

• 分子诊断学论著(全军检验大会优秀论文) •

结肠癌相关抗原的纯化与分析

田 笑

(中国人民解放军第二〇二医院检验科, 辽宁沈阳 110003)

摘 要:目的 从培养的人结肠腺癌细胞系 LS-180 细胞中纯化结肠癌相关抗原, 并对其基本特性进行分析, 探讨其在结肠癌组织中的表达。方法 以人结肠腺癌细胞 LS-180 免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 融合, 通过有限稀释法得到能稳定分泌抗 LS-180 细胞单克隆抗体的杂交瘤细胞株。再以 5×10^6 /mL 腹腔注射 BALB/c 小鼠, 收集腹水。裂解 LS-180 细胞, 通过抗结肠癌相关抗原 mAb SCAb8 与免疫沉淀柱偶联进行免疫沉淀纯化结肠癌相关抗原 SC8。浓缩后经 SDS-PAGE、Western blot 和 ELISA 法对纯化抗原进行鉴定。并用免疫组化的方法检测该抗原在结肠癌组织及正常组织和其他癌组织中的表达。结果 纯化所获结肠癌相关抗原 SC8, 其相对分子质量(Mr)约为 61 000, 由 30 000 和 31 000 两种亚基组成, 免疫组化实验表明, SC8 在结肠癌组织中有较高的表达, 与癌旁正常组织及其他癌组织相比存在显著的统计学差异($P < 0.05$)。结论 利用单克隆抗体 SCAb8 进行免疫沉淀, 从人结肠腺癌细胞 LS-180 中获得纯化的肿瘤相关抗原 SC8, 该抗原有可能在临床上为结肠癌的诊断和治疗提供一定的参考价值。

关键词:结肠肿瘤; 抗原, 肿瘤; 免疫沉淀; 免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2510-02

肿瘤是 21 世纪人类面临的巨大挑战, 在中国, 从 20 世纪 70 年代以来, 癌症发病率一直呈上升趋势, 无论是城市还是乡村, 恶性肿瘤死亡率均位居死亡疾病之首。为攻克癌症, 国家投入巨资进行研究, 尽管手术、放疗、化疗技术在肿瘤的治疗上取得了一定的成绩, 但对恶性肿瘤的治疗仍不理想^[1]。本实验中我们用免疫沉淀的方法, 利用本实验室制备纯化的抗结肠癌相关抗原的单克隆抗体(mAb), 从结肠癌细胞裂解液中获得相关抗原, 用 SDS-PAGE、Western blot 对纯化抗原进行鉴定^[2]。通过对肿瘤抗原的纯化与鉴定, 了解抗原的本质, 为进一步发现肿瘤标志物、发展肿瘤免疫治疗奠定基础^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI1640 培养液(美国 Hyclone 公司)、新生小牛血清(NBS)(杭州四季青生物材料有限公司)、羊抗鼠辣根过氧化物酶(HRP)酶抗抗体(IgG)(北京中杉金桥生物技术公司)、UVIPRO 凝胶图像获取及分析系统(英国 Uvitec 公司 GAS70XX/71XX 型 软件版本 11.03)、SDS 电泳仪及 Western blot 转印槽(美国 Bio-Rad 公司 PowerPac300 系统)、Model550 型酶标仪(Bio Rad 公司)、超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技公司 YJ9E II D 型)、12 孔细胞培养板(美国 Corning 公司)、倒置显微镜(日本 Nikon 公司 TE2000-U 型)、人结肠腺癌细胞 LS-180(北京军事医学科学院惠赠)、BALB/c 小鼠。

1.2 方法

1.2.1 杂交瘤细胞的制备 人结肠腺癌细胞 LS-180 正常传代培养^[4], 待细胞数量足够后, 以 1×10^8 免疫 BALB/c 小鼠, 加强免疫 3 次后, 取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 按照 2 : 1 进行融合, 通过 HAT 选择性培养, 使杂交瘤细胞增殖并形成克隆, 得到能稳定分泌抗 LS-180 细胞单克隆抗体的杂交瘤细胞株^[2,5]。

1.2.2 腹水单克隆抗体的制备 BALB/c 小鼠腹腔注射降植烷 10 d 后, 无菌收集已经制备好并传代培养的抗结肠癌 mAb 杂交瘤细胞, 以 5×10^6 腹腔注射 BALB/c 小鼠, 常规饲养, 15 d 后用灭菌注射器收集腹水, 经辛酸法纯化, 以紫外分光光度计检测蛋白含量, 测得蛋白浓度为 92 mg/mL。通过免疫细胞化学染色检测 SC8 抗原在 LS-180 细胞中的表达^[2-3]。

1.2.3 细胞裂解液的制备 无菌收集培养的人结肠腺癌细胞 LS-180, 以预冷的 PBS 洗细胞 3 次, 1 800 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用三去污裂解液裂解细胞^[1], 置冰浴 30 min, 取出液体

