



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2023.12.015

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2023.12.015>

· 临床研究 ·

抑瘤肠菌联合抗程序性细胞死亡蛋白 1 单抗治疗微卫星稳定型结直肠癌的实验研究

苏小婷 张明生

[摘要] **目的** 探讨抑瘤肠菌(TSE)与抗程序性细胞死亡蛋白 1(PD-1)单抗联合治疗对微卫星稳定(MSS)型结直肠癌(CRC)疗效的影响。**方法** 选取 BALB/c 小鼠构建 CT26 荷瘤小鼠模型后,随机分为对照组、TSE 单药组(TSE 组)、 α PD-1 单药组(α PD-1 组)、TSE 联合 α PD-1 组(联合组),每组 10 只。定期测量小鼠皮下移植瘤体积并监测体重,给药 14 天后处死获取皮下移植瘤,比较各组肿瘤体积大小;采用苏木精-伊红(HE)染色观察肿瘤细胞的形态结构;采用免疫组化法检测肿瘤组织 CD8⁺T 细胞数量;采用流式细胞术检测皮下移植瘤组织和脾脏组织中 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞占 CD45⁺细胞的比例。**结果** 对照组、TSE 组、 α PD-1 组及联合组小鼠肿瘤平均体积依次减小($P < 0.05$)。免疫组化结果显示,对照组、TSE 组、 α PD-1 组及联合组小鼠肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞数量依次升高($P < 0.001$)。肿瘤组织流式细胞术结果显示, α PD-1 组小鼠 CD3⁺CD8⁺T 细胞占 CD45⁺细胞的比例高于对照组,联合组小鼠 CD3⁺CD8⁺T 细胞占 CD45⁺细胞的比例高于对照组、TSE 组及 α PD-1 组($P < 0.05$)。**结论** TSE 联合抗 PD-1 单抗可明显提高免疫单药治疗的抑瘤作用,可能通过增加肿瘤组织中浸润 CD8⁺T 细胞而促进抗 PD-1 单抗治疗 CRC 的疗效。

[关键词] 结直肠癌; 肠道菌群; 抗 PD-1 单克隆抗体; 免疫治疗

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

Experimental study of tumor-suppressing enterobacteria combined with anti-programmed cell death protein-1 monoclonal antibody therapy microsatellite stable colorectal cancer

Su Xiaoting, Zhang Mingsheng. Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of tumor-suppressing enterobacteria(TSE) combined treatment with anti-programmed cell death protein-1 (PD-1) monoclonal antibody on the efficacy of microsatellite stable(MSS) colorectal cancer(CRC). **Methods** BALB/c mice were selected to construct CT26 tumor-bearing mouse models and randomly divided into control group, TSE single drug group(TSE group), α PD-1 single drug group(α PD-1 group), TSE combined α PD-1 group(combination group), 10 in each group. The subcutaneous tumor volume of the mice were measured regularly and the body weight were monitored. After 14 days of administration, the mice were killed and subcutaneous tumors were obtained, and the tumor volume of each group was compared. Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to observe the morphological structure of tumor cells. The number of CD8⁺T cells in tumor tissues was investigated by immunohistochemistry. The proportion of CD4⁺T cells and CD8⁺T cells in CD45⁺ cells in tumor tissues and spleen tissues were detected by flow cytometry. **Results** Average tumor volume of control group, TSE group, α PD-1 group and combination group was gradually decreased in turn($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that the number of CD8⁺T cells in tumor tissue of control group, TSE group, α PD-1 group and combination group increased in turn($P < 0.001$). The flow cytometry results of tumor tissue showed that the proportion of CD3⁺CD8⁺T cells in CD45⁺ cells of α PD-1 group was higher than that in control group, and the proportion of CD3⁺CD8⁺T cells in CD45⁺ cells of combination group was higher than that in control group, TSE group and α PD-1 group($P < 0.05$). **Conclusion** TSE combined with anti-PD-1 monoclonal antibody can significantly enhance the anti-tumor effect of single immune drug therapy, and may promote the efficacy of anti-PD-1 monoclonal antibody in the treatment of CRC by increasing the infiltration of CD8⁺T cells in tumor tissues.

