

· 医药生物技术 ·

# 基于 PiggyBac 转座系统构建稳定表达 *UL19* 基因的小鼠乳腺癌细胞系 4T1

赵晓彤, 王欣雅, 刘滨磊, 胡翰, 汪洋\*

湖北工业大学 生命科学与健康工程学院, 湖北 武汉 430068

赵晓彤, 王欣雅, 刘滨磊, 胡翰, 汪洋. 基于 PiggyBac 转座系统构建稳定表达 *UL19* 基因的小鼠乳腺癌细胞系 4T1[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4138-4148.

ZHAO Xiaotong, WANG Xinya, LIU Binlei, HU Han, WANG Yang. Construction of a stable 4T1 cell line expressing *UL19* by the PiggyBac transposon system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4138-4148.

**摘要:** 为研究溶瘤II型单纯疱疹病毒(oncolytic herpes simplex virus type 2, oHSV2)主要衣壳蛋白 VP5 蛋白(由 *UL19* 基因编码)调控免疫细胞抗肿瘤的机制, 本研究通过 PiggyBac 转座系统构建了稳定表达 VP5 蛋白、近红外荧光蛋白(near-infrared fluorescent protein, iRFP)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的小鼠乳腺癌细胞 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞系。通过流式细胞术及免疫印迹法筛选 GFP 及 VP5 高表达的单克隆细胞系, 检测所构建细胞系中 *UL19* 基因表达稳定性。经 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR、免疫印迹法检测, 连续传代至 15 代的 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞中的 *UL19* 基因拷贝数及 VP5 蛋白表达量均显著高于瞬转 *UL19* 基因的 4T1 细胞, 证明 *UL19* 基因稳定插入至 4T1 细胞基因组中。实时无标记动态细胞分析技术(real time cellanalysis, RTCA)监测 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞显示具有与其亲代细胞 4T1 相似的生长活性。进一步研究证实, NK92 细胞对 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞的杀伤能力显著高于 4T1 细胞。本研究为阐述 VP5 蛋白在 4T1 细胞中通过 HLA-E 分子调控包括 T 细胞、NK 细胞在内的免疫细胞发挥抗肿瘤功能奠定了基础。

**关键词:** 溶瘤II型单纯疱疹病毒; VP5 蛋白; PiggyBac 转座系统; 4T1 细胞

资助项目: 国家自然科学基金(32270969, 81972308)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270969, 81972308).

\*Corresponding author. E-mail: wangyang@hbut.edu.cn

Received: 2024-02-19; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-08

# Construction of a stable 4T1 cell line expressing *UL19* by the PiggyBac transposon system

ZHAO Xiaotong, WANG Xinya, LIU Binlei, HU Han, WANG Yang\*

School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

**Abstract:** To investigate the mechanism of the major capsid protein VP5 (encoded by the *UL19* gene) of oncolytic herpes simplex virus type II (oHSV2) in regulating the antitumor function of immune cells, we constructed a mouse breast cancer cell line 4T1-iRFP-VP5-GFP stably expressing VP5 protein, near-infrared fluorescent protein (iRFP), and green fluorescent protein (GFP) by using the PiggyBac transposon system. Flow cytometry and Western blotting were employed to screen the monoclonal cell lines expressing both GFP and VP5 and examine the expression stability of *UL19* in the constructed cell line. The results of SYBR Green I real-time PCR and Western blotting showed that the copies of *UL19* and the expression level of VP5 protein in the 15th passage of 4T1-iRFP-VP5-GFP cells were significantly higher than those in the 4T1 cells transiently transfected with *UL19*, demonstrating the stable insertion of *UL19* into the 4T1 cell genome. The real-time cell analysis (RTCA) was employed to monitor the proliferation of 4T1-iRFP-VP5-GFP cells, which showed similar proliferation activity to their parental 4T1 cells. Further studies confirmed that NK92 cells exhibited stronger cytotoxicity against 4T1-iRFP-VP5-GFP cells than against 4T1 cells. This study laid a foundation for elucidating the role of VP5 protein in regulating immune cells, including T cells and NK cells, *via* HLA-E in 4T1 cells to exert the anti-tumor function.

**Keywords:** oncolytic herpes simplex virus type II; VP5 protein; PiggyBac transposable system; 4T1 cells

溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)是一种新型的肿瘤治疗手段,其利用诱导宿主免疫细胞抗肿瘤作用以及选择性杀伤肿瘤细胞来发挥作用<sup>[1]</sup>。与传统的治疗方式相比,溶瘤病毒疗法能够在保留正常细胞的情况下,特异性地杀伤肿瘤细胞,被认为是一种安全有效的治疗方法。目前常见的溶瘤病毒有单纯疱疹病毒、麻疹病毒、腺病毒等<sup>[2]</sup>。单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是双链 DNA 病毒,是溶瘤病毒常用的载体。HSV 的繁殖能够受特异性疱疹病毒药物控制,其基因组相对容易被改造,并且可以对其

表面的糖蛋白进行修饰,使之与特异的细胞受体相结合,因此也是 OV 疗法中最常用的病毒之一<sup>[3]</sup>。本课题组研发的溶瘤 II 型单纯疱疹病毒 oHSV2 是以 HSV-2 HG52 毒株为基础,将编码人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte macrophage colony stimulating factor, hGM-CSF)的基因序列插入,同时敲除 *ICP34.5* 和 *ICP47* 基因<sup>[4]</sup>。VP5 蛋白由 *UL19* 基因编码,是单纯疱疹病毒主要结构蛋白。本课题组前期的研究证明了 VP5 蛋白能够被 HLA-E 分子递呈,并能促进包括 T 细胞及 NK 细胞在内的免疫细胞

