

Lgr5 蛋白激活树突状细胞诱导抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞治疗结肠癌的实验

马刚^{1,2} 杨庆强^{1*} 何兴状³

(1. 西南医科大学第一附属医院胃肠外科 四川 泸州 646000; 2. 广元市第一人民医院普外科, 四川 广元 628017; 3. 广元市第一人民医院病理科 四川 广元 628017)

[摘要] 目的 探讨富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白耦联受体 5 (Lgr5) 蛋白激活树突状细胞 (DCs), 诱导产生 CD8⁺ 细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 进行结肠癌免疫治疗的效果。方法 利用 Lgr5 蛋白诱导 DCs 成熟, 同时检测 DCs 表面标记物和白细胞介素 (IL) -40 与 IL-42 表达量的变化, 随后通过 Lgr5-DC 诱导 Lgr5 抗原特异性 CD8⁺ CTL, 并检测 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 对正常结肠上皮细胞 CCD-18Co 和结肠癌细胞 HT29 的作用, 同时检测干扰素 (IFN) - γ 释放量。然后进一步检测 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 对 BALB/C-nu/nu 小鼠结肠癌的抑制情况, 并通过组织染色观察治疗后肿瘤组织的变化。结果 与 PBS 刺激相比, Lgr5 蛋白刺激能够显著上调 DCs 表面标记物 DC80、DC83、DC86 和 HLA-DR 水平, 依次达到 3.29、3.06、2.90 和 6.93 倍; 同时 Lgr5 蛋白刺激显著促进 IL-42 的释放和显著减少 IL-40 的分泌 ($P < 0.05$)。Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 和 DC-CD8⁺ CTL 均导致少量 CCD-18Co 细胞杀伤 ($P > 0.05$), 而 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 对 HT29 细胞的杀伤率是 DC-CD8⁺ CTL 的 4.40 倍 ($P < 0.05$)。动物实验表明, BALB/C-nu/nu 结肠癌移植鼠经 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 治疗后, 肿瘤体积比显著低于 PBS 组和 DC-CD8⁺ CTL 组, 依次达到 0.25 和 0.24 倍 ($P < 0.05$)。组织染色显示, Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 处理导致明显的肿瘤组织病理学改变, 同时 BAX 表达升高。结论 Lgr5 蛋白促进 DCs 成熟并诱导产生 Lgr5 抗原特异性 CD8⁺ CTL, Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 能够高效的杀伤肿瘤细胞并延迟肿瘤生长。

[关键词] 富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白耦联受体; 树突状细胞; 细胞毒 T 淋巴细胞; 结肠癌; 免疫治疗; 小鼠
[中图分类号] R392.9 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2017.04.010

Experimental immunotherapy study on colon cancer by lgr5 activated dendritic cells to induce antigen-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes

MA Gang^{1,2}, YANG Qing-qiang^{1*}, HE Xing-zhuang³

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. Department of General Surgery, Guangyuan First People's Hospital, Sichuan Guangyuan 628017, China; 3. Department of Pathology, Guangyuan First People's Hospital, Sichuan Guangyuan 628017, China)

[Abstract] **Objective** To observe the immunotherapy effect on colon cancer by leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) activated by dextrepermental basis for colon cancer immunotherapy. **Methods** After dendritic cells (DCs) maturation induced by Lgr5, surface molecules, interleukin (IL) -42, and IL-40 of DCs were detected. Subsequently, Lgr5 antigen specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) was induced by Lgr5-DC. The killing effect and interferon (IFN) - γ of Lgr5-DC-CD8⁺ CTL on normal colonic epithelial cells CCD-18Co and colon cancer cell HT29 were tested. After Lgr5-DC-CD8⁺ CTL treatment, tumor volume in BALB/C-nu/nu mice was detected. The morphology of tumor tissue after treatment was observed by tissue staining. **Results** Compared with PBS, Lgr5 protein stimulation significantly increased surface markers DC80, DC83, DC86 and HLA-DR levels, and up to 3.29, 3.06, 2.90 and 6.93 times ($P < 0.05$) respectively. Lgr5 stimulation significantly stimulated the release of IL-42 and significantly reduced the secretion of IL-40 ($P < 0.05$). DC-CD8⁺ CTL and Lgr5-DC-CD8⁺ CTL. Both resulted in a small amount of CCD-18Co cell killing ($P > 0.05$), but the killing rate of Lgr5-DC-CD8⁺ CTL on HT29 cells was 4.40 times as much as that of DC-CD8⁺ CTL. Tissue staining showed that Lgr5-DC-CD8⁺ CTL treatment resulted in significant pathological changes and BAX expression in tumor tissues. **Conclusion** Lgr5 protein stimulated the maturation of DCs cells that

