

## • 临床论著 •

# 细胞角蛋白 18 凋亡片段 M30 单克隆抗体的制备及其在慢性乙型肝炎肝损伤检测中的初步应用

魏飞力 石英 陈杰 胡冬梅 李庆 陈德喜

**【摘要】** 目的 制备针对角蛋白 18 (CK18) 凋亡片段 M30 的单克隆抗体并验证其凋亡检测特异性。方法 以合成的 13 个氨基酸的 M30 抗原多肽与牛血清白蛋白偶联后免疫 BALB/C 小鼠, 取反应良好的小鼠脾细胞同 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 利用选择培养基筛选融合的杂交瘤细胞, 用有限稀释法分离获得能够稳定分泌抗体阳性克隆; 制备腹水抗体纯化后, 用间接 ELISA 方法鉴定抗体的亚类和型别; 用免疫荧光细胞染色法鉴定抗体对于细胞凋亡检测的特异性; 以制备的 M30 单克隆抗体包被 ELISA 平板, 取 35 例慢性乙型肝炎患者血浆分析 M30 抗原水平与肝损伤之间的关系。结果 获得 3 株能稳定分泌 M30 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 三株抗体均为 IgG2a 亚类,  $\kappa$  型抗体; 该单克隆抗体能与发生凋亡的细胞特异性的反应; 应用该单克隆抗体检测慢性乙型肝炎患者血浆中 M30 抗原水平与患者 ALT、AST 水平呈良好的相关性。结论 成功制备针对 CK18 凋亡片段 M30 的单克隆抗体, 该抗体具有良好的细胞凋亡检测特异性, 可以用于慢性肝病肝损伤的检测。

**【关键词】** 角蛋白 18; 凋亡片段; 抗体, 单克隆; 肝炎, 乙型, 慢性

**Preparation of monoclonal antibodies specific to M30 (Cytokeratin 18 apoptosis fragment) and its primary application in detection of liver injure of chronic hepatitis B** WEI Fei-li<sup>\*</sup>, SHI Ying, CHEN Jie, HU Dong-mei, LI Qing, CHEN De-xi.<sup>\*</sup> STD&AIDS Laboratory, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: CHEN De-xi, Email: Dexi09@yahoo.com

**【Abstract】 Objective** To prepare monoclonal antibody (MAb) against M30 (apoptosis fragment of Cytokeratin 18) and investigate its specificity of cell apoptosis detection. **Methods** BALB/C mice were immunized with M30-BSA (13 amino acid residues peptide). Spleen cells of the mice with good reaction were fused with myeloma cells SP2/0. Hybridomas were separated by culturing in HAT cultures. The stable monoclonal hybridomas were isolated by limiting dilution. Mouse ascites were prepared by intraperitoneal injection of hybridoma cells. After purified, the types and subclasses of monoclonal antibodies were identified by indirect ELISA. The specificity of these antibodies was detected by immunofluorescence staining. The ELISA plate was coated by the M30 antibody. The level of M30 antigen from serum of 35 chronic hepatitis B patients were investigated. **Results** Three strains of hybridoma cell lines which could secrete M30 MAb stably were obtained. The three antibodies were all IgG2a subclass and type  $\kappa$ . The antibodies could specifically hybridize with apoptosis hepatocytes. M30 antigen in serum of chronic hepatitis B patients detected by M30 monoclonal antibody had good correlation with ALT and AST. **Conclusion** Antibodies against CK18 apoptosis fragment M30 were obtained. These antibodies had great specificity of cell apoptosis detection and might be used in liver injure detection of chronic liver diseases.

