

[文章编号] 1003—4684(2023)02-0052-05

稳定表达 CD19 的非小细胞肺癌细胞系的构建

朱帅旗, 张帆, 詹思建, 段海潇, 王迪, 胡翰, 汪洋, 刘滨磊

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 细胞系表达的 CD19 可被靶向 CD19 的嵌合抗原受体(CAR)特异性识别。为探究靶向 CD19 CAR-T 抗肿瘤疗效及机制提供可靠稳定的靶细胞系,运用 Lipofectamine 3000™脂质体转染法将 pPBDP-CD19 和 pSPBT 质粒转入 A549 细胞。嘌呤霉素(Puro)筛选,稳定细胞株 A549-CD19 单克隆细胞由有限稀释法得到;RT-qPCR 鉴定 A549-CD19 细胞系中 CD19 mRNA 的表达;流式细胞术检测 A549-CD19 中 CD19 的表达;MTS 法比较改造前后细胞系的生长活性变化。经 Puro 抗性筛选和挑取单克隆,得到 4 个 A549-CD19 单克隆细胞;RT-qPCR 鉴定 A549-CD19 细胞系均有 CD19 mRNA 高表达;流式检测单克隆细胞系阳性率均达到 99%;MTS 法检测发现 A549-CD19 细胞系与亲本细胞 A549 细胞具有一致的生长活性。运用 PiggyBac 转座系统构建稳定表达 CD19 的 A549-CD19 细胞系成功,为评估靶向 CD19 实体瘤 CAR-T 疗效提供靶细胞,奠定 CAR-T 细胞抗实体瘤疗效机制研究基础。

[关键词] A549 细胞; *PiggyBac*; CD19; 绿色荧光蛋白

[中图分类号] R153 [文献标识码] A

人 CD19 是由胞外 N 末端、跨膜结构域与胞内 C 末端组成的跨膜糖蛋白,其大小为 95kd,在多数 B 细胞中极其保守,但在多数慢性和急性 B 淋巴细胞白血病及 B 细胞淋巴瘤中过表达^[1]。CD19 作为关键标记物已被用于白血病、淋巴瘤及免疫疾病的诊断预后评判指标,也为治疗这些疾病提供了靶点^[2]。多个靶向 CD19 的双特异性抗体与 CAR-T 细胞免疫疗法已在临床试验中取得进展^[3],临床实验也证实其良好的疗效,但其在实体瘤组织中的疗效研究较少。据 Schmidts A 等报道,CAR-T 抗实体瘤具有可行性^[4]。此外,Chaurasiya S 等人发现 J2R CAR-T 在肺癌模型中具有优异的抗肿瘤活性^[5]。新英格兰杂志报道了 CAR-T 细胞疗法治疗恶性胶质瘤晚期患者案例,经多次输注 CAR-T 细胞后,患者病症得到完全缓解,这启示了 CAR-T 疗法在实体瘤具有可行性^[6]。限于 CD19 大多表达在血液淋巴瘤,而淋巴瘤细胞多存在于病人血液内,为研究 CAR-T 的抗肿瘤机制带来了不便。而实体瘤细胞具有体外易培养与体内易成瘤的特点,便于评估 CAR-T 抗实体瘤疗效机制。人非小细胞肺癌 A549 细胞系作为常用肿瘤研究细胞模型,在肺癌研究中最具代表性^[7-8],因此本研究拟构建稳定表达 CD19 的 NSCLC 细胞系以便于后续 CAR-T 抗实体瘤疗效机制研究。此外,用于构建稳转细胞系的常见载

体有慢病毒载体和转座子载体,本研究采用的是实验室前期开发的 *PiggyBac* 转座质粒系统。本研究使用带有 CD19 基因的转座质粒和表达转座酶的质粒,将带有 CD19 基因的转座序列转座至 A549 细胞染色体上,实现细胞稳转。此外,绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein,GFP)具有探针的特性,作为报告基因标记特定分子或细胞为科学研究提供极大便利^[10]。在本研究中,GFP 作为荧光标记,在细胞系筛选、单克隆挑选等步骤起重要作用。

