础研究 ·

肝癌细胞疫苗对荷瘤小鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 生成及肿瘤浸润淋巴细胞的影响*

苏立¹, 周攀¹, 李正芳^{2 Δ} , 傅敏¹, 白平¹, 刘楠¹, 王智彪³

(1. 重庆市中医院肿瘤科 400011; 2. 重庆市中医院内分泌科 400011; 3. 重庆医科大学医学超声工程研究所 400016)

摘要:目的 探讨高强度聚焦超声(HIFU)制备肿瘤疫苗对小鼠抗同源肿瘤免疫力的影响。方法 以 HIFU 辐照或高温水浴灭活 H22 细胞制成 HIFU 瘤苗和高温瘤苗。将雌性 BALB/c 小鼠 108 只,随机分为 HIFU 瘤苗、高温瘤苗、生理盐水组,分别皮下注射 HIFU 瘤苗、高温瘤苗、生理盐水,之后接种 H22 细胞,观测荷瘤小鼠肿瘤体积及生存期。ELISA 检测免疫后荷瘤小鼠脾淋巴细胞在同源肿瘤再刺激下 IFN- γ 的生成。免疫组化检测小鼠肿瘤浸润 T 淋巴细胞。结果 HIFU 瘤苗免疫使小鼠肿瘤生长被抑制,脾淋巴细胞 IFN- γ 生成增加,且较高温瘤苗组更显著($P < 0.05$)。瘤苗增加了肿瘤中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞浸润的程度。结论 HIFU 瘤苗提高了实验动物的抗肿瘤免疫力,表现为增高的淋巴细胞 IFN- γ 生成和肿瘤内淋巴细胞浸润。

关键词:癌症疫苗;超声,高强聚焦;干扰素 γ ;淋巴细胞;小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.27.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)27-2846-03

Influence of tumor cell vaccine on lymphocyte IFN- γ production and tumor infiltrating lymphocytes in tumor-bearing mice*

Su Li¹, Zhou Pin¹, Li Zhengfang^{2 Δ} , Fu Min¹, Bai Ping¹, Liu Nan¹, Wang Zhibiao³

(1. Department of Oncology; 2. Department of Endocrinology, Chongqing Hospital of Traditional

Chinese Medicine, Chongqing 400011, China; 3. Institute of Medical Ultrasound Engineering, Chongqing University of Medicine Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of tumor vaccine prepared by high intensity focused ultrasound(HIFU) on anti-homologous tumor immunity in mice. **Methods** HIFU tumor vaccine and hyperthermic tumor vaccine were prepared by inactivating H22 cells with the HIFU irradiation or hyperthermic water bath. 108 female BALB/c mice were randomly divided into HIFU tumor vaccine, hyperthermic tumor vaccine and normal saline groups, 20 mice in each group. Then H22 murine hepatic carcinoma cells were inoculated subcutaneously. The tumor volume and lifetime of all tumor-bearing mice were observed. The IFN- γ production by mice spleen lymphocytes under the re-stimulation of H22 cell was measured by ELISA, and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were investigated by immunohistochemistry. **Results** The tumor growth of mice was suppressed by HIFU tumor vaccine immunity and the IFN- γ production of spleen lymphocytes was increased, which were more significant than hyperthermic tumor vaccine ($P < 0.05$). More CD4⁺ and CD8⁺ cells were found in tumors of vaccines immunized mice. **Conclusion** HIFU prepared tumor vaccine enhances the mice anti-tumor immunity manifested by increasing IFN- γ production of lymphocytes and TILs.

