

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.002

· 研究快报 ·

## Ad5/F35-MAGE-A3 的构建及其对黑素瘤患者 DC 成熟和凋亡的影响

张晓颖<sup>1</sup>, 徐晗<sup>2</sup>, 张斌<sup>1▲</sup>, 陈虎<sup>1</sup>(1. 解放军 307 医院 造血干细胞移植中心 全军造血干细胞研究所, 北京 100071; 2. 金华市中心医院 血液科, 浙江 金华 321000)

**[摘要]** **目的:**构建含人黑素瘤相关抗原 3 (melanoma-associated antigen 3, MAGE-A3) 的重组 5/35 型腺病毒(adenovirus serotype 5/35, Ad5/F35), 观察腺病毒介导的 MAGE-A3 过表达对黑素瘤患者树突状细胞(dendritic cell, DC)的成熟和凋亡的影响。**方法:**选择转染效率最高的腺病毒载体, 构建重组腺病毒载体并包装腺病毒颗粒 Ad5/F35-MAGE-A3。免疫组化和 Western blotting 检测 Ad5/F35-MAGE-A3 感染对健康人、肾癌患者及黑素瘤患者 DC 中 MAGE-A3 表达的影响, 流式细胞术检测 Ad5/F35-MAGE-A3 感染对黑素瘤患者 DC 成熟和凋亡的影响。**结果:**成功构建了含人 MAGE-A3 的重组腺病毒载体并包装腺病毒颗粒 Ad5/F35-MAGE-A3, 病毒感染滴度为  $7.94 \times 10^8$  IU/ml。Ad5/F35-MAGE-A3 感染显著提高了健康人和肾癌患者 DC 中 MAGE-A3 的表达 ( $P < 0.05$ ), 不影响黑素瘤患者 DC 中 MAGE-A3 的表达 [ $(0.3352 \pm 0.1272)$  vs  $(0.4672 \pm 0.0704)$ ],  $P > 0.05$ ]。Ad5/F35-MAGE-A3 感染后黑素瘤患者 DC 共刺激分子 CD80 [ $(20.42 \pm 0.58)\%$  vs  $(10.22 \pm 1.04)\%$ 、 $(8.95 \pm 0.2)\%$ ]、CD86 [ $(85.3 \pm 3.98)\%$  vs  $(39.85 \pm 2.86)\%$ 、 $(34.1 \pm 4.32)\%$ ] 和 HLA-DR [ $(86.87 \pm 4.36)\%$  vs  $(63.68 \pm 3.15)\%$ 、 $(60.69 \pm 4.81)\%$ ] 的表达明显高于阴性对照组和空白对照组(均  $P < 0.05$ ), 但 DC 凋亡率无显著差异 [ $(1.18 \pm 0.09)\%$  vs  $(1.09 \pm 0.11)\%$ ],  $P > 0.05$ ]。**结论:**重组腺病毒载体 Ad5/F35-MAGE-A3 能够高效转染黑素瘤患者的 DC, 感染后不影响 MAGE-A3 在 DC 中的表达, 能够促进 DC 的成熟, 无明显细胞毒作用。

**[关键词]** 黑素瘤相关抗原 3; 树突状细胞; 腺病毒载体; 黑素瘤

**[中图分类号]** R739.5; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)06-0637-08

## Construction of recombinant adenovirus Ad5/F35-MAGE-A3 and its effect on maturation and apoptosis of dendritic cells in patients with melanoma

Zhang Xiaoying<sup>1</sup>, Xu Han<sup>2</sup>, Zhang Bin<sup>1▲</sup>, Chen Hu<sup>1</sup>(1. Institute of Hematopoietic Stem Cell of PLA, Hematopoietic Stem Cell Transplantation Center, No. 307 Hospital of PLA, Beijing 100071, China; 2. Department of Hematology, Central Hospital of Jinhua, Jinhua 321000, Zhejiang, China)

