

· 基础医学 ·

PEI修饰的氢氧化铝纳米颗粒增强树突状细胞抗原提呈作用的初步研究

任宏艳¹, 康美云², 王子妤¹, 姚琦¹, 张璐瑶¹, 王永韧^{2*}

¹南京中医药大学医学院整合医学学院病理学与病理生理学系, 江苏 南京 210023; ²南京医科大学附属儿童医院血液肿瘤科, 江苏 南京 210008

[摘要] 目的:探索聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)修饰的氢氧化铝纳米颗粒(HS)增强树突状细胞(dendritic cell, DC)抗原提呈的作用及其机制。方法:DC负载PEI修饰前后的HS联合卵清蛋白(ovalbumin, OVA)抗原后与B₃Z细胞共孵育, CPRG(chlorophenol red-β-d-galactopyranoside)方法检测DC对OVA的抗原提呈能力, Western blot检测DC中泛素化OVA蛋白的表达;以不同刺激剂[干扰素(interferon, IFN)-α、R848]与负载HS/PEI-OVA的DC混合后,收集培养上清ELISA检测白介素(interleukin, IL)-12的表达,与B₃Z共孵育后CPRG方法检测不同刺激剂对HS/PEI增强DC抗原提呈的作用;DC负载HS/PEI-OVA后与OT-I T细胞共孵育,检测OT-I T细胞增殖;皮下接种小鼠黑色素瘤细胞B16-OVA构建小鼠黑色素瘤模型,探讨负载HS/PEI-OVA的DC疫苗体内诱导CD8⁺IFN-γ⁺T细胞比率上升及特异性T细胞分泌IFN-γ的能力。结果:与未经PEI修饰的HS相比,HS/PEI能显著增强DC对OVA抗原的提呈能力,并增加DC中泛素化OVA蛋白的表达及IL-12的分泌;IFN-α、R848均可进一步增强DC对HS/PEI-OVA的提呈作用;DC负载HS/PEI-OVA可显著促进OT-I T细胞的增殖;DC-HS/PEI-OVA疫苗小鼠体内能诱导高效的T细胞应答。结论:HS/PEI能显著增强DC对抗原的交叉提呈,诱导高效的T细胞应答。

[关键词] PEI; 氢氧化铝纳米颗粒; 树突状细胞; 抗原提呈

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)10-1425-07

doi:10.7655/NYDXBNS20211001

The study on the enhancement of antigen presentation in dendritic cells by polyethyleneimine modification of aluminum hydroxide nanoparticle

REN Hongyan¹, KANG Meiyun², WANG Ziyu¹, YAO Qi¹, ZHANG Luyao¹, WANG Yongren^{2*}

¹Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ²Department of Hematology and Oncology, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of polyethylenimine (PEI) modified alumina hydroxide nanoparticles (HS/PEI) on enhancing dendritic cell (DC) antigen presentation. **Methods:** DCs were loaded with HS combined with ovalbumin (OVA) antigen in the presence or absence of PEI and co-incubated with B₃Z cells. The activation of B₃Z cells was determined by CPRG assay. The expression of ubiquitinated OVA protein in DCs was detected by Western blot. After incubated with HS/PEI-OVA and different stimulants (IFN-α, R848), IL-12 expression of DCs was detected by ELISA, and the activation of B₃Z cells was determined by CPRG assay after co-incubation with B₃Z cells. DCs loaded with HS/PEI-OVA were co-incubated with CFSE-labeled OT-I T cells to detect the proliferation of OT-I T cells. The increased percentage of CD8⁺IFN-γ⁺T cells and IFN-γ secretion of specific T cells induced by DC-HS/PEI-OVA vaccine were examined in B16-OVA tumor-bearing mice. **Results:** Compared with HS without PEI, HS/PEI significantly enhanced the OVA antigen presentation ability of DCs, increased the ubiquitinated OVA protein expression and IL-12 secretion of DCs. IFN-α and R848 could further enhance the presentation of HS/PEI-OVA by DCs. HS/PEI-OVA could significantly promote OT-I T cells proliferation *in vitro* and induce efficient T-cell responses *in vivo*. **Conclusion:** HS/PEI could enhance antigen cross-presentation of DCs and induce efficient T-cell responses.

