DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.12.008

文章编号:1000-5404(2003)12-1045-04

论著

多表位组合肽诱导 HLA-A2$^+$ 人 PBMC 产生抗原特异性 CD8$^+$ T 细胞应答的研究

石统东,吴玉章,周 伟,贾正才,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 探讨基于 HBV 抗原优势表位的治疗性多肽抗原组分、结构与体外诱导 CD8$^+$ T 细胞应答之间的关系。方法 用计算机辅助分子设计技术,设计基于 HBV 抗原免疫优势性 CTL 表位、B 细胞表位和破伤风类毒素通用 Th 细胞表位的 3 种治疗性多肽候选疫苗分子,经 Merrifield 固相多肽合成技术合成,并经 HPLC 纯化、鉴定。以 HLA-A2$^+$ 健康人和慢性乙型肝炎患者的 PBMC 为实验对象,进行体外诱导 CD8$^+$ T 细胞应答的免疫学功能研究。结果 所设计治疗性多肽分子可在体外诱导较强的抗原特异性 CD8$^+$ CTL 应答;"-AAA-"铰链区设计和"Th+B"细胞表位的引入可增强 CTL 表位肽的免疫原性。结论 提示在治疗性表位多肽疫苗的分子设计中,短而高柔性的"铰链区"设计和"Th+B"细胞表位的引入可显著提高小分子表位肽的免疫原性。

关键词:HBV;CTL;治疗性多肽;表位;分子设计
中图法分类号:R372.2$^+$1;R392.11 文献标识码:A

Polypeptides based on CTL, T helper and B-epitopes of HBV antigens induce HLA-A2$^+$ human PBMCs to produce CD8$^+$ CTL-mediated cytotoxicity

SHI Tong-dong, WU Yu-zhang, ZHOU Wei, JIA Zheng-cai, ZOU Li-yun (Institute of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore how to trigger an HLA Ⅰ-restricted CD8$^+$ T cell response to exogenously synthesized peptides *in vitro*. Methods A new panel of therapeutic peptides based on the immunodominant B- and CTL epitopes of HBV PreS$_2$ region and HBcAg and the tetanus toxoid common T helper epitopes were synthesized by Merrifield solid-phase peptide synthesis, and HLA-A2$^+$ human PBMCs were used to investigate the immunological properties of the mimetic peptides. Results The results demonstrated that the peptides could trigger vigorous CD8$^+$ HBV-specific CTL responses *in vitro* specifically and effectively. Conclusion The results reveal that T helper plus B-epitopes designing with the introduction of short and flexible linker can remarkably improve the immunogenicity of short peptides and hence produce effective CTL responses *in vitro*.

Key words: hepatitis beta virus; cytotoxic T lymphocytes; therapeutic peptide; epitope; molecular design

对于乙型肝炎,尤其慢性乙型肝炎,目前的治疗方法难以清除细胞内病毒感染。病毒持续存在于肝细胞内导致感染迁延化,并可继发肝硬变、肝癌。如何打破宿主对 HBV 抗原的免疫耐受、清除细胞内病毒感染是 HBV 特异性治疗的关键所在。

近年来,随着乙肝病毒免疫生物学和免疫病理学的飞速进展,保护性免疫的观念也发生了深刻变化;对慢性乙型肝炎特异性治疗的研究有了新的进展。研究表明:HLA-Ⅰ类分子介导的细胞免疫,特别是由抗原特异性 CTL 所介导的细胞毒作用,在 HBV 感染的控制和痊愈过程中起核心作用,是清除细胞内病毒感染的关键;有效的保护性免疫源于一组表位的合理组合与搭配;基于多表位的组合肽治疗有望打破宿主对表面抗原的免疫耐受[1~7]。

天然病毒抗原由于含有一些对保护性应答不利的组分,容易导致机体 Th1/Th2 失平衡,干扰细胞间通讯,导致免疫偏差或免疫缺陷[7,8]。因此必须在抗原表位水平上对天然抗原分子进行改造或修饰,以去除对免疫应答不利的因素,同时保证应答的特异性。本研究在 HBV 抗原表位资料的基础上,选择 HBcAg 免疫优势 CTL 表位、Pre-S$_2$ B 细胞表位及破伤风类毒素通用 Th 表位为研究对象,应用计算机辅助分子设计技术对 HBV 治疗性多肽分子进行设计和筛选,设计基于上述表位的新型模拟多肽抗原,并以 HLA-A2$^+$ 健康人和慢

