

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.005

· 基础研究 ·

光学分子活体成像监测评价 MUC1-DC 疫苗治疗乳腺癌 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤的效果

尹良伟^{1,2}, 王贺双², 刘鹏², 祝艳华², 于环², 刘宇², 马海英^{3,△}, 伍建林^{1,4,△} (1. 大连医科大学 研究生院, 辽宁 大连 116044; 2. 大连医科大学附属大连市中心医院 肿瘤内科, 辽宁 大连 116033; 3. 大连医科大学 基础医学院 组织胚胎学教研室, 辽宁 大连 116044; 4. 大连大学附属中山医院 影像医学教研室, 辽宁 大连 116001)

[摘要] **目的:** 评价黏蛋白 1 (mucin 1, MUC1) 基因转染的 DC 疫苗治疗乳腺癌 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤的效果及其可能的机制。**方法:** 采用 GFP 慢病毒转染 MCF-7 细胞获得 GFP-MCF-7 细胞, 皮下种植于 BALB/c 裸鼠, 成瘤后随机分为 3 组。各组裸鼠首先尾静脉注射体外活化的 CIK 细胞 (1×10^8 个/只), 治疗组于皮下注射 MUC1 基因转染的 MUC1-DC (MUC1-DC 组) 或 DC (DC 组) (0.2 ml, 1×10^7 个/只), 对照组 (Control 组) 注射等体积生理盐水, 每天治疗 1 次, 连续 5 d; 采用小动物活体光学成像系统在开始治疗前及治疗后第 35 天观察移植瘤荧光成像, 分析荧光强度和荧光面积; 并采用免疫组化法检测瘤组织中 Caspase 3 的表达、TUNEL 法检测细胞凋亡率。**结果:** GFP-MCF-7 接种后 7 d, 成瘤率 100%; 光学分子成像法监测结果显示, 治疗前 MUC1-DC 组、DC 组和 Control 组之间体内移植瘤荧光信号强度无明显差异 ($P > 0.05$); 第 35 天, MUC1-DC 组的荧光信号强度明显低于 Control 组 ($P < 0.05$); DC 与 Control、MUC1-DC 与 DC 组间均无显著性差异 (均为 $P > 0.05$), 但 MUC1-DC 比 DC 组荧光信号更低; 治疗前 MUC1-DC 组、DC 组和 Control 组之间体内移植瘤荧光信号分布面积无显著差异 ($P > 0.05$); 第 35 天, Control 组荧光信号呈多处散在分布, MUC1-DC 组和 DC 组的荧光信号面积均明显低于 Control 组 (均为 $P < 0.01$), MUC1-DC 组的荧光信号面积低于 DC 组, 但无显著差异 ($P > 0.05$); Control 组 Caspase 3 表达最少, DC 组次之, MUC1-DC 组呈高表达 Caspase 3, 3 组间差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); 3 组细胞凋亡率分别为: Control 组 (4.11 ± 2.61)%、DC 组 (9.63 ± 2.27)%、MUC1-DC 组 (25.30 ± 8.24)%, 3 组间差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论:** MUC1-DC 疫苗比单纯 DC 免疫治疗人乳腺癌荷瘤小鼠能够更有效地抑制肿瘤的生长和扩散, 发挥了更好的促进肿瘤细胞凋亡的作用。

[关键词] 黏蛋白 1; 树突状细胞; 乳腺癌; 光学分子成像

[中图分类号] R737.9; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)12-1179-07

Treatment efficacy of MUC1-DC vaccine in breast cancer MCF-7 cell xenografts in nude mice evaluated by monitoring tumor growth with optical molecular imaging

YIN Liangwei^{1,2}, WANG Heshuang², LIU Peng², ZHU Yanhua², YU Huan², LIU Yu², MA Haiying^{3,△}, WU Jianlin^{1,4,△} (1. Graduate School of Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning, China; 2. Department of Oncology, Dalian Central Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116033, Liaoning, China; 3. Department of Histoembryology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning, China; 4. Department of Medical Imageology, Zhongshan Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian 116001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the treatment efficacy of mucin 1 (MUC1) gene transfected dendritic cell (MUC1-DC) vaccine on breast cancer MCF-7 cell xenografts in nude mice and its possible mechanism. **Methods:** GFP lentivirus were transfected into human breast cancer MCF-7 cells to obtain the GFP-MCF-7 cells which were subcutaneously implanted into BALB/c nude mice. After tumorigenesis, the mice were randomly divided into three groups. First, CIK cells activated *in vitro* (1×10^8 cells/mouse) were injected into the mice of each group *via* tail vein. In the treatment groups, MUC1-DC (MUC1-DC group) or DC (DC group) were injected

[基金项目] 大连市卫计委科研课题资助项目 (No.2012-0407L)。Project supported by the Program of Scientific Research Foundation from Health and Family Planning Commission of Dalian City (No.2012-0407L)

[作者简介] 尹良伟 (1975—), 男, 博士, 主任医师, 主要从事肿瘤化疗及生物治疗方面的基础与临床研究工作, E-mail: Lwyin2008@163.com

[通信作者] 伍建林 (WU Jianlin, corresponding author), 博士, 主任医师, 主要从事肺癌及相关疾病的综合影像学, E-mail: cjr.wujianlin@vip.163.com; 马海英 (MA Haiying, corresponding author), 博士, 副教授, 主要从事活细胞示踪和神经退行性疾病相关研究; E-mail: mahaiping@dmu.edu.cn.