[Key words] PEI; aluminum hydroxide nanoparticle; dendritic cell; antigen presentation

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(10):1425-1431]

[基金项目] 国家自然科学基金(81502681)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangyongren@gmail.com

树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗因其在肿瘤免疫治疗中的应用而引起广泛关注。DC是启动特异性免疫应答最强大的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)。然而,DC疫苗的临床疗效往往由于缺乏能够引起充分免疫应答的有效抗原而受到限制^[1-2]。因此,增强DC对抗原的加工提呈能力是促进DC疫苗成功应用于临床的关键策略。

免疫佐剂常用来与抗原结合以增强其免疫原性进而诱导有效的免疫应答^[3-4]。氢氧化铝是近年来应用最广泛的佐剂之一。此外,由于其卓越的安全性,含铝佐剂已被美国食品和药物管理局批准用于临床^[3-7]。然而,经典的含铝佐剂只能触发适度的体液免疫应答,而无法诱导有效的细胞免疫应答。氢氧化铝纳米颗粒由微晶纳米纤维簇组成,具有优异的蛋白质吸附性能^[3,8]。许多研究表明,氢氧化铝纳米颗粒具有有效表面积大、生物相容性好、载抗原能力强等显著优势^[3,7-8]。我们之前的研究表明^[9],当抗原共价结合到 α -Al₂O₃纳米颗粒时,DC对抗原的交叉提呈效率显著提高。最近研究表明,聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)应用于基因传递系统时,可以产生较高的表面电荷和膜干涉效应,从而促进有效的基因转染^[10-11]。本文通过PEI修饰的氢氧化铝纳米颗粒HS(HS/PEI)与抗原联合后负载DC以探索HS/PEI是否能增强DC对抗原的交叉提呈诱导特异性T细胞应答及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物选用6~8周龄SPF级C57BL/6小鼠,雌性,体重18~20 g,购自扬州大学比较医学中心。6~8周龄SPF级OT-I小鼠,雌性,体重18~20 g,购自南京大学模型动物研究中心。实验动物的饲养、使用和操作均获得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准。细胞株及试剂mutuDC细胞株和B₃Z细胞株由美国波特兰肿瘤中心的胡红明教授馈赠。DMEM培养基、RPMI-1640培养基、胎牛血清、PBS(Gibco公司,美国);卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、PEI、CPRG(chlorophenol red- β -D-galactopyranoside)(Sigma公司,美国);HS(Chemtrade Chemicals公司,美国);蛋白定量检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国);R848(Invivogen公司,法国);白介素(interleukin, IL)-12检测试剂盒(eBioscience公司,美国);OVA抗体(Santa Cruz公司,美国);His标签蛋白纯化填料Ni-Sepharose excel(GE

Healthcare公司,美国);CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)(BioLegend公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及HS/PEI-OVA的制备

来源于CD11c:SV40LgT转基因C57BL/6小鼠脾脏的mutuDC细胞株在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺的DMEM培养基中培养,B₃Z细胞株(表达LacZ的H-2K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄特异性CD8⁺T细胞杂交瘤)在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺的RPMI-1640培养基中培养。将0.5 mL HS(5 mg/mL)加入1.5 mL PEI(8 000 Da, 25 mg/mL)后与OVA溶液室温下共孵育1 h制备成HS/PEI-OVA混合液。

1.2.2 CPRG法检测DC对抗原的提呈能力

mutuDC细胞(2×10^4 个,50 μ L/孔)和刺激剂[干扰素(interferon, IFN)- α 、R848]作用前后的HS/PEI-OVA(10 μ g/mL,50 μ L/孔)混合后放入96孔U底培养板,6 h后与B₃Z细胞(2×10^5 个,100 μ L/孔)37 $^{\circ}$ C共孵育过夜。离心,取上清,200 μ L PBS清洗细胞后加入CPRG工作液,37 $^{\circ}$ C孵育4 h后加入终止液(50 μ L/孔),850 g离心7 min后取上清,酶标仪595 nm波长检测吸光度。B₃Z细胞特异性识别OVA激活其中LacZ的表达,与CPRG显色底物结合后生成氯酚红,通过测定吸光度检测B₃Z细胞的活化情况。

1.2.3 Western blot检测DC中泛素化OVA蛋白的表达

mutuDC(5×10^6 个)分别与PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA(10 μ g/mL)于37 $^{\circ}$ C共孵育6 h后以PFO(perfringolysin O,100 ng/mL)处理30 min,离心后收集上清,蛋白定量检测试剂盒测定上清中的蛋白总量。按课题组之前的方法富集PFO提取液中的泛素化蛋白^[12]。将带有His6标记的泛素化蛋白纯化工具Vx3GFP融合蛋白(30 μ g/mL)加入等蛋白总量的PFO提取液中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。加入Ni-Sepharose excel层析柱颗粒,4 $^{\circ}$ C旋转混合1 h后将混合物移至层析管中进行亲和层析纯化。离心后,用含5 mmol/L咪唑的Tris-NaCl缓冲液(20 mmol/L Tris-Cl,300 mmol/L NaCl,pH 8.0)清洗树脂,最后用含250 mmol/L咪唑的Tris-NaCl缓冲液洗脱his6-Vx3GFP结合的泛素化蛋白。洗脱液在4 $^{\circ}$ C下以PBS透析过夜,将富集的泛素化蛋白保存在-80 $^{\circ}$ C。通过Western blot检测其中泛素化OVA蛋白的含量。将富集的泛素化蛋白经SDS-PAGE分离,转移到PVDF膜,加入OVA抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗膜3次后加入HRP标记的二

