



抗人晚期糖基化终产物受体胞外段不同表位单克隆抗体的制备

晚期糖基化终产物受体(receptor of advanced end product, RAGE)是分布在单核巨噬细胞、血管内皮细胞、肾系膜细胞、神经细胞及平滑肌细胞等细胞表面的一种膜蛋白,由400多个氨基酸组成,分为胞外段、跨膜段和胞内段,其相对分子质量约35 000,属免疫球蛋白超家族成员[1]。作为一种信号转导受体,RAGE与晚期糖基化终产物(AGE)或其他配体在细胞表面结合,从而引起细胞内多种信号转导机制的激活,在糖尿病慢性并发症[2]、透析相关性淀粉样变[3]、阿尔茨海默病[4]、动脉粥样硬化[5]等疾病的发生过程中起重要作用。最近有报道RAGE与某些肿瘤的发生及其转移有关[6][7]。而在上述领域的研究中,针对RAGE的抗体,尤其是单克隆抗体对研究AGE与RAGE的相互作用及其与上述疾病的发病机制和寻找新的防治靶点极为重要。本研究用重组人RAGE(rhRAGE)胞外段蛋白作为免疫原,成功制备了针对重组RAGE不同位点的单克隆抗体,为RAGE及与之有关疾病的研究提供了有效的工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和主要试剂 小鼠骨髓瘤细胞系(NS-1细胞)、人单核巨噬细胞系(THP-1)为本室保存,均在含10%新生牛血清IMDM(购自GIBCO公司)培养体系中培养;原核表达系统构建、表达由第一军医大学南方医院肾内科完成;PEG(4000)为Merk产品,Ni²⁺-NTA亲和柱为Invitrogen产品,FITC标记羊抗小鼠抗体(进口分装)、HRP-羊抗鼠IgG购自鼎国试剂公司;弗氏佐剂、抗Ig亚型分型血清为Sigma公司产品;IMDM培养基、新生牛血清、HAT和HT为Gibico-BRL产品,HItrap ProteinG购自Amersham Pharmacia Biotech。

1.1.2 实验动物 6周龄雌性SPF级Balb/c小鼠,购自第一军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 rhRAGE蛋白的表达与纯化 rhRAGE胞外段23~342的原核表达质粒构建(另文发表)参照载体pET14(+)说明书进行,利用Ni²⁺-NTA亲和层析柱进行纯化。经ELISA与Western blot证明与抗RAGE多克隆抗血清(由Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School提供[8])可特异性结合。

1.2.2 杂交瘤细胞株的建立

1.2.2.1 动物免疫 用纯化的rhRAGE融合蛋白作为免疫原,基础免疫共5次,间隔3周,每次抗原用量为50 μg/只。初次用弗氏完全佐剂混合乳化,皮下多点,以后用弗氏不完全佐剂,腹腔注射。每次免疫后1周测效价,在融合前3 d尾静脉注射加强免疫,抗原用量100 μg/只。

1.2.2.2 细胞融合 取免疫小鼠的脾细胞与NS-1细胞按常规方法进行融合,经HAT选择性培养基培养,以ELISA法筛选阳性克隆,再通过有限稀释法进行两次亚克隆筛选出能稳定分泌抗人RAGE蛋白mAb的杂交瘤细胞株,并制备mAb腹水,以HItrap ProteinG柱纯化腹水。

1.2.3 mAb抗体特性鉴定

1.2.3.1 Ig亚类测定 参照Sigma公司试剂盒(ISO-1)说明书。

1.2.3.2 效价测定 以纯化的rhRAGE蛋白(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)包被(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜), 5%脱脂奶粉封闭(37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h), 不同稀释度的各株mAb腹水或纯化单抗为一抗, HRP-羊抗鼠IgG为二抗, 邻苯二胺底物显色, 酶标仪读取D(490)值。

1.2.3.3 Western blot鉴定 将THP-1细胞裂解液、纯化rhRAGE蛋白分子作为样品, 无关细胞裂解物为阴性对照。用SDS-PAGE分离, 再用Bio-Rad电转移系统, 将凝胶蛋白带转移至硝酸纤维素膜。与各株杂交瘤细胞腹水纯化的单抗反应后, 加入HRP-羊抗鼠IgG孵育, 底物显色。

1.2.3.4 流式细胞测定 10%新生牛血清 IMDM培养THP-1细胞, 收集到 1×10^6 个细胞。用IMDM稀释到 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 分别加入B2.2、正常小鼠IgG, 洗涤后加FITC标记羊抗鼠IgG, 其他如常规操作。上机(流式细胞仪为BD FACSCaliburTM)测定。

