论著

文章编号:1000-5404(2006)06-0546-04

抗人 MIF 单克隆抗体的制备及其活性的初步鉴定

郭建秀[1],李 鹏[1],伍艳芳[2],易维京[1],刘进军[1],郭 鹰[1],唐 捷[2],胡川闽[1] ([1]第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038;[2]中国科学院生物物理研究所,北京 100101)

提 要:目的 构建人巨噬细胞移动抑制因子(human macrophage migration inhibitory factor, hMIF)原核表达系统并制备其单克隆抗体。**方法** 采用 RT-PCR 从乳腺癌细胞株 MDA-MB453 细胞克隆 hMIF cDNA,测序后构建 pET11b/hMIF 重组表达质粒,转化入大肠杆菌 BL21 (DE3),诱导表达 hMIF;重组 hMIF 经纯化和鉴定后,作为抗原常规免疫和 CpG ODN 加强免疫 BALB/c 小鼠,制备单克隆抗体并鉴定活性。**结果** 构建 pET11b/hMIF 重组表达质粒,表达出预期 hMIF 蛋白,表达率 30%,纯化后纯度达 95%。Western blotting 鉴定为 hMIF,NO 释放实验证实具有生物学活性。两种免疫方案共获得 9 株分泌抗 hMIF 抗体的杂交瘤细胞株,其中一株经 Western blotting 和活性鉴定证明具有特异性和生物学活性。**结论** 获得 hMIF 重组蛋白和抗 hMIF 单克隆抗体,为其基础性研究和在脓毒症的治疗等临床应用研究奠定基础。

关键词: 巨噬细胞移动抑制因子;原核表达;单克隆抗体;制备

中图法分类号: R329-33;R392.11;R392.2 **文献标识码:** A

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against hMIF

GUO Jian-xiu[1], LI Peng[1], WU Yan-fang[2], YI Wei-jing[1], LIU Jin-jun[1], GUO Ying[1], TANG Jie[2], HU Chuan-min[1] ([1]Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Objective To construct a prokaryotic expression system of human macrophage migration inhibitory factor (hMIF) and prepare its monoclonal antibodies (MAb). **Methods** After hMIF cDNA was amplified from human breast cancer cell line MDA-MB453 and cloned into T vector for DNA sequencing, the confirmed hMIF cDNA was inserted into expression vector pET11b. The recombinant was transformed into BL21 (DE3) and hMIF expression was induced with IPTG. The obtained hMIF protein was verified with Western blotting, and its biological activity was measured by NO release in cultured RAW264.7 cells. CpG ODN was introduced as the adjuvant for immunizing BALB/c mice. The generated MAbs were determined with Western blotting and *in vitro* NO releasing experiment. **Results** hMIF was obtained and purified to 95% and showed certain biological activity. CpG ODN was proved to enhance the immunization. Among the 9 stains of hybridoma obtained, 2D10 was identified with MIF antigen specificity and the ability to decrease hMIF induced NO release in the cultured RAW264.7 cells. **Conclusion** The obtained hMIF protein and its MAbs found a basis for basic study of this cytokine and potential clinical applications of the antibodies.

Key words: macrophage migration inhibitory factor; prokaryotic expression; monoclonal antibody

现已证明 MIF 在由革兰阴性和阳性菌感染所致的脓毒症发病过程中发挥关键性作用[1,2]。虽然抗生素治疗已取得了很大的进展,但脓毒症的病死率仍然从 1980 年的 4.2 人/10 万人上升到 1992 年 7.7 人/10 万人,12 年间增加 83%[3]。迄今为止国内外尚没有应用于临床的针对脓毒症的有效制剂[4]。MIF 作为一种潜在的促炎细胞因子,是天然免疫和获得性免疫中的关键调节元件,通过多种途径促进免疫应答和炎性反应。MIF 的过度表达,如在感染性休克时,会引起免疫

基金项目: 重庆市科委自然科学基金资助重点项目(2004BA5017),创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金资助项目(200317)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2004BA5017) and the Open Funds of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined injury (200317)

