

具有中和功能的抗单体 C-反应蛋白单克隆抗体的制备及其初步应用

岳雅丽¹, 王俊宏^{1*}, 方敏¹, 郭妍^{1,2*}, 程蕴琳¹

(¹南京医科大学第一附属医院老年心血管科, 江苏 南京 210029; ²江苏省盛泽医院心血管科, 江苏 苏州 215228)

[摘要] 目的:制备单体 C-反应蛋白(monomeric C-reactive protein, mCRP)的单克隆抗体。方法:用合成的人 C-反应蛋白末端八肽氨基酸,与牛血清白蛋白偶联后免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 按 5:1 的比例融合,间接竞争 ELISA 法和有限稀释法进行单克隆杂交瘤细胞的筛选;制备腹水抗体;采用 Protein G 亲和层析法纯化抗体,用间接 ELISA 和 Western blot 方法测定抗体特异性,并采用该单抗研究其对 mCRP 干预的乳大鼠心肌细胞的保护作用。结果:得到 1 株能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,纯化后的单克隆抗体纯度达 98%,抗体活性良好,并且该抗体可以降低 mCRP 导致的心肌细胞 TGF-β 的表达。结论:成功获得 1 株能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,并对其初步应用进行了鉴定,并证实其可以中和 mCRP 引起的心肌细胞的损伤作用。

[关键词] 单体 C-反应蛋白;单克隆抗体

[中图分类号] R392-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)01-032-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130107

Characterization and potential application of monoclonal antibody specific to monomeric C-reactive protein

Yue Yali¹, Wang Junhong^{1*}, Fang Min¹, Guo Yan^{1,2*}, Cheng Yunlin¹

(¹Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Cardiology, Shengze Hospital of Jiangsu Province, Suzhou 215228, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare monoclonal antibody (MAb) against monomeric C-reactive protein. **Methods:** BALB/c mice were immunized with mCRP-BSA and the spleen cells of the mice were fused with myeloma cells SP2/0 at the ratio of 5:1. Monoclonal hybridomas were screened by competitive indirect enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) and limited dilution. Mouse ascites were prepared by intraperitoneal injection of hybridoma cells. MAbs to mCRP was purified by Protein G Affinity chromatography methods. The specificity and activity of ascites antibody were determined by Western Blot and indirect ELISA. The protective effects of this antibody influenced on cardiomyocytes were further studied. **Results:** Strain of hybridoma cell line could secrete MAb stably. After purification, the obtained monoclonal antibody can decrease mCRP induced TGF-β expression on cardiomyocytes. **Conclusion:** The obtained strain of hybridoma cell line could secrete MAb stably, and purified MAb had protective effect on cardiomyocytes.

[Key words] monomeric C-reactive protein; monoclonal antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 032-036]

C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是一种能与肺炎链球菌 C 多糖体反应形成复合物的急性时相反应蛋白,组织损伤、感染、肿瘤、心肌梗死等一系列

急慢性炎症性疾病时,在白介素(interleukin, IL)-6 等细胞因子的刺激下,肝细胞合成 CRP。CRP 是一种环状五聚体蛋白,其一级结构包含 5 个相同的亚单位,亚单位间以非共价键相结合,每个亚单位在其表面都含有 CRP 配体结合位点。CRP 是心血管疾病预后的独立危险因素^[1],它可以反映动脉粥样硬化斑块的成分并预测斑块破裂的可能性。此外,越来越多的研究表明 CRP 不仅仅是一个生物学指标,它还参与了动脉粥样硬化形成及心肌梗死的过程。本研

[基金项目] 国家自然科学基金(30900602);江苏省科技厅自然科学基金(BK2011382);江苏省“六大人才高峰”(2011WSN-029)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoyan51@hotmail.com; cnjjh2000@yahoo.com.cn

究前期发现,CRP 可以作为重要的损伤因子导致心肌细胞凋亡^[2]。正常状态下,CRP 分子以五聚体形式存在,在缺血、缺氧及低 pH 环境下可分解为单体 CRP (monomeric C-reactive protein, mCRP), 可以导致炎症反应^[3]。因此,制备具有中和 mCRP 不良生物学功能的抗 mCRP 单克隆抗体,不仅可以对抗 mCRP 所致的心肌细胞及内皮细胞的损伤作用,而且对于 mCRP 的检测也具有重要意义。本研究以纯化的 mCRP 抗原为免疫原,利用细胞融合技术^[4],建立了能稳定分泌特异性抗 mCRP 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并对得到的单克隆抗体进行了纯化和鉴定,为中和 mCRP 引起的心肌细胞损伤提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料及试剂

