

靶向树突状细胞的结肠癌肿瘤疫苗的制备

宋政文, 赵智辉

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子与医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 目前, 由于肿瘤特异性抗原难预测以及这些新抗原能否通过激活性通路被抗原呈递细胞有效摄取等问题还未解决, 使得现有肿瘤疫苗的临床治疗并没有达到预期效果, 同时, 肿瘤细胞抗原的高度唾液酸化修饰会诱发机体产生抑制性免疫应答。因此, 本研究尝试利用链霉亲和素 (Streptavidin, SA) 与生物素 (Biotin) 之间几乎不可逆的非共价结合原理, 将生物素标记至肿瘤细胞抗原的唾液酸修饰位点, 然后与结合有 SA 的激活性内吞受体的配体进行交联来制备肿瘤疫苗。首先, 构建并表达能靶向树突状细胞 (Dendritic cells, DCs) 的重组蛋白 SA-mIgG1Fc。其次, 叠氮修饰的非天然糖通过代谢掺入途径标记 CT26.WT 结肠癌细胞抗原的糖基化修饰位点, 利用生物正交反应使肿瘤抗原的叠氮修饰位点共价缀合生物素, 获得生物素化广谱肿瘤抗原 (Biotinylated broad-spectrum tumor antigen, Biotin-TAg)。最后, 将 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 按最佳交联比进行交联, 从而获得结肠癌肿瘤疫苗, 并对其含有的特异性抗原进行检测。结果显示, 利用基因工程方法成功表达出 SA-mIgG1Fc, 并获得能与 SA 结合的 Biotin-TAg, 将 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 按最佳交联质量比为 1:48 进行交联, 从而制备出具有靶向性和稳定性的结肠癌肿瘤疫苗, 同时检测出制备的肿瘤疫苗中有特异性抗原胰岛素样生长因子 1 受体 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1R)。本研究在方法学上为研制新型肿瘤疫苗奠定了基础。

[关键词] 树突状细胞, 结肠癌, 肿瘤疫苗, 链霉亲和素, 生物素

[中图分类号] Q513 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2020)03-0112-08

Construction of a Colon Cancer Tumor Vaccine Targeting Dendritic Cells

Song Zhengwen, Zhao Zhihui

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products,
Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: At present, the issues of predication difficulty for tumor specificity antigens and the ability of these new antigens to be effectively taken up by antigen presenting cells have not been resolved, hence the expected clinical treatment of tumor vaccines has not been achieved, meanwhile, the highly sialylated modification of tumor cell antigens can induce a suppressive immune response in the body. Therefore, this study attempted to use the almost irreversible non-covalent binding principle between Streptavidin (SA) and biotin to cross-link the biotin to the sialic acid modification site of the tumor cell antigen and then to cross-link it with the ligands that bind the activated endocytic receptors of SA to prepare the tumor vaccine. Firstly, the recombinant protein SA-mIgG1Fc that targets dendritic cells (DCs) was constructed and expressed. Secondly, azide-modified unnatural sugars labelled CT26.WT colon cancer cell antigen glycosylation sites via metabolic incorporation pathway, then the biotinylated broad-spectrum tumor antigen (Biotin-TAg) was obtained by covalently conjugating biotin with the azide modification site of the tumor antigen using a biological orthogonal reaction. Finally, the colon cancer tumor vaccine was obtained by cross-linking SA-mIgG1Fc with Biotin-TAg at an optimal cross-linked ratio, and the specific antigen contained in which was detected. The results showed that the SA-mIgG1Fc was successfully expressed using genetic engineering methods, and Biotin-TAg capable of binding to SA was obtained, the targeted and stable colon cancer tumor vaccine was prepared by cross-linking SA-mIgG1Fc with Biotin-TAg at an optimal cross-linked mass ratio of 1:48, at the same time, the expression of the specific antigen insulin growth factor-1 receptor (IGF-1R) in the prepared tumor vaccine was detected. This study laid a foundation for the development of a novel tumor vaccine based on methodology.

Key words: dendritic cells, colon cancer, tumor vaccine, streptavidin, biotin

收稿日期: 2020-03-02.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273232).

通讯作者: 赵智辉, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤免疫治疗. E-mail: Zhaozhihui1964_@aliyun.com

结直肠癌(Colorectal cancer,CRC)是一种多病发于机体的直肠和结肠部位的恶性肿瘤,2018年,预估CRC的新发病例将有180多万,死亡人数约88.1万人,在全球恶性肿瘤排行榜中,其发病率位居第三位,死亡率位居第二位^[1-3]。手术、放疗和化疗可作为CRC的保守治疗手段,当前,需要新的免疫疗法和生物靶向治疗来提高结肠癌的生存率^[4-7]。但是,由于具有免疫原性的肿瘤新抗原的鉴定难度大、耗时、耗材以及这些新抗原能否通过激活受体通路被抗原呈递细胞有效摄取等问题还未得到有效解决,导致现有肿瘤疫苗的临床疗效并没有达到预期。DCs是机体内功能最强大的抗原呈递细胞,它能利用其表面的Fc γ 受体、C型凝集素受体等通过吞噬作用高效率获取并加工肿瘤抗原,从而呈递给初始T淋巴细胞,有效激活T细胞免疫应答,在诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫中发挥着核心作用^[8-9]。同时,免疫球蛋白G Fc γ 受体(Immunoglobulin G Fc γ receptor,IgG Fc γ R)是免疫效应细胞的表面分子,主要表达于DCs表面,这些分子通过抗体与抗原的交联,介导细胞内的信号级联反应,Fc γ RI是IgG高亲和力激活性受体,能激活机体产生有效的抗肿瘤免疫应答^[10-14]。目前,已有研究发现唾液酸化抗原能通过Ig型凝集素E受体被DCs吞噬,进而诱导调节性T细胞的从头合成,抑制效应T细胞的产生和功能,从而诱发机体产生抑制性免疫应答,形成肿瘤免疫耐受^[15]。另外,在前期研究中发现,利用抗原与抗体的结合原理,将生物素修饰的肿瘤抗原与抗生物素抗体进行交联,制备出的肿瘤疫苗的免疫效果并不明显,原因之一是由于两者的结合亲和力弱,导致制备的抗原与抗体的交联复合物不稳定,从而不能产生有效的抗肿瘤免疫应答,研究发现SA与生物素能发生快速且几乎不可逆的非共价结合,同时对机体没有明显的毒副作用^[16-19]。另外,SA-Biotin系统广泛用于偶联蛋白质、核酸和糖等生物活性物质^[20-21]。

