卓越医见：肿瘤和免疫治疗 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003821

树突状细胞膜微泡在T细胞激活与结直肠癌细胞杀伤中的作用研究

徐 菡[1]，张 亮[2]，冷小静[3]，晏殊瑾[1]，庞 华[1]
（1.重庆医科大学附属第一医院核医学科，重庆 400042；2.重庆医科大学附属第一医院超声科，重庆 400042；
3.重庆医科大学附属第二医院超声科，重庆 400010）

【摘 要】目的：设计并评估一种基于树突状细胞膜微泡（dendritic cell membrane-derived microbubbles，DCM@MBs）的疫苗策略，探索其在肿瘤免疫治疗中的应用潜力，特别是通过激活T细胞实现肿瘤细胞的免疫特异性杀伤。**方法：**首先，通过肿瘤细胞膜蛋白提取和树突状细胞（dendritic cells，DCs）激活实验，确认肿瘤抗原可以有效刺激未成熟DCs的成熟。然后，利用成熟的树突状细胞膜和脂质混合制备DCM@MBs，并通过共聚焦显微镜（confocal laser scanning microscope，CLSM）和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）等方法对其形态、大小及蛋白质组成进行表征分析。最后，通过体外共培养实验评估DCM@MBs对T细胞的激活作用，以及其在特异性杀伤肿瘤细胞中的能力。**结果：**在树突状细胞体外激活实验中，肿瘤细胞膜蛋白刺激后，25 μg/mL组未成熟DCs表面主要组织相容性复合体Ⅱ类分子（major histocompatibility complex class Ⅱ，MHC Ⅱ）的表达水平为（25.167 ± 1.203）%，与对照组相比明显升高（P<0.001）；DCM@MBs呈现出由红色细胞膜包裹形成的微泡，且分散均匀，大小约为1~5 μm。在体外共培养实验中，DCM@MBs组T细胞INF-γ的分泌量为（120.574 ± 5.179）pg/mL，与对照组相比明显促进了$CD8^+$ T细胞的激活（P<0.001）；且对CT26.WT肿瘤细胞的免疫特异性杀伤率为（30.737 ± 0.216）%，是4T1小鼠乳腺癌细胞杀伤率（9.893 ± 0.341）%的3.11倍。**结论：**DCM@MBs策略在肿瘤免疫治疗中展现了明显潜力，能够有效激活T细胞并特异性杀伤肿瘤细胞，为肿瘤免疫治疗提供了新思路。

【关键词】树突状细胞；免疫疗法；微泡；细胞膜；树突状细胞疫苗
【中图分类号】R730.51 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2025-02-09

Role of dendritic cell membrane microbubbles in the activation of T cells and the killing of colorectal cancer cells

Xu Han[1], Zhang Liang[2], Leng Xiaojing[3], Yan Shujin[1], Pang Hua[1]
(1. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Ultrasound, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Department of Ultrasound Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To design and evaluate a cell membrane vaccine strategy based on dendritic cell membrane microbubbles (DCM@MBs), and to explore its potential application in tumor immunotherapy, especially the immune-specific killing of tumor cells through the activation of T cells. ***Methods*:** At first, tumor cell membrane proteins were extracted and dendritic cells (DCs) were activated to confirm that tumor antigens could effectively stimulate the maturation of immature DCs. Mature DC membranes were then mixed with lipids to prepare DCM@MBs, which were characterized for morphology, size, and protein composition by confocal laser scanning microscopy and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, *in vitro* co-culture experiments were conducted to assess the effect of DCM@MBs on the activation of T cells and their ability for specific killing of tumor cells. ***Results*:** In the *in vitro* DC activation experiment, after stimulation with tumor cell membrane proteins, the 25 μg/mL group had a significant increase in the expression level of MHC class Ⅱ molecule (25.167% ± 1.203%) on the surface of immature DCs compared with the control group (P<0.001), and DCM@MBs presented with microbubbles encapsulated by red cell membranes, with uniform dispersion and a size of 1-5 μm. In the *in vitro* co-culture experiment, the amount of INF-γ secreted by T cells was (120.574 ± 5.179) pg/mL in the DCM@MBs group, significantly enhancing the activation of $CD8^+$ T cells compared with the control group (P<0.001), and furthermore, the immune-specific killing rate against CT26.WT tumor cells was (30.737 ± 0.216)%, which was 3.11 times that against 4T1 mouse

作者介绍：徐 菡，Email：xuan1999ee@163.com，研究方向：超声介导的肿瘤免疫治疗。
通信作者：庞 华，Email：phua1973@163.com。
基金项目：国家自然科学基金青年基金资助项目（编号：82202175）
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250408.1125.002（2025-04-08）

breast cancer cells (9.893 ± 0.341)% . ***Conclusion***: The DCM@MBs strategy proposed in this study shows significant potential in tumor immunotherapy and can effectively activate T cells and specifically kill and eliminate tumor cells, which provides new ideas for tumor immunotherapy.

