

· 论 著 ·

结核杆菌抗原 Ag85C 的 HLA-A * 0201 限制性 CD8⁺ CTL 表位的预测及鉴定

吴传勇, 娄加陶, 蒋廷旺, 钱 琤, 周 晔, 陈 燕, 陈 波, 谷明莉, 邓安梅*, 仲人前*

(第二军医大学长征医院实验诊断科, 解放军临床免疫中心, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 预测及鉴定结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 抗原 Ag85C 的 HLA-A * 0201 限制性 CD8⁺ CTL 表位, 为基于表位的结核疫苗研究提供依据。 **方法:** 应用 SYFPEITHI 数据库预测结核杆菌抗原 Ag85C 序列中可能存在的 HLA-A * 0201 限制性 T 细胞表位, 利用 T2 细胞株分析各预测的抗原肽与 HLA-A * 0201 分子的亲合力, 选取高亲合力肽诱导特异性 CTL 细胞, 检测各高亲合力肽刺激其特异性 CTL 细胞分泌的 IFN- γ 水平、在体外的 CTL 增殖反应以及细胞杀伤毒性, 逐步鉴定出 Ag85C 的 HLA-A * 0201 限制性 CD8⁺ CTL 表位。 **结果:** SYFPEITHI 数据库从 Ag85C 序列中预测到 14 条能够结合 HLA-A * 0201 分子的抗原肽, 其中 3 个抗原肽(170~178 aa, 317~325 aa 和 144~153 aa) 显示与 T2 细胞上 HLA-A * 0201 分子有高结合力, 而抗原肽 FLTREMPAWL(144~153 aa) 能够诱导大多数 HLA-A * 0201 阳性结核患者及 PPD(+) 健康志愿者产生特异性 CTL 细胞, 并分泌大量的 IFN- γ , 能够诱导 CTL 体外发生增殖, 能够产生特异性杀伤活性。 **结论:** 成功鉴定出抗原肽 FLTREMPAWL(144~153 aa) 结核杆菌抗原 Ag85C 的 HLA-A * 0201 限制性 CD8⁺ CTL 表位, 可作为结核疫苗设计的候选表位, 为进一步研发新型有效的抗结核疫苗奠定了基础。

[关键词] 分枝杆菌, 结核; 抗原; 表位; T 淋巴细胞, 细胞毒性

[中图分类号] R 378.911

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)04-0349-06

Prediction and identification of HLA-A * 0201 restricted CD8⁺ CTL epitope in *Mycobacterium tuberculosis* Ag85C

WU Chuan-yong, LOU Jia-tao, JIANG Ting-wang, QIAN Cheng, ZHOU Ye, CHEN Yan, CHEN Bo, GU Ming-li, DENG An-mei*, ZHONG Ren-qian* (Department of Clinical Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Center of Clinical Immunology of PLA, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To predict and identify HLA-A * 0201 restricted CD8⁺ CTL epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigen Ag85C, so as to provide evidence for epitope-based study for tuberculosis (TB) vaccine. **Methods:** The online database SYFPEITHI was applied to predict the potential HLA-A * 0201 restricted epitopes from Ag85C, an antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. T2 cell line was used to assay the affinity between the predicted peptides and HLA-A * 0201 molecules. The specific CTL lines were induced from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HLA-A * 0201 positive TB patients and PPD+ healthy donors by peptides with high binding affinity to HLA-A * 0201 molecules. IFN- γ production, *in vitro* proliferation and cytotoxicity of peptide-induced CTL were determined to screen HLA-A * 0201 restricted CD8⁺ CTL epitopes from those candidates. **Results:** Fourteen potential epitopes were identified from the SYFPEITHI database. After binding affinity assay, 3 of the 14 peptides (170-178 aa, 317-325 aa, and 144-153 aa) were found to have high binding affinity to HLA-A * 0201 molecules. However, only one peptide (144-153 aa) stimulated its specific CTL to release IFN- γ , proliferate *in vitro* and produce specific cytotoxicity. **Conclusion:** We have successfully identified a HLA-A * 0201 restricted CD8⁺ CTL epitope of Mtb Ag85C-FLTREMPAWL(144-153 aa), which might be a candidate epitope for TB vaccine designing. Our findings provides a basis for developing novel and effective anti-TB vaccine.

