

• 论 著 •

膜结合型抗大鼠 FcεRIα 单克隆抗体制备及活性鉴定

李 莉¹, 李先兴², 徐银海³, 张玲珍¹, 孔宪涛¹, 仲人前^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 长征医院器官移植中心; 3. 徐州医学院附属医院检验科, 徐州 220114)

[摘要] **目的:**建立抗鼠 FcεRI 单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb), 为靶向诱导肥大细胞凋亡创造条件。**方法:**大鼠嗜碱性粒细胞细胞系 RBL-2H3 免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, ELISA 筛选鼠血清和融合细胞产生的抗体, 有限稀释克隆化培养。SDS-PAGE 胶电泳、免疫扩散鉴定抗体性质, IgE 竞争结合、组胺释放检测抗体生物活性, ¹²⁵I-细胞膜抗体复合物免疫沉淀放射自显影鉴定抗体识别抗原成分。**结果:**获得 2 株抗 FcεRIα McAb 生产细胞株 ER-E5.3、ER-C7.4, 均为 IgG1。培养上清和小鼠腹水获得的抗体效价均大于 10⁻⁵。流式细胞术分析抗体与 RBL-2H3 结合率均大于 95%, 与大鼠胸腺细胞和外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)无交叉反应, 并能竞争性抑制 IgE 与肥大细胞结合。抗体触发 RBL-2H3 脱颗粒, 组胺释放效应与抗原特异性 IgE 对肥大细胞的激活效应相同。酶切的 Fab 片段能与 RBL-2H3 结合, 也能竞争性抑制 IgE 与肥大细胞的结合, 但不致 RBL-2H3 脱颗粒。抗体结合的细胞膜成分为 α 亚单位。**结论:**大鼠肥大细胞免疫小鼠与骨髓瘤细胞融合得到 2 株抗体产生杂交瘤克隆 ER-E5.3 和 ER-C7.4, 抗体效价和功能活性达到了实验要求, 抗原识别成分为膜 FcεRIα。

[关键词] FcεRIα; 抗体, 单克隆; 肥大细胞

[中图分类号] R 392.11

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1303-04

Preparation of membrane binding monoclonal antibody anti rat FcεRIα and detection of its activity

LI Li¹, LI Xian-Xing², XU Yin-Hai³, ZHANG Ling-Zhen¹, KONG Xian-Tao¹, ZHONG Ren-Qian^{1*} (1. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Institute of Organ Transplantation, Changzheng Hospital; 3. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 220114)

[ABSTRACT] **Objective:** To induce the mast cell apoptosis by specifically targeting the monoclonal antibody (mAb) against FcεRIα. **Methods:** Splenocytes of BALB/c mice immunized with rat basophilic leukemia cells line RBL-2H3 were fused with myeloma cells line SP2/0. ELISA assay was used to screen antibody secreting from mouse sera and fused cells. Hybridoma cell lines were cloned by limiting dilution. The character and bioactivity of the antibodies were measured by immune electrophoresis on SDS-PAGE gel, immunodiffusion, competitive inhibition and histamine release. The antigen component was verified by analyzing the autoradiography of precipitation of immune complexes of ¹²⁵I-labeled RBL-2H3 and mAbs. **Results:** Two monoclonal antibody cell lines ER-E5.3 and ER-C7.4 were acquired. The antibodies were specifically against rat FcεRIα and all belonged to IgG1 subtype. The titrations of antibodies in supernatant and mouse ascites were higher than 10⁵. Flow cytometry (FCM) showed that the binding rate of antibodies to RBL-2H3 cells was over 95% but no cross-linked activity to rat thymus and peripheral blood lymphocytes (PBL) was detected. The antibodies prevented IgE bind to RBL-2H3 and the histamine release was equivalent to that of DNP-IgE triggered RBL-2H3. Fab prepared by papain-digestion of the whole antibody showed the same activity as whole antibody in self-binding and inhibiting IgE binding to RBL-2H3, but lost the ability to trigger histamine release. Immunoprecipitation and autoradiography demonstrated that the antibody was directly against membrane FcεRIα-subunit. **Conclusion:** Two hybridoma clones ER-E5.3 and ER-C7.4 have been obtained. The titration and activity of the 2 antibodies all meet the requirement for experimental study and the antigen can be specifically recognized by FcεRIα.

