

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.06.006

· 基础研究 ·

## mGM-CSF-GnRH3 与 mGM-CSF-GRP6 融合蛋白体外抗肿瘤作用及生物信息学预测

刘淑君, 韦晓芳<sup>△</sup>, 刘生凤, 黄滢霜, 张焱, 曹荣月(中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** **目的:** 制备鼠源粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor, mGM-CSF)与促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)的融合蛋白 mGM-CSF-GnRH3(mGGn)和 mGM-CSF 与胃泌素释放肽(gastrin-releasing peptide, GRP)的融合蛋白 mGM-CSF-GRP6(mG6), 探讨这两种融合蛋白在体外对黑色素瘤 B16F10 细胞的抑制效果, 并对其等电点、相对分子质量、疏水性、稳定性、亚细胞定位、信号肽、空间结构、潜在抗原表位等进行初步预测。**方法:** mGGn 与 mG6 融合蛋白制备成功后, 通过显微观察、划痕实验、CCK-8 法、流式细胞术分别检测不同浓度蛋白对 B16F10 细胞形态、细胞迁移、细胞增殖、细胞周期的影响, 利用蛋白质在线分析系统 EXPASY、GOR4、SWISS MODEL 对重组融合蛋白进行基本属性、二三级结构分析预测, 运用 IEDB 和 ABCpred 软件综合预测其 B 细胞抗原表位, 采用 SYFPEITHI、BIMAS 和 NetCTL 软件综合预测其 CTL 表位, 利用 NetMHCIIpan 3.1 Server 和 IEDB 软件综合预测其 Th 表位。**结果:** mGGn 和 mG6 融合蛋白均抑制肿瘤细胞的增殖和迁移; mGGn 能使 B16F10 细胞周期阻滞于 G1 期, mG6 能使 B16F10 细胞周期阻滞于 S 期, 不能进入 G2 期, 从而抑制肿瘤细胞的增殖。mGGn 和 mG6 结构丰富, 含有较多潜在的 B 细胞、CTL 和 Th 表位。**结论:** mGGn 与 mG6 融合蛋白在体外对黑色素瘤 B16F10 细胞具有抑制作用, 其生物信息学预测为进一步研究两种融合蛋白的生物学功能和免疫活性奠定了基础。

**[关键词]** 鼠源粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 促性腺激素释放激素; 胃泌素释放肽; 黑色素瘤; B16F10 细胞; 生物信息学分析  
**[中图分类号]** R392.11; R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)06-0582-08

## *In vitro* anti-tumor effect of mGM-CSF-GnRH3 and mGM-CSF-GRP6 recombinant fusion protein and their bioinformatics prediction

LIU Shujun, WEI Xiaofang<sup>△</sup>, LIU Shengfeng, HUANG Yingshuang, ZHANG Yan, CAO Rongyue(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 21009, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare the fusion protein mGM-CSF-GnRH3 (mGGn) of mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor (mGM-CSF) combining with gonadotropin releasing hormone (GnRH) and the fusion protein mGM-CSF-GRP6 (mG6) of mGM-CSF combining with gastrin-releasing peptide (GRP), and to investigate the inhibitory effect of the above two fusion proteins on B16F10 melanoma *in vitro* as well as to preliminarily predict their isoelectric point, relative molecular weight, hydrophobicity, stability, subcellular localization, signal peptide, spatial structure and potential epitopes. **Methods:** After the successful preparation of mGGn and mG6, the effects of different concentrations of fusion proteins on tumor cell morphology, migration, proliferation and cell cycle were detected by microscopic observation, scratch test, CCK-8 method and flow cytometry, respectively. The protein online analysis systems EXPASY, GOR4, SWISS MODEL were used to predict the basic properties and secondary/tertiary structure of recombinant fusion proteins. The B cell epitopes were predicted by IEDB and ABCpred software, the CTL epitopes were comprehensively predicted by SYFPEITHI, BIMAS and NetCTL software, and the Th epitopes were predicted by NetMHCIIpan 3.1 Server and IEDB software. **Results:**

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.81172973, 81373232); 国家高新技术研究发展(863)计划资助项目(No.2015AA020314); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目(No.J1030830); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(No.PAPD1)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373232, 81172973), the National High Technology Research and Development (863) Program of China (No.2015AA020314), the National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (No. J1030830), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (No.PAPD1)

**[作者简介]** 刘淑君(1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤疫苗方面的研究, E-mail: 2432165457@qq.com; 韦晓芳(1994-), 女, 本科生, 主要从事肿瘤疫苗方面的研究, E-mail: 1015850084@qq.com。△为共同第一作者

**[通信作者]** 曹荣月(CAO Rongyue, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤疫苗方面的研究, E-mail: caorongyuenanjing@126.com

Both mGGn and mG6 inhibited the migration and proliferation of tumor cells. mGGn could block B16F10 cell cycle at G1 phase while mG6 could block B16F10 cell cycle at S phase, all of which prevented cells entering into G2 phase to inhibit tumor cell growth. The mGGn and mG6 fusion proteins got diverse structures and had multiple potential B epitopes, CTL epitopes and Th epitopes. **Conclusion:** mGGn and mG6 have inhibitory effect on B16F10 melanoma *in vitro*, and bioinformatics predictions have laid a foundation for further study of the biological functions and immunological activities of these fusion proteins.

