

## PD-L1 疫苗中引入不同免疫原性氨基酸对 T 细胞亚群分化的影响

陈红梅, 康彦良, 刘 利, 姚文兵, 田 宏\*

(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** 为了比较内源性的 3-硝基酪氨酸与非天然的 4-硝基苯丙氨酸在 PD-L1 疫苗中的引入对 T 细胞亚群分化的影响, 利用遗传密码扩充技术, 将这两种免疫原性氨基酸分别引入到 PD-L1 疫苗的不同位点, 获得具有 3-硝基酪氨酸以及 4-硝基苯丙氨酸的两种 PD-L1 突变体。用这两种突变体免疫小鼠, 分析对小鼠脾脏 T 细胞亚群分化的影响。流式细胞术检测结果显示, 4-硝基苯丙氨酸在 PD-L1 疫苗中的引入可促进 Th1 细胞的极化, 同时降低 Treg 细胞的比例, 3-硝基酪氨酸的引入对 Th1 细胞的极化无影响, 同时能显著提高 Treg 和 Th17 细胞的比例。二者在 PD-L1 疫苗中的引入均能促进脾脏 CD8<sup>+</sup> T 细胞的应答, 其中含有 4-硝基苯丙氨酸的 PD-L1 突变体应答效果更强。实验结果表明, 与内源性的 3-硝基酪氨酸在 PD-L1 疫苗中的引入相比, 非天然的 4-硝基苯丙氨酸更适合用于肿瘤疫苗的设计。

**关键词** PD-L1; 疫苗; 3-硝基酪氨酸; 4-硝基苯丙氨酸; T 细胞亚群

**中图分类号** R967 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0349-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200313

**引用本文** 陈红梅, 康彦良, 刘利, 等. PD-L1 疫苗中引入不同免疫原性氨基酸对 T 细胞亚群分化的影响[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(3): 349–356.

**Cite this article as:** CHEN Hongmei, KANG Yanliang, LIU Li, *et al.* Effects of different immunogenic amino acids in PD-L1 vaccine on the differentiation of T cell subsets[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(3): 349–356.

## Effects of different immunogenic amino acids in PD-L1 vaccine on the differentiation of T cell subsets

CHEN Hongmei, KANG Yanliang, LIU Li, YAO Wenbing, TIAN Hong\*

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

**Abstract** To compare the effects of endogenous 3-nitrotyrosine and non-natural 4-nitrophenylalanine in PD-L1 vaccine on the differentiation of T cell subsets, two immunogenic amino acids were introduced into the same site of PD-L1 vaccine. Two PD-L1 mutants with 3-nitrotyrosine and 4-nitrophenylalanine were obtained, respectively, using genetic code expansion technology. Mice were immunized with these two mutants, and their effects on the differentiation of T cell subsets in spleen were analyzed. The results of flow cytometry showed that the introduction of 4-nitrophenylalanine in PD-L1 vaccine could promote the polarization of Th1 cells while reducing the proportion of Treg cells; the introduction of 3-nitrotyrosine had no effect on the polarization of Th1 cells, while significantly increasing the proportion of Treg and Th17 cells. The introduction of both into PD-L1 vaccine could promote the response of CD8<sup>+</sup> T cells in spleen, and the response of PD-L1 mutant containing 4-nitrophenylalanine was stronger. In summary, the non-natural 4-nitrophenylalanine is more suitable for the design of tumor vaccines as compared with endogenous 3-nitrotyrosine.

**Key words** PD-L1; vaccine; 3-nitrotyrosine; 4-nitrophenylalanine; T cell differentiation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81973222, No. 81673343, No. 91753112)

**收稿日期** 2020-03-23 **\*通信作者** Tel: 025-83271543 E-mail: tinahe@139.com

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81573222, No. 81673343, No. 91753112)

免疫原性氨基酸是一类能增强多肽、蛋白免疫原性的非天然氨基酸,如硝基苯丙氨酸、硝基酪氨酸等<sup>[1-2]</sup>,对自身免疫性疾病的发病、肿瘤的免疫逃逸等生理病理过程有重要影响。免疫原性氨基酸改变蛋白质免疫原性的作用在免疫病理学、肿瘤免疫学等领域中受到了广泛关注。

