

PD-1 抗体表达载体的构建及其功能的探究

陶 雷¹, 黎 江², 朱海莉², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438)

摘 要: 通过构建含 PD-1 抗体基因的重组腺病毒表达载体 Ad35-anti-PD-1, 表达的 PD-1 抗体以探究其对细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)抗肿瘤功能的影响。用 ELISA 实验检测 Ad35-anti-PD-1 在 293 细胞中 PD-1 抗体的表达量;利用 Protein G 亲和层析法纯化 PD-1 抗体;通过体外杀伤实验研究 PD-1 抗体阻断 PD-1 信号通路的 CTL 杀伤肝癌细胞能力的变化。显示成功构建重组腺病毒载体 Ad35-anti-PD-1, 滴度为 1×10^{10} pfu/mL;ELISA 实验检测在 72 h 时 293 细胞上清中 PD-1 抗体的表达量约在 600 ng/mL;Western blotting 实验证明 PD-1 抗体包含正确的重链(50 kD)和轻链(25 kD);ELISA 实验检测从 100 mL 细胞上清中得到 1 mL 浓度在 40 μ g/mL 的 PD-1 抗体;体外杀伤实验证明 CTL 在添加 PD-1 抗体的环境中杀伤肝癌细胞的能力显著增强。

关键词: CTL; PD-1 抗体; 抗肿瘤; 免疫细胞治疗; 免疫抑制

中图分类号: Q255

文献标志码: A

0 引 言

PD-1(programmed death 1)是 CD28 家族成员,表达于活化的 T 细胞、B 细胞、自然杀伤 T 细胞、单核细胞和树突状细胞^[1-2]。静息的 T 细胞不表达 PD-1,但被激活后可表达 PD-1^[3]。PD-1 以区室化的形式储存在细胞内^[4-5]。T 细胞被激活后,细胞表面的 PD-1 表达可在 24 h 之内检测到,PD-1 与其配体结合后,几个小时之内就可产生效应^[6]。PD-1 为 T 细胞活化的负调控蛋白,它可以抑制 T 细胞活性,降低 T 细胞抗肿瘤功能^[7-8]。这促使人们开发抗体去阻断细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的 PD-1 信号,增强 CTL 活性,提高 CTL 过继细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)的疗效。

2012 年,美国约翰霍普金森大学综合肿瘤科的研究者 Suzanne L. Topalian 博士等^[9]评估了 BMS-936558,一种特异性阻断 PD-1 的抗体的抗肿瘤效

应及安全性,发现 PD-1 抗体对四分之一至五分之一的非小细胞肺癌患者、黑色素瘤患者、肾细胞癌患者有效。本研究利用表达 IgG4 亚型的 PD-1 抗体的重组腺病毒载体,体外实验探究了被 PD-1 抗体阻断 PD-1 信号的 CTL 杀伤肿瘤细胞能力的变化,为 PD-1 抗体辅助 CTL 进行肿瘤 ACT 的临床应用提供参考。

1 试 验

1.1 实验材料与仪器

实验用 KOD 酶购自 Toyobo 公司,限制性内切酶购自 NEB 公司,DNA 连接酶 Solution I 购自 Takara 公司;质粒 anti-PD-1VH、anti-PD-1VL、pCB218、pPE3-F35、重组腺病毒 Ad35-TP53 均由本实验室构建;E.coli DH5 α 菌、人胚肾细胞株 293 细胞、肝癌细胞株 HepG2、Huh7 均由本实验室保存;IgG4-Fc 蛋白购自 Sino Biological 公司;鼠抗人 IgG 单抗、HRP-鼠抗人 IgG 单抗、兔抗人 IgG4(H+L)

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(81071850)

作者简介: 陶 雷(1988-),男,安徽池州人,硕士研究生,主要从事肿瘤的免疫细胞治疗研究。

通信作者: 钱其军, E-mail: qianqi@163.com

多抗、HRP-山羊抗兔 IgG、兔抗人 TP53 多抗均购自 Abcam;Protein G 预装柱购自 GE 公司;CCK-8 细胞计数试剂盒购自同仁化学公司。实验所需引物均由上海捷瑞生物公司合成:

引物 1:5'-CGGAATTCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGC-3';

引物 2:5'-CAAAGTCTGTTTAACAGGAGCTCGCCTTTTACGTTTACCCAGAGACAGGGAG-3';

引物 3:5'-CGACGTCTCCCGCCAACTTGAGAAGGTCAAATCAAAGTCTGTTTAACAGG-3';