**[Key words]** mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor (mGM-CSF); gonadotropin-releasing hormone (GnRH); gastrin-releasing peptide (GRP); melanoma; B16F10 cell; bioinformatics analysis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(6): 582-589. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.06.006]

近年来研究<sup>[1]</sup>发现,某些非性腺轴器官起源的肿瘤,如肺癌、胰腺癌、肾上腺癌、黑色素瘤和肝癌细胞上都存在促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的结合位点, GnRH类似物可抑制这些肿瘤细胞生长。胃泌素释放肽(gastrin-releasing peptide, GRP)与许多恶性肿瘤的发生、转移、侵袭等关系密切,参与肿瘤转移与新生血管的生成,是一个较好的肿瘤标志物<sup>[2-3]</sup>。鼠源粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor, mGM-CSF)可以诱导髓样细胞分化为DC,并促进DC的增殖和成熟,同时可通过诱导粒细胞、单核细胞以及NK细胞的抗体依赖的细胞毒作用,促进Th1型细胞因子的分泌<sup>[4-5]</sup>。动物实验和临床研究<sup>[6-7]</sup>证实,GM-CSF可在肿瘤主动免疫治疗中作为佐剂使用,具有安全、无毒、不良反应小等优点。由于单靶点的小分子类药物治疗范围窄,且易产生免疫逃逸和耐药性,故mGM-CSF分别与GnRH3和GRP6靶点相结合构建相应的融合蛋白mGM-CSF-GnRH3(mGGn)和mGM-CSF-GRP6(mG6),可提高机体对肿瘤细胞的免疫应答,达到识别和杀灭肿瘤细胞的目的<sup>[8]</sup>。本研究应用生物信息学方法,对上述两重组融合蛋白的结构、抗原表位、免疫学相关信息等进行初步预测,以期为该融合蛋白体内外抗肿瘤研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、质粒和细胞株

载体质粒 pET28a(+), 菌种 *Escherichia coli* BL21 (DE3)、重组质粒 pET28a-mGM-CSF-GnRH3-hinge-MVP-NRLLLTG、pET28a-mGM-CSF-GRP6 和黑色素瘤 B16F10 细胞株均为中国药科大学微基因实验室保存。

### 1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清(杭州四季青工程研究所), RPMI 1640 (美国 Gibco 公司), 青链霉素混合液(上海 Solarbio 公司), 二甲亚砜(上海国药集团化学试剂有限公司), CCK-8 试剂盒细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所)。Bio-Rad550 型酶标仪

(美国 Bio-Rad 公司), BD Accuri™ C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

### 1.3 mGGn 和 mG6 融合蛋白的诱导表达和分离纯化

将含有重组质粒 pET28a-mGM-CSF-GnRH3-hinge-MVP-NRLLLTG 和 pET28a-mGM-CSF-GRP6 两株重组菌进行乳糖诱导表达,通过超声破碎、包涵体洗涤、溶解、分步稀释复性和 DEAE52 阴离子交换色谱的方法分离纯化 mGGn 和 mG6,透析后冻干保存。

### 1.4 B16F10 细胞的培养

将冻存的 B16F10 细胞迅速恒温水浴解冻,加入培养液重悬细胞,离心后加培养液混匀,将复苏后的 B16F10 细胞培养在含 10% FBS、1% 青链霉素的 1640 培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的恒温培养箱中培养,观察细胞贴壁状况,视情况更换新鲜培养液。细胞汇合度达到瓶底面积的 80% 以上进行传代培养,弃去原有的培养液,加入 PBS 溶液轻晃漂洗细胞,重复操作。加入适量 0.25% 胰蛋白酶进行消化并收集细胞,制成单细胞悬液,平均接种到 2~3 个培养皿内继续培养。

### 1.5 B16F10 细胞形态学观察

将培养好的 B16F10 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔培养板,用不含 FBS 的培养液培养过夜待细胞贴壁后,分别更换为含 1 000、100、10、1、0.1 μg/ml mGGn 和 mG6 的 1% FBS、1% 青链霉素的 1640 培养基,培养细胞 24 h,并与对照组合 0 μg/ml 药物的培养基培养 24 h 的 B16F10 细胞作比较。在倒置显微镜下观察 B16F10 细胞形态学的变化并拍照。

### 1.6 划痕实验检测 mGGn 和 mG6 蛋白对 B16 F10 细胞迁移的影响

在 6 孔板背后,用 marker 笔均匀画出横线,横穿过孔,每个孔至少穿过 3 条线,在孔中加入约  $5 \times 10^5$  个细胞,用不含 FBS 的培养液培养过夜,待细胞贴壁后用枪头垂直于孔板底部画横线划痕,用 PBS 清洗细胞 3 次,分别加入含 1 000、100、10、1、0.1 μg/ml mGGn 和 mG6 的 1% FBS、1% 青链霉素的 1640 培养基,放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养并在 0、24 h 分别进行拍照。

1.7 CCK-8 法检测 mGGn 和 mG6 蛋白对 B16F10 细胞增殖的抑制作用

将培养好的 B16F10 细胞以约  $5 \times 10^3$ /孔的密度接种到 96 孔板中, 用不含 FBS 的培养液培养 12 h, 待细胞贴壁后换成含药的培养液继续培养。空白对照组给予等体积的培养基, 实验组分别加入不同浓度的 mGGn 和 mG6 培养基, 阴性对照组为含 0  $\mu\text{g/ml}$  药物的培养基, 每个浓度设置 6 个复孔。分别培养 24、48、72 h 后向每孔加入 CCK-8 溶液, 将培养板置培养箱内孵育一段时间, 用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度 ( $D$ ) 值。按下列公式计算抑制率: 细胞增殖抑制率 (%) =  $[1 - (D_{\text{加药}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{未加药}} - D_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

