

[文章编号] 1000-8861 (2009) 01-0034-05

抗人 DcR3 单克隆抗体的制备、鉴定及应用

刘瑞振¹, 张长弓¹, 何 琼², 苏金华¹, 陈彩霞¹, 陈 福¹, 庄国洪^{1*}

[摘要] 目的 制备抗 DcR3 单克隆抗体 (mAb), 鉴定其生物学特性, 并应用于 ELISA、Western blot、Flow cytometry (FCM) 检测。方法 以纯化的可溶性 DcR3 (sDcR3) 免疫 Balb/c 小鼠, 采用杂交瘤技术制备抗 DcR3 mAb。用 Ig 亚类 ELISA 试剂盒鉴定抗 DcR3 mAb 的亚类。用 ELISA 方法测定抗 DcR3 mAb 与 sDcR3 结合的特性, SDS-PAGE 鉴定抗 DcR3 mAb 与 SW480 细胞上清中 DcR3 结合的特性, 以鉴定 mAb 的特性。用间接 ELISA 法检测腹水 mAb 的效价、亲和常数并进行表位分析。Western blot 检测 mAb 的特异性及应用, 并用所获抗 DcR3 单克隆抗体 (mAb) 通过流式细胞仪检测肿瘤细胞表面 DcR3 的表达水平。结果 获得 4 株可分泌 DcR3 mAb 的杂交瘤细胞系 ZZ-393、ZZ-394、ZZ-151 和 ZZ-268。其中 DcR3 mAb ZZ-268 (下文简称为 ZZ-268) 的 Ig 亚类为 IgG1 (型); 腹水效价为 1×10^5 ; 亲和常数为 1.28×10^9 水平; ZZ-268 和 ZZ-151 可识别与其他 2 种抗体不同的抗原表位; Western blot 证实, 获得的 ZZ-268 可特异性地识别 DcR3; 通过流式细胞术可敏感地检测到不同肿瘤细胞表面 DcR3 的表达水平。结论 获得 4 株抗 DcR3 的 mAb, 其中 ZZ-268 效价高、特异性强, 将此抗体用于膜 DcR3 与 sDcR3 的检测分析。

[关键词] DcR3; 单克隆抗体; 制备**[中图分类号]** R392.11 **[文献标志码]** A

Preparation, characterization, and application of monoclonal antibodies against human decoy receptor 3

LIU Ruizhen, ZHANG Changgong, HE Qiong, CHEN Caixia, CHEN Fu, ZHUANG Guohong

Anti-Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] **Objective** To prepare monoclonal antibodies mAb against DcR3, characterize their biological properties and apply them to ELISA, Flow cytometry, and Western blot detection. **Methods** Balb/c mice were immunized with soluble DcR3 (sDcR3) for preparing mAb by using hybridoma technique. Ig subclass and specificity of mAbs were analyzed by ELISA and SDS-PAGE, respectively. The titres, relative affinity, and epitopes of mAbs in ascitic fluid were determined by indirect ELISA. The specificity and application of mAb were detected via Western blotting. DcR3 expression on the tumor cell surface was detected by FCM. **Results** Hybridoma cell lines secreting anti-DcR3 mAbs were obtained and named as ZZ-393, ZZ-394, ZZ-151, and ZZ-268. DcR3 mAb ZZ-268 (as follows called ZZ-268) Ig subclass belonged to IgG1. The titer of ZZ-268 in ascitic fluid was 1×10^5 ; the affinity constant of ZZ-268 was 1.28×10^9 . ZZ-268 recognized the same epitopes on DcR3 molecule with ZZ-151. The expression of DcR3 on different tumor cells surface could be sensitive detected by FCM. **Conclusion** Four mAbs against DcR3 have been prepared successfully and ZZ-268 with high titers and specificity can be used in membrane DcR3 and sDcR3 testing.

