

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0121-04

• 实验研究 •

自制单克隆抗体检测糖尿病大鼠肾脏和心脏糖基化终产物

王碧蕾¹, 刘乃丰¹, 杨笛², 张寄南²

(1 东南大学附属中大医院康复科, 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] 糖基化终产物; 人血清白蛋白; 单克隆抗体; 糖尿病; 免疫组织化学

[摘要] 目的 为探讨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, 采用本实验室所制备的 7F、5F、8A 三株单抗, 检测高血压糖尿病大鼠肾脏和心脏糖基化终产物。方法 Western blotting 分析所制备单抗与对照物(人血清白蛋白、孵育人血清白蛋白和牛血清白蛋白)的交叉反应性及其针对的抗原表位。用所得单抗对糖尿病大鼠肾脏和心脏进行糖基化终产物的免疫组织化学分析。结果 所得抗体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。在糖尿病大鼠肾脏和心脏探查到葡萄糖源性糖基化终产物, 而正常对照组不明显。结论 3株抗糖基化终产物单克隆抗体细胞株具较高抗原特异性, 可定性显示组织中的糖基化终产物。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Self Made Monoclonal Antibodies Detect Diabetic Rat Kidney and Heart Glycation End Products

WANG BiLei¹, LIU NaiFeng¹, YANG Di², and ZHANG JiNan²

(1 Department of Rehabilitation Medicine, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University Nanjing, Nanjing, Jiangsu 210009 China)

(2 Institute for Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029 China)

[KEY WORDS] Advanced Glycosylation End Product Human Serum Albumin Monoclonal Antibody Diabetes Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of advanced glycation end products (AGE) in pathogenesis and development of diabetic complications. **Methods** Indirect ELISA and Western blotting were used to analyse the immunological property of mAb and the epitope which would be combined with mAb. AGE in serum of human and aorta, renal heart from diabetic rats were also detected by mAb. **Results** mAb reacted with AGE specially and was combined with non-carboxymethyl lysine (non-CML). AGE in renal and heart of diabetic rats had been detected but were not obviously detected in normal rats. **Conclusion** mAb(non-CML) reacted with AGE specially and might be of value for AGE measurement.

晚期糖基化终产物(AGE)是一组在蛋白质、脂质、核酸等大分子物质的氨基和葡萄糖等还原糖的醛基之间非酶性糖基化反应终产物的总称。目前国内研究已证实, AGE作为主要的非酶糖化产物参与了糖尿病并发症的发生发展过程。为了探讨 AGE在糖尿病并发症的发生发展中所发挥的作用, 本实验室在成功制备出五株抗 AGE单克隆抗体

(mAb)后^[1], 又继续筛选出 7F、5F、8A 三株单抗, 并通过免疫组织化学分析糖尿病大鼠肾脏和心脏 AGE, 为 AGE的致病意义提供病理学依据并进一步探讨 AGE的致病机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

AGE、羧甲基赖氨酸(CML)为心血管研究所实验室制备; 人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)和碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgM 抗体为 Sigma 公司产品; 糖尿病大鼠心脏、肾脏标本为心血管研究所实验室提供。

1.2 单抗特异性鉴定

Western blotting 分析 AGE、对照组 HSA、未孵育

[收稿日期] 2010-01-03

[修回日期] 2010-02-05

[作者简介] 王碧蕾, 硕士, 住院医师, 主要从事心血管疾病发病机制的分子生物学研究以及心血管疾病的康复研究, E-mail为 wangbiLei@126.com。刘乃丰, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病发病机制、冠心病与糖尿病血管并发症的研究, 擅长高血压、冠心病和高脂血症的药物治疗, 尤其注重心血管危险因素干预。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 单抗研制与心肌损伤疾病诊断及发病的研究。

HAS, BSA 经 SDS-PAGE 分离, 常规方法在 Bio-Rad 系统转移至硝酸纤维膜上, 用 7% 奶粉封闭后加入单抗与膜反应, 清洗后加碱性磷酸酶标记的二抗, 用 BCIP/NBT 系统显色。

