论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0896-03

结直肠癌单克隆抗体的制备及生物学特性鉴定

陈 曦,黄 悦,于 彬,梅 峰,韩 鹃,周德山 (第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 制备结直肠癌特异性单克隆抗体,为深入研究相关肿瘤的发病机制提供新的实验工具。**方法** 用人结直肠癌患者的手术标本制备细胞悬液免疫小鼠,按常规方法行细胞融合,经免疫组织化学染色筛选阳性克隆,并对其抗体的特性和生物学性状等进行分析。**结果** 共获得32个阳性克隆,其中针对结直肠癌较特异性的阳性克隆有2个(克隆株2-3,15-8)。免疫组化染色显示,克隆株2-3培养上清和腹水与结直肠癌组织的冰冻切片反应的阳性率可达100%。癌旁正常组织的阳性率较低,且染色强度远弱于癌组织,当抗体稀释度超过1:6 000时反应阴性,而肿瘤组织仍呈强阳性。从结肠癌的分化程度来看,分化较差的肿瘤组织,包括中、低分化的癌组织染色较强。另外,免疫染色阳性产物主要位于肿瘤的腺腔和正常黏膜表面,提示该抗体所识别的抗原可能为结直肠癌细胞和黏膜上皮分泌的黏蛋白等抗原。**结论** 本研究成功地制备了两株针对结直肠癌的较特异的单克隆抗体,可作为实验研究相关蛋白在结直肠癌及其他肿瘤发病中的作用机制的方法。

关键词:单克隆抗体;黏蛋白;结直肠癌

中图法分类号:R392-33;R392.2;R735 **文献标识码**:B

Preparing and identifying a monoclonal antibody against human colorectal carcinoma

CHEN Xi, HUANG Yue, YU Bin, MEI Feng, HAN Juan, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To produce monoclonal antibodies against colorectal carcinoma and provide a new tool for study of the mechanisms in related cancers. **Methods** Specimens of colorectal carcinoma were freshly obtained from surgery. Balb/c mice were immunized with cell suspension from colorectal carcinoma tissues. Fusion was done as classical hybridoma method. Positive hybridomas were selected by immunohistochemical staining. The nature and biological characteristic of the selected monoclonal antibodies was investigated. **Results** Thirty-two positive hybridomas were selected. Two (2-3,15-8) of these hybridomas secreted antibodies binding specifically to human colorectal carcinoma. By immunohistochemical staining, all of colorectal carcinoma cases was positive for 2-3 antibody. In contrast, normal colon and rectal mucosa showed much weaker staining, and was totally negative when 2-3 ascites antibody was diluted over 1:6 000. In addition, 2-3 antibody reacted strongly with moderately differentiated and poorly differentiated colorectal carcinoma. The immunoreactive substance was observed on luminal contents of colorectal carcinoma tubules and on apical surface of normal epithelium, indicating that the antigen recognized by 2-3 antibody may be a kind of mucin secreted by colorectal carcinoma and normal epithelium and may participate in tumor invasion and metastasis. **Conclusion** We successfully produced two monoclonal antibodies against colorectal carcinoma.

Key words: monoclonal antibody; mucin; colorectal carcinoma

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,在我国,其发病率居各类恶性肿瘤第4位[1]。结直肠癌患者在初次诊断时已有25%的患者发生转移,75%的患者虽可手术完全切除,但其中仍有50%的病例出现复发现象。因此,结直肠癌的早期发现和早期治疗至关重要。单克隆抗体具有广泛的应用前景,利用单克隆抗体能识别相应抗原的特性,用于肿瘤患者的普查、诊断和临床治疗等研究。且可将一些抗癌药物或同位素等与针对肿瘤抗原的单克隆抗体相连接,靶向性地杀伤肿瘤细胞,从而减少对正常组织的毒副作用[2]。鉴于

基金项目:国家自然科学基金(30570983)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570983)
作者简介:陈 曦(1981-),女,福建省莆田市人,硕士研究生,主要从事胃肠道肿瘤发病机制等方面的研究。电话:13896187287,E-mail:chenxi5500@yahoo.com.cn
通讯作者:周德山,电话:(023)68752230,E-mail:dszhou2000@163.com
收稿日期:2006-11-10;修回日期:2007-01-30