引物 4:5'-CGGGATCCGGGCCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCCAACTTG-3';

引物 5:5'-CGGGATCCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC-3';

引物 6:5'-ACGCGTCGACTTATCAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3';

引物 7:5'-CTGGCCAATACCAACCTTA-3';

引物 8:5'-ATATGAGCTCACAATGCTTC-3'。

1.2 试验方法

1.2.1 质粒 pCB218-anti-PD-1 的构建及鉴定

将 PD-1 抗体重链和轻链用具有自我剪切能力的弗林蛋白酶(Furin)/口蹄疫病毒 2A 多肽——F/2A 进行连接:以 anti-PD-1VH 为模板,引物 1 和引物 2 为引物进行 PCR;以第一次 PCR 产物为模板,引物 1 和引物 3 为引物进行 PCR;再以第二次 PCR 产物为模板,引物 1 和引物 4 为引物进行 PCR,至此将 PD-1 抗体重链基因片段 anti-PD-1VH 和 F/2A 进行融合,上下游引入 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切位点。以 anti-PD-1VL 为模板,引物 5 和引物 6 为引物进行 PCR,在 anti-PD-1VL 基因上下游引物 *BamHI* 和 *SalI* 酶切位点。然后将上述获得的重链和轻链基因片段酶切连入骨架载体 pCB218(本实验室保存并命名),命名为 pCB218-anti-PD-1。将酶切正确的克隆送上海华大基因公司进行测序。

1.2.2 重组腺病毒 Ad35-anti-PD-1 构建、鉴定、扩增及纯化

将 293 细胞按 1×10^6 /孔铺 6 孔板,待长到 90%~95%汇合率时,取质粒 pCB218-anti-PD-1 和骨架质粒 pPE3-F35 用 Lipofectamine2000 共转染法转染,进行病毒重组。得到的病毒蚀斑用 PCR 方法进行鉴定。用引物 7 和引物 8 进行野毒鉴定,阳性质粒为 pXC1;用引物 1 和引物 4 对融合了 2A 的重链进行鉴定,阳性质粒为 pCB218-anti-PD-1;用引

物 5 和引物 6 对轻链进行鉴定,阳性质粒为 pCB218-anti-PD-1。鉴定正确的无野毒(或野毒很微弱)Ad35-anti-PD-1 病毒克隆在 293 细胞中进行大量扩增,用 CsCl 梯度离心法纯化并用 50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀法)测滴度。

1.2.3 PD-1 抗体的表达和鉴定

1×10^5 /孔 293 细胞铺 24 孔板,待细胞长至 80%汇合率,弃掉培养液,每孔添加 1 mL 新鲜的 DMEM 培养液,并加入 MOI 值为 10 的 Ad35-anti-PD-1 病毒,感染 1.5 h 后,每孔补加 50 μ L FBS,37℃、5%CO₂ 的培养箱中继续培养,72 h 后收集细胞上清,ELISA 检测 PD-1 抗体浓度,Westernblotting 检测重链和轻链的分子量。用 ELISA 双抗夹心法,抗体分别为鼠抗人 IgG 单抗和 HRP-鼠抗人 IgG 单抗,标准品为 IgG4-Fc 蛋白,梯度浓度稀释,样品按 10 倍稀释。Westernblotting 的一抗为兔抗人 IgG4(H+L)多抗,二抗为 HRP-山羊抗兔多抗。

1.2.4 PD-1 抗体的纯化

病毒感染的方法同 1.2.3,在 175 cm² 细胞培养瓶中进行;72 h 收集细胞上清,12 000 r/min 离心 5 min,收取上清液并用 0.22 μ m 滤膜过滤;以 500 μ L/30 mL 的比率在上清中添加 0.1 M NaOH 溶液,获取 PD-1 抗体与 Protein G 结合的合适 pH,然后过 Protein G 预装柱(Protein G 预装柱事先用 10 倍体积的 PBS 平衡);10 倍体积的 PBS 洗涤过后,用 20 mL pH2.5 的 glycine-HCl 洗脱(预装柱用 10 倍体积的 PBS 洗涤,用 20%的乙醇保存);洗脱后的 PD-1 抗体溶液经 30 Kda Amicon MLtra-15 Centrifugal Filter Devices 浓缩,用 1 mL PBS 重悬,考马斯亮蓝染色检验其纯度,ELISA 测其浓度。

