

## · 疫苗研究 ·

## 肿瘤疫苗在结肠癌模型小鼠体内抑制效果的评价

韩卢<sup>1</sup>, 梁朝远<sup>1</sup>, 石思伟<sup>1</sup>, 杨立群<sup>1</sup>, 邓雄威<sup>2</sup>, 盛望<sup>1</sup>

1. 北京工业大学 环境与生命学部, 北京 100124; 2. 国家纳米科学中心, 北京 100190

**摘要:** **目的** 评价肿瘤疫苗在结肠癌模型小鼠体内的抑制效果。**方法** 用 CpG 的  $\beta$ -葡聚糖纳米颗粒(CpG  $\beta$ -glucan nanoparticles, CNP)于体外刺激小鼠骨髓来源树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs),同时设 PBS 组、NP 组(无 CpG 纳米颗粒)、Lysate 组(MC38 细胞裂解物)及 CpG 组(CpG1826),流式细胞术检测 BMDCs 表面标志分子的表达情况,ELISA 法检测细胞培养上清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和 IL-12p40 的含量。将 50 mg / mL 肿瘤裂解物(MC38 细胞裂解物)与 200 mg / mL 的 CNP 按 1 : 1 的体积比混合,制备成肿瘤裂解物纳米疫苗。用该疫苗经皮下免疫 C57BL / 6J 小鼠(Vaccine 组),同时设 PBS 组、CNP 组及 Lysate 组,每周 1 次,共免疫 3 次,末次免疫后 1 h,经小鼠右下肢皮下接种 MC38 细胞,  $2 \times 10^5$  个 / 只,每 3 d 测量 1 次肿瘤体积,并绘制肿瘤生长曲线;流式细胞术分析小鼠血液中 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 及 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞比例;ELISA 法检测小鼠血液和脾脏中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和干扰素  $\gamma$ (interferon  $\gamma$ , IFN $\gamma$ )的含量。**结果** CNP 在体外提高 BMDCs 表面标志物 CD11c<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup> MHC- II<sup>+</sup> 的表达及 IL-6 和 IL-12p40 的分泌水平明显高于其他 4 组( $t = 4.3 \sim 46.2$ ,  $P$  均  $< 0.05$ )。与其他 3 组比较,Vaccine 组小鼠肿瘤体积明显减小( $t = 2.6 \sim 3.4$ ,  $P$  均  $< 0.05$ );CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 及 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞比例差异均无统计学意义( $t = 0.5 \sim 1.9$ ,  $P$  均  $> 0.05$ );血液中 IFN $\gamma$  含量明显升高( $t = 3.8 \sim 4.6$ ,  $P$  均  $< 0.05$ ),TNF- $\alpha$  含量差异无统计学意义( $t = 0.4 \sim 2.0$ ,  $P$  均  $> 0.05$ );脾脏中 IFN $\gamma$  及 TNF- $\alpha$  含量均明显升高( $t = 6.3 \sim 13.0$ ,  $P$  均  $< 0.001$ )。**结论** 制备的肿瘤裂解物纳米疫苗能提高小鼠体内免疫水平,有效抑制结肠癌生长。

**关键词:** 肿瘤疫苗;肿瘤裂解物;CpG  $\beta$ -葡聚糖纳米颗粒;结肠癌

**中图分类号:** R73-36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0011-06

## Evaluation of inhibitory effect of tumor vaccine in colon carcinoma model mice

HAN Lu<sup>\*</sup>, LIANG Zhao-yuan, SHI Si-wei, YANG Li-qun, DENG Xiong-wei, SHENG Wang<sup>\*</sup>Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Corresponding author: SHENG Wang, E-mail: shengwang@bjut.edu.cn

