DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.014
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)10-1159-03

论著

穿膜肽 HIV-Tat_{49-57}和 CTL 表位融合多肽疫苗的初步免疫学效应研究

王 莉,吴玉章,石统东,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 探讨穿膜肽 HIV-Tat_{49-57}将 CTL 表位带入活细胞胞质并将其投入 MHC-Ⅰ类抗原提呈途径的可能性。方法 应用多肽固相合成技术,分别合成含 HIV Tat_{49-57}和 HLA-A2.1限制性 CTL 优势表位 MART-1_{27-35}的18肽和该CTL表位9肽。采用间接免疫荧光与激光共聚焦显微镜技术,分别对上述18肽和9肽的穿膜能力进行了动态观察。进一步用标准^{51}Cr释放试验分别检测了上述18肽和9肽在HLA-A2.1阳性健康者外周血单个核细胞(PBMC)中诱导的表位MART-1_{27-35}特异性CTL活性。结果 18肽能够穿过活哺乳动物细胞质膜进入胞质,并呈现出时间、剂量依赖关系;而9肽则无此效应。与9肽相比,18肽在体外诱导出了明显增强的特异性CTL活性($P<0.05$)。结论 穿膜肽 HIV Tat_{49-57}可有效携带CTL表位穿过细胞膜进入胞质,并有效激发出针对该表位的特异性CTL应答,为新型抗肿瘤及细胞内感染的多肽疫苗设计提供新思路。

关键词:穿膜肽;HIV Tat_{49-57};CTL 表位;MHC-Ⅰ类抗原提呈途径;多肽疫苗
中图法分类号:R392.12;R392.2;R730.51 文献标识码:A

Immunologic effect of a new peptide vaccine containing CTL epitope transferred by cell-penetrating peptide HIV-Tat_{49-57}

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

Abstract: **Objective** To discuss the possibilities of the intracellular delivery of CTL epitope by cell-penetrating peptide HIV-Tat_{49-57} and of the ensuing MHC class Ⅰ pathway presentation. **Methods** A nonamer (P1) peptide (MART-1_{27-35}) of CTL epitote and an 18-mer peptide (P2) containing HIV Tat_{49-57} and MART-1_{27-35} were synthesized with aid of polypeptide solid phase synthesis technique. The intracellular transport capabilities of these peptides were tested with indirect immunofluorescence assay and confocal microscopy. In addition, the nonamer and 18-mer peptide were used to stimulate PBMC of the healthy HLA-A2.1+ blood donors. Then, the activity of MART-1_{27-35} specific CTL in PBMC of those donors was measured by using a standard 4 h ^{51}Cr release assay. **Results** The 18mer peptide was more effective than the nonamer in cellular uptake and efficiently crossed the plasma membranes of the live cells in a time and concentration-dependent fashion. Furthermore, the specific CTL activity induced by the 18mer was much stronger than that induced by the nonamer. **Conclusion** The results show that HIV-Tat_{49-57} can deliver the exogenous antigenic peptide into the cytoplasm of live cells and probably trigger the MHC class Ⅰ-processing pathway. Thus, the described procedure should be applied to the design of peptide vaccine in order to induce CTL immunity against tumor and intracellular infection.

Key words: cell-penetrating peptides; HIV Tat_{49-57}; CTL epitope; MHC-Ⅰ antigen-presenting pathway; peptide vaccine

研究表明,产生于细胞质中的蛋白或多肽抗原可有效进入MHC-Ⅰ类抗原提呈途径得以呈递,从而诱发抗原特异性的CTL应答。外源性蛋白或多肽抗原较难进入抗原提呈细胞胞质及MHC-Ⅰ类抗原提呈途径,成为这类疫苗研制中的一个难题。近年来研究显示,人类免疫缺陷病毒HIV的转录活化因子——Tat蛋白具有自由通过细胞质膜的特性,并且整个蛋白或片段Tat_{37-72}可定位于胞质及细胞核[1]。现已有不少借助Tat蛋白的穿膜活性将其它蛋白或DNA成功导入活细胞内的报道[2,3]。该蛋白含86~102个氨基酸残基,具有3个功能结构域:其一是对于反式激活尤为重要的酸性N-端区域;其二是富含半胱氨酸的DNA结合区(22~37位氨基酸),带有一个锌指基元;其三为碱性区(包括第47~58位氨基酸),该功能区主要介导Tat蛋白发生细胞内在化。目前发现,几个源于Tat碱性结构域的不同长度的短肽均显示出较强的穿膜功能,其中最短的片段是Tat_{49-57}[4]。

