

一种真核细胞分泌型重组融合蛋白 rPC 的构建、表达与纯化

李春春¹, 谢雨琼¹, 曹江¹, 邵吉民²

1 浙江大学医学院 附属第二医院临床研究中心, 浙江 杭州 310009

2 浙江大学医学院 病理学与病理生理学系, 浙江 杭州 310058

李春春, 谢雨琼, 曹江, 等. 一种真核细胞分泌型重组融合蛋白 rPC 的构建、表达与纯化. 生物工程学报, 2020, 36(5): 969-978.
Li CC, Xie YQ, Cao J, et al. Construction, expression and purification of a mammalian secretory recombinant fusion protein rPC. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 969-978.

摘要: 抑制性免疫检查点 PD-1 或 CTLA-4 靶向治疗药物已用于肿瘤的临床治疗, 但单一靶点药物会有耐药发生, 联合使用同时封闭多个靶点可提高疗效, 因此拟构建一个可封闭多个靶点的新型重组蛋白。首先设计并合成了一个由人类 PD-1 和 CTLA-4 两个受体的胞外功能域组成并且 C 端带 6×His 标签的分泌型重组融合蛋白 rPC 编码序列, 插入真核细胞表达载体 pLVX-IRES-ZsGreen1, 稳定转染 HEK293 细胞, 收集细胞培养上清, 以亲和方法纯化重组蛋白 rPC, 通过实时荧光定量 PCR 检测多个人类肿瘤细胞系中 PD-1 配体 PD-L1、PD-L2 和 CTLA-4 配体 CD80、CD86 的表达, 以选择相对高表达的细胞, 利用细胞免疫荧光染色方法检验 rPC 与肿瘤细胞的结合能力, 并用 CCK-8 法检测 rPC 是否对肿瘤细胞的生长有影响。结果表明, 重组融合蛋白 rPC 可由稳定转染表达载体的 HEK293 细胞表达并分泌, 纯化后的 rPC 可以与 PD-1 和 CTLA-4 配体表达相对较高的肺癌细胞 NCI-H226 结合, 并且 rPC 处理对其生长并无直接影响, 与预期一致。成功获得的重组融合蛋白 rPC 可用于进一步的体内外功能研究, 也为今后研发新型多靶点肿瘤免疫治疗蛋白药物打下了坚实的基础。

关键词: 重组融合蛋白, PD-1, CTLA-4, 免疫检查点

Construction, expression and purification of a mammalian secretory recombinant fusion protein rPC

Chunchun Li¹, Yuqiong Xie¹, Jiang Cao¹, and Jimin Shao²

1 Clinical Research Center, the 2nd Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

2 Department of Pathology and Pathophysiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: Drugs targeting immune checkpoint are used for cancer treatment, but resistance to single drug may occur. Combination therapy blocking multiple checkpoints simultaneously can improve clinical outcome. Therefore, we designed a

Received: September 6, 2019; **Accepted:** November 1, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81172516).

Corresponding authors: Jiang Cao. Tel: +86-571-87315201; E-mail: caoj@zju.edu.cn

Jimin Shao. Tel: +86-571-88208209; E-mail: shaojimin@zju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81172516) 资助。

网络出版时间: 2019-12-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191210.1120.004.html>

recombinant protein rPC to block multiple targets, which consists of extracellular domains of programmed cell death protein 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). The coding sequence was inserted into expression vector and stably transfected into HEK293 cells. The culture supernatant was collected and rPC was affinity-purified. Real-time quantitative PCR was used to evaluate the expression levels of ligands for PD-1 and CTLA-4 in several human cancer cell lines. The binding of rPC with cancer cells was examined by immunofluorescence cell staining, the influence of rPC on cancer cell growth was assayed by CCK-8. The results showed that rPC could be expressed and secreted by stably transfected HEK293 cells, the purified rPC could bind to lung cancer NCI-H226 cells which have high levels of ligands for PD-1 and CTLA-4, no direct impact on cancer cell growth could be observed by rPC treatment. The recombinant protein rPC can be functionally assayed further for developing novel immunotherapeutic drugs for cancer.

Keywords: recombinant fusion protein, PD-1, CTLA-4, immune checkpoint

恶性肿瘤是危及人类生命的重大疾病, 而免疫检查点异常是导致其发生和进展的重要因素之一。抑制性免疫检查点蛋白通过与各自配体结合而抑制免疫功能, 肿瘤组织中两个抑制性免疫检查点程序性细胞死亡蛋白 (Programmed cell death protein 1, PD-1) 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4) 是目前肿瘤治疗中的重要靶点, 已有相应的抗体药物应用于临床, 可以通过封闭并阻断相应受体-配体的结合而解除肿瘤组织的免疫抑制状态, 发挥抗肿瘤作用^[1-3]。但是由于肿瘤组织中通常有多种免疫检查点的异常, 因此会对单一靶点的药物产生耐药, 多靶点同时封闭可避免这一问题, 提高疗效^[4-5]。对靶点蛋白的封闭可以利用特异性抗原/抗体的竞争性结合, 也可以利用特异性受体/配体的竞争性结合。对多靶点同时封闭可以通过基因工程手段构建双靶向重组抗体或由不同受体结合域组成的重组融合蛋白实现。

