

## PD-1 胞外段 cDNA 在真核细胞的表达与其功能鉴定

贺宇飞 张桂梅 王小红 张慧 袁野 李东 冯作化\*

(华中科技大学同济医学院生化与分子生物学系, 武汉 430030)

**摘 要** PD-L/PD-1 是参与肿瘤免疫逃避的一条抑制性信号途径。为了用可溶性的 PD-1 受体阻断 PD-L/PD-1 的相互作用, 将小鼠 PD-1 胞外段(aal-aal67)作为独立可溶性分子进行了真核表达, 并对其功能进行鉴定。构建了编码小鼠 PD-1 胞外段 cDNA(sPD-1)的真核质粒表达载体 pPD-1A 和编码 sPD-1-CFP 重组蛋白的真核质粒表达载体 pPD-1B; 细胞转染实验表明其表达产物主要是分泌到细胞外的可溶性产物(sPD-1), 流式细胞仪检测表明 sPD-1 可有效结合 PD-1 配体; 肿瘤细胞杀伤实验表明, sPD-1 作用于肿瘤细胞或在脾淋巴细胞激活过程中作用于淋巴细胞, 均可增强 Hsp70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的作用。sPD-1 真核表达载体的构建为在肿瘤局部表达抑制性共刺激分子的可溶性受体, 拮抗肿瘤微环境中负调节因素对 T 细胞的抑制作用, 增强机体的抗肿瘤能力, 提供了一种新的肿瘤基因治疗手段。

**关键词** PD-1, 可溶性受体, 真核表达, 质粒载体

**中图分类号** R730.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0699-05

T 细胞形成对肿瘤的特异性免疫耐受的过程中, 其表面的负调控受体起着重要作用。PD-1 是 T 细胞表面表达的重要的负调节性受体, 其配体有两个: PD-L1<sup>[1]</sup> (亦称 B7-H1) 和 PD-L2<sup>[2]</sup> (亦称 B7-DC)。PD-Ls 是肿瘤微环境中十分重要的负调节因子, 可在肿瘤细胞如肺癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤、头颈鳞状细胞癌和胶质瘤<sup>[3-5]</sup> 中表达, 亦表达于树状突细胞(dendritic cells, DCs)表面, 甚至在激活的 T 细胞也有表达。PD-L 可抑制 T 细胞激活和产生细胞因子, 增加肿瘤特异性 CTL 的凋亡, 使肿瘤逃避免疫杀伤作用<sup>[3]</sup>。阻断 PD-L 的作用能够促进 T 细胞激活, 进而增强抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>, 抗 PD-L1 抗体在动物实验中亦具有抗肿瘤效应<sup>[7]</sup>。

机体内的一些膜型受体可转换成可溶性形式, 产生拮抗功能。PD-1 是一种跨膜受体, 但在生理条件下尚未发现有天然的可溶性 PD-1 存在。本文研究中利用 DNA 重组技术构建了 2 个真核质粒表达载体, 分别编码 PD-1 的胞外段和 PD-1 胞外段与绿色荧光蛋白(GFP)构成的重组蛋白, 实验表明它们的真核表达产物是分泌型可溶性的, 这种可溶性 PD-1(sPD-1)能够阻断 PD-L/PD-1 信号并增强 T 细胞

杀伤肿瘤细胞的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂:** DMEM、RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FCS)及 TRIzol 试剂购自 GIBCO 公司, DNA 重组工具酶和 G418 为 Promega 公司产品, Dosper 脂质体购自 BM 公司, ConA 为 Sigma 公司产品。热休克蛋白 70 (Hsp70)-H22 抗原肽复合物的制备参见文献[8]。

**1.1.2 质粒、细胞和动物:** 质粒 pcDNA3.1、含 GFP 基因的真核表达质粒 pTracer 和含 lacZ 基因的 pcDNA3.1/His/lacZ(placZ)均为 Invitrogen 公司产品, 用于细胞转染的质粒用碱变性法抽提, 聚乙二醇纯化, 紫外分光光度计定量及计算纯度, 用于实验的质粒纯度均大于 98%。E. coli DH5α 为本研究室保存; BHK 细胞株和 H22 小鼠肝癌细胞株购自中国典型培养物保藏中心(武汉), 两种细胞均培养于含 10% FCS 的 DMEM 中。正常小鼠脾细胞、Hsp70-H22 抗原肽复合物或 ConA 刺激的小鼠脾细胞的制备参见文献[8], 脾细胞经 2 μg/mL 的 ConA 刺激后上调

