

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.003

· 研究快报 ·

食管癌患者外周血 MAGE-C2 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的功能及临床意义

李璞璞^{a,b}, 陈新峰^{a,b}, 平玉^{a,c}, 张震^{a,c}, 秦国慧^{a,b}, 黄岚^a, 张毅^{a,b,c} (郑州大学 a. 第一附属医院 生物细胞治疗中心; b. 第一附属医院 肿瘤科; c. 生命科学学院, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:** 评价食管癌患者外周血恶性黑色素瘤相关抗原(melanoma-associated antigen, MAGE)-C2 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的功能, 并分析其与临床病理参数的相关性。 **方法:** 密度梯度离心法获取 130 例食管癌初治患者(收集自 2014 年 11 月至 2015 年 11 月郑州大学第一附属医院胸外科) 的 PBMC, 流式细胞术、RT-PCR 方法筛选 HLA-A2 * 0201 和 MAGE-C2 共阳性的患者, 其 PBMC 培养 7、14 d 后加 MAGE-C2(336-344) 抗原肽 1 μg/ml、IL-2 100 μg/ml 和 CD3/CD28 Dynabeads 2 μl 处理, 诱导扩增抗原特异性 CD8⁺ T 细胞, 流式细胞术检测 CD8⁺ T 细胞表面 CD107a 和胞内 IFN-γ 的水平, 并分析其与临床参数的相关性。 **结果:** 筛选出 52 例 HLA-A2 * 0201 和 MAGE-C2 共阳性的患者, MAGE-C2(336-344) 处理其 PBMC 后, MAGE-C2(336-344) 处理组 CD8⁺ T 细胞中 CD107a⁺ IFN-γ⁺, CD107a⁺ IFN-γ⁻ 和 CD107a⁻ IFN-γ⁺ 细胞的比例明显升高 (*P* < 0.05); CD107a 的表达在早期、未发生淋巴结转移和高分化的食管癌患者明显高于晚期、发生淋巴结转移和低分化的癌症患者 (*P* < 0.05); IFN-γ 的表达在高分化的食管癌患者明显高于低分化的食管癌患者 (*P* < 0.05)。 **结论:** 成功诱导扩增 MAGE-C2 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞, 并发现其功能与食管癌的分期和淋巴结转移相关, 似可作为一种理想的免疫治疗靶点。

[关键词] 食管癌; CD8⁺ T 细胞; 恶性黑色素瘤相关抗原-C2; CD107a; 干扰素-γ

[中图分类号] R735.1; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)04-0476-05

Function analysis of MAGE-C2 antigen-specific CD8⁺ T cells in peripheral blood of patients with esophageal cancer and its clinical significance

LI Pupu^{a,b}, CHEN Xinfeng^{a,b}, PING Yu^{a,c}, ZHANG Zhen^{a,c}, QIN Guohui^{a,b}, HUANG Lan^a, ZHANG Yi^{a,b,c} (a. Bio-cytotherapy Center, the First Affiliated Hospital; b. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital; c. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the function of melanoma-associated antigen (MAGE)-C2 antigen-specific CD8⁺ T cells in peripheral blood of the patients with esophageal cancer, and analyze its relevance to clinical pathological parameters. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from 130 patients with esophageal cancer who were collected by Department of thoracic surgery, the First Hospital affiliated to Zhengzhou University during November 2014 and November 2015 with density gradient centrifugation. The patients with co-positive HLA-A2 * 0201 and MAGE-C2 were selected with flow cytometry and RT-PCR assays. After PBMCs of the patients were cultured for 7 and 14 days and treated with MAGE-C2(336-344) antigen peptide (1 μg/ml), IL-12 (100 μg/ml) and CD3/CD28 Dynabeads (2 μl) to induce amplification of antigen-specific CD8⁺ T cells, as well as CD107a on surface of CD8⁺ T cells and IFN-γ in the cells were detected with flow cytometry assay, and their relationships with clinical parameters were analyzed. **Re-**