抗室温下孵育1 h, TBST洗膜3次后加化学发光试剂,在暗室中采用凝胶成像分析仪进行分析。

1.2.4 ELISA法检测DC负载HS/PEI-OVA后培养上清中IL-12的表达

mutuDC细胞(2×10^4 个, $50 \mu\text{L}/\text{孔}$)和刺激剂(IFN- α 、R848)作用前后的HS/PEI-OVA($10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $50 \mu\text{L}/\text{孔}$)混合后放入96孔U底培养板 37°C 孵育6 h后,收获细胞培养上清。ELISA法检测培养上清中IL-12的表达。

1.2.5 CFSE标记的OT-I T细胞增殖实验

取OT-I小鼠脾脏细胞加入CFSE染料(终浓度 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$), 37°C 孵育10 min,加入5倍体积的预冷PBS,冰上放置5 min,低温离心10 min后以RPMI-1640培养液重悬至 4×10^6 个/ mL ; 2×10^5 个DC分别与PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)于 37°C 共孵育6 h后与上述CFSE标记好的OT-I小鼠脾脏细胞(4×10^6 个)混合 37°C 共孵育5 d,流式细胞术检测CFSE标记的OT-I T细胞的增殖。

1.2.6 HS/PEI-OVA免疫后小鼠体内 $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ T细胞比率及特异性T细胞分泌IFN- γ 的检测

C57BL/6小鼠左下侧腹部下注射接种B16-OVA细胞(2×10^5 个/ $100 \mu\text{L}$)。待移植瘤生长的第7天,移植瘤有米粒大小时,随机分组,每组5只,两侧腹股沟淋巴结注射OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA(每侧 $15 \mu\text{g}/15 \mu\text{L}$),以PBS作为对照组;第12天尾静脉注射DC-OVA、DC-HS-OVA、DC-HS/PEI-OVA疫苗(每只 5×10^6 个/ $500 \mu\text{L}$),对照组注射DC-PBS(每只 5×10^6 个/ $500 \mu\text{L}$)。第16天,取小鼠脾脏和淋巴结细胞,含10%胎牛血清的RPMI-1640重悬细胞后放入48孔板(每孔 2×10^6 个/ mL),每孔加SIINFEKL($1 \mu\text{g}/\text{mL}$,

OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide)或CD3抗体($5 \mu\text{g}/\text{mL}$)再刺激12 h后,每孔加 $50 \text{ ng}/\text{mL}$ 佛波酯、 $500 \text{ ng}/\text{mL}$ 钙离子载体和 $2 \mu\text{mol}/\text{L}$ 高尔基体抑制剂继续培养6 h,收获细胞,流式细胞术检测 $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ T细胞比率;刺激72 h后,收取培养上清,ELISA检测培养上清中IFN- γ 的水平。CD3抗体作为阳性对照。

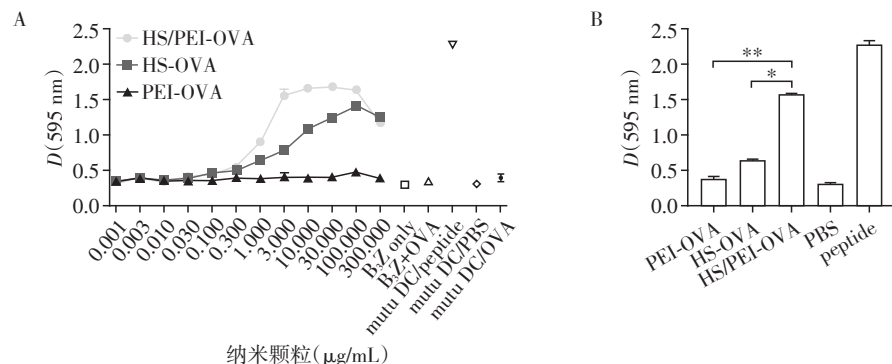
1.3 统计学方法

实验数据用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析,各组数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组定量资料比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,多组间数据两两比较采用LSD法。两组定量数据比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HS/PEI显著增强mutuDC对OVA蛋白的抗原提呈作用

为了验证HS/PEI在DC抗原提呈中的作用,将不同浓度(0.001、0.003、0.010、0.030、0.100、0.300、1.000、3.000、10.000、30.000、100.000、300.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的PEI、HS、HS/PEI分别与OVA蛋白($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)室温共孵育1 h,mutuDC负载PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA后与B₂Z细胞 37°C 孵育过夜,CPRG法检测DC对抗原的提呈能力。结果发现,随着纳米颗粒浓度上升,与PEI-OVA、HS-OVA组相比,HS/PEI-OVA组的吸光值显著上升(图1A、B)。并且当纳米颗粒浓度为 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,mutuDC负载HS/PEI-OVA对B₂Z细胞的激活已显著高于其他组(图1B),故在后续实验中,OVA蛋白浓度皆为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$,纳米颗粒浓度皆为 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。提示HS/PEI可显著增强mutuDC



