

人 4-1BBL 胞外区基因的克隆与表达研究

Cloning and Expression of the Extracellular Domain of 4-1BBL

姜文国 熊冬生* 邵晓枫 王金宏 许元富,
刘 芳 郭红星 朱祯平 杨纯正

JIANG Wen-Guo, XIONG Dong-Sheng*, SHAO Xiao-Feng, WANG Jin-Hong, XU Yuan-Fu,
LIU Fang, GUO Hong-Xing, ZHU Zhen-Ping and YANG Chun-Zheng

中国医学科学院/中国协和医科大学 血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020
State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College,
Tianjin 300020, China

摘 要 用 RT-PCR 方法从人单核 THP-1 细胞系克隆人 4-1BBL 胞外区基因,将其重组到 pAYZ 表达载体中,构建成人 4-1BBL 胞外区基因表达载体。将该载体转化大肠杆菌 16C9,获得稳定表达,表达产物主要以可溶性状态存在;SDS-PAGE 和 Western blot 分析显示,其分子量约为 22kD,与预期结果一致。这是首次在大肠杆菌中获得 4-1BBL 胞外区可溶性表达。生物学活性检测显示 4-1BBL 对于维持 T 淋巴细胞因子释放非常有益,同时 PI 单染表明它能抑制 Jurkat 细胞的凋亡。这将在抗肿瘤免疫治疗中具有潜在应用前景。

关键词 4-1BBL, 协同刺激分子, 原核表达

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0703-05

Abstract RT-PCR was used to clone DNA fragment of the extracellular domain of 4-1BBL from human THP-1 cells (human monocyte), and the expression vector pAYZ4-1BBL was constructed by cloning the extracellular domain of 4-1BBL into the expression vector pAYZ. The extracellular domain of 4-1BBL was expressed in *E. coli* 16C9 and purified by affinity chromatography. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the relative molecular weight of soluble 4-1BBL is 22kD which was consistent with the theoretically predicted value. So far as we know, it is the first time that the soluble expression of 4-1BBL in *E. coli* was achieved. 4-1BBL induced a significant release of IL-2 in stimulated Jurkat cells after 48h incubation, especially in the presence of tumor cell. At the same time the apoptosis level of Jurkat cell reduce more than 50%. In conclusion 4-1BBL may be useful in cancer immunotherapy.

Key words 4-1BB ligand, costimulatory molecules, prokaryotic expression

Received: April 16, 2005; Accepted: May 26, 2005.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Program of China (863 program) (No. 2003AA215080) and Key Foundation of Tianjin City Government (No. 003119511).

* Corresponding author. Tel 86-22-27230740; E-mail: dsxiong@public.tpt.tj.cn

国家高技术研究发展计划项目(863)资助(No. 2003AA215080);天津市科委科技攻关经费资助(No. 003119511) http://journals.im.ac.cn

在诱导 T 细胞进行增殖进而分化成效应细胞时,除抗原-MHC 分子复合物介导的特异性刺激外,还需要协同刺激分子提供第二信号。如果缺乏协同刺激信号,则 T 细胞将进入无反应状态,甚至发生凋亡。因此,协同刺激分子强有力地影响着 T 细胞的应答。而肿瘤细胞往往缺少或者低表达这些协同刺激分子,而不能活化 T 细胞介导有效的细胞免疫应答。CD28/B7 分子是研究最多的途径,认为是起始 T 细胞激活发生最主要的机制。然而,随着 T 细胞的激活,也有许多其它分子有助于扩增 T 细胞反应。其中 4-1BB/4-1BBL 是近年来研究的热点。4-1BB/4-1BBL 是 TNFR/TNF 配体家族的成员。大量动物和人的肿瘤体内外研究表明 4-1BB/4-1BBL 在很多方面参与转导信号,影响着 T 细胞的扩增和存活。在肿瘤免疫治疗中发挥着很重要的作用^[1,2]。

