

笔者推断百里酞可能通过其下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达从而对 EPCs 增殖和功能产生抑制作用。而为百里酞作为一种新型血管生成抑制剂应用于临床提供了一定的实验参考。

参考文献

- Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22(7):251-256
- Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications [J]. N Engl J Med, 1971, 285(21):1182-1186
- Yi T, Cho SG, Yi Z, *et al.* Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7):1789-1796
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. Circ Res, 2001, 89(1):E1-E7
- Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22(7):251-256
- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, *et al.* Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2009, 69(13):5575-5583
- Suzuki T, Nishida M, Futami S, *et al.* Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans. A case report of a Tokaimura nuclear accident victim [J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2):487-492
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick A S, *et al.* Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization [J]. Genes Dev, 2007, 21(12):1546-1558
- Bohle A S, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis [J]. Langenbecks Arch Surg, 1999, 384(2):133-140
- Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, *et al.* Matrix metalloproteinases - 2 and - 9 are expressed in human neuroblastoma; contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis [J]. Cancer Res, 1988, 58(10):2209-2216
- Ahmed MM, Mohammed SH. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in situ mRNA expression in colorectal tumors from Iraqi patients [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2011, 54(1):7-14
- Guo J, Xiao B, Liu Q, *et al.* Suppression of C - myc expression associates with anti - proliferation of aloe - emodin on gastric cancer cells [J]. Cancer Invest, 2008, 26(4):369-374
- Ho LL, Chen WJ, Lin - Shiau SY, *et al.* Penta - O - galloyl - beta - Dglucose inhibits the invasion of mouse melanoma by suppressing metalloproteinase - 9 through down - regulation of activator protein - 1 [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 453(2-3):149-158
- Sun MH, Han XC, Jia MK, *et al.* Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase - 9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(38):5931-5937
- Yao JS, Zhai W, Young WL, *et al.* Interleukin - 6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration; the role for KDR and MMP - 9 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(4):1396-1404
- Rao J S, Gondi C, Chetty C, *et al.* Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus - mediated transfer of antisense uPAR and MMP - 9 in non - small cell lung cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(9):1399-1408
- Watanabe K, Yoshida D, Noha M, *et al.* Suppression of matrix metalloproteinase - 2 and - 9 mediated invasiveness by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, BE16627B [J]. J Neurooncol, 2001, 52(1):1-9

(收稿:2011-03-12)

(修回:2011-03-14)

人源化乙肝表面抗体重链克隆、表达及免疫学特性初步鉴定

王晔恺 周吉航 周世权 曾 芳 黄燕燕 刘晓光

摘 要 目的 建立一种利用单细胞分选技术克隆人源化乙肝表面抗体重链的方法。**方法** 从乙肝疫苗接种志愿者外周血中分选得到单个抗体分泌细胞,单细胞 RT-PCR 筛选 20 个单菌落,挑选其中有 IgG 保守区域的克隆全长,并将 IgG(H)基因全长克隆到 pEGFP-N1 载体,转染 COS-7 细胞,取上清液进行 Western blotting 验证,并采用 Batty 饱和法测定亲和力和常数。**结果** 筛选得到 IgG(H)能与 HBsAg 结合,且 K_a 值达到 2.39×10^9 L/mol。**结论** 利用单细胞分选克隆技术获得的抗体重链亲和

基金项目:浙江省科技厅分析测试资助项目(2009F70067)

作者单位:316004 浙江省舟山医院细胞分子生物学实验室

通讯作者:刘晓光,电子信箱:lxg2004@gmail.com

力较高。

关键词 单细胞分选 单细胞反转录聚合酶链反应 乙肝表面抗体 亲和力

Cloning, Expression and Immunological Traits of Humanized HBsAb Heavy Chain. Wang Yekai, Zhou Jihang, Zhou Shiquan, Zeng Fang, Huang Yanyan, Liu Xiaoguang. Zhoushan Hospital, Zhejiang 316004, China

Abstract Objective To establish a method for cloning humanized HBsAb heavy chain by single - cell sorting and single - cell RT - PCR techniques. **Methods** Single antibody - secreting cell was isolated by single - cell sorting from peripheral blood of HBV - vaccinated subjects. 20 colonies were screened by single - cell RT - PCR. The full - length coding HBsAb heavy chain conserved sequence was cloned into pEGFP - N1 vector. Then the vector was transfected into COS - 7 cells. The binding affinity of IG(H) heavy chain in cell - free supernatant expressed by COS - 7 cells was detected by western blot. **Results** The IG(H) heavy chain can specific bind to HbsAg and the value of K_a was 2.39×10^9 L/mol. **Conclusion** The results demonstrated that humaried antibody heavy chain has a high affinity to HBsAg.