[△]为共同通讯作者

subcutaneously (0.2 ml, 1×10^7 cells/mouse). In the control group, normal saline of the same volume was injected. The treatment frequency was once per day for 5 consecutive days. The fluorescence imaging of transplanted tumor was observed before and 35 days after the treatment with optical imaging system, and fluorescence intensity and area were analyzed. The expression of Caspase 3 in xenograft tissues was detected by immunohistochemistry, and the cell apoptosis was detected by TUNEL assay. Results: The tumor formation rate of nude mice was 100% at 7 days after GFP-MCF-7 implantation. The results of optical molecular imaging showed that there was no significant difference in fluorescence signal intensity among MUC1-DC group, DC group and Control group before treatment ($P > 0.05$). At day 35 after treatment, the fluorescence signal intensity of MUC1-DC group and DC group was significantly lower than that of Control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between DC and Control group, as well as between MUC1-DC and DC group (all $P > 0.05$), but the fluorescence signal of MUC1-DC group was lower than that of DC group. There was no significant difference in the distribution area of fluorescence signal among MUC1-DC group, DC group and Control group before treatment ($P > 0.05$). At day 35, the fluorescence signal in Control group was scattered in multiple areas, and the area of fluorescence signal in MUC1-DC group and DC group was significantly smaller than that in Control group (all $P < 0.01$), but there was no significant difference between MUC1-DC group and DC group ($P > 0.05$). Caspase 3 expression was the highest in MUC1-DC group, followed by DC group, and the least in Control group, and the differences among the three groups were significant (all $P < 0.05$). TUNEL results showed that the apoptosis rate of Control group, DC group and MUC1-DC group was $(4.11 \pm 2.61)\%$, $(9.63 \pm 2.27)\%$, and $(25.30 \pm 8.24)\%$, respectively (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Compared with mere DC immunotherapy, MUC1-DC vaccine can more effectively inhibit tumor growth and metastasis in nude mice bearing human breast cancer cell xenografts, exerting a better effect in promoting tumor cell apoptosis.

[Key words] MUC1 gene; dendritic cell (DC); breast cancer; optical molecular imaging

[Chin J Cancer Biother, 2021, 27(12): 1179-1185. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.005]

在机体的抗肿瘤免疫中, T细胞介导的细胞免疫发挥着主导作用, 其机制在于DC诱导的CTL对肿瘤细胞的特异性细胞毒作用^[1-2]。以DC为基础的肿瘤免疫治疗方法, 如DC或DC-CIK细胞等, 被广泛应用, 然而其应用于临床仍存在缺陷。近些年, 诸多研究^[3-4]通过负载肿瘤全细胞抗原、肿瘤特异性表位肽刺激或转入肿瘤抗原基因等方法制备DC疫苗, 对抑制恶性肿瘤有较好的效果, 而且部分DC疫苗已经正式被批准应用于临床^[5-6]。其中, 肿瘤抗原致敏的DC可以释放一种有抗原提呈能力的囊泡小体, 可以显著刺激抗原特异性CTL活性^[7]。用特定的基因转染DC或敲除特定的基因片段是加强DC抗肿瘤免疫功能的有效手段之一, 基因修饰的DC可为机体免疫系统提供多个可供识别的抗原表位, 为其在肿瘤预防和生物免疫治疗方面的应用提供了广泛的前景^[8-9]。表达于肿瘤细胞表面的黏蛋白1 (mucin 1, MUC1) 糖基化不完全, 可暴露出隐蔽的抗原表位, 这些表位可以通过MHC限制性或非MHC限制性被TCR识别, 并导致特异性的肿瘤杀伤。MUC1还可以通过受体酪氨酸激酶信号传导通路、Wnt信号传导通路等促进肿瘤的生长、浸润及转移, 因此MUC1是肿瘤主动特异性免疫治疗的理想靶分子^[10-11]。MUC1在一些腺癌上皮细胞的表面呈高表达, 如乳腺癌、肺腺癌等^[12-14]。MUC1也可以作为乳腺癌相关的特异性、敏感性较高的分子生物学标志物, 基于MUC1的疫苗具有良较好的抗肿瘤活性^[15], 本研究采用慢病毒载体介导MUC1基因转染DC, 经MUC1-DC疫苗联合CIK免

疫治疗, 通过光学分子成像技术, 探讨了其在人乳腺癌小鼠模型中的抑瘤作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

18只BALB/c雄性裸鼠, 6~8周龄, 体质量20~22 g, 购买并饲养于大连医科大学SPF实验动物中心(动物合格证号: No.211003700001617), 饲养条件: 26℃~28℃、相对湿度40%~60%、12 h/12 h明暗周期。脂质体Lipofectamine 3000 (产品编号: Lipo3000) 购自Initrogen公司, Caspase单克隆抗体(产品编号: 9662) 购自CST公司, 质粒提取试剂盒(产品编号: b511249-0010) 购自Promega公司。

