

烧伤自体皮不足提供了一条新途径^[8]。

摘 要

本文分别以五种不同浓度的表皮细胞和四种密度的3T3细胞饲养层做了混合培养观察。接种前3T3细胞先行⁶⁰Co, 60 Gy放射。培养的表皮膜片均做了大体染色, 组织切片和电镜观察。不同培养时间的表皮细胞还分别进行了DNA合成³H-TdR掺入标记测定。

结果证实表皮细胞与3T3细胞最佳混合接种比例为1:1。最适细胞接种量为 $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 。在此条件下表皮细胞生长最快, 15天形成膜片。而且饲养层培养表皮细胞接种量少, 表皮面积扩大倍数大。为此我们认为饲养层培养是表皮细胞培养的最好方法之一。

图 版 说 明

图 1 培养后第7天表皮细胞在饲养层中形成集落。剪头为3T3细胞条带(倒置显微镜 $\times 100$)

图 2 表皮细胞培养后15天生长成的表皮膜片。
(倒置显微镜 $\times 100$)

图 3 培养第10天后表皮膜片组织切片 \downarrow 为基底细胞

(光镜 $\times 150$)

图 4 表皮细胞培养后21天的透射电镜。
($\times 8000$)

- A. 桥粒
- B. 张力纤维
- C. 粗面内质网

参 考 文 献

- [1] Rheinwala, G. et al., 1975, *Cell.*, 6: 331—344.
- [2] Green, H. et al., 1987, *Science.*, 200: 1385.
- [3] Milo, G. E. et al., 1980, *In Vitro.*, 16: 20.
- [4] Gallico, G. G. et al., 1984, *New England J. Medicine.*, 311: 448.
- [5] Hagflick, L. et al., 1973, *Tissue culture methods and application.* New York. PP. 220.
- [6] Gilcrest, B. A. et al., 1980, *Cell Biol Inter Reports.*, 4: 11.
- [7] Green, H. et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 5665.
- [8] Daniel, A. et al., 1986, *J. Invest Dermat.*, 86: 181.

人肺癌免疫导向药物的研究 II. 单抗和苯丁酸氮芥结合物的研究

郭 瑶 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

张鸿良

(中国科学院上海药物研究所)

早在1905年Paul Ehrlich就提出了“导向药物”的概念, 单克隆抗体技术的问世使这一概念得到相应的发展, 特别活跃的领域之一是单克隆抗体与药物的结合物作为有潜在应用价值的免疫导向药物, 俗称“生物导弹”。其次, 由于生物导弹能更集中于靶细胞, 因此有可能使达到正常组织和细胞的生物导弹的量比药物单

独作用时少, 故兼有减少副作用的可能, 有希望发展成为一种新的治疗肿瘤方法。已经结合的“弹头”包括细菌或植物毒素, 如白喉毒素, 蓖

本工作部分受国家“七五”肺癌攻关项目和上海市科学技术发展基金项目资助。工作过程中得到本实验室同仁和中科院药物所陈崇光、郭秀月同志的热情帮助, 特此致谢。

mmol) 掺入细胞量作为细胞生长速率的指标, 对比观察单抗-CBL 结合物、CBL、LAC-210 单抗、NIgG、NIgG-CBL 结合物对 SPC-A₁ 肺腺癌细胞的体外杀伤作用。取生长形态好的 SPC-A₁ 细胞, 稀释成 8×10^4 /ml, 每孔接种 2×10^4 细胞, 加入待测样品, 每组 3 孔。培养 24 小时后轻轻吸去药液, 然后每孔加入含 ³H-TdR 1 μ ci 的新鲜培养液, 再培养 24 小时后吸取上清液, 加胰酶(Difco 生产)消化液(0.05%·0.02% EDTA·0.85% NaCl)消化 8 分钟, 用多头细胞收集仪收集细胞于玻璃纤维膜上, 用蒸馏水反复洗几次, 再以 95% 乙醇洗 1 次。取下滤条, 37°C 烘干, 置闪烁瓶中加闪烁液测定。

