

肿瘤新抗原疫苗对 EGFR-TKI 耐药肺癌的作用及机制研究

冯炜红¹, 韩玲¹, 魏剑辉¹, 田冲¹, 王宇鹏¹, 李凤娥², 杜学明^{1*}

1. 天津市北辰医院 肿瘤科, 天津 300400

2. 得克萨斯大学安德森癌症中心 黑色素瘤医学部, 美国 休斯顿 77054

摘要: **目的** 通过采用肿瘤新抗原疫苗对产生表皮细胞生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)耐药性的肺癌大鼠模型进行治疗,并进一步探究其机制。**方法** 采用胸部X射线照射,剂量为3 Gy,每周3次,构建大鼠肺癌模型,对EGFR-TKI治疗2周后,大鼠肿瘤大小不再减小,视为耐药性大鼠肺癌模型建立成功。采用标准的固相合成肽化学和反相高效液相色谱法合成和纯化多肽制备特异性新抗原,将大鼠肺癌EGFR-TKI耐药模型随机分为模型组、传统化疗组[采用传统一线联合化疗方式,先ip培美曲塞10 mg/(kg·d),再ip顺铂0.6 mg/(kg·d),连续用药10 d],新抗原组(采用sc特异性新抗原进行化疗,剂量3 mL/只,连续用药2次)。PET-CT检测各组大鼠的肿瘤大小,苏木素-伊红(HE)染色观察组织病变情况,流式细胞术检测各组大鼠外周血淋巴细胞CD4⁺、CD8⁺、CD127⁺表达,酶联免疫吸附实验检测外周血γ干扰素(IFN-γ)、白细胞介素(IL)-2、IL-5水平。**结果** 新抗原组肿瘤质量显著低于模型组和传统化疗组($P<0.05$),同时PET-CT扫描新抗原组肿瘤病灶出现缩小趋势;HE染色中,相比于模型组和传统化疗组,新抗原组肺组织中炎性浸润现象呈现显著下降趋势,同时新生毛细血管的增加量和肺泡腔的孔径呈现上升趋势;相比于模型组和传统化疗组,新抗原组大鼠外周血淋巴细胞中CD4⁺、CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺的表达情况呈现显著升高,CD8⁺的表达则显著降低($P<0.05$);相比于模型组和传统化疗组,新抗原组大鼠外周血中IL-2、IFN-γ、IL-5水平显著下降($P<0.05$)。**结论** 采用肿瘤新抗原疫苗对EGFR-TKI耐药后肺癌大鼠模型进行干预,能够有效地缩减肿瘤质量,对肺部组织炎性病变程度起到一定的缓解作用,能够减轻炎症浸润情况,通过升高外周血淋巴细胞内CD4⁺、CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺,减少CD8⁺因子的表达,起到免疫抑制作用。另外,新抗原疫苗能够降低外周血IFN-γ、IL-2、IL-5炎性因子水平,减轻肺部炎症程度。

关键词: 新抗原疫苗;表皮细胞生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂;肺癌;干扰素-γ;白细胞介素-2、白细胞介素-5

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)02-0237-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.02.003

Study on the mechanism of tumor neoantigen vaccine in treatment of EGFR-TKI resistant lung cancer

FENG Wei-hong¹, HAN Ling¹, WEI Jian-hui¹, TIAN Chong¹, WANG Yu-peng¹, LI Feng-e², DU Xue-ming¹

1. Department Oncology, Tianjin Beichen Hospital, Tianjin 300400, China

2. Department of Melanoma Medicine, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston 77054, USA

Abstract: Objective To further explore the mechanism of tumor neoantigen vaccine to treat lung cancer rat models with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) resistance. **Methods** The rat lung cancer model was established by chest X-ray irradiation at a dose of 3 Gy, 3 times weekly. After EGFR-TKI treatment for 2 weeks, the tumor size of the rats did not decrease, which was regarded as the successful establishment of drug-resistant rat lung cancer model. Specific neoantigens are prepared by synthesizing and purifying peptides using standard solid-phase synthetic peptide chemistry and reversed-phase high performance liquid chromatography. The EGFR-TKI resistant rat lung cancer model was randomly divided into model group, conventional chemotherapy group [Traditional first-line combined chemotherapy, peritoneally injected pemetrexed 10 mg/(kg·d), followed by cisplatin 0.6 mg/(kg·d) for 10 consecutive days], neoantigen group (Specific neoantigen was injected subcutaneously for 2 times at a dose of 3 mL). The tumor size of rats in each group was detected by PET-CT, the histological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE)

