

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.002

ALDH1A1 mRNA 负载树突状细胞疫苗体外诱导抗鼻咽癌干细胞免疫反应

谢云青, 许扬梅, 陈珊珊, 林晓为, 刘沁颖(福建省肿瘤医院暨福建医科大学肿瘤临床医学院 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 探讨乙醛脱氢酶 1A1(ALDH1A1)mRNA 负载树突状细胞(DC)疫苗体外诱导抗鼻咽癌干细胞免疫反应的能力。**方法:** 体外转录 ALDH1A1 mRNA 并电转染至人外周血 DC, 构建 ALDH1A1-DC 疫苗, 转染 EGFP mRNA 为对照。流式细胞术检测 DC 表型、淋巴细胞亚群、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)增殖和细胞因子分泌。分选 ALDH⁺ 和 ALDH⁻ C666-1 细胞, 检测干细胞标志物(CD24、CD133)和干性基因(OCT4、SOX2、Nanog)的表达水平, 采用 CCK-8 法评估 ALDH1A1-DC 疫苗诱导的特异性免疫杀伤能力。**结果:** EGFP-DC 荧光表达率显著高于未转染 DC ($P < 0.000 1$), ALDH1A1-DC 抗原提呈分子 HLA-ABC、共刺激分子 CD86、CD40 和 CCR7 表达与未转染 DC 相比显著增强 ($P = 0.001 3$ 、 $P = 0.005 9$ 、 $P = 0.000 4$ 及 $P = 0.001 9$)。与单独淋巴细胞组(T)及空载 DC 诱导的淋巴细胞组(DC-T)相比, ALDH1A1-DC 诱导的 CTL 比例最高(均 $P < 0.000 1$), 分裂指数最高 ($P = 0.000 2$ 、 $P = 0.000 3$), 且 CD8⁺CD69⁺ ($P = 0.000 5$ 、 $P < 0.000 1$) 和 CD8⁺ IFN- γ ⁺ ($P = 0.012 6$ 、 $P = 0.001 9$) 细胞亚群比例均显著提高。ALDH1A1-DC-T 细胞对 ALDH⁻C666-1 悬浮细胞球的杀伤效果显著优于 ALDH⁻细胞球 ($P = 0.001 0$), 且与其他各组淋巴细胞相比表现出较强的抗 ALDH⁻C666-1 悬浮细胞球的免疫效应 ($P = 0.001 0$, $P < 0.000 1$)。然而, HLA-ABC 阻断后其对 ALDH⁻C666-1 细胞的特异性杀伤效应显著降低 ($P < 0.000 1$)。**结论:** mRNA 转染 DC 后可翻译蛋白并促进 DC 成熟, 增强其诱导特异性 CTL 免疫反应的能力。

[关键词] 肿瘤干细胞; 乙醛脱氢酶 1A1; 树突状细胞; 细胞毒性 T 淋巴细胞; 鼻咽癌

[中图分类号] R739.6; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 05-0486-08

The specific immune response of dendritic cell vaccine pulsed with ALDH1A1 mRNA on nasopharyngeal carcinoma stem cells *in vitro*

XIE Yunqing, XU Yangmei, CHEN Shanshan, LIN Xiaowei, LIU Qinying (Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Fujian Cancer Hospital & Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the ability of dendritic cell (DC) vaccine loaded with aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) mRNA to enhance anti-nasopharyngeal carcinoma stem cell immune responses *in vitro*. **Methods:** ALDH1A1 mRNA was transcribed *in vitro* and electroporated into human peripheral blood-derived DCs to construct ALDH1A1-DC vaccine; EGFP mRNA was used as a transfection control. Flow cytometry was employed to analyze DC phenotypes, lymphocyte subsets, cytotoxic T lymphocyte (CTL) proliferation, and cytokine secretion. ALDH⁺ and ALDH⁻C666-1 cells were sorted; expression of stem cell markers (CD24, CD133) and stemness-associated genes (OCT4, SOX2, Nanog) was analyzed. The specific cytotoxic capacity induced by ALDH1A1-DC was evaluated using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. **Results:** EGFP-DC exhibited significantly higher fluorescence expression than untransfected DCs ($P < 0.000 1$). Moreover, ALDH1A1-DC significantly enhanced the expression of antigen-presenting molecules HLA-ABC, co-stimulatory molecules CD86, CD40, and CCR7 compared to untransfected DCs ($P = 0.001 3$, $P = 0.005 9$, $P = 0.000 4$, $P = 0.001 9$). Compared with the T lymphocyte group (T) and the DC-T group (DC-induced T lymphocytes), ALDH1A1-DC-induced T lymphocytes (ALDH1A1-DC-T) exhibited the highest proportion of CTL ($P < 0.000 1$), the highest proliferation index ($P = 0.000 2$ and $P = 0.000 3$, respectively), the highest proportions of CD8⁺CD69⁺ cells ($P = 0.000 5$ and $P < 0.000 1$, respectively), and the highest proportions of CD8⁺ IFN- γ ⁺ subsets ($P = 0.012 6$ and $P = 0.001 9$, respectively). CCK-8 assay demonstrated that ALDH1A1-DC-T exhibited significantly enhanced cytotoxicity against ALDH⁻ C666-1 suspension spheres compared to ALDH⁻ spheres ($P = 0.001 0$). Furthermore, ALDH1A1-DC-T elicited the most potent anti-ALDH⁻ C666-1 immune response among all lymphocyte groups tested ($P = 0.001 0$ and

[基金项目] 福建省卫生健康委员会医学创新课题(2023CXA036); 福建省科技创新联合资金项目(2024Y9622)

[作者简介] 谢云青, 女, 硕士, 主任技师

[通信作者] 刘沁颖(扫码获取作者通信方式)



$P < 0.0001$, respectively). However, HLA-ABC blockade significantly attenuated this specific cytotoxicity ($P < 0.0001$). **Conclusion:** mRNA transfected into DCs can be translated into protein and promote the maturation of DCs and enhance the ability of DCs to induce specific CTL immune response.

