

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.002

TCR BV12-3 重组载体构建及其抗肿瘤作用的初步研究*

王 辉 区裕升 沈 晗 黄树林[△]

(广东药学院生命科学与生物制药学院; 广东省生物技术候选药物研究重点实验室 广东 广州 510006)

摘要 目的: 构建 pEGFP-C3-TCR BV12-3 表达载体并初步研究其抗肿瘤作用。**方法:** TCR BV12-3 基因片段从 pGEM-T-TCR BV12-3 载体上酶切并克隆至 pEGFP-C3 载体中, 通过脂质体将 pEGFP-C3-TCR BV12-3 表达载体转染外周血单个核细胞(PBMCs), 48 小时后荧光显微镜观察转染效率。PBMCs 细胞、pEGFP-C3 载体转染的 PBMCs 细胞、pEGFP-C3-TCR BV12-3 表达载体转染的 PBMCs 细胞分别与肝癌细胞 BEL-7402 和宫颈癌细胞 HeLa 共培养 24 h, 显微镜观察肿瘤细胞的生长情况。**结果:** 测序证实 TCR BV12-3 基因片段成功亚克隆至 pEGFP-C3 载体中, 荧光显微镜证实重组体转染 PBMCs 细胞 48 h 后可有效表达绿色荧光。显微镜观察发现 pEGFP-C3-TCR BV12-3 载体转染的 PBMCs 对肝癌细胞有杀伤作用, 但对宫颈癌杀伤作用不明显。**结论:** 成功构建 pEGFP-C3-TCR BV12-3 表达载体, 初步证实 TCRBV12-3 对肝癌细胞有杀伤作用。

关键词: T 细胞受体; BV12-3; 克隆; 肿瘤

中图分类号: Q78, R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)02-206-03

Construction and Primary Study on the Anti-Tumor Effect of TCR BV12-3 Recombinant Vector*

WANG Hui, OU Yu-sheng, SHEN Han, HUANG Shu-lin[△]

(School of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology Candidate Drug Research, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, 510006, China)

ABSTRACT Objective: To construct pEGFP-C3-TCR BV12-3 vector, and to investigate the effect of TCR BV12-3 on anti-tumor. **Methods:** TCR BV12-3 gene was digested from pGEM-T-TCR BV12-3, and was cloned into pEGFP-C3 vector. The pEGFP-C3-TCR BV12-3 recombinant vector was transfected into peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) via liposome. After 48 h, the transfection efficiency was measured by fluorescence microscope. Then, the PBMCs, pEGFP-C3-TCR BV12-3 and pEGFP-C3 transfection were co-cultured with hepatocarcinoma cells BEL-7402 and cervical cancer cells HeLa, respectively. After 24 h incubation, the anti-tumor effect of TCR BV12-3 was investigated by microscope. **Results:** The DNA sequencing analysis showed that TCR BV12-3 gene was successfully subcloned into pEGFP-C3 vector, and the green fluorescence could be detected by fluorescence microscope in PBMCs transfected with pEGFP-C3-TCR BV12-3. PBMCs transfected with pEGFP-C3-TCR BV12-3 showed cytotoxicity in BEL-7402 cells. **Conclusion:** The pEGFP-C3-TCR BV 12-3 vector was successfully constructed, and the anti-tumor effect of TCR BV12-3 was proved initially.

Key words: TCR; BV12-3; Clone; Tumor

Chinese Library Classification(CLC): Q78, R730.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)02-206-03

前言

T 细胞受体(TCR)是 T 细胞表面特异性识别抗原和介导免疫应答的分子, 是 T 细胞对肿瘤抗原进行识别和杀伤的基础^[1]。TCR 中的 V β 区是 T 细胞受体多样性的主要来源之一, 根据 V β 区基因的特点将 TCR V β 区的几十种基因片段归为 24 个亚家族。正常情况下, 健康人体体内 TCR V β 的 24 个亚家族几乎全部表达。在肿瘤患者中, 机体 T 细胞在肿瘤细胞抗原的持续刺激下, 某个或某些具有肿瘤抗原高亲和力的 T 细胞克隆性生长, 表现出某些 TCR V β 亚家族选择性表达, 使患者部分 V β 亚家族出现优势表达的情况^[2]。有研究者用肿瘤特

