论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2120-04

人肿瘤转移相关抗原肝素酶 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位的预测及初步鉴定

陈 婷[1],万 瑛[2],汤旭东[1],房殿春[1],余松涛[1],熊 震[1],罗元辉[1],杨仕明[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军消化病研究所,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 预测并鉴定肿瘤转移相关抗原肝素酶来源的 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位。**方法** 采用超基序、量化基序和分子模拟相结合的方法,对肝素酶 HLA-A2.1 限制性 CTL 表位进行预测,合成候选表位肽;利用 T_2 细胞的特点,对合成的候选肽与 HLA-A2.1 分子进行亲和力分析,初步验证预测结果;利用标准 ^{51}Cr 释放试验检测特异性 CTLs 诱导活性。**结果** 在所筛选的 5 个候选 CTL 表位中,Hpa(525-533)、Hpa(277-285)、Hpa(405-413)可在体外有效诱导肝素酶特异性 CTLs 的产生,对肝素酶阳性且 HLA-A2 阳性的 KATO-Ⅲ细胞具有明显的杀伤效应。**结论** Hpa(525-533)、Hpa(277-285)、Hpa(405-413)有可能是肿瘤抗原肝素酶 HLA-A2.1 的限制性 CTL 表位。

关键词: 肝素酶;表位;HLA-A2.1 限制性;分子模拟

中图法分类号: R394-33;R394.3;R730.2 **文献标识码:** A

Prediction and peptide binding assay of HLA-A2.1-restricted CTL epitope from heparanase

CHEN Ting[1], WAN Ying[2], TANG Xu-dong[1], FANG Dian-chun[1], YU Song-tao[1], XIONG Zhen[1], LUO Yuan-hui[1], YANG Shi-ming[1] ([1]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To predict and identify the HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes in heparanase (Hpa), a new tumor associated antigen. **Methods** Supermotif and quantitative motif methods were used to predict the CTL epitopes. Then the prediction was evaluated by T2 binding test. **Results** Five predicted highest score candidate epitopes were Hpa(525-533), Hpa(353-361), Hpa(277-285), Hpa(400-408) and Hpa(405-413). The results of molecular simulations showed that the 5 candidate peptides could effectively bind with HLA-A2.1. Further peptide binding assay demonstrated that these 5 candidate peptides bound to HLA-A2.1 with high affinity. Hpa(525-533), Hpa(277-285) and Hpa(405-413) induced heparanase-specific immune responses against KATO-Ⅲ gastric tumor cells, which was both positive for heparanase and HLA-A2. **Conclusion** Hpa(525-533), Hpa(277-285) and Hpa(405-413) might be the HLA-A2.1- restricted epitope of Hpa.

Key words: heparanase; epitope; HLA-A2.1-restricted; molecular modeling

基于树突状细胞(dendritic cell, DC)的肿瘤多肽疫苗,因其特异性好、副作用小已成为肿瘤免疫治疗研究的一个热点,因此寻找新的肿瘤相关抗原及鉴定相应的 CTL 表位是肿瘤免疫治疗的关键。肝素酶(heparanase, Hpa)是近年来新发现的一个肿瘤转移相关基因,在正常组织中仅低表达于淋巴细胞和骨髓,但在几乎所有的转移性恶性肿瘤细胞中普遍存在,而且表达的水平与肿瘤的转移、TMN 分期等临床预后不良指标明显相关。肝素酶已成为中晚期肿瘤治疗的一个良好靶位,在恶性肿瘤的免疫治疗中显示出较好的前景[1-4]。我们在既往研究中也观察到胃癌组织的肝素酶阳性率明显高于癌旁组织,肝素酶 mRNA 的表达与

基金项目:国家自然科学基金(30570841,30200123)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570841, 30200123)