1.3 抗原表位鉴定

1.3.1 单抗相加试验 以 AGE 0.25 μg/孔包被酶联板, 同时投入两株单抗 (经 PBS 稀释为 1:100), 进行间接 ELISA 反应, 比较两株单抗同时投入与单独投入时吸光度 A 值 (490 nm 和 530 nm) 的变化, 计算相加指数 (AI)。

1.3.2 抗原表位鉴别 Western blotting 分析 AGE, CML 经 SDS-PAGE 分离, 常规方法在 Bio-Rad 系统转移至硝酸纤维膜上, 用 7% 奶粉封闭后加入单抗与膜反应, 清洗后加碱性磷酸酶标记的二抗, 用 BCIP/NBT 系统显色。

1.3.3 糖尿病大鼠肾脏 AGE 的探查 标本为糖尿病大鼠及正常对照大鼠肾脏冰冻切片 (7 μm/片), 7F 为第一抗体, 用 BCIP/NBT 免疫组织化学染色法。阳性结果为棕褐色。同时用 TBS 替代第一抗体作阴性对照。

1.3.4 糖尿病大鼠心脏 AGE 的探查 标本为糖尿病大鼠及正常对照大鼠心脏冰冻切片 (5 μm/片), 7F 为第一抗体, 用 BCIP/NBT 免疫组织化学染色法, 显色后再用核固红染液复染。阳性结果为深紫红色。同时用 TBS 替代第一抗体作阴性对照。

2 结果

2.1 单抗的特异性

Western blotting 及间接 ELISA 法显示, 单抗可与 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)。

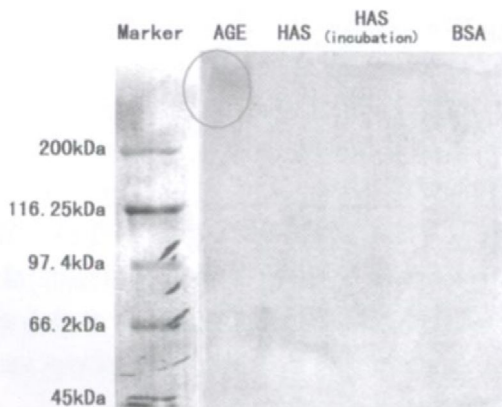


图 1. 抗体特异性的 Western blotting 分析

2.2 抗原的表位

所获单抗针对同一非 CML 型抗原表位 (表 1 和图 2)。

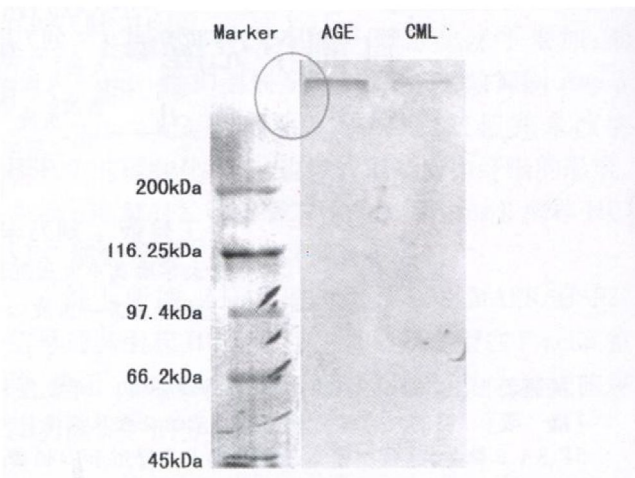


图 2 单抗的抗原表位鉴定

表 1. 各株单抗间相加指数

	7F	5F	8A
7F	0.107		
5F	0.358	0.145	
8A	0.279	0.336	0.111

2.3 肾脏免疫组织化学

以 7F 为第一抗体探寻糖尿病大鼠肾脏 AGE, 结果显示 AGE 在糖尿病大鼠肾小球系膜扩展区以及结节性损害区沉积, 而在正常对照及空白对照大鼠肾小球未见沉积, 在糖尿病及正常大鼠肾小管均有 AGE 沉积 (图 3-6)。