本研究以人黑色素瘤分化抗原MART-1的HLA-A2限制性CTL表位MART-1_{27-35}为模式表位,探讨穿膜肽HIV-Tat_{49-57}将CTL表位多肽携带进入细胞质并将其投入MHC-I类抗原提呈途径的可能性,为多肽疫苗研制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 氨基酸、树脂等合成多肽的原料由美国PE公司和ACT公司提供;rhIL-2为我所研制;胎牛血清及RPMI 1640培养基购自Hyclone公司;$Na^{51}CrO_4$购自北京中国同位素公司;佛氏佐剂(完全和不完全两种)购于GIBCO公司;辣根酶和FITC标记的山羊抗兔IgG均购自北京中山生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器 ABI 431A型固相多肽合成仪(美国PE公司);Delta 600型高压液相色谱仪(HPLC,美国Waters公司);FT-603γ闪烁探头,FH463A自动定标器(北京核仪器厂);激光共聚焦显微镜(TCS-NT,德国Leica公司),由我校中心实验室提供。

基金项目:国家重点基础研究发展规划计划资助项目("973"项目)(2001CB510001);国家自然科学基金资助项目(39800170)
作者简介:王 莉(1975-),女,四川省南充市人,博士研究生,助教,主要从事肿瘤免疫学及多肽疫苗分子设计方面的研究。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:2002-07-24

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

1.1.3 细胞系 T2 细胞(购于 ATCC); BHK 细胞(幼仓鼠肾细胞,由本校细胞生物学教研室馈赠)。

1.2 方法

1.2.1 多肽序列设计与合成 多肽的合成在 431A 多肽合成仪上进行。穿膜肽 HIV Tat_{49-57} 的序列是 RKKRRQRRR。P1 为 9 肽,其序列为 $MART\text{-}1_{27-35}$(AAGIGILTV);P2 为 18 肽,序列为 Tat_{49-57}-$MART\text{-}1_{27-35}$(RKKRRQRRRAAGIGILTV);P3 为 $HBcAg_{18-27}$(FLPSDFFPSV),在本实验中作为对照肽。多肽合成后在 Delta600 型 HPLC 上进行纯化,纯度达到 90% 以上。多肽鉴定在 API2000 型质谱仪上进行,合成多肽分子量均与理论值相符。

1.2.2 制备 P1、P2 的多克隆免疫血清 用 P1、P2 分别混合佛氏佐剂,背部皮下多点免疫家兔(第三军医大学实验动物中心),共免疫 5 次,用间接 ELISA 方法分析 IgG 滴度大于 1∶2 000。

1.2.3 间接荧光免疫与激光共聚焦显微镜分析 将 BHK 细胞铺于 2 个放有 24 mm×24 mm 盖玻片的 6 孔板中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整浓度至各孔 10^4,1 ml,于 37 ℃、5% CO_2 孵育 24 h 后,分别将 P1、P2 加入 6 孔板,肽终浓度为 50 μg/ml,每孔孵育不同时间(5、10、30 min);将不同终浓度(5、20、50、100 μg/ml)的 P1、P2 加入另一 6 孔板中,37 ℃孵育 30 min。用 4 ℃ PBS 将各孔细胞洗涤 3 次;用 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min,用 4 ℃ PBS 洗涤 3 次;用 0.1% Triton X-100 处理 10 min,再用 4 ℃ PBS 洗涤 3 次。将所制备的兔抗血清作 1∶1 000 稀释后,分别加入各相应孔中,37 ℃孵育 1 h;用 4 ℃ PBS 洗涤 4~5 次,再用 FITC 标记的羊抗兔 IgG 作 1∶100 稀释后与 BHK 细胞共育 30 min,用 PBS 洗涤 4~5 次。取出盖玻片,用激光共聚焦显微镜观察。

