

CTP-BCR-ABL抗原肽负载树突状细胞体外致敏T淋巴细胞靶向杀伤CML细胞

王旭¹ 曾大川¹ 郑忍忍¹ 黄峥兰¹ 高淼^{2*}

(¹重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

²重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

摘要 BCR-ABL为慢性髓细胞白血病特异胞质抗原, 为良好的免疫治疗靶标。该研究选择BCR-ABL融合位点的两段抗原肽SSKALQRPV(SS)、GFKQSSKAL(GF)为靶点, 与胞质转导肽融合表达, 负载小鼠骨髓源性树突状细胞。在胞质转导肽介导下, SS、GF短肽进入树突状细胞并定位于内质网, 具备了被树突状细胞识别为内源性抗原并以MHC I类分子递呈的条件。在体外培养中, 用致敏的树突状细胞刺激脾脏CD8⁺ T淋巴细胞, 获得针对CML的细胞毒性T淋巴细胞, 同时检测该细胞毒性T淋巴细胞体外抗CML的效应。结果证实, 胞质转导肽介导的GF抗原短肽负载的树突状细胞能够诱导CD8⁺ T淋巴细胞增殖活化并产生针对CML的细胞毒性杀伤效应。因此, GF抗原肽有望作为CML免疫治疗的靶点。该研究为鉴定出靶向CML细胞的T淋巴细胞表面的特异TCR序列准备了条件, 进而为后续制备靶向CML的TCR-T细胞奠定了基础。

关键词 树突状细胞; 细胞毒性T淋巴细胞; BCR-ABL; 慢性髓细胞白血病; 胞质转导肽

Cytotoxic T Lymphocytes Sensitized *in Vitro* by Dendritic Cells Loaded with CTP-BCR-ABL Antigen Peptide Can Target and Kill CML Cells

WANG Xu¹, ZENG Dachuan¹, ZHENG Renren¹, HUANG Zhenglan¹, GAO Miao^{2*}

(¹Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics Ministry of Education, School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract BCR-ABL is a specific cytoplasmic antigen of chronic myeloid leukemia, which is suitable to be a target for immunotherapy. In this study, the two antigen peptides, SSKALQRPV (SS) and GFKQSSKAL (GF), at the BCR-ABL fusion site were selected as targets. SS and GF were respectively fused with CTP (cytoplasmic transduction peptide). The fusion peptides were used to sensitize bone marrow-derived dendritic cells of Balb/c mouse. Under the mediation of cytoplasmic transduction peptide, CTP-SS and CTP-GF peptides smoothly entered the cytoplasm of dendritic cells and located in the endoplasmic reticulum, thus having the basic conditions to be recognized as endogenous antigens and be presented to the cell surface by MHC I molecules. *In vitro* culture, the spleen CD8⁺ T lymphocytes were stimulated by dendritic cells sensitized with CTP-SS or CTP-GF to obtain cytotoxic T lymphocytes against chronic myelogenous

收稿日期: 2020-09-22 接受日期: 2020-12-10

国家自然科学基金青年基金(批准号: 81802074)和重庆市基础科学与前沿技术研究项目(批准号: cstc2018jcyjAX0726)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15023251324, E-mail: gaomiao_1@163.com

Received: September 22, 2020 Accepted: December 10, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Fund (Grant No.81802074) and Chongqing Basic Science and Frontier Technology Research Project (Grant No.cstc2018jcyjAX0726)

*Corresponding author. Tel: +86-15023251324, E-mail: gaomiao_1@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5460>

leukemia cells. Then, the effect of cytotoxic T lymphocytes against CML cells *in vitro* was tested. The results confirmed that dendritic cells loaded with CTP-GF antigen peptide could induce the proliferation and activation of CD8⁺ T lymphocytes and produce cytotoxic killing effects against CML cells. Therefore, the GF antigen peptide at the BCR-ABL fusion site is expected to be a well target for CML immunotherapy. This study prepares the conditions for identifying specific TCR sequences on the surface of T lymphocytes that target CML cells, and then lays the foundation for our subsequent preparation of TCR-T cells that target CML.

Keywords dendritic cells; cytotoxic T lymphocytes; BCR-ABL; chronic myeloid leukemia; cytoplasmic transduction peptide

慢性髓细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种恶性骨髓增生性疾病。其发病的根本原因是由于 t(9;22) (q34;q11) 产生的 *bcr-abl* 融合基因, 编码 BCR-ABL 融合蛋白, 激活 STAT5、Akt、CRKL、Erk 等信号, 促使 CML 的发生发展^[1]。目前针对 CML 患者的治疗主要是应用酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs), TKIs 对 CML 疗效显著, 极大地改善了 CML 患者的预后, 显著地延长了 CML 患者的生存期。但依然有大约 1/3 的患者对 TKIs 耐药或不耐受, 且 TKIs 对加速期和急变期患者疗效差, 以及 CML 患者对 TKIs 的终身依赖性仍是亟待解决的难题^[2]。因此, 仍需探索 CML 新的治疗手段。

引起我们关注的是, CML 是适合应用免疫治疗的疾病。首先, CML 细胞有特异性抗原, 具备免疫靶向治疗的基础条件。BCR-ABL 癌蛋白是 CML 特征性的胞质抗原, 它过表达于 99% 以上的 CML 细胞, 且其融合位点两侧的序列只表达于 CML 细胞, 正常细胞中不表达, 是 CML 的特异抗原。其次, 位于 BCR-ABL 融合位点附近的抗原肽可以经 MHC 分子递呈至 CML 细胞表面, 这就具备了被 BCR-ABL 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) 识别的基础。据报道, 横跨 BCR-ABL 融合位点的三段抗原肽 SSKALQRPV (后文简称 SS)、KQSSKALQR、GFKQSSKAL (后文简称 GF) 能够在体外诱导健康供体和 CML 患者的外周血淋巴细胞发生 CTLs 反应, 同时这些 CTLs 能够识别并杀伤 HLA 匹配的 BCR-ABL⁺ 的慢性髓细胞白血病细胞 K562, 说明这些肽能够被有效地天然加工和递呈^[3-4]。再者, BCR-ABL 蛋白为 CML 细胞存活所必需, 敲除 *bcr-abl* 的 CML 细胞不能存活, 因而 CML 细胞不可能通过缺失 BCR-ABL 发生免疫逃逸^[5]。因此, BCR-ABL 癌蛋白融合位点附近的短肽具备理想靶抗原的所有条件, CML 适合应用免疫疗法。

