DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.006
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1143-03

论著

肿瘤抗原MAGE-12的B细胞表位4分支多重抗原肽的合成及鉴定

李艳秋,吴玉章,倪 兵,贾正才 (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 设计合成肿瘤抗原MAGE-12的B细胞表位抗原肽并对其进行鉴定。方法 在预测MAGE-12的B细胞表位序列为QSDEGSSNEEQE(82—93)的基础上,采用4分支多重抗原肽结构合成抗原肽,免疫C-57BL/6小鼠,产生多克隆抗体,应用ELISA实验及免疫组化实验检测多克隆抗体是否为人的抗原肽的特异性抗体。结果 免疫C-57BL/6小鼠后可产生MAGE-12的抗原特异性的多克隆抗体,抗体滴度可达1∶64。结论 证明所预测的表位为MAGE-12的B细胞表位。

关键词:B细胞表位;MAGE-12;表位鉴定;ELISA
中图法分类号:R345.16;R392.11;R394.2 文献标识码:A

Synthesis and identification of B-cell epitope of tumor antigen MAGE-12

LI Yan-qiu, WU Yu-zhang, NI Bing, JIA Zheng-cai (Institute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To synthesize and identify the antigenic peptide of B-cell epitope on tumor antigen MAGE-12. Methods Based on predicted B-cell epitope MAGE-12_{82-93}, a multiple antigenic peptide (MAP) system was used to synthesize the immunogen. C-57BL/6 mice were immunized with the immunogen to produce the polyclonal anti-serum. The polyclonal antibody in the serum of immunized mice was identified by using ELISA and immunohistochemical method. Results The antibody titer was reached to 1∶64. The polyclonal antibody was identified as objective specific antibody. Conclusion Those results show that the synthesized MAGE—1282—93 may be a B—cell epitope of MAGE-12.

Key words: epitopes of B-cell; epitope identification; MAGE—12; ELISA

在过去十几年里,肿瘤抗原的研究取得了很大的进步,这为肿瘤特异性免疫治疗奠定了良好的基础。而肿瘤抗原表位生物学的研究是过渡到临床应用的重要前提。MAGE-12是1994年发现的肿瘤特异性抗原[1],它表达于各种组织型的肿瘤细胞,但在正常组织(除睾丸和胎盘外)却不表达,提示是较为理想的肿瘤特异性免疫治疗的靶抗原。本研究在预测的MAGE-12 B细胞表位基础上[2],采用4分支多重抗原肽(Multiple antigenic peptide,MAP)结构设计合成抗原肽,免疫C-57BL/6小鼠,产生多克隆抗体,应用ELISA实验及免疫组化实验检测多克隆抗体是否为抗原肽的特异性抗体,为基于MAGE-12的临床主动免疫治疗研究提供新的手段。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

BIO-RAD Model 3500自动酶联检测仪;超声波粉碎器(Somc&Material, Inc公司);ABI431A型多肽合成仪(美国PE公司);FA1104型电子天平(上海天平仪器厂);Model3550自动酶联检测仪(美国BIO-RAD公司)。

1.2 主要试剂

包被物(MAP肽);酶标抗体(辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG)预先滴定工作浓度;S-P 9002试剂盒:购自北京中山生物技术有限公司;完全佐剂(购于北京中山公司);不完全佐剂(购于北京中山公司);4分支MAP树脂(美国PE公司);多肽合成用氨基酸(美国PE公司);多肽合成试剂(均出自美国PE公司):哌啶、DMAP、甲醇、HOBt、DCC、DCM、NMP;苯甲硫醚(Sigma);EDT(Sigma);TFA(TEDLA);DMSO(苏州正兴化工研究所);乙氰(TEDLA)。ELISA包被缓冲液为0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6);洗涤液(PBS-T20)为含0.05% Tween-20的0.02 mol/L的PBS(pH 7.4);待测标本及抗体稀释液为含5%小牛血清的PBS-T20;酶标二抗为羊抗鼠IgG-HRP(北京中山,ZB-2305);底物为邻苯二胺(OPD)-H_2O_2。

1.3 多肽的设计

1.3.1 多肽序列的选择 以Kyte-Doolittle亲水性方案预测肿瘤抗原MAGE-12的B细胞表位,选择MAGE-12_{82-93}(QSDEGSSNEEQE)作为待测序列。

