

CpG ODN联合肿瘤抗原致敏的树突状细胞疫苗抑制和预防小鼠黑色素瘤的研究

曾佳昕^{1,2#}, 张文渊^{2#}, 刘二刚^{3*}, 刘凌云⁴, 黄永焯^{2,3}, 王慧媛^{2*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 中国科学院药物创新研究院中山研究院, 广东 中山 528437; 4. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006)

摘要: 探讨非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (CpG) 的脱氧寡核苷酸 (oligodeoxynucleotide, ODN) 联合肿瘤抗原致敏树突状细胞 (DC) 治疗和预防黑色素瘤的作用。首先从小鼠骨髓中分离得到骨髓来源的树突状细胞 (BMDC), 并将小鼠黑色素瘤 B16 细胞来源的全抗原与 DC 共孵育, 采用全硫代修饰的 CpG ODN 作 DC 免疫刺激剂, 制备 DC 疫苗。通过测定 T 淋巴细胞增殖和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 对靶细胞 B16 的杀伤作用来评价该疫苗的体外免疫活性。将疫苗经小鼠腹腔注射, 观察其治疗和预防小鼠黑色素瘤的效果。所有动物实验均在中国科学院上海药物研究所实验动物管理委员会 (IACUC) 的指导和标准下进行。结果显示, CpG ODN 和肿瘤抗原联用致敏的 DC 疫苗能够促进 T 淋巴细胞增殖, 并提高活化的 T 淋巴细胞对靶细胞 B16 的杀伤活性。体内实验表明, 无论是治疗实验还是预防实验, DC 疫苗组的平均瘤重和瘤体积均低于 PBS 对照组。实验结果证明基于 CpG ODN 和黑色素瘤肿瘤抗原制备的 DC 疫苗对肿瘤具有较好的抑制作用, 为恶性黑色素瘤治疗提供了一个潜在的方案。

关键词: 树突状细胞; 肿瘤疫苗; CpG 寡脱氧核苷酸; 黑色素瘤; 免疫治疗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0385-07

Effect of DC vaccine sensitized with CpG ODN combined with tumor antigen on murine melanoma

ZENG Jia-xin^{1,2#}, ZHANG Wen-yuan^{2#}, LIU Er-gang^{3*}, LIU Ling-yun⁴,
HUANG Yong-zhuo^{2,3}, WANG Hui-yuan^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. Zhongshan Branch, the Institute of Drug Research and Development, Chinese Academy of Sciences, Zhongshan 528437, China; 4. The Research Center of Basic Integrative Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The potential application of dendritic cells (DC) sensitized with cytosine-phosphoric acid-guanine (CpG) oligodeoxynucleotide (ODN) and tumor antigen as a vaccine against murine melanoma was investigated with freshly isolated mouse bone marrow-derived dendritic cells. For the DC vaccine preparation, DC were sensitized with the B16 tumor antigen and CpG ODN was used to promote further maturation of the DC. The immunogenic activity of the vaccine was evaluated *in vitro* by determining the proliferation of T lymphocytes and the killing effect of cytotoxic T lymphocytes (CTL) on B16 tumor cells. The DC vaccine was injected intraperitoneally

收稿日期: 2021-05-18; 修回日期: 2021-07-02.

基金项目: 重点研发计划政府间国际科技创新合作/港澳台科技创新合作重点专项项目 (2021YFE0103100); 广州市科技计划项目 (201707010319); 上海市科委一带一路项目 (18430740800).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 13501639275, E-mail: liuergang@zidd.ac.cn;

Tel: 13661835307, E-mail: wanghuiyuan@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0760

and tumor inhibition in mice bearing B16 xenografts was examined. All mice were cared for under an approved SIMM Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) protocol. *In vitro*, this DC vaccine promoted the proliferation of T lymphocytes and showed a potent killing effect on the target B16 cells. *In vivo* experiments showed that after treatment or pre-immunization both the tumor volume and weight were significantly decreased. The DC vaccine with CpG ODN and tumor antigen exhibited an inhibitory effect against melanoma, providing a potential method for melanoma cancer treatment.

