论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0984-03

胃癌、食管癌中 NY-ESO-1 抗原特异性免疫应答与生存率的关系研究

陈 军[1],尚小云[2],唐 波[1],钱 锋[1],石 彦[1],余佩武[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军普通外科专科中心,微创胃肠外科中心,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 分析胃癌、食管癌中 NY-ESO-1 抗原基因的表达分布、NY-ESO-$1_{157-165}$表位引发的特异性细胞免疫应答的状态与生存率的关系。**方法** 利用 RT-PCR 方法检测 112 例胃癌和 76 例食管癌患者肿瘤标本和正常胃黏膜中 NY-ESO-1 抗原基因的表达,应用多色流式分析结合 HLA-A2 限制性表位肽/五聚体复合物技术对胃癌、食管癌患者外周血 NY-ESO-$1_{157-165}$表位特异性 CTL 进行精确定量。回顾分析 20 例 NY-ESO-1^+/HLA-$A2^+$患者,随访 3 年,比较不同免疫应答状态对生存率的影响。**结果** 食管癌患者中 NY-ESO-1 mRNA 表达频率(36.8%)明显高于胃癌(13.4%)。在 20 例检测到的 NY-ESO-1^+HLA-$A2^+$患者中,强反应者($CD8^+$ $pentamer^+$ cells ≥0.5%)生存率明显高于弱反应者($CD8^+$ $pentamer^+$ cells < 0.5%)($P<0.01$)。**结论** 胃癌、食管癌患者均有不同程度表达 NY-ESO-1,其特异性免疫应答被检测到,并与生存率有关。

关键词: 胃癌; 食管癌;抗原;多肽疫苗;生存率

中图法分类号: R392.13;R730.23;R735 **文献标识码:** A

Antigen expression and cellular immunogenicity of NY-ESO-1 in gastric and esophageal cancer

CHEN Jun[1], SHANG Xiao-yun[2], TANG Bo[1], QIAN Feng[1], SHI Yan[1], YU Pei-wu[1] ([1]Department of General Surgery and Center of Microinvasive Gastrointestinal Surgery, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the relationship between the CTL response of NY-ESO-1 in gastric and esophageal cancer and survival rate in Chinese in order to provide data to develop a vaccine against the NY-ESO-1 positive cancer. **Methods** One hundred and twelve gastric cancer specimens and seventy-six esophageal cancer specimens were analyzed for the expression of NY-ESO-1 mRNA by RT-PCR. Pentamer staining were performed to analyze the frequency of NY-ESO-$1_{157-165}$ specific CTL in NY-ESO-1/HLA-A2 positive patients. The correlation of CTL response and survival rate were analyzed. **Results** About 13.4% of the gastric cancer and 36.8% of the esophageal cancer were NY-ESO-1 positive. There were 23 patients with NY-ESO-1/HLA-A2 double positive. Frequency of Pentamer staining analysis and survival rate of these NY-ESO-1/HLA-A2 double positive patients indicated that high survival rate correlate with strong cellular immune response. **Conclusion** NY-ESO-1 expression is found in some of gastric and esophageal cancer, and NY-ESO-$1_{157-165}$ peptide can be regarded as a candidate for vaccination due to their expression and CTL response.

Key words: gastric cancer; esophageal cancer; antigens; peptide vaccine; survival rate

机体在针对肿瘤的免疫应答过程中,细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)是主要的效应细胞,而 CTL 在识别抗原时是以表位为基础的[1,2]。NY-ESO-1 是目前已知的肿瘤特异性抗原中免疫原性最强的抗原[3,4],目前已在 NY-ESO-1 抗原中鉴定出 3 个 HLA-A2 限制性 $CD8^+$ T 细胞表位[5],其中 Karbach 等[6]已将 NY-ESO-$1_{157-165}$优势性表位用于临床试验,对一些肿瘤晚期患者进行免疫治疗,结果表明,NY-ESO-1抗原疫苗对部分转移灶有消退作用。本研究分析 NY-ESO-1 基因在胃癌和食管癌中的表达情况,检测 NY-ESO-$1_{157-165}$肽特异性 CTL 反应频率,同时观测 NY-ESO-1^+/HLA-$A2^+$患者细胞免疫强度与生存率的关系,进一步了解 NY-ESO-1 抗原在胃癌和食管癌中的表达特征,以及其细胞免疫应答状态与生存率之间的关系,探讨 NY-ESO-$1_{157-165}$肽疫苗在胃癌、食管癌免

