

• 论 著 •

鼠源性抗星形胶质细胞上调基因 1 单克隆荧光抗体 在恶性浆膜腔积液检测中的应用*

路 蔓, 龙 敏, 刘 冲, 陈 曦, 王 琛, 张惠中

(第四军医大学唐都医院临床实验与检验科, 陕西西安 710038)

摘要:目的 应用鼠源性抗星形胶质细胞上调基因 1(AEG-1)单克隆荧光抗体检测恶性浆膜腔积液中的肿瘤细胞。方法 应用 PCR 及 Western-blot 方法检测浆膜腔积液脱落细胞中的 AEG-1 表达;用鼠源性抗 AEG-1 单克隆荧光抗体与恶性浆膜腔积液中的肿瘤细胞共孵育,同时采用良性病变的浆膜腔积液作为阴性对照。结果 恶性浆膜腔积液脱落细胞中 AEG-1 表达呈阳性,而良性病变的浆膜腔积液脱落细胞中 AEG-1 表达为阴性或弱阳性;同时鼠源性抗 AEG-1 单克隆荧光抗体直接标记脱落细胞的结果与 PCR 和 Western-blot 检测结果一致。结论 鼠源性抗 AEG-1 单克隆荧光抗体为浆膜腔积液中的肿瘤细胞鉴定提供了新的实验手段。

关键词:鼠源性抗星形胶质细胞上调基因 1; 单克隆抗体; 荧光标记; 浆膜腔积液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0289-03

Application of mouse anti AEG-1 monoclonal fluorescent antibody in malignant serous cavity effusions*

Lu Man, Long Min, Liu Chong, Chen Xi, Wang Chen, Zhang Huizhong

(Department of Clinical Experiment and Laboratory, Tangdu Hospital of Fourth

Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

Abstract: **Objective** To use mouse astrocytes elevated gene-1(AEG-1) monoclonal fluorescent antibody for detecting tumor cells in malignant serous cavity effusions. **Methods** The expression of AEG-1 in serous cavity effusion exfoliated cells by PCR and Western-blot; the mouse monoclonal anti-AEG-1 fluorescent antibody and tumor cells in malignant serous cavity effusions were co-cubated, meanwhile, the serous cavity effusions in benign lesions were taken as the negative control. **Results** The AEG-1 expression was positive in malignant serous cavity effusions exfoliated cells, while which in benign lesion serous cavity effusion was negative or weakly positive; meanwhile the results of direct labelling in mouse anti AEG-1 monoclonal antibodies were consistent with the results by PCR and Western-blot. **Conclusion** Mouse anti AEG-1 monoclonal fluorescence antibody can provide certain theoretical basis for the detection of tumor cells in serous cavity effusion.

Key words: mouse astrocytes elevated gene-1; monoclonal antibodies; fluorescently labeling; effusion

星形胶质细胞上调基因 1(AEG-1)是近年来发现的新的癌基因, Emdada 等^[1]于 2009 年对其做了进一步证实。该基因位于与多种恶性肿瘤发生密切相关的人类 8 号染色体(8q22)上,进一步研究表明其是促进肿瘤发生、发展的一个关键因子^[2-3]。相关研究表明, AEG-1 基因与多种恶性肿瘤,如肝细胞癌、神经胶质瘤、食管癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌等的发生、发展密切相关^[4]。另有研究表明,人 AEG-1 基因的启动子(-2710/+49)缺少 TATA 或 CAAT 盒,但含有多个 Spl 基序并富含 GC 序列,其中 Spl 基序可以与核因子- κ B(NF- κ B)相互作用,可能是 AEG-1 发挥功能的重要片段^[5-6]。现已证实 AEG-1 是 Ras/PI3K/Akt/c-Myc 信号转导通路的下游靶分子,可以通过调控 PI3K/Akt、NF- κ B、Wnt/ β -catenin、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等多条信号途径参与正常细胞转化,肿瘤细胞增殖、侵袭、转移,血管生成等多个肿瘤发生、发展的环节,并能介导肿瘤细胞自噬活性和化疗耐药。该基因对多种恶性肿瘤的诊断和预后具有重要的临床意义,可能成为肿瘤治疗和抗癌药物研发的新靶点。本实验室前期通过杂交瘤技术获得 1 株能稳定分泌抗 AEG-1 单克隆抗体的杂

