

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.006

穿膜肽介导的 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 诱导 CTL 对黑素瘤 A-375 细胞的杀伤活性

李文丽, 贾原, 赵晴, 李芳, 靳保利, 张俊萍(山西医学科学院 山西大医院 肿瘤生物治疗科, 山西 太原 030032)

[摘要] **目的:** 探讨穿膜肽 (cell penetrating peptide, CPP) Tat₄₉₋₅₇ 携带 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 抗原肽致敏 DC 后诱导获得抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL), 并体外检测其对黑素瘤细胞株 A-375 的杀伤效果。**方法:** 采集健康志愿者外周血 50 ml, 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, 经细胞因子诱导, 获得 DC 和 T 淋巴细胞。实验组用 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏 DC, 待 DC 成熟后与 T 淋巴细胞混合诱导产生 CTL, 并设 PBS 组和 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组作为对照。流式细胞术检测致敏前后 DC 的表型, 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法检测抗原肽疫苗致敏 DC 后诱导的 CTL 对黑素瘤细胞株 A-375 的体外杀伤活性, 同时与对人肺癌 A549 细胞株、人白血病 K562 细胞的杀伤作用进行比较。**结果:** Tat 显著提升 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 进入 DC 的穿膜能力。与 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏的 DC 相比, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏后 DC 的 CD80/CD86 [(54.9 ± 3.3)% vs (43.8 ± 5.7)% , $P < 0.05$] 和 CD40 [(42.1 ± 1.9)% vs (23.7 ± 2.8)% , $P < 0.05$] 的表达率显著升高。Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 刺激 DC 后诱导培养的 T 细胞亚群主要以 MHC-I 类分子介导的 CD3⁺CD8⁺ 细胞为主。Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组 CTL 对 A-375 细胞的杀伤能力显著高于 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组, 且随着效靶比的增加, 杀伤活性逐渐增强 ($P < 0.05$)。A-375 细胞高表达 NY-ESO-1, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组 CTL 对 A-375 细胞具有特异性杀伤作用, 杀伤作用显著强于 A549 和 K562 细胞 (均 $P < 0.05$)。**结论:** Tat₄₉₋₅₇ 可以增强 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 抗原多肽的免疫原性, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 多肽致敏 DC 能有效诱导 CTL 抗黑素瘤细胞 A-375 的特异性免疫应答。

[关键词] 黑素瘤; 树突状细胞; 细胞穿膜肽; 肿瘤免疫治疗

[中图分类号] R739.5; R730.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0710-06

Cytotoxic effect of CTLs toward melanoma A-375 cells induced by cell penetrating peptide-fused NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃

Li Wenli, Jia Yuan, Zhao Qing, Li Fang, Jin Baoli, Zhang Junping (Department of Cancer Bio-therapy, Shanxi Dayi Hospital of Shanxi Academy of Medical Sciences, Taiyuan 030032, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the cytotoxic effect of cytotoxic lymphocytes (CTLs) activated by Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ sensitized dendritic cells on melanoma A-375 cells. **Methods:** We collected the peripheral blood (about 50 ml) from healthy volunteers and isolated mononuclear cells by using lymphocyte separation medium. The cells were treated with cytokines to produce dendritic cells and T lymphocytes. After sensitized with the Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ peptide, the dendritic cells were co-cultured with the T lymphocyte cells to generate antigen-specific CTLs. Phenotypes of the dendritic cells were examined by flow cytometry. The antigen-specific cytotoxic activity of the CTLs against A-375 melanoma cells *in vitro* was assessed by the lactate dehydrogenase (LDH) method. Human lung cancer A549 cells and leukemia K562 cells were used as controls. **Results:** The expression rate of CD80/CD86 in dendritic cells sensitized with Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ was (54.9 ± 3.3)% significantly higher than these sensitized with NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ ([43.8 ± 5.7]%, $P < 0.05$). There were also significant increase of CD40 expression ([42.1 ± 1.9]% vs [23.7 ± 2.8]%, $P < 0.05$) in Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ sensitized dendritic cells. These results indicated that the Tat fragment (49-57) significantly improved the cell penetrating ability of NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃. The T lymphocytes activated by the Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ sensitized DC were

[基金项目] 山西省生物治疗示范平台项目资助 (No. 2014091105-0101)。Project supported by the Biological Treatment Demonstration Platform Project of Shanxi Province (No. 2014091105-0101)

