

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00753

• 论 著 •

人 ICOS-Ig 融合蛋白的真核表达及其生物学活性

张 鹏¹, 秦 琴¹, 王振猛², 王 健¹, 沈 茜^{1*}

1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

[摘要] **目的:**真核表达人 ICOS 胞外区与 IgG Fc 融合蛋白, 并对其生物学活性进行初步分析。**方法:**以 RT-PCR 方法克隆人 ICOS 胞外区片段和人 IgG Fc 片段, 定向插入真核表达载体 pSecTag2, 构建重组质粒 pSecTag2-ICOS-Ig, 脂质体转染 CHO 细胞, 可溶性表达并纯化 ICOS-Ig 融合蛋白。采用 SDS-PAGE、蛋白质印迹、ELISA 对融合蛋白进行鉴定, 配体结合活性实验和混合淋巴细胞增殖反应实验检测融合蛋白的活性。**结果:**构建的 ICOS-Ig 融合蛋白表达载体在 CHO 细胞中表达 ICOS-Ig 蛋白。纯化获得的 ICOS-Ig 可以与配体 ICOSL 特异性结合, 并抑制同种 T 淋巴细胞增殖反应。**结论:**成功构建了人 ICOS 胞外区与人 IgG Fc 融合蛋白真核表达系统, 获得有生物学活性的 ICOS-Ig 融合蛋白。

[关键词] ICOS-Ig 融合蛋白; 真核表达; 配体亲和力; 淋巴细胞增殖

[中图分类号] R 392.111 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0753-04

Eukaryotic expression of human ICOS-Ig fusion protein and analysis of its biological activity

ZHANG Peng¹, QIN Qin¹, WANG Zhen-meng², WANG Jian¹, SHEN Qian^{1*}

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To express human ICOS extracellular region and IgG Fc fusion protein using eukaryotic vector and to analyze its biological activity. **Methods:** Human ICOS extracellular region and IgG Fc fragment were cloned by RT-PCR and inserted into eukaryotic expression vector pSecTag2. The constructed plasmid pSecTag2-ICOS-Ig was stably transfected into CHO cells. Soluble ICOS-Ig fusion protein was collected from serum-free medium and purified with protein A affinity chromatography. The purified product was analyzed by SDS-PAGE, Western blotting assay, and ELISA. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) and mixed lymphocyte reaction (MLR) were used to study the activity of the fusion protein. **Results:** ICOS extracellular region and IgG Fc fragment were successfully cloned into expression vector; ICOS-Ig fusion protein was expressed and purified in mammal cells. The purified fusion protein specifically bound to ICOSL and inhibited mixed lymphocyte reaction. **Conclusion:** A ICOS-Ig fusion protein expression system has been successfully constructed, and bioactive ICOS-Ig fusion protein has been obtained.

[KEY WORDS] ICOS-Ig fusion protein; eukaryotic expression; ligand affinity; lymphocyte proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7):753-756]

抗原特异性 T 细胞的活化需要 2 种不同的刺激信号。第一信号是由抗原递呈细胞 (APC) 表面 MHC-抗原肽复合物和 T 细胞上的 TCR-CD3 提供, 第二信号即共刺激信号由 APC 与 T 细胞上表达的共刺激分子产生。缺乏共刺激信号将导致淋巴细胞进入无应答状态, 甚至凋亡^[1]。共刺激分子家族中,

研究最深入的是 CD28、CTLA-4 及其配体 B7-1 和 B7-2 通路, 针对抑制该通路的生物制剂 (CTLA4-Ig) 已于 2005 年被美国 FDA 批准上市, 为以阻断 T 淋巴细胞共刺激分子为治疗靶点的临床研究展示了良好的前景。

可诱导共刺激分子 (inducible costimulator, ICOS)

[收稿日期] 2009-02-11 [接受日期] 2009-05-05

[基金项目] 国家高技术研究发展计划 (“863”计划, 2002AA214091) 和国家自然科学基金青年基金 (30500501). Supported by the High-tech Research and Development Program of China (“863”program, 2002AA214091) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (30500501).

