文章编号:1000-5404(2005)20-2031-04

论著

噬菌体颗粒抗原与MHC-Ⅱ类分子的交叉递呈位于内质网囊泡

郭 晟,万 瑛,周镜然,邹丽云,刘 娜,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究噬菌体呈现颗粒交叉递呈过程中,MHC-Ⅰ-抗原肽复合物在细胞内的形成部位,及其与MHC-Ⅱ类分子阳性区域和内质网标志物阳性区域的关系。**方法** 构建呈现$OVA_{257-264}$表位的噬菌体颗粒,大量制备此重组噬菌体颗粒。巨噬细胞与重组噬菌体颗粒共孵育后,使用抗MHC-Ⅰ-抗原肽复合物特异性单克隆抗体,观察巨噬细胞中MHC-Ⅰ-抗原肽复合物形成的部位。使用抗MHC-Ⅱ类分子、内吞相关区域标志蛋白的单克隆抗体以及能显示内质网的特异性荧光染料,观察巨噬细胞内MHC-Ⅰ-抗原肽复合物和内吞相关区域及内质网的关系。**结果** 成功构建了呈现$OVA_{257-264}$表位的噬菌体颗粒,纯化并鉴定了此噬菌体颗粒表达$OVA_{257-264}$表位的情况。共聚焦显微镜观察到MHC-Ⅰ-抗原肽复合物和MHC-Ⅱ类分子阳性区域共聚,进一步染色发现此复合物位于转铁蛋白受体和LAMP-1(晚期内体/溶酶体的表面标志物)阳性区域中,同时此区域呈现内质网标志蛋白阳性。**结论** 重组噬菌体颗粒能在MHC-Ⅱ类分子阳性、内体-内质网标志物阳性的区域内完成交叉递呈。

关键词: 交叉递呈;CTL;MHC
中图法分类号: R329.25;R373.9;R392.11 **文献标识码:** A

Cross-presentation of phage particle antigen in MHC class Ⅱ and endoplasmic reticulum marker-positive compartments

GUO Sheng, WAN Ying, ZHOU Jing-ran, ZOU Li-yun, LIU Na, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the formation and intracellular location of MHC-Ⅰ-peptide complexes and discover the relationship between MHC class Ⅰ-peptide complexes and MHC class Ⅱ molecules and endoplasmic reticulum marker-positive compartments during the cross-presentation of phage particle antigens. **Methods** The hybrid filamentous phage particles were constructed, which displayed the $OVA_{257-264}$ epitope. $OVA_{257-264}$/Kb complexes and MHC class Ⅱ molecules or markers that distinguish early from late endocytic compartments and lysosomes or markers of ER were co-stained to further define the nature of the compartments stained with $OVA_{257-264}$/Kb complexes. **Results** The phage particles displaying the $OVA_{257-264}$ epitope were successfully constructed. We observed that the MHC class Ⅰ-peptide complexes co-localized with MHC class Ⅱ molecules and endocytic system makers or ER membrane markers during cross-presentation of phage particle antigens. **Conclusion** Endocytosed phage particles may be processed and cross-presented in organelles positive for phagosome and endoplasmic reticulum (ER) markers.

Key words: cross-presentation; CTL; MHC

经典的抗原递呈理论认为,外源性抗原经MHC-Ⅱ类途径由抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)递呈给$CD4^+$T细胞,内源性抗原经MHC-Ⅰ类途径被APC递呈给$CD8^+$T细胞,从而引起机体的免疫应答。然而,更多的证据表明对多种外源性抗原均可经交叉递呈,激发$CD8^+$T细胞的免疫应答[1~3]。近来的研究也证实,专职的APC经MHC-Ⅰ类途径递呈外源性抗原的能力,对于启动MHC-Ⅰ类分子限制性免疫应答过程是十分必要的[4]。由于交叉递呈在抗感染和抗肿瘤免疫中起着举足轻重的作用,因此阐明交叉递呈的细胞和分子机制有重要意义。

在本实验中,我们以重组丝状噬菌体颗粒作为模式抗原,选用巨噬细胞作为APC,研究了巨噬细胞吞噬噬菌体颗粒后,细胞中MHC-I-肽复合物的形成部位与MHC-Ⅱ类分子阳性的内吞相关区域的关系。我们的实验显示重组噬菌体颗粒能够在MHC-Ⅱ类分子阳性、内