1.2.3.5 单抗识别位点的鉴定 用rhRAGE 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被, 5%脱脂奶粉封闭; 洗涤后加入系列稀释的纯化B2.2或E10 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 然后加入等体积的生物素标记B2.2(Biotin-B2.2), 使其终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 混匀, 室温作用1 h; 加入HRP-avidin, 显色及测定同前。抑制率计算: $[1 - \text{加入非标记单抗孔}D(\lambda) \text{值} / \text{未加非标记单抗孔}D(\lambda) \text{值}] \times 100\%$ 。

1.2.3.6 双抗体夹心法检测可溶性rhRAGE 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的E10包被, 5%脱脂奶粉封闭; 洗涤后加入系列稀释的rhRAGE 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h; 其余步骤为Biotin-B2.2 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h; HRP-Avidin, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h, 显色及测定同前。

2 结果

2.1 rhRAGE蛋白的纯化与鉴定

将诱导菌用PBS洗涤2次后, 重悬于50 mmol/L PB(含300 mmol/L NaCl, pH 7.6)溶液中, 冻融3次后超声破菌。取超声沉淀, 8 mol/L尿素变性, 过 Ni^{2+} -NTA亲和层析柱纯化, 所获RAGE融合蛋白的纯度在90%左右(图1)。该蛋白相对分子质量理论值为35 000, 糖基化修饰后为45 000。糖基化蛋白经糖苷酶(Sigma)处理后仍为35 000。本研究选择45 000形式作为免疫原, 经哈佛大学医学院提供的抗RAGE多抗进行鉴定, 证明其可与多抗特异性结合。

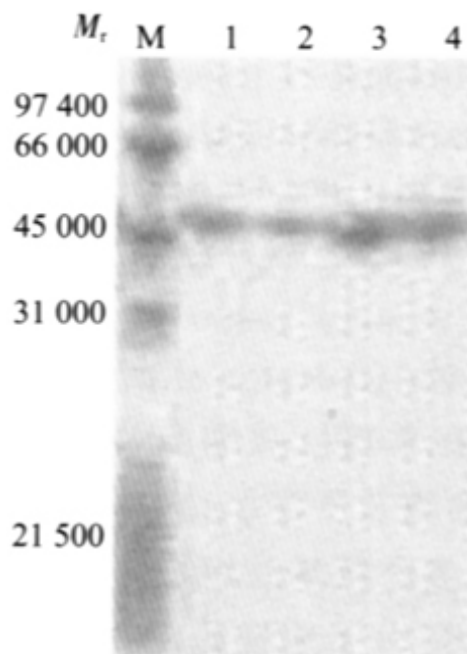


图1 rhRAGE SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 rhRAGE in SDS-PAGE

M: Marker; Lanes 1-4: rhRAGE sample collected from the column

2.2 杂交瘤细胞系的建立

共进行了3次融合，融合率均在90%以上。经ELISA法初筛、复筛、克隆化，得到2株可稳定分泌抗人RAGE蛋白的杂交瘤细胞株，分别命名为B2.2、E10。

2.3 mAb的效价及Ig亚类测定

mAb B2.2和E10腹水效价分别为 1×10^{-6} 和 2.5×10^{-5} 。免疫双扩法检测亚类的结果显示，2株抗人RAGE mAb都属于IgG2b。

2.4 Western blot结果

如图2所示。B2.2与E10可与重组蛋白电泳带结合，预染蛋白质Marker示在45 000，符合糖基化RAGE蛋白分子量。

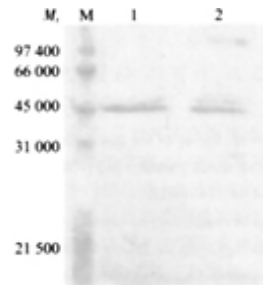


图2 rhRAGE与mAb B2.2的结合

Fig.2 rhRAGE bound to mAb B2.2 detected by Western blotting
M: Marker; Lanes 1-2: rhRAGE in different concentration

