

## 抗人丙二醛修饰低密度脂蛋白单克隆抗体的 制备和免疫学性质\*

阎道广 周 玫 陈 媛

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

### Preparation and the Immunological Characterization of Monoclonal Anti- bodies Against Malondialdehyde-modi- fied Low Density Lipoprotein

YAN Dao-Guang, ZHOU Mei and CHEN Yuan  
(Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First  
Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**ABSTRACT** In this study, two monoclonal antibodies (McAb) against malondialdehyde-modified low density lipoprotein (MDA-LDL) were obtained, designated as HML1 and HML2 respectively, both of them can react to MDA-LDL with a high titer and belong to the subclass of IgG2a. The McAb additivity test shown that two McAb were against the same determinants of MDA-LDL. Solid-phase competitive biotin-avidin EIA indicated that HML1 recognized MDA-LDL, MDA-albumin, MDA-polylysine but not native LDL. It is postulated that the covalent adducts of MDA with lysine residues are involved the formation of MDA-derived epitopes on apolipoprotein B.

**KEY WORDS** Malondialdehyde-modified low density lipoprotein; Monoclonal antibodies

**摘要** 本文报道两株抗丙二醛修饰的低密度脂蛋白单克隆抗体(HML1、HML2),两者均有较高的抗体效价,抗体类型为IgG2a。单抗相加实验表明,HML1和HML2识别同一抗原位点。竞争性BA-E LISA实验显示:HML1能够识别丙二醛修饰的低密度脂蛋白、丙二醛清蛋白、丙二醛聚赖氨酸。但与天然低密度脂蛋白

无交叉反应。推测HML1抗原位点与低密度脂蛋白在修饰过程中丙二醛和载脂蛋白B上的赖氨酸残基形成的共价结合物相关。

**关键词** 丙二醛修饰的低密度脂蛋白;单克隆抗体

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)发生氧化修饰后可被巨噬细胞膜上的清道夫受体识别,引起大量吞噬,导致泡沫细胞形成这一学说已被人们所重视。体外实验表明<sup>[1]</sup>, LDL极易被氧化,这个过程涉及脂质过氧化,产生大量的活性醛类如丙二醛。丙二醛与LDL载脂蛋白B上的游离氨基共价结合使之产生了新的抗原性。最近,在正常人和动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病人血清中发现有丙二醛修饰的低密度脂蛋白(malondialdehyde-modified low density lipoprotein, MDA-LDL)自身抗体存在<sup>[2]</sup>, MDA-LDL的单克隆抗体国外已有报道<sup>[3]</sup>,并已用于测定体内MDA-LDL含量以代表体内氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OLDL)的量。考虑到OLDL与MDA-LDL不同<sup>[4]</sup>,后者主要使LDL的载脂蛋白B游离氨基减少及负电性增加。OLDL除上述改变外,其载脂蛋白、磷脂、胆固醇也发生了变化。我们同时制备了MDA-LDL单克隆抗体和OLDL单克隆抗体(另文报道),为比较MDA-LDL和OLDL的抗原性差异,正确定量体内OLDL以及进一步研究不同修饰程度OLDL的抗原性,我们制备了两株抗MDA-LDL单克隆抗体,为OLDL在泡沫细胞形成中的机理和清道夫受体的生物学特征提供理论依据。

\* 国家自然科学基金资助项目

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

①BALB/c小鼠(8周龄,雌性,学校动物中心提供);②SP2/0;③PEG(分子质量4000);④新生牛血清;⑤酶标羊抗鼠IgG, Avidin-HRP,生物素化羊抗鼠IgG;⑥酶标底板;⑦酶标检测仪(DYNATECH MR5000);⑧小鼠IgG及其亚类,IgM,IgA抗血清(上海生物制品研究所)。

### 1.2 低密度脂蛋白的分离与修饰

采用一次性密度梯度离心法<sup>[1]</sup>,健康成人新鲜血取自南方医院血库,昆明鼠购自本校动物中心,杀鼠取血。分离的人与鼠LDL均在含有EDTA(0.01%)和NaN<sub>3</sub>(0.01%)的PBS中透析24h(4℃),蛋白质定量采用Lowry's法,纯度采用琼脂糖电泳鉴定<sup>[4]</sup>。LDL的丙二醛修饰,按文献[7]报道的方法进行,酸水解四乙氧基丙烷(sigma)产生丙二醛,将人或鼠LDL(1g·L<sup>-1</sup>)加入终浓度为10mmol·L<sup>-1</sup>的丙二醛,37℃水浴中温育1h和3h。修饰程度用电泳迁移率和游离氨基减少百分率反映。琼脂糖电泳按前述的方法,游离氨基测定采用Habeb的方法<sup>[4]</sup>。

