

腺病毒介导的 T 细胞高效基因表达系统的构建

刘品一¹, 吕赛群², 崔磊¹, 李振海¹, 黎江², 李林芳², 吴红平², 金华君², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

摘要: 结合转基因修饰的手段,能有效提高细胞免疫治疗的疗效,但由于缺乏 T 细胞高活性表达系统,限制了该方法的应用。构建腺病毒介导的双荧光素酶启动子活性筛选系统,检测一系列常用强启动子(CMV、CMV(in)、CAG、EF1 α 及CASD)在 T 细胞株 K562 及 Jurkat 中的活性,发现 EF1 α 启动子活性在 T 细胞株中的活性最高。在 EF1 α 的基础上,增加 mCMV 增强子和 hCMV 增强子顺式作用元件,构成了 2 个新型嵌合型启动子 CCEF 及 CCEF(in)。双荧光素酶检测系统检测结果表明,新构建的 2 个启动子在 T 细胞中的活性高于 EF1 α ,且两者相比 CCEF 启动子活性更高($p < 0.05$)。利用 CCEF 启动子控制 PD-1 全长抗体基因,并将此表达框插入腺病毒基因组,构建重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1。通过 Western blotting 及 ELISA 方法检测病毒感染 T 细胞株后,抗体基因的表达效率。结果表明,Ad-CCEF-anti-PD-1 感染 T 细胞后,PD-1 抗体能在 T 细胞中正确表达,且表达量较高(K562 中 11.019 $\mu\text{g/mL}$, Jurkat 中 9.078 $\mu\text{g/mL}$),表明该腺病毒介导的 T 细胞高效的基因表达系统成功构建,具有良好的应用前景。

关键词: 腺病毒; 启动子; PD-1; 癌症免疫治疗

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

0 引言

近年来国际上癌症生物治疗尤其是癌症免疫细胞治疗发展迅速,已取得许多令人称奇与广受瞩目的临床疗效,各大世界顶尖杂志也对此作了专题的报道^[1-3]。肿瘤过继细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)作为肿瘤免疫细胞的重要组成部分,在经历了 20 世纪八九十年代的研究低潮期^[1]后,近年来又重新进入人们视野,并取得了长足的进步^[4]。其中,武装化 T 细胞如过表达促免疫作用的细胞因子、屏蔽肿瘤微环境中的免疫负调节信号及表达相关基因使 T 细胞体内存活时间延长等调控策略,会使 ACT 疗效得到大幅度提高^[5]。而外源基因的稳定高效表达则成为上述策略得以成功实施的难点,一般外源基因在 T 细胞中较难强效表达。

强启动子是指对 RNA 聚合酶有很高亲和力的启动子,对于基因修饰过程中表达外源基因的效率具

有显著影响。目前常用的强启动子一般有 CMV、CMV(in)、CAG、EF1 α 及 CASI 等。有研究表明通过对启动子进行改造,一些组成型启动子能在一些细胞株中强效表达^[6]。增强子是增加和其连锁的基因的转录频率的 DNA 序列,可大幅度增加基因转录频率,增强子的作用与增强子的取向无关并且增强转录频率的功能可以累加^[7-8]。PD-1 是主要表达在 T 细胞上的抑制性受体,与其配体 PD-L1 结合可显著抑制 T 细胞的活化与增殖,并调节细胞因子的表达与分泌。肿瘤细胞可通过上调 PD-L1 的表达抑制正常 T 细胞免疫作用,从而逃避免疫系统的杀伤。因此一些阻断 PD-1 或 PD-L1 的药物或方法能够释放这些被抑制活性的 T 细胞,重新激活免疫系统对抗肿瘤。最近的研究表明,抗 PD-1 抗体可以使四分之一至五分之一的非小细胞肺癌患者,或黑色素瘤患者产生有效反应^[9-10]。

本研究在 EF1 α 的基础上,增加 mCMV 增强子

收稿日期: 2014-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81071850);重大传染病的防治重大专项(2013zx10002-010-007)

