

顺铂对荷瘤鼠髓源性抑制细胞的选择性 下调作用

黄香 吴昊 郭人花

【摘要】 目的 通过观察不同剂量的顺铂 (Cisplatin, DDP) 对 B16 黑色素瘤荷瘤鼠髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 的下调作用, 探讨介导 DDP 免疫调节作用的机制。方法 建立 C57BL/6 鼠 B16 黑色素瘤模型, 随机分为三组: 生理盐水 (normal saline, NS) 组: 予 NS; DDP 2.5 mg/kg 组: 予 DDP 2.5 mg/kg, ip; DDP 5 mg/kg 组: 予 DDP 5 mg/kg, ip。流式细胞术检测 DDP 处理后荷瘤鼠肿瘤组织、外周血中 MDSCs、CD3⁺T 细胞及自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞比例的变化。绘制肿瘤生长曲线比较不同剂量的 DDP 对细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer cells, CIK cells) 抑瘤作用的增效作用。结果 DDP 可显著降低肿瘤组织中 MDSCs 的比例 ($P < 0.05$), 而对外周血中 CD3⁺T 细胞及 NK 细胞的比例无显著作用; 两种剂量的 DDP (2.5 mg/kg vs. 5 mg/kg) 对 MDSCs 的下调作用无显著差异。DDP 预处理可显著增强 CIK 细胞对 B16 黑色素瘤的抑制作用 ($P < 0.05$); 此种增效作用在 DDP 的两种剂量组 (2.5 mg/kg vs. 5 mg/kg) 间无统计学差异。结论 在 B16 黑色素瘤模型中, DDP 预处理可增强 CIK 细胞免疫治疗的疗效, 且此种增效作用与 DDP 选择性下调肿瘤组织中 MDSCs 的比例相关。

【关键词】 预处理化疗; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 免疫调节; 髓源性抑制细胞

Cisplatin selectively decreased the percentages of myeloid-derived suppressor cells in murine B16 melanoma model HUANG Xiang, WU Hao, GUO Ren-hua. Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: GUO Ren-hua, Email: rhguo@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the dynamic changes of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) after cisplatin (DDP) treatment in a murine B16 melanoma model and to elucidate the underlying mechanisms mediating the immuno-stimulating effect of DDP precondition. **Methods** C57BL/6 mice were injected with B16 cells to establish the murine melanoma model and then randomly divided into three groups. (a) Group Normal Saline (NS): administered with NS; (b) Group DDP 2.5 mg/kg: administered with DDP 2.5 mg/kg; (c) Group DDP 5 mg/kg: administered with DDP 5 mg/kg. The percentages of MDSCs and endogenous effector cells in tumor tissues and peripheral blood after DDP treatment were analyzed through flow cytometry. Tumor volumes were monitored to evaluate the efficacy-enhancing effect of DDP with different doses. **Results** In B16 melanoma model, DDP could significantly decrease the percentages of MDSCs in tumor tissues ($P < 0.05$), whereas exerting no effect on the levels of CD3⁺ T lymphocytes and natural killer(NK) cells ($P > 0.05$). There were no significances of MDSCs downregulation and efficacy-enhancing effect between the two doses of preconditioning DDP ($P > 0.05$). **Conclusion** DDP precondition could selectively decrease the percentages of MDSCs in B16 melanoma model, which may contribute to the efficacy-enhancing effect of DDP.

【Key words】 Preconditioning chemotherapy; CIK cells; Immunomodulation; Myeloid-derived suppressor cells

髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 在多种肿瘤患者的外周血、次级淋巴

器官中异常积聚, 与肿瘤免疫逃逸密切相关^[1]。研究发现多种化疗药物对 MDSCs 的数目及功能具有下调作用: 吉西他滨和 5-氟尿嘧啶可选择性下调 MDSCs 的数目, 提高肿瘤局部效应 T 细胞的浸润, 增强抗肿瘤细胞免疫应答^[2-3]。全反式维 A 酸可诱导 MDSCs 向抗原呈呈细胞前体细胞的分化, 阻遏其免疫抑制功能^[4]。我们发现顺铂 (Cisplatin, DDP) 可下调 B16 黑色素瘤荷瘤鼠