**Abstract:** **Objective** To evaluate the inhibitory effect of tumor vaccines in colon carcinoma model mice. **Methods** Mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were stimulated by using CpG  $\beta$ -glucan nanoparticles (CNP) in vitro. The BMDCs were divided into PBS group, NP group (without CpG nanoparticles), Lysate group (MC38 cell lysate) and CpG group (CpG1826), which were determined for the expression of marker molecules on the surface by flow cytometry and for the contents of interleukin-6 (IL-6) and IL-12p40 in the culture supernatant by ELISA. The tumor lysate nano-vaccine was prepared by mixing 50 mg / mL tumor lysate (MC38 cell lysate) with 200 mg / mL CNP in a volume ratio of 1 : 1, with which mice were subcutaneously immunized as Vaccine group. Vaccine group, PBS group, CNP group and Lysate group were immunized once a week, for three times in total. Mice were subcutaneously inoculated with MC38 cells,  $2 \times 10^5$  cells for each, in the right lower limb 1 h after the last immunization, and measured for tumor volume once every three days to plot the tumor growth curve. The ratios of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T and CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the blood were analyzed by flow cytometry and the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) in the blood and spleen of mice were determined by ELISA. **Results** CNP effectively increased the expression of CD11c<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> MHC- II<sup>+</sup> and the

**基金项目:** 国家自然科学基金(31770999).

**通信作者:** 盛望, E-mail: shengwang@bjut.edu.cn

secretion of IL-6 and IL-12p40 in BMDCs in vitro, which were significantly higher than those in other 4 groups ( $t = 4.3 \sim 46.2$ , each  $P < 0.05$ ). Compared with that of the other three groups, the tumor volume of mice in Vaccine group decreased significantly ( $t = 2.6 \sim 3.4$ , each  $P < 0.05$ ); There was no significant difference in  $CD3^+ CD8^+$  T and  $CD3^+ CD8^+$  T cell ratios ( $t = 0.5 \sim 1.9$ , each  $P > 0.05$ ); The content of  $IFN\gamma$  in blood increased significantly ( $t = 3.8 \sim 4.6$ ,  $P < 0.05$ ), while that of  $TNF-\alpha$  showed no significant difference ( $t = 0.4 \sim 2.0$ , each  $P > 0.05$ ); However, the contents of  $IFN\gamma$  and  $TNF-\alpha$  in spleen increased significantly ( $t = 6.3 \sim 13.0$ , each  $P < 0.001$ ). **Conclusion** The prepared nano-vaccine of tumor lysate improved the immune level in mice and effectively inhibited the growth of colon carcinoma.

**Keywords:** Tumor vaccine; Tumor lysate; CpG  $\beta$ -glucan nanoparticles (CNP); Colon carcinoma

有报道显示,2018 年全球恶性肿瘤新发病率约 1 808 万例,死亡病例约 956 万例,中国分别约占 23.7% 和 30%<sup>[1]</sup>。美国癌症统计数据及中国肿瘤流行病学数据均表明,结肠直肠癌导致死亡的病例数列第三位<sup>[2-3]</sup>。目前,手术是治疗结肠直肠癌的首选途径,但存在术后复发的可能,虽然放化疗可在一定程度上可防止肿瘤复发,但部分患者存在不适合及副反应大的情况<sup>[4-5]</sup>,预后效果仍不理想。因此,亟需寻找预防和治疗结肠直肠癌的新方法。

有研究表明,肿瘤疫苗可激活患者的免疫系统,使其识别肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAAs),从而破坏肿瘤细胞,防止肿瘤复发<sup>[6]</sup>。目前,多数肿瘤疫苗均是 TAAs 和免疫辅助剂组合,免疫机体后激活树突状细胞(dendritic cells, DCs),产生信号,诱导  $CD8^+$  T 细胞成熟,分化为 TAAs 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)。肿瘤疫苗主要通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)途径发挥作用,DCs 识别肿瘤细胞抗原后,经其表面 MHC 提呈,使 T 细胞活化、增殖,活化的 T 细胞从血管中迁移至肿瘤部位,浸润肿瘤,进行特异性杀伤肿瘤细胞。多数 TAAs 均在肿瘤细胞膜表面,裂解肿瘤细胞可获得含有多种特征和非特征的抗原,用其制备的肿瘤疫苗可针对患者体内多种 TAAs<sup>[7]</sup>。这种肿瘤疫苗的制备过程简单、成本低,但其免疫原性较弱,抗原提呈细胞对其摄取效率较低。生物纳米颗粒可作为疫苗的佐剂及抗原的包装载体,增强细胞对肿瘤裂解物的吸收,促进激活抗原提呈细胞,包括壳聚糖纳米颗粒、磷酸钙纳米颗粒、纳米脂质体、聚多巴胺纳米颗粒等<sup>[8-11]</sup>。CpG1826 为一段寡核苷酸,是具有较强的抗肿瘤作用一种 DNA 佐剂<sup>[12]</sup>。本课题组前期研究组装了纳米递送系统,构建  $\beta$  葡聚糖-CpG 复合佐剂纳米颗粒,且具有良好的佐剂刺激效果<sup>[13-14]</sup>,也可用于包装新抗原<sup>[15]</sup>,表明纳米化的 CpG 可作为载体和佐剂用于疫苗的制备。本研究采用纳米化的 CpG 与

