DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.013
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1156 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1156-03

肿瘤抗原MAGE-2 HLA-A2限制性新CTL表位的鉴定

耿 淼,吴玉章,贾正才,周 伟 (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 寻求新的HLA-A2限制性肿瘤抗原MAGE-2 CTL表位。方法 经超基序与量化基序相结合预测的肿瘤抗原MAGE-2的4个表位作为研究对象,标准的^{51}Cr实验与肽结合实验相结合进行验证。结果 预测表位肽MAGE-$2_{220-228}$,MAGE-$2_{271-279}$经体外刺激PBMC后可有效的诱导CTL效应产生,当效/靶为100∶1时溶破靶细胞效率分别为74.4%,68.2%。HLA-A2分子亲和力分析,荧光系数分别为0.61、0.24阳性肽荧光系数为0.79。结论 多肽MAGE-$2_{220-228}$、MAGE-$2_{271-279}$可作为新的HLA-A2限制性CTL表位。

关键词:肿瘤抗原;MAGE-2;表位;鉴定
中图法分类号:R392.11;R394—33 文献标识码:A

Identification of novel HLA-A2-restricted CTL epitopes derived from tumor antigen MAGE-2

GENG Miao, WU Yu-zhang, JIA Zheng-cai, ZHOU Wei (Institute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore and identify novel HLA-A2-restricted CTL epitopes of MAGE-2. Methods Four candidate CTL peptides predicted with peptide supermotif and quantitative motif were subjected ^{51}Cr release assay combined with peptide binding assay were performed to verify these epitopes. Results Peptides of MAGE-$2_{220-228}$ and MAGE-$2_{271-279}$ were confirmed able to elicit CTLs after PBMC stimulation *in vitro*. When effect to target was 100∶1, the lysis percent of target cells were 74.4% and 68.2% respectively. This peptide was found to bind with sufficient affinity to the HLA-A2 molecule by using a binding assay. The fluorescence indexes were 0.61 and 0.24, and positive peptide fluorescence index was 0.79. Conclusion These results indicate that the peptides of MAGE-$2_{220-228}$ and MAGE-$2_{271-279}$ are novel HLA-A2-restricted CTL epitopes.

Key words: tumor antigen; MAGE-2; epitopes; identification

肿瘤特异性免疫治疗的基本原理是根据细胞毒性T细胞(CTL)可以特异识别存在于肿瘤细胞表面的抗原多肽(这种识别受MHC-Ⅰ类分子限制),当肿瘤抗原多肽在抗原提呈细胞(APC)的作用下以MHC-肽分子复合物的形式被提呈于APC表面被CTL识别,同时CTL被分化增殖为具有杀瘤活性的CTL,特异杀伤肿瘤细胞。因此寻求特异肿瘤抗原及其相应的CTL表位,成为了肿瘤免疫治疗的关键。20世纪80年代由Boon成功分离与鉴定特异性肿瘤抗原——黑色素瘤抗原MAGE家族,1994年发现MAGE-3的HLA-A2限制性CTL表位FLWGPRALV(271—279),并经实验证实此表位在体外可诱导特异的CTL产生[1]。随着这些实验的成功寻找与鉴定MAGE家族成员的特异性CTL表位成为肿瘤免疫研究的热点,MAGE家族成员的CTL表位也被陆续发现,研究也发现同一种肿瘤抗原可以被不同的MHC-Ⅰ类分子所递呈,既同一抗原中可能存在多个由不同MHC-Ⅰ类分子限制的CTL表位。而HLAI类分子在人群中的表达比例存在种族差异,在我国HLA-$A2^+$人群达到53%[2],因此进行HLA-A2限制性CTL表位的研究更具有现实意义。本研究是在此基础上对经超基序与量化基序相结合预测出的肿瘤抗原MAGE-2的4个HLA-A2限制CTL优势表位[3],进行体外杀伤、HLA-A2亲和力的免疫学的研究,希望能够发现新的HLA-A2限制性CTL表位,为临床免疫治疗表达MAGE-2抗原的肿瘤患者提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人黑色素瘤细胞系LB373-MEL,表达肿瘤抗原MAGE-2,HLA-A2阳性(比利时Marchand教授惠赠),作为靶细胞。HLA-$A2^+$健康人浓缩白细胞(西南医院提供)。T2:HLA-A2表达阳性,且内源性抗原加工处理能力缺失(由军科院馈赠)。BB7.2:抗HLA-A2单克隆抗体(购于ATCC)。二抗FITC标记的羊抗鼠IgG(购于北京中山生物技术有限公司)。流式细胞仪(Calibur美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 分离外周血单个核细胞(PBMC) 经常规聚蔗糖-泛影葡氨分层液梯度离心法分离获得。

