

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.04.007

## ISCOM 型白血病瘤苗对小鼠巨噬细胞作用的研究\*

吴隼,黄琰,杨满,字友梅,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)型白血病瘤苗对小鼠巨噬细胞的作用。**方法** 将 C57BL/6 小鼠 30 只分为模型组、灭活的红白血病细胞(FBL-3)瘤苗组(灭活瘤苗组)和灭活的 FBL-3 细胞+ISCOM 瘤苗组(ISCOM 瘤苗组),小鼠注射 FBL-3 细胞建立白血病荷瘤小鼠模型,治疗 4 周后,分离小鼠腹腔巨噬细胞,观察不同组别的巨噬细胞吞噬功能、一氧化氮(NO)、白细胞介素(IL)-1、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、巨噬细胞杀伤活性和抗原呈递功能。**结果** ISCOM 瘤苗组小鼠腹腔巨噬细胞数量、巨噬细胞吞噬功能、IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2、T 细胞增殖能力和 NO 高于模型组和灭活瘤苗组( $P < 0.05$ ),ISCOM 瘤苗组巨噬细胞细胞杀伤活性显著高于模型组( $P < 0.01$ )。**结论** ISCOM 型瘤苗可以增加巨噬细胞的数量,增强巨噬细胞的吞噬作用及抗原呈递能力。

**[关键词]** 白血病瘤苗;巨噬细胞;ISCOMs

**[中图分类号]** R392.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)04-0451-03

## Study on effect of ISCOM leukemia vaccine on mouse macrophages\*

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

(Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453100, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of immunostimulatory complex(ISCOM) leukemia vaccine on macrophages of tumor-burdened mice. **Methods** A total of 30 C57BL/6 mice were randomly divided into the model group, inactivated erythroleukemia cell FBL-3 vaccine group and inactivated FBL-3 cell plus ISCOM leukemia vaccine group. The FBL-3 cell leukemia tumor-burdened mice model was established by injection of FBL-3 cells. After treatment for 4 weeks, the mouse peritoneal macrophages were separated. Their phagocytosis effect, NO TNF- $\alpha$  and IL-1, killing activity and antigen-presenting function were investigated in various groups. **Results** The number of mouse abdominal cavity macrophages, macrophage phagocytosis function, IL-1, TNF- $\alpha$ , NO, IL-2 and T cell proliferation ability in the ISCOM leukemia vaccine group were higher than those in the model group and the inactivated FBL-3 tumor vaccines group( $P < 0.05$ ). The cell killing activity of macrophages in the ISCOM leukemia vaccine group was significantly higher than that in the model group( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The ISCOM leukemia vaccine can increase the number of macrophages and enhance the phagocytosis and antigen-presenting ability of macrophages.

**[Key words]** leukemia vaccine; macrophages; ISCOMs

目前血液恶性肿瘤多以化疗为主,但近年来国内外在主动免疫治疗白血病方面研究甚多,肿瘤疫苗可通过激活患者自身免疫系统,增强机体的抗癌能力,阻止肿瘤的生长、扩散和复发<sup>[1-2]</sup>。本研究在前期的研究中发现免疫刺激复合物(immunostimulating complex, ISCOM)型白血病瘤苗可增强荷瘤小鼠的巨噬细胞(M $\phi$ )活性和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)活性,达到改善荷瘤小鼠的非特异性免疫和细胞免疫功能的作用,在此基础上,本文旨在探讨 ISCOM 型白血病瘤苗对小鼠巨噬细胞的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** (1)主要试剂:小鼠 IL-1 Elisa 试剂盒(华美生物工程公司);小鼠 TNF- $\alpha$  Elisa 试剂盒(华美生物工程公司);NO 检测试剂盒(南京建成公司);小鼠 IL-2 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);<sup>[3H]</sup>-TdR(中科院上海原子能研究所, 中国)。(2)实验动物和细胞株:C57BL/6 小鼠 30 只,6~8 周龄,体质量 18.0~22.0 g,雌雄各半,购买于新乡医学院实验动物中心。红白血病细胞(FBL-3)细胞株购买于中山大学实验动物中心。

