

病。颗粒酶素 B 的高表达与关节炎症的加重相关^[9-10]。亦有研究^[11]发现,在穿孔素基因缺陷的小鼠中,胶原诱导的关节炎程度明显减轻。

本研究应用流式细胞技术系统地观察了颗粒酶素 B 和穿孔素在 RA 患者关节液、外周血的表达,结果发现穿孔素和颗粒酶素 B 在 RA 患者的外周血和关节液中均明显的高表达,与前人研究报道结果类似。这提示颗粒酶素 B 和穿孔素的高表达是参与 RA 发病的两个重要因素。为了更详细的观察穿孔素和颗粒酶素 B 在 RA 发病中的作用,本研究将患者分为活动期和非活动期,结果发现活动期 RA 患者外周血淋巴细胞表达穿孔素和颗粒酶素 B 要高于非活动期 RA 患者,这也说明穿孔素和颗粒酶素 B 参与疾病的进展。在初发和复发 RA 患者,外周血和关节液的淋巴细胞穿孔素和颗粒酶素 B 表达并没有显著的变化,提示淋巴细胞表达穿孔素和颗粒酶素 B 的变化和疾病是否复发可能没有直接的联系。

总之,RA 患者外周血及关节液中 CTL 细胞和 NK 细胞中穿孔素和颗粒酶素 B 呈高表达,提示其可能是参与 RA 发病和疾病进展的重要分子。

[参考文献]

- [1] Rukavina D, Laskarin G, Rubesa G, et al. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells[J]. *Blood*, 1998, 92: 2410-2420.
- [2] Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Tschopp J, et al. Demonstration of granzyme A and perforin messenger RNA in the synovium of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38: 477-484.
- [3] Blanco P, Pitard V, Viillard J F, et al. Increase in activated CD8⁺ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 201-211.
- [4] Prpic Massari L, Kastelan M, Gruber F, et al. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin-infiltrating cells in patients with lichen planus[J]. *Br J Dermatol*, 2004, 151: 433-439.
- [5] Arnold V, Balkow S, Staats R, et al. Increase in perforin-positive peripheral blood lymphocytes in extrinsic and intrinsic asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161: 182-186.
- [6] Tak P P, Spaeny-Dekking L, Kraan M C, et al. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA)[J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 116: 366-370.
- [7] Spaeny-Dekking E H, Hanna W L, Wolbink A M, et al. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 3610-3616.
- [8] Gulan G, Ravlic-Gulan J, Strbo N, et al. Systemic and local expression of perforin in lymphocyte subsets in acute and chronic rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2003, 30: 660-670.
- [9] Kraan M C, Haringman J J, Weedon H, et al. T cells, fibroblast-like synoviocytes, and granzyme B⁺ cytotoxic cells are associated with joint damage in patients with recent onset rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63: 483-488.
- [10] Goldbach-Mansky R, Suson S, Wesley R, et al. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64: 715-721.
- [11] Bauer K, Knipper A, Hoang T R, et al. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7: R877- R884.

[收稿日期] 2007-05-10

[修回日期] 2007-06-06

[本文编辑] 贾泽军

• 研究简报 •

B 型利尿钠肽单克隆抗体的制备

Preparation of monoclonal antibody against B-type natriuretic peptide

游晓华¹, 秦永文¹, 黄盛东², 龚德军², 袁 扬²

(1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433; 2. 长海医院胸心外科)

[关键词] 利尿钠肽; 单克隆抗体

[中图分类号] R 446.112

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2007)07-0742-02

B 型利尿钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)是一种由 32 个氨基酸构成的多肽类神经激素,主要来自于心室,作为一种心衰标志物在临床逐渐被接受。本研究拟以先前已制备的 TRX-BNP 融合蛋白作抗原,制备 BNP 单克隆抗体,为研制 BNP 单抗试剂盒作准备。

1 材料和方法

1.1 材料 抗原 TRX-BNP 系通过基因重组技术自行制

备^[1], Sp2/0 骨髓瘤细胞由本院胸外科实验室提供, BALB/c 小鼠购自长春生物制品研究所。完全及不完全弗氏佐剂、RPMI 1640 培养基购自 Sigma 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,聚乙二醇(PEG)购自 Merck 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自 Calbiochem 公司, MABTEST 试剂盒购自

[作者简介] 游晓华, 博士, 讲师、主治医师。

E-mail: youxiaohua@medmail.com.cn

晶美公司。超声粉碎仪由 Sonics&materials 公司生产, ELISA 仪由 BioTech 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 杂交瘤细胞株的建立 按照常规操作^[2],选取 7~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠,以 TRX-BNP 作抗原,经背部注射免疫,反复免疫 4 次,末次免疫 4 d 后,拉颈处死免疫小鼠,无菌摘取脾脏,经研磨冲洗,收集脾细胞悬液,锥虫蓝染料排斥法计数活的脾细胞数目。取 1×10^8 脾细胞与 2×10^7 Sp2/0 骨髓瘤细胞混匀,注入 50% 聚乙二醇(PEG),进行细胞融合。终止融合后,接种于含饲养细胞的 96 孔板孵育,至出现小克隆,克隆长至孔底面积的 $1/3 \sim 1/2$ 时取培养上清液,行抗体检测。

