

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0471-06

可溶性 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白诱导非特异性抗肿瘤免疫

徐冬,魏枫,付晓达,于津浦,任秀宝*(天津医科大学肿瘤医院免疫室,天津市肿瘤防治重点实验室,天津300060)

[摘要] 目的: 观察可溶性 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白对体外非特异性抗肿瘤免疫的影响。方法: 以含 sCD80-Linker-sCD40L、sCD80、sCD40L 编码基因的重组腺病毒载体或对照病毒载体转染人卵巢癌细胞 SKOV3, ELISA 检测上清中可溶性 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白及 sCD80、sCD40L 蛋白的表达。由卵巢癌患者外周血单个核细胞培养树突状细胞(dendritic cells, DCs), 将 DCs 和自体 T 细胞共同培养并加入不同上清诱导 48 h; 用异基因混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)检测诱导的 DCs 刺激淋巴细胞增殖能力; 以诱导的 T 细胞为效应细胞, SKOV3 细胞或 K562 细胞为非特异性靶细胞, 通过乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放实验检测杀伤活性。结果: ELISA 检测证实病毒转染 SKOV3 细胞上清中 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白、sCD80 蛋白和 sCD40L 蛋白表达量分别为 2.791 ng/ml、1.956 ng/ml 和 1.407 ng/ml。MLR 证实, 与对照相比, 融合蛋白上清诱导的 DCs[刺激-反应细胞比例 1:100, (0.382 ± 0.053) vs (0.167 ± 0.028), $P < 0.01$; 刺激-反应细胞比例 1:50, (0.636 ± 0.164) vs (0.311 ± 0.067), $P < 0.01$; 刺激-反应细胞比例 1:10, (1.245 ± 0.271) vs (0.423 ± 0.156), $P < 0.01$] 和 sCD40L 上清诱导的 DCs[刺激-反应细胞比例 1:100, (0.341 ± 0.062) vs (0.167 ± 0.028), $P < 0.01$; 刺激-反应细胞比例 1:50, (0.567 ± 0.106) vs (0.311 ± 0.067), $P < 0.01$; 刺激-反应细胞比例 1:10, (1.098 ± 0.263) vs (0.423 ± 0.156), $P < 0.01$] 刺激同种异基因混合淋巴细胞增殖能力明显增强。LDH 释放实验提示, sCD40L 上清诱导的 T 淋巴细胞对靶细胞非特异性杀伤活性显著强于对照 SKOV3 组[(42.28 ± 6.27) vs (22.49 ± 3.56), $P < 0.01$] 和 K562 组(47.94 ± 6.72) vs (26.33 ± 2.89), $P < 0.01$], 而融合蛋白上清诱导的 T 淋巴细胞对靶细胞非特异性杀伤活性显著强于 sCD40L 上清诱导的 T 淋巴细胞[SKOV3 组为(58.97 ± 8.92) vs (42.28 ± 6.27), $P < 0.05$; K562 组为(66.55 ± 9.43) vs (47.94 ± 6.72), $P < 0.05$]。结论: 可溶性 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白能有效诱导体外非特异性抗肿瘤免疫, 对肿瘤免疫治疗具有潜在应用价值。

[关键词] CD80; CD40L; sCD80-Linker-sCD40L; 融合蛋白; 树突状细胞; 卵巢癌细胞; 抗肿瘤免疫

[中图分类号] R730.5 **[文献标志码]** A

Soluble sCD80-Linker-sCD40L fusion protein induces unspecific anti-tumor immunity *in vitro*

