

靶向抑制 *Myc* 对小鼠 LLC 全细胞疫苗免疫原性的影响

张学明 王惠 钱冬萌 王斌

(青岛大学基础医学院, 山东 青岛 266071)

[摘要] 目的 制备小鼠 Lewis 肺癌(Lewis lung carcinoma, LLC)全细胞疫苗,并探讨该疫苗在提高 C57BL/6N 小鼠免疫系统对抗 LLC 方面的作用。方法 利用 TCGA 数据库分析 MYC 扩增背景下人类肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)组织内免疫细胞浸润丰度的变化特点,探讨确定制备 LLC 全细胞疫苗时紫外线照射的最佳时长。利用小鼠模型,评估靶向抑制 *Myc* 的 LLC 全细胞疫苗在抵抗 LLC 方面的效果。结果 在人 LUAD 组织样本中,相较于 *N-MYC* 低表达组,*N-MYC* 高表达组的激活 CD4⁺ 记忆 T 细胞与激活 NK 细胞浸润丰度显著降低($W=28\ 233, 27\ 990, P<0.05$), Tregs 细胞浸润丰度显著升高($W=36\ 074, P<0.05$)。抑制剂处理过的小鼠 LLC 细胞在经过 15 min 的紫外线照射后完全失去活性,并且 LLC 细胞内的 *c-Myc*、*N-Myc* 和 *PD-L1* 表达量显著降低($t=6.26\sim 13.51, P<0.05$)。在小鼠模型实验中,与 Irra 组相比, Irra 处理组中的小鼠表现出肿瘤生长速度减缓和生存期延长的现象。此外, Irra 处理组小鼠的脾脏和肿瘤内 CD3⁺ CD8⁺ /CD3⁺ T 细胞比值以及血清中的细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 表达水平也显著增加($F=54.83\sim 381.10, P<0.05$)。结论 本研究成功制备了 LLC 全细胞疫苗。在小鼠实验中,接种靶向抑制 *Myc* 的 LLC 全细胞疫苗能够提高免疫系统对 LLC 的攻击能力,抑制肿瘤细胞的生长速度,延长小鼠生存期。

[关键词] 肺肿瘤;肿瘤微环境;基因, MYC;基因扩增;免疫原性,疫苗;数据库;计算生物学

[中图分类号] R734.2;R392-33

[文献标志码] A

EFFECT OF TARGETED INHIBITION OF *Myc* ON IMMUNOGENICITY OF LEWIS LUNG CARCINOMA WHOLE-CELL VACCINE IN MICE ZHANG Xueming, WANG Hui, QIAN Dongmeng, WANG Bin (School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To prepare a whole-cell vaccine for murine Lewis lung carcinoma (LLC), and to investigate the role of this vaccine in enhancing the anti-LLC ability of immune system in C57BL/6N mice. **Methods** TCGA database was used to analyze the changes in the infiltration level of immune cells within human lung adenocarcinoma (LUAD) tissue in the context of MYC amplification, and the optimal duration of ultraviolet irradiation was explored for the preparation of LLC whole-cell vaccine. A mouse model was used to assess the effect of LLC whole-cell vaccine with targeted inhibition of *Myc* on resistance to LLC. **Results** In human LUAD tissue samples, compared with the low *N-MYC* expression group, the high *N-MYC* expression group had a significant reduction in the infiltration abundance of activated CD4⁺ memory T cells and activated NK cells ($W=28\ 233, 27\ 990, P<0.05$) and a significant increase in the infiltration abundance of Tregs cells ($W=36\ 074, P<0.05$). The mouse LLC cells treated by an inhibitor completely lost their activity after 15 minutes of ultraviolet irradiation, and there were significant reductions in the expression levels of *c-Myc*, *N-Myc*, and *PD-L1* within LLC cells ($t=6.26-13.51, P<0.05$). In the mouse model experiment, compared with the Irra group, the Irra treatment group showed a reduction in tumor growth rate and an increase in survival time. In addition, the Irra treatment group had significant increases in CD3⁺ CD8⁺ /CD3⁺ ratio in the spleen and tumor and the serum levels of the cytokines tumor necrosis factor- α and interferon gamma ($F=54.83-381.10, P<0.05$). **Conclusion** The LLC whole-cell vaccine is successfully prepared in this study. In the mouse experiment, vaccination of the LLC whole-cell vaccine with targeted inhibition of *Myc* can enhance the ability of the immune system to attack LLC, thereby reducing tumor growth rate and prolonging survival time.