六、补体依赖的溶细胞作用

收集 SPC-A₁ 细胞, 计数活细胞(>95%)。各反应管内置 2×10^6 细胞(0.1 ml), 分组加入 210 腹水 0.1 ml, SP₂/O 腹水 0.1 ml, 以 PBS 作对照; 混匀后, 分别加入 0.1 ml 新鲜或冻存的豚鼠血清、兔血清、人血清作补体, 以 PBS 作对照, 充分摇匀, 置 37°C 孵育 30 分钟, 其间摇动一次。最后用台盼兰染色法测定死亡细胞率^[14]。进一步用 210 腹水或纯化单抗及 1:20 兔血清按上法重复 1—2 次作用于 SPC-A₁ 细胞^[15]。分别观察 210 单抗和补体的溶细胞作用。

结 果

一、单抗纯化结果

用正常小鼠血清上 Protein A-Sepharose CL-4 B 柱, 结果如图 1。在 pH 6.0 能得到较纯的 IgG₁, 在 pH 3.0 能得到较纯的 IgG₂, 而在 pH 4.0 峰, 则主要含有 IgG₃, 但也混有少量的 IgG₂。LAC-210 腹水的纯化结果如图 2, 纯化后的单抗除主要是 IgG₃ 外, 还伴有痕量的 IgG₂。