Key words: cancer vaccines; ultrasound, high-intensity focused; interferon-gamma; lymphocytes; mice

研究发现高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)辐照肿瘤细胞制备的肿瘤疫苗(简称瘤苗)可使免疫小鼠获得一定的抗同源肿瘤的免疫力^[1],但瘤苗诱导的动物体内免疫功能的变化尚不清楚。T 淋巴细胞介导的细胞免疫是抗肿瘤免疫反应的主体,体内某些细胞因子的增多是细胞免疫活化的标志,而淋巴细胞在肿瘤中的浸润程度通常被认为与肿瘤宿主的预后相关^[2-3]。本实验以 H22 荷瘤小鼠为模型,在观察 HIFU 瘤苗免疫小鼠大体抗肿瘤效应的基础上,探讨免疫后的荷瘤小鼠脾淋巴细胞干扰素- γ (IFN- γ)生成以及肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的变化,以了解 HIFU 瘤苗免疫对小鼠免疫功能的影响。同时以高温凝固方法制备的瘤苗作对照,比较 HIFU 瘤苗效能。

1 材料与方

1.1 材料

HIFU 肿瘤治疗系统由重庆医科大学超声工程研

究所提供;雌性 BALB/c 小鼠共 108 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g,由重庆医科大学实验动物中心提供;H22 小鼠肝癌细胞株由重庆医科大学实验细胞库提供;兔抗小鼠 CD4 及兔抗小鼠 CD8 抗体购自北京博奥森公司,免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒及小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒购自北京中杉金桥公司;ELX800 酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司。

1.2 方法

1.2.1 制备 HIFU 和高温瘤苗

将 H22 细胞调整浓度为 1×10^7 /mL, HIFU 辐照该细胞悬液制成 HIFU 瘤苗, HIFU 参数为:声强 1.054 W/cm^2 、焦距 110 mm、频率 0.8 MHz、时间 80 s。另取相同的细胞悬液 65°C 高温水浴 1 h 制备高温瘤苗。

1.2.2 小鼠肿瘤体积测量

将 60 只小鼠,随机分为 3 组,每组 20 只,每组分别接受 HIFU 瘤苗、高温瘤苗及生理盐水皮下注射,每只 0.2 mL,每周 1 次,连续 4 周,第 5 周以对数生长期

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(cstc 2006bb5263)。

 Δ 通讯作者, Tel: (023) 63832518; E-mail: lizhengfang_1958@163.com。

的 H22 细胞 4×10^6 个/只小鼠腋前皮下注射。接种后游标卡尺每周测量小鼠瘤体长径(a)与横径(b),以 $(a \times b^2)/2$ 计算肿瘤体积^[4]。

1.2.3 小鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 生成水平检测 小鼠 18 只,分 3 组,每组 6 只,每组分别接受 HIFU 瘤苗、高温瘤苗、生理盐水皮下注射及再接种 H22 细胞同前,接种 H22 细胞后 1 周处死,无菌取脾,于金属筛网上剪碎研磨,收集匀浆以小鼠淋巴细胞分离液梯度离心,获得脾淋巴细胞悬液。取此淋巴细胞 2×10^4 个与 H22 细胞 2×10^3 个混合加入 96 孔板,在含 10% FBS 的 RPMI1640 中共育 48 h,每组设 3 个复孔,之后 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液用 ELISA 法测 IFN- γ 。ELISA 按试剂盒说明步骤进行,以酶标仪测 492 nm 波长处吸光值。