2.5 mAb B2.2结合THP-1细胞

THP-1系人类单核细胞系，在静止和活化状态下可不同程度地表达RAGE。B2.2可与26%的THP-1细胞结合(图3)。

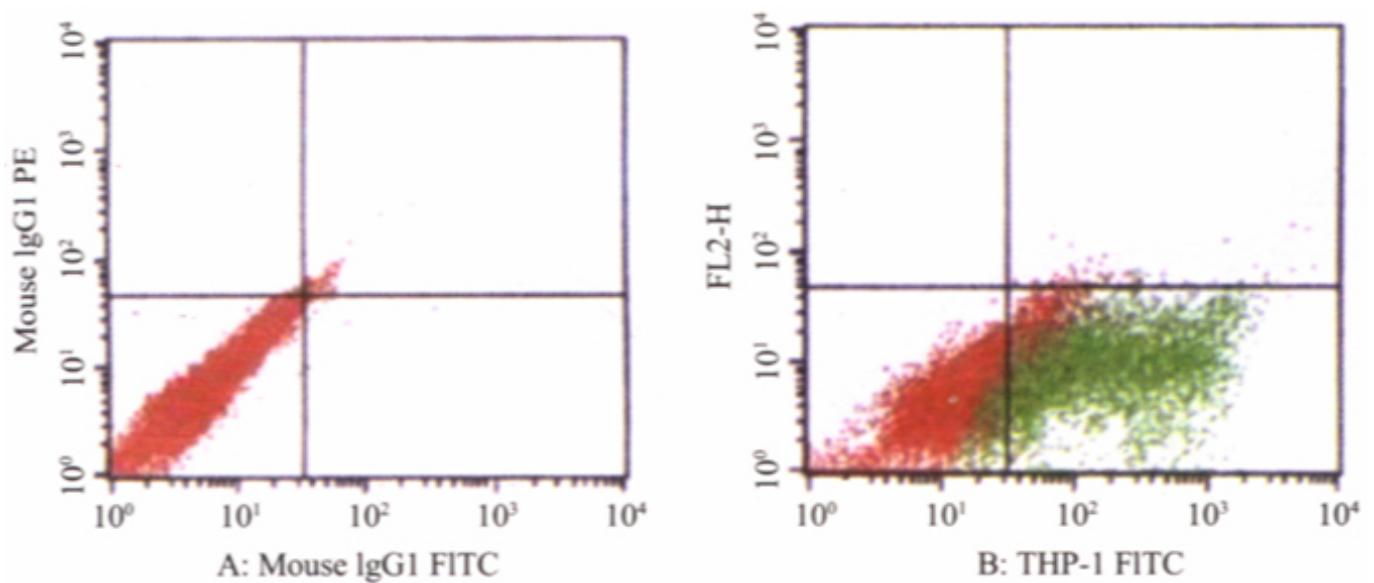


图3 单抗B2.2结合THP-1细胞

Fig.3 Binding of mAb B2.2 to THP-1 cells
A: Non-immunized mouse IgG;
B: mAb B2.2

2.6 mAb B2.2或E10与rhRAGE的结合

图4显示两株单抗均与包被的rhRAGE结合，但B2.2在约20 ng/ml仍具结合抗原的能力，而E10在低于100 ng/ml就难以结合包被抗原了。由此可见B2.2的结合力明显优于E10。

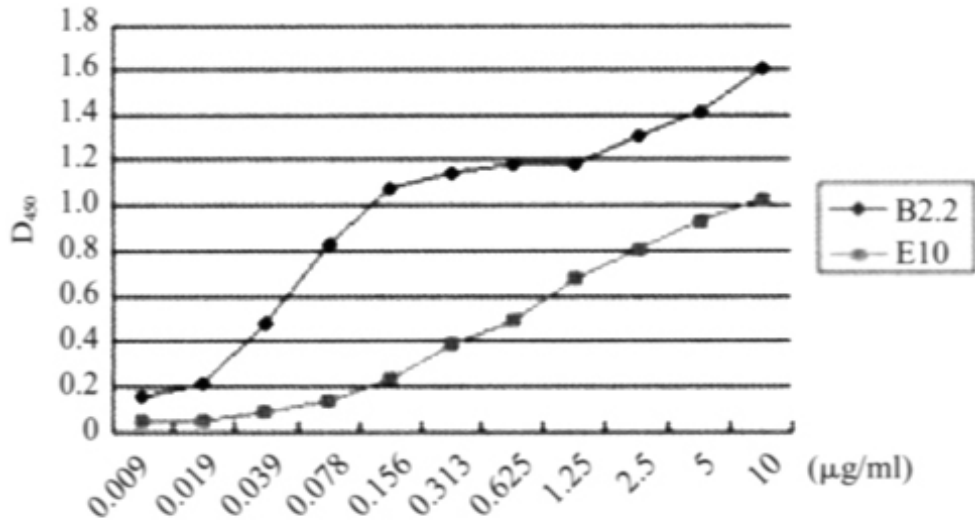


Fig.4

图4 单抗B2.2或E10与rhRAGE的结合 Fig.4 Binding of mAb B2.2 and E10 to rhRAGE

2.7 两株单抗对Biotin-B2.2结合rhRAGE的阻断作用

为了确定两株单抗所识别的位点是否相同或相近，我们用未标记的B2.2和E10去阻断Biotin-B2.2与rhRAGE的结合。结果(图5)显示，未标记的B2.2可有效阻断Biotin-B2.2与rhRAGE的结合，50%抑制浓度(IC⁵⁰)低于0.5 µg/ml；而未标记的E10则完全不能阻断Biotin-B2.2与rhRAGE的结合。

