文章编号:1000-5404(2012)11-1035-05

论著

人端粒酶逆转录酶表位多抗原肽疫苗的体外抗肿瘤免疫效应研究

廖忠莉[1],汤旭东[2],王国珍[2],周 媛[1],杨武晨[1],周圆圆[1],覃 勇[1],胡 建[1],郭 红[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所[2])

[摘要] **目的** 检测基于人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位R540的多抗原肽(multiple antigen peptide,MAP)的体外抗肿瘤活性。**方法** 将HLA-A2限制性hTERT CTL表位的多抗原肽负载正常人外周血来源(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的树突细胞,并将负载多肽的树突细胞刺激淋巴细胞产生hTERT特异性的CTL细胞,采用^{51}Cr释放实验检测所诱导的CTL细胞体外抗肿瘤杀伤效应。**结果** hTERT特异性CTL表位的多抗原肽所诱导的CTL细胞对hTERT及HLA-A2表达均阳性的肿瘤细胞杀伤作用较之其单肽疫苗杀伤活性明显增强,在最大效靶比(E/T)80∶1时,高出率均大于25%。而对HLA-A2阴性的HepG2肝癌细胞及hTERT阴性的U2OS骨肉瘤细胞不具有杀伤效应,同时其对自体淋巴细胞和树突细胞也不具有杀伤效应。**结论** HLA-A2限制性hTERT CTL表位多抗原肽相较于其单肽能在体外诱导更强的抗肿瘤免疫效应。

[关键词] 人端粒酶逆转录酶;多抗原肽;肿瘤疫苗
[中图法分类号] R392.7; R394.3; R73-362 [文献标志码] A

In vitro antitumor immune activity of human telomerase reverse transcriptase epitope multiple antigen peptide vaccine

Liao Zhongli[1], Tang Xudong[2], Wang Guozhen[2], Zhou Yuan[1], Yang Wuchen[1], Zhou Yuanyuan[1], Qin Yong[1], Hu Jian[1], Guo Hong[1]([1] Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2] Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the antitumor activity of multiple antigen peptide (MAP) vaccine of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) based on cytotoxic T lymphocytes (CTL) epitope R540 *in vitro*. **Methods** Dendritic cells (DC) from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) pulsed with HLA-A2-restricted hTERT MAP were used to stimulate lymphocytes to produce hTERT-specific CTL. *In vitro* antitumor activity of hTERT MAP vaccine against tumor cells was detected by ^{51}Cr release assay. **Results** The *in vitro* antitumor activity of hTERT MAP vaccine was significantly stronger than its linear peptide vaccine against tumor cells with a positive expression of hTERT and HLA-A2 and at the maximum effector/target (E/T) ratio (80∶1), the lysis rate was over 25%. The hTERT MAP vaccine had no killing effect on hTERT or HLA-A2 negative tumor cells and on autologous lymphocytes or DC. **Conclusion** The antitumor activity of hTERT MAP vaccine is stronger than its linear peptide vaccine against tumor cells *in vitro*.

[**Key words**] human telomerase reverse transcriptase; multiple antigen peptide; cancer vaccine

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071845). Corresponding author: Guo Hong, E-mail: haojia2004@yahoo.com.cn

尽管目前有多种手段用于治疗恶性肿瘤,但是恶性肿瘤仍是威胁人类生命的主要原因之一。传统的治疗手段包括:手术、放疗、化疗。放疗和化疗在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤正常细胞。随着对肿瘤生物学行为的深入研究及生物技术的迅速发展,以肿瘤免疫治疗为主的肿瘤的生物治疗已成为肿瘤治疗的第四种模式。

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT),又名人端粒酶催化亚单位,为端粒酶活性的限速成分,经研究证实hTERT在85%以上的恶性肿瘤及其癌前病变中过度表达,是癌细胞永生化的必要途径,在维持肿瘤继续分裂、增殖和生存中发挥重要作用[1]。hTERT的高表达还与肿瘤的不良预后、浸润、转移密切相关[2]。以上证据均提示hTERT可作为肿瘤疫苗的共有抗原。研究[3]表明,hTERT全长基因的腺病毒载体负载DC,以及带有hTERT全长基因

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071845)
[通信作者] 郭 红,E-mail: haojia2004@yahoo.com.cn

