论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1308-04

抗人氨基末端脂多糖结合蛋白二硫键稳定性Fv抗体的制备及生物学活性的初步研究

邹 佳,葛晓冬,杨艳丽,刘友生 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 制备抗人氨基末端脂多糖结合蛋白(N-terminal fragment of human lipopolysaccharide binding protein, NH-LBP)的二硫键稳定性Fv抗体(disulfide stabilized Fv fragment,dsFv),并初步测定其生物学活性。**方法** 将含有dsFv-V_L与dsFvV_H包涵体蛋白经复性、折叠和纯化,获得完整的dsFv抗体。通过ELISA、TNF-α分泌等方法,初步测定dsFv抗体在体内外的生物学活性。**结果** 获得dsFv抗体蛋白约2.1 mg,dsFv与NH-LBP有较好的结合能力,并在动物体内减轻了LPS所诱导的炎症反应,发挥了一定的保护活性。**结论** 通过分别表达V_L和V_H片段,再制备dsFv抗体是可行的,dsFv能部分抑制LBP的生物学功能。

关键词: 人氨基末端脂多糖结合蛋白;包涵体;二硫键稳定性Fv抗体

中图法分类号: R392-33;R392.11;R967 **文献标识码:** A

Preparation and characterization of disulfide stabilized Fv fragment antibody against N-terminal fragment of human lipopolysaccharide binding protein

ZOU Jia, GE Xiao-dong, YANG Yan-li, LIU You-sheng (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain the disulfide stabilized Fv fragment (dsFv) against N-terminal fragment of human lip polysaccharide binding protein (NH-LBP) and to identify its biological vitality. **Methods** The disulfide stabilized Fv fragment antibody (dsFv) was obtained after the inclusion bodies of dsFvV_H and dsFvV_L had been refolded and purified. Then the characteristics of dsFv were determined *in vitro* by ELISA and by detecting the secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in rats. **Results** There was 2.1 mg protein of dsFv obtained. dsFv had good combination with NH-LBP and could restrain inflammatory reaction caused by lip polysaccharide (LPS) *in vivo*. **Conclusion** It is feasible to get dsFv against NH-LBP by respective expression of V_L and V_H. The partial inhibition of the biological function of LBP by dsFv is a new way to restrain the over-inflammatory reaction *in vivo*.

Key words: N-terminal fragment of human lip polysaccharide binding protein; inclusion body; disulfide stabilized Fv fragment (dsFv)

在烧伤、野战创伤及G^-杆菌感染患者机体中,脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein,LBP)在炎症的发生、发展、转归发挥着重要的作用。LBP是一种促进脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与效应细胞受体相结合的关键载体蛋白,它能显著促进LPS与单核/巨噬细胞膜表面的CD14(membrane CD14, mCD14)结合,从而促进炎症的发生、发展[1,2]。LBP的N端(N-terminal fragment of human LBP, NH-LBP)为与LPS的结合区,因此若能获得针对NH-LBP的抗体,则可能通过该抗体封闭LBP的N端生物学功能,阻断LPS与LBP的结合,减轻内毒素诱导的炎症反应,从而降低G^-杆菌感染引起的死亡率。二硫键稳定性Fv抗体(disulfide stabilized Fv fragment antibody, dsFv),是在V_H和V_L之间通过二硫键连接形成的抗体,由于它提高了Fv片段的稳定性,弥补了普通Fv抗体稳定性差的缺点,因而增强了其在临床上的应用价

基金项目:国家自然科学基金(30400426);第三军医大学科研创新基金(2004) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400426) and the Scientific Funds of Third Military Medical University (2004)

作者简介:邹 佳,女,重庆市人,硕士,助教,主要从事创伤病理、蛋白质工程方面的研究,现在解放军军事医学研究院4所。电话:(023)68752246

通信作者:葛晓冬,电话:(023)68752246,E-mail: xiaodongge650@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-07-17;修回日期:2008-03-27

值[3]。

本研究将抗 NH-LBP 的 dsFvV$_L$与 dsFvV$_H$包涵体蛋白通过复性、折叠和纯化后,获得针对 NH-LBP 的完整 dsFv 抗体,并分别测定其在体内外活性,为进一步探索内毒素的阻断途经及 LBP 在人体内的变化规律打下基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料及试剂来源