**[Abstract]** **Objective:**To construct a recombinant adenovirus Ad5/F35 containing human melanoma-associated antigen 3 (MAGE-A3), and to observe the effect of adenovirus-mediated MAGE-A3 overexpression on the maturation and apoptosis of dendritic cells (DCs) in patients with melanoma. **Methods:** To choose the adenoviral vectors with the highest transfection efficiency, and then to construct recombinant adenovirus vectors and packaging adenovirus particles Ad5/F35-MAGE-A3. Immunohistochemistry and Western blotting were performed to detect the influence of Ad5/F35-MAGE-A3 infection on the expression of MAGE-A3 of DCs in healthy people and patients with kidney cancer or melanoma. Flow cytometry was used to detect the effect of Ad5/F35-MAGE-A3 infection on the maturation and apoptosis of DCs in patients with melanoma. **Results:** The recombinant adenovirus vector containing human MAGE-A3 was successfully constructed and adenovirus particles Ad5/F35-MAGE-A3 were packaged with the infective titer of  $7.94 \times 10^8$  IU/ml. Ad5/F35-MAGE-A3 infection improved the MAGE-A3 expression of DCs in healthy people and kidney cancer patients ( $P < 0.05$ ),

**[基金项目]** “十一五”新药创制重大专项资助项目(No. 2009zx09503)。Project supported by the Key Drug Creation and Development Program of the “Eleventh Five-year Plan”(No. 2009zx09503)

**[作者简介]** 张晓颖(1982-), 女, 河北省迁西市人, 博士生, 主要从事造血干细胞移植和细胞免疫治疗的研究。E-mail:xyzhang830@163.com

**[通信作者]** 陈虎(Chen Hu, corresponding author), E-mail:chenhu217@aliyun.com; 张斌(Zhang Bin, co-corresponding author), E-mail:zb307ctc@163.com。▲共同通信作者

**[网络出版]** http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20131202.1522.002.html

and it did not affect MAGE-A3 expression of DCs in melanoma patients ( $[0.3352 \pm 0.1272]$  vs  $[0.4672 \pm 0.0704]$ ,  $P > 0.05$ ). After Ad5/F35-MAGE-A3 infection, the co-stimulatory molecule CD80 ( $[20.42 \pm 0.58]\%$  vs  $[10.22 \pm 1.04]\%$ ,  $[8.95 \pm 0.2]\%$ ), CD86 ( $[85.3 \pm 3.98]\%$  vs  $[39.85 \pm 2.86]\%$ ,  $[34.1 \pm 4.32]\%$ ) and HLA-DR ( $[86.87 \pm 4.36]\%$  vs  $[63.68 \pm 3.15]\%$ ,  $[60.69 \pm 4.81]\%$ ) which expressed on the surface of DCs was significantly higher than that of the negative control group and the blank control group (all  $P < 0.05$ ), but no significant difference existed in apoptosis rate ( $[1.18 \pm 0.09]\%$  vs  $[1.09 \pm 0.11]\%$ ,  $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Recombinant adenovirus vector can efficiently affect DCs. Ad5/F35-MAGE-A3 infection may not affect the expression of MAGE-A3 of DCs in melanoma patients, and promote the maturation of DCs without obvious cytotoxicity.

[ **Key words** ] melanoma-associated antigen 3; dendritic cell; adenovirus vector; melanoma

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 637-644 ]

人黑素瘤相关抗原 3 (melanoma-associated antigen 3, MAGE-A3) 是一种肿瘤-睾丸抗原 (cancer-testis antigen, CTA), 属于黑素瘤相关抗原家族, 在黑素瘤、肝癌、前列腺癌等恶性肿瘤细胞表面都有表达, 是肿瘤疫苗中理想的靶抗原<sup>[1-2]</sup>。以 MAGE-A3 为靶点的树突状细胞 (dendritic cell, DC) 疫苗在肿瘤治疗的基础和临床研究中的应用日趋成熟<sup>[3-4]</sup>。目前, 人类腺病毒载体广泛应用于 DC 疫苗的制备, 因其具有安全性好、能有效增殖、滴度高等特点而非常适合用于基因治疗<sup>[5]</sup>。大多数载体都是以 5 型腺病毒 (adenovirus serotype 5, Ad5) 为基础构建的, 但 Ad5 对 DC、造血干细胞及恶性肿瘤细胞的感染率较低, 限制了其应用, 因此应对 Ad5 进行改造。对 Ad5 的纤维顶球进行了改造获得的腺病毒 Ad5/F11p 对于血液细胞的转导靶向性更好; 用 Ad35 的纤突蛋白改造 Ad5, 制造出嵌合型腺病毒载体 Ad5/F35, 可有效提高对 DC 等细胞的感染率<sup>[6-7]</sup>。本研究通过构建复制缺陷型第一代 Ad5 载体 Ad5/F35-MAGE-A3, 探讨腺病毒介导的 MAGE-A3 过表达对黑素瘤患者 DC 成熟和凋亡的影响, 为其应用于 DC 疫苗的制备奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及材料

