

## 抗人肺癌单克隆抗体 LC-1 对荷人肺腺癌裸鼠的放射免疫定位

王升年 李 明 陈麟际\* 姚中一\*\* 徐惠钧 车裕芳 王 珏

张素胤\* 马寄晓\*\* 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

近年来,一些学者采用同位素标记单克隆抗体(单抗),在荷瘤裸鼠体内进行放射免疫定位试验取得了明显进展,为临床进行放射免疫定位诊断提供了依据。许多研究结果表明,单抗的特异性和亲和性是成功地进行放射免疫定位的重要因素之一。为此,我们采用 $^{131}\text{I}$ 标记自己制备的抗人肺癌单抗 LC-1<sup>[1]</sup>,在荷人肺腺癌(LAX-83)裸鼠体内进行放射免疫定位试验,以探讨单抗 LC-1 在临床上用于放射免疫定位诊断的可能性。

### 材 料 和 方 法

一、抗人肺癌单抗 LC-1 的纯化 含 IgM 型单抗 LC-1 的小鼠腹水先后采用低渗透析<sup>[2]</sup>和 Sephadex G-200 分子筛层析法进行纯化。纯化后的单抗 LC-1 用免疫电泳和双向免疫扩散法鉴定纯度,用 ELISA 法<sup>[3]</sup>测定免疫活性;按  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的浓度将人肺腺癌(SPC-A<sub>1</sub>)细胞加入 96 孔板中,37℃、CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜;甩干 96 孔板中的培液;37℃过夜烘干;用 0.25% 戊二醛固定;用含 1% 小牛血清和 0.1% 的 Tween 20 的 pH 7.4 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 次后,以含 2% 小牛血清的 pH 7.4 0.01 mol/L PBS、37℃、封闭 1.5 小时,洗涤 3 次,以后测定步骤同文献<sup>[3]</sup>。

二、荷瘤裸鼠 根据生长速度先后取裸鼠移植性人肺腺癌(LAX-83)<sup>[4]</sup>和人胃癌(SGC-7901)<sup>[5]</sup>组织,分别接种于裸鼠右前肢和左后肢背部皮下,使它们在实验时长成大小相仿的肿瘤[图 1]。

三、 $^{131}\text{I}$  标记单抗 LC-1 采用氯胺 T 标记法用  $^{131}\text{I}$  标记单抗 LC-1<sup>[6]</sup>。用 Sephadex G-25 去除游

离 $^{131}\text{I}$ 。用三氯醋酸沉淀法测定单抗 LC-1 的标记率、比放射性和放化纯度。实验中所用标记样品的纯度大于 80%,达到基本要求<sup>[7]</sup>。

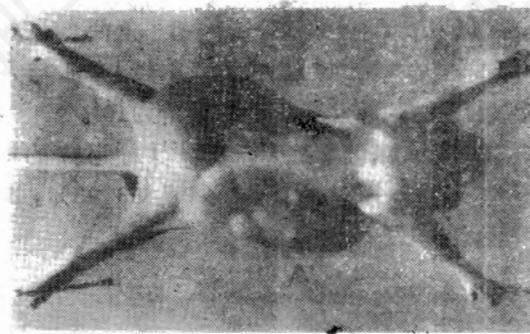


图 1 荷瘤裸鼠模型

A. 人肺腺癌(LAX-83)

B. 人胃癌(SGC-7901)

四、荷瘤裸鼠的放射免疫定位 4 只接种了人肺腺癌(LAX-83)和人胃癌(SGC-7901)的裸鼠模型,经腹腔注射  $14.8 \text{ mol/L Bq}^{131}\text{I-LC-1}$ /只。注射前三天饮水中加碘化钾(最终浓度为 1%),以封闭甲状腺对放射性碘的摄取。注射后 24、48、72、96 小时进行  $\gamma$  照像。

五、 $^{131}\text{I-LC-1}$  在荷瘤裸鼠体内的分布 经 96 小时  $\gamma$  照像后的裸鼠经眼眶放血、脱颈处死。解剖后取出部分人肺腺癌、人胃癌和各主要脏器。各组织块用生理盐水洗涤后,吸干、称重,在井型探头  $\gamma$ -计数器中测定放射性强度,计算每克人肺腺癌与人胃癌的放