XU Dong, WEI Feng, FU Xiao-da, YU Jin-pu, REN Xiu-bao* (Department of Immunology, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of sCD80-Linker-sCD40L fusion protein on the unspecific anti-tumor immunity *in vitro*. **Methods:** Ovarian cancer SKOV3 cells were separately transfected with recombinant adenoviral vectors containing sCD80-Linker-sCD40L fusion gene, sCD80 gene, sCD40L gene or with control adenovirus. The expression of the sCD80-Linker-sCD40L fusion protein, sCD80 protein and sCD40L protein in the supernatants of SKOV3 cells was determined by ELISA. Dendritic cells (DCs) were cultured with peripheral blood mononuclear cells from a patient with ovarian carcinoma. DCs and autologous T cells were co-cultured and were exposed to different supernatants for 48 h. The allostimulatory effects of DCs on T cells were determined by mixed lymphocyte reaction (MLR). The unspecific killing activities of induced T cells against SKOV3/K562 cells were measured by LDH-releasing assay. **Results:** ELISA assay showed that levels of the sCD80-Linker-sCD40L fusion protein, sCD80 protein and sCD40L protein in the supernatants of transfected SKOV3 cells were 2.791 ng/ml, 1.956 ng/ml and 1.407 ng/ml, respectively. The fusion protein-exposed DCs ([0.382 ± 0.053] vs [0.167 ± 0.028], $P < 0.01$; [0.636 ± 0.164] vs [0.311 ± 0.067], $P < 0.01$; [1.245 ± 0.271] vs [0.423 ± 0.156], $P < 0.01$) and sCD40L-exposed DCs ([0.341 ± 0.062] vs [0.167 ± 0.028], $P < 0.01$; [0.567 ± 0.106] vs [0.311 ± 0.067], $P < 0.01$; [1.098 ± 0.263] vs [0.423 ± 0.156], $P < 0.01$) stimulated mixed lymphocyte reaction (MLR) significantly. LDH-releasing assay indicated that sCD40L-exposed T lymphocytes showed significantly stronger non-specific killing activity against SKOV3 cells [(42.28 ± 6.27) vs (22.49 ± 3.56), $P < 0.01$] and K562 cells (47.94 ± 6.72) vs (26.33 ± 2.89), $P < 0.01$], while sCD80-Linker-sCD40L-exposed T lymphocytes showed significantly stronger non-specific killing activity against SKOV3 cells (58.97 ± 8.92) vs (42.28 ± 6.27), $P < 0.05$; and K562 cells (66.55 ± 9.43) vs (47.94 ± 6.72), $P < 0.05$].

[基金项目] 天津市高等学校科技发展计划基金资助项目(20030309); 天津医科大学科学基金资助项目(2003Ky33). Supported by Foundation for Science Technology Program of Tianjin Higher Education (20030309); the Science Foundation of Tianjin Medical University (2003ky33)

[作者简介] 徐冬(1970-), 男, 湖南省益阳市人, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤化疗及免疫治疗研究, E-mail: xudongatj@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: rwziyi@yahoo.com

0.271] vs [0.423 ± 0.156], $P < 0.01$ at stimulator-reactor ratios of 1:100, 1:50 and 1:10, respectively) and sCD40L-exposed DCs ([0.341 ± 0.062] vs [0.167 ± 0.028], $P < 0.01$; [0.567 ± 0.106] vs [0.311 ± 0.067], $P < 0.01$; [1.098 ± 0.263] vs [0.423 ± 0.156], $P < 0.01$ at stimulator-reactor ratios of 1:100, 1:50 and 1:10, respectively) more efficiently stimulated allogenic T cell proliferation than DCs of control groups. The fusion protein-exposed T cells showed significantly greater killing activity against SKOV3/K562 cells than sCD40L-exposed T cells ([58.97 ± 8.92] vs [42.28 ± 6.27], $P < 0.05$, shown in SKOV3 group; [66.55 ± 9.43] vs [47.94 ± 6.72], $P < 0.05$, shown in K562 group); sCD40L-exposed T cells showed significantly greater killing activity than that of control group ([42.28 ± 6.27] vs [22.49 ± 3.56], $P < 0.01$, shown in SKOV3 group; [47.94 ± 6.72] vs [26.33 ± 2.89], $P < 0.01$, shown in K562 group). **Conclusion:** sCD80-Linker-sCD40L fusion protein can effectively induce unspecific anti-tumor immunity *in vitro* and has a potential effect in treatment of tumor immunotherapy.