结肠癌肿瘤细胞裂解液分别于体外刺激小鼠骨髓来源树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)成熟后,按一定比例混合,制备肿瘤裂解物纳米疫苗,免疫小鼠后,检测小鼠体内细胞因子的分泌水平,评价该疫苗在动物体内的免疫效果。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** C57BL/6 小鼠结肠癌细胞系 MC38 细胞购自北京协和细胞库,由北京工业大学环生学部保存。

**1.2 主要试剂及仪器** CpG1826 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;CpG  $\beta$ -葡聚糖纳米颗粒(CpG  $\beta$ -glucan nanoparticles, CNP)由北京工业大学环境与生命学部按文献[14]方法制备;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)及白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)均购自美国 Peprotech 公司;IL-6、IL-12p40、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,  $TNF-\alpha$ )和干扰素  $\gamma$ (interferon  $\gamma$ ,  $IFN\gamma$ )ELISA 检测试剂盒、anti-CD11c-FITC、anti-MHC- II -PE、anti-CD80-APC、anti-CD86-Percpey5.5、anti-CD3-FITC、anti-CD8-PE 及 TruStain FcX™PLUS(anti-mouse 16/32)抗体封闭液均购自美国 BioLegend 公司;RPMI1640 培养基、FBS 及 PBS (pH 7.4)均购自美国 Gibco 公司;红细胞裂解液、PBS-EDTA、ELISA 终止液及小鼠淋巴分离液均购自北京达科为生物技术有限公司;70  $\mu$ m 筛网及 FACS 流式细胞仪(FACS Calibur 型)购自美国 BD 公司。

**1.3 实验动物** SPF 级 C57BL/6J 小鼠,雌性,30 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物合格证号为:SCXK(京)2019-0010,饲养于北京神瑞生物技术有限公司动物房。本实验对小鼠的所有处理均以科研为目的进行养殖和使用,且按照动物伦理相关规定进行(文件号为:PONY-BG356-2018A)。

**1.4 小鼠 BMDCs 的分离** 将 2 只小鼠脱颈处死,浸泡于 75% 酒精中,进行表面消毒处理;随后无菌取小

鼠的胫骨和股骨,置 75% 酒精中浸泡 5 min;剔除骨头上残留肌肉, PBS 洗涤干净;用 RPMI1640 培养液冲洗骨髓,收集培养液,经 70  $\mu\text{m}$  筛网过滤,转移至 10 cm 培养皿,室温静置 30 min;收集未贴壁细胞, 800  $\times g$  离心 5 min,弃上清,用 RPMI1640 培养基重悬,计数。将获得的 BMDCs 按  $4 \times 10^6$  个/孔加至 6 孔板,再加入 RPMI1640 培养基(含 10% FBS、1% PBS、20 ng/mL GM-CSF 和 10 ng/mL IL-4), 4 mL/孔,于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 3 d,更换新培养基;培养 5 d 时,半量更换新培养基;培养 7 d,收集悬浮细胞, 800  $\times g$  离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 培养基重悬,计数。

**1.5 BMDCs 的体外刺激试验** 将 BMDCs 细胞液浓度调整为  $1 \times 10^6$  个/mL,加入 24 孔板, 1 mL/孔,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。将 BMDCs 分为 PBS 组(2  $\mu\text{L}$ /孔)、NP 组(无 CpG 纳米颗粒, 2  $\mu\text{g}$ /孔)、Lysate 组(MC38 细胞裂解物, 2  $\mu\text{g}$ /孔)、CpG 组(CpG1826, 2  $\mu\text{g}$ /孔)、CNP 组(CNP, 2  $\mu\text{g}$ /孔),每组均设 3 个复孔,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h;收集细胞,用 anti-CD11c-FITC、anti-MHC-II-PE、anti-CD80-APC、anti-CD86-Percepcy5.5 混合液(等体积比混合)染色 30 min,上流式细胞仪检测;收集培养上清,采用相应 ELISA 试剂盒测定 IL-6 及 IL-12p40 的含量。

