

# 融合蛋白 G3G6 和 HST1 致敏 DC 疫苗抗黑色素瘤的药效学研究

王睿<sup>1#</sup>, 王永梅<sup>1#</sup>, 蔡铭君<sup>1</sup>, 柯学佳<sup>1</sup>, 吴越<sup>1</sup>, 崇军<sup>2\*</sup>, 曹荣月<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198; <sup>2</sup>上海复星长征医学科学有限公司, 上海 200444)

**摘要** 探究促性腺激素释放激素(GnRH)与胃泌素释放肽(GRP)偶联的融合蛋白(G3G6)和热休克蛋白65(HSP65)与六跨膜前列腺上皮抗原(STEAP1)偶联的融合蛋白(HST1)致敏树突状细胞(DC)的效果和致敏后DC对B16F10黑色素瘤的抑制杀伤作用。利用实验室现存工程菌表达融合蛋白G3G6和HST1,按未致敏DC(US-DC)组,G3G6融合蛋白致敏DC(G3G6-DC)组,HST1融合蛋白致敏DC(HST1-DC)组和G3G6及HST1联合致敏DC(GH-DC)组致敏小鼠骨髓来源的DC分化成熟,获得融合蛋白致敏的相应DC疫苗。将B16F10黑色素瘤细胞以 $1 \times 10^6$ 个/只移植于C57BL/6J雄性小鼠构建黑色素瘤模型,DC疫苗免疫治疗,体内外实验探究DC疫苗的抗肿瘤药效。流式细胞术分析证明,融合蛋白有效刺激DC分化成熟;动物实验显示,与US-DC组相比,G3G6-DC黑色素瘤抑制率为35.75%,HST1-DC组为34.03%,GH-DC组为55.74%。研究结果初步证明,G3G6-DC和HST1-DC均可有效抑制黑色素瘤B16F10细胞小鼠移植瘤的生长( $P < 0.05$ ),且联合用药优于单独用药( $P < 0.01$ )。

**关键词** 黑色素瘤;免疫治疗;树突状细胞疫苗;促性腺激素释放激素;胃泌素释放肽;六跨膜前列腺上皮抗原;热休克蛋白65

**中图分类号** R73-36 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)02-0238-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190216

**引用本文** 王睿,王永梅,蔡铭君,等.融合蛋白G3G6和HST1致敏DC疫苗抗黑色素瘤的药效学研究[J].中国药科大学学报,2019,50(2):238-245.

**Cite this article as:** WANG Rui, WANG Yongmei, CAI Mingjun, et al. Pharmacological effects of anti-melanoma DC vaccine sensitized by fusion proteins of G3G6 and HST1[J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(2): 238-245.

## Pharmacological effects of anti-melanoma DC vaccine sensitized by fusion proteins of G3G6 and HST1

WANG Rui<sup>1#</sup>, WANG Yongmei<sup>1#</sup>, CAI Mingjun<sup>1</sup>, KE Xuejia<sup>1</sup>, WU Yue<sup>1</sup>, CHONG Jun<sup>2\*</sup>, CAO Rongyue<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

<sup>2</sup>Shanghai Fosun Long March Medical Science Co., Ltd., Shanghai 200444, China

**Abstract** This study aimed to investigate the effects of fusion proteins GnRH-GRP (G3G6) and HSP65-STEAP1 (HST1) on dendritic cells (DC) and the sensitization of DCs to B16F10 melanoma. The fusion proteins G3G6 and HST1 were obtained using the previous engineering strains in our laboratory. Group by unsensitized DC (US-DC), the G3G6 fusion protein sensitized DC, the HST1 fusion protein sensitized DC (HST1-DC) and the combined sensitized DC (GH-DC), the mouse bone marrow-derived DCs were sensitized with fusion protein to obtain the fusion protein sensitized DC vaccines. B16F10 melanoma cells were transplanted into C57BL/6J male mice to construct a melanoma model ( $1 \times 10^6$  cells per mouse), and DC vaccine was injected for treatment. The

**收稿日期** 2019-01-28 **通信作者** \* Tel:021-60765888 E-mail:chongjun@fosunpharma.com

\*\* Tel:025-86185515 E-mail:caorongyuenanjing@126.com

**基金项目** 国家基础科学人才培养基金资助项目(No. J1310032);国家自然科学基金资助项目(No. 81373232, No. 81673340);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

<sup>#</sup>王睿和王永梅对本论文的贡献相同

antitumor efficacy of DC vaccine was explored by *in vitro* and *in vivo* experiments. Flow cytometry analysis showed that the fusion protein can effectively stimulate DC into differentiation and maturation; in the animal experiment, the inhibition rate of melanoma treated with G3G6-DC was 35.75%, that of HST1-DC group and combination group were 34.03% and 55.74%. It was initially proved that both G3G6-DC and HST1-DC can effectively inhibit the growth of transplanted tumors of melanoma B16F10 cells in mice, and the combination therapy is superior to the single therapy.