本研究构建稳定表达 CD19 的 A549 细胞系,旨在为评估靶向 CD19 实体瘤 CAR-T 疗效机制提供理想靶细胞模型。

1 实验材料

从北京协和医院细胞中心获得 A549 细胞;用 DME/F-12(HyClone, USA)培养 A549 细胞;于浙江天杭生物购买 FBS。从 Thermo Fisher Scientific 购买 Lipofectamine3000™转染试剂盒;*PiggyBac* Dual Promoter-CD19 重组质粒和 Super *PiggyBac* Transposase(pSPBT)转座酶质粒由本实验室改造并保存。无内毒素质粒小提中量试剂盒购于 TIANGEN 公司。嘌呤霉素(Puro)与 MTS 分别购于碧云天生物和 Promega 公司;大肠杆菌 DH5α 感受态由本团队自主制备。RNA 抽提和 RNA 逆转

录试剂盒于 TIANGEN 和 Vazyme 购买,SYBR Green 荧光染料于 TOYOBO 公司购买。PE Anti-CD19 抗体于 Abcam 公司购买。流式细胞检测仪(BD);体视荧光显微镜(Nikon 公司);荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific),多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific);北京东联哈尔二级生物安全柜。

2 实验方法

2.1 质粒提取

于-80℃超低温冰箱中取出甘油保存的 *Piggyc-Bac* Dual Promoter-CD19 (即 pPBDP-CD19 质粒菌,由实验室成功构建),将解冻菌液以 1 : 1000 的比例接种至 LB 液体培养基中,加入 Amp 使其终浓度为 100 μg/mL,37℃,200 r/min 摇菌 14 h。使用质粒试剂盒提取质粒并测浓度和纯度。

2.2 细胞对嘌呤霉素的敏感性实验

收集 A549 细胞并离心(500×g, 5 min),离心后重悬细胞并计数。细胞铺 24 孔板(1.5×10⁵个/孔),于 37℃,5% CO₂,湿润的培养箱培养 12 h。次日于细胞孔中加入梯度浓度的 Puro,之后每天观察细胞贴壁百分比并做记录,共计 6 d。期间每 2d 换含 Puro 的新鲜培养基,在第 4 天确定 A549 细胞的最低致死浓度^[11]。

2.3 细胞转染

转染前 1 天,用 EDTA-胰酶消化 A549 细胞,终止消化后收集细胞悬液至离心管,于 500×g 下离心 5 min 后弃上清重悬计数。之后调整细胞密度,接种至 24 孔板,1.5×10⁵个/孔,将细胞放入细胞培养箱过夜培养。第 2 天当细胞汇合度达到 70%~80%时进行质粒转染:按 Lipofectamine3000™ 转染试剂说明书以 *m* (pPBDP-CD19-GFP) : *m* (pSPBT)=5 : 1 的质粒质量比转染 A549 细胞^[12]。用体视荧光显微镜下观察转染 48 h 后细胞的 GFP 表达率。

2.4 抗性筛选与 A549-CD19 单克隆细胞系挑选

A549 细胞转染 48 h 后,按确定的最低致死浓度筛选转染细胞。其间,每 2 天换一次含 Puro 的新鲜培养基,待所剩细胞均表达 GFP 时进行单克隆挑选。将孔板内细胞消化后计数,根据计数的细胞密度进行梯度稀释,稀释密度为 500 个/mL。96 孔板预加 100 μL 培养基,接种细胞,每孔 2 μL 细胞悬液。96 孔板放入细胞培养箱,24 h 后记录单个细胞孔。待细胞克隆形成后于体视荧光显微镜下判断表达 GFP 情况,筛选出表达 GFP 细胞克隆并将其扩大培养,依次扩培到 24 孔板、12 孔板、6 孔板、T25

