

文章编号: 1006-3080(2025)01-0060-10

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20240319001

基于 KRAS 突变肽段介导的胰腺癌免疫治疗

贺心怡¹, 汤丁越², 张洁², 丁浩¹, 吴侠¹

(华东理工大学 1. 药学院; 2. 生物工程学院, 上海 200237)

摘要: 通过增加 KRAS 抗原负荷来增强机体主动免疫, 开发了一种 KRAS 靶向的免疫治疗药物。构建了 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3 和 Ad-SNP4 这 4 种质粒表达载体, 每种载体含有的突变肽段种类、数量、排列顺序以及连接方式不同, 但均包含 Q61H 突变肽段, 同时表达载体包装腺病毒衣壳, 并在体内外进行验证及筛选。结果表明, 这 4 种表达载体都能在体外成功表达, 并在小鼠体内引起免疫反应。肿瘤药效实验表明, 在含有 KRAS^{Q61H} 突变位点的移植瘤小鼠模型中, 药物可刺激体内免疫反应从而抑制肿瘤生长, 但这 4 种药物的药效存在明显差异, Ad-SNP1 载体药效最好。

关键词: 胰腺导管癌; KRAS; 免疫疗法; 腺病毒; 基因治疗

中图分类号: R735.9

文献标志码: A

胰腺癌(Pancreatic Cancer, PC)是一种消化系统恶性肿瘤,胰腺导管癌(Pancreatic Ductal Adenocarcinomas, PDAC)是胰腺癌最主要的亚型,约 90% 的胰腺恶性肿瘤源于胰腺导管上皮病变形成的胰腺导管癌^[1]。胰腺癌 5 年总生存率仅为 12% 左右^[2],早期发现率低、进展快、易产生耐药性是胰腺癌的主要特点,也是导致其预后不良的主要因素^[1]。据研究结果显示,到 2023 年胰腺癌已成为继肺癌和结直肠癌之后的第三大癌症死亡原因^[2-3]。用手术切除的方法进行治疗目前被认为是胰腺癌唯一的治疗方法^[4],治疗标准为先手术后辅助化疗,但由于大多数病例在早期没有症状,这导致目前可用的诊断测试往往无法检测到早期疾病患者,确诊时只有 15%~20% 的患者有手术机会,大部分患者被诊断时就处于疾病晚期或因局部进展而失去手术机会^[1,5-6]。对于不可进行手术切除的处于疾病转移或疾病晚期患者,化疗是唯一的治疗选择^[7]。但 PDAC 是一种对于化疗耐药性很强的癌症。在能够耐受 5-氟尿嘧啶、伊立替康、奥沙利铂三重化疗的患者中,生存期也只能延长到 11 个月^[8],且这种姑息性化疗可能具有显著的毒性。

Ras 基因是人类癌症中最经常出现突变的肿瘤基因组。而在 *Ras* 突变型癌症中又有 84% 的突变为 KRAS 异构体发生突变^[9]。据 Connor 等^[10]的研究显示,大约 90% 的 PDAC 中存在 KRAS 突变, KRAS 高频率的突变以及其在癌症发展早期被激活,都意味着 KRAS 突变导致的致癌信号传导可能是 PDAC 的一个重要驱动因素^[10]。在 KRAS 中,与癌症相关的错义突变主要聚集在 Gly12(G12)、Gly13(G13)和 Gln61(Q61)密码子上,共占 99%^[11],而在 KRAS^{Q61} 突变中 Q61 的主要突变为 Q61H,约占 57%^[12]。突变的 KRAS 不仅可以促进肿瘤细胞的增殖,还可以促进调节 T 细胞(Treg)等免疫抑制细胞的浸润,减少肿瘤组织中 CD8⁺T 淋巴细胞比例^[13-17]。KRAS 突变等遗传畸变是癌症特有,而在正常组织中不存在^[18]。因此,靶向 KRAS 的典型热点突变是治疗有 KRAS 突变位点癌症的一种非常有吸引力的方法。

在免疫学上,与黑色素瘤^[19]、肺癌和膀胱癌^[20]等其他肿瘤相比,PDAC 具有低免疫原性和低肿瘤突变负荷(TMB)^[19],对于大多数患者来说,肿瘤内很少有效应 T 细胞浸润^[21]。大量体细胞突变释放新抗原

收稿日期: 2024-03-19

作者简介: 贺心怡(2000—),女,湖北人,硕士生,主要研究方向为胰腺癌的免疫治疗。E-mail: 18807132406@163.com

通信联系人: 吴侠, E-mail: wuxia@ecust.edu.cn

引用本文: 贺心怡,汤丁越,张洁,等. 基于 KRAS 突变肽段介导的胰腺癌免疫治疗[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(1): 60-69.

Citation: HE Xinyi, TANG Dingyue, ZHANG Jie, et al. Immunotherapy of Pancreatic Cancer Mediated by KRAS Mutant Peptides[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(1): 60-69.

能使得肿瘤组织中炎症细胞因子和效应 T 细胞增加^[22-24],说明高 TMB 能够激起免疫治疗的疗效^[19,25]。理论上,只要 KRAS 突变在肿瘤细胞上表现出来,通过免疫疗法直接靶向 KRAS 突变就可以实现体内抗肿瘤作用^[26]。已有研究表明突变的 KRAS 肽装载在抗原呈递细胞上可以诱导 KRAS 突变特异性 T 细胞反应^[27-30]。KRAS 突变特异性 T 细胞被激活后可以杀死 KRAS 突变肿瘤细胞,并抑制 KRAS 突变肿瘤的生长。

本文通过增加 KRAS^{Q61H} 突变形成新抗原负荷来激起机体强烈的免疫反应,增强抗肿瘤免疫细胞活性^[31]。将表达 KRAS^{Q61H} 抗原融合蛋白的质粒表达载体包装为 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 病毒注射液,将其注射到小鼠肿瘤组织内,定期测量肿瘤体积变化,在给药后检测小鼠体内效应 T 细胞的变化情况。在终点处取肿瘤组织,分别在 RNA 层面和蛋白层面检测肿瘤组织处 T 细胞的浸润情况。结果表明,Ad-SNP1 通过激起荷瘤小鼠体内强烈的免疫反应,从而达到抑制肿瘤生长的效果,这证明了通过基因治疗的方式增加抗原负荷来达到抑制肿瘤生长是可行的,同时筛选出了效果较好的表达载体,为后续进一步的研究奠定了基础。

1 实验部分

1.1 主要原料与试剂

本文所用的骨架质粒由本实验室保存。SNP1、SNP2、SNP3、SNP4 序列由北京六合华大基因科技有限公司进行全基因合成。限制性核酸内切酶购自 NEB 公司;T4 连接酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;Human GM-CSF DuoSet ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司;抗 HSP70 (Mycobacterium tuberculosis) 抗体购自 GeneTex 公司;APC-CyTM7 Hamster Anti-Mouse CD3e、FITC Rat Anti-Mouse CD4、PerCP-CyTM5.5 Rat Anti-Mouse CD8a 购自美国 BD 公司;C57BL/6J 小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司;人胚肾细胞(HEK293)购自中科院上海细胞库;鼠源胰腺癌细胞(Pan02)购自上海酶研生物科技有限公司;反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;QPCR SYBR Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。人源 KRAS^{Q61H} 基因过表达慢病毒由山东维真生物公司包装。

