

# McAbGB<sub>2</sub> 识别的乳腺癌血清抗原性质研究\*

蔡桂英 陈虹 魏玲

(华西医科大学生物化学教研室, 成都 610041)

**摘要** 对抗人乳腺癌血清抗原单克隆抗体 GB<sub>2</sub> (McAbGB<sub>2</sub>) 识别的抗原 (McAbGB<sub>2</sub> 抗原) 性质及含量进行了研究. 结果表明, McAbGB<sub>2</sub> 抗原是由糖及蛋白质组成的复合蛋白质, 不耐热; McAbGB<sub>2</sub> 抗原决定簇不存在于铁蛋白及癌胚抗原; 蛋白质印迹检测表明 McAbGB<sub>2</sub> 抗原有两条区带, 分子量分别为 116 及 45 ku, 分布于血液及癌组织; 用 McAbGB<sub>2</sub> 进行血清学分析 (ELISA 试验), 结果表明: 乳腺癌阳性符合率达 98% (50/51), 正常人及乳腺良性肿瘤病人的假阳性率分别为 6% (3/50) 及 6.7% (1/15). McAbGB<sub>2</sub> 抗原可能是新的乳腺癌相关抗原.

**关键词** 乳腺癌血清抗原, 肿瘤相关抗原, ELISA, 血清学分析

近年来乳腺癌发病率不断上升, 临床强调对其早诊早治, 但目前的防治方法尚不完善. 用抗乳腺癌单抗检测患者血清中的对应抗原, 以期能达到早诊、监测病情和预后的目的, 已成为抗乳腺癌单抗的基础和应用研究领域中最活跃的课题之一<sup>[1]</sup>, 如单抗 115D8<sup>[2]</sup>、3E1.2<sup>[3]</sup>及 DF3<sup>[4]</sup>等已引起人们的注目, 但目前可用于乳腺癌血清学诊断的有价值的单抗还很少, 且检测的灵敏度、阳性检出率等还不理想. 作者以人血清提取的乳腺癌抗原为免疫原制备了较高特异性的抗人乳腺癌血清抗原的单克隆抗体 GB<sub>2</sub> (McAbGB<sub>2</sub>), 并用于血清学诊断研究, 至今国内未见这方面的报道. 本文对 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的性质及其在人血清中的水平进行了研究.

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和试剂

McAbGB<sub>2</sub>: 由人乳腺癌血清抗原免疫的 BALB/C 小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞融合的杂交瘤细胞产生, 经硫酸铵沉淀及 DEAE-纤维素柱层析纯化.

乳腺癌血清抗原: 从乳腺癌病人血清经有机溶剂和 CsCl 密度梯度超离心提取并纯化.

乳腺肿瘤病人血: 由四川省肿瘤医院乳腺

外科提供, 并经临床和病理学检查验证.

正常人血: 由成都市中心血站和华西医科大学附属一院采血室提供.

各种癌症病人血: 华西医科大学附属一院 24 科提供.

### 1.2 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的性质

**1.2.1 分子量测定:** 乳腺癌血清抗原与标准分子量蛋白 (45~200 ku) 以 5%~20% 梯度胶进行 SDS-PAGE 分析, 以乳腺癌组织提取液作对照. 再按 Towbin<sup>[5]</sup>的方法将凝胶蛋白质转移至硝酸纤维素膜 (Bio-Rad) 上, 进行蛋白质印迹测定.

**1.2.2 影响抗原活性的因素:** 用间接 ELISA 法观察胰蛋白酶、甲醇、高碘酸钠及煮沸 4 种因素对抗原活性的影响.

**1.2.3 McAbGB<sub>2</sub> 抗原与铁蛋白、癌胚抗原的相关性研究:** 采用 ELISA 间接竞争性抑制试验观察这两种恶性肿瘤相关抗原与 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的关系.

### 1.3 人血清中 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的含量分析

采用间接 ELISA 法, 将自制乳腺癌血清抗原用包被缓冲液稀释至 250、125、62.5、31.25、15.625、7.8 和 3.9 μg/L, 取不同浓

\* 国家教委博士点基金资助项目.