异性 TCR α 和 β 链基因转染自体外周血淋巴细胞, 取得非常显著的抗肿瘤效果^[3]。本研究拟构建 pEGFP-C3-TCR BV12-3 重组载体并初步观察其对肝癌细胞系和宫颈癌细胞系的杀伤效果, 为进一步研究 TCR BV12-3 的抗肿瘤作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞株 BEL-7402 和宫颈癌细胞 HeLa (本实验室冻存); 质粒 pGEM-T-TCR BV12-3 (本实验室构建); 质粒 pEGFP-C3 购自 clontech 公司; 胰酶和 Lipofectamine LTX 转染试剂购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI、T4

* 基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-708); 广东省医学科研课题(B2002070)

作者简介: 王辉(1977-), 女, 博士, 讲师, 从事肝脏疾病发病机理及治疗研究, E-mail: vera_wh@hotmail.com

[△] 通讯作者: 黄树林, E-mail: shulhuang@sina.com

(收稿日期: 2013-04-30 接受日期: 2013-05-24)

连接酶、Taq 酶购自 TaKaRa 公司;OMEGA 质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自广州飞扬生物工程有限公司;DMEM 培养基和 1640 培养基均为 Gibco 公司产品;胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品;正常人外周血来自广药附属第一医院血库;淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-C3-TCR BV12-3 重组载体的构建 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别酶切质粒 pGEM-T-TCR BV12-3 和载体 pEGFP-C3。酶切产物 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶回收试剂盒回收,目的基因 TCR BV12-3 和酶切后载体 pEGFP-C3 用 T4 连接酶 4℃ 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 并涂琼脂平板,37℃ 倒置培养过夜。随机挑取 13 个菌为模板,以 BV12-3 为特异性引物(上游引物:5'-ATTCTCGAGATG-GACTCCTGGACCTT-3';下游引物:5'-CGCGAATTCGCTAGCCTCTGGAATCCTTTCT-3')进行菌落 PCR 鉴定。收集阳性细菌并用 OMEGA 质粒提取试剂盒提取重组质粒 pEGFP-C3-TCR BV12-3 并送往 invitrogen 生物公司测序。

1.2.2 PBMCs 分离 采用 Ficoll-Hopaque 密度梯度离心法分离人外周血单核细胞。取淋巴细胞分离液 15 mL 置于 50 mL 灭菌离心管中,用滴管吸取稀释好的血液(以 PBS 溶液将血液 1:1 稀释)30 mL 沿管壁缓缓加入,水平离心机 1500 rpm 离心 30 min。吸取 PBMC 移入另一无菌离心管中用 PBS 洗涤两次,1200 rpm 离心 15 min 收集细胞。用 RPMI1640 培养基重悬细胞,计数调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL,置于 CO₂ 培养箱待用。

1.2.3 重组体转染 PBMCs 6 孔板每孔加入 200 μ L PBMCs 细胞(每孔 2×10^6 个细胞)。质粒 pEGFP-C3-TCR BV12-3/pEGFP-C3 2.5 μ g 用 500 μ L 无血清 RPMI1640 培养基稀释,加入 2.5 μ L PLUSTM Reagent 轻微混合,室温孵育 5 min。LipofectamineTM LTX 10 μ L 加入 DNA 稀释液轻微混合,室温孵育 25 min。DNA-LipofectamineTM LTX 转染复合物直接加入 PBMCs 细胞中,前后旋转 6 孔板混匀。孵育 6 h 后补加 RPMI1640 培养基和胎牛血清(终浓度 10%)至总体积 1 mL,于 37℃ 细胞培养箱中继续孵育 42 h 后倒置荧光显微镜下观察淋巴细胞中绿色荧光蛋白表达情况。

1.2.4 肿瘤细胞培养 BEL-7402 和 HeLa 细胞在 DMEM 培养液中(含有 10% 胎牛血清,1%青霉素/链霉素)于 37℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱培养。