A:不同浓度纳米颗粒与OVA蛋白($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)联合后,DC提呈能力的变化;B:纳米颗粒浓度为 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,DC分别负载PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA后对OVA的提呈能力。两组比较, $P < 0.05$,** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图1 CPRG法检测DC分别负载PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA后对OVA的提呈能力

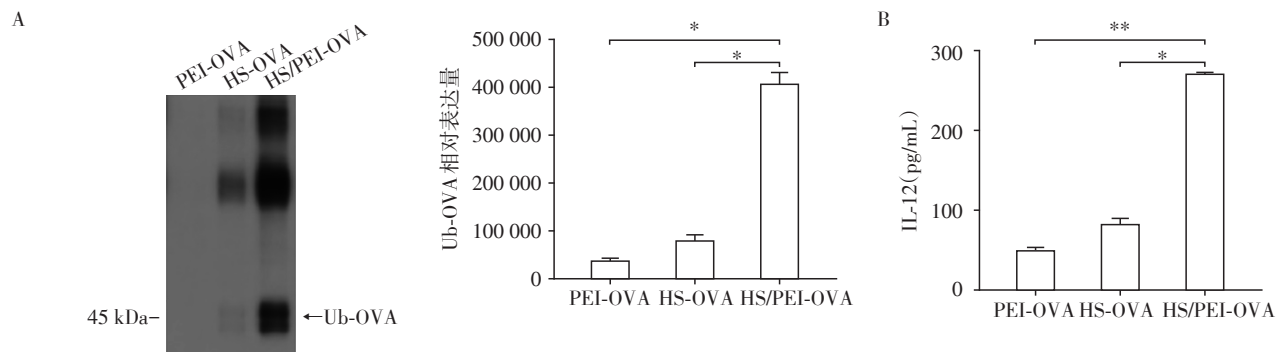
Figure 1 The efficiency of OVA cross-presentation by DCs loaded with PEI-OVA, HS-OVA or HS/PEI-OVA was determined by CPRG assay

对OVA抗原的提呈能力。

为了探讨HS/PEI增强DC抗原提呈作用的机制,mutuDC与PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA于37℃共孵育6h后加入PFO处理DC。课题组以往研究已证实泛素化蛋白能增强DC的交叉提呈刺激特异性T细胞活化^[12]。因此我们运用泛素化蛋白纯化工具Vx3GFP融合蛋白从上述PFO处理的DC上清液中富集泛素化蛋白,Western blot检测其中泛素化OVA蛋白的表达。结果显示,DC负载HS/PEI-

OVA后泛素化OVA蛋白的表达明显高于PEI-OVA和HS-OVA组(图2A)。

成熟的DC分泌多种细胞因子,其中IL-12可通过促进交叉提呈诱导有效的T细胞应答^[13-14]。为进一步探讨HS/PEI-OVA刺激对DC分泌IL-12的影响,将mutuDC分别与PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA于37℃共孵育6h后收取上清,ELISA检测细胞培养上清中IL-12的表达。结果显示,HS/PEI-OVA刺激DC分泌IL-12的水平明显高于其他两组(图2B)。



A: Western blot检测DC分别负载PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA后PFO提取液中泛素化OVA蛋白的表达;B: ELISA检测DC分别负载PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA后培养上清中IL-12的表达。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图2 HS/PEI增强DC抗原提呈能力及IL-12的分泌

Figure 2 Enhanced cross-presentation and secretion of IL-12 in DCs by HS/PEI

以上结果提示PEI修饰的经典纳米铝佐剂可显著增强DC对抗原的交叉提呈,诱导有效的T细胞应答。

2.2 IFN- α 和TLR刺激剂R848对DC提呈HS/PEI-OVA的影响

TLR和I-IFN可调节DC的成熟、抗原提呈及其诱导的抗病毒和抗肿瘤反应^[15-17]。为检测TLR和I-IFN对DC提呈HS/PEI-OVA的影响,mutuDC负载刺激剂(IFN- α 、R848)作用前后的HS/PEI-OVA于37℃孵育6h后收取上清,ELISA检测细胞培养上清中IL-12的表达;与B₃Z细胞37℃孵育过夜后,CPRG法检测DC对HS/PEI-OVA的提呈能力。结果显示,与未刺激的HS/PEI-OVA组相比,IFN- α 和R848刺激组DC分泌IL-12的水平显著升高(图3A),且能进一步刺激B₃Z细胞的活化(图3B)。提示IFN- α 、R848可进一步增强DC对HS/PEI-OVA的交叉提呈,诱导高效的T细胞应答。

