

利用 hTM 表达细胞株制备抗人血栓 调节蛋白单克隆抗体 *

郭紫芬¹⁾ 何淑雅²⁾ 朱炳阳¹⁾ 李斌元²⁾ 廖端芳^{1)**}

(¹⁾南华大学药物药理研究所, 衡阳 421001; ²⁾南华大学生物化学教研室, 衡阳 421001)

摘要 为了研制抗人血栓调节蛋白(hTM)的单克隆抗体(mAb), 给经 CHO 细胞免疫的 BALB/c 小鼠腹腔注射环磷酰胺诱导其对 CHO 和 CHO-TM5 细胞的共同抗原表位产生免疫耐受, 再用高效表达 hTM 的 CHO-TM5 常规免疫小鼠。细胞融合后, ELISA 筛选分泌抗 hTM 的特异性 mAb 阳性克隆, 并将其腹腔注射 BALB/c 小鼠诱生腹水。腹水中的 mAb 经亲和层析纯化后, 采用 ELISA、流式细胞术、免疫组织化学染色法及 Western blotting 对其进行特异性鉴定。结果显示, 共获得了 5 株阳性克隆, 其中 2F7 可稳定分泌 IgG1 亚型的 mAb, 腹水抗体效价为 1×10^6 , 含量为 19.56 g/L。2F7 在体内与正常组织的交叉反应极少, 对 HUVEC、CHO-TM5 有特异性结合, 并可识别细胞裂解液还原条件下分子质量为 105 ku 左右的蛋白质多肽。2F7 的解离常数 K_d 约为 1.22×10^{-9} mol/L。实验结果表明, 通过采用新的技术路线, 直接应用 hTM 表达细胞株免疫小鼠, 成功制备了具有高度特异性与高亲和力的抗 hTM mAb, 为其他来源困难的蛋白质 mAb 制备提供了可借鉴的技术方案, 同时 2F7 的研究鉴定为进一步应用抗 hTM mAb 进行 hTM 生物学功能及临床意义研究提供了新的物质基础。

关键词 免疫耐受, 环磷酰胺, 血栓调节蛋白, 单克隆抗体

学科分类号 R392.11, R967

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00517

血栓调节蛋白是 1981 年首次由 Esmon 和 Owen 确认, 并于 1982 年从兔肺中分离并命名的一种单链跨膜糖蛋白^[1], 是凝血酶最主要的表面受体之一^[2]。现有研究表明, 人血栓调节蛋白(human thrombomodulin, hTM)不但具有强大的抗凝功能^[3], 还有抗炎反应、抗血管内膜增生等重要作用^[4], 更是反映血管内皮细胞损伤的分子标记物^[5], 与冠心病等多种疾病发生、发展及预后密切相关^[6, 7], 对许多疾病的诊断和治疗均有重要意义。制备抗 hTM 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 旨在为研究 hTM 生物学功能和临床意义提供有用的手段。抗 hTM mAb 的制备与其他 mAb 制备相比, 由于纯度较高的 hTM 天然蛋白来源困难, 致使筛选的工作量较大, 杂交瘤细胞阳性率较低。尽管目前已有成功制备多个抗 hTM mAb 的报道^[8, 9], 但由于其价格昂贵, 严重制约了相关研究的深入开展, 并在一定程度上影响了临床相关疾病分子诊断的普及。环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是一种非特异性免疫抑制剂, 与抗原联用时能选择性杀伤针对

外来抗原迅速增殖的 B 细胞, 并诱导机体在一定时期内对该抗原产生特异性免疫耐受, 而不影响机体免疫系统对其他抗原的识别。国内外学者已将 CP 免疫删减法成功用于 mAb 的制备^[10~13]。因此, 利用我们自主构建的高效稳定表达 hTM 的 CHO-TM5 细胞株^[8], 应用 CP 免疫删减法免疫小鼠, 有效克服了制备 mAb 时依赖高纯度 hTM 的局限性。应用这一 hTM mAb 制备新方案, 成功地获得了 5 株阳性杂交瘤细胞株, 并且这一不依赖高纯度 hTM 的 mAb 制备方案可推广应用于其他低丰度蛋白的 mAb 制备。同时, 本研究鉴定 mAb 2F7 为开展此 mAb 的进一步临床应用研究提供了十分宝贵的材料基础。

