

# 个性化结直肠癌肿瘤疫苗的制备

盛 慧, 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, 由于存在肿瘤特异性新抗原难鉴定以及无法将广谱肿瘤抗原通过激活性内吞受体途径递送给抗原提呈细胞等制约因素, 使得肿瘤疫苗的临床疗效不佳, 同时, 肿瘤细胞表面抗原的高度唾液酸化修饰会导致免疫耐受。所以, 本研究尝试利用糖代谢掺入, 使肿瘤抗原的唾液酸位点标记上正交基团-叠氮( $-N_3$ ), 同时将特定的激活性吞噬受体的配体标记上另一正交基团-炔烃, 通过生物正交反应, 制备肿瘤疫苗。首先, 利用分子生物学手段构建了重组质粒, 再利用真核系统表达能靶向树突状细胞(dendritic cells, DCs)的重组蛋白 mlgG1Fc。接着, 用含正交基团的化合物修饰吞噬受体的配体。再者, 通过代谢掺入途径将叠氮修饰的非天然糖标记到 CT26.WT 小鼠结直肠癌细胞抗原的糖基化修饰位点, 制备  $N_3$ -TA<sub>g</sub>。最后, 通过无铜点击反应将吞噬受体的配体与广谱肿瘤抗原缀合, 制备个性化结直肠癌肿瘤疫苗。结果证明, 已成功利用真核系统表达出 mlgG1Fc 蛋白, 并获得 DIBO 修饰的 mlgG1Fc 蛋白, 将 mlgG1Fc-DIBO 与  $N_3$ -TA<sub>g</sub> 缀合, 制备出个性化且靶向性 DCs 的结直肠癌肿瘤疫苗。本研究在理论方法上为制备新型肿瘤疫苗提供了指导意义。

**[关键词]** 结直肠癌, 肿瘤疫苗, 生物正交反应, 树突状细胞

**[中图分类号]** R735.3+7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2022)01-0074-07

## Preparation of Personalized Colorectal Cancer Tumor Vaccine

Sheng Hui, 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, due to the difficulty of identifying tumor-specific antigens and the inability to deliver broad-spectrum tumor antigens to antigen-presenting cells through the activating endocytic receptor pathway, the clinical therapeutic effect of existing tumor vaccines is not good. Meanwhile, the tumor cell antigens with highly sialylated modification can lead to immune tolerance. Therefore, this study tried to use metabolic incorporation to label the sialic acid of the tumor antigen with an orthogonal group-azide( $-N_3$ ), and at the same time label the ligand of a specific activating phagocytic receptor with another orthogonal group-Alkynes, through bio-orthogonal reactions to prepare tumor vaccines. Firstly, construct and express the recombinant protein mlgG1Fc that can target dendritic cells(DCs), and then modify the ligands of the phagocytic receptor with compounds containing orthogonal groups. Secondly, the azide-modified unnatural sugars are used to label the glycosylation modification sites of CT26.WT colon cancer cell antigen through metabolic incorporation to prepare  $N_3$ -TA<sub>g</sub>. Finally, the phagocytic receptor ligand is conjugated with a broad-spectrum tumor antigen through a copper-free click reaction to obtain a colorectal cancer tumor vaccine. The results proved that the use of genetic engineering methods to successfully express the mlgG1Fc protein, and obtain the DIBO-modified mlgG1Fc protein, and conjugate mlgG1Fc-DIBO with  $N_3$ -TA<sub>g</sub> to prepare a targeted and stable colorectal cancer tumor vaccine. The research has laid the foundation for the preparation of new tumor vaccines in methodology.

**Key words:** colorectal cancer, tumor vaccine, bioorthogonal reaction, dendritic cells

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)作为一种常见的消化道恶性肿瘤之一, 根据 2018 年中国癌症统计的结果显示, 中国结直肠癌发病数占全球 24.3%, 死亡数占全球 22.9%, 并呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。由于临床表

收稿日期: 2020-12-29.

