

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.002

## GnRH/M2 融合蛋白致敏 DC 疫苗对黑色素瘤 B16F10 细胞移植瘤的抑制

曹荣月, 马云菲, 袁玉婷, 张昕黎, 李曼曼, 苗梓韬, 金亮(中国药科大学生命科学与技术学院 微生物药物实验室, 江苏南京 210009)

**[摘要]** **目的:** 制备促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)与 M2 的融合蛋白(GnRH/M2), 研究由该融合蛋白致敏而成的 DC 疫苗对黑色素瘤 B16F10 细胞小鼠移植瘤的抑制作用。**方法:** 构建表达载体 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 质粒, 该质粒转化的工程菌在乳糖的诱导下, 融合蛋白 ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 以包涵体形式表达, 经超声破碎、洗涤和乙醇分级沉淀纯化后, 通过酸水解将蛋白多肽 GnRH3-hinge-MVP-M2 释放出来, 并通过 DEAE-52 阴离子交换层析进行分离。将此融合多肽致敏 DC 获得 DC 疫苗。构建黑色素瘤 B16F10 细胞小鼠移植瘤模型, 按接种疫苗不同, 分为: 环磷酸胺组(CTX)、GnRH/M2 融合蛋白致敏 DC 组(GDC)、肿瘤细胞裂解物致敏 DC 组(BDC)、GnRH/M2 融合蛋白致敏 DC + 环磷酸胺组(GDCTX)、肿瘤细胞裂解物致敏 DC + 环磷酸胺组(BDCTX)和生理盐水组(NS), 观察 GnRH/M2 疫苗对模型小鼠的移植瘤生长、CTL 杀伤能力和 T 细胞增殖的作用。**结果:** 成功构建 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 质粒并高效表达融合蛋白。GDC 组移植瘤生长明显慢于 NS 组( $P < 0.05$ ), 且与 BDC 组相似( $P > 0.05$ ); GDCTX 组抑瘤效果虽进一步提高, 但与 CTX 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。各实验组对 B16F10 细胞的杀伤作用和对 T 细胞增殖作用均优于阴性对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且 GDC 组与 BDC 组间差异不显著( $P > 0.05$ )。**结论:** 初步证明融合多肽 GnRH/M2 致敏的 DC 疫苗能有效抑制黑色素瘤 B16F10 细胞小鼠移植瘤的生长。

**[关键词]** 促性腺激素释放激素; 树突状细胞; B16F10 细胞; 黑色素瘤; 融合蛋白

**[中图分类号]** R739.5; R730.51; R967

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)04-0468-08

## Inhibitory effect of DC vaccine sensitized by GnRH/M2 fusion protein on melanoma B16F10 cell xenografts

CAO Rongyue, MA Yunfei, YUAN Yuting, ZHANG Xinli, LI Manman, MIAO Zitao, JIN Liang (Laboratory of Minigene Pharmacy, School of Life Science and Technology, Pharmaceutical University of China, Nanjing 21009, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare fusion protein of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and M2 (GnRH/M2), and investigate inhibitory effect of DC vaccine sensitized with the fusion protein on melanoma B16F10 cell xenografts. **Methods:** An expression vector of pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 plasmid was constructed and transferred into engineering bacteria. Under the induction of lactose, fusion protein of ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 was expressed as inclusion body in the transferred engineering bacteria. Then the fusion protein was purified by means of ultrasonic broken, washings and ethanol fractionation precipitation. After purification, protein polypeptide GnRH3-hinge-MVP-M2 was released by acid hydrolysis and isolated with DEAE-52 anion exchange chromatography. DCs were sensitized with the fusion polypeptide to obtain DC vaccine. Mouse models with melanoma B16F10 xenografts were established and divided into

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81172973, 81373232); 大学生创新药物研制能力提高项目(No. J1030830), 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 江苏省杰出人才引导项目(No. BK20140029)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172973, 81373232), the National Programs of Training Innovative Drug Development Abilities for Undergraduates(No. J1030830), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions(PAPD), and the Excellent Talent Leading Foundation of Jiangsu Province(No. BK20140029)

**[作者简介]** 曹荣月(1961-), 女, 安徽宿州人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤疫苗方面的研究, E-mail: caorongyue@njpu.edu.cn

**[通信作者]** 金亮(JIN Liang, corresponding author), E-mail: liangjin1975@cpu.edu.cn; 曹荣月(CAO Rongyue, co-corresponding author), E-mail: caorongyue@njpu.edu.cn

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.r.20160711.1018.004.html>

cyclophosphamide group ( CTX ), DC sensitized with GnRH/M2 fusion protein group ( GDC ), DC sensitized with tumor cell lysate group ( BDC ), DC sensitized with GnRH/M2 fusion protein plus cyclophosphamide group ( GDCTX ), DC sensitized with tumor cell lysate plus cyclophosphamide group ( BDCTX ) and normal saline group ( NS ), according to different vaccination. Effects of GnRH/M2 vaccine on growth of the xenografts, killing ability of CTL and proliferation of T cells in the mouse models were observed. **Results:** The pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 plasmid was successfully constructed and the fusion protein efficiently expressed. Growth of the xenografts in GDC group was more slower than that in NS group obviously (  $P < 0.05$  ), and similar to that in BDC group (  $P > 0.05$  ). Although inhibitory effect on tumor in GDCTX group was further increased, but there not was any significant differences comparing with CTX group (  $P > 0.05$  ). Killing effect on B16F10 cells and proliferation effect on T cells in various treatment groups were significantly better than those in negative control groups (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ), but differences of them between GDC and BDC groups were not obvious (  $P > 0.05$  ). **Conclusion:** It was preliminarily proved that the DC vaccine sensitized with the fusion polypeptide GnRH/M2 could effectively inhibit growth of the melanoma B16F10 xenografts in the mouse model.

