DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.003
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
1330 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1330-03

肿瘤抗原MAGE-2多抗原肽疫苗的设计合成及免疫原性研究

耿 淼,吴玉章,管孝鞠,贾正才,周 伟,邹丽云 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 采用多抗原肽(multiple antigen peptide, MAP)设计方案,提高线性短肽的免疫原性。方法 对肿瘤抗原MAGE-$2_{220-228}$细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位进行分子修饰,设计、合成四分支多抗原肽(MAP4)。标准Fmoc合成方案进行合成,液相色谱/质谱联用(LC/MS)进行目的肽鉴定。以体外刺激人外周血单核细胞(PBMC)诱导CTL效应及IFN-γ分泌,标准^{51}Cr释放实验与Elispot实验进行免疫原性的研究。结果 标经准^{51}Cr释放实验验证,低浓度的MAP4可以诱导出有效的CTL效应,Elispot实验显示MAP4能够有效诱导的IFN-γ分泌。结论 MAP的构建能够增强CTL效应和IFN-γ的分泌,是一种有效刺激CTL应答的多肽疫苗形式。

关键词:肿瘤抗原MAGE-2;MAP;免疫原性
中图法分类号:R392.7;R394-33;R730.51 文献标识码:A

Studies on the molecular design, chemical synthesis, and immunogenicity of multiple antigen peptide vaccines from MAGE-2

GENG Miao, WU Yu-zhang, GUANG Xiao-ju, JIA Zheng-cai, ZHOU Wei, ZOU Li-yun (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To improve the immunogenicity of linear peptide by employing the multiple antigen peptide (MAP) as vaccine candidate structure. Methods The molecular engineering experiment of the CTL epitope peptide MAGE-2220-228 was performed. The four-branch MAP (MAP4) was synthesized by Fmoc method and the purity was analyzed by RP-HPLC. The peptide was identified by liquid chromatography (LC) and mass-spectrum (MS). The MAP4 immunogenicity was studied using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HLA-A2+ healthy donors. The CTL response and the IFN-γ secretion were detected by standard ^{51}Cr release assay and enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. Results Low concentration MAP4 could induce effective CTL response and generous IFN-γ secretion *in vitro*. Conclusion The MAP structure is a good candidate structure for designing a new generation of peptide-based vaccine, which can induce effective CTL response and generous IFN-γ secretion. The MAP structure can also improve the immunogenicity of short CTL peptide.

Key words: tumor antigen MAGE-2; multiple antigen peptide; immunogenicity

随着肿瘤分子免疫学与分子生物学研究的进展,证明细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)介导的特异性细胞免疫是主要的抗肿瘤机制,研制肿瘤抗原相应的CTL表位肽疫苗,是肿瘤特异性免疫治疗的新途径。但在实际应用中,短肽疫苗并不能有效的激起体内的免疫反应,其原因可能是其结构方面的缺点[1]。因此近几年对合成肽疫苗的研究主要着重于通过对其构型的改建增添分子修饰以提高肽疫苗的免疫原性及在体内的稳定性。本研究对HLA-A2限制的线形CTL表位肽MAGE-$2_{(220\sim228)}$ KIWEELSML[2]进行改建,采用Tam实验室提出多抗原肽(multiple antigen peptide, MAP)的设计方案[3,4],构建了表位相同的四分支肽(MAP4),并进行免疫原性的研究。

1 材料与方法

1.1 1MAP的设计

HLA-A2限制的CTL表位MAGE-$2_{(220-228)}$序列KIWEELSML为基础,赖氨酸为核心基质构建表位单体相同的四分支肽(图1)。

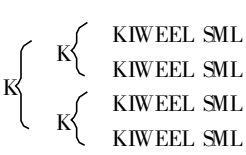


图1 MAP4结构示意图

Fig 1 Schematic structure of MAGE-2220-228 tetravalent peptide

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100167),国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100167) and the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (2001CB510001)

作者简介:耿 淼(1973-),女,山东省滨州市,硕士,实验师,主要从事肿瘤表位肽疫苗方面的研究。电话:(023)68752236-801, E-mail: gengmiao-2000@yahoo.com

收稿日期:2003-12-04;修回日期:2004-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　MAP 合成、鉴定

