

# 纳米金颗粒负载的免疫原性多肽体外T细胞筛选

杨艳琳<sup>1</sup> 师传胤<sup>2,3</sup> 钱其军<sup>2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; <sup>2</sup>上海细胞治疗研究院, 上海 201805;

<sup>3</sup>上海细胞治疗工程技术研究中心, 上海 201805; <sup>4</sup>东方肝胆外科医院生物治疗科, 上海 201805)

**摘要** 备受关注的肿瘤免疫治疗其核心在于能够激发免疫应答的抗原表位。该文以纳米金颗粒作为筛选载体, 偶联肿瘤抗原, 体外与人外周血单个核细胞相互作用, 以酶联免疫斑点法精确检测免疫原性来筛选具有免疫原性的抗原多肽。光谱分析证明了纳米金颗粒与合成多肽的偶联, 荧光显微镜和电子显微镜直接证明细胞摄取偶联复合物, 通过检测T细胞 $\gamma$ -干扰素分泌水平证实了不同多肽的免疫原性。该文优化了实验参数(如pH、缓冲液体系以及孵育时间等), 显著地减少了从多肽合成到免疫原性分析的实验过程所需的时间, 同时, 实验规模也成功地缩小到了96孔板, 达到简单快速筛选免疫原性多肽的最终目的。

**关键词** 纳米金颗粒; 筛选; 免疫原性多肽; 抗原表位

## Gold Nanoparticle-Based *In Vitro* Screening on Immunogenic Peptides With T Cells

Yang Yanlin<sup>1</sup>, Shi Chuanyin<sup>2,3</sup>, Qian Qijun<sup>2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Science and Technology University, Hangzhou 310018, China; <sup>2</sup>Shanghai Cell Therapy Research Institute, Shanghai 201805, China; <sup>3</sup>Shanghai Engineering Research Center of Cell Therapy, Shanghai 201805, China; <sup>4</sup>Department of Biotherapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 201805, China)

**Abstract** The core of highly-anticipated immunotherapy lies on the epitope which can lead to activated immune response. This study employed gold nanoparticles (AuNP) as panning carrier to conjugate tumor antigens and incubated with peripheral blood mononuclear cell. Candidates for immunogenic peptides were screened by enzyme-linked immune spots (ELISPOT) assay. Spectrum analysis showed that synthesized peptides can be successfully conjugated to gold nanoparticles. Fluorescence microscopy and transmission electron microscopy demonstrated cellular uptake of conjugation complex. Through the IFN- $\gamma$  secretion analysis from activated T cells, immunogenicity of different peptides can thus be evaluated. This study optimized experiment parameters such as pH, buffer system, and incubation time etc; shortened the total experiment time from peptide synthesis to immunogenicity analysis; down-scaled to reaction system into 96-well plate and achieved the goal of simple and rapid screening of immunogenic peptide.

**Keywords** nanoparticles; screening; immunogenic peptide; epitope

收稿日期: 2016-04-13 接受日期: 2016-06-16

国家自然科学基金创新团体基金(批准号: 81221061)和上海工程技术研究中心特别基金(批准号: 12DZ2251600)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13311850698, E-mail: qianqj@sino-gene.com

Received: April 13, 2016 Accepted: June 16, 2016

This work was supported by the National Natural Science Funds for Creative Research Groups (Grant No.81221061) and Shanghai Engineering Technology Research Center Special Fund (Grant No.12DZ2251600)

\*Corresponding author. Tel: +86-13311850698, E-mail: qianqj@sino-gene.com

网络出版时间: 2016-08-29 16:30:49 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160829.1630.006.html>

肿瘤的免疫疗法利用T细胞对肿瘤特异性抗原的应答反应诱导免疫系统对肿瘤造成杀伤作用, 避免药物带来的常见不良反应, 改善患者的生活品质<sup>[1]</sup>, 给肿瘤治疗带来了希望, 成为肿瘤治疗的热点。免疫治疗药物, 尤其是免疫检查点抑制抗体[如细胞毒T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)和程序性死亡受体-1<sup>[2]</sup>(programmed death receptor-1, PD-1)已在某些肿瘤中具有显著疗效。由于其高度特异性、显著的有效性以及相对可控的副作用<sup>[3]</sup>, 肿瘤免疫治疗已成为越来越多肿瘤的标准治疗方式<sup>[4]</sup>, 对延长存活率有很大的帮助<sup>[5]</sup>。肿瘤的免疫治疗包括多细胞免疫疗法<sup>[6]</sup>和特异性抗肿瘤疗法<sup>[7]</sup>。杀伤性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL), 是T细胞的其中一小类, 在肿瘤细胞识别和杀伤过程中起重要作用<sup>[8]</sup>。总体而言, 特异性免疫治疗的基础在于肿瘤特异性抗原的识别与处理<sup>[9]</sup>, 无论采用肿瘤抗原疫苗和嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)方法, 其核心都是要支持免疫系统正确识别肿瘤细胞<sup>[10]</sup>。然而, 很多情况下, 能引起免疫的抗原性质是不明确的<sup>[11]</sup>。抗原特异性T细胞群在体外培养后也可能发生显著改变, 比如刺激后体外优势克隆型及次优势克隆型的减少<sup>[12]</sup>。因此, 确立一定数量的抗原表位(epitope)不仅是免疫治疗的基础, 也是持续疗效的保障。

虽然T细胞抗原在临床药物应用和研究中非常有应用前景, 但是一方面由于效应T细胞和抗原递呈细胞之间相互作用的复杂性, 另一方面是由于庞大的T细胞群和大量潜在T细胞表位的存在<sup>[13]</sup>, 使得其发现和鉴定速度过慢, 导致无法满足高效筛选的要求。在免疫干预实验中, 免疫原性的综合研究或者T细胞表位的整体性研究非常困难, 因此通常利用混合多肽来监测T细胞的应答<sup>[14]</sup>。相比过程复杂的表达克隆<sup>[14-18]</sup>和高度仪器依赖的肽洗脱<sup>[19-22]</sup>方法, 肽疫苗(peptide vaccine)能更大程度地缩短筛选潜在表位所需要的时间<sup>[23]</sup>及对大型仪器的依赖性, 提高效率及拓宽应用广度。此外, 新兴的基于分子模型计算的T细胞表位预测已取得部分成果但仍需改进<sup>[24]</sup>。多肽结合主要组织相容性复合体分子(major histocompatibility complex, MHC)的计算机预测在基于表位的疫苗发展中具有重要的实际意义, 然而该预测方法基于具免疫原性的多肽, 现有的大部分

