

自表达 SIRP α -Fc 融合蛋白对 T 细胞功能的影响

崔磊¹, 黎江², 刘辉², 吴红平², 李林芳², 郝方元², 金华君², 钱其军^{1,2}

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

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

摘要: 探讨携带 SIRP α -Fc(SF)融合基因蛋白基因的重组腺病毒 Ad35-SF 感染 T 细胞后对 T 细胞功能的影响。腺病毒 Ad35-SF 感染 Jurkat T 细胞后,通过 Western blotting 及 ELISA 方法检测细胞上清中 SF 融合蛋白的大小与表达量;通过流式分析技术检测细胞表面 CD47 的封闭情况;通过 CCK8 方法检测细胞的增殖与对肿瘤细胞的杀伤作用。结果表明,Ad35-SF 构建成功,其感染 Jurkat T 细胞后,能在其内表达并分泌产生大小约为 48 kD 的 SF 蛋白,细胞上清中 SF 的表达量可到达 19.1 $\mu\text{g/mL}$ 。Ad35-SF(MOI=1)感染 Jurkat 细胞 18 h 后,细胞 CD47 阳性比例从 97.06%下降到 15.32%;当 Ad35-SF 感染复数增加至 5,10 时,CD47 阳性比率进一步降低至 2.94%和 1.73%。相对于空病毒对照组,Ad35-SF 感染 Jurkat 细胞 48 h 后其增殖效果提高了 29%,对肝癌细胞株 Hep 3B 的杀伤作用提升 25.6%($p<0.01$)。结果表明构建的重组腺病毒 Ad35-SF 能有效感染 Jurkat 细胞并在其内表达分泌 SF 蛋白,封闭细胞表面的 CD47,同时显著提高 Jurkat 细胞的增殖能力和对肝癌细胞的杀伤作用。

关键词: CD47; T 细胞; 腺病毒; 肝癌

中图分类号: Q789

文献标志码: A

0 引言

CD47 是肿瘤细胞表面高表达的膜蛋白^[1],其能与巨噬细胞表面的 CD47 的受体—信号调节蛋白 α (Signal Regulatory Protein α , SIRP α)结合,释放“不吃我”信号,抑制巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,导致肿瘤细胞免疫逃逸^[2-3]。研究表明,当 CD47 与 SIRP α 的结合被阻断后,可以增强巨噬细胞对肿瘤的吞噬作用^[4-6]。另有研究表明,活化的 T 淋巴细胞中 CD47 高表达^[7-8],其能与另一种 CD47 受体—血小板反应蛋白 1 (Thrombospondin-1, TSP1)结合,抑制 T 淋巴细胞的增殖与活化,进而影响 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[9-12]。因此,封闭细胞表面的 CD47 将有助于维持巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬以及 T 淋巴细胞的增殖与活化。

在本研究中,笔者将来自于 SIRP α 突变株 CV1 (由 Weiskopf 等^[13]发现)、具有高亲和力结合 CD47 的作用的肽段与人类 IgG1 的 Fc 段基因融合,组成 SF 融合基因嵌入到 35 型非增殖型腺病毒中。利用新构建的腺病毒 Ad35-SF 感染 T 淋巴细胞,原位表达并分泌 SF 蛋白从而封闭细胞表面的 CD47。本实验选用易于被腺病毒感染的 Jurkat 细胞作为研究对象,探索封闭 CD47 的 Jurkat 细胞对肝癌细胞的杀伤影响,为病毒 Ad35-SF 感染 CTL 细胞以及 CIK 细胞后对肿瘤细胞杀伤影响的研究提供指导。

1 实验

1.1 实验材料与仪器

用于鉴定病毒和 SF 基因的引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成(合成的引物序列如表 1)。E.

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(81071850)

作者简介: 崔磊(1989-),男,山西运城人,硕士研究生,主要从事靶向基因—病毒治疗方面的研究。

通信作者: 钱其军, E-mail: qianqj@sino-gene.com

coli DH5 α 菌,腺病毒载体 pPE3-F35,载体质粒 pDC898,SIRP α -Fc(SF)基因模板质粒均由第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室构建保存。Lipofectamine 2000 转染试剂盒、细胞培养血清、培养液购于 Gibco 公司,人胚肾细胞 HEK293、肝癌细胞 Hep-3B 由第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室保存备用。羊抗人 IgG、兔抗人 IgG、鼠抗兔 IgG-HRP、鼠抗人 IgG-HRP 均购于 Abcam 公司,流式细胞仪 guava easycyte BHT 购于 MERCK 公司,ChemiDocXRS 购于伯乐生物公司,同型抗体鼠抗人 IgG-FITC 以及鼠抗人 CD47-FITC 抗体均购于 BD 公司。CCK8 试剂盒购于同仁化学。

