

晚期糖基化终产物单克隆抗体的特异性和抗原表位鉴定

王碧蕾¹, 魏 芹¹, 刘乃丰¹, 杨 笛², 张寄南²

(1. 东南大学附属中大医院心内科, 江苏省南京市 210009;

2. 南京医科大学附属第一医院心血管研究所, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 分子生物学; 晚期糖基化终末产物; 人血清白蛋白; 单克隆抗体; 糖尿病; 主动脉

[摘要] 目的 探讨晚期糖基化终产物在糖尿病慢性并发症发生发展过程中的作用, 对我们制备的 5 株抗糖基化终产物单克隆抗体进行特异性及抗原表位鉴定。方法 采用间接酶联免疫吸附法和蛋白印迹术分析所制备单克隆抗体与对照物(人血清白蛋白、孵育人血清白蛋白、牛血清白蛋白)的交叉反应性及其针对的抗原表位。用所得单克隆抗体对正常对照、糖尿病及透析病人血清和糖尿病大鼠主动脉进行糖基化终产物的蛋白印迹分析。结果 所得抗体与糖基化终产物特异性结合, 而与对照物结合较低, 提示它们与糖基化终产物结合能力和特异性较强。初步鉴别其抗原表位非羧甲基赖氨酸。在正常对照、糖尿病及透析病人血清中检测到葡萄糖源性糖基化终产物。用所得单克隆抗体行蛋白印迹分析, 发现糖尿病高血压大鼠主动脉含糖基化终产物特异显色, 而正常对照组不明显。结论 5 株抗糖基化终产物单克隆抗体细胞株具较高抗原特异性, 可定性发现血清和组织中的糖基化终产物。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Identification of Monoclonal Antibody of Advanced Glycation End Products

WANG Bi-Lei¹, WEI Qin¹, LIU Nai-Feng¹, YANG Di², and ZHANG Ji-Nan²

(1. School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009; 2. Institute for Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycosylation End Products; Human Serum Albumin; Monoclonal Antibody; Diabetes; Aorta; Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of advanced glycation end products (AGEs) in pathogenesis and development of diabetic complications, and analyse the immunological property of monoclonal antibodies (McAb) against AGEs. **Methods** Indirect ELISA and western blotting were used to analyse the immunological property of McAb and the epitope which would combine with McAb. AGEs in serum of human and aortas from diabetic rats were also detected by McAb. **Results** McAb reacted with AGEs specially and combined with nor-carboxymethyl lysine (nor-CML). AGEs in serum of human and aortas from diabetic rats had been detected, however, there had been no AGEs detected in aortas from normal rats. **Conclusion** McAb(nor-CML) reacted with AGEs specially, and might be of value for AGEs measurement.

晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)是在非酶促条件下, 蛋白质、氨基酸、脂类或核酸等的游离氨基与还原糖的醛基经过缩合、重排、裂解、氧化修饰后产生一组稳定的终末产物。近期大量研究证明, AGE 在糖尿病并发症的发生发展过程中具有重要作用。血清与组织中 AGE 水平与糖尿病慢性并发症的程度明显相关, 已作为监视糖尿病、尤其是伴有肾脏损害及血管并发症病人治疗效果的一项指标^[1]。为了研究 AGE 的病理意义并建立较为稳定、可靠的检测方法, 本实验室已

成功制备并初步筛选出 5 株抗 AGE 单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb), 分别命名为 3G、6F、7A、11B 和 12B。本文对其特异性及抗原表位进行鉴定, 并进一步对正常对照、糖尿病及透析病人血清和糖尿病大鼠主动脉进行 AGE 探寻。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞系

BALB/c 小鼠 2 只, 雌性, 8~12 周龄, 购自上海中科院试验动物中心; 小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0, 为本实验室细胞库提供。

1.2 主要试剂

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgM 抗体(A9688)和底物溶液 NBT(nitro blue tetrazolium chloride)/BCIP(5-bromo-4-chloro-3-