的抗肿瘤作用。

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤,会对女性的身体健康造成极大的危害。据中国乳腺健康联盟发布的《中国乳腺癌防治报告(2020)》数据显示,2020年,全球乳腺癌新发病例达226万例<sup>[5]</sup>。而在我国,这一数字达到了42万例;数据显示,与部分西方国家相比,我国乳腺癌5年生存率相对较低,我国女性乳腺癌发病率正在以每年3.3%的速度增长,高于全球平均水平<sup>[6-7]</sup>。慢病毒载体与转座子载体常用于构建真核细胞稳转细胞系,本研究采用PiggyBac转座子系统,该系统由编码转座酶的辅助质粒和转座子质粒组成,与病毒载体相比具有操作简单、安全性高、提高外源基因整合效率等优点。将包含*UL19*基因、近红外荧光蛋白(near-infrared fluorescent protein, iRFP)基因和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的转座子质粒和表达转座酶的辅助质粒转染小鼠乳腺癌细胞系(4T1),使4T1细胞系稳定表达*UL19*基因、*iRFP*基因和*GFP*基因,并对其进行稳定性验证,成功构建了稳定表达VP5蛋白的4T1-iRFP-VP5-GFP细胞系。构建的4T1-iRFP-VP5-GFP细胞与其亲代4T1细胞具有相似的生长活性。进一步研究证实,NK92细胞对4T1-iRFP-VP5-GFP细胞杀伤能力显著高于4T1细胞。本研究为探究VP5蛋白诱导免疫细胞发挥抗肿瘤活性机制提供了合适的细胞模型,并为通过溶瘤病毒进行乳腺癌治疗的研究提供了体外药效学评价模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

HEK293T细胞、小鼠乳腺癌细胞(4T1)、NK92细胞购自美国典型培养物保藏中心(American Typical Culture Collection, ATCC);PiggyBac Dual Promoter质粒、super PiggyBac

Transposase (pSPBT)转座酶质粒及大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态由本实验室提供并保存;限制性内切酶(*Xba*I和*Eco*R I)购自NEB公司;高保真酶(2 $\times$ phanta Flash Master Mix)、ClonExpress II One Step Cloning Kit (Exnase II、5 $\times$ CE Buffer)、胶回收/DNA纯化试剂盒、HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR、ChamQ SYBR qPCR Master Mix (without ROX)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;无内毒素质粒中提试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司;DMEM-F12培养基购自南京森贝伽生物科技;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司;质粒转染使用Lipofectamine 3000转染试剂盒购自赛默飞世尔科技有限公司;细胞筛选用嘌呤霉素(puromycin)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)购自白鲨生物科技有限公司;PAGE凝胶快速制备试剂盒(10%)购自上海雅酶生物医药科技有限公司;Anti-VP5抗体购自圣克鲁斯生物技术有限公司;山羊抗兔二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 PBDP-iRFP-VP5-GFP载体构建

利用PCR技术,以pCMV-3 $\times$ flag-UL19质粒为模板扩增*UL19*基因,将载体PiggyBac-iRFP双酶切后胶回收,并利用同源重组的方法将扩增得到的*UL19*基因与载体进行连接,之后将其转化到大肠杆菌中,摇菌1.5 h后涂布于含有100 mg/mL氨苄青霉素(ampicillin trihydrate, Amp)的平板上,37 $^{\circ}$ C恒温培养过夜。挑选单克隆进行菌落PCR及琼脂糖凝胶电泳并进行测序鉴定,对连接成功的PBDP-iRFP-VP5-GFP阳性单克隆菌液进行质粒提取和酶切鉴定。

#### 1.2.2 检测PBDP-iRFP-VP5-GFP质粒VP5蛋白表达

用含有10% FBS的DMEM-F12培养基于

37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 HEK293T 细胞, 将生长状态良好的细胞于前一晚接种到 6 孔板中, 汇合度达到 60% 时进行转染。按照 Lipofectamine 3000 说明书将 PBDP-iRFP-VP5-GFP:pSPBT 按照 5:1 比例共转染细胞, 转染 24 h 后观察荧光情况后弃去培养基, 用 PBS 洗涤后加入配制好的 RIPA 裂解液(RIPA:蛋白酶抑制剂混合物=100:1) 于冰上裂解 30 min, 13 000 r/min 离心 15 min, 5×Loading buffer 加入上清液, 金属浴 100 °C 煮 15 min 获得总蛋白。经 7.5% SDS-PAGE 凝胶后, 使用 Bio-Rad 半干转膜仪进行转印。转印结束后的 NC 膜于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h 后, 加入 1:1 000 稀释的 VP5 抗体, 在 4 °C 冰箱中孵育过夜; TBST 洗 3 遍, 每次 5 min, 加入 1:10 000 稀释的 HRP 标记山羊抗鼠 IgG (H+L), 摇床室温孵育 1 h; TBST 洗 3 遍, 每次 5 min, 用超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影液显影观察。

### 1.2.3 4T1 细胞嘌呤霉素敏感实验

将生长状态良好的 4T1 细胞于前一晚铺板至 24 孔板中, 细胞密度为 10<sup>4</sup>/孔。待细胞汇合度达到 80% 后, 弃去培养基, 加入用完全培养基稀释后的嘌呤霉素, 使嘌呤霉素终浓度为 0–10 μg/mL, 每个浓度设置 3 个复孔。每日观察孔板中细胞生长情况并进行记录, 连续培养 1 周后, 细胞全部死亡的最低嘌呤霉素浓度即为最适嘌呤霉素筛选浓度。

### 1.2.4 单克隆细胞筛选

取 4T1 细胞用胰酶消化后计数, 将其数量调整到 3×10<sup>5</sup> 个细胞后接种至 6 孔板中, 当细胞汇合度达到 80% 后, 按照 Lipofectamine 3000 说明书, 每孔总质粒 2.5 μg, 按照 PBDP-iRFP-VP5-GFP:pSPBT 为 5:1 的比例共转染细胞, 转染 6 h 后更换新鲜培养基, 培养 48 h 后观察荧光情况。

将转染 48 h 后的 4T1 细胞弃去培养基, 加入嘌呤霉素浓度为 4 μg/mL 的完全培养基, 于

37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每 2 d 更换含有 4 μg/mL 嘌呤霉素的完全培养基并观察细胞发光情况, 直至孔内不发光的阴性细胞全部死亡后, 用胰酶消化细胞, 采用有限稀释法将细胞稀释至 10 个/mL, 每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板中, 培养 2 周后挑选 4 株生长状态良好的单克隆细胞扩大培养并传代。

