

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.010

· 基础研究 ·

表皮生长因子受体通路底物 8 疫苗对乳腺癌细胞的抑制效应及其可能机制

涂三芳, 李玉华, 宋朝阳, 邓兰, 黄睿(南方医科大学珠江医院 血液科, 广东 广州 510282)

[摘要] 目的:探索表皮生长因子受体通路底物 8(epidermal growth factor receptor substrate 8, EPS8)疫苗对乳腺癌细胞的抑制效应及其可能的机制。方法:Western blotting 检测 EPS8 蛋白在小鼠乳腺癌 4T1 细胞株中的表达。通过基因重组、表达和纯化等技术制备特异性的小鼠源性 EPS8,以 EPS8 蛋白为靶点制备抗肿瘤疫苗并免疫 BALB/c 小鼠,间接 ELISA 测定免疫前后不同时间小鼠血清内抗 EPS8 抗体效价;流式细胞术检测免疫前后的脾 T 淋巴细胞亚群比例。建立乳腺癌 4T1 细胞荷瘤小鼠模型并接种 EPS8 疫苗,接种佐剂作为对照,比较 2 组荷瘤小鼠的生存期、肿瘤体积、肿瘤重量,计算 EPS8 疫苗抑瘤率;流式细胞术检测荷瘤小鼠脾 T 淋巴细胞亚群比例,LDH 法检测其细胞毒性 T 细胞(CTL)杀伤率。结果:EPS8 蛋白在乳腺癌 4T1 细胞株中高表达。成功构建的 EPS8 蛋白疫苗免疫小鼠后产生抗 EPS8 抗体,且随着免疫次数的增加,小鼠体内抗 EPS8 抗体滴度呈上升趋势。乳腺癌 4T1 细胞接种于经 EPS8 疫苗或佐剂免疫后的小鼠后,与佐剂对照组相比,EPS8 疫苗组小鼠生存期显著升高[中位生存时间:44(38~50) vs 37(34~40) d; $t=2.477, P=0.043$],肿瘤质量显著降低[(2.21 ± 0.35) vs (3.31 ± 0.88) g; $t=3.574, P=0.009$],EPS8 疫苗的抑瘤率为 33.23%。EPS8 疫苗组小鼠脾 CD4⁺T 比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值均显著高于佐剂对照组($P<0.001$),EPS8 疫苗组 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T 细胞的比值显著低于佐剂对照组($P<0.001$)。效靶比为 20:1 时,EPS8 疫苗组 CTL 对靶细胞的杀伤活性即显著高于佐剂对照组[(19.05 ± 4.41)% vs (13.36 ± 3.10)%]; $t=2.263, P=0.040$]。结论:EPS8 疫苗不仅具有诱导小鼠产生体液免疫应答的功能,还能够降低荷瘤小鼠体内 Treg 细胞比例,激活体内 T 细胞免疫功能;EPS8 疫苗可抑制肿瘤的生长、有效延长荷瘤小鼠的生存期。

[关键词] 肿瘤疫苗;表皮生长因子受体通路底物 8;乳腺癌;4T1 细胞

[中图分类号] R737.9; R730.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2014)01-0055-07

Epidermal growth factor receptor substrate 8 vaccine-mediated breast cancer cell growth inhibition and the underlying mechanisms

Tu Sanfang, Li Yuhua, Song Chaoyang, Deng Lan, Hang Rui (Department of Hematology, Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibiting effect of a vaccine against epidermal growth factor receptor substrate 8 (EPS8) on the growth of breast cancer cells and the possible underlying mechanisms. **Methods:** Recombinant mouse EPS8 protein was prepared through gene recombination, expression and purification. A vaccine was generated using this recombinant EPS8 protein and BALB/c mice were immunized with this vaccine ($n=8$) or an adjuvant ($n=8$). The titer of anti-EPS8 antibody before and at different time points after immunization was assessed by indirect ELISA. Proportion of T lymphocyte subsets in the spleen of immunized mice was determined through flow cytometry before and after immunization. Seven days after the third immunization with EPS8 vaccine or the adjuvant, mice were injected with 4T1 breast cancer cells. In the two groups of animals, survival time, tumor volume, and tumor weight were assessed and the rate of tumor growth inhibition was accordingly calculated. In tumor-bearing animals, T lymphocyte subsets in the spleen were analyzed by flow cytometry, and CTL killing rate was measured by LDH assay. **Results:** High levels of Eps8 protein were de-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81372249);教育部高校博士点基金(No. 20114433110012);广东省教育厅科技创新项目(No. 2012KJ CX0025)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81372249), the University Doctoral Foundation of Education Ministry(No. 20114433110012), and the Science and Technology Innovation Project of the Education Bureau of Guangdong Province(No. 2012KJ CX0025)

