

# 肺癌抗原组中强免疫原性抗原的筛选

刘东利, 贺小龙, 杜延玲, 杨拴盈, 彭丹

延安大学附属医院呼吸内科, 陕西 延安 716000

**摘要:** **目的** 筛选肺癌抗原组中强免疫原性抗原, 以期为肺癌的早期诊断、疫苗研制提供参考。**方法** 选取 5 份异体肺癌患者血清以重组 cDNA 表达文库血清学分析 (SEREX) 技术筛选肺癌 cDNA 表达文库, 并进行生物信息学分析。此外, 选取 2017 年 2 月至 2018 年 2 月收治的肺癌患者 60 例为肺癌组, 另取同期进行体检的正常人员 60 例为对照组。分别采集两组人员血清标本, 对比相关肺癌抗原的异体血清反应结果。并对差异有统计学意义的肺癌抗原进行受试者工作特征 (ROC) 曲线分析, 明确其在肺癌早期诊断中的价值。**结果** 本实验共完成 3 轮血清学筛选, 最终得到 70 个阳性克隆。采用 NCBI 网上序列分析软件 BLAST 对各 cDNA 序列的同源性进行比对, 结果显示上述 70 个阳性克隆分别表示 63 个不同基因, 包括 35 个已知基因、26 个功能未知基因以及 2 个新基因。其中 35 个已知基因中仅有 DNA 拓扑异构酶 II  $\alpha$  (Top2A) 基因与肺癌相关, 2 个新基因分别为热休克蛋白 90 $\alpha$  (HSP90 $\alpha$ )、真核翻译延长因子 1 $\gamma$  (EF-1 $\gamma$ ), 功能未知基因中可能与肺癌相关的包括二羟苯基甲酸内置结合蛋白 1 配偶体 (POB1)、中枢神经系肽酶 I (TPPI), 共 5 种肺癌相关抗原。肺癌组 Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆的 IgG 血清抗体阳性率高于对照组 ( $P < 0.01$ )。Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆联合检测诊断肺癌的曲线下面积、敏感性、特异性高于上述三项指标单独检测 ( $P < 0.05$ )。**结论** SEREX 技术可用于肺癌抗原组中强免疫原性抗原的筛选、鉴定, 临床工作中可将 Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 基因作为肺癌早期诊断以及免疫治疗的靶向基因。

**关键词:** 肺癌; 重组 cDNA 表达文库, 血清学分析技术; 免疫性抗原; 筛选; 免疫治疗

**中图分类号:** R 730.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)06-0751-04

## Screening of strong immunogenic antigens in lung cancer antigen group

LIU Dong-li, HE Xiao-long, DU Yan-ling, YANG Shuan-ying, PENG Dan

Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China

Corresponding author: PENG Dan, E-mail: 2364510284@qq.com

**Abstract: Objective** To screen strong immunogenic antigen in lung cancer antigen group and provide guidance for the early diagnosis and vaccine development of lung cancer. **Methods** Five serum samples from allogeneic lung cancer patients were collected to screen lung cancer cDNA expression library by recombinant cDNA expression library (SEREX) technology, and bioinformatics analysis was carried out. In addition, 60 patients with lung cancer treated from February 2017 to February 2018 were designed as lung cancer group, and 60 normal persons receiving physical examination at the same period were served as control group. Serum samples were collected respectively for antigen cloning in two groups and compared with the results of foreign serum responses of 5 lung cancer antigens. In addition, receiver operating characteristic (ROC) curve of lung cancer antigens with statistical significance was analyzed to clarify their value in the early diagnosis of lung cancer. **Results** Three rounds of serological screening were completed, and 70 positive clones were obtained. Using NCBI online sequence analysis software BLAST, the homology comparison of each cDNA sequence showed that the 70 positive clones represented 63 different genes, including 35 known genes, 26 unknown functional genes and 2 new genes. Among the 35 known genes, only DNA topoisomerase II  $\alpha$  (Top2A) gene was associated with lung cancer, 2 new genes were heat shock protein 90  $\alpha$  (HSP90 $\alpha$ ) and eukaryotic translation elongation factor 1  $\gamma$  (EF-1 $\gamma$ ). Among functionally unknown genes, dihydroxybenzoic acid-binding protein 1 (POB1) and central nervous system peptidase I (TPPI) were related to lung cancer. The positive rates of IgG serum antibody of Top2A, HSP90 $\alpha$  and POB1 antigen clones in lung cancer group were statistically higher than those in control group ( $P < 0.01$ ). The area under curve, sensitivity and specificity of combined detection of Top2A, HSP90 $\alpha$  and POB1 antigen clones were statistically higher than those of

individual detection of Top2A, HSP90 $\alpha$  and POB1 in the diagnosis of lung cancer ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SEREX technology can be used to screen and identify strong immunogenic antigens in lung cancer antigens. Top2A, HSP90 $\alpha$  and POB1 can be used as target genes for early diagnosis and immunotherapy of lung cancer in clinic.

