

评价肿瘤疫苗免疫原性的新型人免疫系统小鼠模型

江亮亮, 江涛, 罗建华, 姚文兵, 田泓*

(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 人免疫系统(human immune system, HIS)小鼠大都用于评价肿瘤疫苗诱导细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)效应的能力,却不能准确反映肿瘤疫苗诱导体液免疫应答的能力。本研究利用密度梯度离心法分离人外周血单核细胞,与体外诱导分化的同源树突状细胞(dendritic cells, DCs)共移植到NCG小鼠中从而建立DC-HIS小鼠模型。在DC-HIS小鼠中,共移植的抗原递呈细胞(HLA-DR⁺CD11c⁺)能定植于模型小鼠脾脏;DCs共移植也显著提高了激活的人CD4⁺T/CD8⁺T细胞和人B细胞的比例,提示DCs-HIS小鼠能较好的模拟人体的免疫应答情况。利用所构建的DCs-HIS小鼠评价靶向HER2蛋白疫苗(NitraTh-HER2)的免疫原性,结果显示,NitraTh-HER2疫苗能够诱导HER2特异性人IgG抗体的产生,并具有显著的抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC),靶细胞SK-BR-3的裂解率达到47.1%;NitraTh-HER2疫苗能够产生抗原特异性的CTL效应,靶细胞SK-BR-3的裂解率达到14.6%。研究结果提示,DC-HIS小鼠模型为预测人类肿瘤疫苗的免疫原性提供了有效的方法。

关键词 人免疫系统小鼠;模型;肿瘤疫苗;同源树突状细胞;免疫原性

中图分类号 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2019)06-0734-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190615

引用本文 江亮亮,江涛,罗建华,等. 评价肿瘤疫苗免疫原性的新型人免疫系统小鼠模型[J]. 中国药科大学学报,2019,50(6):734-742.
Cite this article as: JIANG Liangliang,JIANG Tao,LUO Jianhua,et al. A novel human immune system mice model for assessing the immunogenicity of cancer vaccines[J]. *J China Pharm Univ*,2019,50(6):734-742.

A novel human immune system mice model for assessing the immunogenicity of cancer vaccines

JIANG Liangliang, JIANG Tao, LUO Jianhua, YAO Wenbing, TIAN Hong*

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

Abstract Human immune system (HIS) mice are usually used to evaluate the ability of tumor vaccines to induce cytotoxic T lymphocyte (CTL) effects, but they failed to accurately reflect the ability of cancer vaccines to induce humoral immune responses. In this study, human peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation and co-transplanted into NCG mice with *in vitro* differentiated dendritic cells (DCs) to establish a DC-HIS mouse model. In DC-HIS mice, co-transplanted antigen-presenting cells (HLA-DR⁺CD11c⁺) could colonize the spleen of model mice. Moreover, co-transplantation of DCs significantly increased the proportion of activated human CD4⁺T/CD8⁺T cells and B cells in HIS mice, indicating that DC-HIS mice could better mimic the human immune responses. The immunogenicity of the targeted HER2 protein vaccine (NitraTh-HER2) was evaluated using the DCs-HIS mice. The results showed that the NitraTh-HER2 vaccine was able to induce the production of HER2-specific human IgG antibodies with a significant antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) effect and the lysis rate of target cell SK-BR-3 reached 47.1%. The NitraTh-HER2 vaccine was able to produce antigen-specific CTL effect, and the lysis rate of target cell SK-BR-3 reached 14.6%. Taken together, the DC-HIS mouse model provides an effective method for predicting the immunogenicity of human

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)

tumor vaccines.

Key words human immune system mice; model; cancer vaccines; autologous dendritic cells; immunogenicity

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

治疗性肿瘤疫苗具有诱导高度特异性抗肿瘤效应和长效免疫记忆的巨大优势^[1]。诱导肿瘤抗原特异性细胞和体液免疫应答的能力对于肿瘤疫苗抑制肿瘤至关重要的。然而,由于免疫系统的种属特异性,很难在临床前研究中准确预测肿瘤疫苗的免疫原性^[2-3]。例如,实验动物(黑猩猩或 MUC1 转基因小鼠)的体内研究显示,MUC1 疫苗可以引发动物体内抗原特异性免疫反应^[4-5]。然而,在 I/II 期临床试验中给予晚期肿瘤患者时,MUC1 疫苗的免疫原性较低,未能诱导出有效的抗肿瘤效应^[6-7]。

人免疫系统(human immune system, HIS)小鼠是通过在免疫缺陷小鼠中重建功能性人免疫系统而产生的人源化小鼠模型,已广泛用于免疫治疗的临床前研究^[3]。研究表明,在免疫缺陷小鼠体内重建的人免疫系统能够产生针对特定抗原的免疫应答。Spranger 等^[8]构建了人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)-NSG 小鼠模型,以评估黑色素瘤相关抗原-1 疫苗,结果显示该疫苗可诱导特异性 CD8⁺ T 细胞的产生。在另一项研究中, Camacho 等^[9]在 Hu-PBMC-NOD/scid-DR1 小鼠中评估了癌胚抗原疫苗并检测到了 CEA 特异性细胞免疫应答。这些证据表明, HIS 小鼠可以反映人免疫细胞对肿瘤抗原的反应,可以作为研究抗肿瘤免疫反应的模型^[10]。

