

抗 CD3、CD7 单抗-PAPs 免疫毒素的构建 及其联合杀伤效应

张 玲¹, 李官成², 朱兆玲², 林学颜²

(中山大学 1. 肿瘤防治中心肿瘤研究所病因研究室, 广东 广州 510060; 2. 免疫学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】应用抗人 T 淋巴细胞单抗(抗 CD3 和抗 CD7), 分别与商陆抗病毒蛋白(PAPs)偶联构成两种免疫毒素, 并探讨这两种免疫毒素在体外联合对 T 淋巴细胞和 T 淋巴母细胞(CEM 细胞)的杀伤效应。【方法】选用抗 CD3 和抗 CD7 杂交瘤细胞制备单克隆抗体腹水, 经纯化后以 SPDP 为交联剂, 将两种单抗分别与商陆抗病毒蛋白偶联构建成抗 CD3 和抗 CD7 单抗免疫毒素, 分别以及联合后对 T 淋巴细胞和 CEM 细胞进行体外细胞毒试验。【结果】构建的两种单抗-PAPs 免疫毒素活性良好, 其特异性杀伤 T 淋巴细胞和 T 淋巴母细胞 CEM 细胞的效应比单一抗 CD3-PAPs 和抗 CD7-PAPs 更强, 对照组仅有轻微的杀伤效应。【结论】成功地构建了抗 CD3 和抗 CD7 单抗-PAPs 免疫毒素, 及其不同抗原决定簇的单抗免疫结合物, 并证明联合应用抗 CD3-PAPs 和抗 CD7-PAPs 免疫毒素有相加的杀伤效果。

关键词: 抗体, 单克隆; 免疫毒素类; 商陆有丝分裂原类

中图分类号: R730 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2003)01-0039-03

Construction and Combined Cytotoxicity of Anti-CD3 and Anti-CD7 Monoclonal Antibody-PAPs Immunotoxin

ZHANG Ling, LI Guang-cheng, ZHU Zhao-ling, LIN Xue-yan

(1. Cancer Institute, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China, 2. Department of Immunology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To construct two monoclonal antibody immunotoxins of anti-CD3-PAPs and anti-CD7-PAPs, and to test its cytotoxicity on T lymphocyte and T lymphoblast (CEM cell). 【Methods】Purified anti-CD3 and anti-CD7 monoclonal antibodies (McAb) were linked with PAPs by SPDP, and constructed immunotoxin of anti-CD3-PAPs and anti-CD7-PAPs. The cytotoxicity of two immunotoxins on CEM cells was tested respectively and jointly. 【Results】The bi-McAb-immunotoxin showed higher activities and specific killing effect on CEM cell and T lymphocytes than anti-CD3-PAPs or anti-CD7-PAPs alone. Lower cytotoxicity was found in control group. 【Conclusion】Anti-CD3-PAPs and anti-CD7-PAPs immunotoxin were constructed and showed higher cytotoxicity on T lymphocytes when they were used jointly than used alone.

Key words: antibodies, monoclonal; immunotoxin; pokeweed mitogens

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):39~41]

近年来研究发现商陆抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein from seeds, PAPs)等植物有丝分裂原类的单链毒素作为“弹头”制备的单链免疫毒素(immunotoxin, IT), 能够避免完整植物毒素 B 链

结合细胞的非特异性细胞毒性。本实验应用两种抗人 T 淋巴细胞单克隆抗体(抗 CD3 和抗 CD7 单抗)和马抗人胸腺淋巴细胞球蛋白(anti-horse thymus globulin, AHTG)与 PAPs 构建成免疫毒素

收稿日期: 2002-09-30

基金项目: 广东省科委重点攻关课题资助项目(97-77-5)

作者简介: 张 玲(1949-), 女, 江苏镇江人, 硕士, 副研究员, 主要从事肿瘤病因学、肿瘤免疫学研究。

(IT),进行不同抗原决定簇的单抗-IT联合杀伤T淋巴细胞效应的研究,以期为骨髓或器官移植^[1-3]以及淋巴细胞白血病和淋巴瘤等临床治疗研究提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

商陆抗病毒蛋白(PAPs)由中科院昆明植物研究所提供。3-(2-吡啶二巯基)丙酸-N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)购于Sigma公司。