通常情况下, 内源性抗原经 MHC I 类分子递呈

激活 CTLs 应答, 外源性抗原经 MHC II 类分子递呈激活 Th 细胞应答。树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 作为体内功能最强大的抗原递呈细胞, 可在交叉递呈外源性肿瘤抗原后刺激机体产生抗原特异性 CTLs 应答。交叉递呈即在通常情况下经 MHC II 类分子递呈的外源性抗原被 DCs 以 MHC I 类分子递呈的过程。DCs 将外源性抗原识别为内源性抗原是实现交叉递呈的前提条件。在前期研究中, 我们将体外合成的胞质转导肽 (cytoplasmic transduction peptide, CTP) 与 BCR-ABL 融合位点的抗原短肽 (以下简称 CTP-BCR-ABL) 融合后, 负载 DCs, 借 CTP 穿透细胞膜专性定位于胞质的特性, 使 CTP-BCR-ABL 在 DC 内呈现明显的胞质定位, 从而实现外源性 BCR-ABL 抗原肽被视为内源性抗原而加工处理, DCs 得以以 MHC I 类分子交叉递呈途径将抗原肽递呈给 CD8⁺ T 细胞, T 细胞借表面的 BCR-ABL 抗原特异 TCR 识别 CML 细胞, 成功诱导了 CML 特异 CTLs 应答^[6]。然而, 之前的策略采用的是体内活化方案, 步骤繁琐, 涉及的过程主要包括从小鼠体内分离骨髓细胞制备 DCs, 接着用 CTP-BCR-ABL 抗原肽负载 DCs 后, 将其注入小鼠腹股沟淋巴结, 连续注射两次, 历时 3 周, 刺激小鼠体内 CD8⁺ T 细胞活化, 随后分离小鼠脾脏淋巴细胞在体外扩增 1 周后, 回输疾病模型鼠体内监测治疗效应。整个过程可控性差, 且历时长。

为了更快速高效地获得针对 CML 细胞的特异性 CTLs, 本研究中我们探讨体外诱导的方法。我们的方案为分离小鼠骨髓细胞, 体外诱导培养为 DCs 后, 用 CTP-BCR-ABL 抗原融合肽进行负载, 负载后的 DCs 与分离得到的小鼠脾脏 CD8⁺ T 淋巴细胞在体外共培养 3 天, 同时补充一系列细胞因子, 进而获得 CTLs。本方案的优点为诱导周期短, 且诱导过程全程可监测。同时我们比较了不同的 CTP-BCR-ABL 抗原肽诱导 CML 特异性 CTLs 的效率, 为后期基于

CTLs制备CML特异性TCR-T细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物

6周龄Balb/c雄鼠购自重庆医科大学实验动物中心。所有动物实验均符合美国国立卫生研究院关于实验动物的护理和使用指南(NIH出版物第8023号, 1978年修订), 并经重庆医科大学生物医学伦理委员会批准。

1.2 细胞

本研究实验中所用到的CML细胞均为鼠源性慢性髓细胞白血病细胞株BaF3-P210(简称BP210), 其由本课题组构建并按照常规方法传代培养。BP210是利用逆转录病毒载体将 *bcr-abl* 基因导入小鼠前B淋巴细胞株BaF3中, 筛选得到的稳定表达BCR-ABL的细胞株^[7]。

1.3 主要试剂

BCR-ABL抗原肽、CTP-BCR-ABL抗原肽、CTP-BCR-ABL-FITC及CTP肽购自上海生物工程有限公司; 小鼠脾脏淋巴细胞分离液(Ficoll)购自天津灏洋生物制品科技有限公司; 重组鼠白细胞介素-4(recombinant mouse interleukin-4, rmIL-4)、重组鼠白细胞介素-2(recombinant mouse interleukin-2, rhIL-2)、重组鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant mouse granulocyte macrophage colony-stimulating factor, rmGM-CSF)和重组鼠肿瘤坏死因子- α (recombinant mouse tumor necrosis factor- α , rmTNF- α)购自北京义翘神州生物技术有限公司; 内质网红色荧光探针(ER-Tracker Red)购自上海碧云天生物技术有限公司; CD3、CD28抗体、流式抗

体CD11c-PE、CD80-FITC、CD86-PE-cy7、MHC I-efluor 450、MHC II-APC、CD8a-FITC、CD69-APC及对应的同型对照均购自美国Ebioscience公司; CD8⁺磁珠分选试剂盒购自德国美天旎生物技术有限公司; CCK8试剂盒购自博士德生物工程有限公司; RPMI 1640培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司。

1.4 肽段合成

我们将BCR-ABL融合位点的两段抗原肽: SS、GF与CTP进行融合表达即CTP-BCR-ABL抗原肽, 以下简称CTP-SS、CTP-GF。为了方便肽段的定位, 我们在肽段序列中融合表达了FITC。具体序列见表1。

1.5 树突状细胞的体外诱导培养

取6周龄Balb/c雄鼠的股骨和胫骨, 用无血清RPMI 1640培养基将骨髓细胞从骨髓中冲出, 裂解红细胞后, PBS洗涤3遍, 用含有10 ng/mL rmIL-4、20 ng/mL rmGM-CSF的RPMI 1640完全培养基重悬, 调整骨髓细胞浓度为 2.5×10^6 个/mL, 铺至6孔板, 第3天全量换液去除悬浮细胞, 隔天半量换液, 同时补充细胞因子, 第7天加入10 ng/mL TNF- α , 以促进树突状细胞成熟。具体实验方法见参考文献[8]。

1.6 树突状细胞表面分子检测

收集刚刚分离的小鼠骨髓细胞以及培养至第8天的树突状细胞, 调整细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL, 加入CD11c-PE、CD80-FITC、CD86-PE-cy7、MHC I-efluor 450、MHC II-APC抗体, 同时设置同型对照组, 避光室温孵育30 min, 用流式细胞仪进行检测。

1.7 抗原肽负载树突状细胞

在培养的第8天, 调整细胞浓度为 1.5×10^6 个/mL, 铺

表1 BCR-ABL融合位点抗原肽及胞质转导肽序列

Table 1 The sequences of antigen peptides at the fusion site of BCR-ABL and cytoplasmic transduction peptide

简称 Abbreviation	氨基酸序列 Amino acid sequence
SS	SSKALQRPV
GF	GFKQSSKAL
CTP	GGRRARRRRRK
CTP-SS	SSKALQRPV-GGRRARRRRRK
CTP-GF	GFKQSSKAL-GGRRARRRRRK
SS-FITC	FITC-Acp-SSKALQRPV
GF-FITC	FITC-Acp-GFKQSSKAL
CTP-SS-FITC	FITC-Acp-SSKALQRPV-GGRRARRRRRK
CTP-GF-FITC	FITC-Acp-GFKQSSKAL-GGRRARRRRRK

Acp为氨基己酸, 可有效保护FITC荧光标记多肽的稳定性。

Acp is aminocaproic acid, which can effectively protect the stability of FITC fluorescent labeled polypeptides.