人体内除了在 T 细胞表面有 PD-1 和 CTLA-4 等免疫检查点受体蛋白表达外, 还存在着相应的游离的可溶性受体, 即 sPD-1 和 sCTLA-4 等, 协调机体免疫调节^[6-8]。因此我们采用特异性受体/配体竞争性结合策略, 利用 PD-1 和 CTLA-4 的胞外功能域设计了一个全新的重组融合蛋白, 可结合到表达 PD-L1、PD-L2、CD80 和 CD86 等任何一种 PD-1 或 CTLA-4 配体的细胞表面, 从而封闭

这些配体, 使之无法与 T 细胞表面的 PD-1 或 CTLA-4 结合而抑制 T 细胞活性。在本工作中我们设计了一个含有人的 PD-1 和 CTLA-4 两个受体功能域的重组融合蛋白 rPC (Recombinant PD-1-CTLA-4) 编码序列, 并成功获得了由哺乳动物细胞表达的重组融合受体蛋白, 并对该蛋白的结合能力等作了初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

人胚肾细胞 HEK293、人肺鳞癌细胞 NCI-H226、人肺腺癌细胞 A549、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 HEPG2 购自 ATCC; 人乳腺癌细胞 Bcap-37、人胃腺癌细胞 SGC7901 购自上海中国科学院细胞库; 人胃印戒细胞癌 GCSR1-6 由本课题组建系^[9]; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京康为世纪生物有限公司; DNA marker 1 kb ladder plus 购自广州东盛生物科技有限公司; RPMI1640 培养液、DMEM 高糖培养液购自武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Biological Industries 公司; LB 培养基购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Not* I 购自 New England Biolabs 公司; 琼脂糖、RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 蛋白预染 marker 购自 Thermo 公司; 考马斯亮蓝快速染色液购自碧云天生物技术公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司; Immobilon Western

Chemiluminescent HRP Substrate 购自 Merck Millipore 公司; HRP 标记的 GAPDH 抗体购自上海康成有限公司; HRP 标记的 6×His Tag 抗体购自华安生物有限公司; DyLight650 标记的 6×His tag 抗体购自 Abcam 公司; 细胞核染料 Hoechst33342 购自 Sigma 公司; 转染试剂 Attractene Transfection Reagent、亲和层析用 Ni-NTA Agarose、切胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 均购自 QIAGEN 公司; 细胞活性检测试剂 Cell Counting Kit 8 购自 Dojindo 公司; 质粒提取试剂盒 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System、逆转录酶、dNTPs、RNA 酶抑制剂、T4 DNA Ligase、荧光定量试剂盒 GoTaq qPCR Master 购自 Promega 公司。

1.2 重组融合蛋白 rPC 的设计与表达载体的构建

包含有人 PD-1 和 CTLA-4 的重组融合蛋白 rPC 的设计如图 1 所示, 该重组蛋白 N 端为 Gaussia 荧光素酶的分泌型信号肽, PD-1 和 CTLA-4 两个功能域之间由人 IgG 铰链区连接, C 端为 6×His 标签。其中 Gaussia 荧光素酶信号肽序列为 pSF-CMV-Puro-NH₂-GAUS-Gaussia (Luciferase) 分泌型质粒 (Sigma-Aldrich, OGS1498) 的 nt 882–929, PD-1 功能域序列为 GenBank 数据库中 人 PD-1 mRNA 序列 (NM_005018) 的 nt 117–566, CTLA-4 功能域序列为 GenBank 数据库中 人 CTLA-4 mRNA 序列 (NM_001037631) 的 nt

278–694。人 IgG 的铰链区序列为 GenBank 数据库人免疫球蛋白重链恒定区 mRNA 序列 (MG815646) 的 nt 298–366。该序列两端引入 Not I 酶切位点, 并在起始密码子前增加 Kozak 序列 (GCCACC)。

上述重组融合蛋白编码核苷酸序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 合成的序列连接在 pUC57 的质粒载体上(pUC57-rPC)。用 Not I 酶将 rPC 编码序列从 pUC57-rPC 上切下, 用 Not I 酶将 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体酶切后用碱性磷酸酶处理以防自身环化, 将二者切胶回收, 16 °C 连接过夜, 转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌, 挑取克隆, 提取质粒, 用 Not I 酶切鉴定是否有片段插入, 用 Kpn I 酶切进一步确定 rPC 编码序列插入方向, 正向插入的质粒命名为 pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC。