【Key words】dendritic cell; immunotherapy; microbubbles; cell membrane; dendritic cell vaccine

近年来，肿瘤免疫治疗已成为继传统手术、化疗和放疗之后的一种革命性治疗[1-2]。其中，开发基于树突状细胞（dendritic cells，DCs）的肿瘤疫苗已成为肿瘤免疫治疗的热点[3-4]。DCs作为一种专业类型的抗原呈递细胞（antigen presenting cells，APC），可以识别、处理肿瘤抗原，并将其作为抗原肽主要组织相容性复合物分子（peptide-major histocompatibility complex，pMHC）呈递到DC细胞膜上[5-6]。未成熟DCs在摄取抗原或受到某些因素刺激后即分化为成熟DCs。随后，这些成熟DCs会激活抗原特异性T淋巴细胞的几个子集，以消除同源肿瘤细胞[7]。目前的DC疫苗制备方法是先从患者血液的单核细胞中分选出DCs并对其进行体外处理。经过质量检测后，将活性DCs重新输注到同一患者的1个部位，以促进其在最邻近的淋巴组织中激活T细胞[8]。

然而，完整的DCs在体内可能会受到多种抑制性信号的调控，这些信号可能来自肿瘤微环境或其他免疫抑制机制，从而导致DC在抗原呈递和T细胞激活方面的功能减弱。例如，肿瘤细胞释放的外泌体可以抑制DC的成熟和迁移，进而促进免疫抑制[9]。此外，某些药理分子也可以通过改变DC的激活状态，诱导其耐受性，从而削弱其免疫刺激能力[8]。因而，需要开发更安全、更有效的基于树突状细胞的疫苗作为肿瘤免疫治疗的替代策略。

本研究基于结直肠癌细胞系CT26.WT的全细胞抗原致敏的DCs，开发了一种新型DC膜疫苗（dendritic cell membrane-coated microbubbles，DCM@MBs），并系统评估了其通过激活细胞毒性T淋巴细胞（cytotoxic T lymphocytes，CTLs）介导的肿瘤细胞杀伤效应，为开发新型肿瘤免疫治疗策略提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 4T1鼠乳腺癌细胞系和DC2.4鼠树突状细胞系（未成熟型）购自中桥新洲生物科技有限公司（中国上海）。CT26.WT鼠结直肠癌细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司（中国武汉）。

1.1.2 主要试剂 细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白酶抑制剂（phenylmethanesulfonyl fluoride，PMSF）、细胞膜红色荧光染色（1,1′-dioctadecyl-3, 3, 3′, 3′-tetramethylindocarbocyanine perchlorate，DiI）试剂盒、乳酸脱氢酶细胞毒性检测（lactate dehydrogenase，LDH）试剂盒、考马斯亮蓝染液均购自碧云天生物技术有限公司（中国上海）。二棕榈酰磷脂酰胆碱（1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine，DPPC）和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000[1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-methoxy（polyethylene glycol）-2000，DSPE-mPEG2000]均购自西安瑞熙生物科技有限公司（中国西安）。甘油购自Sigma-Aldrich（美国圣路易斯）。磺化远红Cyanine5.5荧光团的胺反应活性酯（Sulfo-CY-5.5 NHS ester）购自MCE（美国新泽西）。本研究采用以下抗体进行流式细胞术检测：FITC标记的小鼠抗CD4抗体（克隆号GK1.5，货号11-0041-82，eBioscience公司，美国）、APC标记的小鼠抗CD8α抗体（克隆号53-6.7，货号100712，BioLegend公司，美国）、PE标记的小鼠抗CD3抗体（克隆号17A2，货号12-0032-82，eBioscience公司，美国）以及FITC标记的小鼠抗MHC Ⅱ类分子抗体（克隆号M5/114.15.2，货号11-5321-82，eBioscience公司，美国）。干扰素-γ（interferon-gamma，IFN-γ）检测采用美科生物技术有限公司（中国上海）提供的酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒完成。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞膜蛋白的制备 为了制备肿瘤抗原，根据细胞膜蛋白抽提试剂盒提供的方法提取CT26.WT鼠结直肠癌细胞膜蛋白。首先，将培养后的CT26细胞（1×10^8个）重悬于3 mL的膜蛋白提取液中，并加入蛋白酶抑制剂，在冰浴中孵化15 min。然后，将细胞悬液在液氮中反复冻融3次后离心（2 000 r/min，10 min）收集上清液。随后将细胞上清液再次进行离心（14 000 r/min，30 min）收集沉淀。将收集的沉淀重悬于200 μL的膜蛋白抽提试剂中，冰浴15 min后离心（14 000 r/min，5 min），收集上清液即为肿瘤细胞膜蛋白。肿瘤细胞膜蛋白浓度根据BCA试剂盒提供的方法进行量化。其余的肿瘤细胞膜蛋白储存在-80 ℃，以备使用。

1.2.2 树突状细胞的激活效果 为评估肿瘤细胞膜蛋白的树突状细胞摄取效率，将DC2.4细胞以3×10^3个/孔的密度接种于共聚焦培养皿中，培养24 h使其充分贴壁后，分别于0、1、3、6和24 h时间点加入20 μg/mL Cy5.5标记的肿瘤细胞膜蛋白溶液，进行时间梯度观察。最后，通过共聚焦激光扫描显微镜（confocal laser scanning microscopy，CLSM）（尼康，日本东京）观察DC2.4细胞吞噬肿瘤细胞膜蛋白的情况。为评

估肿瘤细胞膜蛋白对DC2.4细胞成熟率的影响，将细胞以2×10^5个/孔的密度接种于6孔板（n=3），37 ℃、5% CO_2条件下培养24 h后，分别加入0、5、15和25 μg/mL肿瘤细胞膜蛋白溶液（1 mL/孔），继续培养24 h后检测细胞成熟标志物表达。流式细胞仪检测每组DC2.4细胞表面主要组织相容性复合体Ⅱ类分子（major histocompatibility complex class Ⅱ，MHC Ⅱ）的表达量。为了评估DC2.4激活的静态过程，分别在肿瘤细胞膜蛋白刺激前（0 h）和刺激后24 h拍摄图像，通过共聚焦显微观察DC2.4的形态变化。