1.2 主要仪器

净化工作台(上海上净净化设备有限公司,CA-

1390-1 型)、二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific, BB150 型)、荧光倒置显微镜(德国徕卡 Leica 公司, DMIL 型)、多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司, Synergy H1 型)、定量基因扩增仪(Aanalytik Jena AG 公司, OTOWER3.0 型)、高速组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司, KZ-II 型)。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建及病毒包装 根据人源 KRAS 序列及其热点突变位点,设计并优化得到 SNP1、SNP2、SNP3、SNP4 序列,将基因序列提交北京六合华大基因科技有限公司进行全基因合成。将合成好的 SNP1、SNP2、SNP3、SNP4 序列和实验室已有 pAd 载体骨架用限制性内切酶进行双酶切,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收所需的载体骨架片段及目的基因片段,将其用 T4 连接酶进行连接即得到本文所需的 4 个质粒表达载体。质粒转化感受态细胞,并涂布平板培养,将平板上的单克隆菌落挑出培养,菌液送测确认序列无误后抽提质粒用于病毒包装。本文中使用的 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 病毒的包装、扩增和纯化由上海泰儿图生物科技公司完成。

1.3.2 细胞培养及病毒感染 培养基为添加体积分数 10% FBS 和青霉素和链霉素(总体积分数 1%)的高糖 DMEM 培养基,细胞置于 37 °C 的 CO₂ 细胞培养箱中培养。HEK293 细胞以 5×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板,待每个孔内细胞汇合率达到 70%~80% 时,每孔感染 1×10⁷ pfu 的 4 种病毒,培养 48 h 后收上清用于 Elisa 实验,收细胞提取 RNA 用于实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)实验。

1.3.3 组织、细胞的 RNA 提取及 Real-Time qPCR 感染病毒后的细胞加 Trizol 提取 RNA;对于小鼠的肿瘤组织,加 Trizol 及研磨珠匀浆处理后提取 RNA,将提取得到的 RNA 样本进行定量,后用 Prime Script Mix 酶反转录得到 cDNA。根据后续实验所需体积配置扩增体系,扩增体系为 cDNA、双蒸水和预混液 SYBR Mix,用 RT-qPCR 检测在 RNA 水平上各项指标的表达情况,检测时每个样品均设 3 个复孔。

1.3.4 小鼠血常规 对小鼠进行眼眶取血,取血时须在 EP(Eppendorf)管中提前加入 EDTA-K2 抗凝剂,抗凝剂质量浓度为 1.5 mg/mL,血样送由赛维尔生物科技有限公司进行血常规检测。

1.3.5 流式细胞术检测小鼠外周血淋巴细胞 对小鼠进行眼眶取血(在 EP 管中提前加入肝素锂抗凝剂),每管血样中加入 2 μL APC-Cy7 CD3e、1 μL PerCP-Cy5.5 CD8a、1 μL FITC CD4,设置好对照组,

避光孵育 30 min 后用红细胞裂解液进行 2 次红细胞破除,再用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次后用 0.5 mL PBS 重悬,最后细胞滤网过滤后流式上机。

1.3.6 Pan02-Q61H 细胞系构建 首先鼠源胰腺癌细胞(Pan02)提取 RNA 并测序,证实 Pan02 细胞系中不含 KRAS^{Q61H} 突变。用含有 KRAS^{Q61H} 突变的慢病毒以感染复数 50、用 1/2 小体积感染法感染 Pan02,并用含有适当浓度嘌呤霉素的新鲜完全培养液培养几代,筛选稳定转导的细胞株(慢病毒中设计携带有 Puromycin 抗性基因),用显微镜观察 GFP 信号,确认感染情况。收取筛选后的细胞用流式细胞仪检测 GFP 信号,再次验证荧光细胞的比例。同时收细胞并提取 mRNA 进行 RT-qPCR 检测 Pan02-Q61H 细胞在 mRNA 水平上 KRAS^{Q61H} 突变表达。将 RT-qPCR 产物再次进行 PCR 扩增,扩增产物送样测序,验证构建情况。

1.3.7 Pan02-Q61H 小鼠移植瘤实验 构建并验证好的 Pan02-Q61H 细胞,第 1 天(D1)以皮下注射的方式将 8×10^5 个细胞量接种在 C57BL/6 小鼠的右侧背部,每只注射 100 μ L,构建移植瘤小鼠模型。将荷瘤小鼠随机分为 5 组($n=7$),分别为 SNP1 组、SNP2 组、SNP3 组、SNP4 组以及 Control 组,在移植后第 8、14、20 d,每只小鼠瘤内注射 5×10^8 pfu 相应的 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 这 4 种病毒,注射体积为 100 μ L,对照组小鼠则在对应时间点注射相同体积病毒稀释液,根据肿瘤生长情况,每 3 d 监测一次肿瘤的大小,并使用游标卡尺记录二维测量值,计算肿瘤大小($0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$)。在第 34 d 处死小鼠,收集肿瘤组织并称重。

1.3.8 小鼠组织切片及免疫荧光染色 采用多聚甲醛固定肿瘤组织后用梯度乙醇进行组织脱水,然后用二甲苯进行组织透明,最后进行浸蜡和包埋,得到组织样品石蜡块,将蜡块修整后,用石蜡切片机将其切成厚度均为 5 μ m 切片,切片贴于载玻片上进行烤片、脱蜡及复水得到组织样品切片。组织切片先用抗原修复液进行修复,后用体积分数为 3% 的过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶活性,再用封闭液封闭非特异性位点,封闭结束后孵育对应的 CD4、CD8 和 CD11B 抗体,最后用 DAPI(4',6-二脒基-2 苯基吡啶)对细胞核进行染色后封片,用荧光显微镜进行观察并拍摄荧光图。

1.3.9 统计分析 所有的实验数据均使用 Graphpad Prism 9.0 进行统计分析,并采用组件 Student's t-tests 及单因素 One-Way ANOVA 进行分析,所有结果均采用平均值 $\pm$ 标准差(SD)进行表示。 $P<0.05$ 表示数

据在统计学上具有显著性差异,*表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$, ****表示 $P<0.0001$ 。Western Blot 图片以及免疫荧光图片使用 Image J 统计处理,并用 Graphpad Prism 9.0 进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 4 种载体构建及表达水平检测

设计并构建好 4 种质粒表达载体,结果如图 1 所示。由图 1(a)可见,4 种表达载体均由两个表达盒构成,第 1 个表达盒由人巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)启动子、含多种 KRAS 突变位点的肽段融合热激蛋白 70(Heat Shock Protein 70, HSP70)分子佐剂构成;第 2 个表达盒由 TK 启动子以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF)构成。各表达载体 SNP1、SNP2、SNP3、SNP4 中的 KRAS 突变序列排序、连接方式以及种类数量不同,但均含有 Q61H 突变肽段,将构建并验证无误的质粒包装腺病毒衣壳得到 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 这 4 种病毒。