因此,本研究通过构建重组质粒pcDNA3.1(+)/SA-mIgG1Fc,表达能靶向DCs表面激活性受体Fc γ RI的重组蛋白SA-mIgG1Fc,然后与Biotin-TAg进行稳定有效的交联,从而制备能靶向DCs且具有稳定性的结肠癌肿瘤疫苗。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ham's F-12K培养基购自英潍捷基贸易有限公司,抗生素(100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)、RPMI-1640培养基购自Wisent公司,Opti-MEM无血清培养基购自GIBCO公司,胎牛血清购自天津康源生物技术有限公司,0.25%胰蛋白酶购自碧云天公司,G418二硫酸盐购自Sigma公司,LipofectamineTM 2000、tetraacetylated N-Azidoacetyl-D-Mannosamine (Ac4ManNAz)、Click-iT DIBO-Biotin、蛋白marker购自Thermo Fisher公司,无水乙醇购自广东光华科技有限公司,蛋白酶抑制剂购自Bimake公司,Tris、Glycine购自南京博巧生物科技有限公司,HCl购自上海久亿化学试剂有限公司,NaOH购自西陇化工股份有限公司,0.05% Tween 20购自国药集团化学试剂有限公司,Protein G 4FF Chromatography Column购自上海翊圣生物科技有限公司,BCA试剂盒、FITC-Biotin、Protein A+G Beads、Goat IgG anti-Mouse IgG1 (Fc) antibody、Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)-HRP、Anti-Biotin-HRP-linked antibody、IGF-1R polyclonal antibody、Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP均购自Bioworld公司,质粒构建所需试剂均由Bioworld公司提供,RIPA Lysis Buffer、结合缓冲液由本实验室配制。

1.2 主要方法

1.2.1 细胞培养

小鼠CT26.WT结肠癌细胞株(购自中国科学院细胞库)在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下,用含10% FBS和抗生素(100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)的RMPI 1640完全培养液培养。

CHO K1细胞株(由江苏欧威医药有限公司惠赠)在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的条件下,使用含10% FBS和抗生素(100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)的Ham's F-12K完全培养液培养。

1.2.2 pcDNA3.1(+)/SA-mIgG1Fc的构建

从Uniprot和NCBI数据库中查询小鼠IgG1Fc和链霉菌属SA基因编码序列进行比对分析。选用合适的编码序列与Linker序列及分泌信号肽序列进行拼合,根据pcDNA3.1(+)表达载体克隆位点选择相应的酶切位点序列,设计PCR扩增引物,并在上下游引物的5'端分别引入Hind III (5'-CCCAAGCTT-3'),Xho I (5'-CCGCTCGAG-3')酶切位点。

上游引物:5'-CCCAAGCTTATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-3',

下游引物:5'-CCGCTCGAGTCATTTACCAGGAGACTGGGAGAGG-3'.

PCR 扩增含有酶切位点的 SA-mIgG1Fc 基因,将大小正确的条带进行割胶纯化回收,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定回收片段.将大小正确的回收产物和 pcDNA3.1(+)表达载体分别进行双酶切,T4 连接酶连接载体和目的基因片段,构建出的重组表达载体 pcDNA3.1(+)/SA-mIgG1Fc 进行转化 DH5 α 感受态细菌,涂布于氨苄平板上,37℃倒置培养过夜,挑取单克隆,经菌落 PCR, *Hind* III 和 *Xho* I 酶切验证,对阳性克隆菌进行提取质粒,送至公司测序,测序结果与目的基因片段序列进行比对,将测序正确的重组质粒命名为 pcDNA3.1(+)/SA-mIgG1Fc.

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳

称取 0.3 g 琼脂糖,加至含有 20 mL 1×TAE 电泳缓冲液的锥形瓶中,微波炉加热,使琼脂糖充分溶解,加入 1 μ L 核酸染料,将其轻轻倒入电泳凝胶板里,插上点样梳,待凝胶凝固后,将待测 DNA 样品、Marker 等按照预设的上样量和顺序进行上样,120 V 电泳 20 min,将电泳凝胶块放在凝胶成像仪中观察电泳结果.

