

# 食管癌细胞核仁抗原单克隆抗体的制备 及其特性的初步鉴定

刘乐和<sup>1</sup>, 林汉良<sup>2</sup>, 钟叔平<sup>4</sup>, 刘长秀<sup>1</sup>, 梁惠珍<sup>2</sup>, 徐 劲<sup>1</sup>, 张昌卿<sup>3</sup>, 沈忠英<sup>4</sup>

(中山医科大学 1. 病原生物学部, 广东 广州 510089; 2. 病理教研室;  
3. 肿瘤医院; 4. 汕头大学医学院, 广东 汕头 515041)

**摘要:**【目的】制备抗食管癌细胞核仁抗原单克隆抗体, 用于寻找肿瘤的标志物和癌的病理诊断。【方法】以食管癌组织核基质为抗原, 采用足垫法免疫 Balb/c 小鼠, 运用杂交瘤技术建立分泌特异性单抗的杂交瘤细胞株, 制备食管癌细胞抗原片和食管癌冰冻切片, 采用免疫组化检测并采用蛋白印迹法(Western blotting)分析, 鉴定是否为特异性单克隆抗体。【结果】获得一细胞株(1-7/E)能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 1-7/E 能与食管癌细胞和其他 10 种癌细胞的核仁反应, 不与正常食管上皮细胞核仁反应。Western blotting 分析表明, 1-7/E 与食管癌组织核基质 41 ku 处有一反应带, 与正常食管组织核基质无反应。【结论】1-7/E 可能是对食管癌等多种肿瘤细胞核仁抗原的特异性单克隆抗体, 为深入研究肿瘤细胞核仁抗原的生物学特性及肿瘤病理诊断提供了有效的制剂, 并具开发的潜在价值。

关键词: 食管肿瘤; 细胞核仁; 抗体; 肿瘤; 抗体; 单克隆

中图分类号: R375.1; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0108-05

## The Preparation of Monoclonal Antibody to Nucleolar Antigen of Esophageal Carcinoma and Preliminary Identification of Its Characteristics

LIU Le-he<sup>1</sup>, LIN Han-liang<sup>2</sup>, ZHONG Shu-ping<sup>4</sup>, LIU Zhang-xiu<sup>1</sup>,  
LIANG Hui-zhen<sup>2</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, ZHANG Chang-qing<sup>3</sup>, SHEN Zhong-ying<sup>4</sup>

(1. Department of Parasitology and Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089;  
2. Department of Pathology; 3. Tumor Hospital; 4. Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China)

**Abstract:** 【Objective】 To prepare monoclonal antibody to nucleolar antigen of esophageal carcinoma for searching of the marker substances of neoplasms cell and pathological diagnosis of carcinomas. 【Methods】 Using nuclear matrix of esophageal carcinoma as antigen to immune Balb/c mice by inoculating into pads of the hind feethand, and hybridoma technique, a hybridoma cell line secreting specific monoclonal antibody was established. By Western blotting analysis and immunohistochemistry on smear of esophageal carcinoma cell lines and frozen sections of esophageal carcinoma, to identify specificity of the monoclonal antibody. 【Results】 A hybridoma cell line (1-7/E) stably secreting antibody was created. The 1-7/E antibody reacted positively with nucleoli of esophageal carcinoma and other ten kinds of carcinoma and negatively to nucleoli of normal esophageal epithelium. Western blotting analysis showed that 1-7/E antibody reacted to nuclear matrix of esophageal carcinoma at the site of 41 ku as a reaction band and not to that of normal esophagus. 【Conclusions】 Antibody 1-7/E may be specific to nucleolar antigen of esophageal carcinoma and other carcinomas. The antibody is worthy for further study of biological characteristics of tumor nucleolar antigens and pathological diagnosis of malignancies, and may

收稿日期: 1999-09-30

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(960777)

作者简介: 刘乐和(1931-)男, 江西新余人, 教授, 硕士生导师

be of commercial value.

