

表达人癌胚抗原重组痘苗病毒的构建^①

杨洁^{1②} 杨太成² 罗超权¹ 王晓怀²

杨英浩¹ 江悦华² 伍新尧¹

(1 中山医科大学生化教研室; 广州, 510089 2 广州军区总医院医学实验科; 广州, 510036)

摘要 用痘苗病毒作载体,成功构建了高效表达人癌胚抗原(CEA)的 CEA重组痘苗病毒,用 143TK 细胞作为宿主细胞,表达的蛋白质只在细胞膜上能检测到,而胞质内和细胞上清液中均未能检测到,可见所表达的蛋白质保持了其原有特性,再次证实痘苗病毒是真核表达的有效载体。本结果为进一步研究 CEA重组痘苗病毒能否激活机体的免疫系统杀伤表达 CEA的肿瘤提供了物质基础。

关键词 痘苗病毒 遗传学; 癌胚抗原; 基因表达; 基因重排

中图分类号 Q 344.13

癌胚抗原(CEA)是一种最常用的肿瘤相关抗原。临床上用其作为检测胃肠道肿瘤的指标^[1],并用来评估胃肠道肿瘤患者手术后的预后。目前,有关肿瘤逃避机体免疫反应的机理尚不完全清楚,有人认为是肿瘤自身及其相关抗原的免疫原性弱,或是抗原提呈障碍从而不能激活机体的体液免疫和细胞免疫系统,导致不能杀死肿瘤细胞^[2]。若将弱免疫原与一强免疫原共同表达,则可以对前者起抗原提呈作用,增强其抗原性。痘苗病毒具有很强的免疫原性,近几年人们又发现了它的新用途——表达外源基因的载体^[3,4]。将外源基因插入痘苗病毒后可获得高效表达,并具有抗原提呈作用,提高外源基因的免疫原性。更有意义的一点是所表达的外源基因产物可被有效地糖基化,并可被转移到细胞表面。本实验将 CEA-cDNA 基因插入痘苗病毒的非必需区 TK, 组成 CEA重组痘苗病毒并获得高效表达,进一步研究对于相关肿瘤的基因治疗。

1 材料与方 法

1.1 质 粒

含 CEA-cDNA 的质粒由加拿大 Kaufman 实验室惠赠^[5]。pGEM 7Zi(+)和 pBluescript SK 质粒购自华美生物工程公司北京分公司。pJ120 质粒由中

国预防医学科学院病毒学研究所惠赠,含有痘苗病毒天坛株 11K 晚期启动子(P11K)和 25K 早期启动子(P25K)反向串联^[6], P11K 下游有多酶切点供插入外源基因, P25K 下游为 *LacZ* 基因作为选择标记,旁边为天坛株 TK 基因左右侧翼序列, P11K ATG 与 *StuI* 切点间有 TAG 终止密码子以保证在 *StuI* 位点下游的多酶切点表达的外源基因产物为非融合蛋白^[7]。

1.2 细胞和病毒

1.2.1 143TK 细胞株 由广州军区总院惠赠,是胸苷嘧啶缺陷的人骨髓瘤细胞,可在含有 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BUDR)的培养基中生长而不能存活于含 HAT 的培养基中,使用前在含 25 mg/L 5-BUDR 的培养液传代 2 次。

1.2.2 痘苗病毒天坛株(761) 由中国预防医学科学院病毒学研究所惠赠,在含 HAT 培养基中鉴定,用噬斑法测定滴度(PFU_{1mL})。

1.2.3 外源基因与痘苗病毒的重组 参考文献[4],先用天坛株野生型感染 70%~80% 成片生长的 143TK 细胞, 37℃ 孵育 2 h,每 15 min 摇 1 次,同时配制溶液 A 和溶液 B(A 液: 100 μL 不含小牛血清的 1640 培养液,加入 1.5 μg pJ-CEA 质粒 DNA; B 液: 100 μL 不含小牛血清的 1640 培养液加入 15 μL Lipofectamine)。溶液 A 和 B 混合后于室温放置 30 min,加入含 10% 小牛血清的 1640 培养液。吸

