

小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体对其脾脏 T 细胞的影响

张子寒[#], 龚桂花[#], 谢丽萍, 胡又佳^{*}

中国医药工业研究总院, 上海 201203

张子寒, 龚桂花, 谢丽萍, 胡又佳. 小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体对其脾脏 T 细胞的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 231-247.

ZHANG Zihan, GONG Guihua, XIE Liping, HU Youjia. Effect of expressing of anti-PD-1 antibody in mouse mammary gland on spleen T cells in transgenic mice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 231-247.

摘要: 为从细胞水平研究小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体对转基因鼠脾脏 T 细胞表面抗原蛋白、细胞因子表达、脾脏 CD4⁺ T 细胞增殖以及增殖相关通路的影响, 将 8 周龄未经历过怀孕的和 18 周龄经历过哺乳的表达抗人 PD-1 抗体的转基因小鼠分成两组, 每组以转基因阴性鼠为对照, 提取脾脏淋巴细胞, 检测脾脏淋巴细胞的变化。与转基因阴性小鼠相比, 乳腺表达抗 PD-1 抗体的转基因小鼠的免疫系统中的脾脏 T 细胞的效应 T 细胞比例上升, Treg 细胞比例下降, CD4⁺ T 细胞表达的 IFN- γ 、IL-17 以及 IL-2 有不同程度的增加。IL-4、IL-10 以及 TGF- β 都没有发生变化。与 T 细胞刺激相关的一些细胞表面的蛋白分子也没有引起变化。转基因阳性鼠和转基因阴性鼠中 T 细胞增殖没有显著性差异, 转基因阳性鼠中 PI3K/Akt/mTOR 和 Ras/MEK/ERK 这两条通路上的磷酸化蛋白只有部分表达上调, 整个通路没有完全上调。结果表明, 转基因小鼠作为表达抗 PD-1 抗体这类免疫系统相关单克隆抗体的宿主是可行的。

关键词: 转基因小鼠; 抗 PD-1 抗体; 脾脏 T 细胞; 细胞因子; 细胞表面抗原蛋白; 信号通路

Effect of expressing of anti-PD-1 antibody in mouse mammary gland on spleen T cells in transgenic mice

ZHANG Zihan[#], GONG Guihua[#], XIE Liping, HU Youjia^{*}

China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China

Abstract: This study aims to investigate the effect of anti-PD-1 antibody expressed in mouse mammary gland on the surface antigen protein of spleen T cells, cytokine expression, spleen CD4⁺ T cell proliferation and proliferation related pathways of transgenic mice at the cellular

资助项目: 上海市自然科学基金(19ZR1454300)

This work was supported by the Shanghai Natural Science Foundation (19ZR1454300).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: huyoujia@sinopharm.com

Received: 2022-04-17; Accepted: 2022-08-01; Published online: 2022-08-24

level. Transgenic mice expressing anti-human PD-1 antibody at 8 weeks of age without pregnancy and 18 weeks of age with lactation were divided into two groups, with transgenic negative mice in each group as the control. Spleen lymphocytes were extracted and the changes of spleen lymphocytes were detected. Compared with transgenic negative mice, the proportion of effector T cells of spleen T cells in the immune system of transgenic mice with anti-PD-1 antibody expressed in breast increased, the proportion of Treg cells decreased, and the IFN- γ , IL-17 and IL-2 expressed in CD4⁺ T cells increased in varying degrees. Moreover, IL-4, IL-10 and TGF- β in CD4⁺ T cells did not change, nor did some cell surface protein molecules related to T cell stimulate. There was no significant difference in T cell proliferation between transgenic positive and transgenic negative mice. In transgenic positive mice, the expression of phosphorylated proteins in PI3K/Akt/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways were partially up-regulated, but the whole pathway was not completely up-regulated. Therefore, it is feasible to use transgenic mice as host to express monoclonal antibodies related to immune system such as anti-PD-1 antibody.

Keywords: transgenic mice; anti-PD-1 antibody; spleen T cells; cytokine; cell surface antigen protein; signal pathway

肿瘤免疫治疗是应用免疫学原理和方法, 提高肿瘤细胞的免疫原性和对效应细胞杀伤的敏感性, 激发和增强机体抗肿瘤免疫应答, 并应用免疫细胞和效应分子输注宿主体内, 协同机体免疫系统杀伤肿瘤、抑制肿瘤生长^[1]。

近几十年来, 单克隆抗体(monoclonal antibodies, mAbs)在医学研究、临床诊断和治疗方面发挥了越来越大的作用, 占据了生物药物总产量的 30%以上^[2]。目前已上市或者正在临床试验的单克隆抗体主要是由哺乳动物细胞产生^[3], 转基因动物乳腺反应器是外源基因的理想表达场所, 转基因动物乳腺表达的蛋白经过充分的修饰加工, 具有稳定的生物活性。

PD-L1 (programmed death-ligand 1)是一种表达于细胞表面的蛋白, 又称 B7-H1 蛋白, 由 CD274 基因编辑表达^[4]。它可以与效应 T 细胞上的 PD-1 及 B7.1 结合, 传导免疫抑制信号, 抑制免疫效应 T 细胞的活性^[5]。这一过程也会导致通过 PI3K/AKT/mTOR 和 Ras/MEK/ERK 途径的信号转导减少^[6], 对效应 T 细胞功能重

要的转录因子表达减少(Tbet、Gata3 和 Eomes)以及促生存因子 Bcl-xL 表达减少^[7]。PD-L1 在许多类型的细胞中表达, 比如胎盘、血管内皮细胞、胰岛细胞、肌肉及肝细胞等。在生理条件下, PD-1/PD-L1 信号通路在胎盘、眼、脑等部位通过最大限度降低这些组织周围的免疫反应, 从而避免自身免疫性疾病的发生^[8]。在病理条件下, 肿瘤细胞 PD-L1 分子的异常高表达及其信号通路激活会抑制肿瘤特异性免疫 T 细胞的增殖及活性, 并促进其凋亡, 从而帮助肿瘤细胞实现免疫逃逸^[9]。

本实验室在已经构建好的转基因小鼠^[10]乳腺中成功表达抗 PD-1 抗体, 因为小鼠 PD-1 和人 PD-1 具有 60%的同源性, 因此在转基因鼠乳腺中表达抗人 PD-1 抗体可能会对转基因鼠的免疫系统产生一定的影响。因此本研究将从细胞水平研究小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体对转基因鼠脾脏 T 细胞表面抗原蛋白、细胞因子表达、脾脏 CD4⁺ T 细胞增殖以及增殖相关通路的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

青链霉素双抗(100×), 购自 Hyclone 公司; 动物总蛋白提取试剂盒, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 4%–20% SDS 聚丙烯酰胺预制胶, 购自天地人和生物科技有限公司; Western blotting 试剂盒、免疫荧光染色试剂盒, 购自上海酶联生物科技有限公司; 动物总蛋白提取试剂盒, 购自上海凌仪生物科技有限公司; True-Nuclear™ Mouse Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor® 488/CD4 APC/CD25 PE)、PE anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1)、PE anti-mouse CD279 (PD-1)、PE anti-mouse CD80、APC anti-mouse CD28、PE anti-mouse CD152 (CTLA-4)、APC anti-mouse CD62L、PerCP/Cy5.5 anti-mouse/human CD44、PerCP/Cy5.5 anti-mouse IL-4、APC anti-mouse IL-2、PE anti-mouse LAP (TGF-β1)、PerCP/Cy5.5 anti-mouse IFN-γ、APC anti-mouse IL-17A、PE anti-mouse IL-10、FITC anti-mouse CD4、PerCP/Cy5.5 anti-mouse/human CD11b、FITC anti-mouse CD11c、APC anti-mouse CD19、Cell Staining Buffer、TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody、RBC Lysis Buffer (10×)、Fixation Buffer、Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10×)、Cell Activation Cocktail (with Brefeldin A), Biolegend 公司; MagCollect™ Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit, R&D 公司; CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen 公司; Active Ras Detection Kit、Phospho-PI3 Kinase p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) (E3U1H) Rabbit mAb、Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb、Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP® Rabbit mAb、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/

Tyr204) (197G2) Rabbit mAb、Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) Rabbit mAb、Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb、PI3 Kinase p85 (19H8) Rabbit mAb、Ras (27H5) Rabbit mAb、p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb、mTOR (7C10) Rabbit mAb、β-Actin (D6A8) Rabbit mAb、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody、MEK1/2 (47E6) Rabbit mAb, 购自 CST 公司。

1.2 试验动物

能够在乳腺中分泌产生的抗人 PD-1 抗体的 8 周龄及 18 周龄转基因 C57BL/6 雌性小鼠, 由本实验室构建^[10]。C57BL/6 小鼠购自赛业(苏州)生物科技有限公司, 小鼠均饲养在无病原体(specific pathogen free, SPF)环境中。所有动物实验均经上海医药工业研究院药理评价研究中心实验动物伦理委员会批准(批准号: FZY2021F041)。