用 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 感染人肾上皮细胞系(HEK293)后检测 GM-CSF 和 HSP70 的表达,结果如图 1(b)和 1(c)所示。由图可见,4 种病毒在 HEK293 中 GM-CSF 蛋白都有表达,其中 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3 组中 GM-CSF 蛋白表达较未感染组分别提高了 131.142、105.031、112.932 倍($P<0.01$),Ad-SNP4 组中 GM-CSF 蛋白表达较未感染组提高了 51.2654 倍($P<0.05$),Ad-SNP1 组中 GM-CSF 蛋白表达较其他 3 组更高;同时在感染 48 h 后收细胞提取 mRNA,通过实时定量 PCR 检测 mRNA 水平上 HSP70 的表达,Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 组 HSP70 表达较未感染组分别提高了 25864.5、753.396、8411.12、2940.8 倍($P<0.01$),Ad-SNP1 组 HSP70 表达显著高于其他 3 组。上述结果表明 4 种病毒在细胞层面都能表达,但表达水平不同,Ad-SNP1 表达最高,其次是 Ad-SNP2、Ad-SNP3,Ad-SNP4 表达最低。为了进一步确定表达情况并筛选表达较好的载体,在体内进行进一步的药效研究。

2.2 4 种载体在小鼠体内免疫评价

已有研究证实了包含突变位点的 KRAS 衍生肽疫苗在癌症患者中能够诱导或增强免疫原性^[27]。本研究将 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 4 种病毒($n=5$)通过皮下注射进入 C57 小鼠体内,剂量为 1×10^8 pfu,评价其体内激活免疫反应的能力。本研究采取与其他研究类似的多次给药模型,以激

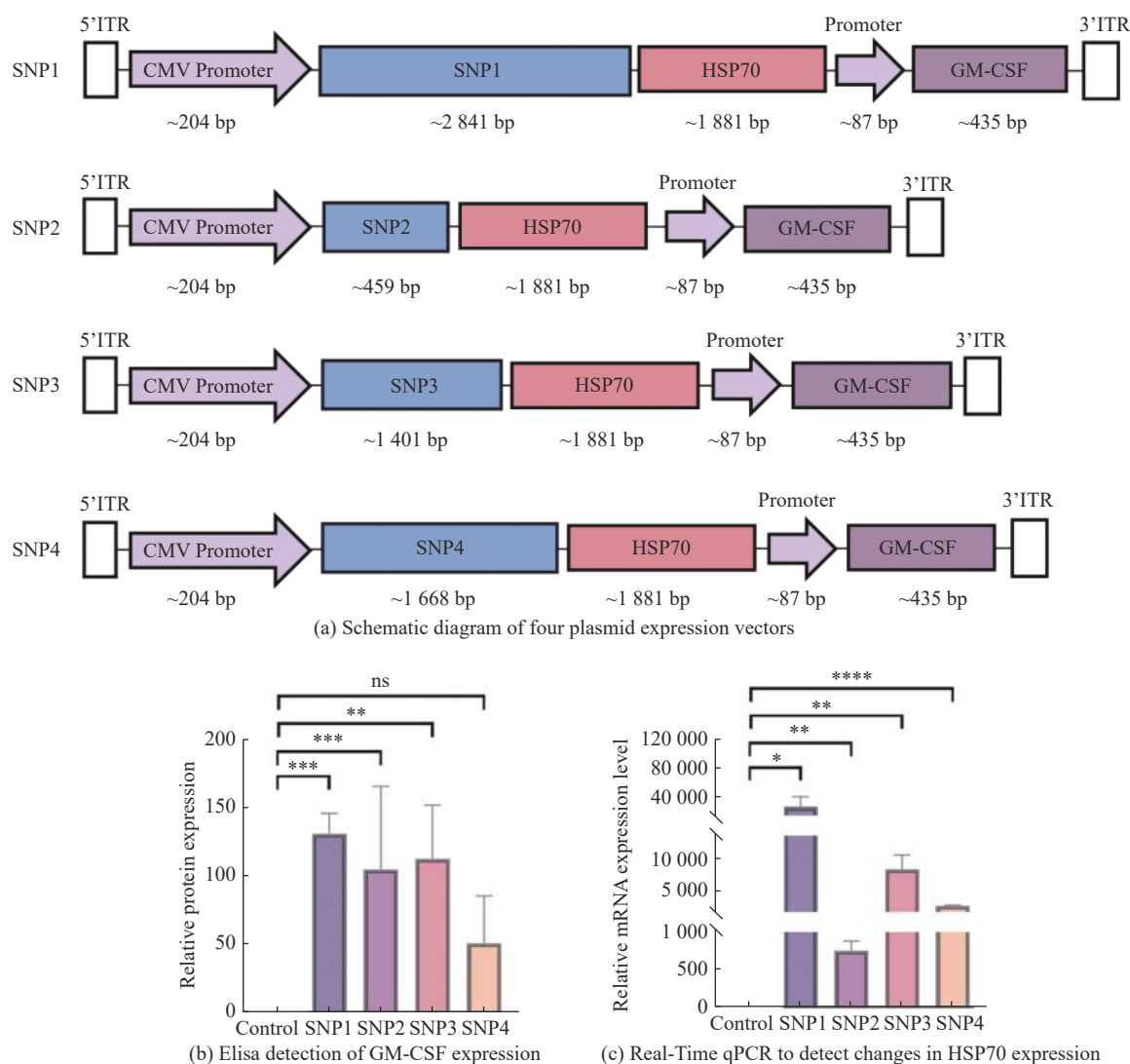


图1 4种载体构建及表达水平检测

Fig. 1 Four vectors construct and expression level detection

活并将免疫反应性维持在一定水平^[28]。研究结果表明,皮下注射4种病毒后,在第1次给药后的第2 d (D2)取血,在第1次给药后两周以相同的剂量再次给药(D14),第2次给药后第6 d (D20)取血,检测血液中白细胞(White Blood Cell, WBC)、单核细胞(Monocytes, Mon)、淋巴细胞(Lymphocyte, Lymph)、中性粒细胞(Neutral Granular Cell, Gran)的变化情况,来判断4种病毒激起机体免疫反应的能力。

第1次给药后2 d (D2)血常规结果如图2(b)~(e)所示,分析血常规结果可以发现,在给药后2 d Ad-SNP1、Ad-SNP4组小鼠体内白细胞、单核细胞、淋巴细胞3种免疫相关细胞与对照组相比有显著提升($P<0.05$);中性粒细胞在Ad-SNP1组小鼠体内升高($P<0.05$),Ad-SNP4组无明显升高($P>0.05$);Ad-SNP2、Ad-SNP3组与未给药组相比上述4种免疫相关细胞均未引起显著变化;总体来看,Ad-SNP1组和Ad-

SNP4组在病毒注射第2 d激起小鼠体内的免疫反应。

在第2次给药后的第6 d (D20)血常规结果如图2(f)~(i)所示,Ad-SNP1、Ad-SNP2和Ad-SNP3组小鼠体内上述4种免疫相关细胞与未给药组相比都有显著升高($P<0.05$);但是Ad-SNP4组在第2次给药后第6 d (D20)时小鼠体内4种免疫相关细胞均降低到与对照组相同水平($P>0.05$),总体来看,Ad-SNP1组、Ad-SNP2组和Ad-SNP3组在第2次病毒注射后第6 d (D20)依然能一定程度激起小鼠体内的免疫反应,而Ad-SNP4组激起小鼠体内免疫反应的能力较差,与未给药组相比没有显著性差异。