[**Key words**] CD80; CD40L; sCD80-Linker-sCD40L; fusion protein; dendritic cells; ovarian cancer cells; anti-tumor immunity

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 471-476]

B7-CD28 和 CD40L-CD40 共刺激信号在抗肿瘤免疫应答和免疫调节中起着重要作用^[1-2]。CD80 即 B7-1, 与 T 淋巴细胞上的相应配体 CD28 结合后, 可促进 CD8⁺ T 细胞向细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocytes, CTL)分化^[3], 刺激 CD4⁺ T 细胞向 Th1 细胞分化^[4]。CD40 配体(CD40L)是肿瘤坏死因子家族成员, 能诱导 DCs 表型和功能的成熟^[5], 并促进其增殖^[6-7]。本研究采用腺病毒转染技术, 使通过一段 Linker 连接的 CD80 胞外区和 CD40L 胞外区作为融合蛋白在肿瘤细胞中分泌性表达, 观察融合蛋白上清对人卵巢癌细胞 SKOV3 体外非特异性抗肿瘤免疫的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和材料

AD-293 包装细胞、人卵巢癌细胞系 SKOV3、人慢性粒细胞白血病细胞系 K562 由本室保存。rhIL-4 购自 Peptotech 公司。rhGM-CSF 购自百济公司。rhIL-2 购自北京四环制药厂。人 sCD80 ELISA 检测试剂盒和人 sCD40L ELISA 检测试剂盒购自 Innovation 公司。丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 购自日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司。四甲基偶氮唑蓝(thiazolyl blue, MTT)及二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO) 购自 Sigma 公司。LDH 试剂盒购自 Promega 公司。RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司。Ficoll 淋巴细胞分离液和胎牛血清(FBS) 购自中国医学科学院血液学研究所科技公司。外周富集血来自本院收治的 1 例卵巢癌患者, 异基因外周血来自健康志愿者。患者及志愿者均签署知情同意书, 并报医院伦理委员会批准。

1.2 载体构建和病毒的扩增

携带人 Sig-sCD80-Linker-sCD40L 融合基因的重组腺病毒载体由本室构建^[8], 标记为 Ad-Sig-sCD80-Linker-sCD40L。其中 Sig 为分泌型信号肽基因, 来自人 IL-12b; Linker 为一段柔性肽基因; sCD80 和 sCD40L 为人 CD80 胞外区和 CD40L 胞外区基因。采用相同体系构建单独携带 sCD80 和 sCD40L 的重组腺病毒载体, 分别标记为 Ad-Sig-sCD80 和 Ad-Sig-sCD40L, 与空载体(标记为 Ad-eGFP)共同作为对照。以上病毒通过转染 AD-293 细胞获得扩增, CsCl₂ 密度梯度离心法纯化浓缩。将 AD-293 细胞接种于 6 孔板, 每孔 5×10^5 细胞, 培养过夜。将病毒 Sig-sCD80-Linker-sCD40L、Ad-Sig-sCD80、Ad-Sig-sCD40L 和 Ad-eGFP 按 10 倍稀释 5 管, 浓度从 10^5 到 10^9 不等, 分别加入各孔细胞中, 留 1 孔作为空白对照。孵育 2 h。移去细胞上清液, 小心加入 3 ml 含 1.25% 琼脂糖的混合生长液, 使其完整覆盖在培养孔的底部。37 °C 培养, 其间可增加混合生长液用量。3 周后观察空斑形成情况, 利用稀释倍数和空斑个数计算病毒滴度(CFU/ml)^[9]。

1.3 可溶性 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白上清的获得和检测

SKOV3 细胞以含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液 37 °C、5% CO₂ 常规培养。待 SKOV3 细胞增殖至 80% 铺满后换液, 加入纯化浓缩的 Ad-Sig-sCD80-Linker-sCD40L 病毒继续培养 24 h, 观察细胞内荧光, 收集上清, 标记为上清 A, 保存于 -80 °C 冰箱。另以 Ad-Sig-sCD80、Ad-Sig-sCD40L 和 Ad-eGFP 病毒感染 SKOV3 细胞, 24 h 后获取上清分别标记为上清 B、上清 C 和上清 D 作为对照。按 Innovation 公司 Bender MedSystems 人 sCD80 ELISA 试剂盒使用说明操作, 取上清 A、上清 B、上清 C 和上清 D 各

