维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2007年第16卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2007, Vol. 16, No. 5

人泌尿系上皮肿瘤疫苗的初步研究

王祥卫，张立新，张远宁，叶 钢，张艮甫 （第三军医大学附属新桥医院泌尿科，重庆 400037）

［摘 要］ **目的** 通过筛选噬菌体随机12肽库获得MUC1糖链抗原模拟表位。**方法** 利用纯化获得的Ma695抗体筛选噬菌体随机12肽库，通过夹心ELISA分析噬菌体克隆，测定阳性克隆DNA序列并进行同源性及氨基酸分析，竞争性抑制实验鉴定噬菌体克隆。**结果** 经3轮筛选，获得了14个阳性克隆，DNA序列分析并推导出氨基酸序列：KHYDPFHHRMPQ，QADTARSVALAG，VPSKPDLHVRSI，MTPIHYWNHNRV。鉴定结果表明4个噬菌体展示肽克隆抑制率均在50%以上。**结论** 所得序列KHYDPFHHRMPQ，QADTARSVALAG，VPSKPDLHVRSI，及MTPIHYWNHNRV模拟了MUC1抗原表位。

［关键词］ MUC1抗原；模拟表位；噬菌体随机12肽库
［中图分类号］ R730.3 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042(2007)05-0302-03

A study on epithelium tumor vaccine in urologic system

WANG Xiang-wei, ZHANG Li-xin, ZHANG Yuan-ning, YE Gang, ZHANG Gen-fu (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective To identify and characterize the mimic epitope of MUC1 from phage display random 12 peptide library. **Methods** The purified Ma695 antibody was used to screen in phage display random 12 peptide library. The positive clones were identified by sandwich ELISA, competitive inhibition assay. The homologous comparison of amino acid sequences of positive clones was conducted through searching the protein sequence databank. The digestion analyses of amino acid sequences were also conducted by software. **Results** 14 positive clones were acquired after 3 rounds of screening. Amino acid sequences deduced from DNA sequences showed four different sequences as KHYDPFHHRMPQ, QADTARSVALAG, VPSKPDLHVRSI, MTPIHYWNHNRV. The inhibitory assay showed that the 4 mimic epitope peptides displaying on the phage surface could effectively inhibit the combination of antibody with antigen and the inhibitory rates of each mimic epitope were 50% higher than that in the control. **Conclusion** The results shows that KHYDPFHHRMPQ, QADTARSVALAG, VPSKPDLHVRSI, MTPIHYWNHNRV are the mimotopes which could mimic the epitope of MUC1.

Keywords: Mucin 1; mimic epitope; phage display random 12 peptide library

泌尿系肿瘤是泌尿外科疾病中最常见的疾病，深入研究其治疗方法具有重要的临床意义。正常情况下泌尿生殖道腺上皮细胞的管腔面顶部都有MUC1的表达。但在膀胱癌、前列腺癌、精囊癌等腺癌中MUC1呈异常表达：①表达量增高；②极性分布消失；③糖链的糖基化不全，糖链变短，分枝少，结构简单，导致新糖链表位形成和正常情况下隐蔽的肽链表位暴露，使MUC1成为可被免疫系统识别的肿瘤抗原[1]。由于MUC1具备以上特点，使其成为多种上皮性肿瘤免疫治疗的新靶点，通过机体的体液和细胞免疫机制能有效免除MUC1高表达肿瘤细胞。为研发人泌尿系上皮肿瘤疫苗，本文应用MUC1糖链抗体筛选噬菌体随机12肽库获得了MUC1模拟表位，报告如下。

［基金项目］ 国家863课题资助项目(2002AA214111)
［作者简介］ 王祥卫(1969－)，男，山东省济南市人，主治医师，讲师，北京大学泌尿外科研究所博士后，主要从事泌尿系肿瘤免疫治疗方面的研究。电话：(023)68774624
［收稿日期］ 2007-03-25 ［修回日期］ 2007-05-20

