

· 研究简报 ·

## 用荷瘤裸鼠模型研制抗人肝癌单克隆抗体<sup>①</sup>

颜江华 杨善民 林炳珍 郑耘 苏金华 陈福 陈瑞川

(抗癌研究中心)

1985 年 Watanabe 等报道<sup>[1]</sup>用去胸腺载瘤小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP 2/0 融合获得抗结肠癌单克隆抗体之后,利用荷瘤裸鼠模型成功研制抗人肿瘤单抗的报道<sup>[2]</sup>已相继出现,但所获单抗多为 IgM、IgG 类的单抗得率不高,本工作采用多次手术大部切除瘤块的方法延长荷瘤裸鼠的成活期,获得一株抗人肝癌 IgG 类单抗,其研制过程和结果报道如下。

### 1 材料和方法

**人肝细胞癌移植瘤模型** 人肝癌细胞株 BEL-7402 为陈瑞铭等建立<sup>[3]</sup>,由中科院上海细胞所引进,本中心细胞库保存。动物 BALB/c 裸鼠(SPF 级)6~8 周龄,由本中心裸鼠室供应。BEL-7402 裸鼠模型系本室建立(杨善民等,待发表),瘤组织移植接种于小鼠背侧,2 个月后过大瘤体通过手术大部切除(重复 1~3 次),以延长荷瘤小鼠的成活期。

**细胞融合和筛选** 实验取荷瘤 3 个月左右裸鼠的脾细胞,参考 Kohler 等方法<sup>[4]</sup>进行细胞融合。脾细胞和 SP2/0 的比例约 4:1,在 50%PEG(MW 4000,Merck 公司产品)作用下融合,细胞以每孔  $5 \times 10^4$  个分配于 96 孔板,在 HAT 选择性培养基中培养,7 d 后换用 HT 培养基,20 d 后长出杂交瘤孔的上清,用 ELISA 和 IFA 法初筛,阳性孔细胞经 3 次以上克隆并冻存。

**杂交瘤和瘤细胞株的培养** 实验用瘤细胞株和克隆后杂交瘤养于 15%新生牛血清或 15%胎牛血清 RPMI1640 培养其中,内含 50 mmol 谷氨酰胺、100 IU/ml 的青霉素和链霉素。培养环境:5%CO<sub>2</sub>、37℃和 100%的湿度。

**抗体分类和效价测定** 抗体 Ig 分类按 ELISA 法(Eyemed 公司试剂盒),效价测定按 IFA 法<sup>[5]</sup>,靶细胞为 BEL-7402。

**抗体特异性反应实验** 所用细胞株均为本室引进和保存,细胞接种于盖玻片上培养,长满细胞的玻片经甲醇固定后 IFA 染色(FITC 标记羊抗鼠抗体为 Sigma 公司产品),病理标本来源于本中心病理室,石蜡组织切片经脱蜡水化后染色。

### 2 结 果

**细胞融合和初筛** 共用荷瘤裸鼠脾细胞进行 5 次融合,成功 3 次,共获得阳性孔 44 个,第一次融合裸鼠荷瘤成活期为 45 d,所获 8 个阳性孔均分泌 IgM,第二、三次融合裸鼠荷瘤成活期都在 89 d 以上,共有 6 个阳性孔分泌 IgG 类抗体,经反复筛选和克隆,对一株强阳性反应的杂交瘤 JH<sub>11</sub> 深入研究。

<sup>①</sup> 本文 1992-08-15 收到;福建省卫生厅基金资助项目

杂交瘤 JH<sub>11</sub> 单抗 Ig 亚类鉴定和效价测定。杂交瘤 JH<sub>11</sub> 分泌的单抗命名为 McAbJH<sub>11</sub>，经 3 次以上克隆，在体外培养 9 个月以上，仍能稳定分泌。其单抗 Ig 亚类属于 IgG<sub>3</sub>，杂交瘤细胞培养上清效价为 1:10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>，腹水效价在 1:10<sup>5</sup> 以上。

McAbJH<sub>11</sub> 与各种细胞的免疫反应结果见表 1，McAbJH<sub>11</sub> 与靶细胞 BEL-7402 呈强阳性反应，其抗体标记荧光主要分布在细胞膜上，并形成一荧光圈(图 1)；与正常混合血细胞、胃癌细胞株(MGc-803 和 A<sub>79-11</sub>)和肺腺癌细胞株(L<sub>142</sub> 和 A<sub>549</sub>)等没有交叉。

表 1 IFA 分析 McAbJH<sub>11</sub> 与各种体外培养细胞的反应特性

Tab. 1 Reactivities of McAbJH<sub>11</sub> with a variety of cells cultured in Vitro by IFA

细 胞	McAbJH <sub>11</sub>	McAb <sub>1</sub> D <sub>3</sub> *	SP 2/0 上清
BEL-7402	++	—	—
MGc-803	—	—	—
A <sub>79-11</sub>	—	—	—
L <sub>142</sub>	—	+	—
A <sub>549</sub>	—	—	—
混合血型红细胞	—	—	—
混合血型淋巴细胞	—	—	—