MHC等位基因对应的抗原表位之间存在明显的差异<sup>[25]</sup>。因此, 可能需要较长时期的算法改进和实验数据支持。

在发现抗原表位的实验方法中, 除了前述较为直接的肽洗脱法, 其他方法均采用间接的T细胞应答观察, 如荧光信号<sup>[26]</sup>、四聚体流式检测<sup>[27]</sup>及细胞因子分泌检测<sup>[28]</sup>等, 抗原信息导入也同样有着各类方法<sup>[13]</sup>。纳米金颗粒(gold nanoparticle, AuNP)能有效传递免疫原性物质并且具有低生物毒性<sup>[29-30]</sup>, 是一种潜在的肿瘤免疫治疗的优良载体。目前, TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )偶联的纳米金颗粒(CYT-6091)在I期临床实验阶段中发现, 其可以通过肝脏缓慢清除<sup>[31]</sup>。纳米金颗粒被细胞摄取与清除的机制取决于尺寸, 形状和表面修饰特性。纳米金颗粒大小在13 nm到100 nm之间, 能被淋巴引流及细胞摄取, 其中, 直径在50 nm左右的颗粒显示了最高的细胞摄取率, 小于15 nm的颗粒能通过核孔<sup>[32-34]</sup>。通过核定位信号肽(nuclear localization signal peptides, NLSs)、细胞穿膜肽(cell penetrating peptides, CPPs)或者受体靶向型多肽的作用, 纳米金颗粒可以进入细胞或细胞核。在实际应用中还发现, 经过紫杉醇修饰的纳米金颗粒在肿瘤治疗中显示对正常细胞无细胞毒性<sup>[35]</sup>。这种稳定安全的特性也使纳米金颗粒能够成为表位筛选的理想载体。以纳米金颗粒为载体的转导方法与传统的电穿孔法、脂质体转染法<sup>[36-37]</sup>、腺病毒转染法等相比, 在安全和稳定方面均拥有更大的优势。

本研究通过在纳米金颗粒表面与含巯基氨基酸之间形成金硫键实现纳米金颗粒和多肽的共价结合, 利用光谱分析证实纳米金颗粒与合成多肽形成偶联, 荧光及电镜观察记录纳米金颗粒进入细胞, 通过T细胞是否分泌 $\gamma$ -干扰素(interferon-gamma, IFN- $\gamma$ )的鉴定实验, 验证不同多肽的免疫原性。此外, 本研究进一步优化了多个实验参数如pH、缓冲液、培养时间等, 从而显著地缩短了从合成多肽的筛选直至免疫原性分析的时间, 并且成功将筛选过程缩小至96孔板体系, 实现高效筛选的最终目的。本研究涉及的抗原表位高效筛选技术可为计算机模拟预测提供大量数据支持, 共同推动肿瘤精准免疫治疗的发展与应用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 免疫原性多肽的合成

纳米金颗粒(15 nm)可以与肿瘤相关抗原成功

偶联<sup>[32-34]</sup>, 并且经过检测证明其免疫原性。实验选用多肽编号, 名称及序列等相关信息详见表1。其中, 编号1~7号多肽为HLA-A\*0201型(MHC-I类)匹配的抗原, 显示在I/II期临床试验中均有不同程度的免疫反应<sup>[38-39]</sup>。8号多肽同为HLA-A\*0201, 由于其低免疫原性在实验中设置为阴性对照组<sup>[40]</sup>。9号多肽为anti-rat OVA257-264, 应用在细胞摄取实验中<sup>[41]</sup>。10号多肽含RGD序列。部分多肽经过荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC)修饰。细胞摄取多肽通过荧光显微镜检测。纳米金颗粒与多肽的偶联及细胞摄取等总体实验过程详见下图1。

### 1.2 纳米金颗粒与多肽偶联

室温下, 硫醇可以与纳米金颗粒在溶液环境中形成共价键<sup>[27]</sup>。首先, 将20  $\mu\text{mol/L}$ 的PEG(methoxy PEG-Thiol, 5 kDa)和20  $\mu\text{mol/L}$ 的多肽在离心管中等体积混合, 形成多肽与含巯基聚乙二醇(PEG)摩尔比为1:1。然后, 将混合物加入到15 nm柠檬酸盐包被的纳米金(1.16 nmol/L)胶体中, 形成巯基与纳米金颗粒的摩尔比(以下简称为硫金摩尔比)为2 500:1。室温搅拌金/PEG/多肽混合物1 h, 使硫醇与柠檬酸在纳米金颗粒中完全置换。然后, 12 000 r/min离心30 min富集偶联复合物。弃上清, 并用合适体积的缓冲液重悬偶联复合物。为了提高偶联效率, 需调整实验过程中的pH及缓冲液, 偶联结果通过纳米金颗粒与偶联复合物在380~610 nm波长之间吸收峰检测得到。

### 1.3 树突状细胞的制备

用血细胞分离机(Fresenius Kabi公司)分离

收集病人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。每个病人收集约 $2 \times 10^9$ 个PBMC, 用AIM-V培养基(Gibco公司)洗2遍后, 稀释至 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 。然后, 将PBMC按每孔约 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种到96孔板中培养2 h。贴壁细胞加入树突状细胞(dendritic cell, DC)培养基(含100 ng/mL GM-CSF、1 000 U/mL IL-4和50 ng/mL FLT3-L)诱导培养未成熟DC细胞。所有细胞因子均购买自Novoprotein公司。

### 1.4 293A细胞和巨噬细胞的制备

除DC细胞外, 本研究中还应用到了293A细胞和巨噬细胞。用DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培养293A细胞, 1.0 mmol/L丙酮酸钠, 100 U/mL青霉素和100  $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 加10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度条件下培养, 每3 d传代, 取对数生长期细胞用于实验。小鼠腹腔注射500  $\mu\text{L}$ 液体石蜡, 饥饿处理72 h刺激巨噬细胞生成, 收集腹腔液, 于1 000 r/min离心3 min, PBS洗3次, 加RPMI 1640, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度培养, 每3 d更换培养基。

