DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.023

论著

文章编号:1000-5404(2003)24-2220-03

特异性肿瘤坏死因子-α免疫吸附柱的研制及其吸附率的实验研究

王 勤,吴雄飞,王军霞,刘 宏,李 敫,金锡御 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿专科中心肾科,重庆 400038)

提 要:目的 制备特异性肿瘤坏死因子-α免疫吸附柱,并测试其吸附性能。方法 采用自行设计定制的过滤柱,其内装入以PSM为载体,依次包被PLL及抗rHTNF-α McAb而制备的免疫微球,制成特异性免疫吸附柱,观察吸附柱对3种不同浓度的2种TNF-α溶液的吸附率以及柱效稳定性和重复使用情况。结果 该吸附柱的最大吸附量均达到90%以上,抗原含量与最大吸附量及最大吸附时间成反比。pH值3.0的PBS可将98.3%的rhTNF-α自微球上洗脱,吸附柱缓冲后的吸附率仍达96%。结论 特异性TNF-α免疫吸附柱对TNF-α有极佳的吸附率,且柱效稳定,可以重复使用。

关键词:肿瘤坏死因子-α;免疫微球;免疫吸附
中图法分类号:R392.11;R-331 文献标识码:A

Preparation of specific immune adsorption column for TNF-α and its adsorption rate

WANG Qin, WU Xiong-fei, WANG Jun-xia, LIU Hong, LI Lian, JIN Xi-yu (Division of Kidney Diseases, Center for Urology of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To prepare the specific immune absorption column for TNF-α and to test its absorptive capability. **Methods** Polystyrene microspheres (PSM) were coated with poly-L-lysine (PLL) and antirecombinant human TNF-α monoclonal antibody (rHTNF-αMcAb). This immune microspheres were used as carrier and loaded into the self-made filter column. The adsorption rate of the column for TNF-α in two out of three kinds of solutions at different concentrations, the stability of column effect and the condition of repeated application were observed. **Results** The maximum adsorption volume of the column for TNF-α was more than 90% for all kinds of solutions. The content of antigen was in reverse ratio to the maximum adsorption volume and the time for maximum adsorption volume. PBS with pH 3.0 could rinse down 98.3% rHTNF-α from the microspheres. The adsorption rate of the adsorption column still reached 96% after buffering. **Conclusion** The specific immune adsorption column with high adsorption rate for TNF-α and stable efficiency can be used repeatedly.

Key words: tumor necrosis factor-alpha; immune microsphere; immunoadsorption

大量研究认为,肿瘤坏死因子-α(TNF-α)在全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及多器官功能障碍综合征(Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的发病中是一个关键的细胞因子,是启动一系列病理生理反应的扳机。清除过量产生的TNF-α,阻止有害细胞因子的产生,阻断SIRS,是早期治疗MODS并改善MODS预后的关键。本研究应用自行设计的过滤柱,采用新颖的免疫微球制作技术,成功地研制了一种新型特异性TNF-α免疫吸附柱,并观察该吸附柱对3种不同浓度的2种TNF-α溶液的吸附率以及柱效稳定性和重复使用情况。主要目的是探讨一种特异性的吸附清除TNF-α的新方法,为今后创造新型救治MODS患者的有效措施提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

1.1.1 主要试剂 重组人肿瘤坏死因子-α(rHTNF-α)、抗重组人肿瘤坏死因子-α单克隆抗体(Z20)由军科院沈倍奋院士惠赠。聚苯乙烯微球(PSM,天津南开和成科技公司),多聚赖氨酸(PLL,武汉博士德生物公司)。

1.1.2 主要仪器设备 UV-754分光光度计(上海精密仪器公司),550-酶标仪(Bio-Rad,美国),倒置显微镜、荧光显微镜

基金项目:重庆市应用基础研究资助项目(2002-18-79)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2002-18-79)
作者简介:王 勤(1954-),男,山东省平原县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肾脏病和血液净化临床方面的研究,发表论文9篇。现在解放军324医院工作。电话:(023)68762063
通信作者:吴雄飞,电话:(023)68754726;E-mail:kidney@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-10-16;修回日期:2003-10-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(Olympus, 日本), TE-112 微量注射泵(Terumo, 日本)、XPS 仪(Physics&Electon Co. 美国)。

