

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0110-05

人 PD-L1(B7-H1)基因克隆及其逆转录病毒载体的构建和稳定表达

陈永井, 施 勤, 葛 彦, 徐宽枫, 古 涛, 孙建军, 李文香, 张学光 (苏州大学医学生物技术研究所, 苏州 215007)

[摘 要] **目的:** 克隆人 PD-L1(B7-H1)基因,并构建含有该目的基因的重组逆转录病毒载体,获得稳定表达 PD-L1 基因的 L929 细胞。**方法:** 从人心脏 cDNA 文库中扩增出 PD-L1 基因,通过双酶切装入逆转录病毒载体 pGEZ-Term 中,脂质体法共转染包装细胞 293T,用含有完整病毒颗粒的 293T 细胞的培养上清感染 L929 细胞,72 h 后,加入 Zeocin 进行筛选,挑选出能稳定表达 PD-L1 蛋白的 L929 细胞株。**结果:** 构建了用于表达的含 PD-L1 基因的重组逆转录病毒载体;经转染包装细胞 293T 后,包装出具有感染能力的重组 PD-L1 逆转录病毒;经 RT-PCR、流式细胞仪表型检测表明,筛选出的 L929 转基因细胞能稳定表达人 PD-L1 蛋白。**结论:** 构建了含人 PD-L1 基因重组逆转录病毒载体和稳定表达人 PD-L1 蛋白的细胞株,为该基因功能的后续研究和单克隆抗体的研制奠定了基础。

[关键词] PD-L1; 逆转录病毒; 稳定表达; 筛选

[中图分类号] R373.9; Q785 [文献标识码] A

Gene Cloning of Human PD-L1(B7-H1) and the Corresponding Recombinant Retrovirus Construction and Stable Expression

CHEN Yong-jing, SHI Qing, GE Yan, XU Kuan-feng, GU Tao, SUN Jian-jun, LI Wen-xiang, ZHANG Xue-guang (Biotechnology Institute of Suzhou University, Suzhou, 215007, China)

[Abstract] **Objective:** To clone human PD-L1(B7-H1) gene and construct recombinant retrovirus vector carrying the target gene which can be expressed stably in mammal cell line L929. **Methods:** PD-L1 gene was amplified by PCR (polymerase chain reaction) from the human heart cDNA library and confirmed by DNA-sequence analysis. Digested with the restriction endonucleases PstI and EcoRI, the PD-L1 gene was inserted into retrovirus vector pGEZ-Term. The recombinant retrovirus vector together with its two helper virus vectors cotransfected into the package cell 293T in the context of LipfectAMINE. Then the supernatant of 293T was used to infect L929 cells. L929 cell line stably expressing PD-L1 protein was selected in the presence of Zeocin(500 μg/ml). **Results:** The full-length PD-L1(B7-H1) gene was successfully cloned; and the recombinant retrovirus vector carrying PD-L1 gene for expression was constructed; by transfecting package cell line 293T, recombinant PD-L1 retrovirus with infective capability was packaged and after 2 weeks of selection, the infected L929 cells formed monoclonal colonies in selective medium. Results of RT-PCR and flow cytometry indicated that L929 transgenic cells could stably express human PD-L1 protein on the membrane of cells. **Conclusion:** Cloning of human PD-L1(B7-H1) gene and construction of the recombinant retrovirus vector and L929 cell line stably expressing PD-L1 protein could contribute to further biological function research and monoclonal antibody preparation.

[Key words] PD-L1; retrovirus; stable expression; selection

* 机体在进行正常免疫应答的过程中,T,B 细胞除需要抗原受体提供的第一信号外,还需要一系列的共刺激分子参与提供第二信号,从而使其达到激活阈而被激活,产生效应及记忆细胞,发挥免疫防御功能^[1-3]。与此同时,这一激活过程又引起其他共刺激分子或抑制性分子的调节性表达,起到免疫调节的作用。PD-1 是一个重要的诱导表达的抑制性受体,它与自身两个

配体 PD-L1(B7-H1)和 PD-L2(B7-DC)相互作用,在免疫反应的负性调控方面发挥着重要作用^[4-7]。PD-L1 属于 B7 家族,具有 IgV 和 IgC 样区、跨膜区及胞浆区

