

# 癌胚抗原单克隆抗体的制备及免疫学性状的研究

卢宝兰 程明 强来英 尹红章 张怡 冯新泉

(卫生部北京生物制品研究所, 北京)

用由结肠癌肝转移灶纯化的 CEA 抗原免疫 BALB/C 小鼠, 其脾细胞与鼠骨髓瘤细胞 SP2/O 融合, 制备产生 CEAMcAb 的杂交瘤。用 ELISA 法检测与 CEA、NCA、NCA-2 的反应特异性。获得 8 株仅与 CEA 有结合反应的 McAb, 通过阻断抑制试验证明这 8 株 McAb 认识 CEA 分子上三个不同的抗原决定簇。它们的免疫球蛋白亚类同是 IgG<sub>1</sub>。

**关键词** 癌胚抗原; 单克隆抗体; 免疫

癌胚抗原 (CEA) 是人类消化道肿瘤为主的多种恶性肿瘤的标记。大量临床检验的结果表明, 动态测定 CEA 有助于判断肿瘤的临床病程、预后、治疗效果及预测有无复发转移。近年来又有将 CEA 抗体标记上同位素或结合某些毒性物质、抗癌药物等进行定位或成像诊断及导向治疗的尝试。但是 CEA 与存在于肺、脾和颗粒性白细胞表面的正常交叉反应抗原 (NCA)<sup>[1]</sup> 及成人或胎粪中的粪抗原 (NCA-2<sup>[2]</sup>、NFA-1<sup>[3]</sup>、NFA-2<sup>[3]</sup>) 有共同的抗原决定簇。因此用普通免疫方法制备的多克隆抗 CEA 血清与上述相关抗原有很强的交叉反应, 从而影响临床诊断及导向治疗的特异性。近年来, 由于单克隆抗体 (McAb) 技术的建立, 有了获得高效价的、仅识别单个抗原决定簇的抗体的可能性。为此我们应用 McAb 技术, 试图制备出针对 CEA 特异抗原决定簇的抗体, 来提高临床诊断的阳性率和特异性, 为定位成像诊断和导向治疗提供特异性抗体。本文报道 CEAMcAb 的制备方法及各株 CEAMcAb 的免疫学性状。

## 材料与方法

### (一) BALB/C 小鼠及 SP2/O 浆细胞瘤细胞株

BALB/C 小鼠系本所试验动物室繁殖饲养。SP2/O 由 Dr. R. G. Webster 提供, 本实验室传代保存。

### (二) 抗原制备及免疫

免疫用的纯化 CEA 系从结肠癌肝转移灶 (1) 提取 (方法见另文)<sup>[4]</sup>。20 $\mu$ g 抗原溶于 0.1ml 生理盐水中, 与等量福氏完全佐剂充分混合, 腹腔注射, 三个月后腹腔注射 30 $\mu$ g 抗原溶于 0.2ml 生理盐水中。三天后取脾做细胞融合。NCA 由正常人脾及肺提取。NCA-2 由胎粪提取 (方法见另文<sup>[4]</sup>)。另用四个不同个体的结肠癌或胃癌的原发灶及转移灶提取的 CEA 作为检测用。

### (三) 单克隆抗体的制备

1. 细胞融合: 取免疫小鼠脾制成细

胞悬液。将脾细胞和 SP2/O 细胞按 10:1 的比例混合,用 pH7.0、50% PEG (MW1000) 融合。融合细胞混悬于 HAT-CM 中〔含  $2 \times$  HAT 的 DMEM 完全培养液,与 SP2/O 细胞培养上清液 (CM) 等量混合〕。加入健康 BALB/C 小鼠的胸腺和脾细胞作为饲养细胞,接种 96 孔培养板。置 37°C 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中培育。定期加液或换液。培育 14 天后改换 HT-CM 培养液。

2. 抗体检测:用 ELISA 法筛选抗体阳性孔,方法是先把 CEA 结合到免抗 CEA 抗体包被的固相珠上,然后加入待检培养上清液,反应后加入酶标兔抗鼠 Ig,最后加底物显色,肉眼筛选 (+ +) 以上的阳性孔,扩大培养,上清液再一次检测与 CEA 的反应性及有无与 NCA、NCA-2 的交叉反应。方法是用 NCA、NCA-2 分别包被于固相珠上,加待检上清液进行 ELISA 测定。