**【Key words】** Keratin-18; Apoptosis fragment; Antibodies, monoclonal; Hepatitis B, chronic

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.10.109

基金项目: 国家自然科学基金(81272266; 81071843; 81100288); 佑安肝病艾滋病基金(BJYAH-2011-061)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院性病艾滋病实验室(魏飞力、李庆), 感染科(陈杰); 北京市肝病研究所(石英、陈德喜); 大连医科大学统计学教研室(胡冬梅)

通讯作者: 陈德喜, Email: Dexi09@yahoo.com

凋亡是指程序性细胞死亡, 相对于细胞坏死, 凋亡是细胞的主动反应, 是细胞对环境的生理性病理性刺激信号、环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程<sup>[1]</sup>。半胱天冬氨酸酶(Caspase)在凋亡过程中的作用是必不可少的, 凋亡的过程实际上是 Caspase 不可逆的有限水解底物的级联放大反应过程<sup>[2]</sup>。

角蛋白 18(CK18)是重要的细胞骨架中间丝蛋白之一,在上皮来源细胞内表达量丰富,如成人肝脏中、外分泌腺、小肠等细胞中 CK18 占总蛋白量 5% 左右<sup>[3]</sup>。作为肝细胞内含量最丰富的蛋白之一,CK18 除了起到细胞骨架的支撑作用以外,还通过多种途径参与着细胞内的各种反应。当细胞受到损伤性刺激发生凋亡时,多条途径被激活,同时激活了 Caspase 系统, Caspase3 将 CK18 在两个位点进行切割,即 Asp238 和 Asp396<sup>[4]</sup>。这种形式的裂解是高度凋亡特异的,并且凋亡片段对蛋白酶体的降解作用稳定,能够释放进入血浆中<sup>[5]</sup>。M30 抗原是位于 CK18 第 387~396 个氨基酸残基的一段 13 个肽的表位,其抗体特异性识别 M30 抗原,由于只有在 Caspase-3 裂解的 K18 片段能够暴露出 387~396 氨基酸残基的表位,因此, M30 抗体对于上皮细胞的凋亡是具有特异性的。制备 M30 抗体对于上皮来源细胞凋亡水平的特异性检测具有重要意义。本文利用合成的 M30 短肽,成功制备了针对 M30 片段的特异性单克隆抗体,并将其用于慢性肝病肝损伤患者标本的检测。

## 资料与方法

1. 主要材料及试剂: M30 凋亡片段 13 肽氨基酸(N-LEDGEDFNGLDALDS),由北京赛百盛基因技术有限公司完成,其纯度 >95%,将其与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)偶联; Cy3 标记羊抗小鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司;胎牛血清,高糖 DMEM 购自美国 Invitrogen 公司;弗氏佐剂(完全、不完全)均购自美国 Sigma 公司。

2. 临床慢性肝病患者标本:慢性乙型肝炎患者 35 例,均为 2011 年 6 至 12 月在首都医科大学附属北京佑安医院住院的患者,其中男 29 例,女 6 例,年龄 22~76 岁,平均 46 岁。病毒性肝炎诊断标准均按照 2000 年西安第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议讨论修订的《病毒性肝炎防治方案》进行分型诊断。健康对照组 20 名,为门诊体检者,平均年龄 47 岁,乙型肝炎标志物均为阴性,身体健康,不合并其他急慢性疾病。

3. 主要仪器: Thermo 371 型细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司); Bio-RAD 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Olympus IX71 荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

4. 动物免疫:用 BSA 偶联的 M30 多肽(20 μg/只)与弗氏完全佐剂充分乳化后用皮下注射的方法免疫 5 只 8~12 周雌性 BALB/c 小鼠,基础免疫 14 d 和 28 d 后,加强免疫 2 次,其剂量与基础免疫相同。42 d 时用混有不完全佐剂的抗原(100 μg/只)再次加强免疫,3 次加强 3 d 后,取血测定抗体滴度。

5. 小鼠抗血清滴度测定:用 0.05 mol/L pH 值 9.5 的碳酸盐缓冲液稀释 M30 多肽后加入酶标板中包被酶标板,4 °C 过夜。使用前封闭。将抗 M30 小鼠血清稀释成不同的稀释度,各取 100 μl 加到上述包被板中,37 °C 反应 1 h 后,再加入 100 μl 辣根过氧化物酶-兔抗鼠 IgG,37 °C 下反应 30 min,洗涤后,加入显色液,显色 20 min,用终止液终止反应,酶标仪 450 nm 读取吸光度值。选取免疫反应最好的 3 只小鼠(ID: EM30-T1, EM30-T2, EM30-T3)脾脏进行细胞融合。

