

异种黑色素细胞疫苗诱导小鼠抗恶性黑色素瘤免疫反应

罗锋 魏于全 阚兵 杨莉 田玲 卢铀 彭枫
姜愚 刘继彦 赵霞 邹立群 雷松 毛咏秋

【摘要】 目的 研究异种黑色素细胞疫苗对小鼠恶性黑色素瘤生长的抑制作用。方法 制备异种黑色素细胞疫苗,皮下预防免疫小鼠后再接种恶性黑色素瘤,并以该疫苗皮下注射治疗恶性黑色素瘤鼠,随后测量肿瘤大小。采用⁵¹Cr 释放法,体外分析小鼠脾细胞的细胞毒性 T 细胞 (CTL) 活性,以间接 ELISA 法检测小鼠血清抗肿瘤抗体。结果 预防免疫使 90% 小鼠恶性黑色素瘤生长受到抑制,疫苗治疗使 50% 小鼠肿瘤生长受到抑制,免疫组鼠较对照组 CTL 杀伤活性在 20 1、10 1、5 1 不同效靶比时,分别增高 34.0%、24.1% 及 13.9% ($P < 0.05$),体内出现抗恶性黑色素瘤抗体。结论 异种黑色素细胞疫苗可诱导小鼠抗恶性黑色素瘤特异性免疫反应,抑制肿瘤生长。

【主题词】 黑色素瘤/免疫学; 异种黑色素细胞疫苗

Antitumor immune response against mouse melanoma to xenogeneic vaccination LUO Feng, WEI Yuquan, KAN Bing, et al. Center of Cancer Biotherapy, First Affiliated Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China

【Abstract】 **Objective** To study the inhibition of melanoma growth in mice by vaccination with xenogeneic melanocytes. **Methods** Xenogeneic vaccine was prepared from pig eye melanocytes. It was used before or after B16 melanoma challenge in C57 mice. The size of tumor was monitored. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity of mouse spleen cells was measured by ⁵¹Cr release assay. Antibody response against pig melanocytes and B16 melanoma cells were detected by indirect ELISA. **Results** Preventive vaccination resulted in inhibition of tumor growth in 90% of the immunized mice, while therapeutic vaccination inhibited tumor growth in 50% of the treated mice. Specific CTL activity and antibodies in the immunized mice were detected. **Conclusion** Anti-tumor immune response capable of inhibiting melanoma growth can be induced by xenogeneic melanocyte vaccination.

【Subject words】 Melanoma/immunology; Xenogeneic melanocyte vaccine

恶性肿瘤是在机体免疫选择压力下异质性生长的,由于大多数肿瘤细胞抗原是自身分化抗原,其免疫原性弱^[1],因此有效激发机体对肿瘤细胞的免疫反应,尤其是细胞毒性 T 细胞 (CTL) 免疫反应,是抗肿瘤研究的重要内容。为此,我们采用异种黑色素细胞疫苗免疫方式,试图激发机体的抗恶性黑色素瘤免疫反应,从而抑制肿瘤的生长。

材料与方法

一、材料

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(39725031);国家 973 项目分题基金资助项目(G1998051214)

作者单位:610041 成都,华西医科大学第一附属医院肿瘤生物治疗研究中心肿瘤中心(罗锋、魏于全、阚兵、杨莉、田玲、卢铀、雷松、毛咏秋、彭枫、姜愚、刘继彦、邹立群);华西医科大学第二附属医院妇产科(赵霞)

通信作者:魏于全

B16 黑色素瘤细胞系、Meth A 纤维肉瘤细胞系均购自美国 ATCC, H22 肝癌细胞系购自中国科学院上海药物研究所。C₅₇ 小鼠购自华西医科大学实验动物中心,鼠龄 7~10 周,雌雄各半。猪眼取自中国内江猪。福氏完全及不完全佐剂购自美国 Gbco BRL, Na₂⁵¹CrO₄ 购于杜邦公司,辣根过氧化物酶标记的蛋白 A 购自美国 Bio-Rad, 胶原酶及 RPMI 1640 培养液等试剂均为美国 Sigma 公司产品。酶标仪:3550-UV 型(美国)。

