

TSH 受体单克隆抗体研究进展

魏军平 刘 媛

〔作者简介〕 魏军平,中国中医科学院广安门医院内分泌科主任医师、教授、博士生导师,兼任中国中西医结合学会内分泌专业委员会候任主任委员。长期从事中西医结合防治糖尿病及其慢性并发症如大小血管、周围神经病变以及甲状腺功能亢进症、亚急性非化脓性甲状腺炎、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能减退症等内分泌代谢疾病的临床、科研、教育、管理工作。主持和参与完成世界卫生组织基金、国家自然科学基金、国家“九五”、“十五”攻关、“十一五”国家科技支撑计划、“十二五”行业专项基金、国家中医药管理局基金、首都医学发展科研基金等科研项目 18 项。获中国中西医结合学会科学技术奖、中华中医药学会科学技术奖、北京市科技进步奖等 8 项奖励。

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.001

TSH 受体抗体(TSH receptor antibodies, TRAb)特异性存在于自身免疫性甲状腺疾病(AITD)患者体内,可与甲状腺细胞膜表面的 TSH 受体(TSHR)结合,产生一系列生物学效应。TRAb 分为刺激性(TSAb)、阻断性(TBAb)及中性 3 种,在 Graves 病中,TSAb 的作用占主导地位,而在慢性淋巴细胞性甲状腺炎(HT)中,TBAb 可能起主要作用^[1,2]。以往的研究中,为获取 TRAb,多采用粗提患者血清中 TRAb 的方法,该方法存在一定的局限性,如获得量少、纯度低、难以分离不同功能的抗体等。近年来随着单克隆抗体技术的发展,研究者已陆续成功制备多种 TSH 受体单克隆抗体,得到广泛应用。本文对 TSH 受体单克隆抗体的研究进展做一综述。

一、TSH 受体单克隆抗体的发展历史

自 1956 年 Adams 等首先发现 GD 患者血清中存在与 TSH 作用类似的物质后,研究者经过大量研究,证实该物质为针对 TSHR 的免疫球蛋白。然而,TRAb 在血清中含量过低,为研究其性质及与 TSHR 的作用机制造成了困难^[3]。1989 年 Parmentier 等报道了 TSHR 蛋白的成功合成,在此基础上,研究者通过将 TSHR 蛋白注入小鼠体内,获得多种鼠 TSH 受体抗体。然而这些早期获得的动物 TSH 受体单克隆抗体存在明显的局限性:效能较低,不能诱导动物发生甲亢,在毫克/毫升(mg/ml)的浓度上方可产生作用,难以媲美人 TRAb 的作用;来源于动物,可能与人类 TRAb 的性质存在一定差异^[4]。

DNA 免疫等技术的发展为获取单克隆抗体提供

了新思路。2002 年,3 个实验室同时报道成功合成具有高效能的刺激性动物 TSH 受体单克隆抗体。其中,一种抗体有刺激 TSHR 的作用而无拮抗 TSH 及血清 TRAb 的作用,故不完全具备人 TRAb 的特征,而其他两种抗体则同时具备这些作用^[5~7]。2003 年,Sanders 等^[8]报道成功合成了与自体 TRAb 性质相似的、具有高效能的刺激性人 TSH 受体单克隆抗体,在学界引起巨大反响,被认为具有里程碑式的意义^[9]。此后,多种来源于人类的具有刺激或阻断性的 TSH 受体单克隆抗体陆续成功获取,同时来源于小鼠、仓鼠等啮齿类动物的单克隆抗体也大量报道。这些抗体均在研究工作中得到广泛的应用,为基础、临床等多个领域的研究工作提供了极大的便利。

二、TSH 受体单克隆抗体的分类

1. 根据生物学效应:根据甲状腺细胞的作用,可将 TRAb 分为刺激性、阻断性及中性 3 种,因此 TSH 受体单克隆抗体也相应分为 3 种。刺激性单克隆抗体可竞争性抑制 TSH 与 TSHR 的结合,且刺激作用强于 TSH,故可促进甲状腺细胞的增殖及激素的分泌;阻断性抗体竞争性抑制 TSH 与 TSHR 的结合,但本身不产生刺激作用,故可阻断 TSH 对 TSHR 的效应;中性抗体可与 TSHR 结合,但结合位点与 TSH 不同,故不影响 TSH 与 TSHR 的结合及相应的生物学效应。另外, Sanders 等^[10,11]还报道了某些具有反向激动作用的 TSH 受体单克隆抗体。该类抗体不仅通过拮抗 TSH 与 TSHR 的结合产生阻断作用,还可对 TSHR 产生反向激动作用。TSHR 本身具固有活性,在不受 TSH 或 TRAb 刺激的情况下即有微弱的刺激信号通路作用,此类抗体的反向激动作用可抑制 TSHR 的该基础活性。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173260)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院