1 材料与方法

1.1 材料

Ph. D. -12TM肽库(NEW ENGLAND Biolabs)为展示在噬菌体pIII蛋白N端的12肽库，库滴度为4×10^{12} pfu/ml，随机多样性(complexity)为1.9×10^{9}，所用受体菌为XL1-blue (tetr)，均由张立新博士惠赠。－96 gIII测序引物5' C TCA TAG TTA GCG TAA CG 3'，由大连TaKaRa公司合成。MUC1抗体Ma695由本室纯化制备；4D抗体为正常组织MUC1抗体。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体滴度的测定 取含<100 fu的平板计蓝斑数目，计算噬菌体滴度。噬菌体滴度＝蓝斑数×稀释度×10^{2} (pfu/ml)。

1.2.2 Ph. D. -12肽库的生物淘洗 第一轮：用包被液将Ma695抗体浓度调为100 μg/ml，每孔加入150 μl抗原液，4 ℃湿盒中过夜。封闭液，4 ℃放置1 h。加入10 μl (4×10^{10} pfu)噬菌体库液，常温轻摇60 min。洗脱液漂洗后，立即加入30 μl中和液，混匀。取洗脱液测滴度。剩余洗脱液进行扩增。第二、三轮：方法同第一轮，MA695浓度调为10 μg/ml，加入2×10^{11} pfu扩增噬菌体，TBST中Tween-20的浓度提高到0.5%

维普资讯 http://www.cqvip.com

(V/V)。

1.2.3 噬菌斑的扩增 用枪头挑取单个第三轮扩增后测定滴度后的蓝斑,接种培养基,37 ℃,260 r/min,4.5 h,离心取80%上清,4 ℃保存或加入甘油至终浓度50%后,-20 ℃保存。

1.2.4 夹心ELISA 分析获得的噬菌体克隆将Ma695抗体用包被液稀释成10 μg/ml,包被双条可拆酶标板,4 ℃过夜。加入扩增后的噬菌体,同时取2 μl原库+200 μl TBST作为对照,加入HRP/AntiM13单抗后显色,50 μl l2 M H_2SO_4 终止显色,测定 OD_{450}。

1.2.5 测序模板的快速纯化及DNA测序 扩增噬菌斑。DNA沉淀重悬于30 μl TE。送测序。

1.2.6 竞争抑制实验 将人MUC1蛋白包被微孔,BSA封闭,阳性噬菌体克隆与Ma695抗体室温共孵育2 h后,加入微孔,37 ℃孵育1 h后,缓冲液洗涤,加入HRP标记的羊抗鼠抗体,TMB显色。测 OD_{450} 值。计算抑制率:抑制率=(抑制前 OD_{450} - 抑制后 OD_{450})/抑制前 OD_{450} ×100%。

2 结果

2.1 Ph. D. -12肽库的生物淘洗

按上述方法所述,进行3轮生物淘洗,噬菌体克隆获得有效的富集达110倍。

2.2 噬菌体克隆的ELISA分析

从上述筛选获得的噬菌体克隆中挑选MUC1 OD_{450}/4D OD_{450} >2.0者,共获得14个阳性克隆。

2.3 噬菌体阳性克隆的DNA序列测定及分析

根据测序结果的比较,将其分为两种类型,第一类为相同序列模式:KHYDPFHHRMPQ (t1,3,4,6,7,17,16,10,9,8,11);第二类为单一序列模式:QADTARSVALAG(t2),VPSKPDLHVRSI (t5),MTPIHYWNHNRV(t13)。依据其氨基酸序列同源程度,未发现获得其同源性基序。所得序列与MUC1序列比对,亦未发现同源性序列,说明筛选得到的表位是MUC1的模拟表位。

2.4 噬菌体克隆的竞争抑制实验

与Ma695特异性结合的噬菌体克隆做竞争抑制试验,结果4个噬菌体展示肽克隆抑制率均在50%以上(分别为79.34%,64.71%,73.57%及51.96%),能较大程度地特异性抑制抗原抗体结合,提示这些阳性克隆的外源肽具有一定的MUC1抗原模拟功能。

