

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.006

· 研究快报 ·

早期肝癌相关抗原 CTAG1A 在肝细胞癌组织与细胞中的表达及其细胞毒性 T 淋巴细胞抗原表位鉴定

刘傳言^{1,2}, 危晏平^{2,3}, 付靖波^{2,3}, 李亮^{2,3}, 王红阳^{1,2,3} [1. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032; 2. 海军军医大学 国家肝癌科学中心, 上海 201805; 3. 海军军医大学第三附属医院(东方肝胆外科医院)国际合作生物信号转导研究室, 上海 200433]

[摘要] **目的:** 肝细胞癌(HCC)是肝脏最常见的原发性恶性肿瘤。早期HCC 检出率低,多数患者就诊时已经是晚期,预后极差,因此亟须探索有效的HCC 早期诊断标志物及干预治疗靶点。癌胚/睾丸抗原 1A(CTAG1A)在多种肿瘤中异常表达并且具有强免疫原性,但其在HCC 中的表达特性及免疫原性尚不明确。本研究旨在鉴定HCC 组织和细胞中CTAG1A 的表达趋势和免疫原性,为HCC 早期诊断提供新的生物标志物,为临床免疫治疗提供新的潜在靶点。**方法:** 通过转录组芯片筛选 10 对极早期HCC (BCLC 0 期HCC) 肿瘤与癌旁组织的差异表达基因谱。利用 RT-qPCR 在独立大样本(BCLC 0、A、B、C 期HCC 组织及癌旁组织, $n = 149$) 及多种肝癌细胞系中验证 CTAG1A 的表达。通过生物信息学工具(IEDB 数据库的 TepiTool 和 Swiss Model) 预测 CTAG1A 的 MHC-I 型和 MHC-II 型抗原表位。采用固相多肽合成法合成候选肽段,经 HPLC 纯化及质谱验证后,使用 IFN- γ 酶联免疫斑点法(ELISpot)检测 9 例 HCC 患者外周血单个核细胞(PBMC)对各个肽段的特异性 T 细胞反应。临床样本来源于 2015 至 2022 年海军军医大学第三附属医院(东方肝胆外科医院)收治的 HCC 患者,所有样本的采集使用均获患者知情同意,并经东方肝胆外科医院伦理委员会审查批准(EHBHXY2015-01-017),严格按照相关要求和伦理规定严格执行。采用 SPSS 30.0 软件进行统计学处理,通过 ROC 曲线评估诊断效能。**结果:** 转录组芯片筛选结果显示,CTAG1A 在极早期 HCC(BCLC 0 期HCC) 中表达显著上调($FC = 99.16, P < 0.0001$),临床独立样本验证显示其在各分期 HCC 中均呈现出高表达趋势且在早期 HCC 中呈现出较佳的诊断效能(BCLC 0 期HCC AUC = 0.6893, 敏感性 = 85.71%; BCLC A 期HCC AUC = 0.8229, 敏感性 = 83.33%); 进一步的分析结果显示,CTAG1A 在多种肝癌细胞系中的表达显著高于相对正常肝细胞系($P < 0.001$)。与甲胎蛋白(AFP)相比,CTAG1A 在 BCLC 0 期和 A 期HCC 中的诊断效能更优(AFP 在早期 HCC 中 ROC 曲线分析无显著差异, $P > 0.05$)。生物信息学工具预测发现 CTAG1A 含 8 个 MHC-I 型和 4 个 MHC-II 型抗原表位。IFN- γ ELISpot 实验显示,12 条合成肽段能不同程度地诱导 HCC 患者 PBMC 的特异性 T 细胞反应。**结论:** CTAG1A 在 HCC 早期即显著高表达,且具有多表位免疫原性,可能能够激活 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞,提示其具有作为 HCC 免疫治疗靶点的潜力,可望为开发基于 mRNA 疫苗或过继性细胞疗法的联合免疫治疗策略提供新的方向。相较于 AFP,CTAG1A 在早期 HCC 中展现出更优的诊断效能,提示其作为 HCC 早期诊断标志物的可能。

[关键词] 肝细胞癌; 肿瘤相关抗原; 癌胚/睾丸抗原 1A; 早期诊断

[中图分类号] R735.7; R730.3; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)03-0270-11

The expression of early hepatocellular carcinoma-related antigen CTAG1A in hepatocellular carcinoma tissues and cells and identification of cytotoxic T lymphocyte epitopes

LIU Fuyan^{1,2}, WEI Yanping^{2,3}, FU Jingbo^{2,3}, LI Liang^{2,3}, WANG Hongyang^{1,2,3} (1. Cancer Research Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. National Center for Liver Cancer, Naval Medical University, Shanghai 201805, China; 3. International Co-operation Laboratory on Signal Transduction, Third Affiliated Hospital of Naval Medical University [Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital], Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant tumor of the liver. The diagnosis rate of early HCC is low, and most patients are diagnosed at the late stage and have a very poor prognosis. Therefore, it is urgent to explore effective early diagnosis markers and intervention targets for HCC. Cancer/testicular antigen 1A (CTAG1A) is abnormally expressed

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 82172896); 中国科协青年人才托举工程(No. 2023QNRC001)

[作者简介] 刘傳言(1997—),女,硕士生,主要从事肝脏肿瘤免疫治疗研究。E-mail: fuyanliu2023@gmail.com

[通信作者] 王红阳, E-mail: hywangk@vip.sina.com; 李亮, E-mail: liliangyuanquan@163.com

and highly immunogenic in a variety of tumors, but its expression characteristics and immunogenicity in HCC remain unclear. The aim of this study is to identify the expression and immunogenicity of CTAG1A in HCC tissues and cells, providing a new biomarker for the early diagnosis of HCC and a new potential target for clinical immunotherapy. **Methods:** This study screened the differentially expressed gene profiles between 10 pairs of very early HCC (BCLC stage 0 HCC) tumors and paracancerous tissues using a transcriptome microarray. The expression of CTAG1A was verified by RT-qPCR in an independent large sample (BCLC stage 0, A, B, C HCC tissues and adjacent non-tumor tissues, $n=149$) and various hepatocellular carcinoma cell lines. Bioinformatics tools (TepiTool of IEDB database and Swiss Model) were used to predict the MHC-I and MHC-II epitopes of CTAG1A. The candidate peptides were synthesized by solid-phase polypeptide synthesis method. After purification by HPLC and verification by mass spectrometry assay, the specific T cell responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 9 HCC patients to all peptides were detected by IFN- γ enzyme-linked immunospot assay (ELISpot). The clinical samples were collected from HCC patients admitted to the Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital) from 2015 to 2022. The collection and usage of all samples were carried out with the consent of the patients, and with the approval of the Ethics Committee of Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital (EHBHKEY2015-01-017) and in strict accordance with relevant requirements and ethical regulations. Statistical analysis was performed using SPSS 30.0 software, and the diagnostic efficiency was evaluated by ROC curve. **Results:** Transcriptome chip screening results showed that CTAG1A expression was significantly up-regulated in the very early-stage HCC (BCLC stage 0 HCC) ($|FC| = 99.16$, $P < 0.0001$). The verification using the clinical independent samples showed its high expression in all stages of HCC and better diagnostic efficacy in early-stage HCC (BCLC stage 0 HCC AUC=0.6893, sensitivity = 85.71%; BCLC stage A HCC AUC = 0.8229, sensitivity = 83.33%). Furthermore, the expression of CTAG1A was significantly higher in multiple liver cancer cell lines than in relatively normal liver cell lines ($P < 0.001$). Compared with alpha-fetoprotein (AFP), CTAG1A showed better diagnostic efficacy in BCLC stage 0 and stage A HCC (ROC curve analysis of AFP showed no significant difference in early HCC, $P > 0.05$). Bioinformatics tools predicted that CTAG1A contained 8 MHC-type I and 4 MHC-type II epitopes. The IFN- γ ELISpot assay showed that 12 synthetic peptides could induce PBMC specific T cell response in HCC patients to varying degrees. **Conclusion:** CTAG1A is significantly overexpressed in early-stage HCC and has multi-epitope immunogenicity, which may activate CD8⁺ and CD4⁺ T cells, suggesting its potential as a target for HCC immunotherapy. It may provide a new direction for developing combined immunotherapy strategies based on mRNA vaccines or adoptive cell therapy. Compared with AFP, CTAG1A exhibits better diagnostic efficacy in early-stage HCC, suggesting its potential as a marker for early diagnosis of HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma (HCC); tumor-associated antigen; cancer/testis antigen 1A (CTAG1A); early diagnosis

