

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.11.001

疟原虫遗传减毒孢子诱导抗肺癌免疫的初步研究^{*}

邓旭锋¹, 郑 鸿², 周 东¹, 刘权兴¹, 丁 艳², 徐文岳²▲, 戴纪刚¹△

(1. 第三军医大学新桥医院胸外科, 重庆 400037; 2. 第三军医大学病原生物教研室, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 初步探讨疟原虫遗传减毒孢子能否诱导抗肺癌免疫作用, 为肺癌疫苗的研究提供新的思路。**方法** 实验分为实验组与对照组, 实验组尾静脉注射遗传减毒孢子进行免疫 C57BL/6J 小鼠, 对照组注射磷酸缓冲盐溶液 (PBS); 14 d 后用 Lewis 肺癌细胞 (LLC) 皮下接种, 待肿瘤长出后用游标卡尺测量肿瘤大小; 肿瘤组织免疫组化对比肿瘤增殖、凋亡、血管生成情况。**结果** 两组小鼠的肿瘤生长有差异, 疟原虫遗传减毒孢子能抑制肿瘤的增殖、血管生成、促进凋亡。**结论** 遗传减毒孢子可能是一种新的治疗策略或能成为一种有效的载体介导肺癌的免疫治疗。

[关键词] 肺肿瘤; 疟原虫; 遗传减毒孢子; Lewis 肺癌细胞

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)11-1441-03

Antitumor effect of malaria genetically attenuated sporozoites infection in a murine lewis lung cancer model^{*}

Deng Xufeng¹, Zheng Hong², Zhou Dong¹, Liu Quanxing¹, Ding Yan², Xu Wenye²▲, Dai Jigang¹△

(1. Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

2. Department of Pathogenic Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To learn whether plasmodium genetic attenuated sporozoites (GAS) can induce immunity against lung cancer, in order to provide new ideas for the study of lung cancer vaccine. **Methods** Ther study was divided into two groups respectively, experimental group received intravenous injection of genetically attenuated sporozoites to immunize C57BL/6J mice and control group injection of phosphate buffer solution (PBS); after 14 days, we subcutaneously inoculated lewis lung cancer (LLC) cells, calipers was used to measure tumor size. Immunohistochemical staining was detected tumor proliferation, apoptosis, and angiogenesis. **Results** There was statistically significant in tumor size. Immunohistochemical staining revealed that attenuated sporozoites infection inhibited LLC eslls proliferation, angiogenesis, apoptosis. **Conclusion** The malaria attenuated sporozoites may provide a novel strategy or therapeutic vaccine vector for anti-lung cancer immune-based therapy.

[Key words] lung neoplasms; malaria; genetically attenuated sporozoites; lewis lung cancer

肺癌仍然是癌症相关死亡的首要原因, 在 2012 年全球肺癌死亡人数占癌症相关死亡人数的 19.4%^[1]。肺癌的治疗方法主要有手术、化疗、放疗等, 但近年来兴起的免疫疗法则主要通过增强机体的免疫应答抗肿瘤, 具有敏感性、特异性强特点, 被认为最有希望的肺癌治疗策略^[2-4]。尽管目前的治疗方法已经得到了提高, 但是肺癌的预后还是不理想, 所以探索新的治疗方法是非常有必要的。大量的研究证实, CD8⁺T 淋巴细胞免疫应答机体的免疫系统监视和抑制肿瘤的最主要效应机制^[5-6]。与抗肿瘤和抗病毒感染相一致, 机体也是通过诱导 T 淋巴细胞免疫应答清除胞内寄生的原虫。另外, 有些抗寄生虫的药物也具有抗肿瘤作用, 提示抗肿瘤的研究有可能从抗寄生虫研究中得到启发。目前已有文献证实了寄生虫抗肿瘤^[7-10]的研究。

