维普资讯 http://www.cqvip.com

179—182

重庆医科大学学报 1992年第17卷第3期

# 抗肝细胞生长多肽单克隆抗体及其抗独特型抗体的建立及初步应用

病毒性肝炎研究所

周卫平* 张定凤 石郁媛 黄爱尤 刘 林 曹小平

**提 要** 为了深入研究肝细胞生长因子及其与肝细胞作用的机制，本文应用单克隆抗体技术获得两株分泌肝细胞生长多肽单克隆抗体的杂交瘤细胞系；以纯化的两株单抗为抗原，我们制备了抗独特型兔血清抗体，发现它们具有肝细胞生长多肽样作用。本文应用单克隆抗体检测250例正常人和肝病病人血清（免疫斑点法），发现重型肝炎病人血清肝细胞生长多肽含量明显增高，肝性脑病病人更为明显；慢性迁延性肝炎与正常人比较无显著差异，提示血清肝细胞生长多肽升高与肝细胞损伤程度有关。4例肝癌病人3例血清肝细胞生长多肽阳性，推测肝细胞生长多肽可能参与了肝细胞癌性生长的调控

**关键词** 单克隆抗体McAb；抗独特型抗体Anti-Id；肝细胞生长多肽HSP

**中图分类号** R392.11

近年来，国内外学者对肝再生和刺激肝细胞生长的物质进行了大量研究，取得结果不一，但一致认为除了胰岛素、胰高血糖素、上皮生长因子和血小板衍生的生长因子等一类已知物质外，还存在着一类能特异地刺激肝细胞DNA合成，促进肝细胞增殖的活性物质，称做"肝细胞生长因子（*Hepatocyte Growth Factor*，HGF）"。

到目前为止，至少有三大类HGF已被纯化或部分纯化[1,2,3]。由于各个学者的工作环境、实验方法和实验条件各不相同，所得之HGF也有所差异。不仅分子量不同，其理化特性亦有明显区别。它们是不同物质还是同一物质的不同构象尚无从得知。本文用改良LaBrecque方法制备肝细胞生长多肽，并获得其单克隆抗体，为了解各类HGF的作用基团及其与肝细胞受体的关系，为今后肝细胞生长多肽的基因重组工作打下基础。

## 材料与方法

**1. 细胞株**

A. $P_2$—$NS_1$—2—Ag4—1骨髓瘤细胞，本所提供。

B. QGY—770肝癌细胞，本所提供。

**2. 动物** 雄性BALB/c小鼠，8—12周龄，本校实验动物中心提供。

**3. 抗原** 采用改良LaBrecque法[2]，从人胎肝组织（水囊引产）匀浆制备得肝细胞生长多肽。

**4. 主要试剂** A. 50%PEG，分子量4000，日本进口分装。B. RPMI 1640培养基(FLow Laboratories)。C. 新生小牛血清，购于华西生化制品厂。D. HRP（辣根过氧化物酶）标记抗BALB/C小鼠IgG抗体，购于卫生部成都生物制品研究所。E. 氚标记胸腺嘧苷（$^3$H—TdR），购于中科院上海核物理研究所。

* 研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

**5. 单克隆抗体的制备** 用聚乙二醇（PEG）融合免疫小鼠脾细胞和$NS_1$骨髓瘤细胞；用酶联免疫（ELISA）方法和HSP活性阻断实验筛选抗体分泌克隆[4]；用有限稀释法进行克隆化培养。

**6. 单抗的特异性鉴定** A. 肝细胞生长多肽活性抑制剂量依赖试验；B. 免疫印迹参见[5]。

**7. 单抗的抗独特型抗体的制备**[6] 用纯化抗HSP单抗免疫新西兰白兔，30天后采血分离抗体。以抗Id为刺激物，用$^3H$—TdR掺入法测活性，并用抗HSP加以阻断。把抗Id血清与抗HSP进行双向琼脂扩散，以正常兔血清为对照，观察并记录结果。

**8. 正常人和肝病病人血清中HSP测定（免疫斑点法）**[5]

取5μl血清点在硝酸纤维滤膜（0.3μ，北京化工学校工厂）上，4℃过夜，用含10%小牛血清磷酸盐缓冲液（PBS）震荡洗涤2h，加抗HSP单抗37℃孵2h。同法洗涤，加酶标二抗，37℃孵1h。同法洗涤，换液四次，置底物液（联苯胺）反应30min，室温显色，蒸馏水终止反应。