CRP 末端八肽氨基酸 (Phe-Thr-Lys-Pro-Gln-Leu-Trp-Pro) 由杭州中肽公司合成,并将其与牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 偶联;mCRP 蛋白根据文献提供方法制备^[5]。辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)、聚乙二醇 (PEG)、HAT、HT、佐剂、降植烷购自美国 Sigma 公司。胎牛血清来自美国 Invitrogen 公司,DMEM 购自美国 Gibco 公司。细胞培养板、细胞培养瓶、离心管均为美国 Corning 公司产品。

1.1.2 主要仪器

细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品; Synergy HT 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司产品; Centrifuge 5810R 离心机为美国 Eppendorf 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫

用 BSA 偶联的 CRP 末端八肽氨基酸 (20 $\mu\text{g}/\text{只}$) 与弗式完全佐剂充分乳化后用皮下注射的方法免疫 5 只 BALB/c 小鼠,基础免疫 14 d 和 28 d 后,加强免疫 2 次,其剂量与基础免疫相同。42 d 时用混有不完全佐剂的抗原 (100 $\mu\text{g}/\text{只}$) 再次加强免疫,3 次加强 3 d 后,取血测定抗体滴度。

1.2.2 小鼠抗血清滴度测定

包被酶标板,用 0.05 mol/L pH9.5 的碳酸盐缓冲液稀释 mCRP 后加入酶标板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。使用前封闭。将抗 mCRP 小鼠血清稀释成不同的稀释度,各取 100 μl 加到上述包被板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后,再加入 100 μl HRP-兔抗鼠 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min,

洗涤后,加入显色液,显色 20 min,用终止液终止反应,酶标仪 450 nm 读取吸光度值。

1.2.3 细胞融合与筛选

①细胞融合:取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞在 50%PEG 作用下融合。融合后的细胞置于培养基中,含 5%CO₂ 的培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养;②筛选:融合 5~6 d 后,待杂交瘤细胞生长状态良好时去上清进行筛选。筛选方法与小鼠抗血清滴度测定方法相同;③克隆化:采用有限稀释法对杂交瘤细胞培养液上清呈 mCRP 抗体阳性的杂交瘤细胞进行克隆化。待克隆后的细胞生长状态良好时,进行再筛选、克隆,直至所有细胞培养液上清均呈 mCRP 抗体阳性为止。

1.2.4 单克隆抗体小鼠腹水制备

在接种杂交瘤细胞 1 周前,向 BALB/c 小鼠腹腔内注射降植烷。取杂交瘤细胞计数,离心后加入 DMEM 培养基使细胞悬浮,每只小鼠腹腔注射 0.5 ml。1 周后取腹水,离心取上清,分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 下长期保存。

1.2.5 抗体纯化

将得到的腹水用 Protein G 亲和层析法进行纯化。SDS-PAGE 鉴定单克隆抗体的纯度。分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 4%,还原状态下处理样品,电泳后考马斯亮蓝 R-250 染色,乙醇乙酸脱色,直至背景脱净为止,然后经凝胶成像系统扫描并分析,鉴定其纯度。

1.2.6 抗体的鉴定

抗体敏感性鉴定:包被酶标板,用 0.05 mol/L pH9.5 的碳酸盐缓冲液稀释 mCRP 蛋白后加入酶标板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,使用前封闭。将纯化的 mCRP 抗体 (3 g/L) 按比例稀释成不同的稀释度,各取 100 μl 加到上述包被板中,反应 1 h 后,再加入 100 μl HRP-兔抗鼠 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,洗涤后,加入显色液,显色 20 min,用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,酶标仪 450 nm 读取吸光度值。

抗体特异性鉴定:采用 Western blot 法鉴定抗体与 mCRP 结合的特异性。取纯化的 mCRP 蛋白,以 BSA 蛋白作为对照,10%聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白电泳产物转移至 NC 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,纯化的 mCRP 抗体 (1:3 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;再加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;用化学发光显色试剂盒显色,X 线曝光。单抗亚类鉴定:采用小鼠单抗亚类鉴定试剂盒鉴定单抗亚类。