1.2.4 效应细胞的制备 HLA-A2 阳性健康人的外周血浓缩白细胞由第三军医大学附属西南医院输血科提供,经常规聚蔗糖—泛影葡胺分层液梯度离心法分离,获得外周血单个核细胞(PBMC),用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基调节细胞浓度为 1×10^6/ml。分别用 P1、P2、P3、各肽反复刺激 PBMC,每 7 d 加肽刺激 1 次,肽终浓度为 10 nmol/ml,同时次日补加 60 IU/ml 的 rhIL-2。刺激 3 次后第 3 天,收集 PBMC,作为标准 ^{51}Gr 释放试验的效应细胞。

1.2.5 靶细胞的制备与标记 T2 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基体外培养;收集 T2 细胞,离心洗涤 2 次后,用含 10% 新鲜胎牛血清的 1640 培养基调整细胞浓度为 1×10^6/ml(总体积为 1 ml),加入 10 nmol/ml 的 P1,同时加入 100 μCi $Na^{51}CrO_4$,37 ℃、5% CO_2 孵育 90 min。600 r/min 离心 6 min 洗涤 3 次后,用上述培养基调整浓度至 1×10^5/ml。

1.2.6 细胞毒性试验 采用标准 ^{51}Gr 释放试验。将效应细胞与靶细胞按照效靶比(E/T)=100∶1,50∶1,25∶1,12.5∶1,加入到 96 孔尖底平板中,每组每效靶比设 3 个复孔。最大释放组和最小释放组分别由 100 μl 靶细胞和 100 μl 2 mol/l HCl,100 μl 靶细胞和 100 μl 1640 培养基组成。将该平板于 500 r/min 30 s 后,置于 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 4 h。1 000 r/min 离心 10 min 后,小心取上清 100 μl,移入一次性塑料试管中,用 γ 计数器分别测定各孔 ^{51}Gr 释放量。^{51}Gr 释放率=(实验组 cpm 平均值−最小释放 cpm 平均值)/(最大释放 cpm 平均值−最小释放 cpm 平均值)×100%。

1.3 统计学处理

采用 t 检验。

2 结果

2.1 间接荧光免疫与激光共聚焦显微镜分析

结果显示:在与 P2 共育过的 BHK 细胞内观察到了荧光信号,且荧光强度随着孵育时间的延长及肽浓度的增加而增强,见图 1,2。而在与 P1 共育过的 BHK 细胞内却观察不到荧光信号,见图 3。

