DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.011
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0864-03

MART-1特异性治疗性多肽诱导CD8$^+$ T细胞应答的研究

石统东,王 莉,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 探讨基于黑色素瘤特异性抗原MART-1$_{27-35}$表位的治疗性多肽抗原组分、结构,及诱导抗原特异性CD8$^+$ T细胞应答的关系。方法 用蛋白质分子设计技术,设计基于黑色素瘤特异性抗原MART-1$_{27-35}$表位、HIV Tat$_{49-57}$CCP序列及破伤风类毒素通用Th表位的治疗性多肽候选分子,经Merrifield固相多肽合成技术合成,HPLC纯化、鉴定。以黑色素瘤病人PBMC为实验对象,对其诱导T细胞增殖、Th1极化、抗原特异性CD8$^+$ CTL效应进行研究。结果 所设计治疗性多肽分子可在体外诱导Th1极化和抗原特异性CD8$^+$T细胞应答,含Th、CTL表位的双表位肽抗原略优于单纯CTL表位肽,含Th、CTL表位和HIV Tat$_{49-57}$CCP序列的肽抗原效应显著优于前二者($P<0.05$)。结论 提示基于黑色素瘤特异性抗原优势CTL表位、HIV Tat$_{49-57}$CCP序列及破伤风类毒素通用Th表位的治疗性多肽设计可显著提高肿瘤治疗性小分子肽的免疫原性。

关键词:黑色素瘤;治疗性多肽;表位;免疫原性;CTL
中图法分类号:Q516;R392.11;R392-33 文献标识码:A

Therapeutic peptide based on CTL epitope of human melanoma antigen MART-1 can induce CD8$^+$ T cell response *in vitro*

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

Abstract: Objective To explore how to improve the immunogenicity of short epitope peptides of triggering melanoma MART-1 specific CD8$^+$T cell responses. Methods Therapeutic peptides based on the immunodominant MART-127-35, HIV Tat49-57CCP sequence and a tetanus toxoid universal Th epitope were designed and synthesized. The immunological functions were studied in PBMCs from HLA-A2$^+$ melanoma patients. Results The results demonstrated that the peptides could trigger vigorous MART-1-specific CD8$^+$ CTL activities *in vitro*. The function of peptide containing MART-127-35 and tetanus universal Th epitope was more vigorous than that of MART-127-35 peptide, and the immunogenicty of the peptides with HIV Tat49-57CCP sequence, MART-127-35 and tetanus universal Th epitope was the most vigorous. Conclusion Linkage of HIV Tat49-57CCP sequence and a tetanus universal Th epitope could dramatically improve the immunogenictiy of the MART-127-35 epitope peptide.

Key words: melanoma; therapeutic peptide; epitope; immunogenicity; CTL

细胞免疫应答在抗肿瘤免疫应答中起着主要作用,其中MHC Ⅰ类分子限制的肿瘤特异性抗原特异性的CTL是主要效应细胞[1,2]。肿瘤抗原的天然蛋白及其表位多肽可在体外诱导特异性CTL活化、增殖,但由于肿瘤抗原特别是其表位多肽的免疫原性弱,在体内难以诱导产生足够量的CTL[3~5]。由于蛋白抗原的结构是影响免疫原性的主要因素,免疫原性与MHC Ⅰ类分子的亲和力呈正相关,因此,可利用计算机辅助分子设计对肿瘤特异性抗原进行修饰或改造,以将其更有效地导入内源性蛋白的MHC Ⅰ类分子限制性途径,促进APC的提呈而提高小肽的免疫原性,诱导足够量的效应CTL产生[6~10]。本研究选择黑色素瘤特异性抗原MART-1为研究对象,该抗原可被HLA-A2和HLA-B45.1等Ⅰ类分子识别与提呈,对基于肿瘤抗原的分子改造和免疫识别研究具有重要的理论和现实意义。在其优势CTL27-35表位的基础上,进行分子设计、筛选,并合成基于优势表位的模拟多肽抗原,以HLA-A2$^+$黑色素瘤患者外周血为实验对象,对其诱导T细胞增殖、Th1极化、抗原特异性CD8$^+$ CTL效应进行研究,对基于肿瘤抗原优势表位的分子结构、免疫原性和免疫识别进行探讨。

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,用431A多肽合成仪合

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800170)
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。电话:(023)68752236-801
收稿日期:2002-12-15;修回日期:2003-03-25

