

硝基化通用 T 细胞表位疫苗 CD47-NitraTh 的设计与抑瘤活性

罗建华, 夏雪霏, 姚文兵, 田 淳*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 210009)

摘要 利用遗传密码扩充技术, 将免疫原性氨基酸对硝基苯丙氨酸定点引入到通用 T 细胞表位, 并将其与免疫检查点分子 CD47 分子胞外区 19-140 片段融合表达, 构建了靶向免疫检查点 CD47 的疫苗 CD47-NitraTh。CD47-NitraTh 能够在 BALB/c 小鼠体内诱导产生高滴度抗体, 并可显著抑制 CT26 结肠癌肿瘤生长, 提高脾脏 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的比例, 同时可促进 naïve T 细胞向 Th1 细胞极化。值得关注的是, CD47-NitraTh 不仅提高了肿瘤浸润淋巴细胞的比例, 同时还降低了肿瘤组织中 Treg 细胞比例, 意味着 CD47-NitraTh 疫苗能够重塑肿瘤免疫抑制性微环境。本研究结果提示, CD47-NitraTh 可以作为有效的肿瘤疫苗候选分子。

关键词 免疫检查点; CD47; 通用 T 细胞表位; 肿瘤疫苗

中图分类号 Q354 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2019)05-0614-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190516

引用本文 罗建华, 夏雪霏, 姚文兵, 等. 硝基化通用 T 细胞表位疫苗 CD47-NitraTh 的设计与抑瘤活性 [J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(5): 614–621.

Cite this article as: LUO Jianhua, XIA Xuefei, YAO Wenbing, et al. Design and antitumor effect of nitrated T helper cell epitope vaccine CD47-NitraTh [J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(5): 614–621.

Design and antitumor effect of nitrated T helper cell epitope vaccine CD47-NitraTh

LUO Jianhua, XIA Xuefei, YAO Wenbing, TIAN Hong*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Using the genetic code extension technology, the immunogenic amino acid, *p*-nitrophenylalanine, was introduced into the universal T cell epitope and then fused with the fragment of the extracellular region of the immune checkpoint molecular CD47 (19-140) to construct a vaccine targeting CD47. The CD47-NitraTh vaccine elicited high titer antibody in BALB/c mice, significantly inhibited CT26 colon cancer cells growth, and increased the ratio of spleen CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. Meanwhile, it promoted the polarization of naïve T cells to Th1 cells. Notably, CD47-NitraTh not only increased the proportion of tumour-infiltrating lymphocytes but also reduced the proportion of Treg cells in tumour tissues, which means that CD47-NitraTh vaccine can remodel the tumour immunosuppressive microenvironment. The results of this study suggested that CD47-NitraTh can be used as an effective tumour vaccine candidate.

Key words immune checkpoint; CD47; universal T cell epitope; tumor vaccine

This study was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 81573335, No. 81673343, No. 91753112).

CD47 广泛表达于细胞表面, 可与信号调节蛋白 α、血小板反应蛋白以及整合素相互作用, 介导凋亡、增殖、免疫等一系列反应^[1]。2017 年, Matlung 等^[2]

证实 CD47 是细胞表面一个重要的“self”标记, 是调节巨噬细胞吞噬作用的一个重要信号。CD47 可以与巨噬细胞表面 SIRPα 结合, 磷酸化其 ITIM, 随后

收稿日期 2019-04-12 *通信作者 Tel: 025-83271543 E-mail: tinahew@139.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81573335, No. 81673343, No. 91753112)

招募 SHP-1 蛋白,产生一系列级联反应抑制巨噬细胞的吞噬作用。19 世纪 80 年代首次被确认为人类卵巢癌的肿瘤抗原,之后 CD47 被发现在多种人类肿瘤类型中表达,包括急性骨髓白血病、慢性骨髓白血病、急性淋巴细胞白血病、非霍金性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、膀胱癌和其他实体肿瘤^[3]。之后在不同的研究中证实,几乎所有的肿瘤细胞和组织都高表达 CD47,是对应正常细胞和组织的 3 倍,是个理想的肿瘤免疫治疗靶点^[4]。

目前全球共有 19 款针对 CD47 的单抗、双抗和融合蛋白的临床早期或临床前研究药物,其中 5 个 CD47 抗体已进入临床试验。至少 3 种 CD47 拮抗剂(Hu5F9-G4,CC-90002 和 TTI-621)目前处于活跃的Ⅵ/Ⅶ 期临床试验中,涵盖血液恶性肿瘤和实体瘤^[5]。抗-CD47 抗体对非小细胞肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌和脑胶质瘤等有明显抑制作用,并能延长 NSG 小鼠的生存期。与抗体相比,疫苗可以产生多克隆抗体,并产生免疫记忆效应,防止肿瘤细胞的转移与复发^[6-8]。但 CD47 作为自体蛋白,存在免疫耐受^[9]。因此,如何提高 CD47 抗原的免疫原性,打破机体免疫耐受是 CD47 肿瘤疫苗设计开发的关键。