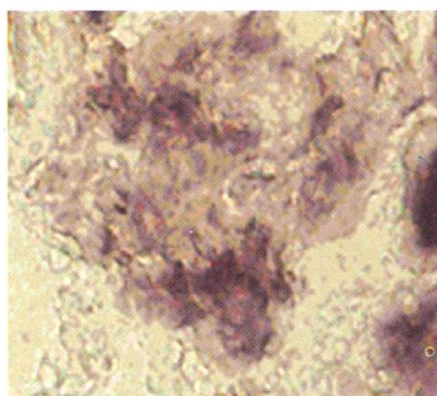


图 3 糖尿病大鼠肾小球 (×400 系膜区沉积)

2.4 心脏免疫组织化学

以 7F 为第一抗体探寻糖尿病大鼠肾脏 AGE, 结果显示在糖尿病大鼠心肌细胞胞浆内有多量点状、条状特异性 AGE 特异性显色, 而在正常对照心肌细胞胞浆内未见明显沉积 (图 7 和 8)。

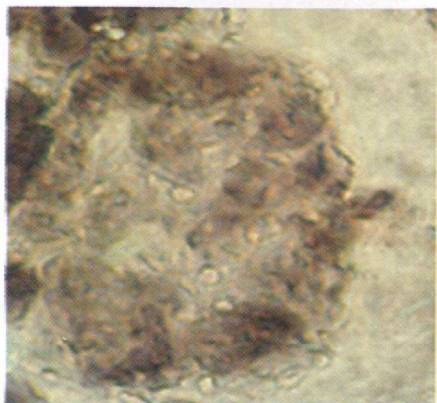


图 4. 糖尿病大鼠肾小球(×400,结节性损害区沉积)

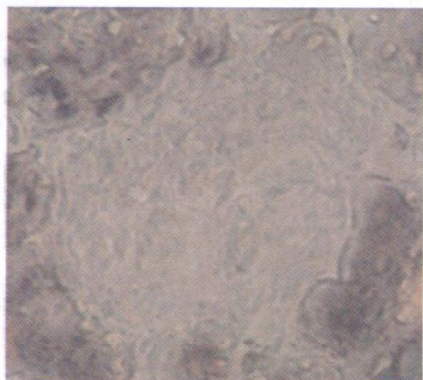


图 5. 糖尿病大鼠肾小球(×400,阴性对照)

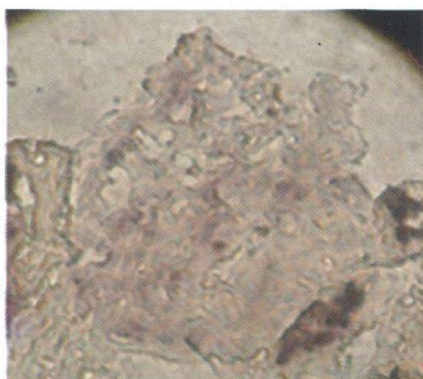


图 6. 正常对照大鼠肾小球(×400)

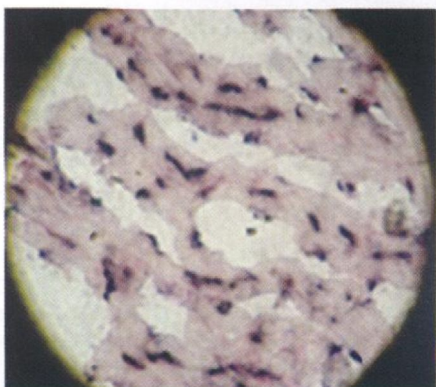


图 7. HD 大鼠心肌细胞(×400)