表 1 实验所需引物

引物编号	引物序列
SF-F	CCATTTCAGGTGTCGTGAGGA
SF-R	GCTGCAATAAACAAGTTGCTCG
VT001	CTGGCCAATACCAACCTTA
VT002	ATATGAGCTCACAATGCTTC
VT605	CCACTAACAACCACAGGCGG
VT606	GGGGATGTGGTCAGCGTAGC
W165	TGGCGTTTTATTATTATAGT CAGCTCTAGAAAG
W189	CCGGAATTCGCTAATTCCTCA CGACACCTGAAATG

1.2 实验方法

1.2.1 病毒包装、扩增和鉴定

将 pDC898 和 pCA19-SF 通过 *Sal* I 和 *Eco* R I 双酶切,pDC898 酶切产物电泳回收 5 262 bp 的基因片段,pCA19-SF 酶切产物电泳回收 1 143 bp 的基因片段。所得的大小片段产物进一步连接、转化,挑取阳性克隆,抽提质粒进行酶切鉴定,鉴定正确的质粒送北京六合华大基因有限公司测序。命名正确的质粒为 pDC898-SF。随后将质粒 pDC898-SF 与腺病毒骨架质粒 pPE3-F35 利用 Lipofectamine 2000 共转染 HEK293 细胞,包装并获得 4 个 Ad35-SF 病毒株。应用 Qiagen DNA Kit 提取重组腺病毒 DNA,对病毒基因组进行 PCR 鉴定,采用有限稀释法测定病毒滴度。

1.2.2 Western blotting 法检测

Jurkat 细胞采用 1640+10%胎牛血清(FBS)培养液。0.25%胰酶消化细胞、传代,37℃、5% CO₂ 条件下培养。使用重组病毒 Ad35-SF 分别以 MOI=1、5、10 感染 5×10⁵/孔的 Jurkat 细胞,饥饿感染 2 h 后,每孔补加 2%的 FBS 和无血清的 1640 培养液至终体积为 3 mL,感染 48 h 后收取上清。将收

集到的上清加入蛋白上样缓冲液 100℃煮 10 min。冷却后以每孔 10 μ L 的量上样,经聚丙烯酰胺电泳后转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(兔抗人 IgG)4℃孵育过夜,洗膜,二抗(鼠抗兔 IgG-HRP)室温孵育 45 min,洗膜。将 ECL 试剂作用于 PVDF 膜上,暗室反应 5 min 于 ChemiDocXRS 仪器上拍摄。

1.2.3 ELISA 法检测

采用双抗夹心法:用包被液将羊抗人 IgG 抗体稀释到 1.0 μ g/mL,100 μ L/孔包被酶标板,4℃过夜;PBST 清洗 5 次拍干,每孔加入 100 μ L 封闭液(2% BSA),37℃孵育 1 h;PBST 清洗 5 次拍干;加入样品(PBS 100 倍稀释 1.2.2 中收集的上清)及标准品(即西妥昔单抗,经 PBS 连续倍比稀释,500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8 ng/mL 和 0 ng/mL),100 μ L/孔,设复孔及对照孔,37℃孵育 50 min;PBST 清洗拍干;用封闭液将鼠抗人 IgG-HRP 稀释到 0.5 ng/mL,100 μ L/孔,37℃孵育 45 min;PBST 清洗排干,加入底物显色液(TMB),100 μ L/孔,37℃避光显色 10 min;每孔加入 50 μ L 终止液,在酶标仪 450 nm 处测 OD 值;绘制标准曲线,计算 SF 蛋白的表达量。

1.2.4 流式检测

以每孔 5×10⁶ 个 Jurkat 细胞铺六孔板,24 h 后收集细胞,加入鼠抗人抗 CD47-FITC 3 μ L,以加入等量同型对照抗体及不添加任何抗体的细胞作为对照,避光孵育 15 min 后流式细胞仪测试 Jurkat 细胞的 CD47 表达量。

