

# 氟达拉滨联合瘤苗抗小鼠 RMA 淋巴瘤的实验

李翔<sup>1</sup>,高全立<sup>2</sup>,买玲<sup>3</sup>

Experiment of Anti-RMA Lymphoma of Mice by Fludarabine Peritoneal Injection Associated with Inactivated Lymphoma Vaccine

LI Xiang<sup>1</sup>,GAO Quan-li<sup>2</sup>,MAI Ling<sup>3</sup>

1. Department of Pathology and Pathophysiology, Basic Medical School of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Blood Department of Cancer Hospital of Henan Province, 3. Department of Scientific Research Outside Affair

Corresponding Authors:MAI Ling, E-mail:mailing5588134@yahoo.com.cn

**Abstract: Objective** To observe the anti-RMA lymphoma effect and mechanism by Fludarabine injection associated with inactivated lymphoma vaccine. **Methods** Use C57BL/6 mice as a target, Foxp3 genes in spleens were identified by Western blot, at the same time, the tumor growth and survival of the Fludarabine group and the control group were observed. **Results** Fludarabine could downregulate the expression of Foxp3 gene, and fludarabine associated with vaccine could not only inhibit the tumor growth but also improve survival of animals ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The experiment revealed that Fludarabine associated with vaccine can strengthen the ability to antagonize tumor, and prolong life span of tumor-bearing mice.

**Key words:** Fludarabine; Vaccine; Foxp3; Immunologic enhancement

**摘要:目的** 研究注射用化疗药物氟达拉滨(Fludarabine)联合瘤苗治疗小鼠 RMA 淋巴瘤的作用与机制。**方法** 以 C57BL/6 小鼠为研究对象,通过 Western blot 分析实验组与对照组小鼠脾脏组织中 Foxp3 基因的表达,并观察各组小鼠的肿瘤生长与生存期。**结果** 氟达拉滨组与对照组相比,能够下调 Foxp3 基因的表达。氟达拉滨联合瘤苗能有效抑制肿瘤的生长速度,并提高荷瘤小鼠的生存期,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 氟达拉滨联合瘤苗能够增强小鼠机体抵抗肿瘤的能力,并能够延长小鼠生存期。

**关键词:** 氟达拉滨;瘤苗;Foxp3;免疫增强作用

**中图分类号:**R733.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2010)05-0519-03

## 0 引言

氟达拉滨(Fludarabine, F-ara-A)是一种氟化腺嘌呤类似物,对分裂期和静止期的淋巴细胞都有选择性抑制作用<sup>[1]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞是一种具有免疫调节功能的细胞群,转录因子 Foxp3,是其最重要的细胞内标志<sup>[2-3]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞具有广泛的免疫抑制作用,它不仅能够抑制自身免疫性疾病的发生,而且可能参与诱导移植耐受以及肿

瘤免疫的调节。研究表明,多数肿瘤细胞中均发现 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞增加<sup>[4]</sup>。剔除 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞不仅能阻止原发性肿瘤的生长、加强肿瘤疫苗的免疫原性,同时还能增强新生肿瘤的治疗作用。基于氟达拉滨联合瘤苗在小鼠 RMA 淋巴瘤预防方面的研究<sup>[5]</sup>,本实验以 C57 BL/6 小鼠为研究对象,通过分析实验组与对照组 Foxp3 基因的表达并观察小鼠生存期和肿瘤生长情况,来研究氟达拉滨联合瘤苗在淋巴瘤治疗中的作用,并试图探讨它是否通过抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞来增强抗肿瘤能力,这种化学免疫疗法可为临床的肿瘤治疗提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6 小鼠:40 只,6~8 周龄,

收稿日期:2009-01-08;修回日期:2009-08-20

基金项目:河南省省属科研机构 2006 年度研究开发专项资金资助项目(0641130201)

作者单位:1. 450052 郑州大学基础医学院病理学与病理生理学系;2. 河南省肿瘤医院血液科,3. 科研外事科

通信作者:买玲, E-mail:mailing5588134@yahoo.com.cn

作者简介:李翔(1983-),女,博士,主要从事肿瘤病因、发病机制及生物治疗的研究

(20 ± 2)g, 雌性, 由北京大学动物实验中心提供。

1.1.2 肿瘤细胞株 C57BL/6 小鼠来源的 T 淋巴瘤 RMA 细胞株(H-2b), 由中国医学科学院肿瘤医院张叔人教授惠赠。

1.1.3 试剂 氟达拉滨购于拜耳医药保健有限公司广州分公司; 注射用盐酸多柔比星(阿霉素)购于浙江海正药业股份有限公司; 兔抗鼠 Foxp3 多克隆抗体和 β-actin 抗体购于 Santa Cruze 公司; 羊抗兔 IgG-HRP 购于博士德生物工程有限公司; RPMI1640 和胎牛血清购于 TBD 公司, 其他均为常用试剂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠淋巴瘤细胞株 RMA 生长在含 10%胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度下培养。接种时用培养液调整细胞浓度 2.5 × 10<sup>6</sup>/ml, 于每只小鼠右侧背部皮下接种 0.2 ml。