和隐性表位的颗粒疫苗,在体内外均可以诱导产生hTERT特异性的CTL效应细胞,对hTERT阳性的胃癌、结肠癌等多种癌细胞具有一定的杀伤效应,而对表达hTERT阴性的淋巴细胞和DC不具有杀伤效应。

1988年Tam实验室提出了多抗原肽(multiple antigen peptide, MAP)的设计方案,采用分子量小且免疫原性弱的赖氨酸为核心基质,将若干条抗原表位相同的单体肽偶联在一起,形成树状结构,这种设计模式通过疫苗自身结构的优化,从而改善传统单肽疫苗免疫原性弱的弊端。本研究拟选择人hTERT优势CTL表位R540,构建其四分支多抗原肽,研究其在体外的抗肿瘤活性,并与hTERT全长基因疫苗、表位单体疫苗诱导的CTL活性进行对比,为hTERT的MAP疫苗抗肿瘤效应的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血液标本 采集健康人外周血富集白细胞层(白膜,第三军医大学西南医院输血科提供)。

1.1.2 hTERT特异性CTL表位R540四分支多抗原肽及其单肽设计与合成 由上海强跃生物科技有限公司代为合成。采用反相高压液相色谱仪(RP-HPLC)鉴定其纯度达95%以上,采用液相色谱/质谱技术(LC/MS)鉴定其分子量为所需要目的多肽。

1.1.3 实验试剂 RPMI1640培养基(美国HyClone公司);胎牛血清(美国HyClone公司);人淋巴细胞分离液(TBD生物技术发展公司);细胞因子rhGM-CSF、rhIL-4、TNF-α(英国Peoro Tech公司)。

1.1.4 肿瘤细胞 KATO-Ⅲ胃癌细胞($hTERT^+$, $HLA\text{-}A2^+$)、HepG2肝癌细胞($hTERT^+$, HLA-A2)、U2OS骨肉瘤细胞($hTERT^-$, $HLA\text{-}A2^+$)、SW480结肠癌细胞($hTERT^+$, $HLA\text{-}A2^+$)、MCF-7乳腺癌细胞($hTERT^+$, $HLA\text{-}A2^+$);转染了HLA-A2基因的HepG2肝癌细胞($hTERT^+$, $HLA\text{-}A2^+$)、转染了hTERT基因的U2OS骨肉瘤细胞($hTERT^+$, $HLA\text{-}A2^+$)由西南医院全军消化病研究中心提供。

1.1.5 携带hTERT全长基因腺病毒 由西南医院全军消化病研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 树突细胞的培养及树突细胞成熟表型鉴定 树突细胞培养按参考文献[4]进行。树突细胞成熟表型鉴定采取流式细胞仪检测。

1.2.2 质粒构建与转染 实验中转染了HLA-A2基因的HepG2肝癌细胞($hTERT^+$, $HLA\text{-}A2^+$)、转染了hTERT基因的U2OS骨肉瘤细胞($hTERT^+$, $HLA\text{-}A2^+$)由西南医院全军消化病研究中心提供,具体方法按参考文献[4-5]进行。

1.2.3 hTERT特异性效应细胞的制备 将成熟的人外周血来源的树突细胞平均分为4份,分别负载hTERT特异性CTL表位R540多抗原肽、hTERT特异性CTL表位R540单肽、携带hTERT全长基因腺病毒及阴性对照肽。将负载了多肽及腺病毒的树突细胞辐照去分化,辐照量为20 Gy。随后将负载了多肽及腺病毒的树突细胞与之前冻存的未贴壁的淋巴细胞共培养,同时加入rhIL-2,使其终浓度为1 200 U/ml。如此反复用负载了多肽及腺病毒的树突细胞反复刺激淋巴细胞3次,每周1次从而制备成所需的hTERT-R540特异性CTL效应细胞[6]。

1.2.4 CTL活性的检测 将效应细胞按照不同效靶比(E/T)=80∶1、40∶1、20∶1、10∶1,加入到靶细胞平板中,培养孵育,最大释放组和最小释放组分别由100 μl靶细胞和100 μl HCl、100 μl靶细胞和100 μl RPMI1640培养基组成。之后用γ计数器分别测定各自^{51}Cr释放量。采用^{51}Cr释放法检测CTL活性。^{51}Cr释放率=(实验组cpm平均值-最小释放cpm平均值)/(最大释放cpm平均值-最小释放cpm平均值)×100%。