兔抗人 MAGE-A3 抗体购自美国 Abcam 公司, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、通用型二步法检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, FITC 标记的驴抗兔 IgG 抗体购自美国 Biolegend 公司, rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF- $\alpha$  均购自美国 Pepro-Tech EC 公司, CCR7-PE、CD80-PE、CD83-FITC、CD86-FITC、HLA-DR-PerCP 和 CD11c-APC 均购自美国 BD 公司, DMEM 培养基、胎牛血清均购自美国 Thermo 公司, 无血清培养基 X-VIVO 购自瑞士 Lonza 公司。重组腺病毒载体 Ad5/F35-EGFP (感染滴度

为  $1.8 \times 10^{10}$  PFU/ml)、Ad5-EGFP (感染滴度为  $1.5 \times 10^{10}$  PFU/ml) 均由本元正阳基因技术有限公司提供, 重组腺病毒载体 Ad5/F11p-EGFP (感染滴度为  $1.5 \times 10^{10}$  PFU/ml) 由军事医学科学院放射与辐射研究所提供, 载体质粒 pOTB7-MAGE-A3 由本室保存, 穿梭质粒 pDC316-MAGE-A3 由本元正阳基因技术有限公司构建。

### 1.2 DC 的培养

血细胞分离机采集健康人、黑素瘤和肾癌患者外周血各 50 ml, 经 Ficoll 液分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 以  $2.5 \times 10^6$  个/ml 细胞加入 12 孔板中, 每孔细胞悬液 1 ml, 放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养; 贴壁 2 h 后, 加 rhIL-4 50 ng/ml、rhGM-CSF 100 ng/ml, 继续培养 72 h; 第 3 天和第 5 天常规换液, 第 7 天收获成熟 DC, 用于检测。

### 1.3 荧光显微镜观察、流式细胞术检测三种腺病毒载体对 DC 的转染效率

在 DC 培养第 5 天, 分别按不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值 (200、500、1 000) 将 Ad5/F35-EGFP、Ad5-EGFP 及 Ad5/F11p-EGFP 3 种腺病毒载体转染健康人 DC, 并设置不转染的空白对照组, 每组 3 个复孔。转染后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 倒置荧光显微镜观察 DC 中 EGFP 的表达并拍照。同时, 取各组细胞置于 EP 管内, 离心弃去上清液, 每管内加 200 ~ 300  $\mu$ l PBS 重悬, 流式细胞术检测三种腺病毒载体对 DC 的转染效率, 挑选转染效率最高者进行下一步实验。

### 1.4 腺病毒载体 Ad5/F35-MAGE-A3 的构建与病毒颗粒的制备

根据 NCBI 提供的 MAGE-A3 基因序列 (BC005963), 交由武汉三鹰生物技术有限公司选择载体质粒 pOTB7-MAGE-A3, 将该质粒经 PCR 获得的 945 bp 左右的 MAGE-A3 基因片段克隆至穿梭质

粒 pDC316-mCMV 上,获得腺病毒载体 Ad5/F35-MAGE-A3。热休克法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,阳性克隆扩大培养后提取质粒,经双酶切、PCR 和测序验证。同时构建不含目的基因的空腺病毒载体 pDC316-EGFP 作为对照。构建好的腺病毒载体 Ad5/F35-MAGE-A3 与空腺病毒载体 pDC316-EGFP 由本元正阳基因公司进行重组腺病毒的包装与纯化。

