

载脂蛋白 A1-P11融合蛋白诱导血清抗体在大鼠、小鼠及家兔中的动态变化

龙民慧, 王园园, 邢微微, 王旻, 朱贺, 邹民吉, 刘深, 徐涛, 王嘉玺, 徐东刚

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京市 100850)

[关键词] 生理学; 载脂蛋白 A1-P11; 融合蛋白; 血清抗体

[摘要] 目的 探讨载脂蛋白 A1-P11融合蛋白诱导血清抗体在大鼠、小鼠以及家兔中的变化, 比较融合蛋白在三种动物中的反应原性, 确定适于评价载脂蛋白 A1-P11药效的动物种类。方法 大鼠、小鼠及家兔各 14只, 随机选取 7只按照 1 mg/kg体重静脉注射载脂蛋白 A1-P11融合蛋白, 隔天给药; 各组余下的 7只动物注射生理盐水作为对照。并在给药前 1天、第 2、4、8、12、15、18和 20次给药时及停药后第 1、2、3和 4周采血。用酶联免疫吸附法检测不同时间点的中和抗体。结果 载脂蛋白 A1-P11在这三种动物中抗体变化的消长规律基本一致, 但是家兔产生抗体显著高于小鼠和大鼠。结论 三种动物中, 大鼠和小鼠更适合作为评价载脂蛋白 A1-P11长期功效的动物, 因而这两种动物的病理模型可作为评价载脂蛋白 A1-P11药效的候选动物, 为探讨载脂蛋白 A1-P11治疗高脂血症和干预动脉粥样硬化奠定基础。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

Dynamic Change of Antibodies Induced by Apolipoprotein A1-P11 Fusion Protein in Rats, Mice and Rabbits

LONG Min-Hui, WANG Yuan-Yuan, XING Wei-Wei, WANG Min, ZHU He, ZOU Min-Ji, LIU Shen, XU Tao, WANG Jia-Xi and XU Dong-Gang

(Institute of Basic Medical Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A1-P11; Fusion Protein; Serum Antibody

[ABSTRACT] **Aim** To explore the dynamic change of antibodies in rats, mice and rabbits when they were treated with apolipoprotein A1-P11 (ApoA1-P11) and the reactionogenicity of antibodies were compared among them, then to determine the suitable animal which can be repeatedly treated with ApoA1-P11 for long time. **Methods** 14 rats, 14 mice and 14 rabbits were each randomly divided into two groups: the ApoA1-P11 group and the control group. The ApoA1-P11 group received ApoA1-P11 (1 mg/kg weight) once every other day, respectively, and the control group received normal saline in the same way. The sera of both groups were collected before the administration, in the week 1, 2, 3 and 4 after the last injection. The change pattern and titers of antibodies were determined by ELISA. **Results**

The rising and dropping patterns of antibodies in rats, mice and rabbits were similar, but the level of antibodies produced by rabbits was much higher than that of rats and mice. **Conclusions** The rats and mice are more suitable for evaluation of ApoA1-P11's effects for long-time use, to whom correspondance should be addressing compared with rabbits which laid a foundation for ApoA1-P11 used for treating hyperlipemia and atherosclerosis.

高血脂、高凝血状态是动脉粥样硬化的危险因素, 降低血脂水平和改善凝血状态能够干预动脉粥样硬化的发展^[1-3]; S100蛋白 (P11)具有溶栓活性和激活纤溶酶原的功能^[4-6], 而载脂蛋白 A 是高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)的重要组成部分, 能够转运胆固醇和调节血脂^[7-10]。因此, 我们通过基因工程的方法构建和制备了载脂蛋白 A1-P11融合蛋白, 并在体外证实载脂蛋白 A1-P11同时具有

