

抗 CD28 分子单克隆抗体的制备及其免疫学特性

刘晶 魏文青 赵满仓 张艳 杨梦迪

摘要 :目的 制备抗人 CD28 单克隆抗体 ,对其免疫学特性进行分析。方法 利用多肽技术合成的 CD28 抗原免疫 BALb/c 小鼠 ,应用细胞杂交技术 ,获得抗 CD28 的单克隆抗体 ,并对其免疫学特性进行了分析。结果 经过融合、亚克隆成功获得了 9 株抗人 CD28 的杂交瘤细胞株 ,均为 IgG ,4 株为 IgG2a ,5 株为 IgG2b。利用竞争抑制实验分别对其中的 5 株进行了抗原位点测定 ,5 株分别针对三个不同的抗原位点。结论 此单抗细胞株的建立 ,对于深入研究 CD28 单抗对 T 淋巴细胞的作用机理有重要意义。

关键词 :CD28 ;McAb ;T 淋巴细胞 ;免疫学特性

中图分类号 :R392.11 文献标识码 :A 文章编号 :1009-9727(2012)2-182-03

Preparation and immunologic identification of the monoclonal antibodies to human CD28. LIU Jing ,WEI Wen-qing ,ZHAO Man-cang et al.(Department of Central Laboratory General Hospital of Beijing Military Command Beijing 100700 P. R. China)

Abstract :Objective To prepare the monoclonal antibody against human CD28 and analyse its immunological characteristics. Methods The human CD28 was synthesized by the FMOC solid-phase organic chemical method ,then the compound antigen was immunized the BLAB/c mice to prepare the anti-CD28 monoclonal antibody ,whose immunological characteristics were analyzed. Results After cell fusion and sub cloning ,9 hybridoma cell lines were obtained ,all of them were IgG subtypes ,4 lines belonged to IgG2a ,5 lines belonged to IgG2b. Five stains were chosen for anlysis of the antigenic determinant by competitive inhibition test ,the results showed that the five cell lines against three different antigenic sites. Conclusion The preparation of the CD28- McAb might provide the important foundation for further study of the mechanism of CD28- McAb acting on T lymphocyte.

Key words :CD28 ;McAb ;T lymphocyte

近年来人们致力于将诱导活化的 T 淋巴细胞用于过继免疫治疗。通常用 CD3 抗体体外激活 T 淋巴细胞 ,将 CD8、CD25 杀伤性 T 淋巴细胞回输治疗恶性肿瘤和病毒感染的患者^[1]。T 淋巴细胞的活化需要 TCR/CD3 识别 APC 表面的 MHC- 肽复合物提供的第一信号以及 CD28/B7 等协同刺激分子提供的第二信号^[2]共同作用。研究表明 ,如果 T 淋巴细胞在接受第一信号之后 ,不能接收第二信号的刺激 ,则 T 淋巴细胞的反应性和增殖活性都将迅速的下降 ,所以利用 CD3 抗体在体外激活 T 淋巴细胞的同时 ,迅速提供第二信号的刺激是非常重要的。T 淋巴细胞表面的协同刺激分子 CD28 与其配体 B7 的相互作用是为 T 淋巴细胞活化提供第二信号的主要途径之一^[3-5]。为此 ,我们利用合成的 CD28 抗原免疫 BALb/c 小鼠 ,制备出抗 CD28 的 McAb ,并对免疫学特性进行了分析 ,经初步观察发现 ,此抗体具有较强的增强和活化 T 淋巴细胞的功能。

1 材料与方 法

1.1 材料 BALb/c 小鼠 ,8 周龄 ,购自中国医学科学院动物繁育中心 ,SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞 ,由军事医学

科学院五所惠赠。CD28 抗原、弗氏佐剂、HRP- 羊抗鼠 IgG、抗体亚类鉴定试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司 ;HRP、美国 Sigma 公司 ;DMEM 培养基 ,美国 Gibico 公司。PEG4000、氨甲蝶呤、胸腺嘧啶核苷、次黄嘌呤、胎牛血清、硼氢化钠、高碘酸钠购自北京化学试剂公司 ,为分析纯试剂。96 孔细胞培养板和 ELISA 板 ,Costar 公司 ;DNM9606 型酶标仪 ,北京普郎新技术有限公司产品。