本文受上海市自然科学发展基金资助。

\* 中国科学院上海药物研究所

\*\* 上海市第六人民医院

射性比值(Lca/Sca)及与各主要脏器的放射性比值(T/NT)。

**六、人肺腺癌细胞与人胃癌、脾脏细胞放射性的比较** 在上述体内分布实验中,将部分人肺腺癌、人胃癌和脾脏分别在120目尼龙网上剪碎,冲洗过滤制备成细胞悬液,用血球计数板计数,在井型探头 $\gamma$ -计数器上分别测定它们的放射性强度。用含2%小牛血清的pH 7.4 0.05 mol/L PBS将细胞洗涤三次,再测定各细胞的放射性强度,计算 $1 \times 10^6$ 个细胞洗涤前及洗涤后的放射性强度。

### 实验结果

**一、提纯后的单抗 LC-1 的鉴定** 提纯后的单抗 LC-1 在免疫电泳中与兔抗小鼠全血清抗体只产生一条沉淀线(图2)。在双向免疫扩散中只与抗小鼠 IgM 抗体产生沉淀线(图3)。这说明所提纯的单抗 LC-1 达到了免疫纯。经 ELISA 法测定提纯的 2 mg/ml 单抗 LC-1 与人肺腺癌细胞(SPC-A<sub>1</sub>)反应的效价为 $10^4$ 。

**二、<sup>131</sup>I 标记单抗 LC-1** <sup>131</sup>I 标记后的单抗 LC-1, 经测定, 它的标记率为 63.96%, 比放射活性为 222 kBq/ $\mu$ g。

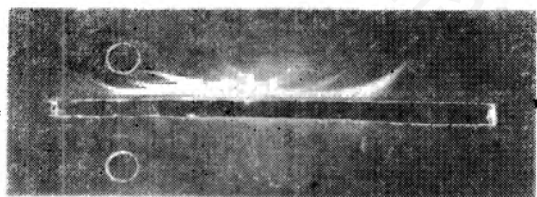


图2 纯化的单抗 LC-1 免疫电泳结果

上。正常小鼠血清 下。纯化的单抗 LC-1 中间槽。兔抗小鼠全血清抗体

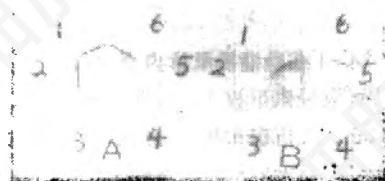


图3 纯化的单抗 LC-1 双向免疫扩散试验结果

中间孔 A. 抗小鼠 IgM 抗体  
B. 抗小鼠 IgG 抗体  
外周孔 1. 正常小鼠血清(1/10)  
2—6. 纯化的单抗 LC-1(不同浓度)



图4 注射 <sup>131</sup>I-LC-1 48 小时  $\gamma$  照像结果

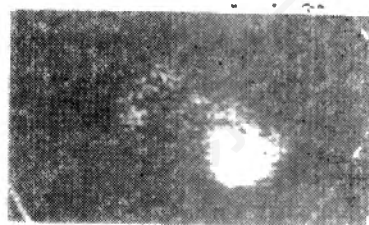


图5 注射 <sup>131</sup>I-LC-1 72 小时  $\gamma$  照像结果

表1 <sup>131</sup>I-LC-1 注入荷瘤裸鼠后 96 小时 T/NT 值及 Lca/Sca 值

组 织	T/NT 值及 Lca/Sca 值( $\bar{x} \pm SD$ )
血 液	1.64 $\pm$ 0.67
肝	1.22 $\pm$ 0.54
肾	1.84 $\pm$ 0.60
脾	1.44 $\pm$ 0.57
胃	2.70 $\pm$ 0.90
心	3.10 $\pm$ 0.69
肺	1.42 $\pm$ 0.35
甲 状 腺	3.07 $\pm$ 1.41
肌 肉	2.67 $\pm$ 0.91
肠	2.47 $\pm$ 0.57
膀 胱	1.78 $\pm$ 0.81
人 胃 癌	3.03 $\pm$ 1.02