遗传减毒孢子 *fabb/f-/-* 265BY 是一种经遗传操纵方式特异敲除疟原虫肝期发育的必要基因 *fabb/f*, 得到能入侵肝实质细胞, 但发育停滞在晚期的子孢子^[11]。遗传减毒孢子能诱导机体产生强烈 CD8⁺T 淋巴细胞反应, 有效地抵御孢子的感染和清除感染肝细胞的疟原虫。红内期疟原虫对肺肿瘤的生长存在着一定的抑制作用^[12], 此外在对弓形虫及锥虫的抗肿瘤研究中发现这类寄生虫可能与肿瘤存在着交叉抗原^[13], 而寄生虫的感染诱导的免疫应答也可能对肿瘤产生非特异性杀伤。因此本研究意在探讨遗传减毒孢子 *fabb/*

f-/- 265BY 的免疫能否诱导小鼠的抗肿瘤免疫作用。

1 材料与方法

1.1 小鼠及虫株 C57BL/6J 小鼠购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心, LLC 细胞株购于上海中科院细胞库, 约氏疟原虫 *fabb/f-/-* 265BY 株的遗传减毒孢子由第三军医大学病原生物学教研室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 遗传减毒孢子免疫小鼠 20 只 C57BL/6J 小鼠分为实验组与对照组, 将实验室提供的遗传减毒孢子稀释为每毫升 150 000 条的浓度, 实验组小鼠尾静脉注射上述浓度的遗传减毒孢子每只 200 μ L, 理论上使每只小鼠被 30 000 条遗传减毒孢子免疫; 对照组用相同的方法尾静脉注射 PBS 溶液 200 μ L/只。为了验证遗传减毒孢子是否减毒成功, 实验组小鼠每隔 2 天尾静脉血涂片观察, 记录原虫血症。实验重复 3 次。

1.2.2 流式监测外周血 CD8⁺T 细胞 两组小鼠从免疫开始每隔 2 天眼球取血做流式细胞学检测, 每组用去 4 只小鼠。取 500 μ L 外周血加入到含有 1 mL PBS 的 EP 管中, 12 000 r/min 离心 10 s, 去上清液。沉淀加入 1 mL 红细胞裂解液重悬, 冰上作用 2 min 后加入到盛有 2 mL PBS 的 5 mL EP 管中 1 600 r/min 离心 5 min, 用 100 μ L FACS 流式洗液重悬 (收集 PBMC, 计数板上计数细胞数量需要达到 1×10^6 个)。加入 1.25 μ L

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172238, 81472188)。 作者简介: 邓旭锋 (1988—), 硕士, 主要从事抗肺癌基础研究。

▲ 通讯作者, E-mail: xuwenyue@gmail.com。 △ 通讯作者, E-mail: 691057831@qq.com。

(0.25 $\mu\text{g}/\text{test}$ anti-mouseCD8a PreCP-Cy5.5) 和 2 μL (1 $\mu\text{g}/\text{test}$ anti-mouseCD11a FITC M/17/4)混匀,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 35 min。加入 1 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ FACS 流式洗液 1 600 r/min 离心 5 min 弃上清液,加入 200 μL 的 FACS 流式缓冲液重悬沉淀,进行 FACS 检测。

1.2.3 LLC 的培养及接种 取出冻存细胞,快速在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中解冻。超净台内将其转移到 10 mL 的玻璃离心管中,加入 3 mL 含血清的 DMEM,轻柔吹打混匀,1 000 r/min 离心 5 min 洗涤 1 次,弃上清液。加入 1 mL 培养基重悬,转移到培养瓶,放入细胞培养箱内。待细胞铺满培养瓶底部,吸去培养基,加入 3 mL PBS 轻轻摇动进行洗涤,然后吸去 PBS,加入 3 mL 胰酶进行消化。当瓶底出现毛玻璃样结构时,吸去胰酶液,加入 PBS,轻柔吹打成单个细胞后,显微镜下计数板计数。将细胞浓度调整为 $5\times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,分别以每只 200 μL 的计量皮下接种实验组与对照组小鼠右侧腹股沟。

1.2.4 肿瘤大小测量 接种 LLC 细胞后每天观察每只小鼠皮下成瘤情况。发现肿瘤每隔 2 天用游标卡尺测量肿瘤的最大直径 a 及最短横径 b(单位为 mm),用公式 $a\times b^2/2$ 计算肿瘤体积。