6. 细胞融合及抗体生产细胞株的筛选:运用 PEG 方法对上述免疫鼠的致敏脾细胞与预先培养的骨髓瘤细胞株 SP2/0 进行融合;先后采用含 HAT 和 HT 的培养基置于 96 孔培养板中培养,进行选择培养;融合 5~6 d 后,待杂交瘤细胞生长状态良好时去上清进行筛选,筛选方法与小鼠抗血清滴度测定方法相同;ELISA 检测后将 OD 值最高的单克隆再有限稀释接入 96 孔板中如上法所述再次亚克隆,此过程重复数次,直至阳性孔比率为 100%,将筛选得到的阳性单克隆扩大培养,细胞数按  $2 \times 10^6$ /管进行冻存。同时收集细胞安排腹水制备。

7. 腹水制备及抗体纯化:以 0.5 ml/只的剂量腹腔注射液状石蜡灭活 BALB/c 小鼠的腹腔巨噬细胞;7~10 d 后腹腔注射上述稳定表达目的抗体的杂交瘤细胞株,数量为  $(1.15 \sim 1.30) \times 10^6$ /只;接种细胞 7~10 d 后,抽取腹水,4 °C 条件下  $12\ 000 \times g$  离心收集上清液。应用 Sigma 公司的 Protein A 抗体纯化试剂盒(货号: PURE1A)进行腹水的纯化,纯化后的腹水重新进行效价测定,腹水效价为 1:100 000(图 1)。

8. 单克隆抗体的亚类和型别鉴定:采用间接 ELISA 法,以辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 Ig-G1、IgG2a、IgG2b、IgG3、λ 型和 κ 型抗体为二抗,鉴定制备单抗的亚类和型别。

9. 免疫荧光细胞染色检测 M30 单克隆抗体对细胞凋亡的特异性:将 HepG2 细胞以  $5 \times 10^4$ /ml 的浓度接种于预先置放好高压玻片的 24 孔细胞培养板中,24 h 后向细胞中加入 MMS(50 ng/ml)处理 24 h 后去除细胞培养上清, PBS 清洗以后,加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞,经 1% Triton-100 打孔处理以后,采用制备的单克隆抗体(1:1000)孵育细胞,室温 1 h,再次清洗后加入 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,室温 1 h 后清洗细胞,最后应用含 DAPI 的甘油封片,与 Nikon 90i 荧光显微镜下观察细胞染色并拍照。

10. 慢性乙型肝炎患者血浆标本的初步检测:应用 0.05 mol/L pH 9.5 的碳酸盐缓冲液稀释 M30 单克隆抗体至终浓度 200 ng/ml,包被于酶标板中,4 °C 过夜。



表2 慢性乙型肝炎患者与健康对照组一般情况及 M30 抗原水平

组别	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	ALT [U/L, $M(Q25, Q75)$ ]	AST [U/L, $M(Q25, Q75)$ ]	CHE [U/L, $M(Q25, Q75)$ ]	M30 [A450, $M(Q25, Q75)$ ]
慢性乙型肝炎组	46.3 ± 15.9	71.6(52.3, 87.5)	70.8(50.7, 72.8)	2698(875, 3022)	0.52(0.29, 0.78)
健康对照组	47.7 ± 11.2	28.7(16.3, 37.2)	23.1(14.8, 30.8)	2498(822, 2977)	0.33(0.28, 0.42)
t/Z 值	0.100	2.234	2.656	1.421	5.874
P 值	0.747	0.035	0.008	0.285	0.000

使用前封闭。将被检测者血浆用 PBS 1:2 稀释后, 100  $\mu$ l 加入酶标板中, 分别以人 IgG 和 PBS 作为阴性对照和空白, 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h 后, 再加入 100  $\mu$ l 辣根过氧化物酶-羊抗人 IgG, 37  $^{\circ}$ C 下反应 30 min, 洗涤后加入显色液, 显色 20 min, 用终止液终止反应, 酶标仪 450 nm 读取吸光度值。

11. 统计学分析: 采用 SPSS 17.0 统计分析软件, 正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两独立样本的计量资料比较采用 *t* 检验, 非正态分布的计量资料采用中位数(四分位间距) [ $M(Q25, Q75)$ ] 表示, 两组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验; 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