1.2 CIK细胞培养

取健康成人新鲜外周血, 用血细胞分离机采集外周血单个核细胞50~100 ml, 加入淋巴细胞分离液后用密度梯度离心法纯化, 无血清培养液洗涤2次, 获得纯度在90%以上的PBMC。于无血清培养液中加入1 000 U/ml的重组人IFN- γ , 37℃、5%CO₂培养箱中培养; 24 h后加入50 ng/ml的CD3单克隆抗体和300 U/ml的重组人IL-2, 刺激CIK细胞的生长和增殖。

1.3 慢病毒转染DC

人DC、MUC1基因转染DC和质粒由本实验室前期研究提取和制备保存, 人乳腺癌MCF-7细胞由大连医科大学组织胚胎学教研室惠赠。取1 ml无血清DMEM, 加入不同体积的脂质体, 制备DMEM-

lipo3000 混合液。制备 DMEM-质粒混合液:取 1 ml 无血清 DMEM 于 5 ml EP 管,向其中加入 0.5 μg 慢病毒包膜质粒 pMD2.G、1.5 μg 慢病毒包装质粒 pSPAX2、2 μg 慢病毒载体质粒 pCDH-Fluc-GFP、2.5 μl P3000™,混匀后静置 5 min。每管 DMEM-质粒混合液加入 1 ml 的 DMEM-lipo3000 混合液,混匀,静置 15 min。MCF-7 细胞在 6 cm 培养皿中培养,向其中加入转染试剂 2 ml,培养 3 d 后通过检测经转染的 MCF-7 细胞(GFP-MCF-7)表达 GFP 的情况比较不同脂质体浓度对转染效率的影响。选择转染效率最高组的优化条件进行后续实验。

1.4 光学分子成像技术监测 MUC1-DC 联合 CIK 治疗乳腺癌裸鼠模型的疗效

于裸鼠胸背部皮下注射处于对数生长期的 GFP-MCF-7 细胞,细胞数量为 1×10^7 个/只,体积为 0.1 ml/只;在第 7 天时选择荷瘤大小相似的裸鼠随机分为生理盐水对照组(Control 组)、DC 治疗组(DC 组)及 MUC1-DC 治疗组(MUC1-DC 组),每组 6 只;各组小鼠首先尾静脉注射体外活化的 CIK 细胞(1×10^8 个/只);同时,治疗组于皮下注射 MUC1-DC 或 DC 1×10^7 个/只,体积 0.2 ml/只,对照组则注射生理盐水 0.2 ml/只,每天治疗 1 次,连续治疗 5 d,在裸鼠模型开始治疗前及开始治疗后第 35 天分别采用 IVIS Lumina II 小动物活体成像仪进行活体光学分子成像监测和观察,通过积分光密度(integral optical density, IOD)值判断动物体内 GFP 表达部位及强度,并进行数据处理。

1.5 监测裸鼠移植瘤体积

GFP-MCF-7 裸鼠模型于治疗结束后第 5 天起,每 5 d 用卡尺测量肿瘤的最大纵径(a)及最大横径(b),肿瘤体积= $0.52\times a\times b^2$ (cm³),并动态观察肿瘤生长的情况。待 35 d 后采用颈椎脱臼法处死裸鼠,剥离肿瘤,测量并称重。肿瘤组织用于后续实验检测。

1.6 免疫组化法检测 Caspase 3 表达

获取的肿瘤组织经固定后制备石蜡切片;脱蜡、水化,抗原修复 10 min;滴加 3% H₂O₂,室温静置 10 min;经过正常山羊血清封闭 10 min;滴加 Caspase 单克隆抗体 50 μl,4 °C 过夜;经 50 μl 二抗处理后用 DAB 显色,并进行苏木精复染,在显微镜下观察和采集图片,利用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

1.7 TUNEL 法检测移植瘤组织中细胞凋亡情况

移植瘤组织切片经脱蜡、水化后滴加 100 μl 细胞通透液(0.1% TritonX-100)室温孵育 30 min;Labeling Solution 与 TDT 进行 25:1 混合,将其适量滴加于待测样品区,室温孵育 1 h;再次向待测样品区滴加细胞通透液处理 5 min,重复 3 次,封片;荧光显微镜下观察并采集图片,利用 ImageJ 软件进行计数凋亡细胞,计算凋亡率。

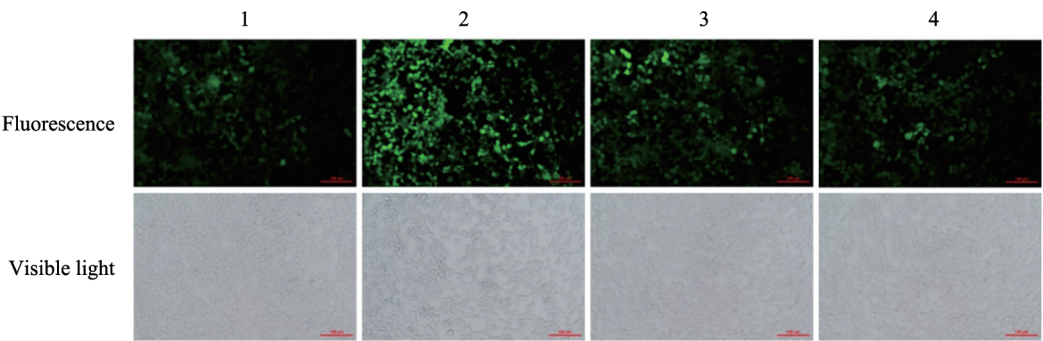
1.8 统计学处理

采用 Graphad Prism7.0 软件作为统计学分析处理工具,连续变量的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,裸鼠成瘤活体光学分子成像的 IOD 值比较采用组间方差分析,如果组间存在差异,则进一步行两两 *t* 检验比较;凋亡率分析采用两独立样本 *t* 检验。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢病毒转染获得 GFP-MCF-7 细胞