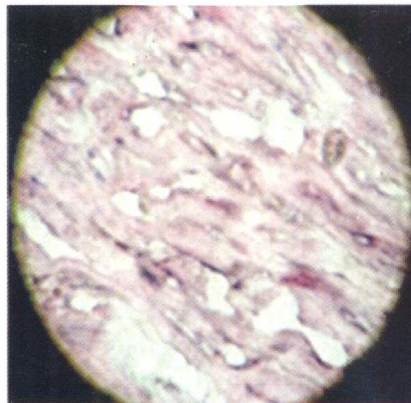


图 8 正常对照大鼠心肌细胞(×400)

3 讨论

由于 AGE 可以由多种还原糖和多种蛋白质、脂质以及核酸形成,因此具有高度的多源性和异质性,在体内有多种不同的存在形式。目前研究较多的是 CML,且已确定 CML 为 AGE 的抗原决定簇之一。Makita 等^[2]用自制的多克隆抗体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。人工合成已知结构的 AGE 如 imidazole, FFI, AFGP, Pyrroline, Pentosidine 不和 AGE 抗体结合。这说明在自然条件下形成的 AGE 和人工合成的 AGE 抗原决定簇不同。本实验在 AGE 制备过程中,尽可能地模拟体内 AGE 的生成过程。所制备单抗与 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。单抗相加试验显示这三株抗体识别同一抗原表位,但因为这三株抗体均为 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。目前比较确定的是这三株抗体所识别的 AGE 成分均为 non-CML。

Miura 等^[3]证明 non-CML 的水平与 1 型糖尿病微血管病变的严重程度密切相关。糖尿病肾病是糖尿病常见的慢性微血管并发症,其特征性病理改变是细胞外基质在肾小球基底膜、系膜区的堆积和肾小管间质纤维化为特征,其中,AGE 与糖尿病肾病的关系尤为受到人们的关注^[4]。多项研究均发现,AGE 在糖尿病大鼠肾组织中积聚较对照显著增多,而且,AGE 的积聚量和 DN 的病变严重程度相关。本研究使用抗 AGE McAb 对糖尿病大鼠肾脏 AGE 进行免疫组织化学检测,发现 AGE 在糖尿病大鼠肾小球的系膜扩展区及结节性损伤区明显沉积,而在正常对照及阴性对照(未加一抗)的肾小球中未发现 AGE 沉积。这些研究均表明 AGE 与糖尿病肾病

的发生发展有着密切关系。AGE水平的增高可能是由于在糖尿病肾病患者,体内存在的持续高血糖状态和氧化应激,使得AGE的产生显著增加;同时由于体内的AGE主要通过肾脏排出,当患者肾脏发生病变致肾功能受损时,肾脏的排泌功能下降,AGE的排出受阻,从而使得患者体内的AGE水平增高更为显著。

糖尿病性心肌病是糖尿病患者所特有的心脏病变,初始表现为无明显症状的心脏舒张功能障碍,随着病情进展,收缩功能亦失调,最终导致发病率、死亡率增高。近年的研究表明,高血糖引起的蛋白的非酶糖基化在糖尿病性心肌病的发生、发展中起着重要作用。Dragos等^[4]发现无临床心脏疾病表现的2型糖尿病患者已有左心室功能障碍,其病变程度与血清中糖化血红蛋白浓度呈正相关。体内高糖环境能加速糖尿病动物心肌层的硬化,而一些可特异性抑制AGE形成的物质如氨基胍^[5]、TRC4186^[6]、ALT-711^[7]可有效防止糖尿病及衰老过程中的这一病理性硬化并改善心脏功能,相关病理研究提示氨基胍还可抑制或延缓糖尿病大鼠心肌超微结构病变^[8]。研究表明AGE可诱导心肌细胞发生炎症反应,进而对心肌细胞造成损伤^[9]。Meenwakt等^[10]发现表皮AGE的自发荧光量与糖尿病心肌病的病死率密切相关。Nakamura等^[11]用抗AGE PcAb最早在糖尿病患者心肌细胞胞浆内发现特异性AGE显色。Fuji等^[12]使用抗AGE McAb在糖尿病大鼠心肌细胞胞浆内发现AGE,同时确定其分布于内质网及溶酶体内,为AGE在糖尿病性心肌病发生发展过程中所起的作用提供了有力的病理学依据。而Forbes等^[13]使用抗CML McAb在糖尿病大鼠心肌组织间隙发现CML沉积,且与胶原交联和心肌硬化程度密切相关。有研究发现,在8周龄STZ诱导的糖尿病大鼠心脏中,心肌细胞内质网上的Ca²⁺-ATP酶(SERCA2a)的肽链中有多种AGE结构(包括单个未交联及交联AGE)形成,经AGE修饰的SERCA2a活性降低、从而导致心肌舒张功能障碍^[14]。以上研究提示不同AGE结构在心肌组织中的分布及其致病机制不尽相同。本研究使用抗AGE McAb在糖尿病大鼠的心肌细胞胞浆内发现有AGE沉积,与Takenori的结果近似,下一步实验将进一步对