1.2.4 免疫组化 将 30 只小鼠,分 3 组,每组 10 只,按同样方法分别免疫并接种,接种 H22 细胞 2 周后处死小鼠,切取其皮下肿瘤,4% 中性多聚甲醛固定、常规脱水、石蜡包埋,5 μ m 切片。免疫组化按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 TIL 半定量分析 镜下细胞膜或细胞质显现棕黄色判定为 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞。阳性细胞半定量分析参考文献^[2-3]方法:每个标本镜下随机选取 10 个高倍视野($\times 200$),以肿瘤内部阳性细胞分布最丰富的 3 个视野作为计数范围。根据视野内平均阳性细胞数($1 \sim <20$ 、 $20 \sim <50$ 、 ≥ 50),将细胞浸润程度分为 I、II、III 3 个等级。计数时排除肿瘤边缘及坏死区域。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,肿瘤体积数据用析因方差分析,肿瘤淋巴细胞浸润结果行 Mann-Whiney U 秩和检验,其他数据行单因素方差分析,计量数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠肿瘤体积和生存期比较 因生理盐水组小鼠在接种 H22 细胞 21 d 后出现较多死亡,故记录 21 d 内各组的肿瘤体积。21 d 内生理盐水组小鼠死亡 2 只,按死亡时肿瘤体积记录,结果显示各组小鼠间肿瘤体积有差异,21 d 时生理盐水组肿瘤体积为 $(3\ 509 \pm 524)$ mm³,高温瘤苗组为 $(2\ 001 \pm 472)$ mm³,HIFU 瘤苗组为 $(1\ 601 \pm 383)$ mm³ ($P < 0.05$),见图 1。观察生存情况至 6 周,各组小鼠生存期存在明显差异,平均生存期生理盐水组为 (23.3 ± 1.0) d、高温瘤苗组为 (31.8 ± 0.9) d,HIFU 瘤苗组为 (35.7 ± 1.1) d ($P < 0.05$),见图 2。

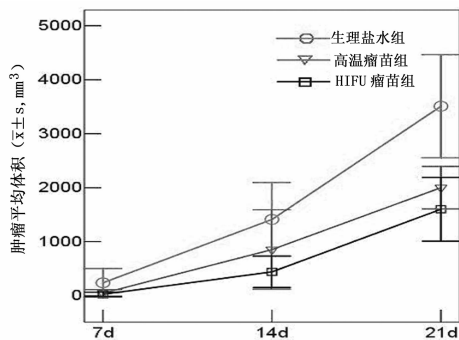


图 1 接种 H22 细胞 21 d 内各组小鼠的肿瘤体积比较

2.2 小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 水平 各组小鼠免疫后在 H22 细胞的再刺激下,其脾淋巴细胞 IFN- γ 分泌水平为:生理盐水组 $(1\ 133 \pm 208)$ pg/mL,高温瘤苗组 $(6\ 333 \pm 351)$ pg/

mL,HIFU 瘤苗组 $(9\ 366 \pm 1\ 026)$ pg/mL,组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 瘤苗对各组小鼠 TIL 的影响 两种瘤苗免疫的荷瘤小鼠肿瘤组织中 CD4⁺、CD8⁺ 细胞浸润均较明显。根据阳性细胞浸润分级计算,高温瘤苗及 HIFU 瘤苗组肿瘤组织内 CD4⁺、CD8⁺ 细胞浸润程度较生理盐水组有显著提高 ($P < 0.05$),两种瘤苗组间 TIL 浸润程度差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

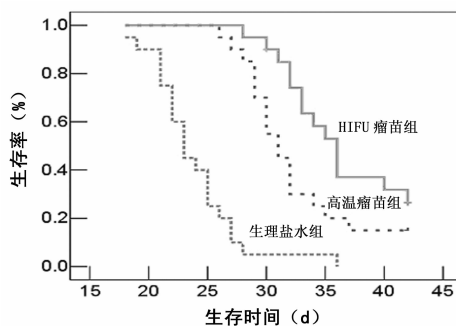


图 2 接种 H22 细胞后各组小鼠的生存曲线

表 1 各组小鼠肿瘤淋巴细胞浸润程度的分布 (n=10)

组别	CD4 ⁺			CD8 ⁺		
	I	II	III	I	II	III
生理盐水组	5	5	0	6	4	0
高温瘤苗组	1	4	5*	2	4	4*
HIFU 瘤苗组	0	3	7*	1	3	6*

