

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00900

人信号调节蛋白 α 单克隆抗体的制备及初步应用

唐 亮, 鄢和新, 刘 琼, 唐善花, 王红阳*

第二军医大学东方肝胆外科研究所信号转导实验室, 上海 200438

[摘要] **目的** 以合成的多肽制备人信号调节蛋白 α (SIRP α)的单克隆抗体(mAb),并初步应用于免疫学检测,评价其应用效果。**方法** 以合成多肽与载体 KLH 交联的偶联物为免疫原,免疫 BALB/c 小鼠,应用细胞融合技术建立能稳定分泌抗人 SIRP α 的杂交瘤细胞株。采用分泌的 mAb 进行流式细胞术、蛋白质印迹及免疫组化检测,观察检测结果;采用分泌的 mAb 刺激经豆蔻佛波醇乙酯(PMA)处理的 THP-1 细胞,抗体芯片检测分泌细胞因子水平的变化,ELISA 法验证其中 TNF- α 、IL-6 的水平变化。**结果** 成功获取可分泌抗人 SIRP α 的杂交瘤细胞,分泌的 mAb 应用于流式细胞术、蛋白质印迹及免疫组化检测,取得较好的效果;与阴性对照组和同型抗体对照组相比,制备的 mAb 能促进经 PMA 处理的 THP-1 细胞分泌 TNF- α 、IL-6 等细胞因子($P < 0.01$)。**结论** 利用合成多肽成功制备了高特异性抗人 SIRP α 的单克隆抗体。

[关键词] 合成多肽;单克隆抗体;信号调节蛋白 α ;THP-1

[中图分类号] R 392.116 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0900-04

Preparation and preliminary application of a novel monoclonal antibody against human SIRP α

TANG Liang, YAN He-xin, LIU Qiong, TANG Shan-hua, WANG Hong-yang*

International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] To prepare a monoclonal antibody against human SIRP α using synthetic peptide, and to use it for immune test to assess its efficacy. **Methods** The synthetic peptide of SIRP α was linked with KLH and the product was used as antigen for immunization of BALB/c mice. The mAb anti-SIRP α was obtained by hybridoma technique. The produced mAb was used for flow cytometry, Western blotting analysis and immunohistochemistry assay. Cytokines secreted by PMA-treated THP-1 cells were tested by antibody arrays after exposure to the obtained mAb, and the levels of TNF- α and IL-6 were assayed by ELISA. **Results** The mAb secreting hybridoma clone was successfully obtained and it had a satisfactory efficacy when used for flow cytometry, Western blotting analysis and immunohistochemistry assay. Compared with negative control and isotype control, the prepared mAb can stimulate TNF- α and IL-6 secretion in PMA-treated THP-1 cells. **Conclusion** We have successfully prepared the mAb against SIRP α using synthetic peptide.

[Key words] synthetic peptide; monoclonal antibodies; signal regulatory protein alpha; THP-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):900-903]

信号调节蛋白 α (SIRP α)属于免疫球蛋白超家族(IgSF)成员,是一种主要表达于髓系细胞的跨膜蛋白^[1]。SIRP α 胞外区含有3个IgSF结构域和多个糖基化位点^[2],其胞质区在大鼠、小鼠和人之间高度保守,带有2个免疫受体酪氨酸抑制基元(ITIMs,特征氨基酸序列为I/VxYxxL),其中包含4个酪氨酸残基。由于其特殊的细胞定位和结构,决定了其在不同细胞信号传递中发挥不同的功能。

SIRP α 主要分布在髓系组织(巨噬细胞、树突状细胞等),因此其在机体免疫调节中的作用成为目前研究的热点。在

免疫系统中 SIRP α 通过与 CD47 相互作用发挥负向调节作用^[3];但 SIRP α 抗体也可降低巨噬细胞分泌 TNF- α ^[4],提示 SIRP α 可能在天然免疫中又起到一定的正向调节作用。因此,本研究以人工合成的多肽为抗原,尝试制备出高效、特异的 SIRP α 单克隆抗体(mAb),并初步观察和评判 SIRP α 的相关功能,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 酶标仪(BioTek, Synergy 2),流式细胞仪(Beckman Coulter, MoFlo™ XDP),红外线激光扫描仪