1.2.2 瘤苗制备 用培养液调小鼠 RMA 细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup>/ml, 阿霉素浓度为 25 μM, 培养箱中放置 24 h, PBS 冲洗 3 次, 接种时每只小鼠免疫 3 × 10<sup>6</sup> 个灭活的 RMA 淋巴瘤细胞, 双侧腋窝皮下各接种 0.1 ml。

1.2.3 动物分组及处理 先在 40 只小鼠右侧背部皮下接种小鼠 RMA 淋巴瘤细胞, 约 10 d 后在原接种部位长出直径约为 0.5 cm 的瘤块, 再随机分为四组: (1) 氟达拉滨组: C57 BL/6 荷瘤小鼠, 每只腹腔注射氟达拉滨 6 mg/kg, 3 天一次, 共 2 次; (2) 瘤苗组: C57 BL/6 荷瘤小鼠, 每只腋窝皮下接种灭活瘤苗 3 × 10<sup>6</sup> 个, 每周一次, 共 2 次; (3) 氟达拉滨联合瘤苗组: C57 BL/6 荷瘤小鼠, 每只腹腔注射氟达拉滨 6 mg/kg, 3 天一次, 共 2 次, 最后一次注射 3 天后, 每只腋窝皮下接种灭活瘤苗 3 × 10<sup>6</sup> 个, 每周一次, 共 2 次; (4) 0.9%氯化钠溶液组: C57 BL/6 荷瘤小鼠, 每次处理均使用 0.9%氯化钠溶液作为对照;

其中, 每组小鼠各处死 3 只, 取出脾脏, 用 Western blot 检测 Foxp3 基因的表达, 剩余各组小鼠观察肿瘤生长情况及死亡率。

1.2.4 Western blot 检测 Foxp3 基因的表达 用常规 Western blot 方法, 分别以兔抗鼠 Foxp3 多克隆抗体为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 经化学发光显色, 检测小鼠脾脏组织中 Foxp3 基因的表达。

1.2.5 观察肿瘤生长情况 肿瘤长出后, 每两天测一次瘤体大小, 并绘制出肿瘤生长趋势图。

1.2.6 观察小鼠死亡率 隔日观察并记录每组小鼠死亡数目, 并计算死亡率。

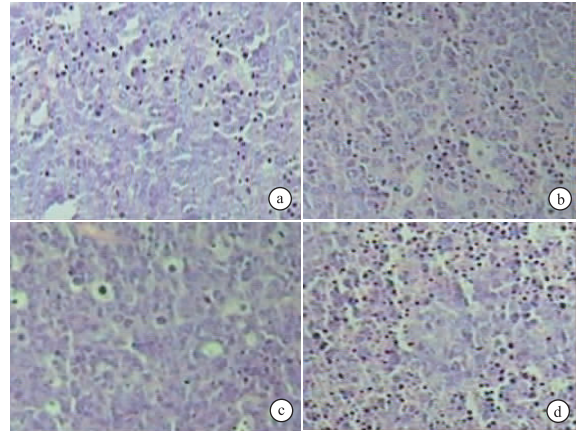
1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行方差分析, *t* 检验, 检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 肿瘤组织病理切片(HE 染色)结果

肿瘤细胞呈多形性, 核不规则或圆形, 染色质呈点状或泡状, 有多个核仁, 胞浆丰富浅染。四组切片均为 T 细胞淋巴瘤浸润, 各组之间无明显差异, 见图 1。



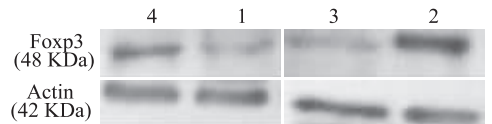
a: PBS(HE); b: Fludarabine(HE); c: Vaccine(HE); d: Fludarabine and Vaccine(HE)

图 1 各组肿瘤组织的病理切片结果

Figure 1 The pathological section result of the tumor tissue from each group

2.2 Western blot 分析结果

分别取氟达拉滨组和对照组小鼠脾脏组织, 用 Western blot 分析 Foxp3 基因的表达, 可见氟达拉滨组与对照组, 氟达拉滨联合瘤苗组与瘤苗组相比, Foxp3 基因表达下调, 两组间比较均有统计学差异 (P < 0.05), 见图 2。



1: Fludarabine; 2: Vaccine; 3: Fludarabine and Vaccine; 4: PBS

图 2 Western blot 分析 Foxp3 基因的表达

Figure 2 The expression of Foxp3 gene by Western blot

2.3 各实验组 C57 BL/6 小鼠体内成瘤情况

将小鼠 RMA 淋巴瘤细胞接种于 C57 BL/6 小鼠右侧背部皮下, 经 10 d 的成瘤潜伏期后, 在其接种部位形成肉眼可见的瘤块, 直径约为 0.5 cm。随着时间的增长, 肿瘤体积逐渐增大。氟达拉滨组、瘤苗组、氟达拉滨联合瘤苗组和对照组的肿瘤生长速度分别为每天 0.1、0.06、0.03、0.25 cm<sup>3</sup>。氟达拉滨