培养瓶中。

2.5 RT-qPCR 检测 A549-CD19 单克隆细胞系 CD19 mRNA 的表达

从 NCBI 数据库获取 GAPDH 和 CD19 基因转录 mRNA 序列并设计 SYBR 荧光染料定量 PCR 引物,送基因公司合成备用。分别取 A549-CD19、A549 细胞铺 6 孔板,6×10⁵个/孔,培养箱培养过夜。第二天 RNA 抽提和逆转录试剂盒提取 RNA,并将 mRNA 逆转录 cDNA。以 cDNA 为模板进行相对 RT-qPCR,GAPDH 作为内参,检测 CD19 转录水平的相对表达,使用 2^{-ΔΔCt} 法[ΔΔCt=(Ct_{样品} -Ct_{GAPDH})-(Ct_{对照} -Ct_{GAPDH})]进行数据处理分析^[13]。其中 CD19 的定量引物为:F: ACT-GAC-CATCATCAAGGA, R: ACCACCGTAGTAATA-ATGTT;GAPDH 的定量引物为:F: CTCTGG-TAAAGTGGATATTGT, R: GGTGGAAT-CATATTGGAACA。

2.6 流式细胞术检测 A549-CD19 单克隆细胞系 CD19 的表达

准备约 10⁶ 个的 A549-CD19 和 A549 细胞上机进行流式细胞检测,其中 A549 作为对照细胞。胰酶消化并用完全培养基终止消化,将细胞悬液收集到 1.5 mL EP 管中,于 500×g 下离心 5 min,弃上清并用 PBS 重悬细胞。使用 PBS 清洗细胞 1 次,最后用 500 μL PBS 重悬,此时细胞密度约 2×10⁶ 个/mL。之后加入偶联 PE 的 CD19 抗体与细胞避光孵育 30 min,孵育完成后使用 PBS 清洗细胞 3 次,重悬细胞^[14]。细胞悬液经细胞滤网过滤,同时设置流式细胞仪检测通道为 GFP 和 PE 双通道、设置细胞上样的上限数为 5×10⁵ 个。最后将细胞悬液上机检测,收集数据。PE 的相对荧光强度作为 CD19 表达的量化指标。

2.7 MTS 法检测 A549-CD19 细胞系增殖活性

选取表达较高的 A549-CD19-3 细胞系进行增殖活性测定。取一定量的 A549 与 A549-CD19-3 细胞,计数后铺 96 孔板,每个孔板接种对应细胞悬液 100 μL(2×10⁴ 个),每种细胞三个复孔,铺 5 块 96 孔板。培养过夜按 0 h 计,分别于 0,24,48,72,96 h 后测定细胞活性。MTS 检测步骤如下:于空白培养基和细胞所在孔中分别加入 MTS 溶液 20 μL,包裹锡纸于细胞培养箱中避光孵育 4 h。4 h 后多功能酶标仪待测样品孔 490 nm 波长下的吸光度。

3 实验结果

3.1 A549-CD19 细胞系构建

pPBDP-CD19-GFP 质粒构建如图 1 所示。其

中 CD19 cDNA 全长 1671 bp,并且受上游 CMV 启动子转录调控。抗性基因 PuroR 和标记基因 GFP 之间通过 T2A 序列连接并受 EF1 α 启动子调控。

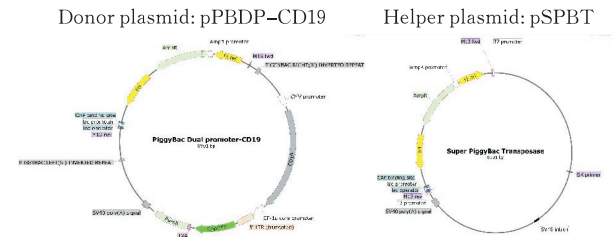


图 1 CD19 转座质粒系统

3.2 A549 细胞对嘌呤霉素敏感性分析

图 2 展示的是 A549 细胞在 Puro(1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用下的致死曲线。结果表明,经 Puro 处理 4 d 后,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量即可观察到细胞完全死亡,因此后续筛选转染细胞的浓度确定为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