MAP 的合成：肽合成在 ABI431A 固相自动肽合成仪上进行。采用标准的 Fmoc 方法[5]，选用 0.125 mmol Fmoc-MAP-Branch-PSC 树脂，按照序列使肽链从 C 端逐个向 N 端延伸，各氨基酸的用量为 0.5 mmol，氨基酸∶树脂＝4∶1。将 MAP 粗品溶解，浓度为 15 mg/ml，经 0.45 μm 纤维滤膜过滤后，explore100 型中压液相色谱仪上纯化。根据其溶解特性为脂溶性采用 PO-ROS-50-R1 填充料的纯化柱。反相高压液相色谱仪（reverse phase-high performance liquid chromatography RP-HPLC 美国 waters）鉴定纯度，分析柱采用 C18，流动相为含有 0.1% 三氟乙酸的乙氰溶液，流速 1 ml/min。分子量的测定在 API2000 型质谱仪（美国 waters）上进行。

1.3　MAP 免疫原性研究

1.3.1　细胞毒实验　　采用标准的 ^{51}Cr 释放实验[6]，实验共分为 3 组，MAP45 μg/ml、MAGE-$2_{220\sim228}$ 5 μg/ml 和 IL-2 对照组。效应细胞的制备：HLA-A2 阳性健康人的浓缩白细胞经常规聚蔗糖-泛影葡氨分层液梯度离心、获得外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC），用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基调节细胞浓度为 1×10^6/ml。次日分别加入不同浓度的待检肽共培养，第 3 天加入 50 U/ml 的 rhIL-2 继续培养。肽刺激 3 次后，于最后 1 次刺激 3 d 后收集细胞，并按相应效靶比调节细胞浓度，作为效应细胞。靶细胞标记：将培养好的 LB373-MEL（人黑色素瘤细胞系，表达肿瘤抗原 MAGE-2，HLA-A2 阳性，比利时 Marchand 教授惠赠）按 1×10^6/ml 调节细胞浓度于试管（1 ml），3.7 MBq Na $^{51}CrO_4$，37 ℃、5% CO_2 孵育 90 min，摇匀。标记好的靶细胞，用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基调节为 1×10^5/ml 的细胞悬液，每孔 100 μl 铺于 96 孔培养板。每孔靶细胞中加入效应细胞 100 μl，使相应的效/靶比分别为 25∶1、50∶1、100∶1，肿瘤细胞的最大杀伤采用 2 mol/L HCl，自释放为靶细胞加培养基。37 ℃、5% CO_2 孵育 4 h。1 000 r/min 离心 10 min，各取上清 150 μl，用 γ 计数器分别测定脉冲数。

$$^{51}Cr\ 特异释放率=\frac{实验组\ cpm\ 平均值-自释放\ cpm\ 平均值}{最大释放\ cpm\ 平均值-自释放\ cpm\ 平均值}\times100\%$$

1.3.2　Elisopt 试验检测 IFN-γ 分泌　　Elisopt 试剂盒购于法国 DIACLONE 公司。末次肽刺激 3 d 后，将细胞按 1×10^5/100 μl 加入底部铺有自制 NC 膜，并包被有 IFN 单抗的 96 孔板中。参照说明书进行实验操作。结果在立体显微镜下观察记数。

1.4　统计学方法

采用 SPSS10.0 对各组数据进行方差分析。

2　结果

2.1　反相高压液相色谱仪（RP-HPLC）分析结果

MAP 经纯化后 RP-HPLC 分析发现：MAP 其主峰出现在保留时间（tR）为 15.405 min 处，其峰面积占整个面积的 72.15%（图 2）。

2.2　液相色谱/质谱联用（LC/MS）鉴定

纯化后的目标肽经液质联用分析鉴定，经 ESI 离子源后，各肽可以分别带 4、5、6 个正电荷。质/荷比分别为 1232.1、985.9、821.4，相应的分子量为 4 924.4，理论值为 4 924.6（图 3）。

