

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.004

· 基础研究 ·

## Survivin HLA-A2<sup>+</sup> 高亲和性 CTL 表位的预测及鉴定

陈明水, 陈强, 李洁羽, 周智锋, 陈淑萍, 叶韵斌\* (福建医科大学 教学医院 福建省肿瘤医院 肿瘤免疫研究室, 福州 350014)

[摘要] 目的: 采用生物信息方法预测和鉴定 survivin 抗原 HLA-A2<sup>+</sup> 限制性 CTL 表位, 为探索基于 survivin 的肿瘤免疫治疗奠定基础。方法: 采用超基序法和量化基序法对靶抗原 survivin HLA-A2<sup>+</sup> 限制性 CTL 表位进行预测; 选取得分 > 10 的表位肽为候选对象, 并进行人工合成。采用 T2 细胞, 以 HLA-A2 结合实验和流式细胞术 (FITC 染色) 检测候选 CTL 表位肽的结合亲和力 [以荧光系数 (fluorescence index, FI) 表示]; 以 HLA-A2 解离实验和流式细胞术检测其结合稳定性 [以复合物解离 50% 的时间 DC<sub>50</sub> (dissociation complex 50%) 表示]。结果: 预测到的候选 survivin CTL 表位肽分别是: <sup>20</sup>STFKNWPFL<sup>28</sup> (SV<sub>20-28</sub>)、<sup>23</sup>KNWPFLEGC<sup>31</sup> (SV<sub>23-31</sub>)、<sup>96</sup>LTLGEFLKL<sup>104</sup> (SV<sub>96-104</sub>)、<sup>6</sup>LPPAWQPFL<sup>14</sup> (SV<sub>6-14</sub>)、<sup>33</sup>CTPERMAEA<sup>41</sup> (SV<sub>33-41</sub>)、<sup>46</sup>CPTENEPDL<sup>54</sup> (SV<sub>46-54</sub>)、<sup>130</sup>KVRRRAIEQL<sup>138</sup> (SV<sub>130-138</sub>)、<sup>37</sup>RMAEAGFIH<sup>45</sup> (SV<sub>37-45</sub>)、<sup>88</sup>SVKKQFEEL<sup>96</sup> (SV<sub>88-96</sub>)。亲和力分析显示: SV<sub>20-28</sub>、SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub>、SV<sub>23-31</sub> 的 FI 分别为 8.61、6.88、5.89、3.81; SV<sub>33-41</sub>、SV<sub>6-14</sub>、SV<sub>46-54</sub>、SV<sub>37-45</sub>、SV<sub>88-96</sub> 的 FI 分别为 0.31、-0.29、-0.4、-0.16 和 -0.03; 稳定性分析结果 DC<sub>50</sub> 为: SV<sub>20-28</sub>、SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub> > 8 h; SV<sub>23-31</sub> 为 4~6 h; SV<sub>6-14</sub>、SV<sub>33-41</sub>、SV<sub>88-96</sub> 为 2~4 h; SV<sub>46-54</sub>、SV<sub>37-45</sub> 为 0~2 h。结果提示, SV<sub>20-28</sub>、SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub> 为高亲和力表位肽, SV<sub>23-31</sub> 为中等亲和力表位肽, SV<sub>33-41</sub>、SV<sub>6-14</sub>、SV<sub>46-54</sub>、SV<sub>37-45</sub>、SV<sub>88-96</sub> 为低亲和力表位肽。结论: 超基序法、量化基序法可快速有效地预测抗原表位, SV<sub>20-28</sub>、SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub> 有可能是 survivin HLA-A2<sup>+</sup> CTL 表位, 可用于后续研究。