作者简介: 刘品一(1990—),女,浙江嵊州人,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

和 hCMV 增强子,构成了 2 个新型嵌合型启动子 CCEF 及 CCEF(in),将 CCEF 及 CCEF(in)及外源基因表达框分别构建到腺病毒表达载体上并包装病毒,构建腺病毒介导的双荧光素酶报告系统 Ad-CCEF 及 Ad-CCEF(in),并利用该系统检测该 2 个启动子在人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 中的活性;同时构建携带有全长抗体基因 anti-PD-1 的重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1,感染人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 后,Western blotting 及 ELISA 检测外源基因的表达效率。结果显示,人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 中,CCEF 及 CCEF(in)均高于常规启动子 EF1 α ,且 CCEF 启动子能较好地启动外源基因 anti-PD-1 在 K562 及 Jurkat 细胞中的表达,说明该腺病毒介导的 T 细胞高效的基因表达系统成功构建,具有良好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂

实验用到的所有限制性内切酶和连接酶都购买自 NEB 公司,电泳胶回收试剂盒购买自天根公司。质粒转染试剂盒及病毒基因组提取试剂盒均购买自 Qiagen 公司。启动子基因序列 CCEF 及 CCEF(in),anti-PD-1 送捷瑞公司合成。质粒 pDC-Rluc 及腺病毒骨架质粒 PPE3、PPE3-Fluc 由第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒实验室构建。重组腺病毒 Ad-CMV、Ad-CMV(in)、Ad-CASI、Ad-CAG 及 Ad-EF1 α 由第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒实验室构建。人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 来自于第二军医大学东方肝胆外科医院的基因-病毒实验室。细胞培养液购买自 Gibco 公司。Western blotting 及 ELISA 所用抗体均购买自 Abcam 公司。双荧光素酶报告系统检测试剂盒购买自 Promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 启动子及其表达穿梭质粒的构建及鉴定

新设计的启动子 CCEF 及 CCEF(in)送捷瑞公司合成,同时在启动子序列上下游分别引入酶切位点 *Xba* I 及 *Eco* RI,装入 pDC-Rluc 载体,阳性质粒分别命名为 pDC-CCEF-Rluc、pDC-CCEF(in)-Rluc。质粒 pDC-CCEF-anti-PD-1 在 pDC-CCEF-Rluc 基础上构建,即通过全基因合成 anti-PD1 抗体基因,并在两端分别引入 *Eco* RI 及 *Sal* I 酶切位点,装入经相同酶切处理的 pDC-CCEF-Rluc 载体,替换原 RLuc 基因。

1.2.2 重组腺病毒的包装与鉴定

利用质粒转染试剂盒,将质粒 pDC-CCEF-Rluc、pDC-CCEF(in)-Rluc 分别与腺病毒骨架质粒 PPE3-Fluc 共转染至 293 细胞包装非增殖型病毒 Ad-CCEF 及 Ad-CCEF(in)。将质粒 pDC-CCEF-anti-PD-1 与腺病毒骨架质粒 PPE3 共转染至 293 细胞包装非增殖型病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1。试剂盒抽提病毒基因组 DNA,利用引物(表 1)VT001 和引物 VT002 用 PCR 扩增方法鉴定野毒,利用引物 pEF1F 和引物 pEF1R 组合,进行 CCEF-Rluc 及 CCEF(in)-Rluc 的 PCR 鉴定,利用引物 Anti-PD1F 和引物 Anti-PD1R 组合进行 anti-PD-1 基因的 PCR 及电泳鉴定。选取正确的阳性病毒克隆进行大量扩增并纯化,采取 TCID₅₀ 法测定病毒滴度。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
VT001	CTGGCCAATACCAACCTTA
VT002	ATATGAGCTCACAATGCTTC
pEF1F	ACCGTTTACGTGGAGACTCG
pEF1R	CCCATTTCATCAGGTGCAT
Anti-PD1F	CTTATCAACACTCTCCCTG
Anti-PD1R	GAATTCGCCACCATGGAAGC