1.2.3 成熟树突状细胞膜的提取 根据1.2.1中的方法提取DCM。随后，收集沉淀物冻干以便进一步使用。

1.2.4 DCM@MBs的制备 通过典型的机械振荡方法合成DCM@MBs。将纯化的树突状细胞膜（DCM，1 mg）与脂质混合物[二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC，2 mg）和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇2000（DSPE-PEG2000，质量比DPPC∶DSPE-PEG2000=5∶3）共同溶解于含1%（w/v）甘油的磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS，0.5 mL）中。混合均匀后，取0.5 mL混合液转移至玻璃小瓶，采用气体置换法将瓶内空气置换为八氟丙烷（octafluoropropane，C3F8）气体，完成微泡制备。最后，使用银汞胶囊调和机（型号YJT-XX，上海生物医疗器械有限公司，中国）机械震荡小瓶45 s，确保充分混匀形成均匀悬液。该工艺利用细胞膜的脂质特性，所得产物被指定为DCM@MBs。用于对照试验，按照相同的程序制备普通脂质微泡，原料使用DPPC和DSPE-PEG2000（质量比为5∶3）的混合物，总质量为3 mg。

1.2.5 抗原负载的树突状细胞膜微泡（antigen-loaded dendritic cell membrane-coated microbubbles，DCM@MBs）的表征 本研究采用共聚焦激光扫描显微镜系统（confocal laser scanning microscopy，CLSM；Andor Dragonfly 200，Oxford Instruments，UK）分析DCM@MBs的形态特征，以确定MBs表面细胞膜片段的分布和完整性。同时，通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）；Mini-PROTEAN Tetra系统，（Bio-Rad，USA）分离蛋白质组分，经考马斯亮蓝R-250染色后，采用Image Lab软件（v6.1）进行灰度分析，系统表征DCM@MBs中树突状细胞特征性蛋白的组成谱。

1.2.6 体外共培养 为了评估DCM@MBs能否激活T细胞。本课题组从负荷CT26肿瘤的BALB/c小鼠中分离出1×10^7个脾脏淋巴细胞，分离的脾脏淋巴细胞分别与以下处理组共培养：磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）阴性对照组、空白微泡（microbubbles，MBs，200 μg/mL）组、未负载抗原的树突状细胞膜微泡（non-antigen loaded dendritic cell membrane-coated microbubbles，iDCM@MBs，200 μg/mL）组及抗原负载的树突状细胞膜微泡（antigen-loaded dendritic cell membrane-coated microbubbles，DCM@MBs，200 μg/mL）实验组，各组均设3个复孔，于37 ℃、5% CO_2条件下培养48 h。脾脏淋巴细胞用PBS洗涤3次，于4 ℃避光条件下分别采用PE标记的小鼠抗CD3抗体（克隆号17A2，eBioscience）、FITC标记的小鼠抗CD4抗体（克隆号GK1.5，BioLegend）及APC标记的小鼠抗CD8α抗体（克隆号53-6.7，BD Pharmingen）进行表面标记，流式细胞仪（BD FACS Canto Ⅱ）采集数据，FlowJo软件（v10.8.1）分析T淋巴细胞亚群比例。为了测定刺激后免疫细胞分泌的细胞因子，在48 h后，收集与PBS、MBs、iDCM@MBs、DCM@MBs共培养后的脾脏淋巴细胞培养基悬浮液，并根据酶联免疫吸附检测法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）严格按照说明书操作流程定量检测培养上清中干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）的分泌水平。同时，基于乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒（CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay，货号G1780，Promega）的标准化方案，评估DCM@MBs活化的脾脏淋巴细胞对CT26.WT结直肠癌细胞和4T1乳腺癌细胞的杀伤效应，其中效应细胞（活化的脾脏淋巴细胞）与靶细胞（CT26.WT/4T1）按10∶1的比例共培养6 h后测定LDH释放量。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0（GraphPad Software，USA）进行统计分析及图表绘制。计量资料符合正态分布的数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；组间比较采用单因素方差分析，方差齐性通过Brown-Forsythe检验确认，若差异有统计学意义，则进一步采用Tukey多重比较检验进行事后分析。检验水准α=0.05。

