

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.01.013

ISCOM 型白血淋巴瘤苗联合 1-甲基色氨酸免疫治疗荷瘤小鼠疗效观察*

黄 琰,吴 隼,字友梅,张 媛,杨 满,马 栋,贺立山
(新乡医学院第一附属医院血液科,河南新乡 453100)

[摘要] **目的** 探讨免疫刺激复合物(ISCOM)型白血淋巴瘤疫苗(简称瘤苗)联合 1-甲基色氨酸对荷瘤小鼠的治疗作用。**方法** 皂苷溶液中加入脂肪酶蛋白(1 mg/mL)7 ℃反应 12 h,加入 80 μL 脂类混合物溶液和 5 mL 皂苷溶液(1 mg/mL)制备 ISCOM 型白血淋巴瘤苗。C57BL/6 小鼠分为模型组、ISCOM 型白血淋巴瘤苗组、1-甲基色氨酸组和联用组(ISCOM 型白血淋巴瘤苗+1-甲基色氨酸),小鼠注射 FBL-3 细胞建立白血淋巴瘤小鼠模型,模型组给予等量生理盐水,其余各组接受对应药物治疗 4 周后,记录体质量,NK 细胞、Mφ 细胞和细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)细胞杀伤活性、血清 IL-10 和 IL-12 表达水平。**结果** 联用组瘤质量低于 1-甲基色氨酸组和 ISCOM 型白血淋巴瘤苗组[(0.64±0.26)g vs. (2.49±0.91)g, $P<0.01$;(0.64±0.26)g vs. (1.28±0.73)g, $P<0.05$];联用组 Mφ 细胞杀伤活性显著高于 1-甲基色氨酸组[(55.69±13.69)% vs. (69.47±14.79)%, $P<0.01$];联用组 NK 细胞杀伤活性显著高于 1-甲基色氨酸组[(38.41±8.27)% vs. (67.22±12.74)%, $P<0.01$];联用组 CTL 细胞杀伤活性高于 1-甲基色氨酸组和 ISCOM 型白血淋巴瘤苗组[(43.77±8.89)% vs. (69.68±11.44)%, $P<0.01$;(58.87±9.45)% vs. (69.68±11.44)%, $P<0.05$];联用组 IL-10 均显著低于 1-甲基色氨酸组、ISCOM 型白血淋巴瘤苗组[(76.2±6.82)pg/L vs. (98.3±13.4)pg/L, $P<0.01$;(76.2±6.82)pg/L vs. (202.3±44.5)pg/L, $P<0.01$];联用组 IL-12 高于 1-甲基色氨酸组、ISCOM 型白血淋巴瘤苗组[(381.2±47.3)pg/L vs. (332.1±30.2)pg/L, $P<0.05$;(381.2±47.3)pg/L vs. (291.2±17.3)pg/L, $P<0.01$]。**结论** ISCOM 白血淋巴瘤苗联合 1-甲基色氨酸具有较佳的抗瘤活性,其机制可能是通过介导 IL-10 和 IL-12 的表达。**[关键词]** ISCOM 型瘤苗;1-甲基色氨酸;前体细胞淋巴瘤母细胞白血病/淋巴瘤;联用**[中图分类号]** R733 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)01-0037-03

The treatment effect of ISCOM leukemia vaccine combination with 1-methyl tryptophan on tumor burden mice*

Huang Yan,Wu Sun,Zi Youmei,Zhang Yuan,Yang Man,Ma Dong,He Lishan

(Department of Hematology,the First Hospital Affiliated to Xinxiang Medicine College,Xinxiang,Henan 453100,China)