[收稿日期] 2005-12-07

[修回日期] 2006-05-11

[作者简介] 王碧蕾, 硕士研究生, 医师, 研究方向为心血管病的分子生物学机制, 联系电话 13951782479, E-mail 为 wangbilei@126.com。刘乃丰, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 东南大学附属中大医院院长、东南大学临床医学院院长, 主要从事心血管疾病发病机制研究。张寄南, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事抗人心肌钙蛋白 I 单克隆抗体研制与心肌梗死疾病诊断及发病的研究。

indolyl phosphate-toluidine salt) 为 Sigma 产品, D-葡萄糖为 Amresco 产品, Sephadex G-200 为 Pharmacia 产品, 免疫球蛋白标准亚类抗血清为 Boehringer 产品。羧甲基赖氨酸(carboxymethyl lysine, CML)、糖尿病大鼠^[2] 主动脉标本为南京医科大学附属第一医院提供。正常对照、糖尿病及透析病人血清各 10 例, 由东南大学附属中大医院提供, 对照组年龄在 25~35 岁、糖尿病组及透析组年龄在 50~60 岁、透析病人为糖尿病合并尿毒症, 各组间未考虑性别差异。

1.3 晚期糖基化终末产物的制备及鉴定

葡萄糖用 0.2 mmol/L PBS (pH 7.4) 配成 0.5 mmol/L 溶液, 加入 HSA (浓度为 50 g/L), 过滤除菌, 37℃ 孵育 3 个月。PBS 透析除去未结合的葡萄糖后, 经 Sephadex G-200 凝胶层析纯化, 荧光光谱扫描(激发波长 370 nm; 发射波长 440 nm) 鉴定为 AGE-HSA。孵育 HSA 除不加葡萄糖外余相同条件制备。

1.4 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

以含 AGE-HSA 100 µg/只腹腔注射 BALB/c 小鼠, 2 周一次, 共 5 次, 末次免疫后第 4 d 将免疫脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 14 d 后运用间接 ELISA 法筛选阳性孔, 然后以有限稀释法进行阳性孔的亚克隆, 获得分泌抗 AGE McAb 的杂交瘤细胞株。

1.5 腹水制备

参照文献[3], 在接种杂交瘤细胞前, 先给 Balb/c 小鼠腹腔注射 0.5 mL 液体石蜡, 然后每只小鼠腹腔注射 $5 \times (10^5 \sim 10^6)$ 个杂交瘤细胞。7~10 d 后, 小鼠腹部明显胀大, 此时可取腹水, 收集好的腹水以 2 kr/min 离心、吸取上清液, 加入 0.02% 叠氮钠, 分装保存于 -20℃。

1.6 单克隆抗体亚型的鉴定

按 Isotrip kit (Boehringer 公司) 操作说明书进行。将腹水 1:100 稀释后加入 AGE 包被的 96 孔板中, 4℃ 过夜; 自动洗板机洗 3 次, 先后加入 Isotype specific (1:2 000) 和 anti-goat IgG-HRP 二抗 (1:2 000), 进行间接 ELISA 法反应, 测定 A (490 530) 值。

1.7 单克隆抗体特异性鉴定

1.7.1 Western blotting 分析 AGE、对照组 HSA、未孵育 HSA、BSA 各 15 µg 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 常规方法在 Bio-Rad 系统转移至硝酸纤维膜上, 用 7% 奶粉封闭后加入所制备的抗 AGE 单克隆抗体与膜反应, 清洗后加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgM 二抗 (A9688), 用 BCIP/NBT 系统显色。

1.7.2 间接 ELISA 法 将腹水 1:100 稀释后加入 AGE、对照组 HSA、未孵育 HSA、BSA 包被的 96 孔板中, 进行间接 ELISA 法反应, 测定 A (490 530) 值。

1.8 抗原表位鉴定

1.8.1 单克隆抗体相加试验 以 AGE 0.25 µg/孔包被酶联板, 同时投入两株单克隆抗体 (经 PBS 稀释为 1:102), 进行间接 ELISA 法反应, 比较两株单克隆抗体同时投入与单独投入时 A (490 530) 值的变化, 计算相加指数 (additional index, AI)。AI = $(2A_1 + 2/A_1 + A_2) - 1$ 。考虑到技术误差及两个不同决定簇可能由于位点相近形成空间位阻, 因此当 AI > 50%, 认为两单克隆抗体识别不同抗原决定簇; AI < 50%, 则认为两单克隆抗体识别同一抗原决定簇。

1.8.2 Western blotting 分析 AGE 和 CML 经 SDS-PAGE 分离, 在 Bio-Rad 系统中转移至硝酸纤维膜上, 用 7% 奶粉封闭后加入单克隆抗体与膜反应, 清洗后加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgM 二抗 (A9688), 用 BCIP/NBT 系统显色。

