

抗人血管内皮细胞膜蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

郭紫芬, 陈成立, 周翠兰, 郭玉, 涂剑, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 单克隆抗体; 血管内皮细胞; 膜蛋白; 制备; 鉴定

[摘要] 目的 研制特异性抗人血管内皮细胞膜蛋白的单克隆抗体, 为深入研究血管内皮细胞的功能及血管内皮细胞与疾病的关系提供基础。方法 以血管内皮细胞株为免疫原直接免疫 Balb/c 小鼠, 采用 B 淋巴细胞杂交瘤技术, 通过细胞酶联免疫吸附试验筛选分泌抗人血管内皮细胞膜蛋白的特异性单抗的阳性克隆后, 将杂交瘤细胞株腹腔注射 Balb/c 小鼠诱生腹水。腹水中的单抗用蛋白质 G 琼脂糖凝胶-4B 柱亲和层析纯化后, 采用酶联免疫吸附试验、流式细胞术、免疫组织化学染色法及免疫印迹法对其特异性进行鉴定。结果 获得了一株可稳定分泌抗人血管内皮细胞膜蛋白单抗的杂交瘤细胞株。特异性单抗 NH-2 亚型为 IgG1, 腹水 NH-2 效价为 1×10^{-6} , 含量为 18.82 g/L。NH-2 与人血管内皮细胞株和原代培养的人脐静脉内皮细胞均有特异性结合, 并可识别细胞裂解液还原条件下相对分子量为 40 kDa 左右的蛋白多肽。NH-2 对相应抗原具有高度的细胞特异性及组织特异性, 在体内与正常组织的交叉反应少。结论 成功制备了抗人血管内皮细胞膜蛋白的单抗, 在血管内皮细胞的生物学功能及临床意义研究方面将具有潜在的应用价值。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody against Human Vascular Endothelial Cell Membrane Proteins

GUO Zi-Fen, CHEN Cheng-Li, ZHOU Cui-Lan, GUO Yu, TU Jian, and LIAO Duang-Fang

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Monoclonal Antibodies; Vascular Endothelial Cells; Membrane Protein; Prepare; Identify

[ABSTRACT] **Aim** To produce specific monoclonal antibody (McAb) against human vascular endothelial cell membrane proteins for investigating the functions and relation to disease of vascular endothelial cells. **Methods** McAb was prepared with classical hybridoma technique. Human vascular endothelial cell line (ECV304) was used to immunize female Balb/c mice 3 times at an interval of 4 weeks. On the third days after the third immunization, mice were sacrificed and spleen cells were harvested to prepare hybridoma cells with SP2/0 cells at the ratio of 10 to 1. Hybridoma cells were then cultured at 96 well plates for screening with cellular enzyme-linked immunoabsorbent assay (CELISA). Balb/c mice were intraperitoneally injected with the selected hybridoma cells. Ascites were collected and monoclonal antibodies were purified using fast protein liquid chromatography (FPLC), and its Ig class, subclass and titer were then determined respectively. The specificity of the yielded McAb was identified with CELISA, flow cytometry, ABC immunohistochemistry and immunoblotting. **Results** One line of hybridoma cells with high expression of specific McAb termed as NH-2 against vascular endothelial cell membrane protein was obtained. The Ig subclass of the McAb NH-2 was IgG1 and the titer of ascitic McAb was 1×10^{-6} . Furthermore, the content of ascitic McAb was 18.82 g/L. Flow cytometry, CELISA and western blot assays demonstrated that McAb NH-2 could specifically recognize antigen expressed on ECV304 and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). Meanwhile, the tissue specificity and cell specificity of antigen recognized by McAb NH-2 were identified better separately by immunohistochemical ABC staining and flow cytometry. On the other hand, the molecular weight of antigen protein recognized by McAb NH-2 was about 40kD. **Conclusions** NH-2 can specifically recognize the natural antigen expressed mainly in vascular endothelial cells, which will potentially be useful for investigation of the functions and clinic application values of vascular endothelial cells.

