

• 医学与免疫生物技术 •

## 胞外亲环素 A 对炎症发生的影响及其抗体在抑制炎症反应中的作用

李文博<sup>1,2</sup>, 刘薇<sup>1,2</sup>, 陈璨<sup>1,2</sup>, 范文辉<sup>1</sup>, 张鹤<sup>1</sup>, 刘文军<sup>1,2</sup>, 孙蕾<sup>1,2</sup>

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

李文博, 刘薇, 陈璨, 等. 胞外亲环素 A 对炎症发生的影响及其抗体在抑制炎症反应中的作用. 生物工程学报, 2018, 34(1): 90-101.

Li WB, Liu W, Chen C, et al. Effect of extracellular cyclophilin A on inflammatory response and anti-inflammatory activity of antibody against cyclophilin A. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 90-101.

**摘 要:** 亲环素 A (Cyclophilin A, CypA) 是肽基脯氨酰顺/反异构酶家族成员, 主要分布于细胞质中, 当细胞受到外界刺激时会分泌到细胞间隙, 与 CD147 以配体-受体形式结合, 促进炎症细胞的趋化。利用大肠杆菌 BL21 表达并纯化 CypA 蛋白, 利用该蛋白刺激小鼠的骨髓来源巨噬细胞 (BMDM)。实时荧光定量 PCR 和 ELISA 试验结果发现, BMDM 分泌的 IL-1 $\beta$  等炎症因子的表达水平均显著上调, 表明胞外 CypA 具有促进炎症发生的作用。同时以 CypA 蛋白为免疫原制备多克隆抗体, 用于 LPS 诱导的小鼠急性肺炎的治疗试验。与未治疗组相比, anti-CypA 抗体治疗组小鼠的肺组织表面出血点较少, 损伤程度减轻, 肺组织和血液中 IL-1 $\beta$  的表达量显著下降, 表明 anti-CypA 抗体对 LPS 诱导的炎症具有一定的治疗效果。本研究以胞外 CypA-CD147 的相互作用为靶点, 利用 anti-CypA 抗体抑制炎症反应, 为开发抗炎症药物提供了一种新的思路和策略。

**关键词:** 亲环素 A, 炎症, 抗体治疗

**Received:** March 13, 2017; **Accepted:** June 5, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31472178, 31672531), Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSZD-EW-Z-005-001), National Key Technology Support Program (No. 2015BAD11B02).

**Corresponding authors:** Lei Sun. Tel: +86-10-64807503; E-mail: sunlei362@im.ac.cn

Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; E-mail: liuwj@im.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31472178, 36172531), 中国科学院重点研究计划 (No. KSZD-EW-Z-005-001), 国家科技支撑计划 (No. 2015BAD11B02) 资助。

网络出版时间: 2017-07-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170705.0957.001.html>

# Effect of extracellular cyclophilin A on inflammatory response and anti-inflammatory activity of antibody against cyclophilin A

Wenbo Li<sup>1,2</sup>, Wei Liu<sup>1,2</sup>, Can Chen<sup>1,2</sup>, Wenhui Fan<sup>1</sup>, He Zhang<sup>1</sup>, Wenjun Liu<sup>1,2</sup>, and Lei Sun<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Cyclophilin A (CypA) is a member of peptidyl prolyl isomerases (PPIase) family. CypA is best known as a ubiquitously distributed intracellular protein. It has also been shown to be secreted by cells in response to inflammatory stimuli and oxidative stress. Extracellular CypA (eCypA) interacts with CD147 to initiate inflammatory responses via recruiting leucocytes into inflamed tissue. Recombinant CypA was expressed in *Escherichia coli* and then purified using Superdex 75<sup>TM</sup> 16/60. The results of Real-time PCR and ELISA showed that the expression levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , secreted by eCypA stimulated BMDM were significantly up-regulated, indicating that eCypA played an important role in promoting inflammatory responses. In addition, anti-CypA antibody was prepared using purified CypA protein for therapeutic evaluation in a mouse model of LPS-induced acute lung inflammation. Antibody-treated mice showed reduced lung injury and the expression levels of IL-1 $\beta$  in the lung tissue and blood were decreased significantly, indicating that anti-CypA antibody exerted a potent anti-inflammatory activity. Our findings provide a potential therapeutic antibody for inflammation-mediated diseases.

**Keywords:** cyclophilin A, inflammation, therapeutic antibody

亲环素 A (Cyclophilin A, CypA) 具有肽基脯氨酰顺/反异构酶 (PPIase) 活性, 是一种在生物界广泛存在、高度保守的蛋白质<sup>[1]</sup>。细胞在静息状态时, CypA 主要分布在细胞质中, 只有当受到活性氧等外界刺激或发生炎症反应时才会分泌到细胞外<sup>[2-3]</sup>。胞外 CypA (eCypA) 表现出促炎活性和趋化活性, 在炎症发生的过程中发挥着重要作用。例如, 脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 刺激的巨噬细胞分泌大量的 eCypA, 参与宿主的炎症反应<sup>[3]</sup>; 在类风湿关节炎<sup>[4-5]</sup>、败血症<sup>[6]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[7]</sup>、莱姆病<sup>[8]</sup>等炎症相关疾病的发生过程中, eCypA 表达量明显上升。

近年来研究发现, eCypA 可以调节细胞膜上细胞外基质金属蛋白酶诱导子 (Extracellular matrix metalloproteinase inducer, emmprin, CD147) 的表达水平<sup>[9]</sup>, 并与 CD147 以配体-受体形式结合, 参与单核细胞、中性粒细胞、T 淋巴细胞的

趋化, 诱导炎症反应中的白细胞渗入病变组织。CD147 是一种高度糖基化的跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族成员, 可以与多种蛋白相互作用, 促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[10]</sup>, 参与调节生殖与视觉功能以及发育早期神经系统功能等<sup>[11]</sup>, 同时也参与多种疾病发生发展的病理过程。

目前, 以 eCypA 或 CD147 为靶点, 利用免疫抑制剂 Cyclosporin A (CsA) 和 FK-506、anti-CD147 抗体、CD147 拮抗肽或者 RNA 干扰技术等抑制 eCypA-CD147 相互作用, 均可在体内或体外实验中显示出很好的治疗效果, 一定程度上延缓疾病的发展<sup>[12]</sup>, 这充分揭示了这一药物设计靶点的应用前景。在 LPS 诱导的小鼠急性肺炎模型中, 经 anti-CD147 抗体或 CsA 处理后, 小鼠支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞渗出比例下降到 50%, 减轻病变组织的炎症反应。而联合使用 anti-CD147 抗体和 CsA 两种药物与单独使用其中