Key words: dendritic cell; tumor vaccine; CpG oligodeoxynucleotide; melanoma; immunotherapy

肿瘤与免疫功能密切相关,免疫系统的抑制促进了肿瘤的进展^[1]。近年来,肿瘤的免疫治疗进展很快,已通过各种手段激活免疫系统来产生持久的杀伤肿瘤细胞的免疫效应^[2]。基于树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的疫苗在肿瘤治疗中显示出较好的前景^[3],2010年自体前列腺癌疫苗 Sipuleucel-T (Provenge) 获FDA批准上市^[4]。DC是起源于骨髓造血祖细胞或单核细胞分化而成的专职抗原提呈细胞 (APCs),起到抗原呈递和介导T细胞活化的功能,能够激活免疫,杀伤肿瘤细胞。然而,与正常组织相比,肿瘤部位浸润的DC明显减少,且存在不同程度的功能缺陷,无法有效提呈抗原、激发细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 识别和杀伤肿瘤细胞,导致免疫耐受^[5]。

由于DC的成熟度与功能直接相关,因此DC的成熟和活化是机体抗肿瘤免疫中的重要环节。以肿瘤抗原蛋白、肿瘤抗原肽、肿瘤细胞裂解物或者凋亡的肿瘤细胞刺激DC,均能使DC激活,并且在体内展现较强的抗肿瘤免疫应答^[6,7]。

黑色素瘤具有强免疫原性,因此免疫治疗在黑色素瘤的治疗中有较多建树,目前常见的针对黑色素瘤的免疫治疗方法是以免疫检查点抑制剂为主的抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4) 抗体和程序性死亡受体1 (PD-1) 抗体。然而临床试验发现,PD-1单抗在中国黑色素瘤患者中疗效低于西方人群且容易出现耐药。尤其是针对肢端、黏膜来源的黑色素瘤患者,有效率更低。因此需要有新药物、新技术的发展。肿瘤患者的差异性是导致免疫疗法难以进行广泛治疗的原因之一。运用肿瘤患者自身肿瘤组织的抗原,激活DC形成的是针对患者个人的定制型疫苗,可以拥有患者癌细胞所携带的几乎所有的抗原信息,能提呈多样的肿瘤抗原,大大增强免疫系统识别肿瘤细胞的能力。

此外,含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸 (oligodeoxynucleotide, ODN) 可以被 Toll 样受体 9 (TLR9) 识别并触发机体防御机制^[8]。CpG ODN 作为免疫增强剂不仅能促进促炎性辅助性 T 细胞 (Th) 分群 1 (Th1) 细胞因子的产生,还能促进 DC 等抗原提呈细胞的成熟和活化,而且可以进一步增强肿瘤疫苗的功能^[9,10]。

本研究采用黑色素瘤细胞来源的全抗原来刺激骨髓来源树突状细胞 (bone marrow-derived dendritic cells, BMDC), 并联合 CpG ODN 作为 DC 的成熟刺激信号,体外诱导 DC 成熟,制备 DC 疫苗。通过体内外实验,探讨 DC 疫苗治疗和预防小鼠黑色素瘤的作用,为实现黑色素瘤 DC 疫苗的应用提供实验依据。

材料与方法

细胞株及实验动物 B16 (小鼠黑色素瘤细胞株) 购于中国科学院细胞库; C57BL/6 小鼠, 雄性, 4~5 周龄, 体重 20 ± 2 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物实验操作均遵循中国科学院上海药物研究所实验动物管理委员会 (IACUC) 的规范和准则。实验动物使用许可证号: SYXK (沪) 2020-0042。

主要试剂 CpG-ODN 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列是 CpG21798: 5'-T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G-3', 其中 (*) 代表硫代磷酸酯键连接, (-) 代表磷酸二酯键连接^[11]; 重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子 (rmGM-CSF) 和白介素-4 (rmIL-4) 购于 Sigma-Aldrich 公司; PE 标记的大鼠抗小鼠 CD11c 单克隆抗体、大鼠抗小鼠 CD86 单克隆抗体购于 BD Pharmingen 公司。

BMDC 的获取和培养 按常规操作, 安乐死小鼠后, 无菌操作分离股骨和胫骨, 将骨两端剪去, 用注射器吸取无血清的培养基将骨髓冲出, 用移液枪吹打均匀, 然后用 200 目滤网过滤, $300 \times g$ 离心 5 min, 收集细胞, 再用红细胞裂解液裂解后重悬, $300 \times g$ 离心两次去上清, 调节细胞浓度为每毫升 1×10^6 个, 置于新鲜 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ GM-CSF 和 $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-4) 中培养。于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次。