[ **Key words** ] gonadotropin releasing hormone ( GnRH ); dendritic cell ( DC ); B16F10 cell; melanoma; fusion protein [ Chin J Cancer Biother, 2016, 23( 4 ): 468-475. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.002 ]

2011 年 FDA 批准新型抗黑色素瘤的免疫药物抗 CTLA-4 单抗 Ipilimumab 和特异性小分子酪氨酸激酶抑制剂 Vemurafenib 两种药物上市以来,黑色素瘤的研究进入了一个新阶段<sup>[1]</sup>,免疫治疗、靶向治疗等治疗方法成为近几年研究的热点。促性腺激素释放激素( gonadotropin releasing hormone, GnRH )是一种由 10 个氨基酸残基组成的肽类激素,发现于下丘脑的神经内分泌细胞中,许多恶性肿瘤组织如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌<sup>[2-3]</sup>、黑色素瘤<sup>[4-5]</sup>等都分泌 GnRH 或表达其受体。GnRH 的分子量小,免疫原性很弱,因此难以单独将其作为疫苗。为了增强 GnRH 的抗原性,本实验室构建了一种重组 GnRH 多肽<sup>[6-8]</sup>,是由三段首尾相连的 GnRH 多肽片段,其后依次串联了人类 IgG1 铰链区中的一段小肽( 225-232/225'-232' )和麻疹病毒蛋白( measles virus protein, MVP ),简称 GnRH3-hinge-MVP。为进一步增强 GnRH 多肽的抗肿瘤活性,本实验在 GnRH3-hinge-MVP 核苷酸序列的下游插入 M2 片段( M 片段是 HSP70 主要的非特异性免疫增强肽段),经原核表达、纯化获得了 GnRH3-hinge-MVP-M2 多肽,同 DC 体外共培养获得 DC 疫苗并回输黑色素瘤模型小鼠,观察其抑瘤效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

载体质粒 pET28a、菌种 *E. coli* BL21( DE3 )、pET28a-hVEGF121 I -M2( VGM2 )和 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-NRLLLTG( PEDGD )质粒均为中国药科大学微基因药理学实验室保存。B16F10 黑色素瘤细胞由本实验室保存,清洁级 C57BL/6J 雄性小鼠( 5 周龄 )购自扬州大学[ 动物合格证号:

SCXK( 苏 )2012-2004 ]。

引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。限制性内切酶 *Nco* I、*Nhe* I、*Hind* III 购自 Fermentas 公司, DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司,胎牛血清购自杭州四季青工程研究所, RPMI 1640 购自 Thermo Fisher 公司, GM-CSF、IL-4 购自 PeproTech 公司, 环磷酸胺购自山西普德药业股份有限公司( 批号: 04150602 ), LDH 细胞毒性检测试剂盒、CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究所, Ficoll Paque Plus 淋巴细胞分离液购自 GE 公司。

### 1.2 GnRH3-hinge-MVP-M2 融合蛋白表达载体的构建

1.2.1 引物设计 根据 PEDGD 和 VGM2 序列的多克隆位点, 利用引物设计软件设计两对引物( 表 1 ), 引物 P1 引入 *Nco* I 酶切位点, 引物 P2 和 V1 引入 *Nhe* I 酶切位点, 引物 V2 中引入 *Hind* III 酶切位点。

表 1 PCR 引物

Tab. 1 Primers for PCR

Primer	Sequences( 5'-3' )
P1	CATGCCATGGATACGCCATTCGATG
P2	CGGCTAGCAGCAACACCCTCCAGA
V1	CGGCTAGCTCTAGCCAGCCTTCC
V2	CCCAAGCTTACTTGTGTGAGCG

1.2.2 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP 克隆载体的构建 以重组质粒 PEDGD 为模版, 利用引物 P1 和 P2 克隆 ansB-C-GnRH3-hinge-MVP 基因片段, PCR 产物和 pET-28a 载体质粒分别经 *Nco* I 和 *Nhe*

I 双酶切后连接, 转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 进行菌液 PCR 和测序鉴定, 对比正确后进行下一步重组表达载体的构建。

1.2.3 重组表达载体 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 的构建与鉴定 以重组质粒 VGM2 为模版, 利用 V1, V2 克隆扩增 M2 基因, 并和上一步构建成功的重组质粒分别经 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后连接, 构建重组质粒 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2。重组质粒转入 *E. coli* BL21 后, 进行菌液 PCR 和测序鉴定。

### 1.3 融合蛋白的诱导表达、分离与纯化

将鉴定后的重组菌培养 4 h 后加入 7 mmol/L 乳糖诱导表达, 每小时测 600 nm 波长处光密度 ( $D$ ) 值, 8 h 后离心取菌体沉淀, 12% SDS-PAGE 分析, 观察目的蛋白条带位置和表达量, 确定最佳诱导时间。