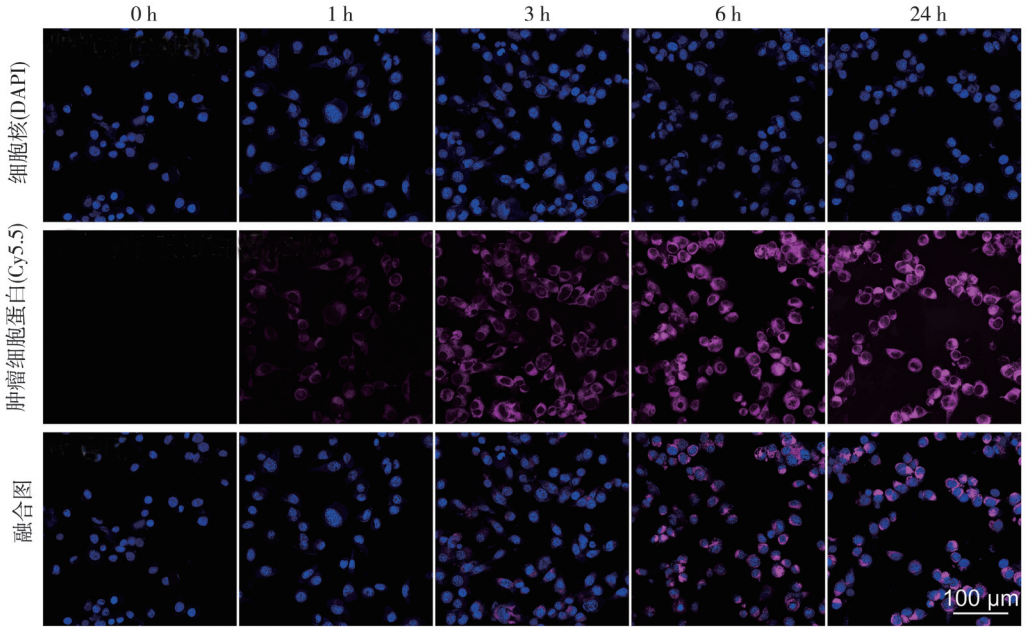
2 结 果

2.1 DCs体外调控成熟

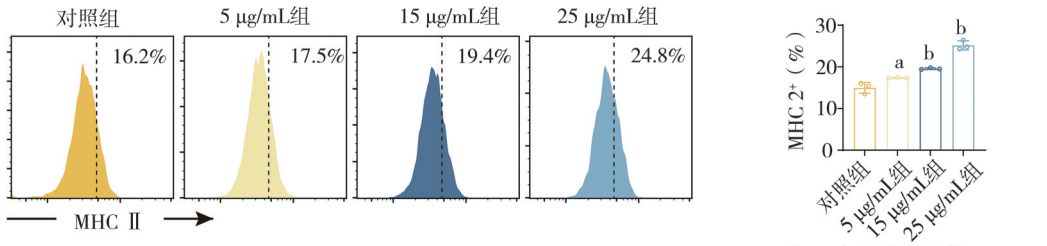
由于肿瘤抗原是否可以体外激活DC细胞对于DC疫苗制备至关重要，因此研究了DC细胞的体外调控成熟影响。为了研究肿瘤细胞膜蛋白是否可以被DC有效摄取，将Cy5.5（红色荧光，蛋白染料）标记的肿瘤细胞膜蛋白，与未成熟的DCs（DAPI，核染料标记）共孵育。通过CLSM可以清楚地观察到，从0~24 h，肿瘤细胞膜蛋白摄取逐渐增加，于是选择了24 h作为后续实验的共孵育条件（图1A）。为评估肿瘤细胞膜蛋白对DCs体外成熟的影响，将未成熟DCs分别与0（对照）、5、15和25 μg/mL肿瘤细胞膜蛋白共培养24 h后，采用流式细胞术检测细胞表面MHC Ⅱ类分子的表达水平。结果显示，各浓度组MHC Ⅱ表达量分别为：对照组（14.97±1.70）%、5 μg/mL组（17.37±0.01）%、15 μg/mL组（19.57±0.04）%、25 μg/mL组（25.17±1.20）%，（F=58.240，P<0.001）。25 μg/mL组与对照组相比差异有统计学意义（t=12.340，P<0.001），表明高浓度肿瘤细胞膜蛋白可明显促进DCs的成熟（图1B）。此外，与未成熟DCs的小三角形相比，肿瘤细胞膜蛋白刺激后的细胞表面伸出树枝样突起，形态不规则，长短及粗细不一（图1C）。

2.2 DCM@MBs的表征

使用肿瘤细胞膜蛋白对未成熟DCs进行冲击致敏处理后，通过差速离心法提取成熟树突状细胞膜组分（dendritic cell membrane，DCM）。随后，DPPC、DSPEmPEG2000和DCM以5∶3∶4的质量比与含有1 wt%甘油的PBS进行水化，然后用C3F8填充混合物，最终在机械振动下制备DCM@MBs。为了证明微泡表面成功负载细胞膜碎片，DCM用细胞膜染料

