

• 论 著 •

Trop2 病毒样颗粒的制备及纯化研究^{*}

王 琳, 王 希, 董 轲, 张惠中[△]

(第四军医大学唐都医院临床实验与检验科, 陕西西安 710038)

摘 要:目的 获得 Trop2 为靶点的病毒样颗粒(VLPs), 为进一步体内诱导实验和疫苗研究提供依据。方法 利用分子克隆技术构建 Trop2 真核表达载体 pCAGGs/Trop2 和杆状病毒表达载体 pFastbac1/Trop2, 以 pCAGGs/Trop2 表达载体转化 HeLa 细胞, 用免疫细胞化学方法确定 Trop2 蛋白表达并锚定于胞膜上; 以 pFastbac1/Trop2 转化大肠杆菌 E. coli DH10bac 菌株获得重组杆粒 Trop2 Bacmid, 转染 Tn5 昆虫细胞获得重组病毒 Trop2 rBV, 与室保存的 Gag rBV 共感染昆虫细胞得到重组 VLPs, 透析浓缩后经蔗糖密度梯度离心纯化、蛋白免疫印迹(WB)鉴定, 电镜观察病毒形态。结果 构建成功的重组杆粒 Trop2 Bacmid 转染 Tn5 昆虫细胞获得重组病毒 Trop2 rBV, 与 Gag rBV 共感染昆虫细胞获得重组 Trop2 VLPs。结论 成功制备了 Trop2 VLPs, 为其后续诱导体液和细胞免疫应答研究奠定了基础。

关键词: Trop2; 肿瘤疫苗; 病毒样颗粒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)08-1020-04

Expression and purification of Trop2 virus like particles^{*}

Wang Lin, Wang Xi, Dong Ke, Zhang Huizhong[△]

(Department of Clinical Research and Diagnosis, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

Abstract: Objective To gain the virus like particles (VLPs) based on Trop2 targets, which provided the basis for further in vivo induced experiments and anti-tumor vaccine studies. **Methods** Using molecular cloning method to construct eukaryotic expression vector of pCAGGs/Trop2 and baculovirus expression vector of pFastbac1/Trop2, expression product of pCAGGs/Trop2 in HeLa cells were intended to be anchored to the cell membrane by the methods of Immunohistochemistry; pFastbac1/Trop2 were transformed into E. coli DH10bac isolates to gain recombinant bacmids, which were transfected into insect cells to express recombinant baculovirus with Gag rBV, then sucrose density gradient centrifugation, Western Blot and electron microscope were performed to purify and identify the Trop2 VLPs. **Results** Building recombinant bacmids which were transfected into insect cells to express recombinant baculovirus with Gag rBV, gained the recombinant Virus like Particles. **Conclusion** Trop2 VLPs was successfully prepared, which laid the foundation for the subsequent induction of humoral and cellular immune response.

Key words: Trop2; tumor vaccine; virus like particles

随着分子生物学、细胞生物学和免疫学等研究的进展, 肿瘤疫苗逐渐成为肿瘤免疫治疗的热点, 但目前研发的临床实验肿瘤疫苗很难获得满意疗效, 新型更有效的肿瘤疫苗制备策略亟待发掘^[1]。病毒样颗粒(VLPs)是由病毒单一或多个结构蛋白自行装配形成, 能够模拟天然病毒衣壳空间结构^[2], 因 VLPs 不含病毒的核酸成分而无复制和感染能力, 但具有天然病毒的类似嗜性, 能被多种免疫细胞摄取并在细胞内运输, 从而通过主要组织相容性复合体(MHC I)类途径呈递, 激发全面免疫反应, 这些独特的性质使 VLPs 在疫苗研究中备受关注, 为新型疫苗的研发提供了新平台; 膜表面糖蛋白 Trop2 高表达于多种上皮来源的恶性肿瘤^[3], 并与肺癌恶性程度密切相关^[4], 其表达产物定位于细胞膜表面, 使其成为抗体和 ADCC 的理想作用靶点^[5]; VLPs 自我装配过程中, 外源蛋白与壳蛋白 Gag 之间会有相互作用关系, 外源蛋白之间的相互作用也会影响 VLPs 组装效率及蛋白呈现特性^[6-8]。本课题拟结合 SIV-Gag 病毒制备特点制备以 Trop2 为靶点的 VLPs, 为后续