**Key words:** Lung cancer; Recombinant cDNA expression library; Immunological antigen; Screening; Immunotherapy

**Fund program:** Yan'an Science and Technology Research and Development Plan Project (2016KS-09)

肺癌发病率在全球范围内所有恶性肿瘤中位居首位,且患者 5 年生存率仅为 14.1%<sup>[1]</sup>。相关研究报道显示,近年来我国的肺癌发病率以及病死率正呈显著上升趋势,且逐渐趋于年轻化,已成为目前严重影响我国居民生命健康安全的重要疾病之一<sup>[2]</sup>。由于肺癌发病早期具有极强的隐匿性,因此临床上大部分患者一经确诊便已是中晚期,丧失了手术根治的时机。由此可知,如何对肺癌进行早期有效诊断以及治疗显得尤为重要,是改善患者预后、提高生存期的关键。有研究报道表明,肿瘤的发生可归结为多种肿瘤相关基因结构或(和)功能异常,而肿瘤抗原便是上述异常基因所表达的、在质或量方面异常的蛋白质或多肽<sup>[3]</sup>。重组 cDNA 表达文库血清学分析(SEREX)技术是目前全球范围内广泛应用的一种筛选肿瘤相关抗原的血清学技术,该技术主要是以机体肿瘤细胞免疫反应为基础,采用同种类型肿瘤患者的血清对肿瘤组织、细胞系的 cDNA 表达文库予以免疫筛查,从而达到发现以及鉴定出新的肿瘤相关抗原的目的<sup>[4]</sup>。SEREX 所筛选的抗原不仅可作为肿瘤诊断的标志物,同时亦可为肿瘤的免疫治疗提供指导作用。鉴于此,本文通过筛选肺癌抗原组中强免疫原性抗原,旨在为肺癌的早期诊断、疫苗研制提供指导。现作以下报道。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 2 月至 2018 年 2 月本院收治的肺癌患者 60 例为肺癌组,包括男性 38 例,女性 22 例,年龄 44 ~ 82 (61.30  $\pm$  7.29) 岁。另取同期于本院进行体检的正常人员 60 例为对照组,包括男性 40 例,女性 20 例,年龄 42 ~ 81 (61.22  $\pm$  7.31) 岁。纳入标准:(1)所有肺癌患者均经组织病理学检查确诊;(2)入院前均未接受过化疗、放疗等抗肿瘤治疗;(3)年龄  $\geq$  18 周岁;(4)临床病历资料完整。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤者;(2)存在交流沟通或精神疾病者。两组性别、年龄比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。所有人员知情同意,本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 研究方法 (1)cDNA 表达文库的免疫学筛选:首先对肺癌 cDNA 文库储存液,以 SM 缓冲液予以稀

释,铺平板,于 42  $^{\circ}$ C 孵育 6 h。孵育过程中予以 10 mmol/L IPTG 处理硝酸纤维素膜,噬菌斑硝酸纤维素膜转印,予以封闭以及洗膜处理。随后将其放置于 1:5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG 中,于室温条件下振摇 1 ~ 2 h。重复洗膜 2 次,将 1:200 稀释预吸收过的肺癌血清加入硝酸纤维素膜,于室温条件下振摇 2 h,并进行羊抗人 IgG 和显色反应。将只有 2 张硝酸纤维素膜上均显色,且去除羊抗人 IgG 阳性斑点的显色斑点标记为阳性克隆,将阳性克隆保存在 SM 缓冲液中,为了排除假阳性并达到纯化阳性克隆的目的,需进行 3 轮的重复筛选。(2)生物信息学分析:以 T3 与 T7 作为引物对阳性克隆扩增菌液进行序列测定,部分克隆按照测序结果设计特异引物测定序列,具体操作由北京三博远志生物技术有限公司完成。测序结果于 NCBI 网站上采用 BLAST 软件搜索 GenBank,并通过 Blastn 与 Blastp 完成同源序列分析。(3)肺癌组与对照组血清标本采集:两组人员入院后分别采集清晨空腹静脉血 10 ml,加入抗凝剂放置于室温条件下 2 h,随后以 1 000 g 条件进行 15 min 的离心处理,取上层血清保存在 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中待检。(4)IgG 抗体检测抗原克隆血清反应:首先将肺癌抗原基因进行克隆铺板,于 42  $^{\circ}$ C 条件下培养 6 ~ 8 h,将硝酸纤维素膜浸入 0.01 mol/L 的 IPTG 溶液中完全浸湿,并采用滤纸晾干。待噬菌斑长出后予以贴膜,完成后置入 42  $^{\circ}$ C 条件下培养 4 h,去除膜并浸入 PBST 溶液中重复 3 次洗膜,10 min/次。将硝酸纤维素膜浸入封闭液中,于室温条件下振荡 2 h,采用 PBST 重复 3 次洗膜,10 min/次,待膜晾干后剪成 100 份,大小为 1 cm  $\times$  2 cm,采用铅笔标记号码。随后分别进行一抗、二抗反应,并予以显色处理。