1.2 CD28 单克隆抗体的制备 按照常规法进行动物免疫 ,第一次用福氏完全佐剂 ,第 2、3、4、5 次用不完全佐剂 ,第 6 次用纯抗原直接脾脏注入。最后一次免疫后的第三天 ,取 BALb/c 小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 8 :1 比例在 50% PEG4000 的作用下进行融合。8d 后用 ELISA 法检测有融合细胞生长孔的抗体分泌。对于阳性细胞孔扩大培养 ,亚克隆 ,制备腹水。

1.3 单抗 Ig 及亚类鉴定 单抗体亚类的鉴定采用快速定性试纸法 ,方法按使用说明书进行。

1.4 单抗的效价测定 取腹水用 pH7.4 的 PBS 倍数

作者单位 北京军区总医院 中心实验科 ,北京 100700
作者单 价 :刘晶(1977-) ,女 ,本科 ,主管技师 ,主要从事检验医学基础研究。

稀释,用 ELISA 法进行测定。

1.5 抗原位点测定 采用棋盘滴定法选出包被抗原和 HRP-羊抗鼠 Ig 的最佳反应浓度,测定 McAb 饱和曲线,求出 McAb 的饱和浓度。按以下条件进行单抗相加试验和双抗体竞争试验。

1.5.1 单抗相加试验 包被 CD28 抗原 4℃过夜。洗 3 次后加入一株抗 CD28 McAb,37℃ 孵育 2h,洗 3 次后再加入另一株 CD28 McAb,37℃ 孵育 2h,洗涤后加 HRP-羊抗鼠 IgG,37℃ 孵育 1h,洗涤后加底物显色。

1.5.2 双抗体竞争试验 分别包被 CD28 McAb 各株,4℃过夜,洗涤后加 CD28 抗原,37℃ 2h,洗涤后加 HRP-McAb,37℃ 1h,洗涤后加底物显色。

1.6 统计学方法 数据处理采用 SPSS13.0 统计软件,数据资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据分析采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD28 单克隆抗体的制备 由于合成抗原的免疫原性较弱,经过多次免疫,第 5 次后效价才达到 1:16。一周后脾内注射人纯抗原 100μl(1mg/ml)进行加强,3d 后用于融合。此次融合共分配了三块 96 孔细胞培养板,有细胞生长的 246 孔,融合率为 85.4%;阳性 9 株(分别命名为 A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9),阳性率为 3.6%。分别将 9 株细胞亚克隆,待分泌抗体达 100%时,扩大培养,一部分冻存,一部分注入小鼠腹腔制备腹水。

2.2 单克隆抗体 Ig 及亚类鉴定 测定 9 株 McAb 的 Ig 亚类,其中 4 株为 IgG2a(A2、A3、A4、A8),5 株为 IgG2b(A1、A5、A6、A7、A9)。

2.3 单克隆抗体效价测定 取腹水,用生理盐水稀释成不同浓度,测定其效价,A2 为 1×10^7 ,A1、A3、A4、A8 为 2×10^6 ,A5、A6、A7、A9 为 3.2×10^4 。

2.5 单克隆抗体抗原位点测定 分别取 5 株(A1、A2、A3、A4、A8)腹水,按照 1.5 方法进行抗原位点测定。单抗相加试验结果见表 1。

表 1 单抗相加试验结果

Table 1 The results of the additive test

单克隆抗体 McAb	A 值/AI			
	A2	A3	A4	A8
A1	74.9± 6.1	68.5± 5.7	47.4± 4.9	39.6± 4.1
A2		45.8± 4.6	78.1± 6.8	79.3± 8.0
A3			57.2± 6.0	77.2± 6.7
A4				40.3± 5.3

根据公式 $A.I = [2A1 + 2/(A1 + A2) - 1] \times 100$ 来计算

相加指数 A.I。当 A.I 值超过 50%时即认为是识别两个不同的抗原位点,低于 50% 则为识别同一位点。此结果显示,A1、A4、A8 为针对同一位点,A2、A3 为针对另一位点。

