

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0157-04

## EBV-LMP2 多肽激活的特异性 CTL 抑制同 HLA-I 亚型的鼻咽癌移植瘤形成

杜海军, 周玲, 左建民, 付华, 王琦, 李红霞, 曾毅 (中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052)

[摘要] **目的:** 研究异体的 EBV-LMP2 表位多肽所激活的特异性 CTL 对具有相同 HLA-I 类分子亚型鼻咽癌细胞 (CNE2) 移植瘤的抑制作用, 探讨异体间的免疫治疗。**方法:** 先将 CNE2 细胞接种于 Scid 鼠背部皮下建立移植瘤模型; 然后通过 SSP-PCR 确定 CNE2 的 HLA-I 类分子亚型, 并选取与 CNE2 有相同 HLA-I 类分子亚型的外周血淋巴细胞; 实验再将 3 组不同细胞分别接种于 Scid 鼠背部皮下, (1) 对照组: 仅接种 CNE2 细胞; (2) T 细胞组: 接种未激活的淋巴细胞与 CNE2 混合细胞。(3) CTL 组接种经 EBV-LMP2 多肽激活的特异性 CTL 与 CNE2 混合细胞。观察 EBV-LMP2 多肽激活的 CTL 对 CNE2 移植瘤生长的影响。**结果:** CNE2 于一周左右在 Scid 鼠背部形成肿块, 病理学鉴定为低分化上皮癌; SSP-PCR 显示 CNE2 含有 HLA-A11 基因位点; 含有相同基因位点的 DC 负载 LMP2-A11 多肽所激活的 CTL, 明显抑制 CNE2 移植瘤生长。**结论:** EBV-LMP2 多肽所激活的特异性 CTL 抑制 HLA 亚型相同的 CNE2 移植瘤的形成。

[关键词] 移植瘤; EBV-LMP2 表位多肽; HLA-I 类分子亚型

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

## Inhibition of Transplantable Tumor of Nasopharyngeal Carcinoma Cells Line by Specific LMP2-CTLs

DU Hai-jun, ZHOU Ling, ZUO Jian-min, FU Hua, WANG Qi, LI Hong-xia, ZENG Yi (Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate inhibitory effect of specific cytotoxicity lymphocytes (CTLs) pulsed by EBV-LMP2-peptide epitopes on transplantable tumor of nasopharyngeal carcinoma cell (NPC) line-CNE2 with identical HLA-I molecule subtypes, and explore the possibility of immunotherapy among individuals. **Methods:** Transplantation tumor was established through subcutaneous injection of CNE2 cells in Scid mice. HLA-I subtypes in CNE2 cells were identified by specific site primer polymerase chain reaction (SSP-PCR). Matched HLA HLA-I molecule subtypes with CNE2 were screened among normal volunteers. Specific CTLs stimulated by EBV-LMP2-peptide epitopes were collected for the next steps. Three groups were divided. (1) CTL group: CNE2 cells with specific CTLs stimulated by EBV-LMP2-peptide epitopes were injected into mice subcutaneousness. (2) T group: CNE2 cells with t lymphocytes were injected. (3) The control group, CNE2 cells were injected only. The results were observed in a few weeks later. **Results:** Transplantable tumors were observed after CNE2 having been injected into scids mice. HLA-A11 in CNE2 cells was detected by SSP-PCR. Comparing the results from the three groups, we found specific CTLs stimulated by A11-LMP2-peptide epitopes distinctly retarded the growth of CNE2 transplantable tumor. **Conclusion:** Specific-LMP2 CTLs with HLA-A11 molecule subtype effectively inhibit the development of transplantable tumor of CNE2 cells with identical HLA-I molecule subtype of three different groups were injected.

[Key words] transplantable tumor; EBV-LMP2 peptides epitopes; HLA-I molecule subtypes

\* 鼻咽癌是我国南方常见恶性肿瘤, 几乎 100% 鼻咽癌患者有 EB 病毒感染。在临床治疗上通常采用放疗及药物等手段。但晚期患者易复发、转移, 治疗又极大地影响自身免疫系统。免疫治疗正成为医学肿瘤学研究关注的焦点。免疫治疗是通过肿瘤抗原激活细胞毒

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (基金编号为 3020520), 国家“973”资助项目 (G1998051201), 国家“863”资助项目 (2001AA217091)

