

融合蛋白CTP-FoxM1诱导C57BL/6小鼠骨髓来源树突状细胞的活化

郑 兰 王海霞 唐翌姝 张莉萍*

(重庆医科大学附属第一医院检验科实验室, 重庆 400016)

摘要 树突状细胞(dendritic cells, DCs)疫苗负载的肿瘤抗原可以使DCs大量表达表面分子II类组织相容性抗原(major histocompatibility complex class-II, MHC-II)及共刺激分子CD40、CD80、CD86, 促进Th1(T helper 1)型细胞因子的分泌, 从而可以将肿瘤抗原充分递呈给T淋巴细胞, 诱导机体产生杀伤肿瘤细胞的免疫应答。其中, 肿瘤抗原是否能充分活化DCs是机体发挥抗肿瘤免疫应答的关键。该研究以融合蛋白CTP-FoxM1(cytoplasmic transduction peptide-forkhead box M1)为研究对象, 探讨其对C57BL/6小鼠骨髓来源DCs的活化作用。首先, 分别将胞质转导肽(cytoplasmic transduction peptide, CTP)、FoxM1(forkhead box M1)抗原相关基因连接入pCOLD-TF-DNA, 构建重组原核表达质粒pCOLD-TF-CTP-FoxM1, 转化感受态大肠杆菌BL21, IPTG(isopropyl β -D-l-thiogalactopyranoside)诱导表达, 经亲和纯化、Western blot验证得到融合蛋白CTP-FoxM1。然后, 用CCK-8试剂盒检测经不同浓度的融合蛋白CTP-FoxM1处理48 h后的DCs的存活率; 用激光共聚焦显微镜观察融合蛋白CTP-FoxM1在DCs的定位情况; 流式细胞仪检测DCs表面MHC-II类分子和共刺激分子CD40、CD80、CD86的表达情况; ELISA法检测DCs培养上清中细胞因子白介素-12(interleukin-12, IL-12)的分泌水平。结果显示: CTP-FoxM1对DCs的生长有一定的抑制作用, 且与其浓度有关, 浓度为1 μ g/mL的融合蛋白CTP-FoxM1处理组的DCs存活率($80.93\% \pm 8.36\%$)明显高于浓度为2 μ g/mL融合蛋白CTP-FoxM1处理组DCs的存活率($70.13\% \pm 5.38\%$, $P < 0.001$)和4 μ g/mL融合蛋白CTP-FoxM1处理组DCs的存活率($62.97\% \pm 4.06\%$, $P < 0.001$)。在激光共聚焦显微镜下可以观察到该融合蛋白能够在DCs胞质内定位, 与对照组相比, 该融合蛋白可以上调DCs表面MHC-II类分子和共刺激分子CD40、CD80、CD86的表达量($P < 0.01$, $P < 0.05$)及细胞因子IL-12的分泌量($P < 0.001$)。结果提示, 融合蛋白CTP-FoxM1能促进DCs的活化, 对肝癌的免疫治疗有一定的潜能, 为下一步探索融合蛋白CTP-FoxM1负载的DCs是否能够在体内发挥免疫效应奠定了一定的基础。

关键词 胞质转导肽; 原核表达; 蛋白纯化; 树突状细胞; 疫苗; 肿瘤免疫

Activation Analysis of C57BL/6 Mouse Bone Marrow Derived Dendritic Cells Stimulated by Fusion Protein CTP-FoxM1

Zheng Lan, Wang Haixia, Tang Yishu, Zhang Liping*

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The tumour associated antigens of DCs (dendritic cells) can significantly increase the expression

收稿日期: 2015-01-08 接受日期: 2015-03-11

国家自然科学基金(批准号: 81272545)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012513, E-mail: 1309898173@qq.com

Received: January 8, 2015 Accepted: March 11, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272545)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012513, E-mail: 1309898173@qq.com

网络出版时间: 2015-04-23 14:27

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150423.1427.003.html>

of cell surface molecules MHC-II and costimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86, enhance the Th1 type cytokines secretion and present the antigens to T cells to induce the anti-tumour immune response. Whether the tumour associated antigens can fully activate DCs is the key factor during the whole anti-tumour immune response. In order to detect the effect of the fusion protein CTP-FoxM1 on the activation of C57BL/6 mouse bone marrow derived DCs, CTP-FoxM1 fragments were sequentially inserted into plasmid pCold-TF, then the constructed recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21 and induced by IPTG. The fusion protein CTP-FoxM1 was purified by affinity chromatography and finally identified by Western blot assay. The survival rates of DCs treated with different concentrations of CTP-FoxM1 for 48 h were tested by the CCK-8 assay; the cytoplasmic localization of the fusion protein was observed by the confocal microscopy; the expressions of MHC-II, CD40, CD80 and CD86 phenotypes of DCs were evaluated by the flow cytometry and the secretion of cytokine IL-12 was detected by the ELISA assay. The result indicated that the survival rates were suppressed by the fusion protein CTP-FoxM1 in a concentration depended manner. The survival rate of 1 $\mu\text{g/mL}$ of CTP-FoxM1 treated DCs ($80.93\% \pm 8.36\%$) was higher than that of the 2 $\mu\text{g/mL}$ of CTP-FoxM1 treated DCs ($70.13\% \pm 5.38\%$, $P < 0.001$) and 4 $\mu\text{g/mL}$ of CTP-FoxM1 treated DCs ($62.97\% \pm 4.06\%$, $P < 0.001$). The fusion protein CTP-FoxM1 was located in the cytoplasm of DCs. It could upregulate the expression levels of MHC-II, CD40, CD80 and CD86 of DCs and the secretion of IL-12 ($P < 0.001$) compared with PBS treated groups. The study suggests that the fusion protein CTP-FoxM1 has the capacity of activating DCs and the potency of immunotherapy of hepatocellular carcinoma. These findings make a foundation for the further study of the immunological effects of DCs pulsed with CTP-FoxM1 *in vivo*.