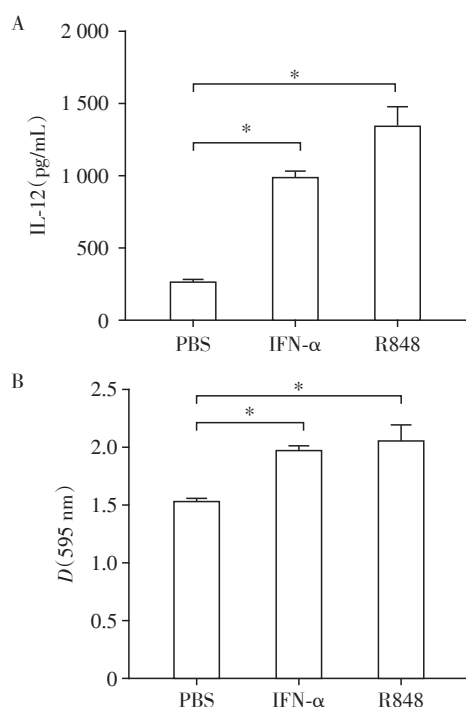
2.3 DC负载HS/PEI-OVA后显著促进OT- I T细胞的增殖

DC将抗原加工处理提呈给T细胞在刺激T细胞活化的同时也会促进T细胞的增殖。OT- I转基因小鼠CD8⁺T细胞的T细胞受体(TCR)特异性识别H-2K^b-OVA₂₅₇₋₂₆₄。将DC负载PEI-OVA、HS-OVA、

HS/PEI-OVA后与CFSE标记的OT- I小鼠脾脏细胞37℃共孵育5d,流式细胞术检测OT- I T细胞的增殖。结果显示,DC负载HS/PEI-OVA诱导OT- I T细胞的增殖(80.1%)明显高于PEI-OVA组(27.0%)和HS-OVA组(43.3%)(图4)。结果进一步证实HS/PEI能显著增强DC交叉提呈抗原诱导特异性T细胞免疫应答。

2.4 DC-HS/PEI-OVA疫苗显著增强小鼠体内CD8⁺IFN- γ ⁺T细胞比率及特异性T细胞IFN- γ 的分泌

为了观察DC-HS/PEI-OVA疫苗诱导小鼠体内T细胞活化的情况,我们建立小鼠B16-OVA黑色素瘤模型,第7天分别给予OVA、HS-OVA或HS/PEI-OVA淋巴结初次免疫,第12天DC-OVA、DC-HS-OVA或DC-HS/PEI-OVA尾静脉加强免疫(图5A)。第16天,取小鼠脾脏和淋巴结细胞,用SIINFEKL或CD3抗体再刺激12h后,流式细胞术检测CD8⁺IFN- γ ⁺T细胞比率。结果显示,HS/PEI-OVA免疫组的淋巴细胞在体外通过SIINFEKL刺激后CD8⁺IFN- γ ⁺T细胞比率明显高于OVA组、HS-OVA组和PBS对照组(图5B)。72h后,ELISA检测细胞培养上清中IFN- γ 水平。结果显示,与PBS和OVA组相比,HS-OVA免疫组的IFN- γ 水平有一定程度的升高;而HS/



A: 负载刺激剂 (IFN- α 、R848) 作用前后的 HS/PEI-OVA, ELISA 检测细胞培养上清中 IL-12 的表达; B: 与 B₃Z 细胞 37 °C 孵育过夜后, CPRG 法检测 DC 对 HS/PEI-OVA 提呈能力的变化。两组比较, * $P < 0.05$, $n=3$ 。