二、异种黑色素细胞疫苗的制备

取新鲜猪眼,切开眼球暴露视网膜,用生理盐水反复吹打收集视网膜细胞,加胶原酶消化后制成 2×10^6 /ml 黑色素细胞悬液(显微镜检查证实黑色素细胞占 95% 以上)。离心弃上清,3% 副甲醛固定,洗涤后超声打碎细胞,生理盐水稀释成细胞抗原悬液 (2×10^7 /ml) 作为异种疫苗。

三、细胞培养

B16 黑色素瘤细胞用含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养基,置于 CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期细胞做实验,浓度为 2 × 10⁶/ml。

四、异种黑色素细胞疫苗免疫后接种 B16 黑色素瘤

C₅₇小鼠 20 只均分为实验组与对照组。实验组异种黑色素细胞疫苗免疫方法:上述抗原悬液不同量(1 × 10⁴ ~ 1 × 10⁷ 个细胞)第一次免疫加完全福氏佐剂(CFA) 0.1 ml,以后加不完全福氏佐剂(IFA) 0.1 ml,每只鼠多点皮下注射,每周免疫 2 次,共 3 周,随后在其背部皮下接种 1 × 10⁴ ~ 1 × 10⁶ B16 黑色素瘤细胞。对照组除抗原悬液改为生理盐水外,还含有相同佐剂,免疫方法同实验组。接种后观察肿瘤生长,待瘤结节形成后,用游标尺测量其最大长径及垂直径,3 d 1 次。观察 50 d 或肿瘤体积 > 500 mm³ 时即处死动物。此外,采用相同免疫方法免疫小鼠后接种 H₂₂肝癌细胞、Meth A 纤维肉瘤细胞,以猪其他组织细胞(眼结膜、肌肉、肝脏等)制备对照异种细胞疫苗,免疫小鼠后接种 B16 黑色素瘤细胞,观察肿瘤生长情况。

五、异种黑色素细胞疫苗治疗 B16 黑色素瘤

C₅₇小鼠 20 只均分为治疗组与对照组,每只小鼠背部皮下接种 1 × 10⁴ ~ 1 × 10⁶ B16 黑色素瘤细胞。当小鼠皮下扪及肿瘤结节(直径约 3 mm)时,治疗组小鼠即进行皮下免疫治疗:异种黑色素细胞抗原悬液 0.1 ml(1 × 10⁶)加 CFA 0.1 ml 多点皮下注射,每周 2 次,连续 7 周;对照组除细胞抗原悬液改为生理盐水外,其余同实验组,按前述方法观察肿瘤生长情况。此外,采用相同的治疗方法治疗 H₂₂肝癌、Meth A 纤维肉瘤荷瘤鼠,与异种细胞疫苗治疗 B16 黑色素瘤荷瘤鼠对照,观察肿瘤生长情况。

六、细胞免疫及体液免疫

C₅₇小鼠 20 只均分为实验组与对照组,异种黑色素细胞疫苗免疫方法同前。在免疫第 3 周后第 7 天,处死动物,心脏采血,分离制备免疫血清。在超净工作台内,无菌暴露腹腔摘取脾脏,制备成 1 × 10⁷/ml 免疫脾细胞悬液,并用尼龙棉柱法分离出 T 淋巴细胞。

1. 细胞免疫功能检测:采用 6 h ⁵¹Cr 释放法检测异种黑色素细胞疫苗诱导的 CTL 杀伤活性,具体方法见参考文献[2]。

2. 体液免疫功能检测:以猪眼黑色素细胞冻融液及 B16 黑色素细胞冻融液为抗原,采用间接 ELISA 法检测免疫血清中的抗体,具体方法见参

文献[3]。以阳性孔 A 值 > 阴性孔 A 值 + 2 个标准差作为阳性结果判断标准。

七、数据处理及统计分析

肿瘤体积计算公式为:肿瘤体积(mm³) = 1 × 2a × b²(a 为垂直长径, b 为垂直短径)。以百分杀伤活性计算 CTL 功能,采用 t 检验比较组间差异。

