

激活型人源化抗人 CD137 单克隆抗体的研制与生物学活性鉴定

何妍^{1,2}, 王华菁^{1,3}, 陆婷¹, 徐依云¹, 黄勇¹, 杨焕凤¹

摘要 目的 制备鼠抗人 CD137 抗体,并对该抗体进行人源化改造。方法 构建 hCD137-pCDNA3.4 真核表达质粒,经 293F 细胞表达纯化及鉴定后,获得 CD137 蛋白。制备 pHAGE-CMV-MCS-IRES-ZsGreen-hCD137 的慢病毒,感染 HEK-293FT 细胞,获得用来筛选杂交瘤的 CD137 转基因细胞株。将 CD137 蛋白免疫小鼠,检测小鼠血清抗体效价,将免疫小鼠的脾脏和骨髓瘤细胞 SP2/0 融合,采用 ELISA 方法及流式细胞术对小鼠杂交瘤进行筛选。将筛选后的杂交瘤细胞接种小鼠,获得腹水。对抗体亚型和抗体效价进行测定,并通过竞争结合抑制实验等方法对所获的 CD137 单抗的生物学特性进行分析鉴定。提取该 mAb 杂交瘤细胞株的总 RNA 逆转录成 cDNA,进行鼠抗人 CD137 抗体可变区序列克隆,构建人源化抗体重链和轻链表达载体,瞬时转染 HEK-293FT,检测分析各重组人源化抗体与抗原的亲和力。结果 获得 1 株 CD137 单抗(6F5),该抗体与 CD137L 有竞争作用。蛋白结合表位在 A. A 30-100。6F5 能够激活 NF- κ B 信号通路,对外周血单个核细胞增殖具有显著促进作用,且人源化后抗体的亲和力不变。结论 成功制备 1 株 CD137 人源化抗体,该人源化抗体为下一步开展体内肿瘤治疗奠定了基础。

关键词 CD137; 单克隆抗体; T 细胞激活

中图分类号 R 819

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)09-1332-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.003

CD137(CD137/TNFRSF9)可能是第一个被确定为免疫治疗靶标的 TNFRSF 成员^[1-2]。CD137 由调节性 T 细胞(Treg)和几种先天免疫细胞群体组成型表达^[3],CD137 抗体通过三聚体连接人肿瘤坏死因子受体相关因子 1(TRAF1)和人肿瘤坏死因子受体相关因子 2(TRAF2),调节免疫细胞功能通路 NF- κ B 的活化^[4],能诱导干扰素- γ (IFN- γ)和白介素 2 的增殖和产生,并通过上调抗细胞凋亡途径(包括

Bcl- α L)来增强细胞存活,CD137 通过刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)增强 NK 细胞的增殖。CD137 对肿瘤反应性 T 细胞存在优先表达及增加 T 细胞募集到肿瘤部位的能力,可以保护 T 细胞免受活化诱导的细胞死亡反应(activation-induced cell death,AICD),同时增强 T 细胞的毒活性^[5]。然而,目前已研发的 CD137 抗体对于 CD137 蛋白的特异性识别结合能力有限,对 NF- κ B 信号通路的激活能力有限,促进 PBMC 细胞增殖有限,或诱导免疫细胞分泌细胞因子的能力有限,因此亟待开发新的人源化 CD137 抗体以用于新药研发。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 试剂 PCR buffer、dNTP、rTaqDNA 聚合酶、DL 2000 和 DL 15000 DNA Marker、限制性核酸内切酶均购自日本 TaKaRa 公司;DNA 片段回收试剂盒和质粒小提试剂盒,蛋白 Marker 均购自北京天根公司;Gibson Asse、bly Master Mix 购自美国 NEB 公司;完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、Accuspin 管均购自美国 Sigma 公司;脱脂奶粉、PE-Mouse anti-hCD137 抗体购自美国 BD 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂、RPMI 1640 和 DMEM 培养基、GIBCO 胎牛血清(FBS)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、goat anti-mouse-647 均购自美国 Abcam 公司;Protein A 纯化柱购自美国 GE 公司。

