DOI:10.16016/j.2097-0927.202401037

WT1 多肽乳佐剂疫苗的免疫增强效应及其对急性髓系白血病抗肿瘤效应研究

叶 演,张泽珑,朱宝行,刘姝琳,宋 振,袁庆鹏,杨 赟,李海波,邹全明,曾 浩,孙红武 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系微生物与生化药学教研室,国家免疫生物制品工程技术研究中心

[**摘要**] **目的** 评价 Wilm 瘤基因 1(Wilms' tumor gene1, WT1)多肽联合 AddaVax™ 乳佐剂疫苗的稳定性、安全性、免疫增强效应及其对急性髓系白血病抗肿瘤效应。**方法** 用 MALDI-TOF-MS 飞行时间质谱评价该佐剂疫苗中 WT1 多肽的稳定性;将 C57BL/6 雌性小鼠按照随机数字表法分成 3 组:PBS 组、WT1 组和 WT1+AddaVax™ 组,使用免疫剂量为抗原 50 μg/只、佐剂 50 μg/只,按照第 0、14、28 天肌肉注射免疫程序进行免疫。用 HE 染色评价疫苗肌肉注射小鼠脏器组织毒性;用 ELISA 检测细胞因子水平;ELISpot 检测脾细胞分泌 IFN-γ 细胞数量;流式细胞术检测疫苗促体外骨髓来源树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells,BMDCs)成熟和促淋巴细胞活化及 H-2Db WT1 四聚体检测特异性 $CD8^+$ T 细胞比例;用 C1498-mWT1 稳转细胞株构建小鼠白血病肿瘤模型后,评价其预防与治疗的抗肿瘤效应。**结果** WT1 多肽可在疫苗中稳定存在,对小鼠肌肉注射未发生明显的脏器组织变化;对小鼠肌肉注射 WT1+AddaVax™ 疫苗后,与 WT1 组相比,WT1+AddaVax™ 组可诱导高水平的 Th1 细胞免疫应答 γ 干扰素(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及其 Th17 免疫应答白介素 17A(IL-17A)($P<0.05$);与 WT1 组相比,WT1+AddaVax™ 组促进脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的细胞数量增加($P<0.01$),促进 BMDCs 成熟的标志物 $CD40^+/CD11c^+$、$CD86^+CD80^+/CD11c^+$细胞比例增加($P<0.05$),促进淋巴细胞中 $CD4^+/CD3^+$ T、$CD69^+/CD8^+$ T 细胞比例增加($P<0.05$)及其特异性 $CD8^+$ T 细胞比例增加($P<0.05$);利用 C1498-mWT1 小鼠急性髓系白血病皮下荷瘤模型的抗肿瘤效应中,WT1+AddaVax™ 组中位生存期相比于 WT1 组小鼠延长了 6 d。在第 50 天时,WT1 多肽+AddaVax™ 组小鼠生存率为 28.5%,其他组小鼠全部死亡($P<0.05$)。**结论** WT1 多肽联合 AddaVax™ 乳佐剂疫苗具有良好的免疫学和明显抗肿瘤效果。

[**关键词**] WT1 多肽;AddaVax™ 乳佐剂;急性髓系白血病;免疫应答;抗肿瘤效应

[**中图法分类号**] R392.7; R730.51; R733.71 [**文献标志码**] A

Improved immune response and anti-tumor effect of WT1 peptide emulsion adjuvant vaccine for acute myeloid leukemia

YE Yan, ZHANG Zelong, ZHU Baohang, LIU Shulin, SONG Zhen, YUAN Qingpeng, YANG Yun, LI Haibo, ZOU Quanmin, ZENG Hao, SUN Hongwu Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, National Immunobiologics Engineering and Technology Research Center, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the stability, safety and immune enhancement and anti-tumor effects of Wilms' tumor gene 1 (WT1) peptide combined with AddaVax™ emulsion vaccine for acute myeloid leukemia. **Methods** The stability of WT1 peptide in the adjuvant vaccine was evaluated using MALDI-TOF-MS time-of-flight mass spectrometry. Female C57BL/6 mice were randomly divided into PBS group, WT1 peptide group, and WT1 peptide + AddaVax™ emulsion adjuvant vaccine group. The immunization was

[**基金项目**] 国家重点研发计划(2021YFC2302603);国家自然科学基金面上项目(32070924,31970078);重庆市自然科学基金面上项目(2019jcyjA-msxmx0159)

[**通信作者**] 孙红武,E-mail:sunhongwu2001@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

performed at a dose of 50 μg/mouse for antigen and 50 μg/mouse for adjuvant, with intramuscular injection on days 0, 14, and 28. HE staining was used to assess the toxicity of intramuscular vaccination on mouse organ tissues. Cytokine levels were detected by ELISA, and the number of IFN-γ-secreting splenocytes was measured by ELISpot. Flow cytometry was employed to detect the maturation of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) promoted by the vaccine *in vitro* and the promotion for lymphocyte activation, and H-2Db WT1 tetramer was utilized to detect the proportion of specific $CD8^+$ T cells. After establishing a mouse leukemia tumor model using the C1498-mWT1 stable cell line, the anti-tumor effects of the vaccine for prevention and treatment were evaluated. **Results** The WT1 peptide stably existed in the vaccine without causing significant organ tissue changes in mice after intramuscular injection. Compared to the mice immunized with WT1 aqueous solution, the mice after intramuscular injection of the WT1 peptide emulsion adjuvant vaccine showed stronger immune responses of Th1 cells, including IFN-γ and TNF-α, as well as Th17 cells of IL-17A ($P<0.05$), and the mice had not only promoted number of IFN-γ secreting splenocytes ($P<0.01$) but also enhanced maturation of BMDCs, as indicated by an increase in the proportions of $CD40^+/CD11c^+$ and $CD86^+$ $CD80^+/CD11c^+$ cells ($P<0.05$). Additionally, there were increases in both the proportion of $CD4^+/CD3^+$ T and $CD69^+/CD8^+$ T cells ($P<0.05$) and the proportion of specific $CD8^+$ T cells ($P<0.05$). In the anti-tumor effect study using the C1498-mWT1 mouse model, the median survival time of the WT1+AddaVax™ group was extended by 6 d compared to the WT1 aqueous solution group. At day 50, the survival rate of mice in the WT1+AddaVax™ group was still 28.5%, while all mice in the other groups had died ($P<0.05$). **Conclusion** The vaccine with the WT1 peptide and AddaVax™ emulsion adjuvant exhibits good immunological and anti-tumor effects.