[KEY WORDS] *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb); antigens; epitopes; T-lymphocytes, cytotoxic

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 349-354]

结核(tuberculosis, TB)是影响人类健康的主要传染性疾 病之一,尤其是在发展中国家和地区,估计全世界约有三分之一的人口可能感染过结核杆菌,其中绝大多数为潜伏感染者^[1]。每年约有 800 万人新感染结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb),至少 300 万人死于结核^[2]。结核杆菌和人类免疫缺陷病毒(HIV)的伴发感染,以及结核杆菌多重耐药菌株的持续扩散^[3],更是加剧了结核的危害。目前人类唯一可用的抗结核疫苗是卡介苗(BCG)。

[基金项目] 国家自然科学基金(30471616),上海市重点基础科研项目(05JC14052),上海市重点科研支撑条件项目(051409012),上海市青年科技启明星计划(QMX01423)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30471616), Shanghai Key Project in Basic Science Research (05JC14052), Shanghai Key Scientific Research Supporting Program (051409012), and Shanghai Rising Star Program (QMX01423)。

[作者简介] 吴传勇,硕士生。E-mail: wcy-9@sina.com

* Corresponding authors. E-mail: amdeng70@yahoo.com; rqzhong@yahoo.com

虽然其能够预防结核在婴儿之间的传播,但对成人肺结核的预防效果却受到争议,介于0%~80%^[4]。因此迫切需要研发一种新型有效的抗结核疫苗。

结核杆菌是一种细胞内病原体,有效的细胞介导的免疫反应对于控制结核杆菌感染是必需的。许多研究表明,CD4⁺T细胞能够通过产生细胞因子(IFN- γ 等)激活巨噬细胞,参与抗结核反应^[5]。然而,越来越多来自人体和动物的研究表明,CD8⁺细胞毒性T细胞(CTL)在抗结核保护性免疫中发挥重要作用,包括溶解感染细胞、直接的抗菌活性和释放激活巨噬细胞抗菌活性的细胞因子等^[6]。有研究^[7]发现结核杆菌蛋白表位特异的人CD8⁺CTL细胞能够溶解感染细胞并释放IFN- γ 。

Ag85复合体,由85A、85B和85C3种高度同源的蛋白组成,与分枝杆菌的转移酶活性相关,参与合成分枝杆菌的细胞壁,能够在多数接触结核杆菌的健康人体内诱导T细胞增殖和IFN- γ 释放,是结核疫苗较理想的候选抗原^[8]。HLA-A*0201是人群中较主要的HLA表型之一,Ag85A和Ag85B的HLA-A*0201限制性CD8⁺T细胞表位已经被鉴定出来^[8-9],但Ag85C的相关表位尚未被鉴定。

本研究采用免疫信息学的方法,利用数据库SYFPEITHI,从Ag85C的氨基酸序列中,筛选出可能与HLA-A*0201结合的肽进行化学合成。分析合成肽与HLA-A*0201的结合力,筛选出结合力较强的肽,在体外刺激其特异性CD8⁺CTL细胞,并以ELISA法检测特异性T细胞产生的IFN- γ ,时间分辨荧光法(DELIFA)检测特异性T细胞的增殖反应及细胞毒性,逐步鉴定出Ag85C的HLA-A*0201限制性CD8⁺CTL表位。

1 材料和方法

1.1 研究对象 肺结核确诊患者24例,其中HLA-A*0201阳性13例,HLA-A*0201阴性11例,经放射学和临床痰培养检验确诊。结核菌素试验(PPD)阳性健康志愿者31例,其中HLA-A*0201阳性14例,HLA-A*0201阴性17例,经放射学检查无结核病灶。均抽取外周血10 ml,以肝素抗凝。所有操作及材料获取均征得受试者知情同意。

1.2 试剂及仪器 淋巴细胞分离液LymphoprepTM购自挪威AXIS-SHIELD公司;RPMI 1640培养基和胎牛血清购自Gibco公司;人重组GM-CSF、IL-4购自R&D公司;LPS、人重组IL-2、DMSO、BFA、 β 2-MG购自Sigma公司;FITC标记的鼠抗人

