

IgY 抗体作为导向载体对消化系统肿瘤的选择性识别作用研究

杨建民 金志刚* 余琼** 杨涛兰 王恢鹏 刘连瑞

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘要 用生物治疗方法治疗肿瘤已被视为肿瘤治疗的第四大疗法,其主要是免疫治疗,包括抗体与偶合物,肿瘤疫苗等。而要想获得有效的肿瘤治疗药物,其关键是要寻找小型化的、高效的导向载体。我们的实验室以低分化腺胃癌的 P110 癌蛋白作为抗原,免疫 SPF 鸡,从卵黄中提取抗体 IgY 作为植物毒素的导向性载体;实验结果证明, IgY 能特异性地选择识别消化系统的肿瘤组织,为进一步研究肿瘤的导向药物提供了另一理论依据。

关键词 IgY 抗体, MGC-80-3 细胞株, 选择性识别, 导向性载体

免疫过的鸡所产卵黄中含有抗体早有报道。早在 60 年代,英国剑桥大学的 Williams 对蛋黄的水溶性蛋白进行了分析,结果指出,其中有一含量在 50% 以上,分子量为 150kDa 的蛋白与血清中 γ -Globulin 免疫球蛋白相似。美国 Stanfore 大学医学研究中心的 Gassmann^[8] 研究也指出,免疫鸡所产的卵黄中含有丰富而廉价的特异性抗体。同时,日本、德国、加拿大等国的科学家分别以不同的抗原免疫鸡,从卵黄中提取抗体,研究其在疾病防治、特异性识别、以及与其它抗体比较,认为无论在免疫适应性,还是在抗体分离和抗体性质方面, IgY 抗体都是一个令人比较满意的抗体^[1,7]。中国科学院微生物研究所的田波教授曾对病毒卵黄免疫球蛋白抗体的制备进行过阐述。我们的研究是以 MGC-80-3 细胞的 P110 癌蛋白作为抗原。(因为, P110 蛋白在 MC29 细胞中是 v-myc 基因表达的一种融合蛋白^[4],根据我们的免疫交叉反应实验,在消化系统肿瘤中含 P110 蛋白)。皮下多点注射免疫 SPF 鸡,取血测出效价后,逐日收集鸡蛋,用以提取 IgY 抗体,研究其对消化系统中肿瘤组织的特异性识别作用,并进一步研究其在肿瘤治疗方面的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF 鸡(北京实验动物中心),羊毛脂,卡介苗(购自卫生部北京生物制品研究所), MGC-80-3 细胞株(本实验室保存), PEG(购自 FLUKA 公司),荧光素(购自 Aldrich 公司)。

1.2 方法

* 现在单位:北京宣武医院 100053, ** 哈尔滨医药工程技术研究所 150020。

本文于 1996 年 1 月 4 日收到。

1.2.1 P110 蛋白的分离和纯化: 培养 MGC-80-3 细胞成单层, 然后用生理盐水洗涤细胞 3 次, 将细胞悬于 Buffer A 中 (10mmol/L NaCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.1mmol/L PMSF, 1mmol/L EDTA), 在 -20℃ 存放, 取出后溶化, 超声波破碎细胞, 加硫酸铵成 50% 的饱和度, 在 4℃ 搅拌 1h, 16000r/min 离心 20min, 收集沉淀, 溶于 Buffer B 中 (20mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10mmol/L EDTA, 2% SDS, 0.1% β-巯基乙醇), 用水饱和酚萃取 3 次, 酚相在含 0.25mol/L 蔗糖 Buffer B 中透析, 透析后加硫酸铵成 50% 的饱和度, 搅拌溶解后, 以 12 000r/min 离心 30min, 沉淀溶于无菌水中, 在 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 切下分子量为 110kD 的凝胶带, 经洗脱液洗脱, 收集洗脱液, 真空浓缩, 制得免疫抗原 P110。

1.2.2 免疫方法: 以 SPF 鸡为免疫对象, 采用皮下多点注射的方法。每周注射 1 次, 免疫 3~4 次, 第 1 次用完全 Freund 佐剂, 以后用不完全 Freund 佐剂。取血测定效价, 测出效价后逐日收集鸡蛋^[10]。