### 1.5 细胞摄取纳米金颗粒-多肽偶联复合物

如前所述, 通过荧光显微镜检测DC细胞摄取FITC标记的纳米金颗粒-多肽复合物情况。简单地说, 将50  $\mu\text{L}$ (多肽含量为60 nmol)按上述方法配制的纳米金颗粒-多肽复合物加入到150  $\mu\text{L}$ 含有 $5 \times 10^5$ 个未成熟DC细胞的培养体系中, 培养2 h(37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度)。处理后细胞用生理盐水洗2次, 保存在生理盐水溶液中用于荧光显微镜检测。用透射

表1 多肽信息(根据参考文献[38-42]修改)

Table 1 Peptide information (modified from references [38-42])

编号 No.	多肽名称 Peptide name	序列 Peptide sequences
1	hAFP137-145	CPLFQVPEPV
2	hAFP158-166	CFMNK(FITC)FIYEI
3	hAFP325-334	CGLSPNLNRFI
4	hAFP542-550	CGVALQTMK(FITC)Q
5	MART-127-135	CAAGIGILTV
6	gp100 209-217 (210M)	CIMDQVPFSV
7	Tyrosinase 368-376 (370D)	CYMDGTMSQV
8	p53 (149-157)	CSTPPPGRTRV
9	OVA257-264	SIINFEK(FITC)L, H-2K <sup>b</sup> restricted
10	Peptide containing RGD	CK(FITC)KKKKKGGGRGDMFG

6号多肽名称中(210M)表示该多肽序列210号为甲硫氨酸; 7号多肽名称中(370D)表示该酪氨酸酶多肽序列370号为天冬氨酸。

Peptide No.6 has methionine at site 210 in its sequence as indicated by (210M) and peptide No.7 has aspartic acid at site 370 in its sequence as indicated by (370D).

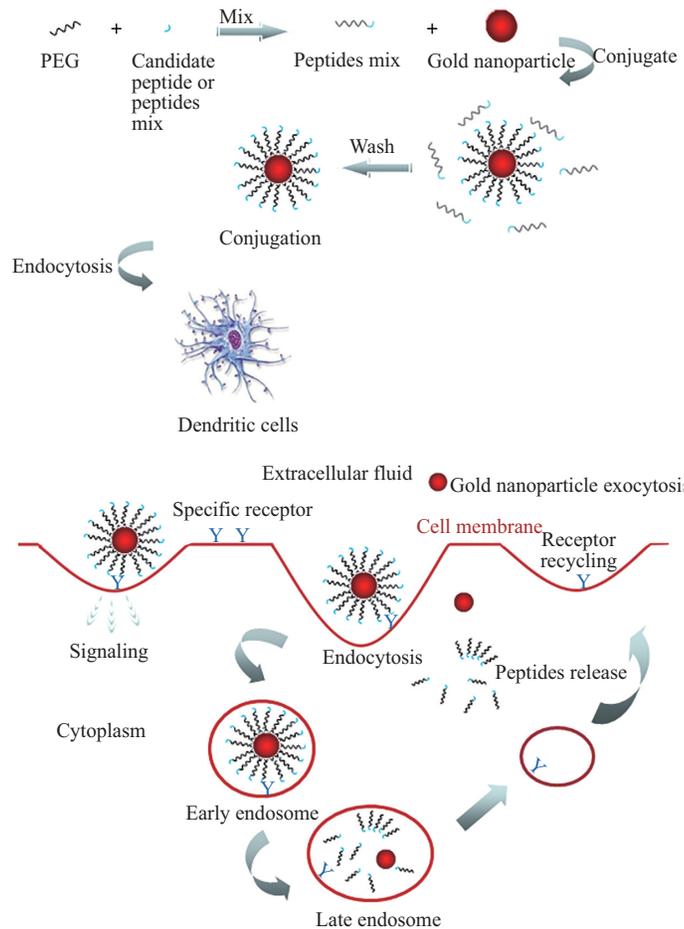


图1 纳米金颗粒介导筛选免疫原性多肽技术路线图

Fig.1 Schematic diagram of gold nanoparticle-based screening on immunogenic peptides

电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)直接观察细胞摄取纳米金颗粒能力时,由于DC细胞样本量的限制,无法满足切片要求以完成TEM观察,因此改用293A细胞检测细胞摄取纳米金颗粒的情况。方法如下,培养约 $1 \times 10^8$ 个293A细胞,用15 mL纳米金颗粒处理。处理后细胞收集并用多聚甲醛固定。使用HITACHI H-7650透射电子显微镜完成电镜实验。

### 1.6 酶联免疫斑点试验

抗原特异性T细胞应答反应是通过酶联免疫斑点试验(enzyme-linked immunospot, ELISPOT)检测IFN- $\gamma$ 的释放水平来实现的,实验设置3个对照组(分别为空白对照组、阴性对照组和阳性对照组)及不同浓度的实验组,使用人IFN- $\gamma$ 预包被ELISPOT试剂盒(达科为生物技术股份有限公司)进行检测。首先用200  $\mu$ L培养基预包被每孔,然后将100  $\mu$ L含 $1 \times 10^5$ 个细胞的液体加入到除空白对照组外的各实验孔,空白对照组加对应体积培养基。实验所用细胞为

PBMC,在阳性对照组孔加入阳性刺激剂10  $\mu$ L/孔,等体积培养基加入到阴性对照组孔,浓度梯度的纳米金颗粒-多肽复合物加入到各实验孔。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵育20 h后,在4  $^{\circ}$ C用去离子水裂解10 min。用试剂盒提供的洗液洗5遍后,每孔加100  $\mu$ L生物素偶联的IFN- $\gamma$ 单抗孵育1 h。重复上述清洗步骤后,每孔加100  $\mu$ L的链霉亲和素-HRP后孵育1 h。再重复清洗步骤后,每孔加100  $\mu$ L新鲜配置AEC显色液,并将实验板避光20 min显色。显色完成后弃溶液,用去离子水洗若干遍后,自然晾干实验板,用Bioreader 4000-PRO-X(Bio-Sys, Germany)读板仪进行斑点读取,单次实验设置3个复孔进行均值统计,3次独立重复实验后,采用Origin 8.0软件进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 纳米金颗粒和免疫原性多肽的偶联