通讯作者:魏军平,电子信箱:weijunping@126.com

2. 根据来源和制备方法:根据来源的差异,TSH受体单克隆抗体可分为来源于动物(主要是小鼠和仓鼠)者及来源于人类者,两种抗体的制备方法不同。来源于动物的单克隆抗体以往多采取将纯化的TSHR蛋白注入动物体内的方法获取,然而此种方法获得的单克隆抗体效能降低,且与人TRAb性质存在较大差异,不能满足研究工作的需要;随着技术的发展,现在多采取DNA免疫技术制备。根据Sanders等的报道,其制备方法为将TSHR DNA注射入小鼠体内,选取体内产生足够浓度TRAb的小鼠,分离其脾细胞,采用杂交瘤技术制备单克隆抗体。来源于人类的单克隆抗体则通过直接分离患者体内B淋巴细胞的方法,即采用符合条件的自身免疫性甲状腺疾病(主要是Graves病和HT)患者的外周血,分离其B淋巴细胞并置于多孔板中培养,分别检测各小孔上清液中的TRAb,选取符合条件的细胞,通过杂交瘤技术制备单克隆抗体^[4]。

3. 几种主要的TSH受体单克隆抗体

(1)刺激性TSH受体单克隆抗体:M22为首个成功获取的与人TSAb特征相似且具有高效能的刺激性人TSH受体单克隆抗体,由Sanders等^[8]于2003年获得,亦为目前应用最广泛的刺激性TSH受体单克隆抗体之一。该抗体来源于一位同时患有GD及1型糖尿病的19岁男性患者的外周血B淋巴细胞,通过对16500个B淋巴细胞进行筛选而最终获取。该抗体既可拮抗TSH与TSHR的结合,又具有强烈的刺激TSHR的作用,在纳克/毫升(ng/ml)浓度下即可产生作用。TSH受体竞争抑制法和生物学测定法表明,其效能为供体患者血清IgG的3000倍,为人TSH的25倍,为动物TSH单克隆抗体的10~100倍,体现良好的优势^[8,12]。该单克隆抗体合成后,在多领域得到广泛应用。

K1-18由Evans等^[13]于2010年报道。该抗体获取自一位54岁、有8年AITD病史的女性甲减患者的外周血B淋巴细胞,其效能为供体血清抗体的10000倍以上。值得注意的是,该患者血清同时具有刺激性及阻断性TRAb,除K1-18外,还从该患者血清中获取高效能的阻断性TSH受体单克隆抗体K1-70。除以上来源于人体者外,还有许多来源于动物者。如Sanders等^[5]于2002年报道的来源于小鼠的RSR-12、RSR-14、RSR-15;Ando等^[6]于2002年报道的来源于仓鼠的MS-1(Mount Sinai-1);2004年报道来源于仓鼠的9F4、10C12等^[11]。根据研究,小鼠单克隆抗体MS-1、9F4的效能高于RSR-12等仓鼠单克隆抗体^[11]。以上抗体尽管来源于动物,但

由于效能较高、与人TRAb性质相似,且价格相对便宜,能满足一定的研究工作需要。

(2)阻断性TSH受体单克隆抗体:5C9由Sanders等^[10]于2008年报道,来源于一位患产后甲状腺功能减退症、血清中有高含量TRAb的27岁女性患者的外周血B淋巴细胞。5C9可竞争性抑制TSH、人血清TRAb、M22及动物刺激性TSH受体单克隆抗体与TSHR的结合,其效能为供体血清的3900倍。值得注意的是,该抗体不但通过拮抗TSH、TRAb与TSHR的结合阻断其效应,还对TSHR的基础活动有抑制作用,被称为TSHR的反向激动剂。K1-70为来源于人体的阻断性TSH受体单克隆抗体,由Evans等^[13]于2010年报道,与K1-18来自同一患者,其效能为供体血清的10000倍以上。除来源于人体者外,来源于动物者主要有:Sanders等^[14]2005年报道的来源于小鼠的RSR-B2;Chen等^[15]2007年报道来源于小鼠的CS-17,该抗体除阻断作用外同时具有TSHR反向激动作用;Ando等^[6]于2002年报道的来源于仓鼠的Tab-8、2004年报道来源于仓鼠的7G10等^[11]。在研究工作中可根据不同抗体的性质选择使用。