除了通过小鼠血常规检测来评价4种病毒药物激起机体免疫能力外,本文还通过小鼠外周血流式细胞术检测CD3⁺、CD4⁺以及CD8⁺T淋巴细胞的变化情况来多角度评价4种病毒药物激起小鼠体内免疫反应的能力。

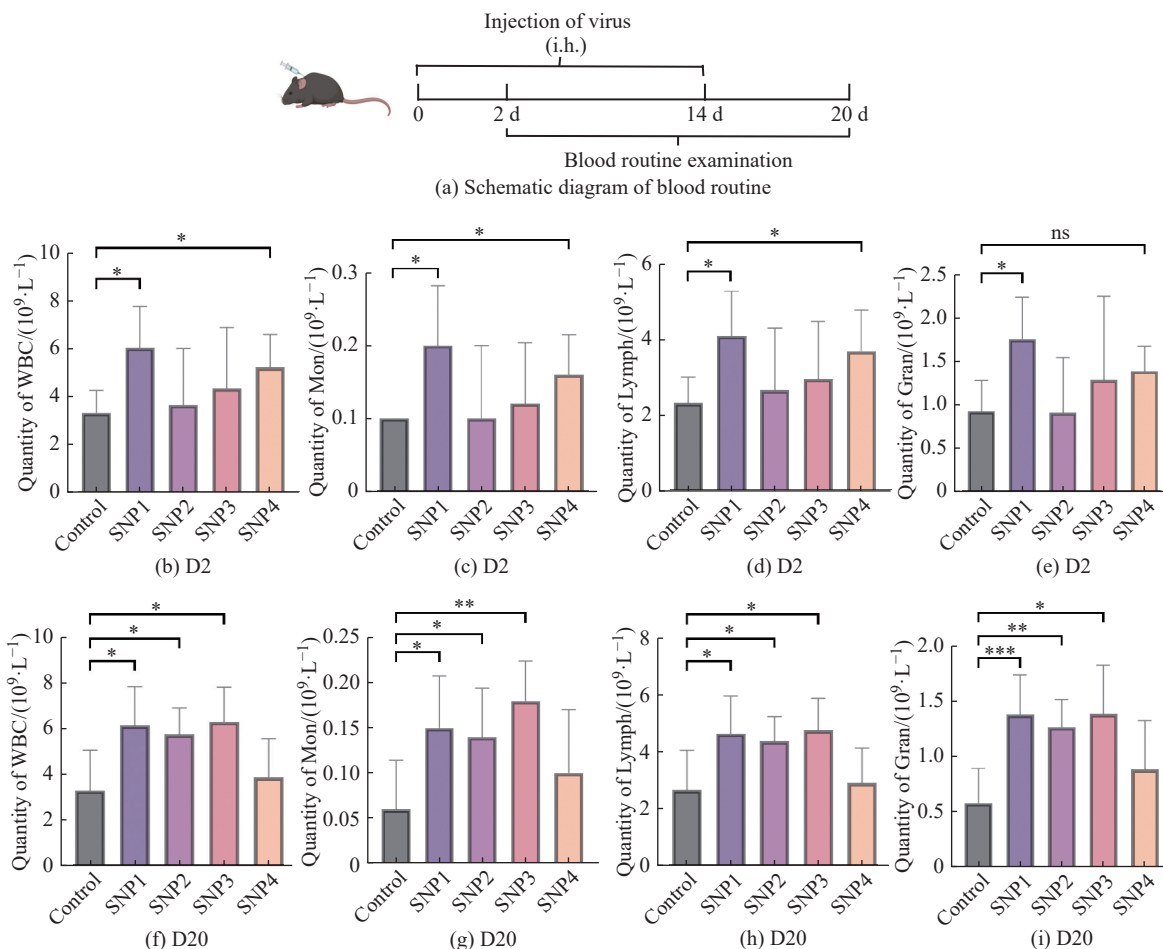


图 2 小鼠血常规检测结果

Fig. 2 Results of blood routine tests in mice

在第 1 次给药后两周 (D14) 取血, 通过流式细胞术检测外周血 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 以及 $CD8^+$ T 淋巴细胞的变化情况, 结果如图 3 所示, Ad-SNP1 组小鼠外周血中 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的数量 (外周血中 10^4 个细胞中阳性细胞数量) 与未给药组相比有显著升高 ($P < 0.001$), Ad-SNP2 组小鼠外周血中 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的数量同样也有升高 ($P < 0.05$), 但 Ad-SNP2 组小鼠 $CD4^+$ T 淋巴细胞的数量无显著增加 ($P > 0.05$), 而 Ad-SNP3 和 Ad-SNP4 组 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的数量均与未给药组无显著差别 ($P > 0.05$)。从外周血流式结果来看, Ad-SNP1、Ad-SNP2 能够显著激起小鼠免疫反应, 但 Ad-SNP2 激起小鼠免疫反应的能力较 Ad-SNP1 差, 而 Ad-SNP3 和 Ad-SNP4 不能激起小鼠体内免疫反应。

