

携带 Herceptin-MICB 融合蛋白基因的腺病毒载体的构建

贾 玉¹, 李林芳², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学新元医学与生物技术研究, 杭州 310018; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

摘 要: 为了构建携带 Herceptin-MICB 融合蛋白基因的腺病毒载体, 筛选出能表达该融合蛋白的重组腺病毒, 检测其表达融合蛋白的情况及抗肿瘤特征。首先, 通过 PCR 将 NKG2D 的配体 MICB 的基因片段插入含有全长抗体 Herceptin 基因的 5 型腺病毒穿梭载体 pDC339-Her 中, 获得载体 pDC339-Her-MICB 与腺病毒骨架载体 pBHGloxΔE1, 3Cr 重组, 然后在 293 细胞内进行病毒包装得到非增殖型腺病毒 Ad-Her-MICB, 纯化后测病毒滴度。双抗体夹心 ELISA 和 Western blot 检测融合蛋白的表达情况; 间接免疫荧光实验 (IFA) 检测融合蛋白的特异性。酶切后 DNA 电泳鉴定证实载体构建成功, 重组病毒经 PCR 鉴定携带融合蛋白基因。融合蛋白的表达量为 $(623.25 \pm 38.62) \text{ ng/mL}$; Western blot 显示: 该融合蛋白与商品化的 Herceptin 抗体轻链重链比较, 大小一致, 浓度匹配; 间接免疫荧光检测 (IFA) 显示了融合蛋白与 HER-2 过表达的卵巢癌细胞株 SK-OV-3 结合的特异性。结果表明: 腺病毒 Ad-Her-MICB 携带 Herceptin-NKG2D 配体融合蛋白基因能在体外正常表达且与商品化的 Herceptin 生物学特性相似, 为融合蛋白的抗肿瘤治疗奠定基础。

关键词: 肿瘤; 抗体治疗; Herceptin; NKG2D; 融合蛋白

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A

0 引 言

HER-2 (erbB-2/neu) 属于表皮生长因子受体 (EGFR) 家族成员, 它在 25% 的乳腺癌细胞中过度表达^[1], 在卵巢癌、前列腺癌、肺癌以及胃肠癌细胞中也存在过度表达现象。Herceptin 也是唯一经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的治疗转移性乳腺癌药物。Herceptin 在多种乳腺癌细胞系中可以激活抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)^[2]。NK 细胞是介导 ADCC 作用的主要免疫细胞, 而 NKG2D 是 NK 细胞表达的活化型受体, NKG2D 配体和受体的结合能够活化 NK 细胞和 T 细胞, 并且促进这些细胞表达发挥细胞毒作用的蛋白分子。MICA 和 MICB (MHC-I 类链相关 A 和 B) 是最早被发现的 NKG2D 配体。临床实验证明抗体药物有一定的疗效, 但病人的肿瘤很难被彻底清除, 因此, 对于抗体药物所要求的提高抗肿瘤效率和延长药物持续作用时间等还有待于进一步提高。将抗体分子的片段与细胞因子融合, 该融合蛋白不但具有抗体与抗原结合的特异性, 还具有细胞因子的多功能活性, 从而可借助抗体将细胞因子导向到特定的靶部位, 使其高效发挥生物学功能, 减轻全身毒副作用^[3]。

为了提高 Herceptin 抗体的抗肿瘤特性, 本实验在 Herceptin 抗体基因的重链恒定区 3 连接上 NKG2D 配体 MICB 的基因, 构成 Herceptin-MICB 融合蛋白基因, 进一步证明腺病毒载体是否能正常表达该融合蛋白, 以及这种融合蛋白是否具有与 Herceptin 抗体相似的特异性。本实验为提高 Herceptin 抗体的疗效奠定基础, 是肿瘤靶向治疗的新方法。

收稿日期: 2010-01-13

基金项目: 国家新药创制重大专项课题 (2009ZX09103-687)

