论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0406-04

MUC1抗原的B细胞表位预测

杨清浩[1],王祥卫[1],金 燕[1],张立新[2] ([1]第三军医大学新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037;[2]北京军事医学科学院307医院肿瘤分子室,北京 100850)

提 要:目的 预测MUC1抗原的B细胞表位。**方法** 联合运用多种方法对MUC1的二级结构和表面特性,如理化性质、亲水性、可塑性、溶剂可及性及免疫原性等方面进行分析,预测MUC1的抗原表位。**结果** MUC1存在有多个潜在的抗原表位位点,可能的蛋白质抗原表位区域:1-10,24-54,65-77,84-91,108-134,140-156,159-174,179-196,199-210,220-233,237-265,270-299,316-337,351-362,369-396,411-420,445-502。**结论** 应用多参数预测MUC1抗原的B细胞表位,为进一步研究MUC1结构和功能、构建MUC1突变体和选择表达新型MUC1分子奠定了基础。

关键词:MUC1抗原;B细胞;表位

中图法分类号:R341.32;R392.11 **文献标识码**:A

Prediction of the B cell epitope for MUC1 antigen

YANG Qing-hao[1], WANG Xiang-wei[1], JIN Yan[1], ZHANG Li-xin[2] ([1]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Oncology, No. 307 Hospital, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To predict the B cell epitope for MUC1 antigen. **Methods** The secondary structure and surface properties of MUC1, such as physical and chemical characters, hydrophilicity, antigenicity, were analyzed with various methods. **Results** Many distinct antigenic epitopes in MUC1 were identified by computation: 1-10, 24-54, 65-77, 84-91, 108-134, 140-156, 159-174, 179-196, 199-210, 220-233, 237-265, 270-299, 316-337, 351-362, 369-396, 411-420, and 445-502. **Conclusion** Prediction of the B cell epitope for MUC1 can provide a base for the studies of structure and function of MUC1, construction of its mutants, and selection of new expression forms of MUC1.

Key words: MUC1 antigen; B cell; epitope

MUC1蛋白是一种高分子量糖蛋白,在人膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌等腺上皮细胞均有表达。MUC1在肿瘤细胞中表达量增高,为正常的100倍以上;肿瘤细胞MUC1广泛分布,而正常细胞MUC1呈极性分布;MUC1糖链的糖基化不全,导致正常情况下隐蔽的肽链表位暴露。基于以上特点,MUC1可作为免疫治疗的靶点。为分析研究MUC1的结构和功能关系,了解其二级结构特征和表面特性,我们在方法学比较的基础上,联合运用多方法预测MUC1的抗原表位。为研究针对MUC1抗原的肿瘤免疫预防和免疫治疗预措施提供线索。

1 材料与方法

1.1 蛋白质的序列

蛋白质的序列检索自瑞士生物信息研究所提供的Swiss-Prot蛋白质数据库。

1.2 二级结构预测

应用DNAStar Protean软件提供的模块进行,采用Chou等提出的预测方案和Garnier法[1,2]。

1.3 亲水性参数

应用DNAStar Protean软件进行,采用Hopp-Woods等[3,4]方案。

1.4 可及性参数

采用AntheProt软件提供蛋白质溶剂可及性(Solvent accessibility)方案。

1.5 可塑性预测

应用DNAStar Protean软件进行,采用Karplus-Schultz[5]方案。

1.6 抗原性指数分析

采用DNAStar Protean软件提供的抗原指数分析模块,与方法对MUC1的抗原表位进行预测。该模块采用Jameson-Wolf[6]的方法,为4参数联立的综合预测方法包括:亲水性、表面特性、可塑性、二级结构预测方案。

2 结果

2.1 MUC1序列分析

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTE

基金项目:国家"863"课题资助项目(2002AA214111)
Supported by the National "863" Research Projects of China (2002AA214111)

作者简介:杨清浩(1965-),男,四川省蓬溪县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事膀胱肿瘤方面的研究。电话:(023)68752283

收稿日期:2004-11-29;修回日期:2005-02-15

KNAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVTLAPATEPASGSAATWGQD-
VTSVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTR-
PPPGSTAPPAHGVTSAPDTRPPPGSTAPAAHGVTSAPDTRPAPGSTAP-
PAHGVTSAPDNRPALASTAPPVHNVTSASGSASGSASTLVHNGTSAR-
ATTTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSTVPPLTSSN-
HSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQRDISEMFLQ-
IYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTE-
AASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLVCVLVALAI-
VYLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPS-
STDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

