

B7-H4 单抗 3C8 的纯化及对肿瘤免疫逃逸的阻断作用研究

陈亚莉, 李安琪, 张宁玥, 章良*

(苏州大学药学院, 苏州 215123)

摘要 采用 Protein G 亲和色谱及 DEAE 阴离子交换柱色谱分离纯化精制鼠源性 B7-H4 单克隆抗体 3C8, 结合流式检测可与 B7-H4/293T 转基因细胞株结合的目标抗体组分, 获得了纯化的鼠源性 B7-H4 单克隆抗体 3C8。反相柱色谱检测其纯度为 93%, SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定证明经过两步柱色谱, 目标抗体的纯度大大提高。流式细胞术检测发现 3C8 只与 B7-H4/293T 转基因细胞株结合, 不与 Mock/293T 细胞结合, 并且 3C8 也不与 B7 家族其他成员的转基因细胞株结合。激光共聚焦实验显示 3C8 可特异性染色 B7-H4/293T 转基因细胞, Western blot 实验发现, 以 3C8 作为一抗, B7-H4/293T 转基因细胞有阳性条带而 Mock/293T 细胞没有条带。用 3C8 作为一抗进行免疫组化, 结果显示, 前列腺癌和肾癌组织特异性高表达 B7-H4 分子, 而前列腺癌旁组织和肾癌旁组织 B7-H4 呈阴性表达。T 细胞体外实验显示, B7-H4-Ig 可特异性与活化 T 细胞结合, 但 3C8 可阻断这种结合作用, 并可逆转 T 细胞增殖抑制作用及 T 细胞因子分泌抑制作用。

关键词 单克隆抗体 3C8; B7-H4; 纯化; 负性共刺激; 免疫逃逸; 阻断作用

中图分类号 R730.3 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)04-0461-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170411

引用本文 陈亚莉, 李安琪, 张宁玥, 等. B7-H4 单抗 3C8 的纯化及对肿瘤免疫逃逸的阻断作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(4): 461-468.

Cite this article as: CHEN Yali, LI Anqi, ZHANG Ningyue, et al. Purification of monoclonal anti-B7-H4 antibody and the blockade of B7-H4-mediated tumor immune evasion by the antibody[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(4): 461-468.

Purification of monoclonal anti-B7-H4 antibody and the blockade of B7-H4-mediated tumor immune evasion by the antibody

CHEN Yali, LI Anqi, ZHANG Ningyue, ZHANG Liang*

College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract The purified 3C8 was obtained by two step column purification, including Protein G affinity purification and DEAE anion exchange purification. The purity of purified 3C8 was about 93% when analyzed by reverse column. SDS-PAGE showed that the purity of 3C8 was increased greatly by two step purification. By flowcytometry we found that 3C8 specifically binded with B7-H4/293T cells and did not bind with Mock/293T cells, moreover 3C8 did not bind with other B7 family members transgene cells. In confocal experiment 3C8 could specifically stained B7-H4/293T cells. In Western blot only B7-H4/293T cells showed positive band while Mock/293T cells showed negative result. The result of immunohistochemistry showed that B7-H4 was highly expressed in prostate cancer and renal cell carcinoma, while para-cancer tissues did not express B7-H4. The T cell proliferation experiment showed that B7-H4-Ig could bind to activate T cells and inhibit T cell proliferation, while 3C8 could block the binding of B7-H4-Ig and reverse the T cell proliferation inhibition effect of B7-H4-Ig by CFSE and CCK8 assay. The cytokine IFN- γ and IL-2 secreted by activating T cells was decreased by B7-H4-Ig and 3C8 could reverse the effect of B7-H4-Ig.

Key words monoclonal antibody 3C8; B7-H4; purification; negative costimulation; immune evasion; blockade

This study was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 31370872)

T 细胞的活化需要两个不同的细胞外信号的共同刺激^[1]: 即由抗原递呈细胞 (APC) 表面的 MHC-Ag 肽复合物与 TCR 特异性结合作为第一信号和来自 APC 表面的共刺激分子与 T 细胞表面相应受体的结合作为第二信号。第二信号包括正性共刺激信号和负性共刺激信号, 主要是由 B7 家族与其受体 CD28 家族的相互作用而产生^[2]。B7 家族成员中的正性共刺激分子包括 B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、CD28、B7RP1 (ICOSL), 负性共刺激分子包括 CTLA4、PD-1、PD ligand (PL1)、PDL2、B7-H3、B7-H4 和 VISTA。正性共刺激分子与负性共刺激分子的表达能够正性或负性调控 T 细胞的功能, 造成 T 细胞的活化或抑制, 从而在肿瘤免疫过程中发挥着杀伤肿瘤细胞或抑制 T 细胞的活性这两种截然不同的功能。