[KEY WORDS] FcεRIα; antibodies, monoclonal; mast cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1303-1306]

IgE 高亲和力受体(FcεRI)是由 α、β 和 2 条 γ 链构成的四聚体。α 亚单位为其结合部位, 其本身不需 β 和 γ 链的辅助即可完成与 IgE 的结合^[1]。抗 FcεRIα 单克隆抗体(McAb)是肥大细胞功能研究、IgE 及抗原活化肥大细胞信号转导以及变态反应病治疗研究的重要工具。但目前国际上没有商品化的

抗体供应, 国内也没有此抗体。为满足下一步课题研

[基金项目] 国家自然科学基金(30171200)。

[作者简介] 李 莉(1960-), 女(汉族), 博士, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: annyli38@hotmail.com

* Corresponding author, E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

究的需要,我们利用杂交瘤细胞融合技术,建立了抗大鼠 FcεRIα 单抗,并进行了活性鉴定。

1 材料和方法

1.1 抗原免疫 FcεRIα 高表达的大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞系 RBL-2H3(美国 Hana Smith 教授惠赠) 28×10^7 , γ 射线(3 000R)照射后,腹腔注射 BALB/c 小鼠(6 周龄,购自 The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)免疫 3 次。

1.2 抗体检测 用 ELISA 方法, RBL-2H3 细胞包被 96 孔 V 底板, 孵育过夜, 0.25% 戊二醛固定, 封闭后加待检小鼠血清或细胞培养上清, 二抗为抗小鼠 IgG-HRP(Santa Cruze), DAB-H₂O₂ 显色, 酶标仪读取 492 nm 光密度(D)。阳性对照为抗 FcεRIα 单抗(clone 5.14, Zelig Eshhar 教授惠赠), 小鼠无关抗体为阴性对照。另设同样处理的正常大鼠胸腺细胞和 PBL 对照。

1.3 细胞融合与筛选 取血清抗体滴度高的小鼠脾脏, 制备单个核细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0(ATCC)1:8 融合(50% PEG, MW 1000)。融合细胞以 HAT-RPMI 1640(GibcoBRL)选择培养。 γ 射线(3 000 R)照射的 C57/B 小鼠(6 周龄, 购自 The Jackson Laboratory)腹腔巨噬细胞为饲养细胞。HT 培养基筛选杂交瘤细胞克隆。阳性孔以有限稀释法进行克隆和亚克隆。

1.4 抗体和 Fab 片段纯化 单克隆阳性孔细胞培养后收上清, 细胞注射至小鼠腹腔获得腹水, 经 Sepharose CL-4B Protein G(Pharmacia Fine Chemical, USA)纯化。无血清培养基培养的杂交瘤细胞上清和腹水木瓜蛋白酶切 37℃ 15 h, 对 PBS 透析, 经 Protein A-Sepharose(Pharmacia Fine Chemical, USA)层析纯化。

1.5 抗体和 Fab 片段活性 FCM 检测 (1)与肥大细胞结合率: 不同比例稀释的细胞培养上清和 Fab 片段为一抗, 分别与 RBL-2H3 细胞、大鼠胸腺细胞和大鼠外周血共育 4℃ 45 min, 洗涤后加抗小鼠 IgG-FITC 4℃ 45 min; (2)与 IgE 竞争结合率: 同(1)将单抗、Fab 与 RBL-2H3 共育, 洗涤后加入大鼠 IgE(DNP 特异, B-D Biosciences, USA), 4℃ 2 h, 洗涤后加抗大鼠 IgE-FITC(B-D Biosciences, USA) 4℃ 45 min; 洗涤后 FCM(Epics-XL, Beckman-Coulter, USA)检测。分别以相同处理但无一抗为阴性对照; 阳性对照以大鼠 IgE 为一抗, 抗大鼠 IgE-FITC 为二抗。

1.6 抗体和 Fab 片段活性 ELISA 检测 结合活性检测同方法 1.2, 与一抗平行管设加 Fab 片段组; 竞争抑制活性检测时在一抗与细胞共育洗涤后, 加入大鼠 IgE, 4℃ 2 h, 再加抗 IgE-HRP。不加细胞培养上清, 仅加过量大鼠 IgE(600 μg)作为最大结合抑制率。

1.7 单抗类型鉴定 免疫双扩散鉴定 Ig 种类及亚类; 间接非竞争抑制 ELISA 检测抗体滴度。

1.8 抗体结合抗原成分鉴定 为确定单抗结合的 RBL-2H3 细胞成分, 将 RBL-2H3 细胞经半乳糖过氧化物酶碘化。¹²⁵I-半乳糖过氧化物酶标记的细胞(10^6)等量分至不同管中, 加入不同稀释度的杂交瘤细胞培养上清、Fab、IgE 和抗小鼠 CD3 单抗 500 μl/管, 4℃ 2 h, 离心弃上清, 沉淀细胞用 CHAPS(含 30 μg/ml Aprotinin, 200 μg/ml PMSF, 10 μg/ml leupeptin 和 10 μg/ml 10 Pepstatin, Sigma Aldrich, USA)裂解, 离心后上清与羊抗鼠 Ig-Staph A 复合物震荡孵育 18℃ 4 h。沉淀物以 10 mmol/L CHAPS 和 1.5 mol/L lipids 洗, 再溶于 2% SDS 10% 甘油 0.08 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液中, 煮沸 2 min。离心收上清, 10% SDS-PAGE 电泳, 放射自显影显示结果。