各参数最优的情况下,实验结果显示,纳米金颗粒与免疫原性多肽的偶联仅可在等电点附近或微

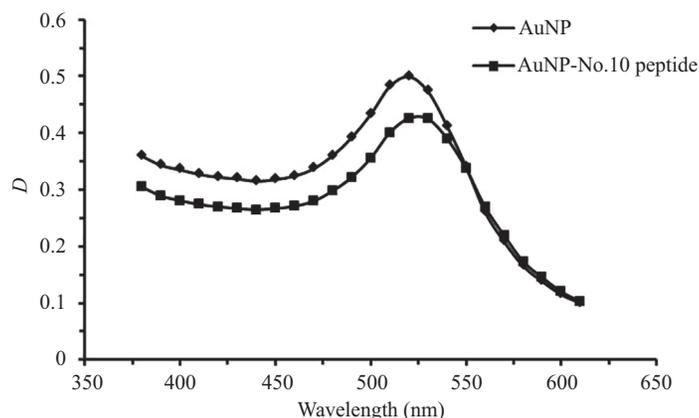
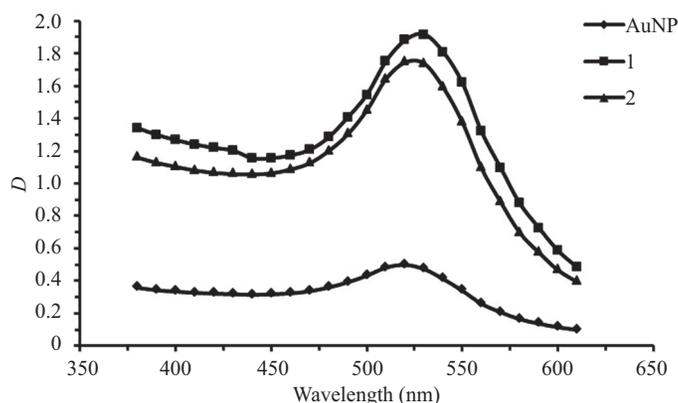


图2 等电点下纳米金颗粒与多肽偶联

Fig.2 AuNP-peptide conjugation at isoelectric point



图中所用多肽为[SIINFEK(FITC)L, H-2 KB restricted], 曲线1为纳米金颗粒与9号多肽成功偶联后用含0.2% Tween 20的乙醇溶液重悬后的结果, 曲线2为同样多肽偶联后用生理盐水重悬后的结果。

Peptide sequence SIINFEK(FITC)L was chosen in current graph. AuNP conjugating with peptide No.9 and resuspension with ethanol solution containing 0.2% Tween 20 was shown as curve 1 while its resuspension with physiological saline was shown as curve 2.

图3 不同稀释剂对纳米金颗粒与多肽偶联效率的影响

Fig.3 The effect of different buffer on AuNP-peptide conjugation

酸性条件下获得成功。图2显示, 10号多肽[CK(FITC) KKKKKGGGRGDMFG]与纳米金颗粒在最佳pH7.5的条件下成功偶联。如果pH不适宜, 纳米金颗粒偶联效率极低, 甚至会出现沉降现象, 导致偶联失败。此外, 偶联过程中, 不同pH条件下, 多肽-PEG中间体加入到纳米金颗粒中后, 溶液颜色将发生从酒红到淡紫不同程度的改变。

实验选取9号多肽[SIINFEK(FITC)L, H-2 KB restricted]研究不同缓冲液对偶联结果的影响。在pH5.8的条件下成功偶联后, 分别用去离子水和生理盐水稀释偶联复合物。结果显示, 当实验过程中所用PEG用生理盐水稀释或者偶联复合物用生理盐水重悬时, 纳米金颗粒将出现沉降导致偶联失败。可能的原因是, 生理盐水中钠离子影响了溶液的稳定性。当PEG用去离子水稀释并且偶联复合物也用

去离子水重悬时, 偶联成功但会有少量偶联复合物将在离心管内壁上残留引起损耗。当使用含0.2% Tween 20的乙醇溶液重悬偶联复合物时, 离心管内壁残留引起的损耗将显著减少。图3显示了9号多肽[SIINFEK(FITC)L, H-2 KB restricted]在最佳pH5.8成功偶联并用含0.2% Tween 20的乙醇溶液重悬。

硫金摩尔比会随着多肽序列大小及多肽体积的改变而改变。偶联成功的关键在于形成金硫键。因此硫金摩尔比的改变, 将会直接影响免疫原性多肽半胱氨酸上巯基与金颗粒表面形成金硫键。结果显示, 当硫金摩尔比为2 500:1时, 纳米金颗粒与多肽成功偶联的效率最高。图4显示了2种不同免疫原性多肽, 9号多肽[SIINFEK(FITC)L, H-2 KB restricted]和10号多肽[CK(FITC)KKKKKGGGRGDMFG]成功与纳米金颗粒偶联。吸收值的不同显示了2种不同

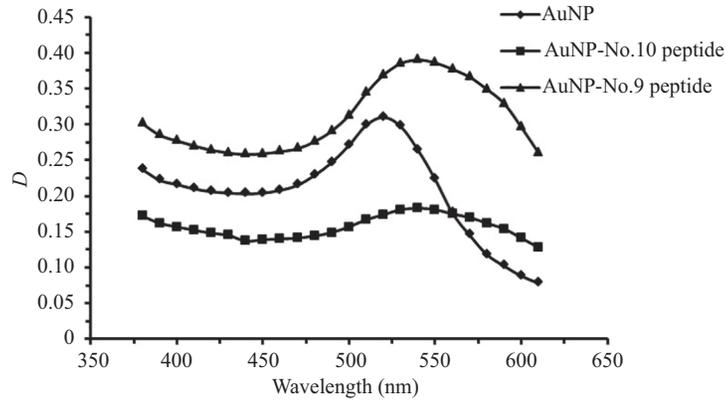


图4 不同多肽与纳米金偶联效率显示不同硫金摩尔比对偶联效率的影响

Fig.4 Characterization of AuNP-peptide conjugation process with different mole ratio of gold against thiols