作者简介: 郭建秀(1975-),女,陕西省渭南市人,硕士研究生,主要从事抗体制备及人源化方面的研究。电话:(023)68752313, E-mail: gangela@mail.tmmu.com.cn

通讯作者: 胡川闽,电话:(023)68753761,E-mail: chuminhu@yahoo.com

收稿日期: 2005-11-30;**修回日期:** 2006-02-17

系统功能紊乱。拮抗 MIF 及其介导的炎症反应，在治疗感染性休克中具有重要作用。本研究旨在克隆人 MIF（hMIF）cDNA 序列并构建其原核表达载体，表达和纯化获得 hMIF 蛋白，制备抗 hMIF 抗体，为制备单链抗体和 hMIF 的深入研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

pET11b 质粒购自 Novagen 公司，人乳腺癌 MDA-MB453 细胞株购自中科院细胞所，其他菌株和细胞由本室冻存。纯化所用层析柱及纯化仪均由 Amersham 公司提供。hMIF cDNA 克隆的上游引物（5′-CGCCATATGCCGATGTTCATCGTAAACAC-3′，含 *Nde* Ⅰ位点）和下游引物（5′-CGCGGATCCTGCGGCTCTTAGGCGAAGG-3′，含 *Bam*H Ⅰ位点）由上海博亚公司合成。非甲基化 CpG 寡核苷酸片段（CpG oligonucleotides，CpG ODN）1826（5′-TCCATGACGTTCCTGACGTT-3′，全硫代修饰）由本校药理教研室周红教授惠赠。抗 hMIF 单克隆抗体为美国耶鲁大学 Bucala 教授馈赠。单克隆抗体亚类检测试剂盒购自 Sigma 公司。HRP-羊抗小鼠和兔抗羊 IgG 来自北京鼎国公司。NO 试剂盒（硝酸还原酶法）购自南京建成生物工程研究所。

1.2　hMIF 表达和纯化

从乳腺癌细胞株 MDA-MB453 细胞中以 RT-PCR 克隆出 hMIF cDNA。TA 克隆测序后，将 pGEM-T/hMIF 与 pET11b 载体分别双酶切后连接，酶切鉴定后 pET11b/hMIF 重组质粒转化入 BL21（DE3）菌，阳性菌落扩大培养后加入终浓度为 1 mmol/L的 IPTG 诱导蛋白表达。15% Tricine-SDS PAGE 电泳观察蛋白的表达情况。筛选出的高表达菌株在发酵罐内扩大培养并诱导。每克湿菌加 10 ml 裂解液（20 mmol/L PB pH 5.8），混匀后超声破菌，离心后取上清，直接上样于 SP Sepharose FF 阳离子交换柱，20 mmol/L PB（1 mol/L NaCl）洗脱。初产物再上样于 20 mmol/L PB［1 mol/L $(NH_4)_2SO_4$］平衡的 Octyl Sepharose FF 疏水层析柱，20 mmol/L PB 洗脱。高效液相层析系统（HPLC1100 Series，Aglient，美国）Oppak SB-805HQ 分析柱测定样品纯度。Lowry 法（Folin 酚法）测定 hMIF 蛋白质含量。

1.3　hMIF 的鉴定

以 Bucala 教授赠送的抗 hMIF 单克隆抗体作为一抗，Western blot 鉴定纯化后的重组蛋白。GST-人乳腺珠蛋白（human mammaglobin，hMAM）融合蛋白作为阴性对照。具体实验步骤参照参考文献[5]。为了去除可能含有的内毒素对实验结果的影响，用 Detoxi-Gel™ 内毒素去除胶（Pierce，美国）参照说明书处理纯化后的 hMIF。重组蛋白的活性鉴定采用文献[6]中的方法观察 hMIF 处理对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响来判定。具体方案是：6 孔板中每孔加入 3 ml 细胞浓度为 5×10^5/ ml的 DMEM 培养基（含 10% 的胎牛血清），在 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 24 h；弃上清后，用 PBS 洗涤 2 次；每孔中分别加入含 0、0.5、1、2、4、8 μg/ml 重组 hMIF 的无酚红的完全 DMEM 培养基 3 ml，继续培养 15 h；取细胞上清 1 ml，12 000 r/min离心 5 min，取 100 μl 测 NO 含量。NO 含量的测定按照试剂盒说明书中细胞培养液样品的方法进行。每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。