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(3): 270-280. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.006]

免疫治疗是恶性肿瘤的重要治疗策略,但其对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的疗效受限于HCC抗原性弱、特异性抗原缺乏等问题^[1]。解析HCC的抗原图谱和机体对肿瘤抗原的免疫应答条件是提升免疫治疗响应的关键。癌症/睾丸抗原1A(cancer/testis antigen 1A, CTAG1A)基因编码的CTAG1A蛋白含有180个氨基酸残基,分子量为18 000,其N端富含甘氨酸,C端的Pcc-1结构域具有强疏水性;CTAG1A蛋白在胆囊癌^[2]、卵巢癌^[3]、结肠癌^[4]和非小细胞肺癌^[5]等多种肿瘤中异常表达。CTAG1A蛋白具有较强的免疫原性,既往研究^[6]筛选T细胞表位的cDNA表达文库发现,CTAG1A编码一种被肿瘤特异性T细胞识别的、具有58个氨基酸残基的蛋白质。在黑色素瘤患者中能检测到CTAG1A特异性CD8⁺ T细胞^[7]。CTAG1A还可以作为非小细胞肺癌的新抗原^[8]。但CTAG1A在HCC中的表达特性和免疫原性目前尚不清楚。肿瘤的基因表达谱、免疫谱和代谢谱等均随着肿瘤分期的不同而改变。为了系统地筛选HCC早期诊断及高危人群筛查潜在的生物标志物,探讨HCC早期发生的机制并开发新的早期治疗方法,笔者所在课题组以极早期[巴塞罗那临床肝癌

(Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC)0期]HCC为直接研究对象,鉴定了HCC组织和细胞中CTAG1A的表达趋势和免疫原性。希望通过本研究为HCC早期诊疗提供新的标志物,为开发HCC联合免疫治疗策略提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 患者样本

本研究使用的HCC患者血液样本及组织样本采集自2015年至2022年期间于海军军医大学第三附属医院(东方肝胆外科医院)确诊为HCC并接受肝癌切除手术的患者;10对HCC肿瘤组织/配对癌旁组织样本于术中采集,9例血液样本于住院期间采集外周静脉血获得。所有样本的采集使用经患者知情同意,并经东方肝胆外科医院伦理委员会批准(伦理审批号:EHBHKEY2015-01-017),严格按照相关要求和伦理规定严格执行。

1.2 细胞、主要试剂及仪器

相对正常肝细胞系L02和QSG7701细胞、人肝癌细胞系MHCC97-L、MHCC97-H、PLC/PRF/5、

HCCLM3、SK-HEP-1、HuH-7、HepG2、和 Hep-3B 细胞均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。DMEM 细胞培养液、RPMI-1640 细胞培养液、胎牛血清均购自 Invitrogen 公司, 细胞冻存液和胰蛋白酶购自上海新赛美公司, DMSO 购自 Sigma-Aldrich 公司, IFN- γ 酶联免疫斑点法 (enzyme-linked immunospot assay, ELISpot) 检测试剂盒购自达科为公司, AG RNAex Pro RNA 提取试剂购自艾科瑞公司, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit、LightCycler 480 SYBR Green I Master 购自 Roche 公司。C170 E3 二氧化碳培养箱购自 BINDER 公司, LightCycler™96 实时荧光定量 PCR 仪购自 Roche 公司, LibertyBlue 2.0 全自动微波多肽合成仪购自 CEM 公司。

1.3 细胞培养

相对正常肝细胞系 QSG7701 和 L02、人肝癌细胞系 SMMC-7721、HepG2、HCCLM3、MHCC97-L、MHCC97-H、PLC/PRF/5、SK-HEP-1、HuH-7 和 Hep-3B 等细胞均接种于细胞培养皿中, 使用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液, 在温度 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培育温箱中培养。

1.4 转录组芯片检测、分析 HCC 组织中的差异表达基因

使用转录组芯片 (Agilent Human GE Microarray 4x44k) 分析 10 对极早期 HCC (BCLC 0 期) 肿瘤组织/配对癌旁组织样本中 mRNA 的指纹图谱。以差异倍数的绝对值 ($|FC|$) > 2 及 $P < 0.05$ 作为筛选条件, 筛选差异表达的 mRNA。利用 DNASTAR 软件 (Lasergene) 分析芯片数据结果, 利用 JAVATreeviewer 软件绘制基因热图。

1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测组织和细胞中 CTAG1A 基因的表达

本实验中使用的 HCC 组织样本对应的患者临床信息详见本课题组既往发表论文^[6]。其中 BCLC 0 期样本 21 例、A 期 48 例、B 期 46 例、C 期 34 例。用 AG RNAex Pro RNA 提取试剂从组织或细胞中提取总 RNA。使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, 根据说明书进行反转录, 合成 cDNA。利用 LightCycler 480 SYBR Green I Master 在 LightCycler™96 实时 PCR 仪上进行 qPCR 检测。反应步骤如下: 预变性 95 °C 5 min; 三步循环扩增条件为 95 °C 15 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s, 共 35 个循环; 熔解 72 °C 10 min。使用 18S 和 GAPDH 作为内源性参考基因对于 mRNA 的表达进行标准化。本研究使用的引物采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 提供的 Primer-BLAST 工具设计, PCR 引物由 Invitrogen 公司合成, 序列如下:

CTAG1A 上游引物为 3'-TGCTTGAGTTCTACCTCGCC-5', 下游引物为 3'-GCCAAAAACACGGGCAGAAA-5'; 18S 上游引物为 3'-CGGCTACGACATCCAAGGAA-5', 下游引物为 3'-GCTGGAATTAGCGCGGCT-5'; GAPDH 上游引物为 3'-CATGAGAAGTATGACAACAG-5', 下游引物为 3'-ATGAGTCCTTCCACGATA-5'。

1.6 分离 HCC 患者 PBMC

使用 EDTA 抗凝真空采血管采集 9 位 HCC 患者全血, 加入等体积 PBS 稀释, 沿着管壁缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液, 2 000 r/min 常温离心 20 min, 刹车速度设为 5。离心后, 将血浆层及淋巴细胞分离液层之间的 PBMC (白色云雾状) 吸出, 用 14 mL 预冷的 PBS 重悬细胞, 1 800 r/min、4 °C 离心 20 min。弃上清液, 加入适量含有 10% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养液重悬细胞, 加入培养皿中。

1.7 ELISpot 检测 CTAG1A 肽段是否能诱导特异性 T 细胞反应

用于 ELISpot 实验的肝细胞 HCC 患者的临床样本选择标准: (1) BCLC 0 期或 A 期; (2) TNM 分期为 I 期; (3) 手术前采集患者血清检测 MHC I 分型为 HLA-A*01:01, MHC II 分型为 HLA-DRB1*01:01 (经预测能与 CTAG1A 潜在的抗原表位结合的分型)。