一种相比治疗效果差别不大,表明 anti-CD147 抗体和 CsA 都是针对 eCypA-CD147 复合物起作用<sup>[13]</sup>。此外,干扰 eCypA-CD147 的相互作用也可减少急性过敏性哮喘中嗜酸性细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞 Th2 细胞因子的产生<sup>[14]</sup>。然而,上述药物或抗体在使用过程中不仅会阻断 eCypA-CD147 的结合,还有可能产生一些副作用。例如,针对 PPIase 活性的免疫抑制剂 CsA 和 FK-506 的特异性较差,可同样作用于除 CypA 之外的其他亲环素家族成员(例如 CypB)<sup>[1]</sup>,而且会引起机体的免疫抑制;anti-CD147 抗体封闭 CD147 使其失活的同时可能会导致 CD147 其他的正常生理功能受到影响。

由于 anti-CypA 抗体只在细胞外针对 eCypA 发挥作用,不会影响细胞内 CypA 的正常功能,因此,anti-CypA 抗体作为一种抗炎症药物,用于阻断 eCypA-CD147 相互作用并治疗炎症的可行性远远高于其他药物,将极大地增强药物的特异性并减少副作用的产生。已有研究将抗华支睾吸虫亲环素 A 抗体用于小鼠脓毒血症的治疗,发现其可以通过减轻炎症反应、抑制弥散性血管内凝血保护内皮细胞等多方面发挥保护作用,从而降低死亡率<sup>[15]</sup>。而本研究利用 LPS 诱导的炎症反应和小鼠急性肺炎模型证明了 eCypA 促进炎症发生的作用,并进一步探讨了能够特异性阻断 eCypA-CD147 相互作用的人 anti-CypA 抗体在抑制小鼠急性肺炎中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;新西兰白兔由中国科学院遗传与发育生物学研究所动物实验中心饲养及免疫。

### 1.2 质粒、菌株及细胞株

表达人 CypA 的重组质粒 pET-30a-CypA、用

于联合免疫的质粒 pcDNA3.0-CypA 由本实验室构建并保存;大肠杆菌 TOP10、BL21 (DE3)由本实验室保存;小鼠骨髓衍生的巨噬细胞(Bone marrow-derived macrophage, BMDM)取自 C57BL/6 小鼠股骨骨髓,原代培养经巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)诱导后使用。

### 1.3 主要试剂及仪器

$\alpha$ -糜蛋白酶、N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide 四肽底物、脂多糖、LPS、弗氏完全佐剂购自 Sigma 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;AMV 反转录酶、RNase 抑制剂购自 Promega 公司;兔白细胞介素 (IL-1 $\beta$ ) 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司;ROX Reference Dye II、SYBR Premix DimerEraser 购自 TaKaRa 公司;ToxinEraser<sup>TM</sup> 内毒素去除试剂盒、ToxinSensor<sup>TM</sup> Chromogenic LAL 内毒素检测试剂盒购自金斯瑞生物科技有限公司;Quantikine ELISA Mouse IL-1 $\beta$  试剂盒购自 R&D 公司;Superdex 75<sup>TM</sup> 16/60 及 HiTrap Protein G HP 柱购自 GE Healthcare 并使用其 AKTA FPLC 蛋白纯化系统;紫外分光光度计 Spectrophotometer ND-1000 为 NanoDrop 公司产品;TECAN infinite M200 PRO 酶标仪购自瑞士 Sunrise 公司;7500 实时定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司(Applied Biosystems);实验中所用盐酸胍、醋酸、辛酸、硫酸铵、葡萄糖、柠檬酸钠、柠檬酸、乙醇、二甲苯、冰醋酸等试剂均为国产分析纯。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.4 CypA 蛋白表达、纯化及稳定性检测

将 pET-30a-CypA 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 37 °C 平板倒置培养过夜。挑取单菌落接入含 1% 卡那霉素的 LB 液体培养基中,振荡培养 6 h 后 1:100 接入 2 L 1% 卡那霉素的 LB 液体

培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至菌液  $OD_{600}$  在 0.6–0.8 之间, 留取少量诱导前全菌作为对照, 在剩余培养液中 1:2 000 加入异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 37 °C、200 r/min 诱导 4 h。500 r/min 离心 15 min 收集菌体, 取诱导前后菌体破碎并收集沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 鉴定目的蛋白的表达。包涵体经洗涤后使用 6 mol/L 盐酸胍变性, 12 000 r/min 离心取上清, 所得产物复性换液至含 20 mmol/L Tris、20 mmol/L NaCl 的缓冲液中。利用 Superdex 75<sup>TM</sup> 16/60 分子筛纯化, 收集产物进行 SDS-PAGE 分析以确定目的蛋白, 使用 Bicinchoninic acid (BCA) 法测定蛋白含量。

将纯化 CypA 蛋白分别置于 37 °C 培养箱中 3、6、12、24、36、48、72 h 后取样进行 SDS-PAGE 分析, 观察其降解情况。

## 1.5 纯化 CypA 蛋白 PPIase 活性检测及内毒素含量检测

### 1.5.1 纯化蛋白 PPIase 活性检测

采用 Fischer 等<sup>[16]</sup>建立的糜蛋白酶偶联法, 略为改进, 建立 2 mL 反应体系, 包含 10  $\mu$ mol/L  $\alpha$ -糜蛋白酶, 78  $\mu$ mol/L N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide 四肽底物 (溶于含 0.47 mol/L LiCl 的三氟乙醇中), 10 nmol/L 纯化 CypA 蛋白。取 1 860  $\mu$ L 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 与 100  $\mu$ L 200  $\mu$ mol/L  $\alpha$ -糜蛋白酶溶液, 混合后在 0 °C 下预平衡 10 min 以达到热平衡。加入纯化所得的 1  $\mu$ mol/L CypA 蛋白 20  $\mu$ L, 5 min 后加入 20  $\mu$ L 的 7.8 mmol/L 四肽底物 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide, 迅速混合引发反应。用分光光度计记录 390 nm 处  $OD$  值在 60 s 内的变化, 以含 20 mmol/L Tris、20 mmol/L NaCl 的缓冲液为对照, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 为空白, 整个实验过程温度需控制在 0 °C。

