

免疫共刺激分子增强自噬小体疫苗诱导的 T 细胞应答

邢芸¹, 周镇先², 苗梓韬¹, 李曼曼¹, 曹荣月^{1*}, 龙军^{3**}⁽¹⁾中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; ⁽²⁾东南大学附属南京市第二医院, 南京 210003;⁽³⁾南京中医药大学药学院, 南京 210046)

摘要 自噬小体疫苗 DRibble 被证实可以有效诱导小鼠和人 T 细胞应答, 为了进一步增强 DRibble 疫苗诱导人 T 细胞应答的能力, 本研究将免疫共刺激分子 OX40、CD80 和对照质粒分别转染至表达 CMV pp65 蛋白的 LT3-pp65 细胞系中, 制备 3 种类型的 DRibble 疫苗为: Ctrl/pp65 DRibble、OX40/pp65 DRibble 和 CD80/pp65 DRibble。通过 ELISA 法检测不同 DRibble 疫苗诱导树突状细胞表达 IL-12 的水平, 结果显示, OX40/pp65 DRibble 和 CD80/pp65 DRibble 诱导树突状细胞表达 IL-12 的水平显著高于 Ctrl/pp65 DRibble。进一步将 3 种 DRibble 疫苗分别刺激树突状细胞后与扩增的 CMV 特异性 T 细胞共培养, 通过流式细胞术检测表达 IFN- γ 的 T 细胞占总 T 细胞的百分比。实验结果显示, 与 Ctrl/pp65 DRibble 相比, OX40/pp65 DRibble 和 CD80/pp65 DRibble 诱导 CD8⁺ T 细胞表达 IFN- γ 的能力显著增高, OX40/pp65 DRibble 和 CD80/pp65 DRibble 诱导 CD4⁺ T 细胞表达 IFN- γ 的水平也显著高于 Ctrl/pp65 DRibble。实验证明免疫共刺激分子 OX40 和 CD80 修饰均可以加强 DRibble 疫苗体外诱导人 T 细胞应答的能力。

关键词 OX40; CD80; 自噬小体; T 细胞应答; 体外

中图分类号 R737.9 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)06-0749-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160620

引用本文 邢芸, 周镇先, 苗梓韬, 等. 免疫共刺激分子增强自噬小体疫苗诱导的 T 细胞应答[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6): 749–754.

Cite this article as: XING Yun, ZHOU Zhenxian, MIAO Zitao, et al. Costimulate moleculars amplified the DRibble mediated T cells response[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(6): 749–754.

Costimulate moleculars amplified the DRibble mediated T cells response

XING Yun¹, ZHOU Zhenxian², MIAO Zitao¹, LI Manman¹, CAO Rongyue^{1*}, LONG Jun^{3**}¹School of Life Science&Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²The Second Hospital of Nanjing, Nanjing 210003; ³School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract Autophagosomes derived from tumor cells have been proved to induce potent T cell response both in mouse and human. In human *in vitro* study, dendritic cells (DC) loaded with cytomegalovirus (CMV) pp65 antigen-containing DRibble were capable to efficiently re-stimulate pp65-specific T-cell recall responses from freshly isolated or frozen human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). This study developed more robust assays using *in vitro* expanded antigen-specific T cells that contained a much higher percentage of antigen-specific T cells. DC cross-presentation efficiency of OX40 and CD80 modified pp65-DRibble was detected by intracellular IFN- γ staining. Compared with Ctrl/pp65 DRibble, the percentage of IFN- γ ⁺ in total CD8⁺ T cells and CD4⁺ T cells was improved with OX40/pp65 DRibble and CD80/pp65 DRibble stimulation. In addition, vaccine induced IL-12 in dendritic cells, which polarizes Th cells toward the IFN- γ high Th1 phenotype, evaluated by ELISA in culture supernatant was dramatically higher in OX40/pp65 DRibble and CD80/pp65 DRibble groups than in Ctrl/

收稿日期 2016-04-13 **通信作者** * Tel: 025-83271242 E-mail: caorongyue@nj126.com

** Tel: 025-85811625 E-mail: long_ydp@aliyun.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81373232); 国家基础科学人才培养基金资助项目 (No. J1030830); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 南京市科委国际合作项目 (No. 201303049)

pp65 DRibble group. These results have implications for the immuneactivity of OX40 and CD80 modified DRibble and choice for prospective clinical use of DRibble-based cancer immunotherapy.