含有免疫原性氨基酸的蛋白质可以在多种病理条件下自发形成,如:酪氨酸的硝基化修饰与自身免疫性疾病密切相关。例如,在类风湿关节炎患者的滑液和系统性红斑狼疮或急性肺损伤的患者血清中已鉴定出抗硝基酪氨酸抗体<sup>[3-5]</sup>。含有酪氨酸硝基化修饰的蛋白质具有潜在的免疫原性<sup>[6]</sup>,高水平的酪氨酸硝基化蛋白会激活免疫系统,可能在维持自身性免疫疾病中起重要作用。此外,也有研究人员用化学或生物学的方法将免疫原性氨基酸引入蛋白质或多肽中,以此改变目标分子的免疫原性。例如:Hardy等<sup>[7]</sup>曾经将3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3NO<sub>2</sub>Tyr)引入到抗原表位肽的特定位置,通过改变MHC I限制性抗原接触位置间接影响T细胞的识别。课题组前期研究也发现,将4-硝基苯丙氨酸(4-nitrophenylalanine, 4NO<sub>2</sub>Phe)定点引入到人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、细胞程序性死亡配体1(programmed death ligand 1, PD-L1)等自体蛋白中,不仅能诱导机体产生高滴度抗HER2、抗PD-L1的抗体,还能刺激CD4<sup>+</sup>T细胞激活,辅助CD8<sup>+</sup>T细胞产生抗体依赖性细胞介导的杀伤作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)和细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)介导的杀伤效应,成为有效的肿瘤疫苗候选分子<sup>[8-10]</sup>。

尽管硝基取代的苯丙氨酸和酪氨酸均是免疫原性氨基酸,但3-硝基酪氨酸在各种病理条件下由一氧化氮合酶催化产生,属于酪氨酸的衍生物,而4-硝基苯丙氨酸并不能在机体内自发形成,属于非天然的外源氨基酸,两者在机体内诱发的免疫应答可能存在差异,尤其是这两种免疫原性氨基酸对T细胞亚群分化的影响,可能对机体免疫耐受和自身免疫之间的平衡存在重要影响。然而,关于免疫原性氨基酸对T细胞亚群分化影响的研究报道较少。

为了解决这一问题,本文利用遗传密码扩充

技术在PD-L1疫苗的相同位点分别引入了3-硝基酪氨酸和4-硝基苯丙氨酸,比较二者对CD4<sup>+</sup>T细胞不同亚群的影响以及CD8<sup>+</sup>T细胞的激活情况,从而分析二者的引入对机体免疫耐受和自身免疫之间的平衡是否存在不同的影响,为后续基于免疫原性氨基酸的蛋白疫苗的设计提供指导。

## 1 材料

### 1.1 试剂

3-硝基酪氨酸、4-硝基苯丙氨酸(上海吉尔生化有限公司);异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、L-阿拉伯糖(L-Ara)、卡那霉素(Kan)、氯霉素(Cm)(南京鼎国生物技术有限公司);BCA蛋白定量分析试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠IgG、CpG(美国Sigma公司);白细胞激活刺激剂(Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™)、流式固定/破膜液(Cytofix/Cytoperm Soln Kit)、流式抗体等(美国BD公司)。

### 1.2 仪器

Multiscan自动酶标仪、高速冷冻离心机、恒温培养箱(美国Thermo公司);Countstar全细胞计数仪(上海泽权仪器设备有限公司);水平离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);Accuri C6 Plus流式细胞仪(美国BD公司)。

### 1.3 动物

清洁级C57BL/6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)2017-0001。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

### 1.4 菌种和质粒

*E. coli* BL21(AI)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。

## 2 方法

### 2.1 WT PD-L1疫苗分子的表达

将实验室前期构建的WT PD-L1疫苗分子的甘油菌pET28-PD-L1 BL21(DE3)接种于20 mL LB培养基小瓶中(Kan),37℃,220 r/min培养过夜,取活化的菌液接种于至200 mL LB(Kan)培养基大瓶中,37℃,220 r/min培养3 h后,测得A<sub>600</sub>为0.6~

0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导剂, 诱导 8 h, 取诱导前后的菌液进行 SDS-PAGE 验证蛋白是否表达, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 保存于 -20 ℃。

## 2.2 3-硝基酪氨酸和 4-硝基苯丙氨酸取代的 PD-L1 表达菌株的构建

将编码 PD-L1 疫苗分子的 11 位氨基酸密码子突变为琥珀密码子 TAG, 将突变体基因片段和质粒载体 pET28a 利用 *Nco* I、*Hind* III 进行双酶切, 胶回收酶切产物, T4 DNA 连接酶 16 ℃ 过夜连接。连接产物转化至 *E. coli* DH10B 大肠埃希菌感受态细胞, 37 ℃ 培养过夜。次日挑取阳性克隆, 接种在含 Kan 性的液体 LB 培养基中, 37 ℃, 220 r/min 过夜培养。取菌液测序, 测序正确的质粒命名命名为 pET28a-3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1。将质粒转化至实验室前期构建的含 pAC-3NO<sub>2</sub>TyrRS 质粒的 *E. coli* BL21 (AI) 感受态细胞中, 涂布于 Kan/Cm 双抗的 LB 平板, 37 ℃ 倒置培养过夜。挑取阳性克隆并进行表达验证, 菌命名为 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1-BL21 (AI)。4-硝基苯丙氨酸取代的 PDL1 质粒以及表达菌株按同样方法的构建, 质粒命名为 pET28a-4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1, 菌命名为 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1-BL21 (AI)。