[收稿日期] 2010-03-18 **[接受日期]** 2010-05-28

[基金项目] 国家自然科学基金(30871293),国家高技术研究发展计划(“863”计划,2007AA02Z166)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(30871293) and National Program for High Technology Research and Development of China(“863” Program, 2007AA02Z166)。

[作者简介] 唐 亮,主管技师。E-mail: tl1919@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.com

(LI-COR,Odyssey),细胞因子抗体芯片(120种细胞因子)(Raybiotech,AAH-CYT-1000),人TNF- α 、IL-6 ELISA Kit(达科维,DKW12-1720-096,DKW12-1060-096,中国),豆蔻佛波醇乙酯(PMA,Sigma,P1585)。雌性SPF级6周龄BALB/c小鼠购自第二军医大学实验动物中心。

1.2 抗原的合成与偶联 抗原多肽设计参考GenBank(GeneID:140885),具体序列为:RVTTVSESTKRENMDFSISISC,针对SIRP α 与CD47可能的结合区^[5],由百奇生物科技(上海)有限公司合成并纯化。多肽与匙孔贻血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin,KLH)的偶联采用戊二醛连接法^[6]完成。

1.3 单克隆抗体的制备、纯化及鉴定 纯化的多肽-KLH偶联物100 μ g以PBS稀释后与等体积完全弗氏佐剂(CFA)混匀乳化,免疫6周龄雌性BALB/c小鼠5只,双肩周围皮下注射和双后腿肌内注射,每个区域大约用1/8的免疫原,将剩余1/2的免疫原进行腹腔注射。1周后加强免疫50 μ g,CFA,腹腔注射。2周后加强免疫50 μ g,不完全弗氏佐剂(IFA),腹腔注射。3周及以后,每周直接腹腔注射50 μ g加强免疫。第5周起,每周尾静脉采血,ELISA测定效价;用多肽-KLH偶联物抗原1.25 μ g/ml包被,10%FCS封闭,血清稀释后加入,HRP标记的羊抗小鼠IgG作为二抗,OPD显色,酶标仪波长490 nm读数。取转染了人pcDNA3-SIRP α -4Y的稳定细胞系Huh-7/hSIRP α -4Y 1×10^6 细胞,重悬于100 μ l含1%BSA的PBS中,加入1 μ l血清4 $^{\circ}$ C作用30 min,PBS洗涤2次,重悬于100 μ l含1%BSA的PBS中,加入1 μ g PE标记的二抗4 $^{\circ}$ C作用20 min,PBS洗涤2次,重悬于500 μ l PBS中,流式细胞仪检测。最后1次加强免疫3 d后,取流式检测效果最好的小鼠脾细胞,与SP2/0细胞比例5:1在PEG1500的作用下融合,植入96孔板,37 $^{\circ}$ C、5%(体积分数)CO₂条件下培养。培养10 d后,镜下检测生长出克隆细胞孔为融合阳性孔。尽量选择单克隆细胞孔的上清进行ELISA检测。ELISA阳性的克隆用流式细胞术检测Huh-7/hSIRP α -4Y细胞,筛选出的克隆亚克隆2次,采用流式检测效果最好的克隆,即92CT57.39.3。6~8周龄的雌性BALB/c小鼠用石蜡油腹腔注射10 d后,取杂交瘤细胞以 2×10^6 细胞/只腹腔注射。7~14 d后从小鼠腹腔抽出富含抗体的腹水进行检测和纯化。纯化采用Protein G亲和层析法^[7]。单克隆抗体类型的鉴定:利用小鼠单克隆抗体的Ig类与亚类特异性抗体进行ELISA检测。