**Key words** melanoma; immunity therapy; dendritic cell vaccine; gonadotropin releasing hormone (GnRH); gastrin releasing peptide (GRP); six transmembrane epithelial antigens of prostate 1 (STEAP1); heat shock protein 65 (HSP65)

This study was supported by the National Fund for Fostering Talents in Basic Science(No. J1310032); the National Natural Science Foundation of China (No. 81373232, No. 81673340) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions(PAPD)

#WANG Rui and WANG Yongmei contributed equally to this work

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是一种起源于神经嵴黑色素细胞并由异常黑色素细胞过度增生引发的高度恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,主要见于皮肤,发病率约占所有恶性肿瘤的1%~3%。因MM对放疗及化疗的敏感性差,临床治疗难度大,有效率低,寻求各种治疗方法以延长MM患者的生存期是治疗的关键<sup>[2]</sup>。近年来,随着生物技术的迅速发展,以调动机体的免疫功能来抑制肿瘤细胞增殖为基础的肿瘤免疫治疗,已被广泛研究和应用于临床并取得了一定疗效,成为继手术、放疗和化疗之后的又一重要的治疗手段<sup>[3]</sup>。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现功能最强,能激活初始T细胞的专职抗原递呈细胞,可以诱导、调节和维持CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞免疫反应<sup>[4-6]</sup>。以DC为基础的免疫疗法已被应用于恶性肿瘤(如黑色素瘤)的治疗<sup>[7]</sup>。然而,DC的主要功能不是消除病原体,而是在其表面上呈递其抗原,从而诱导T细胞对病原体的特异性免疫应答<sup>[8]</sup>。因此,选取合适肿瘤抗原刺激DC,是DC疫苗发挥治疗作用的关键。

促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)及其受体在多种肿瘤细胞表面高表达,作为重要介质和其他生物因子一起构成复杂的信号转导网络,可通过对性腺轴内分泌调节、对细胞的自分泌调节发挥肿瘤抑制作用<sup>[9]</sup>。而胃泌素释放肽(gastrin releasing peptide, GRP)是一种含有27个氨基酸的胃肠道神经激素。研究证实GRP与许多恶性肿瘤的发生、转移和侵袭密切相关,并可以刺激肿瘤的生长,通过自分泌或旁分泌途径参

与肿瘤新生血管形成并促进肿瘤转移<sup>[10]</sup>。

在许多肿瘤患者体内,多因肿瘤抗原无法识别或T细胞无法活化而发生免疫逃逸<sup>[11]</sup>。为避免该现象,选用GnRH与GRP偶联的融合蛋白制得双靶点DC疫苗来探究其对黑色素瘤的抑制效果。

相比正常组织,六跨膜前列腺上皮抗原(six transmembrane epithelial antigens of prostate 1, STEAP1)在多种肿瘤类型中过度表达,包括黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、卵巢癌和尤文肉瘤<sup>[12-17]</sup>,可认为STEAP1是一个理想的抗肿瘤疫苗靶点。而研究表明,当STEAP1应用为单靶点DNA疫苗进入体内时,其免疫原性较差<sup>[18]</sup>。近年来,已开发出各种免疫佐剂以避免不良反应,载体蛋白如分枝杆菌热休克蛋白65(HSP65)具有这种佐剂特性。研究表明,HSP65抗原不仅可以上调细胞免疫反应<sup>[19]</sup>,还可以显著提高负荷抗原的免疫原性,刺激机体产生免疫反应<sup>[20-21]</sup>。因此,本研究选用STEAP1为另一致敏DC抗原,并将其与HSP65偶联以增强免疫原性。

## 1 材 料

### 1.1 菌种和质粒

菌种 *Escherichia coli* BL21 (DE3), pET28a-GnRH3-hinge-MVP-GRP6, pET-28a-His-HSP65-STEAP1<sub>186-193</sub>质粒均为本实验室保存。

### 1.2 动物和细胞株

C57BL/6J 雄性小鼠(6周龄,扬州大学实验动物中心,SCXK(苏)2017-0007);黑色素瘤 B16F10 细胞株为本实验室保存。所有动物实验均符合动

物伦理委员会标准。

## 2 方 法

### 2.1 融合蛋白的制备

对实验室现存含有目的基因的工程菌 pET28a-GnRH3-hinge-MVP-GRP6 和 pET-28a-His-HSP65-STEAP1<sub>186-193</sub> 进行诱导表达,将表达蛋白分离提取并纯化,真空冷冻干燥后得到融合蛋白 GnRH3-GRP6 (G3G6)和 HSP65-STEAP1 (HST1)冻干粉末。

### 2.2 B16F10 黑色素瘤细胞的培养

从液氮中取出冻存的 B16F10 黑色素瘤细胞,37℃ 水浴解冻后加入 RPMI 1640 培养基 10 mL 混匀,离心弃上清液,加入全培养基重悬,37℃、5% CO<sub>2</sub> 下培养 48 h,观察细胞生长状态,换液传代培养。

### 2.3 DC 疫苗的制备

脱颈处死小鼠,75% 乙醇消毒 5 min,无菌取出小鼠后腿的胫骨和股骨,剪断两端骨髓,用不完全培养基冲洗骨髓直至骨变白,将冲洗液离心弃上清液,重复洗涤沉淀 1 次,加入红细胞裂解液 10 mL 混匀静置(室温、3 min),离心除去红细胞,重悬洗涤调整细胞数为每毫升  $5 \times 10^6$  个,加入含有 20 ng/mL rmGM-CSF,10 ng/mL rmIL-4 的完全培养基,隔日半量换液,在第 7 天分组加入 20 μg/mL 已纯化的 G3G6 以及 HST1 融合蛋白以致敏 DC,继续培养 24 h,观察细胞的数量形态,离心后调整细胞数为每毫升  $1 \times 10^6$  个,即得 DC 疫苗。

分组策略如下:(1) G3G6 融合蛋白致敏 DC (G3G6-DC)组;(2) HST1 融合蛋白致敏 DC (HST1-DC)组;(3) G3G6 及 HST1 联合致敏 DC (GH-DC)组;(4) 未致敏 DC (US-DC)组,加入与融合蛋白等量完全培养基,作为阴性对照组。