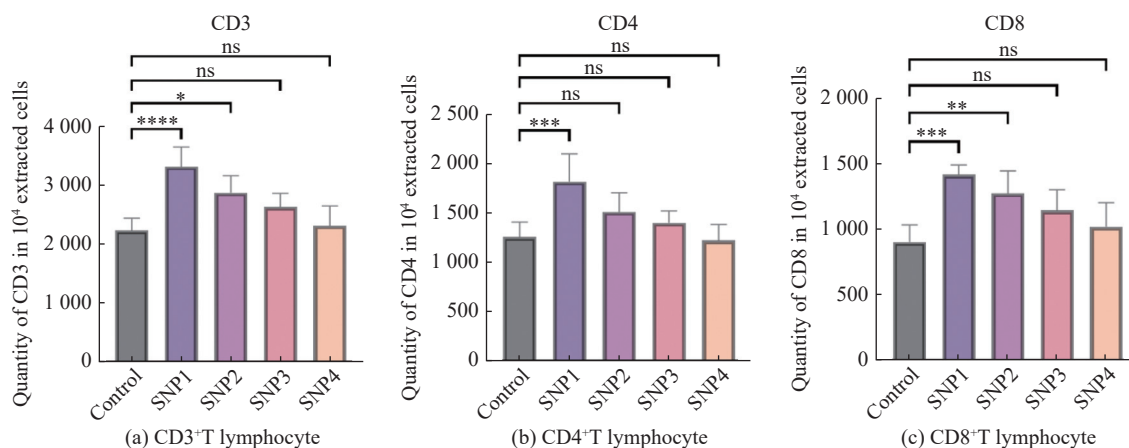
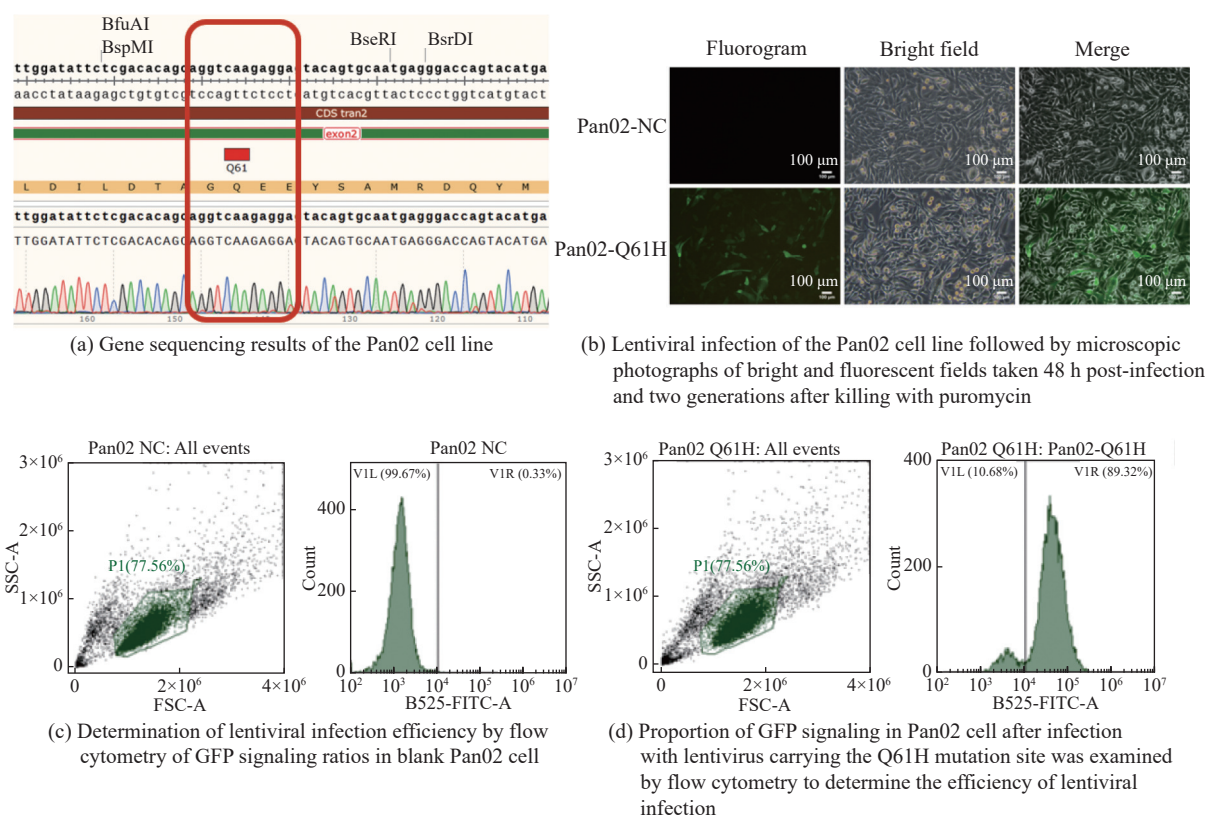
综合分析小鼠血常规结果及外周血流式细胞术结果, 判断 4 种病毒在小鼠体内都能激起免疫反应; Ad-SNP1 组激起小鼠体内免疫反应的能力最强; 其次是 Ad-SNP2、Ad-SNP3 组, 也有一定激起小鼠免疫反应的能力; 由于 Ad-SNP4 组仅在第 1 次给药后 2 d (D2) 血常规结果显示体内免疫升高, 说明 Ad-SNP4

激起小鼠体内免疫反应的能力最弱。

2.3 Pan02-Q61H 细胞构建及药效评价

2.3.1 Pan02-Q61H 细胞构建及验证 本研究采用 Pan02 细胞进行比较分析 4 种病毒对于移植瘤模型的免疫杀伤作用。本研究首先检测了 Pan02 细胞是否含有 Ad-SNP1、Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 中的 KRAS^{Q61H} 突变位点。测序结果显示, Pan02 不含有 KRAS^{Q61H} 突变位点 (图 4(a))。进一步, 本研究使用含有 Q61H 突变的 KRAS 基因的慢病毒进行感染, 获得 Pan02-Q61H 细胞系。结果显示, 慢病毒感染 Pan02 细胞并用嘌呤霉素筛选后, 在荧光显微镜下可以观察到明显的绿色荧光 (图 4(b))。流式细胞检测表明 89.32% 的 Pan02 细胞成功被慢病毒感染 (图 4(c)、(d))。

进一步, 本研究对构建好的细胞系进行了鉴定。分别提取未感染 Pan02 细胞 (Pan02-NC) 与 Pan02-Q61H 细胞的 mRNA, 并进行 RT-qPCR 扩增, 结果如图 5 所示。KRAS^{Q61H} 能够在 Pan02-Q61H 细胞中表达, 其表达量是未感染 Pan02 细胞的 378 703 倍 (图 5(a), $P < 0.001$)。测序结果显示, KRAS^{Q61H} 突变成功插入 Pan02-Q61H 细胞 (图 5(b))。蛋白水平分析

图3 流式细胞术检测 CD3⁺、CD4⁺以及 CD8⁺T 淋巴细胞Fig. 3 Flow cytometry detection of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺T lymphocytes图4 通过感染携带 KRAS^{Q61H} 突变位点的慢病毒构建 Pan02-Q61H 细胞系Fig. 4 Construction of the Pan02-Q61H cell line by infection with a lentivirus carrying the KRAS^{Q61H} mutation site

显示, KRAS^{Q61H} 在 Pan02 细胞中显著上调表达 (图 5(c)、(d), $P < 0.01$).

综上所述, 从多角度证明了慢病毒感染 Pan02 细胞系成功构建含有 KRAS^{Q61H} 突变位点的 Pan02-Q61H 多克隆细胞系。

2.3.2 4种病毒在Pan02-Q61H诱导的胰腺癌模型中的药效评价 为了进一步确认4种病毒在体内对于Pan02-Q61H细胞的免疫杀伤作用, 将Pan02-Q61H细胞以 8×10^5 个细胞量皮下注射, 接种于C57BL/6小鼠的背部 ($n=7$), 诱导胰腺癌移植瘤模型 (图 6(a)).

在细胞注射第8d进行药物治疗。

本研究中, Ad-SNP1 处理组可见皮下肿瘤大小始终处于较低水平, 与未给药组相比能显著抑制肿瘤的生长速度 (图 6(b), $P < 0.05$), 而从 D11 开始 Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 及对照组肿瘤均开始显著增长。Ad-SNP3、Ad-SNP4 组与对照组相比能抑制肿瘤生长速度 (图 6(b)), 但不存在显著性差异 (图 6(c), $P > 0.05$), 而 Ad-SNP2 组抑制肿瘤生长效果较差 (图 6(c), $P > 0.05$)。研究终点处死小鼠, 取肿瘤组织记录终点处肿瘤质量及体积并拍摄肿瘤终点图片 (图 6(e)), 结