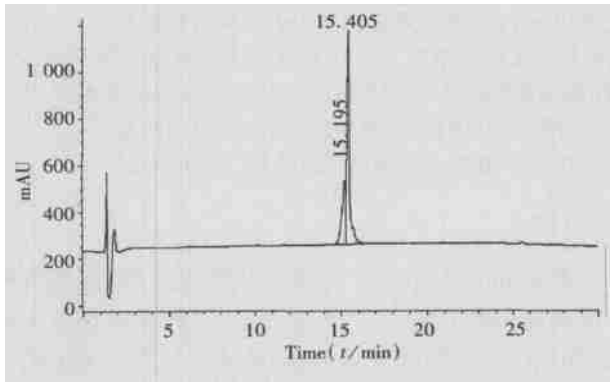


图 2　RP-HPLC 分析 MAP 的纯度

Fig 2　Analysis of MAP purity by RP-HPLC

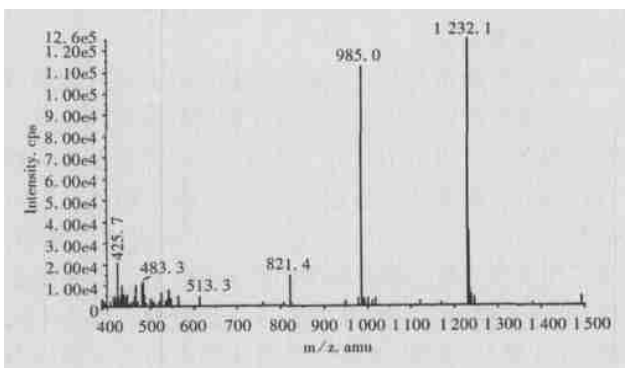


图 3　MAP 的质谱分析

Fig 3　MS analysis of MAP

2.3　细胞毒实验

实验组经体外诱导 PBMC 的 CTL 效应，经标准 ^{51}Cr 释放实验进行验证。MAP 5 μg/ml 可以诱导出有效的 CTL 效应，当效∶靶＝100∶1 时效应细胞对靶细胞的溶破率为 46%，而 MAGE-$2_{220\sim228}$ 线性短肽并没有特应杀伤，仅为 9.3%，IL-2 对照组为 8.1%（图 4）。经双因素方差分析 MAP4 与各组差异显著（$P<0.05$）。

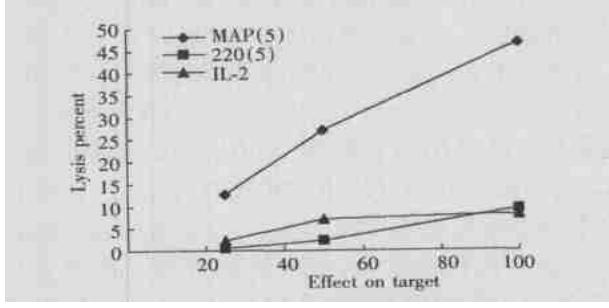


图 4　MAP 与 MAGE-$2_{220\sim228}$ 刺激 PBMC 对 LB-373 的溶破率（肽浓度＝5 μg/ml）

Fig 4　Lysis of cell line LB373-MEL by MAGE-$2_{220\sim228}$ or MAP stimulated PBMC（peptide concentration ＝ 5 μg/ml）

2.4　IFN-γ 分泌

活化的 CTL 细胞在体外抗原的刺激下能分泌 IFN-γ，因此

(C)1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

采用ELISPOT方法可推测经各组抗原刺激后特异性CTL细胞的数目。在立体电镜下观察发现:MAP4刺激其特异的分泌CTL的细胞数最多,而线性肽与对照组并没有显著差异,各组斑点均数为MAP4组61,MAGE-$2_{220\sim228}$组18,IL-2组15。经单因素方差分析MAP4与各组间差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

肿瘤抗原MAGE-2为特异性肿瘤抗原,黑色素瘤中有高达70%的表达[7],同时在其它肿瘤中也有不同程度的表达(如肺部肿瘤、肝细胞癌等)[8,9]。新近报道还特异性高表达头部肿瘤、横纹肌肉瘤[10,11]。MAGE-2作为肿瘤的诊断标志以及免疫治疗的靶抗原近年来备受关注。因此开发MAGE-2的CTL表位相应的多肽疫苗具有重要意义。