1.2　方法

1.2.1　过滤柱的制作、处理及检测　　自行设计过滤柱(细长管状玻璃制品, 长 20 cm, 内径 0.4 cm, 容量 5 ml; 筛板厚 0.5 cm、孔径 100 μm, 耐强酸、强碱及 100 ℃。下端设一转向开关, 上端具磨砂盖), 由重庆北碚玻璃制品厂制成产品; 常规预处理后行 XPS 检测[1], 二甲基二氯硅烷行硅烷化处理。分别使生理盐水、血浆通过该柱, 计算通透率; 滤过液行光镜观察。

1.2.2　制备免疫微球　　先将清洗后的 PSM(每份 100 mg)包被 PLL, 分别于 4 ℃、20 ℃及 37 ℃时 15、30、60、120 min 取样, 分光光度计测定 PLL 含量; 以 3 种不同 pH 值的洗脱液行包被稳定性测定; 以 Marshall 法[2] 用 FITC 标记已包被 PSM 的 PLL, 荧光显微镜下观察。再用戊二醛两步法[3] 行抗 rHTNF-α McAb 包被 PLL, 同上法标记包被的抗体并观察。

1.2.3　特异性 TNF-α 免疫吸附柱的制作及其性能检测　　将免疫微球移入过滤柱中, 制备吸附柱。工作状态性能检测: ①将硅胶管经微量注射泵连接吸附柱与输液瓶。当生理盐水及新鲜血浆通过吸附柱时, 严密观察各处有无渗漏及进气; ②将吸附柱分别置于不同位置, 观察微球悬浮状态。抗体包被稳定性检测: 以 3 种洗脱液通过吸附柱, 收集滤过液, 分光光度计测定; 荧光显微镜下观察免疫微球表面荧光强度变化。

1.2.4　吸附率检测　　①使 3 种不同 rHTNF-α 浓度的 PBS 及血浆通过吸附柱, 收集每分钟滤过液。ELISA 法测定滤过前后 rHTNF-α 浓度变化; ②收集 4 种不同 pH 值的 PBS 滤过液中 rHTNF-α 洗脱情况; 同时取微量微球置荧光显微镜下观察; ③将 0.1 mol/L pH 8.5 的 CBS 100 ml 以同样速率注入吸附柱, 对免疫微球进行缓冲。再次行滤过吸附及 ELISA 测定, 观察免疫微球对 rHTNF-α 的二次吸附率。

1.3　统计学分析

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　XPS 检测结果

在 194.00～214.00 电子伏特(eV)的 Cl 原子范围内, 未见明显强度峰; 在 158.00～178.00 eV 的 S 原子束缚范围内, 峰值位于 174.88 eV, 但强度仅达 1482 cps, 未及强度的 50%; 在 394.00～414.00 eV 的 N 原子束缚范围内, 也未见明显强度峰。对照美国物理电子公司提供的参照表(PC Software reference table), 未发现有氮(N)、氯(Cl)和硫(S)原子污染。硅烷化处理后的实验中, 过滤柱内未发现有血浆粘附。

过滤柱的观察显示, PSM 呈规则正球形, 表面光滑, 无缺损, 直径大于筛板孔径; 过滤柱对生理盐水的通透性为 20 ml/min, 加入 PSM 后略有下降, 为 16.8 ml/min; 对血浆的通透性为 17.5 ml/min, 加入 PSM 后的通透性略降为 14.0 ml/min。但均无统计学差异($P>0.05$)。收集的所有滤过液中均未显示有 PSM 漏出。

2.2　免疫微球检测结果

不同条件下 PLL 包被 PSM 后浓度下降结果见表 1。从表中看出, pH 9.5、20 ℃、60～120 min 3 者为 PLL 包被 PSM 的最佳条件。荧光显微镜下仅在 pH 9.5、20 ℃组中见到 PSM 表面有荧光素反应, 证实了确有 PLL 包被在 PSM 表面。洗脱液检测结果显示, 洗脱前后 PLL 含量无明显变化, 说明 PLL 在 PSM 表面包被较为牢固。

表 1　包被 PSM 后 PLL 浓度下降百分率

Tab 1　Decrease of PLL concentration after being coated on PSM(%)