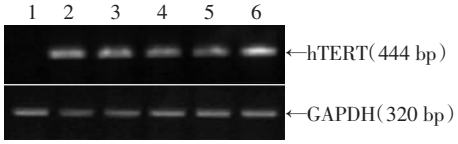
1.3 统计学分析

所得数据取平均值,以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件,均数的比较用配对t检验分析。

2 结果

2.1 hTERT及HLA-A2在不同肿瘤细胞中的表达

RT-PCR结果显示KATO-Ⅲ胃癌细胞、HepG2肝癌细胞、SW480结肠癌细胞、MCF-7乳腺癌细胞中hTERT mRNA表达均为阳性;U2OS骨肉瘤细胞hTERT mRNA表达均为阴性,但当U2OS骨肉瘤细胞转染了含hTERT基因的质粒后,其表达为阳性(图1)。另外,我们采取流式细胞术检测了KATO-Ⅲ胃癌细胞、HepG2肝癌细胞、SW480结肠癌细胞、MCF-7乳腺癌细胞、U2OS骨肉瘤细胞中HLA-A2的表达情况,结果提示HepG2肝癌细胞、KATO-Ⅲ胃癌细胞、MCF-7乳腺癌细胞、SW480结肠癌细胞、U2OS骨肉瘤细胞中HLA-A2的表达分别为8.0%、99.87%、97.97%、100.00%、100.00%,当HepG2肝癌细胞转染了含HLA-A2基因的质粒后,其HLA-A2的表达提高至91.2%(图2)。