[关键词] survivin; CTL 表位; T2 细胞; 生物信息方法

[中图分类号] R730.3; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)03-0227-05

## Prediction and identification of survivin specific HLA-A2<sup>+</sup> CTL restricted high affinity epitope

CHEN Ming-shui, CHEN Qiang, LI Jie-yu, ZHOU Zhi-feng, CHEN Shu-ping, YE Yun-bin\* (Immuno-oncology Laboratory of Fujian Tumor Hospital, Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To predict and identify survivin specific HLA-A2<sup>+</sup> CTL restricted epitopes by bio-informatic methods, so as to provide a foundation for survivin-based immunotherapy. **Methods:** Survivin specific HLA-A2<sup>+</sup> restricted CTL epitopes were predicted by computer super-motif algorithm combined with quantitative-motif algorithm. Candidate epitopes were verified when their scores were higher than 10 and were then artificially synthesized. Affinity of candidate epitope was examined by HLA-A2 binding assay combined with flow cytometry using T2 cells (shown as fluorescence index, FI). Stability of candidate epitope was evaluated by HLA-A2 dissociation assay combined with flow cytometry (shown as 50% complex dissociation time, DC<sub>50</sub>). **Results:** Nine candidate epitopes were obtained: <sup>20</sup>STFKNWPFL<sup>28</sup> (SV<sub>20-28</sub>), <sup>23</sup>KNWPFLEGC<sup>31</sup> (SV<sub>23-31</sub>), <sup>96</sup>LTLGEFLKL<sup>104</sup> (SV<sub>96-104</sub>), <sup>6</sup>LPPAWQPFL<sup>14</sup> (SV<sub>6-14</sub>), <sup>33</sup>CTPERMAEA<sup>41</sup> (SV<sub>33-41</sub>), <sup>46</sup>CPTENEPDL<sup>54</sup> (SV<sub>46-54</sub>), <sup>130</sup>KVRRRAIEQL<sup>138</sup> (SV<sub>130-138</sub>), <sup>37</sup>RMAEAGFIH<sup>45</sup> (SV<sub>37-45</sub>), and <sup>88</sup>SVKKQFEEL<sup>96</sup> (SV<sub>88-96</sub>). HLA-A2 binding assay showed that FI values of SV<sub>20-28</sub>, SV<sub>96-104</sub>, SV<sub>130-138</sub> and SV<sub>23-31</sub> epitopes were 8.61, 6.88, 5.89 and 3.81, respectively; those of SV<sub>33-41</sub>, SV<sub>6-14</sub>, SV<sub>46-54</sub>, SV<sub>37-45</sub> and SV<sub>88-96</sub> epitopes were 0.31, -0.29, -0.4, -0.16 and -0.03, respectively. HLA-A2 dissociation assay showed that DC<sub>50</sub> values of SV<sub>20-28</sub>, SV<sub>96-104</sub> and SV<sub>130-138</sub> epitopes were longer than 8 h; that of SV<sub>23-31</sub> epitope was 4-6 h; those of SV<sub>6-14</sub>, SV<sub>33-41</sub> and SV<sub>88-96</sub> epitopes were all

[基金项目] 福建省科技发展计划重点项目 (No. 2008I0012)。Supported by the Key Science and Technology Development Program of Fujian Province (No. 2008I0012)

[作者简介] 陈明水 (1967-), 男, 福建省福州市人, 副主任医师, 主要从事肿瘤免疫学研究, Email: mschen9401@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: yunbin\_ye@yahoo.com

2-4 h; those of SV<sub>46-54</sub>, SV<sub>37-45</sub> epitopes were both 0-2 h. The above results demonstrated that SV<sub>20-28</sub>, SV<sub>96-104</sub> and SV<sub>130-138</sub> were high affinity epitopes; SV<sub>23-31</sub> was intermediate affinity epitope; and SV<sub>33-41</sub>, SV<sub>6-14</sub>, SV<sub>46-54</sub>, SV<sub>37-45</sub> and SV<sub>88-96</sub> were low affinity epitopes. **Conclusion:** Antigen epitope can be quickly and efficiently predicted by super-motif algorithm combined with quantitative-motif algorithm. SV<sub>20-28</sub>, SV<sub>96-104</sub> and SV<sub>130-138</sub> epitopes are survivin specific HLA-A2<sup>+</sup> restricted CTL epitopes, which can be used for later research.

