维普资讯 http://www.cqvip.com

1995 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1995

170-173, 169　R737.2504　R392-33

前列腺特异性抗原多克隆抗体的制备及初步应用

病理生理学教研室　段　红*　段积华　韦　克　范维珂

提　要　用盐析法、阴、阳离子交换柱层析及凝胶过滤法，从人前列腺组织中分离纯化前列腺特异性抗原(PSA)，经 SDS-PAGE 显示其分子量为34KD。以该抗原常规免疫家兔，获得抗 PSA 多克隆抗体，此抗体经进一步纯化后，以免疫印迹技术证实它具有 PSA_{12} 特异性。ABC 法显示该抗体对正常、肥大及癌变的前列腺腺上皮呈阳性反应，而对其它正常及肿瘤组织呈阴性反应。用 ELISA 夹心法分析该抗体血清学特异性，结果表明前列腺癌患者血清 PSA 的含量非常显著地高于对照组。

关键词　前列腺特异性抗原；多克隆抗体；前列腺癌　前列腺肿瘤

中图分类号　R392－32　R737.25

前列腺癌好发于老年男性的一种常见恶性肿瘤，尤以欧美国家多见，在美国男性癌症死亡率中居第二位[1]。近年来，我国前列腺癌发病率已明显增高。因而寻找前列腺癌的标记物对该疾病的诊断及治疗有极其重要意义。1979 年，Wang[2]等从前列腺组织中提取并纯化出一种前列腺组织特异性抗原(Prostate Specific Antigen，PSA)，立即受到各国学者广泛注意和深入研究。关于 PSA，国外研究较多，而国内甚少。本实验从人前列腺组织中提取并纯化 PSA，制备、鉴定抗 PSA 多克隆抗体，结果表明该抗体具有良好的特异性。现报道如下：

1　材料和方法

1.1 PSA 的提取与纯化　参照 Wang 氏法以人新鲜的各种前列腺组织为材料，用 35% 及 55% 饱和度硫酸铵进行分段盐析，用磷酸钾缓冲液透析得 PSA 粗提物，再依次经 CM－Sephadex－C_{50}，Sephadex－G_{100} 及 DEAE－Sephadex－A_{50} 柱层析纯化[3]，获得纯化的 PSA 提取物。

1.2 PSA 的鉴定

1.2.1 用十二烷基磺酸钠－聚丙烯酰胺凝胶梯度电源(SDS－PAGE)测定蛋白质分子量[4]。

1.2.2 用琼脂双向扩散试验证实 PSA 纯化样品与 DAKO 公司的抗 PSA 多抗的特异性。

1.2.3 用考马斯亮兰 G_{250} 法进行蛋白定量[5]。

1.3 制备抗 PSA 的抗血清

1.3.1 免疫：PSA 纯品与等量佐剂(首次为完全佐剂，以后用不完全佐剂)乳化后，多点(足垫、腰背、颈背、腘窝淋巴结)注入家兔皮内、皮下。共五次免疫，最后家兔大腿肌肉加强免疫一周后取血，分离血清，56℃ 保温 30 分钟灭活，－20℃ 保存。

1.3.2 制备单价特异性抗血清[6]。

在正常女性血清(不含 PSA 抗原液)中加入 2.5% 戊二醛，4℃ 过夜成胶冻状，粉碎后成颗粒状的凝胶吸附剂，再用缓冲液清洗数次。将该吸附剂直接加入抗血清中(1∶5)，37℃，30 分钟，4℃ 过夜，离心后上清则为单价特异性抗清，若仍存在少许杂抗体，可重复吸附。

将吸附后的兔血清经两次 50% 饱和度硫酸铵盐析提取 r－球蛋白，用磷酸钠缓冲液透析后再经 DEC_{52} 纤维素柱层析，所得的纯化物则为抗 PSA 特异性 IgG 抗体。

1.3.3 制备抗 PSA 特异性 IgG 抗体

1.4 抗 PSA 多克隆抗体特异性分析

1.4.1 琼脂扩散法进行抗体效价测定

四川省教委重点科研课题　* 研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4.2 参照 Towbin 氏法[7]酶联免疫电泳转移技术检测多抗的特异性。

1.4.3 免疫组化 ABC[8]检测抗体的组织特异性，组织系本校常规外科病理检查标本（甲醛固定、石蜡包埋），经病理确诊；ABC 试剂为华美生物工程公司产品，程序参照本室常规。