3. 杂交瘤细胞的克隆化:抗体分泌阳性孔的细胞,经传代增殖后,用含有饲养细胞的 0.35% 软琼脂克隆,十天后挑选单个细胞集落,扩大培养,再次检测上清与 CEA 的反应性。抗体阳性的细胞株经 2—3 个月连续传代后,再次克隆。

4. McAb 的制备:克隆后的抗体阳性细胞注射于 BALB/C 小鼠腹腔内 (200 万细胞/只),小鼠在 2—4 周前注射降植烷。6—10 天后抽取腹水,腹水经 40% 饱和硫酸铵沉淀及 DEAE 离子交换柱层析纯化 IgG。

#### (四) CEAMcAb 免疫学性状的分析方法

1. 抗体活性及亲和常数 K 测定:用 ELISA 法测定各株 McAb 对免疫原 CEA 及其它四份不同肿瘤来源 CEA 的结合活性。亲和常数 K 值测定参照 Steward 等人的方法<sup>[5]</sup>,变量<sup>125</sup>I-CEA 与定量抗体

反应,用 50% 饱和硫酸铵分离结合的与游离的抗原,测定结合抗原的 cpm 值,用外推法求 K 值。

2. McAb 识别的抗原决定簇的异同性分析:用 ELISA 法测定不同抗体间的阻断抑制作用。先制备 CEA 固相抗原,加入 100 倍稀释的腹水抗体作为第一抗体,反应后,洗涤,加入酶标记的第二抗体。如果第一抗体和酶标记的第二抗体认识的抗原决定簇是相同的或是相关的,则第二抗体与 CEA 的结合被抑制,否则第二抗体仍保持与 CEA 很高的结合能力。

3. 用琼脂免疫双扩散试验及抗体吸收试验分析各株 McAb 的异同性:将 9 株 McAb 与纯化 CEA 在 1% 琼脂糖或含有 5% PEG (MW6000) 的 1% 琼脂糖上作免疫双扩散试验。出现可见沉淀线的抗体分别经 CEA、NCA、NCA-2 吸收后,再用双扩散法测定与 CEA 的反应性。

4. 免疫组织化学分析:用 C<sub>14</sub>、C<sub>50</sub> 和 C<sub>6</sub> 分别作为第一抗体,用荧光标记或过氧化物酶标记的免抗鼠 IgG 进行间接荧光或酶染色,观察各种癌组织及正常组织的着色情况。

5. McAb 的 Ig 类别及亚类鉴定:用免抗鼠 Ig 的各类及亚类血清 (Bionetic),以免疫双扩散法或 ELISA 法鉴定。

## 结 果

进行了一次细胞融合,共接种 480 个孔,有杂交瘤生长的 332 个孔 (69.2%),初测抗体阳性者有 54 个孔 (16.2%),扩大培养后,进行特异性检测时,10 个孔丢失分泌抗体的能力,剩余的 44 个孔中,20 个孔只与 CEA 起反应,经两次软琼脂克隆后,建成株的有 8 株,它们是 C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>47</sub>, C<sub>50</sub>, C<sub>6</sub>; 24 个

孔与CEA、NCA-2 都有反应, 从中只选择了一个孔进行再克隆建株, 命名为C<sub>22</sub>。8 株CEA特异的McAb除对作为免疫原的CEA (结肠癌肝转移灶 I) 有良好的反应性外, 与 4 个其他不同个体来源的CEA也有良好的反应性(结果见表 1)。亲和常数 K 值在  $2.3 \times 10^7 - 7.6 \times 10^9 M^{-1}$  范围之间。9 株McAb 的Ig 分类鉴定表明: C<sub>22</sub> 为IgG<sub>3</sub>, 其余均为IgG<sub>1</sub>。

表 1 McAbs对不同组织来源CEA 的反应性 (ELISA)