[Abstract] **Objective** Investigated the treatment effect of ISCOM leukemia vaccine combination with 1-methyl tryptophan on tumor burden mice. **Methods** Saponin was added lipase protein (1 mg/mL) 7 ℃ for 12 h,adding 80 μL lipid mixed solution and 5 mL saponin solution (1 mg/mL) to prepare ISCOM leukemia vaccine. C57BL/6 mice were randomly divided into model group, ISCOM leukemia vaccine group,1-methyl tryptophan group and combination group,Mice were injected FBL-3 cell to built leukemia tumor-burdened mice model. After treatment for 4 weeks,tumors weight,NK and Mφ and CTL cell killing activity,serum levels of IL-10,IL-12 were detected. **Results** Tumor weight in combination group was less than 1-methyl tryptophan and ISCOM leukemia group [(0.64±0.26)g vs. (2.49±0.91)g, $P<0.01$;(0.64±0.26)g vs. (1.28±0.73)g, $P<0.05$];NK cell killing activity in combination group was higher than 1-methyl tryptophan group[(38.41±8.27)% vs. (67.22±12.74)%,all $P<0.01$];Mφ activity in combination group was significantly higher than 1-methyl tryptophan group[(55.69±13.69)% vs. (69.47±14.79)%, $P<0.01$]; CTL activity in combination group was significantly higher than 1-methyl tryptophan group and ISCOM leukemia group[(43.77±8.89)% vs. (69.68±11.44)%, $P<0.01$;(58.87±9.45)% vs. (69.68±11.44)%, $P<0.05$];IL-10 in combination group were significantly lower than 1-methyl tryptophan group and ISCOM leukemia group [(76.2±6.82)pg/L vs. (98.3±13.4)pg/L, $P<0.01$;(76.2±6.82)pg/L vs. (202.3±44.5)pg/L, $P<0.01$];IL-12 in combination group were significantly higher than 1-methyl tryptophan group and ISCOM leukemia group[(381.2±47.3)pg/L vs. (332.1±30.2)pg/L, $P<0.05$;(381.2±47.3)pg/L vs. (291.2±17.3)pg/L, $P<0.01$]. **Conclusion** Combination with 1-methyl tryptophan and ISCOM leukemia vaccine has a well anti-tumor effect,its mechanism may be through mediated and the expression of IL-12 and IL-10. **[Key words]** ISCOM leukemia vaccine;1-methyl tryptophan;precursor cell lymphoblastic leukemia/lymphoma;combination

免疫治疗是肿瘤治疗研究的方向,免疫疗法治疗血液系统恶性肿瘤倍受人们的关注,国内外在主动免疫治疗白血方面研究甚热。肿瘤疫苗(简称瘤苗)在现代肿瘤治疗中作为肿瘤术后、化学治疗、放射治疗的一种辅助治疗手段越来越受到关注^[1-2]。1-甲基色氨酸能够抑制免疫调节细胞及肿瘤细胞中的 2,3 双加氧酶活性,促进细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)的活化、增殖,发挥抗肿瘤作用^[3]。免疫刺激复合物(immunostimulating

complexes,ISCOM)是一种全新的抗原提呈系统,是荷载肽或蛋白质抗原的脂类载体复合物,具有佐剂和抗原提呈的双重功能。本研究在前期研究中发现 ISCOM 型白血淋巴瘤苗可以改善荷瘤小鼠的免疫功能,发挥抗癌作用。本文拟通过联合使用 1-甲基色氨酸探讨其与 ISCOM 型白血淋巴瘤苗是否有协同抗癌作用。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞 C57BL/6 小鼠 40 只,6~8 周龄,体质量

* 基金项目:河南省教育厅基金资助项目(2006320039)。 作者简介:黄琰(1976—),副主任医师,硕士,主要从事白血病的免疫治疗。

18.0~22.0 g,雌雄各半,购自新乡医学院实验动物中心。FBL-3 细胞株购自中山大学实验动物中心。

1.2 试剂 小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒(华美生物工程公司);小鼠 IL-12 ELISA 试剂盒(华美生物工程公司);RPMI1640 培养基(GIBCO,美国);脂肪酶蛋白(SIGMA,美国);卵磷脂(SIGMA,美国);胆固醇(SIGMA,美国);丝裂霉素 C(SIGMA,美国);胎牛血清(GIBCO,美国);MTT(SIGMA,美国);皂苷(SIGMA,美国);Mega-10(Amresco,美国)。ISCOM 型白血病瘤菌的制备^[4]:皂苷溶液中加入脂肪酶蛋白(1 mg/mL)使其浓度为0.02 mg/mL,7 ℃反应 12 h,随后加入 80 μL 脂类混合物溶液和 5 mL 皂苷溶液(1 mg/mL),室温下反应 4 h。冰浴超声处理,透析,浓缩,4 ℃保存备用。脂类混合物溶液的配制:将卵磷脂和胆固醇溶解于 20%的 Mega-10 溶液中,调整浓度为 10 mg/mL;皂苷溶液的配制:皂苷溶解于 PBS 溶液中,调整浓度为 1 mg/mL。FBL-3 细胞内加入丝裂霉素 C(100 μg/mL),于 37 ℃水浴中放置 30 min,灭活^[5]。

1.3 方法^[6] 所有小鼠均建立荷瘤小鼠模型,FBL-3 培养于含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,取 0.2 mL 1×10⁶/mL 细胞注射于鼠左肋皮下于 3~7 d 可触及肿瘤后。取造模成功的小鼠 40 只分为模型组、ISCOM 型白血病瘤苗组、1-甲基色氨酸组和联用组,每组 10 只。给药:模型组给予等量生理盐水,ISCOM 型白血病瘤苗组治疗时在肿瘤部位注射瘤苗 0.