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
作者简介:石统东(1970-),男,山东省蒙阴县人,博士,讲师,主要从事蛋白质工程与免疫学方面的研究,发表论文 15 篇。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-11-29;修回日期:2003-01-22

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

性肝炎病人外周血单个核细胞(PBMC)为研究对象进行了体外实验,希望能诱导MHC-Ⅰ类分子介导的细胞免疫应答,打破宿主对HBV表面抗原和核心抗原的免疫耐受,清除HBV感染宿主的细胞内病毒感染,从而消除诱导宿主产生肝硬变、肝癌的危险。

1 材料和方法

1.1 多肽合成、纯化与鉴定

采用Merrifield固相化学合成方案,固定羧基端向氨基端延伸肽链,在431A多肽合成仪上合成。各种Fmoc-氨基酸由美国PE公司和ACT公司提供。P1肽为HBcAg CTL_{18-27}表位肽;P2肽为HBcAg CTL_{18-27}的N端连接Pre-S_2 B_{18-24}表位;P3肽为在HBcAg CTL_{18-27}的N端α-氨基酸上顺序连接破伤风类毒素通用Th_{37-53}和Pre-S_2 B 18-24表位;各表位间连接顺序选择-A-A-A-。以黑色素瘤MART-1_{27-35}做无关肽对照。

合成多肽以高效液相色谱(WATERS 600)纯化,质谱(API 2000)分析分子质量与电荷分布。纯化产物经低压旋转蒸发及乙醚沉淀,获得多肽纯品。-70 ℃储存。

1.2 HLA-$A2^+$人PBMC分离

无菌取HLA-$A2^+$健康人(附属西南医院血库提供)和慢性肝炎患者(附属西南医院感染病中心提供)各3例的抗凝外周血,Ficoll-Hypaque法离心分离PBMC,用RPMI1640完全培养液(含10%胎牛血清)调节细胞浓度为1×10^6/ml,体外培养20 h,待其恢复原生长状态后进行后续处理。

1.3 体外诱导抗原特异性效应CTL的产生及活性检测

前述分离得到的HLA-$A2^+$人PBMC制成单细胞悬液,根据试验设计体外分组培养,以2×10^5/ml浓度悬浮于RPMI1640培养液(含10%胎牛血清、10 ng/ml抗原、30 U/ml rhIL-2)中,分配于24孔细胞培养板内,持续培养1周后,以1 000 r/min离心10 min,弃上清,用前述培养液重悬,用各种表位肽再次刺激,每周1次,共2次;末次刺激24 h后,离心收集细胞,用前述培养液调节细胞至相应浓度,用作效应细胞。应用^{51}Cr释放试验检测比较细胞毒活性,方法见文献[9]。

1.4 Th1/Th2极化与平衡改变的分析

HLA-$A2^+$人PBMC按1.3的方法持续刺激3次,末次刺激24 h后,以1 000 r/min离心10 min,收集上清。用双抗体夹心ELISA法检测细胞因子IL-4、IFN-γ分泌水平,并分析肽抗原诱导T细胞Th1/Th2型极化及平衡改变的功能。试剂盒由美国Endogen公司提供,按试剂盒说明操作。

1.5 HLA-Ⅰ pep四聚体法定量检测HBcAg$_{18-27}$表位特异性$CD8^+$ CTL应答

HLA-$A2^+$人PBMC按1.3的方法持续刺激3次,末次刺激24 h后,以1 000 r/min离心10 min,收集细胞;用PBS缓冲液(0.02 mol/L,pH7.2)离心洗涤2次,定容计数,均分2管,加入1.5 ml Ep管内。于每个样品中的一管加入2 μl R-PE标记的HLA-A*0201/FLPSDFFPSV和20 μl Cy-Chrome标记的鼠抗人CD8单抗,另外一管加入10 μl R-PE标记的亲和素和10 μl Cy-Chrome标记的鼠IgG1,κ作为对照;于37 ℃避光孵育30 min,以1 000 r/min离心10 min,收集细胞;用PBS缓冲液离心洗涤2次,去除未结合抗体;将细胞重悬于0.3 ml PBS缓冲液内,混匀,用流式细胞仪检测(FACstar Plus, Beckton-Dickinson)。

