

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.004

修饰的肿瘤抗原肽 CEA_{610D} 疫苗的体外抗肿瘤作用

刘晶¹, 李翠玲¹, 顾洪涛¹, 阴海鹏¹, 朱传福², 温培娥¹, 张玲^{1*} (1. 山东省医学科学院基础医学研究所山东省医药卫生肿瘤免疫与中药免疫重点实验室 山东省现代医用药物与技术重点实验室, 山东济南 250062; 2. 山东省血液中心 HLA 研究室, 山东济南 250014)

[摘要] 目的: 评价修饰的 CEA_{610D} 抗原肽疫苗体外抗肿瘤免疫的有效性, 为其临床应用提供依据。方法: 多肽固相合成法合成 HLA-A2 CEA 修饰肽(CEA_{610D})、HLA-A2 天然肽 CEA₆₀₅₋₆₁₃(天然肽)和 HLA-A2 无关肽 MAGE-3(无关肽), 采用同种异体混合淋巴细胞与肽共孵育的方法, 诱导肽特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL), 利用 MTT 法检测 CTL 的增殖和杀伤活性; 流式细胞术观察细胞表型; RT-PCR 检测细胞穿孔素的表达; ELISA 法检测 CTL 上清中 IFN- γ 的水平。结果: CEA_{610D} 疫苗产生肽特异性 CTL 的能力最强($P < 0.05$), 其 CD8⁺ T 细胞数也高于天然肽组和无关肽组; 在效靶比为 40:1 时, CEA_{610D} 和天然肽所诱导的 CTL 对 CEA + HLA-A2 限制性人结肠癌细胞 T84 的杀伤活性可达(56.7 ± 3.73)% 和(51.2 ± 1.86)% , 而 3 种肽特异性 CTL 细胞对 CEA + HLA-A2 人结肠癌 lovo 细胞杀伤活性维持在本底水平; CEA_{610D} 组的 CTL 所释放的杀伤相关介质穿孔素和上清中 IFN- γ 的水平也显著高于其余两组($P < 0.01$)。结论: 与天然肽相比, CEA_{610D} 疫苗可打破自身表位的免疫耐受, 在体外抗肿瘤免疫中更具优势。

[关键词] 肿瘤抗原肽; 癌胚抗原; 修饰肽; 细胞毒性 T 淋巴细胞; 抗癌作用

[中图分类号] R730.3; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0120-05

In vitro anti-tumor activity of altered tumor-associated antigen CEA_{610D} peptide

LIU Jing¹, LI Cui-ling¹, GU Hong-tao¹, YIN Hai-peng¹, ZHU Chuan-fu², WEN Pei-e¹, ZHANG Ling¹ (1. Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences; Key Medical Laboratory of Tumor Immunology and Traditional Chinese Medicine Immunology of Shandong Province; Key Laboratory of Modern Medical Drugs and Technology of Shandong Province, Jinan 250062, Shandong, China; 2. Laboratory of HLA, Haematology Center of Shandong Province, Jinan 250014, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vivo* efficacy of altered CEA_{610D} peptide vaccine against tumor, so as to provide a basis for its clinical use. **Methods:** Altered CEA peptide CEA_{610D}, natural CEA peptide CEA₆₀₅₋₆₁₃ and MAGE-3 peptide were synthesized by polypeptide solid-phase synthesis system. The cytotoxicity T lymphocytes (CTLs) were induced by autologous mixed lymphocytes reaction implused with above peptides; proliferation and cytotoxicity of different CTLs were measured by MTT; phenotypes of the CTLs were detected by flow cytometry; expression of perforin in different CTLs were assayed by RT-PCR; IFN- γ levels in the supernatants of different CTLs were detected by ELISA. **Results:** CEA_{610D} peptide more efficiently induced CTL than CEA₆₀₅₋₆₁₃ and MAGE-3 peptide did ($P < 0.05$). The number of CD8⁺ T cells in CEA_{610D} group was significantly larger than those in CEA₆₀₅₋₆₁₃ and MAGE-3 groups ($P < 0.05$). When the E:T was 40:1, the cytotoxicity of CTLs induced by CEA_{610D} and CEA₆₀₅₋₆₁₃ against CEA⁺ HLA-A2⁺ T84 cells were (56.7 ± 3.73)% and (51.2 ± 1.86)% , respectively. But the CTL cytotoxicities induced by the three peptides against CEA⁺ HLA-A2⁻ Lovo cells were all at the background level. Perforin expression and IFN- γ level of CTLs in CEA_{610D} group were significantly higher than those in the other two groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Compared with natural CEA₆₀₅₋₆₁₃ peptide, altered CEA_{610D} peptide can effectively break the immune tolerance to self peptide, and thus has a stronger anti-tumor activity *in vitro*.

