文章编号:1000-5404(2009)23-2319-04

论著

抗 HIF-1α 肺腺癌人源单链抗体的筛选和初步鉴定

王 洁[1],李建国[1],庞 华[1],彭志平[2],李少林[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院核医学科,[2]核医学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 从单链大容量噬菌体抗体库中筛选特异性的抗 HIF-1α 肺腺癌人源单链抗体(scFv),并进行初步鉴定。**方法** 先后以肺腺癌细胞 A549、HIF-1α 为抗原,通过"吸附-洗脱-扩增"从大容量噬菌体抗体库中筛选特异性抗体,感染大肠杆菌 HB2151,实现可溶性抗体的表达,ELISA、免疫细胞化学检测抗原-抗体结合活性,SDS-PAGE 和 Western blot 检测可溶性抗体表达和相对分子质量。**结果** 经筛选后,单链抗体得到富集。随机选取 10 个克隆,ELISA 检测 5 个与 HIF-1α 抗原呈阳性反应,阳性率为 50%。免疫细胞化学表明抗体与 A549 细胞特异性结合。SDS-PAGE、Western blot 证明单链抗体成功可溶表达,且相对分子质量在 30×10^3 左右,ELISA 显示其有较好的特异性。**结论** 利用单链大容量噬菌体抗体库技术成功获得特异性抗 HIF-1α 的肺腺癌人源单链抗体。

关键词: 噬菌体抗体库;单链抗体;HIF-1α;肺腺癌
中图法分类号: R392.11;R392.7;R734.2 **文献标识码:** A

Screening and identification of human anti-HIF-1α scFv of lung adenocarcinoma

WANG Jie[1], LI Jian-guo[1], PANG Hua[1], PENG Zhi-ping[2], LI Shao-lin[2] ([1]Department of Nuclear Medicine, First Affiliated Hospital, [2]Department of Nuclear Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To screen human anti-hypoxia-inducible factor (HIF)-1α scFv of lung adenocarcinoma from large phage antibody library and identify the positive clones. **Methods** Panning of large phage antibody library against lung adenocarcinoma cell line A549 and HIF-1α was conducted respectively to select specific antibodies. *E. coli* HB2151 was infected to induce the expression of soluble scFv. The binding activity and specificity were tested by ELISA and immunocytochemical assay. The expression and relative molecular weight of the soluble scFv was detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. **Results** After panning, the target scFv was enriched, and ELISA results showed that positive reactions to HIF-1α were detected in 5 of 10 random clones with a positive ratio of 50%. Immunocytochemical analysis showed the specific affinity of the antibodies to A549 cells. The soluble human anti-HIF-1α scFv fragments of lung adenocarcinoma were expressed in *E. coli* HB2151 and then confirmed by SDS-PAGE. The result of Western blotting showed that the relative molecular weight of the soluble scFv was about 30×10^3. The binding activity and specificity were confirmed by ELISA. **Conclusion** Human anti-HIF-1α scFv of lung adenocarcinoma is successfully obtained with large phage antibody library technique.

Key words: phage antibody library; single chain variable fragment; hypoxia-inducible factor-1α; lung adenocarcinoma

缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor, HIF-1)是肿瘤缺氧时重要的转录调节因子,HIF-1α 是调节其活性的主要亚基。研究发现 HIF-lα 在非小细胞肺癌(none small cell lung cancer, NSCLC)肿瘤组织中高表达,且与肿瘤的生长、侵袭转移密切相关,有望成为肺癌诊断和治疗的新靶点。

噬菌体单链抗体(scFv)克服了单克隆抗体(mAb)的人抗鼠抗体反应,为完全的人源抗体,我们

基金项目: 国家自然科学基金(30370422,30070230);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5305)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370422, 30070230) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5305)
作者简介: 王 洁,女,河南省安阳县人,硕士研究生,主要从事肿瘤核医学方面的研究。电话:(023)86138189, E-mail:wang343051@sohu.com
通信作者: 李建国,电话:(023)68898877
收稿日期: 2009-06-14;**修回日期:** 2009-07-28