### 1.2.5 检测单克隆细胞 GFP 及 VP5 蛋白表达水平

取野生型 4T1 细胞与扩大培养的单克隆细胞用胰酶消化后离心, 取 1×10<sup>5</sup> 个细胞于 1.5 mL EP 管中, 用 1 mL PBS 溶液洗 3 遍, 加 500 μL PBS 重悬后, 以野生型 4T1 细胞为对照, 用流式细胞术检测单克隆细胞 GFP 表达情况。

将扩大培养的单克隆细胞与 4T1 细胞接种至 6 孔板中, 按照 1.2.2 中的方法检测细胞中 VP5 蛋白的表达水平。

### 1.2.6 实时无标记动态细胞分析技术检测 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞系生长活性

将生长状态良好的 4T1 细胞及 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞每孔 1×10<sup>4</sup> 个接种于电子微孔板中, 使用 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪检测 4T1 细胞及 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞生长状况<sup>[8]</sup>。

### 1.2.7 鉴定 *ULI9* 基因插入情况

提取 4T1 细胞及第 1 代和连续传至第 15 代的 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞基因组, 并进行 *ULI9* 基因的 PCR 扩增, 引物序列见表 1。以 4T1 细胞为阴性对照进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定 *ULI9* 基因插入情况。

### 1.2.8 实时荧光定量 PCR 检测 *ULI9* 基因表达

提取第 1、5、15 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞基因组, 以瞬转不同质粒浓度(1.5、2.5 μg) *ULI9* 基因的 4T1 细胞为对照, 使用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法以 *GAPDH* 为内参, 每组设置 3 个重复, 对 *ULI9* 基因的相对表达量进行检测, 所用引物见表 1。结果采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析 *ULI9* 基因的相对表达量<sup>[9-11]</sup>。

### 1.2.9 NK92 细胞对 4T1 及 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞杀伤试验

将 NK92 细胞分别与 4T1 细胞和 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞按照效靶比=2:1 共孵育, 使用 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪检测 NK92 细胞对 4T1 细胞和 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞的杀伤效果。

**表 1** *UL19* 扩增及实时荧光定量 PCR 检测引物序列  
Table 1 *UL19* amplification and real-time fluorescence quantitative PCR detection primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'→3')
UL19-F	ATGGCCGCTCCTGCCCG
UL19-R	TTACAGAGACAGGCCCTTAGC
Q-UL19-F	TACTTCTCCTCCATCCGCCA
Q-UL19-R	CACGGGGCTCATCTTGAAGT
GAPDH-F	CTCTGGTAAAGTGGATATTGT
GAPDH-R	GGTGAATCATATTGGAACA

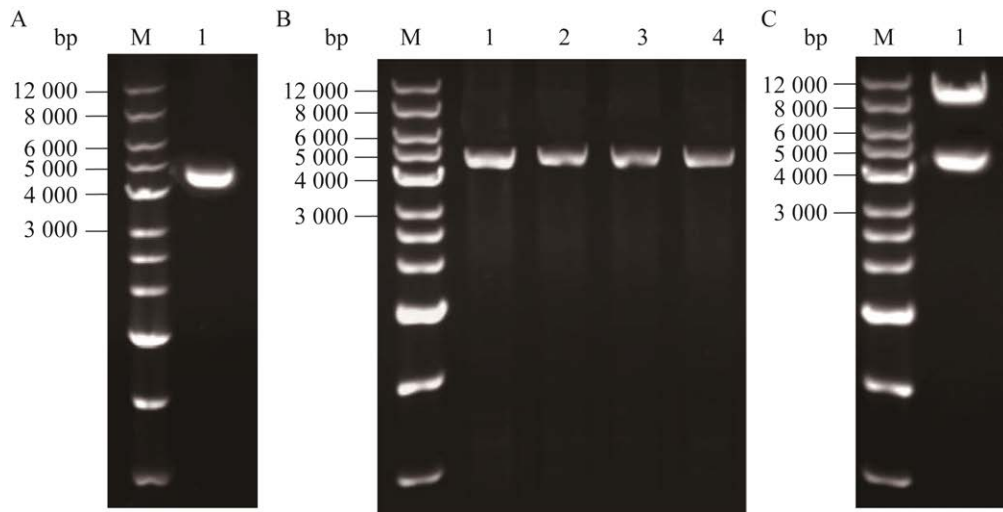
## 2 结果与分析

### 2.1 PBDP-iRFP-VP5-GFP 质粒鉴定

以 pCMV-3×flag-UL19 质粒为模板扩增 *UL19* 基因, 琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增得到的 *UL19* 基因约为 4 125 bp, 与预期大小一致(图 1A)。利用同源重组方法将 PBDP-iRFP 载体与 *UL19* 基因连接, 转化到 DH5 $\alpha$  感受态中, 涂布于含有 Amp 抗性的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养。挑选单克隆菌落进行菌落 PCR (图 1B), 将阳性单克隆菌液送测序分析, 测序结果无突变。重组质粒经 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切后得到的片段大小与预期结果一致(图 1C)。

### 2.2 PBDP-iRFP-VP5-GFP 质粒验证

将 PBDP-iRFP-VP5-GFP:pSPBT 按照 5:1 比例共转染 HEK293T 细胞, 转染 24 h 后使用倒置荧光显微镜观察并拍摄 GFP 表达(图 2A、2B)。提取转染后的 HEK293T 细胞总蛋白, 经免疫印



**图 1** PBDP-iRFP-VP5-GFP 质粒琼脂糖凝胶电泳图 A: PCR 鉴定. Lane M: 1 kb DNA marker; Lane 1: *UL19* 基因片段. B: 菌落 PCR. Lane M: 1 kb DNA marker; Lane 1-4: 单克隆菌落. C: 双酶切鉴定. Lane M: 1 kb DNA marker; Lane 1: 重组质粒双酶切片段(*Xba* I 和 *Eco*R I)

