

基于肿瘤抗原 PBK 的融合蛋白疫苗的设计制备及抗肿瘤活性

钱茜茜, 李国志, 田 涛, 高向东*

(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 211198)

摘要 PBK 是一种癌症/睾丸抗原, 其在人类的多种正常组织中不表达, 而在癌变后的组织细胞中异常过表达, 促进癌症的发生、转移甚至耐药性, 为肿瘤免疫治疗提供了新靶点。本研究将硝基化 T 细胞表位与 PBK 蛋白融合表达, 构建了以 PBK 为靶点的蛋白疫苗 PBK-Nitrath; 采用 IFN- γ ELISpot 法评估免疫小鼠脾脏中 PBK 抗原特异性 T 细胞的激活水平, 并在体外进行细胞毒性 T 细胞杀伤效应检测评估其对 H22 肝癌细胞的杀伤能力; 在此基础上采用 H22 肝癌皮下移植瘤模型对其抗肿瘤活性进行评价, 并通过流式细胞术对外周血和脾脏 T 淋巴细胞的分化情况与肿瘤的免疫浸润情况进行分析。结果显示, PBK-Nitrath 能够显著地诱导 PBK 抗原特异性 T 细胞的激活, 增强细胞毒性 T 淋巴细胞的杀伤能力, 并可显著抑制小鼠肝癌肿瘤生长, 提高外周血与脾脏中 CD8 $^+$ CD107a $^+$ T 细胞的比例, 同时可促进肿瘤淋巴细胞的浸润。研究结果提示 PBK-Nitrath 是有潜力的肿瘤疫苗候选分子。

关键词 PBK; 肿瘤免疫; 肿瘤疫苗; 肝癌

中图分类号 R186; Q816 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)05-0657-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024030801

引用本文 钱茜茜, 李国志, 田涛, 等. 基于肿瘤抗原 PBK 的融合蛋白疫苗的设计制备及抗肿瘤活性 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(5): 657–665.

Cite this article as: QIAN Qianqian, LI Guozhi, TIAN Hong, et al. Design, preparation, and antitumor activity of fusion protein vaccine based on tumor antigen PBK[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(5): 657–665.

Design, preparation, and antitumor activity of fusion protein vaccine based on tumor antigen PBK

QIAN Qianqian, LI Guozhi, TIAN Hong, GAO Xiangdong*

Jiangsu Provincial Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract PBK is a cancer/testis antigen that exhibits absent expression in various normal human tissues, but undergoes aberrant overexpression upon cellular transformation, thereby promoting the initiation, metastasis and even drug resistance of cancer. Consequently, it represents a novel target for tumor immunotherapy. In this study, PBK-Nitrath, a protein vaccine specifically designed to target PBK by fusing nitrated T epitope with the PBK protein was developed, using the IFN- γ ELISpot method to evaluate the activation level of PBK antigen-specific T cells in the spleen of immunized mice, and conducting *in vitro* cytotoxicity T cell killing efficacy test to evaluate the killing ability against H22 hepatic carcinoma cells; the anti-tumor activity was evaluated using a H22 hepatic carcinoma subcutaneous transplantation tumor model, and the differentiation of peripheral blood and spleen T lymphocytes and tumor immune infiltration were analyzed by flow cytometry. Results showed that PBK-Nitrath could efficiently induce the activation of antigen-specific T cells against PBK while enhancing cytotoxic T lymphocyte-mediated killing capacity, significantly impede hepatic carcinoma progression in mice and increase the ratio of CD8 $^+$ CD107a $^+$ T cells within peripheral blood and spleen, and facilitate tumor lymphocyte infiltration. Our findings reveal the potential utility of PBK-Nitrath as an effective candidate for tumor vaccine.

收稿日期 2024-03-08 * 通信作者 Tel: 13405852857 E-mail: xdgao@cpu.edu.cn

基金项目 新疆维吾尔自治区重点研发任务专项 (2020B03003)

Key words PBK; tumor immunity; tumor vaccine; hepatic carcinoma

This study was supported by the Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2020B03003)

PDZ 结合激酶 (PDZ-binding kinase, PBK), 也称为 T 淋巴因子激活的杀伤细胞来源蛋白激酶 (T-lymphokine-activated killer-cell-originated protein kinase, TOPK), 是一种癌症/睾丸抗原^[1], 除了在睾丸生殖细胞和一些胎儿组织外, 在正常组织中几乎无法检测到 PBK 表达, 而在血液癌、乳腺癌、黑色素瘤、宫颈癌、肺癌、结直肠癌和肝癌等多种肿瘤组织中观察到 PBK 的异常过表达或激活^[2]。PBK 作为一种双特异性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞周期调节和有丝分裂进程中发挥至关重要的作用^[3]。PBK 在多种原发性肿瘤中的过表达与肿瘤发生、转移、侵袭性增强和耐药性有关^[4]。多种肿瘤组织中 PBK 的表达与患者的不良预后之间存在显著关系, PBK 可以作为肿瘤预后不良的潜在标志物和预测因子^[5]。越来越多的证据表明, PBK 与肿瘤发生发展密切相关, 并且在大多数肿瘤组织中特异性过表达, 是癌症免疫治疗的潜在有效靶点。

