

·论著·

细菌外膜囊泡肿瘤疫苗对胰腺癌小鼠肿瘤细胞增殖和 CD8⁺ T 细胞浸润的影响

陈志强¹ 马娜娜² 赵潇² 高松¹ 郝继辉¹

¹天津医科大学肿瘤医院胰腺肿瘤科 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市“肿瘤防治”重点实验室 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060;²中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室 国家纳米科学中心,北京 100190

通信作者:高松,Email:foxgao2004@163.com

【摘要】 目的 探讨细菌外膜囊泡(OMVs)肿瘤疫苗对胰腺癌小鼠肿瘤细胞增殖和 CD8⁺ T 细胞浸润的影响。**方法** 采用实验研究方法。采用卵清蛋白(OVA)慢病毒载体质粒 pLV-EF1a-hluc-P2A-mNeogreen-CMV-OVA-3Xflag-P2A-puro 构建小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞;采用大肠杆菌来源 ClyA-Catchers-OMVs(CC-OMVs)与标签化抗原肽 SpyTag-OVA 制备 OMVs 肿瘤疫苗;应用 OMVs 肿瘤疫苗刺激小鼠 CD8⁺ T 细胞生成,采用体外细胞杀伤实验(OMVs 肿瘤疫苗刺激 T 细胞组和对照 T 细胞组)、小鼠皮下胰腺癌成瘤模型(OMVs 肿瘤疫苗组和对照组)和免疫组织化学染色检测分析 OMVs 肿瘤疫苗抑制胰腺癌细胞增殖,刺激 CD8⁺ T 细胞浸润的效果。观察指标:(1)小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞鉴定情况。(2)CC-OMVs 形态观察情况。(3)OMVs 肿瘤疫苗特异性 T 细胞对小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞增殖抑制情况。(4)OMVs 肿瘤疫苗对小鼠胰腺癌的抑制情况。(5)OMVs 肿瘤疫苗刺激小鼠胰腺癌组织 CD8⁺ T 细胞浸润情况。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料以绝对数或百分率表示。**结果** (1)小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞鉴定情况。激光共聚焦检测结果显示:感染 OVA 慢病毒载体质粒 pLV-EF1a-hluc-P2A-mNeogreen-CMV-OVA-3Xflag-P2A-puro 的小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞表达 mNeogreen 绿色荧光。流式细胞检测结果显示:以小鼠胰腺癌 Pan02 细胞为参照, Pan02-OVA 细胞 Flag 蛋白表达率为 90.7%。(2)CC-OMVs 形态观察情况。透射电子显微镜检测结果显示:CC-OMVs 呈均匀球形,直径 <50 nm。(3)OMVs 肿瘤疫苗特异性 T 细胞对小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞增殖抑制情况。细胞增殖毒性检测结果显示:OMVs 肿瘤疫苗刺激 T 细胞组小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞 450 nm 吸光度为 0.41 ± 0.12 ,对照 T 细胞组为 1.05 ± 0.15 ,两组比较,差异有统计学意义($t=9.54, P<0.05$)。(4)OMVs 肿瘤疫苗对小鼠胰腺癌的抑制情况。OMVs 肿瘤疫苗组小鼠背部皮下肿瘤组织质量为 (81 ± 10) g,对照组为 (153 ± 17) g,两组比较,差异有统计学意义($t=8.26, P<0.05$)。(5)OMVs 肿瘤疫苗刺激小鼠胰腺癌组织 CD8⁺ T 细胞浸润情况。免疫组织化学染色检测结果显示:OMVs 肿瘤疫苗组小鼠背部皮下肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞染色数目为 (28.7 ± 3.5) 个,对照组为 (9.3 ± 1.5) 个,两组比较,差异有统计学意义($t=8.74, P<0.05$)。**结论** 细菌 OMVs 肿瘤疫苗可抑制胰腺癌小鼠肿瘤细胞增殖并提高肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞浸润数目。

【关键词】 胰腺肿瘤; 细菌外膜囊泡; 肿瘤疫苗; 免疫治疗; 动物模型; 治疗效果
基金项目:国家自然科学基金(82072657)

The influence of bacterial outer membrane vesicles tumor vaccine on tumor cell proliferation and CD8⁺ T cell infiltration of mouse with pancreatic cancer

Chen Zhiqiang¹, Ma Nana², Zhao Xiao², Gao Song¹, Hao Jihui¹¹Department of Pancreatic Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National

DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220215-00087

收稿日期 2022-02-15

引用本文:陈志强,马娜娜,赵潇,等.细菌外膜囊泡肿瘤疫苗对胰腺癌小鼠肿瘤细胞增殖和 CD8⁺ T 细胞浸润的影响[J].中华消化外科杂志,2022,21(4):530-536. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220215-00087.



Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China; ²CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China
Corresponding author: Gao Song, Email: foxgao2004@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of bacterial outer membrane vesicles (OMVs) tumor vaccine on tumor cell proliferation and CD8⁺ T cell infiltration of mouse with pancreatic cancer. **Methods** The experimental study was conducted. The ovalbumin (OVA) lentivirus vector plasmid pLV-EF1a-hluc-P2A-mNeongreen-CMV-OVA-3Xflag-P2A-puro was used to construct the mouse pancreatic cancer Pan02-OVA cells. The ClyA-Catchers-OMVs (CC-OMVs) originated from *Escherichia coli* and labeled antigenic peptide SpyTag-OVA were used to construct the OMVs tumor vaccine. Mouse CD8⁺ T cells were stimulated by OMVs tumor vaccine, and the effects of OMVs tumor vaccine on inhibiting pancreatic cancer cells proliferation and stimulating CD8⁺ T cell infiltration were analyzed by in vitro cell killing assay, including the OMVs tumor vaccine stimulated T cell group and the control T cell group, subcutaneous pancreatic cancer model, including the OMVs tumor vaccine group and the control group, and immunohistochemical staining. Observation indicators: (1) identification of mouse pancreatic cancer Pan02-OVA cells; (2) morphological observation of CC-OMVs; (3) inhibition of mouse pancreatic cancer Pan02-OVA cells by OMVs tumor vaccine specific T cells; (4) inhibition of mouse pancreatic cancer by OMVs tumor vaccine; (5) CD8⁺ T cell infiltration in pancreatic cancer tissue of mouse stimulated by OMVs tumor vaccine. Measurement data with normal distribution were represented as $Mean \pm SD$, and comparison between groups was analyzed using the *t* test. Count data were described as absolute numbers or percentages. **Results** (1) Identification of mouse pancreatic cancer Pan02-OVA cells. Results of laser scanning confocal microscopy showed that the mNeongreen fluorescence was expressed in Pan02-OVA cells infected with the OVA lentivirus vector plasmid of pLV-EF1a-hluc-P2A-mNeongreen-CMV-OVA-3Xflag-P2A-puro. Results of Flow cytometry showed that using the mouse pancreatic cancer Pan02 cells as references, the protein expression rate of Flag on the Pan02-OVA cells was 90.7%. (2) Morphological observation of CC-OMVs. Results of transmission electron microscopy analysis showed that the CC-OMVs were in spherical shape, with a diameter <50 nm. (3) Inhibition of mouse pancreatic cancer Pan02-OVA cells by OMVs tumor vaccine specific T cells. Results of cell proliferation toxicity test showed that the absorbance at 450 nm of mouse pancreatic cancer Pan02-OVA cells was 0.41 ± 0.12 and 1.05 ± 0.15 in the OMVs tumor vaccine-stimulated T cell group and the control T cell group, respectively, showing a significant difference between the two groups ($t=9.54$, $P<0.05$). (4) Inhibition of mouse pancreatic cancer by OMVs tumor vaccine. The weight of subcutaneous tumor tissue in the back of mouse was $(81 \pm 10)g$ and $(153 \pm 17)g$ in the OMVs tumor vaccine group and the control group, respectively, showing a significant difference between the two groups ($t=8.26$, $P<0.05$). (5) CD8⁺ T cell infiltration in pancreatic cancer tissue of mouse stimulated by OMVs tumor vaccine. Results of immunohistochemical staining showed that the numbers of CD8⁺ T cells staining in the mouse back subcutaneous tumor tissues was 28.7 ± 3.5 and 9.3 ± 1.5 in the OMVs tumor vaccine group and the control group, respectively, showing a significant difference between the two groups ($t=8.74$, $P<0.05$). **Conclusion** Bacterial OMVs tumor vaccine can inhibit proliferation of pancreatic cancer cells and increase the numbers of CD8⁺ T cells infiltrated in pancreatic cancer tissue of mouse.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; Bacterial outer membrane vesicles; Tumor vaccine; Immunotherapy; Animal model; Treatment effects

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82072657)

胰腺癌是一种高度恶性的消化系统肿瘤,手术切除率低,化疗等治疗效果有限,患者预后差,5年生生存率仅10%^[1-4]。近年来,肿瘤免疫治疗,特别是免疫检查点抑制剂等发展迅速,在多种肿瘤治疗中取得较好效果^[5-11]。但免疫检查点抑制剂单药治疗或联合化疗均未能有效延长胰腺癌患者生存时间^[12-13]。主要原因是胰腺癌为“冷肿瘤”,其肿瘤组织内浸润