**1.6 肿瘤裂解物纳米疫苗的制备** 用含 10% FBS 和 1% PS 的 RPMI1640 培养基,于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 MC38 细胞,待长满单层后,用 PBS 洗涤 1 次, 0.25% 胰酶消化, 800  $\times g$  离心 5 min;弃上清,用 1 mL PBS 重悬,计数,调整密度为  $1 \times 10^7$  个/mL,置液氮冷冻 5 min;迅速转移至 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min,反复冻融 5 次, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 2 000  $\times g$  离心 10 min;取上清,即肿瘤裂解物, BCA 法检测蛋白浓度,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。将 200 mg/mL CNP 和 50 mg/mL 肿瘤裂解物按 1:1 的体积比混合,制备成肿瘤裂解物纳米疫苗。

**1.7 动物分组及给药** 将小鼠适应性饲养约 5 d,随机分为 4 组: PBS 组、CNP 组、Lysate 组、Vaccine 组,分别经小鼠皮下注射 PBS(100  $\mu\text{L}$ /只)、CNP[20  $\mu\text{g}$ /(100  $\mu\text{L}$ ·只)]、MC38 细胞裂解物[50  $\mu\text{g}$ /(100  $\mu\text{L}$ ·只)]、肿瘤裂解物纳米疫苗(100  $\mu\text{L}$ /只),每组 5 只。每周免疫 1 次,连续给药 3 次,末次免疫后 1 h,经小鼠右下肢皮下接种 MC38 细胞,  $2 \times 10^5$  个/只,于接种后 3、6、9 d 测量并记录各组小鼠体内肿瘤的最大直径和最小直径,并按下式计算肿瘤体积。以时间为横坐标,肿瘤体积为纵坐标,绘制肿瘤生长曲线。

$$\text{肿瘤体积}(\text{cm}^3) = 1/2 \times \text{最大直径}(\text{cm}) \times \text{最小直径}(\text{cm})^2$$

**1.8 各组小鼠血液中 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量的检测** 最后一次测量肿瘤体积后,用 10% 水合氯醛麻醉小

鼠,经眼眶采血,置 EDTA 抗凝管, 800  $\times g$  离心 10 min,取上层血浆,采用相应 ELISA 试剂盒测定其 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量;下层血浆于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存,用于后续试验。

**1.9 各组小鼠血液中 CD3 $^+$  CD4 $^+$  T 及 CD3 $^+$  CD8 $^+$  T 细胞比例的检测** 取下层血液,加入 1 mL PBS,用滴管将稀释血液沿试管壁缓慢加至含有 2 mL 淋巴细胞分离液的离心管中,于 4  $^{\circ}\text{C}$ , 1 500  $\times g$  离心 20 min;取中间白膜层,即外周血单核细胞,用 PBS 洗涤 1 次,加入 TruStain FcX $^{\text{TM}}$  PLUS(anti-mouse16/32) 抗体封闭液,室温封闭 5 min;分别加入 anti-CD80-APC、anti-CD3-FITC、anti-CD8-PE,室温避光孵育 20 min;PBS 洗涤 1 次,制成单细胞悬液,经流式细胞仪检测,应用 FlowJo 10.0 软件分析检测结果。

**1.10 小鼠脾细胞中 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量的检测** 1.8 项小鼠采血后,经脱颈处死,无菌取小鼠脾脏,置 RPMI1640 培养基中,于 70  $\mu\text{m}$  筛网中研磨,用 PBS 冲洗筛网,收集细胞, 800  $\times g$  离心 5 min;弃上清,加入 5 mL 红细胞裂解液,于冰上裂解 5 min;加入 10 mL PBS-EDTA 终止反应,于室温, 800  $\times g$  离心 5 min;弃上清,用 2 mL 含 10% FBS 和 1% PS 的 RPMI1640 培养基重悬,计数。将小鼠脾细胞加至 96 孔板,  $1 \times 10^6$  个/孔,加入 MC38 肿瘤裂解物, 40  $\mu\text{g}$ /孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  刺激 72 h;收集上清,用相应 ELISA 试剂盒检测 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量。