[基金项目] 国家自然科学基金面上资助项目(No. 81171986; 81271815), 国家自然科学基金中美生物医学合作研究资助项目(No. 812111102), 卫生部科研攻关基金资助项目(No. 20110110001), 河南省科技厅基础与前沿技术研究基金资助项目(No. 112300410153; 122300410155)。 Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171986; 81271815), the National Natural Science Foundation of China and Sino-US Cooperation in Biomedical Research Projects (No. 812111102), the Research Grant from the Ministry of Public Health (No. 20110110001), and the Basic and Advanced Technology Research Foundation from Science and Technology Department of Henan Province (No. 112300410153; 122300410155)

[作者简介] 李璞璞(1990-), 女, 河南省商丘市人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫相关研究, E-mail: pupuli2@163.com

[通信作者] 张毅(ZHANG Yi, corresponding author), E-mail: yizhang@zzu.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160711.1023.006.html>

sults: Fifty two patients with co-positive HLA-A2 * 0201 and MAGE-C2 were selected out. After their PBMCs were treated with MAGE-C2(336-344), percentage of CD107a⁺ IFN- γ ⁺ / CD107a⁺ IFN- γ ⁻ / CD107a⁻ IFN- γ ⁺ in CD8⁺ T cells of the treatment group was obviously increased ($P < 0.05$). Expression of CD107a in early stage and highly differentiated esophageal cancer patients without lymphatic metastasis was obviously higher than that in advanced and poorly differentiated esophageal cancer patients with lymphatic metastasis ($P < 0.05$). Expression of IFN- γ in patients with highly differentiated esophageal cancer was higher than that in patients with poorly differentiated esophageal cancer ($P < 0.05$). **Conclusion:** Amplification of MAGE-C2 antigen-specific CD8⁺ T cells was successfully introduced, and associations of its function with esophageal cancer staging and lymphatic metastasis were found. It could become an ideal target for immunotherapy of the cancer.

[**Key words**] esophageal cancer; CD8⁺ T cell; melanoma associated antigen-C2; CD107a; IFN- γ

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(4): 476-480. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.003]

世界范围内食管癌的病死率在男性肿瘤患者中位于第五位,在女性肿瘤患者中位于第八位,并具有一定的区域分布性,尤其在河南省多发^[1-2]。尽管近几年食管癌的疗效不断改善,但患者5年生存率仍不足17%^[1-2]。1985年,美国国立癌症研究所 Rosenberg 等^[3]首次应用肿瘤过继细胞治疗(adoptive cytotherapy, ACT)方法治疗黑色素瘤,开辟了免疫治疗肿瘤的新途径,其中T细胞治疗被认为是更为有效的治疗手段。抗原特异性CD8⁺T细胞能够识别并杀伤表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞。目前,研究最为普遍的抗原是癌胚抗原,其家族中研究最多的分子为恶性黑色素瘤相关抗原(melanoma-associated antigen, MAGE),一般情况下,MAGE基因除了睾丸及胎盘外的正常组织中均不表达,在恶性肿瘤组织中高表达^[4-5]。MAGE基因根据其染色体位置及组织分布不同,分为MAGE-A、MAGE-B、MAGE-C、MAGE-D、MAGE-E和MAGE-F六个亚家族^[4]。而MAGE-C抗原家族中的MAGE-C2已被鉴定出具有HLA-A2 * 0201限制性且能够有效提呈给CD8⁺T细胞的肽段有两种,分别为ALKDVEERV(336-344),LLFGLALIEV(191-200)^[5]。本课题组的前期工作^[6]已证实,MAGE-C2抗原在肺癌中的表达率高达70%,而MAGE-C2在食管癌中诱导抗原特异性T细胞反应尚未见报道。因此,本课题组探讨MAGE-C2(336-344)诱发抗原特异性CD8⁺T细胞的反应性。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

收集2014年11月至2015年11月郑州大学第一附属医院胸外科收治的食管癌初治患者130例,所有患者均经临床诊断和病理活检确诊并且入院之前未接受过化疗和放射治疗。筛选出HLA-A2和

