基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000839

乳腺癌相关抗原 ROR1 H-2Kd 限制性 CTL 表位预测及初步鉴定

马天明[1],张 娜[1],郑维萍[1],陈 黎[1],唐 俐[1],苏新良[2]
(1. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室、组织工程与干细胞研究室;
2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:预测并鉴定乳腺癌相关抗原受体酪氨酸激酶样孤儿受体 1(receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1,ROR1) H-2Kd 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)表位,为研究以 ROR1 为靶点的乳腺癌免疫治疗奠定基础。**方法**:采用生物信息学方法预测乳腺癌相关抗原 ROR1 H-2Kd 限制性 CTL 表位,选取预测软件中评分较高的抗原表位肽进行人工合成及纯化。肽结合试验检测抗原表位肽与 H-2Kd 分子的亲和力。选用亲和力较高的抗原表位肽体外刺激脾淋巴细胞,ELISA 法检测细胞因子 γ-干扰素(interferon-γ,IFN-γ)和白介素-12(interleukin-12,IL-12)的分泌。**结果**:预测的 4 条候选 ROR1 CTL 表位肽均具有较高的亲和力,其荧光指数(fluorescence index,FI)在 30 μg/ml 时均大于 1.5。ELISA 结果显示表位肽 ROR1(NYMFPSQGI)可在体外有效诱导 IFN-γ 和 IL-12 细胞因子的产生。**结论**:ROR1(NYMFPSQGI)为乳腺癌相关抗原 ROR1 H-2Kd 限制性 CTL 表位,为研究以 ROR1 为靶点的乳腺癌免疫治疗奠定了基础。

【关键词】乳腺癌;ROR1;CTL 表位;生物信息学方法
【中图分类号】R730.51 **【文献标志码】**A **【收稿日稿】**2015-06-16

Prediction and identification of H-2Kd restricted CTL epitope derived from breast cancer associated antigen ROR1

Ma Tianming[1], Zhang Na[1], Zheng Weiping[1], Chen Li[1], Tang Li[1], Su Xinliang[2]
(1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering; 2. Department of Endocrine Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To predict and identify breast cancer associated antigen receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1(ROR1) H-2Kd restricted cytotoxic T lymphocyte(CTL) epitopes and to provide experimental data for breast cancer immunotherapy based on ROR1. ***Methods***: ROR1 specific H-2Kd restricted CTL epitopes were predicted by bio-informatic methods. Four candidate epitopes with relatively high scores were artificially synthesized and purified. Analysis of binding ability of the candidate epitope peptides with H-2Kd molecules was carried out by peptide binding assay. ELISA assay was used to check interferon-γ(IFN-γ) and interleukin-12(IL-12). ***Results***: Four candidate epitopes had high affinities of H-2Kd; the FI values were more than 1.5 when concentrations were more than 30 μg/ml. ELISA results showed that ROR1(NYMFPSQGI) could stimulate spleen lymphocyte secreting IFN-γ and IL-12. ***Conclusion***: ROR1(NYMFPSQGI) is a H-2Kd restricted CTL epitope of breast cancer associated antigen ROR1. This study provides an experimental data for breast cancer immunotherapy based on ROR1.

【Key words】breast cancer; receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1; cytotoxic T lymphocyte epitope; bioinformatics

作者介绍:马天明,Email:52518313@qq.com,
研究方向:肿瘤病理生理。
通信作者:唐 俐,Email:tanglicq@cqmu.edu.cn。
基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:NSFC81272571);
重庆市渝中区科技计划资助项目(编号:20120208);重庆市渝中区科技计划资助项目(编号:20110309)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2050.022.html (2016-01-19)