同理,分别以 MOI=1、5 和 10 的 Ad35-SF 病毒量感染 Jurkat 细胞,18 h 后收集细胞检测感染病毒后 CD47 的表达量,以感染未携带目的基因的空病毒 Ad35(MOI=10)的样品作为对照;以 MOI=1 的 Ad35-SF 病毒量感染 Jurkat 细胞,分别在感染 24、48、72 h 后收集细胞,检测 CD47 的表达量,以 MOI=1 感染 Ad35 病毒 72 h 后收集的样品作为对照。

1.2.5 CCK8 法检测细胞增殖

将 Jurkat 细胞 3×10⁵/孔铺六孔板,分别加入 Ad35 病毒组和 Ad35-SF(MOI=5)。饥饿感染 2 h 后,每孔补加 2%的 FBS 和无血清的 1 640 培养液至终体积为 3 mL,混匀后使用排枪转移至 96 孔板,2 000 个/孔。48 h 后,每孔加入 10 μ L CCK8,1.5 h 后于 450 nm 测吸光值。同时,绘制 Jurkat 细胞的细胞数量/OD 标准曲线(经 1 640 连续倍比稀释,

12 000、6 000、1 500、750、375、187.5、93.75 个/孔), 根据标准曲线算出细胞数量。

1.2.6 CCK8 法检测 Jurkat T 细胞的杀伤

将 Hep3B 细胞以 1×10^4 /孔铺 96 孔板, 每孔加 100 μ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。待细胞贴壁后, 移去旧培养液。根据不同效靶比 ($E/T=1, 2, 5$) 加入 Ad35-SF 病毒感染后的 Jurkat-SF 细胞 ($MOI=5$), 补含 2% FBS 的 1640 培养液至 200 μ L, 并设仅接种 Hep3B 细胞孔, 仅接种 Jurkat 细胞孔以及含 2% FBS 的 1640 培养液对照孔, 含 2% FBS 的 DMEM 培养液对照孔。37℃、5% CO_2 条件下培养共培养 12 h, 加入 CCK8 试剂, 30 min 后在 450 nm 测吸光值。同时, 绘制 Jurkat 细胞的细胞数量/OD 标准曲线细胞数量曲线 (经 1640 连续倍比稀释, 500 000、250 000、125 000、62 500、31 250、15 625、7 812.5、3 906.25 个/孔)。根据标准曲线求得细胞数, 计算裂解率, 裂解率 = $[(\text{靶细胞数量} + \text{效应细胞数量} - \text{实验组细胞数量}) / \text{靶细胞数量}] \times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 重组病毒 Ad35-SF 的构建与鉴定

将高亲和力结合 CD47 分子的 SIRP α 突变株 CV1 基因片段与人类 IgG1 的 Fc 段基因融合成 SIRP α -CV1-IgG1 Fc (简称 SF), 使用 T 细胞高活性启动子 TCEFI 控制 SF 融合蛋白的表达, 将该表达框插入腺病毒 E1 区; 同时, 将 E3 区原有的 5 型纤毛替换成 5/35 型纤毛, 以增强病毒对 T 细胞的感染效率, 构建获得的 5/35 嵌合纤毛、非增殖型腺病毒命名为 Ad35-SF (模式见图 1)。

分别以 SF 基因、5/35 型的纤毛蛋白基因、TCEFI 启动子及野毒 E1A 基因特异引物对包装获得的腺病毒进行 PCR 鉴定, 理论上使用对应的引物应分别能扩增出 1 143、879、1 882 bp 和 779 bp 的片段产物。PCR 片段电泳显示, 4 个 Ad35-SF 病毒株不同基因片段的扩增结果与理论结果相符, 表明包装的 4 个 Ad35-SF 病毒株均正确 (图 2)。