MAGE-C2共阳性的52例患者为研究对象,其中男性30例、女性22例,年龄35~79岁,中位年龄61岁。MAGE-C2抗原肽ALKDVEERV(336-344)购自上海吉尔生化有限公司,小牛血清购自天津市正江现代生物技术有限公司,淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司,改良型Hyclone RPMI 1640培养基购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,TRIzol和SYBR GREEN染料均购自Takara公司,rhIL-2购自北京双鹭药业股份有限公司,流式荧光抗体CD3-PE-cy7、CD8-APC-cy7、7-AAD-Percp、CD107a-FITC、IFN- γ -APC均购自美国BD公司。MAGE-C2基因(189 bp)上游引物(5'-TGAGTTAGAAGACTGGGTAGATGC-3')和下游引物(5'-ATGCTCTCGGTAAG ATTTGGTATC-3')由上海生工合成。流式细胞仪(BD Canto II)购自美国BD公司。

1.2 用流式术、RT-PCR筛选HLA-A2 * 0201和MAGE-C2共阳性的食管癌患者

采集食管癌患者外周血20 ml, Ficoll密度梯度离心法(1 363 × g, 25 min)获取PBMC,用RPMI 1640完全培养液(含双抗和10%灭活小牛血清)调整其密度为1 × 10⁶个/ml。取1 × 10⁵个PBMC,加表面抗体CD3-Percp、HLA-A2 * 0201-PE^[6-7],4℃避光孵育10 min,流式检测HLA-A2 * 0201的表达情况,筛选出HLA-A2 * 0201阳性患者。从HLA-A2 * 0201阳性患者的癌组织提取mRNA,经反转录、RT-PCR扩增MAGE-C2、电泳检测,筛选出MAGE-C2阳性患者。

1.3 HLA-A2 * 0201和MAGE-C2共阳性食管癌患者PBMC培养

将HLA-A2 * 0201和MAGE-C2共阳性患者的PBMC铺到6孔板里(约1 × 10⁶/孔),加MAGE-C2(336-344)抗原肽1 μg/ml、IL-2 100 μg/ml、CD3/

CD28 Dynabeads 2 μl ^[8]刺激, 7 d 后同样方法刺激一次, 14 d 后检测细胞表面 CD107a 和胞内 IFN- γ 水平。

1.4 流式术检测 MAGE-C2(336-344) 对食管癌患者 PBMC CD107a 和 IFN- γ 表达的影响及其与临床病理参数的相关性

收取 6 孔板里 PBMC 于 1.5 ml 离心管中, 加生理盐水离心后取沉淀, 再用培养基重悬后铺于 24 孔板中, 加 MAGE-C2 肽 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激 6 h, 加表面抗体 CD3-PE-cy7、CD8-APC-cy7、7-AAD-Percp、CD107a-FITC 等 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 固定, 破膜后加抗体 IFN- γ -APC, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。计算 CD8⁺ T 细胞中 CD107a⁺ 和 IFN- γ ⁺ T 细胞的比例, 分析其与临床病理参数的相关性。

1.5 统计学处理

采用 Prism 5.0 软件分析数据并绘制统计图, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 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 筛选出 52 例 HLA-A2 * 0201 和 MAGE-C2 共阳性食管癌患者

流式术(图 1)、RT-PCR 检测(图 2)结果显示, 130 例食管癌患者中 78 例为 HLA-A2 * 0201 阳性, 52 例为 HLA-A2 * 0201 和 MAGE-C2 共阳性。

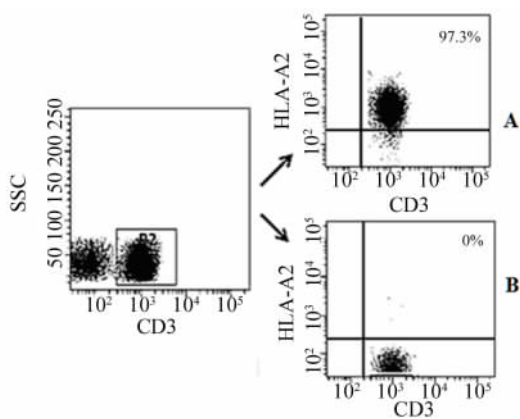


图 1 流式细胞术检测食管癌患者 PBMC 中 HLA-A2 * 0201 的表达

Fig. 1 The expression of HLA-A2 * 0201 in peripheral blood from the patients with esophageal cancer detected by flow cytometry