[作者简介] 李文丽 (1988 -), 女, 山西省太原市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗的基础与临床研究, E-mail: john83629@sina.com

[通信作者] 张俊萍 (Zhang Junping, corresponding author), E-mail: junpingzhang_118@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151216.1247.012.html>

mainly CD3⁺CD8⁺ cells. The cytotoxic activity of the CTLs induced by Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃-sensitized dendritic cells toward A-375 melanoma cells was significantly higher than these induced with NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃-sensitized dendritic cells ($P < 0.05$). The CTLs were also specific as they killed NY-ESO-1-expressing A375 more efficient than A549 cells and K562 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tat₄₉₋₅₇ cell penetrating peptide can enhance the immunogenicity of the peptide NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃. Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ polypeptide-sensitized dendritic cells can effectively induce the specific immune response against melanoma A-375 cells.

[**Key words**] melanoma; dendritic cells(DCs); cell penetrating peptides (CPPs); tumor immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 710-715]

NY-ESO-1 抗原是肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigen, CT)家族中的重要成员,除睾丸组织和胎盘组织外,其在正常组织中几乎不表达。NY-ESO-1 在多种组织类型肿瘤中呈不同程度的表达,表达频率最高的是神经母细胞瘤(82%)^[1]、滑膜肉瘤(80%)^[2]、黑素瘤(46%)^[3]和卵巢上皮癌(43%)^[4]。NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 是迄今发现的最具免疫原性的肿瘤抗原之一,可以在 NY-ESO-1 表达阳性的肿瘤患者体内引起自发性体液免疫反应和特异性 T 细胞免疫反应。因此, NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 抗原理论上可作为抗原疫苗,进而成为肿瘤特异性免疫治疗的靶标。穿膜肽(cell penetrating peptide, CPP),由富含碱性氨基酸的序列构成,能够穿透细胞膜且携带大分子物质进入不同性质的活细胞内^[4]。它可携带多种物质,如 DNA、RNA、多肽、蛋白、小分子化合物等,具有广泛的组织相容性、稳定性、低免疫原性和可人工合成等优点^[5]。Wang 等^[6]报道,利用 CPP Tat 可显著提升 HLA 限制性多肽的 DC 穿膜效率,且半衰期显著延长。因此, CPP 被应用于肿瘤疫苗领域。本研究采用 Tat₄₉₋₅₇ 携带 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 抗原多肽致敏 DC 诱导获得特异细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL),体外检测其对黑素瘤细胞株的杀伤效果,探索 CPP 联合 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 多肽疫苗免疫治疗黑素瘤的可行性。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

人黑素瘤细胞株 A-375(HLA-A2)、人肺癌细胞株 A549、人白血病细胞株 K562 由本实验室保存, NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 多肽(HLA-A0201)和 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃多肽(HLA-A0201)购自北京赛百盛基因技术有限公司。FITC 购自美国 Sigma 公司, RhGM-CSF、rhIL-2、rhIL-4、rhIL-7、rhTNF- α 购自 Peprotech 公司, 10% 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购自 Promega 公司, RPMI 1640 购自 Scientific 公司, FITC 标

记 CD80 单抗、FITC 标记 CD40 单抗、PE 标记 CD80 单抗均购自 BD 公司, 鼠抗人 NY-ESO-1 单抗购自美国 Cambridge, Ficoll 分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, 荧光倒置显微镜购自奥林巴斯公司, 流式细胞仪购自 BD 公司。

1.2 荧光标记抗原多肽 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃

将制备的抗原多肽 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃、NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃(浓度为 1 mg/ml)与用 pH8.0 的 100 mmol/L NaHCO₃-NaOH 配制的 100 mmol/L Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)溶液混合标记, 4 ℃ 避光过夜反应; 反应混合液再经凝胶柱(P10)脱盐去除游离的 FITC, 用 HEPES 缓冲液(10 mmol/L HEPES, 25 mmol/L NaCl)洗脱, 并根据公式 [$D_{280} - D_{294} \times 0.3$]/ ϵ 计算偶联 FITC 的多肽浓度。