乳腺癌是我国女性主要的恶性肿瘤之一，具有发病率高、死亡率高和治愈率低等特点，目前主要治疗手段为手术、化疗、放疗、内分泌治疗及分子靶向治疗等。近年来随着免疫学的不断发展，免疫治疗已成为乳腺癌患者重要而有效的辅助治疗手段。细胞免疫是机体抗肿瘤免疫的重要机制，细胞毒性T淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte，CTL）是机体特异性抗肿瘤免疫的主要效应细胞，基于肿瘤特异性抗原的肿瘤疫苗可以启动以肿瘤特异性CTL反应为主的抗肿瘤效应。因此，筛选鉴定乳腺癌肿瘤相关抗原的CTL表位，对研发具有预防或治疗作用的乳腺癌肿瘤疫苗有着重要意义。受体酪氨酸激酶样孤儿受体1（receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1，ROR1）是一种癌胚期糖蛋白，正常成年人组织中无表达，在胚胎发生过程中及多种类型的肿瘤细胞中表达[1-4]。Zhang等研究发现ROR1在乳腺腺癌中高表达，并与其临床高度恶性行为密切相关，是一个理想的肿瘤免疫治疗候选抗原[5-6]。本研究应用生物信息学手段，预测并鉴定小鼠ROR1的CTL抗原表位，为进一步研究基于ROR1的肿瘤疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 ROR1H-2Kd限制性CTL表位的预测

查询美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）中小鼠ROR1肿瘤抗原的蛋白质序列，采用超基序法和量化基序法预测小鼠ROR1H-2Kd限制性CTL表位。预测网站分别为：http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/Epitope Prediction.htm 和 http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/。选取2种方法得分最高的9肽作为候选表位肽。

1.2 多肽的合成和纯化

根据生物信息学软件筛选结果，选择合成4条H-2Kd限制性9肽。多肽交予上海强耀生物科技有限公司（ChinaPeptidesCo.，Ltd.）合成，高效液相色谱仪（high performance liquid chromatography，HPLC）检测纯度。以粉剂状态保存于-20 ℃。

1.3 多肽的鉴定分析

1.3.1 细胞株及抗体 小鼠RMA-S（TAP缺陷的小鼠淋巴瘤细胞系）细胞购至第三军医大学免疫学教研室。RMA-S细胞于常规RPMI1640培养液中培养。FITC标记大鼠抗小鼠H-2Kd抗体购于美国Biolegend公司。

1.3.2 候选表位肽亲和力分析 采用肽结合试验检测各候选表位肽与H-2Kd分子的结合情况：RMA-S细胞用PBS洗2次，以5×10⁵/孔接种于96孔培养板中。加入候选肽表位，终浓度分别为10、20、30和40 μg/ml。RMA-S细胞在5%CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养18 h，收集细胞，离心1 000 r/min，5 min。冰PBS洗3次，再次离心。在细胞沉淀中加入1 μl FITC标记大鼠抗小鼠H-2Kd抗体，4 ℃避光孵育30 min。PBS洗3次，FACSVantage SE型流式细胞仪（美国BD公司）检测平均荧光强度（mean fluorescence intensity，MFI）。用荧光指数（Fluorescence index，FI）判断亲和力。FI的计算方法为：FI=[（候选表位肽MFI-不加肽MFI）/（不加肽MFI）]×100%。FI>1.5提示表位肽与H-2Kd分子结合力高，1.0<FI<1.5提示表位肽与H-2Kd分子结合力中等，1.0>FI>0.5提示表位肽与H-2Kd分子结合力低[7]。

1.4 多肽体外生物学活性检测

小鼠颈椎脱位处死后浸入75%乙醇中浸泡2~3 min消毒，无菌条件下取出脾脏。用注射器针芯经200目无菌不锈钢筛网研磨，pH 7.4的PBS冲洗。收集细胞悬液，加入淋巴细胞分离液，2 000 r/min，离心30 min。取中间层淋巴细胞，PBS洗涤两次，RPMI1640+10%FCS培养液重悬。将淋巴细胞以5×10⁵个/孔接种于96孔培养板中，加入候选多肽，终浓度为0.1、1、10和100 μg/L，培养48 h。收集细胞上清，用ELISA试剂盒（Biolegend，美国）检测多肽刺激淋巴细胞分泌的细胞因子IFNγ和IL-12。

1.5 统计学方法

所得数据应用SPSS 19.0软件分析。每个实验重复3次，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。2组间计量资料的比较采用独立样本t检验。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 ROR1 H-2Kd限制性CTL表位的预测结果