由于难以在体外获得足够量的 4-1BBL 蛋白,因此关于人 4-1BB/4-1BBL 途径的研究还相对较少。因此我们设计针对胞外区的引物,从 THP-1 细胞提取总 RNA,通过 RT-PCR 克隆 4-1BBL 胞外区基因,并且在首次原核系统表达获得可溶性 4-1BBL。然后证实了它维持 T 细胞因子释放及抑制其凋亡的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体和细胞系:表达载体 pAYZ、大肠杆菌 *E. coli* 16C9、人单核 THP-1 细胞系、Jurkat T 淋巴细胞系由本室保存。细胞系用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液传代培养。

1.1.2 试剂:Pfu DNA 聚合酶(上海申博生物科技有限公司),Trizol、M-MLV 逆转录酶、T4 DNA 连接酶(Invitrogen),限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Not* I (TaKaRa),胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒(北京赛百盛生物技术有限公司),放射免疫测定 IL-2 试剂盒(天津洁瑞公司),PHA-R (Sigma),HRP 标记的鼠抗 E-tag 抗体、抗 E-tag 柱(Pharmacia)。

1.1.3 引物:P1、P2 为扩增 4-1BBL 胞外区的引物,由上海生工公司合成,画线部分为酶切位点:

P1: 5'-GTCACAAACGCGTACGCTCTCCGCGAGGGTCCCGAGC-3' (*Mlu*I)

P2: 5'-GCCGCTGCGGCCGCTTCGACCTCGGTGAAGGGAG-3' (*Not*I)

1.2 方法

1.2.1 人 4-1BBL 胞外区基因的克隆及表达载体的

构建:取 2×10^7 个培养的 THP-1 细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA,并以 mRNA 为模板反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,以 P1、P2 引物进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后,用 *Mlu* I 和 *Not* I 消化,并与经 *Mlu* I 和 *Not* I 消化后的表达载体 pAYZ 连接,形成人 4-1BBL 胞外区基因表达载体 pAYZ4-1BBL。表达载体 pAYZ4-1BBL 经 PCR 鉴定,并用双脱氧终止法测定其 DNA 序列。

1.2.2 人 4-1BBL 胞外区基因的表达和纯化:将含有表达载体 pAYZ4-1BBL 的 *E. coli* 16C9 接种于 2YT 培养基(含氨苄青霉素 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$)中, 37°C 振荡培养 8h 后,转接于 Ap5 培养基(0.15% 葡萄糖, 1.1% 酸水解酪蛋白, 0.06% 酵母抽提物, 0.019% MgSO_4 , 0.107% NH_4Cl , 0.373% KCl , 0.12% NaCl , 0.12mol/L 三乙醇胺, pH7.4, 氨苄青霉素 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$)中, 30°C 振荡培养 24h, 4°C 离心收集菌体,将菌体于 -20°C 冻存 1h,化冻后加入细菌外周质腔蛋白质提取液(三羟甲基氨基甲烷 25mmol/L, 乙二醇四乙酸 1mmol/L, 苯甲基磺酰氟(PMSF) 0.1mmol/L, 蔗糖 20% (W/V), 氯化钠 200mmol/L, pH7.5),于 4°C 轻摇 1h, 12000 r/min 4°C 离心 20min,上清液经磷酸盐缓冲液(PBS)透析后,上样于抗 E-tag 柱,经 PBS 洗柱后,用 pH3.0 的甘氨酸溶液洗脱,洗脱液立即用 pH8.0 的 Tris 缓冲液中和。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测:表达产物经 12% SDS-PAGE 电泳,将其转移至醋酸纤维素膜上,3% 脱脂奶溶液 4°C 封闭过夜,用 HRP 标记的鼠抗 E-tag 抗体室温孵育 1h, PBS 洗 3 次,每次 10min,然后用二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.2.4 人 4-1BBL 胞外区蛋白影响激活 T 细胞系 IL-2 释放的测定:将生长良好的 Jurkat 细胞,分组 1.0×10^5 细胞,设空白对照分别不同处理,5% CO_2 孵育 48h, 2000r/min 离心 10min,收集上清,采用放射免疫分析测定 IL-2 的释放。

