DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.003
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0619-04

论著

一株抗人胆管癌相关抗原杂交瘤细胞株的建立及鉴定

王细文[1],梁 平[1],韩本立[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院肝胆外科,重庆 400037;[2]附属西南医院肝胆外科中心、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 建立能分泌与人胆管癌组织特异结合的高效价抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体的杂交瘤细胞株。方法 用培养的人胆管癌细胞系SK-CHA-1免疫BALB/c小鼠后,获取免疫小鼠的脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞SP 2/0融合,ELISA方法及免疫荧光染色法筛选细胞融合后生成的杂交瘤细胞株。结果 ELISA方法及免疫荧光染色法共筛选出5株能持续稳定分泌抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其中2F4E8杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体具有选择性强,效价高的特点,冻存半年后复苏,仍能稳定分泌。经免疫组织化学及免疫荧光检测发现,该单克隆抗体与胆管癌组织呈阳性反应,而与肝癌组织,胰腺癌组织以及其他消化道癌组织呈阴性反应。且与正常胆管组织及正常肝组织亦呈阴性反应。结论 2F4E8是一株稳定的杂交瘤细胞株,所分泌的抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体特异性强,效价高,在胆管癌的诊断、治疗及基础研究中有较好的应用前景。

关键词:胆管癌相关抗原;杂交瘤;单克隆抗体
中图法分类号:R392.11;R735.8 文献标识码:A

Establishment and identification of a hybridoma cell line against human cholangiocarcinoma-related antigen

WANG Xi-wen, LIANG Ping, HAN Ben-li (Department of Hepatobiliary Surgery, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To produce an anti-cholangiocarcinoma-related antigen hybridoma cell line which can secreate antibody specifically bind to human bile duct carcinoma tissues with high titer. Methods Spleen cells were obtained from BALB/c mice immunized with human cholangiocarcinoma cell line SK-CHA-1 and fused with murine myeloma cell SP 2/0. Hybridoma cells were selected with ELISA and immunofluoresent staining after the cell fusion. Results Five clonies of hybridoma cell which could secrete anti-cholangiocarcinoma-related antigen McAb were obtained. Among these colonies, the hybridoma cell line 2F4E8 was found to secrete McAb with the same specificity and titer after 6 months of freezing. With immunohistochemical and immunofluoresent assay, it was found that this McAb could positively react with bile duct carcinoma tissues, while negatively with hepatocarcinoma, pancreatocarcinoma and other gastroenteric malignant tissues, and also has negative reaction with normal bile duct and liver tissues. Conclusion 2F4E8 is a stable hybridoma cell line and the anti-cholangiocarcinoma-related antigen McAb it secretes is of high specificity and titer. This cell line possesses the prospect in the diagnosis, treatment and basic research of cholangiocarcinoma.

Key words: cholangiocarcinoma-related antigen; hybridoma; monoclonal antibody

胆管癌是一种比较少见的消化道肿瘤,据估计,美国每年新发现病例为4 500例[1]。据现有的资料统计结果表明,我国胆管癌的发病率明显高于国外[2],这可能与我国胆管结石,胆道炎性疾病较国外多见等因素有关[3]。虽然胆管癌分化好,生长缓慢,较少发生远处

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670713)
作者简介:王细文(1964—),男,湖北省鄂州市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤免疫学方面的研究,发表论文6篇。
电话:(023)68755232
收稿日期:1999-09-20;修回日期:2000-03-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

转移,但由于胆管癌不易与一些炎性胆管病变相区别,有时需做多次多处病理切片检查才能明确诊断[4]。放射免疫诊断是一种灵敏度高的诊断方法,从80年代中期开始,国外学者利用单克隆抗体技术对胆管癌患者血清和胆汁的肿瘤标记物进行放射免疫检测,结果表明CEA及CA19-9、CA125等肿瘤标记物在胆管癌病人血清中显著升高。然而这些肿瘤标记物对胆管癌并无特异性,它们只能在胆管癌已经非常大且伴有远处转移时才能检测出其浓度升高[5~7]。因此,制备出一种特异性强、效价高的抗人胆管癌单克隆抗体,对提高胆管癌的诊断及治疗水平具有重要意义。本研究采用杂交瘤制备技术,制备出1株分泌特异性强、效价高的抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体杂交瘤细胞株2F4E8,现将其制备过程及初步鉴定结果报告如下。

1 材料及方法

1.1 免疫原及免疫方法

人胆管癌细胞系SK-CHA-1细胞(本校西南医院陈华博士赠送)培养于含10%小牛血清的DMEM培养基(Gibco产品)中,取指数生长期的细胞作免疫原经腹腔注射免疫6~8周龄的雌性BALB/c小鼠,初次免疫用细胞1×10^7/鼠,间隔2周后等量细胞追加免疫1次,后每隔2周追加免疫1次,融合前3 d等量细胞加强免疫1次,融合前1 d取鼠眼静脉血以间接ELISA法测血清抗体效价,选取效价高的小鼠作脾细胞供体。