1.2 两种抗人T淋巴细胞单抗的制备和鉴定

抗CD3和抗CD7杂交瘤细胞的复苏培养,含单抗腹水的制备及鉴定按文献^[4-6]进行。

1.3 两种抗人T淋巴细胞单克隆抗体与PAPs的交联和鉴定

PAPs用40 mmol/L pH7.6磷酸缓冲盐溶液(PBS)(含150 mmol/L NaCl)溶解为5 g/L,与溶于二甲亚砜(DMSO)大于PAPs 3倍浓度的SPDP,置23℃反应30 min;过葡聚糖凝胶-25F柱除去游离的SPDP,在紫外(280 nm)监测下收集第一峰洗脱液,经超滤浓缩后置4℃冰箱备用。分别将两种单克隆抗体纯品用PBS按5 g/L稀释及透析后,与SPDP反应30 min;过葡聚糖凝胶-25F柱除去游离的SPDP,收集第一峰洗脱液;浓缩后加入50 mmol/L的二巯苏糖醇(DTT)进行还原反应30 min;再过葡聚糖凝胶-25F柱除去游离的DTT,收集第一峰洗脱液浓缩备用。

将上述制备的PAPs-SPDP分别与还原的IgG-SPDP按3:1浓度之比混合,置4℃搅拌下反应24 h;过葡聚糖凝胶-150柱,按每管3 mL分步收集,第一峰洗脱液经浓缩后获得IT,测定含量和过滤除菌后置-20℃贮存备用。同法制备马抗人胸腺淋巴细胞球蛋白(AHTG)和正常鼠IgG与PAPs的偶联物作为对照。

1.4 染料排斥法测定IT的靶细胞毒性效应^[6]

将新鲜分离的外周血T细胞用RPMI 1640培养液调整细胞数为 1×10^6 /mL,分别于小试管内用不同浓度的抗CD3-PAPs、抗CD7-PAPs、多抗AHTG-PAPs和正常鼠IgG-PAPs等处理,在NH₄Cl 20 mmol/L条件下孵育1.5 h,离心洗涤2次后重悬于RPMI 1640培养液(含200 mL/L小牛血清)中备用。

采用台盼蓝染料排斥法测定不同浓度IT处理的T细胞活力,以未处理的细胞(只加培养液)作对

照。计算着色的死细胞,并以下式计算细胞毒效应:

$$\text{细胞毒效应} = \frac{\text{实验组死亡细胞数} - \text{对照组死亡细胞数}}{100 - \text{对照组死亡细胞数}} \times 100\%$$

1.5 改进的噻唑蓝(MTT)法测定免疫毒素的联合杀伤率

无菌取新鲜分离外周血T淋巴细胞,用含200 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养液将细胞数调整为 3×10^6 /mL,分别加入96孔培养板中,每孔100 μL,37℃、5%CO₂培养24 h,再分别加入5组不同浓度的试验物,分别为抗CD3-PAPs、抗CD7-PAPs、抗CD3-PAPs加抗CD7-PAPs、多抗AHTG-PAPs、正常鼠IgG-PAPs,每孔10 μL,各设3个复孔,37℃、5%CO₂培养48 h;1 000 r/min离心10 min,小心吸弃上清,每孔加50 μL用培养液配制的MTT(5 g/L),继续培养4 h;2 000 r/min离心10 min,弃上清,每孔加入1:1混合的乙醇和二甲亚砜150 μL,振荡20 min使结晶溶解;用Dynatech MR 5000型酶标仪测定A₅₇₀、A₆₃₀值。上述实验重复3次,取其均值,按下式计算杀伤率:

$$\text{杀伤率} = \left(1 - \frac{\text{实验孔 } A_{570} - \text{实验孔 } A_{630}}{\text{对照孔 } A_{570} - \text{对照孔 } A_{630}}\right) \times 100\%$$

2 结 果

2.1 两种抗人T细胞McAb腹水的特性

当抗CD3及抗CD7单抗腹水稀释至1:6 400时,活细胞免疫荧光测定,CEM和外周血T淋巴细胞荧光阳性率均达90%以上;Raji、K₅₆₂和B细胞呈阴性反应。腹水稀释至1:10⁵时,淋巴结悬液涂片细胞阳性率仍在50%以上。CELISA法测定抗CD3和抗CD7腹水的效价均在1:10⁵以上。

2.2 免疫毒素的抗体活性

免疫荧光结果显示,当IT中的单抗浓度稀释至10⁻⁸ mol/L时,CEM细胞阳性率>80%;CELISA测定,IT中单抗的效价均在10⁻⁹ mol/L以上。结果表明,经偶联法获得的IT仍保持较好的抗体活性。

2.3 免疫毒素特异性杀伤效应的比较^[5]

台盼蓝染色计数结果显示,两种抗人T细胞单抗IT和多抗AHTG-PAPs对T细胞产生50%细胞毒效应的浓度(EC₅₀值)均在10⁻⁹~10⁻¹⁰ mol/L;而正常鼠IgG-PAPs和游离PAPs对T细胞的杀伤率,在10⁻⁷~10⁻¹¹ mol/L浓度范围内均未超过