1.2.2 细胞培养 PBMC培养基选用RPMI1640加10%胎牛血清,体外常规培养。LB373-MEL培养基选用IMDM,加10%胎牛血清、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/ml氢化可的松。

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:耿 淼(1973—),女,山东省滨州市人,硕士研究生,主要从事肿瘤疫苗研究工作。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-07-12

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

T2 培养基选用 RPMI1640, 并加以 10%胎牛血清, 体外常规培养。BB7.2 培养基选用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基体外常规培养。

1.2.3　诱导 CTL 效应　　PBMC 于分离后的第 2 天分别用 4 个候选肽刺激(10 μg/ml), 以后每隔 7 d 刺激 1 次, 共刺激 3 次, 刺激同时加 IL-2 50 U/ml。

1.2.4　多肽合成　　多肽合成在 ABI 431A 型多肽合成仪, 采用标准的 Fmoc 方案, 略加修改, 精氨酸采用两次偶联。多肽合成后在 Delta600 型 HPLC(美国 Waters 公司)上进行纯化, 纯化选用 C18 制备柱, 纯度达到 90%以上。纯化后多肽分子量在 API 2000 型质谱仪(美国 Waters 公司)上进行。将多肽纯品溶于 DMSO 中, 终浓度为 20 mg/ml, 置于-20℃备用。

1.2.5　细胞毒实验　　采用标准的 ^{51}Cr 释放实验[4]。首先进行靶细胞标记, 将靶细胞浓度调整到 1×10^6/ml 加入 100 μCi $Na^{51}CrO_4$, 37 ℃、5% CO_2 孵育 90 min 后, 将标记好的靶细胞以 1×10^4/100 μl 加入 96 孔板。将效应细胞分别按照效靶比 100∶1, 50∶1, 25∶1, 12.5∶1 加入靶细胞中每孔 100 μl。对照组选用无关肽 HBVc18-27FLPSDFFPSV 刺激效应细胞获得, 肿瘤细胞的最大杀伤采用 2 mol/lHCL, 自释放为靶细胞加培养基。将 96 孔板 37 ℃、5% CO_2 孵育 4 h, 离心后取上清 100 μl, γ 记数器测定脉冲数(CPM)。

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

1.2.6　肽结合实验　　各肽与 HLA-A2.1 的亲和力分析试验见文献[5]。首先将 1×10^6/ml 的 T2 细胞用冰 PBS、800 r/min 离心 6 min, 洗涤 3 次后, 再与 10 μg/ml 的 4 个候选肽 37 ℃共孵育 4 h。孵育好的细胞用冰 PBS, 同样离心条件洗涤 3 次, 加入 100 μl BB7.2 杂交瘤细胞培养上清液, 冰浴 40 min。PBS 洗涤 3 次, 加入 100 μl 1∶100 稀释的二抗 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 溶液, 在冰上孵育 40 min, 洗涤后于流式细胞仪检测平均荧光强度, 波长 488 nm。阳性已知肽 MAGE-$2_{(112-120)}$ 作为阳性对照, 未加肽刺激的单纯 T2 细胞为背景对照。

结果判定: 间接免疫荧光法检测各肽与 HLA-A2.1 分子的结合情况, 是基于外源性多肽与 T2 细胞表面 MHC-Ⅰ类分子的结合可使其表面 MHC-Ⅰ类分子的表达量增加, 两者结合越稳固, 则可检测到的 MHC-Ⅰ类分子越多, 以平均荧光强度为检测指标。结果以荧光系数(FI)作为衡量指标。

$$\text{荧光系数(FI)}=\frac{\text{样本平均荧光强度}-\text{背景平均荧光强度}}{\text{背景平均荧光强度}}$$

2　结果

2.1　CTL 杀伤实验

候选表位肽体外 3 次刺激 HLA-$A2^+$ 健康人的 PBMC, 诱导特异性 CTL 杀伤效应通过标准的 ^{51}Cr 释放实验显示, 除已鉴定肽 MAGE-$2_{(112-120)}$ 诱导出特异的 CTL 效应, MAGE-$2_{(220-228)}$、MAGE-$2_{(271-279)}$ 也能诱导有效的 CTL 效应, 对靶细胞具有较高的溶破率, 在效靶比为 100∶1 时, MAGE-$2_{(220-228)}$ 与 MAGE-$2_{(271-279)}$ 对应的靶细胞溶破率分别为 74.4%、68.2%。MAGE-$2_{(171-179)}$ 则没有诱导出明显的杀伤效应, 见图 1, 2。