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

现不典型,多数结直肠癌患者在初诊时已经发展为局部晚期或晚期,导致治愈率和生存率较低<sup>[2-3]</sup>,目前的主要治疗手段并不能使大多数患者显著获益<sup>[4-5]</sup>。伴随免疫学和肿瘤学发展,肿瘤免疫疗法已成为治疗癌症的新趋势,主要有癌症疫苗、细胞疗法、细胞因子和免疫检查点抑制剂治疗<sup>[6-8]</sup>。肿瘤疫苗具有副作用少、抗肿瘤特异性强等诸多特点,在预防肿瘤复发方面也具有优势<sup>[9-11]</sup>。开发治疗性肿瘤疫苗的关键是确定抗原,理想的抗原应具有较强肿瘤特异性的新抗原,能够诱导机体产生较强的抗肿瘤 T 细胞反应。但是,由于鉴定具有免疫原性的肿瘤新抗原以及相应的肿瘤疫苗研制周期和成本等问题,很难造福晚期肿瘤患者<sup>[12]</sup>。DCs 是自然界中已发现的功能最强大的抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APC),也是唯一能够活化初始型 T 细胞的 APC,其表面分子能够处理提呈肿瘤细胞,分泌多种细胞因子,是特异性免疫应答反应的始动者<sup>[13-14]</sup>。同时,细胞表面的免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) Fc $\gamma$  受体 (Fc gamma receptors, Fc $\gamma$ Rs) 通过介导抗原-抗体免疫复合物与免疫细胞及其他细胞间的相互作用,引起多种免疫应答<sup>[15-16]</sup>。肿瘤细胞膜上糖链的高度唾液酸化修饰会使得肿瘤细胞黏附、侵袭、迁移等多种功能发生变化<sup>[17-19]</sup>。另外,利用生物正交反应将两种可以发生特异性反应的化学基团分别修饰待缀合的分子,两种标记后的分子可以在接近生理条件下通过正交基团共价结合<sup>[20-22]</sup>。从研究策略上,将特定的激活性吞噬受体的配体和广谱肿瘤抗原直接缀合。

基于此,本研究课题通过构建重组表达载体 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker,表达出可以靶向 DCs 表面激活性吞噬受体 Fc $\gamma$ RI 的融合蛋白 mlgG1Fc,接着,进行化学修饰,使其标记上炔烃,再 N3-TAg 进行点击反应,制备出个性化且可以靶向 DCs 的结直肠癌肿瘤疫苗。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

F-12K 培养基、Opti-MEM 培养基购自 Gibco, 抗生素 (Penicillin-Streptomycin Mixed solution (100 $\times$ )) 购自北京博奥森生物科技公司, RPMI Medium Modified 培养基购自 Hyclone 公司, 胎牛血清购自康源生物, 0.25% 细胞胰酶消化液购自碧云天公司, 蛋白 Marker 购自南京思科捷公司, Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, 蛋白酶抑制剂购自 Bimake 公司, Protein G 4ff chromatography column 购自翊圣生物, BCA 试剂盒、Protein A+G beads、Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)-HRP、IGF-1R Polyclonal Antibody、Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP 均购自南京 Bioworld 公司, Goat IgG anti-Mouse IgG1 (Fc) antibody 购自德国 Dianova 公司, Click-iT<sup>®</sup> DIBO-amine、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Azide (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 5-Carboxamido-(6-Azidohexanyl), Bis (Triethyl ammonium Salt)), 5-isomer 购自 Thermo fisher, 构建质粒所需试剂均由南京 Bioworld 提供, 结合缓冲液、RIPA 裂解液均由本实验室配制, tetraacetylated N-Azidoacetyl-D-Mannosamine (Ac4ManNAz) 由北京大学药学院李中军教授课题组合成。

### 1.2 主要方法

#### 1.2.1 细胞培养

小鼠 CT26.WT 结直肠癌细胞株 (购自武汉普若赛) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10%FBS 和 1 $\times$  抗生素的 RPMI Medium Modified 培养基常规培养。

CHO-K1 细胞株 (购自上海中国科学院细胞库) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10%FBS 和 1 $\times$  抗生素的 F-12K 培养基常规培养。

#### 1.2.2 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 的构建

从 Uniprot 和 NCBI 数据库调取小鼠 IgG1Fc 基因编码序列和蛋白序列, 进行比对分析。选用编码序列与 Linker 序列以及信号肽序列进行拼接, 同时在拼接片段两端加上与表达载体克隆位点相应的酶切位点序列 (包含保护碱基), 设计一对含 *Kpn* I (5'-GGTACC-3'), *Eco*R I (5'-GAATTC-3') 酶切位点的 PCR 引物, 用以亚克隆 mlgG1Fc-linker 基因序列。

上游引物: 5'-AAACGACACCCCATCTGTC-3',

下游引物: 5'-ATGCTGAGCACATCCTTGGG-3'。

PCR 扩增含酶切位点的 mlgG1Fc-linker 基因, 将正确大小的目的条带割胶后进行纯化回收, 通过琼脂糖凝胶电泳实验来鉴定回收片段。将正确大小的回收产物和 pcDNA3.1 (+) 表达载体进行双酶切反应,

T4 连接酶连接 pcDNA3.1 载体及目的片段. 将已构建的重组表达载体 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌,涂布于含抗生素的 LB 板子上,于 37 ℃ 振荡摇床上培养 12 h,用枪头挑取单克隆菌落,经小提后的质粒送至公司测序,测序结果与设计的目的基因片段进行序列比对分析,将构建的重组表达载体命名为 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker.