正性共刺激分子表达缺失, 或者负性共刺激分子表达上调, 均会保护肿瘤细胞避免效应 T 细胞的破坏, 最终造成肿瘤细胞的免疫逃逸。因此, 通过设计针对负性共刺激分子的单克隆抗体, 阻断对 T 的免疫抑制作用, 促进 T 细胞的增殖、活化及细胞因子分泌, 从而有效地杀伤靶细胞, 这也为肿瘤的治疗提供了新的途径。因此, 近年来以负性共刺激分子家族成员为靶点的单抗类药物的研发进入了一个快速发展期。

目前, 以负性共刺激分子 CTLA-4 及 PD-1/PD-L1 为靶点的单抗类药物已成功上市, 对这些分子靶点的抑制均能显著抑制肿瘤生长。临床研究结果显示, 使用 CTLA-4 以及 PD-1 单克隆抗体药物的晚期黑色素瘤以及其他肿瘤患者, 均表现出较为积极的结果。尤其是以 PD-1/PD-L1 为靶点的单抗类药物, 疗效显著, 开创了肿瘤免疫治疗的新纪元^[3]。

B7-H4 分子是 2003 年 Sica 等^[4]发现的 B7 家族的一个成员, 表达在专职 APC 中, 并广泛分布于非淋巴组织中。RT-PCR 分析显示, 在胎盘、肝、骨骼肌、肾、胰腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠等器官, 有其 mRNA 表达, 但在脑组织和心脏未发现其表达。研究表明, B7-H4 是一种负性共刺激分子, 作用与 PD-L1 类似, 可抑制 T 细胞的增殖、细胞因子分泌及细胞周期的进行, 从而下调 T 细胞的免疫功能^[4-6]。虽然对 B7-H4 分子的功能了解得还不很全面, 但其在正常组织中几乎不表达, 而在一些肿瘤细胞上异常表达, 如卵巢癌、乳腺癌、直肠癌、子

宫内膜癌、肺癌、肾细胞癌等。提示其与多种肿瘤的发生具有相关性以及在保护肿瘤细胞逃避免疫监视的过程中起着重要作用^[7-8]。

本实验室在已获得的抗 B7-H4 的鼠源性单克隆杂交瘤细胞 3C8 的前期研究工作基础上, 通过亲和色谱及 DEAE 离子交换柱色谱两步纯化法, 获得了纯化的鼠源性抗人 B7-H4 单克隆抗体 3C8, 反相色谱检测其纯度为 93.16%。对其应用研究发现, 该抗体可特异性与 B7-H4 分子结合, 并可用于流式细胞术、免疫荧光、Western blot 及免疫组化。3C8 可阻断 B7-H4-Ig 介导的 T 细胞增殖抑制及 T 细胞因子分泌抑制。

1 材料

1.1 药品与试剂

Hitrap Protein G 色谱柱 (美国 GE 公司); DEAE FF 阴离子交换色谱 A 柱 (美国 GE 公司); Zorbax 300SB-C₁₈ (9.4 mm × 25 mm) 反相分析柱 (美国 Agilent 公司); DAB 试剂盒 (北京博奥森生物科技有限公司); HRP 偶联羊抗鼠二抗 (美国 CST 公司); 羊血清 (中科晨宇北京生物科技有限公司); 苏木素 (上海索莱宝生物科技有限公司); 中性树胶 (国药集团化学有限公司); 高效切片石蜡 (上海华永石蜡有限公司); RPMI 1640 培养基粉剂 (美国 Gibco 公司); 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 胰蛋白酶 (上海沃凯公司); Cy5 标记的羊抗鼠 IgG、PE 标记的羊抗鼠 IgG 和鼠 IgG 同型对照 (美国 Biolegend 公司); 牛血清白蛋白 BSA (上海前尘生物科技有限公司); 多聚甲醛 PFA (上海生物工程技术有限公司); Triton X-100 (美国 Pharmacia 公司); DMSO 细胞冻存液、多聚赖氨酸、碘化丙啶、RNA 酶 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 其余试剂均为市售分析纯, 实验用水为纯净水。

1.2 仪器

760-0650 分离纯化色谱仪、Mini Protean Cell 垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); FC500 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); Leica TCS SP2 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.3 动物

取 8~10 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 由昭衍公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (苏) 2013-0003。

所有动物均符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 抗 B7-H4 单克隆抗体的制备及分离纯化

2.1.1 抗 B7-H4 单克隆抗体的制备 本实验室前期通过免疫 BALB/c 小鼠,取小鼠脾脏细胞并与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合,再通过筛选获得的单克隆杂交瘤细胞株 3C8,该杂交瘤细胞株培养在含 10% FCS 的 DMEM 培养基中传代。本实验室采用体内诱生腹水法生产单克隆抗体。每只腹腔注入 Pristane 0.5 mL。1 周后每只腹腔注射 3C8 杂交瘤细胞 1×10^7 个,同时另一侧腹腔再次注入 Pristane 和 IFA 的等体积混合物 0.2 mL,轻轻按摩小鼠腹部,使杂交瘤细胞分散于腹腔中。观察小鼠的腹部变化并及时收集腹水。一般在 7~10 d 后收集腹水,离心取上清液分装与 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.1.2 Protein G 免疫亲和色谱纯化单克隆抗体