[Key words] tumor-associated antigen peptide; CEA; altered peptide; cytotoxicity T lymphocyte(CTL); anti-tumor activity

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 120-124]

[基金项目] 山东省医学科学院科研项目(No. 2006-25)。Supported by the Research Projects of Shandong Academy of Medical Science(No. 2006-25)

[作者简介] 刘晶(1982-), 女, 山东省枣庄市人, 硕士研究生, 主要从事抗肿瘤免疫方面研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: zhlhln@tom.com

肿瘤抗原肽疫苗是 20 世纪 90 年代逐渐发展起来的肿瘤免疫治疗新手段,因其安全、高效且特异性靶向肿瘤组织而不损伤正常细胞,已成为肿瘤根治性治疗的主要发展方向^[1]。近年来,多种肿瘤抗原肽疫苗已进入临床试验,并取得一定的效果^[2-3]。但由于天然肽抗原制备的疫苗免疫原性较弱,易引起免疫耐受,临床试验疗效仍不理想。因此,目前对肿瘤抗原肽疫苗的研究着重于对其修饰和添加佐剂以达到提高其免疫原性及体内稳定性的目的。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是相对分子质量为 180 000 的膜间黏附糖蛋白,主要表达在结肠、直肠、胃、胰腺的肿瘤以及 70% 以上的肺癌和 50% 左右的乳腺癌中,是一种高效且较为理想的靶抗原^[4]。本研究为了使疫苗诱发更强的免疫反应,选择天然表位 CEA₆₀₅₋₆₁₃(YLSGANLNL),在其 610 位上以天冬氨酸代替天冬酰胺,采用固相合成法合成新的修饰 CEA 抗原肽,提高抗原肽的免疫原性,增加肽与复合物的稳定性^[5],并通过体外 MTT、流式细胞术、RT-PCR 等实验,在分子及基因水平上阐明其激活免疫细胞和介导细胞毒作用的抗肿瘤机制,为新型抗原肽疫苗的临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和主要试剂

人结肠癌细胞 T84(表达 CEA 的 HLA-A2 细胞株)购自北京协和细胞中心,人结肠癌细胞 Lovo(表达 CEA 的非 HLA-A2 细胞株)为本实验室常规培养保存。

修饰的 CEA 抗原肽(YLSGADLNL)(CEA_{610D})和天然肽 CEA₆₀₅₋₆₁₃(YLSGANLNL)均由北京中科亚光生物科技有限公司合成,HLA-A2 无关肽 MAGE-3(LLIIVLAI)(无关肽)由姜国胜研究员惠赠。丝裂霉素(MMC)为协和发酵工业株式会社产品,rhIL-2 系威海安捷医药生物技术有限公司产品。RPMI 1640、DMEM、DMEM/F-12、胰蛋白酶为 GIBCO 产品,MTT 系 Promega 公司产品。荧光标记的抗 CD3、CD4 和 CD8 分子单抗系美国 BD 公司产品。IFN- γ ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。引物:穿孔素(perforin)基因,forward 5'TGTATGATG-GCTGGG-3',reverse 5'CCTGTG GTAAGCATGCT-3'扩增产物片段大小为 523 bp; β -actin, forward 5'-ATCATGTTGAGACCTTCAACA-3',reverse: 5'-CATCTCTGCTCGAAGTCCA-3',扩增产物片段大小为 318 bp;均由上海生工生物工程技术有限公司合成。RT-PCR 试剂购自上海生工生物工程技