1.6 统计学分析

所得数据的分析用t检验方法。

2 结果

2.1 模拟多肽抗原分子的纯化与分析

高纯度多肽产物的获得是后续研究的基础。多肽纯化通过RP-HPLC进行,选择梯度乙月青进行有效分离,选择流速为1 ml/min。所纯化多肽纯度皆在95%以上,质谱测定分子量值与理论预测值完全一致。

2.2 ^{51}Cr释放试验检测比较模拟肽抗原诱导细胞毒活性

靶细胞选择T2和HepG2.2.15细胞,以相应多肽预负载。经体外诱导产生的CTL,按50∶1的效靶细胞比例,将效靶细胞共培养4 h,检测效应CTL细胞的细胞毒活性,分析多肽抗原体外诱导CTL介导的细胞免疫的能力。结果表明:P3体外刺激人PBMC,能够较强地诱导抗原特异性CTL产生,并在效靶细胞共培养过程中造成靶细胞的特异性溶破,在E/T为50时,其溶破率可达(68.4±15)%(慢性肝炎患者PBMC略低,为58.2%)。P2也能体外激活人PBMC,诱导产生并扩增抗原特异性效应CTL,并可使T2靶细胞溶破最高达(46.8±11)%,该结果略低于P3,但较之小鼠体内实验结果显著增高[10],分析可能是由于抗原直接作用于PBMC导致T细胞直接激活和细胞间的直接递呈。表位肽模拟抗原P1在小鼠体内实验中,基本不能诱导抗原特异性CTL产生,而在HLA-$A2^+$人PBMC实验中,经抗原体外激活和两次体外特异性扩增,所产生的抗原特异性效应CTL表现出较强的细胞毒活性,其对靶细胞的特异性溶破率可达42.5%(慢性肝炎患者较低,为31.2%)。上述P3诱导抗原特异性CTL活性的功能显著高于P2、P1;P2、P1差异无显著性意义($P>0.05$)。提示CTL表位是诱导CTL应答的基础,如能启动APC、模拟抗原、靶细胞间的直接识别机制,可能将外源性抗原导入内源性抗原的HLA-Ⅰ限制途径。而在多肽分子内设计"Th+B"表位肽段辅助CTL表位也是使后者充分发挥功能所必需的,见图1。

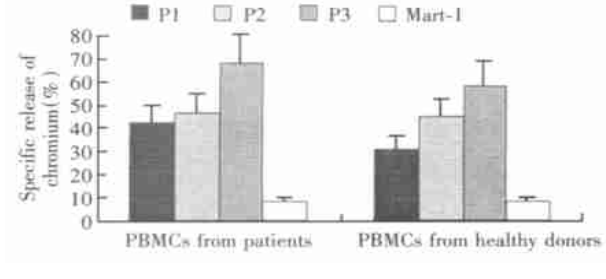


图1 模拟肽免疫原体外诱导HLA-$A2^+$人PBMC而产生的效应CTL对抗原负载T2靶细胞特异性溶破率分析(E/T=50∶1)

Fig 1 The specific lysis of peptides precoated T2 targets by HLA-$A2^+$ effector CTLs induced by P1, P2, P3 and irrelative peptide(Mart-1), respectively(E/T=50∶1)

