

人 IL17-RD 胞外区真核表达及其单克隆抗体的制备

孙小军, 梅坤荣, 王银银, 任芳丽, 夏永静, 常智杰

清华大学医学院, 北京 100084

摘要: 为了进一步研究白介素 17 受体 D (IL-17RD) 在 IL-17 信号的调节作用, 探索是否可以通过单克隆抗体阻断 IL-17RD 介导的 IL-17 信号通路而缓解自身免疫疾病, 利用昆虫表达载体从 Sf9 细胞中表达纯化人 IL-17RD-ECD 蛋白, 免疫 Balb/C 小鼠 30 d, 取小鼠脾脏细胞并与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合, 应用有限稀释法进行筛选, 经过克隆化后筛选到一株能稳定分泌抗 IL-17RD-ECD 的杂交瘤细胞株 1F8。经过初步鉴定, 该细胞株分泌的抗体类型为 IgG1+kappa 类, 经过 Western blotting 和 ELISA 检测, 该抗体特异性良好。首次成功制备了人 IL-17RD 的单克隆抗体, 为进一步探索 IL-17RD 介导的 IL-17 信号在自身免疫疾病中的作用提供了物质基础。

关键词: 人 IL-17RD, 真核表达, 蛋白纯化, 单克隆抗体

Eukaryotic expression of human IL17-RD-ECD and generation of its monoclonal antibody

Xiaojun Sun, Kunrong Mei, Yinyin Wang, Fangli Ren, Yongjing Xia, and Zhijie Chang

School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: IL-17 Receptor D (IL-17 RD) is a cytokine receptor that mediates IL-17 signaling and plays an important role in responding to the invasion of extracellular pathogens and many inflammatory and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. In this study we report the generation of a mouse monoclonal antibody against human IL-17 RD. The recombinant human IL-17RD extracellular domain (hIL-17RD-ECD) was produced in the baculovirus expression system and purified from culture medium of sf9 insect cells. The purified protein was used as a T-dependent antigen to immune Balb/C mice. B cells from the spleen of immunized mice were fused with murine cell SP2/0. Hybridoma cell lines were screened for the production of the monoclonal antibody against hIL-17-RD-ECD using ELISA. A hybridoma cell line 1F8 was found to have a high production of the antibody, which was further confirmed for the specificity by both western blot and ELISA analyses. The monoclonal antibody obtained from hybridoma 1F8 was characterized to be IgG1+Kappa subclass. This study provided a base for the further therapeutic application of the antibody on the autoimmune disease including rheumatoid arthritis.

Keywords: human IL-17RD, eukaryotic expression, protein purify, monoclonal antibody

Received: May 11, 2011; Accepted: July 4, 2011

Supported by: China National Grand S&T Special Project (No. 2009ZX09103-702).

Corresponding author: Zhijie Chang. Tel: +86-10-62785076; Fax: +86-10-62773625; E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

重大新药创制科技重大专项项目 (No. 2009ZX09103-702) 资助。

IL-17 是一类重要的细胞因子^[1-3], 通过 IL-17 受体家族传递信号影响下游基因的表达。IL-17 受体家族是一群与自身免疫疾病免疫活性有关的受体, 能介导 IL-17 信号通路, 从而实现许多重要的生理功能。几年前, 本课题组首先报道了一种小鼠和人 IL-17 受体 (当初我们命名为 IL-17RLM^[4], 后来又称为 Sef^[5], 现确定为 IL-17RD^[6-9])。我们已经发现 IL-17RD 能够负调控 FGF 信号通路, 最近我们发现 IL-17RD 的一个显性负突变体 IL-17RD-ECD 能够明显抑制 IL-17 信号通路^[6], 由于 IL-17RD 在 IL-17 信号通路中发挥着重要作用, 我们推测应用 IL-17RD-ECD 的单克隆抗体可以阻断 IL-17 信号, 有望成为基于阻断 IL-17 信号通路治疗类风湿关节炎等自身免疫疾病^[10-11]的潜在蛋白药物。

然而, 至今国内未见 IL-17RD-ECD 的单克隆抗体的报道。本研究在已经获得人 IL-17RD 基因的基础上首先构建其胞外区的真核表达载体, 利用昆虫细胞表达了 hIL-17RD-ECD 蛋白并制备其单克隆抗体, 为下一步基于 IL-17RD 单克隆抗体研发治疗类风湿关节炎等自身免疫疾病的药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Balb/C 小鼠 (8~12 周龄, 雌性) 购自北京维通利华实验动物有限公司; SP2/0 细胞购自北京康为世纪生物科技有限公司; 胶回收试剂盒购自 Vigorous 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Pst* I、DNA Maker 以及低分子量蛋白 Marker 为 TaKaRa 公司产品; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、