图3 IFN- α 和TLR刺激剂R848对DC提呈HS/PEI-OVA的影响

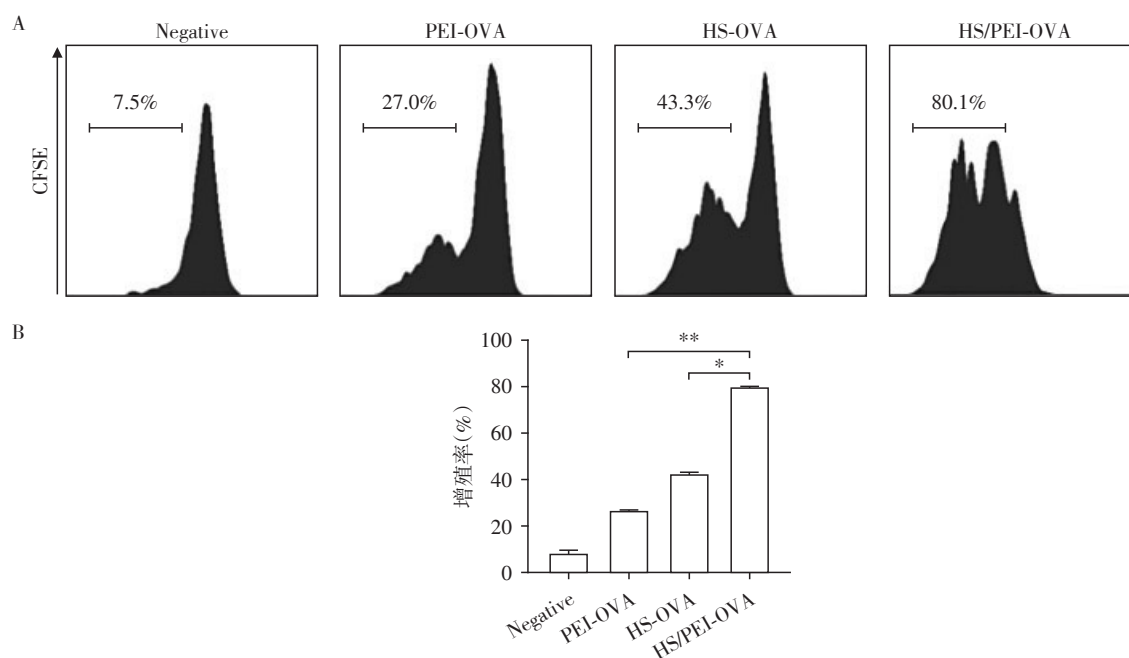
Figure 3 Cross-presentation of HS/PEI-OVA by DCs can be enhanced by IFN- α and TLR agonist R848

PEI-OVA 免疫组 IFN- γ 水平增高更显著 (图 5C)。以上结果提示 HS/PEI 在体内可显著增强 DC 对抗原的交叉提呈诱导有效的 T 细胞应答。

3 讨论

一直以来铝佐剂作为免疫增强剂被广泛应用于疫苗^[3-7]。经典的含铝佐剂只能增强抗体反应,而不能诱导有效的细胞免疫应答^[18]。已有研究证实,氢氧化铝纳米颗粒具有很强的吸附能力,可以携带可溶性蛋白^[3,8]。PEI 由于携带强正电荷在修饰纳米颗粒时可增强其表面电荷^[10]。本研究以 OVA 作为模型抗原,以 OVA 特异性 CD8⁺T 细胞杂交瘤 B₃Z 为效应细胞, CPRG 法检测 B₃Z 细胞的活化。我们发现低浓度的 OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 HS/PEI 混合后即可以引起较强的 B₃Z 反应,提示 PEI 修饰的常规铝佐剂颗粒可以显著提高 DC 抗原交叉提呈的效率。

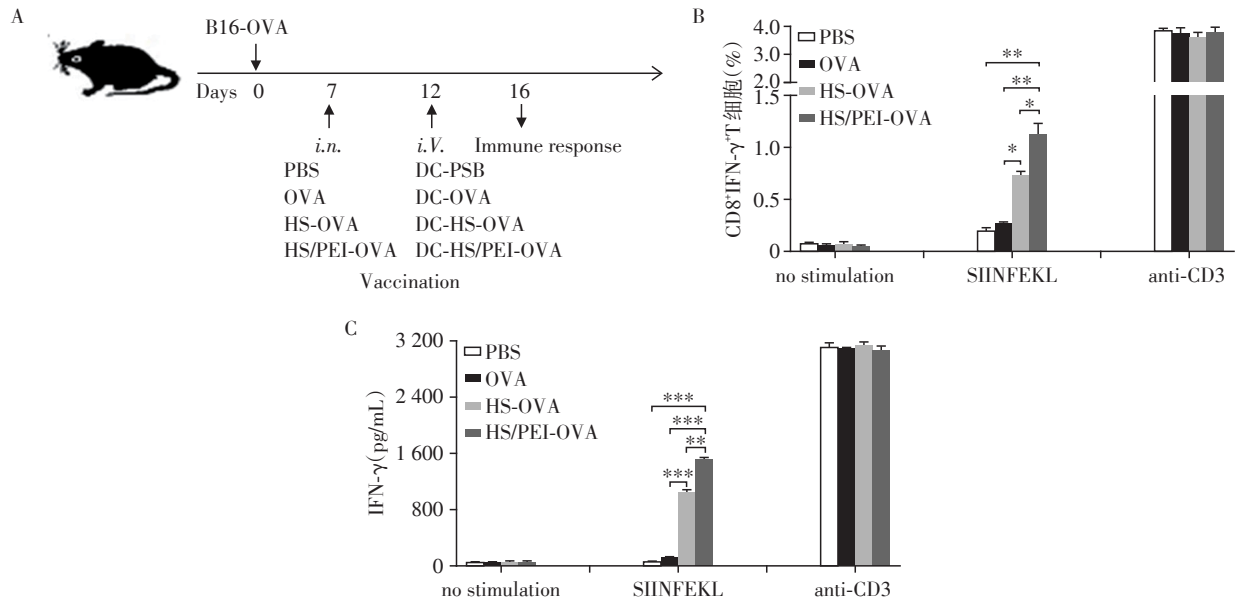
DC 中高浓度的抗原蛋白是诱导有效免疫应答的关键。本课题组已经证实,与细胞裂解液相比,泛素化蛋白能诱导更高效抗原交叉提呈^[12]。Sims 等^[19]报道了一种可以结合泛素化蛋白的工具蛋白 Vx3, 本课题组前期构建的 Vx3GFP 工具蛋白已成功分离肿瘤细胞中的泛素化蛋白^[12]。膜孔形成蛋白 PFO 可以穿透细胞膜并释放胞浆蛋白到培养基中^[20]。因此,本研究通过 Western blot 检测了 PFO 处理的 DC