使用 IFN- γ ELISpot 试剂盒, 按照说明书进行 ELISpot 检测实验, 简述如下: 使用锥虫蓝染色液对待测细胞染色后计数, 计算细胞存活率。每孔加入 50 μ L 细胞悬液 (含有 1×10^6 个细胞)、50 μ L CTAG1A 肽刺激 (工作质量浓度 50 μ g/mL)。使用终质量浓度 10 μ g/mL 的植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 作为阳性对照; 空白孔及 RPMI-1640 代替 CTAG1A 肽处理的孔作为阴性对照。每组设置两个复孔。在含 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱内过夜培养。

结果判定标准。阳性判断标准: 计数 CTAG1A 肽刺激后每 1×10^6 个 PBMC 形成斑点数, 以斑点形成单位数 (spot forming unit, SFU) 判定反应强度。反应孔内 SFU > 2 倍阴性对照孔, 且斑点数大于 25 SFU/ 10^6 PBMC, 判定反应为阳性。

1.8 生物信息学方法分析、预测 CTAG1A 的 CTL 表位及抗原肽的理化特性

利用 Swiss model 工具 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive/JcGruA/models/>) 对 CTAG1A 进行同源建模; 利用 IEDB 数据库的 TepiTool 工具 (<http://tools.iedb.org/tepitool/>) 预测 CTAG1A 的 MHC-I 和 MHC-II 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 表位; 利用生物信息学分析软件 HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) 分析预测每

个预测抗原肽的疏水性(hydrophobicity)、疏水力矩(hydrophobic moment);利用生物信息学分析软件ExPasy(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)计算预测抗原肽的分子量、等电点等数据。

1.9 固相多肽合成法合成CTAG1A预测抗原表位肽段

使用CEM LibertyBlue 2.0全自动微波多肽合成仪合成CTAG1A的肽段。过程简述如下:将氩气的压力设为0.3 MPa,在Liberty Blue软件的Liberty Method Editor中输入需要合成的序列,按照说明书将试剂全部装配完成后开始合成。肽段合成结束后将连有肽的树脂溶液转移到多肽合成管中,加入切割液,置于60℃恒温振荡器中剧烈摇晃4 h,去除TFA后获得肽粗品溶液。加入-20℃预冷的乙醚使肽粗品沉淀;30 000 r/min离心5 min,弃去上清液,保留下层沉淀蛋白,再次加入冰乙醚,相同的条件离心共3次,所得沉淀即为粗品肽。

1.10 HPLC法纯化抗原表位肽段

在上述所得的肽粗品中加入比例为9:1的水和乙腈,在超声下溶解,用0.22 μm孔径的滤膜过滤所得溶液,随后在制备型HPLC上进行进样分析。在220 nm的吸收波长下进行洗脱,流动相为含有0.1% TFA的水溶液以及含有0.1% TFA的乙腈溶液,收集主峰处的目标肽段,随后进行质谱检测,以确定其分子量。用超纯水将目标肽段溶解成1 mg/mL的溶液,

用HPLC进行梯度洗脱,洗脱梯度从5%乙腈溶液洗脱至100%乙腈溶液,流速设为1 mL/min,计算肽段的纯度以及出峰时间。将纯化后的肽保存于-80℃。

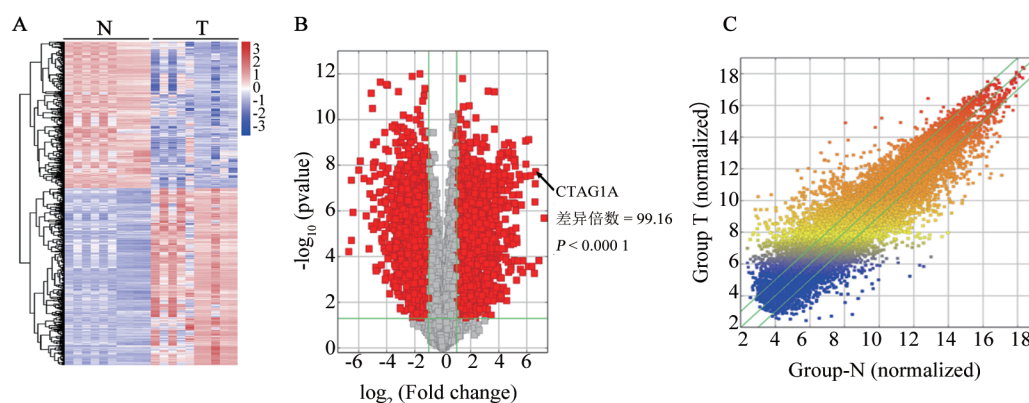
1.11 统计学处理

采用IBM SPSS Statistics软件(version 30.0.0)进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;对于两组资料,满足正态性,采用 t 检验考察组间均数差值;多组资料如果满足正态性和方差齐性,则采用单因素方差分析,若各组间有差异,进一步采用两两比较;如不满足正态性或方差齐性,则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CTAG1A在HCC早期即显著升高

利用人类基因转录组芯片分析比较10对极早期HCC(BCLC 0期HCC)患者的新鲜肿瘤组织与配对癌旁组织的差异表达mRNA指纹图谱(图1A),在极早期HCC肿瘤组织中共筛选出9 470种上调和10 765种下调的mRNA(图1A~C)。其中,CTAG1A的表达水平排在显著升高表达mRNA的前3位($|FC| = 99.16, P < 0.0001$)。以上结果提示CTAG1A可作为肝癌早诊生物标志物和潜在的肝癌相关抗原。



A: BCLC 0期HCC患者的癌(T)/癌旁(N)组织中差异表达的mRNA的转录组分析热图,红色代表表达水平上调、蓝色代表表达水平下调,数值表示经Z-score转换后的基因表达量。B: BCLC 0期HCC患者的癌(T)/癌旁(N)组织中差异表达的mRNA的转录组分析火山图,红色点代表表达水平的 $|FC| > 2$ 且 $P < 0.05$ 的基因,灰色点代表 $|FC| < 2$ 或 $P \geq 0.05$ 的基因,黑色箭头指示代表CTAG1A的数据点。C: BCLC 0期HCC患者的癌(T)/癌旁(N)组织中差异表达的散点图,顶部绿线上方表示癌(T)/癌旁(N)组织上调 $|FC| > 2$ 的基因,底部绿线下方的点表示癌(T)/癌旁(N)组织中下调 $|FC| > 2$ 的基因。