**Key words:** esophageal neoplasms; cell nucleolus; antibodies, neoplasms; antibodies monoclonal

与肿瘤生长有关的核仁蛋白研究是肿瘤研究的重要组成部分,核仁蛋白成分分析显示,正常核仁的一些蛋白质在癌细胞中不复存在,而癌细胞核仁却出现了一些正常细胞所没有的蛋白质,称为肿瘤核仁抗原(tumor nucleolar antigens,简称TNA),其中只见于人恶性肿瘤细胞者,又称为人恶性肿瘤相关核仁抗原(human malignancy-associated nucleolar antigens,简称HMNA)<sup>[1,2]</sup>。国内外已有关于制备HMNA单克隆抗体(McAb)的报道<sup>[3,4]</sup>,但未见关于食管癌细胞核仁单克隆抗体的报道。本文旨在以食管癌核基质为抗原制备食管癌细胞核仁McAb,为深入研究肿瘤细胞核仁抗原的生物学特性和食管癌发生、发展机理,为食管癌和其他恶性肿瘤的早期病理诊断提供一个潜在应用和开发价值的生物制品。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞与组织

食管癌细胞株(H5E973及EC8712)由汕头大学医学院沈忠英教授提供、人胃腺癌细胞株(MCG803)、人宫颈癌细胞株(Hela)、人胰腺癌细胞株(SW1990)、人肺腺癌细胞株(GLC-82),由中山医科大学动物中心陈系古教授提供。鼻咽癌细胞株(SUNE)由中山医科大学肿瘤研究所汪慧民教授提供,食管癌组织及正常食管组织和其他肿瘤组织由中山医科大学肿瘤医院区深明教授、张昌卿副研究员、中山医科大学第一附属医院郑克立教授、曾金云副教授,汕头大学医学院沈忠英教授提供。

### 1.2 冰冻切片,细胞抗原片

食管癌组织,正常食管组织及其他肿瘤组织冰冻切片由中山医科大学病理教研室和中山医科大学肿瘤医院病理科协助制备。

细胞抗原片制备,将各种肿瘤细胞接种于 $\varphi = 15\%$ 血清1640培养基中, $\varphi = 5\%$ CO<sub>2</sub>温箱培养48~72h,收集细胞,制成细胞抗原片,冷丙酮固定,置于-20℃冰箱保存备用。

### 1.3 试剂

免疫组化检测:LSAB法,DAKO LSAB Kit K681。Ig类型鉴定试剂为Mouse Monoclonal Anti-

body Isotyping Kit。

### 1.4 核基质的制备

食管癌组织核基质和正常食管组织核基质的制备,按参考文献[5]介绍方法进行。

### 1.5 杂交瘤细胞株的建立

1.5.1 动物免疫 取食管癌组织核基质100 $\mu$ g与不完全佐剂均匀混合,给Balb/c小鼠双侧足垫免疫注射,初次免疫后第12d再取100 $\mu$ g核基质同法注射,加强免疫后第3天取脾窝淋巴结制成细胞悬液,用于融合。

1.5.2 细胞融合及克隆筛选 细胞融合按参考文献[6]介绍方法融合,淋巴细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0-AG14)数之比为4:1,在 $\varphi = 50\%$ PEG 4000 U融合后,用含 $\varphi = 20\%$ 小牛血清RPMI 1640的HAT选择培养基悬浮细胞,将细胞接种到两块96孔细胞培养板,置于 $\varphi = 5\%$ CO<sub>2</sub>培养箱培养,第1~7天隔天换液,一周后改换HT培养基,至杂交瘤细胞长至孔底1/5~1/4时,取上清液进行免疫组化检测——LSAB法,按试剂盒说明进行,特异性阳性孔用有限稀释法克隆。

