

• 论 著 •

构建 CLDN18.2 慢病毒载体及其稳转细胞株的建立*

王晓丽, 彭建明, 严慧深, 江秀玲[△]

(扬州市职业大学医学院, 江苏 扬州 225009)

[摘要] 目的 构建表达人紧密连接蛋白 18.2 (CLDN18.2) 的慢病毒载体, 并通过慢病毒转导 293T 细胞获得稳定表达 CLDN18.2 的 293T 稳转细胞株。方法 采用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增目的基因, 将其插入质粒 pWPT, 构建 pWPT-CLDN18.2 慢病毒包装质粒。采用 PCR 对重组质粒进行鉴定, 对重组质粒进行慢病毒包装后转导 293T 细胞系, 同时设立未转质粒的 293T 细胞作为对照组, 得到 293T-CLDN18.2 混合克隆细胞。检测转染后目的蛋白水平及单克隆细胞阳性率。结果 经 PCR 鉴定, 在 700 bp 处有一条清晰条带与目的基因大小相符。在 25~35 kDa 处有明显条带, 与预期 28.8 kDa 相符。表达 CLDN18.2 单克隆细胞的阳性率为 99.3%。结论 该研究成功获得稳定表达人 CLDN18.2 的 293T 稳转细胞株, 为下一步的单克隆抗体的制备奠定了基础。

[关键词] 慢病毒; 载体; 肿瘤; 耐药性; 蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.21.004

中图法分类号: R945

文章编号: 1009-5519(2024)21-3625-04

文献标识码: A

Establishment of CLDN18.2 lentiviral vector and its stable transformed cell line*

WANG Xiaoli, PENG Jianming, YAN Huishen, JIANG Xiuling[△]

(School of Medicine, Yangzhou Polytechnic College, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

[Abstract] **Objective** To construct a lentiviral vector expressing human tight junction protein 18.2 (CLDN18.2), and to obtain a stable 293T transformed cell line expressing CLDN18.2 through lentiviral transduction of 293T cells. **Methods** The target gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into the plasmid pWPT to construct the pWPT-CLDN18.2 lentivirus packaging plasmid. The recombinant plasmid was identified by PCR, and the recombinant plasmid was packaged with lentivirus and transduced into 293T cell line. At the same time, 293T cells without transferred plasmid were set up as the control group to obtain 293T-CLDN18.2 mixed clone cells. The target protein level and monoclonal cell positivity rate after transfection were detected. **Results** A clear band at 700 bp was identified by PCR, that matches the size of the target gene. There was a clear band at 25-35 kDa, which was consistent with the expected 28.8 kDa. The positive rate of monoclonal cells expressing CLDN18.2 was 99.3%. **Conclusion** This study successfully obtains a stable 293T transgenic cell line expressing human CLDN18.2, and lays the foundation for the preparation of monoclonal antibodies in the next step.

[Key words] Lentiviral; Vector; Tumor; Drug resistance; Protein

肿瘤是当前人类面对的主要疾病之一^[1], 目前主要治疗方法为传统手术和放射、化疗。对于早期和非转移性肿瘤, 手术的治疗效果显著, 而对于中晚期和广泛转移性肿瘤, 治疗主要以放射、化疗为主, 但这些治疗方法会广泛杀伤细胞, 会给健康组织带来损害, 同时不良反应严重且易产生耐药性, 使患者备受折磨^[2]。随着科学技术的进步和医学研究的深入, 人们对肿瘤发生和转移机制有了更深入的了解, 目前靶向

抗肿瘤药物的研发已成为医学和药学的研究热点^[3]。靶向治疗为中晚期癌症患者或无法手术切除的转移性癌症患者提供了一种新的治疗方法。在全球范围内, 胃癌仍然是常见癌症之一, 2020 年新增病例超过百万。全球每 13 例死亡病例中就有 1 例死于胃癌, 其发病率排名第 5 位, 死亡率排名第 4 位^[4]。Claudins 家族是整合素膜蛋白, 存在于上皮细胞和内皮细胞紧密连接中, 构成了细胞旁屏障和孔, 控制上皮细