1.8 流式细胞术检测 mGGn 和 mG6 细胞周期的影响

采用细胞周期与细胞凋亡试剂盒检测, 具体操作步骤按说明书进行。

1.9 生物信息学预测重组 mGGn 和 mG6 蛋白的基本结构

利用蛋白质分析系统 EXPASY (<http://ca.expasy.org/>) 分析重组融合蛋白的理化性质; 利用 TARGETP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) 对亚细胞定位进行在线分析; 采用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析信号肽及位置。采用 GOR4 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)) 分析蛋白二级结构; 利用 SWISS MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/swiss-model.html>) 进行同源建模, 获得其三级结构。

1.10 生物信息学预测 mGGn 抗原 B 细胞、CTL 及 Th 表位

利用 IEDB ([http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)) 进行预测, 从  $\beta$ -拐角、表面可能性、柔韧性、抗原指数、亲水性等分别进行单方案预测, 再采用 ABCpred 软件 (<http://www.imtech.res.in/raghava/>

[abcpred/ABC\\_submission.html](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)), 根据得分高低进行预测。综合上述两种软件预测结果, 预测最可能的 B 细胞表位。综合利用 3 种在线工具 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>)、BIMAS ([http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) 和 NetCTL (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>) 对重组蛋白的 HLA-A\*0201 限制性 CTL 表位进行远程预测, 分值较高的九肽作进一步分析。综合 NetMHCIIpan 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>) 和 IEDB ([http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell\\_tools.html](http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html)) 两种方法对重组蛋白的 HLA-DRB1\*0901、HLA-DRB1\*1202、HLA-DRB1\*1501 限制性 Th 细胞表位进行预测。

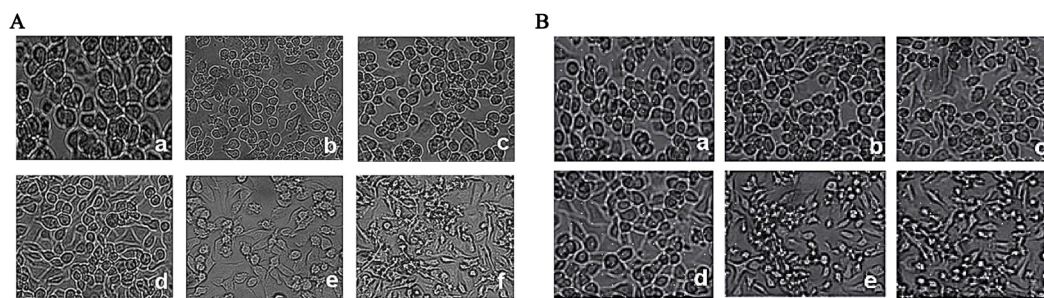
1.11 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mGGn 与 mG6 在体外对 B16F10 肿瘤细胞增殖具有抑制作用

倒置显微镜下观察结果 (图 1a-e) 显示, B16F10 细胞的细胞形态及增殖情况, 比较发现给药组肿瘤细胞形态明显改变, 细胞轮廓趋于圆形, 边缘模糊, 贴壁率降低, 细胞有不同程度的变形。而对照组 (0  $\mu\text{g/ml}$ ; 图 1f) 的细胞增殖旺盛, 轮廓清楚呈规则的多边形, 贴壁率高, 细胞形态明亮无明显改变。表明重组融合蛋白对 B16F10 细胞有一定的抑制增殖作用, 随着药物浓度的升高, 肿瘤细胞形态改变越明显, 具有剂量效应。



A: mGGn; B: mG6; a: 1 000  $\mu\text{g/ml}$ ; b: 100  $\mu\text{g/ml}$ ; c: 10  $\mu\text{g/ml}$ ; d: 1  $\mu\text{g/ml}$ ; e: 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ; f: 0  $\mu\text{g/ml}$