1.3 评价标准和结果对比 IgG 抗体检测抗原克隆血清反应结果判定:反应呈深的紫蓝色显影记为阳性,反应呈淡的噬菌斑影或不显影记为阴性。对血清反应筛选出的肺癌相关抗原阳性率进行两组间的对比。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件对所有数据进行分析。分别以  $n(\%)$ 、 $\bar{x} \pm s$  表示计数、计量数据,分别予以  $\chi^2$ 、 $t$  检验。DNA 拓扑异构酶 II  $\alpha$  (Top2A)、热休克蛋白 90 $\alpha$  (HSP90 $\alpha$ )、二羟基苯甲酸内酯结合

蛋白 1 配偶体 (POB1) 抗原克隆用于肺癌的诊断能效率予以受试者工作特征 (ROC) 曲线分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺癌 cDNA 表达文库筛选以及生物信息学分析结果** 本实验共完成 3 轮血清学筛选, 最终得到 70 个阳性克隆。采用 NCBI 网上序列分析软件 BLAST 对各 cDNA 序列的同源性进行比对, 结果显示上述 70 个阳性克隆分别表示 63 个不同基因, 包括 35 个已知基因、26 个功能未知基因以及 2 个新基因。其中 35 个已知基因中仅有 Top2A 基因与肺癌相关; 2 个新基因分别为 HSP90 $\alpha$ 、真核翻译延长因子 1 $\gamma$  (EF-1 $\gamma$ ); 功能未知基因中可能与肺癌相关的包括 POB1 和中枢神经系肽酶 I (TPP1), 共 5 种肺癌相关抗原。

**2.2 肺癌组与对照组 IgG 抗体检测抗原克隆血清反应结果对比** 肺癌组 Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆的 IgG 血清抗体阳性率高于对照组 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

**2.3 Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆诊断肺癌的 ROC 曲线分析** Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆联合检测诊断肺癌的曲线下面积、敏感性、特异性高于上述三项指标单独检测 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 肺癌组与对照组 IgG 抗体检测抗原克隆血清反应阳性结果对比 例 (%)

组别	例数	Top2A	HSP90 $\alpha$	EF-1 $\gamma$	POB1	TPP1
肺癌组	60	28(46.67)	29(48.33)	32(53.33)	34(56.67)	30(50.00)
对照组	60	13(21.67)	13(21.67)	25(41.67)	19(31.67)	22(36.67)
$\chi^2$ 值		8.336	9.377	1.637	7.603	2.172
<i>P</i> 值		0.004	0.002	0.201	0.006	0.141

表 2 Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆诊断肺癌的 ROC 曲线分析

组别	曲线下面积	敏感性	特异性
Top2A	0.528 *	0.47 *	0.61 *
HSP90 $\alpha$	0.562 *	0.52 *	0.66 *
POB1	0.571 *	0.54 *	0.68 *
联合三项检测	0.846	0.87	0.81

注: 与联合三项检测相比, \*  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

免疫治疗是目前临床上用以治疗恶性肿瘤疾病的重要手段之一, 但由于肿瘤相关抗原免疫原性较弱, 从而导致其临床治疗效果受到一定程度的制约<sup>[5-6]</sup>。有研究报道显示, 由于正处于生长中的肿瘤细胞所表达的肿瘤相关抗原不一定均具有强免疫原性, 无法诱发足够强的免疫应答反应, 因此往往呈现