### 1.5 免疫组织化学法检测 Ad5/F35-MAGE-A3 感染对 DC 中 MAGE-A3 表达的影响

培养至第 5 天的健康人、肾癌患者及黑素瘤患者 DC 分别以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度接种于六孔板,转染组以 MOI = 500 感染病毒颗粒 Ad5/F35-MAGE-A3,未转染组不感染病毒颗粒,两组 DC 均置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h, PBS 洗涤并重悬细胞后,用离心涂片机制备 4 张细胞涂片。按照通用型二步法检测试剂盒说明进行免疫组化染色。将转染组和未转染组各分成两组,分别为实验组和阴性对照组。实验组加入兔抗人的抗 MAGE-A3 抗体 (1:100),阴性对照组用 PBS 代替一抗。最后将涂片置于显微镜下观察 MAGE-A3 的表达,并用 PPI 6.0 软件计算光密度值。

### 1.6 Western blotting 检测 Ad5/F35-MAGE-A3 感染对健康人 DC 中 MAGE-A3 表达的影响

培养至第 5 天的健康人 DC 以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度接种于 6 孔板,实验组以 MOI = 500 感染病毒 Ad5/F35-MAGE-A3,并设置未转染的对照组,两组 DC 均置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后收集 DC,提取总蛋白并定量。调整蛋白浓度至相同水平进行 SDS-PAGE,蛋白电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭。加入兔抗人的抗 MAGE-A3 蛋白抗体 (1:100), $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜, TBST 洗涤 3 次。加入 HRP 标记的二抗 (1:1 000),室温反应, TBST 洗涤 3 次。ECL 发光,以胶片显影,定影。

### 1.7 流式细胞术检测转染 Ad5/F35-MAGE-A3 对黑素瘤患者 DC 表型的影响

培养至第 5 天的黑素瘤患者 DC,以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度接种于 6 孔板,分为实验组、阴性对照组和空白对照组。实验组以 MOI = 500 感染腺病毒 Ad5/F35-MAGE-A3,阴性对照组感染空白腺病毒 pDC316-EGFP,空白对照组 DC 不做任何处理。将 3 组 DC 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。然后加入 rhTNF- $\alpha$  至终质量浓度 33.3 ng/ml,继续培养 48 h 后收集 3 组细胞,各取  $1 \times 10^6$  个 DC 分置于 4 个 EP 管内。每组的第 1 个 EP 管设置为空白对照

管,第 2 个 EP 管内加入 PE-CD80 抗体和 FITC-CD86 抗体,第 3 个 EP 管内加入 FITC-CD83 抗体和 PE-CCR7 抗体,第 4 个 EP 管内加入 PerCP-HLA-DR 抗体和 APC-CD11c 抗体,室温下避光静置 30 min,用 PBS 冲洗、重悬,流式细胞术检测 Ad5/F35-MAGE-A3 感染对 DC 表型的影响。

### 1.8 流式细胞术检测转染 Ad5/F35-MAGE-A3 对黑素瘤患者 DC 凋亡的影响

培养至第 5 天的黑素瘤患者 DC,以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于 6 孔板中,分为实验组、阴性对照组和空白对照组,实验组以 MOI = 500 感染腺病毒 Ad5/F35-MAGE-A3,阴性对照组感染空白腺病毒 pDC316-EGFP,空白对照组 DC 不做任何处理。将 3 组 DC 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h,然后加入 rhTNF- $\alpha$  至终质量浓度 33.3 ng/ml,继续培养 48 h 后收集 3 组细胞。取  $1 \times 10^6$  个 DC,加入 PI 染色,避光静置 30 min 后,用 PBS 冲洗、重悬,流式细胞仪检测 Ad5/F35-MAGE-A3 感染对 DC 凋亡的影响。

### 1.9 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SAS9.1 统计分析,组间比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组腺病毒载体 Ad5/F35-EGFP 高效转染 DC

荧光倒置显微镜下观察 Ad5/F35-EGFP、Ad5-EGFP 及 Ad5/F11p-EGFP 3 种重组腺病毒载体转染的 DC 中 EGFP 的表达,在蓝色荧光激发下,可见部分细胞发出强弱不等的绿色荧光,随着 MOI 值的增加,绿色荧光逐渐增强。同时可见,在相同 MOI 值条件下 Ad5/F35-EGFP 转染的 DC 荧光最强(图 1)。