单抗竞争试验 结果见表 2。固定抗原,用酶标记抗体和未标记抗体竞争结合抗原。如果两个 McAb 识别同一个抗原位点,就会出现竞争抑制现象,抑制率≥50%。结果证实,A1、A4、A8 为针对同一位点,A2、A3 为针对另一位点。与单抗相加试验的结果完全符合。

表 2 双抗体竞争试验结果

Table 2 The results of double-antibody competitive inhibition assay

包被抗体 Peridium antibody	A 值抑制率(%)Inhibition rate				
	HRP-A1	HRP-A2	HRP-A3	HRP-A4	HRP-A8
A1	77.3± 8.1	27.5± 3.2	31.5± 3.9	79.8± 6.5	73.6± 6.2
A2	69.2± 7.0	72.2± 7.4	70.3± 6.1	21.3± 3.4	16.3± 2.1
A3	20.3± 3.2	74.5± 6.9	84.4± 7.0	47.4± 5.0	23.4± 3.4
A4	73.9± 4.5	19.8± 3.1	46.3± 4.1	75.6± 6.1	79.5± 7.0
A8	70.1± 6.9	21.5± 3.8	17.5± 2.4	62.7± 5.9	73.6± 6.9

3 讨论

T 淋巴细胞在免疫系统中起重要作用,它一方面有直接的免疫效应,另一方面还通过所产生的多种细胞因子,直接或间接发挥广泛的免疫调节作用。在免疫应答过程中,T 淋巴细胞在 TCR 识别抗原后,需要第二信号才能活化增殖。T 淋巴细胞表面的糖蛋白 CD28 被认为是最重要的协同刺激分子,其主要的生物学效应是与 APC 上的天然配基 B7-1、B7-2 相互作用后,可增强 T 淋巴细胞合成和分泌 IL-2,促进 T 淋巴细胞的活化增殖,促进 T、B 细胞的黏附,防止克隆无应答状态的形成^[6]。CD28 分子的相对分子量为 80000~90000,属于免疫球蛋白超家族的成员。CD28 表达于大多数静止及活化的 A 细胞,约 95%的 CD4 和 50%的 CD8 阳性 T 细胞表达该分子。此外,部分 NK 细胞和人恶性浆细胞也表达 CD28 分子。因此,制备抗 CD28 单抗,为研究其在 T 细胞的活化、增殖及信号传导中的作用提供了有效的物质基础。

以往制备 CD28 单抗,多以高表达膜型 CD28 分子的细胞为免疫原^[7]。由于细胞表面的抗原决定簇数目较多,造成筛选工作量大、周期长、效率低,给抗体制备带来一定困难。我们采用多肽合成的 CD28 抗原制备单抗,特异性较高。但由于是合成抗原,其免疫原性较弱,按照常规的免疫方法难以达到较好的效果,为此我们在原有的基础免疫上,连续多次进行加强免疫,直到具有一定的效价为止。研究确定 McAb 所针

对的抗原位点是分析抗体免疫活性的重要环节,我们在制备了 9 株抗体后分别对其中的 5 株抗体进行了位点测定,经过反复的测定、筛查,确定 5 株 McAb 针对两个不同的抗原位点。对于 CD28 单抗及其生物活性的初步研究为深入探讨 T 淋巴细胞的表位形态和增殖将提供重要的依据。另外,我们就单抗对 CD28 激发效应及活化 T 淋巴细胞的表型进行了分析,该研究将另文报道。

参考文献:

[1] Tao Y, Ying X, Yucheng L et al. Clinical study of co-treatment with DC-CIK cells for advanced solid carcinomas [J]. Chinese-German J Clin Oncol 2011, 10(6): 354-359.
 [2] Chi XW, Liu J. The research summary of the effect of costimulatory molecule in the solid carcinomas [J]. Guide of China Medicine, 2010, 8(19): 71-73. (In Chinese)
 (迟小伟, 刘杰. 共刺激分子在实体性肿瘤中的研究综述[J]. 中国