[ **Key words** ] survivin; CTL epitope; T2 cell; bio-informatic method

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 227-231 ]

Survivin(简称SV)是抗凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis, IAPs)家族的新成员,是迄今发现最强的凋亡抑制因子。该基因在正常成人终末分化组织(除胚胎、胸腺和睾丸)中不表达或低表达,而在绝大多数肿瘤组织呈阳性表达<sup>[1]</sup>。Survivin的高表达可通过多种机制抑制多种因素诱导的细胞凋亡,并与肿瘤的不良预后密切相关。这种广泛的分布提示 survivin 基因的表达可能在癌症中失控,很可能会成为一个新的肿瘤标记物及肿瘤基因防治的靶基因,用于肿瘤的基因免疫治疗。

表位(epitope)是蛋白抗原经抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)加工处理,继而与MHC I类分子结合并最终提呈给T细胞受体(TCR)识别,引起有效免疫应答的短肽,一般为8~10个氨基酸,是引起免疫应答和免疫反应的基本单位。筛选和鉴定合适的抗原表位是研制多肽疫苗的前提<sup>[2]</sup>。HLA-A2<sup>+</sup>是在人群中最普遍表达的等位基因,在我国超过50%的人表达HLA-A2<sup>+</sup>。因此,由HLA-A2.1分子递呈的肿瘤抗原肽表位诱导的CTL在肿瘤免疫治疗中具有重要意义。本研究采用超基序、量化基序法对靶抗原 survivin HLA-A2<sup>+</sup>限制性CTL表位进行预测,为针对 survivin 表位的后续研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 靶抗原

选择在肿瘤组织中高表达、而在正常组织中低表达或不表达的 survivin 作为靶抗原,此抗原位于17号染色体的q25区,相对分子质量为16 500,由142个氨基酸残基组成,登陆号为XM 512010,其编码的蛋白质序列(摘自Genebank)如下:MGAPTLP-PAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGCACTPERMAEAGF IHCPTENEPDLAQCFCKELEGWEPDQDPIEEHKK HSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDREERAKNKIAK ETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAA MD。

### 1.2 主要实验材料

T2细胞购自ATCC。T2<sup>+</sup> HIV-1 POL 476(序列

为ILKEPVHGV)由GenScript公司合成。单抗BB7.2购自BD Pharmingen公司;无血清AIM-V培养基购自Gibco公司;β2-M、Brefeldin A购自Sigma公司;胎牛血清购自Hyclone公司。FACS Calibur流式细胞仪购自BD公司。

### 1.3 超基序法预测 survivin 表位

采用SYFPEITHI抗原肽预测软件,扫描 survivin 抗原的氨基酸序列,对 survivin 的 HLA-A2 限制性 CTL 表位进行远程预测,预测由9个氨基酸残基组成的CTL表位。利用Internet网络进入SYFPEITHI主页(<http://www.syfpeithi.de/home.htm>),选择Epitope prediction进入CTL表位预测界面。于<Select MHC type>复选框选定CTL表位限制性MHC类型为HLA-A\*0201,表位肽大小选9肽,得出的一系列候选表位,选择得分大于10的表位进一步分析。

### 1.4 量化基序法预测 survivin 表位

利用量化基序法(BIMAS)预测软件,在序列输入框中输入 survivin 序列,〈HLA molecule〉选定HLA-A\*0201,表位肽大小选9肽,输出结果确切表位数选30,运行软件,得出的一系列候选表位。

### 1.5 多肽的合成

选取超基序和量化基序法中得分较高的表位肽进行合成,表位肽由GenScript公司合成、纯化。

### 1.6 HLA-A2 结合实验检测候选表位肽的亲合力

亲合力检测参照文献[3]方法,即T2细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基体外培养,用AIM-V培养基调细胞密度至 $1 \times 10^6$ /ml,接种于24孔培养板,1 ml/孔;加入浓度为10 μmol/L各候选表位肽和β2-M(3 μg/ml);以T2<sup>+</sup> β2-M作为阴性对照,T2<sup>+</sup> POL 476(ILKEPVHGV)作为阳性对照,37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育21 h, PBS洗涤3次,加入FITC标记的HLA-A2单抗BB7.2,孵育15 min, PBS洗涤2次,流式细胞术检测T2细胞表面HLA-A2分子的平均荧光强度(mean intensity of fluorescence, MIF)。以荧光系数(fluorescence index, FI)衡量亲合力,FI=(实验组MIF-阴性对照组MIF)/阴性对照

