

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.22.013

跨膜型 TNF- α 单克隆抗体腺病毒表达载体的构建和鉴定

龚 泉¹ 王存德¹ 周晓曦² 黄 亮² 周剑峰² 曹 阳^{2Δ}

(1 云南省肿瘤医院 昆明医科大学第三附属医院姑息医学科 云南 昆明 650118;

2 华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科 湖北 武汉 430032)

摘要 目的:应用 AdEasy-1 系统构建包含 tmTNF- α 单克隆抗体轻、重链序列的重组腺病毒表达载体。**方法:**首先 PCR 合成抗体轻、重链序列,分别将轻、重链序列插入经过改造的含有双启动子的穿梭质粒 pShuttle-2CMV,将穿梭载体电转化转化 AdEasy 系统 BJ5183 感受态,挑取单克隆扩增质粒后酶切鉴定。**结果:**成功构建重组腺病毒表达载体 pAdEasy-tmTNF- α , 抗体重链、轻链序列酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳证实条带片段大小正确,电转化 BJ5183 后挑选重组克隆提取质粒, *PacI* 酶切后重组片段位于 4.5 kb 及 3 kb 位置,证明重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-tmTNF- α 构建成功。**结论:**将腺病毒系统与单克隆抗体技术相结合,利用 AdEasy-1 系统成功构建腺病毒重组 tmTNF- α 单克隆抗体表达载体,为进一步开展肿瘤基因治疗的研究提供基础。

关键词:重组腺病毒;单克隆抗体;跨膜型 TNF- α ;恶性肿瘤

中图分类号:Q75;Q78;R730.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)22-4256-04

Construction and Identification of an Adenovirus-Mediated Recombinant Monoclonal Antibody Against Transmembrane TNF- α

GONG Quan¹, WANG Cun-de¹, ZHOU Xiao-xi², HUANG Liang², ZHOU Jian-feng², CAO Yang^{2Δ}

(1 Department of Palliative Medicine, Yunnan Tumor Hospital, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, 650118, China; 2 Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430032, China)

ABSTRACT Objective: To construct a recombinant adenovirus vector which contains the sequences of light and heavy chain of tmTNF- α antibody through AdEasy system. **Methods:** The heavy and light chain sequences of the antibody were firstly amplified by PCR, and these segments were respectively cloned into a reconstructed pShuttle vector that contains 2CMV. The vector was electrotransformed within the AdEasy expression competent cell BJ5183. Monoclones were picked and then recombinant plasmid was purified and identified. **Results:** The recombinant adenovirus pAdEasy-tmTNF- α was successfully constructed and confirmed by 1% agarose gel electrophoresis. The recombinant adenovirus plasmid pAdEasy-tmTNF- α , which electrotransformed into BJ5183 was also examined by enzyme digestion. **Conclusion:** Recombinant adenovirus tmTNF- α monoclonal antibody expression vector was successfully constructed through AdEasy-1 system by means of the integration of adenovirus system and monoclonal antibody technology, which may provide the basis for further research of gene therapy of tumor.

Key words: Recombinant adenovirus; Monoclonal antibody; Transmembrane TNF- α ; Tumor

Chinese Library Classification (CLC): Q75; Q78; R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)22-4256-04

前言

肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种具有多种生物学活性和功能的细胞因子,在体内主要以两种形式存在:分子量为 26 kD 的跨膜型(transmembrane TNF- α , tmTNF- α)和分子量为 17 kD 的分泌型(secreted TNF- α , sTNF- α)^[1], tmTNF- α 是一种跨膜蛋白,在 TNF- α 转换酶(TNF- α converting enzyme, TACE) 的作用下,其胞外段被切割而产生 sTNF- α ^[2]。

tmTNF- α 与 sTNF- α 的生物学作用不尽相同,sTNF- α 多引起靶细胞坏死^[3],而 tmTNF- α 主要诱导靶细胞凋亡^[4]。在对肿瘤细胞的杀伤作用方面,tmTNF- α 的抗癌谱较 sTNF- α 更广^[5],在动物实验中,tmTNF- α 在体内可直接杀伤肿瘤细胞,同时还可促使肿瘤细胞高表达 Fas 基因,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[6,7]。