作者简介:陈 军,男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究。电话:(023)68773171,E-mail:vannyy@tom.com

通信作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com

收稿日期:2009-03-02;修回日期:2009-03-20

疫治疗中的意义。

1　材料与方法

1.1　研究对象

收集我院 2005 年 6 – 12 月的 112 例胃癌手术标本和 76 例食管癌手术标本，本组病例均经手术后病理学检查明确诊断，同时根据第 7 版胃癌食管癌 TNM 分期标准分期。112 例胃癌手术标本中男性 60 例，女性 52 例，年龄 31 ~ 76 岁，平均年龄 55 岁，术前均未行放疗及化疗。76 例食管癌手术标本中男性 42 例，女性 34 例，年龄 44 ~ 77 岁，平均年龄 57 岁。标本取材于手术后 10 ~ 20 min，立即于液氮中冻存。第 2 天置于 – 80 ℃保存，直至标本使用时。对照组选择同期 20 例健康人正常胃黏膜组织作为对照。

1.2　主要试剂和仪器

Trizol 总 RNA 提取试剂、Superscript Ⅱ反转录 cDNA 合成试剂盒购自 Invitrogen 公司，*Taq* DNA polymerase 购自 Promega 公司，引物由上海英俊公司合成。美国 BD FACS Aria 型流式细胞仪、CD3-PE/Cy5、CD8-APC/Cy7 及各抗体的同型对照均购自美国 BD 公司，HLA-A2 鼠抗人单克隆抗体来源于 BB7.2 小鼠杂交瘤细胞株购自 ATCC 公司，PE 标记的 pentamer HLA-A2/SLLMWITQV 购自英国 Proimmune 公司。

1.3　HLA-A2 表型的鉴定

新鲜采集肝素抗凝外周血 200 μl，并设立阴性对照管，37 ℃孵育 30min；流式洗涤液洗涤 2 次，加 1∶50 稀释的 FITC-羊抗小鼠 IgG 100 μl，室温避光孵育 20 min；加红细胞裂解液 2 ml，37 ℃孵育 10 min，直至细胞悬液变成透亮溶液，3 000 r/min 离心 3 min；洗涤 2 次，1% 多聚甲醛 200 μl 重悬固定，FACS Asia 流式细胞仪检测，BD FACS 专用 FACSDIVA 软件分析。

1.4　RT-PCR 分析

用 Trizol 试剂提取总 RNA，取 1 μg 总 RNA，采用常规方法进行逆转录及 PCR。NY-ESO-1 正义链：5′-AGTTCTACCTCGC-CATGCCT-3′，反义链：5′-TCCTCCTCCAGCGACAAACAA-3′，PCR 产物片段长为 386 bp；内参照 β-actin 正义链：5′-GTGGGGCGC-CCCAGGCACCA-3′，反义链：5′-CTTCCTTAATGTCACGCACGAT-TTC-3′，PCR 产物片段长度为 540 bp。

1.5　pentamer 染色

肝素抗凝的全血 200 μl，加 2 ml PBS 稀释后，1 000 r/min 离心 5 min ；用吸管小心移弃上清液；加入 10 μl PE 标记的 pentamer ，避光孵育 30 min；洗涤 2 次；加 20 μl PE-Cy5 标记的 CD3、20 μl APC-Cy7 标记的 CD8 抗体于全血细胞中，设置同型对照，混匀；室温避光孵育 30 min；洗涤 1 次；加红细胞裂解液，37 ℃孵育 10 min；待细胞悬液变成真性溶液后洗涤 2 次；用 1% 多聚甲醛 200 μl 重悬固定，FACS Aria 流式细胞仪检测，BD FACS 专用 FACSDIVA 软件分析。

1.6　统计学处理

使用 SPSS 12.0 统计软件，多组间均数比较采用方差齐性的单因素方差分析，2 组间比较采用双侧组间或配对 t 检验。对 23 例 NY-ESO-1$^+$/HLA-A2$^+$ 患者进行了术后随访，时间为 3 年。将随访病例根据特异性 CTL 反应强度分为强反应（CD3$^+$ CD8$^+$ pentamer$^+$ cells ≥0.5%）和弱反应组（CD3$^+$ CD8$^+$ pentamer$^+$ cells <0.5%），按 Kaplan-Meier 方法绘制各组生存曲线，采用 SAS 8.1 统计软件，运用 Log-Rank 检验比较各组累积生存率差异性。