**1.11 统计学分析** 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, GraphPad Prism 6.0 软件绘制图表,试验数据均以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BMDCs 的体外刺激试验** CNP 组 BMDCs 表面标志物 CD11c $^+$  CD80 $^+$ 、CD11c $^+$  CD86 $^+$ 、CD11c $^+$  MHC-II $^+$  的表达水平明显高于 CpG、PBS、NP 及 Lysate 组( $t = 4.3 \sim 20.5$ ,  $P$  均  $< 0.05$ ),见表 1。表明 CNP 可促进 BMDCs 成熟。CNP 组 BMDCs 的培养上清中 IL-6 和 IL12p40 含量明显高于 CpG、PBS、NP 及 Lysate 组( $t = 5.8 \sim 46.2$ ,  $P$  均  $< 0.01$ ),见表 2。表明 CNP 可显著提高 BMDCs 分泌 IL-6 和 IL12p40 的水平。

**2.2 小鼠体内肿瘤的生长曲线** Vaccine 组小鼠体内的肿瘤体积明显小于 PBS、CNP、Lysate 组( $t$  分别为 3.4、2.7、2.6,  $P$  均  $< 0.05$ );Lysate 组小鼠体内的肿瘤体积虽略小于 PBS 组和 CNP 组,但差异均无统计学意义( $t$  分别为 1.9 和 1.3,  $P$  均  $< 0.05$ )。见图 1。

表 1 各组 BMDCs 表面标志分子的表达情况( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 1 Expression of marker molecules on cell surface of BM-DCs in various groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	CD11c <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup>
CNP	30.0 ± 1.5	27.0 ± 1.6	24.7 ± 1.3
CpG	22.0 ± 2.0 <sup>aa</sup>	19.7 ± 1.4 <sup>aa</sup>	19.4 ± 1.7 <sup>a</sup>
PBS	12.0 ± 0.2 <sup>aaa</sup>	12.5 ± 1.1 <sup>aaa</sup>	13.8 ± 1.3 <sup>aaa</sup>
NP	12.0 ± 0.6 <sup>aaa</sup>	13.3 ± 2.7 <sup>aa</sup>	12.9 ± 0.4 <sup>aaa</sup>
Lysate	14.7 ± 0.1 <sup>aaa</sup>	12.7 ± 2.7 <sup>aaa</sup>	13.6 ± 1.1 <sup>aaa</sup>

注:与 CNP 组比较, a 表示  $P < 0.05$ ; aa 表示  $P < 0.01$ ; aaa 表示  $P < 0.001$ 。

表 2 BMDCs 培养上清中 IL-6 和 IL12p40 的含量( $\text{pg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 2 Contents of IL-6 and IL-12p40 in the supernatant of BM-DCs ( $\text{pg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	IL-6	IL12p40
CNP	8 398.8 ± 313.5	10 867.3 ± 1 072.2
CpG	3 380.6 ± 1 115.1 <sup>aa</sup>	5 028.4 ± 1 386.8 <sup>aaa</sup>
PBS	31.2 ± 6.1 <sup>aaa</sup>	19.3 ± 1.3 <sup>aaa</sup>
NP	34.6 ± 3.2 <sup>aaa</sup>	23.0 ± 2.9 <sup>aaa</sup>
Lysate	33.4 ± 7.1 <sup>aaa</sup>	19.9 ± 4.7 <sup>aaa</sup>

注:与 CNP 组比较, aa 表示  $P < 0.01$ ; aaa 表示  $P < 0.001$ 。

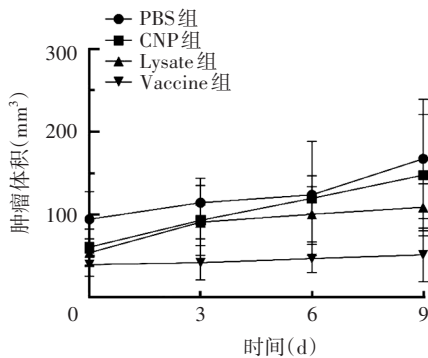


图 1 小鼠体内肿瘤的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of tumor in mice

2.3 小鼠血液中 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的含量 Vaccine 组小鼠血液中的 IFN $\gamma$  含量明显高于 PBS、CNP、Lysate 组( $t$  分别为 4.6、4.6、3.8,  $P$  均  $< 0.05$ ), TNF- $\alpha$  含量与其他 3 组差异无统计学意义( $t$  分别为 2.0、1.1、0.4,  $P$  均  $> 0.05$ )。见表 3。