本实验室前期将免疫原性氨基酸引入自体蛋白以及筛选得到在合适位点引入免疫原性氨基酸并且可打破 MHC Ⅱ 亚型的限制的通用 Th 表位^[10-11],其可以和不同小鼠 MHC Ⅱ 亚型和人 HLA Ⅱ 亚型结合,打破 MHC Ⅱ /HLA Ⅱ 亚型分子的限制,促进 CD4⁺ T 细胞的增殖分化,协助 CD8 表位产生 CTL 效应、协助 B 表位产生高滴度抗体^[12]。

本研究选取 CD47 胞外 19 ~ 140 片段,通过柔性连接肽 GPSL 将 CD47 胞外片段与硝基化通用 Th 表位融合,并利用实验室前期构建的硝基化定点引入系统,获得了靶向 CD47 的蛋白疫苗,命名为 CD47-NitraTh。实验证明 CD47-NitraTh 可诱导产生高滴度抗体,并促进脾脏 T 细胞增殖,降低肿瘤中 Treg 细胞比例,提示 CD47-NitraTh 可以作为靶向 CD47 的肿瘤疫苗候选分子。

1 材 料

1.1 菌种和质粒

E. coli BL21 (DE3)、pET22b (+) Vector 均为中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室保存。

1.2 试 剂

*p*NO₂Phe(上海吉尔生化有限公司);3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,北京索莱宝科技有限公司);异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp)、氯霉素(Cm)(南京鼎国生物技术有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗小鼠 IgG(美国 BD 公司);小鼠脾脏淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 动 物

清洁级 BALB/c 雌性小鼠(6 ~ 8 周龄)购自扬州大学比较医学中心,合格证号:SCXK(苏)2017-0007。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

1.4 细胞株

小鼠结肠癌细胞株 CT26(中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室保存)。

1.5 仪 器

高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);水平离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);Countstar 全自动细胞计数仪(上海泽权仪器设备有限公司);Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方 法

2.1 CD47 蛋白疫苗的构建

通过柔性连接肽 GPSL 对 CD47 蛋白胞外区与硝基化通用 T 表位进行连接,命名为 CD47-NitraTh,氨基酸序列如下:

QLLFSNVNSIEFTSCNETVVIIPCIVRNVEAQSTEE
MFVKWKLNKSYIFIYDGKNNSTTDQNFTSAKISVSD
LINGIASLKMDFRDAMVGNYTCEVTELSREGKTVIEL
KNRTVSWFSPNEKGPSLAKFVAATLKpNO2PheAA

根据大肠埃希菌密码子偏好爱性,对 CD47-NitraTh 的 DNA 序列进行优化,将优化后的 CD47-NitraTh 序列送至金唯智通过 NdeI、NcoI 酶切位点合成到 pET22b (+) 表达载体上。提取测序正确的 CD47-NitraTh 质粒,转化至含 pAC-4tRNA-pNO₂PheRS 质粒的 BL21 (DE3) 感受态中。将菌液均匀涂布在含有氨苄和氯霉素抗性的固体琼脂 LB 平板表面上,37 °C 倒置过夜培养后,用接种环无菌条件下挑取阳性单克隆,扩大培养,送至南京金唯智公司进行测序。

2.2 CD47-NitraTh 抗原片段的表达纯化

取测序正确的甘油菌 200 μL,接种于 LB 培养基(含 100 μg/mL Amp、17 μg/mL Cm)20 mL 中,37 °C 过夜培养。取过夜活化的菌液 1 mL 转接于 M9 培养基(含 100 μg/mL Amp、17 μg/mL Cm)100 mL 中,37 °C,220 r/min 培养 7.5 h 后,加入终浓度为 0.1 mol/L 的对硝基苯丙氨酸,培养 0.5 h 后,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37 °C,220 r/min 培养 18 h 后,8 000 r/min,5 min 收集菌体。超声破碎菌体,离心取沉淀,对包涵体进行清洗以去除杂蛋白和核酸等杂质。用 8 mol/L 尿素对包涵体进行变性,4 °C 过夜搅拌,变性液过 Ni 亲和色谱柱,用 20 mmol/L 咪唑缓冲液平衡 Ni 柱,50 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱杂蛋白,500 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱目的蛋白,然后按体积比 1:4 加入 pH 9.0 的复性缓冲液,用 Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液透析,超滤浓缩,BCA 法测蛋白浓度。

2.3 ELISA 法检测 CD47-NitraTh 的免疫原性

将 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠分成 PBS(PBS + 佐剂)、CD47-NitraTh(CD47-NitraTh + 佐剂)组。皮下免疫小鼠,每周免疫 1 次,共免疫 3 周,疫苗给药剂量为每只每次 50 μg,最后一次免疫 1 周后,眼眶取血分离血清。ELISA 法检测小鼠抗血清中针对 CD47-NitraTh 的抗血清滴度。在酶标条中每孔加入 100 μL 终浓度为 5 μg/mL 的 CD47 蛋白,37 °C 孵育 2 h;PBST 清洗 5 次;然后每孔加入 5% BSA 封闭液 200 μL,4 °C 孵育过夜;PBST 清洗 5 次;每孔加入稀释后的小鼠血清 100 μL;37 °C 孵育 2 h;PBST 清洗 6 次;每孔加入稀释后的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 100 μL,37 °C 孵育 45 min;PBST 清洗 6 次;每孔加入 TMB 底物反应液 100 μL,37 °C 避光孵育 15 min;每孔加入 2 mol/L 的 H₂SO₄ 50 μL 终止反应;检测 A₄₅₀。