体内免疫应答实验及有效的新型肿瘤疫苗研究提供依据, 为高表达 Trop2 的恶性肿瘤如肺癌、宫颈癌、胃癌及胰腺癌疫苗研制与应用提供新思路 and 借鉴依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株及质粒 大肠杆菌 E. coli JM109、E. coli DH5a、E. coli DH10bac、人宫颈癌细胞株 HeLa 和昆虫细胞 Tn5, 杆状病毒表达载体 pFastBac1、真核表达载体 pCAGGs 均为本实验室保存, SIV-Gag 杆状病毒(rBV-Gag)为美国 Emory 大学 Ling Ye 教授惠赠。

1.1.2 主要试剂与仪器 Cellfectin II Reagent、Sf-900 II SFM、Unsupplemented Grace's Insect Medium、Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; QSM-O3SP/50 蛋白质浓缩仪购自美国通用; Hitachi-H7500 透射电镜由唐都医院电镜中心提供; 分子克隆载体及相关辅助试剂、各种酶、抗菌药物、IPTG、X-gal 均购自于 TaKaRa 公司; 引物由北京奥科鼎盛生

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金(81201775、81527974); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2013JZ010)。 作者简介: 王琳, 女, 检验技师, 主要从事医学分子生物学方面的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: huizz328@163.com。

物科技公司合成。

1.2 方法

1.2.1 Trop2 基因扩增 根据 Gene Bank Trop2 序列设计引物,分别从不同新生鼠组织用 Trizol 法提取相应 RNA,RT-PCR 扩增出 Trop2 基因序列、回收 PCR 产物,按照克隆载体 pMDTM18-Vector 说明书进行连接反应,连接产物转化 E. coli JM109 感受态,涂布 LB/Amp 培养平板,37℃过夜培养,随机挑取单菌落增菌并提取质粒 DNA,酶切鉴定正确后送测序,得到含有目的基因的 T 克隆载体 Tv/Trop2。

1.2.2 Trop2 真核表达载体的构建 用 EcoR I /Xho I 双酶切测序成功的 Tv/Trop2 和真核表达载体 pCAGGs,PCR 回收目的片段连接到 pCAGGs 上,转化 E. coli JM109 感受态细胞,提取质粒双酶切及测序鉴定成功,构建真核表达载体并命名为 pC/Trop2。

1.2.3 Trop2 包膜定位表达确认 真核表达载体 pC/Trop2 参照脂质体 Lipofectamine2000 说明书转染 HeLa 细胞,分别设立空白对照组、阴性对照组。转染 24 h 后 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,收集标本,常规方法进行 Western Blot 检测 Trop2 蛋白表达;同时,HeLa 细胞爬片、脂质体法转染后 24 h,取出爬片进行细胞免疫化学染色,检测 Trop2 蛋白在细胞水平的表达情况。

1.2.4 Trop2 杆状病毒表达载体的构建 用 EcoR I /Xho I 双酶切质粒 Tv/Trop2 和 pFastBac1 杆状病毒表达载体,回收后用 T4 连接酶连接目的片段与载体,连接产物转化 E. coli DH5a 感受态细胞,涂布 LB/Amp 培养平板,37℃过夜培养;随机挑取单菌落增菌并提取质粒 DNA,双酶切及测序鉴定正确后,得到杆状病毒表达载体命名为 pF/Trop2。

1.2.5 pF/Trop2 转染与 Bacmid 鉴定 将 1 μL pF/Trop2 杆状病毒表达载体转染 100 μL E. coli DH10bac 感受态细胞,冰浴 30 min,42℃热激 45 s,加入 900 μL LB 培养基、37℃、180 r/min 培养 4 h,筛选培养板(含 100 μg/mL X-gal、40 μg/mL IPTG、50 μg/mL 卡那霉素、10 μg/mL 四环素、7 μg/mL 庆大霉素)37℃培养 48 h,蓝白筛选阳性克隆,参照 S. N. A. P Midiprep Kit 说明书分离重组杆粒 DNA(Bacmid),用 pUC/M13 鉴定引物进行 PCR 鉴定,并命名为 Trop2 Bacmid。

1.2.6 Bacmid 转染 TN5 昆虫细胞制备 Rbv 1 μL Trop2-bacmid 与 10 μL 转染试剂混合,依据 Cellfectin II Reagent 说明书操作转染 TN5 昆虫细胞,27℃培养 6 h,更换 Sf-900 II SFM 继续培养,至转染细胞出现病变现象表明杆粒转染成功,收集上清液获得第一代病毒 P1,传代扩增病毒进行滴度测定,至滴度达到($5 \times 10^7 \sim 10^8$) pfu/mL,收集病毒命名为 Trop2 rBV。