作者简介:郭 晟(1980-),女,江西省九江市人,硕士研究生,助教,主要从事抗原递呈方面的研究。电话:(023)68752236;E-mail:sylvia0567@sina.com
通讯作者:万 瑛,电话:(023)68752236-815;E-mail:wanying2003cn2003@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-08-01;修回日期:2005-09-05

体-ER 表面标志物阳性的区域内完成交叉递呈。

1 材料与方法

1.1 细胞系和小鼠

6～10 周龄 C57BL/6(B6)小鼠(H-2^b)5 只由本校实验动物中心提供。巨噬细胞系 Ana-1,来自经 J2(v-raf/v-myc)重组逆转录病毒感染的 C57BL/6 小鼠,购于上海细胞所。细胞培养于含 10% 胎牛血清(fetal calf serum,FCS),100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基中。

1.2 抗体

抗 $OVA_{257-264}$/Kb 复合物抗体来自于杂交瘤细胞 25. D1. 16 的培养上清,由 R. N. Germain 教授惠赠。生物素标记的抗小鼠 I-A/I-E 购于 eBioscience。抗小鼠转铁蛋白受体(CD71)的单抗和抗小鼠溶酶体相关膜蛋白(LAMP)-1(CD107a)的单抗购于 Pharmingen。多克隆抗钙联蛋白的抗血清购于 Stressgen,FITC 标记的羊抗小鼠 IgG,Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG 和羊抗兔 IgG,生物素化的羊抗大鼠 IgG 和 Cy3 标记的亲和素均作为二抗。小鼠 BD Fc Block™购于 Pharmingen。

1.3 丝状噬菌体颗粒的大量制备及纯化

噬菌粒 pC89his 是由噬菌粒 pC89(由 F. Felici 教授惠赠)改造而来的,具体方法见文献[5]。分别合成两条互补寡核苷酸单链(AATTCAGTATAATCAACTTTGAAAAACTGGAGCTCGAGCTGTACAAGCAGGATCCTGCTTGTACAGCTCGAGCTCCAGTTTTTCAAAGTTGATTATACTG),退火后变成编码 $OVA_{257-264}$ 位氨基酸的双链,克隆入载体 pC89his 的 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ位点之间,经转化后鉴定正确的重组子,命名为 pC89hisOVA。呈现 H-2^d限制性表位 $P1A_{35-43}$ 的噬菌粒 pC89hisP1A 作为对照,构建方法同前[6]。将这些噬菌粒按常规方法制备成噬菌体颗粒。

制备的含有噬菌体颗粒的上清加入 5 ml Ni-NTA 琼脂糖凝胶柱(QIAGEN Inc.,Valencia,CA),在 AKTA explore 100 层析仪(Pharmacia,Peapack,NJ)上进行亲和层析。非特异性结合产物用洗涤液(0.1 mol/L NaH_2PO_4,0.01 mol/L Tris-HCl, pH 值 7.0)移去,纯化所得的产物溶于洗脱液(0.1 mol/L NaH_2PO_4,0.01 mol/L Tris-HCl,pH 值 4.5)中。

1.4 ELISA 实验

取部分纯化后的噬菌体颗粒,以 1∶5 的比例稀释于 PBS 中,加入 ELISA 板中于 4 ℃冰箱中过夜使其完全吸附于板子上。PBST(0.1% 吐温 20/PBS)洗加样孔 3 次,封闭液(1% BSA/PBST)室温封闭 1 h。加入抗小鼠 6 个连续的组氨酸残基(6 × His)的抗体(Roche, Germany,1∶1 000)室温孵育 1 h。PBST 洗板子,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG(1∶2 000),室温孵育 1 h。加入显色底物邻－苯二胺(OPD),闭光反应 5 min,用 20 μl 硫酸(2 mol/L)终止反应,在 450 nm 波长处测量光吸收度。

