

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.01.004

• 基础研究 •

# 低剂量顺铂周期化疗促进肿瘤特异性免疫应答降低宫颈癌再发的实验研究



杨丽华, 胡万芹, 肖 肖, 杨 静

**Enhancement of Anti-tumor Immune Response and Decrease of Recurrence Rate of Cervical Cancer by Low Dose Metronomic Chemotherapy of Cisplatin**

YANG Lihua, HU Wanqin, XIAO Xiao, YANG Jing

Department of Obstetric and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China

Corresponding Author: HU Wanqin, E-mail: 974220997@qq.com

**Abstract: Objective** To explore the effect of low dose metronomic chemotherapy of cisplatin on specific anti-tumor immune response and recurrence rate of cervical cancer. **Methods** Establish C57BL/6 mouse tumor model with TC-1 cells was established, the mice were divided into 3 groups ( $n=5$ ) (control, low dose and high dose group). The tumor growth curve was drawn and the HPV-E7 specific CD8+ T cells number in PBMC were determined. The tumor model establishment, grouping and treatment were same as above, after 7 days treatment, the tumor was removed and the TC-1 cells were reinjected in the contralateral hypogastrium after 2 days of surgery. The tumor recurrence rate and survival rate were checked. **Results** (1) The antitumor effect was similar after low dose or high dose cisplatin treatment. (2) The HPV-E7 specific CD8+ T cells in low dose group were significantly higher than that in control or high dose group. (3) The tumor recurrence rate in the low dose group was lower than that in control or high dose group. (4) The survival rate in low dose group was higher than that in control or high dose group. **Conclusion** Low dose metronomic chemotherapy of cisplatin can inhibit tumor growth effectively, through enhancing specific antitumor immune response, decrease the recurrence of tumor and increase the host survival rate in a certain extent.

**Key words:** Cisplatin; Metronomic chemotherapy; Immune response; Cervical cancer; Dosage

**摘要:目的** 探讨低剂量顺铂周期化疗对机体抗肿瘤免疫应答及宫颈癌再发率的影响。**方法** 建立TC-1肿瘤细胞C57BL/6小鼠模型,分为3组( $n=5$ ):对照组、低剂量组、高剂量组,绘制3组肿瘤生长曲线,用药结束后7 d检测3组小鼠外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中HPV-E7特异性CD8+T细胞的数目。同法建立小鼠肿瘤模型、分组、治疗,治疗结束后7 d,切除肿瘤组织,下腹部对侧接种TC-1细胞,观察肿瘤再发率和小鼠生存率。**结果** (1)顺铂低剂量周期疗法和高剂量疗法抗肿瘤作用相似。(2)低剂量周期疗法组PBMC中HPV-E7阳性的CD8+T数量显著高于高剂量组和对照组。(3)低剂量周期疗法组肿瘤再发率显著低于高剂量组和对照组;(4)低剂量周期疗法组肿瘤小鼠生存率显著高于高剂量组和对照组。**结论** 顺铂低剂量周期疗法能有效抑制肿瘤生长,其通过促进肿瘤特异性免疫应答,在一定程度上降低肿瘤再发,提高宿主生存率。

**关键词:** 顺铂; 周期化疗; 免疫应答; 宫颈癌; 剂量

中图分类号: R737.33 文章编号: A

## 0 引言

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一。虽然目前采用的化疗、手术和放射疗法起到了一定治疗效果,但这些传统治疗难以根治残留的小病灶或微转移灶,以至于仍有35%左右的患者因复发或转移而

导致最后死亡<sup>[1]</sup>。目前认为机体的免疫状态影响传统治疗效果及预后,因为免疫系统能识别自身抗原和异己抗原,清除异己抗原,激活的免疫系统发挥免疫监视作用,持续监测肿瘤细胞状态,及时清除异常细胞,防止肿瘤复发和转移<sup>[2]</sup>。近年来有研究报道低剂量周期化疗有免疫促进作用。另外,低剂量周期化疗因为其不良反应小,患者耐受性、依从性好而受到越来越多的关注<sup>[3]</sup>。但目前未见顺铂低剂量周期疗法对宫颈癌短期化疗效果、长期肿瘤再发率以及对机体免疫状态影响的研究,故本研究通过顺铂低剂量周期疗法和高剂量疗

收稿日期: 2012-10-15; 修回日期: 2013-03-07

基金项目: 云南省科技厅自然科学研究基金资助项目(2009ZC113M)