1.2.7 Trop2 VLPs 制备与纯化 以 Gag rBV(本室保存)和 Trop2 rBV MOI 比例为 1:10 共感染 TN5 昆虫细胞,感染 72 h 后收集培养上清液,经 QSM-O3SP/50 蛋白质浓缩仪浓缩后,蔗糖梯度密度离心(从管口至管底质量/体积百分比浓度梯度依次为 10%、>10%~30%、>30%~50%),从管底依次收集不同片段,无钙镁 PBS 洗涤纯化。

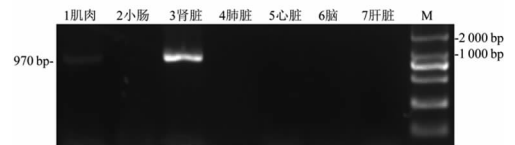
1.2.8 蛋白免疫印迹鉴定表达 以 SDS-PAGE 及蛋白免疫印迹法分别检测收集片段的蛋白表达,依据常规方法进行,将上述标本跑 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色;同时 SDS-PAGE 胶上目的蛋白用电转移法转移至硝酸纤维素膜

上,分别用 SIV-Gag 和 Trop2 抗体检测目的蛋白表达。

1.2.9 电镜观察 取制备好的 Trop2 VLPs,滴一小滴于铜网上,使有支持膜的表面与样品液表面接触,稍晾干,1%磷钨酸溶液负染晾干后,Hitachi-H7500 透射电镜观察制备好的 VLPs 形态结构。

2 结果

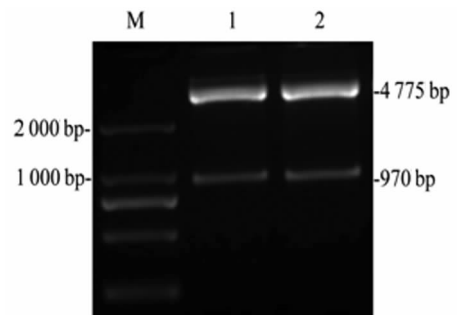
2.1 构建 Trop2 真核表达载体、杆状病毒表达载体及包膜定位表达情况 新生鼠组织(肌肉、小肠、肾脏、肺脏、心脏、肝脏及脑)中提取的 RNA,RT-PCR 法扩增 Trop2 基因,结果显示在肌肉、肾脏中扩增出 970 bp 目的条带,连接 T 克隆载体、EcoR I /Xho I 双酶切鉴定大小正确,DNA 测序结果比对,获得测序正确的 Tv/mTrop2 目的基因,见图 1。



1~7:不同鼠组织 Trop2 PCR 产物;M:DL2000 Marker。

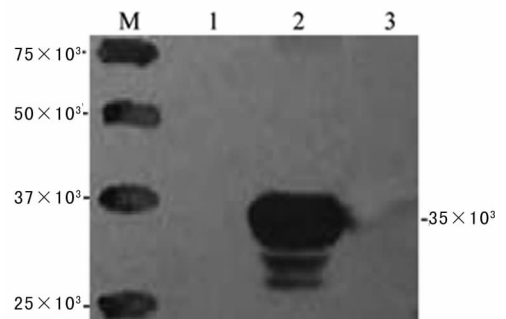
图 1 Trop2 基因 RT-PCR 结果

目的基因克隆入 pCAGGs 真核表达载体(4 790 bp)和 pFastbac1 杆状病毒表达载体(4 750 bp),EcoR I /Xho I 双酶切鉴定结果显示目的片段 970 bp,条带大小正确,见图 2,测序结果经比对与目的基因 Trop2 一致,成功构建了真核表达载体 pC/Trop2 和杆状病毒表达载体 pF/Trop2。