(3)中性TSH受体单克隆抗体:现有的中性TSH受体单克隆抗体多来源于动物。Tab-16、Tab-4、Tab-6来源于仓鼠,由Ando等^[6]于2002年报道;7G10、8C9、9D9等亦来源与仓鼠,由同一实验室于2004年报道^[14]。

4. TSH受体单克隆抗体的应用现状

(1)研究TRAb与TSHR结合的分子生物学机制:①研究TRAb与TSHR的结合位点:自TRAb发现以来,其与TSHR结合的分子生物学机制一直为学界关注的热点,然而由于TRAb在血清中含量低,难以提取及分离不同性质的TRAb,造成研究的瓶颈。TSH受体单克隆抗体的成功制备使此类研究得以顺利进行。在DNA免疫技术广泛使用之前,研究者通过TSHR蛋白免疫的方法获取多种动物TSH受体单克隆抗体,虽然该类抗体效能较低,但研究者借此已勾勒出TSHR上与TRAb结合密切相关的3个区域。高效能人或动物单克隆抗体成功制备后,为进一步研究提供了便利。如Latif等^[16,17]均分别报道通过使用多种性质的来源于人及动物的单克隆抗体,对TRAb与TSHR结合的氨基酸位点及相关机制进行了探索 and 比较;②研究TSHR介导的胞内信号通路:TRAb与甲状腺细胞膜表面的TSHR结合后,经由一系列胞内信号转导通路,对细胞的增殖、激素的分泌产生作用。TSH单克隆抗体的获取为探索不同性质TRAb介导

的信号通路的特征提供了可能。如 Morshed 等^[18]通过分别采取刺激性抗体 M22、MS1、RSR-12, 阻断性抗体 Tab-8、RSR-B2, 中性抗体 Tab-16、7G10 等刺激 FRTL 细胞, 并检测信号通路关键因子的方法, 对不同性质抗体介导的信号通路的特征进行了报道, 并与 TSH 相比较, 对阐明 TRAb 与 TSHR 结合后机制有很大帮助。

(2) 用于 TRAb 检测手段的研发: 血清 TRAb 含量的检测对于 GD 的诊断及预后有重要意义。传统的 ELISA 法主要根据 TRAb 可竞争性抑制 TSH 结合 TSHR 的原理, 通过检测患者血清中 TRAb 竞争性抑制反应体系中放射碘标记的牛 TSH 结合 TSHR 的能力, 测定 TRAb 的含量。由于 TSH 价格较为昂贵, 随着单克隆技术的发展, 已陆续尝试使用小鼠或人的 TSHR-mAbs 替代试剂盒中的 TSH, 取得良好的效果, 其中 M22 的应用最为广泛。如 Smith 等^[19]报道以 M22-生物素为基础的 ELISA 法检测 TRAb, 具有良好的敏感度和特异性。另外, 近年来德国罗氏公司将全自动电化学光免疫分析法 (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) 引入 TRAb 的检测, 采取 M22 作为主要反应试剂, 其主要原理为通过检测血清 TRAb 抑制钨标记的 M22 结合 TSHR 的能力, 测定 TRAb 的含量。与传统的 ELISA 法需要手动检测、耗时较长相比, 该方法为自动化检测, 耗时 < 30min, 具有简便、快捷的优势, 且根据报道, 有较高的敏感度和特异性, 有广阔的临床应用前景^[20]。

(3) 探索 Graves 眼病的发病机制及治疗: Graves 眼病 (GO) 为 AITD 的表现之一, 发病机制尚不明确, 可能与自身免疫因素导致眶后纤维组织增生有关, 其治疗亦存在争议。TSH 受体单克隆抗体的制备对研究 GO 发病机制、探索治疗方法提供了帮助。van Zeijl 等^[21]观察低分子 TSHR 阻断剂 Org-274179-0 对反 TSH、血清 TRAb 及 M22 与 GO 眼眶成纤维母细胞表面 TSHR 结合后 cAMP 释放的情况, 结果表明 Org-274179-0 可完全阻断以上三者的作用, 证实血清 TRAb、M22 对眼眶成纤维母细胞的作用完全由 TSHR 介导。Kumar 等^[22]采取 M22、TSH 分别干预体外培养的 GO 眼眶成纤维细胞, 观察其脂肪化情况及相关的信号通路, 结果表明 TSH、M22 具有促进眼眶成纤维母细胞脂肪增生的作用, 且该机制与 PI_3K 信号通路关系密切, 提示阻断 PI_3K 通路可能对 GO 的治疗有效。Turcu 等^[23]的研究表明, M22、MS-1 有激活 cAMP、pAkt 等多条信号通路, 从而导致 GO 眼眶成纤维母细胞透明质酸生成的作用, 而低分子 TSHR 反向激动剂 NCGC00229600 不仅可阻断 M22、