AGE的分布进行定位,同时受最近研究启发,肌浆网中的AGE将是探寻重点。

抗AGE抗体的制备和应用是AGE研究的重要手段。使用抗AGE抗体对组织AGE进行免疫组织化学研究也是探讨AGE致病机制的一个重要手段。本试验所制备的单抗在定性显示组织中AGE方面具有较好的特异性及敏感性,并能进行初步的定位,有助于进一步研究AGE的致病机制。

[参考文献]

- [1] 王碧蕾,魏芹,刘乃丰,等. 晚期糖基化终产物单克隆抗体的特异性和抗原表位鉴定[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006 14(5): 409-412
- [2] Makita Z, Vlassara H, Cerami A, et al. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo [J]. *J Biol Chem*, 1992 267(8): 5133-140
- [3] Mira J, Yanagishi S, Uchigata Y, et al. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation end products are correlated to severity of microvascular complications in patients with type 1 diabetes [J]. *J Diabetes Complications* 2003 17: 16-21
- [4] Dragos V, Eleftherios N, Ann C, et al. Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic patients with Type 2 diabetes mellitus related to serum lipids and glycated haemoglobin [J]. *Clinical Science*, 2003 105: 591-599
- [5] Hermann KL, McCulloch AD, Omens JH. Glycated collagen cross-linking alters cardiac mechanics in volume-overload hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 284: 1277-284
- [6] Joshi D, Gupta R, Dubey A, et al. TRC4186 a novel AGE-breaker improves diabetic cardiomyopathy and nephropathy in Ob-ZSF1 model of type 2 diabetes [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009 54(1): 72-81
- [7] Liu J, Masarekar MR, Vatner DE, et al. Glycation end-product cross-link breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 285: 2587-591
- [8] 姜强,赵家军,李伯勤,等. 氨基胍对糖尿病大鼠心肌保护作用的超微结构研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2006 14(1): 67-69
- [9] 胡波,张晓刚,曾琳琳. 糖基化终产物诱导心肌细胞炎症反应的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2007 23(12): 2341-345
- [10] Meenwakt R, Lutgers HL, Links TP, et al. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes [J]. *Diabetes Care* 2007 30: 107-112
- [11] Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, et al. Immunohistochemical localization of advanced glycosylation endproducts in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus [J]. *Am J Pathol* 1993 143: 1649-656
- [12] Fuji T, Nishigaki R, Kawahara K. Ultrastructural changes and immunohistochemical localization of advanced glycation end products in the heart of streptozotocin-treated Mongolian gerbils [J]. *Mol Electron Microsc* 1999 32: 43-49
- [13] Forbes M, Thomas MC, Thallas V, et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes [J]. *Circ Res* 2003 92: 785-792
- [14] Bidase KR, Zhang Y, Shao CH. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase [J]. *Diabetes* 2004 53: 463-473

(此文编辑 文玉珊)