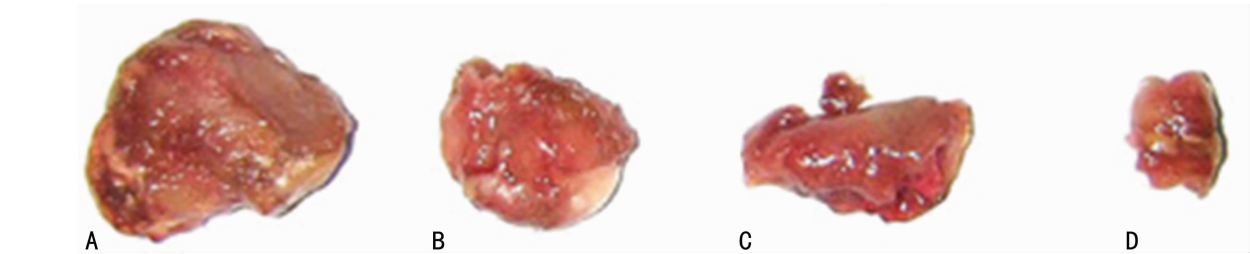
2 mL,1 周 1 次;1-甲基色氨酸组于饮用水中加入 5 mg/mL 1-甲基色氨酸,自由饮水;联用组在肿瘤部位注射瘤苗 0.2 mL,同时饮用 1-甲基色氨酸。治疗维持 4 周。

1.4 疗效观察及检测指标 治疗 4 周后,处死小鼠,分离瘤体,称取质量。参考文献方法分离获得 NK 细胞、Mφ 细胞和 CTL 细胞,采用 MTT 考察测量各组治疗后细胞杀伤活性。Mφ(NK/CTL)的杀伤活性=[1-与 Mφ(NK/CTL)作用的 L1210 OD 值/对照 L1210 OD 值]×100%。分离小鼠腹主动脉血,静置离心分离获得血清,采用 ELISA 试剂盒测定 IL-10 和 IL-12 水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计数资料比较采用 χ² 检验,计量资料比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠瘤质量和抑瘤率比较 治疗结束后,模型组瘤质量(4.08±2.09)g;1-甲基色氨酸组瘤质量(2.49±0.91)g,抑瘤率为 38.9%;ISCOM 型白血病瘤苗组瘤质量(1.28±0.73)g,抑瘤率为 68.6%;联用组瘤质量(0.64±0.26)g,抑瘤率为 84.3%。1-甲基色氨酸组瘤质量低于模型组(P<0.05),ISCOM 型白血病瘤苗组和联用组显著低于模型组(均 P<0.01);联用组瘤质量低于 1-甲基色氨酸组和 ISCOM 型白血病瘤苗组(P<0.01,P<0.05)。见图 1、表 1。



A:模型组;B:1-甲基色氨酸组;C:ISCOM 型白血病瘤苗组;D:联用组。

图 1 各组肿瘤大小

表 1 各组瘤质量和抑瘤率比较

组别	n	瘤质量(±s,g)	抑瘤率(%)
模型组	10	4.08±2.09	—
1-甲基色氨酸组	10	2.49±0.91 ^{ad}	38.9
ISCOM 型白血病瘤苗组	10	1.28±0.73 ^{dc}	68.6
联用组	10	0.64±0.26 ^b	84.3

a:P<0.05,b:P<0.01,与模型组比较;c:P<0.05,d:P<0.01,与联用组比较。—:此项无数据。

2.2 各组 Mφ、CTL 和 NK 细胞杀伤活性比较 1-甲基色氨

酸组、ISCOM 型白血病瘤苗组和联用组 Mφ 细胞杀伤活性均显著高于模型组(均 P<0.01),联用组 Mφ 细胞杀伤活性显著高于 1-甲基色氨酸组(P<0.01);ISCOM 型白血病瘤苗组和联用组 NK 细胞杀伤活性显著高于模型组(均 P<0.01),联用组 NK 细胞杀伤活性显著高于 1-甲基色氨酸组(P<0.01);1-甲基色氨酸组、ISCOM 型白血病瘤苗组和联用组 CTL 细胞杀伤活性均显著高于模型组(均 P<0.01),联用组 CTL 细胞杀伤活性高于 1-甲基色氨酸组和 ISCOM 型白血病瘤苗组(P<0.01,P<0.05)。见表 2。