血管内皮细胞是一个十分活跃的代谢及内分

泌库, 参与机体的凝血、免疫、物质转运和生物学活性物质的释放等重要生命活动^[1], 在血管通透性屏障、炎症反应及生理止血过程中有着非常重要的作用。在许多病理情况下, 如缺血^[2]、缺氧^[3]、高脂血症^[4]等因素一旦损伤内皮细胞, 破坏内皮结构就会导致内皮细胞功能出现异常。但近几年各方面研究均证明: 血管内皮细胞功能紊乱是心血管疾病早期的重要特征, 早于血管结构和形态发生明显改变之

[收稿日期] 2008-07-15

[修回日期] 2008-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (30770868); 湖南省自然科学基金 (07C0050)

[作者简介] 郭紫芬, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为心血管药理学, 联系电话为 0734-8281408, E-mail 为 guozifen@yahoo.com.cn。
通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管药理学, 联系电话为 0734-8281308, E-mail 为 dfliao66@yahoo.com.cn。
郭玉, 硕士, 副教授, 主要研究方向为心血管药理学, 联系电话为 0734-8281408, E-mail 为 guoyuhy@yahoo.com.cn。

前^[5]。因此关于内皮细胞的功能研究是目前十分活跃的研究领域,血管内皮细胞的功能障碍是众多心血管疾病的重要发病机制。本研究以人血管内皮细胞株(vascular endothelial cell, ECV304)为抗原制备了抗人血管内皮细胞的单克隆抗体,并对其特异性进行了鉴定,藉此为进一步研究内皮细胞的功能及其与疾病的关系提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640、HAT 和 HT 选择性培养基为法国 GIBCO-BRL 公司产品。小鼠 Ig 类及亚类测定试剂盒为 Sigma 公司产品。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗鼠 IgG 为法国 Immunotech 公司产品。其他试剂均为市售进口或国产分析纯。健康人外周血来自苏州市中心血站。新生儿脐带取自江苏省吴中县人民医院。健康人组织切片由苏州大学附属第二医院病理科提供。Balb/c 小鼠购自中国科学院上海动物实验中心。小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 与 ECV304 均由江苏省血液研究所惠赠。

1.2 动物免疫

收集对数生长期的 ECV304 细胞,调整细胞浓度至 2×10^{10} 个/L,对 8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠行腹腔注射(1×10^7 个细胞/只)。免疫 3 次,免疫间隔时间为 4 周。第二次免疫后 10 d 左右,眼眶取血测定血清效价。细胞融合前 3 d,再次腹腔注射同样数量 ECV304 细胞,以加强免疫。3 d 后断颈处死小鼠,取其脾细胞作细胞融合用。

1.3 细胞融合、筛选及克隆化

将免疫鼠脾细胞与 SP2/0 细胞悬液以 10:1 混合,按常规方法进行细胞融合,HAT 与 HT 培养基选择性培养。用细胞酶联免疫吸附试验(cellular enzyme-linked immunoabsorbent assay, CELISA)法对培养上清液进行检测筛选阳性克隆。采用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行多次单克隆化,直至所有克隆分泌抗体阳性率达 100%。

1.4 腹水制备及抗体纯化

将杂交瘤细胞(1×10^7 个细胞/只)腹腔注射经降植烷预先敏化的 Balb/c 小鼠诱发腹水,5~10d 后抽取腹水。按照 Pharmacia 公司提供的 McAb 纯化方案,快速蛋白液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)系统蛋白质 G 琼脂糖凝胶-4B 柱亲和层

析纯化腹水中的 McAb。

1.5 Ig 类别、亚类及效价与含量测定

利用 Sigma 公司小鼠 Ig 类及亚类测定试剂盒,通过琼脂糖免疫双扩散法检测阳性杂交瘤细胞的培养上清液及腹水中 McAb 的 Ig 亚类。用 CELISA 法检测纯化腹水的 McAb 效价。用 M750-B 紫外分光光度计测定抗体蛋白质的含量,计算公式为蛋白质含量(g/L) = $OD_{280} \times 1.55 - OD_{260} \times 0.76$ 。

1.6 杂交瘤细胞株染色体的检测

将杂交瘤细胞培养至对数期后采用秋水仙素阻断法检测染色体数目。选择染色体分散好,无重叠,无失散的细胞进行计数分析。每份标本应计数 100 个完整的中期细胞。

1.7 单克隆抗体识别抗原特异性鉴定

采用 CELISA、流式细胞术及 western blot 法分析,实验中用 PBS 替代 NH-2 作空白对照,用无关的单克隆抗体替代 NH-2 作为阴性对照。HUVEC 的分离培养参照 Jaffe 法^[6]。