Keywords cytoplasmic transduction peptide; prokaryotic expression; protein purify; dendritic cell; vaccine; tumour immunology

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一^[1], 其发病率高, 进展迅猛, 严重威胁人类的生命健康。由于其起病隐匿, 患者发现时往往已处于晚期, 错过了手术治疗的最佳时期, 从而影响患者的治疗效果。肿瘤的免疫治疗方法因其可有效诱导特异性的肿瘤杀伤作用而成为临床工作者和免疫学家研究的热点^[2]。其中, 将负载的肿瘤抗原作用于树突状细胞(dendritic cells, DCs), 使其致敏并活化, 表达抗原递呈相关的表面分子(如MHC-II类分子和共刺激分子CD40、CD80、CD86), 是实现DCs抗原递呈、诱导机体产生杀伤肿瘤细胞作用的关键步骤^[3]。FoxM1(forkhead box M1)是肿瘤存活的必需抗原, 与肝癌的发生和发展有密切的关系, 是肝癌免疫治疗理想的靶抗原^[4-5]。作为外源性抗原, 如果将FoxM1内源化, 定位于DCs胞质内, 就可以高效地诱导DCs活化, 充分发挥其抗原递呈功能。胞质转导肽(cytoplasmic transduction peptide, CTP)是近年来研究较多的胞质蛋白运载工具, 其细胞毒性小、穿透率高, 具有显著的胞质定位偏性^[6-7]。基于以上理论, 本实验在体外构建并表达纯化融合蛋白CTP-FoxM1, 将其与C57BL/6小鼠骨髓来源的

DCs共培养, 免疫荧光法检测融合蛋白CTP-FoxM1在DCs的定位情况, CCK-8试剂盒检测DCs的存活情况, 流式细胞术检测DCs表面MHC-II类分子和共刺激分子CD40、CD80、CD86的表达情况, ELISA法检测DCs培养上清中细胞因子白介素-12(interleukin-12, IL-12)的分泌水平。研究结果为下一步探讨融合蛋白CTP-FoxM1负载的DCs对肝癌细胞的杀伤机制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

大肠杆菌BL21、表达载体pCLOD-TF-DNA为本实验室保存; Taq DNA聚合酶、各种限制性内切酶、PrimeStar DNA聚合酶和T4 DNA连接酶均购自TaKaRa公司; 异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-l-thiogalactopyranoside, IPTG)购自Solarbio公司; 质粒小提试剂盒购自Omega公司; 兔来源的抗His标签抗体购自Cell Signaling公司; Alexa Fluor488荧光标记的山羊抗兔抗体购自碧云天生物技术有限公司; 镍离子亲和层析柱购自QIAGEN公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)和辣根过氧化物酶

(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 氨苄西林、咪唑、冰乙酸、甲醇及Triton X-100均购自上海生物工程技术有限公司; 细胞培养基RPMI1640和胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)购自Gibco公司; 重组粒细胞-集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和白介素-4(interleukin-4, IL-4)购自RD公司; 流式抗体FITC-anti-mouse CD11c、PE-anti-mouse CD40、PE-Cy5-anti-mouse CD80、PE-Cy5-anti-mouse CD86、PE-anti-mouse MHC-II(IA/IE)及各荧光抗体的同型对照全部购自Ebioscience公司; CCK-8试剂盒购自日本同仁公司; 青霉素-链霉素购自Hyclone公司。

1.2 实验动物

SPF级C57BL/6小鼠3只, 5周龄, 18~25 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.3 融合蛋白CTP-FoxM1的制备

1.3.1 目的基因的获得和重组表达载体的构建 根据GenBank中C57BL/6小鼠FoxM1的cDNA基因序列(cDNA, NM-008021), 选择FoxM1的关键抗原表位序列GGT CTG ATG GAA CTG AAT ACC ACA CCG CTG, 并通过连接酶将其串联为4联体, 以增强其抗原的活化, 与CTP通过连接酶连接, 直接合成基因全长, 插入pCOLD-TF原核表达载体中, 反应条件为: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性20 s, 55 °C退火20 s, 72 °C延伸25 s, 共28个循环, 72 °C延伸5 min。将构建质粒转化至感受态大肠杆菌DH5 α , 37 °C培养过夜。次日挑取在含有氨苄西林的LB平板上生长的单个菌落, 经菌落PCR筛选出阳性菌落, 增菌后提取质粒, 经测序后将正确的pCOLD-TF-CTP-FoxM1重组质粒-80 °C保存备用。

1.3.2 融合蛋白CTP-FoxM1的诱导表达 将重组质粒pCOLD-TF-CTP-FoxM1转化感受态大肠杆菌BL21, 挑取阳性菌株, 接种于5 mL氨苄抗性LB培养基中, 培养至 D_{600} 为0.6时, 加入IPTG使其终浓度为1 mmol/L, 37 °C诱导表达3 h后, 4 °C、4 000 r/min离心10 min收集菌体, 4 °C超声裂解后再次离心, 12 000 r/min离心30 min, 收集上清液。

1.3.3 融合蛋白CTP-FoxM1的纯化、脱盐浓缩和Western blot鉴定 采用镍离子亲和柱层析纯化收集的上清液, 以低浓度咪唑缓冲液漂洗目的融合蛋白, 以高浓度咪唑缓冲液洗脱目的融合蛋白, 经10%

SDS-PAGE电泳, 考马斯亮蓝染色, 凝胶电泳成像系统成像。将收集的流出液分别经超滤杯进行超滤浓缩, 交换液为含20 mmol/L NaCl、5 mmol/L Tris的水溶液(pH8.0), 将收集的浓缩液进行Western blot分析。

1.4 小鼠骨髓来源DCs的体外分离与培养

参考Inaba等^[8]和Lutz等^[9]的实验方法, 经本实验室改进, 取5周龄C57BL/6小鼠1只, 用1.5%戊巴比妥麻醉后用高浓度的CO₂致死, 浸泡于75%的酒精中消毒5 min, 无菌条件下取其胫骨和股骨, 剪开四肢骨两端, 暴露骨髓腔, 用RPMI1640培养基反复冲洗骨髓腔直至发白, 将收集到的骨髓细胞反复吹打成单个细胞悬液, 经200目细胞筛过滤后, 1 500 r/min离心10 min, 收集细胞, 加入红细胞裂解液, 室温下静置5 min以除去红细胞, 用无菌PBS洗涤细胞2次后再次1 500 r/min离心5 min, 收集细胞。用含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗、GM-CSF(终浓度为10 ng/mL)、IL-4(终浓度为5 ng/mL)的完全细胞培养基重悬细胞, 按 2×10^6 /mL的浓度分置于六孔板的每个孔, 每孔补加上述完全细胞培养基至4 mL, 将细胞培养板放置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养, 分别在第3 d全量换液、第5 d半量换液, 并补充细胞因子GM-CSF和IL-4, 使其终浓度不变, 直至细胞培养的第7 d。