1.4　单克隆抗体的制备

6～8 周龄雌性 BALB/c 小鼠（第三军医大学动物实验中心提供）12 只随机等分为常规免疫组和 CpG ODN 加强免疫组。免疫方案如下所述。第 1 次免疫：常规组以弗氏完全佐剂（每只 100 μl）与稀释于等体积 PBS 的 MIF 抗原（100 μg/只）混匀乳化至油包水状，腋窝、腹股沟、背部皮下和腹腔多点注射；CpG ODN 加强免疫组以每只小鼠弗氏不完全佐剂 25 μl + MIF 10 μg + CpG ODN 10 μl（1 μg/μl）加 PBS 补足至 50 μl 混匀乳化至油包水状，室温下静置 15 min，再次混匀后注射小鼠两侧股四头肌。第 2 次免疫：初次免疫 4 周后，常规组改为弗氏不完全佐剂，方法同第 1 次免疫；CpG ODN 组免疫方法同初次免疫。第 3 次免疫：第 2 次免疫 3 周后，2 组均用抗原稀释于 PBS 中（每只小鼠 0.5 ml，含 MIF 50 μg）腹腔注射免疫。第 4 次免疫：第 3 次免疫 2 周后，方法同第 3 次。分别在第 2 次免疫、第 3 次免疫后 1 周采小鼠尾静脉血，分离血清后，用间接 ELISA 法检测其效价。第 4 次免疫 3 d 后取脾，与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合。单克隆抗体的筛选、克隆化，腹水制备、抗体的效价、杂交瘤细胞的核型分析按本室常规方法进行。单克隆抗体亚类鉴定按照试剂盒提供的方法进行。

1.5　抗 hMIF 单克隆抗体的鉴定

Western blotting 鉴定所获得鼠源性单克隆抗体同重组 hMIF、GST-hMAM 融合蛋白是否具有特异性。采用抗体竞争抑制实验验证所制备的单抗是否具有生物学活性。BALB/c 小鼠腹腔接种杂交瘤细胞的方法大量制备单克隆抗体腹水。首先将腹水 20 000 r/min，15 min 离心去除沉淀。再用 Detoxi-Gel™ 内毒素去除胶处理含单克隆抗体的腹水。设立正常小鼠血清对照组、单独腹水组（2 ml）、不同剂量腹水（200、40、20、4、2 μl）+2 μg/ml 重组 MIF 组、单独 2 μg/ml 重组 MIF 组（总体积都是 2 ml），观察他们对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响。正常小鼠血清，作为阴性对照。每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。

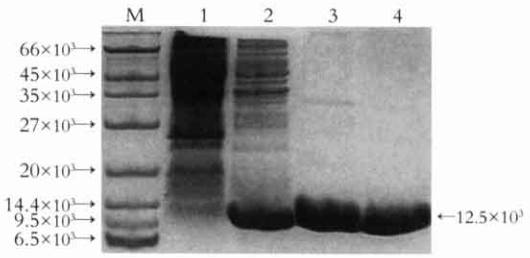
1.6　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　hMIF 的表达和纯化