按最佳诱导时间大规模培养重组菌体, 裂解后超声破碎, 离心保留沉淀。包涵体用 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次, 8 mol/L 尿素溶解。用 0.5、1 和 2 倍体积预冷的无水乙醇分级沉淀蛋白, 沉淀用 SDS-PAGE 分析蛋白纯度。取纯度最高者加入 60 mmol/L HCl, 置 48 °C 水浴 72 h, 将融合蛋白水解为目的多肽 GnRH3-hinge-MVP-M2 (相对分子质量 11 000) 及其融合伙伴 ansB-C (相对分子质量 14 000), 每 12 h 用 SDS-PAGE 检测蛋白水解情况。反应完毕后加入 NaOH 溶液, 调 pH 至 2.5 左右, 离心取上清, 再调 pH 至 6.5 左右, 离心收集沉淀。

沉淀用离子交换缓冲液 (pH 9.0 Tris-HCl 25 mmol/L) 溶解, 过阴离子交换柱 DEAE-cellulose 做进一步纯化。用 NaCl (0~250 mmol/L) 进行梯度洗脱, 收集含目的蛋白峰组分, 透析后冻干保存, 并进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.4 融合蛋白的生物活性测定

C57BL/6J 小鼠腋下皮下接种 B16F10 黑色素瘤细胞 ( $3 \times 10^6$  个/ml), 100  $\mu$ l/只。14 d 后肿瘤生长到 2 cm  $\times$  2 cm 左右时, 无菌剥取肿瘤组织制备单细胞悬液 ( $2 \times 10^7$  个/ml), 反复冻融 5 次后离心取上清, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 对含 B16F10 肿瘤细胞裂解物的滤液进行蛋白定量, -20 °C 保存。

取 C57BL/6J 小鼠脾细胞制备成悬液, 以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 96 孔板中, 分别加入 PBS 溶液、GnRH/M2 融合蛋白 (终质量浓度为 20 ng/ml)、B16F10 肿瘤细胞裂解物 (终质量浓度为 20 ng/ml) 和刀豆蛋白 A (ConA, 终质量浓度为 5  $\mu$ g/ml), 其中 PBS 溶液为阴性对照, ConA 因具有刺激脾细胞增殖的作用而作为阳性对照, 检测液总体积 100  $\mu$ l。培

养 72 h 后加入 CCK-8 试剂, 酶标仪测定  $D_{450}$  值, 其  $D$  值越高, 说明活细胞数量越多。

### 1.5 DC 疫苗的制备

取 C57BL/6J 小鼠股骨和胫骨中的骨髓细胞, 用含 20 ng/ml rmGM-CSF 和 10 ng/ml rmIL-4 的 1640 完全培养基调整细胞密度为  $5 \times 10^6$  个/ml, 分装于 6 孔板中, 体外培养使其逐渐分化成未成熟 DC。48 h 后全量换液, 去除未贴壁细胞, 隔日半量换液。第 6 天加入 GnRH/M2 融合蛋白或 B16F10 肿瘤细胞裂解物 (终质量浓度 20 ng/ml) 致敏 DC, 4 h 后加入 20 ng/ml TNF- $\alpha$ , 第 2 天收集细胞, 调整细胞数为  $5 \times 10^6$  个/ml, 即得 DC 疫苗。

### 1.6 DC 疫苗对小鼠 B16F10 黑色素瘤的免疫治疗

C57BL/6J 小鼠在腋下皮下部位接种 B16F10 细胞 ( $2 \times 10^5$  个细胞, 100  $\mu$ l), 随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为生理盐水组 (NS)、环磷酰胺组 (CTX)、GnRH/M2 融合蛋白致敏 DC 组 (GDC)、肿瘤细胞裂解物致敏 DC 组 (BDC)、GnRH/M2 融合蛋白致敏 DC + 环磷酰胺组 (GDCTX)、肿瘤细胞裂解物致敏 DC + 环磷酰胺组 (BDCTX)。其中 GDCTX 和 BDCTX 组以 CTX 组为对照, 其余实验组以 NS 组为对照。

实验期间分别于接种后的第 3、10、17 天免疫 3 次。NS 组皮下注射生理盐水溶液 100  $\mu$ l; CTX 组以 20 mg/kg 剂量给药 100  $\mu$ l; GDC 组和 BDC 组分别注射 GnRH/M2 融合蛋白致敏和肿瘤细胞裂解物致敏的 DC 疫苗 (含  $5 \times 10^5$  个细胞) 100  $\mu$ l; GDCTX 组和 BDCTX 组同时注射等量 DC 疫苗和 CTX。待瘤块长到可触程度开始测量肿瘤大小, 每隔 3 d 测量 1 次, 计算肿瘤体积。最后 1 次免疫后第 5 天将各组小鼠处死, 剥取肿瘤, 拍照并称重, 计算各组抑瘤率 (IR),  $IR (\%) = (\text{对照组移植瘤平均质量} - \text{实验组移植瘤平均质量}) / \text{对照组移植瘤平均质量} \times 100\%$ 。以时间为横坐标, 肿瘤体积为纵坐标, 绘制肿瘤生长曲线。