[收稿日期] 2016-12-01 **[修回日期]** 2016-12-15

[作者简介] 马刚 (1981—), 男 (汉族), 四川省广元市人, 医学学士, 主治医师。

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

E-mail: yangqingqiang121@163.com Tel: (083) 3165421

induced the production of Lgr5 antigen specific CD8⁺ CTL. Lgr5-DC-CD8⁺ CTL can effectively kill tumor cells and delay the growth of tumor.

[Key words] Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5; Dendritic cell; Cytotoxic T lymphocyte; Colon cancer; Immunotherapy; Mouse

结肠癌具有较高的发病率和死亡率,严重威胁了人们的生命健康,由于其早期诊断困难,使得癌症常规治疗(手术、化疗及放疗)难以收到较好的疗效^[1]。免疫治疗能够克服癌症常规治疗的不足,提高癌症治疗效率同时减少了副作用^[2]。然而免疫治疗常常受到靶点的限制,选择合适的肿瘤识别靶点成为了免疫治疗癌症的关键^[3]。富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白耦联受体 5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5, Lgr5) 在正常组织中表达水平有限,而在肿瘤细胞特别是肿瘤干细胞中异常高表达^[4]。Lgr5 特异性高表达为肿瘤免疫治疗提供了理想靶点。

本研究通过 Lgr5 蛋白刺激而获得能够呈递 Lgr5 抗原的成熟树突状细胞(dendritic cells, DCs)细胞,后者进一步刺激 T 淋巴细胞而获得能够识别 Lgr5 蛋白的抗原特异性 CD8⁺ 细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),并探讨了 Lgr5 特异性 CD8⁺ CTL 的抗肿瘤特性,为结肠癌的免疫治疗提供实验数据。

材料和方法

1. 细胞培养

人结肠癌细胞系(HT29 细胞)和人正常结肠细胞系(CCD-48Co 细胞)购于 ATCC 中心,HT29 细胞培养于 McCoy's 5A 培养基(Cellgro)中,同时加入 10% 胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技有限公司);CCD-48Co 细胞培养于 DMEM(高糖)培养基(Cellgro)中,同时加入 10% FBS;待细胞浓度达到 90% 汇合时,进行胰蛋白酶(Qiagen 公司)消化传代培养。

采集健康志愿者新鲜外周血 5ml,室温下在 2000 r/min 条件下离心 20 min,收集位于上层和中间层之间的白色狭窄带,培养于 6 孔培养板中,待贴壁 2 h 后,添加 2ml RPMI1640 培养基(Cellgro),然后加入白细胞介素(IL)-4 (0.5 IU/L)以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 1 IU/L(武汉默沙克生物技术有限公司),在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,培养至第 3 天,加入 Lgr5 抗原(武汉默沙克生物技术有限公司),另 1 组加入 PBS,培养至第 6 天加入肿瘤坏死因子-α 1 IU/L(美国 BD 公司),刺激 DCs 成熟,在第 7~8 天可收获 Lgr5-DC 和 DCs。未贴壁的细胞转至另外 6 孔培养板,加入 RPMI1640

(10% FBS),同时加入 IL-4 (50 μg/L) 和 GM-CSF (100 μg/L) 进行 T 细胞培养。

2. DCs 表型检测

浓度(1×10^9 /L DCs),然后加入小鼠单克隆 CD80 抗体(1:2000)、小鼠单克隆 DC83 抗体(1:3000)、小鼠单克隆 DC86 抗体(1:2500)和小鼠单克隆 HLA-DR(human leukocyte antigen DR)抗体(1:2000)进行标记,之后加入羊抗小鼠 IgG-FITC (1:1500)孵育,最后用 FACS Calibur/Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)进行检测,相关抗体由 Abcam 公司提供,操作严格按照产品说明进行。

3. IL-10 和 IL-12 检测

将 5×10^8 /L DCs 和 Lgr5-DC 细胞分别接种于 6 孔板中,待培养 2 d 后收集细胞上清,相关酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒由美国 BD 公司提供,IL-10 和 IL-12 的吸光度由 Infinite 200 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)测定,并通过标准曲线计算 IL-10 和 IL-12 的浓度,操作流程严格按照说明书进行。