作者简介: 贾 玉 (1983—), 男, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤靶向基因病毒治疗及抗体治疗方面的研究。

通讯作者: 钱其军, 电子邮箱: qianqj@163.com

1 实 验

1.1 实验材料

5 型腺病毒穿梭载体 pDC355-Her、pDC358-Her、pDC339-Her、质粒 pUC19-Her、pXC1 均为本实验室改造保存;MICB 基因购自广州复能基因有限公司;骨架载体 pBHGlox Δ E1, 3Cr 购自加拿大 Microbix Biosystems 公司;Lipofect amine2000 试剂盒购自美国 GIBCO 公司;人胚肾细胞株 293 购自加拿大 Microbix Biosystem 公司;HER-2 阴性的人肝癌细胞株 SMMC-7721 和 HER-2 高表达的人卵巢癌细胞株 SK-OV-3 购自美国 ATCC 公司。

本实验所需引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,引物序列如下:重链融合区上游:GAGC-CCCACAGTCTTC;重链融合区下游:ACTGTGGGGCTC AGCTTTACCCGGAGACAG;MICB 上游 TA-AAGCTGAGCCCCACAGTC;MICB 下游:CCCCGCTAGCTTATCACTAGGCGCCCTCAGT;轻链上游:TACTGAATTTCGCCACCATGGAAGCCCCAG;轻链下游:CAGTTCTTTTGATCTCCACCTTGGTGCC;重链上游:TGCTAAGCTTGCCACCATGGAGTTTTTG;野毒上游:CTGGCCAATACCAACCTTA;野毒下游:CTGGCCAATACCAACCTTA。

1.2 实验方法

1.2.1 携带 Herceptin-MICB 基因的腺病毒载体 pDC339-Her-MICB 的构建

根据 Herceptin 重链基因和 MICB 基因合成引物,以 pUC19-Her 为模板,通过 PCR 获得 Herceptin 重链上酶切位点 Age I 之后的基因片段(885 bp);以 MICB 基因为模板,通过 PCR 获得目的片段(1 086 bp);然后将上述两片段通过重叠延伸 PCR(overlap extension PCR)获得 Her-MICB 融合基因 Her-MICB(1 971 bp)。融合基因经 Age I + Nhe I 双酶切后连入质粒 pDC355-Her,得到 pDC355-Her-MICB。再用 Age I + Nhe I 酶切 pDC355-Her-MICB,将融合蛋白基因连入 pDC358-Her,得到 pDC358-Her-MICB。最后用 Hind III + Nhe I 酶切 pDC358-Her-MICB 将融合蛋白基因连入 pDC339-Her,最终得到携带 Herceptin-MICB 基因的腺病毒载体 pDC339-Her-MICB。

1.2.2 腺病毒 Ad-Her-MICB 的重组及鉴定

将上述构建好的 pDC339-Her-MICB 与 5 型腺病毒骨架载体 pBHGlox(delta)E1, 3Cr 通过 Lipofectamine2000 试剂盒共转染至 293 细胞,共转染后的 9~14 d,收集病毒空斑,经过三轮病毒空斑纯化,得到非增殖型腺病毒 Ad-Her-MICB。使用 QIAGEN DNA Blood Mini Kit 提取病毒 DNA,再通过 PCR 鉴定。

1.2.3 重组腺病毒 Ad-Her-MICB 的扩增、纯化及滴度测定

腺病毒的扩增纯化采用 293 细胞及氯化铯密度梯度离心法,采用 50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀)测病毒滴度。

1.2.4 双抗体夹心 ELISA 方法检测融合蛋白的表达

将培养的 293 细胞消化、重悬,计数铺 24 孔板,每孔细胞 1×10^5 个细胞在 5% CO₂ 孵箱培养 24 h 后,换液(无血清)。加入 MOI=10 的 Ad-Her-MICB 病毒,轻轻摇匀,2 h 后再换成 5% FBS 培养液,继续培养 48 h,收集上清。以鼠抗人 IgG1 抗体做为一抗,以 HRP 标记的鼠抗人 IgG1 抗体做为二抗,商品化的 Herceptin 为标准品,蛋白上清和标准品每孔各 100 μ L。其他步骤按常规方法操作。450 nm 测 OD 值,绘制标准曲线,计算融合蛋白的表达量。