1.3 稳定表达 rPC 融合蛋白的 HEK293 细胞系的建立

HEK293 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中。取生长状态良好的 HEK293 细胞, 以 5×10^5 个接种于 $\phi 35$ mm 培养皿中, 培养 16–18 h 用于转染。转染操作按照试剂说明进行: 取 1 μ g pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC 质粒稀释于 DMEM 培养液中, 终体积为 100 μ L, 加入 4.5 μ L Attractene 转染试剂, 轻轻混匀, 于室温静置 15 min 以形成转染复合物。吸去 $\phi 35$ mm 培养皿中培养液, 加入 1 mL 含 10% 胎牛血清的

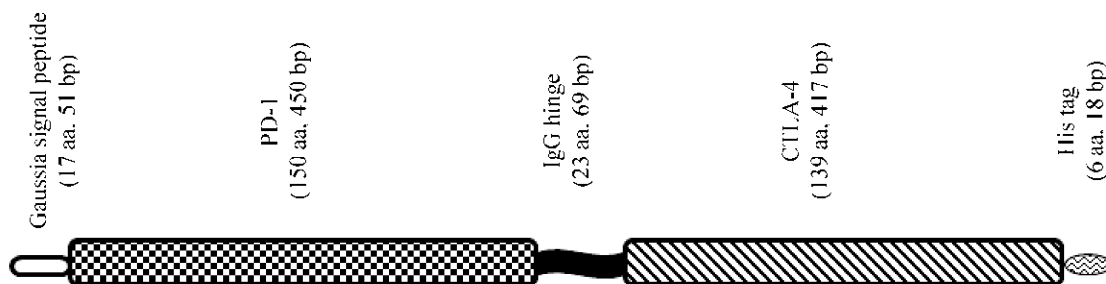


图 1 重组融合蛋白 rPC 设计示意图

Fig. 1 Illustration for the design of recombinant fusion protein rPC.

DMEM 培养液,将准备好的转染复合物均匀地滴加到培养皿中,轻轻混匀,培养 6 h 后加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 24 h。采用有限稀释法进行单克隆细胞培养:用胰酶消化细胞后计数,取适量细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液悬浮至 10 个细胞/mL,以每孔 100 μ L 加入到 96 孔细胞培养板中,培养 10–14 d 后在荧光显微镜下观察,对有绿色荧光的细胞孔再次做单克隆化培养,获得稳定表达绿色荧光蛋白的细胞克隆,扩增培养。

1.4 Western blotting 分析

收集能稳定表达绿色荧光的细胞克隆,以未转染的 HEK293 细胞作为对照,用三去污裂解液(0.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 mol/L NaCl, 0.2 g/L 叠氮钠, 1 g/L SDS, 100 mg/L 苯甲基黄酰氟, 1 mg/L 抑肽酶, 1 mL/L Nonidet P-40, 5 g/L 去氧胆酸钠)冰上裂解提取总蛋白,利用 BCA 蛋白定量试剂盒定量,取 10 μ g 总蛋白热变性后进行 10% SDS-PAGE 检测,20 mA 电泳 1.5 h,250 mA 转膜 2 h,转膜后的 PVDF 膜用 10% 脱脂奶粉室温封闭 30 min,用 HRP 标记的 anti-6 \times His tag 抗体以 1:3 000 的稀释浓度室温结合 1 h,用 TBST 缓冲液洗膜 3 次后,加入化学发光底物显带。内参检测使用有 HRP 标记的 GAPDH 抗体(1:5 000)室温结合 1 h,同样在 TBST 洗涤后,加入化学发光底物显带,鉴定 rPC 的表达并筛选出 rPC 表达量相对较高的稳定转染细胞克隆,并将此克隆命名为 HEK293/rPC。

1.5 rPC 融合蛋白的纯化

HEK293/rPC 细胞传代培养 16–18 h 后换液,将胎牛血清浓度由 10% 降至 2.5%,培养 72 h、收集培养上清。收集的培养上清经 3 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,收集上清,真空冷冻干燥,少量无菌水重新溶解后以 PBS 作为缓冲液进行透析(截留分子量 3 000 Da)后用于纯化。Ni-NTA 琼脂糖凝胶悬液用结合缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)平衡,

将透析后的浓缩培养上清加 NaCl 至 500 mmol/L,加咪唑至 10 mmol/L,调 pH 值至 8.0 后与已平衡的 Ni-NTA 琼脂糖凝胶混匀,于 4 $^{\circ}$ C 结合 16–18 h。2 000 r/min 离心 1 min,弃上清,依次以洗涤缓冲液 I(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)和洗涤缓冲液 II(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, pH 8.0)各洗 2 次,最后用洗脱液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱,得到纯化的蛋白溶液。使用 Merck Millipore 超滤离心管 Amicon[®] Ultra-4 (4 mL/10 kDa, UFC801096)去除咪唑,并利用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。纯化的 rPC 融合蛋白经 10% SDS-PAGE 检测,用考马斯亮蓝快速染色液染色,并用上述 Western blotting 方法鉴定。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测肿瘤细胞配体表达