### 1.6 单克隆抗体特性鉴定

1.6.1 单克隆抗体初步提纯 将杂交瘤细胞培养上清,采用中性盐沉淀法,见文献[7]。

1.6.2 单抗特异性鉴定 将初步纯化的单抗作为第一抗体与食管癌、正常食管、其他肿瘤的冰冻切片以及与食管癌细胞和其他癌细胞抗原片进行免疫组化检测。

1.6.3 蛋白印迹法(Western blotting)分析 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)按Laemmli方法进行,分离胶质量浓度为120g/L。

蛋白质印迹(Western blot)<sup>[8]</sup> 食管癌组织核基质和正常食管组织核基质,经SDS-PAGE后用Bio-rad微型转移电泳装置,并按Towbin等方法,将其从凝胶电转印至硝酸纤维素膜。电转印条件:4℃、40V、5h,然后将转印后的硝酸纤维素膜取出,丽春红染色,观察转印效果,随后水洗去丽春红,用 $\varphi = 3\%$ 牛血清白蛋白封闭37℃1h,加初步纯化的单克隆抗体(1:5稀释),4℃孵育过夜,用0.01mol/L磷酸盐缓冲溶液洗3次,每次5min,加HRP-GAM IgG(辣根过氧化物酶标记羊抗鼠免疫

球蛋白G)1:100稀释, 37℃1h, 洗涤同前, 洗涤后显色, 用HRP的底物四氯一萘酚, 5min内完成, 显色满意后, 用蒸馏水冲洗终止反应, 待膜干燥后, 立即拍照。

1.6.4 单抗Ig类或亚类鉴定 按试剂盒内说明逐一加试剂, 观察显色反应。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤细胞株的建立

细胞融合率为85%, 分泌抗体的阳性率为7%, 经用有限稀释法克隆, 最后获得一株能稳定分泌抗体的细胞株(1-7/E)并进行了特异性鉴定。

### 2.2 McAb 1-7/E特异性的初步鉴定

#### 2.2.1 McAb 1-7/E对食管癌细胞的反应性

LSAB法测定McAb在食管癌细胞的定位, 发现McAb定位在食管癌细胞核仁上(图1.1~1.3), 图1可见McAb在食管癌细胞H5E973核仁上有棕色

阳性反应, 核浆、核膜为阴性, 图1.2可见McAb在食管癌组织冰冻切片上癌细胞核仁有棕色阳性反应, 核浆、核膜、胞浆为阴性, 而其他细胞核仁均为阴性; 图1.3可见McAb在正常食管组织冰冻切片上, 上皮细胞核仁、核浆、核膜、胞浆反应均为阴性。

2.2.2 McAb 1-7/E对其他恶性肿瘤细胞的反应性 LSAB法测定McAb在其他恶性肿瘤癌细胞的定位, 发现McAb定位在癌细胞核仁上(图1.4~1.9), 图1.4~1.9可见McAb在多种癌细胞核仁上有棕色阳性反应, 核浆、核膜、胞浆为阴性。其他非癌细胞核和核仁均为阴性。

2.2.3 McAb 1-7/E对几种癌细胞株和几种组织的反应性 LSAB法检测McAb对几种癌细胞株的反应性, 见表1; 对几种组织的反应性, 见表2。平滑肌胞浆呈弱阳性反应, 但核仁呈阴性。

### 2.3 免疫印迹法分析

食管癌核基质, 正常食管粘膜核基质蛋白经SDS-PAGE分离后, 用考马斯亮蓝染色, 可见正常

表1 单抗1-7/E与各种癌细胞的反应(LSAB法)

Table 1 Reactivity of McAb 1-7/E with several kinds of cancer cell lines (by LSAB technique)

Cell lines	Immunohistochemical			
	Nucleoli	Nucleoplasm	Nuclear membrane	Cytoplasm
Eso phageal carcinoma cell line H5E973	+	-	-	-
Eso phageal carcinoma cell line EC8712	+	-	-	-
Gastric carcinoma cell line MCG 803	+	-	-	-
Cervical carcinoma cell line HeLa	+	-	-	-
Cancer of pancreas cell line SW 1990	+	-	-	-
NPC cell line SUNE	+	-	-	-
HCC cell line Bel-7402	+	-	-	-

