

[文章编号] 1007-385X(2003)04-0257-03

OVA66 抗原肽与 HLA-A2 分子结合性和结合稳定性的研究

王 颖, 尤 强, 张惠珍, 王树军, 陈玲琳, 周光炎, 葛海良(上海市免疫学研究所 上海第二医科大学, 上海 200025)

[摘 要] **目的:** 建立利用 T2 细胞体外筛选肿瘤相关抗原 OVA66 中 HLA-A2 限制性抗原肽表位的实验方法。**方法:** 应用计算机预测获得 OVA66 抗原中多个不同分值的九肽分子, 在不同浓度(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 下与 T2 细胞共同孵育 4 h, 并分别在其后的 0, 2, 4 h 测定 T2 细胞表面 HLA-A2 分子的平均表达强度, 抗原肽与 HLA-A2 的亲合力以 20% MFI_{max} 时的抗原肽作用浓度表示; 抗原肽与 HLA-A2 分子结合稳定性以 $\text{MFI}(4\text{ h})/\text{MFI}(0\text{ h})$ 的百分比表示。**结果:** 经计算机预测所获得的分值不同的 4 种候选 OVA66 抗原肽表位与 T2 细胞表面 HLA-A * 0201 的结合能力和结合稳定性显示出差别, 并且与预测的分值不尽符合, 其中 L235 和 L238 与 HLA-A * 0201 的结合力优于 L236 和 L237。**结论:** 利用 T2 细胞可以在体外初步筛选获得与 HLA-A * 0201 具有高亲和力的抗原肽。

[关键词] OVA66 抗原肽表位; HLA-A2 结合能力; 结合稳定性

[中图分类号] R392.1; R730.5 [文献标识码] A

The Binding Ability and Binding Stability between OVA66 Peptides and HLA-A * 0201 Molecule

WANG Ying, YOU Qiang, ZHANG Hui-zhen, WANG Shu-jun, CHEN Lin-lin, ZHOU Guang-yan, GE Hai-liang(Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200025)

[Abstracts] **Objective:** To establish the methods for screening the HLA-A2-restricted peptides on T2-dependent cell model. **Methods:** The binding ability and binding stability of peptides to HLA-A2 molecule was determined by measuring peptide-induced expression of HLA-A2 molecules on TAP-deficient cell line-T2 cells. Briefly, T2 cells were incubated with OVA66 candidate peptides at different concentration(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and different time. After incubation, expression of HLA-A2 molecules on T2 cells was detected by flow cytometry with murine mAb BB7.2 against human HLA-A2 molecule. The binding ability of peptides was calculated with peptide concentration of 20% MFI_{max} , while the binding stability of peptides was calculated with percentage of $\text{MFI}(4\text{ h})/\text{MFI}(0\text{ h})$. **Results:** Four OVA66 candidate peptides were assayed with this method. Compared with reference peptide, two peptides (L235 and L238) displayed strong binding ability and good stability, while other two peptides (L236 and L237) exhibited low affinity to HLA-A2 molecules on T2 cells. **Conclusion:** With T2-dependent cell model, we could test the binding ability and binding stability of peptides before inducing peptide-specific T cell lines *in vitro*.

[Key words] OVA66 peptide; HLA binding ability; stability

* MHC 分子和被递呈的抗原肽之间的相互作用是诱导特异性细胞免疫的重要基础。有实验表明, 低亲和力的抗原肽以诱导免疫耐受为主, 而高亲和力的抗原肽以诱导免疫应答为主^[1], 所以抗原肽与 MHC 分子之间亲和力的大小往往决定诱导免疫应答的性质。目前, 对于一个新发现的肿瘤抗原, 利用计算机软件虽然可以得到被特定 MHC 结合的抗原肽, 但其与 MHC 分

子的亲和力仍需通过实验加以验证。经典的实验方法

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(39970824), 上海市高教局青年科学基金项目(03BQ37)