### 1.5.2 纯化蛋白内毒素去除及残余量测定

使用以修饰过的粘菌素 B (PMB) 为配体制成的内毒素去除树脂装填柱子, 纯化蛋白经 0.22  $\mu$ m 膜过滤除菌后上样, 经洗脱去除内毒素后收集淋洗液, 使用 ToxinSensor<sup>TM</sup> Chromogenic LAL 内毒素检测试剂盒测定内毒素含量。

## 1.6 anti-CypA 多克隆抗体制备及纯化

### 1.6.1 动物免疫

新西兰白兔正常饲养至体重为 2 000–2 500 g, 观察 7–10 d, 身体状态无异常备用。第一次免疫 (1 d) 取质粒 pcDNA3.0-CypA 0.5 mg 和纯化 CypA 蛋白 1 mg 与等体积弗氏完全佐剂 (Sigma 公司) 乳化至混合物在水中不扩散, 家兔背部皮下 6–8 点、双后脚皮下注射以联合免疫。第二次免疫 (22 d) 和第三次免疫 (36 d) 均使用 0.5 mg 纯化蛋白和等体积弗氏不完全佐剂乳化至混合物在水中不扩散, 家兔背部皮下 4–6 点免疫。检测血清效价, 使用 1 mg 纯化蛋白加强免疫一次 (50 d)。10 d 后, 家兔颈动脉放血至死亡, 取全血大约 100 mL 置于 4 °C 冰箱过夜, 离心分血清约 40 mL, 分装后 –80 °C 保存备用。

### 1.6.2 多克隆抗体纯化

血清离心取上清, 用 4 倍体积 60 mmol/L 醋酸缓冲液稀释, 调至 pH 4.5。1:40 加入辛酸, 室温搅拌 30 min, 4 °C 静置 2 h 以上。离心收集上清, 加入 1/10 体积的 10 $\times$ PBS, 调至 pH 7.4, 在 4 °C 条件下, 以 0.277 g/mL 加入硫酸铵, 搅拌 30 min, 静置过夜。离心收集沉淀, 溶于 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 中, 使用 HiTrap Protein G HP 亲和层析, 以 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 上样冲洗, 0.1 mol/L Gly-HCl (pH 2.7) 洗脱。收集纯化抗体, 透析换液至 PBS 中, BCA 法测定含量。

### 1.6.3 Western blotting 鉴定抗体的有效性

制备小鼠 BMDM 细胞, 加入 M-CSF 诱导,

于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养至细胞分化贴壁, 用细胞裂解液 (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes), 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂) 收取细胞, 4 °C 裂解 30 min, 12 000 r/min 离心取上清, 加入 5×上样缓冲液, 95 °C 处理样品 10 min。同时, 取菌体超声破碎后离心分离得到的包涵体, 初步洗涤后于少量 PBS 中加入 5×上样缓冲液, 经上述处理后与细胞裂解液一同进行 SDS-PAGE, 将蛋白转移至 PVDF 膜 (15 V, 25 min)。用含 1% BSA 和 5% 脱脂奶的 TBST 封闭过夜, 使用纯化后抗体以 1 : 20 000 作为一抗, 以鼠单抗  $\beta$ -tubulin (1 : 2 000) 为内参, 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。二抗为羊抗兔和羊抗鼠, 1 : 5 000 稀释, 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 使用底物显色试剂盒曝光显影。

## 1.7 eCypA 对小鼠 BMDM 中炎症因子表达水平的影响

### 1.7.1 细胞培养及处理

将在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中原代培养经 M-CSF 诱导分化的 BMDM 使用细胞刮刀刮下, 吹打混匀后计数, 稀释至  $1 \times 10^6$ /mL 后接入 12 孔培养板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 过夜培养至细胞贴壁。换为无血清 DMEM 培养基, 加入不同剂量 eCypA 刺激其炎症因子产生。

### 1.7.2 BMDM 中炎症因子表达水平检测

移去细胞培养基, 使用 Trizol 提取 RNA, 以 oligo(dT<sub>18</sub>) 作为引物, AMV 反转录酶 (Promega 公司) 经反转录反应获得 cDNA, 反应体系包括 12  $\mu$ L RNA、4  $\mu$ L oligo (dT<sub>18</sub>)、16  $\mu$ L 2.5 mmol/L dNTPs、1  $\mu$ L AMV 反转录酶、10  $\mu$ L 5×AMV 缓冲液、1  $\mu$ L RNase 抑制剂, 加双蒸水补充至 50  $\mu$ L。使用实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  的表达水平, 反应体系包括 2  $\mu$ L cDNA、0.2  $\mu$ mol/L 引物、0.4  $\mu$ L ROX Reference

Dye II、10  $\mu$ L SYBR Premix DimerEraser (TaKaRa), 加入双蒸水补足到 20  $\mu$ L。使用 7500 实时定量 PCR 仪进行 qPCR 反应, Ct 值反应程序为第一步 95 °C 30 s, 第二步共 40 个循环, 包括 95 °C 5 s, 60 °C 31 s。每个样品重复 3 次, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参, 利用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算其相对表达量。

用细胞裂解液收取细胞, SDS-PAGE 后将蛋白转移至 PVDF 膜, 封闭过夜, 一抗为兔多抗 IL-1 $\beta$  (1 : 2 000), 二抗为羊抗兔 (1 : 5 000), 以鼠单抗  $\beta$ -tubulin (1 : 2 000) 为内参, 利用 Western blotting 检测 IL-1 $\beta$  表达水平, 具体方式同 1.6.3。

### 1.7.3 BMDM 上清中 IL-1 $\beta$ 表达量检测

收集每组细胞上清液, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定各组细胞上清中炎症因子 IL-1 $\beta$  的含量。测定方法按 Quantikine ELISA Mouse IL-1 $\beta$  试剂盒说明书进行, 每组设 3 个重复, 于 490 nm 处读取 OD 值, 绘制标准曲线并得出蛋白含量。

## 1.8 anti-CypA 抗体对 LPS 诱导的小鼠急性肺炎治疗效果评价

### 1.8.1 实验动物分组及 LPS 诱导急性肺炎模型建立

取 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠随机分为空白组 (PBS)、未治疗组 (LPS)、治疗组 (LPS+anti-CypA) 3 组, 每组 5 只。空白组每只小鼠经鼻腔滴注 50  $\mu$ L PBS, 未治疗组和治疗组小鼠经乙醚麻醉后, 每只小鼠经鼻腔滴注 3  $\mu$ g LPS (溶于 50  $\mu$ L PBS)。