将腹水解冻,离心去除凝块,每 10 mL 腹水加入 1 mol/L CaCl_2 1 mL,5% Sulfate dextran 溶液 0.1 mL,室温搅拌 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心(12 000 r/min,20 min)去除纤维蛋白。取上清液按 50% 饱和度缓慢加入等体积饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,混匀后置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,4~6 h,离心弃上清液。取沉淀加 0.01 mol/L,pH 7.0 的 PBS 复溶。透析去除 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,上样。色谱条件:结合缓冲液——pH 7.0,0.02 mol/L 磷酸钠缓冲液;洗脱缓冲液——pH 3.0,0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液。样品经 FPLC 系统上 Hitrap Protein G 亲和色谱柱,采用洗脱液洗脱,收集蛋白峰流出液,及时用 pH 9.0 的 Tris 溶液矫正 pH 至 7.0,PBS 透析后用紫外分光光度计测定抗体蛋白的含量,其浓度的计算公式为:抗体蛋白含量(mg/mL) = $A_{280} \times 1.55 - A_{260} \times 0.76$ 。产品过滤除菌后分装与 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.1.3 DEAE 离子交换柱色谱精制单克隆抗体

DEAE FF 阴离子交换色谱柱,以 0.03 mol/L 的 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液为 A 液,在 A 液中加入 1 mol/L NaCl 配制成的溶液为 B 液,设置洗脱梯度为 0~0.5 mol/L 的 NaCl(20 柱体积),进行梯度洗脱,收集目标峰。

2.2 反相柱色谱进行纯度鉴定

采用 Zorbax 300SB-C19(9.4 mm \times 25 mm)反相色谱柱,以含 0.1% 三氟乙酸的纯水溶液为 A

液,以纯乙腈为 B 液,设置洗脱梯度为 0%~50% B 液(250 mL),进行梯度洗脱,峰面积回归。

2.3 流式细胞仪检测

离心收集细胞,加入 PBS 洗涤液 3.0 mL,1 800 r/min 离心 5 min,小心吸弃上清液,并重复洗涤 1 次,吸去上清液;加入适当稀释度的小鼠抗人 B7-H4 单克隆抗体 3C8 50 μL ,小心混匀,对照管中加入鼠 IgG 同型对照稀释液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 30 min,加入 PBS 洗涤两次,1 800 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀,加入 1:100 稀释的 PE 标记的羊抗鼠 IgG 15 μL ,吹打混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 30 min,PBS 洗涤两次,收集细胞沉淀,加入 PBS 吹打混匀,上流式细胞仪检测荧光表达量,鼠 IgG 同型对照管调零。

2.4 激光共聚焦显微镜进行免疫荧光观察

细胞爬片,4% PFA 固定 10min,0.5% TritonX-100 穿孔 15 min,PBS 漂洗两次,每次 5 min,1% BSA 封闭 30 min,加入 1% BSA 稀释的 3C8,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 2 h,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min,加入 1% BSA 稀释的二抗,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 2 h,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min,10 $\mu\text{g/mL}$ RNA 酶作用 30 min,PBS 清洗 1 次,50 $\mu\text{g/mL}$ PI 作用 30 min,PBS 漂洗 1 次,激光共聚焦显微镜观察 3C8 染色情况。

2.5 Western blot 分析

采用化学发光显色的 Western blot 分析,具体实验操作参考试剂盒说明书进行。简述如下:分别取 1×10^7 细胞,用预冷的 RIPA 细胞裂解液 0.5 mL,同时加入蛋白酶抑制剂,裂解细胞。取细胞裂解液 30 μL ,经 12% SDS-PAGE 电泳,并电转移(0.65 mA/cm^2)至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。第 2 天分别加入纯化的 3C8 抗体室温孵育 1 h,用 TBST 洗去未结合的抗体,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,继续孵育 1 h,洗涤后加入 ECL 曝光显色。

2.6 免疫组织化学染色(SABC 法)

所有标本经 4% 甲醛液固定,常规脱水石蜡包埋。将石蜡组织块做厚度 4 μm 连续切片。脱蜡前将组织芯片及对照组织切片放在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烘烤 1~2 h;置于新鲜二甲苯 I 和 II 中分别浸泡 15 min;无水乙醇 I,II 中各浸泡 5 min;95% 乙醇中浸泡 5 min;85% 乙醇中浸泡 5 min;75% 乙醇中浸泡 5 min;PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3%

的过氧化氢(H_2O_2)封闭 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。取适量的 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)于压力锅中大火加热至沸腾, 进行抗原热修复。10%羊血清封闭液 37 °C 孵育 30 min。一抗 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次。二抗 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次。DAB 显色 3~5 min, 在显微镜下掌控染色程度; 自来水流水冲洗 10 min, 终止染色。苏木精复染, 自来水冲洗。50~60 °C 温水复蓝, 0.5% 盐酸-酒精分化, 流水冲洗。芯片依次放入 75% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、二甲苯 I、二甲苯 II, 每次 1 min。中性树胶封片, 待其自然干燥后镜下观察结果及分析。

