

抗人肺癌单克隆抗体 (3D3) 的研制及其特性鉴定*

颜江华 杨善民 孙亚敏 陈瑞川 郑耘 陈山厦

(厦门大学抗癌研究中心, 厦门 361005)

陈锦辉

(厦门市第一医院病理科, 厦门 361000)

摘要 本文用人肺腺癌组织免疫的BALB/c小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤Sp2/0细胞融合, 获得1株单克隆抗体(McAb 3D3)。Ig类测定为IgG₁型。杂交瘤培养上清液和腹水的效价分别为1:10³~10⁴和1:10⁶。采用间接免疫荧光法(IFA)观察到McAb3D3主要与肺腺癌细胞株A549和L342反应, 与其它组织肿瘤细胞株没有反应。ABC免疫酶染色试验显示McAb3D3主要与肺腺癌组织反应, 与正常肺组织没有反应。

关键词 肺肿瘤; 抗体, 单克隆

近年来, 有关抗人肺癌单克隆抗体研制的报道不少, 但大多数是采用体外培养的肺癌细胞株作免疫原^[1-3]。我们用临床手术切除的人肺癌组织制备抗原, 成功地获得一株抗肺癌单克隆抗体, 命名为McAb 3D3。其初步生物学特性研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 抗原制备和单克隆抗体产生 取一例新鲜的肺腺癌组织标本, 剪除周围的结缔组织和正常肺组织。将癌组织研碎。200目铜网过滤, 离心洗涤后调整细胞数, 制成单细胞悬液。以 2×10^7 个癌细胞直接免疫小鼠或冻存备用。部分肺癌组织按Drewinko等法^[4]提取肺癌组织膜抗原的粗提物。以 2×10^7 个癌细胞悬液腹腔注射首次免疫BALB/c小鼠, 每2周追加1次, 融合前1、2、3 d

各用膜抗原粗提物加强1次。制备脾细胞悬液, 3只小鼠的脾细胞混合在一起并与Sp2/0细胞融合^[5]。以膜抗原粗提物包被微孔板, ELISA法进行初筛, 阳性孔用ABC染色法在甲醇固定的石蜡切片上加以证实。获得一株强阳性杂交瘤, 经有限稀释法3次克隆, 阳性率达100%。扩大培养后, 接种于BALB/c小鼠产生腹水抗体。

1.2 染色体分析 秋水仙碱阻断法^[6]。

1.3 单克隆抗体纯化和鉴定 腹水单克隆抗体用50%硫酸胺粗提, 经DEAE-52层析柱, 聚丙烯酰胺鉴定纯度。

1.4 单克隆抗体Ig类别、亚型分析

ELISA法(Zymed公司试剂盒, 方法按说明书)。

1.5 单克隆抗体效价测定 按常规间接ELISA法进行。

1.6 细胞株特异性鉴定 间接免疫荧光

* 本课题为福建省自然科学基金资助课题

法 (IFA), 所用细胞株来自国内外有关研究室。

1.7 组织特异性初步鉴定 所用组织切片来自本中心病理室及厦门市第一医院病理科。切片按常规脱蜡水化后, 照ABC染色法进行 (Zymed公司试剂盒)。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立 本研究进行2次融合, 共获得38孔杂交瘤。3D3孔经膜抗原粗提物包板ELISA法初筛及抗原片肺腺癌组织切片ABC染色法验证, 确有阳性反应。经3次克隆后阳性率达100%。该株在体外连续传代培养18个月以及冻存后复苏, 仍能稳定分泌抗体。命名为McAb 3D3。镜检100个细胞, 染色体数为87~96, 大多为端着丝点, 少数为亚中部着丝点。

2.2 McAb 3D3 特性鉴定 DEAE-52柱层析后的McAb经聚丙烯酰胺电泳, 考马氏亮蓝色显示为电泳纯制品。ELISA试剂盒Ig亚型分析McAb 3D3为IgG1。杂交瘤细胞培养上清抗体滴度为 $1:10^3 \sim 10^4$; 小鼠腹水抗体滴度为 $1:10^6$ 。