尽管 CD8⁺ T 细胞通常被认为在抗肿瘤免疫中很重要,但越来越多的研究表明体液免疫应答在肿瘤免疫治疗中也起着重要作用^[1,11]。因此,预测肿瘤疫苗诱导体液免疫应答的能力在肿瘤疫苗设计中至关重要。Becker 等^[12]通过移植 PBMCs 构建 HIS 模型小鼠并注射乙型肝炎疫苗和破伤风类毒素疫苗后,在小鼠体内可以检测到乙肝和破伤风特异性抗体。但是,通过直接移植 PBMCs 构建的 HIS 模型小鼠存在明显的缺陷。该 HIS 小鼠中分泌 IgG 型抗体的 B 细胞比例极低, B 细胞反应不稳定^[13]。此外,人类树突状细胞(DCs)在移植 PBMC 的 HIS 小鼠中所占比例极低^[14-15],而 DCs 在启动 T 细胞应答中起到十分关键的作用。基于 PBMCs 移植的 HIS 小鼠难以对疫苗进行有效的加工与递

呈,因而难以准确反应疫苗的免疫原性。

据报道, DCs 是目前发现最强的抗原递呈细胞,未成熟的 DCs 具有强大的抗原内吞能力,而成熟的 DCs 高表达协同刺激因子同时进行抗原的提呈作用^[16]。和一般抗原提呈细胞不同, DCs 不仅可激活记忆性 T 细胞或已活化 T 细胞,还能刺激 naïve T 细胞的增殖,有效地激活 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞^[17]。因此,本研究将负载疫苗的 DCs 和 PBMCs 共移植 NCS 小鼠,构建 DC-HIS 小鼠模型以模拟人体的免疫应答情况,用于肿瘤疫苗的免疫原性评价。

1 材料

1.1 试剂及细胞株

人 IgG ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司); Alum 佐剂、CpG 佐剂、FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(美国 BD 公司); 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB, 北京索莱宝科技有限公司); Amp、Cm(南京鼎国生物技术有限公司); 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(LDH)细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。靶向 HER2 的蛋白疫苗 NitraTh-HER2 参考文献[18-19]中所述方法制备。

人乳腺癌细胞株 SK-BR-3 和人胚胎肾细胞系 HEK293(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)。

pcDNA3.1(+) Vector 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 动物

SPF 级 NCG 雌性小鼠(6~8 周龄)购自南京大学模式动物研究院,合格证号: SCXK(苏)2015-0001。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

1.3 仪器

全波长酶标仪、高速冷冻离心机、细胞培养箱(美国 Thermo 公司); Countstar 全自动细胞计数仪(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); 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 PBMCs 分离和移植

通过密度梯度离心分离来自健康志愿者的 PBMC。取健康志愿者外周血 50 mL 装在抗凝管,上下颠倒混匀。将外周血装在 50 mL 离心管,1 000 r/min 离心 5 min。轻柔吸除部分最上层血浆。用无菌 PBS 按 3:2 稀释剩余血液,上下颠倒混匀。新取 50 mL 离心管加入人淋巴细胞分离液 15 mL,倾斜后,沿管壁缓慢加入 25 mL 稀释血液,1 640 r/min 离心 20 min。离心结束后,轻柔吸取第二层白色薄膜层到新 50 mL 离心管,用无菌 PBS 按 4:1 稀释,上下颠倒混匀,1 640 r/min 离心 10 min。弃上清液,用无菌 PBS 30 mL 重悬,1 400 r/min 离心 3 min。重复上一步骤。弃上清液,用 1640 完全培养基重悬沉淀单核细胞,取部分样品计数。为了构建 HIS 小鼠,将 2×10^7 个 PBMC 用 RPMI 1640 培养基 200 μ L 重悬,并通过腹膜内或/和静脉内移植到 NCG 小鼠中。

2.2 单核细胞来源 DCs 的体外诱导

将黏附的单核细胞与 PBMC 分离,并在含有 800 U/mL 重组人 GM-CSF 和 500 U/mL IL-4 的 RPMI 1640 完全培养基中培养 7 d。每 2 天更新培养基和细胞因子。在第 4 天,使用终浓度为 50 μ g/mL 匙孔血蓝蛋白(KLH),卵白蛋白(OVA)或 NitraTh-HER2 孵育未成熟 DC。在第 6 天,用 40 ng/mL 重组人 TNF- α 刺激 DC。24 h 后,收获成熟 DC。

2.3 HIS 小鼠的免疫

分选 PBMC(2×10^7 个)并分别用蛋白 100 μ g (KLH, OVA 或 NitraTh-HER2) 刺激过夜。收集 PBMC 用 RPMI 1640 培养基 200 μ L 重悬,移植到 NCG 小鼠中。在第 7 天,在 PBMCs + DCs 组中,用抗原孵育的 DC(5×10^5 个)免疫小鼠;在 PBMC 组中,用 50 μ g 与铝佐剂或佐剂混合的相应蛋白质免疫小鼠。在第 14 天,用 50 μ g 蛋白质免疫所有小鼠。在第 28 天,将小鼠处死并收集组织样品。

2.4 ELISA 试验

每周收集免疫小鼠的血清。通过人 IgG ELISA 试剂盒评估总人 IgG 浓度。为了测量特异性抗体的水平,用 ELISA 包被液分别稀释抗原至 10 μ g/mL,在酶标条中每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 清洗 5 次,每孔加入 ELISA 封闭液 200 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。PBST 清洗 5 次;加入小鼠