1.9 肥大细胞脱颗粒检测 用 ELISA 检测组胺释放(ELISA kit R&D, Systems Inc. USA)确定。(1)单抗的脱颗粒效应检测: 1×10^6 /ml RBL-2H3 细胞加入 96 孔酶标板, 100 μl/孔, 生长至对数期, 分别与两株细胞培养上清、Fab 和大鼠 IgE 孵育 37℃ 1 h; (2)抗原特异性 IgE 的脱颗粒效应检测: 如上处理的细胞中加入抗-DNP-IgE 1.5 μg/ml, 37℃ 孵育过夜, 加入 DNP-BSA 50 μl/孔(100 ng/ml), 37℃ 1 h; (1)、(2)完成后倒去板中液体, 洗 2 遍, 吸净, 加 200 μl/孔 pNPP 25℃ 350 r/min 震荡 30 min, 终止液终止, 酶标仪读取 D_{450} 值。标准液和对照液代替单抗和 Fab 分别作为标准绘制标准曲线和作为空白对照。1.5~1.9 各项检测均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 细胞融合与杂交瘤细胞筛选 融合细胞培养于 4 块 96 孔板, 240 孔中 208 孔有克隆生长, 融合率 87%, 其中抗体阳性 20 孔, 抗体阳性率 8.5%。筛选后得到 2 株克隆, ELISA 和 FCM 证实与 EBL-2H3 细胞的结合活性, 不与大鼠胸腺细胞和 PBL 结合(图 1)。能竞争抑制 IgE 与肥大细胞的结合, Fab 与两株单抗作用相同(图 2, 图 3)。抗体命名为 ER-E5.3 和 ER-C7.4。

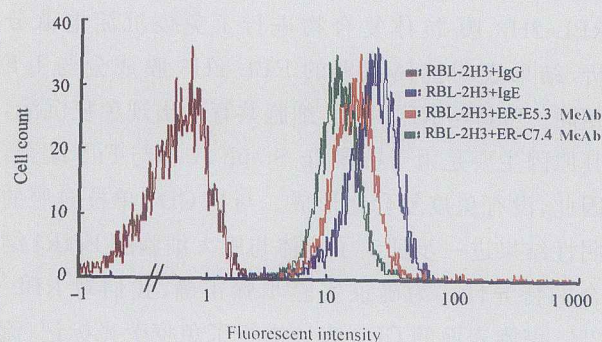


图1 FCM检测杂交瘤ER-E5.3H和ER-C7.4细胞培养上清与RBL-2H3细胞结合率

Fig 1 Binding rate of RBL-2H3 with supernatant of ER-E5.3 and ER-C7.4 detected by FCM

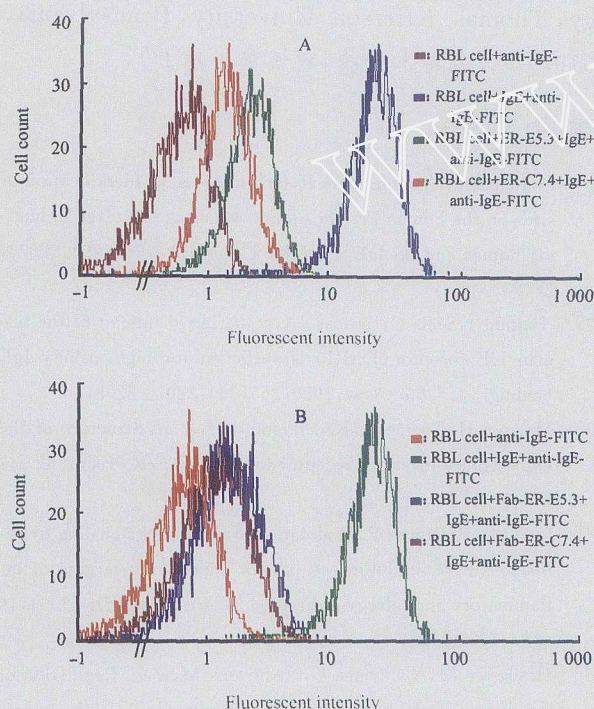


图2 单抗ER-E5.3和ER-C7.4细胞株培养上清(A)及其Fab片段(B)与IgE竞争结合RBL-2H3

Fig 2 Competition between IgE and supernatant(A), Fab fragments of ER-E5.3 and ER-C7.4 cell lines(B) in binding to RBL-2H3 cells