的肿瘤特异性T细胞数量不足^[12-13]。笔者团队前期工作构建基于细菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)的肿瘤疫苗制备平台,可高效激活抗原特异性免疫反应,刺激肿瘤特异性T细胞产生^[14]。本研究通过制备小鼠胰腺癌Pan02-OVA细胞、构建小鼠皮下胰腺癌成瘤模型,探讨细菌OMVs肿瘤疫苗对胰腺癌小鼠肿瘤细胞增殖和CD8⁺T细胞浸润的影响。

材料与方法

一、实验材料与方法

采用实验研究方法。

(一)实验材料

1. 小鼠胰腺癌 Pan02 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心;293T 细胞获取自中国科学院动物研究所。

2. 可稳定表达 ClyA-Catchers 标记 OMVs (CC-OMVs) 的大肠杆菌由笔者团队构建^[14]。

3. 卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 慢病毒载体质粒 pLV-EF1a-hluc-P2A-mNeongreen-CMV-OVA-3Xflag-P2A-puro 由北京合生生物科技有限公司构建;包装质粒 psPAX2、pMD2G 获取自中国科学院生物物理研究所。

4. 主要实验试剂:胎牛血清、DMEM 培养基、Lipofectamine 3000 转染试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;病毒转染试剂聚凝胺购自北京兰博利德商贸有限公司;嘌呤霉素、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自北京索莱宝科技有限公司;4% 多聚甲醛购自北京兰杰柯科技有限公司;PE 标记大鼠抗小鼠 Flag 单克隆抗体购自美国加州 BioLegend 公司;Bicinchoninic acid (BCA) 蛋白定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;醋酸双氧铀购自北京中镜科仪技术有限公司;标签化抗原肽 SpyTag-OVA 购自上海强耀生物科技有限公司;RBC 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞增殖毒性检测 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒购自日本九州岛同仁化学研究所;基质胶购自美国纽约州康宁公司;兔抗小鼠 CD8 单克隆抗体购自英国剑桥 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗购自美国马萨诸塞州 SeraCare 公司;二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 染色试剂盒购自江苏世泰实验器材有限公司。

5. 主要实验器材:共聚焦培养皿购自康宁(美国)公司;电镜铜网购自北京中镜科仪技术有限公司;超速离心管购自美国贝克曼库尔特有限公司;孔径分别为 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤器购自美国密理博公司;孔径为 70 μm 细胞筛网购自韩国京畿道 SPL Lifesciences 公司。

6. 实验动物:6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究符合动物实验和研究的相关伦理规范,所有动物实验

方案均经国家纳米科学中心实验动物伦理委员会审批,批号为 NCNST21-2101-YC01。

7. 主要实验仪器:激光共聚焦扫描显微镜为德国蔡司公司 LSM700 产品;流式细胞仪为安捷伦科技中国有限公司 NovoCyte 产品;超速离心机为美国贝克曼库尔特有限公司 Optima L-100XP 产品;透射电子显微镜为日本电子株式会社 JEM-1400 产品;酶标仪为美国佛蒙特州博腾仪器有限公司 SILFA 产品。

(二)实验方法

1. 细胞培养:小鼠胰腺癌 Pan02 细胞、293T 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,添加 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/L}$ 链霉素,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

2. OVA 慢病毒制备、收集:OVA 慢病毒载体质粒 pLV-EF1a-hluc-P2A-mNeongreen-CMV-OVA-3Xflag-P2A-puro、包装质粒 psPAX2、包装质粒 pMD2G 按 4:3:1 体积比例混合后,采用 Lipofectamine 3000 转染试剂,按说明书感染对数生长期 293T 细胞;36 h 后收集培养上清液,经 0.45 μm 孔径滤器过滤获得 OVA 慢病毒。

3. 小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞的制备:OVA 慢病毒、聚凝胺按 1 000:1 体积比例混合后,感染对数生长期小鼠胰腺癌 Pan02 细胞;36 h 后采用含 2 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基筛选小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞,经连续 3 次传代培养获得小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞。

4. 小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞的鉴定:(1)激光共聚焦检测。取对数生长期小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞接种于共聚焦培养皿,24 h 后去除培养基,采用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 漂洗细胞 3 次,采用 4% 多聚甲醛固定细胞,采用 DAPI 染色细胞核,采用激光共聚焦扫描显微镜观察细胞荧光。(2)流式细胞检测。收集对数生长期小鼠胰腺癌 Pan02 细胞和 Pan02-OVA 细胞,采用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 分别漂洗细胞 3 次,PE 标记大鼠抗小鼠 Flag 单克隆抗体按 1:100 稀释后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育细胞 30 min,经流式细胞仪检测小鼠胰腺癌 Pan02 细胞和 Pan02-OVA 细胞 Flag 表达。