1. 纯化后抗体效价的鉴定: 三株单克隆抗体效价均达到 1:1000 000(图 1)。

2. 单克隆抗体的亚类及型别鉴定(表 1): 制备的 6 株单克隆抗体均为 IgG2a 亚类、 $\kappa$  型抗体。

表1 纯化后单克隆抗体浓度、效价抗体亚类和型别鉴定

抗体编号	浓度 (mg/ml, $\bar{x} \pm s$ )	效价	抗体亚类	抗体型别
EM30-T1	2.0 ± 0.8	10 <sup>-6</sup>	IgG2a	$\kappa$
EM30-T2	2.2 ± 0.5	10 <sup>-6</sup>	IgG2a	$\kappa$
EM30-T3	1.9 ± 0.7	10 <sup>-6</sup>	IgG2a	$\kappa$

3. 免疫荧光染色法抗体肝细胞凋亡特异性检测(图 2): M30 抗体只有在发生显著凋亡的肝细胞才出现强染色, 而正常细胞无染色。

4. 制备的 M30 单克隆抗体在检测慢性乙型肝炎肝损伤中的初步应用: 慢性乙型肝炎组与健康对照组一般状况比较见表 2, 应用本文制备的抗体检测慢性乙型肝炎患者血浆 M30 抗原水平显著高于健康对照组 ( $P = 0.000$ ) (表 2, 图 3); 应用 Pearson 相关分析, 慢性乙型肝炎患者血浆 M30 抗原水平与 ALT、AST 分别具有良好的正相关性 ( $r = 0.831, P = 0.000; r = 0.837, P = 0.000$ ) (图 4, 5), 但与胆碱酯酶无相关性 ( $r = -0.051, P = 0.770$ ) (图 6)。

## 讨 论

肝细胞的凋亡是慢性肝病肝细胞的损伤的重要机制, 在病毒性肝炎、脂肪性肝病肝损伤中起到重要的作用<sup>[6]</sup>。CK18 是组成肝细胞骨架的主要中间丝蛋白之一, 作为细胞骨架支撑肝细胞的正常形态, 而近年来研究发现, CK18 与肝细胞的损伤、凋亡等生理病理反应均密切相关, 可溶解状态与固态状态 CK18 的动态变化亦参与了细胞内的多条重要信号传导通路<sup>[7-8]</sup>。CK18 的一个凋亡片段 M30, 作为一个新的抗原在肝细胞凋亡早期阶段可以在外周血或者细胞培养上清中检测到, 而在细胞发生坏死的时候则无法检测<sup>[9]</sup>。因此 M30 抗原作为特异性的细胞凋亡检测指标受到广泛的关注。针对 M30 这段 13 个氨基酸的多肽的单克隆抗体, 能够特异性的识别 Asp396 裂解位点<sup>[10]</sup>, 以该抗体为基础的 ELISA 检测试剂盒也被广泛应用于近年来发表的多篇高水平肝病杂志上, 有望成为新的肝细胞凋亡的标志物。然而该类试剂盒目前依赖进口, 价格昂贵, 因此, 在我国这样一个肝病大国, 生产和拥有自己的肝细胞检测试剂具有重要的意义。

本文利用体外合成 M30 抗原多肽, 制备了 M30 单克隆抗体 3 株, 均具有良好的特异性和较高的抗体效价。应用间接免疫荧光法研究发现, 在肝细胞发生凋亡时, DAPI 染色的细胞核发生固缩, 染色质断裂, 而这些细胞正是 M30 单克隆抗体强染色的细胞, 说明该单克隆具有良好的凋亡检测特异性。在国外 CK18 凋亡抗体的检测主要用于非酒精性脂肪肝<sup>[11]</sup> 和 HCV 感染慢性肝病<sup>[12-13]</sup> 的肝细胞损伤程度的检测, 而对于 HBV 感染慢性肝病的检测较少, 尽管如此, M30 凋亡片段的检测仍然能够较好地反映 HBV 感染慢性肝病肝组织损伤的情况<sup>[14]</sup>, 并且有望作为非活动性 HBV 携带者与慢性活动性肝病的区别指标<sup>[15]</sup>。本文利用自主制备的 M30 单克隆抗体包被 ELISA 平板, 初步检测了 35 例分别具有不同肝损伤指标的慢性乙型肝炎患者, 结果发现, 这些患者血浆 M30 抗原水平与 ALT、AST 均具有良好的相关性, 说明 M30 抗原作为肝细胞损伤的检测指标具有良好的敏感性。M30 抗原在健康对照组血浆中