将 NCI-H226、A549、Bcap-37、SGC7901、GCSR1-6 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,MCF-7、HepG2 培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中,待细胞生长汇合度达到 80%–90%,分别收集细胞,利用 Trizol 试剂提取各细胞总 RNA,使用美国 Denovix 公司的超微量核酸测定仪(DS-11)进行定量,各取 2 μ g RNA 进行逆转录,体系为:0.4 mmol/L oligo(dT) 18, 0.8 mmol/L dNTPs, 200 U M-MLV 逆转录酶, 25 U RNA 酶抑制剂, DEPC- H_2O , 总体积 25 μ L, 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h。取 2 μ L 上述逆转录反应产物进行实时荧光定量 PCR 反应,反应体系为:2 μ L cDNA, 400 nmol/L 各上下游引物, 10 μ L GoTaq qPCR Master Mix, 用 Nuclease-free water 补至总体积 20 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 扩增程序 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 45 s, 共 40 个循环。特异性上下游引物见表 1,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。对 PD-L1、PD-L2、CD80、CD86 进行实时荧光定量 PCR,以 GAPDH 为内参,根据各细胞的 PD-L1、PD-L2、

CD80、CD86 的 Ct 值,再以 $2^{-\Delta Ct}$ 作为各基因的相对表达量($\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}$),挑选表达量相对较高的肿瘤细胞,进行细胞免疫荧光染色检测。

1.7 重组融合蛋白 rPC 与肿瘤细胞的结合

取 6×10^4 个生长状态良好的细胞接种于 24 孔板中,培养 16–18 h。吸去培养液,以预冷的 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。用 4% 多聚甲醛固定 NCI-H226 细胞 20 min, PBS 清洗 3 次后,用 5% BSA 封闭 1 h 后,对照组加入 5% BSA,实验组加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用 5% BSA 稀释的 rPC 蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 结合过夜,以 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,加入 1:1 000 稀释的以 DyLight650 标记的 6xHis tag 抗体,室温避光结合 2 h,以 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,最后用 100 ng/mL 的 Hoechst33342 进行细胞核染色,染色后 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。倒置荧光显微镜下观察并拍照。以 PBS 代替 rPC 蛋白作为阴性对照。

1.8 重组融合蛋白 rPC 对 NCI-H226 细胞增殖的影响

取生长状态良好的 NCI-H226 细胞,胰酶消化并计数,以 8 000 个/孔细胞接种于 96 孔板中,培养 16–18 h,加入纯化的 rPC 蛋白至终浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 每个浓度 5 个复孔,继续培养 72 h,吸去上清液,

表 1 实时荧光定量 PCR 检测用引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time fluorescent quantitative PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
PD-L1-for	ATGCCTTGGTGTAGCACTGAC	21
PD-L1-rev	GCTGGATTACGTCTCCTCCAAATG	24
PD-L2-for	CTGTGTGTTCTGGAATACTCACGTG	25
PD-L2-rev	ATGTGAAGCAGCCAAGTTGGATG	23
CD80-for	ACTCGCATCTACTGGCAAAAAGGA	23
CD80-rev	ATGGGAGCAGGTTATCAGGAAAA	23
CD86-for	TGGTGTCTCTCTCTGAAGATTC	23
CD86-rev	ATCATTCCTGTGGGCTTTTTGTG	23
GAPDH-for	CTTAGCACCCCTGGCCAAG	19
GAPDH-rev	GATGTTCTGGAGAGCCCCG	19

加入 10 μL CCK-8,培养 2 h 后测 OD_{450} ,分析融合蛋白对细胞生长的影响。

2 结果与分析

2.1 pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC 表达载体的鉴定

将重组表达载体 pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC 用 *Not* I 酶切和 *Kpn* I 酶切两种酶切方法进行鉴定。如图 2 所示,用 *Not* I 酶切得到大小约为 1 030 bp 和 8 204 bp 两条带,表明 rPC 片段已经插入 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体中;用 *Kpn* I 酶切来确定片段插入的方向,正向插入可得到 1 281 bp、1 567 bp 和 6 386 bp 三个条带,表明目的基因片段 rPC 成功正向插入到 pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC 载体上。

2.2 稳定表达 rPC 蛋白的 HEK293/rPC 细胞系的建立及鉴定

提取转染 pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC 重组载体的 HEK293 细胞克隆和未转染的 HEK293 细胞总蛋白,利用 Western blotting 检测 rPC 表达水平,结果见图 3。由图中可以看出,所有细胞克隆均表达 rPC 蛋白,将表达较高的 H 克隆定为 HEK293/rPC,进行后续实验。图 4 为荧光显微镜下观察该细胞克隆中绿荧光蛋白的表达情况。

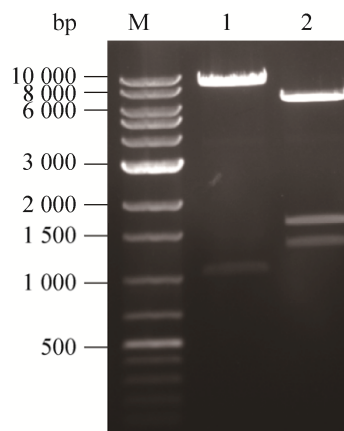


图 2 pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC 质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Characterization of plasmid pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC by restriction endonuclease digestion. M: 1 kb DNA ladder; 1: pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC digested by *Not* I; 2: pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC digested by *Kpn* I.