流式细胞仪检测 EGFP 阳性细胞比例,结果显示(图 2),3 种重组腺病毒载体对 DC 的感染效率都随 MOI 值的增加而增大 ( $P < 0.05$ ),在相同 MOI 值条件下,Ad5/F35-EGFP 的感染效率最高。在 MOI = 200 时,Ad5/F35-EGFP 组的感染效率即显著高于 Ad5-EGFP 组和 Ad5F11p-EGFP 组 [ $(60.68 \pm 3.76)\% \text{ vs } (0.15 \pm 0.03)\%、(0.58 \pm 0.32)\%$ ,均  $P < 0.01$ ];在 MOI = 500 时,Ad5/F35-EGFP 组的感染效率达到最高 [ $(87.31 \pm 6.85)\% \text{ vs } (0.67 \pm 0.14)\%、(2.47 \pm 0.47)\%$ ,均  $P < 0.01$ ]。并且,Ad5/F35-EGFP 组在 MOI 为 500 和 1 000 时对 DC 感染效率的差异无统计学意义 [ $(87.31 \pm 6.85)\% \text{ vs } (89.77 \pm 3.08)\%$ , $P > 0.05$ ]。

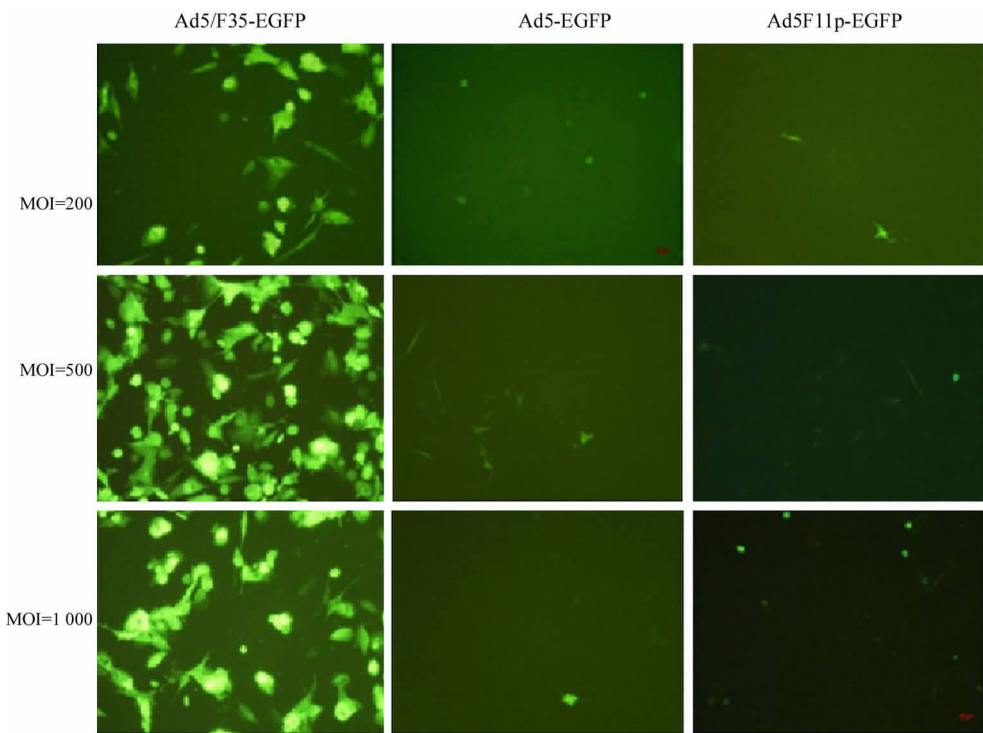


图 1 三种重组腺病毒载体转染 DC 后 EGFP 的表达( ×100 )

Fig. 1 Expression of EGFP in DC after transfected by three kinds of recombinant adenovirus vectors( ×100 )