[作者简介] 张 鹏, 博士, 主治医师. E-mail: wang_zhangpeng@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873611, E-mail: msminli@hotmail.com

是1999年Hutloff等^[2]发现的CD28家族的新成员,优势表达在活化的T细胞表面,其生物学功能与经典共刺激分子CD28不尽相同;CD28是诱导初始T细胞增殖活化的关键性分子,而ICOS则是活化后促进T细胞分化并发挥效应的主要共刺激分子;CD28分子主要参与机体的初次免疫应答,而ICOS主要是在再次免疫应答以及免疫记忆中发挥着重要作用^[3]。阻断ICOS通路诱导活化T细胞的无应答或凋亡,显然更有利于诱导特异性的免疫耐受,在免疫性疾病的治疗中发挥更有针对性的治疗作用。

因此,我们构建了表达人ICOS-Ig融合蛋白的真核表达体系,表达纯化ICOS-Ig融合蛋白,并初步分析其生物学特性,为今后的实验研究和可能的临床应用研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *E. coli* DH5 α 由本室保存。表达载体pSecTag2购自Invitrogen公司,pIGplus由美国Frank S. Walsh博士惠赠。中华仓鼠卵巢细胞株CHO和人B淋巴瘤细胞株Daudi由本室保存。雄性BALB/c和C57BL/6小鼠,6~8周龄,购自中科院实验动物中心。*Taq*酶、T4连接酶、限制性内切酶等购自TaKaRa公司。Lipofectamine 2000、RPMI 1640培养液和胎牛血清等购自Gibco BRL公司。Hygromycin B购自Roche公司。佛波醇、离子霉素、Protein A Sepharose 4FF、人IgG、FITC等购自Sigma公司。人IgG ELISA试剂盒购自Bethyl公司。HRP-anti-human IgG1 Fc购自PIERCE公司。PE-anti-human ICOSL购自eBioscience公司。³H-TdR购自中国原子能研究所。

1.2 人ICOS胞外区片段和人IgG1重链基因Fc恒定区的扩增 用终浓度为20 ng/ml的佛波醇(PMA)和200 ng/ml的离子霉素刺激人外周血单个核细胞,72 h后收集细胞,TRIzol试剂提取总RNA,RT-PCR扩增ICOS胞外区片段,引物F:5'-GCG GCC CAG CCG GCC GAA ATC AAT GGT TCT GCC-3'(含*Sfi*I酶切位点),R:5'-GCT CTA GAC TTC AGC TGG CAA AG-3'(含*Xba*I酶切位点),反应参数:94℃ 5 min,(94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s)×30,72℃ 8 min。以表达载体pIGplus为模板,PCR扩增人IgG1重链基因Fc恒定区,引物F:5'-TCT AGA GAT CCC AAA TCT TGT GAC-3'(含*Xba*I酶切位点),R:5'-GCG GCC GCT CAT TTA CCC GGA GAC AG-3'(含*Not*I酶切位点),反应参数:94℃ 5 min,(94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min)×30,72℃

8 min。PCR产物分别电泳后割胶回收目的条带并克隆至pMD18T载体,进行测序验证。

1.3 真核表达载体pSecTag2-ICOS-Ig的构建 测序正确的pMD18T/ICOS质粒用*Sfi*I和*Xba*I双酶切,pMD18T/Ig质粒用*Xba*I和*Not*I双酶切,同时表达载体pSecTag2用*Sfi*I和*Not*I双酶切,割胶回收酶切后的各目的片段,继而T4连接酶连接、转化细菌DH5 α ,挑选、鉴定获得重组真核表达载体pSecTag2-ICOS-Ig。

1.4 ICOS-Ig融合蛋白的表达、纯化与鉴定 参照Lipofectamine 2000说明书,将pSecTag2-ICOS-Ig和Lipofectamine混合转染CHO细胞,培养24 h后,按1:10传代,待细胞贴壁后,以500 μ g/ml Hygromycin B筛选阳性克隆,建立稳定表达ICOS-Ig融合蛋白的CHO细胞系。用10%FBS的RPMI 1640进行大规模滚瓶细胞培养,细胞培养至相当数量(培养液1~2 L),更换为无血清培养液,继续培养3~5 d。收集细胞培养液,经Protein A Sepharose 4FF纯化,PBS透析并过滤除菌,即获得纯化蛋白。纯化蛋白通过还原/非还原状态SDS-PAGE和蛋白质印迹法(HRP-anti-human IgG1 Fc)进行定性鉴定,并采用人IgG ELISA试剂盒进行定量分析。鉴定正确的纯化ICOS-Ig融合蛋白稀释后,用人IgG ELISA试剂盒检测蛋白浓度为2.8 mg/ml,分装后-80℃保存。