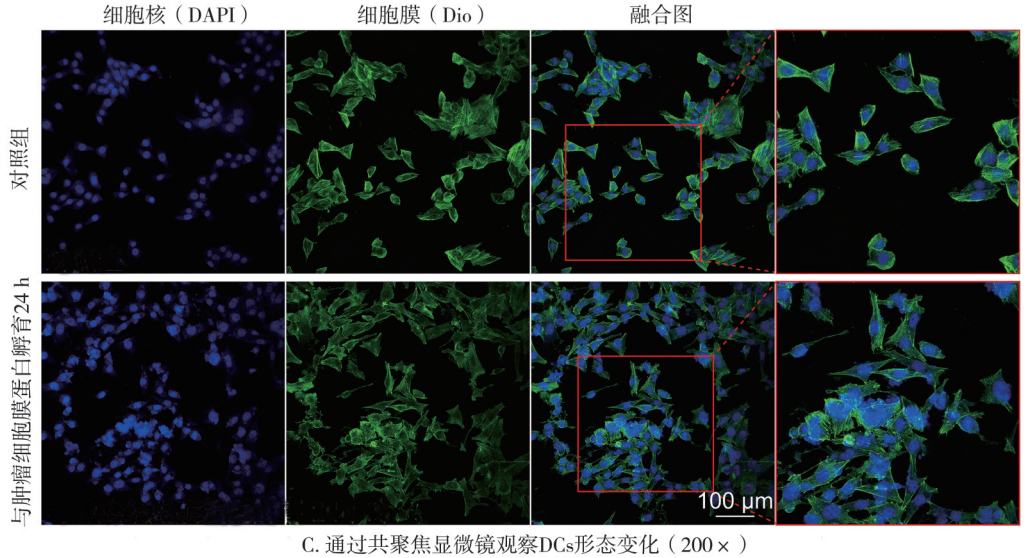


A. DCs吞噬的共聚焦显微镜图（200×）



注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与对照组比较，$P<0.01$

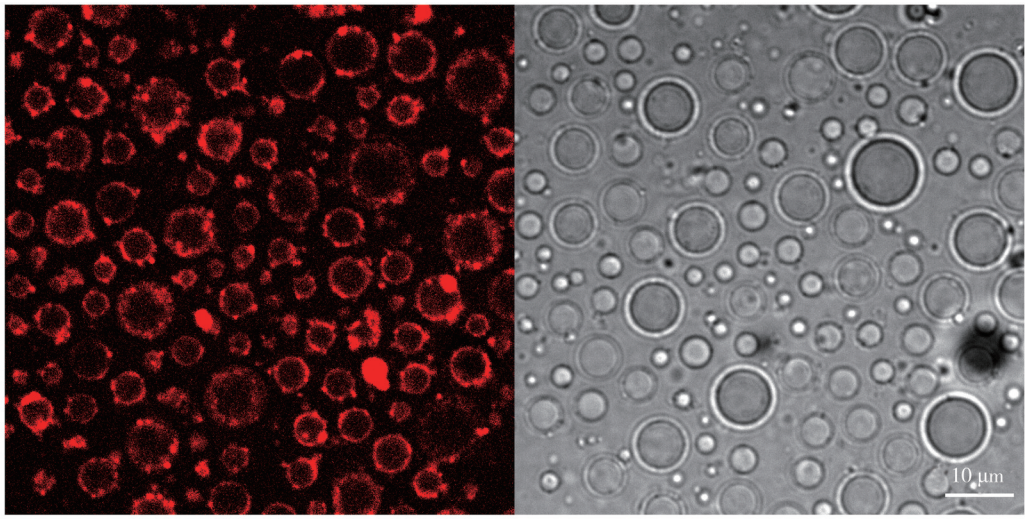
B. 通过流式细胞术检测DCs表面MHCⅡ类抗原的表达



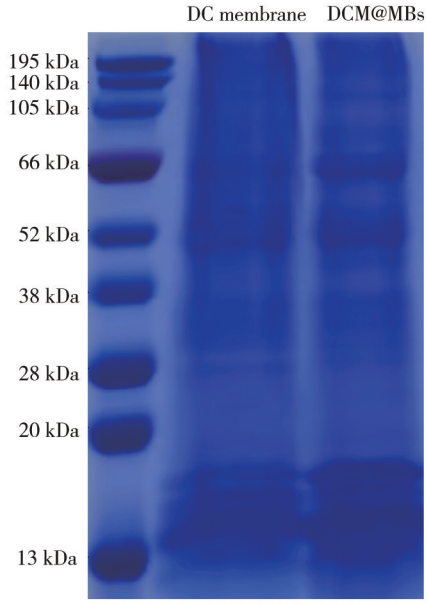
C. 通过共聚焦显微镜观察DCs形态变化（200×）

图1　肿瘤细胞膜蛋白刺激DCs成熟

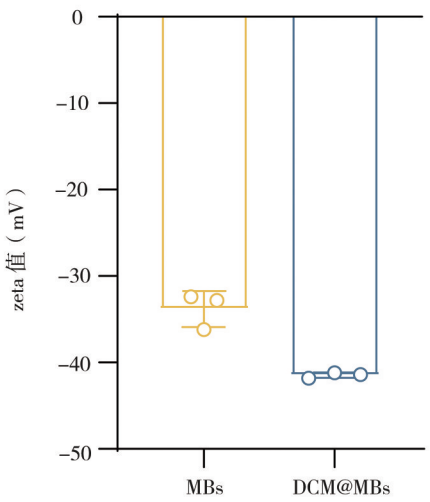
DiI（红色荧光）进行标记。通过CLSM，可以清楚地观察到制作的DCM@MBs呈现出由红色细胞膜包裹形成的微泡，且分散均匀，大小约为1~5 μm（图2A）。此外，通过SDS-PAGE分析成熟DC细胞膜DCM和DCM@MBs的蛋白质成分，发现DCM和DCM@MBs的蛋白表达非常相似，这表明在制作微泡的过程中成功负载细胞膜碎片（图2B）。使用OpptroniX仪器测定微泡的表面Zeta电位，分析显示DCM@MBs负表面电荷zeta值为（−41.467 ± 0.093）mV（图2C），与MBs（−33.800 ± 4.360）mV相比，证明DCM作为DCM@MBs组合物的一部分提高了材料的稳定性和分散性。