以 Trizol 法提取人乳腺癌细胞株 MDA-MB453 细胞总 RNA 为模板，RT-PCR 扩增出约为 353 bp 的基因序列。TA 克隆后测序证实与 GenBank 中报道的完全一致。建立重组质粒 pET11b/hMIF 后，转化于 BL21（DE3）菌，IPTG 诱导表达。重组菌经裂解、离心、阳离子交换和疏水层析法纯化后，分别取样行 15% Tricine SDS-PAGE 电泳。经考马斯亮蓝染色后，可见诱导菌比未诱导菌明显多出 1 条清晰的分子量约 12.5×10^3 条带，与预期 hMIF 的分子量相符（图 1）。重组蛋白的表达量约占细菌总蛋白的 30%。高效液相色谱法证实经 SP Sepharose FF 阳离子交换柱初纯化后 hMIF 蛋白的纯度达 90% 以上，再由 Octyl Sepharose FF 疏水层析纯化后 hMIF 纯度可达 95%（图 2）。



M：标准；1：IPTG 未诱导 BL21 菌上清；2：IPTG 诱导 BL21 菌上清；3：SP Sepharose FF 柱纯化后样品；4：Octyl Sepharose FF 柱纯化后样品

图1 重组 hMIF 蛋白的诱导表达与纯化

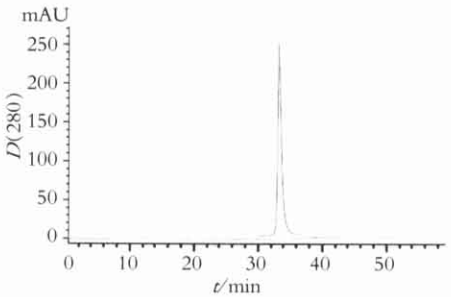
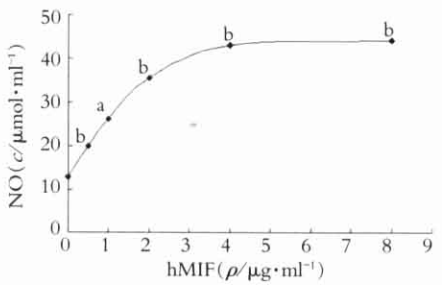


图2 高效液相色谱测 hMIF 纯度

2.2 hMIF 的鉴定

Western blotting 结果显示 BL21 转化菌表达且纯化后的蛋白能与抗 hMIF 抗体(Bucala 教授赠送)产生特异性蛋白质染色条带，而阴性对照 GST-人乳腺珠蛋白(hMAM)融合蛋白与上述抗体无反应，证明诱导表达的蛋白为 hMIF。重组 hMIF 处理培养的 RAW264.7 细胞可促进其 NO 释放量，其中 1 μg/ml hMIF 处理组同未处理组 NO 释放量相比差异显著($P<0.05$)，而 0.5、1、2、4、8 μg/ml 处理组 NO 释放量则非常明显高于未处理组($P<0.01$)。不同剂量的重组 hMIF 处理 RAW264.7 细胞 NO 释放量呈量效关系(图 3)。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 hMIF 未处理组比较

图3 hMIF 对 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响

2.3 抗 hMIF 抗体制备

常规免疫组获得 3 株分泌抗 hMIF 抗体杂交瘤细胞株，其中 2 株 IgG_1，1 株 IgG_{2a}；CpG ODN 组得到 6 株细胞株，其中 2 株 IgG_1，2 株 IgG_{2a}，1 株 IgG_{2b}，1 株 IgM。CpG ODN 组产生的杂交瘤细胞 2D10 培养上清效价达到 1∶12 800。杂交瘤细胞的核型分析表明 9 株杂交瘤细胞的染色体数目均在 80～102，说明这 9 株杂交瘤细胞为小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞的融合体。杂交瘤细胞经数次冻存，体外传代培养 3 个月以上均能稳定分泌抗体。

2.4 hMIF 蛋白和 hMIF 单克隆抗体的活性鉴定

Western blotting 证实杂交瘤细胞 2D10 单抗是针对 hMIF 的特异性单克隆抗体。在抗体竞争抑制实验中，将 2D10 制备的腹水 200、40、20、4、2 μl 加入 2 μg/ml 重组 hMIF 处理的 RAW264.7 细胞中，其 NO 释放量非常显著低于 2 μg/ml 重组 hMIF 单独处理组($P<0.01$)，说明制备的单抗可竞争地同培养液中的 hMIF 结合，阻止 hMIF 进入细胞内抑制其促进 NO 的释放。