## 2.3 3-硝基酪氨酸和 4-硝基苯丙氨酸取代的 PD-L1 蛋白的表达与纯化

将保存的 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1-BL21 (AI) 菌种接种于 2 mL LB 培养基的试管中 (Kan/Cm) 振荡培养过夜。将活化的菌液接种于至 200 mL LB (Kan/Cm) 培养基大瓶中, 37 ℃, 220 r/min 培养 3 h 后, 测得 A<sub>600</sub> 为 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.15% L-Ara、1 mmol/L IPTG 诱导剂及终浓度 0.1 mol/L 的 3NO<sub>2</sub>Tyr, 诱导 8 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 称重, 按 1:10 (g/mL) 的比例加入包涵体洗涤液, 4 ℃ 搅拌 30 min。超声破碎, 离心收集沉淀, 加入包涵体洗涤液清洗, 去除杂蛋白以及核酸。随后按 1:10 (g/mL) 的比例加入含有 8 mol/L 脲素的变性液, 4 ℃ 搅拌变性过夜。变性液经镍亲和色谱柱纯化后将目的蛋白按 1:4 比例进行复性。将复性液于 20 mmol/L Tris-HCL 冲液透析除盐, 超滤浓缩。所获得的的目的蛋白进行 SDS-PAGE 检测和 Western blot 鉴定。不含免疫原性氨基酸的野生型 PD-L1 (WT PD-L1) 和 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 按同样方法制备。

## 2.4 动物分组及免疫方案

将 6~8 周雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 PBS、WT PD-L1、3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1、4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 共 4 组, 每组 8 只。与 CpG 佐剂联合使用皮下免疫小鼠, 每周免疫 1 次, 每次每只给药剂量为 50 μg, 佐剂 10 μg, 一共免疫 3 次, 第 28 天处死小鼠。

## 2.5 流式细胞术测定各组对 T 细胞亚群分化的影响

处死小鼠后, 浸泡于 75% 乙醇中 5 min, 无菌条件下取出小鼠脾脏, 研磨过 70 μm 筛网, 加入 PBS 1 mL 于培养皿中洗残留细胞并过筛, 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞。用 PBS 重悬洗涤细胞 1 次, 加入裂解液轻柔吹悬准确控制时间裂解 10~15 min, 1 200 r/min 离心 5 min。收集细胞用 PBS 轻柔洗涤 1 次, 弃上清液, 加入适量无菌 RPMI 1640 培养基 (含 10% FBS) 对细胞进行重悬, 计数, 稀释为每毫升 1×10<sup>6</sup> 个细胞备用。

细胞标记: Th1 (CD4-FITC、IFN-γ-Cy5.5), Th2 (CD4-FITC、IL-4-APC), Treg (CD4-FITC、CD3-Cy5.5、Foxp3-PE、CD25-APC), Th17 (CD4-FITC、CD3-Cy5.5、IL17-APC), CD8 (CD8-FITC、IFN-γ-Cy5.5)。

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 Cytofix/Cytoperm Soln Kit)、IL-4 组 (先加 Cytofix/Cytoperm Soln Kit, 后加 IL-4 抗体)、IFN-γ 组 (先加 Cytofix/Cytoperm Soln Kit, 后加 IFN-γ 抗体)、CD8 组 (先加 CD8 抗体, 后加 Cytofix/Cytoperm Soln Kit)、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)、IL17 (先加 Cytofix/Cytoperm Soln Kit, 后加 IL-17 抗体)。

CD8/Th1/Th2/Th17 细胞染色: 取每个小鼠脾脏细胞 1×10<sup>6</sup> 个铺板于 24 孔板, 每孔 1 mL, 每孔加入 Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ 2 μL 刺激, 孵育 5 h。离心收集细胞收集细胞于 2 mL EP 管中 (以下所有溶液提前 4 ℃ 预冷), 离心 (4 ℃, 1 000 r/min, 5 min), 加入 PBS 1 mL, 离心 (4 ℃, 1 000 r/min, 5 min), 加入 CD4/CD8 抗体, 冰上避光孵育 30 min, 然后加入 PBS 1 mL, 离心 (4 ℃, 1 300 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 ℃, 1 300 r/min, 5 min), 弃上清液,

再加入工作洗涤液 1 mL, 离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 300 r/min, 5 min)。分别加入对应的流式抗体, 冰上避光孵育 30 min。再加入工作洗涤液 1 mL, 离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 300 r/min, 5 min)。加入 PBS 300  $\mu\text{L}$  重悬。流式细胞仪检测。