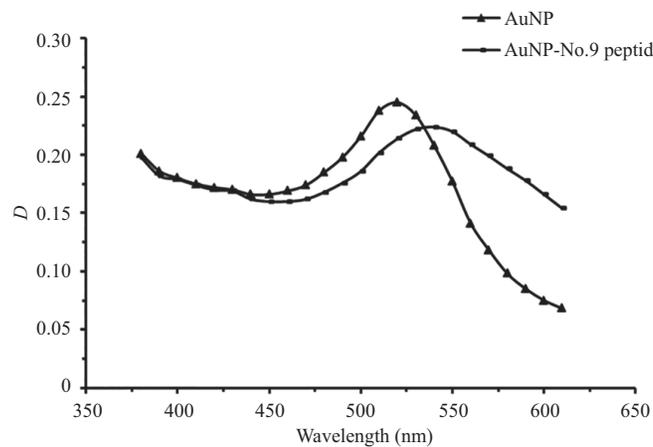


图5 纳米金与多肽在96孔板中成功偶联

Fig.5 Characterization of AuNP-peptide conjugation process in 96-well plate

硫金摩尔比下不同的偶联效率。

## 2.2 缩小体系规模实现高效筛选

为了减小偶联体系的规模,使用9号多肽[SIINFEK(FITC)L, H-2 KB restricted]在最佳pH5.8时,与纳米金颗粒偶联。在同一离心管中,混合20  $\mu\text{mol/L}$ 等体积7.2  $\mu\text{L}$ 多肽和PEG,形成摩尔比为1:1。将混合物加到粒径为15 nm的柠檬酸盐包被的100  $\mu\text{L}$ 纳米金颗粒中,室温搅拌金/PEG/多肽混合物1 h,使硫醇和柠檬酸在纳米金颗粒表面完全交换。混合完全后,将偶联复合物转移到1.5 mL离心管中,12 000 r/min离心30 min纯化偶联复合物并去除上清。用100  $\mu\text{L}$ 含0.2% Tween 20的乙醇溶液重悬偶联复合物。图5显示了380~610 nm的光谱吸收以证实偶联成功。

## 2.3 偶联复合物细胞实验及电镜评估

纳米金颗粒与多肽[SIINFEK(FITC)L, H-2 KB restricted]偶联复合物用上述方法在最佳条件下合成。将偶联复合物加入到DC细胞后,分别孵育2、

4、6、16 h,孵育处理后,细胞进行荧光显微镜检测。图6显示了细胞不同时间摄取纳米金颗粒-多肽复合物的情况,说明使用纳米金颗粒来筛选免疫原性多肽的方法是可行的,且孵育时间可缩短至2 h,即有一定数量纳米金颗粒携带抗原多肽进入细胞。

此外,偶联复合物也分别被加入到DC细胞,巨噬细胞和293A细胞中,以检测不同细胞摄取纳米金颗粒-多肽复合物的情况。图7显示了3种细胞均可以摄取纳米金颗粒-抗原多肽偶联复合物。

由于DC细胞来源限制,且上述实验已证明,293A细胞同样能有效吞噬纳米金颗粒,为满足电镜实验所需的大量细胞数,本研究采用293A细胞进行电镜实验观察细胞对纳米金颗粒-抗原多肽复合物摄取情况。结果如图8所示,可见纳米金颗粒能进入细胞,但是仍有部分聚团现象,部分实验条件可能需要进一步优化。

## 2.4 不同多肽进入细胞后的免疫原性

实验使用PBMC进行ELISPOT检测,以评价不

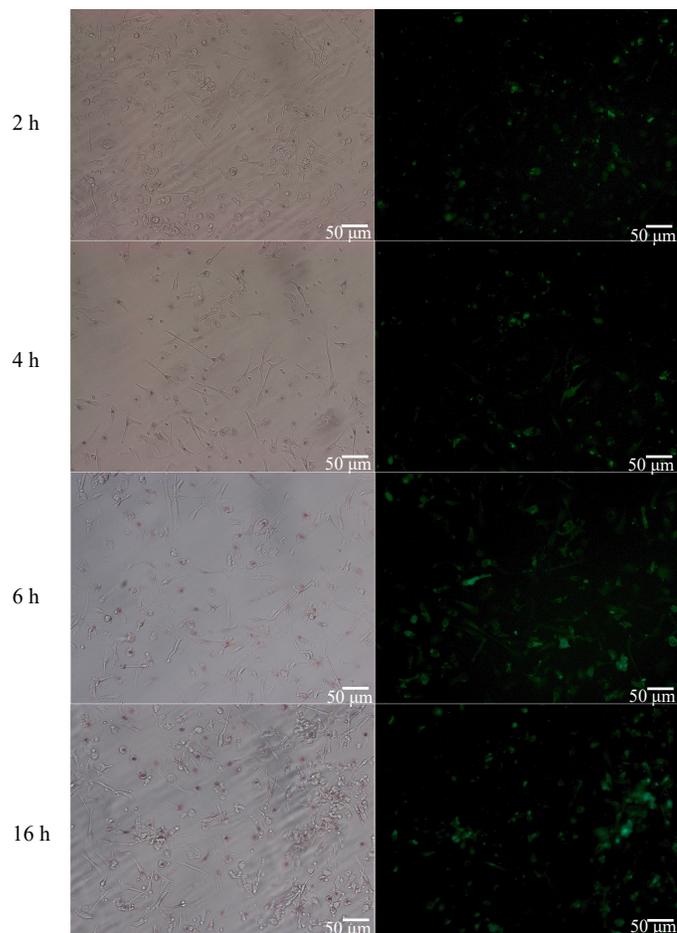


图6 DC与纳米金颗粒-多肽偶联复合物孵育不同时间后摄取情况  
Fig.6 DC uptake of AuNP-peptide complex after different incubation times

