

抗人 CD154 单克隆抗体的构建及免疫学特性分析

张春艳¹, 张志方², 宁波¹, 李树浓³, 朱兆玲¹

(中山医科大学 1. 免疫学教研室, 2. 生理学教研室, 3. 病理生理学教研室, 广州 510089)

[关键词] 人 CD154; 单克隆抗体; T 淋巴细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 为进一步研究人 CD154 单克隆抗体在抑制动脉粥样硬化发生和发展中的作用, 采用重组人 CD154 分子免疫 BALB/c 小鼠, 用杂交瘤技术制备抗人 CD154 单克隆抗体, 并分析其免疫学特性。结果发现, (1) 有 6c5、1b6、5d3 共三株杂交瘤细胞株的培养上清与 GST-hCD154 融合蛋白反应, 与 GST 不反应。6c5、1b6 和 5d3 培养上清效价分别为 1: 128、1: 256 和 1: 64。(2) 经 Western blot 鉴定, 在分子质量为 56 kDa 处有一抗原抗体结合的条带, 而分子质量为 26 kDa 处无特异性条带。证明三株杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体可以结合 GST-hCD154 但不与 GST 反应, 是特异性结合人 CD154 的单克隆抗体。(3) 流式细胞术发现, 6c5 细胞株分泌的单克隆抗体能与激活的人外周血 T 细胞结合。说明已构建的单克隆抗体是特异性针对人 CD154 的, 为下一步用人 CD154 单克隆抗体抑制动脉粥样硬化的研究打下了基础。

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] A

Preparation of Anti-hCD154 Monoclonal Antibody and Analysis of its Immunological Properties

ZHANG Chun-Yan¹, ZHANG Zhi-Fang², NING Bo¹, LI Shu-Nong³, and ZHU Zhao-Ling¹

(1. Department of Immunology, 2. Department of Physiology, 3. Department of Pathophysiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

MeSH Human CD154; Monoclonal Antibody; T Cell; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To Prepare anti-hCD154 monoclonal antibody and analysis its immunological properties. Methods The GST-hCD154 fusion protein was used as antigen to immunize BALB/c mouse. B cell was fused with myeloma cell SP2/0 to produce hybridoma cell line that can secrete anti-hCD154 antibody. The hybridoma cells were identified by using ELISA, Western blot and FACS method. **Results** (1) ELISA result demonstrated that culture supernatants of three hybridoma cells(6c5, 1b6, and 5c3) can react with GST-hCD154, but not react with GST. (2) Western blot show that three monoclonal antibodies could bound to a protein band with molecular weight of 56 kDa (GST-hCD154), but could not bound to a protein band with molecular weight of 26 kDa (GST). (3) FACS show that McAb 6c5 can bound to peripheral blood T cell activated. **Conclusion** 6c5 cell is a specific McAb against human CD154 molecules expressed on activated human T cells. Preparation of anti-hCD154 monoclonal antibody be used to study the inhibitory function of atherosclerosis progression.

CD154 是一种主要存在于激活的 T 淋巴细胞表面的 II 型跨膜糖蛋白, 由 261 个氨基酸组成, 分子质量为 30~ 39 kDa, 它是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) 超家族成员, 是 CD40 的配体。CD40-CD154 之间相互作用, 是诱发体液免疫和细胞免疫的重要信号传导途径^[1-3], 其表达异常与诸如动脉粥样硬化等炎症反应密切相关。文献[4-6]报道, 在鼠

和动脉粥样硬化损伤部位聚集有大量的 CD154⁺ T 细胞, 病灶部位的血管内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞和 T 细胞均能表达 CD40 和 CD154。而且, 患有偶发性心绞痛病人血浆中 CD154 水平高于正常人; 在喂食高胆固醇饲料的实验性低密度脂蛋白 LDL 受体基因缺陷模型鼠中, 用抗 CD154 单克隆抗体阻断 CD40-CD154 信号传导途径, 可使动脉粥样硬化病灶缩小, 巨噬细胞和 T 淋巴细胞数量减少, 粘附分子的表达受到抑制^[7-9]。为此, 本文研制抗人 CD154 单克隆抗体, 并分析其免疫学特性, 为下一步抗人 CD154 单克隆抗体抑制动脉粥样硬化的发生发展的实验研究奠定基础。