[作者简介] 涂三芳(1983-),女,江西省高安市人,博士,主要从事肿瘤免疫治疗及干细胞移植免疫调节研究。E-mail: doctortutu@163.com

[通信作者] 李玉华(Li Yuhua, correspondence author), E-mail: li_yuhua@yahoo.com

tected in 4T1 cells. Anti-EPS8 antibody was produced in mice immunized with the EPS8 vaccine; its titer was increasing with the frequency of immunization. Survival time was significantly higher in mice ($P < 0.05$), tumor weight was significantly lower ($[2.21 \pm 0.35] \text{ g vs } [3.31 \pm 0.88] \text{ g}$, $P < 0.05$), the proportion of CD4^+ T cells and ratio of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ in the spleen were significantly higher ($P < 0.001$), those control animals and the $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Treg}/\text{CD4}^+\text{T}$ cell ratio in the spleen was significantly lower ($P < 0.001$) in mice immunized against EPS8 than in control animals. There was no difference in the percentage of CD8^+ T cells in the spleen between two groups ($P > 0.05$). EPS8 vaccination resulted in a significant increase in the killing activity of CTLs as compared with the control ($[19.05 \pm 4.41] \% \text{ vs } [13.36 \pm 3.10] \%$, $P < 0.05$). **Conclusion:** EPS8 vaccination may induce the mice functional humoral immune response, reduce the proportion of Treg cells, and enhance the cytotoxicity of T cells in mice with breast cancer, thereby suppressing tumor growth and prolong survival.

[Key words] tumor vaccine; epidermal growth factor receptor substrate 8 (EPS8); breast cancer; 4T1 cell

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 55-61]

恶性肿瘤是威胁人类健康和生命的首要疾病,手术、放射治疗和化学治疗等传统治疗的效果均有限^[1]。1902年开展的利用肿瘤疫苗(tumor vaccine)针对肿瘤患者的免疫治疗实验,拉开了肿瘤免疫学研究的序幕^[2]。肿瘤疫苗是通过肿瘤细胞或肿瘤抗原物质诱导机体产生特异性细胞免疫和体液免疫反应,以达到清除或控制肿瘤的目的^[3]。表皮生长因子受体通路底物8(epidermal growth factor receptor substrate 8, EPS8)是一种相对分子质量为97 000的蛋白,编码基因定位于12q23-q24,具有一个相对分子质量为68 000的亚型(P68)^[4]。研究^[4,6]指出, EPS8在口腔鳞癌、卵巢癌、乳腺癌等多种实体肿瘤中表达量异常增高,正常组织中不表达,且高表达的EPS8与肿瘤细胞的增殖、转移、侵袭能力增强具有显著相关性。EPS8参与肿瘤的发生、发展过程,在肿瘤中的表达具有高度的选择性,并与肿瘤预后、复发有一定的关系,是有潜在应用价值的肿瘤标志物^[7]。本研究以EPS8蛋白为靶点构建抗肿瘤疫苗,在乳腺癌荷瘤小鼠动物模型中,观察疫苗对肿瘤生长曲线、细胞因子分泌、T细胞亚群变化、T细胞增殖杀伤能力的影响,为探讨疫苗防治恶性肿瘤的新策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、实验动物以及相关试剂

pET28a-EPS8重组质粒为小鼠源性,由本课题组成功构建并保存;BL21由本实验室保存, BL21-pET28a-EPS8由本实验室成功构建。实验动物为SPF级BALB/c小鼠,4~6周龄,雌性,由南方医科大学实验动物中心提供(动物合格证号为4402101243)。小鼠乳腺癌4T1细胞株来源于中国科学院上海生命科学院,由本实验室培养、保存。羊抗

鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,HRP羊抗鼠二抗购自美国SIGMA公司, Purified Mouse Anti-EPS8购自美国BD公司, BCA蛋白浓度测定试剂盒与SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自碧云天生物技术研究所,弗氏完全佐剂(FCA)和弗氏不完全佐剂(FICA)购自美国SIGMA公司。