收稿日期: 2021-07-14

基金项目: 天津市北辰区科技计划项目 (SHGY-2020006)

作者简介: 冯炜红 (1985—), 女, 主治医师, 硕士, 主要从事肿瘤学方向工作。E-mail: balala2005@163.com

*通信作者: 杜学明 (1973—), 男, 副主任医师, 本科, 主要从事肿瘤介入治疗方向工作。E-mail: dudaming73@163.com

staining, the expression of CD4⁺, CD8⁺, and CD127⁺ in peripheral blood lymphocytes of rats in each group was detected by flow cytometry, and the levels of interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2, and IL-5 in peripheral blood were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The tumor quality in the neoantigen group was significantly lower than that in the model group and traditional chemotherapy group ($P < 0.05$), and the tumor lesions in the PET-CT scanning neoantigen group showed a trend of shrinkage. In HE staining, compared with the model group and traditional chemotherapy group, the inflammatory infiltration in the lung tissues of the neoantigen group showed a significant decreasing trend, while the increase of new capillaries and the aperture of alveolar cavity showed an increasing trend. Compared with model group and conventional chemotherapy group, the expression of CD4⁺, CD4⁺/CD127⁺, and CD8⁺/CD127⁺ in peripheral blood lymphocytes of neoantigen group was significantly increased, while the expression of CD8⁺ was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group and conventional chemotherapy group, the levels of IL-2, IFN- γ , and IL-5 in peripheral blood of neoantigen group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The intervention of tumor neoantigen vaccine on EGFR-TKI resistant lung cancer rat model can effectively reduce the tumor quality, alleviate the degree of inflammatory lesions in lung tissue to a certain extent, and reduce inflammatory infiltration. By increasing CD4⁺, CD4⁺/CD127⁺, and CD8⁺/CD127⁺ in peripheral blood lymphocytes, and reducing the expression of CD8⁺ factors, play an immunosuppressive role. In addition, neoantigen vaccine can reduce the levels of IFN- γ , IL-2, IL-5 inflammatory factors in peripheral blood, and reduce the degree of lung inflammation.

Key words: neoantigen vaccine; EGFR-TKI; lung cancer; IFN- γ ; IL-2; IL-5

肺癌的高发病率使其成为临床最常见的恶性肿瘤疾病之一，同时对其进行组织病理学检测发现，非小细胞肺癌在肺癌的疾病总体发生率达到 80% 以上^[1]。针对非小细胞肺癌多采用放疗、化疗以及手术治疗^[2]。分子靶向治疗是在传统治疗基础之上针对肺癌进行肿瘤生物学的治疗，因其是对肿瘤病变基因进行靶向干预，在治疗中具有特异性强、毒性小、副作用小等特点^[3]，同时因其靶向性特点也使其在对疾病进行治疗中减轻了对正常组织的伤害，对肿瘤疾病的治疗具有重要的应用价值。

目前针对靶向药物的研究中，多以表皮细胞生长因子受体（EGFR）作为靶点进行相关靶向药物的研究^[4]，同时有学者针对 EGFR 靶向药物进行分类，一类为用于阻止 EGFR 与细胞内天然受体进行结合的单克隆抗体，使其直接在细胞外发挥作用，阻止 EGFR 向细胞内的信息的传递^[5-6]；另一类为表皮细胞生长因子受体 - 酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKIs），通过对细胞生长过程中表皮细胞生长因子受体酪氨酸激酶进行抑制，达到阻碍细胞增殖等生物学特性表达的作用^[7-8]。针对靶向药物在临床应用中的观察，单克隆抗体和 EGFR-FKIs 在临床上治疗肺癌患者均能延长患者的生存时间^[9]。同时又有学者针对 EGFR-FKIs 进行研究发现，肺癌晚期患者通过 EGFR-FKIs 治疗后，可打破传统治疗患者生存时间不足 1 年的局面，使患者的生存时间延长 2 年左右，具有良好的临床治疗效果^[10]。但随着 EGFR-FKIs 在临床应用中越来越广泛，肺癌患者 EGFR-FKIs 治疗后存在着固有抵抗和继发性耐药，