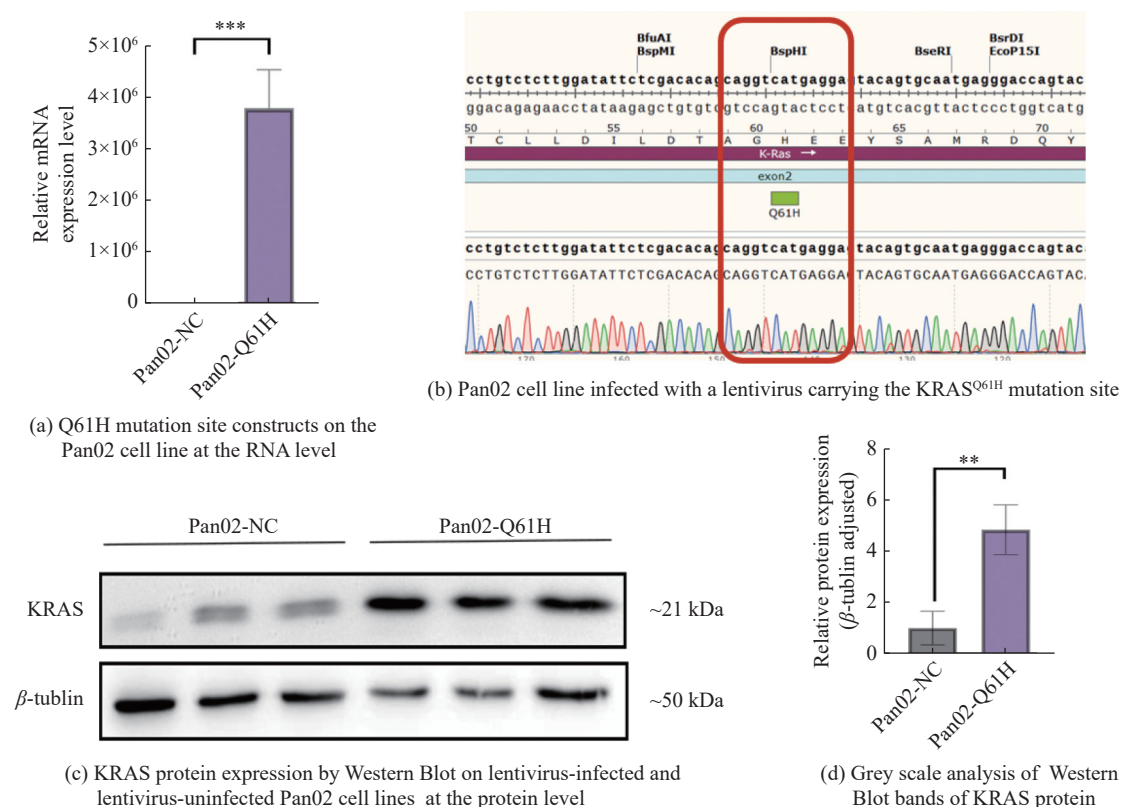


图 5 Pan02-Q61H 多克隆细胞系验证

Fig. 5 Validation of the Pan02-Q61H polyclonal cell line

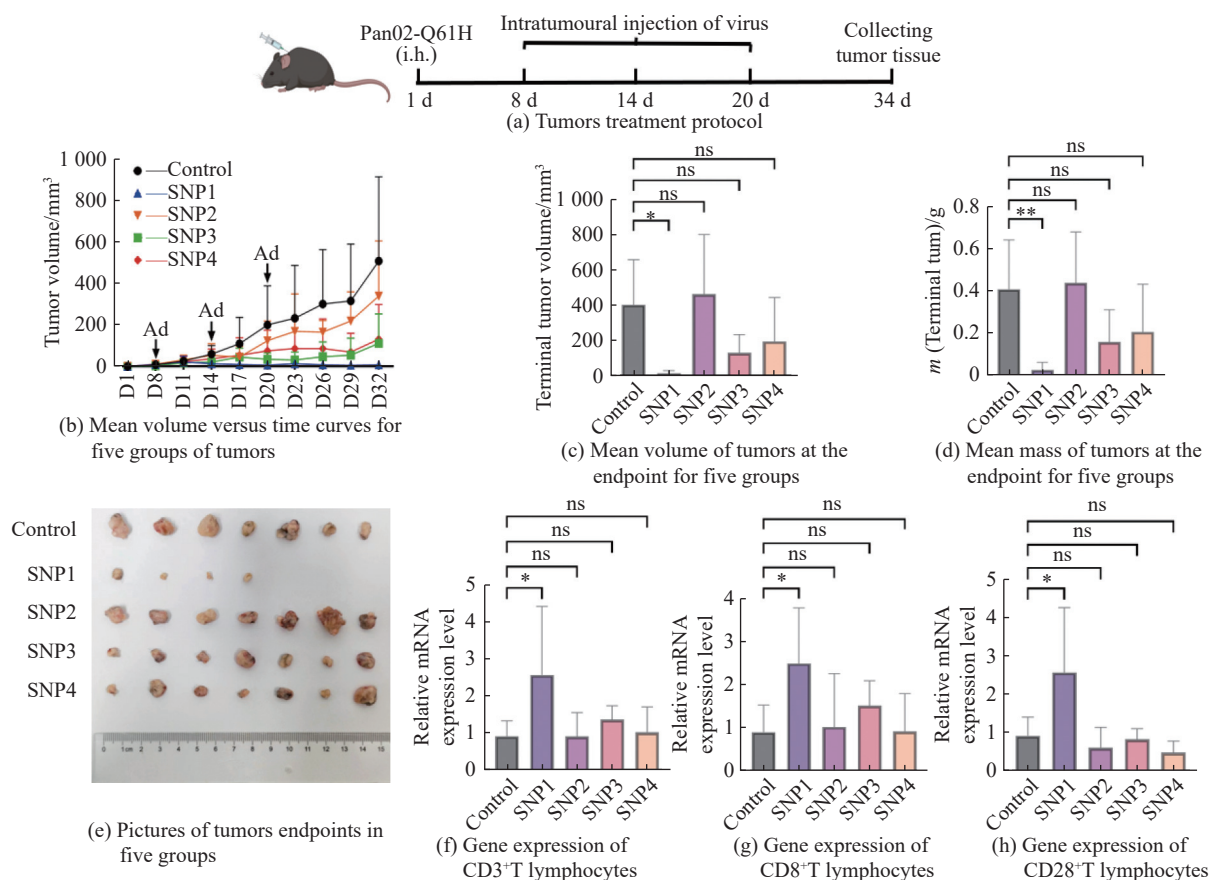


图 6 4 种病毒在 Pan02-Q61H 移植瘤小鼠模型中疗效评价

Fig. 6 Evaluation of the efficacy of four viruses in the Pan02-Q61H transplanted tumors mouse model

果显示终点处 Ad-SNP1 组每只小鼠体内的肿瘤质量及体积均显著小于对照组 (图 6(c)、(d), $P<0.05$), Ad-SNP3、SNP4 组肿瘤终点质量及体积也小于对照组,但不存在显著差异 (图 6(c)、(d), $P>0.05$), 而 Ad-SNP2 组肿瘤终点质量及体积均大于对照组 (图 6(c)、(d), $P>0.05$), 显示 Ad-SNP2 没有发挥肿瘤抑制作用。综合肿瘤生长情况表明, Ad-SNP1 有显著的肿瘤抑制作用, Ad-SNP3 和 Ad-SNP4 的对肿瘤的抑制作用较差, 而 Ad-SNP2 没有肿瘤抑制作用。一项临床研究同样表明, 通过联合注射合成突变 RAS 肽和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对胰腺癌患者进行免疫诱导治疗, 能够延长对肽疫苗有免疫应答癌症患者的生存期^[28]。

本研究通过检测小鼠肿瘤组织中 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD28^+$ T 细胞表达情况判断药物激起小鼠体内免疫情况, 取小鼠终点肿瘤组织提 RNA, 并反转录为 cDNA, 进行 RT-qPCR 检测 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD28^+$ T 细胞表达情况 (图 6(f)~(h)), 结果表明 Ad-SNP1 组肿瘤组织中免疫相关的 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达显著上

