

· 临床研究 ·

抗人胰腺癌单克隆抗体的制备和应用^①

张厚德^② 袁世珍^③

(中山医科大学孙逸仙纪念医院消化疾病研究室, 广州, 510120)

提 要 本文报告应用杂交瘤技术, 制备出鼠抗人胰腺癌单克隆抗体(mAb) YPC₃。ABC免疫组织化学检查结果表明, YPC₃mAb与32例被检胰腺癌组织中的28例(28/32), 87.5%有反应, 而与11例正常胰腺组织全部无反应。YPC₃mAb尚与19种其它肿瘤中的5种(5/19, 26.3%)和17种非肿瘤组织中的5种(5/17, 29.4%)有反应, 但多数反应较弱。YPC₃mAb结合抑制性ELISA法测定137例血清相应抗原含量结果表明, 31例胰腺癌中的17例(17/31, 54.8%)结合抑制率大于65%。其它各组分别为: 良性消化系疾病(2/35, 5.7%)、非胰消化系癌肿(8/40, 20.0%)、正常人(1/31, 3.2%)。对胰腺癌诊断的敏感性、特异性和准确性分别为54.8%、89.6%和81.8%。结果提示YPC₃mAb对胰腺癌的血清学诊断有一定价值, 并可能适用于胰腺癌的导向定位和治疗。

主题词 杂交瘤; 抗体, 单克隆; 胰腺肿瘤; 抗体, 肿瘤

中图分类号 R73-35

胰腺癌是消化道常见的恶性肿瘤, 早期诊断率极低, 是预后最差的恶性肿瘤之一。大量研究表明, 应用抗肿瘤单克隆抗体(mAb)进行免疫诊断和免疫治疗是提高恶性肿瘤早期诊断率和治愈率的有效途径之一。本研究旨在运用杂交瘤技术, 制备具有较高敏感性和特异性的鼠抗人胰腺癌mAb, 并初步进行血清学诊断。

1 材料和方法

1.1 抗人胰腺癌 mAb 研制

mAb的制备基本上参照文献介绍方法进行^[1], 略有变动。过程如下: BALB/c纯系小鼠经人胰腺癌细胞株Capan-2(从美国加州大学医学院引进)裸鼠移植至腹腔免疫后, 取其脾细胞与非分泌性骨髓瘤细胞Sp2/0-Ag14按10:1比例混合, 以分子量为4000的50%聚乙二醇进行融合。以Capan-2细胞作为包被抗原, 取杂交瘤上清液作

ELISA初筛出抗体阳性孔。再用胰腺癌和正常胰腺等组织切片, 取抗体阳性杂交瘤上清作ABC免疫组织化学染色, 比较筛选出目的杂交瘤, 并以有限稀释法克隆化。常规制备腹水型mAb、计算杂交瘤染色体数、鉴定抗体亚类和测定抗体效价。

1.2 免疫组织化学检查

各种组织标本均以10%中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片厚5 μ m。用ABC免疫组织化学染色检测抗人胰腺癌mAb与各种人体肿瘤、正常组织和非肿瘤良性病变的反应性, 确定抗原的组织细胞定位和分布状况。ABC试剂盒为美国Vactastain产品。第1抗体为本室制备的鼠抗人胰腺癌mAb, 第2抗体为Biotin标记的马抗鼠IgG。以骨髓瘤细胞Sp2/0-Ag14培养上清取代第1抗体为阴性对照。显色底物为DAB。结果判断标准如下: 细胞显色部位呈深棕色为强阳性(++), 棕色为中度阳性(+), 浅棕色为弱阳性(+), 细

① 本课题由国家自然科学基金资助

② 第一作者, 1962年出生, 男, 医学博士, 主治医师

③ 导师

胞与背景一致不着色或呈浅黄色为阴性(-)。

1.3 血清抗原测定

采用结合抑制性 ELISA 法测定所制抗人胰腺癌所识别的抗原在血清中的含量,探讨其血清学对胰腺癌的诊断价值。血清标本共 137 份,来自我院外科及消化科确诊病人及血库献血员。其中胰腺癌 31 例、献血员 31 例、非胰腺消化系统癌 40 例(结肠癌 14 例、胃癌 12 例、肝癌 10 例、胆囊癌 4 例)、良性消化系疾病 35 例(肝硬化 7 例、胆石症 9 例、消化性溃疡 6 例、急性胰腺炎 3 例、慢性胰腺炎 10 例)。测定过程如下:选定 Capan-2 细胞作为靶抗原包被。第 1 抗体为本室制备的鼠抗人胰腺癌 mAb 杂交瘤培养上清,用 ELISA 法测定其稀释度,以饱和释度的 50% 为最适工作液浓度。第 2 抗体为过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(上海医科大学产品)。底物为 TMB。将 1:2 稀释的待检血清和第 1 抗体工作液等量混合,4℃ 过夜,混合液(样品)及饱和稀释的第 1 抗体(标准)分别与靶抗原反应,用 ELISA 法测定 OD450nm。结合抑制率(BI)计算式如下:

$$BI = \left(1 - \frac{\text{样品 OD450} - \text{本底 OD450}}{\text{标准 OD450} - \text{本底 OD450}} \right) \times 100\%$$

正常人组 BI 值均数 + 1.96 标准差为阳性阈值,大于该值为阳性病例。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

在 4 次成功的融合实验中,共接种 864 孔,其中有 391 孔出现杂交瘤生长。以 Capan-2 细胞作包被抗原进行 ELISA 法筛选杂交瘤培养上清,共获 49 个抗体阳性孔,占杂交瘤孔数的 12.3%。此抗体阳性杂交瘤再在胰腺癌、正常胰腺、淋巴结、肾脏和肝脏组织各 2 例进行 ABC 免疫组织化学染色比较筛选,凡对非胰腺癌组织反应者,一律剔除。结果共获 3 孔仅对胰腺癌反应的杂交瘤。选

择其中一孔进行深入研究。该孔杂交瘤经 2 次克隆化后,单克隆杂交瘤生长孔抗体阳性率达 100%,强弱一致,ABC 免疫组织化学染色分析保持原特征。命名该株杂交瘤为 YPC₃。杂交瘤 YPC₃ 经体外连续培养 5 个月,生长良好,稳定分泌 mAb。反复冻存复苏至今近 2 年仍保持稳定。染色体计数为 91,而用于融合的骨髓瘤 Sp2/0-Ag14 和 BALB/c 小鼠脾细胞染色体数分别为 73 和 40。结果表明 YPC₃ 符合杂交瘤特征。杂交瘤 YPC₃ 所分泌的 mAb 类型为 IgG₁。ELISA 法测定杂交瘤上清和腹水抗体效价分别为 1:16×10⁴ 和 1:3.20×10⁴。

2.2 YPC₃mAb 与各种人体组织的反应

各种人体肿瘤、正常组织和非肿瘤良性病变的 ABC 免疫组织化学染色结果见表 1 和表 2。

表 1 抗胰腺癌 YPC₃mAb 与人体肿瘤的反应

肿瘤名称	例数 (n)	ABC 染色结果			
		(-)	(+)	(++)	(+++)
胰腺腺癌	32	4	4	16	8
胰岛细胞瘤	2	2	0	0	0
脂神经纤维瘤	1	1	0	0	0
胰腺囊腺瘤	1	0	0	1	0
食道癌	10	10	0	0	0
胃癌	10	5	4	1	0
结肠腺瘤	8	7	1	0	0
结肠癌	10	10	0	0	0
肝癌	6	6	0	0	0
胆囊癌	3	3	0	0	0
甲状腺癌	2	2	0	0	0
涎腺癌	2	2	0	0	0
鼻咽癌	2	2	0	0	0
乳腺癌	5	5	0	0	0
肺癌	5	3	2	0	0
肾癌	1	1	0	0	0
膀胱癌	2	2	0	0	0
卵巢癌	1	0	1	0	0
子宫平滑肌瘤	6	6	0	0	0
子宫平滑肌肉瘤	1	1	0	0	0

注:(-)阴性;(+)弱阳性; (++)中度阳性; (+++)强阳性

表2 抗胰腺癌 YPC₃mAb 与人正常组织、非肿瘤良性病变的反应

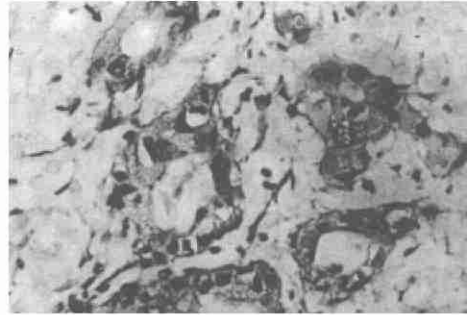
组织和病变名称	例数 (n)	ABC 染色结果			
		(-)	(+)	(++)	(+++)
胰	11	11	0	0	0
慢性胰腺炎	3	0	3	0	0
假性胰腺囊肿	3	3	0	0	0
食管	2	2	0	0	0
慢性胃炎	8	4	3	1	0
小肠	2	2	0	0	0
结肠	10	10	0	0	0
涎腺	4	3	1	0	0
甲状腺	5	5	0	0	0
肝	9	9	0	0	0
肺	5	5	0	0	0
肾	4	3	1	0	0
心肌	3	3	0	0	0
平滑肌	3	3	0	0	0
皮肤	6	2	3	0	1
脾	6	6	0	0	0
淋巴结	5	5	0	0	0