5. CC-OMVs 的制备:参照文献^[14]。收集可稳定表达 CC-OMVs 的大肠杆菌培养基,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,5 000 r/min (离心半径为 14.275 cm),离心 10 min;收集上清液分别经 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径滤器过滤;收集滤液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,150 000 g 离心 3 h;收集沉淀物用无菌 PBS 充分溶解,并采用 BCA 蛋白定量试剂盒,按照说明书检测 CC-OMVs 溶液的浓度。

6. CC-OMVs 的形态观察: 取 CC-OMVs 溶液 10 μ L 滴加在电镜铜网上, 室温下静置 15 min 后轻甩电镜铜网弃去溶液, 滴加 10 μ L 醋酸双氧铀在电镜铜网上, 室温下静置 15 min 后轻甩电镜铜网弃去溶液, 于阴凉干燥处静置电镜铜网 1~2 h, 采用透射电子显微镜检测 CC-OMVs 形态。

7. OMVs 肿瘤疫苗的制备: 参照文献[14]。分别取 50 μ g CC-OMVs 和 50 μ g SpyTag-OVA 于室温下混合获得 OMVs 肿瘤疫苗。

8. 小鼠 T 细胞的制备: 取 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 分为 OMVs 肿瘤疫苗组和 PBS 对照组, 每组 3 只; 分别于第 0、3 天通过腹部皮下注射 100 μ L OMVs 肿瘤疫苗或 100 μ L PBS; 于第 10 天采用脊髓脱臼法处死小鼠, 取脾脏研磨后采用 70 μ m 孔径细胞筛网过滤; 收集过滤液按 1:5 体积比例加入 RBC 裂解液, 混匀后室温下静置 2 min; 4 $^{\circ}$ C 条件下, 500 g 离心 5 min; 收集沉淀物用无菌 PBS 充分重悬, 经细胞计数后备用。

9. 细胞杀伤实验: 取对数生长期小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞接种于 96 孔板, 分为 OMVs 肿瘤疫苗刺激 T 细胞组和对照 T 细胞组, 每组 8 孔, 每孔接种 5 000 个细胞; 接种 12 h 后, OMVs 肿瘤疫苗刺激 T 细胞组、对照 T 细胞组每孔分别加入 20 000 个上述实验 8 中 OMVs 肿瘤疫苗组小鼠 T 细胞或 PBS 对照组小鼠 T 细胞, 继续培养 24 h 后, 按照 CCK-8 试剂盒操作步骤, 采用酶标仪检测 450 nm 吸光度。

10. OMVs 肿瘤疫苗小鼠胰腺癌抑制实验: 取 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 分为 OMVs 肿瘤疫苗组和对照组, 每组 5 只; 取对数生长期小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞, 与基质胶等体积混合制成细胞浓度为 1×10^7 个/mL 细胞悬液; 采用 1 mL 胰岛素注射针吸取 100 μ L 细胞悬液接种于 OMVs 肿瘤疫苗组和对照组小鼠背部皮下; OMVs 肿瘤疫苗组于细胞接种后第 5、9、13 天通过小鼠腹部皮下注射 100 μ L OMVs 肿瘤疫苗。对照组于同一时间点同一位置注射 100 μ L PBS; 于细胞接种后第 20 天采用脊髓脱臼法处死小鼠, 收集小鼠背部皮下肿瘤组织并拍照、称重。

11. 免疫组织化学染色检测: 采用 DAB 染色方法, 操作步骤参照试剂盒说明书, 兔抗小鼠单克隆 CD8 抗体按 1:2 000 稀释, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗按 1:200 稀释。由 2 位独立的病理科医师进行双盲阅片, 评估染色结果。

二、观察指标

(1) 小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞鉴定情况: 激光共聚焦检测 results 和流式细胞检测结果。(2) CC-OMVs 形态观察情况: 透射电子显微镜检测结果。(3) OMVs 肿瘤免疫特异性 T 细胞对小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞增殖抑制情况: CCK-8 检测结果。(4) OMVs 肿瘤疫苗对小鼠胰腺癌的抑制情况: 小鼠背部皮下肿瘤组织质量。(5) OMVs 肿瘤疫苗刺激小鼠胰腺癌组织 CD8⁺ T 细胞浸润情况: 小鼠背部皮下肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞免疫组织化学染色结果。

三、统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。计数资料以绝对数或百分率表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞鉴定情况