图1 在极早期HCC中CTAG1A的表达即显著升高

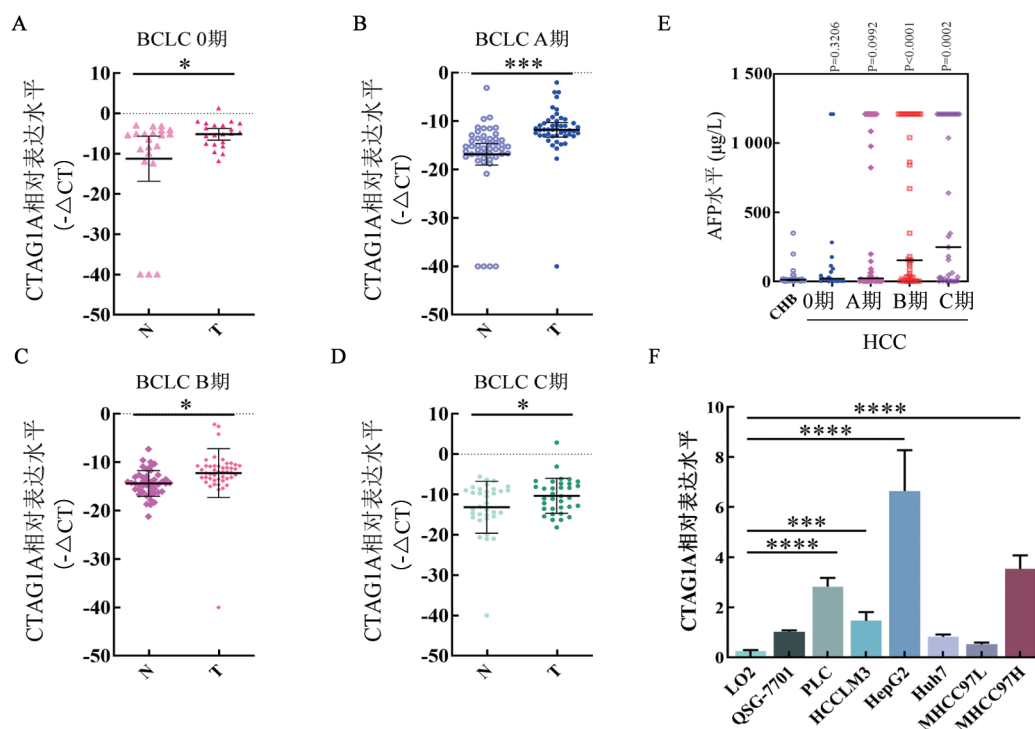
2.2 CTAG1A在各期肝癌中均存在异常高表达

利用独立大样本验证发现,在各期HCC中(包括BCLC 0、A、B、C期),CTAG1A的mRNA均呈现异常高表达的趋势,尤其在BCLC A期HCC样本中更加显著(图2A~D)。对比分析肝癌经典诊断标志物和

抗原——甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)在慢性乙型肝炎病毒感染患者和不同分期HCC患者中的表达水平发现,AFP主要在BCLC B期和C期患者中呈现显著高表达(图2E, $P < 0.05$),而在BCLC 0期和A期患者中未观察到AFP显著升高趋势($P > 0.05$)。这

一发现提示,与AFP相比,CTAG1A更具有作为HCC早期诊断生物标志物的潜在应用价值。此外,相比

于相对正常人肝细胞系L02和QSG-7701,CTAG1A在多种人肝癌细胞系中表达升高(图2F)。



A~D: RT-qPCR 检测各期 HCC (BCLC 0、A、B、C 期) 的癌(T)/癌旁(N)组织中 CTAG1A mRNA 表达水平; 与癌旁组织相比, * $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$; E: 慢性乙肝患者及各期 HCC 患者血清 AFP 水平; F: RT-qPCR 检测人肝癌细胞系中 CTAG1A 表达水平, *** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 。

图2 CTAG1A在各期HCC组织和人肝癌细胞系中表达异常升高

2.3 CTAG1A是潜在的肝癌早期诊断标志物

为了进一步验证CTAG1A是否可作为HCC早期诊断潜在的生物标志物,进行ROC曲线分析发现,CTAG1A在BCLC 0、A、B期HCC中均表现出较好的与癌旁组织的区分效能(0、A、B各期AUC分别是0.6893、0.8229、0.7663; $P < 0.05$; 图3A~D); HCC经典标志物及抗原AFP在BCLC B、C期HCC中表现出了较好的区分效能(B、C期AUC分别是0.7468、0.7475; $P < 0.05$; 图3G~H),而在0、A两期HCC中,AFP的表现并不显著(图3E~F, $P > 0.05$); 以上结果提示,CTAG1A是HCC早期诊断有效的生物标志物,对于早期诊断HCC而言表现优于AFP。ROC分析同时得出,在BCLC 0期HCC(极早期HCC)中,CTAG1A作为生物标志物用于诊断的敏感性是85.71%、特异性是42.86%;在BCLC A期HCC(早期HCC)中,CTAG1A用于诊断的敏感性是83.33%、特异性是77.08%。

2.4 CTAG1A具有潜在的MHC-I型和MHC-II型抗原表位

利用 Swiss model 工具对CTAG1A进行同源建模,并使用IEDB数据库的TepiTool工具对CTAG1A的抗

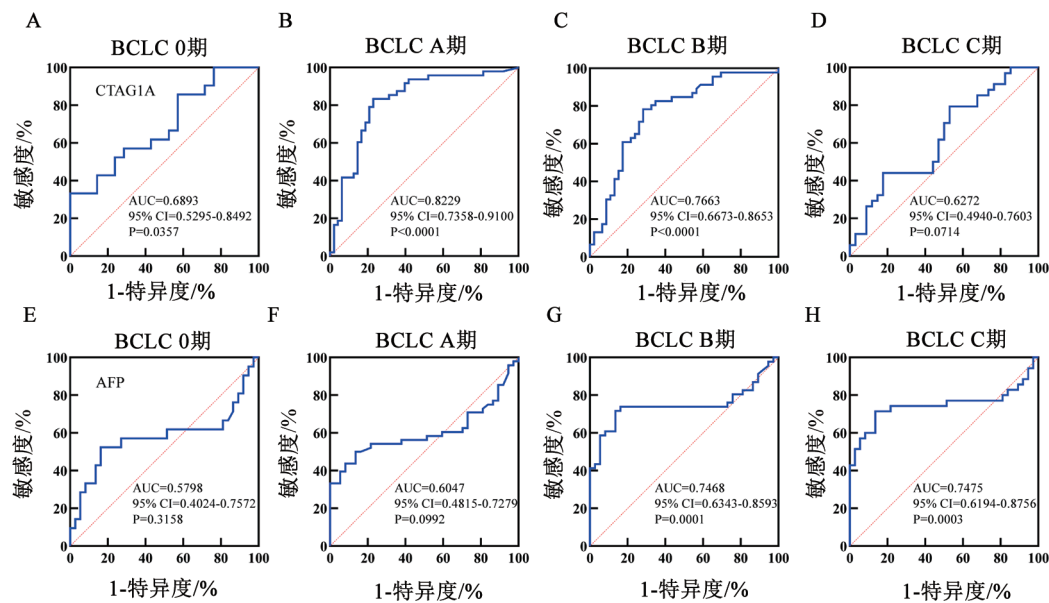
原表位进行分析,发现了其潜在的8个MHC-I型和4个MHC-II型抗原表位,分别是CTAG1A₁₀₈₋₁₁₆, CTAG1A₈₆₋₉₄, CTAG1A₁₂₀₋₁₂₈, CTAG1A₁₁₀₋₁₁₈, CTAG1A₁₅₇₋₁₆₅, CTAG1A₁₄₈₋₁₅₆, CTAG1A₁₂₇₋₁₃₅, CTAG1A₁₅₄₋₁₆₂和CTAG1A₁₂₃₋₁₃₇, CTAG1A₈₈₋₁₀₂, CTAG1A₁₃₉₋₁₅₃, CTAG1A₁₄₉₋₁₆₃(图4A~C),提示CTAG1A基因编码蛋白具有作为HCC相关抗原的潜力。

2.5 生物信息学分析CTAG1A的预测抗原表位的相关特性

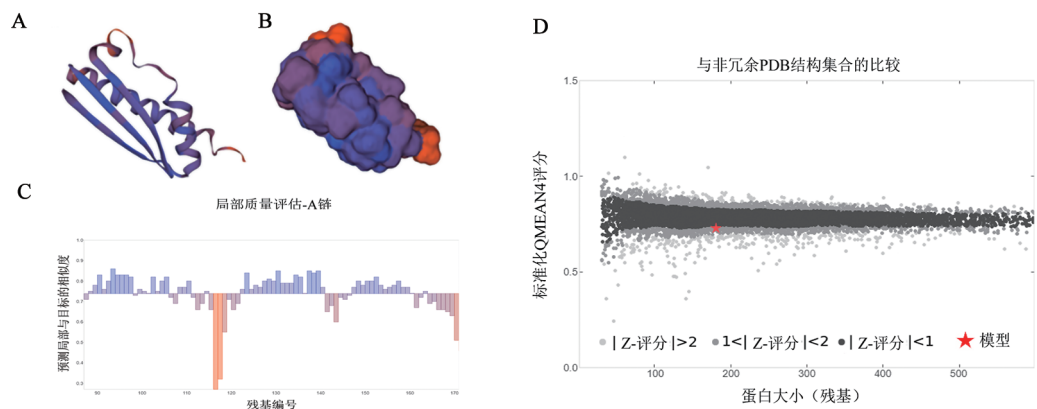
利用生信分析软件Expasy (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)计算预测抗原表位的分子量、等电点(pI)数据,结果见表1。

