中国肿瘤生物治疗杂志 Chin J Cancer Biother 2005 Jun; 12(2): 94 ~ 97

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0094-04

应用血清蛋白组学技术筛选鼻咽癌肿瘤抗原

宋 鑫[1], 杨金亮[1], 唐小海[2], 柳 斌[1], 秦 慧[1], 黄 欣[1], 田 聆[1], 魏于全[1](1. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 成都 610041; 2. 成都市药友科技发展有限公司, 成都 610041)

[摘 要] **目的**: 应用血清蛋白组学技术优化肿瘤抗原筛选方法,筛选鼻咽癌肿瘤抗原。**方法**: 以免疫印迹技术筛选出含有特异性抗体的鼻咽癌患者血清,运用免疫沉淀技术对血清与鼻咽癌细胞株(CNE1)的裂解物进行处理以富集肿瘤抗原,正常人血清做对照,经凝胶电泳找出差异条带,通过质谱分析、数据库搜索和信息学分析鉴定差异蛋白。**结果**: 应用此方法找出存在于鼻咽癌样本中的明显差异条带1条,重复性较好,经鉴定该条带为膜结合IgM。**结论**: 采用上述方法筛选肿瘤抗原行之有效,可能成为肿瘤抗原筛选的一种简单、便捷、灵敏的有效方法,得到鼻咽癌候选抗原膜结合IgM。

[关键词] 血清蛋白质组学; 免疫沉淀; 鼻咽癌; 肿瘤抗原
[中图分类号] R739.63 [文献标识码] A

Screening Tumor Antigens of Nasopharyngeal Carcinoma by Serological Proteomics Technologies

SONG Xin[1], *YANG Jin-liang*[1], *TANG Xiao-hai*[2], *LIU Bin*[1], *QIN Hui*[1], *HUANG Xin*[1], *TIAN Ling*[1], *WEI Yu-quan*[1](*1. State Key Laboratory of Biotherapy for Human Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Pharmmate Technology Co. Ltd, Chengdu 610041, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To screen tumor antigens of nasopharyngeal carcinoma by serological proteomics technologies. **Methods**: The nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1 was used as a source of tumor cell proteins for Western blot analysis in which individual sera with special immunoreaction were selected and for immunoprecipitation analysis. Then, differential proteins are analyzed by mass spectrometry and bioinformatics methods. **Results**: Membrane-bound IgM was identified in the differential protein band. **Conclusion**: It may be a convenient, simple and sensitive way to screen tumor antigens by proteomics technologies. Membrane-bound IgM may probably be a novel antigen of nasopharyngeal carcinoma.
[**Key words**] serological proteomics; immunoprecipitation; nasopharyngeal carcinoma; turmor antigen

筛选人类肿瘤特异性抗原长期以来是困扰肿瘤免疫学界的一大难题,随着肿瘤免疫学理论和研究技术的发展,已有多种方法用于肿瘤抗原的筛选,如T细胞克隆技术[1]、血清学筛选重组cDNA表达文库(seroligical analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX)技术[2]、噬菌体展示技术(phage display)[3]、核糖体展示技术(ribosome display)[4]等。上述技术在研究相应的肿瘤相关抗原中已显示出一定的效果,但尚存一些不足之处。由于蛋白质组学技术近年来的发展,从蛋白质组水平筛选肿瘤抗原已陈现出其优势。目前,有关鼻咽癌肿瘤抗原的研究仍然集中于研究EB病毒与鼻咽癌的相互关系上,而有关鼻咽癌细胞本身的肿瘤抗原研究到目前为止还几乎是空白[5-7]。因此,我们试图通过应用血清蛋白组学技术对鼻咽癌肿瘤抗原进行筛选,寻找一种筛选肿瘤抗原的便捷、灵敏的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

所有的鼻咽癌患者血清均取自四川大学华西医院经组织活检、病理切片确诊为鼻咽癌的初诊患者。正常血清为体检时所得正常人血清。人高分化鳞状上皮

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(No. 30270524)
[作者简介] 宋鑫(1976 -), 男, 黑龙江省大庆人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤生物治疗的基础与临床方面研究
[通讯作者] 魏于全 Tel: 86-28-85422564