1.2 Western blotting检测EPS8蛋白在小鼠乳腺癌4T1细胞株中的表达

常规方法培养4T1细胞,用胰酶消化4T1细胞,蛋白裂解液裂解并提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度,制成蛋白样品。蛋白样品按4:1加入缓冲液,另设缓冲液为空白对照组,进行SDS-PAGE;以半干转膜至聚偏二氟乙烯膜,室温干燥2h;将膜放在4℃,并加入5%脱脂奶粉封闭过夜或室温摇床1h,洗膜;加入鼠源性抗EPS8 IgG1单克隆抗体(1:5 000)摇床上孵育1h或4℃过夜,漂洗后再加入羊抗鼠的二抗(1:1 000)摇床上孵育1h;加入显色液,避光显色至出现条带时终止反应,观看结果并拍照。

1.3 重组EPS8蛋白的提取、纯化及鉴定

常规方法培养乳腺癌4T1细胞,TRIzol法提取总RNA,反转录cDNA第一链做为PCR模板,自行设计引物扩增Eps8目的片段,连接于表达载体pET28a并转化大肠杆菌BL21。采用IPTG诱导EPS8蛋白表达,用超声波将表达EPS8蛋白的大肠杆菌裂解,提取EPS8蛋白,用Ni-NTA柱亲和层析纯化,超滤柱浓缩蛋白,SDS-PAGE及Western blotting方法鉴定EPS8, BCA法测定EPS8蛋白浓度。

1.4 间接ELISA检测接种EPS8疫苗对小鼠血清EPS8抗体滴度的影响

将16只BALB/c小鼠按随机数字表分组法分成2组:EPS8疫苗组和佐剂对照组,每组8只。每只小

鼠颈背部皮肤皮下多点注射乳剂,每周1次,共3次。其中 EPS8 疫苗组注射由 EPS8 蛋白与免疫佐剂混合制成的乳剂,EPS8 蛋白用量为 100 μg /只,佐剂对照组小鼠注射同等剂量由 PBS 溶液与免疫佐剂混合制成的乳剂进行免疫。两组小鼠均分别于免疫前、免疫 1 次后、免疫 2 次后、免疫 3 次后取血,常规方法分离血清备用。采用间接 ELISA 测定血清中抗 EPS8 抗体滴度。

1.5 流式细胞术检测接种 EPS8 疫苗对小鼠脾 T 淋巴细胞亚群比例的影响

将 8 只 BABL/c 小鼠按随机数字表分组法分为 2 组:佐剂对照组和 EPS8 疫苗组,每组 4 只。颈椎脱臼法处死,无菌取脾脏,制备脾淋巴细胞悬液,流式细胞术检测小鼠脾 T 淋巴细胞亚群比例。再将 16 只 BABL/c 小鼠随机分为 2 组:佐剂对照组和 EPS8 疫苗组,每组 8 只。分别免疫小鼠(方法同上),第 3 次免疫后第 7 天,2 组各无菌取脾,流式细胞术检测免疫后小鼠脾 T 淋巴细胞亚群比例。

1.6 乳腺癌荷瘤小鼠动物模型的建立及分组免疫

将 16 只 BABL/c 小鼠,按随机数字表分组法分为 2 组:EPS8 疫苗组和佐剂对照组,每组 8 只。各组小鼠用乳剂进行免疫(方法同上)。常规方法培养乳腺癌细胞 4T1 细胞,于小鼠第 3 次免疫 7 d 后,皮下接种 4T1 细胞,接种部位为右腋下,接种细胞数量为 7×10^6 个/只。动态观察肿瘤形成情况,肿瘤形成后每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)和短径(b),肿瘤体积 $V = 1/2ab^2$ 。记录小鼠生存期及肿瘤体积变化。比较两组小鼠肿瘤重量,计算 EPS8 疫苗抑瘤率,抑瘤率(%) = $(1 - \text{EPS8 疫苗组肿瘤质量} / \text{佐剂对照组肿瘤质量}) \times 100$ 。

1.7 流式细胞术、LDH 法检测接种 EPS8 疫苗对荷瘤小鼠 T 细胞免疫功能的影响

取 BABL/c 小鼠 16 只,随机数字表法分为 2 组:EPS8 疫苗组和佐剂对照组,每组 8 只。建立免疫鼠肿瘤模型,方法同上。小鼠接种肿瘤后第 28 天颈椎脱臼处死,无菌取脾,培养脾淋巴细胞,流式细胞术检测脾 T 淋巴细胞亚群 CD4^+ T 细胞、 CD8^+ T 细胞及 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ Treg 细胞比例。LDH 法检测 CTL 杀伤率,杀伤率(%) = $(\text{实验组释放} - \text{靶细胞自发释放} - \text{效应细胞自发释放}) / (\text{靶细胞最大释放} - \text{靶细胞自发释放}) \times 100\%$ 。