1:U2OS骨肉瘤细胞;2:U2OS/hTERT骨肉瘤细胞;3:KATO-Ⅲ胃癌细胞;4:MCF-7乳腺癌细胞;5:SW480结肠癌细胞;6:HepG2肝癌细胞

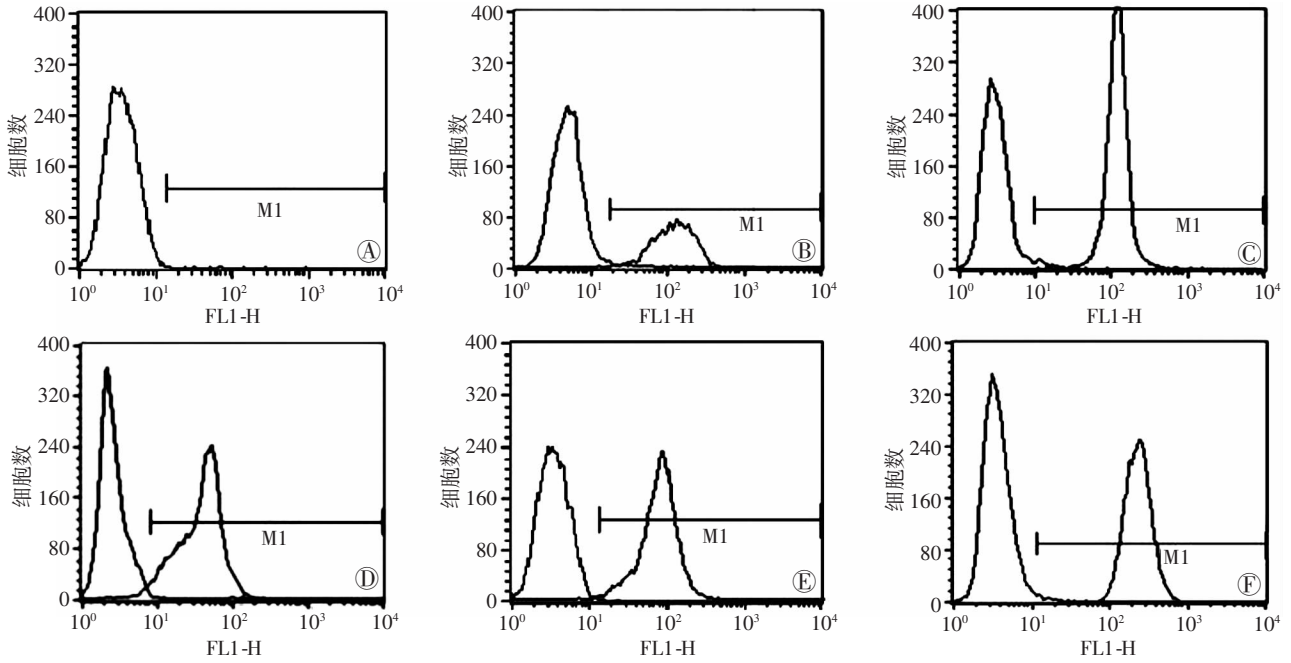
图1 RT-PCR检测靶细胞中hTERT的表达

2.2 树突细胞成熟表型鉴定

流式细胞检测提示培养7 d后的树突细胞,其细胞表面分子CD1α、CD83、CD86、HLA-A2分别达到67.17%、75.49%、99.77%、98.74%(图3)。这些结果提示该树突细胞已成熟,具备强大的抗原提呈能力。

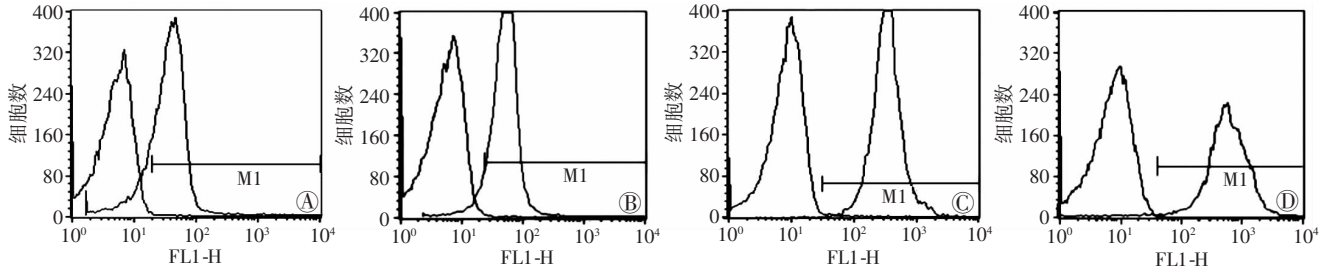
2.3 hTERT-R540-MAP的体外抗肿瘤活性检测

采用^{51}Cr释放试验检测hTERT-R540-MAP所诱导的CTL细胞杀伤肿瘤细胞的活性,结果显示在最高效靶比80∶1时,hTERT全长基因的腺病毒疫苗诱导的抗肿瘤反应最强,hTERT-R540-MAP4杀伤肿瘤细胞后的^{51}Cr释放率较与其对应的单肽提高25%以上(图4),而hTERT阴性或者HLA-A2阴性的肿瘤细胞不具备杀伤作用(图5)。



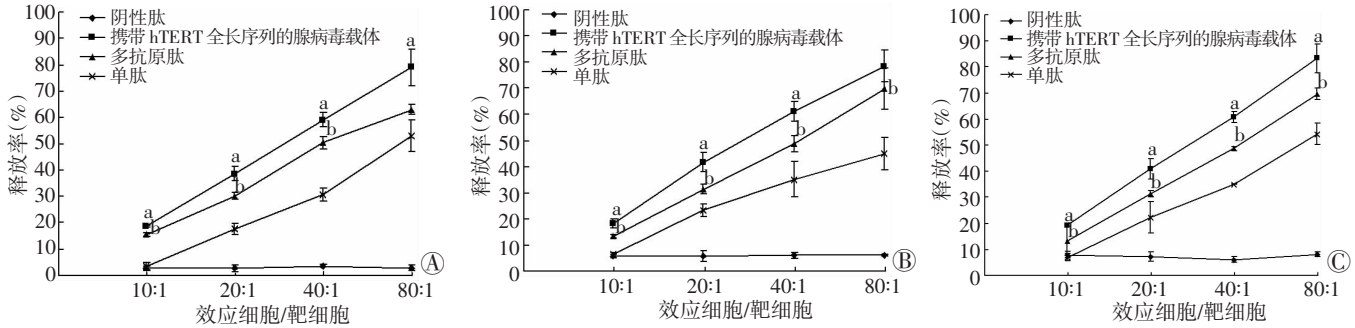
A：HepG2肝癌细胞；B：转染了HLA-A2基因的HepG2肝癌细胞；C：KATO-Ⅲ胃癌细胞；D：MCF-7乳腺癌细胞；E：SW480结肠癌细胞；F：U2OS骨肉瘤细胞