一滴, 于镜下观察细胞是否充分裂解, 裂解效果不好时可以再超声裂解数分钟。用 $10\,000 \times g$ 4 ℃离心 10 min, 取上清, PBS 透析, 4 ℃过夜, 测定裂解液中蛋白的浓度, 然后放 -20 ℃保存。

1.2.4 免疫沉淀 使用美国 Pierce 公司 SeizeTMPPrimary 免疫沉淀试剂盒, 按其说明书操作, 使单克隆抗体与凝胶耦联好后, 向已结合抗体的凝胶中加入粗提抗原样品, 4 ℃过夜(此过程中不断轻轻翻转混合)后离心。将过滤柱置于新离心管中, 0.4 mL IP 缓冲液洗 3 次, 监测洗液 A280 直至吸光度至 0.01 以下。向凝胶-抗原抗体复合物中加入 200 μ L 洗脱缓冲液, 轻叩混匀后离心。所获样品经过超滤管适当浓缩后, 以 A280 紫外分光光度法定量, -20 ℃保存备用^[6]。

1.2.5 经纯化后抗原的鉴定 经过免疫沉淀后的抗原样品浓缩后, 进行还原型和非还原型 SDS-PAGE, 共制备两块凝胶, 一块经考马斯亮兰 R-250 染色、脱色后, 与标准相对分子质量 Marker 进行比对, 以确定所提抗原的分子量大小^[1,6]。另一块进行 Western blot, 将凝胶上抗原转移至 NC 膜上, 封闭液(含 3% 牛血清清蛋白的 PBS 缓冲液)进行封闭, 依次加入纯化后的腹水单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, DAB 显色。

1.2.6 统计学处理 所得数据采用 SPSS 统计软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 免疫细胞化学染色 结果显示, SC8 抗原蛋白在结肠癌细胞 LS-180 中阳性表达为棕黄色颗粒均匀着色, 主要位于细胞膜及细胞质, 见图 1。

2.2 细胞裂解液的 ELISA 检测 Lowery 法测定细胞裂解液中蛋白的浓度为 846 g/L, 用间接 ELISA 法检测裂解液中抗原的活性, 结果显示, 纯化后的抗原在一定范围内随蛋白浓度的增高与 mAb 反应的 A_{280} 值也随之增高, 见图 2。

2.3 纯化抗原的鉴定 在还原及非还原条件下, 纯化后的 SC8 抗原样品经 SDS-PAGE 电泳后显示, 在非还原条件下可见分子质量为 61×10^3 的条带, 在还原条件下可见相对分子质量约为 30×10^3 和 31×10^3 的两条带, 见图 3。纯化抗原转移至 NC 膜上后, 以所制备的腹水单克隆抗体为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot, 可见与 SDS-PAGE 电泳结果中分子质量为 61×10^3 和 $30 \times 10^3 \sim 31 \times 10^3$ 两处条带相对应的条带。

2.5 免疫组化 结肠癌肿瘤相关抗原 SC8 在 60 份组织切片中的表达结果表明,SC8 在结肠癌组织中有较高的表达,在癌旁正常组织及其他癌组织中无表达或个别成轻度表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

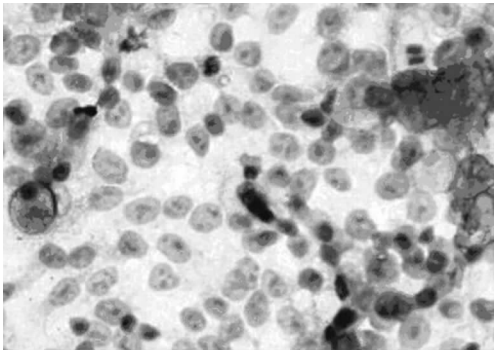


图 1 SC8 抗原在结肠癌细胞 LS-180 中的表达

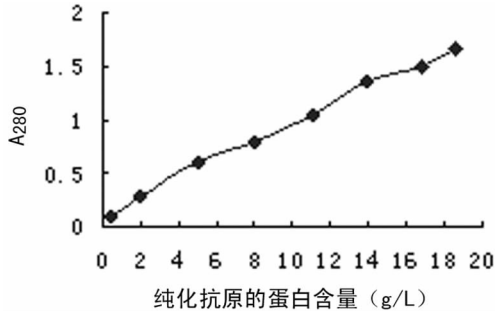
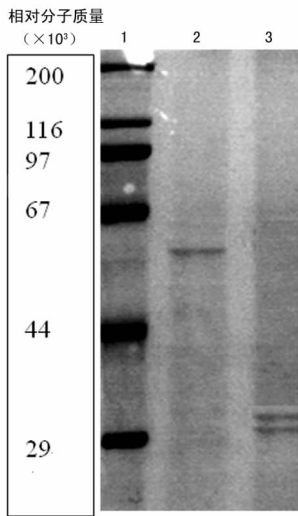