1.4 应用单克隆抗体进行蛋白质印迹检测 Huh-7/hSIRP α -4Y及Jurkat细胞(本室保存)的蛋白裂解物进行SDS-PAGE;电转至硝酸纤维素膜;含5%BSA的TBST封闭1 h,TBST洗1次,5 min;含5%BSA的TBST稀释抗SIRP α 单克隆抗体(1 μ g/ml),孵育2 h,TBST洗3次,每次5 min;含5%BSA的TBST稀释IR-800标记的抗小鼠二抗(0.1 μ g/ml),孵育1 h,TBST洗4次,每次5 min;用红外线激光扫描仪Odyssey扫描。

1.5 应用单克隆抗体进行免疫组化检测 本院肝细胞癌手术标本石蜡切片置60 $^{\circ}$ C恒温箱烘烤20 min,脱蜡至水;3% H₂O₂(溶于80%甲醇)室温10 min灭活内源性过氧化物酶,

PBS洗3次各5 min;0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)高压修复抗原,PBS洗3次各5 min;山羊血清封闭,室温20 min,甩去多余液体;滴加以抗体稀释液稀释的抗SIRP α 单克隆抗体92CT57.39.3(10 μ g/ml),室温孵育2 h,PBS洗3次各5 min;滴加HRP标记的二抗50 μ l,室温孵育1 h,PBS洗3次各5 min;DAB显色5~10 min,在显微镜下掌握染色程度,PBS洗3次各5 min;苏木精复染2 min,盐酸乙醇分化,自来水冲洗10~15 min;脱水、透明、封片、拍照。

1.6 单克隆抗体对THP-1细胞的作用观察 12孔板每孔 4×10^5 个THP-1细胞(本室保存),培养基含100 ng/ml的PMA,24 h后换成普通培养基,继续培养48 h,重新换成普通培养基^[8],加入相应抗体至20 μ g/ml,6 h后收集上清,进行细胞因子抗体芯片检测。ELISA法验证其中TNF- α 、IL-6的浓度。

1.7 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各指标均数采用单因素方差分析,均数间两两比较采用SNK-*q*检验,以 $\alpha=0.05$ (双尾)为检验水准。所有数据均进行方差齐性检验。

2 结果

2.1 SIRP α mAb杂交瘤细胞系的建立 使用PEG1500对免疫后小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0融合,第5天开始出现融合细胞。经ELISA检测,凡D₄₉₀值大于阴性对照(Sp2/0细胞培养上清)2倍以上者,初步判定为阳性克隆。经多肽-KLH偶联物特异性间接ELISA筛选,获得7个阳性融合细胞孔。对7个阳性孔再进行流式细胞术鉴定筛选仅有1个融合细胞孔上清为阳性。后经2次亚克隆筛选得到1个克隆92CT57.39.3。

2.2 SIRP α mAb类型鉴定及流式检测结果 用Ig类与亚类特异性抗体进行ELISA检测,结果表明单克隆抗体92CT57.39.3的重链为IgG1型,轻链为 κ 链。流式细胞术检测结果(图1)表明,相较于对照同型抗体,单克隆抗体92CT57.39.3能特异性地结合于Huh-7/hSIRP α -4Y细胞,而对照则没有结合。

2.3 SIRP α mAb蛋白质印迹及免疫组化检测结果 蛋白质印迹结果(图2)表明单克隆抗体92CT57.39.3能较为特异地识别SIRP α 分子。免疫组化检测结果(图3)表明单克隆抗体92CT57.39.3能较特异地识别SIRP α 分子。

2.4 SIRP α mAb促进THP-1分泌TNF- α 、IL-6细胞因子抗体芯片结果(图4)表明,单克隆抗体92CT57.39.3能促进THP-1分泌某些细胞因子,数据经标准化后最明显的是IL-6、TNF- α 等,升高至1.5倍以上者7种,降低至0.67倍以下者15种。ELISA验证(图5)显示,与阴性对照组[(1.19 \pm 0.03) ng/ml]和同型抗体对照组[(1.25 \pm 0.06) ng/ml]比,单克隆抗体92CT57.39.3能促进THP-1细胞分泌TNF- α [(6.11 \pm 0.19) ng/ml];IL-6也由(36.57 \pm 12.80) pg/ml和(32.00 \pm 2.38) pg/ml增加至(93.83 \pm 5.30) pg/ml。单因素方差分析显示三组间差异有统计学意义,进一步经SNK-*q*检验进行两两比较,实验组与两对照组差异均有统计学意义($P < 0.01$),而两对照组间差异则无统计学意义。