1.5 显微镜观察DCs的形态

于光学显微镜下观察DCs生长状况, 注意观察细胞的数量、形态变化、是否伸出伪足以及是否悬浮。

1.6 流式细胞仪检测小鼠骨髓来源DCs表面标志分子CD11c

收集培养至第7 d的DCs, 1 500 r/min离心5 min, 收集细胞。用PBS重悬细胞, 调细胞数为 1×10^7 /mL, 分别取100 μ L细胞悬液装至两只EP管中, 大鼠血清封闭30 min后, 往其中一只EP管中加入1 μ L FITC标记的anti-mouse CD11c抗体, 另一支EP管中加入1 μ L FITC标记的同型对照, 4 °C孵育30 min后, PBS洗涤3次, 用流式细胞仪检测DCs表面标志性分子CD11c的表达情况^[10-11]。

1.7 CTP-FoxM1对DCs存活率的影响

按照上述方法培养小鼠骨髓来源的DCs至第7 d, 收集细胞, 将细胞铺于96孔板, 种板密度为 1×10^5 /孔, 随机将细胞分为两组, 实验组加入终浓度分别为1 μ g/mL、2 μ g/mL、4 μ g/mL的融合蛋白CTP-

FoxM1, 对照组加入等量的PBS, 总体积为100 μ L/孔, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中继续培养48 h后取出细胞培养板, 每孔加入10 μ L CCK-8试剂, 酶标仪测定波长为450 nm下的吸光度值, 将所得数据汇总, 用以下公式计算细胞存活率: 细胞存活率=(实验组D值-空白对照组D值)/(阴性对照组D值-空白对照组D值) $\times$ 100%。

1.8 CTP-FoxM1在DCs的定位研究

收集培养至第7 d的DCs铺于24孔板中, 种板密度为 2×10^5 /孔。将DCs随机分为两组, 一组加入终浓度为1 μ g/mL的融合蛋白CTP-FoxM1作为实验组, 一组加入等量的PBS作为对照组, 放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中继续培养4 h后, 1 500 r/min离心5 min, 收集DCs。用预冷的PBS洗涤DCs 3次后涂于玻片上, 在-20 $^{\circ}$ C条件下经固定液(冰乙酸与甲醇以3:1的比例配制)固定15 min, 0.2% TritonX-100透膜处理20 min, 10%山羊血清封闭1 h, 然后加入一抗(兔源抗His抗体), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日加入二抗(Alexa Fluor488荧光标记的山羊抗兔抗体), 经PBS洗涤后, 37 $^{\circ}$ C用DAPI复染细胞核15 min。用50%甘油封闭玻片后, 在激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白CTP-FoxM1在DCs内的亚细胞定位情况。

1.9 CTP-FoxM1对DCs细胞形态及表面分子表达量的影响

收集培养至第7 d的DCs, 将其分为两组, 实验组加入终浓度为1 μ g/mL的融合蛋白CTP-FoxM1, 对照组加入等体积的无菌PBS, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中继续培养48 h后, 倒置显微镜下观察DCs的形态变化并拍照。调细胞浓度为 10^7 /mL, 每支EP管加入50 μ L细胞悬液, 用大鼠血清封闭30 min后, 按照抗体使用说明, 分别对两组DCs进行抗体[(FITC-anti-mouse CD11c、PE-Cy5-anti-mouse CD86、PE-anti-mouse CD40、PE-Cy5 anti-mouseCD80及PE anti-mouse MHC-II(IA/IE)]标记, 避光孵育30 min后用PBS洗涤细胞3次, 流式细胞仪检测细胞表面分子MHC-II、CD40、CD80及CD86的表达情况。

1.10 CTP-FoxM1对DCs培养上清中IL-12的检测

收集培养至第7 d的DCs, 将其分为两组, 实验组加入终浓度为1 μ g/mL的融合蛋白CTP-FoxM1, 对照组加入等体积的无菌PBS, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中继续培养48 h后, 收集DCs培养上清, 同时用LPS处理的DCs上清液作阳性对照, 按照ELISA试剂盒说明

书, 检测DCs培养上清中细胞因子IL-12的蛋白含量。

1.11 统计学分析

所有实验至少重复3次, 采用SPSS 21.0软件对所得数据进行统计学分析, 数据用 $\text{mesn}\pm\text{S.D.}$ 表示。组间两两比较采用 t 检验, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

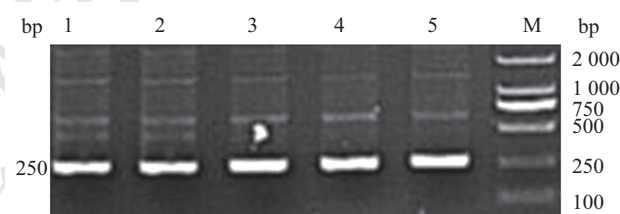
2 结果

2.1 重组原核表达质粒的菌落PCR鉴定

重组原核表达质粒pCOLD-TF-CTP-FoxM1转化感受态大肠杆菌DH5 α 后, 从氨苄西林抗性平板上筛出单个菌落, 经PCR鉴定, 1~5号孔可以扩增出250 bp的目的基因片段, 大小与理论值相符(图1)。

2.2 融合蛋白CTP-FoxM1的表达和纯化

融合蛋白CTP-FoxM1诱导产物的上清液经过

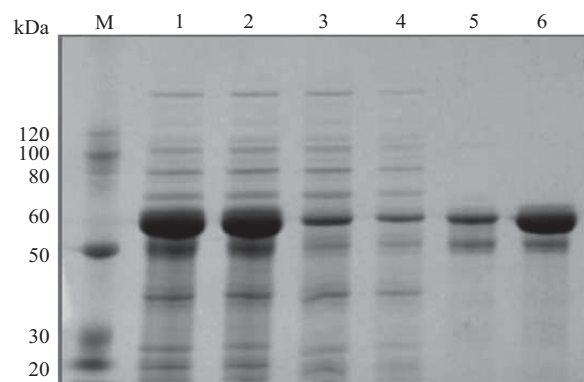


1~5: 重组原核表达质粒pCOLD-TF-CTP-FoxM1; M: DNA marker DL 2000。

1~5: recombinant prokaryotic expression plasmid pCOLD-TF-CTP-FoxM1; M: DNA marker DL 2000.