组 MIF。FI > 1 表示多肽与 HLA-A2 有较高亲和力。

1.7 HLA-A2 解离实验检测候选表位肽的稳定性

候选表位肽稳定性检测参照文献[ 4 ]方法,即 T2 细胞用含 10 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养,用 AIM-V 培养基调细胞密度至 1 × 10<sup>6</sup>/ml,接种于 24 孔培养板,1 ml/孔;加入浓度为 10 μmol/L 各候选表位肽和 β2-M( 3 μg/ml );37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 21 h, PBS 洗涤 3 次以去除多余的表位肽,加入 AIM-V 培养液、以阻断新合成的 HLA-A2 在 T2 细胞表面的表达。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 1 h, 洗涤,重新置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育,以 2 h 为间隔,收集 0、2、4、6、8 h 的细胞加入 BB7. 2 抗体,室温孵育 15 min, PBS 洗涤 3 次,流式细胞仪检测 T2 细胞表面 HLA-A2 分子的荧光强度。结果用 DC<sub>50</sub>( dissociation complex 50% )表示, DC<sub>50</sub>表示每个肽在 t = 0 时的荧光强度减弱到 50% 时所需的时间,即 50% MHC-肽复合物解离所需的时间。

2 结果

2.1 Survivin HLA-A2<sup>+</sup> CTL 表位预测结果

综合 survivin 超基序法中的得分及在量化基序法中的得分,选择在两种预测方法中都出现的且综合两者得分( 两者得分相乘 )较高的 9 个表位肽为候选表位肽( 表 1 )。

表 1 SYFPEITHI 法与 BIMAS 法预测得分较高的表位肽

Tab.1 Scores of candidate epitopes predicted by SYFPEITHI and BIMAS

Epitope sequence	SYFPEITHI score	BIMAS score	Total* score
<sup>20</sup> STFKNWPFL <sup>28</sup>	18	10.264	184.75
<sup>23</sup> KNWPFLEGC <sup>31</sup>	10	4.035	40.35
<sup>96</sup> LTLGFLKL <sup>104</sup>	23	3.546	81.56
<sup>6</sup> LPPAWQPFL <sup>14</sup>	13	1.304	16.95
<sup>33</sup> CTPERMAEA <sup>41</sup>	14	0.651	9.11
<sup>46</sup> CPTENEPDL <sup>54</sup>	12	0.572	6.86
<sup>130</sup> KVRRRAIEQL <sup>138</sup>	19	0.560	10.64
<sup>37</sup> RMAEAGFIH <sup>45</sup>	12	0.525	6.3
<sup>88</sup> SVKKQFEEL <sup>96</sup>	17	0.061	1.04

\* Total score = SYFPEITHI score × BIMAS score

2.2 候选表位肽的亲合力

亲合力分析显示,9 条候选肽中有 4 条 FI > 1,

说明这些候选肽与 HLA-A2 具有较强的结合力;5 条 FI < 1,说明该 5 条候选肽与 HLA-A2 结合力较弱( 表 2 )。

表 2 候选表位肽的亲合力分析  
Tab.2 Affinity of candidate epitopes

Epitope position	Sequence	Fluorescent intensity	FI
----	Negative control	16.32	----
----	POL476( ILKEPVHGV )	216.76	12.28
20-28	STFKNWPFL	156.82	8.61
23-31	KNWPFLEGC	78.46	3.81
96-104	LTLGFLKL	128.53	6.88
6-14	LPPAWQPFL	11.57	-0.29
33-41	CTPERMAEA	21.43	0.31
46-54	CPTENEPDL	9.86	-0.4
130-138	KVRRRAIEQL	112.37	5.89
37-45	RMAEAGFIH	13.75	-0.16
88-96	SVKKQFEEL	15.83	-0.03

2.3 候选表位肽的稳定性

稳定性分析显示, SV<sub>20-28</sub>、SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub> 的 DC<sub>50</sub> > 8 h; SV<sub>23-31</sub> 的 DC<sub>50</sub> 为 4 ~ 6 h; 其余表位肽的 DC<sub>50</sub> 均 < 4 h, 如图 1、表 3。