[Key words] DcR3; monoclonal antibody; preparation

诱骗受体 3 (decoy receptor 3, DcR3, 又称 TR6) 是 1998 年 Pitti 等^[1]发现的肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族的新成员, 是一种可溶性受体, 能与 TNF 家族成员: Fas 配体 (Fas ligand, FasL)、LIGHT [(herpes virus entry mediator (HVEM)-L) 和 TL1A^[2] 竞争性地结合, 并抑制其介导的细胞凋亡, 从而导致机体对肿瘤细胞和活化的自身免疫细胞的耐受, 与多种恶性肿

瘤、自身免疫性疾病、移植排斥等方面密切相关。研究表明, DcR3 在肺癌、胃肠道肿瘤、脑恶性胶质瘤、胰腺癌和肝癌等恶性肿瘤组织中都有不同程度的表达^[3]; 同时, DcR3 在肿瘤患者血清及组织中浓度的高低与其恶性度呈正相关^[4], 检测术后患者血清中 DcR3 水平可作为肿瘤切除彻底与否的重要指标^[5]。因此利用抗 DcR3 单克隆抗体 (mAb) 研究 DcR3 在上述疾病中的表达非常必要。在成功构建、表达 sDcR3 的前提下, 进一步制备抗 DcR3 单克隆抗体, 鉴定其特异性并评价其在 ELISA、Western blot、Flow cytometry 的应用前景。为 ELISA 试剂盒的研制及肿瘤的诊断奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 1) 动物及试剂: 6~8 周龄雌性 Balb/c

作者单位: 1. 厦门大学医学院抗癌研究中心; 2. 厦门市波生生物技术有限公司

收稿日期: 2008-05-20; 修回日期: 2008-09-27

基金项目: 厦门大学科研启动资金 (Z03103) 和厦门市科技计划项目 (3502Z20083008) 资助

*通信作者: 庄国洪, 厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门 361005;

Tel: 0592-2180587; E-mail: zhuanguohong@yahoo.com.cn

共同第一作者

小鼠由厦门大学医学院实验动物中心提供。重组 DcR3 蛋白、小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0、SW480、Hela (cervical carcinoma cell), BGC823 (gastric carcinoma) 等细胞为本实验室储存。NTA 层析纯化所获 sDcR3 纯品。对照抗 DcR3 (p-DcR3, IgG1) 单克隆抗体购自美国 BioVision 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (厦门市波生生物技术有限公司惠赠), Fluorescent (FITC) 标记的羊抗鼠 IgG 蛋白 (Sigma, USA)。弗氏完全及不完全佐剂购自 Sigma 公司。2) 仪器: Protein G 亲和层析柱为 Pharmacia 公司产品。酶联免疫分析仪 (型号 MOLD1354) 为芬兰 Labsystems 公司产品。流式细胞仪 (型号 FACSCalibur) 为美国 BD 公司产品。

1.2 杂交瘤细胞的建立 1) 免疫动物: 参照 [6], 以纯化的 sDcR3 100 μL (约 45 μg) 与等量弗氏完全佐剂乳化后经腹腔注射小鼠, 每隔 2 周以相同剂量的 sDcR3 加等量不完全佐剂加强免疫 2 次。末次加强免疫后 3 d, 采用 ELISA 法测定小鼠血清中抗 sDcR3 抗体的效价, 效价高 ($> 1\ 2\ 800$) 的小鼠经尾静脉再加强注射 sDcR3 100 μL , 3 d 后进行细胞融合。2) 细胞融合、筛选、克隆化及腹水制备, 均按实验室常规方法进行^[7-8]。

1.3 腹水 mAb 的纯化 首先将所用材料和试剂在室温中平衡, 去掉 Protein G 亲和层析柱顶部和下端的盖子, 排出柱内的储存液, 加 5 mL 结合缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , pH 6 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液) 平衡柱子。将 mAb 腹水用 10 ~ 15 mL 结合缓冲液适当稀释后上样, 待样品完全进入层析柱后, 用结合缓冲液洗柱, 再用 6 ~ 10 mL 洗脱液 (pH 2.7 的 0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液) 进行洗脱, 收集洗脱液, 用紫外分光光度计测定其蛋白含量, 用 SDS-PAGE 鉴定其纯度。