1.1.2 菌种与质粒 真核表达载体 pCDNA3.4 由该治疗性疫苗研究中心实验室保存;大肠杆菌 DH5 α 感受态及大肠杆菌 BL21 购自北京天根公司。

1.1.3 细胞与病毒 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,人胚胎肾细胞 293F 为治疗性疫苗研究中心实验室保存。PBMC 细胞来自于志愿者,标本获取与使用方法得到上海长征医院医学伦理委员会的批准。

1.1.4 实验动物与组织来源 SPF 级 6~8 周龄 Balb/c、F1 小鼠,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,该实验对动物的处置均符合动物伦理学

2018-05-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31500755)

作者单位: ¹ 治疗性疫苗国家工程中心,上海 201203

² 复旦大学生命科学学院,上海 200433

³ 第二军医大学肿瘤研究所,上海 200433

作者简介:何妍,女,硕士研究生;

杨焕凤,女,MBA,副高级工程师,责任作者,E-mail: heyanyan@canature.com

标准。由复旦大学实验动物中心协助饲养。

1.2 方法

1.2.1 蛋白真核表达质粒的构建与鉴定 通过 DNASTAR 软件比较人 CD137 胞外段的亲水性与免疫原性,选取 CD137 第 86~186 个氨基酸所在的胞外段作为免疫靶向片段,并设计成在重组肽段羧基端(c 端)融合有一个 His 标签的形式。随后,将以上所对应的基因片段 5'端添加 HindIII 酶切位点、3'端添加 XbaI 酶切位点后交由上海桑尼生物公司合成,通过酶切位点 HindIII 和 XbaI 将该基因片段插入 pCDNA3.4 载体中,构建 CD137 真核表达质粒 pCDN3.4。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态,通过 HindIII/XbaI 双酶切和 PCR 鉴定(上游引物 p1: 5'-CCCAAGCTTATGGGAAACAGCTGTTAC-3'; 下游引物 p2: 5'-GCTCTAGATCAATGGTGATGGTGATGATGCTGCGGAGACTGT-3')筛选阳性克隆后由上海桑尼生物公司测序。

1.2.2 重组蛋白的表达与纯化 运用脂质体转染法将构建成功的 pCDNA3.4/hCD137-his 重组载体转染 293F 细胞。取对数生长期 293F 细胞,于 37℃、120 r/min 的 CO₂ 细胞摇床中培养,培养密度为 1.0 × 10⁵/ml,细胞生长密度达到倍数增殖时,进行转染;将脂质体-载体混合液加入细胞,扩大培养 7 d 后收集上清液进行纯化,其对照为转染 pCDNA3.4-GFP 空载体的 293F 细胞(293/mock)。

1.2.3 鼠抗人 CD137 单克隆抗体制备 将纯化的重组蛋白人 CD137 与等体积的弗氏佐剂混合乳化均匀(初免使用完全弗氏佐剂,加强免疫使用不完全弗氏佐剂),随后对 3 只 Balb/c 雌鼠经皮下多点注射免疫,免疫剂量为 100 μ g/只,体积为 300 μ l/只,共免疫 3 次,时间间隔为 2 周。初免后每 2 周从小鼠尾静脉采血,在第 3 次免疫完成后进行一次腹腔冲击免疫,免疫剂量为 50 μ g/只,3 d 后取该小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞做融合实验;HAT 法筛选 10 d 后换 HT 培养基。在第 14 天时吸取杂 14 交瘤细胞培养上清液进行人 CD137 包被的 ELISA 检测,对检测结果为阳性的亚克隆采用有限稀释法进行至少 2 次以上的克隆化,直到筛选出稳定分泌单克隆抗体的融合细胞株。

1.2.4 表位鉴定 为了确定 CD137 蛋白抗体的表位结合区,在公开的犬 CD137 蛋白序列(Ref. Seq. XM 845243)上对人 CD137 蛋白(4-1BB 蛋白)的胞外结构域进行一系列突变。具体的突变位点参见表 1,将突变后的序列构建到 pHAGE-CMV-MCS-IRES-