[Key words] cancer stem cell (CSC); aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1); dendritic cell (DC); cytotoxic T lymphocyte (CTL); nasopharyngeal carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(5): 486-493. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.002]

鼻咽癌放疗后约20%的患者出现复发或远处转移,放射抵抗性是治疗失败的关键因素^[1-2]。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)具有自我更新、治疗抵抗及休眠潜能,与肿瘤进展、复发转移及耐药密切相关^[3-4],因而靶向CSC为提升治疗获益提供了方向^[5]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是启动免疫应答的核心枢纽,DC疫苗也在肿瘤免疫治疗中展现出良好的安全性与有效性,但其应用受限于抗原特异性不足与细胞来源匮乏^[6]。乙醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)是CSC关键表面标志物,其中ALDH1A1在多种实体瘤CSC中高表达,与CSC自我更新、耐药性及致瘤潜能相关,且在正常组织中表达水平低^[7]。以ALDH1A1为DC疫苗靶点抗原,可精准靶向CSC亚群以降低脱靶毒性。ALDH1A1作为胞内抗原,可通过MHC I类分子途径被DC有效加工、提呈,进而高效激活细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),诱导特异性抗肿瘤免疫应答,从而有效清除具有CSC表型的肿瘤细胞^[8-10]。本研究采用ALDH1A1 mRNA转染DC,体外评估ALDH1A1-DC疫苗诱导抗鼻咽癌CSC免疫反应的能力,为DC疫苗新型抗原负载策略探索提供实验依据,同时为靶向鼻咽癌CSC的DC疫苗研发及临床转化奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人鼻咽癌C666-1细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司,人ALDH1A1-pcDNA3.1(+)质粒及qRT-PCR引物均由上海生工公司合成/构建,EGFP-pcDNA3.1(+)质粒、TRIzol及CFSE染色剂均购自美国Invitrogen公司,Sma I限制性内切酶购自德国Qiagen公司,质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,mMESSAGE mMACHINE® Kit购自美国Ambion公司,RPMI 1640及Opti-MEM培养基、胎牛血清、0.25%胰酶均购自美国Gibco公司,Mogengel基质胶购自厦门模基生物科技有限公司,一步法PrimeScript™ qRT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、IL-4及TNF- α 均购自美国Peprotech公司,IL-2购自北京四环制药有限公司,CD3单抗、GT-T551

培养基均购自北京宝日医生物技术有限公司,淋巴细胞分离液购自美国General Electric公司,HLA-ABC-ECD、CD86-PE、CD40-PC5、CCR7-PC7、CD3-PC5/CD8-ECD/CD4-PE/CD69-APC-H7、CD133-FITC、CD24-PE流式荧光抗体及IFN- γ 细胞因子流式检测试剂盒均购自美国BD公司,鼠抗人HLA-ABC抗体购自美国Thermo公司,STEMCELL ALDEFLUOR™ Kit购自加拿大STEMCELL Technologies公司,Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自美国MCE公司,ABI 7500实时荧光定量PCR(RT-qPCR)仪购自美国应用生物系统公司,NanoDrop 2000c购自美国Invitrogen公司,4D-Nucleofector细胞核转染仪购自瑞士Lonza公司,BD FACSAriaIII流式细胞分选仪购自美国BD公司。

1.2 人ALDH1A1-DC疫苗的构建及表型检测

1.2.1 人ALDH1A1 mRNA的体外扩增

按照质粒提取试剂盒说明书提取ALDH1A1-pcDNA3.1及EGFP-pcDNA3.1质粒。利用Sma I酶切位点将ALDH1A1-pcDNA3.1及EGFP-pcDNA3.1质粒线性化,回收酶切后的线性化质粒,以此为模板,通过mMESSAGE mMACHINE® Kit(Ambion公司)进行ALDH1A1和EGFP mRNA的体外扩增,采用LiCl回收法进行mRNA纯化回收,琼脂糖凝胶电泳鉴定回收的mRNA,分光光度计检测mRNA的浓度。

1.2.2 分离培养人外周血DC

抽取健康献血者50~100 mL外周静脉血(经福建医科大学附属肿瘤医院伦理委员会审核批准,献血者均签署知情同意书,伦理审批号:K2024-354-01),经Ficoll密度梯度离心分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),加入GT-T551培养基,以密度 2×10^6 个/mL铺入75 cm²的细胞培养瓶,摇匀后平放入37 °C、5% CO₂培养箱,培养2 h后,收集上清悬浮淋巴细胞冻存储备用。向贴壁细胞培养体系内加入20 mL GT-T551培养基(含GM-CSF 500 ng/mL、IL-4 500 ng/mL),每隔1 d补液1次,并于培养第5天添加TNF- α (50 ng/mL),于第6天收集DC进行转染。

1.2.3 ALDH1A1-DC及EGFP-DC的构建及质控

采用Neon™电转染系统进行ALDH1A1 mRNA转染。按照Neon™ Kit说明书操作,447 × g离心5 min收集培养至第6天的DC。细胞沉淀用DPBS漂洗

1次,离心洗涤操作同上。按照 3×10^5 个细胞/ $5 \mu\text{g}$ mRNA的比例,取适量的ALDH1A1或EGFP mRNA至1.5 mL无菌微量离心管中,将DC重新悬浮于适量Buffer R溶液中并加入含有mRNA的管中,轻轻混匀,用Neon™吸头将所有样品吸入电极杯底部,置于电击台上,电转电压230 V,按照操作说明进行电转染,转染EGFP mRNA作为转染的阳性对照组。将电转后DC样品转移到6孔板中,并补充DC完全培养基(含500 ng/mL GM-CSF、500 ng/mL IL-4、50 ng/mL TNF- α),使最终体积为3 mL。

1.2.4 流式细胞术检测转染前后DC表型

转染24 h后,在荧光显微镜下观察EGFP mRNA转染DC的效率(EGFP-DC),收集细胞,采用流式细胞术检测荧光强度。离心收集ALDH1A1 mRNA转染的DC(ALDH1A1-DC)及未转染的DC,PBS洗涤细胞2次,按照每 1×10^6 个细胞加入10 μL 抗体工作液的配比,加入荧光标记抗体HLA-ABC-FITC、CD86-PE及CCR7-FITC,避光孵育20 min后,PBS洗涤细胞2次,用1 mL PBS重悬标记后的细胞,流式细胞仪检测各组DC表型。