1.4 mAb 的效价及 Ig 亚类鉴定 1) 效价测定: 用 sDcR3 (2 mg/L) 包被 96 孔板, 按间接 ELISA 法的常规进行测定。2) Ig 亚类的鉴定: 采用鼠 Ig 亚类 ELISA 检测试剂盒进行鉴定。

1.5 mAb 的特异性鉴定 1) 抗 ZZ-268 与 sDcR3 结合的特异性鉴定: 采用 ELISA 法测定, 用不同浓度 (0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 及 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 sDcR3 包被 96 孔板, 每孔 100 μL , 4 过夜。PBST 洗涤 4 次, 每孔加 200 μL (10 mg/mL) BSA 封闭反应板, 37 反应 2 h。PBST 洗涤 4 次, 备用。每孔加入 ZZ-268 杂交瘤培养上清 100 μL , 以购买的抗 DcR3 抗体作为阳性对照, PBS 溶液作为阴性对照, 37 反应 1 h。PBST 洗涤 4 次, 加羊抗鼠 IgG-HRP, 每孔 100 μL , 室温反应 1 h。PBST 洗涤 4 次, 加底物 TMB 显色, 加终止液, 测 $A_{450\text{nm}}$, 绘制曲线。2) 抗 ZZ-268 与 SW480 细胞上清中 DcR3 结合的特性鉴定: 用 SDS-PAGE 检测, 将 2.5、5.0、7.5、10、12.5、15、17.5、20 μL sDcR3

(1 mg/mL) 与 100 μL ZZ-268 混合, 分别加入到小离心管中, 室温反应 30 min, 加入 SW480 细胞上清 (100 $\mu\text{L}/\text{管}$) 于冰浴中反应 30 min, 并以只加 SW480 细胞的培养上清作为对照。每孔加入 15 μL , 以 SDS-PAGE 测定 ZZ-268 与膜 DcR3 的结合。

1.6 mAb 亲和常数的测定 参照 Beatty 等^[9] 建立的非竞争酶免疫法测定。首先确定 DcR3 抗原的最适包被量, 绘制用 4 个浓度 (5、2.5、1.25、0.625 mg/L) 的 DcR3 包被时, mAb 的稀释度与 $A_{450\text{nm}}$ 的关系图, 分别求出其最大 A 值一半 (即 $A_{50\%}$) 处对应的抗体浓度。按公式 $K_{\text{aff}} = (n - 1) / (n \cdot \text{Ab} - \text{Ab})$ 计算亲和常数。式中 Ab 和 Ab 分别表示任意 2 条曲线的抗原包被浓度为 Ag 和 Ag 时 $A_{50\%}$ 时的抗体浓度 $n = \text{Ag}/\text{Ag}$, 注意计算时保证 $\text{Ag} > \text{Ag}$, 每个抗原包被量就能计算出 1 个 K_{aff} 值, 然后两两比较, 当 $n = 2$ 时, 可得 3 个 K 值; $n = 4$ 时, 得 2 个 K 值; $n = 8$ 时, 可得 1 个 K 值, 求出 6 个 K 值的均数作为最终结果。

1.7 mAb 的抗原表位分析 参照 Friguet 等^[10] 报道的 ELISA 相加实验进行测定。即用 sDcR3 (2 mg/mL) 包被 96 孔板, 分别加入 4 株杂交瘤细胞 ZZ-393、ZZ-394、ZZ-151 和 ZZ-268 的培养上清 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 用 PBS 补足 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。再分别取 4 种杂交瘤细胞的培养上清各 50 μL : 按 ZZ-393 + ZZ-394、ZZ-393 + ZZ-151、ZZ-393 + ZZ-268、ZZ-394 + ZZ-151、ZZ-394 + ZZ-268 及 ZZ-151 + ZZ-268 混合后, 加入到另外 6 孔中, 于 37 孵育 1 h。洗板, 加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 同上孵育及洗板后, 加底物 OPD 溶液, 于波长 490 nm 测定 A 值。按公式 $[(2A_{1+2}) / (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$ 计算相加指数 (AI)。 A_{1+2} 为两种培养上清混合后的 A 值; A_1 、 A_2 为 1 种培养上清的 A 值, 当 $\text{AI} > 50\%$ 时, 即认为是与不同表位的结合。