2.2　候选肽的 HLA-A2 亲和力分析

根据用间接免疫荧光法检测各肽与 HLA-A2.1 分子的结合情况, 荧光系数(FI)作为亲和力的检测指标, 发现其中 MAGE-$2_{(112-120)}$ 与 HLA-A2 分子具有高亲和力, 荧光系数为 0.79。多肽 MAGE-$2_{(220-228)}$ 荧光系数 0.61。而 MAGE-$2_{(271-279)}$ 与 HLA-A2 的亲和力则非常低, 荧光指数仅为 0.24, MAGE-$2_{(171-179)}$ 基本没有结合, 荧光指数 0.15, 见图 3。

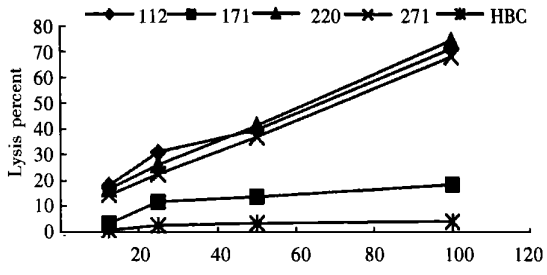


图 1　待检肽刺激 PBMC 后对 LB373-MEL 的溶破率

Fig 1　Specific lytic percentage of target cells LB373-MEL by peptide stimulated HLA-$A2^+$ PBMC (Effect/target= 12.5∶1, 25∶1, 50∶1, and 100∶1

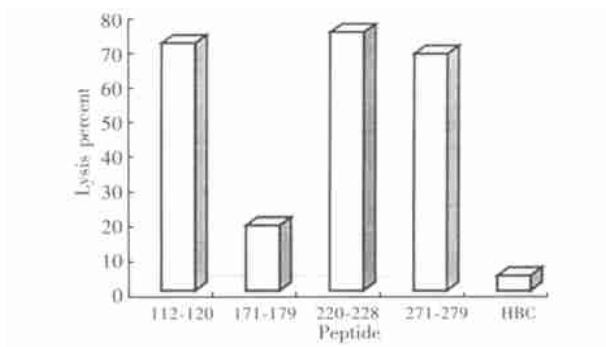


图 2　各肽刺激 PBMC 对 LB373-MEL 的溶液效率(效∶靶= 100∶1)

Fig 2　Specific lytic percentage of target cells LB373-MEL by various peptide stimulated HLA-$A2^+$ PBMC (Effect/target= 100∶1)