2.3 重组融合蛋白 rPC 的纯化及鉴定

HEK293/rPC H 克隆培养液上清中 rPC 蛋白经纯

化定量后,进行 10% SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝快速染色结果见图 5A。由图中可见,纯化前的

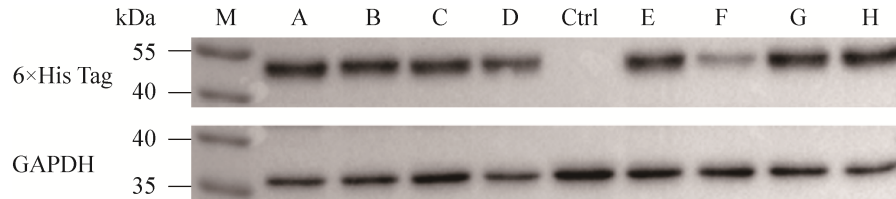


图 3 Western blotting 检测 rPC 的表达

Fig. 3 Detection of rPC expression by Western blotting. M: protein molecular weight standard; A-H: different clones of pLVX-IRES-ZsGreen1-rPC transfected HEK293 cells; Ctrl: non-transfected HEK293 as negative control.

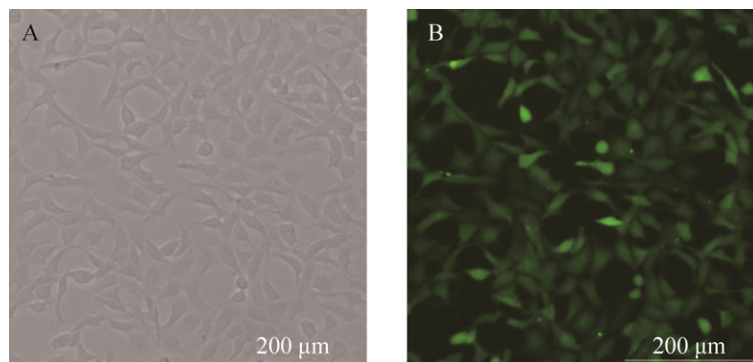


图 4 荧光显微镜下观察 HEK293/rPC 细胞中绿荧光蛋白的表达

Fig. 4 Expression of green fluorescent protein in HEK293/rPC cells observed under fluorescent microscope. (A) Bright-field observation. (B) Fluorescence observation.

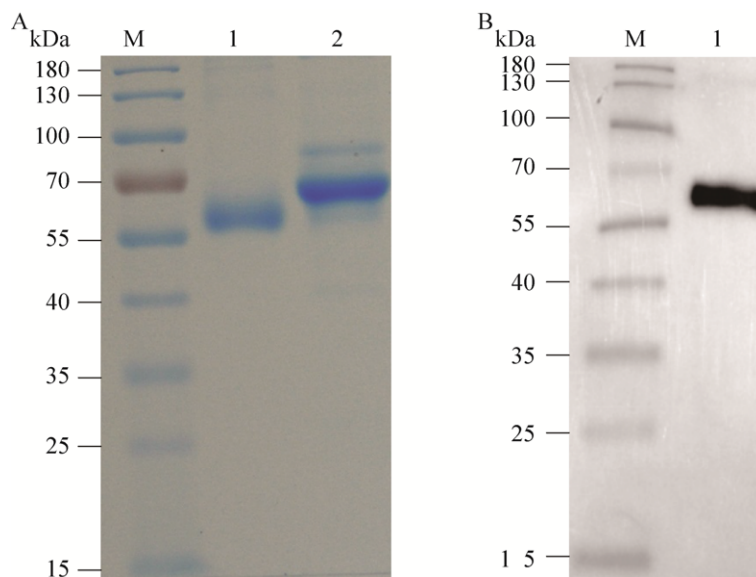


图 5 重组融合蛋白 rPC 的纯化与鉴定

Fig. 5 Purification and characterization of recombinant fusion protein rPC. (A) 10% SDS-PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue staining. M: protein molecular weight standard; 1: purified rPC; 2: crude sample. (B) Western blotting for rPC. M: protein molecular weight standard; 1: purified rPC.