交瘤细胞株(IE3)。本研究培养 IE3 细胞小鼠,腹腔内注射制备腹水,提取并纯化单克隆抗体,并用异硫氰酸荧光素(FITC)对单克隆抗体进行荧光标记。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集临床确诊为恶性肿瘤,且常规中能查见大量异形有核细胞的浆膜腔积液,其中诊断为卵巢癌患者的腹水标本 13 份,诊断为肺癌并全身转移患者的胸腔积液标本 17 份。并收集良性病变的浆膜腔积液作为阴性对照,其中诊断为肝硬化患者的腹水标本 22 份,诊断为心力衰竭患者的胸腔积液标本 8 份。

1.2 仪器与试剂 2720 型 PCR 仪由美国基因泰克工程技术公司提供, DYY-8C 双稳定时电泳仪、DYCP-40C 半干式碳板转移槽由北京六一生物科技有限公司提供,凝胶图像分析仪由美国阿尔法科技有限公司提供, UBR4 型干浴器由 Grant Brother 公司提供, BCD-628WACW 冰箱由海尔公司提供,超净工作台由富康公司提供,生化培养箱由重庆永生实验仪器厂提供。DNA 标记物由西安润德公司生物技术有限公司提供; Protein 标记物由美国 Thermo scientific 公司提供;山羊抗小鼠

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81201525)。 作者简介:路蔓,女,主管检验师,主要从事临床检验基础研究。

二抗由中山生物技术有限公司提供; FITC 及二甲基亚砷(DMSO)由美国 Sigma 公司提供; RNAiso Plus 及反转录试剂盒由日本 TaKaRa 公司提供; 氯仿、异丙醇、75%乙醇由天津市津北精细化工有限公司提供。

1.3 检测方法

1.3.1 AEG-1 蛋白检测 收集胸腔积液及腹水细胞提取 RNA, 反转录为 cDNA, PCR 检测 AEG-1。(1)收集浆膜腔积液中的细胞提取 RNA。①将胸腔积液及腹水离心收集细胞, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。②收集细胞, 移入 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL RNAiso Plus, 混匀放置 10 min。③加入 200 μ L 氯仿, 震荡混匀 15 s 以上, 室温放置 5 min, 离心(4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min, 10 min)。④离心后液体分层, 上层无色液体含 RNA, 小心吸取上层无色液体移入新的 1.5 mL 离心管中。⑤加入等体积异丙醇, 混匀, 15~30 $^{\circ}$ C 下孵育 10~30 min, 离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 10 min)。⑥去上清, 沉淀加入 75%乙醇 1 mL, 震荡 30 s, 离心(4 $^{\circ}$ C, 7 500 r/min, 5 min)。⑦小心去上清, 管内沉淀在超净台中鼓风干燥 3~5 min。⑧加入 20 μ L 焦磷酸二乙酯(DEPC)水溶液溶解沉淀。(2)将 RNA 反转录为 cDNA。反转录 20 μ L 体系为: 提取细胞的 RNA 模板 2 μ L、5 \times prime script 4 μ L、ddH₂O 14 μ L。PCR 扩增: 37 $^{\circ}$ C 15 min、85 $^{\circ}$ C 5 s、4 $^{\circ}$ C ∞ 。(3)PCR 检测 AEG-1 蛋白。Mix 20 μ L 体系为: 2 \times Taq Mix 10 μ L、ddH₂O 8 μ L、引物异黏蛋白(MT-DH)1 μ L、模板 cDNA 1 μ L。