[作者简介] 张春艳, 女, 1966 年 5 月出生, 河南省平顶山市人, 博士, 讲师。张志方, 男, 1964 年 10 月出生, 河南省平顶山市人, 博士, 副教授, 教研室副主任。李树浓, 男, 1937 年 10 月出生, 广东省惠州市人, 教授, 博士研究生导师。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞系

昆明鼠, 雌性, 6~8 周龄, 购自中山医科大学实验动物中心; BALB/c 纯系鼠, 雌性, 6~7 周龄, 购自中山医科大学实验动物中心; 鼠骨髓瘤细胞 SP2/0, 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 主要试剂

RPMI-1640 细胞培养基、完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂购自 GIBCO 公司; 荧光(FITC) 标记的兔抗鼠 IgG 购自 DAKO 公司; PMA、Ionomycin、HAT、HT、PEG、辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 等购自 Sigma 公司; 其它常规化学试剂, 购自 Sigma 公司或国产分析纯试剂。

1.3 免疫动物

将 GST-hCD154 融合蛋白 0.5 mL (2 g/L) 作为抗原与等量的完全福氏佐剂混合乳化, 直到成为油包水的状态, 取 5 只 6~7 周龄的雌性健康 BALB/c 小鼠同时用 GST-hCD154 融合蛋白进行免疫, 第一次基础免疫, 每只小鼠自后足垫注射, 双后足垫共注射抗原 100 μ g, 基础免疫 10 天后, 触摸小鼠的腹股沟淋巴结, 发现此处淋巴结肿大, 再按上述方法用等量的抗原与不完全福氏佐剂进行加强免疫, 共加强免疫 3 次后, 采集免疫鼠尾巴血, 用 ELISA 检测免疫鼠血清中产生抗体的效价, 选择产生抗体效价达到 1.024×10^5 的 BALB/c 鼠作为细胞融合用的淋巴细胞的供者。细胞融合前 3 天, 将 GST-hCD154 融合蛋白 100 μ L, 自肿大的腹股沟淋巴结直接注射进行加强冲击免疫。

1.4 细胞融合

取免疫鼠淋巴细胞和 SP2/0 细胞悬液(淋巴细胞: SP2/0= 3: 1) 于 50 mL 离心管中, 按常规方法进行细胞融合后, 加入含 HAT 的 RPMI-1640 完全培养基, 分配入铺有饲养层细胞的 24 孔细胞培养板, 0.5 mL/孔, 在 5% CO₂、37 °C 条件下培养。

1.5 杂交瘤细胞的选择性培养

融合当天用 HAT 选择性培养基培养, 融合后每天观察细胞生长情况, 在融合后的第 4 天, 倒置显微镜下可见有小的杂交瘤细胞克隆出现, 以后日渐克隆长大。在融合后第 7 天, 换用 HT 培养基培养, 融合后的第 10 天, 杂交瘤克隆生长至孔底 1/5 时, 检测培养上清的特异性抗体。

1.6 阳性克隆的筛选及克隆化

用间接 ELISA 法筛选阳性克隆。选择与 GST-hCD154 融合蛋白呈阳性反应, 而与 GST 呈阴性反应

的杂交瘤细胞作为阳性细胞克隆。采用显微操作进行克隆化培养。

1.7 免疫学特性分析

1.7.1 抗体效价的测定 将杂交瘤细胞培养上清用 10 mmol/L PBS 倍比稀释, 用间接 ELISA 测定其效价, 同时设立阴性对照(PBS) 和阳性对照(免疫鼠的眼球血)。

1.7.2 抗体特异性的鉴定 采用常规间接 ELISA 方法和常规免疫印迹方法。

1.7.3 流式细胞仪技术

1.7.3.1 单标检测单克隆抗体与激活淋巴细胞的结合 从人外周血分离单个核细胞, 用 PMA 和 ionomycin 激活后, 用预冷的 PBS 洗一次, 加入杂交瘤细胞培养上清 100 μ L, 同时设立阴性对照(分泌无关抗体的杂交瘤细胞培养上清), 4 °C 作用 1 h, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 加入 100 μ L FITC 标记的兔抗鼠 IgG (1: 1 000), 4 °C 作用 1 h, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 用 1% 多聚甲醛固定细胞, 用流式细胞仪检测。

