

• 医学与免疫生物技术 •

人源抗 ICAM-1 单链抗体的制备及其生物学活性鉴定

陈云雨^{1,2}, 孙红^{2,3}, 刘刚¹, 胡华波¹, 张国利², 刘晓平¹, 岳玉环²

1 皖南医学院 药学院 新药筛选与评价中心, 安徽 芜湖 241002

2 军事医学研究院 军事兽医研究所, 吉林 长春 130122

3 黑龙江生物科技职业学院 生物制药系, 黑龙江 哈尔滨 150025

陈云雨, 孙红, 刘刚, 等. 人源抗 ICAM-1 单链抗体的制备及其生物学活性鉴定. 生物工程学报, 2018, 34(12): 2016–2024.
Chen YY, Sun H, Liu G, et al. Preparation and identification of anti-human ICAM-1 scFv. Chin J Biotech, 2018, 34(12): 2016–2024.

摘要: 利用噬菌体展示技术筛选特异性人源抗 ICAM-1 单链抗体 (Anti-human ICAM-1 scFv) 并进行生物学活性鉴定。应用 Tomlinson I+J 噬菌体抗体库, 以 P1 抗原肽为包被抗原, 经过 4 轮“吸附-洗脱-扩增”进行亲和富集筛选。以 PCR 反应、ELISA 抗原交叉反应和 Dot blotting 实验进行阳性克隆的鉴定。scFv 经原核表达和分离纯化后, 以 Western blotting 实验、竞争 ELISA 实验和细胞黏附抑制实验对其生物学活性进行初步鉴定。Tomlinson I+J 噬菌体抗体库经 4 轮亲和富集筛选, 利用 ELISA 方法成功筛出 4 株阳性克隆。通过 PCR 鉴定反应、ELISA 抗原交叉反应和 Dot blotting 实验, 最终获得了 1 株既能与 P1 抗原肽特异结合又能与人 ICAM-1 抗原特异结合的阳性克隆 J-A1。对 scFv 进行原核表达和亲和层析后获得了高纯度的目的蛋白。竞争 ELISA 实验和细胞黏附抑制实验证实纯化的 scFv 具有良好的亲和活性和抗细胞黏附活性。文中成功利用噬菌体展示技术筛选到特异性人源抗 ICAM-1 scFv, 为进一步探索该抗体在炎症相关性疾病治疗中的应用奠定了基础。

关键词: 噬菌体展示技术, 细胞间黏附分子, ICAM-1, 单链抗体, 人源化抗体

Received: March 12, 2018; **Accepted:** May 2, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81703546, 81272485), Anhui Provincial Natural Science Foundation (No. 1808085QH265), Jilin Province Science and Technology Development Program (No. 20160520045JH), The Doctoral Starting-up Fund of Wannan Medical College (No. RCQD201617), National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0501002).

Corresponding authors: Yuhuan Yue. Tel: +86-431-86985962; E-mail: yhyue2013@163.com

Xiaoping Liu. Tel: +86-553-3932601; E-mail: liuxiaoping@wnmc.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81703546, 81272485), 安徽省自然科学基金 (No. 1808085QH265), 吉林省科技发展计划 (No. 20160520045JH), 皖南医学院博士科研启动基金 (No. RCQD201617), 国家重点研发计划“宠物病毒性传染病血液生物制品研究与产品创制” (No. 2016YFD0501002) 资助。

网络出版时间: 2018-06-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180516.1027.003.html>

Preparation and identification of anti-human ICAM-1 scFv

Yunyu Chen^{1,2}, Hong Sun^{2,3}, Gang Liu¹, Huabo Hu¹, Guoli Zhang², Xiaoping Liu¹, and Yuhuan Yue²

¹ Center for New Drug Screening & Evaluation, School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

² Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, Jilin, China

³ Department of Biomedicine, Heilongjiang Vocational College of Biology Science and Technology, Harbin 150025, Heilongjiang, China

Abstract: To screen the specific anti-human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) single chain fragment variable (scFv) using phage display library technology and to identify its biological activity. P1 peptide was used as antigen, and the phage antibodies against human ICAM-1 antigen were panned by four binding-eluting-amplifying cycles using Tomlinson I+J phage display library. After four rounds of selective enrichment screening, the positive clones were determined by PCR, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)-based antigenic cross reaction and Dot blotting. Then the binding specificity and biological activity of purified scFv were identified by Western blotting, competitive ELISA and cell adhesion inhibition assay respectively. Furthermore, four positive clones were first panned through P1 peptide coated-ELISA assay, and then J-A1 was obtained and identified by PCR, ELISA-based antigenic cross reaction and Dot blotting, which could show a specific binding between P1 peptide and human ICAM-1 protein antigen. Subsequently, the purified scFv showed a satisfactory specificity and anti-adhesive activity in competitive ELISA and the cell adhesion inhibition assay. The specific anti-human ICAM-1 scFv was prepared successfully from Tomlinson I+J phage display library, which pave the way for further application of anti-human ICAM-1 scFv for inflammation diseases therapeutics.