1.3 ALDH1A1-DC诱导特异性免疫反应的功能鉴定

1.3.1 流式细胞术检测DC诱导前后淋巴细胞亚群变化

将1.2.2节中冻存的悬浮淋巴细胞复苏后,加入GT-T551完全培养基(含CD3 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、IL-2 1 000 U/mL、IFN- γ 1 000 U/mL)培养72 h后,以1:20的比例加入ALDH1A1-DC(ALDH1A1-DC-T组)及未转染DC(DC-T组)共培养72 h后,离心收集细胞,按1.2.4节中的方法进行CD3-PC5/CD4-PE/CD8-ECD流式荧光抗体标记,流式细胞术检测各组中淋巴细胞亚群的变化,以未加入DC诱导的淋巴细胞(T组)及未经刺激的淋巴细胞作为对照。

1.3.2 淋巴细胞增殖试验

DPBS洗涤分离的PBMC 3次,用含5%FBS的DPBS重悬细胞并调整各组细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,按照每mL细胞加入5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CFSE的配比,对PBMC进行标记,37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应5 min后离心收集细胞,DPBS洗涤细胞3次,用含10% FBS的GT-T551培养基洗涤、离心,将细胞重悬于GT-T551培养基(含10% FBS及1 000 U/mL IL-2),按照1:20的比例分别加入未转染DC(DC-T组)及ALDH1A1-DC(ALDH1A1-DC-T组),未加入DC的淋巴细胞(T组)作为对照,培养72 h后离心收集各组细胞,按照上述1.3.1方法加入CD3-PC5/CD4-PE/CD8-ECD/CD69-APC-H7流式荧光抗体标记细胞,流式细胞术检测各组淋巴细胞亚群及CD8 $^{+}$ T细胞增殖和活化情况,以CFSE染色的初始T细胞作为阳性对照,采用FCS

Express 7软件进行细胞增殖数据拟合分析。

1.3.3 细胞因子分泌检测

用细胞因子检测试剂盒检测各组CD8 $^{+}$ T细胞IFN- γ 分泌水平。按照试剂盒说明书操作,步骤如下:各组淋巴细胞在1.5%植物血凝素M(phytohemagglutinin-M, PHA-M)作用下培养48 h。收集各组淋巴细胞,分别加入10%血清封闭Fc受体,采用CD8-电子耦合染料(electron coupled dye, ECD)抗体进行细胞表面染色20 min,固定、破膜后,加入IFN- γ -APC抗体染色20 min,洗涤、离心后,用100 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测各组淋巴细胞IFN- γ 分泌情况。

1.4 C666-1细胞悬浮细胞球培养及CSC特性鉴定

1.4.1 ALDH $^{+}$ 细胞分选

将对数生长期的C666-1细胞调整至 1×10^6 个/mL,分为2管,向对照管中加入5 μL 二乙氨基苯甲醛(diethylaminobenzaldehyde, DEAB)(ALDH酶活性特异性抑制剂)并混匀,另一管加入等体积PBS溶液。然后向每管中加入2.5 μL 活化的ALDEFLUOR™试剂并立即混匀,反应30 min后,离心收集细胞,并以PBS重悬细胞,流式细胞仪分析ALDEFLUOR(FITC通道)。上述标记后的细胞利用流式细胞仪对其进行分选并分别收集ALDH $^{+}$ (ALDEFLUOR阳性)及ALDH $^{-}$ (ALDEFLUOR阴性)细胞。分选收集的细胞PBS洗涤3次后,PBS重悬细胞沉淀,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min以恢复细胞内ALDH酶活性,重新利用ALDEFLUOR™试剂进行孵育染色,并利用流式细胞仪检测分选后的细胞纯度。

1.4.2 C666-1悬浮细胞球的培养及形态观察

基质胶解冻后,适当混匀,使用预冷的培养基稀释至1 mg/mL。向6孔细胞培养板表面加入基质胶(50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$),平铺均匀,避免产生气泡,并将培养板在37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置24 h形成凝胶。向收集的ALDH $^{+}$ 及ALDH $^{-}$ 细胞中分别加入RPMI 1640无血清培养基,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL。吸去凝胶上清液,每孔加入上述细胞各1 mL,并补充1 mL RPMI 1640无血清培养基,6孔板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 培养箱中培养,观察悬浮细胞球大小。

1.4.3 鉴定C666-1悬浮细胞球的干性特性

10 d后,收集悬浮细胞球,0.25%胰酶消化后经细胞筛网过滤以制成单细胞悬液,按照上述方法在收集的细胞中加入CD24-PE/CD133-FITC荧光标记抗体进行标记,流式细胞术检测ALDH $^{+}$ 及ALDH $^{-}$ 细胞来源的悬浮细胞球表型。

采用qRT-PCR评估SOX2、OCT4及Nanog干性基因的表达。使用TRIzol试剂提取ALDH $^{+}$ 及ALDH $^{-}$ 细胞来源悬浮细胞球的总RNA。参照PrimeScript™ qRT-PCR

试剂盒说明书, 于 25 μ L 反应系统中进行 qRT-PCR。引物序列见表 1。SRY 盒转录因子 2 (SRY-box transcription factor 2, SOX2)、POU 类 5 同源框 1 (POU class 5

homeobox 1, OCT4) 及 Nanog 同源框 (Nanog homeobox, Nanog) 的表达水平以 GAPDH 为内参进行标准化, 并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。每个实验均重复 3 次。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
SOX2	5'-GGATAAGTACACGCTGCCCG-3'	5'-ATGTGCGCGTAAGTGTCCAT-3'
OCT4	5'-AACCCACACTGCAGCAGATCA-3'	5'-TCTCGTTGTGCATAGTCGCT-3'
Nanog	5'-CAATGGTGTGACGCAGGGAT-3'	5'-TGCACCAGGTCTGAGTGTT-3'
GAPDH	5'-CCCTCCGCTTCGCCCTCCGCTTCG-3'	5'-CACCTGTGCTGTAGCCAAA-3'