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

成。固定羧基端由 C 端向 N 端延伸肽链。各 Fmoc-氨基酸由美国 PE 公司和 ACT 公司提供。多肽 P1 为黑色素瘤特异性抗原 $MART\text{-}1_{27\text{-}35}$表位肽(AAGIGILTV)；多肽 P2 为在 P1 的 N 端连接破伤风类毒素通用 Th 表位(QYIKANSKFIGITEL)，表位间连接顺序为-AAA-；多肽 P3 为在 P2 的 C 端连接 HIV $Tat_{49\text{-}57}$CCP 序列(RKKRRQRRR)。

合成多肽以 HPLC(WATERS 600)纯化，质谱(API 2000)分析分子量与电荷分布。纯化收集液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

无菌取黑色素瘤患者抗凝外周血，应用流式细胞仪进行 HLA 分型筛选，取 HLA-$A2^+$ 外周血 5 例，Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC，用 RPMI1640 完全培养液(含 10% 胎牛血清)调节细胞浓度为 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　Mart-1 特异性效应 CTL 的产生及活性检测

同源 PBMC 制备：取 1.2 培养的 HLA-$A2^+$ 人 PBMC，以 10^6/ ml浓度悬浮于 RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清)中，取 5 ml 于 15 ml 无菌离心管内，分别加入 1 μg/ ml 肽抗原 P1、P2、P3 培养 3 h 以上，其间不断轻轻摇动，以防细胞成团。然后用 ^{60}Co 以 3 000 rad 剂量照射，离心，用 RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清)重悬，备用。

取 1.2 分离得到的 HLA-$A2^+$ 人 PBMC 制成单细胞悬液，以 4×10^5/ ml 浓度悬浮于 RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清)中，分配于 24 孔细胞培养板内，分别加 10 ng/ ml 肽抗原 P1、P2、P3；3 d 后加入 rhIL-2 30 IU/ ml，3 d 后，以 1 000 r/ min 离心 10 min，弃上清，用前述培养液重悬，用同源 PBMC 再次刺激(同源 PBMC∶效应细胞＝2∶1)，次日加入 rhIL-2 30 IU/ ml，每周 1 次，共 3 次；末次刺激 48 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。以同期培养的未刺激 PBMC 为阴性对照。

应用 ^{51}Cr 释放试验检测比较细胞毒活性[11]：以 LB373-MEL 细胞系为靶细胞，完成免疫学试验。将靶细胞培养至状态良好，取 10^6 细胞置于 1 ml RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清)中，加 100 μCi $Na^{51}CrO_3$(NEN，USA)，于 37 ℃水浴中标记 60 min；用 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次，以 10^4靶细胞/ 孔铺于 96 孔 V-型底细胞培养板中，按效靶比(E/T)50∶1 分别加入效应细胞，轻轻振荡混匀，各做 3 个复孔。培养板以 300 r/ min 离心 3 min，然后置于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养 4 h。取上清检测 γ 计数值。其中设最大释放值为 10^4靶细胞置于 1 mol/ L 盐酸中培养所得上清的 γ 计数值，自发释放值为 10^4 靶细胞置于含 20%胎牛血清的 1640 培养基中 4 h 所得上清的 γ 计数值。其中，自发释放值应低于最大释放值的 30%。^{51}Cr 特异性释放百分率计算公式为：

$$\frac{\text{样本值 cpm}-\text{自发释放值 cpm}}{\text{最大释放值 cpm}-\text{自发释放值 cpm}}\times 100\%$$

1.4　IFN-γ ELISPOT[12] 法检测抗原诱导 Th1 极化

HLA-$A2^+$ 人 PBMC 按 1.3 的方法持续刺激 4 次，末次刺激 24h 后，调节细胞浓度为 2×10^5/ ml。IFN-γ ELISPOT 试剂盒由法国 DiaClone 公司提供，按说明书操作，每孔设 3 个复孔，以 100 μl/ 孔加入 PVDF 膜衬底的 96 孔酶联板中，于 37 ℃，5% CO_2 条件下培养 15～20 h 后，用试剂盒提供的洗涤液洗涤，加生物素标记的检测抗体孵育后，加底物显色。在倒置显微镜下观察、计数斑点数目。以同期培养的未刺激 PBMC 为阴性对照。结果以平均值/ 10^6 细胞表示。