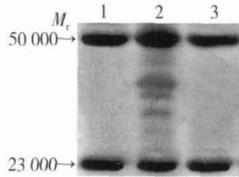
1.8 Western blot 检测 分别取纯化的 DcR3 融合蛋白 10 μL (1 mg/mL) 于 A、B、C、D 4 个小离心管中, 经 PBS 以 1:5 (A)、1:10 (B)、1:20 (C)、1:40 (D) 倍比稀释混匀后, 每孔加样 15 μL 标记为 1、2、3、4, 经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上, 以 1:1 000 稀释的 ZZ-268 小鼠腹水为一抗, 以 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗, 通过 DAB 显色系统进 Western blot 检测。

1.9 mAb 在流式细胞仪检测肿瘤细胞表面 DcR3 表达水平的应用 将分别加入到小离心管中的肿瘤细胞 BGC、Hela、MGC、BEL、H910、HL60、MCF-7 ($1 \times 10^5\ \text{mL}^{-1}$) 与 PBS 稀释的 ZZ-268 (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 充分混匀, 冰浴 30 min, PBS 洗涤 3 次。再与 Fluorescent (FITC) 标记的羊抗鼠 IgG 蛋白 (Sigma, USA) 混合, 冰浴反应 30 min, PBS 洗涤 3 次, 通过流式细胞仪检测肿瘤细胞表面 DcR3 表达水平。并在此基础上, 进一步检测了 FasL 诱导的肿瘤细胞凋亡率与 DcR3 表达量的关系。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞系的建立 经动物免疫、细胞融合、筛选及克隆化,建立了四株能稳定分泌抗 DcR3 的杂交瘤细胞株,分别命名为 ZZ-393、ZZ-394、ZZ-151 和 ZZ-268。将这四株细胞在体外连续传代培养半年以上,冻存、复苏后,仍可保持分泌 mAb 的能力。

2.2 腹水 mAb 的纯化 腹水 mAb 经 Protein G 析柱纯化后,用紫外分光光度计测定纯化蛋白的浓度为 20 g/L。经 SDS-PAGE 鉴定 mAb 的纯度在 95% 以上, M_r 为 146 000 (轻链为 23 000,重链为 50 000)。其中,ZZ-268 的 SDS-PAGE 鉴定如下(图 1)。



1) Purchased mAb DcR3 and IgG1; 2) Pre-purified mAb ZZ-268; 3) Purified mAb ZZ-268.

图 1 纯化的 ZZ-268 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig 1 Identification of purified mAbs by SDS-PAGE

2.3 mAb 的效价测定及 Ig 亚类鉴定 间接 ELISA 检测表明,ZZ-268 腹水的效价为 1×10^5 ;ZZ-268 亚型为 IgG1 (型)。

2.4 mAb 的特异性鉴定

2.4.1 抗 ZZ-268 与 sDcR3 结合的特异性鉴定 结果显示,ZZ-268 与不同浓度的 DcR3 结合反应的 A 值为 0.273、0.430、0.733、0.891、1.126、1.126;阳性对照组抗 DcR3 单克隆抗体与不同浓度的 DcR3 结合反应的 A 值为 0.273、0.450、0.736、0.901、1.126、1.128,说明 ZZ-268 为抗 DcR3 的特异性抗体(图 2)。

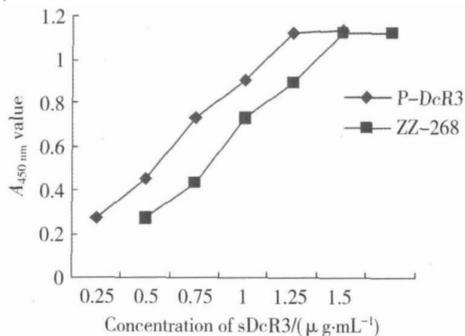
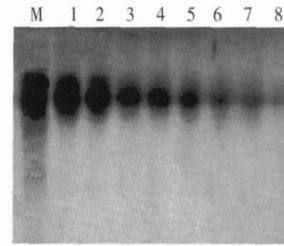