图 2 细胞裂解液的 ELISA 检测



1: 分子质量标准带; 2: 非还原 SDS-PAGE; 3: 还原 SDS-PAGE。

图 3 经纯化后抗原样品的 SDS-PAGE 结果

表 5 SC8 抗原在结肠癌及其他组织中的
阳性率及 χ^2 检验结果

组别	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	P
结肠癌组织	20	18	2	90	<0.05
癌旁正常组织	20	4	16	20	
其他肿瘤组织	20	18	2	90	<0.05
其他肿瘤组织	20	3	17	15	

类反应性的一类物质。这种抗原一般仍保持原来细胞的抗原性。肿瘤相关抗原是指一些肿瘤细胞表面糖蛋白或糖脂成分,它们在正常细胞上不表达或有微量表达,但在肿瘤细胞中表达明显增高^[7]。在这些与肿瘤相关的抗原中很多被作为临床血清肿瘤标志物使用。但是,由于肿瘤相关抗原的组织特异性较差,个体分布亦不一致,因此使用单一抗体往往难以获得良好的诊断和疗效。因此,我们制备并纯化了一种新型的结肠癌肿瘤相关抗原 SC8,并证明了此抗原在结肠癌组织中成高表达,而在癌旁正常组织及其他癌组织中几乎无表达。从血清学角度探讨该抗原在结肠癌临床诊断中的意义^[8]。

肿瘤抗原的纯化手段多种多样,但主要是使用抗体作为纯化工具。目前,可用以下 4 种方法获取肿瘤相关抗原:(1)亲和层析法;(2)蛋白质免疫印迹法;(3)免疫沉淀法;(4)免疫学方法筛选 cDNA 文库获得抗原基因^[2,4]。本实验使用免疫沉淀的方法进行抗原纯化,免疫沉淀可用于蛋白质混合物中靶抗原的定性和定量。其独特优点是选择性好,免疫球蛋白与其相应抗原的特异性很高,因此可从蛋白质混合物中提纯出抗原-抗体复合物。此外,免疫沉淀法极为敏感,可检出低至 100 pg 的蛋白。该法与 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结合应用是研究原核细胞、真核细胞或体外翻译系统所表达抗原蛋白的合成与加工过程的理想技术^[10]。

纯化肿瘤抗原对于肿瘤诊断方法的发展有重要意义,临床上已应用多种肿瘤抗原作为肿瘤标记物来辅助诊断,例如:癌胚抗原(CEA)诊断结肠癌、胃癌、乳腺癌;甲胎蛋白(AFP)诊断肝癌;前列腺特异性抗原(PSA)辅助诊断前列腺癌;神经元特异性烯醇化酶(NSE)鉴别诊断小细胞肺癌和神经母细胞瘤等等。如果使用本实验的所制备的肿瘤抗原与传统的肿瘤抗原进行联合诊断,有助于相关癌症诊断率的提高。这不仅给肿瘤的生物学研究提供了物质基础,为相关肿瘤的临床诊断及治疗提供了一个新的思路,将来也可以通过肿瘤疫苗的研制对肿瘤病人进行主动免疫治疗^[9]。

参考文献

[1] 柳晓燕,姚晓玲,宋玉,等. 结肠癌相关抗原的制备及其临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(4):335-337.
[2] 陈志南,刘民培. 抗体分子与肿瘤[M]. 北京:人民军医出版社,2002:121-581.
[3] 冯慧,伊德林,曾艳,等. 肿瘤相关抗原在人大肠癌中的表达[J]. 肿瘤防治研究,2007,34(5):354-358.
[4] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社,2002:20-22.
[5] 冯慧,伊德林,曾艳,等. 亲和层析法纯化抗大肠肿瘤相关抗原的单克隆抗体[J]. 新乡医学院学报,2006,23(6):564-568.
[6] 王鹏,刘会娟,闫平平,等. 联合检测肿瘤相关抗原抗体在结肠直肠癌免疫诊断中价值的研究[J]. 2009,29(8):761-764.
[7] 荆结线,杜丽莉,王文达,等. 结直肠癌患者血清肿瘤标志物水平与临床病理学特征的关系[J]. 中国肿瘤临床,2008,35(3):162-166.
[8] 林朝群,张鹏,康飞科,等. 肝癌相关抗原 MRP-L28 血清学特异性研究及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(6):817-820.
[9] 刘民培,吴祖泽. 肿瘤基因的一种新的功能分类与概念[J]. 中国肿瘤临床,2004,31(21):1253-1256.
[10] E. 哈洛, D. 莱恩. 抗体实验技术指南[M]. 北京:科学出版社,2002:67-284.

(收稿日期:2012-08-09)

3 讨 论

肿瘤标志物是由肿瘤细胞生物合成、释放或者是宿主对癌