Key words Single - cell sorting; Single - cell RT - PCR; HbsAg; Affinity

血源性乙肝疫苗在我国经数十年近亿人次的接种,虽从总体上来说具有良好的安全性和免疫原性,但对小部分使用者如新生儿等群体仍存在异源性致敏的风险^[1]。随着 DNA 重组技术的进展,出现了鼠单抗、小分子抗体等各种重组乙肝表面抗体,但与天然的人抗体分子相比,小分子抗体结构不完整无法发挥 Fc 段介导的各种生物学效应,而鼠单抗则不能完全消除抗体的异源性,亲和力也低。因此,本研究针对以上的问题,通过流式分选得到抗体分泌细胞(antibody - secreting cells, ASC)群,建立起一种利用单细胞 RT - PCR 克隆并表达得到能与乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)特异性结合的人源化乙肝表面抗体(hepatitis B surface antibody, HBsAb)重链,为人源化、个体化的乙肝治疗性抗体开发提供理论和实验依据。

对象与方法

1. 研究对象:选取健康志愿者 8 名,无各种器质性和免疫

性疾病史,未接种过乙肝疫苗,乙肝三系各项检测均为阴性(放射免疫法),对志愿者注射乙肝疫苗(基础免疫 3 针),完成第 3 针注射后的第 30 日清晨各志愿者均空腹抽血 20ml,以枸橼酸钠(1:9)抗凝,每份样本取 2ml 全血 3000r/min 离心取 500 μ l 血浆检测其 HBsAb 浓度(放射免疫法),筛选得到 HBsAb > 1000mIU/ml 的样本 1 份。

2. 单细胞分选:将筛选出的 HBsAb > 1000mIU/ml 的样本(放免仪器为雅培 i2000 型,乙肝三系定量检测试剂盒为配套试剂)用 Ficoll 液(CEDARLANE - H - CL5020)分离,吸取 500 μ l 单个核细胞层悬液, PBS 洗涤 3 次,吸弃上清,加 CD3 - FITC、CD20 - FITC、CD38 - PE、CD27 - PC5、CD19 - APC 各 20 μ l(贝克曼 - 库尔特),振荡混匀,避光静置 20min 后,加 200 μ l PBS,标本置流式细胞仪(BD FACS Aria 高速分选型)上,依次选取 R1 $\rightarrow$ R2 $\rightarrow$ R3 门,得到 R1&R2&R3 细胞群(CD19⁺/CD20⁻&CD3⁻/CD27^{high}/CD38^{high}),用调试用 96 孔板(Axygen 公司)确定液滴中心位置,开启这群细胞的分选,每孔一个细胞,分选多板(图 1)。分选结束后加盖并取出微孔板,显微镜(Olympus BX60)下计数并记录有单个细胞的孔号。

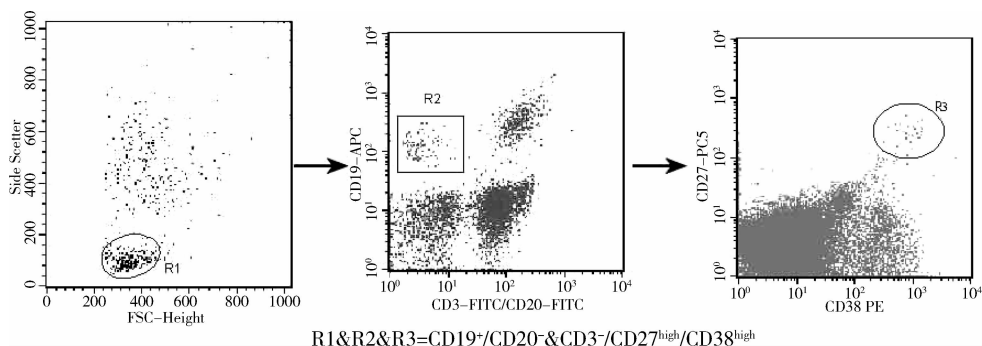


图 1 含抗体分泌细胞较多的淋巴细胞群(CD19⁺/CD20⁻&CD3⁻/CD27^{high}/CD38^{high})