HLA-A2单克隆抗体(BB7.2)、FITC标记的鼠抗人HLA-A2.1单克隆抗体、FITC标记的抗IFN- γ 抗体购自Caltag公司;RNA抽提试剂盒购自Qiagen公司;HLA-A2高分辨PCR-SSP(序列特异性引物-聚合酶链反应)试剂盒购自One Lambda公司;鼠抗人IFN- γ ELISA检测试剂盒购自BD公司;时间分辨荧光 DELFIA 细胞增殖(AD0200)与细胞毒性(AD0016)检测试剂盒购自Wallac Oy公司;多肽由上海生工生物工程技术有限公司合成;T2细胞株由第二军医大学长征医院实验诊断科保存;流式细胞仪(Coulter EPICS XL)、时间分辨荧光检测仪(DELIFIA 1235,Perkin Elmer)。

1.3 HLA分型及表位预测、多肽合成 以FITC标记的鼠抗人HLA-A2单克隆抗体(BB7.2),应用流式细胞仪对HLA-A2进行初步筛选,再以HLA-A2高分辨PCR-SSP试剂盒确认HLA-A*0201亚型。

从NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得结核杆菌抗原Ag85C的氨基酸序列,应用SYFPEITHI数据库(<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>)对其进行HLA-A*0201限制性CTL表位预测,根据多肽上的氨基酸是否为锚定残基、辅助残基或优势残基进行计分^[10],选取分值不低于22分的14条作为可能的CTL表位。委托上海生工生物工程技术有限公司应用F-moc化学法合成预测表位,经高效液相色谱(HPLC)测定其纯度>95%,再经质谱(MS)鉴定其组分。低压冻干粉保存于4 $^{\circ}$ C,用前以无菌蒸馏水复苏多肽(2 μ g/ μ l)。

1.4 抗原肽亲和力的分析 利用HLA-A*0201(+)抗原处理缺陷T2细胞系进行抗原肽亲和力分析。T2细胞在组装及转运HLA I类分子时有缺陷,表面空载的HLA-A2分子表达极不稳定,递呈后很快降解,外源的抗原肽与T2细胞表面的HLA-A2分子结合,能够增加细胞表面的HLA-A2分子的表达,抗原肽与HLA-A2的结合力越强,T2细胞表面HLA-A2分子的表达量就越高,表达的HLA-A2分子可以利用小鼠抗人HLA-A*0201单克隆抗体以流式细胞仪测定^[11]。具体为:以含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及100 U/ml链霉素的RPMI 1640培养液培养T2细胞,培养的T2细胞以pH 3.2的柠檬酸钠-磷酸盐缓冲液预处理1 min,使细胞表面的MHC I类复合物变性,立即用过量的RPMI 1640培养液洗1遍,调节细胞浓度至 3×10^5 ,以1 ml/孔种于24孔细胞培养板。以预测的各抗原肽(20 μ g/ml)刺激,补充Brefeldin(BFA,10

$\mu\text{g/ml}$)和 $\beta 2\text{-MG}$ ($1\ \mu\text{g/ml}$), 37°C 5% CO_2 饱和湿度孵育 4 h, 并以未加抗原肽为空白对照孔。收集细胞, 以 FACS(含 0.2% FCS 和 0.1% 叠氮钠的 PBS) 洗 1 遍, 用 FITC 标记的鼠抗人 HLA-A2.1 单克隆抗体染色, 常温暗处反应 30 min, FACS 液洗 2 遍, 以鞘液悬浮, 流式细胞仪(Coulter EPICS XL)检测荧光强度。每个实验重复 3 次, 以平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)为检测指标, 以荧光增长倍数(fluorescence ratio, FR)作为衡量指标, $\text{FR} = \text{抗原肽处理后的平均荧光强度} / \text{无抗原肽处理的平均荧光强度}$ 。以 $\text{FR} > 1.5$ 为高亲合力, 选取具有高亲合力的抗原肽继续进行后续实验。

1.5 抗原肽特异性 CTL 制备 用淋巴细胞分离液 LymphoprepTM, 以密度梯度离心法分离收集的肝素抗凝的静脉血中的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。分离得到的 PBMC 种于 6 孔细胞培养板, 在含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中, 37°C 5% CO_2 孵育 1.5 h。收集悬浮细胞(主要为淋巴细胞), 以 10% 二甲亚砜 90% 小牛血清保存于液氮备用。贴壁细胞为树突状细胞(dendritic cell, DC), 加入含 GM-CSF($1\ 000\ \text{U/ml}$, R&D)、IL-4($1\ 000\ \text{U/ml}$, R&D)及含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液, 37°C 5% CO_2 培养 7 d, 及时补充新鲜培养液。5 d 后, 加入 LPS($1\ \mu\text{g/ml}$, Sigma)培养 2 d 后, γ 照射使其失去增殖活性。将经过照射的 DC 与抗原肽($10\ \mu\text{mol/L}$) 在培养液中, 37°C 5% CO_2 共孵过夜。将 1×10^5 负载有抗原肽的 DC 与 1×10^6 自体 PBMCs 种于含 10% FCS 的 RPMI 1640 完全培养液的 24 孔细胞培养板, 37°C 5% CO_2 混合培养 3 d, 再加入 rIL-2($20\ \text{U/ml}$, Sigma)继续培养 10 d, 进行后续实验。