### 1.7 LDH 细胞毒性实验检测 DC 疫苗对模型小鼠 CTL 杀伤功能的影响

最后 1 次免疫后第 5 天, 取各组小鼠的脾细胞悬液作为效应细胞, 以 B16F10 细胞为靶细胞 ( $1 \times 10^5$  个/孔), 用 LDH 细胞毒性检测试剂盒检测 CTL 杀伤功能, 效靶比为 20:1、40:1、80:1。特异性 CTL 的杀伤效率 (%) =  $(\text{实验组释放量} - \text{自发释放量}) / (\text{最大释放量} - \text{自发释放量}) \times 100\%$

### 1.8 混合淋巴反应 (MLR) 实验检测 DC 疫苗对模型小鼠 T 细胞增殖能力的影响

取 C57BL/6J 小鼠脾脏过 100 目筛网, 加入淋

巴细胞分离液分离出 T 细胞作为靶细胞 ( $2 \times 10^6$  个/ml), 96 孔板中每孔加  $100 \mu\text{l}$ 。以 DC 疫苗为效应细胞, 并根据效应细胞与靶细胞 1:5、1:10、1:20 的比例每孔加入  $100 \mu\text{l}$  效应细胞, 对照组只加靶细胞不加效应细胞, 每组均设 4 个复孔。按效应细胞分组: 未致敏 DC 组 (iDC); GnRH/M2 融合蛋白致敏 DC 组 (GDC); 肿瘤裂解产物致敏 DC 组 (BDC); 肿瘤裂解产物 + GnRH/M2 融合蛋白致敏 DC 组 (BGDC)。培养 72 h 后加入 CCK-8 溶液, 测定光密度  $D_{450}$  值并计算增殖指数 (SI)。SI = (测试孔  $D$  值 - 对照孔  $D$  值) / 对照组  $D$  值。

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据间比较采用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示具有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 成功构建并获得 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 表达载体

琼脂糖凝胶电泳显示, 以 PEDGD (图 1A) 及 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP 克隆载体 (图 1B) 为模版, 用引物 P1 和 P2 进行 PCR 均可以得到大小为 572 bp 的扩增带, 与 ansB-C-GnRH3-hinge-MVP 基因片段大小相符。DNA 测序结果也证明 ansB-C-GnRH3-hinge-MVP 已经正确插入 pET28a 载体中, pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP 重组质粒构建完成。

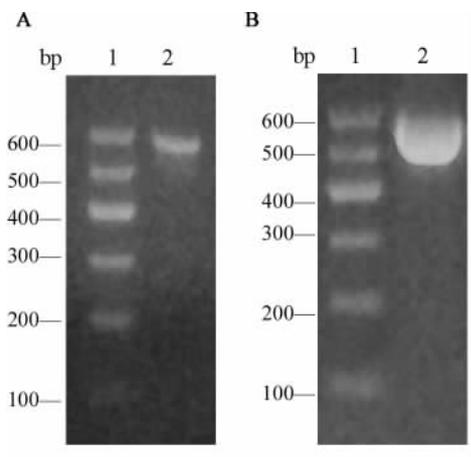


图 1 PEDGD 和 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MV 载体表达产物的 PCR 电泳图

Fig. 1 PCR image of expression products of PEDGE and pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP vectors

A: Expression product of PEDGD vector;

B: Expression product of pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP vector; Lane 1: DNA marker; Lane 2: Expression product

### 2.2 M2 基因片段正确插入 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 表达载体

以 VGM2 为模版, 用引物 V1、V2 进行 PCR 可扩展出 150 bp 的 M2 基因核酸条带 (图 2)。以 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 表达载体为模版, 用引物 P1 和 V2 进行 PCR, 可以得到大小为 712 bp 的扩增带 (图 3), 与预期大小相符。经 DNA 测序分析显示, M2 片段正确插入了 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MVP 质粒中。

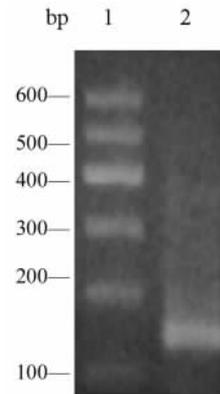


图 2 VGM2 为模版的 M2 基因表达产物 PCR 电泳图

Fig. 2 PCR image of expression product of M2 gene in VGM2 as template

Lane 1: DNA marker; Lane 2: Expression product

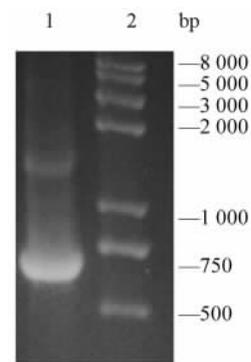


图 3 pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MV

表达载体为模版的 M2 基因表达产物 PCR 电泳图

Fig. 3 PCR image of expression product of M2 gene in pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MV vector as template

Lane 1: Expression product of M2 gene in pET28a-ansB-C-GnRH3-hinge-MV vector; Lane 2: DNA marker

### 2.3 诱导表达并分离、纯化融合蛋白 ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2

乳糖诱导表达融合蛋白, SDS-PAGE 检测结果 (图 4) 显示, 在 20 kD ~ 30 kD 附近出现目的蛋白条

带,与预测的 ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2 相对分子质量(25 kD)相符;且在诱导 5 h 时表达量最高。

重组菌体经破碎后发现融合蛋白以包涵体形式表达。包涵体加入尿素溶解后进行乙醇分级沉淀,15% SDS-PAGE 分析,加入 1 倍体积无水乙醇时目的蛋白纯度较高,保留此沉淀(图 5)。