至12孔板中,分为三组:CTP组、CTP-GF组、CTP-SS组,分别加入相应的抗原肽至终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$,负载20 h后即致敏的树突状细胞,经全量换液,同时补充含10 ng/mL rmIL-4、20 ng/mL rmGM-CSF的RPMI 1640完全培养基继续培养,以备后续实验(后文提及的致敏树突状细胞均为此方法处理所得)。

1.8 免疫荧光技术检测抗原肽在树突状细胞中的定位

将培养成熟的树突状细胞分为四组(CTP-SS组、SS组、CTP-GF组、GF组),调整细胞浓度为 1.5×10^6 个/mL,相应肽段负载1 h后,收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, PBS洗5遍,按照说明书配制内质网红色探针工作液,重悬细胞并于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, PBS洗3遍,每组细胞用PBS重悬后制备细胞涂片,待干燥后4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS洗3遍,内质网红色探针染液复染15 min, PBS洗3遍, DAPI染核15 min, PBS洗3遍,甘油封片,用激光共聚焦显微镜观察。

1.9 磁珠分选脾脏淋巴细胞及流式细胞术鉴定

取6周龄Balb/c雄鼠的脾脏,放至装有RPMI 1640不完全培养基的研钵中研磨,将获得的细胞悬液移至无菌试管中,另取无菌试管加入小鼠脾脏淋巴细胞分离液,将上述细胞悬液缓慢加至分离液上层,分离液与细胞悬液体积比为1:1, 2 000 r/min离心20 min。吸取白膜层细胞, PBS洗3遍,加入3倍体积红细胞裂解液裂解红细胞, PBS洗3遍,即为脾脏淋巴细胞。计数,每 10^7 个细胞加入10 μL CD8 $^{+}$ 磁珠及90 μL 缓冲液,重悬后4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min,在磁力架上过柱,阳性分选,吸附在柱子上的即为CD8 $^{+}$ T淋巴细胞。调整收集的CD8 $^{+}$ T淋巴细胞的浓度为 1.0×10^6 个/mL,加入CD8a-FITC抗体,同时设置同型对照,避光室温孵育30 min,用流式细胞仪进行检测。

1.10 体外活化同种异体Balb/c小鼠脾脏淋巴细胞

收集各组致敏的树突状细胞及CD8 $^{+}$ T淋巴细胞,用含有10 ng/mL rmIL-2、10 ng/mL rmIL-4、20 ng/mL rmGM-CSF、1:1 000稀释的CD3、CD28抗体的RPMI 1640完全培养基调整细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL,按照1:1的比例铺至6孔板中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养3天,即为细胞毒性T淋巴细胞。

1.11 流式细胞术检测CD8 $^{+}$ T淋巴细胞活化分子的表达情况

肽段负载后的树突状细胞与CD8 $^{+}$ T淋巴细胞共培养24 h后,收集细胞,调整细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL,

加入CD8a-FITC及CD69-APC抗体,设置同型对照组,避光室温孵育30 min,用流式细胞仪进行检测。

1.12 CCK8实验评价致敏树突状细胞刺激CD8 $^{+}$ T淋巴细胞增殖的能力

采用CCK8检测试剂盒测定各组致敏树突状细胞刺激CD8 $^{+}$ T淋巴细胞增殖的能力。将致敏树突状细胞与磁珠分选得到的CD8 $^{+}$ T淋巴细胞,按10:1、1:1、1:10、1:100的效靶比加入96孔板中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中共孵育,同时设置各效靶比下未致敏树突状细胞与CD8 $^{+}$ T淋巴细胞共孵育作为阴性对照组,单独培养基孔作为空白对照组,72 h后每孔加入1/10体积的CCK8溶液,继续孵育2 h,酶标仪测450 nm的吸光度(D)值,并计算刺激指数(stimulate index, SI), $\text{SI} = (D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{阴性对照组}} - D_{\text{空白对照组}})$ 。

1.13 CCK8实验评价CD8 $^{+}$ T淋巴细胞对BP210细胞的CTL效应

采用CCK8检测试剂盒测定CTLs对正常细胞BaF3及CML细胞株BP210的毒性。将CTLs和正常细胞BaF3或CML细胞株BP210,按20:1、40:1、80:1的效靶比加入96孔板,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中共孵育,同时设置单独靶细胞及不同效靶比下单独CTLs对照组,5 h后每孔加入1/10体积的CCK8溶液,继续孵育2 h,酶标仪测450 nm的吸光度(D)值,并计算杀伤率。杀伤率 $= [1 - (D_{\text{实验组}} - D_{\text{效应细胞组}}) / D_{\text{靶细胞组}}] \times 100\%$ 。实验组是效应细胞+靶细胞,不同效靶比的实验组中,靶细胞的数量一样,效应细胞的数量不一样。通过将各个效靶比下实验组的吸光度值减去相应的单独CTLs组的吸光度值,得到的就是靶细胞BaF3或BP210的吸光度值,能够反映CTLs对靶细胞的杀伤效应。