1.3 DC 的培养及抗原多肽致敏

采集健康志愿者外周血 50 ml。淋巴细胞分离液于 4 ℃、2 000 \times g 离心 10 min 分离单核细胞。吸取白膜细胞层, 加入 50 ml PBS 混匀, 离心去除淋巴细胞分离液。PBS 洗涤两次后, 将外周血单核细胞悬浮于 RPMI 1640 培养基中, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中贴壁 3 ~ 6 h 后, 收集悬浮细胞用于 T 淋巴细胞的培养。贴壁细胞 PBS 荡洗两次后为 DC 前体细胞, 加入 GM-CSF (800 U/ml)和 IL-4 (1 000 U/ml)继续培养, 隔天半量换液, 第 5 天加入 TNF- α (20 ng/ml)及抗原肽 10 ng/ml(实验组和对照组 DC 分别加入 FITC -Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 和 FITC -NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃)诱导 DC 成熟; 第 7 天收获细胞, 调整细胞密度到 10⁶/ml, 加入荧光抗体 CD80-FITC 和 CD86-PE, 避光放置 30 min, 洗涤 2 次后进行流式细胞术(FCM)检测 CD80/CD86、CD40。

1.4 淋巴细胞的培养

收集贴壁后的悬浮未贴壁细胞加入 75 cm² 细胞培养瓶, 调整细胞密度为 1 \times 10⁶/ml, 加入含 200 U/ml IL-2 的 RPMI 1640 培养液于 37 ℃、5% CO₂ 培养, 隔日半量换液, 培养 7 d 后收获淋巴细胞备用。

1.5 DC 与 T 细胞共同培养诱导特异性 CTL

第 8 天,将刺激成熟的 DC 细胞与 T 淋巴细胞混合后计数,共培养 6 d。隔天换液(1640 + 10% 血清 + 200 U/ml IL-2)。第 14 天时,细胞计数。同时对培养物进行流式细胞术检测 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD8⁺CD28⁺ 及 CD40L 表达率。

1.6 Western blotting 检测 A375、K562、A549 细胞内 NY-ESO-1 的表达

A375、K562、A549 细胞加入缓冲液(20 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0. 1% TritonX-100, pH7. 2)悬浮后,超声破碎,10 000 × g 离心 15 min,调整蛋白浓度为 50 μg/ml,进行 10% SDS-PAGE,并以 β-actin 为内参照。转 PVDF 膜, PBS 洗 3 次后封闭,加入鼠抗人 NY-ESO-1 单克隆抗体(1: 1 000)室温下孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次后加入兔抗鼠二抗(1: 5 000),过夜孵育,化学发光法 ECA 进行曝光。

1.7 LDH 释放法检测 DC-CTL 对 A-375 细胞的杀伤

以 DC-CTL 为效应细胞,以 K562、A549 和 A-375 细胞为靶细胞,按效靶比 10: 1, 30: 1, 50: 1 加入 96 孔 U 型板中,每孔含靶细胞 1 × 10⁴ 个,共培养 4 h 设 3 个复孔。最大 LDH 释放孔加入裂解液 50 μl,

45 min 后 250 × g 离心 4 min,将 50 μl 上清液转移至另一酶标分析板中,加入底物 50 μl/孔,避光室温孵育 30 min 后,每孔加入 50 μl 终止液,将孔中的气泡去除,1 h 内检测 450 nm 处光密度(D)值,取 3 孔均值。计算 CTL 杀伤率,细胞杀伤率(%) = (实验组释放孔 D 值 - 效应细胞自发释放孔 D 值 - 靶细胞自发释放孔 D 值) / (靶细胞最大释放孔 D 值 - 靶细胞自发释放孔 D 值) × 100% 。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 17. 0 统计软件进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用配对的 t 检验,多样本均数的比较采用方差分析,方差不齐用秩和检验。以 P < 0. 05 或 P < 0. 01 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Tat₄₉₋₅₇ 提高 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 的穿膜能力

荧光倒置显微镜下观察,结果(图 1)显示, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组 DC 的荧光高于单纯 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃, 荧光灰度结果检测显示,在激发波长 520 nm 下实验组(FITC-Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃)荧光吸收强度显著高于对照组。