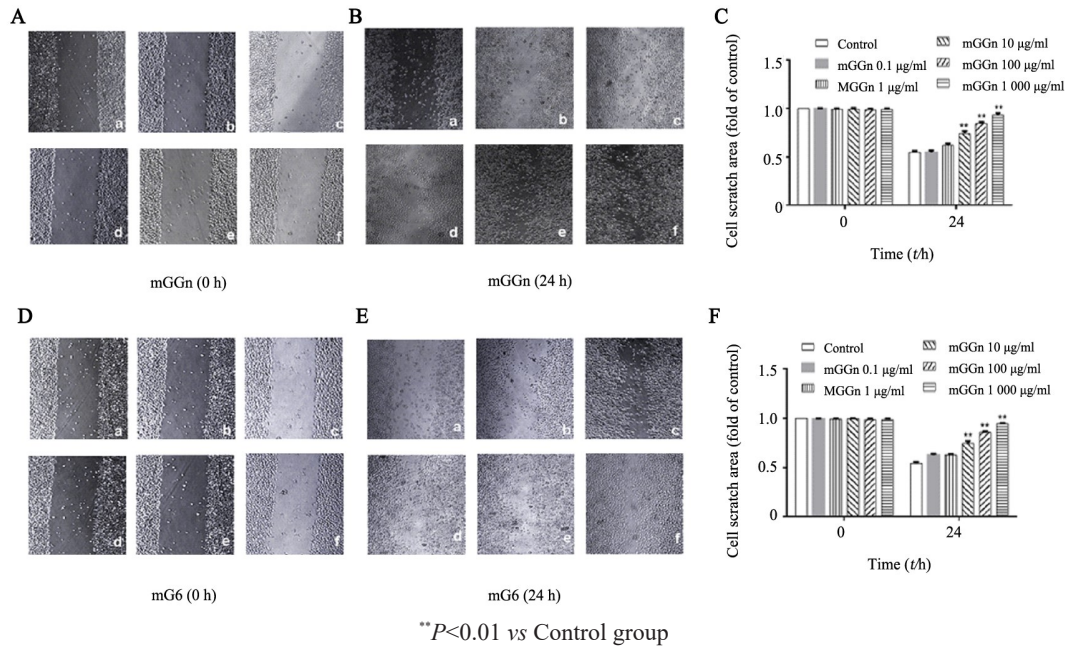
图 1 融合蛋白在体外对 B16F10 细胞细胞形态学的影响 ( $\times 200$ )

Fig.1 The effect of fusion proteins on the cell morphology of B16F10 cells *in vitro* ( $\times 200$ )

2.2 mGGn 与 mG6 均能抑制 B16F10 细胞的迁移  
划痕实验随机选取视野内 3 个区域, 拍照后利用

Image J 进行分析。结果显示, 给药组 (0.1、1、10、100、1 000  $\mu\text{g/ml}$  mGGn 与 mG6 作用 24 h) 与空白对

照组相比, 划痕区域空隙面积明显增大, 表明重组融合蛋白在一定程度上能抑制肿瘤细胞的迁移, 并呈剂量依赖性。



A: mGGn for 0 h; B: mGGn for 24 h; C: Scratch area of B16F10 after mGGn treatment; D: mG6 for 0 h; E: mG6 for 24 h; F: Scratch area of B16F10 after mG6 treatment; a: 1 000  $\mu\text{g/ml}$ ; b: 100  $\mu\text{g/ml}$ ; c: 10  $\mu\text{g/ml}$ ; d: 1  $\mu\text{g/ml}$ ; e: 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ; f: 0  $\mu\text{g/ml}$

图2 mGGn和mG6对B16F10细胞迁移的影响( $\times 40$ )

Fig.2 Effect of mGGn and mG6 on migration of B16F10 cells( $\times 40$ )

### 2.3 mGGn与mG6均能明显抑制B16F10细胞增殖

CCK-8法检测检测结果(图3A)显示, mGGn蛋白分别处理24、48和72 h后, 最高浓度抑制率从43.56%升高到72.74%,  $\text{IC}_{50}$ 分别达到3 184.000、325.382和25.179  $\mu\text{g/ml}$ 。mG6蛋白分别处理24、48、72 h后, 最高浓度抑制率从49.56%上升到79.54%,

$\text{IC}_{50}$ 分别达到3 226.000、252.144和27.385  $\mu\text{g/ml}$ (图3B)。在相同作用浓度下, 培养48和72 h后的抑制率与对照组(培养24 h)相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 表明mGGn与mG6能抑制B16F10细胞增殖活性, 且具有时间效应和剂量效应。