Key words OX40; CD80; autophagosome; T cell response; *in vitro*

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373232); the National Basic Science Personnel Training Foundation (No. J1030830); the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD); the International Program of Nanjing Scientific and Technological Commission (No. 201303049)

肿瘤的免疫治疗是继手术治疗、放疗和化疗之后第四重要的肿瘤治疗方法。肿瘤免疫治疗的研究起源于 19 世纪末, 纽约的外科医生 William Coley 发现, 肿瘤切除手术的术后感染患者预后更好, 提示免疫系统的参与可以帮助抑制肿瘤生长^[1-2]。此后, 肿瘤学家、免疫学家以及疫苗学家们研究了一系列肿瘤免疫治疗方案^[3]。肿瘤疫苗的临床应用研究中, 确实有一部分肿瘤患者 (<10%) 在使用肿瘤疫苗后能显著延长生存期, 但相较于化疗和放疗, 肿瘤疫苗疗效依然有限, 因此临床应用受到限制^[4]。

肿瘤疫苗是以肿瘤抗原为研究对象, 诱导树突状细胞(DC)交叉递呈反应激活 CD8⁺ T 细胞应答被广泛认为是评估疫苗效果的重要指标^[5]。本课题组研究的自噬小体疫苗是通过药物作用主动诱导自噬, 抑制溶酶体/蛋白酶体活性, 富集肿瘤细胞诱导的自噬小体。这些保留了长寿蛋白、短寿蛋白(short-live proteins, SLiPs)和残缺的核糖体产物(DRiPs, defective ribosomal products)等多种肿瘤抗原的自噬小体囊泡结构, 称为 DRibble(DRiPs-containing blebs)。DRibble 作为抗肿瘤疫苗, 在小鼠实验中证实可以有效地诱导 CD8⁺ T 效应细胞靶向杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长。在人体外实验中也证实 DRibble 为载体的疫苗可以有效诱导 T 细胞应答^[6-8]。

OX40 和 CD80 是重要的免疫共刺激分子, OX40 主要表达在 CD4⁺ T 细胞表面, 可以与表达在抗原递呈细胞(APC)上 OX40L 结合, CD80 表达在活化的 B 细胞、活化的 T 细胞以及 APC 等多种免疫细胞表面, 可以与 T 细胞表面的 CD28 分子结合, OX40 和 CD80 均是协同刺激 T 淋巴细胞活化的免疫共刺激分子^[9-10]。

为了进一步优化疫苗的效果, 本研究将 OX40 和 CD80 分别转染至表达 CMV pp65 蛋白的 LT3-pp65 细胞系中, 制备含有 OX40 和 CD80 的 pp65-

DRibble 疫苗。pp65 是巨细胞病毒(CMV)主要白细胞抗原, CMV 感染人群广泛, 本研究以 pp65 抗原肽诱导后经 IL-2 体外扩增的 CMV-CTL 为效应 T 细胞。以经 GM-CSF 和 IL-4 诱导的 CD14⁺ 单核细胞来源的树突状细胞(moDC)为 APC, 通过流式细胞术检测含有 OX40 和 CD80 的 DRibble 疫苗经 moDC 递呈后诱导 CMV-CTL 细胞表达 IFN- γ 的水平, 并且通过 ELISA 检测了不同的 DRibble 疫苗诱导 moDC 表达 IL-12 的能力, 为 DRibble 疫苗的优化及临床研究提供依据。

1 材料

1.1 试剂

RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); X-VIVO 15 培养基(瑞士 Lonza 公司); 人外周血单个核细胞(PBMC)样本、LT3 人肺癌细胞和转染了 pp65 蛋白的 LT3-pp65 细胞(美国波特兰医学中心肿瘤研究所); 细胞内染色破膜剂、BFA、固定液及鼠抗人 CD3-PerCP 抗体、鼠抗人 CD4-FITC 抗体、鼠抗人 CD8-APC-Cy7 抗体、鼠抗人 IFN- γ -APC 抗体、鼠抗人 OX40-PE 抗体、鼠抗人 CD80-PE 抗体以及鼠抗人同型对照 Isotype-PE 抗体(美国 BD 公司); 庆大霉素、LPS 及 R848(美国 Invivogen 公司); pp65 蛋白(德国美天旎公司); HLA-I 限制性 pp65 抗原肽为包括(HLA: A2、B18、B35、B44、B0702)的混合肽库(德国 Panatecs 公司); 重组人细胞因子(美国 Peprotech 公司); 人淋巴细胞分离液(美国 GE 公司); IL-12 ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司); pcDNA3.1-Ctrl、pcDNA3.1-OX40 和 pcDNA3.1-CD80 质粒由本实验室构建和保存。