1:pC/Trop2 真核表达载体;2:pF/Trop2 杆状病毒表达载体;M:DL2000 Marker。

图 2 pC/Trop2、pF/Trop2 载体酶切鉴定

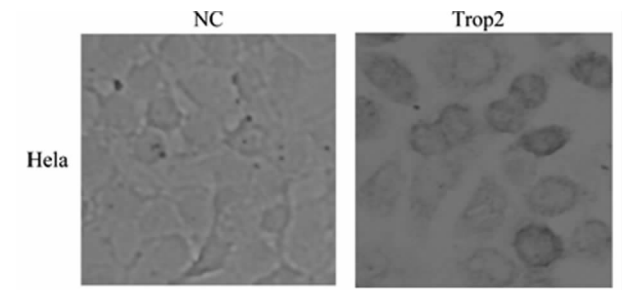


1:空白组;2:转染 pCAGGs 阴性对照组;3:转染 pC/Trop2 表达载体组;M:DL2000 Marker。

图 3 WB 检测 Trop2 表达

蛋白免疫印迹鉴定 Trop2 在 HeLa 细胞表达情况,结果显示,对比分析空白对照、阴性对照显示约在 35×10^3 处出现特

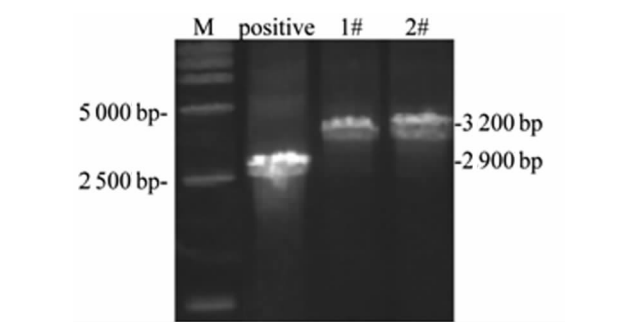
异条带,见图 3,证实转染了 pC/Trop2 表达载体的 Hela 细胞成功表达 Trop2 蛋白。细胞免疫化学方法结果显示对比 NC 组可见 Trop2 组在细胞膜高表达,见图 4,证实表达产物锚定于胞膜。



NC:转染 pCAGGS 阴性对照组;Trop2:转染 pC/Trop2 真核表达载体组。

图 4 免疫组化检测 Trop2 真核表达定位

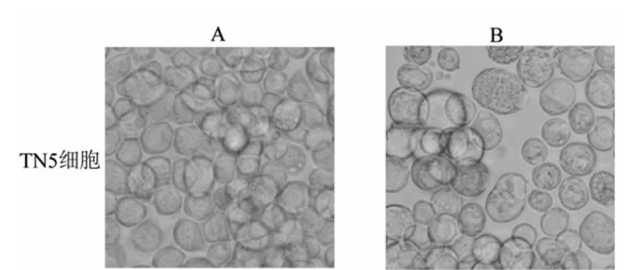
2.2 Trop2 Bacmid 鉴定结果 杆状病毒表达载体 pF/Trop2 转座 E. coliDH10bac 菌株,白色克隆为阳性克隆,应用鉴定引物(pUC/M13)进行 PCR 鉴定、分离杆粒,显示 1#、2#扩增出目的片段 3 270 bp(2 300 bp+970 bp)和阳性对照片段(2 900 bp),证实目的基因已整合入杆粒,命名为 Trop2 Bacmid,见图 5。



1#、2#:1 号、2 号 Trop2 BacmidPCR 产物;positive:阳性对照;M:DL15000 Marker。

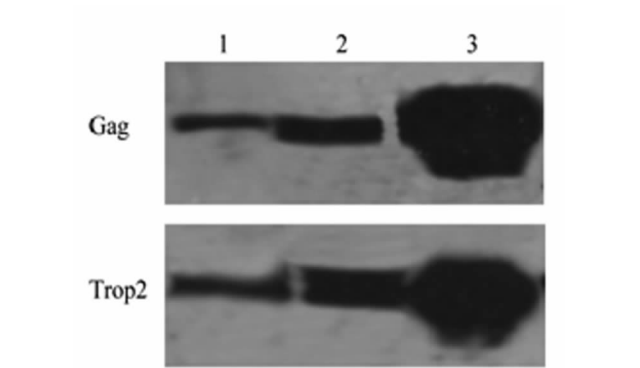
图 5 Trop2 Bacmid 鉴定结果

2.3 嵌合 Trop2 VLPs 的制备与鉴定 Trop2 Bacmid 转染细胞 5 d 后,细胞逐渐增大、肿胀,渐脱离贴壁培养状态,对比正常对照组、转染组结果表明杆粒转染成功,见图 6。上清传代扩增培养,按照 Gag rBV 与 Trop2 rBV MOI 比例 1:10 共感染 TN5 细胞大量制备 VLPs,浓缩纯化收集不同密度层蛋白片段,蛋白免疫印迹分析 VLPs 纯度,分析结果可见洗脱后在 30%~50%蔗糖浓度层 VLPs 片段含量最大,见图 7。