1.5 检测 ALDH1A1-DC-T 细胞抗 ALDH⁺ CSC 的特异性免疫效应

采用 CCK-8 法检测 ALDH1A1-DC-T 细胞靶向特异性抗原的免疫杀伤效应。ALDH⁺ 及 ALDH⁻ C666-1 悬浮细胞经 0.25% 胰酶消化并经细胞筛网过滤以制成单细胞悬液, 离心收集细胞, 分别以每 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板作为靶细胞, 按 20:1 的效靶比分别加入 ALDH1A1-DC-T、DC-T 及 T 组淋巴细胞作为效应细胞 (每孔效应细胞总量为 2×10^5 个), 每组设 3 个复孔。另设单独的效应细胞孔和靶细胞孔为对照。培养 24 h 后, 每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂反应 2 h, 测定 450 nm 波长处的光密度 (*D*) 值, 计算细胞杀伤率。细胞杀伤率 = $[1 - (\text{实验孔 } D \text{ 值} - \text{单独效应细胞孔 } D \text{ 值}) / \text{单独靶细胞孔 } D \text{ 值}] \times 100\%$ 。

ALDH⁺ C666-1 细胞悬浮球经上述方法处理并加入 96 孔板后, 将鼠抗人 HLA-ABC 抗体加入孔中 (10 mg/mL), 室温反应 30 min, 再按 20:1 的效靶比加入 ALDH1A1-DC-T 细胞作为效应细胞。以未阻断 HLA-ABC 的 ALDH⁺ C666-1 细胞为对照。采用 CCK-8 法检测效应细胞杀伤率。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 软件处理数据, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ALDH1A1/EGFP mRNA 体外扩增鉴定及转染后 DC 表型分析

琼脂糖凝胶法检测结果 (图 1A) 显示, 扩增的 ALDH1A1 mRNA 序列长约 2.0 kb, EGFP mRNA 片段大小约 1.2 kb, 与两种基因 CDS 序列理论长度相符。

荧光显微镜下观察结果 (图 1B) 显示, 转染 24 h 后 EGFP-DC 显示绿色荧光, 流式细胞术检测其绿色荧光表达率为 $(49.5 \pm 6.81)\%$, 与未转染 DC 相比显著提高 ($P < 0.001$)。流式细胞术检测 DC 表型, 结果

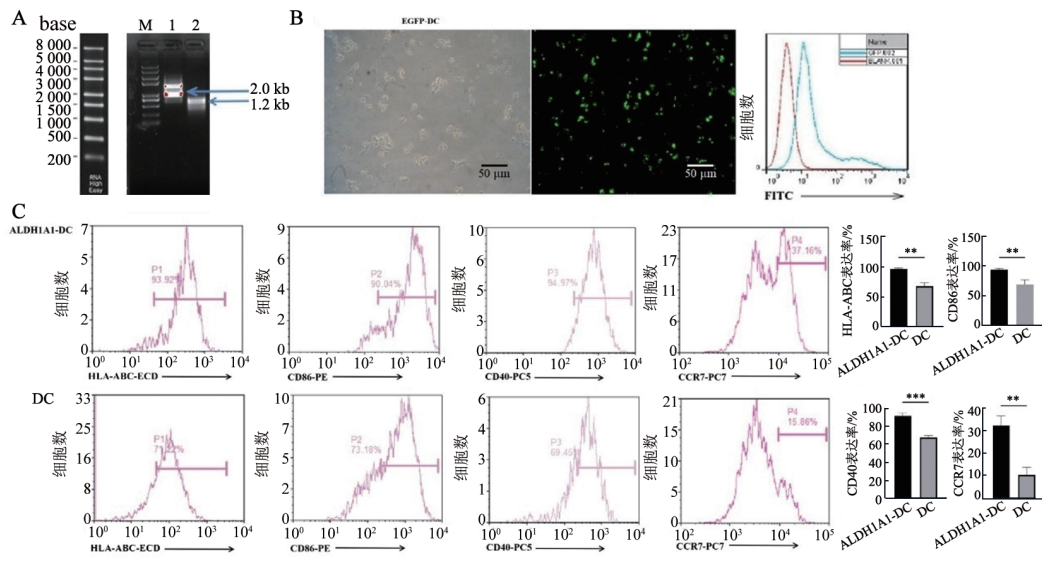
(图 1C) 显示, 与未转染 DC 组相比, ALDH1A1-DC 表面 CC 趋化因子受体 7 (C-C chemokine receptor 7, CCR7) 的表达显著升高 [$(32.34 \pm 4.04)\%$ vs $(10.21 \pm 3.42)\%$, $P = 0.002$], 抗原提呈分子 HLA-ABC、共刺激分子 CD86、CD40 表达率较未转染 DC 也显著升高 [HLA-ABC: $(96.29 \pm 1.83)\%$ vs $(67.24 \pm 6.00)\%$, $P = 0.0013$; CD86: $(94.48 \pm 2.16)\%$ vs $(68.89 \pm 8.00)\%$, $P = 0.0059$; CD40: $(91.39 \pm 3.13)\%$ vs $(67.37 \pm 2.14)\%$, $P = 0.0004$]。

2.2 ALDH1A1-DC 诱导的免疫反应能力检测

流式细胞术检测鉴定各组淋巴细胞亚群结果 (图 2A) 显示, CD3 单抗刺激后, T、DC-T 及 ALDH1A1-DC-T 组中 CD3⁺ T 细胞的比例与初始淋巴细胞相比均显著提高 [$(88.77 \pm 3.43)\%$ 、 $(91.73 \pm 1.60)\%$ 、 $(94.37 \pm 2.01)\%$ vs $(25.12 \pm 5.45)\%$, 均 $P < 0.0001$], 而 T、DC-T 及 ALDH1A1-DC-T 组之间差异无统计学意义 ($P = 0.2280$ 、 $P = 0.1484$ 、 $P = 0.0630$)。同时 ALDH1A1-DC-T 组中 CTL (CD3⁺CD8⁺ T 细胞) 比例显著高于 DC-T、T 及初始淋巴细胞组 [$(82.90 \pm 3.37)\%$ vs $(47.27 \pm 3.67)\%$ 、 $(34.2 \pm 3.60)\%$ 、 $(14.63 \pm 7.08)\%$, 均 $P < 0.0001$], DC-T 组中 CTL 占比显著高于 T 组 ($P = 0.007$)。