1.8.3 间接 ELISA 法 将腹水 1:100 稀释后加入 AGE 和 CML 包被的 96 孔板中, 进行间接 ELISA 法反应, 测定 A (490 530) 值。

1.9 血清晚期糖基化终末产物的探查

正常对照、糖尿病及透析病人血清 1:100 稀释后经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 常规方法在 Bio-Rad 系统转移至硝酸纤维膜上, 用 7% 奶粉封闭后加入单克隆抗体与膜反应, 清洗后加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgM 二抗 (A9688), 用 BCIP/NBT 系统显色。

1.10 组织晚期糖基化终末产物的探查

糖尿病及对照大鼠主动脉匀浆、裂解后离心取上清, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 常规方法在 Bio-Rad 系统转移至硝酸纤维膜, 用 7% 奶粉封闭后加单克隆抗体与膜反应, 清洗后加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgM 二抗 (A9688), 用 BCIP/NBT 系统显色。

2 结果

2.1 晚期糖基化终末产物的制备及鉴定

本实验制备的 AGE-HSA 在激发波长 380 nm 发射波长 452 nm 时荧光强度最强, 符合 AGE 的荧光特性。

2.2 单克隆抗体单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

经常规细胞融合和间接 ELISA 法筛选, 获得稳定分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株 3G、6F、7A、11E、12E。

2.3 单克隆抗体亚型的鉴定

用小鼠 Ig 及其亚类检测试剂盒实验表明它们均为 IgM 型。

2.4 单克隆抗体特异性鉴定

Western blotting 及间接 ELISA 法显示单克隆抗体可与 AGE 特异性结合, 而与对照组 HSA、未孵育 HSA、BSA 结合较低, 提示它们与 AGE 结合能力和特异性较强(图 1 和表 1)。

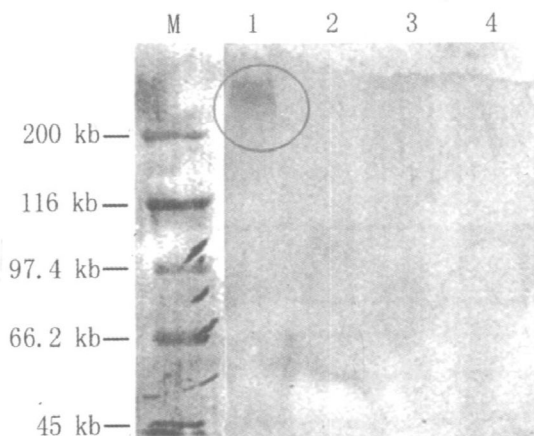


图 1. 抗体特异性的蛋白印迹分析 M 为蛋白标志物, 1 为 AGE, 2 为 HSA, 3 为孵育 HSA, 4 为 BSA。

表 1. 单克隆抗体特异性的间接酶联免疫吸附法分析结果

分组	(-)	(+)	7A	3G	11E	12E	6F
AGE	0.02	1.00	1.24	1.94	1.03	2.44	1.72
HSA	0.09	1.11	0.41	0.56	0.34	0.64	0.57
孵育 HSA	0.08	1.10	0.51	0.61	0.44	0.49	0.38
BSA	0.08	1.10	0.48	0.34	0.48	0.53	0.33

(-) 为阴性血清对照; (+) 为阳性血清对照; 3G、6F、7A、11E 和 12E 为各株单克隆抗体编号名称(下同)

2.5 单克隆抗体抗原表位鉴定

结果显示本实验室所获单克隆抗体针对同一非 CML 型抗原表位(图 2、表 2 和表 3)。

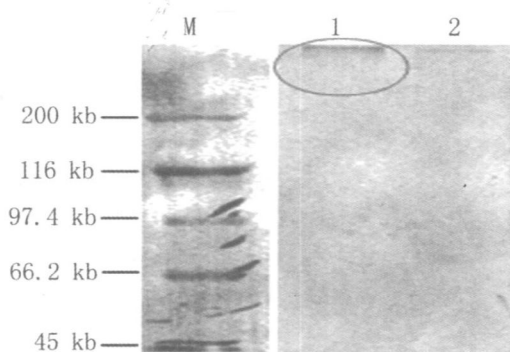


图 2. 单克隆抗体的抗原表位鉴定 M 为蛋白标志物, 1 为 AGE, 2 为 CML。

2.6 血清晚期糖基化终末产物的探查

在正常对照、糖尿病及透析病人血清中检测到

葡萄糖源性 AGE(图 3)。

表 2. 单克隆抗体抗原表位鉴定的间接酶联免疫吸附法分析

分组	(-)	(+)	7A	3G	11E	12E	6F
AGE	0.02	0.99	1.24	1.94	1.03	2.44	1.7
2CML	0.09	0.34	0.62	0.81	0.56	0.58	0.49

表 3. 各株单克隆抗体间相加指数(AI)