2.3 McAb 3D3 与各种细胞的反应性 阳性反应细胞株显示荧光抗体定位在细胞膜上。

表1 McAb 3D3 与各种细胞的反应性

Tab 1 Reactivity of McAb 3D3 with a variety of cells cultured in vitro

细胞名称	McAb3D3上清	Sp2/0上清
肺巨细胞癌 95D	±	-
肺腺癌 A549	+	-
L342	++	-
SPC-A-1	-	-
胃癌 MGc80-3	-	-
A79-11	-	-
肝癌 BEL-7402	-	-

乳腺癌 McF-7	-	-
仓鼠成纤维细胞 V79	-	-
小鼠成纤维细胞 NIH3T3	-	-
ABO 型混合红细胞	-	-
混合淋巴细胞	-	-

注 - 阴性, ±部分细胞弱阳性, + 阳性, ++ 强阳性。以下同。

2.4 McAb 3D3 组织特异性鉴定 阳性反应组织切片显示 McAb 3D3 相关抗原主要分布在细胞膜上。

表2 ABC染色法测定 McAb 3D3 的组织特异性

Tab 2 Determination of McAb3D3 specificity by ABC staining

组织来源	阳性数/例数	-	+	++
肿瘤组织				
胃癌	0/3	3		
结肠癌	0/3	3		
食管癌	1/5	4	1	
肺癌 鳞癌	0/3	3		
腺癌	5/6	1	2	3
未分化癌	1/3	2	1	
肝癌	0/3	3		
胚胎组织				
胚肺组织	0/2	2		
胚胃组织	0/2	2		
胚大肠组织	0/2	2		
胚小肠组织	0/2	2		
胚肝组织	0/2	2		
正常组织				
肺	0/2	2		
胃	0/2	2		
肝	0/1	1		

3 讨论

本文用手术切除的新鲜肺腺癌组织作为免疫原, 获得了一株持续、稳定分泌的单克隆

抗体——McAb3D3。经初步特异性分析,在筛选的12种细胞中仅与肺癌细胞株有反应,尤以肺腺癌细胞L342和A549反应为强;此外与肺巨细胞癌95D细胞也有反应。但与胃癌细胞株(MGc80-3, A79-11)、乳腺癌细胞株(MCF-7)和肝癌细胞株(BEL-7402)等没有反应,也不与人肺成纤维细胞V79、ABO血型混合红细胞及混合淋巴细胞反应。组织特异性检测结果显示McAb 3D3与正常肺、胃、肝组织及胚肺、胃、大肠小肠、肝组织等没有交叉,对肺腺癌组织有较好的特异性(5/6),但与肺未分化癌及食管癌组织也有部分交叉。初步结果表明McAb 3D3是一个新的抗人肺癌单克隆抗体,其相关抗原特性及导向治疗研究正在进行之中。

参考文献

1 洪锦心,等. 抗人体肺癌单克隆抗体

(HLC₃)的反应性研究. 肿瘤 1986; 6(1):5

2 葛锡锐,等. 抗人肺腺癌细胞株SPC-A-1的单克隆抗体的制备和鉴定. 实验生物学报 1987; 20(3):221-235

3 赖百塘,等. 抗人肺腺癌单克隆抗体的研究. 中华肿瘤杂志 1990; 12(4):284

4 Drewinko B, et al. New monoclonal antibody against colon cancer associated antigen. Cancer Res 1986; 49: 5137

5 Kohler GS and Milstein C. Continuous Cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495

9 鄂征. 组织培养技术. 北京人民出版社 1982; 178

(收稿 1991-12-19)

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody (McAb D) against Human Lung Cancer

Yan Jianghua, Yang Shanmin, Sun Yaping, Chen Ruichuan, Zheng Yun, Chen Xiashan

(Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005)

Chen Jinhui

(Department of Pathology, First Hospital of Xiamen, Xiamen 361000)

Abstract Monoclonal antibody (McAb₃D₃) was prepared by fusing mice myeloma cells SP2/0 with spleen cells from BALB/c mice immunized with membrane antigens from lung adenocarcinoma. The McAb was identified as IgG and its titer in hybridoma supernatants and ascites was shown by ELISA to be 1:10-10 and 1:10, respectively. Indirect immunofluorescence assay (IFA) showed that McAb3D3 reacted mainly with human lung cancer cells, though it did not react with normal human cells. ABC immunoperoxidase stain test demonstrated that McAb 3D3 reacted with pulmonary adenocarcinoma but not with normal human tissues.

Key words human lung cancer; antibody, monoclonal