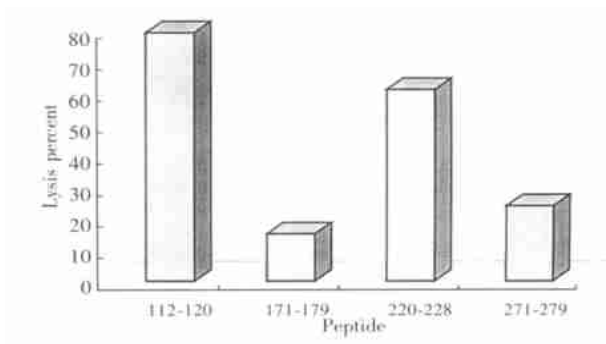


图 3　间接荧光法检测肽与 HLA-A2 分子结合的荧光系数

Fig 3　Fluorescence index of the peptides binding with HLA-A2

3　讨论

MAGE-2 为肿瘤特异性抗原, 基因定位于 X 染色

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

体 q28 区，含 4 个外显子。抗原被第 4 个外显子编码，分子量为 48×10^3，由 314 个氨基酸残基组成。MAGE-2 不仅在黑色素瘤中有高表达(70%)，在其他肿瘤中也有很高的表达，骨肉瘤表达为 75%。新近报道其还特异性高表达于头部肿瘤、横纹肌肉瘤[6,7]，因此 MAGE-2 作为多种肿瘤的诊断标志以及免疫治疗的靶抗原已在近年来倍受关注。早在 1997 年 Visseren 等[8] 就鉴定了两个MAGE-2 抗原的 HLA-A2 限制的 CTL 表位。分别是 9 肽 KMVELVHFL(112-120)，10 肽 YLQLVFGIEV(157-166)，1999 年 Tahara[9] 又发现由 HLA-A24 限制性 9 肽 CTL 表位 EYILQLVFGI(156-164)，但这些表位的临床应用并未见报道其原因可能类似于抗原多肽 MAGE-3$_{271-279}$是其表位多肽在肿瘤细胞表面的表达不足引起[10]，发现更好 MAGE-2 的 CTL 疫苗成为研究的关键。研究中首先对 4 个候选表位 KMVELVHFL(112-120)；KIWEELSML(220-228)；FLWGPRALI(271-279)；PISHLYILV(171-179)，其中 KMVELVHFL(112-120) 为 Visseren 已证明的 HLA-A2 限制性 CTL 表位，进行特异的 CTL 诱导实验，实验方法采用肽与 IL-2 共同体外刺激 PBMC，实验结果以标准的 ^{51}Cr 释放实验进行评估。结果发现 4 个待检表位中除阳性肽 KMVELVHFL 能诱发 CTL 产生，KIWEELSML(220-228)、FLWGPRALI(271-279) 均能有效的诱导 CTL 效应的产生，杀伤表达 MAGE-2 的 HLA-A2$^+$ 的肿瘤细胞系 LB373-MEL，其中 MAGE-2(220-228)的杀伤效率最高，证明 MAGE-2(220-228) 和 MAGE-2(271-279) 为 MAGE-2 的 CTL 表位。相反 MAGE-2(171-179)没有此作用，不是 CTL 表位。HLA-A2 限制性实验采用 1993 年由 Nijman 创建的多肽结合实验，用候选肽刺激内源性抗原加工处理能力缺失的 HLA-A2 阳性的T2 细胞，间接免疫荧光法检测各肽与 HLA-A2.1 分子的结合情况。基于外源性多肽与 T2 细胞表面 MHC-Ⅰ类分子的结合越稳固可使其表面 MHC-Ⅰ类分子的表达量增加，则可检测到的 MHC-Ⅰ类分子越多[11]，既相对应的平均荧光强度也就越高，结果以荧光系数作为衡量标准，发现多肽 MAGE-2(220-228) 的荧光系数稍低于阳性肽 MAGE-2(112-120) 但明显高于多肽 MAGE-2(271-279)，说明 9 肽 MAGE-2(220-228) 细胞表面 MHC-Ⅰ类分子形成的肽复合物的稳定性高于 MAGE-2(271-279)。而 MAGE-2(171-179) 则不形成多肽复合物，从而间接证明了 CTL 细胞在发挥杀伤效应受 MHC-Ⅰ类分子限制，只对抗原多肽与 MHC-Ⅰ分子形成的复合物做出反应，分化增殖为具有杀瘤活性的 CTL。

本实验研究鉴定出两个新表位 MAGE-2(220-228) 和 MAGE-2(271-279)，体外刺激 PBMC 均可诱导出较高的 CTL 杀瘤活性，有效杀伤人体肿瘤细胞，且抗原多肽 MAGE-2(220-228) 可与 HLA-A2 分子形成稳定的复合物。本实验结论为构建以肿瘤抗原 MAGE-2 为基础的肿瘤疫苗提供了依据。

参考文献：

[1] van der Bruggen P, Bastin J, Boon T, *et al*. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(12): 3 038-3 043.

[2] Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, *et al*. Peptide motifs of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(9): 2 453-2 456.

[3] 耿 淼，贾正才，万 瑛，等. 肿瘤抗原 MAGE-2 HLA-A2 限制性 CTL 表位的预测[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(10): 988-992.

[4] 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(5 072): 927-934.

[5] Nijman H W, Houbiers J G, Vierboom M P, *et al*. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes[J]. Eur J Immunol, 1993, 23(6): 1 215-1 219.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Visseren M J, van der Burg S H, van der Voort E I, *et al*. Identification of HLA-A*2010-restricted CTL epitopes enconded by the tumor-specific MAGE-2 gene product[J]. Int J Cancer, 1997, 73(1): 125-130.

[9] Tahara K, Takesako K Sette A, *et al*. Identification of a MAGE-2-encoded human leukocyte antigen-A24-binding synthetic peptide that induces specific antitumor cytotoxic T lymphocytes[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(8): 2 236-2 241.

[10] Valmori D, Lienard, Waanders G, *et al*. Analysis of MAGE-3-specific cytolytic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patients[J]. Cancer Res, 1997, 57(4): 735-741.

[11] van Elsas A, van der Burg S H, van der Minne C E, *et al*. Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(8): 1 683-1 689.

（编辑 王 红）

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