培养液上清中的目的蛋白含量很少, 主要为培养液中的牛血清白蛋白之类的其他蛋白成分, 亲和纯化后的样品经考马斯亮蓝染色显示为单一条带。纯化后的样品经 Western blotting 鉴定也仅显示一条特异性条带, 表明纯化成功 (图 5B)。

2.4 rPC 与肿瘤细胞结合

为了验证上述重组融合蛋白 rPC 是否可以有效地与细胞表面的相应配体结合, 我们先对一些肿瘤细胞中的配体表达情况进行了检测。对 NCI-H226、A549、Bcap-37、MCF-7、HepG2、SGC7901、GCSR1-6 细胞提取总 RNA 后, 利用实时荧光定量 PCR 检测了 PD-1 配体 PD-L1 和 PD-L2、CTLA-4 的配体 CD80、CD86 以及内参 GAPDH 的表达。上述肿瘤细胞各种配体基因相对表达量见图 6, 其中 CD80 的表达在各细胞中基本上都较少, NCI-H226 细胞的 PD-L1、PD-L2、CD86 三个配体基因表达比其余肿瘤细胞的表达量均高一些, 因此我们选择了 NCI-H226 细胞, 利用细胞免疫荧光技术, 检测重组融合蛋白 rPC 与肿瘤细胞的结合能力。从图 7 的结果可以看出, 在相同曝光时间下, 对照组 NCI-H226 细胞没有

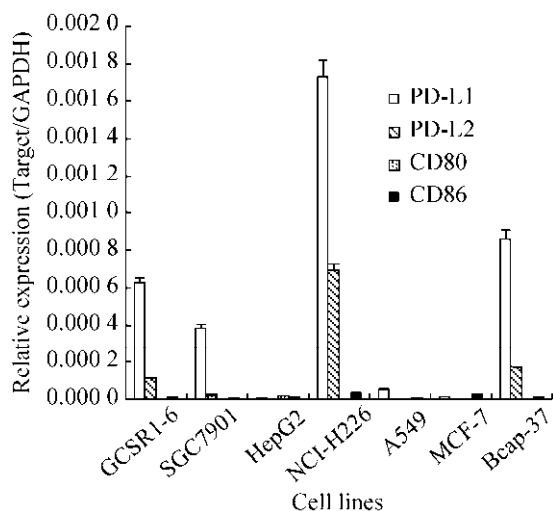


图 6 肿瘤细胞中 PD-L1、PD-L2、CD80 和 CD86 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of PD-L1, PD-L2, CD80 and CD86 in cancer cells.

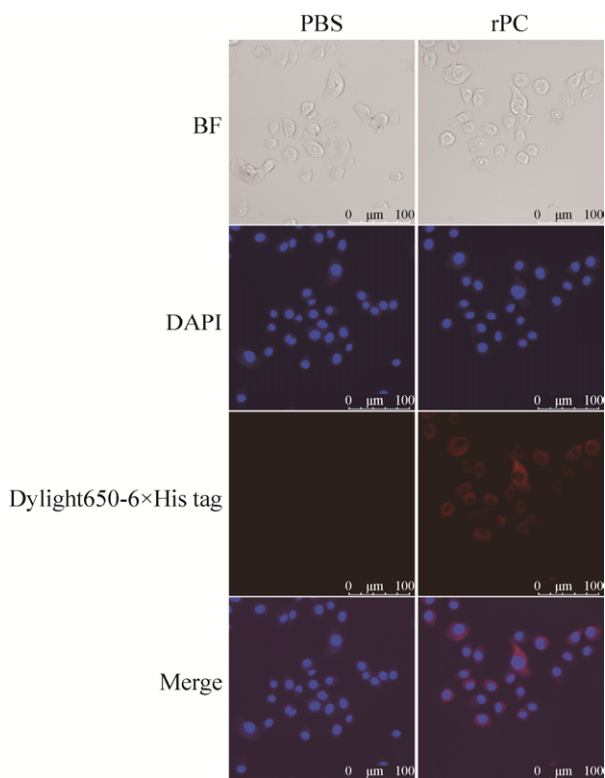


图 7 重组融合蛋白 rPC 与 NCI-H226 细胞的结合实验

Fig. 7 Binding assay of recombinant fusion protein rPC with NCI-H226 cells.

显示出荧光信号, 而以纯化的 rPC 结合的 NCI-H226 细胞可以在荧光显微镜下看到红色荧光, 说明 rPC 蛋白可以与 NCI-H226 细胞有效地特异性结合。

2.5 融合蛋白对肿瘤细胞增殖的影响

图 8 为 CCK-8 法检测不同浓度的重组融合蛋

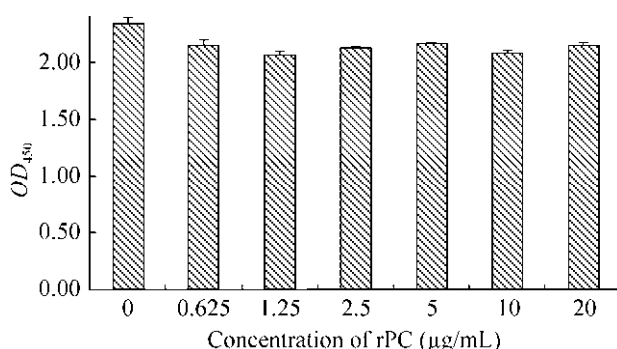


图 8 rPC 对 NCI-H226 细胞生长的影响

Fig. 8 Effect of rPC on the growth of NCI-H226 cells.