### 1.8.2 治疗组 anti-CypA 抗体给药

取 anti-CypA 抗体 200  $\mu$ g 溶于 300  $\mu$ L PBS 中, 于 LPS 诱导 24 h 前腹腔注射给药一次, LPS 诱导后随即再给药一次, 共计两次。

### 1.8.3 血液和肺组织中 IL-1 $\beta$ 表达水平检测

末次给药 18 h 后小鼠眼球取血, 1 : 1 加入阿氏液 (Alsever's solution) 中, 使用 Trizol 提取 RNA。同时取小鼠肺脏, 称重后加入 Trizol 研磨, 3 000 r/min

离心 5 min 去除沉淀后依照说明书操作提取 RNA。经 RT-PCR 后利用实时定量 PCR 仪进行 qPCR 反应, 以 GAPDH 为内参, 利用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算 IL-1 $\beta$  相对表达量, 实验方法及体系同 1.7.2。

#### 1.8.4 肺指数检测及病理切片制作

记录小鼠体重和肺重量, 利用公式 (肺指数=肺重/体重 $\times$ 100) 计算肺指数。拍照记录小鼠肺表面形态, 并沿支气管向肺叶中充入 10% 甲醛。分离肺叶于 10% 甲醛中固定 48 h, 经脱水透明后包埋于石蜡中以制作病理切片, 将切片经 H&E 染色后于镜下观察并记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组 CypA 蛋白的表达和纯化

将 pET-30a-CypA 转化大肠杆菌 BL21 并进行诱导表达, 收集所得菌体经超声破碎后离心, 沉淀洗涤后加入 6 mol/L 盐酸胍变性, SDS-PAGE 检测包涵体中重组 CypA 蛋白的表达情况。如图 1A 所示, 蛋白以包涵体形式表达, 分子量约为 24 kDa, 与预期大小相符。所得变性蛋白复性浓缩后, 利用 Superdex 75<sup>TM</sup> 16/60 层析柱分离目的蛋白, 利用 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。如图 1B 所示, 所得蛋白仅在 24 kDa 存在目的条带, 无其他杂带, 其纯度在 90% 以上。

### 2.2 CypA 蛋白的稳定性检测

将纯化蛋白置于 37 °C 恒温培养箱中, 分别于 3、6、12、24、36、48、72 h 后取样进行 SDS-PAGE, 结果如图 2 所示。CypA 蛋白在 37 °C 24 h 内可保持稳定, 在后续的 CypA 刺激细胞实验中, 作用时间均在 12 h 以内, 排除了由于 CypA 蛋白降解对实验结果的影响。

### 2.3 CypA 蛋白的 PPIase 活性检测

CypA 蛋白具有 PPIase 活性, 可催化含脯氨酸的底物肽从反式到顺式构象的转换。利用糜蛋白酶

偶联法建立 2 mL 反应体系, 记录 60 s 内 390 nm 处 OD 值变化, 以 OD<sub>390</sub> 对 t(s) 作图。由图 3 可见, 与空白对照相比, 加入 CypA 样品的体系中酶反应加快, 表明 2 个 CypA 蛋白样品均具有 PPIase 活性。

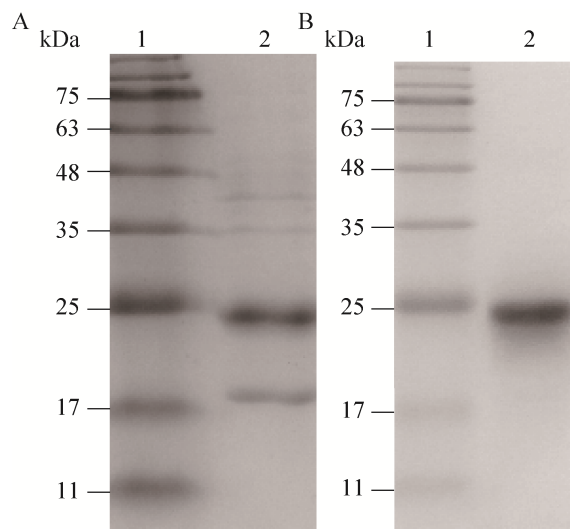


图 1 重组 CypA 蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant CypA. (A) 1: protein molecular weight marker; 2: pellet of the post-induced bacterial lysates from ultrasonic disruption. (B) 1: protein molecular weight marker; 2: purified recombinant protein by molecular sieve.

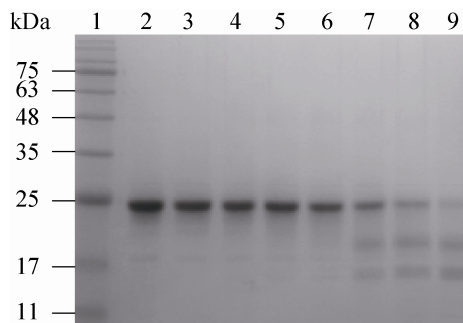


图 2 SDS-PAGE 检测 CypA 蛋白的稳定性

Fig. 2 Determination of CypA stability by SDS-PAGE. 1: protein molecular weight marker; 2-9: protein samples incubated at 37 °C for 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours, respectively.

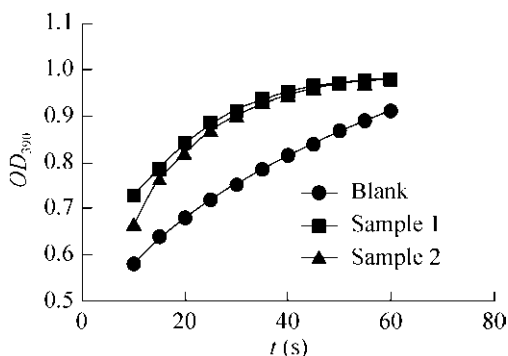


图3 CypA 蛋白的 PPIase 活性检测

Fig. 3 Determination of PPIase activity of CypA.