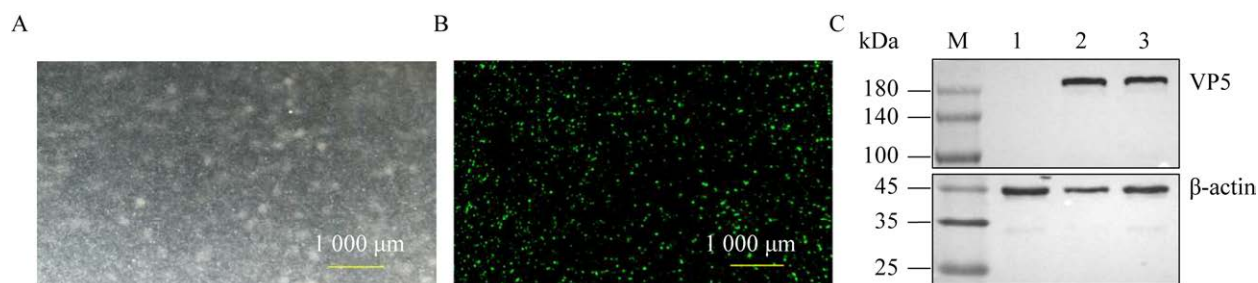
Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PBDP-iRFP-VP5-GFP plasmid. A: PCR identification. Lane M: 1 kb DNA marker; Lane 1: *UL19* gene fragment. B: Colony PCR. Lane M: 1 kb DNA marker; Lane 1-4: Monoclonal colonies. C: Double-enzymatic excision identification. Lane M: 1 kb DNA marker; Lane 1: Recombinant plasmid double-enzymatic fragment (*Xba* I and *Eco*R I).

迹法检测 VP5 蛋白表达,结果显示,在 186 kDa 附近有目的条带,而阴性对照 HEK293T 细胞未检测到条带(图 2C)。

### 2.3 4T1-iRFP-VP5-GFP 稳转细胞系筛选

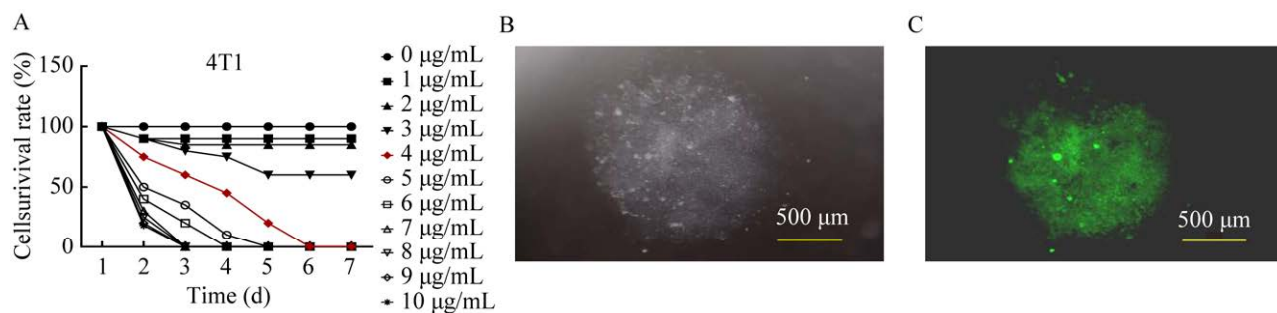
用含 0–10  $\mu\text{g/mL}$  嘌呤霉素的完全培养基筛选 4T1 细胞 1 周后,经发现在 1 周内使细胞全部死亡的最低嘌呤霉素浓度为 4  $\mu\text{g/mL}$ ,因此选

取 4  $\mu\text{g/mL}$  为最适嘌呤霉素筛选浓度(图 3A)。4T1 细胞用 Lipofectamine 3000 转染 48 h 后,在荧光显微镜下观察 GFP 荧光比例为 70%,经嘌呤霉素筛选培养 1 周后,采用有限稀释法挑取单克隆细胞。经 2 周培养后得到 4 株单克隆细胞并进行扩大培养,并在荧光显微镜下观察(图 3B、3C)。



**图 2 PBDP-iRFP-VP5-GFP 质粒验证** A: 使用荧光显微镜在明场 2 倍放大条件下观察 HEK293T 细胞. B: 使用荧光显微镜在蓝光(激发光波长为 420–485 nm) 2 倍放大条件下观察 HEK293T 细胞. C: 重组质粒转染验证. Lane 1: HEK293T; Lane 2–3: 重组质粒转染后的 HEK293T

Figure 2 PBDP-iRFP-VP5-GFP plasmid validation. A: HEK293T cells using a fluorescence microscope under 2 $\times$  magnification at light field. B: HEK293T cells using a fluorescence microscope under blue light (420–485 nm excitation wavelength range) at 2 $\times$  magnification. C: Recombinant plasmid transfection validation. Lane 1: HEK293T; Lane 2–3: Recombinant plasmid.



**图 3 单克隆细胞系筛选** A: 不同浓度嘌呤霉素对 4T1 细胞致死率曲线图. B: 使用荧光显微镜在白光 500 倍放大下观察单克隆细胞. C: 使用荧光显微镜在蓝光(激发光波长为 420–485 nm) 500 倍放大下观察单克隆细胞

Figure 3 Screening of monoclonal cell lines. A: Lethality curves of 4T1 cells with different concentrations of puromycin. B: Observation of monoclonal cells using fluorescence microscope at 500 $\times$  magnification in white light. C: Observation of monoclonal cells using fluorescence microscope at 500 $\times$  magnification in blue light (420–485 nm excitation wavelength range).