收稿日期: 1995-08-31, 修回日期: 1995-11-02

度的血清抗原 50 μl 分别加入酶标板标准孔内, 同时将待测血清作 1:8×10<sup>4</sup> 稀释, 分别取 50 μl 加入测定孔内, 37℃ 保温 2 h 后洗涤 3 次, 加 1:5000 单抗, 以稀释缓冲液作对照, 37℃ 保温 2 h, 洗涤 3 次, 加 HRP-兔抗小鼠 IgG<sub>Fc</sub> (1:4000), 37℃ 保温 2 h, 洗涤 3 次, 以 0.16% 邻苯二胺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色 30 min, 2 mol/L 硫酸终止反应, 于 492 nm 测光密度. 以标准孔光密度值为纵坐标, 相应的血清抗原蛋白含量为横坐标, 作半对数坐标标准曲线. 根据标准曲线确定样品中单抗对应抗原的含量. 抗原含量以 U/ml 表示, 1 U/ml 相当于 1 μg/L 自制乳腺癌血清抗原的蛋白含量.

## 2 结 果

### 2.1 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的性质

2.1.1 乳腺癌血清抗原经 4 种因素处理后, 除甲醇外, 其他 3 个因素 (胰蛋白酶、NaIO<sub>4</sub> 及高温) 均使抗原活性降低 (表 1), 且在 NaIO<sub>4</sub> 浓度为 1 mmol/L 时已对抗原有明显破坏作用 (图 1).

表 1 4 种因素对 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的影响

处理因素	A <sub>492</sub>	
	处理前	处理后
2.5 g/L 胰蛋白酶, 37℃, 1 h	0.37	0.01
20 mmol/L NaIO <sub>4</sub> , 室温, 1 h	0.74	0.15
甲醇, 0℃, 30 min	0.37	0.30
煮沸, 10 min	0.40	0.21

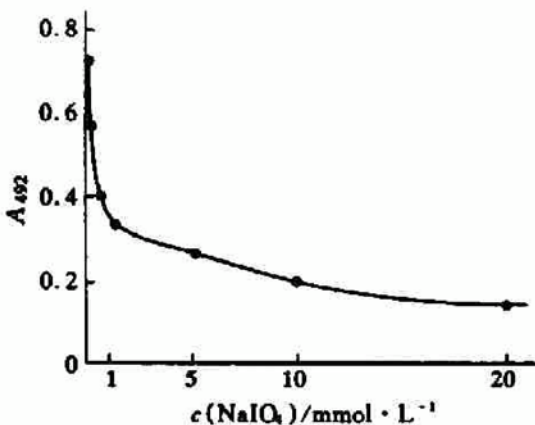


图 1 NaIO<sub>4</sub> 对 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的影响

2.1.2 ELISA 竞争性抑制试验结果表明, 铁蛋白和癌胚抗原对 McAbGB<sub>2</sub> 与其抗原结合无明显抑制作用, 光密度值分别为 0.70 及 0.72, 缓冲液对照为 0.81.

2.1.3 蛋白质印迹试验结果表明, McAbGB<sub>2</sub> 抗原有两条带, 分子量分别为 116 及 45 ku, McAbGB<sub>2</sub> 抗原分布于乳腺癌组织和血清中 (图 2).

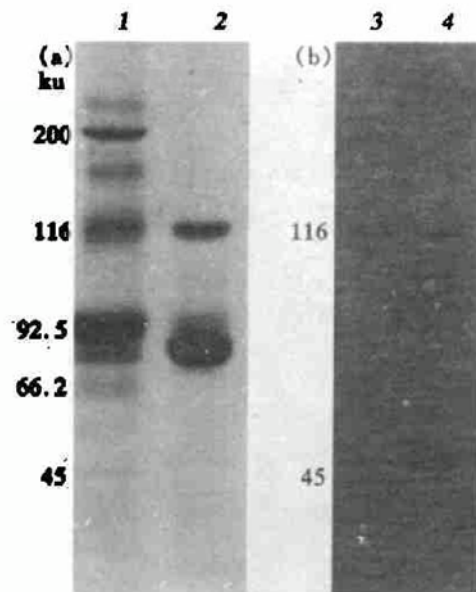


图 2 McAbGB<sub>2</sub> 抗原的电泳及蛋白质印迹图谱

(a) SDS-PAGE (5%~20% 梯度胶). 1: 标准分子量; 2: 乳腺癌血清抗原. (b) 蛋白质印迹. 3: 乳腺癌组织提取液; 4: 乳腺癌血清抗原.

### 2.2 McAbGB<sub>2</sub> 抗原在人血清中的水平

2.2.1 以乳腺癌血清抗原蛋白量 1 μg/L 为 1 U/ml 绘制人血清中乳腺癌血清抗原的标准曲线, 其结果见图 3.