通过 GFP 表达情况比较不同质粒浓度和脂质体浓度对转染效率的影响,结果(图 1)显示,第 2 组的 GFP 亮度显著高于其他各组(均 *P*<0.01),即当加入 0.5 μg 慢病毒包膜质粒 pMD2.G、1.5 μg 慢病毒包装质粒 pSPAX2、2 μg 慢病毒载体质粒 pCDH-Fluc-GFP 时,转染效率最佳;当加入 10 μl lipo3000 脂质体和 10 μl P3000™时,第 3 组的 GFP 亮度显著高于其他组(均 *P*<0.01)(图 2),故选择此浓度脂质体进行后续实验。



1: 0.25 μg pMD2.G+0.75 μg pSPAX2+1 μg pCDH-Fluc-GFP; 2: 0.5 μg pMD2.G+1.5 μg pSPAX2 + 2 μg pCDH-Fluc-GFP; 3: 1 μg pMD2.G+3 μg pSPAX2+4 μg pCDH-Fluc-GFP; 4: 2 μg pMD2.G+6 μg pSPAX2+8 μg pCDH-Fluc-GFP; Bar=100 μm

图 1 慢病毒转染质粒浓度条件优化
Fig.1 Optimization of vector concentration in lentiviral transfection

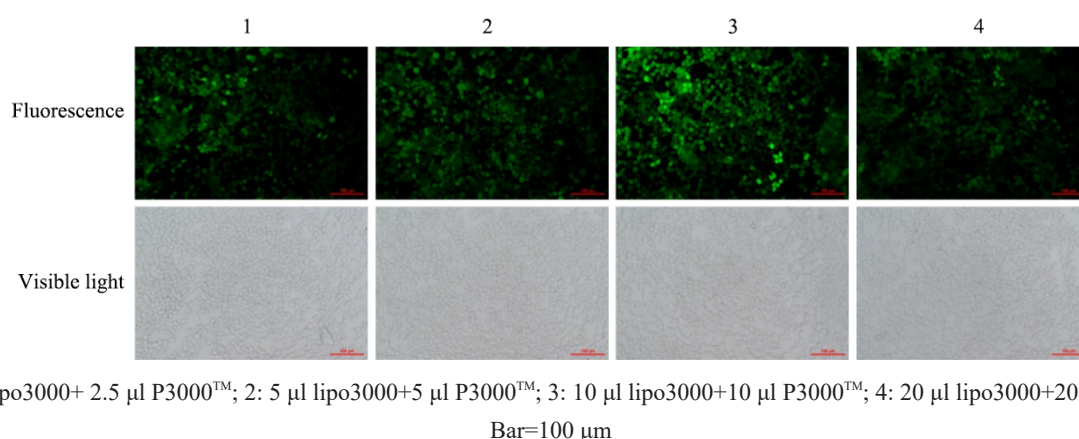


图2 慢病毒转染脂质体浓度条件的优化

Fig.2 Optimization of liposome concentration in lentiviral transfection

2.2 MUC1-DC 抑制裸鼠乳腺癌移植瘤的生长

裸鼠于接种后 7 d, 可触及直径约 2 mm 大小肿块, 成瘤率 100%。治疗前和治疗后 35 d 活体光学分子成像检测结果(图 3)显示, 治疗前 MUC1-DC 组、DC 组和 Control 组裸鼠体内移植瘤荧光信号强度分别为 $(1.49 \pm 0.15) \times 10^9$ 、 $(1.67 \pm 0.13) \times 10^9$ 、 $(0.95 \pm 0.29) \times 10^9$, 组间比较差异无统计学意义 ($F=0.4341$, $P=0.6751$); 开始治疗后第 35 天, 3 组荧光信号强度分别为 $(1.51 \pm 0.33) \times 10^9$ 、 $(2.23 \pm 0.16) \times 10^9$ 、 $(4.78 \pm 1.00) \times 10^9$, 其中 MUC1-DC 组的荧光信号强度明显低于 Control 组 ($P=0.0357$); DC 与 Control、MUC1-DC 与 DC 组间差异无统计学意义 ($P=0.0649$, $P=0.1187$), 但 MUC1-DC 比 DC 组荧光信号更低。从荧光信号分布面积上进行统计分析, 治疗前 MUC1-DC 组、DC 组和 Control 组 3 组的荧光信号面积分别为 $(35.52 \pm 10.13) \text{ mm}^2$ 、 $(40.24 \pm 5.80) \text{ mm}^2$ 、 $(48.04 \pm 11.77) \text{ mm}^2$, 组间体内移植瘤荧光信号面积差异无统计学意义 ($F=1.084$, $P=0.4207$); 开始治疗后第 35 天, 3 组的荧光信号面积分别为 $(218.5 \pm 76.05) \text{ mm}^2$ 、 $(407.2 \pm 10.91) \text{ mm}^2$ 、 $(986.8 \pm 88.17) \text{ mm}^2$, 其中 Control 组荧光信号呈多处散在分布, MUC1-DC 组和 DC 组的荧光信号面积明显低于 Ct 组 ($P=0.0027$, $P=0.0029$), 但 MUC1-DC 组与 DC 组的荧光信号面积无显著差异 ($P=0.07$)。