激光共聚焦检测结果显示: 感染 OVA 慢病毒载体质粒 pLV-EF1a-hluc-P2A-mNeongreen-CMV-OVA-3Xflag-P2A-puro 的小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞表达 mNeongreen 绿色荧光。见图 1。

流式细胞检测结果显示: 以小鼠胰腺癌 Pan02 细胞为参照, Pan02-OVA 细胞 Flag 蛋白表达率为 90.7%。见图 2。

二、CC-OMVs 形态观察情况

透射电子显微镜检测结果显示: CC-OMVs 呈均匀球形, 直径 < 50 nm。见图 3。

三、OMVs 肿瘤疫苗特异性 T 细胞对小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞增殖抑制情况

CCK-8 检测结果显示: OMVs 肿瘤疫苗刺激 T 细胞组小鼠胰腺癌 Pan02-OVA 细胞 450 nm 吸光度为 0.41 ± 0.12 , 对照 T 细胞组为 1.05 ± 0.15 , 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 9.54, P < 0.001$)。

四、OMVs 肿瘤疫苗对小鼠胰腺癌的抑制情况

OMVs 肿瘤疫苗组小鼠背部皮下肿瘤组织质量为 (81 ± 10) g, 对照组为 (153 ± 17) g, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.26, P < 0.001$)。

五、OMVs 肿瘤疫苗刺激小鼠胰腺癌组织 CD8⁺ T 细胞浸润情况

免疫组织化学染色检测结果显示: OMVs 肿瘤疫苗组小鼠背部皮下肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞染色数目为 (28.7 ± 3.5) 个, 对照组为 (9.3 ± 1.5) 个, 两组

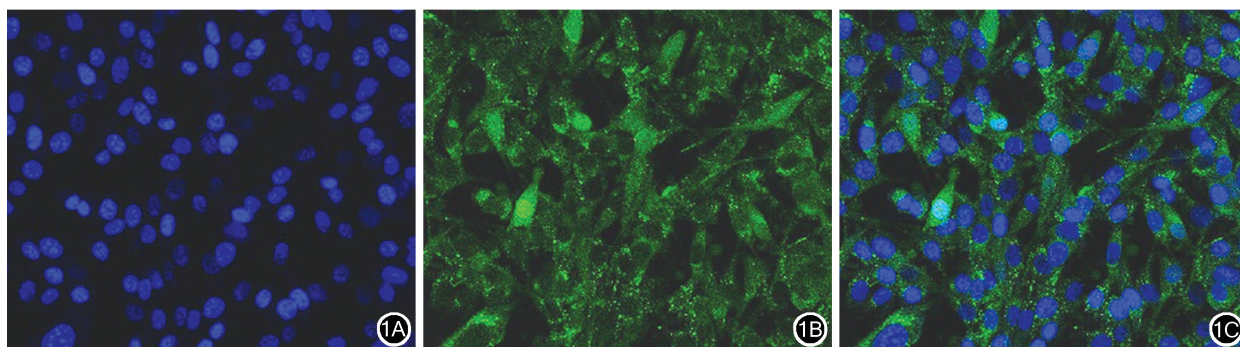


图1 激光共聚焦检测小鼠胰腺癌Pan02-OVA细胞 1A:细胞核4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色;1B:细胞质或细胞核mNeogreen绿色荧光显色;1C:细胞核、细胞质荧光重叠 免疫荧光染色 高倍放大

Figure 1 Analysis of mouse pancreatic cancer Pan02-OVA cells by laser scanning confocal microscopy 1A: 4',6-diamidino-2-phenylindole staining in nucleus; 1B: mNeogreen green fluorescence in cytoplasm or nucleus; 1C: Overlapping the nucleus fluorescence with the cytoplasm fluorescence Immunofluorescence staining High magnification

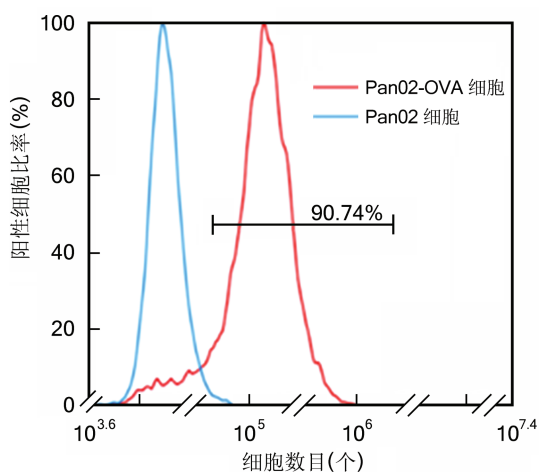


图2 流式细胞检测小鼠胰腺癌Pan02细胞和Pan02-OVA细胞Flag蛋白表达率

Figure 2 Flow cytometry analysis of Flag expression in pancreatic cancer Pan02 cells and Pan02-OVA cells