Table 1 Reactivity of McAbs against CEAs of different tissue origin (ELISA)

CEAs 的组织来源 CEAs tissue origin	P/N值 P/N value*							
	C <sub>2</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>17</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>47</sub>	C <sub>50</sub>	C <sub>6</sub>
结肠癌肝转移灶(1) Hepato-metastasis of colonic carc. (1)	3.2	4.3	4.4	5.4	4.8	4.0	2.4	4.2
胃癌肝转移灶 Hepato-metastasis of gastric carc.	2.3	3.0	3.2	4.3	3.9	2.9	3.7	1.86
结肠癌乳腺转移灶 Mammary gland metastasis of colonic carc.	2.8	4.1	4.5	5	4.7	3.9	3.9	3.3
结肠癌肝转移灶(2) Hepato-metastasis of colonic carc. (2)	2.5	4.3	4.5	5.4	4.4	3.1	4.0	3.1
结肠癌原发灶 Primary tumor of colonic carc.	3.0	5.1	4.6	5.6	4.7	3.5	3.2	3.1

注: (1) P, 实验组吸光度值, N; 对照组吸光度值, P/N值 > 2 为阳性。

(2) CEA McAb 用 1:100 腹水进行测定。  
note, \*P, A value of experiment, N; A value of control, P/N value > 2 = positive  
All the McAbs used were ascitic fluid dil. 1:100

C<sub>22</sub> 与CEA、NCA-2 均有反应, 说

明是针对 CEA 和 NCA-2 的共同决定簇的; 其余 8 株只与CEA结合, 是针对CEA特异抗原决定簇的。用ELISA阻断抑制试验分析这些抗体所识别的抗原决定簇的异同性, 根据不同McAb间相互抑制的程度, 可把 8 个株分为三组。从表 2 可见: 同组的各抗体间相互有很强的抑制作用, 但对其他两组的抗体则完全没有抑制或只有很轻微的抑制, 因此可以认为三个组的抗体是分别识别 CEA 分子上三个不同抗原区的。

表 2 阻断抑制试验 (ELISA)

Table 2 Blocking inhibition assay (ELISA)

阻断用第一 McAb 1:100 McAb(blocking):1:100	酶标第二McAb 的结合百分率 Binding % of enzyme labelled McAb			
	C <sub>14</sub> -E	C <sub>50</sub> -E	C <sub>6</sub> -E	
I	C <sub>2</sub>	9.3	100	100
	C <sub>5</sub>	3.5	100	100
	C <sub>14</sub>	2.8	100	100
	C <sub>17</sub>	2.3	100	100
II	C <sub>20</sub>	19.4	100	100
	C <sub>47</sub>	100	9.8	100
III	C <sub>50</sub>	100	8.2	100
	C <sub>6</sub>	89	100	21

用 1% 琼脂糖作免疫双扩散试验时, 只有C<sub>22</sub>与CEA 出现可见沉淀线。该沉淀线如图 1 所示和兔抗CEA 血清与 CEA 抗原间出现的沉淀线有部分相关关系, 显然

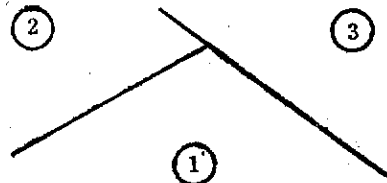


图 1 C<sub>22</sub>和兔抗CEA血清对CEA的免疫双扩散  
Fig. 1 Double immunodiffusion of C-22 and rabbit anti-CEA against CEA

1. 癌胚抗原 CEA
2. C-22
3. 兔抗CEA血清 Rabbit anti-CEA serum

多克隆抗CEA抗体中除了有类似C<sub>22</sub>性质的抗体外, 还有针对CEA上其他抗原决定簇的抗体。

用含5% PEG的1%琼脂糖作试验时, 不仅C<sub>22</sub>出现可见反应, C<sub>2</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>14</sub>、C<sub>17</sub>、C<sub>20</sub>也出现可沉淀线, 这5株的沉淀线是相互融合的, 但与C<sub>22</sub>的沉淀线有部分吻合(见图2), 再次证明C<sub>2</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>14</sub>、C<sub>17</sub>、C<sub>20</sub>所认识的抗原决定簇是相同的, 与C<sub>22</sub>所识别的是不同的。第II组的C<sub>47</sub>、C<sub>50</sub>和第III组的C<sub>8</sub>即使在PEG琼脂糖中也不出现沉淀线, 将C<sub>47</sub>、C<sub>50</sub>、C<sub>8</sub>混合后再对CEA作免疫扩散, 也无肉眼可见反应。