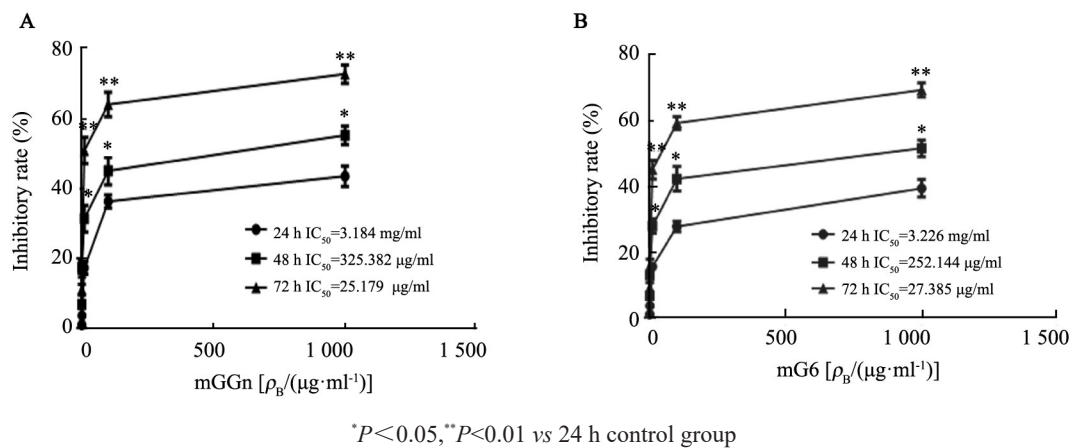


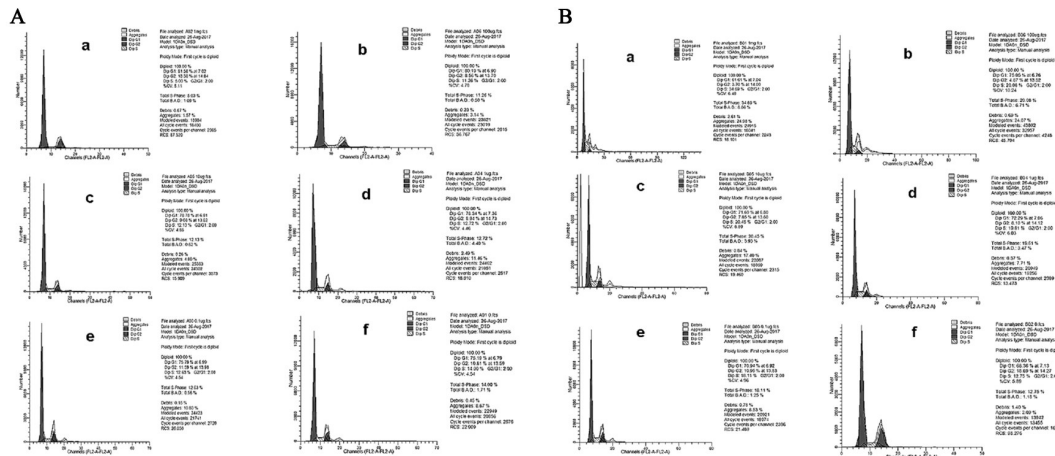
图3 mGGn和mG6不同作用浓度和作用时间对B16F10细胞增殖活性的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effects of different concentrations of mGGn and mG6 treatment for various time periods on the proliferation of B16F10 cells

2.4 mGGn和mG6能阻滞B16F10细胞周期

给药组(0.1、1、10、100、1 000 μg/ml)和空白对照组mGGn与mG6作用B16F10细胞24 h后,流式细胞仪检测结果(图4A、表1)显示,mGGn在一定程度上能使B16F10细胞周期阻滞于G1期,不能进入S期,从

而抑制细胞生长,且具有剂量依赖关系。而mG6融合蛋白在一定程度上能使B16F10细胞周期阻滞于S期,不能进入G2期,从而抑制细胞生长,且具有剂量依赖关系(图4B、表1)。



A:mGGn; B:mG6; a: 1 000 μg/ml; b: 100 μg/ml; c: 10 μg/ml; d: 1 μg/ml; e: 0.1 μg/ml; f: 0 μg/ml

图4 mGGn和mG6蛋白作用24 h后对B16F10细胞周期的影响

Fig.4 Effect of mGGn and mG6 proteins on the cell cycle distribution of B16F10 cells after treatment for 24 h

表1 不同浓度mGGn和mG6作用24 h后B16F10细胞周期的变化(%)

Tab.1 Changes in the cell cycle of B16F10 cells after treatment of different concentrations of mGGn and mG6 for 24 h (%)

Concentration [ $c_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]	mGGn		mG6	
	G1	S	S	G2
0	75.19	14.00	12.75	18.89
0.1	75.79	12.63	18.11	10.95
1	78.34	12.72	19.61	8.10
10	78.78	12.13	20.45	7.85
100	80.19	11.26	20.08	4.87
1 000	81.58	5.03	34.69	3.70

2.5 生物信息学预测mGGn和mG6的基本属性

mGGn蛋白的理论PI为6.33,分子质量约为22 000,由EXPASY的ProtParam子程序得出该蛋白状态稳定,由TARGETP初步推断该蛋白为胞内表达蛋白,由SignalP得出该蛋白没有信号肽,为非分泌蛋白。利用EXPASY的子程序ProtScale进行亲疏水性分析得出mGGn为亲水蛋白。同上,mG6的理论PI为6.99、分子质量约为22 000,该蛋白状态稳定,为胞内表达蛋白,不含信号肽,为非分泌亲水性蛋白。

2.6 生物信息学预测mGGn和mG6蛋白二级结构

利用GOR对mGGn进行二级结构折叠类预测,结果(图5)显示,β-转角及无规卷曲是比较松散的柔性结构,该区域常含有B细胞的优势表位。其无规卷曲和β-转角主要位于第1~16、29~55、65~69、75~104、111~199位氨基酸。mG6二级结构折叠类预测结果(图6)显示,其无规卷曲和β-转角主要位于第1~16、29~55、65~69、75~104、111~200位氨基酸。

2.7 生物信息学预测重组融合蛋白三级结构

图7a模型是以GM-CSF为同源模板建模,QMEAN是一个对构建出的同源模型进行整体评估的检测工具,Z-score是能量值的差值,Z分数越低越稳定,整个模型的质量就越好。QMEAN4重要的指标为模型总体能量值,溶剂化能和扭转势能。从图7b可以看出mGGn和mG6融合蛋白的模型能量值得分都较低,符合模型稳定性的条件要求。图7c表示准备建模的氨基酸序列与PDB数据库中其他蛋白质的匹配度。

2.8 生物信息学预测出mGGn抗原表位

由上述结果发现mGGn与mG6基本物理性质与空间结构相似、体外抗肿瘤效果相同,故随机选取mGGn作为目标蛋白,预测其最可能的潜在抗原B细胞、CTL和Th表位。IEDB软件联合ABCpred软件对目标蛋白数据进行归纳整理,得到的候选B细胞表位肽(表2);将SYFPEITHI和BIMAS独立预测得到分