1.2.5 人 4-1BBL 胞外区蛋白对激活 T 细胞系凋亡的影响:取生长良好的 Jurkat 细胞,调整细胞浓度加样于 24 孔板, 1×10^6 /孔。用 PBS 作阴性对照,各孔分别加入 PHA- α (终浓度 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$)及 4-1BBL 胞外区蛋白(终浓度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$), 37°C , 5% CO_2 孵育 48h, 2000r/min 4°C 离心 5min,用 PBS 洗 1 次,然后加入预冷 70% 乙醇固定 24h, 2000r/min 4°C 离心 5min,弃去乙醇,用 PBS 洗 1 次,加入 PI 1mL 4°C 避光 40min,用 400 目的筛网过滤 1 次,然后流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 人 4-1BBL 胞外区基因的克隆及表达载体的构建

从 THP-1 细胞中提取总 RNA,经 RT-PCR 扩增后,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,可见清晰条带,大小约为 630bp(图 1A)。扩增的产物经酶切插入到 pAYZ 载体,构建成人 4-1BBL 胞外区基因表达载体 pAYZ4-1BBL。阳性克隆提取质粒采用 *Mlu* I 和 *Sph* I 酶切消化后的产物可见一条分子量约 630bp 的条带,与预计分子量相同(图 1B)。双脱氧末端终止法测定结果显示,克隆的人 4-1BBL 胞外区序列与已知序列相同。

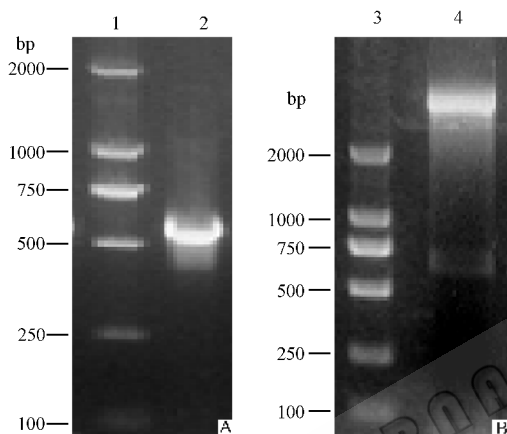


图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Analysis of PCR and restriction digestion products by agarose gel electrophoresis

1,3 :DNA marker(DL2000);2 :PCR product of the extracellular domain of 4-1BBL A :pAYZ4-1BBL/*Mlu* I + *Not* I .

2.2 人 4-1BBL 胞外区基因的表达和纯化

含有表达载体 pAYZ4-1BBL 的 *E. coli*16C9 在 2YT 培养基中生长,转接于 Ap5 培养基后,碱性磷酸酶启动子(*phoA*)在低磷酸盐的诱导下,合成 mRNA,并在该 mRNA 的 SD 序列位置合成带 E-tag 纯化标志的人 4-1BBL 胞外区基因蛋白质,该蛋白质在 St II 信号肽的作用下分泌到细菌外周质腔中。发酵液经离心、高渗溶液处理,人 4-1BBL 胞外区蛋白从细菌外周质腔释放出来,然后用抗 E-tag 柱分离纯化,纯化产物以可溶性状态存在,摇瓶培养的产量达 1.0mg/L 以上。纯化产物经 12% 的 SDS-PAGE 分析显示,在分子量约 22kD 处有一条蛋白质带,无其他蛋白质带(图 2A)。Western blot 结果表明,抗 E-tag 抗体能与该蛋白质带杂交,纯化前溶液在相应位置也有一条蛋白质杂交带,而纯化后的流出液无任何