根据生物信息学软件分析所获得的结果，选取得分较高的4条多肽为后续研究的候选表位肽（表1）。

表1 ROR1抗原H-2Kd表位的预测结果

Tab.1 Prediction of the epitopes of H-2Kd-restricted ROR1 antigen

H-2Kd peptide	AApos	Sequence
ROR1-p1	788-796	NYMFPSQGI
ROR1-p2	591-599	DFLHIAIQI
ROR1-p3	604-612	EYLSSHFFV
ROR1-p4	738-746	RFKDIHVRL

2.2 多肽的合成和纯化

多肽的合成和纯化交由上海强耀生物科技有限公司合成。高效液相色谱法分析显示多肽纯度≥95%。ROR1-p1主峰出现在保留时间（retention time，tR）为10.416 min时，其理论分子量为1 069.28，实际分子量为1 067.32；ROR1-p2主峰出现在保留时间为10.497 min时，其理论分子量为1 074.38，实际分子量为1 074.38；ROR1-p3主峰出现在保留时间为11.273 min时，其理论分子量为1 056.21，实际分子量为1 054.65；ROR1-p4主峰出现在保留时间为13.368 min时，

其理论分子量为 1 081.28，实际分子量为 1 081.32。4 条候选肽的实际分子量与理论分子量吻合，表明合成正确。合成的多肽分别溶解于 DMSO（Sigma，美国）中，浓度为 1 mg/ml，-80 ℃冷冻保存（图 1）。

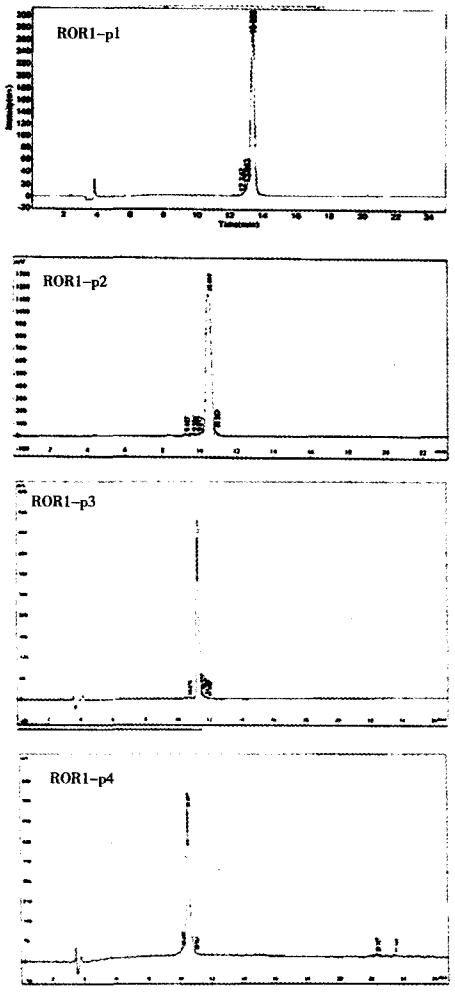


图 1 各候选表位肽高效液相色谱法分析结果

Fig.1 Peptides analyzed by HPLC

2.3 H-2Kd 和各表位候选肽亲和力分析

流式细胞检测结果显示，随表位肽浓度的增加，荧光指数逐渐增高，表明 RMA-S 细胞表面 H-2Kd 分子的表达逐渐增强。当表位肽浓度达到 30 μg/ml 时，4 条候选表位肽的荧光指数均大于 1.5，提示 4 条候选表位肽与 H-2Kd 均有较高的亲和力（表 2）。其中 ROR1 788-796（NYMFPSQGI）活性最强，选择用于后续实验。

表 2 ROR1 来源的候选表位肽与 H-2Kd 分子亲和力分析

Tab.2 H-2Kd binding affinity to ROR1-derived peptides

组别（μg/ml）	ROR1-p1	ROR1-p2	ROR1-p3	ROR1-p4
10	1.34	1.31	1.27	1.29
20	1.55	1.48	1.44	1.37
30	2.19	1.98	1.95	1.94
40	2.41	2.16	2.18	2.21