1.5 FACS检测ICOS-Ig融合蛋白与配体结合 1 mg/ml ICOS-Ig融合蛋白或人IgG,加入相当蛋白量1/20的FITC,采用0.025 mol/L pH 9.5的碳酸盐缓冲液透析法进行FITC标记。 5×10^5 的Daudi细胞,先用10 μ g/ml人IgG室温封闭30 min,再分别与PE-anti-human ICOSL流式检测抗体或20 μ g/ml FITC-ICOS-Ig/FITC-IgG 4℃孵育45 min,PBS/1% BSA洗涤2次后,上流式细胞仪检测。

1.6 体外检测ICOS-Ig融合蛋白对同种T细胞增殖的影响 Ficoll分离法收集BALB/c小鼠脾细胞,细胞悬液浓度为 5×10^6 /ml,25 Gy ⁶⁰Co辐照灭活,作为刺激细胞。尼龙毛柱法收集C57BL/6小鼠脾T细胞,细胞悬液浓度为 5×10^6 /ml,作为反应细胞。刺激细胞和反应细胞各 2×10^5 个接种96孔板,进行单向混合淋巴细胞增殖反应(MLR),均设3个复孔,实验分组:(1)单独反应细胞组;(2)单独刺激细胞组;(3)反应细胞+刺激细胞+加入不同浓度(0~50 μ g/ml)ICOS-Ig组;(4)反应细胞+刺激细胞+加入50 μ g/ml对照IgG组。37℃ 5%CO₂条件下培养3 d,最后16 h加入1 μ Ci (1 Ci=3.7 $\times 10^{10}$ Bq)³H-TdR。收获细胞, β 液闪烁计数器检测各样品每分钟脉冲数(cpm,

1 cpm=6.17×10⁸ Bq),代表细胞增殖率。
1.7 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 真核表达载体 pSecTag2-ICOS-Ig 的鉴定 获得的重组真核表达载体 pSecTag2-ICOS-Ig 经酶切鉴定正确(图 1)。

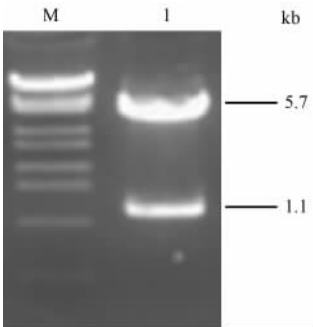


图 1 重组质粒 pSecTag2-ICOS-Ig 的酶切鉴定结果
Fig 1 Identification of pSecTag2-ICOS-Ig by restriction enzyme digestion
M:DNA marker;1:pSecTag2-ICOS-Ig/*Sfi* I + *Not* I

2.2 ICOS-Ig 融合蛋白的鉴定 纯化的 ICOS-Ig 融合蛋白经还原 SDS-PAGE 及蛋白质印迹分析显示在还原状态下可检测到相对分子质量约为 50 000 的特异蛋白,符合 ICOS-Ig 单体的大小;而非还原 SDS-PAGE 分析显示在非还原状态下可检测到相对分子质量约为 100 000 的特异蛋白,表明 ICOS-Ig 融

合蛋白是以通过二硫键结合的二聚体形式表达,符合天然状态 ICOS 在细胞表面的表达形式(图 2)。

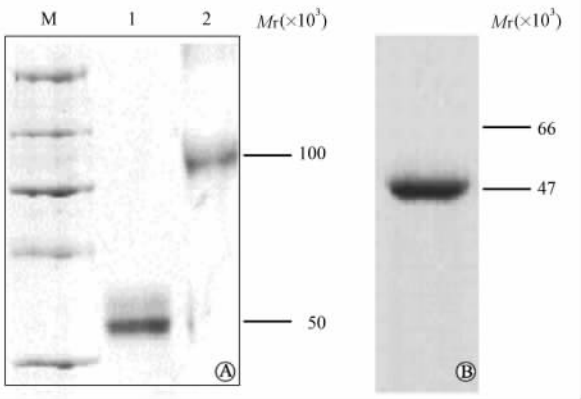


图 2 SDS-PAGE 和蛋白质印迹鉴定 ICOS-Ig 融合蛋白
Fig 2 SDS-PAGE and Western blotting assay of fusion protein ICOS-Ig
A:SDS-PAGE assay. M: Protein marker; 1: Reduced protein; 2: Non-reduced protein. B: Western blotting assay (HRP-anti-human IgG1 Fc)