2.7 外周血淋巴细胞(T 细胞)的制备

取正常志愿者外周血用 Hank's 缓冲液 1:1 稀释后, 缓慢加于 Ficoll 分离液上, 2 000 r/min 离心收集单核细胞层(PBMCs), 洗涤 2 次后用 RPMI 1640 培养基置于 6 孔培养板中培养 4 h(37 °C, 5% CO_2), 轻轻吸出悬浮细胞, 用 37 °C 培养基轻洗依次, 富集 T 细胞用于后续实验。

2.8 淋巴细胞增殖实验

2.8.1 CFSE 染色检测淋巴细胞增殖 磁珠分选 CD4^+ 和 CD8^+ T 细胞, CFSE 染色 10 min, PBS 清洗, 激发型鼠抗人 CD3 单抗包被 24 孔板, 4 °C 过夜, 吸去上清液, PBS 洗涤 3 遍。用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基将 T 细胞调整为每毫升 1×10^6 个, 接种于 24 孔板, 并加入 B7-H4-Ig, 或再加入 3C8, 将 CFSE 染色的 T 淋巴细胞放置 24 孔板培养 72 h, 收集细胞, 流式检测。

2.8.2 CCK8 法检测淋巴细胞增殖 处理 96 孔板的方法同上, 收集的 T 淋巴细胞置于 96 孔板培养 24, 48, 72 h 后加入 CCK8, 检测 495 nm 处吸收度。

2.8.3 T 细胞分泌细胞因子的检测 取 T 细胞培养上清液, ELISA 法检测 IFN- γ 和 IL-2 的分泌量, 按试剂盒说明书操作。

3 结果

3.1 鼠抗人 B7-H4 单克隆抗体 3C8 的纯化制备

首先用杂交瘤细胞 3C8 注射小鼠腹腔, 获得腹水, 然后进行抗体的纯化。抗体纯化的第 1 步是 Hitrap Protein G 亲和色谱, 色谱条件及结果见图 1-A, 收集两个峰, 流式细胞仪检测与 B7-H4/293T 转基因细胞株的结合(图 1-A), 发现峰 II 可特异性地

与 B7-H4 转基因细胞株结合, 说明峰 II 是目标抗体。接下来对亲和色谱获得的峰 II 进行精制。采用离子交换柱, 色谱条件及结果见图 1-B, 收集 5 个峰, 流式细胞仪检测与 B7-H4/293T 转基因细胞株的结合(图 1-B), 发现峰 IV 可特异性地与 B7-H4 转基因细胞株结合, 说明峰 IV 是目标抗体。接着对两步纯化法制备获得的样品进行纯度检测。首先对第 2 步离子交换柱色谱获得的收集峰 IV 用反相柱色谱进行纯度检测, 色谱条件及结果见图 1-C, 软件分析其纯度为 93.16%。接着采用 SDS-PAGE 电泳分析小鼠腹水、亲和色谱获得的抗体组分及离子交换柱精制获得的抗体组分, 结果显示通过两步色谱纯化, 抗体的纯度越来越高, 最后获得的抗体电泳结果显示含有重链和轻链, 轻链相对分子质量约为 25 kD, 重链相对分子质量约为 55 kD(图 1-D)。

3.2 单克隆抗体 3C8 结合特异性

将纯化精制的 3C8 单克隆抗体与 Mock/293T 和 B7-H4/293T 转基因细胞结合, 结果显示 3C8 可特异性与 B7-H4/293T 转基因细胞结合, 而不与 Mock/293T 转基因细胞结合(图 2-A), 说明 3C8 可特异性识别 B7-H4 分子。由于 B7 家族成员一级序列及空间结构有高度相似性, 为进一步确认 3C8 识别 B7-H4 分子的特异性, 又检测了 3C8 与 B7 家族其他成员的转基因细胞的结合情况, 结果显示 3C8 不和 B7 家族其他成员的转基因细胞结合(图 2-B)。

3.3 单克隆抗体 3C8 的应用范围

3C8 抗体是通过流式筛选获得的, 因此该抗体明确可用于流式检测, 但是否能用于其他实验方法的检测尚未知, 因此通过一系列实验方法验证其用途。首先进行免疫荧光实验, 结果显示 3C8 可成功染色 B7-H4/293T 转基因细胞株, 而 Mock/293T 细胞 3C8 不染色(图 3-A), 说明该单抗可用于免疫荧光试验。接着又进行免疫印迹, 发现 B7-H4/293T 细胞提取液用 3C8 进行 Western blot 呈阳性结果, Mock/293T 则呈阴性结果(图 3-B), 说明 3C8 抗体也可用于免疫印迹实验。根据文献报道, 人正常组织基本不表达 B7-H4, 而肿瘤组织往往特异性高表达 B7-H4^[9], 因此收集了临床肾癌组织标本和癌旁正常组织, 前列腺癌组织标本及癌旁正常组织, 免疫组化染色结果显示前列腺癌旁正常组织