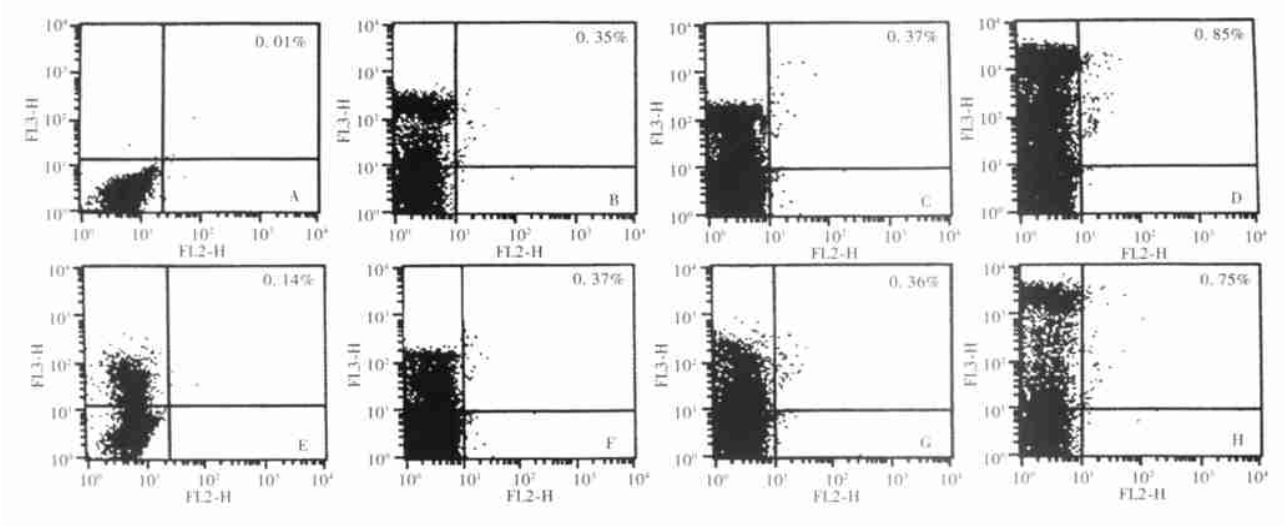
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　诱导 T 细胞 Th1/Th2 型极化及平衡改变的检测

对培养上清中 IL-4、IFN-γ 等细胞因子的检测表明, 以模拟抗原肽 P3 诱导 Th1、Th2 型细胞极化的能力最强, 并以 Th1 型极化为主; 模拟抗原肽 P1、P2 也能诱导 T 淋巴细胞向 Th1 型转化, 虽功能稍弱, 但相互间功能无显著差别($P>0.05$), 可能是因为模拟肽抗原直接激活淋巴细胞的原因。

2.4　HLA-Ⅰ pep 四聚体法定量检测 $HBcAg_{18-27}$ 表位特异性 CD8$^+$ CTL 应答

HLA-A2$^+$ 人 PBMC 在用肽抗原刺激前后, 均以 HLA-A *0201/FLPSDFFPSV 和 CD8 单抗双染色法对 $HBcAg_{18-27}$ 表位特异性 CD8$^+$ CTL 应答进行定量检测。结果显示, 健康人 PBMC 未刺激时未检测到 $HBcAg_{18-27}$ 表位特异性 CD8$^+$ CTL 应答, 其染色结果低于背景(0.02%); 慢性肝炎患者 PBMC 未刺激时, 其 $HBcAg_{18-27}$ 表位特异性 CD8$^+$ CTL 染色结果高于背景, 为 0.09%~0.17%; 经肽抗原激活后, PBMC 中 HLA-A *0201/FLPSDFFPSV-CD8 双阳性细胞频率显著增高, 健康人组最高达 0.85%(8 500/106 PBMC), 慢性肝炎患者组达 0.45%~0.75%(4 500~7 500/106 PBMC); 多肽 P2、P1 效果无明显差别, HLA-A *0201/FLPSDFFPSV-CD8 双阳性细胞频率明显低于 P3, 不超过 0.4%(4 000/106 PBMC)。无关肽抗原刺激的健康人和慢性肝炎患者的 PBMC, 其 HLA-A *0201/FLPSDFFPSV-CD8 双阳性细胞频率基本同 PBMC 用肽抗原刺激前, 见图 2。



A: MART-127-35 peptide stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ healthy donors; B: Peptide 1 stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ healthy donors; C: Peptide 2 stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ healthy donors; D: Peptide 3 stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ healthy donors; E: MART-127-35 peptide stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ chronic hepatitis B patients; F: Peptide 1 stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ chronic hepatitis B patients; G: Peptide 2 stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ chronic hepatitis B patients; H: Peptide 3 stimulating PBMC from HLA-A2$^+$ chronic hepatitis B patients