目前国内外制备的结直肠癌单克隆抗体多为肿瘤细胞系免疫所得，这些抗体与直接用肿瘤组织免疫存在一定的差异[3]，使其应用受到了限制。因此，本研究用新鲜结直肠癌手术标本制备细胞悬液免疫小鼠，寻找针对结直肠癌特异性的单克隆抗体，为研究相关肿瘤的发病机制提供新的方法。

1　材料与方法

1.1　材料

BALB/c 小鼠 20 只由本校实验动物中心提供。小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0、结肠癌细胞系 SW480 为本室保存。HRP 标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白抗体购自 DAKO 公司。结直肠癌手术病理标本由本校西南医院、新桥医院、大坪医院普通外科提供。

1.2　方法

1.2.1　结直肠癌单克隆抗体的制备　　取人高、中、低分化腺癌标本各两例，免疫 3 组小鼠，每组 2 只。新鲜结直肠癌手术标本经冰冻切片确认为癌组织后，选取癌上皮细胞比较集中、结缔组织相对较少的部位（2 cm × 1 cm × 1 cm 大小），镜下观察约 70% 为肿瘤细胞，去除周围脂肪和结缔组织，制成细胞悬液，经 39% Percoll 离心，除去红细胞和淋巴细胞，与完全弗氏佐剂等量混匀后免疫两只 BALB/c 小鼠，加强免疫改用不完全弗氏佐剂。经检测血清抗体效价升高后，取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 融合，冰冻切片免疫组化筛选与结直肠癌反应阳性，而正常黏膜阴性的克隆，经有限稀释法进行单克隆化，并将特异性克隆进行扩大培养，按常规方法制备腹水。

1.2.2　免疫组化鉴定　　利用所筛选的阳性细胞株的培养上清和腹水作为第一抗体分别染色结直肠癌组织、癌旁组织，以 HRP 标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白的抗体为第二抗体，进行间接法免疫酶标细胞化学染色，比较染色部位、强度与肿瘤的生物学行为间的关系。本研究共收集 30 例结直肠癌患者的病理标本，包括癌组织、近癌组织和远癌组织；近癌组织是指癌旁 1 cm 以内增生上皮所在部位，远癌组织是指癌旁 3 cm 以上远癌黏膜所在部位。免疫组化结果采用免疫反应评分方法行半定量检测：通过染色强度和阳性比例判断阳性与否。①染色强度评为 0 ~ 3 分：0 分（未染色），1 分（浅棕色），2 分（棕色），3 分（深棕色）；②阳性比例（整块切片中阳性细胞占所有肿瘤细胞的比例）评为 0 ~ 3 分：0 分（0 ~ 1%），1 分（1% ~ 25%），2 分（25% ~ 50%），3 分（> 50%）；免疫反应评分为染色强度与阳性比例得分的乘积，大于或等于 1 分的样本为所测蛋白表达阳性[4,5]。

1.3　统计学方法

实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件分析，各组间的均值比较采用单因素方差分析。

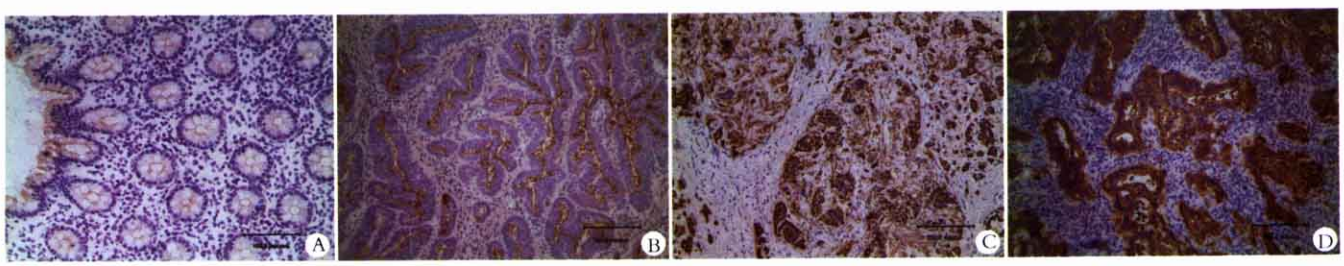
2　结果

2.1　细胞融合及克隆化

选择其中小鼠血清效价高的进行细胞融合 3 次，计 576 个孔，有 96 个孔长出细胞克隆，融合率为 16.6%，其中对结直肠癌免疫组织化学染色阳性的孔有 32 个。选择特异性强、细胞克隆生长良好的 2 个孔（分别命名为 2-3，15-8）进行单克隆化，此两株杂交瘤已连续培养 4 个月，至今仍保持良好的抗体分泌能力，冻存复苏后亦能分泌大量抗体，染色体检查符合杂交瘤细胞的基本特征。此两株特异性较强的杂交瘤均来自低分化腺癌免疫所得。