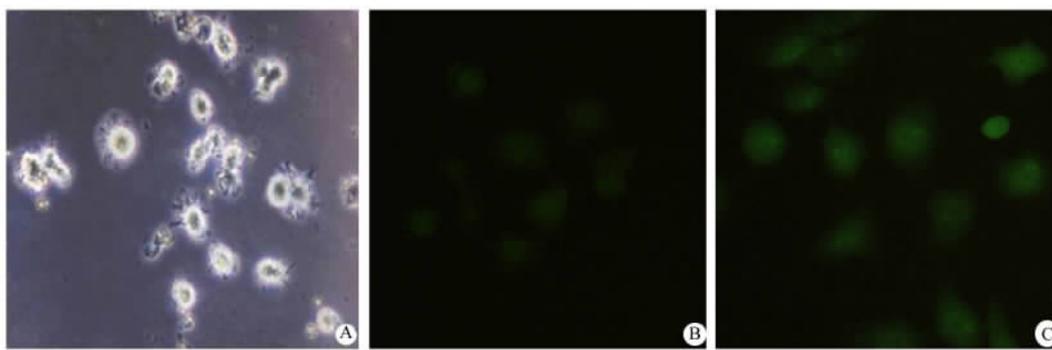


图 1 Tat 显著提升 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 进入 DC 的穿膜能力(×400)

Fig. 1 Tat effectively enhances the penetration ability of NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ into DCs(×400)

A:DCs morphology under phase contrast microscope; B:Fluorescent effect of NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ pulsed DCs;

C:Fluorescent effect of Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ pulsed DCs

2.2 抗原肽致敏 DC 后表型分析

流式细胞术检测结果(图 2)显示,与 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组相比, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏后 DC 的 CD80/CD86 [(43. 8 ± 5. 7)% vs (54. 9 ± 3. 3)% , P < 0. 05] 和 CD40 [(23. 7 ± 2. 8)% vs (42. 1 ± 1. 9)% , P < 0. 05] 表达显著提高,且两组的 CD80/CD86 和 CD40 表达均高于 PBS 对照组(均 P <

0. 05) 。

2.3 DC 诱导 CTL 后 T 细胞亚群及细胞因子分泌水平

DC 培养成熟后与 T 细胞共培养,每天定期观察,倒置显微镜下显示 T 淋巴细胞显著扩增,且随着细胞数量的增加出现聚团集落。流式细胞术检测抗原肽致敏 DC 后体外诱导的 T 淋巴细胞表型,结

果(表 1)显示, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组较单纯 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组及 PBS 组诱导 CD3⁺ CD8⁺ 细胞有明显增加(均 $P < 0.05$); CD8⁺ 细胞中 CD28⁺ T 细胞比例明显增加(均 $P < 0.05$), 总 T 细胞中 CD40L 表达较

对照组有所提升(均 $P < 0.01$)。细胞因子分泌情况检测结果(图 3)显示, CD3⁺ CD8⁺ T 细胞中 IL-2、IFN- γ 的分泌水平较单纯 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组有所提高。