## 1.2 方法

**1.2.1 瘤苗的制备** ISCOM 疫苗的制备<sup>[3]</sup>: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 °C 反应 12 h,随后加入 80  $\mu$ L 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 °C 保存备用。脂类混合物溶液的配制<sup>[4]</sup>: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  $\mu$ g/mL),于 37 °C 水浴中放置 30 min,灭活。灭活的 FBL-3 细胞制备:FBL-3 细胞内加入丝裂霉素 C(100  $\mu$ g/mL),于 37 °C 水浴中放置 30 min,PBS 液洗 3 次,使用生理盐水重新调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  /mL。

**1.2.2 瘤苗免疫动物模型的建立** 所有小鼠均建立负瘤小鼠模型<sup>[5]</sup>,FBL-3 培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,取 0.2 mL  $1 \times 10^6$  /mL 细胞注射于鼠左肋皮下于 3~7 d 可触及肿瘤后<sup>[6]</sup>。将 30 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠分为 3 组,模型组、灭活的 FBL-3 瘤苗组(灭活瘤苗组)和灭活的 FBL-3 细胞+ISCOM 瘤苗组(ISCOM 瘤苗组),各组均进行荷瘤小鼠动物模型的建立,模型组采用等体积的生理盐水进行治疗,上述各组均每周治疗 1 次,治疗时在肿瘤部位注射瘤苗 0.2 mL,治疗维持 4 周。

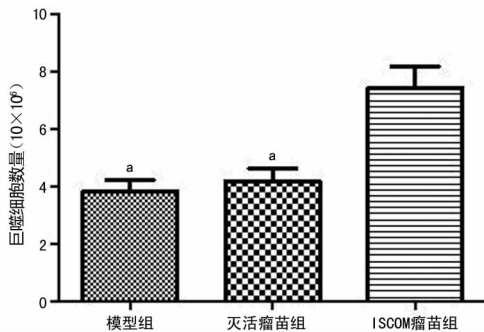
\* 基金项目:河南省教育厅基金资助项目(2006320039)。 作者简介:吴隼(1968—),副教授、副主任医师,硕士研究生,主要从事血液病恶性肿瘤的免疫治疗研究。

**1.2.3 小鼠巨噬细胞的吞噬能力、杀伤活性、促炎因子和抗原呈递能力测定** 小鼠腹腔灌注 RPMI1640 培养基收集小鼠腹腔巨噬细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、RPMI1640 培养基体外培养。分离巨噬细胞计数考察不同组别中小鼠巨噬细胞数量的改变。吞噬能力: 将醛化的鸡红细胞注入小鼠腹腔检测腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 吞噬指数(%) = 吞噬红细胞的巨噬细胞数/巨噬细胞总数 × 100%<sup>[7]</sup>。促炎因子: 采用一氧化氮(NO)、白细胞介素(IL)-1 和肿瘤坏死因子 α(TNF-α) 检测试剂盒检测巨噬细胞培养液表达水平。杀伤活性: 采用 MTT 测量各组治疗后的巨噬细胞杀伤活性。抗原呈递能力测定: 分离不同组别瘤苗免疫小鼠 T 细胞, 将分离巨噬细胞共孵育, 采用 IL-2 检测试剂盒检测培养液中 IL-2 水平和 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入法检测 T 细胞增殖能力<sup>[8]</sup>。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料以率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠腹腔巨噬细胞数量比较** 模型组小鼠腹腔巨噬细胞为  $(3.82 \pm 1.24) \times 10^6$ , 灭活瘤苗组为  $(4.16 \pm 1.41) \times 10^6$ , ISCOM 瘤苗组为  $(7.43 \pm 2.27) \times 10^6$ ; ISCOM 瘤苗组小鼠腹腔巨噬细胞数量显著高于模型组、灭活瘤苗组, 差异有统计学意义 ( $t = 4.37, 3.86, P < 0.01$ ), 见图 1。