鼻咽癌细胞系 CNE-1 由河南医科大学惠赠。十二烷基磺酸钠(SDS)、甘氨酸(Glycine)、Tris、丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝 G-250、蛋白定量试剂盒为 BIO-RAD 公司产品;Goat anti-human IgG AP(二抗)购自 Sigma 公司;磁珠Dynabeads® proteinA 购自 Dynal 公司;显色剂 BCIP/NBT Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV 购自 Vector Laboratories 公司;硝酸纤维素膜 Bio Trace NT Membrane 购自 PALL 公司。电泳仪 Mini-PROTEIN® 3 CELL、Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell、GS-800 标准扫描仪、PDQuest 凝胶图像分析软件均为 BIO- RAD 公司产品;Biflex 质谱仪为德国 Bruker 公司产品。

1.2 细胞培养与收集

CNE-1 细胞在含有 10% 小牛血清、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 1640 培养基中,于 37℃,5% CO_2 饱和湿度的条件下培养。待细胞增殖至对数生长期时用生理盐水冲洗 3 遍,然后在冰浴条件下用细胞刮轻轻刮下,离心,弃上清,余留细胞团充分沥水后,置 -80℃冰箱中保存待用。

1.3 细胞蛋白质的提取

将收集的细胞团(约 1×10^7 个细胞)重悬于 10 μl 蛋白酶抑制剂 Cocktail + 1 ml RIPA 裂解缓冲液(150 mmol/L NaCl;1.0% NP-40;0.5% 脱氧胆酸钠;0.1% SDS;50 mmol/L Tris,pH8.0。使用前 4℃ 预冷)中,并在冰浴条件下对细胞裂解物行超声裂解 6 次,每次 10 s,冰浴 30 min,15 000 r/min 离心 15 min,收集上清,于 -80℃保存。

1.4 免疫印迹技术筛选特异鼻咽癌血清

将 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移的硝酸纤维素膜(NC 膜)在室温下用含 5% 脱脂奶粉的 PBS-T(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4, 2 mmol/L KH_2PO_4, 0.05% (v/v) Tween20, pH7.4)封闭 2 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min。将 NC 膜按电泳样品轨迹剪成条状,分别用不同鼻咽癌患者的血清及正常血清(1∶500 稀释)在 4℃ 条件下孵育过夜,PBS 洗 3 次,每次 5 min,然后加入碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG(二抗,1∶30 000 稀释)室温孵育 2 h 后,PBS 洗 5 min,底物生色液显色。比较筛选出含有特异性抗体的病人血清。

1.5 免疫沉淀筛选抗原

取 0.5 ml 细胞裂解液移入 EP 管中,加入筛选出来的鼻咽癌血清 2 μl,室温下于摇床上孵育 2 h。向 EP 管中各加入 Dynabeads proteinA 100 μl,充分混匀,室温轻轻振荡孵育 15 min。用 0.1 mol/L Na-phosphate (pH 8.1) 0.5 ml 反复清洗 3 次,然后用 0.1 mol/L citrate (pH3.1) 30 μl 洗脱抗原-抗体复合物,共 2 次。在洗脱样品中加入 2 × SDS 凝胶加样缓冲液,样品置沸水中 3 ~ 5 min,15 000 r/min,离心 5 min。正常对照血清处理同上。将制备好的样品进行 1-D SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染,筛选差异条带。

1.6 蛋白质鉴定及数据库查询

切取差异蛋白条带,经胶内胰酶消化,采用 Biflex (Bruker 公司)进行肽质量指纹图谱测定,获得的肽质量指纹图谱以酶自动降解峰进行校正,通过 Mascot 软件(Http://www.expasy.org/tools/peptident.Html)在 SWISS-PROT 蛋白数据库进行结果查询,查询条件:表观分子量的误差范围为 ±20%,肽片段分子量最大容许误差范围为 ±0.2 Da,每个肽允许有 1 个不完全裂解位点,物种来源选择人类,离子选择 $[M+H]^+$ 和 Monoisotopic,半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸,被选择的片段信号峰均应较强,为基线宽度的 1 倍以上。