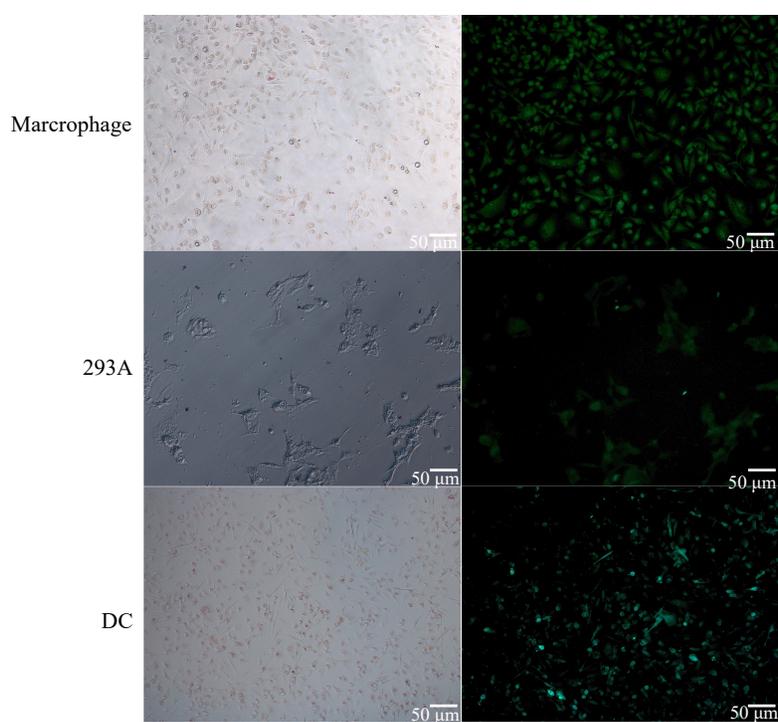
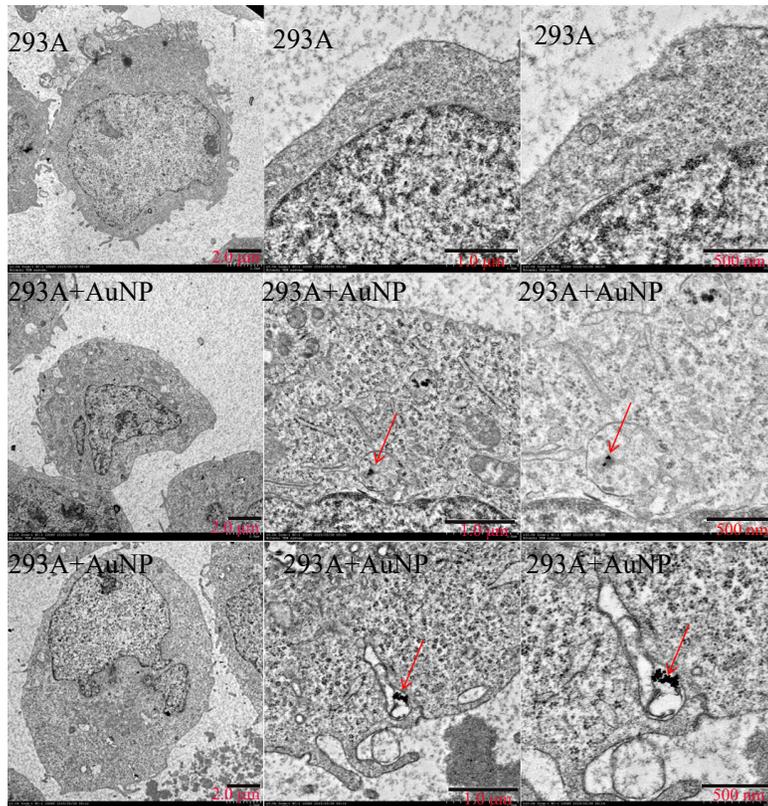


图7 不同细胞孵育4 h后摄取纳米金颗粒-多肽偶联复合物情况  
Fig.7 Uptake of AuNP-peptide complex by different cell types with 4 hours incubation

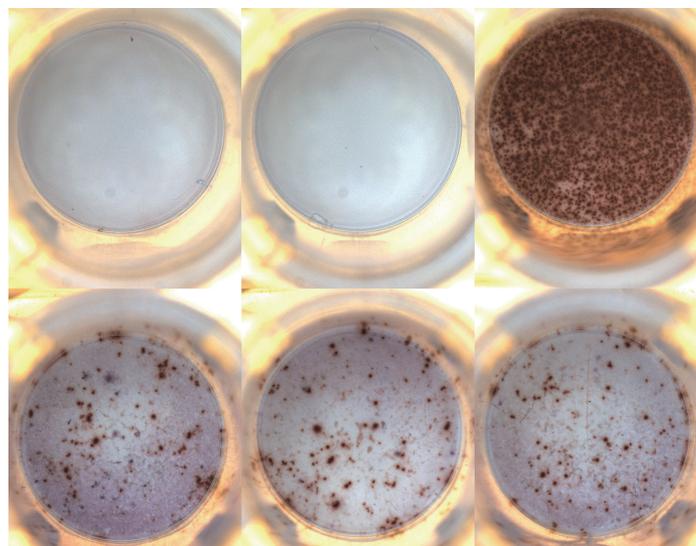


第一列图显示293A细胞全貌, 第二列图分别显示293A细胞上选取不同视野, 第三列图分别对应第二列图中视野再次放大。图中红色箭头指示纳米金颗粒在细胞内的位置。

The first column images show the full view of 293A cells. The second column images show the selected view of 293A cells, respectively. The third column images show the magnifying view in the second column images, respectively. Red arrows in image show the location of 293A cells uptake AuNP-peptide complex with endocytosis.

图8 293A细胞摄取纳米金颗粒电镜评估

Fig.8 Evaluation of 293A cellular uptake of AuNP with TEM

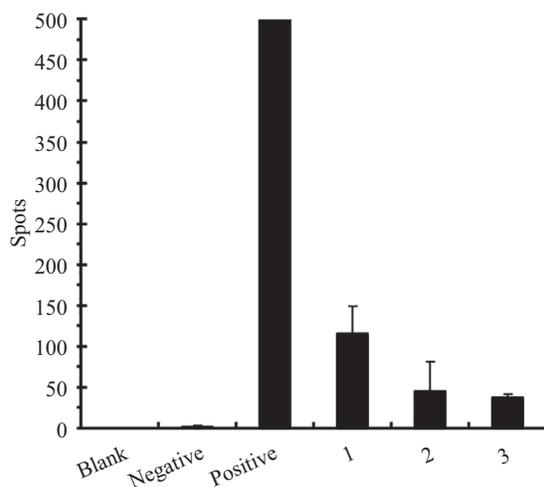


上: 从左到右为空白对照组、阴性对照组、阳性对照组。空白对照组和阴性对照组无免疫原性斑点形成, 阳性对照组有大量免疫原性斑点形成。下: 从左到右为加入纳米金颗粒-多肽偶联复合物10、20、30 μL组, 分别有不同程度的免疫原性斑点形成。

Top row: from left to right is blank, negative control and positive control. Blank and negative control both has no immunogenic spots formation. Positive control has large number of immunogenic spots formation. Bottom row: wells show immunization spots of PBMCs uptake 10, 20, 30 μL conjugation complex, respectively.