1.5　统计学方法

所得试验数据用 t 检验。

2　结果

2.1　模拟多肽抗原的纯化与分析

多肽纯化通过 RP-HPLC 进行，选择梯度乙腈进行有效分离，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 Mart-1 特异性效应 CTL 的产生及活性

以 LB373-MEL 细胞系为靶细胞，应用 ^{51}Cr 释放试验检测比较肽抗原诱导 HLA-$A2^+$ 人 PBMC 产生的细胞毒细胞毒活性。结果表明：P3 体外刺激人 PBMC，能够较强地诱导 Mart-1 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，5 例 HLA-$A2^+$ 黑色素瘤病人的 PBMC 间无显著差异，在 E/T＝50 时，其溶破率可达(72.5±18.5)%；P2 也能体外激活人 PBMC，诱导产生并扩增 Mart-1 特异性效应 CTL，可使靶细胞溶破达(48.6±10.7)%，该结果低于 P3，但显著高于单纯 $MART\text{-}1_{27\text{-}35}$表位肽($P<0.05$)，后者诱导产生的 Mart-1 抗原特异性 CTL 可导致(23.4±5)%靶细胞特异性溶破，见图 1。

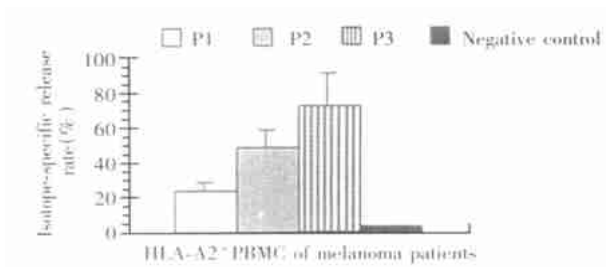


图 1　模拟肽诱导 **HLA-$A2^+$** 黑色素瘤病人 **PBMC** 产生的效应 **CTL** 对 **LB373-MEL** 靶细胞特异性溶破率分析(**E/ T＝50∶1**)

Fig 1　The specific lysis of LB373-MEL by Mart-1 specific HLA-$A2^+$ effector CTLs induced *in vitro* by P1, P2 and P3 respectively

2.3　诱导 T 细胞 Th1 极化的检测

用 IFN-γELISPOT 法检测肽抗原诱导 Th1 极化效应。结果表明，以模拟抗原肽 P3 诱导淋巴细胞的 Th1 型极化的能力最强；可检测到 IFN-γ 分泌细胞数为(7 500±1 377)/ 10^6 PBMC，各例 PBMC 间无显著差别($P>0.05$)；多肽 P2、P1 也能诱导淋巴细胞的 Th1 型转化，但功能较弱，IFN-γ 分泌细胞数分别为(4 280±840)/ 10^6 PBMC 和(4 030±752)/ 10^6 PBMC，两肽抗原在各例 PBMC 间功能无显著差别，见图 2。

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

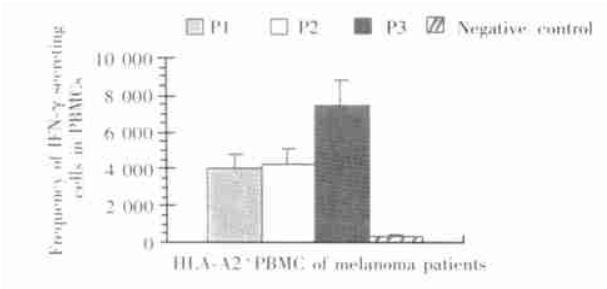


图 2 模拟肽抗原诱导 **HLA-A2**$^+$黑色素瘤病人 **PBMC** 的 **Th1** 极化效应[以 **IFN-γ** 分泌细胞频率(细胞数/10^6**PBMC**)表示]

Fig 2 Analysis of *in vitro* Th1 polarization alterations induced by synthetic peptide oantigens

