

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.02.002

❖ 基础研究 ❖

ST2 抗体治疗对 Kras^{G12D} 非小细胞肺癌小鼠肿瘤标志物的水平和 IL-33、ST2 表达的影响

传锋彬¹, 史红阳², 孔振兴³

(1. 渭南市中心医院呼吸与危重症医学科, 陕西 渭南 714000; 2. 西安交通大学第二附属医院呼吸与危重症医学科; 3. 西安市第四医院检验科, 陕西 西安 710004)

【摘要】目的: 探讨 ST2 抗体治疗对 Kras^{G12D} 小鼠非小细胞肺癌中肿瘤标志物神经烯醇化酶 (NSE)、癌胚抗原 (CEA) 水平和 IL-33、ST2 表达的影响。**方法:** 以野生型 (WT) 非小细胞肺癌小鼠为对照组, Kras^{G12D} 非小细胞肺癌小鼠为试验组, 用 ELISA 法于第 6 周、12 周、18 周检测小鼠血清中 NSE 和 CEA 的水平; 流式细胞术检测小鼠肺肿瘤组织中的调节性 T 细胞 (Tregs) 以及表达 ST2 抗体的 Tregs 细胞的比例; RT-qPCR 检测小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和肺组织中 IL-33 的表达水平。**结果:** 随着周龄增长, Kras^{G12D} 小鼠血清中 NSE 和 CEA 的水平不断提高, 肺肿瘤中 Tregs 高度表达 ST2 抗体 ($P < 0.05$); ST2 抗体治疗可清除 Kras^{G12D} 小鼠肺癌中活化的 Tregs, 增强抗肿瘤免疫反应, 降低血清 NSE、CEA 水平 ($P < 0.05$)。**结论:** Tregs 中 ST2 抗体的表达可上调 Kras^{G12D} 小鼠血清中 NSE、CEA 的水平, 并且 ST2 抗体治疗可通过清除肺组织中活化的 Tregs, 减轻肿瘤负担, 降低血清中 NSE 和 CEA 的水平。

【关键词】 非小细胞肺癌; ST2 抗体; 调节性 T 细胞; Kras 突变; 肿瘤标志物; 白细胞介素 33; 小鼠

【中图分类号】 R730.2; R734.2 **【文献标志码】** A

Effects of ST2 antibody treatment on the expression of tumor markers, IL-33 and ST2 antibody in Kras^{G12D} mice with non-small cell lung cancer

CHUAN Feng-bin¹, SHI Hong-yang², KONG Zhen-xing³

(1. Department of Respiratory and Critical Medicine, Weinan Central Hospital, Weinan 714000; 2. Department of Respiratory and Critical Medicine, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University; 3. Department of Laboratory, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of ST2 antibody treatment on the expression of tumor markers neuron-specific enolase (NSE) and carcinoembryonic antigen (CEA), IL-33 and ST2 in KrasG12D mice with non-small cell lung cancer. **Methods:** Wild-type (WT) mice without non-small-cell lung cancer and KrasG12D mice with non-small-cell lung cancer were selected as the controls and treated groups. The ELISA method was used to detect the levels of NSE and CEA in the mice's serum at 6th week, 12th week and 18th week of tumor progression. Also, the proportion of regulatory T cells (Tregss) in the tissue of lung tumor Tregs and those expressing ST2 was evaluated by flow cytometry. Additionally, the expression of IL-33 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue was analyzed through quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results:** The levels of NSE and CEA in the serum of KrasG12D mice were increased with age, and ST2 was highly expressed in Tregs of non-small-cell lung tumors were increased ($P < 0.05$). Furthermore, the in vitro introduce of ST2 antibody could clear the activated Tregs in KrasG12D mice with non-small-cell lung cancer, enhance the anti-tumor immune response, and reduce the levels of NSE and CEA in mice's serum ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of ST2 in Tregs up-regulate the levels of NSE and CEA levels in KrasG12D mice's serum, while the in vitro introduce of ST2 antibody effectively reduce the burden of tumors and the levels of NSE, CEA by clearing activated Tregs in lung tumors.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; ST2 antibody; Regulatory T cells; Kras mutation; Tumor marker; IL-33; Mice