## 2.4 CypA 蛋白中内毒素的去除

PMB 可与内毒素特异性结合, 以修饰过的 PMB 为配体制成内毒素去除树脂, 可特异性地去除内毒素。将纯化蛋白分 3 次去除内毒素, 其去除效果由鲎试剂验证。鲎试剂与样品内毒素反应过程中产生的凝固酶使特定底物显色, 通过比对其与标准品其释放出的呈色团的多少而测定内毒素含量。所得结果如表 1 所示, 3 份样品内毒素含量均低于 0.000 3 EU/ $\mu$ g, 在细胞实验中可有效避免因内毒素存在而诱发细胞免疫反应。

## 2.5 anti-CypA 抗体的 Western blotting 分析

将兔血清经辛酸-硫酸铵初步纯化后, 利用 HiTrap Protein G HP 柱亲和层析, 获得纯化后抗体。PBS 中透析过夜, 测得含量为 3.3 mg/mL。为了鉴定抗体的有效性, 将纯化后 anti-CypA 抗体 1:20 000 稀释作为一抗, 利用 Western blotting 对 BMDM 的细胞裂解液和表达 CypA 蛋白的大肠杆菌包涵体进行检测。由图 4 可见, anti-CypA 抗体可特异性地识别 BMDM 中约为 18 kDa 的 CypA 蛋白。在针对包涵体的检测中, 虽然可检测到其他非特异性条带, 但在 24 kDa 处条带更为明显, 识别度更高。因此, 我们制备的 anti-CypA 抗体能够有效地识别真核及原核表达系统中表达的 CypA 蛋白。

表 1 CypA 蛋白内毒素含量的测定

Table 1 Determination of endotoxin contamination

Sample	Endotoxin concentration (EU/mL)	Protein concentration ( $\mu$ g/mL)	Endotoxin contamination (EU/ $\mu$ g)
1	0.041 16	143.651 7	0.000 29
2	0.032 44	113.314 6	0.000 29
3	0.044 39	218.932 6	0.000 20

## 2.6 eCypA 对小鼠 BMDM 中炎症因子表达的影响

在 C57BL/6 小鼠 BMDM 中加入 eCypA, 终浓度分别为 0.1、0.5、1、2  $\mu$ mol/L, 9 h 后收集细胞, 利用 qPCR 检测 IL-1 $\beta$  表达量的变化。由图 5A 可见, eCypA 在 0–1  $\mu$ mol/L 范围内随着剂量加大, IL-1 $\beta$  表达量也随之提高, 表明 IL-1 $\beta$  表达量对 eCypA 剂量存在依赖性。但当 eCypA 浓度达到 2  $\mu$ mol/L 时, IL-1 $\beta$  表达量显著下降, 可能与高剂量 eCypA 对细胞产生毒害作用有关。加入 eCypA 12 h 后收集细胞上清, 利用 ELISA 方法检测 BMDM 分泌的 IL-1 $\beta$  的含量。由图 5B 可见,

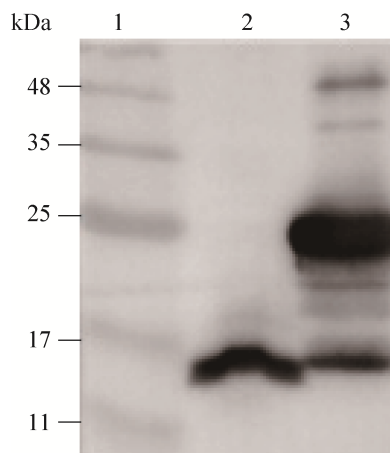


图4 Anti-CypA 抗体有效性鉴定

Fig. 4 Identification of anti-CypA antibody by Western blotting analysis. Lane 1: protein molecular weight marker; Lane 2: CypA protein expressed in BMDM cells; Lane 3: pellet of the post-induced bacterial lysates from ultrasonic disruption.



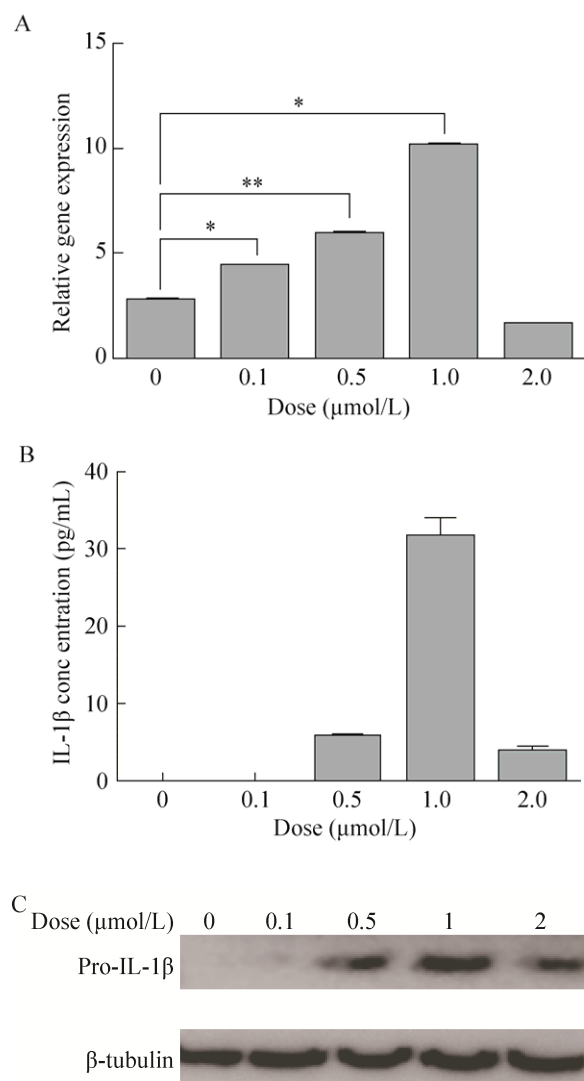


图5 eCypA 剂量对 IL-1 $\beta$  表达水平的影响

Fig. 5 Effect of eCypA's dose on expression level of IL-1 $\beta$ . (A) qPCR analysis of IL-1 $\beta$  expression level in BMDMs stimulated by eCypA with different doses for 9 h. (B) ELISA analysis of IL-1 $\beta$  concentration in supernatant of BMDMs stimulated by eCypA with different doses for 12 h. (C) Western blotting analysis of IL-1 $\beta$  expression level in supernatant of BMDMs stimulated by eCypA with different doses for 12 h.

