

## 肿瘤疫苗联合节拍化疗对小鼠乳腺癌作用的研究\*

史业辉 周立艳 魏 枫 于津浦 贾勇圣 佟仲生

**摘要 目的:**研究新型肿瘤疫苗联合节拍化疗对晚期乳腺癌小鼠模型的治疗效果,并探讨其作用机制。**方法:**以小鼠乳腺癌细胞系4T1接种Balb/c小鼠建立模型。利用含高迁移率核小体蛋白1(high-mobility group nucleosome binding protein 1, HMGN1)基因的重组质粒转染4T1细胞,制备疫苗。小鼠皮下接种4T1细胞,随机分成生理盐水对照组(NS组)、吉西他滨节拍化疗组(MET组)、疫苗组、节拍化疗联合疫苗组(联合组)4组。观察各组小鼠肿瘤生长及不良反应,并检测肿瘤局部调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)的Foxp3表达及肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)的变化。**结果:**联合组肿瘤体积明显小于MET组及疫苗组( $P<0.05$ ),与NS组比较有显著性差异( $P<0.001$ )。Western blot和免疫组织化学检测发现,联合组与MET组小鼠肿瘤局部浸润Tregs的Foxp3表达及肿瘤MVD明显减少( $P<0.05$ )。各治疗组未出现明显的不良反应。**结论:**HMGN1基因修饰的新型疫苗联合吉西他滨节拍化疗在乳腺癌小鼠模型治疗中疗效显著且耐受性良好。

**关键词** 肿瘤疫苗 HMGN1 节拍化疗 调节性T细胞 Foxp3

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20140125

### Anti-tumor effect of tumor vaccine combined with metronomic chemotherapy on breast cancer in mice

Yehui SHI, Liyan ZHOU, Feng WEI, Jinpu YU, Yongsheng JIA, Zhongsheng TONG

Correspondence to: Zhongsheng TONG; E-mail: tonghang@medmail.com

Department of Breast Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, The National Clinical Research Center of Cancer; Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, and Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy, Tianjin, Tianjin 300060, China

This study was supported by the Key Anticancer Technologies R & D Program of Tianjin (No. 12ZCDZSY16200), the Scientific Foundation of Tianjin Health Bureau (No. 2010KZ76), and Development Funds for Scientific Projects of Colleges and Universities in Tianjin (No. 20100116)

**Abstract Objective:** This study aimed to observe the synergistic effect of a new tumor vaccine combined with metronomic chemotherapy in vivo on breast cancer. This study was also conducted to investigate the mechanism of this combination. **Methods:** Balb/c mice inoculated with 4T1 mouse breast cancer cell were used as tumor models. High-mobility group nucleosome-binding protein 1 (HMGN1) gene was used to transfect 4T1 cell lines as cancer vaccines. After 4T1 cell was inoculated, the mice were randomized into four groups: normal saline (NS); metronomic gemcitabine (GEM) alone; cancer vaccine alone; and combination therapy group. Tumor growth and potential toxicities of these regimens were observed. The Foxp3 expression of regulatory T cells (Tregs) was detected by western blot and immunohistochemical staining. The microvessel density (MVD) of the tumor was also detected by immunohistochemical staining. **Results:** The tumor volume of the mice was significantly lower in the combination group than in the MET group or cancer vaccine group ( $P<0.05$ ). This result exhibited a higher significant difference than the tumor volume of the mice in the NS group ( $P<0.01$ ). Foxp3 expression was significantly lower in the mice treated with GEM (combination or MET group). MVD was significantly lower in these two groups than in the cancer vaccine group or NS group ( $P<0.05$ ). Furthermore, adverse reactions slightly occurred in each group. **Conclusion:** The combination of cancer vaccines and metronomic GEM is a very active and well-tolerated regimen for breast cancer in mice.

**Keywords:** cancer vaccine, HMGN1, metronomic chemotherapy, regulatory T cell, Foxp3

晚期乳腺癌患者常因接受多疗程、多方案化疗对多种化疗药物已耐药,且骨髓储备功能较差不能耐受常规剂量化疗,是临床乳腺癌治疗的难题。新兴的生物治疗特别是乳腺癌疫苗无疑为晚期乳腺癌

作者单位:天津医科大学肿瘤医院乳腺肿瘤内科,国家肿瘤临床医学研究中心,乳腺癌防治教育部重点实验室,天津市肿瘤防治重点实验室,天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室(天津市300060)

\*本文课题受天津市科技计划项目(编号:12ZCDZSY16200),天津市卫生局科技基金(编号:2010KZ76)及天津市高等学校科技发展基金计划项目(编号:20100116)资助