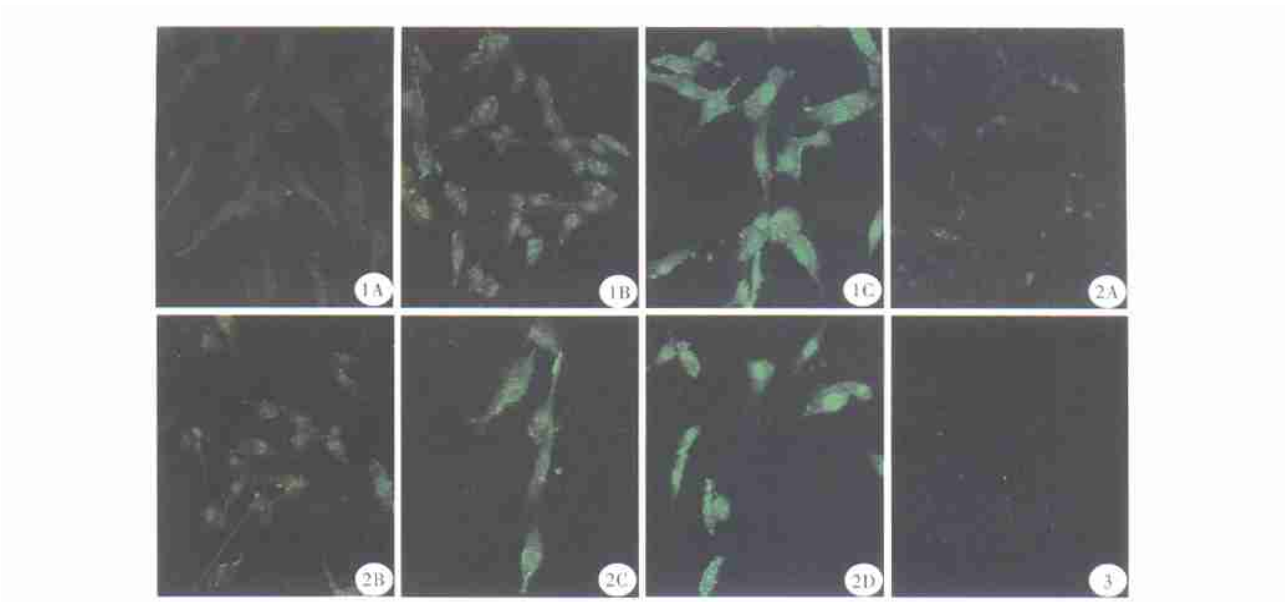


图 1 与 P2(50 μg/ml)分别共育 5 min(A)、10 min(B)和 30 min(C)后的激光共聚集显微镜分析

Fig 1 Confocal microscopic pictures of BHK cells treated with the 18-mer peptide (P2, 50 μg/ml) for 5 (1A), 10 (1B) and 30 (1C) min respectively

图 2 BHK 分别与不同浓度的 P2(5、20、50、100 μg/ml)共育 30 min 后的激光共聚集显微镜分析

Fig 2 Confocal microscopic pictures of BHK cells treated with the 18-mer peptide (P2) for 30 min at the concentrations of 5 (2A), 20 (2B), 50 (2C) and 100 (2D) μg/ml respectively

图 3 BHK 与 P1(50 μg/ml)共育 30 min 后的激光共聚焦显微镜分析

Fig 3 Confocal microscopic picture of BHK cells treated with the nonamer (P1, 50 μg/ml) for 30 min

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

2.2　标准^{51}Gr 释放试验检测比较各肽诱导的表位特异性 CTL 细胞毒效应

用各肽反复刺激 PBMC 后诱导的特异性 CTL 细胞毒效应, 见图 4。P1 作为阳性对照肽, 虽诱导出了针对 MART-1_{27-35}表位的特异性CTL 细胞毒效应, 但活性较弱, 在 E/T= 100∶1 时, 靶细胞的特异性溶破率为 41.6%; P2 诱导出了较强的 CTL 活性, 在 E/T= 100∶1 时, 靶细胞特异性溶破率为 70.3%; 而用 P3 诱导的 CTL 却对靶细胞基本无特异性杀伤。

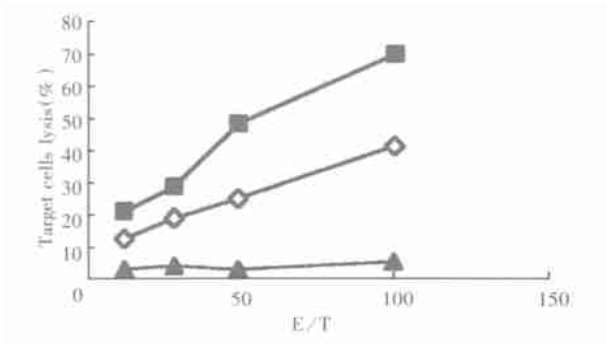


图 4　**P1、P2、P3 分别在体外诱导人 PBMC 的 MART-1_{27-35} 特异性 CTL 反应**

Fig 4　MART-1_{27-35} specific CTL cytotoxic activity of PBMC from healthy HLA-A2.1 + blood donors stimulated with the nonamer (P1, ＊), the 18-mer peptide (P2, ＊), and HbcAg$_{18-27}$ (P3, as control, ＊) respectively