1.2 杂交瘤细胞株的建立及单克隆抗体的制备

1.2.1 细胞融合 将小鼠骨髓瘤细胞SP2/0与免疫脾细胞(1∶10)在50%PEG(Sigma产品,分子量4 000)介导下融合。

1.2.2 阳性克隆筛选及克隆化培养 以间接ELISA及间接免疫荧光法检测杂交瘤培养孔上清,间接ELISA试验的包被抗原为人胆管癌相关抗原CCRA其制备及纯化按文献[8、9]介绍方法进行。纯化的CCRA按20 ng/ml的工作浓度包被40孔酶联检测板,按50μl/孔加杂交瘤培养上清液,37 ℃反应2 h,弃上清。加1∶1 000 HRP-山羊抗小鼠IgG,100μl/孔,37 ℃反应30 min。按50μl/孔加入底物溶液,室温下避光反应30 min。加入2 mol/L H_2SO_4终止反应。加底物溶液前各步骤之间均以洗涤液洗涤3 min×3次。阴性对照孔第一抗体为1∶1 000的正常鼠血清,阳性对照孔第一抗体为1∶1 000的免疫小鼠血清。反应后的酶联板置于酶联检测仪中检测反应结果。凡D_h值大于阴性对照孔2倍以上者,判断为阳性。有限稀释法进行克隆化培养,至所有杂交瘤上清均呈阳性为建株标准。

1.2.3 单克隆抗体腹水的制备及纯化 将1×10^6杂交瘤细胞接种于预先腹腔注射液体石蜡的BALB/c雌鼠腹腔,约10 d后获取腹水,测定其效价,经$(NH_4)_2SO_4$盐析和DEAE纤维素层析纯化后分装,冻存于-20 ℃备用。

1.3 杂交瘤细胞染色体检查

按常规核型分析方法进行杂交瘤细胞的染色体检查。

1.4 单克隆抗体的鉴定

1.4.1 亚类鉴定 按B.M公司生产的Isostrip™试剂盒说明进行。

1.4.2 单克隆抗体的效价检测 采用间接ELISA方法。

1.4.3 单克隆抗体的免疫印迹反应 培养的胆管癌细胞及SP2/0细胞按常规方法制备细胞膜蛋白,经SDS-PAGE后,取下凝胶,夹在电转移缓冲液浸湿的滤纸和NC膜之间,进行电转移。电转移完毕,取出NC膜,进行免疫测定。

1.4.4 单克隆抗体的免疫组织化学染色 肿瘤标本来自近3年来经手术切除后病理确诊的石蜡包埋组织,正常组织来自尸检或手术切除的石腊包埋组织。ABC法染色。

1.4.5 间接免疫荧光染色切片的激光扫描共聚焦显微镜观察 用单克隆抗体进行间接免疫荧光染色的胆管癌组织、肝癌组织、正常胆管组织以及正常肝组织切片各5张,置激光扫描共聚焦显微镜下观察染色结果。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

融合细胞接种于96孔培养板中,共计288孔,其中240孔有杂交瘤生长,融合率为83.3%。共筛选出阳性克隆13孔,阳性率为4.6%。选择克隆生长好,特异性强的5孔进行克隆化,有限稀释后阳性率达100%。其中2F4进一步亚克隆后,筛选得的2F4E8特异性强、效价高、抗体分泌稳定。冻存半年后复苏保持抗体分泌能力。

2.2 杂交瘤细胞的染色体分析

2F4E8细胞染色体数目为86~102条,有端着丝粒及中着丝粒染色体,见图1。



图1 杂交瘤2F4E8染色体形态

Fig 1 Morphology of the chromosome of hybridoma 2F4E8

2.3 单克隆抗体2F4E8的特性鉴定

2.3.1 2F4E8的效价及亚型鉴定 2F4E8为IgG1亚型,κ轻链,见图2。ELISA检测培养上清效价为1∶40,腹水效价为1∶1 000。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