1.5 共聚焦显微镜观察

腹腔巨噬细胞取自 C57BL/6 小鼠。细胞铺于经过消毒的载玻片上,培养 12 h,使巨噬细胞充分粘附并且伸展。洗涤 3 次后,粘附细胞与重组的噬菌体颗粒(pC89hiaOVA,5 × 10^{10} puf/ml)共同培养 3 或 5 h,对照噬菌体颗粒(pC89hisP1A,5 × 10^{10} puf/ml)共同培养 5 h。4% 多聚甲醛固定,0.1% 皂素(PBS/1% BSA)通透 7 min。为了双染 MHC-Ⅰ-肽复合物和 MHC-Ⅱ类分子,巨噬细胞用 5 μl 的小鼠 BD Fc Block™封阻,加入 25. D1. 16 的培养上清,37 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次,加入 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(1∶400),4 ℃冰箱放 30 min。洗涤细胞后加入生物素标记的抗小鼠 I-A/I-E(1∶400),4 ℃孵育 30 min,加入 Cy3 标记的亲和素(1∶400)。

为了双染 MHC-Ⅰ-肽复合物和内吞路径的标志物,将巨噬细胞和重组的噬菌体颗粒共同孵育。细胞被封阻后如前所述加入 25. D1. 16 的培养上清。洗涤细胞,加入抗小鼠转铁蛋白受体(CD71)的单抗(1∶400)和抗小鼠 LAMP-1(CD107a)的单抗(1∶400),4 ℃放 30 min,然后相继加入生物素标记的羊抗大鼠 IgG(1∶100)和 Cy3 标记的亲和素(1∶400)。为了双染 MHC-Ⅰ-肽复合物和 ER 膜,将巨噬细胞和重组的噬菌体颗粒(pC89hiaOVA,5 × 10^{10} puf/ml)共同孵育 5 h,封阻后加入 25. D1. 16的培养上清,洗涤细胞,加入 0.5 μg/ml DiOC6 作用 5 min。为了双染 MHC-Ⅰ-肽复合物和 ER 表面标志物钙联蛋白,将巨噬细胞和重组的噬菌体颗粒(pC89hiaOVA,5 × 10^{10} puf/ml)共同孵育 5 h,封阻后加入 25. D1. 16 的培养上清,洗涤细胞,加入抗钙联蛋白的抗血清(1∶100),室温孵育 1 h,然后加入 Cy3 标记的羊抗兔 IgG。在激光共聚焦显微镜 TCS 4D(Leica Lasertechnik)下进行图像采集和结果分析。

2 结果

2.1 制备噬菌体颗粒

制备的重组丝状噬菌体颗粒用 5 ml Ependorf 管分装,置 4 ℃冰箱保存。由于构建的噬菌粒带有小鼠 6 个连续的组氨酸残基(6 × His)的标记,可用琼脂糖凝胶柱进行亲和层析,随后在色谱仪上进行数据分析。结果出现两个峰值,分别包含了 80% 和 20% 的噬菌体颗粒。为了检测重组丝状噬菌体颗粒是否表达 $OVA_{257-264}$ 表位,用抗小鼠 6 × His 的单克隆抗体进行 ELISA 反应。