1.8 统计学处理

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件。采用的统计学方法有:(1)对于两独立样

本资料,先采用 Levene 方差齐性检验,若方差齐,采用两独立样本 t 检验;方差不齐,则采用两样本 t' 检验。(2)对于完全随机设计资料,若方差齐,采用单向方差分析方法(One-way ANOVA)进行统计分析,用 LSD 方法进行组间两两比较;方差不齐,用 Welch 方法进行多组间比较,采用 Dunnett's T3 方法进行组间两两比较。(3)对于重复测量数据的单因素多水平资料,采用重复测量数据的方差分析方法进行多水平比较。(4)采用析因设计资料的方差分析。(5)小鼠生存时间采用 Kaplan-Meier 法分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EPS8 蛋白在乳腺癌 4T1 细胞株中的表达

Western blotting 检测结果(图 1)显示,EPS8 蛋白在相对分子质量 97 000 及 68 000 处出现明显的条带,大小与实际值一致,空白对照的结果为阴性,可见 EPS8 蛋白在乳腺癌 4T1 细胞中高表达。

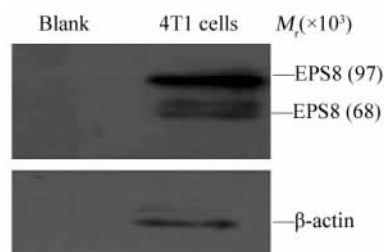


图 1 EPS8 蛋白在 4T1 细胞中高表达

Fig. 1 Overexpression of EPS8 protein in 4T1 cells

2.2 EPS8 蛋白片段的表达、纯化、鉴定及其体液免疫功能分析

BCA 法测定的蛋白浓度为 0.96 ~ 3.346 mg/L 菌。Western blotting 结果(图 2)显示,在相对分子质量 33 000 处有明显的蛋白条带,说明从大肠杆菌中提取的蛋白为目的蛋白 EPS8。抗体滴度测定(表 1)显示,佐剂对照组血清中抗 EPS8 抗体为阴性,EPS8 疫苗组抗 EPS8 抗体为阳性,且随着免疫次数的增加,小鼠体内抗 EPS8 抗体滴度呈上升趋势。

2.3 接种 EPS8 疫苗延长荷瘤小鼠生存期

佐剂对照组小鼠在接种细胞后 50 天内全部死亡,其中位生存时间是 37 d(34 ~ 40 d);EPS8 疫苗组中位生存时间是 44(38 ~ 50) d。EPS8 疫苗组小鼠生存期显著高于佐剂对照组小鼠生存期($t = 2.477, P = 0.043$)(表 2,图 3)。

2.4 接种 EPS8 疫苗抑制小鼠肿瘤生长

接种 4T1 细胞后观察小鼠肿瘤体积, EPS8 疫苗组和佐剂对照组小鼠体积变化无显著差异 ($F = 4.308, P = 0.057$, 图 4)。EPS8 疫苗组小鼠肿瘤质量显著低于佐剂对照组 [$(2.21 \pm 0.35) \text{ g vs } (3.31 \pm 0.88) \text{ g}; t = -3.574, P = 0.009$]。EPS8 疫苗的抑瘤率为 33.23%。

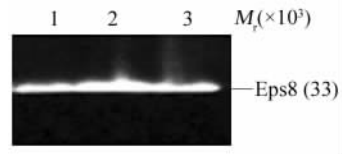


图 2 Western blotting 鉴定 EPS8 蛋白
Fig. 2 Western blotting map of EPS8 protein
1, 2, 3: Purified EPS8

表 1 小鼠血清抗 EPS8 蛋白抗体的滴度

Tab. 1 Serum antibody titers of mice against EPS8 protein

| Immunity | Antibody titer | | | | | | | | Average |
|----------|----------------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|---------|
| First | 1: 40 | 1: 80 | 1: 40 | 1: 40 | 1: 40 | 1: 20 | 1: 20 | 1: 40 | |
| Second | 1: 40 | 1: 80 | 1: 80 | 1: 40 | 1: 80 | 1: 160 | 1: 80 | 1: 80 | |
| Third | 1: 160 | 1: 80 | 1: 320 | 1: 320 | 1: 80 | 1: 160 | 1: 80 | 1: 160 | |