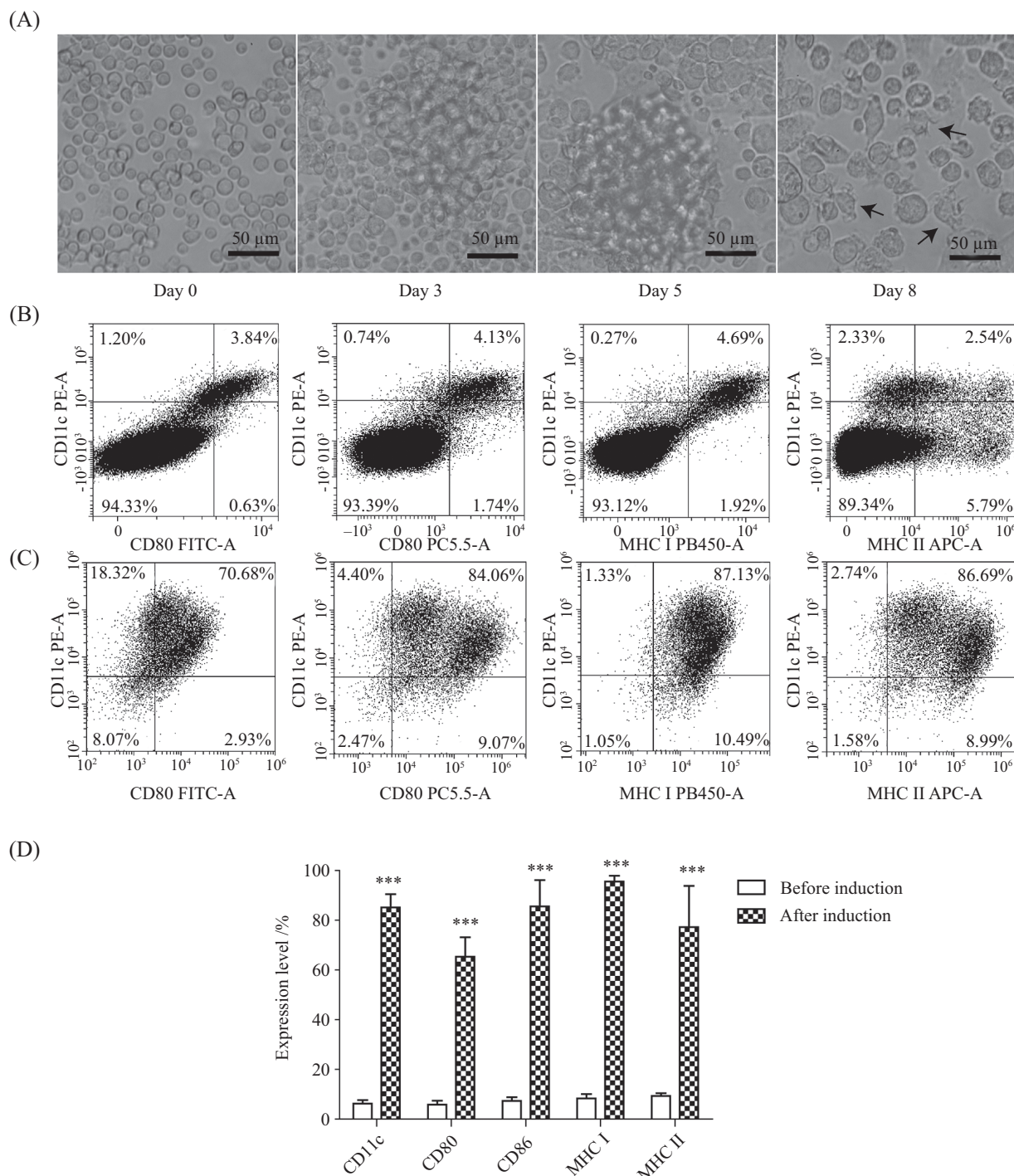
1.14 统计学分析

各实验均独立重复三次,使用GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析。定量资料结果数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外诱导培养小鼠骨髓细胞获得树突状细胞

分离6周龄Balb/c雄鼠的股骨和胫骨,用无血清培养基将细胞从骨髓中冲出,裂解红细胞后即小鼠骨髓细胞,如图1A所示,刚刚分离出的小鼠骨髓细



A: 体外诱导培养的小鼠骨髓源性树突状细胞在光镜下的形态, 箭头所示为诱导培养产生的典型的树突状细胞; B: 流式细胞术检测诱导前骨髓细胞表面分子CD11c、CD80、CD86、MHC I、II类分子的表达情况, 实验重复三次, 此为其中一次的结果; C: 流式细胞术检测经诱导后树突状细胞表面分子CD11c、CD80、CD86、MHC I、II类分子的表达情况, 实验重复三次, 此为其中一次的结果; D: 流式细胞术检测诱导前后骨髓细胞表面分子CD11c、CD80、CD86、MHC I、II类分子表达情况的统计结果, 实验重复三次, *** $P < 0.001$, 与诱导前相比。

A: the morphology of mouse bone marrow-derived dendritic cells induced *in vitro* was observed under inverted microscope, the arrows showed typical dendritic cells after induction; B: the expression of molecules on the surface of bone marrow cells before induction detected by flow cytometry, including CD11c, CD80, CD86, MHC I and II. Each experiment was repeated for three times and this was the result of one representative experiment; C: the expression of molecules on the surface of dendritic cells after induction detected by flow cytometry, including CD11c, CD80, CD86, MHC I and II. Each experiment was repeated for three times and this was the result of one representative experiment; D: the statistical results of the expression of the molecules CD11c, CD80, CD86, MHC I and II on the surface of bone marrow cells before and after induction detected by flow cytometry, *** $P < 0.001$ compared with the before induction.