1.3.2 MAP抗原肽的设计 以所选序列为基础。采用4分支肽设计。MAP抗原肽的结构示意图见图1。

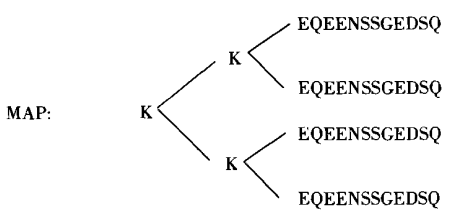


图1 MAP结构示意图

Fig. 1 Schematic structures of MAP

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:李艳秋(1972—),女,辽宁省兴城市人,硕士,主管技师,主要从事肿瘤疫苗方面的研究,现在沈阳军区总医院检验科工作,沈阳 110015。电话:(024)23051301
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-08-24

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

1.4 MAP 肽的合成

多肽的合成在 ABI431A 型多肽合成仪(美国 PE 公司)上进行,树脂选用 4 分支 MAP 树脂,采用标准 Fmoc 方案合成树脂-MAP 肽。多肽合成后,用 95%的三氟乙酸(TFA)裂解液将多肽从树脂上裂解下来,同时去除多种保护基团[3]。将反应后的混合液经玻璃滤器过滤以滤掉树脂,并用三氟乙酸冲洗反应瓶和滤器。将滤液在常温下低压蒸发至 1~2 ml,加乙醚 50 ml 使多肽沉淀,经玻璃滤器过滤,收集沉淀,干燥,所得便是多肽产品。免疫原为未裂解的树脂-MAP 肽,免疫学检测包被抗原为从树脂-MAP 肽上裂解下来的 MAP 肽。

1.5 免疫方法及免疫学检测

1.5.1 动物及分组 C-57BL/6 小鼠 20 只(北京军事医学科学院丰台六所动物实验中心),2 月龄,体重(18±2)g,雌雄不限,随机分为 4 组,每组 5 只。

1.5.2 免疫方法[4] 以 MAP 为免疫原,共注射 3 次,每次间隔 2 周,首次以 CFA 为佐剂,加强免疫以 IFA 为佐剂。小鼠首次及加强免疫量为 50 μg/只,与 0.3 ml 佐剂完全乳化后,在腘窝、腹股沟、腋部皮下及腹腔多点注射。

1.5.3 标本的采集与分离 最后一次免疫后 3 周,眼眶放血,收集血液,分离血清,并冻存于-20℃冰箱备用。

1.5.4 ELISA 检测抗体 采用标准间接 ELISA 法测定血清中抗体滴度,分别测定每组动物特异性抗体滴度。按 100 μl/孔包被 96 孔酶联板(CORNING),抗原浓度为 20 μg/ml,4 ℃过夜;以 8% BSA-PBS 37 ℃封闭 120 min,洗涤 3 次,3 min/次;加倍比稀释的被测动物血清,100 μl/孔,37 ℃孵育 90 min。洗涤 3 次后,加入酶标二抗,37 ℃ 30 min;洗涤 3 次后,加入 OPD-H_2O_2 底物,37 ℃ 10 min,终止反应。酶联仪于 490 nm 测定吸光度 *A* 值,以正常小鼠血清作阴性对照。结果以双复孔 *A* 值均值表示。以待测标本 *A* 值/阴性对照 *A* 值> 2.1 为阳性标准,以出现阳性反应的最高稀释度作为该样本中抗体滴度。

1.5.5 细胞培养与制片 LB373-MEL 细胞培养与制片:人黑色素瘤细胞系 LB373-MEL(由比利时 Ludwig 癌症研究所 Marchand 教授惠赠),体外常规培养。LB373-MEL 的培养基选用 IMDM,并加以 10%胎牛血清、116 μg/ml 精氨酸、36 μg/ml 天冬酰胺、219 μg/ml 谷氨酸、200 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、100 μg/ml 转铁蛋白,5 μg/ml 胰岛素、30 nmol/L 亚硒酸钠、10 nmol/L 雌二醇、10 nmol/L 氢化可的松。待细胞生长至对数生长期时,将其传代至加有 24 mm×24 mm 盖玻片的 6 孔板中,37 ℃孵箱过夜,待其贴壁后加适量培养基,生长至对数生长期时,弃掉培养基,加 4%多聚甲醛固定液,4℃冰箱过夜,次日弃掉固定液,至-20 ℃冰箱保存,备用。免疫组化前,将其用树胶固定于常规载玻片上,置室温,次日-20 ℃冰箱保存。

293 细胞培养与制片:293 细胞培养,DMEM 培养基,体外常规培养。制片同 LB373-MEL。

1.5.6 免疫组化方法 参照 SP9002 试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 小鼠抗体滴度的动态测定