1.2.4 SA-mIgG1Fc 的表达

按 DNA 质量与脂质体体积比 3 μ g:8 μ L,将 pcDNA3.1(+)/SA-mIgG1Fc 进行转染 CHO K1 细胞,转染培养 6 h 后,更换 Ham's F-12K 细胞培养液,继续培养至 48 h. 加入终浓度为 800 μ g/mL 的 G418 进行稳转细胞株的筛选,每间隔 2 d 进行一次细胞换液,进行为期 2 周的加压筛选,当 CHO K1 细胞数量由减少变为增多时,开始收集细胞培养上清液.

1.2.5 SA-mIgG1Fc 的纯化

收集能稳定并大量表达 SA-mIgG1Fc 的 CHO K1 细胞培养上清液,按上清液量加入 1/10 体积的 1 mmol/L Tris·HCl (pH 8.5) 缓冲液,调节样品液的 pH 值至偏碱性. 连接 Protein G 4FF Chromatography Column 预装柱和蠕动泵,依次进行上样、PBST 洗杂、Glycine-HCl 洗脱,将含有 SA-mIgG1Fc 的洗脱液进行 BCA 蛋白定量,置于液氮中速冻,放 -80℃ 冰箱保存.

1.2.6 SA-mIgG1Fc 与 FITC-Biotin 的结合

取 100 μ L Protein A+G Beads 于 0.5 mL EP 管,4℃、1000 rpm 离心 3 min. 弃上清,使用 200 μ L 1×PBS 缓冲液清洗 Protein A+G Beads 3 次,将其平分至 2 个 0.5 mL EP 管中,其中一管作为实验组,加入 32 μ g SA-mIgG1Fc,另一管作为空白对照组,向 2 个 0.5 mL EP 管中补加 1×PBS 缓冲液至体积为 100 μ L,室温、摇床孵育 2 h. 4℃、1000 rpm 离心 3 min,弃上清,使用 200 μ L 1×PBS 缓冲液清洗 3 次. 分别取 0.3 μ L FITC-Biotin (10 mmol/L) 与两管的 Protein A+G Beads 混合,向 2 个 0.5 mL EP 管中补加 1×PBS 缓冲液至体积为 100 μ L,避光、4℃孵育过夜. 使用 200 μ L 1×PBS 缓冲液清洗 Protein A+G Beads 3 次,100 μ L 1×PBS 缓冲液重悬 Protein A+G Beads,分别取 10 μ L Protein A+G Beads 重悬液加至 96 孔板中,荧光显微镜观察并采集图像.

1.2.7 生物素标记叠氮修饰的肿瘤抗原

收集对数生长期的 CT26.WT 结肠癌细胞并进行计数,按 3×10^6 个/mL 的细胞密度接种 10 cm 细胞培养皿,取 5.825 mL 细胞培养液于 15 mL 离心管中,加入 175 μ L 20 mmol/L Ac4ManNAz 充分混匀 (Ac4ManNAz 终浓度为 0.5 mmol/L),加至上述细胞培养皿中,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h. 然后进行细胞换液,弃细胞培养皿中的细胞培养液,加 6 mL 含 600 μ L 20 mmol/L Ac4ManNAz 的细胞培养液 (Ac4ManNAz 终浓度为 2 mmol/L),于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24 h.

待细胞长至约 90% 融合度时,向细胞培养皿中加 1 mL RIPA 强裂解液 (裂解液:蛋白酶抑制剂 = 100:1),冰上裂解 30 min,收集细胞裂解液,4℃、12 500 rpm 离心 20 min,收集上清液进行 99℃变性 6 min,冰上静置 5 min,加入 150 μ L 2 mmol/L Biotin-DIBO (15 μ L/10⁶ cells),充分混匀,室温、避光孵育 2 h. 最后进行 BCA 蛋白定量,按照细胞裂解液与冰乙醇的体积比为 1:10 进行冰乙醇沉淀蛋白,从而除去未反应的生物素,放置于 -80℃ 冰箱,静置过夜.

1.2.8 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 的最佳交联比

从 -80℃ 冰箱取出醇沉蛋白 Biotin-TAg,4℃、12 500 rpm 离心 15 min. 弃上清,冰乙醇清洗蛋白沉淀,置于冰上,待残留乙醇挥发干净. 使用一定量的结合缓冲液充分复溶 Biotin-TAg,然后进行 BCA 蛋白定

量. 将 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 按质量比为 1:12、1:24、1:48、1:96 进行充分混合, 4 ℃ 孵育过夜. 将每组蛋白混悬液分别重悬 Protein A+G Beads, 充分混匀, 4 ℃ 孵育 4 h. 4 ℃、1 000 rpm 离心 3 min, 收集孵育上清, 200 μ L 结合缓冲液重悬 Protein A+G Beads, 4 ℃、1 000 rpm 离心 3 min, 弃上清, 重复 2 次. 50 μ L 1 \times Loading buffer 重悬 Protein A+G Beads, 99 ℃ 煮样 5 min, 4 ℃、12 500 rpm 离心 3 min, 收集洗脱液, 进行免疫印迹检测, 由此确定 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 的最佳交联比.

1.2.9 结肠癌肿瘤疫苗中所含抗原 IGF-1R 的检测

将 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 按质量比为 1:12、1:24、1:48、1:96 进行交联, 步骤同 1.3.8, 免疫印迹检测肿瘤细胞表面糖基化修饰蛋白 IGF-1R 的表达.