2.4 小鼠血液中的 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 及 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞比例 Vaccine 组小鼠血液中 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞比例与 PBS、CNP、Lysate 组比较, 差异无统计学意义( $t$  分别为 0.5、0.6、0.7,  $P$  均  $> 0.05$ ); Vaccine 组小鼠血液中 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞比例略高于其他组, 但差异

也无统计学意义( $t$  分别为 0.7、0.9、1.9,  $P$  均  $> 0.05$ )。见表 4。

表 3 各组小鼠血清中 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的含量( $\text{pg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab. 3 Contents of IFN  $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum of mice in various groups ( $\text{pg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	IFN $\gamma$	TNF- $\alpha$
Vaccine	169.5 ± 77.3	12.9 ± 0.3
PBS	10.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	13.4 ± 0.5
CNP	11.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	12.3 ± 1.2
Lysate	30.7 ± 28.0 <sup>a</sup>	12.3 ± 0.4

注: a 表示与 Vaccine 组比较,  $P < 0.05$ 。

表 4 各组小鼠血液中的 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 及 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞比例( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab. 4 Proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells in blood of mice in various groups ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T
Vaccine	13.6 ± 1.9	13.3 ± 3.5
PBS	12.6 ± 2.1	12.1 ± 1.2
CNP	14.1 ± 0.6	11.6 ± 2.2
Lysate	13.2 ± 1.2	10.1 ± 1.1

2.5 小鼠脾脏中 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的含量 Vaccine 组小鼠脾脏中 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量均明显高于 PBS、CNP、Lysate 组( $t$  分别为 6.3 ~ 13.0,  $P$  均  $< 0.001$ )，见表 5。

表 5 各组小鼠脾脏中 IFN $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的含量( $\text{pg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab. 5 Contents of IFN  $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in spleen of mice in various groups ( $\text{pg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	IFN $\gamma$	TNF- $\alpha$
Vaccine	2 807.5 ± 952.3	70.3 ± 7.4
PBS	79.0 ± 36.3 <sup>aaa</sup>	23.8 ± 6.2 <sup>aaa</sup>
CNP	76.1 ± 20.5 <sup>aaa</sup>	21.8 ± 4.0 <sup>aaa</sup>
Lysate	375.7 ± 154.7 <sup>aaa</sup>	38.6 ± 8.6 <sup>aaa</sup>

注: aaa 表示与 Vaccine 组比较,  $P < 0.001$ 。

### 3 讨论

目前, 疫苗接种是癌症免疫预防的最佳途径, 如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)疫苗。疫苗接种

具有安全性高、可产生长期记忆、成本低、供给方便等优势, 不仅可单独使用, 还可联合其他方法使用<sup>[16]</sup>。肿瘤裂解物疫苗具有制备方法简单, 生产成本低的优点, 疫苗中含有大量免疫原性表位, 可通过体液免疫与细胞免疫途径发挥作用, 达到预防或治疗的作用。肿瘤裂解物与佐剂的联合使用, 尤其是纳米化的佐剂, 可增强体内的免疫效果。CpG 寡核苷酸是通过 Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 发挥免疫激活作用<sup>[17-18]</sup>, 与其他 TLR 不同, TLR9 存在于细胞内, CpG 寡核苷酸通过细胞内吞作用进入细胞后与 TLR9 结合。肿瘤裂解物进入体内, 被 DCs 吞噬, 经抗原递呈给 T 细胞促进其分化为特异性 CTL。佐剂 CpG 可增强该过程, 从而促进免疫应答效果。DCs 作为功能最强的抗原提呈细胞, 在先天免疫和适应性免疫关系中起重要作用。未成熟的 DCs 表现出强大的捕获抗原能力, 但不能有效地处理抗原和刺激 T 细胞。摄取抗原后, 未成熟的 DCs 分化为成熟的 DCs, 同时表型和功能也发生变化。成熟的 DCs 表达高水平的表面标志物 (如 MHC-II、CD80 和 CD86 等), 促进抗原呈递并分泌细胞因子<sup>[19]</sup>。在相同的剂量下, 纳米化 CpG 可比非纳米化 CpG 激活更强的免疫应答<sup>[20]</sup>。临床前和临床研究中, 由于 CpG 寡核苷酸能够启动肿瘤微环境中的免疫激活, 打破免疫抑制和治疗耐受, 可用于治疗各种癌症, 因此受到广泛关注<sup>[21]</sup>。