A:未转染组;B:转染 Trop2 Bacmid 组。

图 6 转染 TN 5 细胞后



1:10%蔗糖浓度层 VLPs;2:>10%~30%蔗糖浓度层 VLPs;3:>30%~50%蔗糖浓度层 VLPs。

图 7 WB 检测 VLPs 组装效率

2.4 电镜观察 透射电镜负染结果表明视野中出现结构完整、颗粒大小均一的 VLPs,其直径大小为 110~120 nm 与 gag VLPs 直径大小相似(直径大小约 110 nm),表明该方法能产生结构完整的 VLPs,见图 8。

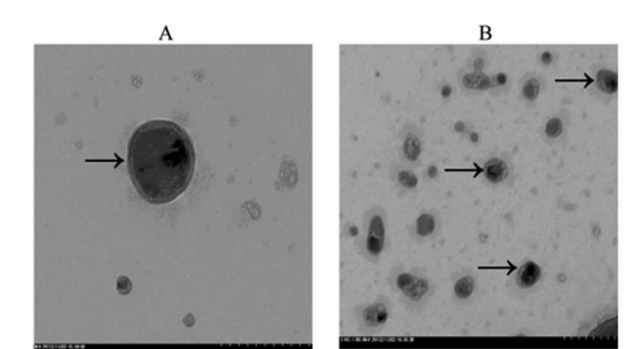


图 8 透射电镜观察 VLPs

3 讨 论

肺癌是当前世界上发病率较高的恶性肿瘤,随着免疫治疗研究的不断深入,以肿瘤特异性抗原为基础的疫苗研究备受关注^[9],VLPs 疫苗研发技术成为肿瘤疫苗研发的新策略之一,为肿瘤的预防和治疗开辟了新的途径。

膜表面糖蛋白 Trop2 在多种上皮来源的恶性肿瘤中过表达,在肿瘤细胞增殖及决定恶性表型中发挥重要作用,定位于胞膜表面使其成为抗体和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)的理想靶点,尤其是对那些缺乏有效表达 MHC I 类分子而不能呈递抗原于细胞毒 T 细胞的肿瘤细胞具有更重要的抗原递呈意义^[10]。VLPs 因抗原呈现好、制备简便安全性高、免疫原性强等优势,成为疫苗研发热点。

本课题中结合 SIV-Gag 在病毒复制过程中的装配机制特性,制备以 Trop2 为靶点的嵌合型肺癌 VLPs。考虑到 VLPs 自我装配过程中,外源蛋白需通过与壳蛋白 Gag 之间相互作用出胞并形成 VLP,外源蛋白胞内表达定位直接影响 VLPs 组装效率及蛋白呈现特性^[11],首先通过构建真核表达载体 pC/Trop2 在 Hela 细胞中表达,经免疫细胞化学法确定了 Trop2 蛋白表达并定位在细胞膜上,使抗原成分有利于呈现于 VLPs 结构表面;其次,有多种系统可用于 VLPs 表达制备,选择 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达并获得 Trop2 靶抗原组装的 VLPs。其优点如下:表达量较高、细胞(下转第 1025 页)

P53 表达水平上调可能是其抑制细胞增殖的机制。CD133 是肿瘤干细胞的广谱标志物之一,ABCG2 是肿瘤细胞逃避药物作用的标志物之一,ICAM-1 是一细胞黏附分子,在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用,细胞免疫荧光方法显示:随着顺铂浓度的增加,CD133、ABCG2、ICAM-1 的表达增强,因此可知,顺铂刺激了肿瘤干细胞耐药机制的加强。

综上所述,顺铂作用于肝癌 HepG2 肿瘤干细胞后,可能通过上调肿瘤标记物 P53、caspase-3、caspase-8 表达,从而抑制人 HepG2 肝癌细胞的生长,并抑制人 HepG2 肿瘤细胞的迁移愈合,且随着药物浓度增加而抑制作用增强。但是顺铂在应用于肝癌患者后普遍出现耐药现象,对于其耐药机制的研究还有待于进一步完善^[8-10]。

参考文献

[1] Cheung ST,Cheung PF,Cheng CK,et al. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette(ABC)B5 regulate liver Cancer cell chemoresistance[J]. Gastroenterology, 2011, 140(1):344-355.