[**Key words**] WT1 peptide; AddaVax™ adjuvant; acute myeloid leukemia; immune response; anti-tumor effect

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2302603), the General Program of National Natural Science Foundation of China (32070924, 31970078) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (2019jcyjA-msxmx0159). Corresponding author: SUN Hongwu, E-mail: sunhongwu2001@163.com

急性髓系白血病是造血组织的干细胞恶性克隆性疾病[1],其特征为白细胞在骨髓及其他造血组织中呈恶性、无限制地增生,进而浸润全身各组织和脏器,对机体产生严重损害,发病率高达3.7/100 000人,死亡率高达2.7/100 000人~18/100 000人[2],严重威胁人类健康。最新研究表明,疫苗能激活一系列免疫增强反应,使免疫系统能够识别并清除肿瘤细胞,具有良好的肿瘤治疗效果,是控制急性髓系白血病的理想策略。其中肿瘤多肽疫苗具有特异性高、化学结构稳定、结构简单、易于制备及无潜在致癌性等优点,被人们广泛使用。研究表明,Wilm瘤基因1(Wilms' tumor gene1, WT1)定位于染色体11p13,在急性髓性细胞白血病及大部分实体瘤中均存在高表达[3-5],因此,WT1多肽是免疫治疗的优选靶抗原[6-8],激发机体产生特异性免疫应答、细胞毒性T淋巴细胞反应[9-10],清除术后或放化疗后瘤细胞微小残留,从而达到根除恶性肿瘤的目的。目前国际上已有32个以WT1为靶点的恶性肿瘤主动特异性免疫治疗疫苗进入了临床试验,其中1个进入临床Ⅲ期试验,并已经取得较好疗效[3,5]。由于多肽疫苗免疫原性弱、易降解、不易被抗原提呈细胞摄取,具有主要组织相容性复合体(MHC)限制性,导致细胞免疫效果差,须用佐剂进行增强疫苗应答。

现上市疫苗佐剂中,被30多个国家批准应用于多种疫苗中的MF59佐剂可诱导机体产生有效免疫应答[11]。它的配方类物AddaVax™乳剂佐剂可引起细胞(Th1)和体液(Th2)免疫反应[12-13]。目前国内外未见WT1多肽和AddaVax™的研究报道。基于此,本研究选择急性髓系白血病WT1多肽,联合AddaVax™乳佐剂制备白血病WT1乳佐剂多肽疫苗,对其稳定性、组织病理改变的安全性研究后,考察其增强免疫应答作用,并利用C1498-mWT1稳转细胞株构建小鼠白血病肿瘤模型,评价其预防与治疗免疫保护效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6雌性小鼠(SPF级6~8周龄,体质量18~20 g),购自北京华阜康生物科技股份有限公司。所有动物实验获陆军军医大学动物伦理委员会批准

(AMUWEC20228029)。

1.2 主要试剂和仪器

WT1 多肽(序列为 RMFPNAPYL)由上海波泰生物科技有限公司提供;AddaVax™ 乳佐剂购自 Invivogen 公司;4%多聚甲醛、红细胞裂解液均购自上海碧云天公司;异氟烷购自瑞沃德公司;C1498-mWT1 稳转细胞株[C1498 细胞被 CMV 启动子驱动的小鼠 WT1 17AA(+)KTS(+)亚型全长 cDNA 基因转导,并将该 cDNA 插入 pcDNA3.1(+)哺乳动物表达载体]由重庆闻达生物科技有限公司提供;DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清均购自美国赛默飞公司;青霉素-链霉素溶液(100×)购自 HyClone 公司;DMSO 购自日本 Sigma 公司;一级水由实验室自制;T-Select H-2Db $WT1_{126-134}$ Tetramer-RMFPNAPYL-PE 购自博尔迈生物技术有限公司;PE anti-mouse CD40、APC anti-mouse CD86、Percp/Cy5.5 anti-mouse CD80、PE anti-mouse CD3、FITC anti-mouse CD4、Percp/Cy5.5 anti-mouse CD8a、APC/Cy7 anti-mouse CD69 均购自 Biolegend 生物科技有限公司;IFN-γ 酶联免疫吸附试剂盒、TNF-α 酶联免疫吸附试剂盒、IL-17A 酶联免疫吸附试剂盒、ELISpot Plus: Mouse IFN-γ (ALP)试剂盒均购自达科为生物技术股份有限公司;生物安全柜购自力康仪器有限公司;ELISpot 读板机购自德国艾迪 AID 公司;台式高速离心机购自德国艾本德股份公司;细胞培养箱购自美国赛默飞公司;细胞计数仪购自德京科技有限公司;FACS Canto Ⅱ流式细胞仪购自美国 BD 公司。所用仪器由陆军军医大学药学与检验医学系国家免疫生物制品工程技术研究中心及大学中心实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 疫苗的制备 将 WT1 多肽(浓度为 10 mg/mL,纯度为 98.3%)和 AddaVax™ 乳佐剂进行混合(W/W,1∶1)后,放置在 4 ℃,旋转混悬仪混悬 4~6 h,放置冰箱备用。

1.3.2 WT1 多肽在疫苗中稳定性研究 取 200 μL 多肽乳佐剂疫苗及其未加乳佐剂多肽,用基质辅助电离-时间飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)进行检测。

1.3.3 动物肌肉注射免疫接种 实验分成 3 组:PBS 组、WT1 组、WT1+AddaVax™ 组,每组 5 只。使用免疫剂量为抗原 50 μg/只,佐剂 50 μg/只,按照第 0、14、28 天肌肉注射免疫程序进行免疫。以下疫苗脏器毒性研究实验、ELISA 实验、ELISpot 实验、流式细胞术检测疫苗促进淋巴细胞活化能力和 WT1 特异性 $CD8^+$ T 细胞实验均按照此剂量和程序进行注射。

1.3.4 疫苗脏器毒性研究 每日上午观察小鼠存活状态。末次免疫后第 3 天,每组按照随机数字表法选择 1 只小鼠,异氟烷麻醉后处死,取出肝脏、脾脏、心脏、肺脏、肾脏及肌肉组织放入 1 mL 浓度为 4%多聚甲醛溶液中,室温固定 48 h,石蜡包埋切片 HE 染色后,光学显微镜观察其组织毒性。

1.3.5 ELISA 试剂盒检测血清中细胞因子水平 在末次免疫后 14 d 取小鼠尾静脉全血,以 630×*g* 离心 10 min,分离血清,用 ELISA 试剂盒检测 γ 干扰素(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及其 Th17 免疫应答白介素 17A(IL-17A)水平。

1.3.6 ELISpot 测定 IFN-γ 分泌水平 在末次免疫后第 14 天,小鼠异氟烷麻醉后处死,分离脾淋巴单细胞悬液后,调整细胞浓度为 1×10^7/mL,取 50 μL,加入活化好的预包被有 IFN-γ 的 ELISpot 板中,再加入 50 μL 的 40 μg/mL WT1 多肽溶液进行混合,阳性对照孔加入佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate,PMA,500 ng/mL)稀释液 100 μL,阴性对照孔加入 RPMI1640 完全培养基 100 μL。将平板置于含有 5% CO_2、37 ℃细胞培养箱中培养 48 h。弃去培养液,用 PBS 洗涤,每孔加入 100 μL 检测抗体(R4-6A2-biotin)室温孵育 2 h,用 PBS 洗板后加入稀释好的链霉亲和素-辣根过氧化物酶(1∶1 000)室温孵育 1 h,洗板后加入 TMB 显色液,当出现明显的斑点时用蒸馏水冲洗板子,终止显色。待板子晾干后,置于 ELISpot 读板机中进行斑点计数并采集图片。