1.2.5 Western blot 检测

将上述实验中收集的蛋白上清用 Western blot 常规方法检测融合蛋白的表达情况。

1.2.6 间接免疫荧光实验(IFA)

选用 HER-2 高表达的 SK-OV-3 细胞和 HER-2 阴性的 SMMC-7721 细胞计数铺 96 孔板, 1×10^4 /孔, CO₂ 孵箱培养 24 h;将液体吸去, $1 \times$ PBS 洗 2 次;加多聚甲醛, 30 μ L/孔,放置 5~10 min;吸去液体, $1 \times$ BSA 洗 3 次;加入上述实验收集的细胞上清, 30 μ L/孔,商品化 Herceptin 作为阳性对照;冰浴 2 h;加入带有荧光素的鼠抗人 II 抗, 30 μ L/孔,冰浴 1 h,避光放置;将液体吸去, $1 \times$ BSA 洗 3 次,最后 1 次至少放置 2 min。将液体吸去,加 $1 \times$ BSA, 30 μ L/孔,荧光显微镜下观察。

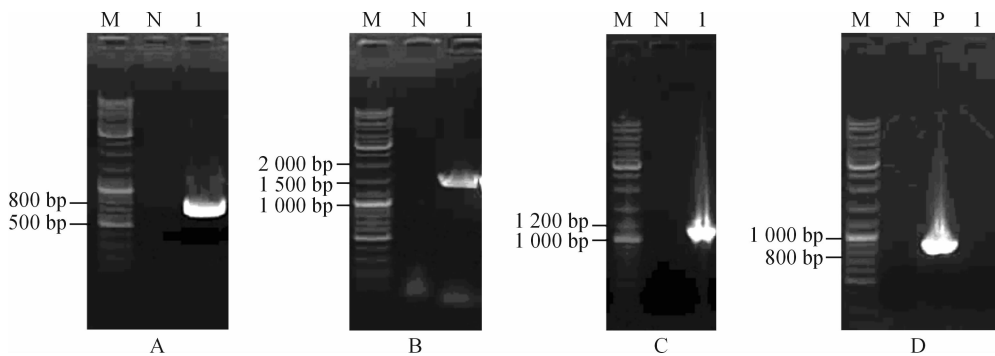
2 结 果

2.1 载体 pDC339-Her-MICB 的鉴定

如图 1 所示,pDC339-Her-MICB 经 *Hind*Ⅲ + *Nhe*Ⅰ 酶切,应出现大小为 2 568 bp 和 5 633 bp 的两条带(如图 1A);*Age*Ⅰ 酶切应出现大小为 2 589 bp 和 5 552 bp 的两条带(如图 1B);*Apa*Ⅰ 酶切应出现大小为 1 961 bp 和 6 180 bp 的两条带(如图 1C)。三组限制性内切酶鉴定结果显示条带大小均正确,说明携带 Herceptin-MICB 基因的腺病毒载体 pDC339-Her-MICB 构建成功。

2.2 病毒 Ad-Her-MICB 的 DNA 的 PCR 鉴定

将构建成功的穿梭质粒 pDC339-Her-MICB 与腺病毒骨架质粒 pBHGloxΔE1,3Cr 于 293 细胞中重组,包装出病毒颗粒。经 PCR 检测病毒基因组中 Herceptin 轻链(714 bp)、Herceptin 重链(1 410 bp)、MICB 基因(1 086 bp)序列的大小均正确,病毒大量扩增后利用引物 pXC1(879 bp)PCR 证实扩增后的病毒中不含有野生型病毒。病毒 Ad-Her-MICB 的 DNA 的 PCR 鉴定结果证实融合蛋白的基因已成功重组至病毒基因组中(鉴定结果如图 2 所示)。