3　讨论

随着越来越多的肿瘤抗原被确定, 表位预测方法以及组合化学技术的建立和完善, 基于肿瘤抗原 CTL 表位的多肽疫苗逐渐显露出诱人的应用前景[5]。但多肽疫苗的免疫原性通常较低, 且难以被 APC 捕获、加工并呈递, 不能有效激发 CTL 活性[6]。为提高多肽抗原被 APC 摄取并呈递的效率, 人们应用福氏佐剂、ISCOM(免疫刺激复合物)或脂质体等与多肽抗原混合免疫, 虽基本解决了抗原性弱的问题, 也提高了抗原肽进入 I 类途径递呈的效率, 但佐剂本身具致炎和毒性作用, 且佐剂的作用机制尚不清楚, 目前仅能用于动物实验。"分子内佐剂"是近几年提出来的多肽抗原修饰方案, 即在多肽的氨基或羧基末端加上脂类或糖类等基团, 多肽经修饰后免疫原性有所增加, 但尚无报道发现其在体内诱导 CTL 应答的能力有明显改善。多抗原性肽疫苗(MAP)及树形肽虽因结构复杂化使免疫原性增加, 但其常引起 APC 的内吞作用, 导致该抗原肽进入 MHC-Ⅱ类递呈途径, 往往诱导出较强的体液免疫[7]。如何有效诱导抗原特异性细胞毒性 T 细胞介导的细胞免疫, 成为多肽疫苗研制中亟待解决的问题。可见探索一种使多肽抗原高效地进入 APC 胞质, 进而循 MHC-Ⅰ类抗原提呈途径呈递的安全传递系统, 无疑对于多肽疫苗的研制有着重要意义。

结合穿膜肽 HIV-Tat$_{49-57}$ 的研究进展, 我们设想: Tat$_{49-57}$可能有效将多肽抗原导入 APC 胞质内, 上述难题渴望突破。本研究在表位 MART-1_{27-35}的 N-端加上 Tat$_{49-57}$序列, 合成一个含 18 个氨基酸残基的多肽, 同时合成一个仅含单纯表位的 9 肽和另一无关肽, 作为本实验的对照。通过间接免疫荧光技术与激光共聚焦显微分析, 我们发现: 18 肽具有穿过哺乳动物细胞胞膜的能力, 并定位于胞质和胞核, 该过程表现为剂量、时间依赖关系。同时, 我们检测了由各肽诱导的 MART-1_{27-35}特异性 CTL 细胞毒效应, 结果显示: 18 肽在人PBMC 中诱导出了显著增强的MART-1_{27-35}特异性 CTL 活性。

由以上结论, 我们推测: 此 18 肽通过某种未知机制穿过PBMC 胞膜进入胞质, 在蛋白酶体或氨基肽酶作用下Tat$_{49-57}$序列被裂解掉, 余下的表位 MART-1_{27-35}与 TAP 结合并转运至内质网, 再与其中组装成熟的 HLA-A2 分子结合, 最终此复合体可能以较高的密度、稳定地呈递于细胞表面, 为 CTL 提供较强的第一活化信号。相反, 9 肽难以进入 PBMC 细胞内, 它们可能直接与不稳定表达于细胞表面的微量 MHC-Ⅰ类分子结合, 给 CTL 提供的第一活化信号也相对较弱。至于 18 肽是否通过经典的 MHC-Ⅰ类抗原提呈途径得以呈递, 其具体机制尚待进一步研究。

本研究表明穿膜序列 Tat$_{49-57}$的引入, 可克服传统多肽疫苗难以被细胞摄取与呈递的不足。

新近研究表明: 可通过优化穿膜序列, 增强其穿膜及抵抗蛋白水解酶的能力[8], 这无疑为穿膜肽更好地应用于多肽疫苗的研制打下了坚实基础。

参考文献:

[1] Fawell S, Seery J, Daikh Y, *et al*. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(2): 664－668.
[2] Becker-Hapak M, McAllister S S, Dowdy S F. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells[J]. Methods, 2001, 24(3): 247－256.
[3] Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, *et al*. Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(28): 26 204－26 210.
[4] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus[J]. J Biol Chem, 1997, 272(25): 16 010－16 017.
[5] Eisenbach L, Bar-Haim E, El-Shami K. Antitumor vaccination using peptide based vaccines[J]. Immunol Lett, 2000, 74(1): 27－34.
[6] Bona C A, Casares S, Brumeanu T D. Towards development of T-cell vaccines[J]. Immunol Today, 1998, 19(3): 126－133.
[7] Tam J P. Recent advances in multiple antigen peptides[J]. Immunol Methods, 1996, 196(1): 17－32.
[8] Ho A, Schwarze S R, Mermelstein S J, *et al*. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Res, 2001, 61(2): 474－477.

（编辑　王　红）

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