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.20.049

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81201597); 国家自然科学基金 (81172217)

作者单位: 210029 南京医科大学第一附属医院肿瘤科

通讯作者: 郭人花, Email: rhguo@njmu.edu.cn

外周血、骨髓、脾脏组织及肿瘤引流淋巴结中MDSCs的比例, 增强后续输注的细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK cells)的抗肿瘤作用^[5]。在本实验中, 我们进一步观察了不同剂量的DDP预处理后, B16黑色素瘤荷瘤鼠肿瘤组织及外周血中MDSCs、CD3⁺T淋巴细胞以及自然杀伤(natural killer, NK)细胞数目的变化, 比较了两种不同剂量的DDP预处理对CIK细胞疗效的增效作用, 以进一步阐明DDP免疫调节作用的机制。

材料与方法

一、实验材料

SPF级雌性C57BL/6小鼠购于南京医科大学实验动物中心, 用于实验的小鼠均为6~8周龄。动物实验遵循江苏省人民医院动物伦理委员会的规范与准则。小鼠B16黑色素瘤细胞购自上海生物化学与细胞学研究所, 细胞以DMEM培养液(Hyclone)维持于37℃及5%CO₂的孵育箱中。

二、实验方法

1. 实验模型的建立: 将 1×10^6 个B16小鼠黑色素瘤细胞接种于C57BL/6鼠右侧背部皮下, 待B16细胞形成直径约5mm的皮下结节时, 将荷瘤小鼠随机分为三组(每组25只)。生理盐水(normal saline, NS)组: 予NS(0.2 ml, ip, D0)作为对照; DDP(齐鲁制药有限公司)2.5 mg/kg组: 予DDP(2.5 mg/kg, ip, D0); DDP 5 mg/kg组: 予DDP(5 mg/kg, ip, D0)。

2. 流式细胞术: DDP预处理化疗后不同时间点(D0, D3, D6, D9, D12)收集并制备荷瘤鼠外周血、肿瘤组织单细胞悬液。参照各抗体说明书中的实验步骤进行各分子的染色, 各时间点各组织悬液各分子均设同型对照抗体管为阴性对照。外周血、肿瘤组织进行Gr-1、CD11b双分子(FITC-conjugated anti-Gr-1, PE-conjugated anti-CD11b, eBioscience)染色; 外周血进行CD3e分子(PE-conjugated anti-CD3e, eBioscience)和CD49b分子(FITC-conjugated anti-CD49b, eBioscience)的染色。流式细胞仪(FACS-Calibu, BD Biosciences)计数各细胞数目及比例。

3. CIK细胞的制备: 无菌条件下制备C57BL/6小鼠脾脏组织单细胞悬液, 小鼠淋巴细胞分离液(灏洋生物制品科技有限责任公司)密度梯度离心富集单个核细胞。完全RPMI-1640培养液重悬, 培养第1天添加1000 U/ml小鼠 γ 干扰素(Peprotech), 24 h后添加小鼠白介素2(Peprotech)和抗小鼠CD3单抗(eBioscience), 终浓度分别为500 U/ml和50 ng/ml。每2 d更换新培养液, 补充小鼠白细胞介素2以

300 U/ml终浓度维持。

4. 疗效观察模型: 预处理化疗方案为单剂的DDP, 过继性免疫治疗方案DDP 2.5 mg/kg组: DDP(2.5 mg/kg, ip, D0); DDP 5 mg/kg为CIK细胞($1 \times 10^7/100 \mu\text{l}$, iv, D3)。将荷瘤鼠随机分为六组(每组7只)。NS组: 予NS作为对照; CIK组: 单独CIK细胞; g组: DDP(5 mg/kg, ip, D0); DDP 2.5 mg/kg-CIK组: DDP预处理(2.5 mg/kg, ip, D0)联合CIK细胞; DDP 5 mg/kg-CIK组: DDP预处理(5 mg/kg, ip, D0)联合CIK细胞。游标卡尺隔天测量肿瘤长短径, 监测肿瘤体积变化: 肿瘤体积=0.5×长径×短径×短径。