溶栓和转脂功能, 它有可能成为治疗和干预动脉粥样硬化的新型药物。大鼠、小鼠及家兔是制作动脉粥样硬化模型常选动物, 且经常用于评价药物对动脉粥样硬化干预效果。蛋白药物长期运用会产生大量的抗体, 从而影响药物的使用和功效。不同动物对同一种蛋白反应的程度不一样, 它们所产生抗体量也有所不同, 药物对不同的动物影响也存在差异。在药物评价的实验中, 必须选取合适的动物才能对药物功效作出正确、客观的判断。本实验通过检测大鼠、小鼠及家兔对载脂蛋白 A1-P11反应原性和抗体变化, 比较三种动物的抗体产生动态变化规律, 为选择合适的动物制作动脉粥样硬化模型评价载脂蛋

[收稿日期] 2008-06-02 [修回日期] 2008-10-10

[作者简介] 龙民慧, 博士, 工程师, E-mail为 longminhui7475@yahoo.com.cn; 王园园, 实验师。通讯作者徐东刚, 研究员, E-mail为 xudg@nic.bmi.ac.cn

白 A1-P11 的药效奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar 大鼠 (体重 180 ± 20 g)、新西兰大耳白 (体重 20 ± 2 kg) 和 BALB/c 小鼠 (体重 20 ± 2 g) 各 14 只, 购自军事医学科学院动物中心; 载脂蛋白 A1-P11 纯品和兔多克隆抗体为本室制备; 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠、羊抗兔、兔抗大鼠二抗购自中美公司; BSA 购自 Sigma 公司; 酶标板购自 Costa 公司; OPD 为张立营赠送; 其余产品和试剂均为国产分析纯。

1.2 重组蛋白的纯化

PB 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.6) 透析经 8 mol/L 尿素洗涤的包涵体, 经 Q-sepharose 阴离子柱层析纯化, NaCl 梯度洗脱收集洗脱峰中的目的蛋白; 乙酸铵缓冲液 (pH 4.5, 50 mmol/L, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L EGTA) 透析, S-sepharose 阳离子柱用乙酸铵缓冲液平衡, 将透析后的蛋白液层析纯化, 收集洗脱峰中的目的蛋白; 凝胶过滤层析柱 Sephacryl S-200 使用 PB (50 mmol/L, pH 7.4) 缓冲液平衡, 将阳离子交换柱收集的目的蛋白过凝胶柱, 流速 0.3 mL/min 收集蛋白峰进行电泳, 然后使用切胶纯化和电洗脱法对载脂蛋白 A1-P11 进一步纯化, 将切下胶磨碎后放入处理好的透析袋于 PB (50 mmol/L, pH 7.6) 置入电泳槽, 电压 90 V, 5 h 然后将透析袋中液体在 6000 r/min 离心 10 min 获得纯化产物, 最后 SDS-PAGE 检测。

1.3 动物实验

动物饲养的温度为 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 湿度为 $65\% \pm 10\%$ 。将大鼠、小鼠和家兔随机分为两组, 每组分别 7 只, 大鼠、小鼠进行尾静脉注射, 家兔耳缘静脉注射, 载脂蛋白 A1-P11 用量为 1 mg/kg 体重, 隔天注射, 共 20 次; 对照组用生理盐水经同样处理。小鼠和大鼠经尾静脉和眼球采血两种方式, 家兔经耳缘静脉采血, 采血时间点是给药前 1 天、第 2、4、8、12、15、18 及 20 次给药时以及停药后 1、2、3 及 4 周。将采到的全血置于 37°C 温箱, 30 min 后 3000 r/min 离心 20 min, 然后吸出上清。

1.4 载脂蛋白 A1-P11 包被浓度的选择

ELISA 和方正法选择检测不同稀释浓度的载脂蛋白 A1-P11。0.5、1、2、4、10、50、100 及 500 mg/L 的载脂蛋白 A1-P11 在 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液 (pH 9.5) 包被到酶标板, $100 \mu\text{L/孔}$, 4°C 湿盒内包被