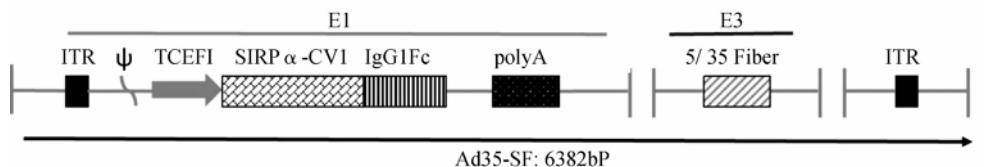
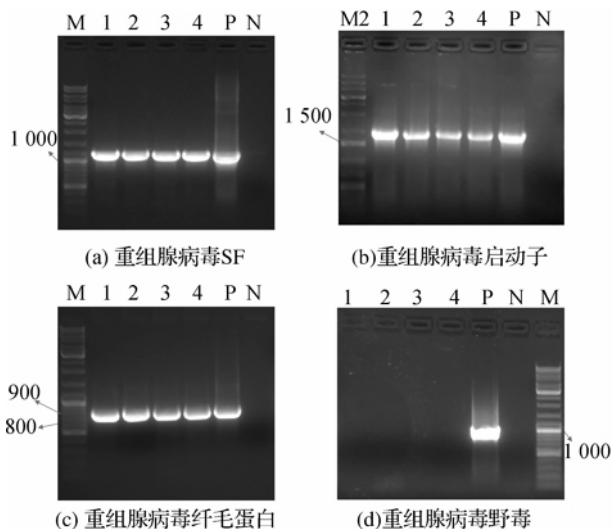


图1 腺病毒 Ad35-SF 结构示意图



M: DNA Ladder Mix Marker; M2: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; N: 阴性对照; P: 阳性对照; 1-4: Ad35-SF 4 个病毒株

图2 病毒 Ad35-SF 的 PCR 鉴定结果

2.2 病毒感染 Jurkat 细胞后 SF 蛋白的表达鉴定

使用 Ad35-SF 1 号克隆, $MOI=1, 5, 10$, 分别

感染 Jurkat 细胞 48 h。Western blotting 检测显示, 分泌的 SF 蛋白大小约为 48 kD, 与理论的大小相符 (因 SIRP α 存在转录后的不同修饰, 而杂交出大小相近的两条带) (图 3)。可见, 随着病毒感染量的增加, SF 蛋白的分泌量增强 (图 3)。

ELISA 检测结果显示, 不同 MOI 的 Ad35-SF 感染 Jurkat 细胞后, 均能检测到 SF 蛋白的表达。 $MOI=1$ 时, 培养液中 SF 蛋白的分泌量为 2.1 μ g/mL; $MOI=5$ 时, 培养液中 SF 蛋白的量为 13.7 μ g/mL; $MOI=10$ 时, 培养液中 SF 蛋白的量达到 19.0 μ g/mL (图 3b); 在空白对照中, 无病毒感染的 Jurkat 细胞上清没有检测到 SF 蛋白。表明随着 Ad35-SF 病毒感染量的值提高, 培养液中分泌的 SF 蛋白量也在相应增加, 其中在 $MOI=10$ 时, 培养液中 SF 蛋白的量最高, 与 Western blot 结果相一致。

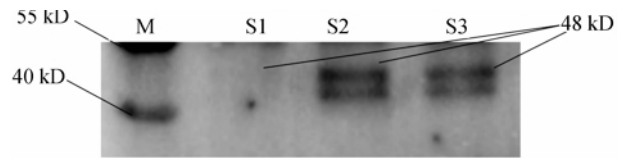
2.3 病毒感染 Jurkat 细胞后对其细胞表面 CD47 的封闭作用检测

流式细胞仪检测结果显示, 未经处理过的

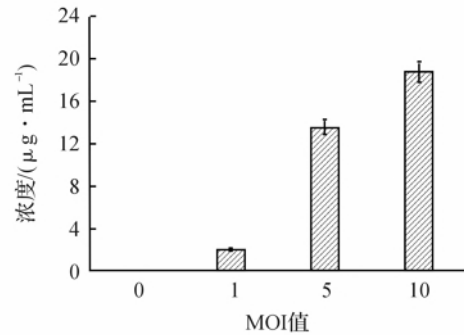
Jurkat 细胞的 CD47 阳性比例为 96.81% (如图 4a)。MOI=1、5、10 的 Ad35-SF 病毒感染 Jurkat 细胞 18 h 后, CD47 的阳性率分别降为 15.32%、2.94%、1.73% (如图 4b)。MOI=1 的 Ad35-SF 病毒感染 Jurkat 细胞 24、48、72 h 后, CD47 的阳性率分别为 3.97%、3.60%、2.36% (如图 4c)。结果表明, 使用 Ad35-SF 感染 Jurkat 细胞后, CD47 的阳性率能显著、快速下降, 表明 Ad35-SF 感染 Jurkat 细胞能通过自分泌的 SF 蛋白, 有效封闭 Jurkat 细胞表面的 CD47 分子。