1.2.10 免疫印迹

按配方配置 12% 分离胶和 4% 浓缩胶, 样品与 Loading buffer 按比例混合, 99 ℃ 煮样 5 min, 使蛋白充分变性, 4 ℃、12 500 rpm 离心 3 min, 吸取一定量的上清液进行上样, 在电压 85 V 条件下电泳, 待蛋白 Marker 分开后调电压至 135 V 继续电泳, 直至溴酚蓝到达胶的底部. 制作转膜三明治, 在冰浴恒流条件下 100 V 电泳 120 min. 转膜结束后, 将 PVDF 膜浸泡于封闭液中 (5% 脱脂奶粉, TBS 配制), 室温封闭 2 h 后, 敷一抗, 4 ℃ 孵育过夜, 加入荧光二抗, 室温避光孵育 1 h, 在 PVDF 膜表面滴加 ECL 显色液, 使用 Tanon 5200 Multi 多功能成像系统扫描拍照.

1.2.11 统计学分析

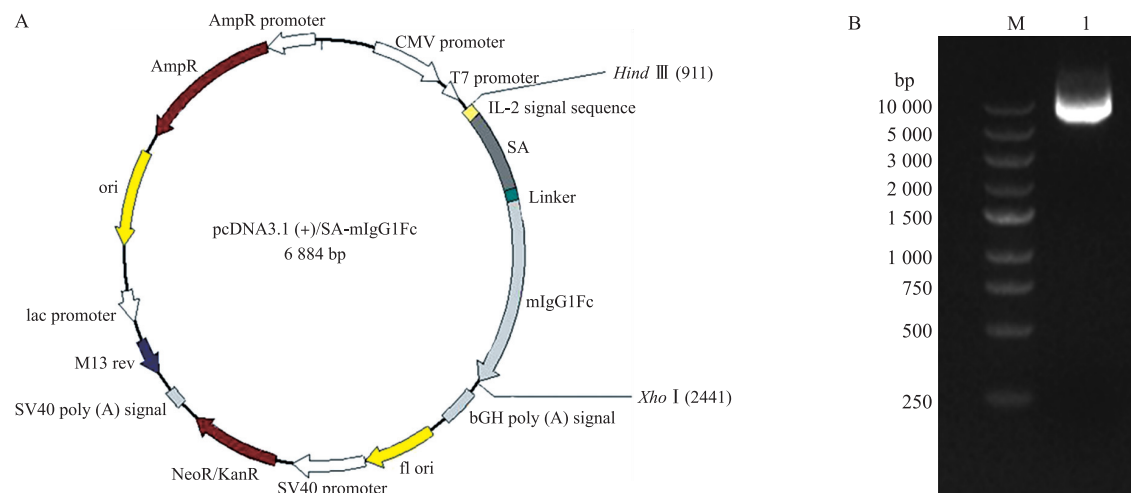
实验数据采用平均值 \pm 标准误 (means \pm SEM) 来表示, 数据间的显著性差异用 one-way ANOVA 或 *t* 检验. 图由 GraphPad Prism 完成, 实验均独立重复 3 次或以上, 当 $P < 0.05$, * 表示具有统计学显著性差异, n.s. 表示无显著差异.

2 结果与讨论

2.1 SA-mIgG1Fc 的表达、纯化与鉴定

将目的基因 SA-mIgG1Fc 克隆到 pcDNA3.1 (+) 表达载体上, 构建重组表达载体 pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc, 上、下游酶切位点分别为 *Hind* III 和 *Xho* I, 表达图谱如图 1-A 所示. 构建出的重组表达载体 pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc 转化 DH5 α 感受态细菌, 提取质粒后送至公司测序, 同时, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示约在 7000 bp 处有目的条带 (图 1-B), 与构建的重组质粒图谱的大小一致, 从而证明已成功构建并表达出重组质粒 pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc.

NEO 基因是对氨基糖苷类抗生素的抗性基因, 若重组质粒中含有 *NEO* 基因时, 细胞表达该基因时可以使灭活氨基糖苷类抗生素, 从而使细胞存活下来. 因此, pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc 转染 CHO K1 细胞



A: 重组表达载体 pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc 图谱; B: pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc 的琼脂糖凝胶电泳图, M: DL15000 DNA Marker; I: pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc.

图 1 pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc 的构建与表达

Fig. 1 Construction and expression of pcDNA3.1 (+)/SA-mIgG1Fc

48 h 时,使用氨基糖苷类抗生素 G418 进行筛选能稳定高表达重组蛋白 SA-mIgG1Fc 的 CHO K1 细胞系. 经过两周的加压筛选,收集细胞培养上清液,使用 1 mL Protein G 4FF Chromatography Column 纯化浓缩 SA-mIgG1Fc. 结果如图 2 所示,收集的 SA-mIgG1Fc 洗脱液中有目的条带,分子量约为 75 kDa,同时,收集的管 3 和管 4 中含 SA-mIgG1Fc 的洗脱液浓度达到 1 mg/mL,将其置于液氮中速冻,放-80 ℃冰箱保存备用.