这在一定程度上对 EGFR-FKIs 的治疗效果具有限制作用^[11]。有研究表明，在对 EGFR-FKIs 的耐药性实验中发现，当非小细胞肺癌患者采用 EGFR-FKIs 进行首次治疗时治疗效果最显著，且随着治疗次数的增多，患者机体产生的药物抵抗现象也愈加显著，使出现耐药性患者治疗后的无进展生存时间缩短^[12-13]。因此在此环境背景下对 EGFR-TKI 耐药性进行治疗，能够有效地解决肺癌患者预后差和生存时间短的现状^[14]。

将肿瘤细胞与正常细胞相关生物学特性表征进行比较，肿瘤细胞的发生与发展过程使机体的免疫识别系统发生变化^[15]，细胞在机体内发生恶性增殖、表面抗原突变以及过度表达抗原，使细胞发生免疫逃逸现象^[16]。近年来对肿瘤进行免疫治疗是打破肿瘤在化疗过程中产生免疫耐受性的新型治疗模式^[17]，免疫疗法的治疗原理是利用机体的免疫系统对肿瘤相关抗原进行识别^[18]，从而调控机体对肿瘤细胞的攻击能力，并通过一系列的干预手段对肿瘤免疫炎性和效应细胞的杀伤性进行整体修改^[19]，从而激发和增强机体免疫应答的作用，协调机体的免疫调节系统对肿瘤进行杀伤并抑制其增长^[20]。肿瘤免疫治疗能够使抗原抗体进行相互结合，促进免疫系统记忆机制的产生^[21]。同时针对免疫疗法研发出的肿瘤治疗性疫苗是将肿瘤抗原以多种形式注射入患者体内，进一步诱导患者机体免疫应答反应，达到治疗清除肿瘤的作用^[22]。本实验通过对肿瘤新抗原疫苗治疗 EGFR-TKI 耐药后肺癌的机制进行研究，为相关医学研究者以及临床工作者针对肺

癌的治疗提供参考。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

正电子发射计算机断层显像(PET-CT, 飞利浦; Discovery ST16 PET CT、Discovery VCT64 PET CT, 美国GE公司), NH21 流式细胞仪(德国Freiberg Instruments 公司), 18F-2-氟-2 脱氧-D-葡萄糖[18F-FDG, 汇佳生物科技(上海)有限公司], 注射用培美曲塞二钠(山西振东泰盛制药有限公司, 国药准字 H20080249, 规格: 0.5 g, 批号 0622106014), 顺铂(上海源叶生物科技有限公司, 国药准字 H53021740, 规格: 2 mL: 10 mg, 批号 1g0535B03), 异硫氰酸荧光素(FITC, 青岛捷世康生物科技有限公司), 苏木素-伊红染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司), 酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒(上海琛艺实业有限公司)。Wistar 雌性大鼠 100 只, 清洁级, 体质量 250 g, 4 月龄, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 动物许可证号: SCXK20060009。

1.2 方法

1.2.1 建立大鼠肺癌 EGFR-TKI 耐药模型^[23] 实验选取月龄为 4 个月的大鼠进行胸部 X 射线照射, 剂量为 3 Gy, 照射频率为每周 3 次, 照射完毕后对大鼠行 PET-CT 实时检查, 对于 PET-CT 下可见大鼠肺部占位者视为建模成功, 并记录肿瘤个数变化情况, 对所有的大鼠均完成 EGFR 基因筛查, 并筛选出 EGFR 突变大鼠进行 EGFR-TKI 治疗, 采用小动物 PET-CT 实时监测肿瘤的大小。若治疗过程中, 连续 2 周大鼠肿瘤大小不再减小, 视为耐药性大鼠肺癌模型建立成功。

1.2.2 特异性新抗原的制备^[24] 新抗原的准确预测是构建个性化肿瘤疫苗的主要挑战, 研究中已与 MD 安德森癌症肿瘤抗原涉及著名专家 Gregory Lizée 教授合作, 建立了完善的突变检测、人类白细胞抗原(HLA)分型判定、表达定量、肿瘤新生抗原肽(neo-peptide)测定、卵白裂解、抗原加工相关转运体(TAP)转运、主要组织相容性复合体(MHC)亲和力检测技术、克隆状态分析以及新抗原筛选等技术。以 EGFR L858R 突变为例, 通过检测患者 HLA 分型, 结合项目组合作创新性研发的肽结合预算法, 根据患者突变位点与 HLA 分型设计并制备特异性多肽, 从而设计出多条基于 EGFR L858 的合成肽, 长度为 9~21 个氨基酸。同时, 操