血清(PBS 1:800 稀释)作为一抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 清洗 5 次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgM 或辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG(二抗稀释液 1:10 000 稀释)作为二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min。PBST 清洗 5 次,每孔加入 TMB 显色液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μ L 终止反应,测定 450/630 nm 波长下样品的吸收度。

2.5 流式检测 HIS 脾脏 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的比例和激活检测

取小鼠脾脏淋巴细胞,用流式缓冲液稀释为每毫升 1×10^7 个。取 100 μ L,加入相应的流式染料,冰上避光孵育 30 min,每隔 10 分钟轻柔振荡。30 min 后,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入流式缓冲液 500 μ L 重悬,1 000 r/min 离心 5 min。重复上一步骤。弃上清液,流式缓冲液 200 μ L 重悬,流式细胞仪检测。

小鼠脾脏淋巴细胞标记:人淋巴细胞(PerCP-Cy5.5-hCD45),人 T 细胞(PerCP-Cy5.5-hCD45, FITC-hCD3),人 B 细胞(PerCP-Cy5.5-hCD45, PE-hCD19)。人辅助 T 细胞(FITC-hCD3, BB515-hCD4),人 CTL 细胞(FITC-hCD3, PE-hCD8)。激活的 CD4⁺ T 细胞(PerCP-Cy5.5-hCD45, BB515-hCD4, APC-hCD69),激活的 CD8⁺ T 细胞(PerCP-Cy5.5-hCD45, PE-hCD8, APC-hCD69)。

2.6 免疫组化和免疫荧光

小鼠处死时,将脾脏固定在 4% 多聚甲醛中。用小鼠抗人 CD45, CD3, CD19 抗体进行免疫组织化学染色。在该过程结束时,将切片与 3-二氨基联苯胺反应并用苏木精复染,通过光学显微镜观察。对于免疫荧光测定,将切片用小鼠抗人 CD11c 抗体和兔抗人 CD3 抗体染色,然后与 Alexa 488(绿色)缀合的山羊抗小鼠 IgG 和 Cy3(红色)缀合的兔 IgG 抗体一起孵育。通过数字载玻片扫描仪扫描后观察。

2.7 乳酸脱氢酶(LDH)释放试验检测细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)效应和抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)效应

为了检测 CTL 效应,使用 SK-BR-3 或 HEK293 细胞(每孔 1×10^4 个)作为靶细胞。将疫苗免疫后小鼠的脾脏细胞并与靶细胞一起以 50:1 的效应/靶比例培养 4 h,通过 LDH 释放测定试剂盒测量 LDH 释放量,计算 CTL 效应。为了检测 ADCC 效应,使用 SK-BR-3(每孔 1×10^4 个)作为靶细胞,将

免疫小鼠的血清 1:50 稀释用作抗体,将疫苗免疫后小鼠的脾脏细胞并与靶细胞一起以 50:1 的效应/靶比例培养 4 h,通过 LDH 释放测定试剂盒测量 LDH 释放量,计算 ADCC 效应。

2.8 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 联合腹膜内和静脉内移植在 HIS 小鼠中具有最高的人淋巴细胞重建水平

为了优化 HIS 小鼠的重建水平,分别通过腹膜

内(ip)、静脉内(iv)或联合两种途径将 2×10^7 个人 PBMC 移植到 NCG 小鼠中。移植后 5 周,ip + iv 组脾脏明显增大(图 1-A)。流式分析显示,ip + iv 组在脾脏 ($69.4\% \pm 9.9\%$) 和外周血 ($78.7\% \pm 12.2\%$) 中有最高的人单核细胞(hCD45⁺)比例(图 1-B ~ 1-C)。位于 HIS 小鼠脾脏中的人 CD45⁺ 细胞主要由成簇的 CD3⁺ T 细胞和分散的 CD19⁺ B 细胞组成(图 1-D)。值得注意的是,与 iv 组或 ip 组相比,ip + iv 组更快地产生人 IgG 抗体并具有更高的抗体滴度(图 1-E)。这些结果显示联合 iv + ip 注射途径具有最佳的植入效率,并用于随后的实验中。