A. 共聚焦激光扫描显微镜（CLSM）(左)和明场显微镜（右）下DCM@MBs的图像（200×）



B. SDS-PAGE凝胶电泳图

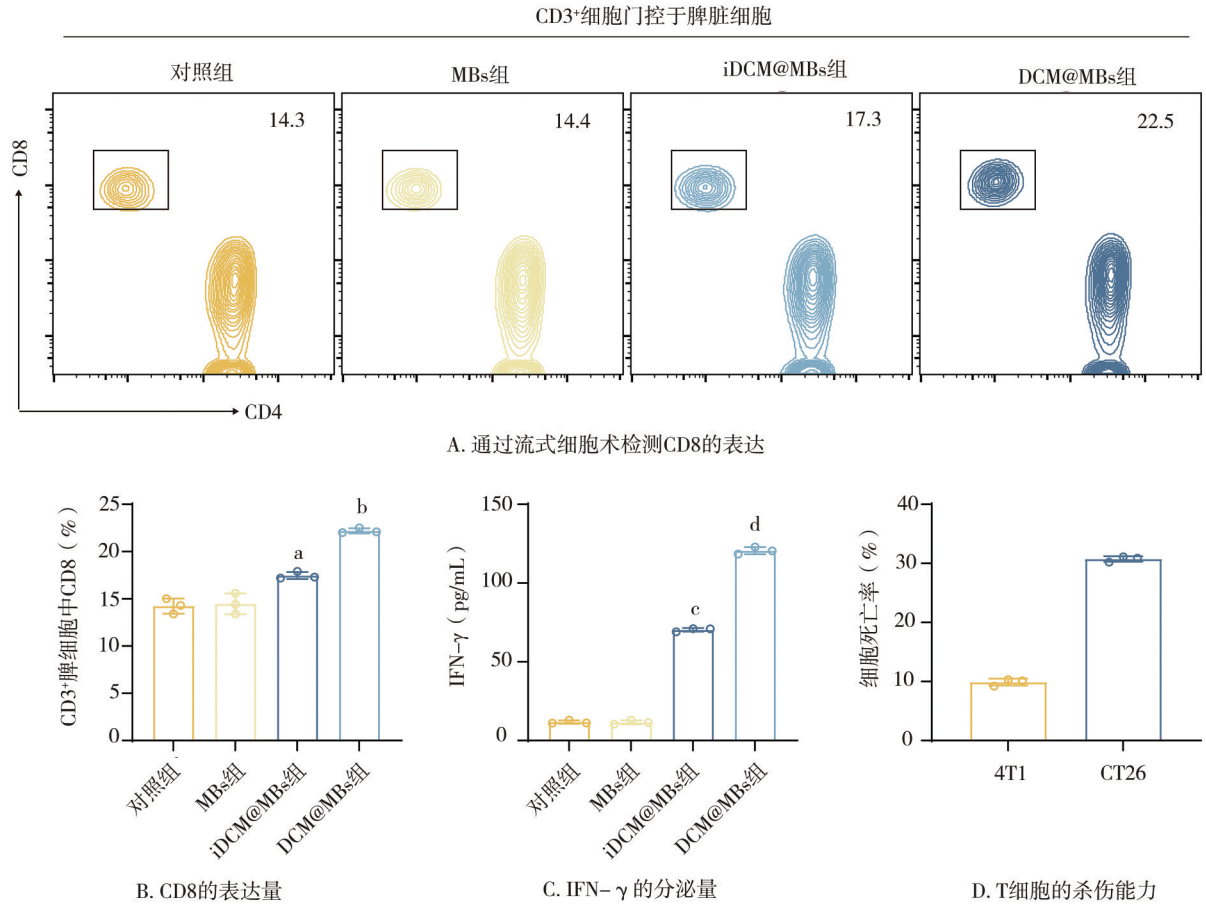


C. 电位图

图2　树突状细胞膜微泡(DCM@MBs)的表征

2.3　T细胞的激活以及体外特异性抗肿瘤作用

为了评估DCM@MBs是否可以将肿瘤抗原呈递给T细胞并激活T细胞，本课题组通过体外共培养进行验证。由于$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞在免疫治疗中是杀死癌细胞的主要力量，本实验通过流式细胞术测量CD8在$CD3^+$T细胞（来自小鼠脾脏淋巴细胞）细胞膜上的表达，对照组、MBs组、iDCM@MBs组、DCM@MBs组$CD3^+$T细胞中CD8表达水平分别为(14.233 ± 0.643)%、(14.467 ± 1.213)%、(17.467 ± 0.143)%、(22.200 ± 0.070)%。与对照组相比，DCM@MBs组$CD3^+$T细胞中CD8的表达明显升高（P<0.001）。除此之外，本课题组发现与对照组相比，iDCM@MBs组也表现出T细胞的激活作用（P=0.003）（图3A、B），可能与未成熟DC表面表达低水平的MHC Ⅱ类分子有关。此外，用Elisa试剂盒检测各组脾脏淋巴细胞培养基上清液中IFN-γ的含量，对照组、MBs组、iDCM@MBs组、DCM@MBs组分别为(11.761 ± 1.703) pg/mL、(11.573 ± 1.671) pg/mL、(70.339 ± 1.270) pg/mL、(120.574 ± 5.179) pg/mL。与对照组相比，DCM@MBs组明显促进了T细胞INF-γ的分泌（P<0.001）（图3C）。鉴于DCM@MBs能有效诱导T细胞激活，于是将未处理的脾脏淋巴细胞和DCM@MBs处理后的脾脏淋巴细胞与CT26.WT肿瘤细胞和4T1小鼠乳腺癌细胞分别以10∶1的数量比（T细胞与靶细胞）共孵育24 h后进行乳酸脱氢酶检测。DCM@MBs处理后的脾脏淋巴细胞组中，CT26细胞死亡率为(30.737 ± 0.216)%，是4T1细胞死亡率(9.893 ± 0.341)%的3.11倍，此外，未处理的脾脏淋巴细胞组中，CT26和4T1的细胞死亡率差异无统计学意义（图3D），说明DCM@MBs对CT26具有免疫特异性。



注：a，与对照组比较，$P<0.01$；b，与对照组比较，$P<0.01$；c，与对照组比较，$P<0.01$；d，与对照组比较，$P<0.01$

图3 T细胞的激活与特异性杀伤能力

3 讨 论

DC疫苗是一种利用DC呈现抗原并刺激免疫系统攻击肿瘤细胞的免疫疗法。当前的DC疫苗在临床前模型中取得了很高的成功率[10]。有研究证明，在评估总体生存率的试验中，DC疫苗可以提高约20%的总体生存率，这是临床上有意义的改善阈值[11]。目前全球范围内已开展超过200项DC疫苗临床试验[12]，主要针对以下4种恶性肿瘤：黑色素瘤（病例数>1 000）、前列腺癌（病例数>750）、胶质母细胞瘤（病例数>500）以及肾细胞癌（病例数>250）。