1.2.5 提呈 TP53 抗原的 DC 和 TP53 特异性的 CTL 的培养

提呈 TP53 抗原的 DC 和 TP5 特异性的 CTL 由本实验室工作人员培养。

1.2.6 PD-1 信号阻断的 CTL 对肿瘤细胞的体外杀伤

参照 CCK8 细胞计数试剂盒说明书进行操作。比较加入 PD-1 抗体的 CTL 和不加 PD-1 抗体的 CTL 对 TP53 阳性的肝癌细胞株 HepG2、Huh7 杀伤效率的变化。将培养的肿瘤细胞收集离心后,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,按 1×10^4 /孔铺 96 孔板;将培养的 CTL 以效靶比为 10:1 和 1:1 铺板,设置 4 组(I:肿瘤细胞 II:CTL III:CTL+肿瘤细胞 IV:PD-1 抗体+CTL+肿瘤细胞),其中第 IV 组加入 50 μ L 纯化的 PD-1 抗体(浓度为 40 μ g/mL),

用 DMEM 将每孔终体积补至 200 μ L; 每组设 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱培养 12 h; 每孔加 CCK8 溶液 20 μ L, 细胞培养箱培养 1 h; 酶标仪上 450 nm 处测吸光度, 按照以下公式计算杀伤率,

杀伤率 =

$$\frac{\text{靶细胞吸光度} - (\text{效靶细胞吸光度} - \text{效应细胞吸光度})}{\text{靶细胞吸光度}}$$

2 结果与讨论

2.1 PD-1 抗体结构示意图

如图 1 所示, 在抗体的重链和轻链之间以 F/2A 进行连接, 利用 F/2A 可以将上下游基因剪切的特性, 最终可以分别表达 PD-1 抗体的重链和轻链。

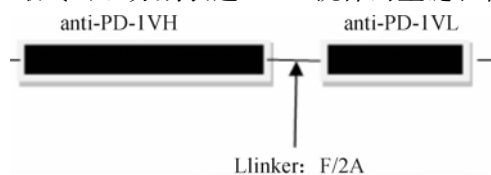
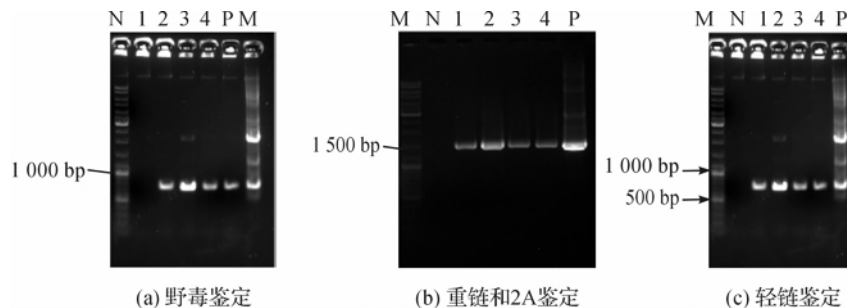


图 1 重组 PD-1 抗体结构示意图

2.2 pCB218-anti-PD-1 酶切鉴定

EcoRI 和 *SalI* 双酶切片段大小约为 2 200 bp



M: GeneR μ Ler DNA Ladder Mix; P: 阳性对照; N: 阴性对照;

1、2、3、4: Ad35-anti-PD-1 的 4 个病毒蚀斑。

图 3 Ad35-anti-PD-1 的 PCR 鉴定

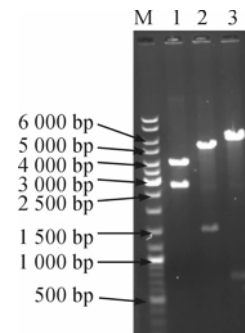
2.4 PD-1 抗体表达量测定

首先选取 72 h 测定 Ad35-anti-PD-1 的 1~4 号病毒蚀斑的 PD-1 抗体表达量, 发现 3 号病毒蚀斑的表达量显著高于其它克隆 ($P < 0.05$), 如图 4(a) 所示; 然后测定了 3 号病毒蚀斑在 0~96 h 的 PD-1 抗体表达量, 发现在 72 h 表达量显著高于其他时间点 ($P < 0.05$), 约 600 ng/mL, 如图 4(b) 所示。故选取 3 号病毒克隆大量表达抗体, 收集 72 h 的细胞上清用于抗体纯化。

2.5 PD-1 抗体分子量

确定 PD-1 抗体的表达量后, 用 Western blotting 实验鉴定 PD-1 抗体重链和轻链在电泳后凝胶中的位置。实验结果表明构建的重组腺病毒 Ad35-

和 4 500 bp; *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切片段大小约为 1 500 bp 和 5 200 bp; *BamHI* 和 *SalI* 双酶切片段大小约为 700 bp 和 6 000 bp。3 组酶切结果均与理论值相符, 如图 2 所示。