图 2　**HLA-A2$^+$ 人 PBMC 经肽抗原刺激后, 应用 HLA-Ⅰ pep 四聚体法定量检测 $HBcAg_{18-27}$ 表位特异性 CD8$^+$ CTL 应答**

Fig 2　After stimulation by HLA-A2$^+$ human PBMC, $HBcAg_{18-27}$ specific CD8$^+$ CTLs responses detected by HLA-Ⅰ pep-tetramer analysis

3　讨论

本研究应用计算机辅助分子设计技术设计、筛选基于 HBV 抗原免疫优势性 CTL、B 细胞表位和破伤风类毒素通用 Th 表位的新型模拟多肽分子, 经人工合成后, 以 HLA-A2$^+$ 健康人和慢性肝炎病人 PBMC 为研究对象进行了体外实验, 观察其诱导 CTL 效应的能力, 研究免疫原组分及结构与诱导免疫应答的关系。

结果表明, P3 体外刺激人 PBMC, 能够较强地诱导抗原特异性 CTL 产生、诱导 Th1、Th2 型 T 细胞极化, 并以 Th1 型极化为主, 显著优于 P2 和 P1; P2 也能体外激活人 PBMC 和 Th1 型极化, 诱导产生并扩增抗原特异性效应 CTL, 效应略低于 P3, 但较之小鼠体内实验结果显著增高[9], 分析可能是由于抗原直接作用于 PBMC 导致 T 细胞直接激活和细胞间的直接递呈。表位肽模拟抗原 P1 在小鼠体内实验中, 基本不能诱导抗原特异性 CTL 产生, 而在 HLA-A2$^+$ 人 PBMC 实验中, 经抗原体外激活和两次体外特异性扩增, 所产生的抗原特异性效应 CTL 表现出较强的细胞毒活性, 提示 CTL 表位是诱导 CTL 应答的基础, 如能启动 APC、模拟抗原、靶细胞间的直接识别机制, 可能将外源性抗原导入内源性抗原的 HLA-Ⅰ限制途径。而在多肽分子内设计"Th+B"表位肽段辅助 CTL 表位也是使后者充分发挥功能所必需的。

应用 HLA-Ⅰ pep 四聚体法定量检测各模拟抗原肽体外诱导 PBMC 产生 $HBcAg_{18-27}$ 表位特异性 CD8$^+$ CTL

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

应答的程度和特异性。结果显示：健康人阴性对照 PBMC 中 HLA-A *0201/FLPSDFFPSV °CD8 双阳性细胞频率基本未检测到；慢性肝炎患者 PBMC 维持在较低水平经肽抗原激活后，PBMC 中 HLA-A *0201/FLPSDFFPSV °CD8 双阳性细胞频率显著增高，P3 体外刺激人 PBMC，能够较强地诱导 HLA-A *0201/FLPSDFFPSV °CD8 双阳性细胞产生，显著优于 P2 和 P1；揭示在多肽设计中，引入短而高柔性的“铰链区”和“Th＋B”表位，能显著提高小肽的抗原性和被 APC 提呈的能力。多肽 P2、P1 效果无显著差别，HLA-A *0201/FLPSDFFPSV °CD8 双阳性细胞频率明显低于 P3；而在小鼠体内实验中，表位肽模拟抗原 P1 基本不能诱导抗原特异性 CTL 产生[9]，分析原因可能是在体外实验中，抗原直接作用于 PBMC 导致 T 细胞直接激活和细胞间的直接递呈所致。这与相关报道一致[5~8]。无关肽抗原刺激的 PBMC，其 HLA-A *0201/FLPSDFFPSV °CD8 双阳性细胞频率基本同阴性对照，提示所设计治疗性模拟多肽抗原具有 HBV 抗原特异性。四聚体染色方法依赖 TCR 与其配基的相互作用，不同于传统的抗体染色，由于 TCR-MHC-肽在靶细胞表面的结合亲和力较低，时间也较短，且在细胞膜表面和膜下的微囊中 TCR 下调以阻止细胞被抗原迅速和过度刺激以避免细胞凋亡[10~12]，这为四聚体法定量表位特异性 $CD8^+$ T 细胞造成了一些困难。但本结果仍证实了所设计的基于 $HBcAg_{18-27}$ 表位的模拟多肽抗原具有高度的 HBV 特异性。