白 rPC 对 NCI-H226 细胞生长的影响。从图中可看出,重组蛋白 rPC 对 NCI-H226 生长没有明显的直接促进或抑制作用。

3 讨论

免疫逃避是导致肿瘤发生发展的一个重要原因,而免疫检查点的异常则是免疫逃避的机制之一。肿瘤细胞会通过 T 细胞 PD-1、CTLA4 等抑制性免疫检查点相关通路来逃避免疫系统,以抗体阻断这些通路可对恶性肿瘤起到治疗作用^[10-11]。目前针对免疫检查点 PD1/PD-L1 和 CTLA-4 的药物已用于临床^[12-15],但是也存在着应答率低和耐药的问题,而肿瘤组织中多个免疫检查点异常是导致这些问题的重要原因之一,采用多个单一靶点药物联合使用可以提高疗效^[4,16],而研发多靶点药物将能够同时封闭多个免疫检查点,更好地解除 T 细胞的抑制,发挥更强的抗肿瘤效应。已有报道显示一种重组 PD-1 蛋白具有很好的免疫调节作用^[17]。因此,本研究设计了重组融合蛋白 rPC,含有 PD-1 和 CTLA-4 两个检查点蛋白的胞外功能域,不仅能与 PD-1 的配体 PD-L1 和 PD-L2 结合,而且也能与 CTLA-4 的配体 B7-1 和 B7-2 结合,因此能够同时封闭并阻断肿瘤细胞表面和抗原递呈细胞表面的 PD-L1、PD-L2、B7-1 和 B7-2 等配体对 T 细胞表面的 PD-1 和 CTLA-4 的结合,发挥双靶点解除免疫抑制的作用,体现出比单一靶点药物更好的疗效。

由于哺乳动物细胞有能够使蛋白质正确折叠所必需的各种分子伴侣以及辅助因子和翻译后修饰,保证蛋白质的结构和功能,在表达外源蛋白时相对原核细胞有一定的优势,因此目前重组抗体药物均使用哺乳动物细胞表达系统进行生产。中国仓鼠卵巢(CHO)和人胚肾(HEK 293)细胞是常用于生产重组蛋白的哺乳动物细胞。HEK 293 细胞具有转染效率高、易于培养的特点^[18],因此我们在工作中选择了 HEK293 作为表达系统开展

研究。

我们在序列的设计方面,在起始密码子前加上 Kozak 序列有助于真核细胞中的翻译;在 N 端使用的 Gaussia 荧光素酶信号肽为相对效率较高的分泌型信号肽^[19-20];PD-1 和 CTLA-4 功能域之间采用天然的 IgG 重链的铰链区来连接,可以使得两个功能域更好地独立发挥作用而减少相互干扰;6×His 序列为相对较小的标签,对重组蛋白的功能影响不大,而且有助于检测和分离纯化。

在成功获得稳定表达重组融合蛋白 rPC 的细胞克隆后我们进行了 rPC 的分离纯化。由于 rPC 是分泌到培养液中的,因此我们在细胞培养中采用 2.5% 的低血清浓度,一方面可以使细胞生长不会因为生长过快频繁传代导致上清中的 rPC 积累过少,另一方面也可以尽量减少血清中各种蛋白浓度过高对后续纯化的干扰(从图 5A 可以看出,即使采用了低血清浓度培养,培养上清中主要的蛋白质还是高丰度的白蛋白)。根据一级结构计算得到的重组融合蛋白 rPC 的理论分子量应为 37.8 kDa,但我们在实验中发现 rPC 的表观分子量大于理论分子量,表明 rPC 重组融合蛋白可能在翻译后有一定的修饰,因为 PD-1 和 CTLA-4 两个功能域均为胞外段,可能发生不同程度的糖基化^[21]。

PD-1 的配体 PD-L1、PD-L2 可表达于肿瘤细胞,而 CTLA-4 的配体 CD80、CD86 较多表达在抗原递呈细胞,但肿瘤细胞也会有少量表达。为了验证 rPC 是否具有与相应配体结合的生物活性,我们挑选了 PD-L1 和 PD-L2 都有较高表达且 CD80 和 CD86 也有一定表达的人肺癌 NCI-H226 细胞进行了结合实验,结果表明我们得到的 rPC 纯化蛋白可以有效地与该细胞结合,具有生物活性。另外,我们还用细胞增殖实验排除了 rPC 对肿瘤细胞生长具有促进作用的风险。