### 1.2.3 琼脂糖凝胶电泳

称取 0.2 g 琼脂糖于锥形瓶中,加入 20 mL 1×TAE 电泳缓冲液,放置微波炉里加热煮沸,共 3 次,再加入 1  $\mu$ L 核酸染料,将缓冲液转移至凝胶板中,装上梳子,凝固后,将质粒 DNA 样品、DNA Marker 按照合适的顺序进行上样,125 V 电泳 25 min,将电泳结束后的凝胶置于成像仪中观察实验结果.

### 1.2.4 mlgG1Fc-linker 的表达

按 DNA 质量与 Lipo2000 体积比 9  $\mu$ g:20  $\mu$ L,将 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 转染 CHOK1 细胞,转染培养 6 h 后,更换新鲜的 F-12K 完全培养基,分时段收集细胞培养上清液,加入 1/100 体积的蛋白酶抑制剂,保存于-80 ℃ 冰箱中.

### 1.2.5 mlgG1Fc-linker 的纯化

收集一定量表达 mlgG1Fc 的 CHOK1 细胞培养液上清,按上清液量加入 1/10 体积的 1 mmol/L Tris-HCl(pH 8.5)的缓冲液,调节样品 pH 值至偏碱性. 连接蠕动泵和 Protein G 4FF Chromatography Column 预装柱,依次进行上样、PBST 洗杂、Glycine-HCl 洗脱、中和液中和,将含有目的蛋白 mlgG1Fc 的洗脱液进行 BCA 定量后,保存于-80 ℃ 冰箱中.

### 1.2.6 在固相系统中完成对 mlgG1Fc 化学标记

取 80  $\mu$ L Protein A+G beads 于 0.6 mL EP 管中,4 ℃,2 000 rpm 离心 3 min. 将其均分至 2 个 0.6 mL EP 管中,一管作为实验组,加入 50  $\mu$ g mlgG1Fc 蛋白;另外一管作为对照组,4 ℃ 振荡孵育 4 h. 弃上清,200  $\mu$ L 活化缓冲液清洗 Protein A+G beads 2 次,加入活化缓冲液 400  $\mu$ L,4 ℃,振荡孵育 2 h. 离心,保留少量液体,并定量. 取出 EDAC 和 NHSS 储备液,室温融化,涡匀. 吸 2  $\mu$ L EDAC 和 2  $\mu$ L NHSS 加到上述 0.6 mL EP 管中,补加活化缓冲液至液体终体积 100  $\mu$ L(EDAC 终浓度为 2 mmol/L,NHSS 终浓度为 5 mmol/L),涡旋混匀,置于冰上活化 1 h. 向上述 100  $\mu$ L 溶液中加入 200  $\mu$ L 偶联缓冲液,振荡,4 ℃,2 000 rpm 离心 3 min,重复 3 次. 加入偶联缓冲液 400  $\mu$ L,4 ℃,振荡孵育 2 h. 4 ℃,2 000 rpm 离心 3 min,保留液体,并定量. 加入 3  $\mu$ L Click-iT<sup>®</sup> DIBO-amine,补加偶联缓冲液使得溶液的终体积为 100  $\mu$ L,(Click-iT<sup>®</sup> DIBO-amine 终浓度为 1.8 mmol/L),轻轻涡旋,4 ℃ 反应过夜. 交联结束的反应液,加入 200  $\mu$ L DPBS,4 ℃,2 000 rpm 离心 3 min,弃上清,重复 3 次,使 Protein A+G beads-mlgG1Fc-DIBO 终体积约 50  $\mu$ L.

各取 5  $\mu$ L Protein A+G beads-mlgG1Fc-DIBO 于 PCR 管中. 加入 1  $\mu$ L Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Azide(终浓度约 100  $\mu$ mol/L). 4 ℃,避光反应 1 h. 加入 200  $\mu$ L DPBS,4 ℃,2 000 rpm 离心 3 min,弃上清,重复 3 次. 取 Protein A+G beads 置于 96 孔板中,在荧光显微镜下观察实验现象及采集图像.