及肾癌旁正常组织 B7-H4 都呈阴性表达(图 3-C I,Ⅲ),而肿瘤组织都特异性高表达 B7-H4(图 3-C II,Ⅳ)。说明 B7-H4 可作为肿瘤诊断和治疗的一个靶分子,3C8 可作为特异性识别肿瘤组织 B7-H4 的一个抗体。

3.4 3C8 抗体可阻断 B7-H4 分子的负性共刺激活性

由于已知 B7-H4 通过与活化 T 细胞表面未知受体结合而抑制 T 细胞功能,为进一步研究 3C8 抗体对 B7-H4 功能的影响,采集健康人外周血, Ficoll 分离获得人单核细胞,贴壁培养收集人淋巴

细胞,anti-CD3 单克隆抗体刺激 T 细胞使其激活,用购买的 B7-H4-Ig 分子与 T 细胞结合,PE 二抗染色,流式细胞仪观察 T 细胞与 B7-H4-Ig 的结合情况,结果显示 B7-H4-Ig 不与未活化的 T 细胞结合,但可特异性与活化 T 细胞结合,当加入 3C8 抗体时,由于 3C8 与 B7-H4-Ig 的竞争结合,阻断了 B7-H4-Ig 与活化 T 细胞的结合(图 4-A)。当用 CFSE 对活化 T 细胞染色后流式细胞仪观察 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的增殖分裂,发现未激活的 T 细胞基本不增殖分裂,而被 anti-CD3 单克隆抗体激活后的 T 细胞分裂增殖旺盛,当加入 B7-H4-Ig 时 T 细

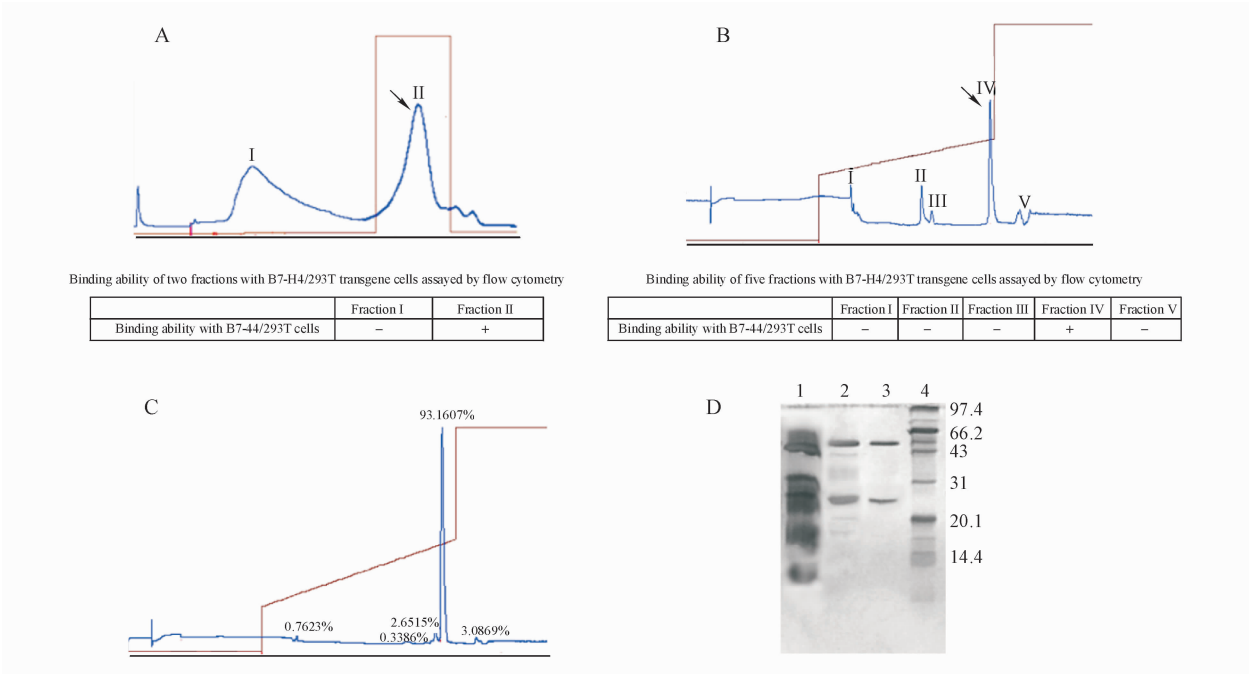


Figure 1 Purification step of anti-B7-H4 mAb 3C8 and the assessment of purity
A;Mice ascites purified by Hitrap Protein G affinity column. The ascited purified by the affinity column under the condition showed in figure and the ability of fraction I and II to bind with B7-H4/293T cells were assayed by flow cytometry. - No binding; + Binding;B;Fraction ii collected from affinity column was further purified by DEAE FF anion exchange chromatography under the condition showed in figure. Five fractions were collected in this step. The ability of these fractions to bind with B7-H4/293T cells were assayed by flow cytometry. - No binding; + Binding;C;The purity of the product was assayed by Zorbax 300SB-C19 reverse chromatography under the conditions showed in figure;D:The purity of ascites,fraction collected from affinity column,or from the anion exchange column were assayed by SDS-PAGE. band 1-Ascites;band 2-Fraction II from affinity column;band 3-Fraction IV from DEAE FF column;band 4-Marker