图1 重组原核表达质粒的PCR鉴定

Fig.1 PCR identification of recombinant prokaryotic expression plasmid pCOLD-TF-CTP-FoxM1



M: 标准marker; 1: 破菌后蛋白; 2: 破菌离心后上清; 3: 过柱后的穿透液; 4: 过柱液上清; 5: 漂洗液上清; 6: 洗脱液上清。

M: standard marker; 1: bacterial lysate; 2: supernatant of lysate after centrifugation; 3: protein of column flow-through; 4: supernatant of binding buffer; 5: supernatant of washing buffer; 6: supernatant of elution buffer.

图2 SDS-PAGE分析融合蛋白CTP-FoxM1的表达和纯化
Fig.2 Expression and purification of fusion protein CTP-FoxM1 analyzed by SDS-PAGE

柱液(20 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl)过柱,咪唑浓度为40 mmol/L的漂洗液漂洗,咪唑浓度为500 mmol/L的洗脱液洗脱,收集流出液,经10%的

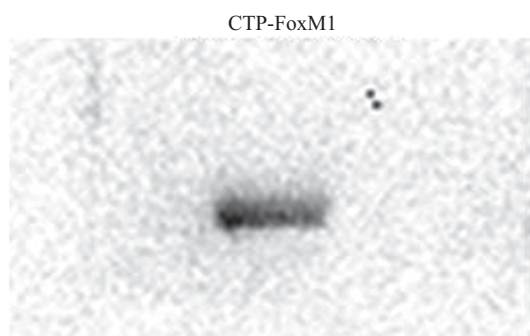


图3 纯化后的融合蛋白CTP-FoxM1的Western blot鉴定
Fig.3 Western blot identification of purified fusion protein CTP-FoxM1

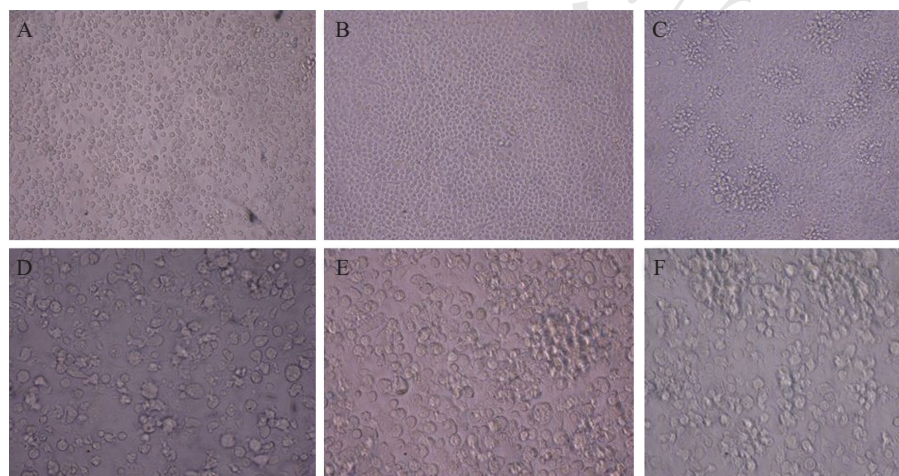
SDS-PAGE分析,得到相对分子质量为59.6 kDa的目的蛋白,大小与预期相符(图2)。

2.3 融合蛋白CTP-FoxM1的Western blot鉴定

将纯化后的融合蛋白CTP-FoxM1经脱盐超滤浓缩后进行Western blot分析。结果显示,表达的融合蛋白CTP-FoxM1可与兔来源抗His抗体特异性结合,可见特异性条带(图3)。

2.4 分离培养的C57BL/6小鼠骨髓来源的DCs的鉴定

2.4.1 DCs形态学观察 将C57BL/6小鼠胫骨和股骨部分的骨髓细胞分离后,红细胞裂解液裂解红细胞,用含有10% FBS、1%青霉素-链霉素双抗、GM-CSF(终浓度为10 ng/mL)、IL-4(终浓度为5 ng/mL)的RPMI1640完全培养基重悬细胞,在37 °C、5%

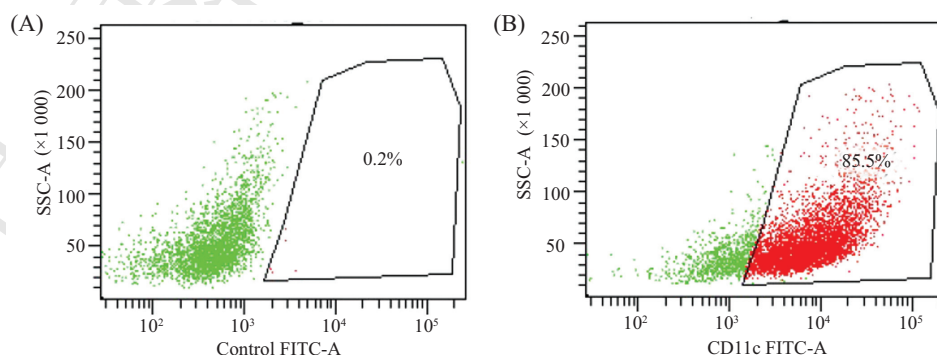


A: DCs体外诱导第1 d的细胞形态; B: DCs体外诱导培养第2 d的细胞形态; C: DCs体外诱导第3 d的细胞形态; D: DCs体外诱导第4 d的细胞形态; E: DCs体外诱导第5 d的细胞形态; F: DCs体外诱导第6 d的细胞形态。

A: the morphology of induced DCs on day 1; B: the morphology of induced DCs on day 2; C: the morphology of induced DCs on day 3; D: the morphology of induced DCs on day 4; E: the morphology of induced DCs on day 5; F: the morphology of induced DCs on day 6.