鼠抗 6×His mAb(1922416)购自 ROCHE 公司,HRP-鼠抗人 kappa 链抗体购自 Pierce 公司,针对 6×His 的亲和纯化 TALON 柱芯购自 Clontech 公司;氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽、精氨酸等试剂购自鼎国生物有限公司;BALB/c 小鼠购自本校实验动物中心;NH-LBP[4]、抗 NH-LBP Fab 抗体[5]及抗 NH-LBP 的 dsFvV$_L$ 与 dsFvV$_H$ 包涵体蛋白(由大肠杆菌 BL21 star 诱导表达)[6]由本课题组构建。

1.2　dsFvV$_L$ 与 dsFvV$_H$ 包涵体蛋白的复性折叠

将本课题组所筛选的抗 NH-LBP Fab 抗体[5]的 V$_H$ 链基因(为 κ 轻链)和 V$_L$ 链基因中引入突变,编码半胱氨酸,再将突变后的基因连入载体 pComb3H 并于工程菌 BL21 star(DE3)中表达[6],从表达菌体内分离出含有抗 NH-LBP dsFvV$_L$、dsFvV$_H$ 的包涵体蛋白,并以包涵体溶解液(含 50 mmol/L 磷酸钠、6 mol/L 盐酸胍、300 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L PMSF,pH 7.2 ~ 7.4)溶解,磁力搅拌 30 min 后 4 ℃过夜,15 000×g 离心 20 min,取上清,采用 TALON 柱芯进行亲和纯化,收集蛋白质洗脱峰,并采用透析袋脱盐。此后将 dsFvV$_L$、dsFvV$_H$ 蛋白液按 1∶1 的比例混匀,再以 1∶9的比例与蛋白质复性液(含 50 mmol/L KH_2PO_4、1 mmol/L EDTA、2 mmol/L 还原型谷胱甘肽、1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽)混合,用 KOH 保持 pH = 10.7,冰浴中磁珠搅拌 45 min,再用 HCl 调 pH 8.0,在室温下用磁珠搅拌 60 min 后 4 ℃过夜;4 ℃下 12 000×g 离心 15 min 后收集上清,转入透析袋进行脱盐、低温冻干。随后溶解于 20 ml 折叠缓冲液中(含 100 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L 精氨酸,2 mmol/L EDTA,0.9 mmol/L 氧化型谷胱甘肽),用 HCl 调 pH 8.5,于 10 ℃放置 36 ~ 42 h,再加入同量氧化谷胱甘肽后 10℃放置 12 h[7]。

1.3　dsFv 蛋白的亲和纯化

用 TALON 柱芯亲和纯化 dsFv。以 1×PBS 平衡液(含 50 mmol/L 磷酸钠、300 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L PMSF,pH 7.4)洗涤柱芯,含 dsFv 的折叠缓冲液过柱后,先以 1×PBS 平衡液洗柱,再依次使用 A、B、C 共 3 种液体(为分别含咪唑 5、150、300 mmol/L 的 1×PBS 液)进行洗脱,收集洗脱各峰;随后收集液体装入透析袋[截留相对分子质量(8 ~ 10)×10^3],以 5 mmol/L 的 PBS 溶液于 4 ℃下透析 16 ~ 24 h,脱盐后低温冻干。采用 FOLIN 酚法检测其蛋白浓度,并进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳,初步鉴定其纯度。

1.4　dsFv 的体内外活性检测

1.4.1　dsFv 的体外活性检测　①将 dsFv 蛋白与 NH-LBP 蛋白按相等物质的量混合后 37 ℃水浴 5 min,进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,观察 dsFv 条带位移的改变,判断 dsFv 是否能与 NH-LBP 结合。②以 NH-LBP 为抗原标 96 孔板(含 NH-LBP 1 μg/孔),以不同浓度的 dsFv 为一抗,以 HRP-鼠抗人 kappa 链为二抗,以 TMB 为显色底物,并以人血白蛋白为阴性对照,通过 ELISA 法,检测 dsFv 与 NH-LBP 的结合能力。

1.4.2　dsFv 抗体与 Fab 抗体结合活性的比较　以 NH-LBP 为抗原标 96 孔板,分别以不同浓度的 dsFv 抗体和 Fab 抗体[5]为一抗,再以 HRP-鼠抗人 κ 链为二抗,通过 ELISA 实验,对比 2 种抗体与 NH-LBP 的结合力。