### 1.2.7 制备叠氮化肿瘤抗原

收集 CT26.WT 结直肠癌细胞,进行计数,按细胞  $4\times 10^6$  个/mL 接种于 10 cm 培养皿中,取 5.825 mL 细胞培养基于 15 mL 离心管中,加入 175  $\mu$ L 20 mmol/L Ac4ManNAz 充分混匀(Ac4ManNAz 终浓度为 0.5 mmol/L),加至 10 cm 培养皿中,于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h. 次日更换新培养基,即弃掉细胞培养皿中的旧培养基,加 7 mL 含 700  $\mu$ L 20 mmol/L Ac4ManNAz 的细胞培养基(Ac4ManNAz 终浓度为 2 mmol/L),于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下再培养 24 h.

#### 1.2.7.1 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub> 与 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Azide 的结合

向培养皿中加终浓度为 5  $\mu$ mol/L 的 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Azide. 室温,避光反应 1 h. DPBS 清洗细胞 3 次,荧光显微镜下观察并采集图像.

#### 1.2.7.2 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub> 的获得

待细胞密度达 90%时,弃培养基,1×PBS 清洗细胞 2 次,加入 1 mL RIPA 裂解液和 10  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂于细胞培养皿中,冰上裂解 0.5 h,每隔 10 min 晃动培养皿一次,收集细胞裂解液于 1.5 mL EP 管中,4 ℃、12 400 rpm 离心 11 min,收集上清,加入 10 倍体积的冰乙醇沉淀 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub>,置于-80 ℃ 冰箱中,静置过夜.

### 1.2.8 mlgG1Fc-DIBO 与 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub> 的生物正交反应

次日,取出醇沉蛋白 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub>,4 ℃、12 500 rpm 离心 10 min. 弃掉冰乙醇上清,并清洗蛋白沉淀一次,置于冰上,待乙醇挥发干净,每管用 100 μL 的结合缓冲液复融 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub>,将溶于结合缓冲液中的 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub> 在高温下变性 6 min,立即置于冰上 5 min,加入蛋白酶抑制剂,涡旋混匀.

将 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub> 加入 1.2.6 步骤的 Protein A+G beads-mlgG1Fc-DIBO 中,涡旋混匀,室温,振荡孵育 1 h,用 200 μL DPBS 清洗 Protein A+G beads,4 ℃、2 000 rpm 离心 3 min,重复 3 次. 50 μL 1×Loading Buffer 重悬 Protein A+G beads,99 ℃煮样 6 min,4 ℃、12 500 rpm 离心 3 min,上样,进行免疫印迹检测,由此确定生物正交反应的发生.