[KEY WORDS] Lung neoplasms; Tumor microenvironment; Genes, MYC; Gene amplification; Immunogenicity, vaccine; Database; Computational biology

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,患者的发病率和死亡率持续攀升^[1]。尽管手术、放疗、化疗等

方法可延长患者生存,但副作用和治疗失败的问题仍然存在。肿瘤免疫疗法,尤其是全细胞疫苗研究备受关注^[2-3]。通过对患者癌细胞进行体外培养和处理,可制备出保留免疫原性的非活性全癌细胞颗粒疫苗。然而,由于肿瘤细胞对免疫系统的抑制作用,使肿瘤细胞制备的疫苗治疗效果受到影响^[4]。

[收稿日期] 2023-04-19; **[修订日期]** 2023-06-24

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFA0900802);山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY011009)

[通讯作者] 钱冬萌, Email: qiandongmeng@sina.com; 王斌, Email: wangbin532@126.com

MYC 家族由 c-MYC、N-MYC 和 L-MYC 组成,其中 c-MYC 和 N-MYC 在许多人类肿瘤的发生和发展中扮演关键角色^[5]。MYC 可以促使肿瘤细胞增殖并抑制免疫细胞浸润^[6]。已有研究表明靶向抑制 MYC 可增强黑色素瘤及神经母细胞瘤的免疫原性,但在肺腺癌(LUAD)领域相关研究尚缺乏^[7]。(+)JQ1 以及 I-BET151 均可以靶向抑制小鼠细胞中 *c-Myc* 和 *N-Myc* 表达,两者联合使用后,其抑制作用会增强^[7-9]。本研究通过数据库分析 MYC 扩增对人类 LUAD 细胞免疫原性的影响,同时在小鼠模型中通过给予靶向抑制 *Myc* 的小鼠 Lewis 肺癌(LLC)全细胞疫苗,探索其在激活小鼠免疫系统杀伤 LLC 细胞方面的效果。

1 材料和方法

1.1 LUAD 组织和癌旁正常组织中免疫细胞浸润丰度的比较

获取 TCGA 数据库中 LUAD 患者(包含 501 例 LUAD 组织样本和 54 例癌旁正常组织样本)的基因表达矩阵,以 LUAD 组织中 *c-MYC* 和 *N-MYC* 表达量的中位数为界,将 LUAD 患者分为 *c-MYC* 高、低表达组以及 *N-MYC* 高、低表达组。并采用 CIBERSORT R 脚本计算 LUAD 组织和癌旁正常组织中不同免疫细胞的浸润丰度,比较 *N-MYC* 高、低表达组之间以及 *c-MYC* 高、低表达组之间不同免疫细胞浸润丰度。

1.2 试剂及动物和细胞

(+)JQ1 和 I-BET151 购自上海陶术生物科技有限公司。RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒购自上海赛默飞世尔科技(中国)有限公司,干扰素- γ (IFN- γ)ELISA 试剂盒购自杭州联科生物科技股份有限公司。6 周龄雌性 C57BL/6N 小鼠 45 只,体质量 17~18 g,购自北京维通利华公司,许可证号:SCXK(京)2021-0006。小鼠 LLC 细胞系(上海 ATCC 公司)置于含体积分数为 0.10 胎牛血清的 DMEM 培养基、双抗(100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素)混合溶液中,于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 孵箱中进行培养。

1.3 CCK-8 实验确定 LLC 细胞的最佳紫外线照射时长

将生长状态良好并占据皿底面积大约 40%~50% 的 LLC 细胞分为处理组和对照组,置于直径为

10 cm 的圆形培养皿当中。处理组 LLC 细胞的 DMEM 培养基中加入 0.4 μ mol/L 的 (+)JQ1 和 0.4 μ mol/L 的 I-BET151,对照组 LLC 细胞置于常规 DMEM 培养基中,均培养 4 d。然后将两组细胞置于光学显微镜下观察细胞的形态;在培养皿中将两组细胞均制备成浓度 1×10^{10} /L、高度 1 mm 的均匀悬液,置于摇床上以 50 r/min 的速度晃动细胞悬液,同时用波长为 254 nm 的紫外线对其进行照射,照射时长分别为 0、5、10、15、20、25、30 min。在照射 LLC 细胞不同时长后的第 0、12、24 小时,使用 CCK-8 试剂盒检测 LLC 细胞的吸光度值,以评估 LLC 细胞的增殖活性。操作严格遵循说明书执行,实验重复 3 次,结果取均值。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 LLC 细胞中 *Myc* 和 *PD-L1* mRNA 的表达