2.3 MUC1-DC 对裸鼠移植瘤体积和质量的影响

荷瘤裸鼠行 MUC1-DC 或 DC 联合 CIK 细胞治疗 5 d, 结束后 5 d 开始测量肿瘤体积大小, 结果显示, 从开始治疗后 20 d 起, Control 组、DC 组及 MUC1-DC 组肿瘤体积大小出现差异, 但无统计学意义; 随后差异逐渐增大, 至 35 d, Control 组、DC 组及 MUC1-DC 组移植瘤体积分别为 $(2.86 \pm 0.13) \text{ cm}^3$ 、 $(1.95 \pm 0.18) \text{ cm}^3$ 、 $(0.94 \pm 0.09) \text{ cm}^3$, MUC1-DC 组肿瘤生长明显受抑制, 3 组间肿瘤大小差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 肿瘤生长曲线见图 4。同时, 3 组平均瘤质量分别为

$(1.80 \pm 0.13) \text{ g}$ 、 $(1.18 \pm 0.11) \text{ g}$ 、 $(0.80 \pm 0.10) \text{ g}$, MUC1-DC 组和 DC 组与 Control 组比较(均为 $P<0.01$), 差异均有统计学意义, 且 MUC1-DC 组与 DC 组比较, 差异也有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.4 MUC1-DC 治疗后裸鼠移植瘤组织中 Caspase 3 表达升高

免疫组化法检测结果(图 5)显示, Control 组 Caspase 3 表达最少, DC 组次之, MUC1-DC 组 Caspase 3 表达水平最高, 3 组间比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.5 MUC1-DC 治疗后裸鼠移植瘤中细胞的凋亡率升高

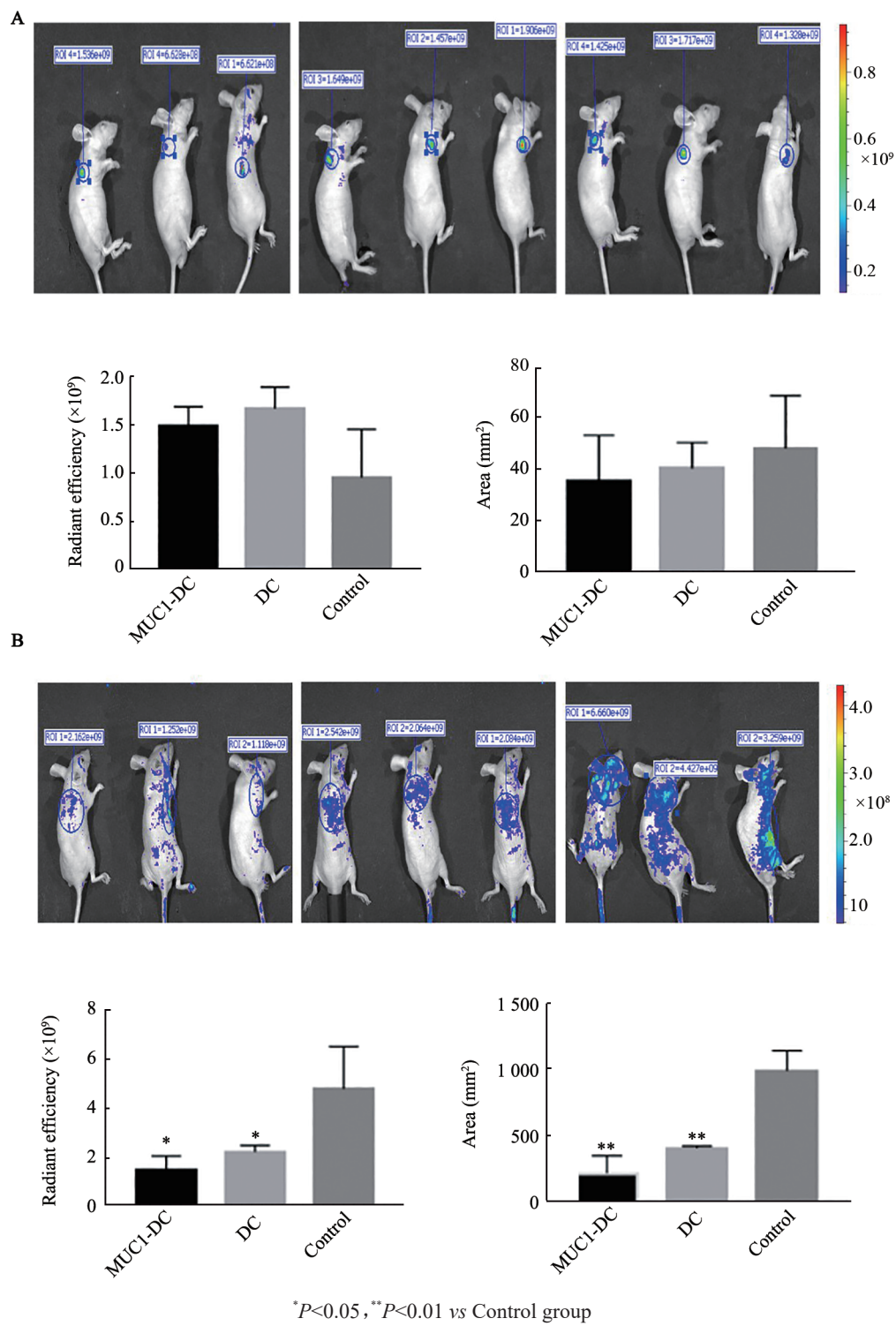
以 TUNEL 法检测各组移植瘤组织中细胞凋亡情况, 结果(图 6)表明, MUC1-DC 组细胞凋亡率显著高于 DC 组和 Control 组 [$(25.30 \pm 8.24)\%$ vs $(4.11 \pm 2.61)\%$ 、 $(9.63 \pm 2.27)\%$, 均 $P<0.05$]。