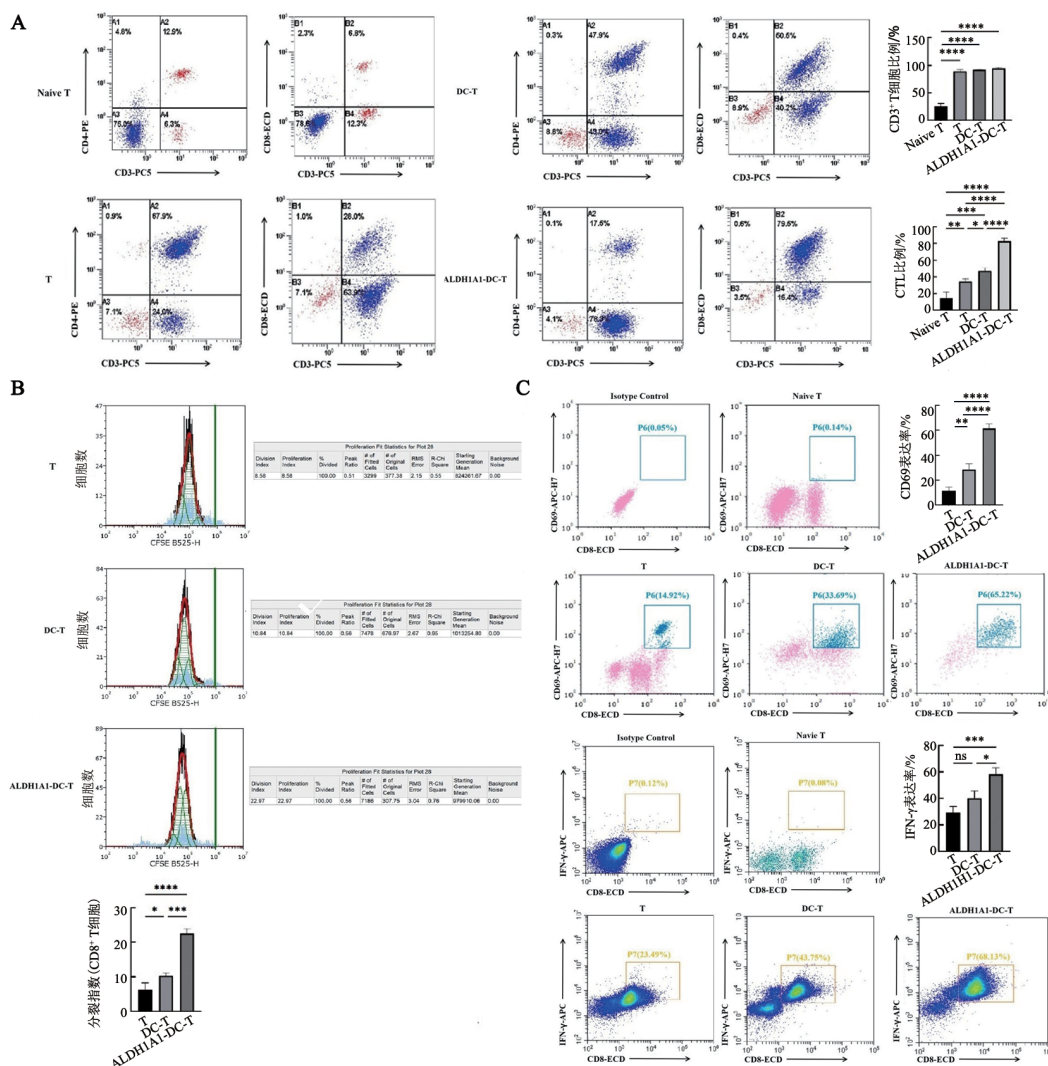
CFSE 染色法检测 CTL 增殖情况, 拟合数据结果 (图 2B) 显示, ALDH1A1-DC-T 组中 CTL 分裂指数 (divide index) 显著高于 DC-T 组与 T 组 [(22.56 ± 1.43) vs (10.42 ± 0.76) 、 (6.28 ± 2.00) , $P = 0.0002$ 、 $P = 0.0003$], 而 DC-T 组中 CTL 的分裂指数与 T 组相比也有显著变化 ($P = 0.028$)。

流式细胞术检测各组 CD8⁺ T 细胞表面活化标志物 CD69 及分泌 IFN- γ 的能力, 结果 (图 2C) 显示, 与 DC-T 及 T 组相比, DC 负载 ALDH1A1 mRNA 后, 其诱导的 ALDH1A1-DC-T 中 CD8⁺ T 细胞表面 CD69 表达率显著提高 [$(61.56 \pm 3.53)\%$ vs $(28.70 \pm 4.52)\%$ 、 $(11.50 \pm 3.06)\%$, $P = 0.0006$ 、 $P < 0.0001$], 且分泌 IFN- γ 的水平显著提高 [$(58.43 \pm 4.84)\%$ vs $(42.02 \pm 5.53)\%$ 、 $(29.21 \pm 4.75)\%$, $P = 0.0126$ 、 $P = 0.0017$], 而 DC-T 组与 T 组分泌 IFN- γ 的水平没有显著差异 ($P = 0.0596$)。



A: 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增的 mRNA (M: RNA 分子量标准; 1: ALDH1A1 mRNA; 2: EGFP mRNA); B: 荧光倒置显微镜下观察 EGFP-DC (标尺 = 50 μm) 及流式细胞术检测绿色荧光表达; C: 流式细胞术检测 ALDH1A1-DC 及未转染 DC 表型。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

图1 体外扩增的 ALDH1A1、EGFP mRNA 及 mRNA 转染后 DC 鉴定



A: 各组淋巴细胞亚群分析; B: 各组 CTL 增殖数据拟合; C: 各组 CD8⁺ T 细胞中 CD69 及 IFN-γ 表达水平分析。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