[作者简介] 王 颖(1969-), 女, 上海人, 博士生, 主要从事肿瘤免疫和免疫调节研究

[通讯作者] 葛海良

是直接诱导 T 细胞免疫反应从而确定抗原肽的性质,但所需花费的时间较长,技术要求较高。T2 细胞是 HLA-A * 0201 阳性, TAP 分子缺陷的细胞株,这个细胞不能加工内源性的抗原,但是可以递呈外源性的抗原肽;在无抗原肽存在的情况下,其细胞表面 HLA-A2 分子的表达处于低水平,一旦有合适的外源性抗原肽与 T2 细胞表面的 HLA-A2 分子结合,其细胞表面 HLA-A2 的表达强度将大大提高。所以利用 T2 细胞筛选 HLA-A2 高亲和力的抗原肽可以成为快速而有效的实验模型。

OVA66 抗原是我们通过血清学方法从卵巢癌细胞 cDNA 文库中筛选得到的一个肿瘤特异性抗原,其与先前获得的 CML 抗原具有高度同源性^[2],在肿瘤的临床诊断和设计抗原肽疫苗用于肿瘤的治疗上具有很好的前景。本实验拟以 OVA66 抗原为研究对象,建立以 T2 细胞为细胞模型的 HLA-A2 限制性抗原肽筛选方法,获得与 HLA-A2 分子具有高结合能力和较好稳定性的 OVA66 抗原肽,为体外建立 OVA66 抗原肽特异性的 T 细胞系提供必要的实验准备。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

OVA66 抗原肽 L235, L236, L237 和 L238, HIV pol476(L239)^[3]由美国 Chiron 公司合成;T2 细胞由美国 Stanford 大学引进;抗 HLA-A2 单抗 BB7.2 由美国 UCSF 惠赠;FITC-羊抗鼠 IgG 二抗购自 Sigma 公司。

1.2 OVA66 抗原肽的预测

采用抗原肽预测软件分析获得,网站地址为 <http://bimas.dcert.nih.gov/molbio/hla-bind>。

1.3 OVA66 候选抗原肽与 HLA-A * 0201 结合试验

以 T2 细胞 + β_2 微球蛋白(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)为阴性对照,将 T2 细胞和不同浓度(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的抗原肽共同孵育 4 h 后,采用间接免疫荧光法和流式细胞仪测定 T2 细胞表面 HLA-A2 分子的平均表达强度(以 f 值表示),以 20% MFI_{max} 时的 OVA66 抗原肽浓度表示抗原肽与 HLA-A2 分子的结合能力。

1.4 OVA66 抗原肽与 HLA-A * 0201 结合稳定性试验

选择最适抗原肽浓度,将 T2 细胞和抗原肽共同孵育 4 h,分别在其后的 0, 2, 4 h 测定 T2 细胞表面 HLA-A2 分子的平均表达强度,以 MFI(4 h)/MFI(0 h) 的百分比表示抗原肽与 HLA-A2 结合的稳定性。

2 结 果

2.1 OVA66 抗原肽表位的计算机软件预测

我们以从卵巢癌文库中筛选得到的肿瘤候选抗原 OVA66 为研究对象,采用抗原肽预测软件(<http://bimas.dcert.nih.gov/molbio/hla-bind>)搜索得到多个与 HLA-A2 相匹配的抗原肽,选择其中不同分值且具有与多种 HLA 分子结合能力的抗原肽,体外合成抗原肽。

表 1 计算机软件预测获得的 OVA66 抗原肽表位

Tab. 1 Characteristic of OVA66-derived candidate epitopes

Peptide	Sequence	Position in OVA66	Score
L235	FLPDHINIV	306-314	1236.9
L236	VLTTKNLFL	568-576	199.7
L237	ALCECLRRV	509-517	131.2
L238	AIAERLMHL	378-386	27.6
L239*	IVGAETFYV		330.1

* :L239 as positive control

2.2 OVA66 抗原肽与 HLA-A * 0201 结合性实验

(图 1)显示 T2 细胞经过与抗原肽孵育后,其细胞表面 HLA-A2 分子表达的密度明显上升。抗原肽结合实验结果表明 20% MFI_{max} 时的抗原肽浓度由高至低分别为 L238 L239, L235, L237 和 L236;分别约为 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 浓度越高,表明其与 HLA-A2 * 0201 分子结合的抗原肽越多,由此表明,对于计算机预测得到的 4 个 OVA66 来源的抗原肽,与对照抗原肽相比, L238 和 L235 与 HLA-A2 * 0201 分子的结合能力高于 L237 和 L236。