2.4 CD47-NitraTh 抑瘤活性评价

将 BALB/c 小鼠皮下注射 5 × 10⁵ 个 CT26 细胞,当肿瘤体积达到 1~3 mm³ 时,将造模合格的小鼠分为 2 组,分别为 PBS(PBS + 佐剂)、CD47-NitraTh(CD47-NitraTh + 佐剂)组,每组 6 只进行后续实验。PBS、CD47-NitraTh 分别与 CpG 佐剂联合免疫小鼠,免疫方式:皮下注射,每只每次疫苗 50 μg,佐剂 10 μg,免疫 3 次,每周免疫 1 次。每 3 天记录小鼠的体重和小鼠的肿瘤体积。小鼠肿瘤体积 = 长 ×

宽 × 宽/2。第 28 天,取小鼠肿瘤、肝、肾。计算小鼠抑瘤率,小鼠肝肾做 HE 染色。小鼠抑瘤率 = (PBS 组瘤重 - 实验组瘤重)/PBS 组瘤重 × 100%。

2.5 流式细胞术分析 CD47-NitraTh 对小鼠脾脏 T 细胞亚群的影响

最后一次免疫 1 周后,处死小鼠,在 75% 乙醇中浸泡 5 min 后,无菌条件下取出脾脏,并用 PBS 对脾脏进行清洗和研磨,过 70 μm 筛网;用 PBS 对细胞和筛网进行冲洗,转移至离心管中,离心,430 r/min,10 min;弃上清液,加入 PBS 1 mL 重悬;缓慢滴加细胞悬液至 3 mL 淋巴细胞分离液上层,保持淋巴细胞分离液与细胞悬液液面清晰分层,收集淋巴细胞层;加入 PBS 8 mL,离心,430 r/min,5 min,弃上清液,重复 1 次;用培养基重悬细胞,稀释为每毫升 5 × 10⁶ 个细胞备用。

细胞标记:Th1(FITC-CD4、APC-IFN-γ), Th2(FITC-CD4、PE-IL-4), CD8(PE-CD3e、PERCP-CY5.5-CD8), CD4(FITC-CD4)。具体步骤如下:

单染组:空染组(细胞破膜液)、CD4 组(先加 CD4 抗体,后加细胞破膜液)、CD8 组、IL-4 组(先加细胞破膜液,后加 IL-4 抗体)、IFN-γ 组(先加细胞破膜液,后加 IFN-γ 抗体)。

Th1、Th2 细胞染色:取每个小鼠脾脏细胞 1.5 × 10⁶ 个铺板于 24 孔板,每孔 1 mL,每孔加入白细胞活化刺激剂 2 μL,37 °C 孵育 5 h。收集细胞于 2 mL EP 管中(以下所有溶液提前冰上预冷),离心(4 °C,602 r/min,5 min),加入 1 mL PBS,离心(4 °C,602 r/min,5 min),加入 CD4 抗体,冰上避光孵育 25 min,然后加入 PBS 1 mL,离心(4 °C,602 r/min,5 min),每孔加入细胞破膜液 250 μL,冰上避光孵育 15 min,然后加入工作洗涤液 1 mL,离心(4 °C,1 032 r/min,5 min),弃上清液,再加入工作洗涤液 1 mL,离心(4 °C,1 032 r/min,5 min)。加入 IL-4 和 IFN-γ 抗体,冰上避光孵育 30 min。再加入工作洗涤液 1 mL,离心(4 °C,1 032 r/min,5 min)。加入 PBS 300 μL 重悬。流式细胞仪检测。

CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 细胞染色:根据流式抗体说明书操作。

2.6 流式细胞术分析 CD47-NitraTh 对肿瘤浸润淋巴细胞与 Treg 细胞比例的影响

取适量大小的肿瘤样本,研磨直至无块状肿瘤残留,润洗至 6 孔板中,体积约 4 mL。将匀浆液转

移到 15 mL 离心管中, 按照体积比 1:1 加入等量的淋巴细胞分离液 (5 mL)。离心, 2 000 r/min, 15 min。将乳白色淋巴细胞层转移到新的 15 mL 离心管中, 向离心管中加入 PBS 10 mL, 2 000 r/min, 15 min。弃上清液, 用含 2% FBS 的 PBS 重悬, 细胞计数, 调整到细胞浓度为每毫升 1×10^7 个细胞, 转移到 1.5 mL EP 管中, 100 μ L, 加入流式抗体, 4 °C, 避光 30 min。430 r/min, 离心 10 min。用含 2% BSA 的 PBS 重悬。

设置单染组: 空染组(加转录因子缓冲液)、CD4 组(先加 CD4 抗体, 后加转录因子缓冲液)、CD8 组、CD4 组、CD25(先加 CD25 抗体, 后加转录因子缓冲液)、FOXP3(先加转录因子缓冲液, 后加 FOXP3 抗体)。