T 淋巴细胞的获取 取小鼠脾脏置于筛网中, 反复研磨脾脏, 用培养基充分吹下细胞至皿中。 $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清。红细胞裂解液裂解后重悬, $300 \times g$ 离心两次去上清。按照尼龙毛柱法进行 T 细胞洗脱: PBS 平衡尼龙毛柱子, 经过高压灭菌后垂直固定于生物安全柜内; 打开夹子, 调节流速为 $3 \sim 4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 先

后加入 3 倍体积的无血清培养基和 3 倍体积的有血清培养基平衡柱子; 随后用培养基 4 mL 重悬细胞 (每毫升 5×10^8 个), 样品加入后, 再加少量培养液, 然后关闭弹簧夹, 在培养箱内 37°C 孵育 1 h; 取出柱子, 置于生物安全柜内, 加入适当体积经 37°C 预热的培养基, 打开弹簧夹控制流速为 $3 \sim 4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 流出约 5 mL 之后, 流出的培养液不再透明, 此时流出液含有 T 细胞, 收集这部分培养基。流式细胞仪鉴定后备用。

BMDC 疫苗的制备 如图 1A, 首先制备 B16 肿瘤细胞冻融粗提全抗原: 将处于对数生长期的 B16 小鼠黑色素瘤细胞消化, 计数并收集到离心管中, 在水浴 (37°C) 和液氮中反复冻融 5 个循环, 获得具有全抗原的 B16 肿瘤细胞组分, 在 -80°C 保存。随后, 收获培养至第 7 天的未成熟的 BMDC 细胞, 调整浓度为每毫升 1×10^6 个, 每孔按 BMDC 与抗原细胞的比例 1:10 加入 B16 肿瘤细胞冻融抗原 (计数按冻融前的细胞数量计数), 重悬于 DC 完全培养基, 在培养箱中继续培养 48 h。最后加入 CpG ODN 使其终浓度为 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续培养 48 h 后收获诱导成熟的 BMDC 细胞, 即得 BMDC 疫苗。收集 BMDC 细胞, 常规制样, 加入 1:100 稀释的荧光标记相应单抗, 标记 30 min (冰浴避光), PBS 洗 1 次后再用 PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测表面分子 CD11c 和 CD86 的表达。

淋巴细胞增殖反应 分别采用 CCK8 法和 CFSE 法检测淋巴细胞的增殖反应。CCK8 法: 按上述方法制成的 T 淋巴细胞悬液, 加入 96 孔平底板, 调整 T 细胞数目为 1×10^5 个/孔。与 BMDC 疫苗共培养 48 h 后, CCK8 法比较 T 细胞的增殖指数。共培养结束后, 每孔加入 CCK8 试剂, 置于培养箱内 4 h, 450 nm 波长下测量 A 值。增殖指数 = (实验组 A 值 / 对照组 A 值 - 1) \times 100%。CFSE 法: 将 T 细胞经可对活细胞进行荧光标记的染料 CFSE (5, 6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) 标记, 然后与 BMDC 疫苗共培养 48 h, 流式检测 T 细胞荧光强度的变化。

细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 对 B16 靶细胞的杀伤作用 以 B16 细胞为靶细胞测定 CTL 活性。靶细胞按 1×10^5 个/孔加入 24 孔板, 培养 24 h 后, 加入用 DC 疫苗诱导的 T 淋巴细胞继续培养 48 h。采用 CFSE 法观察 CTL 抑制 B16 细胞增殖的作用。同时以流式细胞仪 (Annexin V/PI) 检测 CTL 对 B16 细胞的杀伤作用, Annexin V/PI 双阳性细胞为经过 CTL 作用的处于晚期凋亡状态的 B16 细胞。

BMDC 疫苗体内抗黑色素瘤的活性 荷瘤小鼠模型的建立: B16 细胞于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 细胞生长至 90% 左右时, 台盼蓝染色, 细胞计数, 制备

为每毫升 1×10^7 个的细胞悬液。吸取 200 μL 注射到 C57BL/6 小鼠背部皮下, 医用胶水闭合注射针眼。待肿瘤生长至 100 mm^3 , 随机分为两组, 一组为 PBS 对照组, 另一组以 DC 疫苗按照每只 1×10^6 个/0.5 mL 腹腔注射治疗小鼠, 每周 1 次, 以相同剂量加强免疫, 共免疫 2 次。治疗过程中测瘤体大小, 计算肿瘤体积 ($V = 1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$), 绘制荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线。第 2 次免疫 1 周后处死小鼠, 称取瘤重, 计算抑瘤率。抑瘤率 = (PBS 对照组平均瘤重 - 治疗组瘤重) / PBS 对照组平均瘤重 \times 100%。