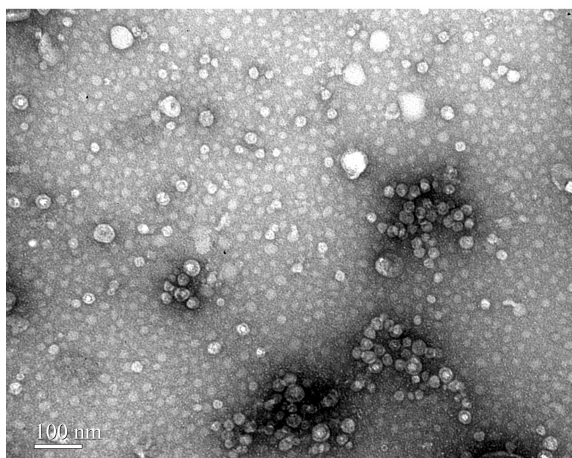
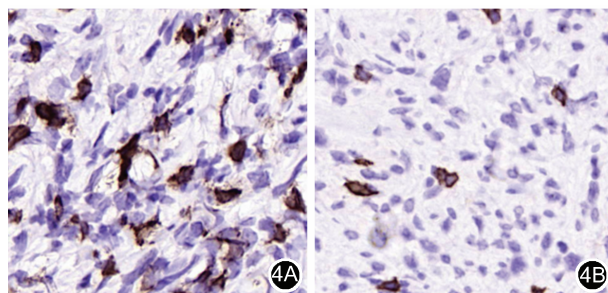


图3 透射电子显微镜检测ClyA-Catchers-细菌外膜囊泡

Figure 3 Transmission electron microscope analysis of ClyA-Catchers-bacterial outer membrane vesicles

比较,差异有统计学意义($t=8.74, P<0.001$)。免疫组织化学染色检测见图4。



注:外膜囊泡肿瘤疫苗组小鼠于腹部皮下注射外膜囊泡肿瘤疫苗,对照组小鼠于腹部皮下注射磷酸盐缓冲液

图4 免疫组织化学染色检测外膜囊泡肿瘤疫苗组和对照组小鼠胰腺癌组织CD8⁺T细胞 高倍放大 4A:外膜囊泡肿瘤疫苗组小鼠胰腺癌组织CD8⁺T细胞染色;4B:对照组小鼠胰腺癌组织CD8⁺T细胞染色

Figure 4 Immunohistochemical staining of CD8⁺T cell in the mouse pancreatic cancer tissue of outer membrane vesicles group and control group 4A: CD8⁺T cell staining in the the mouse pancreatic cancer tissue of outer membrane vesicles group; 4B: CD8⁺T cell staining in the the mouse pancreatic cancer tissue of control group High magnification

讨 论

已有的研究结果显示:肿瘤疫苗可以刺激机体免疫系统产生肿瘤特异性T细胞,发挥杀伤肿瘤细胞、抑制肿瘤生长的作用^[15-17]。目前,胰腺癌肿瘤疫苗包括细胞疫苗、蛋白质或多肽类疫苗、基因疫苗等^[18-24]。其中,蛋白质或多肽类疫苗可以被T细胞识别免疫显性抗原决定簇,进而引发抗肿瘤免疫反应,且具有易合成、成本低、性状稳定等优点^[25]。

肿瘤免疫反应的强度取决于肿瘤的“抗原强

度”,但肿瘤相关抗原的免疫反应强度可能由于对自身蛋白的中央免疫耐受从而受到限制^[26-27]。在肿瘤形成过程中,发生非同义基因突变可产生肿瘤细胞唯一表达的新抗原,其具备的肿瘤特异性等优点成为设计肿瘤疫苗的理想靶点^[28-30]。已有的研究结果显示:人胰腺癌表达中等程度的非同义抗原性突变^[31]。有研究者发现可以预测免疫原性的新抗原质量指标,并与患者预后相关^[32-34]。

本研究中,笔者基于团队前期构建的OMVs肿瘤疫苗制备平台,选择模式抗原OVA模拟肿瘤细胞特异性抗原,通过与CC-OMVs快速反应制备OMVs肿瘤疫苗。其结果显示:OMVs肿瘤疫苗可提高小鼠胰腺癌组织中CD8⁺T细胞的浸润,体外实验中OMVs肿瘤疫苗刺激的T细胞可抑制小鼠胰腺癌细胞增殖。该结果为以OMVs肿瘤疫苗制备平台,选择胰腺癌新型特异性抗原快速制备OMVs特异性肿瘤疫苗奠定基础。笔者认为:高效、经济地针对不同胰腺癌患者筛选新型特异性抗原是未来研究的发展方向^[35]。此外,由于胰腺癌存在复杂的免疫微环境,联合应用针对不同分子机制的肿瘤免疫治疗,可能为提高胰腺癌治疗效果提供新思路^[36-40]。