1.3.2 Western-blot 检测细胞蛋白 (1)收集浆膜腔积液中的脱落细胞提取蛋白。①将胸腔积液及腹水离心收集细胞, 用磷酸盐缓冲液清洗一遍。②加入 200 μ L 细胞裂解液、2 μ L DMSO, 4 $^{\circ}$ C 摇床 30 min 裂解细胞。③离心(4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min, 15 min), 取上清。(2)Western-blot 检测细胞蛋白。将浆膜腔积液细胞裂解蛋白上样, 用纯化后的抗 AEG-1 单克隆抗体作为一抗(1:500 稀释), 用山羊抗小鼠作为二抗(1:5 000 稀释)。

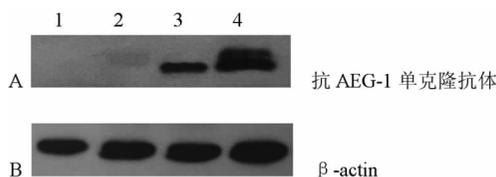
1.3.3 鼠源性抗 AEG-1 单克隆荧光抗体检测恶性浆膜腔积液中的肿瘤细胞 (1)取新鲜抽取的浆膜腔积液 1 mL, 加入 2 μ L 鼠源性抗 AEG-1 单克隆荧光抗体(1:500 稀释)。(2)37 $^{\circ}$ C 避光摇床 100 r/min 反应 30 min。(3)用磷酸盐缓冲液离心(1 200 r/min, 5 min)清洗 3 遍, 除去未结合上的荧光单克隆抗体。(4)压片, 荧光显微镜镜检。

2 结果

2.1 病理科脱落细胞检测 卵巢癌及肺癌患者浆膜腔积液的脱落细胞中查见肿瘤细胞。

2.2 PCR 检测 AEG-1 表达 收集浆膜腔积液中的细胞提取 RNA, 反转录为 cDNA, PCR 检测 AEG-1, 见图 1。恶性浆膜腔积液脱落细胞中 AEG-1 呈阳性, 而良性病变的浆膜腔积液脱落细胞中 AEG-1 呈阴性或弱阳性。

2.3 Western-blot 检测浆膜腔积液细胞 AEG-1 表达 细胞蛋白检测结果见图 2。恶性浆膜腔积液脱落细胞中 AEG-1 呈阳性, 而良性病变的浆膜腔积液脱落细胞中 AEG-1 呈阴性或弱阳性, 与 PCR 的检测结果一致。



1:肝硬化腹水细胞裂解蛋白; 2:心力衰竭胸腔积液细胞裂解蛋白; 3:卵巢癌腹水细胞裂解蛋白; 4:肺癌胸腔积液细胞裂解蛋白; B: 对应 4 种细胞的 β -actin 结果。

图 2 Western-blot 检测细胞蛋白

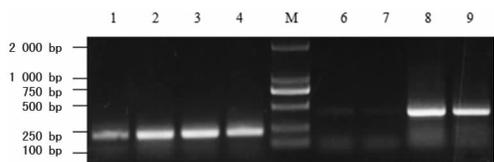
2.4 浆膜腔积液中的异形有核细胞 鼠源性抗 AEG-1 单克隆荧光抗体检测浆膜腔积液中的异形有核细胞结果见图 3~4 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。在恶性浆膜腔积液中, FITC 标记的抗 AEG-1 单克隆抗体可与脱落的肿瘤细胞膜表面的 AEG-1 特异性结合, 而在良性病变的浆膜腔积液中呈阴性。抗 AEG-1 单克隆荧光抗体直接标记脱落细胞的结果与 PCR 和 Western-blot 检测结果一致。