## 结　果

**1. 杂交瘤细胞克隆** 融合后细胞悬加于四块96孔板（共384孔），第三天出现杂交瘤细胞生长，12d后共有276孔克隆生长，融合率71.9%。用ELISA法检出39孔阳性克隆，阳性率14%。选出22孔单个克隆生长孔扩增后做活性抑制实验，6孔$^3H$—TdR掺入率高于阳性对照组（$p<0.05$）；12孔无显著差异（$p>0.05$）；4孔低于阳性对照组（$p<0.05$）。将后四孔克隆化培养，待细胞长满1/3—1/2孔时用ELISA法初筛。在阳性孔中选出生长良好的单个克隆扩增于24孔板，三天左右取上清液做活性抑制实验，选抑制率高者进行再克隆。最后筛选出两株分泌抗HSP的杂交瘤细胞，MCHS-1、MCHS-2。经四天培养后做染色体检查，两株细胞均为多倍体。各计数100个细胞，求出两株细胞染色体众数均为95条。MCHS-1主要分泌$IgG_3$，MCHS-2主要分泌$IgG_1$。两株细胞上清最高效价1:64，最低1:16；腹水效价MCHS-1为1:2048，MCHS-2为1:1024。

**2. 特异性鉴定** A. 肝细胞生长多肽活性抑制剂量依赖特性：以MCHS-1和MCHS-2培养上清及另一株非抗HSP克隆上清阻断抑制HSP的活性，$\left[\text{抑制率}=\frac{\text{实验组CPM}-\text{对照组CPM}}{\text{阳性对照组CPM}-\text{对照组CPM}}\times 100\%\right]$发现MCHS-1和MCHS-2上清有明显阻断效应，且呈剂量依赖[图1]。

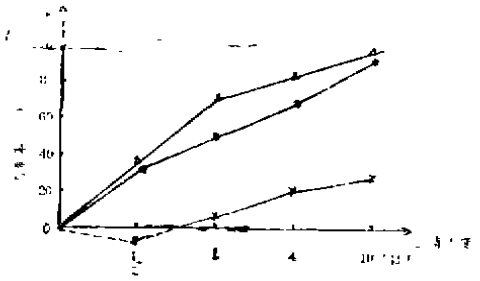


**图1 HSP活性抑制剂量依赖曲线**

注：△MCHS-2，⊙MCHS-1，x非抗HSP分泌克隆

B. 蛋白印迹：两株细胞分泌的抗HSP均可使硝酸纤维滤膜上17.5KD区带染色，但不能识别其它蛋白质区带。

**3. 抗肝细胞生长多肽的单克隆抗体相应抗独特型抗体的制备** 首次免疫三十天后心内采血分离抗体（抗$Id_1$和抗$Id_2$）。琼扩效价抗$Id_1$为1:64，抗$Id_2$为1:128。正常兔血清与两株单抗无沉淀反应。活性测定显示抗$Id_1$和抗$Id_2$均具有HSP样活性，且分别为两株单抗所阻断。

**4. 用免疫斑点法检测250例正常人和肝病病人血清HSP含量，结果见表1**

## 讨　论

本文采用改良LaBrecque方法从人胎肝分离出一种肝细胞生长多肽。以HSP为抗原免疫小鼠，经五次融合及克隆化培养，从276孔克隆中筛选出39孔阳性克隆，最后得到两株持续分泌抗肝细胞生长多肽单抗隆抗体的鼠——鼠杂交瘤细胞。两株抗HSP

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 正常人和肝病病人血清中HSP测定结果

| 分类 | 检测人数 | 阳性人数* | | | | 阳性率 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | + | ++ | +++ | ++++ | |
| 正常人 | 92 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1.1% |
| 重型肝炎 | 53 | 1 | 18 | 27 | 3 | 98.1% |
| （肝性脑病） | 4 | 0 | 0 | 1 | 3 | 100% |
| 急性黄疸型肝炎 | 25 | 15 | 5 | 0 | 0 | 80% |
| 慢性活动性肝炎 | 40 | 20 | 2 | 0 | 0 | 55% |
| 慢性迁延性肝炎 | 27 | 2 | 0 | 0 | 0 | 7.4% |
| 肝癌 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 75% |
| 无症状携带者 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | — |

* "+"弱阳性，"++"阳性，"+++～++++"强阳性

主要针对17.5KD的多肽，有明显的HSP活性抑制剂量依赖特征。证明这两株单抗是针对HSP活性成分的特异抗体。

继Jerne的免疫网络学说的建立，人们又发现抗Id抗体不仅在免疫调节过程中形成连锁的交互抑制，而且还具有促进免疫的正反馈作用[6]。本文以研究抗HSP单抗的特异性为出发点，用两株单抗免疫大白兔制备了抗Id型血清抗体。免疫扩散显示了抗HSP与抗Id之间的特异亲和力；活性测定则表明抗Id抗体能模拟抗原（HSP）的作用。这说明抗HSP是HSP活性结构的特异抗体；提示与抗HSP免疫球蛋白的三位一体结构（Id型决定簇、抗原识别位点和高变区）互为镜象的抗Id型抗体的抗原结合位点可能类似HSP抗原决定簇（即HSP的活性基团）的结构。这一特性将为我们研究肝细胞膜上HSP受体位点、分布及数量提供方便。

NaKamura等应用基因重组技术在cos-1猴肾细胞表达出82KD的人类肝细胞生长因子（hHGF）。我们所得的HSP虽然也具有启动肝细胞DNA合成、促进肝细胞增殖的作用，但与前者的关系尚不了解。我们曾用抗HSP单抗检测hHGF的β链基因片段（NaKamura博士赠送）在大肠杆菌的表达产物（详见另文），发现不能识别。只对人胎肝匀浆上清和乙醇沉淀肝细胞刺激物（ETOH—ppt—HSS）的17.5KD区带有亲和力，与LaBrecque的结论相似[4]。

Gohda等报告肝昏迷病人血浆中HGF活性与昏迷程度正相关，随着昏迷好转活性逐渐下降[5]。Tsubouchi等用ELISA法测定肝病病人血中HGF含量水平，亦得出相似结论[7]。本文用微量免疫斑点法检测250例正常人和肝病病人血清中HSP水平，发现重型肝炎病人血清中HSP水平增加，尤以肝性脑病病人明显，四例全呈强阳性。死亡病例中血清HSP似低于生存者，但统计学处理无意义（$p>0.05$）。慢性活动性肝炎和急性黄疸性肝炎阳性率高，但水平较低，多为弱阳性。慢性迁延性肝炎和无症状携带者与正常人相比无显著差异。这提示血清HSP水平与肝细胞损伤程度有关。估计HSP是继肝损伤后产生和释放的一种活性物质，对它的含量水平测定有助于了解肝细胞的损伤程度，推测病人预后。肝癌病人血清HSP似有所增高，但病例少，无法定论。进一步的研究有助于作出有价值的结论。

## 参考文献

[1] Toshikazu Nakamura, et al. Nature, 1989; 342:440

[2] LaBrecque D.R, et al. Hepatology,

维普资讯 http://www.cqvip.com

1987; 7:100
[3] Ghda, et al. Exp. Cell Res. 1986. 166:139
[4] 戴保民, 主编.单克隆抗体与人兽共患病.科学出版社 1989: 140
[5] 戴保民, 主编.单克隆抗体与人兽共患病.科学出版社 1989: 153
[6] Kohler h. Idiotype antibody in biology and medicine. ed1.Florida: Academic press. 1984: 401
[7] Tsubouchi, et al. Hepatology, 1991: 13[1]:1

(收稿日期 1991-12-19)

# HYBRIDOMA AND MONOCLONAL ANTIBODY(McAb) FOR HEPATOCYTE STIMULATOR PROTEIN(HSP)

*Zhou Weiping*, et al

Institute for Viral Hepatitis

We have purified HSP from liver of human fetus by improved LaBrecque' S method. Immunized BALB/C mice with HSP, we adopted activity-inhibition experiment of HSP as remedy for ELISA method to screen useful hybredoma clone. Finally, we obtained 2 antibodyproducing clonies, which produced IgG3 and IgG1 that revealed clearly the dose-dependent inhibitive activity for HSP. The antiidiotype antibodies of anti-HSP showed similiar stimulative activity as HSP. Determining serum HSP by the anti-HSP, we discovered higher level in patients with fulminant hepatic failure

**KEY WORDS** Monoclonal Antibody, McAb; Anti-idiotype Antibody, Anti-Id; Hepatocyte Stimulator Peptide, HSP