1.7.3.2 双标检测单克隆抗体与激活的人 T 细胞的结合 从人外周血分离单个核细胞, 用 PMA 和 ionomycin 激活后, 用预冷的 PBS 洗一次, 加入 6c5 杂交瘤细胞培养上清 100 μ L, 同时设立阴性对照(分泌无关抗体的杂交瘤细胞培养上清), 4 °C 作用 1 h, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 同时加入 100 μ L FITC 标记的兔抗鼠 IgG (1: 1 000)、Cychrome TM-CD3 单克隆抗体和 PE-CD8 单克隆抗体, 4 °C 作用 1 h, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 用 1% 多聚甲醛固定细胞。

2 结果

2.1 抗人 CD154 单克隆抗体的制备

杂交瘤细胞阳性克隆结果, 采用显微操作将阳性克隆连续克隆 3 次, 得到 3 株分泌抗人 CD154 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 6c5、1b6 和 5d3。

2.2 杂交瘤细胞培养上清的抗体效价测定

采用间接 ELISA 对三株细胞分泌的抗体效价进行测定, 6c5、1b6 和 5d3 培养上清效价分别为 1: 128、1: 256 和 1: 64。

2.3 抗人 CD154 单克隆抗体的鉴定

三株杂交瘤细胞株的培养上清均与 GST-hCD154 融合蛋白反应, 与 GST 不反应。分别用 GST-hCD154 融合蛋白和 GST 作抗原。经 Western-bolt 鉴定, 在分子质量为 56 kDa 处有一抗原-抗体结合的条带, 而分子质量为 26 kDa 处无特异性条带(图 1,

Figure 1)。证明三株杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体可以结合 GST-hCD154 但不与 GST 反应, 是特异性结合人 CD154 的单克隆抗体。单标检测结果发现, 6c5 所分泌的单克隆抗体与激活的外周血淋巴细胞的结合率为 9.7%, 而对照组的结合率为 1.2%, 说明 6c5 所分泌的单克隆抗体能与激活的人外周血淋巴细胞结合(图 2, Figure 2)。双标检测发现, 6c5 所分泌的单克隆抗体与 CD3⁺ T 淋巴细胞的结合率为 4.9%, 对照组的结合率为 0.8%, 说明 6c5 所分泌的单克隆抗体能与激活的 T 淋巴细胞结合。还发现, 其与 CD8⁺ T 淋巴细胞的结合率为 0.8%, 而对照组的结合率为 0.3%, 说明 6c5 所分泌的单克隆抗体只与少量激活的 CD8⁺ T 淋巴细胞结合(图 3, Figure 3)。

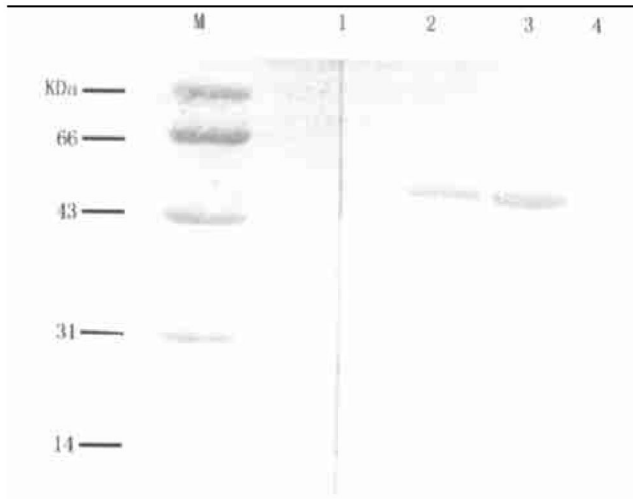


图 1. 抗体特异性的 Western blot 分析

Figure 1. Western blot analysis of the antibody specificity.

M: protein marker; 1 lane: 26 kDa GST expression products; 2-3 lane: 56 kDa GST-hCD154 expression products; 4 lane: incubation bodies.

