

# HLA-A2 限制性人食管癌相关抗原 COX-2 表位的鉴定和改造

祁峰,高艳锋,孙战强,胡红敏,陈鲤翔,祁元明

Identification and Optimization of HLA-A2 Restricted COX-2 Derived Antigen Peptides

QI Feng, GAO Yan-feng, SUN Zhan-qiang, HU Hong-min, CHEN Li-xiang, QI Yuan-ming

Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Corresponding Author: QI Yuan-ming, E-mail: qym@zzu.edu.cn

**Abstract: Objective** To identify the HLA-A2 restricted CTL epitopes of over-expressed COX-2 in esophageal carcinoma (EC). **Methods** Five novel HLA-A2 restricted peptides of COX-2-derived antigen were predicted by SYFPEITHI prediction method combined with MHCpred and NetChop3.0 Server. The candidate peptides were synthesized by standard Fmoc chemistry and their binding affinity and stability to HLA-A2 molecule were evaluated by flow cytometry. Otherwise the weak binding peptide P66 ( $FI < 0.5$ ) was optimized by substituting its phenylalanine with tyrosine, and the cytotoxic activities against the EC cells were determined by MTT assay. **Results** P321 showed higher affinity ( $FI = 1.93$ ) for HLA-A2 molecule compared to other candidate peptides and P66 Y1 exhibited remarkable affinity for HLA-A2 molecule ( $FI = 1.48$ ). Furthermore, these two peptides could bind stably with HLA-A2 molecule ( $DC_{50} > 2$ ). The MTT assay reflected that P321 and P66 Y1 could specifically lyse EC-1 and EC-9706 cells which expressed COX-2 compared to P66. **Conclusion** P321 and P66 Y1 derived from over-expressed COX-2 in esophageal carcinoma are potential epitopes which are capable of inducing HLA-A2-restricted CTLs and killing HLA-matched EC cells.

**Key words:** COX-2; Antigen peptide; HLA-A2; Epitope

**摘要:**目的 筛选和鉴定食管癌广泛高表达蛋白 COX-2 的 HLA-A2 限制性 CTL 表位。方法 运用生物信息学的方法,以 SYFPEITHI 法初步预测,结合 MHCpred 2.0 和 NetChop3.0 Server 在线分析,设计出五条新的抗原肽。通过标准 Fmoc 固相合成法合成抗原肽,以流式细胞仪对其与 HLA-A2 分子的结合力和稳定性进行分析,并对结合力较低的 P66 ( $FI < 0.5$ ) 的原始序列进行改造,将其序列第一位的苯丙氨酸替换成酪氨酸(P66 Y1),以 MTT 实验检测抗原肽诱导的特异性 CTL 对肿瘤细胞的杀伤作用。结果 P321 对 HLA-A2 分子有较高的结合力( $FI = 1.93$ ),同时 P66 Y1 与 HLA-A2 分子的结合力显著增强( $FI = 1.48$ ),并且它们与 HLA-A2 分子的稳定性较好( $DC_{50} > 2$  h)。P321 和 P66 Y1 对表达 COX-2 的 EC-9706、EC-1 的杀伤率分别明显高于 P66。结论 源于食管癌广泛高表达抗原 COX-2 的抗原肽 P321 和 P66 Y1 能分别有效激发 HLA-A2 限制性 CTL 的免疫应答并杀伤肿瘤细胞。

**关键词:** COX-2; 抗原肽; HLA-A2; 表位

中图分类号: R735.1; R730.51 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)07-0460-04

## 0 引言

肿瘤内源性抗原肽和 MHC 分子结合之后相互作用是诱导特异性 T 细胞免疫的重要分子基础。肿瘤内源性抗原首先被蛋白酶体加工成寡肽片段(一般为九肽),这些表位肽与 MHC 分子相结合形成稳定的肽/MHC 分子复合物,再由抗原呈递细胞