[Key words] Colorectal cancer; Intestinal flora; Anti-PD-1 monoclonal antibody; Immunotherapy

基金项目:希思科-恒瑞肿瘤研究基金项目(Y-HR2019-0295)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科

通讯作者:张明生, E-mail: zms75@163.com

结直肠癌(CRC)是世界上第三大常见恶性肿瘤和第二大恶性肿瘤死亡原因^[1-2]。免疫治疗的出现为恶性肿瘤治疗带来新的希望,其对黑色素瘤、非小细胞肺癌等不同类型的恶性肿瘤临床疗效显著^[3-4]。免疫治疗只对少数高度微卫星不稳定(MSI-H)型CRC效果显著,而对占95%以上的微卫星稳定/错配修复功能完整(MSS/pMMR)型CRC并不敏感,也就是常说的“冷肿瘤”状态^[5]。所以,目前如何提高MSS/pMMR型CRC患者的免疫治疗疗效,将“冷肿瘤”转变为“热肿瘤”是肠癌免疫治疗领域的热点。许多研究表明抗肿瘤免疫反应受肠道菌群影响,通过调节肠道菌群可改善抗肿瘤免疫反应^[6]。但是,肠道菌群是否影响抗程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)单抗对MSS型CRC的治疗效果还需要进一步的探索。抑瘤肠菌(TSE)是由与肿瘤免疫相关的特殊肠道细菌和抗肿瘤免疫促进物等组成的药物,可通过调节肠道菌群平衡进而促进抗肿瘤免疫反应。CT26细胞属于MSS型小鼠CRC细胞系,对免疫检查点阻断的敏感性不高^[7]。本研究构建了MSS型CRC荷瘤小鼠模型,通过动物实验观察了TSE联合抗PD-1单抗治疗CRC的疗效的影响并对其作用机制做了初步探索。

材料与方法

1. 材料:6~8周龄,体重18~20g的雌性BALB/c小鼠,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,在同济医院科研大楼动物中心的无特定病原体(SPF)级别的屏障环境中饲养。小鼠结肠癌细胞CT26购自尚恩生物技术有限公司;RPMI-1640培养基、0.25% EDTA胰蛋白酶消化液均购于美国Hyclone公司;胎牛血清购自中国赛默飞世尔科技有限公司;小鼠CD8抗体购自英国Abcam公司;TSE购自博吉弘康(嘉兴)生物医药有限公司;抗PD-1单克隆抗体购自Leinco公司。小鼠流式抗体LIVE/DEAD(FVS510)、CD45(APC-CY7)、CD3(APC)、CD4(PE)、CD8a(FITC)均购自美国Biolegend公司。

2. 方法

(1)细胞培养:CT26肿瘤细胞培养于含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,置于37℃、5% CO₂培养箱中进行孵育。

(2)建立小鼠皮下移植瘤模型^[8]:将之前扩增的处于对数生长期的CT26肿瘤细胞用胰蛋白酶消化并用PBS洗涤、稀释后制备肿瘤细胞悬液,浓度为 5×10^6 个/ml,置于冰盒中保存,以保证肿瘤细胞活力。提前一天用剃毛刀将小鼠右背下侧的毛发剃光,并用耳标对小鼠进行标记。用1ml胰岛素针吸取200 μl细

胞悬液皮下注射至小鼠右背下侧的部位。

(3)测量小鼠皮下移植瘤的体积和监测小鼠体重:用游标卡尺分别测量小鼠皮下移植瘤的最长径和最短径,肿瘤体积 = (最长径 × 最短径²)/2;每隔2天测量小鼠肿瘤大小和称重。