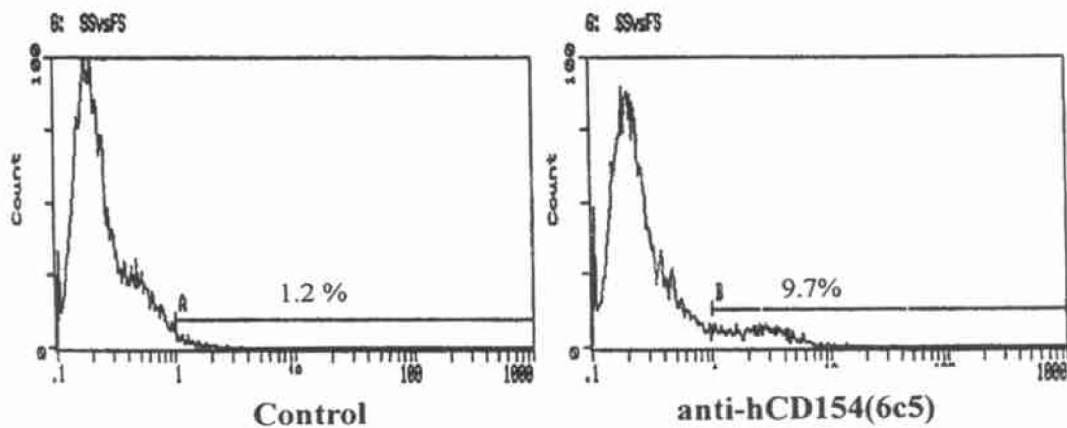


图 2. 抗人 CD154 单克隆抗体(6c5)结合被激活的外周血单核细胞的流式细胞仪鉴定结果

Figure 2. Identification of anti-hCD154 monoclonal antibody (6c5) binding to human peripheral blood mononuclear cell activated with PMA plus ionomycin by flow cytometry.

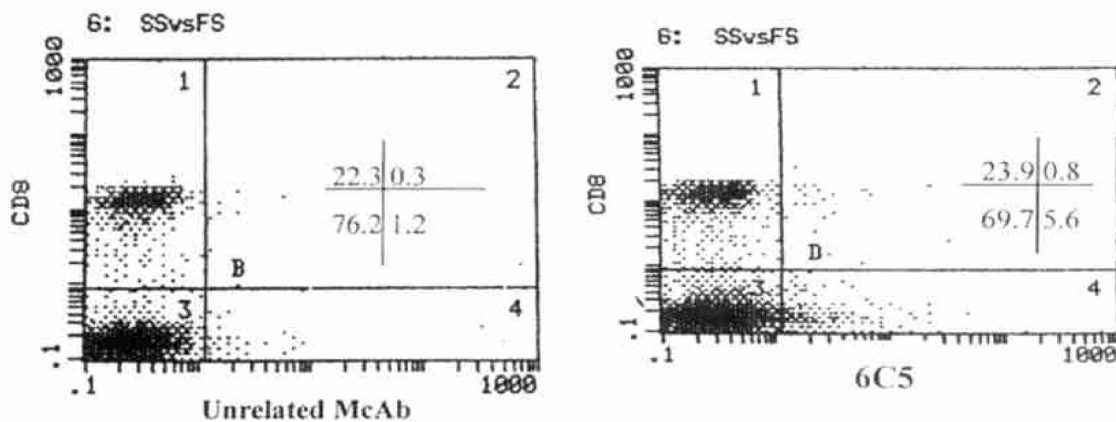


图 3. 抗人 CD154 单克隆抗体(6c5)结合被激活的 CD8⁺ T 淋巴细胞的流式细胞仪鉴定结果

Figure 3. Identification of anti-hCD154 monoclonal antibody (6c5) binding to human CD8⁺ T lymphocyte activated with PMA plus ionomycin by flow cytometry.

3 讨论

本实验采用 GST-hCD154 融合蛋白作为抗原,即增加了抗原的免疫原性,又给筛选工作带来方便,选择与 GST-hCD154 融合蛋白反应而与 GST 不反应的特异性杂交瘤细胞株,最后用激活的人外周血 T 淋巴细胞鉴定,得到了特异性抗人 CD154 分子的单克隆抗体,十分方便。目前,采用此方法研制人 CD154 单克隆抗体,国内外均未见报道。

由于免疫效果的好坏是能否得到特异性单克隆抗体的关键,所以免疫方法的选择至关重要,常用的免疫方法有腹腔注射、皮下注射、尾静脉注射和脾内直接注射免疫等,本实验采用小鼠后足垫作为基础免疫和加强免疫的注射部位,融合前 3 天采用淋巴结直接注射进行加强冲击免疫。与常规的免疫方法相比,有以下优点: ①操作简单,避免了脾内直接免疫所造成的免疫小鼠的感染和死亡; ②在免疫期间,可随时通过触摸小鼠腹股沟淋巴结肿大情况了解免疫效果,从而确定再次免疫的时间、抗原剂量和免疫次数; ③融合时,摘取淋巴结作为 B 淋巴细胞的来源,极少有红细胞污染,无需溶解红细胞; ④提高免疫鼠对抗原的反应性,从而提高了融合率和细胞克隆的阳性率。