PEG 4000、HAT 均为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人 IL-17RD-ECD 表达载体构建

通过分析人 IL-17RD 基因序列及其编码氨基酸序列可知, IL-17RD-ECD (36~299 aa) 中含有 *Bam*H I 酶切位点, 因此先突变掉 *Bam*H I 对应的碱基但不改变氨基酸序列, 再设计构建引物连接目的序列至引入了 gp67 信号肽的 pFastBac-dual 载体中。为了便于操作, 设计 1 对引物, 引物 5'端和 3'端分别设计了 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点。上述引物由英俊北京公司合成, 使用前稀释至 20 pmol/mL。引物序列见表 1。

以突变成功的 pcDNA3.1-hIL-17RD-Myc 质粒为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。预期 PCR 产物长度为 789 bp。然后, 将 PCR 产物引入 pFastBac-dual 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α ^[12], 小量提取质粒。

1.2.2 hIL-17RD-ECD 蛋白在昆虫细胞中的表达以及蛋白纯化

复苏一株 sf9 细胞, 用 SF-900 II 培养基在 8 cm 的培养皿中于 27 °C 静置培养, 至细胞融合度为 70%~80% 准备转染。按照 Cellfectin 试剂盒说明书转染构建成功的 Bacmid 质粒 2 mg 进入细胞。转染完 5 h 后细胞基本贴壁, 弃去培养基, 加入 8 mL 新的 SF-900 II 培养基。27 °C 静置培养 10 d, 离心留上清, 得到 P0 病毒。取 50 μ L P0 加入到 50 mL 密度为 $1.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 的 sf9 细胞中, 27 °C 100 r/min 培养 6 d, 离心收上清, 即为 P1 病毒。此时病毒滴度已

表 1 构建载体所用引物

Table 1 The primers used in vector construction

Primer name	Primer sequence (5'-3')
IL-17RD-I-for	TTCTAAAGGACCCGAAGCAG
IL-17RD-I-rev	CTGCTTCGGGTCCCTTAGAA
IL-17RD-F- <i>Bam</i> H I	ATGCGGATCCC GCCGACACCTGTGGC
IL-17RD-R- <i>Pst</i> I	AACTGCAGTCAGTGATGGTGATGGTGATGTCTGATGGGCCCGGCCCA

可以感染细胞并大量表达蛋白。用大的细胞培养瓶培养 800 mL sf9 细胞, 当细胞密度为 $1.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 且状态良好时, 以 1:100 加入 P1 病毒, 27 °C、100 r/min 培养 72 h, 收细胞。

将细胞培养物 4 000 r/min 离心 10 min, 上清抽滤后浓缩, 在此过程中加入裂解液 (10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 浓缩至体积为 200 mL, 15 000 r/min 离心 35 min, 收集上清并加入 1.5 mL Ni-NTA, 4 °C 摇动孵育 3 h, 使目标蛋白与 Ni-NTA 充分结合。孵育后, 用 800 mL 含 20 mmol/L 咪唑的裂解液洗脱杂蛋白, 再用 15 mL 含 500 mmol/L 咪唑的裂解液洗脱目的蛋白, 浓缩至体积为 800 μ L。然后使用 AKTA 和 Superdex 200 分子筛层析柱进行进一步精细纯化, 即得到纯化的目的蛋白。

1.2.3 小鼠免疫及融合小鼠的选择

取 6 只 8~12 周龄的雌性 Balb/C 小鼠, 将纯化的 IL-17RD-ECD 蛋白用 PBS 稀释后与等体积弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后, 经腹腔注射, 剂量为 80 μ g/只 (以蛋白浓度计)。21 d 后, 取 IL-17RD-ECD 蛋白 40 μ g (以蛋白浓度计) 和等体积弗氏完全佐剂充分乳化后腹腔注射。加强免疫 1 次, 以后每隔 14 d, 加强免疫 1 次, 共免疫 4 次。第 4 次免疫后 7 d, 采集小鼠血清, 用间接 ELISA 法 (包被原 IL-17RD-ECD 浓度为 2 μ g/mL) 选择融合小鼠。根据比值法^[13]测量小鼠抗体效价, 选择效价最高的那只小鼠作为融合小鼠。融合前 3 d 对小鼠注射与首次免疫等剂量的免疫原。