1.2.5 pEGFP-C3-TCR BV12-3 转染的 PBMCs 对肿瘤细胞的影响 收集对数期肿瘤细胞,调整细胞悬液浓度至 1×10^5 个/mL,6 孔板每孔加入 2 mL,37℃ 5% CO₂ 孵育过夜至细胞贴壁。弃去上清,设四个组,A 组为空白对照,加入 RPMI1640 培养基;B 组为 PBMCs 组,加入未处理的 PBMCs,C 组为空载体组,加入转染 pEGFP-C3 的 PBMCs,D 组为 TCR BV12-3 组,加入转染 pEGFP-C3-TCR BV12-3 的 PBMCs。5% CO₂,37℃ 孵育 24 h,倒置显微镜下观察。

2 结果

2.1 pEGFP-C3-TCR BV12-3 重组载体的构建

对质粒 pGEM-T-TCR BV12-3 和 pEGFP-C3 进行 *EcoR* I

和 *Xho* I 双酶切,得到产物经琼脂糖凝胶电泳证实大小分别约为 930 bp 和 4.7 kb(图 1),与 TCR BV12-3 和 pEGFP-C3 片段大小相符。

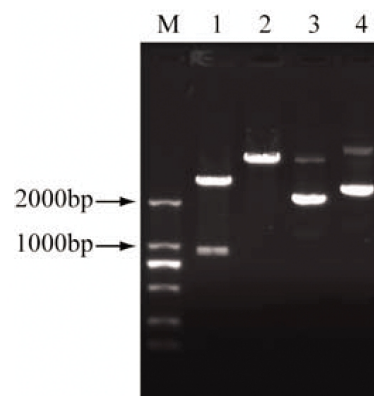


图 1 质粒双酶切产物琼脂糖凝胶电泳:M:DNA marker;1:pGEM-T-TCRBV12-3 质粒 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切;2:pGEM-T-TCRBV12-3 质粒;3:pEGFP-C3 质粒 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切;4:pEGFP-C3 质粒

Fig. 1 Double digestion products of plasmids in agarose gel electrophoresis: M:DNA marker;1:pGEM-T-TCRBV12-3 was double digested by *EcoR* I and *Xho* I;2:pGEM-T-TCRBV12-3 plasmid;3:pEGFP-C3 was double digested by *EcoR* I and *Xho* I;4:pEGFP-C3 plasmid

酶切产物经连接转化构建 pEGFP-C3-TCR BV12-3 重组载体并进行菌落 PCR 鉴定,阳性克隆的 PCR 产物大小与 TCR BV12-3 片段大小相符(图 2)。提取重组质粒并测序,结果显示 TCR BV12-3 的序列与 Genebank 公布的基因序列相符,表明重组载体构建成功。

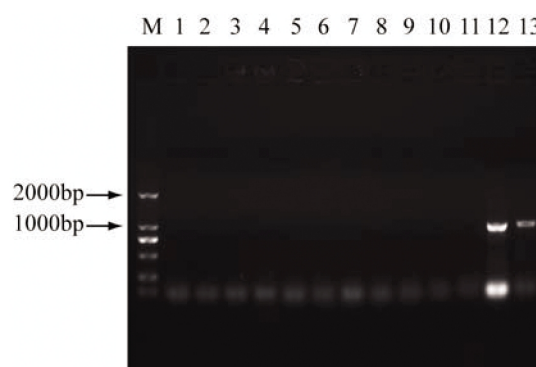


图 2 重组质粒 pEGFP-C3-TCR BV12-3 菌落 PCR 鉴定:M:DNA marker;1-13:菌落 PCR 产物

Fig. 2 Identification of plasmid pEGFP-C3-TCR BV12-3 by colony PCR: M:DNA marker;1-13: Colony PCR products

2.2 GFP 表达的检测

荧光显微镜下观察 pEGFP-C3-TCR BV12-3 重组载体转染 PBMCs 48 小时后绿色荧光显示明显(图 3),说明 pEGFP-C3-TCR BV12-3 在 PBMCs 中能有效表达。