M 均为 DNA Ladder Mix; N 均为阴性对照;A 图中 1:Herceptin 轻链的鉴定结果;B 图中 1:Herceptin 重链的鉴定结果;C 图中 1:MICB 基因的鉴定结果;D 图中 1:Ad-Her-MICB 的 DNA 的 PCR 产物;P:pXC1 质粒 PCR 的结果

图 2 病毒 Ad-Her-MICB 的 DNA 的 PCR 鉴定

2.3 病毒滴度测定

Ad-Her-MICB 经过扩增,纯化后,TCID₅₀ 法测得病毒滴度为 1.15 × 10⁹ pfu/mL。

2.4 Ad-Her-MICB 在 293 细胞株中的融合蛋白的表达量

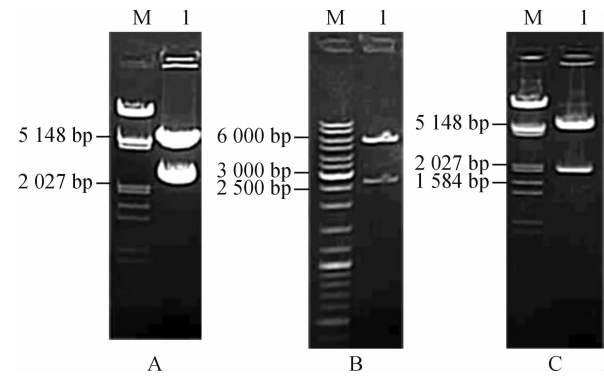
腺病毒 Ad-Her-MICB 按 MOI=10 转染 293 细胞株,收集上清。双抗体夹心 ELISA 方法检测融合蛋白的表达量为(623.25 ± 38.62) ng/mL。

2.5 Western blot 检测

Western blot 结果(如图 3 所示)显示,转染 Ad-Her-MICB 病毒的 293 细胞能够分别表达融合蛋白中抗体的轻链和重链融合区,其轻链的相对分子量与商品化的 Herceptin 的轻链相同,且浓度匹配,融合蛋白的分子量大小也与理论大小一致。

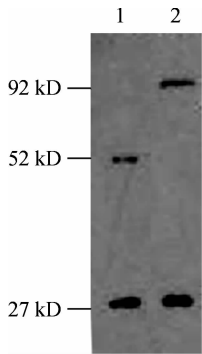
2.6 间接免疫荧光实验(IFA)

在图 4 中可见,HER-2 阳性的 SK-OV-3 细胞在荧光显微镜下可检测



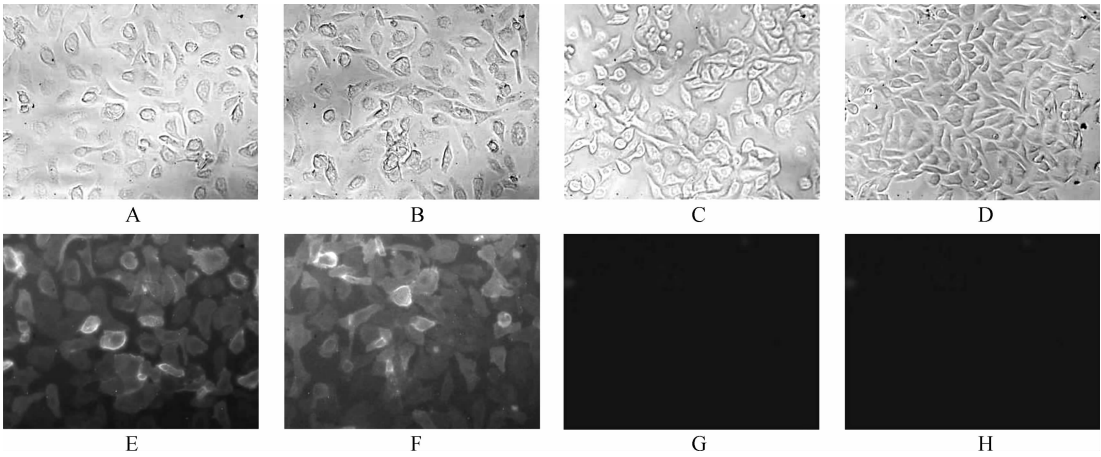
A 图中,M:λDNA/*Eco*RI+*Hind*Ⅲ marker;1:*Hind*Ⅲ + *Nhe*Ⅰ 酶切结果(2 568 bp+5 633 bp);B 图中,M:DNA Ladder Mix;1:*Age*Ⅰ 酶切结果(2 589 bp+5 552 bp);C 图中,M:λDNA/*Eco*RI+*Hind*Ⅲ marker;1:*Apa*Ⅰ 酶切结果(1 961 bp+6 180 bp)