DC 负载 PEI-OVA、HS-OVA、HS/PEI-OVA 后与 CFSE 标记的 OT- I 小鼠脾脏细胞 37 °C 共孵育 5 d, 流式细胞术检测 CFSE 标记的 OT- I T 细胞的增殖 (A) 及统计图 (B)。两组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图4 DC负载HS/PEI-OVA后显著促进OT- I T细胞的增殖

Figure 4 The proliferation of OT-I T cells induced by DCs loaded with HS/PEI-OVA



A:皮下接种B16-OVA黑色素瘤细胞建立荷瘤小鼠模型,分别进行OVA、HS-OVA或HS/PEI-OVA免疫;B:流式细胞术检测CD8⁺IFN- γ ⁺T细胞比率;C:ELISA检测细胞培养上清中IFN- γ 的水平。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图5 DC-HS/PEI-OVA免疫B16-OVA荷瘤小鼠后显著增强小鼠体内CD8⁺IFN- γ ⁺T细胞比率及特异性T细胞IFN- γ 的分泌
Figure 5 Vaccination with DC-HS/PEI-OVA significantly increased the percentage of CD8⁺IFN- γ ⁺T cells and IFN- γ secretion of specific T cells in the B16-OVA tumor-bearing mice

胞浆中Vx3GFP分离的泛素化抗原蛋白的表达情况。结果发现当OVA与HS/PEI结合后,DC细胞内释放的Ub-OVA明显增加。成熟DC分泌的Th1型细胞因子IL-12已证实可以促进细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答^[13-14]。通过检测DC负载OVA联合纳米颗粒后分泌IL-12的变化,我们发现DC负载HS/PEI-OVA后分泌IL-12明显增加。表明HS/PEI可通过增加DC中泛素化蛋白的表达及IL-12的分泌诱导高效的细胞免疫应答。

已证实IFN- α/β 能有效诱导DC的成熟,增强DC对抗原的交叉提呈从而激活CD8⁺T细胞^[16-17]。DC表达多种TLR,TLR的激活是DC实现有效交叉提呈的关键信号^[21]。TLR7/8激活剂R848、TLR7激动剂Imiquimod刺激DC可显著上调DC表面MHC II类分子和共刺激分子CD40、CD80、CD86的表达,并增加IFN- α 的分泌^[22-25]。本研究结果也证实了IFN- α 和R848刺激可进一步促进HS/PEI增强DC交叉提呈的作用。其他TLR刺激物Poly(I:C)、CpG、LPS等对HS/PEI增强DC交叉提呈的作用还有待进一步研究。

为了进一步探讨HS/PEI能否在小鼠体内增强DC对OVA抗原的交叉提呈进而诱导特异性CD8⁺T细胞活化,我们用OVA、HS-OVA或HS/PEI-OVA负载DC后免疫B16-OVA荷瘤小鼠,取出小鼠脾脏和淋巴结细胞后用SIINFEKL再刺激,发现HS/PEI-

OVA免疫组CD8⁺IFN- γ ⁺T细胞的比率明显增加,比其他组产生更高水平的IFN- γ 。这些结果证明了HS/PEI在体内能显著增强DC交叉提呈抗原进而诱导特异性T细胞免疫应答。

抗原的高效提呈是诱导有效T细胞免疫应答的关键。本研究证明了PEI修饰的氢氧化铝纳米颗粒(HS/PEI)能显著增强DC抗原提呈作用诱导高效的T细胞应答。更重要的是,我们进一步证明了HS/PEI联合抗原后能够在体内诱导抗原特异性的免疫应答。DC负载HS/PEI联合抗原后在抗肿瘤免疫应答方面的作用还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] GARDNER A, DE MINGO PULIDO Á, RUFFELL B. Dendritic cells and their role in immunotherapy [J]. Front Immunol, 2020, 11:924
- [2] SANTOS P M, BUTTERFIELD L H. Dendritic cell-based cancer vaccines [J]. J Immunol, 2018, 200(2):443-449
- [3] HE P, ZOU Y, HU Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism [J]. Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(2):477-488
- [4] PIELENHOFER J, SOHL J, WINDBERGS M, et al. Current progress in particle-based systems for transdermal vaccine delivery [J]. Front Immunol, 2020, 11:266
- [5] MOYER T J, KATO Y, ABRAHAM W, et al. Engineered