* 基金项目: 江苏省自然科学基金项目(18KJD36003); 扬州市职业院校级自然科学基金项目(2018ZR28)。

作者简介: 王晓丽(2003—), 大专, 初级药士, 主要从事药物开发的基础研究。 [△] 通信作者, E-mail: 343503030@qq.com。

胞间空间分子的流动。Claudins 家族有紧密连接蛋白(CLDN)18.1、CLDN18.2 这 2 个成员,二者含有 4 个跨膜区域,并由 261 个氨基酸构成,有着极高的相似度序列^[5-6],仅外部区段上的抗原特征有所区别。有研究显示,CLDN18.2 在原始胃癌和转移性胃癌细胞表面呈高水平表达,其也在胰腺癌、食管癌和肺癌中发现^[7]。提示 CLDN18.2 在各种癌症发展过程中起关键作用。目前,许多针对 CLDN18.2 的抗体药物已经进入临床试验阶段^[8-9]。本研究通过构建 CLDN18.2 的慢病毒载体,成功筛选出稳定表达人 CLDN18.2 的 293T 转化细胞株,为后续单克隆抗体药物的研究和生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 质粒 pWPT、pMD2.G、psPAX2 购自美国 Ambrx Biopharma 公司,293T 细胞购自通派(上海)生物科技有限公司。

1.2 主要试剂 抗 CLDN18.2 抗体购自英国 Abcam 公司, Anti-Flag-M2-HRP 购自德国 Sigma 公司, FITC-goat antiHuIgG-Fc 购自美国 Jackson 公司, 重组胰酶、0.4% 台盼蓝、polybrene、杜氏磷酸缓冲液(DPBS)、DMEM、胎牛血清(FBS)均购自美国 Gibco 公司,质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于瑞士 Omega 公司, PMSF、Pierce[®] BCA Protein Assay、Pierce[®] BCA Protein Assay ReagentA、Pierce TM BCA Protein Assay ReagentB、Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate、预染 Marker 购自美国 Thermo 公司, RIPA 裂解液(强)、半干转膜液(粉剂)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)液(粉剂)、显影试剂盒购自上海碧云天生物公司。

1.3 方法

1.3.1 重组慢病毒载体构建和重组质粒酶切鉴定 以合成的人 CLDN18.2 基因序列为模板,并用聚合酶链式反应(PCR)进行扩增,上游引物序列为 5'-GCTTACGCGTCCTAGCGCTACCGGTCGCCACC ATG GCCGTG ACTGCCTGTCA-3',下游引物序列为 5'-TCGAGGTCGACTTACTTGTCGTCATCGT CTTTGTAATCGGATCCCACATAGTCGTGCTTG GAAG-3'。在上、下游引物中分别加入了 Mlu I 和 Sal I 酶切位点。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析经 PCR 扩增后的目的片段,利用 DNA 纯化试剂盒进行片段回收,然后连接至 Mlu I 和 Sal I 双酶切后的 pWPT 载体中,将形成的质粒命名为 pWPT-CLDN18.2。该质粒在 CLDN18.2 基因 C 末端,含有 Flag 标签序列。连接后的质粒载体通过 PCR 鉴定。

1.3.2 慢病毒包装 293T 细胞消化后以 $8 \times 10^6 / \text{cm}^2$ 密度铺至 10 cm 培养皿,于 37 °C 培养。配制质粒/PEI 混合液(pWPT 18.2 5 μg 、psPAX2 7.5 μg 、

pMD2.G 2.5 μg),加入 800 μL DMEM 中孵育。对应 PEI 量为 45 μL ,加入 800 μL OMEM 中孵育 5 min。将质粒混合液逐滴加入 PEI 孵育液中,并轻轻混匀,室温孵育 20 min。将配制的质粒/PEI 混合液逐滴加入细胞中,混匀。5 h 后换液。48 h 后收集病毒上清液,以 0.45 μm 滤膜过滤后于 4 °C 暂时保存。

1.3.3 慢病毒感染的 293T-CLDN18.2 混合克隆细胞构建及鉴定

1.3.3.1 病毒转导 选取生长良好的 293T 细胞以 $3 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 密度铺至 6 cm 培养皿。72 h 后弃去 293T 细胞上清液,加入 3 mL 新鲜的完全培养基,再加入 1 mL 病毒原液,加入终浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 polybrene 进行培养。96 h 后去除上清,加入 5 mL 新鲜的完全培养基。次日将细胞消化后,取一半细胞用于蛋白质免疫印迹(Western blotting)检测。另一半细胞继续培养,并于 1 d 后收集,用于 Western blotting 检测。