三、统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计分析, 实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间均值比较采用 t 检验, 多组间均值的比较采用单因素方差分析(One-Way-ANOVA), LSD法用于两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. DDP下调了B16黑色素瘤荷瘤鼠肿瘤组织中MDSCs的比例: 我们首先观察了DDP预处理后荷瘤小鼠肿瘤组织中Gr-1⁺CD11b⁺MDSCs比例的动态变化。两种剂量的DDP预处理均可显著下调肿瘤组织中MDSCs的比例, 在D3达低谷(在后续实验中, 以此作为预处理后观察时间点), 此后低水平维持, 此种显著性差异自D3持续至D9(D3: $P = 0.022$, DDP2.5 mg/kg vs. NS; $P = 0.015$, DDP5 mg/kg vs. NS, 图1); 而在两种DDP预处理剂量组间, 肿瘤组织中MDSCs的比例无统计学差异(D3: $P = 0.783$, 图1)。有趣的是, NS对照组肿瘤组织中MDSCs的比例与肿瘤负荷呈正相关, 随肿瘤体积的增大而逐渐升高, 但MDSCs的比例在D12经历回落, 此现象可能与肿瘤体积过大严重坏死致MDSCs局部浸润障碍相关。

2. DDP预处理后外周血中MDSCs比例的动态变化: 随后我们监测了DDP预处理后荷瘤小鼠外周血中MDSCs比例的动态变化。与既往研究结果类似^[6], DDP预处理化疗后外周血中MDSCs比例的降低较为滞后, 于D6开始出现, 低水平持续至D9(图2); 但与NS对照组相比, 仅存在下降趋势, 而无统计性差异($P > 0.05$, 图2)。与肿瘤组织中的结果类似, 两种DDP预处理剂量组间MDSCs比例相近, 无显著差异($P > 0.05$, 图2)。值得注意的是, 荷瘤鼠外周血MDSCs比例在无DDP预处理干预的情况下(NS对照组)亦与肿瘤负荷呈正相关, 但在D12可观察到较肿瘤组织更为明显的MDSCs比例的回落, 推测系肿瘤消耗恶病

质所致。

3. DDP 预处理后外周血 CD3⁺T 淋巴细胞以及 NK 细胞比例的变化: 外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞以及 NK 细胞比例的变化亦纳入观察范围: 两种剂量的 DDP 预处理后 D3, 外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞以及 NK 细胞的比例与 NS 对照组相比均无统计学差异 ($P>0.05$, 图 3)。DDP 预处理似乎对外周血 CD3⁺T 淋巴细胞的比例无丝毫作用, 其水平与 NS 对照组基本持平(图 3A); 而 NK 细胞比例在 DDP 预处理后呈现升高趋势, 且与 DDP 的预处理剂量呈正相关(图 3B)。

4. DDP 预处理增强了 CIK 细胞对 B16 黑色素瘤的抑制作用: 与既往研究获得的结果一致^[5-8], 单独的 DDP 化疗或 CIK 细胞免疫治疗并不能诱导显著的肿瘤生长抑制, 而两者的联合则可显著抑制小鼠 B16 黑色素瘤的生长(图 4); 而两种预处理剂量的 DDP 对 CIK 细胞的增效作用无显著性差异 ($P>0.05$, 图 4)。

讨 论

化疗药物的免疫调节作用已逐渐受到人们的重视, 以其作为预处理措施调节机体免疫内环境, 可增强后续免疫治疗的抗肿瘤作用^[9-11]。我们的既往研究发现预处理化疗可在多种动物肿瘤模型中(Lewis 肺癌、CT-26 结肠癌、B16 黑色素瘤)增强 CIK 细胞的抗肿瘤作用^[5-8], 但介导化疗药物免疫调节作用的机制尚未完全阐明。DDP 是应用较为广泛的一种预处理化疗药物, 其免疫调节机制包括: 上调肿瘤细胞 NKG2D 配体的表达以提高肿瘤细胞对 NKG2D⁺淋巴细胞杀伤作用的敏感性^[12]; 增加肿瘤细胞 Fas 受体的表达使其更易被 Fas 配体⁺免疫效应细胞所杀伤^[13]; 促进 CD3⁺T 淋巴细胞至肿瘤局灶的浸润, 下调肿瘤局灶中调节性 T 细胞的比例; 下调次级淋巴组织中 MDSCs 的比例^[5-8]。在此项研究中, 我们在 B16 黑色素瘤模型中观察了 DDP 预处理化疗后肿瘤组织中 MDSCs 的比例以及外周血循环中内源性效应细胞比例的变化, 并比较了不同预处理剂量的 DDP 对 CIK 细胞体内抗肿瘤作用的增效作用, 以期进一步阐明 DDP 免疫调节作用的作用。