1.4.3　dsFv 的体内活性检测　将 BALB/c 小鼠按雌雄各半分为 3 组,每组 10 只,分为白蛋白阴性对照组、LPS 阳性对照组和 dsFv 治疗组。其中白蛋白阴性对照组为腹腔注射鼠源白蛋白(100 μg/100 g),白蛋白不能促进 LPS 与单核细胞的 mCD14 结合,也不参与 LPS 的代谢、降解,因此白蛋白作为无关蛋白,成为阴性对照。LPS 阳性对照组为腹腔注入 LPS(20 μg/100 g)及鼠源白蛋白(100 μg/100 g)。dsFv 治疗组为腹腔注入 LPS(20 μg/100 g),立即注射 dsFv(100 μg/100 g);注射 72 h 后断头处死、眼球取血并制备血清,用 TNF-α 放射免疫试剂盒检测血中 TNF-α 含量,并测量其肝功能 3 项指标(ALT、AST、ALB),进行统计学分析,另将动物模型的脑、心、肺、肝、肾等脏器固定、常规石蜡切片、HE 染色,光镜下观察其病理学改变。

1.5　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对 dsFv 或 Fab 抗体与 NH-LBP 的结合数据,以及动物损伤 72 h 后血清学 ALT、AST、ALB、TNF-α 的数据,均采用 SPSS 10.0 统计学软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　dsFv 蛋白的亲和纯化

dsFv 蛋白经复性折叠后,用 TALON 柱芯进行亲和纯化,可见 A、C 液所洗脱下来的 A、C 蛋白质吸收峰均不明显,只有 B 液所洗脱下来的 B 蛋白质吸收峰明确(图 1)。经过 Folin 酚法测量,共获得 dsFv 蛋白 2.1 mg,其中 1 L dsFvV$_L$ 表达菌液与 1 L dsFvV$_H$ 表达菌液可共同制备 dsFv 0.62 mg。

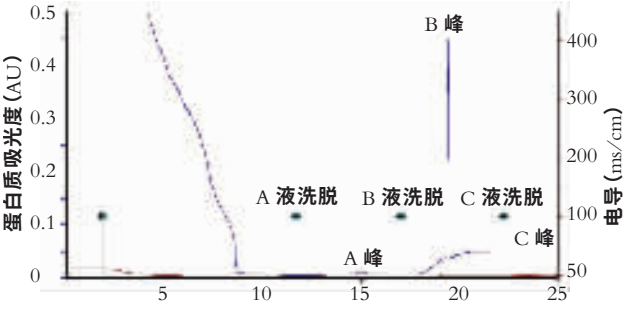
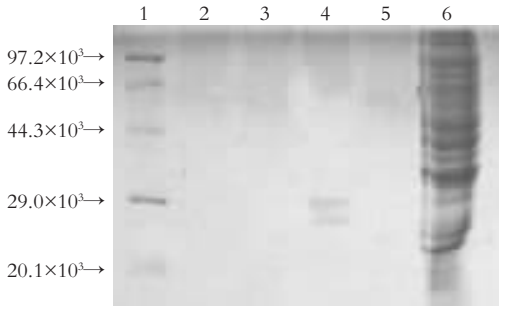


图 1　折叠后的 dsFv 蛋白应用 TALON 柱芯进行亲和纯化

2.2　dsFv 纯化各峰蛋白质的 Tricine-SDS-PAGE 电泳鉴定

各洗脱峰蛋白电泳,可见 B 峰蛋白于(29 ~ 30)×10^3 处有 2 条条带,这是由于 β 巯基乙醇破坏 dsFv 二硫键所致,从而使得 dsFvV$_L$ 与 dsFvV$_H$ 分别显示(图 2)。

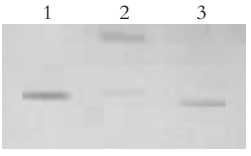


1:蛋白质标准;2:在用 A 液洗脱前所收集的洗脱液(图 1 第 10 min 时间点所收集);3:dsFv 纯化洗脱 A 峰;4:dsFv 纯化洗脱 B 峰;5:dsFv 纯化洗脱 C 峰 ;6:空 BL21 star 全菌蛋白