3 讨论

“肿瘤免疫疗法”这一新兴治疗手段持续得到了人们对机体免疫系统潜在的强大肿瘤杀伤能力的关注。临床研究^[16]结果表明 DC-CIK 法对乳腺癌的治疗是安全有效的。近年来, 不同负载条件刺激下的 DC 疫苗得到了广泛研究。负载肿瘤抗原的 DC 与 CIK 细胞联合治疗可有效抑制裸鼠肺腺癌移植瘤的生长^[17]。加载 CD133⁺HT-29 细胞裂解液或 RNA 的 DC-CIK 细胞对裸鼠结肠癌细胞 HT-29 移植瘤有更好的抑瘤作用^[18]。这些研究提示负载肿瘤抗原的 DC 疫苗或可作为乳腺癌免疫治疗的新手段。

癌细胞转移是乳腺癌致死的主要原因, 为了更全面反映乳腺癌病理过程, 本研究建立成瘤率高并能自发向远处转移的人乳腺癌 MCF-7 裸鼠动物模型, 采用慢病毒介导人源 MUC1 基因修饰 DC 制备 MUC1-DC 疫苗, 联合 CIK 细胞进行免疫治疗, 采用

小动物活体分子成像系统监测了 MUC1-DC 或 DC 分别联合 CIK 细胞免疫治疗后裸鼠移植瘤的生长情况，以评价 MUC1-DC 疫苗对乳腺癌免疫作用的效果及其可能的机制。



A: The distribution, intensity and area of the fluorescence signal before treatment; B: The distribution, intensity and area of the fluorescence signal after 35 days of treatment

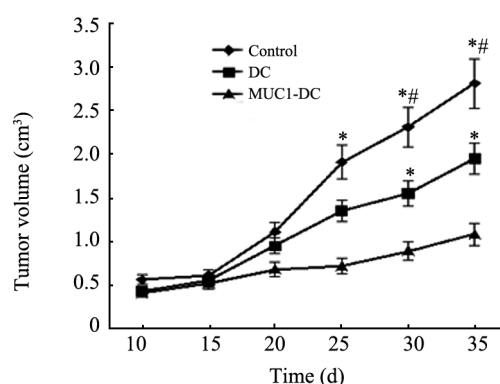
图3 裸鼠光学分子成像检测 MUC1-DC 对移植瘤的抑制作用

Fig.3 The inhibitory effect of MUC1-DCs on xenografts of nude mice detected by optical molecular imaging

小动物活体荧光成像是光学分子成像技术的一种，是在小动物活体状态下采用特定荧光蛋白对特定细胞或靶分子进行标记，通过成像系统显像及荧光蛋白强度进行定性、定量的研究，动态观察肿瘤的生长、转移情况^[19-20]。在抗肿瘤疗效判定方面，相对于只能从组织结构等大体层面进行检测、判断的传

统影像学技术来说,小动物活体荧光成像在这方面更具有优势^[21-22]。其优点在于具有高灵敏度,可以通过对发光信号的检测而追踪肿瘤的转移过程。有报道称,其可观察到癌细胞在血管中的停留、外渗和转移灶等一系列过程,甚至能够检测到少于100个细胞的肿瘤微小转移病灶^[23-24]。本研究采用小动物活体成像仪捕捉GFP释放的绿色荧光强度和面积,判断出移植瘤的大小和分布,以此推算出移植瘤的生长情况及免疫治疗的干预效果。结果显示,实验期间均可检测到发光信号,GFP-MCF-7移植后第7天,即治疗前,成像荧光强度无显著变化,且荧光信号分布集中,面积无明显差异。DC或MUC1-DC免疫治疗开始后第35天,GFP稳定表达使细胞仍然能够被跟踪。MUC1-DC治疗组肿瘤生长明显受抑制,MUC1-DC组的荧光信号强度明显低于Control组,而DC与Control、MUC1-DC与DC组间均无显著性差异,但MUC1-DC比DC组荧光信号更低,且荧光信号面积明显小于DC组,Control组荧光信号呈散在多处分布,面积明显大于MUC1-DC与DC组。另外,各组瘤