作标准的固相合成肽化学和反相高效液相色谱法合成与纯化多肽[产品纯度在 95.0%以上, 三氟醋酸(TFA) < 1%, 内毒素 < 10 EU/mg]并进行新抗原免疫治疗。

1.2.3 大鼠肺癌 EGFR-TKI 耐药模型分组及给药 将大鼠肺癌 EGFR-TKI 耐药模型随机分为 3 组, 即模型组(未进行治疗的大鼠肺癌 EGFR-TKI 耐药模型)、传统化疗组[采用传统一线联合化疗方式, 先 ip 培美曲塞 10 mg/(kg·d), 再 ip 顺铂 0.6 mg/(kg·d), 连续用药 10 d]、新抗原组(采用 sc 特异性新抗原进行化疗, 剂量 3 mL/只, 连续用药 2 次)。

1.2.4 采用 PET-CT 检测对大鼠肿瘤大小 3 组干预 10 d 后对大鼠行 PET/CT 检查, 大鼠检查前禁食 8 h, 禁水 4 h。吸取小剂量 18F-FDG 测定放射性活度, 并对测定时间与单位进行记录, 然后经大鼠尾 iv 18F-FDG, 剂量为 5.55 MBq/kg, 静脉反流回的血液保存于注射器, 对时间进行记录, 注射后大鼠自由活动 40 min, 麻醉, 仰卧位于 Micro PET-CT 检查床, 对大鼠进行 3D 扫描, 并于扫描后将大鼠放回鼠笼正常环境饲养。

1.2.5 苏木素-伊红(HE)染色检测组织病变情况 3 组干预 10 d 后以断颈方式处死大鼠, 并获取大鼠的肺组织, 并进行组织块固定、包埋、切片、HE 染色, 并用倒置显微镜对肺组织病变情况进行观察。

1.2.6 流式细胞术检测外周血淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺、CD127⁺表达 3 组干预 10 d 后取颈动脉血 3 mL, 并放置于抗凝管中, 加入红细胞裂解液, 磷酸盐缓冲液进行洗涤, 并加入 CD4⁺、CD8⁺、CD25⁺、CD127⁺单克隆抗体进行标记, FITC 为荧光标记物, 孵育 30 min。洗涤并固定, 将检验品放置于流式细胞仪上进行检测, 并进行数据分析。

1.2.7 ELISA 法检测外周血 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 (IL)-2、IL-5 活性表达 3 组干预 10 d 后取颈动脉血 3 mL, 并将样本加入到样品孔内, 并加入稀释好的生物素标记抗体, 加上塑封膜, 孵育, 洗去液体, 加辣根过氧化物酶(HRP), 塑封膜封闭, 孵育, 洗板, 加 TMB 避光孵育, 显色, 加终止反应液终止反应, 吸光度值 450 nm 处进行读板。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据结果进行统计学分析, 采用 Graphpad7 绘图软件对数据结果进行图形绘制, 实验结果计算平均值以 $\bar{x} \pm s$ 的形式记录, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用

单因素方差分析及 LSD 事后检验, 多个时间点的比较采用重复测量方差分析以及 Bonferroni 事后检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肿瘤大小的比较

本研究中 100 只肺癌动物模型大鼠均造模成功, 最终筛选出 90 只 EGFR 突变大鼠, 成功建立了肺癌 EGFR 基因突变大鼠耐药模型, 且大鼠均未

出现死亡。对各组肿瘤大小情况检测, 新抗原组大鼠相比于传统化疗组和未进行药物治疗的模型组, 肿瘤质量显著降低 ($P < 0.05$); 传统化疗组与模型组肿瘤、大鼠体质量比较无统计意义, 说明新抗原疫苗能够对肺癌肿瘤体积的增加起到抑制作用; 同时 PET-CT 扫描结果显示, 新抗原组肿瘤病灶相比于传统化疗组和模型组均显著缩小, 见表 1、图 1。