2.3 ICOS-Ig 与配体 ICOSL 特异性结合的能力 首先用 PE-抗 ICOSL 抗体标记 Daudi 细胞,证实其表面有 ICOS 配体分子 ICOSL 的表达。再将真核表达的 ICOS-Ig 和人 IgG 用透析法进行 FITC 标记,用于流式细胞术检测。FITC 标记的 ICOS-Ig 与 Daudi 细胞有特异性结合活性,而 FITC 标记的 IgG 则不与配体表达细胞结合,证明 ICOS-Ig 可与配体 ICOSL 特异性结合,具有生物学活性(图 3)。

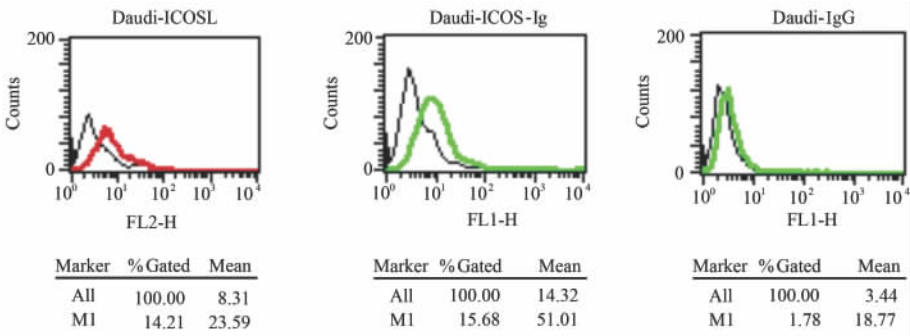


图 3 流式细胞术检测 ICOS-Ig 与配体 ICOSL 的结合活性
Fig 3 Examination of binding specificity of ICOS-Ig with ICOSL by FACS

2.4 ICOS-Ig 抑制同种 T 淋巴细胞增殖反应 25 Gy ⁶⁰Co 辐照灭活的 BALB/c 小鼠的脾细胞,与尼龙毛柱法分离的 C57BL/6 脾脏 T 细胞混合,加入不同浓度 ICOS-Ig 或对照 IgG,进行 MLR。³H-TdR 掺入法结果如图 4 所示:50 μg/ml IgG 对同种 T 细胞的活化没有影响,而 ICOS-Ig 呈

剂量依赖性抑制同种 T 细胞的活化增殖(ICOS-Ig 终浓度为 50 μg/ml 时抑制率约为 60%,*P*<0.05),表明 ICOS-Ig 融合蛋白通过结合配体 ICOSL,可以竞争性阻断 ICOS 共刺激通路,抑制同种 T 淋巴细胞增殖反应。

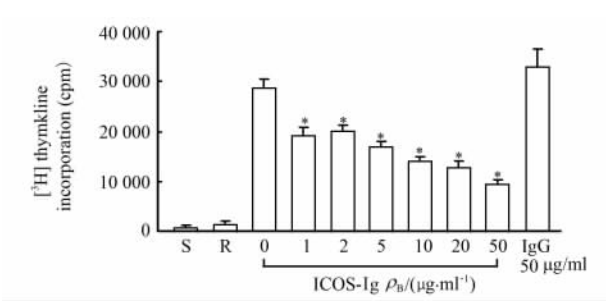


图 4 ICOS-Ig 抑制单向混合淋巴细胞增殖反应

Fig 4 ICOS-Ig inhibits mixed lymphocyte reaction

S; Stimulator alone; R; Responder alone; ICOS-Ig; Mixed spleen cells treated with various concentrations of ICOS-Ig; IgG; Mixed spleen cells treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG; * $P<0.05$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ICOS-Ig or IgG control group

3 讨论

T 淋巴细胞在细胞免疫和体液免疫的诱导中均发挥着重要的作用,自从双信号学说提出以来,共刺激分子在疾病的发生、发展中的作用越来越受到重视。以获准上市的 CTLA4-Ig 为代表,对共刺激信号通路进行人工干预,已成为治疗许多临床疾病的重要手段。