1.2.3 IgY 的提取: 取免疫鸡所产蛋的卵黄, 用 Buffer C (0.1mmol/L NaCl, 0.01% NaN₃, 0.01mol/L 磷酸钠) 按 1:1 稀释, 稀释液按 100ml 加 PEG (MW6 000) 7g, 搅拌使其全溶, 以 12 000r/min 离心 10min, 上清液加 PEG 使之成为 12% 浓度, 再离心, 沉淀溶于 Buffer C 中, 体积与原来相同, 重复 3 次, 最后溶于生理盐水。如果长时间保存, 需加 25% 的甘油, 0.02% NaN₃, 在 -4℃ ~ 4℃ 保存。

1.2.4 IgY 抗体对低分化腺胃癌细胞和胃正常细胞以及与消化系统不同部位肿瘤的选择性识别作用: 从患低分化腺癌病人的癌组织和胃手术病人的正常组织上消化得到癌细胞和正常细胞, 进行间接荧光免疫测定, 结果表明, IgY 能够选择性识别低分化腺胃癌细胞, 而与人正常胃组织细胞无免疫反应 (图版); 同时, 我们用 ABC 免疫组织化学染色方法研究了 IgY 消化系统癌组织病理切片的选择性识别反应, 实验结果指出, IgY 抗体与食道癌、胃贲门低分化腺癌、胃贲门中分化腺癌、胃低分化腺癌、结肠中分化腺癌、结肠高分化腺癌和直肠癌有特异识别反应 (图版), 用胃粘膜作为阴性对照。

2 实验结果

2.1 P110 抗原的电泳分析

从培养的 MGC-80-3 细胞株中提取得到的沉淀溶于电泳缓冲液中, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳; 电泳胶体为 SDS-10% 聚丙烯酰胺, 缓冲液为 Tris-甘氨酸系统, pH8.3 实验结果如图 1。

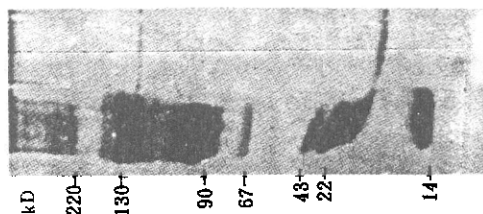


图 1 P110 抗原的电泳分析

Fig.1 Analysis of P110 antigen on SDS-10% polyacrylamide gel
The arrow indicated P110 protein.
SDS-10% polyacrylamide gel

2.2 抗体 IgY 的电泳分析

取抗体 IgY 溶于电泳样品 Buffer 中 (0.01mol/L 磷酸钠, 1% SDS, 0.1mol/L DTT, 10% 甘油和 0.001% 溴酚蓝), 电泳前在沸水中放 5min, 然后上样。胶体为 SDS-10% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳液为

Tris-甘氨酸, pH8.3, 在 20mA 电泳 16h, 电泳后用考马斯亮蓝染色, IgY 抗体为一条带, 分子量为 150kDa。结果如图 2

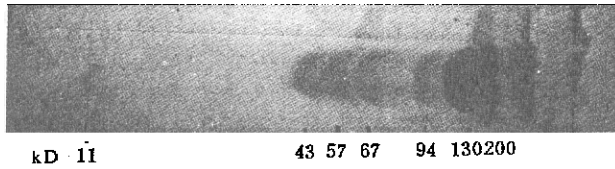


图 2 抗体 IgY 的电泳分析

Fig.2 Analysis of IgY antibody on SDS-10% polyacrylamide gel
The molecular weight of IgY antibody is 150kDa (arrow indicated)

2.3 IgY 与抗原免疫印迹测定 (Western blots)

抗原 20 μ l (2mg/ml) 在 SDS-10% 聚丙烯酰胺凝胶上于 Tris-甘氨酸缓冲液中电泳, 电泳后取下凝胶, 装于电泳转移装置中, 进行电泳转移, 转移后, 将硝酸纤维素膜用转移缓冲液浸泡 30min (在室温条件下), 加 IgY 抗体 (1mg/ml) 在室温下共育 1h, 用转移缓冲液洗 3 次, 每次 10min, 加与过氧化物酶联结的第二抗体 (抗 IgY 的 IgC 1mg/ml) 在室温条件下共育 1h, 用转移缓冲液洗 3 次, 每次 3min, 用 TBS 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 0.9% NaCl) 浸湿 3 次, 用 DAB 染色 (100mg/ml 联苯氨水溶液), 用 3% TCA 浸泡, 显示出 1 条带, 为抗体抗原反应带, 结果如图 3 所示。