1.6 IFN- γ 的检测 将经辐射的 5×10^3 负载抗原肽的 DC $100\ \mu\text{l}$ 与 5×10^4 抗原肽诱导的自体 CTL $100\ \mu\text{l}$ 种于 96 孔细胞培养板, 6 h 后收集细胞培养液的上清, 利用鼠抗人 IFN- γ ELISA 检测试剂盒, 以双抗夹心 ELISA 法检测抗原肽诱导 CTL 分泌的 IFN- γ , 参照说明书进行操作。具体为: 用鼠抗人 IFN- γ 单克隆抗体包被 ELISA 板, 4°C 放置过夜, 洗涤后加入含 10% BSA 的 PBS, 室温静置 1 h; 洗涤后每孔加入不同稀释度的人 IFN- γ 标准品及细胞培养上清液, 室温静置 2 h; 用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗涤 5 次, 加入生物素标记的鼠抗人 IFN- γ 单克隆抗体及亲和素标记的辣根过氧化物酶, 室温静置 1 h; 洗涤后加 TMB 显色剂, 室温闭光放置 30 min, 加

10% 硫酸终止反应; 酶标仪检测培养上清液中分泌 IFN- γ 水平。每个样本设立 3 个复孔。

1.7 细胞增殖试验 采用时间分辨荧光 DELFIA 细胞增殖检测试剂盒, 检测抗原肽诱导 CTL 增殖反应, 操作步骤参照说明书。具体为: 将经辐射的 5×10^3 负载抗原肽的 DC $100\ \mu\text{l}$ 与 5×10^4 抗原肽诱导的自体 CTL $100\ \mu\text{l}$ 种于 96 孔细胞培养板中, 并以未负载抗原肽的 DC 作为阴性对照。加入 $20\ \mu\text{l}$ BrdU 标记液孵育 10 h, 离心洗涤 1 次, 加入 Eu 标记的抗 BrdU 单抗室温孵育 2 h, 洗涤、固定后, 经时间分辨荧光检测仪测定荧光强度值。每个样本设立 3 个复孔, 取其平均值为检测结果。刺激系数(stimulation index, SI) = 含抗原肽的平均荧光强度值/阴性对照平均荧光强度值, 将 $\text{SI} > 3$ 的抗原肽视为能诱导淋巴细胞增殖。

1.8 细胞毒试验 以抗原肽诱导 CTL 为效应细胞(E), 负载抗原肽的 T2 细胞作为靶细胞(T), 以时间分辨荧光 DELFIA 细胞毒性检测试剂盒, 检测抗原肽诱导 CTL 的杀伤活性, 操作步骤参照说明书。设定效应细胞与靶细胞的比例为 10 : 1, 20 : 1, 40 : 1, 共同培养 4 h, 用时间分辨荧光检测仪测定荧光强度值, 每个样本设立 3 个复孔, 取其平均值为检测结果。细胞杀伤活性(%) = (待测孔荧光强度值 - 自然释放孔荧光值) / (最大释放孔荧光强度值 - 自然释放孔荧光值) $\times 100\%$ 。

1.9 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 t 检验分析计量资料, $P < 0.05$ 定为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 表位预测及多肽合成的结果 经数据库 SYF-PEITHI 的预测, 选取以下分值不低于 22 分的 14 条肽作为可能的 CTL 表位, 进行化学合成(表 1)。合成的多肽经高效液相色谱(HPLC)的测定及质谱(MS)的鉴定, 纯度均大于 95%。