**Treg 细胞染色:** 取每个小鼠脾脏细胞  $1 \times 10^6$  个铺板于 24 孔板, 每孔 1 mL, 每孔加入 Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ 2  $\mu\text{L}$  刺激, 孵育 5 h。离心收集细胞收集细胞于 2 mL EP 管中 (以下所有溶液提前  $4^{\circ}\text{C}$  预冷), 离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 000 r/min, 5 min), 加入 PBS 1 mL, 离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 000 r/min, 5 min), 加入 CD4 和 CD25 抗体, 冰上避光孵育 25 min, 然后加入 PBS 1 mL, 离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 300 r/min, 5 min), 每孔加入转录因子缓冲液 1 mL, 冰上避光孵育 40 min。然后加入工作洗涤液 2 mL,

离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 300 r/min, 5 min), 弃上清液, 重复 1 次。加入 FOXP3 抗体, 冰上避光孵育 50 min。再加入工作洗涤液 2 mL, 离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 1 300 r/min, 5 min)。加入 PBS 300  $\mu\text{L}$  重悬。流式细胞仪检测。

## 2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计学分析。采用 One-Way ANOVA 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 $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 和 $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 菌株的构建

$3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 和  $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 的质粒构建图谱如图 1 所示, 在 PD-L1 相同位点分别引入  $3\text{NO}_2\text{Tyr}$  和  $4\text{NO}_2\text{Phe}$ , 用于 PD-L1 突变体蛋白的表达。

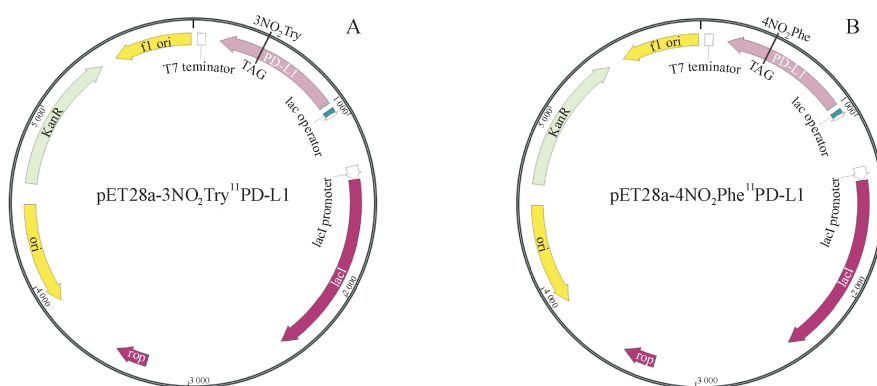


Figure 1 Plasmid map of  $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 (A) and  $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 (B)

### 3.2 WT PD-L1、 $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 和 $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 蛋白的表达

对 WT PD-L1、 $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 和  $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 蛋白进行表达, 取诱导前后全菌进行 SDS-PAGE。结果如下图 2 所示, 诱导后菌体在相对分子质量 27 kD 左右的位置出现条带, 与目的蛋白的相对分子质量大小相符。

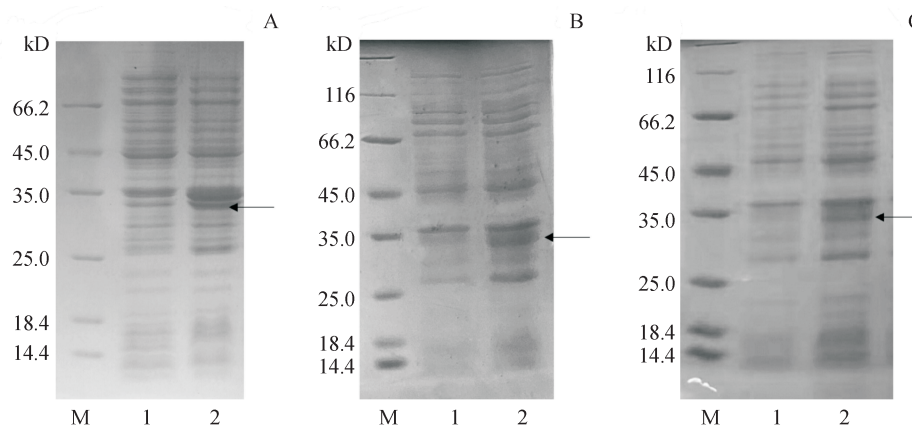
### 3.3 WT PD-L1、 $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1、 $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 蛋白的纯化及 Western blot 鉴定

用镍亲和色谱柱对 WT PD-L1、 $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1、 $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 进行纯化, 目的蛋白经过复性、透析、超滤浓缩之后, 进行 SDS-PAGE 以及 Western blot 鉴定。如图 3 所示获得纯度大于 90% 的 WT PD-L1 及突变体蛋白, 且经 Western blot 验证