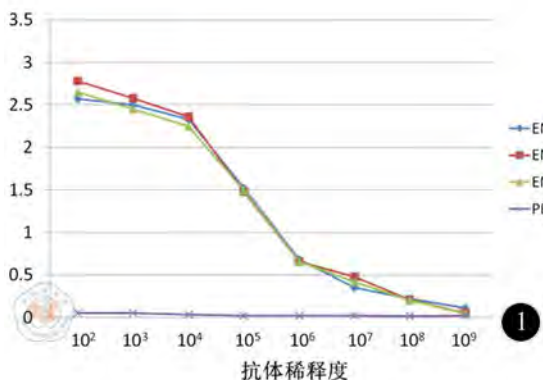


图1 三株单克隆抗体纯化后效价鉴定

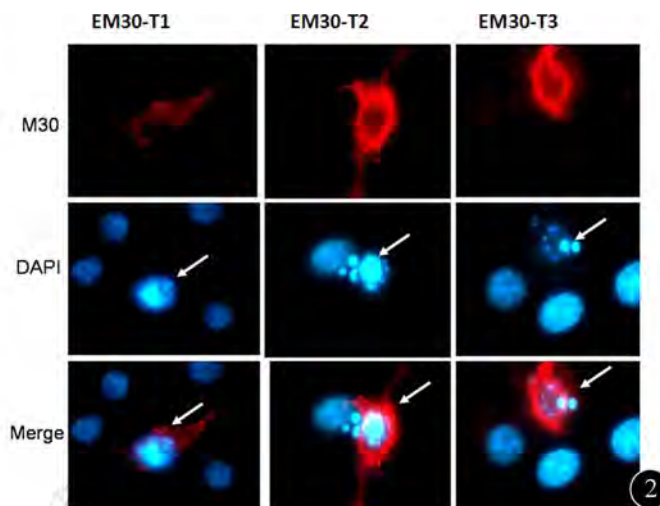


图2 M30单克隆抗体肝细胞凋亡特异性检测 (×1000)