细胞染色: 根据流式抗体说明书操作。

2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。采用 Student's *t*-test 进行数据显著性比较, $P < 0.05$ 为显著性差异, 具有统计学意义。

3 结果

3.1 CD47-NitraTh 蛋白疫苗的表达纯化

大肠埃希菌发酵后诱导表达 CD47-NitraTh 蛋白疫苗, 取 IPTG 诱导前后全菌进行电泳, 相比于诱导前的菌体, IPTG 诱导后在 16.2 kD 附近出现了条带, 与目的蛋白的相对分子质量大小相符(图 1-A)。对 CD47-NitraTh 利用 His 标签进行 Ni 柱分离纯化, SDS-PAGE 检测, 通过 Gel-pro analyzer 软

件分析, CD47-NitraTh 蛋白的电泳纯度大于 95%。蛋白纯度高主要由于蛋白包涵体表达, 且使用亲和色谱的分离方法(图 1-B)。

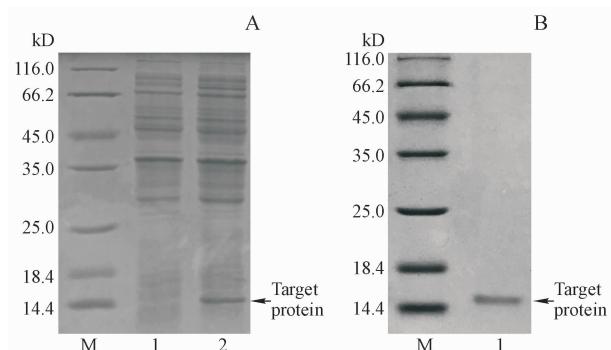


Figure 1 Expression and identification of CD47-NitraTh
(A) SDS-PAGE analysis of CD47-NitraTh expression
M: Protein marker; 1: Protein expression profile of host cells before IPTG induction; 2: Protein expression profile of host cells after IPTG induction
(B) Identification of CD47-NitraTh by Western blot
M: Protein marker; 1: CD47-NitraTh were detected by Western blot with antibody to His-tag

3.2 CD47-NitraTh 的免疫原性检测

用 CD47-NitraTh 免疫 BALB/c 小鼠后每周眼眶取血, 血清稀释 12 800 倍, ELISA 法检测血清中抗体滴度。结果如图 2-A 所示, CD47-NitraTh 免疫后, 诱导 BALB/c 小鼠产生了高滴度的 CD47 特异性抗体。免疫过程中监测小鼠体重, 结果如图 2-B 所示, CD47-NitraTh 免疫小鼠未导致小鼠体重明显减轻, 与 PBS 组(PBS + 佐剂 CpG, 下同)之间无显著性差异。肝(图 2-C)肾(图 2-D)HE 染色结果显示, CD47-NitraTh 免疫的小鼠肝肾细胞形态正常, 与正常小鼠无显著差异。

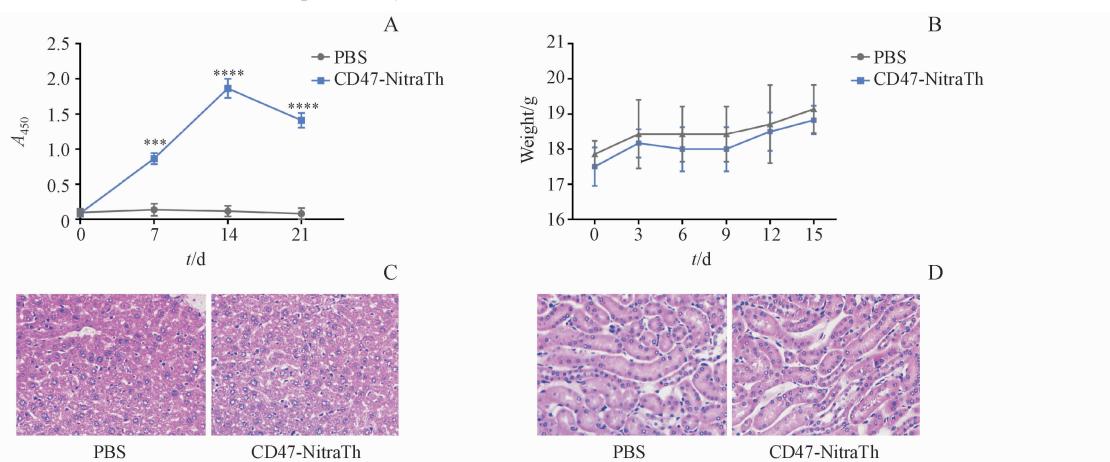


Figure 2 Immunogenicity of CD47-NitraTh in BALB/c mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
(A) CD47-specific IgG antibody level in BALB/c mice immunized with CD47-NitraTh and PBS ($^{***} P < 0.001$, $^{****} P < 0.0001$ vs PBS group);
(B) Changes in body weight of BALB/c mice during immunization with CD47-NitraTh and PBS ($^{***} P < 0.001$, $^{****} P < 0.0001$ vs PBS group);
(C) Comparison of liver HE staining of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS;
(D) Comparison of kidney HE staining of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS

3.3 CD47-NitraTh 的抑瘤活性评价

为了验证 CD47-NitraTh 的抗肿瘤活性, 在 BALB/c 小鼠皮下构建 CT26 实体瘤模型, 用

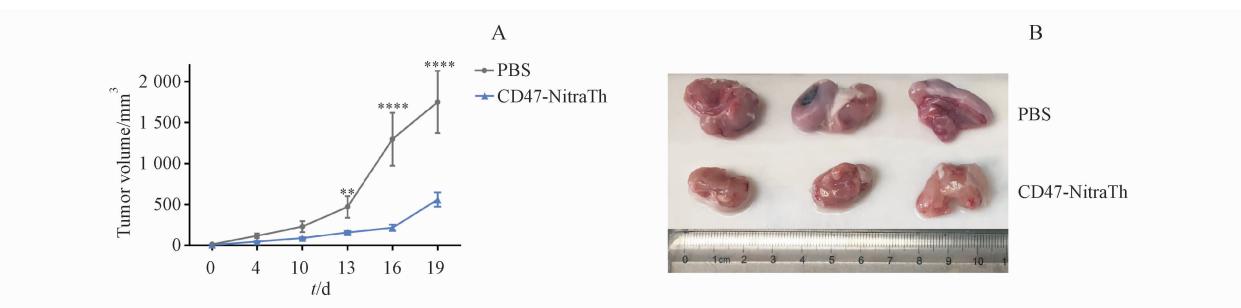


Figure 3 Antitumor activity of CD47-NitraTh ($\bar{x} \pm s, n=3$)

(A) Graph of tumour volume measured from the beginning of CD47-NitraTh treatment ($^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001, ^{****} P < 0.0001$ vs PBS group); (B) Tumor volume of the tumors excised after the mice were sacrificed in the CD47-NitraTh group and PBS group

3.4 CD47-NitraTh 诱导 Th1 型免疫反应

流式细胞术分析 CD47-NitraTh 免疫后小鼠脾脏内 T 细胞亚群的变化, 结果如图 4-A 显示, CD47-NitraTh 免疫后小鼠脾脏中 CD4⁺T 细胞显著高于对照 ($P < 0.01$), 达到 ($22.93 \pm 2.54\%$); 同时, 小鼠脾脏中 CD8⁺T 细胞比例为 ($7.11 \pm 1.07\%$), 也明显高于 PBS 组 (图 4-B)。此外, 与 PBS 组相比, CD47-NitraTh 免疫后, 小鼠脾脏中 Th1 和 Th2 细胞比例均有所增加, 但 Th1 比例增加幅度更大, 达到 ($1.81 \pm 0.12\%$), 而 Th2 比例仅增加了 ($0.92 \pm 0.16\%$) (图 4-C), 结果使 Th1/Th2 比值达到 ($2.19 \pm 0.56\%$) (图 4-D), 提示 CD47-NitraTh 诱导 Th1 型免疫反应, 更有利于发挥抑瘤作用。

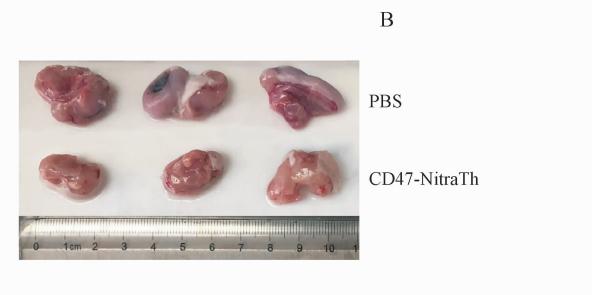
3.5 CD47-NitraTh 增加淋巴细胞浸润降低 Treg 细胞比例

为了进一步探索 CD47-NitraTh 对肿瘤免疫抑制性微环境的影响, 本研究用流式细胞术分析了肿瘤浸润淋巴细胞中各 T 细胞亚群的比例。结果如图 5 所示, CD47-NitraTh 免疫治疗后, 小鼠肿瘤中 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞浸润均明显增加, 有 PBS 组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$)。更为重要的是, CD47-NitraTh 免疫治疗后, 肿瘤组织中 Treg 细胞比例显著低于 PBS 组 [$(0.73 \pm 0.10)\% vs (3.90 \pm 0.90)\%$] ($P < 0.01$) (图 5-C), 提示 CD47-NitraTh 免疫治疗明显改善了肿瘤免疫抑制性微环境。

4 讨 论

目前靶向 CD47 的肿瘤免疫治疗主要是以拮抗性抗体为代表的被动免疫治疗。但抗体药物存

CD47-NitraTh 以 CpG 为疫苗佐剂进行免疫, 结果如图 3 显示, 相比于 PBS 组, CD47-NitraTh 组可以显著抑制肿瘤生长, 抑瘤率达 ($67.9 \pm 4.9\%$)。