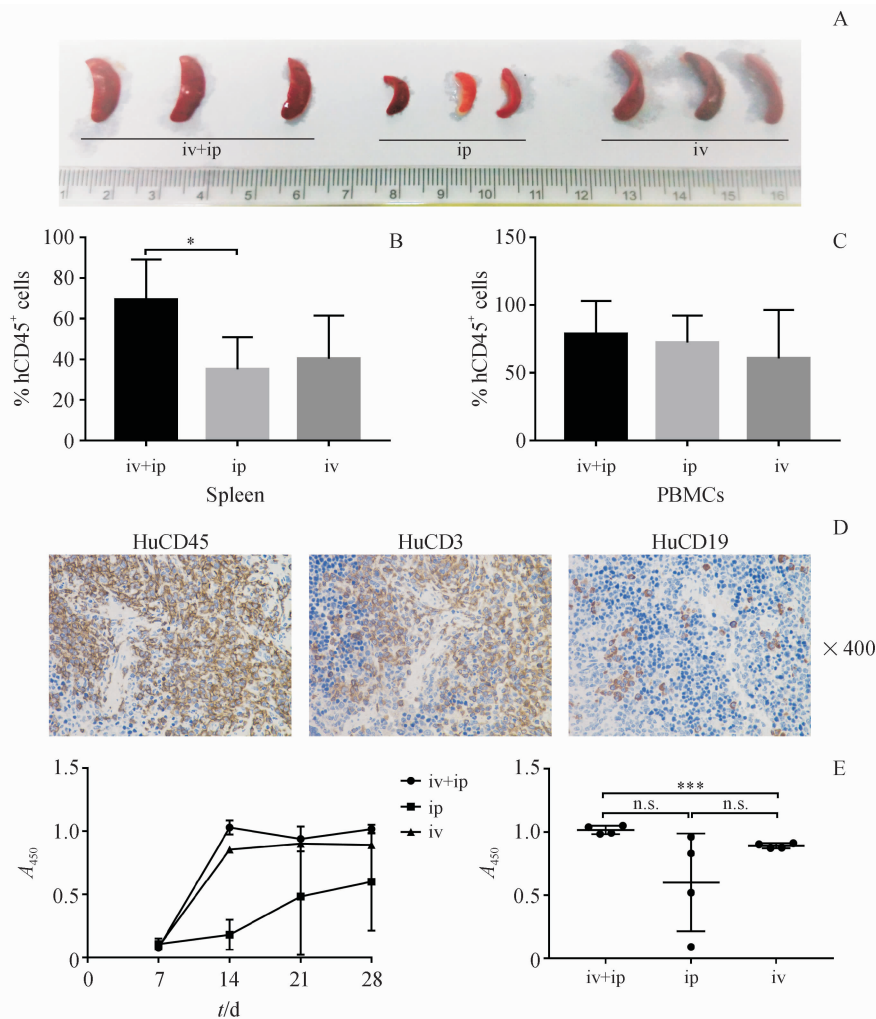


Figure 1 Combined intraperitoneal and intravenous transplantation yielded the highest reconstitution level of human lymphocytes in HIS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

NCG mice were engrafted with PBMCs via iv, ip or ip + iv on day 0. Sera were collected weekly and tissue samples were harvested on day 35. (A) The spleen size of mice. (B, C) The percentage of hCD45⁺ cells in the spleen and peripheral blood. (D) Immunohistochemistry examination of hCD45⁺ cells, hCD3⁺ T cells and hCD19⁺ B cells in the spleen of mice engrafted with PBMCs via iv + ip. Original magnification $\times 400$. (E) The concentration of human IgG in sera of mice on day 21

n. s. ; Not significant. * $P < 0.05$ vs ip group, *** $P < 0.001$ vs iv group

3.2 同源 DC 可以与 T 细胞共定位于 HIS 小鼠脾脏

为了评估同源 DCs 对抗原特异性抗体产生的影响,用负载 KLH 的同源 DCs 免疫 HIS 小鼠 (PBMC + DCs 组),给予混合铝佐剂的 KLH 作为对照 (PBMC 组)。在第 28 天, PBMC + DC 组中小鼠脾

脏中的人抗原呈递细胞 ($\text{hCD11c}^+ \text{HLA-DR}^+$) 显著增加 ($P < 0.01$) (图 2-A), 表明 DC 的成功移植和迁移。此外,免疫荧光测定显示供体匹配的人 DCs 和 T 细胞聚集在脾脏的某些区域 (图 2-B), 预示可能发生 DC-T 细胞相互作用和 T 细胞特异性激活。

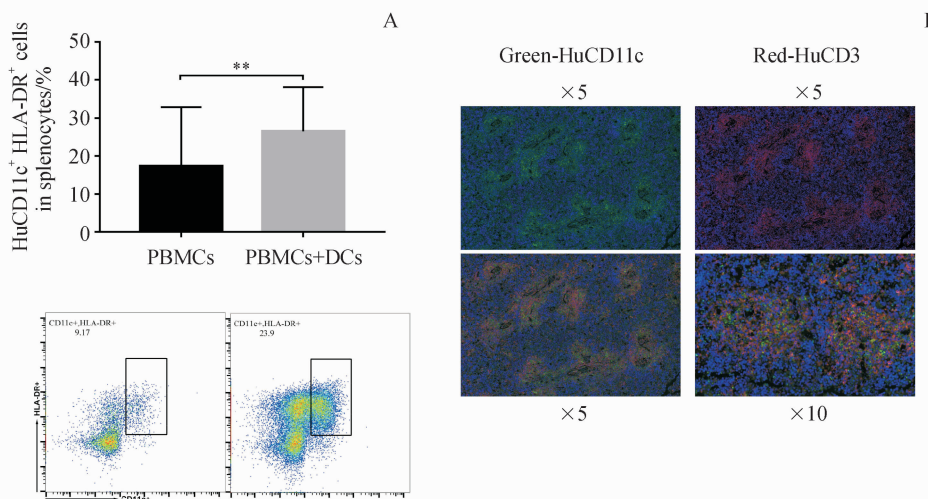


Figure 2 Autologous dendritic cells (DCs) could co-localize with T cells in the spleen of HIS mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

DC-HIS mice or HIS mice were immunized with KLH. Tissue samples were harvested on day 28. (A) Percentages of $\text{hCD11c}^+ \text{HLA-DR}^+$ cells in the spleen. (B) Immunofluorescent examination of hCD11c^+ DCs (Green) and hCD3^+ T cells (Red) in the spleen of DC-HIS mice. Original magnification $\times 5$ or $\times 10$