* 国家自然科学基金资助项目(30770868)和湖南省重点学科建设项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281308, E-mail: dfliao@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-07-19, 接受日期: 2009-02-02

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640、HAT 和 HT 选择性培养基为法国 GIBCO-BRL 公司产品；小鼠 Ig 类及亚类测定试剂盒为 Sigma 公司产品；辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 为法国 Immunotech 公司产品；环磷酸胺(CP)为上海第三制药厂产品；其他试剂均为进口或国产分析纯；新生儿脐带由南华大学附属第一医院提供；BALB/c 小鼠购自中国科学院上海动物实验中心；小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0-AG14 和 CHO 细胞株由江苏省血液研究所惠赠；CHO-TM5 细胞株与阳性对照 mAb NH-1 均由南华大学药物药理研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组。将 8~10 周龄 BALB/c 雌性小鼠分为 5 组，每组 3 只：a. CP 50 mg/(kg·次)组；b. CP 100 mg/(kg·次)组；c. CP 150 mg/(kg·次)组；d. CP 对照组，即以 0.85% NaCl 替代 CP；e. 阴性对照组，不用任何抗原刺激，亦不应用 CP。

1.2.2 动物免疫。取对数生长期的 CHO 细胞以无菌 PBS 洗涤 3 遍，以无菌 PBS 悬浮，调整细胞密度至 $2 \times 10^{10}/L$ ，对 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠行腹腔注射 (1×10^7 /只)。而后根据分组情况分别于 10 min, 24 h, 48 h 给小鼠腹腔注射不同剂量的 CP 或 0.85% NaCl。2 周后重复此过程，诱导小鼠对 CHO 和 CHO-TM5 细胞的共同抗原表位产生免疫耐受。第 2 次 CHO 细胞免疫 10 天后，眼眶取血，将血清加入到固定有 CHO 细胞抗原的聚乙烯 ELISA 板，37℃ 温育 2 h 后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 继续 37℃ 温育 2 h，邻苯二胺显色液显色测定 490 nm 波长时的 A 值。通过此间接法 ELISA 测定血清中 CHO 抗体效价。根据测定结果选取抗体效价最低的一组小鼠，准备 CHO-TM5 细胞免疫。2 周后取生长状态良好的携带目的抗原 hTM 的 CHO-TM5 细胞腹腔注射小鼠， 5×10^6 /只，共免疫 3 次，每次免疫间隔时间为 2 周。第 2 次 CHO-TM5 细胞免疫 10 天后，再次眼眶取血(方法同前)测定血清中 CHO-TM5 抗体效价。选择抗体效价最高的小鼠，于细胞融合前 3 天，再次腹腔注射同样数量的 CHO-TM5 细胞，以加强免疫。3 天

后，断颈处死小鼠取其脾细胞作细胞融合用。

1.2.3 细胞融合、筛选及克隆化。细胞融合、克隆化、杂交瘤细胞冻存复苏均按常规方法进行。将免疫鼠脾细胞与 SP2/0 细胞悬液以 10:1 混合，按常规方法进行细胞融合，HAT 与 HT 培养基选择性培养。为了提高获得特异性 mAb 的几率，两次间接法 ELISA 对培养上清液进行检测筛选：先用包被有 CHO-TM5 细胞的聚乙烯 ELISA 板筛选出阳性克隆，再将筛选出的阳性克隆经包被有 CHO 细胞的聚乙烯 ELISA 板筛选出阴性克隆即 CHO-TM5⁺CHO⁻为所需阳性杂交瘤细胞。采用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行多次单克隆化，直至所有克隆分泌抗体阳性率达 100%。

1.2.4 腹水制备及抗体纯化。将杂交瘤细胞腹腔注射经降植烷预先敏化的 BALB/c 小鼠诱生腹水， 1×10^7 /只。按照 Pharmacia 公司提供的 mAb 纯化方案，FPLC 系统蛋白质 G Sepharose-4B 柱亲和层析纯化腹水中的 mAb。

1.2.5 抗体 Ig 类别、亚类及效价与含量测定。按 Sigma 公司小鼠 Ig 类及亚类测定试剂盒说明操作，通过琼脂糖免疫双扩散法检测阳性杂交瘤细胞的培养上清液及腹水中 mAb 的 Ig 亚类。间接法 ELISA 检测纯化腹水中 mAb 效价。利用 M750-B 紫外分光光度计测定纯化腹水中抗体蛋白的含量，计算公式为蛋白质含量(g/L) = $A_{280} \times 1.55 - A_{260} \times 0.76$ 。