作者简介:陈 婷(1981-),女,四川省广安县人,硕士,医师,主要从事肝素酶方面的研究。电话:13880943239

通讯作者:杨仕明,电话:(023)68765184

收稿日期:2007-06-19;修回日期:2007-07-06

肿瘤的直径、转移、浸润深度、TMN 分期相关[5]。进一步研究表明,肝素酶全长基因的 DC 细胞可以激发肝素酶特异性 CTL 反应,对于肝素酶阳性的且 HLA 型别匹配的胃癌细胞具有明显的免疫杀伤效应[6,7],此结果提示肝素酶不仅是中晚期肿瘤免疫治疗的一个新的靶点,而且其氨基酸序列中可能存在 CTL 抗原表位,这种表位经 DC 细胞递呈后可以激活 CTL,从而发挥抗肿瘤效应。另外在中国人群中,HLA-A2.1 阳性人群高达 50%,所以寻找肝素酶 HLA-A2.1 的限制性 CTL 表位就更具有现实意义。本研究的目的在于采用生物信息技术预测肝素酶的 CTL 表位,并采用实验方法进行鉴定,为肝素酶抗原表位的临床应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　肿瘤抗原

肝素酶共由 543 个氨基酸残基组成,序列如下:MLLRSKPALPPPLMLLLLGPLGPLSPGALPRPAQAQDVVDLDFFTQEPLHLVSPSFLSVTIDANLATDPRFLILLGSPKLRTLARGLSPAYLRFGGTKTDFLIFDPKKESTFEERSYWQSQVNQDICKYGSIPPDVEEKLRLEWPYQEQLLLREHYQKKFKNSTYSRSSVDVLYTFANCSGLDLIFGLNALLRTADLQWNSSNAQLLLDYCSSKGYNISWELGNEPNSFLKKADIFINGSQLGEDFIQLHKLLRKSTFKNAKLYGPDVGQPRRKTAKMLKSFLKAGGEVIDSVTWHHYYLNGRTATREDFLNPDVLDIFISSVQKVFQVVESTRPGKKVWLGETSSAYGGGAPLLSDTFAAGFMWLDKLGLSARMGIEVVMRQVFFGAGNYHLVDENFDPLPDYWLSLLFKKLVGTKVLMASVQGSKRRKLRVYLHCTNTDNPRYKEGDLTLYAINLHNVTKYLRLPYPFSNKQVDKYLLRPLGPHGLLSKSVQLNGLTLKMVDDQTLPPLMEKPLRPGSSLGLPAFSYSFFVIRNAKVAACI

1.2　CTL 表位预测的超基序方案

参照文献[8]的方法进行,利用计算机软件在肝素酶蛋白氨基酸序列中寻找合适的九肽。

1.3　量化基序法

采用 HLA-A2.1 分子的结合矩阵,依照文献[8]的方法,对超基序预测出的 CTL 表位进一步采用量化基序进行进一步的验证。

1.4　分子模拟方案[9]

在第三军医大学全军免疫学研究所的 Silicon Graphics 工作站,应用 Insight Ⅱ软件中的 Discover 3.0 模块(采用 CVFF 力场),对来自肝素酶的 5 个九肽与 HLA-A2.1 分子的复合物进行分子动力学模拟。HLA-A2.1 的初始坐标来源于蛋白质晶体结构数据库,运用 Bioploymer 模块对流感病毒和 HLA-A2.1 的复合物中的表位肽进行氨基酸替换。

1.5　九肽的合成、纯化、分析及鉴

本实验中的 5 条九肽均在北京亚光生物技术有限公司进行合成、纯化。

1.6　细胞培养

T_2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基中,BB7.2 杂交瘤细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于体外培养,培养条件为 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度,每隔 2 ~ 3 d 传代 1 次。