收稿日期: 004-02-27, 修回日期: 2004-06-04。

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划资助项目(No. 2002CB513100)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-27-83657574; Fax: 86-27-83657574; E-mail: fengzhg@public.wh.hb.cn

表达 PD-1 的配体 PD-L1<sup>[9]</sup>, 各种脾细胞均培养于含 10% FCS 的 RPMI 1640 中。雄性昆明种小鼠购自同济医学院实验动物学部。

## 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR:** 总 RNA 用 TRIzol 试剂提取, 按说明书进行。逆转录 PD-1 胞外段的 RNA 来自经 ConA 刺激的昆明鼠脾细胞; 质粒表达鉴定时, RNA 取自转染质粒后的 BHK 细胞, 并经无 RNA 酶的 DNA 酶作用 0.5h 后再进行逆转录, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色分析。

**1.2.2 小鼠 PD-1 胞外段 cDNA 的克隆及真核表达载体的构建:** 编码 PD-1 胞外段(aa1 ~ aa167)的 cDNA 片段(含有信号肽序列)由 RT-PCR 扩增, GFP 基因片段采用 PCR 直接从质粒 pTracer 扩增。pPD-1A 为 PD-1 胞外段的 cDNA 片段插入 pcDNA3.1 的 *Hind* III 和 *Eco* R I 位点而成, 所用引物为 5': 5'-GGTTCATAAAGCTTCTGAAGCGGACACTGCC-3', 3' 引物引入终止密码: 5'-CCTGGTGAATTCATTGAAA-CCGGCCTTCTGG-3'。pPD-1B 为 PD-1 胞外段的 cDNA 片段(两端为酶切位点 *Hind* III 和 *Eco* R I)和 GFP 基因片段(两端为酶切位点 *Eco* R I 和 *Xba* I)连接插入 pcDNA3.1 的 *Hind* III 和 *Xba* I 位点而成, 所用 PD-1 片段扩增引物: 5'引物同 pPD-1A, 3': 5'-CCTGGTGAATTCCTTTGAAACCGGCCTTCTGG-3'; GFP 片段扩增引物: 5': 5'-GGTTGAGAATTCTGGCTAGCAAAGGAGAAG-3', 3'引物引入终止密码: 5'-GGCACTGGTCTAGATCAATCCATGCCATGTGT-3'。上述基因片段与 pcDNA3.1 质粒经相应的酶切和连接后, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 筛选重组子并经酶切和测序鉴定。

**1.2.3 细胞转染:** 参考脂质体 Dosper 说明书, 在 24 孔板中进行。瞬时转染时, BHK 细胞密度在 60% ~ 80% 时转染, 每孔用脂质体 2  $\mu$ L, pPD-1B、pTracer、placZ 质粒均为 0.5  $\mu$ g, 48h 后, placZ 转染的细胞以 X-gal 试剂检测, 其它转染细胞于倒置荧光显微镜观察, 培养上清用于流式细胞仪检测。稳定转染 pPD-1A 质粒时, 转染 24h 后加 800  $\mu$ g/mL G418 筛选, 培养 3 周后上清用于体外肿瘤杀伤实验。

**1.2.4 流式细胞仪检测:** 脾细胞经 ConA 刺激培养 48h 后离心去上清, 加 pTracer(对照)或 pPD-1B 转染 BHK 细胞的培养上清室温孵育 1h, 洗细胞一次后上 FACSCalibur(BD Biosciences 公司)检测, CellQuest 软件分析, 计算平均荧光密度变化情况。阻断实验时, 脾细胞先与抗 PD-L1 和抗 PD-L2 的抗体

(eBioscience, 各 3  $\mu$ g/mL)室温孵育 30min, 再与相应上清孵育检测。

**1.2.5 体外肿瘤杀伤实验:** 参见文献 8, 采用 MTT 检测法, 效应细胞与靶细胞的比例分别为 4:1、8:1、16:1。

在研究 sPD-1 对淋巴细胞影响效应的实验中: 靶细胞为正常的 H22, 在制备 Hsp70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞时, 于激活培养过程中在培养液中加 30% 体积的 pPD-1A 质粒转染细胞上清。在研究 sPD-1 对瘤细胞影响效应的实验中: 将靶细胞 H22 与 pPD-1A 质粒转染细胞上清孵育 1h, 再与 Hsp70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞(效应细胞)混合, 进行杀伤实验。