Keywords: phage display technology, intercellular adhesion molecule, ICAM-1, scFv, humanized antibody

细胞间黏附分子-1 (Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 广泛表达于多种细胞表面, 属于免疫球蛋白超家族成员, 是由膜外区、跨膜区和胞浆区组成的跨膜糖蛋白。在细胞生理状态时, ICAM-1 处于低水平表达; 当细胞受到致炎因子刺激后, ICAM-1 表达量明显增加。通过与淋巴细胞功能性相关抗原 (Lymphocyte functional antigen-1, LFA-1) 结合, 介导粒细胞、淋巴细胞与血管内皮细胞的黏附, 促进白细胞游走和趋化于炎症病灶, 加重病理损伤, 在炎症性疾病的发生与发展中发挥重要作用, 已经成为炎症相关性疾病治疗的新靶标^[1-4]。利用重组抗体封闭 ICAM-1 生物学功能, 减轻并改善病理性炎症损伤已经成为抗炎治疗的重要策略。目前, 应用抗 ICAM-1 单克隆抗体疗法对移植排斥反应、自身免疫性疾病、多发性骨髓瘤、糖尿病肾病、溃疡性结肠炎等多种疾病的治疗已经取得了较好的疗效^[5-7]。

与传统的嵌合抗体相比, 单链抗体 (Single chain fragment variable, scFv) 不仅保持亲本抗体的特异性、载体性和靶向性特点, 还具有分子量小、免疫原性低、组织穿透力强和易于改造等诸多优点, 已经成为重组抗体领域的研究热点^[8-9]。郝文波等利用抗 ICAM-1 单克隆抗体对噬菌体十二肽库进行筛选, 证实保守序列 P1 短肽 (KLYLIAEGSVAA) 同样具有天然 ICAM-1 的生物学功能^[10]。本研究将 P1 短肽作为抗原, 利用 Tomlinson I+J 噬菌体抗体库, 经 4 轮“吸附-洗脱-扩增”亲和富集筛选人源抗 ICAM-1 scFv, 经分离纯化后, 对其生物学活性进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠抗 ICAM-1 单克隆抗体 (Monoclonal antibody, McAb) 2C5 由本实验室制备; P1 抗原肽 (KLYLIAEGSVAA) 由上海强耀生物科技有限

公司合成; Tomlinson I+J 噬菌体抗体库、辅助噬菌体 KM13、*Escherichia coli* TG1 和 *E. coli* HB2151 由中国科学院过程工程研究所刘瑞田教授惠赠; c-Myc(9E10)-HRP 购自 Santa Cruz 公司; 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、胰酶、四甲基联苯胺溶液 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 和二氨基联苯胺溶液 (3,3'-Diaminobenzidine, DAB) 购自 Sigma-Aldrich; 2×Easy Taq[®]酶、DNA 标准分子量购自 TransGen 公司; 二辛可宁酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo 公司; HisTrap 亲和层析柱购自 GE 公司; 人 ICAM-1 抗原购自 R/D 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 抗 ICAM-1 scFv 的亲亲和富集筛选

将 P1 抗原肽 (1 μg/孔) 包被 96 孔酶标板, 使用 Tomlinson I+J 噬菌体抗体库 (I 库库容 1.47×10^8 ; J 库库容 1.35×10^8 ; scFv 产物含有 c-Myc 和 His 标签), 在 96 孔酶标板中实施 4 轮“吸附-洗脱-扩增”亲和富集筛选过程。进行第 1 轮筛选时, 以含 0.1% Tween-20 的磷酸盐 (Phosphate buffered solution, PBS) 缓冲液 (PBST) 洗板 10 次, 第 2 轮及其以后的筛选中分别洗板 20 次, 充分洗去非特异性吸附的噬菌体。洗涤后以胰酶室温消化 30 min, 洗脱噬菌体。经过“吸附-洗脱-扩增”过程将每轮筛选所收集的噬菌体置于下一轮筛选条件中, 从而使阳性噬菌体得到富集并计算每轮筛选的富集倍数。