1.3.7 流式细胞术检测疫苗体外促进骨髓来源树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells,BMDCs)成熟

将小鼠麻醉处死后置于 75% 酒精中浸泡 2 min,手术取出所有股骨和胫骨,用 1 mL 注射器吸取无菌 PBS 插入股骨和胫骨,反复冲洗出骨髓,452×*g* 离心 5 min,弃上清,加入红细胞裂解液轻柔重悬,PBS 终止裂解,452×*g* 离心 5 min,用 RPMI1640 完全培养基中含有 10 ng/mL 白介素 4(interleukin-4,IL-4)和 20 ng/mL 集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)重悬,加入细胞培养皿中,每 2 天弃去半量培养基,补充半量新鲜培养基,第 6 天所获得的细胞 BMDCs,调整细胞浓度为 1×10^6/mL 后,以 1 mL/孔加入 6 孔板中。随后 WT1 组中加入 WT1 多肽水溶液(每孔 WT1 终浓度为 5 μg/mL WT1),WT1+AddaVax™ 组中分别加入 WT1 多肽水溶液以及 AddaVax™ 佐剂(每孔终浓度为 5 μg/mL WT1,5 μg/mL AddaVax™)进行药物刺激,PBS 作为空白对照,各组设置 3 个复孔,随后将上述细胞培养板置于 CO_2 培养箱中,37 ℃、

5% CO_2 条件下孵育 12 h。收集细胞,PBS 清洗细胞,弃上清,将 CD86、CD40、CD80、CD11c 等 DC 细胞成熟的标志物流式抗体用 Staining Buffer 稀释液(1∶100)稀释混合,每孔加入 50 μL 混合流式抗体重悬细胞,4 ℃避光孵育 30 min。452 ×*g* 离心 5 min,弃掉上清,所得细胞用 200 μL PBS 重悬,用 FACS Canto Ⅱ流式细胞仪进行检测。

1.3.8 流式细胞术检测疫苗促进淋巴细胞活化能力

在末次免疫后第 14 天,小鼠异氟烷麻醉后处死,分离脾淋巴单细胞悬液后,调整细胞浓度为 2×10^7/mL。在 24 孔板中每孔加入 500 μL 细胞悬液,再加入 500 μL 经除菌过滤的 WT1 多肽水溶液(终浓度为 20 μg/mL)后,放入 37 ℃ 含有 5% CO_2 的培养箱中培养 48 h。452×*g* 离心 5 min,弃上清,加入 200 μL PBS 重悬洗涤,重复步骤 3 次。将 CD3、CD4、CD8a、CD69 等流式抗体用 Staining Buffer 稀释液(1∶100)稀释混合,每孔加入 50 μL 混合流式抗体重悬细胞,4 ℃避光孵育 30 min。452×*g* 离心 5 min,弃掉上清,所得细胞用 200 μL PBS 重悬,用 FACS Canto Ⅱ流式细胞仪进行检测。

1.3.9 WT1 特异性 $CD8^+$ T 细胞检测 在末次免疫后第 14 天,小鼠异氟烷麻醉后处死,分离脾淋巴单细胞悬液后,调整细胞浓度为 2×10^7/mL。在 24 孔板中每孔加入 500 μL 细胞悬液,再加入 500 μL 经除菌过滤的 WT1 多肽水溶液(终浓度为 20 μg/mL)后,放入 37 ℃含有 5% CO_2 的培养箱中培养 48 h。452×*g* 离心 5 min,弃上清,加入 200 μL PBS 重悬洗涤,重复步骤 3 次。随后用 100 μL Staining Buffer 重悬,加入 10 μL/孔 T-Select H-2Db WT1 四聚体,再加入 CD3、CD8a 流式抗体混匀后,4 ℃避光孵育 30 min。452×*g* 离心 5 min,弃上清,用 200 μL PBS 重悬细胞,用 FACS Canto Ⅱ流式细胞仪进行检测。

1.3.10 C1498-mWT1 荷瘤模型构建与评价 参照文献[14-15],构建 C1498-mWT1 细胞皮下小鼠荷瘤模型后,评价 WT1+AddaVax™ 疫苗的治疗和预防效果。将培养的 C1498-mWT1 细胞浓度调整为 8×10^6/mL;待小鼠麻醉后,将其右侧肩背部毛剃光和脱毛,皮下注射 100 μL 的 C1498-mWT1 细胞,构建出 C1498-mWT1 稳转细胞株小鼠白血病肿瘤模型。出于人道主义考虑,当小鼠肿瘤体积超过 2 000 mm^3 时,处死小鼠。治疗性免疫保护效果评价:小鼠皮下接种 C1498-mWT1 细胞(8×10^5/只),接种后第 3、10、17 天按相同剂量进行免疫。在接种 C1498-mWT1 细胞后第 0、4、8、12、16 及 20 天记录肿瘤的长和宽,并计算肿瘤体积。肿瘤体积计算公式为 $V=\pi/6\times L\times W^2$,其中 L 为肿瘤的长,W 为肿瘤的宽[16-19]。接种后 50 d,每天观察记录小鼠存活状态,并绘制其生存曲线。预防性免疫保护效果评价:用上述 1.3.3 相同免疫程序和剂量进行免疫,在末次免疫后第 7 天,对小鼠皮下接种 C1498-mWT1 细胞(8×10^5/只)。在接种 C1498-mWT1 细胞后在第 0、4、8、12、16 及 20 天记录肿瘤的长和宽,按照公式计算肿瘤体积。接种后 50 d,每天观察记录小鼠存活状态,并绘制其生存曲线。

1.4 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.0 进行统计学分析,数据表示为 $\bar{x}\pm s$,两组数据之间的比较采用非配对 t 检验,多组数据之间的比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 疫苗中 WT1 多肽稳定性研究

用 MALDI-TOF-MS 质谱仪对 WT1 多肽水溶液及 WT1+AddaVax™ 进行离子峰信息比对。WT1 多肽质谱在 m/z = 1 108 处有明显主峰(图 1A)。WT1 + AddaVax™ 的质谱图可见除了聚合物特殊峰型外,在 m/z=1 108 处有明显离子峰,位置与 WT1 多肽所形成的离子峰基本一致(图 1B)。结果显示,WT1 多肽与 AddaVax™ 混合后,WT1 多肽依然稳定存在,提示疫苗制备过程对 WT1 多肽未造成明显影响。

2.2 WT1 多肽乳佐剂疫苗体内安全性评价

为了评价 WT1 和 WT1+AddaVax™ 的体内毒性,分别于第 0、14、28 天,使用 PBS、WT1 水溶液、WT1+AddaVax™ 对小鼠进行肌内注射,观察小鼠的存活率,小鼠均存活。于末次免疫后第 3 天,取小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏及肌肉组织,制作组织切片,进行 HE 染色,从图 2 中可看出,与 PBS 组相比,各组的组织中均未出现明显的中性粒细胞聚集炎症、水肿等严重的组织病理学改变。上述结果表明,制备出 WT1 乳剂佐剂多肽疫苗未出现明显的脏器毒性反应。

