

抑制 T 细胞增殖的抗 CD45 单克隆抗体的建立

苏泽红², 李亚林^{1,*}, 谭翔文¹, 余坚¹, 刘鑫¹, 袁月亲², 练高建¹

(1. 南华大学实验动物学部, 湖南 衡阳 421001;
2. 南华大学药学与生物科学学院, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 目的 寻找能调节 T 细胞功能的相关分子, 进行与 T 细胞介导的自身免疫性疾病相关的研究。方法 从 BALB/c 小鼠骨髓中收集树突状细胞, 免疫 Wistar 大鼠, 进行细胞融合, 建立杂交瘤细胞系。筛选得到很多株能调节 T 细胞功能的杂交瘤细胞系, 对其中一株最能抑制 T 细胞增殖的杂交瘤细胞系进行了进一步的深入研究。结果 显示其目标分子是 CD45, 同时增殖实验结果显示该抗体能显著抑制 T 细胞增殖反应。结论 抗 CD45 单克隆抗体能有效抑制 T 细胞增殖, 有望将本抗体用于 T 细胞介导的自身免疫性疾病的相关预防及治疗中。

【关键词】 CD45; 单克隆抗体; 抑制; T 细胞增殖; 树突状细胞; 小鼠; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0035-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.008

Establishment of an anti-CD45 monoclonal antibody that inhibits T-cell proliferation

SU Ze-hong², LI Ya-lin^{1,*}, TAN Xiang-wen¹, YU-Jian¹, LIU Xin¹,
YUAN Yue-qin², LIAN Gao-jian¹

(1. Department of Laboratory Animal Science, 2. Department of Biotechnology, School of Pharmacology and Biological Sciences, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China)

【Abstract】 Objective To identify molecules that modulate T-cell functions and serve the studies on T-cell mediated autoimmune diseases. **Methods** Bone marrow-derived dendritic cells were collected from BALB/c mice to immunize Wistar rats, and to establish many hybridoma cell lines. Many hybridoma cell lines which could modulate T-cell functions were obtained. One of the cell lines, most actively inhibiting T-cell proliferation, was further studied. **Results** The anti-CD45 mAb recognized CD45 and significantly suppressed T-cell proliferation in proliferation assays. **Conclusions** Our results indicate that the anti-CD45 mAb can effectively suppress T-cell proliferation, and is promising to be used in the prevention and treatment of T-cell mediated autoimmune diseases in the future.

【Key words】 CD45; Monoclonal antibody; Inhibition; T- cell proliferation; Mouse; Rat; Dendritic cells

CD45, 又可称之为 B220、CD45R、CD45RA、CD45RB、CD45RC、EC3.1.3.48、LCA、T200、Ly5 和 PTPRC。Trowbridge 等^[1]研究表明 CD45 CD45RO 是白细胞表面共同抗原 (leukocyte common antigen, LCA), 在所有白细胞上都有表达, 并且已经证实

各种不同的哺乳动物, 鸡、鲨鱼及红鳍东方豚中, 都有 CD45 同系物存在。CD45 是一种表达在所有有核造血细胞及其前体表面均有表达的 I 型转膜分子。Fellberg 等^[2,4]研究证实, CD45 参与多种免疫功能, 尤其对细胞信号转导、淋巴细胞生长、发育和

[基金项目] 湖南省科技厅项目(2013TT2007, 2014TT2012), 湖南省教育厅优秀青年项目(13B102), 湖南省自然科学基金(13JJ3081)资助。

[作者简介] 苏泽红(1976-), 女, 博士, 从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: zehongsu@hotmail.com

[通讯作者] 练高建(1976-), 男, 博士, 副教授, 主要从事免疫学相关研究。E-mail: liansue@163.com

*: 作者对本文有同等贡献。

活化具有重要的调节作用。Johnson 等^[3,5]研究证实,CD45 是细胞膜上信号传导的关键分子,在淋巴细胞的发育成熟,功能调节及信号传递中具有重要意义。但 CD45 是否在 T 细胞增殖过程中发挥作用,迄今未见相关报道。

