

携带 Herceptin 与 MICA 胞外结构域融合基因的 重组腺病毒的构建及鉴定

金鲁宁¹, 李林芳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病毒基因治疗实验室, 上海 200438)

摘要: 通过构建能表达抗体 Herceptin 与 MICA 胞外结构域的融合蛋白的重组腺病毒,为进一步联合 NK 细胞的治疗研究奠定基础。采用 Overlap-PCR 的方法获得 Herceptin 与 MICA 胞外结构域的融合基因,并将融合基因连接到载体 pDC339 上。接着再利用酶切及 PCR 方法鉴定载体及重组病毒基因的正确性,并通过 ELISA 和 Western Blot 检测融合蛋白的表达情况,最后经间接免疫荧光分析(IFA)检测融合蛋白的结合特性。构建的载体酶切后经电泳鉴定证实构建成功,重组病毒 DNA 的 PCR 显示病毒携带了 Herceptin 的轻链基因、重链基因及 MICA 胞外结构域的基因;ELISA 和 Western Blot 证实重组腺病毒成功地表达出了目的融合蛋白;IFA 实验表明融合蛋白能与 SK-OV-3 细胞表面的 Her-2 受体特异性地结合。最后成功地构建了能表达具有正常结合特性的抗体 Herceptin 与 MICA 胞外结构域的融合蛋白的重组腺病毒,为之后与 NK 细胞的联合治疗研究奠定基础。

关键词: Herceptin; MICA; 腺病毒

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A

0 引 言

her-2/neu(her2) 基因是类 *erbB* 基因家族的成员,编码一人表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)相关的酪氨酸激酶——表皮生长因子受体 2(HER2)^[1],能调节细胞的生长、分化和生存,在 20%~30% 人类转移性乳腺癌患者体内存在过表达的现象^[2]。Herceptin(赫赛汀)是获美国 FDA 许可的用于治疗 Her-2 过表达乳腺癌患者的一种重组的人源化单克隆抗体,通过将鼠抗 HER-2 抗体(4D5)的高度可变的抗原结合区——决定簇互补区(complementarity-determining region, CDR)插入人 IgG1 的骨架区产生的^[3],能直接靶向于 HER-2 蛋白的胞外结构域(extracellular domain, ECD),抑制 Her-2 过表达肿瘤的生长,Herceptin 的单独给药或与化疗治疗的联合用药,虽取得了一定的疗效,但治愈率低,仍待进一步的改进。

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是天然免疫系统的一个重要组成部分,是一群 CD56+CD3-的细胞,其发育成熟有赖于骨髓的作用,主要起源于 CD34+的造血干细胞^[4],成熟后主要分布于肝脏、脾脏及外周血中,占到这几处淋巴细胞的 5%~20%,而较少出现于骨髓、胸腺和淋巴结等处^[5],在机体抵抗病毒感染的抗肿瘤的过程中发挥关键作用。NKG2D(natural-killer group2, member D)是 NK 细胞的一个重要的激活型受体,MICA(Major histocompatibility class I related chain A)作为它众多配体中的一员,广泛地表达于各种肿瘤细胞表面,很少在正常细胞中出现,过表达 MICA 的肿瘤细胞,更易被 NK 细胞所识别、杀伤。但同

收稿日期: 2010-01-08

基金项目: 国家新药创制重大专项课题(2009ZX09103-687)

作者简介: 金鲁宁(1986-),男,浙江温州人,硕士研究生,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

通讯作者: 钱其军,电子邮箱: qianqj@163.com

时,由肿瘤细胞过度分泌可溶性的 MICA,将会阻断 NKG2D 与肿瘤细胞表面的 MICA 的作用,并进而减弱了抗肿瘤反应^[6]。Bin 等^[7]基于对 NKG2D-MICA 复合物的晶体结构分析,合成了 P1、P2、P3 三条短肽,以此来模拟 MICA 的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域的功能。结果发现这三条短肽均能抑制 NK 细胞对 Hela 细胞的杀伤,而 NK 对本身缺乏 MICA 的 K562 细胞的杀伤不受它们的影响。而且,肽段越长,其抑制作用也就越明显。

基于上述研究进展,本研究通过构建了携带 Herceptin 和 MICA 胞外结构域(简称为 MICA(E))的融合基因的 5 型重组腺病毒——Ad5-Herceptin-MICA(E),以获得拥有双重功能的融合蛋白,即可以通过融合蛋白中的 Herceptin 抗体部分与 Her-2 阳性的肿瘤细胞相结合,再通过 MICA 部分与 NK 细胞结合,在增强 NK 细胞杀伤活性的同时,还能使 NK 细胞更多地聚集在靶细胞的周围,对靶细胞进行更有效地杀伤。