- immunogen binding to alum adjuvant enhances humoral immunity[J]. *Nat Med*, 2020, 26(3):430-440
- [6] DANIELSSON R, ERIKSSON H. Aluminium adjuvants in vaccines - a way to modulate the immune response [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 115:3-9
- [7] MAUGHAN C N, PRESTON S G, WILLIAMS G R. Particulate inorganic adjuvants: recent developments and future outlook [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(3):426-449
- [8] COLAPRICO A, SENESI S, FEFLICCA F, et al. Adsorption onto aluminum hydroxide adjuvant protects antigens from degradation [J]. *Vaccine*, 2020, 38(19):3600-3609
- [9] LI H, LI Y, JIAO J, et al. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy - dependent cross - presentation and potent antitumour response [J]. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6(10):645-650
- [10] LI X, CHEN Y, WANG M, et al. A mesoporous silica nanoparticle--PEI--fusogenic peptide system for siRNA delivery in cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4):1391-1401
- [11] ZHUPANYN P, EWE A, BUCH T, et al. Extracellular vesicle(ECV)-modified polyethylenimine(PEI)complexes for enhanced siRNA delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2020, 319:63-76
- [12] YU G, MOUDGIL T, CUI Z, et al. Ubiquitinated proteins isolated from tumor cells are efficient substrates for antigen cross-presentation [J]. *J Immunother*, 2017, 40(5):155-163
- [13] JUNG H J, PARK S H, CHO K M, et al. Threonyl-tRNA synthetase promotes T helper type 1 cell responses by inducing dendritic cell maturation and IL-12 production via an NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:571959
- [14] MAIERR B, LEADER A M, CHEN S T, et al. A conserved dendritic - cell regulatory program limits antitumour immunity[J].*Nature*, 2020, 580(7802):257-262
- [15] TRAN T H, TRAN T T P, TRUONG D H, et al. Toll-like receptor-targeted particles: a paradigm to manipulate the tumor microenvironment for cancer immunotherapy [J]. *Acta Biomater*, 2019, 94:82-96
- [16] SPROOTEN J, AGOSTINIS P, GARG A D. Type I interferons and dendritic cells in cancer immunotherapy [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2019, 348:217-262
- [17] SHIRLEY J L, KEELER G D, SHERMAN A, et al. Type I IFN sensing by cDCs and CD4(+)T cell help are both requisite for cross-priming of AAV capsid-specific CD8(+)T cells[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(3):758-770
- [18] CREPEAUX G, AUTHIER FJ, EXLEY C, et al. The role of aluminum adjuvants in vaccines raises issues that deserve independent, rigorous and honest science [J].*J Trace Elem Med Biol*, 2020, 62:126632
- [19] SIMS J J, SCAVONER F, COOPER E M, et al. Polyubiquitin-sensor proteins reveal localization and linkage-type dependence of cellular ubiquitin signaling [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(3):303-309
- [20] SANYAL S, CLAESSEN J H, PLOEGH H L. A viral deubiquitylating enzyme restores dislocation of substrates from the endoplasmic reticulum(ER) in semi-intact cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(28):23594-23603
- [21] LISK C, YUEN R, KUNIHOLM J, et al. Toll-Like receptor ligand based adjuvant, PorB, increases antigen deposition on germinal center follicular dendritic cells while enhancing the follicular dendritic cells network [J]. *Front Immunol*, 2020, 19:11:1254
- [22] ZHANG L, HUANG J, CHEN X, et al. Self-assembly nanovaccine containing TLR7/8 agonist and STAT3 inhibitor enhances tumor immunotherapy by augmenting tumor - specific immune response [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(8):e003132
- [23] TOY R, KEENUM M C, PRADHAN P, et al. TLR7 and RIG-I dual - adjuvant loaded nanoparticles drive broadened and synergistic responses in dendritic cells *in vitro* and generate unique cellular immune responses in influenza vaccination[J]. *J Control Release*, 2021, 330:866-877
- [24] LI S, YAO J C, LI J T, et al. TLR7/8 agonist treatment induces an increase in bone marrow resident dendritic cells and hematopoietic progenitor expansion and mobilization [J].*Exp Hematol*, 2021, 96:35-43
- [25] 弓莉,王元占,卢涛,等. TLR7激动剂Imiquimod减弱转染IL-10的小鼠髓样树突状细胞的负向调节功能[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(10):1360-1363

[收稿日期] 2021-05-11