体内免疫耐受状态, 正是上述原因导致了机体免疫系统难以有效抑制肿瘤生长<sup>[7-8]</sup>。由此可知, 筛选强免疫原性抗原是改善肺癌免疫治疗效果的关键, 亦是目前临床肺癌诊疗中重点关注的热点问题之一。近年来, 随着相关研究的不断深入, 以及基因组学、蛋白组学、代谢组学以及糖脂组学等高通量组学技术的逐渐发展, 越来越多的肿瘤相关抗原筛选技术开始被建立, 其中 SEREX、血清学分析技术 (SERPA)、血清蛋白组学分析以及蛋白芯片技术等已成为目前临床上筛选、鉴定肿瘤相关抗原的重要手段<sup>[9-10]</sup>。

本文结果表明, 本试验共完成 3 轮血清学筛选, 最终得到 70 个阳性克隆。采用 NCBI 网上序列分析软件 BLAST 对各 cDNA 序列的同源性进行比对, 结果显示上述 70 个阳性克隆分别表示 63 个不同基因, 包括 35 个已知基因、26 个功能未知基因以及 2 个新基因。其中 35 个已知基因中仅有 Top2A 基因与肺癌相关, 2 个新基因分别为 HSP90 $\alpha$ 、EF-1 $\gamma$ , 功能未知基因中可能与肺癌相关的包括 POB1、TPP1。这与袁娜、杨军等<sup>[11-12]</sup>的研究报道相一致, 说明 SEREX 技术应用于肺癌相关抗原的筛选、鉴定中具有重要价值。然而, SEREX 技术尚且存在一定的局限性: 由于该技术主要是通过分子克隆与表面展示技术建立蛋白表达库, 用于免疫筛选、鉴定肿瘤相关抗原, 其无法反映天然蛋白于机体内的免疫原性, 具有一定的假阳性率。此外, 肺癌组 Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆的 IgG 血清抗体阳性率较对照组增高, 差异有统计学意义, 提示 Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 对于肿瘤的诊断、免疫治疗具有一定的指导作用。分析原因, 笔者认为 Top2A 属于有丝分裂时染色体分离过程中重要核酶之一, 可通过对双链 DNA 的局部状况产生直接影响, 进一步参与 DNA 进程的调整中<sup>[13-14]</sup>。且当 DNA 发生损伤时, 其表达显著升高, 通过诱导凋亡细胞的死亡以适应 DNA 的损伤。HSP90 $\alpha$  是机体处于应激状态下所产生的一种高度保守蛋白, 其可能介导了肺癌多种蛋白合成过程, 并在一定程度上为生长较差的肺癌细胞提供保护作用, 同时可通过和信号蛋白相结合, 进一步对肿瘤细胞的生长发挥调控作用<sup>[15]</sup>。已有研究报道证实, POB1 在前列腺癌中存在明显高表达, 可诱导前列腺癌细胞的凋亡<sup>[16-17]</sup>。可能是通过参与细胞的迁移、凋亡过程, 进一步在肺癌的发生、发展过程中起着至关重要的作用。另外, Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 抗原克隆联合检测诊断肺癌的曲线下面积、敏感性、特异性较上述三项指标单独检测增高, 提示临床工作中可通过联合检测上述三项指标以提高肺癌早期诊断的灵敏度以及特异度, 同时, 也可为

肺癌的免疫治疗药物的研制提供新的靶点和思路,值得今后更深入的研究。

综上所述, SEREX 技术应用于肺癌抗原组中强免疫原性抗原的筛选、鉴定具有较高价值, Top2A、HSP90 $\alpha$ 、POB1 基因可作为肺癌早期诊断以及免疫治疗的靶向基因,值得临床重点关注。

#### 参考文献

- [1] Tsutsumi K, Matsuya Y, Sugahara T, et al. Inorganic polyphosphate enhances radio-sensitivity in a human non-small cell lung cancer cell line, H1299[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6):1010428317705033.
- [2] 孙楠, 孙守国, 臧若川, 等. ENO1 自身抗体联合癌胚抗原在肺腺癌诊断中的临床应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(6):446-449.
- [3] 杨昌恒, 虞必英, 廖江荣, 等. 支气管肺泡灌洗液及血清中肿瘤标志物在肺癌诊断中的临床应用[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2018, 11(3):334-335.
- [4] 刘昉, 孙秀珍, 徐晶, 等. 法国梧桐花粉变应原 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定[J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(4):327-330.
- [5] 何晓锋, 肖越勇. 肿瘤冷冻免疫及联合细胞免疫治疗的现状与进展[J]. *中华放射学杂志*, 2013, 47(4):381-384.
- [6] Nakao M, Muramatsu H, Kagawa Y, et al. Immunological status may predict response to nivolumab in non-small cell lung cancer without driver mutations[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(7):3781-3786.
- [7] 魏智民, 陈寅, 焦顺昌. 免疫检查点抑制剂在肺癌治疗中的应用研究进展[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2018, 17(5):383

-388.