3. 乙肝表面抗体重链克隆:单细胞 RT - PCR 模板制备:在显微镜下观察到有单个细胞的微孔中每孔加入 1% 的 NP40(碧云天生物技术研究所) 5 μ l, 42 $^{\circ}$ C 孵育 20min, 再加 AMV

0.5 μ l, 45 $^{\circ}$ C 孵育 45min, 然后分两等份, 分别用于重链部分全长片段和全长片段的克隆。

采用巢式 PCR 克隆重链部分全长片段:取单细胞 RT -

PCR 模板,第 1 轮 PCR 加 Access Quick Master mix (2 ×) (Promega 公司) 12.5 μl, dNTPs (10mmol/L each) 0.5 μl, 重链部分全长片段 5′-随机引物(天根生化)和 3′-外侧引物(5′-aag-gtgtgcacgcgcgtgt-3′)各 0.5 μl (终浓度为 0.6 μmol/L), 加 ddH₂O 补足 25 μl, PCR 条件为 95℃ 15min; 95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min; 4℃ 5min。第 2 轮 PCR 加第一轮 PCR 产物 2 μl 为模板, 2 × PCR buffer 12.5 μl, 重链部分片段 5′-随机引物和 3′-内侧引物(5′-cggttcggggaag-tagtct-3′)各 1 μl (终浓度为 0.6 μmol/L), PCR 条件均为: 95℃ 5min; 95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 45s, 35 个循环; 72℃ 5min, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。

4. 重链部分全长 PCR 产物纯化和鉴定: 产物切割, 用 DNA 胶回收纯化试剂盒 (Promega 公司) 纯化, 克隆到 T 载体, 挑取 20 个白斑摇菌, 送至中国科学院北京基因组研究所测序。

5. 重链全长克隆: 取“单细胞 RT-PCR 模板”5 μl, 重链全长引物 5′端引物(5′-atcagatctatggctagt gggagggtggc-3′) 0.5 μl (终浓度为 1 μmol/L), 3′端引物 0.5 μl (5′-atcaagctttcattaccggagaca ggga-3′) (终浓度为 1 μmol/L), 10 × buffer 5 μl, dNTP (25mmol/L) 2 μl, LA taq 0.5 μl, 补 ddH₂O 到 25 μl。扩增条件为 95℃ 5min; 95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 2min, 35 个循环; 72℃ 10min, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。产物经胶回收后, 双酶切克隆到 pEGF-N1 成为 pEGFP-IgG(H) 质粒, 并送中国科学院北京基因组研究所测序验证。

6. pEGFP-IgG(H) 转染: pEGFP-IgG(H) 质粒经 LipofectAMINE™ 试剂盒 (Life Technologies 公司) 转染到 COS-7 细胞, 培养 72h, 取上清 4000r/min 离心 10min, 弃沉淀。

7. IgG(H) 结合特异性验证: HBsAg (北京生物制品研究所) 用 1 × SDS 稀释到 10 μg/ml, 用 PCR 仪煮沸 10min 变性, 每孔 10 μl 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白 (15% 分离胶, 5% 浓缩胶), 转移至 PVDF 膜上 (300mA, 30min), 5% 脱脂牛奶封闭非特异抗原 2h, 按照蛋白质 marker 切割 PVDF 膜, 并分别加入 1:50 稀释的上清, 4℃ 过夜。PBS-T 洗涤 3 次, 每次 10min。再分别加入 1:1000 稀释的羊抗人 IgG-HRP (Santa Cruz), 室温震荡 1h, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 15min。ECL 系统显色, 凝胶成像仪 (BIO-RAD Universal Hood II 型) 下摄片, 采用 Quantity one 分析软件进行条带分析。

8. IgG(H) 亲和力检测: 亲和力常数 (K_a) 测定参照 Batty 饱和法^[2], 将 HBsAg 溶解在 5 μg/ml 的碳酸钠缓冲液中, 室温包被在 96 孔板中过夜, PBS-T 洗 3 次, 将不同浓度 IG(H) 上清加到 96 孔板中, 孵育 1h, 洗去后加 HRP 标记羊抗人 IgG 二抗, TMB 显色试剂盒显色后置酶标仪 450nm 波长下读取数据。

