

用载人肺癌的裸鼠研制的单克隆抗体

刘全海 孟德鸣 冯 怡
张兆鸿 胡士亮 顾春露

(上海医药工业研究院, 上海)

吴存忠 倪灿荣

(上海第二军医大学, 上海)

肿瘤细胞与正常细胞共有大量的强抗原, 而大多数肿瘤相关抗原则相对较弱, 这就给用肿瘤细胞免疫BALB/c小鼠以研制抗肿瘤单克隆抗体(McAb)的工作带来了不少困难。Watanabe等用免疫功能重建的方法获得了抗胃癌的McAb^[1]。Korol Sikora用去胸腺载瘤小鼠的脾细胞融合获得了抗结肠癌的McAb^[2]。我们用载人肺癌LAX的裸鼠进行试验, 经过融合和一系列筛选, 获得了选择性较好的抗肺癌的McAb。它与肺腺癌组织的细胞膜呈阳性反应, 而与正常组织无交叉反应, 免疫球蛋白分类属IgG, 它们的研制过程及其反应性报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 人肺腺癌移植瘤模型 LAX

LAX 为张氏等建立的人肺腺癌裸鼠移植瘤模型^[3], 由中国科学院上海药物研究所引进, 本室传代。动物为NC裸鼠(Nu/Nu, 6—8周龄, 上海肿瘤研究所提供)插块法接种于腋下, 1.5—2.0月肿瘤长大重10g左右, 无菌条件下取脾脏, 分离成单细胞悬液, 进行融合。

(二) 人肺癌细胞株

我们取LAX移植瘤块, 无菌条件下分离, 培养于RPMI 1640培养基中, 补充200mol/L丙酮酸钠, 100mol/L L-谷氨酰胺, 青霉素100μg/ml, 链霉素100μg/ml, 及13%新生牛血清, 于37℃, 5% CO₂培养箱内培养, 至今已传80代(建株情况待报道)。

(三) 人体正常组织和肿瘤组织

人体正常组织来自急死病人或手术标本, 胎

儿组织来自22—26周龄4例水囊引产的胎儿, 胃癌标本均为术前未经用药的手术标本, 所有标本均切成小块, 置于-70℃冰箱中保存。

(四) 融合和筛选

融合基本按Bazin^[4]等的方法, 1×10⁸脾细胞和2.7×10⁷小鼠骨髓瘤细胞株 NSO(Milstein实验室转赠)在PEG(MW4000, Merck公司)的作用下融合, 分配于8块96孔细胞培养板, 在HAT选择性培养基中生长, 18天后, 用ELISA法初筛。

(五) 酶联免疫吸附试验(ELISA)

参照 Brautz^[5]等的方法改进而成, 细胞用机械法剥下或分离, PBS洗三次, 每孔加50—100μl PBS, 含1×10⁵细胞, 37℃孵育过夜干燥, 次日备用, 如为人体组织或含过氧化酶的细胞均按Laudsarp^[6]等方法, 即100%甲醇99ml加33% H₂O₂ 1ml, 每孔加100μl, 室温下孵育10min, PBS洗三次, 以灭活内源性过氧化酶的活性, 防止干扰ELISA的结果。酶标抗体由本室用戊二醛方法标记^[7], 效价通常在1:1000至1:2000。用前通常先与相应的组织或细胞吸附, 以减少交叉反应。

(六) 免疫荧光染色

细胞培养于盖玻片上, 经甲醛固定后染色, 组织经冰冻切片成6μm的薄片, 用免疫荧光法染色^[8]。

(七) 免疫组织化学染色

组织经冰冻切片或石蜡包埋用PAP法, 经辣

本文于1989年4月6日收到。

根过氧化酶^[9]染色,具有相应抗原的细胞被染成棕色,如抗体针对细胞膜上的抗原,则细胞膜被染成棕色,细胞质内基本上无棕色染料沉着。

结 果

(一) 融合和初筛

细胞融合后4天出现克隆,10天后计数,融合成功率为98%,18天后用ELISA方法测试其上清液,对LAX细胞株的反应,结果阳性率为17%。

(二) 筛选和纯化

用ELISA和免疫荧光法进一步筛选以对人肺癌组织和细胞有阳性反应且为抗细胞膜的抗体,而与成人及胎儿的正常组织呈阴性反应为筛选标准,获四株杂交瘤的细胞株,分别命名为ALA-01, 02, 03及04,其中ALA-01效价较高,经三次克隆化后,将 1×10^6 细胞接种入经液体石蜡预先处理过的BALB/c小鼠的腹腔。10—14天后收集腹水,经 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 沉淀,DEAE柱层析,免疫扩散证明已纯化之单克隆抗体。对该四株单抗经免疫扩散试验证明均为IgG₁。

取四株杂交瘤细胞株的腹水,用ELISA法测试其与LAX细胞反应的滴度,均在 10^{-5} 稀释度以上,而ALA-01在 10^{-6} 稀释度以上。

(三) ALA-01-ALA-04 对肿瘤细胞的反应

ELISA法及免疫荧光法检测证明其除对LAX细胞为阳性外,对人低分化肺癌细胞株LuyePa亦为阳性,而对人肝癌细胞株SMMG7721,对人体骨肉瘤细胞株POS、OS及HOS₆,宫颈癌细胞株Hela均为阴性。