ZsGreen 病毒包装载体上,并感染 293FT 细胞通过流式分选培养制成稳定表达细胞株,将细胞株结合纯化的抗体,无突变的 CD137 转基因细胞株做为阳性对照,通过流式检测法中阳性比例确定表位。

表 1 CD137 人至犬序列突变体表

H CD137 胞外结构域的突变体	氨基酸改变
Hu CD137 N&E	N30K ,A56T ,G57S ,R60K ,T61A
Hu CD137 N&E 1	N30K ,D38G ,N39K ,R41K ,S46L ,A56T ,G57S ,R60K ,T61A
Hu CD137 N&E 2	N30K ,A56T ,G57S ,R60K ,T61A ,K69E ,R75K ,E77V
Hu CD137 N&E 3	N30K ,D38G ,N39K ,R41K ,S46L ,A56T ,G57S ,R60K ,T61A
Hu CD137 N&E 4	L24I ,P27S ,N30K ,D38G ,N39K ,R41K ,N42S ,S46L ,A56T ,G57S ,R60K ,T61A ,K69E ,R75K ,E77V ,T89I ,P90S ,S100
Hu CD137 N&E 5	K115Q ,C121R ,R134Q ,R154S ,V156A
Hu CD137 N&E 6	S161A ,P162S ,D164G ,L165F ,A169T

1.2.5 人源化抗体的制备 使用 TRIzol(购自上海生工生物)提取杂交瘤细胞株的总 RNA,用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板做 PCR,使用 Ig-Primer Sets 试剂盒分别克隆抗体重链和轻链可变区序列;将克隆得到的抗体重链和轻链可变区序列测序。将 PCR 产物克隆入 pCDNA3.4 载体进一步扩增表达。构建嵌合抗体,将上述测序正确的质粒构建成真核表达载体 pcDNA3.4 (+) (VHCH) 和 (VLCL)。将重、轻链表达载体后共同瞬时转染 293F 细胞表达抗体蛋白。在 37℃、5% CO₂ 的摇床中培养 7 d 后收集上清液,用琼脂糖凝胶 protein A 层析填料纯化上清液中的嵌合抗体。

人源化过程根据以下原则进行:在比对鼠源抗体与胚系模板的基础上,完全保留 CDR 区的氨基酸序列,参考已有文献报道的关键性骨架区残基,以及已上市/临床的基于 IGKV4-1* 01 的人源化抗体确定人源化序列,对骨架区的关键鼠氨基酸进行选择保留,产生初步人源化序列,之后再根据突变对亲和力的影响逐渐减少骨架区鼠氨基酸数。共有四个突变体,c6F5 为人鼠嵌合抗体,c6F5-IgG2 为鼠可变区构建在人的 IgG2 骨架上,c6F5-HR1 为可变区保留一个鼠源氨基酸,发现表达量下降后将影响的氨基酸序列回复突变为 hu6F5 A/V back 人源化抗体。

全基因合成人源化抗体 hu6F5 重链可变区和轻链可变区,将抗体重链可变区和轻链可变区分别插入 pcDNA3.4 (+) -sshkappa 和 pcDNA3.4 (+) -sshIgG2 表达载体,将重、轻链表达载体后共同瞬时

转染 293F 细胞表达抗体蛋白。在 37 ℃、5% CO₂ 的摇床中培养 7 d 后收集上清液,用琼脂糖凝胶 protein A 层析填料纯化上清液中的人源化抗体 hu6F5。

1.2.6 抗体体外功能鉴定

1.2.6.1 NF-κB 信号通路检测 制备表达人 CD137 以及稳定整合的 NF-κB 萤光素酶报告基因的 293T 细胞。收获细胞,洗涤及重悬浮于 DMEM 完全培养基,细胞密度为 6×10^5 个/ml。将 50 μl 细胞铺板于白色 96 孔平板的每个测定孔中。在存在 2.5:1 比率的交联抗体 Fab 山羊抗人 IgG Fc 的条件下,分别加入 human IgG2(同型对照)以及各抗体。加入抗体后将平板在 37 ℃温育 5 h。加入 75 μl 的 Bright-Glo Luciferase 试剂,使用酶标仪测量萤光素酶活性的量。