### 2.4 流式细胞仪检测 DC 成熟度

收集未致敏 DC 和融合蛋白致敏的 DC 到检测管中,离心后用 PBS 进行洗涤,再次离心后用预冷的 PBS 100 μL 重悬,采用 FITC 抗小鼠 CD11c,PE 抗小鼠 CD86 和 APC 抗小鼠 CD<sub>80</sub> 标记所有细胞样品并设置对照组,冰浴避光染色 30 min,离心用预冷的 PBS 200 μL 重悬,以未致敏 DC 组作为阴性对照进行流式检测。

### 2.5 体内药效为研究

2.5.1 B16F10 黑色素瘤细胞的培养和皮下移植模型的建立 调整 B16F10 黑色素瘤细胞单细胞

悬液密度为每毫升  $5 \times 10^6$  个,与第 0 天接种于小鼠腋部皮下。

2.5.2 荷瘤小鼠的分组及免疫方法 将动物随机分为 4 组,每组 5 只,按照未致敏 DC (US-DC)组, G3G6 融合蛋白致敏 DC (G3G6-DC)组, HST1 融合蛋白致敏 DC (HST1-DC)组和 G3G6 及 HST1 联合致敏 DC (GH-DC)组于第 3、10、17 天进行免疫治疗,于第 8、12、16、20 天对小鼠进行称重,第 21 天处死小鼠取各组肿瘤、脾脏、胸腺称重,计算抑瘤率 (IR)和脏器指数,留脾脏培养用于效靶比测定实验。给药方式见表 1。

$$IR = (\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量 (mg)} / \text{体重 (g)} \times 100\% \quad (2)$$

Table 1 Dosing regimen of C57BL/6J (n=5)

Group	Dosage (Per mouse)	Administration
US-DC	$5 \times 10^5$ cells	iH
G3G6-dc	$5 \times 10^5$ cells	iH
HST1-DC	$5 \times 10^5$ cells	iH
GH-DC	$5 \times 10^5$ cells	iH

US-DC: unsensitized DC; G3G6-DC: G3G6 fusion protein sensitized DC; HST1-DC: HST1 fusion protein sensitized DC; GH-DC: G3G6 and HST1 fusion protein sensitized DC

2.5.3 黑色素瘤块病理分析 将剥取的肿瘤组织浸没于 10% 福尔马林溶液中固定 24 h,送交第三方切片公司,HE 染色检验。

### 2.6 脾细胞的培养

剥取的小鼠脾脏称重后研磨过筛网(100 目),PBS 洗涤重悬,加入等量的红细胞裂解液,离心取沉淀,经 PBS 洗涤后离心取沉淀,调整细胞数为每毫升  $1 \times 10^7$  个,加入完全培养基 5 mL,37℃、5% CO<sub>2</sub> 下按原分组进行培养,观察细胞生长状态同时给细胞换液传代。

### 2.7 最佳效靶比的确定

调整培养脾脏细胞数为每毫升  $2 \times 10^6$  个,按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中。以 DC 疫苗与细胞悬液分别作为效应细胞和靶细胞,按 1:5,1:10 以及 1:15 的比例加入靶细胞。效应细胞分组:未致敏 DC 组, G3G6 融合蛋白致敏 DC 组, HST1 融合蛋白致敏 DC 组和联合致敏 DC 组。培养 48 h 后按 CCK-8 检测试剂盒测定吸收度并计算增殖指数 (SI)。

## 2.8 统计分析

实验中采用 SPSS 19.0 统计软件分析,采用方

差检验分析组间差异, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。整体实验流程如图 1 所示。

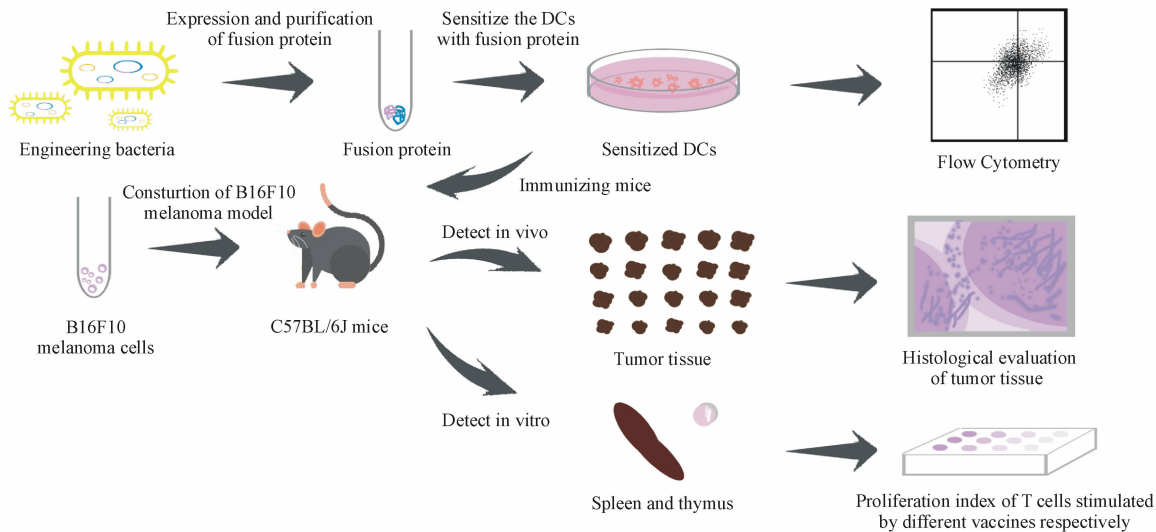


Figure 1 Experimental flow chart

## 3 结果

### 3.1 DC 细胞的培养与成熟分化

如图 2 所示,在培养初期,DC 细胞均呈圆形且直径较小(图 2-A)。随培养时间的延长,DC 细胞

直径逐渐增大并且有堆叠生长的趋势(图 2-B)。培养第 6 天可观察到部分 DC 细胞表面伸出伪足,融合蛋白致敏后则大部分 DC 细胞表现出树突状(图 2-D),即成熟树突状细胞的特征。