1.7　HLA-A2.1 分子与各肽的亲和力分析[10]

T_2 细胞经 PBS 洗涤 2 次后,按 1×10^6/孔种植于 96 孔培养板中,各多肽用 RPMI1640 完全培养基稀释后,以 100 μmol/L 的浓度加入到 T_2 细胞的培养液中,并设置生理盐水空白对照孔,阳性对照选用 HIV_{pol}(476 - 484)(ILLEPVHGV),阴性对照选用小鼠肝素酶多肽表位 mHpa(519 - 526)(FSYGFFVI)。T_2 细胞在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养 18 h 后,收集 T_2 细胞以 1 000 r/min 离心 5 min 后,取细胞沉淀用冰 PBS 洗涤 3 次,再以同样条件离心后,在细胞沉淀中加入 100 μl BB7.2 细胞株来源的鼠抗人 HLA-A2.1mAb,4 ℃孵育 1 h。用 PBS 洗涤 3 次后,加入 100 μl 1∶50 的 FITC-羊抗鼠 IgG,4 ℃孵育 30 min 后,洗涤 3 次。用 1 ml 冰 PBS 洗涤后,在流式细胞仪上检测平均荧光强度(mean florescence intensity, MFI),结果以荧光指数(florescence index,FI)作为衡量指标。

$$FI=\frac{\text{样本 MFI}-\text{背景 MFI}}{\text{背景 MFI}}$$

FI > 1.5 视为多肽与 HLA-A2.1 分子亲和力高,1.0 < FI ≤ 1.5 视为中等亲和力,1.0 ≥ FI > 0.5 视为低亲和力。

1.8　^{51}Cr 杀伤实验

取经流式细胞仪检测证实的 HLA-A2.1 阳性健康人浓缩的白细胞,经常规聚蔗糖-泛影葡胺分层液梯度离心获得 PBMC,调节细胞数为 1×10^9/L,培养于含 100 ml/L FCS 的 RPMI1640 培养基中,于培养第 2 天加入 10 mg/L 的各候选肽,第 3 天加入 3×10^4 U/L 的重组人 IL-2。以后每周细胞全量换液 1 次,并保持各候选肽和重组人 IL-2 的浓度。刺激 3 次后,于最后 1 次刺激的 3 d 内,收集细胞作为效应细胞。各靶细胞的标记按常规方法进行。采用标准的 ^{51}Cr 释放实验,于 V 型板各孔中加入标记的靶细胞 1×10^4/孔。各靶细胞孔中加入不同稀释度的效应细胞,使相应的效靶比分别为 10∶1、20∶1、40∶1 和 80∶1,每组设立 3 个复孔。对照组的效应细胞用重组人 IL-2 刺激的 PBMC。最大杀伤采用 2 mol/L 的 HCl,自释放为靶细胞加培养基。于 37 ℃、50 ml/L CO_2 孵育 4 h,以 1 000 r/min 离心 10 min,各取上清液 100 μl,用 γ 计数器分别测定液体闪烁计数值(cpm 值),计算 ^{51}Cr 特异释放率。

^{51}Cr 特异释放率 = (实验组 cpm 平均值 - 自释放 cpm 平均值)/(最大释放 cpm 平均值 - 自释放 cpm 平均值) × 100 %

1.9　统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　超基序和量化基序结果

超基序方案预测了 64 条多肽表位,进一步使用量化基序

方案优化预测条件，共预测30条表位肽符合要求：PAFSYSFFV（525－533），PLLSDTFAA（353－361），KMLKSFLKA（277－285），PLPDYWLSL（400－408），WLSLLFKKL（405－413），ALPPPLMLL（8－16），FMWLDKLGL（363－371），LIFGLNALL（184－192），LLRSKPAL（1－9），VLDIFISSV（315－323），YTFANCSGL（174－182），QLNGLTLKM（494－502），NLHNVTKYL（456－464），FLNPDVLDI（310－318），LVSPSFLSV（51－59），LLLGPLGPL（16－24），QLGEDFIQL（241－249），GLLSKSVQL（487－495），KLVGTKVLM（412－420），TLARGLSPA（82－90），WLDKLGLSA（365－373），NLATDPRFL（64－72），VMRQVFFGA（380－388），DLTLYAINL（449－457），RTATREDFL（303－311），LILLGSPKL（72－80），ATDPRFLIL（66－74），LVDENFDPL（393－401），SVQKVFQVV（322－330），LMLLLLGPL（13－21）。