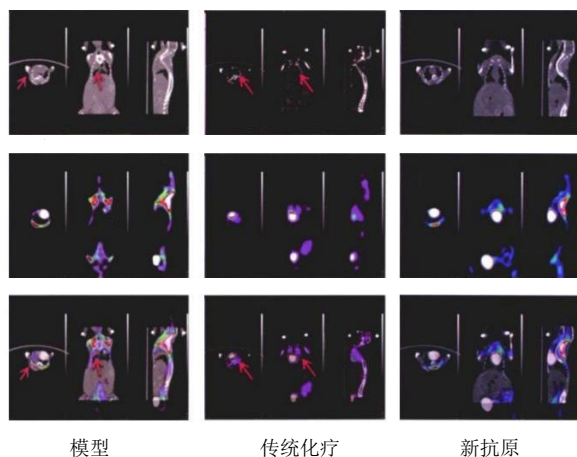
表 1 各组大鼠肺癌肿瘤体积比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 1 Comparison of lung cancer tumor volume in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

组别	剂量	肿瘤质量/g	大鼠体质量/g
模型	—	10.92 ± 2.31	311.23 ± 20.98
传统化疗	培美曲塞 10 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ + 顺铂 0.6 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	8.31 ± 1.56	312.11 ± 21.46
新抗原	3 mL	3.16 ± 1.23* [#]	312.02 ± 20.31* [#]

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与传统化疗组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs traditional chemotherapy group



模型 传统化疗 新抗原

箭头部位为肺部病灶部位
Arrow is the lung lesion

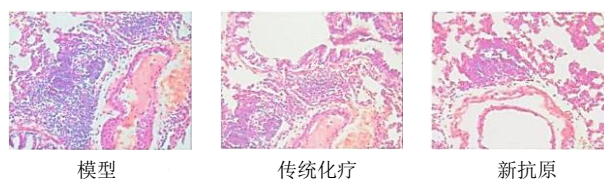
图 1 大鼠肿瘤 PET-CT 不同序列扫描结果

Fig. 1 PET-CT scan results of different sequences of rat tumors

2.2 各组大鼠肿瘤 HE 染色情况的比较

模型组大鼠未采取措施干预, 肺组织炎性细胞浸润明显, 组织伴有大量弥漫性水肿, 未见新生血管形成; 传统治疗组炎性细胞浸润明显, 组织水肿明显, 伴有少许新生血管形成; 新抗原组肺组织炎性细胞浸润不明显, 组织中伴有轻度弥漫性水肿,

且具有新生血管的形成。与传统化疗组及模型组大鼠肺部组织染色结果对比, 新抗原组炎性浸润现象减轻, 同时有新生血管的形成, 肺泡腔出现扩大趋势, 且弥漫性水肿呈现轻度表达, 对肺癌具有良好的治疗作用, 见图 2。



模型 传统化疗 新抗原

图 2 各组大鼠肿瘤 HE 染色图

Fig. 2 HE staining of tumor of rats in each group

2.3 各组大鼠外周血淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺表达的比较

与模型组及传统化疗组相比, 新抗原组 CD4⁺、CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺的表达显著升高 ($P < 0.05$), 但是模型组与传统化疗组外周血淋巴细胞中 CD4⁺、CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺的表达差异无统计意义。同时进一步对新抗原组 CD8⁺在外周血淋巴细胞中的百分比进行检测, 其表达活性与模型组与传统化疗组相比显著下降 ($P < 0.05$), 表达受到抑制, 见表 2、图 3。

表 2 各组大鼠外周血淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 2 Expression of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD127⁺, CD8⁺/CD127⁺ in peripheral blood lymphocytes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

组别	剂量	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD127 ⁺	CD8 ⁺ /CD127 ⁺
模型	—	27.84 ± 2.03	33.92 ± 2.35	17.96 ± 2.36	15.03 ± 1.86
传统化疗	培美曲塞 10 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ + 顺铂 0.6 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	31.21 ± 2.12	32.01 ± 2.59	21.01 ± 2.21	17.23 ± 2.94
新抗原	3 mL	35.36 ± 2.23* [#]	26.31 ± 2.91* [#]	26.98 ± 1.36* [#]	20.98 ± 1.12* [#]

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与传统化疗组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs traditional chemotherapy group