总的来说，目前大多数肿瘤疫苗都是针对单一的抗原靶点。虽然目前的肿瘤疫苗在一些黑色素瘤[13]和前列腺癌[14]中的治疗效果令人鼓舞，但在面对癌细胞的高异质性和突变率时，其往往无法提供充足的免疫原性[15]。此外，这些疫苗还可能促进免疫逃逸和抗原丢失[16]。因此，如何在肿瘤抗原中识别出一种或几种具有高肿瘤特异性的最佳抗原是一个严峻的挑战。解决这些问题的一种策略是使用全癌细胞、全癌细胞裂解物或肿瘤细胞膜作为DCs启动的多抗原源。这可以针对肿瘤细胞的完整抗原谱来启动免疫系统。然而，大量非肿瘤相关抗原材料的存在可能降低免疫反应的效能[17]。值得注意的是，肿瘤细胞膜能够复制肿瘤细胞表面抗原的多样性，包括已知和未知的肿瘤特异性抗原以及肿瘤相关抗原的全阵列[18]。对树突状细胞施加肿瘤细胞膜刺激可以最大限度地发挥多抗原疫苗在目标识别方面的优势，同时降低免疫逃逸的易感性。目前，DC疫苗的制备和使用涉及分离、离体装载以及将DC回输到患者体内。虽然由DC介导的免疫疗法可能有效，但传统DC疫苗所面临的1项障碍是，完整的DCs在体内可能受到多种抑制性信号的调节[8-9,19]。然而，值得注意的是，DC膜已被证明比完整的DCs携带更多的肿瘤相关抗原-主要组织相容性复合体Ⅱ类分子复合物[20-21]，从而更有效地启动

抗肿瘤免疫。本研究针对上述问题，提出了一种基于树突状细胞膜的DC疫苗策略，并通过一系列试验验证了其在肿瘤免疫治疗中的潜力。

未成熟DCs已知无法诱导抗原特异性反应，且可能诱导调节性T细胞的分化。相反，成熟的DCs则表现出T细胞反应所必需的主要组织相容性复合体分子增强的表达[22-23]。因此，在疫苗给药之前，控制DC达到完全成熟和激活状态，对于避免诱导免疫耐受至关重要。本研究发现，未成熟DCs能够有效吞噬肿瘤细胞膜蛋白，且随着时间的推移，吞噬量逐渐增加。通过流式细胞术分析，本课题组发现，在肿瘤细胞膜抗原刺激后，DCs表面MHC Ⅱ类分子的表达明显增加，这证明了肿瘤抗原的有效呈递以及DCs的成熟。此外，这一结果为后续的DC疫苗的制备提供了理论依据，表明肿瘤抗原能够通过树突状细胞有效传递，并促进T细胞的激活。

DCM@MBs是由DCM与脂质混合后填充C3F8后，通过机械振动法制备的。通过CLSM和SDS-PAGE实验证明，微泡表面成功负载了成熟DC膜，并且与DC相比，微泡的体积更小。因此，可以从相同起始量的DC细胞中产生更高的疫苗产量。此外，微泡的Zeta电位分析结果显示，DCM@MBs具有负电荷，这有助于提高其在体内的稳定性，防止聚集，并保证了良好的生物相容性。众所周知，微泡可以实现精确的体内输送，即超声靶向微泡破坏技术。具体来说，静脉注射微泡后，这些微泡会在施加超声照射的地方振荡和崩溃，从而实现局部声学空化效应[24-26]。同时，机械微流体和微泡破坏过程中的剪切应力产生的超声通孔可以增强局部血管通透性。因此，本课题组设计且制备的DCM@MBs具有介导疫苗精确输送到淋巴器官的潜力。

在肿瘤免疫治疗的临床应用中，T细胞的激活和肿瘤特异性免疫反应是关键环节[27-29]。本研究首先通过流式细胞术实验评估了DCM@MBs激活T细胞的能力。与对照组相比，DCM@MBs组共孵育后的$CD8^+$T细胞数量明显增多。接下来，进一步验证了其对肿瘤细胞的免疫特异性杀伤作用，其对CT26.WT肿瘤细胞的杀伤表现出比4T1小鼠乳腺癌细胞更明显的细胞死亡率。实验证明，DCM@MBs能够激活T细胞，并实现其对肿瘤细胞的免疫特异性杀伤作用，具有进一步研究体内T细胞介导肿瘤免疫治疗的潜力。

综上所述，本研究提出的基于DCM@MBs的疫苗策略在肿瘤免疫治疗中展现出了潜力。首先，DCM@MBs的制备简单且稳定，具有良好的生物相容性和免疫激活能。其次，DCM@MBs能够有效激活T细胞并促进其特异性杀伤肿瘤细胞。然而，本研究仅在体外实验中验证了这一策略的效果，尚未进行体内肿瘤治疗，其在体内的疗效和安全性仍需进一步研究。但是目前超声微泡作为载体递送药物和树突状细胞膜疫苗在肿瘤免疫治疗中都取得了进展[30-31]，因此，进一步探究DCM@MBs在体内治疗肿瘤的潜力值得关注。该技术有望与其他治疗手段（如化疗药物、免疫调节因子等）联合使用，从而实现更加精准和高效的肿瘤治疗。

参 考 文 献

[1] Zhang QF, Li J, Jiang K, et al. CDK4/6 inhibition promotes immune infiltration in ovarian cancer and synergizes with PD-1 blockade in a B cell-dependent manner[J]. Theranostics, 2020, 10(23): 10619-10633.

[2] Singh MP, Sethuraman SN, Miller C, et al. Boiling histotripsy and *in situ* CD40 stimulation improve the checkpoint blockade therapy of poorly immunogenic tumors[J]. Theranostics, 2021, 11(2): 540-554.