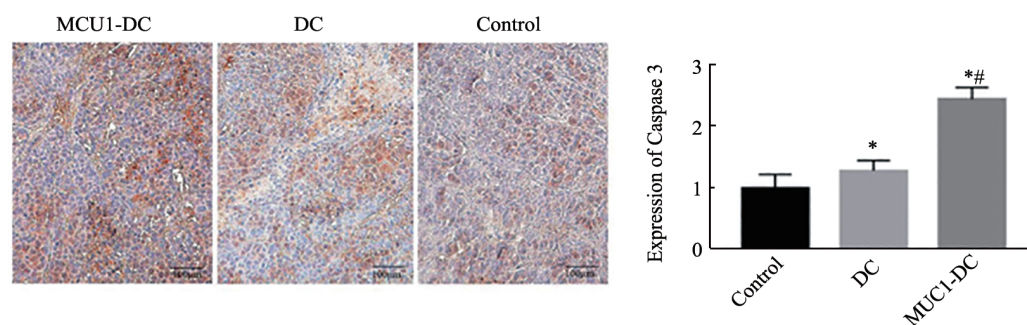
质量比较与荧光成像结果相一致。上述结果表明,转染MUC1基因能显著提高DC细胞抑制乳腺癌细胞增殖的能力,且活体光学分子成像方法能够准确测出裸鼠移植瘤变化和转移情况,为移植瘤的免疫治疗效果提供可靠的检测手段。



* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs DC group

图4 不同实验组裸鼠移植瘤生长情况比较

Fig.4 Growth of xenografts in nude mice of various groups



* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs DC group; Bar=100 μ m

图5 MUC1-DC治疗促进裸鼠移植瘤组织中Caspase 3的表达

Fig.5 MUC1-DC treatment promoted the expression of Caspase 3 in xenograft tissues of nude mice

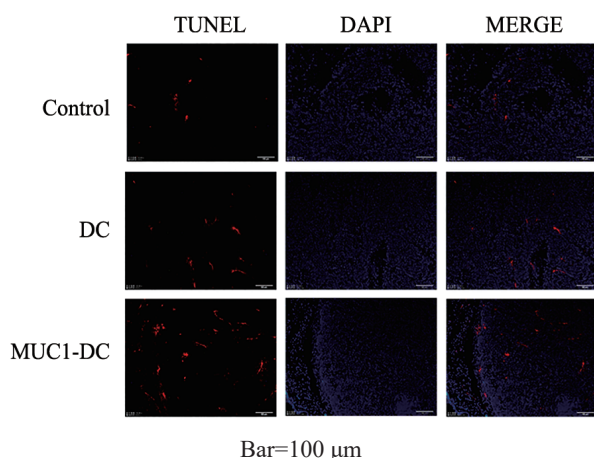


图6 MUC1-DC治疗促进裸鼠移植瘤组织中细胞的凋亡

Fig.6 MUC1-DC treatment promoted the cell apoptosis in xenograft tissues of nude mice

为进一步探究MUC1-DC对乳腺癌裸鼠肿瘤模

型生长发挥了更好抑制作用可能的机制,本研究取瘤后进行了肿瘤细胞的凋亡检测。免疫系统识别和清除外来异物和自身异常组织,必须依靠对自身起反应的淋巴细胞的“删除”,而这种“删除”主要通过细胞凋亡来完成。本实验中探讨的Caspase 3被认为是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,也是CTL细胞杀伤机制的重要组成部分^[25]。本研究免疫组化检测结果发现,MUC1-DC治疗组表达Caspase 3明显高于其他两组;同时TUNEL检测结果也表明MUC1-DC治疗组移植瘤组织中细胞凋亡率明显高于DC组及Control组。本研究表明,MUC1作为乳腺癌相关的特异性、敏感性较高的分子生物学标志物以及免疫治疗的潜在靶点,MUC1基因转染DC增强了其在人乳腺癌裸鼠模型的杀伤作用和促凋亡作用,MUC1-DC治疗促进人乳腺癌裸鼠模型细胞凋亡的

机制还有待于深入研究。

综上所述,本研究通过以慢病毒为载体转染人乳腺癌MCF-7,建立携带GFP报告基因的GFP-MCF-7乳腺癌裸鼠模型,通过光学分子成像技术监测活体裸鼠体内移植瘤的生长,通过定性与定量分析证明,与单纯DC相比,MUC1基因转染的DC联合CIK细胞对乳腺癌裸鼠模型的肿瘤生长起到了明显的抑制作用;其抑瘤作用的机制与MUC1促进细胞凋亡有关。但MUC1-DC增强免疫活性的机制可能还涉及多细胞因子与凋亡的相互作用。本研究的不足之处在于受制于疫情期间的实验条件,未能进行多节点和更长周期的动态检测。相信随着光学分子成像活体检测技术的不断成熟和新兴技术的不断开发与完善,人们对于乳腺癌乃至其他恶性肿瘤疾病的免疫治疗效果的研究将会越来越清晰。

[参 考 文 献]