① 广东省卫生厅“九五”五个一工程项目资助课题; ② 第一作者, 1968 年出生, 女, 博士生

除培养瓶中的病毒液,加入含溶液 A 和 B 的培养液,37°C 孵育 5 h 吸除培养液,加入 10 mL 含 10% 小牛血清,0.8% 低溶点琼脂糖,25 mg/L 5-BUDR 及 30 μL X-gal 的 1640 培养液,室温放 15 min 凝固后,37°C 培养 48 h 根据 TK 和 LacZ 蓝斑双重特征进行筛选。将选出的蓝斑纯化 3 次,之后大量扩增鉴定。

1.3 重组痘苗病毒的鉴定

1.3.1 PCR 法 根据 CEA-cDNA 的序列设计一对引物。因该引物不仅用于鉴定 CEA,还要用于其它实验,所以在引物 1 的 5' 端设计有 XhoI 酶切点和 ATG,引物 2 的 5' 端有 ClaI 酶切点和 TAG,两条引物序列如下:引物 1 5'-CTCGAGATGCCGAGCTGCCCAAGCCCT-3' 引物 2 5'-ATCGATCTAAGAGACTGTGATGCTCTTG-3'。

1.3.2 放射免疫法测定 CEA 的表达量 用重组痘苗病毒液和野生型痘苗病毒液分别感染 80% 成片生长的 143TK 细胞,培养 48 h 后,收集细胞及培养液,离心后将上清液 1 保存,细胞沉淀加 200 μL STE 混匀后 -20°C 反复冻融 5 次,再离心,保存上清液 2,细胞碎片加 200 μL STE 混匀加 10% SDS 10 μL,置室温 1 h,用放射免疫方法测定 CEA 的含量。待测标本为野生型痘苗病毒:上清液 1 上清液 2 细胞碎片;重组型痘苗病毒:上清液 1 上清液 2 细胞碎片。

1.4 主要试剂来源

所有限制性内切酶和 T₄DNA 连接酶购自华美公司,放射免疫试剂盒购自上海生物制品研究所。

2 结 果

2.1 pJ-CEA 重组质粒的构建

电脑查寻 CEA-cDNA 全序列上限制性内切酶位点,与 pJ120 质粒 P11K 启动子下游的多酶切点进行比较,pJ120 上可供插入 CEA 片段的切点只有 Xhd 位点,而 CEA 片段是从 p91023B-CEA-17 质粒经 EcoRI 酶切获得的,在 CEA 片段两端没有 Xhd 位点,这就需要经过两个中间载体 pGEM 7Zf (+) 和 pBluescript SK,利用 LacZ 作为选择标记,经蓝白斑筛选,挑出白斑,酶切鉴定为 pBlue-CEA 这时在 CEA 片段两端各接上了一个 Xhd 位点,即可将 CEA 片段顺利插入 pJ120 质粒。酶切鉴定结果见图 1

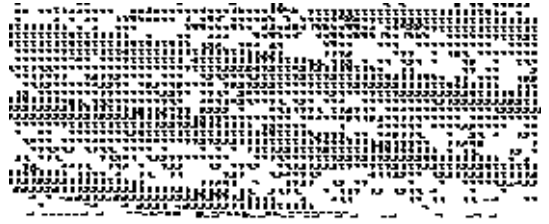


图 1 pJ120, pJ-CEA 及 p91023B-CEA-17 质粒酶切

1. Marker λ DNA / HindIII; 2. pJ120 质粒 DNA; 3. pJ-CEA 质粒 DNA; 4. p91023B-CEA-17 质粒 DNA; 5. pJ120 质粒 Xhd 酶切; 6. pJ-CEA 质粒 Xhd 酶切; 7. p91023B-CEA-17 质粒 EcoRI 酶切