## 2.4 流式细胞术及免疫印迹法筛选 4T1-iRFP-VP5-GFP 稳转细胞系

挑选的 4 株单克隆细胞扩大培养后经流式细胞术检测 GFP 阳性率, 4 株单克隆细胞均能检测到 GFP 的表达, 其中 C5 单克隆细胞的 GFP 阳性率达到 100% (图 4A)。由于 PiggyBac 质粒为双启动子系统, 目的基因与下游 GFP 的表达属于不同的启动子, 因此同时使用免疫印迹法检测筛选到的表达 GFP 细胞中 VP5 蛋白的表达情况。结果表明, 这 4 株单克隆细胞均能够检测到 VP5 蛋白表达(186 kDa), 其中 C5 单克隆细胞的 VP5 蛋白表达量最高(图 4B)。因此, 挑选 GFP 及 VP5 表达量最高的 C5 单克隆细胞扩大培养并用于后续实验。

## 2.5 4T1-iRFP-VP5-GFP 稳转细胞系及 4T1 细胞系生长活性监测

使用 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时

无标记细胞分析仪监测 4T1 细胞与 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞生长状况, 结果显示在插入了 *UL19* 基因后, 该细胞生长活性与 4T1 野生型细胞趋于一致(图 5)。

## 2.6 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞系基因组鉴定

提取扩大培养的第 1 代及连续传至第 15 代的 4T1-iRFP-VP5-GFP 的细胞基因组, 以野生型 4T1 细胞为阴性对照, 进行 *UL19* 基因 PCR 扩增, 并进行琼脂糖凝胶电泳分析。琼脂糖凝胶电泳结果如图 6 所示, 第 1 代及第 15 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞基因组中均能检测到 *UL19* 基因(4 125 bp)。

## 2.7 *UL19* 基因在 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞系中稳定高表达

为了验证 *UL19* 基因在构建的 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞系中稳定高表达, 检测了第 1、5、15 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞中 *UL19* 基因拷贝数, 以瞬转 *UL19* 基因的 4T1 细胞为对照。

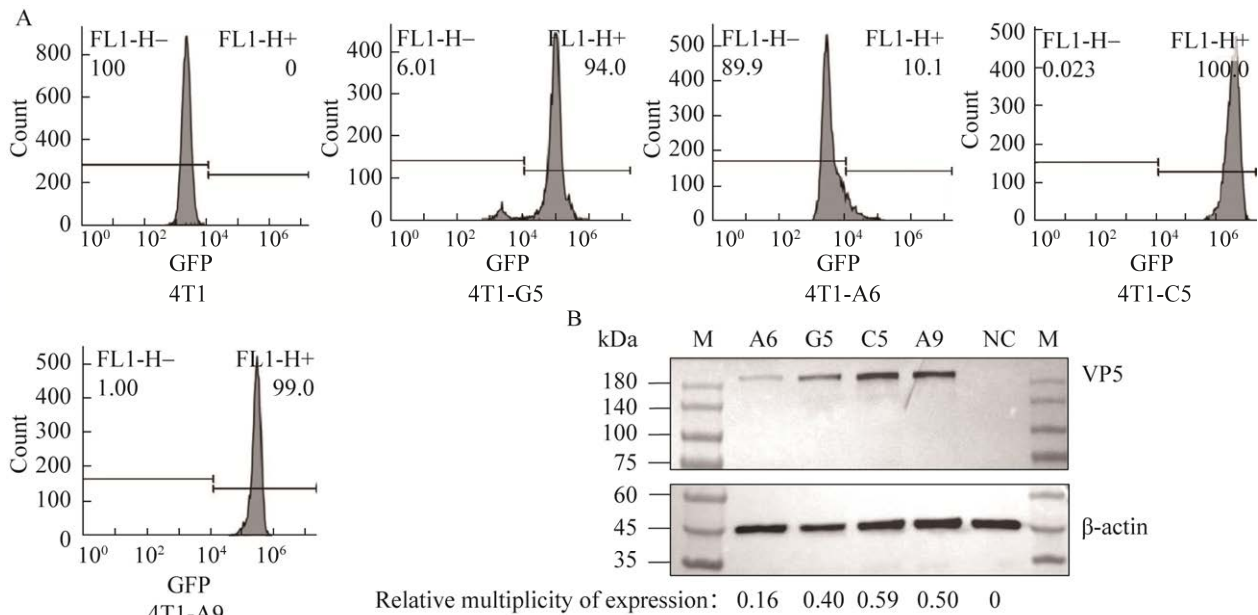


图 4 流式细胞术及免疫印迹法筛选单克隆细胞系 A: 流式细胞术检测单克隆细胞中 GFP 表达. B: 免疫印迹法筛选单克隆细胞中 VP5 蛋白表达

Figure 4 Flow cytometry and Western blotting screening of monoclonal cell lines. A: Detection of GFP expression in monoclonal cells by flow cytometry. B: Screening of VP5 protein expression in monoclonal cells by Western blotting.

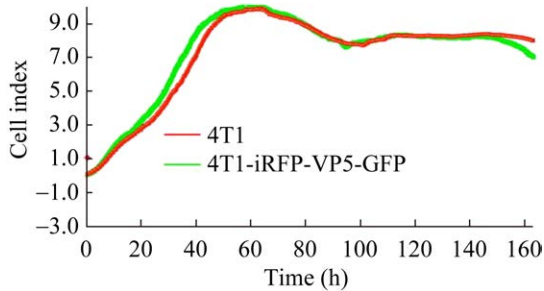


图5 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞及 4T1 细胞生长活性监测

Figure 5 4T1-iRFP-VP5-GFP cell and 4T1 cell growth activity monitoring.

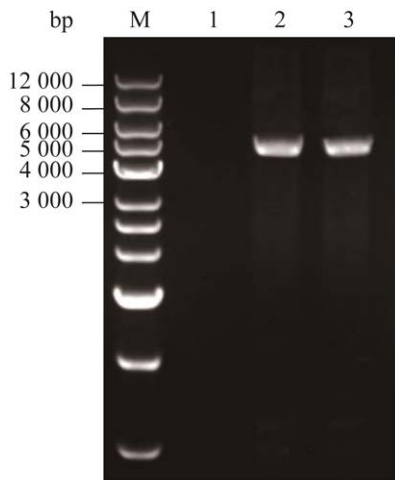


图6 琼脂糖凝胶电泳检测 *ULI9* 基因 Lane M: 1 kb DNA marker. Lane 1: 4T1 细胞 *ULI9* 基因扩增; Lane 2: 第 1 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞 *ULI9* 基因扩增; Lane 3: 第 15 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞 *ULI9* 基因扩增

Figure 6 Agarose gel electrophoresis detection of the *ULI9* gene. Lane M: 1 kb DNA marker; Lane 1: *ULI9* gene detection in 4T1 cell; Lane 2: *ULI9* gene detection in generation 1 4T1-iRFP-VP5-GFP cell; Lane 3: *ULI9* gene detection in generation 15 4T1-iRFP-VP5-GFP cell.