图1 体外诱导培养小鼠骨髓细胞获得树突状细胞

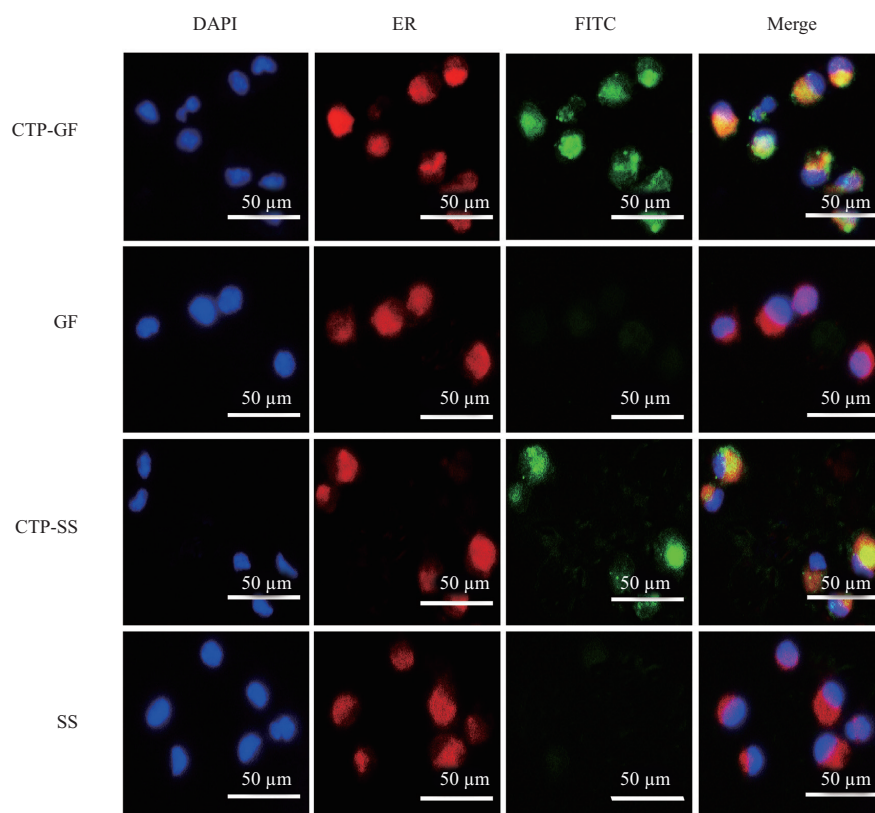
Fig.1 Induction and culture of mouse bone marrow cells *in vitro* to obtain dendritic cells

胞大小均匀, 细胞较小, 细胞表面圆润光滑, 接着我们在培养基中补充rmIL-4、rmGM-CSF细胞因子, 在细胞因子存在下, 培养第3天时, 骨髓细胞开始产生集落, 集落周围隐约可见毛刺样突起, 同时骨髓细胞逐渐向树突状细胞分化, 细胞体积变大, 培养第5天时, 集落增多, 细胞周围毛刺样突起增多。培养第7天加入成熟因子TNF- α 后, 集落散开, 镜下大部分细胞形状不规则, 毛刺样突起明显, 似蜘蛛状, 与文献报道的典型的树突状细胞形态相符^[9-11]。刚刚分离出的骨髓细胞, 我们检测其表面与树突状细胞相关的表面分子CD11c、CD80、CD86、MHC I、MHC II类分子的表达情况, CD11c与CD1a、CD83一起被认为是DCs特征性标记分子; CD80、CD86和MCH6分子是DCs表面的共刺激分子, 当其呈高表达状态标志着DCs的活化成熟; MHC I类分子在DCs表面高表达, 证明DCs具备递呈内源性分子的能力。如图1B、图1D所示, 刚分离的骨髓细胞表面CD11c表达量为 $(6.26\pm 1.16)\%$, CD80表达量为 $(5.9\pm 1.25)\%$, CD86表达量为 $(7.36\pm 1.22)\%$, MHC I

类分子表达量为 $(8.4\pm 1.44)\%$, MHC II类分子表达量为 $(9.39\pm 0.85)\%$, 均为低表达。经过7天的诱导分化, 收集细胞, 用流式细胞术检测此时细胞表面CD11c、CD80、CD86、MHC I、MHC II类分子的表达情况, 如图1C、图1D所示, 体外诱导后的树突状细胞表面分子CD11c达 $(85.2\pm 5.37)\%$, CD80达 $(65.34\pm 4.67)\%$, CD86达 $(85.62\pm 10.63)\%$, MHC I类分子达 $(95.65\pm 2.16)\%$, MHC II类分子达 $(77.3\pm 6.49)\%$, 与诱导前相比均呈现高表达, 证明诱导方法有效, 已诱导出成熟的树突状细胞, 具备加工递呈抗原的能力。

2.2 胞质转导抗原肽显著定位于胞质

SS、GF抗原肽被CTP转入DCs胞质中, 是DCs将抗原肽视为内源性抗原进而通过MHC I类分子递呈给CD8⁺ T淋巴细胞的基础。我们用细胞免疫荧光技术检测抗原肽的胞内定位并用激光共聚焦显微镜观察, 由图2可见, 相比于单独的抗原肽(GF、SS), 在CTP介导下, CTP-GF、CTP-SS抗原肽呈显著的胞质定位(FITC标记), 并与内质网呈现共定位



DAPI染细胞核; ER即ER-Tracker-Red, 染内质网; FITC标记抗原肽。

DAPI stains nucleus; ER represents ER-Tracker-Red, stains endoplasmic reticulum; FITC labels antigen peptides.

图2 免疫荧光技术检测胞质转导肽向胞内输送抗原肽的能力

Fig.2 The ability of cytoplasmic transduction peptide to deliver antigen peptides into cells detected by immunofluorescence technology

现象(ER-Tracker-Red标记)。内源性抗原正是通过被DCs输送至内质网腔进行加工才得以以MHC I类分子递呈途径被递呈。综上, 我们的实验结果证实, CTP成功将SS、GF抗原肽带入至DCs细胞内部, 同时DCs细胞将SS、GF抗原肽视为内源性抗原在内质网加工处理, 因而具备了通过MHC I类分子途径递呈给CD8⁺ T淋巴细胞的条件。