将培养 4 d 的对照组和处理组 LLC 细胞,用 PBS 制备成浓度为 1×10^{10} /L 的均匀细胞悬液,紫外线照射两组 LLC 细胞 15 min 后,立即用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,反转录试剂盒反转录合成 cDNA,加入含有 *c-Myc*、*N-Myc* 和 *PD-L1* 引物的预混液进行 RT-qPCR 扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 LLC 细胞中目标 mRNA 的相对表达水平,引物名称及其序列见表 1。每次实验设置 3 个复孔,实验重复 3 次,结果取均值。

表 1 引物名称及其序列

引物名称	序列	长度(bp)
c-Myc	F;5'-AAAAAGAGCCGAGTGGGAGG-3'	20
	R;5'-AAATAGGGCTGCACCGAGTC-3'	20
N-Myc	F;5'-ACCATGCCGGGGATGATCT-3'	19
	R;5'-AGCATCTCCGTAGCCCAATTC-3'	21
PD-L1	F;5'-GCTCCAAAGGACTTGTACGTG-3'	21
	R;5'-TGATCTGAAGGGCAGCATTTC-3'	21

1.5 小鼠肿瘤模型的构建

将培养 4 d 的对照组和处理组 LLC 细胞,用 PBS 制备成浓度为 1×10^{10} /L 的均匀细胞悬液。紫外线照射两组 LLC 细胞 15 min 后,立即与 PBS 以 1:1 混合,得到对照组和处理组的 LLC 全细胞疫苗,4 °C 下储存。将 45 只 C57BL/6N 雌性小鼠随机均分为未免疫组(PBS 组)、单纯紫外线疫苗组(Irra 组)、紫外线试剂处理疫苗组(Irra 处理组),每组 15 只。所有小鼠第 1 天于左腋窝皮下接种 5×10^5 个 LLC 细胞,PBS 组小鼠第 5、12、19 天于右侧大腿内侧肌肉注射 200 μ L PBS,Irra 组小鼠第 5、12、19 天于右侧大腿内侧肌肉注射 5×10^9 /L 对照

组 LLC 全细胞疫苗 200 μL , Irra 处理组小鼠第 5、12、19 天于右侧大腿内侧肌肉注射 $5 \times 10^9/\text{L}$ 处理组 LLC 全细胞疫苗 200 μL 。所有小鼠注射完成后均常规饲养。

每组小鼠随机取出 5 只, 隔 1 d 测量 1 次体质量, 隔 2 d 测量 1 次肿瘤体积, 均测量至第 25 天, 计算肿瘤体积(V)。V=肿瘤最长径 \times 肿瘤最短径 $^2 \times 0.52$ 。每组小鼠再随机取出 5 只, 以肿瘤直径达到伦理阈值(15~20 mm)时为死亡终点, 分别行全麻后脱颈处死。记录小鼠生存期, 采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。

1.6 ELISA 方法检测各组小鼠血清中促炎性因子 TNF- α 和 IFN- γ 的表达水平

每组小鼠随机取出 5 只, 在接种 LLC 全细胞疫苗第 25 天时, 麻醉后眼球取血, 脱颈处死, 解剖分离小鼠的脾脏和肿瘤组织。将小鼠血液样本室温下放置 2 h, 置于水平离心机上 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 3 000 r/min 离心 15 min, 收集血清, 使用 ELISA 试剂盒检测血清中 TNF- α 和 IFN- γ 水平, 测试步骤严格按照试剂盒说明书中的要求进行。

1.7 流式细胞术检测小鼠脾脏以及肿瘤组织中 CD3 $^+$ CD8 $^+$ /CD3 $^+$ T 细胞比值

将 3 组小鼠的脾脏和肿瘤组织研磨后, 以 200 目铜网过滤得到单细胞悬液。将细胞接种于 96 孔板中, 每孔约 1×10^6 个细胞, 每孔细胞中加入混合抗体(PE anti-mouse CD3、PE anti-mouse CD4、PE anti-mouse CD8), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。置于流式细胞仪上进行检测, 采用 FlowJo 软件(版本 10.8.1)分析 CD3 $^+$ CD8 $^+$ /CD3 $^+$ T 细胞比值。