1.2.2 阳性克隆的 ELISA 检测

将第 4 轮亲和富集筛选的阳性噬菌体感染 *E. coli* HB2151 后, 从所涂布的 TYE 平板上随机挑取单克隆菌落接种到 96 孔细胞培养板 (含 100 μg/mL Amp 和 1% 葡萄糖的 2×TY 培养基) 培养过夜。次日从该板上转接 2 μL 菌液至第二块 96 孔细胞培养板 (含 100 μg/mL Amp 和 0.1% 葡

萄糖的 2×TY 培养基), 37 °C 培养至 OD_{600} 约为 0.9 时加入 1 mmol/L IPTG 诱导, 30 °C 培养过夜。次日离心取上清进行阳性克隆菌株的 ELISA 检测。

在 ELISA 检测中, 以 P1 抗原肽 (1 μg/孔) 包被 96 孔酶标板, 以包被 1 μg 牛血清白蛋白 (Bull serum albumin, BSA) 作为阴性对照。酶标板经 2% 脱脂奶粉 (Skim milk) 封闭后, 每孔加入 50 μL 诱导上清, 室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次后, 每孔加入 1:500 稀释的 c-Myc(9E10)-HRP 抗体, 室温孵育 1 h。再以 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 TMB 底物溶液避光显色, 然后加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 OD_{450} 值。每份样品做双孔测定, 取 OD 平均值。阳性克隆菌株确定标准: OD 值为阴性对照值 3 倍以上。

1.2.3 PCR 鉴定阳性克隆

按照 pIT-2 载体基因序列, 合成两条引物扩增 scFv 基因片段。P1: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; P2: 5'-CTATGCGGCCCCATTCA-3'。

PCR 反应体系如下: 引物 P1 (10 μmol/L) 和 P2 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 阳性克隆菌液 1 μL, 2×Easy Taq[®] 10 μL, 再用无菌蒸馏水补足体积至 20 μL。

PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s、54 °C 30 s、72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应结束后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.2.4 阳性克隆的 ELISA 抗原交叉反应实验

分别以 P1 抗原肽 (1 μg/孔)、3% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 2% 脱脂奶粉 (Milk) 包被 96 孔酶标板, 4 °C 过夜。次日, 每孔分别加入 PCR 鉴定含有完整 scFv 基因片段的阳性克隆诱导的上清进行 ELISA 抗原交叉反应实验, 实验步骤如 1.2.2 所述。

1.2.5 Dot blotting 实验鉴定阳性克隆

将硝酸纤维素膜置于平皿中, 以 1 μL 人 ICAM-1 抗原 (1.0 mg/mL) 在硝酸纤维素膜中央

点样。经 2% 脱脂奶粉封闭后, 加入 500 μL 经抗原交叉反应实验鉴定的阳性克隆诱导的上清, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为阴性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次后, 每孔加入 1 : 500 稀释的 c-Myc(9E10)-HRP 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。再以 PBST 洗涤 3 次, 以 DAB 溶液显色。

1.2.6 抗 ICAM-1 scFv 的分离纯化与 Western blotting 鉴定

将 J-A1 工程菌接种于 500 mL 2 \times TY 培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp+0.1% 葡萄糖) 中进行 scFv 的诱导表达 (1.0 mmol/L IPTG, 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 16 h)。离心收集上清, 以 40% 饱和硫酸铵沉淀目的蛋白, 用 20 mL 平衡液 (25 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.5) 稀释后, 制备粗提液。将 HisTrap 亲和层析柱以平衡液进行平衡后。以 0.5 mL/min 上样, 再以平衡液洗脱流穿峰至基线。最后以洗脱液 (25 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, pH 7.5) 进行梯度洗脱并收集目的蛋白峰。纯化的目的蛋白以 10% SDS-PAGE 进行分析, 将其透析过夜后, 以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行定量。

将含人 ICAM-1 抗原的 SDS-PAGE 胶进行转膜, 进行 Western blotting 检测。一抗为 1 : 200 稀释的纯化 scFv, 二抗为 1 : 500 稀释的 c-Myc(9E10)-HRP 抗体, 用增强型 HRP (Horseradish peroxidase) 底物化学发光液显影成像。

1.2.7 抗 ICAM-1 scFv 的生物学活性鉴定

1) 竞争 ELISA 实验

将 P1 抗原肽 (1 $\mu\text{g}/\text{孔}$) 包被 96 孔酶标板, 以牛血清白蛋白 (BSA) 封闭酶标板。将 0.1 mg/mL McAb 2C5 与倍比稀释的 scFv 混合后, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 依次加入酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 洗板 3 次后, 加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。以 TMB 底物溶液避光显色, 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 酶标仪检测 OD_{450} 值。

2) 人血管内皮细胞-单核细胞黏附抑制实验^[11-12]