2.2 抗原肽亲和力分析的结果 培养的 T2 细胞表达的 HLA-A*0201 分子极不稳定, 递呈后很快降解, 平均荧光强度较弱。经合成的抗原肽处理后 T2 细胞平均荧光强度见表 1。经抗原肽 4、7 和 12 处理后的 T2 细胞, 平均荧光强度出现升高, 其中以抗原肽 12 升高最为明显。抗原肽与 HLA-A*0201 分子亲和力分析的结果显示, 抗原肽 4、7 和 12 与 HLA-A*0201 分子具有高亲和力, 能上调 T2 细胞 HLA-A*0201 分子表达(图 1)。因此选择抗原肽 4、7 和 12 继续进行后续试验。

表 1 抗原肽刺激后 T2 细胞的平均荧光强度
Tab 1 Mean fluorescence intensity(MFI) of T2 cells induced by individual antigenic peptides

Peptide	Position	Sequence	Score	MFI
1	25~34 aa	AMGAVLVYGL	26	5.57
2	22~30 aa	AIAAMGAVL	24	4.36
3	22~31 aa	AIAAMGAVLV	24	4.75
4	170~178 aa	SMSGGSALI	24	7.44
5	20~29 aa	RLAIAAMGAV	23	5.33
6	267~276 aa	NIPAKFLEGL	23	5.19
7	317~325 aa	AMKADIQHV	23	6.93
8	9~17 aa	RLRSAATTL	22	5.21
9	23~31 aa	IAAMGAVLV	22	4.67
10	51~59 aa	GLPVEYLQV	22	4.84
11	81~89 aa	YLLDGLRAQ	22	5.11
12	144~153 aa	FLTREMPAWL	22	10.78
13	168~177 aa	GLSMSGGSAL	22	4.61
14	289~297 aa	AADGGRNGV	22	4.93
No peptide	-	-	-	4.17

者产生较强的阳性增殖反应, SI 的平均值达到 (15.3±3.4) 和 (17.1±4.7)。抗原肽 4 和 7 在 HLA-A * 0201 阳性结核患者及 HLA-A * 0201 阳性、PPD(+)健康志愿者中未诱导出明显的增殖反应。抗原肽 4、7、12 在 HLA-A * 0201 阴性结核患者、HLA-A * 0201 阴性 PPD(+)健康志愿者,均未出现显著的增殖反应(图 3)。

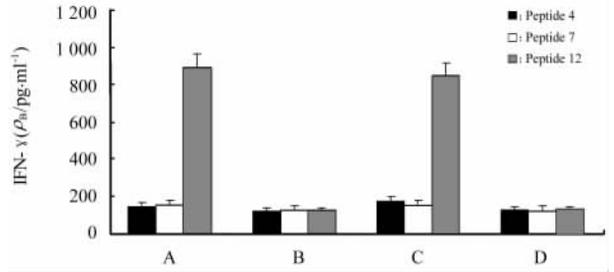


图 2 抗原肽诱导特异性 CTL 分泌 IFN-γ
Fig 2 IFN-γ release by peptide-induced CTL

A: HLA * 0201 (+) TB patient; B: HLA * 0201 (-) TB patient; C: HLA * 0201 (+) PPD (+) normal volunteer; D: HLA * 0201 (-) PPD (+) normal volunteer; n=3, $\bar{x} \pm s$

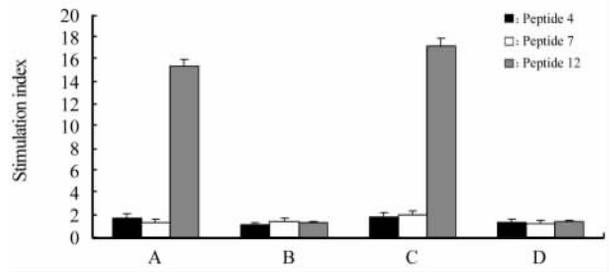


图 3 抗原肽诱导特异性 CTL 在体外的增殖反应
Fig 3 Proliferation of peptide-induced CTL in vitro

A: HLA * 0201 (+) TB patient; B: HLA * 0201 (-) TB patient; C: HLA * 0201 (+) PPD (+) normal volunteer; D: HLA * 0201 (-) PPD (+) normal volunteer; n=3, $\bar{x} \pm s$