从大容量抗体库中筛选得到特异性抗 HIF-1α 的肺腺癌人源 scFv,为该抗体今后用于肺癌临床的诊断和治疗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大容量噬菌体抗体库为本实验室构建,辅助噬菌体 M13KO7、大肠杆菌 *E. coli* TG1、*E. coli* HB2151、辣根过氧化物酶标记抗 M13 单克隆抗体(HRP/Anti-M13 Monoclonal Antibody)、HiTrap™ Anti-E tag 亲和层析柱均购自 Amersham biosciences 公司,人肺腺癌细胞株 A549、支气管上皮细胞 HBE16 为本实验室保存,乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s 购自本校病理生理实验室,HIF-1α 抗原购自北京博奥森生物技术有限公司,鼠抗E-tag 单克隆抗体购自天津赛尔生物技术有限公司,anti-E tag 抗体(HRP)购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 对噬菌体抗体库的全细胞筛选 将噬菌体抗体库预先用正常支气管上皮细胞 HBE16 吸附,以封闭抗体非特异性结合部位。再以肺腺癌 A549 细胞(1×10^7)为抗原经"吸附-洗脱-扩增"对抗体库进行 4 轮亲和筛选富集。

1.2.2 抗 HIF-1α 抗体的筛选 将 HIF-1α 抗原用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液稀释至 10 μg/ml,包被免疫管,4 ℃过夜,次日 5% 的 BSA 封闭 2 h,加入 500 μl 全细胞筛选过的噬菌体抗体库,37 ℃孵育 1 h,0.1% Tween20-PBS 洗 3 次,加入 500 μl 洗脱液(0.1 mol/L 甘氨酸-HCl,pH 2.2),37 ℃静置 10 min,吹打后转入一干净试管,50 μl 中和液(1 mol/L Tris 液,pH 7.4)混匀,加入对数生长期 *E. coli* TG1 细胞 3 ml,37 ℃缓摇 2 h,加入氨苄青霉素至终浓度为 100 μg/ml,葡萄糖至终浓度为 2%,再加入 3×10^{10} pfu 的 M13K07,振荡培养 1.5 h。离心沉淀 *E. coli* TG1 细胞,弃上清,10 ml 2YT-AK 培养液重悬沉淀,振荡培养过夜。过夜菌液离心沉淀细胞,上清中加入 1/5 体积 PEG/NaCl,冰浴 2 h,离心弃上清,2 ml 2YT 培养液重悬沉淀,离心取上清,完成第一轮筛选。第二、三、四轮筛选时,除了 PBST 洗涤次数分别为 3、5、10 次外,其余均与第一轮筛选的条件相同;每次筛选前后的抗体库均取少量菌液涂 SOBAG 板计算抗体库滴度,计算投入产出比(回收率),作为特异性噬菌体抗体富集的指标。

1.2.3 ELISA 实验鉴定噬菌体抗体 从 SOBAG 板挑取单菌落,加入 M13K07 辅助噬菌体制备噬菌体抗体,用于 ELISA 检测。将 HIF-1α 抗原稀释至 5 μg/ml 包被 96 孔板,一抗为噬菌体抗体,设立对照(PBS 代替噬菌体抗体)。二抗为 HRP/anti-M13 单克隆抗体。TMB 底物显色,450 nm 波长酶标仪读板,P/N >4 为阳性。

1.2.4 免疫细胞化学鉴定 取对数生长期的肺癌 A549 细胞、乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞制成 3×10^4 个/ml 的细胞悬液进行细胞爬片,4% 多聚甲醛固定,过氧化氢去除内源性过氧化氢酶,非免疫血清孵育后加一抗噬菌体抗体,以 PBS 代替一抗作阴性对照,二抗为 HRP/anti-M13 单克隆抗体。DAB 显色,封片,光镜下观察拍照。

1.2.5 可溶性抗 HIF-1α 抗体的表达 取 ELISA 检测强阳性的单菌落抽提质粒,转入感受态 *E. coli* HB2151 菌,涂 SOBAG 板并挑单菌落,培养液培养至 $D(600)=0.5$ 时加入 IPTG 至 1 mmol/L。离心收集细菌,重悬于提取缓冲液后超声碎菌。离心收集上清即得可溶性 scFv;重悬沉淀再离心,上清即细菌周质中的可溶性 scFv。

1.2.6 SDS-PAGE、Western blot 鉴定可溶性 scFv 的表达 在电泳槽上灌制 12% 分离胶、5% 浓缩胶行 SDS-PAGE,将可溶表达诱导菌液各 15 μl 加入上样缓冲液中加样,凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。将 SDS-PAGE 鉴定表达可溶性 scFv 菌液经 HiTrap™ Anti-E tag 亲和层析柱纯化后行 Western blot 鉴定,加入鼠抗 E-tag 单克隆抗体和 HRP-抗鼠抗体检测,化学发光,显影,定影。