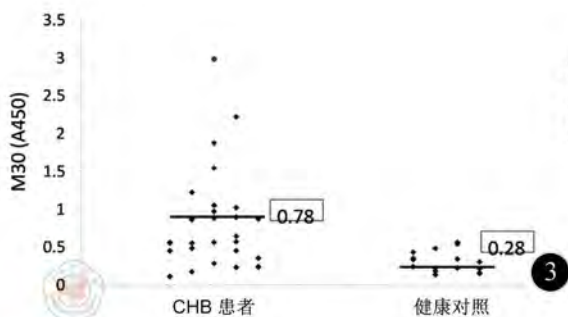


图3 CHB患者和健康对照者M30抗原水平散点图。CHB: 慢性乙型肝炎

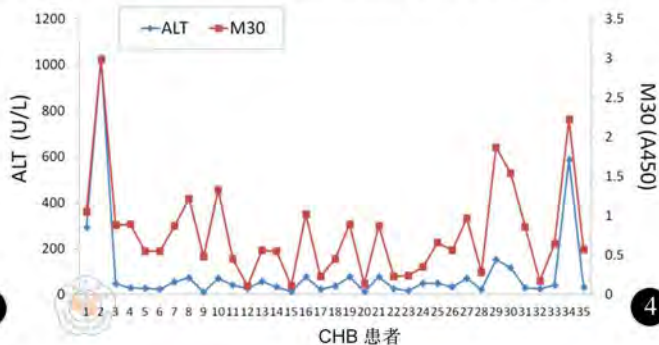


图4 CHB患者血浆M30水平与ALT水平折线图。ALT: 丙氨酸氨基转移酶

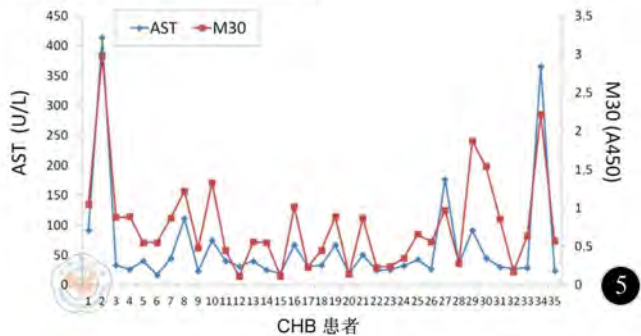


图5 CHB患者血浆M30水平与AST水平折线图。AST: 天冬氨酸氨基转移酶

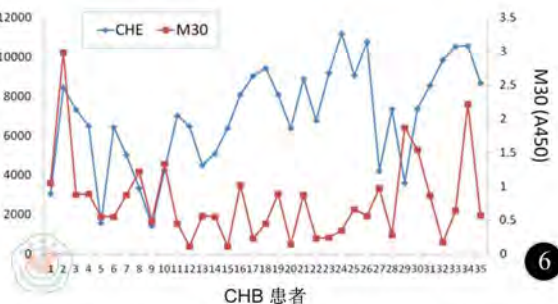


图6 CHB患者血浆M30水平与CHE水平折线图。CHE: 胆碱酯酶

呈低水平,亦说明本文制备的 M30 单克隆抗体具有良好的检测特异性。

成功制备单克隆抗体是制备检测试剂盒的第一步,能否应用于临床检测还需大量的临床样本进一步的验证,本文仅利用少量标本对三个常用临床指标进行了初步验证,证明制备的单克隆抗体具有较好的临床实用性。本课题组将在现有 3 株单克隆抗体的基础上,制备多种标记单克隆抗体,进一步完善检测试剂的开发,用于未来检测之需。

### 参 考 文 献

- [1] Jacobson MD, Weill M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. Cell, 1997, 88: 347-354.
- [2] Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. Eur J Biochem, 1996, 237: 884.
- [3] Liu YH, Ho CC, Cheng CC, et al. Cytokeratin 18-mediated disorganization of intermediate filaments is induced by degradation of plectin in human liver cells. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407: 575-580.
- [4] Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. J Cell Biol, 1997, 138: 1379-1394.
- [5] Cha SI, Ryerson CJ, Lee JS, et al. Cleaved cytokeratin-18 is a mecha-

- nistically informative biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 2012, 13:105.
- [6] Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*, 2005, 54:1024-1033.
- [7] Ndozangue-Touriguine O, Hamelin J, Bréard J. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76:11-18.
- [8] Strnad P, Stumptner C, Zatloukal K, et al. Intermediate filament cytoskeleton of the liver in health and disease. *Histochem Cell Biol*, 2008, 129:735-749.
- [9] Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG, et al. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol*, 1997, 138:1379-1394.
- [10] Speirs CK, Hwang M, Kim S, et al. Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. *Am J Cancer Res*, 2011, 1:43-61.
- [11] Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, et al. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*, 2009, 50:1072-1078.
- [12] Kronenberger B, Wagner M, Herrmann E, et al. Apoptotic cytokeratin 18 neoepitopes in serum of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2005, 12:307-314.
- [13] Jazwinski AB, Thompson AJ, Clark PJ, et al. Elevated serum CK18 levels in chronic hepatitis C patients are associated with advanced fibrosis but not steatosis. *J Viral Hepat*, 2012, 19:278-282.
- [14] Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Tsochatzis E, et al. Serum apoptotic caspase activity as a marker of severity in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Gut*, 2008, 57:500-506.
- [15] Eren F, Yilmaz Y, Kose S, et al. Caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 in patients with chronic hepatitis B. *Clin Chim Acta*, 2010, 411:2029-2032.

(收稿日期:2013-05-07)

(本文编辑: 马超)

魏飞力, 石英, 陈杰, 等. 细胞角蛋白 18 凋亡片段 M30 单克隆抗体的制备及其在慢性乙型肝炎肝损伤检测中的初步应用[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(10):4333-4337.