图2 流式细胞仪检测靶细胞中HLA-A2的表达



A：CD1α；B：CD83；C：CD86；D：HLA-A2

图3 流式细胞仪检测树突细胞成熟表型



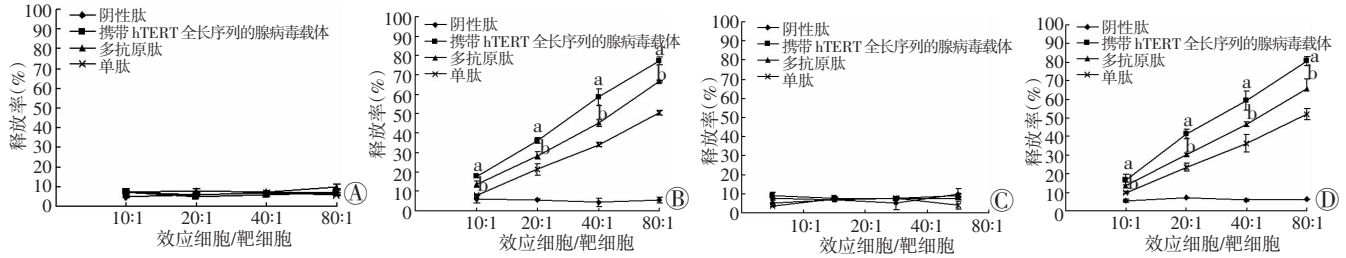
a：$P<0.05$，与hTERT多抗原肽诱导的CTL细胞杀伤靶细胞的释放率比较；b：$P<0.05$，与hTERT单肽诱导的CTL细胞杀伤靶细胞的释放率比较

A：靶细胞为KATO-Ⅲ胃癌细胞；B：靶细胞为MCF-7乳腺癌细胞；C：靶细胞为SW480结肠癌细胞

图4 hTERT多抗原肽诱导的CTL细胞对hTERT及HLA-A2表达均阳性的肿瘤靶细胞的免疫杀伤反应

2.4 hTERT特异性CTL表位多抗原肽诱导的CTL反应对自体淋巴细胞及DC的毒副作用

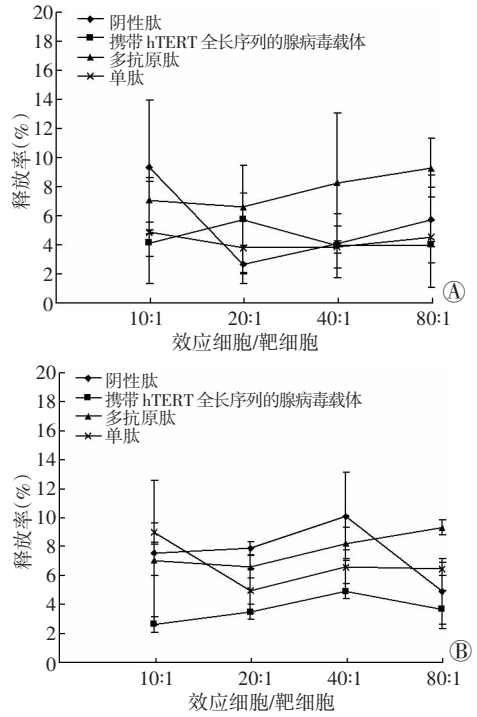
采用^{51}Cr释放试验检测hTERT特异性CTL表位多抗原肽诱导的CTL反应对自体淋巴细胞及DC的影响，结果显示hTERT-R540-MAP4诱导的CTL反应对自体淋巴细胞及DC无任何杀伤效应（图6）。



a :$P<0.05$,与hTERT多抗原肽诱导的CTL细胞杀伤靶细胞的释放率比较;b :$P<0.05$,与hTERT单肽诱导的CTL细胞杀伤靶细胞的释放率比较

A:靶细胞为hTERT表达阴性的U2OS骨肉瘤细胞;B:靶细胞为转染了hTERT cDNA的U2OS骨肉瘤细胞;C:靶细胞为HLA-A2表达阴性的HepG2肝癌细胞;D:靶细胞为转染了HLA-A2 cDNA的HepG2肝癌细胞