2.4 病毒 Ad35-SF 对 Jurkat 细胞的增殖影响

病毒感染细胞 48 h 后, 在酶标仪上测得 Ad35-SF 组、Ad35 组、空白对照组的 OD 值分别为 0.629、0.482、0.527 (如图 5a), 代入 Jurkat 细胞数量曲线可以计算出 Ad35-SF 组、Ad35 组、空白对照组实际的细胞数量分别为 5 235、3 539 和 4 058。相较空白对照组和 Ad35 组, Ad35-SF 组 Jurkat 细胞的增殖效果分别提高 29% 和 47.9% ($p < 0.01$) (图 5b)。

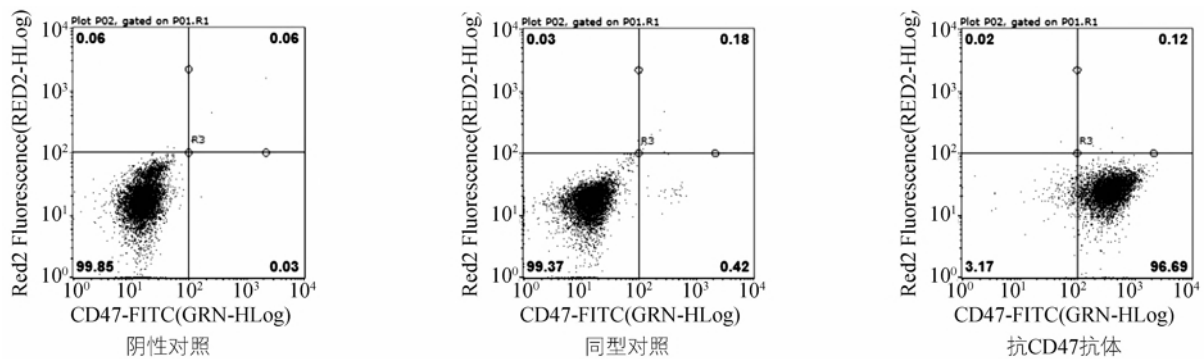


(a) Western blotting 检测 Jurkat 细胞培养液中 SF 蛋白大小

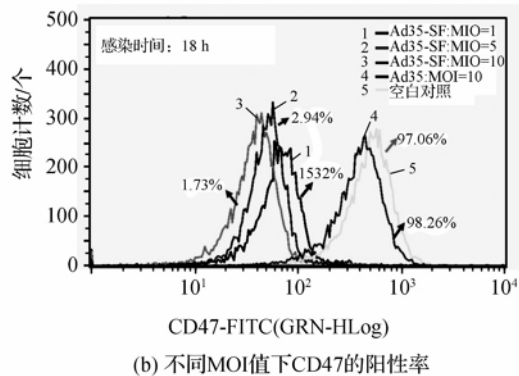


(b) ELISA 检测 Jurkat 细胞培养液中 SF 蛋白的含量

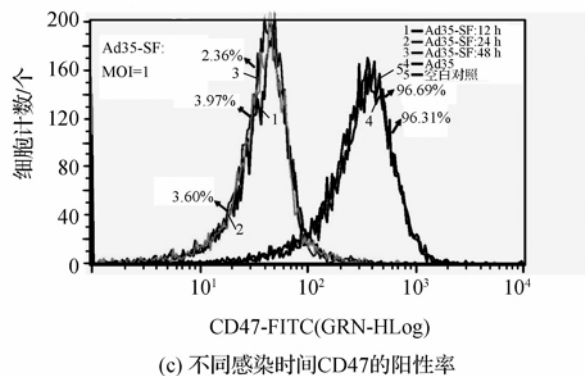
图3 SF 蛋白 Western blotting 检测和 ELISA 检测
注: S1, S2, S3 分别为 Ad35-SF 病毒以 MOI=1, MOI=5, MOI=10 时感染 Jurkat 细胞后培养液中的 SF 蛋白, M: PageRuler Prestained Protein Ladder.