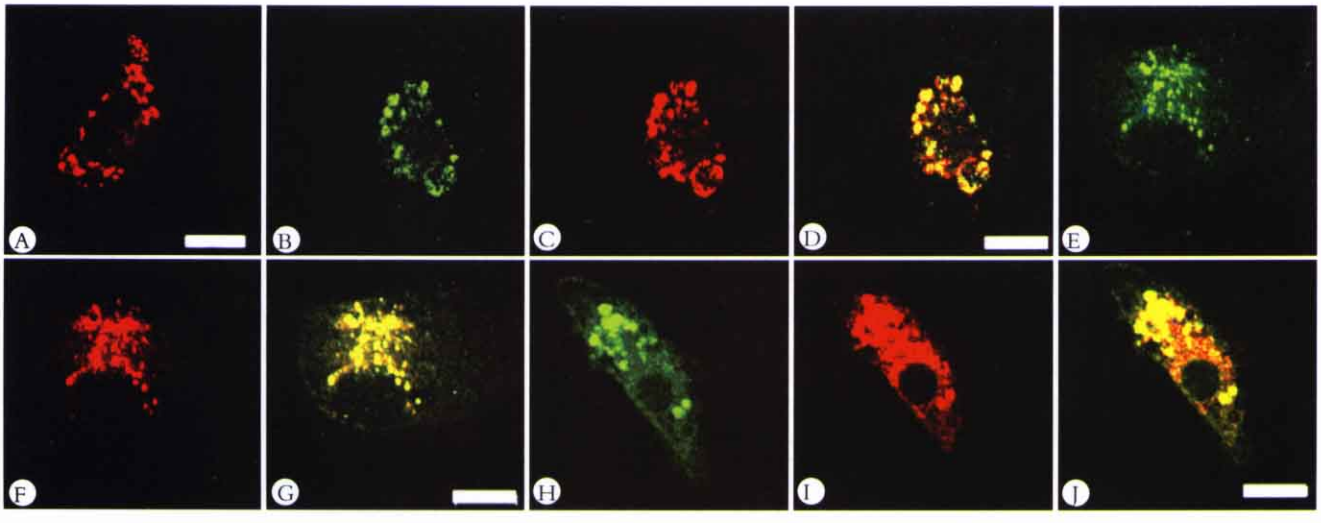
2.2 MHC-Ⅰ-肽复合物定位于 MHC Ⅱ阳性的内体区域

近来有研究表明 MHC-Ⅰ类分子位于 MHC-Ⅱ类分子阳性的区域中,并且推测这部分 MHC-Ⅰ类分子可能参与了对外源性抗原的递呈[5,7]。在本实验中,我们检测了重组噬菌体颗粒的交叉递呈过程中,MHC-Ⅰ-肽复合物和 MHC-Ⅱ阳性的内吞区域的关系。来自 C57BL/6 小鼠的腹腔巨噬细胞和噬菌体颗粒(pC89hiaOVA)共孵育,双染 MHC-Ⅰ-肽复合物和 MHC-Ⅱ类分子(图 1A)。利用共聚焦显微镜,我们观察到 MHC-Ⅰ-肽复合物和 MHC-Ⅱ阳性的区域能发生共聚(图 1B－D)。这一现象直接说明巨噬细胞对外源性噬菌体颗粒的交叉递呈和 MHC-Ⅱ类途径有部分相关。

利用了针对早期和晚期内吞体以及溶酶体表面标志物的特异性抗体,进一步明确了 MHC-Ⅰ-肽复合物染色阳性区域的性质。腹腔巨噬细胞和噬菌体颗粒(pC89hisOVA)共孵育,双染 MHC-Ⅰ-肽复合物和转铁蛋白受体(CD71,早期内体的表面标志物)以及 LAMP-1(晚期内体/溶酶体的表面标记)。结果显示 MHC-Ⅰ-复合物和这些内体的表面标记物有大量的共聚成分(图 1E－J)。这些现象说明 MHC-Ⅰ-肽复合物确实可于内吞系统中形成。