1 材料和方法

1.1 实验材料

腺病毒载体质粒 pXC1、质粒 PUC19-Herceptin、腺病毒载体质粒 pBHGlox(delta)E1,3Cre、质粒 pDC355-Herceptin 和质粒 pDC339-Herceptin 本实验室保存。

1.2 实验方法

用于融合基因构建的引物设计与合成:根据美国 Genentech 公司和 GeneCopoeia 公司所公布的 Herceptin 抗体和 MICA 的 cDNA 序列设计引物,通过 PCR 获得 Herceptin 抗体重链基因 Age I 酶切位点之后的基因片段(885 bp,记为 Herceptin')及 MICA 胞外结构域部分的基因(852 bp,记为 MICA(E)),并在引物中加入相应的酶切位点,引物序列如下:Herceptin' 引物 1(上游):CCCCACCGGTGACGGTGTC(Age I);引物 2(下游):AAGACTGTGGGGCTCTTTACCCGAGACAG;MICA(E)引物 3(上游):TAAAGAGC-CCCACAGTCTTC;引物 4(下游):CCCCGCTAGCTTATCAGGAATGTCTGCCAATG(Nhe I)。

用于质粒鉴定的引物设计与合成:检测野生型病毒的引物(pXC1):上游引物 CTGGCCAATACCAAC-CTTA,下游引物 ATATGAGCTCACAATGCTTC;Herceptin 轻链引物:上游引物 TACTGAATTCGC-CACCATGGAAGCCCCAG,下游引物 CAGTTCTTTTGATCTCCACCTTGGTGCC;Herceptin 重链引物:上游引物:TGCTAAGCTTGCCACCATGGAGTTTTGG,下游引物:上述引物 2;MICA(E)引物:上述引物 3、4;

所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成并经 PAGE 电泳进行纯化定量。用去离子水溶解,分装后于一 20℃ 保存备用。

1.3 实验步骤

1.3.1 质粒 pDC339-Herceptin-MICA(E)的构建

通过 PCR 分别从 PUC19-Herceptin 和 MICA 上获得基因 *herceptin'* 和 *mica(e)*,再用 Overlap-PCR 的方法获得融合基因 *herceptin'-mica(e)*,然后通过 Age I 和 Nhe I 双酶切,将 *herceptin'-mica(e)* 插入质粒 pDC355-Herceptin 中,获得质粒 pDC355-Herceptin-MICA(E),经 HindIII 和 Nhe I 双酶切,将基因 Herceptin-MICA(E)连接到质粒 pDC339-Herceptin 中,获得质粒 pDC339-Herceptin-MICA(E)。

1.3.2 重组 5 型腺病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E)的构建

将构建的质粒 pDC339-Herceptin-MICA(E)与腺病毒骨架载体 pBHGlox(delta)E1,3Cre(由本实验室改造保存)通过 Lipofectamine2000 试剂盒共转染至 HEK293 细胞。共转染后 9~14 d 出现病毒空斑,经过 3 次病毒空斑纯化,得到重组腺病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E)。将重组腺病毒在 HEK293 细胞中扩增后,再利用氯化铯梯度离心法对病毒进行纯化,最后通过 TCID50 法(50%组织培养感染剂量法)测定病毒滴度。

1.3.3 重组腺病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E)介导的融合基因的表达

将 HEK293 细胞以 5×10^5 个/孔(体积为 15.5 mL)铺于六孔板中,于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 24 h,接着将培液换成含 5%胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)的 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)培养液,再将病毒按感染复数 MOI=10 加入其中,轻轻摇动混匀,重新放回培养箱培养,培养 48 h 后,取上清通过 ELISA 和 Western Blot 检测蛋白的表达;通过间接免疫荧光分析(IFA)检测蛋白与 SK-OV-3 细胞(一种 Her-2 阳性的人卵巢癌细胞)表面 Her-2 受体的结合特性。

2 结 果

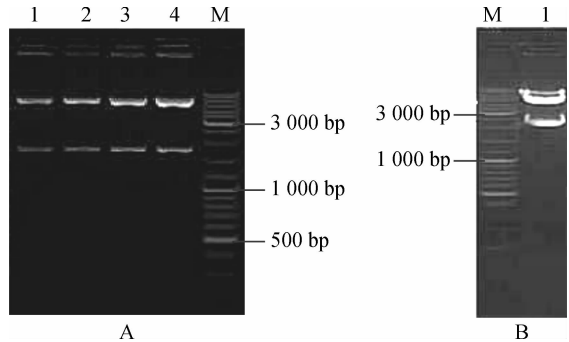
2.1 构建质粒 pDC355-Herceptin-MICA(E) 和 pDC339-Herceptin-MICA(E)