2.3 血清中细胞因子分泌水平检测结果

利用 ELISA 试剂盒对小鼠免疫后的血清中细胞因子水平进行检测。从图 3 中可看出,WT1+AddaVax™ 组能够有效诱导 Th1 细胞免疫的细胞因子(IFN-γ、TNF-α)、Th17 偏向的细胞因子(IL-17A)的产生,且与 WT1 组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。实验结果表明,小鼠肌肉免疫接种 WT1+AddaVax™ 乳佐剂疫苗可以通过诱导特异性 Th1 型免疫应答来发挥免疫保护作用。

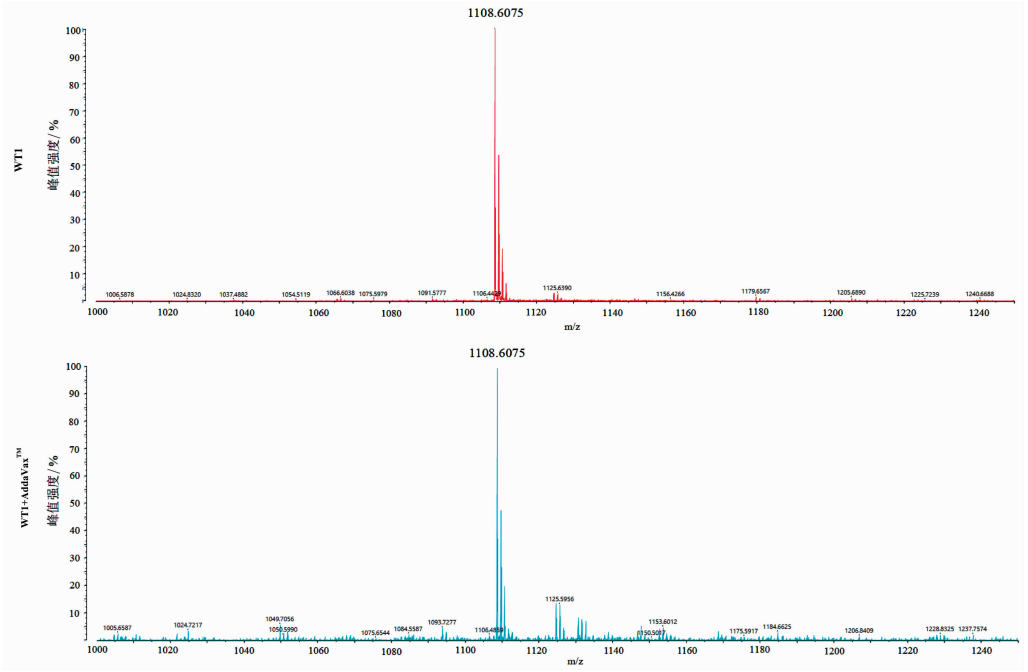


图 1　WT1(A)和 WT1+AddaVax™(B)质谱检测结果

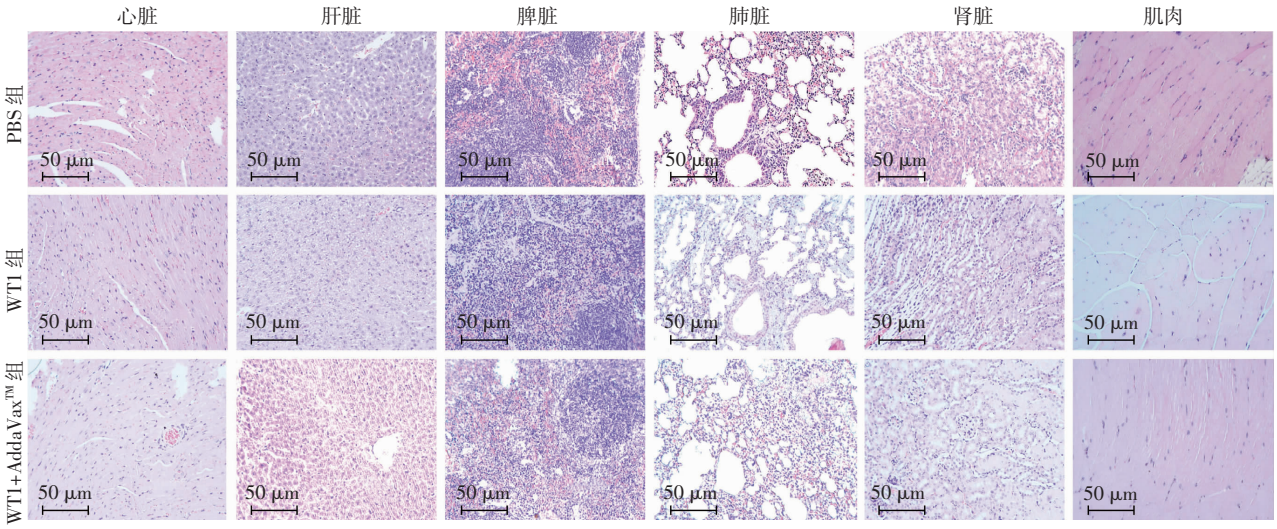
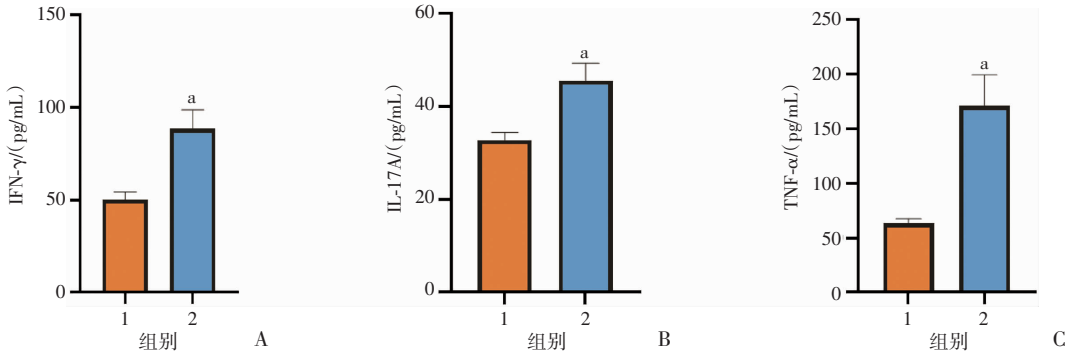


图 2　末次免疫后 3 d 小鼠主要脏器 HE 染色切片观察



1:WT1 组;2:WT1+AddaVax™ 组;a:$P<0.05$,与 WT1 组比较

A:IFN-γ 检测结果;B:IL-17A 检测结果;C:TNF-α 检测结果

图 3　免疫后小鼠血清中细胞因子检测结果($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

2.4 ELISpot 检测 WT1 多肽乳佐剂疫苗诱导产生的细胞免疫应答能力

为了检测疫苗免疫小鼠后产生的免疫应答水平,末次免疫后第 14 天,分离小鼠脾脏淋巴细胞并制备单细胞悬液,随后进行 ELISpot 实验,通过检测产生 IFN-γ 的细胞斑点数量,评价不同组别疫苗诱导产生的免疫应答水平。如图 4A 所示为各组代表性 ELISpot 斑点图,经 WT1 多肽刺激后,WT1+AddaVax™ 组相比于 WT1 组分泌 IFN-γ 的细胞较多,而 PBS 组几乎未见细胞斑点。统计斑点数并进行统计学分析,WT1+AddaVax™ 组小鼠产生 IFN-γ 的脾脏淋巴细胞数量大于 WT1 组($P<0.01$,图 4B)。以上结果表明,WT1+AddaVax™ 可诱导机体产生 Th1 型免疫反应,增强 WT1 多肽诱导产生的免疫应答水平。