100 μl 加入 U 型 96 孔板的相应孔中,并加 100 μl 样品稀释液混合。另设置倍比梯度稀释的 sCD80 标准品(加入样品稀释液致总体积 200 μl)和空白对照组(加入 200 μl 样品稀释液),每组样品重复 3 孔。用酶标仪(BIOTEK 公司 Synergy HT 型)读取 450 nm 光密度(D_{450})值。根据测得的不同浓度标准品 D 值制作 sCD80 标准曲线,根据标准曲线计算样品上清 B 中 sCD80 含量,并根据相对分子量推算上清 A 中 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白含量。再用 sCD40L ELISA 试剂盒检测,制作 sCD40L 标准曲线,计算上清 C 中 sCD40L 含量,推算上清 A 中 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白含量。

1.4 DC 的培养

用 Ficoll 淋巴细胞分离液从 CS-3000 血细胞分离机采集的卵巢癌患者外周富集血中获得单个核细胞,以 RPMI 1640 培养液洗涤去除抗凝剂,调整细胞密度至 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$, 37°C 、5% CO_2 孵育 2 h。轻摇培养瓶,吸取含非贴壁细胞的上清留作备用。以 RPMI 1640 培养液洗涤培养瓶,贴壁细胞标记为 DC,以含 10% FBS、GM-CSF 1 000 U/ml、IL-4 1 000 U/ml 的 RPMI 1640 培养液 37°C 、5% CO_2 继续培养,每 3 d 半量换液。

1.5 DC 和 T 细胞的诱导

将前述非贴壁细胞用尼龙毛分离 T 细胞,以含 10% FBS、100 U/ml IL-2 的 RPMI 1640 培养液 37°C 、5% CO_2 培养,标记为 T-IL-2。将培养第 6 天的 DC 和 T-IL-2 以 1:10 的比例混合,细胞密度 $1 \times 10^6/\text{ml}$,培养液为 RPMI 1640 和上清 A 各半,并加 FBS 至 10%,加 IL-2 至 100 U/ml。于 37°C 、5% CO_2 孵育 48 h。另设置上清 B、上清 C、上清 D 诱导组和不加上清组为对照。48 h 后用尼龙毛分离 T 细胞,分别标记为 Ta、Tb、Tc、Td 和 T0;分离 T 细胞后的 DC 标记为 DCa、DCb、DCc、DCd 和 DC0。

1.6 同种异基因混合淋巴细胞反应(MLR)

用 Ficoll 淋巴细胞分离液从健康人外周血分离单个核细胞,用前述方法培养同种异基因 T 细胞。取 DCa、DCb、DCc、DCd 和 DC0 细胞,同时取未经诱导的 DC 作为 Control 组,加入 MMC 至 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C 水浴 45 min 去增殖活性,用 PBS 洗涤 2 遍作为刺激细胞。在 U 型 96 孔板中,每孔加刺激细胞 1×10^3 、 2×10^3 、 1×10^4 ,分别加 1×10^5 异基因 T 细胞(作为反应细胞)混合作为实验组,或不加反应细胞作为对应的单独 DC 组。另设置单独 T 细胞组(1×10^5 T 细胞)。培养 7 d 后每孔加 5 mg/ml MTT 20 μl 反应 4 h,离心弃上清,每孔加 DMSO 100 μl 震

荡混匀,用酶标仪读取 570 nm 光密度(D_{570})值,按以下公式计算刺激指数(stimulation index, SI)。

$$\text{SI} = (\text{实验组 } D - \text{单独 T 细胞组 } D - \text{对应的单独 DC 组 } D) / \text{单独 T 细胞组 } D$$

1.7 LDH 释放实验检测非特异杀伤

SKOV3 细胞和 K562 细胞以含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液 37°C 、5% CO_2 常规培养至对数生长。分别以 SKOV3 细胞、K562 细胞为靶细胞,以 Ta、Tb、Tc、Td、T0 和未诱导淋巴细胞(作为 control)为效应细胞。按 Promega 公司 CytoTox 96 LDH 分析试剂盒使用说明操作,取 U 型 96 孔培养板,反应孔加靶细胞和效应细胞各 100 μl (靶效比 1:10);效应细胞自然释放孔加效应细胞和培养液各 100 μl ;靶细胞自然释放孔和靶细胞最大释放孔加靶细胞和培养液各 100 μl ;本底孔和体积纠正孔加培养液 200 μl 。上述各项均设 3 个复孔,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h,然后在靶细胞最大释放孔与体积纠正孔内加入 20 μl 的 lysis buffer,放置 30 min,将 96 孔培养板以 1 500 r/min 离心 5 min,每孔吸取上清 50 μl 致平底 96 孔板中,加入反应底物 50 μl ,室温避光孵育 30 min,加入终止液 50 μl 震荡混匀,用酶标仪测定 492 nm 光密度(D_{492})值^[10]。按以下公式计算杀伤活性:

$$\text{杀伤活性}(\%) = (\text{反应孔 } D - \text{效应细胞自然释放孔 } D - \text{靶细胞自然释放孔 } D) / (\text{靶细胞最大释放孔 } D - \text{靶细胞自然释放孔 } D) \times 100\%$$