ICOS 是 1999 年由 Hutloff 等发现的 CD28 家族成员,优势表达在活化的 T 细胞表面,对维持 T 细胞效应和记忆细胞活化、免疫球蛋白类型转换、调节 Th1/Th2 细胞极化等有重要作用;阻断 ICOS 共刺激通路,会导致活化 T 细胞无功能、免疫球蛋白类型转换受损^[2,4-6]。多种疾病的动物模型研究表明^[7-9],以 ICOS 途径为靶点的免疫调节对包括自身免疫、移植免疫和肿瘤免疫均有着重要的临床治疗意义。

本研究首先采用基因工程的方法将 ICOS 胞外区与人 IgG1 的绞链区及 CH2、CH3 区结合,构建了 ICOS-Ig 融合蛋白真核表达体系。Ig 融合蛋白具有如下特征^[10]: (1)易于纯化和检测,通过 IgG1 的 Fc 与蛋白 A 结合进行方便的收集、纯化,并可用抗人 IgG1 Fc 抗体识别 Fc 段进行特异性鉴定; (2)增加该蛋白在血液中的半衰期,利于重组蛋白作为治疗药物在临床中的实际应用; (3)IgG1 的 Fc 结构域可形成二硫键结合的二聚体,符合天然状态 ICOS 在细胞表面的表达形式。

本实验对 ICOS-Ig 融合蛋白的生物学功能进行了初步研究。经流式细胞术检测, FITC 标记的重组融合蛋白 ICOS-Ig 与配体表达细胞 Daudi 细胞有结

合活性, FITC 标记的 IgG 则不与配体表达细胞结合,证明 ICOS-Ig 与配体 ICOSL 可以特异性结合,具有生物学活性。然后,体外实验验证 ICOS-Ig 对同种异体 T 细胞免疫功能的抑制作用。用不同浓度的重组蛋白作为拮抗剂与混合淋巴细胞共同反应,结果显示随着重组蛋白浓度增加,淋巴细胞的增殖活性明显下降,彼此存在剂量效应关系,说明本载体系统表达的 ICOS-Ig 重组蛋白能体外结合配体分子并阻断 ICOS 共刺激通路,有效抑制同种混合淋巴细胞的增殖反应。上述实验结果表明, ICOS-Ig 融合蛋白可以阻断 ICOS 共刺激通路,有望在免疫性疾病的治疗中发挥诱导特异性免疫耐受的作用,为今后的实验研究和可能的临床应用研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Greenwald R J, Freeman G J, Sharpe A H. The B7 family revisited [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 515-548.

[2] Hutloff A, Dittrich A M, Beier K C, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 [J]. *Nature*, 1999, 397: 263-266.

[3] Nurieva R I. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction [J]. *Clin Immunol*, 2005, 115: 19-25.

[4] Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages H W, Bonhagen K, Radbruch A, et al. Expression of ICOS *in vivo* defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10 [J]. *J Exp Med*, 2003, 197: 181-193.

[5] Mahajan S, Cervera A, MacLeod M, Fillatreau S, Perona-Wright G, Meek S, et al. The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 1796-1808.

[6] McAdam A J, Greenwald R J, Levin M A, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40 mediated antibody class switching [J]. *Nature*, 2001, 409: 102-105.

[7] Kashizuka H, Sho M, Nomi T, Ikeda N, Kuzumoto Y, Akashi S, et al. Role of the ICOS-B7h costimulatory pathway in the pathophysiology of chronic allograft rejection [J]. *Transplantation*, 2005, 79: 1045-1050.

[8] Ansari M J, Fiorina P, Dada S, Guleria I, Ueno T, Yuan X, et al. Role of ICOS pathway in autoimmune and alloimmune responses in NOD mice [J]. *Clin Immunol*, 2008, 126: 140-147.

[9] Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M J, Lang S, Kirkwood J M, Whiteside T L. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4(+)CD25highFoxp3(+) T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression [J]. *J Immunol*, 2008, 180: 2967-2980.

[10] Liossis S N, Tsokos G C. Monoclonal antibodies and fusion proteins in medicine [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 721-729.