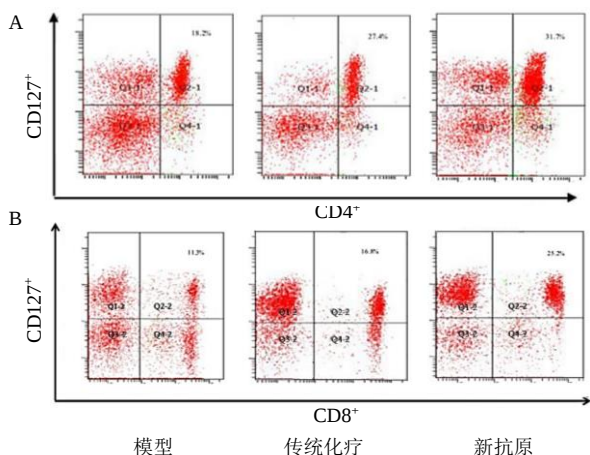


图 3 各组细胞 CD4⁺/CD127⁺ 淋巴细胞(A)和 CD8⁺/CD127⁺ 淋巴细胞(B)百分比流式图

Fig. 3 Flow chart of percentage of CD4⁺/CD127⁺ (A) and CD8⁺/CD127⁺ (B) lymphocytes in each group

表 3 各组大鼠外周血 IFN- γ 、IL-2、IL-5 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 3 Expression of IFN- γ , IL-2 and IL-5 in peripheral blood of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

组别	剂量	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-5/(pg·mL ⁻¹)
模型	—	88.69 ± 6.72	86.63 ± 5.31	49.23 ± 5.98
传统化疗	培美曲塞 10 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ + 顺铂 0.6 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	69.03 ± 5.96*	72.31 ± 4.98*	39.26 ± 6.68*
新抗原	3 mL	60.31 ± 5.23*#	61.31 ± 5.69*#	25.98 ± 6.73*#

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与传统化疗组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs traditional chemotherapy group

测, 获取外周血进行淋巴细胞表面标志分子以及炎症因子表达进行鉴定, 同时对肺癌组织修复程度进行观察, 分析其机制, 为其他学者的研究提供参考。

本次实验通过采用 Micro PET-CT 检测法对大鼠肿瘤大小以及 3D 扫描图进行检测, 在保证各组大鼠体质量无差异性以及均成瘤的情况下, 采用肿瘤新抗原疫苗进行治疗后, EGFR-TKI 耐药肺癌大鼠肿瘤质量出现明显减小, 同时 PET-CT 扫描结果显示, 与模型组和传统化疗组相比, 新抗原组的大鼠 3D 模型中对肺癌病灶大小呈现缩小趋势; 同时对大鼠肺组织 HE 染色上可以看出, 肿瘤新抗原疫苗治疗中, 组织炎症浸润程度出现显著下降, 而肺部组织内毛细新生血管的形成以及肺泡腔孔均呈现扩增趋势; 同时, 组织内部弥漫性水肿现象也呈现下降趋势。由此可以看出, 采用肿瘤新抗原疫苗对 EGFR-TKI 耐药肺癌大鼠模型进行治疗, 能够减轻大鼠的肺组织肿瘤体积, 也使肿瘤组织炎症浸润程度减小, 促进肺部组织新生毛细血管的形成, 对耐药性产生后的肺癌组织起到一定的修复作用, 起

2.4 各组大鼠外周血 IFN- γ 、IL-2、IL-5 水平比较

与模型组相比, 传统化疗组和新抗原组炎症因子 IL-2、IFN- γ 、IL-5 水平显著下降 ($P < 0.05$); 新抗原组炎症因子 IL-2、IFN- γ 、IL-5 水平显著低于传统化疗组, 差异显著 ($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

肿瘤特异性抗原疫苗作为新一代的肿瘤治疗性疫苗, 通过对肿瘤细胞基因组突变基因的产生、研发与之进行相匹配的抗原^[25], 并将其注入体内。通过将肿瘤抗原与突变基因进行结合, 促进机体的免疫应答反应, 进一步对肿瘤细胞进行杀伤以及清除^[26]。本实验中通过选用合适的雌性大鼠建立肺癌 EGFR-TKI 耐药模型, 并对目标特异性新抗原的进行制备, 进一步对肺癌 EGFR-TKI 耐药大鼠模型进行不同药物干预, 对大鼠体内的肿瘤大小进行检