1.2.7 抗 mCRP 单克隆抗体对体外培养的乳大鼠

心肌细胞转化生长因子 (transforming growth factor, TGF-β) 表达的影响

乳大鼠心室肌细胞的原代培养参照文献的方法^[6],并适当改进。取出生 1~3 d 的 Sprague Dawley 大鼠,用 75% 的酒精浸泡消毒,在超净工作台中,无菌开胸取出心脏,剔除与心脏相连的大血管和心房组织,放入预冷的 PBS 液中挤出残余的血液,冲洗 3 次。用眼科剪将心室剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右碎块,加入 0.1% 胶原酶,混匀,置于 37℃ 200 r/min 的恒温摇床中消化 10 min。剩余的组织中继续加入 0.1% 的胶原酶,混匀,于摇床中继续消化,此过程重复数次,直至组织块被消化完全,每次消化后的上清加入胎牛血清终止消化。用 300 目细胞筛过滤未完全消化的组织块,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 悬浮细胞,接种于培养皿中培养 2 h,用差速贴壁法去除成纤维细胞。2 h 后未贴壁的细胞基本为心室肌细胞,取细胞悬液接种于培养皿中,在含 5% CO₂ 的培养箱中于 37℃ 下培养。48 h 后可见细胞融合成片,同步搏动。取 72 h 的心肌细胞用于实验。

实验分为 4 组:① 正常对照组:正常培养的心肌细胞,未予任何干预;② mCRP 组:正常培养的心肌细胞,培养 24 h 后给予 20 μg/ml mCRP;③ mCRP+mCRP 抗体组:正常培养的心肌细胞,培养 24 h 后给予 20 μg/ml mCRP 和 50 μg/ml mCRP 抗体;④ mCRP 抗体组:正常培养的心肌细胞,培养 2 h 后予 50 μg/ml mCRP 抗体处理。

心肌细胞加药培养 24 h 后,弃去培养基,用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 遍,加入适量的细胞裂解液,冰上裂解 30 min,用细胞刮刮下细胞,吸入到 1.5 ml 离心管中,4℃ 12 000 r/min 离心 20 min,小心吸取上层悬液,此即为细胞总蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度。行聚丙烯酰胺凝胶电泳后用 Western blot 法检测心肌细胞 TGF-β 蛋白的表达。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

各组细胞 TGF-β 的表达情况采用 GAPDH 为内参,以 TGF-β 与 GAPDH 灰度比值为统计量,所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;应用 SPSS13.0 统计软件包进行数据分析,用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较各组间均数差异, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

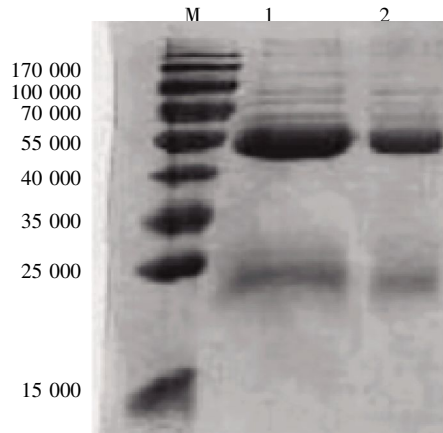
2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

细胞融合后经 HAT 培养液筛选以及间接 ELISA 检测,取上清效价最高的细胞株采用有限稀释法单克隆化 3 次。杂交瘤细胞株经培养 14 周后仍能稳定分泌单克隆抗体,且经液氮冻存、复苏后,此细胞株仍能稳定分泌特异性抗 mCRP 抗体。

2.2 单抗的纯化

小鼠腹腔接种分泌 mCRP 单抗的杂交瘤细胞后共获得 15 ml 腹水,采用 Protein G 亲和层析法提取纯度较纯、活性较好的 mCRP 抗体,进行 SDS-PAGE (图 1)。



M: 分子量标准; 1、2 为纯化后的 mCRP 抗体 (样品经过还原, 上样量为 30 μg/孔)。

图 1 SDS-PAGE 检测纯化的 mCRP 抗体

Figure 1 SDS-PAGE analysis of purified anti-mCRP McAb

2.3 单抗的鉴定

抗体的效价测定结果见图 2, 表明所制备的 mCRP 抗体与 mCRP 蛋白有较好的亲和力。Western blot 结果显示所纯化的 mCRP 抗体能与 mCRP 蛋白特异性结合, 在 23 000 处出现目的条带, 与 mCRP 蛋白的预期大小相符 (图 3)。