表 2 小鼠生存时间 (t/d)

Tab. 2 The survival time of mice (t/d)

| Group | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Media |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| EPS8 | 34 | 38 | 53 | 42 | 48 | 55 | 44 | 48 | 44 |
| Adjuvant | 37 | 35 | 34 | 41 | 32 | 50 | 38 | 38 | 37 |

显著降低 ($P < 0.05$), 说明两组小鼠在发生肿瘤后免疫功能均受到抑制。

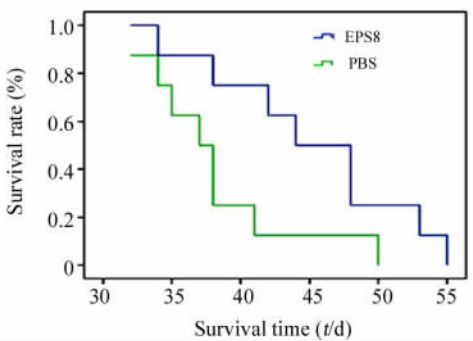


图 3 EPS8 疫苗显著延长荷瘤小鼠的生存期
Fig. 3 EPS8 vaccine prolong the survival time of tumor-bearing mice

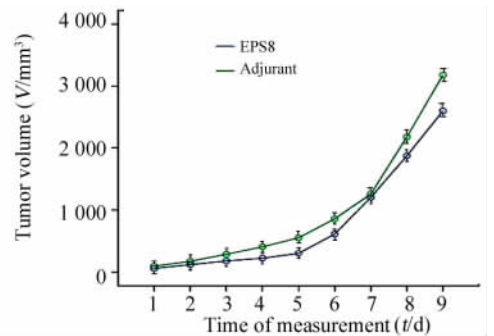


图 4 小鼠肿瘤体积生长曲线
Fig. 4 Growth curve of tumor volume in mice

2.5 接种 EPS8 疫苗对小鼠脾 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例的影响

在两组非荷瘤小鼠中, 免疫前与免疫后比较其脾 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比、CD4⁺/CD8⁺ 比值的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。接种肿瘤后, EPS8 疫苗组 CD8⁺ T 细胞比例无显著变化 ($P = 0.084$), 而佐剂对照组 CD8⁺ T 细胞比例显著降低; 两组小鼠的 CD4⁺ T 细胞比例、CD4⁺/CD8⁺ 比值均

在荷瘤小鼠模型中, EPS8 疫苗组小鼠脾 CD4⁺ T 细胞百分比显著高于佐剂对照组 [$(19.18 \pm 3.69)\% \text{ vs } (11.26 \pm 1.73)\%$; $t = 5.506, P = 0.000$], 小鼠脾 CD4⁺/CD8⁺ 比值也显著高于佐剂对照组 [$(1.84 \pm 0.17) \text{ vs } (1.38 \pm 0.24)$; $t = 4.263, P = 0.001$], 而两组之间 CD8⁺ T 细胞无显著差异 ($t = 1.758, P = 0.101$) (表 3, 4, 5)。

2.6 接种 EPS8 疫苗降低小鼠脾 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例

流式细胞术检测小鼠脾 CD4⁺ CD25⁺ Treg, 结果 (图 5) 显示, EPS8 疫苗组 CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T 细胞的比值显著低于佐剂对照组 [$(1.32 \pm 0.41)\% \text{ vs } (10.70 \pm 3.32)\%$; $t = 7.506, P = 0.000$]。

表 3 荷瘤小鼠脾 CD4⁺ T 细胞百分比($\bar{x} \pm s, \%$)
 Tab. 3 Percentage of splenic CD4⁺ T cells in tumor-bearing mice($\bar{x} \pm s, \%$)

| Group | Preimmune | Post immune | Inoculated tumor | F | P |
|----------|--------------|--------------|------------------|---------|-------|
| EPS8 | 31.28 ± 2.06 | 34.19 ± 5.86 | 19.18 ± 3.69 | 23.621 | 0.000 |
| Adjuvant | 30.93 ± 1.04 | 31.96 ± 3.53 | 11.26 ± 1.73 | 152.302 | 0.000 |
| <i>t</i> | 0.303 | 0.920 | 5.506 | 3.727 | 0.034 |
| <i>P</i> | 0.772 | 0.373 | 0.000 | | |