通信作者:佟仲生 tonghang@medmail.com

患者的治疗带来了希望,而乳腺癌疫苗疗效受多种因素影响,目前研究热点主要在如何增强疫苗免疫疗效及克服体内抑制因素。警报素(alarmins)是一类具有树突状细胞(dendritic cell, DC)募集和活化双重作用的内源因子<sup>[1]</sup>,可作为疫苗强有力的佐剂,其中高迁移率核小体蛋白1(HMGN1)为 alarmins 家族中重要成员之一。节拍性化疗(metronomic chemotherapy, MET)是指持续性、小剂量、高频率使用细胞毒性药物,中间无间歇期的一种化疗方式<sup>[2]</sup>。Son 等<sup>[3]</sup>研究表明节拍化疗与免疫治疗及放疗联合,显著提高小鼠结肠癌生存期,机制主要是通过降低调节性T细胞水平。本研究通过构建HMGN1分泌表达的乳腺癌疫苗并联合节拍化疗治疗小鼠晚期乳腺癌,并初步探讨二者协同作用机制,为晚期乳腺癌解救治疗及乳腺癌生物化疗治疗模式提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Balb/c 小鼠,雌性,4~6周龄,平均体质量20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,SPF级条件下饲养,符合伦理委员会认可。小鼠乳腺癌细胞系4T1为本院免疫室保存。吉西他滨购自Lilly France公司,Foxp3抗体购自Ebioscience公司,CD34抗体购自Novus公司,Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>购自Invitrogen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Hyclone公司。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠乳腺癌疫苗的制备 利用含HMGN1基因的重组质粒,以脂质体法转染生长状态良好的4T1细胞。24、48 h后采用TCA-丙酮沉淀法提取细胞上清蛋白,Western blot检测HMGN1蛋白的分泌,以分析转染效率。收集分泌量达到使用标准的4T1细胞,给予致死量(30 Gy)放射线照射,制备乳腺癌疫苗。

1.2.2 荷瘤小鼠模型的建立及分组 正常Balb/c小鼠随机分成4组,5只/组。将对数生长期的4T1细胞调整细胞浓度至 $5 \times 10^7$ /mL,接种0.1 mL于每只小鼠右侧腹股沟皮下,每日观察肿瘤形成情况。扪及肿瘤直径为6~9 mm时随机分为4组:1)节拍化疗联合疫苗组(联合组):每只小鼠腹腔注射吉西他滨(gemcitabine, GEM)10 mg/kg,每3天1次,持续至第21天;化疗第8天,于肿瘤对侧皮下注射疫苗细胞( $1 \times 10^6$ 个/只),7 d后加强免疫1次;2)单纯疫苗组(疫苗组):只给予疫苗免疫治疗,联合组化疗7 d后,本组小鼠肿瘤注射疫苗;3)单纯吉西他滨节拍化疗组(MET组):只给予小剂量吉西他滨治疗;4)生理盐水对照组(NS组):采用生理盐水腹腔内和皮下注射。各组用量用法均参照联合组。

1.2.3 组织取材及免疫印迹和免疫组织化学检测 上述动物实验中,在接种肿瘤后第31天,测量小鼠肿瘤的大小,颈椎脱臼法处死小鼠。无菌条件下完整剥离瘤组织,生理盐水冲洗后电子天平称重,将瘤组织切成小块,部分置于常温下10%中性福尔马林浸泡24 h。常规石蜡包埋后4  $\mu$ m连续切片,免疫组织化学检测Foxp3、CD34;另一部分置于液氮中,提取蛋白后Western blot法检测Foxp3表达。

1.2.4 结果判定 成瘤后隔日测量小鼠体质量和肿瘤最长径(a)及与之垂直的横径(b),根据公式 $V = 1/2ab^2$ 计算移植瘤体积,绘制移植瘤生长曲线。实验过程中注意观察小鼠皮毛色泽、食欲及活动变化。Foxp3判定:Foxp3是Tregs发育、活化、发挥功能的关键基因,为叉状头/翼状螺旋转录因子,细胞核着色为阳性结果。对每张切片随机计数5个高倍视野( $\times 400$ )阳性细胞数,取平均值。MVD判定:以CD34单抗作为特异血管内皮细胞表面抗体检测MVD,按照Weidner等<sup>[4]</sup>判定标准计数。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS19.0统计软件进行分析。计量资料以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析及LSD-t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HMGN1基因修饰疫苗的构建