(APC)呈递给 T 淋巴细胞从而诱导出抗原特异性 CTL 行使肿瘤免疫的功能。所以抗原肽与 MHC 分子之间的亲和力是诱导免疫应答反应的关键因素<sup>[1]</sup>。T2 细胞是抗原转运相关蛋白(TAP)分子缺陷的细胞株,这种细胞不能呈递内源性的抗原,却可以俘获并呈递外源性的抗原肽。利用 T2 细胞株筛选 HLA- (人的 MHC 分子)限制性高亲和力的抗原肽已经成为快速而准确的实验方法,为筛选有效的针对特定靶蛋白的抗原肽提供了基础。环氧合酶-2(COX-2)是最近在食管癌细胞中发现有高表达的蛋白(鳞癌 91%、腺癌 78%)<sup>[2]</sup>,近年来有报道 COX-2 的过度表达与多种上皮性肿瘤发生发展关

收稿日期:2007-01-01;修回日期:2008-01-24

基金项目:河南省科技攻关资助项目(0624410024);河南省高校杰出科研人才创新工程资助项目(2007kycx002)

作者单位:450001 郑州大学生物工程系

通讯作者:祁元明, E-mail: qym@zzu.edu.cn

作者简介:祁峰(1980-),男,硕士,主要从事多肽生物化学和细胞生物学研究

系密切,并且发现许多抑制 COX-2 的药物能够对某些肿瘤具有预防和治疗作用<sup>[2]</sup>,但是以 COX-2 为靶点来筛选抗原肽却未见报道。本文以我们先前的生物信息学筛选方法和结果为基础<sup>[3]</sup>,运用生物信息学方法即 MHC 配体和多肽模式数据库 (SYFPEITHI) 初步预测,结合 MHC 分子结构表位预测算法 (MHCpred2.0) 和蛋白酶体裂解基序 (NetChop3.0 Server) 分析,筛选出与 HLA-A2 分子 (我国表达 HLA-A2 的人群达到 53 %<sup>[4]</sup>) 具有高亲和力和较强稳定性 COX-2 来源的抗原肽<sup>[5]</sup>,并且对与 HLA-A2 分子结合力较低的抗原肽,通过改变影响抗原肽与 HLA-A2 分子结合锚定位点的氨基酸,从而增强它们之间结合力<sup>[6]</sup>。本文中的抗原肽 P321 和经过氨基酸序列改造的抗原肽 P66 Y1 均尚未有报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Fmoc 保护氨基酸,苯并三氮唑-*N,N,N',N''*-四甲基脲六氟磷酸酯 (HB TU)、*N*-羟基苯并三氮唑 (HOBt)、三氟乙酸 (TFA), Wang 树脂,苯甲硫醚 (Thioanisole), 1,2-乙二硫醇,二氯甲烷;*N,N*-二甲基甲酰胺,哌啶 (纯度 99 %,其余试剂均为分析纯) 均购于上海吉尔生化有限公司。RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,鼠抗人 HLA-A2 单克隆抗体 (BB 7.2)、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠二抗及布雷菲德氏菌素 (Brefeldin A) 购自美国 Sigma 公司, $\alpha$  微球蛋白购自德国 Merck 公司,T2 细胞由第三军医大学吴玉章教授惠赠。SCL-10A VP 高效液相色谱仪购自日本 Shimadzu 公司,电喷雾质谱仪 (ESI-MS) 购自美国 Mariner 公司,Ultrospec3000 型分光光度仪购自美国 Pharmacia Biotech 公司,流式细胞仪购自美国 Beckson Dickson 公司。

### 1.2 COX-2 抗原肽 HLA-A2 限制性表位的预测

首先运用 MHC 配体和抗原表位肽数据库 (SYFPEITHI) 预测,将分值较高的抗原肽再基于结构的表位预测算法 (MHCpred2.0) 进行结构亲和性分析。把初选出的九肽通过蛋白酶体裂解基序 (NetChop3.0 Server) 酶切分析。