本研究用 CNP 体外刺激 BMDCs 成熟, 结果显示, 相同剂量 CNP 比 CpG 表现出了更好的刺激效果, 明显促进了细胞因子 IL-6 和 IL-12p40 的表达 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 增强了细胞免疫和体液免疫效果。小鼠皮下接种疫苗后, MC38 肿瘤生长缓慢, 肿瘤体积明显小于其他组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 表现出良好的免疫预防效果; CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 及 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞比例差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ); 血液中 IFN $\gamma$  含量明显升高 ( $P$  均  $< 0.05$ ), TNF- $\alpha$  含量差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ); 脾脏中 IFN $\gamma$  及 TNF- $\alpha$  含量均明显升高 ( $P$  均  $< 0.001$ ), 显示出了良好的抗肿瘤效果。

综上所述, 构建的 CNP 能够有效激活并促进 DCs 成熟, 增强 IL-6 和 IL-12p40 等细胞因子的分泌, 提高体液和细胞免疫水平; 与肿瘤裂解物联合制备成的疫苗, 在结肠癌小鼠模型中具有良好的预防效果, 也促进了体内的抗肿瘤细胞因子的释放, 为肿瘤预防和治疗提供了新的思路和策略。另外, 本研究中各组小鼠数量较少, 难免影响检测结果, 因此, 后续研究中将增加各组小鼠数量, 以期获得更准确的结果。

## 参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] DESANTIS C E, MILLER K D, GODING SAUER A, *et al.* Cancer statistics for African Americans, 2019 [J]. *CA*, 2019, 69 (3): 211-233.
- [3] CAO M M, CHEN W Q. Epidemiology of cancer in China and the current status of prevention and control [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 46 (3): 145-149. (in Chinese)  
曹毛毛, 陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状 [J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46 (3): 145-149.
- [4] PASSARDI A, NANNI O, TASSINARI D, *et al.* Effectiveness of bevacizumab added to standard chemotherapy in metastatic colorectal cancer: final results for first-line treatment from the ITACa randomized clinical trial [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26 (6): 1201-1207.
- [5] HUTCHINS G, SOUTHWARD K, HANDLEY K, *et al.* Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29 (10): 1261-1270.
- [6] GOTWALS P, CAMERON S, CIPOLLETTA D, *et al.* Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17 (5): 286-301.
- [7] SRIVATSAN S, PATEL J M, BOZEMAN E N, *et al.* Allogeneic tumor cell vaccines [J]. *Hum Vaccin & Immunotherapeutics*, 2014, 10 (1): 52-63.
- [8] SHI G N, ZHANG C N, XU R, *et al.* Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine [J]. *Biomaterials*, 2017, 113: 191-202.
- [9] HESSE C, KOLLEND A S, ROTAN O, *et al.* A tumor-peptide-based nanoparticle vaccine elicits efficient tumor growth control in antitumor immunotherapy [J]. *Mol Cancer Therapeutics*, 2019, 18 (6): 1069-1080.
- [10] KIM S Y, NOH Y W, KANG T H, *et al.* Synthetic vaccine nanoparticles target to lymph node triggering enhanced innate and adaptive antitumor immunity [J]. *Biomaterials*, 2017, 130: 56-66.
- [11] WANG X, WANG N, YANG Y, *et al.* Polydopamine nanoparticles carrying tumor cell lysate as a potential vaccine for colorectal cancer immunotherapy [J]. *Biomaterials Sci*, 2019, 7 (7): 3062-3075.