1.2.6.2 人源化 CD137 抗体诱导细胞因子表达 用不同浓度人源化 CD137 抗体、抗 CD3-ε 克隆 UCHT1 以及 UTOMILUMAB(作为阳性对照)、cG33-IgG2(作为阴性对照)刺激外周血单个核细胞(PBMC)。离心后检测培养上清液。通过 ELISA 法检测上清液中的细胞因子。受试样品和标准品加入到抗细胞因子包被的 96 孔板中。在室温放置 2 h 后,在 PBS-T 中洗板 3 次,先与工作检测抗体保温,然后加入底物。450 nm 处检测吸光度,基于标准曲线计算浓度。

1.2.7 抗体亲和力鉴定

1.2.7.1 BLI 检测抗体亲和力 结合人 CD137 的某些抗体的结合动力学使用 ForteBio octet 384 仪器通过生物膜干涉(BLI)技术测量。包含氨基酸 24-186 的重组人 CD137/his 标签蛋白由本研究室制备。将蛋白质溶解于含 PBS、0.1% 牛血清白蛋白(BSA)及 0.02% Tween 20 的缓冲液中。抗体通过与 AMQ 传感器固定,在 PBS、0.1% BSA 及 0.02% Tween 20 中将抗体浓度稀释为 50 nmol/L。将重组蛋白人 CD137 在 1.56 ~ 100 nmol/L 浓度范围以 1 500 r/min 结合 10 min,随后以相同转速在 PBS、0.1% BSA 及 0.02% Tween 20 中进行 10 min 解离。结合的复合物通过甘氨酸脉冲再生。使用 octet Data Analysis 9.0 软件进行数据分析。传感图拟合为简便的 1:1 Langmuir 结合模型。抗体示出与重组人 CD137 的可逆结合。

1.2.7.2 FACS 检测抗体亲和力 3 倍稀释不同人源化抗体,加入到 CD137-293 细胞中,再用 Alexa Fluor® 647-GOAT Anti-Human Ab 染色后上流式细胞仪检测荧光。当抗原为一定数量,逐渐增加抗体

浓度,抗体抗原结合达到饱和,然后求出抗原饱和 50% 时结合的抗体浓度。其倒数即为亲和常数,画出饱和曲线,EC₅₀ 即为亲和常数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 真核表达质粒的构建与鉴定 将 pCDNA3.4 真核表达载体和合成的人 CD137 胞外段基因片段都进行 HindIII/XbaI 双酶切处理,分别回收后在 T4 连接酶作用下进行连接,并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态中构建重组质粒。提取质粒,挑取经 HindIII/XbaI 双酶切和 PCR 方式鉴定均可获得约 558 bp 片段的阳性克隆(图 1A),由上海桑尼生物公司测序。经鉴定,真核表达重组质粒 pCDNA3.4-CD137 构建成功。

2.2 重组蛋白的表达纯化与鉴定 以 293F 细胞和 293F/mock 为对照,用 ELISA 方法检测其上清液中 hCD137 蛋白的表达。结果显示,293F、293F/mock 上清液中 hCD137 的表达均为阴性,293F/hCD137-His 基因转染细胞上清液 hCD137 表达水平较高,表达的目的蛋白能够以分泌型形式存在。SDS-PAGE 结果见图 1B。