2.6 CTAG1A能够诱发特异性T细胞反应

将上述合成的12种CTAG1A MHC-I和MHC-II型抗原表位肽,分别与9位肝癌患者的PBMC共同温育(患者的基本信息见表2)。使用IFN- γ ELISpot检测与CTAG1A肽段共温育后的PBMC,结果显示MHC-I型(图7)和MHC-II型(图8)的抗原表位对应的肽段均能诱导不同程度的特异性T细胞反应,进一步验证了早期HCC相关抗原CTAG1A的免疫原性。



利用 RT-qPCR 检测 CTAG1A 表达水平 (A~D) 与血清 AFP 水平 (E~H) 诊断各期 HCC (BCLC 0、A、B、C 期) 的 ROC 曲线分析。
图 3 CTAG1A 与 AFP 对各期 HCC 的诊断效能



A、B: CTAG1A 蛋白同源建模 3D 结构图; C: 按残基编号预测的局部相似性与目标的相似度;
D: 模型的 QMEAN4 评分与非冗余 PDB 结构集合的比较。

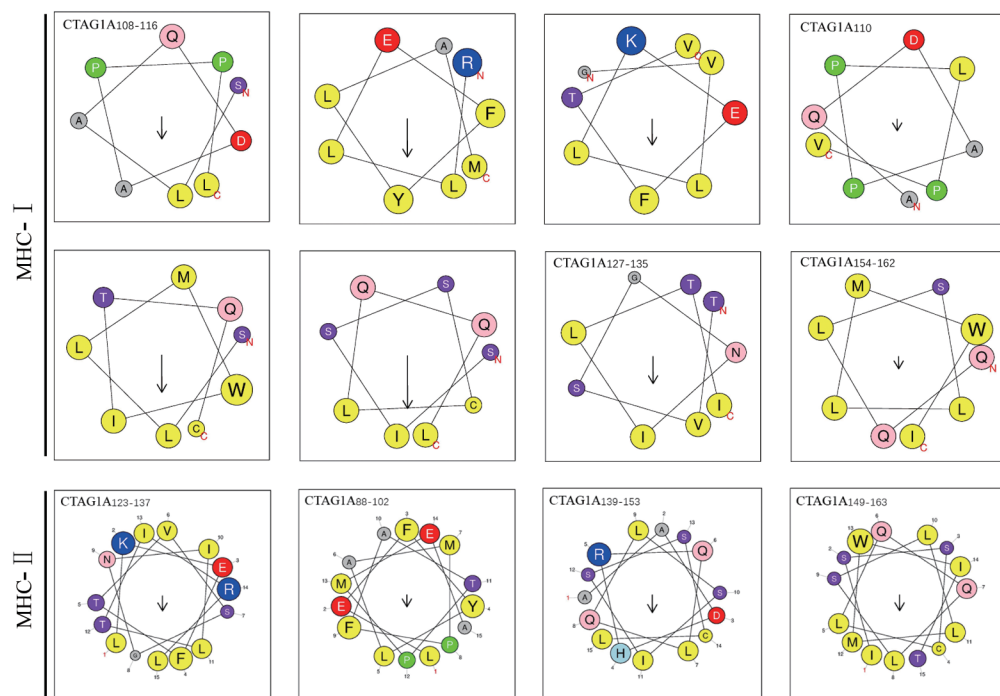
图 4 CTAG1A 蛋白同源建模

表 1 抗原肽段的理化性质

表位	MHC 分类	序列	分子量	pI	净电荷	疏水性/H	疏水矩/ μ H
CTAG1A ₁₀₈₋₁₁₆	MHC-I	SLAQDAPPL	911.02	3.80	-1	0.492	0.273
CTAG1A ₈₆₋₉₄	MHC-I	RLLEFYLAM	1 155.42	6.00	0	0.860	0.470
CTAG1A ₁₂₀₋₁₂₈	MHC-I	GVLLKEFTV	1 005.22	6.00	0	0.696	0.319
CTAG1A ₁₁₀₋₁₁₈	MHC-I	AQDAPPLPV	907.03	3.80	-1	0.523	0.142
CTAG1A ₁₅₇₋₁₆₅	MHC-I	SLLMWITQC	1 094.35	5.24	0	1.136	0.459
CTAG1A ₁₄₈₋₁₅₆	MHC-I	SISSCLQQQL	978.13	5.24	0	0.687	0.650
CTAG1A ₁₂₇₋₁₃₅	MHC-I	TVSGNILTI	917.07	5.19	0	0.711	0.334
CTAG1A ₁₅₄₋₁₆₂	MHC-I	QQLSLLMWI	1 131.40	5.52	0	1.100	0.151
CTAG1A ₁₂₃₋₁₃₇	MHC-II	LKEFTVSGNILTIRL	1 704.04	8.75	+1	0.597	0.228
CTAG1A ₈₈₋₁₀₂	MHC-II	LEFYLA MPFATPMEA	1 731.05	3.79	-2	0.783	0.182
CTAG1A ₁₃₉₋₁₅₃	MHC-II	AADHRQLQLSISSCL	1 641.86	6.78	+0.25	0.457	0.264
CTAG1A ₁₄₉₋₁₆₃	MHC-II	ISSCLQQLSLLMWTT	1736.12	5.52	0	1.008	0.237

同时,利用生信分析软件 HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>)分析预测了每个预测抗原肽的疏水性(hydrophobicity)、疏水力矩(hydrophobic

moment)等信息(图5)。随后,采用固相多肽合成法合成上述肽段,通过液相色谱仪纯化,并使用质谱检测其分子量(图6)。



CTAG1A 蛋白潜在的 MHC-I 型和 MHC-II 型抗原表位螺旋图。图中紫色圆圈显示极性残基,黄色圆圈显示非极性残基,蓝色圆圈显示碱性残基,红色圆圈显示酸性残基,粉色圆圈显示带电中性残基,灰色圆圈显示不带电中性残基,绿色圆圈显示非极性中性残基。圆圈大小和氨基酸体积成正比;箭头的长短显示疏水力矩的高低。

图5 CTAG1A 蛋白潜在的抗原表位螺旋图

表2 ELISpot 实验所有临床样本基本信息

临床病理特征	n	百分比/%
年龄/岁		
≤ 40	2	22.2
> 40	7	77.8
性别		
男性	9	100
女性	0	0
TNM 分期		
I a	1	11.1
I b	8	
II, III	0	0
肿瘤大小分级		
T1	9	100
T2, T3, T4	0	0
BCLC 分期		
0	1	11.1
A	8	88.9
B, C	0	0
血清 AFP		
+	4	44.4
-	5	55.5