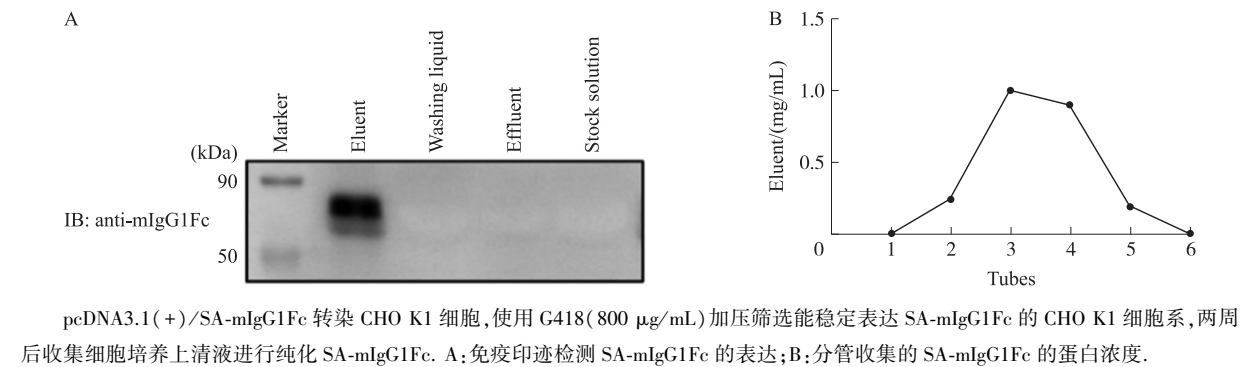
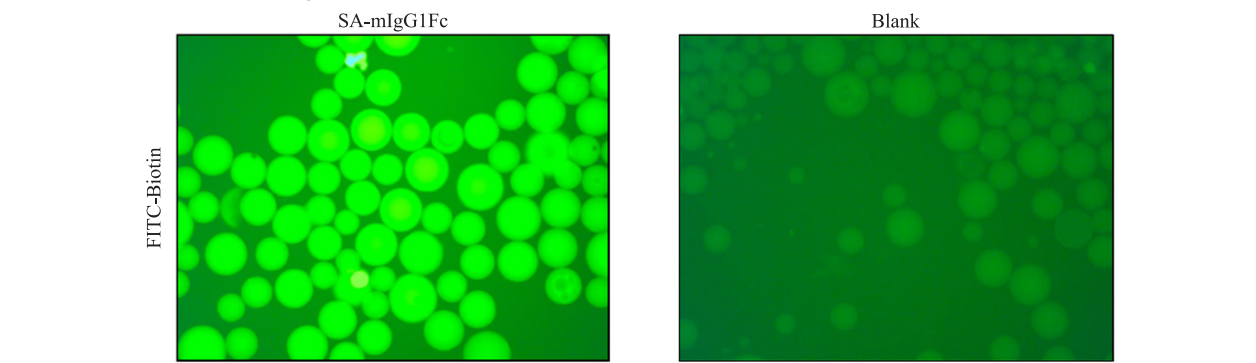


图 2 SA-mIgG1Fc 的纯化
Fig. 2 Purification of SA-mIgG1Fc

为了鉴定纯化收集的 SA-mIgG1Fc 是否能与生物素结合,使用 Protein A+G Beads 负载 SA-mIgG1Fc,再与 FITC-Biotin 共孵育,荧光检测 SA-mIgG1Fc 与生物素的交联情况. 结果如图 3 所示,相比较于空白对照组,实验组中有较强荧光,说明结合有 Protein A+G Beads 的 SA-mIgG1Fc 成功与 FITC-Biotin 进行交联,即证明纯化收集的 SA-mIgG1Fc 能与生物素结合.

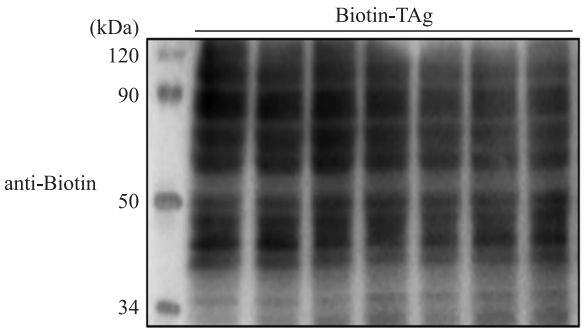


取两组等量的 Protein A+G Beads,其中一组 Protein A+G Beads 与 SA-mIgG1Fc 在室温条件下孵育 2 h,然后再与 FITC-Biotin (10 mmol/L)避光孵育过夜. 另一组 Protein A+G Beads 只与 FITC-Biotin(10 mmol/L)避光孵育过夜. 荧光显微镜观察两组的荧光强度.

图 3 SA-mIgG1Fc 与 FITC-Biotin 的结合
Fig. 3 The binding of SA-mIgG1Fc with FITC-Biotin

2.2 生物素标记叠氮修饰的肿瘤抗原

叠氮修饰的非天然糖可以通过细胞糖代谢途径掺入到肿瘤细胞表面的唾液酸修饰位点,利用叠氮与结合生物素的炔烃进行生物正交反应的原理获得 Biotin-TAg. 另外,在本实验室的前期研究中,已经证明使用终浓度为 0.5 mmol/L Ac4ManNAz 与 CT26.WT 细胞共培养 24 h,继而使用终浓度为 2 mmol/L Ac4ManNAz 与其共培养 24 h,收集叠氮修饰的非天然糖代谢掺入的肿瘤细胞蛋白,与 2 mmol/L Biotin-DIBO (15 μL/10⁶ cells)进行生物正交反应可获得 Biotin-TAg,免疫印迹检测肿瘤抗原被生物素标记的情况. 结果如图 4 所示,肿瘤抗原中有明显的目的条带,Biotin-DIBO 能够标记上有叠氮修饰位点的肿瘤抗原,说明生物素能高效地标记广谱肿瘤抗原.