1.2 仪器

细胞培养箱(美国 Thermo 公司); LSR-Fortessa 流式细胞仪(美国 BD 公司); 台式离心机(美国 Thermo 公司)。

2 方 法

2.1 DRibble 疫苗的准备

将瞬时转染了对照质粒、OX40 和 CD80 的 LT3-pp65 细胞及 LT3 细胞在含 10% 血清的 RPMI-1640 培养基中培养 48 h,更换至含 20 nmol/L 硼替佐米及 20 mmol/L 氯化铵的培养液中继续培养 24 ~ 48 h,直至显微镜下观察到细胞中有很多小泡结构。收获细胞培养物,先经 1 500 r/min 离心 5 min,去除大颗粒细胞碎片;收获的上清液再经 12 000 r/min 离心 15 min,得到粒径约为 100 ~ 1 000 nm 的亚细胞结构小体即为 DRibble 疫苗。

2.2 人外周血单个核细胞的制备

按照人淋巴细胞分离液使用说明书,经密度梯度离心法分离 PBMC、离心完成后小心取出离心管,可见淋巴细胞清晰白色云雾层介于两相液面之间;用移液器小心取出中间活细胞层,转移至新的 15 mL 离心管中,加 RPMI-1640 培养液 10 mL 洗涤,室温 1 600 r/min 离心 5 min。离心结束后弃上清液,用 CMX (含 10% 血清、40% RPMI-1640 及 50% X-VIVO 15) 人淋巴细胞培养液重悬细胞;计数,将细胞浓度调整至每毫升 1×10^7 个^[11]。

2.3 CMV pp65 特异性人 T 淋巴细胞的体外扩增及鉴定

将有 CMV 抗原特异性记忆 T 细胞的人 PBMC,以每毫升 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个重悬于 CMX 培养基中;每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,在 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育约 2 h 后,单核/巨噬细胞将贴于板底;轻轻混匀吸走所有上清液中未贴壁淋巴细胞;用 CMX 培养基轻柔洗涤培养板 1 ~ 2 次,去除所有未贴壁细胞。贴壁细胞中每孔添加含 GM-CSF (50 ng/mL)、IL-4 (10 ng/mL) 的 CMX 培养基 2 mL。每 3 天半量更换含细胞因子的培养液;第 7 天时,收集细胞,流式细胞术检测 moDC 细胞表型;剩余细胞以每毫升 1×10^6 个细胞的浓度冻存于液氮中,作为检测的抗原递呈细胞待用。将分离的悬浮细胞浓度调整至每毫升 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个,按每孔 5 mL 接种于 6 孔板,加入 2 μg/mL CMV 抗原肽孵育 48 h,刺激记忆 T 淋巴细胞活化,48 h 后添加终浓度为 1 000 U/mL 的 IL-2。每 3 天半量更换含 IL-2 的新鲜培养液,12 ~ 14 d 时进行细胞计数,将细胞用荧光标记的 anti-CD3/CD4/CD8 抗体染

色,流式细胞术检测细胞表型^[12]。

2.4 CMV 特异性 T 细胞应答水平检测

2.4.1 pp65 抗原肽诱导 T 细胞应答 将 2×10^5 个效应 T 细胞重悬于 CMX 培养液 100 μL 中接种于 96 孔圆底板,加入终浓度 2 μg/mL 的 CMV 抗原肽,100 μL 放于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育 2 h,每组 2 复孔;加入高尔基体阻断剂 BFA 继续培养 8 h。孵育结束后,将细胞用荧光标记的 anti-CD3/CD4/CD8/IFN-γ 抗体依据 BD 公司提供的 ICS 方法进行染色,流式细胞术检测 T 细胞表达 IFN-γ 的水平。