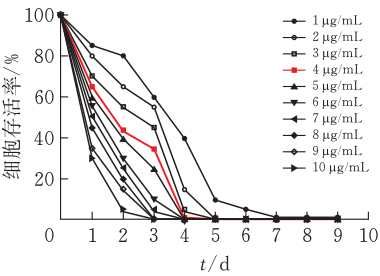


图 2 A549 细胞对嘌呤霉素的敏感度曲线

3.3 pBDP-CD19 与 pSPBT 质粒共转 A549 细胞

pBDP-CD19 转座载体质粒与 pSPBT 辅助质粒转染 A549 细胞 48 h 后,于体视荧光显微镜蓝色激发光下可以观察到 GFP 的表达,表明质粒转染表达且效率在 30%左右(图 3)。

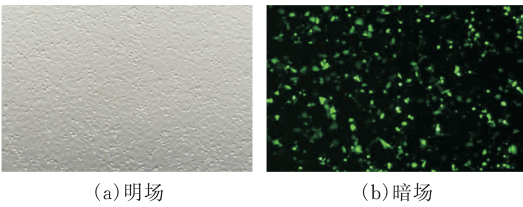


图 3 荧光显微镜拍摄 GFP 在 A549 细胞中的表达

3.4 A549-CD19 细胞单克隆挑选

经过 Puro 抗性筛和单克隆细胞挑选并将细胞培养 4 d 后,得到 4 个表达 GFP 的 A549-CD19 单克隆细胞团。图 4 是于荧光显微镜明场和暗场下拍摄的结果。

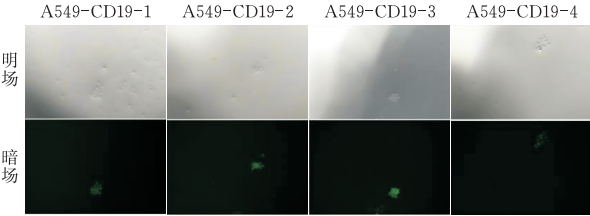


图 4 GFP 在 A549-CD19 单克隆细胞系中的表达

3.5 CD19 mRNA 在 A549-CD19 细胞系中高表达

收集单克隆细胞系并对其 CD19 mRNA 的转录进行荧光相对定量。如图 5 所示,4 个 A549-CD19 单克隆细胞系相较于 A549 细胞有 2000 多倍的表达,表明 CD19 mRNA 在 A549-CD19 单克隆细胞系中高表达。

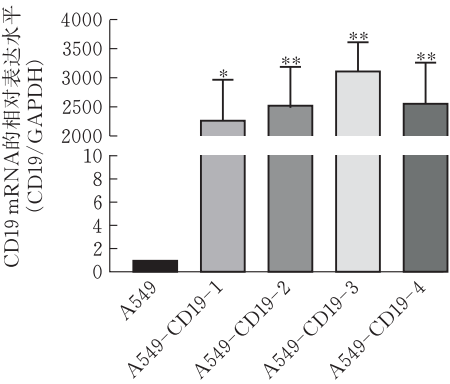
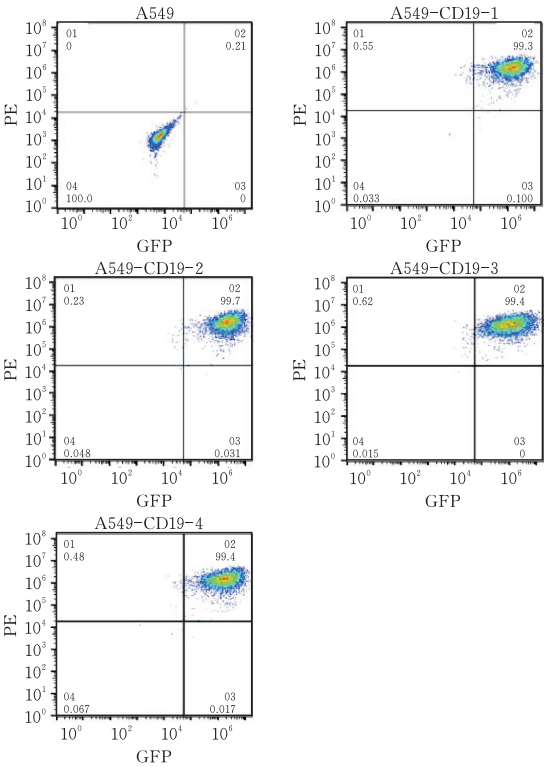