2.4 IgY 抗体对消化系统肿瘤组织的选择性识别作用

以抗 MGC-80-3 细胞的抗体 IgY 为抗原免疫家兔, 从兔抗血清中分离抗体 IgG, IgG 抗体与荧光素 FITC 连接, 进行间接荧光免疫测定 IgY 对低分化腺胃癌细胞和正常细胞的特异识别作用。同时用 ABC 免疫化学染色方法测定 IgY

与消化系统癌组织病理切片的特异反应; 从图版可知抗体 IgY 能够选择性识别消化系统中的癌细胞和癌组织, 而与正常细胞和正常组织无特异性反应 (见图版-I)。



图 3 免疫印迹反应

Fig. 3 Western blots

A. Electrophoretogram before immunoblotting

B. Blotting map after immunoblotting

3 讨 论

目前与肿瘤的手术后相配合的疗法是放射治疗和化学治疗, 其中对化学治疗的研究最多。用于化疗的化学药物或多或少都能选择性地杀死癌细胞, 都有一定的疗效。但是, 这些化学药物都有一定的副作用, 在杀死癌细胞的同时也能杀死快速生长的正常细胞, 对机体正常组织造成不良的影响^[2,3,5,6]。为了避免抗癌药物对正常细胞的毒副作用, 探索抗肿瘤药物能够特异性的选择癌细胞而杀之, 这就要求寻找高效的、能将毒素有效地运输到靶细胞 (癌细胞) 上去的载体, 载体一旦找到靶细胞, 立即与靶细胞结合, 并释放毒素, 杀死癌细胞^[4,9]。我们获得的 IgY 抗体对人低分化黏液腺胃癌有特异性识别作用, 实验结果证明该抗体能选择性的识别消化系统不同部位的肿瘤细胞。

Western blot 实验证明 IgY 抗体能与抗原 P110 蛋白发生抗体抗原结合反应, 表明 IgY 抗体能够作为运输毒素的特异性载体, 以 IgY 为载体合成的抗肿瘤导向药物对肿瘤治疗获得比较理想的结果。IgY 抗体作为一种导向载体具有下列特点^[11,12]: a. 来源丰富, 可以用于治疗; b. 产量高, 成本较低; c. IgY 抗体比其他抗体半衰期长, 约为 1 个月; d. IgY 是一种多抗, 对一种抗原有多种抗体结合, 因此以该抗体为载体合成的导向药物杀伤力强; E. IgY 抗体不传播 HIV 和肝炎。IgY 抗体比较稳定, 在 60℃, pH7. 2 时能 10min 不失活; 在 40℃, pH4. 0 时活性能保持 10min; 在 37℃ 的胃液中体外培养 60min IgY 仍保持活性。此外, IgY 抗体对一些蛋白酶的降解作用有一定的抗性。这些优点都说明 IgY 抗体作为导向药物载体的可能性。