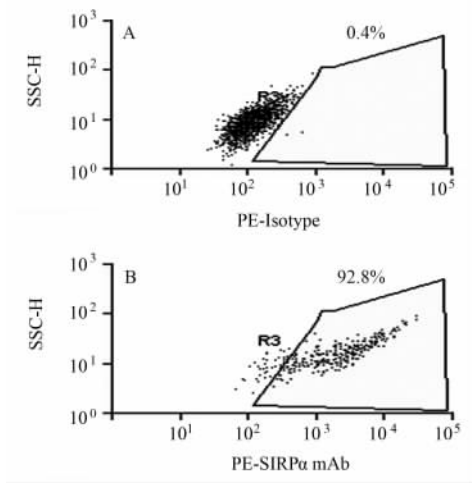


图 1 SIRP α mAb 用于流式细胞术检测 Huh-7/hSIRP α -4Y 细胞

Fig 1 Flow cytometry assay using SIRP α mAb on Huh-7/hSIRP α -4Y cells

A: Isotype control; B: SIRP α mAb clone 92CT57.39.3

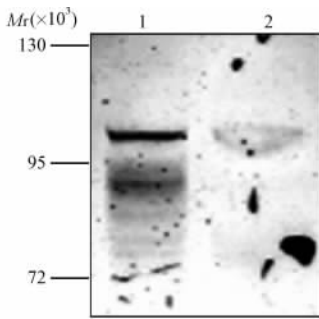


图 2 应用 SIRP α mAb 进行蛋白质印迹检测

Fig 2 Western blotting analysis using SIRP α mAb

1: Huh-7/hSIRP α -4Y cell total lysate; 2: Jurkat cell total lysate

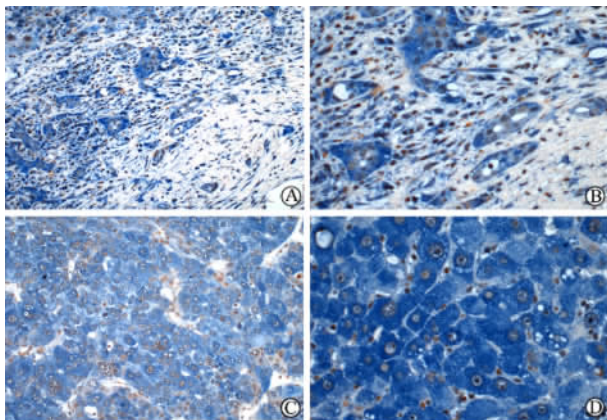


图 3 应用 SIRP α mAb 进行免疫组化检测

Fig 3 Immunohistochemistry staining using SIRP α mAb

A: Hepatocellular carcinoma tissue; B: Hepatocellular carcinoma tissue; C: Corresponding paracancerous tissue; D: Corresponding paracancerous tissue. Original magnification: $\times 100$ (A,C), $\times 200$ (B,D)

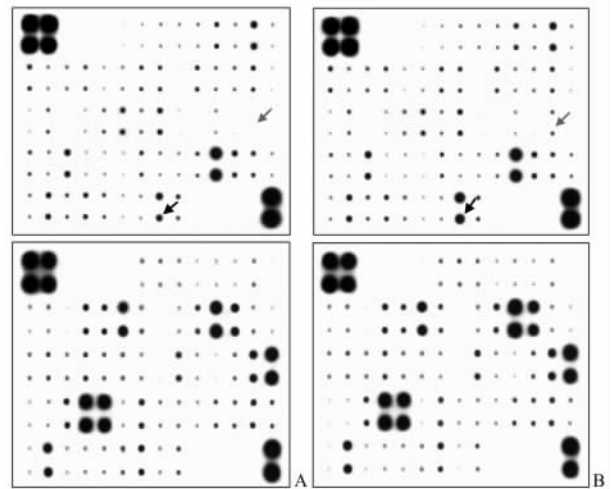


图 4 THP-1 上清的细胞因子抗体芯片检测结果

Fig 4 Cytokine chip assay with THP-1 supernatant

A: Treated with isotype control; B: Treated with SIRP (mAb clone 92CT57.39.3). Black arrows: TNF- α ; Gray arrows: IL-6