DDP 预处理化疗可显著降低肿瘤组织中 MDSCs 的比例(图 1), 借此改善肿瘤免疫微环境, 介导 DDP 对 CIK 细胞免疫治疗的增效作用。通过对 DDP 预处理后肿瘤组织中 MDSCs 比例的动态监测, 发现其比例在 D3 降至最低点, 后呈缓慢增长, 但较 NS 对照组均显著下降。在后续实验中, 我们选择低谷 D3 作为时间点

观察 DDP 的免疫调节作用。外周血中 MDSCs 比例的动态观察显示 DDP 并未能诱导循环 MDSCs 比例的显著下调, 与 NS 对照组相比, 外周血 MDSCs 比例仅存在下降趋势。上述结果提示 DDP 预处理化疗对 MDSCs 的下调作用可能依赖于肿瘤组织免疫微环境的改变, 而非 DDP 对 MDSCs 的直接细胞毒作用, 即 DDP 通过改变肿瘤微环境中某些细胞因子或免疫细胞的水平影响了局部 MDSCs 的数目。

机体内源性效应细胞在抗肿瘤免疫应答中发挥不可或缺的作用^[14-15], 因此我们观察了 DDP 预处理化疗对 CD3⁺T 细胞及 NK 细胞的作用: 外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞以及 NK 细胞的比例与 NS 对照组相比均无明显差异。文献报道, 吉西他滨和 5-氟尿嘧啶在下调 MDSCs 数目的同时对 T 细胞、NK 细胞及 B 细胞无明显影响^[2-3]。此结果与既往研究类似, 提示 DDP 预处理化疗对 MDSCs 细胞具有选择性下调作用, 进一步证实 DDP 以非细胞毒作用机制下调 MDSCs。

预处理化疗的免疫调节机制可因药物剂量的不同而异: 大剂量环磷酰胺造成淋巴细胞削减诱导效应细胞的自稳性增生; 小剂量环磷酰胺下调调节性 T 细胞数目及功能^[16]。为透彻了解 DDP 的免疫调节机制, 探索 DDP 的最佳预处理剂量, 我们设定了两种剂量 2.5 mg/kg 及 5 mg/kg 进行各项实验, 以比较其免疫调节作用的异同。可惜的是, 在这两种预处理剂量组间, 各观察指标均无统计学差异: 包括肿瘤组织中 MDSCs 比例、外周血 MDSCs 比例、外周血 CD3⁺T 细胞与 NK 细胞比例以及对 CIK 细胞的增效作用。在实验动物耐受的条件下进一步增大预处理剂量以增加剂量组可能会获得阳性结果, 有待进一步探讨。

最后, 在对肿瘤组织及外周血 MDSCs 比例的动态观察中, 我们发现随着肿瘤体积的增长, MDSCs 比例逐渐增加, 这与免疫编辑理论是一致的, 即恶性肿瘤在发生发展的过程中, 可利用多种免疫抑制机制, 获得逃避免疫监视的能力^[17]。对这些免疫抑制机制的深入研究, 有助于我们发现可成功逆转免疫耐受甚至治愈肿瘤的作用靶点, 为新的治疗手段的开发提供思路。

综上所述, 通过观察 DDP 预处理后对 B16 黑色素瘤荷瘤鼠 MDSCs 数目以及内源性效应细胞的影响, 发现 DDP 预处理化疗可选择性下调荷瘤鼠肿瘤组织中 MDSCs 的比例, 而对内源性效应细胞无明显作用, 为介导 DDP 预处理化疗免疫增效机制的探讨提供了实验依据。