2　结果

2.1　胃癌、食管癌组织标本中 NY-ESO-1 表达情况

在 112 例胃癌患者中，有 15 例（13.4%）胃癌组织中表达 NY-ESO-1 mRNA，男女患者之间的表达率无统计学差异（表 1）。在 76 例食管癌患者中，有 28 例（36.8%）食管癌组织中表达 NY-ESO-1 mRNA，男女患者之间的表达率也无统计学差异（P >0.05，表 2）。从不同病理分期来看，根据食管癌组织学分类和 TNM 分期进行分组，结果显示 NY-ESO-1 基因表达率在组织学类型和 TNM 分期均无统计学差异（P >0.05，表 1、2），表明该基因表达与胃癌、食管癌组织学类型无统计学差异。

表 1　胃癌 NY-ESO-1 基因表达与临床主要病理参数的关系

参数	n	NY-ESO-1$^+$	NY-ESO-1$^+$/HLA-A2$^+$
性别			
男	60	8	5
女	52	7	3
年龄（岁）			
≥45	67	10	6
<45	45	5	2
病理分期			
Ⅰ + Ⅱ	47	7	3
Ⅲ + Ⅳ	65	8	5
TNM 分期			
Ⅰ + Ⅱ	34	6	3
Ⅲ + Ⅳ	78	9	5

表 2　食管癌 NY-ESO-1 基因表达与临床主要病理参数的关系

参数	n	NY-ESO-1$^+$	NY-ESO-1$^+$/HLA-A2$^+$
性别			
男	42	17	9
女	34	11	6
年龄（岁）			
≥45	47	18	10
<45	29	10	5
病理分期			
Ⅰ + Ⅱ	36	14	7
Ⅲ + Ⅳ	40	14	8
TNM 分期			
Ⅰ + Ⅱ	31	12	6
Ⅲ + Ⅳ	45	16	9

2.2　HLA-A2 分型

对所有 NY-ESO-1$^+$ 患者及健康人进行 HLA-A2 检测，筛选出阳性者再进行 pentamer 频率检测。在检测的 15 例 NY-ESO-1$^+$ 胃癌和 28 例 NY-ESO-1$^+$ 食管癌患者中，分别有 8 例和 15 例 HLA-A2 阳性（表 1、2）；20 例健康人中检测到 10 例 HCA-A2 阳性。经流式细胞仪检测 HLA-A2 阳性的平均荧光强度均大于 90%。

2.3　表位特异性 CTL 频率的检测

检测 10 例 HLA-A2 阳性的健康人和 13 例 HLA-A2 阴性的食管癌患者以明确 pentamer 的非特异染色背景，结果显示 CD3$^+$ CD8$^+$ pentamer$^+$ 的细胞群频率为（0.02 ± 0.001），而胃癌

患者组 CTL 频率为(0.42 ± 0.03),食管癌患者组 CTL 频率为(0.39 ± 0.01),胃癌组与食管癌组之间无统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 胃癌、食管癌患者免疫应答强度与生存率分析

本组 23 例 NY-ESO-1$^+$/HLA-A2$^+$ 患者中,有 3 例失随访,故我们根据 20 例 Y-ESO-1$^+$/HLA-A2$^+$ 胃癌、食管癌患者外周血 CD3$^+$ CD8$^+$ pentamer$^+$ 细胞的频率,将强反应组与弱反应组 3 年生存率比较,两者差异有统计学意义(图 1,$P < 0.05$)。

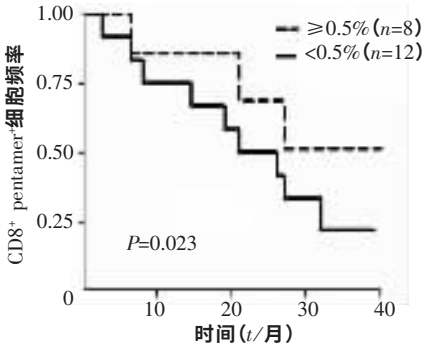


图 1 NY-ESO-1$^+$/HLA-A2$^+$ 胃癌、食管癌患者中强反应者与弱反应者积累生存率的比较

3 讨论

肿瘤免疫治疗是近年来受到关注的新疗法之一,已成为除手术、放疗和化疗外的治疗肿瘤的重要手段。肿瘤免疫治疗主要通过治疗性疫苗激发和增强机体的免疫机能,以达到控制和杀灭肿瘤细胞的目的。肿瘤治疗性疫苗激活机体的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞,产生肿瘤的保护性免疫应答的作用在动物实验中已得到肯定,多种疫苗已进入临床试验阶段,是一种有着广阔应用前景的肿瘤免疫治疗方法[6,7]。本研究分析了胃癌和食管癌中肿瘤抗原 NY-ESO-1 的表达,并检测了该抗原优势性表位 NY-ESO-1$_{157\text{-}165}$ 特异性细胞免疫应答状态,经过 3 年随访,发现患者细胞免疫应答状态与生存率有着密切的关系。