BMDC 疫苗体内预防黑色素瘤诱导免疫的作用 先以 BMDC 疫苗腹腔注射免疫动物, 每只 1×10^6 细胞/0.5 mL, 每周 1 次, 共 2 次。末次免疫 3 周后, 分别给免疫小鼠接种体外培养到对数生长期的 B16 黑色素瘤细胞 (2×10^6 个/只)。观察生长情况, 21 天后 CO_2 室窒息法处死小鼠, 称取瘤重, 计算抑瘤率。

数据处理和分析 采用 Originpro 9 软件对实验数据进行处理分析。数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。统计学显著性差异定义为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

结果

1 CpG ODN 和肿瘤抗原联用对 DC 的活化作用

为了观察 CpG ODN 和肿瘤抗原对 DC 疫苗的促进作用, 单独使用 CpG 或者 CpG 联合肿瘤抗原刺激体外培养的 BMDC 细胞, 然后用流式细胞仪检测 CD11c 和 CD86 的表达。如图 1C、D 所示, 在显微镜下观察, BMDC 经刺激后, 细胞表面形成了大量树突状的突起, 可见伪足突出, 胞质逐渐变大。

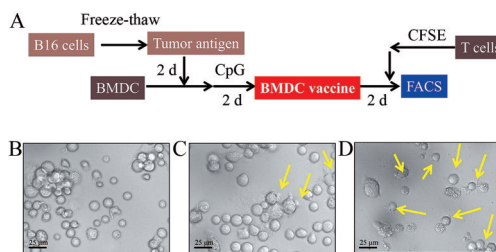


Figure 1 Preparation of bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) vaccine and the morphology of BMDC with/without stimulants. A: Preparation of BMDC vaccine; B: The morphology of BMDC without stimulants; C: The morphology of BMDC stimulated by cytosine-phosphoric acid-guanine (CpG) oligodeoxynucleotide (ODN); D: The morphology of BMDC stimulated by CpG ODN and tumor antigen

同时, 经过刺激的 BMDC 与未成熟 BMDC 组比较, 表面标志物 CD11c、CD86 的阳性细胞率均明显增加, 且平均荧光强度也明显增长。结果显示, 经刺激获

得的BMDC为成熟的BMDC细胞(图2),且CpG ODN和肿瘤抗原联合刺激后致敏DC的效果更强。

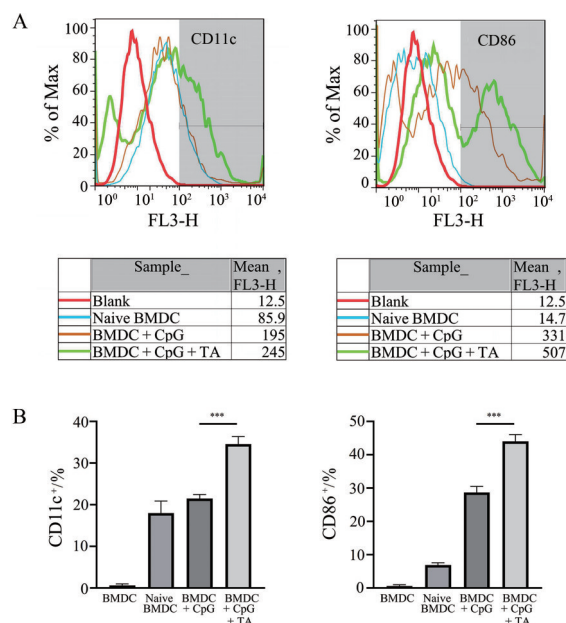


Figure 2 Fluorescence activating cell sorter data of dendritic cells. A: Flow patterns and mean fluorescence of expression levels of CD11c and CD86 on dendritic cell (DC) surface after sensitization; B: The positive rates of CD11c⁺ and CD86⁺ cells were also determined by flow cytometry. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$. TA: Tumor antigen