目前针对 PBK 分子设计的药物主要为小分子抑制剂, 仍处于临床前阶段^[6]。HI-TOPK-032 和 OTS964 是两种报道较多的靶向 PBK 的小分子抑制剂, 然而它们的作用机制很可能涉及间接靶向多种激酶, 并且溶解度和毒性方面存在极大问题, 这限制了其临床应用^[7–8]。与小分子抑制剂相比, 肿瘤疫苗能够主动激活免疫反应, 具有肿瘤靶向性、激活免疫特性的优势, 并能产生长期的抗肿瘤免疫记忆, 具有治疗转移性肿瘤和预防肿瘤复发的潜力^[9]。治疗性肿瘤疫苗的优势还包括最小的非特异性影响、广泛的治疗窗口、低毒性, 同时其给药剂量小且给药次数少利于提高患者的依从性, 在癌症治疗中具有良好的临床应用前景^[10]。由于 PBK 是自体抗原, 免疫自我耐受机制会消除对其具有高亲和性的特异性免疫细胞, 肿瘤疫苗则必须通过刺激低亲和力的反应性 T 细胞来打破耐受^[11]。因此, 克服对肿瘤相关抗原的耐受性仍然是基于肿瘤疫苗的免疫疗法的障碍。

因此, 本研究利用实验室前期筛选获得的硝基化 T 细胞表位 Nitrath, 设计了 PBK 蛋白疫苗, 命名为 PBK-Nitrath, 并对其抗肿瘤活性进行了研究。结果证实, PBK-Nitrath 可以显著抑制 H22 肝癌肿瘤

生长, 提高外周血与脾脏中 CD8⁺CD107a⁺ T 细胞的比例, 同时可促进肿瘤中细胞毒性 T 淋巴细胞的浸润, 提示 PBK-Nitrath 是有潜力的肿瘤疫苗候选分子。

1 材 料

1.1 试 剂

IFN- γ ELISpot 检测试剂盒 (德国 AID 公司); CpG1018(北京擎科生物科技有限公司); RPMI 1640 培养基、DMEM 高糖培养基、EasyPure RNA Kit 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); 红细胞裂解液、PE-Cy7 标记的抗小鼠 CD8a 抗体; FITC 标记的抗小鼠 CD45 抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD3 抗体、PE 标记的抗小鼠 CD8a 抗体、PerCP/Cyanine5.5 标记的抗小鼠 CD3 抗体、Alexa Fluor® 700 标记的抗小鼠 CD107a 抗体 (美国 BioLegend 公司); APC 标记的抗小鼠 CD107a 抗体、7-AAD 活性染色溶液、CFSE 细胞增殖试剂盒 (美国赛默飞公司); HiScript III RT Super-Mix for qPCR 试剂、染料法定量 PCR 检测试剂盒 (南京诺唯赞生物科技公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

Nanodrop 2000 分光光度计、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); AKTA Pure 25M 蛋白纯化系统 (美国 Cytiva 公司); Accuri C6 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 动 物

SPF 级 BALB/c 雌性小鼠, 6 周龄, 购于杭州子源实验动物科技有限公司, 合格证号 20231220Abzz 0105000739。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

1.4 细胞株

小鼠肝癌细胞株 H22 为生物药物成药性研究重点实验室保存。

1.5 菌种和质粒

E.coli BL21(DE3)、pET28a(+)Vector 均为生物药物成药性研究重点实验室保存。

2 方 法

2.1 PBK-Nitrath 蛋白的设计构建

根据 UniProt 蛋白在线数据库 (www.uniprot.org) 获得鼠源 PBK 蛋白序列 >sp|Q9JJ78|1-330, 将 PBK 原型蛋白命名为 PBK。通过柔性连接肽 LRMK 将 PBK 与硝基化 T 表位进行连接, 命名为 PBK-Nitrath。

根据大肠埃希菌密码子偏好性, 对 PBK-Nitrath 的 DNA 序列进行优化, 将优化后的序列通过同源重组合成到 pET28a(+) 表达载体上。将测序正确的 PBK-Nitrath 质粒转化至含 pAC-4tRNA-pNO2-PheRS 质粒的 BL21(DE3) 感受态中, 将菌液均匀涂布在含有卡那霉素和氯霉素抗性的固体琼脂 LB 平板表面上。37℃ 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, 保存菌种。

2.2 PBK-Nitrath 蛋白的表达纯化

取甘油菌 200 μL, 接种于 LB 培养基 (含 100 μg/mL 卡那霉素、17 μg/mL 氯霉素) 20 mL 中, 37℃ 过夜培养。取过夜活化的菌液 10 mL 转接于 M9 培养基 (含 100 μg/mL 卡那霉素、17 μg/mL 氯霉素) 1 L 中, 37℃, 220 r/min 培养 7.5 h 后, 加终浓度为 1 mmol/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℃, 220 r/min 培养 18 h 后, 8 000 r/min, 30 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除去杂质蛋白和核酸等杂质。用 8 mol/L 尿素对包涵体进行变性, 4℃ 过夜搅拌, 变性液过 Ni 亲和色谱柱, 用 20 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱杂蛋白, 200 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱目的蛋白, 然后按体积比 1:20 加入复性缓冲液, 用磷酸盐缓冲液透析, 超滤浓缩, BCA 法测蛋白浓度。

2.3 IFN-γ ELISpot 法检测 PBK-Nitrath 的免疫原性

将 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠分成将小鼠分为 3 组, 分别为对照组 (佐剂 CpG1018 20 μg)、PBK 组 (PBK 蛋白 50 μg + 佐剂 CpG1018 20 μg)、PBK-Nitrath 组 (PBK-Nitrath 蛋白 50 μg + 佐剂 CpG1018 20 μg), 每组 6 只。皮下免疫小鼠, 每周免疫 1 次, 共免疫 3 周。最后一次免疫 1 周后, 处死小鼠。此外, 分离主要器官肝脏与肾脏, 用 4% 多聚甲醛固定, 并切片进行 HE 染色, 以评估组织损伤或异常。

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, 1 200 r/min, 5 min; 再加入红细胞裂解液 4 mL 重悬细胞, 37℃ 静置 5 min; 补加 PBS 至 10 mL, 1 200 r/min 离心 5 min; 再重复用 PBS 洗涤细胞两次; 用 RPMI 1640 完全培养基对细胞进行重悬, 进行细胞计数。