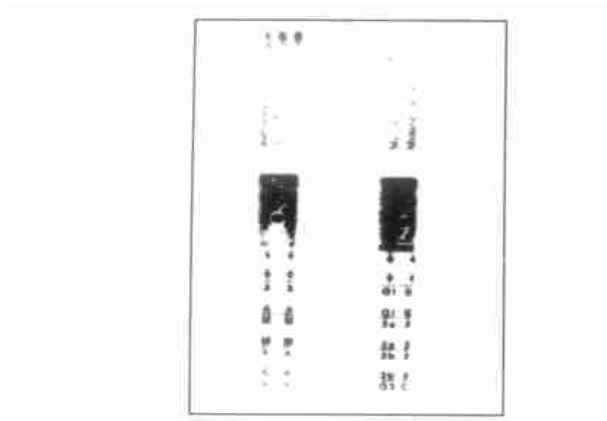


图 2　单克隆抗体 **McAb 2F4E8** 的抗体亚类及亚型

Fig 2　The subclass and the subtype of McAb 2F4E8

2.3.2　2F4E8 的免疫印迹反应　　电转移后的 NC 膜经 2F4E8 反应, 显色结果示胆管癌细胞为阳性, SP2/0 细胞为阴性。

2.3.3　2F4E8 的免疫组织化学反应结果, 见表 1, 图 3

表 1　单克隆抗体 **McAb 2F4E8** 免疫组织化学反应结果

Tab 1　Results of McAb 2F4E8 histochemical reaction

Tissues	Cases	Positive *	Positive rate
Bile duct carcinoma	15	13	86.7%
Normal bile duct tissues	10	1	10.0%
Hepatocellular carcinoma	15	3	20.0%
Pancreatic adenocarcinoma	15	2	13.3%
Gastric carcinoma	15	1	6.7%
Colonic carcinoma	15	1	6.7%
Rectal carcinoma	15	1	6.7%

*: Except bile duct carcinoma, all the positive results are weak

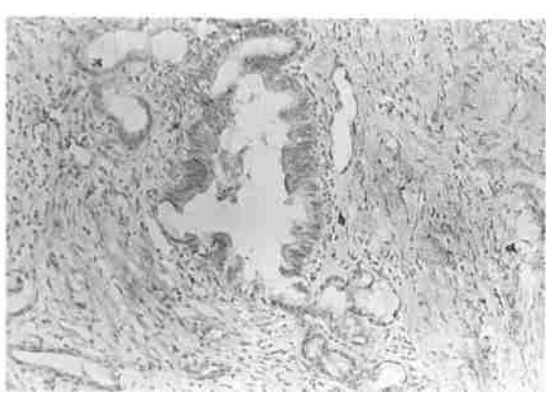


图 3　单克隆抗体 **McAb 2F4E8** 与人胆管癌组织免疫组织化学反应结果　(ABC× 200)

Fig 3　Result of immunohitochemical staining of human bile duct carcinoma tissue with McAb 2F4E8　(ABC× 200)

2.3.4　2F4E8 的间接免疫荧光染色切片激光扫描共聚焦显微镜观察结果显示, 2F4E8 与胆管癌组织呈阳性反应, 与肝癌组织及正常肝组织、正常胆管组织呈阴性反应, 见图 4。

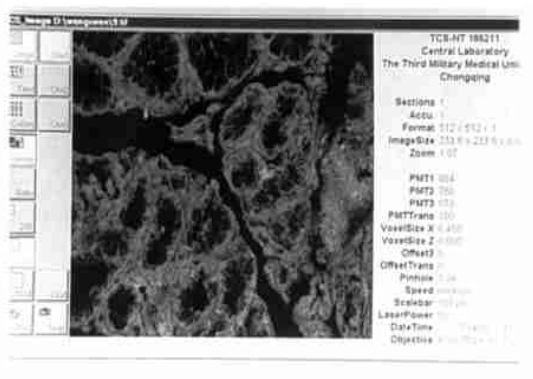


图 4　单克隆抗体 **McAb 2F4E8** 与人胆管癌组织间接免疫荧光反应切片的激光扫描共聚焦显微镜观察结果

Fig 4　Laser scanning confocal microscopy of indirect immunofluoresent staining of human bile duct carcinoma tissue with McAb 2F4E8

3　讨论

自 1975 年 Kohler 和 Milstein 发明单克隆抗体制备技术以来[10], 国内外有许多种单克隆抗体问世, 并广泛用于临床诊断、治疗及基础研究之中[11~13]。但迄今为止, 特异性强, 效价高的单抗为数不多。故人们仍在不断地开发新的单克隆抗体。随着分子生物学的飞速发展, 新的肿瘤抗原不断出现[14]。针对这些肿瘤抗原的单克隆抗体也相继问市[15], 这无疑为肿瘤的诊断和治疗提供了新的手段。

本研究结果表明, 2F4E8 是一株稳定的杂交瘤细胞系, 所分泌的抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体属 IgG1 亚类, κ 轻链。抗体的特异性强, 在胆管癌的诊断、治疗及基础研究中有较好的应用前景。

在本研究过程中, 作者利用激光扫描共聚焦显微镜进行单克隆抗体的鉴定, 结果表明, 与传统的荧光显微镜相比, 激光扫描共聚焦显微镜具有色彩鲜明、组织结构清晰, 结论可靠的优点, 在单克隆抗体的筛选及鉴定中不失为一种好方法[16]。

参考文献:

[1] Blumgart L H. Surgery of the liver and biliary trac[M]. Edingberg: Churchill Living Stone, 1994. 968.