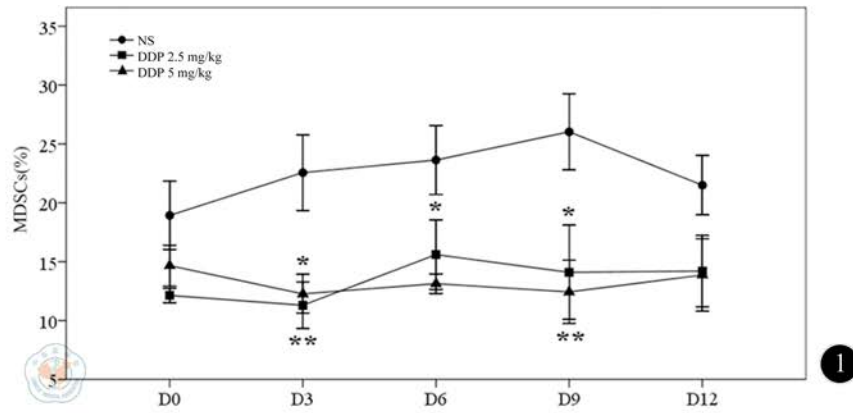


图1 DDP预处理化疗后荷瘤鼠肿瘤组织中MDSCs细胞比例的动态变化。建立B16黑色素瘤模型，随机分为三组并予相应治疗。不同时间点制备荷瘤鼠肿瘤组织单细胞悬液，流式细胞仪检测Gr-1⁺CD11b⁺细胞的比例。Points, 平均细胞比例 (n=5); Bars, SE; *: DDP 2.5 mg/kg vs. NS, **: DDP 5 mg/kg vs. NS, P<0.05

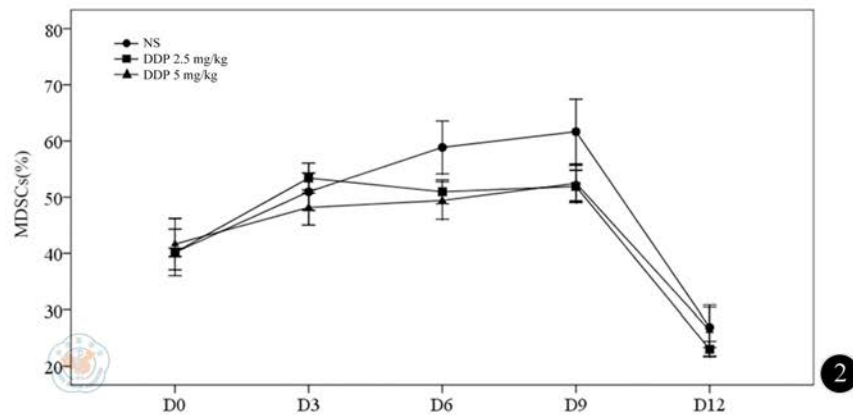


图2 DDP预处理化疗后荷瘤鼠外周血MDSCs比例的动态变化。建立B16黑色素瘤模型，随机分为三组并予相应治疗。处理后不同时间点制备荷瘤鼠外周血单细胞悬液，流式细胞仪检测Gr-1⁺CD11b⁺细胞的比例。Points, 平均Gr-1⁺CD11b⁺细胞比例 (n=5); Bars, SE