首次免疫后 2 周始,取血 1 次/周,分离血清,以 4 分支 MAP 结构,树脂裂解的 MAGE-12$_{82-93}$ 为包被抗原,ELISA 间接法测定特异性抗体滴度,首次免疫 3 周后即可检出特异性抗体,抗体滴度在测定时间内,抗体滴度逐渐增高,首次免疫后 8 周,抗体滴度达最高 1∶64。抗体滴度随免疫次数和时间升高,见图 2。

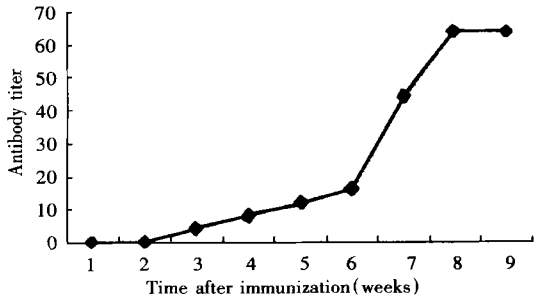


图 2 MAP 抗原免疫 C-57BL/6 小鼠后抗体动态检测

Fig 2 Dynamic changes of antibodies of C-57BL/6 mouse immunized with MAP antigen

2.2 抗体特异性检测

对 MAGE-12 表达阳性的 LB373-MEL 细胞作免疫组化染色,结果在胞质中出现特异性的棕黄色颗粒,见图 3。293 细胞为阴性对照,未见棕黄色反应。

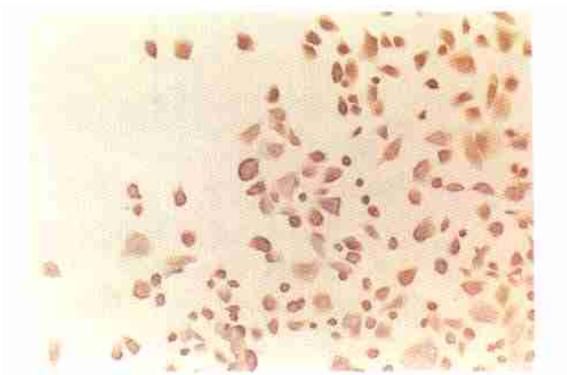


图 3 MAGE-12 表达阳性的 LB373-MEL 细胞株 (S-P×100)

Fig 3 Expression of MAGE-12 in cell line LB373-MEL (S-P×100)

3 讨论

多肽抗原表位成分简单,引发的免疫反应针对性强,但其表位肽的分子量小,在体内易降解,因而有免疫原性低的缺陷。既往多是用表位肽交联载体蛋白的方法来提高其免疫原性,但载体蛋白有其固有缺陷,因而有待改进。本研究采用 MAP 结构,它是以寡聚赖氨酸为核心的放射状分子肽[5]。寡聚赖氨酸分子量小,免疫原性弱,既往研究已证实,不足以诱发特异性的免疫反应。吴玉章等[6] 已证明含表位肽的 MAP 结构能产生针对表位肽的特异免疫应答。MAP 结构的引入是替代传统肽交联蛋白载体并提高免疫原性的有效办法,这为基于表位而设计新型抗原分子的免疫学研究提供了很好的模型。

本研究采用酶联免疫试验间接法,进行了小鼠抗体滴度的动态测定,最大稀释度为 1∶64,这证明产生的抗体为 MAGE-12$_{82-93}$ 的特异性抗体。将产生的抗体

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

与表达 MAGE-12 的 LB373-MEL 细胞系作免疫组化染色,结果显示于胞质有阳性反应。以上结果说明产生的抗体为人 MAGE-12 的特异性抗体。

综上所述,本研究所预测的表位(QSDEGSSNEEQE)确实为人 MAGE-12 的 B 细胞表位。该表位的发现和其免疫原的设计为多个表位联合使用打下基础,为多肽疫苗的研制提供了可靠依据。

参考文献:

[1] Ding M, Beck R J, Keller C J, *et al*. Cloning and analysis of MAGE-1-related genes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 202(1): 549—555.
[2] 李艳秋, 吴玉章, 贾正才. 肿瘤抗原 MAGE-12 的表位及二级结构预测[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(4): 268—270.
[3] 贾正才, 吴玉章, 王祥智, 等. 肿瘤抗原 MAGE-3 预测 CTL 表位的合成与否定[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(10): 940—942.
[4] 吴玉章, 刘茂昌, 贾正才, 等. ABV 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.
[5] 刘茂昌, 吴玉章, 朱锡华, 等. 乙肝病毒新型免疫原性多肽的设计、合成[J]. 免疫学杂志 1998, 14(2): 98—100.
[6] 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.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2002)10-1145-01