2.3 分离制备高纯度的CD8⁺ T淋巴细胞

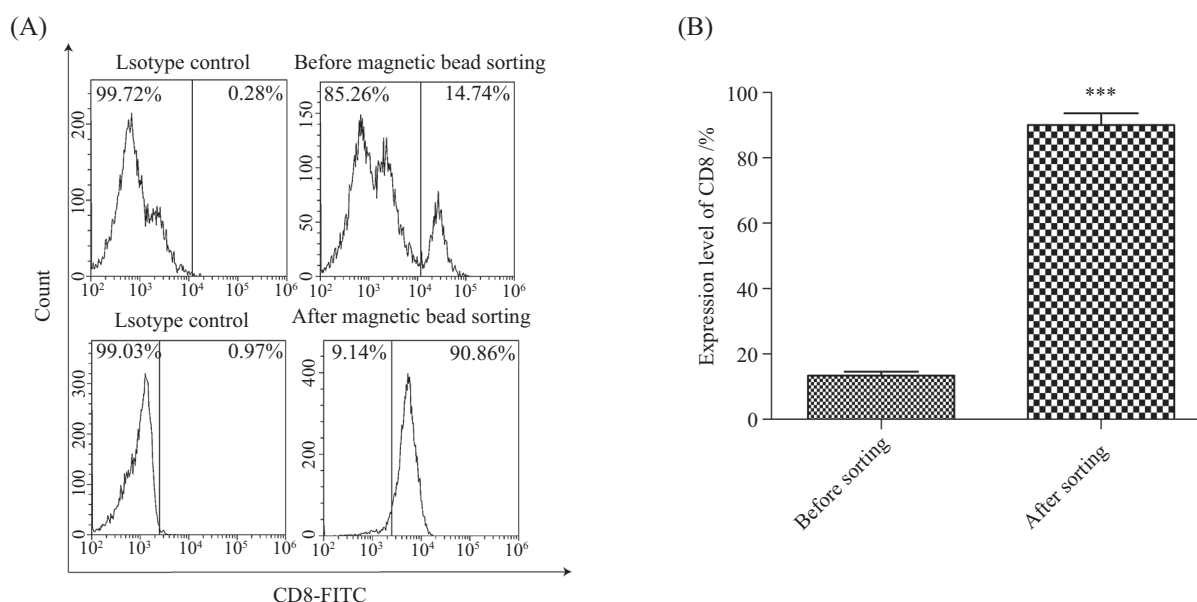
CD8⁺ T淋巴细胞也被称为细胞毒性T淋巴细胞或杀手T细胞, 是体内对靶细胞发挥特异性杀伤效应的细胞^[12], 分离制备出高纯度CD8⁺ T淋巴细胞是后续制备CML特异性CTLs的基础。我们分离出Balb/c小鼠的脾脏, 经研磨、过滤、密度梯度离心获取白膜层小鼠脾脏淋巴细胞之后, 将小鼠脾脏淋巴细胞进行磁珠分选。用流式细胞术检测磁珠分选前后的小鼠脾脏淋巴细胞中CD8⁺ T淋巴细胞的频率, 结果如图3所示: 分选前脾脏淋巴细胞CD8⁺ T淋巴细胞百分比为(13.4±1.19)%, 分选后脾脏淋巴细胞CD8⁺ T淋巴细胞百分比高达(90.05±3.62)%, 可满足后续实验的要求。

2.4 CTP-GF可有效刺激CD8⁺ T淋巴细胞

CD69分子是T淋巴细胞被激活后通过TCR信号

通路活化的最早表达于T细胞表面的活化标记, 又称活化诱导分子(activation inducer molecule, AIM)。CD69在静息的T淋巴细胞表面呈低表达趋势, 而受到刺激后在细胞表面的表达增强, 且具有较高的敏感性^[13]。我们用流式细胞术检测经各组致敏树突状细胞刺激后, CD8⁺ T淋巴细胞表面活化分子CD69的表达情况。结果显示, CTP-GF组致敏树突状细胞刺激的CD8⁺ T淋巴细胞表面活化分子CD69显著上升, 高达(42.25±1.42)%; CTP-SS组致敏树突状细胞刺激的CD8⁺ T淋巴细胞表面活化分子CD69仅轻微上调, 为(14.41±2.13)%; CTP致敏树突状细胞刺激的CD8⁺ T淋巴细胞表面活化分子CD69表达情况与对照组(未经肽段负载的DCs与CD8⁺ T淋巴细胞共培养)相比无差异(图4A和图4B)。

在受到抗原递呈细胞的有效刺激后, CD8⁺ T淋巴细胞表面的T细胞受体(T cell receptor, TCR)传递的信号将介导T细胞活化, 最明显的表现为细胞数量快速增加^[12]。因此, 负载CTP-SS、CTP-GF抗原肽的树突状细胞能否刺激CD8⁺ T淋巴细胞增殖, 是CD8⁺ T淋巴细胞活化较为直观的标志。我们采用CCK8实验检测各组致敏树突状细胞(即经CTP-SS或CTP-