MUC1 含 516 个氨基酸，分子量 53×10^3，含有 3 个 VNTRs 重复(PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA)。

2.2　MUC1 的二级结构预测

采用 DNAStar 软件的 Chou-Fasman 方案和 Garnier 法进行二级结构预测，结果(图 1)表明：MUC1 属于一种混合型蛋白，其中，α-螺旋占 11%，β-片层占 47%，Turn(转角)占 12%，Coil(无规则卷曲)占 30%。

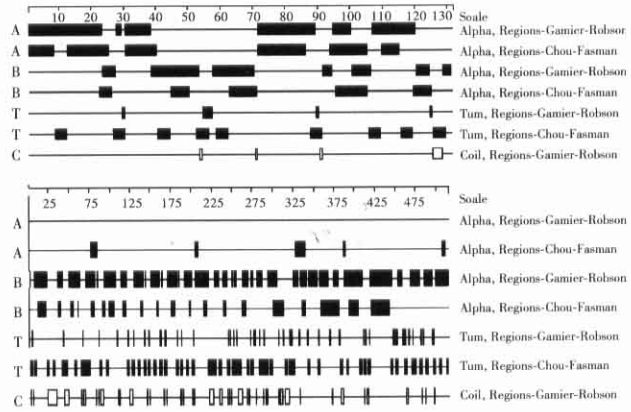


图 1　MUC1 的二级结构分析(DNAStar Protean)

Fig 1　Prediction of the secondary structure of MUC1

2.3　MUC1 的亲水性

结果见图 2，MUC1 亲水性区域的分布不均匀，中部分布较为密集，亲水性较高区域：1-10，25-57，65-82，85-100，110-211，236-300，311-339，373-397，443-497。

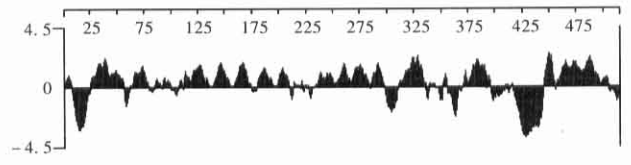


图 2　MUC1 亲水性分析(DNAStar Protean)

Fig 2　Analysis of hydrophilicity of MUC1 by DNAStar Protean

2.4　MUC1 的溶剂可及性

MUC1 的溶剂可及性分析曲线近似于亲水性方案分析曲线(图 3)。可及性较高区域，位于 MUC1 分子表面。可及性较低区域，即埋藏于分子内部的区域。

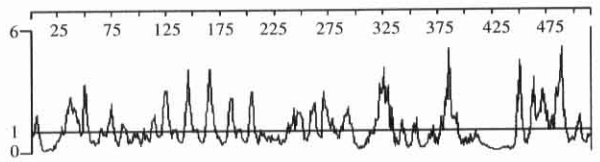


图 3　MUC1 的溶剂可及性分析

Fig 3　Analysis of solvent accessibility of MUC1

2.5　MUC1 的可塑性预测

可塑性较高区域(图 4)：22-51，57-77，84-90，104-113，120-133，139-153，160-171，180-194，220-230，256-263，270-297，314-325，351-359，379-388，411-417，480-500。这些区域可能具有一定的柔韧性，形成表位的可能性较大，容易与抗体进行嵌合。由于 MUC1 是一种具有一定刚性和伸展性的大分子，表达于细胞表面可覆盖其周围的细胞表面分子，从而影响细胞表面分子间的相互作用，从而有助于肿瘤细胞从瘤体上释放出来，逃避免疫系统的监视。



图 4　MUC1 的可塑性分析

Fig 4　Analysis of flexible regions of MUC1

2.6　MUC1 抗原表位预测

应用 DNAstar 软件，采用 Jameson-Wolf 方法对 MUC1 的抗原表位进行预测(图 5，6)，可看出 MUC1 存在有多个潜在的抗原表位位点，可能的蛋白质抗原表位区域：1-10，24-54，65-77，84-91，108-134，140-156，159-174，179-196，199-210，220-233，237-265，270-299，316-337，351-362，369-396，411-420，445-502。