图 2 dsFv 的 Tricine-SDS-PAGE 鉴定电泳

2.3 dsFv 与 NH-LBP 结合后的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

将 4 μg dsFv 蛋白、4 μg NH-LBP 蛋白(相对分子质量 28×10^3)、4 μg dsFv 与 NH-LBP 混合孵育后的蛋白液分别上样。电泳后凝胶上可见 dsFv 蛋白、NH-LBP 蛋白均为单一条带(图 3),而 dsFv 与 NH-LBP 混合液中出现了新的条带(为 dsFv 与 NH-LBP 结合后蛋白质条带),并可见少许未结合的 dsFv 蛋白条带,初步证明 dsFv 与 NH-LBP 具有一定的结合性。



1: dsFv 蛋白; 2: dsFv 与 NH-LBP 混合液; 3: NH-LBP 蛋白

图 3 dsFv 与 NH-LBP 结合后的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

2.4 ELISA 法测定 dsFv 抗体活性

以人血清白蛋白为对照,经 ELISA 检测,当抗体浓度为 0.1 mg/L 时,获得的光密度值为对照的 2.4 倍,而当浓度下降到 0.01 mg/L 以下时,测得的光密度值明显下降,与白蛋白比较,相差不显著($P>0.05$,表 1)。

表 1 dsFv 抗体与 NH-LBP 的结合活性($\bar{x}\pm s$)

抗原	不同浓度的 dsFv 抗体(mg/L)				
	10	1	0.1	0.01	0.001
NH-LBP	0.61±0.27[a]	0.34±0.19[a]	0.12±0.05[a]	0.06±0.05	0.05±0.03
白蛋白	0.04±0.01	0.06±0.04	0.05±0.03	0.04±0.03	0.04±0.02

a: $P<0.05$,与白蛋白比较

2.5 dsFv 抗体及 Fab 抗体与 NH-LBP 抗原结合活性的比较

以 NH-LBP 为抗原,以人血清白蛋白为对照,对 dsFv 抗体和 Fab 抗体进行结合活性检测,经 t 检验,证明二者与抗原结合的能力相似($P>0.05$,表 2);证实 dsFv 抗体与 Fab 抗体在抗原结合能力上无统计学差异。

2.6 体内各生化指标的检测和分析

测得肝功能 ALT、AST、ALB 及 TNF-α 的各值比较见表 3,可见小鼠用 LPS 损伤后,阳性对照组的 ALT 和 AST 显著升高,ALB 明显降低,提示肝功能损害严重。用 dsFv 进行治疗的动物组,其 ALT 和 AST 也显著升高(与白蛋白阴性对照组比较,$P<0.01$),ALB 无明显改变($P>0.05$),提示肝功能有一定的损害,但肝损伤程度较 LPS 阳性对照组轻(dsFv 治疗组与 LPS 阳性对照组比较,$P<0.05$),dsFv 治疗组的 TNF-α 较阴性对照组升高了约 86%($P<0.01$),但较阳性对照组减轻了约 67%($P<0.01$),初步证明 dsFv 对机体 LPS 的损伤具有一定的保护功能。

表 2 dsFv 抗体及 Fab 抗体与 NH-LBP 的结合活性($\bar{x}\pm s$)

抗原	dsFv(mg/L)		Fab(mg/L)	
	0.1	0.01	0.1	0.01
NH-LBP	0.12±0.05[a]	0.06±0.03	0.15±0.03[a]	0.07±0.04
白蛋白	0.05±0.03	0.04±0.03	0.04±0.03	0.06±0.02

a: $P<0.05$,与白蛋白比较

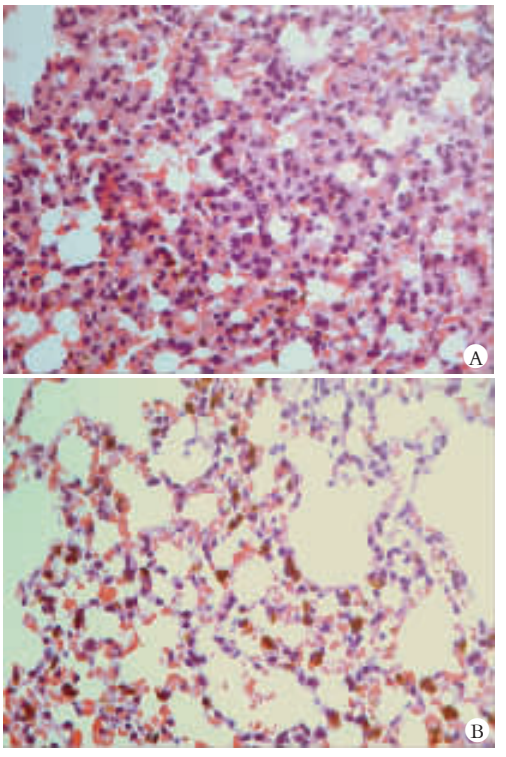
表 3 动物损伤 72 h 后各生化指标的测定($\bar{x}\pm s$)