2.3 TCR BV12-3 对肿瘤细胞的杀伤作用

如图 4A 示,空白对照组肝癌细胞饱满,色泽光亮,生长均

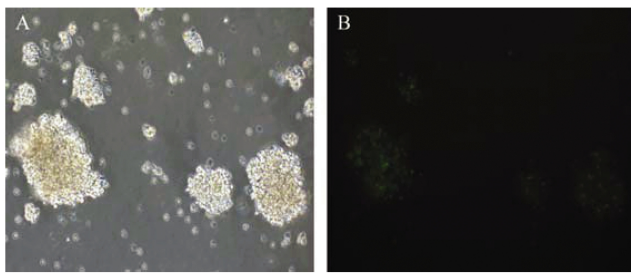


图3 PBMCs 中 GFP 表达(100×):A:PBMCs 普通光学显微镜图片;B: PBMCs 荧光显微镜图片

Fig. 3 GFP expression in PBMCs(100×):A:Micrographs of PBMCs by microscope; B: Micrographs of PBMCs by fluorescence microscope

匀;PBMCs 组与空载体转染组(图 4B、4C)的肝癌细胞个体明显变小,色泽暗淡,但是细胞数目变化不大;TCR BV12-3 转染组的肝癌细胞(图 4D)明显大量死亡并凝聚成团,证实 TCR-BV12-3 对 BEL-7402 有杀伤作用。与之相对照,如图 5 所示,同 PBMCs 组和空载体转染组相比,TCRBV12-3 转染组对 HeLa 细胞的杀伤效果不明显。

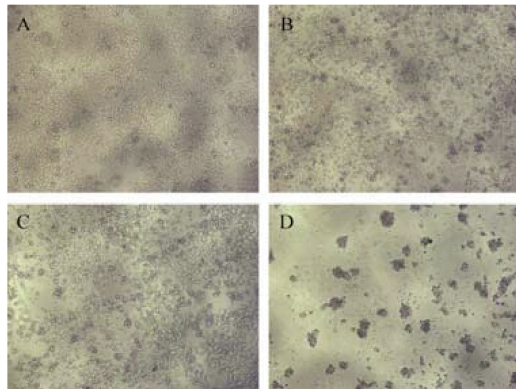


图4 不同组细胞与 BEL-7402 共培养后的细胞形态:A:空白对照组;B: PBMCs 组;C:空载体转染 PBMCs 组;D: TCRBV12-3 转染 PBMCs 组
Fig. 4 Cellular morphology of BEL-7402 co-cultured with different cell groups; A: Control group; B: PBMCs group; C: PBMCs transfected with empty vector group; D: PBMCs transfected with TCRBV12-3 group

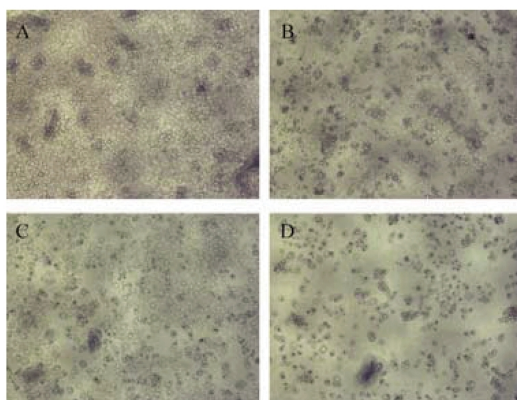


图5 不同组细胞与 HeLa 共培养后的细胞形态:A:空白对照组;B: PBMCs 组;C:空载体转染 PBMCs 组;D: TCRBV12-3 转染 PBMCs 组
Fig. 5 Cellular morphology of HeLa co-cultured with different cell groups: A: Control group; B: PBMCs group; C: PBMCs transfected with empty vector group; D: PBMCs transfected with TCRBV12-3 group

3 讨论

随着分子生物学技术的发展,应用基因工程技术提高 T 细胞对肿瘤抗原的识别杀伤能力的研究成为肿瘤免疫治疗的研究热点^[4-6]。临床前及临床研究初步证明 TCR 基因修饰的 T 细胞具有特异性的肿瘤杀伤功能^[7,8]。TCR 基因转导不仅在黑色素瘤治疗上取得了突破性进展^[9,10],而且在乳腺癌、肝癌、白血病等的治疗研究上也取得了一定的成效^[11-13]。