2 BMDC疫苗致T淋巴细胞的增殖能力明显增强

CpG-ODN和肿瘤抗原致敏DC后,活化T淋巴细胞的增殖能力有所增强。如图3A所示,CFSE是活细胞染料,能够轻易穿透细胞膜,在活细胞内与胞内蛋白共价结合,水解后释放出绿色荧光。在细胞分裂增殖过程中,每分裂一次,CFSE会平均分配至两个子代细胞中,因此其荧光强度是亲代细胞的一半。由于CFSE的荧光强度会随着细胞的分裂而逐级减弱,因此荧光强度越弱,说明存活的肿瘤细胞越多。且经过flow jo拟合可以看出,加入CpG刺激的BMDC疫苗后,T细胞出现多个增殖峰;如果加入CpG和肿瘤抗原联合刺激的BMDC疫苗,则会进一步刺激T细胞增殖,分裂指数明显增加。此外,为防止过度免疫而导致自身免疫紊乱,这一部分细化了BMDC的加入量,寻找BMDC疫苗的最低有效剂量。随着所加入BMDC疫苗的增多,T细胞荧光强度逐渐减弱,说明BMDC疫苗可促进T细胞增殖。随后用CCK8法观测T细胞增殖率,图3C显示,随着BMDC疫苗加入量的增多,T细胞的增殖率也保持增长。同样的,CpG和肿瘤抗原联合刺激的BMDC疫苗促进T细胞增殖的能力更强。

3 致敏DC疫苗明显提高CTL杀伤黑色素瘤细胞B16的活性

考察BMDC疫苗体外诱导出的CTL对肿瘤细胞的抑制作用。RPMI 1640培养液培养DC所获得的未成熟BMDC诱导的T细胞,对靶细胞B16无明显杀伤作用;CpG ODN和肿瘤抗原致敏的BMDC疫苗所诱导的CTL,对靶细胞B16产生杀伤作用。如图4A所示,显微镜下可见细胞形态变化,出现明显皱缩,CFSE荧光较强说明CTL抑制了B16细胞的增殖。图4B的流式结果也体现CTL诱导了靶细胞的凋亡,Q2双染区域为晚期凋亡的肿瘤细胞。可见,BMDC疫苗成功诱导出了杀伤性T细胞。

4 BMDC疫苗对荷黑色素瘤小鼠肿瘤生长的作用

为探究融合BMDC疫苗的抗肿瘤效果,本研究选择在C57BL/6雄性小鼠体内构建黑色素瘤模型。接种后第7天,小鼠肿瘤平均直径达到100 mm³时给予第1次治疗。在第7、14、21天分别测定小鼠瘤体积并绘制曲线。于接种瘤细胞后第21天,安乐死小鼠,剥取肿瘤并称量,如图5所示,BMDC疫苗组平均瘤重及平均体积均显著小于PBS组($P < 0.05$)。

5 BMDC疫苗对小鼠肿瘤发生的预防作用

对小鼠进行BMDC疫苗免疫两次后,末次免疫的第3周,将B16黑色素瘤细胞悬液接种于小鼠皮下,并进行观测。21天后,安乐死小鼠并对肿瘤质量和抑制效率进行分析。预防实验的结果表明,BMDC疫苗免疫小鼠后,肿瘤发生和生长明显迟缓。到实验终点时,小鼠所生长的肿瘤与PBS相比,无论体积和质量都明显减小($P < 0.05$),说明BMDC疫苗使小鼠产生了特异性免疫记忆(图6)。

讨论

黑色素瘤是来源于黑色素细胞的高度恶性肿瘤,易发生局部和远处转移。随着免疫治疗的研究不断深入,近年来发现黑色素瘤在所有实体瘤中对免疫治疗最为敏感^[12,13],然而免疫治疗不应答及耐药等问题也亟待解决^[14]。因此,进一步探索黑色素瘤发生发展,寻求新的免疫疗法成为当前研究热点。

目前,免疫相关细胞作为癌症疫苗的种类只有DC获批。DC是固有免疫和适应性免疫过程中的联系节点,是目前已知的体内功能最强的APCs^[15],实体瘤内浸润的DC数量多有利于患者预后,但肿瘤患者体内DC的活性受到抑制。因此,通过激活DC来对抗肿瘤免疫逃逸,将DC疫苗应用于黑色素瘤的治疗正成为一种潜在的有效方案。