1.8 统计学分析

所有统计分析均使用 R 软件进行。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Student-*t* 检验、Wilcoxon 秩和检验、单因素方差分析(ANOVA)和重复测量设计的方差分析, 单因素方差分析两两比较采用 Tukey HSD 法, 重复测量设计的方差分析两两比较采用 Bonferroni 校正检验。生存期分析采用 Kaplan-Meier 法 Log-rank 检验, 生存分析两两比较采用 Bonferroni 校正检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

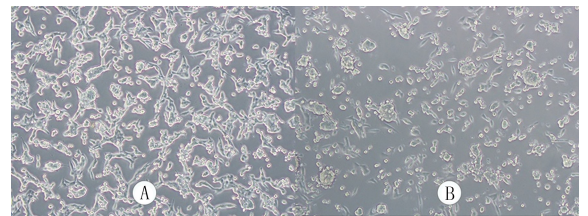
2.1 LUAD 组织和癌旁正常组织中免疫细胞浸润丰度比较

通过 TCGA 数据库计算 LUAD 患者的 LUAD

组织与癌旁正常组织中免疫细胞的浸润丰度, 结果显示, 与癌旁正常组织相比, LUAD 组织内 CD8 $^+$ T 细胞、CD4 $^+$ 记忆 T 细胞、NK 细胞及 M0 巨噬细胞的浸润丰度显著性降低($W = 9\ 276 \sim 20\ 086, P < 0.05$), 调节性 T 细胞(Tregs)的浸润丰度显著升高($W = 18\ 672, P < 0.05$); 相较于 *N-MYC* 低表达组, *N-MYC* 高表达组的激活 CD4 $^+$ 记忆 T 细胞与激活 NK 细胞的浸润丰度显著降低($W = 28\ 233, 27\ 990, P < 0.05$), Tregs 细胞的浸润丰度显著性升高($W = 36\ 074, P < 0.05$); *c-MYC* 高、低表达组之间比较, 免疫细胞的浸润丰度均无显著差异($P > 0.05$)。

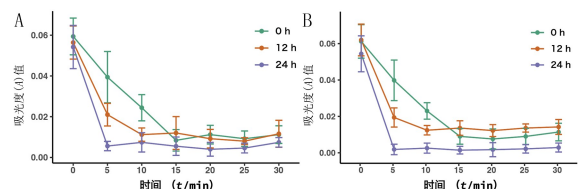
2.2 LLC 细胞的最佳紫外线照射时长

光学显微镜下观察发现, 与对照组相比, 处理组 LLC 细胞的数量明显减少, 细胞聚集程度明显降低(图 1)。重复测量方差分析显示, 测量时点、照射时长及两者的交互作用对细胞的吸光度值均有显著影响($F = 5.51 \sim 188.97, P < 0.05$)。单独效应分析显示, 在相同测量时点下, 各组 LLC 细胞在照射时长为 0、5、10、15 min 时的吸光度值比较, 差异均有显著性($P < 0.05$)。在相同测量时点下, 各组 LLC 细胞在照射时长为 15、20、25、30 min 时的吸光度值比较, 差异均无显著性($P > 0.05$); 在相同的照射时长下, 即 15、20、25、30 min, 各组 LLC 细胞在第 0、12、24 小时时的吸光度值比较, 差异均无显著性($P > 0.05$), 见图 2。因此在经过紫外线照射 15 min 的后第 0 小时时, 两组 LLC 细胞均失去了活性, 故后续采用紫外线照射 15 min 后第 0 小时的 LLC 细胞制备 LLC 全细胞疫苗。



A: 对照组, B: 处理组, 200 倍

图 1 两组 LLC 细胞显微镜下观察结果



A: 对照组, B: 处理组

图 2 两组 LLC 细胞紫外线照射不同时长及不同测量时点的吸光度值

2.3 *Myc* 与 *PD-L1* mRNA 在对照组和处理组中

的表达差异

RT-qPCR 结果显示,与对照组相比较,处理组 LLC 细胞 *c-Myc*、*N-Myc*、*PD-L1* mRNA 相对表达水平显著降低($t = 6.26 \sim 13.51, P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组 LLC 细胞的 *c-Myc*、*N-Myc*、*PD-L1* mRNA 相对表达水平比较 ($n = 9, x \pm s$)