1.2.6 杂交瘤细胞株染色体的检测。将杂交瘤细胞培养至对数期后采用秋水仙素阻断法检测染色体数目，验证杂交瘤细胞是否是 SP2/0 与小鼠脾细胞融合而成。选择染色体分散好、无重叠、无失散的细胞进行计数分析。

1.2.7 抗体特异性检测。间接法 ELISA 及流式细胞术检测 mAb 与 CHO-TM5 以及原代培养的人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的特异性结合反应。间接法 ELISA 操作同前。流式细胞术先用 PBS 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/ml$ ，加入 mAb 于 4℃ 孵育 30 min，再与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗于 4℃ 孵育 30 min 后，用 0.5 ml PBS 悬浮沉淀细胞，用流式细胞仪检测阳性细胞百分率与平均荧光强度。免疫组织化学 ABC 法鉴定 mAb 的组织特异性。取多种健康组织石蜡切片，按 ABC 药盒中的说明书进行操作，显色后再用苏木素染色液衬染，镜检。同时收集对数生长期的 CHO、CHO-TM5 与 HUVEC 细胞裂解液，进行 10% SDS-PAGE 后，按常规方法

转至硝酸纤维膜后用 5% BSA-PBS 封闭 2 h, 洗后依次与 mAb、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温反应各 2 h, 氯萘酚显色的 Western blotting 鉴定 mAb 识别细胞膜表面抗原 hTM 的特异性。

1.2.8 解离常数测定. 将经过 FPLC 系统纯化后的 mAb, 10 倍梯度稀释后, 用包被有原代培养的 HUVEC 细胞抗原聚乙烯 ELISA 板进行间接法 ELISA, 方法同前. 吸光度降低为最大值 50% 时的 mAb 浓度即为解离常数 K_d , 用 mol/L 表示。

2 结 果

2.1 不同剂量 CP 诱导小鼠对 CHO 细胞产生免疫耐受的影响

第 2 次腹腔注射 BALB/c 小鼠 CHO 细胞 10 天后, 眼眶取血, 间接法 ELISA 测定各小鼠血清抗体效价, 检测抗体对 CHO 细胞的反应性(图 1). CP 150 mg/(kg·次)剂量组 3 只小鼠全部死亡, CP 50 mg/(kg·次)剂量组尽管产生了抗 CHO 抗体, 但效价较低, 不完全诱导小鼠的特异性免疫耐受, 而 CP 100 mg/(kg·次)剂量组血清抗体效价更低, 与未免疫小鼠阴性对照组接近, 说明该剂量能较好降低免疫系统对 CHO 细胞的反应性, 有效完全诱导小鼠对 CHO 细胞与 CHO-TM5 细胞共同抗原表位产生免疫耐受的作用. 于是我们选择 CP 100 mg/(kg·次)剂量组的小鼠准备后续 CHO-TM5 细胞免疫, 增强小鼠对 CHO-TM5 细胞表面抗原 hTM 的免疫应答来研制 hTM mAb。

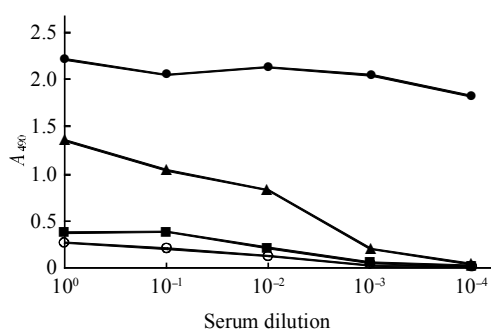


Fig. 1 Effect of different doses of CP on immune tolerance induction

●—●: Corresponding to CP control; ▲—▲: Corresponding to 50 mg/kg; ■—■: Corresponding to 100 mg/kg; ○—○: Corresponding to negative control.