针对健康人与肿瘤患者 TCR V β 亚家族基因表达存在差异的现象,为探索 TCRV 区基因寡克隆性表达与机体对肿瘤细胞识别与杀伤的关系,本研究构建了表达绿色荧光蛋白 GFP 的重组载体 pEGFP-C3-TCR BV12-3。GFP 是目前最常用荧光蛋白标签,将目的蛋白与 GFP 融合表达,可对所研究蛋白质的位置、运动及其活性等,通过显微镜观察其荧光过程而加以监视^[14]。重组载体 pEGFP-C3-TCR BV12-3 转染 PBMCs 细胞 48 小时后荧光显微镜观察荧光蛋白 GFP 标记的目的蛋白 TCR BV12-3,结果发现其可正常表达。研究者将 TCR V β 亚家族基因导入正常人外周血淋巴细胞后攻击肿瘤细胞,研究 TCR V β 基因修饰后淋巴细胞的生物学活性及抗肿瘤作用^[15-17]。为观察 TCR BV12-3 对肝癌及宫颈癌是否具有杀伤活性,根据预实验本研究采用效靶比(PBMCs:肿瘤细胞)10:1 且 PBMCs 与肿瘤细胞共孵育 24 小时。结果证实转染 pEGFP-C3-TCR BV12-3 的 PBMCs 与肝癌细胞 BEL-7402 共培养 24 小时后肝癌细胞死亡,细胞数明显减少;而同样条件下其对宫颈癌细胞 HeLa 的杀伤作用较弱。

本研究构建了 TCR BV12-3 与 GFP 的融合表达载体并对 TCR BV12-3 体外抗肿瘤活性做了初步的探讨,上述结果为 TCR BV12-3 的抗肿瘤谱研究及其在肿瘤治疗中的应用提供了理论和实验依据。

参考文献(References)

- [1] 陶端立,邵红伟,沈晗,等.人类 TCR $\alpha\beta$ 家族 V 基因的进化研[J]. 中国免疫学杂志,2008,24(3): 240-243
Tao Chang-li, Shao Hong-wei, Shen Han, et al. Evolution of human T cell receptor variable gene segment families [J]. Chinese journal of immunology, 2008, 24(3): 240-243
- [2] 区裕升,邵红伟,吴凤麟,等.肿瘤患者胸/腹水和外周血中 TCR V β 亚家族表达及调节性 T 细胞亚群的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(4): 368-371
Ou Yu-sheng, Shao Hong-wei, Wu Feng-lin, et al. Study on the T cells receptor (TCR) V β repertoire and the expression profile of Treg between peripheral blood mononuclear cells and the tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in patients with carcinoma[J]. Chinese journal of immunology, 2012, 28(4): 368-371
- [3] Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. Science, 2006, 314(5796): 126-129
- [4] 王谨,李升平,郑利民.基因修饰 T 淋巴细胞在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2008, 15(3): 292-295
Wang Jin, Li Sheng-ping, Zheng Li-min. Research progress on genetically-engineered T lymphocytes in anti-tumor immunotherapy [J]. Chinese journal of cancer biotherapy, 2008, 15(3): 292-295
(下转第 213 页)

- [17] Sadoshima J. The role of autophagy during ischemia/reperfusion[J]. Autophagy, 2008, 4(4): 402-403
- [18] Wang D, Ma Y, Li Z, et al. The role of AKT1 and autophagy in the protective effect of hydrogen sulphide against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Autophagy, 2012, 8(6): 954-962
- [19] 包灵洁, 易晓芳. 自噬在卵巢癌中的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2013, (1): 54-56
- Bao Ling-jie, Yi Xiao-fang. Updates in the Study of Autophagy in Ovarian Cancer[J]. J Int Obstet Gynecol, 2013, (1): 54-56
- [20] 王和峰, 翟纯刚, 庞文会, 等. PI3K/Akt / mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 390-397
- Wang He-feng, Zhai Chun-gang, Pang Wen-hui, et al. Roles of PDK/Akt/mTOR signaling pathway in macrophage autophagy and atherosclerotic plaque instability[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2013, 29(3): 390-397
- [21] Li J, Ni M, Lee B, et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(9): 1460-1471
- [22] 徐冶, 李晓宁, 钟加滕, 等. 缺糖缺氧经内质网应激途径诱导宫颈癌 Hela 细胞自噬[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(26): 4089-4091
- Xu Ye, Li Xiao-ning, Zhong Jia-teng, et al. Oxygen-glucose deprivation (OGD) induce autophagy of cervical carcinoma Helacell line by endoplasmic reticulum stress pathway[J]. China's maternity and child care, 2011, 26(26): 4089-4091
- [23] Song B S, Yoon S B, Kim J S, et al. Induction of autophagy promotes preattachment development of bovine embryos by reducing endoplasmic reticulum stress[J]. Biol Reprod, 2012, 87(1): 8, 1-11