(4)分组及处理:皮下注射后的5~7天,当小鼠皮下移植瘤体积生长到50~100 mm³时,将所有小鼠随机分为对照组、TSE单药组(TSE组)、αPD-1单药组(αPD-1组)、TSE联合αPD-1组(联合组),每组小鼠各10只。处理方式:对照组每2天腹腔注射1次生理盐水,并每天予200 μl生理盐水灌胃处理;TSE组每2天腹腔注射1次生理盐水,并每天予200 μl TSE灌胃处理(TSE ≥ 120 亿 CFU/ml);αPD-1组每2天腹腔注射1次αPD-1 5 mg/kg,并每天予200 μl生理盐水灌胃处理;联合组每2天腹腔注射1次αPD-1 5 mg/kg,并每天予200 μl TSE灌胃处理。所有小鼠均连续处理14天。

(5)肿瘤组织样本的获取和染色:实验结束后以颈椎脱臼法处死小鼠,获取皮下移植瘤,于PBS中漂洗后用滤纸吸干并进行称重及拍照记录肿瘤大体图片。各组均取适量肿瘤组织置于4%多聚甲醛中放置24~48 h,脱水、石蜡包埋、脱蜡、切片,再行苏木精-伊红(HE)染色和免疫组化染色。HE染色用于确证实实验所取组织为肿瘤组织,并可以观察结肠癌细胞形态特征。免疫组化染色用于检测肿瘤组织中的CD8⁺T细胞,用CD8一抗孵育好的切片用DAB试剂盒进行染色,等切片脱水后,再使用中性胶进行固定,然后在显微镜下观察。用白光扫描仪采集图像,用NDP.View2软件分析图像。

(6)流式细胞术:将分离的小鼠皮下移植瘤组织和脾脏剪碎,研磨制成匀浆,将含IV型胶原酶(1 mg/ml)、透明质酸酶(0.01 mg/ml)、DNase I (0.002 mg/ml)的混合消化酶置于37℃恒温消化45 min,消化完成后加入红细胞裂解液进行裂红,多次离心后制成单细胞悬液,然后使用200目滤网洗涤和过滤以去除杂质。采用固定活力染色510区分活细胞和死细胞,再用抗小鼠流式抗体进行染色。染色样品在CytoFLEX-3激光13色流式细胞仪上进行分析,并使用FlowJo 10.0软件分析制图。

3. 统计学处理:应用Graphpad Prism 8.0.2软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.4 组小鼠皮下移植瘤体积比较:对照组、TSE组、

αPD-1 组及联合组小鼠皮下移植瘤平均体积依次减小 [(1 314.09 ± 267.75) mm³、(855.89 ± 145.38) mm³、(470.04 ± 98.21) mm³、(261.85 ± 76.68) mm³, $P < 0.05$], 见图 1。

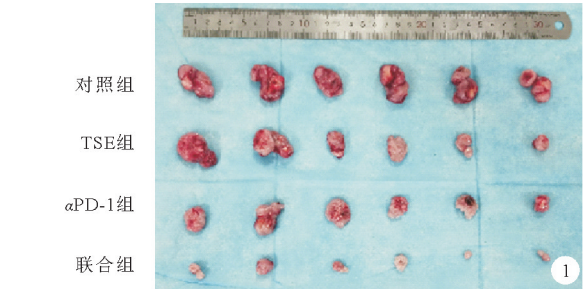


图 1 4 组小鼠离体的皮下移植瘤组织体积比较

2.4 组小鼠皮下移植瘤组织 HE 染色和免疫组化染色结果: HE 染色结果显示, αPD-1 组和联合组有大面积的肿瘤坏死组织。免疫组化染色结果显示, 对照组、TSE 组、αPD-1 组及联合组小鼠皮下移植瘤组织中 CD8⁺ T 细胞数量依次升高 [(14.83 ± 4.26)、(68.17 ± 9.13)、(122.50 ± 13.26)、(192.67 ± 29.68), $P < 0.001$]。见图 2。

3.4 组小鼠皮下移植瘤组织和脾脏组织中 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞与 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞比较: 皮下移植瘤组织流式细胞术结果显示, αPD-1 组小鼠 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞高于对照组, 联合组小鼠 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞高于对照组、TSE 组及 αPD-1 组 ($P < 0.05$); 而 TSE 组小鼠 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞与对照组及 αPD-1 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠皮下移植瘤组织中 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞和脾脏组织中 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞、CD3⁺ CD4⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