[基金项目] 国家重大基础研究项目(2001CB51003)资助

[作者简介] 陈永井(1977-),男,江苏盐城人,学士,主要从事分子免疫学研究

[通讯作者] 张学光, E-mail: smbxuegz@public1.sz.js.cn

尾部。具有较广泛的组织表达谱,甚至在某些恶性肿瘤细胞系上也有表达,可能与肿瘤的免疫逃避机制相关^[8]。目前已对 PD-1/PD-L 这一途径有了较深入的研究,但同时表明 PD-L1 对 T 细胞存在两种不同的效应(刺激或抑制)^[8,9]。为了对该共刺激分子进行深入研究,我们克隆了人 PD-L1(B7-H1)编码区全长基因,并构建了重组逆转录病毒载体,经筛选获得能稳定表达人 PD-L1 分子的 L929 转基因细胞。

1 材料与方 法

1.1 cDNA 文库和引物

人心脏 cDNA 文库为 Clontech 公司产品;上游引物:5'-TAC TGC AGA AGA TGA GGA TAT TTG CTG TC-3'(含 PstI 位点),下游引物 5'-ATT GAA TTC TTA CGT CTC CTC CAA ATG TG-3'(含 EcoRI 位点)。

1.2 载体及细胞株

克隆载体 pMD18-T 购自 TakaRa 公司;逆转录病毒载体 pGEZ-Term 及两个辅助病毒载体 pHIT456 和 pHIT60 由德国 Seifling 教授惠赠,细菌 Top10 及细胞 293T 和 L929 均由本所保种。

1.3 主要试剂

脂质体 LipfectAMINE 和筛选药物 Zeocin 购自 invitrogen 公司;polybren 购自 Sigma 公司;单克隆抗体抗人 PE-PD-L1 购自美国 ebioscience 公司;各种限制性内切酶及 T₄ 连接酶购自日本 TaKaRa 公司;G418 和琼脂粉(日本进口分装)购自上海华美公司。小量质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购自上海华舜公司;小牛血清(FCS)购自杭州四季青公司;TRIZOL 和 1640 培养基购自美国 GIBCO 公司;逆转录试剂盒购自 MBI 公司。

1.4 PD-L1 基因的扩增和纯化

以人心脏 cDNA 文库为模板,用上述配对引物进行 PCR 扩增,反应条件为 50 μl 体系加入 1.5 μl cDNA 文库,5U Taq DNA 聚合酶,94℃ 预变性 4 min 后,94℃ 变性 1 min,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,扩增 35 个循环,然后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用试剂盒进行纯化。

1.5 目的片段的鉴定

PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体后,转化感受态细菌 Top10,并挑选阳性克隆,经重组质粒电泳、PCR 和酶切鉴定,并测序进一步确证。

1.6 重组逆转录病毒载体的构建

测序正确的 pMD18-T/PD-L1 质粒用 PstI 和 EcoRI 双酶切 37℃,5 h,同时双酶切逆转录病毒载体 pGEZ-Term,37℃,4 h,割胶回收酶切后的目的片段,继而连

接转化细菌,用上述方法鉴定获得重组逆转录病毒载体 pGEZ-Term/PD-L1。

1.7 逆转录病毒颗粒的产生

将重组逆转录病毒载体 pGEZ-Term/PD-L1 与两辅助病毒 pHIT456 和 pHIT60 按 2:1:1 的量用脂质体法共转染 6 孔板中 50%~60% 汇片的 293T 细胞,整个过程按照试剂盒操作手册进行。转染 48 h 后,收集少量 293T 细胞,用流式细胞仪检测报告基因绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达情况,计算转染率。同时制备阴性对照的逆转录病毒 pGEZ-Term。