2.4.2 DRibble 抗原或纯化的蛋白抗原诱导 T 细胞应答 将 2×10^4 个 moDC 与 10 μg/mL DRibble 疫苗混合,重悬在 100 μL CMX 中,接种于 96 孔圆底板,置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育 6 h,实验每组 2 复孔;将 2×10^5 个效应 T 细胞 (100 μL) 加到培养孔中继续孵育 12 h,加入高尔基体阻断剂 BFA 继续培养 8 ~ 12 h。孵育结束后,细胞用荧光标记的 anti-CD3/CD4/CD8/IFN-γ 抗体进行 ICS 染色,流式细胞术检测 T 细胞表达 IFN-γ 水平。

2.5 DRibble 诱导 moDC 表达 IL-12

将 moDC 经 1 000 U/mL IFN-γ 诱导 6 h 后,分别将 2×10^5 个 moDC 与 10 μg/mL DRibble 疫苗混合,以 PBS 为阴性对照,以 LPS/R848 (50 ng/mL)/(1 μg/mL) 为阳性对照,细胞及刺激物重悬在 CMX 200 μL 中,接种于 96 孔圆底细胞培养板,置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育过夜,实验每组 2 复孔。孵育结束后,通过 ELISA 法检测试剂盒检测培养上清液中 IL-12 的表达水平^[13]。

2.6 细胞转染

将 LT3-pp65 细胞在含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基培养至铺满 75 cm² 培养瓶底 70%。将 pcDNA3.1-Ctrl、pcDNA3.1-OX40 和 pcDNA3.1-CD80 45 μg 与 Lipofectamine 2000 45 μL 在 RPMI-1640 无血清培养基 1 500 μL 混匀,室温孵育 15 min。分别每种质粒和脂质体的混合物平均加入 3 个细胞培养瓶中。将瞬时转染的细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 48 h 后,各取其中 1 瓶细胞通过流式细胞术检测 OX40 和 CD80 的转染效率,剩余 2 瓶用于制备 DRibble 疫苗。

需要荧光标记的细胞分别经 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,分成 3 管,每管 1×10^5 个细

胞,用流式缓冲液洗涤;弃上清液,每管加入 5 μ L Fc 受体封闭抗体孵育 5 min;加入流式缓冲液洗涤,室温 1 600 r/min 离心 5 min;3 管中分别加入荧光标记的同型对照抗体(isotype)、anti-OX40 和 anti-CD80 抗体在 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;加入流式缓冲液洗涤,室温 1 600 r/min 离心 5 min,细胞在 300 μ L 流式缓冲液中重悬,通过流式细胞术检测转染效率。

2.7 统计学分析

流式细胞术数据应用 Flowjo 软件进行分析处理,其他数据应用 Graphpad 进行统计学分析,均数间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 OX40 和 CD80 转染 LT3-pp65 细胞

将转染了 pcDNA3.1-Ctrl、pcDNA3.1-OX40 和 pcDNA3.1-CD80 的 LT3-pp65 细胞系经流式细胞术检测 DNA 转染效率。结果显示,经瞬时转染 48 h 后,OX40/LT3-pp65 中约有 92.1% 细胞表达 OX40,CD80/LT3-pp65 中约有 89.3% 细胞表达 CD80,Ctrl/LT3-pp65 细胞不表达 OX40 或 CD80(图 1)。

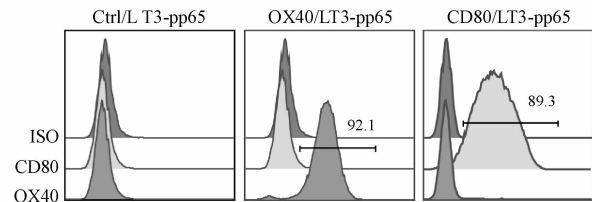


Figure 1 Frequency of CD80/OX40 expressing cells in Ctrl/CD80/OX40 DNA transfected LT3-pp65 lines

3.2 CMV pp65 特异性人 T 淋巴细胞(CMV-CTL)的体外扩增及鉴定

收集培养 12 d 的 T 细胞,经流式细胞术检测,得到的 CD3⁺ T 细胞纯度大于 90%。在 CD3⁺ T 淋巴细胞中,CD8⁺ T 细胞约占 85.70%,CD4⁺ T 细胞约占 12.24%(图 2)。最终 CD3⁺ T 细胞的扩增总倍数最高达到了 983 倍。

3.3 CMV-CTL 扩增效率

将得到的 CMV 抗原特异性 T 细胞经 pp65 抗原肽再次刺激,通过 ICS 及流式细胞术检测 T 细胞中 IFN- γ 的表达。结果显示,在 CD8⁺ T 细胞中,有高达(89.09 \pm 3.39)% 细胞可表达 IFN- γ ;CD4⁺