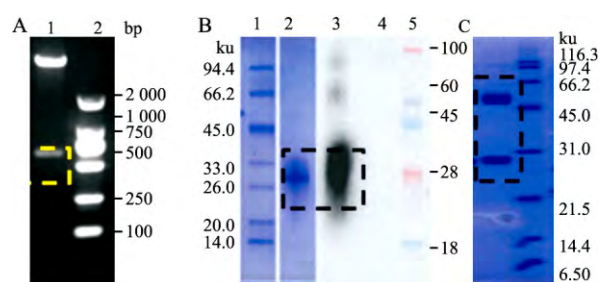


图1 CD137 表达载体、重组蛋白及 CD137 单抗 6F5 的鉴定

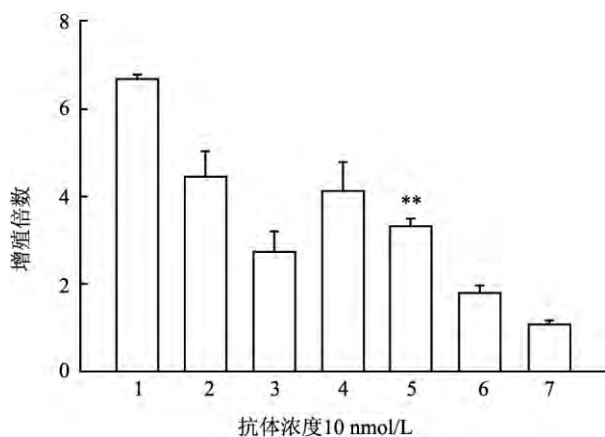
A: h-CD137 基因的克隆和 pCDNA3.4 重组载体的酶切验证; B: h-CD137-his 融合蛋白的蛋白纯化及 Western blot 验证; C: h-CD137 单抗 6F5 的蛋白纯化

2.3 鼠抗人 CD137 抗体的表位测定 将突变后的序列构建到 pHAGE-CMV-MCS-IRES-ZsGreen 病毒包装载体上,并感染 293FT 细胞通过流式分选培养制成稳定表达细胞株,将细胞株结合 6F5 纯化抗体,无突变的 CD137 转基因细胞株做为阳性对照,通过流式检测法中阳性比例确定表位,结果见表 2。表位在 a. a. 30 ~ 100 之间。

表2 抗体6F5表位图

样本	N&E	N&E1	N&E 2	N&E 3	N&E 4	N&E5	N&E6
6F5	-	-	-	+	-	+	+
阳性对照	+	+	+	+	+	-	+

2.4 人源化抗人 CD137 抗体的信号通路检测 使用 Bright-Glo Luciferase 检测试剂盒检测加入抗体后反应 5 h 的 CD137 转基因细胞株内荧光素酶的表达情况, 读值见图 2。由图可见 6F5 能够激活 NF κ B 信号通路, 并产生荧光素酶来使底物产生荧光值, 该值与阴性值相比差异有显著差异 ($P < 0.01$)。

图2 NF- κ B 信号通路的检测

1: m6F5; 2: c6F5; 3: c6F5-IgG2; 4: c6F5-HR1; 5: hu6F5-A/V back; 6: UTOMILUMAB; 7: Cg33-IgG2; 与 Cg33-IgG2 组相比: ** $P < 0.01$

2.5 抗体对 PBMC 细胞激活功能的鉴定 用不同浓度人源化后不同突变 hCD137 抗体和抗 CD3- ϵ 克隆 UCHT1 刺激 PBMC, 使用试剂盒检测培养上清液中的 IL-2 (图 3A)、IFN- γ 含量 (图 3B)。结果显示 hCD137 抗体能显著提高细胞因子的分泌, 与正常 PBMC 培养上清液中细胞因子含量相比差异有显著性。

2.6 抗体亲和力分析 分别使用 BLI 和 FACS 的方法检测人源化后不同突变抗体的亲和力。生物膜层光学干涉技术 (Biolayer Interferometry, BLI) 是通过固化 CD137 单抗 6F5 结合 CD137 蛋白 (结合浓度依次为 100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56 nmol/