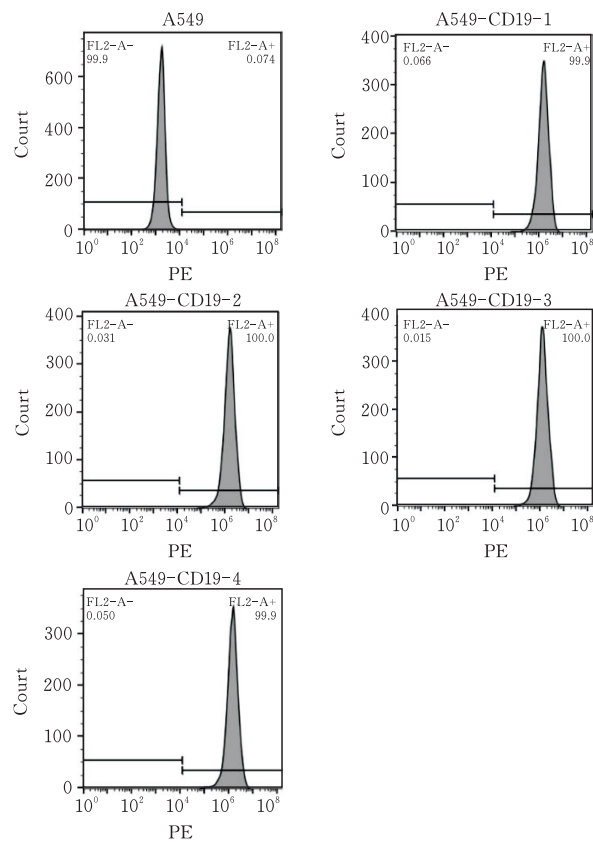
图 5 A549-CD19 细胞系中的 CD19 mRNA 高表达

3.6 CD19 在 A549-CD19 细胞系中具有高表达

以 A549 细胞作为对照,流式细胞术检测 A549-CD19 单克隆细胞系的纯度及 CD19 在细胞膜上的表达。如图 6a 所示,4 个单克隆细胞系的 GFP 与 PE-CD19 的双阳率均高于 99%,表明 A549-CD19 细胞系的纯度很高。另外,通过 PE-CD19 单通道的平均荧光强度即 MFI 判断 CD19 的表达情况(图 6b),CD19-PE 的 MFI 均达到 99.9%,表明 CD19 在 A549-CD19 细胞系中的表达丰度很高。综上,A549-CD19 细胞系构建成功。



(a) A549-CD19 细胞系的纯度检测



(b) A549-CD19 细胞系 CD19 表达丰度检测

图 6 流式检测 A549-CD19 单克隆细胞系 CD19 的表达

3.7 A549-CD19 细胞系具有与亲本 A549 细胞一致的生长活性

从 A549-CD19-2 和 A549-CD19-3 两个细胞系中随机选取 A549-CD19-3 单克隆细胞系进行增殖活性比较。如图 7 所示,根据 MTS 溶液加入细胞 4 h 后的 490nm 处吸光度值显示,A549-CD19-3 细胞系在 0、24、48、72、96 h 时间点的吸光度值与亲本细胞的吸光度值差异无显著统计学意义($P>0.5$),CD19 的表达对细胞增殖活性基本无影响。