### 1.3 单克隆抗体的产生

BALB/c小鼠,每只以鼠源性MDA-LDL 50μg(不同修饰程度,加福氏不完全佐剂),皮下多点免疫,1次/2周,共4次,融合前三天用人MDA-LDL 50μg(不同修饰度)加强免疫一次,三天后取鼠脾细胞与SP2/0融合,常规ELISA法筛选阳性孔,经有限稀释法3次克隆化,阳性率达100%,扩大培养后,3×10<sup>6</sup>个细胞注入BALB/C小鼠腹腔获取腹水。

### 1.4 单克隆抗体的纯化

腹水用硫酸胺盐析法粗提,DEAE-52层析柱纯化,聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度。

### 1.5 单克隆抗体生物学性质的研究

1.5.1 单克隆抗体效价测定按常规间接ELISA法。

1.5.2 单克隆抗体Ig类别、亚型分析用双向免疫扩散法。

1.5.3 染色体分析用秋水仙碱阻断法。

1.5.4 相对亲和力的测定用ELISA法。

1.5.5 单抗相加实验<sup>[1]</sup> ELISA法测定酶标羊抗鼠抗体和生物素化抗鼠抗体最佳反应浓度是1:40,纯化抗体测饱和曲线得HML1、HML2的饱和起始浓度均为1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>3</sup>,按这些条件进行本实验和下一个实验,包被MDA-LDL(1mg·g<sup>-1</sup>,0.01%EDTA,0.01%NaN<sub>3</sub>),4℃过夜,洗三次后加入一株单抗,37℃水

浴2h;再加入另一株单抗,37℃水浴2h;加酶标羊抗鼠抗体,37℃水浴2h;加底物显色,测492nm OD值。

1.5.6 竞争性BA-ELISA实验<sup>[10]</sup> 参照Wagener等的方法,①包被抗原(1mg·L<sup>-1</sup>,0.01%EDTA,0.01%NaN<sub>3</sub>,每孔100μl),4℃过夜;②37℃封闭2h(封闭液为含1%BSA,0.01%NaN<sub>3</sub>,0.05%Tween 20的PBS);③每孔加适当稀释的单抗(50μl)及同等数量的PBS(50μl,含1%BSA,0.01%NaN<sub>3</sub>,0.05%Tween 20,其中包括递增浓度的竞争性抑制剂),37℃水浴2h;④加1:40稀释的生物素化抗鼠Ig抗体,每孔100μl,37℃水浴1h;⑤加Avidin-HRP,每孔100μl,37℃水浴45min;⑥加底物显色,测492nm OD值,结果以B/Bo表示,B是竞争性抑制剂存在时抗原与抗体结合量的OD值,Bo是无竞争性抑制剂时抗原与抗体结合量的OD值。

## 2 结果

### 2.1 不同修饰程度丙二醛修饰低密度脂蛋白电泳迁移率和游离氨基变化

丙二醛修饰的LDL电泳结果如图Figure 1,由图谱可见,经丙二醛修饰后LDL电泳速度增快,其迁移率3h>1h,以正常LDL的游离氨基数量为100%,丙二醛修饰1h和3h后,游离氨基分别减少33%和78%。鼠LDL经丙二醛修饰后,其电泳迁移率和游离氨基减少百分率与单抗人丙二醛类似(结果未显示)。

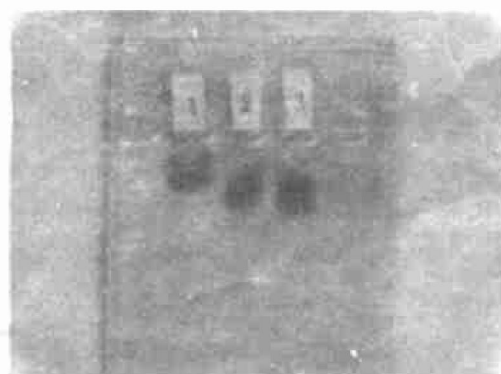


Figure 1. Electrophoretogram of LDL. 1. Normal LDL; 2. LDL modified by MDA for 1 h; 3. LDL modified by MDA for 3 h.