Time	pH 9.5			pH 8.5			pH 7.4		
(min)	4 ℃	20 ℃	37 ℃	4 ℃	20 ℃	37 ℃	4 ℃	20 ℃	37 ℃
15	7.19	39.89	35.26	8.38	19.97	30.08	0.02	0.03	0.00
30	12.54	65.17 *	51.84 *	9.71	32.19	42.15	0.01	0.01	0.00
60	27.61	96.82 **	91.22 **	14.55	79.36 **	81.51 **	0.01	0.01	0.01
120	25.83	99.33 **	98.53 **	21.69	91.84 **	92.36 **	0.01	0.01	0.01

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* 15 min

抗 rHTNF-α McAb 包被 PLL 后的含量下降百分比平均值分别为 63.55%、95.28%和 87.23%。提示在相同温度及包被时间内, 0.2%浓度的戊二醛溶液可以构成彼此之间的最佳交联。FITC 标记观察也显示抗 rHTNF-α McAb 明显包被在 PLL 之上。洗脱实验结果显示, 在洗脱液中无明显抗体含量增加; 荧光显微镜观察也未见免疫微球表面荧光强度有明显变化, 说明用戊二醛溶液进行的抗体对 PLL 的包被结合牢固, 达到了制作吸附柱的要求。

2.3　特异性 TNF-α 免疫吸附柱的检测结果

结果显示, 该柱的密封性能良好, 液体进出通畅, 开关应用灵活自如, 吸附柱倒置 180°时, 微球悬浮最为充分且通透率无变化。吸附柱对 3 种不同浓度的 2 种溶液中抗原的吸附结果见表 2 (TNFα-PBS: 含抗原的 PBS; TNFα-plasm: 含抗原的血浆)。

表 2　特异性 TNF-α 免疫吸附性的吸附率

Tab 2　Adsorption rate of the specific TNF-α immunoadsorptive column

Concentration	TNFα-PBS		TNFα-plasm	
(μg/ml)	Maximum absorption rate(%)	Time(min)	Maximum absorption rate(%)	Time(min)
2	99.7	9	97.2	8
5	99.4	5	93.5	5
10	99.1	3	90.7	3

从表 2 中可以看出: ①最大吸附率均达到 90%以上; ②抗原含量越高, 最大吸附率就越低, 达到最大吸附量时间就越短; 相反, 抗原含量越低, 最大吸附率就越高, 达到最大吸附量时间就越长, 二者成反比; ③吸附柱达最大吸附率时存在饱和现象。

4 种洗脱滤过液中的 rHTNF-α 浓度分别为 0.90%、1.20%、8.70%、98.30%。提示 pH 3.0 的洗脱液可以将大部分 TNF-α 自免疫微球上洗脱。对吸附柱进行缓冲后, 再 1 次进行的吸附试验结果表明, 免疫微球仍具有较强的特异性吸附能力(吸附率达 96%)。

3　讨论

本研究主要采用血液净化中连续性血浆滤过吸附

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(CPFA)的原理,将免疫微球装入一个既有良好通透性能,又能有效阻止微球漏出,与血浆纤维蛋白原接触后较少引起凝血机制紊乱,并且能够满足实验研究要求的容器中,应用免疫学原理,有针对性地清除血浆中的TNF-α。我们自行设计的过滤柱的生物相容性好,可以阻挡微球的漏出,不同实验条件下的通透性良好。细长管状可以保证液体里微球在其中的充分悬浮。

制备免疫微球的关键之处是确保包被后的抗体具有稳定的功能活性。聚苯乙烯(PS)表面带有-COOH官能团,已被广泛地作为载体微球使用[4]。多聚赖氨酸(PLL)是一种较大分子的、表面带有多个正电荷的多聚阳离子胺,具有极强的粘附性,近来正被日益广泛地用于组织工程以及包括芯片技术在内的基因工程领域[5]。PS与PLL二者正好是一对构建免疫微球的良好材料,不仅可以进行静电结合以及共价结合,而且还保留了多聚赖氨酸多余的带正电荷氨基的特点,便于进行其后的抗体包被。由于其后洗脱抗原要使用酸性溶液,恐影响PLL的包被稳定性,故我们采用3种不同pH值的包被液(pH 9.5、8.5及7.4),对包被条件及其稳定性进行了探索。结果显示:①包被条件以20 ℃、pH 9.5、60 min为最佳;②不同酸度的洗脱液未能破坏这种较为牢固的包被。