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 ISCOM 瘤苗组比较。

图 1 各组小鼠腹腔巨噬细胞数量比较

**2.2 各组小鼠巨噬细胞吞噬功能比较** 模型组小鼠巨噬细胞吞噬指数为  $(29.50 \pm 8.20)\%$ , 灭活瘤苗组巨噬细胞吞噬指数为  $(54.80 \pm 11.50)\%$ , ISCOM 瘤苗组巨噬细胞吞噬指数为  $(68.30 \pm 16.30)\%$ , ISCOM 瘤苗组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能高于模型组 ( $t = 6.72, P < 0.01$ ) 和灭活瘤苗组 ( $t = 2.14, P < 0.05$ )。

**2.3 各组小鼠巨噬细胞分泌 IL-1、TNF-α 及 NO 水平比较** ISCOM 瘤苗组小鼠 IL-1 高于模型组、灭活瘤苗组 ( $t = 7.36, 2.45, P < 0.05$ ), 灭活瘤苗组 IL-1 高于模型组 ( $t = 6.04, P < 0.01$ ); ISCOM 瘤苗组 TNF-α 高于模型组、灭活瘤苗组 ( $t = 7.13, 3.34, P < 0.01$ ), 灭活瘤苗组 TNF-α 高于模型组 ( $t = 3.92, P < 0.01$ ); ISCOM 瘤苗组 NO 高于模型组、灭活瘤苗组 ( $t = 9.76, 3.71, P < 0.01$ ), 灭活瘤苗组 NO 高于模型组 ( $t = 6.69, P < 0.01$ ), 见表 1。

**2.4 各组小鼠巨噬细胞杀伤活性比较** 模型组小鼠巨噬细胞杀伤活性为  $(34.23 \pm 9.67)\%$ , 灭活瘤苗组为  $(60.32 \pm 14.07)\%$ , ISCOM 瘤苗组为  $(69.47 \pm 14.79)\%$ , ISCOM 瘤苗组、灭活瘤苗组小鼠巨噬细胞杀伤活性显著高于模型组 ( $t = 6.31, 4.83, P < 0.01$ ); 灭活瘤苗组和 ISCOM 瘤苗组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。

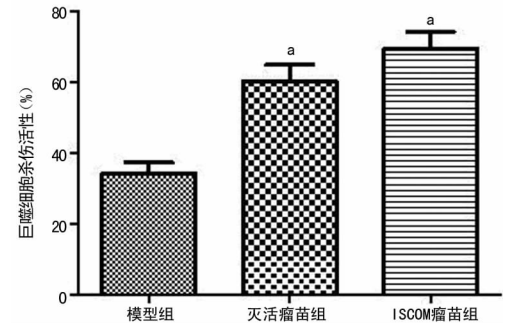
**2.5 各组小鼠巨噬细胞抗原呈递能力比较** ISCOM 瘤苗组

IL-2 高于模型组、灭活瘤苗组 ( $t = 2.34, 2.42, P < 0.05$ ); ISCOM 瘤苗组 T 细胞增殖能力高于模型组、灭活瘤苗组 ( $t = 2.78, 2.68, P < 0.05$ ), 见表 2。

表 1 各组小鼠巨噬细胞分泌 IL-1、TNF-α 及 NO 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	IL-1(U/mL)	TNF-α(×10 <sup>3</sup> pg/mL)	NO(μg/mL)
模型组	23.50 ± 4.30	2.24 ± 0.33	1.52 ± 0.74
灭活瘤苗组	50.60 ± 13.50 <sup>a</sup>	3.52 ± 0.96 <sup>a</sup>	4.22 ± 1.04 <sup>a</sup>
ISCOM 瘤苗组	68.40 ± 18.50 <sup>ab</sup>	5.26 ± 1.27 <sup>ac</sup>	6.19 ± 1.32 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与模型组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>:  $P < 0.01$ , 与灭活瘤苗组比较。