	3G	6F	7A	11E	12E
3G	0.127				
6F	0.118	0.205			
7A	0.248	0.223	0.121		
11E	0.476	0.368	0.273	0.167	
12E	0.201	0.350	0.168	0.090	0.105

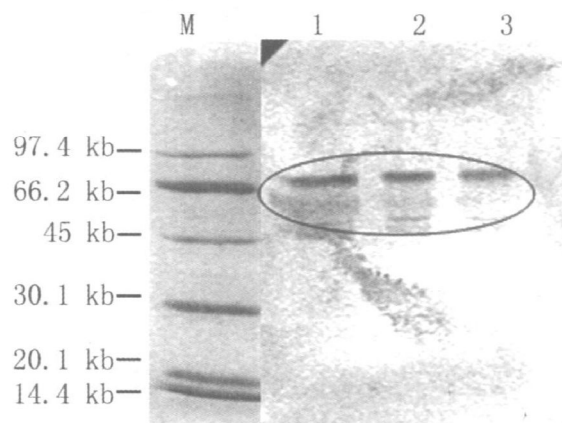


图 3. 血清晚期糖基化终产物的蛋白印迹分析 M 为蛋白标志物, 1 为对照组, 2 为糖尿病组, 3 为透析组。

2.7 组织晚期糖基化终末产物的探查

Western blotting 显示糖尿病高血压大鼠主动脉含 AGE 特异显色, 而正常对照组不明显(图 4)。

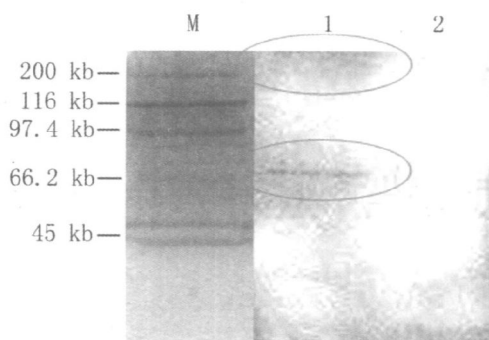


图 4. 糖尿病大鼠主动脉晚期糖基化终产物的蛋白印迹分析

M 为蛋白标志物, 1 为糖尿病大鼠主动脉, 2 为正常对照组大鼠主动脉。

3 讨论

晚期糖基化终末产物(AGE)在糖尿病等一系列疾病的发病中的作用日益受到重视,研究 AGE 结构及检测血清和组织中浓度对这些疾病的诊断、疗效评价及预后有重要意义。但是 AGE 具有高度异质性,化学定义不明确且不稳定,所以至今尚缺乏标准的 AGE 检测手段。ELISA 具有敏感度高、特异性强、操作简单等特点,用 ELISA 方法检测 AGE 是一种颇为理想的微量测定技术。国内在 ELISA 系统中使用的都是多克隆抗体^[4,6],其特异性和专一性较差。而单克隆抗体具有高度的特异性和专一性,可以用于专一研究某种 AGE 结构及其功能。利用抗 AGE 单克隆抗体还可对组织中的 AGE 进行精确的定性或定位检查。

目前国内尚无 AGE 的单克隆抗体,国外制备了针对 CML 和 nonr-CML 的单克隆抗体,对血清中 AGE 含量进行了初步检测,但结果存在一定差异,原因是 AGE 的结构和抗原决定簇尚未完全清楚。Ikeda 等^[7]发现 CML 为 AGE 的抗原决定簇之一。Makita 等^[8]证明多种蛋白质和葡萄糖、果糖孵育产生的 AGE 存在共同的抗原决定簇。本实验在 AGE 制备过程中,按照本实验室的经典方法,直接将人血清白蛋白和葡萄糖放在生理条件下孵育,没有加入任何还原剂、抗菌素等,以尽可能地模拟体内 AGE 的生成过程。所制备单克隆抗体与 AGE 标准品特异性结合,而与 HSA、孵育 HSA、BSA 结合较低,提示它们与 AGE 结合能力和特异性较强。单克隆抗体相加试验显示这五株抗体识别同一抗原表位,但因为这五株抗体均为 IgM 型,所以不排除因抗体的五聚体构型导致空间位阻过大造成的假阴性。从单克隆抗体抗原表位鉴定结果可以看出,所获得的五株单克隆抗体与 CML 无明显特异性结合,所以可以确定这五株抗体所识别的 AGE 成分均为 nonr-CML。对血清的 Western blotting 分析显示,它们可特异性识别血清中 AGE 成分,证实我们所制备的葡萄糖源性 AGE 在血清中确实存在,为进一步的定量检测及试剂盒的研发提供了广阔的前景。