### 2.2 杂交瘤细胞株的建立

两次融合,每次铺96孔板6块,计1152孔,获杂交瘤427孔,融合率37%,用MDA-LDL作抗原筛选出14个阳性孔,阳性率3.2%,进一步筛选出对不同修饰程度的MDA-

LDL(1 h、3 h)强阳性的反应孔各一孔,三次克隆化后阳性率达 100%,连续传代及冻存半年复苏后,仍能分泌抗体,两株细胞命名为 HML1、HML2。

### 2.3 单克隆抗体生物学性质的研究

2.3.1 效价测定 HML1、HML2 培养上清效价为  $1.29 \times 10^4$ 、 $1.73 \times 10^4$ ,腹水效价为  $3.8 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^4$ 。

2.3.2 抗体类别和亚类 HML1、HML2 均为 Ig G2a。

2.3.3 染色体分析 镜检 100 个细胞,染色体数 88~96,多为端着丝点,少数为亚中部着丝点。

2.3.4 亲和力测定 ELISA 法测 HML1、HML2 的相对亲和力为  $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,相对亲和力 HML1>HML2。

2.3.5 单抗相加实验 在抗原决定簇被相应抗体完全占有后,增加 McAb 浓度一般并不增加反应强度,如果两抗体不是针对同一决定簇,反应强度应接近两个 McAb 反应之和,根据公式  $AI = (2AI + 2(AI + A2) - 1) \times 100\%$  计算相加指数 AI。考虑到技术误差及两个不同决定簇由于位点相近而形成的空间位阻,因此当  $AI > 50\%$  可认为两抗体识别不同抗原决定簇,如  $AI < 50\%$ ,可认为识别同一抗原决定簇。实验结果(Table)表明:HML1、HML2 识别同一抗原决定簇。

Table. The results of ELISA additivity test

McAb	OD	AI(%)
HML1	0.70	
HML2	0.63	
HML1+HML2	0.95	42.28

2.3.6 竞争性 BA-ELISA 实验 结果表明,具有竞争性地抑制包被抗原 MDA-LDL 与 HML1 结合的强抑制剂是 MDA-LDL,丙二醛聚赖氨酸和丙二醛清蛋白也具有竞争抑制能力乙酰 LDL(acetyl-LDL, ALDL)只具有不显著的竞争性,而氧化修饰 4 h 和 24 h 的 LDL 也具有很强的竞争抑制能力,但新分离的正常 LDL

没有显示竞争抑制作用(Figure 2)。Figure 3 是用不同修饰度的 MDA-LDL 作抑制剂显示:随修饰程度的增加,其竞争抑制能力逐渐增强,但 LDL 的游离氨基减少到一定程度后,竞争性抑制剂的抑制能力趋于饱和。

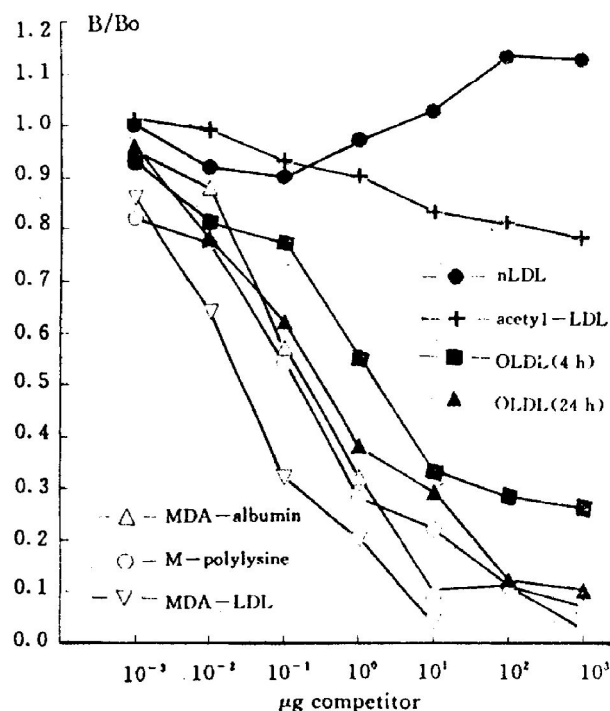


Figure 2. Solid-phase competitive biotin-avidin EIA of McAb HML1 with various potential competitors.

Each value represents the mean of duplicate determinations.

### 3 讨论

我们按照 Curtiss 等<sup>[11]</sup>报道的方法,先用不同修饰程度的鼠 LDL 对 BALB/C 小鼠进行免疫,使其产生专一的与人 MDA-LDL 非常相似的鼠 MDA-LDL 的决定簇的 B 细胞克隆,于融合三天前用不同修饰程度的人 MDA-LDL 加强免疫,使鼠不会产生对异源蛋白的决定簇抗体以避免种系差异性的影响。本文报道的两株单抗系分别用不同修饰程度的 MDA-LDL 从两次融合获得的 14 株阳性孔中筛选出的强阳性孔克隆培养后建立的,单抗相加实验表明,两株单抗识别同一抗原决定簇,竞争性 BA-ELISA 显示天然 LDL 不能抑制 MDA-LDL 与 HML1 结合,而丙二醛聚赖氨酸以及丙二醛清蛋白却是 MDA-LDL 强竞争抑制剂。据此,我们认为,LDL 被丙二醛修饰后形成了新的抗原