调 ($P<0.05$), 同时与 T 细胞活化、增殖相关的 $CD28^+$ T 细胞的表达也显著上调 ($P<0.05$), 而 Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 组肿瘤组织中 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD28^+$ T 细胞的表达与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$)。这证明给药后药物通过激起了小鼠体内强烈的免疫反应从而抑制肿瘤生长。Gjertsen 等^[28]的研究也表明, 对接种了含有突变 Ras 肽疫苗后的患者进行肿瘤活检中, 肿瘤组织中存在针对 Ras 突变的特异性 T 细胞, 同时研究表明生存时间与疫苗免疫应答之间存在显著关联。

进一步, 本研究将肿瘤组织切片后进行免疫荧光染色, 从蛋白层面分析肿瘤组织中 $CD4^+$ T 以及 $CD8^+$ T 细胞免疫浸润情况。免疫荧光结果 (图 7(a)、图 7(c)~(d)) 显示 Ad-SNP1 组 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞的阳性荧光信号明显高于对照组 ($P<0.001$); 而 Ad-SNP2、Ad-SNP3、Ad-SNP4 组与对照组相比 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞的阳性荧光信号无显著性差异 ($P>0.05$), 免疫荧光的结果跟 RT-qPCR 的趋势一致。CD11B 是整合素 CR3(也叫补体受体 3)的 α 链, 主要表达在巨噬细

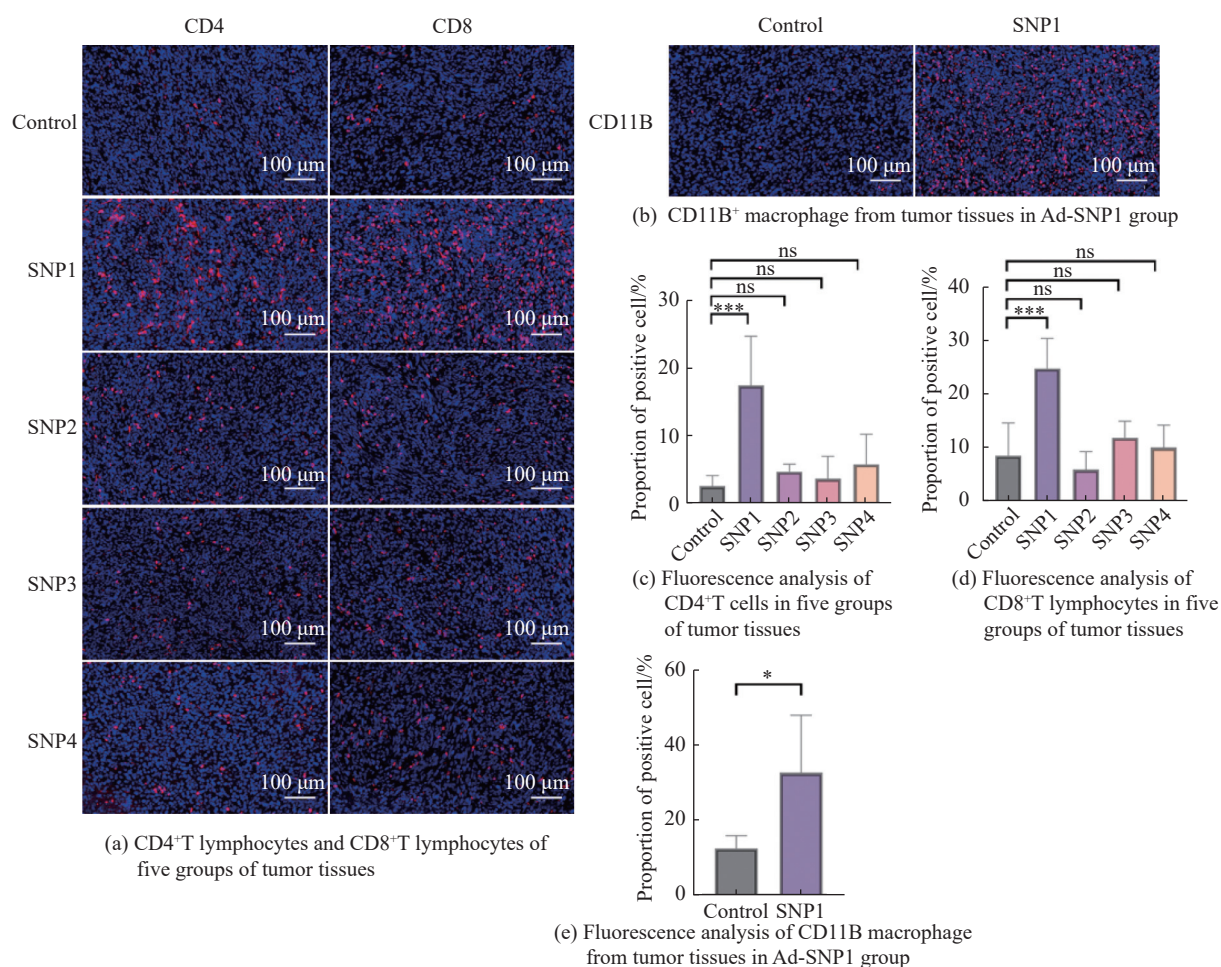


图 7 5 组肿瘤组织的免疫荧光结果

Fig. 7 Immunofluorescence results of five groups of tumors tissues

胞、单核细胞、中性粒细胞、NK 细胞上,研究表明浸润的中性粒细胞上 CD11B 表达水平升高,抗肿瘤活性增强^[32]。于是本研究又将 Ad-SNP1 组的肿瘤组织切片进行了 CD11B 免疫荧光染色(图 7(b)、(e)),发现 Ad-SNP1 组肿瘤组织中与肿瘤细胞杀伤相关的 CD11B⁺细胞浸润也有显著提升($P<0.05$),进一步证明了 Ad-SNP1 通过激起强烈免疫从而抑制肿瘤生长。

3 结 论

通过基因治疗的方式增加抗原负荷从而激起机体强烈的免疫反应达到抑制肿瘤生长可行,同时本文从 4 种表达载体中筛选出了效果最好的 Ad-SNP1 表达载体,Ad-SNP1 载体在免疫实验中激起小鼠免疫反应的能力是最强的,同时在移植瘤模型中显示出较好的肿瘤抑制作用,且 Ad-SNP1 载体在小鼠肿瘤组织的相关免疫细胞浸润也明显高于对照组及其他 3 组,因此从 4 种病毒中筛选出药效最好的 Ad-SNP1 载体药物用于后续进一步的研究,为胰腺癌治疗药物的开发提供新的可能。

本文构建的 Ad-SNP1 载体药物是针对 KRAS^{Q61H} 突变型癌症的一种主动免疫治疗方法,可以克服小分子药物难以与 KRAS 的疏水口袋结合的问题和肿瘤浸润淋巴细胞的分离和制备困难的问题。主动免疫治疗相较于其他几种疗法有相对较少的副作用,对靶肿瘤细胞具有特异性,以及对肿瘤特异性抗原产生持久的记忆反应等几种主要优势。同时 KRAS^{Q61H} 突变还常见于肺癌及结肠癌中,故 Ad-SNP1 还可用于其他多种含有 KRAS^{Q61H} 突变的癌症治疗,为更多含有 KRAS^{Q61H} 突变的癌症患者带来新的希望。