Western blot检测转染24、48 h后细胞上清蛋白(各两个样品),结果显示均有HMGN1蛋白的分泌(图1),符合疫苗构建要求。

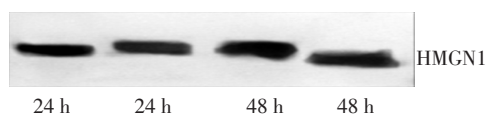


图1 Western blot检测转染后4T1细胞上清中HMGN1蛋白表达水平  
Figure 1 HMGN1 protein expression in transfected 4T1 cell culture supernatant detected by western blot analysis

### 2.2 各组小鼠乳腺癌移植瘤生长的抑制效应

各组小鼠体质量、皮毛、食欲、行为等一般情况均未出现与治疗有关的改变。治疗前及治疗早期各组小鼠皮下移植瘤体积差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗第13天NS组移植瘤体积与各治疗组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但各治疗组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗结束后,NS组肿瘤体积为 $(3201.1 \pm 657.2) \text{ mm}^3$ 、MET组肿瘤体积为 $(2010.6 \pm 439.3) \text{ mm}^3$ 、疫苗组肿瘤体积为 $(2432.1 \pm 527.8) \text{ mm}^3$ 、联合组肿瘤体积为 $(1292.8 \pm 364.9) \text{ mm}^3$ 。联合组移植瘤体积与NS组比较有显著性差异( $P < 0.001$ ),与MET组或疫苗组比较亦有显著性差异( $P < 0.05$ ),而MET

组和瘤苗组间比较差异无统计学意义( $P=0.209$ )(图2)。各组瘤重比较与以上结果相似(图3)。

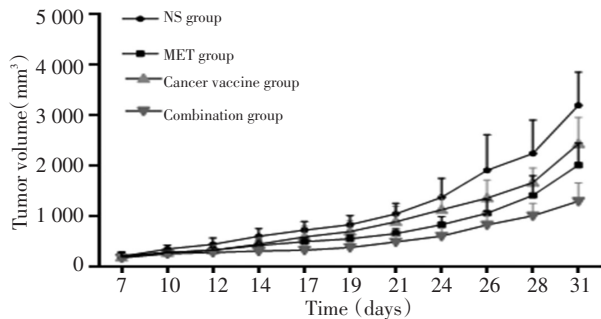


图2 小鼠移植瘤生长曲线  
Figure 2 Tumor growth curves of mice

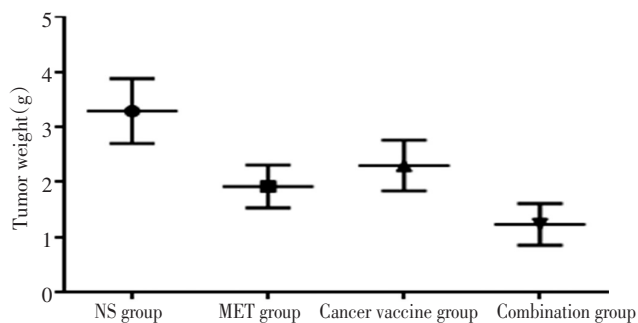
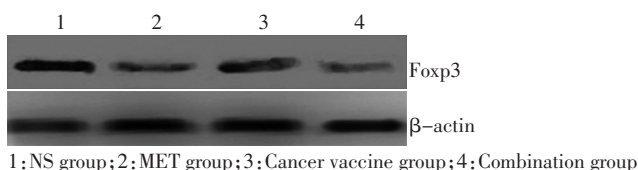


图3 小鼠移植瘤瘤重  
Figure 3 Weight of transplanted tumor in mice

### 2.3 吉西他滨节拍化疗降低免疫抑制细胞的检测

Western blot结果显示,各组小鼠肿瘤组织均表达Foxp3蛋白,采用蛋白条带和 $\beta$ -actin的灰度值比值评价,MET组及联合组比值明显低于NS组及瘤苗组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。免疫组织化学结果显示NS组、MET组、瘤苗组、联合组小鼠肿瘤组织均能观察到Foxp3阳性淋巴细胞,阳性细胞数分别是(40.8 $\pm$ 8.3)个/HP、(13.8 $\pm$ 4.4)个/HP、(34.2 $\pm$ 5.1)个/HP、(14.4 $\pm$ 4.3)个/HP。分析结果显示NS组与含小剂量吉西他滨化疗组(MET组及瘤苗组)差异有统计学意义( $P<0.001$ ),与瘤苗组比较差异无统计学意义( $P=0.089$ ,图4~5)。