3 讨论

MIF 已被证实是一种潜在的促炎因子，是免疫和炎症反应中的关键分子。Roger 等[7]在动物实验中发现：腹腔单独注射 LPS 或与 MIF 同时注射，TNF-α 及 IL-1 等因子显著增加，MIF 协同 LPS 诱导脓毒性休克；抗 MIF 抗体能够中和血液中的 MIF，同时降低 TNF-α；用 LPS 刺激 $MIF^{-/-}$ 的巨噬细胞以及转染了 MIF 反义 mRNA 的正常巨噬细胞对 LPS 不敏感、TNF-α 和 IL-6 水平无变化、TLR-4 的表达在 mRNA 和蛋白水平表现为降低，证明了 MIF 在脓毒性休克中的中心环节作用。在革兰阳性细菌引起的外毒素血症中[8,9]，细菌外毒素毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin 1，TSST-1)及链球菌热原外毒素 A(streptococcal pyrogenic exotoxins A，SPEA)均可刺激 MIF 的释放。$MIF^{-/-}$ 动物对 TSST-1 及 SPEA 诱导的休克有耐受，抗 MIF 抗体对其有保护作用。细菌内毒素及外毒素均可引起的 MIF 的释放，导致血液 MIF 浓度显著升高，并且 MIF 水平与毒素血症的程度、重要器官的损伤呈相关关系[10]。在动物实验性细菌性腹膜炎及盲肠结扎穿孔模型的病理变化过程中[11]，MIF 首先在腹腔中分泌增加，然后血液浓度升高，抗 MIF 抗体对实验动物具有保护作用，甚至在术后 8 h 抗体治疗仍然有效[12]。治疗性抗 MIF 抗体能显著提高动物的存活率、降低血液中细菌的数量。本研究克隆 hMIF cDNA 并诱导其原核表达，经过纯化后获得高纯度的重组抗 hMIF，并以此为抗原获得鼠源性 hMIF 单克隆抗体。这样可进一步制备人源化的单链抗体，为 MIF 基础性研究，以及在脓毒症的治疗等临床应用研究奠定基础。

在动物的免疫过程中，常规采用的佐剂是弗氏完全和不完全佐剂。在本研究中我们引入 CpG 二核苷

酸作佐剂来增强免疫效果。1995 年，Krieg 等[13]发现细菌 DNA 中的 CpG 基序能够多克隆活化小鼠 B 细胞。含 CpG 基序的 CpG ODN 可激活天然免疫应答并诱导获得性免疫应答[14]，诱导机体产生 Thl 型细胞因子和 IgG_{2a} 抗体，显示出良好的佐剂效应。CpG DNA 几乎对所有蛋白质抗原和灭活疫苗具有佐剂作用，而且在与其他佐剂合用时还可弥补其他佐剂诱导 Th2 型免疫应答的缺陷。在本课题中，CpG ODN 组的 6 只小鼠在第 2 次免疫后 1 周（第 5 周）有 5 只血清效价就达到了融合的要求，而此时常规免疫组仅有 1 只达到效价。CpG ODN 组得到 6 株分泌抗 hMIF 抗体的杂交瘤细胞株和常规免疫组获得 3 株杂交瘤细胞株，也反映出 CpG ODN 优势分泌 IgG_{2a} 和 IgG_1。IgG_{2a} 和 IgG_1 的优势分泌也有助于它们在抗原抗体中和反应中发挥更大的作用。另外，CpG ODN 组前两次免疫所需的抗原每次只有 10 μg，远远低于常规免疫组 100 μg 的剂量，节约了抗原。