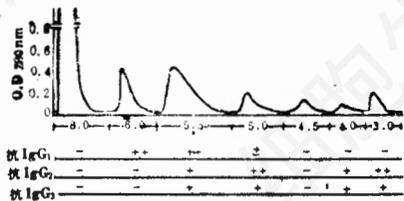


图 1 不同 pH 缓冲液洗脱图谱及双扩散试验

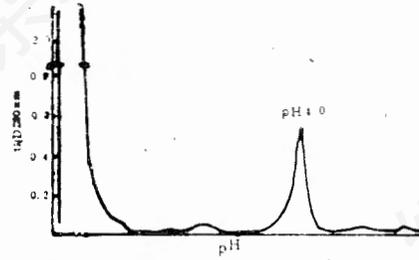


图 2 LAC-210 单抗纯化图谱

二、结合物的制备与鉴定

1. 光谱叠加法求算分子比

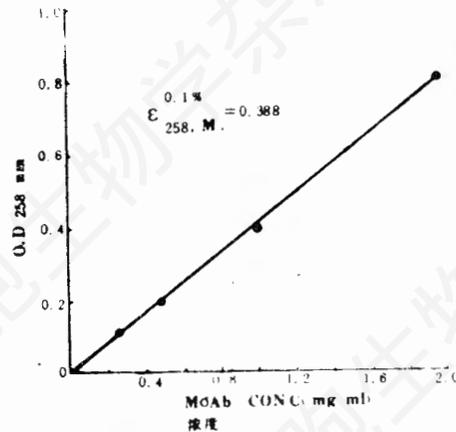


图 3 求 $\epsilon_{258}^{0.1\%}, M$ 标准曲线

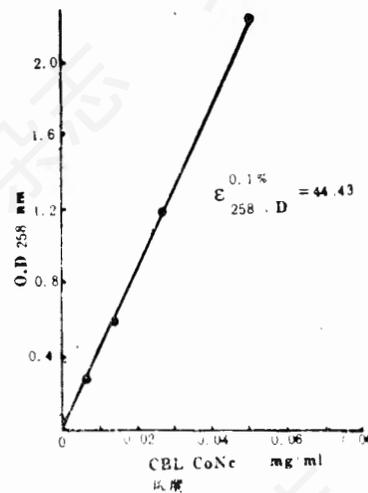


图 4 求 $\epsilon_{258}^{0.1\%}, D$ 标准曲线

结合物的几次制备结果见表 1。

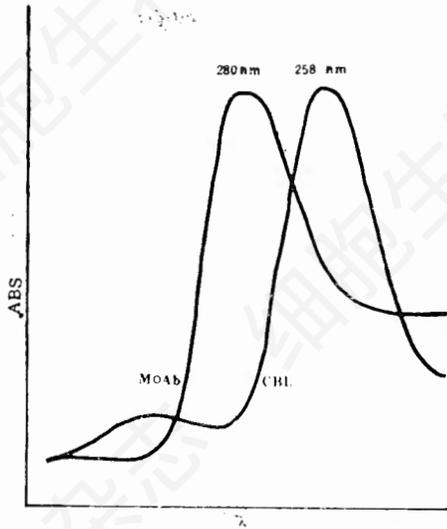


图5 MoAb和CBL全波长扫描图谱

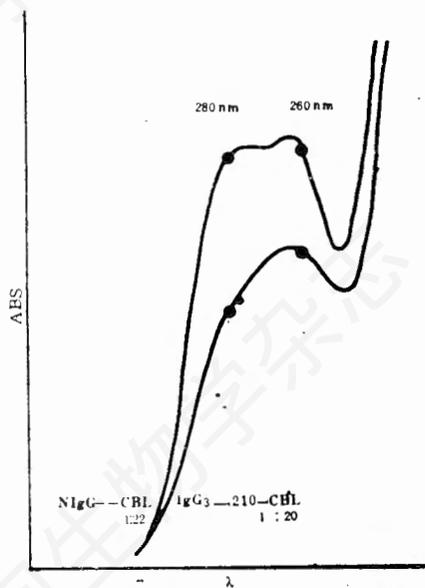


图6 MoAb-CBL及NIgG-CBL结合物全波长扫描图

2. 结合物中CBL活性的测定
 由于最后一步碱化形成的颜色很不稳定，

表1 免疫球蛋白与CBL结合物的制备及分析

制备物	投料比	蛋白回收率	分子比
M ₀ Ab-CBL	1:48	69%	1:17
M ₀ Ab-CBL	1:49	92%	1:20
NIgG-CBL	1:45	82%	1:22

尤其在光照下极易消失，所以吸收值变化很快，无法定值。进行了一些改进的尝试，如碱化在冰浴中进行、避光，结果虽好，但重复性较差，故此实验只能定性观察。图7 I、II为两次重复结果。

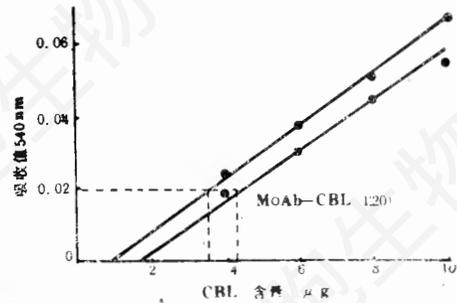


图7 Epstein改良法测CBL活性基团标准曲线

3. 结合物中抗体活性的测定

结果见表2。

M₀Ab-CBL结合物具有较好的ELISA阳性结果，表明抗体亲和力依然很高，在制备过程中没有造成失活。

三、体外毒性试验

1. 补体依赖的溶细胞试验

表3结果表明LAC-210单抗在不同来源，包括兔、人、豚鼠补体参与下，未能破坏靶细胞SPC-A₁。甚至重复一次或二次处理也均未能破坏靶细胞。

表2 单抗与CBL结合物中抗体活性的分析

样品	MoAb	MoAb-CBL(1:20)	NIgG	NIgG-CAL(1:22)
浓度	0.15 mg/ml	0.12 mg/ml—0.0032 mg/ml	0.33 mg/ml	0.0105 mg/ml—0.24 mg/ml
OD _{495nm}	0.720	0.997	0.030	0.124

表3 抗人肺癌单抗LAC-210对人肺癌靶细胞SPC-A⁻¹的依赖补体的细胞毒试验

孵育物	细胞死亡率(%)	
210 腹水 (1:1000)	人补体(1:20)	7.1
	兔补体(1:20)	4.7
	豚鼠补体(1:20)	8.2
	PBS	4.8
PBS	人补体(1:20)	4.1
	兔补体(1:20)	5.8
	豚鼠补体(1:20)	4.6
SP 2/0 腹水 (1:1000)	人补体(1:20)	8.1
	兔补体(1:20)	11.8
	豚鼠补体(1:20)	7.0
	PBS	9.5
210 腹水 (1:1000)	兔补体(1:20)	3.6(一次)*
		5.0(二次)
		5.0(三次)
210 单抗 (0.33 mg/ml)	兔补体(1:20)	7.4(一次)
		9.0(二次)
		11.0(三次)