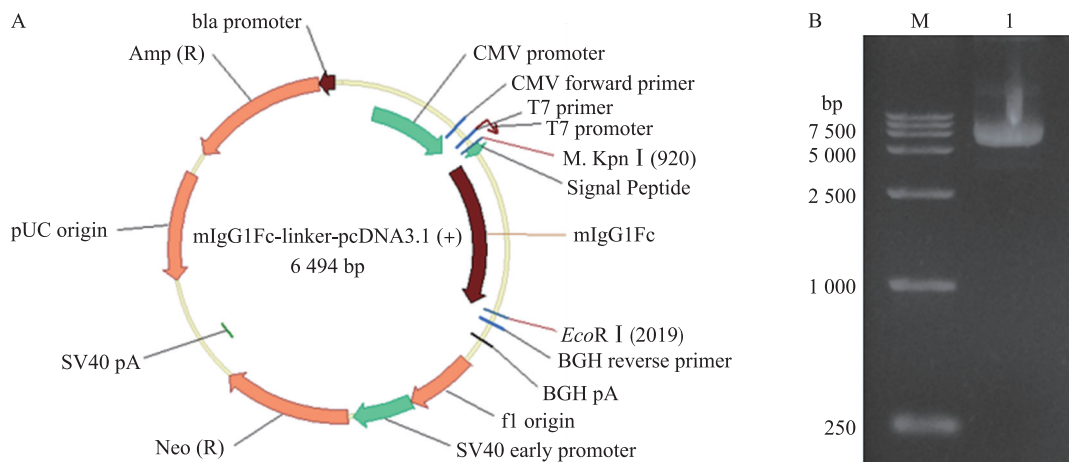
### 1.2.9 免疫印迹

配置 15% 的上层胶和 4% 的下层胶,样品与 loading buffer 按比例混合,99 ℃煮样 6 min,4 ℃、12 500 rpm 离心 3 min,上样,调电压至 85 V 电泳约 30 min,蛋白 Marker 分开后,调电压至 135 V 继续电泳约 1 h,直至溴酚蓝散去. 转膜后,在冰浴恒流条件下 270 mA 电泳 1.5 h. 转膜完成后,将 PVDF 膜浸于封闭液中,室温振荡封闭 2 h 后,敷一抗,4 ℃恒温振荡孵育 12 h,洗膜后加入二抗,室温振荡孵育 1.5 h,将显色液加至 PVDF 膜表面,使用 Tanon 5200 Multi 多功能成像系统显色并采集图片.

## 2 结果与讨论

### 2.1 mlgG1Fc 的表达与鉴定

将目的基因 mlgG1Fc-linker 克隆到 pcDNA3.1(+) 表达载体上,构建重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker,质粒图谱如图 1-A 所示. 将构建出的重组表达载体 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细菌,质粒小提后送至公司进行测序,同步,进行琼脂糖凝胶电泳检测,由实验结果可知,在 6 500 bp 左右处有明显的目的条带,如图 1-B,构建的重组质粒与设计重组质粒大小吻合,由此说明已成功构建出重组表达载体 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker.



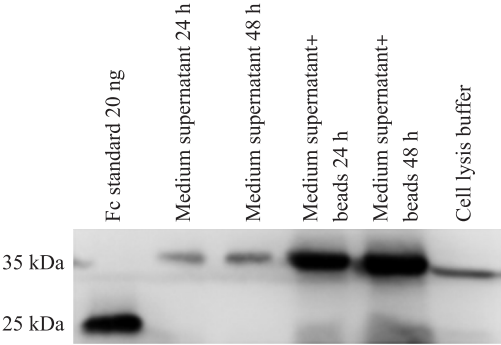
A: 重组表达载体 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 图谱; B: pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 的琼脂糖凝胶电泳, M: DL1500 DNA Marker; 1: pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker

图 1 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 的构建

Fig. 1 Construction of pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker

用 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 转染 CHO-K1 细胞,分时段收集细胞培养液上清,使用 Protein A+G beads 负载目的蛋白,通过细胞裂解,分析蛋白表达情况,结果如图 2 所示,收集的培液上清、使用 Protein A+G beads 富集后的洗脱液和裂解液中均含有目的条带,分子量约为 55 kDa.

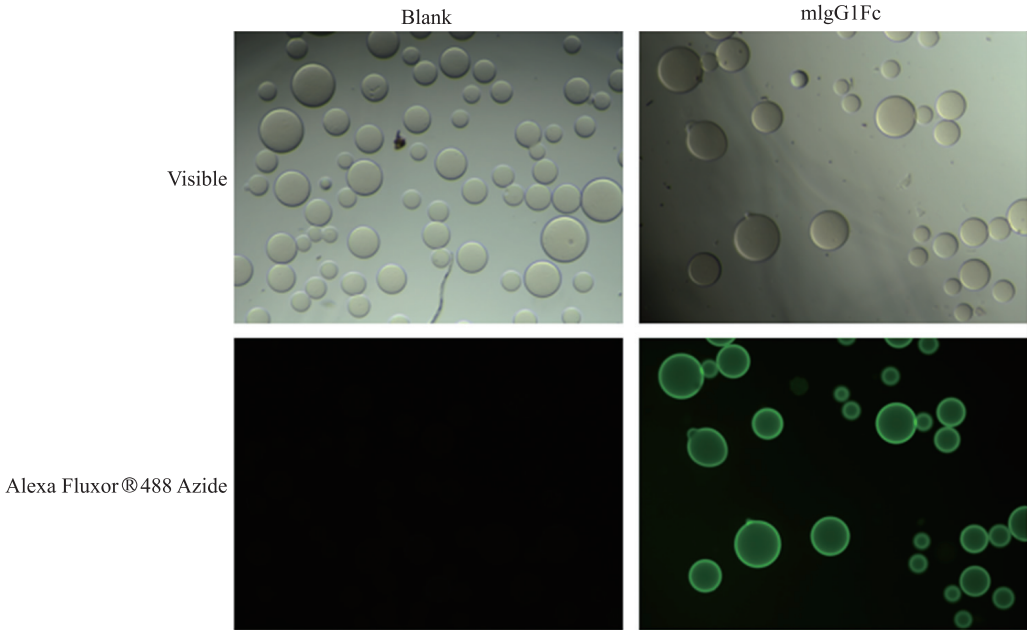
为了鉴定表达收集的 mlgG1Fc 能否在固相系统中完成 DIBO 化学标记,首先使用 Protein A+G beads 负载 mlgG1Fc,经活化和偶联,再与 Click-iT® DIBO-amine 反应,使用 Alexa Fluor® 488 Azide 荧光检测二者的结合. 实验结果如图 3,相对于对照组来说,实验组中可以看到很强的荧光,说明结合有 Protein A+G beads 的 mlgG1Fc 成功与 Click-iT® DIBO-amine 发生化学反应,即证明收集的 mlgG1Fc 已在固相系统中完成化学修饰.



pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 转染 CHO-K1 细胞,分时段(24 h、48 h)收集培养液上清,免疫印迹检测培养上清、经 Protein A+G beads 负载后的培养上清和裂解液中 pcDNA3.1(+)-mlgG1Fc-linker 的表达.

图 2 mlgG1Fc 的表达

Fig. 2 Expression of mlgG1Fc



取两组等量的 Protein A+G beads,其中一组 Protein A+G beads 与 mlgG1Fc 4 ℃ 振荡下孵育 4 h,两组 Protein A+G beads 分别经活化和偶联后,再与 Click-iT® DIBO-amine 4 ℃ 反应过夜. 最后,再与 Alexa Fluor® 488 Azide 4 ℃ ,避光反应 1 h. 利用荧光显微镜对比两组实验中的荧光强度.

图 3 Protein A+G beads-mlgG1Fc-DIBO 与 Alexa Fluor® 488 Azide 的结合

Fig. 3 The binding of Protein A+G beads-mlgG1Fc-DIBO and Alexa Fluor® 488 Azide

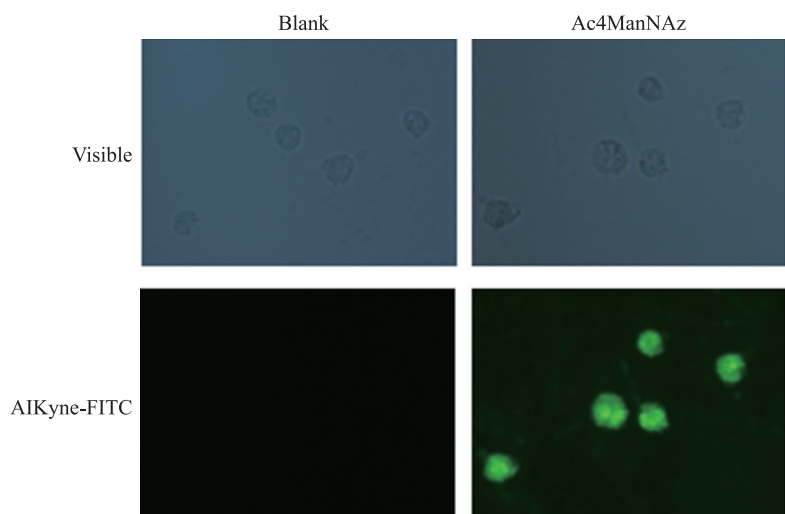
2.2 叠氮化肿瘤抗原的制备

经叠氮基团修饰的非天然糖能够通过糖掺入途径进入到肿瘤细胞膜表面的唾液酸化修饰位点,从而获得 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub>. 在之前的研究中,已证实使用终浓度为 0.5 mmol/L Ac4ManNAz 与 CT26.WT 细胞共培养 24 h,再使用终浓度为 2 mmol/L Ac4ManNAz 与其共培养 24 h,通过裂解细胞可以获得 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub>. 利用 FITC 标记的 Alkyne,通过免疫荧光技术考察肿瘤细胞表面叠氮化修饰的情况. 结果如图 4 所示,实验组有荧光且非常强烈,而对照组没有荧光,这表明 Ac4ManNAz 能通过细胞糖代谢途径掺入到 CT26.WT 细胞表面含唾液酸的糖蛋白上,使糖蛋白带上叠氮基团.

2.3 生物正交反应

收集 Ac4ManNAz 代谢掺入的肿瘤细胞蛋白溶液,与 Protein A+G beads-mlgG1Fc-DIBO 室温振荡孵育 1 h,Western blot 检测两者结合情况,实验结果如图 5 所示. 从图中可以看出,A 实验组有目的条带,说明 N<sub>3</sub>-TA<sub>g</sub> 与 mlgG1Fc-DIBO 通过生物正交反应缀合在一起.