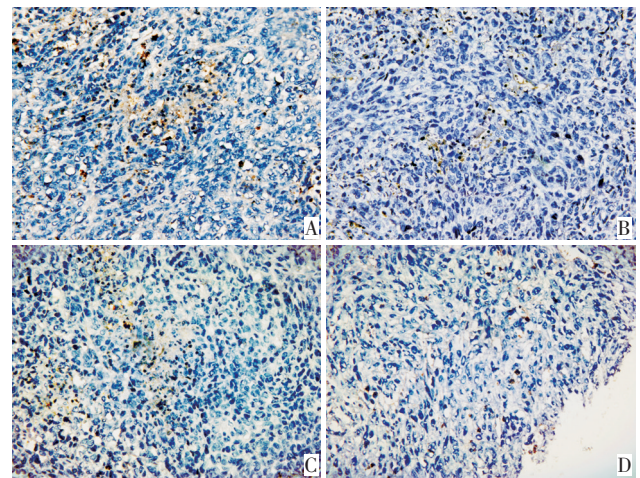


1: NS group; 2: MET group; 3: Cancer vaccine group; 4: Combination group  
图4 Western blot检测肿瘤局部浸润Tregs的Foxp3蛋白表达  
Figure 4 Foxp3 protein expression in tumor-infiltrated Tregs detected by western blot analysis

### 2.4 节拍化疗对肿瘤血管新生的影响

MET组(11.4 $\pm$ 5.80)与联合组(12.8 $\pm$ 4.60)的MVD计数明显低于NS组(30.0 $\pm$ 3.54)和瘤苗组(24.0 $\pm$ 3.81)( $P<0.001$ ),而两组间MVD计数差异无统计学

意义( $P=0.633$ ),NS组和瘤苗组MVD计数差异也无统计学意义( $P=0.053$ )。



A: NS group; B: MET group; C: Cancer vaccine group; D: Combination group  
图5 免疫组织化学检测移植瘤组织中Foxp3表达(SP $\times$ 400)  
Figure 5 Foxp3 protein expression in tumor-infiltrated Tregs detected by immunohistochemistry

## 3 讨论

本研究通过建立小鼠晚期乳腺癌模型,利用乳腺癌细胞4T1作为抗原,alarmins家族成员HMG1作为佐剂构建乳腺癌瘤苗,进行瘤苗联合吉西他滨节拍化疗的联合治疗,疗效显著且未见明显毒副反应。

alarmins可通过促进抗原的摄取、处理和呈递,在获得性免疫预警过程中发挥关键作用<sup>[1,5]</sup>。HMG1作为alarmins家族成员之一在修饰瘤苗方面具有其独特的优势:可刺激DC增殖、成熟;上调人单核细胞来源的DC表达CD80、CD86、CD83及MHC I/II类分子等,并促使其分泌IL-12、IL-6、IL-8、IL-23、TNF等促炎性细胞因子;上调CCL21、CCR7及下调CCL5等参与肿瘤免疫反应,可进一步激活小鼠体内免疫效应细胞<sup>[6]</sup>。利用肿瘤细胞作为抗原,可避免因肿瘤细胞抗原表位突变而发生的免疫逃逸<sup>[7]</sup>,提供已知和未知的肿瘤相关抗原,并无需事先鉴定所有抗原分子。本研究发现瘤苗组的体内抗肿瘤效应明显优于NS组,这可能与HMG1较强的免疫佐剂效应相关。

肿瘤疫苗临床疗效欠佳的一个重要原因是肿瘤获得了多种逃逸机体免疫的方法。研究发现Tregs与肿瘤免疫逃逸密切相关<sup>[8]</sup>,肿瘤微环境中存在的Tregs数量普遍升高,即肿瘤通过某种机制诱导了Tregs的分化,而Tregs可通过多种途径抑制机体的获得性和天然性抗肿瘤免疫,介导肿瘤免疫逃逸,促进肿瘤发展<sup>[9]</sup>。逆转Tregs的免疫抑制作用将有助于打破肿瘤免疫耐受,提高肿瘤疫苗的疗效。研究表明<sup>[10]</sup>使用小剂量化疗药物循环刺激可显著降低Tregs数