过夜。用 0.05 (体积比) Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次, 拍干后加含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 封闭, $200 \mu\text{L/孔}$, 37°C 反应 2 h, 然后用 PBST 洗涤 3 次。家兔多克隆抗体 (抗体滴度为 10^6) 1:5000 稀释后, 按照 $100 \mu\text{L/孔}$ 加入酶标板, 37°C 反应 1 h 后用 PBST 洗 3 次。加 1:3000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 孵育 1 h。PBST 洗涤 4 次, 加新鲜配制的底物液 ($\text{OPD-H}_2\text{O}_2$) $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 避光 15 min。加入 $2 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$, $25 \mu\text{L/孔}$ 。置入酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度。最后按方正法选择原则确定抗原包被浓度。

1.5 抗体检测

用 ELISA 方法检测抗体。以 0.05 mol/L pH 9.5 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液按 1 mg/L 的载脂蛋白 A1-P11 包被酶标板, $100 \mu\text{L/孔}$, 4°C 湿盒内包被过夜。用 0.05 (体积比) Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次, 拍干后加含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 封闭, $200 \mu\text{L/孔}$, 37°C 反应 2 h, 然后用 PBST 洗涤 3 次。抗血清 1:5000 稀释后, 按照 $100 \mu\text{L/孔}$ 加入酶标板, 37°C 反应 1 h 后用 PBST 洗 3 次。加 1:3000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 孵育 1 h。PBST 洗涤 4 次, 加新鲜配制的底物液 ($\text{OPD-H}_2\text{O}_2$) $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 避光 15 min。加入 $2 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$, $25 \mu\text{L/孔}$ 。置入酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度。

2 结果

2.1 纯化情况

SDS-PAGE 分析纯化产物, 尿素提取包涵体后, 纯度达到 70% 以上, 经过切胶纯化和电洗脱后蛋白的纯度达到 95% 以上 (图 1 和 2)。

2.2 抗原包被浓度

当包被浓度为 1 mg/L 时, 阳性血清 OD > 0.8 阴性血清 OD 值 < 0.1, 根据方正法选择原则, 抗原包被浓度为 1 mg/L (表 1)。

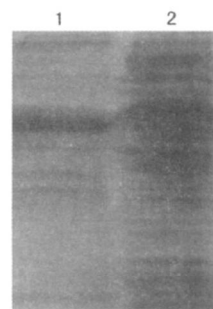


图 1 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析融合蛋白表达情况 1 为包涵体, 2 为细菌裂解产物。

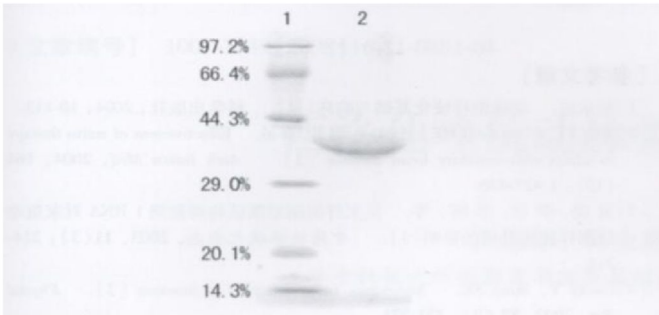


图 2 蛋白纯化情况 1 为蛋白分子量标准, 2 为纯化后的融合蛋白。

表 1 抗原包被浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

浓度 (mg/L)	对照组	阳性组
0.5	0.04 ± 0.004	0.61 ± 0.010
1	0.091 ± 0.006	0.8231 ± 0.008
2	0.3161 ± 0.009	1.221 ± 0.011
4	0.511 ± 0.008	1.891 ± 0.011
10	0.871 ± 0.009	2.371 ± 0.016
50	0.791 ± 0.012	3.671 ± 0.023
100	-	-
500	-	-

2.3 抗体在三种动物中的变化

家兔、大鼠和小鼠在接受载脂蛋白 A1-P11 处理所产生抗体变化规律一致。停药后 1 周抗体量基本不变, 2 周后抗体量呈上升趋势, 4 周抗体量缓慢回落, 但家兔产生的抗体量显著高于小鼠和大鼠。小鼠和大鼠产生抗体量低, 说明长期使用载脂蛋白 A1-P11, 小鼠和大鼠体内所产生的中和抗体对载脂蛋白 A1-P11 功能影响较小 (表 2 和图 3)。