3 讨论

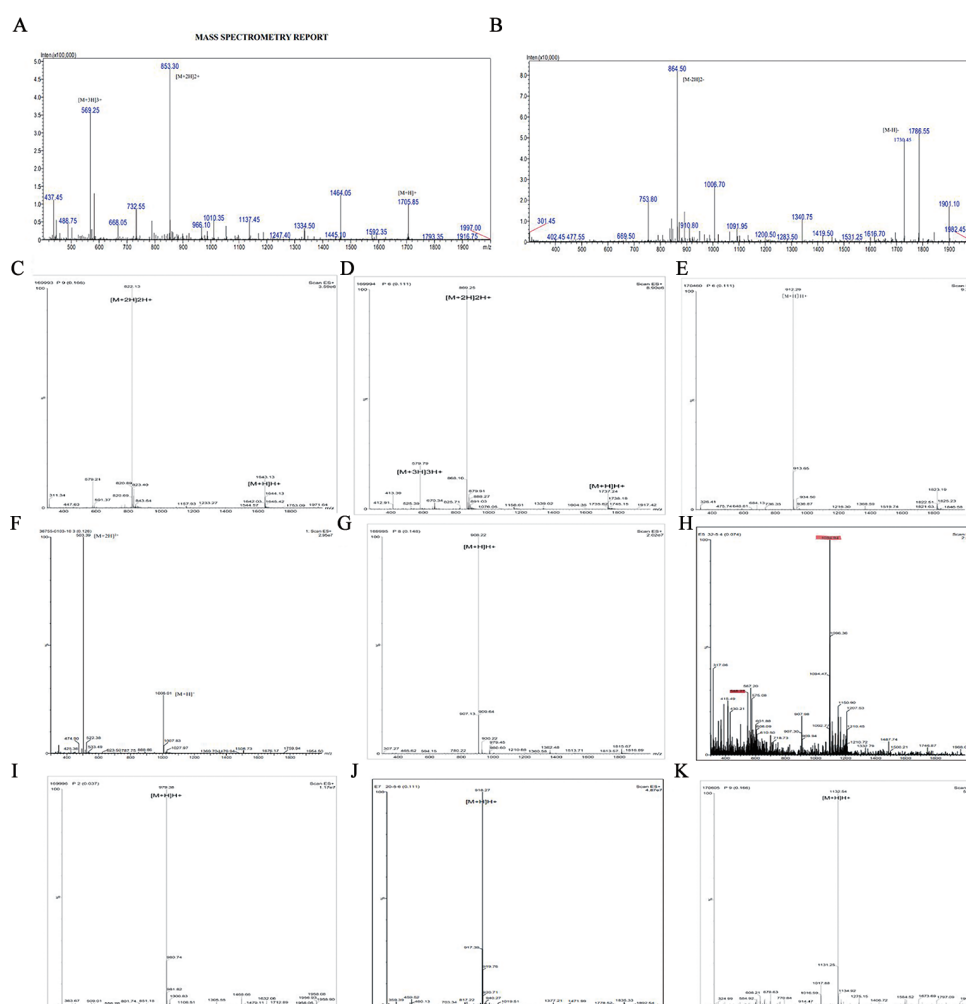
尽管针对恶性肿瘤治疗的基础和临床研究层出不穷,但是目前对早期 HCC 患者的诊断手段及临床治疗措施仍然十分有限,这极大地影响了 HCC 患者的预后^[9-11]。近年来,免疫治疗被应用到多种肿瘤的治疗中,但由于抗原性弱、缺少特异性抗原、肿瘤微环境的负性调控信号等原因,HCC 临床免疫治疗的应答率较低^[1,12-13]。已知的 HCC 相关抗原 AFP 在 50%~80% 的 HCC 中高表达,其存在 4 个 CTL 表位,且其 HLA-A2 的限制性多肽表位可被人和小鼠 T 细胞识别^[1,14]。但是在临床实际中,AFP 特异性免疫治疗的疗效并不理想^[1,14]。因此,探索新的 HCC 相关抗原、为 HCC 的早期诊断和治疗提供潜在的靶点具有显著的临床意义。

肿瘤免疫治疗的关键是寻找在肿瘤组织和正常组织中差异表达,且能激发或增强肿瘤特异性免疫反应的肿瘤相关抗原^[15]。在本研究中,笔者所在课题组以极早期 HCC (BCLC 0 期 HCC) 为直接研究对象,利用人类基因转录组芯片,对比分析了 10 对极早期

HCC 患者的新鲜肿瘤组织与配对癌旁组织的 mRNA 表达谱, 筛选出在极早期 HCC 组织中表达即显著升高的 CTAG1A。CTAG1A 基因位于 X 染色体的 Xq28 区域, 其编码 CTAG1A 蛋白。在生殖细胞、胎盘细胞等多种肿瘤细胞中均有表达^[16]。CTAG1A 是一种癌症睾丸抗原^[2-5], 通常认为这一类抗原具有高度免疫原性, 其具有在免疫豁免区中限制性表达、在肿瘤组织中稳定表达、以及编码癌症免疫原性抗原的能力。研究^[2-5]证实, CTAG1A 在胆囊癌、卵巢癌、结肠癌和非小细胞肺癌等多种肿瘤中异常表达。本研究利用独立大样本验证发现, CTAG1A 的 mRNA 在 HCC 各期均异常高表达。

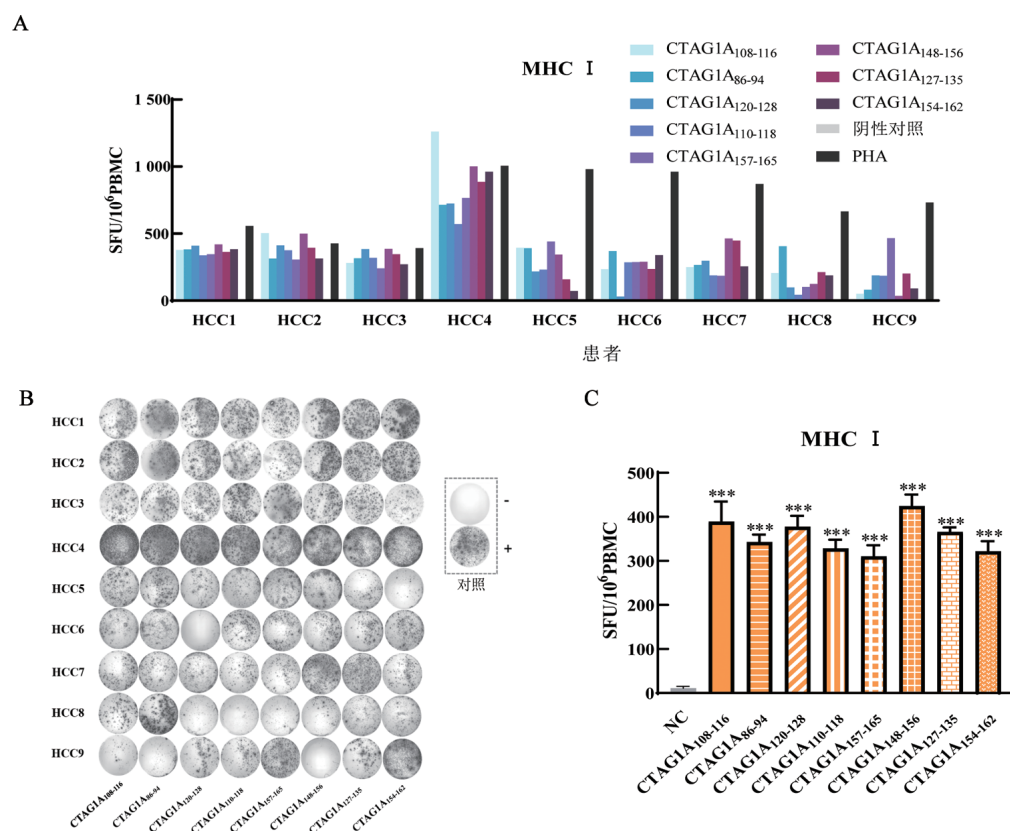
肝癌的早期诊断是改善患者预后的关键, 但目前临床广泛应用的肝癌筛查标志物 AFP 在早期肝癌中的敏感性较差^[17-18]。本研究发现, CTAG1A 在极早期肝癌中即显著上调, 提示其作为早期诊断标志物的潜力。为了阐明 CTAG1A 在早期 HCC 中的诊断效