2.2 杂交瘤细胞系的建立

取 CHO-TM5 细胞抗体效价最高(血清抗体效价为 5×10^{-5})的免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合, 细胞融合 5~7 天后观察, 所有培养孔均有杂交瘤细胞生长, 融合率为 100%. 两次间接法 ELISA 筛选出 CHO-TM5⁺ CHO⁻阳性杂交瘤细胞. 及时采用有限稀释法克隆化培养阳性杂交瘤细胞, 进行 3 次亚克隆后, 最后得到 5 株阳性杂交瘤细胞株, 分别命名为 1B1、2F7、3F6、3A2 和 3A6. 为了使 hTM mAb 能得到较好的临床应用, 需要对其进行一般性质的检测与特异性的鉴定, 于是我们随机挑选杂交瘤细胞株 2F7 进行进一步的研究, 2F7 体外连续培养 6 个月仍持续分泌抗体。

2.3 mAb 一般性质的检测

将 2F7 杂交瘤细胞扩大培养后对 BALB/c 小鼠进行腹腔注射, 诱导产生抗 hTM mAb 的腹水, 5~10 天后抽取腹水, 腹水产量为 4~6 ml/只. 腹水经蛋白质 G Sepharose-4B 柱亲和层析纯化后进行了一般性质的检测, 腹水中抗体蛋白的含量为 19.56 g/L, mAb 的重链为小鼠 IgG1 型, mAb 效价可达 1×10^{-6} . 秋水仙素阻断法检测杂交瘤细胞株 2F7 染色体数目均值为 98.

2.4 mAb 特异性鉴定

间接法 ELISA 检测结果发现, 0.2 mg/L 的 mAb 2F7 与稳定高表达 hTM 的 CHO-TM5 细胞以及原代培养的 HUVEC 呈强阳性反应, 而与 CHO 细胞不反应. 流式细胞术也同样检测到 mAb 2F7 ($1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 细胞)与 CHO-TM5 及 HUVEC 呈特异性结合, 其细胞结合率分别为 88.92% 与 92.13%, 对照 mAb NH-1 为 81.90% 和 88.50%, 而与 CHO 呈阴性反应(图 2), 2F7 具有良好的细胞特异性. ABC 免疫组织化学法检测人健康组织切片标本结果显示, 1 mg/L 的 mAb 2F7 除与输卵管平滑肌细胞有轻微交叉反应外, 与胸腺、肝脏、甲状腺、前列腺、膀胱、脾、肺及小肠等其他组织呈阴性反应, 但与各组织血管内皮细胞均呈明显阳性反应(图 3), 2F7 具有较好的组织特异性. Western blotting 检测同样显示, 0.2 mg/L 的 mAb 2F7 可特异地识别 CHO-TM5 及 HUVEC 细胞裂解液还原条件下分子质量约为 105 ku 左右的蛋白质多肽, 与 hTM 基因编码的蛋白质还原条件下的理论预期值相符(图 4).

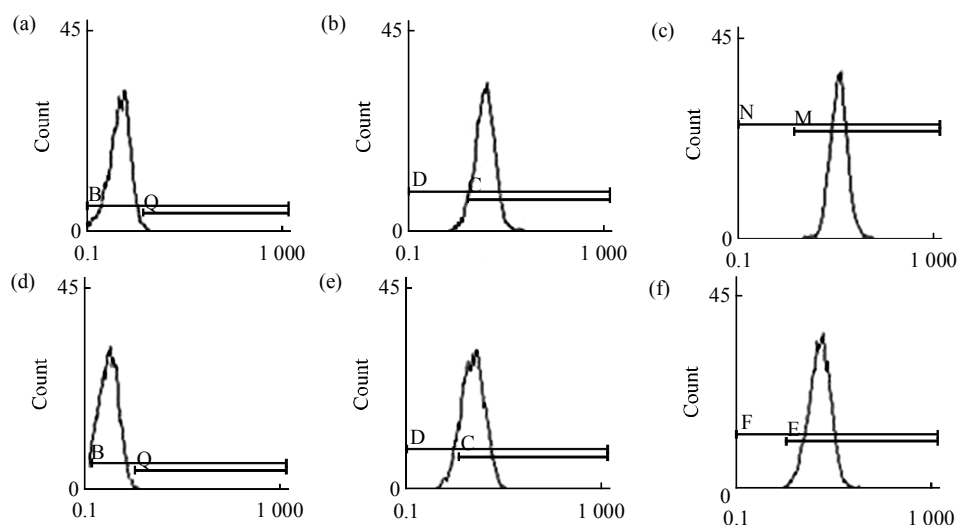


Fig. 2 Detection of hTM expression on cell membranes by flow cytometry with 2F7

(a), (b) and (c) Cells treated with mAb 2F7. (d), (e) and (f) Cells treated with mAb NH-1 as a positive control. (a) and (d) CHO cells, (b) and (e) CHO-TM5 cells, (c) and (f) HUVECs.