既往检测表位特异性 CTL,常使用^{51}Cr 释放法或限制性稀释分析方法(LDA)等,它们需要将特异性反应 T 细胞在体外经过表位肽的反复刺激扩增,费时费力,且不能适时定量的检测,因此会造成数量和功能的偏差。随着四聚体(tetramer)技术的出现,为精确定量检测 CTL 及其前体细胞提供了新的手段[8]。它是一个不需要靶细胞就可评价特异性 CTL 活性、活化及功能状态的技术平台,目前被认为是定量检测表位特异性 CTL 的金标准[9]。五聚体(Pentamer)技术是在四聚体技术上的改进和完善,从而具有更高的灵敏度和亲和力。

肿瘤抗原 NY-ESO-1 在多种肿瘤中广泛表达,如黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌等,而在除睾丸和卵巢外的正常组织中不表达,NY-ESO-1 抗原不仅能在患者体内诱发体液免疫,还可引起较强的细胞免疫应答[10,11],因此,NY-ESO-1 是肿瘤特异性免疫治疗的理想靶位。经分析,NY-ESO-1 在我国的食管癌和胃癌患者中均有表达,其中在食管癌中表达水平较高,是理想的治疗靶标[12]。

本研究将患者的免疫应答状态与生存率结合分析,结果显示,大多数的 NY-ESO-1 抗原表达阳性的胃癌和食管癌患者可以检测到 NY-ESO-1$_{157\text{-}165}$ 表位特异性 CTL 反应。将 CTL 反应根据其频率分为强反应和弱反应组,发现两者的生存率有显著性差异,说明细胞免疫应答状态与肿瘤消退与发展有着密切联系,为 CTL 表位多肽疫苗的应用提供了理论依据。

参考文献:

[1] Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 83 – 117.

[2] Boon T, Coulie P G, Van-den-Eynde B J, *et al*. Human T cell responses against melanoma[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 175 – 208.

[3] Chen Y T, Scanlan M J, Sahin U, *et al*. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(5): 1914 – 1918.

[4] Jackson H, Dimopoulos N, Mifsud N A, *et al*. Striking immunodominance hierarchy of naturally occurring CD8$^+$ and CD4$^+$ T cell responses to tumor antigen NY-ESO-1[J]. J Immunol, 2006, 176(10): 5908 – 5917.

[5] Purbhoo M A, Sutton D H, Brewer J E, *et al*. Quantifying and imaging NY-ESO-1/LAGE-1-derived epitopes on tumor cells using high affinity T cell receptors[J]. J Immunol, 2006, 176(12): 7308 – 7316.

[6] Karbach J, Gnjatic S, Pauligk C, *et al*. Tumor-reactive CD8$^+$ T-cell clones in patients after NY-ESO-1 peptide vaccination[J]. Int J Cancer, 2007, 121(9): 2042 – 2048.

[7] Susumu S, Nagata Y, Ito S, *et al*. Cross-presentation of NY-ESO-1 cytotoxic T lymphocyte epitope fused to human heat shock cognate protein 70 by dendritic cells[J]. Cancer Sci, 2008, 99(1): 107 – 112.

[8] Xiao Z, Mescher M F, Jameson S C. Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation[J]. J Exp Med, 2007, 204(11): 2667 – 2677.

[9] Laugel B, van-den-Berg H A, Gostick E, *et al*. Different T cell receptor affinity thresholds and CD8 coreceptor dependence govern cytotoxic T lymphocyte activation and tetramer binding properties[J]. J Biol Chem, 2007, 282(33): 23799 – 23810.

[10] Theurillat J P, Ingold F, Frei C, *et al*. NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases: correlation with CD8$^+$ T-cell and CD79a$^+$ plasmacytic/B-cell infiltration[J]. Int J Cancer, 2007, 120(11): 2411 – 2417.

[11] Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, *et al*. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class Ⅰ/Ⅱ specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(31): 12837 – 12842.

[12] 唐 郡, 阎晓初, 彭贵勇, 等. 食管鳞状细胞癌 P-gp、GST-π、TopoⅡ的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2007,29(17): 1692 – 1695.

(编辑 龙 亮)