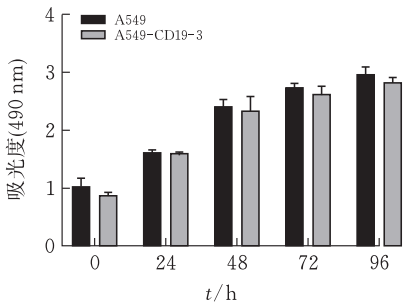


图 7 A549 和 A549-CD19 细胞系的生长活性比较

4 结论与讨论

运用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂共转 pPBDP-CD19 质粒与 pSPBT 质粒至 A549 细胞中,构建了表达 CD19 的人非小细胞肺癌单克隆细胞系即 A549-CD19,而后运用 RT-qPCR 和流式细胞术

成功检测到 CD19 的转录表达。
B 细胞抗原受体 CD19 作为膜上免疫球蛋白共受体的重要一员,在 B 细胞的各生长阶段基本都表达,在大多急性/慢性 B 淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤上可以鉴定。这些特性决定了 CD19 是抗 B 淋巴恶性肿瘤 CAR-T 治疗的最佳靶点。根据已有报道,CD19 CAR-T 细胞具有靶向 CD19⁺ 肿瘤细胞的特异、有效且持久的杀伤效果^[15]。因此,通过建立稳定表达 CD19 的人肺癌 A549 细胞系(即 A549-CD19)为后续评估 CAR-T 抗实体瘤疗效及机制研究提供理想的靶细胞系。*PiggyBac* 作为高效的转座子系统之一,长期被用于体细胞诱导多能干细胞工程,而且不改变原基因的结构和功能,可以为 T 淋巴细胞提供持续的转基因表达^[16]。因此,使用 *PiggyBac* 转座子系统作为稳定遗传修饰的技术平台,将 pPBDP-CD19 质粒与 pSPBT 质粒导入 A549 细胞,根据转染后成功表达 CD19 的细胞对嘌呤霉素的抗性筛选阳性细胞。选择表达 CD19 的单克隆细胞建立 A549-CD19 细胞系;转录水平的 RT-qPCR 反应和蛋白水平的流式细胞术检测证实 CD19 整合到 A549 基因组中并成功转录表达。根据 MTS 生长活性差异性比较,A549-CD19 细胞系表现出与亲本细胞一致的生长增殖活性。

总之,在此构建的单克隆 A549-CD19 细胞系不仅为体外评估 CD19-CAR 改造 T 细胞抗实体瘤疗效机制研究提供了靶细胞,同时也为后续 CAR-T 在动物模型体内浸润对抗实体瘤疗效研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] 袁园.一株可应用于嵌合体抗原受体基因修饰的细胞治疗技术的 CD19 单克隆抗体的筛选与鉴定[D].苏州:苏州大学,2016.

[2] IMURA Y,ANDO M,KONDO T,et al.CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD[J].JCI insight,2020,5(14),e136185,1-16.

[3] LEDEREROVA A,DOSTALOVA L,KOZLOVA V, et al.Hypermethylation of CD19 promoter enables antigen-negative escape to CART-19 in vivo and in vitro [J].Journal for immunotherapy of cancer,2021,9(08),e002352,1-8.

[4] SCHMIDTS A,MAUS M V.Making CAR T cells a solid option for solid tumors[J].Frontiers in immunology,2018(09): 2593.

[5] CHAURASIYA S,CHEN N G,LU J,et al.A chimeric poxvirus with J2R (thymidine kinase) deletion shows

safety and anti-tumor activity in lung cancer models [J].Cancer gene therapy,2020,27(03): 125-135.

[6] BROWN CE,ALIZADEH D,STARR R,et al.Regres- sion of glioblastoma after chimeric antigen receptor t- cell therapy [J].The New England journal of medicine, 2016,375(26):2561-2569.