- [8] 陈若冰, 陈涛. 疫苗在肺癌治疗中的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2018, 21(23):2777-2790.
- [9] 郑燕华, 邹德威, 冯凯, 等. 蛋白芯片技术筛选肝癌血清标志蛋白的初步研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(6):628-631.
- [10] 林裕辉, 李旭, 刘坚军, 等. 基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学分析鉴定下肢动脉硬化闭塞症潜在的血清生物标记物[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(12):2820-2822.
- [11] 袁娜, 辛国宏, 左笑笑, 等. 联合应用噬菌体展示技术与重组 cDNA 表达文库血清学分析技术筛选肺癌早期诊断相关抗原[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2014, 43(4):388-396.
- [12] 杨军, 刘妮, 李宗芳, 等. 一种新的组学技术 - 肿瘤抗原组学[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(6):1375-1378.
- [13] 韩正祥, 张梦瑾, 张英楠, 等. TOP2A 在非小细胞肺癌中的高表达促进肿瘤细胞的增殖和侵袭能力[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(9):1371-1375.
- [14] 王传新. 肺癌早期诊断的新肿瘤标志研究[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2017, 5(4):212-216.
- [15] 张晶锐, 高峰, 李荣江. HSP90 $\alpha$ 、MMP-9 在胆管癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国临床研究*, 2017, 30(8):1067-1069.
- [16] 王鹏, 闫平平, 刘会娟, 等. 肺癌候选抗原的血清反应分析及其联合检测的应用[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(21):2278-2280.
- [17] Tan Y, Wang J, Su S, et al. Enhancement of endocytic uptake of HIV-1 virions into CD4-negative epithelial cells by HIV-1 gp41 via its interaction with POB1[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(6):568-571.

收稿日期:2018-09-10 修回日期:2018-10-10 编辑:王娜娜

(上接第 751 页)

- [15] 余佩武, 钱锋, 郝迎学, 等. 腹腔镜胃癌根治术 726 例的疗效分析[J]. *中华消化外科杂志*, 2011, 10(1):44-47.
- [16] Orsenigo E, di Palo S, Tamburini A, et al. Laparoscopy-assisted gastrectomy versus open gastrectomy for gastric cancer: A monoinstitutional Western center experience[J]. *Surg Endosc*, 2011, 25(1):140-145.
- [17] Koeda K, Nishizuka S, Wakabayashi G. Minimally invasive surgery for gastric cancer: the future standard of care[J]. *World J Surg*, 2011, 35(7):1469-1477.
- [18] Omori T, Masuzawa T, Akamatsu H, et al. A simple and safe method for billroth I reconstruction in single-incision laparoscopic gastrectomy using a novel intracorporeal triangular anastomotic technique[J]. *J Gastrointest Surg*, 2014, 18(3):613-616.
- [19] Hiyoshi Y, Oki E, Ando K, et al. Outcome of esophagojejunostomy during totally laparoscopic total gastrectomy: A single-center retrospective study[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(12):7227-7232.
- [20] Nakauchi M, Suda K, Kadoya S, et al. Technical aspects and short- and long-term outcomes of totally laparoscopic total gastrectomy for

advanced gastric cancer: A single-institution retrospective study[J]. *Surg Endosc*, 2016, 30(10):4632-4639.

- [21] 朱甲明, 刘晶晶, 文大成, 等. 全腹腔镜下吻合技术在腹腔镜胃癌根治术中的应用[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2013, 16(9):881-884.
- [22] 柳焱刚, 陈建思, 覃宇周, 等. 全腹腔镜下与腹腔镜辅助远端胃癌根治术毕 I 式吻合术的效果比较[J]. *广东医学*, 2015, 36(14):2211-2213.
- [23] 王栓辉, 刘国正. 完全腹腔镜下根治性全胃切除术治疗近端胃癌 30 例[J]. *中国现代普通外科进展*, 2017, 20(12):968-970.
- [24] 张焱辉, 李靖锋, 唐俊, 等. 腹腔镜胃癌根治术对进展期胃癌的应激、免疫变化及并发症的影响[J]. *中国临床研究*, 2018, 31(2):150-153.
- [25] 张英杰, 梁金荣. 腹腔镜胃癌根治术治疗进展期胃癌患者的近期疗效及对腹腔内微转移的影响[J]. *中华全科医学*, 2017, 15(11):1867-1869.

收稿日期:2018-10-07 编辑:王国品