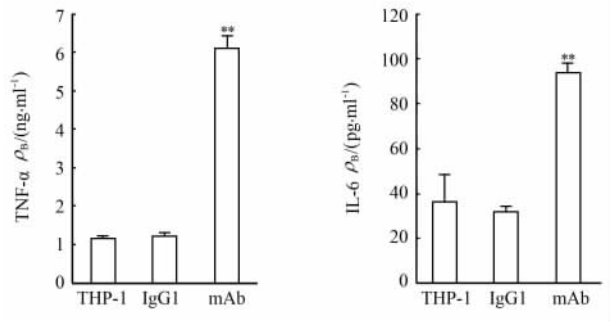


图 5 ELISA 法检测 THP-1 细胞上清 TNF- α 、IL-6 水平

Fig 5 TNF- α and IL-6 concentrations in THP-1 supernatant as determined by ELISA

THP-1: THP-1 supernatant; IgG1: Treated with isotype control; mAb: Treated with SIRP α mAb clone 92CT57.39.3. * * $P < 0.01$ vs IgG1 or THP-1

3 讨论

单克隆抗体在疾病的诊断和治疗中已有大量应用。诊断方面如淋巴细胞鉴别、病原体鉴别(palivizumab^[9])、肿瘤诊断和分型(用于结肠癌的 votomab 和 arcilumonab,用于探测感染部位的 sulemab,用于卵巢癌的 igovomab 和用于黑素瘤的 tecnemab K-1 等^[10])和测定体内激素含量^[11]等。治疗方面也有防治异物排斥反应(orthoclone OKT3^[12])、治疗类风湿性关节炎(adalimumab、etanercept、infliximab)^[13-15]、治疗复发的低度滤泡型非霍奇金淋巴瘤(rituximab^[16])和降低血管成形术高危患者缺血性并发症发生率(abciximab^[17])等。一方面,作为医学检验试剂,单克隆抗体充分发挥其优势,由于其特异性强,可将抗原抗体反应的特异性大大提高,减少了可能存在的交叉反应,使实验结果可信度加大,而单克隆抗体的均一性和生物活性一致性使抗原抗体反应结果也便于

质量控制,利于标准化和规范化。另一方面,由于抗体与特异蛋白结合,也可用于蛋白功能的探索,因为其使用方便,且结果稳定,在难以转染的原代细胞的研究中占有重要地位。

本研究首先检测了 SIRP α mAb 的特异性。流式细胞术、蛋白质印迹和免疫组化检测结果都显示该单抗能与 SIRP α 特异结合,能很好地用于 SIRP α 的检测。由于 SIRP α mAb 能很好地与 SIRP α 结合,我们进一步研究了单抗结合对 SIRP α 信号通路的影响。SIRP α mAb 与 SIRP α 相结合可抑制 TNF- α 的合成和分泌^[4],这种抑制作用是通过促进 SIRP α 胞内区酪氨酸磷酸化,启动 SIRP α 抑制性信号通路来实现的。本研究中,通过细胞因子芯片检测和 ELISA 检测证实:其与单抗的结合促进了 TNF- α 和 IL-6 的分泌。由于两实验结果是建立在不同单克隆抗体株的情况下,我们认为本研究用单抗可能抑制了 SIRP α 胞内区酪氨酸磷酸化,进而抑制了 SIRP α 负向信号通路,促进了 TNF- α 和 IL-6 的分泌。SIRP α -CD47 是巨噬细胞与其他物种之间最重要的识别标志^[18],针对其结合位点的抗体可能影响 SIRP α -CD47 的功能,进而改变巨噬细胞的功能。本研究设计合成的多肽针对两者可能的结合位点,但得到的单克隆抗体多数(6/7)不能用于流式细胞术检测,而 92CT57.39.3 虽能进行流式细胞术和蛋白质印迹检测,也能影响巨噬细胞 THP-1 的 TNF- α 和 IL-6 分泌,但不能阻断 SIRP α -CD47 的结合(数据未显示)。所以我们推测:除了 CD47, SIRP α 还存在其他配体,这种胞外配体的功能也可能刺激 SIRP α 的负向信号,抑制 TNF- α 和 IL-6 的分泌,具体情况还需后续研究。