* : $P < 0.05$,与生理盐水组比较。

3 讨 论

肿瘤疫苗作为肿瘤免疫治疗的重要部分被广泛研究,其种类较多,包括肿瘤细胞疫苗、树突状细胞疫苗、肿瘤肽类疫苗及肿瘤 DNA 疫苗等^[5],又可依据针对肿瘤抗原的不同分为全肿瘤细胞即多表位疫苗和特定抗原表位疫苗。全肿瘤细胞疫苗携带了完整的肿瘤抗原库,无需筛选肿瘤特异性抗原,这是全肿瘤细胞疫苗相对特定抗原疫苗的优势。目前灭活肿瘤细胞已获得全肿瘤细胞疫苗的方法有:反复冻融、热凝固、放射辐照、紫外线照射、甲醛固定及光动力杀伤等,但有的方法效果并不理想^[6],本研究以 HIFU 辐照肿瘤细胞制备疫苗,为研制肿瘤疫苗提供了一种新方法,HIFU 瘤苗免疫小鼠后大体观察发现肿瘤生长受抑制,小鼠生存期延长,提示 HIFU 瘤苗具有提高实验动物抗肿瘤免疫力的效果。

抗肿瘤免疫的主体是细胞免疫,由 1 型辅助性 T 细胞 (Th1) 介导,而 2 型辅助性 T 细胞 (Th2) 介导免疫应答向体液免疫发展。Th1 细胞产生的细胞因子主要是 IFN- γ 、IL-2,而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5。Th1 类和 Th2 类细胞因子的平衡决定了哪种免疫反应占主导地位,Th 细胞由分泌 Th1 类细胞因子向 Th2 类因子转换可能是抗肿瘤免疫失效的机制之一^[7]。IFN- γ 也可由活化的 CD8⁺ 细胞分泌,主要是细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 分泌,故 IFN- γ 水平增高可以作为是细胞免疫增强和 CTL 活化的标志,这对抗肿瘤是有益的。本实验发现经 HIFU 瘤苗免疫,荷瘤小鼠脾淋巴细胞在同源肿瘤再刺激下 IFN- γ 生成较未免疫小鼠成倍增

加,提示经瘤苗免疫小鼠体内产生了对该肿瘤敏感的淋巴细胞群,也表明细胞免疫的增强及 CTL 细胞激活。

免疫组化结果显示两种瘤苗免疫后小鼠 TIL 数量较未免疫组有显著提高。文献报道 TIL 数量是有利于宿主的预后因子,如 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞浸润较多的食管鳞癌患者有较长的生存期^[3],而 CD3⁺ 细胞在肿瘤周边浸润较少是宫颈癌复发的高危因素^[8]。有研究表明肿瘤实质中的 TIL 数量比肿瘤间质或边缘的 TIL 数量和预后的关系更加确切^[9],本实验中以肿瘤实质内的 TIL 为观察对象,发现瘤苗组肿瘤浸润 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞较未免疫组增多,这与观察到的免疫小鼠肿瘤生长受抑制是吻合的。肿瘤生长抑制和动物生存期延长在 HIFU 瘤苗组较高温瘤苗组更加明显,但两种瘤苗组间 TIL 浸润程度无显著差异,其原因可能在于除 TIL 的数量外,宿主预后与 TIL 之间还存在其他的影响因素^[10],如 TIL 的具体类型被认为是另一重要的预后因素,CD4⁺ 辅助细胞被认为对诱导 CTL 产生及维持 CTL 记忆有明确作用,而 CD4⁺ 细胞中的调节 T 细胞(Treg)亚群,则可能下调抗肿瘤免疫反应^[7]。本实验中未能区分 CD4⁺ 细胞的具体亚群,另外由于本实验中样本数较少且免疫组化及半定量的方法检验效能有限,可能未显示出两组潜在的差别。

为了衡量 HIFU 瘤苗的效能本研究以热凝固方法制备高温瘤苗作对照,理论上二者同属全肿瘤细胞疫苗,包含了相同的肿瘤抗原,且在本实验参数条件下 HIFU 辐照对细胞也产生 65℃ 左右的热效应,但实验结果显示 HIFU 瘤苗效能优于高温瘤苗,其机制并不清楚,这可能与 HIFU 辐照对细胞产生的特殊的生物学效应有关,HIFU 辐照除产生热效应外,还对细胞形成特有的机械效应及空化效应。近来研究认为细胞死亡时的某些物质释放能激活免疫,这是一些被称作“危险信号”或“损伤相关分子形式”的物质,如:热休克蛋白(heat shock protein,HSP)、核苷酸、钙网蛋白等^[11-13]。研究显示 HIFU 的机械和空化效应比 HIFU 的热效应更有利于辐照细胞“危险信号”的释放^[14],而 HIFU 的辐照也促使细胞释放“损伤相关分子形式”之一的 HSP^[15],这可能是 HIFU 辐照瘤苗比单纯热凝固细胞瘤苗免疫效能更高的原因之一。