1.3.3.2 Western blotting 检测 293T-CLDN18.2 混合克隆(取自感染后 48、72 h)分别以蛋白裂解液裂解,离心后取上清液,采用 BCA 法进行测定。以 293T 作为阴性对照,各取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 分析,转膜,封闭,加入一抗 Anti-Flag-M2-HRP(以 1:400 比例稀释)、二抗(以 1:10 000 比例稀释),室温孵育 2 h,冲洗后显影。

1.3.4 慢病毒感染的 293T-CLDN18.2 单克隆细胞筛选 收集感染后 48 h 的 293T-CLDN18.2 混合克隆细胞后,采用有限稀释方法进行处理。从每个样本中抽出大约 50 个细胞并将其与含有 10% FBS 的 10 mL DMEM 混合均匀。在 96 孔板中分散成单层,放置于 37 °C、5% CO₂ 的环境下进行培养。培养 3~5 d 后于显微镜下观察,若孔中有 4~6 个细胞形成的集落,并仅此一个集落,则视为单克隆细胞,用笔做好标记。在 37 °C、5% CO₂ 的环境下,继续进行静态培养。2 周后单克隆形成的集落较为明显,按照 24、12、6 孔板等顺序逐步扩大其培养。

1.3.5 检测转染后目的蛋白水平 将 293T-CLDN18.1 单克隆细胞消化后,收取部分蛋白进行 Western blotting 检测,方法同 1.3.3.2。

1.3.6 检测转染后目的蛋白的单克隆细胞阳性率 取 6 孔板中的 293T 和 293T-CLDN18.2 的单克隆细胞进行消化处理,收集并离心。加入 1% FBS(由 1×DPBS 配制而成),重新悬浮细胞,离心并清洗 2 次。去掉所有上层液体,并将 FITC-goat antiHu IgG-Fc 以 1:200 的比例稀释,接着加入 100 μL 1% FBS 复活细胞,温度设置为 4 °C,时间为 45 min,避免阳光照射,离心并清洗 3 次。最后,从试管中提取出 200 μL 细胞悬液,放入 96 孔流式细胞板中,采用流式细

胞仪检测转染后目的蛋白的单克隆细胞阳性率。

2 结 果

2.1 重组 pWPT-CLDN18.2 表达载体的构建情况 根据质粒图谱,利用限制性内切酶 Mlu I、Sal I 对 pWPT 质粒进行双酶切处理,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳回收酶切后产物。将目的基因与酶切后的质粒进行连接,质粒图谱见图 1。随机选取其中一个表达载体进行 PCR 扩增以确认目标片段的存在。见图 2。结果显示,700 bp 位置上显示出非常明显的条带,与目的基因大小相符,提示 pWPT-CLDN18.2 表达载体构建成功。

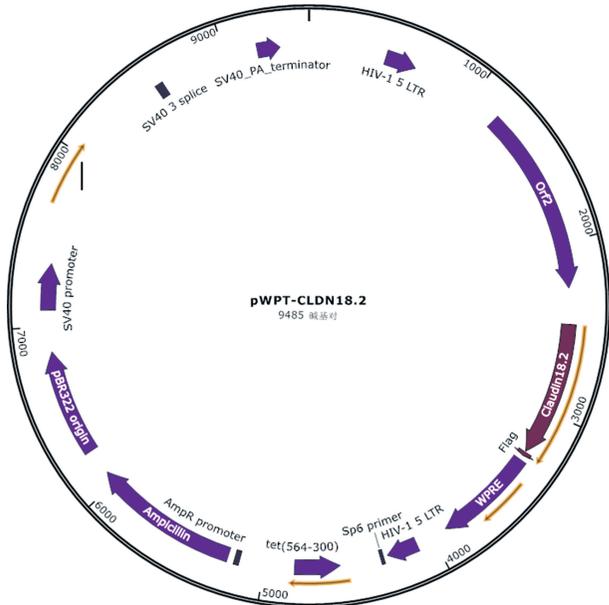


图 1 pWPT-CLDN18.2 载体图谱

2.2 转染后目的蛋白表达水平 培养 48、72 h 后,293T-CLDN18.2 混合克隆细胞裂解蛋白在 25~35 kDa 处均有明显条带(图 3A),单克隆细胞裂解蛋白也有明显的蛋白条带,与预期 28.8 kDa 大小相符,而且未转导 293T 细胞在该处无条带(图 3B),表明稳转