准备 IFN-γ ELISpot 试剂板, 加入灭菌 PBS 清洗 4 次。然后加入 RPMI 1640 完全培养基, 室温静置孵育 30 min。倒弃培养基, 随后在各孔中加入对应的刺激物, 其中刺激用蛋白每孔 10 μg, 阳性刺激物每孔 10 μg。接着加入小鼠脾脏淋巴细胞悬液, 每孔 5×10^5 个细胞, 设置阳性对照和阴性对照。37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h。PBS 洗涤 5 次。加入稀释的 IFN-γ 检测抗体 (R4-6A2-biotin), 室温孵育 2 h。PBS 洗涤 5 次, 加入稀释的酶标亲和素抗体, 室温孵育 2 h。PBS 洗涤 5 次, 加入过滤后的显色液, 避光显色 20 min。用去离子水洗涤正反面及底座 3~5 遍, 终止显色。将板条避光密封保存, 酶联免疫斑点分析仪读取数据。

2.4 细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤效应检测

将 200 μL, 5×10^4 个 H22 细胞提前铺于 48 孔板。37℃、5% CO₂ 培养 4 h。收集过夜刺激孵育的脾脏淋巴细胞到离心管中, 1 200 r/min 离心 5 min。加入 PBS 10 mL, 1 200 r/min 离心 5 min。加入适量的 PBS 重悬细胞, 添加 CFSE, 使其终浓度为 2 μmol/L, 立即混合并在室温下避光孵育 7 min。通过添加 4 倍体积的预冷的 RPMI 1640 完全培养基停止标记, 并在冰上孵育 10 min, 1 200 r/min 离心 5 min。用预冷的 RPMI 1640 完全培养基洗涤细胞 2 次, 1 200 r/min 离心 5 min。加入完全培养基重悬计数, 按照 50:1 效靶比进行铺板, 2.5×10^6 个脾脏淋巴细胞, 5×10^4 个 H22 细胞。孵育 24 h。收集培养基, 再加入 PBS 洗涤, 收集上清液, 1 769 r/min 离心 5 min。用 70 μm 滤膜过滤, 每孔在上样前 5 min 加入 7-AAD 5 μL, 流式细胞仪检测。

2.5 基于 H22 肝癌皮下移植瘤的 PBK-Nitrath 疫苗抗肿瘤活性评价

BALB/c 小鼠腹腔移植 2×10^6 个 H22 细胞, 腹腔培养 10 d 后, 抽取腹水, 分离 H22 细胞, 每只 BALB/c 小鼠于右后肢靠背部位皮下注射 2×10^5 个 H22 细胞。当肿瘤体积达到 10~40 mm³ 时, 选择造模成功且肿瘤形态规则的小鼠, 以肿瘤体积大小为标准进行随机区间分组, 确保组间小鼠肿瘤体积和

体重大小没有显著性差异。将小鼠分为 3 组, 分别为对照组(佐剂 CpG1018 20 μg)、PBK 组(PBK 蛋白 50 μg + 佐剂 CpG1018 20 μg)、PBK-Nitrath 组(PBK-Nitrath 蛋白 50 μg + 佐剂 CpG1018 20 μg), 每组 8 只。分组当天(第 0 天)进行皮下免疫, 随后在第 7、14 天进行两次免疫, 共免疫 3 次。一周测量肿瘤体积和体重 2 次。皮下肿瘤体积计算方法: 体积 = (长 \times 宽²) / 2。

2.6 流式细胞术分析 PBK-Nitrath 对外周血 T 细胞亚群的影响

摘除小鼠眼球取外周血约 100 μL 至抗凝管中并弹匀。加入 1× 红细胞裂解液 2 mL, 室温避光孵育 12 min, 加入 PBS 3 mL 终止裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1769 r/min 离心 5 min 弃上清液。再重复用 PBS 洗涤细胞两次, 加入含 1% BSA 的 PBS 1 mL 重悬细胞。CD8⁺CD107a⁺ T 淋巴细胞染色根据流式抗体说明书操作。

2.7 流式细胞术分析 PBK-Nitrath 对脾脏 T 细胞亚群的影响

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, 1200 r/min 离心 5 min; 再加入红细胞裂解液 4 mL 重悬细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min; 补加 PBS 至 10 mL, 1200 r/min 离心 5 min; 再重复用 PBS 洗涤细胞两次; 用 RPMI 1640 完全培养基对细胞进行重悬, 进行细胞计数。CD8⁺CD107a⁺ T 淋巴细胞染色根据流式抗体说明书操作。

2.8 流式细胞术分析 PBK-Nitrath 对肿瘤浸润淋巴细胞的影响

取实体肿瘤组织新鲜标本, 用手术剪去除坏死及脂肪组织, 选取肿瘤细胞集中和细胞活力较好的部位。将组织切成直径 1~2 mm 的碎块, 随后将肿瘤组织转移至装有消化酶的离心管中。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 40 min, 每隔 10 分钟颠倒混匀。将细胞悬液经 70 μm 滤网过滤, PBS 冲洗, 收集滤液, 1769 r/min 离心 7 min。加入 PBS 重悬细胞。设置实验组、单染组和空染组, 每个样本取 2×10^6 个细胞, 加入 PBS 1 mL 重悬细胞, 1769 r/min 离心 5 min。加入含 1% BSA 的 PBS 1 mL 重悬细胞。CD3⁺CD8⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺CD107a⁺ T 淋巴细胞染色根据流式抗体说明书操作。