T 细胞有(18.57 \pm 4.23)% 表达 IFN- γ ,而未经抗原刺激的 PBS 对照组中 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞表达 IFN- γ 水平很低(<1%)(图 3)。从 1 \times 10⁶ 个 PBMC 培养平均得到 604 \times 10⁶ 个 CMV-pp65 抗原特异性 CTL。

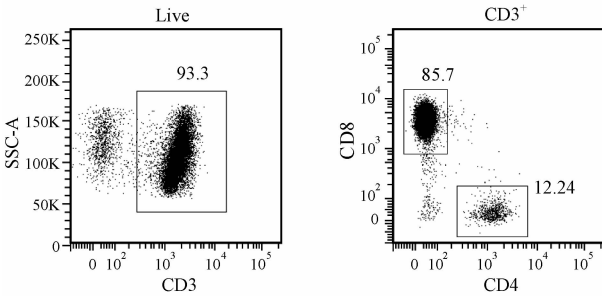


Figure 2 Dot plot of T cell phenotype after CMV specific T cell expansion in IL-2

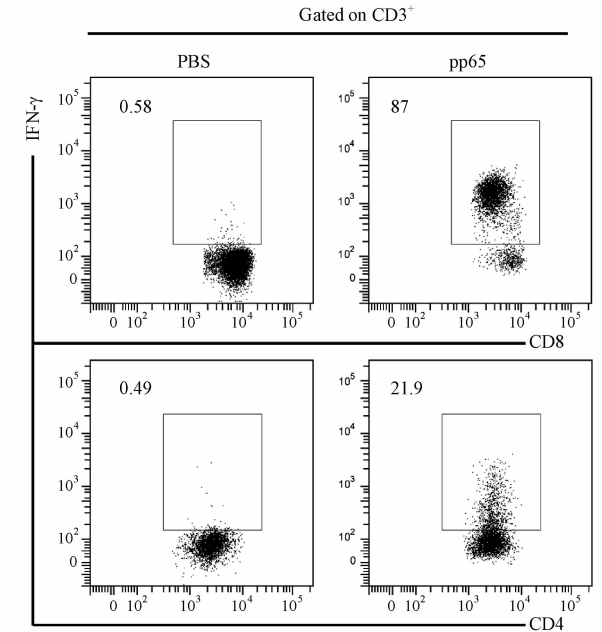


Figure 3 Dot plot of T cell IFN- γ production in CD3⁺ CD8⁺ T and CD3⁺ CD4⁺ T cells after pp65 peptide stimulation

3.4 DRibble 诱导 moDC 活化

实验将免疫共刺激分子 CD80 和 OX40 分别转染至 LT3-pp65 细胞中,制备的疫苗与经 IFN- γ 诱导的 moDC 细胞孵育过夜,通过 ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-12 的表达水平。结果显示,与 Ctrl/pp65 DRibble 相比,OX40/pp65 DRibble 疫苗(3 817 \pm 134) pg/mL (*P* < 0.001) 和 CD80/pp65 DRibble 疫苗(3 358 \pm 157) pg/mL (*P* < 0.001) 可显著提高 DC 细胞表达 IL-12 的水平,与 LPS/R848 阳性对照(3 593 \pm 143) pg/mL 诱导 IL-12 的水平

相当(图 4)。可见 DRibble 疫苗经 OX40 或 CD80 修饰可以显著增强疫苗诱导 moDC 活化的能力。

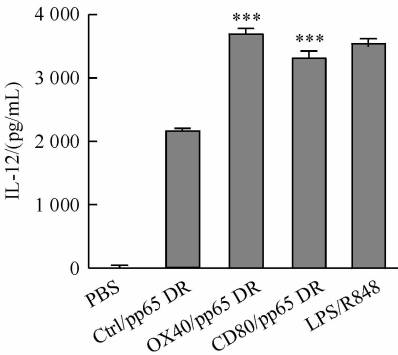


Figure 4 IL-12 levels in IFN- γ primed moDC supernatant after overnight incubation with indicated stimulus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
*** $P < 0.001$ vs Ctrl/pp65 DR group