表 4 荷瘤小鼠脾 CD8⁺ T 细胞百分比($\bar{x} \pm s, \%$)
 Tab. 4 Percentage of splenic CD8⁺ T cells in tumor-bearing mice($\bar{x} \pm s, \%$)

| Group | Preimmune | Post immune | Inoculated tumor | F | P |
|----------|--------------|--------------|------------------|--------|----------|
| EPS8 | 12.65 ± 0.98 | 14.15 ± 1.69 | 10.54 ± 2.29 | 7.475 | 0.005 |
| Adjuvant | 12.52 ± 1.65 | 13.12 ± 0.99 | 8.48 ± 2.41 | 14.595 | 0.000376 |
| <i>t</i> | 0.133 | 1.478 | 1.758 | 0.794 | 0.460 |
| <i>P</i> | 0.899 | 0.162 | 0.101 | | |

表 5 荷瘤小鼠脾 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值($\bar{x} \pm s$)
 Tab. 5 The ratio of splenic CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in tumor-bearing mice($\bar{x} \pm s$)

| Group | Preimmune | Post immune | Inoculated tumor | F | P |
|----------|-------------|-------------|------------------|--------|-------|
| EPS8 | 2.47 ± 0.21 | 2.41 ± 0.14 | 1.84 ± 0.17 | 24.929 | 0.000 |
| Adjuvant | 2.51 ± 0.31 | 2.42 ± 0.19 | 1.38 ± 0.24 | 46.162 | 0.000 |
| <i>t</i> | -0.229 | -0.213 | 4.263 | 5.656 | 0.008 |
| <i>P</i> | 0.827 | 0.835 | 0.001 | | |

2.7 EPS8 疫苗提高 CTL 对肿瘤细胞的杀伤活性

LDH 法检测杀伤活性,结果(图 6,表 6)显示,不同效靶比之间细胞杀伤率比较差异有统计学意义($F = 9.018, P = 0.001$)。在各效靶比作用下,两组细胞杀伤率组间比较差异有统计学意义($F = 35.301, P = 0.000$)。EPS8 疫苗组各效靶比之间,CTL 杀伤率的差异有统计学意义($F = 10.674, P = 0.001$)。佐剂对照组各效靶比之间比较,CTL 杀伤率差异无统计学意义($F = 1.731, P = 0.201$)。效靶比为 20:1 和 40:1 时, EPS8 疫苗组 CTL 对靶细胞的杀伤活性显著高于佐剂对照组 CTL 对靶细胞的杀伤活性($t =$

2.263, $P = 0.040$; $t = 5.810, P < 0.001$)。

3 讨论

通过疫苗免疫的方法对肿瘤进行预防及治疗越来越受关注,已成为肿瘤治疗的新模式^[8]。理想的疫苗能够诱导机体产生足够强大的免疫反应,以达到清除癌细胞的目的。研究^[9]表明, EPS8 在大部分恶性实体肿瘤细胞中异常高表达;高表达 EPS8 与肿瘤细胞的增殖、侵袭能力密切相关,采用 siRNA 方法沉默 EPS8 基因后,其致瘤性显著下降。因此, EPS8 符合肿瘤抗原靶点的要求,是制备肿瘤疫苗的潜在标志物。