2.9 肿瘤组织 RNA 分离提取和 qRT-PCR

每个小鼠肿瘤样本称取 20 mg, 放入液氮预冷的研钵中研磨成粉, 随后使用 RNA 提取试剂盒提取肿瘤组织 RNA。使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 的浓度和纯度。使用 HiScript III RT Super-Mix for qPCR 试剂将每个样本的总 RNA 1 μg 反转录为 cDNA, 使用染料法定量 PCR 检测试剂盒通过 qRT-PCR 检测基因表达差异。实验步骤按照试剂盒操作说明书进行。

2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计学分析, 各项结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 One-Way ANOVA 方差分析对 3 组及以上样本进行显著性比较, $P < 0.5$ 被认为具有统计学意义。

3 结 果

3.1 PBK-Nitrath 蛋白疫苗的表达纯化

大肠埃希菌发酵后诱导表达 PBK-Nitrath 蛋白, 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 PBK-Nitrath 在 39.9 kD 附近出现了条带(图 1-A), 与目的蛋白的相对分子质量大小相符。对 PBK-Nitrath 利用 His 标签进行 Ni 柱分离纯化, 经 6×His 标签抗体的 Western blot 检测, 纯化产物与目的蛋白 PBK-Nitrath 的相对分子质量大小一致(图 1-B)。经 SDS-PAGE 检测, 通过 image J 软件分析, PBK-Nitrath 蛋白的纯度大于 95%(图 1-C)。同时制备了原型蛋白 PBK 作为对照。

3.2 PBK-Nitrath 的免疫原性检测

按照“2.3”项对雌性 BALB/c 小鼠进行分组、免疫。分离免疫后各组小鼠的脾脏淋巴细胞, 采用 ELISpot 法检测脾脏中的 T 细胞分泌 IFN- γ 的水平。结果如图 2-A 所示, 相较于对照组(生理盐水 + 佐剂, 下同), PBK-Nitrath 组在疫苗免疫后脾脏中的 T 细胞的 IFN- γ 分泌水平显著提高($P < 0.0001$), 并显著高于 PBK 组($P < 0.01$), 这表明 PBK-Nitrath 能够有效诱导 PBK 抗原特异性 T 细胞的激活。

肿瘤疫苗发挥作用的关键在于诱导机体产生对于肿瘤的细胞免疫, 为了验证这一点, 在体外进行细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤效应检测, 评估免疫激活后的 T 细胞对 H22 肝癌细胞的杀伤能力。分离免疫过后的 BALB/c 小鼠的脾脏淋巴细胞作为效应

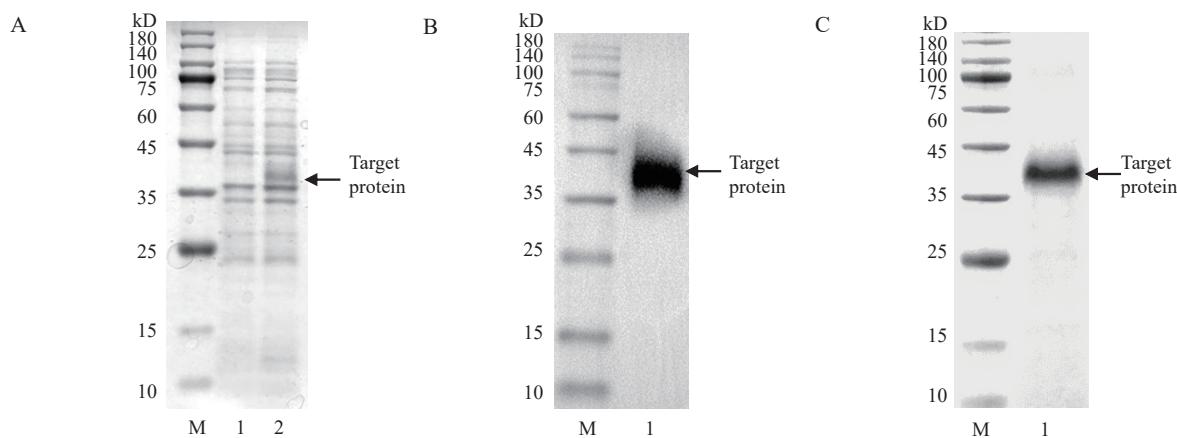


Figure 1 Expression and identification of PBK-Nitrath
A: SDS-PAGE analysis of PBK-Nitrath expression (M: Marker; 1: Before induction; 2: After induction); B: Western blot of the purified PBK-Nitrath protein (M: Marker; 1: PBK-Nitrath); C: SDS-PAGE of the purified PBK-Nitrath protein (M: Marker; 1: PBK-Nitrath)

细胞, 选择肿瘤细胞株 H22 为靶细胞, 以 50:1 的比例共孵育后, 采用 CFSE/7AAD 染色, 使用流式细胞术进行分析。结果如图 2-B 所示, PBK-Nitrath 疫苗诱导的细胞毒性 T 淋巴细胞具有很高的体外杀伤活性, 为 $(16.35 \pm 3.207)\%$, 显著高于对照组 ($P < 0.001$) 和 PBK 组 ($P < 0.01$)。

对经过 3 次疫苗免疫后的各组小鼠肝肾进行 HE 染色, 结果如图 2-C 显示, PBK-Nitrath 免疫的小鼠肝肾细胞形态正常, 未见明显异常。免疫过程中称量小鼠体重, 结果如图 2-D 所示, PBK-Nitrath 免疫小鼠未导致小鼠体重明显减轻, 与对照组之间