图4 倒置显微镜下观察体外诱导培养DCs的形态(200×)

Fig.4 The morphology of induced DCs *in vitro* observed under inverted microscope (200×)

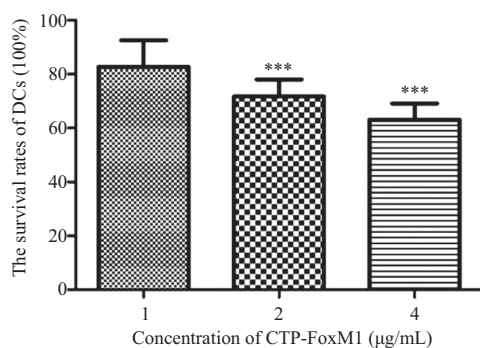


A: FITC标记的同型对照; B: 培养至第7 d DCs表达的CD11c。

A: FITC isotype control group; B: CD11c of DCs on the 7th day.

图5 流式细胞仪分析DCs表面分子CD11c的表达情况

Fig.5 The expression of CD11c on the DCs tested by flow cytometry

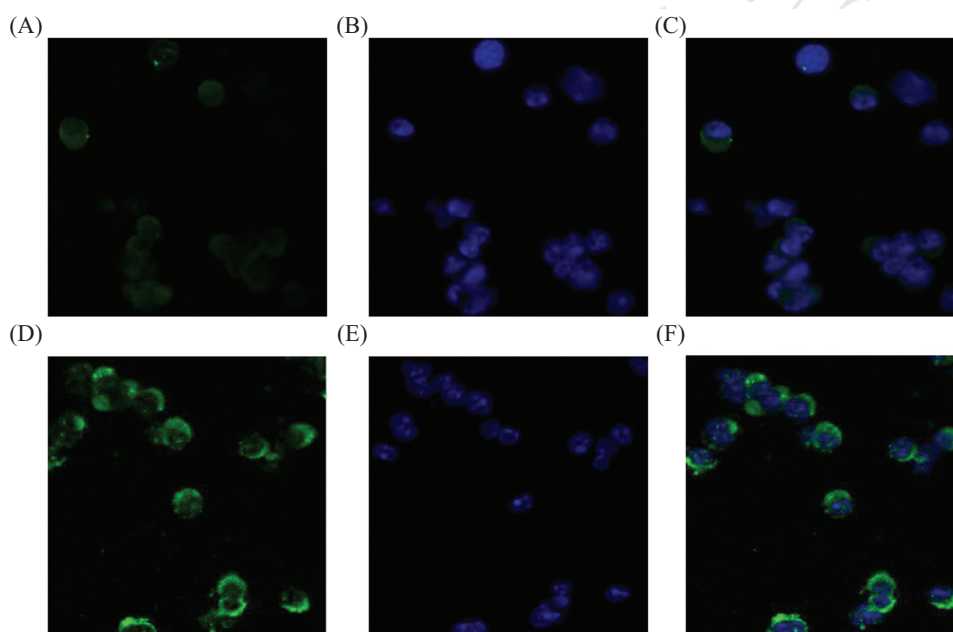


*** $P < 0.001$, 与1 $\mu\text{g/mL}$ CTP-FoxM1处理组比较。

*** $P < 0.001$ vs 1 $\mu\text{g/mL}$ of CTP-FoxM1 treated group.

图6 不同浓度的CTP-FoxM1对DCs存活率的影响

Fig.6 The effect of different concentrations of CTP-FoxM1 on the survival rates of DCs



A~C: PBS组DCs激光共聚焦成像图; A: 激光共聚焦显微镜下观察DCs内Alexa Fluor 488荧光分布情况; B: DAPI复染DCs细胞核的图像; C: 图A、图B的合成图; D~F: CTP-FoxM1处理组DCs激光共聚焦成像图; D: 激光共聚焦显微镜下观察DCs内Alexa Fluor 488荧光分布情况; E: DAPI复染DCs细胞核的图像; F: 图D、图E的合成图。

A~C: PBS treated DCs observed by confocal microscope; A: Alexa Fluor 488 fluorescence visualized in DCs by confocal microscope; B: confocal microscopic images of the DAPI counterstained nucleus; C: merged confocal microscopic images of A and B; D~F: CTP-FoxM1 treated DCs observed by confocal microscope; D: Alexa Fluor 488 fluorescence visualized in DCs by confocal microscope; E: confocal microscopic images of the DAPI counterstained nucleus; F: merged confocal microscopic images of D and E.

图7 激光共聚焦显微镜观察融合蛋白CTP-FoxM1在DCs内的细胞定位(800×)

Fig.7 The localization of fusion protein CTP-FoxM1 in DCs visualized by confocal microscope (800×)

CO_2 的细胞培养箱中培养7 d, 光学显微镜下可见: 细胞由贴壁生长渐渐变为悬浮生长, 细胞体积变大, 并且伸出少量树状突起(图4)。

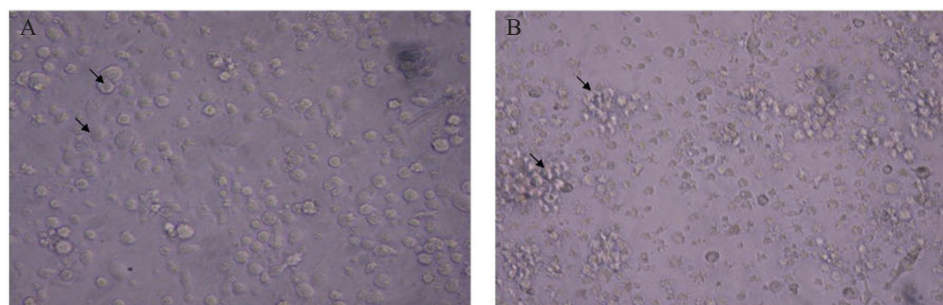
2.4.2 流式细胞仪检测DCs表面标志分子CD11c

CD11c为鉴定小鼠骨髓来源DCs的重要标志。收集培养至第7 d的DCs, 调细胞数为 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 用流式细胞仪检测DCs表面CD11c表达情况。重复检测3次后将所得数据汇总。经流式细胞仪检测, 结果显示, 经此方法分离得到的小鼠骨髓来源的DCs, 其CD11c表