到良好的治疗效果。为了进一步了解其产生原因, 实验对此进行分析, 肿瘤新抗原疫苗对 EGFR-TKI 耐药肺癌大鼠模型进行注射后, 其自身携带的特异性抗原与肿瘤细胞表面的特异性受体进行结合^[27], 从而使机体的细胞免疫反应和体液免疫应答反应均受到高程度激活^[28], 促使 T 细胞亚群 Th1/Th2 活跃状态受到促进, 使 Th2 细胞对淋巴因子以及趋化因子的释放增多^[29]; 并使其在炎症细胞处发生聚集, 对炎症细胞产生清除作用, 减轻组织内炎症浸润程度^[30], 而趋化因子携带的传递信号能够对血管内皮细胞产生刺激作用, 使肺组织内部的肺毛细血管呈现增多^[31], 从而对肺部病变组织起到修复作用, 达到治疗的目的。这一实验结果与 Raoof 等^[32]的研究结果具有一致性。

实验中对采用不同药物干预大鼠的外周血进行采集, 并进行外周血淋巴细胞中标志分子鉴定。与模型组及传统化疗组相比, 新抗原组大鼠治疗后, 外周血淋巴细胞中 CD4⁺、CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺ 标志分子表达情况均呈现显著升

高,同时新抗原组 CD8⁺表达活性受到抑制 ($P<0.05$),为了进一步验证肿瘤新抗原疫苗注射后小鼠机体免疫机制的变化,对外周血中炎症因子的表达进行鉴定,相比于模型组 and 传统化疗组,新抗原组小鼠外周血中炎症因子 IL-2、IFN- γ 、IL-5 水平显著下降 ($P<0.05$),分析其产生机制,肿瘤新抗原疫苗携带的特异性抗体与 EGFR-TKI 耐药后肺癌细胞进行特异性结合后,对机体的抗肿瘤免疫机制产生影响,进一步促进 T 辅助细胞的活性表达^[33],从而对机体的免疫反应产生诱导,促使其辅助效能增加,同时 CD8⁺的降低,减轻了 T 淋巴细胞的细胞毒性^[34],使 B 细胞以及 CD4⁺均呈现高强度表达,促进抗体形成及细胞的免疫反应,同时 CD4⁺/CD127⁺、CD8⁺/CD127⁺处于动态平衡状态^[35],以有效维持细胞免疫功能的稳定表达,且其比值升高,标志着细胞的免疫能力增强,对肿瘤细胞的杀伤力及清除能力也得到提高^[36],对肿瘤起治疗作用。Takeda 等^[37]的研究中显示,在对肺癌患者进行化疗过程中,调节其机体的免疫功能,增强机体的免疫防御机制,降低抗免疫功能,能有效地提高化疗效果,与本研究结果具有一致性。

综上所述,肿瘤新抗原疫苗治疗后能够减轻肿瘤质量,使肺癌病灶呈现缩减趋势,也能使肺癌组织的炎性浸润及弥漫性水肿出现消减趋势,促进新生毛细血管及肺泡腔的形成及扩大,且对外周血淋巴细胞中标志性因子具有调节作用;同时,降低炎症因子的表达,表明肿瘤新抗原疫苗通过与肺癌细胞的抗原特异性结合,使机体的免疫系统功能表达上升,对肿瘤细胞的杀伤及清除力度加大,对疾病的治疗及预后起到重要作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ott P A, Hu-Lieskovan S, Chmielowski B, et al. A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer [J]. *Cell*, 2020, 183(2): 347-362.
- [2] Li L, Goedegebuure S P, Gillanders W E. Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(12): 11-17.
- [3] Hegde S, Krisnawan V E, Herzog B H, et al. Dendritic cell paucity leads to dysfunctional immune surveillance in pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(3): 289-307.
- [4] Leko V, McDuffie L A, Zheng Z, et al. Identification of neoantigen-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in primary bladder cancer [J]. *J Immunol*, 2019, 202(12): 3458-3467.
- [5] Wells D K, van Buuren M M, Dang K K, et al. Key parameters of tumor epitope immunogenicity revealed through a consortium approach improve neoantigen prediction [J]. *Cell*, 2020, 183(3): 818-834.
- [6] Nakahara Y, Kouro T, Igarashi Y, et al. Prospects for a personalized peptide vaccine against lung cancer [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2019, 18(7): 703-709.
- [7] Guo Z S, Lu B, Guo Z, et al. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: Cancer vaccines and oncolytics [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 6-9.
- [8] Ye X, Liang X, Chen Q, et al. Surgical tumor-derived personalized photothermal vaccine formulation for cancer immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(3): 2956-2968.
- [9] Akazawa Y, Saito Y, Yoshikawa T, et al. Efficacy of immunotherapy targeting the neoantigen derived from epidermal growth factor receptor T790M/C797S mutation in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(8): 2736-2746.
- [10] Ding Z, Li Q, Zhang R, et al. Personalized neoantigen pulsed dendritic cell vaccine for advanced lung cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 26.
- [11] Castle J C, Uduman M, Pabla S, et al. Mutation-derived neoantigens for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1856.
- [12] Zhang R, Yuan F, Shu Y, et al. Personalized neoantigen-pulsed dendritic cell vaccines show superior immunogenicity to neoantigen-adjuvant vaccines in mouse tumor models [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(1): 135-145.
- [13] Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, et al. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 14.
- [14] Zhou C, Wei Z, Zhang Z, et al. pTuneos: Prioritizing tumor neoantigens from next-generation sequencing data [J]. *Genome Med*, 2019, 11(1): 67.
- [15] Jiang T, Cheng R, Pan Y, et al. Heterogeneity of neoantigen landscape between primary lesions and their matched metastases in lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2020, 9(2): 246-256.
- [16] De Mattos-Arruda L, Vazquez M, Finotello F, et al. Neoantigen prediction and computational perspectives towards clinical benefit: Recommendations from the ESMO precision medicine working group [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(8): 978-990.