无显著性差异。

3.3 基于 H22 肝癌皮下移植瘤的 PBK-Nitrath 疫苗抗肿瘤活性评价

按照“2.5”项对 BALB/c 小鼠进行分组、免疫。在第 19 天, 对照组小鼠肿瘤即将超过 2000 mm^3 , 遂将小鼠处死进行后续的检测。如图 3-A 所示, 到第 19 天处死时, 对照组的肿瘤体积达到了 $(1982 \pm 488.3) \text{ mm}^3$, 而 PBK-Nitrath 组的肿瘤体积仅为 $(1003 \pm 382.1) \text{ mm}^3$, 表明 PBK-Nitrath 疫苗能显著抑制 H22 皮下移植瘤的生长 ($P < 0.001$)。肿瘤组织的称重结果见图 3-B, 从图中可知, 实验终点时,

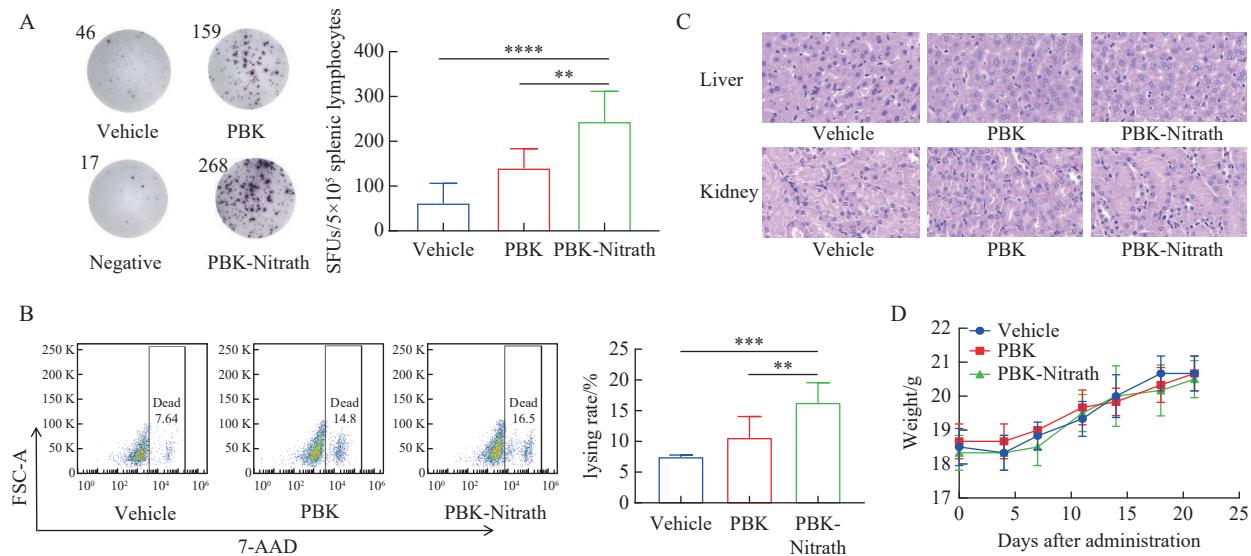


Figure 2 Immunogenicity of PBK-Nitrath vaccine ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

A: IFN- γ secretion levels in spleen lymphocytes; B: *In vitro* killing toxicity of splenic lymphocytes; C: Tissue slices of liver and kidney of mice after immunization ($100\times$, HE); D: Changes in body weight of mice during immunization

$**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$

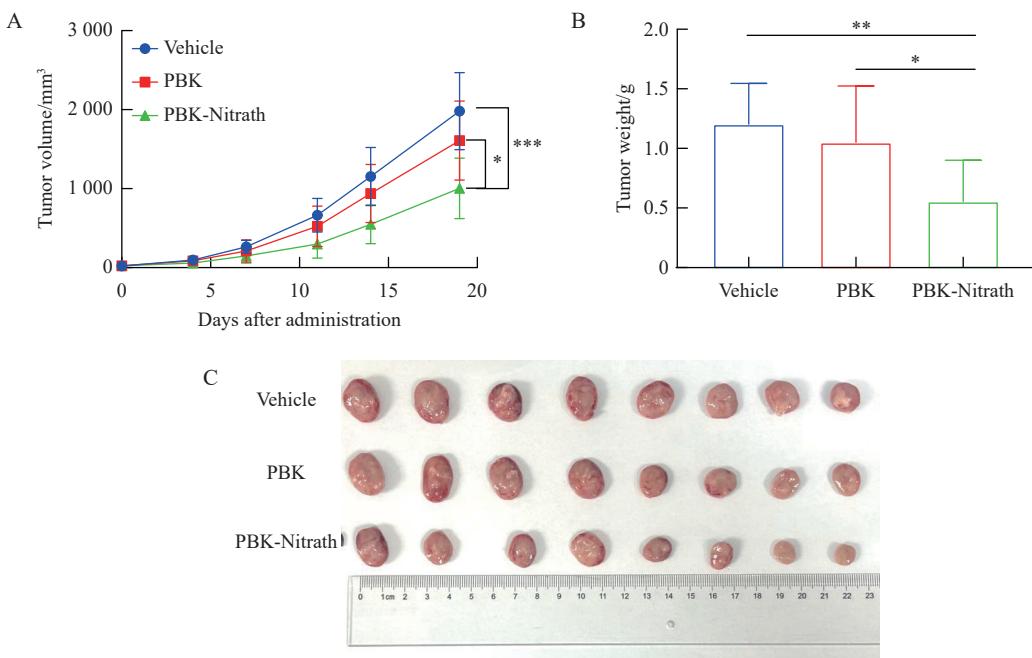


Figure 3 Antitumor activity of PBK-Nitrath ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A: Tumor volume growth curve; B: Tumor weight; C: Tumor tissue

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

PBK-Nitrath 组的肿瘤重量为 (0.56 ± 0.34) g, 显著低于对照组 ($P < 0.01$), 也远低于 PBK 组 ($P < 0.05$), 表明 PBK-Nitrath 可以显著抑制肿瘤生长。