TNF- α 可通过多种机制发挥抗肿瘤作用^[8,9],但在某些情况下也可能促进肿瘤生长^[10],甚至对肿瘤细胞产生保护作用^[11,12],对抗体内 TNF- α 可诱导慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞凋亡^[13]。还有学者证实,急性白血病(AL)通过化疗达到完全缓解的患者体内 TNF- α 水平显著降低^[14]。肿瘤细胞自身表达的 TNF- α 可以通过激活 NF- κ B 来抑制肿瘤细胞凋亡^[15]。

通过靶向对抗或抑制 TNF- α 可能有利于一些疾病的治疗及预后,寻找高效、特异性的拮抗药物靶向对抗 TNF- α 的某些

作者简介:龚泉(1984-),男,住院医师,主要研究方向:恶性肿瘤的综合治疗

Δ通讯作者:曹阳,电话:0871-68185656-2044,

E-mail: caoyangemma@163.com

(收稿日期:2013-12-26 接受日期:2014-01-23)

生物学活性,是许多肿瘤治疗和改善预后的重要策略^[6],具有中和活性的单克隆抗体因高效、特异、精确、低毒等优势成为研究者关注的焦点^[7]。传统的抗体制备技术繁琐,抗体制备工艺复杂、成本高昂,限制了其临床应用,将腺病毒系统与单克隆抗体技术相结合,通过重组腺病毒系统能够高效制备单克隆抗体^[8]。本研究首先构建 tmTNF- α 抗体的腺病毒表达载体,有望以该载体为基础,高效制备高度选择性的单克隆抗体,在 tmTNF- α 阳性肿瘤细胞的靶向治疗中发挥重大作用。

1 材料与方法

1.1 序列、菌株和质粒

tmTNF- α 单克隆抗体轻链(Light Chain,以“L”表示)、重链(Heavy Chain,以“H”表示)序列由华中科技大学同济医学院免疫学系提供,DH5 α 感受态为天根公司产品,BJ5183 感受态、穿梭质粒 pShuttle-CMV、pAdTrack-CMV 及腺病毒基因组骨架质粒 pAdEasy-1 均由华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤生物医学中心保存。

1.2 试剂

PCR 引物由美国 Invitrogen 公司合成,EcoRV、NheI、MluI、NotI、BamHI、SalI、XhoI、PacI、PmeI 等限制性内切酶购自日本 TAKARA 公司,T4 DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒为美国 Fermentas 公司产品,质粒提取试剂盒为中国博大泰克公司产品。

1.3 方法

1.3.1 质粒的构建及鉴定

1) 扩增抗 tmTNF- α 抗体轻链、重链片段

分别用 PCR 扩增并纯化轻链、重链序列,扩增引物序列如下:

轻链:5'-GCTAGCTAGCTAGCATGCAGACAGTCA-CACTTCGAT

NheI

3'-GCCGACGCGTCTGTTATAATTCTACCGTTCGACG CT

MluI

重链:5'-GGCCTAGTCGACCTAGCATGGATCAGCTGTGGTCA

SalI

3'-GGCGTGC GGCCGACGCTAGAGCAGACTCACCTGC

NotI

2) 改造 pShuttle-CMV 质粒多克隆位点

① 人工合成一段长度 20 bp 左右的多克隆位点片段,此片段包含以下多克隆位点:-XhoI-NheI-Bsu36I-MluI-EcoRV-,片段序列为:5'-ctcgaggctagctagcctnaggcgacgcgtgatc-3',将人工合成的片段退火、解链,得到两端为 XhoI 和 EcoRV 酶切位点的单链 DNA 用于后续连接反应。