4. CD8⁺ CTL 的体外诱导培养

DCs 与 Lgr5-DC 经 γ 射线(0.25 Gy)照射后制备刺激细胞,按 T:DC(10:1)比例进行培养,同时加入 IL-2 (0.05 IU/L),培养 7 d 后,重复上述操作 3 次。培养 21 d 后,CTL 细胞孵育 CD8 抗体,然后通过磁珠分选试剂盒(美国 BD 公司)筛选 CD8⁺ CTL,相关操作严格按照试剂盒说明书进行。

5. 固相酶联免疫斑点技术检测干扰素-γ

干扰素(interferon, IFN)-γ 抗体[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]预先包被 96 孔板,然后加入 DC-CD8⁺ CTL 和 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 分别和 CCD-48Co 与 HT29 细胞共培养,单纯的 CD8⁺ CTL 作为阴性对照,CD8⁺ CTL 经植物血凝素刺激作为阳性对照,培养 24 h 后进行显色,并计算 IFN-γ 阳性斑点数目。

6. CD8⁺ CTL 肿瘤细胞杀伤效应检测

DC-CD8⁺ CTL 和 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 分别和 CCD-48Co 与 HT29 细胞以 20:1 的比例进行培养,培养 24 h 后,进行 AnnexinV-FITC/PI(日本同仁化学研究所)染色,通过 FACS Calibur/Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测凋亡率,操作严格按照产品说明进行。

7. 建立裸鼠结肠癌模型

BALB/C-nu/nu 裸鼠(4 周)购于广东省医学实验动物中心,实验动物生成许可证号:SCXK(粤)

2014-0035。裸鼠饲养及相关动物实验严格按照广东省医学实验动物中心相关要求进行。将 0.1 ml (1×10^6 个) HT29 细胞接种于裸鼠背部,饲养形成结肠癌荷瘤小鼠。待肿瘤体积长至 100 mm^3 时进行相关实验。

8. CD8^+ CTL 免疫治疗结肠癌荷瘤小鼠

将 48 只结肠癌荷瘤小鼠随机分为: PBS 组、DC- CD8^+ CTL 组以及 Lgr5-DC- CD8^+ CTL 组,每组 16 只; PBS 组尾静脉注射 PBS 100 ml , DC- CD8^+ CTL 组尾静脉注射 DC- CD8^+ CTL (2×10^7 个) 0.1 ml , Lgr5-DC- CD8^+ CTL 组尾静脉注射 Lgr5-DC- CD8^+ CTL (2×10^7 个) 0.1 ml , 各组小鼠每隔 1 周进行 1 次治疗。

9. 肿瘤体积检测

应用游标卡尺定期测量 3 组荷瘤小鼠的肿瘤长短直径,并计算肿瘤体积,肿瘤体积 = $(L \times W^2) / 2$, L 表示肿瘤长直径, W 表示肿瘤短直径。

10. 肿瘤组织 HE 染色

将经不同治疗 22 d 后的荷瘤裸鼠安乐死,收集各组肿瘤组织进行 HE 染色。主要程序依次是固定、脱水、透明、组织包埋、石蜡切片、脱蜡、HE 染

色、脱水、透明、封片,详细程序严格按照 HE 染色程序以及石蜡切片程序进行。

11. 肿瘤组织免疫组织化学染色

将经不同治疗 22 d 后的荷瘤裸鼠安乐死,收集各组肿瘤组织进行免疫组织化学染色。详细程序严格按照免疫组织化学染色程序进行,鼠单克隆 BAX 抗体和生物素耦联的羊抗小鼠 IgG 由杭州华安生物技术有限公司提供。

12. 统计学分析

应用统计学软件 SPSS 21.0 进行相关数据统计学分析,数据采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示,采用方差分析进行比较, $P < 0.05$ 表示差异存在统计学意义。

结 果

1. Lgr5 刺激对 DCs 表面标记物的影响

流式细胞仪检测显示,DCs 经过 Lgr5 刺激后,细胞表面标记物 CD80、DC83、DC86 和 HLA-DR 阳性细胞率显著升高,依次是 PBS 刺激的表面标记物阳性 DCs 的 3.29、3.06、2.90 和 6.93 倍 ($P < 0.05$),说明 Lgr5 的刺激能够促进 DCs 的成熟,见图 1。