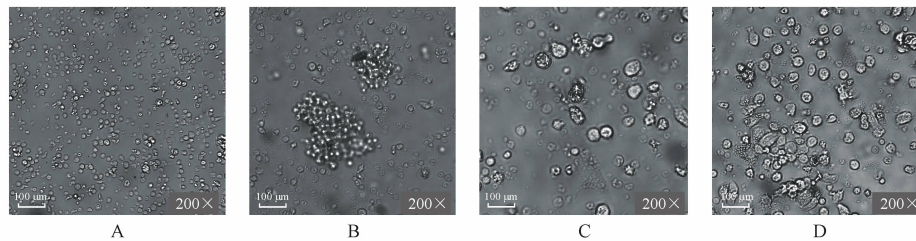


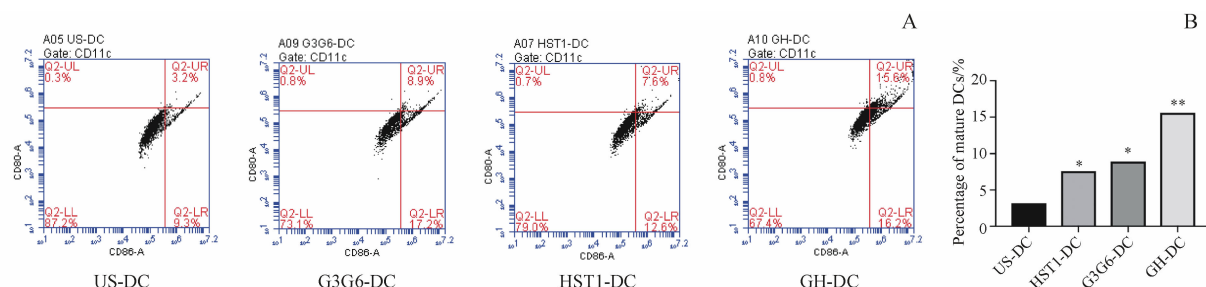
Figure 2 Morphology of dendritic cells (DC) under microscope (200 ×)

A-D: DC training photos of the second day, the fourth day, the sixth day and the eighth day, respectively

经流式细胞仪检测,结果用 BD Accuri C6 进行分析,如图 3,所有细胞都处于 CD11c 阳性范围中。相同培养时间,未经蛋白致敏的 DC 细胞中表达成熟信号分子的细胞占比 3.2%,经 G3G6 融合蛋白致敏成熟的细胞占比 8.9%,经 HST1 融合蛋白致敏的成熟细胞表达标志分子的强度则为 7.6%,而经 G3G6 和 HST1 两融合蛋白联合致敏的 DC 细胞成熟率高达 15.6%。由此说明,DC 细胞在 G3G6 和 HST1 两融合蛋白联合刺激后能够显著上调 CD11c、CD86 和 CD80 的表达量( $P < 0.05$ ),而融合蛋白 G3G6 与 HST1 的致敏效果引起的表达上调之间并无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 3.2 DC 疫苗的体内药效探究

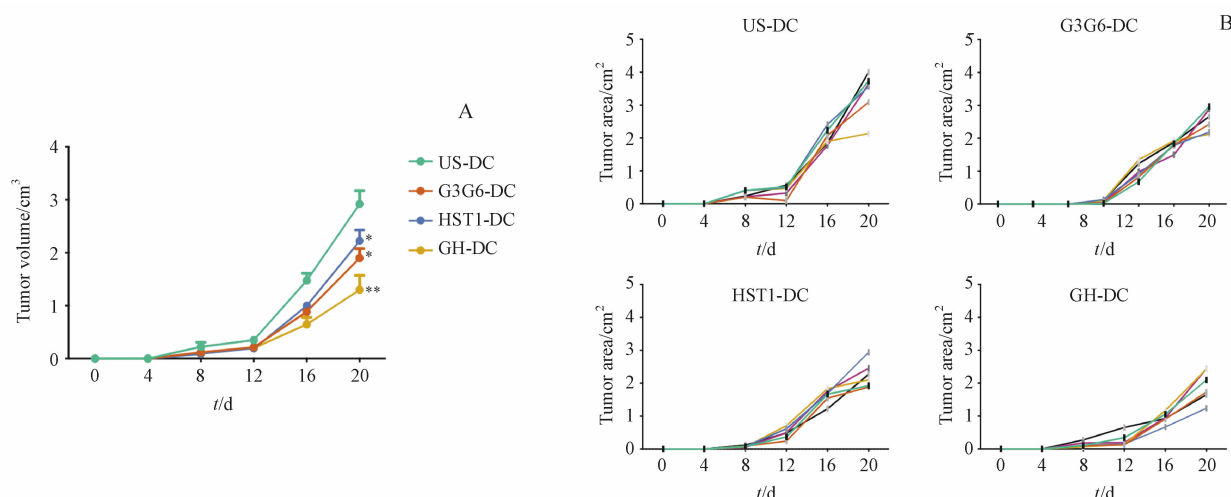
为探究融合蛋白致敏 DC 疫苗的抗肿瘤效果,本研究选择在 C57BL/6J 雄性小鼠体内构建黑色素瘤模型进行探究。在第 0 天将培养适当的 B16F10 黑色素瘤细胞悬液接种于小鼠腋下,并在第 3、10、17 天分组向小鼠体内注射融合蛋白致敏 DC 疫苗进行治疗。在第 8、12、16、20 天分别测定并计算各组小鼠负荷肿瘤面积和面积并绘制生长曲线如图 4。由生长曲线,各融合蛋白致敏 DC 组的肿瘤面积和肿瘤体积均小于注射未致敏 DC 组,可认为各实验组均有抑瘤效果,其中联合致敏组即 GH-DC 组抑瘤效果最佳。