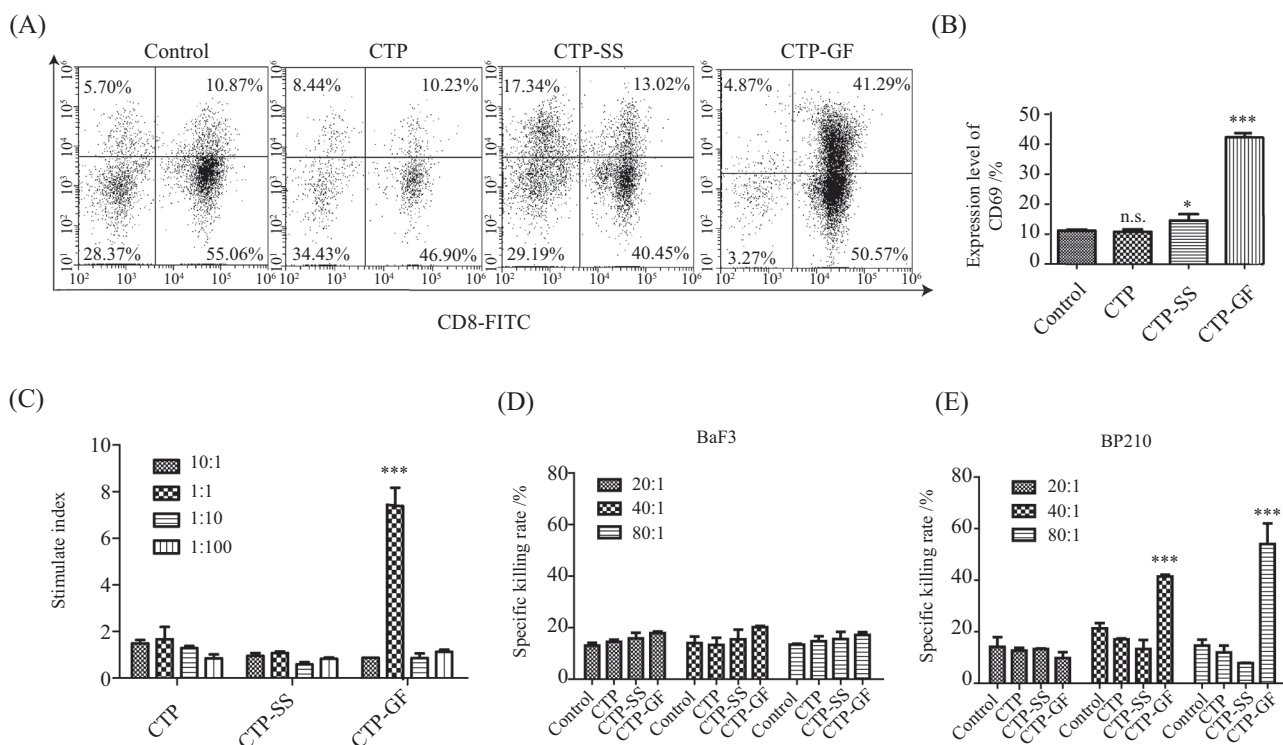


A: 流式细胞术检测CD8磁珠阳性分选前后小鼠脾脏淋巴细胞表面CD8的表达情况, 实验重复三次, 此为其中一次的结果; B: 流式细胞术检测CD8磁珠阳性分选前后小鼠脾脏淋巴细胞表面CD8表达情况的统计结果。*** $P < 0.001$, 与分选前相比。

A: detection of the expression of CD8 on the surface of mouse spleen lymphocytes before and after CD8 magnetic bead positive sorting by flow cytometry. Each experiment was repeated for three times and this was the result of one representative experiment; B: the statistical results of the expression of CD8 on the surface of mouse spleen lymphocytes before and after CD8 magnetic bead positive sorting detected by flow cytometry. *** $P < 0.001$ compared with the before sorting.

图3 流式细胞术检测磁珠分选小鼠脾脏淋巴细胞的效率

Fig.3 The sorting efficiency of magnetic beads to mouse spleen lymphocytes detected by flow cytometry



A: 流式细胞术检测各组致敏树突状细胞刺激CD8⁺T淋巴细胞表面活化分子CD69的表达情况, 实验重复三次, 此为其中一次的结果; B: 流式细胞术检测各组致敏树突状细胞刺激CD8⁺T淋巴细胞表面活化分子CD69的表达情况的统计结果; C: CCK8实验检测各组致敏树突状细胞刺激CD8⁺T淋巴细胞增殖的能力; D: CCK8实验检测各组CTLs杀伤正常细胞BaF3的情况; E: CCK8实验检测各组CTLs杀伤靶细胞BP210的情况; Control: 未经肽段负载的树突状细胞刺激的CD8⁺T淋巴细胞; CTP: 经CTP致敏树突状细胞刺激的CD8⁺T淋巴细胞; CTP-GF: 经CTP-GF致敏树突状细胞刺激的CD8⁺T淋巴细胞; CTP-SS: 经CTP-SS致敏树突状细胞刺激的CD8⁺T淋巴细胞。n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与对照组相比。

A: the expression of CD69 on the surface of CD8⁺T lymphocytes stimulated by sensitized dendritic cells in each group detected by flow cytometry. Each experiment was repeated for three times and this is the result of one representative experiment; B: statistical results of the expression of CD69 on CD8⁺T lymphocytes stimulated by sensitive dendritic cells detected by flow cytometry; C: the ability of sensitized dendritic cells to stimulate the proliferation of CD8⁺T lymphocytes detected by CCK8 experiment; D: the killing effects of CTLs on normal cells BaF3 detected by CCK8 experiment; E: the killing effects of CTLs on target cells BP210 detected by CCK8 experiment. Control represented the group which CD8⁺T lymphocytes stimulated by dendritic cells without peptide loading; CTP represented the group which CD8⁺T lymphocytes sensitized by dendritic cells loaded with CTP; CTP-GF represented the group which CD8⁺T lymphocytes sensitized by dendritic cells loaded with CTP-GF; CTP-SS represented the group which CD8⁺T lymphocytes sensitized by dendritic cells loaded with CTP-SS. n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with the control group.

图4 CTP-GF致敏树突状细胞刺激CD8⁺T淋巴细胞产生CML特异性杀伤效应

Fig.4 CTP-GF-sensitized dendritic cells stimulate CD8⁺T lymphocytes to produce specific killing effect on CML cells

GF处理的DCs)对CD8⁺T淋巴细胞增殖能力的影响。结果显示, 当刺激细胞(致敏树突状细胞)与靶细胞(CD8⁺T淋巴细胞)比例为1:1时, 刺激效果最明显, 并且CTP-GF抗原肽致敏的树突状细胞表现出了出色的刺激靶细胞增殖的能力, 但CTP-SS致敏的树突状细胞并未表现出对靶细胞明显的刺激效应(图4C)。

活化后的CD8⁺T淋巴细胞能否发挥杀伤作用, 是制备CML特异性CTLs的关键。我们通过CCK8实验检测各组CTLs杀伤正常细胞BaF3及靶细胞BP210的效率。结果如下, 与对照组相比, 各组CTLs对正常细胞BaF3杀伤效率均无差异(图4D), 证明我们制备的CTLs对正常细胞没有杀伤作用, 而对于靶

细胞BP210, 与对照组相比CTP致敏CTLs组、CTP-SS致敏CTLs组杀伤效率均无显著差异; 在效靶比40:1、80:1时, CTP-GF致敏CD8⁺T淋巴细胞杀伤率分别达(41.34±1.74)%、(53.99±3.02)%, 与对照组相比差异显著(图4E, $P<0.001$)。

以上实验结果说明, CTP-GF负载的DCs能有效刺激CD8⁺T淋巴细胞活化, 活化后的CD8⁺T淋巴细胞能够产生针对CML细胞(BP210)的杀伤效应, 证实体外诱导方案有效。

3 讨论

在本研究中, 我们将BCR-ABL融合位点附近两

段抗原短肽(GF、SS)与CTP融合表达后,负载Balb/c小鼠骨髓源性树突状细胞,并在体外致敏Balb/c小鼠脾脏CD8⁺ T淋巴细胞,随后检测了致敏的小鼠CD8⁺ T淋巴细胞在体外的抗慢性髓细胞白血病细胞的效应。通过流式细胞术检测经致敏树突状细胞刺激后的CD8⁺ T淋巴细胞表面CD69的表达、CCK8实验检测各组致敏树突状细胞对CD8⁺ T淋巴细胞增殖能力的影响、CCK8实验检测各组CTLs杀伤靶细胞情况,我们的实验结果证实,CTP-GF负载的DCs能有效刺激CD8⁺ T淋巴细胞活化,活化后的CD8⁺ T淋巴细胞能够产生针对CML细胞(BP210)的杀伤效应,证实成功制备出CML特异性CTLs。这说明我们的体外诱导方案有效,可代替体内诱导方案用于后续TCR-T细胞的研发。体内诱导方案耗时数月,而体外诱导方案缩减为数日,大大地缩短了实验周期。