肺癌是癌症相关死亡的主要原因, 患者 5 年平均生存率仅为约 15%^[1]。其中, 非小细胞肺癌约占所有肺癌的 80%。肿瘤标志物神经烯醇化酶 (neu-

ron-specific enolase, NSE) 和癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 可用于非小细胞肺癌的早期诊断和病理类型鉴别^[2]。非小细胞肺癌常基于 Kras 基

因的驱动突变,与吸烟相关的人非小细胞肺癌中,超过 25% 与活化的 Kras 突变有关^[3]。另有研究显示,调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregss)可在人非小细胞肺癌早期和晚期中大量累积^[4]。Tregss 通过抑制效应 T 细胞,维持组织的完整性,并且短暂清除 Tregss 可有效降低机体的肿瘤负荷^[5]。但是,完全清除 Tregss 也会诱发致命的自身免疫性疾病。现有 Tregs 靶向治疗,如 CD25 抗体治疗,由于特异性较低,会使活化的效应 T 细胞耗竭^[6-7]。因此,通过局部清除 Tregs 或优先靶向免疫抑制 Tregs 亚群来促进抗肿瘤免疫的有效策略具有重要意义。本研究拟检测 Kras 突变非小细胞肺癌(Kras^{G12D})小鼠血清中 NSE、CEA 的水平,及其 Tregs 中 ST2 蛋白的表达;进一步探讨 ST2 抗体治疗对 Kras 突变非小细胞肺癌小鼠血清中 NSE、CEA 及其肿瘤负荷和抗肿瘤免疫反应的作用,以期治疗 Kras 突变的非小细胞肺癌中活化的 Tregs 提供一定的实验依据。

1 材料方法

1.1 主要试剂

CD25(PC61)、CD4(RM4-5)、Foxp3(FJK-16s)、ST2(RMST2-2)、NK1.1(PK136)和 PD1(J43)抗体购于美国 BD 生物科学公司。同型对照免疫球蛋白购于武汉艾美捷科技有限公司。

1.2 实验小鼠分组

40 只健康雄性 Kras^{G12D} 非小细胞肺癌小鼠及 8 只对照野生型(wild type, WT)非小细胞肺癌小鼠购于美国 Jaxlab 公司,在 SPF 清洁级环境下饲养。40 只 Kras^{G12D} 小鼠随机分为 5 组,每组 8 只;ST2 抗体治疗实验中,随机选取 2 组 Kras^{G12D} 小鼠在 18 周时分别给予腹腔注射 ST2 抗体(1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)或同型对照免疫球蛋白(1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹),连续 3 周,WT 组注射同型对照免疫球蛋白(1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。结束后各组小鼠处死。

1.3 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

分别在 6 周、12 周和 18 周时采用小鼠酶联免疫吸附试验试剂盒检测小鼠血清中 NSE、CEA 水平,操作过程严格按照说明书进行。

1.4 流式细胞术

提取小鼠肺肿瘤组织,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)灌洗后,用 0.1 mg/mL 胶原酶 IV 在 37 °C 消化 30 min,然后用 70 μm 尼龙网对肺组织进行机械分离,1 000 rpm 离心 20 min,获得单个核细胞。

对分离出的细胞进行流式细胞仪分析。采用

FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司生产)测定 Tregs 细胞的表达水平,CD4-FITC + CD25-PE + Foxp3 抗体标记 Tregs 细胞,并进一步检测 Tregs 细胞中 CD4-FITC + CD25-PE + Foxp3 + ST2、CD4-FITC + CD25-PE + Foxp3 + NK1.1、CD4-FITC + CD25-PE + Foxp3 + PD1 的表达,调整细胞浓度,将 100 μL 以上荧光抗体加入对应单个核细胞内,室内避光孵育 1 h,冲洗(PBS 缓冲液),将破膜剂加入,再次避光孵育 15 min, PBS 冲洗后上机收集细胞流式细胞仪进行检测,检测过程严格按照说明书进行。