3 讨论

近来研究发现,粘蛋白分子可以保护肿瘤细胞不受CTL细胞和NK细胞的细胞毒作用。粘蛋白分子可以覆盖在肿瘤细胞的表面,阻碍免疫细胞和抗体与肿瘤抗原的接触,使ADCC作用和免疫效应细胞不能激活。对许多上皮性肿瘤如乳腺癌、膀胱癌、直肠癌和卵巢癌的研究发现,肿瘤细胞可以改变其表面粘蛋白如MUC1的表达,这些粘蛋白分子的表达改变有助于肿瘤细胞逃避机体的免疫监视。另外,肿瘤细胞表面蛋白糖基化的异常,也可以使蛋白抗原决定簇被封闭或者改变肿瘤细胞的一生物学活性,有助于免疫逃避。正是由于上述原因,肿瘤细胞无法有效激活自身T淋巴细胞,并可导致T细胞耐受或缺失的出现。应用肿瘤疫苗的目的是为了有效激活自身T淋巴细胞,打破原有的免疫耐受局面[2-4]。

本研究所选择的MUC1粘蛋白作为一个肿瘤相关抗原,已被一些研究者作为一个肿瘤主动免疫治疗的理想靶抗原。虽然肿瘤MUC1的多肽表位正常时被糖链覆盖,不易引起免疫应答,但MUC1毕竟是一种自身抗原,在用MUC1多肽进行免疫治疗时,并不能完全排除产生自身免疫的可能性。因此,用MUC1的模拟表位作为肿瘤疫苗,作为一种异源分子,一方面可增强其免疫原性,另一方面可减少诱发自身免疫的机会。

目前的研究显示,筛选配基中能与噬菌体多肽结合的位点仅有数个,这些位点通常都是筛选配基与其配体的结合部位或活性位点。因此,通过筛选所获得的结合肽具有一定的特异性和亲和力。亲和筛选中,即使经过多轮筛选,也不能排除非特异性噬菌体克隆的存在,因而进一步挑取单个克隆,确定它与筛选配基的特异性吸附是实验必不可少的步骤。其中,ELISA能半定量测定筛选配基与噬菌体克隆间的结合常数,是最为常用的方法[5-7]。实验中,我们应用该方法筛选阳性克隆,采用不相关抗体4 D(识别正常MUC1蛋白的抗体)作为阴性对照,以Ma695 OD_{450}/4D OD_{450} >2.0作为阳性结果判定标准,避免了由于噬菌体用量过大所可能造成的假阳性,所获得的实验结果较为可靠。

由于抗原与抗体结合的位点一般由几个氨基酸残基组成,随机肽库中就有部分多肽可以模拟或组成抗原表位而与抗体结合,通过对筛选获得的多肽进行序列和结构分析,就可得到一系列不同的短肽,其中许多序列可能具有共同的或者相似的序列,称为基序(motif),这种序列极有可能为蛋白分子上的抗原表位。带有基序的噬菌体克隆或根据基序化学合成的多肽若能竞争性的阻断抗体与抗原的结合,表明该基序在一定程度上模拟了蛋白质的表位。蛋白质抗原与抗体的结合表位长度约3-5个氨基酸,许多抗体的结合表位已被确定[8-9]。因此,可用噬菌体随机肽库筛选抗原模拟表位。

用识别连续抗原表位的单抗进行筛选时,往往能够从随机肽库得到许多与抗原表位的同源性很高的表位,但也有许多作者报道了用识别连续抗原表位的单抗从噬菌体随机肽库中筛选出与相应抗原没有同源性