2.2.2 正常人、乳腺良性肿瘤病人及乳腺癌病人血清中 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平见表 2. 结果表明 (表 2) 乳腺癌病人与正常人及乳腺良性肿瘤病人之间的血清中 McAbGB<sub>2</sub> 抗原含量均存在显著性差异 (P<0.001), 乳腺良性肿瘤病人血清 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平与正常人相比无显著性差异 (P>0.05).

人血清中 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平分析见图 4.

以正常人血清中McAbGB<sub>2</sub>抗原含量平均值加

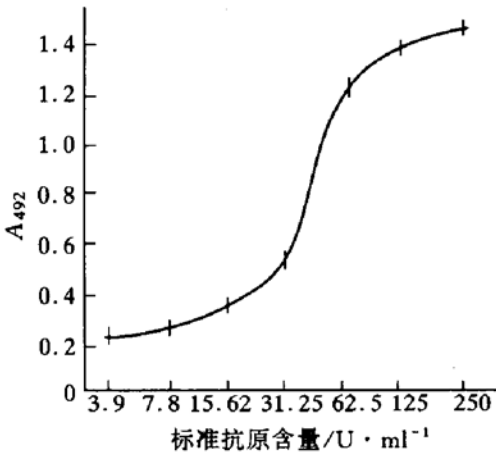


图3 人血清中乳腺癌血清抗原 (McAbGB<sub>2</sub> 抗原) 的标准曲线

表2 乳腺肿瘤病人血清中 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平

组别	例数	McAbGB <sub>2</sub> 抗原 (x±s) /U·ml <sup>-1</sup>
正常人	50	8.5±9.74
乳腺良性肿瘤病人	15	11.5±11.09
乳腺癌病人	51	69.0±42.65

2倍标准差  $x + 2s$  (27.98 U/ml) 为阳性判断标准, 观察到乳腺癌病人血清 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平的阳性符合率为 98% (50/51), 有 6% (3/50) 正常人, 6.7% (1/15) 乳腺良性肿瘤病人显假阳性。

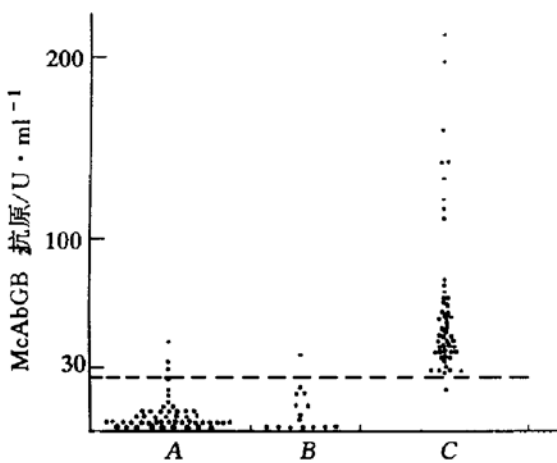


图4 人血清 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平

A: 正常人; B: 乳腺良性肿瘤病人; C: 乳腺癌病人。

2.2.3 其他上皮性恶性肿瘤病人 (27 例) 血清中 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平见表 3, 其值均低于阳性判断值, 接近正常人均值。

表3 某些上皮性恶性肿瘤病人 McAbGB<sub>2</sub> 抗原水平

类型	例数	McAbGB <sub>2</sub> 抗原/U·ml <sup>-1</sup>
宫体癌	1	26
卵巢癌	1	16
肺癌	2	13.5
肺癌	7	<8.5
食道癌	4	<8.5
结肠癌	4	<8.5
胃癌	4	<8.5
肾癌	1	<8.5
前列腺癌	1	<8.5
胸腺癌	1	<8.5
鼻咽癌	1	<8.5

### 3 讨 论

本文报道用抗人乳腺癌血清抗原 McAbGB<sub>2</sub> 检测人血清中乳腺癌抗原水平, 结果显示乳腺癌病人阳性符合率达 98%; 乳腺癌病人与乳腺良性肿瘤病人及正常人之间的血清 McAbGB<sub>2</sub> 抗原含量均呈显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 具有统计学意义. 因此, McAbGB<sub>2</sub> 识别的抗原与乳腺癌直接关联。