在着针对的靶点单一, 用药量大, 可能产生抗药抗体等问题^[13]。相比于被动免疫疗法, 主动免疫具有明显的优势^[14–15]: 针对多抗原表位产生免疫应答, 使肿瘤难以通过抗原的突变产生逃逸变种; 能在机体内建立免疫记忆, 可以长时间抑制肿瘤细胞生长, 减少复发和转移; 特异激活针对肿瘤细胞的免疫杀伤细胞, 专一性强, 不良反应小等。但由于 CD47 属于自身蛋白, 存在自身免疫耐受, 难以诱导机体产生针对 CD47 的免疫应答, 因此无法开发为疫苗用于肿瘤治疗。

实验室前期筛选得到引入对硝基苯丙氨酸的通用 Th 细胞表位, 可有效打破自身免疫耐受, 将其与 HER2 胞外区相连, 可诱导小鼠体内产生高滴度的抗 HER2 抗体, 并产生强效的 CTL 效应^[10], 靶向 HER2 的硝基化通用 T 表位的疫苗本身就具有抑瘤活性, 但是在佐剂 CpG 的作用下, 抑瘤作用显著提高。基于这项前期研究, 本研究将硝基化的通用 T 表位应用于靶向免疫检查点的 CD47 疫苗设计中, 并使用 CpG 作为佐剂, 证实该表位同样可以辅助免疫检查点分子打破免疫耐受, 诱导机体产生靶向 CD47 的特异性免疫应答。对荷瘤小鼠的抑瘤实验结果显示, CD47-NitraTh 免疫治疗能诱导 BALB/c 小鼠产生针对 CD47 的体液免疫应答和细胞免疫应答, 并有效抑制结肠癌肿瘤生长。

研究显示 Th1 细胞在抑制肿瘤的复发过程中是不可或缺的^[16], 较低 Th1/Th2 比率与肿瘤复发呈正相关^[17]。Th 细胞向 Th1 极化能有效抑制肿瘤生长, 而向 Th2 极化则对肿瘤有促进作用。此外, Th1 细胞分泌的 IFN- γ 以及 TNF- α 可以发挥协

同抗肿瘤作用^[18]。本研究结果表明, CD47-NitraTh 可刺激 naïve CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞极化, 提高 Th1/Th2 比例, 产生有利于抑制肿瘤的免疫效应。

另一个值得关注的方面是, CD47-NitraTh 的免疫治疗显著改善了肿瘤免疫抑制性微环境。已有大量研究表明, 肿瘤的免疫抑制性微环境是阻碍肿瘤免疫治疗发挥作用的一个主要因素^[19]。Treg 细胞是肿瘤免疫微环境中有效的免疫抑制细胞, 其分泌 TGF-β 以抑制 CD8⁺ 效应 T 细胞的功能, 在各种肿瘤和邻近组织如黑素瘤、乳腺癌、结肠癌和胰腺

癌中聚集^[20]。研究指出, Treg 细胞肿瘤浸润的增加与较差的存活率相关^[21], 并导致严重的肿瘤免疫抑制。本研究结果表明 CD47-NitraTh 可以显著提高肿瘤组织内 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的比例, 同时, 还可有效降低 Treg 细胞比例, 从而逆转肿瘤免疫抑制性微环境。