**Figure 3** Cell surface molecules on DC (A) and the percentage of mature DC in each group (B) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs US-DC group

US-DC: Unsensitized DC; G3G6-DC: GnRH-GRP fusion protein sensitized DC; HST1-DC: HSP65-STEAP1 fusion protein sensitized DC; GH-DC: G3G6 and HST1 combined sensitized DC



**Figure 4** Growth detection of different fusion protein DC sensitized tumor

A: Increase of the tumor volume during treatment ( $\bar{x} \pm s, n=5$ ); B: Increase of the tumor area during treatment

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs US-DC group

HST1-DC: HSP65-STEAP1 fusion protein sensitized DC; GH-DC: G3G6 and HST1 combined sensitized DC

肿瘤面积计算公式:

$$A = L \times W \quad (3)$$

其中:  $A$  为肿瘤面积,  $L$  为长度,  $W$  为宽度。

肿瘤体积计算公式:

$$V = L \times W^2 / 2 \quad (4)$$

其中:  $V$  为肿瘤体积,  $L$  为长度,  $W$  为宽度。

于第 24 天结束治疗,处死小鼠并分组剥去肿瘤组织、脾脏和胸腺称重并拍照如图 5。由肿瘤组织照片,可观察出各融合蛋白致敏 DC 组瘤块均小于未致敏 DC 组。数据处理得:G3G6-DC 组的抑瘤率为 35.75%,HST1-DC 组的抑瘤率为 34.03%,而 GH-DC 的抑瘤率为 55.74%,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

由公式(2)得脾脏脏器指数和胸腺脏器指数。如图 6,相比未致敏组,各融合蛋白致敏 DC 组小鼠的脾脏和胸腺均有增大,其中联合致敏组的增大最

为显著,具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。由此可证明,融合蛋白致敏 DC 可有效激发小鼠体内免疫系统,从而发挥抗肿瘤效果。

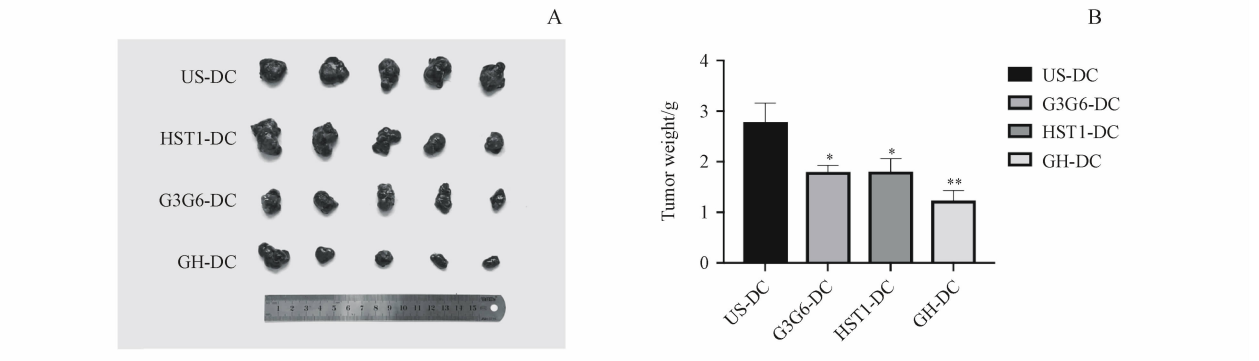
### 3.3 肿瘤组织切片分析

为进一步研究融合蛋白致敏 DC 疫苗抑制肿瘤的药效,光学显微镜观察组织染色切片。如图 7 显示,US-DC 组中少见肿瘤组织坏死,核固缩、核碎裂或溶解;可见病理性核分裂象,如黄色箭头所示;多见肿瘤细胞肿胀,胞质疏松或呈空泡化,如红色箭头所示;少量肿瘤细胞凋亡,如蓝色箭头所示;无明显炎症细胞浸润。G3G6-DC 组可见较大面积组织细胞坏死,核固缩、核碎裂或溶解,并伴有大量出血,如黑色箭头所示;部分肿瘤细胞凋亡,如蓝色箭头所示。HST1-DC 组中肿瘤组织局部出血,细胞红染,无细胞结构,如黑色箭头所示;多见肿瘤细胞肿胀,胞质疏松或呈空泡化,如红色箭头所示;局