作者单位: 650101昆明,昆明医科大学第二附属医院妇产科

通信作者: 胡万芹, E-mail: 974220997@qq.com

作者简介: 杨丽华(1972-),女,博士,副教授,主要从事妇科肿瘤临床的研究

法, 探讨两种用药策略对抗肿瘤效应、抗肿瘤免疫力及肿瘤复发的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 鼠肺上皮细胞株TC-1, 鼠源性的HPV16阳性的肿瘤细胞株, 广泛用于宫颈癌的动物实验研究, 由霍普金斯大学TC WU教授惠赠。

1.1.2 实验动物 健康近交系C57BL/6小鼠, 4~6周龄, 雌性, 体质量20~30g, 购自北京维通利华公司。按三级动物要求, 饲养在无特定病原体环境中, 所用饲料、饮水及垫料均经高压灭菌处理。

1.1.3 主要试剂 RPMI 1640细胞培养液为美国Gibco公司产品; 顺铂: 5毫升/只, Sigma公司产品, PE-anti-CD8美国BD公司产品, 均购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 磷酸缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 购自北京北方同正生物技术有限公司; 红细胞裂解液购自碧云天公司; FITC-HPV-E7 四聚体 (tetramer) 由霍普金斯大学TC WU教授惠赠。

1.1.4 实验仪器 流式细胞仪型号为美国Beckman coulter公司的Epics XL-MCL, 数据应用Becton Dickinson 公司Cell Quest软件分析。

### 1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤抑制效应 于C57BL/6小鼠左侧下腹部注射  $1 \times 10^5$  TC-1细胞建立肿瘤模型, 12 d后下腹部肿瘤大小约0.5~0.6 cm, 小鼠随机分为3组 (每组5只), 对照组 (PBS联合外科手术组)、顺铂低剂量组 (低剂量顺铂联合外科手术组)、顺铂高剂量组 (高剂量顺铂联合外科手术组)。对照组给予PBS, 50微升/只, 腹腔注射, 3天1次, 共2次; 低剂量顺铂组给予顺铂5 mg/kg, 腹腔注射, 3天1次, 共2次; 高剂量顺铂组给予顺铂10 mg/kg, 腹腔注射, 1次。每周两次测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b)至手术切除肿瘤之日。按 $a \cdot b^2/2$ 公式计算肿瘤体积(V)<sup>[4]</sup>, 取各组平均值, 绘制肿瘤生长曲线。

1.2.2 小鼠PBMCs的HPV-E7特异性CD8+T细胞检测 按上分组及方案治疗小鼠, 用药结束后1周取小鼠尾静脉血, 加入红细胞裂解液2 ml, 室温放置2 min以裂解红细胞, 1 600 r/min 离心5 min, 弃上清液, 再次加入红细胞裂解液500  $\mu$ l, 室温放置2 min, 加入PBS 2 ml, 振荡均匀后1 600 r/min离心5 min, 弃上清液。混匀细胞, 细胞悬液加入FITC-HPV-E7 四聚体0.5  $\mu$ l (0.1  $\mu$ g), 抗PE-CD8a 1  $\mu$ l (0.2  $\mu$ g), 4 $^{\circ}$ C孵育30 min, 流式细胞仪上检测E7 四聚体阳性的CD8+T细胞数量, 应用BD细胞软件分析系统分析数据。

1.2.3 观察肿瘤再发率及小鼠生存率 按上分组及方案治疗小鼠, 用药结束后1周取小鼠尾静脉血后手

术切除肿瘤, 2d后, 小鼠对侧下腹部接种 $1 \times 10^5$  TC-1细胞, 观察肿瘤再发率及小鼠生存率。观察时间至再次接种TC-1细胞后60天或小鼠自然死亡或小鼠肿瘤直径达2 cm时 (此时处死小鼠, 等同于小鼠死亡)。(参照Steve Broomfield等<sup>[5]</sup>的方法, 建立小鼠肿瘤再发模型)。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS17.0软件进行统计分析。所有数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 计量资料应用 *t* 检验和方差分析; 小鼠生存率和生存曲线应用Kaplan-Meier法。 *P* < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 抗肿瘤效应比较

与对照组比较, 高剂量和低剂量顺铂组均显示显著的肿瘤抑制作用 (*P* < 0.05), 而高剂量与低剂量顺铂组的抗肿瘤效应差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见图1。