2.2 抗体类型 琼脂糖免疫双扩散示细胞培养上清与羊抗鼠IgG1亚类抗血清有明显沉淀线,与其他亚类抗血清无沉淀线,证明两株抗体均为IgG1亚类。

2.3 抗体识别位点 ^{125}I 标记肥大细胞膜后再与抗体结合形成的复合物经细胞裂解液裂解后的沉淀,与抗鼠Ig-Staph A结合,10% SDS-PAGE电泳,放射自显影结果显示(图4)沉淀形成的条带比较宽,上清、IgE和纯化抗体形成条带的位置基本一致,与

标准分子质量比较其相对分子质量在5 000~6 000之间,与国外文献报道的亲纯化获得的FcεRIα基本一致。Fab、抗鼠CD3单抗与 ^{125}I -肥大细胞膜结合沉淀成分无条带形成,表明抗体识别部位为肥大细胞的FcεRIα。

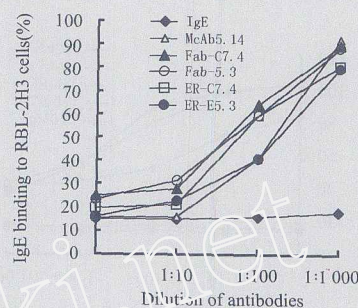


图3 ELISA检测单抗培养上清、Fab片段与IgE竞争结合RBL-2H3细胞

Fig 3 Inhibition of IgE binding to RBL-2H3 cells by supernatant of hybridoma cell lines, Fab fragments and McAb 5.14

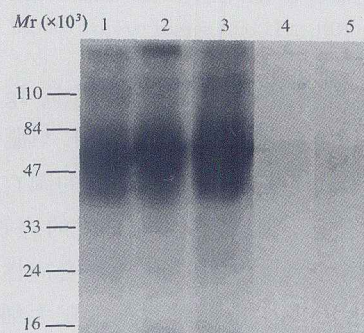


图4 ^{125}I -RBL-2H3-抗体复合物

免疫沉淀放射自显影检测抗体结合膜抗原成分

Fig 4 Autoradiography of McAbs recognized by electrophoresis of immunoprecipitation of

^{125}I -RBL-2H3-McAb complex on SDS-PAGE gel

1: ^{125}I -RBL-2H3-ER-E5.3; 2: ^{125}I -RBL-2H3-ER-C7.4;

3: IgE; 4: ^{125}I -RBL-2H3-Fab;

5: ER-E5.3 and ^{125}I -RBL-2H3-anti-CD3

2.4 抗体的生物学活性 ELISA方法检测了抗体与肥大细胞结合后的组胺释放。结果2株细胞培养上清的完整抗体均能引起肥大细胞脱颗粒,组胺释放效应与抗原特异性IgE引起的效应相同,Fab片段则无此作用(图5),证实抗体的活性和单一Fab仅有结合活性而不能触发活化。

3 讨论

肥大细胞活化的信号转导是由抗原特异性IgE或交联的IgE或抗FcεRI抗体与肥大细胞膜FcεRI结合^[1],经由α链识别后将活化信号经β和γ链转

导至肥大细胞,触发其脱颗粒,引起组胺等的释放^[2,3]。有关肥大细胞信号转导的研究历史很久,有关的机制、途径和蛋白质、基因已相对明确^[4~7]。FcεRI 与活化分子的结合是由 α 链独自完成的,α 链由胞外区、跨膜结构和胞内 3 部分构成,识别部位在膜外^[2,6,7]。

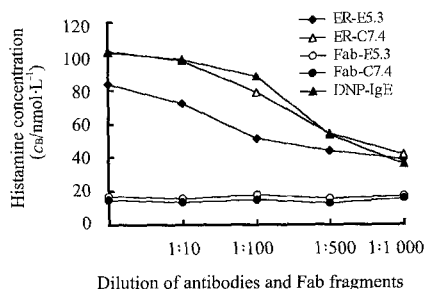


图 5 ELISA 检测抗体及其 Fab 与 RBL-2H3 细胞结合后的脱颗粒效应

Fig 5 Histamine release triggered by antibodies and Fab fragments after binding to RBL-2H3 with ELISA assay
DNP and DNP-IgE triggered histamine releasing by RBL-2H3 cells served positive control