1.2.4 细胞融合、筛选及抗体类型鉴定

取融合小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 (细胞数目比值为 10:1) PEG 4 000 融合^[14], 选择培养基为含 HAT 的 RPMI1640 培养基。融合 10 d 后, 采用间接 ELISA 筛选杂交瘤细胞上清, 应用有限稀释法对抗体分泌阳性杂交瘤细胞进行克隆, 待阳性率达到 100% 时建立细胞株并置于液氮冻存。用 Southern Biotech 试剂盒对该杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体

进行类型鉴定, 具体方法参照试剂盒说明书。

1.2.5 腹水制备及单克隆抗体的纯化

取 8 周龄健康雌性 Balb/C 小鼠 6 只, 每只腹腔注射灭菌液体石蜡 0.5 mL, 7~14 d 后每只小鼠腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞。7~10 d 后待小鼠腹部明显膨大, 可抽取腹水。腹水采集后离心除去油脂和沉淀, 即得到小鼠腹水单克隆抗体。将腹水上样至用 Binding Buffer 平衡 protein G 亲和柱至基线平稳, 收集流穿液, 然后将流穿液再次上柱, 平衡至基线平稳。加入 Eluting Buffer 洗脱, 收集洗脱峰, 得到纯化的单克隆抗体。

1.2.6 单克隆抗体的特性鉴定

特异性测定: 应用间接 ELISA 法进行单克隆抗体特异性测定, 将所有阳性细胞转入 24 孔板培养进行复筛并检测与 IL-17RA-ECD 蛋白的交叉反应性。

抗体的分子质量鉴定: 采用 SDS-PAGE 进行测定。

单抗浓度测定: 紫外分光法测定单抗在 280 nm 和 260 nm 处的吸光度值 A_{280} 和 A_{260} 。蛋白含量按照下列公式计算: 蛋白质含量 (mg/mL) = $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$ 。

1.2.7 单克隆抗体的检测

利用 Western blotting 检测小鼠组织中的 IL-17RD, 将蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 转移至 NC 膜上, 所用 IL-17RD 一抗为 1:1 000 稀释, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG。

2 结果与分析

2.1 表达载体构建

为了在昆虫细胞中表达人 IL-17RD-ECD, 我们利用 PCR 扩增人 IL-17RD-ECD 的 cDNA 并将其利用 BamH I 和 Pst I 位点插入 pFastBac-dual 载体中。酶切鉴定发现所插入片段大小和预期大小一致 (图 1)。经测序分析后证明, 所构建载体及插入片段序列完全正确。

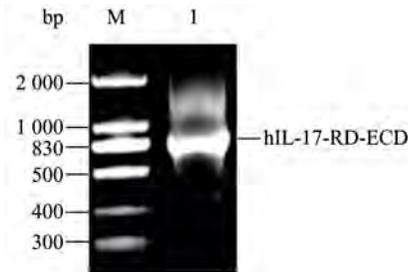


图1 人 IL-17RD-ECD 表达载体的鉴定

Fig. 1 Identification of IL-17RD-ECD by enzymedigestion. M: DNA marker; 1: IL-17RD-ECD digested by *Bam* H I and *Pst* I.

2.2 hIL-17RD-ECD 蛋白的表达和纯化

将所构建的载体瞬时转染至 sf9 细胞中,得到足量病毒。利用病毒感染 sf9 细胞得到稳定分泌外源蛋白 hIL-17RD-ECD 的细胞。大量培养该细胞 72 h 后,产生出足量 hIL-17RD-ECD 蛋白,利用 Ni-NTA 结合, AKTA Superdex200 柱子纯化,得到了纯化蛋白(图 2)。

2.3 融合小鼠的选择

4 次免疫后, 6 只小鼠中, 1、3、4、5 号小鼠抗体效价为 1:32 000, 6 号小鼠抗体效价为 1:64 000, 2 号小鼠抗体效价为 1:128 000, 选取效价最高的 2 号小鼠进行融合。

2.4 杂交瘤细胞株的建立以及抗体类型鉴定

细胞融合后, 经过筛选及细胞单克隆化的过程, 共得到两株稳定分泌抗 hIL-17RD-ECD 单克隆抗体的细胞株, 其中一株特异性良好, 命名为 1F8 (图 3)。用单克隆抗体类型鉴定试剂盒对该杂交瘤细胞所产生的抗体进行类型鉴定, 结果表明 1F8 细胞株分泌的单克隆抗体为 IgG1+Kappa 型。