表位肽疫苗与其它肿瘤疫苗相比具有成分简单诱发的免疫效应针对性强并摆脱了抑制性病理性表位的影响等优点。但由于其分子量较小与其结构的单一性往往造成免疫原性呈降低的规律,体内不能诱发理想的免疫效应[12,13]。以往短肽疫苗为了解决这一弊端,多采用表位多肽交联载体蛋白的方法来提高其免疫原性,但由于载体蛋白本身也为一分子量较大的外来抗原,往往诱生的抗体多是针对载体蛋白的而非目的表位。1988年Tam实验室提出了多抗原肽的设计方案,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(一般多为4条或8条)抗原表位相同或不同的单体肽偶联在一起,形成树枝结构。这种设计模式不但很好的模拟天然表位构象,而且无需再偶联载体蛋白便能诱生高滴度、高亲和力的抗体,而MAP本身没有免疫原性。现代保护性免疫理论同样认为,有效的保护性免疫取决于一组表位的合理组合[14,15]。因此采用MAP设计方案既能提高疫苗的质量又能去除载体蛋白的缺陷。本实验中,我们采用MAP设计方案构建了以MAGE-$2_{220\sim228}$表位序列为基础的抗原表位相同的四分支多抗原肽MAP4,增强其诱导CTL的效应。以往实验中已证明当肽浓度为10 μg/ml线性肽MAGE-$2_{220\sim228}$可在体外诱导出有效的CTL效应[2],但在降低浓度是否还可诱发CTL效应?实验显示当肽浓度采用5 μg/ml的低浓度时,线性短肽并没有激起有效的CTL效应对靶细胞的溶破率仅为9.3%,而MAP4的设计方案则有效的提高了短肽的免疫原性,经MAP4刺激的效应细胞对靶细胞的溶破率为46%。相同的结果在ELISPOT实验也得到验证,经MAP4刺激后出现大量分泌IFN-γ的淋巴细胞。提示,在对短肽恢复其大分子特性后,其免疫原性也相应提高,且其抗原的特异性也没有发生变化。本实验证实了MAP的设计方案能有效的提高线形短肽疫苗的CTL效应,同时也为不同CTL表位的串联提供了设计模式,为临床肿瘤多肽疫苗的设计提供了一个良好的方案。

参考文献:

[1] 汪海丹,丁淑香.病毒T细胞表位和T细胞疫苗的研究进展[J].国外医学预防诊断、治疗用生物制品分册,1999,22(4):152-156.

[2] 耿 淼,吴玉章,贾正才,等.肿瘤抗原MAGE-2 HLA-A2限制性CTL表位的鉴定[J].第三军医大学学报,2002,24(10):1156-1158.

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

[4] Tam J P. Recent advances in muptille antigen peptides[J]. J Immunol Meth, 1996, 196(1): 17-32.

[5] Loffet A. Synthesis of a pentapeptide by the Merrifield method[J]. Experientia, 1967, 23(5): 406-407.

[6] Matsumura M, Fremont D H, Peterson P A, *et al*. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules[J]. Science, 1992, 257(5072): 927-934.

[7] De Backer O, Verheyden A M, Martin B, *et al*. Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes[J]. Genomics, 1995, 28(1): 74-83.

[8] Weynants P, Lethe B, Brasseur F, *et al*. Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas[J]. Int J Cancer, 1994, 56(6): 826-829.

[9] Tahara K, Mori M, Sadanaga N, *et al*. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 1999, 85(6): 1234-1240.

[10] Scarcella D L, Chow, C W, Gonzales M F, *et al*. Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(2): 335-341.

[11] Dalerba P, Frascella E, Macino B, *et al*. MAGE, BAGE and GAGE gene expression in human rhabdomyosarcomas[J]. Int J Cancer, 2001, 93(1): 85-90.

[12] Ertl H C, Xiang Z. Novel vaccine approaches[J]. J Immunol, 1996, 156(10): 3579-3582.

[13] 吴玉章,刘茂昌,贾正才,等.HBV新型免疫原的设计、合成及免疫原性研究[J].第三军医大学学报,2000,22(10):919-923.

[14] Wu Y Z, Zhu X H. A new approach for B cell epitope prediction in viral proteins[J]. Chin Sci Bull, 1995, 40(9): 761-767. 85-90.

[15] Horsfall A C, Hay F C, Soltys A J, *et al*. Epitope mapping[J]. Immunol Today, 1991, 12(7): 211-213.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net