分组	<i>c-Myc</i>	<i>N-Myc</i>	<i>PD-L1</i>
对照组	1.010 ± 0.164	1.002 ± 0.081	1.003 ± 0.098
处理组	0.198 ± 0.063	0.183 ± 0.067	0.345 ± 0.154

2.4 小鼠模型中体质量、肿瘤体积和生存期的分析

各组小鼠在接种 LLC 全细胞疫苗 4~5 d 后,左侧腋窝处均出现肿瘤肿块。重复测量方差分析结果显示,测量时间对小鼠体质量具有显著影响($F = 288.08, P < 0.05$),而分组和分组与测量时间交互作用对小鼠的体质量均无显著影响($P > 0.05$);单独效应分析显示,同一个测量时点,3 组小鼠的体质量比较无显著差异($P > 0.05$)。见图 3A。分组、测量时间以及两者交互作用对小鼠的肿瘤体积均有显著性影响($F = 2.32 \sim 908.04, P < 0.05$);单独效应分析显示,在接种 LLC 细胞后第 19、22、25 天时,Irra 组小鼠肿瘤体积均显著小于 PBS 组,Irra 处理组小鼠肿瘤体积均显著小于 Irra 组($P < 0.05$),见图 3B。

Kaplan-Meier 法分析各组小鼠的生存率,经过 Log-rank 检验,3 组小鼠的生存曲线比较差异有显著性($\chi^2 = 20.60, P < 0.05$),其中 Irra 组优于 PBS 组,Irra 处理组优于 Irra 组($P < 0.05$),见图 3C。

2.5 各组小鼠血清 TNF- α 和 IFN- γ 表达水平比较

PBS 组、Irra 组和 Irra 处理组小鼠血清 TNF- α 的表达水平分别为 (5.81 ± 0.47)、(9.76 ± 1.01)、(19.82 ± 1.09)ng/L,PBS 组、Irra 组和 Irra 处理组小鼠血清 IFN- γ 表达水平分别为 (19.54 ± 2.44)、(35.84 ± 1.75)、(75.31 ± 4.83)ng/L。3 组小鼠血清中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达水平比较均有显著差异($F = 320.70, 381.10, P < 0.05$),其中 Irra 组两个指标均显著高于 PBS 组,Irra 处理组均显著高于 Irra 组($P < 0.05$)。

2.6 各组小鼠脾脏和肿瘤内 CD3⁺CD8⁺/CD3⁺ T 细胞比值比较

PBS 组、Irra 组和 Irra 处理组小鼠脾脏组织中 CD3⁺CD8⁺/CD3⁺ T 细胞比值分别为 0.12 ± 0.02 、 0.16 ± 0.01 、 0.22 ± 0.02 ,3 组小鼠肿瘤组织中分别为 0.13 ± 0.01 、 0.21 ± 0.02 、 0.30 ± 0.01 。3 组小鼠脾脏和肿瘤中 CD3⁺CD8⁺/CD3⁺ T 细胞比值比较均有

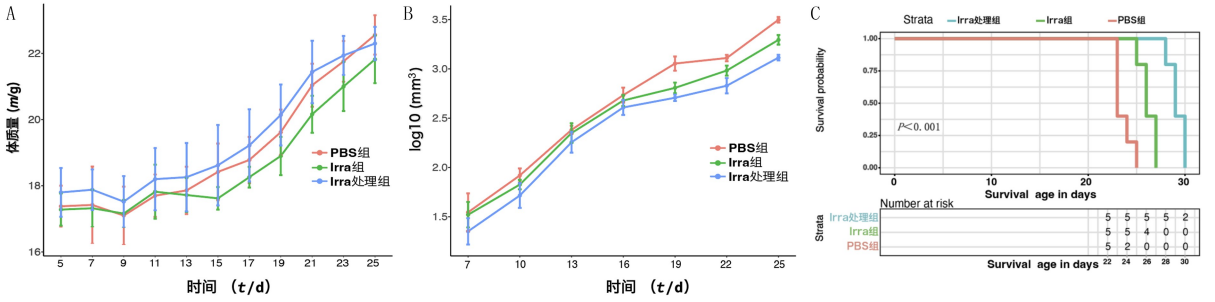
显著统计意义($F = 54.83, 143.70, P < 0.05$),其中 Irra 组脾脏和肿瘤组织中 CD3⁺CD8⁺/CD3⁺ T 细胞比值均显著高于 PBS 组,Irra 处理组均显著高于 Irra 组($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨 论