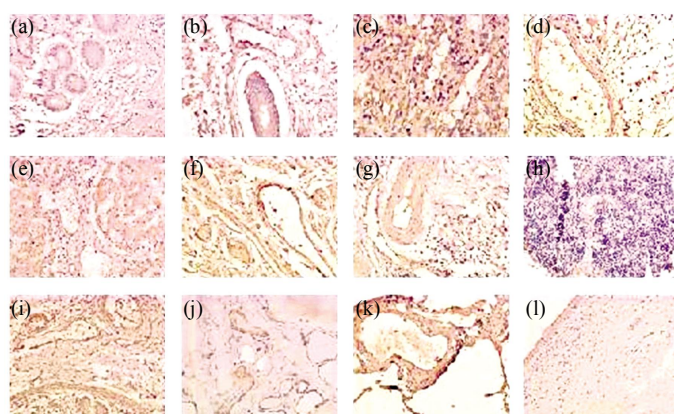


Fig. 3 Detection of hTM expression in human normal tissues by immunohistochemical ABC staining with 2F7

(a) Small intestine. (b) Uterus. (c) Spleen. (d) Ovary. (e) Liver. (f) Oviduct. (g) Cholecyst. (h) Thymus. (i) Stomach. (j) Thyroid gland. (k) Lung. (l) Bladder. Oviduct was stained weakly, and the other tissues was not stained. The original magnification was 100 $\times$.

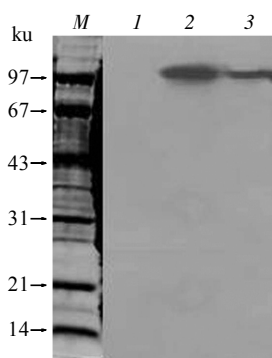


Fig. 4 Western-blotting analysis of mAb 2F7

M: Protein marker; 1: CHO; 2: CHO-TM5; 3: HUVEC.

2.5 mAb 亲和力鉴定

含量为 19.56 g/L 的 mAb 10 倍梯度稀释以后间接法 ELISA 检测结果显示, 吸光度降低为最大值 50% 时 mAb 2F7 的稀释度为 1 : 100 000 (图 5), 因此解离常数 $K_d \approx 1.22 \times 10^{-9}$ mol/L.

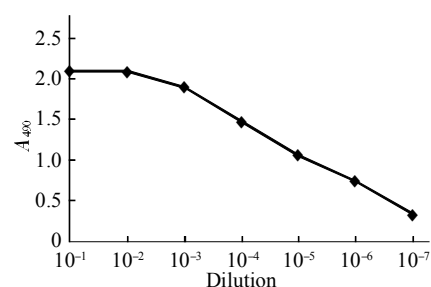


Fig. 5 Dissociation constant of mAb 2F7

3 讨 论

目前制备 mAb 的传统方法是用纯度较高的天然蛋白质作为特异性抗原, 加佐剂后免疫动物. 此方法虽然成功率很高, 然而对于一些组织或细胞, 因成分复杂导致提纯方法繁琐或提纯困难, 在某些情况下甚至是不可能的. 而直接应用组织或细胞进行免疫, 能减低或干扰特异性抗原诱导的免疫应答, 即获得的抗体大多是针对强免疫原性抗原的抗体. 因此, 以高效表达 hTM 的 CHO-TM5 细胞株直接作为免疫原制备 hTM mAb, 筛选的工作量很大^[8]. 另外, 其中的混杂物刺激机体产生的抗体也会干扰对特异性抗体的检测. 而若采用抽提 CHO-TM5 细胞膜表面 hTM 分子的方法, 则易改变其抗原的分子结构和免疫原性, 通常也很难成功. 也有利用原核表达纯化目的蛋白作为抗原以免疫动物来获得蛋白质抗体, 但由于原核表达系统不能进行转录后的加工过程, 常使真核蛋白缺乏表达后的必要修饰, 因此其表达产物作为免疫原而制备的 mAb 就有可能不识别天然蛋白, 所获 mAb 临床应用因此受限.