2.5 WT1 多肽乳佐剂疫苗促进小鼠 BMDCs 细胞成熟

为了检测 WT1 多肽乳佐剂疫苗能否促进 BMDCs 细胞成熟,通过流式细胞术检测 CD40、CD80、CD86 等 DC 成熟的标志物,并分别分析 $CD40^+/CD11c^+$ 细胞、$CD86^+CD80^+/CD11c^+$ 细胞的比例。

与 WT1 组相比,WT1+AddaVax™ 组 $CD40^+/CD11c^+$ 细胞比例与 $CD86^+CD80^+/CD11c^+$ 细胞比例显著高于 WT1 组($P<0.01$,$P<0.05$,图 5)。结果表明,WT1+AddaVax™ 具有显著促进 BMDCs 细胞成熟的能力。

2.6 WT1 多肽乳佐剂疫苗促进小鼠淋巴细胞的活化

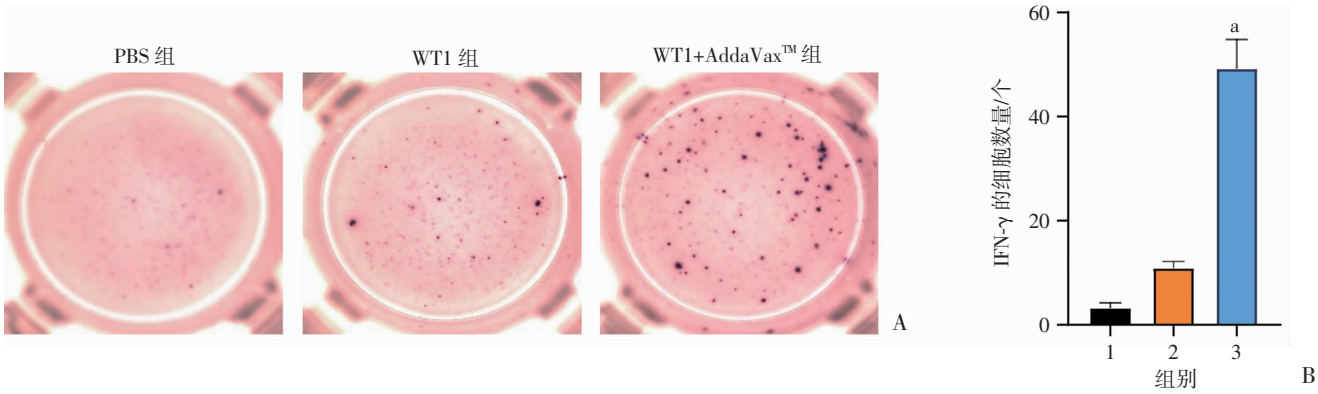
在末次免疫后第 14 天,无菌条件下取小鼠脾脏,制备脾细胞悬液,利用流式细胞术检测 CD69 分别在 CD4、CD8 上的表达水平。图 6 中可看出,WT1+AddaVax™ 组中特异性 $CD4^+$T 细胞的比例和 CD69 在 $CD8^+$T 细胞中的表达水平均显著高于 WT1 组,且差异具有统计学意义($P<0.01$),表明 WT1+AddaVax™ 可促进脾细胞在 $CD4^+$ T 细胞、$CD8^+$ T 细胞的活化。

2.7 小鼠免疫后特异性 $CD8^+$ T 水平

小鼠免疫后特异性 $CD8^+$ T 水平如图 7 所示。WT1 组中特异性 $Tetramer^+$在 $CD3^+CD8^+$T 细胞的比例较 PBS 对照组略升高,但差异无统计学意义,而 WT1+AddaVax™ 组显著高于 WT1 组($P<0.01$),证明 WT1+AddaVax™ 免疫后能够诱导较强的细胞免疫应答。