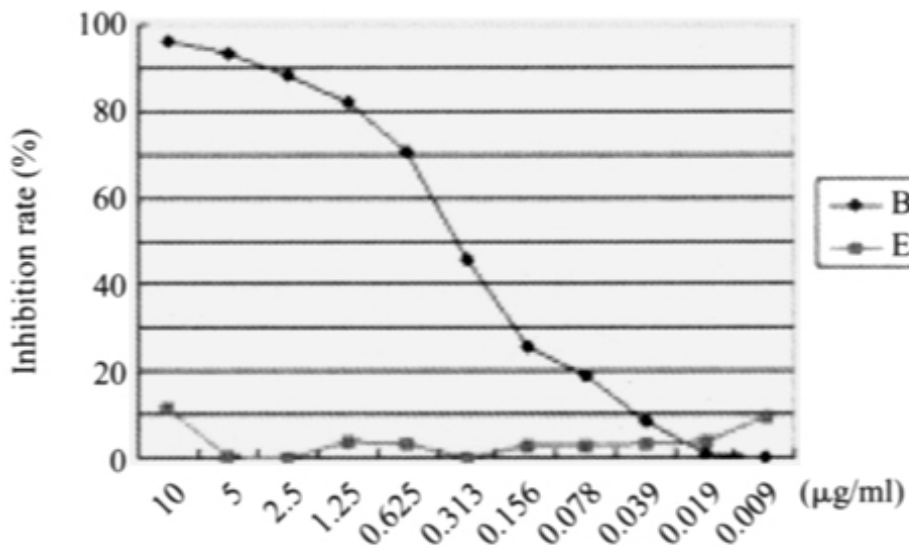


Fig.5

图5 非标记单抗对Biotin-B2.2结合rhRAGE的抑制 Fig.5 Inhibition on binding of biotin-B2.2 to rhRAGE by unlabelled mAbs

2.8 双抗体夹心法的建立与可溶性rhRAGE的测定

鉴于两株单抗所识别的位点不同，我们设计了以E10作为捕获抗体包被，与Biotin-B2.2进行双抗体夹心ELISA，其检测敏感度约40 ng/ml，且呈较好的剂量曲线(图6)。

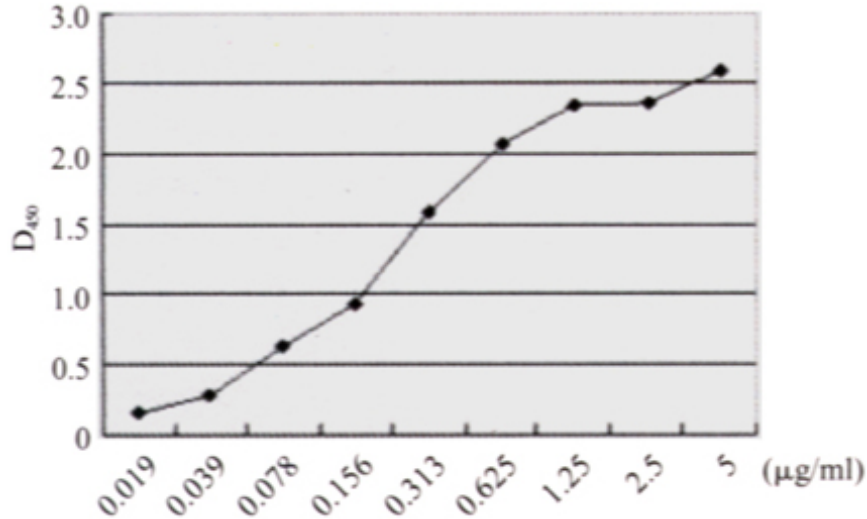


图6 双抗体夹心法测定可溶性rhRAGE
Fig.6 Determination of soluble rhRAGE by sandwich ELISA
Fig.4 Fig.5