CP 免疫删减法可制备出能区别两种相近组织成分的 mAb, 从而为一些特殊组织抗原和细胞抗原的分析提供了新的手段. CP 免疫删减法在 mAb 技术中的应用, 为免疫工作者提供了一种新的途径, 即可用未经纯化的抗原进行免疫, 有利于保持抗原的免疫原性, 也可以增强稀有抗原及弱免疫原性抗原的免疫应答, 有利于获得预期的抗体, 减少了筛选的工作量等. 当然值得注意的是, CP 免疫删减法的作用效果难以控制. 有时因其不能完全抑制抗非目的抗原抗体的产生, 而药物本身的毒性作用往往可引起小鼠免疫系统的全面抑制, 使小鼠因感染等原因而死亡, 导致免疫的失败. 本实验中 CP 50 mg/(kg·次)剂量组剂量太小, 诱导特异性免疫耐受效果不理想, CP 150 mg/(kg·次)剂量组则剂量太大, 小鼠死亡, 而 CP 100 mg/(kg·次)剂量组具有较好地降低免疫系统针对 CHO 细胞的反应性, 能有效诱导小鼠对 CHO 细胞与 CHO-TM5 细胞共同抗原表位产生免疫耐受的作用. 因此我们选择 CP 100 mg/(kg·次)剂量组准备后续 CHO-TM5 细胞免疫, 增强小鼠对 CHO-TM5 细胞表面抗原 hTM 的免疫应答来研制 hTM mAb.

为了减少筛选的工作量, 提高抗原免疫产生特定抗体的阳性率, 本研究以 CHO 细胞为耐受原免

疫小鼠, 尔后在 10 min, 24 h, 48 h 分别联合应用 CP 100 mg/kg, 经过 2 周后重复注射 CHO 细胞与 CP 延长免疫耐受状态时间, 提高了本实验方案的成功率. 再经过 2 周的间隔时间后, 以稳定高效表达 hTM 的 CHO-TM5 细胞按常规方法免疫小鼠, 诱发免疫系统针对目的抗原分子 hTM 的免疫应答. 为减少假阳性克隆的干扰, 提高获得特异性 mAb 的几率, 我们先以 CHO-TM5 包板大面积筛选, 保存所有阳性孔, 再采用 CHO 细胞进行阴性对照筛选, 即通过两次间接法 ELISA 筛选 CHO-TM5⁺ CHO⁻ 阳性克隆. ELISA 结果发现所有 CHO-TM5 阳性克隆均是 CHO 细胞的阴性克隆. 我们共获得 5 株阳性杂交瘤细胞株, 其中随机挑选的 2F7 稳定性较好, 体外培养 6 个月仍能持续稳定分泌 mAb. 随后我们对 mAb 2F7 进行了一般性质的检测及特异性的鉴定, 为其进一步临床应用研究提供了十分宝贵的材料基础. mAb 2F7 除能准确识别 HUVEC 与 CHO-TM5 表达的 hTM 外, 主要只与活检组织中人的血管内皮细胞起反应, 不与胸腺、脾、胃及肠等其他正常组织有明显反应. 而国外现有的某些商业化单抗如 Santa Cruz 公司的 TM(D3)sc-13164 与扁桃体呈阳性反应, AbD Serotec 公司的 MCA641T 与淋巴结有交叉反应, Sigma-Aldrich 公司 HPA002982 与胃等多种组织均有不同程度的交叉反应等等. 与这些抗体比较, mAb 2F7 对 hTM 抗原特异性较好. 且 2F7 的解离常数 K_d 约为 1.22×10^{-9} mol/L, 其亲和力高于 Daiichi Fine Chemical Industries (Toyama, Japan) TM mAb 21-5D2, 21-4G3 和 21-9H12^[9]. 因此具有良好特异性与较高亲和力的 mAb 2F7, 可以用于 ELISA、流式细胞术、免疫组织化学染色法及 Western blotting 检测等, 交叉反应少, 无明显反应背景. 我们希望通过后续的进一步实验能证实 hTM 特异性单抗 mAb 2F7 在其他某些性能上优于国外现有的 hTM mAb, 那本研究将具有一定的经济价值.