两批实验中均设置两组对照: 靶细胞均为体外培养的正常 H22 细胞, 效应细胞为正常脾细胞(对照 A)或 Hsp70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞(对照 B)。

## 2 结果

### 2.1 表达载体构建

质粒 pPD-1A 和 pPD-1B 的构建图谱如图 1 所示。两个质粒均首先进行酶切鉴定, 以 *Hind* III 和 *Eco* R I 酶切 pPD-1A, 以 *Hind* III、*Eco* R I 和 *Xba* I 同时酶切 pPD-1B, 所产生的片段大小与预期的一致(资料未显示)。随后将 2 个质粒进行测序(上海生物工程技术有限公司), cDNA 序列均与 GenBank 公布序列一致。

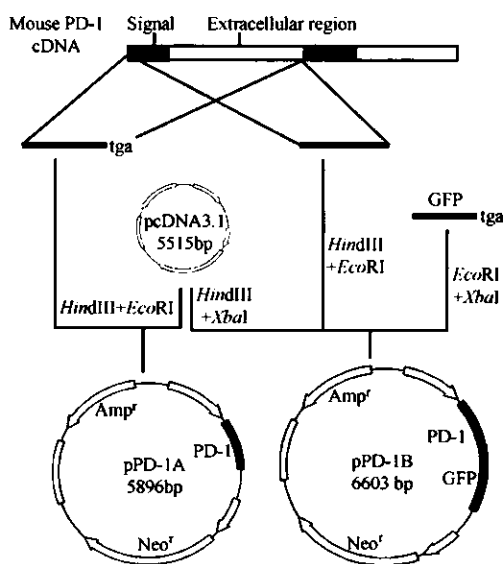


图 1 表达载体 pPD-1A 和 pPD-1B 的构建

Fig. 1 Scheme for the construction of expression vectors pPD-1A and pPD-1B

2.2 可溶性重组小鼠 PD-1 的真核表达

PD-1 本身是一个跨膜蛋白,通过胞外段与配体结合。质粒 pPD-1B 编码 PD-1 胞外段(含有信号肽序列)与 GFP 的融合蛋白。真核表达质粒 pPD-1B 和 pTracer 都是以相似的载体骨架构建的,将两种表达质粒以同样条件分别转染 BHK 细胞,比较转染表达结果,显示 pTracer 转染细胞的表达产物都滞留于细胞内(图 2a),而 pPD-1B 转染的细胞大部分都是表达分泌性产物,只有极少数细胞内存在未分泌的产物(图 2b),placZ 质粒亦可有效转染表达(图 2c)。RT-PCR 显示转染 pPD-1B 质粒的细胞表达有 PD-1

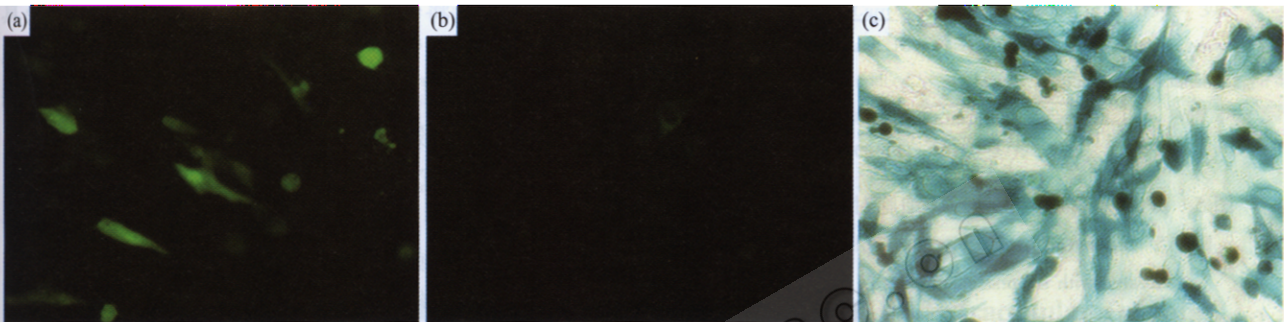


图 2 BHK 细胞同样条件下转染 pTracer (a)、pPD-1B (b)和 pcDNA3.1/His/lacZ (c)质粒的表达情况  
Fig. 2 Expression of pTracer (a) , pPD-1B (b) and pcDNA3.1/His/lacZ (c) after BHK cells were transfected with the plasmids under same conditions