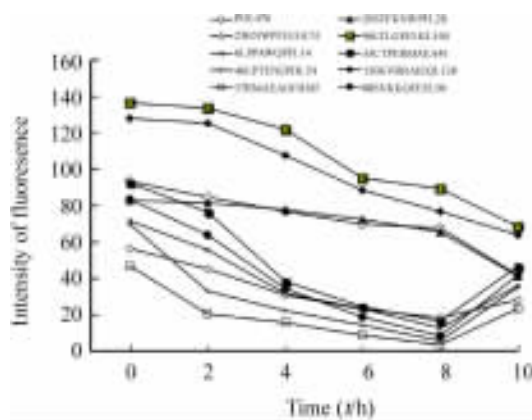


图 1 候选肽的稳定性鉴定

Fig.1 Stability of candidate epitopes

由以上实验结果把预测的 survivin 表位肽分成 3 组:( 1 )高亲和力表位肽,与 HLA-A2 结合力强,形成稳定的肽/HLA-A2 复合物,它们是 SV<sub>20-28</sub>、

SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub>; (2)中等亲和力表位肽,与 HLA-A2 结合力较弱,但能形成稳定的肽/HLA-A2 复合物,仅一个 SV<sub>23-31</sub>; (3)低亲和力表位肽,与 HLA-A2 不能形成稳定的肽/HLA-A2 复合物,它们是 SV<sub>6-14</sub>、SV<sub>33-41</sub>、SV<sub>46-54</sub>、SV<sub>37-45</sub>、SV<sub>88-96</sub>。

表 3 候选表位肽在不同时间的荧光强度(%)

Tab. 3 Fluorescence intensities of candidate epitopes at different time points

Epitope	Time (t/h)					DC <sub>50</sub> (t/h)
	0	2	4	6	8	
POL476(ILKEPVHGV)	93.41	84.56	76.63	69.72	67.71	15.60
<sup>20</sup> STFKNWPFL <sup>28</sup>	82.67	81.65	77.52	72.43	65.37	13.75
<sup>23</sup> KNWPFLEGC <sup>31</sup>	56.42	44.93	30.76	22.83	18.37	5.37
<sup>96</sup> LTLGFEFLK <sup>104</sup>	136.78	133.52	121.69	94.83	89.41	9.26
<sup>6</sup> LPPAWQPFL <sup>14</sup>	71.64	55.43	31.52	23.61	12.46	2.61
<sup>33</sup> CTPERMAEA <sup>41</sup>	92.38	76.53	38.32	24.16	16.37	3.06
<sup>46</sup> CPTENEPDL <sup>54</sup>	69.82	32.74	22.32	14.51	5.73	0.86
<sup>130</sup> KVRRRAIEQL <sup>138</sup>	127.74	125.26	107.32	88.53	76.92	10.57
<sup>37</sup> RMAEAGFIH <sup>45</sup>	46.62	20.43	15.62	8.46	3.52	1.43
<sup>88</sup> SVKKQFEEL <sup>96</sup>	83.36	63.58	34.26	18.54	8.37	3.62

### 3 讨论

肿瘤免疫治疗是肿瘤综合治疗的重要组成部分,CTL 是最主要的抗肿瘤效应细胞,它能直接溶解肿瘤细胞,而且能分泌一系列细胞因子,如 IFN- $\gamma$ 、TNF 和 GM-CSF 等,进一步增强机体对肿瘤的免疫反应<sup>[5]</sup>。以特异性 CTL 为基础的肿瘤免疫治疗的关键在于确定合适的肿瘤抗原,但免疫细胞不能识别整个抗原分子,而只能识别抗原分子表面的活性部位,即抗原决定簇或表位。表位是抗原中能被免疫细胞特异性识别的线性片段或空间构象性结构。CTL 识别抗原是以表位为基础,T 细胞表位是蛋白抗原经抗原提呈细胞加工处理,继而与 MHC-I 类分子结合并最终提呈给 T 细胞受体(TCR)识别,引起有效免疫应答的短肽,是引起免疫应答和免疫反应的基本单位,设计和鉴定合适的抗原表位是诱导免疫反应的前提。以往对于一个已知序列的肿瘤抗原,筛选其优势 CTL 表位通常是用酸洗脱法,将肿瘤细胞上与 MHC-I 类分子结合的抗原肽洗脱下