酸水解 72 h 后融合蛋白基本被水解成 ansB-C 和 GnRH3-hinge-MVP-M2 两部分(图 6),所以选择融合蛋白酸水解时间 72 h。

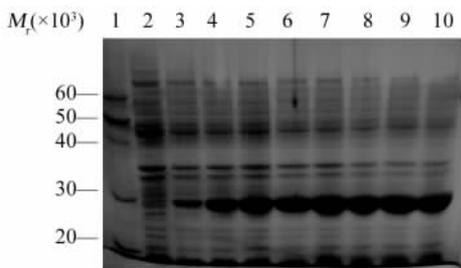


图 4 12% SDS-PAGE 分析乳糖诱导不同时间重组菌的融合蛋白表达

Fig. 4 Fusion proteins expressed by the recombinant bacteria for various introducing times with lactose in 12% SDS-PAGE analysis

Lane 1: Protein marker; Lane 2: Total protein of the recombinant bacteria before introduction with lactose; Lane 3 ~ 10: Total protein of the recombinant bacteria for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 h introduced with lactose respectively

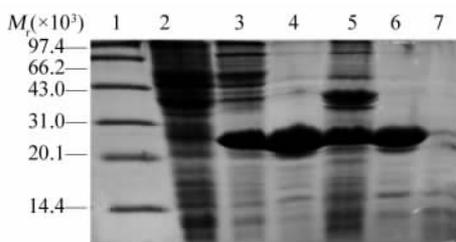


图 5 15% SDS-PAGE 分析不同体积浓度乙醇沉淀的融合蛋白  
Fig. 5 The fusion proteins deposited with ethanol in different volume concentrations analyzed by 15% SDS-PAGE

Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Total protein of the recombinant bacteria before introduction with lactose; Lane 3: Total protein of the recombinant bacteria after introduction with lactose; Lane 4: Liquid of dissolving inclusion protein; Lane 5 ~ 7: Depositions of the fusion protein in the volume concentrations of 1:1/2, 1:1 and 1:2 ethanol

由 ProtParam 软件可推算出融合蛋白 ansB-C-GnRH3-hinge-MVP-M2、融合伙伴 ansB-C 及目的多

肽 GnRH3-hinge-MVP-M2 的理论等电点依次为 pH 6.3、4.88 和 7.47,融合伙伴与目的多肽之间等电点值相差较大,因此可以分别调节溶液的 pH 值达到融合蛋白和融合伙伴的等电点来促使其沉淀,将其和目的多肽分开。

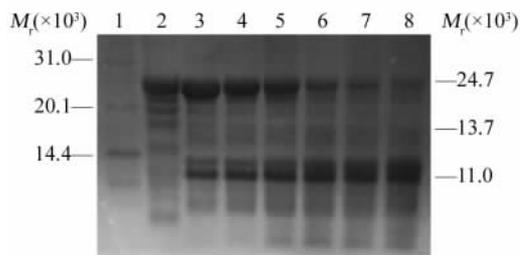


图 6 12% SDS-PAGE 分析不同盐酸水解时间融合蛋白的水解结果

Fig. 6 Cleavages of the fusion protein for various cleavage times with hydrochloric acid analyzed by 12% SDS-PAGE

Lane 1: Protein marker; Lane 2 ~ 8: The fusion protein cleaved by hydrochloric acid for 0, 12, 24, 36, 48, 60 and 70 h, respectively

将水解后的蛋白调节 pH 至 2.5、4.5、6.5,分别离心取上清,电泳分析各蛋白组分的溶解度(图 7),发现 pH 2.5 时,融合伙伴主要存在于沉淀中,pH 4.5 时有少部分融合伙伴和目的多肽溶解在溶液中,而 pH 6.5 时目的多肽溶解度最低,同时杂蛋白与目的多肽产生了共沉淀。因此选择的纯化策略是先将水解后蛋白调 pH 至 2.5,离心取上清,以去除融合伙伴,调 pH 到 6.5,离心收集沉淀进行下一纯化步骤。

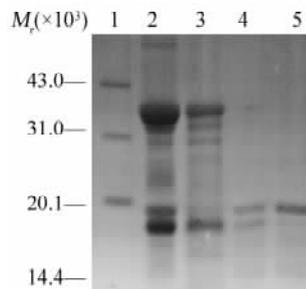


图 7 12% SDS-PAGE 分析蛋白组分在不同 pH 值的溶解度  
Fig. 7 Solubilities of the fusion protein components at various pH values in 12% SDS-PAGE

Lane 1: Protein marker; Lane 2: The fusion protein after hydrolyzed with hydrochloric acid; Lane 3: Supernatant of the hydrolyzed fusion protein at pH2.5; Lane 4: Supernatant of the hydrolyzed fusion protein at pH4.5; Lane 5: Supernatant of the hydrolyzed fusion protein at pH6.5

应用离子交换色谱对蛋白沉淀复溶物进行进一步纯化。将含目的蛋白组分最多的洗脱样品除盐、冻干、复溶后 12% tricine SDS-PAGE 检测,发现目的蛋白以二聚体形式存在(图 8)。