** $P < 0.01$ vs PBMCs group

3.3 同源 DC 可以针对不同抗原诱导特异性抗体反应

与 PBMC 组相比,在 PBMCs + DCs 组的血清中检测到更高水平的 KLH 特异性人 IgM ($P < 0.05$) (图 3-A)。值得注意的是,在所有组中,只有负载 KLH 的 DC 可以在 HIS 小鼠中诱导出高滴度的 KLH 特异性人 IgG 抗体 (图 3-B)。为了进一步确定 DC 的共移植是否可以诱导针对多种抗原的特异性抗体应答,用负载鸡卵清蛋白 (OVA) 的 DC 免疫小鼠。如图 3-C 和 3-D 所示,负载 OVA 的同源 DC 也可以诱导 OVA 特异性人 IgM 和 IgG 抗体的产生。这表明在 DC-HIS 小鼠模型中,DC-T 细胞可以相互作用,并诱导抗原特异性 IgM 和 IgG 抗体产生。

3.4 同源 DC 可以促进外周人 CD4^+ T 细胞激活

为了进一步证实同源 DC 的共移植的作用,用肿瘤疫苗免疫 DC-HIS 小鼠或 HIS 小鼠并且研究了 DC 对人 T 细胞亚群的影响。通常,基于自身抗原的肿瘤疫苗由于免疫耐受而难以诱导特异性免疫应答。在前期研究中,设计了硝基化 Th 细胞表位 (命名为 NitraTh),它可以显著增强 HER2 疫苗

在小鼠体内的免疫原性^[19]。将人 HER2 的胞外区域 (369 ~ 647) 与 NitraTh 融合以构建靶向 HER2 的疫苗 (NitraTh-HER2)。

用 NitraTh-HER2 免疫 DC-HIS 小鼠 (PBMCs + DCs 组);用 NitraTh-HER2 免疫没有 DC 共移植的 HIS 小鼠 (PBMC 组) 作为对照。虽然 DCs 对脾脏中 hCD45^+ 细胞的频率没有显著影响 (图 4-A),但 PBMC + DCs 组中 CD4^+ T 细胞比例显著高于 PBS 组 ($P < 0.05$) (图 4-B)。此外, PBMCs + DCs 组中 $\text{CD4}^+ \text{CD69}^+$ T 细胞的比例显著高于 PBMCs 组 ($P < 0.05$) (图 4-C),表明 DC 的共同移植改善了 CD4^+ T 细胞的活化。与这些结果一致,在 PBMC + DCs 组小鼠脾脏中检测到更高比例的 B 细胞 (图 4-D)。

3.5 同源 DC 可以促进外周人 CD8^+ T 细胞激活

进一步检测同源 DC 对 CD8^+ T 细胞的影响,流式检测显示,相对于对照组, PBMC + DCs 组中 CD8^+ T 细胞和 $\text{CD8}^+ \text{CD69}^+$ T 细胞显著增加 (图 5),表明 DC 可以增强 NitraTh-HER2 产生的细胞免疫。总结这些结果,DC-HIS 小鼠模型可以更有效地模拟人免疫系统对肿瘤疫苗的反应。

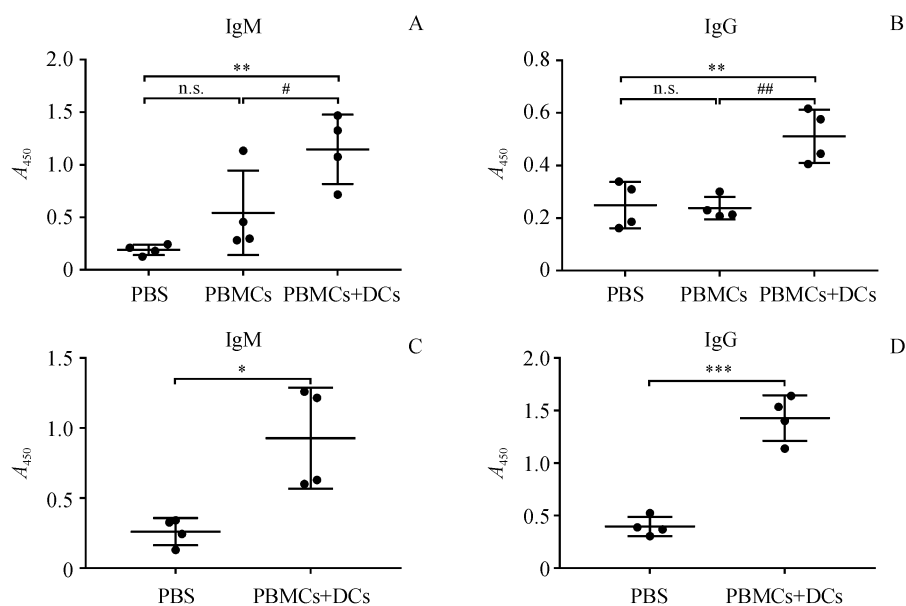


Figure 3 Autologous DCs can induce specific antibody responses to various antigens ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Model mice were immunized with KLH or OVA. Sera were collected weekly. (A) Concentration of KLH-specific human IgM and IgG in sera of mice on day 21. (B) Concentration of OVA-specific human IgM and IgG in sera of mice on day 21