注: (-) 阴性; (+) 弱阳性; (++) 中度阳性; (+++) 强阳性

YPC₃mAb 与 32 例胰腺癌组织中的 28 例有反应, 占 87.5%, 多数呈中等强度反应。反应部位主要见于癌细胞浆和胞膜, 少数见于癌性腺腔内分泌物(附图)。4 例阴性病例均为高分化腺癌。19 种其它肿瘤组织有 5 种(26.3%) 与 YPC₃mAb 呈不同程度的交叉反应, 但绝大多数为弱阳性。反应部位与胰腺癌相同。

11 例正常胰腺组织无一与 YPC₃mAb 反应。全部 17 种被检正常和非肿瘤良性病变组织中的 5 种(29.4%) 呈不同程度的反应, 多数为弱阳性。3 例慢性胰腺炎均呈弱阳性, 2 例见于腺泡和导管上皮, 1 例见于残存胰岛细胞。其它阳性组织见于胃腺细胞、涎腺导

管、肾小管上皮和皮肤基底细胞。



附图 胰腺高分化导管腺癌的 YPC₃mAb ABC 免疫组织化学染色

深色显示癌细胞浆和胞膜着色, 癌周结缔组织未见染色(苏木素复染 ×400)

2.3 血清抗原含量

YPC₃mAb 结合抑制性 ELISA 法测定血清相应抗原含量结果是 31 例献血员结合抑制率为 31.85% ± 16.88%, 均值 + 1.96 标准差为 65%, 取此值为阳性阈值, 凡大于此值者判为阳性, 各组阳性率见表 3。

表3 137 例血清 YPC₃ 抗原阳性率

组别	n	阳性数	阳性率(%)	P 值
胰腺癌	31	17	54.8	—
非胰消化系癌肿	40	8	20.0	0.0023
良性消化系疾病	35	2	5.7	0.0000
献血员	31	1	3.2	0.000

胰腺癌病人阳性率最高(17/31, 54.8%), 献血员仅 1 例阳性(1/31, 3.2%)。8 例阳性的非胰消化系癌肿分别是 4 例结肠癌(4/14)、2 例胃癌(2/12)、2 例肝癌(2/10)。胆囊癌无阳性病例(0/4)。2 例阳性的良性消化系疾病分别是 1 例肝硬化(1/7)和 1 例胆石症(1/9)。消化性溃疡(0/6)、急性胰腺炎(0/3)和慢性胰腺炎(/10)均无阳性病例。

单就诊断胰腺癌而言, 其诊断的敏感性、

特异性和准确性分别为 54.8%、89.6%和 81.8%。

3 讨 论

一般制备抗人体肿瘤 mAb 的程序大致相同。但筛选方案的不同,对所获目的杂交瘤的价值具有重大的影响。迄今文献报告的抗人胰腺癌 mAb 的筛选方案一般都是使用与免疫原相同的癌细胞株用 ELISA 法初筛出抗体阳性杂交瘤,进而剔除其中与淋巴细胞、纤维母细胞株反应者,最后再选出与多株胰腺癌反应,而少与其它肿瘤细胞株反应的杂交瘤作为目的杂交瘤。这种筛选方案的最大缺点是,由于目前尚没有正常胰腺细胞株可作比较筛选,结果无法保证所获 mAb 不与正常胰腺反应而影响其使用价值。事实上,迄今文献报道的 10 余种抗人胰腺癌 mAb 多数与正常胰腺存在交叉反应^[1~6]。而作者采用的方法则有所不同,在用 ELISA 法初筛出抗体阳性杂交瘤后,随即改用 ABC 免疫组织化学染色在胰腺癌和正常胰腺等正常组织中比较筛选,剔除与正常胰腺等正常组织反应者。结果所选出的杂交瘤 YPC₃ 经大量 ABC 免疫组织化学分析表明, YPC₃mAb 与高达 87.5% 的被检胰腺癌组织反应,而与正常胰腺无反应,与其它组织的交叉反应并不高于同类研究报告,且多数为弱阳性。这不但说明作者所选用的筛选方案可行,同时也郑重提示, YPC₃mAb 将十分适用于胰腺癌的导向诊断和导向治疗。事实上,本室最近以 ^{99m}Tc-YPC₃mAb 用于荷人胰腺癌裸鼠的放射免疫定位显像已获成功。同时,体内外实验均证明 YPC₃mAb 能明显增加 LAK 细胞、巨噬细胞杀伤胰腺癌细胞的作用(材料见另文)。