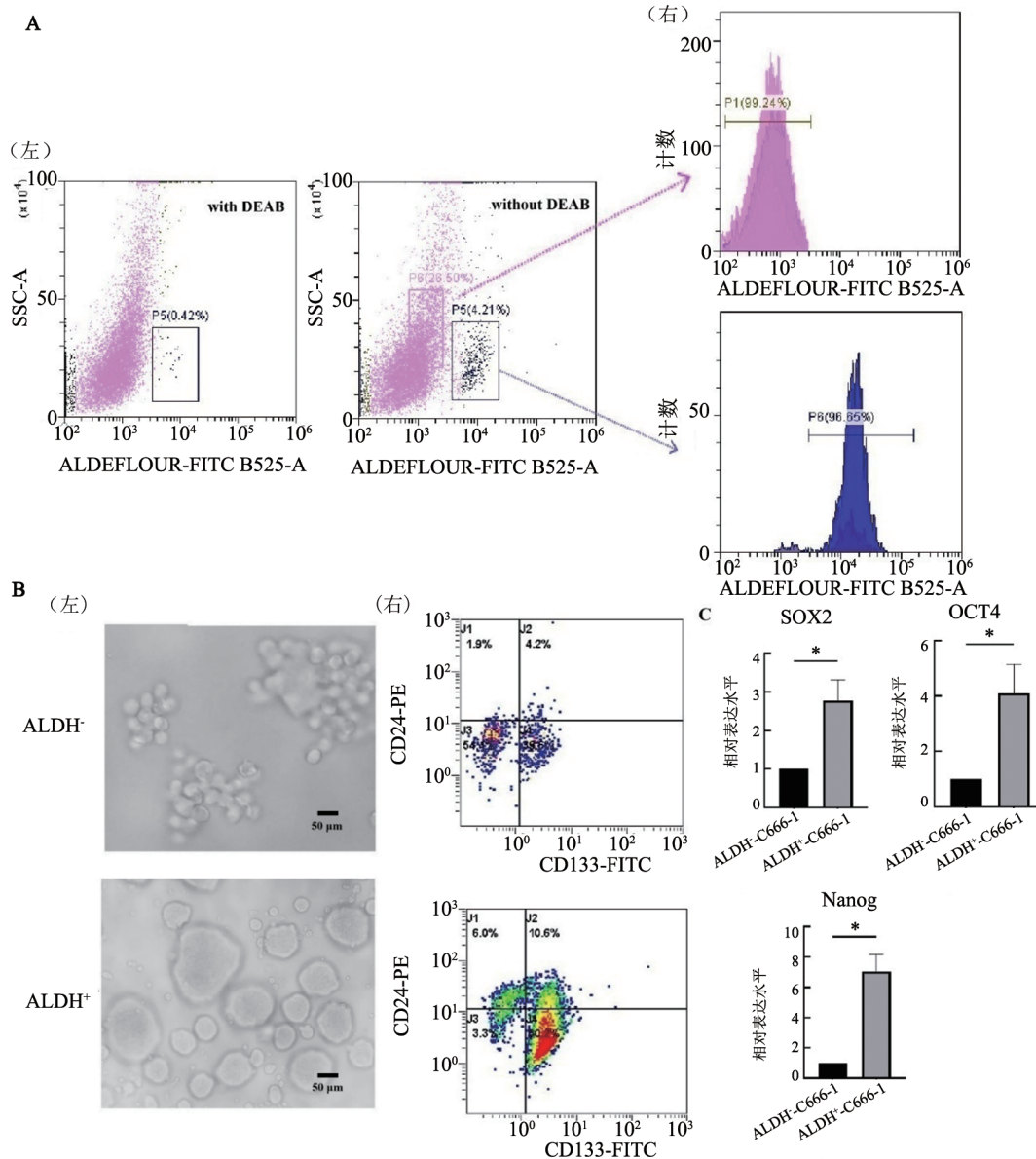
图2 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群及细胞因子分泌水平

2.3 C666-1 细胞的 CSC 特性分析

C666-1 细胞采用 ALDEFLUOR 试剂染色后, 流式细胞术检测结果(图 3A, 左)显示, 有 $(4.61 \pm 0.63)\%$ 的细胞表达 ALDH, 标记为 ALDH⁺ 细胞。分选出 ALDH⁺ 及 ALDH⁻ 的 C666-1 细胞再次利用 ALDEFLUOR 试剂染色鉴定分选纯度, 结果(图 3A, 右)显示纯度均达到 90% 以上, 证实流式分选技术可行。

倒置显微镜下观察悬浮细胞球, 可见 ALDH⁺-C666-1 细胞来源的悬浮细胞球结构紧致, 而 ALDH⁻-C666-1 细胞来源的悬浮细胞球则较松散(图 3B, 左)。流式细胞术检测 2 种悬浮细胞球表面

CD24、CD133 干细胞标志物的表达, 结果(图 3B, 右)显示 ALDH⁺-C666-1 细胞形成的悬浮细胞球表面 CD24、CD133 的表达率均显著高于 ALDH⁻-C666-1 悬浮细胞球 [CD24: $(17.34 \pm 2.06)\%$ vs $(5.04 \pm 1.09)\%$, $P < 0.001$; CD133: $(85.6 \pm 5.36)\%$ vs $(40.27 \pm 3.25)\%$, $P < 0.001$]。qRT-PCR 比较两组细胞球中干性基因 SOX2、OCT4 及 Nanog 表达, 结果(图 3C)显示, ALDH⁺ 细胞球中 3 种基因的表达水平均升高, 分别是 ALDH⁻ 细胞球的 (2.78 ± 0.55) 、 (2.71 ± 1.06) 和 (7.07 ± 1.11) 倍。



A: 流式细胞术分选及鉴定 ALDH⁺ 及 ALDH⁻-C666-1 细胞; B: 倒置显微镜下观察 ALDH⁺ 及 ALDH⁻-C666-1 悬浮细胞球并采用流式细胞术鉴定 CSC 表型(标尺 = 50 μm); C: qRT-PCR 检测 ALDH⁺ 及 ALDH⁻-C666-1 悬浮细胞球干性基因的表达。*P < 0.05。