表 2 各组 Mφ、CTL 和 NK 细胞杀伤活性比较(±s,%)

组别	n	Mφ 细胞	NK 细胞	CTL 细胞
模型组	10	34.23±9.67	34.03±6.63	25.18±4.89
1-甲基色氨酸组	10	55.69±13.69 ^{bd}	38.41±8.27 ^d	43.77±8.89 ^{bd}
ISCOM 型白血病瘤苗组	10	60.32±14.01 ^b	62.36±13.93 ^b	58.87±9.45 ^{bc}
联用组	10	69.47±14.79 ^b	67.22±12.74 ^b	69.68±11.44 ^b

b:P<0.01,与模型组比较;c:P<0.05,d:P<0.01,与联用组比较。

2.3 各组 IL-10 和 IL-12 比较 1-甲基色氨酸组、ISCOM 型白血淋巴瘤苗组和联用组 IL-10 均显著低于模型组(均 $P<0.01$),联用组 IL-10 均显著低于 1-甲基色氨酸组、ISCOM 型白血淋巴瘤苗组(均 $P<0.01$);1-甲基色氨酸组、ISCOM 型白血淋巴瘤苗组和联用组 IL-12 均高于模型组($P<0.05$, $P<0.01$),联用组 IL-12 高于 1-甲基色氨酸组、ISCOM 型白血淋巴瘤苗组($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组 IL-10 和 IL-12 比较($\bar{x}\pm s$,pg/L)			
组别	<i>n</i>	IL-10	IL-12
模型组	10	363.2 $\pm$ 61.2	262.1 $\pm$ 36.4
1-甲基色氨酸组	10	202.3 $\pm$ 44.5 ^{bd}	291.2 $\pm$ 17.3 ^{ad}
ISCOM 型白血淋巴瘤苗组	10	98.3 $\pm$ 13.4 ^{bd}	332.1 $\pm$ 30.2 ^{bc}
联用组	10	76.2 $\pm$ 6.82 ^b	381.2 $\pm$ 47.3 ^b

^a, $P<0.05$,^b, $P<0.01$,与模型组比较;^c, $P<0.05$,^d, $P<0.01$,与联用组比较。

3 讨 论

白血病目前的治疗仍然以化学治疗为主,但化学治疗产生的不良反应及耐药性限制了其的使用,造血干细胞移植可以治愈白血病,但受制于供体少、手术死亡率高和费用高等因素^[7]。白血病的主动免疫治疗日益受到重视,主动免疫的机理是特异性肿瘤抗原通过抗原呈递细胞激活 T 淋巴细胞成为 CTL,CTL 识别肿瘤细胞后释放多种杀伤因子^[8]。

本研究前期研究中发现 ISCOM 型白血淋巴瘤苗能够分别通过增强荷瘤小鼠的 M ϕ 细胞活性和 CTL 细胞活性达到改善荷瘤小鼠非特异性免疫和细胞免疫功能的作用,且该疫苗制备简单、使用方便。1-甲基色氨酸是吡啶 2,3 双加氧酶的竞争性抑制剂,通过封闭黑色素瘤细胞系中吡啶 2,3 双加氧酶的表达,能显著增强 T 细胞的免疫功能^[9-10]。采用吡啶 2,3 双加氧酶的竞争性抑制剂 1-甲基色氨酸和传统化学治疗、放射治疗结合可以取得更佳的治疗效果,而通过 1-甲基色氨酸可以增强 LLC/DC 融合疫苗的抗肿瘤效果,诱导强 CTL 反应^[11]。为此本研究中考察了 ISCOM 型白血淋巴瘤苗联合 1-甲基色氨酸在荷瘤小鼠中的治疗效果。研究结果显示,联用组抑瘤率为 84.3%,瘤质量显著低于甲基色氨酸组和 ISCOM 型白血淋巴瘤苗组($P<0.05$)。M ϕ 细胞、CTL 细胞和 NK 细胞杀伤活性中,联用组显著优于 1-甲基色氨酸组,但与 ISCOM 型白血淋巴瘤苗组效果相当,仅 CTL 优于 ISCOM 型白血淋巴瘤苗组,该结果与其他研究类似,可能与 1-甲基色氨酸对于 CTL 具有较强作用有关^[12]。