1.2.3 启动子在人 T 细胞株中的活性检测

本课题组前期建立了腺病毒介导的双荧光素酶报告系统,可分别检测各启动子在细胞株中的启动子活性。人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 分别按 1×10^4 cells/孔铺 96 孔板,置 37℃、5% CO₂ 孵箱 24 h,分别将重组腺病毒 Ad-CMV、Ad-CMV(in)、Ad-CASI、Ad-CAG、Ad-EF1 α 、Ad-EF1 α 、Ad-CCEF 及 Ad-CCEF(in)以 MOI=20 感染人 T 细胞株,每种病毒每个细胞株设 3 个复孔,48 h 后用 Promega 公司双荧光素酶报告系统检测试剂盒检测启动子的活性。

1.2.4 启动子控制 PD-1 全长抗体基因在人 T 细胞株中的表达分析

人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 分别按 5×10^5 cells/孔铺 6 孔板,置 37℃、5% CO₂ 孵箱 24 h,按 MOI=20 分别感染重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1,48 h 后收细胞上清,用 Western blotting(使用鼠抗人 IgG4(H+L)作为一抗)及双夹心 ELISA 方法(使用羊抗人 IgG 多抗包埋,鼠抗人 IgG 检测,以西妥昔抗体作为标准品,未经 Ad-CCEF-anti-PD-1 感染的细胞作为本底,在结果处理中减去本底,再依照标准曲线算出抗体的表达量)定性定量检测 anti-PD-1 蛋白的表达。

2 实验结果与分析

2.1 常用强启动子在 T 细胞中的活性筛选

双荧光素酶报告系统检测各常用强启动子 CMV

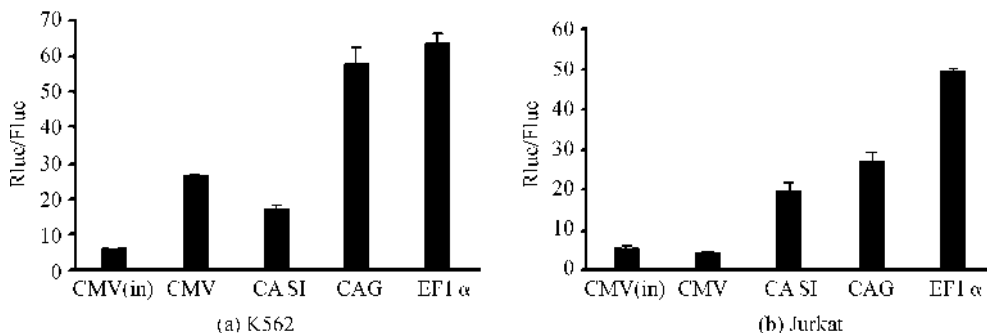


图1 各常用强启动子在人 T 细胞中的活性检测

2.2 新启动子 CCEF 及 CCEF(in)的构建与鉴定

在 EF1α 的基础上,构建了新的启动子 CCEF 及 CCEF(in)(图 2A)。将新设计的上述 2 个启动子装入 pDC-Rluc 载体后,进行酶切鉴定。质粒 pDC-CCEF-Rluc 经 *Eco* R I+*Xba* I 酶切片段为 1 198 bp+4 597 bp(图 2B(a)),质粒 pDC-CCEFin-Rluc 经 *Eco* R I+*Xba* I 酶切片段为 1 845 bp+4 597 bp(图 2B(b)),DNA 凝胶电泳结果图显示结果与预期相符,表明质粒构建成功,可用于下一步病毒包装。