术有限公司。

1.2 混合淋巴细胞反应制备肽特异性 CTL 细胞^[5-8]

常规分离 2 名 HLA-A2 健康人新鲜外周血单个核细胞(PBMC),用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液(完全培养液)调细胞密度至 1×10^6 /ml。以其中 1 人的 PBMC 作为刺激细胞,以终质量浓度 25 μ g/ml MMC 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 处理,用不含小牛血清的 1640 液洗涤 3 次,调细胞密度至 2×10^6 /ml。另 1 人的 PBMC 作为反应细胞,用完全培养液调细胞密度至 2×10^6 /ml。以 1:1 的比例将反应细胞和刺激细胞接种 96 孔板,3 个实验组分别向 96 孔板中加入 CEA_{610D}、天然肽及无关肽,终质量浓度分别为 10 μ g/ml、10 μ g/ml、50 pg/ml,同时每组添加 rhIL-2,使其终质量浓度为 20 U/ml,总体积 200 μ l/孔,每组设 3 个复孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养,于第 3 天加入细胞因子 rhIL-2,使其终质量浓度为 20 U/ml,第 5 天收获肽特异性 CTL 细胞。于终止培养前 4 h 每孔加入 10 μ l MTT(5 mg/ml),37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 4 h,离心去上清,每孔加入 150 μ l DMSO,酶标仪检测 *D* 值。

1.3 流式细胞术观察肽特异性 CTL 细胞表型的变化^[9]

按 1.3 的方法收集各组肽特异性 CTL,调细胞密度至 1×10^6 /ml,每样品分为 3 管,每管含 1.0×10^6 细胞,1 号管中加入同型对照 IgG1-FITC、IgG-PE 抗体,2 号管中加入稀释的 CD3-FITC 和 CD8-PE 荧光抗体,3 号管中加入 CD3-FITC 和 CD8-PE 荧光抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。用含 2% 小牛血清的 PBS 洗 3 遍,200 目尼龙网过滤,上机检测。

1.4 RT-PCR 法测定各组肽特异性 CTL 杀伤相关介质穿孔素的表达变化^[10-11]

收集 3 种肽特异性 CTL,依据 TR IZOL Reagent 说明,提取总 RNA,定量后进行 RT-PCR。DNA 扩增产物以 β -actin 基因作内参照,采用 Gel Dos 1000 凝胶分析仪扫描,测定各组 mRNA 的相对表达值。

1.5 MTT 法检测各组抗原肽诱导的肽特异性 CTL 杀伤活性^[12-13]

取对数生长期的 T84 及 Lovo 细胞,分别用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 及含 10% 小牛血清的 DMEM 调细胞密度至 1×10^5 /ml 作为实验组和对照组靶细胞,接种于 96 孔板,100 μ l/孔。收集 3 种肽特异性 CTL 细胞作为效应细胞,调细胞密度至 4×10^6 /ml、 2×10^6 /ml、 1×10^6 /ml。按效靶比分别为 40:1、20:1、10:1、加入各实验组和对照组靶细胞中,100 μ l/孔,并设各密度效应细胞对照、各组靶细胞对照、空白对照组。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 24 h,检测方法同 1.3。按下式计算杀伤率:杀伤率(%)

$= [1 - (\text{实验组 } D \text{ 值} - \text{效应细胞对照组 } D \text{ 值}) / \text{靶细胞对照组 } D \text{ 值}] \times 100\%$

1.6 ELISA 法检测肽特异性 CTL 细胞因子 IFN- γ 的分泌水平^[14-15]

收集肽诱导的特异性 CTL 细胞上清, 按检测 IFN- γ 的试剂盒说明操作, 检测上清液中 IFN- γ 的分泌水平。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 12 统计软件包进行 χ^2 检验、*t* 检验。