本实验中,我们利用CTP专性定位于胞质的特点,采用将CTP与抗原肽融合表达的策略,以期实现将抗原肽输送至树突状细胞内部从而以内源性抗原递呈给CD8⁺ T淋巴细胞。我们的免疫荧光实验结果证实,CTP-SS、CTP-GF抗原肽在DCs中呈现显著的胞质定位并与内质网共定位(图2),这说明树突状细胞已将其视为内源性抗原并转运至内质网进行加工处理。但在后续的CTLs效应实验中,只有CTP-GF负载的树突状细胞表现出良好的促进CD8⁺ T淋巴细胞活化的作用(图4B)以及促进CD8⁺ T淋巴细胞增殖的作用(图4C),并且经过负载CTP-GF的DCs刺激后的CD8⁺ T淋巴细胞表现出明显的杀伤靶细胞作用(图4E)而对正常细胞无杀伤作用(图4D),证明GF肽段适合作为CML免疫治疗的靶点,且体外诱导方案确实有效。而经CTP-SS负载的DCs刺激的CD8⁺ T细胞未表现出杀伤效应,我们考虑可能的原因有,首先我们是在Balb/c小鼠细胞中进行验证,虽然这两段短肽已被证实能够被人HLA分子递呈,但在小鼠细胞中,SS肽可能并不能被小鼠MHC I类分子递呈,CD8⁺ T淋巴细胞也就无法识别。其次,CTP-SS肽段能够使CD8⁺ T淋巴细胞活化分子CD69轻微上调,活化程度相比于CTP-GF弱很多,且CTP-SS的促增殖效应不明显,可能由于CTP-SS的免疫原性不如CTP-GF所致,具体机制仍待探讨。最后,我们考虑即使SS可以被小鼠MHC I类分子递呈,可能在BP210细胞表面被递呈的SS的数量不如GF的数量多,相应地,被CTP-SS诱导的CD8⁺ T淋巴细胞的效应也就不如CTP-GF

所诱导的CD8⁺ T淋巴细胞。具体的GF、SS肽段效应还需在人体细胞中进一步探究。为何刺激细胞与靶细胞比例为10:1时,刺激效果反而不好(图4C),我们分析,可能是由于刺激细胞与靶细胞大小悬殊所致,致敏树突状细胞的大小比CD8⁺ T淋巴细胞的大小大了将近10倍,在培养空间体积一定、T细胞数量相同的情况下,当树突状细胞比例过大时,CD8⁺ T淋巴细胞并不能与树突状细胞更好地接触,反而树突状细胞争夺了T细胞生长所需的营养和空间。

综上所述,我们证明了胞质转导肽CTP在体外诱导树突状细胞疫苗中的作用,证实CML BCR-ABL融合位点的抗原肽GF能够在体外诱导CTLs应答。这为今后开发基于BCR-ABL融合位点抗原肽的TCR-T细胞提供了初步的实验依据,为CML的治疗提供了一种新的思路。

参考文献 (References)

- [1] SAWYERS C L. Chronic myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(17): 1330-40.
- [2] LE COUTRE P D, GILES F J, HOCHHAUS A, et al. Nilotinib in patients with Ph⁺ chronic myeloid leukemia in accelerated phase following imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results [J]. *Leukemia*, 2012, 26(6): 1189-94.
- [3] BOCCHIA M, WENTWORTH P A, SOUTHWOOD S, et al. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules [J]. *Blood*, 1995, 85(10): 2680-4.
- [4] YOTNDA P, FIRAT H, GARCIA-PONS F, et al. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(10): 2290-6.
- [5] KOLDEHOFF M, ZAKRZEWSKI J L, BEELEN D W, et al. Additive antileukemia effects by GF11B- and BCR-ABL-specific siRNA in advanced phase chronic myeloid leukemic cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(7): 421-7.
- [6] YANG H, ZHOU H, HUANG Z, et al. Induction of CML-specific immune response through cross-presentation triggered by CTP-mediated BCR-ABL-derived peptides [J]. *Cancer Lett*, 2020, 482(2020): 44-55.
- [7] 史梦, 冯文莉, 张文萍, 等. 稳定表达 BCR/ABL的小鼠BaF3-P210细胞株的建立及其生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报(SHI M, FENG W L, ZHANG W P, et al. Establishment of mouse BaF3-P210 cell line stably expressing BCR/ABL and its biological characteristics [J]. *Journal of the Third Military Medical University*), 2008, 30(19): 1791-4.
- [8] RONEY K. Bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1960(2019): 57-62.
- [9] 王翼寅, 陈睿, 汪琨, 等. 小鼠骨髓源树突状细胞的体外培养及鉴定[J]. 昆明医科大学学报(WANG Y Y, CHEN R, WANG J, et al. Culture and identification of dendritic cells derived from mouse bone marrow *in vitro* [J]. *Journal of Kunming Medical University*), 2013, 34(11): 5-8.

- [10] 罗建飞, 陈必成, 陈忠华. 小鼠骨髓来源树突状细胞和DC2.4形态与功能比较[J]. 中国康复(LUO J F, CHEN B C, CHEN Z H. Comparison of morphology and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells and DC2.4 [J]. China Rehabilitation), 2005, 20(3): 145-6.
- [11] 刘钟, 胡燕燕, 陈金波, 等. 小鼠骨髓来源树突状细胞体外诱导培养及其不同生长状态差异性探索[J]. 重庆医科大学学报(LIU Z, HU Y Y, CHEN J B, et al. *In vitro* induction and culture of dendritic cells derived from mouse bone marrow and exploration of the differences in different growth states [J]. Journal of Chongqing Medical University), 2020, 45(6): 1-6.
- [12] GERRITSEN B, PANDIT A. The memory of a killer T cell: models of CD8⁺ T cell differentiation [J]. Immunol Cell Biol, 2016, 94(3): 236-41.
- [13] VAZQUEZ B N, LAGUNA T, CARABANA J, et al. CD69 gene is differentially regulated in T and B cells by evolutionarily conserved promoter-distal elements [J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6513-21.