将以 LPS 刺激后的人血管内皮细胞 ECV304 用 Hank's 液洗涤 2 次后, 前两组加入抗 ICAM-1 scFv (2 μg 、5 μg), 后两组加入 McAb (2 μg 、5 μg), 每组设置 8 孔, 以加入 PBS 孔作为对照组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 60 min。每孔加入单核细胞悬液 100 μL (约 $1\times 10^5/\text{孔}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 用预温培养基轻轻洗去未黏附单核细胞。充分洗涤后, 每孔加入 100 μL 0.25% Rose Bengal 溶液, 室温静止 5 min。弃除染料后, 以 PBS 洗涤 2 次, 每孔再加入 PBS-乙醇 (V/V=1 : 1) 200 μL , 室温静置 30 min, 酶标仪检测 OD_{570} 值。

黏附率(%)=(ECV304 细胞黏附单核细胞 OD 值-ECV304 细胞 OD 值)/总单核细胞 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.2.8 统计学分析

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组均数比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 时为差异显著。

2 结果与分析

2.1 抗 ICAM-1 scFv 的亲富集筛选

Tomlinson I+J 噬菌体抗体库经 4 轮“吸附-洗脱-扩增”亲和富集筛选后, 噬菌体抗体收获率由第 1 轮的 2.00×10^{-8} 增加到第 4 轮的 4.00×10^{-5} , 富集倍数增加 2 000 倍左右 (表 1)。亲和富集筛选过程中噬菌体抗体收获率的逐渐升高是特异性噬菌体抗体富集的表现, 是评价亲和富集筛选效果的一个核心指标^[13-15]。

将第 4 轮亲和富集筛选的阳性噬菌体感染 *E. coli* HB2151 后, 从所涂布的 TYE 平板中随机挑取 400 个单克隆菌落接种于 96 孔板中进行培养并诱导表达 scFv, 利用 ELISA 实验进行初步筛选, 最后得到 4 株阳性克隆, 分别命名为 J-A1、J-H12、I-B7 和 I-B10。

表 1 亲和富集筛选对抗 ICAM-1 scFv 的富集效应

Table 1 Selective enrichment of anti-human ICAM-1 phage antibodies from Tomlinson I+J phage display library

Round	Input phage (pFU)	Output phage (pFU)	Recovery rate (%) (output/input)	Enrichment (rate _n /rate ₁)
1	1.00×10 ¹³	2.00×10 ⁵	2.00×10 ⁻⁸	1
2	5.40×10 ¹²	8.50×10 ⁶	1.60×10 ⁻⁶	80
3	6.80×10 ¹²	7.80×10 ⁷	1.10×10 ⁻⁵	550
4	5.00×10 ¹²	2.00×10 ⁸	4.00×10 ⁻⁵	2 000

2.2 阳性克隆的鉴定

以 PCR 法对上述 4 株阳性克隆进行 PCR 扩增, 在约 930 bp 处均扩增出特异条带, 与预期大小一致, 说明其含有完整的 *scFv* 基因 (图 1A)。

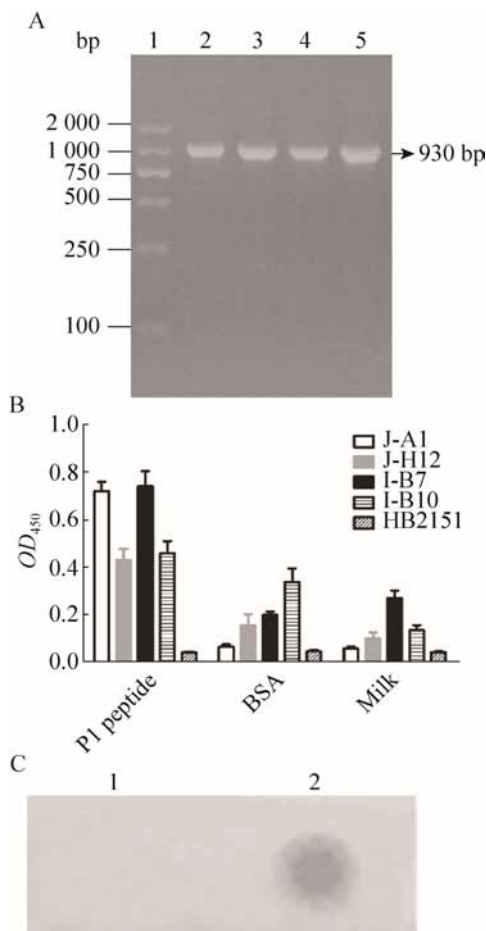


图 1 阳性克隆的鉴定

Fig. 1 Identification of four positive clones. (A) PCR products of four positive clones. 1: DNA marker; 2: J-A1; 3: J-H12; 4: I-B7; 5: I-B10. (B) ELISA-based antigenic cross reaction of four positive clones. (C) Dot blotting assay for J-A1 clone. 1: negative control; 2: J-A1 clone.