达量可达 $88.00\% \pm 4.66\%$ (图5)。

2.5 CTP-FoxM1对DCs存活率的影响

用终浓度分别为1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1处理DCs, 以等量的PBS作为对照组, 每组均设3个平行孔, 重复3次。CCK-8试剂盒检测细胞的存活率。结果显示, 经终浓度分别为1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$ 融和蛋白CTP-FoxM1处理后的DCs, 细胞存活率分别为 $80.93\% \pm 8.36\%$ 、 $70.13\% \pm 5.38\%$ 、 $62.97\% \pm 4.06\%$, 表明融合蛋白CTP-FoxM1对DCs

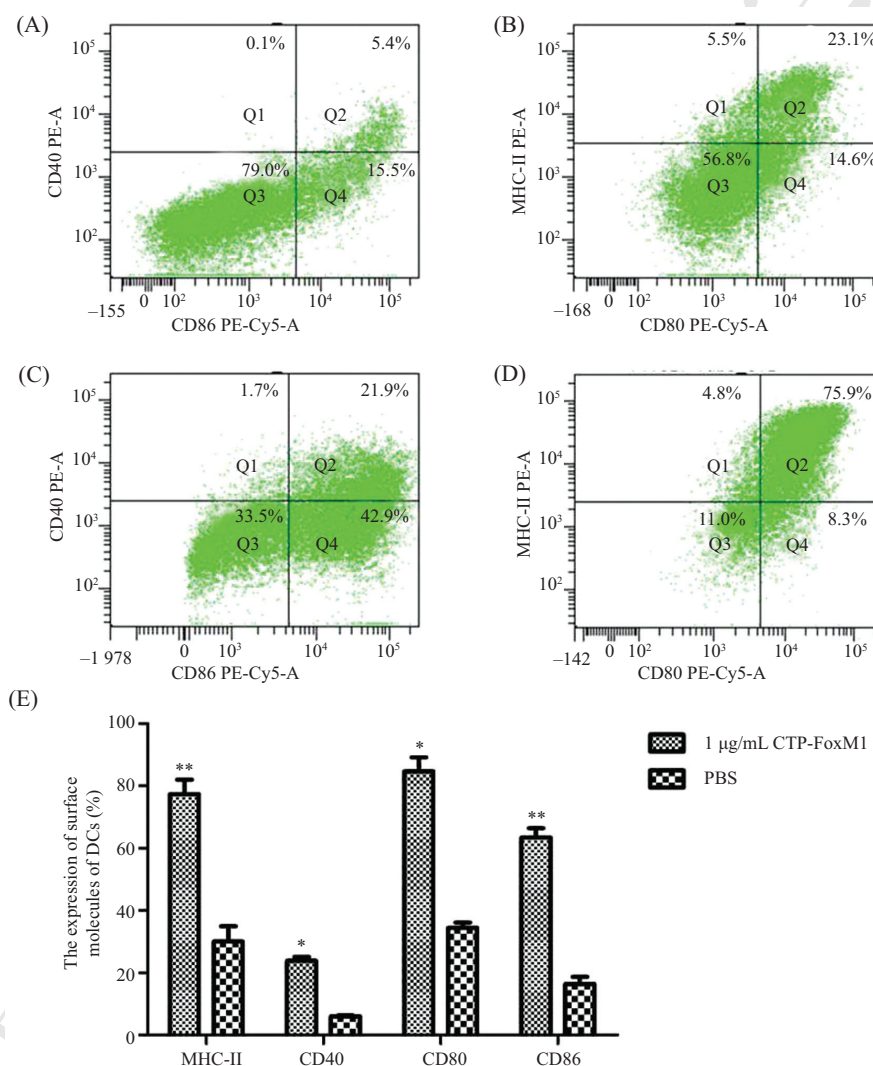


A: PBS处理组DCs; B: CTP-FoxM1处理组DCs。箭头所指为DCs。

A: DCs treated with PBS; B: DCs treated with CTP-FoxM1. Arrows showed DCs.

图8 光镜下DCs形态观察(200×)

Fig.8 The morphology of DCs under inverted microscope (200×)

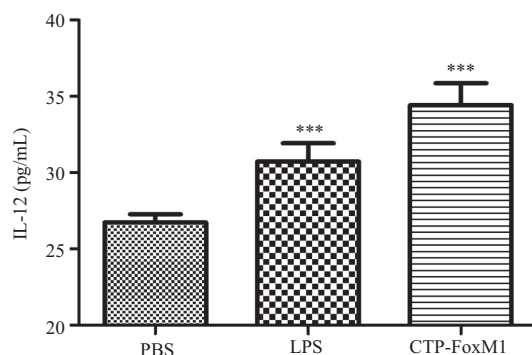


A: 流式细胞术检测PBS处理组DCs表面分子CD40、CD86的表达情况; B: 流式细胞术检测PBS处理组DCs表面分子MHC-II、CD80的表达情况; C: 流式细胞术检测CTP-FoxM1处理组DCs表面分子CD40、CD86的表达情况; D: 流式细胞术检测CTP-FoxM1处理组DCs表面分子MHC-II、CD80的表达情况; E: PBS处理组DCs和CTP-FoxM1处理组DCs表面分子MHC-II、CD40、CD80、CD86表达情况的比较。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与PBS组相比。

A: the expression of CD40 and CD86 molecules on PBS treated DCs detected by flow cytometry; B: the expression of MHC-II and CD80 molecules on PBS treated DCs detected by flow cytometry; C: the expression of CD40 and CD86 molecules on CTP-FoxM1 treated DCs detected by flow cytometry; D: the expression of MHC-II and CD80 molecules on CTP-FoxM1 treated DCs detected by flow cytometry; E: the expression of MHC-II, CD40, CD80 and CD 86 molecules on CTP-FoxM1 groups vs PBS groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS treated groups.