2 结果

2.1 修饰的 CEA_{610D} 和天然肽 CEA₆₀₅₋₆₁₃ 的合成

采用多肽固相合成法合成天然肽 CEA₆₀₅₋₆₁₃, 序列为 YLSGANLNL。对天然肽在原氨基酸 610 位点上以天冬氨酸替换天冬酰胺, 合成修饰的 CEA 抗原肽 CEA_{610D}, 序列为 YLSGADLNL。

2.2 混合淋巴细胞反应诱导肽特异性 CTL 细胞

如图 1 所示, 混合淋巴细胞与各组肽共孵育 5 d, 并添加细胞因子 rhIL-2, 收获肽特异性 CTL 细胞, 其中 CEA_{610D} 组获得的 CTL 细胞与未加肽的对

照组相比, 增殖最为显著 ($P < 0.05$)。

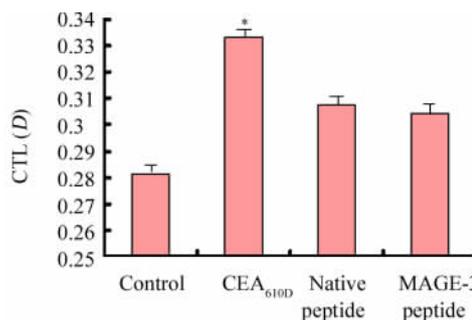


图 1 肽特异性 CTL 细胞的诱导
Fig. 1 Peptide specific CTLs induced by control, CEA_{610D}, native peptide and MAGE-3 peptide
* $P < 0.05$ vs control group, $n = 3$

2.3 各组肽特异性 CTL 细胞表型的比较

由图 2 观察到, CEA_{610D} 组诱导的 CTL 细胞, CD3⁺CD8⁺T 细胞所占比例为 38.0%, 与天然肽组及无关肽组的 35.5% 和 36.1% 相比略有增高, 但无显著性差异 (χ^2 检验, $P > 0.05$)。