② 将 pShuttle-CMV 以 XhoI 和 EcoRV 双酶切并纯化。

③ 将退火处理后的人工合成序列与双酶切后的 pShuttle-CMV 连接,使 pShuttle-CMV 的多克隆位点变为:-CMV-BglII-KpnI-SalI-NotI-XhoI-NheI-Bsu36I-MluI-EcoRV-。

④ 将连接产物转化 DH5 α 感受态,挑取单克隆,提取质粒。

3) 改造 pAdtrack-CMV 质粒多克隆位点

① 将 pAdtrack-CMV 以 XhoI 和 NheI 双酶切并纯化,得到以下片段:-XhoI-HindIII-EcoRV-polyA-CMV-NheI-。

② 将改造后的 pShuttle-CMV 同样以 XhoI 和 NheI 双酶切并纯化。

将上述两步的酶切纯化片段连接,pShuttle-CMV 的多克隆位点变为:-CMV-BglII-KpnI-SalI-NotI-XhoI-HindIII-EcoRV-polyA-CMV-NheI-Bsu36I-MluI-EcoRV-polyA,即构建双启动子的穿梭载体 pShuttle-2CMV。

4) 插入轻链和重链序列

① 轻链序列含有的酶切位点为:-NheI-L-MluI-,用 NheI 和 MluI 双酶切轻链 PCR 产物和 pShuttle-2CMV。

② 将上述 1) 步骤的酶切产物纯化后连接,连接产物转化 DH5 α ,挑取单克隆,提取质粒,得到 pShuttle-2CMV-L。

③ NheI 和 MluI 双酶切鉴定轻链序列插入 pShuttle-2CMV。

④ 重链序列含有的酶切位点为:-SalI-H-NotI-,用 SalI 和 NotI 双酶切重链 PCR 产物和 pShuttle-2CMV-L。

⑤ 将上述 4) 步骤的酶切产物纯化后连接,连接产物转化 DH5 α ,挑取单克隆,提取质粒,得到 pShuttle-2CMV-H-L。

⑥ SalI 和 NotI 双酶切鉴定重链序列插入 pShuttle-2CMV-L。

经过上述改造,使最终得到的 pShuttle-2CMV-H-L 的多克隆位点为:-CMV-BglII-KpnI-SalI-H-NotI-XhoI-HindIII-EcoRV-polyA-CMV-NheI-L-MluI-EcoRV-polyA。

1.3.2 重组腺病毒表达载体的构建和鉴定

1) 将重组质粒 pShuttle-2CMV-H-L 以 PacI 酶切线性化。

2) 将上一步中酶切后的质粒行琼脂糖凝胶电泳,位置正确则纯化酶切产物,并测量质粒浓度,取 0.1 μ g 酶切产物与 0.1 μ g pAdEasy-1 质粒混匀,加入 BJ5183 感受态中混合后,选择适当程序进行电转化,挑选克隆,依据琼脂糖凝胶电泳结果选择合适大小重组腺病毒质粒 pAdEasy-H-L,PCR 及 PacI 酶切鉴定正确后提取质粒,测定浓度备用。

3) 将上述电转化 BJ5183 的 LB 平皿经 37 $^{\circ}$ C 下 12-16 h 培养,平皿上长出密布的针尖大小克隆,用无菌牙签或枪头小心挑取单克隆,置于 3-5 mL 相同抗性 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 恒温摇床内振荡 12-14 h,小提重组质粒,琼脂糖凝胶电泳挑选位置正确的克隆,得到正确位置的重组克隆质粒用 PacI 酶切鉴定,观察切下的重组片段是否位于 4.5 kb 或 3 kb 位置,以证实重组克隆的正确性^[9]。

1.4 统计学处理

数据以(均数 $\pm$ 标准差)表示,采用 SPSS 13.0 统计学软件包进行分析,2 检验进行率的比较,组间差异用 t 检验进行比较,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组穿梭质粒载体 pShuttle-2CMV 的鉴定