[3] Zeng W, Pan J, Fang Z, et al. A novel PD-L1-containing MSLN targeting vaccine for lung cancer immunotherapy[J]. Front Immunol, 2022, 13: 925217.

[4] Dolcetti R, López-Soto A, Dal Col J. Editorial: dendritic cell-based immunotherapy in solid and haematologic tumors[J]. Front Immunol, 2020, 11: 507.

[5] Gallo C, Barra G, Saponaro M, et al. A new bioassay platform design for the discovery of small molecules with anticancer immunotherapeutic activity[J]. Mar Drugs, 2020, 18(12): 604.

[6] Irla M, Küpfer N, Suter T, et al. MHC class Ⅱ-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity[J]. J Exp Med, 2010, 207(9): 1891-1905.

[7] Chen X, Fan X, Li F. Development and evaluation of a novel diammonium glycyrrhizinate phytosome for nasal vaccination[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(10): 2000.

[8] Ju Y J, Lee K M, Kim G, et al. Change of dendritic cell subsets Involved in protection against listeria monocytogenes Infection in Short-Term-Fasted Mice[J]. Immune Netw, 2021, 22(2): 1032-1038.

[9] Qiu P, Guo Q, Yao Q, et al. Characterization of exosome-related gene risk model to evaluate the tumor immune microenvironment and predict prognosis in triple-negative breast cancer[J]. Front Immunol, 2021, 12: 736030.

[10] Sakamoto T, Koya T, Togi M, et al. different In Vitro-generated MUTZ-3-derived dendritic cell types secrete dexosomes with distinct

phenotypes and antigen presentation potencies[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(15):836.

[11] Collignon A, Silvy F, Robert S, et al. Dendritic cell-based vaccination: powerful resources of immature dendritic cells against pancreatic adenocarcinoma[J]. Oncoimmunology, 2018, 7(12): e1504727.

[12] Marra A, Trapani D, Viale G, et al. Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies[J]. NPJ Breast Cancer, 2020, 6: 54.

[13] Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma[J]. N Engl J Med, 2011, 364(22): 2119-2127.

[14] Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2010, 363(5): 411-422.

[15] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(2): 81-94.

[16] van der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, et al. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(4): 219-233.

[17] Lokhov PG, Balashova EE. Cellular cancer vaccines: an update on the development of vaccines generated from cell surface antigens[J]. J Cancer, 2010, 1: 230-241.

[18] Han B, Yang M, Yang X, et al. Systematic analysis of survival-associated alternative splicing signatures in thyroid carcinoma[J]. Front Oncol, 2021, 11: 561457.

[19] Yuan C, Zhang J, Lou J, et al. Comprehensive Analysis of Monocarboxylate Transporter 4 (MCT4) expression in breast cancer prognosis and immune infiltration *via* integrated bioinformatics analysis[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 3850-3863.

[20] Besse B, Charrier M, Lapierre V, et al. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(4): e1071008.

[21] Ochyl LJ, Moon JJ. Dendritic cell membrane vesicles for activation and maintenance of antigen-specific T cells[J]. Adv Healthc Mater, 2019, 8(4): e1801091.

[22] Liu Y, Ge Q, Xu S, et al. Efficacy and safety of anlotinib plus programmed death-1 blockade versus anlotinib monotherapy as second or further-line treatment in advanced esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective study[J]. Front Oncol, 2022, 12: 942678.

[23] Takenaka MC, Quintana FJ. Tolerogenic dendritic cells[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(2): 113-120.

[24] Liu F, Mao Y, Yan J, et al. Bionic microbubble neutrophil composite for inflammation-responsive atherosclerotic vulnerable plaque pluripotent intervention[J]. Research(Wash D C), 2022, 20(1): 121-131.

[25] Qin H, Teng R, Liu Y, et al. Drug Release from gelsolin-targeted Phase-transition nanoparticles triggered by Low-Intensity focused ultrasound [J]. Int J Nanomedicine, 2023(17): 61-71.

[26] Xiang X, Pang HQ, Ma T, et al. Ultrasound targeted microbubble destruction combined with Fe-MOF based bio-/ enzyme-mimics nanoparticles for treating of cancer[J]. J Nanobiotechnol, 2021, 19(1): 92.

[27] Li Z, Li Y, Wang X, et al. PPP2R2B downregulation is associated with immune evasion and predicts poor clinical outcomes in triple-negative breast cancer[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 13.

[28] Sun Y, Wu J, Yuan Y, et al. Construction of a promising tumor-infiltrating $CD8^+$ T cells gene signature to improve prediction of the prognosis and immune response of uveal melanoma[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 673838.

[29] 吴朋飞，杨　智，李青晏，等. 肿瘤微环境中细胞代谢相互作用的研究进展[J]. 四川大学学报(医学版), 2024, 55(2): 482-489.
Wu PF, Yang Z, Li QY, et al. Advances in research on cell metabolic interactions in the tumor microenvironment[J]. J Sichuan Univ Med Sci Ed, 2024, 55(2): 482-489.

[30] Ma X, Kuang L, Yin Y, et al. Tumor-antigen activated dendritic cell membrane-coated biomimetic nanoparticles with orchestrating immune responses promote therapeutic efficacy against glioma[J]. ACS Nano, 2023, 17(3): 2341-2355.

[31] Ramasamy T, Chen X, Qin B, et al. STAT3 decoy oligonucleotide-carrying microbubbles with pulsed ultrasound for enhanced therapeutic effect in head and neck tumors[J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0242264.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：
徐　菡，张　亮，冷小静，等. 树突状细胞膜微泡在T细胞激活与结直肠癌细胞杀伤中的作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2025, 50(6): 750-757.