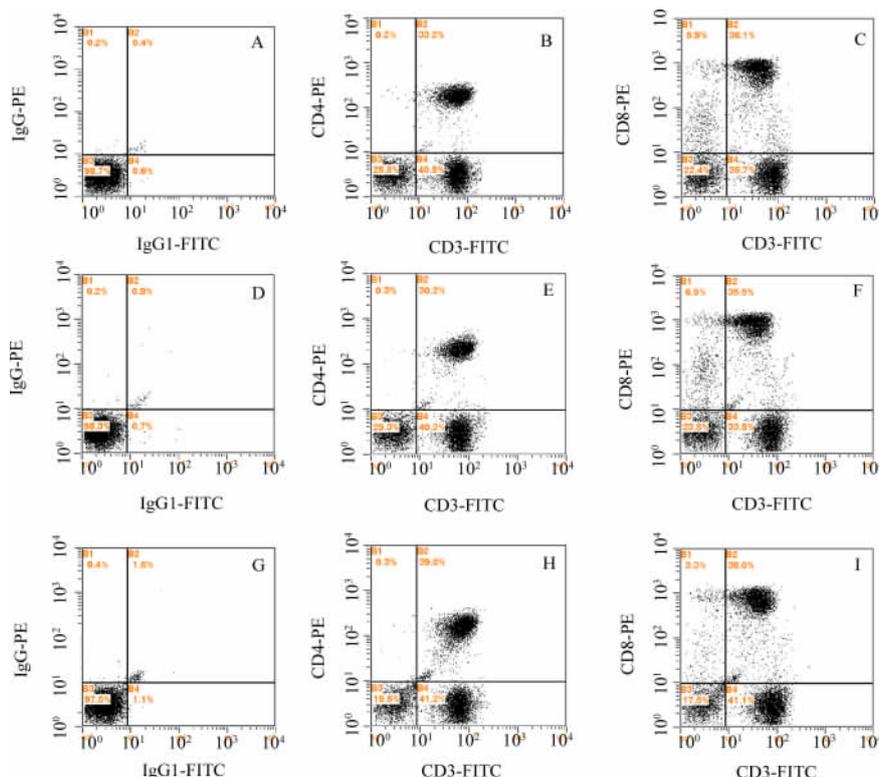


图 2 各组肽特异性 CTL 的表型

Fig. 2 Phenotypes of peptide-specific CTLs in different groups

A: Control in MAGE-3 group; B: CD3⁺CD4⁺ T cells in MAGE-3 group; C: CD3⁺CD8⁺ T cells in MAGE-3 group; D: Control in native peptide group; E: CD3⁺CD4⁺ T cells in native peptide group; F: CD3⁺CD8⁺ T cells in native peptide group; G: Control in CEA_{610D} group; H: CD3⁺CD4⁺ T cells in CEA_{610D} group; I: CD3⁺CD8⁺ T cells in CEA_{610D} group

2.4 肽特异性 CTL 细胞的杀伤活性

由图 3 可见,在效靶比分别为 10:1、20:1、40:1 时,修饰的 CEA_{610D} 组诱导的 CTL 对高表达 CEA 的 HLA-A2 细胞株 T84 的杀伤活性最强,分别是 (36.1 ± 3.57)%、(47.1 ± 1.86)% 和 (56.7% ± 3.73)%,显著高于天然肽和无关肽组(χ² 检验, $P < 0.01$);而对非 HLA-A2 的高分泌 CEA 的 Lovo 细胞株的杀伤活性维持在较低的水平,分别为 (19.4 ± 0.99)%、(23.7 ± 0.50)% 和 (26.5 ± 3.54)%,表明修饰的肽疫苗能够有效诱导特异性 CTL 细胞,并且杀伤作用是特异性针对 HLA-A2 限制性的 CEA 阳性肿瘤细胞。

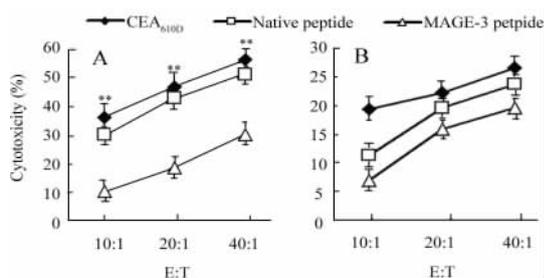


图 3 肽特异性 CTL 对 T84 及 Lovo 细胞的杀伤活性

Fig. 3 Cytotoxicities of peptide-specific CTLs against T84 and Lovo cells

A: CTL cytotoxicity activity against T84 cells;

B: CTL cytotoxicity activity against Lovo cells

** $P < 0.01$ vs MAGE-3 peptide

2.5 肽特异性 CTL 杀伤相关介质穿孔素的表达

如图 4 所示,于 2、3、4 泳道清晰可见位于 523 bp 处的穿孔素片段和 318 bp 处的 β-action 基因片段。与无关肽诱导的 CTL 相比,修饰的 CEA_{610D} 组杀伤相关介质穿孔素表达水平最高,其相对定量值分别为 0.58、0.50、0.42。

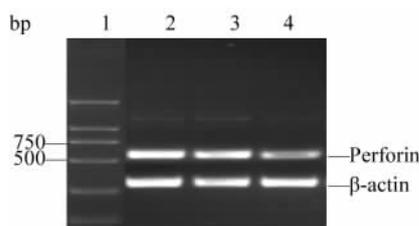


图 4 各组肽特异性 CTL 中穿孔素 mRNA 表达的比较

Fig. 4 Expression of perforin mRNA in different peptide-specific CTLs

1: Marker; 2: CEA_{610D} peptide;

3: Native peptide; 4: MAGE-3 peptide

2.6 肽特异性 CTL IFN-γ 的分泌水平

CEA_{610D} 组所诱导的肽特异性 CTL 细胞上清 IFN-γ 为 (1 399.80 ± 11.86) pg/ml,天然肽组为 (1 286.66 ± 8.56) pg/ml,两组与无关肽组的 (127.75 ± 12.81) pg/ml 相比,IFN-γ 分泌水平明显增高(t 检验, $P < 0.01$)。