量,小剂量远低于临床常用化疗剂量,对于多次化疗后的晚期乳腺癌患者具有重要意义。常规化疗不仅直接杀伤肿瘤细胞,且抑制机体免疫系统,进而削弱肿瘤疫苗的免疫治疗效果。在化疗联合免疫治疗方面,选择合适化疗药物剂量<sup>[11]</sup>和最佳的时间间隔<sup>[12]</sup>非常重要。近年来,MET研究焦点主要是通过持续作用于肿瘤血管内皮细胞抑制其增殖、迁移,阻断血管生成,从而达到抑制肿瘤生长的目的。本研究发现MET组及联合组MVD计数明显低于瘤苗组或NS组,提示MET显著抑制血管新生,使肿瘤组织缺血坏死,生长受限,更利于肿瘤疫苗发挥作用,可能是二者协同作用的机制之一。本研究还发现MET组未见明显毒副反应,表明节拍化疗可用于不能耐受常规化疗的晚期乳腺癌患者。

随着研究不断深入,发现MET可能是一种多靶点的抗癌手段。Jiang等<sup>[13]</sup>应用紫杉醇MET处理转移性乳腺癌小鼠模型,除抗血管作用外,还具有抗淋巴管生成的作用,推测MET可能影响肿瘤微环境。Ghiringheli等<sup>[14]</sup>研究环磷酰胺MET能降低荷瘤小鼠体内的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs数量,改善T细胞和NK细胞的功能,从而起到免疫增强作用。GEM是核苷酸还原酶抑制剂,通过抑制肿瘤细胞DNA合成发挥抗肿瘤作用,被广泛用于实体瘤的化疗,其不仅直接发挥抗肿瘤活性,还介导与肿瘤免疫治疗相关的免疫学效应<sup>[10,15]</sup>,同时该药又非常用一线或二线治疗药物,对于晚期乳腺癌患者意义重大。因此,本研究选用GEM节拍化疗联合瘤苗治疗,结果显示联合组小鼠肿瘤生长较对照组受到显著抑制,经MET处理的小鼠(MET组及联合组)肿瘤局部浸润的Tregs数量明显少于NS组及瘤苗组( $P<0.05$ ),表明MET可降低肿瘤局部浸润Tregs数量,进而增强瘤苗疗效。

综上所述,本研究应用HMG1作为免疫佐剂构建乳腺癌瘤苗有较好的抗癌疗效,MET通过降低肿瘤局部浸润的Tregs水平,增强瘤苗特异性免疫效应,显著抑制肿瘤生长,提示在MET后进行瘤苗的主动免疫可诱发较强的肿瘤免疫应答,也为打破肿瘤患者免疫耐受状态提供了一种新方法。本研究为晚期乳腺癌治疗提供了新的选择,为实体瘤患者的生物-化疗模式提供了一新的思路和方法,值得进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses[J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(4):359-365.
- 2 Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in

mice[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(8):1045-1047.

- 3 Son CH, Shin DY, Kim SD, et al. Improvement of antitumor effect of intratumoral injection of immature dendritic cells into irradiated tumor by cyclophosphamide in mouse colon cancer model[J]. *J Immunother*, 2012, 35(8):607-614.
- 4 Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1):1-8.
- 5 Yang D, Oppenheim JJ. Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(11):3401-3403.
- 6 Yang D, Postnikov YV, Li Y, et al. High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(1):157-171.
- 7 Salerno-Goncalves R, Szein MB. Cell-mediated immunity and the challenges for vaccine development[J]. *Trends Microbiol*, 2006, 14(12):536-542.
- 8 Nizar S, Copier J, Meyer B, et al. T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy[J]? *Br J Cancer*, 2009, 100(11):1697-1703.
- 9 Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, et al. The significance of Treg cells in defective tumor immunity[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2008, 56(3):181-191.
- 10 Tongu M, Harashima N, Monma H, et al. Metronomic chemotherapy with low-dose cyclophosphamide plus gemcitabine can induce anti-tumor T cell immunity in vivo[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(2):383-391.
- 11 Yu B, Kusmartsev S, Cheng F, et al. Effective combination of chemotherapy and dendritic cell administration for the treatment of advanced-stage experimental breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1):285-294.
- 12 Lichtor T, Glick RP, Lin H, et al. Advantages of a unique DNA-based vaccine in comparison to paclitaxel in treatment of an established intracerebral breast cancer in mice[J]. *Cancer Ther*, 2006, 4A:163-170.
- 13 Jiang H, Tao W, Zhang M, et al. Low-dose metronomic paclitaxel chemotherapy suppresses breast tumors and metastases in mice[J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(1):74-84.
- 14 Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(5):641-648.
- 15 Plate JM, Plate AE, Shott S, et al. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(9):915-925.

(2014-01-16收稿)

(2014-03-26修回)

(本文编辑:张侃)



#### 作者简介

史业辉 医学博士,副主任医师。研究方向为乳腺癌综合治疗。

E-mail: carfield@medmail.com.cn