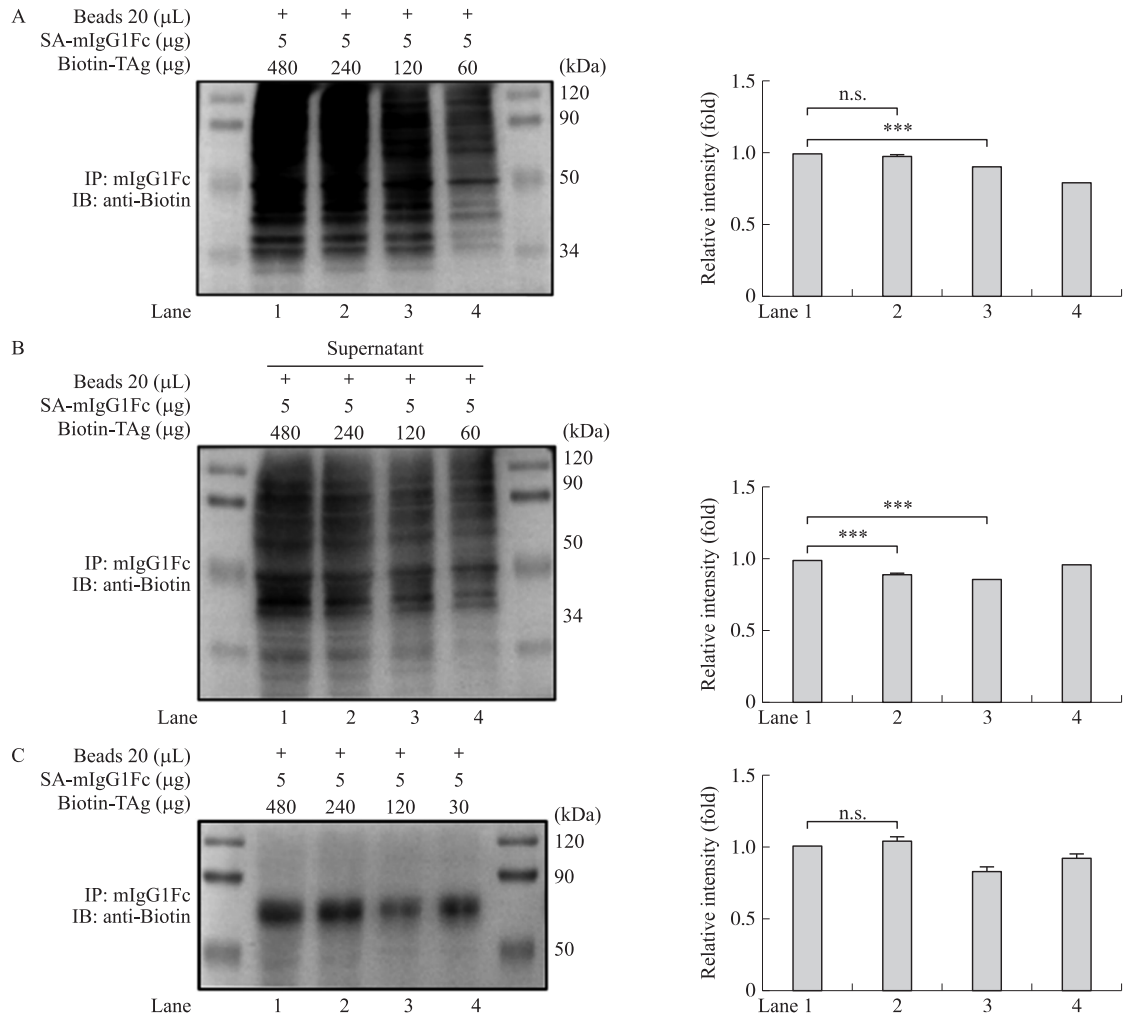


将 Ac4ManNAz 代谢掺入的 CT26.WT 细胞裂解液进行高温变性,再与 Biotin-DIBO(2 mmol/L)进行充分混合,室温、避光孵育 2 h,免疫印迹检测肿瘤抗原被生物素标记的情况.

图 4 生物素化广谱肿瘤抗原
Fig. 4 Biotinylated broad-spectrum tumor antigen

2.3 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 的最佳交联比

为了尽可能多的获得 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 的交联复合物,接下来需要确定两者结合的最佳交联质量比. 将 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 按质量比为 1:12、1:24、1:48、1:96 进行交联,使用足够量的 Protein A+G Beads 进行负载交联复合物,收集 Protein A+G Beads 的孵育上清液和洗脱下来的 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg,免疫印迹确定两者结合的最佳交联比. 结果如图 5 所示,从图 A 可以看出,在 Protein A+G Beads 负载的 Biotin-TAg 中,随着 Biotin-TAg 使用量的增加,交联复合物中含有的 Biotin-TAg 的量也在增加,当 Biotin-TAg 的使用量为 240 μg 和 480 μg 时,获得的交联复合物中含有的 Biotin-TAg 的量无显著差异,说明 240 μg Biotin-TAg 与 5 μg SA-mIgG1Fc 进行交联时已达到饱和状态. 在 Protein A+G Beads 的孵育上清液中(图 B)可以看出,当 Biotin-TAg 的使用量为 240 μg 和 480 μg 时,随着 Biotin-TAg 的增加,上清液中剩余的 Biotin-TAg 的量也在增加,呈现显著性差异,此时也说明 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 的交联已达到饱和状态,上清液中有 Biotin-TAg 的剩余. 在 Protein A+G Beads 负载的 SA-mIgG1Fc 中(图 C)可以看出,240 μg 和 480 μg Biotin-TAg 分别与 5 μg SA-mIgG1Fc 进行交联时,在获得的交联复合物中 SA-mIgG1Fc 的量无显著差异,进一步说明 240 μg Biotin-TAg 与 5 μg SA-mIgG1Fc 的交联已达到饱和状态. 因此,在尽可能多的获得交联复合物的同时,避免 SA-mIgG1Fc 过量,选择 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 的最佳交联质量比为 1:48 进行制备 SA-mIgG1Fc-Biotin-TAg 交联复合物.