3 讨论

鉴于传统肿瘤治疗手段的局限性,生物治疗已成为继手术、化疗、放疗后的第 4 种肿瘤治疗模式^[16]。有效的肿瘤治疗需要体内产生大量肿瘤抗原特异性 CTL 细胞,且对自身的组织耐受^[17]。目前多种形式的肿瘤疫苗中,基于肿瘤抗原肽表位的肽疫苗已在体内外试验中取得了一定积极的成果。尽管其有较强的反应原性,但分子量小、抗原性较弱、易引起免疫耐受,决定了该类疫苗常不能诱发足够强度的肿瘤抗原特异性 CTL 应答,临床疗效不理想。而改造的肽配体类似物有可能成为破坏自身表位耐受、激发有效抗肿瘤应答的有效途径^[18]。本研究中采用多肽合成技术,在 CEA 610 位上以天冬氨酸代替天冬酰胺,对抗原肽带有的专司与 MHC 分子肽结合槽相结合的锚着残基,即 MHC 结合位点或 CTL 识别位点的亲和力低的氨基酸进行置换,影响肽-MHC 复合物与 TCR 的相互作用,增加 ζ 链相关蛋白 70 的磷酸化^[19-20],合成具有代表性的 HLA-A2 限制性的修饰的 CEA₆₀₅₋₆₁₃ (CEA_{610D}),利用在体外进行经典的淋巴混合反应并与肽共孵育 5 d 的技术,收获肽特异性 CTL 细胞。结果显示,修饰的 CEA_{610D} 组的 CTL 细胞增殖最为显著,且经流式细胞术检测其细胞表型 CD3⁺ D8⁺ T 细胞的阳性率高于其余 2 组,表明修饰的肽疫苗在诱导抗原特异性 CTL 方面更具优势,具有更强地诱发 CEA 反应性 T 细胞的能力。

CTL 作为抗肿瘤的主要效应细胞,CTL 活性被视为衡量机体细胞抗肿瘤免疫功能的重要指标。本研究中发现,肽特异性 CTL 对高表达 CEA 且 HLA-A2 阳性细胞株 T84 (HLA-A2⁺, CEA⁺) 的杀伤活性明显增强,而对非 HLA-A2 限制性的高分泌 CEA 的细胞株 Lovo 的杀伤活性维持在较低的水平。其中,修饰的 CEA_{610D} 组杀伤率在效靶比为 10:1、20:1、40:1 时杀伤率分别为 (36.1 ± 3.57)%、(47.1 ± 1.86)%、(56.7 ± 3.73)%,杀伤活性最高。表明修饰的肽疫苗可以打破免疫耐受,提高免疫原性,显著增强针对 CEA 的特异性免疫应答,抗肿瘤免疫作用更为明显。

为进一步探讨抗原肽特异性 CTL 可能的杀伤机制, 本研究中利用 RT-PCR 技术分析杀伤介穿孔素表达水平, ELISA 检测方法 CTL 上清中 IFN- γ 的水平, 观察到修饰的肽疫苗杀伤相关介穿孔素表达水平最高, 其培养上清中 IFN- γ 的水平与 CTL 的杀伤活性结果一致, 显著高于无关肽组, 推测修饰的肽疫苗活化的 CTL 细胞介导的细胞毒效应可能通过以下两方面实现的: 一是通过释放穿孔素-颗粒酶等杀伤介直接有效杀伤肿瘤细胞; 二是通过释放 IFN- γ 等细胞因子上调靶细胞表面 MHC-I 类分子, 提高其抗原提呈能力, 间接杀伤肿瘤细胞。