M: GeneR μ Ler DNA Ladder Mix; 1: *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切;

2: *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切; 3: *BamHI* 和 *SalI* 双酶切

图 2 目的片段酶切结果

2.3 Ad35-anti-PD-1 病毒的 PCR 鉴定

重组后获得 Ad35-anti-PD-1 病毒蚀斑 4 个, 用 PCR 进行鉴定 (图 3)。PCR 结果显示, 1-4 号克隆有极微弱野毒。以上实验结果说明我们获得了 4 个含有目的基因片段的病毒克隆。

anti-PD-1 表达的 PD-1 抗体重链 (50 kD) 和轻链 (25 kD) 的大小与预期相符, 如图 5 所示。

2.6 PD-1 抗体的纯度及浓度

考马斯亮蓝染色实验检测经 Protein G 亲和层析法纯化的 PD-1 抗体, 显示出较好的纯度, 如图 6 所示。ELISA 实验测得从 100 mL 细胞上清中纯化出 1 mL 浓度在 40 μ g/mL 的 PD-1 抗体。

2.7 PD-1 信号阻断的 TP53 特异性的 CTL 对 TP53

阳性的肝癌细胞株的体外杀伤

最后, 用纯化的 PD-1 抗体阻断 TP53 特异性的 CTL 与 TP53 阳性的肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7 之间的 PD-1 信号通路, 证明了 PD-1 信号被阻断的 CTL 杀伤肝癌细胞株的能力显著强于 PD-1 信号未

被阻断的 CTL($P < 0.05$), 表明了笔者构建的重组腺病毒 Ad35-anti-PD-1 表达的 PD-1 抗体能很好地增强 CTL 的抗肿瘤功能, 如图 7 所示。

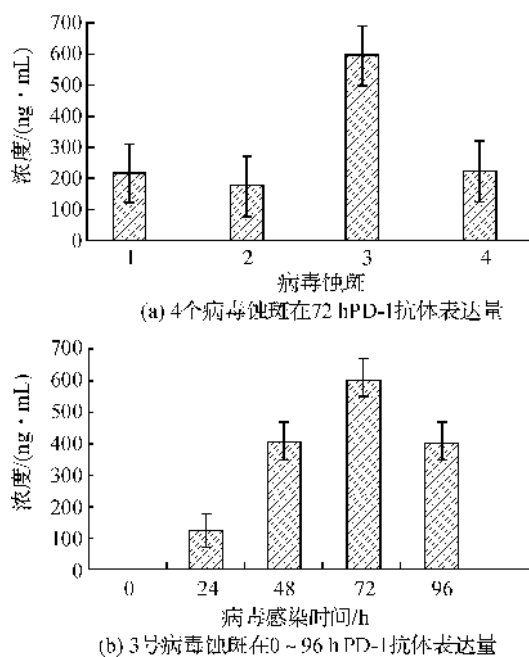
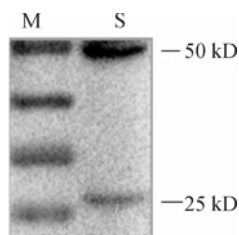


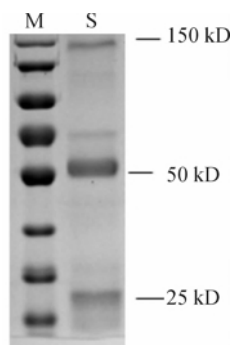
图4 293细胞上清中 PD-1 抗体含量分析



M: PageRuler Prestained Protein Ladder;

S: 293 细胞上清中的 PD-1 抗体

图5 PD-1 抗体重、轻链的大小



M: PageRuler Prestained Protein Ladder;