1.4.4 酶联免疫吸附试验 ELISA 夹心法检测该抗体的血清学特异性。正常血清男女各 20 例（均由重庆市中心血站提供），前列腺肥大 21 例、前列腺癌 26 例及其它系统癌症 24 例（均由重医大附一、二院，市一、二、三人民医院泌尿科提供，由病理确诊）。

2 结果

2.1 PSA 的纯化

2.1.1 PSA 粗提物经三次柱层析纯化，分别收集流出液，合并浓缩。

2.1.2 琼脂双扩法鉴定最后两次柱层析 PSA 样品能与 DAKO 公司抗 PSA 多抗发生特异性反应，产生一条沉淀线。

2.1.3 用 SDS－PAGE 法获得标准蛋白及 PSA 电泳结果 根据标准蛋白相对迁移率间接推算出该样品蛋白质的分子量为 34,674，经考马斯亮兰 G－250 法测定蛋白含量为 1.74mg/ml。

2.2 抗 PSA 抗体的鉴定

2.2.1 琼脂双向扩散试验显示兔抗人 PSA 抗血清的效价为 1:64。

2.2.2 单价特异性抗血清的鉴定

用琼脂双向扩散试验显示吸附前的兔血清有少量杂抗体存在，经女性血清吸附两次后，仅存在一条特异性抗体的沉淀线，且和 DAKD 公司抗 PSA 多抗与 PSA 间沉淀线相吻合。

2.2.3 经硫酸铵盐析及 DE32 柱层析后的抗 PSA 特异性 IgG 抗体的效价为 1：32。

2.2.4 免疫印迹表明 PSA 多抗能使一条分子量为 34KD 左右的主要蛋白质条带染色。

2.2.5 用 ABC 法对正常、前列腺肥大及不同肿瘤组织进行研究，结果见表 1。

实验结果表明 PSA 多抗仅对前列腺组织染色，而其他组织不染色。

2.2.6 ELISA 夹心法检测各组血清 PSA 含量。血清 PSA 标准品（美国 SYNTRON

表 1 PSA 多抗对正常组织及肿瘤组织的免疫组化染色反应

组　织	例　数	染色结果
小脑	1	－
子宫内膜	1	－
前列腺	1	＋＋
卵巢	1	－
胰腺	1	－
结肠	1	－
肺	1	－
骨骼肌	1	－
脾脏	1	－
肝脏	1	－
前列腺肥大	1	＋＋
膀胱癌	1	－
前列腺癌	4	＋＋
肝癌	2	－
胃癌	2	－
肾癌	1	－
结肠癌	1	－

注：＋＋强阳性，有大量上皮细胞染色、－阴性，无任何染色

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　不同检测组血清 PSA 检测结果

x 组　别	例　数	$\bar{x} \pm s$(μg/L)
正常女性	20	−1.46±0.96
正常男性(＜40 岁)	20	1.96±1.66
前列腺肥大	21	3.15±3.19
前列腺癌	26	26.75±18.29***
其他系统癌症	24	2.78±1.81

***$P<0.001$

BIORESEARCH INC 公司)有五个不同浓度 0, 2, 10, 25, 50μg/L)。各检测组 PSA 值的分布及结果见图及表 2。

从表2可知各检测组 PSA 平均值及标准差,通过方差分析表明各检测组 PSA 含量均有非常显著的差异($P<0.01$)。然后进行两两比较及 t 检验,发现前列腺癌症患者血清 PSA 含量非常显著地高于正常男性组、前列腺肥大组及其他癌症组($P<0.001$),而后三组 PSA 含量两两之间无统计学差异($P<0.005$)。