1.2.7 ELISA 实验鉴定可溶性 scFv 把肺腺癌细胞 A549、乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 和正常支气管上皮细胞 HBE16 分别按 3×10^4/孔接种于 96 孔板,ELISA 检测可溶性 scFv 的免疫活性,设立对照(PBS 代替可溶性抗体),各孔分别加入 HRP 标记抗 E tag 抗体,TMB 显色,450 nm 波长酶标仪读板(统计学方法为配对 t 检验)。为进一步鉴定可溶性 scFv 与 HIF-1α 的结合活性,我们用筛选出的 3 株抗体行竞争抑制性 ELISA 实验,将 HIF-1α 包被 96 孔板,实验组每孔加入 25 μl 可溶性抗体的同时分别加入 25 μl 不同浓度的 HIF-1α 竞争抑制,对照组不加抑制。加入 HRP 标记抗 anti-E tag 抗体,TMB 显色,450 nm 波长酶标仪读板。抑制率 = [对照组 $D(450)$ − 实验组 $D(450)$]/对照组 $D(450)\times100\%$。

2 结果

2.1 噬菌体单链抗体的筛选富集和 ELISA 鉴定

以肺癌细胞 A549、HIF-1α 为抗原对噬菌体抗体库(4.6×10^{12} cfu/ml)分别进行了 4 轮"吸附-洗脱-扩增"富集筛选,回收率逐轮提高,最后一轮产出 5.9×10^5 cfu/ml,噬菌体单链抗体得到富集。从 SOBAG 板随机挑取 10 个单菌落,制备噬菌体抗体,ELISA 检测其中 5 个与 HIF-1α 抗原呈阳性反应,阳性率为 50%。5 个阳性抗体的 $D(450)$ 分别为 0.612、0.629、0.607、0.720、0.768。

2.2 免疫细胞化学鉴定

免疫细胞化学结果显示与乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞和肺腺癌 A549 细胞阴性对照比较,scFv 抗体使肺腺癌 A549 细胞明显深染(图 1),证实此 scFv 抗体与肺腺癌 A549 细胞特异性结合。

2.3 SDS-PAGE、Western blot 鉴定可溶性 scFv

将阳性的噬菌体感染 *E. coli* HB2151,经 IPTG 诱导后,表达产物经 SDS-PAGE 检测结果显示上清包含可溶性 scFv 和细菌周质分泌可溶性 scFv 均在 30×10^3 左右有条带,Western blot 结果显示相对分子质量 30×10^3 左右有一条清晰的显影条带(图 2),证明实现 scFv 可溶性表达,且可溶性 scFv 相对分子质量约 30×10^3 左右,与预期一致。



A：A549 细胞；B：MDA-MB-435s 细胞；C：A549 细胞阴性对照

图 1　免疫细胞化学检测 scFv（一步法 ×200）

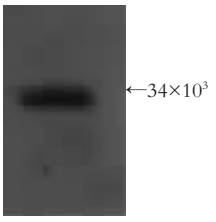


图 2　Western blot 检测可溶性 scFv

2.4　ELISA 鉴定可溶性 scFv

ELISA 结果显示可溶性 scFv 具备较高免疫活性,可以与肺腺癌细胞 A549 特异性结合,而不与乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 和正常支气管上皮细胞 HBE16 结合($P < 0.05$)。竞争抑制 ELISA 实验结果显示获得的 3 株抗体均能同游离的 HIF-1α 抗原产生抑制效应,且抗体浓度越高,抑制作用越明显(图 3),说明获得的可溶性 scFv 与 HIF-1α 特异性结合。