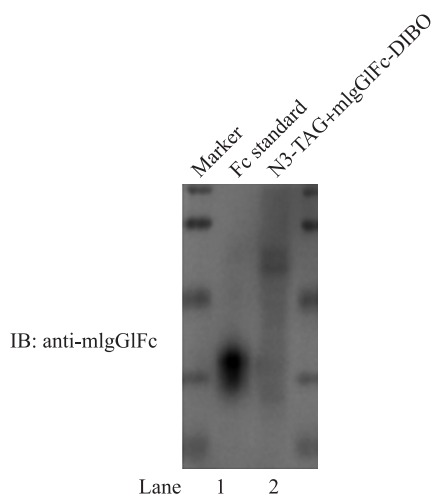




将终浓度为 0.5 mmol/L Ac4ManNAz 与 CT26.WT 细胞共培养 24 h,再用终浓度为 2 mmol/L Ac4ManNAz 共培养 24 h. 利用 FITC 标记的 Alkyne,荧光显微镜观察两组的荧光强度.

图 4 免疫荧光检测 Ac4ManNAz 代谢掺入

Fig. 4 Immunofluorescence detection of Ac4ManNAz metabolic incorporation



将收集的 N3-TAg 投入到 Protein A+G beads-mlgG1Fc-DIBO 中,涡旋混匀,室温,振荡孵育 1 h,DPBS 清洗 Protein A+G beads 3 次,1×Loading Buffer 重悬 Protein A+G beads,99 ℃煮样 6 min,4 ℃、12 500 rpm 离心 3 min,上样,进行免疫印迹检测.

图 5 N<sub>3</sub>-TAg 与 mlgG1Fc-DIBO 的生物正交反应

Fig. 5 Bio-orthogonal reaction of N3-TAg and mlgG1Fc-DIBO

### 3 结论

随着我国恶性肿瘤发病率逐年上升,在传统疗法收效甚微时,肿瘤免疫治疗为肿瘤患者带来了福音<sup>[23-24]</sup>. 肿瘤免疫治疗的原理是通过启动机体免疫系统,克服肿瘤免疫逃逸机制,增强肿瘤微环境的抗肿瘤免疫力来清除癌细胞,其具有安全性高、耐受性好,极少出现不良反应等特点. 目前,肿瘤免疫治疗是除外科手术、化疗和放疗以外最重要的治疗肿瘤的方法<sup>[25-26]</sup>.

在本课题中,首先利用分子生物学手段成功构建并表达出可以靶向 FcγRI 的融合蛋白 mlgG1Fc. 与此同时,为了解决鉴定新抗原难度大、耗时耗力等瓶颈问题,将广谱全肿瘤抗原通过激活性内吞受体途径递送给 APC,从而实现肿瘤抗原的靶向递送,更有利于激发广泛、特异性的抗肿瘤免疫应答. 此外, Ac4ManNAz 通过代谢掺入标记 CT26.WT 结直肠癌细胞抗原的唾液酸修饰位点,封闭修饰在肿瘤抗原糖链上的唾液糖残基,阻止肿瘤抗原通过抑制性途径进入机体,避免肿瘤免疫耐受<sup>[27-29]</sup>的形成.

为了评价制备出靶向 DCs 的结直肠癌肿瘤疫苗的疗效,需进行体内和体外实验. 在体外实验中,还需进一步检测不同肿瘤抗原对 DCs 表型、共刺激分子表达的影响,经抗原致敏后的 DCs 对淋巴细胞增殖情

况以及对小鼠结直肠癌肿瘤细胞的体外杀伤作用。在体内实验中,还需进一步验证肿瘤疫苗对荷瘤小鼠的预防和治疗效果。总而言之,本研究为制备新型结直肠癌肿瘤疫苗提供了新的开发方法和新的理论依据,与此同时,也为下一步体内和体外实验的开展打下了坚实的基础<sup>[29]</sup>。