2.4 ROR1 的生物学活性检测

将小鼠脾淋巴细胞与 ROR1（NYMFPSQGI）共孵育后，随着浓度的增高，ROR1 能诱导小鼠 T 淋巴细胞分泌 IFN-γ 和 IL-12。多肽浓度为 10 和 100 μg/ml 时，细胞因子的产生明显增高（IFN-γ：t=-1 082.674、-6 104.128，P=0.000、0.000；IL-12：t=-34.362、-82.695，P=0.000、0.000），与对照组相比差异具有统计学意义（图 2、3）。

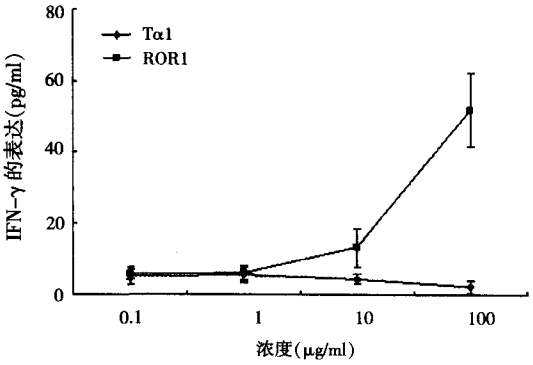


图 2 淋巴细胞分泌 IFN-γ 水平

Fig.2 IFN-γ secreted by spleen lymphocytes

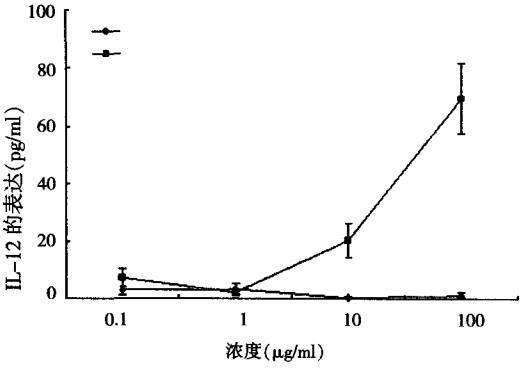


图 3 淋巴细胞分泌 IL-12 水平

Fig.3 IL-12 secreted by spleen lymphocytes

3 讨 论

传统的肿瘤治疗手段有一定的局限性，免疫生物治疗作为一种新兴的辅助疗法日益受到重视。细胞毒性 T 淋巴细胞是最主要的抗肿瘤效应细胞，能直接溶解肿瘤细胞，并且可以分泌 IFN-γ、TNF 和 GM-CSF 等细胞因子，增强机体对肿瘤的免疫反应。有效激发特异性 CTL 应答是目前肿瘤免疫治疗的重要研究目标。CTL 表位能够激活 T 细胞免疫应答，在特异性免疫应答中发挥重要的作用。CTL 表位肽疫苗是一种具有应用前景的肿瘤免疫治疗方式，并已在临床试验中显示出较好的疗效[8-9]。Asahara

等[10]用 HLA-A24 限制性 KIF20A-CTL 疫苗治疗吉西他滨疗法失败的转移性胰腺癌，每周皮下注射，能有效诱导多肽特异性 CTL 应答。完成一个疗程治疗的 29 名患者中，21 例病情稳定，8 例进展，疾病控制率为 72%，患者的存活时间明显延长。提示KIF20A-CTL 疫苗是一种有效的抗晚期胰腺癌肿瘤疫苗。Baba 及其同事[11]用黑色素瘤 gp100 来源 HLA-A*2402 限制性多肽疫苗治疗 6 例 HLA-A*2402 阳性 IV 期黑色素瘤患者，患者无相关的副作用出现，ELISPOT 法检测发现 4 例患者多肽特异性免疫应答增强，所有患者 CD8+CTL 显著增加。