图 1 pDC339-Her-MICB 的酶切鉴定



1:商品化的 Herceptin; 2:Ad-Her-MICB
图 3 Ad-Her-MICB 感染 293 细胞株后融合蛋白的表达

到与 Herceptin-MICB 融合蛋白的结合(如图 4F 所示),荧光强度与商品化的 Herceptin(如图 4E 所示)相似,而商品化的 Herceptin 及 Herceptin-MICB 融合蛋白均不能与 HER-2 阴性的 SMMC-7721 细胞结合,在荧光显微镜下均未见典型荧光(如图 4G,图 4H 所示)。这表明 Ad-Her-MICB 表达的 Herceptin-MICB 融合蛋白与 HER-2 有较好的特异性结合活性。



A:明视野下 SK-OV-3/商品化的 Herceptin;B:明视野下 SK-OV-3/ Ad-Her-MICB;C:明视野下 SMMC-7721/商品化的 Herceptin;D:明视野下 SMMC-7721 /Ad-Her-MICB;E:荧光显微镜下 SK-OV-3/商品化的 Herceptin;F:荧光显微镜下 SK-OV-3/ Ad-Her-MICB;G:荧光显微镜下 SMMC-7721/商品化的 Herceptin;H:荧光显微镜下 SMMC-7721 / Ad-Her-MICB。

图 4 间接免疫荧光法检测 Herceptin-MICB 融合蛋白与 HER-2 结合的特异性(10×20 倍)

3 讨 论

单克隆抗体(MAb)在肿瘤治疗中展现出日益重要的作用。抗体对多种人的恶性肿瘤有很好的疗效,它可以介导机体产生多种免疫效应机制,如 ADCC 作用。随着人们对癌症产生和发展机制的研究的深入进行,肿瘤的靶向特异性治疗迅速发展^[4]。50 年前,研究表明抗体在机体内能特异性地靶向肿瘤细胞,单克隆抗体技术的发展为肿瘤治疗学的发展开辟新的途径^[5]。分子生物学的发展促进了抗体基因融合、重组技术的成熟,提高了抗体的靶向性和杀伤肿瘤细胞的能力。基因融合和重组技术也推动了单克隆抗体的研究、诊断和治疗的发展。抗体治疗的方案有很多,包括不加修饰直接应用、化学修饰、基因重组等,而每种方案在临床上都有优点和不足。因此,提高抗体治疗效果就要增强抗体特异的靶向性,同时降低治疗毒性^[6]。

Herceptin 是一种从鼠源 MAb(4D5)得到的人源化抗体,它能特异性识别胞外区 HER-2/neu^[7]。基于临床试验的结果,Herceptin 经 FDA 批准用于 HER-2/neu 过表达的转移型乳腺癌治疗。它可以单独使用也可以联合紫杉醇药物一同使用,和其他化学药物结合后仍具有很高的活性。Herceptin 的疗效和安全性虽然已经得到充分证实,但是它也存在诸多不足:由于抗体生产的较高技术和设备要求,生产成本低,患者的治疗费用也随之大大增加;同时抗体使用量较大,治疗效果有待于进一步提高。