### 2.2 肿瘤再发率及小鼠生存率比较

对照组小鼠肿瘤再发率100%, 高剂量组再发率80%, 低剂量组肿瘤再发率20%。低剂量顺铂组肿瘤再发率显著低于对照组及高剂量顺铂组 (*P* < 0.05), 对照组与高剂量顺铂组差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。3组小鼠的生存率存在差异, 低剂量顺铂组生存率显著高于对照组及高剂量顺铂组 (*P* < 0.05), 而对照组与高剂量顺铂组差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见图2。

### 2.3 低剂量顺铂化疗导致HPV-E7特异性的CD8+T细胞数目增多

与对照组相比, 低剂量顺铂组HPV-E7特异性CD8+T细胞数量显著升高 (*P* < 0.05), 高剂量顺铂组稍有降低, 但差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见图3。

## 3 讨论

传统化疗方式为最大耐受剂量化疗, 大剂量化疗药物能有效杀灭大多数肿瘤细胞, 去除大的肿瘤病灶, 因此短期效果好, 有些患者的病灶甚至消失。但是由于大剂量化疗药物的骨髓抑制作用, 免疫系统不能发挥免疫监视效应, 导致肿瘤最终复发、转移。现在有观念提出低剂量周期化疗亦能有效杀灭肿瘤细胞, 同时还能诱导肿瘤细胞凋亡, 刺激机体产生特异性抗肿瘤免疫应答而发挥免疫促进作用<sup>[6]</sup>。Zhong 等<sup>[7]</sup>报道预先给予低剂量紫杉醇能调节肿瘤细胞因子网促进树突状细胞疫苗抗肺癌作用。Hermans 等<sup>[8]</sup>报道环磷酰胺周期疗法能有效促进机体肿瘤特异性CD8+T细胞从而增强免疫治疗的抗肿瘤作用。顺铂为宫颈癌一线化疗药物, 临床应用广泛, 但未见顺铂免疫调节作用及免疫记忆的研究。故本研究拟探讨顺铂

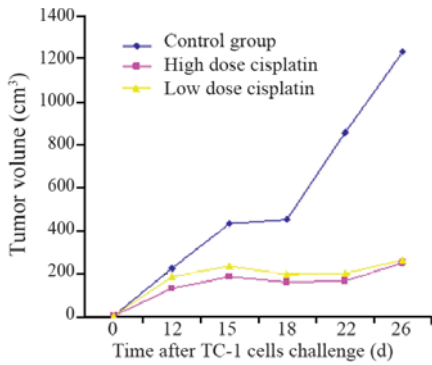


图1 对照组、高剂量顺铂组和低剂量顺铂组抗肿瘤效应比较  
Figure1 The antitumor effect of in the control group, high dose and low dose cisplatin group

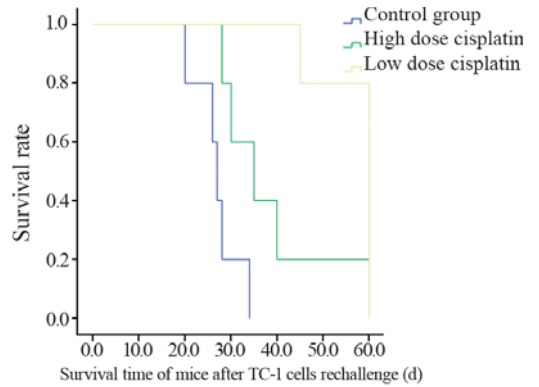


图2 对照组、高剂量顺铂组和低剂量顺铂组小鼠生存率比较  
Figure2 The survival rate of mice in the control group, high dose and low dose cisplatin group