图9 流式细胞术分析DCs表面分子的表达情况

Fig.9 The expression of surface molecules of DCs tested by flow cytometry



*** $P < 0.001$, 与PBS处理组相比。

*** $P < 0.001$ vs PBS treated group.

图10 DCs培养上清中细胞因子IL-12蛋白分泌水平

Fig.10 The level of cytokine IL-12 protein in supernatant of DCs

有一定的抑制作用, 且与其浓度有关($P < 0.001$)。与终浓度为2, 4 $\mu\text{g/mL}$ 融合蛋白CTP-FoxM1处理组的DCs相比, 终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1对DCs的抑制作用较小($P < 0.001$), 因此在本实验后续研究中, 我们均选用浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1处理DCs(图6)。

2.6 细胞免疫荧光检测融合蛋白CTP-FoxM1在DCs中的定位

收集培养至第7 d的DCs, 调细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{孔}$, 铺于24孔板中。随机将DCs分为两组, 其中一组加入终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1作为实验组, 另一组加入等量的PBS作为对照组。激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白CTP-FoxM1在DCs的定位。结果显示, 实验组DCs胞质内可明显见到明亮的绿色荧光, 表明融合蛋白CTP-FoxM1主要定位于胞质, 而对照组DCs内仅能看到微弱的荧光背景(图7)。

2.7 CTP-FoxM1对DCs形态及表面分子表达量的影响

收集培养至第7 d的DCs, 调细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{孔}$, 铺于24孔板中, 将DCs分为两个组, 其中一组加入终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1作为实验组, 另一组加入等量的PBS作为对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养48 h后, 倒置显微镜下观察经融合蛋白CTP-FoxM1处理后的DCs, 其细胞团的数量较对照组DCs多, 细胞“伪足”、“突起”也比对照组DCs明显, 如图8所示, 箭头所指的为DCs。

流式细胞仪检测DCs表面分子MHC-II类分子及共刺激分子CD40、CD80、CD86的表达情况(图9), 实验组DCs表面MHC-II类分子及共刺激分子

CD40、CD80、CD86表达量分别为 $77.37\% \pm 8.04\%$ 、 $27.20\% \pm 7.75\%$ 、 $84.73\% \pm 7.81\%$ 、 $63.47\% \pm 5.23\%$, 而对照组则分别为 $30.00\% \pm 8.59\%$ 、 $6.03\% \pm 0.61\%$ 、 $34.47\% \pm 2.82\%$ 、 $16.47\% \pm 3.85\%$ 。实验组表面分子表达量明显高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$, 图9E), 说明融合蛋白CTP-FoxM1对DCs的活化起促进作用。

2.8 CTP-FoxM1对DCs培养上清中细胞因子IL-12分泌水平的影响

分别收集经PBS和1 $\mu\text{g/mL}$ CTP-FoxM1处理后的DCs的培养上清, 同时用LPS刺激后的DCs上清作阳性对照, ELISA法检测上清中细胞因子IL-12的分泌量, PBS处理组、CTP-FoxM1处理组及LPS处理组IL-12分泌量分别为 26.75 ± 0.52 , 34.43 ± 1.43 , 30.73 ± 1.18 pg/mL, 经1 $\mu\text{g/mL}$ CTP-FoxM1刺激后的DCs, 其IL-12的蛋白分泌水平高于PBS处理组($P < 0.001$, 图10)。

3 讨论

DCs是迄今为止发现的抗原递呈功能最强的免疫细胞, 它能有效激活初始T淋巴细胞, 而其他抗原递呈细胞(如巨噬细胞或是B细胞)只能激活已活化的T细胞或是记忆性T细胞, 因此, DCs是机体免疫应答的启动者, 在机体的免疫应答中发挥着巨大的作用^[12-13]。DCs激活T细胞需要借助其细胞表面分子的相互作用。T细胞活化的第一信号主要来自T细胞表面受体与DCs表面MHC分子-抗原肽复合物的特异性结合; 第二信号主要通过DCs表面共刺激分子(如CD40、CD80及CD86)与T淋巴细胞表面黏附分子(如CD28、CD40L等)相互作用来实现。未成熟的DCs和成熟的DCs是DCs发育的不同阶段, 其行使的

功能也不一样^[14]。未成熟的DCs, 其表面MHC-II类分子及共刺激分子(如CD40、CD80、CD86)的表达量较低, 摄取抗原能力较强但抗原递呈能力较弱, 因而可诱导机体的免疫耐受。未成熟的DCs被抗原活化后迁徙到外周淋巴组织器官, 变为成熟的DCs, 其表面高表达MHC-II类分子和共刺激分子(如CD40、CD80、CD86等), 充分发挥抗原递呈作用, 可以有效激活初始T淋巴细胞, 从而诱导机体产生特异性免疫应答^[15-19]。

本研究首先构建并表达纯化了融合蛋白CTP-FoxM1, 并且用Western blot鉴定了该融合蛋白。然后, 我们用不同浓度的融合蛋白CTP-FoxM1与DCs共培养, 用CCK-8试剂盒检测其对DCs存活率的影响。本实验结果表明, 融合蛋白CTP-FoxM1对DCs的存活率有一定的抑制作用, 且与浓度相关。浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1虽然对DCs有一定的抑制作用, 但明显低于浓度为2, 4 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1处理组, 由于能保证DCs的存活率在80%左右, 故在后续实验中, 我们选用终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1作用DCs。

CTP为近年来研究较多的胞质转导工具, 与传统的抗原转运体如PTD(protein transduction peptide)等胞核定位运载工具相比^[20], 融合蛋白CTP-FoxM1可以将外源性的抗原定位于胞质中, 从而降低对细胞核物质的损伤。本实验经多次重复后, 从图7中可知, 经融合蛋白CTP-FoxM1作用后的DCs, 其胞质内可见大量绿色荧光, 说明该融合蛋白主要定位于胞质中, 与本实验最初设想基本一致。