本实验有效地验证了免疫删减法制备 mAb 的技术方案, 对其他来源困难的蛋白质相应 mAb 的制备, 具有借鉴作用. 我们成功制备高特异性的 hTM mAb 的关键, 在于应用了本文所描述的新的技术组合. 对 hTM mAb 而言, 该技术组合的最优方案为: a. CHO 细胞数 1×10^7 次; b. CP 剂量 100 mg/(kg·次); c. CP 给药时间是给予 CHO 细胞耐受原后 10 min, 24 h, 48 h; e. 间隔 2 周重复 CHO 细胞免疫刺激和 CP 诱导免疫耐受过程;

f. 加强诱导免疫耐受后 2 周再进行常规的 CHO-TM5 细胞免疫。需要指出的是, 不同种类蛋白质的抗原性有所差别。本文所讨论的技术组合在应用于其他来源困难的蛋白质 mAb 制备时, 有时可能需要对上述步骤做一定的改变, 其中影响实验结果的最重要因素是 CP 的剂量与给药时间。CP 剂量太低, 不诱导耐受或诱导不完全耐受, 而 CP 剂量太大时, 小鼠的死亡率明显增加。给予 CP 诱导免疫耐受的最佳时间是在腹腔注射细胞抗原免疫条件下, 小鼠免疫应答细胞被充分激活所需的 48 h 左右。而在诱导小鼠产生耐受的过程中, 最为关键的是, 给予耐受原免疫刺激和 CP 诱导免疫耐受的次数及间隔时间, 即抑制非特异性表达细胞与增强特异性表达细胞免疫功能的次数与间隔时间, 可以明显延长维持免疫耐受时间, 提高免疫删减法的成功率。

本研究既避免了提取和纯化天然蛋白 hTM 的困难, 又保持了抗原的免疫原性, 同时也增强了 hTM 抗原的免疫应答, 减少了筛选的工作量, 获得了预期的具有高度细胞特异性与组织特异性及高亲和力的抗 hTM mAb。这一自主研发的新 mAb 2F7 具有较好的应用前景, 它可用于深入研究 hTM 的结构和生物学功能, 也可作为检测的手段, 来研究内皮细胞 TM 的表达和各种因素对内皮细胞功能的影响及其作用机制, 为在我国更大范围内探讨人体内血栓调节蛋白(TM)含量变化与某些疾病发生的关系提供了物质基础。

参 考 文 献

- 1 Esmon C T, Owen W G. Identification of an endothelial cell cofactor for the thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(4): 2249~2252
- 2 Rezaie A R, Yang L K. Mutagenesis studies toward understanding the mechanism of the cofactor function of thrombomodulin. *Biophys Chem*, 2005, **117**(3): 255~261
- 3 Shi J, Wang J, Zheng H, *et al.* Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2003, **14**(6): 575~585
- 4 Van de Wouwer M, Collen D, Conway E M. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**(8): 1374~1383
- 5 Nadar S K, Al Yemeni E, Blann A D, *et al.* Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension. *Thromb Res*, 2004, **113**(2): 123~128
- 6 Wu K K. Soluble thrombomodulin and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*, 2003, **14**(4): 373~375
- 7 Schumacher A, Seljeflot I, Sommervoll L, *et al.* Increased levels of endothelial haemostatic markers in patients with coronary heart disease. *Thromb Res*, 2002, **105**(1): 25~31
- 8 郭紫芬, 何淑雅, 朱炳阳, 等. 抗人血栓调节蛋白单克隆抗体的制备与鉴定. *生理学报*, 2006, **58**(4): 391~396
- 9 Guo Z F, He S Y, Zhu B Y, *et al.* *Acta Physiol Sin*, 2006, **58**(4): 391~396
- 9 Nara H, Okamoto H, Minota S, *et al.* Mouse monoclonal anti-human thrombomodulin antibodies bind to and activate endothelial cells through NF-kappaB activation *in vitro*. *Arthritis Rheum*, 2006, **54**(5): 1629~1637
- 10 Salata R A, Malhotra I J, Hampson R K, *et al.* Application of an immune-tolerizing procedure to generate monoclonal antibodies specific to an alternate protein isoform of bovine growth hormone. *Anal Biochem*, 1992, **207**(1): 142~149
- 11 Sleister H M, Rao A G. Subtractive immunization: A tool for the generation of discriminatory antibodies to proteins of similar sequence. *J Immunol Methods*, 2002, **261**: 213~220
- 12 Sakakibara K, Sato K, Iwasaki T, *et al.* Generation of an antibody specific to *Xenopus* fertilized eggs by subtractive immunization. *Genes Cells*, 2005, **10**(4): 345~356
- 13 Zijlstra A, Testa J E, Quigley J P. Targeting the proteome/epitome, implementation of subtractive immunization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303**(3): 733~744