1.3 细胞表面免疫荧光染色

雌性 C57BL/6 小鼠在生物安全柜中取脾脏, 研磨后用 70 μm 一次性细胞过滤器过滤细胞, 细胞重悬于磷酸缓冲盐(phosphate-buffered saline, PBS)溶液中。每管加入 PBS 至终体积为 15 mL。台式离心机 350×g 离心 5 min, 去上清。将红细胞裂解液(10×)用蒸馏水稀释成 1×的工作浓度后, 每管加入 3 mL, 冰上孵育 7 min。向试管中加入 10 mL Cell Staining Buffer, 停止红细胞裂解。350×g 离心 5 min 后去上清。用 10 mL Cell Staining Buffer 重复清洗一次。计数活细胞, 并以 5×10⁶–10×10⁶ 个细胞/mL 的浓度在 Cell Staining Buffer 中重新悬浮并取 100 μL 放入 12 mm×75 mm 的流式管中。每 100 μL 细胞中加入 1.0 μg TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody, 冰上孵育 10 min 用于封闭 Fc 受体。每 100 μL 细胞中加入相应的细胞表面抗体, 终浓度为 0.2 mg/L, 常温暗处孵育 15 min。每

管加入 2 mL Cell Staining Buffer, 350×g 离心 5 min, 去上清, 洗涤 2 次。每管加入 0.5 mL Cell Staining Buffer 重悬细胞, 用流式细胞仪分析检测。

1.4 细胞内免疫荧光染色

将获得的脾脏淋巴细胞用 37 °C 预热的脾脏细胞培养基重悬, 浓度为 1×10^6 个细胞/mL, 每 mL 细胞中加入 2 μL 细胞激活混合物[Cell Activation Cocktail (with Brefeldin A)], 5% CO₂、37 °C 培养箱中孵育 6 h, 以刺激胞内细胞因子的表达。350×g 离心 5 min 收集细胞, 去上清。用 Cell Staining Buffer 洗涤两次。依照 1.3 的方法进行细胞表面染色。每 1×10^6 个细胞中加入 0.5 mL Fixation Buffer, 暗处室温固定 20 min。350×g 离心 5 min, 去上清。用蒸馏水将 Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10×) 稀释成 1×, 每 1×10^6 个细胞中加入 1 mL, 350×g 离心 5 min, 去上清, 重复两次。每 1×10^6 个细胞中加入相应浓度的细胞因子抗体, 终浓度为 0.2 mg/L, 常温暗处孵育 15 min。加入 2 mL Cell Staining Buffer, 350×g 离心 5 min, 去上清。洗涤两次。每 1×10^6 个细胞中加入 0.5 mL Cell Staining Buffer 重悬细胞, 用流式细胞仪分析检测。

1.5 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 细胞的检测

使用 True-Nuclear™ Mouse Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor® 488/CD4 APC/CD25 PE) 试剂盒进行 Treg 细胞的检测。依照 1.3 的方法进行细胞表面染色。每 1×10^6 个细胞中加入 20 μL CD4 APC/CD25 PE 的混合物, 暗处室温孵育 15 min。加入 2 mL Cell Staining Buffer, 350×g 离心 5 min, 去上清, 洗涤 2 次。每 1×10^6 个细胞中加入 1 mL 固定液(试剂盒内提供), 漩涡混匀后暗处室温孵育 45–60 min。每管细胞直接加入 2 mL Perm buffer (试剂盒内提供), 350×g

离心 5 min, 去上清。将细胞重悬于 100 μL Perm buffer 中, 每管加入 5 μL Alexa Fluor® 488 anti-mouse FOXP3 (试剂盒内提供), 暗处室温孵育 30 min。每管细胞加入 2 mL Perm buffer, 350×g 离心 5 min, 去上清。每管加入 2 mL Cell Staining Buffer, 350×g 离心 5 min, 去上清, 洗涤 2 次。每管加入 0.5 mL Cell Staining Buffer 重悬细胞, 用流式细胞仪分析检测。

1.6 T 细胞增殖实验

雌性 C57BL/6 小鼠在生物安全柜中取脾脏, 研磨后用 70 μm 一次性细胞过滤器过滤细胞, 细胞重悬于 PBS 中。每管加入 PBS 至终体积为 15 mL。350×g 离心 5 min, 去上清。将红细胞裂解液 RBC Lysis Buffer (10×) 用蒸馏水稀释成 1×的工作浓度后每管加入 3 mL, 冰上孵育 7 min。向试管中加入 10 mL PBS, 停止红细胞裂解。350×g 离心 5 min 后去上清。用 10 mL PBS 重复清洗 1 次, 计数活细胞。

从 MagCelect™ Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit 取出 10×MagCelect Buffer 用蒸馏水稀释成 1×。1×MagCelect Buffer 需置于冰上或冰箱中且在 24 h 内用完。将细胞重悬于 1×MagCelect Buffer 至浓度为 2×10^8 个细胞/mL。每 1×10^7 个细胞中加入 10 μL Mouse CD4⁺ T Cell Biotinylated Antibody Cocktail, 轻柔混匀, 防止出现气泡, 置于 2–8 °C 冰箱中孵育 15 min。随后细胞悬液中加入等体积的链霉亲和素磁流体, 轻柔混匀, 防止出现气泡, 置于 2–8 °C 冰箱中孵育 15 min。

孵育后细胞中加入一定体积的 1×MagCelect Buffer, 每 1×10^8 个细胞的终体积为 2 mL。将含有细胞悬液的离心管垂直放置于细胞分离磁力架, 室温静置 6 min, 小心吸取细胞上清液至另一干净的离心管中, 重复吸附 1 次。接着将细胞于 350×g 离心 5 min 后去

上清,用 PBS 重悬至浓度为 1×10^7 个细胞/mL。加入相同体积的 $2 \mu\text{mol/L}$ CFSE 染液, 37°C 水浴 20 min。反应液中加入 4 倍体积的 T 细胞增殖培养基吸附未结合的染料, 孵育 5 min。 $350 \times g$ 离心 5 min 后去上清, 用 T 细胞增殖培养基重悬至浓度为 1×10^6 个细胞/mL。加入刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA)使其终浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$, 将其铺入 96 孔板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, $5\% \text{CO}_2$, 37°C 培养箱中培养 4 d 后收集细胞, 流式细胞仪检测细胞增殖情况。

1.7 CD4^+ T 细胞总蛋白提取

根据动物总蛋白提取试剂盒的说明书, 向每 1 mL 预冷的裂解液中依次加入 $5 \mu\text{L}$ 磷酸酶抑制剂、 $1 \mu\text{L}$ 蛋白酶抑制剂和 $10 \mu\text{L}$ PMSF 并混匀。冰上预冷待用。将 1.6 中提取的脾脏 CD4^+ T 细胞以每 5×10^6 个细胞加入 Lysis Buffer 0.5 mL 。 4°C 、 150 r/min 摇床振荡 1 h。 4°C 、 $12\ 000 \times g$ 离心 15 min, 收集上清, 即为全蛋白提取物, 二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度, 蛋白分装至离心管 -70°C 保存。

1.8 Western blotting 检测

将 1.7 中获得的蛋白进行 Western blotting 检测^[1], 放入化学发光成像仪中显色拍照, 保存图像文件。

1.9 Ras 活性测定

根据 Ras 活性测定试剂盒的说明书, 先将试剂盒中自带的旋杯插入收集管, 加入 $100 \mu\text{L}$ 谷胱甘肽树脂, $6\ 000 \times g$ 离心 30 s, 弃去收集管中的液体。旋杯中加入 $400 \mu\text{L}$ $1 \times$ 裂解/结合/洗涤缓冲液, $6\ 000 \times g$ 离心 30 s, 弃去收集管中的液体。加入 $80 \mu\text{g}$ GST-Raf1-RBD 后, 立即加入 $500 \mu\text{g}$ 总蛋白, 关闭盖子并封上封口膜。 4°C 、 60 r/min 摇床温和振荡 1 h。将带有收集管的旋杯 $6\ 000 \times g$ 离心 30 s, 将旋杯放入新的

收集管中。用 $400 \mu\text{L}$ $1 \times$ 裂解/结合/洗涤缓冲液清洗旋杯中的树脂, $6\ 000 \times g$ 离心 30 s, 弃去离心后的液体, 重复 2 次。将旋杯放入新的收集管中, 加入 $50 \mu\text{L}$ 还原缓冲液(含 200 mmol/L DTT 的 $2 \times$ SDS 样品缓冲液)进行解吸附, 旋涡样品, 室温孵育 2 min。 $6\ 000 \times g$ 离心 30 s, 收集洗脱液, $95\text{--}100^\circ\text{C}$ 加热 5 min。样品进行 SDS 凝胶电泳后用 Ras Rabbit mAb 进行 Western blotting 检测。

1.10 数据分析

流式细胞仪的检测结果用 Flowjo (BD)软件进行分析, 数据在 GraphPad Prism7.00 (GraphPad 公司)软件中用 t 检验进行统计分析后画图。Western blotting 图谱用 Image J (National Institutes of Health)扫描后数据在 GraphPad Prism 7.00 (GraphPad)软件中用 t 检验进行统计分析后作图。