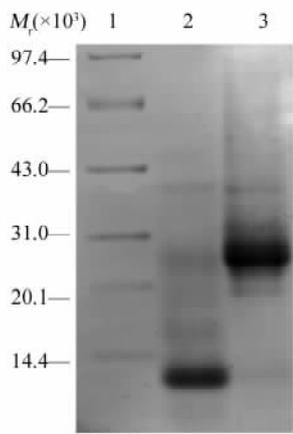


图 8 tricine SDS-PAGE 分析目的蛋白纯化的结果

Fig. 8 Purification result of the target protein in analysis of tricine SDS-PAGE

Lane 1: Protein marker; Lane 2: Target protein after ion exchange chromatography; Lane 3: Target protein as heterodimers of GnRH/M2 after freeze-drying

#### 2.4 融合蛋白 GnRH/M2 能够刺激脾细胞增殖

CCK-8 检测结果显示, ConA 组、B16 组和 GnRH/M2 组  $D$  值显著高于阴性对照组 ( $0.089 \pm 0.006$ ,  $0.171 \pm 0.012$ ,  $0.105 \pm 0.017$  vs  $0.064 \pm 0.006$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

#### 2.5 成功制备不同抗原致敏的 DC 疫苗

提取小鼠骨髓细胞,培养至第 6 d 加入 GnRH/M2 融合蛋白或 B16F10 肿瘤细胞裂解物。第二天显微镜下观察细胞状态可以发现:DC 致敏前细胞呈圆

形,致敏后有树突状突起,为典型的成熟 DC 形态<sup>[9]</sup>(图 9),由此可判断致敏后所得细胞为成熟 DC。

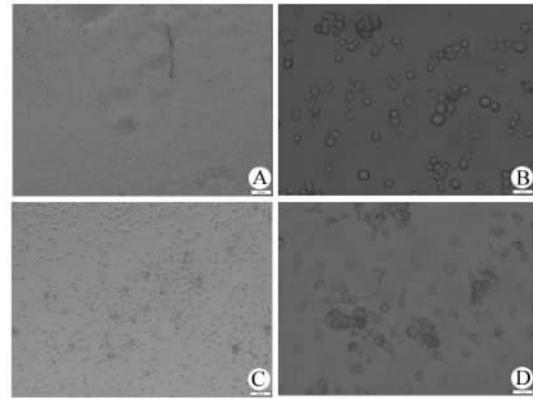


图 9 显微镜观察致敏前后的树突状细胞形态

Fig. 9 Morphology of DC after and before sensitization under microscope

A. DC before sensitization ( $\times 100$ );  
B. DC before sensitization ( $\times 400$ );  
C. DC after sensitization ( $\times 100$ );  
D. DC after sensitization ( $\times 400$ )

#### 2.6 GnRH/M2 组 DC 疫苗抑制移植瘤生长

同 NS 组相比,CTX、GDC、BDC、GDCTX、BDCTX 组的 IR(%) 分别为 57、33、35、63、65。

GDC 组、CTX 组和 BDC 组平均瘤质量均显著小于 NS 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 10A); GDC 组与 BDC 组,以及 GDCTX 组和 BDCTX 组与 CTX 组对比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。免疫期间 5 组实验组的肿瘤体积均小于 NS 组(图 10B),接种后第 18 天,CTX 组和 BDC 组的瘤体积即显著小于 NS 组 ( $P < 0.05$ ),而 GDCTX 组和 BDCTX 组虽然瘤体积较小,但与 CTX 组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

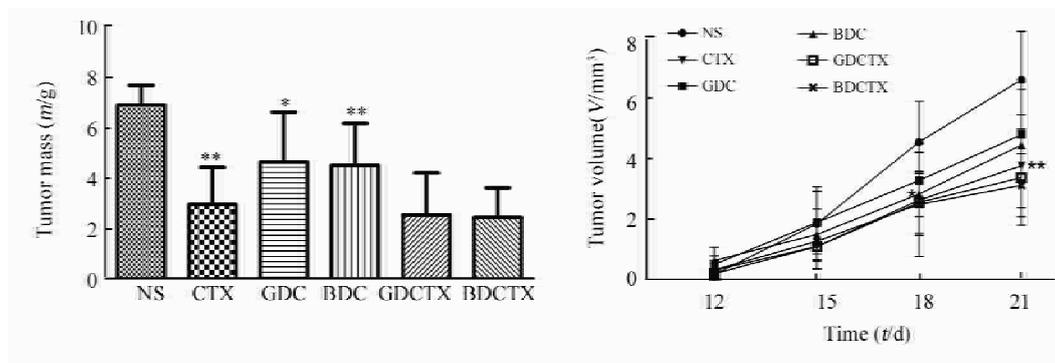


图 10 不同处理组 DC 疫苗免疫 B16F10 荷瘤小鼠实验结果

Fig. 10 Exnografs of B16F10 in Mice immunized with the DC vaccines in various treatment groups

A. Tumor mass; B. Tumor volume

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs NS group

### 2.7 GnRH/M2 组 DC 疫苗增强模型小鼠 CTL 的杀伤功能

检测免疫后各组小鼠的 CTL 杀伤功能。图 11 显示,随着效靶比的增大,各组效应细胞对靶细胞的杀伤力也增大。各实验组杀伤效率均高于 NS 组, GDCTX 组和 BDCTX 组小鼠的脾细胞对肿瘤细胞的杀伤作用最强; GDC 组 CTL 的杀伤率略高于 BDC 组。