[7] RODRIGUEZCANALES J, PARRACUENTAS E, WISTUBA I I .Diagnosis and molecular classification of lung cancer[J].Cancer Treat Res,2016,170:25-46.

[8] JONNA S,SUBRAMANIAM D S.Molecular diagnos- tics and targeted therapies in non-small cell lung cancer (NSCLC): an update[J].Discovery medicine,2019,27 (148): 167-170.

[9] WILSON M H,COATES C J,GEORGE JR A L.Pig- gyBac transposon-mediated gene transfer in human cells[J].Molecular therapy,2007,15(01): 139-145.

[10] PÉDELACQ J D,CABANTOUS S,TRAN T,et al.En- gineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein[J].Nature biotechnology,2006, 24 (01): 79-88.

[11] 王琳,张紫怡,金静,等.稳定表达荧光素酶 BGC823 细 胞系的构建[J].湖北工业大学学报,2021(04): 42-45.

[12] 段海潇,杨俊寒,王琳,等.表达近红外荧光蛋白的结肠 癌细胞系的建立[J].湖北工业大学学报,2020(05): 71-74.

[13] HU H,ZHANG Z,WANG R,et al.BGC823 cell line with the stable expression of iRFP720 retains its pri- mary properties with promising fluorescence imaging ability[J].DNA and cell biology,2020,39(05): 900- 908.

[14] HU H,WANG R,ZHANG Z,et al.PiggyBac-modified CD19-expressing 4T1 cell line for the evaluation of CAR construct[J].International journal of clinical and experimental pathology,2019,12(07): 2631-2638.

[15] KOCHENDERFER J N,DUDLEY M E,KASSIM S H,et al.Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be ef- fectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J].Journal of clin- ical oncology,2015,33(6): 540-549.

[16] ZHENG Y,LI Z R,YUE R,et al.PiggyBac transposon system with polymeric gene carrier transfected into hu- man T cells[J].American journal of translational re- search,2019,11(11): 7126-7136.

Construction of A549 Cell Line Stably Expressing CD19 Using *PiggyBac* System

ZHU Shuaiqi, ZHANG Fan, ZHAN Sijian, DUAN Haixiao, WANG Di, HU Han, WANG Yang, LIU Binlei

(School of Biological Engineering and Food Science, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068,China)

Abstract: Objective: Non-small cell lung cancer (NSCLC) A549-CD19 cell line stably expressing CD19 was constructed by PiggyBac transposon system. The CD19 expressed by the cell line can be specifically recog- nized and bound by the chimeric antigen receptor (CAR) targeting CD19,providing a reliable and stable target cell line for exploring the anti-tumor efficacy and mechanism of the targeting CD19 CAR-T. Meth- ods: pPBDP-CD19 and pSPBT plasmids were transferred into A549 cells by Lipofectamine 3000TM lipo- some transfection, stable cell lines were screened by puromycin (Puro), A549 CD19 monoclonal cells were obtained by limited dilution method, the expression of CD19 mRNA in A549 CD19 cell line was identified by RT qPCR, the expression of CD19 in A549 CD19 was detected by flow cytometry, and the growth ac- tivity of cell line before and after modification was compared by MTS method. Results: After Puro resist- ance screening and selection of clones, four A549 CD19 monoclonal cells were obtained; all A549 CD19 cell lines were identified by RT qPCR to have high expression of CD19 mRNA; flow detection showed that the positive rate of monoclonal cell lines reached 99% MTS method. It was found that the growth and viability of A549 CD19 cell line was consistent with that of parent cell A549.Conclusion: The A549 CD19 cell line stably expressing CD19 is successfully constructed, which provides target cells for evaluating the efficacy of CAR T targeting CD19 solid tumor, and lays the foundation for the study of the mechanism of CD19 CAR T cell anti-solid tumor effect.

Keywords: A549 cell; PiggyBac; CD19; Green fluorescent protein

[责任编辑: 张 众]