为了实验方便本研究中我们采用的是 C 端 6×His Tag 标签,证明了由 PD-1 和 CTLA-4 相应

功能域拼合的重组融合蛋白 rPC 具有结合表达相应受体的肿瘤细胞的能力。后续工作我们将考虑改用人免疫球蛋白的 Fc 结构域, Fc 结构域的应用一方面能够使得融合蛋白在体内有较好的稳定性, 另一方面还可以研究由不同受体结合域组成的融合蛋白是否能和抗体一样发挥一定的抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 在对相应配体的靶点进行封闭的同时还可以对肿瘤细胞或抑制性 T 细胞进行杀伤 (除了封闭靶点作用, 临床上 CTLA-4 抗体的治疗作用更多的是以这一方式体现^[22-23])。

本研究已经成功得到一种新型重组融合蛋白 rPC 蛋白, 并证实其能与肿瘤细胞结合, 但不刺激肿瘤细胞生长, 为进一步研究该蛋白体内外各种功能以及作为一种新型蛋白药物研发打下了基础, 并将为今后利用重组融合受体靶向肿瘤免疫检查点这一思路进行肿瘤治疗的尝试提供经验。后续我们将采用各种方法和手段, 对 rPC 与相应配体分子 (PD-L1/PD-L2 和 C80/CD86) 的直接结合作用、rPC 对 T 细胞的体外杀伤肿瘤细胞的作用、体内抑瘤作用以及相应的机制进行验证和深入研究, 为今后尝试利用重组融合蛋白靶向多个肿瘤免疫检查点这一策略进行肿瘤治疗提供参考。

REFERENCES

- [1] Wu XM, Gu ZK, Chen Y, et al. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, 17: 661-674.
- [2] Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*, 2016, 39(1): 98-106.
- [3] Meng XJ, Liu YL, Zhang JJ, et al. PD-1/PD-L1 checkpoint blockades in non-small cell lung cancer: New development and challenges. *Cancer Lett*, 2017, 405: 29-37.
- [4] Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 255.
- [5] Das R, Verma R, Sznol M, et al. Combination therapy with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 leads to distinct immunologic changes *in vivo*. *J Immunol*, 2015, 194(3): 950-959.
- [6] Gu DQ, Ao X, Yang Y, et al. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J Immunother Cancer*, 2018, 6: 132.
- [7] Xiao H, Huang B, Yuan Y, et al. Soluble PD-1 facilitates 4-1BBL-triggered antitumor immunity against murine H22 hepatocarcinoma *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6): 1823-1830.
- [8] Ward FJ, Dahal LN, Khanolkar RC, et al. Targeting the alternatively spliced soluble isoform of CTLA-4: prospects for immunotherapy? *Immunotherapy*, 2014, 6(10): 1073-1084.
- [9] Xu X, Qian LJ, Su XY, et al. Establishment and characterization of GCSR1, a multi-drug resistant signet ring cell gastric cancer cell line. *Int J Oncol*, 2015, 46(6): 2479-2487.
- [10] Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, et al. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res*, 2013, 73(12): 3591-3603.
- [11] Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2015, 33(17): 1974-1982.
- [12] Balar AV, Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(5): 551-564.
- [13] Berger KN, Pu JJ. PD-1 pathway and its clinical application: A 20 year journey after discovery of the complete human *PD-1* gene. *Gene*, 2018, 638: 20-25.
- [14] Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, et al. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci*, 2017, 24: 26.

- [15] Grosso JF, Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun*, 2013, 13: 5.
- [16] Rotte A, Jin JY, Lemaire V. Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Ann Oncol*, 2018, 29(1): 71–83.
- [17] Lázár-Molnár E, Scanduzzi L, Basu I, et al. Structure-guided development of a high-affinity human Programmed Cell Death-1: Implications for tumor immunotherapy. *EBioMedicine*, 2017, 17: 30–44.
- [18] Nettleship JE, Watson PJ, Rahman-Huq N, et al. Transient expression in HEK 293 cells: an alternative to *E. coli* for the production of secreted and intracellular mammalian proteins//García-Fruitós E, ed. *Insoluble Proteins*. New York, NY: Humana Press, 2015, 1258: 209–222.
- [19] Beate S, Lene C, Christiane T, et al. Improving mammalian cell factories: The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells. *Trends Cell Mol Biol*, 2007, 2: 1–17.
- [20] Xu DS, Chen Y, Jin J. Effect of signal peptide on the expression and secretion of hepatocyte growth factor in CHO. *Chin J Cell Biol*, 2016, 38(12): 1473–1479 (in Chinese).
徐栋生, 陈蕴, 金坚. 信号肽对肝细胞生长因子 HGF 在 CHO 中表达及分泌的影响. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(12): 1473–1479.
- [21] Böhm E, Seyfried BK, Dockal M, et al. Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 87.
- [22] Ingram JR, Blomberg OS, Rashidian M, et al. Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(15): 3912–3917.
- [23] Vargas FA, Furness AJS, Litchfield K, et al. Fc effector function contributes to the activity of human anti-CTLA-4 antibodies. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 649–663.e4.

(本文责编 陈宏宇)