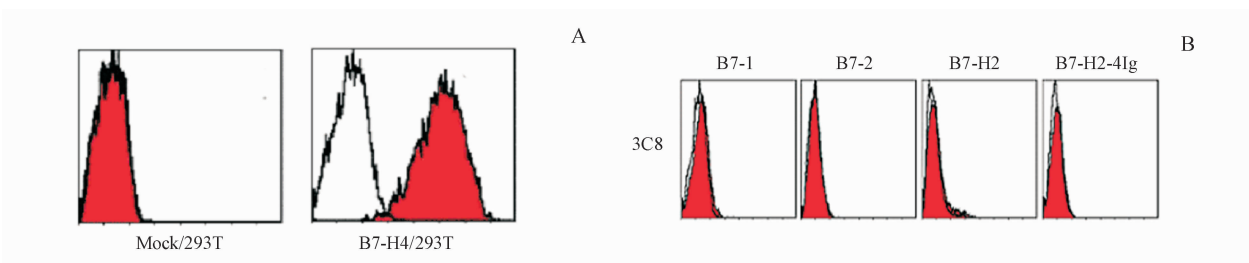


Figure 2 Specificity of the binding between mAb 3C8 and B7-H4
A;Flow cytometry analysis of the binding between 3C8 and B7-H4/293 T cells;B;Flow cytometry analysis of 3C8 and other B7 family members transgene cells

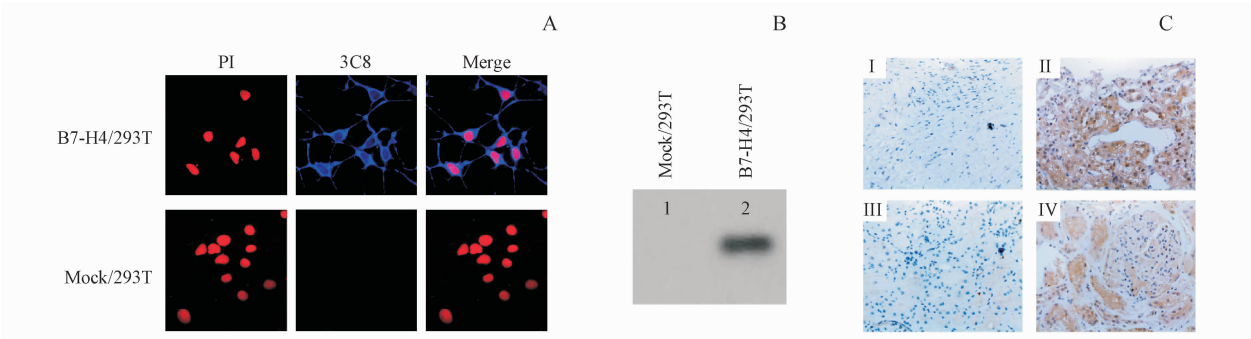


Figure 3 Usage of 3C8 in immunofluorescence, Western blot and immunohistochemistry
A: Usage of 3C8 in immunofluorescence observed under Laser confocal microscope; B: Usage of 3C8 in Western blot by detecting Mock/293T and B7-H4/293T; C: Usage of 3C8 in immunohistochemistry by detecting tumor and para-tumor tissue. I-Para-tumor tissue of prostatic cancer; II-Prostatic tumor tissue; III-Para-tumor tissue of renal cell carcinoma; IV-Renal cell carcinoma tissue