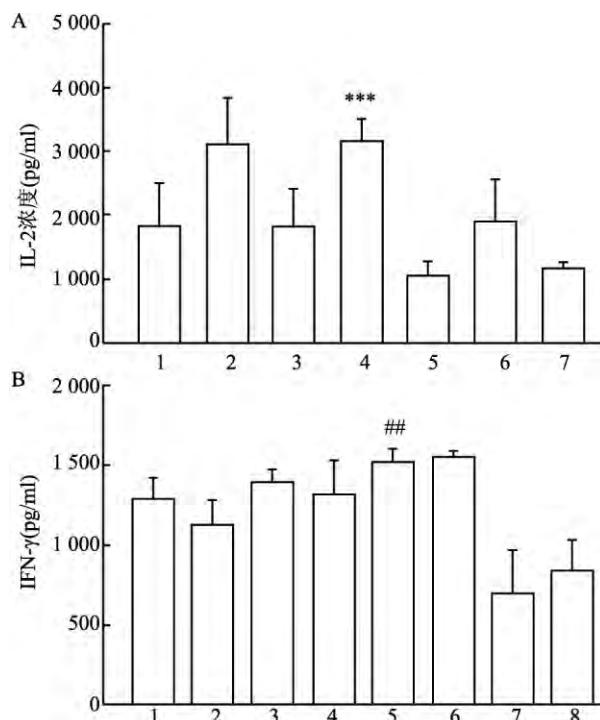


图3 人源化抗人 CD137 对 PBMC 的影响

A: PBMC 与 SEA 及 CD137 抗体共培养 4 d 后的 IL-2 含量; B: PBMC 与 CD3 抗体及 CD137 抗体共培养 4 d 后的 IFN- γ 含量; 与 Cg33-IgG2 组相比: *** $P < 0.001$; 与 PBMC 组相比: ## $P < 0.01$; 1: m6F5; 2: c6F5; 3: c6F5-IgG2; 4: c6F5-HR1; 5: hu6F5-A/V back; 6: UTOMILUMAB; 7: Cg33-IgG2; 8: PBMC

L) 检测 6F5 抗体及其他不同人源化抗体与 CD137 蛋白的亲和力 (图 4A)。结果显示人源化抗体亲和力未因氨基酸突变而下降 (表 3)。

不同抗原抗体反应呈现的平均荧光强度直接定量评价抗体亲和力大小。hCD137-293T 应用于分析抗体亲和力, 抗体的 EC_{50} 进行分析。各抗体的 $Lo-gEC_{50}$ 显示人源化抗体的亲和力未下降, 同 BLI 数据相同 (图 4B)。

3 讨论

肿瘤微环境富含 CD137, 因为其在该位置由效应子和调节性 T 淋巴细胞表达^[6]。更重要的是, 必须将 CD137 激动剂靶向或局部递送至肿瘤, 以暴露

表3 各抗体 KD 值

组别	KD (M)	KD Error	kon (1/Ms)	kon Error	kdis (1/s)	kdis Error	Full R ²
UTOMILUMAB	3.78E-11	1.19E-11	8.07E+05	7.10E+03	3.05E-05	9.57E-06	0.993 6
c6F5	3.34E-10	2.20E-11	5.46E+05	5.83E+03	1.83E-04	1.18E-05	0.991 9
c6F5-HFR1	7.99E-10	3.77E-11	3.02E+05	3.08E+03	2.41E-04	1.11E-05	0.994 7
c6F5-IgG2	8.80E-10	4.05E-11	3.20E+05	3.66E+03	2.82E-04	1.26E-05	0.993 1
hu6F5-AVBACK	4.69E-10	3.59E-11	2.78E+05	2.52E+03	1.31E-04	9.91E-06	0.996 3