2 结 果

2.1 Western blot 筛选含有特异性抗体的鼻咽癌患者血清

经 Western blot 比较正常血清与鼻咽癌患者血清以及不同鼻咽癌血清之间的免疫反应性差异,找出含有特异性抗体的鼻咽癌患者血清(图 1)。实验重复 3 次,重复性好。8 号血清有明显区别与其它血清的反应性条带存在,表明 8 号血清中有特异性抗体存在。

图 1 不同鼻咽癌患者血清 Western blot 比较

Fig. 1 Western blot analysis of sera from patients of nasopharyngeal carcinoma

H: Using serum from health people as primary antibody;
1-9: Using sera from different patients of nasopharyngeal carcinoma as primary antibody.

2.2 鼻咽癌相关肿瘤抗原的富集和筛选

用筛选出来的血清捕捉鼻咽癌肿瘤抗原,经免疫沉淀富集(图 2)。如图所示,箭头所指处(~68 kD)出现特异性差异条带。另外,其余几条表现出量的差异,

而在 ~26 kD 处和 ~50 kD 处出现的无差异条带为免疫球蛋白的重链及轻链。

图 2　正常人血清与鼻咽癌患者血清差异比较(银染)

Fig. 2　Immunoprecipitation analysis of differential sera from normal and nasopharyngeal patients(stained by silver)

M: Protein marker; H: Health people;
P: Patient of nasopharyngeal carcinoma

2.3　差异蛋白的鉴定及生物信息学分析

所得蛋白条带采用 Biflex(Bruker 公司)进行肽质量指纹测定,获得的肽质量指纹图谱以酶自动降解峰进行校正,图 3 为差异蛋白条带的肽质量指纹图谱。对所获得的肽质量指纹图用 Expasy 中的 Pept Ident 查询软件搜索 NCBI/EBI 蛋白数据库,结合 SDS-PAGE 凝胶电泳条带的分子量、匹配肽段的多少(4 个片段以上)和覆盖率(15%)等进行综合分析,确定该蛋白条带为膜结合 IgM。

3　讨　论

筛选和鉴定新的肿瘤抗原对于寻找新的抗肿瘤疫苗、发现肿瘤早期诊断和判断预后的肿瘤标志等具有重要意义。筛选和鉴定抗体识别的肿瘤抗原正成为研究热点。目前,筛选抗体识别的肿瘤抗原的方法有血清学筛选重组 cDNA 表达文库(SEREX)、噬菌体展示技术(phage display)、核糖体展示技术、肽库技术和蛋白质组学技术。T 细胞克隆技术筛选肿瘤抗原,但该技术需要建立稳定的 T 细胞系和肿瘤细胞系的,而这种情况通常是难以遇到的,且对某些肿瘤类型来说又是不能做到的[1]。噬菌体展示技术和核糖体展示技术需要构建和筛选抗体、抗体片段、单链抗体等各种类型的抗体库,从中筛选目的抗体分子,再进一步用来筛选目的抗原。肽库(peptid library)技术也需先构建一个自然或多肽的肽库,结合免疫筛选、肽推论和序列排列分析,然后从中挑出具有抗原性的肽。上述技术存在操作繁琐,假阳性结果较高等问题。SEREX 是二十世纪九十年代中期才出现的新技术,它通过用自体或同种异体血清筛选来源于人体肿瘤组织的 cDNA 表达文库,以鉴定在不同肿瘤患者免疫产生的自身抗原。但 SEREX 技术尚需要解决的问题下列问题[8]:(1)首先应该去除人血清中能与细菌或噬菌体成分发生反应的抗体。(2)肿瘤中存在各种 B 细胞产生的 IgG mRNA ,它们在 SEREX 中能被表达和检测,因此,需要寻找去除这些克隆的策略和方法。

肿瘤血清蛋白组学是应用肿瘤免疫学和蛋白组学相结合的方法寻找肿瘤抗原。目前最常用的就是应用 2-D PAGE 分离肿瘤组织蛋白和癌旁正常组织蛋白,经比较二维凝胶的蛋白分布,找出差异蛋白,通过质谱鉴定和生物信息学分析,筛选出肿瘤相关抗原[9]。我们本次实验在此基础上做了两点改进。首先,应用蛋白质印迹技术筛选具有特异免疫反应性的鼻咽癌患者血