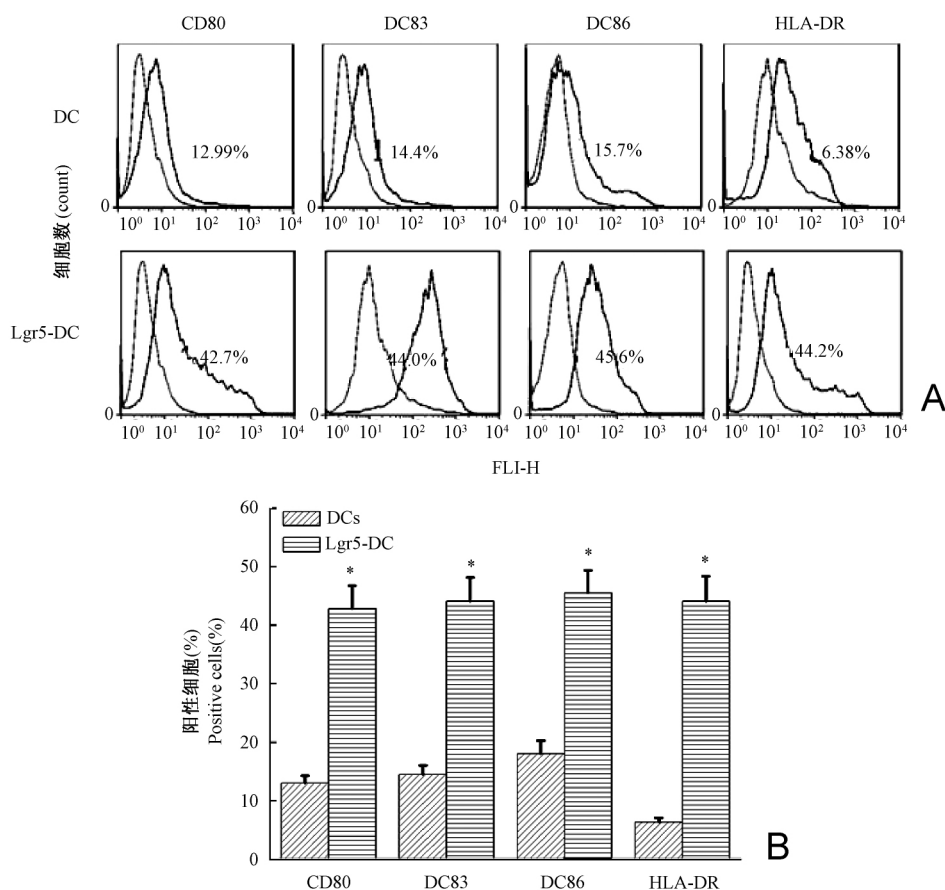


图1 Lgr5 刺激对 DCs 表面标记物 CD80、DC83、DC86 和 HLA-DR 的影响

A. 流式细胞检测 Lgr5 刺激对 DCs 表面表型的影响; B. 统计学分析 DCs 表面表型阳性细胞,与 DCs 组相比, $P < 0.05$

Fig.1 The changes of DCs surface markers CD80, DC83, DC86 and HLA-DR after Lgr5 stimulation

A, The changes of DCs surface markers after Lgr5 stimulation by flow cytometry; B, Statistical analysis of DCs surface phenotype positive cells, compared with DCs group, $P < 0.05$

2. Lgr5 刺激对 DC 释放 IL-10 和 IL-12 的影响

ELISA 检测结果显示, Lgr5-DC 组 IL-10 水平是 DCs 组的 0.66 倍, 比较差异存在统计学意义 ($P < 0.05$); 然而 Lgr5 能够显著促进 DCs 释放 IL-12, Lgr5-DC 组 IL-12 水平是 DCs 组的 1.36 倍, 比较差异存在统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

3. CD8⁺ CTL 与 CCD-18Co 及 HT29 培养后 INF- γ 释放情况

酶联免疫斑点实验检测显示, DC-CD8⁺ CTL 与 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 分别和正常结肠上皮细胞 CCD-18Co 共培养后, INF- γ 的斑点数量相近, 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 然而 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 和结肠癌细胞 HT29 共培养后, INF- γ 的斑点数量显著高于 DC-CD8⁺ CTL 组的斑点数目, 同时其显著高于 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 与 CCD-18Co 共培养的 INF- γ 的斑点数量 ($P < 0.05$), 见图 3。