1.8 单克隆抗体识别抗原分布特异性检测

采用免疫组织化学 ABC 法检测抗原分布组织特异性:取多种健康组织石蜡切片按 ABC 药盒中的说明书进行操作,显色后再用苏木素染色液衬染,镜检。同时采用流式细胞术检测抗原分布细胞特异性:通过常规方法从肝素抗凝健康人外周血获取各种血细胞及参照 Jaffe 法分离培养 HUVEC 后,取 2×10^5 细胞分别与 NH-2 和无关单抗于 4℃ 孵育 30 min,再与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗于 4℃ 孵育 30 min,用流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

将免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,接种于 96 孔板中。5~7 d 后观察,所有培养孔均有杂交瘤细胞生长,融合率 100%。至第 10 天进行 CELISA 筛选和亚克隆,此后重复进行 CELISA 筛选及亚克隆 3 次。最后挑选出 2 株能稳定高效分泌抗 ECV304 单抗的杂交瘤细胞株,分泌的单抗分别命名为 NH-2, 1F1。作者对 NH-2 进行了较深入的免疫学研究。

2.2 单抗一般性质的鉴定

将分泌 NH-2 的杂交瘤细胞扩大培养后对 Balb/c 小鼠进行腹腔注射,诱导产生抗 ECV304 单抗的腹水,腹水产量为 4~6 mL/只。腹水经 FPLC 系统纯化后,紫外分光光度计测定 NH-2 蛋白质含量为 18.82

g/L, 纯化后抗体 CELISA 检测的效价可达 1×10^{-6} 。经免疫双扩散法测定抗体为小鼠 IgG1。对 NH-2 的杂交瘤细胞株的染色体分析示, 染色体均值为 102 (图 1)。

2.3 单抗特异性的鉴定

2.3.1 流式细胞仪检测结果 流式细胞仪检测结果显示 NH-2 与红细胞、白细胞、未活化血小板无反应, 能与 ECV304、HUVEC 呈特异性结合, 细胞结合率分别为 98.90% 和 95.62%, 平均荧光强度分别为 29.00 和 26.03 (图 2)。NH-2 既能与 ECV304 表达的抗原特异结合, 也可与 HUVEC 表达的天然抗原特异结合, 但不与其他血细胞结合。NH-2 识别的抗原

具有良好的细胞特异性。

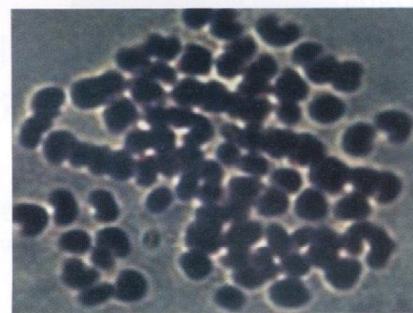


图 1. NH-2 杂交瘤细胞株的染色体相片 (10×100)