1.8 293T 细胞培养上清中逆转录病毒滴度的检测

L929 细胞以 10⁶/孔铺 6 孔板,培养至 60%~70% 汇片,吸尽培养基,加入 1 ml 293T 培养液病毒上清,同时加入 polybren 使其终浓度为 8 ng/ml,37℃ 感染 6 h,添加 10% FCS 的 1640 培养基至 2.5 ml/孔,48 h 后,流式细胞仪检测被感染细胞中 GFP 蛋白的表达率。阳性细胞数乘以稀释倍数,即为病毒滴度(pfu/ml)^[12]。

1.9 L929 细胞的感染和稳定表达抗性细胞株的筛选

按照测定病毒滴度的方法感染 6 孔板中 50%~60% 汇片的 L929 细胞,并隔夜感染重复 3 次,72 h 后,收集细胞,按 1:6 稀释,将其置于含 Zeocin 500 μg/ml 浓度的选择培养基中,筛选培养 2 周,待抗性单克隆集落长出,用尖头吸管吹去表面死细胞和生长状态较差的细胞,继续筛选 5 d,使抗性克隆长至足够大,挑取单克隆菌落,进行扩大培养。

1.10 RT-PCR 检测 L929 转人 PD-L1 细胞中目的基因转录

收集筛选获得的阳性细胞,用 TRIZOL 抽提其总 mRNA,按 MBI 逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA,取 5 μl cDNA 为模板,用前述 PD-L1 特异性引物扩增 PD-L1 基因,同时用 L929 和 L929 转 pGEZ-Term 细胞作对照。

1.11 L929 转基因细胞中 GFP 的稳定表达

收集具有 Zeocin 抗性的阳性细胞,以 L929 细胞作对照,用流式细胞仪在 FITC 波长下检测 L929 转基因细胞中绿色荧光蛋白报告基因的 stable 表达。

1.12 L929 转基因细胞膜表面目的蛋白的表达检测

用直标单抗 PE-PD-L1 与 L929 转人 PD-L1 基因细胞 4℃ 避光反应 25 min,用鼠抗人 PE-IgG1 作同型对照,并用 L929 和 L929 转 pGEZ-Term 细胞作对照,检测人 PD-L1 蛋白在细胞膜上的表达。

2 结 果

2.1 人 PD-L1 编码区全长基因的克隆及鉴定

用 Taq DNA 聚合酶从人心脏 cDNA 文库中能扩增

出 1 条大小在 750 ~ 1 000 bp 之间目的片段(人 PD-L1 为 873 bp),且条带单一,无非特异性。装入 pMD18-T 载体中,经 PCR 和酶切鉴定后的阳性克隆进行 DNA 测序,结果表明,所获得的 cDNA 序列与 GenBank 中注册的人 PD-L1(B7-H1)cDNA 序列完全一致(图 1A)。

2.2 重组逆转录病毒载体的构建及鉴定

按图 2 所示的流程构建重组逆转录病毒载体 pGEZ-Term/PD-L1,筛选的阳性克隆经 PCR 和双酶切后产生的目的片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析与人 PD-L1 基因大小一致。表明重组逆转录病毒载体构建成功(图 1B,C)。

图 1 人 PD-L1 克隆及重组逆转录病毒载体鉴定

Fig.1 PCR amplification of PD-L1 and identification of recombinant pGEZ-Term/PD-L1

A: Lane1 PCR product of PD-L1; B: Lane1 pGEZ-Term Lane2 pGEZ-Term/PD-L1; C: Lane1 pGEZ-Term/PD-L1 cut with PstI and EcoRI (M: Marker)

2.3 重组逆转录病毒载体 GFP 报告基因在 293T 细胞中的瞬时表达

重组逆转录病毒载体 pGEZ-Term/PD-L1 在两个辅助病毒的协助下共转染 293T 细胞,培养 48 h 后,流式细胞仪检测重组逆转录病毒载体中 GFP 报告基因的表达为 27% 左右(图 3:A1-3)。镜下可见部分产毒细胞形态略变,状态较差,少量细胞变圆、悬浮。

2.4 感染逆转录病毒颗粒的 L929 细胞中 GFP 报告基因的瞬时表达

L929 细胞用含有病毒颗粒的 293T 细胞培养上清感染 6 h,补加新鲜培养基继续培养 48 h 后,以 L929 细胞为对照,检测被感染 L929 细胞中 GFP 表达率可达 26% 左右(图 3:B1-3),表明上清中逆转录病毒滴度偏低,但用于筛选稳定表达株是完全可以接受的。