将 4 株阳性克隆用 ELISA 实验进行抗原交叉反应检测, 实验结果表明, J-A1 菌株特异性较好, 其他 3 株与牛血清白蛋白 (BSA) 或脱脂奶粉 (Milk) 均有较高的交叉反应 (图 1B)。Dot blotting 实验表明, J-A1 菌株可以与人 ICAM-1 抗原发生特异性结合反应 (图 1C)。

2.3 J-A1 序列测定与分析

J-A1 序列分析表明, 抗 *ICAM-1 scFv* 基因全长 720 bp, 其中重链可变区基因位于 Linker 的上游, 长 348 bp, 编码 116 个氨基酸; 轻链可变区基因位于 Linker 的下游, 长 327 bp, 编码 109 个氨基酸。两者由含 15 个氨基酸的柔性短肽连接 (加粗序列), 构成了完整的抗 *ICAM-1 scFv* 基因序列 (图 2)。Blast 分析表明, 该基因序列符合数据库中单链抗体所具有的特点, 重链可变区和轻链可变区具有完整的骨架区和互补决定区 (划线序列) 结构。

```
GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG
E V Q I L E S S G G G I V Q P G G S L
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TIT AGC AGC TAT GCC ATG AGC TGG
R L S C A A S S G F T F S S Y A M S W
R L S C A A S S G F T F S S Y A M S W
GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT TCT TCT
V R Q A P G K G L E W V S G I S S S
GGT GCT ACT ACA GCT TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCG AGA
G A T F A Y A D S V K G R F T I S R
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GGT AGT GAT GAT TIT GAC TAC TGG GGC CAG
T A V Y Y C A K G S D D F D Y W G Q
GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC AGC
G T L V T V S S G G G G S G G G G S
GGC GGT GGC GGG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT
G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S
GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC
A S V G D R V T I T C R A S Q S I S
AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
TAT TCT GCA TCC TCG TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA
Y S A S S L Q S G V P S R F S G S G
TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TIT GCA
S G T D F T L T I S S L Q P E D F A
ACT TAC TAC TGT CAA CAG GAT GCT GCT ACT CCT TCT ACG TTC GGC CAA GGC ACC
T Y Y C Q Q D A A T P S L F G Q G T
AAG GTG GAA ATC AAA CCG
K V E I K R
```

图 2 抗 *ICAM-1 scFv* 基因序列分析

Fig. 2 Sequence analysis of *anti-ICAM-1 scFv* gene. underline: complementary-determining region; bold: linker.

2.4 抗 ICAM-1 scFv 的分离纯化与 Western blotting 鉴定

J-A1 工程菌经 IPTG 诱导培养后, 离心收集上清, 经 HisTrap 亲和层析柱分离纯化后, 收集目的蛋白样品进行 SDS-PAGE, 经考马斯亮蓝染色后呈单一蛋白条带, 表明纯化的 scFv 具有较高的纯度。蛋白样品分子量为 30 kDa, 与 scFv 理论分子量基本一致 (图 3A)。scFv 经透析和 BCA 法定量后, 其浓度为 0.65 mg/mL。Western blotting 实验表明, 以纯化的 scFv 作为一抗, 在相对分子量 55 kDa 左右出现特异性条带, 其与 ICAM-1 抗原分子量大小一致, 证实了纯化的 scFv 可与人 ICAM-1 抗原发生特异性结合反应 (图 3B)。

2.5 抗 ICAM-1 scFv 生物学活性鉴定

竞争 ELISA 实验表明, 伴随 scFv 的倍比稀释, OD_{450} 值逐渐升高, 说明 scFv 和 McAb 与 P1 抗原肽的结合作用是相互排斥的, scFv 能与 McAb 竞争结合 P1 抗原肽 (图 4)。

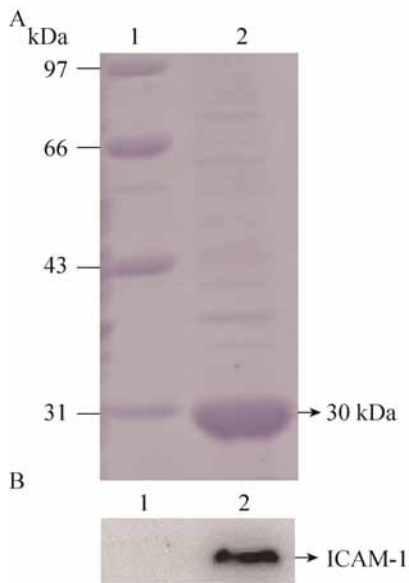


图 3 抗 ICAM-1 scFv 的分离纯化与鉴定

Fig. 3 Purification and identification of anti-ICAM-1 scFv. (A) Purification of anti-ICAM-1 scFv. 1: protein marker; 2: purified anti-ICAM-1 scFv. (B) Western blotting assay of anti-ICAM-1 scFv. 1: negative control; 2: human ICAM-1 antigen band (55 kDa).