蛋白质杂交带,与预期结果相符(图 2B)。

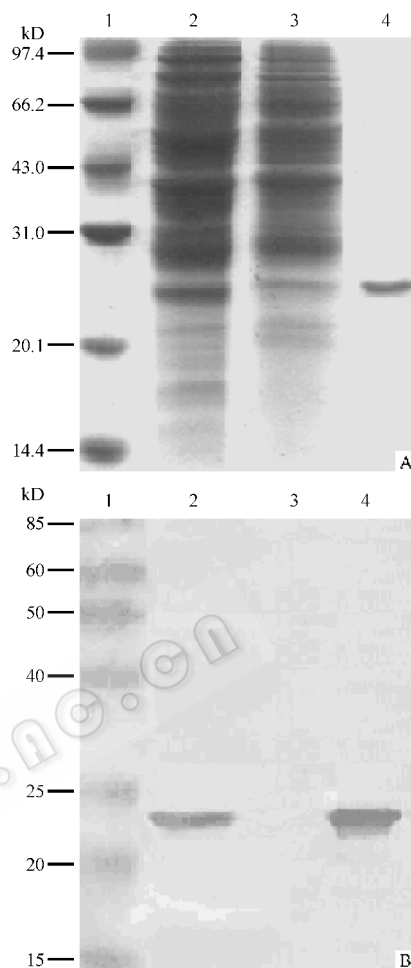


图 2 4-1BBL 胞外区的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

Fig.2 SDS-PAGE and Western blot analysis of extracellular domain of 4-1BBL

A :SDS-PAGE 1 :protein marker ;2 :periplasmic extract of bacteria cells expressing the extracellular domain of 4-1BBL ;3 :flow through from the anti-E tag affinity column ;4 :extracellular domain of 4-1BBL purified by anti-E tag affinity column .

B :Western blot 1 :pre-stained marker ;2 :periplasmic extract of bacteria cells expressing the extracellular domain of 4-1BBL ;3 :flow through from the anti-E tag affinity column ;4 :extracellular domain of 4-1BBL purified by anti-E tag affinity column .

2.3 人 4-1BBL 胞外区蛋白对 Jurkat 细胞 IL-2 释放的影响

IL-2 主要由活化的 T 淋巴细胞产生,它能促进 T 淋巴细胞和 NK 细胞的增殖,促进 B 细胞分化和增殖,促进抗体生成等。因此,在人 4-1BBL 胞外区蛋白影响下 Jurkat T 淋巴细胞系 IL-2 水平的变化可以间接反映出它在疾病治疗中潜在的重要作用。本实验采用放射免疫测定试剂盒可以方便的监测不同处理组 IL-2 水平的变化,可见 Jurkat 细胞激活以后 IL-2 释放减少,但是 4-1BBL 胞外区蛋白能使激活的 Jurkat 细胞

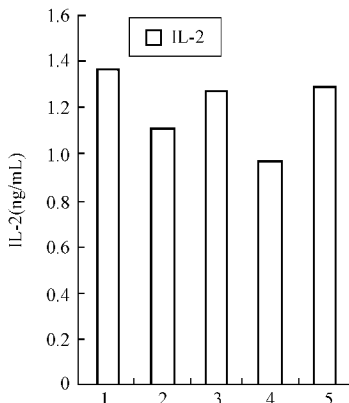


图3 4-1BBL胞外区蛋白对 Jurkat 细胞 IL-2 释放的影响

Fig.3 The effect of extracellular domain of 4-1BBL on the release of IL-2 in Jurkat cells

PBS :negative control ;PHA 2 μ g/mL ;4-1BBL 1 μ g/mL , The data shown is mean of three determinations. 1 :PBS ; 2 :PHA ; 3 :PHA + 4-1BBL ; 4 :PHA + k562 ; 5 :PHA + k562 + 1BBL.