能、比较其不同肝癌亚型中的差异, 以及和同类型 HCC 抗原及标志物进行对比, 本研究在使用不同分期的 HCC 样本进行表达检测的基础上, 利用 ROC 曲线分析方法分析了 CTAG1A 以及 HCC 经典生物标志物及抗原 AFP 在不同分期 HCC 中的表达趋势和诊断效能。从表达水平上看, 利用临床独立大样本验证发现, 在 HCC 各期 (BCLC 0、A、B、C 期), CTAG1A 均呈现异常高表达; 从 *P* 值上看, 与癌旁表达相比较, CTAG1A 在 BCLC A 期 HCC 中的升高趋势尤为显著。同时, 与慢性乙型肝炎病毒感染患者样本相比较, 本研究也分析了肝癌经典诊断标志物以及抗原 AFP 在 HCC 各期患者中表达的高低, 发现 AFP 主要是在 BCLC B 期及 C 期样本中表达显著升高, 在 BCLC 0、A 两期患者样本中, AFP 升高并不显著。这个结果提示, CTAG1A 是一种在 HCC 早期即升高的分子, 具有作为早期诊断生物标志物的可能。



HPLC 进行梯度洗脱, 洗脱梯度从 5% 乙腈溶液洗脱至 100% 乙腈溶液, 设置流速为 1 mL/min, 计算多肽的纯度以及出峰时间。A~K 分别为: CTAG1A₁₂₃₋₁₃₇, CTAG1A₈₈₋₁₀₂, CTAG1A₁₃₉₋₁₅₃, CTAG1A₁₄₉₋₁₆₃, CTAG1A₁₀₈₋₁₁₆, CTAG1A₁₂₀₋₁₂₈, CTAG1A₁₁₀₋₁₁₈, CTAG1A₁₅₇₋₁₆₅, CTAG1A₁₄₈₋₁₅₆, CTAG1A₁₂₇₋₁₃₅, CTAG1A₁₅₄₋₁₆₂ 肽段质谱。

图6 质谱检测纯化后的 CTAG1A 肽段



A: 单条MHC-I型CTAG1A肽在9位HCC患者PBMC(HCC1-HCC9)中诱导的特异性T细胞反应强度; B: 单条MHC-I型CTAG1A肽诱导的特异性T细胞反应ELISpot结果图; C: 单条MHC-I型CTAG1A肽诱导的平均特异性T细胞反应强度。与NC组相比, *** $P < 0.001$ 。

图7 MHC-I型单条CTAG1A肽段诱导的特异性T细胞反应

为了验证这一点,进行了ROC曲线分析。随后发现,CTAG1A在BCLC 0、A、B期HCC中均表现出了较好的与癌旁组织的区分效能;而HCC经典标志物及抗原AFP在BCLC B、C期HCC中表现出了较好的区分效能,而在0、A两期HCC中,AFP的表现并不显著;这个结果提示,CTAG1A是HCC早期诊断有效的生物标志物,对于早期诊断HCC而言表现优于AFP。

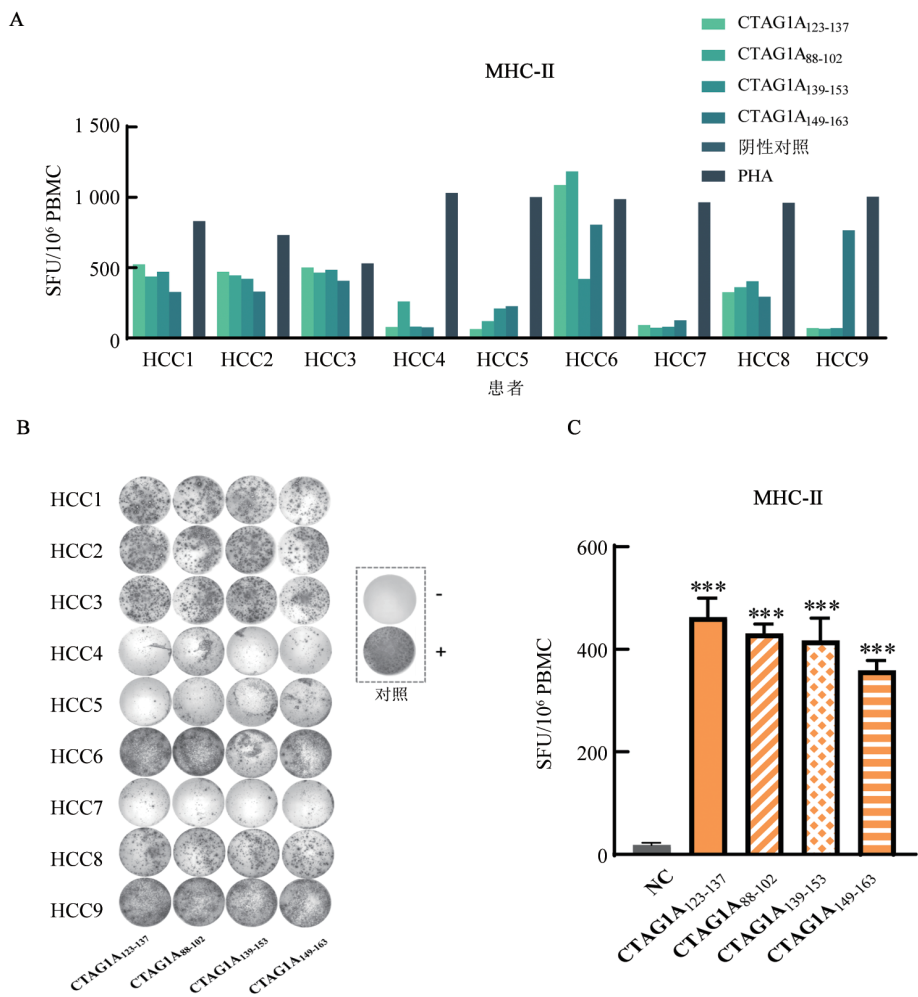
进一步探讨了CTAG1A是否能作为HCC相关抗原。使用生物信息学工具,分析预测了CTAG1A潜在的抗原表位,结果显示CTAG1A具有8个潜在的MHC-I型抗原表位和4个潜在的MHC-II型抗原表位,这说明了CTAG1A基因编码的蛋白具有作为HCC相关抗原的潜力。随后,合成并纯化了这些潜在的抗原肽,并使用质谱法鉴定了肽段的序列。

CTAG1A是癌/睾丸抗原(cancer/testis antigen, CTA)家族中免疫原性较强的抗原^[19],可诱导机体产生体液免疫和细胞免疫应答。在针对不同来源的肿瘤样本的大规模血清学研究中均检测到对CTAG1A的体液免疫应答^[20-21]。另有研究^[22]在两名黑色素瘤患者中鉴定出被CD4⁺T淋巴细胞识别的MHC-II型抗原表位。为了验证CTAG1A在HCC中的免疫原性,

本研究将合成的CTAG1A预测抗原表位肽段,分别与3位MHC亚型预测可与CTAG1A潜在抗原表位结合的HCC患者的PBMC共同温育后,使用IFN- γ ELISpot进行抗原性检测;结果显示,12个预测的抗原表位对应的肽段均能诱导不同程度的特异性T细胞反应,提示CTAG1A是潜在的HCC相关抗原。