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

图 2 各组小鼠巨噬细胞杀伤活性比较

表 2 各组小鼠巨噬细胞抗原呈递能力比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	IL-2(U/mL)	抗原呈递能力(×10 <sup>5</sup> )
模型组	12.92 ± 4.32 <sup>a</sup>	8.15 ± 1.98 <sup>a</sup>
灭活瘤苗组	13.25 ± 3.45 <sup>a</sup>	8.32 ± 1.87 <sup>a</sup>
ISCOM 瘤苗组	17.21 ± 3.85	11.60 ± 3.38

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ISCOM 瘤苗组比较。

## 3 讨论

ISCOM 是一种全新的抗原呈递系统, 具有佐剂和抗原呈递的双重功能, ISCOM 是由皂苷、胆固醇、磷脂、蛋白质抗原等构成的直径为 30~40 nm 的球形笼状颗粒<sup>[9]</sup>。ISCOM 具有增强免疫和抗原递呈的功能, 且能同时刺激体液和细胞免疫<sup>[10]</sup>。用肿瘤疫苗进行主动特异性免疫治疗是一种理想的免疫治疗方法。肿瘤疫苗可以激发全身性细胞免疫, 提高免疫细胞杀伤肿瘤的能力, 并可诱发长期抗肿瘤免疫功能, 防止肿瘤复发及转移<sup>[11]</sup>。单核-巨噬细胞是体内重要的免疫细胞, 广泛分布于网状内皮系统中, 可通过主动吞噬、杀伤、消化病原体, 清除体内衰老突变的肿瘤细胞, 在抑制肿瘤细胞腹腔转移过程中起到重要的免疫作用<sup>[12]</sup>。因此, 本文中观察了 ISCOM 型瘤苗对荷瘤小鼠巨噬细胞功能的影响, 以探究巨噬细胞在 ISCOM 型瘤苗抗肿瘤作用中扮演的作用。

巨噬细胞可以分泌促炎因子 IL-1、TNF-α 和 NO, IL-1 可促进免疫应答、参与炎症反应、促进伤口愈合及刺激造血功能等<sup>[13]</sup>。TNF-α 参与炎症反应、免疫应答及抗肿瘤等<sup>[14]</sup>, 还能够诱导其他细胞因子的释放。巨噬细胞受到刺激活化时, 释放的大量 NO 具有细胞毒作用, 可杀伤微生物(细菌、真菌、病毒)、寄生虫和肿瘤细胞等, 亦可诱发炎症反应保护机体抵御外界不利因素的伤害<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, ISCOM 瘤苗组小鼠腹腔体内的巨噬细胞数量显著高于模型组和灭活瘤苗组, 且巨噬细胞吞噬功能、杀伤活性、抗原呈递活性显著增高, IL-1、

TNF- $\alpha$  和 NO 表达水平亦显著优于模型组和灭活瘤苗组,此结果显示 ISCOM 型瘤苗对荷瘤小鼠免疫后,巨噬细胞数量和活力均得到增强。巨噬细胞作为机体抗原提呈细胞和免疫效应细胞在 ISCOM 型瘤苗介导抗肿瘤免疫反应中起重要作用。

综上所述,ISCOM 型瘤苗可以增加巨噬细胞的数量,增强巨噬细胞的吞噬作用及抗原呈递能力,也意味着提高了荷瘤小鼠的非特异性细胞免疫功能,如免疫监视、抗原递呈等,以便活化 T 淋巴细胞。白血病作为血液恶性肿瘤,临床中需考虑化疗后或骨髓移植后对残留微小病灶的治疗及预防复发,而 ISCOM 型瘤苗明显提高荷瘤小鼠的巨噬细胞杀伤功能,为进一步激活 T 淋巴细胞创造条件。在临床中,白血病患者治疗后采用 ISCOM 型瘤苗,对消灭残留微小病灶、防止复发意义重大。