A: HLA-A2 * 0201 (+); B: HLA-A2 * 0201 (-)

2.2 MAGE-C2(336-344) 处理提高 CD8⁺ T 细胞 CD107a 和 IFN- γ 的表达

流式细胞术检测结果(图 3)显示, 与培养前相

比, MAGE-C2(336-344) 处理组 CD8⁺ T 细胞中 CD107a⁺ IFN- γ ⁺, CD107a⁺ IFN- γ ⁻ 和 CD107a⁻ IFN- γ ⁺ 细胞的比例明显升高($P < 0.05$)。



图 2 RT-PCR 检测 MAGE-C2 在食管癌肿瘤组织中的表达
Fig. 2 The expression of MAGE-C2 in tumor tissues from the patients with esophageal cancer detected by RT-PCR
1/3/4/5/7: MAGE-C2(+); 2/6/8: MAGE-C2(-)

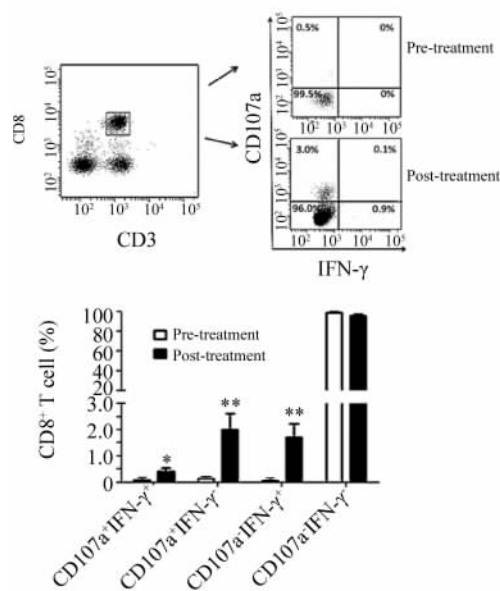


图 3 MAGE-C2(336-344) 处理提高 CD8⁺ T 细胞中 CD107a、IFN- γ 单或双阳性细胞的比例

Fig. 3 Increased percentages of CD107a⁺ IFN- γ ⁺, CD107a⁺ IFN- γ ⁻ and CD107a⁻ IFN- γ ⁺ cells in CD8⁺ T cells after stimulation with MAGE-C2(336-344)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Pre-treatment group

2.3 CD107a、IFN- γ 单阳性或双阳性细胞的比例与临床参数的关系

如表 1 所示, CD107a⁺ (CD107a⁺ IFN- γ ⁺ 和 CD107a⁺ IFN- γ ⁻) T 细胞的比例在早期、未发生淋巴结转移和高分化的食管癌患者中明显高于晚期、发生淋巴结转移和低分化的食管癌患者($P < 0.05$); 而其与性别和年龄无关($P > 0.05$)。IFN- γ ⁺ (CD107a⁺ IFN- γ ⁺ 和 CD107a⁻ IFN- γ ⁺) 细胞的比例在高分化的食管癌患者中明显高于低分化的食管癌患者($P < 0.05$), 而其与性别、年龄、分期和淋巴结转移均无关($P > 0.05$)。

表 1 CD8⁺ T 细胞对 MAGE-C2(336-344)反应性与临床参数的相关性分析Tab. 1 Analysis on the relationship of reactivity of CD8⁺ T cells to MAGE-C2(336-344) with clinical parameters