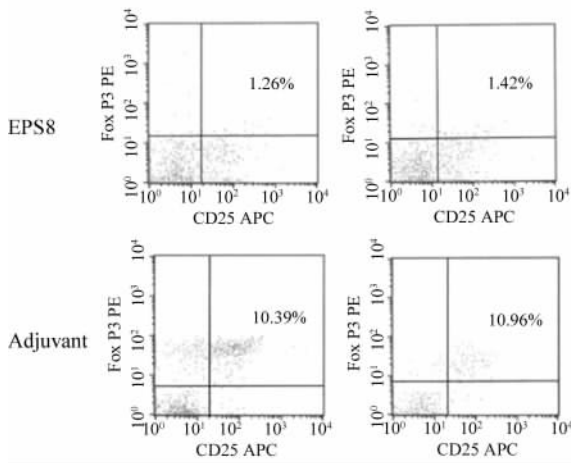


图 5 肿瘤模型中各组 CD4⁺ CD25⁺ Treg/CD4⁺ T 细胞比值

Fig. 5 The ratio of CD4⁺ CD25⁺ Tregs and CD4⁺ T cells in tumor model

本实验结果显示,通过体外构建免疫原性强的 EPS8 蛋白,选择最佳的免疫途径,同时添加免疫佐

剂,经过免疫后,动物体内抗体的效价随着免疫次数的增加而增加,说明 EPS8 蛋白具有刺激机体体液免疫反应的作用效果。

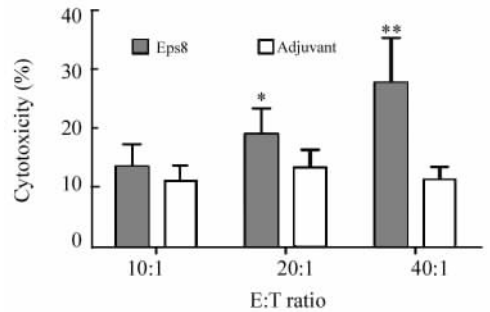


图 6 两组间不同效靶比 CTL 杀伤活性的比较
Fig. 6 Comparison of CTL cytotoxicity between two groups under different effector target ratio

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs adjuvant group

表 6 不同效靶比两组脾淋巴细胞 CTL 杀伤活性的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 6 Comparison of CTL cytotoxicity between two groups under different effector target ratio ($\bar{x} \pm s, \%$)

| Group | 10 : 1 | 20 : 1 | 40 : 1 | F | P |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------|-------|
| EPS8 | 13.53 ± 3.89 | 19.05 ± 4.41 | 27.73 ± 7.68 | 10.674 | 0.001 |
| Adjuvant | 11.10 ± 2.65 | 13.36 ± 3.10 | 11.25 ± 2.32 | 1.731 | 0.201 |
| t/F | 0.159 | 2.263 | 5.810 | 9.458 | |
| P | 0.167 | 0.040 | 0.000 | 0.000 | |

EPS8 参与肿瘤的发生、发展过程,在恶性肿瘤的表达具有高度的选择性,并且与肿瘤患者预后不佳、肿瘤复发有一定的关系^[10]。本实验研究显示, EPS8 蛋白在小鼠乳腺癌细胞株 4T1 高表达,体外构建的 EPS8 疫苗可以延长荷瘤小鼠生存期,抑制小鼠肿瘤生长,初步证明 EPS8 疫苗有抗肿瘤作用。

肿瘤的发生发展同机体免疫系统功能异常存在密切关系,而抗肿瘤免疫主要以细胞免疫为主,其中 T 淋巴细胞是细胞免疫系统的关键部分^[11]。CD4⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞的数量和适当的比例是免疫调节的关键,正常情况下两者处于动态平衡,当两者数目发生变化时,即可能出现细胞免疫功能下降和免疫调节失衡^[12-15]。肿瘤患者 T 细胞亚群 (CD4⁺/CD8⁺) 比值降低,功能失调,并且随着患者肿瘤组织病理级别增高,CD4⁺/CD8⁺ 比值随之降低。本实验表明,经过 EPS8 疫苗免疫后,小鼠脾脏淋

巴细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值与免疫前比较没有明显变化。接种小鼠乳腺癌 4T1 细胞后,小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均下降,佐剂对照组尤为明显,这说明荷瘤小鼠免疫功能受到了抑制。流式细胞术检测荷瘤小鼠脾 T 淋巴细胞亚群结果显示, EPS8 疫苗组 CD4⁺ T 细胞百分比和 CD4⁺/CD8⁺ 比值均高于佐剂对照组 CD4⁺/CD8⁺ 比值。由此说明, EPS8 疫苗对正常小鼠免疫功能没有明显影响,但能帮助荷瘤小鼠维持较高水平 CD4⁺ T 细胞百分比和 CD4⁺/CD8⁺ 比值,从而发挥抑瘤作用。

CTL 是抗肿瘤免疫的主要效应细胞,诱导肿瘤抗原特异性的 CTL 是肿瘤免疫治疗的关键。本实验发现, EPS8 疫苗可以提高小鼠 CTL 的杀伤活性,这可能跟小鼠抗肿瘤作用密切相关。但 EPS8 疫苗组荷