图 2 ELISA 法检测 ZZ-268 与 sDcR3 结合的特性

Fig 2 Detection of binding effect of ZZ-268 to sDcR3 by ELISA

2.4.2 抗 ZZ-268 与 SW480 细胞上清中 DcR3 结合的特性鉴定 将 2.5、5.0、7.5、10、12.5、15、17.5、20 μ L sDcR3 (1 mg/mL) 与各 100 μ L ZZ-268 混合,分别加入到小离心管中,室温反应 30 min,加入 SW480 细胞上清(100 μ L/管)于冰浴中反应 30 min,以只加 SW480(M) 的培养上清作为对照。用 SDS-PAGE 测定 ZZ-268 与 DcR3 的结合。结果发现,随着 sDcR3

浓度的增加,电泳条带逐渐变浅,说明 sDcR3 能够竞争 ZZ-268 与 DcR3 的结合(图 3),ZZ-268 与 SW480 细胞分泌的 DcR3 结合是特异性的。

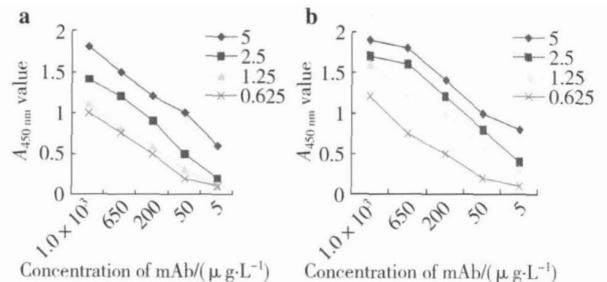


M) ZZ-268 without sDcR3 treatment; 1) ZZ-268 treated with 2.5 μ L sDcR3; 2) ZZ-268 treated with 5.0 μ L sDcR3; 3) ZZ-268 treated with 7.5 μ L sDcR3; 4) ZZ-268 treated with 10 μ L sDcR3; 5) ZZ-268 treated with 12.5 μ L sDcR3; 6) ZZ-268 treated with 15 μ L sDcR3; 7) ZZ-268 treated with 17.5 μ L sDcR3; 8) ZZ-268 treated with 20 μ L sDcR3.

图 3 SDS-PAGE 检测抗 ZZ-268 与 SW480 细胞分泌的 DcR3 结合特性

Fig 3 Bonding effect of ZZ-268 to SW480 cell-secreted DcR3 analyzed by SDS-PAGE

2.5 mAb 亲和常数的测定 对亲和常数测定曲线进行模拟,得到 4 个半数 A 值时的 mAb 的浓度,从图 4 中可以确定,每孔包被 0.625、1.25、2.5、5 mg/L 的 DcR3 时,A 50% 时的 mAb ZZ-394 浓度依次为:600 μ g/L (399.7×10^{-12} mol/L)、550 μ g/L (366.7×10^{-12} mol/L)、300 μ g/L (200×10^{-12} mol/L) 和 50 μ g/L (3.3×10^{-12} mol/L);而使 A 50% 时的 mAb ZZ-268 的浓度依次为:580 μ g/L (386.7×10^{-12} mol/L)、450 μ g/L (303×10^{-12} mol/L)、200 μ g/L (132.5×10^{-12} mol/L) 和 40 μ g/L (26.4×10^{-12} mol/L)。按亲和常数的计算公式,mAb ZZ-394 和 ZZ-268 与 DcR3 结合的亲和常数,分别为 1.09×10^9 和 1.28×10^9 。



a) mAb ZZ-394; b) mAb ZZ-268.