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病和死亡率不断上升。传统治疗方法,如手术、放疗和化疗,受到副作用和治疗失败的严重制约。近年来,肿瘤全细胞疫苗因其保留肿瘤细胞所有抗原逐渐受到关注。然而,由于对免疫系统的抑制作用,全细胞疫苗的治疗效果仍然受到很大限制。因此,寻找一种简单有效的方法以提高肿瘤全细胞疫苗的免疫原性变得尤为重要。

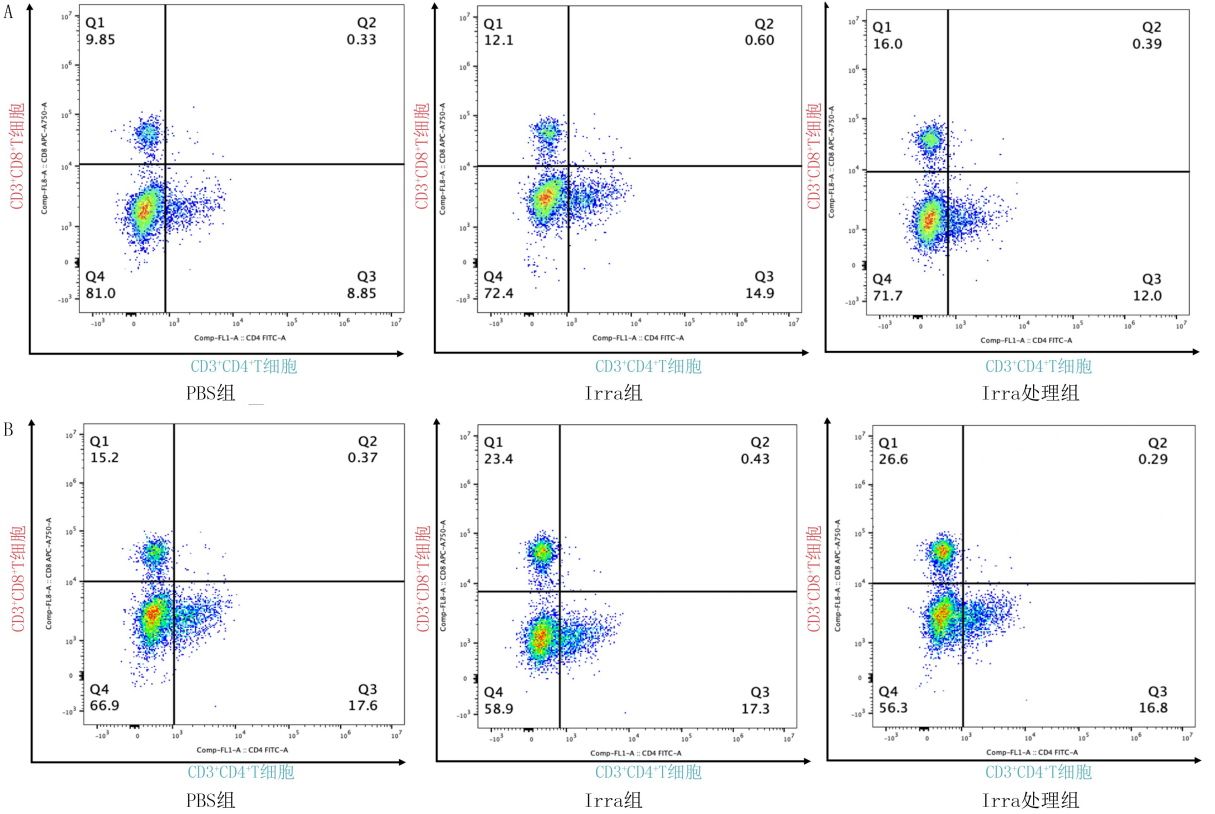
已有的研究显示,抑制致癌基因 MYC 可以提高黑色素瘤和神经母细胞瘤的免疫原性。然而,在 LUAD 领域,相关研究仍然缺乏。本研究对 LUAD 细胞及其 MYC 扩增表达在肿瘤微环境(TME)中对免疫细胞的影响进行了探讨。首先,本研究对比分析了 TCGA 数据库中的 LUAD 组织样本和癌旁组织样本间免疫细胞浸润差异。研究发现,LUAD 组织中 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ 记忆 T 细胞、NK 细胞和 M0 巨噬细胞的浸润丰度显著性降低,而激活 Tregs 细胞的浸润丰度显著提高。在这些免疫细胞中,CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞具有直接杀死肿瘤的能力,而 CD4⁺ 记忆 T 细胞参与长期免疫应答,并且协助其他免疫细胞(如 CD8⁺ T 细胞)发挥抗肿瘤作用^[10-13]。然而,在 TME 中,Tregs 细胞通常对肿瘤的增长和扩散具有促进作用^[14]。这些研究结果表明,LUAD 细胞能有效地抑制 TME 中的免疫细胞对其进行的攻击和持续免疫反应。其次,本研究又进一步在 LUAD 组织 *c-MYC* 高、低表达样本以及 *N-MYC* 高、低表达样本间进行比较,发现 *c-MYC* 高、低表达样本间免疫细胞浸润丰度无差异,而在 *N-MYC* 高表达样本中,CD4⁺ 记忆 T 细胞和激活 NK 细胞浸润丰度显著降低,Tregs 细胞浸润丰度显著提高。这表明 *N-MYC* 基因的过度表达可能会进一步加强 LUAD 细胞抵抗 TME 中免疫细胞的攻击和持久免疫响应能力。