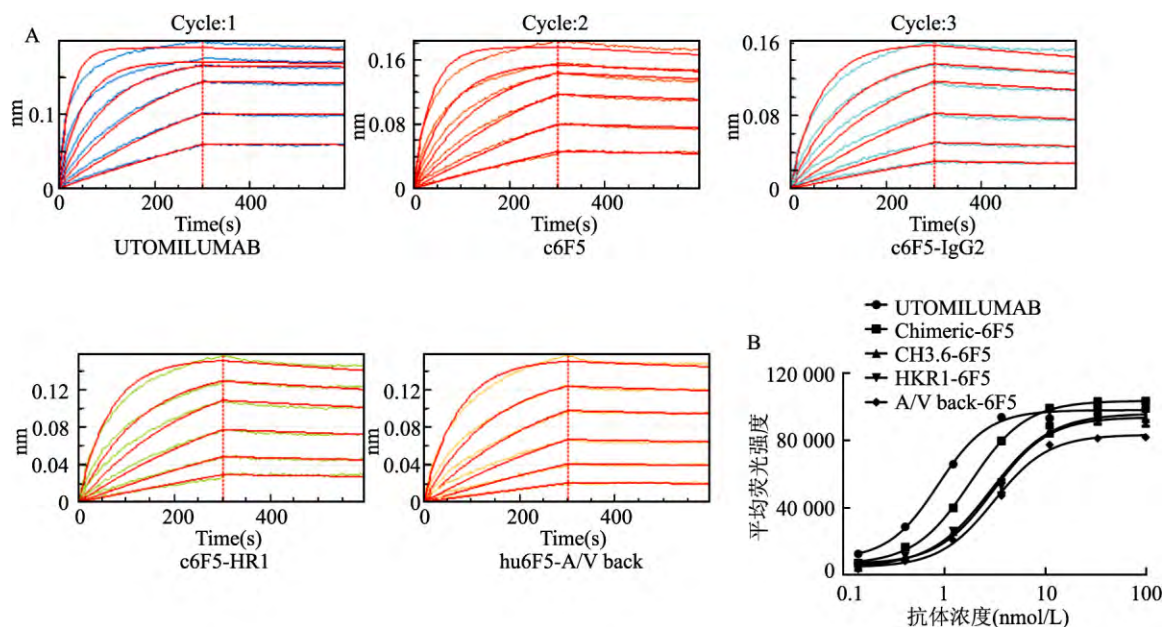


图4 抗体亲和力定量分析结果

A: BLI 测定不同 CD137 单抗的亲和力; B: FACS 测定不同 CD137 抗体亲和力

最大化并限制系统毒性(例如在肝和骨髓中)。事实上,大多数表达的 CD137 仅存在于肿瘤微环境中^[7]。但是这些信号机制由 TNFR 家族和其他表面受体系统的其他成员共享^[8],因此可能会有脱靶副作用。总的来说,基于 CD137 的免疫治疗可能为临床和转化发展提供了许多机会,因此得到有功能性的 CD137 人源化抗体成为迫切需要。目前得到的人源化抗体已经证明了体外功能试验及亲和力。该人源化抗体的表位和现有 CD137 抗体表位不同,可能会降低药物毒性。

下一步研究方向是证实该人源化抗体在体内实验上抗肿瘤效果,建立抗体药物体内药效学评价标准,并且可能开展联合用药评价体内药效学。

参考文献

- [1] Melero I, Shuford W W, Newby S A, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T cell activation molecule eradicate established tumors[J]. *Nat Med*, 1997, 3(6): 682-5.
- [2] Croft M, Benedict C A, Ware C F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies[J]. *Nat Rev Drug Discov* 2013, 12: 147-68.
- [3] Watts T H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses[J]. *Annu Rev Immunol* 2005, 23: 23-68.
- [4] Croft M. The TNF family in T cell differentiation and function: unanswered questions and future directions[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26: 183-90.
- [5] Wolf M, Kuball J, Ho W Y, et al. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8 α T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities[J]. *Blood* 2007, 110: 201-10.
- [6] Vinay D S, Kwon B S. Immunotherapy of cancer with CD137[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 1062-70.
- [7] Kim D H, Chang W S, Lee Y S, et al. CD137 engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation[J]. *J Immunol*, 2008, 180: 2062-8.
- [8] So T, Lee S W, Croft M. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and CD137[J]. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008, 19: 253-62.

Preparation and biological activity of humanized monoclonal antibody against human CD137

He Yan^{1,2}, Wang Huajing^{1,3}, Lu Ting¹, et al

(¹National Engineering Center for the Treatment of Vaccines, Shanghai 201203; ²School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433; ³Cancer Institute, The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Objective To prepare mouse anti-human CD137 antibody and humanize this antibody. **Methods** The

网络出版时间: 2018-8-2 09:39 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.004.html>