2.5 单克隆抗体纯度及分子质量鉴定

我们采用 SDS-PAGE 分析纯化后的单克隆抗体, 结果表明, 所得的 hIL-17RD-ECD 的单克隆抗体重链约为 46 kDa, 轻链约为 25 kDa (图 6)。经紫外扫描, 根据 260 nm 和 280 nm 紫外吸收值, 计算出蛋白质含量为 1.62 mg/mL。

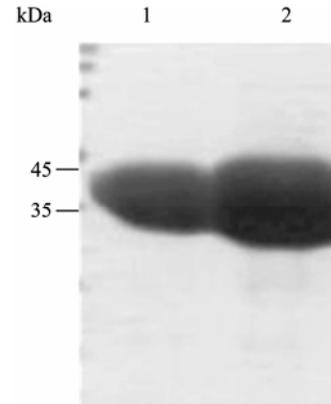


图2 纯化后的人 IL-17RD-ECD 蛋白

Fig. 2 The hIL-17RD-ECD protein was purified by AKTA and Superdex200.

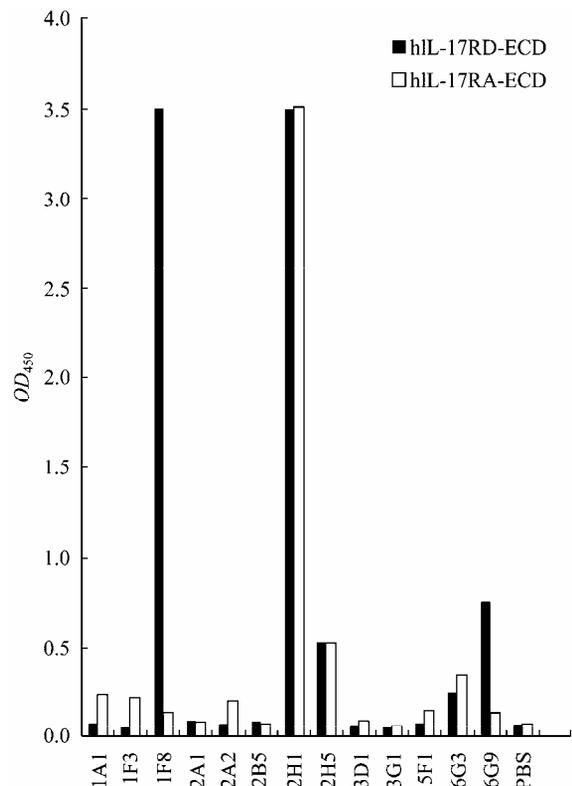


图3 筛选能够特异识别人 IL-17RD-ECD 的杂交瘤细胞

Fig. 3 Different lines of hybridoma cells fused with the spleen cells from mice immunized with hIL-17RD-ECD were examined to show a specific reaction of the antibody with antigen (hIL-17RD-ECD).

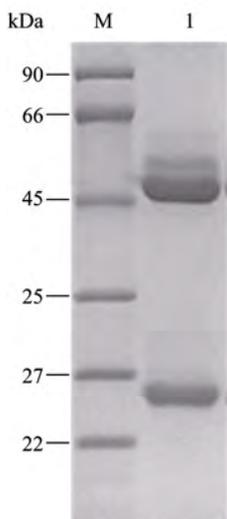


图4 SDS-PAGE 检测单抗

Fig. 4 The monoclonal antibody was tested by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: a Coomassie brilliant blue staining result was shown.

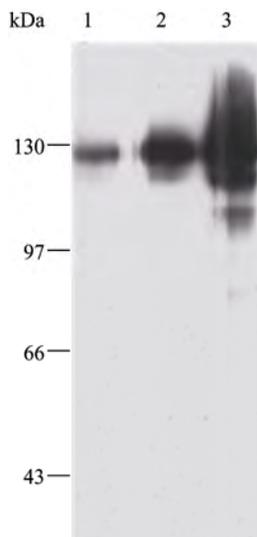


图5 抗体对于组织中 IL-17RD 的检测结果

Fig. 5 The endogenous IL-17RD were tested by Western blotting. 1: brain; 2: liver; 3: kidney.