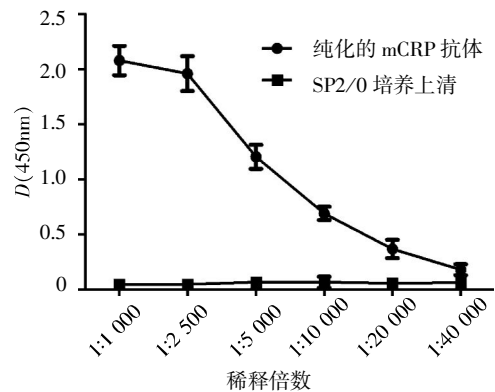
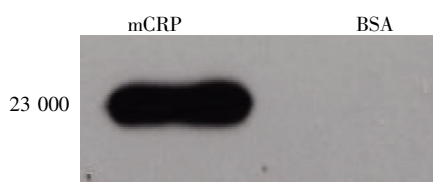


图 2 抗 mCRP 抗体效价的检测

Figure 2 The detection of anti-mCRP McAbs



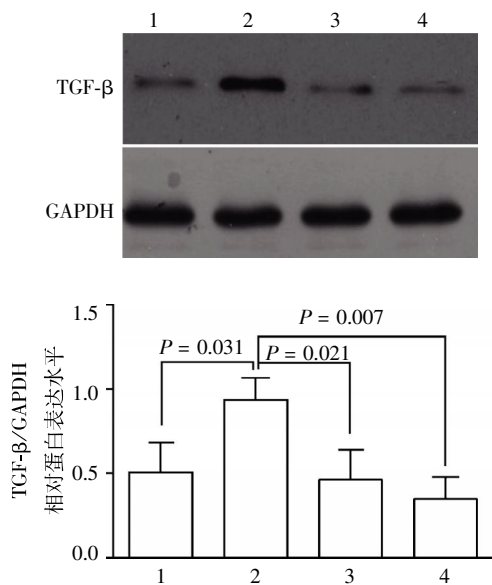
mCRP 为纯化的抗原;BSA 为空白对照组。

图 3 Western blot 检测 McAb 抗体的特异性

Figure 3 The specificity of McAb analyzed by Western blot

2.4 抗 mCRP 单抗对体外培养的乳鼠心肌细胞 TGF- β 表达的影响

与正常对照组心肌细胞相比,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 mCRP 干预培养乳鼠心肌细胞 24 h 后,细胞 TGF- β 表达水平明显升高($P = 0.031$);而给予 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 mCRP 抗体干预后,与单独 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mCRP 蛋白干预相比,即可见心肌细胞的 TGF- β 表达水平显著降低($P = 0.021$,图 4)。



1: 对照组;2:20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 mCRP 干预 24 h;3:20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 mCRP+50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 mCRP 抗体干预 24 h;4:50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 mCRP 抗体干预 24 h。

图 4 Western blot 检测 McAb 对 mCRP 刺激的乳鼠心肌细胞 TGF- β 表达的影响。

Figure 4 Effects of mCRP on the TGF- β protein expression in neonatal cardiac myocytes by Western blot

3 讨论

炎症参与了冠状动脉粥样硬化性心脏病发生发展的整个过程。研究表明,在所有的炎症及细胞因子中,CRP 是预测未来心血管风险最有力的炎症标志物。研究表明 CRP 不仅是冠状动脉粥样硬化性心脏病发生的预测因子,而且直接参与了冠心病的发

生、发展^[7]。

CRP 可以损伤动脉内皮细胞,促使动脉内皮细胞分泌和释放 IL-1 β 、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 和 TGF- β 等炎症介质,加速动脉粥样硬化进程^[8-9],同时可以加速损伤心肌细胞的凋亡^[10],而现有最新研究发现,在这一过程中,CRP 五聚体向 mCRP 的转化对于 CRP 发挥致动脉粥样硬化及致心肌损伤作用尤为关键^[11]。在 CRP 五聚体向 mCRP 的转化过程中,包裹在 CRP 五聚体内部的 C 端八肽氨基酸暴露形成新的抗原结合位点,该抗原表位为 mCRP 所独有^[12]。因此,根据 mCRP 不同于五聚体 CRP 的这一特征,在研究中采用化学合成的方法人工合成了 CRP C 端八肽氨基酸,并将其与 BSA 蛋白偶联形成抗原分子,以此小分子肽为抗原免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合,经反复筛选和单克隆化后得到了一株可以稳定分泌抗 mCRP 的单克隆抗体细胞株。本研究采用 ELISA 与 Western blot 方法证实所制备的 mCRP 单克隆抗体可以特异性识别 mCRP 分子,并且与 mCRP 分子具有很高的亲和力,这为下一步更好的研究 mCRP 的生物学作用提供了基础。