MS-1 与 TSHR 的结合从而阻断该作用, 还可抑制 TSHR 的基础活性, 提示 NCGC00229600 可能在 GO 的治疗中有一定应用前景。

参考文献

- Michalek K, Morshed SA, Latif R, *et al.* TSH receptor autoantibodies[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2009, 9: 113-116
- Latif R, Morshed SA, Zaidi M, *et al.* The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling[J]. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 2009, 38: 319-341
- McLachlan SM, Rapoport B. Monoclonal, human autoantibodies to the TSH receptor - the Holy Grail and why are we looking for it? [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 3152-3154
- Sanders J, Miguel RN, Furmaniak J. TSH receptor monoclonal antibodies with agonist, antagonist, and inverse agonist activities[J]. *Methods in Enzymology*, 2010, 485: 93-420
- Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, *et al.* Thyroid stimulating antibodies[J]. *Thyroid*, 2002, 12: 1043-1050
- Ando T, Latif R, Pritsker A, *et al.* A monoclonal thyroid stimulation antibody[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110: 1667-1674
- Costagliola S, Fransen JD, Bonomi M, *et al.* Generation of a mouse monoclonal TSH receptor antibody with stimulating activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299: 891-896
- Sanders J, Evans M, Premawardhana LDKE, *et al.* Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody [J]. *Lancet*, 2003, 362: 126-128
- Dayan CM. Human monoclonal thyroid-stimulating autoantibody: how useful is a holy grail? [J]. *Lancet*, 2003, 362: 92-93
- Sanders J, Evans M, Betterle C, *et al.* A human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor with thyroid-stimulating blocking activity[J]. *Thyroid*, 2008, 18: 735-746
- Ando T, Latif R, Daniel S, *et al.* Dissecting linear and conformational epitopes on the native thyrotropin receptor[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 5185-5193
- Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, *et al.* Characteristics of a human monoclonal autoantibody to the thyrotropin receptor: sequence structure and function[J]. *Thyroid*, 2004, 14: 560-570
- Evans M, Sanders J, Tagami T, *et al.* Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample[J]. *Clin Endocrinol*, 2010, 73: 404-412
- Sanders J, Allen F, Jeffreys J, *et al.* Characteristics of a monoclonal antibody to the thyrotropin receptor that acts as a powerful thyroid-stimulating autoantibody antagonist [J]. *Thyroid*, 2005, 15: 672-682
- Chen CR, McLachlan SM, Rapoport B, *et al.* Suppression of thyrotropin receptor constitutive activity by a monoclonal antibody with inverse agonist activity[J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 2375-2382
- Latif R, Teixeira A, Michalek K, *et al.* Antibody protection reveals extended epitopes on the human TSH receptor[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44669

(下转第 12 页)

关。以下机制共同参与肿瘤介导免疫抑制:①肿瘤细胞过度消耗葡萄糖,葡萄糖缺乏,抑制效应 T 细胞的功能^[11];②肿瘤细胞表达的 B7 - H1/PD - L1 通过活性 T 细胞上表达的 PD - 1 抑制 T 细胞应答;③肿瘤细胞表达和激活 IDO,通过抑制细胞周期导致细胞凋亡^[12];④肿瘤微环境中的可溶性免疫抑制介质(TGF - β 、VEGF、IL - 10、IL - 23)干扰效应 T 细胞的功能,动员 Treg 诱导肿瘤,并且对效应细胞有直接的免疫抑制作用^[13]。