另外还可应用单克隆抗体通过蛋白印迹术等免疫学技术专一研究某种 AGE 的沉积情况、结构及其功能,对 AGE 致病机制的研究有极大的帮助。Western blotting 分析显示在高血压糖尿病大鼠动脉的匀浆液中发现特异性 AGE 条带,而正常对照大鼠则不明显,这证实了病变大鼠动脉中确实含有葡萄糖源性 AGE。其中一条条带在高于 200 kD 的位置,

考虑是动脉壁交联的大分子 AGE。本实验室制备的葡萄糖源性 AGE 具有交联的特性,在 SDS-PAGE 凝胶电泳中,我们看到随着孵育时间延长,孵育物中大分子质量的组分越来越多。以此推测,在血管壁 AGE 一旦形成,它们之间能不断地相互交联,同时引起胶原纤维间过度的共价交联。这种交联一方面使胶原纤维的机械强度增加、即胶原纤维的性质改变;另一方面,AGE 修饰的胶原纤维本身对蛋白酶的敏感性降低、降解缓慢,使得胶原纤维在组织中堆积,即胶原纤维量变。质变和量变最终导致血管硬化、顺应性降低。另一条条带位于 66.2 kD 稍上方,考虑是大鼠主动脉平滑肌细胞内的尚未交联的 AGE 成分。刘乃丰等^[9]用放射配基结合法发现大鼠主动脉平滑肌细胞表达 AGE 受体,而 AGE 与其受体结合被细胞吞噬降解是其主要代谢途径之一,同时可激发一系列的生物学效应。

抗晚期糖基化终末产物抗体的制备和应用,是 AGE 研究的重要手段。本试验所制备的单克隆抗体在定性显示组织中 AGE 方面具有较好的特异性及敏感性,可用于科研,但 AGE 的抗原决定簇仍需进一步研究,AGE 的 ELISA 测定商品化还有一段路要走。

[参考文献]

- [1] 王金泉,刘志红,周虹,关天俊,沈克勤,黎磊石. 2型糖尿病患者血清和肾组织糖基化终末产物的检测及意义[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1997, 6 (4): 310-314
- [2] 姚荣芬,陈兆和,李玉华,李晶阁,印虹,张寄南,等. 高血压糖尿病大鼠心脏超微结构动态观察[J]. 南京医科大学学报, 1994, 14 (1): 31-33
- [3] 孔文琴,徐玉华,张培元,孙丽,吴晨曦,李茹. 结核病患者人类免疫缺陷病毒感染的检测[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22 (3): 150-152
- [4] 孙子林,刘乃丰,刘必成,童嘉毅,王伯荣,弓玉祥,等. 糖基化终产物抗血清的制备及应用[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22 (5): 293-295
- [5] 戎健,陈文缘,邱鸿鑫,王立兵,汪恕萍,曾昭淳,等. 血红蛋白晚期糖基化终末产物的酶联免疫吸附分析法检测[J]. 基础医学与临床, 2000, 20 (6): 91-93
- [6] 高岩,周谨,王兴宇,惠汝太. 酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测血浆中糖基化终极产物[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2004, 4 (4): 224-227
- [7] Ikeda K, Higashi T, Sana H, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the maillard reaction [J]. Biochemistry, 1996, 35 (5): 8 075-085
- [8] Makita Z, Vlassara H, Cerami A, et al. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo [J]. J Biol Chem, 1992, 267 (8): 5 133-140
- [9] Jin H, Liu NF, Tang R. Effects of advanced glycosylation end products on proliferation and cytosolic free calcium in cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 1997, 18 (5): 422-425

(此文编辑 胡必利)