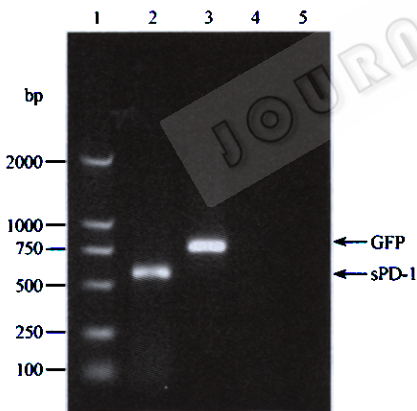


图 3 BHK 细胞转染 pPD-1B 或 placZ 后 RT-PCR 检测特异性表达条带

Fig. 3 RT-PCR detection of specific expression bands of BHK cells transfected with pPD-1B or placZ

1: DL2000 DNA markers; 2: BHK/pPD-1B: PD-1 primers; 3: BHK/pPD-1B: GFP primers; 4: BHK/placZ: PD-1 primers; 5: BHK/placZ: GFP primers

2.4 pPD-1A 表达产物对 H22-Hsp70 复合物激活的脾细胞杀伤活性的影响

pPD-1A 中编码 PD-1 胞外段的序列与 pPD-1B 相同,只是不含 GFP,为排除 GFP 可能对 PD-1 结构域的影响,我们采用 pPD-1A 的表达产物研究其功

胞外段和 GFP 的特异性条带,而 placZ 的细胞则没有 PD-1 和 GFP 特异性条带(图 3)。

2.3 可溶性重组小鼠 PD-1 与细胞表面配体的结合

将转染 pPD-1B 后 48h 的细胞培养上清(sPD-1-GFP)与经 ConA 刺激的小鼠脾细胞孵育,经流式细胞仪检测,与对照相比,脾细胞表面的荧光密度明显增高(图 4,左),而当用抗 PD-L1 和抗 PD-L2 的抗体封闭脾细胞表面的 PD-1 配体时,脾细胞表面的荧光密度则几乎下降至对照水平(图 4,右),表明表达产物能够有效地与激活脾细胞表面的 PD-L1 结合。

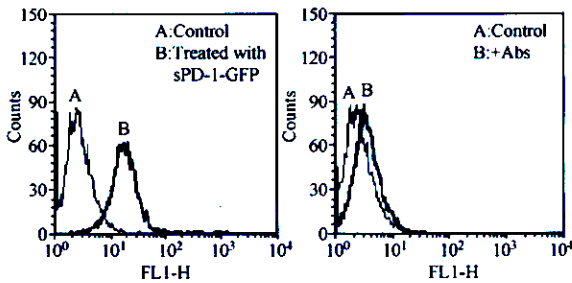


图 4 流式细胞仪检测脾细胞表面的荧光强度的变化  
Fig. 4 FACS analysis of fluorescence intensity on ConA-stimulated spleen cells

The spleen cells were treated with sPD-1-GFP (left) or pretreated with anti-PD-L1 and anti-PD-L2 mAbs (right)

能。经转染、筛选建立了稳定转染 pPD-1A 的细胞 BHK-pPD-1A,在激活脾细胞的过程中加入其培养上清(含 sPD-1),与对照 A(正常脾细胞杀伤正常 H22 细胞)或对照 B(Hsp70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞杀伤正常 H22 细胞)相比,均可明显提高激活脾细胞对 H22 细胞的杀伤率(图 5,  $P < 0.05$ ),这表明 sPD-1 可通过阻断 PD-L1 的作用而促进脾细胞激活。

## 2.5 pPD-1A 表达产物作用于 H22 靶细胞对杀伤作用的影响

将 BHK-pPD-1A 的培养上清处理 H22 靶细胞,再与已激活的效应细胞混合,进行杀伤实验,结果显示,与两组对照相比,同样可以提高激活效应细胞对 H22 细胞的杀伤率(图 6,  $P < 0.05$ )。这表明 sPD-1 可以通过阻断肿瘤细胞表面 PD-L1 的作用,阻抑 PD-L/PD-1 抑制性信号,增强激活淋巴细胞的杀瘤功能。