(a) 感染前阴性对照、同型对照、抗CD47抗体测得的CD47的阳性率



(b) 不同MOI值下CD47的阳性率



(c) 不同感染时间CD47的阳性率

图4 流式检测 Jurkat 细胞 CD47 的阳性率

2.5 Ad35-SF 病毒对 Jurkat 细胞杀伤 Hep3B 细胞的影响

对各组的 OD 值进行计算, 如图 6, Ad35-SF 组中 ($E/T=1, 2, 5$) Jurkat 细胞对 Hep3B 细胞裂解率分别为 37.65%、55.30%、80.65%; Ad35 组中

($E/T=1, 2, 5$) Jurkat 细胞对 Hep3B 细胞裂解率分别为 21.05%、33.70%、57%; 空白对照组中 ($E/T=1, 2, 5$) Jurkat 细胞对 Hep3B 细胞裂解率分别为 16.05%、28.75%、54.95%。结果表明, 3 个不同实验组均随着效靶比的提高, Jurkat 细胞对 Hep3B 细

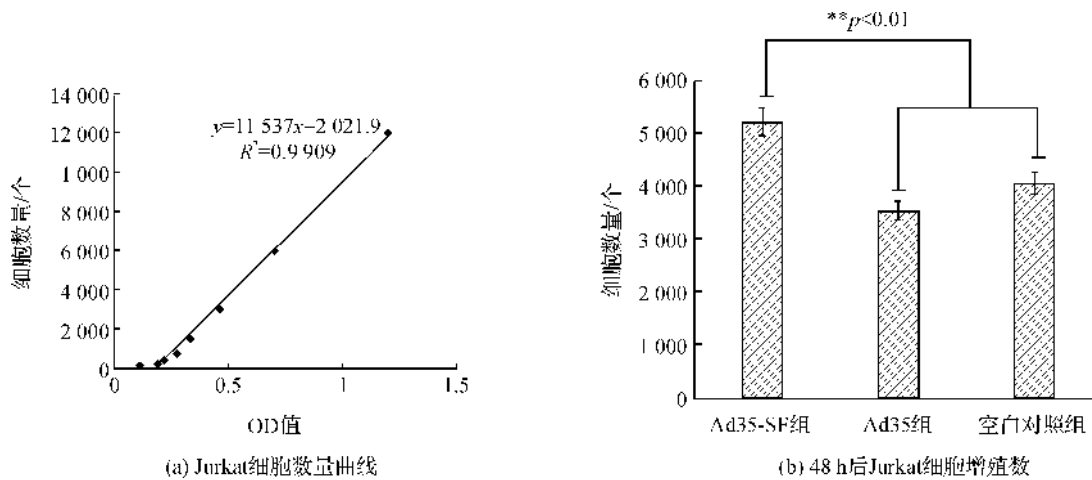


图5 病毒 Ad35-SF 对于 Jurkat 细胞增殖的影响

细胞的裂解率逐渐加强;但 Ad35-SF 组的裂解率在各个靶靶比上均明显优于其它两组 ($p < 0.01$)。已有文献表明 CD47 调节着 T 细胞的活化与死亡,抑制 T 细胞 CD47 的表达,能促进 CD8+T 细胞的增殖及活化^[12,14]。这就与笔者的杀伤以及增殖实验结果吻合,当 Jurkat 细胞表面 CD47 被封闭后,Jurkat 细胞自身的增殖和杀伤能力被显著提高。另外,在体内封闭 CD47(包括肿瘤细胞与 T 细胞),除能增强巨噬细胞吞噬作用外,还能够改善肿瘤微环境、增强 CD8+细胞毒性 T 细胞在肿瘤部位的聚集,促进 T 细胞的增殖和杀伤^[12]。因而,当将自表达 SF 融合蛋白的 T 细胞回输体内后,能通过上述多种途径增强抗肿瘤效果。但由于时间关系,我们未能及时完成相应的体内研究。

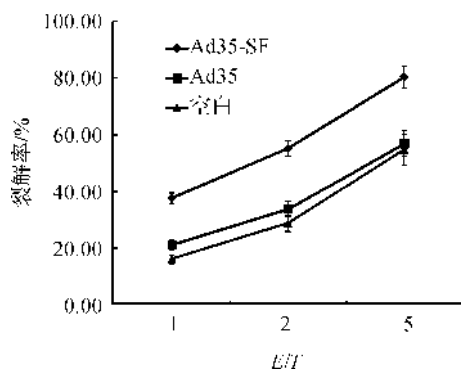


图6 不同 E/T 值时,Jurkat 细胞对于 Hep3B 细胞的杀伤效果

3 结论

a) 成功构建 T 细胞高活性的表达系统。b) 成功构建重组腺病毒载体 Ad35-SF;证实其结构正确并可在体外高效表达 SF 融合蛋白;c) Ad35-SF 能够增强 T 细胞功能:在短时间内高效封闭 Jurkat 细