Clinical feature	N	CD107a ⁺ cell (%)	P	IFN- γ ⁺ T cell (%)	P
Gender					
Male	30	1.07 \pm 0.18	0.355	0.85 \pm 0.13	0.846
Female	22	1.33 \pm 0.22		0.89 \pm 0.13	
Age (t/a)					
< 60	23	1.25 \pm 0.24	0.653	0.86 \pm 0.12	0.911
\geq 60	29	1.12 \pm 0.16		0.88 \pm 0.14	
Lymph node metastasis					
No	31	1.48 \pm 0.21	0.007	1.00 \pm 0.14	0.076
Yes	21	0.73 \pm 0.11		0.67 \pm 0.11	
Stage					
0-2	38	0.41 \pm 0.18	0.005	0.98 \pm 0.12	0.053
3-4	14	0.54 \pm 0.11		0.57 \pm 0.13	
Differentiation					
Middle	28	1.17 \pm 0.21*	0.163	0.86 \pm 0.12*	0.073
High	9	1.77 \pm 0.35		1.35 \pm 0.31	
Low	15	0.84 \pm 0.15*	0.008	0.60 \pm 0.12*	0.01

* P < 0.05 vs high differentiation

3 讨论

CD8⁺ T 细胞能够识别 MHC- I 类分子提呈的内源性抗原肽,目前 HLA-A2 * 0201 限制性的 MAGE-C2 肽段已被鉴定。本研究中的食管癌患者 HLA-A2 * 0201 阳性率为 60%,而 MAGE-C2 在食管癌中具有较高的阳性率,是食管癌免疫治疗的理想靶点,HLA-A2 * 0201 与 MAGE-C2 共阳性率为 40%,这些患者可以应用针对 HLA-A2 * 0201 限制性的 MAGE-C2 抗原表位的免疫治疗,因此评估食管癌患者中的 HLA-A2 * 0201 限制性的 MAGE-C2 特异性 CD8⁺ T 细胞的功能具有一定的临床参考价值^[9]。研究^[10-12]发现,CD107a 可作为一种表面分子来评估抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的杀伤活性,而抗原特异性 CD8⁺ T 细胞在早期癌症患者中功能较强,并且与患者的生存密切相关。本研究结果与前人研究结果相一致,MAGE-C2(336-344)刺激 T 淋巴细胞诱导抗原特异性 CD8⁺ T 细胞反应,在未发生淋巴结转移的食管癌患者 MAGE-C2 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞表面分子 CD107a 的表达水平和内源性 IFN- γ

的分泌水平较淋巴结转移的食管癌患者高。因此,癌瘤抗原 MAGE-C2 激活的 CD8⁺ T 细胞的功能与肿瘤的淋巴结转移、分期和分化密切相关,可以作为一种理想的免疫治疗靶点。研究^[13-14]发现,用 tetramer (MHC-肽四聚体技术)标记抗原特异性 T 细胞,其表面分子 CD107a 的表达水平和内源性 IFN- γ 的分泌水平明显增高,这项重要发现已被建议用以治疗恶性肿瘤的制备疫苗试验中^[15]。然而,本研究中 MAGE-C2(336-344)诱发的抗原特异性 CD8⁺ T 细胞在体外培养后,表面分子 CD107a 的表达水平和内因子 IFN- γ 的分泌水平仍受限制,很可能是因为抗原肽的持续刺激会导致 T 细胞处于持续活化状态,使 T 细胞走向衰竭状态,从而高表达抑制性受体程序性死亡蛋白 1(programmed death-1, PD-1), T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白(T-cell immunoglobulin mucin, Tim3) 和 TIGIT 等一系列免疫抑制分子^[16]。本研究尚未涉及 MAGE-C2 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的功能与患者生存期的相关性,这将会在下一步的实验中探讨,因此癌瘤抗原 MAGE-C2 是否可以作为一种预后评估的指标还需要进一