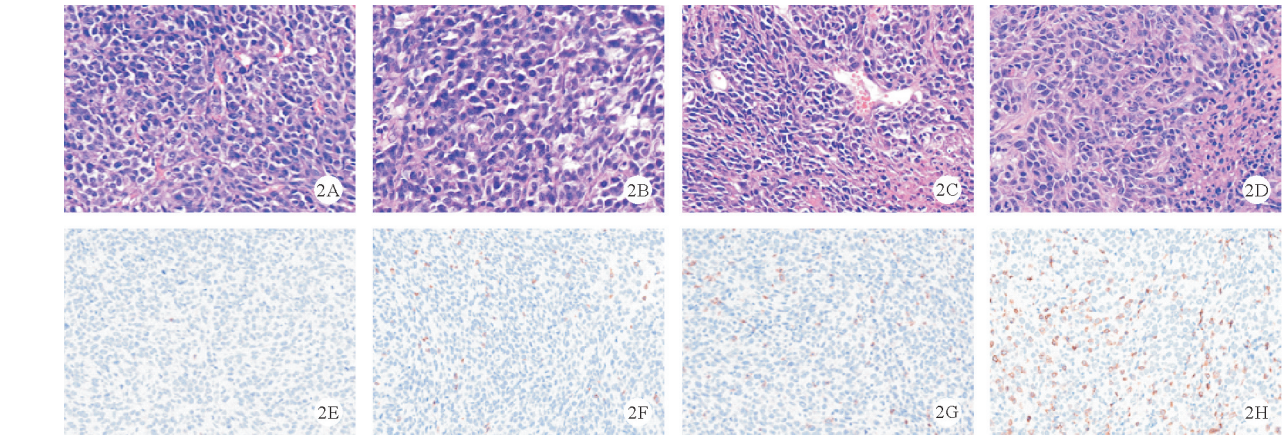


图 2 4 组小鼠皮下移植瘤组织 HE 染色和 CD8⁺ T 细胞免疫组化染色结果

(A、E: 对照组; B、F: TSE 组; C、G: αPD-1 组; D、H: 联合组; A、B、C、D: HE 染色, ×200; E、F、G、H: 免疫组化染色, ×200)

表 1 4 组小鼠皮下移植瘤组织和脾脏组织 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞与 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞/CD45⁺ 细胞比较 (%, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	皮下移植瘤组织		脾脏组织	
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 细胞/CD45 ⁺ 细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 细胞/CD45 ⁺ 细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 细胞/CD45 ⁺ 细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 细胞/CD45 ⁺ 细胞
对照组	12.80 ± 1.47	44.66 ± 11.89	29.10 ± 6.89	58.74 ± 6.03
TSE 组	19.16 ± 5.23	34.56 ± 5.36	32.48 ± 8.42	56.30 ± 6.17
αPD-1 组	20.32 ± 1.94 ^a	35.36 ± 9.31	30.96 ± 5.23	57.08 ± 7.34
联合组	28.82 ± 5.86 ^{abc}	33.18 ± 6.96	29.74 ± 2.74	56.36 ± 7.89

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 TSE 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 αPD-1 组比较, ^c $P < 0.05$

讨 论

CRC 具有高发病率和不良预后的特征, 是人类最常见的消化道恶性肿瘤之一^[9-10]。局限性 CRC 的 5 年生存率为 91%, 转移性 CRC 的五年生存率不超过 20%^[11]。恶性肿瘤的免疫治疗对不同类型恶性肿瘤患者显示出明显的疗效, 包括治疗后病情的长期缓解, 并有希望治愈小部分已发生远处转移的恶性肿瘤患者。但肠癌目前的免疫治疗进展并不顺利, 不如其他恶性肿瘤取得的效果显著, 很大原因是大部分 CRC 为 MSS/pMMR 型, 如何提高免疫治疗在 MSS/pMMR 型 CRC 的疗效一直是临床亟待解决的问题。