2.2 重组痘苗病毒-CEA 的构建

重组病毒的构建通过脂质体共沉淀法在细胞内经同源重组完成。pJ-CEA 质粒的 TK1 和 TK2 片段与同源的痘苗病毒的完整 TK 片段置换,将 CEA 片段插入病毒的 TK 片段,含有 CEA 的重组痘苗病毒为 TK,经含有 5-BUDR 的培养液的筛选,TK 的野生型病毒不能生存,只有 TK 的重组病毒才能繁殖,再有 LacZ 蓝斑进行双重选择,即可获得重组病毒-CEA 经过 3 次纯化,可大量繁殖收获纯净稳定的重组痘苗病毒-CEA

2.3 重组痘苗病毒-CEA 的鉴定

2.3.1 PCR 法 因为 CEA-cDNA 序列含有 3 段可编码有相当高保守性的氨基酸片段(称为 1, 2 和 3 片段),本实验根据这一特点设计了一对引物,可将含 CEA 的模板扩增产生 3 条带:含单一片段(1, 2 和 3 的混合物),含两个片段(1+ 2 和 2+ 3 的混合物),含 3 个片段(1+ 2+ 3)。按常规方法提取野生型病毒和重组型病毒的 DNA,用 pJ-CEA 作为对照,PCR 反应后经 0.8% 琼脂糖电泳,结果如图 2 示。PCR 扩增后重组病毒具有与 pJ-CEA 相同的带型,可见重组病毒含有 CEA 片段。

2.3.2 重组痘苗病毒-CEA 表达产物的鉴定 用放射性免疫法测定结果如表 1 野生型病毒在 3 个样品中均未能测到 CEA 的表达,重组型病毒在两上清液只测得 5 ng/L,细胞碎片测得值 70.7 ng/L,而该试剂盒要求 > 15 ng/L 才有意义,可见转化的细胞有 CEA 的高效表达并将 CEA 主要输送到细胞表面。



图 2 PCR电泳结果

1. pJ-CEA PCR; 2. Marker λ DN A / *Hind*III; 3. CEA-重组痘苗病毒 PCR; 4. 野生型痘苗病毒 PCR

表 1 放射免疫法测定 CEA 含量 (ng/L)

	野生型 痘苗病毒	重组型 痘苗病毒
上清液 1	0	5
上清液 2	0	5
细胞碎片	0	70.7

3 讨论

本文用痘苗病毒作载体,插入外源基因 CEA-cDN A片段后观察到野生型痘苗病毒感染 143TK 细胞所形成的蚀斑大而典型,大部分细胞死亡脱落;而重组痘苗病毒感染 143TK 细胞形成的蚀斑小而不典型,细胞明显病变但没有脱落。可见由于外源基因插入痘苗病毒的非必需区 TK 基因片段而降低了它的毒性(图 3)



图 3 143TK 细胞被病毒感染前后的生长情况

1. 正常生长的 143TK 细胞; 2. 野生型痘苗病毒感染 143 细胞 24 h 的蚀斑; 3. 重组痘苗病毒-CEA 感染 143TK 细胞 24 h 的蚀斑 ($\times 10$)

由于 CEA 基因片段是在痘苗病毒 P11K 启动子之下,在 CEA 的起始密码子之前加入了终止密码

子 TAG,保证了表达的 CEA 是非融合蛋白。本文用放射免疫法测得重组痘苗病毒感染 143TK 细胞后的培养上清液及细胞裂解上清液中 CEA 的含量很少,没有达到有意义值,即在细胞外和胞浆内几乎无 CEA,但在感染后 143TK 细胞碎片中测到 CEA 的含量很高。提示痘苗病毒具有完整的蛋白质翻译后加工系统,可以高效而准确地表达细胞膜糖蛋白 CEA 并将其运输到宿主细胞膜上,这说明痘苗病毒是一良好的真核表达载体,其表达产物保持了蛋白质原有特性。