- [1] COLLIN M, BIGLEY V. Human dendritic cell subsets: an update[J]. Immunology, 2018, 154(1): 3-20. DOI:10.1111/imm.12888.
- [2] ADAMS S, O'NEILL D W, BHARDWAJ N. Recent advances in dendritic cell biology[J]. J Clin Immunol, 2005, 25(3): 177-188. DOI:10.1007/s10875-005-4086-2.
- [3] SANTOS P M, BUTTERFIELD L H. Dendritic cell-based cancer vaccines[J]. J Immunol, 2018, 200(2): 443-449. DOI: 10.4049/jimmunol.1701024.
- [4] HARARI A, GRACIOTTI M, BASSANI-STERBERG M, et al. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach[J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(9): 635-652. DOI: 10.1038/s41573-020-0074-8.
- [5] MODY N, DUBEY S, SHARMA R, et al. Dendritic cell-based vaccine research against cancer[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2015, 11(2): 213-232. DOI:10.1586/1744666X.2015.987663.
- [6] THARA E, DORFF T B, PINSKI J K, et al. Vaccine therapy with sipuleucel-T (Provenge) for prostate cancer[J]. Maturitas, 2011, 69(4): 296-303. DOI:10.1016/j.maturitas.2011.04.012.
- [7] QUAH B J C, O'NEILL H C. The immunogenicity of dendritic cell-derived exosomes[J]. Blood Cells Mol Dis, 2005, 35(2): 94-110. DOI:10.1016/j.bcmd.2005.05.002.
- [8] 尹良伟, 马海英, 王苏平. 基因修饰DC在抗肿瘤免疫治疗中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(5): 618-622. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.019.
- [9] ABRAHAM R S, MITCHELL D A. Gene-modified dendritic cell vaccines for cancer[J]. Cytotherapy, 2016, 18(11): 1446-1455. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.09.009.
- [10] RAO C V, JANAKIRAM N B, MADKA V, et al. Small-molecule inhibition of GCNT3 disrupts mucin biosynthesis and malignant cellular behaviors in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2016, 76(7): 1965-1974. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-2820.
- [11] VLAD A M, KETTEL J C, ALAJEZ N M, et al. MUC₁ immunobiology: from discovery to clinical applications[J]. Adv Immunol, 2004, 82: 249-293. DOI:10.1016/S0065-2776(04)82006-6.
- [12] YANG E, HU X F, XING P X. Advances of MUC₁ as a target for breast cancer immunotherapy[J]. Histol Histopathol, 2007, 22(8): 905-922. DOI:10.14670/HH-22.905.
- [13] 简艳, 斜方芳. 基因修饰DC疫苗在肺癌中的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(10): 1735-1737. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2017.10.052.
- [14] DENNENY E, SAHOTA J, BEATSON R, et al. Mucins and their receptors in chronic lung disease[J/OL]. Clin Transl Immunology, 2020, 9(3): e01120 [2021-10-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32194962/>. DOI:10.1002/cti2.1120.
- [15] GAO T, CEN Q H, LEI H. A review on development of MUC1-based cancer vaccine[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110888 [2021-10-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33113416/>. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110888.
- [16] HU J, HU J, LIU X, et al. Effect and safety of cytokine-induced killer (CIK) cell immunotherapy in patients with breast cancer: a meta-analysis[J/OL]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(42): e8310 [2021-10-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29049237/>. DOI: 10.1097/md.00000000000008310.
- [17] 邱育森, 杜薇, 陈娅, 等. 负载肿瘤抗原DC与CIK共培养对裸鼠乳腺癌移植瘤抑制作用观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(21): 1680-1684. DOI:10.16073/j.cnki.cjcp.2014.21.005.
- [18] 郭虎林, 崔晓旭, 冯青青, 等. 不同负载的DC-CIK联合5-FU治疗方案对结肠癌HT-29细胞移植瘤裸鼠的疗效观察[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(12): 1318-1323. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.004.
- [19] DAY R N, DAVIDSON M W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging[J]. Chem Soc Rev, 2009, 38(10): 2887-2921. DOI:10.1039/b901966a.
- [20] STUDWELL A J, KOTTON D N. A shift from cell cultures to creatures: *in vivo* imaging of small animals in experimental regenerative medicine[J]. Mol Ther, 2011, 19(11): 1933-1941. DOI: 10.1038/mt.2011.194.
- [21] MASSOUD T F, GAMBHIR S S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light[J]. Genes Dev, 2003, 17(5): 545-580. DOI:10.1101/gad.1047403.
- [22] MARTELLI C, LO DICO A, DICEGLIE C, et al. Optical imaging probes in oncology[J]. Oncotarget, 2016, 7(30): 48753-48787. DOI: 10.18632/oncotarget.9066.
- [23] 杨丽华, 沈星凯, 符丹, 等. 小动物活体成像技术在肿瘤研究中的应用[J]. 宁波大学学报(理工版), 2013, 26(4): 115-118.
- [24] 徐梦欣, 李一佳, 刘志博. 细胞标记与体内追踪成像: 在动物和人类中应用的最新进展[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(19): 3108-3116. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2077.
- [25] THIERY J, SAFTA T B, ZIANI L, et al. Mechanisms of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis and relationship with the tumor suppressor p53[J]. Crit Rev Immunol, 2015, 35(6): 433-449. DOI: 10.1615/critrevimmunol.2016015691.

[收稿日期] 2021-08-27

[修回日期] 2021-12-20

[本文编辑] 黄静怡