细胞株构建成功。

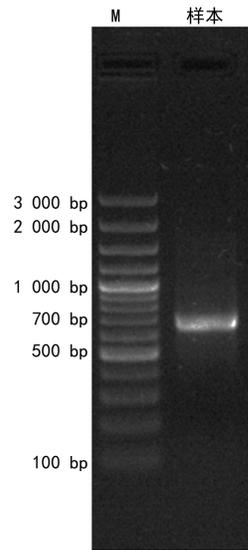
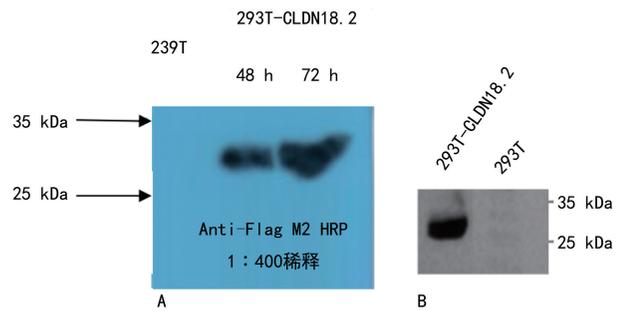


图 2 表达载体的 PCR 鉴定结果



注:A.混合克隆;B.单克隆。

图 3 Western blotting 检测结果

2.3 稳转细胞株的阳性表达率 通过抗 CLDN18.2 抗体检测挑选的候选单克隆细胞 293T-CLDN18.2 细胞株,采用流式细胞仪检测到其表达 CLDN18.2 的细胞阳性率为 99.3%,且与阴性对照区别良好,提示表达 CLDN18.2 的 293T 稳转细胞株构建成功(图 4)。

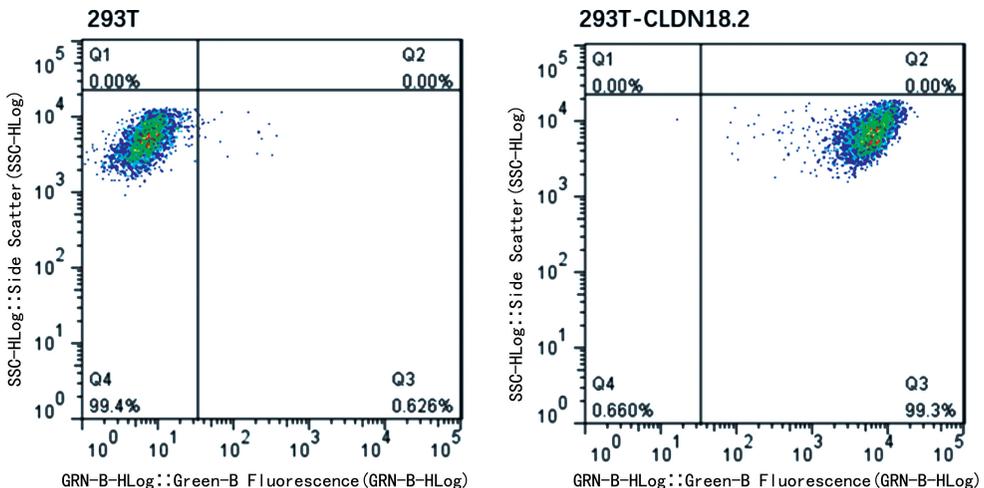


图 4 流式细胞仪检测结果

3 讨 论

目前,在肿瘤的治疗药物中,单克隆抗体由于其特异性高、变态反应轻等明显优势,被众多研究者所关注。研究发现,常见的抗体药物通过 3 种机制来杀伤肿瘤,以抗 CLDN18.2 为代表的单克隆抗体就是其中 1 种,其通过靶向细胞膜表面相应受体分子,介导抗体依赖性的细胞介导的细胞毒作用效应的发生,进而利用自然杀伤细胞和树突状细胞等对靶细胞进行杀伤。