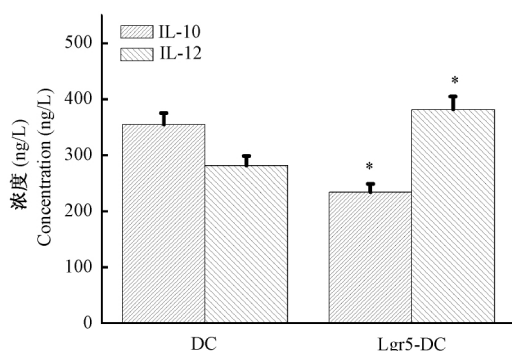


图2 Lgr5 刺激对 DC 释放 IL-10 与 IL-12 的影响
与 DCs 组相比, * $P < 0.05$

Fig. 2 The release of IL-10 and IL-12 on DCs after Lgr5 stimulation
Compared with DCs group, * $P < 0.05$

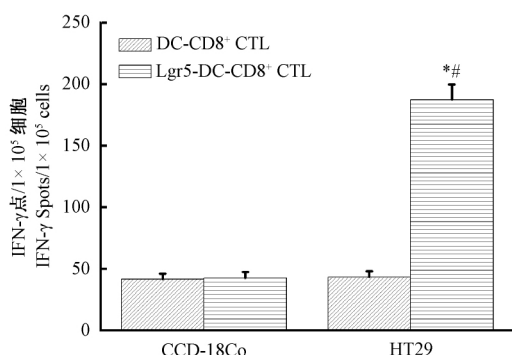


图3 CD8⁺ CTL 与 CCD-18Co 以及 HT29 细胞培养后
INF- γ 释放情况

与 DC-CD8⁺ CTL 共孵育 HT29 比较, * $P < 0.05$; 与
Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 共孵育 CCD-18Co 比较, # $P < 0.05$

Fig. 3 The release of INF- γ after CD8⁺ CTL cultured
with CCD-18Co and HT29 cell

Compared with DC-CD8⁺ CTL co-incubation with HT29,
* $P < 0.05$; Compared with Lgr5-DC-CD8⁺ CTL co-
incubation with HT29, # $P < 0.05$

4. CD8⁺ CTL 诱导细胞凋亡情况

应用 Annexin V-FITC/PI 流式双染方法测定 CD8⁺ CTL 诱导细胞凋亡情况, 发现 DC-CD8⁺ CTL 与 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 诱导正常结肠细胞 CCD-18Co 的细胞凋亡率相近, 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 DC-CD8⁺ CTL 相比, Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 能够显著诱导结肠癌细胞 HT29 凋亡, 其凋亡率增加 4.67 倍, Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 诱导 HT29 的凋亡率是诱导 CCD-18Co 凋亡的 4.40 倍 ($P < 0.05$), 见图 4。

5. CD8⁺ CTL 免疫治疗对 BALB/C-nu/nu 裸鼠结肠癌肿瘤体积影响

治疗前各组 BALB/C-nu/nu 裸鼠肿瘤体积比比较差异不明显 ($P > 0.05$); PBS 处理后 BALB/C-nu/nu

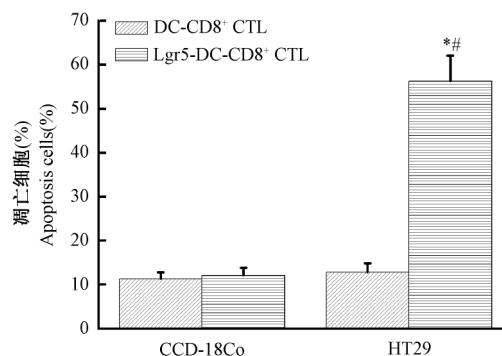


图4 CD8⁺ CTL 诱导细胞凋亡情况

与 DC-CD8⁺ CTL 共孵育 HT29 比较, * $P < 0.05$; 与 Lgr5-DC-CD8⁺
CTL 共孵育 CCD-18Co 比较, # $P < 0.05$

Fig. 4 Apoptosis cell of CCD-18Co and HT29 cell after CD8⁺ CTL
treatment

Compared with DC-CD8⁺ CTL co-incubation with HT29, * $P < 0.05$;
Compared with Lgr5-DC-CD8⁺ CTL co-incubation with HT29, # $P < 0.05$