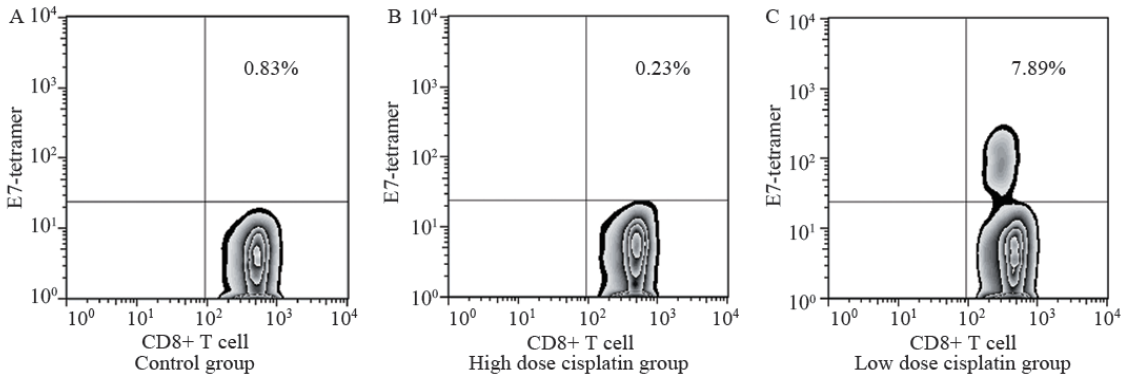


图3 对照组、高剂量顺铂组和低剂量顺铂组HPV-E7特异性CD8+T细胞数目比较  
Figure3 The number of HPV-E7 specific CD8+ T cells in control group, high dose and low dose cisplatin group

不同用药方案，化疗药物本身的免疫调节作用及其对肿瘤再发的影响，为临床选择适当治疗策略提供理论依据。

本研究分别给予低剂量和大剂量顺铂，发现低剂量顺铂与高剂量顺铂短期抗肿瘤效应相似，但低剂量顺铂组抗HPV-E7特异性CD8+T细胞数目显著高于对照组和高剂量顺铂组，说明低剂量顺铂能有效促进肿瘤特异性CD8+细胞数量，促进特异性抗肿瘤免疫应答。为了研究低剂量顺铂增强的抗肿瘤免疫力是否具有防止肿瘤再发的作用，我们把对照组、低剂量和高剂量顺铂组肿瘤切除后对侧下腹部接种肿瘤细胞，观察不同治疗组肿瘤的再发率，发现低剂量顺铂组肿瘤再发率最低，而对照组和高剂量顺铂组再发率均显著高于低剂量顺铂组。提示低剂量顺铂周期疗法近期能有效发挥抗肿瘤效应，同时通过刺激机体细胞免疫，产生免疫记忆，从而发挥免疫监视功能，在一定程度上抑制肿瘤再发，可能为一种值得提倡的化疗用药策略，可以在临床推广。

参考文献:

[1] Bellone S, El-Sahwi K, Cocco E, *et al.* Human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particle L1-specific CD8+cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are equally effective as E7-specific

CD8+ CTLs in killing autologous HPV-16-positive tumor cells in cervical cancer patients:implications for L1 dendritic cell-based therapeutic vaccines[J]. *J Virol*,2009,83(13):6779-89.  
[2] Gong L, Lou JY, Wang P, *et al.* Clinical evaluation of neoadjuvant chemotherapy followed by radical surgery in the management of stage IB2-IIIB cervical cancer[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2012, 117(1):23-6.  
[3] Daenen LG,Shaked Y,Man S, *et al.* Low-dose metronomic cyclophosphamide combined with vascular disrupting therapy induces potent antitumor activity in preclinical human tumor xenograft models[J]. *Mol Cancer Ther*,2009,8(10):2872-81.  
[4] Naito S,von Eschenbach AC,Giavazzi R, *et al.* Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice[J]. *Cancer Res*,1986,46(8):4109-15.  
[5] Broomfield S,Currie A,van der Most RG,*et al.* Partial, but not complete, tumor-debulking surgery promotes protective antitumor memory when combined with chemotherapy and adjuvant immunotherapy[J]. *Cancer Res*,2005,65 (17):7580-4.  
[6] Chen CA,Ho CM,Chang MC, *et al.* Metronomic chemotherapy enhances antitumor effects of cancer vaccine by depleting regulatory t lymphocytes and inhibiting tumor angiogenesis[J]. *Mol Ther*,2010,18(6): 1233-43.  
[7] Zhong H, Han B, Tourkova IL, *et al.* Low-dose paclitaxel prior to intratumoral dendritic cell vaccine modulates intratumoral cytokine network and lung cancer growth[J]. *Clin Cancer Res*,2007,13(18 Pt 1): 5455-62.  
[8] Hermans IF, Chong TW, Palmowski MJ, *et al.* Synergistic effect of metronomic dosing of cyclophosphamide combined with specific antitumor immunotherapy in a murine melanoma model [J]. *Cancer Res*,2003,63(23):8408-13.

[编辑: 周永红; 校对: 安 凤]