3.5 DRibble 诱导 T 细胞应答

本课题组之前研究的自噬小体来源的肿瘤疫苗被证实可以有效治疗小鼠黑色素瘤、肺癌、乳腺癌等,并发现其主要是通过诱导抗原交叉递呈,激活 CD8⁺ T 细胞应答达到肿瘤杀伤的作用。为了检测优化的疫苗诱导人 T 细胞应答的能力,实验以 moDC 为 APC,以 CMV-CTL 细胞为效应细胞,通过流式细胞术检测 DRibble 疫苗诱导 T 细胞表达抗原特异性 IFN- γ 的水平。结果显示,与 Ctrl/pp65 DRibble 疫苗 [(19.7 \pm 0.13)%] 相比,OX40/pp65 DRibble 疫苗 [(28.10 \pm 0.30)%] ($P < 0.05$) 和 CD80/pp65 DRibble 疫苗 [(25.25 \pm 0.95)%] ($P < 0.05$) 可显著提高激活 CD8⁺ T 细胞的应答水平(图 5)。

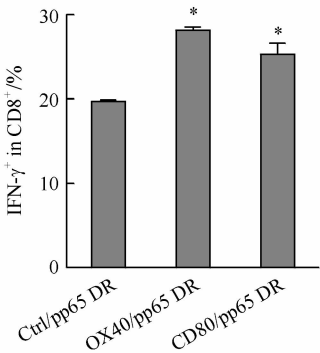


Figure 5 Frequency of IFN- γ production cells in CD3⁺ CD8⁺ T cells after stimulation with indicated DRibble ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* $P < 0.05$ vs Ctrl/pp65 DR group

而且,与 Ctrl/pp65 DRibble 疫苗 (9.7% \pm 0.18%) 相比,经 OX40/pp65 DRibble 疫苗 [(14.75 \pm 3.18)%] ($P < 0.05$) 和 CD80/pp65

DRibble 疫苗 [(14.10 \pm 2.97)%] ($P < 0.05$) 可显著提高 CD4⁺ T 细胞的应答水平(图 6)。

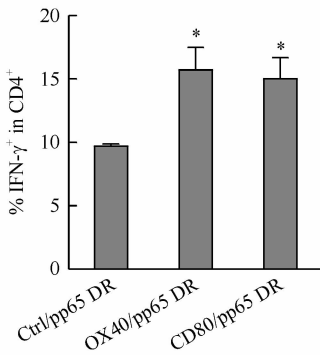


Figure 6 Frequency of IFN- γ production cells in CD3⁺ CD4⁺ T cells after stimulation with indicated DRibble ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* $P < 0.05$ vs Ctrl/pp65 DR group

4 讨论

经典的 T 细胞应答理论中,在第一信号和第二信号同时存在的情况下 APC 才能诱导 T 细胞的激活。第一信号是 T 细胞 TCR 识别 MHC-抗原肽复合物,第二信号是 T 细胞和 APC 上免疫共抑制分子的相互作用。第二信号包括免疫共刺激信号和共抑制信号,免疫系统通过第二信号中的协同作用分子调节免疫激活或耐受的状态。共刺激分子在 APC 抗原递呈过程中起到正向调控作用,目前已发现的免疫共刺激信号主要包括:CD28/CD80、CD27/CD70、CD40/CD40L、OX40/OX40L、CD226/CD155 以及 4-1BB/4-1BBL 等。共抑制分子在 APC 抗原递呈过程中起到负向调控作用,目前已发现的免疫共抑制分子主要包括:CTLA4/B7-1、PD1/PDL1、Tigit/CD155 以及 TIM3/Galectin9 等^[14-18]。

DRibble 是通过主动诱导自噬,抑制溶酶体/蛋白酶体活性,得到的富集肿瘤细胞诱导的自噬小体的抗肿瘤疫苗,而这些抗原被认为是可供 MHC I 类分子识别的模式,能有效诱导抗原交叉递呈,激活 CD8⁺ T 细胞应答。DRibble 中富集了内质网相关蛋白降解途径(ERAD)相关底物^[19],可以有效协助抗原蛋白被 APC 的摄取过程和在胞内的膜转运过程,有效协助 MHC-抗原肽复合物的形成进而再转运至 APC 表面,APC 通过自噬相关途径传递抗原物质供溶酶体降解,降解产物被 MHC II 类分子捕获后转运至细胞表面供 CD4⁺ T 细胞识别^[20-21]。