图 3　P 的肽质指纹图谱(PMF)

Fig. 3　Peptide mass fingerprinting map of P

清。肿瘤患者免疫水平较正常人为低,不能对肿瘤形成有效的识别及清除。但由于个体差异的影响,每个肿瘤患者对于肿瘤的免疫反应性也有所不同,因此在免疫水平较高的患者血清中就有可能存在针对肿瘤产生的特异性抗体,用蛋白质印迹技术先筛选出这种血清,再利用血清中含有的特异性抗体筛选出特异性的肿瘤抗原,可提高识别抗原的成功率。我们对所收集的34例鼻咽癌血清进行了蛋白质印迹分析,其中8号及23号血清在相同位置出现了不同于其它血清样品的差异性反应条带,提示在这2个血清中可能存在鼻咽癌特异性抗体。另外有3个血清样品存在不同的差异性条带,应该为个体差异性的表现。其次,通过免疫沉淀技术富集肿瘤抗原。由于绝大多数肿瘤抗原在人体内的含量都非常少,所以不易被常规手段检出。而免疫沉淀技术通过将抗原聚集在惰性磁珠上,可以快速、简便地将抗原纯化1万倍,大大提高了肿瘤抗原的检出率。应用这种方法,我们从鼻咽癌细胞株CNE1中筛选出了膜结合IgM,说明了通过蛋白质印迹筛选特异免疫反应性肿瘤患者血清,并利用免疫沉淀技术对肿瘤抗原进行纯化来筛选肿瘤特异性抗原是可行的。下一步工作我们将对膜结合IgM在鼻咽癌的病理过程中所起的作用进行深入研究。

[参考文献]

[1] Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, *et al*. A gene encoding an antigen-recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. Science, 1991, 254(5038): 1643-1647.

[2] Sahin U, Tureci O, Schmitt H, *et al*. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 95(25): 11810-11813.

[3] Smith GP. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228(2): 1315-1317.

[4] Panelli M C, Bettinotti M P, Lally K, *et al*. A tumor-infiltrating lymphocyte from a melanoma metastasis with decreased expression of melanoma differentiation antigens recognizes MAGE-12[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4382-4392.

[5] Zeng Y. Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China[J]. Adv Cancer Res, 1985, 44(12): 121-138.

[6] Tsukuda M, Sawaki S, Yanoma S. Suppressed cellular immunity in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1993;120(12):115-118.

[7] Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: Exploiting the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2001, 1(10): 75-82.

[8] 刘然义, 罗慧玲, 曾益新, 等. E1B缺陷腺病毒对鼻咽癌CNE-2细胞杀伤作用及其机理研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(1): 6-9.

[9] Old LJ, Chen YT. New paths in human cancer serology[J]. J Exp Med, 1998, 187(8): 1163-1167.

[10] Chen ZC. Advances in cancer proteomics study[J]. Chin J Cancer, 2004, 23(2): 113-117.

[收稿日期] 2004-12-08 [修回日期] 2005-05-08
[本文编辑] 王 莹

《中国肿瘤生物治疗杂志》已获准由季刊更改为双月刊

《中国肿瘤生物治疗杂志》已通过审批获准自2006年第13卷起由季刊改为双月刊。

由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办、第二军医大学免疫学研究所承办的《中国肿瘤生物治疗杂志》于1994年创刊,1996年获得正式刊号,1997年开始邮局发行。创刊以来,至今已出版12卷。目前,《中国肿瘤生物治疗杂志》已得到学术界的广泛关注和认同,其影响范围日益扩大。更改为双月刊后,《中国肿瘤生物治疗杂志》将继续坚持科学技术发展的双百方针办刊,在编辑中注意学术导向,将基础研究与临床应用并重,进一步提高杂志质量和水平,为我国肿瘤生物治疗研究和应用的发展做出新的贡献。

欢迎踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》网址:http://www.biother.org