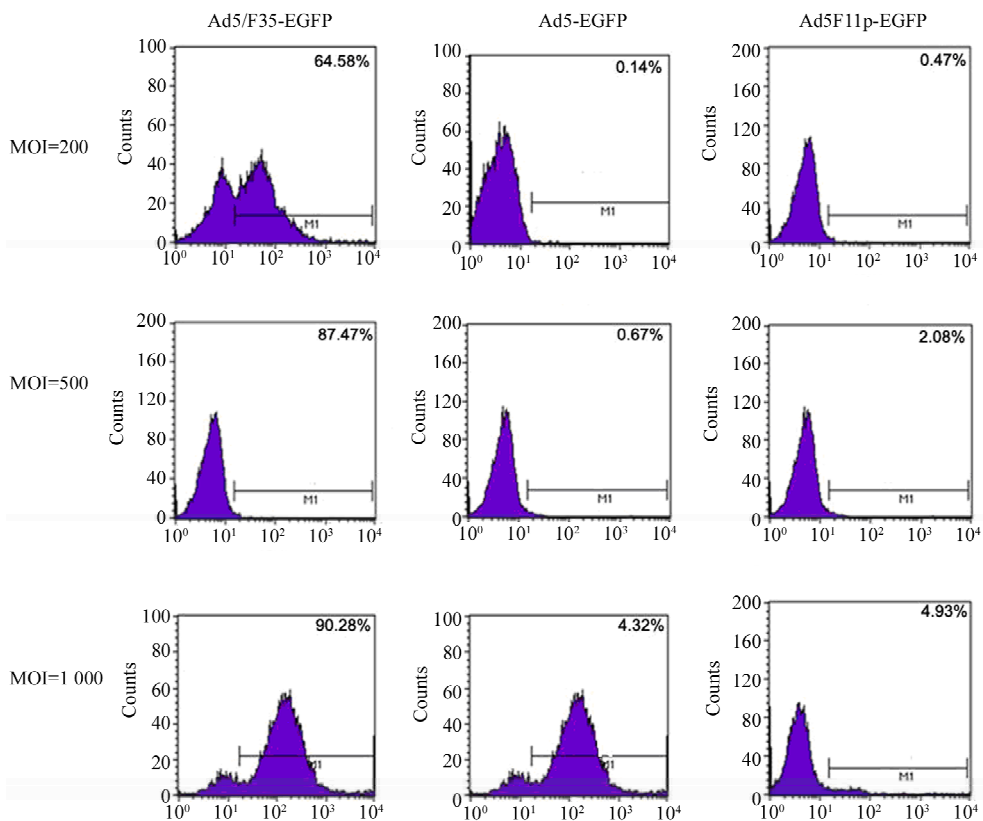


图 2 三种腺病毒载体在不同 MOI 值时对 DC 的转染效率

Fig. 2 Transfection efficiency of three kinds of adenoviral vectors transfected into DC with different MOI values

### 2.2 成功构建重组穿梭质粒 pDC316-MAGE-A3

以设计的引物和 pOTB7-MAGE-A3 为模板进行 PCR,产物经琼脂糖凝胶电泳,在 950 bp 处可见清晰条带,与 *MAGE-A3* 基因目的片段大小相符(图 3);重组质粒 pDC316-MAGE-A3 经 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切后,在 945 bp 和 5 800 bp 处分别可见目的基因片段和穿梭质粒 pDC316 片段(图 4),与预期结果一致。测序结果显示,克隆的 *MAGE-A3* 基因片段长 945 bp,与 GenBank 收录的原始序列相同。纯化后的 Ad5/F35-MAGE-A3 重组腺病毒颗粒感染滴度  $TCID_{50} = 7.94 \times 10^8 IU/ml$ 。

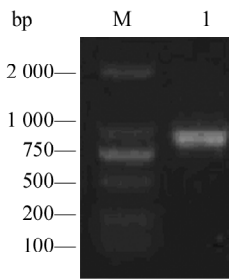


图 3 *MAGE-A3* 基因片段的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of *MAGE-A3* gene fragment

1: The vector plasmid pOTB7-MAGE-A3; M: Marker

### 2.3 Ad5/F35-MAGE-A3 感染不影响黑色素瘤患者 DC 中 *MAGE-A3* 的表达

免疫组织化学法检测结果(图 5)显示,健康人

DC 中不表达 *MAGE-A3* 抗原(  $0.0447 \pm 0.0083$  ),肾癌患者 DC 中低水平表达 *MAGE-A3* 抗原(  $0.1025 \pm 0.0335$  ),而黑色素瘤患者 DC 中高表达 *MAGE-A3* 抗原(  $0.3352 \pm 0.1272$  )。转染 Ad5/F35-MAGE-A3 可以显著提高健康人(  $0.3716 \pm 0.0988$  )、肾癌患者(  $0.3731 \pm 0.0958$  )DC 中 *MAGE-A3* 的表达(均  $P < 0.05$  ),而对黑色素瘤患者 DC 中 *MAGE-A3* 表达(  $0.4672 \pm 0.0704$  )无显著影响(  $P > 0.05$  )。