NO 是一氧化氮合成酶（NO synthase，NOS）催化 L-精氨酸合成的。很多炎症介质可诱导激活 NOS，内毒素也可诱导其合成并增加活性。人 NOS 的激活包括转录因子及转录因子活性蛋白-1（activator protein-1，AP-1）触发的 mRNA 的转录。一旦 NOS 被激活，如有足够的 L-精氨酸，将有大量的 NO 生成。MIF 作为一种炎性细胞因子[15]：①可以直接或间接地促进多种细胞因子的产生和表达，如 TNF、IFN-γ、IL-1、IL-6、IL-8 等；②可通过对糖皮质激素负调节作用，阻止 NF-κB 抑制蛋白 IκB 的合成，促使 NF-κB 进入细胞核内和相应 DNA 序列结合从而释放大量炎性因子；③还能够通过与细胞内蛋白 JAB-1 的相互作用而直接影响核转录因子 AP-1。因此 MIF 可激活 NOS、促进 NO 的释放。NO 合成增加是激活的巨噬细胞的共同特征和重要标志，也是巨噬细胞产生病理和免疫效应的重要步骤。考虑到巨噬细胞 NO 产生与 MIF 的关系，我们运用 hMIF 对巨噬细胞系 RAW264.7 细胞产生 NO 量的影响来判断其的活性。实验证明重组的 hMIF 可显著促进 RAW264.7 细胞释放 NO（$P<0.05$，$P<0.01$）。以此重组蛋白为抗原制备的鼠源性单克隆抗体能通过抗体竞争显著抑制这种效应（$P<0.01$）。这就说明本研究制备 hMIF 和其单克隆抗体的都具有较好的生物学活性。

本研究克隆人 MIF cDNA 序列并构建其高效原核表达载体，表达和纯化后获得高纯度 hMIF 蛋白，以此为抗原制备鼠源性抗 hMIF 单克隆抗体，这样可进一步为其基础性研究，以及在脓毒性休克的诊断、治疗等临床应用研究奠定基础。

参考文献：

[1] CALANDRA T, ROGER T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(10): 791 - 800

[2] DONN R P, RAY D W. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule [J]. J Endocrinol, 2004, 182 (1): 1 - 9

[3] 王正国. 脓毒症研究概况[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(1): 5 - 8.

[4] RIEDEMANN N C, GUO R F, WARD P A. The enigma of sepsis [J]. J Clin Invest, 2003, 112(4): 460 - 467.

[5] J·萨姆布鲁克, E·F·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 888 - 897

[6] BERNHAGEN J, MITCHELL R A, CALANDRA T, *et al*. Purification, bioactivity, and second structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF) [J]. Biochemistry, 1994, 33 (47): 14144 - 14155.

[7] ROGER T, DAVID J, GLAUSER M P, *et al*. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4 [J]. Nature, 2001, 414 (6866): 920 - 924.

[8] CALANDRA T, SPIEGEL L A, METZ C N, *et al*. Macrophage migration inhibitor factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of gram-positive bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (19): 11383 - 11388.

[9] BOZZA M, SATOSKAR A R, LIN G, *et al*. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis [J]. J Exp Med, 1999, 189 (2): 341 - 346.

[10] BOZZA F A, GOES R N, JAPIASSU A M, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor levels correlated with fatal outcome in sepsis [J]. Shock, 2004, 22 (4): 309-313.

[11] ROGER T, GLAUSER M P, CALANDRA T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria [J]. J Endotoxin Res, 2001, 7(6): 456 - 460.

[12] CALANDRA T, ECHTENACHER B, ROY D L, *et al*. Protection from septic shock by neutralization of macrophage inhibitory factor [J]. Nat Med, 2000, 6 (2): 164 - 170.

[13] KRIEG A M, YI A K, MATSON S, *et al*. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. Nature, 1995, 374 (6522): 546 - 549.

[14] HEMMI H, TAKEUCHI O, KAWAI T. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. Nature, 2000, 408 (6813): 740 - 745.

[15] BACHER M, METZ C N, CALANDRA T, *et al*. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(15): 7849 - 7854.

（编辑　栾　嘉）