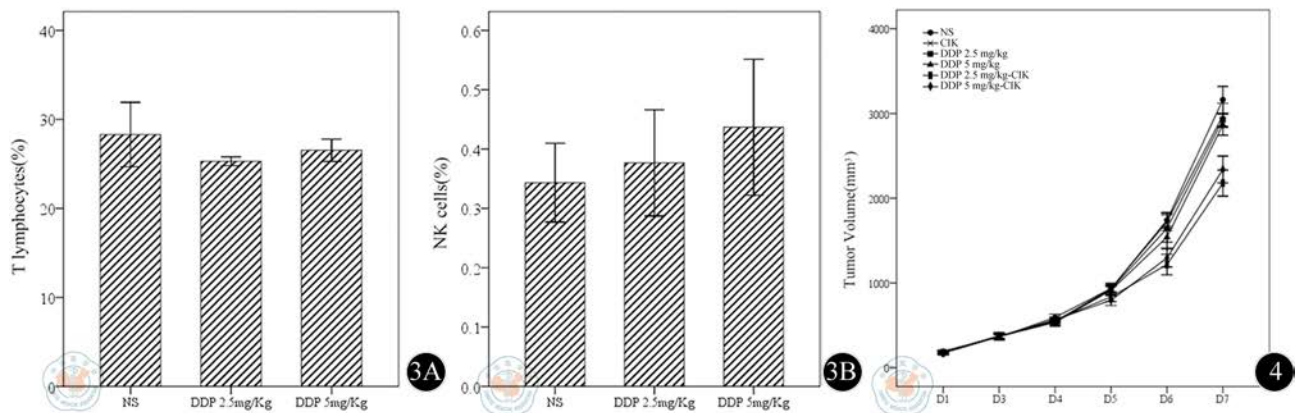


图3 DDP预处理化疗后荷瘤鼠外周血中CD3⁺细胞以及NK细胞比例的变化。建立B16黑色素瘤模型，随机分为三组并予相应治疗处理后D3制备荷瘤鼠外周血单细胞悬液，流式细胞仪检测CD3⁺细胞(3A)以及NK细胞(3B)的比例。Columns, 平均目标细胞比例 (n=5); Bars, SE 图4 DDP预处理化疗联合CIK细胞在B16黑色素瘤模型中的肿瘤抑制作用。建立B16黑色素瘤模型，随机分为六组并予相应治疗。隔日监测肿瘤长短径绘制肿瘤生长曲线

参 考 文 献

[1] Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59: 1593-1600.
 [2] Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, et al. Gemcitabine selectively eliminates

splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 6713-6721.
 [3] Vincent J, Mignot G, Chalmin F, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*, 2010, 70: 3052-3061.
 [4] Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human

- systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*, 2012, 122: 327-336.
- [5] Chen J, Huang X, Huang G, et al. Preconditioning chemotherapy with cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine-induced killer cells in a murine melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 27: 210-220.
- [6] 陈景, 黄香, 宋海珠, 等. 顺铂预处理化疗通过免疫调节增强 CIK 细胞对 B16 恶性黑色素瘤的抑制作用. *癌症进展*, 2011, 9: 631-638.
- [7] Huang X, Huang G, Song H, et al. Preconditioning chemotherapy with paclitaxel and cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine induced-killer cells in a murine lung carcinoma model. *Int J Cancer*, 2011, 129: 648-658.
- [8] Huang X, Chen YT, Song HZ, et al. Cisplatin pretreatment enhances anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells. *World J Gastroentero*, 2011, 17: 3002-3011.
- [9] Guerriero JL, Ditsworth D, Catanzaro JM, et al. DNA alkylating therapy induces tumor regression through an HMGB1-mediated activation of innate immunity. *J Immunol*, 2011, 186: 3517-3526.
- [10] Lesterhuis WJ, Punt CJ, Hato SV, et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest*, 2011, 121: 3100-3108.
- [11] Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, et al. *Ex vivo* expansion of human CD8 T cells using autologous CD4 T cell help. *PLoS One*, 2012, 7: e30229.
- [12] Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, 2005, 436: 1186-1190.
- [13] Micheau O, Solary E, Hammann A, et al. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89: 783-789.
- [14] Ohtani H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun*, 2007, 7: 4.
- [15] Wang LX, Shu S, Plautz GE. Host lymphodepletion augments T cell adoptive immunotherapy through enhanced intratumoral proliferation of effector cells. *Cancer Res*, 2005, 65: 9547-9554.
- [16] Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, et al. Inhibition of CD4⁺25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*, 2005, 105: 2862-2868.
- [17] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004, 21: 137-148.

(收稿日期: 2013-09-16)

(本文编辑: 马超)

黄香, 吴昊, 郭人花. 顺铂对荷瘤鼠髓源性抑制细胞的选择性下调作用 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(20): 9226-9230.



中华医学会