个案与短篇

急性心肌梗死合并急性呼吸窘迫综合征 1 例

A case report of acute myocardial infarction complicated with acute respiratory distress syndrome

张 晔, 王旭开, 刘光耀 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所心血管内科, 重庆 400038)

患者, 男, 54 岁, 因"胸痛 1 d 余"于 2000 年 11 月 4 日 17: 30 入我院, 入院时突然发生晕厥, 意识丧失, 血压 70/40 mmHg, 心率 40 次/min, 呼吸 22 次/min。心电图示"P 波消失, R-R 间期 1.4 s, 基本规则; Ⅱ、Ⅲ、avF、V_{3R-5R} ST 段弓背向上型抬高 0.2~0.5 mV, 与 T 波融合为单相曲线; Ⅰ、avL、V_{2-4} ST 段水平型压低 0.3~0.6 mV"。初步诊断为"冠状动脉粥样硬化性心脏病: 急性下壁、右室心肌梗死; 急性高侧壁、前壁心内膜下心肌梗死; 窦性停搏; 交界区逸搏心律; 心功能Ⅳ级(Kilip 分级)"。血心肌酶谱 CK-MB 54.34 IU。立即送入 CCU 病房, 给予溶栓、抗休克等抢救治疗。19: 20 患者心电监护出现多次室性心动过速、室颤, 立即给予反复非同步直流电除颤, 共计 300 J× 28 次, 并同时继续抗休克等治疗。至 22: 55 最后 1 次非同步直流电除颤后, 患者意识渐恢复, 恢复窦性心律, 约 130 次/min, 律齐, 血压 160/108 mmHg, 呼吸 28 次/min, 血氧饱和度为 96%, 未再发作室性心律失常。查血心肌酶谱 CK-MB 196 IU。入院后第 3 天上午患者渐出现呼吸急促, 频率增至约 40 次/min, 血氧饱和度下降至 83%, 双肺广泛湿啰音。立即给予面罩吸氧、利尿、扩张血管、强心等处理, 症状有所缓解, 但低氧血症仍未纠正。胸片示双肺网状阴影, 部分融合呈磨砂玻璃样, 测 CVP 16 cmH_2O, 血气示: pH 7.515, PCO_2 35 mmHg, PaO_2 56 mmHg。立即行气管插管, 呼吸机辅助呼吸, 模式为 PEEP, PEEP 值为 14 cmH_2O, 潮气量为 600 ml, 吸入氧浓度为 45%~60%, 维持血氧饱和度在 96%左右, 维持出入液体总量负平衡, 同时给予保护心肌、控制感染、激素等治疗, 并加强吸痰、翻身、拍背等护理。维持 CVP 16~18 cmH_2O。多次复查血气, PO_2 由 56 mmHg 逐渐上升, 至 2000 年 11 月 10 日出院时, FiO_2 为 45%, PaO_2 为 150 mmHg, 各项生命体征基本平稳。

讨论

根据中华医学会呼吸病学分会 1999 年制定《急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的诊断标准》[1]。该患者 ARDS 诊断成立。其高危因素在于: ①急性心肌梗死及心源性休克等严重应激状态下, 肌体大量炎性细胞活化, 大量炎症介质释放引起肺脏局部炎症反应及炎症反应失控, 造成肺脏损害; ②多次高能量直流电除颤(300 J× 28 次)过程中, 高压强电流对低电阻的肺实质组织及肺毛细血管壁内皮细胞造成直接损伤[2]; ③高能量电流使肌体产生大量氧自由基[3], 进一步加重肺脏损害。以上多种因素最终导致 ARDS。恰当的机械通气辅助呼吸是 ARDS 的治疗关键。

关键词: 急性心肌梗死; 急性呼吸窘迫综合征
中图法分类号: R542.22; R563.806 文献标识码: B

参考文献:

[1] 中华医学会呼吸病学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊准[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(4): 203.
[2] 钱学贤, 戴玉华, 孔华宇. 现代心血管病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 629—634.
[3] Saliba W, Juratli N, Chung M K, *et al*. Higher energy synchronized external direct current cardioversion for refractory atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 1999, 34(7): 2 031—2 034.

(编辑 张大春)

作者简介: 张 晔(1978—), 女, 湖南省湘潭市人, 医师, 主要从事心血管方面的研究。电话: (023)68757246
收稿日期: 2002-02-09; 修回日期: 2002-05-10

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