注：—，阴性；++，强阳性；+，抗肿瘤单抗

表 2 IFA 分析 McAbJH<sub>11</sub> 和各种组织的反应特性

Tab. 2 Reactivities of McAbJH<sub>11</sub> with a variety of tissues by IFA

组织	例数	McAbJH <sub>11</sub>	McAb <sub>1</sub> D <sub>3</sub>	SP 2/0 上清
人胚胎组织				
肝	2	0/2*	0/2	0/2
肺	2	0/2	0/2	0/2
结肠	2	0/2	0/2	0/2
小肠	2	0/2	0/2	0/2
胃	2	0/2	0/2	0/2
脾	2	0/2	0/2	0/2
肿瘤组织				
肺腺癌	4	0/4	4/4	0/4
肝细胞癌	2	2/2	0/2	0/2
胃腺癌	3	0/3	0/3	0/3

注：\*，阳性数/实验数

McAbJH<sub>11</sub> 与各种组织的免疫反应如表 2，McAbJH<sub>11</sub> 与肝细胞癌组织呈强阳性反应，不与

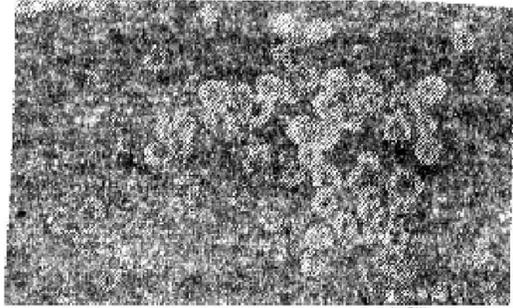


图 1 IFA 显示与 McAbJH<sub>11</sub> 反应阳性的 BEL-7402 细胞 (×400)

Fig. 1 BEL-7402 cells reacted with McAbJH<sub>11</sub> by indirect immunofluorescence assay (×400)

肺腺癌组织和胃腺癌组织反应,也不与胎肝、脾、肺等组织交叉反应。

### 3 讨论

裸鼠是一种良好的实验动物,移植瘤可以在其体内生长并较好地保持肿瘤原有的生物学特性;但裸鼠先天免疫功能缺陷,对多数抗原免疫应答能力很低,尤其是IgG的应答更低。Saati等曾报道用荷瘤裸鼠模型获得的单抗全部为IgM。本文也显示从荷瘤裸鼠模型获得的单抗多为IgM,但延长荷瘤裸鼠的成活期可以增加IgG类单抗的得率。可能肿瘤抗原长期、持续的刺激有助于机体免疫功能重建,增加IgG的应答反应,但确切的机理尚不清楚。多次瘤块大部切除术可以有效地延长荷瘤裸鼠的成活期,通过这种方法,我们成功地获得一株IgG类的抗人肝细胞癌单抗。初步结果显示McAbJH<sub>11</sub>与BEL-7402和肝细胞癌组织有较强的反应性,而不与正常血细胞、胃腺癌细胞株、肺腺癌细胞株和多种人胚胎组织反应;也不与胃腺癌组织和肺腺癌组织反应。表明McAbJH<sub>11</sub>是一株对肝癌有特异性的单抗,其生物学特性研究和临床应用研究有待深入。本文结果再次证实用荷瘤裸鼠模型研制抗肿瘤单抗是一条有效的途径。

### 参 考 文 献

- 1 Watanabe M et al. Tumor localization by human monoclonal antibodies. *JPNJ Cancer Res*, 1985, 2(2): 77~86
- 2 刘全海等. 用载瘤裸鼠研制的单克隆抗体. *生物工程学报*, 1990, 6(4): 341~343
- 3 陈瑞尧等. 人体肝癌体外细胞系 BEL-7402 的建立及其特征. *实验生物学报*, 1978, 11(1): 37~45
- 4 Kohler GS and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495
- 5 徐志凯主编. 实用单克隆抗体技术. 陕西: 陕西科学技术出版社, 1992. 53~55

## Preparation of Monoclonal Antibodies against Hepatocellular Carcinoma with Model of Nude Mice Bearing Tumor Xenograft

Yan Jianghua Yang Shanmin Lin Binzheng Zheng Yun  
Su Jinhua Chen Fu Chen Ruchun  
(Cancer Research Center)

**Abstract** The survival time of the nude mice bearing tumor was prolonged by repeating part-cut of tumor. The spleen cells of the nude mice bearing BEL-7402 xenograft were fused with mouse myeloma cells SP2/0. One hybridomas secreting monoclonal antibody against BEL-7402 cells, McAbJH<sub>11</sub>, was established. McAbJH<sub>11</sub> is IgG<sub>3</sub> type. Its titer of the culture supernatant and ascites was 10<sup>-2</sup>~10<sup>-3</sup> and over 10<sup>-5</sup>, respectively. By the indirect immuno-fluorescence assay, the results showed that McAbJH<sub>11</sub> strongly reacted with BEL-7402 cells, but not with normal blood cells L<sub>342</sub>, MG-803, and sections of human fetal liver, spleen, lung, and so on. Our results proved that the preparation of the monoclonal antibodies with the model of nude mice bearing tumor is an effective method.

**Key words** Monoclonal antibodies, Nude mice, Hepatocellular carcinoma