致 谢 感谢解放军空军总医院李学甫教授在病理组织学方面, 卫生部生物药品检定所尹红章主任等在免疫组织化学方面给予的帮助。

参 考 文 献

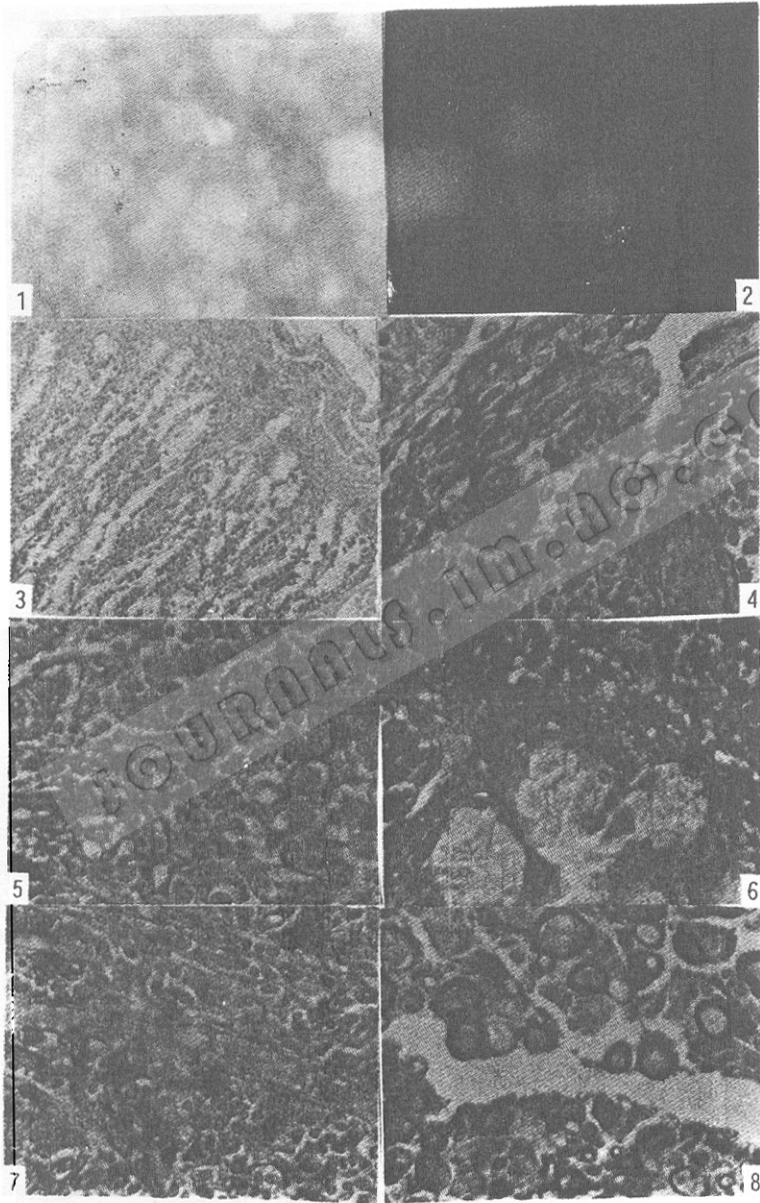
- [1] 凌天冀、唐俊杰、张丽君等. 贵阳医学院学报, 1987. 12 (4): 310~314.
- [2] 沈倍奋: 单克隆抗体, 1993, 9 (3): 12~15.
- [3] 甄永苏: 单克隆抗体, 1993, 9 (3): 16~18.
- [4] Enrique Pimentel. *Oncogenes*. CRC, Press, 1986, p. 46.
- [5] Brown, J, Resurreccion R S, Dickson T G *et al.* *Avian Dis*, 1989, 33 (4): 654~656.
- [6] Farrelly C O', Branton D, Wanke C A. *Infection and Immunity*, 1992, 60 (7): 2 593~2 597.
- [7] Takusaburo E, Tsukada K, Umezu K *et al.* *Microbiol Immunol*, 1990, 34 (7): 617~630
- [8] Gassmann M, Thoemmes P, Weier T *et al.* *FED AM SOC EXP BIOL J*, 1990, 4 (8): 2 528~2 532.
- [9] Heike B, Hermann S. *J Immunol Methods*, 1984, 72 (2): 421~426.
- [10] Hideaki Y, Peralta R C, Diaz R *et al.* *Infection and Immunity*, 1992, 60 (3): 998~1 007.
- [11] Jensenius J C, Andersen I, Hau J *et al.* *J Immunol Methods*, 1981, 46: 63~68.
- [12] Spalding B J. *Bio/Technology*, 1993, 11: 1 214~1 216.

The Selective Recognition of IgY Antibody for Digestive System Cancer as a Carrier

Yang Jianmin Jin Zhigang Yu Qiong Yang Taolan Wang Huipeng Liu Lianrui
(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

Abstract As an efficient drug against cancer, it is important to find a small target vector, such as antibodies. In our laboratory, we immunized SPF hen with P110 protein as an antigen, and then we extracted the IgY from egg yolk of the immunized hen as a target vector of toxins. Results indicated that IgY antibody can specially recognize gastro-intestinal system cancer. This assay may give an important method for the producing vector of antitumorogenic drugs.

Key words IgY antibody, MGC-80-3 cell line, selective recognition, target vector



1. Normal stomach cells, 2. Stomach low differentiation adenocarcinoma cells,
3. Stomach mucous membrane, 4. Oesophago cancer, 5. Stomach cardia low differentiation adenocarcinoma,
6. Stomach cardia middle differentiation adenocarcinoma, 7. Stomach low differentiation adenocarcinoma,
8. Intestinum rectum adenocarcinoma