·临床检验研究论著·

四聚体法定量分析 EBV 相关鼻咽癌患者外周血特异性 CTL

曾学辉[1]，莫　莉[2]，黄　涛[1]，张春雷[1]，李　疆[3]

（1. 广州中医药大学深圳附属医院检验科，广东深圳 518033；2. 深圳市福田区中医院检验科，广东深圳 518034；3. 中山大学肿瘤防治中心实验研究部，广东广州 510060）

摘　要：目的　探讨鼻咽癌（NPC）患者对 Epstein-Barr 病毒（EBV）潜伏膜蛋白（LMP）1、2 的细胞免疫应答。**方法**　采用人类白细胞抗原（HLA）-肽四聚体法检测 14 例 NPC 患者（NPC 组）及 10 例 EBV 阳性无症状者（对照组）外周血 8 个 LMP1、LMP2 表位特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）频率。**结果**　NPC 组 ALL、FLY、LLW 表位特异性 CTL 频数分别为（0.25±0.14）%、（0.28±0.22）%、（0.26±0.19）%，低于对照组的（0.45±0.20）%、（1.03±0.63）%、（0.64±0.35）%（$P<0.05$），其余 5 个表位特异性 CTL 频数组间比较无统计学差异（$P>0.05$）。**结论**　与 EBV 阳性无症状者比较，NPC 患者对 ALL、FLY、LLW 的特异性免疫应答能力减弱，相应表位特异性 CTL 或许也可用于 NPC 免疫治疗。

关键词：鼻咽肿瘤；　四聚体；　T 淋巴细胞；　抗原表位

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.011　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)19-2325-02

Quantitative analysis of specific CTL in patients with EBV-associated nasopharyngeal carcinoma

Zeng Xuehui[1], *Mo Li*[2], *Huang Tao*[1], *Zhang Chunlei*[1], *Li Jiang*[3]

(1. *Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong* 518033, *China*; 2. *Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Futian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong* 518034, *China*; 3. *Department of Experimental Research, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong* 510060)

Abstract: Objective　To evaluate the immune response to latent membrane protein (LMP) 1 and 2 in patients with Epstein-Barr virus (EBV)-associated nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods**　Human leucocyte antigen (HLA)-peptide tetramers were used for the detection of 8 kinds epitope-specific cytotoxic T lymphocyte in peripheral blood of 14 patients with NPC (NPC group) and 10 healthy EBV carriers. **Results**　The mean percentages of ALL, FLY and LLW tetramer positive CTL were (0.25±0.14)%, (0.28±0.22)% and (0.26±0.19)% in NPC group, which were lower than (0.45±0.20)%, (1.03±0.63)% and (0.64±0.35)% ($P<0.05$). **Conclusion**　Patients with NPC might demonstrate a weaker response to several epitopes of LMP1 and LMP2 than healthy control. Expansion these epitope-specific CTL could offer a viable immunotherapy for NPC patients.

Key words: nasopharyngeal neoplasms;　tetramer;　T lymphocyte;　epitope

鼻咽癌（NPC）是一种常见肿瘤，与 Epstein-Barr 病毒（EBV）感染密切相关[1]。潜伏膜蛋白（LMP）1、2（LMP1、LMP2）等 EBV 抗原可诱导异性细胞免疫应答。$CD8^+$ T 淋巴细胞可识别由人类白细胞抗原（HLA）Ⅰ类分子递呈的多肽，在抗病毒感染和抗肿瘤免疫过程中发挥重要作用。定量分析抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）对研究特异性细胞免疫应答具有重要意义。四聚体技术可用于特异性 T 细胞的定量检测[2]。本研究采用 EBV LMP1、LMP2 部分表位肽，合成 HLA-肽四聚体，利用 FACS 流式细胞术定量检测 NPC 患者外周血特异性 CTL，探讨患者外周血 T 淋巴细胞对 EBV LMP1、LMP2 抗原的特异性细胞免疫应答。

1　资料与方法

1.1　一般资料　纳入 14 例经病理学确证的 NPC 患者（患者组）及 10 例 EBV 阳性无症状者（对照组）。

1.2　仪器与试剂　FACS AriaTM 流式细胞仪、anti-CD3-PE-cy5、anti-CD8-FITC（美国 BD）、淋巴细胞分离液（天津灏洋）、HLA 配型序列特异性引物（SSP）试剂盒（美国 Pel-Freez）。多肽由深圳市翰宇生物工程有限公司合成，其 HLA 限制性均已鉴定[3-4]，序列见表 1，相应的多肽四聚体由广州泰默生物技术有限公司合成。