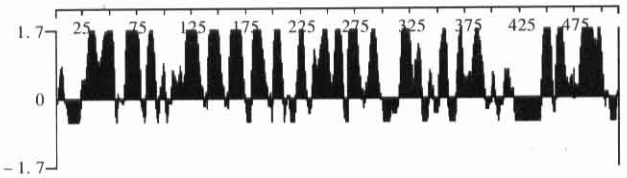


图 5　MUC1 的抗原性指数分析(DNAStar Protean)

Fig 5　Analysis of the antigenic index of MUC1 by DNAStar Protean

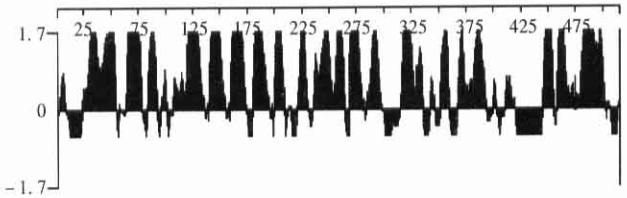


图 6　MUC1 的抗原性指数分析(AntheProt)

Fig 6　Analysis of the antigenic index of MUC1 by AntheProt

3　讨论

近年来，人粘蛋白基因相继被克隆，目前已明确的

有7种，命名为MUC1-7，分别编码粘蛋白MUC1-7的蛋白骨架。各粘蛋白核心肽的单抗或多抗亦相继制备成功，这为研究这些粘蛋白前体核心肽在人正常组织中的分布及肿瘤发生中异常表达的意义奠定了基础。其中MUC1基因克隆最早[2]，其编码是一种大而复杂、高度糖基化的分子，是7种粘蛋白中惟一的跨膜分子，与肿瘤细胞表型的变化、细胞粘附、免疫识别、肿瘤的转移和预后有密切关系[7,8]。

X射线晶体学技术和多维核磁共振技术是当前人们认识蛋白高级结构的主要手段，但这两种技术都有不足之处。前者要求必需得到高标准的蛋白晶体，后者对分子量大于3×10^4的大蛋白不能测定，因此理论模拟和结构预测显得十分重要。

近年来，随着生物信息学的迅速发展，生物学家设计了许多分子生物学软件用于蛋白质的分析。B细胞识别蛋白抗原时，是以其表面的B细胞抗原受体(BCR)与蛋白抗原表位（抗原决定簇）结合，此过程与抗原抗体的结合相同。B细胞蛋白抗原表位的预测自从80年代Hopp等提出亲水性参数对抗原表位预测的方法以来，已有许多参数和算法发表，对B细胞蛋白抗原表位研究起到巨大的推动作用。现今已被大众认可并具有较好预测效果的方法，主要有6种：(1)二级结构预测（secondary structure）。蛋白质二级结构分析与蛋白质表位的分布关系密切，α螺旋、β折叠结构规则，形态固定，常处于蛋白质的内部，难以与抗体嵌合；而β转角和无规则卷曲多处于蛋白质的表面，结构突出，有利于与抗体嵌合，成为抗原表位的可能性大[9]。蛋白质二级结构预测方案，最常采用的是Chou-Fasman方案。Chou最初证实了29种蛋白质晶体结构，1990年，Chou[10]加以完善。目前该方案已包括64种蛋白质晶体结构和4类蛋白质结构，即：α螺旋、β片层、β转角和无规则卷曲。(2)亲水性方案(hydrophilicity)，以Hopp方案最有名，认为蛋白抗原各氨基酸残基可分为亲水残基和疏水残基两类。在机体内，疏水性残基一般埋在蛋白内部，而亲水性残基位于表面，因此蛋白的亲水部位与蛋白的抗原位点有密切的联系。典型的水溶性球蛋白的表面由亲水性残基组成，蛋白质表位常处于表面电荷极性最大的区域。Hopp亲水性方案以残基由有机相环境转移到水相环境的自由能为依据，计算各个氨基酸的亲水性，以预测蛋白质的表位。该亲水性方案基于以下理论：①抗原表位经常处于高度暴露于溶剂的区域。②抗原表位常含有亲水性侧链。现已明确，亲水性部位与表位并无很好的一致性，即高亲水部位不一定是表位，表位也不一定是亲水性部位。(3)可及性方案(accessibility)，指蛋白抗原中氨基酸残基被溶剂分子接触的可能性，它反映了蛋白抗原内、外各层各残基的分布组成。(4)抗原性方案(antigenicity)，认为除亲水性氨基酸残基外，疏水性氨基酸残基也经常出现在表位中，各残基在蛋白抗原位点中的相对出现率对抗原表位的定位预测有一定意义。许多蛋白抗原表位研究已证实，疏水性氨基酸残基对表位形成亦有贡献。(5)可塑性方案(flexibility)，指蛋白抗原构象不是刚性不变的，其多肽骨架有一定程度的活动性。(6)电荷分布方案(charge distribution)。认为对碱性抗原特异的抗体多趋于酸性，对酸性抗原特异的抗体多趋于碱性。但现在理解电荷作用引起的只是非特异性结合。预测B细胞蛋白抗原表位一般以上述多种方案综合考虑。概括而言，作为B细胞蛋白抗原的表位首先应易于位于或移动于蛋白抗原表面，有利于与B细胞抗原受体或抗体结合，另外，要有一定柔韧性，因为抗原与抗原受体或抗体结合有一个嵌合的过程。MUC1抗原能引起免疫应答的表位(功能性表位)位于其胞外区，其跨膜区和胞内区因存在空间位阻，不能成为其功能性表位。