胞以及 CIK 细胞表面 CD47,并促进 Jurkat 的增殖以及体外杀伤肝癌细胞株 Hep3B 的能力。

参考文献:

- [1] Vernon-Wilson E F, Kee W J, Willis A C, et al. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(8): 2130-2137.
- [2] Barclay A N, Brown M H. The SIRP family of receptors and immune regulation[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(6): 457-464.
- [3] van den Berg T K, van der Schoot C E. Innate immune 'self' recognition: a role for CD47-SIRPalpha interactions in hematopoietic stem cell transplantation[J]. Trends Immunol, 2008, 29(5): 203-206.
- [4] Majeti R, Chao M P, Alizadeh A A, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells[J]. Cell, 2009, 138(2): 286-299.
- [5] Chao M P, Alizadeh A A, Tang C, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Res, 2011, 71(4): 1374-1384.
- [6] Edris B, Weiskopf K, Volkmer A K, et al. Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(17): 6656-6661.
- [7] Brooke G, Holbrook J D, Brown M H, Barclay A N. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family [J]. J Immunol, 2004, 173(4): 2562-2570.
- [8] Irandoust M, Alvarez Zarate J, Hubeek I, et al. Engagement of SIRPalpha inhibits growth and induces programmed cell death in acute myeloid leukemia cells [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e52143.

- [9] Li Z, He L, Wilson K, et al. Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation [J]. J Immunol, 2001, 166(4): 2427-2436.
- [10] Li Z, Calzada M J, Sipes J M, et al. Interactions of thrombospondins with $\alpha 4 \beta 1$ integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior[J]. J Cell Biol, 2002, 157(3): 509-519.
- [11] Kaur S, Kuznetsova S A, Pendrak M L, et al. Heparan sulfate modification of the transmembrane receptor CD47 is necessary for inhibition of T cell receptor signaling by thrombospondin-1[J]. J Biol Chem, 2011, 286(17): 14991-15002.
- [12] Soto-Pantoja D R, Terabe M, Ghosh A, et al. CD47 in the tumor microenvironment limits cooperation between antitumor T-cell immunity and radiotherapy[J]. Cancer Res, 2014, 74(23): 6771-6783.
- [13] Weiskopf K, Ring A M, Ho C C, et al. Engineered SIRP α variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies[J]. Science, 2013, 341(6141): 88-91.
- [14] Pettersen R D, Hestdal K, Olafsen M K, et al. Lindberg FP CD47 signals T cell death[J]. J Immunol, 1999, 162(12): 7031-7040.

Effect of Self-Expression of SIRP α -Fc Fusion Protein on T Cell Function

CUI Lei¹, LI Jiang², LIU Hui², WU Hong-ping², LI Lin-fang², HAO Fang-yuan², JIN Hua-jun², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: This paper investigates the effect of T cell functions after recombinant adenovirus Ad35-SF with SIRP α -Fc (SF) fusion gene and protein gene infects T cells. After adenovirus Ad35-SF infected Jurkat T cells, the magnitude and expression quantity of SF fusion protein in suspension of Jurkat T cells were detected through Western blotting and ELISA. The closure condition of CD47 was detected through flow cytometry. Cell proliferation and killing capacity to cancer cells were detected through CCK8. The results show that Ad35-SF was successfully constructed; after it infected Jurkat T cells, 48 kD SF proteins could be expressed and secreted; SF expression quantity could reach 19.1 $\mu\text{g/mL}$ in the suspension of Jurkat T cells. After Ad35-SF ($\text{MOI}=1$) infected Jurkat cells for 18h, the proportion of CD47-positive cells dropped to 15.32% from 97.06%. When infection multiplicity of Ad35-SF increased to 5h and 10h, the proportion of CD47-positive cells further declined to 2.94% and 1.73%, respectively. Relative to the control group, the proliferation increased by 29% after Ad35-SF infected Jurkat cells for 48h, and skilling effect on hepatocellular carcinoma cell line Hep3B increased by 25.6% ($p<0.01$). The above results show that recombinant adenovirus Ad35-SF can effectively infect Jurkat cells, express and secrete SF protein as well as close CD 47 on cell surface. Meanwhile, it can significantly boost proliferation capacity of Jurkat cells and skilling effect on hepatoma carcinoma cells.

Key words: CD47; T cell; adenovirus; liver cancer

(责任编辑: 许惠儿)