CTAG1A的强免疫原性源于其多表位特性。本研究预测并验证了其8个MHC-I型和4个MHC-II型抗原表位,提示其可同时激活CD8⁺和CD4⁺T细胞,形成协同抗肿瘤免疫应答。因此,CTAG1A可作为多模态免疫治疗的潜在靶点,在临床上可能具有多种应用场景:(1)mRNA疫苗。研究表明,针对NY-ESO-1(同为CTA家族成员)的mRNA疫苗在黑色素瘤中显示出良好的安全性及免疫原性^[7]。编码CTAG1A抗原表位的mRNA疫苗可通过脂质纳米颗粒递送,在体内高效表达并呈递抗原,激活特异性T细胞;(2)过继性细胞治疗。通过筛选CTAG1A特异性T细胞受体(T cell receptor, TCR),开发TCR-T或CAR-T疗法,可能直接靶向肝癌细胞;(3)联合免疫检查点抑制剂。既往研究表明,疫苗激活的T细胞高表达PD-1,而抑制剂可阻断其与PD-L1的结合,从而

逆转 T 细胞耗竭^[12]; 基于此, CTAG1A 疫苗与 PD-1/ PD-L1 抑制剂的联用可能打破肿瘤微环境的免疫抑 制状态。



A: 单条 MHC-II 型 CTAG1A 肽在 9 位 HCC 患者 PBMC (HCC1-HCC9) 中诱导的特异性 T 细胞反应强度; B: 单条 MHC-II 型 CTAG1A 肽诱导的特异性 T 细胞反应 ELISpot 结果图; C: 单条 MHC-II 型 CTAG1A 肽诱导的平均特异性 T 细胞反应强度。与 NC 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 8 MHC-II 型单条 CTAG1A 肽段诱导的特异性 T 细胞反应

尽管 CTAG1A 在免疫治疗中的应用前景广阔, 但其在临床中的实际应用还需要针对以下问题进行更深入的研究: (1) 抗原异质性。肝癌具有高度分子异质性, CTAG1A 的表达可能因患者 HLA 分型的不同而差异显著。在将来的研究中, 需通过多中心临床研究明确其适用人群, 并结合基因测序筛选优势亚群; (2) 免疫逃逸。肿瘤可能通过表观遗传沉默或抗原递呈缺陷下调 CTAG1A 表达。对此, 可联合表观遗传调节剂 (如 DNA 甲基化抑制剂) 恢复抗原表达, 或设计多靶点疫苗 (如 CTAG1A 联合 GPC3) 以降低逃逸风险。

综上所述, 本项研究通过高通量筛选, 结合生物信息学预测分析和体外水平诱导 T 细胞特异性反应

等方法, 鉴定了 HCC 早期即显著升高的 CTAG1A 的免疫原性, 探究 CTAG1A 作为 HCC 相关抗原的可能性, 发现其较 HCC 经典标志物和抗原 AFP 更优异的早期诊断效率, 有望为 HCC 早期诊断提供新的标志物, 为开发新的免疫治疗策略如 mRNA 抗肿瘤疫苗提供思路。

[参考文献]

[1] BUTTERFIELD L H, RIBAS A, DISSETTE V B, *et al.* A phase I/II trial testing immunization of hepatocellular carcinoma patients with dendritic cells pulsed with four alpha-fetoprotein peptides[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(9): 2817-2825. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2856.

[2] IBUKIĆ A, RAMIĆ S, ZOVAK M, *et al.* Expression and prognostic

- significance of PD-L1 and NY-ESO1 in gallbladder carcinoma[J]. *In Vivo*, 2023, 37(4): 1828-1837. DOI:10.21873/invivo.13274.
- [3] VLASENKOVA R, KONYSHEVA D, NURGALIEVA A, *et al.* Characterization of cancer/testis antigens as prognostic markers of ovarian cancer[J/OL]. *Diagnostics*, 2023, 13(19): 3092 [2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37835834/>. DOI: 10.3390/diagnostics13193092.
- [4] ALMUTAIRI M H, ALRUBIE T M, ALAMRI A M, *et al.* Cancer-testis gene biomarkers discovered in colon cancer patients[J/OL]. *Genes*, 2022, 13(5): 807 [2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35627192/>. DOI:10.3390/genes13050807.
- [5] JIN S, CAO S B, LI J H, *et al.* Cancer/testis antigens (CTAs) expression in resected lung cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 4491-4499. DOI:10.2147/OTT.S159491.
- [6] WANG R F, WANG H Y. Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine[J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 11-37. DOI:10.1038/cr.2016.155.
- [7] JÄGER E, NAGATA Y, GNJATIC S, *et al.* Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4760-4765. DOI:10.1073/pnas.97.9.4760.
- [8] WEI Y P, CHEN X, LIANG C, *et al.* A noncoding regulatory RNAs network driven by circ-CDYL acts specifically in the early stages hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2020, 71(1): 130-147. DOI:10.1002/hep.30795.
- [9] YANG X P, YANG C, ZHANG S, *et al.* Precision treatment in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(2): 180-197. DOI:10.1016/j.ccell.2024.01.007.
- [10] SANKAR K, GONG J, OSIPOV A, *et al.* Recent advances in the management of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2024, 30(1): 1-15. DOI:10.3350/cmh.2023.0125.
- [11] AZIZ H, KWON Y I C, PARK A, *et al.* Comprehensive review of clinical presentation, diagnosis, management, and prognosis of ruptured hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2024, 28(8): 1357-1369. DOI:10.1016/j.gassur.2024.05.018.
- [12] TANG R, XU J, ZHANG B, *et al.* Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 110 [2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32778143/>. DOI:10.1186/s13045-020-00946-7.
- [13] HUANG H T, FU J, PENG H, *et al.* Co-delivery of polyphyllin II and IR780 PLGA nanoparticles induced pyroptosis combined with photothermal to enhance hepatocellular carcinoma immunotherapy [J/OL]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 647 [2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39434141/>. DOI: 10.1186/s12951-024-02887-6.
- [14] BUTTERFIELD L H, RIBAS A, MENG W S, *et al.* T-cell responses to HLA-A*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(16 Pt 1): 5902-5908.
- [15] ZHANG Y Y, ZHANG Z M. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 807-821. DOI: 10.1038/s41423-020-0488-6.
- [16] SATIE A P, RAJPERT-DE MEYTS E, SPAGNOLI G C, *et al.* The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma *in situ*[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(6): 775-780. DOI: 10.1097/01.lab.0000017169.26718.5f.
- [17] TAYOB N, KANWAL F, ALSARRAJ A, *et al.* The performance of AFP, AFP-3, DCP as biomarkers for detection of hepatocellular carcinoma (HCC): a phase 3 biomarker study in the United States [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(2): 415-423. DOI:10.1016/j.cgh.2022.01.047.
- [18] WEI Y P, FU J B, ZHANG H L, *et al.* N6-methyladenosine modification promotes hepatocarcinogenesis through circ-CDYL-enriched and EpCAM-positive liver tumor-initiating exosomes[J/OL]. *iScience*, 2023, 26(10): 108022 [2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37954137/>. DOI:10.1016/j.isci.2023.108022.
- [19] ANDERSON K S. Tumor vaccines for breast cancer[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(4): 361-368. DOI:10.1080/07357900802574421.
- [20] NATSUME A, WAKABAYASHI T, TSUJIMURA K, *et al.* The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(11): 2542-2553. DOI:10.1002/ijc.23407.
- [21] GIBBS Z A, WHITEHURST A W. Emerging contributions of cancer/testis antigens to neoplastic behaviors[J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(10): 701-712. DOI:10.1016/j.trecan.2018.08.005.
- [22] JÄGER E, JÄGER D, KARBACH J, *et al.* Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4⁺ T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma[J]. *J Exp Med*, 2000, 191(4): 625-630. DOI:10.1084/jem.191.4.625.

[收稿日期] 2025-02-11

[修回日期] 2025-03-20

[本文编辑] 黄静怡