取 4 组等量的 SA-mIgG1Fc,分别与不等量的 Biotin-TAg 进行交联,然后负载 Protein A+G Beads,收集 Protein A+G Beads 的孵育上清液和洗脱液. A:免疫印迹检测 Protein A+G Beads 负载的 Biotin-TAg 以及相应的灰度分析;B:免疫印迹检测 Protein A+G Beads 的孵育上清液中剩余的 Biotin-TAg 以及相应的灰度分析;C:免疫印迹检测 Protein A+G Beads 负载的 SA-mIgG1Fc 以及相应的灰度分析. 实验重复 3 次,*** $p<0.001$,n.s.:无显著差异.

图 5 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 的最佳交联比

Fig. 5 Optimal cross-linking ratio of SA-mIgG1Fc with Biotin-TAg

2.4 结肠癌肿瘤疫苗中 IGF-1R 的表达

在获得 SA-mIgG1Fc-Biotin-TAg 交联复合物后,需要进一步探究交联复合物中含有的特异性抗原. IGF-1R 即胰岛素样生长因子 1 受体,是一种糖蛋白跨膜受体,在结肠癌中表达异常,通过查找 UniProt 数据库,发现其含有多个糖基化修饰的氨基酸位点. 因此,通过免疫印迹检测制备的肿瘤疫苗中是否含有特异性抗原 IGF-1R 的表达. 结果如图 6 所示,Biotin-TAg 与 SA-mIgG1Fc 按不同的交联质量比进行交联时,所得的交联复合物中均含有目的蛋白 IGF-1R 的条带,分子量为 90 kDa,由此说明制备的肿瘤疫苗中含有特异性抗原 IGF-1R.

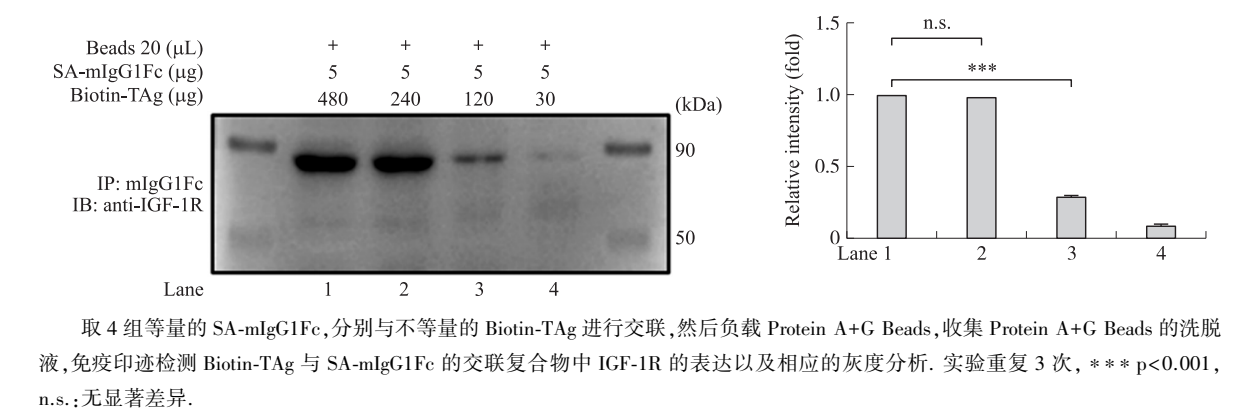


图 6 结肠癌肿瘤疫苗中 IGF-1R 的表达
Fig. 6 The expression of IGF-1R in the colon cancer tumor vaccine

3 结论

肿瘤免疫治疗是通过激发或调动机体免疫系统的免疫监视和免疫应答功能,增强肿瘤微环境的抗肿瘤免疫力来抵抗和清除肿瘤细胞,其毒副作用小、持久性高和特异性强,是目前除手术、放疗和化疗之外的最重要的抗肿瘤手段^[22-24]. 2014 年,Pham 等研究发现小鼠免疫接种 mAb-inactivated *F. tularensis* (mAb-iFt) 复合物,通过靶向小鼠骨髓 DCs 上的 FcγRI 可以增强小鼠的免疫应答,有效抵抗 Ft 的攻击^[11,25]. 因此,肿瘤抗原通过靶向 DCs 表面的激活性受体 FcγRI 途径是一条有效的基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗手段. 在本研究中利用基因工程方法成功构建并表达出能靶向 FcγRI 的重组蛋白 SA-mIgG1Fc. 同时,为了解决鉴定肿瘤新抗原的难度大、耗材等问题,将使用广谱肿瘤抗原通过激活性受体内吞途径递送给抗原呈递细胞,可以将多种抗原表位提供给 DCs 识别,有利于更大范围地激活机体产生更强的 T 细胞免疫应答. 另外,Ac4ManNAz 通过代谢掺入标记 CT26.WT 结肠癌细胞抗原的糖基化修饰位点,在肿瘤抗原的叠氮修饰位点进一步共价缀合生物素,封闭肿瘤抗原上丰富的唾液酸位点,阻止肿瘤抗原与结合唾液酸的 Ig 型凝集素受体的相互作用,避免产生肿瘤免疫耐受. 根据 SA 与生物素能进行快速且几乎不可逆的非共价结合,将 SA-mIgG1Fc 与 Biotin-TAg 按最佳交联质量比为 1:48 进行交联,从而获得能特异性靶向 DCs 且具有稳定性的结肠癌肿瘤疫苗,同时,检测出制备的肿瘤疫苗中有特异性抗原 IGF-1R 的表达.