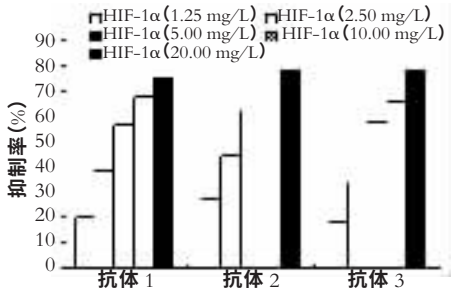


图 3　抗 HIF-1α 可溶性 scFv 的竞争抑制实验

3　讨论

HIF-lα 与肿瘤生长、侵袭转移密切相关,研究发现 HIF-lα 在 NSCLC 肿瘤组织中 mRNA 及蛋白表达明显高于癌旁组织和正常肺组织,作为缺氧条件下一个非常重要的转录调节因子,HIF-lα 可能成为肺癌一个新的生物标志物和诊断、治疗的靶点[1-4]。抗体技术是肿瘤研究的一个热点,目前用于肺癌研究的主要是 mAb,但因其会产生人抗鼠抗体反应,因而不能在临床广泛应用。噬菌体 scFv 克服了这种人抗鼠抗体反应,是完全的人源抗体,且与完整抗体相比具有分子量小、穿透力好、免疫原性弱等优点,而且容易从体内清除,在临床上有很好的应用前景。运用噬菌体抗体库技术制备的抗 TNF-α 人 mAb 已经获美国食品和药品管理(FDA)批准作为治疗 RA 的临床药物且疗效显著,证实了从大容量噬菌体抗体库中筛选人源抗体的可行性。我们从抗体库中筛选出针对 HIF-lα 靶点的肺腺癌人源 scFv,有望为肺癌的早期诊断和治疗提供新的有效途径和切入点,目前国内外还没有这方面的研究。

ScFv 是由 VH 和 VL 中间加一段 Linker 构成[5],目前人源 scFv 的制备主要是利用噬菌体抗体库技术表面呈现的特点,通过高效的筛选体系,不经免疫制备出针对不同抗原的特异 scFv[6]。本实验室已经建立了足够库容的噬菌体抗体库,筛选出特异抗体的关键是采用合理的筛选方法。目前的研究多数是直接针对靶抗原来筛选,本研究为了提高抗体对肺腺癌的针对性,在针对 HIF-1α 抗原筛选之前首先采用了完整细胞筛选法[7,8]进行正负筛选,用 HBE16 细胞阴性筛选除去抗体的非特异性结合,以 A549 细胞进行阳性筛选,大大提高了抗体对肺腺癌细胞的亲和力。对纯化抗原进行固相筛选,使筛选有了明确的靶点,大大提高了筛选特异性与筛选效率,本研究对 HIF-1α 靶抗原进行了 4 轮“吸附-洗脱-扩增”亲和筛选[9,10]。经过 ELISA、免疫细胞化学鉴定,证实通过全细胞筛选和纯化抗原固相筛选相结合的方法,本研究从大容量噬菌体抗体库中筛选出了特异的抗 HIF-1α 肺腺癌人源 scFv。

噬菌体抗体将抗体分子的 scFv 等片段与噬菌体外壳蛋白融合,展示于噬菌体颗粒表面,为了排除噬菌体蛋白的干扰,将筛选的 scFv 更好的用于肺癌诊断和治疗的研究,本实验引入了大肠杆菌 HB2151,HB2151 不含有琥珀抑制基因,终止密码子的存在使抗体分子不与 GⅢ融合,可以实现 scFv 的可溶性表达[11]。SDS-PAGE 鉴定发现 IPTG 诱导菌液在 30×10^3 左右有条带,与预期一致,Western blot 结果也在相对分子量 30×10^3 左右有清晰的条带,证明实现 scFv 可溶性表达,且可溶性 scFv 分子量约 30×10^3 左右,与文献[10]报道结果相似,scFv 的特异性也通过 ELISA 再次证实。可溶性 scFv 的成功表达为下一步将抗体应用于肺腺癌免疫诊

断和治疗研究等奠定了基础。放射免疫显像在肿瘤诊断中发挥着重要的作用,scFv 比 mAb 更适合应用于放射免疫显像,目前我们已经在进行这方面的研究。为了进一步研究筛选的 scFv 对肺癌的作用,我们下一步将进行动物体内外实验以期获得很好的治疗效果。

参考文献:

[1] Yohena T, Yoshino I, Takenaka T, *et al*. Upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA and its clinical significance in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(3): 284 – 290.

[2] Kim S J, Rabbani Z N, Dewhirst M W, *et al*. Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2005, 49(3): 325 – 335.

[3] Li Y, Qiu X, Zhang S, *et al*. Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1alpha and HIF-2alpha correlates with migration and invasion in lung cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(4): 322 – 330.

[4] Zuo S, Ji Y, Wang J, *et al*. Expression and clinical implication of HIF-1alpha and VEGF-C in non-small cell lung cancer[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(6): 674 – 676.

[5] Beckman R A, Weiner L M, Davis H M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors[J]. Cancer, 2007, 109(2): 170 – 179.

[6] Mondon P, Dubreuil O, Bouayadi K, *et al*. Human antibody libraries: a race to engineer and explore a larger diversity[J]. Front Biosci, 2008, 13: 1117 – 1129.