图 3 ALDH 活性细胞分选与 CSC 特性鉴定

2.4 ALDH1A1-DC-T 细胞诱导的特异性免疫杀伤效应检测

CCK-8 法检测结果(图 4)显示, 相比于 DC-T 及 T 组,

ALDH1A1-DC-T 细胞对于 ALDH⁺ C666-1 悬浮细胞的杀伤效应最强 [$(66.06 \pm 3.19)\%$ vs $(32.21 \pm 3.77)\%$, $(24.75 \pm 2.92)\%$, $P = 0.001$, $P < 0.001$]。而 ALDH1A1-

DC-T组对ALDH⁺ C666-1悬浮细胞的杀伤活性与DC-T组细胞相比无显著差异($P=0.052$),与T效应细胞相比显著升高[(46.24 ± 2.42)% vs (26.75 ± 2.78)%, $P=0.001$ 0]。比较ALDH1A1-DC-T细胞对ALDH⁺-C666-1及ALDH⁻-C666-1悬浮细胞的杀伤率,结果显示其对ALDH⁺-C666-1悬浮细胞的杀伤率更高[(66.06 ± 3.19)% vs (46.24 ± 2.42)%, $P=0.001$ 4]。阻断HLA-ABC分子后,ALDH1A1-DC-T组细胞对ALDH⁺-C666-1悬浮细胞的杀伤显著降低[(23.65 ± 2.62)% vs (65.67 ± 3.23)%, $P < 0.000$ 1]。

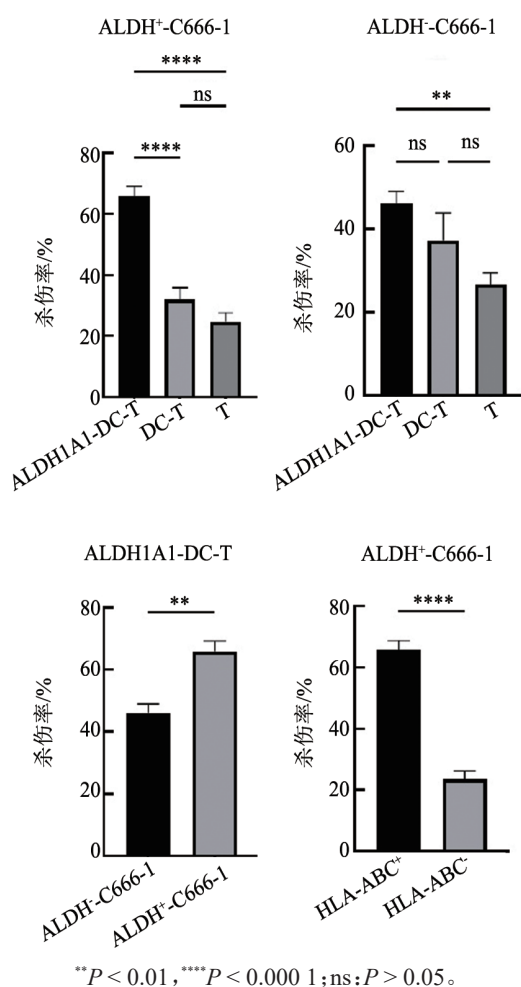


图4 CCK-8法检测各组淋巴细胞抗CSC免疫反应功能

3 讨论

放疗是鼻咽癌的主要治疗方法。然而,固有的或获得性的放射抵抗可能导致鼻咽癌远处转移或复发。CSC的适应性可能有助于其对放疗产生抗性,因此,靶向CSC的治疗策略被视作改善肿瘤疗效的潜在途径^[11-12]。

鉴于CSC对常规方法的敏感性较低,且免疫系统(包括固有免疫和适应性免疫)具有显著调控的作

用,多种基于免疫疗法的CSC靶向策略应运而生。El-Ashmawy等^[13]从CSC样表型的耐药癌细胞中提取抗原用于负载DC,制备的CSC靶向DC疫苗联合低剂量顺铂可显著抑制CSC增殖。然而,DC疫苗的临床应用常受限于抗原的特异性及来源匮乏。采用mRNA负载DC的疫苗策略具有以下优势^[14-16]:首先,mRNA负载方式安全灵活,能够避免基因组整合风险,编码全长抗原激发广泛特异性T细胞应答,且mRNA技术成熟,易于合成与质量控制;其次,mRNA负载促进DC成熟与抗原提呈,内源性表达抗原并激活CD8⁺和CD4⁺T细胞,诱导协同抗肿瘤效应;优化mRNA结构可提高稳定性和翻译效率。最后,mRNA可增强DC活化、迁移及免疫调控。因此,mRNA负载DC的方式为缺乏肿瘤组织的患者提供了标准化可及的肿瘤特异性抗原来源。

ALDH1是CSC的一个关键表面标志物,是多种肿瘤的潜在治疗靶点^[17]。本研究以线性重组ALDH1A1-pcDNA3.1质粒(含ALDH1A1 CDS序列)为模板体外合成mRNA,确保其包含以下关键元件:5'帽结构(对mRNA的稳定和翻译启动至关重要^[18]),5'和3'非翻译区(UTR,调控mRNA的稳定性、定位和翻译效率^[19]),约200 nt的poly(A)尾巴(维持mRNA稳定性和翻译调节^[20]),以及启动蛋白质翻译的起始密码子(AUG)。

本研究结果显示,EGFP mRNA转染DC 24 h后可有效表达荧光蛋白,证实mRNA结构具有一定稳定性,并可在DC内被翻译为蛋白。ALDH1A1 mRNA负载DC后可促进DC成熟表型,其诱导的ALDH1A1-DC-T中CTL的比例显著提高且活性增强。ALDH1A1 mRNA负载的DC疫苗与空载的DC相比具有更强的诱导靶向表达ALDH活性的鼻咽癌CSC的免疫应答能力。值得注意的是,虽然DC-T组中CTL的比例及分裂指数比T组中具有显著差异,但其IFN- γ 分泌水平并无差异,提示活化程度类似,同时,DC-T与T组对ALDH活性阳性CSC的免疫杀伤活性并无显著差异。该研究结果与既往文献一致^[21],提示空载的成熟DC作为专职抗原提呈细胞可有效促进CD8⁺T细胞扩增,但DC对“增殖/数量”和“效应功能(IFN- γ)”是两条独立调控通路,肿瘤抗原负载后的DC可能通过IL-12等细胞因子促进CTL分泌IFN- γ 。这些发现为未来的研究提供了重要方向,后续工作可深入探索这些潜在机制,以期揭示更为全面且精细的免疫应答网络。