结 果

一、异种黑色素细胞疫苗免疫对 B16 黑色素瘤生长的影响

B16 黑色素瘤接种于 C₅₇鼠背部皮下,对照组小鼠成瘤早,1 周内即可在其接种处扪及肿瘤结节,以后迅速长大,30 d 时平均肿瘤体积 > 500 mm³;实验组小鼠成瘤时间延迟,1 周后方出现肿瘤结节,随后瘤体缓慢生长,50 d 时平均肿瘤体积 < 500 mm³(图 1),90% 小鼠肿瘤生长受到抑制。在可比较时间内(接种后 12 ~ 30 d)各观察时点,对照组平均肿瘤体积 > 实验组(P < 0.05)。此外,采用相同免疫方法后,H₂₂肝癌、Meth A 纤维肉瘤肿瘤生长曲线实验组与对照组(仅用佐剂免疫)差异无显著性。与异种细胞疫苗免疫小鼠对照,接种 B16 黑色素瘤小鼠肿瘤生长曲线与图 1 对照组极为相似。此结果表明,异种黑色素细胞疫苗可诱发特异性免疫保护反应,抑制黑色素移植瘤细胞的生长,而不抑制肝癌细胞以及纤维肉瘤细胞生长。

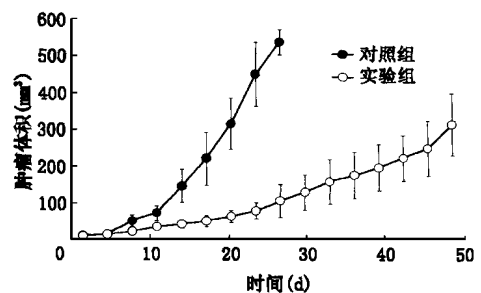


图 1 异种疫苗免疫后肿瘤生长曲线

二、异种黑色素细胞疫苗治疗 B16 黑色素瘤

对照组小鼠肿瘤迅速长大,第 24 天时平均肿瘤体积 > 500 mm³;实验组肿瘤缓慢生长,第 50 天时平均肿瘤体积 < 500 mm³(图 2),50% 小鼠肿瘤生长受到抑制。在可比较的时间内(接种后 9 ~ 24 d),各观察时点对照组平均肿瘤体积 > 实验组(P < 0.05)。H₂₂肝癌、Meth A 纤维肉瘤荷瘤鼠肿瘤生长曲线实验组与对照组差异无显著性。与异种细胞疫苗治疗

B16 黑色素瘤对照, 荷瘤鼠肿瘤生长曲线与图 2 对照组相似。表明异种黑色素细胞疫苗免疫治疗可诱发针对黑色素瘤的特异性抗肿瘤反应, 抑制肿瘤生长, 而对肝癌细胞及纤维肉瘤细胞的生长无影响。

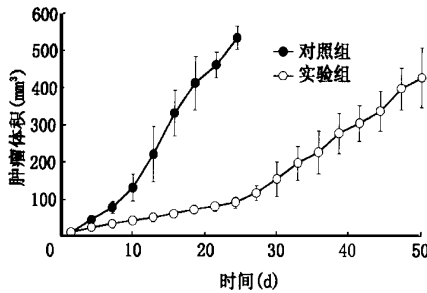


图 2 异种疫苗治疗后肿瘤生长曲线

三、细胞免疫及体液免疫

1. 自身肿瘤杀伤活性: 以 20:1, 10:1, 5:1 不同的效靶比测定鼠脾 CTL 百分杀伤活性, 结果实验组 CTL 较对照组分别增高 34.0%、24.1% 和 13.9% ($P < 0.05$, 图 3), 表明异种黑色素细胞疫苗能诱导 CTL 对 B16 黑色素瘤细胞杀伤活性, 即自身肿瘤杀伤活性增高, 该活性随着效靶比例的增高逐渐加强。而 H₂₂ 肝癌及 Meth 纤维肉瘤, 无 CTL 对相应的肿瘤杀伤活性升高。此外, 亦未发现异种疫苗诱导针对 Yac-1 细胞的 NK 杀伤活性升高。

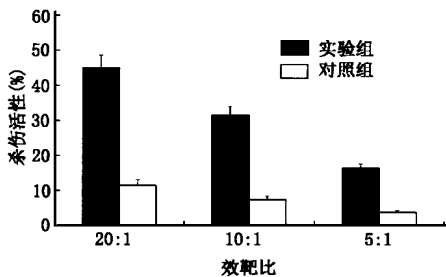


图 3 异种疫苗诱导的特异性 CTL 应答

2. 体液免疫: 免疫血清倍比稀释 (1:100), 猪黑色素细胞抗原孔及 B16 细胞抗原孔吸光度 A 值分别为: 0.433 ± 0.030 A 和 0.316 ± 0.026 ; 阴性对照血清孔分别为: 0.063 ± 0.028 和 0.061 ± 0.023 。按前述判定标准, 猪黑色素细胞抗原孔及 B16 细胞抗原孔均为阳性。说明猪黑色素细胞疫苗免疫后产生了针对猪黑色素细胞抗原及 B16 细胞抗原的抗体, 即 B16 黑色素瘤细胞与猪黑色素细胞存在交叉抗原或相同的抗原决定簇。