近来关于肿瘤与肠道菌群的研究越来越多, 普遍认为肠道微生物群是动物和人类恶性肿瘤免疫治疗疗效相关的关键因素^[12-13]。肠道菌群与免疫治疗疗效息息相关^[14], 改善肠道菌群的分布有可能提高免疫治疗的疗效^[15-16]。调节肠道菌群的主要方法有粪菌移植(FMT)、口服益生菌、益生元等, 直接运用活共生物种或细菌菌群。肠道菌群容易受到遗传和外部环境因素的严重影响, 而不同地区的微生物环境通常存在相当大的差异, 导致肠道微生物群结构和组成的变化^[17]。

由于一个人的肠道微生物组失调不一定反映另一个人的肠道微生物组失调,因此,有时 FMT 不一定可以促进抗 PD-1 单抗的抗肿瘤效应^[18]。FMT 通过复杂的方式发挥作用,难以预测 FMT 结果,且 FMT 后存在未知病原体扩散的风险^[19]。此外,许多问题需要系统和科学的评估,如剂量、给药途径和这种疗法的长期疗效。目前,肠道菌群疗法缺乏明显的便利性和重复性,临床上也没有统一的治疗标准。TSE 是通过科学方法筛选出的 9 种细菌,分别是长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌、青春双嗜酸乳杆菌、动物双歧杆菌、罗伊氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌嗜热链球菌、两歧双歧杆菌,以固定的比例和剂量开发出的食品级产品(食品生产许可证编号为 SC10632117100037),已被证实不仅可预防疾病,还有参与主动免疫调节的功效。

虽然 TSE 可改善肠道微生物群的失衡,但其是否能与肿瘤免疫治疗产生协调作用还并不明确,有待进一步研究。因此,在本研究中我们通过构建 MSS 型 CRC 荷瘤小鼠模型,观察 TSE 联合抗 PD-1 单抗治疗 MSS 型 CRC 能否比单纯免疫治疗产生更好的抗肿瘤效果及其可能的作用机制。结果表明, α PD-1 组和联合组的肿瘤增殖速度低于其他两组,同时联合组的抑瘤作用显著强于 α PD-1 单药组。通过操纵肠道微生物群来改善肿瘤微环境中的 T 细胞浸润是一个研究较多的领域,但仍停留在初级阶段^[20]。有研究发现肠道菌群促进抗 PD-1 单抗治疗 CRC 的效果依赖于 CD8⁺T 细胞,肠道菌群可影响肿瘤微环境,增加肿瘤免疫微环境中免疫细胞的浸润,可将肿瘤微环境重新编程为免疫治疗敏感的“热”状态^[21]。在本研究中,抗 PD-1 单抗只能诱导肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞数量轻度增加,这可能是抗 PD-1 单抗单药治疗效果不佳的原因之一^[22]。然而,当抗 PD-1 单抗与 TSE 联合使用时,与单药组相比,TSE 联合 α PD-1 组显著增加了肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞的浸润,体现了 TSE 良好改善肿瘤免疫微环境的作用。

TSE 能有益地调节肠道菌群并增强 MSS 型 CRC 荷瘤小鼠的抗 PD-1 单抗功效,CD8⁺T 细胞浸润增加是其中一个机制^[23]。还有很多问题并不清楚,包括肠道菌群种类的改变和相互影响、具体有哪些细胞因子或信号通路的参与,临床能否重复出同样的结果等,均为我们即将开展的研究。TSE 具有菌群组成明确,剂量统一,服用方便,安全可靠等特点,克服了以往肠道菌群治疗的缺陷。我们的研究也证实了 TSE 联合抗 PD-1 单抗能够提高免疫治疗的疗效和改善肿瘤微环境,使“冷肿瘤”变成“热肿瘤”,为抗 PD-1 单抗治疗 MSS 型 CRC 提供了一个新思路,是一种很有前景的治