结 果

1. 重链部分全长 PCR 产物电泳: 条带约在 480bp 左右, 将其条带回收后克隆到 T 载体 (图 2)。

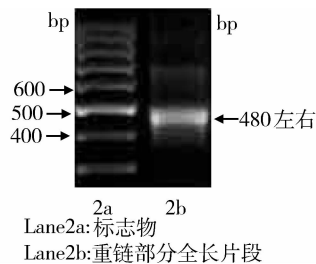


图 2 重链部分全长电泳

2. 重链部分全长序列分析: 20 个白斑摇菌所得的 20 个序列在 NCBI 数据库经 Blast 分析, 15 个克隆全长在 600bp ~ 1kb, 剩下的 5 个克隆中有 3 个是序列相同的克隆, 另外 2 个也是 IgG 重链的序列, 本研究中我们只选取了相同序列的 3 个克隆进一步设计全长引物扩增其全长。

3. 重链全长 PCR 产物电泳和测序: 条带约在 1500bp 左右, 与预期长度相符, 经测序分析重链全长基因 ORF 序列与 NCBI 数据库中的 XP_002348298 95% 同源, 其 Accession number 为 igg_heavy HQ829365 (图 3)。

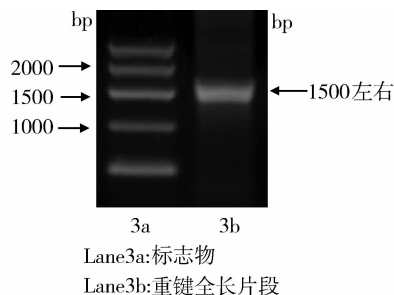


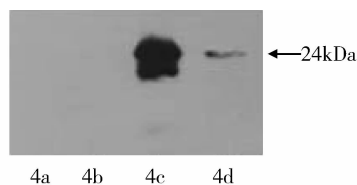
图 3 重链全长 PCR 产物电泳

4. IgG(H) 结合特异性检测: Western blotting 显示, pEGFP-N1 上清液孵育和 pEGFP-N1 上清液加入 10 μg HBsAg 后孵育均无目的条带, 而 pEGFP-IgG(H) 上清液孵育有较强的条带, 但 pEGFP-IgG(H) 上清液加入 10 μg HBsAg 后条带灰度降低较大, 这说明上清液中加入的 HBsAg 与 4d 上的 HBsAg 竞争性地结合上清中的重链, 从而造成 4d 上的条带灰度降低 (图 4)。

5. IgG(H) 亲和力检测: 通过亲和常数测定曲线计算, IgG(H) 的 K_a 值为 2.39×10^9 L/mol (图 5)。

讨 论

单克隆抗体自从 20 世纪 70 年代制备出来以后, 在医学、生物学、免疫学等诸多学科发挥了重要作用, 在临床上对于肿瘤等疾病也有一定的应用价值^[3], 但



4a 4b 4c 4d
Lane4a:pEGFP-N1上清液孵育
Lane4b:pEGFP-N1上清液加入10µgHBsAg后孵育
Lane4c:pEGFP-IgG(H)孵育
Lane4d:pEGFP-IgG(H)上清液加入10µgHBsAg孵育

图 4 Western blotting 检测 IgG (H) 与 HBsAg 结合的特异性

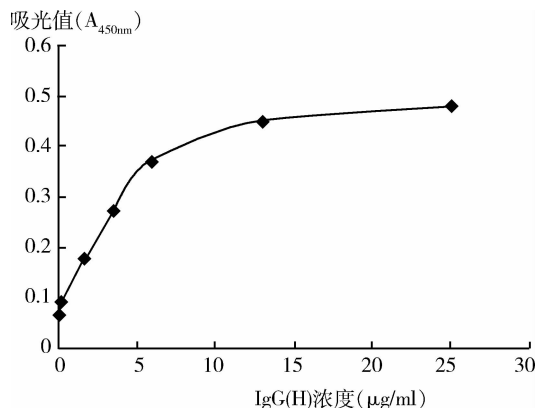


图 5 IgG (H) 亲和常数测定曲线

治疗性单抗目前存在的主要问题是多以鼠源为主,容易被人体免疫系统识别产生人抗鼠抗体而将其清除^[4]。因此,单抗的人源化改造成为热点,这是因为人源化改造后不但减少了机体的免疫排斥反应,而且人源化抗体中的 Fc 段能够诱发机体效应细胞的杀伤作用^[5]。