我们使用来源于 BALB/c 小鼠骨髓的树突状细胞对大鼠进行免疫,然后得到许多可以识别 T 细胞或树突状细胞的杂交瘤细胞,其中一株杂交瘤细胞分泌的抗体对 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖有最强的抑制作用。对其进行的更进一步的分析,表明该杂交瘤所分泌的抗体的目标分子是 CD45。T 细胞的异常增殖在自身免疫性疾病如 1 型糖尿病、类风湿性关节炎等的发生发展中起着重要的作用。基于此,有必要深入研究抗 CD45 单克隆抗体是否能预防治疗一些与 T 细胞异常增殖诱导的相关疾病。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

6~8 周龄 BALB/c 小鼠 10 只,南华大学实验动物学部自繁自养【SCXK(湘)2010-0004】;6~8 周龄 Wistar 大鼠 9 只,购自南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】,均为雌性,饲养于南华大学 SPF 级动物房【SYXK(湘)2010-0006】。SP2/0 骨髓瘤细胞系,293T 细胞系,均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 试剂

完全及不完全 RPMI-1640 培养液,聚乙二醇(PEG1500),HAT 培养液,均购自 Sigma 公司。小鼠抗大鼠 IgG 抗体,蛋白 G 琼脂糖,银染试剂盒,均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 免疫程序及融合

参见参考文献[9]。

1.4 增殖反应实验

收集 BALB/c 小鼠脾脏制备细胞悬液。离心后加入 CFSE 溶液(9000 倍稀释)于 37℃ 水浴锅遮光培养 15 min,1500 r/min 4℃ 离心 5 min,然后用 PBS 1500 r/min 4℃ 离心 5 min,清洗 2 次,最后加入 RPMI 培养液和抗 CD3 单克隆抗体(1:1000),并将细胞转移至 24 孔培养板,CO₂ 培养箱培养 3 d,收集细胞,流式细胞仪检测结果。

1.5 Western blot

从 BALB/c 小鼠收集脾细胞,加入裂解缓冲液作用约 15 min,然后离心收集上清,经 10% SDS 聚

丙烯酰胺凝胶电泳 90 min,再以 150 mA 电流持续转膜 60 min,将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上。加封闭液封闭 1 h 后加入一抗(1:10),4℃ 孵育过夜。过夜后复温至室温,0.1% PBST 缓冲液洗膜 5 min × 3 次,加入二抗(1:1000),37℃ 孵育 45 min,再用 0.1% PBST 缓冲液洗膜 5 min × 3 次,最后用 PBS 洗 15 min。加入等比例的化学发光试剂 A 和 B 后,直接在成像仪进行显影与采图。

1.6 免疫共沉淀实验

参见参考文献[9]。

1.7 细胞转染实验

使用 GeneJuice (Merck 公司)转染试剂,分别将 pcDNA3.1 空白载体或 pcDNA3.1 装载小鼠 CD45 cDNA 后转染 293T 细胞,然后用博来霉素处理得到稳定的 CD45 表达细胞。

本文中所有实验均重复 3 次以上。

2 结果

2.1 建立有效抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖的单克隆抗体

收集纯化 BALB/c 小鼠骨髓树突状细胞,腹腔注射免疫 Wistar 大鼠,获得大量能够识别小鼠树突状细胞或 T 细胞的杂交瘤细胞系。细胞增殖反应实验得到很多株具有抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖效果的杂交瘤细胞系,其中一株对 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖具有最强的抑制效果(图 1,彩插 3),我们将其命名为 F3-6,对其进行深入研究揭示其目标分子。

2.2 Western blot 检测 F3-6 识别的目标蛋白

如图 2 所示,与 F3-6 反应的泳道内在约 250 × 10³ 处出现一条特异性的蛋白条带,而对照抗体 Rat IgG 的泳道内则没有出现蛋白条带。

2.3 单克隆抗体识别的目标分子

将从 BALB/c 小鼠收集的全脾细胞的裂解液与 F3-6 单克隆抗体进行免疫共沉淀反应,然后将其转移到凝胶上进行电泳。电泳后的凝胶进行银染,结果表明,目标带位于约 250 × 10³ (图 3A)。对切割后的目标带进行液相色谱质谱联用技术分析,显示 F3-6 单克隆抗体识别的目标分子为 CD45;为进一步验证 F3-6 单克隆抗体识别 CD45 分子,我们分别用空白载体或装载有小鼠 CD45 的 cDNA 的载体转染 293T 细胞,然后与我们制备的 F3-6 单克隆抗体进行反应,再与 PE-连接的抗大鼠 IgG 抗体反