本研究采用Chou-Fasman方案和Garnier法预测MUC1二级结构，结果显示：α-螺旋占11%，β-片层占47%，Turn(转角)占12%，Coil(无规则卷曲)占30%。β转角和无规则卷曲结构的存在为抗原表位的确定提供了有力的证据。但是，本研究显示仅依赖亲水性预测方案进行表位的确定，有时会导致表位的遗漏。例如：亲水性方案预测结果显示，MUC1氨基酸残基130aa-139aa含有较多的疏水性氨基酸，成为抗原表位的可能性较小。但是，表位作图法证实该区存在单抗的抗原结合位点，其氨基酸序列为STAPPAHGV[11]。由此看来，亲水性部位与表位并无很好的一致性，即高亲水性部位不一定是表位，表位也不一定是亲水性部位。疏水性氨基酸也经常出现在表位中。所以，预测抗原表位，应采用多种参数进行综合分析。

蛋白质抗原表位的抗原指数分析最常采用的方案为Jamson-Wolf方案。该方案综合了亲水性分析值〔Hopp-Woods，H[〈2〉0.5〈1〉0〈-1〉0.5〈-2〉]〕、表面特性分析值〔Emini，S[〈1〉1.0〈0〉]〕、可塑性分析值[5]〔Karplas-Schulz，F[〈1〉1.0〈0〉]〕和二级结构预测分析值〔Chou-Fasman，CF[$t=2,t=1,0$]，Garnier-Robson，GR[$t=2,t=1,0$]〕采用以下公式计算：

$$A=0.3H+0.15S+0.15F+0.2CF+0.2GR$$

预测蛋白抗原表位在上述多种方案综合考虑的基础上，而以可及性方案、可塑性方案、二级结构预测及抗原性方案为重要。本研究仅对MUC1抗原表位进行了预测，但应用效果必须用实验结果来确认。

参考文献：

[1] Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence[J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Bid, 1978, 47: 45 - 148.

[2] Chou P Y, Fasman G D. Empirical predictions of protein conformation[J]. Annu Rev Biochem, 1978, 47: 251 - 276.

[3] Hopp T P. Protein surface analysis. Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites[J]. J Immunol Methods, 1986, 88(1): 1 - 18.

[4] Hopp T P. Retrospective: 12 years of antigenic determinant predictions, and more[J]. Pept Res, 1993, 6(4): 183 - 190.

[5] Karplus P A, Schultz G E. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. Naturwissenschaften, 1985, 72: 212 - 213.

[6] Jameson B A, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants[J]. Comput Appl Biosci, 1988, 4(1): 181 - 186.

[7] Moniaux N, Escande F, Porchet N, *et al*. Structural organization and classification of the human mucin genes[J]. Front Biosci, 2001, 6: D1192 - 1206.

[8] Silverman H S, Parry S, Sutton-Smith M, *et al*. *In vivo* glycosylation of mucin tandem repeats[J]. Glycobiology, 2001, 11(6): 459 - 471.

[9] Apostolopoulos V, Yu M, Corper A L, *et al*. Crystal structure of a non-canonical low-affinity peptide complexed with MHC class I: a new approach for vaccine design[J]. J Mol Biol, 2002, 318(5): 1293 - 305.