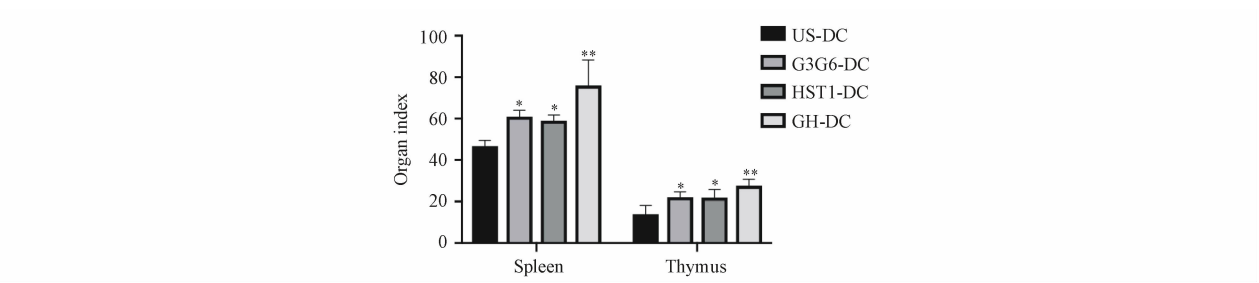


部出现小型钙化灶,如绿色箭头所示;少量肿瘤细胞凋亡,如蓝色箭头所示。GH-DC 组肿瘤组织较松散,一处被膜处大面积出血,局部少量出血;少量肿瘤组织坏死,核固缩、核碎裂或溶解如黑色箭头所示;部分肿瘤细胞肿胀,胞质疏松或呈空泡化,如

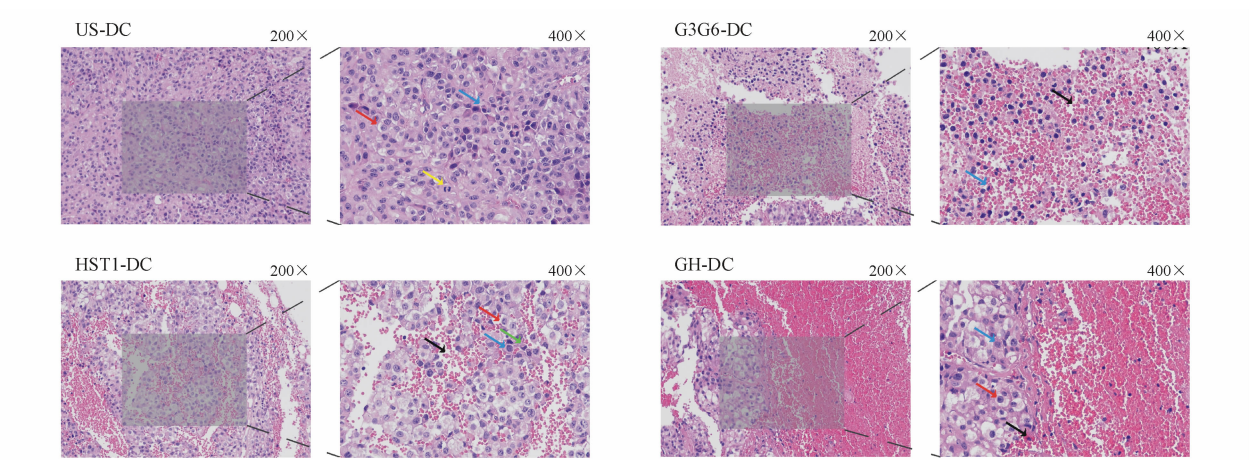
红色箭头所示;少量肿瘤细胞凋亡,如蓝色箭头所示。由此可见,相比未致敏组,各融合蛋白致敏 DC 组均可诱导机体杀伤肿瘤细胞,其中 GH-DC 组即联合致敏组效果优于单一致敏组。



**Figure 5** Final detection of the tumor inhibition  
A: Photograph of the tumor removed from the mice; B: Tumor weight histogram in the end of the treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs US-DC group



**Figure 6** Organ index of spleen and organ index of thymus ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs US-DC group



**Figure 7** Histopathology change of tumor tissues

3.4 最佳效靶比的确定

如图 8, CCK-8 检测结果表明各实验组均可刺激 T 细胞的增殖, 其中效靶比为 1: 5 和 1: 10 的增殖指数均高于 1: 15, 可认为较高浓度的 DC 可以对刺激 T 淋巴细胞增殖产生更显著的效果; 与未致

敏 DC 组相比, G3G6-HST1 联合致敏 DC 组可以形成较高的增殖效应 ( $P < 0.01$ ), 其增殖指数高于 G3G6 融合蛋白致敏 DC 组与 HST1 融合蛋白致敏 DC 组 ( $P < 0.05$ )。