质粒 pDC355-Herceptin-MICA(E) 经限制性内切酶 *Age* I 和 *Nhe* I 双酶切后得到的两条目的条带,大小与预期的条带相符,如图 1A 所示。

质粒 pDC339-Herceptin-MICA(E) 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Nhe* I 双酶切后得到的两条目的条带,大小与预期的条带相符,如图 1B 所示。

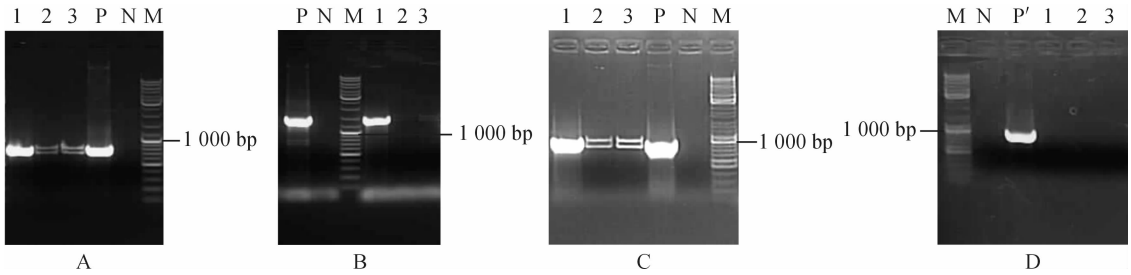
2.2 重组及包装出腺病毒 Ad5- Herceptin-MICA(E)

通过将已成功构建的质粒 pDC339-Herceptin-MICA(E) 与腺病毒骨架质粒 pBHGlox(delta) E1, 3Cre 在 HEK293 细胞中重组,包装出病毒颗粒。通过 PCR 检测到病毒基因组中 Herceptin 轻链基因(713 bp)、Herceptin 重链基因(1 415 bp)和 MICA(E) 基因(852 bp)的存在,证实已成功将抗体 Herceptin 与 MICA(E) 的融合基因重组进了病毒基因组。阳性对照 pXC1 经 PCR 可扩增出 879 bp 的条带,而 Ad5-Herceptin-MICA(E) 并未扩增出该大小的条带,这说明病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E) 中不含野生型病毒。结果如图 2 所示。



A: pDC355-Herceptin-MICA(E) 质粒经限制性内切酶 *Age* I 和 *Nhe* I 双酶切。1~4 号泳道为质粒的不同克隆, M 为 DNA Ladder Mix Marker。B: pDC339-Herceptin-MICA(E) 质粒经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Nhe* I 双酶切。1 号泳道为 pDC339-Herceptin-MICA(E) 质粒, M 为 DNA Ladder Mix Marker。

图 1 pDC355-Herceptin-MICA(E) 和 pDC339-Herceptin-MICA(E) 的鉴定



A: Herceptin 轻链基因 PCR 鉴定结果, B: Herceptin 重链基因 PCR 鉴定结果, C: MICA(E) PCR 鉴定结果, D: 野生型病毒 PCR 鉴定结果(P' 为阳性对照 pXC1 质粒)。1~3 号泳道为病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E) 的 3 个克隆, P 为阳性对照 pDC339-Herceptin-MICA(E) 质粒, N 为阴性对照, M 为 DNA Ladder Mix Marker。

图 2 病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E) 的鉴定

2.3 病毒感染细胞后能够成功表达融合蛋白 Herceptin-MICA(E)

2.3.1 酶联接免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

用病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E) 感染 HEK293 细胞 48 h 后, 经 ELISA 检测后发现融合蛋白在上清中的表达量为(471. 93±12. 33) ng/mL。

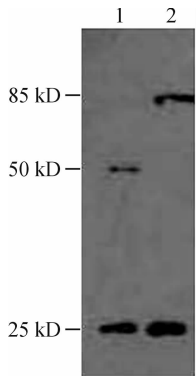
2.3.2 Western Blot 检测

取病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E) 感染 48 h 后 HEK293 细胞的上清做 Western Blot, 以检测融合蛋白的特异性, 结果如图 3 所示。

Western Blot 显示, 转染 Ad5-Herceptin-MICA(E) 病毒的 293 细胞能够表达 Herceptin 抗体的轻链及其重链与 MICA(E) 的融合蛋白, 相对分子量与商品化 Herceptin 的轻、重链以及 MICA(E) 相同, 说明表达的融合蛋白是完整的目的蛋白。