3 讨论

AEG-1 是近年来发现的新的癌基因。到目前为止的恶性肿瘤研究中, AEG-1 表达于多种相关组织恶性肿瘤, 包括肝细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、食管鳞状细胞癌(ESCC)、黑色素瘤、多形性胶质瘤(GBM)等, 但其在正常组织和良性病变中表达不明显^[7-11]。对比分析癌组织和良性病变组织, 已经确定 AEG-1 是一项潜在的诊断癌症及判断预后的指标。浆膜腔积液是在疾病情况下, 胸腔、腹腔或心包腔内集聚的过多液体的总称, 是一种常见的临床现象。最常见病因为恶性肿瘤(31.3%), 其次为结缔组织疾病、结核、肝硬化、心功能不全等。由于 AEG-1 是一个在大多数恶性肿瘤中均表达的基础性癌基因, 因此检测脱落细胞的 AEG-1 即可辨别浆膜腔积液的性质, 且具有很高的特异度。

杂交瘤技术是将经抗原免疫的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞(SP-20)在体外融合在一起, 融合后的杂交瘤细胞兼有骨髓瘤细胞无限繁殖和脾细胞分泌抗体的能力。这种细胞通过克隆化即可成为单克隆系, 能产生大量针对同一抗原决定簇的抗体, 这种抗体就称为单克隆抗体。与多克隆抗体相比, 单克隆抗体的特点是理化性状高度均一、生物活性单一、与抗原结合的特异性强, 性质稳定, 且便于人为处理和质量控制, 这些优点使它一问世就受到高度重视。目前为止, 人们已经研究出各种单克隆抗体, 其应用已经涉及医学、食品、农业、卫生、环境等众多领域, 单抗药物的开发已经成为生物医学的新热点。单克隆抗体广泛用于基础研究, 疾病的诊断治疗、预防, 环境与食品卫生的检测, 提纯蛋白, 优生优育, 而且随着单克隆抗体技术的发展, 将出现更加广阔的前景。

本研究将鼠源性抗 AEG-1 单克隆抗体 FITC 标记可放大信号, 有利于临床检测。在恶性浆膜腔积液中, FITC 标记的抗 AEG-1 单克隆抗体可与脱落的肿瘤细胞膜表面的 AEG-1 特异性结合, 而在良性病变的积液中呈阴性, 结(下转第 293 页)



1,6:肝硬化腹水 β -actin、AEG-1 结果; 2,7:心力衰竭胸腔积液 β -actin、AEG-1 结果; 3,8:卵巢癌腹水 β -actin、AEG-1 结果; 4,9:肺癌胸腔积液 β -actin、AEG-1 结果; M: 蛋白标记物。

图 1 PCR 检测 AEG-1 表达

疫分析,能够进行标准化操作,更符合实验室室内和室间质量控制的要求。其结果判读客观,原始资料易于保存,具有溯源性。所以 ELISA 法是目前梅毒血清学诊断的最佳方法之一^[12]。

金标法是结合了抗原抗体反应与色谱层析技术的一项快速检测技术,具有方便快捷、成本低、对实验室环境要求不高、判读结果直观等特点,可在诊断领域中迅速推广^[13]。本研究结果显示,金标法阳性检出率为 0.89%,与试剂 A、B 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。金标法的灵敏度为 84.85%(56/66),与试剂 A、试剂 B 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。因其灵敏度较低,易出现假阴性,所以只适合大批量的健康体检及急诊手术的初筛试验。

综上所述,ELISA 法具有较高的灵敏度、特异度和阳性符合率,与 TPPA 法相比,其成本低廉,且较易实现自动化酶联免疫分析,适用于大批量的临床手术或输血前标本的筛查工作。金标法具有检测时间快、假阳性少的优点,但其灵敏度较低,适用于大批量的健康体检及急诊手术前的初筛试验。为避免医疗纠纷,对 ELISA 法检测阳性的标本和金标法检测阳性的标本,均应采用 TPPA 法来确诊。

参考文献

[1] 张荣, 阚乃颖. 妊娠期梅毒的临床结局[J]. 安徽医药, 2012, 16(2):192-193.
 [2] 徐文严. 实验室检查对神经梅毒诊断的重要性[J]. 临床皮肤科杂志, 2009, 38(11):742-743.