如图 1 所示,泳道 2#-4# 中 pAdtrack-CMV、pShut-

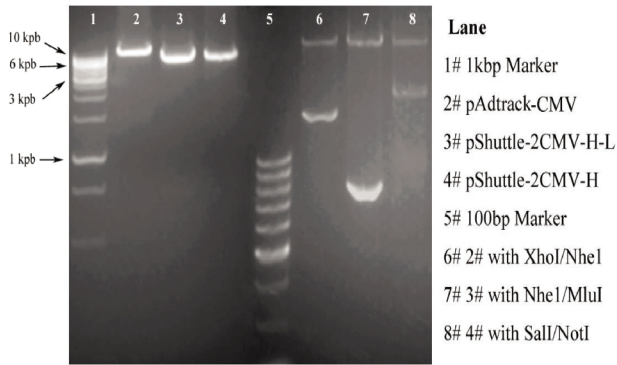


图1 重组穿梭质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant shuttle plasmid pShuttle-2CMV

tle-2CMV-H-L, pShuttle-2CMV-H 质粒位置正确,条带清楚;而泳道 6#-7# 分别为双酶切鉴定上述质粒的电泳图,6# 切下片段为含有一个 CMV 的序列,7# 切下条带为轻链序列,8# 切下条带为重链序列,上述切下条带位置正确、条带清晰,证明重组腺病毒穿梭质粒 pShuttle-2CMV 构建成功,轻链、重链序列成功插入穿梭质粒。

2.2 重组腺病毒质粒的鉴定

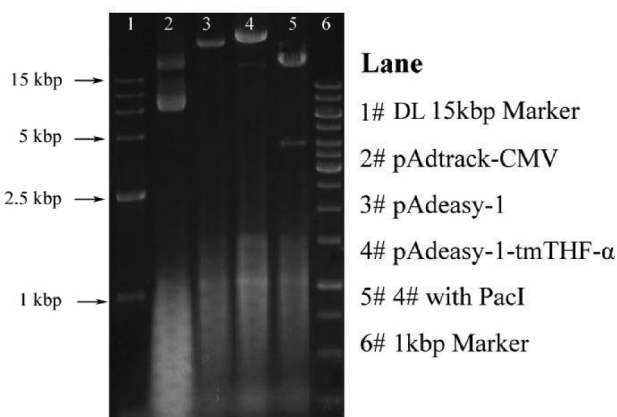


图2 重组腺病毒质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant adenovirus plasmid

如图2所示,泳道 3#-5# 分别为腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1、重组腺病毒质粒 pAdeasy-1-tmTNF-α、以及 pAdeasy-1-tmTNF-α 用 PacI 酶切鉴定的电泳条带,各条带位置正确、条带清晰,酶切鉴定证明重组腺病毒质粒 pAdeasy-1-tmTNF-α 构建成功。

3 讨论

基因治疗是一种新的肿瘤治疗手段,可利用基因工程技术将一段有一定功能的外源性基因整合或通过载体运送到体内,通过靶向抗原、化疗药增敏等机制使肿瘤细胞生长受抑或被直接杀伤,随着分子克隆技术的进步及人们对肿瘤病因、免疫、药理及分子机制等研究的不断深入,肿瘤的基因靶向治疗已成为提高疗效、减少毒副作用的重要方法。腺病毒系统具有宿主范围广、感染效率高、可容纳外源基因插入片段大、病毒制备相对