(下转第 20 页)

- lity of the influenza virus hemagglutinin protein correlates with evolutionary dynamics [J]. *mSphere*, 2018, 3 (1): e00554-17. DOI: 10.1128 / mSphereDirect.00554-17.
- [18] CAO H D, LIU X G, WANG P. Development of enzyme-linked lectin assay for activity and subtyping of influenza virus neuraminidase [J]. *Chin J Biologicals*, 2021, 34 (5): 585-589. (in Chinese)  
曹海丹, 刘旭光, 王平. 流感病毒神经氨酸酶活性及型别鉴定酶联凝集素法的建立 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (5): 585-589.
- [19] SAUTTO G A, KIRCHENBAUM G A, ROSS T M. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal [J]. *Virology*, 2018, 15 (1): 17.
- [20] ZHOU F, HANSEN L, PEDERSON G, *et al.* Matrix M adjuvanted H5N1 vaccine elicits broadly neutralizing antibodies and neuraminidase inhibiting antibodies in humans that correlate with in vivo protection [J]. *Front Immunol*, 2021, 12 (11): 747774.
- [21] WONG S S, WEBBY R J. Traditional and new influenza vaccines [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26 (3): 476-492.
- [22] CHEN J R, LIU Y M, TSENG Y C, *et al.* Better influenza vaccines: an industry perspective [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27: 33.
- [23] EICHELBERGER M C, MONTO A S. Neuraminidase, the forgotten surface antigen, emerges as an influenza vaccine target for broadened protection [J]. *J Infect Dis*, 2019, 219 (Suppl\_1): S75-S80.
- [24] JOB E R, YSENBAERT T, SMET A, *et al.* Broadened immunity against influenza by vaccination with computationally designed influenza virus N1 neuraminidase constructs [J]. *NPJ Vaccin*, 2018, 3: 55.
- [25] SULTANA I, YANG K, GETIE-KEBTIE M, *et al.* Stability of neuraminidase in inactivated influenza vaccines [J]. *Vaccine*, 2014, 32 (19): 2225-2230.

收稿日期: 2022-03-22 编辑: 何巍

## (上接第 15 页)

- [12] LI T, HUA C, YUE W, *et al.* Discrepant antitumor efficacies of three CpG oligodeoxynucleotide classes in monotherapy and co-therapy with PD-1 blockade [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105293.
- [13] LIANG H, XIAO X, ZHANG X, *et al.* Self-assembled nanovehicle-mediated co-encapsulation of inactivated EV71 virus and CpG oligonucleotides elicits potent anti-EV71 humoral and cellular immune protective responses [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2019, 511 (2): 253-259.
- [14] ZHAO J Q, NOOR K S, DONG X X, *et al.* Anti-tumor immunologic modulation and efficacy of na-no-complex adjuvant [J]. *Lett Biotechnol*, 2020, 31 (2): 129-134. (in Chinese)  
赵佳琦, Noor Khattak Sameena, 董晓筱, 等. 纳米复合佐剂的抗肿瘤免疫调控作用及效果研究 [J]. *生物技术通讯*, 2020, 31 (2): 129-134.
- [15] HU Z K, DENG X W, ZHAO J Q, *et al.* Study of immune killing effect induced by HPV16 E786-93 nano-vaccine [J]. *Lett Biotechnol*, 2020, 31 (2): 135-141. (in Chinese)  
胡张可, 邓雄威, 赵佳琦, 等. HPV16 E786-93 纳米颗粒疫苗的免疫杀伤效果研究 [J]. *生物技术通讯*, 2020, 31 (2): 135-141.
- [16] UMAR A. Cancer immunoprevention: a new approach to intercept cancer early [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7 (11): 1067-1071.
- [17] VOLLMER J, KRIEG A M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61 (3): 195-204.
- [18] SAUTER M M, GAUGER J J, BRANDT C R. Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps [J]. *Antiviral Res*, 2014, 109: 83-96.
- [19] BENENCIA F, SPRAGUE L, MCGINTY J, *et al.* Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 425476. DOI: 10.1155 / 2012 / 425476.
- [20] KUAI R, OCHYL L J, BAHJAT K S, *et al.* Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy [J]. *Nat Materials*, 2017, 16 (4): 489-496.
- [21] LI T, WU J, ZHU S, *et al.* A novel C type CpG oligodeoxynucleotide exhibits immunostimulatory activity in vitro and enhances antitumor effect in vivo [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 8.

收稿日期: 2022-03-03 编辑: 李靓