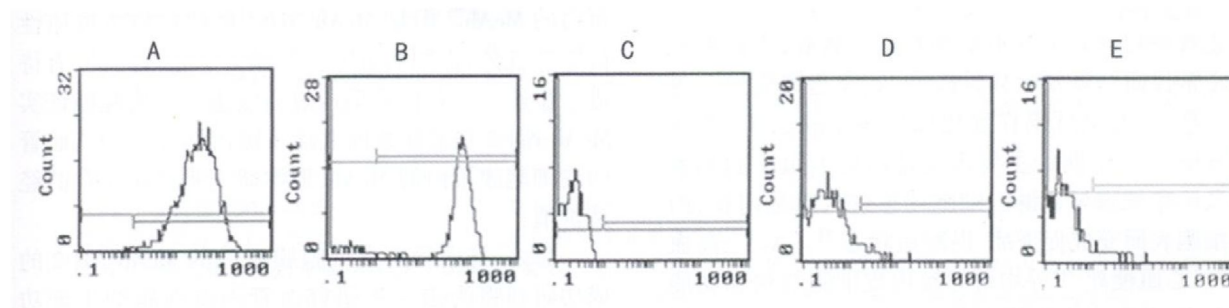


图 2. 流式细胞仪分析 NH-2 与不同血细胞的结合反应 A 为 ECV304, B 为 HUVEC, C 为红细胞, D 为白细胞, E 为血小板。

2.3.2 免疫组织化学结果 ABC 免疫组织化学法检测健康组织切片标本结果显示: NH-2 与子宫、前列腺组织有轻度的交叉反应, 而与小肠、胸腺、脾、

甲状腺、胆囊、卵巢、膀胱、肝脏、肾脏、胃等组织呈阴性反应, 且各组织中的血管内皮细胞均有抗原表达 (图 3)。NH-2 识别的抗原具有较好的组织特异性。

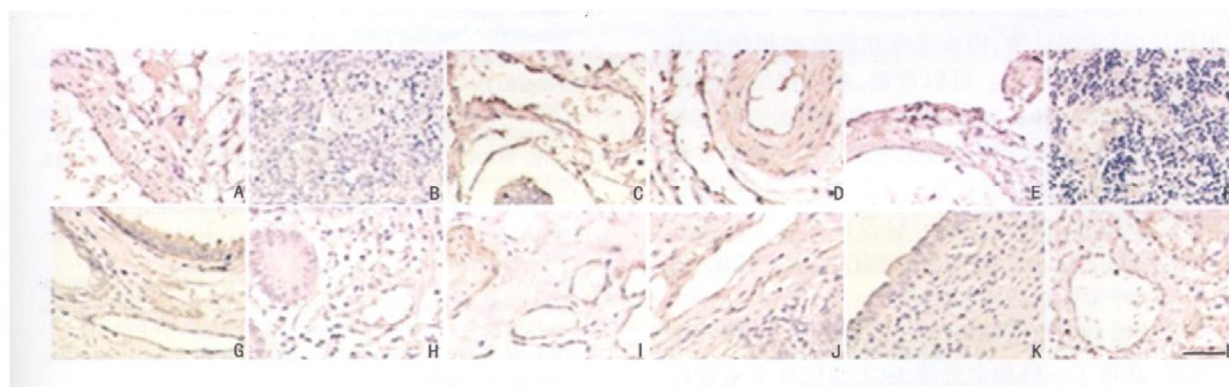


图 3. NH-2 与人体正常组织反应的免疫组化图 (10×40) A 为卵巢, B 为脾, C 为子宫, D 为胆囊, E 为肺, F 为胸腺, G 为前列腺, H 为胃, I 为甲状腺, J 为小肠, K 为膀胱, L 为肝。

2.3.3 Western blot 分析结果 Western blot 分析结果显示 NH-2 可特异地识别 ECV304 及 HUVEC 细胞裂解液还原条件下相对分子量约为 40 kDa 左右的蛋白多肽 (图 4)。此外, CELISA 检测结果表明, 杂交瘤细胞培养上清液和腹水的单抗均能与 ECV304、HUVEC 特异性结合, 其 A_{490} 值分别为 2.08 与 2.12。

3 讨论

血管内皮细胞通过产生生物活性物质, 对维持正常的血管壁通透性、血管的功能状态、凝血纤溶活性及炎症反应起着重要作用。正常情况下, 血管内皮细胞释放的各种活性物质在局部维持一定的浓度比, 这对调节血液循环、维持内环境稳定和生命活动