[作者简介] 杜海军 (1970-), 男, 河北唐山人, 助理研究员, 硕士, 从事 EB 病毒致癌机理及免疫治疗的研究

[通讯作者] 周玲, E-mail: Zhouling@doctor.com.cn

性 T 淋巴细胞,杀伤肿瘤细胞。对肿瘤细胞的杀伤的杀伤活性与 HLA 间的免疫识别密切相关<sup>[1]</sup>。在肿瘤自体免疫治疗方面已有一些成功报道<sup>[2-5]</sup>。在 EB 病毒相关的淋巴瘤免疫治疗上也取得了一定疗效<sup>[6-8]</sup>,而在鼻咽癌的方面,则尚在起步阶段。鉴此,本实验以 PCR-SSP 方法鉴定 HLA- I 类分子亚型,探讨 LMP2 表位多肽刺激特异性细胞毒性 T 淋巴细胞,对含相同 HLA- I 类分子亚型的鼻咽癌细胞 CNE2 的生长抑制作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料来源

CNE2 为低分化鼻咽癌细胞株由本室建立保存;PCR-SSP 引物由赛百胜生物公司合成;EBV-LMP2 CTL 表位多肽<sup>[8]</sup>由美联生物科技公司合成(纯度 >95%)。其多肽序列为 A201: LLWTLVLL, A203: LLLSAW-ILTA, A206: LTAGFLIFL, A11: SSCSSCPLSKI, A24: TYGPFVFMCL, B40: IEDPPFNSL;淋巴细胞分离液购于 Pharmacia 公司;IL-4, GS-CSF 购于 Sigma 公司;Hyclone 精制胎牛血清购于同正生物工程公司;细胞培养所需液由本所配液室提供;Scid 鼠购于中国医学科学院实验动物中心。

### 1.2 鼻咽癌移植瘤模型的建立

选取体重 15 ~ 20 g 的 6 周龄 Scid 鼠 12 只,分 3 组,每组 4 只,雌雄各半;将 CNE2 细胞分别以  $10^5$  个/只、 $10^6$  个/只、 $10^7$  个/只接种 3 组 Scid 鼠背部皮下,观察 Scid 鼠背部形成肿瘤时间;接种 2 周后断脊法处死 Scid 鼠,取出瘤组织中性甲醛固定后,病理染色鉴定瘤组织类型。选取最佳细胞浓度用于以下实验。

### 1.3 HLA- I 类分子亚型的鉴定

根据我国人种中 HLA- I 类分子亚型统计<sup>[9]</sup>合成 HLA-A2, A11, A24, A66, HLA-B40, B47 亚型引物。酚氯仿法抽提 CNE2 细胞及志愿者外周血液 DNA,通过 PCR-SSP 及琼脂糖凝胶电泳方法鉴定并筛选与 CNE-2 相同的志愿者 HLA- I 类分子基因亚型。PCR-SSP 条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30 cycles; 72℃ 5 min。

### 1.4 淋巴细胞的分离与培养

取人外周血以 Ficoll-paque™ 液分离淋巴细胞,于细胞培养箱内 37℃ 孵育 2 h 后,以无血清 RPMI-1640 洗去非黏附细胞;以含 IL-4(25 ng)、GM-CSF(50 ng)和 1% 自身血清的 RPMI-1640 完全培养基诱导培养 DC。以含 IL-2(20 U)和 1% 自身血清的 RPMI-1640 完全培养基诱导培养 T 细胞。诱导培养 1 周后,向 DC 培养液中加入 LMP2-A11 多肽片段 10 ng, TNF- $\alpha$  10 ng/ml,共

同孵育 48 h 后,收集细胞计数,待实验使用。

### 1.5 效应细胞的制备

将 1.3 培养 DC 和 T 细胞按 1:10 的比例混合培养 5 d,隔日半量换液,收集混合培养细胞,待实验使用。

### 1.6 多肽介导的肿瘤细胞的免疫治疗

按 1.3 所述方法将 CNE2 组、CNE2<sup>+</sup> T 细胞组、CNE2<sup>+</sup> CTL 组接种 Scid 鼠,CNE2 接种量为  $10^6$  个/只,T 和 CTL 细胞量为  $10^7$  /只,1 周以后观察各组成瘤情况,并从成瘤日起每周测量各组瘤体大小,于第 5 周后处死 Scid 鼠,取出肿瘤组织称重,比较各组肿瘤体积及重量差异。

## 2 结 果

### 2.1 CNE2 细胞在 Scid 鼠中成瘤

图 1 移植瘤细胞的病理学鉴定结果

Fig.1 Identification of transplantable cells with cell pathological method

在实验中我们发现以  $10^6$  /只、 $10^7$  /只 CNE2 细胞接种的 Scid 鼠分别在 7 ~ 10 d、5 ~ 7 d 在背部形成瘤肿块,而以  $10^5$  /只接种的 Scid 鼠,至第 2 周处死前未观察到瘤组织块产生。成瘤组织经 HE 病理切片鉴定发现多个核仁,核分裂相较多,细胞间界限不清,为人上皮来源的低分化癌(见图 1);说明 CNE2 细胞在 Scid 鼠中形成移植瘤,可作为肿瘤模型用于本试验。