空白样品和 0.1  $\mu\text{mol/L}$  样品中未能检出 IL-1 $\beta$ , 1  $\mu\text{mol/L}$  样品中 IL-1 $\beta$  含量显著高于 0.5  $\mu\text{mol/L}$  样品。当 eCypA 浓度达到 2  $\mu\text{mol/L}$  时, 上清中

IL-1 $\beta$  的含量显著下降。细胞裂解后利用 Western blotting 方法检测细胞中 pro-IL-1 $\beta$  表达量的变化。由图 5C 可见, 细胞中 pro-IL-1 $\beta$  表达量的变化趋势与图 5B 中细胞分泌的 IL-1 $\beta$  含量的变化趋势一致。

以 1  $\mu\text{mol/L}$  eCypA 刺激 BMDM 细胞, 分别在 3、6、9 h 后收集细胞, 利用 qPCR 方法检测炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  表达水平变化, 结果如图 6 所示。eCypA 可诱导 IL-1 $\beta$  的表达, eCypA 刺激 BMDM 9 h 后, IL-1 $\beta$  的表达量与空白对照相比有极显著的提高 ( $P < 0.001$ ) (图 6A)。IL-6 在 BMDM 中本底表达较低, eCypA 刺激后 IL-6 的表达量上升更为明显, 刺激后 3 h 和 9 h, IL-6 的表达量有显著提高 ( $P < 0.01$ ), 6 h 时差异极显著 ( $P < 0.001$ ) (图 6B)。TNF- $\alpha$  为早期炎症因子, 其表达水平在 eCypA 刺激 3 h 后便迅速达到高峰, 而后随时间下降, 与空白对照相比同样差异显著 ( $P < 0.01$ , 图 6C)。

以上研究结果表明, 小鼠 BMDM 中炎症因子 IL-1 $\beta$  的表达水平对 eCypA 存在一定的剂量依赖性, 当 eCypA 浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  时基因表达水平最高。以 1  $\mu\text{mol/L}$  eCypA 刺激 BMDM 后, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  的表达量与空白对照相比均显著上升。可见, eCypA 能够促进小鼠 BMDM 中炎症相关细胞因子的表达。

## 2.7 anti-CypA 抗体治疗 LPS 诱导的小鼠急性肺炎的效果评价

如图 7A 所示, 空白组肺组织表面无损伤, 光滑, 红润, 无出血点; 未治疗组肺组织表面可见明显出血点, 血管纹路明显; 治疗组肺组织表面虽存在少量出血点, 但较未治疗组相比程度明显减轻。肺指数可在一定程度上指示肺损伤强度, 由图 7B 可见, 未治疗组肺指数显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), LPS 诱导的急性肺炎模型建立成功。治疗组肺指数较未治疗组降低了约 30%, 二者差异显



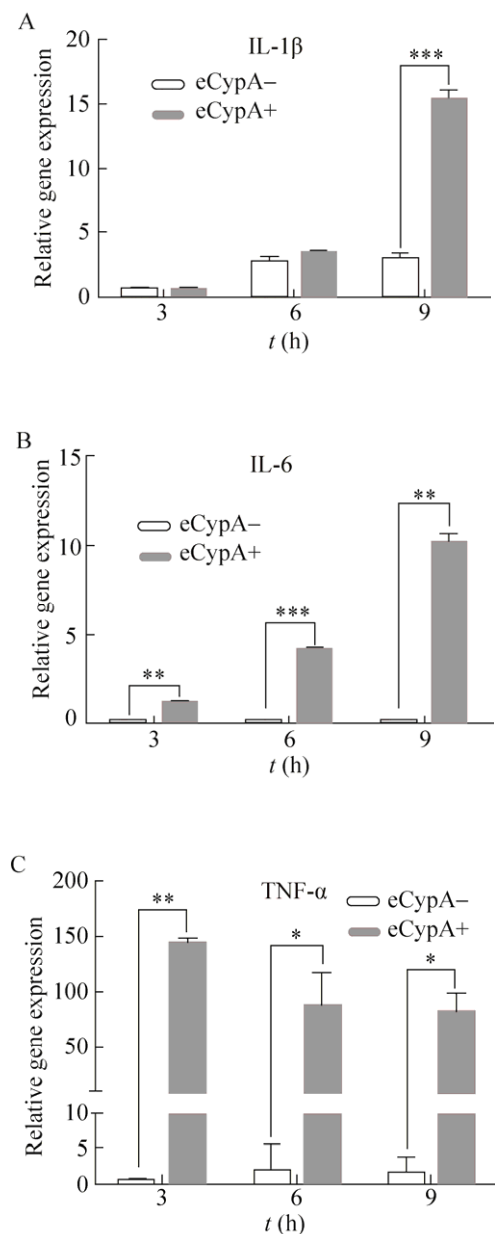


图 6 eCypA 对炎症因子表达水平的影响

Fig. 6 Effect of eCypA on expression levels of inflammatory factors. (A) qPCR analysis of IL-1 $\beta$  expression level in BMDMs stimulated by eCypA for 3, 6, 9 h, respectively. (B) qPCR analysis of IL-6 with the same treatment. (C) qPCR analysis of TNF- $\alpha$  with the same treatment.

著 ( $P < 0.05$ )。肺组织病理切片 H&E 染色结果可见 (图 7C)，空白组无明显损伤，肺泡腔完整，无炎症

细胞分泌浸入，肺泡间隙无炎性细胞浸润，肺泡壁未见明显增厚，纤维结缔组织无增生，组成气管壁的柱状细胞排列规则紧密，气管内无粘液。未治疗组肺组织损伤明显，可观察到大量单核细胞渗入肺泡中，肺泡完整性遭到破坏，可见肺泡内出血，邻近肺泡融合为一体，气管上皮细胞界限模糊，排列不规整，呈现急性炎症表现，其病理形态证实小鼠急性肺炎模型建立成功。治疗组小鼠肺组织同样可观察到白细胞浸润，但程度远不及未治疗组，可观察到少量单核细胞进入肺泡，肺泡有充血但结构完整，边界清晰，气管上皮细胞排列较为紧密，气管中未见粘液。结合肺部病变和肺指数计算结果，可以认为 LPS 诱导的小鼠急性肺炎模型建立成功，并且经过 anti-CypA 抗体的治疗，小鼠肺部炎症程度减轻。