2 结果与分析

2.1 转基因小鼠 CD4^+ T 细胞表面 PD-1 表达的变化

在 8 周龄和 18 周龄经历乳汁分泌的雌鼠中, 转基因阳性鼠 CD4^+ PD-1⁺细胞的比例相较于转基因阴性鼠都有不同程度的降低, 在 8 周龄转基因阳性鼠中 CD4^+ PD-1⁺T 细胞占淋巴细胞的 $18.620\% \pm 1.261\%$ ($n=10$), 转基因阴性鼠的数值为 $22.670\% \pm 1.348\%$ ($n=9$)。经历乳汁分泌的雌鼠组, CD4^+ PD-1⁺T 细胞的比例在转基因阳性鼠($29.240\% \pm 1.119\%$, $n=7$)和转基因阴性鼠($36.79\% \pm 1.44\%$, $n=8$)之间差异要高一些(18 周降低 20.5% vs. 8 周降低 17.8%)(图 1)。以上结果说明在转基因小鼠乳腺中表达抗人 PD-1 抗体后会降低小鼠 CD4^+ PD-1⁺T 细胞的比例。同时发现, 转基因阳性小鼠在经历乳汁分泌后这种作用比没有交配的转基因阳性小鼠明显一

些, 因为 18 周龄转基因阳性鼠 $CD4^+$ PD-1⁺T 细胞比例的变化大于 8 周龄的转基因阳性鼠。

同时对这两组样本脾脏淋巴细胞中的抗原递呈细胞, 包括巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞,

表面的 PD-L1 的表达进行了检测。结果发现无论是 8 周龄的雌鼠还是 18 周龄经历乳汁分泌的雌鼠, 转基因阳性鼠和转基因阴性鼠 APC 表面的 PD-L1 的表达变化均没有显著性差异(图 2)。

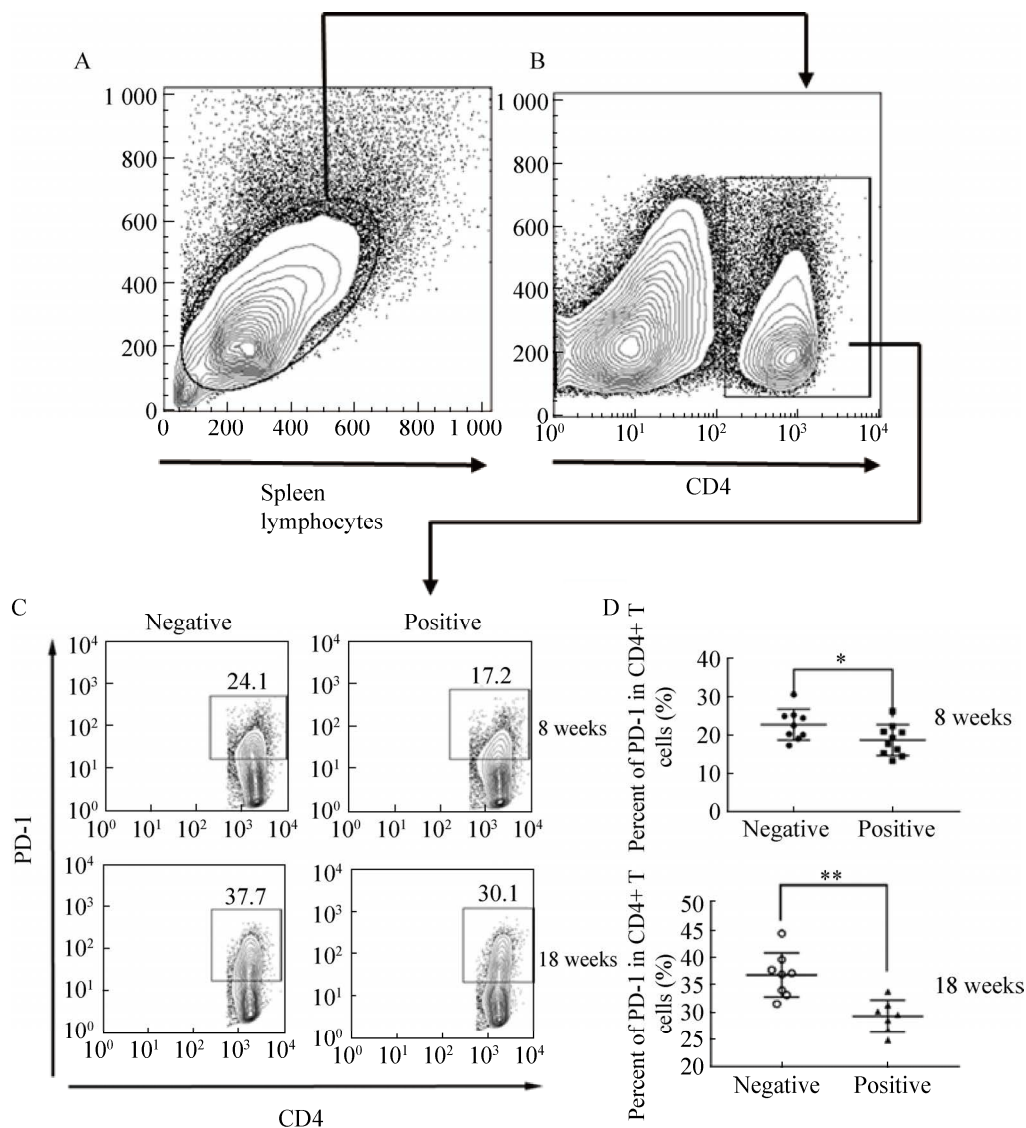


图 1 转基因小鼠 $CD4^+$ T 细胞表面 PD-1 表达的变化

Figure 1 Expression profile of PD-1 on the surface of $CD4^+$ T cells in transgenic mice. A: Splenic lymphocyte circle gate. B: $CD4^+$ cells in spleen lymphocytes. C: Expression and flow cytometry data of PD-1 on the surface of $CD4^+$ T cell in 8-week-old-mice (8 weeks) and 18 week-old-mice (18 weeks). D: Percentage of PD-1 in $CD4^+$ cells in 8-week-old-mice (8 weeks) and 18 week-old-mice (18 weeks). *t*-test for statistical analysis, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Negative: Transgenic negative mice; Positive: Transgenic positive mice; The age of transgenic negative mice and transgenic positive mice used in this experiment is the same between the same group. The same below.

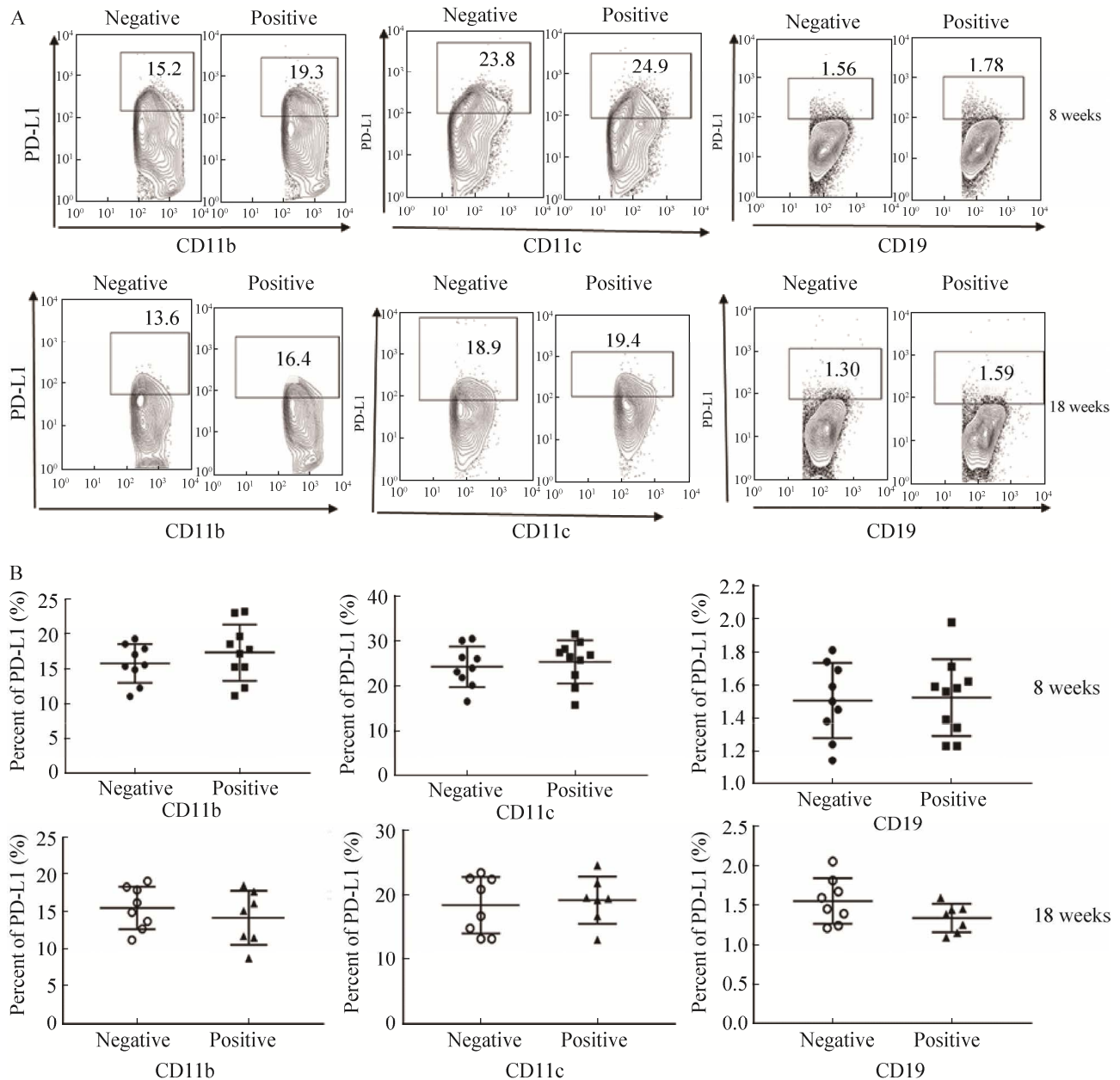


图 2 转基因鼠中 APC 细胞表面 PD-L1 表达比较

Figure 2 Comparison of PD-L1 expression on the surface of APC cells in transgenic mice. A: Expression of PD-L1 analyzed by flow cytometry. B: Expression of PD-L1 analyzed by *t*-test. CD11b: Macrophage surface marker; CD11c: Dendritic cell surface marker; CD19: B lymphocyte surface marker.