3.4 小鼠肝癌模型中外周血和脾脏 CD8⁺ T 淋巴细胞分化情况

通过流式细胞术对小鼠外周血和脾脏中 CD8⁺ CD107a⁺ T 细胞的比例进行测定。结果如图 4-A 所示, 相较于对照组, 原型蛋白 PBK 组外周血中 CD8⁺ CD107a⁺ T 细胞的比例并未出现明显差异, 而免疫 PBK-Nitrath 疫苗后增加了外周血中 CD8⁺CD107a⁺ T 细胞的比例 ($P < 0.05$), 达到 $(0.3035 \pm 0.1713)\%$ 。对于脾脏中的 CD8⁺ T 细胞 (图 4-B), 与对照组相比, PBK-Nitrath 疫苗给药后提高了小鼠脾脏中 CD8⁺ CD107a⁺ T 细胞的比例 ($P < 0.0001$), 达到 $(0.7450 \pm 0.1538)\%$, 同时与 PBK 组相比也产生差异 ($P < 0.001$)。这些结果表明, PBK-Nitrath 疫苗可以提高外周血和脾脏中 CD8⁺CD107a⁺ 双阳性 T 细胞的比例。

3.5 肿瘤浸润淋巴细胞检测

通过流式细胞术检测肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞、CD8⁺CD107a⁺ T 细胞的浸润情况。结果如图 5-A 所示, 与对照组相比, PBK-Nitrath 疫苗接种显著提高了 CD8⁺ T 细胞的肿瘤浸润水平 ($P < 0.05$)。

更为重要的是, PBK-Nitrath 组肿瘤微环境中 CD8⁺ CD107a⁺ T 细胞的比例显著高于对照组 ($P < 0.0001$) 与 PBK 组 ($P < 0.001$), 达到 $(6.815 \pm 2.214)\%$ (图 5-B), 提示 PBK-Nitrath 疫苗接种有效增强了 naïve CD8⁺ T 细胞向细胞毒性 T 淋巴细胞的扩增和分化, 从而增加了肿瘤微环境中细胞毒性 T 淋巴细胞的浸润, 增强其特异性杀伤肿瘤细胞的能力。

细胞毒性 T 淋巴细胞介导的直接杀伤需要细胞间接触, 通常由细胞溶解酶如颗粒酶 B 的释放引起, 并能够分泌 IFN- γ 等细胞因子, 增强其细胞毒作用从而间接杀伤靶细胞, 这些效应蛋白的表达与分泌水平可以评价细胞毒性 T 淋巴细胞的效应功能。肿瘤组织中颗粒酶 B (图 5-C) 和细胞因子 IFN- γ (图 5-D) 的转录水平检测结果显示, 相较于对照组, PBK-Nitrath 组肿瘤组织中颗粒酶 B ($P < 0.001$) 和 IFN- γ ($P < 0.0001$) 的 mRNA 转录水平显著提高, 表明 PBK-Nitrath 疫苗的接种可以增强肿瘤微环境中细胞毒性 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的潜在杀伤能力。

4 讨 论

目前靶向 PBK 的肿瘤疗法主要是以小分子抑制剂为代表的靶向治疗, 但小分子靶向药物存在

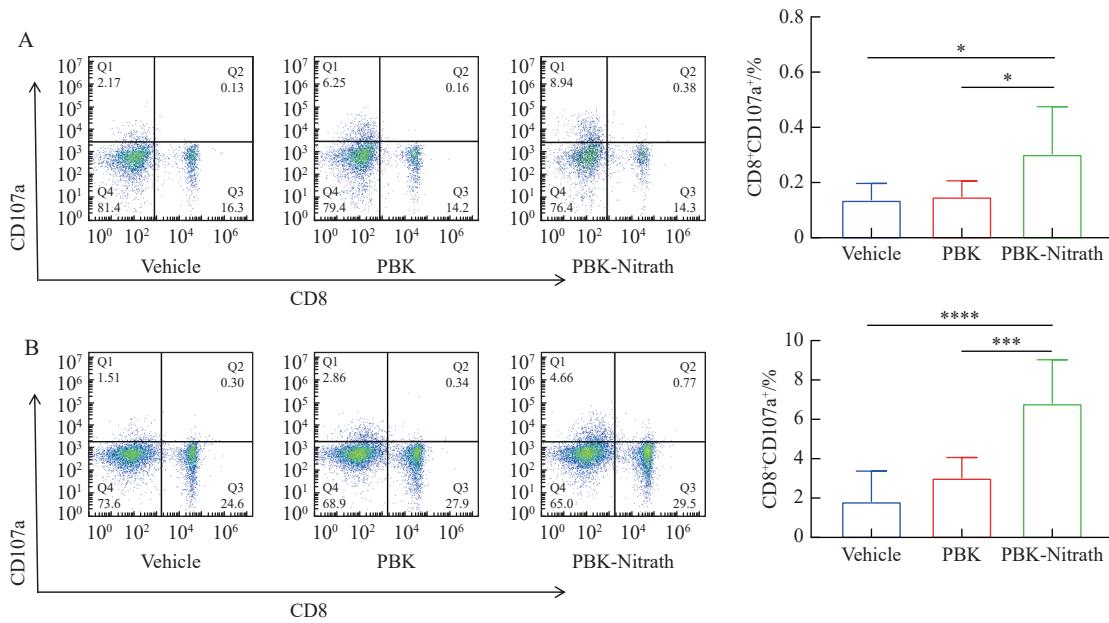


Figure 4 Frequency of CD8⁺CD107a⁺ T cells in the peripheral blood and spleen of mice with hepatic carcinoma ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A: Peripheral blood; B: Spleen