由于胃肠道肿瘤、乳腺癌等多种肿瘤患者体内有 CEA 的高水平表达,但测不到抗 CEA 抗体,若将 CEA 重组痘苗病毒导入患者的体内,利用痘苗病毒能提呈弱免疫原的特性,刺激机体产生抗 CEA 抗体,激活机体的免疫系统,可望有杀伤表达 CEA 肿瘤的效能。有关实验正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Abdel-Nali HH, Schwartz A N, Goldfogel G, *et al.* Colorectal tumors scintigraphy with in-HI anti CEA monoclonal antibody and correlation with surgical histopathologic, and immunohistochemical findings. *Radiology*, 1988, 166: 747
- 2 Osband ME, Ross S. Problems in the investigational study and clinical use of cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 1990, 11: 193
- 3 Mackell M, Smith GL, Moss B, *et al.* General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol*, 1984, 49: 857
- 4 Mackell M, Smith GL, Moss B, *et al.* Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expressing vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 7415
- 5 Beauchemin N, Benchimol S, Cournoyer D, *et al.* Isolation and characterization of full-length functional cDN A clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol*, 1987, 7: 3221
- 6 Tsao H, Liu GQ, Ruan L, *et al.* Construction and application of plasmids containing bidirectional promoters of vaccinia virus. *J Virol*, 1988, 62: 4832
- 7 Tsao H, Ren GF, Chu CM, *et al.* Gene coding for the late 11 000-dalton polypeptide of the Tian Tan strain of vaccinia virus and its 5'-flanking region nucleotide sequence. *J Virol*, 1986, 57: 693

(1996-03-28收稿 1996-10-18修回)

CONSTRUCTION OF RECOMBINED VACCINIA VIRUS EXPRESSING HUMAN CEA

Yang Jie¹ Yang Taicheng² Luo Chaoquan¹ Wang Xiaohuai²
Yang Yinghao¹ Jiang Yuehua² Wu Xinyao¹

(1 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089

2 General Hospital of PLA of Guangzhou, 510036)

By using vaccinia virus as a vector, we have successfully established a CEA-vaccinia virus recombinant capable of highly expressing CEA. After infecting 143TK⁻ cells with the recombinant, the expressed products could be detected by radio-immunoassay technique only in cell membrane fragment but not in cell plasma and culture supernate. It further proved that vaccinia virus is an efficient vector for expressing eukaryotic protein and can maintain the characteristics of the protein. Based on this result, it is possible to study whether CEA-vaccinia virus recombinant can activate immuno-reactive system in vivo for combatting against tumors expressing CEA.

Subject headings vaccinia virus/genetics; carcinoembryonic antigen; gene expression; gene rearrangement

· 简 讯 ·

成立中西医结合研究所、发展我校中西医学术研究

1996年 11月 22日在本校隆重举行“授聘陈可冀院士为中山医科大学名誉教授、成立中西医结合研究所揭牌仪式暨中西医结合学术交流大会”。

中国科学院院士陈可冀教授从北京亲临大会受聘。省卫生厅副厅长、省中医药管理局局长张孝娟出席了大会并讲话,出席大会的还有省中医药管理局副局长邝日健、广州中医药大学著名老中医邓铁涛教授、广东省中西医结合学会会长王建华教授、《中国中西医结合》杂志常务副总编陈维养教授等也亲自到会祝贺,中国中西医结合学会总会发来贺电。

中山医科大学副校长颜光美教授代表黄洁夫校长向陈可冀院士颁发名誉教授聘书。陈可冀教授是目前我国唯一从事中西医结合研究工作的中科院院士,陈院士受聘中山医科大学名誉教授,对促进我校中西医结合研究工作将起重要作用。与此同时,我校正式成立中西医结合研究所,学校领导对该所的建设发展给予极大关怀,拨款 20万元作为该所学科建设费用。

会上,颜光美副校长、陈可冀院士、张孝娟副厅长为我校中西医结合研究所揭牌。我校在中西医结合研究方面,优势明显,但既往的研究工作都是由各院、系、各科室独自进行,中西医结合研究所的成立,组成跨学科、互相协作的学科群,形成集临床、科研、开发三位一体的中西医结合研究基地,对组织、协调全校的中西医结合并发展中西医学术研究有深远的影响。

陈可冀院士还为大会作了“中国传统医学研究进展趋势的展望”的专题报告。会议还进行了广泛的学术交流,我校和广州地区部分院校从事中西医结合研究工作的代表共 150多人参加了会议。

(冯世容)