讨 论

大多数肿瘤抗原是组织分化抗原, 肿瘤细胞常通过缺乏一种或多种激发机体免疫反应所必需的成分, 逃避机体免疫反应而呈异质性生长。但是, 机体免疫系统对肿瘤细胞、肿瘤抗原的耐受及无反应性是相对的、不完全的^[4]。我们已发现人体淋巴细胞在肿瘤微环境中能直接杀伤癌细胞, 其杀伤过程的各阶段改变均可见^[5]; 在体外, 肿瘤患者的淋巴细胞表现出对自身肿瘤的杀伤活性, 即自身肿瘤杀伤活性, 这种杀伤活性的有无与患者预后密切相关^[2]。鉴于机体 T 细胞库的丰富性, 选择具有免疫源性的肿瘤抗原或抗原决定簇, 藉此可望激活自身反应性 T 细胞增殖, 诱导自身肿瘤杀伤活性增高, 抑制肿瘤的生长^[6,7]。

本研究采集猪眼黑色素细胞, 制备异种细胞疫苗, 进行主动免疫。结果发现: 预防免疫后接种 B16 黑色素瘤, 可使 90% 小鼠肿瘤生长受到抑制; 而当接种肿瘤生长成瘤结节 (直径约 3 mm) 后再予以异种细胞疫苗免疫治疗, 可使 50% 小鼠肿瘤生长受到抑制, 同时发现免疫鼠自身肿瘤杀伤活性增高, 体内出现抗肿瘤抗体。提示肿瘤生长受抑是通过异种黑色素细胞疫苗激活体内自身反应性淋巴细胞, 诱导自身肿瘤杀伤活性增高以及抗肿瘤抗体的产生, 经交叉免疫反应作用于恶性黑色素瘤细胞所致。此外, 我们从异种黑色素细胞疫苗免疫后的小鼠分离出 T 淋巴细胞或抗体, 进行过继性免疫治疗, 发现有抗肿瘤作用。

异种黑色素细胞疫苗不作用于 Meth A 纤维肉瘤及 H₂₂ 肝癌细胞, 采用猪肌肉、眼结膜等组织制成的对照异种细胞疫苗, 无抗 B16 黑色素瘤生长的作用, 表明该异种黑色素细胞疫苗抗肿瘤作用与黑色素细胞成分有关, 是恶性黑色素瘤特异性的。恶性黑色素瘤细胞抗原可分为: 黑色素细胞特异性黑色素蛋白、肿瘤特异性突变蛋白和其他抗原^[8]。我们选择猪眼黑色素细胞, 是因可能含有黑色素瘤交叉抗原或抗原决定簇, 制成细胞疫苗辅佐佐剂后免疫动物, 其异种抗原可产生强烈的排斥反应, 激活数种针对肿瘤细胞的自身反应性 T 淋巴细胞, 或诱导抗肿瘤抗体的产生。

采用异种黑色素细胞疫苗诱导小鼠抗恶性黑色素瘤免疫反应, 具有潜在的临床应用价值, 该方法未发现对小鼠有副作用, 如未见体色皮毛改变以及显微病理改变。但其深入的免疫机制, 异种抗原的

分析、鉴定、纯化,均有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med*, 1994, 180:1-4.
- 2 Wei YQ, Xia Z, Yoshitaka K, et al. Induction of autologous tumor killing by heat treatment of fresh human tumor cells: involvement of T cells and heat shock protein 70. *Cancer Res*, 1996, 56:1104-1110.
- 3 Overwijk WW, Lee DS, Surman DR, et al. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2982-2987.
- 4 David J, Morgan, Huub T C, et al. Activation of low avidity CTL specif-

- ic for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity. *J Immunol*, 1998, 160: 643-651.
- 5 Wei YQ, Hang ZB, Liu KF. In situ observation of inflammatory cell-tumor cell interaction in human germinomas: Light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 1992, 23:421-428.
- 6 Willem W, Over W, Allan T, et al. Cp100/ Pmel17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self" reaction, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med*, 1998, 188:277-286.
- 7 Naftzgr CY, Takechi H, Kohda I, et al. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:14809-14814.
- 8 Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF, et al. The use of melanosomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother*, 1998, 21: 237-246.