组别	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALB (g/L)	TNF-α (fmol/ml)
白蛋白阴性对照组	52.0±41.74	62.8±25.52	40.19±13.96	9.06±4.47
LPS 阳性对照组	106.0±33.54[ac]	154.0±18.17[ab]	29.5±6.34[ab]	23.18±7.65[ac]
dsFv 治疗组	87.2±49.95[ac]	117.0±32.87[ab]	35.07±21.5[b]	13.84±61.29[ac]

a: $P<0.01$,与白蛋白阴性对照组比较;b: $P<0.05$,c: $P<0.01$,与 LPS 阳性对照组比较

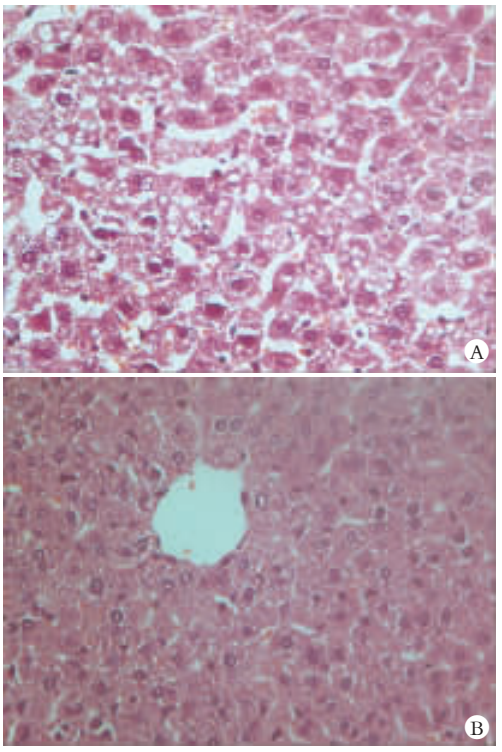
2.7 各器官病理组织学变化

光镜下可见 LPS 对肝和肺的损伤最为明显;其次是肾与脑;而心和脾脏改变不大;dsFv 治疗组与 LPS 阳性损伤对照组比较,各主要器官损伤均较轻,说明本实验中获得的 dsFv 抗体确实能在一定程度上减轻主要器官的损伤(图 4、5)。



A:LPS 损伤阳性对照组 肺泡壁血管显著扩张、充血,部分肺泡腔内见渗出;B:dsFv 治疗组 肺泡壁血管扩张、充血较轻

图 4 肺损伤的光镜观察 (HE×200)



A:LPS 损伤阳性对照组　肝细胞浊肿,部分细胞细胞质内出现空泡,少许细胞包膜破裂,见点状坏死灶;B:dsFv 治疗组　肝细胞浊肿,但无明确坏死灶

图 5　肝损伤的光镜观察　(HE ×400)

3　讨论

自 1990 年 Glockshuber 等[8] 首次成功构建 MCP603 dsFv 抗体以来,dsFv 的研究得到了突飞猛进的发展,它通过在重链的可变区(V_H)和轻链的可变区(V_L)之间形成二硫键来稳定 Fv 片段,与 Fab 抗体相比,稳定性得到很大提高,在机体内存在时间更长,因此在临床上具有较高的应用价值。

本研究运用了由本课题组制备的 dsFvV_L与 dsFv-V_H抗体蛋白片段来制备完整的 dsFv 抗体。由于二硫键的形成需要氧化型谷胱甘肽参加,通过后者的二硫键与重组蛋白中的半胱氨酸(Cys)的巯基之间产生交换,使其巯基转换成氧化的二硫键,从而使谷胱甘肽还原成它的巯基形式;因此在折叠过程使用了大量的氧化型谷胱甘肽,以便增加 dsFv 蛋白的产量[9]。