- [17] Veatch J R, Jesernig B L, Kargl J, *et al.* Endogenous CD4⁺T cells recognize neoantigens in lung cancer patients, including recurrent oncogenic KRAS and ERBB2(Her2) driver mutations [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(6): 910-922.
- [18] Chen T, Hu R, Wan Y, *et al.* Comprehensive mutanome analysis of Lewis lung cancer reveals immunogenic neoantigens for therapeutic vaccines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(3): 607-613.
- [19] Wu S G, Shih J Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 38.
- [20] Soria J C, Ohe Y, Vansteenkiste J, *et al.* Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(2): 113-125.
- [21] Peng S, Wang R, Zhang X, *et al.* EGFR-TKI resistance promotes immune escape in lung cancer via increased PD-L1 expression [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 165.
- [22] Mok T S, Wu Y L, Ahn M J, *et al.* Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(7): 629-640.
- [23] Gao J, Li H R, Jin C, *et al.* Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21(10): 1287-1301.
- [24] Wang Q, Yang S, Wang K, *et al.* MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 63.
- [25] Okura N, Nishioka N, Yamada T, *et al.* ONO-7475, a novel AXL inhibitor, suppresses the adaptive resistance to initial EGFR-TKI treatment in EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(9): 2244-2256.
- [26] Ahn M J, Sun J M, Lee S H, *et al.* EGFR TKI combination with immunotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(4): 465-469.
- [27] Ramalingam S S, Vansteenkiste J, Planchard D, *et al.* Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1): 41-50.
- [28] Li F, Zhu T, Cao B, *et al.* Apatinib enhances antitumour activity of EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer with EGFR-TKI resistance [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 84: 184-192.
- [29] Gelatti A C Z, Drilon A, Santini F C. Optimizing the sequencing of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Lung Cancer*, 2019, 137: 113-122.
- [30] Lim S M, Syn N L, Cho B C, *et al.* Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 65:1-10.
- [31] Sequist L V, Han J Y, Ahn M J, *et al.* Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors: Interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(3): 373-386.
- [32] Raoof S, Mulford I J, Frisco-Cabanas H, *et al.* Targeting FGFR overcomes EMT-mediated resistance in EGFR mutant non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2019, 38(37): 6399-6413.
- [33] Uchibori K, Inase N, Araki M, *et al.* Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14768.
- [34] Higo H, Ohashi K, Makimoto G, *et al.* EGFR-TKI acquired resistance in lung cancers harboring EGFR mutations in immunocompetent C57BL/6J mice [J]. *Lung Cancer*, 2019, 136: 86-93.
- [35] Si J, Ma Y, Bi J W, *et al.* Shisa3 brakes resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma by suppressing cancer stem cell Properties [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 481.
- [36] Marcar L, Bardhan K, Gheorghiu L, *et al.* Acquired resistance of EGFR-mutated lung cancer to tyrosine kinase inhibitor treatment promotes PARP inhibitor sensitivity [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(12): 3422-3432.
- [37] Takeda M, Nakagawa K. First-and second-generation EGFR-TKIs are all replaced to osimertinib in chemo-naive EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer? [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 146.

[责任编辑 高 源]