ALDH1A1 mRNA转染的DC疫苗能够高效诱导特异性免疫应答,从而发挥针对鼻咽癌CSC的显著抗肿瘤效应。本研究不仅为体外制备靶向CSC的

DC 疫苗提供了新的思路, 同时也为基于 mRNA 技术的 DC 疫苗在临床转化应用方面提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] XIE Z Z, LI W, AI J G, et al. C2orf40 inhibits metastasis and regulates chemo-resistance and radio-resistance of nasopharyngeal carcinoma cells by influencing cell cycle and activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 264. DOI:10.1186/s12967-022-03446-z.
- [2] ZHAN Y T, FAN S Q. Multiple mechanisms involving in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Cancer*, 2020, 11(14): 4193-4204. DOI:10.7150/jca.39354.
- [3] OLIVARES-URBANO M A, GRIÑÁN-LISÓN C, MARCHAL J A, et al. CSC radioresistance: a therapeutic challenge to improve radiotherapy effectiveness in cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1651. DOI:10.3390/cells9071651.
- [4] FUKUI R, SAGA R, MATSUYA Y, et al. Tumor radioresistance caused by radiation-induced changes of stem-like cell content and sub-lethal damage repair capability[J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 1056. DOI:10.1038/s41598-022-05172-4.
- [5] HOQUE S, DHAR R, KAR R, et al. Cancer stem cells (CSCs): key player of radiotherapy resistance and its clinical significance[J]. *Biomarkers*, 2023, 28(2): 139-151. DOI:10.1080/1354750x.2022.2157875.
- [6] SPROOTEN J, CEUSTERS J, COOSEMANS A, et al. Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy[J]. *OncoImmunology*, 2019, 8(11): 1638212. DOI: 10.1080/2162402x.2019.1638212.
- [7] MIKI K, OE M, SUZUKI K, et al. Dual-responsive near-infrared turn-on fluorescent probe for cancer stem cell-specific visualization [J]. *J Mater Chem B*, 2024, 12(28): 6959-6967. DOI: 10.1039/d4tb00897a.
- [8] VISUS C, ITO D, AMOSCATO A, et al. Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8⁺ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10538-10545. DOI:10.1158/0008-5472.can-07-1346.
- [9] EL-ASHMAWY N E, EL-ZAMARANY E A, SALEM M L, et al. A new strategy for enhancing antitumor immune response using dendritic cells loaded with chemo-resistant cancer stem-like cells in experimental mice model[J]. *Mol Immunol*, 2019, 111: 106-117. DOI:10.1016/j.molimm.2019.04.001.
- [10] LIAO F, ZHANG J, HU Y Y, et al. Efficacy of an ALDH peptide-based dendritic cell vaccine targeting cancer stem cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(8): 1959-1973. DOI: 10.1007/s00262-021-03129-6.
- [11] BO Y, ZHOU J Y, CAI K M, et al. Leveraging intracellular ALDH1A1 activity for selective cancer stem-like cell labeling and targeted treatment *via in vivo* click reaction[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(36): e2302342120. DOI:10.1073/pnas.2302342120.
- [12] LOOI C K, LOO E M, LIM H C, et al. Revolutionizing the treatment for nasopharyngeal cancer: the impact, challenges and strategies of stem cell and genetically engineered cell therapies[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1484535. DOI:10.3389/fimmu.2024.1484535.
- [13] EL-ASHMAWY N E, SALEM M L, KHEDR E G, et al. Dual-targeted therapeutic strategy combining CSC-DC-based vaccine and cisplatin overcomes chemo-resistance in experimental mice model [J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(7): 1155-1165. DOI: 10.1007/s12094-019-02242-4.
- [14] SAUERER T, ALBRECHT L, SIEVERS N M, et al. Electroporation of mRNA as a universal technology platform to transfect a variety of primary cells with antigens and functional proteins[M]/RNA Vaccines. New York, NY: Springer US, 2024: 219-235. DOI:10.1007/978-1-0716-3770-8_10.
- [15] DE MEY W, LOCY H, DE RIDDER K, et al. An mRNA mix redirects dendritic cells towards an antiviral program, inducing anticancer cytotoxic stem cell and central memory CD8⁺ T cells[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1111523. DOI:10.3389/fimmu.2023.1111523.
- [16] LEE K W, YAM J W P, MAO X W. Dendritic cell vaccines: a shift from conventional approach to new generations[J]. *Cells*, 2023, 12(17): 2147. DOI:10.3390/cells12172147.
- [17] FANG C, ESPOSITO M, HARS U, et al. Targeting autocrine retinoic acid signaling by ALDH1A2 inhibition enhances antitumor dendritic cell vaccine efficacy[J]. *Nat Immunol*, 2026, 27(2): 250-264. DOI:10.1038/s41590-025-02376-4.
- [18] STREKOWSKA M, GRZELA R, MAJEWSKI M, et al. Cap analogs modified with 1, 2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(20): 9578-9590. DOI: 10.1093/nar/gkw896.
- [19] JIA L F, MAO Y H, JI Q Q, et al. Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(9): 814-821. DOI:10.1038/s41594-020-0465-x.
- [20] PASTOR F, BERRAONDO P, ETXEBERRIA I, et al. An RNA toolbox for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(10): 751-767. DOI:10.1038/nrd.2018.132.
- [21] BHANDARKAR V, DINTER T, SPRANGER S. Architects of immunity: how dendritic cells shape CD8⁺T cell fate in cancer[J]. *Sci Immunol*, 2025, 10(103): eadf4726. DOI:10.1126/sciimmunol.adf4726.

[收稿日期] 2026-01-15

[修回日期] 2026-04-17

[本文编辑] 黄静怡