目前完全人源化抗体的制备方法主要通过抗体库技术和转基因技术,而我们通过流式分选和单细胞 RT-PCR 建立的这种从外周血 ASC 细胞中扩增乙肝表面抗体重链基因的技术,不但达到了完全的人源化,而且从理论上说可以针对个体制备出个体化的抗体,达到个体化治疗的目的。由于 ASC 细胞目前的尚无共同认可的表面标记,Crotty 等^[6]认为人记忆性 B 细胞表面标记是 CD19⁺CD20⁺Ig⁺CD27⁺,在受外界抗原刺激 7 天左右能达到外周血 ASC 细胞的 2% 左右,并通过酶联斑点免疫法分离得到这群细胞。而本研究则采用 Smith K 等^[7]报道所采用的 CD19⁺/CD20⁻&CD3⁻/CD27^{high}/CD38^{high} 这类组合进行筛选 ASC 细胞。并且单细胞 RT-PCR 的优点在于克隆出

来的重链和轻链和来源于同一 ASC 细胞,通过连接肽 (Gly₄Ser)₃ 连接配对后,构建出来的抗体可以和自然分泌抗体的分子结构达到高度的相似性,从而最大程度地发挥抗体的结合能力,这是一般重组技术和多细胞模板的 RT-PCR 无法做到的。

抗体的免疫学特性主要体现于抗原抗体反应的结合容量、亲和力、特异性 3 方面,其中测定亲和力 Ka 的方法有平衡透析法、Scatchard plot 法和 Batty 饱和法等^[8],由于 Batty 饱和法简单适用,因此本研究用了此法检测 IgG(H) 的 Ka 值达到了 2.39×10^9 L/mol,而根据 James 等^[9] Ka 为 $10^7 \sim 10^{12}$ L/mol 为高亲和力的理论,我们表达得到的 IgG(H) 亲和力较高。在对抗体的特异性鉴定中一般使用交叉反应实验,而本研究只通过设立多种对照初步地证明 IgG(H) 对 HBsAg 具有一定的结合力,提示此由此重链所制备得到的乙肝表面抗体非常可能具有清除乙肝病毒的能力,在职业暴露、产前阻断等个体化预防和治疗的应用领域有广泛的前景。

参考文献

- 1 Bulbul A, Karadag A, Köklü E, *et al.* Anaphylactic shock due to hepatitis B immunoglobulin in a newborn[J]. Journal of Maternal - Fetal and Neonatal Medicine, 2010, 23(10): 1257 - 1259
- 2 Batty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non - competitive enzyme immunoassay [J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1 - 2): 173 - 179
- 3 Arlen M, Arlen P, Tsang A, *et al.* The therapeutic value of monoclonal antibodies directed against immunogenic tumor glycoproteins [J]. J Cancer, 2010, 1: 209 - 222
- 4 Goto M, Kuribayashi K, Umemori Y, *et al.* High prevalence of human anti - mouse antibodies in the serum of colorectal cancer patients[J]. Anticancer Res, 2010, 30(10): 4353 - 4356
- 5 王业荣, 童德文, 李立, 等. 人源化抗体制备及其应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(4): 683 - 687
- 6 Crotty S, Aubert RD, Glidewell J, *et al.* Tracking human antigen - specific memory B cells; a sensitive and generalized ELISPOT system[J]. J Immunol Methods, 2004, 286(1 - 2): 111 - 122
- 7 Smith K, Garman L, Wrammert J, *et al.* Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen[J]. Nat Protoc, 2009, 4(3): 372 - 384
- 8 王自良, 张改平, 杨艳艳, 等. 抗苯巴比妥单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及其免疫学特性鉴定[J]. 核农学报, 2006, 20(4): 336 - 340
- 9 James WG. Monoclonal antibodies: principles and practice [M]. Academic press, Inc Ltd, 1983: 142 - 147

(收稿: 2011 - 07 - 06)

(修回: 2011 - 07 - 18)