1.2.5 组化检测凋亡 用 10 mL 4% 的多聚甲醛固定小鼠肿瘤标本,送第三军医大学新桥医院中心实验室做石蜡切片。Ki-67、CD31、Tunel 凋亡检测的具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理,计量资料 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验、log-rank test、非参数检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血涂片检查 疟原虫遗传减毒孢子免疫小鼠是安全可靠的。见图 1、2。

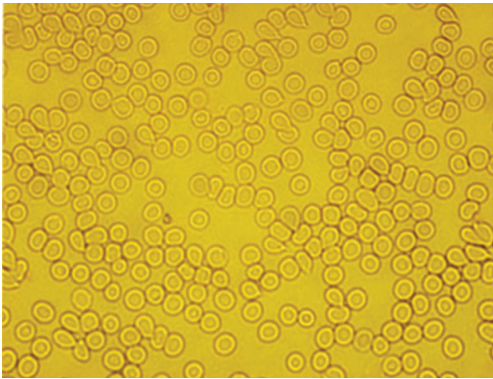


图 1 小鼠尾静脉血涂片

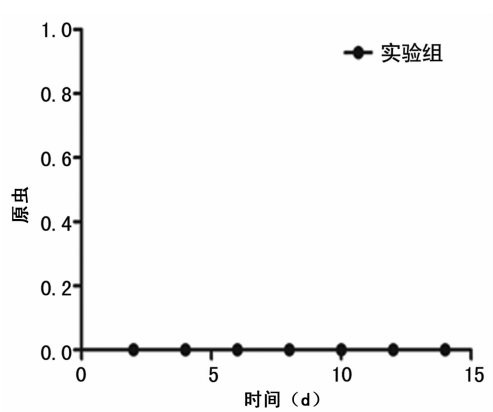


图 2 免疫后每隔 2 天记录的原虫血症

2.2 肿瘤体积、生存曲线 皮下接种第 7 天发现对照组小鼠出现肿瘤,第 11 天实验组小鼠出现肿瘤,两组小鼠的肿瘤体积在第 15、17、19、21、23 天差异有统计学意义($P=0.020,0.006,0.004,0.010,0.050$),见图 3。第 35 天对照组小鼠出现死亡,第 60 天 6 只小鼠全部死亡;而实验组小鼠第 60 天死亡 2 只存活 4 只,两组小鼠的生存时间有差异($P=0.041$),见图 4。小鼠的肿瘤称质量发现有统计学差异($P=0.001$),见图 5。

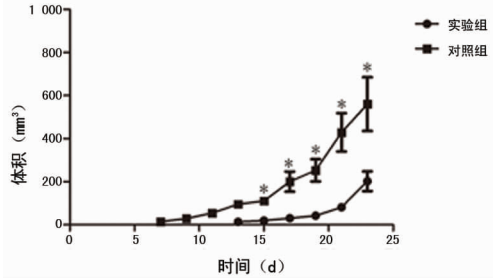


图 3 小鼠肿瘤体积生长情况

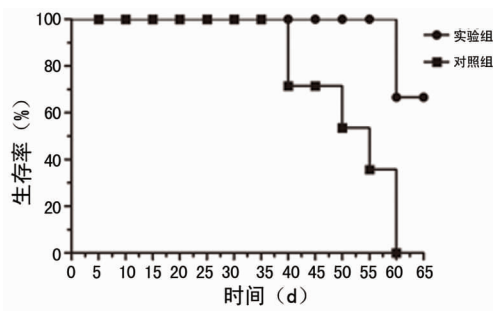


图 4 生存曲线

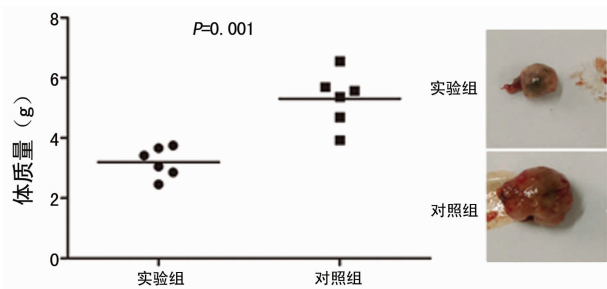


图 5 小鼠肿瘤质量

2.3 流式检测外周血 CD8⁺T 实验组 CD8⁺T 淋巴细胞为 0.640 ± 0.170 多于对照组的 0.289 ± 0.150 ($P=0.004$)。见图 6。