我们采用间接 ELISA 法,对所获得的 3 株杂交瘤细胞株进行特异性鉴定,结果发现 3 株细胞的培养上清液都只与 GST-hCD154 融合蛋白反应,而与 GST 无交叉反应,说明 3 株细胞所分泌的抗体是特异性针对 hCD154 分子。为了进一步证实抗体的特异性,我们采用 Western Blot,结果发现在 56 kDa 部位有单一抗原抗体反应条带,而在 26 kDa 的 GST 的位置无反应条带出现,再一次证明了抗体的特异性。为了研究所得到的抗体能否与人 CD154 结合,我们采用流式细胞技术,结果发现,6c5 细胞分泌的单克隆抗体能与激活的 T 细胞上的 CD154 分子结合,并且大多数分布于 CD3⁺ CD8⁻ 的 T 细胞,少部分分布于 CD3⁺ CD8⁺ 的 T 细胞,结果与国外报道的 CD154 在激活的淋巴细胞的分布特征是相符的^[10],证明所得到的单克隆抗体是针对人 CD154 特异的单克隆抗体。

CD154 在动脉粥样硬化的发生发展中发挥重要作用。研究表明,在人和鼠动脉粥样硬化损伤部位的血管平滑肌细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞均表达 CD154,在体外激活 CD154-CD40 信号途径,可导致趋化因子、细胞因子、细胞间粘附因子、血管细胞间粘附因子、E-选择素的表达,这些物

质与动脉粥样硬化损伤部位巨噬细胞的聚集、脂质团的形成有关。动脉粥样硬化模型鼠体内实验显示,采用抗鼠 CD154 单克隆抗体阻断 CD154-CD40 信号传导途径,可使模型鼠动脉粥样硬化的损伤部位明显缩小,并且可以减少动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞和脂质的量,增加平滑肌细胞和胶原成分,从而增加了斑块的稳定性,预防斑块脱落引发心肌梗塞、脑血管意外等动脉粥样硬化并发症^[11,12]。本实验构建的抗人 CD154 单克隆抗体,是我们系列研究的阶段性结果,为下一步抗动脉粥样硬化的免疫学治疗研究打下了基础。

参考文献

- [1] Clark LB, Foy TM, Noelle RS, et al. CD40 and its ligand [J]. *Adv Immunol*, 1996, **63**: 43-78
- [2] Stout R, Suttles J. The many roles of CD40: CD40L interactions in cell mediated inflammatory responses [J]. *Immunol Today*, 1996, **17** (10): 487-492
- [3] Van Kooten C, Baucheread J. CD40-CD40L interactions in T cell activation [J]. *Immunol Rev*, 1996, **153**: 85-106
- [4] Renskar M, Li H, Chyu KY, et al. Absence of CD40 signaling is associated with an increase in intimal thickening after arterial injury [J]. *Circ Res*, 2001, **88** (4): 390-394
- [5] Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, et al. Comment in: Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (13): 7 458-463
- [6] Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 1999, **5** (11): 313-316
- [7] Laman JD, de Smet BJ, Schoneveld A, et al. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis [J]. *Immunol Today*, 1997, **18**: 272-277
- [8] Zhou X, Stenme S, Hansson GK, et al. Evidence for a local immune response in atherosclerosis, CD4⁺ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Am J Pathol*, 1996, **149**: 359-366
- [9] Stein CS, Martins I, Davidson BL. Long-term reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice by adenovirus-mediated LDLR gene transfer combined with CD154 blockade [J]. *J Gene Med*, 2000, **2** (1): 41-51
- [10] Clarke SR. The critical role of CD40/CD40L in the CD4⁺ dependent generation of CD8⁺ T cell immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2000, **67** (5): 607-614
- [11] Richard PP. Atherosclerosis: The emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (13): 6 930-932
- [12] Esther L, Kitty BJMC, Sylvia H, et al. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (13): 7 464-469

(此文 2001-08-16 收到, 2001-10-30 修回)

(此文编辑 胡必利)