2.3　MHC-Ⅰ-肽复合物是在 ER 膜阳性的区域内形成

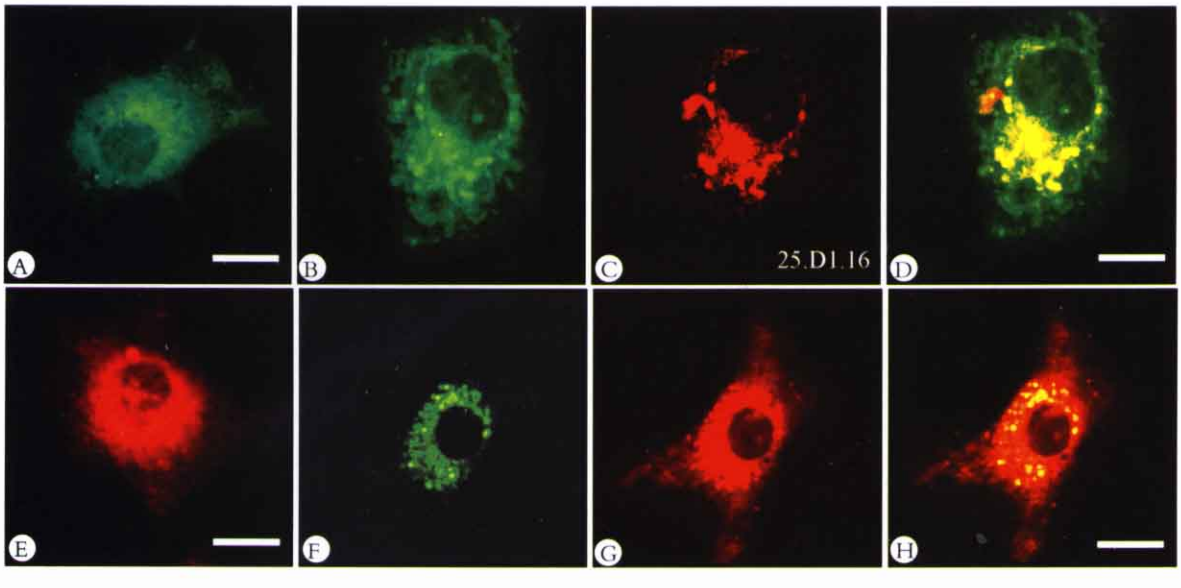
进一步运用显示 ER 的染料来明确 MHC Ⅰ-肽复合物阳性区域和 ER 的关系。在细胞和重组噬菌体颗粒(pC89hisOVA 和 pC89hisP1A)共同作用 5 h 后,染细胞显示 ER 和 MHC Ⅰ-肽复合物。我们发现对照组 pC89hisP1A 仅 ER 为阳性,未见 MHC-Ⅰ-肽复合物(图 2A,E),而 MHC-Ⅰ-肽复合物位于 pC89hisOVA 囊泡样结构中(图 2B－D,F－H),同时也发现此复合物位于类似 ER 的网格样结构中。我们观察到的结果和 Desjardin's 提出的 ER 介导的内吞模式[8]是一致的,同时说明外源性颗粒抗原在这些囊泡中被降解,随后与 MHC-Ⅰ类分子相结合。



Peritoneal cells from C57BL/6 mice were co-cultured with control phage particles (pC89hisP1A, A) or the phage particles pC89hisOVA (B－D) for 5 h and subsequently double-stained for MHC class Ⅰ peptide complexes (green) and MHC class Ⅱ molecules (red); E－G: Peritoneal cells were co-cultured with recombinant phage particles (pC89hisOVA) for 3 h and subsequently double-stained for MHC class Ⅰ-peptide complexes (green) and transferrin receptor (red); H－J: Peritoneal cells were co-cultured with recombinant phage particles (pC89hisOVA) for 5 h and subsequently double-stained for MHC class Ⅰ peptide complexes (green) and LAMP-1 (red). The images on the right represent the merged images (scale bars = 10 μmol/L)

图 1　MHC-Ⅰ-肽复合物和 MHC-Ⅱ类分子以及内吞系统标志物共聚

Fig 1　Co-localization of the MHC class Ⅰ-peptide complexes with MHC class Ⅱ and endocytic system markers



Peritoneal cells were cocultured with the recombinant phage particles pC89hisOVA (B－D,F－H) or pC89hisP1A (A, E) for 5 h, and then ER membranes were stained using DiOC6 (A－D, green). The ER marker protein calnexin was stained with anti-Calnexin-NT and Cy3-goat antirabbit IgG (E－H, red). MHCclass Ⅰ-peptide complexes were stained with 25. D1. 16 culture supernatant and Cy3-GAM IgG (A－D, red) or FITC-GAM IgG (E－H, green). The images on the right represent the merged images (scale bars = 10 μmol/L)

图 2　MHC-Ⅰ-肽复合物阳性的囊泡于 ER 共聚

Fig 2　MHC class Ⅰ-peptide complex-positive vesicles localized in the ER

3 讨论

丝状噬菌体颗粒作为模式抗原是近十几年才发展起来的，在体内能引起特异性的 CTL 反应[4,6,9]。它是一种直径约 6 nm、长度约 800 ~ 2 000 nm 的不对称颗粒，由主要衣壳蛋白 gpⅤⅢ形成大约 2 700个拷贝的外壳。如果融合蛋白少于 100 个氨基酸残基，则每个噬菌体通常出现 100 ~ 200 个拷贝的重组 pⅤⅢ。在本研究中，相应于 0.75 μg/ml 的可溶性 OVA，大约使用了 1.6×10^{-8} mol/L 的重组 pⅤⅢ。这一抗原的用量明显少于其它实验体系中用到的抗原量（10 mg/ml OVA[4]），因此相较于其他的抗原形式有其优越性。