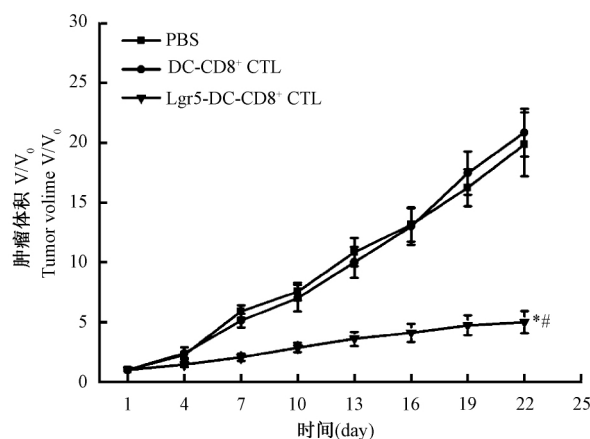


图5 各组 BALB/C-nu/nu 荷瘤小鼠经过不同治疗后肿瘤体积
变化情况

与 PBS 组比较, * $P < 0.05$; 与 DC-CD8⁺ CTL 组比较, # $P < 0.05$

Fig. 5 Tumor volume of BALB/C-nu/nu tumor bearing mice after
different treatment

Compared with the PBS group, * $P < 0.05$; Compared with the
CTL DC-CD8⁺ group, # $P < 0.05$

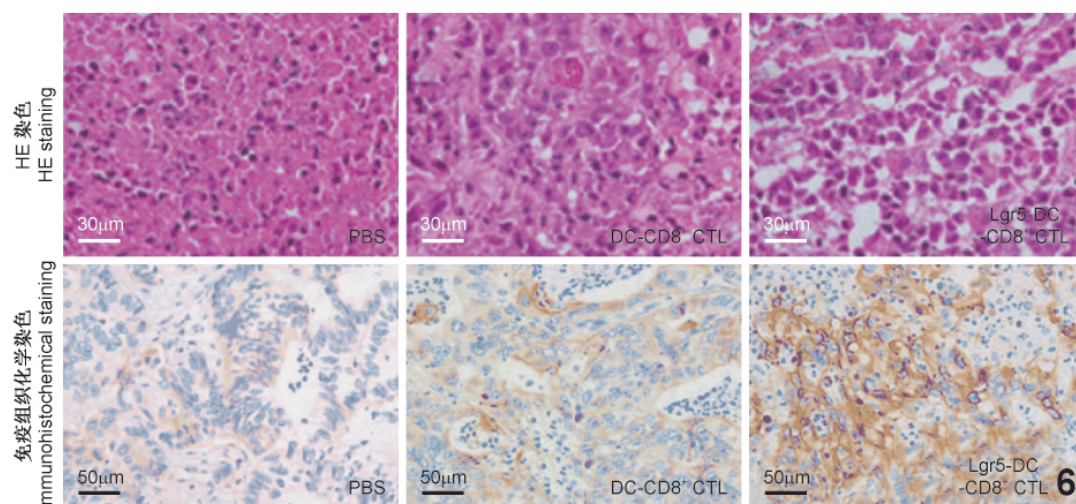


图6 CD8⁺ CTL 治疗后 BALB/C-nu/nu 肿瘤组织 HE 染色 标尺示 30 μm; 免疫组织化学染色 标尺示 50 μm

Fig. 6 BALB/C-nu/nu tumor tissue after CTL CD8⁺ treatment HE staining Bar = 30 μm; Immunohistochemical staining Bar = 50 μm

裸鼠肿瘤体积明显增加达到 19.87 倍, BALB/C-nu/nu 小鼠经 DC-CD8⁺ CTL 处理后, 肿瘤体积明显增加达到 20.86 倍, 两者之间肿瘤体积比相近。BALB/C-nu/nu 荷瘤小鼠经过 Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 处理后, 肿瘤体积缓慢增加, 达到治疗前的 5 倍, 其肿瘤体积比显著低于 PBS 组和 DC-CD8⁺ CTL 组 ($P < 0.05$) (见图 5)。

6. BALB/C-nu/nu 荷瘤小鼠经 CD8⁺ CTL 治疗后肿瘤组织染色

BALB/C-nu/nu 荷瘤小鼠经过 PBS 以及 DC-CD8⁺ CTL 处理后, 肿瘤组织 HE 染色结果显示, 肿瘤细胞排列致密并且核仁明显, 未发现明显的病理学改变, 同时免疫组织化学显示, BAX 表达量很低。Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 处理的肿瘤组织细胞核出现固缩并且细胞间隙增大, 出现明显的水肿和空泡现象, BAX 表达量明显升高 (见图 6)。