2.2　间接法免疫酶标细胞化学染色

2.2.1　单克隆抗体 2-3 在结直肠癌组织中的分布　　克隆 2-3 培养上清的染色阳性物质主要分布在结直肠癌组织，而克隆 15-8 则主要分布在近癌组织，故本研究主要以克隆 2-3 的培养上清和腹水进行系列稀释，观察其相应肿瘤抗原在结直肠癌组织、近癌组织及远癌组织中的分布。结果表明：单克隆抗体 2-3 在结直肠癌远癌正常组织中染色呈阴性或弱阳性，且阳性染色主要分布在远癌正常组织黏膜上皮的游离面（图 1A）。在高分化结直肠腺癌中，单克隆抗体 2-3 反应阳性，阳性产物分布在癌上皮游离面和腺腔内（图 1B）。对于结直肠黏液腺癌，单克隆抗体 2-3 染色呈强阳性，主要分布在癌细胞的细胞质内和细胞膜上（图 1C）。中分化结直肠腺癌的单克隆抗体 2-3 染色亦为强阳性，主要分布在癌细胞细胞质内和细胞膜上，以及癌上皮的腺腔内（图 1D）。



A：远癌正常黏膜（S-P，标尺为 100 μm）；B：高分化腺癌（S-P，标尺为 200 μm）；C：黏液腺癌（S-P，标尺为 200 μm）；D：中分化腺癌（S-P，标尺为 200 μm）

图 1　单克隆抗体 2-3 在结肠癌的分布

2.2.2　单克隆抗体 2-3 在结直肠癌组织中的效价　　抗体效价检测显示，克隆 2-3 腹水稀释至 1∶40 000 时，结直肠癌组织仍为强阳性，最高效价可达 1∶160 000；而癌旁组织仅为弱阳性，稀释超过 1∶6 000 则为阴性。

2.2.3　单克隆抗体 2-3 对结直肠癌组织和癌旁组织的反应差异　　单克隆抗体 2-3 的在结直肠癌组织和近癌组织间有较高的阳性率（分别为 100% 和 71.4%），远癌组织的阳性率（14.3%）大大低于前二者（$P < 0.05$）（表 1）。

表1 结直肠癌组织不同区域的阳性情况

组别	n	阳性例数	阳性率(%)
癌组织	30	30	100.0[a]
近癌组织	21	15	71.4[a]
远癌组织	28	4	14.3

a: $P<0.05$, 与远癌组织比较

免疫反应评分可得,单克隆抗体2-3的染色在结直肠癌组织和近癌组织间有显著差异($P<0.05$),近癌组织和远癌组织间亦存在显著差异($P<0.05$)。总的来说,单克隆抗体2-3与结直肠癌组织免疫组化反应强于近癌组织,近癌组织的反应也强于远癌组织(表2)。

表2 结直肠癌组织不同区域的免疫反应评分

组别	n	免疫反应评分
癌组织	30	6.40±2.04
近癌组织	21	1.48±1.57[a]
远癌组织	28	0.19±0.48[b]

a:$P<0.05$,与癌组织比较; b:$P<0.05$,与近癌组织比较

2.2.4 单克隆抗体2-3对不同类型结直肠癌的反应差异

阳性反应最强的为中分化结直肠腺癌,低分化和黏液腺癌次之,最弱为高分化腺癌。对不同分化类型的结直肠癌组织的染色结果两两进行比较,可得中分化和高分化型间有显著差异($P<0.05$),而中分化与低分化型间无显著差异,低分化与高分化型间亦无显著差异($P>0.05$)(表3)。