值较高的抗原表位, 再结合 NetCTL1.2 预测结果进行综合分析后筛选出的候选 CTL 表位肽(表 3); 综合

NetMHCIIpan 3.1 Server 和 IEDB 两种方法预测结果筛选出的候选 Th 表位肽(表 4)。

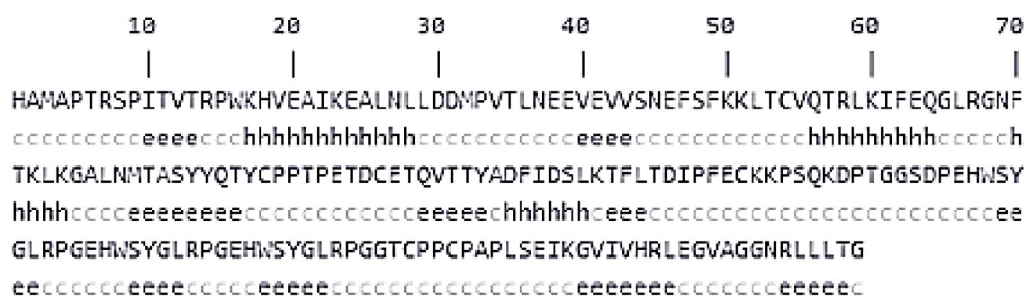


图 5 mGn 融合蛋白氨基酸在序列中的状态

Fig.5 The state of the mGn amino acid sequence

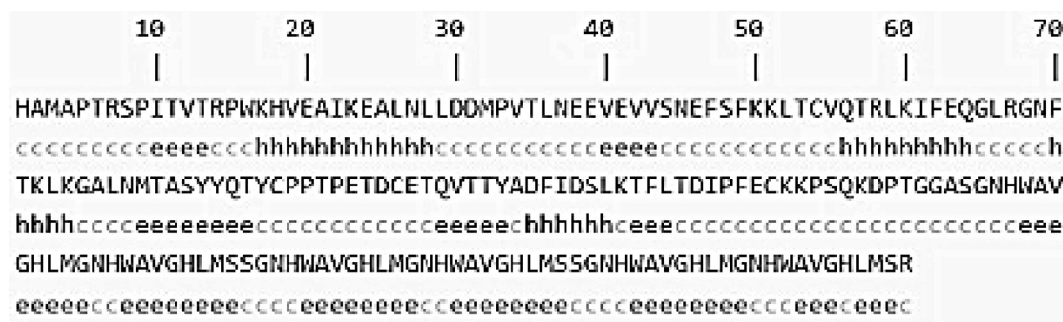
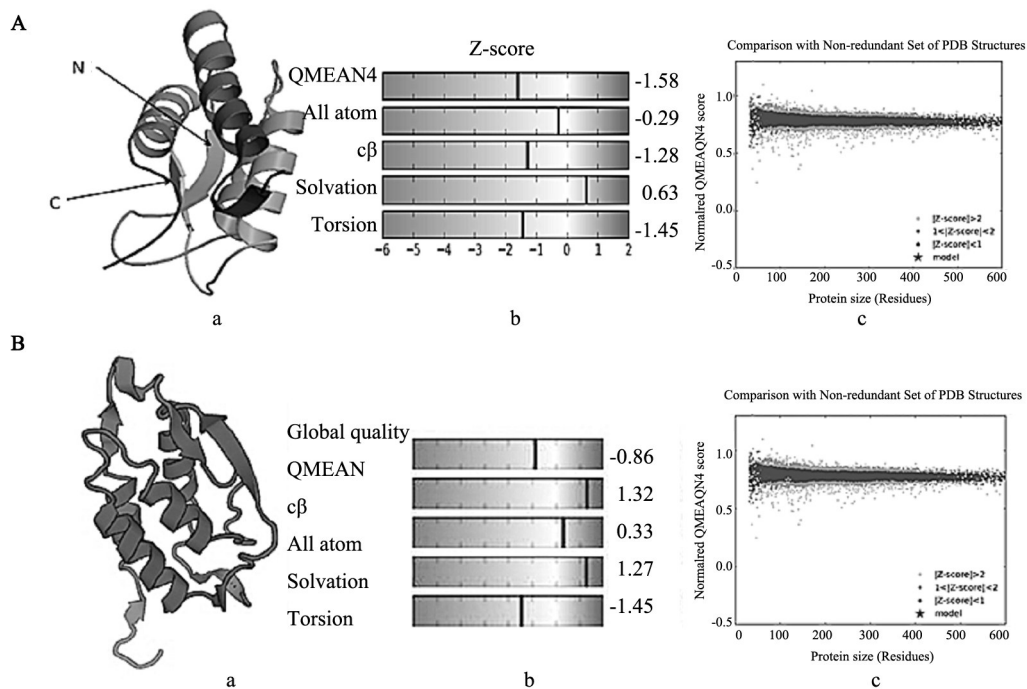


图 6 mG6 融合蛋白氨基酸在序列中的状态

Fig.6 The state of the mG6 amino acid sequence



A:mGn; B:mG6; a:The three - dimensional structure; b:The Z points of fusion protein; c:The QMEAN4 points compared with PDB

图 7 SWISS-MODEL 预测 mGn 和 mG6 蛋白的三级结构

Fig.7 Prediction of the tertiary structure of mGn and mG6 proteins by SWISS-MODEL