讨 论

结肠癌是一种常见的恶性消化道肿瘤, 其死亡率在消化道肿瘤中排列第 3, 由于结肠癌的早期诊断和后期治疗不理想, 其死亡率有逐年增加的趋势^[5]。因手术、化疗及放疗难以收到较好的治疗效果, 寻找合适的结肠癌治疗方案变得尤为重要^[5]。基于肿瘤细胞识别和免疫效应的肿瘤免疫治疗受到了人们的广泛关注。肿瘤免疫治疗主要以提高免疫细胞对肿瘤细胞抗原的识别能力和效应细胞对肿瘤杀伤的敏感性方式, 增强机体的免疫应答, 通过将免疫细胞回输, 与机体固有免疫系统协同达到杀伤肿瘤细胞的目的^[6, 7]。其能够显著杀伤肿瘤细胞, 而减少了对机体的损伤^[8]。寻找理想的靶点是决定免疫细胞识别肿瘤细胞达到治疗癌症的关键。Lgr5 是一种特异性的分子标记物, 在肿瘤组织特别是肿

瘤干细胞中高表达, 与结肠癌干细胞以及结肠癌的发生和发展有着密切的联系, 以 Lgr5 为靶点的肿瘤免疫治疗能够有效地杀伤肿瘤细胞, 特别是肿瘤干细胞, 显著抑制肿瘤的发生与发展, 对肿瘤的免疫治疗具有重要的促进作用^[9, 10]。

本研究通过 Lgr5 蛋白刺激获得能够呈递 Lgr5 抗原的成熟 DCs, 随后将后者刺激 T 淋巴细胞而得到能够特异识别 Lgr5 蛋白的 CTL 细胞, 分离 Lgr5 特异性 CD8⁺ CTL 用于结肠癌免疫治疗。成熟前 DCs 具有很强的抗原识别能力, 成熟后 DCs 识别抗原能力减弱而抗原呈递能力增强, 从而能够呈递抗原并激活 T 淋巴细胞^[11]。Lgr5 蛋白刺激提高了 DCs 表达标记物 CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 水平, CD83 是 DCs 成熟的重要标记分子, 其水平升高说明 Lgr5 蛋白刺激促进了 DCs 的成熟。CD80 和 CD86 水平的升高有利于刺激 T 淋巴细胞活化, 而 HLA-DR 作为主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 类分子可以呈递抗原肽并活化 CD4T 辅助细胞, 后者能够提高 CD8⁺ CTL 的抗肿瘤活性, 促进结肠癌的免疫治疗^[12, 13]。IL-12 介导初始免疫反应和继发免疫反应, 从而触发 Th1 反应, 同时 IL-12 能诱导 T 细胞释放 IFN- γ , 达到杀伤结肠癌细胞的目的。然而 DCs 能够分泌 IL-10, 从而抑制 Th1 反应, 促进了肿瘤细胞的免疫逃避^[14, 15]。Lgr5 蛋白刺激后, DCs 高表达 IL-12, 同时 IL-10 分泌量减少, 说明 Lgr5 蛋白刺激有利于 Th1 反应的进行。Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 肿瘤细胞杀伤实验表明, 其能够有效地杀伤 HT29 结肠癌细胞, 而对正常结肠上皮细胞 CCD-48Co 杀伤较低, Lgr5 触发特异性肿瘤免疫治疗, 减少了对正常细胞的损伤。动物实验研究表明, Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 能够损伤肿瘤细胞, 小鼠肿瘤生长减缓并有减小的趋势, 随着治

疗时间的延长,小鼠肿瘤将得到消除。Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 通过释放 IFN- γ 抑制原癌基因表达,从而抑制肿瘤细胞分裂^[16,17]。Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 释放穿孔素以及颗粒酶,破坏肿瘤细胞膜以及激活半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶信号通路,导致肿瘤细胞溶解死亡^[18~20]。Lgr5 为靶点的肿瘤免疫治疗对结肠癌的治疗具有重要的帮助。Lgr5-DC-CD8⁺ CTL 基础的免疫治疗不仅能够延缓肿瘤生长而且可以联合化疗、放疗等方式彻底消除肿瘤。