总之,免疫疗法以其恢复甚至重建免疫系统、安全、不良反应小等独特的优势已经成为继手术治疗、放、化疗之后的非常重要的治疗办法,并有望根治肿瘤,而众多研究已经证实 DC 疫苗在抗肿瘤免疫中的地位。但是,DC 疫苗的研究还处于初级阶段,受肿瘤类型、大小、疫苗类型及给药途径等影响,临床差异也很大,且临床中也缺乏判断其临床疗效的统一标准。尽管大量研究已经证实了 DC 疫苗强大的抗肿瘤免疫能力,部分研究也观察到了肿瘤的消退,但关于疫苗的剂量、重复给药间隔及联合其他疫苗等问题仍不合理的定论,需要进一步研究。

参考文献

- Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012,30(1):1 - 22
- Jonuleit H, Giesecke - Tuettenberg A, Tuting T, *et al.* A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma - specific T - cell responses in humans following intranodal injection[J]. *Int J Cancer*, 2008,93(2):243 - 251
- Yamanaka R, Homma J, Yajima N, *et al.* Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I / II trial[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(11):4160 - 4167
- Hamidi S, Chen CR, Murali R, *et al.* Probing structural variability at the N terminus of the TSH receptor with a murine monoclonal antibody that distinguishes between two receptor conformational forms[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(1):562 - 571
- Morshed SA, Latif R, Davies TF. Characterization of thyrotropin receptor antibody induced signaling cascades [J]. *Endocrinology*, 2009, 150:519 - 529
- Smith BR, Bolton J, Young S, *et al.* A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies[J]. *Thyroid*, 2004, 14: 830 - 835
- Li Y, Kim J, Diana T, *et al.* A novel bioassay for anti - thyrotrophin receptor autoantibodies detects both thyroid - blocking and stimulating activity[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 173(3): 390 - 397
- van Zeijl CJ, van Koppen CJ, Surovtseva OV, *et al.* Complete inhibi-

- Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, *et al.* Dendritic cell - targeted protein vaccines: a novel approach to induce T - cell immunity [J]. *Intern Med*,2012,271(12): 183 - 192
- Schiavoni G, Mattei F,Gabriele L. Type I interferons as stimulators of DC - mediated cross - priming: impactonanti - tumor response[J]. *FrontImmunol*,2013, 4(12):483 - 490
- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, *et al.* Induction of cytotoxic T - lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide - pulsed dendritic cells[J]. *Blood*,2009,96(9):3102 - 3108
- Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, *et al.* Tumour - dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological eVects and clinical results [J]. *Vaccine*, 2005, 23(17):2367 - 2373
- Ganguly D, Haak S, Sisirak V, *et al.* and B. Reizis, the role of dendritic cells in autoimmunity[J]. *Nature Reviews Immunology*,2013, 13(8):566 - 577
- Mayer CT, Berod L, Sparwasser T. Layers of dendritic cell - mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2012,3(3):183 - 187
- Nuyts AH, Lee WP, Bashir - Dar R, *et al.* Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellularimmunotherapies? [J]. *Multiple Sclerosis*, 2013, 19(8):995 - 1002
- Pletinckx K, Dohler A, Pavlovic V, *et al.* Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory Tcells[J]. *Front Immunol*,2011,27(2):39 - 44
- You CX, Shi M, Liu Y, *et al.* AAV2/IL - 12 gene delivery into dendritic cells(DC) enhances CTL stimulation above other IL - 12 applications:evidence for IL - 12 intracrine activity in DC[J]. *Oncoimmunology*,2012,1(2):847 - 855
- Konduri V, Decker WK, Halpert MM, *et al.* Modeling dendritic cell vaccination for influenza prophylaxis: potential applications for niche populations[J]. *Infect Dis*,2013,207(9):1764 - 1772

(收稿日期:2014 - 07 - 28)

(修回日期:2014 - 08 - 29)

(上接第 3 页)

- tion of rhTSH - , Graves' disease IgG - , and M22 - induced cAMP production in differentiated orbital fibroblasts by a low - molecular - weight TSHR antagonist [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(5):E781 - 785
- Kumar S, Nadeem S, Stan MN, *et al.* A stimulatory TSH receptor antibody enhances adipogenesis via phosphoinositide 3 - kinase activation in orbital preadipocytes from patients with Graves' ophthalmopathy [J]. *J Mol Endocrinol*, 2011, 46(3):155 - 163
- Turcu AF, Kumar S, Neumann S, *et al.* A small molecule antagonist inhibits thyrotropin receptor antibody - induced orbital fibroblast functions involved in the pathogenesis of Graves ophthalmopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(5): 2153 - 2159

(收稿日期:2014 - 07 - 12)

(修回日期:2014 - 09 - 22)