表2 单抗1-7/E对几种组织的核仁反应(LSAB法)

Table 2 Nucleolar reactivity of McAb 1-7/E with several kinds of tissues (by LSAB technique)

Specimens	No. of cases	Positive/ total	None-cancer cells
Eso phageal squamous carcinoma	5	5/ 5	0/ 5
Human normal esophageal epithelium	5	0/ 5	0/ 5
Nasopharyngeal carcinoma	2	2/ 2	0/ 2
Adenocarcinoma of the stomach	2	2/ 2	0/ 2
Colorectal carcinoma	2	2/ 2	0/ 2
Hepatocellular carcinoma	2	2/ 2	0/ 2
Squamous carcinoma of the lung	2	2/ 2	0/ 2
Mammary cancer	1	1/ 1	0/ 1
Carcinoma of ovary	1	1/ 1	0/ 1
Adenocarcinoma of endometrium	1	1/ 1	0/ 1
Carcinoma of urinary bladder	2	2/ 2	0/ 2
Hysteromyoma	1	0/ 1	0/ 1

食管组与食管癌组条带有部分差异,与标准蛋白 Marker 相对照,可见在 40~50 ku 条带处差异明显(图 2),在食管癌蛋白组 41 ku 处可见一着色条带,而正常食管蛋白对照组未见此条带(图 3)。

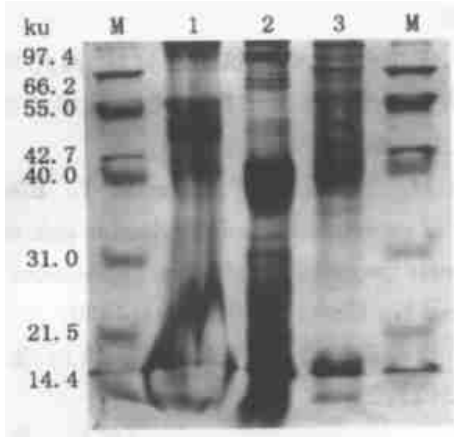


图2 核基质蛋白 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳  
Fig.2 SDS PAGE of nuclear matrix proteins