[7] 段 红,庞 华,尹晓玲,等. 全人源食管癌噬菌体单链抗体库的筛选及特异性鉴定[J]. 中国肿瘤临床, 2008,35(12): 714 – 717.

[8] Heitner T, Satozawa N, McLean K, *et al*. Obligate multivalent recognition of cell surface tomoregulin following selection from a multivalent phage antibody library[J]. J Biomol Screen, 2006, 11(8): 985 – 995.

[9] 王欲晓,乔媛媛,周丽君,等. 从大容量抗体库中筛选抗 TNF-α 人单链抗体[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008,24(9): 878 – 880.

[10] 杜 丽,周丽君,潘秀颉,等. 从大容量噬菌体抗体库中筛选抗 DNA-PKcs 人源单链抗体[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(9): 20 – 26.

[11] Xiong H, Li S, Yang Z, *et al*. *E. coli* expression of a soluble, active single-chain antibody variable fragment containing a nuclear localization signal[J]. Protein Expr Purif, 2009, 66(2): 172 – 180.

(编辑 邓强庭)

(上接2318 页)

表1 尿酸异常组和正常组各项临床指标比较($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

组别	SBP(mmHg)	BMI	WHR	病程(年)	E	A	E/A	E峰减速时间
尿酸异常组	158.2±14.3	28.1±3.6[a]	0.91±0.11[a]	11.0±7.8	67.1±18.4[a]	77.6±11.3[a]	0.82±0.26[a]	223±32[a]
尿酸正常组	155.8±5.64	23.3±3.9	0.79±0.08	10.0±8.1	71.6±17.5	68.4±13.6	1.04±0.27	179±27

a: $P<0.05$,与尿酸正常组比较

3 讨论

高血压患者有很高的 HUA 发病率。血尿酸是嘌呤代谢的终产物,从食物中来源为外源性,内源性则由氨基酸、核苷酸及其他小分子化合物合成和核酸分解代谢而来。高血压引起肾血管阻力增加,肾小动脉硬化,有效肾血流量减少,影响尿酸的排泄。且有证据表明 HUA 可以促进高血压的发生、发展[3]。HUA 与脂代谢紊乱相互加剧:血尿酸水平增加使嘌呤合成相应增加,由于尿酸、血脂合成主要在肝中进行,嘌呤合成相应增多引起葡萄糖-6-磷酸酶的活性增加,导致脂肪酸合成增加使血脂升高; HUA 时 3-磷酸甘油酰脱氢酶的活性降低,使糖酵解的中间产物向 5-磷酸核糖及磷酸核糖焦磷酸转移,导致血尿酸增多。同时也使 3-磷酸甘油积聚致使甘油三酯升高[4]。

本实验中 HUA 组 TG、LDL-C 较 NUA 组增高,而 HDL 较 NUA 组降低。HUA 组较 NUA 组 BMI、WHR 更高。高血压 HUA 与肥胖联系密切。WHR 升高是 HUA 的独立危险因素[5]。HUA 激活肾素-血管紧张素系统及增加盐敏感性,促进血管平滑肌细胞增生[6],众所周知 RAAS 的激活及血管阻力的增加是高血压心功能改变的主要诱因。

高血压早期即可出现舒张功能不全,本研究结果提示 HUA 患者心脏舒张功能异常较尿酸正常组更为显著,考虑与 HUA 等早期生化指标异常密不可分,本研究在生化异常与功能损伤之间建立起了密切关系,是对继往研究的有益补充。

关键词: 高血压病;尿酸;心脏舒张功能
中图法分类号: R544.102 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Bickel C, Rupprecht H J, Blankenberg S, *et al*. Serum uric acid as an independent predictor of mortality in patients with angiographically proven coronary artery disease[J]. Am J Cardiol, 2002, 89(1): 12 – 17.

[2] 孙宁玲. 高血压与心力衰竭[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(4): 382 – 384.

[3] Mazzali M, Hughes J, Kim Y G, *et al*. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism [J]. Hypertension, 2001, 38(5): 1101 – 1106.

[4] Chen L Y, Zhu W H, Chen Z W, *et al*. Relationship between hyperuricemia and metabolic syndrome[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2007, 8(8): 593 – 598.

[5] Hikita M, Ohno I, Mori Y, *et al*. Relationship between hyperuricemia and body fat distribution[J]. Intern Med, 2007, 46(17): 1353 – 1358.

[6] Feig D I, Johnson R J. The role of uric acid in pediatric hypertension [J]. J Ren Nutr, 2007, 17(1): 79 – 83.

(编辑 张 维)