### 1.3 抗原肽的合成、纯化、分析及鉴定

采用标准固相 Fmoc 方案进行合成,经 RP-HPLC 纯化后,经分析其纯度大于 95 %。使用电喷雾质谱 (ESI-MS) 鉴定其分子量。

### 1.4 候选抗原肽与 HLA-A2 分子结合力试验

待测肽 (50  $\mu$ g/ml) 加入含  $\alpha$  微球蛋白 (0.1  $\mu$ g/

ml) 的无血清 RPMI1640 培养基中 37  $^{\circ}$ C 共孵育 18 ~ 24 h 后,冷 PBA (等渗磷酸盐缓冲液 + 0.1 % 牛血清白蛋白 + 0.01 % 叠氮钠) 洗涤 3 次,加 100  $\mu$ l 稀释度为 1:200 的一抗鼠抗人单克隆抗体 BB 7.2,4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。冷 PBA 洗涤 3 次后,加 50  $\mu$ l 稀释度为 1:50 的 FITC-羊抗鼠二抗溶液,4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,洗涤后于流式细胞仪检测,实验重复 3 次,PBS (等渗磷酸缓冲液) 作为阴性对照。结果用荧光系数 (FI) 表示:荧光系数 (FI) = (表位肽平均荧光强度 - 背景平均荧光强度) / 背景平均荧光强度 (当 FI  $\geq$  1.5 时,该候选肽与 HLA-A2 分子具有强结合力;当 1.0  $\leq$  FI < 1.5 时,该候选肽为中等结合力;当 0.5  $\leq$  FI < 1.0 时,该候选肽为低结合力;当 FI < 0.5 时为无结合力)。

### 1.5 候选抗原肽/HLA-A2 复合物稳定性分析

待测肽 (50  $\mu$ g/ml) 加入含  $\alpha$  微球蛋白 (0.1  $\mu$ g/ml) 的无血清 RPMI1640 培养基中 37  $^{\circ}$ C 共孵育 18 h 后,冷 PBA 洗涤 3 次,洗净未结合的肽。加入 10  $\mu$ g/ml 的 Brefeldin A 孵育 1 h,洗涤。37  $^{\circ}$ C,5 % CO<sub>2</sub> 孵育 0、2、4、6 h。然后,冷 PBA 洗涤 3 次,加一抗鼠抗人单克隆抗体 BB 7.2,4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,冷 PBA 洗涤 3 次后,加 FITC-羊抗鼠二抗溶液,4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,洗涤后于流式细胞仪检测,实验重复 3 次。结果以  $DC_{50}$  (即肽/HLA- 复合物的半衰期) 表示。若  $DC_{50} > 2$ ,则该候选肽与 HLA- 分子形成的复合物稳定性良好。

### 1.6 MTT 实验测定杀伤率

诱导成熟的 CTL 作为效应细胞,EC-1 和 EC-9706 食管癌细胞作为靶细胞,按效靶比 20:1 加入 96 孔板中,靶细胞每孔  $4 \times 10^3$  个,设单独靶细胞孔和单独 CTL 孔,每组 3 复孔,每孔 200  $\mu$ l,置 37  $^{\circ}$ C,5 % CO<sub>2</sub>,饱和湿度条件下培养 4 h,MTT 法检测各孔  $A_{570\text{nm}}$  值。按以下公式计算杀伤率。

杀伤率 = [1 - (试验孔 A 值 - 效应细胞孔 A 值) / 靶细胞孔 A 值]  $\times 100\%$

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理,每组实验重复 3 次,用 *t* 检验分析最终结果,以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 COX-2 来源的抗原肽 HLA-A2 限制性表位的预测

运用生物信息学的方法,SYFPEITHI 初步预测,结合 MHCpred2.0 和 NetChop 3.0 分析,设计出五个不同分值的九肽作为肿瘤相关抗原 COX-2 新的候选抗原肽,经 BLAST 分析后确定仅与目的

蛋白有同源性。

尽管抗原肽 P66 在 SYFPEITHI 预测的分值较高,但是在随后的结合力实验中发现其与 HLA-A2 之间的结合力很弱。由于抗原肽的第二位和第九位氨基酸是与 MHC 分子的锚定位点,往往改变锚定位点相邻的氨基酸(例如把第一位点的氨基酸替换成酪氨酸)可以增强其与 MHC 分子的结合力并且特异性不受影响<sup>[4]</sup>。我们将 P66 的第一位氨基酸由苯丙氨酸替换为酪氨酸,替换之后的 P66 类似物 P66 Y1 的 SYFPEITHI、MHCpred2.0 和 NetChop3.0 预测的分值均有所改善,见表 1。

表 1 COX2 来源的候选抗原肽的筛选

Tab 1 Prediction of the candidate peptides derived from COX2

Candidate Peptide	Sequence	SYFPEITHI HLA-A *0201	MHCpred I <sub>C50</sub> (nM) HLA-A *0201	NetChop3.0 Server
P66	FLKPTPNTV	25	160.69	0.94
P66 Y1	YLKPTPNTV	26	103.75	0.98
P93	FLRNAIMSY	17	44.77	0.96
P319	RLILIGETI	22	490.91	0.79
P321	ILIGETIKI	28	130.02	0.64
P486	AVELYPALL	18	1183.04	0.80