国外与治疗相关的研究是以抗 IgE 或抗 α McAb 来封闭或抑制抗原特异性 IgE 与肥大细胞的结合^[8,9]。本实验室已证实肥大细胞的凋亡能够抑制和减低其对过敏原特异性 IgE 刺激的应答,是治疗变态反应甚至肥大细胞相关疾病如变应性皮炎等的理想手段。由抗 FcεRIα 抗体导向的肥大细胞凋亡诱导药物既能以最低剂量发挥最佳效果,又能将药物的毒性降至最低。与国外目前的研究目标比较,我们的方法摒除了抗体代谢和半衰期对疗效的影响,若干次诱导的凋亡最终将根本上消除肥大细胞等过敏反应效应细胞,有望根除变态反应病。

实验结果经过两次强化免疫和反复筛选得到的抗体与肥大细胞结合百分比和平均荧光强度与 IgE 无显著区别(图 1),细胞培养上清 1:50 稀释后与 RBL-2H3 细胞的结合率均>90%。ELISA 方法和 FCM 分析证实细胞培养上清和酶切后的 Fab 片段均表现出很好的对 IgE 与肥大细胞结合的竞争抑制活性(图 2,图 3),与小鼠胸腺细胞和外周血淋巴细胞对照显示了抗体很好的特异性。ELISA 检测培养上清稀释度达到 1:10⁴,纯化后抗体效价提高了 50 倍以上。两株抗体均为 IgG1。与肥大细胞结合后触发的组胺释放与抗原特异性 IgE 与肥大细胞结合后经抗原诱发的组胺释放相同(图 5)。为进一步明确抗体识别的肥大细胞成分,我们用放射性标记的

RBL-2H3 膜-抗体复合物进行了免疫沉淀电泳分析,结果表明抗体识别的 RBL-2H3 膜成分与 IgE 相同。Fab 与 RBL-2H3 细胞共育未出现免疫沉淀,其原因主要是由于抗鼠 Ig-Staph A 不与 Fab 结合,因此,没有免疫复合物形成。与抗 CD3 单抗对照的阴性结果进一步证实了抗体与肥大细胞膜 FcεRI 结合的特异性。为确证实验步骤正确,我们对 RBL-2H3 细胞表面的 CD3 表达进行了免疫荧光标记,流式细胞术分析结果证实 RBL-2H3 不表达 CD3 分子。

[致谢] 抗体制备和放射免疫部分在美国完成,得到 Catherin Calkins 教授(Department of Pathology, Thomas Jefferson University, Pennsylvania, 19107)多方指导和支持,致诚挚谢意!]

[参考文献]

- [1] Mallamaci MA, Chizzonite R, Griffin M, et al. Identification of sites on the human FcεRIα subunit which are involved in binding human and rat IgE[J]. *J Bio Chem*, 1993, 268(29):22076-22083.
- [2] Hakimi J, Seals C, Kondas JA, et al. The α subunit of the human IgE receptor (FcεRI) is sufficient for high affinity IgE binding[J]. *J Bio Chem*, 1990, 265(36):22079-22081.
- [3] Metzger H, Goetze A, Kanellopoulos J, et al. Structure of the high-affinity mast cell receptor for IgE[J]. *Fed Proc*, 1982, 41(1):8-11.
- [4] Luskova P, Draber P. Modulation of the FcεRI signaling by tyrosine kinase inhibitors: search for therapeutic targets of inflammatory and allergy diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(15):1727-17237.
- [5] Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, et al. Regulation of the human FcεRI alpha-chain distal promoter[J]. *J Immunol*, 2003, 170(7):3732-3738.
- [6] Donnadieu E, Jouvin MH, Rana S, et al. Competing functions encoded in the allergy-associated FcεRIα gene[J]. *Immunity*, 2003, 18(5):665-674.
- [7] Takahashi K, Nishiyama C, Ra C, et al. Transcriptional regulation of the human high affinity IgE receptor alpha-chain gene[J]. *Mol Immunol*, 2002, 38(16-18):1193-1199.
- [8] Hashiguchi S, Nakashima T, Nitani A, et al. Human FcεRIα specific human single-chain Fv(scFv) antibody with antagonistic activity toward IgE/FcεRIα binding[J]. *Biochem*, 2003, 133(11):43-49.
- [9] Bez C, Schubert R, Kopp M, et al. Effect of anti-immunoglobulin E on nasal inflammation in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis[J]. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(7):1079-1085.

[收稿日期] 2004-07-28

[修回日期] 2004-09-20

[本文编辑] 曹 静