结果如图 7 所示, *ULI9* 基因在不同代次 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞中稳定表达, 且基因拷贝数显著高于瞬转 *ULI9* 基因的 4T1 细胞系 ( $P < 0.001$ ).

## 2.8 VP5 蛋白在 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞系中稳定表达

为了验证 VP5 蛋白是否在 4T1-iRFP-VP5-GFP

细胞系中稳定表达, 提取第 1、5、15 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞总蛋白进行免疫印迹实验, 并与野生型 4T1 细胞和瞬时转染不同含量 PBDP-iRFP-VP5-GFP 质粒的 4T1 细胞进行对比, 结果如图 8 所示, 在不同代次 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞中均有 VP5 蛋白表达, 且 VP5 表达量高于瞬时转染的 4T1 细胞。

## 2.9 VP5 蛋白增强 NK92 细胞对 4T1 细胞的杀伤

为研究 VP5 蛋白的表达能否影响 NK 细胞对 4T1 细胞的杀伤, 将 NK92 细胞分别与 4T1 细胞和 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞按照效靶比=2:1 共孵育, 通过 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪分析 NK92 细胞对 4T1 和 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞的杀伤效果。结果表明, NK92 细胞对 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞的杀伤效果显著高于 4T1 细胞(图 9)。

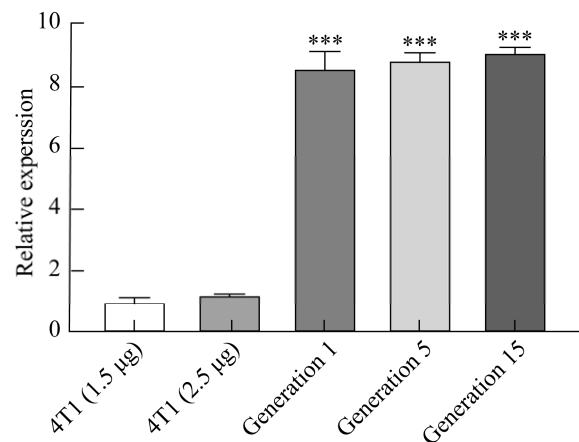
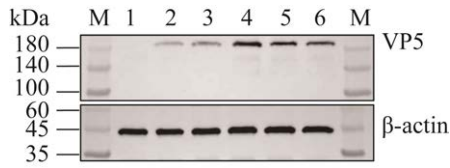


图7 实时荧光定量 PCR 检测 *ULI9* 基因相对表达量 不同代次的 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞 *ULI9* 基因拷贝数均显著高于瞬转 *ULI9* 基因的 4T1 细胞 (\*\*\*:  $P < 0.001$ , One-way ANOVA 检验)

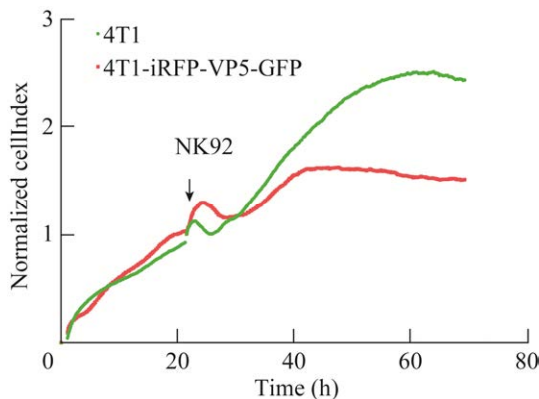
Figure 7 Real-time fluorescence quantitative PCR for detection of relative expression levels of *ULI9* gene. The copy number of the *ULI9* gene in 4T1-iRFP-VP5-GFP cells at different passages were significantly higher than those in 4T1 cells transiently transfected with *ULI9* gene (\*\*\*:  $P < 0.001$ , One-way ANOVA test).





**图 8 免疫印迹法检测 VP5 蛋白表达** Lane 1: 4T1 细胞; Lane 2: 4T1 细胞瞬转 PBDP-iRFP-VP5-GFP 质粒(1.5  $\mu$ g); Lane 3: 4T1 细胞瞬转 PBDP-iRFP-VP5-GFP 质粒(2.5  $\mu$ g); Lane 4: 第 1 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞; Lane 5: 第 5 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞; Lane 6: 第 15 代 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞

Figure 8 Western blotting for detection of VP5 protein expression. Lane 1: 4T1 cells; Lane 2: 4T1 cells transiently transfected with PBDP-iRFP-VP5-GFP plasmid (1.5  $\mu$ g); Lane 3: 4T1 cells transiently transfected with PBDP-iRFP-VP5-GFP plasmid (2.5  $\mu$ g); Lane 4: Generation 1 4T1-iRFP-VP5-GFP cell; Lane 5: Generation 5 4T1-iRFP-VP5-GFP cell; Lane 6: Generation 15 4T1-iRFP-VP5-GFP cell.



**图 9 NK92 细胞对 4T1 及 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞的杀伤**

Figure 9 Killing effect of NK92 cells on 4T1 and 4T1-iRFP-VP5-GFP cells.