TGF- β 是由多种细胞分泌的一类具有广泛生物学效应的生长因子,具有广泛的生物学作用。现已明确,TGF- β 与细胞外基质沉积的关系最密切,TGF- β 及其下游相关信号通路的活化是心肌纤维化、心肌重构的重要原因^[13]。本研究中首次发现,mCRP 可以导致心肌细胞 TGF- β 表达水平明显升高,而心肌细胞 TGF- β 水平的升高不但可以通过旁分泌作用导致心肌纤维细胞转化为肌成纤维细胞,促进心肌纤维化进程,还可以通过自分泌作用于心肌细胞自身促进心肌重构^[14]。由于 mCRP 形成多出现于心肌缺血缺氧情况,而且最新研究也发现在急性心肌梗死患者外周血中可以检测到 mCRP 的存在^[15],因此,推测 mCRP 可能是急性心肌梗死后心肌纤维化重构的一个重要因素。而本研究发现,通过单克隆抗体制备方法得到的 mCRP 单抗具有中和作用,它可以对抗 mCRP 导致的心肌细胞 TGF- β 的升高,这一研究结果提示本实验制备的 mCRP 单抗可用于心肌梗死后心肌纤维化、重构的治疗。当然,mCRP 损伤心肌细胞的具体作用机制及 mCRP 单抗的保护作用有待进一步研究。

综上所述,本研究通过经典的单克隆抗体制备方法获得了 1 株具有生物学活性和较高亲和力的单克隆抗体,该抗体可以对抗 mCRP 所致的心肌损伤

作用,这为今后 mCRP 的研究提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] Rothenbacher D, Kleiner A, Koenig W, et al. Relationship between inflammatory cytokines and uric acid levels with adverse cardiovascular outcomes in patients with stable coronary heart disease[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45907
- [2] Yang J, Wang J, Zhu S, et al. C-reactive protein augments hypoxia-induced apoptosis through mitochondrion-dependent pathway in cardiac myocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 310(1-2): 215-226
- [3] Eisenhardt SU, Habersberger J, Murphy A, et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques[J]. *Circ Res*, 2009, 105(2): 128-137
- [4] Liu XJ, Feng XM, Tang Q, et al. Characterization and potential diagnostic application of monoclonal antibodies specific to rabies virus[J]. *JBR*, 2010, 24(5): 395-403
- [5] Schwedler SB, Amann K, Wernicke K, et al. Native C-reactive protein increase whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice[J]. *Circulation*, 2005, 112(7): 1016-1023
- [6] Liu J, Wang J, Chen X, et al. Ginkgo biloba extract EGB761 protects against aging-associated diastolic dysfunction in cardiomyocytes of D-galactose-induced aging rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 418748
- [7] Hingorani AD, Shah T, Casas JP, et al. C-reactive protein and coronary heart disease: predictive test or therapeutic target?[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(2): 239-255
- [8] Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, et al. C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction[J]. *Circ Res*, 2004, 95(9): 877-883
- [9] Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2004, 109(17): 2058-2067
- [10] 刘剑南, 陈相健, 戴健, 等. C-反应蛋白对体外培养大鼠心肌细胞的影响[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(21): 76-78
- [11] Wang MS, Black JC, Knowles MK, et al. C-reactive protein (CRP) aptamer binds to monomeric but not pentameric form of CRP[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(4): 1309-1318
- [12] Ying SC, Gewurz H, Kinoshita CM, et al. Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies[J]. *J Immunol*, 1989, 143(1): 221-228
- [13] Wang XF, Zhang JY, Li L, et al. Beneficial effects of metformin on primary cardiomyocytes via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase [J]. *Chin Med J*, 2011, 124(12): 1876-1884
- [14] Montalvo C, Villar AV, Merino D, et al. Androgens contribute to sex difference in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF- β [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35635
- [15] Habersberger J, Strang F, Scheichl A, et al. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(1): 64-72

[收稿日期] 2012-11-07