鉴于上述 *N-MYC* 在 TME 中的影响,将 MYC 视为提高 LUAD 全细胞疫苗免疫原性的潜在靶点具有重要的研究意义。为了对人类 LUAD 免疫治疗提供参考,本研究在小鼠 LLC 细胞和小鼠模型中进行了相关全细胞疫苗的实验研究。



A、B、C 分别为各组小鼠体重、肿瘤体积和生存期比较

图 3 各组小鼠体重、肿瘤体积和生存期差异分析



A:小鼠脾脏组织, B:小鼠肿瘤组织

图 4 各组小鼠脾脏和肿瘤内的 CD3⁺CD8⁺ / CD3⁺ T 细胞比值比较

(+)-JQ1 和 I-BET151 是两种重要的 *Myc* 抑制剂,它们联合使用会对 *Myc* 的抑制作用增强。本研究结果显示,(+)-JQ1 和 I-BET151 与 LLC 细胞共培育 4 d 后,LLC 细胞中 *c-Myc* 和 *N-Myc* 的表达量显著下降,并且 *PD-L1* 的表达量也显著下降。*PD-L1* 蛋白位于细胞表面,通过与其受体 *PD-1* 结合,可以抑制免疫细胞的活性,从而阻止其对肿瘤细胞的攻击。研究表明,约 30%~50% 的 LUAD 患者肿瘤细胞中可以检测到 *PD-L1* 的过度表达^[15-16]。这表明(+)-JQ1 和 I-BET151 通过靶向抑制 *Myc* 使 LLC 细胞中 *PD-L1* 的表达量显著下降,从而减轻 LLC 细胞对 TME 的抑制作用。

目前,制备肿瘤全细胞疫苗的手段主要包括热

灭活和辐射灭活(如使用紫外线、伽马射线或 X 射线等辐射源处理肿瘤细胞)^[17]。热灭活法因温度控制困难导致肿瘤抗原蛋白变性受到限制,而 γ 或 X 射线辐射方法受设备沉重、昂贵的影响,也限制了其广泛应用。尽管紫外线设备轻便且廉价,但透射性差限制了其使用。本研究通过设定 1×10^{10} /L 细胞悬液浓度、1 mm 高度并在摇床上以 50 r/min 摇晃,并进行 15 min 的紫外线照射后,成功制备出 LLC 全细胞疫苗。采用这种方法制备的全细胞疫苗能够最大限度地保留 LLC 细胞表面的肿瘤抗原及其免疫原性。