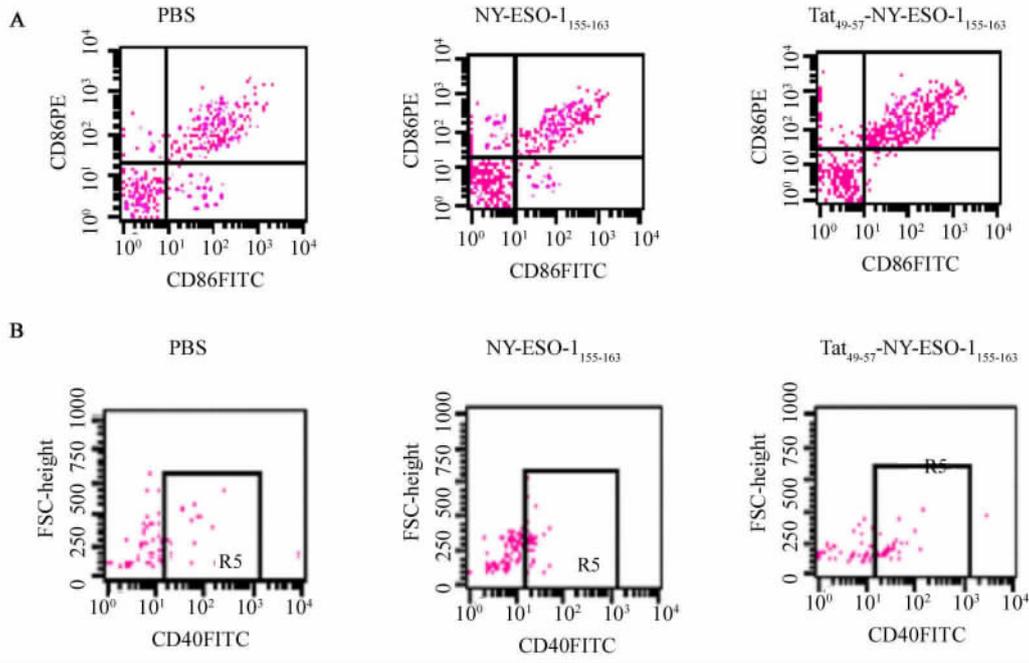


图 2 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏前后 DCs 表型

Fig. 2 The phenotypes of DCs before and after sensitization by Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃

A: Flow cytometry antigen peptides stimulate DCs after CD80/86 expression analysis(DC1: PBS groups, DC2: NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ groups; DC3: Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ groups);
B: Flow cytometry antigen peptides stimulate DCs after CD40 expression analysis

表 1 CTL 亚群表型分析(%)

Tab.1 Phenotypic analysis of CTL subsets (%)

Group	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD40L
PBS	68.1 ± 3.78	42.9 ± 6.43	28.4 ± 2.3	31.2 ± 3.5	7.92 ± 0.8
NY-ESO-1 ₁₅₅₋₁₆₃	77.2 ± 4.12	40.82 ± 5.83	35.61 ± 5.71	48.3 ± 7.3	8.9 ± 0.91
Tat ₄₉₋₅₇ -NY-ESO-1 ₁₅₅₋₁₆₃	88.9 ± 5.23	22.91 ± 3.82	72.1 ± 3.1*	68.9 ± 2.2*	26.48 ± 1.2**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ group and PBS group

2.4 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组 CTL 具有较强的肿瘤细胞杀伤活性

Western blotting 检测结果(图 4)显示, 与 K562、A549 细胞相比, A-375 细胞显著高表达 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃。

LDH 释放法检测结果(图 5、6)显示, 经 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏 DC 诱导的 CTL 对 A-375 细胞杀伤率高于实验组和空白对照组, 其差异有统计学

意义(均 $P < 0.05$), 且随着效靶比的增加杀伤活性也随之增强, 效靶比为 50:1 时差异最显著, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组的杀伤率为 52.53%, NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组的杀伤活性为 35%, PBS 组的杀伤活性为 31.92%。在效靶比一定(50:1)时, 空白对照组 CTL 对 A-375 细胞和 A549 细胞的杀伤活性无明显差异, 而 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组和 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组的 CTL 对 A-375 细胞的杀伤活性均高于对 A549

及 K562 细胞的杀伤活性, 且 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组杀伤活性高于 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

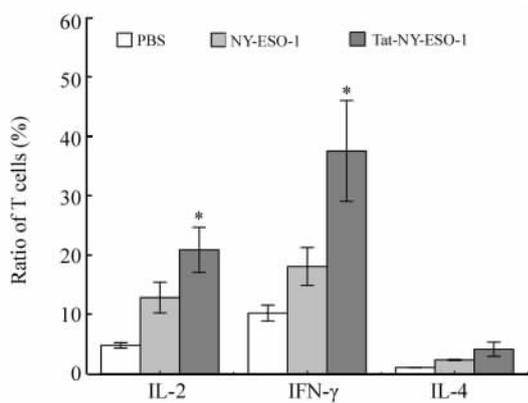


图 3 T 淋巴细胞分泌细胞因子情况分析

Fig. 3 Analysis of cytokines secreted by T lymphocytes

* $P < 0.05$ vs PBS and NY-ESO-1 group



图 4 A-375 细胞高表达 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃

Fig. 4 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ in high level expressed by A-375 cell

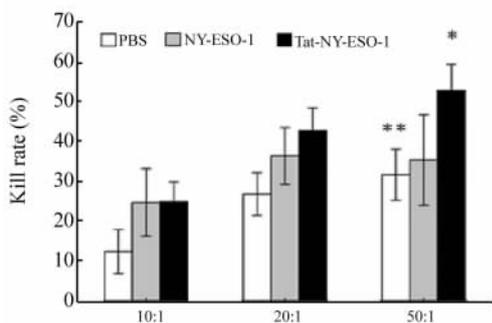


图 5 LDH 法检测不同抗原肽致敏 DC 诱导的 CTL 对黑色素瘤细胞 A-375 的杀伤率

Fig. 5 Killing rate of CTL induced by different peptide sensitized DCs on A-375 cell detected by LDH method