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs PBMCs group

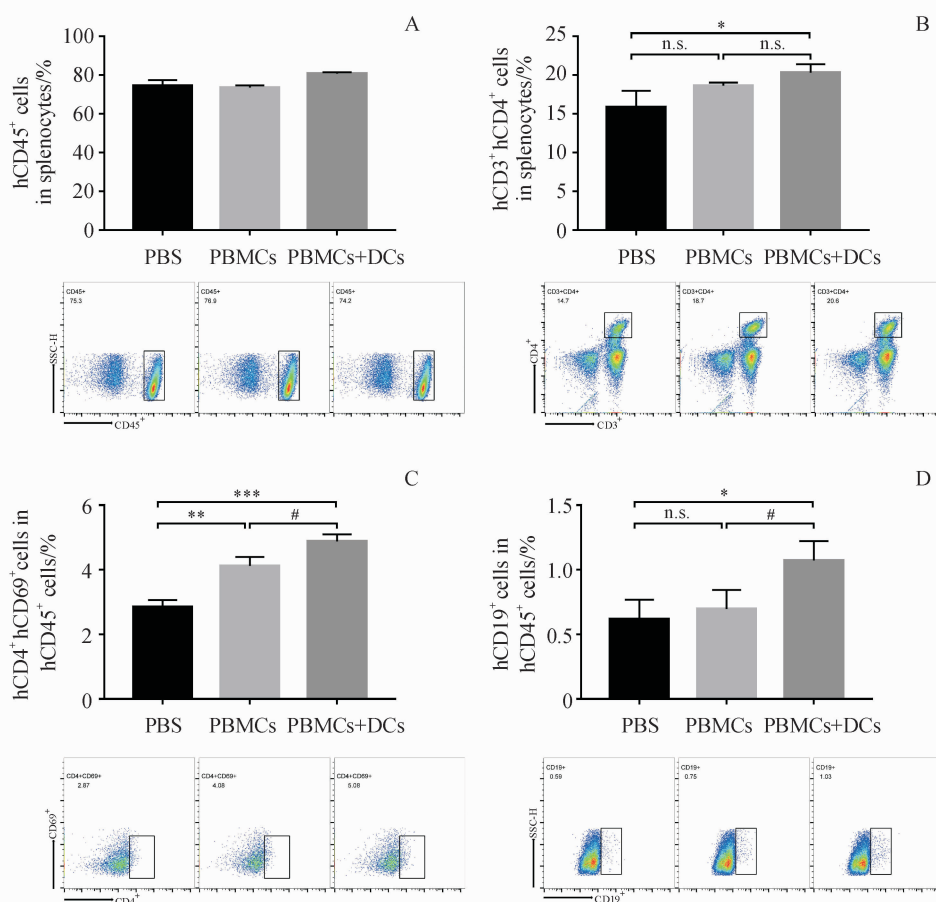


Figure 4 Autologous DCs improves the activation of peripheral human CD4⁺ T cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DC-HIS mice or HIS mice were immunized with NitraTh-HER2. Splenocytes were harvested on day 28. (A, B, C, D) Percentage of human total mononuclear cells (hCD45⁺), helper T cells (hCD3⁺hCD4⁺), activated helper T cells (hCD4⁺hCD69⁺) and B cells (hCD19⁺) in the spleen

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs PBS group; # $P < 0.05$ vs PBMCs group

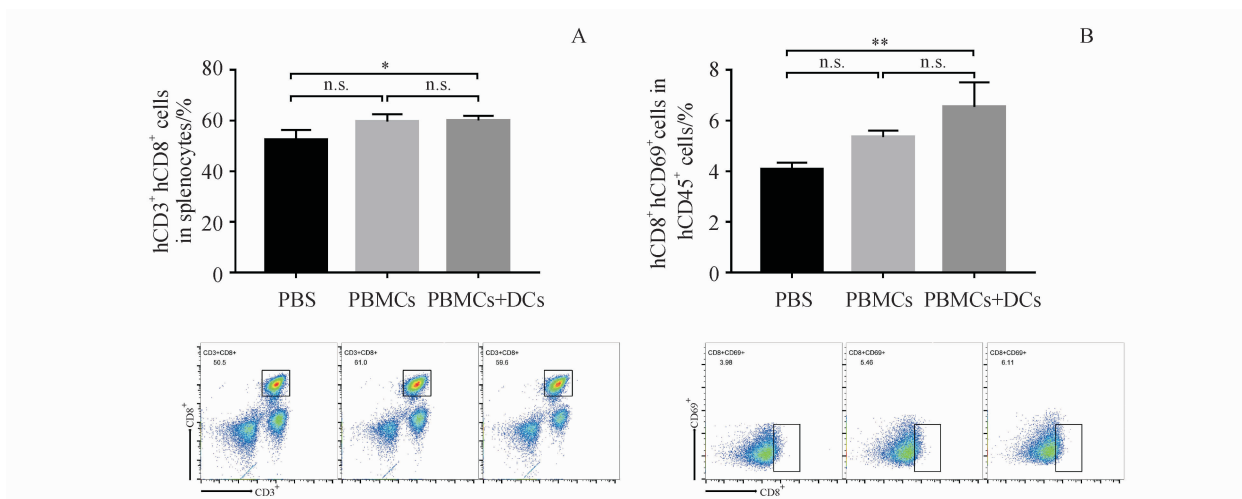


Figure 5 Autologous DCs improves the activation of peripheral human CD8⁺ T cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DC-HIS mice or HIS mice were immunized with NitraTh-HER2. Splenocytes were harvested on day 28. (A, B) Percentage of cytotoxic T cell (hCD3⁺ hCD8⁺) and activated cytotoxic T cells (hCD8⁺ hCD69⁺) in the spleen