2.2 转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞中效应 T 细胞的比例变化

转基因阳性鼠 CD4⁺ 的 T 细胞群体中, CD62L^{low}CD44^{high} 细胞的占比均高于转基因阴性鼠(图 3)。在 8 周龄鼠中, 转基因阳性鼠和转

基因阴性鼠 CD62L^{low}CD44^{high} 所占的比例分别为 21.700 0%±0.906 6% ($n=10$)和 17.130 0%±0.955 2% ($n=9$), 在 18 周龄经历过乳汁分泌的小鼠中, CD62L^{low}CD44^{high} 所占的比例分别为 29.160%±1.799% ($n=7$)和 22.630%±1.383% ($n=8$)。

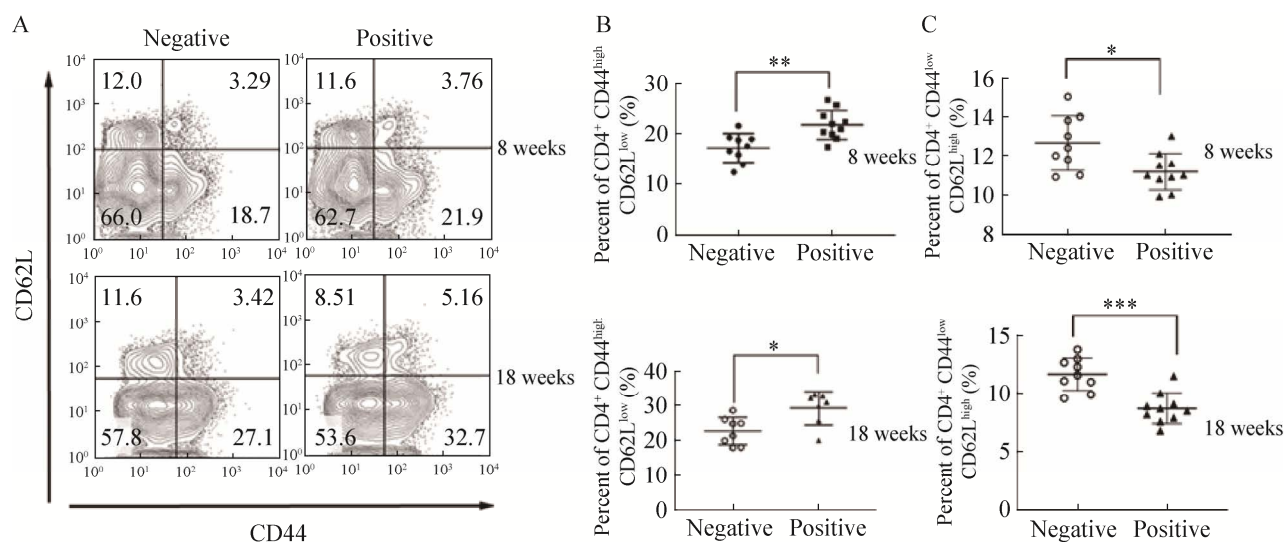


图3 转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞中 CD62L^{low}CD44^{high} 细胞的比例变化

Figure 3 Profile of the percentage of CD62L^{low}CD44^{high} cells in CD4⁺ T cells in transgenic mice. A: Percentage of PD-1 positive cells on the surface of CD4⁺ T cells analyzed by flow cytometry. B: Percentage of CD62L^{low}CD44^{high} cells analyzed by flow cytometry. C: Percentage of CD62L^{high}CD44^{low} cells analyzed by flow cytometry. *t*-test for statistical analysis, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

18 周龄鼠中转基因阳性鼠 CD62L^{low}CD44^{high} (效应 T 细胞) 百分比变化率(28.9%)略高于 8 周龄鼠中转基因阳性鼠的百分比变化率(26.8%)。18 周龄鼠中转基因阳性鼠 CD62L^{high}CD44^{low} (幼稚 T 细胞) 百分比的降低(25.2%)比 8 周龄鼠中转基因阳性鼠的百分比的降低(11.6%)更大。CD62L^{low}CD44^{high} 是记忆/效应 T 细胞的表型, 说明抗人 PD-1 抗体表达后, PD-1/PD-Ls 的结合受影响, 从而会影响 T 细胞的激活, 使幼稚 T 细胞部分地向效应 T 细胞转变。这种影响在分泌乳汁后会更大一些。

2.3 转基因小鼠 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg 细胞的比例以及其 CD4⁺ T 细胞表达的细胞因子 TGF- β 、IL-10 的变化

流式结果显示两组样本中 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg 细胞在转基因阳性鼠(8 周: 4.575 0%±0.276 4%, $n=10$, 18 周: 5.507 0%±0.459 8%, $n=7$) 中的比例要低于同鼠龄的转基因阴性鼠(8 周: 5.881 0%±0.229 5%, $n=9$, 18 周: 7.544 0%±

0.364 3%, $n=8$), 而且在经历过乳汁分泌的样本鼠中, 这种变化更为显著(8 周降低 22.2% vs. 18 周降低 27.0%)(图 4A–4B)。说明抗人 PD-1 抗体在乳腺中的表达抑制了 PD-1/PD-L 通路, 进而抑制了 Treg 细胞在 CD4⁺ T 细胞中的比例。同时检测了 CD4⁺ T 细胞表达的细胞因子 TGF- β 在两组样本中的表达情况。流式结果显示在 8 周龄和 18 周龄的转基因阳性鼠和阴性鼠中 TGF- β 的表达均没有显著性变化($P > 0.05$) (图 4C)。IL-10 的表达在 8 周龄的阳性鼠中要高于阴性鼠, 而在 18 周龄的样本中, 转基因阳性鼠和转基因阴性鼠之间没有显著性变化(图 4E)。

2.4 转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞胞内细胞因子表达的变化

流式荧光检测 CD4⁺ T 细胞胞内因子所占百分比结果见表 1。结果发现, 不管是 8 周龄还是经历乳汁分泌的 18 周龄转基因阳性鼠, 其 CD4⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ (图 5A–5B) 和 IL-17 (图 5C–5D) 与同鼠龄的转基因阴性鼠相比都有增