图 4 抗 DcR3 mAb ZZ-394 及 mAb ZZ-268 与 DcR3 结合的反应曲线

Fig 4 Response curve of binding of ZZ-394 and ZZ-268 to DcR3

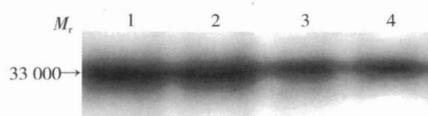
2.6 mAb 抗原结合位点的分析 将 4 株 mAb ZZ-393、ZZ-394、ZZ-151 和 ZZ-268,进行抗体相加试验,并计算相加指数。结果表明,mAb ZZ-393 和 ZZ-394 可识别 1 种抗原表位;mAb ZZ-151 和 ZZ-268 则识别另一种抗原表位(表 1)。

2.7 Western blot 分析 DcR3 融合蛋白相对分子质量 (M_r) 为 33 000,扫描分析显示其纯度达 95% 以上^[5]。ZZ-268 与转印至 PVDF 膜上的 DcR3 融合蛋白在 M_r 约为 33 000 处形成单一的阳性染色带,反应如下(图 5)。

表 1 mAb 的抗原表位分析

Tab 1 Analysis of antigenic epitopes of 4 mAbs

mAb	A _{450 nm} value	A _i / %
ZZ-393	0.53	
ZZ-394	0.55	
ZZ-151	0.62	
ZZ-268	0.65	
ZZ-393 + ZZ-394	0.56	3.7
ZZ-151 + ZZ-268	0.66	3.9
ZZ-393 + ZZ-151	0.9	56.5
ZZ-393 + ZZ-268	1.06	79.7
ZZ-394 + ZZ-151	1.0	71
ZZ-394 + ZZ-268	1.04	73



1) 0.2 mg/mL purified DcR3 protein; 2) 0.1 mg/mL purified DcR3 protein; 3) 0.05 mg/mL purified DcR3 protein; 4) 0.025 mg/mL purified DcR3 protein.

图 5 mAb ZZ-268 Western blot 分析

Fig 5 Western blot analysis of ZZ-268

2.8 mAb 在流式细胞仪检测肿瘤细胞表面 DcR3 表达水平的应用 应用 ZZ-268, 通过流式细胞仪检测到不同的肿瘤细胞表面 DcR3 具有不同的表达水平, 由高到低为 BGC823: 35.3%, HeLa: 31.9%, MGC803: 28.8%, BEL740: 27.5%, H910: 24.9%, HL60: 23.9%, MCF-7: 21.6%; 并在此基础上, 进一步检测了 FasL 诱导的肿瘤细胞凋亡率与 DcR3 表达量的关系, 结论显示: 肿瘤细胞对 FasL 的敏感性与肿瘤细胞表面 DcR3 表达的量密切相关(另文发表)^[11]。

3 讨论

Li 等^[11] 研究发现, DcR3 编码基因 M68 定位于人类染色体于 20q13.3, 含有 4 个富含半胱氨酸的结构域(CRD)。其 mRNA 序列全长 1 114 bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF) 编码 300 个氨基酸(包括 29 个氨基酸残基组成的信号肽), 但没有跨膜区, 是一个分泌性的蛋白, 蛋白 M_r 约 35 000。我们通过重叠 PCR 获得了编码正确氨基酸序列的目的基因。构建 pEF-22b(+)/DcR3 表达载体, 转化大肠杆菌 Rosseta-gami, IPTG 诱导表达, Ni 柱纯化。成功获得目的蛋白, 纯化后, 蛋白纯度达 95% 以上, M_r 为 33 000。ELISA 结果表明所纯化的蛋白可与抗 DcR3 抗体发生特异结合^[5]。

DcR3 竞争性地与 FasL、LIGHT、TL1A 结合后, 可干扰 FasL 介导的凋亡, 还可通过阻断肿瘤坏死因子受体 2(tumor necrosis factor receptor 2, TR2) 和 LIGHT 之间的双向信号转导、TL1A 与死亡受体 3(death receptor 3, DR3) 间的单向信号转导抑制 T 细胞共刺

激, 在肿瘤免疫逃逸及转移、自身免疫性疾病、移植排斥反应中起了重要的作用^[13-14]。

由于 DcR3 在多种恶性肿瘤组织中都有不同程度的表达且表达量的高低与其恶性度呈成正比, 因此, 可用 DcR3 单克隆抗体(mAb), 通过 ELISA、Flow cytometry, 免疫组化等方法分析 DcR3 在不同肿瘤(或自身免疫性疾病)、肿瘤不同时期及治疗前后的表达水平, 并结合临床各种参数, 为临床及自身免疫病的治疗提供新策略。还可应用 DcR3 的单克隆抗体中和 DcR3 蛋白, 以解除对 FasL、LIGHT、TL1A 三大调节系统的抑制, 从而使机体正常发挥清除肿瘤细胞及活化的免疫细胞, 以达到辅助治疗的目的。