瘤小鼠的脾 CD4⁺ T 细胞百分比与免疫前比较没有明显变化,这是否与 EPS8 疫苗提高小鼠 CTL 杀伤活性有联系,尚需深入探讨。

CD4⁺ CD25⁺ Treg T 细胞是一群介导免疫应答负调节及自身免疫耐受的 T 细胞亚群^[16],能显著抑制多种免疫细胞的功能,在肿瘤免疫、感染免疫、自身免疫以及移植免疫中均发挥了重要作用^[17-18]。在肿瘤免疫中,研究^[19-20]发现 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞与肿瘤发生发展的关系十分复杂。已有的研究显示,CD4⁺ CD25⁺ Treg 可能在肿瘤免疫逃逸中起了关键作用^[21]。本研究结果显示,EPS8 疫苗可以降低荷瘤小鼠脾脏 CD4⁺ CD25⁺ /CD4⁺ T 细胞的比例,调节 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞造成的免疫抑制作用。

综上,本课题通过体外基因重组技术成功构建 EPS8 疫苗。EPS8 疫苗可延长荷瘤小鼠生存期,抑制小鼠肿瘤生长。在作用机制的研究中发现,EPS8 疫苗能够维持荷瘤小鼠体内 CD4⁺ T 细胞百分比及 CD4⁺ /CD8⁺ T 细胞比值,提高小鼠 CTL 杀伤活性,降低荷瘤小鼠脾脏 CD4⁺ CD25⁺ /Treg 细胞的比例,从而提高小鼠的免疫功能。但是,对于 EPS8 疫苗是通过何种机制调节脾 T 淋巴细胞亚群比例及是否能增加细胞因子的分泌水平,尚需进一步深入探讨。

[参 考 文 献]

[1] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(4): 220-241.

[2] Old LJ. Tumor immunology: The first century [J]. Curr Opin Immunol, 1992, 4(5): 603-607.

[3] Kroemer G, Fridman WH, Sautès-Fridman C, et al. The European Academy of Tumor Immunology: Bridging fields, continents and generations [J]. Oncoimmunology, 2012, 1(2): 127-128.

[4] Wang H, Teh MT, Ji Y, et al. EPS8 upregulates FOXM1 expression, enhancing cell growth and motility [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(10): 1132-1141.

[5] Tod J, Jenei V, Chrzan M, et al. OC-039 Eps8: A master regulator of integrin-dependent pancreatic cancer invasion [J]. Gut, 2013, 62(Suppl 1): A18.

[6] Ding X, Zhou F, Wang F, et al. Eps8 promotes cellular growth of human malignant gliomas [J]. Oncol Rep, 2013, 29(2): 697-703.

[7] Li YH, Xue TY, He YZ, et al. Novel oncoprotein EPS8: A new target for anticancer therapy [J]. Future Oncol, 2013, 9(10):

1587-1594.

[8] Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 237-251.

[9] Werner A, Disanza A, Reifenberger N, et al. SCFFbxw5 mediates transient degradation of actin remodeller Eps8 to allow proper mitotic progression [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(2): 179-188.

[10] Scita G, Nordstrom J, Carbone R, et al. EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac [J]. Nature, 1999, 401(6750): 290-293.

[11] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines [J]. Nat Med, 2004, 10(9): 909-915.

[12] Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 298-306.

[13] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264.

[14] Davidsson S, Ohlson A-L, Andersson S-O, et al. CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3⁺ regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer [J]. Mod Pathol, 2012, 26(3): 448-455.

[15] Matsushita H, Vesely MD, Koblodt DC, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting [J]. Nature, 2012, 482(7385): 400-404.

[16] Shah W, Yan X, Jing L, et al. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4⁺ FOXP⁺ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix [J]. Cell Mol Immunol, 2010, 8(1): 59-66.

[17] Tan W, Zhang W, Strasner A, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling [J]. Nature, 2011, 470(7335): 548-553.

[18] Kwek SS, Cha E, Fong L. Unmasking the immune recognition of prostate cancer with CTLA4 blockade [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 289-297.

[19] Si TG, Wang JP, Guo Z. Analysis of circulating regulatory T cells (CD4⁺ CD25⁺ CD127⁺) after cryosurgery in prostate cancer [J]. Asian J Androl, 2013, 15(4): 461-465.

[20] Jie H, Gildener-Leapman N, Li J, et al. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients [J]. Br J Cancer, 2013, 109(10): 2629-2635.

[21] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 265-277.

[收稿日期] 2013 - 10 - 27

[修回日期] 2013 - 12 - 25

[本文编辑] 黄静怡