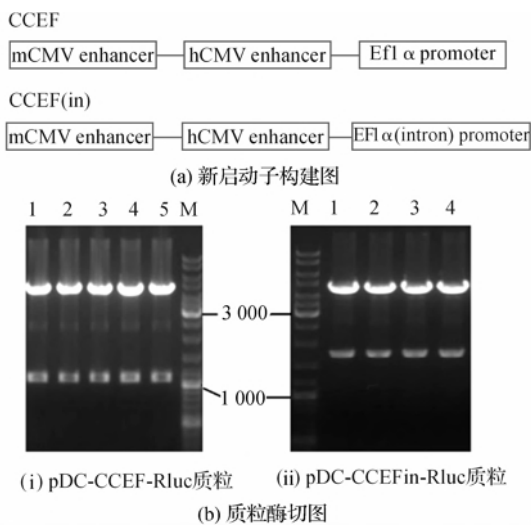


图2 启动子 CCEF, CCEF(in)结构示意图及表达质粒酶切鉴定

注:(b)图中 M 均为 DNA Mix Marker;1,2,3,4,5 分别代表不同的克隆。

2.3 含启动子-Luc 表达框腺病毒的构建及鉴定

笔者构建了重组腺病毒 Ad-CCEF 和 Ad-CCEF(in)(图 3a),使用特异性引物分别运用 PCR 技术扩增鉴定重组腺病毒基因及其野毒(PCR 引物序列见表 1)。如图 3(b)所示,CCEF-Rluc 重组腺病毒可以扩增出大小为 2 465 bp 的目的条带,与阳性对照

(in),CMV,CASI,CAG,EF1α 在人 T 细胞株中的启动活性(图 1)。图 1 中得知,在这些常用强启动子中,腺病毒感染人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 后,EF1α 的启动活性最高。

条带一致,这说明重组腺病毒含有 CCEF-Rluc 基因序列;CCEF(in)-Rluc 重组腺病毒可以扩增出大小为 3 106 bp 的目的条带,与阳性对照条带一致,可以说明重组腺病毒含有 CCEF(in)-Rluc 基因序列。这两种病毒都不能扩增出和阳性对照大小一致的 748 bp 目的条带,表明这两种病毒都未含有野毒。

将这两种病毒大量扩增,并使用氯化铯梯度离心方法纯化这两种病毒,TCID₅₀ 法测得重组腺病毒 Ad-CCEF 滴度为 4.6×10^9 pfu/mL,重组腺病毒 Ad-CCEF(in)滴度为 4.7×10^9 pfu/mL。

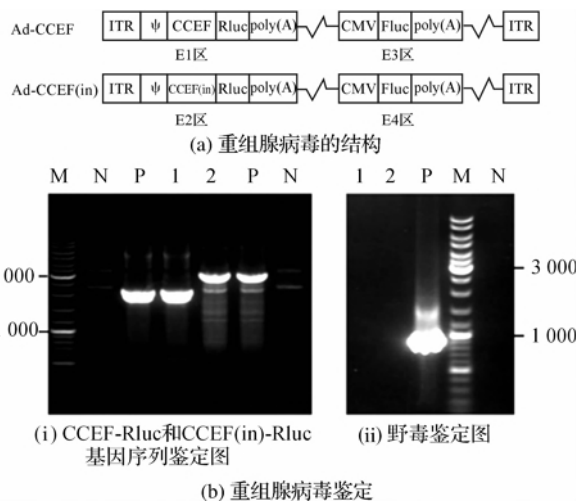


图3 重组腺病毒结构图及鉴定

注:B 图中 M 为 DNA Mix Marker,1 为 CCEF-Rluc,2 为 CCEFin-Rluc,N 均为阴性对照,(a) 图中 P 为对照质粒 pDC-CCEF-Rluc 与 pDC-CCEFin-Rluc,(b) 图中 P 为对照质粒 pXC1。