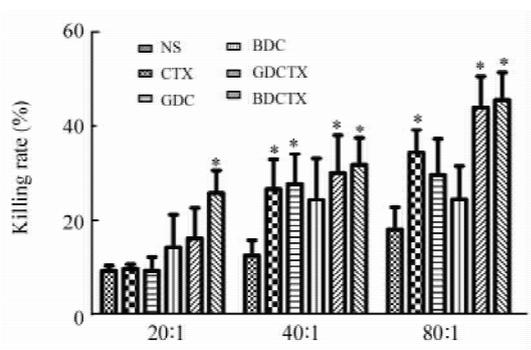


图 11 不同处理组免疫小鼠脾细胞的 CTL 效应  
 Fig. 11 CTL effects of splenocytes in immunized mice of various treatment groups  
 \*  $P < 0.05$  vs NS group

### 2.8 GnRH/M2 组 DC 疫苗促进小鼠 T 细胞增殖

CCK-8 检测发现(图 12), 实验组均能不同程度地刺激 T 细胞增殖, 且随 DC 所占比例增多而增强 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

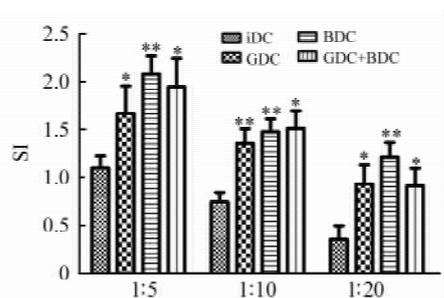


图 12 不同致敏处理 DC 疫苗对小鼠 T 细胞的增殖作用  
 Fig. 12 Proliferation effects of the sensitized DC vaccines in various treatments on T cells of mice  
 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs iDC group

## 3 讨论

DC 作为疫苗治疗恶性肿瘤已有 20 多年历史。目前多数 DC 疫苗都是由患者体内分离而来的 DC 或 DC 前体细胞, 体外诱导分化扩增后负载各种肿瘤相关抗原 (Ag), 诱导 DC 成熟后, 再回输至患者

体内<sup>[10-12]</sup>。热激蛋白家族的 mHSP70 中的第 407 ~ 426 片段 (M) 作为 HSP70 主要的非特异性免疫增强肽段, 能通过上调 DC 表面的共刺激分子和 MHC 分子, 促进 Th1 型刺激反应, 增强杀伤细胞的细胞毒作用, 从而介导强烈的细胞免疫应答; 同时通过与 CD40 结合而增强 mHSP70 或 CD40L 诱导 DC 成熟, 从而高效地摄取、加工处理和提呈抗原, 诱导特异性细胞毒性 T 淋巴细胞生成。研究<sup>[13]</sup>发现, M 经过串联重复 2 次 (M2) 后能够加强对 DC 的刺激效果, 具有较好的抗肿瘤活性。M2 作为 T 辅助表位, 能够促进 DC 的成熟分化, 诱导 Th1 型免疫反应, 刺激 IL-12、TNF- $\alpha$  等细胞因子的分泌。因此本研究在重组 GnRH 抗原多肽的基础上加入 M2, 从而辅助 GnRH 抗原提呈至未成熟 DC 细胞表面。

将 GnRH/M2 融合多肽和 B16F10 肿瘤细胞裂解物制备成 DC 疫苗后进行小鼠抑瘤实验、细胞毒性检测实验和 T 细胞增殖实验, 两种 DC 疫苗分别对瘤细胞的杀伤作用和 T 细胞的增殖效率均好于阴性组, 且两种疫苗抗肿瘤效果相近。结果说明 DC 疫苗在小鼠体内有一定的抗肿瘤效果, 能使荷瘤小鼠体内产生较高免疫应答, 从而起到抑制肿瘤生长的作用。当 DC 疫苗与阳性药物 CTX 联合给药时, 其抑瘤率虽高于单独 CTX 组但不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明 DC 疫苗同 CTX 联合作用时的协同抗肿瘤作用效果不显著。低剂量 CTX 对机体免疫有促进作用, 常作为抗肿瘤阳性药物动物模型。有相关研究表明, 低剂量 CTX 能够清除调节性 T 细胞 (Treg), 并且可能有时间依赖性<sup>[14]</sup>。而 Treg 对 DC 发挥抗肿瘤免疫具有负调节作用。因此, 应用 CTX 之后, 使体内 Treg 降至较低水平再注射 DC 疫苗可能会提高 DC 的抗肿瘤效果<sup>[15]</sup>。此推测还需要作进一步验证。

虽然融合蛋白在原核表达系统中高效表达, 但纯化方法需进一步探索以获得更高纯度的融合多肽。

### [参考文献]

[1] 臧学峰, 唐晓义, 张斌, 等. 黑色素瘤的免疫治疗进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(3): 365-371. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.020.

[2] GRÜNDKER C, GÜNTHER T A R, WESTPHALEN S, et al. Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers [J]. Eur J Endocrinol, 2002, 146(1): 1-14. DOI: 10.1530/eje.0.1460001.

[3] NAGY A, SCHALLY A V. Targeting of cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone analogs to breast, ovarian, endometrial, and prostate cancers [J]. Biol Reprod, 2005, 73(5): 851-859. DOI: 10.1095/biolreprod.105.043489.