综上所述,本研究通过 Lgr5 刺激 DCs 成熟,随后将其刺激 T 淋巴细胞而获得抗原特异性 CD8⁺ CTL 用于结肠癌免疫治疗。Lgr5 刺激后,成熟的 DCs 表面标记物及 IL-12 表达量显著升高,但 IL-10 表达量显著降低; Lgr5-DC 诱导的 Lgr5 特异性 CD8⁺ CTL 具有特异性的肿瘤杀伤能力,显著抑制小鼠肿瘤的发展,对结肠癌的免疫治疗具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Zhang YX, Zhao HJ, Song WG, et al. Effects of TWEAK antisense oligonucleotide on the proliferation and invasion of human colon cancer cell line SW480[J]. Acta Anatomica Sinica, 2014, 45(1): 74-79. (in Chinese)
张延新 赵红军 宋文刚,等. TWEAK 反义寡核苷酸对人结肠癌细胞系 SW480 增殖及侵袭能力的影响[J]. 解剖学报, 2014, 45(1): 74-79.
- [2] Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy[J]. Science, 2015, 348(6230): 69-74.
- [3] Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets[J]. Nat rev Drug Discov, 2015, 14(8): 561-584.
- [4] Sigal M, Rothenberg ME, Logan CY, et al. Helicobacter pylori activates and expands Lgr5(+) stem cells through direct colonization of the gastric glands[J]. Gastroenterology, 2015, 148(7): 1392-1404.
- [5] Ishiguro M, Watanabe T, Kotake K, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum Guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer: comparison with western guidelines[J]. Invest New Drug, 2016, 2(2): 179-190.
- [6] Sanmamed MF, Pastor F, Rodriguez A, et al. Agonists of co-stimulation in cancer immunotherapy directed against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS[J]. Semin Oncol, 2015, 42(4): 640-655.
- [7] Gajewski TF. The next hurdle in cancer immunotherapy: overcoming the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment[J]. Semin Oncol, 2015, 42(4): 663-671.
- [8] Ohaegbulam KC, Assal A, Lazarmolnar E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(1): 24-33.
- [9] Gregorieff A, Liu Y, Inanlou MR, et al. Yap-dependent reprogramming of Lgr5⁺ stem cells drives intestinal regeneration and cancer[J]. Nature, 2015, 526(7575): 715-718.
- [10] Lei ZJ, Wang J, Xiao HL, et al. Lysine-specific demethylase 1 promotes the stemness and chemoresistance of Lgr5(+) liver cancer initiating cells by suppressing negative regulators of β -catenin signaling[J]. Oncogene, 2015, 34(24): 3188-3198.
- [11] Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells[J]. Nat Immunol, 2015, 16(3): 171-198.
- [12] Grujic M, Bartholdy C, Remy M, et al. The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8⁺ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus[J]. CR Biol, 2015, 338(5): 335-342.
- [13] Alfirevic A, Vilar FJ, Alsou M, et al. TNF, LTA, HSPA1L and HLA-DR gene polymorphisms in HIV-positive patients with hypersensitivity to cotrimoxazole[J]. Pharmacogenomics, 2016, 10(4): 531-540.
- [14] Teng MWL, Bowman EP, McElwee JJ, et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases[J]. Nat Med, 2015, 21(7): 719-729.
- [15] Chakrabarty P, Li A, Ceballos-piaz C, et al. IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior[J]. Neuron, 2015, 85(3): 519-533.
- [16] de Groen RA, Boltjes A, Hou J, et al. IFN- λ -mediated IL-12 production in macrophages induces IFN- γ production in human NK cells[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(1): 250-259.
- [17] Yin YX, Xu YQ, Li HL, et al. Expression and significance of IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ in serum and colon tissue in the rat models of ulcerative colitis with spleen and kidney yang deficiency[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2015, 23(2): 139-142. (in Chinese)
殷银霞, 许雅清, 李海龙, 等. IL-1、IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 在脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠血清及组织中的表达[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 139-142.
- [18] Bai L, Takeshima SN, Isogai E, et al. Novel CD8(+) cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle[J]. Vaccine, 2015, 33(51): 7194-7202.
- [19] Noble A, Mehta H, Lovell A, et al. IL-12 and IL-4 activate a CD39-dependent intrinsic peripheral tolerance mechanism in CD8⁺ T cells[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(6): 1438-1448.
- [20] Zhang RQ, Chen ZhL, Luo QH. Enhancing effect of astragalus polysaccharide on the immune function incytoxan-induced immunosuppressed mice[J]. Acta Laboratorium Amomalis Scientia Sinica, 2015, 23(4): 389-394. (in Chinese)
张芮琪, 陈正礼, 罗启慧. 黄芪多糖干预环磷酰胺所致免疫抑制小鼠的免疫功能[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 389-394.

(编辑 安晓意)