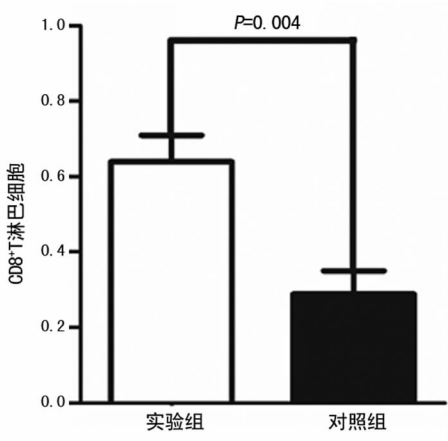


图 6 流式检测外周血

2.4 肿瘤组织免疫组化 本研究对实验组和对照组小鼠皮下肿瘤组织的凋亡情况 & 血管生成进行了监测。Tunel 染色电镜下发现染色质浓缩、边缘化,核膜裂解,染色质分割成块状着色比对照组深;Ki-67 提示对照组染色较实验组深,说明对照组细胞增殖比实验组强;CD31 显示对照组有较多的血管生成。见图 7。

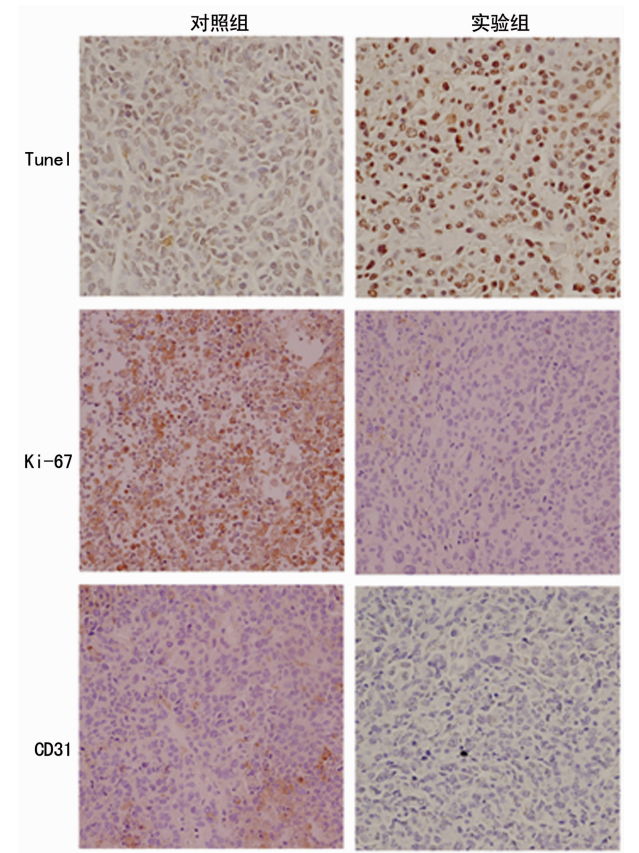


图 7 肿瘤组织免疫组化(×200)

3 讨 论

疟疾是世界上危害最为严重的三大传染病之一,其病原体是疟原虫。疟原虫是由按蚊叮咬传播的,其生活史包括在蚊体内的发育(蚊期)及在人体肝细胞内的发育(红外期)和在红细胞内的发育(红内期)。遗传减毒孢子是一种经遗传操纵特异敲除疟原虫肝期发育成熟的必要基因的子孢子^[11],具备特异入侵肝细胞的能力,但不能在肝细胞内进一步发育。遗传减毒孢子免疫后,能在入侵肝细胞的为数非常少,但却诱导肝脏产生持久、强烈的抗孢子表面主要蛋白环孢子蛋白细胞反应,能有效地抵御孢子的感染和清除感染肝细胞的疟原虫^[14];且遗传减毒孢子不会引起疟原虫的潜在感染,安全性好。