M. Marker protein; Lane 1. Nuclear matrix of normal esophageal mucosa; Lane 2, 3. Nuclear matrix of esophageal carcinoma

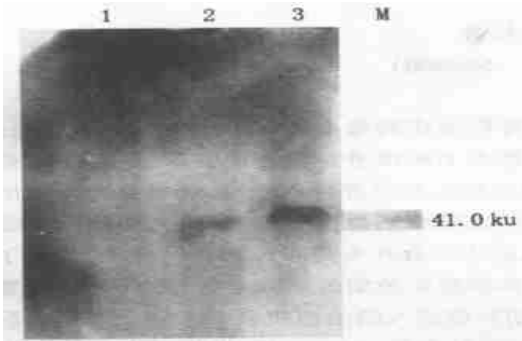


图3 McAb 1-7/E 免疫印迹

Fig.3 Pattern of western blot analysis detection with McAb 1-7/E

M. Marker protein; Lane 1. Nuclear matrix of normal esophageal mucosa; Lane 2, 3. Nuclear matrix of esophageal carcinoma

## 2.4 Ig 类或亚类鉴定

显色反应表明该株单抗重链为 IgM 轻链为 K 链,结果见图 4。

## 3 讨论

核基质又名核骨架,是细胞核内一种动态亚组结构,在形态上为一种不溶的骨架网络,包括核纤层(lamina),内层蛋白纤维颗粒,残留的核仁和核

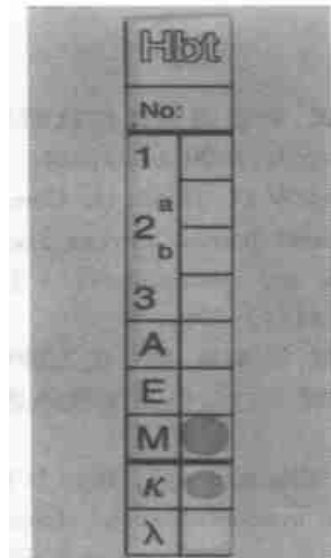


图4 1-7/E Ig 类型

Fig.4 Classification of monoclonal antibody 1-7/E

孔复合体<sup>[9]</sup>。本研究按传统的核基质提取方法,但避免了核酶的使用以免对免疫效果产生影响,以食管癌核基质为抗原足垫法免疫,获得抗食管癌细胞核仁抗原的单克隆抗体,这种结果尚未见报道。

根据免疫组化检测的结果,本研究所获得 1-7/E,能与所检人食管癌和其他 10 种癌细胞核仁起反应而不与正常食管组织及其他细胞核仁起反应,结果表明 1-7/E 所识别的抗原物质与 HMNA 定义的要求是基本相符的。所以 1-7/E 是抗人肿瘤细胞相关核仁抗原的单克隆抗体,具有重要潜在的应用价值。在临床肿瘤诊断中,应用 1-7/E 检测 HMNA 存在与否,能否有助于对恶性肿瘤的判断;在肿瘤患者治疗前后,应用 1-7/E 检测 HMNA 阳性细胞比率的变化,对治疗的效果及预测复发是否有参考价值,值得深入研究。应用 1-7/E 纯化人肿瘤细胞核仁抗原对开展肿瘤细胞核仁抗原的细胞生物学功能研究具有重要意义。蛋白印迹法分析表明 1-7/E 所识别癌细胞核仁抗原为 41 ku(P41)。P41 是否具有较高恶性肿瘤的特异性,是否为重要的肿瘤标志物还需要进一步研究证实。

总之,1-7/E 不论对食管癌的研究还是对其他肿瘤的研究都将具有重要意义和潜在的开发价值。

(本文图 1.1~1.9 见插页 3)

(向在完成本文工作中提供重要实验材料的区深明、郑克立、陈系古、汪慧民教授,曾金云副教授,以及参与部分实验工作的赖小敏副主任、叶玲博士后、黄俊琪硕士和杨国平、方丹云、李彩霞、冯凯涛、侯景辉、李满枝、钟女奇、罗灿峤等技术人员表示衷心的感谢)

## 参考文献:

- [1] 严森荣,程天民. 肿瘤细胞核仁抗原的细胞生物学功能[J]. 免疫学杂志, 1990, 6(4): 281.
- [2] Wu B C, Spohn W H, Busch H. Comparison of nuclear proteins of several human tumors and normal cells by two-dimensional gel electrophoresis [J]. Cancer Research, 1981, 41(1): 336.
- [3] 严森荣,胡川闽,胡福泉,等. 抗人肿瘤相关核仁抗原单克隆抗体的建立[J]. 单克隆抗体通讯, 1992, 8(2): 48.
- [4] Freeman J W, Chatterjee A, Ross B E, *et al.* Epitope distribution and immunochemical characterization of nucleolar phosphoprotein C23 using ten monoclonal antibodies [J]. Molec Cellular Biochem, 1985, 68(1): 87.
- [5] 陈元,汪慧民,张昌卿,等. 抗鼻咽癌细胞 SUNE 核基质单克隆抗体的制备与初步鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11 增刊: 597.
- [6] 刘乐和,罗瑞仙,林梅伦,等. 产生抗登革热 II 型病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立. 免疫学快报, 1983, 3(6): 35.
- [7] 吴宁华,王世中. 单克隆抗体的分离、提纯与鉴定[M]. 见: 顾方舟主编. 淋巴细胞杂交瘤技术的应用. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 20~25.
- [8] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(9): 4350.
- [9] 何明亮. 核基质结合元件的结构特征[J]. 生命的化学, 1995, 15(2): 23.