步探索。

综上所述,该研究结果显示在食管癌患者抗原特异性 CD8⁺T 细胞中的功能及临床意义,有助于判断疾病的进程和预测转归,也为肿瘤的免疫治疗提供了实验依据和新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] YUE D, FAN Q, CHEN X, et al. Epigenetic inactivation of SPINT2 is associated with tumor suppressive function in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 322(1): 149-158. DOI:10.1016/j.yexcr.2013.11.009.
- [2] ENZINGER P C, MAYER R J. Esophageal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(23): 2241-2252. DOI:10.1007/springerreference-173666.
- [3] ROSENBERG S A, LOTZE M T, MUUL L M, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer [J]. *N Engl J Med*, 1985, 313(23): 1485-1492. DOI:10.1056/nejm198512053132327.
- [4] KATSURA Y, SATTA Y. Evolutionary history of the cancer immunity antigen MAGE gene family [J/OL]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (6): e20365 [2016-01-15]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020365>. DOI: 10.1371/journal.pone.0020365.
- [5] MA W, GERMEAU C, VIGNERON N, et al. Two new tumor-specific antigenic peptides encoded by gene MAGE-C2 and presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-A2 * 0201 [J]. *Int J Cancer*, 2004, 109(5): 698-702. DOI:10.1002/ijc.20038.
- [6] Cernea S, Herold K C. Monitoring of antigen-specific CD8 T cells in patients with type 1 diabetes treated with antiCD3 monoclonal antibodies [J]. *Clin Immunol*, 2010, 134(2): 121-129. DOI: 10.1016/j.clim.2009.09.005.
- [7] Ge H L, Wang Y, Wang S J, et al. Identification of melanoma-specific peptide epitopes by HLA-A2 * 0201.1-restricted cytotoxic T lymphocytes [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2006, 38 (2): 110-118. DOI: org/10.1111/j.1745-7270.2006.00134.x.
- [8] BRIMNES M K, GANG A O, DONIA M, et al. Generation of autologous tumor-specific T cells for adoptive transfer based on vaccination, in vitro restimulation and CD3/CD28 dynabead-induced T cell expansion [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61 (8): 1221-1231. DOI: 10.1007/s00262-011-1199-8.
- [9] PRATHEEK B M, SURYAWANSHI A R, CHATTOPADHYAY S, et al. In silico analysis of MHC- I restricted epitopes of Chikungunya virus proteins: implication in understanding anti-CHIKV CD8(+) T cell response and advancement of epitope based immunotherapy for CHIKV infection [J/OL]. *Infect Gene Evol*, 2015, 31: 118-126 [2016-01-15]. <http://www.science-direct.com/science/article/pii/S1567134815000301>. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.01.017.
- [10] AXELSSON-ROBERTSON R, JU J H, KIM H Y, et al. Mycobacterium tuberculosis-specific and MHC class I -restricted CD8⁺ T-cells exhibit a stem cell precursor-like phenotype in patients with active pulmonary tuberculosis [J/OL]. *Int J Infect Dis*, 2015, 32: 13-22 [2016-01-15]. [http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(14\)01734-2/abstract](http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(14)01734-2/abstract). DOI: 10.1016/j.ijid.2014.12.017.
- [11] MIZUKOSHI E, YAMASHITA T, ARAI K, et al. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1448-1457. DOI: 10.1002/hep.26153.
- [12] FLECKEN T, SCHMIDT N, HILD S, et al. Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8⁺ T-cell responses in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2014, 59(4): 1415-1426. DOI: 10.1002/hep.26731.
- [13] XU Y, LI H, GAO R L, et al. Expansion of interferon-gamma-producing multifunctional CD4⁺ T-cells and dysfunctional CD8⁺ T-cells by glypican-3 peptide library in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Clin Immunol*, 2011, 139(3): 302-313. DOI: 10.1016/j.clim.2011.02.014.
- [14] GEHRING A J, HO Z Z, TAN A T, et al. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(2): 682-690. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.04.045.
- [15] MELLMAN I, COUKOS G, DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age [J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 480-489. DOI: 10.1038/nature10673.
- [16] CHAUVIN J M, PAGLIANO O, FOURCADE J, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(5): 2046-2058. DOI: 10.1172/JCI80445.

[收稿日期] 2016 - 04 - 17

[修回日期] 2016 - 05 - 20

[本文编辑] 黄静怡

欢迎登录《中国肿瘤生物治疗杂志》网站 www.biother.org