CLDN18.2 是一种目前研究得较热门的胃特异性膜蛋白。CLDN18.2 蛋白作为一种高度选择性的胃谱系标记物,表达于短周期分化细胞,通常埋藏在胃黏膜中,正常组织中的单克隆抗体基本上接触不到。恶性肿瘤在发展过程中会导致紧密连接的破坏,使肿瘤细胞表面的 CLDN18.2 表位暴露出来,成为特定的靶点。因此,CLDN18.2 被认为是胃癌、胰腺癌等实体肿瘤免疫治疗的有效靶标^[10-13]。已有的临床结果表明,CLDN18.2 作为治疗靶点具有显著的疗效和安全性,因此针对 CLDN18.2 的药物研发具有广阔前景^[14]。目前,制备单克隆抗体最常见的方法是培养稳定表达人 CLDN18.2 的单克隆细胞株,然后通过利用不同的免疫方式,筛选出针对 CLDN18.2 的新型单克隆抗体。

本研究通过在体外构建 CLDN18.2 基因表达的慢病毒载体,经 PCR 鉴定,载体构建成功,感染后 48、72 h 的细胞在 28.8 kDa 左右均有特异条带,与预期理论分子量一致。但研究发现,细胞在感染后 72 h 会发生死亡,重复几次都出现相同的结果,考虑可能是由于 293T 细胞大量表达 CLDN18.2 蛋白,对细胞有损伤作用。而在感染后 48 h,细胞状态还可以,故取感染后 48 h 的细胞继续做单克隆实验。而且,通过 Western blotting 和流式细胞仪检测到 CLDN18.2 在 293T 细胞中高表达,提示通过单克隆筛选成功建立了一个稳定表达人 CLDN18.2 的 293T 细胞克隆,为进一步研究 CLDN18.2 的功能及单克隆抗体的制备奠定了基础。

参考文献

[1] 林静静,张铁威,李秀央. 疾病时空聚集分析的研究与进展[J]. 中华流行病学杂志,2020,41(7):1165-1170.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[3] 罗安,朱欣彦,胡晔东,等. 基于肿瘤基质评分的胃癌预后基因分析[J]. 同济大学学报(医学版), 2021, 41(4): 418-425.

[4] KUMAR V, SONI P, GARG M, et al. Emerging therapies in the management of advanced-stage gastric cancer[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 404.

[5] GÜNZEL D. Claudins: Vital partners in transcellular and paracellular transport coupling[J]. Pflugers Arch, 2017, 469(1): 35-44.

[6] MICKE P, MATTSSON JOHANNA S M, EDLUND K, et al. Aberrantly activated claudin 6 and 18.2 as potential therapy targets in non-small-cell lung cancer[J]. Int J Cancer, 2011; 135(9): 2206-2214.

[7] SAHIN U, KOSLOWSKI M, DHAENE K, et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(23): 7624-7634.

[8] HEWITT K J, AGARWAL R, MORIN P J. The claudin gene family: Expression in normal and neoplastic tissues[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 186.

[9] PELLINO A, BRIGNOLA S, RIELLO E, et al. Association of CLDN18 protein expression with clinicopathological features and prognosis in advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinomas[J]. J Pers Med, 2021, 11(11): 1095.

[10] WALDMANN H. Human monoclonal antibodies: The benefits of humanization[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1904(2019): 1-10.

[11] MAXIMIANO S, MAGALHÃES P, GUERREIRO M P, et al. Trastuzumab in the treatment of breast cancer[J]. Bio Drugs, 2016, 30(2): 75-86.

[12] CHEN R, TAO Y, XU X, et al. The efficacy and safety of nivolumab, pembrolizumab, and atezolizumab in treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. Discov Med, 2018, 26(143): 155-166.

[13] MINACHT-KRAUS R, KREUZBERG M, UT-SCH M, et al. Preclinical characterization of IMAB362 for the treatment of gastric carcinoma[J]. Ann Oncol, 2017, 28: 126.

[14] TRARBACH T, SCHULER M, ZVIRBULE Z, et al. Efficacy and safety of multiple doses of IMAB362 in patients with advanced gastroesophageal cancer: Results of a phase II study[J]. Ann Oncol, 2014, 25(4): iv218.