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

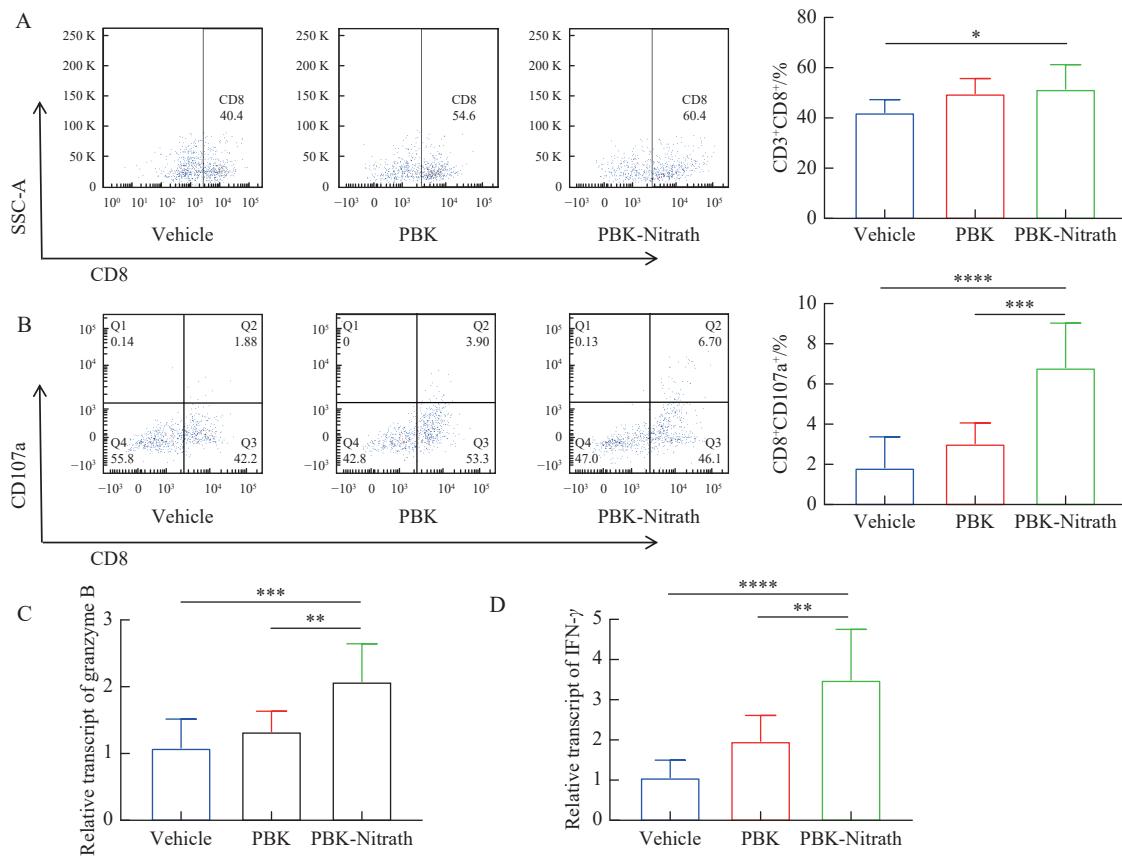


Figure 5 Detection of tumor-infiltrating lymphocytes in mouse tumor tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A: Proportion of CD8⁺ to CD3⁺ T cells; B: Proportion of CD107a⁺ to CD8⁺ T cells; C: Detection of mRNA transcript levels of Granzyme B in tumor tissues by qRT-PCR; D: Detection of mRNA transcript levels of IFN- γ in tumor tissues by qRT-PCR

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

着半衰期短、特异性不强、耐药性甚至毒性等问题^[12]。而治疗性肿瘤疫苗具有明显优势:主动激活免疫系统,肿瘤特异性强,不良反应少;具有免疫记忆性,防止复发与转移;给药次数少,患者依从性好等^[13]。但由于 PBK 属于自身抗原,存在自身免疫耐受,较低的免疫原性限制了疫苗开发。本研究将课题组前期筛选得到的硝基化 T 细胞表位应用于靶向癌症/睾丸抗原 PBK 的疫苗设计中,并使用 CpG1018 作为佐剂。因 PBK 的细胞定位在细胞质及细胞核中,抗体介导的体液免疫并不能起到杀伤肿瘤的效果,因此主要考察了疫苗对细胞毒性 T 淋巴细胞的激活和杀伤肿瘤的能力。免疫原性实验结果与实验室前期的研究结果一致,该硝基化 T 细胞表位可以辅助自身抗原 PBK 打破免疫耐受,显著提高了其免疫原性。PBK-Nitrath 疫苗有效诱导 PBK 抗原特异性 T 细胞的激活,使之分泌更高水平的 IFN- γ ,同时 PBK-Nitrath 诱导产生的细胞毒性 T 淋巴细胞具有很高的体外杀伤活性。抑瘤实验结果表明, PBK-Nitrath 疫苗能诱导 BALB/c 小鼠产生针对 PBK 的细胞免疫应答,显著抑制了 H22 皮下移植瘤的生长,表现出良好的抗肿瘤活性。

研究显示,免疫细胞如 CD8⁺ T 细胞的富集与癌症患者的生存期延长和免疫治疗疗效的提高有关^[14]。肿瘤微环境中细胞毒性 T 淋巴细胞的数量是癌症的关键预后标志物,细胞毒性 T 淋巴细胞浸润多的肿瘤更容易对免疫治疗产生反应^[15]。肿瘤中缺乏 T 细胞可导致对免疫治疗的耐药性^[16]。因此,目前免疫疗法的重点是增强肿瘤内细胞毒性 T 淋巴细胞的活性,促进淋巴组织内细胞毒性 T 淋巴细胞的启动,并建立持久有效的抗肿瘤免疫^[17]。本研究结果表明, PBK-Nitrath 疫苗可以有效增加肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞的浸润,并在外周血、脾脏与肿瘤组织中都观察到 CD8⁺ T 细胞活化与细胞毒性脱颗粒的标志物 CD107a 的增加。这表明 PBK-Nitrath 疫苗的免疫促进了外周免疫器官与肿瘤微环境中 CD8⁺ T 细胞的进一步活化,使细胞毒性 T 淋巴细胞在肿瘤中的浸润增加和细胞毒作用增强。这提示 PBK-Nitrath 可以在机体免疫系统中建立有效的 T 细胞抗肿瘤反应,其可能改变肿瘤抑制免疫微环境,需要后续进一步探究。