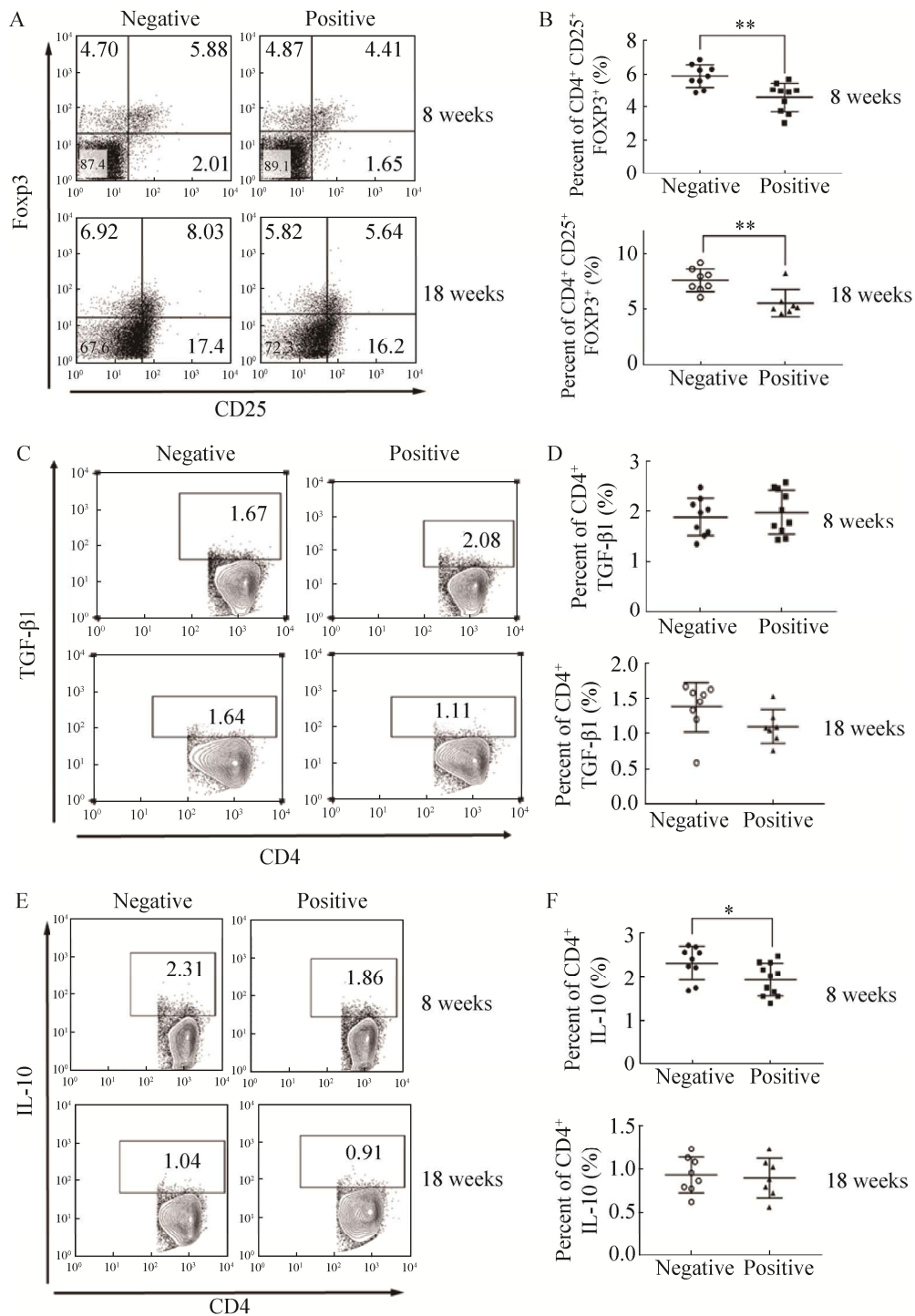


图 4 转基因小鼠 $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ Treg 细胞的比例以及其表达的细胞因子 TGF- β 的变化

Figure 4 Percentage of the $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ Treg cells and profile of the TGF- β expressed in transgenic mice. A: Flow cytometric fluorescence detection signal diagram of spleen lymphocytes after staining. B: Percentage of $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ Treg cells by flow cytometry analysis. C, D: Flow cytometry and proportional data analysis of $CD4^+$ T cells expressing TGF- β . E, F: Proportional fluorescence detection diagram and proportional data analysis of $CD4^+$ T cells releasing IL-10. *t*-test for statistical analysis, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

加, 以上结果说明抗人 PD-1 抗体在乳腺中表达的初期和乳汁分泌期都影响了 T 细胞细胞因子的表达。CD4⁺ T 细胞表达的 IL-2 在 8 周龄的转基因阳性鼠和阴性鼠中没有显著性差异, 在 18 周龄的转基因阳性鼠中的含量要高于同鼠龄的转基因阴性鼠, 呈现出了与 IFN- γ 相同的增长趋势(图 5E-5F)。IL-4 在两个样本的转基因阳性鼠和阴性鼠中都没有检测到有显著性变化(图 5G-5H)。

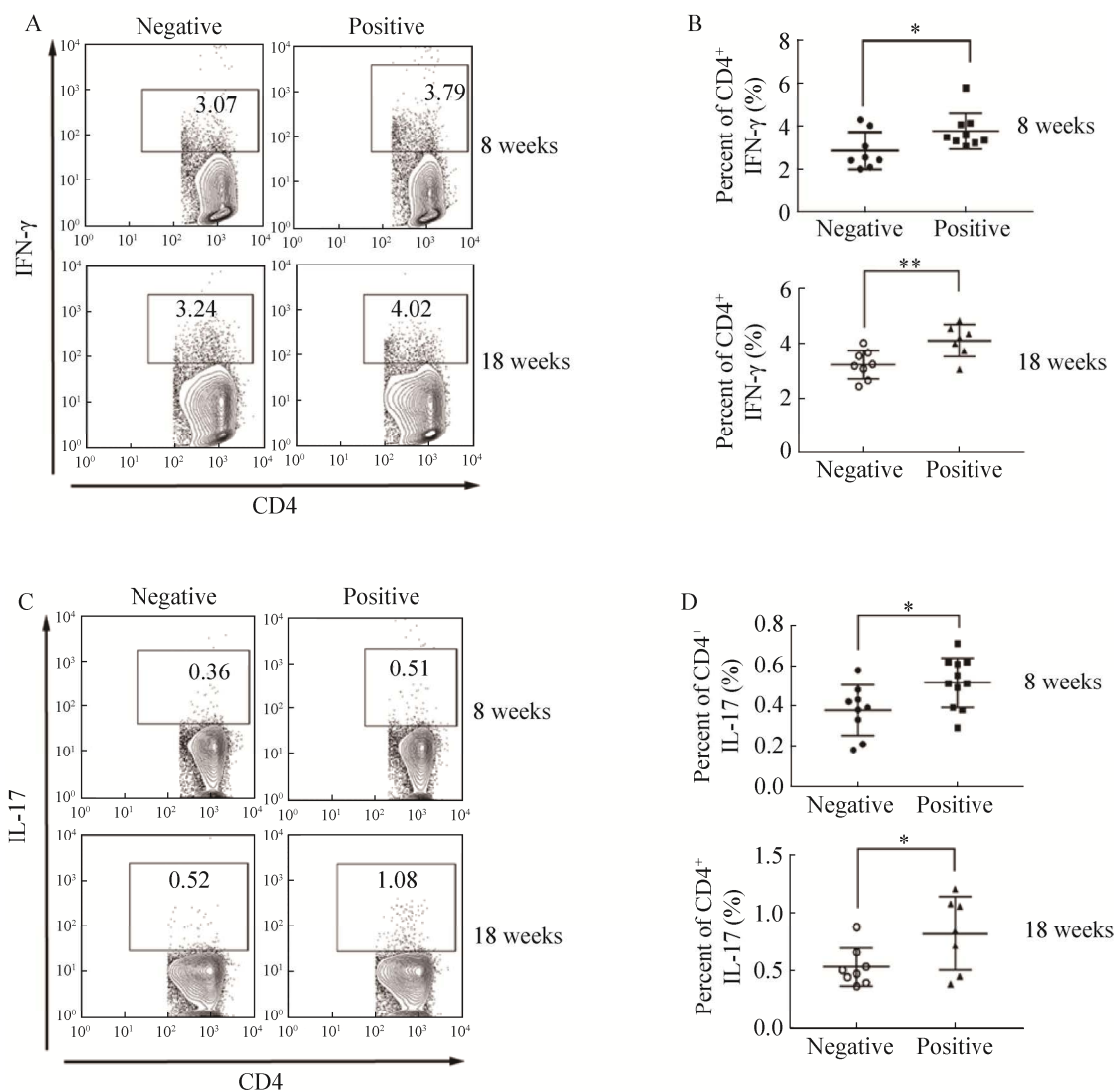
2.5 转基因鼠中 APC 上的 CD80 和 CD4⁺ T 细胞上的 CD28、CTLA-4 的表达变化

流式结果显示两组样本中, 转基因阳性鼠

与转基因阴性鼠 APC 上的 CD80 (图 6A)和 CD4⁺ T 细胞上的 CD28 (图 6B)、CTLA-4 (图 6C) 的表达均没有显著变化。这一结果说明本实验中对 PD-1/PD-L 结合的影响不会导致 CD80-CD28 以及 CD80-CTLA-4 结合的变化。