布地奈德干预对哮喘小鼠 NF- κ B/TGF- β 1 通路及早期气道重塑的影响

邓鹏辉¹, 马常亭², 张健³, 高明霞³, 李鸿佳³, 张才擎³

摘要 目的 探讨布地奈德干预对哮喘小鼠核转录因子- κ B (NF- κ B)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、相关炎症因子表达及早期气道重塑的影响,进一步完善布地奈德治疗哮喘的理论支持。方法 随机将 30 只 BALB/C 雌性小鼠分为对照组、布地奈德组和哮喘组,每组 10 只。布地奈德组、哮喘组均采用鸡卵白蛋白(OVA)诱导建立哮喘模型,对照组则采取生理盐水替代。HE 染色观察小鼠肺组织炎症变化;ELISA 法测定小鼠肺泡灌洗液(BALF)中白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)的表达水平;Western blot 及 Real-time PCR 法分别定量分析肺组织中 NF- κ B p65、TGF- β 1 的蛋白表达及 mRNA 的表达;用医学图像采集系统及医学图像分析软件测定支气管管腔的周长(Pbm)、支气管管壁面积(Wat)、支气管管壁平滑肌面积(WAm)及平滑肌细胞计数(N),将上述指标均用 Pbm 标准化。结果 HE 染色表明哮喘组与对照组相比,哮喘组小鼠有显著的气道周围炎症细胞浸润、黏膜下水肿、气管腔壁狭窄增厚等情况;各组

小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5 检测结果提示,布地奈德组分别与对照组和哮喘组相比,上述指标较对照组高,而明显低于哮喘组($P < 0.05$)。各组小鼠肺组织 Western blot 结果显示,布地奈德组 NF- κ B p65、TGF- β 1 含量明显高于对照组,哮喘组则明显高于布地奈德组($P < 0.05$);Real-time PCR 结果显示 NF- κ B p65 及 TGF- β 1 的 mRNA 在哮喘组中的表达均高于布地奈德组和对照组($P < 0.05$);图像软件分析显示,布地奈德组 Wat/Pbm、WAm/Pbm、N/Pbm 较哮喘组有明显改善,较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 NF- κ B/TGF- β 1 信号通路可能是哮喘发病机制中的重要环节,并可能参与哮喘早期气道重塑,布地奈德治疗哮喘的机制之一可能通过抑制哮喘 NF- κ B、TGF- β 1 的表达,从而改善哮喘症状,干预哮喘气道重塑。

关键词 布地奈德;哮喘;核转录因子- κ B;转化生长因子- β 1;气道重塑

中图分类号 R 364.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)09-1337-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.004

2018-04-28 接收

基金项目: 山东省自然科学基金(编号:ZR2014HL003)

作者单位: ¹ 泰山医学院研究生院 泰安 271000

² 乳山市人民医院呼吸科 威海 264500

³ 山东大学附属千佛山医院呼吸内科 济南 250014

作者简介: 邓鹏辉 男 硕士研究生;

张才擎 男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: freezcq66@163.com

支气管哮喘是由遗传、环境等多种因素共同导致的气道慢性炎症性疾病。随着人类生活环境的改变,哮喘的发病率呈现出上升趋势,调查统计全球范围内有近 3 亿哮喘患者,而目前在治疗中,激素干预在哮喘治疗中的有效性成为国际共识^[1],其治疗哮喘

hCD137-PCDNA3.4 eukaryotic expression plasmid was constructed, followed by the expression, purification and identification using 293F cells, and a CD137 transgenic cell line was obtained for screening hybridoma. Furthermore, the experimental mice were immunized with CD137 protein to detect the serum titer of mice. Spleens of immunized mice were fused with myeloma cells SP2/0, besides, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry were utilized to screen the hybridoma of mice. Simultaneously, the hybridoma ascites of mice were prepared and purified. Then, the total RNA of the mAb hybridoma cell line was extracted, reversely transcribed to cDNA, and the variable region sequence of mouse anti-human CD137 antibody was cloned. Subsequently, the heavy chain and light chain expression vectors of humanized antibody were obtained accordingly, and HEK-293FT was transfected instantaneously. The affinity of recombinant human antibody to antigen was detected and analyzed later. **Results** The results displayed that the affinity of humanized antibodies of combined was not reduced, and 6F5 had a competitive role with its ligand CD137L. Corresponding protein binding epitope was located at a. a 30-100. **Conclusion** We successfully prepares a humanized CD137 antibody, which lay the foundation for the next step in tumor treatment *in vivo*.

Key words CD137; monoclonal antibody; T cell activation