ROR1 是一个跨膜受体酪氨酸激酶，在中枢神经系统、心脏、肺和骨骼系统的正常胚胎发育中起重要作用，但在正常成人组织中不表达。Zhang 等在多种人类肿瘤中检测到 ROR1 的表达，特别是在乳腺腺癌中高表达，并与其临床高度恶性行为密切相关。体外和裸鼠体内沉默 ROR1 的表达均可抑制肿瘤的生长。其进一步研究发现 ROR1 通过 Wnt 途径促进肿瘤细胞的存活，提示 ROR1 是一个肿瘤相关抗原，可以作为肿瘤靶点用于治疗[6]。因此本研究选择 ROR1 作为乳腺癌免疫治疗的肿瘤抗原靶点，对其可能的 H-2Kd 限制性 CTL 表位进行预测，筛选理想的抗原表位肽。

本研究采用超基序法和量化基序法结合的方法，对 ROR1 的 H-2Kd 限制性 CTL 表位进行预测，获得多条侯选抗原表位多肽，合成和纯化侯选抗原表位多肽中得分较高的四条多肽。抗肿瘤免疫应答的启动关键在于多肽表位与主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）分子结合，目前多应用肽结合试验进行检测。肽结合实验的原理主要是利用小鼠抗原处理相关转运体（transporter associated with antigen processing，TAP）缺陷的小鼠淋巴瘤细胞株 RMA-S。TAP 是将内源性多肽从内质网表面转运至内质网腔的一种蛋白质，TAP 缺陷使得内源性多肽无法到达内质网腔与 MHC Ⅰ类分子结合，不能被递呈到细胞表面进行稳定表达。所以RMA-S 表面的 MHC Ⅰ类分子数量直接反映了外源性多肽与 MHC Ⅰ类分子亲和力的大小。本研究利用流式细胞仪检测结果发现四条多肽均与 MHC Ⅰ类分子有较强的结合能力。ROR1 的体外生物学活性以其刺激淋巴细胞分泌细胞因子 IFN-γ 和 IL-12 为活性标志。本研究中选取 ROR1788-796(NYMF-PSQGI)多肽体外刺激脾细胞，随着ROR1 多肽浓度的增高，IFN-γ 和 IL-12 分泌增多，说明ROR1 能刺激诱导 T 细胞的活化并产生细胞因子。ROR1 的体内生物学活性还需进一步研究。

综上所述，本研究通过生物信息学预测，免疫学实验方法筛选和鉴定 ROR1 的 H-2Kd 限制性 CTL 表位，为进一步研发基于 ROR1 抗原表位的肿瘤疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Fukuda T, Chen L, Endo T, et al. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(8): 3047-3052.

[2] Liu Y, Yang H, Chen T, et al. Silencing of receptor tyrosine kinase ROR1 inhibits tumor-cell proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127092.

[3] Shabani M, Naseri J, Shokri F. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1: a novel target for cancer immunotherapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(7): 941-955.

[4] Borcherding N, Kusner D, Liu GH, et al. ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology[J]. Protein Cell, 2014, 5(7): 496-502.

[5] Zhang S, Chen L, Wang-Rodriguez J, et al. The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers[J]. Am J Pathol, 2012, 181(6): 1903-1910.

[6] Zhang S, Chen L, Cui B, et al. ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e31127.

[7] Chen T, Tang XD, Wan Y, et al. HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from human heparanase as novel targets for broad-spectrum tumor immunotherapy[J]. Neoplasia, 2008, 10(9): 977-986.

[8] Minami T, Minami T, Shimizu N, et al. New polycomb group protein enhancer of zeste homolog (EZH) 2-derived peptide with the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 26(1): 133-138.

[9] Kibe S, Yutani S, Motoyama S, et al. Cancer Immunol Res. Phase II study of personalized peptide vaccination for previously treated advanced colorectal cancer[J]. Cancer Immunol Res, 2014, 2(12): 1154-1162.

[10] Asahara S, Takeda K, Yamao K, et al. Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer[J]. J Transl Med, 2013(11): 291.

[11] Baba T, Sato-Matsushita M, Kanamoto A, et al. Phase I clinical trial of the vaccination for the patients with metastatic melanoma using gp100-derived epitope peptide restricted to HLA-A*2402[J]. J Transl Med, 2010(8): 84.

（责任编辑：冉明会）