2.4 启动子 CCEF 及 CCEF(in)在 T 细胞中的活性检测

双荧光素酶报告系统检测 CCEF 及 CCEF(in)启动子在人 T 细胞株中的启动活性(图 4)。从图 4

中可以看出,无论在 K562 细胞还是 Jurkat 中, CCEF, CCEF(in)启动子活性均显著高于 EF1 α 启动子($p < 0.05$),表明增加 hCMV 及 mCMV 增强子能有效提高 EF1 α 启动子的表达活性。但在 K562 细胞中, CCEF, CCEF(in)启动子之间无显著差异,在 Jurkat 细胞中 CCEF 启动子活性明显高于 CCEF(in)启动子($p < 0.05$)。因而,选取 CCEF 作为 PD-1 全长抗体基因的启动子。

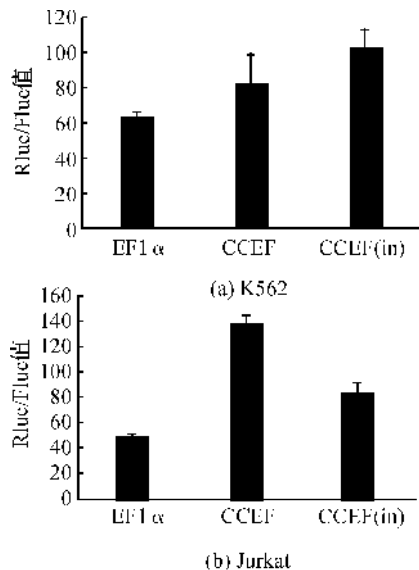


图 4 EF1 α , CCEF, CCEF(in)启动子在 K562, Jurkat 细胞中的活性

注: CCEF, CCEF(in)启动子活性均显著高于 EF1 α 启动子($p < 0.05$)。

2.5 表达 PD-1 全长抗体的重组腺病毒的构建及鉴定

将 CCEF 启动子控制下的 PD-1 全长抗体基因表达框插入腺病毒基因组,构建 Ad-CCEF-anti-PD-1 病毒(图 5a)。用特异性引物分别 PCR 扩增鉴定重组腺病毒基因及野毒,如图 5b 所示,重组腺病毒 3 号克隆能扩增出大小为 2 178 bp 的目的条带,与阳性对照条带一致,表明该重组腺病毒含有 anti-PD-1

基因;该重组腺病毒不能扩增出与阳性对照大小一致的 748 bp 目的条带,说明该重组腺病毒未含有野毒,腺病毒包装成功。

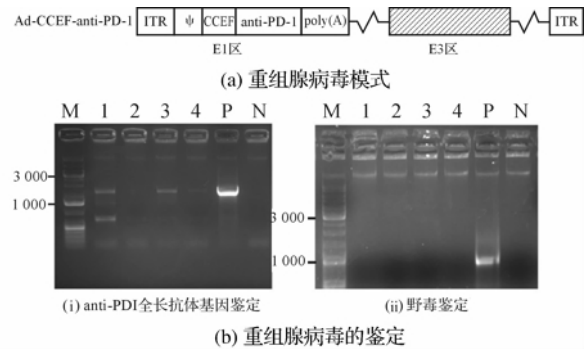


图 5 重组腺病毒 CCEF-anti-PD-1 模式图及病毒鉴定

注: B 图中 M 为 DNA Mix Marker, 1-4 为 CCEF-anti-PD-1 病毒克隆, N 为阴性对照, a) 图中 P 为对照质粒 pDC-CCEF-anti-PD-1, b) 图中 P 为 pXC1。

取 3 号克隆进行该病毒的大量扩增,并使用氯化铯梯度离心方法纯化该病毒, TCID₅₀ 法测得病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1 滴度为 4.3×10^9 pfu/mL。

2.6 PD-1 全长抗体基因在 T 细胞中表达检测

重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1 感染人 T 细胞株 K562、Jurkat 后,利用 Western blotting 及 ELISA 检测外源基因 anti-PD-1 在细胞中的表达效率。