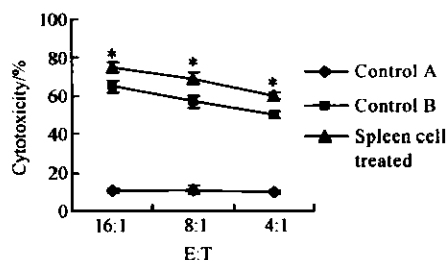


图 5 pPD-1A 表达产物处理脾细胞对杀伤率的影响

Fig. 5 Enhanced cytotoxicity after spleen cells were treated with expression product of pPD-1A

Control A: normal spleen cells + normal H22 cells; Control B: Hsp70-peptide complex-stimulated spleen cells + normal H22 cells. \*,  $P < 0.05$ , compared with control A or B, Student-t test

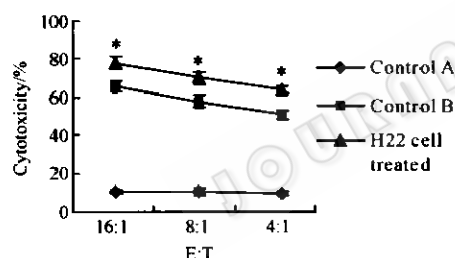


图 6 pPD-1A 表达产物处理 H22 细胞对杀伤率的影响

Fig. 6 Enhanced cytotoxicity after H22 cells were treated with expression product of pPD-1A

Control A: normal spleen cells + normal H22 cells; Control B: Hsp70-peptide complex-stimulated spleen cells + normal H22 cells. \*,  $P < 0.05$ , compared with control A or B, Student-t test

## 3 讨论

T 细胞表面的负调控受体有两个: CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) 和 PD-1 (programmed death 1), 它们都是跨膜受体, 通过其胞外部分与相应配体结合传导抑制性信号<sup>[10,11]</sup>。CTLA-4 与 CD28 (激活性受体) 是一对作用相反的受体, 其配体均为 B7-1 和 B7-2。采用抗体阻断 CTLA-4 传递的抑制性信号, 可增强针对肿瘤的正向免疫应答, 动物实验和临床实验所取得的抗肿瘤效果均证明了这一点<sup>[10]</sup>。遗憾的是, 体内注射抗体时影响范围较广, 在治疗肿

瘤时容易诱发自身免疫反应<sup>[10, 12]</sup>。因此, 我们着重研究可溶性 PD-1 作为局部基因治疗制剂的作用。

PD-1 是一种跨膜受体, 我们将 PD-1 胞外段 (aa1-aa167) 的编码区 cDNA (含有信号肽序列) 插入 pcDNA3.1 质粒, 构建成真核表达载体, 证明其表达产物能够形成可溶性分子、能分泌到细胞外、并有效结合表达相应配体的细胞。以往在研究受体或共刺激分子时, 常将其胞外段与免疫球蛋白的 Fc 段重组, 但这类分子易与具有 Fc 受体的细胞结合, 常常不能成为真正的可溶性分子; 另一方面, 抗体 Fc 段的免疫原性亦使得这类分子难以反复使用。本文研究结果表明, 将含有信号肽序列的 PD-1 胞外段经真核质粒表达后, 可以形成一个独立的可分泌出细胞的可溶性分子, 这为阻断 PD-L/PD-1 信号途径提供了一种新的手段。

PD-1 与 GFP 构成的重组蛋白亦可形成可溶性、分泌型分子, 并且可以特异性结合 PD-L, 这表明连接另一个结构域不会影响 sPD-1 的功能, 将 sPD-1 与其它调节分子构建重组蛋白亦具有可行性。