TNF- α 和 IL-6 是重要的炎症因子,在机体免疫反应中起着重要作用。92CT57.39.3 能促进 THP-1 细胞分泌 TNF- α 和 IL-6,与 Smith 等^[4] 研究结果相反,这可能与两者制备时的抗原不同、识别的表位不同有关。在免疫反应低下人群和一些免疫缺陷患者中,往往不能很好地诱发机体急慢性免疫反应。本研究制备的单克隆抗体能刺激巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-6,利用这一特点,单克隆抗体 92CT57.39.3 可能在激活巨噬细胞,增强其对肿瘤、微生物的免疫功能方面具有积极作用,在治疗免疫反应低下和 TNF- α 与 IL-6 缺乏疾病中可能具有一定应用前景。

[参考文献]

- [1] Yamao T, Matozaki T, Amano K, Matsuda Y, Takahashi N, Ochi F, et al. Mouse and human SHPS-1: molecular cloning of cDNAs and chromosomal localization of genes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231: 61-67.
- [2] Kharitonov A, Chen Z, Sures I, Wang H, Schilling J, Ullrich A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors[J]. *Nature*, 1997, 386: 181-186.
- [3] Vernon-Wilson E F, Kee W J, Willis A C, Barclay A N, Sim-

mons D L, Brown M H. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1[J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 2130-2137.

- [4] Smith R E, Patel V, Seatter S D, Deehan M R, Brown M H, Brooke G P, et al. A novel MyD-1 (SIRP-1alpha) signaling pathway that inhibits LPS-induced TNFalpha production by monocytes[J]. *Blood*, 2003, 102: 2532-2540.
- [5] Hatherley D, Harlos K, Dunlop D C, Stuart D I, Barclay A N. The structure of the macrophage signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) inhibitory receptor reveals a binding face reminiscent of that used by T cell receptors[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 14567-14575.
- [6] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 金冬雁,黎孟枫译.北京:科学出版社,1999,856.
- [7] 白丽, Dent L. 应用 Protein G 纯化细胞培养上清中的大鼠单抗[J]. *免疫学杂志*, 1999, 15: 207-209.
- [8] Park E K, Jung H S, Yang H I, Yoo M C, Kim C, Kim K S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli[J]. *Inflamm Res*, 2007, 56: 45-50.
- [9] Groothuis J R, Nishida H. Prevention of respiratory syncytial virus infections in high-risk infants by monoclonal antibody (palivizumab)[J]. *Pediatr Int*, 2002, 44: 235-241.
- [10] Breedveld F C. Therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Lancet*, 2000, 355: 735-740.
- [11] 崔银珠,李以欣. 单克隆抗体的临床应用[J]. *国外医药*, 2001, 22: 5-7.
- [12] Sgro C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review[J]. *Toxicology*, 1995, 105: 23-29.
- [13] Goldblatt F, Isenberg D A. New therapies for rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 140: 195-204.
- [14] Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine M D, Kaveri S V. Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action[J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3: 262-272.
- [15] Adalimumab; new preparation. Rheumatoid arthritis; no therapeutic advance[J]. *Prescrire Int*, 2004, 13: 171-175.
- [16] Ludwig D L, Pereira D S, Zhu Z, Hicklin D J, Bohlen P. Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 9097-9106.
- [17] Kopp C W, Steiner S, Nasel C, Seidinger D, Mlekusch I, Lang W, et al. Abciximab reduces monocyte tissue factor in carotid angioplasty and stenting[J]. *Stroke*, 2003, 34: 2560-2567.
- [18] Takenaka K, Prasolava T K, Wang J C, Mortin-Toth S M, Khalouei S, Gan O I, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8: 1313-1323.

[本文编辑] 贾泽军