肿瘤会干预人体的免疫功能和妨碍其发展^[15]。但文献报道寄生虫感染可以抑制肿瘤生长已经被很好地证实了^[16]。在这个研究中,作者想验证用遗传减毒孢子免疫后,再皮下接种 LLC 这个模型是否可以抗肿瘤。结果发现疟原虫遗传减毒孢子可以抑制 LLC 的生长,延长小鼠的生存率。免疫组化进一步分析肿瘤组织来自用遗传减毒孢子免疫组小鼠提示肿瘤组织的血管生成受到抑制、细胞增殖数量是减少、细胞凋亡比例增加。另外疟原虫遗传减毒孢子免疫的小鼠外周血 CD8⁺ T 细胞比例明显增高。这说明疟原虫遗传减毒孢子诱导免疫组小鼠的适应性免疫,从而诱导抗肿瘤效果。

肺癌是重要的引起癌症相关死亡的肿瘤。免疫治疗是近年来兴起的治疗肿瘤的方法,被认为是一种有效治疗肺癌的新的策略。免疫治疗就是用特异的或者非特异的免疫原刺激宿主以达到放大宿主低下的免疫力从而杀伤肿瘤细胞。传统免疫辅助疗法,如卡介苗(BCG)、白喉毒素等可以诱导大量免疫炎症细胞,有效治疗一些肿瘤^[17]。然而诱导的免疫反应是弱的、短暂的、不会形成免疫记忆。因此,非特异免疫治疗的优点在肺癌的治疗中是不清楚的,无论是在临床前还是临床中。遗传减毒孢子诱导大量的 CD8⁺ T 细胞抗肿瘤细胞。很明显,遗传减毒孢子不仅诱导一个非特异性的免疫,而且还能诱导一个肿瘤特异性的免疫应答。另外遗传减毒孢子还能产生有效的、长久的系统抗肿瘤免疫。

遗传减毒孢子免疫后可以激发宿主的免疫系统,诱导淋巴细胞的多克隆活化、大量增殖、分化,通过接触寄生虫相关抗原或者宿主自身释放的抗原在免疫遗传减毒孢子后^[18]。或许就是通过这样的机制加强了宿主的免疫监视从而抗肺癌作用。

此研究有两个优点,一是遗传减毒孢子虽然具备特异入侵肝细胞的能力,但不能在肝细胞内进一步发育,不会导致小鼠出现原虫血症。二是由于敲除约氏疟原虫 By265 株的 Fabb/f 基因,所以疟原虫肝期孢子的发育就会停止在晚期,此期的孢子能诱导机体产生大量的 CD8⁺ T 细胞。作者报道疟原虫遗传减毒孢子抑制 LLC 细胞生长通过诱导机体的适应性免疫反应,主要是想提供一个可为有效肺癌亚单位疫苗的设计新思路。

已经有许多关于寄生虫抗肿瘤在人或者动物模型中的科学证据,也有证据表明寄生虫抗肿瘤效应是其增强了宿主免疫力。因此,寄生虫抗原或许可以作为肿瘤免疫疗法的候选者在将来的研究中。尽管如此,寄生虫与肿瘤的关系还是存在争议。但是相信寄生虫的研究将会成为一个新的领域在以后的肿瘤研究中。在接下来的研究中作者将重点研究遗传减毒孢子抗肿瘤的机制。

参考文献

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):E359-386.

[2] Gridelli C, Rossi A, Maione P, et al. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: a renewed anti-cancer strategy[J]. Oncologist, 2009, 14(9):909-920.

[3] Kakimi K, Nakajima J, Wada H. Active specific immunotherapy and cell-transfer therapy for the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer J Iaslc, 2009, 65(1):1-8.

[4] Kelly RJ, Gulley JL, Giaccone G. Targeting the immune system in non-small-cell lung cancer: bridging the gap between promising concept and therapeutic reality[J]. Clin Lung Cancer, 2010, 11(4):228-237.

[5] Senovilla L, Vitale I, Martins I, et al. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy[J]. Science, 2012, 337(6102):1678-1684.