然后,本研究在小鼠模型中评估了针对 *Myc* 靶向抑制的 LLC 全细胞疫苗抵抗 LLC 的效果。相比

接种无抑制剂处理的 LLC 全细胞疫苗,接种抑制剂处理的 LLC 全细胞疫苗可以使小鼠肿瘤增长明显减缓,生存期也得到显著提高。并且,接种抑制剂处理的 LLC 疫苗后小鼠脾脏和肿瘤内 CD3⁺CD8⁺/CD3⁺T 细胞比值以及血清 TNF- α 、IFN- γ 表达水平均有显著提高。CD3⁺CD8⁺T 细胞是细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)的主要成分,在免疫监视过程中起到关键作用。CD3⁺CD8⁺T 细胞能够识别肿瘤细胞表面的特异性抗原并结合,激活 CTLs,进而释放细胞毒性分子如穿孔素和颗粒酶 B,导致肿瘤细胞的凋亡^[18]。此外,CD3⁺CD8⁺T 细胞还能分泌细胞因子如 TNF- α 和 IFN- γ ,进一步增强免疫系统对肿瘤的攻击能力^[19]。TNF- α 和 IFN- γ 由免疫系统的细胞(如巨噬细胞、树突状细胞、NK 细胞等)分泌产生,通过直接杀伤肿瘤细胞、抑制肿瘤细胞生长、抗血管生成以及调节免疫细胞活性等作用共同促使免疫系统对肿瘤细胞的清除。这些研究结果均表明,通过抑制 *Myc*,能够显著增强 LLC 全细胞疫苗对免疫系统的激活作用,进而提升免疫系统对肿瘤细胞的杀伤能力。

综上所述,本研究成功制备了针对 *Myc* 靶向抑制的 LLC 全细胞疫苗。在小鼠模型中,接种这种 LLC 全细胞疫苗可以增强免疫系统对 LLC 的攻击能力,从而显著减缓肿瘤的生长速度,延长小鼠的生存期。这一发现为应用全细胞疫苗治疗人 LUAD 提供了数据参考。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学实验动物福利伦理委员会的审核批准(文件号 20220405C5718-202206097)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》规定进行。
作者声明:所有作者参与了研究设计及论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020;GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.

[2] LIU J, FU M Y, WANG M N, et al. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: Platforms and current progress[J]. J Hematol Oncol, 2022,15(1):28.

[3] KEENAN B P, JAFFEE E M. Whole cell vaccines—Past progress and future strategies[J]. Semin Oncol, 2012,39(3):276-286.

[4] KARPANEN T, OLWEUS J. The potential of donor T-cell repertoires in neoantigen-targeted cancer immunotherapy[J].

Front Immunol, 2017,8:1718.

[5] DUFFY M J, OGRADY S, TANG M H, et al. MYC as a target for cancer treatment[J]. Cancer Treat Rev, 2021,94:102154.

[6] LAYER J P, KRONMÜLLER M T, QUAST T, et al. Amplification of N-Myc is associated with a T-cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression[J]. Oncoimmunology, 2017,6(6):e1320626.

[7] WU X F, NELSON M, BASU M, et al. MYC oncogene is associated with suppression of tumor immunity and targeting Myc induces tumor cell immunogenicity for therapeutic whole cell vaccination [J]. J Immunother Cancer, 2021,9(3):e001388.

[8] CHOI S K, HONG S H, KIM H S, et al. JQ1, an inhibitor of the epigenetic reader BRD4, suppresses the bidirectional MYC-AP4 axis via multiple mechanisms[J]. Oncol Rep, 2016,35(2):1186-1194.

[9] DELMORE J E, ISSA G C, LEMIEUX M E, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc [J]. Cell, 2011,146(6):904-917.

[10] ROSENBERG J, HUANG J. CD8⁺T cells and NK cells: Parallel and complementary soldiers of immunotherapy[J]. Curr Opin Chem Eng, 2018,19:9-20.

[11] HU Y, TIAN Z G, ZHANG C. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018,39(2):167-176.

[12] 马青坪,付顺利,刘永军,等.基于 NK 细胞的招募激活策略在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. 药物生物技术, 2022,29(6):618-623.

[13] BORST J, AHRENDTS T, B BAŁA N, et al. CD4⁺T cell help in cancer immunology and immunotherapy[J]. Nat Rev Immunol, 2018,18(10):635-647.

[14] 梁敏,肖艳红,刘艳灵,等.调节性 T 细胞在抗肿瘤免疫及治疗中的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2022,34(6):481-484.

[15] BRODY R, ZHANG Y D, BALLAS M, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review[J]. Lung Cancer, 2017,112:200-215.

[16] SKOULIDIS F, GOLDBERG M E, GREENAWALT D M, et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma[J]. Cancer Discov, 2018,8(7):822-835.

[17] 黄文俊,曾晓荣.肿瘤细胞疫苗的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2012,35(4):435-439.

[18] 韩明伟,李一鸣,蒋建利.肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞分化与免疫治疗的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2022,38(8):760-766.

[19] 俞丁宁,石映红,钱晖. CD8⁺T 细胞在肿瘤免疫治疗中的应用策略[J]. 江苏大学学报(医学版), 2022,32(6):532-536.