表 1　EBV 多肽的 CTL 表位

命名	肽序列	蛋白	氨基酸残基	HLA 限制性
YLQ	YLQQNWWTL	LMP1	159～167	A02
YLL	YLLEMLWRL	LMP1	125～133	A02
ALL	ALLVLYSFA	LMP1	51～60	A02
CLG	CLGGLLTMV	LMP2	426～434	A02
FLY	FLYALALLL	LMP2	356～364	A02
GLG	GLGTLGAAI	LMP2	293～301	A02
LLW	LLWTLVVLL	LMP2	329～337	A02
SSC	SSCSSCPLSKI	LMP2	340～350	A11

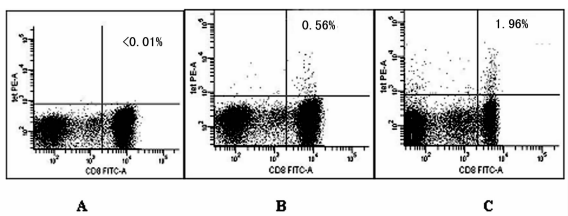
1.3　方法　（1）分离外周血单个核细胞（PBMC）：采集受试者静脉血 50 mL，枸橼酸钠抗凝，按淋巴细胞分离液试剂说明书分离外周血单个核细胞（PBMC），用淋巴细胞冻存液调整细胞浓度至 1×10^9/L，液氮冻存。（2）HLA 分型：提取细胞 DNA，采用聚合酶链反应（PCR）-SSP 技术进行 HLA 分型；反应体系为 PCR 缓冲液 580 μL、纯水 270 μL、Taq 酶 7.5 μL、DNA（75～125 ng/μL）80 μL；PCR 反应步骤为 96 ℃ 60 s，96 ℃ 25

s、70 ℃ 50 s、72 ℃ 45 s 循环 5 次，96 ℃ 25 s、65 ℃ 50 s、72 ℃ 45 s 循环 21 次，96 ℃ 25 s、55 ℃ 60 s、72 ℃ 2 min；用 DNA 级琼脂糖和 0.5×TBE 缓冲液配置浓度为 2% 的琼脂糖凝胶，150 V 电泳 12 min 后紫外灯下观察结果和成像，采用 pel-Freez SSP 分析软件进行分析。(3)四聚体流式细胞术检测：取 1×10^6 个 PBMC，用 FACS 洗液[含 10 g/L NaN_3 及 1 g/L 牛血清清蛋白(BSA)磷酸盐缓冲液(PBS)]洗 1 次后悬浮于 50 μL FACS 洗液中，加入四聚体 1 μg，以 HLA-A 错配的肽-四聚体为阴性对照管，4 ℃避光 30 min，加入 10 μL anti-CD3-PE-cy5 和 anti-CD8-FITC，4 ℃避光 30 min，用 FACS 洗液洗 2 次，悬浮于鞘液后上机检测，用 BD FACS DivaTM 软件获取并分析信号，前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)以线形信号收集，荧光强度以对数度量收集。计数(3～5)$\times10^4$ 个 $CD8^+$ T 淋巴细胞，同时计数 CD8 和四聚体双阳性细胞，计算其在 $CD8^+$ T 淋巴细胞中所占百分比。

1.4　统计学处理　数据采用 SSPS13.0 软件处理，采用成组 t 检验，显著性检验水准为 $\alpha=0.05$。

2　结　果

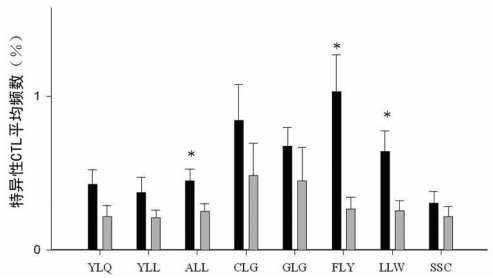
2.1　四聚体检测特异性 CTL　以 FLY 四聚体为例，分别检测 HLA 错配及 HLA 匹配 PBMC，结果显示 HLA 错配 PBMC 几乎不出现 CD8 和四聚体双阳性群(图 1-A)，而 HLA 匹配 PBMC 出现双阳性群(图 1-B、C)。其他 7 个肽-四聚体具有类似结果。