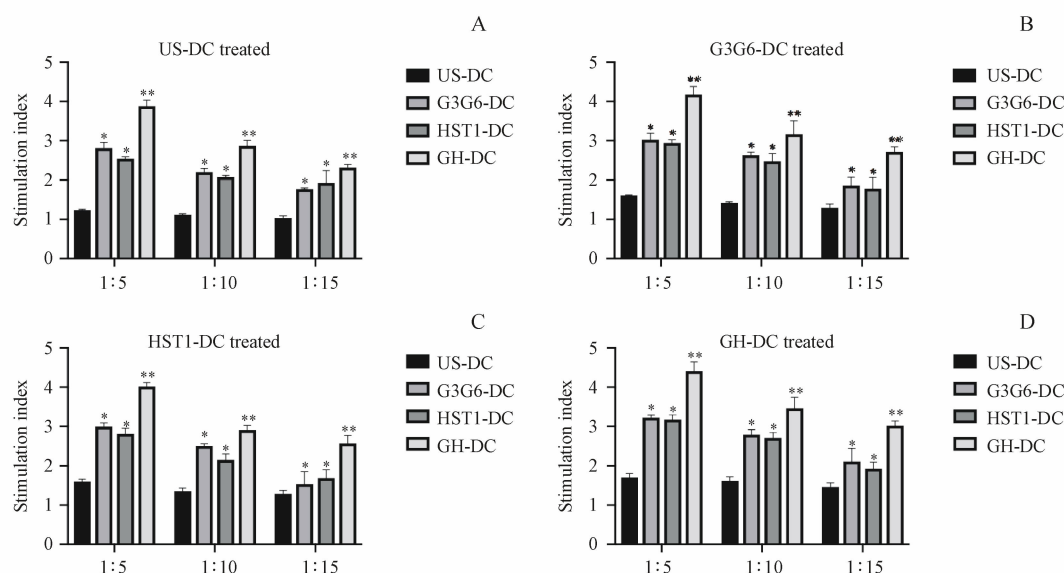


Figure 8 Stimulation index of T cells stimulated by different vaccines, respectively ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs US-DC group

#### 4 讨论

免疫治疗在提高肿瘤治疗率、改善患者生活质量、延长生存期方面起重要作用<sup>[8]</sup>。DC 疫苗可以通过负荷肿瘤抗原回输体内对肿瘤进行靶向治疗<sup>[22]</sup>。本研究以黑色素瘤的免疫治疗为主题,先后研究了单、双靶点的蛋白疫苗和 DC 疫苗<sup>[23–29]</sup>,顺延实验室研究思路,选取偶联双抗原的融合蛋白、偶联免疫佐剂的抗原融合蛋白致敏 DC 疫苗,探究提高抗肿瘤药效的途径。

DC 是目前认为功能最强的专职 APC,未成熟 DC 接触抗原后可通过巨胞饮、受体介导的内吞及吞噬 3 种方式捕获抗原,幼稚 DC 在摄取抗原后即可自发成熟<sup>[30]</sup>,而 DC 成熟之后倾向于诱导免疫应答<sup>[31]</sup>,利用 DC 疫苗进行治疗的第一步应考虑提高 DC 的成熟率。

实验结果显示,相比阴性对照组,G3G6 融合蛋白和 HST1 融合蛋白均具有足以提高 DC 的成熟率强度的免疫原性,大大增加了 DC 诱导免疫应答的潜力。其中两种融合蛋白的免疫原性之间并无显著差异( $P > 0.05$ ),联用组效果显著增强( $P < 0.01$ , vs US-DC)则可归因于免疫原性的叠加性。另有体内实验证实,G3G6 和 HST1 致敏 DC 疫苗均可有效激活免疫系统杀伤肿瘤细胞,且融合蛋白致敏 DC 抗肿瘤疫苗具备靶向性可达到精准治疗,推测原因为 G3G6-DC 疫苗的双抗原选择有效避免了

肿瘤的免疫逃逸;而 HST1-DC 疫苗则因免疫佐剂的偶联,同样提高了免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用。后续将就融合蛋白致敏 DC 疫苗的作用机制展开实验,确定免疫途径进一步完善治疗策略。

为防止过度免疫而导致自身免疫紊乱等问题的发生,本研究继续探究了 DC 疫苗治疗的最适效靶比,结果得当效应细胞(即 DC)与靶细胞(即脾细胞)的比例为 1:5 时,细胞增殖效果最佳( $P < 0.01$ , vs US-DC)。目前有报道,靶细胞对于 DC 的依赖并非线性关系<sup>[22,32]</sup>,可考虑进一步细化探究效靶比,寻找 DC 疫苗的最低有效剂量,为后期临床使用创造便利。

综上所述,融合蛋白致敏 DC 疫苗 G3G6-DC 和 HST1-DC 均可增强树突状细胞的免疫应答,提高对黑色素瘤 B16F10 细胞小鼠移植瘤生长的抑制,且联合用药效果优于单独用药,实验结果有统计学意义。

#### 参考文献

- [1] Yang LG. Immunotherapy for malignant melanoma: current status and progress [J]. *Chin Cancer (中国肿瘤)*, 2018, 27(1): 54–60.
- [2] Wang HY, Lu J. Progress in clinical research of tumor immunotherapy [J]. *The J Pract Med (实用医学杂志)*, 2018, 34(6): 917–919.
- [3] Diao AP, Zhao Q. Research progress in immune cell-mediated cancer therapy [J]. *J Tianjin Univ Sci Technol (天津科技大学学报)*, 2018, 33(1): 1–8.