Western blotting 结果(图 6(a))中可以得知,经重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1 感染的细胞可以表达抗体重链 50 kD,轻链 25 kD,未经感染的细胞不能表达该抗体轻重链,且抗体的轻重链基因大小与预期相符。表明重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1 感染人 T 细胞株 K562, Jurkat 后,可以在其细胞内正常表达 PD-1 全长抗体基因。

ELISA 数据(图 6B)表明,腺病毒能介导外源基因 anti-PD-1 在 T 细胞中高效表达, K562 中 11.019 μ g/mL, Jurkat 中 9.078 μ g/mL。

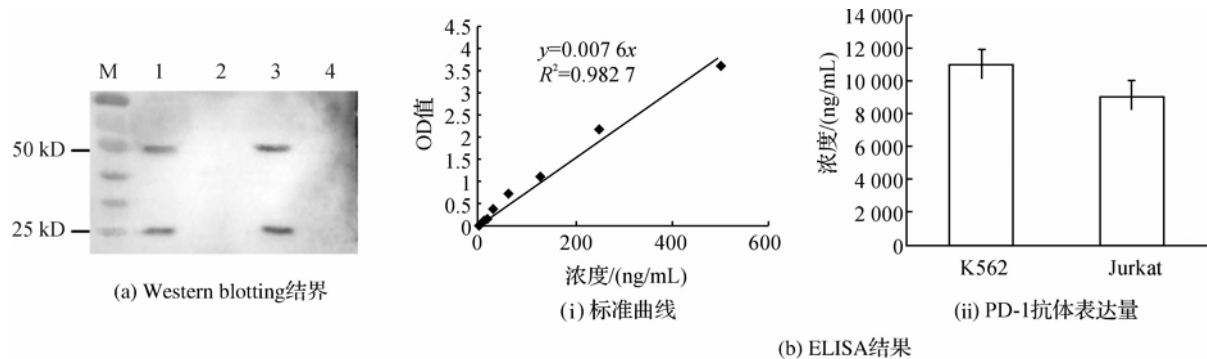


图 6 Western blotting 和 ELISA 测细胞上清中 PD-1 抗体浓度

注: (a) 图中 M 为 PageRuler Prestained Protein Ladder, 1 为经重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1 感染的 Jurkat 上清, 2 为未经感染的 Jurkat 细胞上清, 3 为经重组腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1 感染的 K562 上清, 4 为未经感染的 K562 细胞上清。

3 结 论

a) 在常用强启动子中,启动子 EF1 α 在人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 中的启动子活性最高。将萤火虫荧光素酶 Fluc 和海肾荧光素酶 Rluc 双报告基因分别偶联常用强启动子 CMV、CMV(in)、CAG、EF1 α 及 CASI,并利用该系统检测筛选这一系列启动子在人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 中的活性,发现启动子 EF1 α 活性最高。

b) 启动子 CCEF 及 CCEF(in)的构建与鉴定。在启动子 EF1 α 及 EF1 α (intron)的基础上分别加入 mCMV 增强子、hCMV 增强子,构建出新的嵌合型启动子 CCEF 及 CCEF(in)。

c) 启动子 CCEF 及 CCEF(in)在 T 细胞中的活性检测。将萤火虫荧光素酶 Fluc 和海肾荧光素酶 Rluc 双报告基因分别偶联启动子 CCEF 及 CCEF(in),重组包装腺病毒分别获得 Ad-CCEF 及 Ad-CCEF(in)。再将病毒 Ad-EF1 α 、Ad-CCEF 及 Ad-CCEF(in)感染人 T 细胞株 K562 及 Jurkat 后,双荧光素酶报告系统检测分析相较于启动子 EF1 α ,在此基础上改造的启动子 CCEF 及 CCEF(in)活性明显提高。

d) 成功构建了腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1。将 CCEF 启动子控制下的 PD-1 全长抗体基因表达框插入腺病毒基因组,经检测后,成功构建 Ad-CCEF-anti-PD-1 病毒。

e) 腺病毒 Ad-CCEF-anti-PD-1 能成功表达 PD-1 全长抗体基因。Western blotting 及 ELISA 检测结果显示该腺病毒能介导 PD-1 全长抗体基因在 K562 及 Jurkat 细胞中稳定表达,且表达量较高(K562 中 11.019 $\mu\text{g/mL}$,Jurkat 中 9.078 $\mu\text{g/mL}$)。