Western blotting 检测结果(图 6)显示,转染 Ad5/F35-MAGE-A3 的健康人 DC 中可以见到在相对分子质量 35 000 处 *MAGE-A3* 蛋白的高表达,对照组在该处没有 *MAGE-A3* 蛋白的表达。

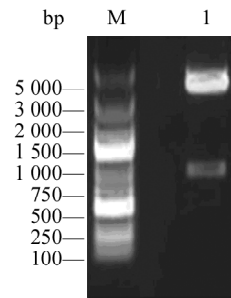


图 4 重组质粒 pDC316-MAGE-A3 的 *Bgl* II/*Sal* I 双酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pOTB7-MAGE-A3 by *Bgl* II/*Sal* I double digestion

1: Shuttle plasmid pDC316-MAGE-A3; M: Marker

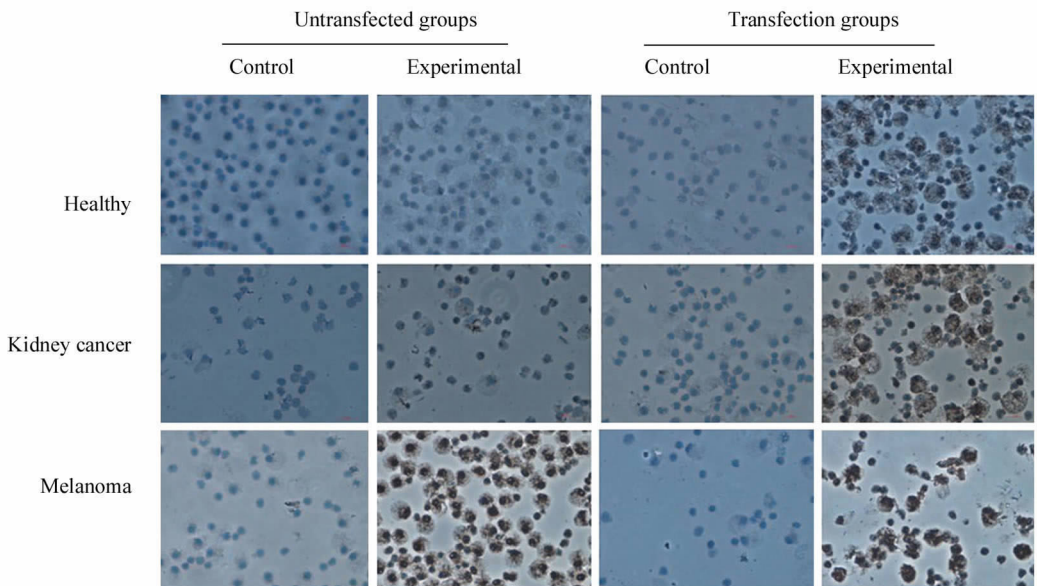


图 5 Ad5/F35-MAGE-A3 感染促进 DC 中 *MAGE-A3* 的表达(  $\times 400$  )

Fig. 5 Ad/F35-MAGE-A3 transfected promoting the expression of *MAGE-A3* in DC(  $\times 400$  )

2.4 Ad5/F35-MAGE-A3 感染对黑色素瘤患者 DC 表型的影响

流式细胞术检测结果(图 7)显示,与阴性对照组和空白对照组相比,Ad5/F35-MAGE-A3 感染后 DC 表面共刺激分子 CD80 [(20.42 ± 0.58)% vs (10.22 ± 1.04)%、(8.95 ± 0.20)%]、CD86 [(85.3 ± 3.98)% vs (39.85 ± 2.86)%、(34.1 ± 4.32)%] 和 HLA-DR [(86.87 ± 4.36)% vs (63.68 ± 3.15)%、(60.69 ± 4.81)%] 的表达明显升高(均  $P < 0.05$ ),CD83、CCR7、CD11c 的表达无显著变化( $P > 0.05$ ),证明实验组 DC 的成熟度高于对照组。