利用 Rose Bengal 对黏附细胞进行染色, 计算细胞黏附率。2 μ g 和 5 μ g scFv 组的黏附率分别为 30.39% 与 26.47%; 同剂量 McAb 组的黏附率分别为 27.45% 与 25.49%, PBS 对照组为 40.19% (图 5)。细胞黏附抑制实验表明, scFv 和 McAb 都能抑制单核细胞与人血管内皮细胞间的黏附, 黏附抑制作用与其浓度呈正相关, 与 PBS 对照组相比, 差异显著。这表明所制备的抗 ICAM-1 scFv 具有较好的抗细胞黏附活性。

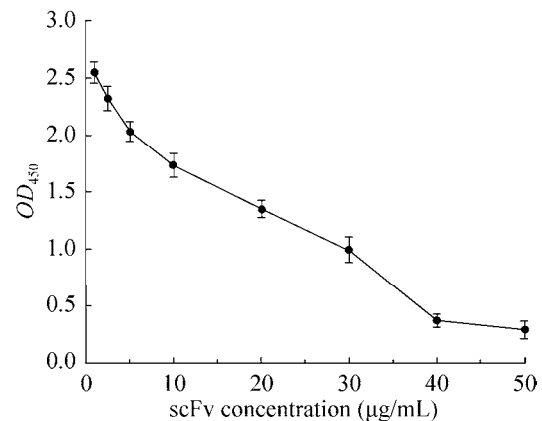


图 4 竞争 ELISA 实验

Fig. 4 Competitive ELISA assay of anti-ICAM-1 scFv.

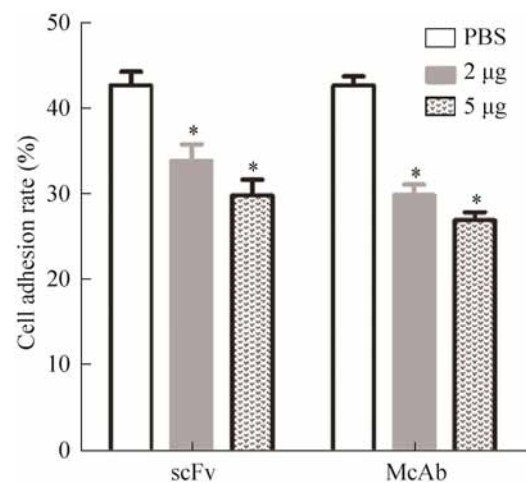


图 5 细胞黏附抑制实验

Fig. 5 Cell adhesion inhibition assay of anti-ICAM-1 scFv and McAb. * $P < 0.05$ compared to PBS control. P values were calculated using t test.

3 讨论

黏附分子介导的细胞黏附是机体生理和病理过程的基本现象和共同过程。由细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和淋巴细胞功能性相关抗原 (LFA-1) 相互作用介导的炎症级联反应过程在炎症性疾病的发生与发展中发挥重要作用^[2,5]。应用新型抗黏附分子抗体特异性阻断上述作用已经成为炎症相关性疾病治疗的新热点, 并成功应用于烧伤、移植排斥反应、缺血再灌注损伤、类风湿性关节炎等多种疾病的临床治疗^[5,16]。美国 FDA 已经批准 Enlimomab、Efalizumab 等抗黏附分子抗体进入 II 期临床研究^[17-19]。