尽管，同巨噬细胞相比，DC 在交叉递呈中发挥着更为重要的作用，然而近来的研究表明，巨噬细胞交叉递呈的机制与 DC 非常相似，由于巨噬细胞的吞噬能力更强，而且在实验的操作上更为简便，因此本实验中我们选择巨噬细胞作为 APCs，也可为以后作为以后实验的基础。

已有研究者用可溶性 OVA 或交联了 OVA 的乳胶颗粒作为模式抗原来研究交叉递呈，他们认为 ER-吞噬体融合区域是细胞内交叉递呈发生的场所[8,10,11]。我们的实验结果将这一发现延伸到了非人工颗粒抗原的范围。使用特异性的单克隆抗体，我们于激光共聚焦显微镜下发现了 MHC-Ⅰ-肽复合物与标记内吞相关区域的转铁蛋白受体或 LAMP-1 有大量重叠的部位，说明 MHC-Ⅰ-肽复合物可在内吞相关区域中形成，进一步染色显示 ER 后发现这一区域也呈现内质网标志蛋白阳性。总之，我们的实验说明丝状噬菌体颗粒进入细胞后可在吞噬体-ER-溶酶体表面标志阳性的区域中被进一步处理并与 MHC-Ⅰ类分子相结合。

MHC-Ⅰ-抗原肽复合物和 MHC-Ⅱ 类分子可发生共聚，说明外源性蛋白在结合 MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ类分子的过程中有部分相同的路径，这为了解 MHC-Ⅰ-抗原肽复合物的转运提供了一个线索。在多种细胞中均观察到内体-浆膜转运途径是受某些因素调节的。一系列的研究表明 MHC-Ⅱ-抗原肽复合物的转运很大程度上受 DC 成熟过程的调控，同时 DC 与特异性 T 细胞的相互作用也能影响这一复合物的转运。另外，有实验观察到 CD34 来源的朗格汉斯细胞被 LPS 激活后，MHC-Ⅰ类分子可从 HLA-DM 阳性的内体区域转运到细胞膜上。因此，很可能 MHC-Ⅰ-肽复合物的转运受到一些分选信号的调控。鉴于交叉递呈的重要性，研究这一调控机制就有其重要意义，它为理解交叉递呈的有效性提供了一个方向。

总之，我们在丝状噬菌体颗粒抗原的交叉递呈过程观察到 MHC-Ⅰ-肽复合物可出现于细胞内 MHC-Ⅱ类分子阳性、吞噬体-ER-溶酶体表面标记阳性的区域中。进一步了解发生于这一区域内抗原交叉递呈的转运机制及调控因素可为疫苗和佐剂或者其他治疗性应用的发展提供广阔的前景。

参考文献：

[1] den Haan J M, Bevan M J. Antigen presentation to CD8$^+$ T cells: cross-priming in infectious diseases[J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(4): 437 - 441.

[2] Heath W R, Carbone F R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 47 - 64.

[3] Reis e Sousa C, Germain R N. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis[J]. J Exp Med, 1995, 182(3): 841 - 851.

[4] De Berardinis P, Sartorius R, Fanutti C, *et al*. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(8): 873 - 876.

[5] Gromme M, Uytdehaag F G, Janssen H, *et al*. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(18): 10326 - 10331.

[6] Wu Y, Wan Y, Bian J, *et al*. Phage display particles expressing tumor-specific antigens induce preventive and therapeutic anti-tumor immunity in murine p815 model[J]. Int J Cancer, 2002, 98(5): 748 - 753.

[7] Chiu I, Davis D M, Strominger J L. Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(24): 13944 - 13949.

[8] Lizee G, Basha G, Tiong J, *et al*. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain[J]. Nat Immunol, 2003, 4(11): 1065 - 1073.

[9] Wan Y, Wu Y, Bian J, *et al*. Induction of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes response *in vivo* by filamentous phage display vaccine[J]. Vaccine, 2001, 19(20 - 22): 2918 - 2923.

[10] Houde M, Bertholet S, Gagnon E, *et al*. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation[J]. Nature, 2003, 425(6956): 402 - 406.

[11] Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, *et al*. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells[J]. Nature, 2003, 425(6956): 397 - 402.

（编辑 陈聪连）