2.5 细胞毒试验结果 在效靶比为 40 : 1 时,细胞杀伤活性达到最高值, 抗原肽 12 可在 13 例 HLA-A * 0201 阳性结核患者中的 12 例, 以及全部 31 例 HLA-A * 0201 阳性、PPD(+)健康志愿者中, 诱导细胞杀伤活性显著提高, 分别为 (30.1±3.6)% 和 (31.4±4.1)%。抗原肽 4 和 7 在 HLA-A * 0201 阳性结核患者及 HLA-A * 0201 阳性 PPD(+)健康志愿者中, 诱导细胞的杀伤活性没有明显增高。而在 HLA-A * 0201 阴性结核患者、HLA-A * 0201 阴性 PPD(+)健康志愿者中, 抗原肽 4、7 和 12 诱导的细胞杀伤活性均小于 10.0%(图 4)。

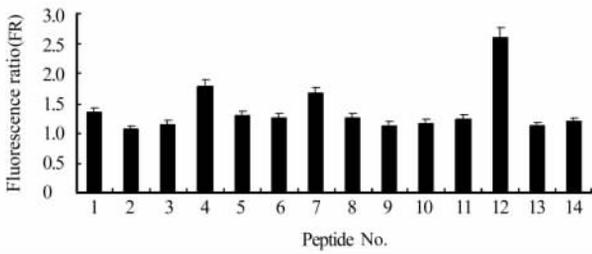


图 1 预测的抗原肽与 HLA-A * 0201 的亲合力分析
Fig 1 The affinity between predicted peptides and HLA-A * 0201
 n=3, $\bar{x} \pm s$

2.3 IFN-γ 检测的结果 抗原肽 4 和 7 在 HLA-A * 0201 阳性结核患者及 HLA-A * 0201 阳性、PPD(+)健康志愿者中未能诱导 CTL 显著分泌 IFN-γ; 抗原肽 4、7 和 12 在 HLA-A * 0201 阴性结核患者、HLA-A * 0201 阴性 PPD(+)健康志愿者, 均未能明显诱导 CTL 分泌 IFN-γ。抗原肽 12 则在 13 例 HLA-A * 0201 阳性结核患者中的 12 例, 以及全部 31 例 HLA-A * 0201 阳性 PPD(+)健康志愿者中, 诱导抗原特异性 CTL 显著分泌 IFN-γ, 平均值分别达到 (892.3±13.2) 和 (849.6±10.3) pg/ml, 明显高于其他组 (P<0.05)。见图 2。

2.4 细胞增殖试验的结果 抗原肽 12 可以诱导 13 例 HLA-A * 0201 阳性结核患者中的 12 例, 以及全部 31 例 HLA-A * 0201 阳性、PPD(+)健康志愿

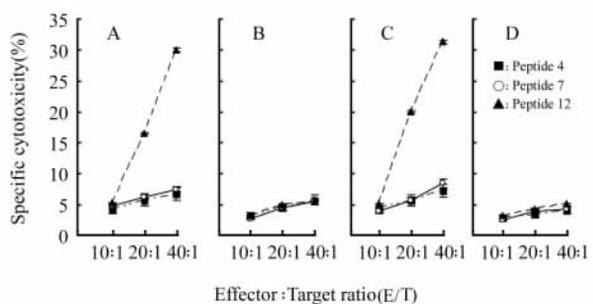


图4 抗原肽诱导的特异性 CTL 细胞毒性

Fig 4 Cytotoxicity of peptide-induced CTL

A: HLA*0201(+) TB patient; B: HLA*0201(-) TB patient; C: HLA*0201(+) PPD(+) normal volunteer; D: HLA*0201(-) PPD(+) normal volunteer; $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

近年来,由于人类免疫缺陷病毒(HIV)的伴发感染、结核杆菌多重耐药菌株的持续扩散,以及惟一可用的卡介苗保护效果不稳定等因素的影响,全球的结核疫情急剧恶化。更好地了解抗结核保护性免疫的性质,有利于进一步研发更加有效的结核疫苗。