2.3.3 间接免疫荧光分析(indirect immunofluorescence assay, IFA)

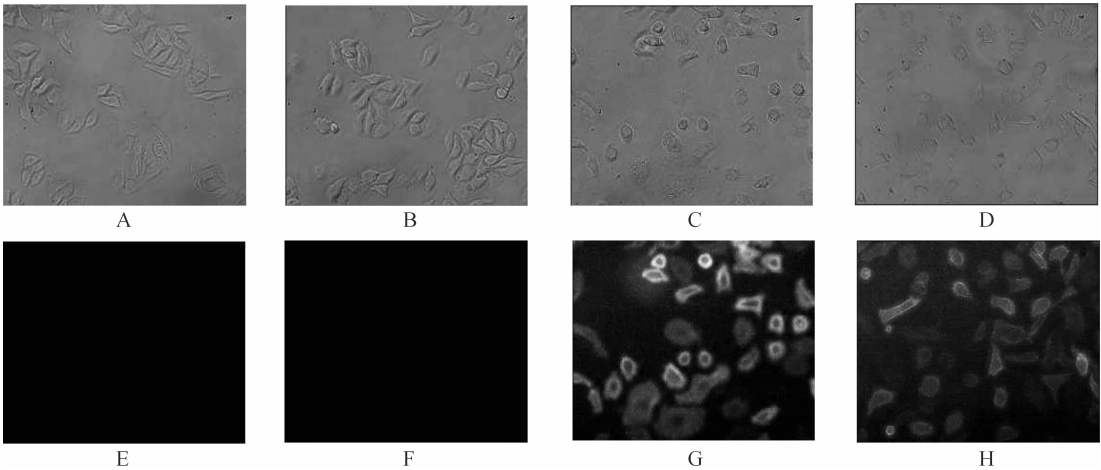
根据 Herceptin 能与 Her-2 受体特异结合的特点, 用荧光标记的羊抗人抗体作为二抗, 与结合于 Her-2 受体的目的蛋白反应, 利用荧光显微镜观察样品在激发光照射下所发出的绿色荧光, 以此来确定目的蛋白与细胞表面 Her-2



1 号泳道为 Herceptin 抗体, 2 号泳道为融合蛋白 Herceptin-MICA(E) 图 3 融合蛋白 Herceptin-MICA(E) 的 Western Blot 检测

受体特异结合的情况,结果如图 4 所示。

经过商品化 Herceptin 和 Herceptin-MICA(E)处理的 HER-2 阳性的 SK-OV-3 细胞在激发光作用下可出现绿色荧光,两者的荧光强度相似,而在 HER-2 阴性的 7721 细胞中未能观察到绿色荧光,这表明 Ad5-Herceptin-MICA(E)表达的融合蛋白能特异地与细胞表面的 Her-2 受体结合,而且,融合蛋白 Herceptin-MICA(E)中的 Herceptin 部分的功能并未因连接了 MICA(E)而受到影响。



A: 明视野下的 Herceptin 处理的 7721 细胞;B: 明视野下的 Herceptin-MICA(E)处理的 7721 细胞;C: 明视野下的 Herceptin 处理的 SK-OV-3 细胞;D: 明视野下的 Herceptin-MICA(E)处理的 SK-OV-3 细胞;E: 荧光显微镜下的 Herceptin 处理的 7721 细胞;F: 荧光显微镜下的 Herceptin-MICA(E)处理的 7721 细胞;G: 荧光显微镜下的 Herceptin 处理的 SK-OV-3 细胞;H: 荧光显微镜下的 Herceptin-MICA(E)处理的 SK-OV-3 细胞。

图 4 IFA 检测融合蛋白 Herceptin-MICA(E)的结合特异性(10×20 倍)

3 讨 论

过继细胞免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)是一种重要的肿瘤生物疗法,主要是将自身或异体的具有抗肿瘤功能的免疫效应细胞,在体外活化和大量扩增之后,再回输到患者体内,使其发挥抗肿瘤作用。NK 细胞作为天然免疫系统的重要组成部分,是机体抗肿瘤和抵抗病毒感染的第一道防线,对肿瘤细胞的杀伤不需要各种预刺激,能高效杀伤多种肿瘤细胞,因此,也常被用于肿瘤的过继性免疫治疗。NK 细胞的抑制或激活主要是通过其表面各种抑制型和激活型受体与各自配体间的相互作用而实现的。NKG2D 是 NK 细胞的一个重要的激活型受体,NK 细胞对靶细胞的裂解依赖于 NKG2D 的活化。