1.8 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件进行卡方检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒的滴度

重组病毒转染 293 细胞 10 d 后可见噬菌斑形成。利用稀释倍数和空斑个数计算,重组腺病毒 Ad-Sig-sCD80-Linker-sCD40L 滴度约为 2×10^{10} CFU/ml,重组腺病毒 Ad-Sig-sCD80 滴度约为 2×10^{10} CFU/ml,重组腺病毒 Ad-Sig-sCD40L 滴度约为 2×10^{10} CFU/ml,空载体 Ad-eGFP 病毒滴度约为 4×10^{10} CFU/ml。

2.2 重组腺病毒转染细胞内融合蛋白的表达

以重组载体 Ad-Sig-sCD80-Linker-sCD40L、Ad-Sig-sCD80、Ad-Sig-sCD40L 和空载体 Ad-eGFP 病毒转染 SKOV3 细胞 24 h,倒置荧光显微镜下均可见细胞内绿色荧光(图 1)。相应上清经 sCD80 ELISA 检测,上清 A 及上清 B 组 D 值显著高于空白对照组

($P < 0.01$),而上清 C 和上清 D 组 D 值较空白对照均无显著差异;经 sCD40L ELISA 检测,上清 A 及上清 C 组 D 值显著高于空白对照组($P < 0.01$),上清 B 组和上清 D 组 D 值较空白对照均无显著差异(图 2)。根据 D 值计算,上清 B 中 sCD80 蛋白含量为 1.956 ng/ml,上清 C 中 sCD40L 蛋白含量为 1.407 ng/ml,根据 2 次 ELISA 检测 D 值及相对分子质量推算,上清 A 中 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白含量为 2.791 ng/ml。

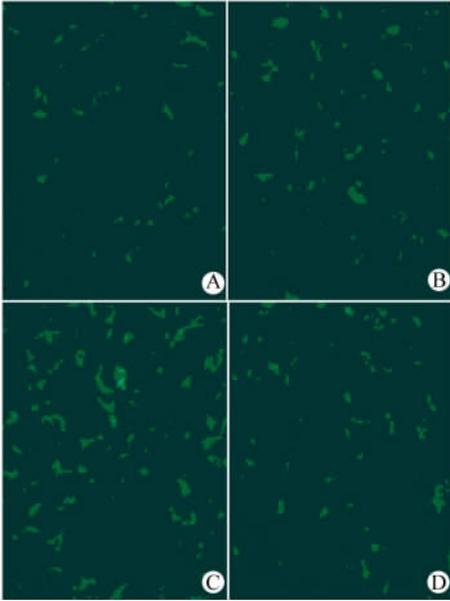


图 1 重组腺病毒转染后 SKOV3 细胞内 GFP 的表达(×200)

Fig. 1 Expression of GFP in SKOV3 cells after transfection by recombinant adenoviral vector (×200)

A: Ad-Sig-sCD80-Linker-sCD40L; B: Ad-Sig-sCD80;
C: Ad-Sig-sCD40L; D: Ad-eGFP

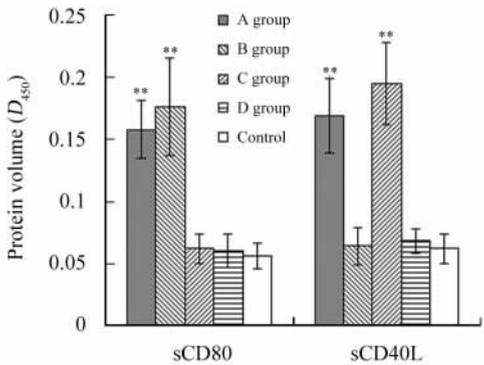


图 2 ELISA 检测 SKOV3 细胞转染后上清中 sCD80-Linker-sCD40L、sCD80、sCD40L 的表达

Fig. 2 Expression of sCD80-Linker-sCD40L, sCD80 and sCD40L in supernatants of SKOV3 cells after transfection