本实验对携带 Herceptin 抗体基因的增殖缺陷型腺病毒载体进行改造,在抗体基因的重链恒定区 3 连接上 NKG2D 配体 MICB 的基因,重组出腺病毒 Ad-Her-MICB,使其表达 Herceptin-MICB 融合蛋白。MICB 配体可以与 NK 细胞表面的受体相互识别并结合,提高 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。NK 细胞表面的 FcγRⅢ(CD16)与抗体的 Fc 段识别结合后,促使自身活化,诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC),从而杀伤靶细胞。理论上,这种融合蛋白相比单独的 Herceptin 抗体具有更好的抗肿瘤效果。这种腺病毒介导的融合蛋白基因治疗有别于传统的抗体治疗,一定程度上可解决治疗肿瘤的抗体生产成本过高的难题。该融合蛋白的抗肿瘤效果有待于进一步体内和体外实验证明。

该研究成功构建了携带 Herceptin-MICB 融合蛋白基因的腺病毒载体,并且在体外能正常表达该融合蛋白;证明了该融合蛋白结合 HER-2 的特异性与商品化的 Herceptin 抗体一致,且轻重链的分子量大小相同,浓度匹配,故可能与其具有相似生物学特性。该腺病毒载体的成功构建为提高抗体的抗肿瘤效果奠定了基础。

参考文献:

[1] Slamon D, Clark G, Wong S, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene[J]. Science, 1987, 235(6): 177-182.

[2] Carter P, Presta L, Gorman C M, et al. Humanization of an anti-p185 her2 antibody for human cancer therapy[J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89(5): 4285-4289.

[3] 房永祥, 冯海燕, 景志忠, 等, 细胞因子融合蛋白技术及其应用前景[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(4): 856-859.

[4] Veronese M, Dwyer P. Monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer[J]. Cancer, 2004, 40(10): 1292-1301.

[5] Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion[J]. Immunol, 1976, 6(9): 511-519.

[6] Trail P A, King H, Dubowchik G M. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(9): 328-337.

[7] Cobleigh M, Vogel C, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease[J]. Clin Oncol, 1999, 17(10): 2639-2648.

Construction and Identification of a Recombinant Adenovirus Vector Expressing Herceptin-MICB Fusion Protein

JIA Yu¹, LI Lin-fang², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, The Second Militaty Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: To construct and identify a recombinant adenovirus vector expressing Herceptin-MICB fusion protein and measure expression of the fusion protein and identify anti-tumor specificity of the fusion protein. The gene of MICB is cloned into type 5 adenovirus vector pDC339-Her to produce the vector pDC339-Her-MICB which is recombined to adenovirus vector (pBHGloxΔE1, 3Cr). The recombinant adenovirus named Ad-Her-MICB propagate in 293 cells, purify and measure virus titers. ELISA is used to measure the expression of the fusion protein. Indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blotting are used to detect the bioactivity of the fusion protein. Enzyme digestion confirm the vector is constructed successfully. Identification by PCR confirm the constructed recombinant adenovirus can express fusion protein efficiently. The expression of fusion protein detected by ELISA is(623. 25±38. 62)ng/mL. The bioactivity and specificity of the fusion protein is similar to the commercial Herceptin as shown by Western blotting and IFA. The study shows Ad-Her-MICB efficiently expresses Herceptin-NKG2D ligand fusion protein in vitro. The bioactivity of the fusion protein is similar to commercial Herceptin. This study may serve as a foundation for anti-tumor therapy of fusion protein.

Key words: tumor; antibody therapy; Herceptin; NKG2D; fusion protein

(责任编辑: 许惠儿)