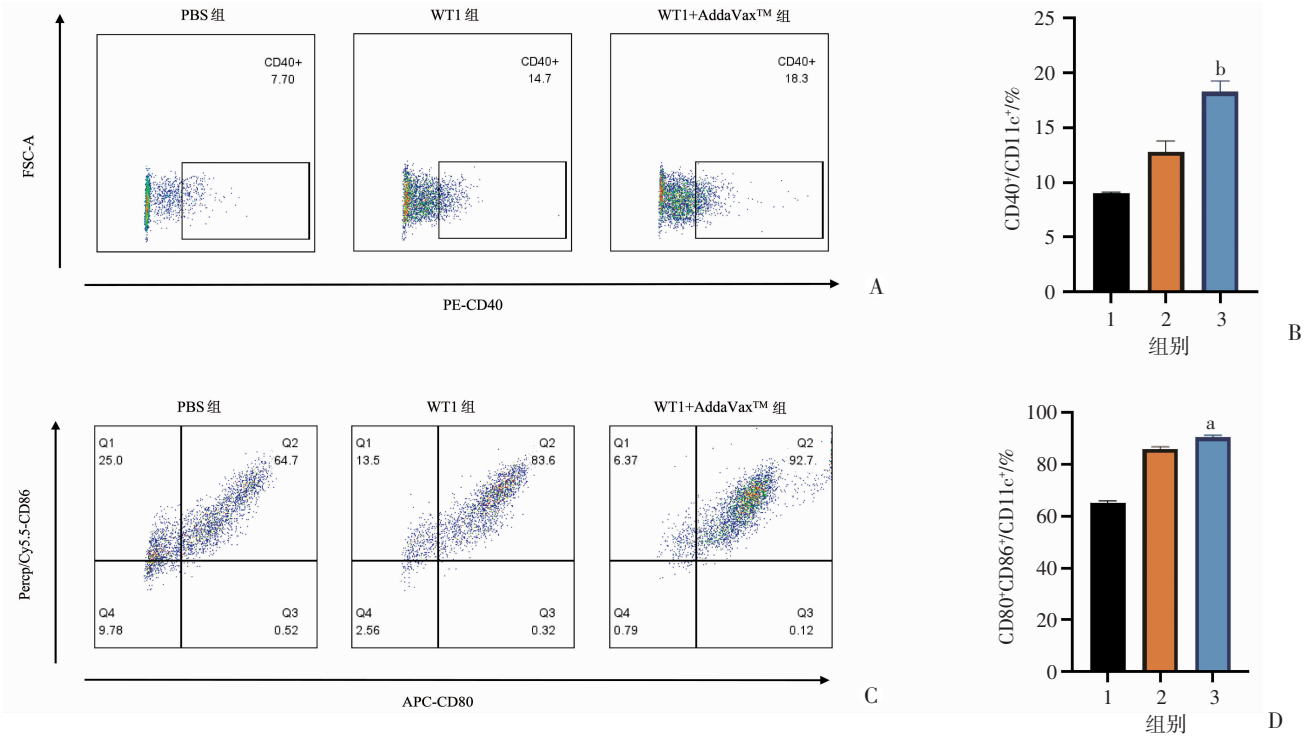
2.8 WT1 多肽乳佐剂疫苗治疗和预防效果评价

从图 8A 中看出,PBS 组及 WT1 组小鼠在荷瘤后肿瘤生长速度相对较快,而 WT1+AddaVax™ 组的 7 只小鼠在 12 d 时还未观察到明显的肿瘤生长;观测 50 d 后各组小鼠的治疗性生存率,可观察到 PBS 组小鼠在第 42 天时全部死亡,小鼠免疫 WT1 组中位生存期相比 PBS 组延长了 4 d,而 WT1+AddaVax™ 组中位生存期相比于 WT1 组小鼠又延长了 6 d。在第 50 天时,WT1+AddaVax™ 组小鼠生存率为 28.5%,其他组小鼠全部死亡,具有统计学差异($P<0.05$,图 8B)。在预防性肿瘤模型中,WT1+AddaVax™ 组小鼠肿瘤生长较缓(图 8C),相比其他组更能显著抑制肿瘤的生长,也可显著延缓小鼠死亡时间(图 8D)。研究证实 WT1+AddaVax™ 组的治疗免疫效果明显强于预防性免疫保护效果,可在一定程度上提高小鼠的存活率,且差异具有统计学意义($P<0.01$)。



A:各组中 IFN-γ 斑点形成细胞;B:免疫后第 14 天通过 ELISpot 检测刺激脾细胞的 IFN-γ 斑点形成细胞数量
1:PBS 组;2:WT1 组;2:WT1+AddaVax™ 组;a:$P<0.01$,与 WT1 组比较

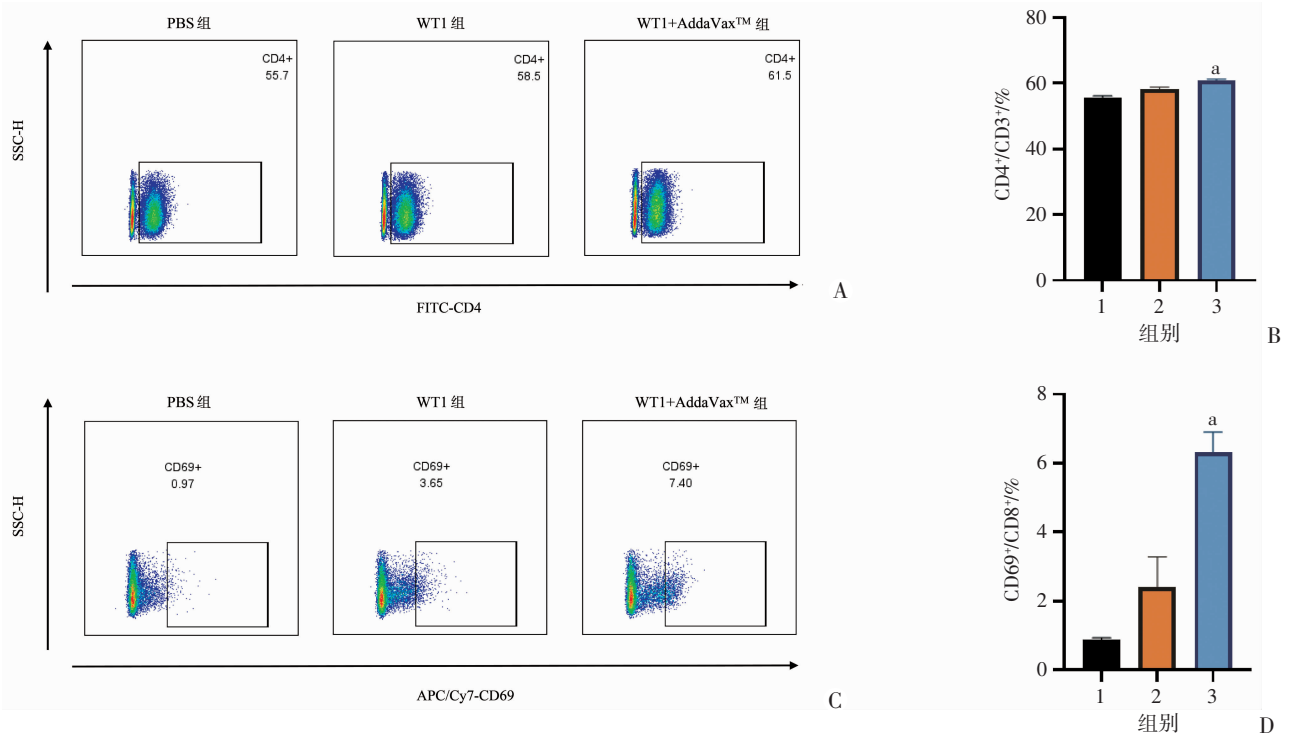
图 4 ELISpot 检测末次免疫后 14 d 小鼠脾脏淋巴细胞 IFN-γ 分泌($n=5$,$\bar{x}\pm s$)



1:PBS 组;2:WT1 组;2:WT1+AddaVax™ 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 WT1 组比较

A:$CD40^+/CD11c^+$流式代表图;B:$CD40^+/CD11c^+$数据结果;C:$CD80^+CD86^+/CD11c^+$流式代表图;D:$CD80^+CD86^+/CD11c^+$数据结果

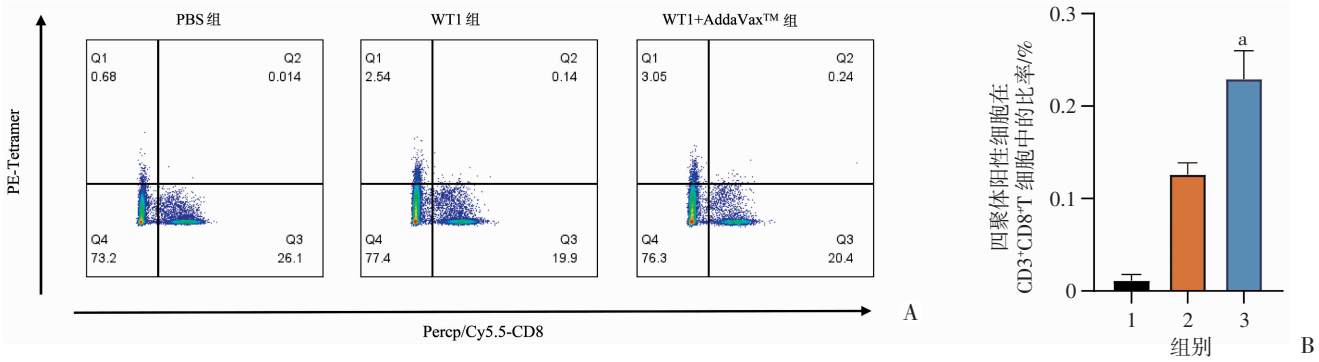
图 5 流式细胞术检测 BMDCs 成熟标志物($n=5,\bar{x}\pm s$)