2.5 Ad5/F35-MAGE-A3 感染不影响黑色素瘤患者 DC 的凋亡

流式细胞术检测结果(图 8)显示,实验组和对

照组 DC 凋亡率的差异无统计学意义[(1.18 ± 0.09)% vs (1.09 ± 0.11)% ,  $P > 0.05$  ]。

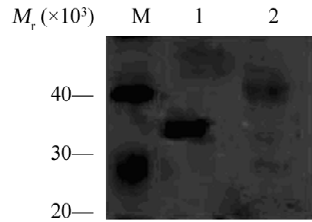


图 6 Ad5/F35-MAGE-A3 感染促进 DC 中 MAGE-A3 的表达

Fig. 6 Ad/F35-MAGE-A3 transfected promoting the expression of MAGE-A3 in DC

M: Marker; 1: Ad5/F35-MAGE-A3; 2: Control

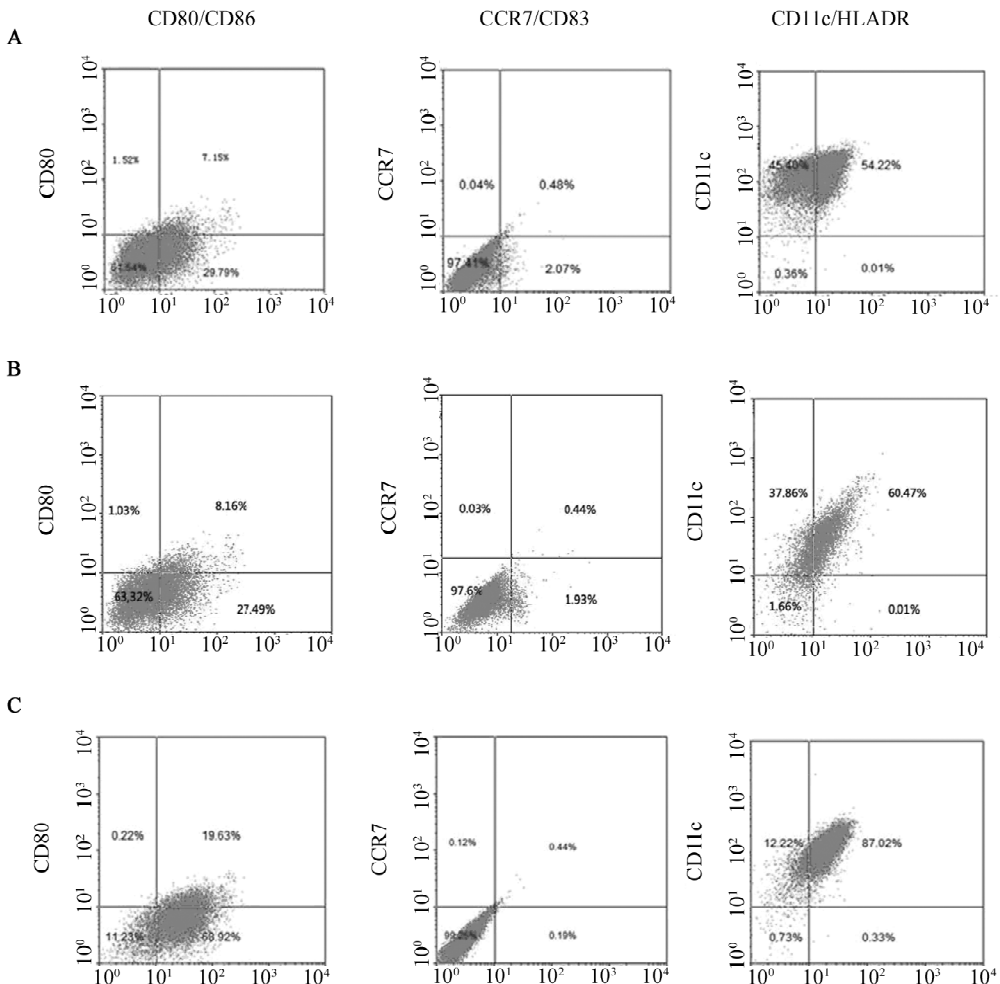


图 7 流式细胞术检测 Ad5/F35-MAGE-A3 感染后 DC 表型的变化

Fig. 7 Change of the phenotype of DC after Ad5/F35-MAGE-A3 infection detected by flow cytometry

A: Blank control; B: Negative control; C: Experimental