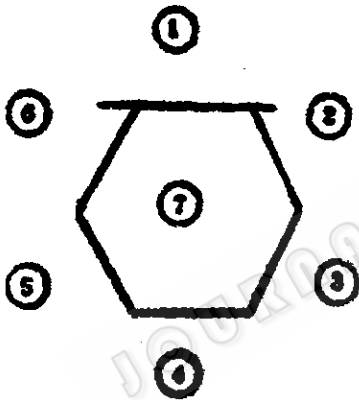


图2 1组McAbs和C<sub>22</sub>在含PEG的琼脂糖中对CEA的免疫双扩散

Fig. 2 Double immunodiffusion of group I McAbs and C-22 against CEA in agarose containing PEG

1. C<sub>22</sub>腹水C-22 Ascitic fluid
2. C<sub>14</sub>腹水C-14 Ascitic fluid
3. C<sub>17</sub>腹水C-17 Ascitic fluid
4. C<sub>20</sub>腹水C-20 Ascitic fluid
5. C<sub>5</sub>腹水C-5 Ascitic fluid
6. C<sub>2</sub>腹水C-2 Ascitic fluid
7. 癌胚抗原 CEA

用CEA、NCA、NCA-2三种抗原分别吸收第1组的代表株C<sub>14</sub>及C<sub>22</sub>后, 再对CEA作免疫双扩散反应。结果是C<sub>14</sub>经CEA吸收后, 沉淀线消失, 而经NCA或NCA-2吸收后, 仍保留与CEA的反应性。C<sub>22</sub>经CEA或NCA-2吸收后, 沉淀

线消失, 但NCA的吸收不影响与CEA的反应性。以上结果再一次证明第1组抗体是针对CEA的特异抗原决定簇, 而C<sub>22</sub>是抗CEA与NCA-2的共同抗原决定簇的。

间接免疫荧光和间接免疫酶染色的免疫组织化学分析的结果是一致的。C<sub>14</sub>、C<sub>50</sub>、C<sub>8</sub>在80-90%的结肠癌、胃癌、肺癌组织可见阳性染色。高分化腺癌的CEA染色主要位于癌腺腔的腔膜面呈线状分布, 腺腔内容物也常可见阳性染色, 散在癌细胞呈现膜着色。低分化及未分化癌大部分表现为胞浆内着色, 阳性物质呈细颗粒状, 癌细胞染色深浅不一。正常人除少数结肠粘膜的上皮表面有弱阳性着色外, 肝、脾、胃、肾、胰等组织均无阳性着色。

## 讨 论

CEAMcAb的研究工作国外已有报道, 但国内尚未见报道。国外报道所得到的CEA McAb中, 为数不少与CEA相关抗原有交叉反应<sup>[6]</sup>。另外一般认为可溶性抗原的McAb要比颗粒性抗原的McAb制备难度大, CEAMcAb的制备也是如此, Robertois<sup>[7]</sup>报道在七批细胞融合中, 仅获得两株。而我们融合了一批, 仅识别CEA特异抗原决定簇的就有20个孔, 加上认识CEA、NCA-2共同抗原决定簇的共有44个孔, 所得阳性抗体株的百分率显然高于国外报道。我们认为这除了所用的SP2/O活性好, 融合及培养条件较适宜外, 还和融合亲本中的特异性致敏淋巴细胞所占的百分率有关, 这又与免疫原的纯度、免疫原性和免疫程序有密切关系。我们制备CEA纯化抗原的方法不同于前人的报道, 不仅纯度高, 而且全部提取过程都在较温和的条件下进行, 保证了CEA的良好免疫原性。