表2 候选B细胞表位肽

**Tab.2 The candidate epitope peptides of B cell**

Peptide	Sequence
P81-96	ASYYYQTYCPPTPETDC
P129-144	PTGGSDPEHWSYGLRP
P27-42	NLLDDMPVTLNEEVEV
P39-54	EVEVVSNEFSFKKLT
P58-73	RLKIFEQGLRGNFTKL

表3 候选CTL表位肽

**Tab.3 The candidate epitope peptides of CTL**

Peptide	Sequence	SYFPEITHI	BIMAS	NetCTL
P28-36	LLDDMPVTL	27	59.558	1.333
P35-43	TLNEEVEVV	27	131.765	1.021
P51-59	KLTCVQTRL	20	74.768	1.016
P113-121	FLTDIPFEC	13	543.440	1.120
P181-189	VIVHRLEGV	24	18.323	0.773

表4 候选Th表位肽

**Tab.4 The candidate epitope peptides of Th**

Pos	Peptide	MHC allele	NetMHCIIpan 3.1 Server	IEDB
P67-81	RGNFTKLKALNMTA	HLA-DRB1 *0901	0.60	0.68
		HLA-DRB1 *1202	9.50	30.76
		HLA-DRB1 *1501	6.50	6.72
P172-186	PAPLSEIKGVIVHRL	HLA-DRB1 *0901	0.80	35.83
		HLA-DRB1 *1202	1.00	47.76
		HLA-DRB1 *1501	0.60	6.07
P107-121	IDSLKTFLTDIPFEC	HLA-DRB1 *0901	5.50	34.66
		HLA-DRB1 *1202	8.50	22.14
		HLA-DRB1 *1501	5.00	12.87

### 3 讨论

恶性黑色素瘤起源于人类神经嵴黑色素细胞,并由黑色素细胞恶性转化而来,具有高度侵袭、高度转移<sup>[9]</sup>。有研究<sup>[10-11]</sup>发现,人类恶性黑色素瘤在儿童和青少年的发病率呈逐年上升的趋势,常规化疗方法效果不佳,预后极差,严重危害人类健康。近年来,生物治疗成了恶性黑色素瘤另外一种重要的治疗策略,其中比较突出的应用就是肿瘤疫苗。GnRH和GRP与许多恶性肿瘤的发生、转移、侵袭等关系密切,可以作为肿瘤标志物应用于肿瘤疫苗<sup>[12-13]</sup>。而GnRH和GRP免疫原性很弱,将其单独作为疫苗很难引起免疫应答,故研发GnRH和GRP疫苗的首要任务就是增强其免疫原性<sup>[14-15]</sup>。AUSSILHOII等<sup>[16]</sup>研究表明,接种腺病毒感染的mGM-CSF修饰后辐照的自体肿瘤全细胞疫苗能增强全身性的免疫反应,可用作肝癌转移手术切除后的辅助治疗。故本研究将GnRH与GRP分别与可发挥佐剂作用的mGM-CSF通过连接肽相偶联构成两种新型融合蛋白,防治肿瘤免疫逃逸现象,以期提高机体对肿瘤细胞的免疫应答。

本研究中首先观察了不同作用浓度的重组融合蛋白对B16F10细胞形态的影响,研究发现mGGn与mG6作用于B16F10肿瘤细胞能使细胞形态明显改变,且具有剂量依赖性。随后进一步研究了重组融

合蛋白对B16F10细胞增殖与迁移能力的影响,结果表明mGGn和mG6能抑制B16F10瘤细胞的增殖与迁移,并分别诱导B16F10细胞G1/S期和S/G2期细胞周期阻滞,且具有剂量依赖关系。最后通过生物信息学的方法进行初步预测,更加全面加深对重组融合蛋白的了解。生物信息学已被广泛应用于疫苗设计、新基因的鉴定、新病毒的发现等方面,利用生物信息学方法分析mGGn蛋白的结构和潜在抗原表位有助于发现重要的疫苗蛋白靶点和药物作用靶点<sup>[17-18]</sup>。本研究对mGGn蛋白三级结构、B细胞、CTL和Th表位、蛋白亲水性等进行分析表明,重组融合蛋白二级结构折叠类型中 $\beta$ -转角及无规卷曲所占比重较大, $\beta$ -转角及无规卷曲二级结构处结构比较松散,易于发生扭曲、盘旋并多位于蛋白表面,有利于与抗体嵌合,较可能成为抗原表位<sup>[19-20]</sup>。由于目前的预测方法均存在一定程度的误差,因此本研究选用多个在线软件进行预测,综合分析选出可能性较大的抗原表位,结果表明,mGGn蛋白预测出5个可能性较大的B细胞和CTL表位以及3个Th表位。由此表明,mGGn蛋白不仅能够被CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞识别,还能被B细胞识别,具有诱导细胞免疫和体液免疫的潜能;而且mGGn蛋白亲水性较高,易表达;上述发现有助于进一步深入研究mGGn蛋白的免疫功能。

综上所述,mGGn和mG6蛋白在体外对B16F10

黑色素瘤细胞具有抑制作用,其动物体内抗肿瘤效应有待进一步研究。此外,该重组融合蛋白对其他癌症有无抗癌作用还待进一步验证,今后 mGGn 与 mG6 可单独作为多肽疫苗或联合其他药物进行特异性靶向治疗,本研究为后续实验研究奠定了基础,具有良好的临床应用前景。