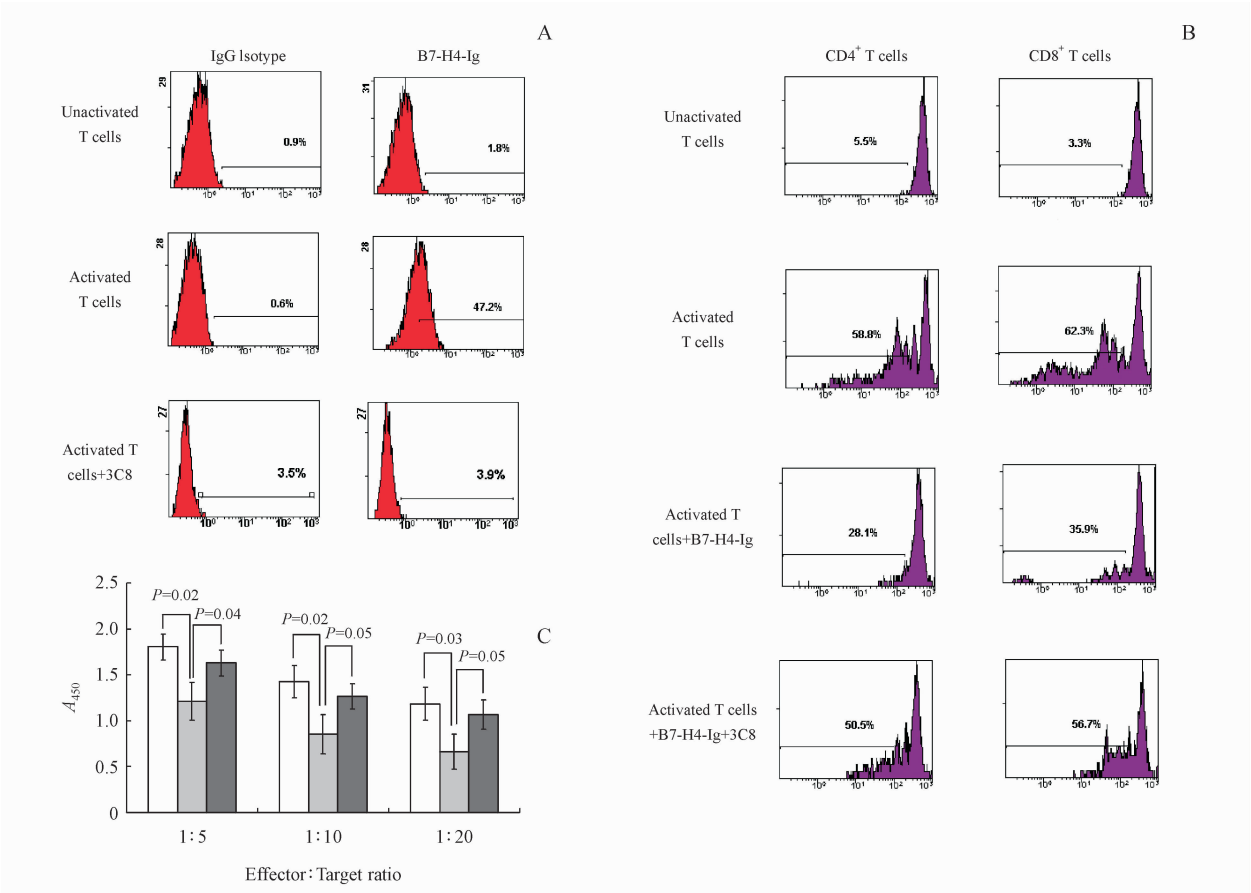


Figure 4 3C8 blocked the binding of B7-H4-Ig with activated T cells and the inhibition of B7-H4-Ig on T cell proliferation
A: 3C8 blocked the binding of B7-H4-Ig with activated T cells; B: 3C8 blocked the inhibition of B7-H4-Ig on T cell proliferation; C: T cell proliferation was assayed by CCK8 kit

胞的增殖受到抑制,但如果再加入 3C8 抗体,则可阻断 B7-H4-Ig 抑制 T 细胞的增殖作用(图 4-B)。除了使用 CFSE 染色外,又采用 CCK8 检测了活化 T 细胞的增殖作用,结果显示 B7-H4-Ig 可抑制 T 细胞的增殖,而 3C8 可阻断 B7-H4-Ig 的抑制,使 T 细胞恢复正常的增殖作用(图 4-C)。

3.5 3C8 阻断 B7-H4-Ig 对 T 细胞因子分泌的抑制作用

除了检测 T 细胞增殖的相关参数,又采用 ELISA 法检测了 T 细胞因子 IFN- γ (图 5-A)和 IL-2(图 5-B)的分泌,发现 B7-H4-Ig 可抑制活化 T 细胞分泌细胞因子,但 3C8 可阻断这种抑制作用。

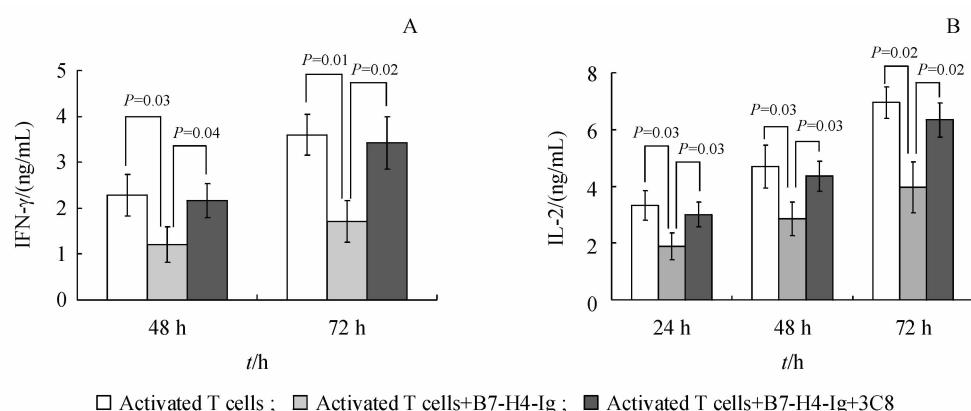


Figure 5 B7-H4-Ig inhibited T cell cytokine secretion and 3C8 abrogated the inhibition
A: Interferon-γ and IL-2; B: Secreted by T cells was assayed by ELISA. B7-H4-Ig inhibited the cytokines secretion and 3C8 abrogated the inhibition