1.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

通过气管插管收集 1 mL PBS 液获得各组小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),1 200 rpm 离心 10 min 后获得 BALF 液,并收集小鼠肺组织样本分别进行核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)分析,用组织匀浆器在 Trizol 试剂中分离肺组织 mRNA, BALF 细胞直接置于 Trizol 中。采用 SYBR 预混料和 Bio-Rad 实时热循环系统进行 RT-qPCR 实验检测转录产物。以磷酸甘油醛脱氢酶基因为标定基因,基因的相对表达量用 2^{-ΔΔCT} 表示。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 过程中的引物序列

Gene	Primer Sequence(5'-3')
IL-33	
forward	5'-TCACTTACACACATGAGCAAGAC-3'
reverse	5'-CGGTCTGAGGAGTAGAGACCA-3'
β-Actin	
forward	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
reverse	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,血清 NSE 和 CEA 水平、肿瘤浸润 Tregs、NK1.1 细胞和 PD-1 的比例均使用单因素方差分析 Tregs,组间比较使用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Kras^{G12D} 小鼠血清 NSE、CEA 的水平和肺肿瘤浸润中 Tregs 的比例

与 WT 组相比, Kras^{G12D} 小鼠血清中肿瘤标志物 NSE 和 CEA 的水平随着周龄的增长不断提高(*P* < 0.05)。流式细胞术结果显示, Kras^{G12D} 小鼠肺 CD4 T 细胞中的 Tregs 比率也随着肿瘤进展的推移而不断增加(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 Kras^{G12D}小鼠血清 NSE、CEA 水平和肺肿瘤浸润中 Tregs 比例 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

测试项目	WT 小鼠	Kras ^{G12D} 小鼠的周龄 (周)		
		6	12	18
NSE (ng/mL)	6.08 ± 1.55	11.11 ± 3.45 *	29.70 ± 5.67 *	35.83 ± 10.76 *
CEA (ng/mL)	4.20 ± 1.02	16.3 ± 2.24 *	39.33 ± 8.15 *	59.34 ± 10.85 *
Tregs 比例 (%)	2.21 ± 0.71	5.18 ± 1.03 *	12.55 ± 3.07 *	17.67 ± 3.19 *

* $P < 0.05$, 与 WT 小鼠比较。

2.2 Kras 突变非小细胞肺癌中 CD4⁺Foxp3⁺T 细胞 ST2 表达

Kras^{G12D}小鼠肺肿瘤中 Tregs 细胞中 CD25 和 ST2 呈高表达 ($P < 0.05$), 见图 1A。随着周龄的增长和肿瘤的发展, Kras^{G12D}小鼠肺组织中和 BALF 液中的白介素 33 (interleukin-33, IL-33) 表达水平均显著增加 ($P < 0.05$), 见图 1B。

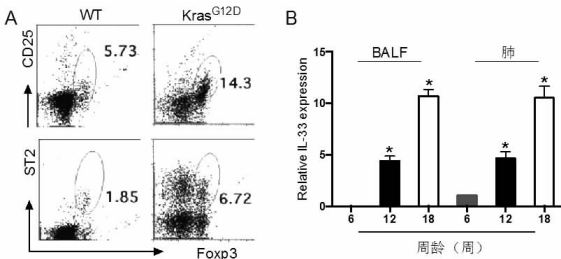


图 1 Kras 突变非小细胞肺癌中 CD4⁺Foxp3⁺T 细胞 ST2 和 IL-33 表达增加

* $P < 0.05$, 与 WT 小鼠比较。

2.3 ST2 抗体治疗后 Kras 突变非小细胞肺癌中活化 Tregs 的比例

与阴性对照组相比, 给予抗 ST2 抗体治疗的 Kras^{G12D}小鼠的肺中表达 ST2 的 Tregs 显著减少 ($P < 0.05$)。见图 2。

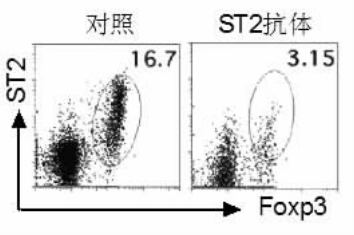


图 2 ST2 抗体治疗后 Kras 突变非小细胞肺癌中活化的 Tregs 比例

2.4 ST2 抗体治疗后 Kras^{G12D}小鼠血清中 NSE、CEA 水平和抗肿瘤免疫反应

ST2 抗体治疗后 Kras^{G12D}小鼠血清中 NSE 和 CEA 的水平显著降低 ($P < 0.05$, 表 3)。此外, Kras^{G12D}小鼠肺肿瘤中 NK1.1 细胞比率降低, PD-1 水平增加, 并且经 ST2 抗体治疗后小鼠肺中的 NK1.1 细胞比率增加而 PD-1 水平降低 ($P < 0.05$)。