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

3.6 DC-HIS 小鼠评价 HER2 肿瘤疫苗免疫原性

为了确认 DC-HIS 小鼠是否可用于肿瘤疫苗评估,用靶向 HER2 的肿瘤疫苗(NitraTh-HER2)免疫 DC-HIS 小鼠。在第 28 天,可以在 DC-HIS 小鼠血清中检测到高水平的 HER2 特异性抗体(图 6-A)。此外,DC-HIS 小鼠中的抗体以浓度依赖性方式介导 ADCC。当 1:50 稀释时,DC-HIS 小鼠血清

对 SK-BR-3 细胞产生显著的 ADCC 作用,裂解率达到 47.1% (图 6-B)。此外,DC-HIS 小鼠也可用于评估 NitraTh-HER2 的 CTL 效应,SK-BR-3 细胞(HER2⁺)的裂解率达到(14.6 ± 1.1)%,而 HEK293 细胞(HER2⁻)的溶解率仅为(5.7 ± 0.5)%,表明 NitraTh-HER2 诱导的 CTL 效应是 HER2 特异性的(图 6-C)。

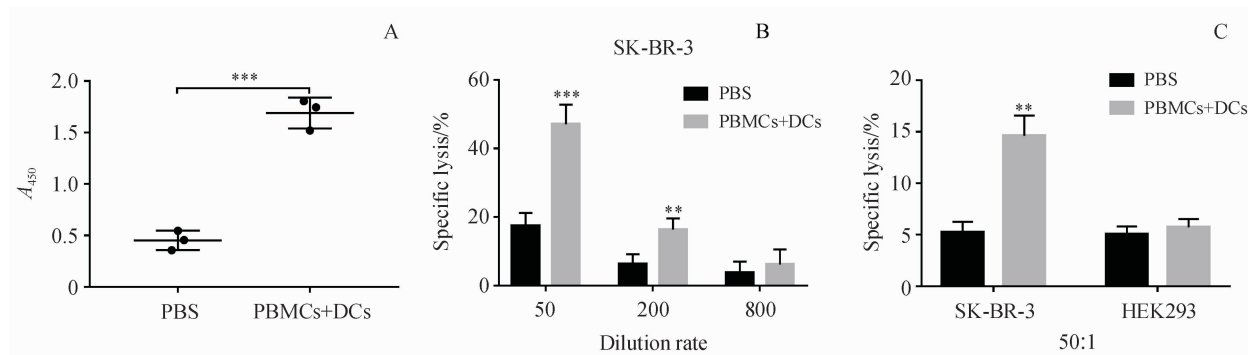


Figure 6 DC-HIS mice can comprehensively evaluate the immunogenicity of cancer vaccines ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DC-HIS mice were immunized with NitraTh-HER2. Sera were collected weekly. (A) Concentration of HER2-specific human IgG in sera of mice on day 21. (B, C) Splenocytes were collected on day 28. A conventional 4-h LDH release assay was performed to measure lysis of tumor cells for ADCC and CTL

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

4 讨论

在本研究中,通过构建 DC-HIS 小鼠模型来评估肿瘤疫苗的免疫原性,该 DC-HIS 小鼠模型有显著的 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞激活反应,可以全面评估肿瘤疫苗 NitraTh-HER2 的免疫原性,包括特异性抗体滴度,ADCC 效应和 CTL 效应。

通常,通过 PBMC 或造血干细胞(HSC)的植入来重建 HIS 小鼠。人免疫细胞的所有谱系都可以在植入人 HSC 的嵌合体小鼠中产生,然而,免疫缺陷小鼠胸腺上皮细胞上表达的是小鼠 MHC 分子而不是人 HLA 分子,在 HIS 小鼠中发育的人 T 细胞缺乏识别抗原的能力^[20]。缺乏人 T 细胞和 B 细胞发育所需的人生长因子和细胞因子的是 HSCs

重建小鼠的另一个限制^[21]。与 HSC 相比, PBMC 中的淋巴细胞已经成熟,可以更准确地反映人体免疫系统对抗原的反应。此外,完全分化的人 PBMC 所需的重建时间短于 HSC^[22]。因此,在本研究中,选择 PBMC 构建 DC-HIS 小鼠模型。

由于免疫系统的种属特异性,在临床前研究中准确预测肿瘤疫苗的免疫原性具有挑战性。例如 MUC1 肽疫苗,它成功地在转基因小鼠中引发抗肿瘤免疫应答,但在临床试验中对患者显示出较弱的免疫原性^[5-6]。MHC 限制可能是此问题的主要原因。此外,尽管人 HLA II 类分子在免疫缺陷小鼠中的表达改善了小鼠的人 T 细胞和 B 细胞功能^[13],但人 HLA II 类分子的多样性仍可导致对 DC 的不适当选择。因此,在基于 PBMC 移植的 HIS 小鼠可能无法准确反映肿瘤疫苗在人体内的免疫应答。

DCs 是最有效的 APC,通过分泌细胞因子诱导抗体的产生并促进 B 细胞的免疫球蛋白类转换^[23]。据报道,在 PBMC 植入的 HIS 小鼠中缺乏人类抗原呈递细胞(APC)^[24]。缺乏人 DC 可能是 HIS 小鼠未能产生强烈体液免疫反应的主要原因。本实验结果与文献报道的相一致,相对于用 KLH 直接刺激,负载 KLH 的 DC 能诱导更高的 KLH 特异性抗体水平(图 3-A,3-B)。此外,在 DC-HIS 小鼠中检测到显著水平的人 OVA 特异性 IgG 抗体(图 3-D),显示 DCs 在 HIS 小鼠中诱导高体液免疫应答中的重要性。