来,再逐一合成重叠肽,用 T 细胞功能试验的方法,对候选表位进行鉴定,并比较各候选肽诱导特异性 CTL 杀伤效应的能力。这一过程不仅难度高、花费大,而且效率低。随着人们对 MHC-I 类分子的晶体结构的阐明,以及对表位肽与 MHC-I 类分子结合特性和 MHC-I 类抗原提呈途径认识的不断深入,应用生物信息学的技术手段进行表位预测已经成为可能<sup>[6]</sup>。目前用于 CTL 表位预测方法主要有基于抗原肽与 MHC-I 类分子结合特性的预测方法和针对抗原加工处理过程的表位预测方法。现有多种用于 CTL 表位预测的程序,其中最为常用的是 Parker 等<sup>[7]</sup>开发的 BIMAS 程序和 Rammensee 等<sup>[8]</sup>开发的 SYFPEITHI。BIMAS 是根据抗原九肽与 HLA-I 分子结合的半衰期进行预测,它可以对 40 多种不同种属的 MHC-I 类限制性表位进行预测。SYFPEITHI 是根据抗原肽初级和次级锚定残基与 MHC 结合的特征计算其亲和力积分,如锚定残基 8~10 分,辅助残基 4~6 分,有利结合残基 1~4 分,不利结合残基 -1~-4 分,各个氨基酸残基得分之和即为该九肽积分。它可以预测 200 余种不同种属不同 MHC-I 类分子的 CTL 表位。

细胞凋亡的抑制在肿瘤发生发展及耐药形成中具有重要作用,凋亡抑制蛋白(IAPs)可以通过抑制 caspase-3、caspase-7 的活性从而抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>,保护肿瘤细胞免受凋亡损伤。Survivin 是凋亡抑制蛋白超家族成员之一,定位于 17q25,含 4 个外显子及 3 个内含子。其编码的蛋白是由 142 个氨基酸组成的胞质蛋白,分子量为 16.2 kD,含有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列(baculovirus IAP repeat, BIR)分子,该结构域含有 70~80 个氨基酸残基,它首次在杆状病毒抗凋亡蛋白中发现,它能抑制细胞凋亡促进细胞增殖<sup>[10]</sup>。Survivin 的高表达与细胞的恶性转化有关,肿瘤组织中 survivin 的高表达能促进肿瘤的生长,并且与肿瘤细胞耐受放疗、化疗,肿瘤患者的总体存活率、肿瘤的复发及不良预后密切相关<sup>[11-12]</sup>。Survivin 在 60 多种肿瘤中高表达,在正常组织中低表达或不表达<sup>[13]</sup>,是肿瘤治疗的理想靶点。迄今已鉴定出多种 survivin 来源的多肽表位,分别由 HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11、HLA-A24 等提呈,能在体内外诱导特异性 CTL 反应<sup>[14-16]</sup>。

本研究以超基序法、量化基序法相结合,预测了 9 条 HLA-A2 限制性 survivin CTL 表位,分别为 SV<sub>20-28</sub>、SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub>、SV<sub>23-31</sub>、SV<sub>6-14</sub>、SV<sub>33-41</sub>、SV<sub>46-54</sub>、SV<sub>37-45</sub>、SV<sub>88-96</sub>,对这些九肽的进一步鉴定将为基于