### 3 讨论与结论

溶瘤病毒发挥作用的机制主要有 2 种,即特异性地靶向杀伤肿瘤细胞和诱导机体抗肿瘤免疫。当肿瘤细胞被 OV 感染后,OV 在体内复

制造成肿瘤细胞裂解死亡,导致局部肿瘤微环境破坏,并释放大量病毒后代,这些溶瘤病毒后代感染周围的肿瘤细胞,同时诱导机体免疫反应应答,使“冷”肿瘤变为“热”肿瘤<sup>[12-13]</sup>。

溶瘤 II 型单纯疱疹病毒 oHSV2 是以 HSV-2 HG52 毒株为基础,敲除 *ICP34.5* 和 *ICP47* 基因,插入了编码人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, hGM-CSF) 的基因序列。*ICP34.5* 基因是 HSV 中主要的神经毒性基因<sup>[14]</sup>,其编码的蛋白 ICP34.5 可使 eIF-2 $\alpha$  去磷酸化。蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR) 是能够识别双链 RNA 及其他病毒成分的胞内蛋白质激酶<sup>[15]</sup>,当被激活时 PKR 抑制蛋白质的合成,加速细胞的迅速死亡,并清除病毒。*ICP34.5* 基因的缺失抑制 PKR 的活性,使其蛋白合成功能恢复正常,激活癌细胞中的 RAS/丝裂原活化蛋白激酶途径,因此,*ICP34.5* 缺失的 HSV 可以在肿瘤细胞内选择性增殖<sup>[16]</sup>。HSV 对 *MHC-I* 基因表达存在抑制作用,*ICP47* 基因是免疫逃逸相关基因,它可以竞争性结合宿主细胞肿瘤异常糖链蛋白 (tumor abnormal glycan protein, TAP)<sup>[17]</sup>。*ICP47* 基因缺失使 TAP 相关转运蛋白被抑制, MHC I 类分子不能被转运到细胞膜,消除细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL) 的递呈<sup>[18-19]</sup>。hGM-CSF 募集树突状细胞并递呈肿瘤抗原,引发获得性免疫应答,对抗肿瘤。

HLA-E 分子主要通过调控激活性受体 NKG2C 与抑制性受体 NKG2A<sup>[20-22]</sup>,这些配体作为 NK 细胞的重要组成部分,是决定其免疫功能的重要因素<sup>[23-25]</sup>。本课题组前期研究证实,溶瘤病毒 oHSV2 能够上调位于肿瘤细胞及免疫细胞表面的 HLA-E 及 NKG2A 分子<sup>[26]</sup>。oHSV2 核衣壳结构主要由 VP5 蛋白、VP19C 蛋白、VP23 蛋白和 VP26 蛋白组成,其中 VP5 蛋白的同源五

聚体与同源六聚体是病毒核衣壳结构的基本结构单元<sup>[27]</sup>。VP5 蛋白由 *UL19* 基因编码, 在单纯疱疹病毒感染宿主后, 引起机体的免疫反应。本团队前期研究证明 VP5 蛋白与 HLA-E 分子存在相互作用<sup>[28]</sup>。本研究利用 PiggyBac 转座子系统将 *UL19* 基因整合到 4T1 细胞染色体上, 利用 *iRFP*、*GFP* 基因的表达作为荧光标记。在通过嘌呤霉素筛选阳性单克隆细胞后, 利用流式细胞术、免疫印迹法、SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 等方法筛选并验证了 *UL19* 基因稳定插入了 4T1 细胞基因组中, 说明 4T1-iRFP-VP5-GFP 细胞系构建成功。进一步研究证实, NK92 细胞对稳定表达 VP5 蛋白的 4T1 细胞(4T1-iRFP-VP5-GFP)的杀伤能力显著高于 4T1 细胞。肿瘤细胞 HLA-E 分子递呈 VP5 蛋白形成的 HLA-E-VP5 多肽复合物对 NK 细胞表面 NKG2A、NKG2C 分子及下游相关信号通路的影响, 以及进一步对 NK 细胞抗肿瘤作用的影响将是下一步研究的方向之一。

## REFERENCES

- [1] KAUFMAN HL, KOHLHAPP FJ, ZLOZA A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14: 642-662.
- [2] ZOLALY MA, MAHALLAWI W, KHAWAJI ZY, ALAHMADI MA. The clinical advances of oncolytic viruses in cancer immunotherapy[J]. *Cureus*, 2023, 15(6): e40742.
- [3] TANG TY, HUANG X, ZHANG G, LIANG TB. Oncolytic immunotherapy: multiple mechanisms of oncolytic peptides to confer anticancer immunity[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2022, 10(7): e005065.
- [4] ZHANG W, ZENG BB, HU X, ZOU LJ, LIANG J, SONG Y, LIU BL, LIU SM. Oncolytic herpes simplex virus type 2 can effectively inhibit colorectal cancer liver metastasis by modulating the immune status in the tumor microenvironment and inducing specific antitumor immunity[J]. *Human Gene Therapy*, 2021, 32(3/4): 203-215.
- [5] 商木岩, 郭帅, 张强, 朴浩哲. 中国乳腺癌筛查现状[J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(11): 1911-1914.
- [6] SHANG MY, GUO S, ZHANG Q, PIAO HZ. Current status of breast cancer screening in China[J]. *Journal of Practical Cancer*, 2020, 35(11): 1911-1914 (in Chinese).
- [7] PASHAYAN N, ANTONIOU AC, IVANUS U, ESSERMAN LJ, EASTON DF, FRENCH D, SROCZYNSKI G, HALL P, CUZICK J, EVANS DG, SIMARD J, GARCIA-CLOSAS M, SCHMUTZLER R, WEGWARTH O, PHAROAH P, MOORTHIE S, de MONTGOLFIER S, BARON C, HERCEG Z, TURNBULL C, et al. Personalized early detection and prevention of breast cancer: ENVISION consensus statement[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020, 17: 687-705.
- [8] HOLMES CE, MUSS HB. Diagnosis and treatment of breast cancer in the elderly[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2003, 53(4): 227-244.
- [9] 刘芳彤, 邢淑雁, 刘孝云, 叶冬雪, 杨佳, 张国英, 容蓉, 杨勇. 基于实时无标记细胞分析技术时间维度特征的体外抗肿瘤活性评价新策略[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(3): 592-598.
- [10] LIU FT, XING SY, LIU XY, YE DX, YANG J, ZHANG GY, RONG R, YANG Y. A new strategy for evaluating *in vitro* antitumor activity based on the time-dimensional characterization of real-time label-free cell analysis[J]. *Chinese Journal of Pharmacology*, 2024, 40(3): 592-598 (in Chinese).
- [11] ANSBRO MR, JACOB CG, AMATO R, KEKRE M, AMARATUNGA C, SRENG S, SUON S, MIOTTO O, FAIRHURST RM, WELLEMS TE, KWIATKOWSKI DP. Development of copy number assays for detection and surveillance of piperazine resistance associated plasmepsin 2/3 copy number variation in *Plasmodium falciparum*[J]. *Malaria Journal*, 2020, 19(1): 181.
- [12] FERREIRA ID, ROSÁRIO VE, CRAVO PVL. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*[J]. *Malaria Journal*, 2006, 5: 1.
- [13] AITMAN TJ, DONG R, VYSE TJ, NORSWORTHY PJ, JOHNSON MD, SMITH J, MANGION J, ROBERTON-LOWE C, MARSHALL AJ, PETRETTO E, HODGES MD, BHANGAL G, PATEL SG, SHEEHAN-ROONEY K, DUDA M, COOK PR, EVANS DJ, DOMIN J, FLINT J, BOYLE JJ, et al. Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans[J]. *Nature*, 2006, 439: 851-855.
- [14] ANDTBACKA RHI, KAUFMAN HL, COLLICHO F, AMATRUDA T, SENZER N, CHESNEY J, DELMAN