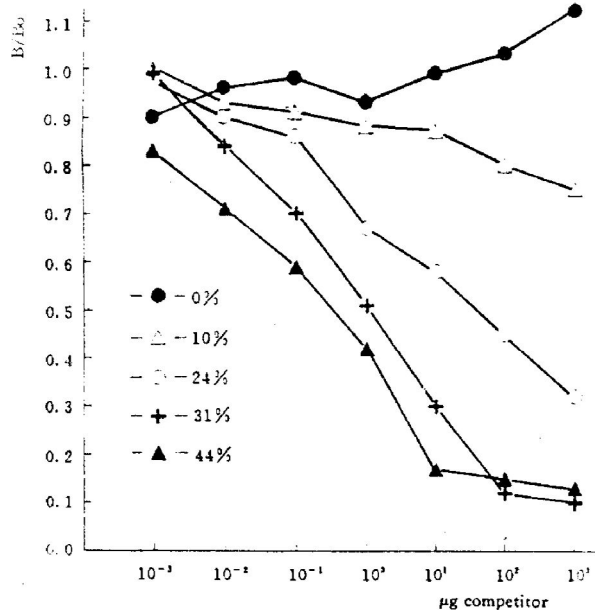


Figure 3. Solid-phase competitive biotin-avidin EIA of McAb HML1 with various degree of LDL modified by MDA. Each value represents the mean of duplicate determinations.

决定簇,其抗原新位点是丙二醛与载脂蛋白B氨基酸残基上的游离氨基共价结合的产物。

Arai等<sup>[12]</sup>研究表明,清道夫受体非单一受体,而是多重性受体(multiple receptor),LDL、乙酰化LDL(ALDL)各有一个专一受体,同时还有一个既能识别OLDL,又能识别ALDL的公共受体,可以推测OLDL和MDA-LDL的抗原性具有差异性。本文的结果和我们在OLDL单克隆抗体研究中发现OLDL至少形成了三个新的抗原位点,为进一步研究结合OLDL和MDA-LDL的清道夫受体特征提供了条件。

最近,在正常人及As病人血清中发现抗MDA-LDL的自身抗体<sup>[2]</sup>,这种自身抗体免疫反应与As发生可能无关,但对有As并发症危险性的病人则可能有预报价值。Salonen<sup>[13]</sup>的报道证实了此点,他们发现颈动脉狭窄病人的抗MDA-LDL的自身抗体的滴度是颈As病变进展的一项独立因素。抗MDA-LDL和OLDL单抗的获得亦为我们更好地研究As患者血液OLDL的自身抗体的特征和探讨血液中是否存在OLDL,以及单抗应用于临床诊断的可能性提供了理论基础。

#### 参考文献

- 1 Esteban H. Autooxidation of human low density lipoprotein loss of polyunsaturated fatty acids vitamins and generation of aldehydes. *J Lipid Res*, 1987, **28**: 495.
- 2 Palinski W, Rosenfeld ME. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (4): 1372.
- 3 Plinski W, Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, et al. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, 1990, **10** (3): 325~335.
- 4 刘尚喜,周玫,陈媛. 低密度脂蛋白的氧化修饰和丙二醛修饰的比较研究. *生物化学和生物物理学报*, 1992, **24** (6): 569~574.
- 5 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学和生物物理学报*, 1989, **21**: 257~260.
- 6 王克勤. 琼脂糖凝胶电泳用于人脂蛋白的分离分型. *生物化学和生物物理学报*, 1979, **11** (1): 37.
- 7 Fogelman AM. Malondialdehyde in human monocyte macrophage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **97**: 2214.
- 8 Habeeb AFSA. Determination of free amino groups in protein by nitrobenzene sulphonic acid. *Biochem*, 1966, **14**: 32.
- 9 Friguet B, Jivadi-Ohanian L, Pages J, et al. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the  $\beta_2$ -subunit of escherichia coli tryptophan synthase. *J Immunol Methods*, 1983, **60**: 351~358.
- 10 Wagener C, Fenger U, Clark BR, et al. Use of biotin-labeled monoclonal antibodies and avidin-peroxidase conjugates for the determination of epitope specificity in a solid-phase competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*, 1984, **68**: 269~274.
- 11 Curtiss LK, Witztum JL. A novel method for generating region specific monoclonal antibodies to modified proteins. Application to the identification of human glucosylated low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1983, **72**: 1427~1438.
- 12 Arai H, Kita T. Multiple receptors for modified low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Comm*, 1989, **159**(3): 1375.
- 13 Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R. Autoantibody against oxidized LDL and progression carotid atherosclerosis. *Lancet*, 1992, **339**: 883.

(本文1995-01-03收到)