综上,细菌OMVs肿瘤疫苗可抑制胰腺癌小鼠肿瘤细胞增殖并提高肿瘤组织中CD8⁺T细胞浸润数目。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈志强、马娜娜:实验设计与实施、数据收集与统计分析、论文撰写;赵潇、高松、郝继辉:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.
- [2] Leber ME, Neault S, Jirovec E, et al. Engineering and combining oncolytic measles virus for cancer therapy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2020, 56: 39-48. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.07.005.
- [3] King J, Bouvet M, Singh G, et al. Improving theranostics in pancreatic cancer[J]. J Surg Oncol, 2017, 116(1): 104-113. DOI: 10.1002/jso.24625.
- [4] 汪栋, 崔铭, 余俊. 胰腺癌精准治疗的研究进展[J]. 中华消化外科杂志, 2021, 20(4): 385-394. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20210223-00089.
- [5] Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency[J]. N Engl J Med, 2015, 372(26): 2509-2520. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596.
- [6] Zhang Y, Velez-Delgado A, Mathew E, et al. Myeloid cells are required for PD-1/PD-L1 checkpoint activation and the establishment of an immunosuppressive environment in pancreatic cancer[J]. Gut, 2017, 66(1): 124-136. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312078.
- [7] Ferrara R, Mezquita L, Texier M, et al. Hyperprogressive disease in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors or with single-agent chemotherapy[J]. JAMA Oncol, 2018, 4(11): 1543-1552. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.3676.
- [8] 樊嘉, 高强. 肝癌的免疫治疗: 有希望便是光明[J]. 中华消化外科杂志, 2022, 21(2): 199-204. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220215-00080.
- [9] 谭黎杰, 黄志良. 食管癌新辅助免疫治疗的现状及未来[J]. 中华消化外科杂志, 2021, 20(6): 635-638. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20210420-00193.
- [10] 赵涵, 黄伟, 曾越灿. PD-1/PD-L1 抑制剂免疫治疗相关不良反应研究现状[J]. 临床误诊误治, 2020, 33(7): 113-116. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3429.2020.07.027.
- [11] 韩瑞, 张建业, 祁生福, 等. 胰腺癌患者外周血sPD-L1的表达水平及其与免疫功能的相关性分析[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(4): 36-39. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2020.04.009.
- [12] Balachandran VP, Beatty GL, Dougan SK. Broadening the impact of immunotherapy to pancreatic cancer: challenges and opportunities[J]. Gastroenterology, 2019, 156(7): 2056-2072. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.12.038.
- [13] Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, et al. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15095. DOI: 10.1038/ncomms15095.
- [14] Cheng K, Zhao R, Li Y, et al. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via plug-and-display technology[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2041. DOI: 10.1038/s41467-021-22308-8.
- [15] Wang QT, Nie Y, Sun SN, et al. Tumor-associated antigen-based personalized dendritic cell vaccine in solid tumor patients[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(7): 1375-1387. DOI: 10.1007/s00262-020-02496-w.
- [16] Salman B, Zhou D, Jaffee EM, et al. Vaccine therapy for pancreatic cancer[J]. Oncoimmunology, 2013, 2(12): e26662. DOI: 10.4161/onci.26662.
- [17] Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, et al. Dendritic cells in the cancer microenvironment[J]. J Cancer, 2013, 4(1): 36-44. DOI: 10.7150/jca.5046.
- [18] Wu AA, Bever KM, Ho WJ, et al. A phase II study of allogeneic GM-CSF-transfected pancreatic tumor vaccine (GVAX) with ipilimumab as maintenance treatment for metastatic pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(19): 5129-5139. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1025.
- [19] Schizas D, Charalampakis N, Kole C, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: a 2020 update[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 86: 102016. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102016.
- [20] Abou-Alfa GK, Chapman PB, Feilchenfeldt J, et al. Targeting mutated K-ras in pancreatic adenocarcinoma using an adjuvant vaccine[J]. Am J Clin Oncol, 2011, 34(3): 321-325. DOI: 10.1097/COC.0b013e3181e84b1f.
- [21] Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(3): 153-168. DOI: 10.1038/s41575-019-0245-4.