未治疗组小鼠肺组织中 IL-1 $\beta$  显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 7D)，同样表明 LPS 诱导的急性肺炎模型建立成功。经 anti-CypA 抗体治疗后小鼠肺组织中 IL-1 $\beta$  表达量下降约 60%，与未治疗组差异显著 ( $P < 0.01$ )。由于 IL-1 $\beta$  主要存在于血液中，故小鼠血液样本中其表达量变化更为明显。经 anti-CypA 抗体治疗的小鼠血液中 IL-1 $\beta$  低于未治疗组，二者的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ，图 7E)。

以上试验结果表明，经 LPS 诱导的未治疗组小鼠肺表面可见明显出血点，肺指数较空白组显著上升，肺组织及血液中 IL-1 $\beta$  表达水平较空白组显著增高，表明 LPS 诱导的小鼠急性肺炎模型建立成功。经 anti-CypA 抗体两次给药后的治疗组与未治疗组相比，肺表面出血点较少，损伤程度较轻，肺指数下降。其肺组织和血液中 IL-1 $\beta$  表达水平与未治疗组相比下降显著，说明 anti-CypA 抗体在一定程度上阻止了 LPS 对小鼠肺脏损伤，减轻和缓解了 LPS 诱发的炎症反应，具有一定治疗效果。

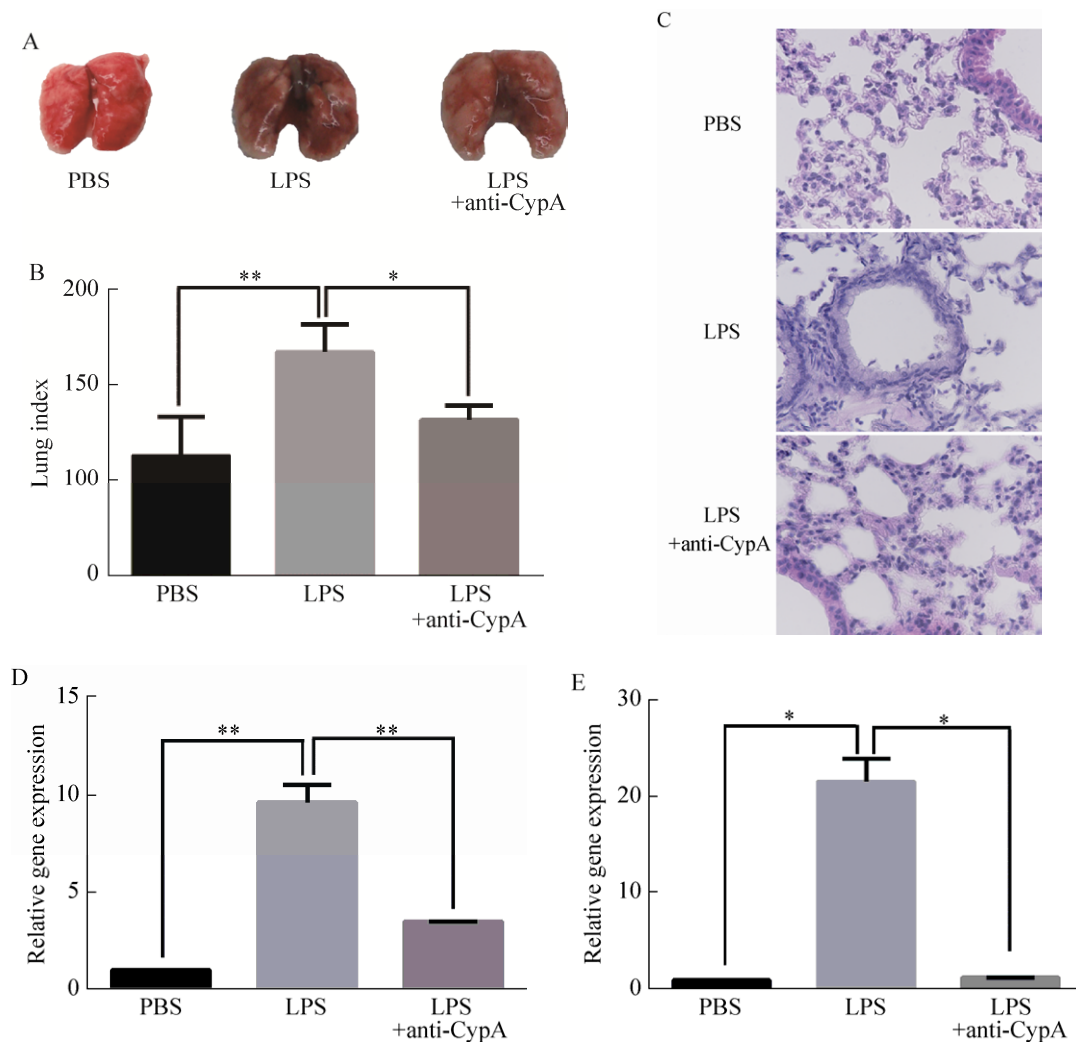


图 7 anti-CypA 抗体对 LPS 诱导小鼠急性肺炎治疗效果的评价

Fig. 7 Therapeutic evaluation of anti-CypA antibody in LPS-induced inflammation. (A) Gross lesion of lungs. (B) Lung index (100 × lung/body weight). (C) Lung tissue was fixed in 10% formalin, sectioned, and stained with H&E for histological analysis. Representative histological sections from the following groups are shown: PBS alone; LPS alone; LPS plus anti-CypA treatment. The magnification was 800×. (D) Relative gene expression of IL-1β in lung tissue. (E) Relative gene expression of IL-1β in peripheral blood.