疗策略,具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(3): 233-254.
- [2] 邓蓓莹, 田山, 董卫国. 胆汁酸在结直肠癌发生发展过程中的研究进展 [J]. 临床内科杂志, 2022, 39(2): 140-142.
- [3] Ribas A, Puzanov I, Dummer R, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEY-NOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial [J]. Lancet Oncol, 2015, 16(8): 908-918.
- [4] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. N Engl J Med, 2015, 373(2): 123-135.
- [5] Aguiar PN Jr, Tadokoro H, Forones NM, et al. MMR deficiency may lead to a high immunogenicity and then an improvement in anti-PD-1 efficacy for metastatic colorectal cancer [J]. Immunotherapy, 2015, 7(11): 1133-1134.
- [6] Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy [J]. Science, 2015, 350(6264): 1084-1089.
- [7] Kim K, Skora AD, Li Z, et al. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(32): 11774-11779.
- [8] 袁禧先, 张书娟, 张玉健. Survivin shRNA-APC 双基因对结肠癌裸鼠皮下移植瘤细胞内质网通路中 GRP78、Caspase-12 表达的影响 [J]. 临床内科杂志, 2019, 36(6): 415-418.
- [9] 高峰, 刘娇, 孙勇, 等. UBE2 C 基因在结直肠癌中表达及其对患者预后预测价值分析 [J]. 临床军医杂志, 2021, 49(3): 279-282.
- [10] 苏博, 闫振宇, 王欣欣, 等. 结直肠癌患者癌组织中 IL-23 表达水平与预后的相关性研究 [J]. 中华全科医学, 2022, 20(8): 1295-1298, 1371.
- [11] Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review [J]. JAMA, 2021, 325(7): 669-685.
- [12] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. Science, 2018, 359(6371): 91-97.
- [13] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. Science, 2018, 359(6371): 97-103.
- [14] 王钧, 王强, 郭智. 肠道微生物与免疫检查点抑制剂的临床应用管理 [J]. 临床内科杂志, 2023, 40(1): 20-23.
- [15] Goc J, Lv M, Bessman NJ, et al. Dysregulation of ILC3s unleashes progression and immunotherapy resistance in colon cancer [J]. Cell, 2021, 184(19): 5015-5030, e16.
- [16] 中国医师协会外科医师分会, 中华医学会外科学分会胃肠外科学组, 中华医学会外科学分会结直肠外科学组, 等. 中国结直肠癌肝转移诊断和综合治疗指南 (2020) [J]. 中国临床医学, 2021, 28(1): 129-144.
- [17] Yang Y, Misra BB, Liang L, et al. Integrated microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between commensal bacteria and metabolites in colorectal cancer [J]. Theranostics, 2019, 9(14): 4101-4114.
- [18] Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients [J]. Science, 2018, 359(6371): 104-108.
- [19] Pamer EG. Fecal microbiota transplantation: effectiveness, complexities, and lingering concerns [J]. Mucosal Immunol, 2014, 7(2): 210-214.
- [20] Jin Y, Dong H, Xia L, et al. The Diversity of Gut Microbiome is Associated With Favorable Responses to Anti-Programmed Death 1 Immunotherapy in Chinese Patients With NSCLC [J]. J Thorac Oncol, 2019, 14(8): 1378-1389.
- [21] Zhang SL, Mao YQ, Zhang ZY, et al. Pectin supplement significantly enhanced the anti-PD-1 efficacy in tumor-bearing mice humanized with gut microbiota from patients with colorectal cancer [J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4155-4170.
- [22] Ngiew SF, Young A, Jacquelin N, et al. A Threshold Level of Intratumor CD8⁺ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1 [J]. Cancer Res, 2015, 75(18): 3800-3811.
- [23] Messaoudene M, Pidgeon R, Richard C, et al. A Natural Polyphenol Exerts Antitumor Activity and Circumvents Anti-PD-1 Resistance through Effects on the Gut Microbiota [J]. Cancer Discov, 2022, 12(4): 1070-1087.

(收稿日期: 2023-05-15)

(本文编辑: 高婷)