该方法使发挥细胞免疫作用的 T 细胞兼具表达抗体的功能,而且该抗体作用于 T 细胞中的免疫抑制分子 PD-1,因而有望通过协同作用,提高过继性细胞免疫治疗的疗效。

参考文献:

- [1] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. Nature, 2011; 480(7378): 480-489.
- [2] DeVita V T Jr, Rosenberg S A. Two hundred years of cancer research[J]. N Engl J Med, 2012; 366(23): 2207-2214.
- [3] Fischbach M A, Bluestone J A, Lim W A. Cell-based therapeutics: the next pillar of medicine[J]. Sci Transl Med, 2013; 5(179): 179-186.
- [4] Couzin-Frankel J. Immune therapy steps up the attack [J]. Science, 2010, 330(6003): 440-443.
- [5] 钱其军, 吴孟超. 肿瘤过继细胞治疗: 老故事新演绎 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 1-6.
- [6] van Arensbergen J, van Steensel B, Bussemaker H J. In search of the determinants of enhancer-promoter interaction specificity[J]. Trends Cell Biol, 2014, 24 (11): 695-702.
- [7] 张 敏, 任慧霞. 报告基因的应用研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(9): 45-48.
- [8] Spilianakis C G, Lalioti M D, Town T, et al. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci [J]. Nature, 2005, 435(7042): 637-645.
- [9] Tumeh P C, Harview C L, Yearley J H, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. Nature, 2014, 515(7528): 568-571.
- [10] Powles T, Eder J P, Fine G D, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer[J]. Nature, 2014, 515(7528): 558-562.

Construction of Adenovirus-Mediated Gene Expression System Suit to T Cells

LIU Pin-yi¹, LÜ Sai-qun², CUI Lei¹, LI Zheng-hai¹, LI Jiang², LI Lin-fang², WU Hong-ping²,
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: In previous studies, it has shown that the efficacy can be significantly improved by combining adoptive immune cell therapy and gene engineering technology. However, this approach has been constrained owing to lack of an appreciate transgene-expression system in T cells. In this study, we constructed a adenovirus-mediated dual luciferase reporter system for screening the promoter activities, and thereby detecting the activity of a series commonly used strong promoter (i. e. CMV, CMV (in), CAG, EF1 α and CASI) in the T cell lines (i. e. K562 and Jurkat). The results showed that EF1 α promoter had the highest activity in the two T cell lines among these test promoters. Subsequently, we added the cis elements from mCMV enhancer and hCMV enhancer to EF1 α promoter to develop two novel chimeric promoters, CCEF and CCEF (in). Through dual luciferase assay, we found that the activity of CCEF or CCEF (in) promoter was significantly higher than EF1 α promoter and furthermore CCEF promoter was relatively the better one between the two novel promoters ($P < 0.05$). Therefore, we used CCEF promoter to drive the expression of full-length anti-PD1 antibody gene and insert such an expression cassette into adenoviral genome, to construct the recombinant adenovirus Ad-CCEF-anti-PD-1. By western blotting and ELSIA analyses, it was shown that the full-length anti-PD1 antibody could be correctly and effectively expressed in the two T cell lines post adenoviral infection, with a concentration at 11.019 $\mu\text{g/mL}$ in K562 cell and 9.078 $\mu\text{g/mL}$ in Jurkat cell, respectively. In summary, we have constructed an expression system with a high capacity to express transgene in T cells, which has a good application prospect in adoptive immune cell therapy for malignant tumors.

Key words: adenovirus; promoter; PD-1; cancer immunotherapy

(责任编辑: 许惠儿)