现在利用的抗人 DcR3 mAb 试剂大都从国外进口, 费时且价格昂贵, 国内鲜见这方面的制备报道。我们以高纯度的重组 DcR3 蛋白作为抗原, 免疫 Balb/c 小鼠, 经过细胞融合, 成功地筛选 4 株可稳定分泌 mAb 的杂交瘤细胞株。其中对 ZZ-268 的特性及应用作一全面的鉴定, 其亚类为 IgG1(型); 腹水效价为 1 × 10⁻⁵; 亲和力为 1.28 × 10⁹; ELISA 相加实验显示 ZZ-268 可识别特异的抗原表位; SDS-PAGE 检测分析, ZZ-268 特异性结合 sDcR3。通过流式细胞术可以检测不同肿瘤细胞 DcR3 的表达。总之, 抗人 DcR3 单克隆抗体(mAb) 的成功制备、鉴定及应用, 不但可进一步研究分析 DcR3 蛋白的表达及分布, 还为其 ELISA 试剂盒的研制及肿瘤的诊断奠定了坚实的基础。

致谢: 在此诚挚感谢厦门市波生生物技术有限公司提供羊抗鼠 IgG HRP; 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心(厦门大学) 帮助检测抗体亚型。

[参考文献]

- [1] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer[J]. Nature, 1998, 396 (6712): 699-703.
- [2] Wan X, Zhang J, Luo H, et al. A TNF family member LIGHT transduces costimulatory signals into human T cells[J]. J Immunol, 2002, 169 (12): 6813-6821.
- [3] Shi G, Mao J, Zhang J, et al. Tumor vaccine based on cell surface expression of DcR3/TR6[J]. J Immunol, 2005, 174 (8): 4727-4735.
- [4] Arakawa Y, Tachibana O, Hasegawa M, et al. Frequent gene amplification and overexpression of decoy receptor 3 in glioblastoma[J]. Acta Neuropathol, 2005, 109 (3): 294-298.
- [5] 李文珠, 陶惠然, 颜江华, 等. 诱骗受体 DcR3 的基因构建、表达及特异性鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22 (2): 151-153.
- [6] 杨明珍, 李鹏, 张竹君, 等. 抗淋巴样增强因子-1 羧基端单克隆抗体的制备及其表位的初步鉴定[J]. 免疫学杂志, 2008, 24 (2): 142-145.

- [7] 李雪玲,王一飞,熊 盛,等. 抗 rhNDPKA 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2004,20(1):86-88.
- [8] 汪燕芳,彭 进,蔡引风. 抗 rhEPO 单克隆抗体的制备及初步应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2004,20(6):696-698.
- [9] Beatty JD,Beatty GB. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods,1987,100(1/2):173-179.
- [10] Friguet B ,Djavadi Ohaniance 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 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase [J]. J Immunol Methods,1983,60(3):351-358.
- [11] Li W, Zhang C, Chen C, et al. Correlation between expression of DcR3 on tumor cells and sensitivity to FasL [J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2007, 4 (6) : 455-460.
- [12] Bai C, Connolly B, Metzker ML, et al. Overexpression of M68/DcR in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (3) : 1230-1235.
- [13] Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, et al. Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression [J]. J Immunol, 2005, 174 (3) : 1647-1656.
- [14] Chang YC, Chen YH, Jackson DG, et al. The glycosaminoglycan-binding domain of decoy receptor 3 is essential for induction of monocyte adhesion [J]. J Immunol, 2006, 176 (1) : 173-180.