### 2.2 HLA- I 类分子亚型

PCR-SSP 及琼脂糖凝胶电泳结果显示 CNE2 细胞中存在 HLA- I 类分子 A11 基因位点,通过对 10 个志愿者的血液 DNA HLA- I 类分子亚型的筛查,发现有一例含有 A11 基因位点(见图 2)。

### 2.3 LMP2 多肽激活 CTLs 细胞抑制 CNE2 移植瘤的生长

实验结果表明:DC 负载 LMP2A11 多肽结合表位所激活的 CTLs 细胞能够有效抑制肿瘤细胞的生长,CNE2 组、CNE2<sup>+</sup> 非 CTL 组均在 7 ~ 10 d 形成肿瘤,而 CNE2 + CTL 组的 4 只 Scid 鼠中只有一只 10 d 形成肿瘤,且肿瘤增长速度(体积和重量)远小于其余 2 组

(见图3)。

图2 PCR-SSP 鉴定 HLA-I 类  
分子亚型琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 Illustration of PCR-SSP by agarose gel electrophoresis

- 1: DL-2000 marker; 2: Positive control in CNE2;  
3. A11 site in CNE2; 4: Positive control in volunteer;  
5: A11 site in volunteer

图3 CNE2 移植瘤的生长结果比较

Fig.3 The inhibitory effect of specific-LMP2 CTLs  
on transplantable tumor of CNE cells

A: The growth curve of transplantable tumor of CNE2 cells  
in volume; B: The comparison of transplantable tumor of  
CNE2 between groups in weight

### 3 讨论

EBV-LMP2 是鼻咽癌细胞中所表达的蛋白,在体内可引起细胞免疫反应。以 EBV-LMP2 多肽进行自体肿瘤治疗,已有成功报道, Lin 等<sup>[10]</sup>以 LMP2 的限制性表位多肽负载鼻咽癌患者的树突状细胞后回输体内,在 16 名病人中,9 名出现针对的 LMP2 多肽较强的 CTLs 活性,且有两人在 3 个月后肿瘤体积减小。而 LMP2 多肽进行异体鼻咽癌治疗方面,尚未见文献报道。本实验选用 LMP2 作为肿瘤特异性抗原体外诱导增强其特异性 CTLs 免疫。我们曾对 LMP2 混合多肽诱导特异性 CTLs 对鼻咽癌细胞的作用进行研究,对我国汉族人群 HLA-I 类分子 A、B 位点亚型统计发现, A2, A11, A24, B40 所占比例分别为 14.79%, 32.77%, 25.84%, 12.94%<sup>[11]</sup>, 4 种亚型总和为 86.34%, 因而,我们选用 LMP2 混合多肽诱导特异性 CTLs 研究体外对 CNE2 的杀伤作用。结果表明以 40:1 的效靶比作用于 CNE2 细胞时,具有明显的杀伤作用。鉴于 HLA-I 类分子亚型影响效应细胞对靶细胞的杀伤效果<sup>[6]</sup>,我们推测分离的淋巴细胞个体与 CNE2 可能存在相同 HLA-I 类分子亚型。一些肿瘤患者体内的 DC 又发生功能缺陷<sup>[7]</sup>。在此基础上,我们采用 PCR-SSP 方法筛选尝试异体同型间的免疫治疗。我们的实验结果表明这种异体间 DC 激活的 T 细胞明显具有抑制肿瘤细胞生长,为我们进一步的临床研究提供良好的实验基础,从实验结果来看 CNE2 组、CNE2<sup>+</sup>非 CTL 组在第 2 周生长较快,第 5 周生长相对减缓,推测可能是营养衰竭导致瘤体内部组织坏死所致。在 CNE2<sup>+</sup>CTL 组中成瘤率仅为 25%,且瘤体体积远小于 CNE2 组、CNE2<sup>+</sup>非 CTL 组。我们实验发现 CNE2<sup>+</sup>非 CTL 组的成瘤体积大于 CNE2 组可能是非特异 T 细胞刺激了 CNE2 细胞的生长,或抑制了 Scid 鼠体内 NK、LAK 细胞活性。本试验只检测到 A11 多肽结合表位,是否还存在其他相同亚型位点有待进一步研究。在鼻咽癌细胞中除表达 LMP2 基因,还表达 LMP1, EBER, EBNA 和 BARF0 基因,以 EBNA 与 LMP2 嵌合基因感染树突状细胞可引起 CD4(+)和 CD8(+)T 细胞的双重应答<sup>[12]</sup>,其对鼻咽癌细胞的杀伤活性有待进一步探索。

### [参考文献]

- [1] Memichael AJ, Ting A, Zweerink HJ, *et al.* Restriction of cell mediated lysis of influenza virus-infected human cells[J]. Nature, 1977, 270(5637): 524-526.