Preparation of Anti-hTM Monoclonal Antibody by Using hTM Expression Cell Line*

GUO Zi-Fen¹⁾, HE Shu-Ya²⁾, ZHU Bing-Yang¹⁾, LI Bin-Yuan²⁾, LIAO Duan-Fang^{1)**}

¹⁾ Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Department of Biochemistry, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract To produce monoclonal antibody (mAb) specifically against human thrombomodulin (hTM), an immune-tolerizing procedure was employed to generate monoclonal antibodies specific to hTM. Female BALB/c mice were first immunized with CHO cells following at 10 min, 24 h, 48 h by intraperitoneal injection of different doses of cyclophosphamide (CP) 2 times at an interval of 2 weeks, thereby tolerizing the mice to common epitopes shared between CHO and CHO-TM5 cells. Subsequently the selected mice with the lowest titer of serum polyclonal antibody by cellular enzyme-linked immunoabsorbent assay (CELISA) were immunized with CHO-TM5 cells, which have stable high level expression of hTM, to produce antibodies specific to hTM 3 times at an interval of 2 weeks. On the third day after the third immunization, mouse with the highest titer of serum polyclonal antibody was sacrificed and spleen cells were harvested to prepare hybridoma cells with SP2/0 cells at the ratio of 10 to 1. Hybridoma cells were then cultured at 96 well plates for screening with CELISA. To improve probability to obtain specific mAb, CELISA was applied twice. The first CELISA was done with polyethylene ELISA plate with a monolayer of CHO-TM5 cells. The positive clones from the first screen were then selected by reacting with similar screening ELISA plate but having CHO cells monolayer instead. Only clones that were positive for the first screening and negative for the second screening were kept, and called as CHO-TM5⁺CHO⁻ hybridoma cells. BALB/c mice were intraperitoneally injected with the selected hybridoma cells. Ascites were collected and monoclonal antibodies were purified using FPLC, and its Ig class, subclass, and titer were then determined respectively. The specificity of the yielded mAb was identified with CELISA, flow cytometry, ABC immunohistochemistry and immunoblotting. Detection of CELISA showed that 100 mg/kg dose of CP could tolerize the mouse to common epitopes shared between CHO and CHO-TM5 cells. And CELISA also discovered that all hybridomas positive for CHO-TM5 cells were negative for CHO cells. Five lines of positive hybridoma cells had been obtained altogether and 2F7 was selected randomly for next investigation. The Ig subclass of the mAb 2F7 was IgG1 and the titer of ascitic mAb was 1×10^{-6} . Furthermore, the content of ascitic mAb was 19.56 g/L and chromosome numbers is 98. Flow cytometry, CELISA and Western blotting assays demonstrated that mAb 2F7 could specifically recognize hTM expressed on CHO-TM5 and human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC). Meanwhile, the tissue specificity of mAb 2F7 was also identified by immunohistochemical ABC staining. On the other hand, Western blotting assays indicated that mAb 2F7 could recognize the antigen protein with 105 ku molecular mass under reduction condition. Moreover, the dissociation constant of mAb 2F7, 1.22×10^{-9} mol/L, indicated the affinity higher than some others. The results suggest that the immunotolerizing protocol provides a convenient general method for producing antibodies specific to desired protein isoforms. mAb 2F7 can specifically recognize the natural hTM expressed mainly on vascular endothelial cells, which will potentially useful for investigating the functions and clinic values of hTM.

Key words immune tolerance, cyclophosphamide, thrombomodulin, monoclonal antibodies

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00517

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30770868) and The Construct Program of the Key Discipline in Hunan Province.

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281308, E-mail: dfliao66@yahoo.com.cn

Received: July 19, 2008 Accepted: February 2, 2009