20%。在台盼蓝染料排斥试验的基础上采用改进的MTT法测定免疫毒素的特异性杀伤效应,表明抗CD3-PAPs和抗CD7-PAPs两种单抗IT均具有

特异性杀伤T淋巴细胞和CEM细胞的作用。结果见表1。

表1 MTT法测定免疫毒素对T淋巴细胞的杀伤率
Table 1 Cytotoxicity of immunotoxins on T lymphocyte tested by MTT ($\bar{x} \pm s$)%

Group	Cytotoxicity rates for different concentration(mol/L)of immunotoxin				
	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
Anti-CD7-PAPs	98.9±0.6	90.9±1.6	58.1±3.0	36.5±3.4	21.1±3.9
Anti-CD7-PAPs	96.7±1.4	87.4±1.5	56.3±2.6	31.7±1.7	19.8±3.5
Anti-CD3-PAPs + Anti-CD7-PAPs(1:1)	99.2±0.5	96.1±1.2	75.6±4.8	48.8±1.9	29.5±3.3
Polyclonal Ab AHTG-PAPs	97.4±1.3	88.1±1.8	69.4±2.7	46.1±3.5	27.6±3.7
Normal mouse IgG-PAPs	15.6±2.2	13.5±3.2	10.1±2.7	7.5±2.5	3.8±1.4

3 讨论

目前用于构建IT的毒素多为植物毒素和细菌毒素。它们可分别以酶样作用方式使真核细胞核糖体60s亚基和肽链延长因子EF-2失活,从而抑制蛋白合成,导致细胞死亡。研究最多的是蓖麻毒素(ricin),用完整毒素ricin(含A、B链)制备的IT毒性强烈,但存在B链结合细胞的非特异毒性^[7]。PAPs是一种天然无B链的植物单链毒素,不仅其杀伤力可与ricin A相媲美,而且有易于提取、稳定性好和非特异毒性小等优点。本实验也证实,在有效浓度范围内PAPs对细胞的非特异杀伤率<20%。因此,PAPs是一种较好的IT弹头物质。

我们在台盼蓝法直接观察死活细胞的基础上,采用改进的MTT法测定IT杀伤率。由于将酸性异丙醇改为用乙醇加二甲亚砜(1:1),Formazan结晶溶解完全,溶液较稳定,而且避免了酸性溶剂引起蛋白沉淀对光密度读数的干扰,使结果更为准确。

本实验证实,多克隆抗体AHTG-PAPs杀伤T细胞及T淋巴母细胞CEM的作用较强,但多克隆抗体是对多种抗原决定簇起反应,而单克隆抗体只针对一种抗原决定簇起反应,故多克隆抗体的特异性不及单克隆抗体。本实验单克隆抗体IT混合组对T细胞的特异杀伤作用与多抗IT组相近,明显较单独应用单克隆抗体IT组增强,与正常鼠IgG相比,差异有显著性($P < 0.01$)。从而提示,应用不同单克隆抗体IT合剂使之在一定程度上多克隆化,既可提高杀伤效率,又能保持其特异性。

由于外周血T淋巴细胞和T淋巴母细胞CEM细胞表面有CD3和CD7共同抗原决定簇,因此我们应用这两种细胞进行免疫荧光实验,均获得较接近的结果。本研究结果表明,抗CD3-PAPs和抗CD7-PAPs两种单克隆抗体IT联合应用,可能对异体骨髓/脐血移植清除T细胞,或自体骨髓移植净化T淋巴白血病细胞以及在器官移植抗排斥治疗等有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] Hamawy M M, Tsuchida M, Manthei E R, *et al.* Activation of T lymphocytes for adhesion and cytokine expression by toxin-conjugated anti-CD3 monoclonal antibodies [J]. *Transplantation*, 1999, 68(5): 693.
- [2] Collins N H, Fernandes J M. T cell depletion and manipulation in allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Immunomethods*, 1994, 5(3): 189.
- [3] Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, *et al.* Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(2):695.
- [4] 林学颜,张玲.现代细胞与分子免疫学[M].北京:科学出版社,2000.459~488.
- [5] 杨斌,林学颜.抗人B细胞淋巴瘤单抗B159-商陆抗病毒蛋白免疫毒素的制备及效应[J].*细胞与分子免疫学杂志*,1996,12(1):22.
- [6] Dariusz S, Saran J S, Richard H C, *et al.* An improved MTT assay [J]. *J Immunological Methods*, 1993, 157(1):203.
- [7] Stripe F, Hughes R C. Specificity of ribosome-inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity [J]. *Biochem J*, 1989, 262(3):1001.

(编辑 黄小廷)