医药指南 2010, 8(19): 71-73.)
 [3] He H, Song WG. The cross talk between the regulatory dendritic cells and the regulatory T cells [J]. Immunological Journal 2010, 26(6): 551-555. (In Chinese)
 (何浩, 宋文刚. 调节性 DC 与调节性 T 细胞的相互作用[J]. 免疫学杂志 2010, 26(6): 551-556.)
 [4] Tuosto L. NF-κB family of transcription factors: Biochemical players of CD28 co-stimulation [J]. Immunology Letters 2011, 135(1): 1-9.
 [5] Bjorgo E, Tasken K. Novel mechanism of signaling by CD28 [J]. Immunology Letters 2012, 129(1): 1-6.
 [6] Watts TH. Staying alive: T cell costimulation, CD28 and Bcl-XL [J]. J Immunol 2010, 185(7): 3785-3787.
 [7] Sun ZW, Tao R, Lu YH et al. Preparation of five monoclonal antibodies against human CD28 and analysis of their biological effects [J]. Chinese Journal of Immunology 2005, 21(6): 406-411. (In Chinese)
 (孙中文, 陶然, 陆艳红, 等. 5 株鼠抗人 CD28 单克隆抗体的研制及生物学特性的研究 [J]. 中国免疫学杂志 2005, 21(6): 406-411.)

收稿日期: 2011-10-17 编辑: 谢永慧

(上接第 181 页)

培养 3d 后对肿瘤细胞的抑制率达最大值,在培养 3~6d 内对肿瘤细胞的抑制率变化不大,培养到第 7d 时对肿瘤抑制率明显下降,见图 7。

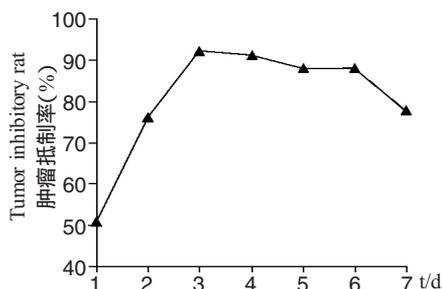


图 7 发酵时间对 HY108 发酵液抗肿瘤活性的影响

Fig 7 Effect of cultivation time on antitumor activity of HY108 fermentable extract

3 讨论

通过对菌株 HY108 发酵优化的研究,发现该菌在较宽的 pH 值和温度范围内都能较好地生长。碳源的选择对菌体合成抗肿瘤活性物质的量起主要作用,实验发现,玉米粉对提高菌株 HY108 抗肿瘤活性物质的产量是非常必要的。

此外,发酵时间也是影响菌株 HY108 合成抗肿瘤活性物质的重要因素,发酵 3d 时产生的抗肿瘤活

性物质最多。与基础发酵培养基相比,优化后的发酵培养基能使菌株 HY108 产生更多的抗肿瘤活性物质,肿瘤抑制率提高了近 20%。

参考文献:

[1] Li DZ, Han BQ. Study of Active metabolite of marine bacteria [J]. Chin J Mar Drugs 2006, 25(5): 51. (In Chinese)
 (李大志, 韩宝芹. 海洋细菌活性代谢产物的研究进展[J]. 中国海洋药物 2006, 25(5): 51.)
 [2] T. Luke Simmons, Eric Andrianasolo, Kerry McPhail et al. Marine natural products as anticancer drugs [J]. Molecular Cancer Therapeutics 2005, 4(2): 333.
 [3] T. Luke Simmons, Kerry L. McPhail, William H. Gerwick et al. Belamide A, a new antimitotic tetrapeptide from a Panamanian marine cyanobacterium [J]. Tetrahedron Letters 2006, 47: 3387.
 [4] Han B, Gross H, Goeqer DE et al. Aurilides B and C, cancer cell toxins from a Papua New Guinea collection of the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula [J]. J Nat Prod 2006, 69(4): 572.
 [5] Fang KT. Uniform design and uniform design table [M]. Bei Jing: Science Press, 1994, 13. (In Chinese)
 (方开泰. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994, 13.)

收稿日期: 2011-12-20 编辑: 符式刚