2.6 小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体对转基因鼠 CD4⁺ T 细胞增殖的影响

流式和数据分析的结果(图 7)显示, 8 周龄的雌鼠和 18 周龄经历乳汁分泌的雌鼠中, 转基因阳性鼠和转基因阴性鼠 T 细胞增殖没有显著性差异。



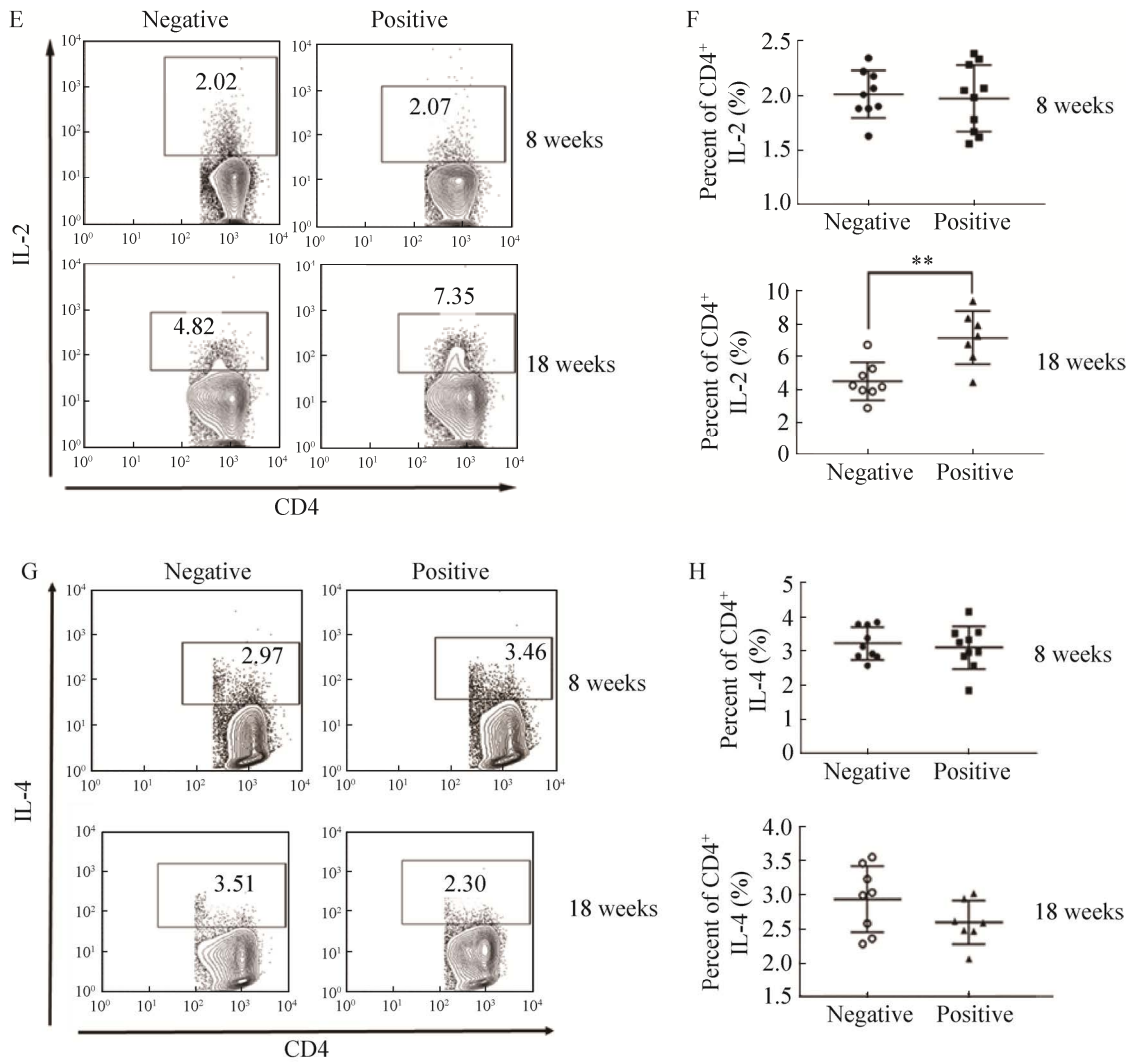


图 5 转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞胞内细胞因子释放的变化

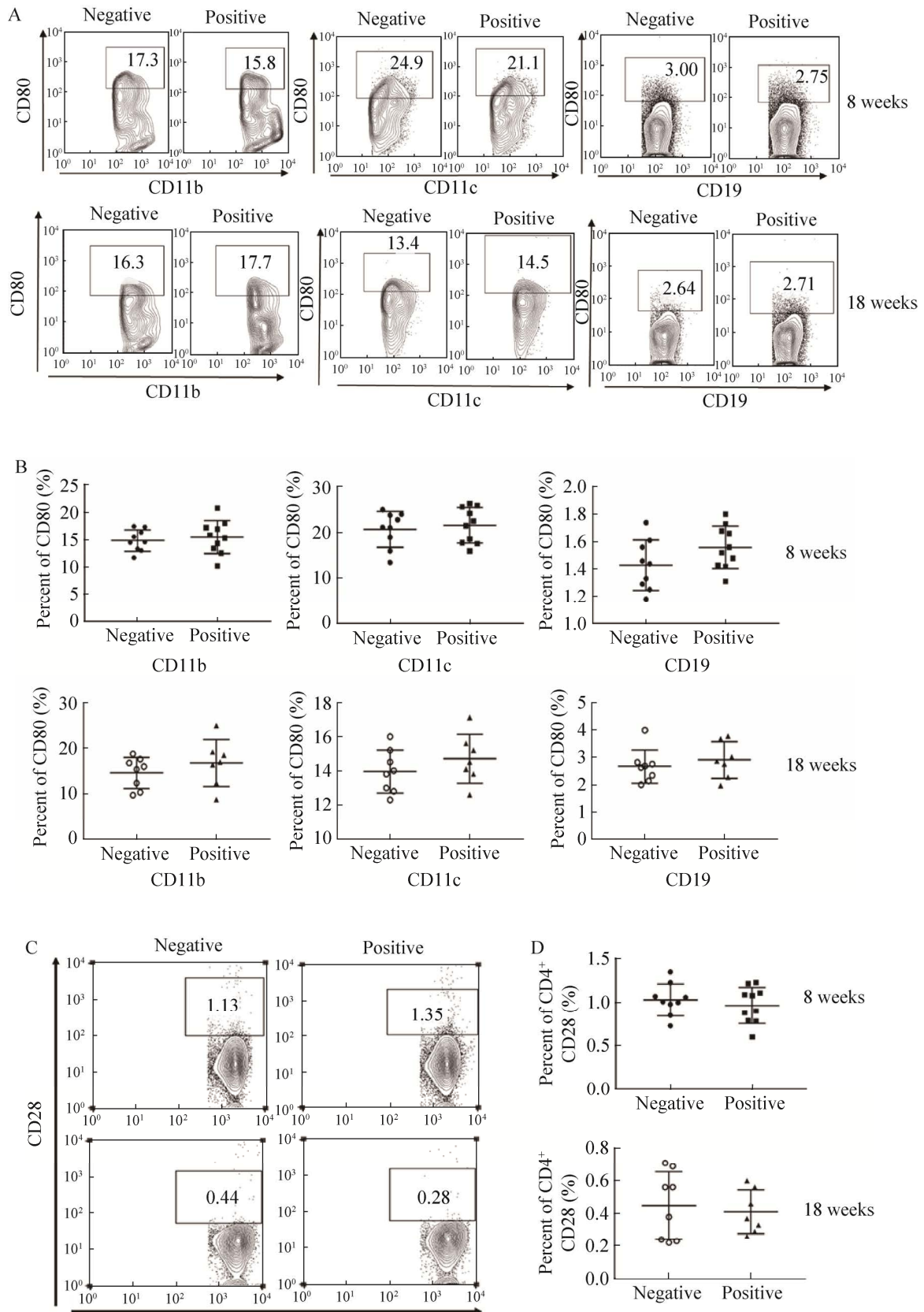
Figure 5 Changes of cytokine released by CD4⁺ T cells in transgenic mice. A, C, E, G: Flow cytometric fluorescence detection of IFN- γ , IL-17, IL-2 and IL-4 released from CD4⁺ T cells. B, D, F, H: Data analysis diagram of IFN- γ , IL-17, IL-2 and IL-4. *t*-test for statistical analysis, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表 1 转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞释放细胞因子所占比例

Table 1 Percentage of different cytokine released by CD4⁺ T cells in transgenic mice

Cytokine	8 weeks negative (%)	8 weeks positive (%)	18 weeks negative (%)	18 weeks positive (%)
IFN- γ	2.863 00 \pm 0.307 90	3.780 00 \pm 0.280 00*	3.224 00 \pm 0.184 70	4.109 00 \pm 0.223 40**
IL-17	0.377 80 \pm 0.041 76	0.516 40 \pm 0.037 59*	0.528 80 \pm 0.059 83	0.821 40 \pm 0.121 40*
IL-2	2.012 00 \pm 0.072 24	1.972 00 \pm 0.095 86	4.489 00 \pm 0.404 40	7.137 00 \pm 0.614 30**
IL-4	3.231 00 \pm 0.159 10	3.103 00 \pm 0.196 70	2.935 00 \pm 0.171 10	2.596 00 \pm 0.121 00
IL-10	2.312 00 \pm 0.127 40	1.937 00 \pm 0.113 20*	0.928 80 \pm 0.073 08	0.895 70 \pm 0.086 27
TGF- β 1	1.890 00 \pm 0.127 20	1.983 00 \pm 0.139 90	1.375 00 \pm 0.125 30	1.097 00 \pm 0.090 76

8w: 8-week old mice; Negative: Transgenic negative mice, $n=9$; Positive: Transgenic positive mice, $n=10$. 18w: 18-week old mice; Negative, $n=8$; Positive, $n=7$. Two parallel experiments are designed for each group. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.