(上接第 208 页)

- [5] Zhao Y, Wang QJ, Yang S, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity [J]. J Immunol, 2009, 183(9): 5563-5574
- [6] Zhou Q, Schneider IC, Edes I, et al. T-cell receptor gene transfer exclusively to human CD8 (+) cells enhances tumor cell killing[J]. Blood, 2012, 120(22): 4334-4342
- [7] Kessels HW, Wolkers MC, van den Boom MD, et al. Immunotherapy through TCR gene transfer[J]. Nat Immunol, 2001, 2(10): 957-961
- [8] Linnemann C, Schumacher TN, Bendle GM. T-cell receptor gene therapy: critical parameters for clinical success[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(9): 1806-1816
- [9] Clay TM, Custer MC, Spiess PJ, et al. Potential use of T cell receptor genes to modify hematopoietic stem cells for the gene therapy of cancer[J]. Pathol Oncol Res, 1999, 5(1): 3-15
- [10] Clay TM, Custer MC, Sachs J, et al. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 507-513
- [11] Hillerdal V, Nilsson B, Carlsson B, et al. T cells engineered with a T cell receptor against the prostate antigen TARP specifically kill HLA-A2+ prostate and breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(39): 15877-15881
- [12] Shen H, Shao HW, Chen XH, et al. Identification of a novel HLA-A2-restricted mutated Survivin epitope and induction of specific anti-HCC CTLs that could effectively cross-recognize wild-type Survivin antigen [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(2): 393-403
- [13] Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Application of adoptive T-cell therapy using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer for the treatment of human leukemia [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 521248
- [14] 吴世康. 绿色荧光蛋白质(GFP)的发现、表达和发展[J]. 影像科学与光化学, 2009, 27(1): 69-78
- Wu Shi-kang. The Discovery and Development of the Green Fluorescent Protein[J]. Imaging science and photochemistry, 2009, 27(1): 69-78
- [15] 胡丽彩, 邱曙东, 黄树林, 等. TCR V β 7.1 基因修饰 T 细胞对乳腺癌杀伤作用的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2003, 19(2): 97-99
- Hu Li-cai, Qiu Shu-dong, Huang Shu-lin, et al. The experimental study of the cytotoxicity to breast cancer cell line using modified T lymphocyte by TCRV β 7. 1 gene [J]. Chinese journal of immunology, 2003, 19(2): 97-99
- [16] 王俊伟, 张巨峰, 张文峰, 等. 共表达 TCR α 12-2 和 TCRV β 7.1 重组腺病毒载体的构建及其杀伤肝癌细胞作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(11): 2001-2004
- Wang Jun-wei, Zhang Ju-feng, Zhang Wen-feng, et al. Construction of recombinant adenovirus vector Ad. TCR α 12-2-IRES-V β 7. 1 and its cytotoxicity in hepatoma [J]. Progress in modern biomedicine, 2008, 8(11): 2001-2004
- [17] 尹青松, 谭荻, 杨力建, 等. TCR V α 23-V β 13 基因修饰 T 细胞及其特异性细胞毒活性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(2): 260-267
- Yin Qing-song, Tan Huo, Yang Li-jian, et al. Specific cytotoxicity of TCR V α 23 - V β 13 gene-modified T-cells [J]. Chinese journal of pathophysiology, 2011, 27(2): 260-267