表3 不同分化类型结直肠癌组织中的免疫反应评分

组别	n	免疫反应评分
高分化	7	4.71±1.60
中分化	16	7.31±1.89[a]
低分化(黏液腺癌)	7	6.00±1.73

a: $P<0.05$,与高分化组比较

3 讨论

近年,虽有一些抗结直肠癌相关抗原的抗体被用于临床相关疾病的诊断和治疗,但数量仍很有限,无法满足临床和基础研究的要求,故开发研制新的针对结直肠癌的抗体具有重要的临床意义和潜在的应用价值。本研究所制备的单克隆抗体主要显示于结直肠癌组织和近癌组织,且癌组织远强于近癌组织,近癌组织强于远癌组织,提示该抗体所识别抗原为针对结直肠癌较特异性的肿瘤相关抗原。从结直肠癌中低分化型染色较强以及有肌层侵袭较易检测到强阳性表达的结果来看,该抗体可能作为结直肠癌较晚期的肿瘤标志物用于结直肠癌的临床诊断和治疗。

与临床常用检测结直肠癌的CEA单克隆抗体(DAKO公司)相比,二者分布位置相似但范围有所增减,故二者是否识别同一抗原仍需进一步鉴定。从抗体稀释效价对结直肠癌的原位诊断来看,2-3单克隆抗体的效价远高于CEA,前者的稀释度可达1:160 000,而CEA效价仅为1:8 000。

由于单克隆抗体2-3所识别的抗原主要分布于腺腔表面和腔内,呈分泌性蛋白的特点,推测该抗原可能属于一种黏蛋白(mucin,MUC),后者是一类高分子量(200 kb以上)的糖蛋白,由肽链主干和大量糖链构成。目前已证明的黏蛋白有18种,从结构和功能上分为三大类:分泌型、膜结合型及其他。黏蛋白广泛表达于胃肠道、呼吸道、泌尿道、生殖道和各种外分泌腺的上皮细胞,其分布有一定的器官特异性;在结直肠癌组织主要存在:MUC1,MUC2和MUC5AC亚型,其表达的上调与结直肠癌的侵袭和转移有关[6,7]。因此,通过不同的黏蛋白组合检测,可以较准确的诊断不同的癌症类型[8,9]。本研究制备的单克隆抗体2-3所识别的抗原是否属于MUC抗原以及在相关肿瘤发病中的作用仍有待于进一步研究。

综上所述,本研究获得了两株较特异的针对结直肠癌的单克隆抗体,其中单克隆抗体2-3可能识别结直肠癌分泌的黏蛋白,作为实验工具可用于结直肠癌发病机制的研究和临床诊断等。

参考文献:

[1] 王继恒, 李世荣. 我国结直肠癌筛查和早期诊断十年回顾: 1994~2005[J]. 胃肠病学, 2006, 11(4): 245-250.

[2] Saif M W. Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2006, 6(1): 46-51.

[3] 樊代明, 张学庸, 陈希陶, 等. 抗结肠癌细胞单克隆抗体的制备及相应抗原免疫组化鉴定[J]. 第四军医大学学报, 1988, 9(2): 74-77.

[4] 马千里, 马 华, 陈 曦, 等. C-KIT蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(8): 831-833.

[5] Kim J C, Roh S A, Kim H C, *et al*. Coexpression of carcinoembryonic antigen and E-cadherin in colorectal adenocarcinoma with liver metastasis[J]. J Gastrointest Surg, 2003, 7(7): 931-938.

[6] Myerscough N, Sylvester P A, Warren B F, *et al*. Abnormal subcellular distribution of mature MUC2 and de novo MUC5AC mucins in adenomas of the rectum: Immunohistochemical detection using non-VNTR antibodies to MUC2 and MUC5AC peptide[J]. Glycoconj J, 2001, 18(11-12): 907-914.

[7] Kim J C, Roh S A, Lee K H, *et al*. Genetic and pathologic changes associated with lymphovascular invasion of colorectal adenocarcinoma [J]. Clin Exp Metastasis, 2005, 22(5): 421-428.

[8] Bando T, Muguruma N, Ito S, *et al*. Basic studies on a labeled anti-mucin antibody detectable by infrared-fluorescence endoscopy[J]. J Gastroenterol, 2002, 37(4): 260-269.

[9] Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates[J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2005, 5(1): 39-64.

(编辑 张大春)