[6] Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent(下转第 1447 页)

- (16):7093-7104.
- [14] Hader C, Marlier A, Cantley L. Mesenchymal-epithelial transition in epithelial response to injury: the role of Foxc2[J]. *Oncogene*, 2010, 29(7):1031-1040.
 - [15] Imai K, Itoh F, Hinoda Y. Regulation of integrin function in the metastasis of colorectal cancer[J]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 1998, 99(7):415-418.
 - [16] Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(6):1688-1694.
 - [17] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6):442-454.
 - [18] Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology[J]. *Pathology*, 2007, 39(3):305-318.
 - [19] Micalizzi DS, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer[J]. *Future Oncol*, 2009, 5(8):1129-1143.
 - [20] Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism[J]. *Dev Biol*, 2002, 250(1):1-23.
 - [21] Seo S, Fujita H, Nakano A, et al. The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development[J]. *Dev Biol*, 2006, 294(2):458-470.
 - [22] Hayashi H, Sano H, Seo S, et al. The Foxc2 transcription factor regulates angiogenesis via induction of integrin beta3 expression[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(35):23791-23800.
 - [23] Hayashi H, Kume T. Forkhead transcription factors regulate expression of the chemokine receptor CXCR4 in endothelial cells and CXCL12-induced cell migration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(3):584-589.
 - [24] Li D, Yan D, Liu W, et al. Foxc2 overexpression enhances benefit of endothelial progenitor cells for inhibiting neointimal formation by promoting CXCR4-dependent homing[J]. *J Vasc Surg*, 2011, 53(6):1668-1678.
 - [25] Watanabe A, Suzuki H, Yokobori T, et al. Forkhead box protein C2 contributes to invasion and metastasis of extrahepatic cholangiocarcinoma, resulting in a poor prognosis[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(11):1427-1432.
 - [26] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. *Cell*, 2008, 133(4):704-715.
 - [27] Hollier BG, Tinnirello AA, Werden SJ, et al. FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6):1981-1992.

(收稿日期:2015-10-11 修回日期:2015-12-20)

(上接第 1443 页)

- mechanism of cancer immunoediting[J]. *Nature*, 2012, 482(7385):400-404.
- [7] Kallinikova VD, Borisova EN, Pakhorukova LV, et al. Immunization against Trypanosoma cruzi and tumor growth in mice[J]. *Med Parazitol (Mosk)*, 2006, 30(4):9-12.
 - [8] Darani HY, Shirzad H, Mansoori F, et al. Effects of Toxoplasma gondii and Toxocara canis antigens on WEHI-164 fibrosarcoma growth in a mouse model[J]. *Korean J Parasitol*, 2009, 47(2):175-177.
 - [9] Miyahara K, Yokoo N, Sakurai H, et al. Antitumor activity of Toxoplasma lysate antigen against methylcholanthrene-induced tumor-bearing rats[J]. *J Vet Med Sci*, 1992, 54(2):221-228.
 - [10] Chen L, He Z, Qin L, et al. Antitumor effect of malaria parasite infection in a murine Lewis lung cancer model through induction of innate and adaptive immunity[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24407.
 - [11] Vaughan AM, Wang R, Kappe SH. Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria[J]. *Hum Vaccin*, 2010, 6(1):107-113.
 - [12] Chen L, He Z, Qin L, et al. Antitumor effect of malaria parasite infection in a murine Lewis lung cancer model through induction of innate and adaptive immunity[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24407.
 - [13] Zenina AV, Kravtsov EG, Tsetsegsaikhan B, et al. The study of immunological component in antitumor effect of Trypanosoma cruzi[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2008, 145(3):352-354.
 - [14] Seder RA, Chang LJ, Enama ME, et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine[J]. *Science*, 2013, 341(6152):1359-1365.
 - [15] Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses[J]. *Science*, 2004, 305(5681):200-205.
 - [16] Hibbs JJ, Lambert LJ, Remington JS. Resistance to murine tumors conferred by chronic infection with intracellular protozoa, Toxoplasma gondii and Besnoitia jellisoni[J]. *J Infect Dis*, 1971, 124(6):587-592.
 - [17] Van den Heuvel MM, Burgers SA, van Zandwijk N. Immunotherapy in non-small-cell lung carcinoma: from inflammation to vaccination[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(2):99-105.
 - [18] Cockburn IA, Zavala F. T cell memory in malaria[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(4):424-429.

(收稿日期:2015-10-28 修回日期:2016-01-03)