* 重复作用次数

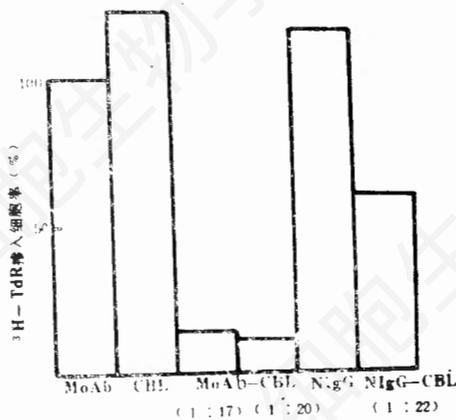


图8 LAC-210单抗和CBL结合物对靶细胞³H-TdR掺入的影响

2. ³H-TdR 掺入试验

在近似浓度下,各检测物对靶细胞SPC-A₁的抑制 TdR 摄取结果见图8。与结合前的单抗或CBL单独作用对比,可见MoAb-CBL结合物对靶细胞有明显的杀伤和抑制作用,10⁻⁵mol/L浓度对³H-TdR掺入细胞的量即有影响,CPM相当于单抗对照的15.7%(1:17结合物)、12.0%(1:20结合物),10⁻⁵mol/L CBL的相对掺入率为123%。正常IgG和NlgG-CBL结合物的相对掺入率分别为115.5%,57.5%,但是NlgG-CBL结合物中CBL的浓度约为10⁻³mol/L,比MoAb-CBL结合物中的CBL浓度高100倍以上。从图9可知10⁻³mol/L CBL的相对掺入率为90.4%,显示有一定的抑制作用。但为什么NlgG-CBL结合物有较高的抑制作用,而且经重复试验也如此,现在还无法解释。

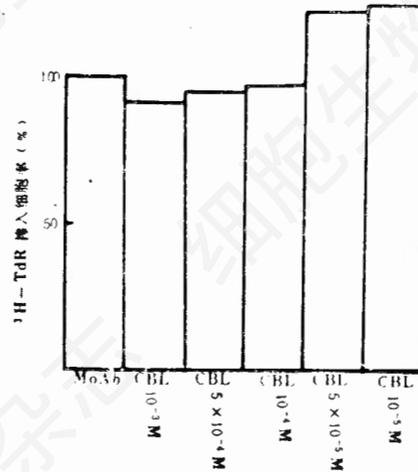


图9 不同浓度的CBL对靶细胞³H-TdR掺入的影响

讨论

我们采用ProteinA-Sepharose CL-4 B来分离单抗IgG的亚类,小鼠IgG亚类对ProteinA的结合力为IgG_{2b}>IgG₃>IgG_{2a}>IgG₁,选用不同pH值的缓冲液即可分别洗脱下来^[16,17]。从正常小鼠血清纯化IgG的结果可知,选用pH 4的缓冲液即可得到IgG₃。但在多次分离

纯化 IgG₃ 中常混有一定量的 IgG_{2a}, 由于对照组这种情况也有, 故而这种结合物只能认为是 IgG 类和药物的结合物, 而不是某种亚类与药物的结合物。在纯化 LAC-210 与 CBL 的结合物时, 洗脱缓冲液浓度不能太低, 否则易生沉淀^[17]。其次, 葡聚糖凝胶含有少量羧基, 可能与蛋白质的碱性基团相互吸引, 从而吸附了部分蛋白质。为了避免这种现象的发生, 必须提高洗脱剂的离子强度。我们最初选用 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液, 蛋白回收率只有 20—30%。以后换用 0.1 mol/L 的 PBS, 得率可达 80—90%。