[10] Chou P Y. Prediction of protein structural classes from amino acid composition[A]. In: Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation[M]. New York: NY, Plenum Press, 1990. 549 - 586.

[11] Engelmann K, Baldus S E, Hanisch F G. Identification and topology of variant sequences within individual repeat domains of the human epithelial tumor mucin MUC1[J]. J Biol Chem, 2001, 276(30): 27764 - 27769.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2005)05-0409-01

个案与短篇

网球肘的综合康复治疗

The rehabilitative treatment on tennis elbow by a comprehensive therapy

田家林，蔡永丰 （中国人民解放军驻香港部队医院理疗科，深圳 518048）

网球肘是一种常见病，主要表现为肱骨外上髁部及肱桡关节附近疼痛不适及上肢功能障碍，持物困难常迁延不愈，影响患者正常生活和工作。我们采用综合康复疗法对 57 例网球肘进行了治疗，取得了良好效果，现报告如下。

1 资料与方法

57 例网球肘患者，男 31 例，女 26 例。发病部位：右侧 34 例，左侧 21 例，双侧 2 例。年龄 18～59 岁，平均 35 岁。病程 7 d～9 个月。临床症状：肘关节外侧疼痛，乏力，前臂活动时，尤其是前臂旋后运动时，疼痛加剧。体征：肱骨外上髁、桡骨头及二者之间有局限而明确的压痛点，伸肌腱牵拉试验（Mills 征）阳性。

本组均采用非手术疗法，依次行局部封闭、理疗、按摩及运动疗法等综合治疗。①封闭治疗：醋酸泼尼松龙注射液 0.5 ml（12.5 mg）加 2%盐酸普鲁卡因注射液 2 ml 作患侧肘外侧痛点局部封闭，注射 1 次后仍疼痛者可隔 7 d 1 次，一般不超过 3 次。②物理治疗：采用荷兰产超声波治疗仪（Sonopuls492 型），频率 3 MHz，声头直径 3 cm，超声头置于肘外侧痛点处，涂足量耦合剂，接触移动法作缓慢回环移动，连续式，0.7～1.6 W/cm^2，每次 15 min，1 次/d，10 次为 1 个疗程。用上海产 LDF-CD31 型超短波治疗仪，波长 7.37 m，频率 40.68 MHz，最大输出功率 200 W，板状电容电极 15 cm×10 cm，间隙 2.0～2.5 cm，痛点对置法（对置于肘外侧痛处及内侧相对应处），微热量，20 min/次，1 次/d，10 次为 1 个疗程。一般为 2 个疗程，每疗程间隔 1 周。③按摩治疗：患者取坐位，屈肘，医者一手托持患肢前臂，另一手轻柔抚摩、推揉、捏拿上臂至前臂，重点按摩肘部外侧，使肌群得到充分放松。然后以拇指揉按桡侧伸腕肌腱起始处或肱桡关节间隙，点压阿是穴（最痛点）及肘髎、曲池、手三里、外关、合谷等穴位，使局部出现酸麻胀感，疼痛减轻。同时环绕摇肘作前臂旋转及肘关节屈伸数次。最后双手反复捏患侧上臂到前臂结束按摩。15 min/次，1 次/d，10 次为 1 个疗程。④按摩完毕后指导患者进行运动疗法：做伸腕、握拳、持物等前臂伸肌伸展与肌力增强练习。15 min/次，2 次/d，10 次为 1 个疗程。

2 结果

以下列 3 项为判定疗效指标：①腕、肘关节活动度（包括旋前、旋后）；②患者疼痛改善情况；③患者握力，握力指数（正常值 > 50）。治愈标准：腕、肘关节活动度正常，疼痛消失，握力指数 > 50；显效：腕、肘关节活动度基本正常，疼痛明显好转，握力指数 > 40；好转：治疗后上述指标有进步；无效：治疗前后无明显变化。

痊愈 36 例（63.16%），显效 12 例（21.05%），好转 8 例（14.04%），总有效率为 98.25%。

3 讨论

网球肘又称肱骨外上髁炎，为肱骨外上髁处伸肌总腱起点

（下转 413 页）

作者简介：田家林（1967－），男，湖北省武汉市人，主治医师，主要从事物理治疗方面的研究。电话：(027)87862904

收稿日期：2004-11-26；修回日期：2004-12-30