2.6 抗 IL-17RD-ECD 单克隆抗体能够检测到组织中的 IL-17RD

我们使用所制备的单克隆抗体按照 1 : 1 000 的稀释倍数对小鼠几种不同组织中的 IL-17RD 蛋白进行免疫印迹检测。结果显示, 抗体能够特异性识别抗原。

3 讨论

类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性系统紊乱疾病, 其基本病理特征是大量促炎症细胞因子聚集并导致关节滑膜异常增生, 血管翳形成, 软骨和软骨下骨质破坏, 关节发生畸形和强直。在临床上主要表现为多处关节肿痛、进行性关节损伤、畸形、伤残, 有时可累及眼、肺等关节外脏器。该病困扰着全球约 2% 的人群, 其中大多数患者是中年妇女。RA 的致残率很高, 故对该病的治疗, 特别是药物研究一直是人们关注的热点^[1]。其中针对 RA 不同致病因素的靶向性生物制剂 (Biological agents) 得到了广泛的重视, 因为这类药物的优点是其靶向性高, 毒副作用小, 所以开始成为一类新兴的药物, 具有很好的市场前景和经济效益。

最近的研究表明, Th17/IL-17 在关节炎的发病过程起着非常重要的作用。IL-17 是活性 T 细胞产生的一种十分重要的促炎症细胞因子, 不但可以诱导滑膜成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞和软骨细胞产生许多细胞因子和趋化因子, 而且还可以促进骨组织中其他一些基因的表达, 从而对骨或软骨细胞进行破坏。已有证据表明, IL-17 在 RA 病人的滑膜液中表达明显升高, 这种升高的趋势可以比正常人滑膜液中的含量高出 3 倍之多。研究还发现 IL-17 在关节炎病理过程的上游起作用, 能够刺激巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-1 β , 也能够诱导滑膜细胞产生 IL-6、IL-8、GM-CSF、PGE₂ (Prostaglandin E₂) 等细胞因子。IL-17 不仅能够和 TNF- α 协同作用来促进 RA 的发生和发展, 也能够独立对 RA 的发生和发展起作用, 成为 RA 致病的关键因素之一。已经有研究表明, 用 IL-17 抗体中和 IL-17 后, RA 经典动物模型—胶原诱导的关节炎 (Collagen-induced arthritis, CIA) 小鼠早期关节炎减轻或消失, 晚期 CIA 小鼠的骨损伤能够有一定程度的恢复。因此制备阻断 IL-17 的抗体成为治疗类风湿性关节炎的一种策略。

IL-17RD 是在一次大规模的原位杂交中被发现,其表达受到 FGFs 的调控。IL-17RD 基因只存在于脊椎动物中,定位于单一的基因座。然而,通过可变联结机制形成的 IL-17RD 异构体具有不同的生物化学和生物学特性。更为有意义的是,本实验室发现,IL-17RD 的一个显性负突变体 IL-17RD-ECD 能够明显抑制 IL-17 信号通路。这些结论都提示 IL-17RD-ECD 的融合蛋白或单克隆抗体可能可以作为阻断 IL-17 信号,治疗类风湿关节炎等自身免疫疾病的药物。

因此,我们利用 DNA 重组技术以及真核细胞蛋白表达技术首先制备出了 hIL-17RD-ECD 并以此作为抗原制备了单克隆抗体,并通过 ELISA 和 Western blotting 证实了我们制备的单克隆抗体特异性良好。此单克隆抗体的成功制备有助于进一步检测 IL-17RD,从而研究 IL-17 信号通路,特别是为类风湿关节炎新药研究提供了实验材料。

REFERENCES

- [1] Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*, 2008, 41(2): 84-91.
- [2] Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 163-196.
- [3] Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*, 2008, 43(3): 402-407.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 1998: 16-55, 880-887.
- [5] Xiong SQ, Zhao QH, Rong ZL, et al. hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. *J Biol Chem*, 2003, 278(50): 50273-50282.
- [6] Rong ZL, Wang A, Li ZY, et al. IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling. *Cell Res*, 2009, 19(2): 208-215.
- [7] Korn T, Oukka M, Kuchroo V, et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*, 2007, 19(6): 362-371.
- [8] Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 2004, 21(4): 467-476.
- [9] Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, et al. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol*, 2005, 167(1): 141-149.
- [10] Kikly K, Liu L, Na SQ, et al. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(6): 670-675.
- [11] Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2): 650-659.
- [12] Liang GD. *Current Protocols in Molecular Biology Experimental Techniques*. Beijing: Science Press, 2001: 30-43.
- [13] Yang LG, Hu SC, Wei PH, et al. *Enzyme Immunoassay*. Nanjing: Nanjing University Press, 1998: 255-256, 433-434, 442.
- [14] Bundle DR, Gidney MA, Kassam N, et al. Hybridomas specific for carbohydrates; synthetic human blood group antigens for the production, selection, and characterization of monoclonal typing reagents. *J Immunol*, 1982, 129(2): 678-682.