表 3 ST2 抗体治疗 Kras^{G12D}小鼠 NSE、CEA 水平和抗肿瘤免疫反应 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

	WT 小鼠	Kras ^{G12D} 小鼠	Kras ^{G12D} 小鼠 + ST2
NSE (ng/mL)	6.08 ± 1.55	35.83 ± 11.76 *	18.32 ± 2.33 #
CEA (ng/mL)	4.20 ± 1.02	59.34 ± 10.85 *	19.05 ± 4.21 #
NK1.1 细胞 (%)	15.15 ± 2.08	7.51 ± 0.98 *	13.33 ± 2.70 #
PD-1 (%)	2.01 ± 0.48	6.59 ± 0.95 *	3.77 ± 0.42 #

* $P < 0.05$, 与 WT 组比较; # $P < 0.05$, 与 Kras^{G12D}小鼠组比较。

3 讨论

致癌的 Kras 突变被认为是 30% 的非小细胞肺癌的始动因素, 且在未进行靶向治疗时与不良预后密切相关^[8]。与许多恶性肿瘤一样, 非小细胞肺癌是一种异质性疾病, 包括多种特异组织学亚型, 具有独特的分子特征^[9]。由于非小细胞肺癌亚型的突变特征不同, 免疫细胞组成和激活状态也不同, 目前临床上尚无针对 Kras 突变的非小细胞肺癌靶向治疗, 尽管针对非小细胞肺癌治疗的早期干预比晚期转移性肿瘤的治疗更有效。因此, 探索有效的靶向治疗手段尤为困难, 进而促使研究 Kras 突变肺肿瘤的特异免疫成分以用于临床治疗具有一定的前瞻性。

近年来, 免疫治疗的进展为癌症靶向治疗提供了新思路, 使用合适的临床前癌症模型开发和测试新药物至关重要。由于自发癌症的基因工程小鼠模型具有可再现人类癌症, 并激活宿主免疫系统对抗内生的肿瘤等优势, 本研究使用了 Kras^{G12D}肺癌小鼠模型, 发现 Tregs 在其肺肿瘤组织中明显富集, 促使小鼠的非小细胞肺癌不断进展, 这可能是由于 Tregs 在肿瘤发展过程中与抗肿瘤的免疫反应有关 Tregs^[10-11]。ST2 是 IL-33 的受体, 与脂肪组织、肠和肌肉中激活的组织中的 Tregs 密切相关^[12]。在流感感染的致病环境中, ST2 表达的 Tregs 已被证明是维持组织完整性的关键介质^[13]。人肺腺癌标本中 IL-33 表达水平升高, 可能会诱导在肺癌中 ST2 表达的 Tregs 的水平增加^[14]。在整体或 Tregs 特异性 ST2 缺失动物模型中, Tregss 中 ST2 的表达可促进结直肠癌的免疫抑制环境^[15]。本研究检测了局部消除肿瘤浸润的 Tregs。结果显示, 在肿瘤进展过程中, ST2 表达的 Tregs 在肺肿瘤组织中高度富集, Tregs 并且 Kras^{G12D}小鼠肺中 IL-33 的表达水平也显著增加。

Tregs 中 ST2 的表达仅限于肺肿瘤组织, 而在次级淋巴器官中几乎不存在, 为探究局部 Tregs 是否可以被特异性抑制, 以及 Kras^{G12D}小鼠中局部 Tregs 是否是肿瘤免疫监测的积极参与者, 本研究还采用