作为获美国 FDA 许可用于治疗 Her-2 过表达的转移性乳腺癌的单克隆抗体药物,Herceptin 的单独给药或是与化疗的联合治疗虽然取得了可喜的成绩,但患者的整体治愈率仍不高。

为进一步提高对 Her-2 阳性肿瘤的治疗效果,本文构建了携带有 Herceptin 全长基因与 MICA 胞外结构域基因片段的融合基因的重组腺病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E),以期获得整合了 Herceptin 与 MICA(E)两者功能的融合蛋白,该蛋白能通过其 Herceptin 部分与肿瘤细胞表面的 Her-2 受体相结合,在发挥 Herceptin 本身抗肿瘤作用的同时,可通过其 MICA(E)部分与 NK 细胞表面的 NKG2D 结合,既增强了 NK 细胞的杀伤活性,又能使靶细胞周围聚集更多的 NK 细胞。本研究先后将融合基因克隆到了腺病毒载体 pDC355 和 pDC339 中,并将 pDC339-Herceptin-MICA(E)用于腺病毒的包装(因本实验室的其他成员初步研究发现重组基因在 pDC339 中的表达会较 pDC355 中的高),之后的 ELISA 和 Western Blot 实验表明,病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E)能在 HEK293 细胞中表达出具有预期大小的完整的融合蛋白 Herceptin-MICA(E);在间接免疫荧光分析(IFA)实验中,经 Herceptin-MICA(E)处理的 SK-OV-3 细胞可以在荧光显微镜下观测到绿色荧光,其荧光强度与商品化的 Herceptin 相似,而作为对照的 7721 细胞处理组,并未出现绿色荧光,这表明,病毒所表达的蛋白具有正常的结合特性,能与 SK-OV-3 细胞表面的 Her-2 受体特异地结合,MICA(E)部分的连入并未影响 Herceptin 的正常功能。重组腺病毒 Ad5-Herceptin-MICA(E)的成功构建,为以后的进一步联合 NK 细胞的治疗研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Slamon D J. Proto-oncogenes and human cancers[J]. NEJM, 1987, 317(15): 955-957.
- [2] Owens M A, Horten B C, Da Silva M M. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues[J]. CBC, 2004, 5(1): 63-69.
- [3] Carter P, Presta L, Gorman C M, et al. Humanization of an anti-p185her2 antibody for human cancer therapy[J]. PNAS USA, 1992, 89(10): 4285-4289.
- [4] Miller J S, Verfaillie C, McGlave P. The generation of human natural killer cells from CD34+/DR-primitive progenitors in long-term bone marrow culture[J]. Blood, 1992, 80(9): 2182-2187.
- [5] Lian R H, Kumar V. Murine natural killer cell progenitors and their requirements for development[J]. Semin. Immunol, 2002, 14(6): 453-460.
- [6] Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation[J]. Nature, 2002, 419: 734-738.
- [7] Zhang Bin, Wei Haiming, Zheng Xiaodong, et al. The inhibitory effects of synthetic short peptides, mimicking MICA and targeting at NKG2D receptors, on function of NK cells[J]. Peptides, 2005, 26(3): 405-412.

Construction and Identification of a Recombinant Adenovirus Vector Carrying a Fusion Gene Composed of Herceptin and the ECD of MICA

JIN Lu-ning¹, LI Lin-fang², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. School of Life Sciences, 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: To construct a recombinant adenovirus which can express a fusion protein composed of Herceptin and the extracellular domain(ECD) of major histocompatibility class I related chain A(MICA). The authors fuse the ECD sequence of gene MICA to the Herceptin through Overlap-PCR, and then connect the fusion gene to the adenovirus vector pDC339. The recombinant vector is identified by restriction enzyme digestion of DNA and PCR. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot are applied to analyze the fusion protein expressed in HEK 293 cells; the binding characteristics of the fusion protein is checked by indirect immunofluorescence assay(IFA). Restriction enzyme digestion of DNA demonstrates that the vector is successfully constructed; PCR identification indicates the existence of fusion gene in the recombinant adenovirus; ELISA and Western Blot show that the recombinant adenovirus can normally express the fusion protein; IFA confirms that the fusion can specially bind to surface HER-2 receptor on SK-OV-3 cells. The authors successfully construct a recombinant adenovirus which can express a fusion protein with normal binding capacity, this contributes to the future research of therapy with natural killer(NK) cells.

Key words: herceptin; MICA; adenovirus

(责任编辑: 许惠儿)