综上所述,HIFU 制备瘤苗的免疫能明显抑制同源移植肿瘤在动物体内的生长,延长实验动物的生存期。肿瘤刺激下 HIFU 瘤苗免疫动物的脾淋巴细胞 IFN- γ 生成增高,提示机体细胞免疫被激活。肿瘤生长受抑制可能与增多的淋巴细胞浸润有关。

参考文献:

- [1] 周颢,付敏,王智彪,等.高强度聚焦超声固化瘤苗的实验研究[J].中国超声医学杂志,2002,18(8):569-571.
- [2] Naito Y,Saito K,Shiiba K,et al. CD8⁺ T cells infiltrated

within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer[J]. Cancer Res,1998,58(16):3491-3494.

- [3] Cho Y,Miyamoto M,Kato K,et al. CD4⁺CD8⁺ T cell Cooperate to improve prognosis of patients with esophageal carcinoma[J]. Cancer Res,2003,63(7):1555-1559.
- [4] Euhus DM,Hudd C,La Regina MC,et al. Tumor measurement in the nude mouse[J]. J Surg Oncol,1986,31(4):229-234.
- [5] Kochenderfer JN,Gress RE. A comparison and critical analysis of preclinical anticancer vaccination strategies[J]. Exp Biol Med,2007,232(9):1130-1141.
- [6] Copier J,Dalgleish A. Overview of tumor cell-based vaccines[J]. Int Rev Immunol,2006,25(5/6):297-319.
- [7] Yu P,Fu YX. Tumor infiltrating lymphocytes: friends or foes[J]. Lab Invest,2006,86(3):231-245.
- [8] Nedergaard BS,Ladekar M,Thomsen HF,et al. Low density of CD3⁺,CD4⁺ and CD8⁺ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer[J]. Br J Cancer,2007,97(8):1135-1138.
- [9] Shunyakov L,Ryan CK,Sahasrabudhe DM,et al. The influence of host response on colorectal cancer prognosis[J]. Clin Colorectal Cancer,2004,4(1):38-45.
- [10] Du C,Wang Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development[J]. J Exp Clin Cancer Res,2011,30(1):12-21.
- [11] Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self[J]. Science,2002,296(5566):301-305.
- [12] Green DR,Ferguson T,Zitvogel L,et al. Immunogenic and tolerogenic cell death[J]. Nat Rev Immunol,2009,9(5):353-363.
- [13] Tesniere A,Panaretakis T,Kepp O,et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death[J]. Cell Death Differ,2008,15(1):3-12.
- [14] Hu Z,Yang XY,Liu Y,et al. Release of endogenous danger signals from HIFU-treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,335(1):124-131.
- [15] Hundt W,O'Connell-Rodwell CE,Bednarski MD,et al. In vitro effect of focused ultrasound or thermal stress on HSP70 expression and cell viability in three tumor cell lines[J]. Acad Radiol,2007,14(7):859-870.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)

(上接第 2845 页)

- surgery[J]. J Anesth,2006,20(2):92-95.
- [13] 宗志军,潘道波,曾因明,等.氟比洛芬酯预防瑞芬芬尼复合麻醉术后急性疼痛[J].徐州医学院学报,2008,28(4):265-267.

- [14] 曾志文,陈伟元,曾金祥.氟比洛芬酯治疗腹腔镜胆囊切除术后急性疼痛的临床研究[J].中国内镜杂志,2006,12(10):1082-1083.

(收稿日期:2012-05-11 修回日期:2012-06-18)