在获得完整的 dsFv 抗体后,体内外分别对其活性进行初步研究,曾有报道二硫键不耐高温但耐受 37 ℃水浴,但 β-巯基乙醇可将二硫键裂解,因此 L、H 链之间的-S-S-链断裂,导致 dsFv 结构破坏。在本研究中,变性凝胶电泳见 dsFv 已断裂成 2 个片段(图 2),进一步采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,将 dsFv 与 NH-LBP 结合后与 dsFv、NH-LBP 进行电泳对比,在电泳后凝胶中可见到明显结合后的条带,证明我们制备的 dsFv 能与 NH-LBP 有效地结合。

本研究共制备 dsFv 抗体约 2.1 mg,并且当该抗体浓度稀释为 0.1 mg/L,仍然与抗原(NH-LBP)有明确的结合力,证明其结合能力较强。与 Fab 抗体相比较,dsFv 抗体的结合活性出现轻度的下降(但相差不显著),并未出现 Brekke 等[10] 所报道的结合活性反而比 Fab 抗体增强的现象。我们认为 dsFv 相对于 Fab 抗体的优越性主要表现为稳定性的增加,而不能进一步提高与抗原的结合力。这是因为在将 Fab 抗体改建为 dsFv 抗体的过程中,并没有针对抗原的空间构像,对抗体结合部位进行改良,因此 dsFv 抗体与 NH-LBP 抗原在空间结合的吻合性无提高,抗原与抗体的结合力也相应无提高。

在动物体内活性实验中,LPS 阳性对照组的小鼠体内,LPS 通过小鼠体内 LBP 的介导,诱导过度炎症反应的发生,导致肺、肝等脏器损害,而 dsFv 治疗组,由于 dsFv 与小鼠体内 LBP 的氨基端竞争性地结合,抑制了 LPS 与 LBP 的结合,阻止了 LPS 所诱导的过度炎症反应的发生,表明 dsFv 能有效减少 LPS 所诱导的炎症因子的产生,在一定程度上减轻过度炎症对主要器官的损伤。针对 NH-LBP 的 dsFv 抗体的获得为进一步研究感染患者体内 LBP 变化规律及抗炎治疗奠定了一定的基础。

参考文献:

[1] Berner R, Furll B, Stelter F, *et al*. Elevated levels of lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in plasma in neonatal early-onset sepsis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(2): 440 - 445.

[2] Gouwy M, Struyf S, Proost P, *et al*. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(6): 561 - 580.

[3] Hao H J, Jiang Y Q, Zheng Y L, *et al*. Improved stability and yield of Fv targeted superantigen by introducing both linker and disulfide bond into the targeting moiety [J]. Biochimie, 2005, 87(8): 661 - 667.

[4] 葛晓冬, 刘友生, 王晓东, 等. 重组人脂多糖结合蛋白的氨基末端片段在昆虫细胞中的表达、纯化及功能鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(22): 2029 - 2032.

[5] 葛晓冬, 邹　佳, 刘友生, 等. 人源抗 NH-LBP Fab 抗体的制备和初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(4): 359 - 362.

[6] 葛晓冬, 邹　佳, 杨艳丽, 等. 抗人脂多糖结合蛋白氨基端片段抗体 dsFv V_L链的构建、表达和鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(14): 1364 - 1367.

[7] Trachuk L, Letarov A, Kudelina I A, *et al*. *In vitro* refolding of carboxypeptidase T precursor from Thermoactinomyces vulgaris obtained in Escherichia coli as cytoplasmic inclusion bodies[J]. Protein Expr Purif, 2005, 40(1): 51 - 59.

[8] Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, *et al*. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments [J]. Biochemistry, 1990, 29(6): 1362 - 1367.

[9] Schmiedl A, Zimmermann J, Scherberich J E, *et al*. Recombinant variants of antibody 138H11 against human gamma-glutamyltransferase for targeting renal cell carcinoma[J]. Hum Antibodies, 2006, 15(3): 81 - 94.

[10] Brekke O H, Loset G A. New technologies in therapeutic antibody development[J]. Curr Opin Pharmacol, 2003, 3(5): 544 - 550.

(编辑　汪勤俭)