[2] Williamson JM,Thairu N,Katsoulas N,et al. Impact of portal vein embolization on expression of Cancer stem cell markers in regenerated liver and colorectal liver metastases[J]. Scand J Gastroenterol, 2010, 45(12):1472-1479.

[3] Zhu AX,Duda DG,Ancukiewicz M,et al. Exploratory analysis of early toxicity of sunitinib in advanced hepatocellular carcinoma pa-

tients; kinetics and potential biomarker value[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(4):918-927.

[4] Na DC, Lee JE, Yoo JE, et al. Invasion and EMT-associated genes are up-regulated in B viral hepatocellular carcinoma with high expression of CD133-human and cell culture study[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 90(1):66-73.

[5] 万元泰,刘小敏,虞金宝,等. 肝复康胶囊对人肝癌细胞系 HepG2 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21):165-168.

[6] 钟扬,李靖,黄小兵,等. 慢病毒载体介导的人肝癌 HepG2 细胞 BC047440 基因沉默[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8):744-748.

[7] 刘礼,谢纪文,王熙,等. EGCG 联合不同剂量放疗对人肝癌细胞系 HepG2 中 hTERT 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(18):1873-1878.

[8] 张方宇,何松. 乳糖脂修饰苦参碱脂质体的肝靶向性和体外抑瘤作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(6):747-751.

[9] 葛金华,朱月永,刘豫瑞,等. siRNA 降低 COX-2 基因表达对肝癌细胞系 HepG2 增殖的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(22):2244-2250.

[10] 特日格乐,邵大鹏,刘刚,等. 人肝癌细胞系 HepG2 的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2011(12):92-95.

(收稿日期:2015-12-25)

(上接第 1022 页)

培养方便、杆状病毒使用相对安全,应用广泛,可以在一个细胞中表达多种蛋白^[12]。除此之外,本研究结合 SIV Gag 蛋白和 Trop2 rBV 共感染制备嵌合 VLPs,多种 MOI 比例共感染昆虫细胞制备嵌合 VLPs,进行体外生物学活性鉴定,筛选最有效的比例可以优化 VLPs 组装效率,从而为后续的体内实验及有效的新型肺癌疫苗研究提供依据,也为高表达 Trop2 的其他恶性肿瘤如宫颈癌、胃癌及胰腺癌的疫苗研制提供新思路 and 借鉴依据^[13]。

参考文献

[1] Win SJ, Ward VK, Dunbar PR, et al. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway[J]. Immunol Cell Biol, 2011, 89(6):681-688.

[2] Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development[J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(10):1149-1176.

[3] Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, et al. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(2):152-158.

[4] 江爱桂,黄建安. Trop2 在晚期非小细胞肺癌组织中的表达及其对预后的影响[J]. 江苏医药, 2013, 39(22):2702-2705.

[5] Gridelli C, Maione P, Comunale D, et al. Adjuvant chemotherapy in elderly patients with non-small-cell lung cancer[J]. Cancer

Control, 2007, 14(1):57-62.

[6] Owonikoko TK, Ragin CC, Belani CP, et al. Lung cancer in elderly patients; an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(35):5570-5577.

[7] Immunosenescence PT. Current status and molecular mechanisms[J]. Hautarzt, 2011, 62(8):598-606.

[8] Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing[J]. Pathol, 2007, 211(2):144-156.

[9] Frasca D, Blomberg BB. Aging affects human B cell responses[J]. J Clin Immunol, 2011, 31(3):430-435.

[10] 舒放,王晓岩,雷迎峰,等. HCV 中和抗原表位与 HBV S 抗原嵌合病毒样颗粒的制备及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(3):257-260, 265.

[11] 李谨革,龙敏,王希,等. Her2/ECD-sf162/TM 融合杆状病毒表达及鉴定[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(13):1798-1802.

[12] 彭建明,李金明. 病毒样颗粒在免疫测定中的应用研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(2):214-216.

[13] Hesketh PJ, Lilenbaum RC, Chansky K, et al. Chemotherapy in patients ≥ 80 with advanced non-small cell lung cancer; combined results from SWOG 0027 and LUN 6[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2007, 2(6):494-498.

(收稿日期:2015-12-20)