综上所述, 本文设计的基于硝基化 T 表位的 CD47-NitraTh 疫苗, 能有效抑制肿瘤生长, 重塑肿瘤免疫抑制性微环境, 是理想的肿瘤疫苗候选分子。

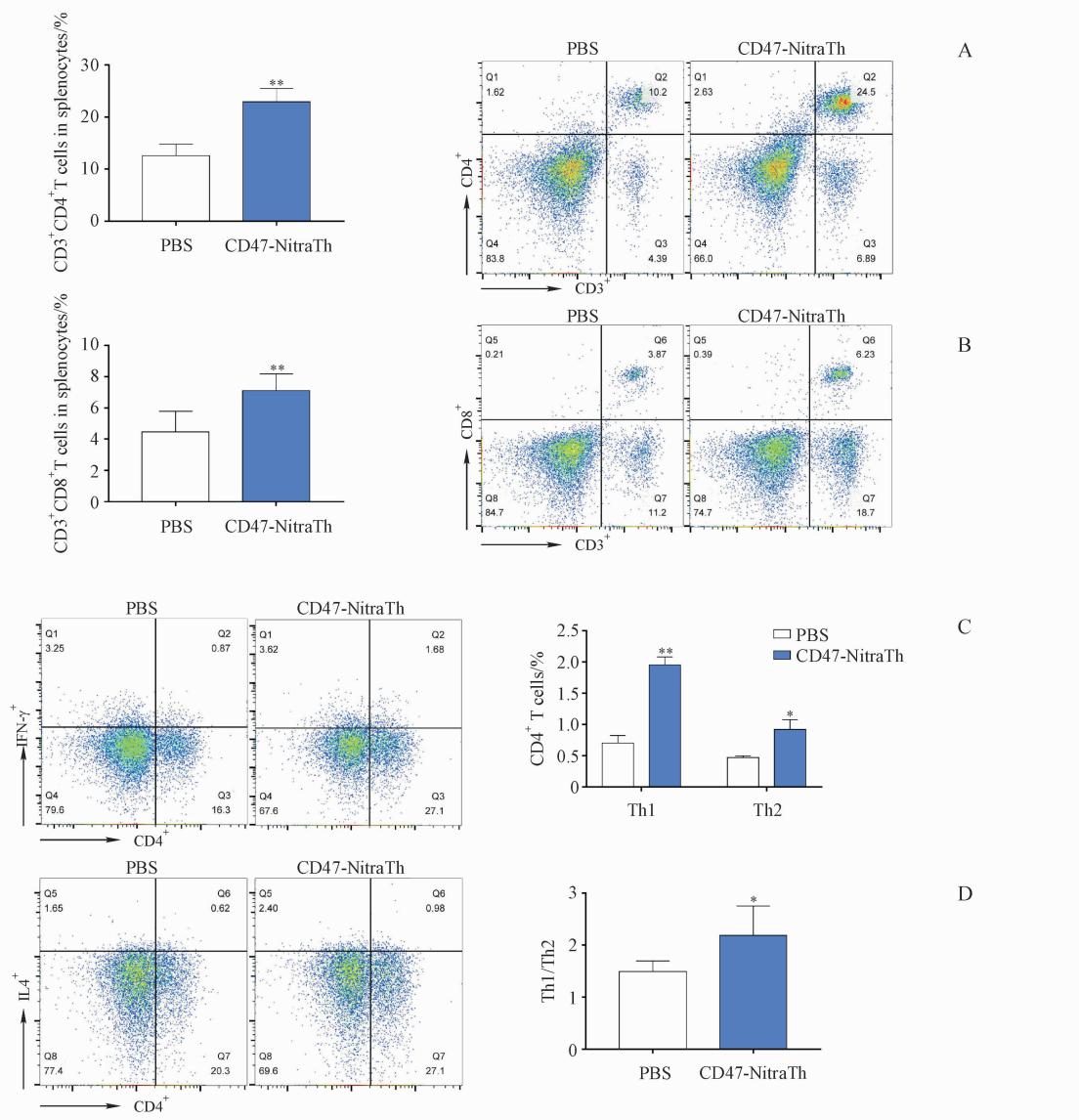


Figure 4 Immunization of CD47-NitraTh induces polarization of naïve CD4⁺ T cells to Th1 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

(A) Frequency of CD3⁺CD4⁺ cells in splenocytes of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS; (B) Frequency of CD3⁺CD8⁺ cells in splenocytes of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS; (C) Frequency of CD4⁺IFN-γ⁺ (Th1) cells and CD4⁺IL4⁺ (Th2) cells in splenocytes of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS; (D) Ratios of Th1/Th2 cells in splenocytes of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS group