表明 WT PD-L1 及突变体正确表达。

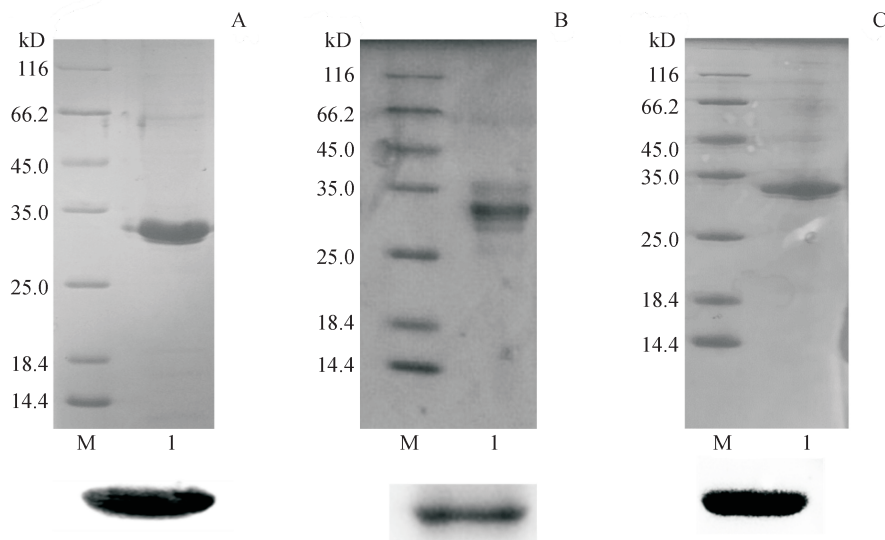
### 3.4 $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 和 $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 免疫对小鼠脾脏内 Th1、Th2 细胞亚群的影响

流式细胞术分析  $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 以及  $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 免疫后小鼠脾脏内 Th1、Th2 细胞比例变化, 结果如图 4 所示,  $4\text{NO}_2\text{Phe}^{\text{H}}$ PD-L1 免疫组小鼠脾脏内 Th1 细胞比例 ( $2.52 \pm 0.04$ )% 显著高于 PBS 组 ( $1.99 \pm 0.08$ )%, 而 Th2 细胞比例 ( $0.26 \pm 0.04$ )% 显著低于 PBS 组 ( $P < 0.05$ )。  $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 免疫组小鼠脾脏内 Th2 细胞比例为 ( $0.20 \pm 0.02$ )%, 显著低于 PBS 组, 但  $3\text{NO}_2\text{Tyr}^{\text{H}}$ PD-L1 免疫对 Th1 细胞的比例无明显影响 ( $P > 0.05$ )。实验结果提示, 4-硝基苯丙氨酸在 PD-L1 疫苗中的引入能使 Th1/Th2 细胞平衡趋向 Th1 细胞。



**Figure 2** SDS-PAGE analysis of the expression WT PD-L1 and mutated PD-L1

A: WT PD-L1; B: 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1; C: 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1. M: Marker, 1: Before IPTG induction, 2: After IPTG induction



**Figure 3** SDS-PAGE analysis and Western blot identification of WT PD-L1 and mutated PD-L1

(A) WT PD-L1. M: Marker, 1: Purified WT PD-L1; (B) 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1. M: Marker, 1: Purified 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1; (C) 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1. M: Marker, 1: Purified 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1

### 3.5 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 和 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 免疫小鼠对脾脏内 Treg 细胞比例的影响

流式细胞术分析 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 以及 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 免疫后小鼠脾脏内 Treg 细胞比例变化,结果如图 5 所示,与 PBS 组( $3.78 \pm 0.06$ )% 相比,4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 组小鼠脾脏内 Treg 细胞比例( $2.90 \pm 0.20$ )% 显著降低( $P < 0.01$ ),而 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 组 Treg 细胞比例( $5.34 \pm 0.44$ )% 与 PBS 组相比则明显提高( $P < 0.05$ )。