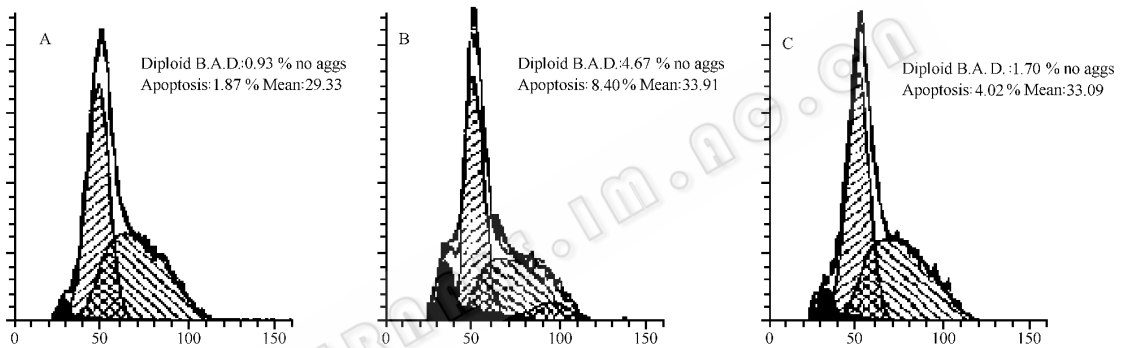


图4 人 4-1BBL 胞外区蛋白对 Jurkat 细胞凋亡的影响

Fig.4 The effect of extracellular domain of 4-1BBL protein on apoptosis of Jurkat cells

A :PBS ; B :PHA-p ; C :PHA-p + 4-1BBL.

3 讨论

肿瘤发生是因为它能逃脱免疫监视。其中一个重要的机制就是肿瘤细胞缺乏协同刺激分子的表达。许多临床研究揭示了应用协同刺激分子是有效的靶标,其中有关 CD28/B7 途径的临床实验已取得很大进展。人 4-1BBL 包含 254 氨基酸,是存在于细胞膜表面的 II 型膜蛋白,人 4-1BBL 基因位于 19 号染色体 19p13.3,主要表达在巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、B 细胞和活化的 T 细胞^[3],并且在一些癌细胞表面也有表达。研究发现 4-1BBL 的功能主要在于通过胞外区和 4-1BB 结合,传导信号来发挥协同刺激作用。动物试验显示增强了 T 细胞介导的抗肿瘤免疫性,揭示了 4-1BB/4-1BBL 在抗肿瘤方面是很有前途的靶标。至为重要的 4-1BBL 能够协同刺激 CD28-T 细胞,导致细胞分裂,细胞因子的释放以

IL-2 的释放增加 0.16ng/mL,在有肿瘤抗原细胞存在的情况下 IL-2 的释放可增加 0.32ng/ml(图 3),说明 4-1BBL 对于维持 T 淋巴细胞因子释放非常有益。

2.4 人 4-1BBL 胞外区蛋白对 Jurkat 细胞凋亡的影响

为进一步评价人 4-1BBL 胞外区蛋白的生物学活性,我们用 PI 单染法研究它对 Jurkat 细胞凋亡的影响。PI 用氩离子激发荧光,在 PI 荧光直方图上,凋亡细胞在 G1/G0 期前出现一亚二倍体峰(sub-G1)。实验结果表明,PHA-p 刺激 Jurkat 细胞活化以后,细胞凋亡增加为 8.40%,当同时加入人 4-1BBL 胞外区蛋白时,细胞凋亡减少约 1 倍为 4.02%。这初步说明人 4-1BBL 胞外区蛋白具有抑制细胞凋亡,延长其存活的功能(图 4)。