DC疫苗可以由特异性肿瘤相关抗原或全肿瘤抗原致敏,也可由组织相容性复合体(MHC)多肽分子和

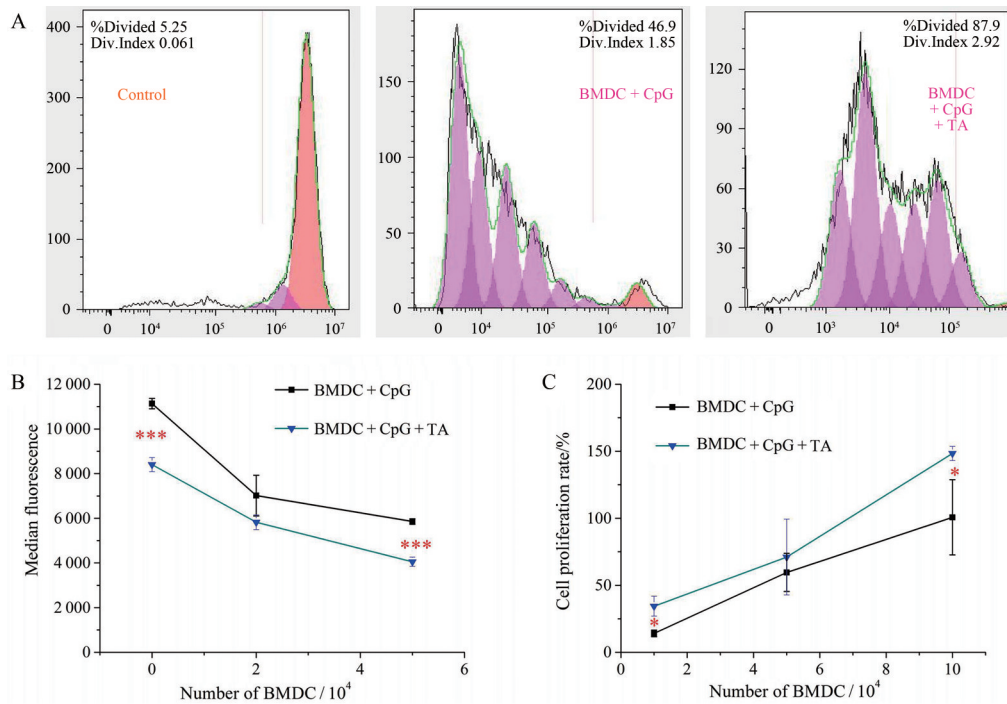


Figure 3 Effects of BMDC vaccine on proliferation of T lymphocytes. A, B: 5,6-Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE); C: CCK8. $n = 3, \bar{x} \pm s. *P < 0.05, ***P < 0.001$

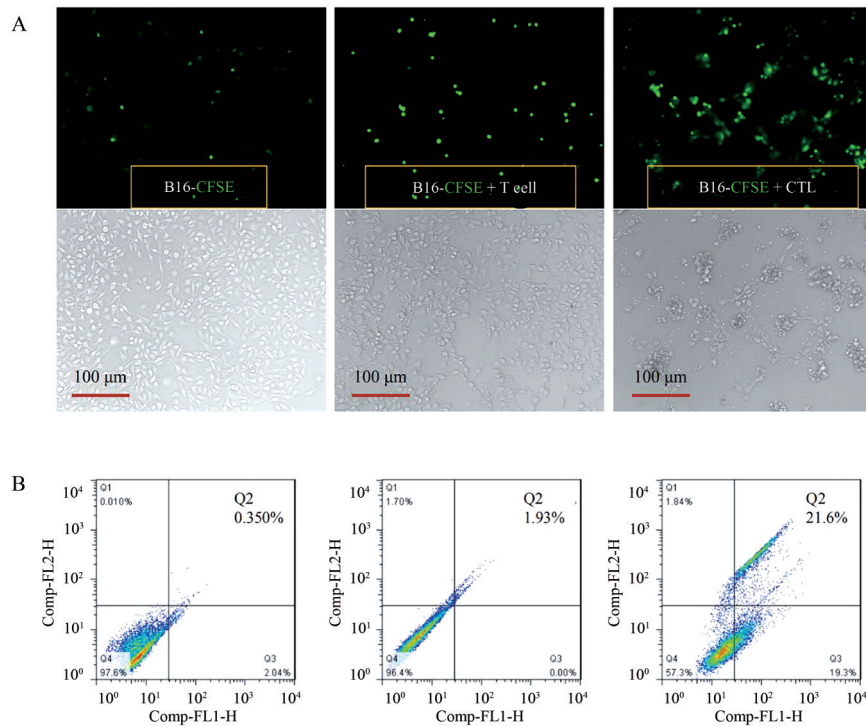


Figure 4 Effect of sensitized DC on the killing activity of cytotoxic T lymphocyte (CTL) against B16 cells. A: CFSE; B: Apoptosis was detected by flow cytometry

肿瘤抗原蛋白致敏。本研究通过反复冻融肿瘤细胞获得肿瘤细胞的完全抗原来致敏 DC。为进一步增强肿瘤抗原致敏的 DC 疫苗的免疫功能,选择自身无免疫原性 CpG ODN 为疫苗佐剂共同刺激 DC。CpG ODN