从中选出亲和力最高的5条多肽进行合成，这5条肽分别为Hpa（525－533）（PAFSYSFFV）、Hpa（353－361）（PLLSDTFAA）、Hpa（277－285）（KMLKSFLKA）、Hpa（400－408）（PLPDYWLSL）、Hpa（405－413）（WLSLLFKKL）。

2.2 计算机分子模拟分析

计算机分子模拟分析表明，肝素酶来源的5个候选表位肽羧基末端氨基酸残基侧链都指向HLA-A2.1分子肽结合槽的凹槽F，第2位氨基酸残基都定位于HLA-A2.1分子肽结合槽的凹槽B附近。除多肽Hpa（277－285）以外，其余4条多肽的第1位氨基酸侧链均指向溶液。见表1。

表1 各Hpa候选表位肽与HLA-A2.1结合的特征参数

肽	序列	距离（nm）	氢键结合数	非键结合能	锚点残基溶剂可及长度（nm）	
					P2	P9
Hpa（525－533）	PAFSYSFFV	1.76	4	－17 158.90	0.36	0.49
Hpa（353－361）	PLLSDTFAA	1.82	3	－16 144.50	1.56	1.87
Hpa（277－285）	KMLKSFLKA	1.78	6	－19 237.50	0.54	0.70
Hpa（400－408）	PLPDYWLSL	1.96	4	－16 276.20	0.29	0.87
Hpa（405－413）	WLSLLFKKL	1.89	5	－18 324.70	0.37	0.46

2.3 多肽的RP-HPLC分析及质谱鉴定结果

经积分运算，各肽主峰面积占所有峰面积的百分数都达到了93%以上，分别为Hpa（525－533）95.34%、Hpa（353－361）98.57%、Hpa（277－285）93.78%、Hpa（400－408）98.51%和Hpa（405－413）99.38%。因此，各肽的纯度达到了应有的实验条件。质谱分析结果显示，各多肽的相对分子质量测定值与理论值相符。

2.4 各肽与HLA-A2.1分子亲和力的分析

我们选定的5条多肽处理后的T_2细胞，其细胞表面表达的HLA-A2.1分子较阴性肽处理的T_2细胞表面表达的HLA-A2.1分子有明显提高（$P<0.05$）。换算成平均荧光强度后，5条候选表位肽在浓度为100 μmol/L的时候，其荧光强度均明显大于阴性肽（$P<0.05$），而与阳性肽的平均荧光强度相比，则无明显差异（$P>0.05$）。进一步按公式将平均荧光强度换算成荧光指数（表2），各候选肽荧光指数分别为7.1、7.2、6.67、5.98、6.79。5条候选表位肽的荧光指数均>1.5，均达到了高亲和力的条件。

表2 肝素酶来源表位肽的HLA-2.1亲和力分析

肽	序列	起始位置	荧光强度	荧光指数
HIV_{pol}	ILLEPVHGV	476－484	912.0±24.1[a]	8.2
Hpa525	PAFSYSFFV	525－533	885.0±9.2[a]	7.1
Hpa353	PLLSDTFAA	353－361	895.0±48.2[a]	7.2
Hpa277	KMLKSFLKA	277－285	837.0±88.4[a]	6.67
Hpa400	PLPDYWLSL	400－408	762.0±40.9[a]	5.98
Hpa405	WLSLLFKKL	405－413	850.0±47.6[a]	6.79
mHpa519	FSYGFFVI	519－526	115.0±5.5	－

a：$P<0.05$，与mHpa519比较

2.5 候选表位肽的^{51}Cr释放分析

5个候选表位肽中，只有Hpa（525－533）、Hpa（277－285）、Hpa（405－413）显示了具有较强的刺激特异性CTL的作用。既表达肝素酶抗原又表达HLA-A2.1分子的KATO-Ⅲ为靶细胞，在效靶比为80∶1时，Hpa（525－533）与Hpa（277－285）的特异性杀伤率可高达60%，Hpa（405－413）的特异性杀伤效率也有40%左右，而Hpa（355－361）与Hpa（400－408）在不同效靶比例的情况下均未见特异性杀伤（图1）。