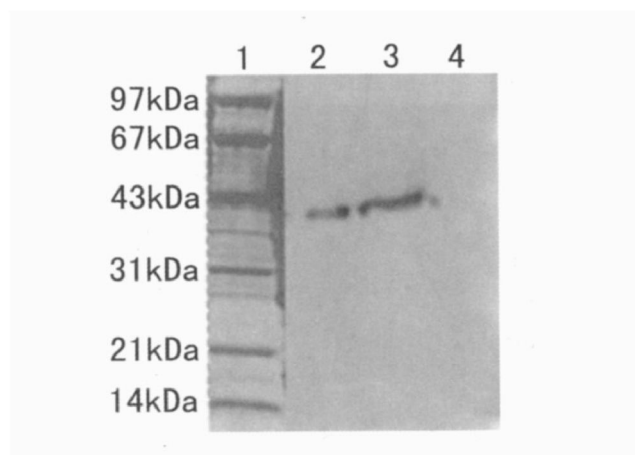


图 4. McAb NH-2 免疫蛋白印迹 1 为 Marker, 2 为 ECV304, 3 为 HUVEC, 4 为阴性对照。

的正常进行具有十分重要的意义。然而, 内皮细胞的正常代谢一旦发生异常改变, 则能迅速促发血管的损伤, 引发动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 的发生发展。As 早期的主要表现是内皮下脂质的积聚以及巨噬细胞与 T 淋巴细胞迁移进入动脉内膜, 内皮细胞表面变成促炎症、促凝血状态^[7]。As^[8]、高血压^[9]、心肌梗死^[10]等均可导致内皮细胞结构和功能的改变, 并且内皮细胞在相应病理过程的发生发展中起着重要的作用。血管内皮功能紊乱既是心血管病的早期表现形式, 又是早于动脉硬化形态学发展的第一步, 1995 年 Schwartz 等^[11]将血管内膜比喻为产生“As 与再狭窄的温床”。As 与血管内皮细胞之间关系密切, 目前仍被普遍接受的 Ross^[12]的修正的“损伤反应”学说认为, 内皮细胞功能性的损伤是 As 形成早期的始动环节。可以肯定, 对内皮细胞功能认识的不断深入必将对心血管疾病的病因学及药物治疗学产生深远的影响。因此纠正异常血管内皮细胞功能可早期防治心血管疾病的发生。一些粘附分子的单克隆抗体在心肌缺血、As 及血栓方面的研究目前大部分正处于实验阶段, 个别已应用于临床, 将为临床治疗带来新的途径。

本实验利用杂交瘤技术通过 CELISA 法筛选阳性克隆, 获得了一株稳定分泌 IgG1 型抗特定血管内皮细胞膜蛋白 McAb 的杂交瘤细胞株, 其染色体数目为 102, 说明杂交瘤细胞株正是小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合而成。经抗体结合特性测定等证明, NH-2 与 ECV304、HUVEC 有特异性结合反应, 可识别还原条件下相对分子量为 40 kDa 左右的蛋白多肽, 表明 NH-2 既可特异性识别 ECV304 表达的抗原分子, 也可特异性识别 HUVEC 表达的天然抗原分子。与已知的其他抗血管内皮细胞特定膜蛋白的单抗比

较, McAb NH-2 组织特异性与细胞特异性均较强, 主要与活检组织中的血管内皮细胞均起反应, 与人体大多数重要组织脏器的血管结合率为 100%, 而与其它组织或血细胞均无反应。NH-2 可以成功用于 ELISA、流式细胞术、免疫组织化学染色法及 western blot 检测等, 交叉反应少, 无明显反应背景。

与制备 McAb 的传统方法所不同的是本研究未使用提纯蛋白质免疫小鼠, 而是直接利用 ECV304 做免疫原, 却成功获得了抗 HUVEC 膜蛋白的特异性的单抗。这样既保持了抗原蛋白质的免疫原性, 又避免了大量原代培养 HUVEC 的繁琐与传代困难, 大大减少了研究的工作量, 可以同时获得针对不同膜蛋白的 McAb。但是 McAb NH-2 是针对强免疫原性抗原的抗体, 识别的抗原蛋白质分子是未知的, 有待进一步研究。我们希望通过后续进一步实验能证实 McAb NH-2 在某些性能上优于国内外现有的抗血管内皮细胞膜蛋白的 McAb, 那本研究将更具一定的经济价值。

总之, 抗血管内皮细胞膜蛋白的 McAb NH-2 的成功研制将为进一步研究血管内皮细胞的生理功能, 以及应用于临床内皮细胞的检测提供条件, 将为阐明 As 等心血管疾病的病理生理及防治提供重要的线索。

[参考文献]

- [1] vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium [J]. *New Engl J Med*, 1990, **323** (1): 27-36.
- [2] 韩英, 刘楠, 陈荣华, 等. 白细胞介素 8 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 155-157.
- [3] 周四桂, 雷小勇, 严鹏科, 等. 缺氧-复氧诱导 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附的分子机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 378-382.
- [4] 赵刚, 周京敏, 李双杰, 等. 普罗布考对高脂家兔胸主动脉内皮细胞功能的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 333-335.
- [5] Reil TD, Moore WS, Kashvan VS, et al. The Effects of thrombus, thrombectomy and thrombolysis on endothelial function [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2000, **19** (2): 162-168.
- [6] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, **52** (11): 2745-2756.
- [7] Davis NE. Atherosclerosis: an inflammatory process [J]. *J Intern Med*, 2005, **37** (1): 72-75.
- [8] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, **109** (23 Suppl 1): e27-e32.
- [9] Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2004, **109** (2): 159-165.
- [10] Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (2): 168-175.
- [11] Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima Soil for atherosclerosis and restenosis [J]. *Circ Res*, 1995, **77** (3): 445-465.
- [12] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362** (6423): 801-809.

(此文编辑 李小玲)