作为一种病原相关分子模式,与 TLR9 受体结合,激活 TLR/IL-IR 通路发挥作用^[6]。两者共同发挥作用,增强 APCs 的捕获能力和效应细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤能力,从而使得患者免疫系统能够直接杀伤肿瘤细

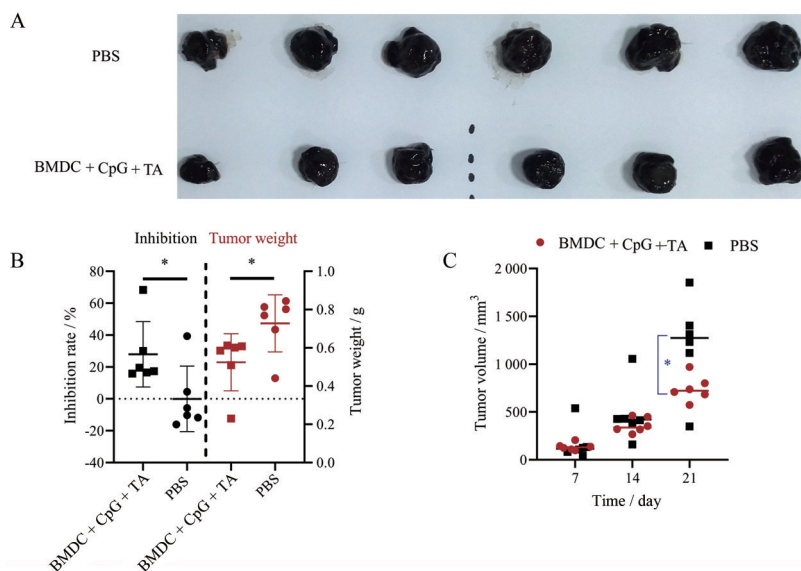


Figure 5 Changes of tumor volume and mass of C57BL/6 mice bearing B16 transplanted xenograft after treatment with BMDC. A: The photograph of tumors; B: The tumor mass and the inhibition effect; C: Changes of tumor volume. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$

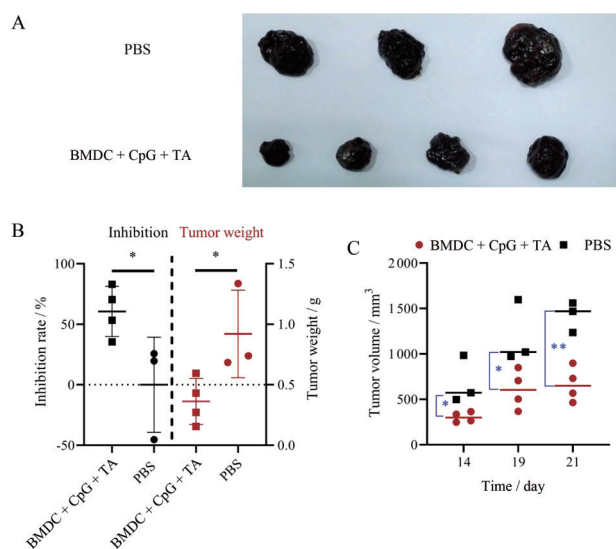


Figure 6 The preventive effect of BMDC vaccine on B16 tumor. A: The photograph of tumors; B: The tumor mass and the inhibition effect; C: Changes of tumor volume. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

胞, 以及具备清除潜伏转移病灶的作用。不但可以用于黑色素瘤的直接治疗, 还可以在黑色素瘤手术切除时, 同时制备个性化的肿瘤疫苗, 预防术后转移和复发。

实验结果显示, CpG ODN 联合肿瘤抗原致敏 DC 组能大大促进 DC 成熟, 使 DC 表面 CD11c 和 CD86 的表达率明显升高, CD86 能提供 T 细胞活化的共刺激信号。体外实验中, 致敏 DC 疫苗能提高 T 淋巴细胞增殖能力 ($P < 0.05$), 活化的 CTL 对靶细胞 B16 产生杀伤作用。在体内研究中, 实验终点时 CpG ODN 和肿瘤抗