:P66 经过第一位氨基酸被酪氨酸替换后的序列

### 2.2 标准 Fmoc 固相合成法合成候选肽

经过标准 Fmoc 固相合成法合成的六条候选肽经过质谱分析,分子量与理论值相符合。

### 2.3 候选抗原肽与 HLA-A2 分子结合力实验结果

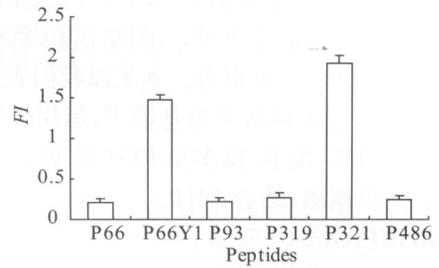
在所有经过生物信息学方法初步筛选出来的候选肽中,P321 表现出了与 HLA-A2 分子较高的亲和力。经过氨基酸改造后的 P66 Y1 与 P66 相比,与 HLA-A2 分子的结合力有显著性提高。P66 Y1 和 P321 两者的荧光系数(FI)分别为 1.48 和 1.93,即 P66 Y1 与 HLA-A2 分子具有中等结合力,而 P321 与 HLA-A2 分子具有强结合力,见图 1。

### 2.4 抗原肽/HLA-A2 复合物稳定性分析结果

将与 HLA-A2 分子具有中等结合力的 P66 Y1 和强结合力的 P321 进行候选肽/HLA-A2 复合物稳定性实验。结果显示,P321 和 P66 Y1 的平均荧光强度(MFI)随着时间的延长(0、2、4、6 h 不同的时间点)依次减弱,见图 2。两个候选肽的 DC<sub>50</sub>(即肽/HLA-复合物的半衰期)均 > 2。

### 2.5 细胞毒试验结果

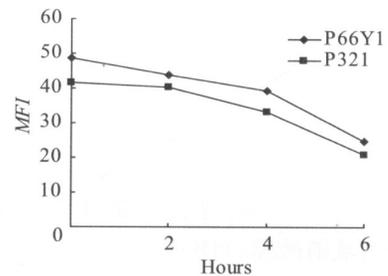
MTT 的结果显示对于表达 COX-2 的食管癌细胞株 EC-1 和 EC-9706, P321 和 P66 与阴性对照(Nopeptide)相比有明显的杀伤活性(P < 0.05)。



The fluorescence index (FI) was calculated using the following formula:  $FI = [\text{mean fluorescence intensity (MFI) sample} - \text{MFI background}] / \text{MFI background}$ , where MFI background represents the value without peptide.

图 1 候选肽与 HLA-A2 分子的亲和力

Fig 1 The affinity of the candidate peptides with HLA-A2 molecules



DC<sub>50</sub> was defined as half-life of the peptide/HLA-A2 complexes

图 2 P321 和 P66Y1 与 HLA-A2 分子的稳定性实验

Fig 2 The stability of the P321/HLA-A2 and the P66Y1/HLA-A2 complexes

而 P66 对 EC-1 和 EC-9706 均无杀伤活性(P > 0.05),见表 2。

表 2 COX2 来源抗原肽诱导 CTL

杀伤肿瘤的平均杀伤率(% ,  $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Tab 2 The cytotoxicity of the CTLs induced by these peptides derived from COX2 (% ,  $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

peptides	EC-1	EC-9706
P66	41.31 ± 4.83	47.04 ± 3.25
P66 Y1	61.27 ± 2.19 *	58.37 ± 5.20 *
P321	75.30 ± 5.10 **	62.50 ± 4.85 *
No peptide	42.84 ± 8.09	41.06 ± 5.64

\*: P < 0.05; \*\*: P < 0.01; 均采用单因素方差分析

### 3 讨论

在体内 MHC 分子和被呈递的抗原肽之间的结合是肿瘤免疫反应的首要步骤,对肿瘤抗原的高亲和力被证明是在体内产生抗肿瘤免疫反应的重要因素<sup>[7]</sup>。1991 年比利时科学家 Boon 等<sup>[8]</sup>采用功能基因组研究策略首次成功分离人黑色素瘤抗原 MAGE 家族,随后一系列的肿瘤特异性抗原被分离鉴定如 BAGE(癌睾丸抗原家族)、hTERT(端粒酶抗原家族)、CEA(癌胚抗原)等。目前已被鉴定的肿瘤抗原