包括激活的巨噬细胞和抗原特异的 CD4⁺T 细胞的相互作用在内的细胞免疫,已经被证实对于引发强烈的抗结核杆菌感染保护性免疫反应非常重要^[6]。然而,在对鼠实验性结核的研究中发现,缺乏有功能的 CD8⁺T 细胞的鼠更容易感染结核杆菌,表明 MHC I 限制性 CD8⁺细胞毒性 T 细胞对抗结核感染具有重要的保护作用。对人结核的研究也发现,MHC I 限制性 CD8⁺T 细胞能识别结核杆菌感染的细胞,能够释放 IFN- γ 、溶解感染的靶细胞和杀伤细胞内细菌^[12]。目前的研究^[13]表明,CD8⁺T 细胞至少通过以下 3 条可能的途径,在抗结核杆菌感染免疫反应中发挥重要作用:释放 IFN- γ 、溶解感染的靶细胞和直接抗结核杆菌。CD8⁺CTL 发挥作用,必须要识别靶细胞表面与相应 MHC I 类分子结合的特异抗原表位。因此,鉴定能够通过 MHC I 类分子提呈给 CD8⁺细胞的结核杆菌抗原表位,即 CTL 表位(cytotoxic T lymphocyte epitopes),对于阐明 CD8⁺T 细胞在抗结核中的保护作用、了解抗结核免疫反应以及研发新型的抗结核疫苗等至关重要。另外,HLA I 类分子在不同人群中的表达存在种族差异,HLA-A*0201 在多数人群中普遍存在,其频率大于 40%,因此进行 HLA-A*0201 限制性 CTL 表位的研究更具有现实意义。

为了鉴定出免疫显性表位以设计更加有效的结

核疫苗,应当选择免疫性较强的结合分枝杆菌抗原成分进行研究。在众多被关注的结核疫苗候选组分中,结核杆菌分泌性蛋白,包括 Ag85 复合体(Ag85A、B 和 C)、19 000 脂蛋白、ESAT-6 和 CFP-10 等,具有高度的免疫原性,在诱导抗结核保护性细胞免疫中具有重要作用,目前被广泛研究^[14]。研究表明,结核杆菌分泌性蛋白还具有免疫调节作用,参与结核杆菌对宿主免疫防御的下调,并在结核的发病和发展中具有重要作用^[15-16]。在人和鼠中抗结核杆菌感染 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞反应中,发现 Ag85 复合体包含免疫显性抗原及 T 细胞表位^[5],并且 Ag85A 和 Ag85B 的 HLA-A*0201 限制性 CD8⁺T 细胞表位已经被鉴定出来^[8-9]。因此对 Ag85 C 的 CD8⁺T 细胞表位的进行鉴定具有重要意义。

以往重叠肽库被广泛用于鉴定已知序列蛋白抗原的 T 细胞表位,即在整个蛋白氨基酸序列的范围内,化学合成具有一定长度的相互重叠的肽段,经淋巴细胞功能试验确定含有 T 细胞表位的肽段,然后从含有 T 细胞表位的肽段 N 或 C 端逐步截短产生一系列短肽段中,再经淋巴细胞功能试验进一步确定最小的 T 细胞表位。这种方法虽然是一种筛选 T 细胞表位的有力工具,具有覆盖面广、漏选可能性小的特点,但是由于需要合成大量的肽段,费时费力、费用较高,尤其是对于序列较长的蛋白^[17]。近年来,一些有助于预测 T 细胞表位的计算机表位预测程序得到了巨大的发展,这些程序能够列出指定蛋白序列中可能存在的 T 细胞表位,与合成重叠肽库相比,大大节省了时间、降低了成本、减少了工作量^[18]。

目前,鉴定 CD8⁺T 细胞表位较理想的方法是,利用计算机程序(如 SYFPEITHI 数据库等)从蛋白抗原中预测出能结合 HLA 分子的肽段;再经研究 MHC-肽复合物在细胞表面的重组或 MHC-肽复合物在 TAP 缺失细胞中的稳定性,验证对预测的肽段与 HLA 分子的结合,以减少被用于最终分析肽特异性 T 细胞识别的候选肽段的数量;最后,对在体内或体外诱导人 PBMCs 或鼠脾细胞得到的 T 细胞,通过细胞因子的生成、在体外的增殖和细胞毒性等检测其经刺激后的反应,以鉴定其特异识别以 HLA 限制方式处理表位的能力,对预测表位进行进一步实验验证^[19]。这是确定 T 细胞抗原表位的一种经济有效的方法,降低了成本和工作量,大大提高了表位鉴定的准确率,为基于 CTL 表位的多肽疫苗研究提供依据^[20]。