\* n = 4

**三、荷瘤裸鼠的放射免疫定位** 荷瘤裸鼠经腹腔注射 <sup>131</sup>I-LC-1 后, 在不同时间  $\gamma$  照像结果显示: 24 小时人肺腺癌、人胃癌及裸鼠身体各部分放射性分布均匀; 48 小时人肺腺癌的放射性高于人胃癌和各主要脏器, 照

表2 人肺腺癌、人胃癌及脾脏细胞洗涤前后放射性比较

裸鼠	组织细胞	人肺腺癌 (CPM/10 <sup>6</sup> 细胞)	人胃癌 (CPM/10 <sup>6</sup> 细胞)	脾脏 (CPM/10 <sup>6</sup> 细胞)
	洗涤状况			
1	洗涤前	2488.67	35.44	319.80
	洗涤后	295.33	0.00	0.00
	洗涤前后放射性比	12%	0%	0%
2	洗涤前	818.00	5.13	39.47
	洗涤后	165.33	0.00	0.00
	洗涤前后放射性比	20%	0%	0%

片上可以看到人肺腺癌的轮廓(图4);72小时裸鼠胸腹部有不完全显像,人肺腺癌显像已十分清楚(图5);96小时除人肺腺癌外裸鼠身体其余部分基本不显像。

四、<sup>131</sup>I-LC-1在荷瘤裸鼠体内的分布  
荷瘤裸鼠经腹腔注射<sup>131</sup>I-LC-1后96小时,Lca/Sca、T/NT值均大于1(表1)。其中较为重要的如人肺腺癌与血液、正常肺的T/NT分别为1.64和1.42;而Lca/Sca为3.03。

五、人肺腺癌细胞与人胃癌细胞、脾细胞放射性的比较  
洗涤后的人肺腺癌细胞、人胃癌细胞和脾细胞放射性都有下降,其中人胃癌细胞和脾细胞在井型探头γ-计数器上已测不出放射性,而人肺腺癌细胞放射性虽有下降,但仍保持原有的放射性的12%—20%(表2)。

### 讨 论

我们于1989年建立了一株分泌抗人肺癌单抗的杂交瘤细胞株(LC-1),其分泌的单抗经ABC酶染色检测显示在体外有较强的特异性和亲和性<sup>[1]</sup>,不过Mc Cready等人发现,体外培养的和体内生长的肿瘤细胞表面的抗原表达有所不同,体外结合指标并不能预示体内的结果<sup>[8]</sup>。因此,单抗LC-1能否在临床上用于放射免疫定位诊断必须用体内实验加以研究。本工作结果表明,单抗LC-1在荷瘤裸鼠体内

对人肺腺癌有良好的特异性和亲和性。γ照像结果表明,在24小时到96小时中人肺腺癌的图像逐渐清晰,72小时可看到清楚的人肺腺癌的显像;而人胃癌及其它脏器的图像则由明显至不明显,最后到不显像。这说明<sup>131</sup>I-LC-1是随血流在人肺腺癌部位与癌细胞结合,产生积聚,从而呈现清晰的轮廓。<sup>131</sup>I-LC-1注射后96小时在裸鼠体内的分布显示Lca/Sca值、T/NT值均大于1,其中瘤血比为1.64±0.67,也与其他作者所报道的不同单抗的瘤血比大多在1.5—2.0之间的结果相似<sup>[6,9,10]</sup>,说明单抗LC-1在人肺腺癌处的积聚并非完全由血供造成的。从洗涤前后的人肺腺癌、人胃癌及脾脏细胞放射性的结果来看,人胃癌和脾脏细胞经洗涤后测不出放射性,而洗涤后的人肺腺癌细胞仍保持一定的放射性,进一步说明了单抗LC-1在体内确能与人肺腺癌细胞产生特异性结合。至于造成人肺腺癌细胞放射性降低的原因,可能由于部分同位素标记在抗体的可变区内致使抗体与抗原结合的空间位阻增加,抗体直接与氧化剂、还原剂接触使敏感的氨基酸残基受损伤,射线对抗体的损伤……此外,我们所采用的抗体纯化方法,很难去除腹水中含有的正常小鼠IgM型抗体,这部分非特异抗体虽然对肿瘤细胞没有活性,但可能会形成非特异性吸附,这种非特异性吸附的抗体