可分为肿瘤睾丸抗原、肿瘤分化抗原、病毒相关抗原、突变抗原及过表达抗原<sup>[9]</sup>。Minev 等针对癌-睾丸抗原家族蛋白和端粒酶抗原家族蛋白的肿瘤免疫治疗已经取得了初步进展<sup>[10,11]</sup>，但是由于受到免疫逃避及自身免疫反应等问题在向肿瘤疫苗转化的过程中遇到困难。COX-2 属于肿瘤过表达抗原家族，它的高度组织特异性表达与肿瘤的发生和侵袭有着密切关系<sup>[12]</sup>。因此以过表达抗原为肿瘤免疫的靶位点进行 CTL 表位筛选，将有助于推进新型肿瘤疫苗的探索和多价肿瘤疫苗的优化策略。

我们运用 SYFPEITHI 初步预测，结合 MHC-Pred2.0 和 NetChop3.0 Server 分析，缩小了所需验证抗原肽的范围，根据结果初步筛选出了分值较高的五个 COX-2 来源的 HLA-A2 限制性肿瘤相关抗原肽。通过体外 T2 细胞与抗原肽结合实验和结合稳定性实验，这些初筛出的肽在体外与 HLA-A2 分子的结合显示出较大差别，大部分初筛出的肽与 HLA-A2 分子的结合力很弱，只有 P321 表现出与 HLA-A2 分子具有较强结合力 ( $FI = 1.93$ )。但是如果改变影响抗原肽和 MHC 分子结合锚定位点部位的氨基酸序列，则可以大大增强两者的结合力。将初筛出的与 HLA-A2 分子结合力很弱的 P66 ( $FI < 0.5$ ) 的第一位氨基酸换成酪氨酸 (P66 Y1)，则 P66 Y1 与 HLA-A2 分子的结合力显著增强 ( $FI = 1.48$ )。稳定性实验显示 P66 Y1/ HLA-A2 和 P321/ HLA-A2 复合物的稳定性较好 ( $DC_{50} > 2$ )。这两个可与 HLA-A2 分子形成稳定复合物的抗原肽为构建以肿瘤抗原 COX-2 为基础的肿瘤疫苗提供了新的表位。

参考文献：

[1] Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, et al. A listing of human

tumor antigens recognized by T cells [J]. Cancer Immunol Immunother, 2001, 50 (1) :3-15.

[2] Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer [J]. Lancet Oncol, 2001, 2 (9) :544-551.

[3] 孙战强, 李永欣, 姜慧萍, 等. 食管癌高表达抗原 HLA-A2/ A3 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞表位预测 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34 (6) :412-415.

[4] 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) :2453-2456.

[5] 李艳秋, 吴玉章, 贾正才, 等. 肿瘤抗原 MA GE-12 的表位及二级结构预测 [J]. 免疫学杂志, 2001, 17 (4) :268-270.

[6] Tourdot S, Scardino A, Saloustrou E, et al. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes [J]. Eur J Immunol, 2000, 30 (12) :3411-3421.

[7] Santegoets S J, Schreurs M W, Masterson A J, et al. In vitro priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells derived from the human MUTZ-3 cell line [J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55 (12) :1480-1490.

[8] Kunth A, Wolfel T, Boon T, et al. Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86 (8) :2804-2808.

[9] Rosenberg A. Progress in human tumor immunology and immunotherapy [J]. Nature, 2001, 411 (6835) :380-384.

[10] Graff-Dubois S, Faure O, Gross DA, et al. Generation of CTL recognizing an HLA-A \* 0201-restricted epitope shared by MA GE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: Implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy [J]. J Immunol, 2002, 169 (1) :575-580.

[11] Minev B, Hipp J, Firat H, et al. Cytotoxic T-cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (9) :4796-4801.

[12] Miyashita M, Makino H, Katsuta M, et al. Cyclo-oxygenase-2 over-expression is associated with human esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Nippon Sch, 2006, 73 (6) :308-313.

[编辑校对:刘红武]