ABC 免疫组织化学染色结果分析还表明, YPC₃mAb 识别的胰腺癌相关抗原位于胰腺癌的胞浆和胞膜。与迄今报道的胰腺癌相关抗原在组织器官分布上存在明显的差异。后者多在正常胰腺、各种消化道癌中有表达,未见皮肤表达^[1~6]。而本抗原恰恰相反。

推测是一种新发现的胰腺癌相关抗原。为了区别,暂将此抗原依本室习惯命名为 YPC₃ 抗原。

从血清 YPC₃ 抗原含量测定结果来看,正常人血清 YPC₃ 抗原含量甚微,因为血清作 1 : 2 稀释时,平均结合抑制率即达 31.85%。血清 YPC₃ 抗原在非胰消化系癌肿也有一定阳性病例,但不高,表明本抗原测定对这些肿瘤的诊断价值不大。胰腺癌病人阳性率最高,达 54.8%。与同类研究相比,其对胰腺癌诊断的敏感性相仿或偏低,但特异性较高^[7]。与 ABC 免疫组织化染色结果比较,血清测定阳性率远低于后者 87.5% 的阳性结果。其原因可能与抗原未纯化、测定方法等有关。但结果仍能看出其在胰腺癌诊断中的价值。有必要进行抗原分离,改进测定方法等,进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Yuan SZ, Ho JJ, Yuan M, et al. Human pancreatic cancer-associated antigens detected by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 1985,45 : 6179
- 2 Metzgar RS, Gaillard MT, et al. Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 1982,42 : 601
- 3 Chin J, Miller F. Identification and localization of human pancreatic tumor-associated antigens by monoclonal antibodies to RWP-1 and RWP-2 cells. *Cancer Res*, 1985,45 : 1723
- 4 Grant AG, Harris PM, Heyderman B, et al. The generation of monoclonal antibodies against human pancreatic exocrine cancer: a study of six different immunization regimes. *Br J Cancer*, 1985,52 : 543
- 5 Chin JK, Rong GH, Scharff JB, et al. Gastrointestinal carcinoma-associated antigen defined by a murine monoclonal antibody. *JNCI*, 1987,47 : 1367
- 6 Dippold WG, Klingel R, Bernhard H, et al.

Secretory epithelial cell marker on gastrointestinal tumors and in human secretions defined by a monoclonal antibody. *Cancer Res*, 1987, 47 : 2092

7 Warshaw AL, Gastillo CFD. Pancreatic carcinoma, *The New Eng J Med*, 1992, 326 : 455

(1993-10-08 收稿 1994-08-07 修回)

GENERATION AND APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN PANCREATIC CARCINOMA

Zhang Houde Yuan Shizhen

(Gastrointestinal Research Laboratory, Sun Yat-Sen Memorial Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Using hybridoma technique, a murine monoclonal antibody (mAb) YPC₃ against human pancreatic carcinoma was generated. When human tissue sections were examined with ABC immunohistochemistry, YPC₃mAb reacted with 28 of 32 (87.5%) pancreatic carcinoma tissues, while it failed to react with all 11 normal pancreatic tissue sections. The mAb also reacted with 5 of 19 (26.3%) nonpancreatic tumor tissues and 5 of 17 (29.4%) nontumor tissues, but the staining was weak in most cases. When the level of serum antigen defined by YPC₃ mAb was measured by binding inhibition ELISA in 137 persons, the binding inhibition rate greater than 65% was found in 17 of 31 (54.8%) patients with pancreatic carcinoma, in 2 of 35 (5.7%) patients with benign gastrointestinal diseases, 8 of 40 (20.0%) patients with nonpancreatic carcinoma and 1 of 31 (3.2%) normal subjects. The diagnostic sensitivity, specificity and accuracy for pancreatic carcinoma were 54.8%, 89.6% and 81.8%, respectively. These results suggest that YPC₃ mAb might be potentially useful for the immunolocalization and targeting therapy of pancreatic carcinoma.

Subject headings hybridomas; antibodies, monoclonal; pancreatic neoplasms; antibodies, neoplasm