噬菌体展示技术是一种可以不经免疫动物和细胞融合等过程, 通过抗体片段的克隆选择, 可以快速制备出几乎所有抗原的人源化抗体的技术^[20-23]。因此, 为快速制备人源抗 ICAM-1 scFv, 本研究利用 Tomlinson I+J 噬菌体抗体库, 采用固相筛选法, 以 P1 抗原肽为包被抗原, 经过 4 轮亲和富集筛选使特异性噬菌体抗体得到了 2 000 倍的富集。通过 ELISA 方法对第 4 轮亲和富集后的部分单克隆菌落进行抗体活性的初步鉴定, 成功筛出 4 株阳性克隆。通过 PCR 鉴定反应、ELISA 抗原交叉反应和 Dot blotting 实验, 最终获得了 1 株既能与 P1 抗原肽特异结合又能与人 ICAM-1 抗原特异结合的阳性克隆 J-A1。J-A1 工程菌经 IPTG 诱导表达, 成功进行了 scFv 的可溶性表达, 继而采用 HisTrap 亲和层析柱进行分离纯化。采用 Western blotting 实验、竞争 ELISA 实验和细胞黏附抑制实验进行了 scFv 生物学活性的初步鉴定。上述实验表明, 纯化的 scFv 具有与人 ICAM-1 抗原特异性结合的特性且结合强度与 scFv 浓度呈正相关; scFv 能够明显抑制人血管内皮细胞和单核细胞间的黏附, 其抗黏附作用随 scFv 浓度的增高而增强, 但单链抗体的黏附抑制作用稍弱于单克隆抗体。

BLAST 进行 J-A1 序列分析表明, J-A1 含有

完整的单链抗体恒定区和可变区, 与已报道的抗 ICAM-1 scFv 氨基酸序列相比^[24], J-A1 的互补决定区 (Complementary-determining region, CDR) 序列与其差异较大, 尤其是重链可变区中的 CDR3 区和轻链可变区中的 CDR1 区。由于抗原-抗体的特异性结合与抗体轻链和重链的 CDR 区环状结构的氨基酸序列密切相关^[25], 故此 CDR 区氨基酸序列差异可能是导致 scFv 亲和力差异的关键, 进一步优化 CDR 区氨基酸序列可能是提高抗 ICAM-1 scFv 生物学活性的重要策略。

与本室曾采用的以大肠杆菌原核表达系统制备抗 ICAM-1 scFv 相比^[24,26], 利用噬菌体展示技术制备 scFv 更加简便易行并具有更高的产量和生物学活性。在后续的研究中, 我们将继续深入研究以提高抗 ICAM-1 scFv 的稳定性和亲水性, 使其具有更佳的生物学活性, 探索抗 ICAM-1 scFv 在炎症相关性疾病治疗中的应用前景。

致谢 衷心感谢中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室生物药物工程研究部主任刘瑞田教授在噬菌体展示技术方面给予的悉心指导和无私帮助!

REFERENCES

- [1] Hua SS. Targeting sites of inflammation: intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. *Front Pharmacol*, 2013, 4: 127.
- [2] Li JL, Zhai XH. The biological functions of integrin LFA-1 and its ligand ICAM-1 and the related diseases. *Chin J Cell Biol*, 2013, 35(8): 1225-1231 (in Chinese).
李金丽, 翟心慧. 整合素 LFA-1 与其配体 ICAM-1 的生理功能及相关疾病. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(8): 1225-1231.
- [3] Lai ZH, Xie YL, Ma C, et al. The biological functions of cell adhesion molecules in monocyte migration. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2015, 31(11): 1571-1575 (in Chinese).