CTL 表位肽的免疫治疗及表位疫苗的研究提供更多的线索。

表位肽与 MHC 分子结合的亲和力和稳定性是能否引起有效 CTL 应答的关键因素<sup>[17]</sup>,并决定诱导免疫应答的性质。研究表明,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<sup>[18]</sup>。为了证实所预测的表位是否是 CTL 表位,用 T2 细胞检测所预测的表位与 HLA-A2 结合的亲和力和稳定性。T2 细胞是用于测定表位肽与 HLA-A2 分子结合力的工具细胞之一,它是 T-B 杂交瘤细胞系,是 HLA-A2 阳性、TAP 分子缺陷的细胞株。该细胞不能加工内源性的抗原,但是可以提呈外源性的抗原肽;在无抗原肽存在的情况下,其细胞表面 HLA-A2 分子的表达不稳定。T2 细胞表面的 HLA-A2 分子与抗原肽结合,其细胞表面 HLA-A2 的表达明显增强,所以利用其与目的肽的结合程度来测定 HLA-A2 分子与目的肽表位间的亲和力。本研究检测结果显示,候选肽 SV<sub>20-28</sub>、SV<sub>96-104</sub>、SV<sub>130-138</sub> 与 T2 细胞具有较高的亲和力,能形成稳定的复合物。

本研究表明,超基序法和量化基序法可快速并有效预测抗原表位。随着越来越多肿瘤抗原的发现,利用计算机算法筛选 HLA-A2<sup>+</sup>高亲和力肿瘤抗原 CTL 表位,并用筛选出的高亲和力表位肽诱导肿瘤抗原特异性的 CTL,这种方法将为肿瘤预防和免疫治疗提供一新的手段。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Li F. Survivin study: what is the next wave[ J ]? J Cell Physiol, 2003, 197( 1 ): 8-29.
- [ 2 ] Kessler JH, Melief CJM. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy[ J ]. Leukemia, 2007, 21( 3 ): 1859-1874.
- [ 3 ] Seki N, Brooks AD, Carter CR, et al. Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis *in vitro*, but cause tumor regression *in vivo* in the absence of perforin[ J ]. J Immunol, 2002, 168( 7 ): 3484-3892.
- [ 4 ] 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: 3411-3421.
- [ 5 ] Lanzavecchia A. Identifying strategies for immune intervention[ J ]. Science, 1993, 260( 511 ): 937-944.
- [ 6 ] Bhasin M, Raghava GP. A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes[ J ]. J Biosci, 2007, 32( 1 ): 31-42.
- [ 7 ] Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains[ J ]. J Immunol, 1994, 152( 1 ): 163-175.
- [ 8 ] Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, et al. SYFPEITHY database for MHC ligands and peptide motifs[ J ]. Immunogenetics, 1999, 50( 1 ): 213-219.
- [ 9 ] Andersen MH, Becker JC, Straten P. Regulators of apoptosis: suitable targets for immunotherapy of cancer[ J ]. Nature, 2005, 4( 5 ): 399-409.
- [ 10 ] Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, et al. Survivin: a promising tumor biomarker[ J ]. J Cancer Lett, 2007, 249( 1 ): 49-60.
- [ 11 ] Allen SM, Florell SR, Hanks AN, et al. Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression[ J ]. Cancer Res, 2003, 63( 3 ): 567-572.
- [ 12 ] Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, et al. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference[ J ]. Clin Cancer Res, 2003, 9( 3 ): 931-946.
- [ 13 ] Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues[ J ]. Mol Cancer Ther, 2006, 5( 5 ): 1087-1098.
- [ 14 ] Reker S, Meier A, Holten-Andersen L, et al. Identification of novel survivin-derived CTL epitopes[ J ]. Cancer Biol Ther, 2004, 3( 2 ): 173-179.
- [ 15 ] Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, et al. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes *in situ* as well as *ex vivo* in cancer patients[ J ]. Cancer Res, 2001, 61( 16 ): 5964-5968.
- [ 16 ] Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, et al. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin[ J ]. Clin Cancer Res, 2002, 8( 6 ): 1731-1739.
- [ 17 ] Franco A, Tilly DA, Gramaglia I, et al. Epitope affinity for MHC class I determines helper requirement for CTL priming[ J ]. Nat Immunol, 2000, 1( 2 ): 145 - 150.
- [ 18 ] Eliada L, Vasso A. Insights into peptide-based vaccine design for cancer immunotherapy[ J ]. Curr Med Chem, 2005, 12( 13 ): 1481-1494.

[ 收稿日期 ] 2009 - 02 - 16

[ 修回日期 ] 2009 - 04 - 21

[ 本文编辑 ] 韩 丹