(编辑 张敏瑞)

## ·新成果·

## 提高肝癌外科治疗的临床实验研究

课题负责人 黄洁夫等

(中山医科大学, 广东广州 510080)

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,手术切除率低,复发率高。针对肝癌外科治疗的难点进行了一系列临床实验研究:①改良无血切肝术:进行无血切肝术的动物实验研究,对传统的无血切肝术作技术上的改进并应用于临床,提高了中央型肝癌的手术切除率和术中的安全性。②肝静脉阻断后的循环机制的研究:在国内外首先对肝静脉阻断后,肝脏血液回流的代偿进行动物实验及临床研究,改变肝静脉不可结扎的旧观念,为中央型肝癌的外科处理原则奠定了基础,提高切除率。③手术模式的改进:提出以下规则肝切除代替规则性肝切除术,更多保留正常肝组织,适应于合并有严重肝硬化的病人,降低了术后肝功能衰竭的合并症,提高术后生存率。④不能切除肝癌的序贯治疗:对肝动脉栓塞后肿瘤的病理学特征,门静脉栓塞术的有效性和安全性都进行动物和临床研究,使不能切除的肝癌变为切除,提高晚期肝癌病人的治愈机会。⑤降低肝癌术后复发率的研究:在国内外首次结合病理学、分子生物学的研究,如肿瘤生物学特性、P53 的表达、PCNA 等,提出了术后复发高危病人的概念和诊断标准,在国内外率先采用肝动脉栓塞化疗对此类病人进行术后 3~4 周辅助治疗,提高疗效,降低复发率,该研究成果已被推广并广泛应用于临床。于 1998 年获国家教育部科技进步二等奖。

(陈丽芳)

## 细胞及分子生物标记物在卫生毒理学应用的研究

课题负责人 张桥等

(中山医科大学卫生学院, 广东广州 510089)

该课题通过对生物标记的研究,使毒理学从细胞及分子水平深入认识中毒的发生机制,与国际上同步开展了 3 大类 24 种生物标记的研究,包括接触标记 2 种,效应标记 17 种和敏感性标记 5 种。工作全部已在人群得到了验证,除个别标记外,在国内均属首次报告。其中部分已获得推广使用,得到了良好的社会效益。是国内公认率先进行生物标记研究并取得优越成果的单位。部分文章发表在国外著名的专业杂志如: Mutation Res, Am J Industr Med 等杂志上。成果于 1999 年获广东省科技进步二等奖。

(陈丽芳)

# 食管癌细胞核仁抗原单克隆抗体的制备及其特性的初步鉴定 (正文见第 108 页)

The Preparation of Monoclonal Antibody to Nucleolar Antigen of Esophageal Carcinoma and Preliminary Identification of Its Characteristics (Text in page 108)