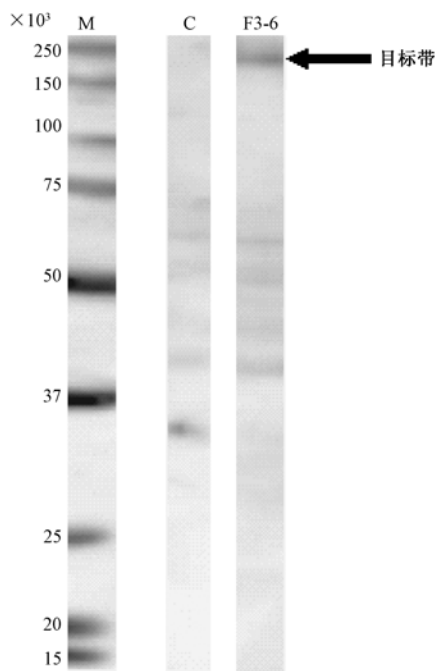


图 2 F3-6 识别的目标蛋白位于约 250×10^3 处 (C: 对照 IgG 抗体)

Fig. 2 The recognized targeted protein F3-6 lies about 250×10^3 (C: Control IgG antibody)

应,流式细胞仪检测结果显示,在过表达 CD45 的 293T 细胞系中,出现与 F3-6 反应的阳性结果(图 3B)。上述结果表明,F3-6 单克隆抗体识别小鼠 CD45。

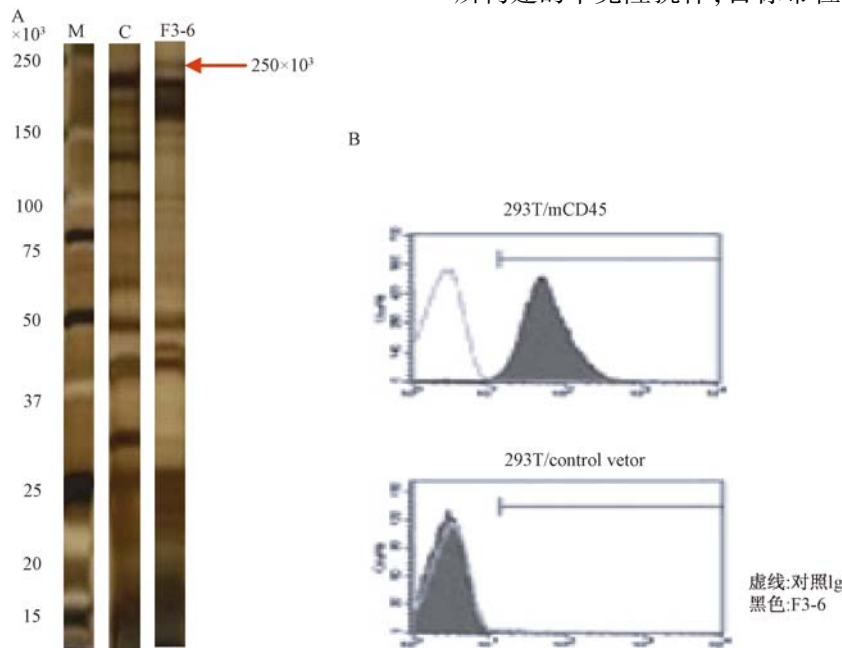


图 3 F3-6 识别 CD45 (目标带位于约 250×10^3 处) (C: 对照 IgG 抗体)

Fig. 3 Recognition of CD45 (molecular weight is about 250×10^3) by the antibody F3-6. C: Control IgG antibody.

3 讨论

CD45,又可称之为 B220、CD45R、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、EC3.1.3.48、LCA、T200、Ly5 和 PTPRC。是白细胞表面共同抗原 (leukocyte common antigen, LCA),在所有白细胞上都有表达,并且已经证实在各种不同的哺乳动物、鸡、鲨鱼及红鳍东方豚中,都有 CD45 同系物存在。Thomas 等^[6]的研究表明 CD45 是一种在所有有核造血细胞及其前体表面均有表达的 I 型转膜分子。Trowbridge 等^[1]研究证实,在各种不同的哺乳动物、鸡、鲨鱼及红鳍东方豚中,都有 CD45 同系物存在。还有研究表明,在 T 细胞及 B 细胞中,多达 10% 的细胞表面区域由 CD45 组成。CD45 参与多种免疫功能,尤其对细胞信号转导、淋巴细胞生长、发育和活化具有重要的调节作用。Byth 等^[13-16]在应用 CD45 突变细胞系和 CD45 缺陷小鼠所做的实验中证实,在淋巴细胞活化所必需的 T 细胞抗原受体 (TCR) 和 B 细胞抗原受体 (BCR) 所介导的信号通路中,CD45 起着关键的正调节作用。CD45 由一类结构相似,分子量较大的跨膜蛋白组成,广泛存在于白细胞表面,是细胞膜上信号传导的关键分子,在淋巴细胞的发育成熟,功能调节及信号传递中具有重要意义^[2-4]。Western blot 和免疫共沉淀结果表明,我们所构建的单克隆抗体,目标带位于约 250×10^3 处。