(编辑 金晓琳)

(上接第 33 页)

高,在感染后 140 d 达最高水平。本研究发现口服免疫鼠脾细胞产生的 IL-2、IFN γ 、TNF α 和 IL-4 分别在免疫后 4~10 周、2~10 周、2~18 周和 10 周升高,分别在免疫后 10、10、6 和 10 周达最高水平,可见口服免疫鼠脾细胞产生高水平 IL-2 大约早于 Eg 原头节感染 21 周,免疫鼠脾细胞产生高水平 IFN γ 大约早于 Eg 原头节感染 7 周;免疫鼠脾细胞产生高水平 TNF α 大约早于 Eg 原头节感染 12 周;免疫鼠脾细胞产生高水平 IL-4 大约早于 Eg 原头节感染 10 周。鼻腔内接种鼠脾细胞产生的 IL-2、IFN γ 、TNF α 和 IL-4 分别在免疫后 2~18 周、2~10 周、2~18 周和 10 周升高,分别在免疫后 10、8、12 和 10 周达最高水平,可见鼻腔内接种鼠脾细胞产生高水平 IL-2 大约早于 Eg 原头节感染 21 周,免疫鼠脾细胞产生高水平 IFN γ 大约早于 Eg 原头节感染 9 周;免疫鼠脾细胞产生高水平 TNF α 大约早于 Eg 原头节感染 6 周;免疫鼠脾细胞产生高水平 IL-4 大约早于 Eg 原头节感染 10 周。提示重组 BCG-Eg95 疫苗在免疫早期(2~10 周)即可诱导小鼠脾细胞产生 Th1 和 Th2 混合型细胞因子,免疫鼠脾 Th1 细胞分泌的 IL-2 可激活 T_H1 细胞,释放多种可溶性淋巴因子,引起局部以单个核细胞浸润为主的炎症反应,激活 CTL 释放穿孔素和淋巴毒素,杀伤 Eg 原头节;Th1 细胞分泌的 IFN γ 可激活巨噬细胞等效应细胞,促进其释放 NO,杀伤 Eg 原头节;Th1 细胞分泌的 IFN γ 还可抑制 Th2 细胞分泌 IL-4,从而减弱 Th2 型反应;Th1 细胞分泌的 TNF α 可促进单核细胞分泌 TNF α 和 IL-1,促进 Th1 细胞分泌 IL-2 和 IFN γ ;免疫鼠脾 Th2 细胞分泌的 IL-4 水平可抑制 Th1 细胞分泌 IL-2、IFN γ 和 TNF α 等细胞因子;各种免疫细胞和细胞因子之间相互促进和相互调节,形成免疫调节网络,提高宿主抗细粒棘球蚴

感染的保护力。

本文还显示每个 EgAg 或 ConA 刺激组的细胞因子水平显著高于相应的原液组,每个 ConA 刺激组的细胞因子水平显著高于相应的 EgAg 刺激组,可能是由于重组 Eg95 抗原仅诱导其特异的 CD4⁺ T 细胞增殖,因此丝裂原诱导的细胞因子水平可高于特异抗原诱导的水平。

[参考文献]

- [1] Torcal J, Navarro ZM, Lozano R, et al. Immune response and *in vivo* production of cytokines in patients with liver hydatidosis[J]. Clin Exp Immunol, 1996, 106(2):317-322.
- [2] Touil Boukoffa C, Sanceau J, Tayebi B, et al. Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis [J]. J Interferon Cytokine Res, 1997, 17(4):211-217.
- [3] 李文桂,朱佑明. 细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗构建及其表达效率研究[J]. 免疫学杂志,2007,23(5):494-498.
- [4] 李文桂,朱佑明. 细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗诱导的保护力观察[J]. 免疫学杂志,2007,23(4):383-385,389.
- [5] 李文桂,朱佑明. 细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗诱导小鼠脾细胞亚群变化的研究[J]. 免疫学杂志,2007,23(6):657-659.
- [6] Haralabidis S, Karagouni E, Frydas S, et al. Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis[J]. Parasite Immunol, 1995, 17(12):625-650.
- [7] 王 松,许 晏,朱 明,等. 细粒棘球蚴病小鼠的细胞因子动态研究[J]. 地方病通报,2002,17(4):8-11.

(编辑 李海鸥)