3 讨论

能否激发细胞免疫应答特别是 MHC Ⅰ 类分子限制性肿瘤抗原特异性 CTL 应答是肿瘤特异性治疗的关键。但由于肿瘤抗原特别是其表位多肽的免疫原性弱,在体内难以诱导产生足够量的 CTL。因此,必须提高肿瘤抗原特别是其表位多肽的免疫原性。本研究在黑色素瘤 Mart-1 抗原优势 CTL 表位的基础上,引入 HIV Tat$_{49-57}$CCP 序列和破伤风类毒素通用 Th 表位,设计、合成模拟多肽抗原。应用自体同源 PBMC 作为抗原提呈细胞,用前述模拟肽抗原体外激活 5 例 HLA-A2$^+$ 黑色素瘤病人 PBMC,就其诱导肿瘤抗原 Mart-1 特异性细胞毒活性和 Th1 型 T 细胞极化效应进行分析。结果表明,所设计肽抗原均可体外诱导人 PBMC 产生细胞毒活性和 Th1 极化,其中以含 CCP 序列的 P3 肽效果最好,显著优于单纯 CTL 表位肽和 CTL+Th 双表位肽。我们推测,P3 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-连接顺序可发挥"铰链"作用,使其可以其 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;其 CCP 序列可有效协助外源性肽段进入 APC 胞内,促进抗原肽更有效地进入内源性蛋白的 MHC Ⅰ 类分子限制性途径,诱导 Th、Tc 细胞激活。对于单纯 CTL 表位肽,一般认为,在体内是难以诱导产生抗原特异性 CTL 应答的[13,14]。对于体外实验结果,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所致。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。就多肽抗原设计而言,因存在潜在 HLA 和抗原缺失变异[15],因此对肿瘤的临床特异性治疗,可能需要在一个肿瘤特异性抗原的多个优势表位的基础上进行多表位组合设计,或者还需要引入其它来源的通用辅助表位。研究结果还提示,在免疫原性较弱的肿瘤肽抗原分子改造中,在已知引入 CCP 序列可显著提高其免疫原性的基础上,引入多表位和短而柔性强的"铰链区"连接顺序可进一步辅助 CTL 表位被 APC 摄取和处理,而使外源性抗原迅速被输送至 MHC Ⅰ 分子限制的天然抗原处理与提呈途径。

参考文献:

[1] Boon T. Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy[J]. Int J Caner, 1993, 54: 177—180.

[2] Cerottini J-C, von Fliedner V, Boon T. Recognition of tumor-associated antigens by T lymphocytes: From basic concepts to new approaches[J]. Ann Oncol, 1992, 8: 11—16.

[3] Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, *et al*. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression[J]. J Immunol, 1995, 154(8): 3961—3968.

[4] Marchand M, van Baren N, Weynants P, *et al*. Tumor regression observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1[J]. Int J Cancer, 1999, 80(2): 219—230.

[5] Barratt-Boyes S M, Vlad A and Finn O J. Immunization of chimpanzees with tumor antigen MUC1 mucin tandem repeat peptide elicits both helper and cytotoxic T cell responses[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(7): 1918—1924.

[6] Hemmer B, Pinilla C, Gran B, *et al*. Contribution of individual amino acids within MHC molecule or antigenic peptide to TCR ligand potency[J]. J Immunol, 2000, 164(2): 861—871.

[7] Chen J L, Dunbar P R, Gileadi U, *et al*. Identification of NY-ESO-1 peptide analogous capable of improved stimulation of tumor reactive CTL[J]. J Immunol, 2000, 165(2): 948—955.

[8] Ridge J P, Rosa F D, Matzinger P, *et al*. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4$^+$T-helper and a T-killer cell[J]. Nature, 1998, 393(6684): 474—478.

[9] Swiniarski H, Wolf S F, Sturmhoefel K, *et al*. IL-12 dependent enhancement of CTL response to weak class Ⅰ-restricted peptide immunogens requires coimmunization with T helper cell immunogens[J]. Clin Immunol, 2000, 94(3): 200—211.

[10] 王 莉,吴玉章,石统东,等. 穿膜序列对 MHC-Ⅰ类限制性 CTL 表位呈递影响的研究[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(10): 1106—1108.

[11] 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.

[12] Scheibenbogen C, Lee K H, Stevanovic S, *et al*. Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFNγ-ELISPOT assay[J]. Int J Cancer, 1997, 71: 932—936.

[13] 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.

[14] Sercarz E E, Lehmann P V, Ametani A, *et al*. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11: 729—766.

[15] Ruiz-Cabello F, Perez-Ayala M, Gomez O, *et al*. Molecular analysis of MHC-class Ⅰ expression in human tumor cell lines[J]. Int J Cancer, 1991, 49: 123—128.

(编辑 冷怀明)

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