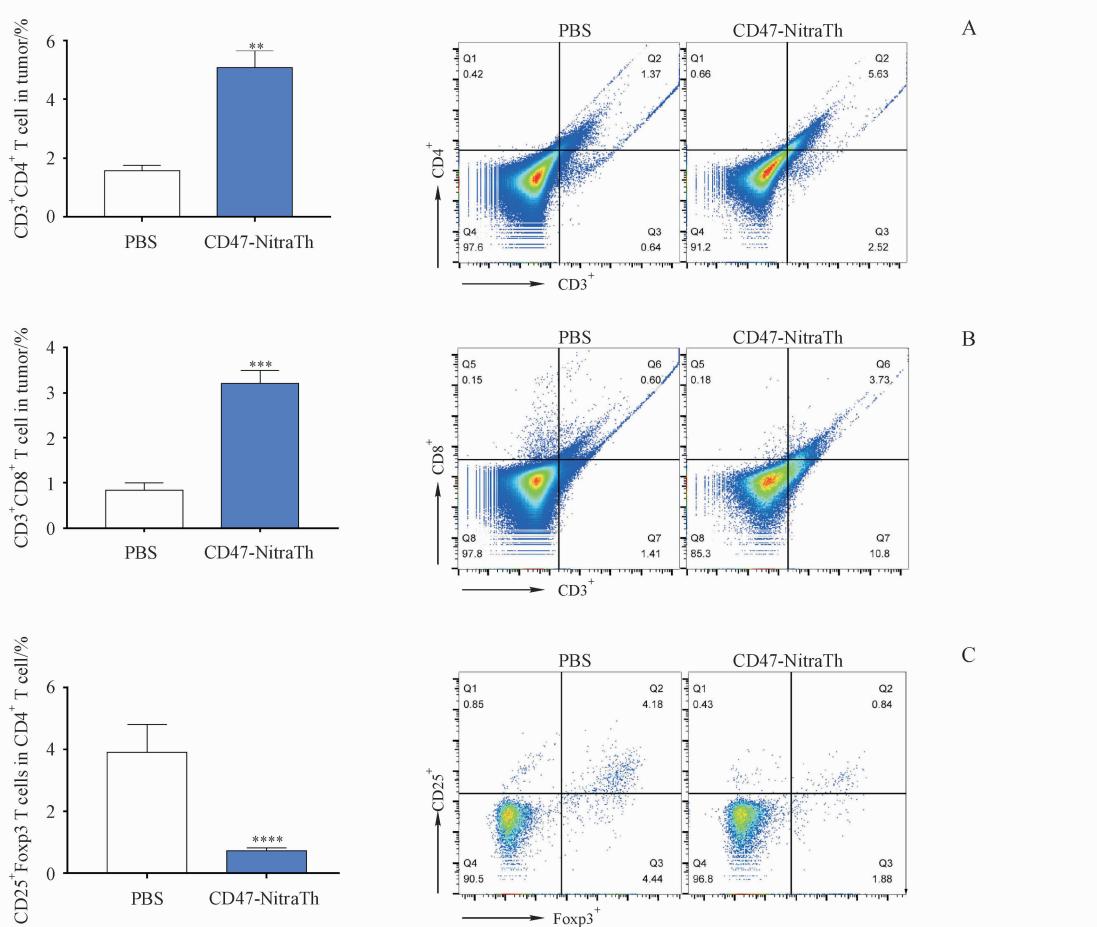


Figure 5 Effect of CD47-NitraTh on the frequency of $CD4^+$ T, $CD8^+$ T cells and Treg cells in tumour infiltrating lymphocytes (TILs) ($\bar{x} \pm s, n=6$)
 (A) Frequency of $CD3^+ CD4^+$ cells in TILs of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS; (B) Frequency of $CD3^+ CD8^+$ cells in TILs of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS (C) Frequency of Treg cells in TILs of mice immunized with CD47-NitraTh and PBS

* * P < 0.01, * * * P < 0.001, * * * * P < 0.0001 vs PBS group

参考文献

- [1] Betancur PA, Abraham BJ, Yiu YY, et al. A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**:14802.
- [2] Matlung HL, Szilagyi K, Barclay NA, et al. The CD47-SIRP α signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer [J]. *Immunol Rev*, 2017, **276**(1):145–164.
- [3] Ingram JR, Blomberg OS, Sockolosky JT, et al. Localized CD47 blockade enhances immunotherapy for murine melanoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(38):10184–10189.
- [4] Zhang L, Huang H. Targeting the cancer biomarker CD47: a review on the diverse mechanisms of the CD47 pathway in cancer treatment [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, **16**(6):658–667.
- [5] Advani R, Flinn I, Popplewell L, et al. CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Engl J Med*, 2018, **379**(18):1711–1721.

- [6] Gholamin S, Mitra SS, Feroze AH, et al. Disrupting the CD47-SIRP α anti-phagocytic axis by a humanized anti-CD47 antibody is an efficacious treatment for malignant pediatric brain tumors [J]. *Sci Transl Med*, 2017, **9**(381):eaaf2968.
- [7] Wong KK, Li WA, Mooney DJ, et al. Advances in therapeutic cancer vaccines [J]. *Adv Immunol*, 2016, **130**:191–249.
- [8] Salman B, Zhou DE, Jaffee EM, et al. Vaccine therapy for pancreatic cancer [J]. *Oncimmunology*, 2013, **2**(12):e26662.
- [9] Tabi Z, Man S. Challenges for cancer vaccine development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, **58**(8):902–915.
- [10] He Y, Tian H, Dai X, et al. Immunogenicity of HER2 vaccine containing p-nitrophenylalanine [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2018, **49**(3):369–375.
- [11] Tian H, He Y, Song XD, et al. Nitrated T helper cell epitopes enhance the immunogenicity of HER2 vaccine and induce anti-tumor immunity [J]. *Cancer Lett*, 2018, **430**:79–87.
- [12] Alexander J, Sidney J, Southwood S, et al. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides [J]. *Immunity*, 1994, **1**

- (9):751–761.
- [13] Dokmanovic M, Wu WJ. Monitoring trastuzumab resistance and cardiotoxicity: A tale of personalized medicine [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, **70**:95–130.
- [14] Gulley JL, Drake CG. Immunotherapy for prostate cancer: recent advances, lessons learned, and areas for further research [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, **17**(12):3884–3891.
- [15] Sonpavde G, Agarwal N, Choueiri TK, et al. Recent advances in immunotherapy for the treatment of prostate cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, **11**(8):997–1009.
- [16] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. *Cell*, 2010, **140**(6):883–899.
- [17] Datta J, Fracol M, McMillan MT, et al. Association of depressed anti-HER2 T-helper type 1 response with recurrence in patients with completely treated HER2-positive breast cancer: role for immune monitoring [J]. *JAMA Oncol*, 2016, **2**(2):242–246.
- [18] Bos R, Sherman LA. CD4⁺ T-cell help in the tumor milieus is required for recruitment and cytolytic function of CD8⁺ T lymphocytes [J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(21):8368–8377.
- [19] Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, et al. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis [J]. *Sci Transl Med*, 2016, **8**(327):327ra26.
- [20] Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2012, **72**(9):2162–2171.
- [21] Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, et al. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4⁺ CD25-lymphocytes is Thymus and proliferation independent [J]. *Cancer Res*, 2006, **66**(8):4488–4495.



中國藥科大學 學報

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿
提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果
展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文
科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号：28-115，欢迎订阅，欢迎投稿！