[3] 曲惠青, 周晓生, 周肖龙, 等. 检测梅毒的四种方法临床应用比较[J]. 中国医药科学, 2013, 3(18):19-21.
 [4] 何细德, 代国知, 陈虹亮. 应用 TPPA 和 TRUST 试验检测梅毒螺旋体抗体及其临床意义[J]. 实用预防医学, 2012, 17(6):1199-1200.
 [5] 康来仪, 宁镇. 获得性免疫缺陷综合征与梅毒[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(6):325-328.
 [6] 刘富然, 高新谱. 受血者输血前梅毒抗体筛查方法及临床意义[J]. 山东医药, 2003, 43(20):19.
 [7] 姚仁南, 陈玲, 陈娜云, 等. 27779 例患者输血治疗前血液传染性指标检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(16):652-653.
 [8] 刘金丽, 胡白, 赵政龙, 等. 梅毒血清固定发病原因及相关影响因素分析[J]. 安徽医药, 2010, 14(6):658-660.
 [9] 李从风. 梅毒螺旋体两种检测方法的比较[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(4):355-356.
 [10] Welch RJ, Litwin CM. An evaluation of two immunoblot assays and a western blot assay for the detection of anti-Syphilis IgG antibodies[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 25, 18(4):255-260.
 [11] 李雷花. 四种梅毒抗体血清学检验方法的比较[J]. 中国实用医药, 2012, 7(16):110-111.
 [12] 刘鹏, 冯国基. 梅毒螺旋体的检测技术与应用现状[J]. 实用医药杂志, 2005, 22(10):939-941.
 [13] 陈晓亮, 浦响, 徐卉, 等. 一种梅毒螺旋体重组抗原胶体金的制备[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(9):865-867.

(收稿日期:2015-08-28)

(上接第 290 页)

果提示,该荧光标记抗体具有肿瘤特异性,可为临床恶性浆膜腔积液的早期诊断提供一定的理论基础。

参考文献

[1] Emdada L, Iee SG, Su ZZ, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(50):21300-21305.
 [2] Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer[J]. Genes Chromosom Cancer, 2006, 45(3):1033-1040.
 [3] Poon TC, Wong N, Lai PB, et al. A tumor progression model for hepatocellular carcinoma; bioinformatic analysis of genomic data [J]. Gastroenterology, 2006, 131(4):1262-1270.
 [4] Yoo BK, Emdad I, Lee SG, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): a multifunctional regulator of normal and abnormal physiology[J]. Pharmacol Ther, 2011, 130(1):1-8.
 [5] Lee SG, Su ZZ, Emdad L, et al. Astrocyte elevated gene 1 (AEG-1) is a target gene of oncogenic Haras requiring phosphatidylinositol 3-kinase and cMyc[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(46):17390-17395.
 [6] Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, et al. Astrocyte elevated gene-1: recent insights into a novel gene in involved in tumor progression, metasta-

sis and neurodegeneration[J]. Pharmacol Pharmacol Ther, 2007, 114(2):155-170.
 [7] Chen W, Ke Z, Shi H, et al. Over-expression of AEG-1 in renal cell carcinoma and its correlation with tumor nuclear grade and progression[J]. Neoplasma, 2010, 57(6):522-529.
 [8] Emdad L, Sarkar D, Lee SG, et al. Astrocyte elevate gene-1: a novel target for human glioma therapy[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(1):79-88.
 [9] Liu L, Wu J, Ying Z, et al. Astrocyte elevate gene-1 upregulates matrix metalloproteinase-9 and induces human glioma invasion [J]. Cancer Res 2010, 70(4):3750-3759.
 [10] Song H, Li C, Li R, et al. Prognostic significance of AEG-1 expression in colorectal carcinoma[J]. Int J Colorectal Dis, 2010, 25(10):1201-1209.
 [11] Xia Z, Zhang N, Jin H, et al. Clinical significance of astrocyte elevate gene-1 expression in human oligodendrogliomas [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2010, 112(2):413-419.

(收稿日期:2015-09-22)