- KA, SPITLER LE, PUZANOV I, AGARWALA SS, MILHEM M, CRANMER L, CURTI B, LEWIS K, ROSS M, GUTHRIE T, LINETTE GP, DANIELS GA, HARRINGTON K, MIDDLETON MR, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2015, 33(25): 2780-2788.
- [13] MA J, RAMACHANDRAN M, JIN C, QUIJANO-RUBIO C, MARTIKAINEN M, YU D, ESSAND M. Characterization of virus-mediated immunogenic cancer cell death and the consequences for oncolytic virus-based immunotherapy of cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11: 48.
- [14] WALKER JD, SEHGAL I, KOUSOULAS KG. Oncolytic herpes simplex virus 1 encoding 15-prostaglandin dehydrogenase mitigates immune suppression and reduces ectopic primary and metastatic breast cancer in mice[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(14): 7363-7371.
- [15] WATANABE I, KASUYA H, NOMURA N, SHIKANO T, SHIROTA T, KANAZUMI N, TAKEDA S, NOMOTO S, SUGIMOTO H, NAKAO A. Effects of tumor selective replication-competent herpes viruses in combination with gemcitabine on pancreatic cancer[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2008, 61(5): 875-882.
- [16] ELDE NC, CHILD SJ, GEBALLE AP, MALIK HS. Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry[J]. *Nature*, 2009, 457: 485-489.
- [17] TOMAZIN R, HILL AB, JUGOVIC P, YORK I, van ENDERT P, PLOEGH HL, ANDREWS DW, JOHNSON DC. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(13): 3256-3266.
- [18] GALOCHA B, HILL A, BARNETT BC, DOLAN A, RAIMONDI A, COOK RF, BRUNNER J, McGEOCH DJ, PLOEGH HL. The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH<sub>2</sub>-terminal 35 residues[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, 185(9): 1565-1572.
- [19] AHN K, MEYER TH, UEBEL S, SEMPÉ P, DJABALLAH H, YANG Y, PETERSON PA, FRÜH K, TAMPÉ R. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(13): 3247-3255.
- [20] PIETRA G, ROMAGNANI C, MORETTA L, MINGARI MC. HLA-E and HLA-E-bound peptides: recognition by subsets of NK and T cells[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15(28): 3336-3344.
- [21] ANDRÉ P, DENIS C, SOULAS C, BOURBON-CAILLET C, LOPEZ J, ARNOUX T, BLÉRY M, BONNAFOUS C, GAUTHIER L, MOREL A, ROSSI B, REMARK R, BRESO V, BONNET E, HABIF G, GUIDA S, LALANNE AI, HOFFMANN C, LANTZ O, FAYETTE J, et al. Anti-NKG2A MAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1731-1743.e13.
- [22] LIU XW, SONG JN, ZHANG H, LIU XY, ZUO FL, ZHAO YN, ZHAO YJ, YIN XM, GUO XY, WU X, ZHANG H, XU J, HU JP, JING J, MA XL, SHI HB. Immune checkpoint HLA-E: CD94-NKG2A mediates evasion of circulating tumor cells from NK cell surveillance[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(2): 272-287.e9.
- [23] MYERS JA, MILLER JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021, 18: 85-100.
- [24] IWASZKO M, BOGUNIA-KUBIK K. Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2011, 59(5): 353.
- [25] PRAŠNIKAR E, PERDIH A, BORIŠEK J. Nonameric peptide orchestrates signal transduction in the activating HLA-E/NKG2C/CD94 immune complex as revealed by all-atom simulations[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6670.
- [26] WANG Y, JIN J, LI YY, ZHOU Q, YAO RY, WU Z, HU H, FANG ZZ, DONG S, CAI Q, HU S, LIU BL. NK cell tumor therapy modulated by UV-inactivated oncolytic herpes simplex virus type 2 and checkpoint inhibitors[J]. *Translational Research*, 2022, 240: 64-86.
- [27] YUAN S, WANG JL, ZHU DJ, WANG N, GAO Q, CHEN WY, TANG H, WANG JZ, ZHANG XZ, LIU HR, RAO ZH, WANG XX. Cryo-EM structure of a herpesvirus capsid at 3.1 Å[J]. *Science*, 2018, 360(6384): eaao7283.
- [28] 姚若一, 范嘉琦, 肖雄, 周芹, 汪洋, 胡翰, 刘滨磊. HLA-E 与 oHSV2 VP5 蛋白相互作用研究[J]. *湖北工业大学学报*, 2023, 38(5): 82-87.
- YAO RY, FAN JQ, XIAO X, ZHOU Q, WANG Y, HU H, LIU BL. Study on the interaction between HLA-E and oHSV2 VP5 protein[J]. *Journal of Hubei University of Technology*, 2023, 38(5): 82-87 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)