用光谱法测分子比的所有操作中, 要尽量避免用塑料制品, 以用玻璃制品为佳。因为我们在扫描中发现, 塑料制品的使用会在 258 nm 区域产生 3 个峰, 且在 258 nm 处为最大吸收峰。这可能是由于从塑料中分解下来的某种物质或基团所引起的, 这物质的积聚会严重影响分子比的测定。

细胞毒试验也受诸多因素的影响, 其中除培养细胞的质量外, 另一重要因素是单抗和靶细胞结合的比例。通常结合比愈高, 杀伤率也愈大。我们曾用 LAC-210 单抗作 FACS 测定, 与靶细胞的结合率为 47.75%, 当这部分能结合单抗的细胞遇到单抗和 CBL 的结合物时, 有可能抑制胸腺嘧啶核苷掺入靶细胞。从表 3 结果可以看出, 在补体存在时, 单抗本身并无杀伤靶细胞的作用。Bernal 等人^[15]曾在兔补体参与下将抗人肺癌单抗与靶细胞作用, 未见明显杀伤效用, 但重复作用两次后几乎所有细胞被杀死。而本文实验中在兔补体参与下作用 1—3 次, 均未见杀伤作用。由此可见, 这种抑制作用乃是由结合物中的药物所引起的。

在本工作过程中, 我们曾先后用过 ³H-Leucine 和 ³H-Thymide 作示踪, 以 ³H-Thymide 的结果较为稳定; 也曾探索过 MTT 方法, 感到此法简便, 如果测定的重复性得到改善的话, 似可替代同位素法。

摘 要

本文报道采用 A 蛋白-琼脂糖凝胶 CL-4 B 亲和层析柱, 从小鼠腹水中纯化针对人肺癌细胞表面抗原的单克隆抗体。继而用苯丁酸氮芥与 N-羟基琥珀酰胺反应产生一活性酯, 然后此化合物与单克隆抗体反应得到单抗与药物的共价结合物。平均每个抗体分子上结合约 20 个 CBL 分子。结合物中的 CBL 活性及单抗活性基本均无损失。在兔、人和豚鼠等不同来源的补体参与下, LAC-210 单抗未能杀伤靶细胞 SPC-A₁。以 ³H-TdR 掺入人肺癌 SPC-A₁ 细胞为标志, 表明此结合物具有明显抑制 TdR 掺入肿瘤细胞的作用。

参 考 文 献

- [1] 谈立松等, 1983, 国外医学—微生物学分册, 6: 66.
- [2] Vitetta, E. S. et al., 1983, *Science*, 219 (4585): 644.
- [3] 王庆诚, 1983, 肿瘤, 6(2): 90—92.
- [4] Mach, J. P. et al., 1983, *Cancer Res.*, 43: 5593.
- [5] Price, M. R. et al., 1984, *Br J. Cancer*, 49: 809—812.
- [6] 葛锡锐等, 1987, 实验生物学报, 20(4): 421—435.
- [7] Neoh, S. H. et al., 1986, *J. Immunol. Meth.*, 91: 231—235.
- [8] Watanabe, M. et al., 1981, *Japan. J. Exp Med.*, 50(1): 65—70.
- [9] Smyth, M. J. et al., 1987, *Cancer Res.*, 47: 62—69.
- [10] Bradford, M. M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72: 248—253.
- [11] 张鸿良等, 单克隆抗体通讯, 待发表资料.
- [12] Epstein, J. et al., 1955, *Anal. Chemistry*, 27(9).
- [13] 葛锡锐等, 1988, 实验生物学报, 21(2): 251—255.
- [14] 李绍康等, 1980, 细胞生物学杂志, 2(1): 45.
- [15] Bernal, D. et al., 1985, *Cancer Res.*, 45 1026—1032.
- [16] 章谷生等, 1982, 上海免疫学杂志, 2(5): 50—53.
- [17] Golding, J. W., 1983, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, P 113—116, Academic Press.