CEA具有多个抗原决定簇, 黑木、松岡<sup>[8]</sup>报道CEA至少有4个不同的抗原决定簇, 其中一个与NCA共有, 两个与NFA-2或NCA-2共有, 另一个则是CEA特异的决定簇。我们在取CEA免疫小鼠脾脏的同时, 采集小鼠血清, 用ELISA法证明对CEA、NCA、NCA-2都有反应, 其中与NCA的反应最弱, 说明在鼠的免疫脾细胞中存在着分泌抗CEA、抗NCA及抗NCA-2的B细胞。但融合后得到了分泌抗CEA和抗NCA-2的McAb, 而未得到抗NCA的, 其原因可能是第一步筛选时, 只保留了反应(+++)以上的细胞孔, 把(+)反应的丢弃了, 由于在CEA分子上与NCA共同的抗原决定簇的抗原性弱, 所丢弃的(+)的细胞孔中很可能有一部分是抗NCA的。

C<sub>2</sub>是认识CEA与NCA-2的共同抗原决定簇的抗体, 在1%琼脂糖中它与CEA就能形成可见沉淀线。一般来说McAb由于只认识一个抗原决定簇, 很难产生沉淀反应。我们分析C<sub>2</sub>之所及产生沉

淀反应的原因可能是由于C<sub>2</sub>识别的抗原决定簇在CEA分子上重复出现的频率很高, 正因如此, 普通的多价CEA免疫血清与NCA-2的交叉反应性高于与CEA的反应性。

CEA分子上除了与各种相关抗原有交叉反应的共同决定簇外, 究竟有无特异性的抗原决定簇, 是一个长期以来有争议的问题。松岡<sup>[9]</sup>曾用被动输入NFA抗体的方法证明CEA有特异抗原决定簇, 但只是基于敏感度低的琼脂扩散分析法。我们用CEA McAb证明了CEA确有特异性的抗原决定簇, 从而为应用CEA抗体建立免疫诊断及免疫治疗方法奠定了基础。

CEA McAb的研制成功, 进而把不同性质的CEA McAb进行合理的组合, 无疑将有助于改进肿瘤的免疫诊断及开展免疫治疗的研究。随着CEA McAb的进展, 就有可能深入地剖析CEA的分子结构, 这对研究CEA的生物功能及癌变基础会起到重要的作用。

## 参 考 文 献

- [1] Mach, J. P., et al., *Immunochimistry*, 9:1031, 1972.
- [2] Burtin, P., et al., *J. Immunol.*, 111:1926, 1973.
- [3] Kuroki, M., et al., *Cancer Res.*, 41:713, 1981.
- [4] 程明等: 中华肿瘤杂志, 6:250, 1984.
- [5] Steward, M. W. & Petty, R. E., *immunology*, 23:881, 1972.
- [6] Herlyn, M., et al., *Hybridoma*, 2:329, 1983.
- [7] Roberto, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:563, 1980.
- [8] 黑木政秀, 松岡雄治: 代谢, 18:717, 1981.
- [9] Matsuoka, Y., et al., *Immunochimistry*, 12:779, 1975.

## DEVELOPMENT AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF ANTI-CEA MONOCLONAL ANTIBODIES

Lu Baolan    Cheng Ming    Qiang Laiying  
Yin Hongzhang    Zhang Yi    Fong Xinquan  
(*National Vaccine and Serum Institute, Beijing*)

Hybridomas producing monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA) have been developed by fusion of mouse myeloma cell line SP 2/O with splenocytes of BALB/C mice which are immunized with purified CEA from hepato-metastasis of colonic carcinoma. The ELISA method is used in examining the specificity of the antibody with CEA, NCA and NCA-2. Eight monoclonal antibodies bounded only to CEA have been obtained finally. These eight CEA specific antibodies have been proved to be recognized three differential epitope on CEA molecular according to the blocking inhibition assay. The Ig subclasses of these CEA McAbs have been determined to be the same IgG<sub>1</sub>.

### Key words

CEA; monoclonal antibody; immunology