综上所述,本研究设计的 PBK-Nitrath 疫苗不仅能诱导抗原特异性 T 细胞的激活,同时增加了肿瘤

中细胞毒性 T 淋巴细胞的浸润,从而有效抑制肿瘤生长,提示 PBK-Nitrath 是有潜力的肿瘤疫苗候选分子。

References

- [1] Park JH, Lin ML, Nishidate T, et al. PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, a putative cancer/testis antigen with an oncogenic activity in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, **66**(18): 9186-9195.
- [2] Huang H, Lee MH, Liu KD, et al. PBK/TOPK: an effective drug target with diverse therapeutic potential[J]. *Cancers*, 2021, **13**(9): 2232.
- [3] Park JH, Nishidate T, Nakamura Y, et al. Critical roles of T-LAK cell-originated protein kinase in cytokinesis[J]. *Cancer Sci*, 2010, **101**(2): 403-411.
- [4] Zhang Y, Yang XJ, Wang R, et al. Prognostic value of PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase (PBK/TOPK) in patients with cancer[J]. *J Cancer*, 2019, **10**(1): 131-137.
- [5] Herbert KJ, Ashton TM, Prevo R, et al. T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK): an emerging target for cancer-specific therapeutics[J]. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(11): 1089.
- [6] Han ZP, Li LZ, Huang YY, et al. PBK/TOPK: a therapeutic target worthy of attention[J]. *Cells*, 2021, **10**(2): 371.
- [7] Kim DJ, Li Y, Reddy K, et al. Novel TOPK inhibitor HITOPK-032 effectively suppresses colon cancer growth[J]. *Cancer Res*, 2012, **72**(12): 3060-3068.
- [8] Matsuo Y, Park JH, Miyamoto T, et al. TOPK inhibitor induces complete tumor regression in xenograft models of human cancer through inhibition of cytokinesis[J]. *Sci Transl Med*, 2014, **6**(259): 259ra145.
- [9] Hu ZT, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18**(3): 168-182.
- [10] Wong KK, Li WA, Mooney DJ, et al. Advances in therapeutic cancer vaccines[J]. *Adv Immunol*, 2016, **130**: 191-249.
- [11] Pedersen SR, Sørensen MR, Buus S, et al. Comparison of vaccine-induced effector CD8 T cell responses directed against self- and non-self-tumor antigens: implications for cancer immunotherapy[J]. *J Immunol*, 2013, **191**(7): 3955-3967.
- [12] Yang YQ, Teng QX, Wu ZX, et al. PBK/TOPK inhibitor OTS964 resistance is mediated by ABCB1-dependent transport function in cancer: *in vitro* and *in vivo* study[J]. *Mol Cancer*, 2022, **21**(1): 40.
- [13] Duan ZH, Yang DD, Yuan P, et al. Advances, opportunities and challenges in developing therapeutic cancer vaccines[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2024, **193**: 104198.

- [14] Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(11): 662-680.
- [15] Wang JC, Sun X, Ma Q, *et al.* Metformin's antitumour and anti-angiogenic activities are mediated by skewing macrophage polarization[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(8): 3825-3836.
- [16] Sharma P, Hu-Lieskov S, Wargo JA, *et al.* Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 707-723.
- [17] Borst J, Ahrends T, Bąbala N, *et al.* CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(10): 635-647.

· 校园信息 ·

本刊副主编孔令义教授荣获第十七届中国药学发展奖·特别贡献奖

2024 年 6 月 21 日,由中国药学发展奖奖励工作委员会、北京长江药学发展基金会主办的中国药学发展奖成立三十周年学术交流暨第十七届药学发展奖颁奖大会在全国人大会议中心隆重召开。中国药科大学副校长、我刊副主编孔令义教授荣获第十七届中国药学发展奖·特别贡献奖,并代表获奖者发表获奖感言。

中国药学发展奖是国家科技部首批批准的奖励人物的全国性医药学奖项,旨在对药学领域中做出突出贡献或取得重大科技成果的药学工作者进行表彰宣传和奖励,激励药学工作者跟踪和超越世界先进水平,为振兴药学、推动药学事业的发展作出更大的贡献。该奖设立特别贡献奖、突出成就奖、杰出青年学者奖等 3 个奖项,至今已成功举办 17 届,共评选出杰出医药人才 300 余人。

孔令义教授在获奖感言中表示,获奖者取得的成绩首先归功于改革开放的伟大时代,受益于国家对科技、教育、医药卫生事业的高度重视和大量投入,是所在团队共同努力的结果。获奖者要以这次获奖为新的起点,深入学习习近平总书记关于教育、科技、人才、卫生健康的重要论述和重要指示批示精神,牢记“四个面向”,加快科技创新,推动高水平科技自立自强。要继续努力、辛勤工作,争取在具有自主知识产权的新药创制中取得新的突破,为提高我国人民的健康水平做出新的更大的贡献。

今年是中国药学发展奖设立 30 周年,与颁奖会同期举办了药学发展奖成立三十周年学术交流论坛,在“创新药物赋能新质生产力发展”论坛上,孔令义教授还作了“若干天然产物及其作用靶点研究”的邀请报告。

(科学技术研究院)