本研究所设计的基于 HBV 抗原免疫优势性表位的多肽抗原均可在体外诱导 T 细胞产生 Th1 型极化和 $HBcAg_{18-27}$ 表位特异性 $CD8^+$ CTL 应答，以含 CTL、B-、Th 3 种表位肽段组合的模拟多肽抗原诱导 T 细胞增殖、分化和抗原特异性 CTL 效应的功能最佳。其较高的免疫原性可能是有赖于其分子结构：其短而高柔性的 AAA 连接顺序可能发挥了“铰链”的作用，而使 P3 可以其 Th/CTL 表位识别并结合 MHC-Ⅰ/Ⅱ分子并被提呈给 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞，而激活 Th、Tc 细胞并发挥功能。说明模拟抗原的设计、合成合理、有效。研究结果还提示，在多肽分子中设计“Th＋B”表位可辅助 CTL 表位显著提高其免疫原性；同时在多肽分子中引入短而柔性强的连接顺序，可发挥“铰链区”的作用，可能促进肽抗原被 APC 摄取和处理，而使 CTL 表位抗原可被输送至 MHC Ⅰ分子限制的天然抗原处理与提呈途径。

目前为止，我们对肽抗原体内外功能差异的分子机制知之甚少。我们认为肽抗原体内诱导细胞毒效应有赖于 APC 的有效提呈；而通过在免疫优势表位的基础上重新设计和修饰线性结构肽、改变其分子特性，而提高其免疫原性和抗原提呈效率，如能启动 T 细胞对小肽抗原的直接识别机制或可能是解决此问题的有希望的途径。

参考文献：

[1] Sijts A J, Ruppert T, Rehermann B, *et al*. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes[J]. J Exp Med, 2000, 191(3): 503－514.

[2] Schirmbeck R, Deml L, Melber K, *et al*. Priming of class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by vaccination with recombinant protein antigens[J]. Vaccine, 1995, 13(9): 857－865.

[3] Wentworth P A, Celis E, Grimi C, *et al*. *In vitro* induction of primary, antigen-specific CTL from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with synthetic peptides[J]. Mol Immunol, 1995, 32(9): 603－612.

[4] Lohr H F, Gerken G, Schlicht H J, *et al*. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B[J]. J Infect Dis, 1993, 168(5): 1133－1139.

[5] Kurts C, Heath W R, Carbone F R. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens *in vivo*[J]. J Exp Med, 1996, 184(3): 923－930.

[6] Chaiken I M, Williams W V. Identifying structure-function relationships in four-helix bundle cytokines: towards *de novo* mimetics design[J]. Trends Biotechnol, 1996, 14(10): 369－375.

[7] Satte A D, Dseroff C, Sidney J, *et al*. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface in hepatitis B virus-transgenic mice[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 1389－1397.

[8] Kurts C, Miller J F, Subramaniam R M. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction[J]. J Exp Med, 1998, 188(2): 409－414.

[9] 石统东，吴玉章，周 伟，等. 基于 HBV 核心抗原 CTL 表位的治疗性多肽在体诱导抗原特异性细胞免疫应答的研究[J]. 第三军医大学学报，2002, 24(10): 1169－1172.

[10] Bertoletti A, Sonthwood S, Chesnut R, *et al*. Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T cell epitope 18－27: interaction with HLA and T cell receptor[J]. Hepatology, 1997, 26(4): 1027－1034.

[11] Whelan J A, Dunbar P R, Price D A, *et al*. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class Ⅰ tetrameric complexes is temperature dependent[J]. J Immunol, 1999, 163(8): 4342－4348.

[12] Valitutti S, Miller S, Cella M, *et al*. Serial triggering of many T cell receptors by a few peptide-MHC complexes[J]. Nature, 1995, 375(6527): 148－151.

（编辑 陈聪连）

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