本研究利用 SYFPEITHI 数据库,从结核杆菌抗原 Ag85C 氨基酸序列中,预测出 14 条能够结合 HLA-A * 0201 分子的抗原肽,利用内源性抗原递呈途径中必需的抗原多肽转运蛋白(TAP)缺乏的 T2 细胞,对预测的抗原肽与 HLA-A * 0201 分子的亲和力进行分析,筛选出位于 170~178 aa、317~325 aa 和 144~153 aa 3 段抗原肽,显示与 T2 细胞上 HLA-A * 0201 分子有高结合力。其中,抗原肽 FL-TREMPAWL(144~153 aa) 能够刺激其从绝大多数 HLA-A * 0201 阳性结核患者及 PPD(+)健康志愿者的 PBMCs 中诱导出其特异性 CTL 细胞分泌大量的 IFN- γ ,在体外发生增殖,并在效靶比为 40 : 1 时对其靶细胞(负载抗原肽 FL-TREMPAWL 的 T2 细胞)具有较强杀伤活性,大都高于 10%。结果表明,结核杆菌抗原 Ag85C 中的抗原肽 FL-TREMPAWL(144~153 aa),是结核杆菌抗原 Ag85C 的 HLA-A * 0201 限制性 CD8⁺ CTL 表位。为今后基于此表位,构建其相应的 HLA-A * 0201 四聚体,定量检测结核患者外周血中的抗原特异性 T 细胞对患者病情进行即时监控,以及开发抗结核多肽疫苗对结核进行预防和治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO report 2004, Geneva, Switzerland, 2004.
- [2] Tuberculosis. WHO Fact Sheet No 104 Revised August 2002. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en>.
- [3] Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, et al. Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7: 1097-1103.
- [4] Kaufmann S H. Is the development of new tuberculosis vaccine possible[J]? Nat Med, 2000, 6: 955-960.
- [5] Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, et al. Identification of murine H2-Dd- and H2-Ab-restricted T-Cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 2004, 72: 3829-3837.
- [6] Flynn J L, Chan J. Immunology of tuberculosis[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 93-129.
- [7] Pathan A A, Wilkinson K A, Wilkinson R J, et al. High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in *M. tuberculosis*-infected subjects without disease[J]. Eur J Immunol, 2000, 30: 2713-2721.
- [8] Geluk A, van Meijgaarden K E, Franken K L, et al. Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B that are recognized by HLA-A * 0201-restricted CD8⁺ T cells in HLA-transgenic mice and humans[J]. J Immunol, 2000, 165: 6463-6471.
- [9] Smith S M, Brookes R, Klein M R, et al. Human CD8⁺ CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A[J]. J Immunol, 2000, 165: 7088-7095.
- [10] Rammensee H, Bachmann J, Emmerich N P, et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs[J]. Immunogenetics, 1999, 50(3-4): 213-219.
- [11] Dong Y, Demaria S, Sun X, et al. HLA-A2-restricted CD8⁺-cytotoxic-T-cell responses to novel epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase, alanine dehydrogenase, and glutamine synthetase[J]. Infect Immun, 2004, 72: 2412-2415.
- [12] Caccamo N, Milano S, Di Sano C, et al. Identification of epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein recognized by human leukocyte antigen-A * 0201 CD8⁺ T lymphocytes[J]. J Infect Dis, 2002, 186: 991-998.
- [13] Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, et al. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells in human tuberculosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 12210-12215.
- [14] Smith S M, Klein M R, Malin A S, et al. Human CD8⁺ T cells specific for *Mycobacterium tuberculosis* secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in The Gambia[J]. Infect Immun, 2000, 68: 7144-7148.
- [15] Trajkovic V, Natarajan K, Sharma P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins[J]. Microbes Infect, 2004, 6: 513-519.
- [16] Latchumanan V K, Singh B, Sharma P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* antigens induce the differentiation of dendritic cells from bone marrow[J]. J Immunol, 2002, 169: 6856-6864.
- [17] Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, et al. Expression mapping using a retroviral vector for CD8⁺ T cell epitopes: definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-Dd[J]. J Immunol Methods, 2005, 298(1-2): 21-34.
- [18] Reche P A, Glutting J P, Reinherz E L. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs[J]. Hum Immunol, 2002, 63: 701-709.
- [19] Martin W, Shai H, De Groot A S. Bioinformatics tools for identifying class I-restricted epitopes[J]. Methods, 2003, 29: 289-298.
- [20] Chaitra M G, Hariharaputran S, Chandra N R, et al. Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential[J]. Vaccine, 2005, 23: 1265-1272.

[收稿日期] 2006-12-21

[修回日期] 2007-02-26

[本文编辑] 贾泽军