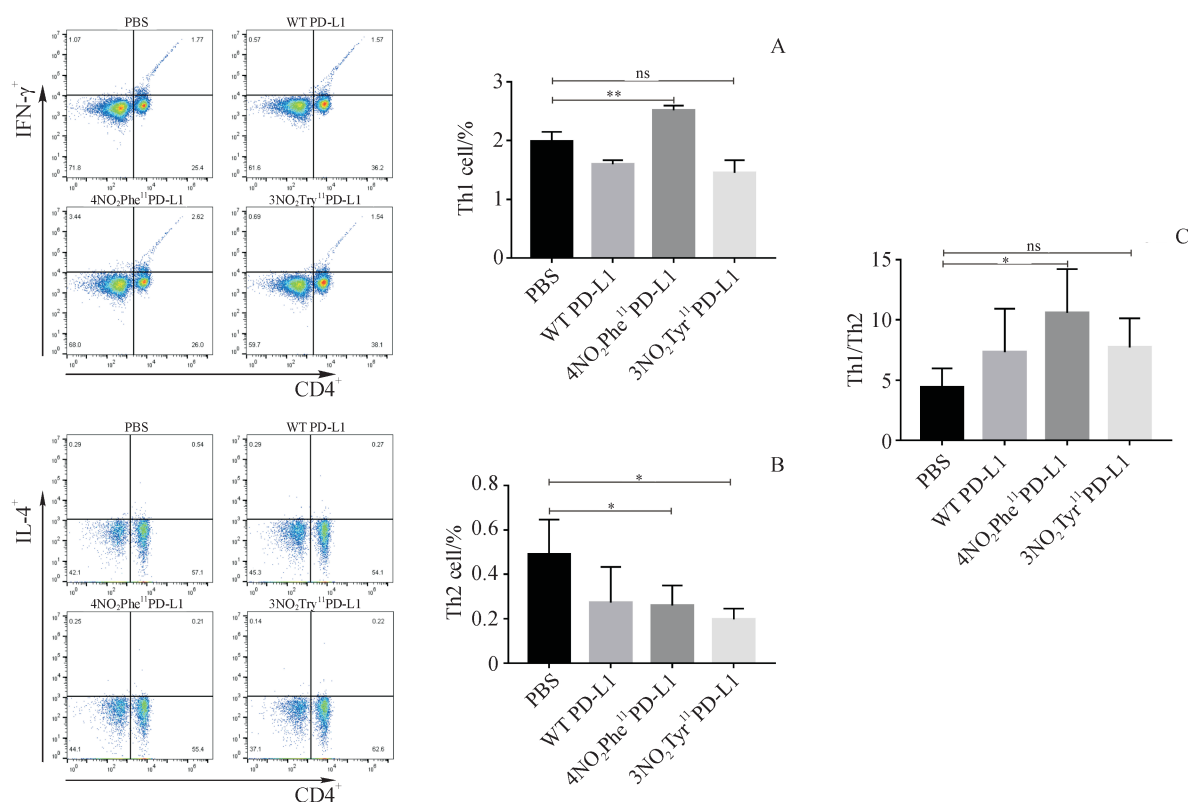
### 3.6 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 以及 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 免疫小鼠后脾脏内 Th17 细胞比例

通过流式细胞术测定脾脏内 Th17 细胞的比例,结果发现,如图 6 所示,与其他各组相比,

3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 免疫小鼠后,脾脏内 Th17 细胞的比例显著增高,4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 免疫后对小鼠脾脏内 Th17 细胞比例没有明显影响。随后分析了 Th17 / Treg 细胞的比例,发现 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 组与 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 组无显著性差异 [ $(0.33 \pm 0.06)\% \text{ vs } (0.28 \pm 0.03)\%$ ],上述结果提示,3-硝基酪氨酸可能在体内作为一种炎症信号发挥作用,对 Th17 细胞亚群影响较大,而 4-硝基苯丙氨酸对 Treg 细胞亚群作用更明显,提示机体可能把含 4-硝基苯丙氨酸的蛋白质作为外源蛋白处理。

### 3.7 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 和 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 免疫小鼠对脾脏内 CD8<sup>+</sup> T 细胞的影响

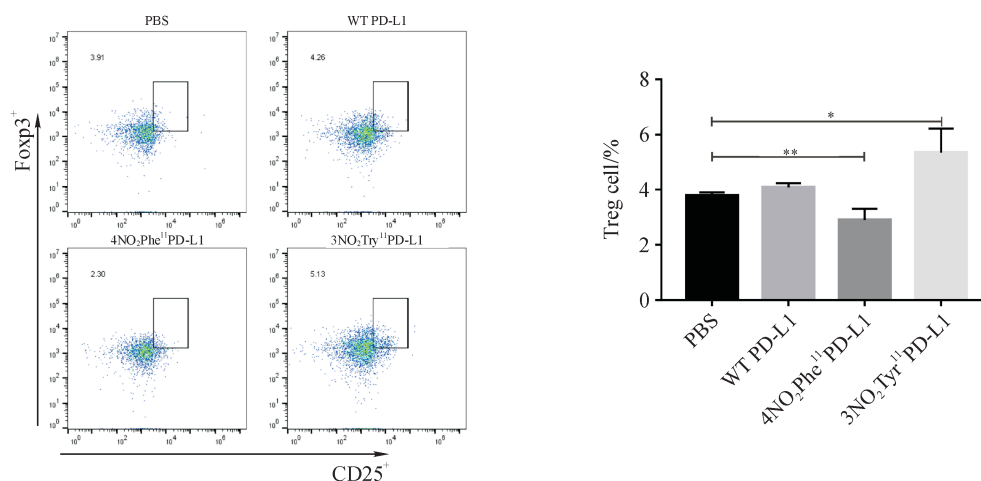
通过流式细胞术分析 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 和



**Figure 4** Immunization of 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 and 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 induces polarization of naïve CD4<sup>+</sup>T cells to Th1 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