(四) 对正常血细胞和骨髓细胞的反应

ELISA测试其与正常人外周血淋巴细胞及A、B、O、AB型血细胞及人的骨髓细胞的反应。结果无交叉反应。

(五) 与成人及胎儿各种正常组织的反应

ELISA法及免疫荧光法测试其与成人的肝、肺、骨、结肠及胎儿的心、肝、脾、肺、肾、胸腺、脑等20种正常组织的反应,结果除ALA-04对皮肤有很弱的阳性外、无交叉反应。

(六) ALA-01 对人体肺癌的反应

ELISA测试6例肺癌均呈阳性反应,对其中4例用免疫荧光法及免疫组化法再复测(1例为中心性肺癌,3例为肺液肺癌),结果肺癌细胞膜有很强的荧光反应。免疫组化法亦显示肺癌细

胞膜被染成棕色,而癌细胞周围的正常组织未被染色,连续切片、分别用HE、免疫荧光和免疫组化法染色,结果,有的HE染色的切片癌细胞呈巢性分布的,用免疫组化和免疫荧光亦显示同样的分布特点。

讨 论

本文结果表明,应用载瘤裸鼠的脾细胞可以获得针对该肿瘤特异性好的McAb。

Saati等已报道用载瘤裸鼠的脾细胞获得了特异性不同的单抗^[10]。他们认为用载有转移倾向的一种肺癌(Burtumor)的裸鼠的脾细胞可以产生特异性较高的McAb,而不具转移倾向的结肠癌和皮肤Merke¹细胞癌则仅能产生特异性很差的McAb,可是本实验所用的人肺癌LAX其转移率极低,但是产生了特异性尚好的McAb,而我们还应用载有非转移性肝癌细胞的裸鼠的脾细胞(另文发表),同样产生了特异性很高的McAb,故我们认为转移与否与能否获得特异性高的McAb并无肯定的联系。

Saati等用载瘤和不载瘤裸鼠的脾细胞所获得的McAb全部为IgM,而我们却获得了IgG₁,也曾测试载瘤裸鼠的血中含有抗该肿瘤的IgG₁抗体。由于裸鼠在胚胎早期胸腺即已退化,所以对许多抗原的初次应答反应,特别是IgG的应答反应是很低的,但是机体的免疫应答反应是很复杂的,而Susumn等也证明裸鼠具有少量的功能性T细胞^[11],因此载瘤裸鼠在肿瘤相关抗原的长期持续刺激下,就有可能产生IgG的应答反应,我们的这些结果与Korul Sikora等^[12]用免疫缺陷小鼠所做的结果是一致的。

我们所获得四株杂交瘤细胞,其分泌的McAb不仅在体外与20余种人体正常组织无交叉反应,而且用¹²⁵I标记的ALA-01在载LAX裸鼠的体内能选择性地集中于肿瘤部位;γ-照相显示了清晰的肿瘤影像(结果另文发表),说明此方法不失为研制抗肿瘤McAb的一种简便、迅速的途径。

我们所获的McAb,无论就其特异性还是抗体的分类均比Saati等所获得的较好,其原因尚待进一步研究,但据我们的经验,载瘤时间较长,瘤块较大,脾脏也较大,这对获得较理想的McAb似乎是必须的。

参 考 文 献

- [1] Watanabe, M. et al.; *JPNJ Cancer Res.*, 76: 43, 1985.
 [2] Sikora, K. et al.; *Med. Oncol. and Tumor Pharmacother*, 3: 5-9, 1986.
 [3] 张素胤等: 中国药理学报, 8(4): 366-369, 1987.
 [4] Bazin, H.: Production of rat monoclonal antibodies with the lou rat non secreting IR 93F myeloma cell. In protides of the Biological Fluids-29th colloquim, edited by H. Peeters, Pergamon Press, pp. 615-618, 1982.
 [5] Brautz, J.A. et al.; *J. of Natl. Cancer Inst.*, 72:841-846, 1984.
 [6] Lansdorp, P.M. et al.; *J. Immuno. Methods*, 39:393-405, 1980.
 [7] Voller, A. et al.; In the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories Inc., 39-40, 1979.
 [8] 许屏: 荧光的免疫荧光染色技术及应用, 上海卫生出版社, 1983.
 [9] Sternberger, L.A.: The unlabelad antibody peroxidaseantiperoxidase(PAP)method Immunocytochemistry Second Edition, 1981.
 [10] Saati, T.A. L. et al.; *Ann. Pathol.*, 7:1-8, 1987.
 [11] Ikehara, S. et al.; *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 81:886-888, 1984.

MONOCLONAL ANTIBODIES FROM NUDE MICE BEARING HUMAN LUNG CANCER XENOGRAFT

Liu Qianhai Meng Deming Feng Yi
 Zhang Zhouhong Hu Shiliang Gu Chunglu
 (Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai)
 Wu Chenzhong Ni Chaiton
 (Second Military Medical College, Shanghai)

Spleen cells of nude mice bearing human lung adenocarcinoma were fused with mouse myeloma cell line NSO. Hybridoma cells grew in 98% of wells of eight cell culture plates. Four monoclonal antibodies, ALA-01, 02, 03 and 04, very strongly reacted with human lung adenocarcinoma cell lines, LAX and Lu apa, but did not cross-react with various human normal tissues and the other kinds of tumor cell lines using ELISA and immunofluorescence stain. These hybridoma cells were able to induce ascites after inoculating the cells into BALB/c mice. Immunodiffusion assay indicated that all of them were IgG₁ types. Immunofluorescence and immunohistochemistry stain against four samples from patients with lung adenocarcinoma showed that ALA-01 could specially bind membrane of the cancer cells.

Key words

Monoclonal antibody against human lung cancer; nude mouse; human lung adenocarcinoma cell line LAX; ELISA