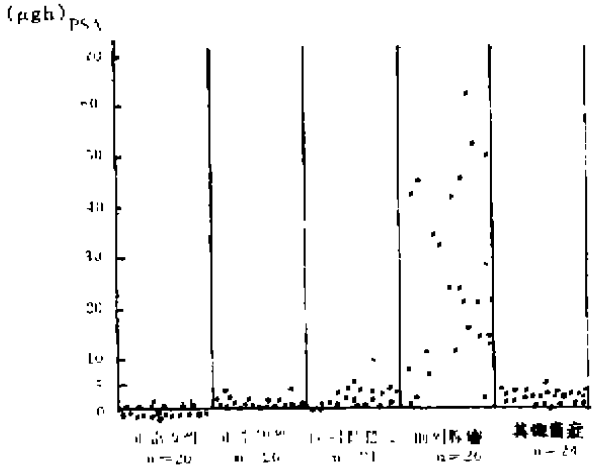


图 1　各检测组 PSA 水平分布图

3　讨论

PSA 是由人前列腺上皮细胞合成并分泌至精液中的一种主要蛋白质，它存在于正常的、肥大的及恶性的前列腺组织中,具有器官定位特异性和细胞类型特异性。其分子量约为 33－34KD, Ip 范围为 6.8～7.5。它是一种血管舒缓素样丝氨酸水解酶，能把精囊内的大分子蛋白质分解为小分子多肽，使凝块水解[9]。正常男性血清中 PSA 浓度〈4.0μg/L,女性体内不存在。

我们参照 Wang 氏法获得 PSA 粗提物后,再经离子交换柱层析、凝胶过滤层析进一步纯化。在阳离子交换层析时，由于 CM－Sephadex－C_{50}携带负电荷、选用低于 pH 6.9(PSA 的等电点)的缓冲液,使 PSA 带的正电荷增多；而在阴离子交换层析时，由于 DEAE－Sephadex－A_{50} 带正电荷，选用 PH 高于 6.9 的缓冲液,使 PSA 带的负电荷增多,以提高 PSA 的回收率。在进行阴离子交换层析时，开始采用侯氏[13]法 pH7～6 梯度洗脱,结果无蛋白峰,后自行设计改用 0～0.5M NaCl 梯度洗脱,才出现蛋白峰。这可能是因为 pH 梯度间隔太小，两种洗脱缓冲液的 pH 太为接近的缘故，因而洗脱效果不佳。

PSA 纯化物采用 SDS－PAGE 确定其分子量。该方法的影响因素较多。浓缩胶、分离胶的浓度、聚合时间的长短、电泳缓冲液是否新鲜、电泳条件及时间的选择,以及测量的准确度都会给分子量的测算带来误差。因而不同的作者或同一作者的不同次实验，对从同一组织中分离的同一蛋白往往得出不完全一致的结果。PSA 的研究亦如此，Wang 指出，PSA 并不是一种均一的糖蛋白，而是一

维普资讯 http://www.cqvip.com

组抗原性相同，等电点和分子量相似的同质异构体。国外不同学者分离纯化抗原的方法不同，其纯化物中同质异物体的种类和数目亦可能不同。我们的结果表明PSA的分子量主要条带为34KD左右，与文献报道的较为一致。

因PSA是一种弱抗原，不易刺激宿主产生抗体，若经兔足底、腘窝淋巴结免疫途径效果较好。若延长免疫过程有可能提高抗血清效价，但存在产生非特异性抗体的危险。一般免疫时间应控制在4～6周，可获得较高效价的抗血清。

免疫组化结果表明PSA多抗能使前列腺组织染色，而对其它正常及肿瘤组织均不染色，说明PSA多抗的前列腺组织特异性。

寻找转移性肿瘤的隐匿性原发灶是临床上棘手的问题之一，也常常是病理科医师面临的难题。由于直肠指诊等检查并不能正确诊断全部的前列腺癌，所以PSA的免疫组化应用对证实男性转移性肿瘤的原发灶是否来源于前列腺是十分重要的，这对指导临床进行转移性前列腺癌的治疗具有重要意义。

从ELISA夹心法测定的PSA结果可得知，女性体内不存在PSA，若以正常男性PSA $x+2s$ 作上限，即5.0μg/L，与Myrtle[10]等测定的PSA参考值4.0μg/L）较为一致。国外文献中大都确认10μg/L为PSA值的临界值上限，本研究中有4.8%前列腺肥大(1/21)及81%的前列腺癌(21/26)病人血清PSA值大于10μg/L，这与Hudson[11]报道的结果接近。Papsidero[12]最早报道前列腺癌患者血清PSA升高。此后大量研究指出可将PSA作为前列腺癌诊断、分期、判断预后及监测病情变化的指标，它是一种可供选择的有效的肿瘤标记物。因此，结合PSA测定、直肠指诊和经直肠超声引导的针吸细胞学活检三种方法，应当是降低前列腺癌死亡的有效措施。