1:PBS 组;2:WT1 组;2:WT1+AddaVax™ 组;a:$P<0.01$,与 WT1 组比较

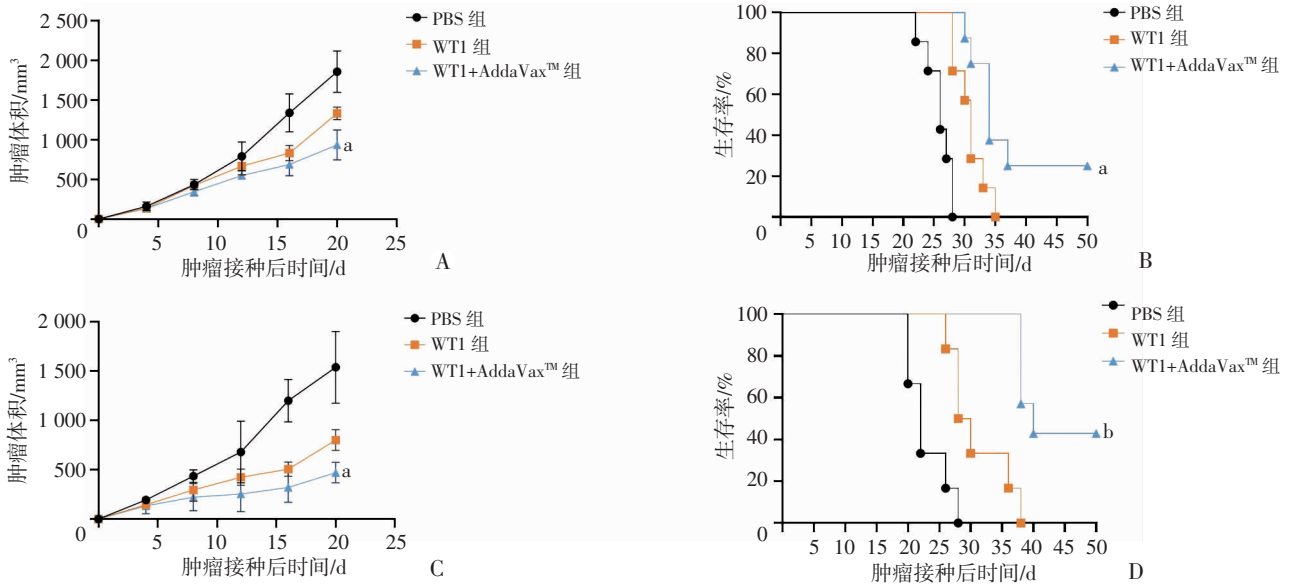
A:$CD4^+/CD3^+$流式代表图;B:$CD4^+/CD3^+$数据结果;C: $CD69^+/CD8^+$流式代表图;D: $CD69^+/CD8^+$数据结果

图 6 流式细胞术检测脾淋巴细胞活化标志物($n=5,\bar{x}\pm s$)



A:$CD8^+$T 细胞流式代表图;B:$CD8^+$T 细胞数据结果　1:PBS 组;2:WT1 组;3:WT1+AddaVax™ 组;a:$P<0.01$,与 WT1 组比较

图 7　流式细胞术检测抗原特异性 $CD8^+$T 细胞($n=5,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 WT1 组比较

A:治疗性效果评价模型小鼠肿瘤体积;B:治疗性效果评价模型小鼠生存率;C:预防性效果评价模型小鼠肿瘤体积;D:预防性效果评价模型小鼠生存率

图 8　疫苗在治疗性和预防性效果评价模型中的保护效果($n=7,\bar{x}\pm s$)

3　讨论

急性髓系白血病传统的放疗或化疗具有一定的治疗作用,也是目前临床采用的主要治疗方法。但其在杀死白血病细胞的同时,也杀死了体内的正常细胞,因而再治疗的同时,对人体造成极大损害[20]。最新研究表明,白血病疫苗能激活一系列免疫增强反应,使免疫系统能够识别并清除白血病细胞,取得了很好的治疗效果[21-22]。MF59 是一种水包油乳液,含有角鲨烯(4.3%)的柠檬酸缓冲液和稳定的非离子表面活性剂吐温 80(0.5%)和司盘 85(0.5%)。角鲨烯在人类类固醇激素的途径中自然合成,存在于皮肤、脂肪组织和肌肉中。天然角鲨烯取自鲨鱼肝,纯化后制备疫苗佐剂。此外,吐温 80 和司盘 85 是常用的表面活性剂,从而构成相对稳定的乳剂颗粒[11,23]。MF59 的安全且耐受性良好,油滴的平均尺寸约为 160 nm,其粒径可通过肌肉注射或者滴鼻免疫的方式递送到引流淋巴结或者黏膜部位发挥佐剂效应,且已获批用于老年人流感疫苗和婴幼儿疫苗,以及儿童、婴儿和孕妇的 H1N1 大流行疫苗。

实验数据表明,将 AddaVax™ 和 WT1 按 1∶1质量比进行物理混合后具有安全性、有效性及高效性等优

点,并在免疫机体后诱导产生细胞免疫应答,其与可溶性抗原对小鼠的免疫在淋巴结和非淋巴组织中产生强大的抗原特异性抗体和 $CD8^+$T 细胞反应。AddaVax™ 可以促进 WT1 多肽疫苗诱导的肿瘤生长抑制和 Th1 倾向的细胞免疫反应,延长小鼠的预防和治疗生存期,促进 WT1 刺激的 DC 的成熟,导致 Th1 极化[24],在提高多肽疫苗免疫效应方面,具有重要价值。

肌肉注射 MF59 后会激活骨髓细胞(例如巨噬细胞、DC 细胞),这些细胞通过产生趋化因子如 CC-趋化因子配体 2(CCL2)、CCL4、CCL5 和 CXC-趋化因子配体 8(CXCL8)[25],进而将中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和更多的单核细胞和 DC 募集到注射部位。这些细胞进一步放大响应并迁移至引流淋巴结以激活 B 和 T 细胞。肌肉注射到小鼠体内后,它可导致 ATP(腺苷三磷酸腺)的瞬时细胞外释放,通过 RIPK3 依赖途径介导适应性免疫反应以及刺激抗原特异性 $CD8^+$细胞产生[26]。而 AddaVax™ 乳佐剂作为 MF59 的类似物,也具有该佐剂特征。疫苗接种中包含的许多佐剂的一个共同特征是在注射引流淋巴结部位快速诱导先天免疫反应,这是有效抗原呈递给 $CD4^+$T 辅助细胞所必需的,为发育 B 细胞和 $CD8^-$T 细胞适应性免疫提供免疫学帮助,从而产生强大的体液和细胞免疫反应[27]。本研究可为后续 AddaVax™ 乳佐剂联合纳米疫苗递送系统进一步增强白血病多肽疫苗免疫应答作用和抗肿瘤效应研究奠定基础,也为 AML 疫苗的开发与设计提供新思路。

参考文献:

[1] 李秀钰, 胡绍雯, 朱惠芳. 白血病干细胞在急性髓系白血病治疗中的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(21): 49-57. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.21.008.
LI X Y, HU S W, ZHU H F. The research progress of therapeutic strategies on acute myeloid leukemia by targeting leukemic stem cells[J]. China J Mod Med, 2023, 33(21): 49-57. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.21.008.