A：FLY 四聚体检测 HLA 错配 PBMC；B、C：FLY 四聚体检测 HLA 匹配 PBMC。

图 1　四聚体检测特异性 CTL

2.2　患者组及对照组特异性 CTL 检测　在所检测的 8 个位点中，患者组 ALL、FLY 及 LLW 表位特异性 CTL 频数分别为(0.25±0.14)%、(0.28±0.22)%和(0.26±0.19)%，低于对照组相应表位特异性 CTL 的频数，即(0.45±0.20)%、(1.03±0.63)%和(0.64±0.35)%，且差异有统计学意义($P<0.05$)，其余 5 个表位特异性 CTL 的平均频数组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)，见图 2。



*：与患者组比较，$P<0.05$。

图 2　患者组(灰色)及对照组(黑色)特异性 CTL 平均频数

3　讨　论

NPC 的发生与 EBV 感染密切相关，几乎所有低分化和未分化 NPC 患者均为 EBV 阳性。EBV 在 NPC 中处于Ⅱ型潜伏期感染，表达 EBV 核抗原 1(EBNA1)、LMP1、LMP2 等，其中 EBNA1 存在甘氨酸－丙氨酸重复序列，不能以 HLA-Ⅰ类分子途径递呈至 $CD8^+$ T 细胞，而 LMP1、LMP2 可通过 HLA-Ⅰ类分子途径递呈至 CTL，使 NPC 患者外周血中存在一定数量的 LMP1、LMP2 特异性 CTL。因此，LMP1、LMP2 是 NPC 免疫治疗的最佳靶点。

四聚体技术在检测特异性 CTL 方面具有灵敏度高，无需事先扩增 CTL 等优点[2]。本研究选择 LMP1、LMP2 的 8 个抗原表位合成四聚体，经流式细胞术检测，发现 NPC 患者 ALL、FLY 及 LLW 表位特异性 CTL 平均频数均高于 HBV 阳性无症状者($P<0.05$)，可能与 NPC 患者免疫功能受损，导致对 LMP1、LMP2 的免疫应答减弱有关。本研究采用四聚体技术检测获得的 CTL 频数高于 Whitney 等[5]采用 ELISPOT 技术检测获得的结果，可能与检测方法不同及标本来源存在差异有关。过继性免疫治疗是可用于 NPC 治疗的方法之一，尤其是 EBV 多肽疫苗在 NPC 免疫治疗中的应用已逐渐受到重视。Louis 等[6-7]将体外扩增的 CTL 用于 EBV 相关 NPC 的过继性治疗，取得较好疗效。本研究结果则提示 ALL、FLY 及 LLW 表位特异性 CTL 或许也可用于 NPC 的免疫治疗。

综上所述，本研究有助于对 NPC 特异性免疫应答的深入认识，可为免疫治疗和免疫监测提供一定的依据和途径。

参考文献

[1] 时景伟，刘彬，魏成国，等. EBV 引起人类相关疾病及其影响因素分析[J]. 中国实验诊断，2011，15(2)：304-306.

[2] Altman JD，Moss PA，Goulder PJ，et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes[J]. Science，1996，274(5284)：94-96.

[3] Duraiswamy J，Burrows JM，Bharadwaj M，et al. Ex vivo analysis of T-cell responses to Epstein-Barr virus-encoded oncogene latent membrane protein 1 reveals highly conserved epitope sequences in virus isolates from diverse geographic regions[J]. J Virol，2003，77(14)：7401-7410.

[4] Straathof KC，Leen AM，Buza EL，et al. Characterization of latent membrane protein 2 specificity in CTL lines from patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma and lymphoma[J]. J Immunol，2005，175(12)：4137-4147.

[5] Whitney BM，Chan ATC，Rickinson AB，et al. Frequency of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes in the blood of Southern Chinese blood donors and nasopharyngeal carcinoma patients[J]. J Med Virol，2002，12(67)：359-363.

[6] Louis CU，Straathof K，Bollard CM，et al. Enhancing the in vivo expansion of adoptively transferred EBV-specific CTL with lymphodepleting CD45 monoclonal antibodies in NPC patients[J]. Blood，2009，113(18)：2442-2450.

[7] Louis CU，Straathof K，Bollard CM，et al. Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma[J]. J Immunother，2010，33(9)：983-990.

(收稿日期：2012-06-09)