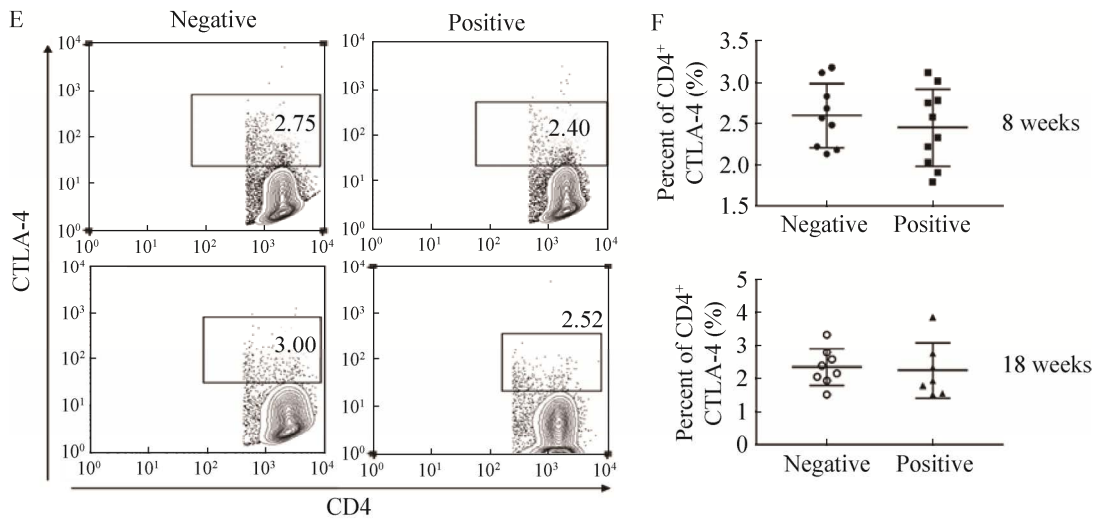


图 6 转基因鼠中 APC 上的 CD80 和 CD4⁺ T 细胞上的 CD28、CTLA-4 的表达

Figure 6 Expression of CD80 in APC, and the percentage of CD28 and CTLA-4 in CD4⁺ T cells in transgenic mice. A, B: Expression of CD80 on APCs. C, D: Expression of CD28 on CD4⁺ T cells. E, F: Differences of CTLA-4 expression between transgenic positive mice and transgenic negative mice aged 8 weeks and 18 weeks.

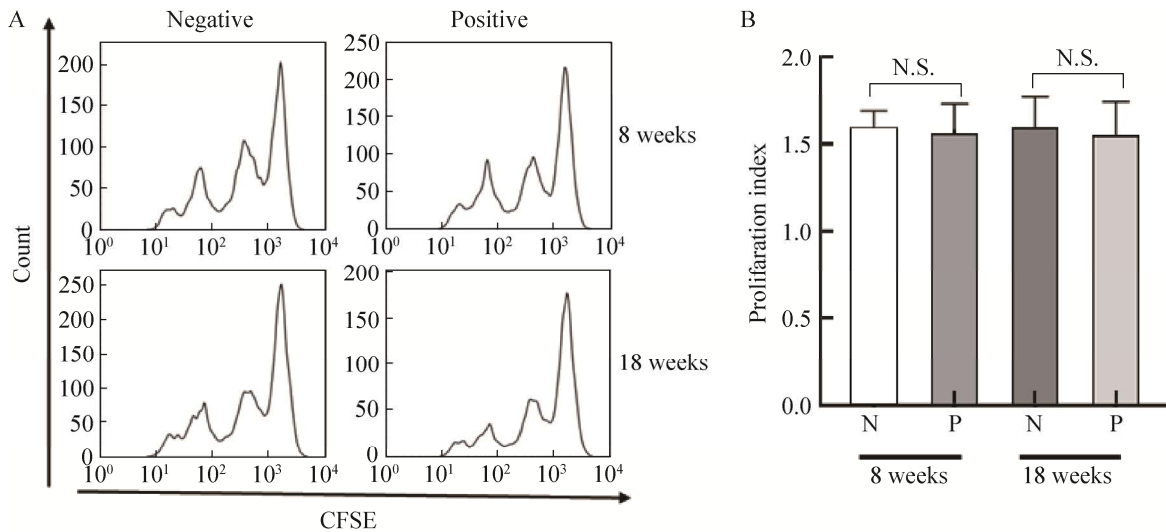


图 7 表达抗 PD-1 抗体对转基因小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞增殖的影响

Figure 7 Effect of expression of anti-PD-1 antibody on CD4⁺ T spleen cell proliferation in transgenic mice. A: Flow cytometry of T cell proliferation. B: Analysis of flow cytometry value-added index data. N: Transgenic negative mice; P: Transgenic positive mice, the same below. N.S.: Not significant, $P > 0.05$.

2.7 小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体对转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞中 PI3K-Akt-mTOR 通路信号分子的影响

结果显示, 在 8 周龄未怀孕的转基因雌鼠

中, 转基因阳性鼠和阴性鼠的 p-PI3K、p-Akt 以及 p-mTOR 的表达水平没有明显的变化(图 8)。在 18 周龄经历乳汁分泌的转基因雌鼠中, 转基因阳性鼠的 p-PI3K 的表达水平比转基因

因阴性鼠高 18.4%, 转基因阳性鼠 p-Akt 的表达水平比转基因阴性鼠高 16.4%, 而 p-mTOR 的表达水平在转基因阳性鼠和转基因阴性鼠之间没有明显变化。

2.8 小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体对转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞中 Ras-MEK-ERK 通路信号分子的影响

结果显示, 在 8 周龄未怀孕的转基因雌鼠中, 转基因阳性鼠和阴性鼠的 Ras、p-MEK1/2 以及 p-Erk1/2 的表达水平没有明显的变化(图 9)。在 18 周龄经历乳汁分泌的转基因雌鼠中, 检测到转基因阳性鼠的活性形式 Ras (与 GTP 结合的 Ras) 的表达水平比转基因阴性鼠高 27.44%,

p-MEK1/2 和 p-Erk1/2 两者的表达水平在转基因阳性鼠和转基因阴性鼠之间没有显著差异。以上结果说明, 小鼠乳腺表达抗 PD-1 抗体主要影响转基因小鼠 CD4⁺ T 细胞中 2 个通路的信号分子中的 PI3K、Akt 以及 Ras 的活性, 没有影响到 2 个通路下游的 mTOR 和 MEK/ERK, 从这个结果推测, 脾脏来源的 CD4⁺ T 细胞的增殖没有出现显著变化的原因可能跟信号通路这些分子的变化有关, 特别是与信号通路级联反应的终端分子没有发生显著变化有关。说明转基因表达抗 PD-1 抗体对整个信号通路的影响是局部的, 因此没有检测到跟这个通路相关的所有因素的全局变化, 而是部分变化,

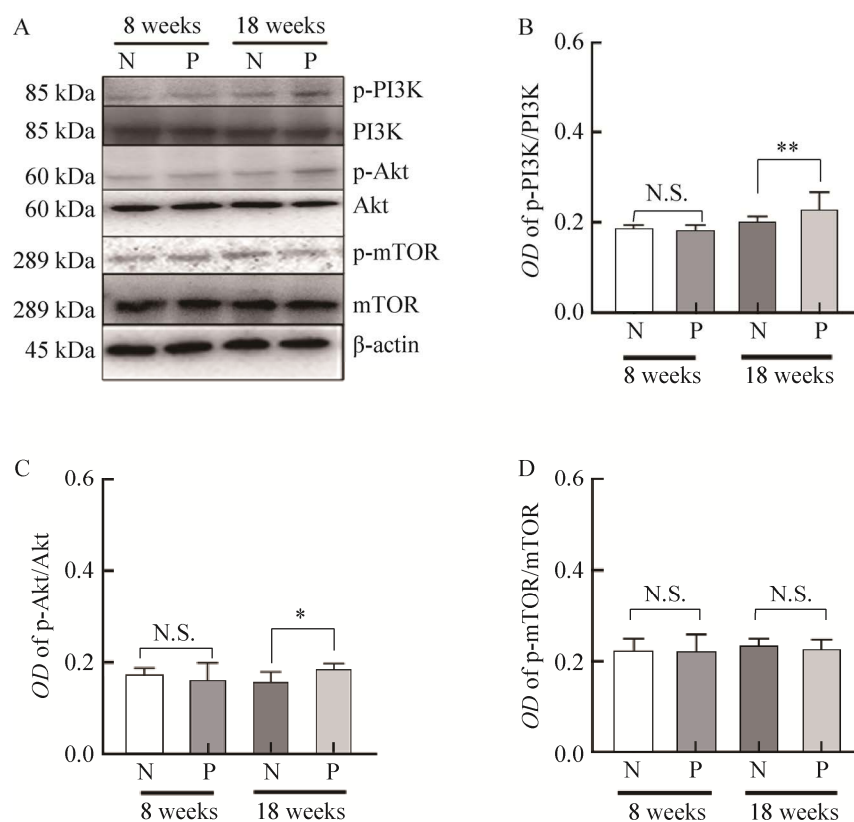


图 8 表达抗 PD-1 抗体对转基因鼠 CD4⁺ T 细胞中 PI3K-Akt-mTOR 通路信号分子表达的影响

Figure 8 Effect of anti-PD-1 antibody in milk on signaling molecules of the PI3K-Akt-mTOR pathway in CD4⁺ T cells in transgenic mice. A: Western blotting results of protein and their phosphorylated forms on PI3K-Akt-mTOR pathway. B, C, D: Gray scale ratio phosphorylated protein to total protein. N.S.: Not significant, $P>0.05$; $**P<0.01$.