容易、腺病毒本身很少和被感染细胞发生基因整合等特点,逐渐成为肿瘤基因治疗中应用最广泛的载体之一。

目前针对 TNF-α 的抗体制剂(如 Infliximab 等)大多只能靶向 sTNF-α,利用抗体中和血清中的 sTNF-α,在临床应用中常需要输注大量抗体才能起到一定治疗作用。对于因 tmTNF-α 致病的疾病则没有明显效果,抗体在中和 sTNF-α 后,tmTNF-α 往往还在发挥其重要的致病作用,使病情得不到良好控制^[9]。这些现象造成了诸多弊端,比较突出的有以下两点:(1)在 tmTNF-α 相关疾病尤其是肿瘤性疾病中,大量输注抗体制剂难以控制病情,将造成抗体治疗费用昂贵以及抗体制剂的浪费;(2)机体中 sTNF-α 担负着许多重要功能,是机体免疫防御的重要介质,正常水平的 sTNF-α 可以参与调解免疫应答、抗感染、诱导肿瘤细胞凋亡、促进组织创伤修复等。FDA 报道:利用现有抗体使 sTNF-α 被大量中和后有可能使机体免疫系统失衡,从而引发一系列不良反应,严重的甚至可能导致二次肿瘤的发生。提高 TNF-α 抗体制剂的选择性是一个至关重要的问题,一方面能够通过靶向致病的 TNF-α 分子以抑制其肿瘤致病作用的某些功能,另一方面保留 TNF-α 所具有的某些对机体有益的作用,可能成为 TNF-α 靶向治疗的方向。

华中科技大学同济医学院免疫学系通过长期研究,设计出一段 tmTNF-α 抗原肽,通过此抗原肽免疫动物获得了一株人/鼠嵌合型抗 tmTNF-α 单克隆抗体 C1,通过计算机抗体分子空间构象模拟及测序技术成功获取了该单克隆抗体的轻链、重链序列,该单克隆抗体能通过特异性识别 tmTNF-α 分子上 TACE 酶切位点结合 tmTNF-α,与 sTNF-α 则没有亲和力。此抗体具有独特的优点:能选择性的结合 tmTNF-α,而不与 sTNF-α 结合,通过抗体分子的空间位阻效应阻止 TACE 的酶切作用,减少 sTNF-α 的分泌量,同时并不封闭 tmTNF-α 的功能结构域,与 tmTNF-α 结合的亲和力极高,在针对 tmTNF-α 阳性肿瘤细胞的靶向治疗中无疑将发挥重大的作用。这一嵌合型单克隆抗体的成功制备使得前文所述的两大弊端得到很好的解决。

在上述发现的基础上,我们首先得到了抗 tmTNF-α 单克隆抗体轻链、重链的完整序列及模板,通过 PCR 扩增得到抗体轻链和重链片段,并成功构建含双启动子的穿梭质粒 pShuttle-2CMV,使抗体轻链、重链在载体内共表达。此后我们通过限制性内切酶酶切反应的载体和重链、轻链片段依次进行连接,成功得到载有抗体轻、重链序列的穿梭质粒 pShuttle-2CMV-H-L,酶切鉴定证实轻链和重链片段成功插入穿梭质粒。随后通过质粒间同源重组得到重组腺病毒表达载体 pAdEasy-1-tmTNF-α,酶切鉴定证实重组成功。

单克隆抗体通过多种机制杀伤肿瘤细胞,包括诱导凋亡、抑制增殖、发挥补体介导的细胞毒效应(CDC)、介导抗体依赖细胞介导的细胞毒效应(ADCC)等^[20],此外还可通过放疗、化疗增敏等来达到肿瘤治疗作用。tmTNF-α 单克隆抗体靶向治疗恶性肿瘤是一项具有显著应用意义的研究,需要进一步深入探索。上述抗 tmTNF-α 单克隆抗体腺病毒表达载体的成功构建,是抗 tmTNF-α 抗体靶向治疗走出的第一步。今后我们将在以下

几个方面进一步开展研究:1、通过 AdEasy-1 系统包装、扩增、纯化产生含有单克隆抗体的腺病毒;2、通过 ELISA、Western Blotting 鉴定抗体与抗原的特异性结合能力;3、观察该抗体在体外能否杀伤肿瘤细胞及其机制;4、研究该抗体对于肿瘤细胞信号传导通路的影响及其机制;5、通过构建动物荷瘤模型,进行初步体内实验,观察靶向治疗效果。