A: Ad-Sig-sCD80-Linker-sCD40L; B: Ad-Sig-sCD80;
C: Ad-Sig-sCD40L; D: Ad-eGFP. * $P < 0.01$ vs control

2.3 融合蛋白诱导的 DC 对同种异基因淋巴细胞的刺激能力

DCa 组和 DCc 组刺激指数(SI)均显著高于 DCb、DCd、DC0 和未诱导 DC(control)组($P < 0.01$),而 DCa 组和 DCc 组之间 SI 无显著差异;DCb 组、DCd 组、DC0 组和 Control 组之间 SI 无显著差异。在刺激、反应细胞比例分别为 1:100, 1:50, 1:10 条件下均呈以上趋势(表 1)。

表 1 不同上清诱导 DC 对同种异基因淋巴细胞的刺激指数
Tab. 1 Stimulation index of different supernatant-exposed DCs in mixed lymphocyte reaction ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Groups	DCs : Lymphocytes		
	1 : 100	1 : 50	1 : 10
DCa	0.382 ± 0.053 **	0.636 ± 0.164 **	1.245 ± 0.271 **
DCb	0.162 ± 0.026	0.305 ± 0.059	0.392 ± 0.071
DCc	0.341 ± 0.062 **	0.567 ± 0.106 **	1.098 ± 0.263 **
DCd	0.187 ± 0.033	0.358 ± 0.043	0.465 ± 0.114
DC0	0.174 ± 0.049	0.347 ± 0.072	0.481 ± 0.137
Control	0.167 ± 0.028	0.311 ± 0.067	0.423 ± 0.156

** $P < 0.01$ vs DCb, DCd, DC0 and control groups

2.4 融合蛋白诱导的 T 细胞对靶细胞的非特异性杀伤作用

靶效比 1:10 条件下, Ta 组杀伤活性显著高于 Tc 组($P < 0.05$)和 Tb、Td、T0 和 Control 组($P < 0.01$); Tc 组杀伤活性亦明显高于 Tb、Td、T0 和 Control 组($P < 0.01$); Tb、Td、T0 和 Control 组间比较,杀伤活性无显著差异。以 SKOV3 细胞和 K562 细胞为靶细胞均呈以上趋势(表 2)。

表 2 不同上清诱导的 T 细胞对 SKOV3 细胞和 K562 细胞的非特异性杀伤活性(%)

Tab. 2 Killing activity of different supernatant-exposed T cells against SKOV3 and K562 cells ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Groups	SKOV3	K562
Ta	58.97 ± 8.92 ^{ΔΔ*}	66.55 ± 9.43 ^{ΔΔ*}
Tb	24.41 ± 4.61	27.16 ± 3.15
Tc	42.28 ± 6.27 ^{ΔΔ}	47.94 ± 6.72 ^{ΔΔ}
Td	26.32 ± 4.19	28.25 ± 3.78
T0	26.67 ± 3.85	29.24 ± 4.86
Control	22.49 ± 3.56	26.33 ± 2.89

^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs Tb, Td, T0 and control groups; * $P < 0.05$ vs Tc group

3 讨论

DCs 是一大类重要的抗原提呈细胞,在激发和调节机体的免疫反应中发挥重要作用。对 DCs 进行基因修饰,使其表达肿瘤相关抗原或免疫共刺激因子,以加强 CTL 效应,是目前肿瘤疫苗研究的热点^[11-12]。单个核细胞或骨髓来源的 DC 在体外经过 GM-CSF 和 IL-4 处理而成熟后,需要 CD40L 的激发来使其抗原提呈功能达到最优状态^[13-14],而 CD40 与 CD40L 的相互作用能促进体内 T 细胞激活^[15]。T 细胞的充分活化需要的第二信号系统是抗原提呈细胞和 T 淋巴细胞表面一系列配对的共刺激分子所介导的共刺激信号^[16],其中树突状细胞表面的 CD80 与 T 细胞表面 CD28 的相互作用所介导的共刺激信号,对于 T 细胞具有重要的免疫调节与免疫刺激作用^[17]。