4 讨论

B7-H4 与 PD-L1 和 CTLA-4 同属于 B7 家族分子,作为免疫卡控点之一,已被免疫学列入干预肿瘤免疫逃逸的靶点之一^[10-11]。由于 B7-H4 在肿瘤免疫逃逸中的作用机制与 PD-L1 高度相似,所以开发单克隆抗体干预肿瘤免疫逃逸的临床疗效预期性很高。通常认为,干预 B7-H4 的作用,可以提高肿瘤浸润 T 淋巴细胞的作用,提高免疫治疗的效果^[11]。有研究者将 B7-H4 的单克隆抗体 1H3 和 12D11 给小鼠注射,发现它们可以显著抑制肿瘤生长,增加 T 细胞和 NK 细胞的浸润,降低 MDSC 的浸润,延长生命^[12]。此外,将幸存的小鼠给予 1H3 处理,则发现这些小鼠能够抵抗肿瘤的再次侵袭^[12]。由实验结果可以推测 B7-H4 的单抗药物在肿瘤的免疫治疗中具有远大的前景,并且 1H3 可能对其他的肿瘤的免疫治疗同样有效。在卵巢癌小鼠肿瘤模型中,B7-H4 单克隆抗体单链可变区片段(scFv)能够延缓肿瘤的生长,并且能够解除体外 B7-H4⁺ APC 细胞对肿瘤特异性 T 细胞活性的抑制^[13-14]。最近有学者研究发现,将 B7-H4 单抗与抗有丝分裂药物偶联能够治疗乳腺癌^[15]。

本研究发现,3C8 作为识别 B7-H4 的特异性单抗,可阻断 B7-H4-Ig 对 T 细胞的增殖抑制及 T 细胞因子分泌的抑制作用,具有潜在的应用价值。3C8 对肿瘤免疫逃逸的阻断作用的体内试验及其在肿瘤诊断和肿瘤治疗中的应用有待进一步研究。

参考文献

- [1] Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**(1): 185-190.
- [2] Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, et al. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family [J]. *Immunity*, 2016, **44**(5): 955-972.
- [3] Swaika A, Hammond WA, Joseph RW. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-I agents in cancer therapy [J]. *Mol Immunol*, 2015, **67**(2 Pt A): 4-17.
- [4] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity [J]. *Immunity*, 2003, **18**(6): 849-861.
- [5] Prasad DV, Richards S, Mai XM, et al. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation [J]. *Immunity*, 2003, **18**(6): 863-873.
- [6] Zang X, Loke P, Kim J, et al. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(18): 10388-10392.
- [7] Awadallah NS, Shroyer KR, Langer DA, et al. Detection of B7-H4 and p53 in pancreatic cancer: potential role as a cytological diagnostic adjunct [J]. *Pancreas*, 2008, **36**(2): 200-206.
- [8] Miyatake T, Tringler B, Liu W, et al. B7-H4 (DD-O110) is over-expressed in high risk uterine endometrioid adenocarcinomas and inversely correlated with tumor T-cell infiltration [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, **106**(1): 119-127.
- [9] Podojil JR, Miller SD. Potential targeting of B7-H4 for the treatment of cancer [J]. *Immunol Rev*, 2017, **276**(1): 40-51.
- [10] Ni L, Dong C. New B7 family checkpoints in human cancers [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, **16**(7): 1203-1211.
- [11] MacGregor HL, Ohashi PS. Molecular pathways: evaluating the potential for B7-H4 as an immunoregulatory target [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, **23**(12): 2934-2941.
- [12] Jeon H, Vigdorovich X, Garrett-Thomson SC, et al. Structure and

cancer immunotherapy of the B7 family member B7x [J]. *Cell Rep*, 2014, 9(3): 1089–1098.

- [13] Dangaj D, Lanitis E, Zhao A, et al. Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(15): 4820–4829.

[14] Dangaj D, Scholler N. Isolation and validation of Anti-B7-H4 scFvs from an ovarian cancer scFv yeast-display library [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1319: 37–49.

- [15] Leong SR, Liang WC, Wu Y, et al. An anti-B7-H4 antibody-drug conjugate for the treatment of breast cancer [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(6): 1717–1729.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2018 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:中国科学引文核心数据库(CSCD 核心)、《中文核心期刊要目总览》(2014 年版)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008 年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010 年连续 3 次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国知网,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社《中国学术期刊影响因子年报(2010 版)》公布的最新数据,《中国药科大学学报》复合影响因子为 1.171,位居中国药学学术期刊第 4 位。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128 页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115

定 价:40 元/期,全年 240 元

地 址:南京市童家巷 24 号

邮政编码:210009

电 话:025-83271566

传 真:025-83271279

E-mail: xuebao@cpu.edu.cn

http://www.zgykdxxb.cn