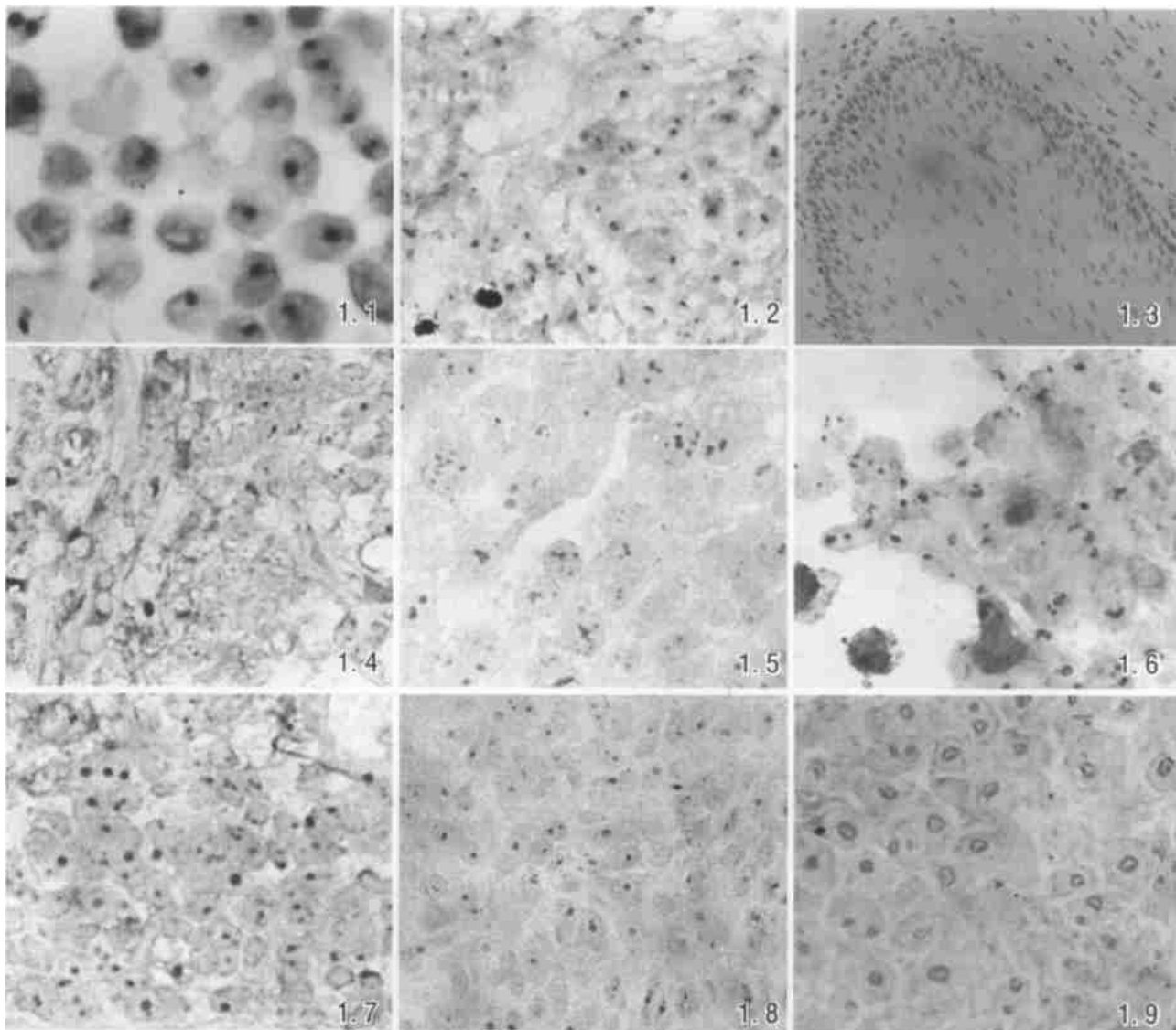


图 1 McAb 1-7/E 在癌细胞的定位

Fig. 1 Reative location of McAb 1-7/E in some carcinoma

- 图 1.1 食管癌细胞(H5E973) × 200    图 1.2 食管癌冰冻切片 × 200    图 1.3 正常食管冰冻切片 × 100  
图 1.4 胃癌冰冻切片 × 200    图 1.5 肝细胞癌冰冻切片 × 200    图 1.6 鼻咽癌细胞株(SUNE) × 200  
图 1.7 鼻咽癌冰冻切片 × 200    图 1.8 肺癌冰冻切片 × 200    图 1.9 子宫内膜腺癌冰冻切片 × 200

- Fig. 1.1 Esophageal carcinoma cell line(H5E973) × 200  
Fig. 1.2 Frozen section of esophageal squamous carcinoms × 200  
Fig. 1.3 Frozen section of human normal esophageal epithelium × 100  
Fig. 1.4 Frozen section of adenocarcinoma of the slomach × 200  
Fig. 1.5 Frozen section of hepatocellular carcinoma × 200  
Fig. 1.6 Nasopharyngeal carcinoma cell lines (SUNE) × 200  
Fig. 1.7 Frozen section of the nasopharyngeal carcinoma  
Fig. 1.8 Frozen section of squamous carcinoma of the lung × 200  
Fig. 1.9 Frozen section of adenocarcinoma of endemetrium × 200