一经洗涤就可能从细胞上洗脱下来。

人胃癌 $\gamma$ 照像结果显示,从48小时起即未见显像,96小时的Lca/Sca为3.03,洗涤后的胃癌细胞不能再测出放射性,所有这些结果都反映了在人胃癌部位的少量同位素的存在主要是由于血流及非特异吸附所造成的,不是单抗LC-1与人胃癌细胞特异性结合的积聚。我们在这方面的工作与李明采用 $^{125}\text{I}$ 标记单抗LC-1和正常小鼠IgM分别经腹腔注入荷人肺腺癌(SPC-A<sub>1</sub>)裸鼠体内,72小时的定位系数为1.38的结果相似<sup>[11]</sup>。这说明采用试验和对照肿瘤接种同一裸鼠进行放射免疫试验是值得采用的方法。同时这样的方法或可减少因个体差异造成的误差,也可避免裸鼠价格昂贵、正

常小鼠IgM来源困难等因素的限制。

### 参 考 文 献

- [1] 葛锡锐等, 1989, 实验生物学报, 22: 359.
- [2] Garcia-Gonzalez, M. et al., 1988, *J Immunol Meth.*, 111: 17.
- [3] 陈登鸿等, 1982, 实验生物学报, 15: 247.
- [4] 张素胤等, 1987, 中国药理学报, 8: 366.
- [5] 王龙宝等, 1987, 肿瘤, 7: 52.
- [6] 俞雁宾等, 1987, 中华肿瘤杂志, 9: 165.
- [7] 肖祥熊等, 1985, 实用放射免疫分析及其临床意义, P 43, 同济大学出版社.
- [8] Mc Cready, D. R. et al., 1989, *J. NCI.*, 81: 682.
- [9] Koji, T. et al., 1980, *Cancer Res.*, 40: 3013.
- [10] Khaw, B. A. et al., 1984, *J. Nucl Med.*, 25: 592.
- [11] 李明等, 1992, 实验生物学报, 25: 31.

## MTT 法快速测定 TNF 活性

虞冠华 龙 娜 施凤霞 许祥裕 丁树标 罗丽华

(南京军区军事医学研究所 210002)

肿瘤坏死因子(TNF)能特异地杀伤肿瘤细胞,对正常组织无明显的毒性作用,因而受到人们的普遍关注。近年来的研究发现, TNF还具有抗病毒、免疫调节、伤口愈合<sup>[1-3]</sup>等作用,同时临床研究也表明,体内TNF量异常与肿瘤<sup>[4]</sup>、感染<sup>[5]</sup>、自身免疫<sup>[6]</sup>等均有关系。因此,建立一个简易、快速、稳定的TNF检测方法对基础理论的研究,尤其是临床上的普及应用是非常必须的。

TNF的定量测定是基于TNF对L 929细胞的细胞毒性作用。根据示踪方法的不同分为同位素释放法<sup>[7]</sup>、形态学法<sup>[8]</sup>、染色法<sup>[9]</sup>等。同位素法有客观指标,微量、灵敏,应用较多。但设备要求高,需要酶消化,程序长,容易造成同位素污染。形态学法用肉眼判断结果,受人为因素影响较大。染色法根据染料不同有结晶紫法、MTT法等。本文用MTT进行染色示踪,并改进了加细胞和样品的时间,使整个测定在30小时内完成,操作简单方便,结果

稳定。

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料

- 1、L 929细胞:引自上海第二军医大学,10% FCS 1640条件下贴壁培养。
- 2、TNF标准品:美国Biogene公司产品。
- 3、重组TNF样品:本室制备纯化。
- 4、放线菌素D: Fluka Biochemika公司产品,用10% FCS 1640配成2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,滤菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- 5、MTT: Fluka Biochemika公司产品,用0.01 mol/L PBS pH 7.2—0.14 mol/L NaCl配成5 mg/ml,滤菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,两周内使用。
- 6、 $^3\text{H}$ -TdR:上海原子能研究所。
- 7、酶标仪: Titertek Multiskan plus MKII型,英国Flow公司。
- 8、液体闪烁计数器: LS 6000 SE型,美国Bac-kem公司。

#### 二、方法

- 1、靶细胞处理:传代培养3—4天,处于对数生长期的L 929细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后,