参考文献:

- [1] ZENG S, POTTIER M, LAN B, *et al.* Chemoresistance in pancreatic cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4504.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, *et al.* Cancer statistics, 2023[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2023, 73(1): 17-48.
- [3] FERLAY J, PARTENSKY C, BRAY F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the eu by 2017[J]. *Acta Oncologica*, 2016, 55(9/10): 1158-1160.
- [4] BRUNNER M, WU Z, KRAUTZ C, *et al.* Current clinical strategies of pancreatic cancer treatment and open molecular questions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4543.
- [5] DE DOSSO S, SIEBENHUNER A R, WINDER T, *et al.* Treatment landscape of metastatic pancreatic cancer[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2021, 96: 102180.
- [6] DUCREUX M, CUHNA A S, CARAMELLA C, *et al.* Cancer of the pancreas: Esmo clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Annals of Oncology*, 2015, 26: 56-68.
- [7] VON HOFF D D, ERVIN T, ARENA F P, *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine[J]. *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(18): 1691-1703.
- [8] CONROY T, DESSEIGNE F, YCHOU M, *et al.* Folfirinox versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 364(19): 1817-1825.
- [9] WATERS A M, DER C J. KRAS: The critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2018, 8(9): a031435.
- [10] CONNOR A A, GALLINGER S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: Integrating omics and clinical data[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 22(3): 131-42.
- [11] COX A D, FESIK S W, KIMMELMAN A C, *et al.* Drug-gating the undruggable ras: Mission possible?[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2014, 13(11): 828-851.
- [12] HUYNH M V, HOBBS G A, SCHAEFER A, *et al.* Functional and biological heterogeneity of kras(q61) mutations[J]. *Science Signaling*, 2022, 15(746): 2694.
- [13] CHENG H, FAN K, LUO G, *et al.* Krasg12d mutation contributes to regulatory t cell conversion through activation of the mek/erk pathway in pancreatic cancer[J]. *Cancer Letters*, 2019, 446: 103-111.
- [14] KITAJIMA S, THUNNALAPALLI R, BARBIE D A. Inflammation as a driver and vulnerability of kras mediated oncogenesis[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2016, 58: 127-135.
- [15] LIAO W, OVERMAN M J, BOUTIN A T, *et al.* KRAS-IRF2 axis drives immune suppression and immune therapy resistance in colorectal cancer [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(4): 559-572.
- [16] LIU P, WANG Y, LI X. Targeting the untargetable kras in cancer therapy[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, 9(5): 871-9.
- [17] ZDANOV S, MANDAPATHIL M, ABU EID R, *et al.* Mutant kras conversion of conventional t cells into regulatory t cells[J]. *Cancer Immunology Research*, 2016, 4(4): 354-365.
- [18] LAUER M S, NAKAMURA R. Reviewing peer review at the NIH[J]. *New England Journal of Medicine*, 2015, 373(20): 1893-1897.
- [19] CHAMPIAT S, FERTE C, LEBEL-BINAY S, *et al.* Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy[J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(1): e27817.
- [20] ALEXANDROV L B, NIK-ZAINAL S, WEDGE D

- C, *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer[J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 415-421.
- [21] BALLI D, RECH A J, STANGER B Z, *et al.* Immune cytolytic activity stratifies molecular subsets of human pancreatic cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23(12): 3129-3138.
- [22] LE D T, DURHAM J N, SMITH K N, *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to pd-1 blockade[J]. *Science*, 2017, 357(6349): 409-413.
- [23] UPADHRASTA S, ZHENG L. Strategies in developing immunotherapy for pancreatic cancer: Recognizing and correcting multiple immune “defects” in the tumor microenvironment[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(9): 8091472.
- [24] YOUNG K, HUGHES D J, CUNNINGHAM D, *et al.* Immunotherapy and pancreatic cancer: Unique challenges and potential opportunities [J]. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2018, 10: 1758835918816281.
- [25] KLEEFF J, KORC M, APTE M, *et al.* Pancreatic cancer[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2016, 21(2): 16022.
- [26] TRAN E, AHMADZADEH M, LU Y C, *et al.* Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers[J]. *Science*, 2015, 350(6266): 1387-1390.
- [27] CARBONE D P, CIERNIK I F, KELLEY M J, *et al.* Immunization with mutantp53- and *K-ras*-derived peptides in cancer patients: Immune response and clinical outcome[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(22): 5099-5107.
- [28] GJERTSEN M K, BUANES T, ROSSELAND A R, *et al.* Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma[J]. *International Journal of Cancer*, 2001, 92(3): 441-450.
- [29] KHLEIF S N, ABRAMS S I, HAMILTON J M, *et al.* A phase i vaccine trial with peptides reflecting oncogene mutations of solid tumors[J]. *Journal Immunotherapy*, 1999, 22(2): 155-165.
- [30] TOUBAJI A, ACHTAR M, PROVENZANO M, *et al.* Pilot study of mutant ras peptide-based vaccine as an adjuvant treatment in pancreatic and colorectal cancers[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2008, 57(9): 1413-1420.
- [31] DREYER S B, CHANG D K, BAILEY P, *et al.* Pancreatic cancer genomes: Implications for clinical management and therapeutic development[J]. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23(7): 1638-1646.
- [32] LINDE I L, PRESTWOOD T R, QIU J, *et al.* Neutrophil-activating therapy for the treatment of cancer[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(2): 356-372.

Immunotherapy of Pancreatic Cancer Mediated by KRAS Mutant Peptides

HE Xinyi¹, TANG Dingyue², ZHANG Jie², DING Hao¹, WU Xia¹

(1. School of Pharmacy; 2. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Ninety percent of pancreatic ductal adenocarcinoma was induced by KRAS gene mutation in clinic. At present, there was a lack of effective targeted therapies for KRAS mutated cancer. Immunotherapy had emerged as a prominent approach for tumor treatment. This study aimed to develop a KRAS-targeted immunotherapy by enhancing immune response of anti-KRAS mutation *in vivo*. We constructed four plasmids with several KRAS-mutated gene sequences, HSP70 and GM-CSF. The order and linker of these KRAS-mutated gene sequences were different within these four plasmids, but they all contained the KRAS^{Q61H} mutation. These plasmids were packaged into adenovirus 5, and their capacity of anti-tumor was analyzed *in vitro* and *in vivo*. The results showed that the four plasmids could be well expressed KRAS antigen, HSP70 and GM-CSF *in vitro*, as well as elicited immune responses in mice. Furthermore, a pancreatic carcinoma cell line with KRAS^{Q61H} mutation, Pan02-Q61H was subcutaneously injected into mice. Among the four vectors, the Ad-SNP1 was best for inhibited the tumor growth. They also induced immune responses, led to inhibition of tumor growth in a Pan02 cells a transplanted tumor mouse models which contained KRAS^{Q61H} mutation sites, and there were significant differences in efficacy among the four drugs. We selected the Ad-SNP1 vector with the best pharmacological effect from the four drugs, laying a foundation for further research in the future, and hoping that it can provide new treatment opportunities for pancreatic cancer patients.

Key words: pancreatic ductal adenocarcinomas; KRAS; immunotherapy; adenovirus; gene therapy

(责任编辑: 王晓丽)