### 3 讨论

大部分与 CypA 相关的研究认为, CypA 是一种广泛存在的胞内蛋白, 主要在蛋白折叠过程中作为分子伴侣起作用<sup>[17]</sup>, 也有研究表明其在细胞通讯中起着转导作用<sup>[18]</sup>。与此同时, 研究人员发现细胞在受到炎症刺激<sup>[3,19]</sup>或者氧化应激<sup>[2,20]</sup>状态下会分泌 CypA, 活化的血小板同样会分泌

CypA<sup>[7]</sup>。由于 CypA 不具有分泌型蛋白所具有的穿膜信号肽, 其外泌主要是通过小泡途径<sup>[20]</sup>。已有研究表明, 胞外 CypA 与 CD147 以配体-受体形式结合, 在炎症反应中起着重要作用。Suzuki 等<sup>[21]</sup>发现 CD147 胞外结构域中 Pro<sup>180</sup>-Gly<sup>181</sup>位点在 CypA 特异性的信号通路中起关键作用。细胞表面的肝素率先与 eCypA 结合, 将其呈递给 CD147, 使下游 ERK 通路被激活。

IL-1 $\beta$  属于白细胞介素-1 家族,主要通过刺激炎症相关基因的表达来诱导效应蛋白表达,在免疫调节及炎症进程起着重要作用。在使用 eCypA 刺激小鼠 BMDM 细胞后,IL-1 $\beta$  表达量受到影响,随着 eCypA 剂量的增加而上调,并在 1  $\mu$ mol/L 剂量下达到巅峰。在该 eCypA 剂量下,早期炎症因子 TNF $\alpha$  表达水平最先出现上调,IL-6 及 IL-1 $\beta$  随之出现表达量上升的现象。进一步肯定了 eCypA 作为促炎因子在炎症反应中的作用和地位,为以其为靶点的炎症药物设计提供了理论依据。

由于目前与 eCypA 相关的炎症反应研究中,CypA 蛋白主要由原核细胞表达获得,其所含有的 LPS 可能同样会对细胞产生刺激,诱发炎症反应,使实验结果不能清晰表达。因此,我们利用原核表达系统表达纯化出高浓度 CypA 蛋白后,检测其稳定性,并做内毒素去除,检测其残余含量,以避免细胞实验中存在的不确定因素。

特异性地阻断 eCypA-CD147 通路的新颖药物设计思路可以分为针对 eCypA 和针对 CD147 两个部分,这样的药物可同样对其他与 eCypA 或者 CD147 有关的疾病起到作用,如癌症和 HIV 感染<sup>[22-24]</sup>。与以往的利用免疫抑制剂 CsA 和 FK-506、CD147 抗体、CD147 拮抗肽或者 RNA 干扰技术等抑制 eCypA-CD147 相互作用不同,本研究以 eCypA 为靶点,使用特异性 anti-CypA 抗体阻断 eCypA-CD147 的相互作用,从而抑制下游的炎症反应,这也不失为一种药物设计思路。

本研究选用 C57BL/6 小鼠构建 LPS 诱导的急性肺炎模型。LPS 与 TLR4 结合后,主要激活两条信号通路:髓样分化因子 88 (Myeloid differentiation factor 88, MyD 88) 依赖的信号通路和 MyD 88 非依赖的信号通路,促使相关炎症细胞因子的合成及释放,最终导致全身炎症的发生<sup>[25]</sup>。胞外 CypA 与 CD147 以配体-受体形式结合,在炎症反应中起促进作用。CypA 与 CD147

的作用机制可能为:在高尔基体囊泡腔内 Cyp60 作用于 CD147 的 Pro211,促进了 CypA 从高尔基体分泌到细胞外。细胞外的 CypA 与细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖与 CD147 胞外区 Pro180 及跨膜区 Pro211 结合,引起脯氨酸异构化,启动细胞内信号事件<sup>[18]</sup>。然而,细胞内信号通路起始的具体过程和机制,仍需要进一步研究。使用 anti-CypA 抗体特异性地阻断 eCypA 与 CD147 的结合,可以抑制 CD147 下游信号事件启动,干预 eCypA-CD147 介导的炎症反应产生,避免机体炎症反应加剧。

我们成功建立了 LPS 诱导的小鼠急性肺炎模型,使用 anti-CypA 抗体进行治疗后,可以在一定程度上减轻和缓解炎症反应。本研究为促进 anti-CypA 抗体药物的临床应用进行了一次有益的探索,同时也为开发抗炎症药物提供了一种新的思路和策略。

## REFERENCES

- [1] Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, et al. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 1984, 226(4674): 544-547.
- [2] Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*, 2000, 87(9): 789-796.
- [3] Sherry B, Yarlett N, Strupp A, et al. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(8): 3511-3515.
- [4] Wang L, Wang CH, Jia JF, et al. Contribution of cyclophilin A to the regulation of inflammatory processes in rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*, 2010, 30(1): 24-33.
- [5] Billich A, Winkler G, Aschauer H, et al. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 1997, 185(5): 975-980.
- [6] Tegeder I, Schumacher A, John S, et al. Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis. *J Clin Immunol*, 1997, 17(5): 380-386.

- [7] Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*, 2004, 103(6): 2096–2104.
- [8] Kratz A, Harding MW, Craft J, et al. Autoantibodies against cyclophilin in systemic lupus erythematosus and Lyme disease. *Clin Exp Immunol*, 1992, 90(3): 422–427.
- [9] Yurchenko V, Pushkarsky T, Li JH, et al. Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain. *J Biol Chem*, 2005, 280: 17013–17019.
- [10] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*, 1995, 55(2): 434–439.
- [11] Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol*, 2003, 18(3): 981–987.
- [12] Yurchenko V, Constant S, Eisenmesser SC, et al. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol*, 2010, 160(3): 305–317.
- [13] Arora K, Gwinn WM, Bower MA, et al. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol*, 2005, 175(1): 517–522.
- [14] Gwinn WM, Damsker JM, Falahati R, et al. Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J Immunol*, 2006, 177(7): 4870–4879.
- [15] Song TZ, Yang M, Chen JT, et al. Prognosis of sepsis induced by cecal ligation and puncture in mice improved by anti-*Clonorchis sinensis* cyclophilin A antibodies. *Parasites Vectors*, 2015, 8: 502.
- [16] Fischer G, Bang H, Mech C. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta*, 1984, 43(10): 1101–1111 (in German).
- [17] Schiene C, Fischer G. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10(1): 40–45.
- [18] Bukrinsky MI. Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. *Trends Immunol*, 2002, 23(7): 323–325.
- [19] Xu Q, Leiva MC, Fischkoff SA, et al. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem*, 1992, 267(17): 11968–11971.
- [20] Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, et al. Cyclophilin a is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2006, 98(6): 811–817.
- [21] Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, et al. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 22959–22965.
- [22] Pushkarsky T, Yurchenko V, Laborico A, et al. CD147 stimulates HIV-1 infection in a signal-independent fashion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(3): 495–499.
- [23] Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, et al. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(11): 6360–6365.
- [24] Obchoei S, Wongkhan S, Wongkham C, et al. Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer. *Med Sci Monit*, 2009, 15(11): RA221–RA232.
- [25] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145–151.

(本文责编 郝丽芳)