### [参考文献]

- [1] CHEN W, SUN K, ZHENG R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. Chinese journal of cancer research, 2018, 30(1): 1-12.
- [2] 孙燕, 顾晋, 汪建平. 中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)[J]. 上海医学, 2018, 41(8): 449-463.
- [3] 薛婷, 冯峰. 结直肠癌能谱 CT 的研究进展[J]. CT 理论与应用研究, 2020, 29(6): 751-758.
- [4] ZHANG Y, QIN B L. The research progress of CAR-T cell therapy in the colorectal cancer[J]. Modern oncology, 2019, 27(1): 157-161.
- [5] CHEN W, ZHENG R, BAAD P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A cancer journal of clinicicans, 2016, 66(2): 115-132.
- [6] ZHAO J, CHEN Y, DING Z Y, et al. Safety and efficacy of therapeutic cancer vaccines alone or in combination with immune checkpoint inhibitors in cancer treatment[J]. Front pharmacol, 2019, 10: 1184.
- [7] CHRISTOFI T, BARITAKI S, FALZONE L, et al. Current perspectives in cancer immunotherapy[J]. Cancers(basel), 2019, 11(10): 1472.
- [8] HE Q, GAO H, WANG J Z. Chinese journal of new drugs[J]. Nature reviews immunology, 2020, 29(21): 2401-2409.
- [9] SOLINAS C, AIELLO M, MIGLIORI E, et al. Breast cancer vaccines: heeding the lessons of the past to guide a path forward[J]. Cancer treat rev, 2020, 84: 101947.
- [10] HE Q, GAO H, GAO M, et al. Anti-gastrins antiserum combined with lowered dosage cytotoxic drugs to inhibit the growth of human gastric cancer SGC7901 cells in nude mice[J]. Cancer, 2015, 6(5): 448-456.
- [11] HE Q, GAO H, GAO M, et al. Immunogenicity and safety of a novel tetanus toxoid-conjugated anti-gastrin vaccine in BALB/c mice[J]. Vaccine, 2018, 36(6): 847-852.
- [12] ZHOU Q P. Current status of tumor neoantigen vaccine research[J]. Biological chemical engineering, 2020, 6(5): 154-156.
- [13] 许若琳, 史曼. 树突状细胞与肿瘤免疫[J]. 科学技术创新, 2019, 35: 28-29.
- [14] RACHEL L S, SREEKUMAR B, NINA B. Dendritic cell-based immunotherapy[J]. Cell research, 2017, 27: 74-95.
- [15] IVAN E, COLOVAI A I. Human Fc receptors: critical targets in the treatment of autoimmune diseases and transplant rejections[J]. Human immunology, 2006, 67(7): 479-491.
- [16] 祁培培, 曹洁. 人免疫球蛋白 G Fc $\gamma$  受体的细胞分布及其功能研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(5): 557-559.
- [17] QIAN J, ZHANG X W, DING J. The effect of sialyltransferases on the sialylated structures in cancer[J]. Chinese bulletin of life sciences, 2006, 18(3): 227-231.
- [18] ZHOU X M, YANG G L, GUAN F. Biological functions and analytical strategies of sialic acids in tumor[J]. Cells, 2020, 9(273): 1-17.
- [19] 陈红梅, 张建华, 徐仑. KL-6 与呼吸系统疾病[J]. 国际儿科学杂志, 2008(2): 137-139.
- [20] LUCHANSKY S J, BERTOZZI C R. Azido sialic acids can modulate cell-surface interactions[J]. Chembiochem: a European journal of chemical biology, 2004, 5: 1706-1709.
- [21] KEPPLER O T, HORSTKORTE R, PAWLITA M, et al. Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications[J]. Glycobiology, 2001, 11: 11R-18R.
- [22] SAXON E, BERTOZZI C R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction[J]. Science, 2000, 287: 2007-2010.
- [23] SONG Y L, ZHU Y Y, ZHOU Y, et al. IFN- $\gamma$  and tumor immunity[J]. Modern oncology, 2021, 29(1): 0143-0148.
- [24] THOMAS S, PRENDERGAST G C. Cancer vaccines: a brief overview[J]. Methods in molecular biology, 2016, 1403: 755-761.
- [25] SABADO R L, BALAN S, BHARDWAJ N. Dendritic cell-based immunotherapy[J]. Cell research, 2017, 27(1): 74-95.
- [26] 黎华丽, 郑勇斌. 结直肠癌免疫治疗的研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(19): 90-92.
- [27] 吴龙龙, 宋红丽. 肝脏耐受性树突状细胞与肝移植免疫研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志, 2021, 27(2): 149-152.
- [28] CHEN J, QIAO Y D, LI X, et al. Intratumoral CD45<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> erythroid cells induce immune tolerance and predict tumor recurrence in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer letters, 2021, 499: 85-98.
- [29] 宋政文, 赵智辉. 靶向树突状细胞的结肠癌肿瘤疫苗的制备[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2020, 43(3): 112-119.

[责任编辑: 黄 敏]