本研究中 DRibble 经免疫共刺激分子 OX40 和 CD80 修饰,这些协同信号分子被富集在抗原递呈反应发生的位点,起到有效的免疫激活的作用。ELISA 检测结果显示,OX40 和 CD80 可以显著增强 DRibble 诱导 moDC 的激活,提高 DRibble 疫苗诱导 moDC 表达 IL-12 的水平。moDC 细胞表达 IL-12 水平的提高可以使免疫应答朝高表达 IFN- γ 的 Th1 型应答极化。

在检测了不同 DRibble 诱导 DC 活化水平后,实验进一步研究了 OX40 和 CD80 修饰的 DRibble 疫苗以及对照 DRibble 疫苗分别诱导 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞表达抗原特异性 IFN- γ 的水平。实验通过流式细胞术及细胞因子胞内染色方法检测 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞表达 IFN- γ 的比例,实验结果显示,OX40 和 CD80 可以显著提高 DRibble 疫苗诱导 pp65 抗原特异性 T 细胞的应答的水平,实验结果进一步证实 OX40 和 CD80 可以提高 DRibble 疫苗诱导免疫应答的能力。

优化的 DRibble 疫苗一方面提供了有效的抗原作为第一信号,同时过表达的 OX40 和 CD80 分子辅助第二信号的正向活化,与未经修饰的 DRibble 疫苗相比,诱导了更强的体外 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞应答水平,为 DRibble 疫苗临床应用的优化提供依据。

参考文献

- [1] Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1991 (262): 3-11.
- [2] Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective[J]. *Pharmacol Ther*, 1994, 64(3): 529-564.
- [3] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1565-1570.
- [4] Neller MA, Lopez JA, Schmidt CW. Antigens for cancer immunotherapy[J]. *Semin Immunol*, 2008, 20(5): 286-295.
- [5] Andersen BM, Ohlfest JR. Increasing the efficacy of tumor cell vaccines by enhancing cross priming[J]. *Cancer Lett*, 2012, 325(2): 155-164.
- [6] Li Y, Wang LX, Pang P, et al. Tumor-derived autophagosome vaccine: mechanism of cross-presentation and therapeutic efficacy[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(22): 7047-7057.
- [7] Twitty CG, Jensen SM, Hu HM, et al. Tumor-derived autophagosome vaccine: induction of cross-protective immune responses against short-lived proteins through a p62-dependent mechanism[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(20): 6467-6481.
- [8] Ye W, Xing Y, Paustian C, et al. Cross-presentation of viral antigens in dribbles leads to efficient activation of virus-specific human memory T cells[J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 100.
- [9] Aspeslagh S, Postel S, Rusakiewicz S, et al. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 52: 50-66.
- [10] Weixler B, Cremonesi E, Sorge R, et al. OX40 expression enhances the prognostic significance of CD8 positive lymphocyte infiltration in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37588-37599.
- [11] Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, et al. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor[J]. *Blood*, 1998, 92(11): 4238-4247.
- [12] Hanley PJ, Shaffer DR, Cruz CR, et al. Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, epstein-barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation[J]. *Cytotherapy*, 2011, 13(8): 976-986.
- [13] Paustian C, Caspell R, Johnson T, et al. Effect of multiple activation stimuli on the generation of Th1-polarizing dendritic cells[J]. *Hum Immunol*, 2011, 72(1): 24-31.
- [14] Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 227-242.
- [15] Nowicki TS, Anderson JL, Federman N. Prospective immunotherapies in childhood sarcomas: PD1/PDL1 blockade in combination with tumor vaccines[J]. *Pediatr Res*, 2016, 79(3): 371-377.
- [16] Guilleminault L, Carmier D, Heuze N, et al. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: inhibition of PD1/PDL1 pathway[J]. *Rev Pneumol Clin*, 2015, 71(1): 44-56.
- [17] Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3-potential mechanisms of action[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 45-56.
- [18] Ascierto PA, Marincola FM, Ribas A. Anti-CTLA4 monoclonal antibodies: the past and the future in clinical application[J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 196.
- [19] Zehner M, Marschall AL, Bos E, et al. The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells[J]. *Immunity*, 2015, 42(5): 850-863.
- [20] Munz C. Of LAP, CUPS, and DRibbles-unconventional use of autophagy proteins for MHC restricted antigen presentation[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 200.
- [21] Yi Y, Zhou Z, Shu S, et al. Autophagy-assisted antigen cross-presentation: autophagosome as the argo of shared tumor-specific antigens and DAMPs[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(6): 976-978.