及增加穿孔素水平和增强细胞毒性效应器功能^[4];并且 4-1BB/4-1BBL 途径具有抑制记忆潜能,可能通过一种 TGF β 依赖的机制,在介导肿瘤清除和抑制自身免疫病方面的发挥双重作用,使得 CD8 + T 细胞达到杀伤恶性细胞而不会因为过度刺激导致健康器官的自身免疫损害这样一个相对平衡^[5]。同时,4-1BB/4-1BBL 是一个对已存在协同刺激的放大器,它有利于产生肿瘤特异性的具有持续性杀伤活性的 CD8 + T 细胞。比仅仅单独应用 B7-1 或 B7-2 更有效。许多数据表明 4-1BB/4-1BBL 和 B7/CD28 协同刺激途径之间有协同效应^[6]。

现阶段的对 4-1BB/4-1BBL 的研究主要集中在以下三个方面,包括过继性转移活体外协同刺激 T 细胞^[7]、抗-4-1BB 单抗治疗^[1,2]和 4-1BBL 制造的全细胞疫苗^[1,6]。虽然在体外和动物模型获得令人鼓舞的结果,但是很难获得足够量的过继性转移 T 细

胞和全细胞疫苗移植入患者体内。而抗-4-1BB 的单抗在体内显示能通过诱导 Th 细胞无能消除了 T 细胞依赖的体液免疫应答,这也限制了它的应用。

本研究基于 4-1BBL 基因和蛋白的特性,克隆了 4-1BBL 胞外区基因,并在原核表达系统获得稳定性表达,表达产物在引导肽_{st II}引导下分泌入细菌周质腔,在周质腔中折叠成正确的空间构象,并以有活性的可溶状态存在,这是首次在大肠杆菌中获得 4-1BBL 胞外区蛋白可溶性表达,以分泌形式表达外源蛋白,可避免细菌蛋白酶对外源蛋白的降解,提高外源蛋白的表达量,同时可降低外源蛋白对宿主细胞的毒性作用^[8]。相对包涵体而言,避免了对包涵体所进行的变性和复性中客观条件所造成的活性的丧失。生物学活性检测显示 4-1BBL 对于维持 T 淋巴细胞系因子释放非常有益,特别是在有肿瘤抗原存在的情况下效果更明显,同时 PI 单染表明它能抑制 Jurkat 细胞的凋亡。基于抗-CD3/抗-CD20 和抗 CD3/抗-Pgp Diabody 的联合应用以及三特异功能分子的构建将是今后的研究方向^[8,9]。

REFERENCES (参考文献)

[1] Ye Z, Hellstrom I, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A *et al.* Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-

1BB. *Nat Med*, 2002, **8**(4):343-348

[2] Martinet O, Divino CM, Zang Y *et al.* T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. *Gene Ther*, 2002, **9**(12):786-792

[3] Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J *et al.* ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood*, 1995, **85**(4):1043-1052

[4] Bukczynski J, Wen T, Watts TH. Costimulation of human CD28- T cells by 4-1BB ligand. *Eur J Immunol*, 2003, **33**(2):446-454

[5] Myers L, Takahashi C, Mittler RS *et al.* Effector CD8 T cells possess suppressor function after 4-1BB and Toll-like receptor triggering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(9):5348-5353

[6] Melero I, Bach N, Hellstrom KE *et al.* Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol*, 1998, **28**(3):1116-1121

[7] Li Q, Carr A, Ito F *et al.* Polarization effects of 4-1BB during CD28 costimulation in generating tumor-reactive T cells for cancer immunotherapy. *Cancer Res*, 2003, **63**(10):2546-2552

[8] Liu YX(刘银星), Xiong DS(熊冬生), Fan DM(范冬梅) *et al.* One amino acid mutation in an anti-CD20 antibody fragmentation that affects the yield bacterial secretion and affinity. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2003, **19**(3):272-276

[9] Gao YX(高瀛岱), Xiong DS(熊冬生), Xu YS(许元生) *et al.* Construction and expression of anti-CD3/Anti-Pgp diabody. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2003, **19**(4):444-449