成熟的DCs不仅高表达MHC-II类分子及其共刺激分子如CD40、CD80、CD86等, 还会使IL-12分泌量增加。IL-12是DCs发挥抗原提呈、活化T细胞最重要的细胞因子, 它可以诱导Th1型细胞及细胞毒性T细胞的分化, 促进Th1型细胞因子干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的分泌, 在消除肿瘤的免疫耐受和发挥CD8⁺ T淋巴细胞的细胞毒性作用等方面发挥巨大作用^[21-22]。通过流式细胞仪检测该融合蛋白对DCs表面分子表达情况的影响, 我们发现, 浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的融合蛋白CTP-FoxM1可以显著上调DCs表面MHC-II类分子和共刺激分子如CD40、CD80、CD86的表达。此外, 我们还通过ELISA法检测经融合蛋白CTP-FoxM1作用的DCs培养上清液中的细胞因子IL-12的蛋白分泌量, 发现其分泌量较对

照组明显增高, 由此我们推断, 该融合蛋白对DCs的成熟及活化发挥了一定的促进作用。

自上个世纪90年代中期开始, DCs疫苗被广泛用于肿瘤的免疫治疗, 包括恶性黑色素瘤、前列腺癌、恶性胶质瘤及肾癌等。虽然DCs疫苗在用于肿瘤的免疫治疗方面仍存在很多不足和疑惑, 但有研究数据表明, DCs疫苗能在一定程度上提高肿瘤患者的生存率^[23-24]。近年来, Palmer等^[25]将体外经肝癌细胞系HepG2激活的DCs自体回输至HCC患者体内, 从血清学和放射学的角度证实了DCs疫苗有良好的安全性和有效性, 这也充分说明了DCs疫苗的应用具有广阔的前景。于是, 我们构想借助融合蛋白CTP-FoxM1负载的DCs疫苗来实现对肝癌的免疫治疗。从本研究的前期实验结果来看, 融合蛋白CTP-FoxM1可以上调DCs表面MHC-II类分子及共刺激分子CD40、CD80、CD86的表达和细胞因子IL-12的分泌, 具有活化DCs从而活化T细胞的潜能, 这为我们后期探索其杀伤肿瘤细胞的免疫效应奠定了一定的基础, 但融合蛋白CTP-FoxM1负载的DCs疫苗是否能在体内发挥杀伤肿瘤细胞的免疫效应, 仍是我们需要继续探索和研究的课题。

参考文献 (References)

- 1 Wong R, Frenette C. Updates in the management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2011; 7(1): 16-24.
- 2 Ge C, Xing Y, Wang Q, Xiao W, Lu Y, Hu X, *et al.* Improved efficacy of therapeutic vaccination with dendritic cells pulsed with tumour cell lysate against hepatocellular carcinoma by introduction of 2 tandem repeats of microbial HSP70 peptide epitope 407-426 and OK-432. *Int Immunopharmacol* 2011; 11(12): 2200-7.
- 3 Bray SM, Vujanovic L, Butterfield LH. Dendritic cell-based vaccines positively impact natural killer and regulatory T cells in hepatocellular carcinoma patients. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 249281.
- 4 Uddin S, Ahmed M, Hussain A, Abubaker J, Al-Sanea N, Abdul Jabbar A, *et al.* Genome-wide expression analysis of Middle Eastern colorectal cancer reveals FOXM1 as a novel target for cancer therapy. *Am J Pathol* 2011; 178(2): 537-47.
- 5 Luscher-Firzlaff JM, Lilischkis R, Luscher B. Regulation of the transcription factor FOXM1c by Cyclin E/CDK2. *FEBS Lett* 2006; 580(7): 1716-22.
- 6 Kim D, Jeon C, Kim JH, Kim MS, Yoon CH, Choi IS, *et al.* Cytoplasmic transduction peptide(CTP): New approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res* 2006; 312(8): 1277-88.
- 7 Huang SF, Liu DB, Zeng JM, Yuan Y, Xiao Q, Sun CM, *et al.* Cloning, expression, purification, distribution and kinetics

- characterization of the bacterial beta-galactosidase fused to the cytoplasmic transduction peptide *in vitro* and *in vivo*. *Protein Expr Purif* 2009; 68(2): 167-76.
- 8 Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, *et al*. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992; 175(5): 1157-67.
- 9 Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, *et al*. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999; 223(1): 77-92.
- 10 Hwang JA, Lee JA, Cheong SW, Youn HJ, Park JH. Benzo(a)pyrene inhibits growth and functional differentiation of mouse bone marrow-derived dendritic cells. Downregulation of RelB and eIF3 p170 by benzo(a)pyrene. *Toxicol Lett* 2007; 169(1): 82-90.
- 11 夏俊波, 吴 奎, 孙 鲲, 王长征. 小鼠骨髓来源的树突状细胞体外扩增与鉴定. 第三军医大学学报(Xia Junbo, Wu Kui, Sun Kun, Wang Changzheng. Amplification and identification of dendritic cells from mouse bone marrow. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* 2005; 27(10): 942-3.
- 12 Klechevsky E, Kato H, Sponaas AM. Dendritic cells star in vancouver. *J Exp Med* 2005; 202(1): 5-10.
- 13 Hart DN. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90(9): 3245-87.
- 14 Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark J, Kwon ED, *et al*. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1775-66.
- 15 Jiang HR, Muckersie E, Robertson M, Forrester JV. Antigen-specific inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by bone marrow-derived immature dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(4): 1598-607.
- 16 Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: Translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311: 17-58.
- 17 Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, *et al*. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999; 162(1): 168-75.
- 18 Baar J. Clinical applications of dendritic cell cancer vaccines. *Oncologist* 1999; 4(2): 140-4.
- 19 Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T. Dendritic cells: Biology of the skin. *Contact Dermatitis* 2009; 60(1): 2-20.
- 20 Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, Singh M. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: Myths and realities. *J Control Release* 2007; 117(2): 148-62.
- 21 Kadowaki N. Dendritic cells: A conductor of T cell differentiation. *Allergol Int* 2007; 56(3): 193-9.
- 22 Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, *et al*. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170(3): 827-45.
- 23 Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2014; 15(7): e257-67.
- 24 Ranieri E, Gigante M, Storkus WJ, Gesualdo L. Translational mini-review series on vaccines: Dendritic cell-based vaccines in renal cancer. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(3): 395-400.
- 25 Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, Torr EE, Ahmed F, Steele JC, *et al*. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumour lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49(1): 124-32.