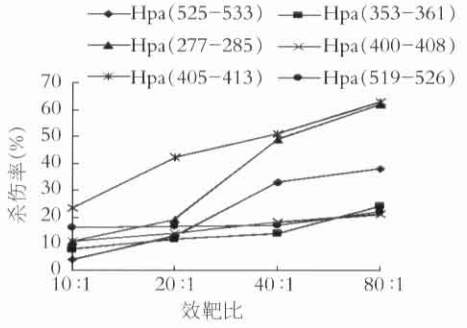


图1 候选表位肽诱导特异CTLs对KATO-Ⅲ的杀伤效率

3 讨论

手术切除、放疗和化疗仍是目前临床肿瘤治疗的首选方案。手术治疗仅对早期肿瘤治疗效果好，中晚期肿瘤患者由于多发生转移，已失去手术治疗的指征；而放、化疗由于其毒副作用大及患者的耐受力较差，往往不为肿瘤患者所接受。因此，以多肽为基础的肿瘤免疫治疗因其毒副作用小、操作简单已经成为中晚期肿瘤治疗的一个重要方向，并且取得了一定的成果。但是目前鉴定的大多数肿瘤抗原均具有组织特异性，如MAGE在黑色素瘤中的应用[11]、PSA在前列腺癌中的应用[12]，这些肿瘤特异性的抗原疫苗仅对产生这种抗原的肿瘤有治疗效果，而对其他肿瘤则没有效果。因此，有必要寻找一种广谱的肿瘤相关抗原，用于肿瘤的免疫治疗。理想的肿瘤抗原应符合[2]：①在绝大多数肿瘤组织中表达从而可以广泛应用；②只表达于肿瘤细胞以避免自身免疫反应；③不表达于正常成熟组织以避免免疫耐受；④在肿瘤的发生、发展过程中具有不可替代的作用，以避免抗原缺失；⑤能诱导足够强度

的免疫反应并导致肿瘤消退；⑥同时包含有 MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ类分子，从而可诱导 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞反应。

Hpa 作为一种新近被克隆出来与肿瘤转移密切相关的新基因，正常组织中除淋巴细胞、骨髓等少有表达外，在正常成熟的非免疫组织中（如心、肺、肝脏、骨骼肌及胰腺等）均不表达，但在几乎所有的转移性恶性肿瘤细胞中普遍存在。Hpa 的活化是肿瘤细胞发生转移的一个重要因素[1-4]。某些肿瘤细胞为逃避免疫监视而下调肿瘤相关抗原的表达，但如果为逃避免疫监视而下调 Hpa 的表达，其本身就足以抑制肿瘤细胞的增殖及转移。因此，Hpa 可以作为一种广谱的肿瘤转移相关抗原用于中晚期肿瘤的免疫治疗。

我们既往的工作表明负载了 Hpa 全长基因的 DC 疫苗可诱导显著的 Hpa 特异的 CTL 反应[6,7]，说明 Hpa 不仅可以作为肿瘤相关抗原用于中晚期肿瘤的免疫治疗，而且在 Hpa 全长基因序列中肯定存在能引起 Hpa 特异的 CTL 的多肽表位。最近，德国学者观测了 3 条 Hpa 抗原表位，即 Hpa（8－16）（ALPPPLMMLL）、Hpa（16－24）（LLLGPLGPL）、Hpa（183－191）（DLIFGLNAL）。本实验表明这 3 条抗原表位负载的 DC 细胞均可以产生 Hpa 特异性的 CTL，对 Hpa 阳性且 HLA-A2 阳性的乳腺癌细胞（BT-20、BT-549 及 BT-124）具有明显的杀伤效应，而对 HLA-A2 阳性但 Hpa 阴性的 MCF-7 乳腺癌细胞不具有杀伤效应，提示上述 3 种 Hpa 特异性抗原表位对乳腺癌细胞的杀伤效应具有 Hpa 特异性，且受 MHC-Ⅰ类分子限制，可以作为乳腺癌及其他转移性肿瘤的多肽疫苗[13]，而 Hpa 全长基因序列中有更多的多肽表位有待发掘。