1.2.2 抗 BNP 单抗的检测 采用 ELISA 法测定。取对数生长期细胞系,用 0.25% 胰蛋白酶消化分散,制成细胞悬液,接种于 96 孔板,按操作常规,依次每孔加杂交瘤细胞培养上清液,加辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG,加新鲜配置的底物溶液,25℃ 暗处反应,以 H_2SO_4 终止反应,判定结果,阴性对照孔无色,阳性对照孔呈橙黄色。

1.2.3 克隆化培养 将杂交瘤细胞悬浮接种于含饲养细胞的培养板中孵育,10~14 d 取培养上清进行抗体检测,对阳性单克隆再克隆化培养,直到 100% 的克隆分泌特异性抗体。

1.2.4 单克隆抗体的大量制备 选用 BALB/c 雌性小鼠,腹腔接种杂交瘤细胞 7~12 d,可见小鼠腹部明显膨胀,消毒腹部皮肤,收集腹水,离心,-70℃ 保存待用。

1.2.5 BNP 单克隆抗体特异性鉴定 用 MABTEST 试剂盒测定抗体类型。用上述抗 BNP 抗体分泌杂交瘤细胞株的培养上清对表达的重组蛋白进行 Western 印迹检测。对人心肌 BNP 蛋白进行免疫组化鉴定,明确其与人心肌 BNP 蛋白结合的特异性。

2 结果

2.1 抗体效价检测结果 检测 Sp2/0 骨髓瘤细胞培养上清、腹水效价,血清作阴性对照,以 D 值 \geq 阴性对照平均 D 值 $\pm 2s$ 者为阳性标准,出现阳性的最高稀释倍数为该腹水或血清的效价。杂交瘤细胞的培养上清抗体效价为 $1:10^4$ 左右。腹水抗体效价为 $1:(10^7 \sim 10^8)$ 。

2.2 单克隆抗体 Ig 类型检测结果 经 MABTEST 试剂盒测定,杂交瘤细胞培养上清及腹水中的抗体均为 IgG 类。

2.3 单克隆抗体的特异性鉴定结果 Western 印迹结果显示,目的蛋白在相对分子质量为 21 000 处出现特异性显色条带,而对照组未见相应的表达条带(图 1)。

免疫组化结果显示所获目的抗体能特异性结合人心肌细胞中天然 BNP 蛋白,呈棕褐色阳性反应,而对照组阴性。

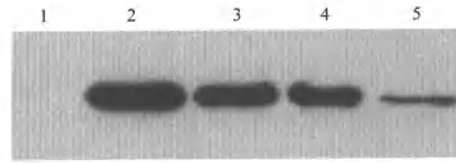


图 1 BNP 单抗 Western 印迹结果

1:细菌总蛋白;2~5:抗体稀释倍数分别为 100、200、400、800

3 讨论

1975 年 Kohler 和 Milstein 在细胞融合技术的基础上,首次成功地制备了能永久分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。目前,单克隆抗体已被广泛应用于各个医学领域^[3]。BNP 是 1988 年由日本学者 Sudoh 等^[4]最初由猪脑分离出来的,主要来自于心室,在心功能衰竭时大量分泌。检测血浆 BNP 浓度有助于对心功能程度的判断^[5]。另外,BNP 在心血管内外科其他疾病中的研究也越来越广泛^[6]。研制开发 BNP 试剂盒是近期的热点。由于目前已有的试剂盒主要依赖进口,检测标准及结果均不同。

为寻找一种快速、有效、经济的检测手段,本研究以先前已制备的 TRX-BNP 融合蛋白作抗原,利用单克隆抗体技术,制备了效价高、特异性好的 BNP 单克隆抗体,为研制 BNP 单抗试剂盒奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 游晓华,秦永文,黄盛东,等. 重组 TRX-BNP 融合蛋白的构建和表达[J]. 第二军医大学学报,2006,27:679-681.
- [2] 孙树汉. 核酸疫苗[M]. 上海:第二军医大学出版社,2000:50-150.
- [3] LaVallie E R, DiBlasio E A, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. Biotechnology,1993,11:187-193.
- [4] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain[J]. Nature,1988,332:78-81.
- [5] Hobbs R E. Using BNP to diagnose, manage, and treat heart failure[J]. Cleve Clin J Med,2003,70:333-336.
- [6] Ray S G. Natriuretic peptides in heart valve disease[J]. Heart, 2005,92:1194-1197.

[收稿日期] 2007-01-04

[修回日期] 2007-06-04

[本文编辑] 曹静