为了评估制备出的靶向 DCs 的结肠癌肿瘤疫苗的免疫效果,需要进行细胞实验和动物实验的检测. 在细胞水平,检测肿瘤抗原对 DCs 表面分子表达的影响,体外负载肿瘤抗原的 DCs 对淋巴细胞的激活作用以及刺激产生的细胞毒性 T 淋巴细胞对 CT26.WT 肿瘤细胞的杀伤作用. 在动物水平,检测肿瘤疫苗对结肠癌小鼠模型的治疗效应以及预防效应. 总之,本研究为肿瘤免疫治疗的疫苗制备提供了新的方法和新的研究理论,同时,为下一步的细胞学实验和动物学实验奠定了基础.

[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: a cancer journal for clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, — 118 —

- 66(2):115-132.
- [3] FENG R M,ZONG Y N,CAO S M,et al. Current cancer situation in China:good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer communications,2019,39(1):22.
- [4] YAGHOUBI N,SOLTANI A,GHAZVINI K,et al. PD-1/PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer[J]. Biomedicine & pharmacotherapy,2019,110:312-318.
- [5] XIAO Y,FREEMAN G J. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy[J]. Cancer discovery,2015,5(1):16-18.
- [6] GUAN Q,MA Y,HILLMAN C L,et al. Development of recombinant vaccines against IL-12/IL-23 p40 and *in vivo* evaluation of their effects in the downregulation of intestinal inflammation in murine colitis[J]. Vaccine,2009,27(50):7096-7104.
- [7] HANZEL J,D' HAENS G R. Anti-interleukin-23 agents for the treatment of ulcerative colitis[J]. Expert opinion on biological therapy,2019:1-8.
- [8] BENVENUTI F. The dendritic cell synapse:a life dedicated to T cell activation[J]. Frontiers in immunology,2016,7:1-5.
- [9] KADOWAKI N. Dendritic cells:a conductor of T cell differentiation[J]. Allergy international:official journal of the Japanese Society of Allergy,2007,56(3):193-199.
- [10] SIEGEL R L,MILLER K D,JEMAL A. Cancer statistics,2018[J]. CA:A cancer journal for clinicians,2018,68(1):7-30.
- [11] GIL M,BIENIASZ M,WIERZBICKI A,et al. Targeting a mimotope vaccine to activating Fcγ receptors empowers dendritic cells to prime specific CD8⁺T cell responses in tumor-bearing mice[J]. Journal of immunology,2009,183(10):6808-6818.
- [12] SEDLIK C,ORBACH D,VERON P,et al. A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation[J]. Journal of immunology,2003,170(2):846-852.
- [13] BOURNAZOS S,RAVETCH J V. Diversification of IgG effector functions[J]. International immunology,2017,29(7):303-310.
- [14] CZECH B,HANNON G J. Small RNA sorting:matchmaking for argonautes[J]. Nature reviews genetics,2011,12(1):19-31.
- [15] PERDICCHIO M,ILARREGUI J M,VERSTEGE M I,et al. Sialic acid-modified antigens impose tolerance via inhibition of T-cell proliferation and de novo induction of regulatory T cells[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America,2016,113(12):3329-3334.
- [16] CHEN W,ZHENG R,BAADE P D,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA:A cancer journal for clinicians,2016,66(2):115-132.
- [17] BAI L,HU Z,WANG F,et al. Generation of streptavidin-tagged human-granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion proteins[J]. Journal of Southern Medical University,2012,32(10):1389-1393.
- [18] NING X,GUO J,WOLFERT M A,et al. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions[J]. Angewandte chemie,2008,47(12):2253-2255.
- [19] SANO T,CANTOR C R. Streptavidin-containing chimeric proteins:design and production[J]. Methods in enzymology,2000,326:305-311.
- [20] KAWAMATA T,TOMARI Y. Making RISC[J]. Trends in biochemical sciences,2010,35(7):368-376.
- [21] NAKAMURA M,MIE M,FUNABASHI H,et al. Construction of streptavidin-luciferase fusion protein for ATP sensing with fixed form[J]. Biotechnology letters,2004,26(13):1061-1066.
- [22] SABADO R L,BALAN S,BHARDWAJ N. Dendritic cell-based immunotherapy[J]. Cell research,2017,27(1):74-95.
- [23] SHINDE P,MELINKERI S,SANTRA M K,et al. Autologous hematopoietic stem cells are a preferred source to generate dendritic cells for immunotherapy in multiple myeloma patients[J]. Frontiers in immunology,2019,10:1079.
- [24] DRAUBE A,KLEIN G N,MATTHEUS S,et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer:a systematic review and meta-analysis[J]. PloS one,2011,6(4):e18801.
- [25] PHAM G H,IGLESIAS B V,GOSSELIN E J. Fc receptor-targeting of immunogen as a strategy for enhanced antigen loading, vaccination, and protection using intranasally administered antigen-pulsed dendritic cells[J]. Vaccine,2014,32(40):5212-5220.

[责任编辑:黄 敏]