表 2 抗体在三种动物中的变化

时间	家兔	大鼠	小鼠
第 4 次给药	0.61 ± 0.21	0.15 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.07 ^a
第 12 次给药	1.65 ± 0.59	0.35 ± 0.10 ^a	0.35 ± 0.10 ^a
第 20 次给药	2.42 ± 0.86	0.69 ± 0.11 ^a	0.73 ± 0.10 ^a
停药后 1 周	2.32 ± 0.83	0.69 ± 0.11 ^a	0.71 ± 0.10 ^a
停药后 2 周	2.41 ± 0.57	0.71 ± 0.10 ^a	0.72 ± 0.12 ^a
停药后 3 周	2.57 ± 0.92	0.78 ± 0.10 ^a	0.76 ± 0.09 ^a
停药后 4 周	2.20 ± 0.79	0.63 ± 0.05 ^a	0.64 ± 0.11 ^a

a 为 $P < 0.005$ 与家兔比较。

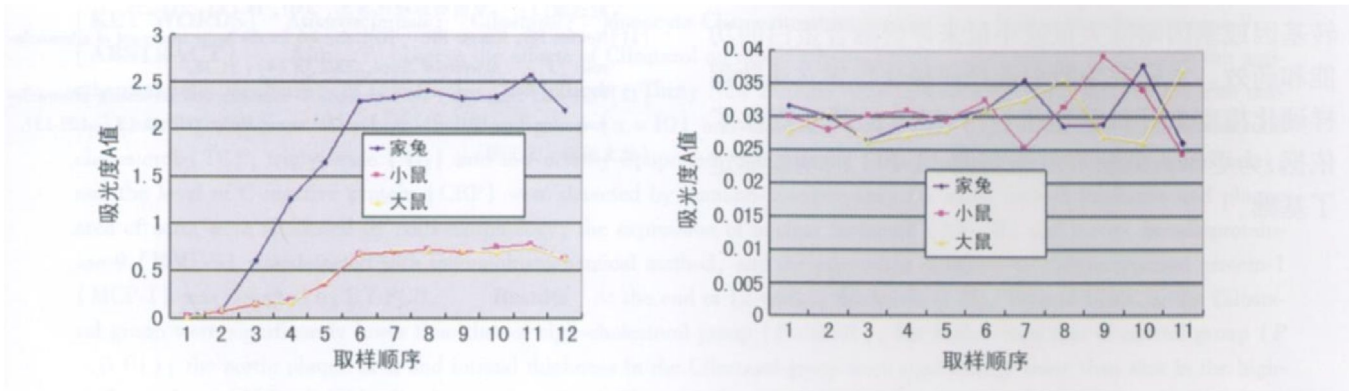


图 3 抗体在三种动物中的变化 左图为阳性血清, 右图为阴性血清。

3 讨论

动脉粥样硬化是许多心脑血管疾病的主要病理基础, 也是中老年人常见疾病之一, 其机制与过程仍不十分清楚。脂质浸润学说、血流动力学学说、中层平滑肌增生学说、受体学说以及感染学说等各种学说的提出反映了人们不断深入的认识过程, 同时也反映动脉粥样硬化的复杂性和多因素有关, 如高胆固醇血症、高甘油三酯血症、高血压、糖尿病、高半胱氨酸血症及高凝状态等^[1]。抗动脉粥样硬化药物主要在于干预和消除各种致病因素, 如高胆固醇、高甘油三酯、脂质过氧化物、高凝状态等, 从而达到预

防斑块的形成, 或稳定、消退已形成斑块的作用。血脂异常是动脉粥样硬化的主要危险因素之一^[1]。纠正血脂异常有利于防治动脉粥样硬化。目前, 调节血脂药物的治疗靶点是降低总胆固醇或低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 水平, 降低甘油三酯水平, 提高高密度脂蛋白胆固醇 (HDLC) 水平^[11, 12]。血浆 HDLC 与动脉粥样硬化性心血管病危险之间呈独立负相关。可以说升高 HDLC 水平是未来开发新药的潜在靶点^[1]。高凝血状态是由于血液中凝血异常, 如纤维蛋白的增高和聚集、凝血因子的异常表达以及纤溶系统受到抑制。凝血异常往往导致血液成份聚集在血管表面, 使氧化型低密度脂蛋白 (ox-