#### 参考文献

- [1] Morein B, Hu KF, Abusugra I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(10): 1367-1382.
  - [2] Iino T, Suehiro Y, Hasegawa A, et al. A therapeutic vaccine in adult T-cell leukemia patients with autologous dendritic cells pulsed with peptides corresponding to tax-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes[J]. *Blood*, 2013, 122(21): 5130-5130.
  - [3] Lövgren-Bengtsson K, Morein B. The ISCOM<sup>TM</sup> technology[M]. *Methods Molecular Medicine<sup>TM</sup>*, New York, 2000: 239-258.
  - [4] Conrad DP, Tsang J, Maclean M, et al. Leukemia cell-rhabdovirus vaccine: personalized immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(14): 3832-3843.
  - [5] Subklewe M, Geiger C, Lichtenegger FS, et al. New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(10): 1093-1103.
  - [6] Camussone CM, Veaute CM, Pujato N, et al. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant[J]. *Res Vet Sci*, 2014, 96(1): 86-94.
  - [7] Xiong Q, Wei Y, Feng Z, et al. Protective efficacy of a live attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with an ISCOM-matrix adjuvant in pigs[J]. *Vet J*, 2014, 199(2): 268-274.
  - [8] Lele SS, Mukhopadhyay BN, Mardikar MM, et al. Impact of catalytic iron on mortality in patients with acute coronary syndrome exposed to iodinated radiocontrast-The Iscom Study[J]. *Am Heart J*, 2013, 165(5): 744-751.
  - [9] Moore DP, Hodgins DC, Firth MA, et al. Incorporation of antigens from *Mannheimia haemolytica* culture supernatant, and recombinant bovine C3d into ISCOM matrix using neutravidin-biotin interaction [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2011, 58(3): 198-202.
  - [10] Rasool MH. Preparation and evaluation of an experimental iscom-based infectious bursal disease vaccine[J]. *Indian J Microbiol*, 2008, 48(3): 401-404.
  - [11] McManus M, Frangoul H, McCullers JA, et al. Safety of high dose trivalent inactivated influenza vaccine in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2014, 61(5): 815-820.
  - [12] 尤旭. 日本血吸虫尾蚴分泌蛋白 SjCa8 对小鼠巨噬细胞作用的实验研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
  - [13] 熊祺琰, 王占伟, 甘源, 等. 免疫刺激复合物基质为佐剂的猪支原体肺炎活疫苗肌肉注射免疫效果评价[J]. *江苏农业学报*, 2011, 27(6): 1310-1315.
  - [14] Berenjian S, Hu K, Abedi-Valugerdi M, et al. The nanoparticulate Quillaja saponin KGI exerts anti-proliferative effects by down-regulation of cell cycle molecules in U937 and HL-60 human leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(7): 1618-1624.
  - [15] Ahlberg V, Lvgren 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.
- (收稿日期: 2015-06-18 修回日期: 2015-10-24)
- 
- (上接第 450 页)
- on atherosclerosis and thrombosis[J]. *Clin Lipidol*, 2011, 6(4): 413-442.
  - [8] Schober A, Siess W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(3): 465-482.
  - [9] 李小好, 杨波, 尚桂莲, 等. 溶血磷脂酸受体 3 介导溶血磷脂酸诱导的平滑肌细胞表型转化[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2012, 14(10): 1082-1086.
  - [10] Hodgkinson CP, Ye S. Toll-like receptors, their ligands, and atherosclerosis[J]. *Sci World J*, 2011, 14(11): 437-453.
  - [11] Lundberg AM, Yan ZQ. Innate immune recognition receptors and damage-associated molecular patterns in plaque inflammation[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 343-349.
  - [12] Falck-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 14008-14023.
  - [13] Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, et al. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(2): 373-383.
  - [14] Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(29): 10679-10684.
  - [15] Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, et al. Chlamydia pneumoniae-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2[J]. *Infect Immun*, 2007, 75(2): 753-759.
- (收稿日期: 2015-08-05 修回日期: 2015-10-13)