IL-10 是一种由 Th2 细胞、单核/巨噬细胞、B 淋巴细胞和角化细胞产生的细胞因子,IL-10 具有免疫抑制作用,可以抑制抗原提呈细胞、CTL 细胞及 NK 细胞的活力^[13-14]。而 IL-12 是一种抗原提呈细胞和 B 细胞产生的细胞因子,是最有效的 CTL 和 NK 细胞活性激活因子^[15]。本研究显示联用组能显著抑制 IL-10 的表达,促进 IL-12 的产生,这可能是联用 1-甲基色氨酸和 ISCOM 型白血淋巴瘤苗发挥抗瘤的作用机制。

综上所述,联用 1-甲基色氨酸和 ISCOM 型白血淋巴瘤苗具有更佳的抗瘤活性,主要增加了 CTL 细胞杀伤活性,而对 IL-10 和 IL-12 表达的调节可能为其作用机理。

参考文献

[1] 陈香丽,王连才,张王刚,等.白血淋巴瘤疫苗联合 1-甲基

色氨酸免疫治疗荷瘤小鼠疗效观察[J].白血淋巴瘤,2011,20(7):395-397,400.

[2] Mattarollo SR,West AC,Steegh K,et al. NKT cell adjuvant-based tumor vaccine for treatment of myc oncogene-driven mouse B-cell lymphoma[J]. Blood,2012,120(15):3019-3029.

[3] 刘燕,张瑞,武希润,等.1-甲基色氨酸对荷肝癌小鼠皮下移植瘤生长的抑制作用[J].中华肝胆外科杂志,2011,17(11):924-927.

[4] Ahlberg V,Lövgren Bengtsson K,Wallgren P,et al. Global transcriptional response to ISCOM-Matrix adjuvant at the site of administration and in the draining lymph node early after intramuscular injection in pigs[J]. Dev Comp Immunol,2012,38(1):17-26.

[5] Lovgren BK,Morein B,Osterhaus AD,et al. ISCOM technology-based matrix M adjuvant: success in future vaccines relies on formulation[J]. Expert Rev Vaccines,2011,10(4):401-403.

[6] Sakamaki I,Kwak LW,Cha SC,et al. Lenalidomide enhances the protective effect of a therapeutic vaccine and reverses immune suppression in mice bearing established lymphomas[J]. Leukemia,2014,28(2):329-337.

[7] 赵月莹. CTL 克隆细胞在白血病中的初步研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2012.

[8] 吴隼,黄琰,马栋,等.免疫刺激复合物型白血淋巴瘤苗对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 广东医学,2014,35(15):2321-2322.

[9] 王改,申惠琴,武希润,等.1-甲基色氨酸与 5-氟尿嘧啶联合干预对荷胃癌小鼠髓源性抑制细胞的影响[J]. 中华普通外科杂志,2014,29(6):464-466.

[10] Minami Y,Fukushima N,Sadarangani A,et al. Treatment with Hedgehog inhibitor PF-913 attenuates leukemia-initiation potential in acute myeloid leukemia cells[J]. Cancer Res,2014,74(19 Suppl):1884.

[11] 刘燕.1-甲基色氨酸对荷肝癌小鼠皮下移植瘤生长抑制作用的研究[D]. 太原:山西医科大学,2011.

[12] Gu X,Erb U,Büchler MW,et al. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice[J]. Int J Cancer,2015,136(4):E74-E84.

[13] Moore DP,Hodgins DC,Firth MA,et al. Incorporation of antigens from manheimia haemolytica culture supernatant, and recombinant bovine C3d into ISCOM matrix using neutravidin-biotin interaction[J]. Biotechnol Appl Biochem,2011,58(pt. 3):198-202.

[14] Zhou Q,Munger ME,Veenstra RG,et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD⁸⁺ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia[J]. Blood,2011,117(17):4501-4510.

[15] Rasool MH. Preparation and evaluation of an experimental iscom-based infectious bursal disease vaccine[J]. Indian J Microbiol,2008,48(3):401-404.