基于以上分析，本研究利用表位预测的超基序方案和量化基序方案预测了 30 条符合要求的多肽表位，在这 30 条多肽表位中有 2 条与德国学者的预测完全一致，有 1 条仅相差 1 个氨基酸，说明使用上述 2 种方法预测 Hpa 多肽表位的可行性和合理性。最终我们选取了亲和力较强且不同于德国学者报道的 5 条多肽表位，并进一步用计算机分子模拟技术考察上述多肽与 HLA-A2.1 分子的结合情况，结果表明 5 条多肽表位均能与 MHC 分子有效结合。进一步合成上述多肽用于 T_2 亲和力实验，对候选肽进行初步的鉴定，亲和力实验结果表明：九肽 Hpa（525－533）、Hpa（353－361）、Hpa（277－285）、Hpa（400－408）、Hpa（405－413）与 HLA-A2.1 分子均具有高亲和力。进一步用标准的细胞毒实验检测候选表位肽诱导特异 CTLs 的能力，结果表明，Hpa（525－533）、Hpa（277－285）、Hpa（405－413）能有效诱导产生特异性 CTL。

综上所述，本研究 5 条多肽中 Hpa（525－533）、Hpa（277－285）与 Hpa（405－413）有可能是 Hpa HLA-A2.1 的 CTL 表位，但其能否显示出广谱高效的杀伤能力，有待后续实验进一步证明。

参考文献：

[1] Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(12): 2018－2039.

[2] 杨仕明，汤旭东，陈　婷，等. 肝素酶：一种新的广谱的肿瘤转移相关抗原在中晚期肿瘤免疫治疗中的作用研究进展[J]. 世界华人消化杂志，2007，15(8)：849－854.

[3] Miao H Q, Liu H, Navarro E, *et al*. Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(18): 2101－2111.

[4] 陈　陵，杨仕明，房殿春，等. 肝素酶：抗肿瘤转移的新靶点[J]. 世界华人消化杂志，2004，12(2)：439－442.

[5] 蔡永国，房殿春，杨仕明，等. 肝素酶 mRNA 在胃癌组织中的表达及其与 c-met 表达的关系[J]. 中华医学杂志，2004，84(12)：974－978.

[6] 蔡永国，房殿春，陈　陵，等. 肝素酶基因修饰的树突状细胞疫苗对胃癌细胞的免疫效应研究[J]. 中华医学杂志，2006，86(44)：3122－3127.

[7] Cai Y G, Fang D C, Chen L, *et al*. Dendritic cells reconstituted with a human heparanase gene induce potent cytotoxic T-cell response against gastric tumor cells *in vitro*[J]. Tumor Biol, 2007, 28(4): 238－246.

[8] 耿　森，贾正才，万　瑛，等. 肿瘤抗原 MAGE-3 HLA-A2 限制性 CTL 表位的预测[J]. 第三军医大学学报，2000，22(10)：934－936.

[9] 贾正才，吴玉章，万　瑛. 肿瘤抗原 MAGE-3 CTL 预测表位的计算机分子模拟研究[J]. 第三军医大学学报，2000，22(10)：937－939.

[10] 汤旭东，万　瑛，陈　婷，等. 小鼠肝素酶 H-$2K^b$限制性 CTL 表位预测及其 MHC-Ⅰ亲和力分析[J]. 重庆医学，2007，36(9)：820－822.

[11] Otto K, Andersen M H, Eggert A, *et al*. Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin [J]. Vaccine, 2005, 23(7): 884－889.

[12] Perambakam S, Hallmeyer S, Reddy S, *et al*. Induction of specific T cell immunity in patients with prostate cancer by vaccination with PSA146-154 peptide[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(9): 1033－1042.

[13] Sommerfeldt N, Beckhove P, Ge Y, *et al*. Heparanase: a new metastasis-associated antigen recognized in breast cancer patients by spontaneously induced memory T lymphocytes[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7716－7123.

（编辑　郭建秀）