- [22] Gjertsen MK, Bakka A, Breivik J, et al. Ex vivo ras peptide vaccination in patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase I / II study[J]. *Int J Cancer*, 1996,65(4): 450-453. DOI:10.1002/(SICI)1097-0215(19960208)65:4<450::AID-IJC10>3.0.CO;2-E.
- [23] Wedén S, Klemp M, Gladhaug IP, et al. Long-term follow-up of patients with resected pancreatic cancer following vaccination against mutant K-ras[J]. *Int J Cancer*, 2011,128(5):1120-1128. DOI:10.1002/ijc.25449.
- [24] Nishida S, Ishikawa T, Egawa S, et al. Combination gemcitabine and WT1 peptide vaccination improves progression-free survival in advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: a phase II randomized study[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018,6(3):320-331. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-17-0386.
- [25] Fritsch EF, Burkhardt UE, Hacohen N, et al. Personal neoantigen cancer vaccines: a road not fully paved[J]. *Cancer Immunol Res*, 2020,8(12):1465-1469. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-20-0526.
- [26] Evans RA, Diamond MS, Rech AJ, et al. Lack of immunoeediting in murine pancreatic cancer reversed with neoantigen[J]. *JCI Insight*, 2016,1(14):e88328. DOI:10.1172/jci.insight.88328.
- [27] Bear AS, Vonderheide RH, O'Hara MH. Challenges and opportunities for pancreatic cancer immunotherapy[J]. *Cancer Cell*, 2020,38(6):788-802. DOI:10.1016/j.ccell.2020.08.004.
- [28] Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells[J]. *Science*, 2015,348(6236):803-808. DOI:10.1126/science.aaa3828.
- [29] Keskin DB, Anandappa AJ, Sun J, et al. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial[J]. *Nature*, 2019,565(7738):234-239. DOI:10.1038/s41586-018-0792-9.
- [30] Ott PA, Hu Z, Keskin DB, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J]. *Nature*, 2017,547(7662):217-221. DOI:10.1038/nature22991.
- [31] Rech AJ, Balli D, Mantero A, et al. Tumor immunity and survival as a function of alternative neopeptides in human cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018,6(3):276-287. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-17-0559.
- [32] Richman LP, Vonderheide RH, Rech AJ. Neoantigen dissimilarity to the self-proteome predicts immunogenicity and response to immune checkpoint blockade[J]. *Cell Syst*, 2019,9(4):375-382.e4. DOI:10.1016/j.cels.2019.08.009.
- [33] Balachandran VP, Łuksza M, Zhao JN, et al. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2017,551(7681):512-516. DOI:10.1038/nature24462.
- [34] Łuksza M, Riaz N, Makarov V, et al. A neoantigen fitness model predicts tumour response to checkpoint blockade immunotherapy[J]. *Nature*, 2017,551(7681):517-520. DOI:10.1038/nature24473.
- [35] Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer[J]. *Nature*, 2017,547(7662):222-226. DOI:10.1038/nature23003.
- [36] Stromnes IM, Brockenbrough JS, Izeradjene K, et al. Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity[J]. *Gut*, 2014,63(11):1769-1781. DOI:10.1136/gutjnl-2013-306271.
- [37] Jang JE, Hajdu CH, Liot C, et al. Crosstalk between regulatory T cells and tumor-associated dendritic cells negates anti-tumor immunity in pancreatic cancer[J]. *Cell Rep*, 2017,20(3):558-571. DOI:10.1016/j.celrep.2017.06.062.
- [38] Seifert L, Werba G, Tiwari S, et al. Radiation therapy induces macrophages to suppress T-cell responses against pancreatic tumors in mice[J]. *Gastroenterology*, 2016,150(7):1659-1672.e5. DOI:10.1053/j.gastro.2016.02.070.
- [39] 王智刚,杨睿,彭敏劼,等.外泌体微小RNAs介导的胰腺癌耐药机制研究进展[J]. *中华消化外科杂志*, 2021,20(4):471-478. DOI:10.3760/cma.j.cn115610-20210219-00081.
- [40] Yamamoto K, Venida A, Yano J, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I[J]. *Nature*, 2020,581(7806):100-105. DOI:10.1038/s41586-020-2229-5.

广告目次

奥林巴斯(北京)销售服务有限公司……………封二
宁波市金迈得医疗科技有限公司……………对封二
深圳翰宇药业股份有限公司……………对导读
柯惠医疗器材国际贸易(上海)有限公司……………对中文目次 1
雅培贸易(上海)有限公司……………对英文目次 1

正大天晴药业集团股份有限公司……………对英文目次 2
雅培贸易(上海)有限公司……………对正文
柯惠医疗器材国际贸易(上海)有限公司……………对封三
费森尤斯卡比华瑞制药有限公司……………封三
强生(上海)医疗器材有限公司……………封四