如何有效地将抗体结合于已包被PLL的微球上,以往的做法有溴化氢法和碳二亚胺法。二者虽均为化学键合方法,但因载体包被上PLL后,表面的主要基团为氨基,抗体的包被结合位点也是氨基,都不适应本研究。须寻找一种既能实现氨基与氨基之间结合、又不引起抗体功能区Fab段变化的交联剂。戊二醛由于带有醛基,在两种物质的氨基之间搭桥,其醛基与氨基缩合形成Schiff氏碱,从而将两物质紧密连在一起。本研究中采用戊二醛两步法,经过对3种不同浓度的戊二醛溶液进行的包被试验,表明0.2%浓度的戊二醛溶液可以造成抗体蛋白质与PLL之间的最佳交联,FITC标记检测证实抗rHTNF-αMcAb明显包被在PLL之上。经pH 7.4、6.0、4.5 3种洗脱液作用,抗体未见丢失,证明包被牢固,达到了实验目的。

我们的最终目的是要观察在血液净化条件下吸附柱对TNF-α的吸附效果。研究结果表明,吸附柱的最大通透性可达900 ml/h,且密封性能完好。柱体倒置180°时,微球悬浮状态最佳,可以保证微球在柱内有充足的空间与含抗原的溶液发生抗原-抗体反应,获取最佳吸附清除效果。说明制备的特异性吸附柱基本达到了在血液净化条件下的应用可行性。近来,国内外许多研究报道了清除血浆中大分子可溶性介质的连续性血浆滤过吸附(CPFA)方式[6]。即把分离出来的血浆经吸附后回输血循环,全血再经血液滤过或透析后回输体内。该模式既避免了血细胞与吸附剂直接接触,克服了血液灌流(HP)的不足;无需补充大量血浆或白蛋白,降低了治疗费用;而且还避免了血浆置换(PE)时补充的新鲜血浆中所含补体对机体造成的不良反应。综合文献[7,8]报道,CPFA对TNF-α的吸附能力最高达67%。但其本质是非特异性吸附,因此无法达到更好的清除效果。本研究制备的吸附柱对抗原的吸附率均达到90%以上,说明该柱具有良好的特异性吸附清除TNF-α的效果。研究还表明,抗原浓度与最大吸附量及其时间成反比,说明在抗原含量较高时,应相应延长吸附时间;该吸附柱存在饱和现象,提示如要继续清除抗原,应及时恢复抗体的特异性结合能力。我们采用将已结合的抗原洗脱后再对微球进行缓冲的办法,仍可达到满意的再度吸附效果(最大吸附量达96%)。这不但证实了柱效的稳定性,而且证明该吸附柱可以重复使用,为将来的临床应用提供了宝贵的实验依据。

(致谢:衷心感谢军科院沈倍奋院士、黎燕教授;四川大学生物材料工程研究所乐以伦教授、于喜迅博士;后勤工程学院史永刚副教授;重庆大学生物工程研究院宋关斌副教授、李平博士在本研究中的所给予的大力帮助)。

参考文献:

[1] Woodhouse K A, Weitz J I, Brash J L. Interactions of plasminogen and fibrinogen with model silica glass surface: Adsorption from plasma and enzymatic activity studies[J]. J Biomed Mater Res, 1994, 28(4): 407-415.
[2] 刘彦仿. 免疫组织化学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1990. 27-32.
[3] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 北京:科学出版社, 1991. 231-301.
[4] Vervaet C, Byron P R. Polystyrene microsphere spray standards based on CFC-free inhaler technology[J]. J Aerosol Med, 2000, 13(2): 105-115.
[5] Allo J C, Midoux P, Merten M, *et al*. Efficient gene transfer into human normal and cystic fibrosis tracheal gland serous cells with synthetic vectors[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(2): 166-175.
[6] Ronco C, Brendolan A, Dan M, *et al*. Absorption in sepsis[J]. Kidney Int Suppl, 2000, 76: S148-153.
[7] Reeves J H, Butt W W, Shann F, *et al*. Continuous plasmafiltration in sepsis syndrome. Plasmafiltration in Sepsis Study Group[J]. Crit Care Med, 1999, 27(10): 2096-3001.
[8] Tetta C, Gianotti L, Cavaillon J M, *et al*. Coupled plasma filtration-adsorption in a rabbit model of endotoxic shock[J]. Crit Care Med, 2000, 28(5): 1526-1533.

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net