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ and PBS groups

分析技术从食管癌 cDNA 表达文库中筛出来的一种肿瘤共享抗原。Jager 等^[7]最早鉴别出一组位于 NY-ESO-1 氨基酸序列第 157-170 位的表位多肽 (p157-167, p157-165, p155-163), 这些多肽可被人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA)-A2 分子提呈, 从而诱导出特异性的 CTL 应答。目前, 研究人员^[8]已鉴定出 20 余种 NY-ESO-1 抗原表位, 可被不同类型的 HLA 分子提呈。其大致可分为 HLA-I 类分子^[9]、HLA-II 类分子提呈的抗原肽^[10-12]和 HLA-I 和 II 类分子共提呈的抗原肽^[4,13], 如 p157-170, 该肽段在较低浓度下就能刺激 CD8⁺、CD4⁺ T 细胞释放细胞因子, 诱导 T 细胞发生增殖反应。NY-ESO-1 抗原表位的不断发现使 NY-ESO-1 抗原肽疫苗迅速发展。NY-ESO-1 衍生多肽已被用于多种表达 NY-ESO-1 的肿瘤的免疫治疗临床试验^[14-16], 证明 NY-ESO-1 多肽疫苗可诱导出强大的特异性体液及细胞免疫应答, 除了注射部位的轻度红肿、疼痛外, 尚未发生其他不良反应。此外, 针对 NY-ESO-1 抗原产生自发性免疫应答的患者, 也未发生自身免疫性疾病。CPP 是一类以非受体依赖方式, 非经典内吞方式直接穿过细胞膜进入细胞的多肽, 能够运载多种生物学活性物质进入细胞内, 并发挥相应的生物学活性和治疗作用, 其转导效率高且不会造成细胞损伤^[17-18]。这一特性保证了 CPP 携带各种大分子物质进入细胞内的高效输送。

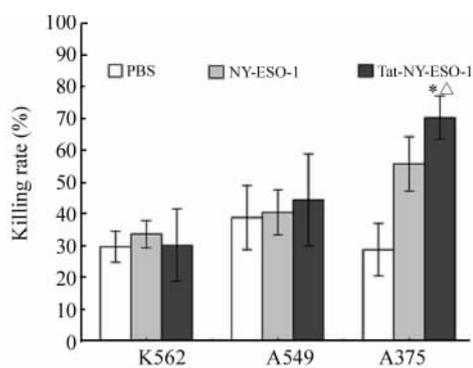


图 6 抗原肽刺激 CTL 对不同肿瘤细胞株的杀伤率

Fig. 6 Killing rates of different tumor cell lines by antigenic peptides stimulating CTL

* $P < 0.05$ vs A549 or K562 cells group;

△ $P < 0.05$ vs NY-ESO-1 or PBS

3 讨论

NY-ESO-1 最初是使用重组 cDNA 文库血清学

本研究中, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 组诱导 CTL 的 CD3⁺ CD8⁺ 细胞明显增加, CD8⁺ 细胞中 CD28⁺ T 细胞比例明显增加, 总 T 细胞中 CD40L 表达升高, 提示 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 刺激 DC 后诱导培养的 T

细胞亚群主要以 MHC- I 类分子介导的 CD3⁺ CD8⁺ 细胞为主。细胞因子分泌情况检测结果显示, CD3⁺ CD8⁺ T 细胞中 IL-2、IFN- γ 的分泌水平较单纯 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 有所提高, 提示 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏 DC 后诱导的 CTL 效应会刺激 CD3⁺ CD8⁺ 亚群分泌细胞因子。但同时结果也显示 IL-4 分泌水平有所提升。在效靶比相同的情况下, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏 DC 多肽疫苗活化的诱导产生的 CTL 对 A-375 细胞的杀伤活性明显高于对照组。推测 CPP 可以有效携带 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 抗原肽进入 DC, 延长 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 抗原肽在细胞内的降解, 从而增强其与 DC 的结合。通过 MHC- I 类分子途径有效地提呈肿瘤特异性抗原, 并活化 T 细胞, 从而产生对相应肿瘤细胞具有特异性的 CTL^[19]。