### [参考文献]

- [1] BACKOFEN M, SCHWACH G, KOEHLING W, et al. Polyanion based controlled release system for the GnRH-receptor antagonist degarelix[J/OL]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 104: 65-71[2018-03-01]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928-0987\(17\)30170-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928-0987(17)30170-7). DOI: 10.1016/j.ejps.2017.03.036.
- [2] ZHANG W, GARG S, ELDI P, et al. Targeting prostate cancer cells with genetically engineered polypeptide-based micelles displaying gastrin-releasing peptide[J]. *Int J Pharm*, 2016, 513(1/2): 270-279. DOI:10.1016/j.ijpharm.2016.09.039.
- [3] BEGUM A A, MOYLE P M, TOTH I, et al. Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(22): 5834-5841. DOI:10.1016/j.bmc.2016.09.039.
- [4] YAN W L, SHEN K Y, TIEN C Y, et al. Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy[J]. *Immunotherapy*, 2017, 9(4): 347-360. DOI:10.2217/imt-2016-0141.
- [5] GOLDMAN C, AKIYAMA M J, TORRES J, et al. Scedosporium apiospermum infections and the role of combination antifungal therapy and GM-CSF: a case report and review of the literature[J/OL]. *Med Mycol Case Rep*, 2016, 11: 40-43[2018-03-01]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211-7539\(16\)30030-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211-7539(16)30030-6). DOI: 10.1016/j.mmcr.2016.04.005.
- [6] BECHER B, TUGUES S, GRETER M, et al. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation[J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 963-973. DOI:10.1016/j.immuni.2016.10.026.
- [7] ALEXANDER W S. In vivo at last: demonstrating the biological credentials and clinical potential of GM-CSF[J]. *Exp Hematol*, 2016, 44(8): 669-673. DOI:10.1016/j.exphem.2016.01.006.
- [8] MESSERSCHMIDT J L, BHATTACHARYA P, MESSERSCHMIDT G L. Cancer clonal theory, immune escape, and their evolving roles in cancer multi-agent therapeutics[J]. *Curr Oncol Rep*, 2017, 19(10): 66-77. DOI:10.1007/s11912-017-0625-2.
- [9] VORA G K, DEMIRCI H, MARR B, et al. Advances in the management of conjunctival melanoma[J]. *Surv Ophthalmol*, 2017, 62(1): 26-42. DOI:10.1016/j.survophthal.2016.06.001.
- [10] ESPENEL S, VALLARD A, RANCOULE C, et al. Melanoma: last call for radiotherapy[J/OL]. *Crit Rev Hematol*, 2017, 110: 13-19 [2018-03-01]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040-8428\(16\)30365-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040-8428(16)30365-1). DOI:10.1016/j.critrevonc.2016.12.003.
- [11] ASCIERTO P A, ACCORONA R, BOTTI G, et al. Mucosal melanoma of the head and neck[J/OL]. *Crit Rev Hematol*, 2017, 112: 136-152[2018-03-01]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040-8428\(17\)30045-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040-8428(17)30045-8). DOI:10.1016/j.critrevonc.2017.01.019.
- [12] XU J, ZHU Z, WU J, et al. Immunization with a recombinant GnRH vaccine conjugated to heat shock protein 65 inhibits tumor growth in orthotopic prostate cancer mouse model[J]. *Cancer Lett*, 2007, 259(2): 240-250. DOI:10.1016/j.canlet.2007.10.011.
- [13] HAO M Z, ZHOU W Y, DU X L, et al. Novel anti-melanoma treatment: focus on immunotherapy[J]. *Chin J Cancer*, 2014, 14(9): 458-465. DOI:10.5732/cjc.014.10118.
- [14] EARL E R, WATERSTON M M, AUGHEY E, et al. Evaluation of two GnRH-I based vaccine formulations on the testes function of entire Suffolk cross ram lambs[J]. *Vaccine*, 2006, 24(16): 3172-3183. DOI:10.1016/j.vaccine.2006.01.041.
- [15] BEGUM A A, MOYLE P M, TOTH I. Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(22): 5834-5841. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.09.039.
- [16] AUSSILHOU B, PANIS Y, ALVES A, et al. Tumor recurrence after partial hepatectomy for liver metastases in rats: prevention by in vivo injection of irradiated cancer cells expressing GMCSF and IL-12 [J]. *J Surg Res*, 2008, 149(2): 184-191. DOI: 10.1016/j.jss.2007.12.789.
- [17] MA X, ZHOU X, ZHU Y, et al. The prediction of T-and B-combined epitope and tertiary structure of the Eg95 antigen of *Echinococcus granulosus*[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(3): 657-662. DOI: 10.3892/etm.2013.1187.
- [18] TSAO H, FUKUNAGA-KALABIS M, HERLYN M. Recent advances in melanoma and melanocyte biology[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(3): 557-560. DOI:10.1016/j.jid.2016.11.004.
- [19] SAHA S, RAGHAVA G P S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network[J]. *Proteins*, 2006, 65(1): 40-48. DOI:10.1002/prot.21078.
- [20] CHEN J, LIU H, YANG J, et al. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale[J]. *Amino Acids*, 2007, 33(3): 423-428. DOI:10.1007/s00726-006-0485-9.

[收稿日期] 2018-01-02

[修回日期] 2018-03-19

[本文编辑] 王映红