图9 ELISPOT实验检测免疫原性多肽刺激PBMC细胞形成免疫斑点

Fig.9 ELISPOT assay for immunization spots formation with immunogenicity peptides stimulation on PBMC



1、2、3组分别为加入纳米金颗粒-多肽偶联复合物10、20、30  $\mu\text{L}$ 组。

Immunization spots formation of PBMC uptake of conjugation complex with a volume of 10, 20, 30  $\mu\text{L}$  as shown in group 1, 2, 3, respectively.

图10 ELISPOT统计结果

Fig.10 Statistics of ELISPOT results

同多肽进入细胞后的免疫原性, 根据刺激T细胞分泌IFN- $\gamma$ 水平的不同证明该筛选方法的可行性。图9的结果显示, 在空白对照中无IFN- $\gamma$ 斑点形成, 而阳性对照中有大量斑点形成, 阴性对照组中有极少量斑点形成。在实验组中, 形成斑点量的不同取决于不同抗原种类及抗原数量。通过ELISPOT读板仪读取实验数据后, 结果如图10所示。数据显示, 抗原刺激PBMC形成的斑点量与所加的量并不成比例。这可能是由于PBMC细胞供者所患疾病种类或恶性程度不同所致。所加偶联复合物为10  $\mu\text{L}$ 实验组比其他两组形成明显多的斑点, 可能的原因是, 纳米金颗粒或残留的稀释剂如柠檬酸对细胞有一定的毒性。

### 3 讨论

随着基因测序的应用推广, 针对肿瘤的治疗势必将趋于精准化和个性化, 其应用主要包括两个方面, 即精准诊断和精准治疗。其中, 精准诊断深入基因水平对肿瘤发生原因进行定位; 治疗上的精准化则指的是针对病因的靶向用药。精准医疗作为一种新型的医学概念及医疗模式, 目前正受到国家的大力支持, 基因测序政策的放开也打开了精准医疗产业化的大门。免疫治疗作为继手术、放疗和化疗之后的第四大肿瘤治疗技术, 其核心要素抗原表位的筛选必将成为肿瘤免疫疗法中的重要一环和常规技术。肿瘤相关免疫原性多肽来源于肿瘤, 作为识别肿瘤抗击肿瘤最直接的武器, 其免疫原性强弱直接关系到肿瘤治疗的效果。

本研究从纳米金颗粒良好的理化性质及广泛的生物学应用入手, 将其与抗原多肽进行偶联实现快速且简便的筛选。在实验过程中, 不断优化各种参数, 如纳米金颗粒与多肽偶联时的pH、缓冲液体系、稀释剂成分、硫金摩尔比、细胞摄取偶联复合物的时间等参数, 实现最优的偶联条件、最少的偶联损耗以及最短的实验时间。在多肽免疫原性实验中成功验证不同多肽的免疫原性。此外, 研究还成功实现了反应体系的缩小, 以适应高通量筛选的需求。现今, 纳米科技在生物学、医学等领域发挥着越来越重要的作用, 纳米材料的优良特性使其拥有广泛的应用前景。生化药品的研发如抗癌药、抗心血管病药、抗艾滋病和糖尿病药, 特别是DNA药物都可引入纳米材料。因此, 本研究所涉及的实验成果在抗病毒感染、肿瘤治疗、疫苗开发等方面都具有重要的理论和实际意义。已有研究表明, 粒径小于50 nm的微粒, 能穿过肝脏内皮或通过淋巴传递到达脾和骨髓, 或者携带小分子多肽或药物跨越血-脑屏障。因此, 针对纳米金颗粒的研究必将极大地推动肿瘤的免疫治疗。此外, 本研究后期可致力于寻找和设计DC细胞靶向型多肽, 可以直接利用人外周血单核细胞, 无需分离DC及T细胞, 减少细胞分离与共培养步骤。

抗原表位筛选结果最终可通过合适的方式, 转换为医疗数据呈现给研究人员、医务工作者及患者。随着数据量的逐渐丰富, 肿瘤的新的基因标志或特异/共有的分子特征可能被发现, 其治疗方法也将随

着现有经验的积累而得到简化与快速采用。本研究所涉及的实验方法可与计算机模拟及预测相结合, 利用现有的MHC分子三维结构与实验筛选出的免疫原性差异明显的几种多肽进行演算, 从抗原亲和力微观角度解释其免疫原性的区别。随着MHC分子的空间结构越来越清晰化和准确化, 多种MHC分子-抗原复合物的数学模型已被建立, 通过计算机模拟运算能预估出每种抗原与MHC分子的亲和力数值。但鉴于MHC分子亚型的多样性, 新抗原前后氨基酸序列以不同组合、不同长度形成表位的多样性, 数据庞大。目前, 该预测方法仍不够成熟, 假阳性或假阴性仍普遍存在, 需要后续耗时耗力的验证工作。因而, MHC分子与抗原的亲合力的准确预估, 仍有待于通过数据的不断积累、预测模型的不断优化来完成。此外, 研究也可覆盖MHC-I类分子及MHC-II类分子对抗原多肽的递呈能力, 这两类分子均可在免疫应答过程中受细胞因子的诱导而表达, 在肿瘤治疗中可通过提高抗原递呈细胞表面表达量达到更好的治疗效果。当多肽能稳定均匀的分散在纳米金颗粒上的时候, 进行多肽与MHC-I类及II类分子的亲和力模拟及预测, 通过计算机模拟找到这两类分子中起结合作用的关键氨基酸, 可为预测抗原递呈能力提供理论基础。