液相色谱质谱联用技术分析及细胞转染结果表明其目标分子为 CD45。同时,细胞增殖实验表明,抗 CD45 单克隆抗体能有效抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖,提示 CD45 在 T 细胞的增殖过程中发挥关键作用,但 CD45 究竟以何种方式经何种途径对 T 细胞的增殖发挥有效抑制作用仍需进行进一步的研究予以阐明。

很多实验结果证实,以 T 细胞介导为主的自身免疫性疾病中,如自身免疫性甲状腺病,类风湿性关节炎等,自身反应性 T 细胞直接参与其中,作为效应细胞识别和攻击带有特异自身抗原的靶细胞所引发^[7,8]。T 细胞表面表达有大量的共刺激分子,如 CD3、CD98 等,对 T 细胞的增殖、功能分化及存活起着正调或负调作用^[9]。大量的研究证实^[10,11]对这些共刺激分子的作用进行修饰可以有效的调节 T 细胞功能,并且研究人员已经从这些实验研究中开发出大量的试剂,比如以共刺激分子受体或配基为作用目标的单克隆抗体或者重组的可溶性配基,用于 T 细胞介导的自身免疫性疾病的治疗。

本文所构建的抗 CD45 单克隆抗体,能有效地抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖,我们将对其进行更深入的研究,探索其对 T 细胞介导的自身免疫性疾病的预防和治疗作用,为将来的临床应用打下坚实的基础。

(本文图 1 见彩插 3。)

参 考 文 献

[1] Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development [J]. *Annu Rev Immunol*. 1994, 12:85 - 116.
[2] Fellberg J, Johnson P. Characterization of recombinant CD45 cy-

toplasmic domain proteins. Evidence for intramolecular and intermolecular interactions [J]. *J Biol Chem*. 1998, 273:17839 - 17845.
[3] Johnson P, Fellberg J. CD45: a key regulator of Lck and T cell activation [J]. *Mod Asp Immunobiol*. 2001, 1:147 - 151.
[4] Yanagi, S, Sugawara H, Kurosaki M, et al. CD45 modulates phosphorylation of both autophosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells [J]. *J Biol Chem*. 1996, 271: 30487 - 30492.
[5] Veillette A, Bookman MA, Horak EM, et al. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck [J]. *Cell*, 1988, 55:301 - 308.
[6] Thomas ML. The leukocyte common antigen family [J]. *Annu Rev Immunol*. 1989, 7:339 - 369.
[7] Hu C, Ding H, Zhang X, et al. Combination treatment with anti-CD20 and oral anti-CD3 prevents and reverses autoimmune diabetes [J]. *Diabetes*, 2013, 62(8):2849 - 2858.
[8] Chung DT, Richard J, Ruzek M, et al. Anti-thymocyte globulin (ATG) prevents autoimmune encephalomyelitis by expanding myelin antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Int Immunol*. 2007, 19:1003 - 1010.
[9] 练高建, 吴端生, 苏泽红, 等. 抑制 T 细胞增殖的抗 CD98 重链单克隆抗体的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(2):64 - 67.
[10] Wang H, Hosiawa KA, Garcia B, et al. Attenuation of acute xenograft rejection by short-term treatment with LF15 - 0195 and monoclonal antibody against CD45RB in a rat-to-mouse cardiac transplantation model [J]. *Transplantation*, 2003, 75(9):1475 - 1481.
[11] Lian G, Arimochi H, Kitamura A, et al. Manipulation of CD98 resolves type 1 diabetes in nonobese diabetic mice [J]. *J Immunol*, 2012, 188(5):2227 - 2234.

[收稿日期] 2014-01-10