2.5 Zeocin 抗性细胞株中 GFP 报告基因的稳定表达

经 Zeocin 筛选出的抗药性 L929 转基因细胞,以 L929 细胞为对照,用流式细胞仪检测其中 GFP 报告基因的表达。L929 转 pGEZ-Term 和转 pGEZ-Term/PD-L1 的两种转基因细胞 GFP 表达率均可高达 99.9% (图 3:C1-3),与细胞抗药性能一致。

图 2 L929 转人 PD-L1 细胞构建流程图

Fig. 2 The construction procedure of transgenic L929 cell

2.6 RT-PCR 检测外源基因 mRNA 的转录

用 TRIZOL 试剂盒抽提 L929 转 PD-L1 基因的细胞总 mRNA,经 RT-PCR 检测目的基因的转录,并用 L929 和 L929 转 pGEZ-Term 细胞作对照。结果显示,L929 转人 PD-L1 细胞中有大约 873 bp 左右的片段扩增,而两组阴性对照均无特异性条带产生,进而表明导入的外源人 PD-L1 基因已整合到 L929 细胞基因组中并能很好地进行转录成相应的 mRNA(图 4)。

2.7 人 PD-L1 蛋白在 L929 细胞膜表面的表达

用直标单抗 PE-PD-L1 与 L929 转人 PD-L1 细胞反应,同时设 L929 和 L929 转 pGEZ-Term 细胞为对照,在 PE 波长下检测细胞标记情况,流式细胞仪检测显示 L929 转人 PD-L1 细胞阳性率为 99.7%,而 L929 和 L929 转 pGEZ-Term 细胞均为阴性,从而表明,人 PD-L1 基因不但转入到 L929 细胞中,而且能够成功地表达在 L929 细胞膜表面。该转基因细胞株阶段性筛选培养半年后,PD-L1 蛋白在 L929 细胞膜表面依然稳定高表

图3 GFP报告基因在293T细胞和L929细胞中的表达

Fig. 3 GFP report gene expression in 293T cell line and L929 cell line

A1-3: GFP report gene instant expression in 293T cell line, A1: 293T cell; A2: pGEZ-Term/293T cell; A3: pGEZ-Term/PD-L1/293T cell;
B1-3: GFP report gene instant expression in L929 cell line, B1: L929 cell; B2: pGEZ-Term/ L929 cell; B3: pGEZ-Term/PD-L1/ L929 cell;
C1-3: GFP report gene stable expression in L929 cell line, C1: L929 cell; C2: pGEZ-Term/ L929 cell; C3: pGEZ-Term/PD-L1/ L929 cell

达(图5)。

3 讨论

共刺激分子在免疫调节中的作用,越来越受到广大研究者的重视,已成为新的研究热点。PD-1是机体免疫反应中诱导表达产生的一个抑制性受体,通过与其配体PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC)相互作用,抑制T、B细胞的过度活化增殖,从而防止过度的免疫损伤和自身免疫性疾病的发生,有利于维持机体的免疫自稳^[7]。随着近两年PD-1两个配体基因的发现,该途径在免疫调节中的作用机制研究进入了一个新的阶段。T、B细胞表面的PD-1受体接受调节信号后导致IL-2,IL-4,IL-10, γ -IFN,GM-CSF等细胞因子表达量的变化,细胞活化增殖受抑^[4,8,11]。目前研究表明鼠PD-L1在癌组织上广泛表达,如:肺癌、肝癌、乳腺癌、鳞状

图4 RT-PCR鉴定转基因细胞

Fig. 4 Identification of transgenic L929 cell line by RT-PCR

Lane 1: L929 cell; Lane 2: pGEZ-Term/L929 cell;
Lane3: pGEZ-Term/PD-L1/L929 cell; M: Marker