原联合致敏的 BMDC 疫苗治疗组的荷瘤鼠平均瘤重和平均体积均显著低于 PBS 对照组; 同时预防实验提示 BMDC 疫苗可在小鼠体内产生长期特异性抗肿瘤免疫记忆细胞, 清除新生肿瘤细胞, 对肿瘤的发生有一定的预防效果。可能的机制包括: CpG ODN 和肿瘤抗原诱导 DC 成熟, 随后成熟的 DC 高表达 MHC-I/II 类分子和 CD80/CD86 等共刺激分子, 诱导 T 淋巴细胞增殖和活化, 产生大量效应 T 细胞, 随后启动效应 T 细胞迁移至肿瘤部位并保持效应 T 细胞在肿瘤部位的长期存在。同时 CpG ODN 还可以抑制 DC 的凋亡, 延长 DC 的生存期^[9], 从而逆转肿瘤微环境 DC 数量减少、功能受抑制的现状^[17]。

由于免疫相关细胞在体外和体内环境中存在一定的功能差异, 本课题组下一步将继续深入探究 DC 疫苗的应用, 如利用药剂学手段直接将 DC 疫苗运输到体内靶部位, 或是将 DC 疫苗和免疫检查点抑制剂联合应用, 结合我国患者肢端、黏膜来源黑色素瘤更为常见的特质, 获取更加完善的研究结果, 为建立更有效治疗黑色素瘤的符合中国患者特征的临床方法提供有效、合理的依据。

作者贡献: 曾佳昕、张文渊负责完成相关实验研究以及数据采集与处理分析工作; 刘二刚和刘凌云负责完成撰写论文工作; 黄永焯和王慧媛负责对本课题实验设计思路进行指导与修改论文工作。所有作者批阅并准许了最终稿件。

利益冲突: 所有作者均声明本论文与其他人或机构无任何利益冲突。

References

- [1] Finn OJ. Cancer immunology [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358: 2704-2715.
- [2] Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, et al. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10: eaat7807.
- [3] Saadeldin M, Abdel-Aziz AK, Abdellatif A. Dendritic cell vaccine immunotherapy; the beginning of the end of cancer and COVID-19. A hypothesis [J]. *Med Hypotheses*, 2021, 146: 110365.
- [4] Ma W, Pham B, Li T. Cancer neoantigens as potential targets for immunotherapy [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2021. DOI: 10.1007/s10585-021-10091-1.
- [5] Peng X, He Y, Huang J, et al. Metabolism of dendritic cells in tumor microenvironment: for immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 613492.
- [6] Palucka AK, Ueno H, Connolly J, et al. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8⁺ T-cell immunity [J]. *J Immunother*, 2006, 29: 545-557.
- [7] Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 18: 767-811.
- [8] Sommariva M, Noci VL, Storti C, et al. Activation of NK cell cytotoxicity by aerosolized CpG-ODN/poly(I: C) against lung melanoma metastases is mediated by alveolar macrophages [J]. *Cell Immunol*, 2017, 313: 52-58.
- [9] Lai C, Duan S, Ye F, et al. The enhanced antitumor-specific immune response with mannose- and CpG-ODN-coated liposomes delivering TRP2 peptide [J]. *Theranostics*, 2018, 8: 1723-1739.
- [10] Li J, Li J, Aipire A, et al. The combination of *Pleurotus ferulae* water extract and CpG-ODN enhances the immune responses and antitumor efficacy of HPV peptides pulsed dendritic cell-based vaccine [J]. *Vaccine*, 2016, 34: 3568-3575.
- [11] Samulowitz U, Weber M, Weeratna R, et al. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties [J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20: 93-101.
- [12] Guo J. Progress of therapy for melanoma in 2009 [J]. *China Prescr Drug (中国处方药)*, 2010, 94: 44-46.
- [13] Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 4311-4318.
- [14] Yan S, Sun L, Wan G. The mechanism and research progress of drug resistance of PD-1/PD-L1 immunotherapy in tumors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1728-1734.
- [15] Yang Y, Guo X, Hu B, et al. Generated SecPen_NY-ESO-1_ ubiquitin-pulsed dendritic cell cancer vaccine elicits stronger and specific T cell immune responses [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 476-487.
- [16] Cai Q, Kublo L, Cumberland R, et al. Optimized systemic dosing with CpG DNA enhances dendritic cell-mediated rejection of a poorly immunogenic mammary tumor in BALB/c mice [J]. *Clin Transl Sci*, 2009, 2: 62-66.
- [17] Majumder S, Bhattacharjee S, Paul Chowdhury B, et al. CXCL10 is critical for the generation of protective CD8 T cell response induced by antigen pulsed CpG-ODN activated dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e48727.