（在本研究中，承蒙汤为学副教授及李培然老师等帮助，又承中心实验室、生化教研究、病解教研究教师大力支持，在此一并致谢！）

参考文献

1 Catalona WJ, et. J Urol 1978;1:119
2 Wang MC, et al. Invest Urol 1979;17:159
3 候一平，等. 华西医科大学学报 1987;18(4)357
4 Tsang VCW, et al. Meth Enzymol 1983;92:377
5 孙爱勋，等. 河北医药 1985;7:134
6 陶义训. 免疫学和免疫学检验 1989;87
7 Towbin H, et al. Pro Natl Acad Sci USA 1979;76:4350
8 Hsu SM, et al. Advance in Immunohistochemistry Delellis RA ed. 1984;31
9 Nadjimetal. Cancer 1981;48:1229
10 Myrtle JF, et al. Adv Cancer Diag Hybritech Inc 1986
11 Hudson MA, et al. J Urol 1989;142:1011
12 Papsidero LD, et al. Cancer Res 1980;40:2428

（收稿日期：1994－11－16）

THE PRODUCTION AND PRELIMINARY APPLICATION OF A POLYCLONAL ANTIBODY TO PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN

Duan Hong, et al

Dept of Pathophysiology

Prostate specific antigen(PSA) was purified from the crude tissue extract of fresh human prostatic tissue by CM－Sephadex－C_{50}, Sephadex－G_{100} and DEAE－Sephadex－A_{50} chromatography, SDS－PAGE showed that it had a molecular weight of 34KD.

（下转第169页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

PRAZIQUANTEL METABOLISM POTENTLY INHIBITED BY NIFEDIPINE AND POSSIBLE CYTOCHROME P450 ISOENZYME INVOLVED IN

He Kan, et al

Dept.of Pharmacology

Nifedipind(NF) competitively and stereoselectively inhibited the metabolism of praziquantel (PQT) enantiomers in human liver microsomes Ki value of NF for the (－)－PQT measured either by parent drug disappearance of by the MI formation was 1.4 and 1 5 μmol/ L, respectively, both of which was much less than the Ki value of 6.1 μmol/L for (＋)－PQT measured by parent drug disappearance. The inhibitory effect of NF on (－)－PQT metabolism in the rat liver microsomes was much less than in human liver microsomes. The Ki value for (－)－PQT and (＋)－PQT disappearance were 11.6 and 10.0 μmol/L, and Ki for MI formation from (－)－PQT was 10 μmol/L. NF had no or a little inhibitory effect on the activities of metoprolol－hydroxylase, ethylmorphine N－demethylase and 7－ethoxycoumarin O－deethylase. Metoprolol, a representative substrate of P450 IID6, had little effect on (－)－PQT and (＋)－PQT metabolism, furthermore, quinidine as a specific inhibitor of P450 IID6 only exhibited a very weak inhibitory effect on (－)－PQT and (＋)－PQT metabolim. These findings indicated that the possidility of P450 IID6 involved in the metabolism of PQT enantiomers might be very low.

KEY WORDS Nifedipine; Enzyme Inhibitor; Human Liver Microsomes; Metabolism; Praziquantel Enantiomers

(上接第 173 页)

Polyclonal antibody(PcAb) was obtained from rabbits immunized with PSA. The PcAb was asbsorbed with normal female serum(NFS), precipitated with ammonium sulfate and then followed by DEAE 32 chromatography. The immunoblotting test indicated that it is specific for PSA 34. The immumohistochemical examination showed that the PcAb could stain the prostatic tissues (normal, benign hypertrophic and malignant), but not the other human tissues. Two－Site sandwish enzyme－linked immunosorbent assay(ELISA) indicated that the mean content of serum PSA in carcinoma of the prostate was significantly higher than that in the normal males.

KEY WORDS Prostate Specific Antigen; Polyclonal Antibody; Prostatic Cancer

(上接 250 页)

11 Tanigawa M, et al. J Am Coll Cardiol 1991. 17·403

12 Hinton RC, et al, Am Heart J 1977;40:509

13 Wolf PA, et al. Neurology 1978;28:973

14 Kumagai K, et al. J Am coll Cardiol 1990; 16:377

(收稿日期 1994－12－08)