细胞癌以及卵巢癌上均有一定表达,而且许多癌组织

的阳性率。本研究结果表明,筛选阳性率可达 100%。用单克隆抗体检测到 PD-L1 目的蛋白在 L929 细胞表面稳定高表达,可用于后续 PD-L1 分子的功能研究,同时 L929 细胞是鼠源性的,对小鼠具有较低的免疫原性,可以将该高表达目的蛋白的 L929 转人 PD-L1 细胞作为免疫源,免疫小鼠制备抗人 PD-L1 单克隆抗体。总之,PD-L1(B7-H1)编码区全长基因的成功克隆、逆转录病毒载体的构建和稳定表达人 PD-L1 蛋白细胞株的建立为对该基因的进一步研究奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] Lanzavecchia A, Lezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: A kinetic view of T cell behavior[J]. Cell, 1999, 96(1): 1-4.
- [2] Schwartz R H. A cell culture mode for T lymphocyte clonal anergy [J]. Science, 1990, 4961: 1349-1356.
- [3] Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: The two-signal model revisited[J]. Trends Immunol, 2001, 22(4): 217-223.
- [4] Freeman GF, Long AJ, Iwai Y, *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. J Exp Med, 2000, 192(7): 1027-1034.
- [5] Latchman Y, Wood CR, Chernnova C, *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibit T cell activation[J]. Nat Immunol, 2001, 2(3): 261-267.
- [6] Carter L, Fouser LA, Jussif J, *et al.* PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and is overcome by IL-2[J]. Eur J Immunol, 2002, 32: 634-643.
- [7] Nishimura H, Honjo T. PD-1: An inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance[J]. Trends Immunol, 2001, 22(5): 265-268.
- [8] Dong HD, Zhu G, Tamada K, *et al.* B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1365-1369.
- [9] Dong HD, Strome SE, Salomao DR, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion[J]. Nat Med, 2002, 8(8): 793-800.
- [10] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(19): 12293-12297.
- [11] Mazanet MM, Hughes CC. B7-h1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synt-hesis[J]. J Immunol, 2002, 169(7): 3581-3588.
- [12] 张华, 寿成超. 人源分泌型血管内皮细胞生长因子受体 flt-1 (I-IV 区) 的基因克隆及其腺病毒载体的构建和表达[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(4): 625-629

[收稿日期] 2002 - 10 - 21

[修回日期] 2003 - 01 - 10

图 5 人 PD-L1 在 L929 细胞中稳定表达

Fig. 5 Identification of L929 cell line expressing PD-L1 stably by mAb PE-PD-L1

A1: Mouse PE-IgG1/L929 cell; A2: PE-PD-L1/L929 cell;
B1: Mouse PE-IgG1/pGEZ-Term/L929 cell; B2: PE-PD-L1/
pGEZ-Term/L929 cell; C1: Mouse PE-IgG1/pGEZ-Term/PD-
L1/L929 cell; C2: PE-PD-L1/pGEZ-Term /PD-L1/L929 cell

经诱导后可使 PD-L1 呈上调性表达,从而促进 T 细胞的凋亡,可能与这些癌细胞的免疫逃避机制密切相关^[9]。阻断 PD-1/PD-L1 的相互作用有望为特异性肿瘤治疗提供潜在有效的方案^[10]。为进一步研究人 PD-L1 在 PD-1/PD-L 途径中的作用,我们通过 PCR 的方法成功克隆了该基因,并将 PD-L1 基因重组入逆转录病毒载体,在辅助病毒载体的协助下,经包装细胞包装成具有感染能力的病毒颗粒,进而用病毒感染其他目的细胞,筛选稳定表达株。如果将包装细胞上清中病毒分离浓缩,提高其滴度再感染肿瘤细胞,可研究 PD-L1 基因在肿瘤细胞中的功能。为解决上清中病毒滴度低的问题,可以采用反复多次感染,有助于提高感染效率。另一种方法就是收集包装细胞反复冻融或超声波破碎,使细胞中的病毒颗粒全部释放出来,再用其上清感染目的细胞。实验中该方法收集上清只需感染 1 次即可。pGEZ-Term 逆转录病毒载体中既有 Zeocin 抗性标记基因,又有绿色荧光蛋白 GFP 报告基因,对于转基因细胞具有双重的筛选作用,大大提高了所筛细胞