[2] 迟彦邦. 实用肝胆外科[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1996. 446－447.

[3] 黄志强. 现代腹部外科学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1995. 500.
[4] 施维锦. 胆道外科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993. 229—230.
[5] Bjornsson E, Kilander A, Olsson R. CA 19-9 and CEA are unreliable markers for cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis[J]. Liver, 1999, 19(6): 501—508.
[6] Nakeeb A, Lipsett P A, Lillemoe K D, *et al*. Biliary carcinoembryonic antigen levels are a marker for cholangiocarcinoma[J]. Am J Surg, 1996, 171(1): 147—152; 152—153.
[7] Ker C G, Chen J S, Lee K T, *et al*. Assessment of serum and bile levels of CA19-9 and CA125 in cholangitis and bile duct carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1991, 6(5): 505—508.
[8] 梁 平. 韩本立. 一种新的胆管癌相关抗原的制备及其临床应用[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(1): 65.
[9] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256(5 517): 495—497.
[10] Juweid M E, Hajjar G, Stein R, *et al*. Initial experience with high-dose radioimmunotherapy of metastatic medullary thyroid cancer using 131I-MN-14 F(ab)2 anti-carcinoembryonic antigen MAb and AHSCR[J]. J Nucl Med, 2000, 41(1): 93—103.
[11] Shin S J, Hoda R S, Ying I, *et al*. Diagnostic utility of the monoclonal antibody A103 in fine-needle aspiration biopsies of the adrenal[J]. Am J Clin Pathol, 2000, 113(2): 295—302.
[12] Hamada H, Kohno N, Yokoyama A, *et al*. A novel monoclonal antibody, H9, directed against the core protein of MUC1 mucin [J]. Oncol Rep, 2000, 7(2): 225—232.
[13] Kwak L W, Campbell M J, Czerwinki D K, *et al*. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors[J]. N Engl J Med, 1992, 327(4): 1 209—1 215.
[14] Weiner L M, Zarou C M, O'Brien J, *et al*. Effector characteristics of the IgG3 murine monoclonal antibody 113F1[J]. J Biol Response Med, 1989, 8(2): 227—237.
[15] Petroll W M, Cavanagh H D, Jester J V. Clinical confocal microscopy[J]. Curr Opin Ophthalmol, 1998, 9(1): 59—65.
[16] Palmer R J Jr, Stemberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(3): 263—268.

(编辑 冷怀明)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)07-0622-01

女性直肠癌患者 Mile's 术后早期性功能障碍的管理

Management of female sexual disorder after Mile's operation

刘作金, 张敬如, 向佳梅, 文仁国 (第三军医大学附属新桥医院普通外科, 重庆 400037)

我国每年约10万人需行结肠造口术, 而40%患者术后将出现性功能障碍[1], 虽然这一问题给患者及家属带来极大不幸, 但由于对生命无直接影响, 既往医护人员对之重视不够, 尤其是女性性功能问题。我们调查分析126例Mile's术后早期女性患者性生理、心理变化, 并探讨了相应对策。

1 临床资料

1990年至1999年8月, 收治女性直肠癌行Mile's手术的患者126例, Dukes B期41例, Dukes C期78例, Dukes D期7例, 年龄21~68岁, 平均(47.2±6.8)岁。同时行阴道后壁切除17例, 卵巢及子宫切除8例。术后2周至2月左右调查, 63%患者表示难以达到术前性满意度, 原因主要有手术相关因素26%, 体象改变不适应45%, 配偶因素9%等。

作者简介: 刘作金(1971—), 男, 四川省内江市人, 硕士, 医师, 主要从事血管外科方面的研究。电话: (023)68755114—74605

收稿日期: 1999-09-10; 修回日期: 1999-11-01

2 性功能障碍的原因

2.1 手术因素[2]

为达到根治目的, 手术需较广泛切除盆侧壁组织, 难免损伤位于双侧直肠侧韧带内的骨盆神经丛, 同时也损伤了盆腔血管及正常血循环; 肛门直肠切除后, 会阴疤痕挛缩, 可致阴道畸形, 尤其是阴道后壁受累切除重建者, 还有缩窄现象, 性交时可产生牵扯疼痛。

2.2 体象改变

理想造瘘口位于易于护理的脐周腹壁膨隆处。术后患者将终身带有1条由腹部突出的肠管, 其痛苦心情可想而知。尤其术后早期, 会阴切除腹壁造瘘等体象改变导致独立人格丧失, 同时由于造口护理不熟练常发生意外粪便外溢, 患者往往认为自己是一个肮脏的残废人。

2.3 配偶态度

配偶对患者腹部造口表现出的烦恼和厌恶, 担心性生活中

(下转626页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net