维普资讯 http://www.cqvip.com

的序列,推测该抗体可能识别一种不连续的或结构上的新型表位[10]。我们应用识别MUC1抗原表位的Ma695单抗筛选噬菌体随机12肽库,挑选从筛选获得的噬菌体克隆,进行插入肽的DNA序列测定。根据测序结果的比较,将其分为两种类型,第一类为相同序列模式:KHYDPFHHRMPQ(x11);第二类为单一序列模式:QADTARSVALAG(x1),VPSKPDLHVRSI(x1),MTPIHYWNHNRV(x1)。依据其氨基酸序列同源程度,未发现其同源性基序。所得序列与MUC1序列比对,亦未发现同源性序列,说明筛选得到的表位是MUC1的模拟表位。由于糖链抗体识别的是肿瘤细胞表面抗原分子上的糖链,所以本研究筛选到的表位只能是模拟表位,是用多肽来模拟多糖抗原与糖链抗体的结合。此种模拟表位的鉴定与蛋白抗原线性表位的鉴定不同,蛋白抗原线性表位的鉴定可以通过噬菌体表面呈现的多肽序列与天然抗原的氨基酸序列的同源性比较来确定筛选到的表位是否正确。而模拟表位的鉴定无法进行同源性比较,只能通过功能分析来判断该多肽是否为抗原的模拟表位。本实验采用了ELISA方法和竞争抑制实验来鉴定糖链抗体的模拟表位。结果显示4个噬菌体展示肽克隆抑制率均在50%以上,能较大程度地特异性抑制抗原抗体结合,提示这些阳性克隆的外源肽具有一定的MUC1抗原模拟功能。

本研究在获得MUC1模拟表位肽序列的同时,亦获得了展示在噬菌体表面的4个MUC1糖链抗原模拟表位阳性噬菌体克隆,该模拟表位以融合蛋白形式展示在噬菌体表面,因此利用这些阳性噬菌体克隆,可作为携带该模拟表位的免疫载体,用于免疫小鼠有可能激发机体的体液免疫反应,产生针对MUC1的体液和细胞免疫应答。

[参考文献]

[1] Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer:protection and control of the cell surface[J]. J Nat Rev Cancer ,2004,4 (1): 45 -49.

[2] Kohzoh Imai, Toshiaki Hayashi, Takamaro Suwa, et al. MUC1 as a human tumor marker[J]. International Congress Series,2001,1223:125 -133.

[3] Hidenobu Ishizaki, Takuya Tsunoda, Satoshi Wada, et al. Inhibition of Tumor Growth with Antiangiogenic Cancer Vaccine Using Epitope Peptides Derived from Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1[J]. Clin Cancer Res, 2006,12 (19):5841 - 5849.

[4] Carr Brendel V, Markovic D, Ferrer K, et al. Immunity to murine breast cancer cells modified to express MUC-1, a human breast cancer antigen, in transgenic mice tolerant to human MUC-1[J]. Cancer Res, 2000,60(9): 2435 -2443.

[5] Ring D. What makes a binding site? [J]. Curr Opin Struct Biol,1995, 5(2): 825 - 829.

[6] Sheu TJ, Schwarz EM, Martinez DA, et al. A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation [J]. J Biol Chem, 2003,278(1):438 -443.

[7] Wells JA. Binding in the growth hormone receptor complex[J]. Proc Natl Acd Sci USA,1996,93(12):1 -6.

[8] Gnanasekar M, Rao KV, He YX, et al. Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of Brugia malayi [J]. Infect Immun,2004,72(8):4707 -4715.

[9] Houshmand H, Bergqvist A. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display [J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,309(3):695 -701.

[10] Kaufman DB, Hentsch ME, Baumbach GA ,et al . Affinity purification of fibrinogen using a ligand from a peptide library[J]. Biotechnol Bioeng,2002,77 (3):278 -289.

(编辑:蒋登金)

延迟性腹膜后血肿破裂出血1例

韦洪章,蒙康龙 (肇庆市鼎湖区中医院,广东 肇庆 526073)

[关键词] 腹膜后;血肿;延迟破裂
[中图分类号] R572.2 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2007)05-0304-01

腹膜后血肿是腹膜后脏器、组织、血管损伤的常见并发症。它是继发于腹腔、脊柱、骨盆较严重的多发性损伤,临床上缺乏特征表现。延迟性破裂出血较少见,本文报告1例如下。

1 临床资料

患者,男,45岁,因车祸伤致左上腹疼痛2 h入院。体查:T 36.7 ℃,P 84次/分,BP 11.95/7.97 kPa。左上腹见20 cm×15 cm皮肤软组织挫伤,明显压痛,无反跳痛及肌紧张,移动性浊

(下转第307页)

[收稿日期] 2007-05-07 [修回日期] 2007-07-20