3 讨论

AGE是糖的醛基和蛋白质氨基之间非酶性糖化、氧化反应的终产物，一旦形成便不可逆转。已证实AGE修饰蛋白可促发细胞炎症反应，导致机体局部和全身的炎症，并可导致组织结构改变。体内AGE水平与糖尿病、慢性肾衰、动脉硬化、脑性痴呆等疾病的病情转归密切相关。AGE受体即RAGE是介导AGE作用的最重要的结合蛋白，广泛分布于单核/巨噬细胞、成纤维细胞、神经元、血管内皮细胞和平滑肌细胞等多种循环或组织细胞。近年研究还发现RAGE与肿瘤转移有关。因此，AGE与RAGE相互作用机制及其与疾病的关系已成为国内外上述领域研究的热点。国内该领域的工作鲜有报道，其原因之一是缺少研究AGE与RAGE的重要工具——抗体，尤其是位点明确的单克隆抗体。而事实上，国外的大部分研究也是用多克隆抗体，只是近来有学者利用表达的RAGE蛋白N端肽(氨基酸序列为90~347)免疫制备了单抗GB3[6]及在制备针对AGE的单抗时偶然见到了一株针对RAGE的单抗[7]。而国内尚无自行制备的抗RAGE单抗与多抗。

本研究利用rhRAGE胞外段(氨基酸序列为23~342)免疫Balb/c小鼠制备单抗，获得两株单抗E10和B2.2。经鉴定B2.2可与表达天然RAGE的THP-1细胞结合，也可与变性rhRAGE蛋白结合(Western blot)。有趣的是，我们发现E10虽然腹水效价及纯化蛋白结合能力显著低于B2.2，但与变性蛋白的结合却明显优于B2.2；进一步对两株单抗识别位点进行分析，用竞争ELISA证明了这两株单抗结合于rhRAGE的不同表位，而且从E10完全不能阻断Biotin-B2.2结合包被rhRAGE的现象可推测这两株单抗所针对的表位相距较远；鉴于此，我们利用这两株单抗组成了双抗夹心体系，用以测定可溶性rhRAGE，线性关系良好。至此，我们不但确认了两株单抗识别的远隔表位，而且结果提示该双抗体夹心法经改进并提高检测敏感度后，有可能成为检测可溶性RAGE的试剂盒。

通过动物实验发现，抗RAGE的中和性抗体和可溶性RAGE能有效地竞争抑制AGE与RAGE的结合，从而减慢AGE相关疾病的发病进程[8][9]。由此可以预见，抗RAGE单克隆抗体和可溶性RAGE不但可作为若干疾病发病机制研究的工具，甚至在不远的将来，在经必要的改造(如人源化)后有可能成为新的治疗药物。

参考文献：

- [1]Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues[J]. Am J Pathol, 1993, 143(6): 1699-712.
- [2]Hori O, Yan SD, Ogawa S, et al. The receptor for advanced glycation end-products

has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1996,11 (Suppl 5): 13-6.

[3]Miyata T, Hori O, Zhang J, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2 microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis[J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(5): 1088-94.

[4]Sasaki N, Toki S, Chowei H, et al. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease[J]. *Brain Res*, 2001, 888(2): 256-62.

[5]Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, et al. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions[J]. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27(2): 97-108.

[6]Hsieh HL, Schafer BW, Sasaki N, et al. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307 (2): 375-81.

[7]Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site[J]. *FEBS Lett*, 2003, 550(1-3): 107-13.

[8]Hou FF, Chertow GM, Kay J, et al. Interaction between β 2m and AGE in the development of dialysis-related amyloidosis[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 1514-9.

[9]Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy, soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rat[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(1): 238-43.

参考文献:

[1]Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues[J]. *Am J Pathol*, 1993, 143(6): 1699-712.

[2]Hori O, Yan SD, Ogawa S, et al. The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1996,11 (Suppl 5): 13-6.

[3]Miyata T, Hori O, Zhang J, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2 microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis[J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(5): 1088-94.

[4]Sasaki N, Toki S, Chowei H, et al. Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease[J]. *Brain Res*, 2001, 888(2): 256-62.

[5]Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, et al. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions[J]. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27(2): 97-108.

[6]Hsieh HL, Schafer BW, Sasaki N, et al. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307 (2): 375-81.

[7]Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site[J]. FEBS Lett, 2003, 550(1-3): 107-13.

[8]Hou FF, Chertow GM, Kay J, et al. Interaction between β 2m and AGE in the development of dialysis-related amyloidosis[J]. Kidney Int, 1997, 51(5): 1514-9.

[9]Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy, soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rat[J]. J Clin Invest, 1996, 97(1): 238-43.

[回结果列表](#)