### 参考文献 (References)

- Kobold S, Duewell P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, Endres S. Immunotherapy in tumors. *Dtsch Arztebl Int* 2015; 112(48): 809-15.
- Wurz GT, Kao CJ, Degregorio MW. Novel cancer antigens for personalized immunotherapies: Latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 2016; 8(1): 4-31.
- Neves H, Kwok HF. Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clin* 2015; 3: 280-8.
- Cook AM, Lesterhuis WJ, Nowak AK, Lake RA. Chemotherapy and immunotherapy: Mapping the road ahead. *Curr Opin Immunol* 2016; 39: 23-9.
- Lopez MN, Pereda C, Segal G, Munoz L, Aguilera R, Gonzalez FE, *et al.* Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J Clin Oncol* 2009; 27(6): 945-52.
- Valteau-Couanet D, Leboulleire C, Maincent K, Tournier M, Hartmann O, Benard J, *et al.* Dendritic cells for NK/LAK activation: Rationale for multicellular immunotherapy in neuroblastoma patients. *Blood* 2002; 100(7): 2554-61.
- Zitvogel L, Kroemer G. The dilemma of anticancer therapy: Tumor-specific versus immune effects. *Blood* 2008; 112(12): 4364-5.
- Vigneron N. Human tumor antigens and cancer immunotherapy. *Bio Med Res Int* 2015; 2015: 1-17.
- Jager E, Jager D, Knuth A. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int J Cancer* 2003; 106(6): 817-20.
- Yang Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* 2015; 125(9): 3335-7.
- Ilyas S, Yang JC. Landscape of tumor antigens in T cell immunotherapy. *J Immunol* 2015; 195(11): 5117-22.
- Koning D, Costa AI, Hasrat R, Grady BPX, Spijkers S, Nanlohy N, *et al.* *In vitro* expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells distorts the T-cell repertoire. *J Immunol Methods* 2014; 405: 199-203.
- Sharma G, Holt RA. T-cell epitope discovery technologies. *Human Immunol* 2014; 75(6): 514-9.
- Chevalier MF, Bobisse S, Costa-Nunes C, Cesson V, Jichlinski P, Speiser DE, *et al.* High-throughput monitoring of human tumor-specific T-cell responses with large peptide pools. *Oncoimmunology* 2015; 4(10): e1029702.
- Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, de Plaen E, Lethe B, *et al.* The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993; 178(2): 489-95.
- Vigneron N, Ma W, Michaux A, Eynde BJ. Identifying source proteins for MHC class I-presented peptides. *Methods Mol Biol* 2013; 960: 187-207.
- Ma W, Germeau C, Vigneron N, Maernoudt AS, Morel S, Boon T, *et al.* Two new tumor-specific antigenic peptides encoded by gene MAGE-C2 and presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-A2. *Int J Cancer* 2004; 109(5): 698-702.
- Ma W, Vigneron N, Chapiro J, Stroobant V, Germeau C, Boon T, *et al.* A MAGE-C2 antigenic peptide processed by the immunoproteasome is recognized by cytolytic T cells isolated from a melanoma patient after successful immunotherapy. *Int J Cancer* 2011; 129(10): 2427-34.
- Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992; 255(5049): 1261-3.
- Henderson RA, Michel H, Sakaguchi K, Shabanowitz J, Appella E, Hunt DF, *et al.* HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: A second pathway of antigen presentation. *Science* 1992; 255(5049): 1264-6.
- Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, *et al.* Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994; 264(5159): 716-9.
- Schirle M, Keilholz W, Weber B, Gouttefangeas C, Dumrese T, Becker HD, *et al.* Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur J Immunol* 2000; 30(8): 2216-25.
- Manijeh M, Mehrnaz K, Violaine M, Hassan M, Abbas J, Mohammad R. In silico design of discontinuous peptides representative of B and T-cell epitopes from HER2-ECD as potential novel cancer peptide vaccines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(10): 5973-81.
- Zhang XW. A combination of epitope prediction and molecular docking allows for good identification of MHC class I restricted

- T-cell epitopes. *Comput Biol Chem* 2013; 45: 30-5.
- 25 Wang S, Bai Z, Han J, Tian Y, Shang X, Wang L, *et al.* Improving the prediction of HLA class I-binding peptides using a supertype-based method. *J Immunol Methods* 2014; 405: 109-20.
- 26 Hadrup SR, Bakker AH, Shu CJ, Andersen RS, van Veluw J, Hombrink P, *et al.* Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers. *Nat Meth* 2009; 6(7): 520-6.
- 27 Newell EW, Sigal N, Nair N, Kidd BA, Greenberg HB, Davis MM. Combinatorial tetramer staining and mass cytometry analysis facilitate T-cell epitope mapping and characterization. *Nat Biotech* 2013; 31(7): 623-9.
- 28 Carvalho LH, Hafalla JCR, Zavala F. ELISPOT assay to measure antigen-specific murine CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Immunol Methods* 2001; 252(1/2): 207-18.
- 29 Almeida JPM, Lin AY, Figueroa ER, Foster AE, Drezek RA. *In vivo* gold nanoparticle delivery of peptide vaccine induces anti-tumor immune response in prophylactic and therapeutic tumor models. *Small* 2015; 11(12): 1453-9.
- 30 Zhang S, Moustafa Y, Huo Q. Different interaction modes of biomolecules with citrate-capped gold nanoparticles. *ACS App Mater Interfaces* 2014; 6(23): 21184-92.
- 31 Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR, Gannon WE, Walker M, *et al.* Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res* 2010; 16(24): 6139-49.
- 32 Tian F, Yue T, Li Y, Zhang X. Computer simulation studies on the interactions between nanoparticles and cell membrane. *Sci China Chem* 2014; 57(12): 1662-71.
- 33 Yang C, Uertz J, Johan D, Chithrani BD. Peptide modified gold nanoparticles for improved cellular uptake, nuclear transport, and intracellular retention. *Nanoscale* 2014; 6(20): 12026-33.
- 34 Choi WI, Sahu A, Kim YH, Tae G. Photothermal cancer therapy and imaging based on gold nanorods. *Ann Biomed Eng* 2012; 40(2): 534-46.
- 35 Heo DN, Yang DH, Moon HJ, Lee JB, Bae MS, Lee SC, *et al.* Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy. *Biomaterials* 2012; 33(3): 856-66.
- 36 Agallou M, Margaroni M, Karagouni E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2011; 29(31): 5053-64.
- 37 Almeida e SL, Beezer A, Alem N, Clapham D, Gaisford S. Analysis of solid state calorimetric data using non-iterative strategies. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62(10): 1201-516.
- 38 Butterfield LH. A Phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four-fetoprotein peptides. *Clin Cancer Res* 2006; 12(9): 2817-25.
- 39 Lau R, Wang F, Jeffery G, Marty V, Kuniyoshi J, Bade E, *et al.* Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2001; 24(1): 66-78.
- 40 Bedrosian I. Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8<sup>+</sup> T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2003; 21(20): 3826-35.
- 41 Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Ikuta Y, *et al.* Multiple antigen-targeted immunotherapy with  $\alpha$ -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunother* 2009; 32(3): 219-31.
- 42 Demers LM, Mirkin CA, Mucic RC, Reynolds RA, Letsinger RL, Elghanian R, *et al.* A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analyti Chem* 2000; 72(22): 5535-41.