图 1 FACS 检测 T2 细胞表面 HLA-A2 分子的表达

Fig. 1 HLA-A2 expression on T2 cell surface with or without peptide

2.3 OVA66 抗原肽与 HLA-A * 0201 结合稳定性试验

抗原肽结合稳定性实验结果表明(图 3),上述 4 种抗原肽在 4 h 时的 MFI 与 0 时的 MFI 比值由高至低依次为 L238 27.73%, L235 21.13%, L239 20.64%,

L236 15.18% 和 L237 3.91%, 说明随着时间的延长, 抗原肽与 T2 细胞表面 HLA-A2 分子的结合量逐渐减少, 但是不同的抗原肽与 HLA-A2 分子的结合稳定性不尽相同, 与对照抗原肽相比, L238 和 L235 与 HLA-A2 的结合稳定性优于对照抗原肽, 而 L236 和 L237 则低于对照抗原肽。

图2 OVA66 抗原肽与 HLA-A2 * 0201 结合性实验结果

Fig.2 HLA-A * 0201 binding ability
of OVA66-derived peptides

图3 OVA66 抗原肽与 HLA-A * 0201
结合稳定性实验结果

Fig.3 HLA-A * 0201 binding stability
of OVA66-derived peptides

3 讨论

特异性肽疫苗的设计和制备是目前肿瘤和自身免疫性疾病治疗中很有前途的手段之一^[3]。通过分子生物学和细胞生物学的方法已经可以获得多个肿瘤或自身免疫性疾病的候选抗原, 再利用计算机软件预测蛋

白质抗原中与 HLA 分子结合的抗原肽^[4]。但其是否真正具有免疫原性, 仍需通过诱导特异性的 CD8⁺ 或 CD4⁺ T 细胞来确认^[5]。诱导特异性 CD8⁺ 或 CD4⁺ T 细胞所需花费的时间长和技术要求高, 而且在一个完整的抗原分子中往往含有多个可与一种 HLA 分子结合的抗原肽, 这又会增加更多的经费和精力的要求。如果能在体外建立一种有效的初步筛选的方法, 将大大减少寻找特异性抗原肽所需花费的时间和精力。

本研究旨在建立体外测定抗原肽与相应 HLA 分子的结合能力的方法, 对计算机预测所获得的抗原肽进行初筛。我们选择并合成了 4 个不同分值的抗原肽, 通过抗原肽结合试验表明, 以抗原肽预测软件为基础预测得到的 OVA66 抗原肽, 经过抗原肽结合实验和抗原肽结合稳定性实验测定, 其在体外与 HLA 分子的结合呈现出很大的差异, 其中 L235 和 L238 具有与 HLA-A * 0201 分子较好的亲和力, 可以作为诱导抗原肽特异性的 T 细胞的首选抗原肽。

经过初步的筛选后, 缩小了所需验证抗原肽的范围。当然体外抗原肽结合实验和结合稳定性实验结果并不能真正代表抗原肽的免疫原性, 最终需通过诱导特异性 CD8⁺ 或 CD4⁺ T 细胞发挥其作用^[6]。

[参考文献]

- [1] Sjoerd H, van der Burg, Marjan JW, *et al.* Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability[J]. *J Immunol*, 1996, 156: 3308-3314.
- [2] Yang XF, Wu CJ, McLaughlin S, *et al.* CML66, a broadly immunogenic tumor antigen, elicits a humoral immune response associated with remission of chronic myelogenous leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98 (13): 7492-7497.
- [3] Peter K, Men Y, Pantaleo G, *et al.* Induction of a cytotoxic T-cell response to HIV-1 proteins with short synthetic peptides and human compatible adjuvants[J]. *Vaccine*, 2001, 19(30): 4121-4129.
- [4] Parmiani G, Gastelli C, Dalerba P, *et al.* Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94 (11): 805-818.
- [5] Wolfel T, Schneider J, Meyer KH, *et al.* Isolation of naturally processed peptides recognized by cytolytic T lymphocytes on human melanoma cells in association with HLA-A2.1[J]. *Int Cancer*, 1994, 57: 413-417.
- [6] van der Bruggen, Traverdardi PC, Chomez P, *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. *Science*, 1991, 254: 1643-1645.

[收稿日期] 2003-04-15

[修回日期] 2003-07-20