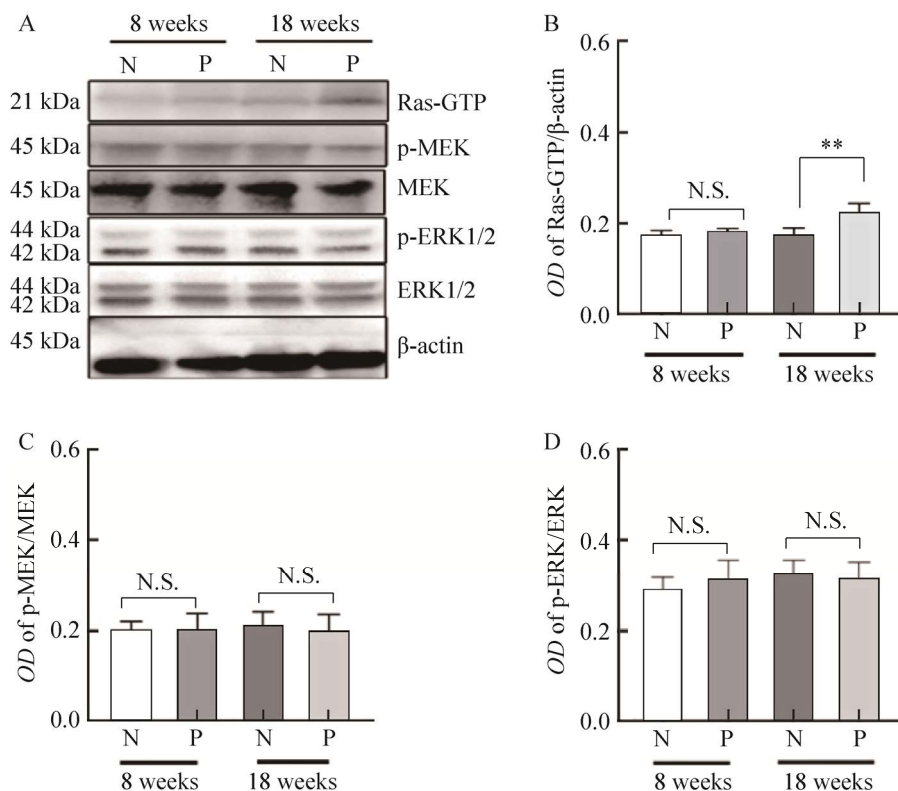


图9 表达抗 PD-1 抗体对转基因鼠 CD4⁺ T cells 中 Ras-MEK-ERK 通路信号子表达的影响

Figure 9 Effect of anti-PD-1 antibody in milk on signaling molecules of the Ras-MEK-ERK pathway in CD4⁺ T cells in transgenic mice. A: Western blotting results of protein and their phosphorylated forms on Ras-MEK-ERK pathway. B: Gray scale ratio of Ras GTP to β -actin. C: Ratio of phosphorylated MEK1/2 to total protein. D: Ratio of phosphorylated ERK1/2 to total protein. N.S.: Not significant, $P>0.05$; $**P<0.01$.

比如效应 T 细胞比例上升, Treg 比例下降, 而 T 细胞增殖能力没有显著变化, IL-10、TGF- β 1 以及 IL-4 这些细胞因子的表达没有变化。

3 讨论与结论

单克隆抗体(mAbs)的研发和生产已成为目前生物制药行业发展最快的一部分。哺乳动物细胞培养是目前生产大多数商业化 mAbs 的首选方法。然而, 由于其生产能力有限且扩大规模所需较高的成本, 这些系统不能很好地满足临床上对治疗用抗体日益增长的需求。随着显微注射技术的发展, 转基因动物乳腺已成为生产重组蛋白的新途径。近年来, 大量重组蛋白

和单克隆抗体在转基因小鼠、兔子、山羊、绵羊、猪和牛的乳腺中获得成功表达。

自 1992 年首次发现 PD-1 以来, 越来越多的证据表明 PD-1 及其配体是 T 细胞活化和耐受以及诱导和维持外周耐受的关键调节因子^[12]。随后的研究也表明, PD-1 通路在自身免疫^[13]、移植免疫^[14]、感染性免疫^[15]和肿瘤免疫^[16]的调节中发挥着重要作用。我们对 T 细胞中 PD-1 信号转导的大部分认识来自于对原始 T 细胞活化后 PD-1 参与的研究。

通过流式细胞仪检测转基因阳性鼠和阴性鼠中 PD-1/PD-Ls 通路相关的蛋白和 CD4⁺ T 细胞表达的细胞因子之间的差异, 以转基因小鼠

乳腺反应器为模型, 从细胞水平发现了表达外源单克隆抗体特别是与免疫系统相关抗体对宿主本身免疫系统的影响。结果表明, 乳腺表达免疫抑制剂会对宿主的免疫系统产生一定的影响, 这种影响可以通过细胞水平的检测进行评估, 但是这种影响是部分的, 没有直接导致转基因动物严重的健康问题, 因此转基因小鼠作为表达 PD-1 这类单抗的宿主是可行的, 同时对于宿主不仅需要关注健康问题, 还需要进行免疫细胞方面的评估检测。

随后检测转基因小鼠脾脏 T 细胞增殖能力, 发现转基因阳性鼠和转基因阴性鼠中 T 细胞增殖没有显著性差异, 且发现转基因阳性鼠中 PI3K/Akt/mTOR 和 Ras/MEK/ERK 的磷酸化蛋白只有部分表达上调, 整个通路没有完全上调, 由此可认为转基因小鼠作为乳腺表达抗 PD-1 抗体这类免疫系统相关单克隆抗体的宿主具有可行性。转基因鼠体内与 PD-1 相关的 PI3K/AKT/mTOR 和 Ras/MEK/ERK 信号通路中 PI3K/AKT 和 Ras 的激活发生了变化, 这种变化有可能是检测到的脾脏 T 细胞中的效应 T 细胞比例上升和 Treg 比例的下降以及 IL-2、IFN- γ 和 IL-17 的水平上升的相关因素, 而未受影响的脾脏 CD4⁺ T 细胞增殖和 IL-10、TGF- β 1 以及 IL-4 的表达可能与信号通路上其他分子未受影响有关, 同时从表观上未观察到动物发生严重的健康问题。因此这种检测可以作为评估表达免疫类单克隆抗体的转基因动物宿主安全性的方法。本文通过对转基因小鼠中相关免疫信号通路分子、免疫细胞比例以及表达的细胞因子的检测得出了转基因小鼠作为表达抗 PD-1 抗体这类免疫相关抗体的可行性, 也可以作为评估表达类似 PD-1 单克隆抗体的转基因动物安全性的手段, 从而使转基因安全性评价体系更完善、更具有系统性。

REFERENCES

- [1] SHARMA P, ALLISON JP. The future of immune checkpoint therapy[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 56-61.
- [2] WALSH G. Biopharmaceutical benchmarks 2014[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(10): 992-1000.
- [3] WURM FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(11): 1393-1398.
- [4] TOPALIAN SL, DRAKE CG, PARDOLL DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2012, 24(2): 207-212.
- [5] HODI FS, O'DAY SJ, MCDERMOTT DF, WEBER RW, SOSMAN JA, HAANEN JB, GONZALEZ R, ROBERT C, SCHADENDORF D, HASSEL JC, AKERLEY W, van den EERTWEGH AJ, LUTZKY J, LORIGAN P, VAUBEL JM, LINETTE GP, HOGG D, OTTENSMEIER CH, LEBBÉ C, PESCHEL C, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010, 363(8): 711-723.
- [6] CHEMNITZ JM, PARRY RV, NICHOLS KE, JUNE CH, RILEY JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(2): 945-954.
- [7] CHEMNITZ JM, RILEY JL, FRAUWIRTH KA, BRAUNSTEIN I, KOBAYASHI SV, LINSLEY PS, THOMPSON CB, PARRY RV. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms[J]. *Blood*, 2004, 104(11): 2657.
- [8] SUN LT, ZHANG LY, YU JR, ZHANG YN, PANG X, MA CH, SHEN MH, RUAN SM, WASAN HS, QIU SL. Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 2083.
- [9] OKAZAKI T, HONJO T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application[J]. *International Immunology*, 2007, 19(7): 813-824.
- [10] GONG GH, ZHANG W, XIE LP, XU L, HAN S, HU

- YJ. Expression of a recombinant anti-programmed cell death 1 antibody in the mammary gland of transgenic mice[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(2): 183-190.
- [11] MASNIKOSA R, BARICEVIC I, LAGUNDZIN D, NEDIC O. Detection of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in porcine serum[J]. *Acta Veterinaria*, 2010, 60(4): 327-337.
- [12] KEIR ME, BUTTE MJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annual Review of Immunology*, 2008, 26: 677-704.
- [13] NISHIMURA H, OKAZAKI T, TANAKA Y, NAKATANI K, HARA M, MATSUMORI A, SASAYAMA S, MIZOGUCHI A, HIAI H, MINATO N, HONJO T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice[J]. *Nature Medicine*, 2001, 291(5502): 319-322.
- [14] SANDNER SE, CLARKSON MR, SALAMA AD, SANCHEZ-FUEYO A, DOMENIG C, HABICHT A, NAJAFIAN N, YAGITA H, AZUMA M, TURKA LA, SAYEGH MH. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses *in vivo*[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(6): 3408-3415.
- [15] BARBER DL, WHERRY EJ, MASOPUST D, ZHU BG, ALLISON JP, SHARPE AH, FREEMAN GJ, AHMED R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-687.
- [16] HINO R, KABASHIMA K, KATO Y, YAGI H, NAKAMURA M, HONJO T, OKAZAKI T, TOKURA Y. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma[J]. *Cancer*, 2010, 116(7): 1757-1766.

(本文责编 郝丽芳)