为同时促进 DCs 的成熟与强化共刺激信号途径,有效激发抗肿瘤免疫,本实验将 CD80 胞外区和 CD40L 胞外区这两个有功能的蛋白的编码序列连接起来,构建融合基因。CD80 为 I 型跨膜蛋白,其 N 端在胞外,C 端在胞内,而 CD40L 为 II 型跨膜蛋白,其 C 端在胞外,N 端在胞内。考虑到多肽链的合成自 N 端开始,本实验把 sCD80 设计在拟构建的融合蛋白的前部,而把 sCD40L 设计在拟构建的融合蛋白的后部,中间则用一段柔性 Linker (Gly4Ser)₃ 将它们连接起来。这样的顺序有利于保持两个分子的自然构象,柔性 Linker 的使用则可以进一步减少其两端的 sCD80 和 sCD40L 之间的互相干扰,有利于两者功能的正常发挥。通过生物学软件对拟构建的融合蛋白进行初步分析预测,未发现新的抗原位点,Linker 部分伸展性能好,对其两端的 sCD80 和 sCD40L 的运动无明显影响,sCD80 和 sCD40L 各自的柔性特征、亲水性亦无改变。可以预期,此融合蛋白中的 sCD80 和 sCD40L 能够保持其原有生物学功能。为构建一个分泌型的融合蛋白,在引物设计中,没有保留 CD80 的信号肽,而是将 IL-12 的 b 亚基信号肽引入到这个融合蛋白中,以使该融合蛋白能够被顺利分泌到细胞外。

通过观察细胞内荧光和 ELISA 检测证实了病毒转染的成功和融合蛋白的表达。混合淋巴细胞反应和杀伤实验显示,在无 TNF- α 、激发型 CD40 单抗、CD3 单抗等存在的情况下,单纯将 DC 与 T 细胞共孵育对 DC 刺激淋巴细胞增殖能力和 T 细胞杀伤肿瘤细胞能力均无显著提高;加入含 sCD80 的上清 B 或不含融合蛋白、sCD80、sCD40L 的上清 D 诱导

对 DC 和 T 细胞的相应能力也无明显影响;融合蛋白和 sCD40L 诱导的 DC 刺激 T 细胞增殖能力均显著高于其他组。游离 sCD40L 诱导的 T 细胞杀伤肿瘤能力显著高于其他对照组,而融合蛋白诱导组又明显高于 sCD40L 诱导组。初步提示游离的 sCD40L 可诱导 DC 在体外成熟从而激活 T 细胞,与文献^[18]相符。可溶性 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白诱导 DC 成熟的作用与 sCD40L 类似,它还可同时发挥 sCD80 活化 T 细胞的作用,较 sCD40L 更有效地诱导体外抗肿瘤免疫。本研究推测,只有表达于细胞表面或通过细胞表面分子与其他细胞连接(例如 sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白通过 sCD40L 与 CD40 作用而与 DC 连接)的 CD80 分子才能通过与 CD28 结合而激活 T 细胞,而游离的 sCD80 与 T 细胞表面 CD28 结合可能干扰了 DC 表面 CD80、CD86 与 T 细胞表面 CD28 的互相作用,因而对 DC 和 T 细胞体外抗肿瘤免疫无明显促进作用。杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤作用可分为特异性杀伤与非特异性杀伤,其中 CTL 是 MHC 限制的,并须识别肿瘤细胞抗原,属特异性杀伤^[19],而 NK 细胞、T-IL-2 细胞则发挥非特异性杀伤作用。T-IL-2 细胞对 K562 细胞的杀伤作用不是 MHC 限制性的,而是非特异的^[20]。本研究以未负载抗原的 DC 与 T-IL-2 细胞共同孵育,不引起抗原的提呈,不会使 T-IL-2 细胞分化为活化的 CTL,故诱导后的 T-IL-2 细胞对 SKOV3 细胞仍发挥非特异性杀伤作用。sCD80-Linker-sCD40L 融合蛋白的功能如何还缺乏有力的证据,对其中的 sCD80 和 sCD40L 结构区生物学活性尚需进行深入研究。本研究中观察到的现象的具体机制以及融合蛋白诱导对 DC 表型、增殖、趋化、分泌 IL-12 等特性的影响,体内外特异性抗肿瘤免疫的作用也有待于进一步的研究。