B7 家族共刺激分子在 T 细胞的激活和耐受过程中发挥着重要作用, 同时也为许多疾病的治疗提供了靶标<sup>[11]</sup>。根据免疫调节的需要, 可以通过一些外源方法来增强或抑制某些信号途径, 其中单克隆抗体和可溶性受体常被用来阻断相关信号<sup>[7]</sup>。但由于抗体的作用常是全身性的, 因而在应用抑制性受体的抗体时面临严重副作用, 即产生自身免疫性反应, 如 CTLA-4 抗体的应用<sup>[10, 12]</sup>。PD-L/PD-1 是参与肿瘤免疫逃避的一条抑制性信号途径, 亦参与外周组织的自身免疫耐受<sup>[11]</sup>。但我们在动物实验中利用质粒 pPD-1A 在肿瘤局部表达 sPD-1 进行肿瘤基因治疗, 没有出现明显的自身免疫性炎症表现, 但达到了增强免疫应答、抗肿瘤的效果(资料另文发表), 提示利用 sPD-1 进行局部基因治疗, 改善肿瘤微环境中免疫调节因素, 特异性的干预负调节性共刺激分子的作用可望成为肿瘤治疗的一种新策略。

作为最终要在病人身上应用的药物, 疗效确切、毒副作用少是最重要的两点。由于 PD-1 的配体分布较广泛, 应用抗体等来阻断其作用时, 不可避免会带来包括全身性自身免疫疾病在内的毒副作用。将表达可溶性受体的真核质粒用于肿瘤局部基因治疗, 可持续稳定表达、并限于局部作用, 相对于抗体具有较大的优势。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Freeman GJ, 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 Exp Med*, 2000, **192**(7): 1027 - 1034
- [2] Latchman Y, Wood CR, Chernova T *et al*. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*, 2001, **2**(3): 261 - 268
- [3] Dong H, Strome SE, Salomao DR *et al*. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 2002, **8**(8): 793 - 800
- [4] Strome SE, Dong H, Tamura H *et al*. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 2003, **63**(19): 6501 - 6505
- [5] Winterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M *et al*. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res*, 2003, **63**(21): 7462 - 7467
- [6] Curiel TJ, Wei S, Dong H *et al*. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*, 2003, **9**(5): 562 - 567
- [7] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(19): 12293 - 12297
- [8] Feng ZH, Huang B, Zhang GM *et al*. Investigation on the effect of peptides mixture from tumor cells inducing anti-tumor specific immune response. *Science in China Ser C*, 2002, **45**(4): 361 - 369
- [9] Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y *et al*. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett*, 2002, **84**(1): 57 - 62
- [10] Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol*, 2002, **3**(7): 611 - 618
- [11] Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**(3): 391 - 396
- [12] Phan GQ, Yang JC, Sherry RM *et al*. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(14): 8372 - 8377

## Eukaryotic Expression and Functional Characterization of PD-1 Extracellular Domain

HE Yu-Fei ZHANG Gui-Mei WANG Xiao-Hong ZHANG Hui YUAN Ye LI Dong FENG Zuo-Hua\*

(Department of Biochemistry & Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract** The negative signal provided by interactions of costimulatory molecules, programmed death-1 (PD-1) and its ligands, PD-L1 (also B7-H1) and PD-L2 (also B7-DC), is involved in the mechanisms of tumor immune evasion. To block PD-Ls-PD-1 interactions by a soluble receptor of PD-1, we constructed a eukaryotic expression plasmid that expresses extracellular region (aa1-aa167) of murine PD-1 (pPD-1A) and, another version of pPD-1A, pPD-1B, carrying cDNAs encoding for both extracellular region of PD-1 and green fluorescent protein (GFP) reporter gene, which was inserted downstream of PD-1. Experiment of BHK cells transfected with pPD-1B determined that most expression product (sPD-1) in the cells was secreted out. FACS analysis revealed that sPD-1 was specific and bound efficiently to PD-1 ligands. Cytotoxicity assay showed that blocking PD-Ls on either tumor cells or spleen cells by sPD-1 mediated enhanced lysis of H22 cells by Hsp70-H22 peptides complex-stimulated spleen cells. The constructed plasmid vector would provide a novel method of tumor gene therapy of blocking PD-Ls-PD-1 interactions by expression of soluble receptor of PD-1 in tumor sites, which could increase the antitumor activity.

**Key words** PD-1, soluble receptor, eukaryotic expression, plasmid vector

Received: 02-27-2004

This work was supported by National Development Program (973) For Key Basic Research of China (No. 2002CB513100).

\* Corresponding author. Tel: 86-27-83657574; Fax: 86-27-83657574; E-mail: fengzhg@public.wh.hb.cn