[ 2 ] Caruso DA, Orme LM, Neale AM, *et al.* Results of a phase 1 study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer[ J ]. *Neuro-oncol*, 2004, 6( 3 ): 236-246.

[ 3 ] Lee JJ, Kook H, Park MS, *et al.* Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysates for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation[ J ]. *J Clin Apheresis*, 2004, 19( 2 ): 66-70.

[ 4 ] 汪晓莺, 梁志强, 张一心, 等. 肿瘤抗原负载的树突状细胞对肝癌肿瘤浸润淋巴细胞体外抗癌作用的影响[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10( 3 ): 170-174.

[ 5 ] 李东复, 杨春荣, 申吉子, 等. 肝癌细胞抗原负载树突状细胞激活 CTL 的抗肿瘤作用[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10( 2 ): 137-138.

[ 6 ] Straahof KC, Bollard CM, Heslop HE. Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers in children[ J ]. *Oncologist*, 2003, 8( 1 ): 83-98.

[ 7 ] Savoldo B, Huls MH, Liu Z, *et al.* Autologous Epstein-Barr virus ( EBV )-specific cytotoxic T cells for the treatment of persistent active EBV infection[ J ]. *Blood*, 2002, 100( 12 ): 4059-4066.

[ 8 ] Rooney CM, Aguilar LK, Huls MH, *et al.* Adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies with EBV-specific cytotoxic T-cell lines[ J ]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 258: 221-229.

[ 9 ] Steven PL, Rosemary JT, Wendy AT, *et al.* Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2: A potential target for CTL-based tumor therapy[ J ]. *J Immunol*, 1997, 158: 3325-3334.

[ 10 ] Lin CL, Lo WF, Lee TH, *et al.* Immunization with Epstein-Barr Virus ( EBV ) peptide-pulsed dendritic cells induces functional CD8<sup>+</sup> T-cell immunity and may lead to tumor regression in patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma[ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62( 23 ): 6952-6958.

[ 11 ] 谭建明, 周永昌, 唐孝达. 组织配型技术与临床应用[ M ]. 人民卫生出版社, 2002. 120-122.

[ 12 ] Bancherov J, Steinmen RM. Dendritic cell and the control immunity [ J ]. *Nature*, 1998, 392( 6673 ): 245-250.

[ 13 ] Almand B, Clark JI, Nikitina E, *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients; A mechanism of immunosuppression in cancer[ J ]. *J Immunol*, 2001, 166( 1 ): 678-689.

[ 14 ] Taylor GS, Haigh TA, Gudgeon Nh, *et al.* Dual Stimulation of Epstein-Barr Virus ( EBV )-Specific CD4( + ) and CD8( + )-T-Cell Responses by a Chimeric Antigen Construct: Potential Therapeutic Vaccine for EBV-Positive Nasopharyngeal Carcinoma[ J ]. *J Virol*, 2004, 78( 2 ): 768-778.

[ 收稿日期 ] 2004 -02 -02 [ 修回日期 ] 2004 -05 -20

### 第三届亚洲 - 大洋洲免疫学联合会学术大会征文通知

第三届亚大免疫学会联盟( FIMSA 2005 )学术大会由中国免疫学会和浙江省科学技术厅主办,浙江省免疫学会承办,定于 2005 年 4 月 18 ~ 22 日在杭州之江饭店召开。大会学术专题包括:造血细胞和淋巴细胞的产生;固有免疫和适应性免疫;免疫调节;免疫预防和免疫治疗等。大会邀请以亚太地区国家为主和英国、美国等免疫学家在会上作专题学术报告。详细信息请见“First Announcement and Call for Abstracts and Registration”和 3rd FIMSA 网址( www. cams. ac. cn/ csi )上发布的会议消息。大会对国内代表会议注册费人民币 1 000 元,学生 500 元( 须附有博士生或硕士生复印件,并有导师签名的证明 );大会面向国内边缘困难地区优秀人才设奖学金 20 名,每人 1 500 元,用于补贴旅费、注册费和住宿费等。有关奖学金申请和评选方法将在 3rd FIMSA 网址上发布。

投送英文摘要格式和时间按“First Announcement and Call for Abstracts and Registration”要求。论文摘要、会议交流均采用英语,截止日期为 2004 年 12 月 15 日。

联系地址:北京东单三条 5 号 中国免疫学会秘书处

邮政编码: 100005

联系电话: ( 010 )65296451 85113258

传 真: ( 010 )65296451 85113258

E - mail: linjiayou@ imicams. ac. cn or linjy@ pumc. edu. cn