(收稿日期:2000-03-15)

作者须知

关于含量和浓度的使用

含量不是物理量。含量作为习惯用语,其概念较模糊,如 B 物含水 70%,究竟是指水的质量与 B 物的质量之比,水的体积与 B 物的体积之比,还是指水的质量与 B 物 100 ml 的体积之比,易引起混乱。按习惯,含量常指的物理量有量纲一的量:质量分数(= $m_B / m_{混}$)、体积分数 = $B / 混$)、摩尔分数(= $n_B / n_{混}$)及质量浓度(= $m_B / 混$,其单位为 g/L、g/ml)。如:含量为 75% 的酒精溶液,确切的表达应为:酒精的体积分数为 75% (或 0.75);含量 10% 的葡萄糖溶液,习惯指质量浓度 10 mg/dl,但已知葡萄糖的相对分子质量为 180.158,查得换算系数 0.555,故应换算成葡萄糖的浓度为 5.55 mol/L;含量为 30 ppm 的 NO,正确表达应为:体积分数为 3×10^{-5} 的 NO。

浓度一词在国际 CB3102.8-93 中已专指物质的量浓度

(c_B),定义为 B 的物质的量除以混合物的体积($n_B / V_{混}$),单位为 mol/L 或 mmol/L。质量分数、体积分数、摩尔分数已不能称为浓度。B 的质量除以混和物的体积,称为质量浓度(= $m_B / 混$,单位为 g/L)。由于某些蛋白质的相对分子质量尚未准确测得,不能算出其 mol 值,因此,在临床检验中有关蛋白质部位仍暂用质量浓度表示。但是,在物质的相对分子质量已知的情况下,应尽可能使用物质的量浓度来表示。质量浓度换算为物质的量浓度,须依据特定的换算系数进行,用 1 除以该物质的相对分子质量,再乘以 10,即可得出该物质 mg/dl 值换算为 mmol/L 值的换算系数。旧制单位克分子浓度(M)、当量浓度(N)均应废止(1M 相当于 1 mol/L;1N 等于 mol/L 值乘以离子价数)。

本刊编辑部

2001 年全国肿瘤外科学术大会征文通知

为了加强我国肿瘤外科的学术交流,及时总结当今肿瘤外科发展的经验和成果,经研究决定,由中华医学会肿瘤分会主办,陕西省医学会肿瘤分会承办的 2001 年全国肿瘤外科学术大会将于 2001 年 11 月在西安市召开。届时将邀请我国著名肿瘤外科专家就我国肿瘤外科学的发展做专题报告,还将对 21 世纪肿瘤外科的热点课题进行专题学术研讨。本次大会按中华医学会一类学术大会记录继续教育学分。大会征文内容:肿瘤外科相关的基础、临床及诊断,药物、外科相关的综合治疗以及外科病理等诸方面。重点为:(1)微创外科在肿瘤外科中的应用;(2)肿瘤外科患者的营养补充;(3)各种扩大根治术及保留功能的根治术;(4)亚临床转移灶的处理;(5)术前辅助性治疗的价值;(6)术后放、化疗的应用;(7)各种诊疗新技术在实体瘤中的应用;(8)预

防性切除在肿瘤外科中的应用;(9)各种成型手术在肿瘤外科的应用;(10)器官移植在肿瘤外科的应用;(10)肿瘤外科手术交流(录像交流)。征文要求:(1)凡未在全国性学术会议及全国性公开刊物发表过的文章均可投寄。(2)论著全文 5 000 字以内;摘要 500 字以内,包括研究目的、方法、结果和结论。一式 2 份。(3)请在文题下方写明作者姓名、单位、通讯地址、邮编并注明稿件所属类别,加盖单位公章。截稿日期:2001 年 6 月 31 日以前(以当地邮戳为准)。会议征文概不退稿,请自备底稿。来信请寄:100710 北京东西大街 42 号 中华医学会学术会务部收。请注明:"2001 年全国肿瘤外科学术大会征文"。

中华医学会学术会务部
中华医学会肿瘤学分会