综上, Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 致敏 DC 能诱导 CTL 强大的抗黑素瘤细胞株 A-375 的免疫作用, 说明 CPP 可以增强肿瘤抗原肽的免疫原性, 在肿瘤疫苗的研究中具有巨大的潜在价值。同时, 虽然 Tat₄₉₋₅₇-NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 杀伤效果显著高于 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃, 但从 NY-ESO-1₁₅₅₋₁₆₃ 氨基酸结构 (SWLLMITQC) 来看, 其 C 端半胱氨酸 C_{ys} 残基易在氧化-还原作用下发生二聚化(二硫键)^[7,10], 引起的抗原肽构象变化可能其免疫原性起到一定的调节作用, 在一定程度上可能会降低 CTL 的杀伤能力。那么, 在 Tat₄₉₋₅₇ 介导下, 氧化-还原作用对其免疫原性调控情况如何, 引起的 CTL 表型多态性也正在进一步研究当中。

[参 考 文 献]

[1] Bao L, Dunham K, Lucas K, et al. MAGE-A1, MAGE-A3, and NY-ESO-1 can be upregulated on neuroblastoma cells to facilitate cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor cell killing [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(9): 1299-1307.

[2] Lai JP, Robbins PF, Raffeld M, et al. NY-ESO-1 expression in synovial sarcoma and other mesenchymal tumors: significance for NY-ESO-1-based targeted therapy and differential diagnosis [J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(6): 854-858.

[3] Li M, Shi H, Mu Y, et al. Effective inhibition of melanoma tumorigenesis and growth via a new complex vaccine based on NY-ESO-1-alum-polysaccharide-HH2 [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 179.

[4] Odunsi K, Matsuzaki J, James SR, et al. Epigenetic potentiation of NY-ESO-1 vaccine therapy in human ovarian cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(1): 37-49.

[5] Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1816(2): 232-246.

[6] Dhodapkar MV, Sznol M, Zhao B, et al. Induction of antigen-spe-

cific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205 [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(232): 232ra51.

- [7] Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(2): 265-270.
- [8] Dutoit V, Taub RN, Papadopoulos KP, et al. Multi-epitope CD8⁺ T cell response to an NY-ESO-1 peptide vaccine results in imprecise tumor targeting [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(12): 1813-1822.
- [9] Sonpavde G, Wang M, Peterson LE, et al. HLA-restricted NY-ESO-1 peptide immunotherapy for metastatic castration resistant prostate cancer [J]. *Invest New Drugs*, 2014, 32(2): 235-242.
- [10] Ayyoub M, Dojcinovic D, Pignon P, et al. Monitoring of NY-ESO-1 specific CD4⁺ T cells using molecularly defined MHC class II/His-tag-peptide tetramers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(16): 7343-7342.
- [11] Gunda V, Frederick DT, Bernasconi MJ, et al. A potential role for immunotherapy in thyroid cancer by enhancing NY-ESO-1 cancer antigen expression [J]. *Thyroid*, 2014, 24(8): 1241-1250.
- [12] Zarour HM, Maillere B, Brusica V, et al. NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor reactive CD4⁺ T cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1): 213-218.
- [13] Buonaquero L, Petrizzo A, Tornesello ML, et al. Translating tumor antigens into cancer vaccines [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(1): 23-34.
- [14] Sonpavde G, Wang M, Peterson LE, et al. HLA-restricted NY-ESO-1 peptide immunotherapy for metastatic castration resistant prostate cancer [J]. *Invest New Drugs*, 2014, 32(2): 235-242.
- [15] Giesen E, Jilaveanu LB, Parisi F, et al. NY-ESO-1 as a potential immunotherapeutic target in renal cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5209-5217.
- [16] Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, et al. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8⁺ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(40): 16723-16728.
- [17] Wang HY, Wang RF, et al. Enhancing cancer immunotherapy by intracellular delivery of cell-penetrating peptides and stimulation of pattern-recognition receptor signaling [J]. *Adv Immunol*, 2012, 114: 151-176.
- [18] Mäger I, Langel K, Lehto T, et al. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(3): 502-511.
- [19] Wang RF, Wang HY. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(2): 149-154.

[收稿日期] 2015 - 03 - 25

[修回日期] 2015 - 10 - 22

[本文编辑] 黄静怡