抗 ST2 抗体治疗 $Kras^{G12D}$ 小鼠 3 周, 在肺肿瘤部位实现活化的 Tregs 消除, 证实了 Tregs 中 ST2 对抗肿瘤免疫的阻碍作用, 表明 ST2 抗体治疗可有效地选择性清除肿瘤浸润激活的 Tregs, 降低肿瘤负担, 增强抗肿瘤免疫反应, 并降低血清中肿瘤标志物 NSE、CEA 水平。因此, 靶向表达 Tregs 中 ST2 可以控制 $Kras^{G12D}$ 肺癌小鼠肿瘤负担以及血清中 NSE、CEA 水平。

$Kras^{G12D}$ 小鼠模型肺中 ST2 的表达为探讨清除肿瘤浸润的 Tregs 在自发性肺癌治疗中的作用提供了新的实验证据。然而, Tregs 的长期缺失可诱导系统效应辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th 细胞) 反应增加, 进而导致过度炎症反应和自身免疫性疾病。可是, 免疫细胞的系统激活也需要持久的免疫反应。因此, 应进一步研究局部 Tregs 的清除或 Tregs 的短暂抑制与全身免疫调节药物联合应用的治疗可能性。本研究显示 $Kras^{G12D}$ 小鼠 ST2 抗体治疗后抗肿瘤免疫反应增强, 但不能排除 ST2 抗体治疗以 $Kras^{G12D}$ 肺癌小鼠中 Tregs 以外的细胞成分为靶点, 从而导致肿瘤抑制和血清标志物降低的可能性, 这也是本研究的局限性, 后续需做进一步的探索。

综上, $Kras^{G12D}$ 非小细胞肺癌小鼠血清 NSE、CEA 水平上调, 肿瘤过度浸润 Tregs, ST2 表达增加, ST2 抗体治疗可显著清除肺肿瘤中活化的 Tregs, 增强抗肿瘤免疫反应, 降低血清中 NSE、CEA 水平。靶向表达 ST2 的 Tregs 可能是非小细胞肺癌潜在的新治疗靶点。

参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
[2] 陈菊芬. 肿瘤标志物 CYFRA21-1、NSE 及 CEA 联合检测在肺癌诊断中的价值 [J]. *实用临床医药杂志*, 2013, 17(15): 20-22.
[3] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular

profiling of lung adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 511(7511): 543-550.
[4] De Simone M, Arrigoni A, Rossetti G, et al. Transcriptional landscape of human tissue lymphocytes unveils uniqueness of tumor-infiltrating T regulatory cells [J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 1135-1147.
[5] Bos PD, Plitas G, Rudra D, et al. Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(11): 2435-2466.
[6] 何方园, 张红鸭, 胡萌萌, 等. 调节性 t 细胞与 Th17 细胞相关因子在实验性自身免疫性肌炎小鼠淋巴结中的表达及意义 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(4): 399-402.
[7] Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, et al. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3 + CD25 + CD4 + regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2010, 202(7): 885-891.
[8] Jordan EJ, Kim HR, Arcila ME, et al. Prospective comprehensive molecular characterization of lung adenocarcinomas for efficient patient matching to approved and emerging therapies [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(6): 596-609.
[9] 江学维, 白楠, 曹江, 等. 埃克替尼治疗非小细胞肺癌的有效性及安全性的 Meta 分析 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(18): 1714-1716.
[10] 王远, 吴昌平, 卢斌峰, 等. 调节性 t 细胞在肿瘤免疫逃逸中的机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(11): 2664-2469.
[11] 高祥, 郭涛, 黄婧, 等. 体外扩增的 treg 细胞抑制 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫 [J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(4): 308-312.
[12] Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(3): 276-285.
[13] Arpaia N, Green J, Moltedo B, et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection [J]. *Cell*, 2015, 162(5): 1078-1089.
[14] Kim MS, Kim E, Heo JS, et al. Circulating IL-33 level is associated with the progression of lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(2): 346-351.
[15] Pastille E, Wasmer MH, Adamczyk A, et al. The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype to promote intestinal cancer [J]. *Mucosal Immunology*, 2019, 12(4): 990-1003.

(收稿日期: 2020-03-30

修回日期: 2020-05-23)