[4] TRESZL A, STEIBER Z, SCHALLY A V, et al. Substantial ex-

- pression of luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) receptor type I in human uveal melanoma [ J ]. *Oncotarget*, 2013, 4 ( 10 ): 1721-1728. DOI: 10.18632/oncotarget.1379.
- [ 5 ] MORETTI R M, MONTAGNANI M M, VAN GROENINGHEN J C, et al. Locally expressed LHRH receptors mediate the oncostatic and antimetastatic activity of LHRH agonists on melanoma cells [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87( 8 ): 3791-3797. DOI: 10.1210/jc.87.8.3791.
- [ 6 ] XU J S, ZHU Z, DUAN P, et al. Cloning, expression, and purification of a highly immunogenic recombinant gonadotropin-releasing hormone( GnRH ) chimeric peptide [ J ]. *Protein Expr Purif*, 2006, 50( 2 ): 163-170. DOI: 10.1016/j.pep.2006.08.016.
- [ 7 ] WANG X J, GU K, XU J S, et al. Preparation of a peptide vaccine against GnRH by a bioprocess system based on asparaginase [ J ]. *Vaccine*, 2010, 28( 31 ): 4984-4988. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.05.026.
- [ 8 ] ZHANG Y, Xu J S, ZHAO R P, et al. Inhibition effects on liver tumors of BALB/c mice bearing H22 cells by immunization with a recombinant immunogen of GnRH linked to heat shock protein 65 [ J ]. *Vaccine*, 2007, 25( 39-40 ): 6911-21. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.07.034
- [ 9 ] 彭福华, 钟秀凤, 胡学强, 等. 小鼠骨髓树突状细胞的培养扩增及生物学特性分析 [ J ]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12( 53 ): 10547-10550. DOI: 10.3321/j.issn:1673-8225.2008.53.029.
- [ 10 ] RADFORD K J, TULLETT K M, LAHOUD M H. Dendritic cells and cancer immunotherapy [ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 27 ( 4 ): 26-32. DOI: 10.1016/j.coi.2014.01.005.
- [ 11 ] SILVA R F, CASTRO M C, PEREIRA V R. Dendritic cell-based approaches in the fight against diseases [ J/OL ]. *Front Immunol*, 2014, 5: 78-78 [ 2016-01-10 ]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00078/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00078.
- [ 12 ] ANGUILLÉ S, SMITS E L, EVA L, et al. Clinical use of dendritic cells for cancertherapy [ J ]. *Lancet Oncol*, 2014, 15( 7 ): e257-e267. DOI: 10.1016/s1470-2045(13)70585-0.
- [ 13 ] LU Y, OUYANG K, FANG J, et al. Improved efficacy of DNA vaccination against prostate carcinoma by boosting with recombinant protein vaccine and by introduction of a novel adjuvant epitope [ J ]. *Vaccine*, 2009, 27( 39 ): 5411-5418. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.089.
- [ 14 ] BRODE S, COOKE A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide [ J ]. *Crit Rev Immunol*, 2008, 28( 2 ): 109-126. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v28.i2.20.
- [ 15 ] MATSUSHITA N, PILON S A, Martin L M, et al. Comparative methodologies of regulatory T cell depletion in a murine melanoma model [ J ]. *J Immunol Methods*, 2008, 333( 1/2 ): 167-179. DOI: 10.1016/j.jim.2008.01.012.
- [ 收稿日期 ] 2016-03-26 [ 修回日期 ] 2016-05-24  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 会 讯 ·

## 中国免疫学会第十一届全国免疫学学术大会征文通知

中国免疫学会第十一届全国免疫学学术大会将于2016年11月4-7日在安徽省合肥市召开,该大会是中国免疫学会主办的品牌学术会议,已形成独特风格和极大影响力,是目前中国免疫学领域中水平最高的学术盛会。从2015年起,全国免疫学学术大会由每两年召开一次更改为每年召开。此次会议邀请了海外著名免疫学家和中国两院院士、各领域顶尖的免疫学者进行大会报告,预计将有来自全国各地、港、澳、台和海外的1500名代表参加会议,涵盖了免疫学基础、临床、疫苗、制剂等各个领域。诚邀国内专家与同行踊跃投稿,积极参加会议交流。

会议日期:2016年11月4-7日

会议地址:合肥丰大国际大酒店

主办单位:中国免疫学会

承办单位:中国科学技术大学医学中心;中国科学技术大学生命科学学院

大会主席:田志刚

大会秘书长:曹雪涛

学术委员会主席:马大龙 高福 孙兵

组织委员会主席:何维 吴玉章 王小宁

**征文基本要求:**凡未在国内外公开刊物发表过的研究论文和相关领域国内外研究进展的综述文章均可向会议投稿。稿件为600~800字的中文或200~300词的英文摘要;摘要包括论文题目、研究背景、研究目的、方法、结果、结论,以及3~5个关键词。所接受的论文摘要将收录会议论文集。投稿拟交流类型:口头报告(分会场交流)、壁报交流、论文汇编。

**投稿方式:**采取网上投稿,网址:www.csimeeting.org;请创建新账号并登录后再进行投稿。

**征文截止时间:**2016年9月15日。秘书处于10月10日前向入选论文作者发出通知。

**大会秘书处联系方式**

联系地址:北京东单三条5号明日楼208室 学会秘书处(100005)

联系人:魏薇 姚婕

电话:010-69156451(Fax)85113258

网站联系人:陈朱波(chenzhubo0905@163.com)

电子邮箱:weiwei\_csi@163.com

中国免疫学会