同源 DC 不仅以 HLA 限制性方式有效地呈递抗原,而且在成熟 DC 上表达的共刺激分子在抗原特异性 T 细胞的有效活化中也具有重要作用。与此观点一致,证实共同移植的 DC 改善了外周 T 细胞的增殖和活化,包括辅助 T 细胞(图 4-B 和 4-C)和细胞毒性 T 细胞(图 5)。这些 T 淋巴细胞与肿瘤疫苗的体液和细胞免疫密切相关。用肿瘤疫苗免疫 DC-HIS 小鼠并检测特异性免疫应答,结果显示,NitroTh-HER2 在 DC-HIS 小鼠中成功诱导抗原特异性抗体,并能诱导产生 ADCC 效应和 CTL 效应。因此用 DC-HIS 小鼠模型可通过直接检测疫苗的 ADCC 活性和 CTL 活性来评估疫苗的抗肿瘤活性。

总之,基于同源 DCs 共移植策略的 HIS 小鼠模型为评估肿瘤疫苗的抗肿瘤活性提供了灵活且

灵敏的评价方法,是用于弥合啮齿动物模型与人类免疫系统之间差距的有效模型。

参 考 文 献

- [1] Finn OJ. Human tumor antigens yesterday, today, and tomorrow [J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, **5**(5): 347–354.
- [2] Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, **12**(11): 786–798.
- [3] Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology [J]. *J Immunol*, 2004, **172**(5): 2731–2738.
- [4] Barratt-Boyes SM, Vlad A, Finn OJ. Immunization of chimpanzees with tumor antigen MUC1 mucin tandem repeat peptide elicits both helper and cytotoxic T-cell responses [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(7): 1918–1924.
- [5] Soares MM, Mehta V, Finn OJ. Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection [J]. *J Immunol*, 2001, **166**(11): 6555–6563.
- [6] Ramanathan RK, Lee KM, McKolanis J, et al. Phase I study of a MUC1 vaccine composed of different doses of MUC1 peptide with SB-AS2 adjuvant in resected and locally advanced pancreatic cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, **54**(3): 254–264.
- [7] Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H, et al. A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors [J]. *Cancer Ther*, 2008, **6**(B): 955–964.
- [8] Spranger S, Frankenberger B, Schendel DJ. NOD/scid IL-2Rg (null) mice; a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies *in vivo* [J]. *J Transl Med*, 2012, **10**: 30.
- [9] Camacho RE, Wnek R, Fischer P, et al. Characterization of the NOD/scid-[Tg]DR1 mouse expressing HLA-DRB1 * 01 transgene; a model of SCID-Hu mouse for vaccine development [J]. *Exp Hematol*, 2007, **35**(8): 1219–1230.
- [10] Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, et al. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, **2014**(7): 694–708.
- [11] Ding CL, Wang L, Marroquin J, et al. Targeting of antigens to B cells augments antigen-specific T-cell responses and breaks immune tolerance to tumor-associated antigen MUC1 [J]. *Blood*, 2008, **112**(7): 2817–2825.
- [12] Becker PD, Legrand N, van Geelen CMM, et al. Generation of human antigen-specific monoclonal IgM antibodies using vaccinated “human immune system” mice [J]. *PLoS One*, 2010, **5**

- (10): e13137. DOI:10.1371/journal.pone.0013137.
- [13] Ifversen P, Borrebaeck CA. SCID-Hu-PBL: a model for making human antibodies[J]. *Semin Immunol*, 1996, **8**(4): 243–248.
- [14] Ardavin C, Martínez del Hoyo G, Martín P, et al. Origin and differentiation of dendritic cells[J]. *Trends Immunol*, 2001, **22**(12): 691–700.
- [15] Kumar S, Jack R. Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells[J]. *J Endotoxin Res*, 2006, **12**(5): 278–284.
- [16] Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, **18**(1): 767–811.
- [17] Galicia G, Gommerman JL. Plasmacytoid dendritic cells and autoimmune inflammation[J]. *Biol Chem*, 2014, **395**(3): 335–346.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Shultz LD, Saito Y, Najima Y, et al. Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(29): 13022–13027.
- [21] Chen QF, He F, Kwang J, et al. GM-CSF and IL-4 stimulate antibody responses in humanized mice by promoting T, B, and dendritic cell maturation[J]. *J Immunol*, 2012, **189**(11): 5223–5229.
- [22] Schmidt MR, Appel MC, Giassi LJ, et al. Human BlyS facilitates engraftment of human PBL derived B cells in immunodeficient mice[J]. *PLoS One*, 2008, **3**(9): e3192. DOI:10.1371/journal.pone.0003192.
- [23] Harui A, Kiertscher SM, Roth MD. Reconstitution of huPBL-NSG mice with donor-matched dendritic cells enables antigen-specific T-cell activation[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2011, **6**(1): 148–157.
- [24] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, **392**(6673): 245–252.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2020 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:《中文核心期刊要目总览》(2017 年版)、中国科学引文核心数据库(CSCD 核心)、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。据中国科学技术信息研究所最新发布的《2017 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《中国药科大学学报》2016 年度核心被引半衰期为 9.1,在 47 种药学核心期刊中排名第一。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