生物治疗是继手术、放疗、化疗之后的肿瘤治疗新途径。腺病毒载体是安全、高效的基因治疗载体。本研究通过设置一系列对照组观察,未见腺病毒载体转导和肿瘤细胞分泌的上清对 DC 及 T 细胞体外生物学特性有明显影响,初步探讨了共刺激分子介导的体外抗肿瘤生物治疗新方法。

[参考文献]

- [1] Cignetti A, Vallario A, Follenzi A, *et al.* Lentiviral transduction of primary myeloma cells with CD80 and CD154 generates antimyeloma effector T cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(4): 445-456.
- [2] Brown R, Murray A, Pope B, *et al.* Either interleukin-12 or interferon-gamma can correct the dendritic cell defect induced by trans-

- forming growth factor beta in patients with myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2004, 125(6): 743-748.
- [3] Jenkinson SR, Williams NA, Morgan DJ. The role of intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 interactions in the generation of tumor-specific CD8⁺ T cell responses [J]. *J Immunol*, 2005, 174(6): 3401-3407.
- [4] Yang Y, Ratts RB, Hussain RZ, *et al.* CD28 : B7 interaction is necessary for the protective effect of T cell vaccination in EAE [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(7): 2032-2042.
- [5] Tong AW, Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(1): 1-13.
- [6] Chen HW, Huang HI, Lee YP, *et al.* Linkage of CD40L to a self-tumor antigen enhances the antitumor immune responses of dendritic cell-based treatment [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(6): 341-348.
- [7] Kalady MF, Onaitis MW, Emami S, *et al.* Sequential delivery of maturation stimuli increases human dendritic cell IL-12 production and enhances tumor antigen-specific immunogenicity [J]. *J Surg Res*, 2004, 116(1): 24-31.
- [8] 魏 枫, 刘 虹, 任秀宝. sCD80-Linker-sCD40L 融合基因腺病毒载体的构建 [J]. *天津医科大学学报*, 2004, 10(2): 200-203.
- [9] Wiehe JM, Ponsaerts P, Rojewski MT, *et al.* mRNA-mediated gene delivery into human progenitor cells promotes highly efficient protein expression [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(3): 521-530.
- [10] Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 64(3): 313-320.
- [11] Chiriva-Internati M, Liu Y, Weidanz JA, *et al.* Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1. 24 [J]. *Blood*, 2003, 102(9): 3100-3107.
- [12] Kim CH, Yoon JS, Sohn HJ, *et al.* Direct vaccination with pseudotype baculovirus expressing murine telomerase induces anti-tumor immunity comparable with RNA-electroporated dendritic cells in a murine glioma model [J]. *Cancer Lett*, 2007, 250(2): 276-283.
- [13] Frleta D, Lin JT, Quezada SA, *et al.* Distinctive maturation of *in vitro* versus *in vivo* anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice [J]. *J Immunother*, 2003, 26(1): 72-84.
- [14] Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, *et al.* Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(13): 7025-7028.
- [15] Haase C, Michelsen BK, Jorgensen TN. CD40 is necessary for activation of naive T cells by a dendritic cell line *in vivo* but not *in vitro* [J]. *Scand J Immunol*, 2004, 59(3): 237-245.
- [16] Cheadle EJ, Selby PJ, Jackson AM. Mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin-infected dendritic cells potently activate autologous T cells via a B7 and interleukin-12-dependent mechanism [J]. *Immunology*, 2003, 108(1): 79-88.
- [17] Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, *et al.* CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2778-2784.
- [18] Kovacovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, *et al.* Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(11): 4942-4946.
- [19] 郝希山, 邵 莹, 任秀宝, 等. MAGE-3/CEA(HLA-A2/A24⁺) 肽疫苗冲击树突状细胞诱导消化道肿瘤患者 CTL 的研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 2001, 28(9): 689-695.
- [收稿日期] 2007 - 06 - 12 [修回日期] 2007 - 07 - 20
[本文编辑] 郁晓路

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam*H I、*Sal* I 等。(4) 各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数 \bar{x} 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(pH 用正体除外),例如长度 *L*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)