S: Protein G 纯化后的 PD-1 抗体

图6 纯化后的 PD-1 抗体电泳结果

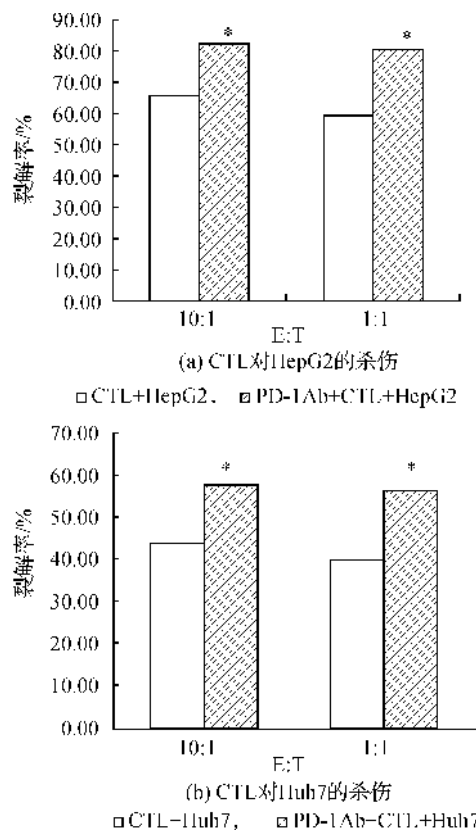


图7 PD-1 信号阻断的 TP53 特异性的 CTL 对 TP53 阳性的肝癌细胞的体外杀伤

* $P < 0.05$, 与未加 PD-1 抗体的对照组比较; E : T 效靶比

3 结 论

本研究成功构建 PD-1 抗体重组腺病毒表达载体 Ad35-anti-PD-1, 表达的 PD-1 抗体在凝胶电泳中其重链和轻链出现的位置与预期相符, 其浓度约在 600 ng/mL。然后从细胞上清中纯化出纯度很高的 PD-1 抗体, 证明了 PD-1 信号阻断后的 CTL 杀伤肝癌细胞的能力显著增强。

本研究完成了从 PD-1 抗体表达载体的构建到表达的 PD-1 抗体体外增强 CTL 杀伤肝癌细胞功能的部分实验。为 Ad35-anti-PD-1 感染 T 细胞, 使 T 细胞分泌 PD-1 抗体, 阻断 CTL 与 DC, CTL 与肿瘤细胞之间的 PD-1 信号, 全面提高 CTL 过继细胞治疗疗效奠定基础。

参考文献:

- [1] Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application[J]. International Immunology, 2007, 19(7): 813-824.
- [2] Keir M E, Butte M J, Freeman G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. Annu Rev Immunol

- nol, 2008, 26: 677-704.
- [3] 纪志鹏, 徐克森. 共刺激分子 CD28/B7 家族在抑制肝脏移植排斥反应中的研究现状及展望[J]. 中国现代普通外科进展, 2005, 8(5): 260-262, 264.
- [4] Raimondi G S W, Tokita D, Morelli A E, et al. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates cd4+cd25+ resting regulatory t cells from activated t cells[J]. J Immunol, 2006, 176: 2808-2816.
- [5] Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll D M, et al. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(45): 17765-17770.
- [6] Chemnitz J M P R, Nichols K E, June C H, et al. Shp-1 and shp-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents t cell activation[J]. J Immunol, 2004, 173: 945-954.
- [7] Paley M A, Kroy D C, Odorizzi P M, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection [J]. Science, 2012, 338 (6111): 1220-1225.
- [8] Yan Zhang S H, Dejun Gong, Yanghua Qin, et al. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD81 T lymphocytes in human non-small cell lung cancer[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2010, 7: 389-395.
- [9] Topalian S L, Hodi F S, Brahmer J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2012, 366(26): 2443-2454.

Research on Construction of Expression Vector of PD-1 Antibody and Its Function

TAO Lei¹, LI Jiang², ZHU Hai-li², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: This research explores the influence of PD-1 antibody on antitumor function of cytotoxic T lymphocyte (CTL) by establishing recombinant adenovirus expression vector Ad35-anti-PD-1 containing PD-1 antibody gene; tests the expression quantity of PD-1 antibody expressed from Ad35-anti-PD-1 in 293 cell through ELISA experiment, purifies PD-1 antibody with Protein G affinity chromatography, studies the change of ability of PD-1 antibody blocking CTL in PD-1 signal path from killing hepatoma carcinoma cell through killing experiment in vitro and successfully constructs recombinant adenovirus carrier Ad35-anti-PD-1 with a valence of 1×10^{10} pfu/mL. ELISA experiment tests that the expression quantity of PD-1 antibody in 293 cell supernatant is about 600 ng/mL at 72 h. Westernblotting experiment proves that PD-1 antibody contains correct heavy chain (50 kD) and light chain (25 kD). ELISA experiment tests that 1mL PD-1 antibody with a concentration of 40 μ g/mL can be obtained from 100 mL cell supernatant. Killing experiment in vitro proves that the ability of CTL in killing hepatoma carcinoma cell in an environment with PD-1 antibody is greatly improved.

Key words: CTL; PD-1 antibody; antitumor; immune cell therapy; immunosuppression

(责任编辑: 许惠儿)