- 赖志豪, 谢玉龙, 马超, 等. 细胞黏附分子在单核细胞迁移中的作用. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(11): 1571–1575.
- [4] Anderson ME, Siahaan TJ. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides*, 2003, 24(3): 487–501.
- [5] Chai JY, Fang PH. The therapeutics advance for anti-ICAM-1 monoclonal antibody. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2011, 21(17): 1372–1374 (in Chinese).
柴锦燕, 方佩华. 抗 ICAM-1 单克隆抗体在治疗方面的研究进展. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 21(17): 1372–1374.
- [6] Wichert S, Juliusson G, Johansson A, et al. A single-arm, open-label, phase 2 clinical trial evaluating disease response following treatment with BI-505, a human anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody, in patients with smoldering multiple myeloma. *PLoS ONE*, 2017, 12(2): e0171205.
- [7] Lobatón T, Vermeire S, Van Assche G, et al. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 39(6): 579–594.
- [8] Ma Y, Zou QM. Single chain antibody and its application in biomedicine. *Immunol J*, 2006, 22(3): 1–5 (in Chinese).
马颖, 邹全明. 单链抗体及其在生物学中的应用. 免疫学杂志, 2006, 22(3): 1–5.
- [9] Wang XY, Yu P. Construction of single-chain Fv antibody and its application in the medicine. *J Pathog Biol*, 2009, 4(10): 790–792 (in Chinese).
汪希雅, 余平. 单链抗体的构建及其在医学上的应用. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(10): 790–792.
- [10] Hao WB, Xu WW, Chen BH, et al. Preparation and identification of phage-displayed ICAM-1 mimic peptide. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2003, 19(1): 77–79 (in Chinese).
郝文波, 徐伟文, 陈白虹, 等. 噬菌体展示 ICAM-1 模拟肽的制备及活性鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(1): 77–79.
- [11] Li YH, Meng RQ, Zhu P, et al. The bio-activities of monoclonal antibodies against intercellular adhesion molecule-1. *Chin J Prev Vet Med*, 2012, 34(5): 397–400 (in Chinese).
李月红, 孟锐奇, 朱平, 等. 抗 ICAM-1 单克隆抗体的生物学功能研究. 中国预防兽医学报, 2012, 34(5): 397–400.
- [12] Chai H, Yu JW, Ma JL, et al. Effect of berberine in tumor necrosis factor- α induced inflammation. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2011, 35(4): 489–491 (in Chinese).
柴惠, 余军伟, 马建龙, 等. 黄连素对肿瘤坏死因子 TNF- α 介导的炎症作用机理研究. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(4): 489–491.
- [13] Zhao Y, Wang QM, Fu XQ, et al. Construction of phage display antibody library to MCF-7 cells and screening of single-chain antibodies against breast cancer cells. *Chin J Biotech*, 2004, 20(5): 667–672 (in Chinese).
赵岩, 王清明, 付学奇, 等. 噬菌体抗体库的构建及抗乳腺癌细胞单链抗体的筛选. 生物工程学报, 2004, 20(5): 667–672.
- [14] Jiang JH, Sun FM, Han Y, et al. Screening and characterization of human anti-GPC3 single chain Fv antibody fragment selected by phage display. *Acta Pharm Sin*, 2017, 52 (12): 1877–1883 (in Chinese).
蒋家豪, 孙福谋, 韩月, 等. 噬菌体展示全人源抗 GPC3 的单链抗体的筛选及鉴定. 药科学报, 2017, 52 (12): 1877–1883.
- [15] Zhang JB, Guo F, Huang XQ, et al. A novel Omp25-binding peptide screened by phage display can inhibit *Brucella abortus* 2308 infection *in vitro* and *in vivo*. *J Med Microbiol*, 2014, 63(6): 780–787.
- [16] Wang F, Zhou T, Song W, et al. Anti-adhesion therapy and human antibody. *Immunol J*, 2002, 18(3): 46–48 (in Chinese).
王锋, 周同, 宋巍, 等. 抗粘附治疗与人抗体研究进展. 免疫学杂志, 2002, 18(3): 46–48.
- [17] Schneider D, Berrouscho J, Brandt T, et al. Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke. *Eur Neurol*, 1998, 40(2):78–83.
- [18] Aditya KG, Andrea MC. Efalizumab in the treatment of psoriasis. *J Cutan Med Surg*, 2006, 10(2): 57–68.
- [19] Zoppo GJ. Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207: 143–148.

- [20] Ge LP, Ding N, Lan GC, et al. Current situation and prospects of therapeutic antibody. *Chin Biotechnol*, 2013, 33(9): 85–93 (in Chinese).
葛良鹏, 丁宁, 兰国成, 等. 治疗性抗体的研究现状与未来. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(9): 85–93.
- [21] Ebrahimizadeh W, Rajabibazl M. Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application. *Curr Microbiol*, 2014, 69(2): 109–120.
- [22] Liu Y, Chen XX, Wang YX, et al. Screening and biological characteristics identification of human anti-CD147 single chain antibody fragments. *Immunol J*, 2018, 34(1): 59–64 (in Chinese).
刘妍, 陈秀秀, 王欲晓, 等. 抗 CD147 人源单链抗体的筛选及生物特性初步鉴定. *免疫学杂志*, 2018, 34(1): 59–64.
- [23] Lin Y, Yan XY. Progression and direction of humanized antibody research. *Chin J Biotech*, 2004, 20(1): 1–5 (in Chinese).
林芸, 阎锡蕴. 人源化抗体研究历程及发展趋势. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 1–5.
- [24] Sun H, Wan ZH, Zhang GL, et al. Construction of expression vector for anti-human intercellular adhesion molecule-1 single chain fragment variable and its expression in *E. coli*. *Chin J Biol*, 2008, 21(5): 405–409 (in Chinese).
孙红, 万忠海, 张国利, 等. 抗人 ICAM-1 单链抗体表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(5): 405–409.
- [25] Dai HP. Genesis, development and application prospect of antibody library: a review. *Chin J Biotech*, 2011, 27(5): 690–697 (in Chinese).
戴和平. 抗体库的起源、发展及应用前景. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 690–697.
- [26] Sun H, Wu GM, Chen YY, et al. Expression, production, and renaturation of a functional single-chain variable antibody fragment (scFv) against human ICAM-1. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(7): 540–547.

(本文责编 陈宏宇)