[2] 王婉嶙, 常桃, 江思远, 等. 急性髓系白血病新型预后分子标志物 NKX2-3 的发现[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2024, 45(1): 63-68. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20240004.014.
WANG W D, CHANG T, JIANG S Y, *et al*. Discovery of A new prognostic molecular marker NKX2-3 for acute myeloid leukemia[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci, 2024, 45(1): 63-68. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20240004.014.

[3] KUMAI T, FAN A, HARABUCHI Y, *et al*. Cancer immunotherapy: moving forward with peptide T cell vaccines[J]. Curr Opin Immunol, 2017, 47: 57-63. DOI: 10.1016/j.coi.2017.07.003.

[4] OUE T, UEHARA S, YAMANAKA H, *et al*. Expression of Wilms tumor 1 gene in a variety of pediatric tumors[J]. J Pediatr Surg, 2011, 46(12): 2233-2238. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.004.

[5] XU N, CHEN W M, LI L D, *et al*. High WT1 expression predicted induction chemotherapy failure in acute myeloid leukemia patients with non-favorable cytogenetic risk[J]. Clin Exp Med, 2023, 23(6): 2629-2638. DOI: 10.1007/s10238-023-00995-5.

[6] CLARKE J M, MORSE M A, LYERLY H K, *et al*. Adenovirus vaccine immunotherapy targeting WT1-expressing tumors[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(6): 875-883. DOI: 10.1517/14712591003798278.

[7] OKA Y, TSUBOI A, KAWAKAMI M, *et al*. Development of WT1 peptide cancer vaccine against hematopoietic malignancies and solid cancers[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(20): 2345-2352. DOI: 10.2174/092986706777935104.

[8] OKA Y, TSUBOI A, OJI Y, *et al*. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(2): 211-220. DOI: 10.1016/j.coi.2008.04.009.

[9] ACHEAMPONG D O, ADOKOH C K, ASANTE D B, *et al*. Immunotherapy for acute myeloid leukemia (AML): a potent alternative therapy[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 225-232. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.100.

[10] AUGSBERGER C, HÄNEL G, XU W, *et al*. Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RMF-peptide-MHC-specific T-cell bispecific antibody[J]. Blood, 2021, 138(25): 2655-2669. DOI: 10.1182/blood.2020010477.

[11] O'HAGAN D T, OTT G S, NEST G V, *et al*. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes[J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(1): 13-30. DOI: 10.1586/erv.12.140.

[12] ALZUA G P, PIHL A F, OFFERSGAARD A, *et al*. Inactivated genotype 1a, 2a and 3a HCV vaccine candidates induced broadly neutralising antibodies in mice[J]. Gut, 2023, 72(3): 560-572. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-326323.

[13] KIM E H, WOODRUFF M C, GRIGORYAN L, *et al*. Squalene emulsion-based vaccine adjuvants stimulate CD8 T cell, but not antibody responses, through a RIPK3-dependent pathway[J]. eLife, 2020, 9: e52687. DOI: 10.

7554/eLife.52687.

[14] KITAGAWA K, ODA T, SAITO H, *et al*. Development of oral cancer vaccine using recombinant *Bifidobacterium* displaying Wilms' tumor 1 protein[J]. Cancer Immunol Immunother, 2017, 66(6): 787-798. DOI: 10.1007/s00262-017-1984-0.

[15] NAKAGAWA N, HASHII Y, KAYAMA H, *et al*. An oral WT1 protein vaccine composed of WT1-anchored, genetically engineered *Bifidobacterium longum* allows for intestinal immunity in mice with acute myeloid leukemia[J]. Cancer Immunol Immunother, 2023, 72(1): 39-53. DOI: 10.1007/s00262-022-03214-4.

[16] FUJITA T, TERAMOTO K, OZAKI Y, *et al*. Inhibition of transforming growth factor-beta-mediated immunosuppression in tumor-draining lymph nodes augments antitumor responses by various immunologic cell types[J]. Cancer Res, 2009, 69(12): 5142-5150. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2499.

[17] JEANBART L, BALLESTER M, TITTA A D, *et al*. Enhancing efficacy of anticancer vaccines by targeted delivery to tumor-draining lymph nodes[J]. Cancer Immunol Res, 2014, 2(5): 436-447. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0019-T.

[18] PENAFUERTE C, NG S, BAUTISTA-LOPEZ N, *et al*. B effector cells activated by a chimeric protein consisting of IL-2 and the ectodomain of TGF-β receptor Ⅱ induce potent antitumor immunity[J]. Cancer Res, 2012, 72(5): 1210-1220. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1659.

[19] YUBA E, KONO Y, HARADA A, *et al*. The application of pH-sensitive polymer-lipids to antigen delivery for cancer immunotherapy[J]. Biomaterials, 2013, 34(22): 5711-5721. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.007.

[20] VADAKEKOLATHU J, MINDEN M D, HOOD T, *et al*. Immune landscapes predict chemotherapy resistance and immunotherapy response in acute myeloid leukemia[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(546): eaaz0463. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaz0463.

[21] REZVANI K. Peptide vaccine therapy for leukemia[J]. Int J Hematol, 2011, 93(3): 274-280. DOI: 10.1007/s12185-011-0781-3.

[22] WANG F. Identification of tumor antigens and immune subtypes of acute myeloid leukemia for mRNA vaccine development[J]. Clin Transl Oncol, 2023, 25(7): 2204-2223. DOI: 10.1007/s12094-023-03108-6.

[23] O'HAGAN D T, OTT G S, GREGORIO E D, *et al*. The mechanism of action of MF59—an innately attractive adjuvant formulation[J]. Vaccine, 2012, 30(29): 4341-4348. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.061.

[24] JIE J, LIU G M, FENG J Y, *et al*. MF59 promoted the combination of CpG ODN1826 and MUC1-MBP vaccine-induced antitumor activity involved in the enhancement of DC maturation by prolonging the local retention time of antigen and down-regulating of IL-6/STAT3[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10887. DOI: 10.3390/ijms231810887.

[25] SON M H, JUNG M Y, CHOI S, *et al*. IL-32γ induces chemotaxis of activated T cells via dendritic cell-derived CCL5[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(1): 30-35. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.052.

[26] LUO R, ONYSHCHENKO K, WANG L, *et al*. Necroptosis-dependent immunogenicity of cisplatin: implications for enhancing the radiation-induced abscopal effect[J]. Clin Cancer Res, 2023, 29(3): 667-683. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1591.

[27] O'HAGAN D T, FRIEDLAND L R, HANON E, *et al*. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines[J]. Curr Opin Immunol, 2017, 47: 93-102. DOI: 10.1016/j.coi.2017.07.010.

(**收稿**:2024-01-10;**修回**:2024-02-26)

(编辑 刘秋池)