与传统肿瘤疫苗相比, 抗原肽疫苗性质稳定、易于制备, 且特异靶向肿瘤组织, 已被视为最具发展潜力的治疗手段之一。本研究定位于 CEA 肽疫苗, 并对其修饰, 显著提高了免疫原性, 与天然肽相比可有效诱导 CTL 细胞的产生, 增强机体的应答水平, 证实其对于肿瘤的杀伤更为有效, 为修饰肽疫苗的临床应用提供新的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, *et al.* "Cancer antigen WTI protein-derived peptide"-based treatment of cancer -toward the further development[J]. *Curr Med Chem.* 2008;15(29):3052-3061.
- [2] 王 歙, 陈慰峰. 利用肿瘤抗原多肽疫苗进行肿瘤的免疫治疗[J]. *自然科学进展*, 2002, 12(9): 903-907.
- [3] Bioley G, Guillaume P, Luescher I, *et al.* HLA class I - associated immunodominance affects CTL responsiveness to an ESO recombinant protein tumor antigen vaccine [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(1): 299-306.
- [4] Fong L, Hou Y, Rivas A, *et al.* Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98(15): 8809-8814.
- [5] 易善红, 冯 泉, 汪泽厚, 等. 新型 HLA 衍生肽对外周单核细胞免疫功能的抑制作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(6): 504-506.
- [6] 刘红菊, 辛建保, 李卓亚, 等. 加载野生型 p53 基因鼠树突状细胞的抗肿瘤作用[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(12): 902-907.
- [7] Lu ZY, Condomines M, Tarte K, *et al.* B7-1 and 4-1BB ligand expression on a myeloma cell line makes it possible to expand autologous tumor-specific cytotoxic T cells *in vitro* [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(3): 443-453.
- [8] 马 鸣, 李秀真, 王 超, 等. MAGE-3 抗原肽致敏树突状细胞的体内抗膀胱癌作用及机制[J]. *山东医药*, 2008, 48(8): 1-3.
- [9] Imai N, Ikeda H, Tawara I, *et al.* Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(1): 241-253.
- [10] 王 军, 张 玲, 顾洪涛, 等. 抗人 P185erbB2 scFv2Fc2IL22 调变肿瘤细胞表面分子和激活免疫效应细胞[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(6): 412-416.
- [11] Jenkins MR, Mintern J, La Gruta NL, *et al.* Cell cycle-related acquisition of cytotoxic mediators defines the progressive differentiation to effector status for virus-specific CD8⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181(6): 3818-3822.
- [12] 盛立霞, 邱国强, 谢晓宝, 等. 两种白血病细胞抗原负载 DC 的体外诱导特异性 CTL 应答的比较[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(2): 205-209.
- [13] 唐 菁, 张 玲, 顾洪涛, 等. 淫羊藿苷、黄芩苷联合多柔比星抑制肝癌细胞 APRIL 表达和逆转肿瘤免疫逃逸[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(6): 516-521.
- [14] Saenger YM, Li Y, Chiou KC, *et al.* Improved tumor immunity using anti-tyrosinase related protein-I monoclonal antibody combined with DNA vaccines in murine melanoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9884-9891.
- [15] Wlodarski MW, Nearman Z, Jankowska A, *et al.* Phenotypic differences between healthy effector CTL and leukemic LGL cells support the notion of antigen-triggered clonal transformation in T-LGL leukemia [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3): 589-601.
- [16] Kahlenberg MS, Sullivan JM, Witmer DD, *et al.* Molecular prognostics in colorectal cancer[J]. *Surg Oncol*, 2003, 12(3): 173-186.
- [17] Hou Y, Kavanagh B, Fong L. Distinct CD8⁺ T cell repertoires primed with agonist and native peptides derived from a tumor-associated antigen [J]. *J Immunol*, 2008, 180(3): 1526-1534.
- [18] Tang Y, Lin Z, Ni B, *et al.* An altered peptide ligand for naïve cytotoxic T lymphocyte epitope of TRP-2(180-188) enhanced immunogenicity [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(3): 319-329.
- [19] Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, *et al.* Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in patients with melanoma [J]. *J Immunol*, 2005, 175(9): 6169-6176.
- [20] Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, *et al.* Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4570-4577.

[收稿日期] 2009-02-02

[修回日期] 2009-03-12

[本文编辑] 王 莹