参考文献(References)

- [1] Freeman SD, Kelm S, Barber EK, et al. Characterization of CD33-a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules[J]. *Blood*, 1995, 85(8): 2005-2012
- [2] Ulyanova T, Blasioli J, Woodford-Thomas TA, et al. The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(11): 3440-3449
- [3] Vitale C, Romagnani C, Falco M, et al. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1999, 96(6): 15091-15096
- [4] Tsubokawa M, Tohyama Y, Tohyama K, et al. Interleukin-3 activates Syk in human myeloblastic leukemia cell line, AML-193 [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 249(3): 792-796
- [5] Hamawy MM, Fischler C, Zhang J, et al. Fc epsilon RI aggregation induces tyrosine phosphorylation of a novel 72 kDa protein downstream of Syk [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 239(3): 670-675
- [6] Hahn CK, Berchuck JE, Ross KN, et al. Proteomic and genetic approaches identify Syk as an AML target [J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(4): 281-294
- [7] Wu C, Sun M, Liu L, et al. The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer[J]. *Gene*, 2003, 3(6): 1-12
- [8] Taylor VC, Buckley CD, Douglas M, et al. The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2 [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 11505-11512
- [9] Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, et al. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals[J]. *Cell*, 1995, 80(5): 729-738
- [10] Yi T, Mui L, Krystal G, et al. Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(12): 7577-7586
- [11] Piccaluga PP, Martinelli G, Rondoni M, et al. First experience with gemtuzumab ozogamicin plus cytarabine as continuous infusion for elderly myeloid leukaemia patients [J]. *Leuk Res*, 2004, 28(9): 987-990
- [12] Balaian L, Ball ED. Anti-CD33 monoclonal antibodies enhance the cytotoxic effects of cytosine-rabinoside and idarubicin on acute myeloid leukemia cells through similarities in their signaling pathways[J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(2): 199-211
- [13] Kell WJ, Burnett K, Chopra R, et al. A feasibility study of simultaneous administration of gemtuzumab ozogamicin with intensive chemotherapy in induction and consolidation in younger patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2003, 102(3): 4277-4283
- [14] Nand S, Godwin J, Smith S, et al. Hydroxyurea, azacitidine and gemtuzumab ozogamicin therapy in patients with previously untreated non-M3-acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes in the elderly: results from a pilot trial [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(11): 2141-2147
- [15] Ball ED, Medeiros BC, Balaian L, et al. A phase I/II trial of 5-azacytidine prior to gemtuzumab ozogamicin for patients with relapsed acute myeloid leukemia with correlative biomarker studies [J]. *Blood*, 2009, 114: 2049a
- [16] Jawad M, Seedhouse C, Mony U, et al. An analysis of factors that affect in vitro chemosensitivity of leukaemic stem and progenitor cells to gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in acute myeloid leukaemia[J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 74-80
- [17] Lima M, Champlin RE, Thall PF, et al. Phase I/II study of gemtuzumab ozogamicin added to fludarabine, melphalan and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for high-risk CD33 positive myeloid leukemias and myelodysplastic syndrome [J]. *Leukemia*, 2008, 22(2): 258-264
- [18] ED Ball, H.E. Broome. Monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy [J]. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2010, 23(3): 403-416
- [19] Nand S, Godwin J, Smith S, et al. Hydroxyurea, azacitidine and gemtuzumab ozogamicin therapy in patients with previously untreated non-M3-acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes in the elderly: results from a pilot trial [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(11): 2141-2147
- [20] Jawad M, Seedhouse C, Mony U, et al. An analysis of factors that affect in vitro chemosensitivity of leukaemic stem and progenitor cells to gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in acute myeloid leukaemia[J]. *Leukemia*, 2010, 24(1): 74-80