LDL)进入内皮细胞,血小板激活和纤维蛋白聚集等事件发生,改变血液凝血状态,可以使动脉血管免于损伤,抑制动脉粥样硬化的发展。

载脂蛋白 A1-P11是将 P11蛋白和载脂蛋白 A1通过基因重组而获得的融合蛋白,在前期的体外实验中发现,该重组蛋白具有较高的转脂活性和一定溶栓活性。是潜在的调节血脂和溶栓以及激活纤溶系统的药物。对该基因表达蛋白的研究我们还处于初步阶段。要进一步研究它的功能和作用,必须进行动物实验。长期在动物体内使用该基因表达的蛋白,可能会产生中和抗体影响使用效果和对功能正确的评价。选择合适的动物是药物评价的关键。本研究通过检测载脂蛋白 A1-P11诱导血清抗体在大鼠、小鼠和家兔中变化情况,试图找出对该融合蛋白免疫反应较低的动物种类,为我们下一步的药物评价试验奠定基础。本研究结果发现,大鼠和小鼠在长期和多次接受载脂蛋白 A1-P11处理,它们产生的抗体水平较低而且抗体持续时间短,而家兔产生的抗体显著高于大鼠和小鼠,不适合长期使用载脂蛋白 A1-P11。虽然大鼠和小鼠不易形成动脉粥样硬化斑块,但是我们可以利用易形成动脉硬化斑块的转基因或基因敲除大鼠或小鼠来评价融合蛋白的功能和药效。本研究为我们选择何种动物建立动脉粥样硬化模型来评价载脂蛋白 A1-P11的药效提供了依据,为更深入地研究载脂蛋白 A1-P11的功能奠定了基础。

[参考文献]

- [1]杨永宗. 动脉粥样硬化基础与临床[M]. 科学出版社, 2004 10-113
 - [2]Wilt TJ, Bloomfield HE, MacDonald R, et al. Effectiveness of statin therapy in adults with coronary heart disease [J]. *Arch Intern Med*, 2004 164 (13): 1427-436
 - [3]富路, 李佳, 李晖, 等. 反义纤溶酶原激活物抑制剂1 RNA对家兔动脉粥样硬化形成的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003 11(3): 214-218
 - [4]Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function [J]. *Physiol Rev*, 2002 82(2): 331-371
 - [5]Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, et al. S100A10, annexin A2, and annexin A2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors [J]. *Front Biosci*, 2005 10: 300-325
 - [6]Glenney JR, Boudreau M, Galyean R. Association of the S-100-related calpactin I light chain with the NH2-terminal tail of the 36-kDa heavy chain [J]. *Biol Chem*, 1986 261(23): 10485-488
 - [7]Phillips MC, Gillette KL, Haynes MP, et al. Mechanisms of high density lipoprotein mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes [J]. *Atherosclerosis*, 1998 137: 13-17
 - [8]Eriksson M, Carlson LA, Miettinen TA, et al. Stimulation of fecal steroid excretion after infusion of recombinant proapolipoprotein A1: Potential reverse cholesterol transport in humans [J]. *Circulation*, 1999 100(6): 594-598
 - [9]Belakazar LM, Merched A, Carr B, et al. Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2003 107(21): 2726-732
 - [10]张新波, 王绿娅, 陈保生, 等. 载脂蛋白 A1的抗动脉粥样硬化功能研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 15(3): 233-235
 - [11]Newton RS, Krause BR. HDL therapy for the acute treatment of atherosclerosis [J]. *Atheroscler Suppl*, 2002 3(4): 31-38
 - [12]Price MJ, Shah PK. New strategies in managing and preventing atherosclerosis: focus on HDL [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2002 3(3): 129-137
- (此文编辑 文玉珊)