图5 hTERT多抗原肽诱导的CTL细胞对hTERT表达阴性的U2OS骨肉瘤细胞及HLA-A2表达阴性的HepG2肝癌细胞的免疫杀伤反应



A:靶细胞为自体淋巴细胞;B:靶细胞为树突细胞

图6 hTERT多抗原肽诱导的CTL细胞对hTERT表达阴性的树突细胞及自体淋巴细胞的免疫杀伤反应

3 讨论

随着对免疫应答分子机制的深入研究,人们已意识到机体的免疫细胞并不是一一对应于各种各样的病原体或天然抗原的整体分子,而是针对各种各样抗原分子的抗原表位,蛋白质抗原通过其表位来体现其免疫特异性。基于抗原分子的免疫干预手段已不再停留在病原体或天然抗原的整体水平,而开始向表位水平过渡。hTERT作为一种肿瘤共有抗原,在85%以上的恶性肿瘤细胞中高表达。过去几年中,已经筛选出的hTERT表位包括MHC-Ⅰ类分子等位基因的HLA-A2、A3等限制性的显性(高亲和力)表位:如R540(ILAKFLHWL)、R865(RLVDDFLLV)等;隐性表位:如P572(RLFFYRKSV)等;MHC-Ⅱ类分子等位基因限制性表位L766(LTDLQPYMRQFVAHL)和R672(RPGLLGASVLGLDDI)等[7]。Vonderheide等[8]首先报道了hTERT特异性的CTL表位R540单肽疫苗所诱导的CTL效应细胞无论在体内还是体外均可有效地杀伤hTERT阳性的肿瘤细胞。传统的单肽疫苗具有便于合成、保存、无传染性、无遗传、整合或重组风险等优点;但是其表位单一、分子量小易被降解而致免疫原性弱,现在有越来越多的研究意在提高多肽疫苗的免疫原性。如多肽疫苗自身结构的优化、联合树突细胞等。

本研究利用成熟的健康成人外周血来源的树突细胞负载hTERT全长基因的腺病毒、hTERT特异性CTL表位R540多抗原肽及其单肽刺激hTERT特异性CTL细胞产生,通过^{51}Cr释放试验检测其体外抗肿瘤活性。结果提示携带hTERT全长基因的腺病毒具有最强的抗肿瘤活性,这与前期其他研究组的实验结果一致[9-10]。腺病毒、慢病毒载体目前已广泛用于肿瘤的免疫治疗中,并且取得不错的抗肿瘤免疫效应,但是这类疫苗的最大问题在于病毒载体本身所带来的一系列安全性问题。

相较于病毒载体疫苗,多肽疫苗具有便于设计合成、价廉、安全等优点,而其最大的缺点在于表位单一、分子量小易被降解而致免疫原性弱。由Tam实验室设计的多抗原肽方案很好地解决了传统多肽疫苗免疫原性弱的弊端,多抗原肽采用分子量小且免疫原性弱的赖氨酸为核心基质,将若干条抗原表位相同的单体肽偶联在一起,形成树状结构,这种设计模式增大了抗原的分子质量,而且还不需要再耦联载体蛋白就能诱生较强的免疫反应;同时,其稳定的二级结构不易反转,故降解速度减缓,延长抗原刺激时间,获得更好的杀伤活性[11]。本实验中,我们采用MAP设计方案构建了以hTERT特异性CTL表位R540的表位序列为基础的抗原表位相同的四分支多抗原肽,其诱导的抗肿瘤CTL反应明显强于hTERT特异性CTL表位R540单肽疫苗。然而目前尚不清楚多抗原肽分支链上的各个抗原表位是怎样被水解下来,今后仍需进一步的实

验去探讨。

采用疫苗进行免疫治疗另一个值得我们关注的问题就是疫苗的自身的安全性问题，在本研究中我们通过^{51}Cr 释放试验检测 hTERT 多抗原肽诱导的 CTL 细胞对自体淋巴细胞及 DC 的影响，发现 hTERT 多抗原肽诱导的 CTL 效应细胞对 hTERT 表达阴性的自体淋巴细胞及 DC 无任何杀伤效应，这与 Vonderheide 研究小组的实验结果相一致[12]。从而也进一步证实了多抗原肽疫苗的安全，并为 hTERT 特异性 CTL 表位 MAP 疫苗肿瘤免疫治疗的临床运用提供了实验依据。

参考文献：

[1] Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells[J]. FEBS Lett, 2004, 564(1/2): 9 - 13.