A: Frequency of Th1 cells; B: Frequency of Th2 cells; C: Ratios of Th1/Th2 cells

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; ns: not significant

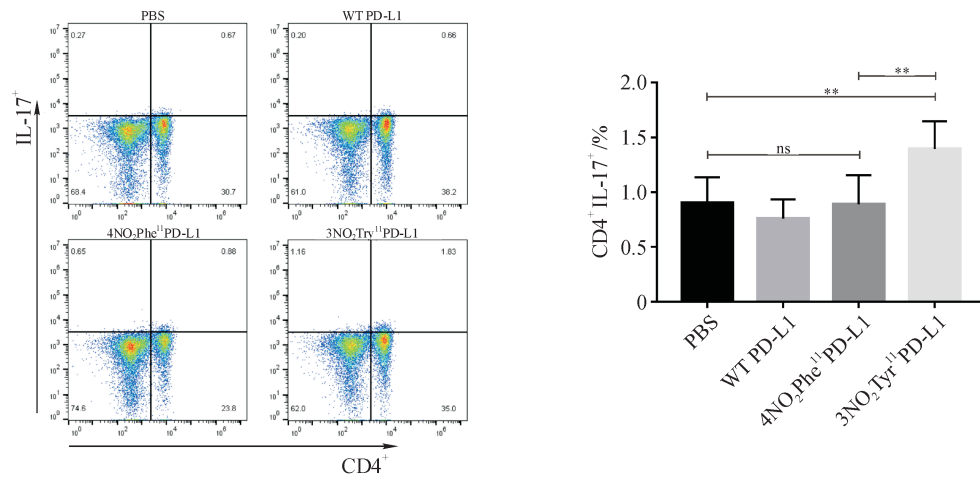


**Figure 5** Effect of 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 and 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 immunization on the frequency of Treg cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

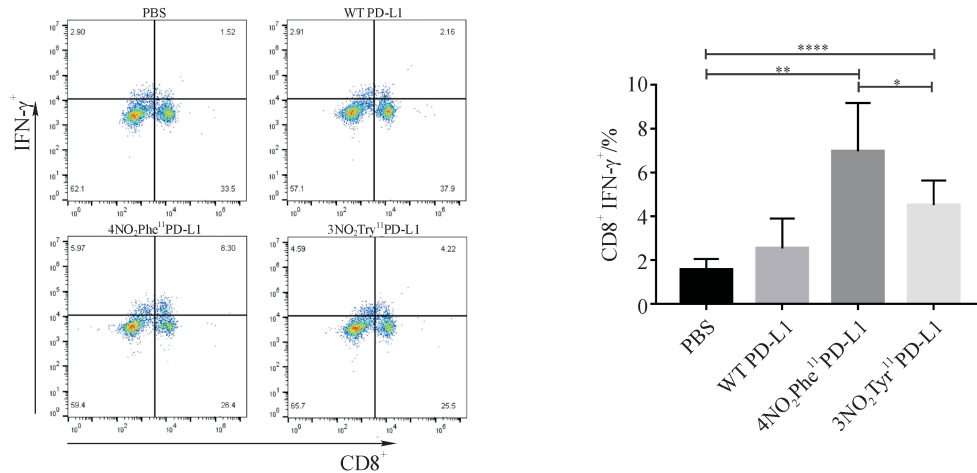
3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 免疫后小鼠脾脏内 CD8<sup>+</sup>T 细胞的激活情况, 结果如图 7 所示, 与 PBS 组相比, 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 以及 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 免疫后小鼠脾脏中的 CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>T 细胞比例均显著增加, 但是

3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PDL 组 CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>T 细胞比例 [ (4.50  $\pm$  0.43)% ] 显著低于 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 组 [ (6.97  $\pm$  0.78)% ]。这可能是由于两者对 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群的作用差异造成的。



**Figure 6** Effect of 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 and 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 immunization on the frequency of Th17 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

\*\* $P < 0.01$ ; ns: not significant



**Figure 7** Effect of 4NO<sub>2</sub>Phe<sup>11</sup>PD-L1 and 3NO<sub>2</sub>Tyr<sup>11</sup>PD-L1 immunization on the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

#### 4 讨论

本研究利用遗传密码扩充技术,将两种免疫原性氨基酸4-硝基苯丙氨酸和3-硝基酪氨酸分别引入到PD-L1疫苗的相同位点,获得具有3-硝基酪氨酸以及4-硝基苯丙氨酸的两种PD-L1突变体。遗传密码扩充技术中,非天然氨基酸由琥珀终止密码子TAG编码,蛋白表达过程中,携带非天然氨基酸的tRNA会和TAG释放因子竞争结合TAG,因此,相较于原型蛋白,突变目的蛋白的产量较低,造成了后续纯化困难,其表达和纯化效率有待进一步提高。