- [4] Chen JH, Zhao DQ. Research progress in immune escape mechanism [J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 2018, **47**(2): 330–334.
- [5] Chen DW, Wang Y, Wang H, et al. CD8<sup>+</sup> T activation attenuates CD4<sup>+</sup> T proliferation through dendritic cells modification [J]. *Cell Immunol*, 2015, **296**(2): 138–148.
- [6] Berner VK, duPre SA, Redelman D, et al. Microparticulate  $\beta$ -glucan vaccine conjugates phagocytized by dendritic cells activate both naive CD4 and CD8 T cells *in vitro* [J]. *Cell Immunol*, 2015, **298**(1/2): 104–114.
- [7] Liu SJ, Xie QY, Gong FS, et al. Efficacy of dendritic and cytokine-induced killer cells on postoperative patients with malignant melanoma [J]. *J Fujian Med Univ* (福建医科大学学报), 2017, **51**(4): 17–22.
- [8] Zheng YM, He CC, Wang SZ, et al. Effect of co-culturing dendritic cells with melanoma cells on formation of melanoma in mice [J]. *Shandong Med J* (山东医药), 2017, **57**(5): 1–3.
- [9] Jia PY, Wang YX. Gonadotropin releasing hormone and its receptor associated with tumor therapy: research advances [J]. *J Int Pharm Res* (国际药学研究杂志), 2009, **36**(3): 179–183.
- [10] Zhang Y, Liu XX, Wang R, et al. Comparison of fusion protein and dc vaccine in inhibition of mouse b16f10 melanoma tumor [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **97**: 784–792.
- [11] Lu Y, Zhang HY, Hou J, et al. Vaccination with a potent DNA vaccine targeting B-cell epitopes of hGRP induces prophylactic and therapeutic antitumor activity *in vivo* [J]. *Gene Ther*, 2010, **17**(4): 459–468.
- [12] Gulley JL, Madan RA, Tsang KY, et al. Immune impact induced by prostatic (psa-tricom), a therapeutic vaccine for prostate cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, **2**(2): 133–141.
- [13] Gomes IM, Maia CJ, Santos CR. STEAP proteins: from structure to applications in cancer therapy [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, **10**(5): 573–587.
- [14] Maia CJ, Socorro S, Schmitt F, et al. STEAP1 is over-expressed in breast cancer and down-regulated by 17 $\beta$ -estradiol in MCF-7 cells and in the rat mammary gland [J]. *Endocrine*, 2008, **34**(1/2/3): 108–116.
- [15] Cheung IY, Feng Y, Danis K, et al. Novel markers of subclinical disease for Ewing family tumors from gene expression profiling [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(23): 6978–6983.
- [16] Moreaux J, Kassambara A, Hose D, et al. STEAP1 is overexpressed in cancers: a promising therapeutic target [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, **429**(3/4): 148–155.
- [17] Kobayashi H, Nagato T, Sato K, et al. Recognition of prostate and melanoma tumor cells by six-transmembrane epithelial antigen of prostate-specific helper T lymphocytes in a human leukocyte antigen class II-restricted manner [J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(11): 5498–5504.
- [18] Garcia-Hernandez Mde L, Gray A, Hubby B, et al. *In vivo* effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate: a candidate antigen for treating prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(3): 1344–1351.
- [19] Wowk PF, Franco LH, Fonseca DMD, et al. Mycobacterial Hsp65 antigen upregulates the cellular immune response of healthy individuals compared with tuberculosis patients [J]. *Hum Vacc Immunother*, 2017, **13**: 1–11.
- [20] Wang XJ, Gu K, Xu JS, et al. Immunization with a recombinant GnRH vaccine fused to heat shock protein 65 inhibits mammary tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, **59**(12): 1859–1866.
- [21] Skalova K, Mollova K, Michalek J. Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: does maturation matter [J]? *Vaccine*, 2010, **28**(32): 5153–5160.
- [22] Zhang CY, Liu JY, Zhang ZM, et al. Study on the optimal efficient ratio on target cells and the antitumor activity of effect cells stimulated by dendritic cells *in vitro* [J]. *J Guangxi Med Univ* (广西医科大学学报), 2007, **24**(4): 493–496.
- [23] Zhang Y, Liu XX, Wang R, et al. Comparison of fusion protein and DC vaccine in inhibition of mouse B16F10 melanoma tumor [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **97**: 784–792.
- [24] Liu SJ, Wei XF, Liu SF, et al. *In vitro* anti-tumor effect of mGM-CSF-GnRH3 and mGM-CSF-GRP6 recombinant fusion protein and their bioinformatics prediction [J]. *Chin J Cancer Biother* (中国肿瘤生物治疗杂志), 2018, **25**(6): 582–589.
- [25] Jing LL, Miao ZT, Li MM, et al. Anti-tumor effect and its mechanism of co-administration of fusion proteins hVEGF121/ $\beta$ hCG and mGM-CSF/ $\beta$ hCG [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(1): 102–109.
- [26] Cao RY, Yu MX, Zhang XL, et al. Construction, expression, purification of VEGF II/GRP fusion protein and the effects on RM-1 prostate tumor in mice [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2016, **36**(8): 9–15.
- [27] Li MM, Jing LL, Yuan YT, et al. Inhibitory effect of hVEGF<sub>121</sub>/ $\beta$ hCG fusion protein combined with chemical drugs on mouse B16F10 melanoma [J]. *Chin J Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2016, **23**(4): 299–303.
- [28] Jing LL, Zhang XL, Li MM, et al. Effect of GnRH/M2 and mGM-CSF/ $\beta$ hCG fusion protein-sensitized dendritic cell vaccine against mouse prostate cancer [J]. *Cancer Res Prev Treat* (肿瘤防治研究), 2016, **43**(10): 842–847.
- [29] Cao RY, Ma YF, Yuan YT, et al. Inhibitory effect of DC vaccine sensitized by GnRH/M2 fusion protein on melanoma B16F10 cell xenografts [J]. *Chin J Cancer Biother* (中国肿瘤生物治疗杂志), 2016, **23**(4): 468–475.
- [30] Cao XT. New advances in basic and clinical research of dendritic cells [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1998, **14**(3): 167–168.
- [31] Zhong GC. New advances in enhancing antigen presentation by dendritic cells [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2004, **20**(2): 253–256.
- [32] Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB, et al. OR. 30. T Cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation [J]. *Nat Immunol*, 2008, **9**(3): 282–291.