[2] Yu S T, Chen L, Wang H J, *et al*. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells *in vitro*[J]. Int J Oncol, 2009, 35(2): 329 - 336.

[3] Guo H, Hao J, Wu C, *et al*. A novel peptide-nucleotide dual vaccine of human telomerase reverse transcriptase induces a potent cytotoxic T-cell response *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(4): 1090 - 1095.

[4] 陈婷，万瑛，汤旭东，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2007, 29(22): 2120 - 2123.

[5] 陈陵，余松涛，梁光萍，等. 端粒酶 hTERT 促进肿瘤细胞侵袭与转移及其机制研究[J]. 实用临床医药杂志，2010, 14(5): 13 - 20.

[6] 王国珍，汤旭东，吴玉云，等. 肝素酶特异性细胞毒 T 淋巴细胞表位多抗原肽负载的树突状细胞疫苗体外抗肿瘤免疫效应研究[J]. 第三军医大学学报，2011, 33(8): 761 - 764.

[7] Vonderheide R H. Prospects and challenges of building a cancer vaccine targeting telomerase[J]. Biochimie, 2008, 90(1): 173 - 180.

[8] Vonderheide R H, Domchek S M, Schultze J L, *et al*. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8$^+$ T lymphocytes[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(3): 828 - 839.

[9] Zhu M Z, Marshall J, Cole D, *et al*. Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 24 - 33.

[10] Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, *et al*. Targeting human telomerase reverse transcriptase with recombinant lentivector is highly effective to stimulate antitumor CD8 T-cell immunity *in vivo*[J]. Blood, 2010, 115(15): 3025 - 3032.

[11] Tam J P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(15): 5409 - 5413.

[12] Danet-Desnoyers G A, Luongo J L, Bonnet D A, *et al*. Telomerase vaccination has no detectable effect on SCID-repopulating and colony-forming activities in the bone marrow of cancer patients[J]. Exp Hematol, 2005, 33(11): 1275 - 280.

（**收稿**：2012-01-18；**修回**：2012-02-22）

（编辑　王　红）

我校第八届海外学者交流计划暨生物医学高层论坛首场报告会顺利召开

2012 年 4 月 27 日，第三军医大学第八届海外学者交流计划暨生物医学高层论坛首场报告会在第一教学馆学术厅顺利召开。学校罗长坤校长、王云贵副校长、科研部徐迪雄部长等领导出席了大会开幕式。学校相关科技干部及与会学者共计 400 余人参加了会议。



罗长坤校长出席开幕式



大会开幕式场景

借“2012 国际突触传递及可塑性学术研讨会”在我校举办之机，受学校委托，本次大会主席之一、基础部生理学教研室胡志安主任特别邀请加拿大皇家科学院王玉田院士、卓敏院士、John MacDonald 院士，英国皇家科学院 Graham Collingridge 院士，韩国科学院 Bong-Kiun Kaang 院士等 5 位国际顶尖专家来校讲学交流，就突触传递及可塑性研究前沿进展作专题学术报告。

神经科学已成为当今生命科学最重要的前沿、热点学科之一。神经突触传递及可塑性作为神经科学研究的基础和核心，在神经科学发展中长期扮演着引领学科跨越的重要角色。近年来，我校在脑胶质细胞结构与功能、神经发育、痛觉生理、神经损伤与修复、睡眠与觉醒等神经科学研究领域具有一定的特色，取得了较大进展，涌现出一批优秀的中青年专家。

我校“海外学者交流计划”自 2000 年启动以来，已连续成功举办了 7 届，为我校广大科技工作者了解把握国际医学科技前沿搭建了一个重要的交流平台，也对密切与广大专家学者的联系，促进国际同行之间交流合作发挥了重要的桥梁和纽带作用。此次论坛的成功召开，也必将对交流突触传递及可塑性领域最新研究成果，拓展国际学术交流与科技合作产生积极的影响。

（科研部成果处　供稿）