研究发现4-硝基苯丙氨酸在PD-L1疫苗中的引入,能够显著提高脾脏内Th1细胞比例,同时

Th2细胞比例显著降低,促进Th1细胞的极化。3-硝基酪氨酸在PD-L1疫苗中的引入对Th1/Th2比例无影响。有研究显示,肿瘤患者具有较低的Th1/Th2比值,而相较于趋向于Th2细胞反应的患者,趋向于Th1反应的患者主要表现出较高的生存率和较低的肿瘤复发率。因此,Th1/Th2平衡向Th1细胞反应的转变有助于肿瘤的有效治疗<sup>[11]</sup>。

随后本研究分析了二者在PD-L1疫苗中的引入对Treg细胞比例的影响,4-硝基苯丙氨酸的在PD-L1疫苗中的引入显著降低Treg细胞的比例,而3-硝基酪氨酸的引入显著提高Treg细胞比例。Treg细胞是肿瘤免疫微环境中有效的免疫抑制细胞,特异性表达转录因子FOXP3,可通过分泌细胞

因子(IL-10/TGF- $\beta$ )或者细胞间的直接接触来抑制CD8<sup>+</sup>T细胞使机体产生免疫耐受,维持机体稳态<sup>[12]</sup>。实验结果提示,机体可能把4-硝基苯丙氨酸的蛋白质作为外源蛋白处理,因此可能打破免疫耐受的能力更强。

值得关注的是,3-硝基酪氨酸的引入与4-硝基苯丙氨酸相比,能显著提高Th17细胞的比例,而很早文献发现在患有不同炎症相关疾病(例如急性肺损伤、心血管疾病和系统性红斑狼疮)的患者血浆中<sup>[13-15]</sup>,均可分离出识别3-硝基酪氨酸的免疫球蛋白,并且由于这些蛋白持续产生会激活免疫系统,因此可能在维持自身性免疫疾病中起作用。而Th17细胞能够通过分泌炎症介质IL-17诱导严重的自身免疫反应<sup>[16-17]</sup>,上述结果提示,3-硝基酪氨酸可能在机体内作为一种炎症信号发挥作用。

本研究还分析了二者在PD-L1疫苗中的引入对CD8<sup>+</sup>T细胞的影响,它们均能有效地促进CD8<sup>+</sup>T细胞的激活,但4-硝基苯丙氨酸在PD-L1疫苗中的引入对CD8<sup>+</sup>T细胞的激活作用更强,这一结果与4-硝基苯丙氨酸的引入能显著提高Th1细胞的比例相一致,提示4-硝基苯丙氨酸更适用于抗肿瘤疫苗的开发。

### 参考文献

- [1] Grünewald J, Tsao ML, Perera R, *et al.* Immunochemical termination of self-tolerance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(32): 11276–11280.
- [2] Grünewald J, Hunt GS, Dong L, *et al.* Mechanistic studies of the immunochemical termination of self-tolerance with unnatural amino acids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(11): 4337–4342.
- [3] Khan F, Siddiqui AA. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, **370**(1/2): 100–107.
- [4] Khan F, Ali R. Antibodies against nitric oxide damaged poly L-tyrosine and 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, **39**(2): 189–196.
- [5] Thomson L, Christie J, Vadseth C, *et al.* Identification of immunoglobulins that recognize 3-nitrotyrosine in patients with acute lung injury after major trauma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, **36**(2): 152–157.
- [6] Ohmori H, Kanayama N. Immunogenicity of an inflammation-associated product, tyrosine nitrated self-proteins [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, **4**(4): 224–229.
- [7] Hardy LL, Wick DA, Webb JR. Conversion of tyrosine to the inflammation-associated analog 3'-nitrotyrosine at either TCR- or MHC-contact positions can profoundly affect recognition of the MHC class I-restricted epitope of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein 33 by CD8 T cells [J]. *J Immunol*, 2008, **180**(9): 5956–5962.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Tian H, Kang YL, Song XD, *et al.* PDL1-targeted vaccine exhibits potent antitumor activity by simultaneously blocking PD1/PDL1 pathway and activating PDL1-specific immune responses [J]. *Cancer Lett*, 2020, **476**: 170–182.
- [11] 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.
- [12] Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarlı A, *et al.* CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells [J]. *J Immunol*, 2005, **174**(5): 2591–2601.
- [13] Lakshminrusimha S, Suresh MV, Knight PR, *et al.* Role of pulmonary artery reactivity and nitric oxide in injury and inflammation following lung contusion [J]. *Shock*, 2013, **39**(3): 278–285.
- [14] Thomson L. 3-Nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis [J]. *Dis Markers*, 2015, **2015**: 1–8.
- [15] Ferreira I, Croca S, Raimondo MG, *et al.* Nitrated nucleosome levels and neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus; a multi-center retrospective case-control study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, **19**(1): 287.
- [16] Jin B, Sun T, Yu XH, *et al.* The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, **2012**: 836485.
- [17] Li P, Spolski R, Liao W, *et al.* Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells [J]. *Immunol Rev*, 2014, **261**(1): 141–156.