联合瘤苗组生长速度最慢,各组间比较均有统计学差异( $P < 0.05$ ),见图 3。

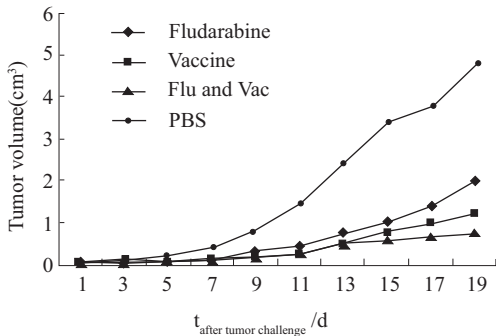


图 3 各组小鼠体内成瘤的生长曲线  
Figure 3 The growth curves of tumor tissue from different groups

### 2.4 各实验组 C57 BL/6 小鼠荷瘤后的平均生存率

在荷瘤后同时观察 C57 BL/6 小鼠的生存率。由图 4 可见,在荷瘤后 25 d,生理盐水组中开始出现小鼠死亡,并在荷瘤后的 30 d 内全部死完。而氟达拉滨组与瘤苗组均在 27 d 开始出现小鼠死亡,氟达拉滨联合瘤苗组在 30 d 开始出现,且死亡的速度明显降低。经析因分析,各组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

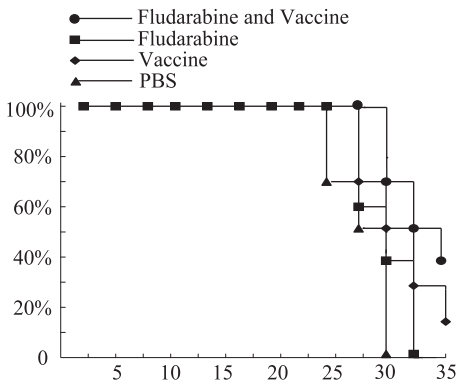


图 4 各组 C57 BL/6 小鼠荷瘤后的平均生存率  
Figure 4 The average survival rate of C57 BL/6 from different groups

### 3 讨论

在当前的治疗策略中,化学免疫治疗已成为新兴的研究热点。而在肿瘤化学免疫治疗方案的设计中,关键因素取决于是否能有效激发机体的抗肿瘤应答。氟达拉滨最早由 Montgonery 和 Henson 在 1969 年合成以来,有人注意到 F-ara-ATP 除了对肿瘤细胞有直接细胞毒作用之外,还可以通过干预免疫系统产生抗肿瘤作用,特别是在抗肿瘤过继性或主动免疫治疗疗效,即 F-ara-ATP 还可以作为免疫

增强剂来使用<sup>[6]</sup>。

Foxp3 基因的表达产物是 Scurfin 蛋白。Foxp3 缺陷的小鼠不能形成 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞,而且发生 Scurfy 小鼠样的炎性疾病,而转入正常的 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞可阻止炎性疾病的发生<sup>[7]</sup>。因此 Foxp3 可能是“天然的”CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞发育和功能的“掌控基因”。

Western blot 结果显示氟达拉滨能够下调 Foxp3 基因的表达,即减少 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的数量,有研究证实肿瘤环境中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比例增加,导致肿瘤免疫失调,去除这群细胞可有效诱导肿瘤免疫,此结果提示氟达拉滨可能通过抑制 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的数量而增强机体抗肿瘤能力。

从图表可看出,氟达拉滨联合瘤苗组小鼠的肿瘤生长速度最慢,生存期最长。其机制可能是氟达拉滨一方面的细胞毒性作用,另一方面下调了 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的数量,封闭其抑制抗机体肿瘤免疫应答的作用,在此基础上接种灭活瘤苗,增强机体抗肿瘤免疫应答,从而较好地抑制了肿瘤的生长。

综上所述,本实验较为成功地观察了氟达拉滨联合瘤苗治疗小鼠淋巴瘤的作用,并研究了其抗肿瘤机制,为临床肿瘤治疗提供了一个新的途径。

### 参考文献:

- [1] Gandhi V, Plunkett W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine[J]. Clin Pharmacokinet, 2002,41(2):93-103.
- [2] Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells [J]. Immunol Rev, 2006, 212(1): 86-98.
- [3] Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: thymus or periphery[J]. Clin Invest, 2003, 112(9):1310-1322.
- [4] Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance[J]. Immunol, 1999, 162(9): 5317-5326.
- [5] 柴晓菲,高全立,许林平,等. 氟达拉滨联合瘤苗抗肿瘤生物治疗作用的实验研究[J]. 中国医药生物技术, 2008, 3(6): 425-429.
- [6] Isrid Sturm, Joachim Oertel, Stephan Oertel, et al. Successful long-term monotherapy with rituximab in a patient with chronic lymphocytic leukemia of the B-cell-lineage: a case report [J]. J Med Case Reports, 2008,2:275.
- [7] Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells[J]. Microbes Infect, 2004, 6(8):745-751.