高碘酸钠对 McAbGB<sub>2</sub> 抗原有较强的破坏作用, 而甲醇不影响抗原活性, 说明 McAbGB<sub>2</sub> 识别的抗原含糖而不含脂类物质. 此外, 胰蛋白酶和高温对其抗原也有作用, 证明该抗原中有蛋白质成分, 所以 McAbGB<sub>2</sub> 抗原属糖蛋白, 且不耐热. ELISA 竞争性抑制试验结果显示 McAbGB<sub>2</sub> 抗原决定簇不存在于铁蛋白及癌胚抗原, 可推测 McAbGB<sub>2</sub> 抗原与这两种恶性肿瘤相关抗原没有结构上联系. 蛋白质印迹试验表明 McAbGB<sub>2</sub> 抗原有两条带, 分子量分别为 116 及 45 ku, McAbGB<sub>2</sub> 抗原可能是分子量为 116 ku 的糖蛋白. 曾有人<sup>[6]</sup>认为癌变的糖蛋白糖链的结构变化可通过侧链增

加所致的高分子量化显示出来, 因此 45 ku 成分可能是 116 ku 糖蛋白的核心蛋白成分.

近年来国外报道的抗乳腺癌单抗识别的抗原属高分子量的粘蛋白样的糖蛋白较多, 对这些单抗识别的各抗原决定簇之间的关系还缺乏完整系统的认识, 只能从抗体的特异性上进行比较. McAbGB<sub>2</sub> 抗原从分子大小看不同于这些大于 200 ku 的粘蛋白样乳腺癌相关抗原, 如 MAM-6<sup>[2]</sup>, CA15.3<sup>[7]</sup> 和 MSA<sup>[8]</sup> 等. 从分子量看, McAbGB<sub>2</sub> 抗原与 100 ku 和 46 ku 这两种成分较为接近, 但不太可能属于同一类. Thompson<sup>[9]</sup> 以乳腺癌细胞系 MCF-7 为免疫原制备的抗乳腺癌单抗 24-17.2, 其识别分子量约为 100 ku 的人乳腺癌相关抗原 (HBCAA), 主要分布于恶性乳腺癌上皮细胞, 并少量出现于正常乳腺上皮细胞, 尽管在乳腺癌病人血中检测到抗 HBCAA 的抗体, 但未报道人血清中分布有 HBCAA, 这与 McAbGB<sub>2</sub> 抗原不同. 另外 Ceriani 等<sup>[10]</sup> 制备的抗乳腺癌单抗 BLMRL-HMFG-MC<sub>3</sub> 识别转移性乳腺癌病人血清中 46 ku 的人乳腺上皮细胞抗原 (HME-Ag), 但非乳腺癌病人和正常人血清中没有该 46 ku 的 HME-Ag, 它可能与晚期转移性乳腺癌相关, 表明它也与 McAbGB<sub>2</sub> 抗原存在差别. 因此, McAbGB<sub>2</sub> 抗原可能是新的乳腺肿瘤相关抗原. 此外, 蛋白质印迹试验表明, McAbGB<sub>2</sub> 抗原也分布于乳腺癌组织提取液, 可推测 McAbGB<sub>2</sub> 抗原由乳腺癌细胞分泌入血液后, 有部分经过一系列代谢过程或解离成 45 ku 的核心蛋白成分, 这也提示 McAbGB<sub>2</sub> 抗原可作为血清乳腺癌标志物, 在简便易行的血清学诊断、治疗监测和预后等方面具有实际的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Hayes D F. Hematol Oncol Clin North Am, 1994; 8: 485
- 2 Hilkens J, Kroezen V, Bonfrer J M G *et al.* Cancer Res, 1986; 46: 2582
- 3 Smart Y C, Stewart J F, Bartlett L D *et al.* Breast Cancer Res Treat, 1990; 16: 23

- 4 Hayes D F, Sekine H, Ohno T *et al.* J Clin Invest, 1985; 75: 1397
- 5 Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 6: 4350
- 6 水落次男, 水幡陽. 最新医学, 1987; 36: 901
- 7 Duncan J L, Price A, Roger S. Eur J Surg Oncol, 1991; 17: 16
- 8 Stacker S A, Sacks N P M, Golder J *et al.* Br J Cancer, 1988; 57: 298
- 9 Thompson C H, Lichtenstein M, Stacker S A *et al.* Lancet, 1984; 2: 124
- 10 Ceriani R L, Sasaki M, Sussman H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1982; 79: 5420

**A Study on Character of Serum Antigen Recognized by McAbGB<sub>2</sub> in Breast Cancer.** Cai Guiying, Chen Hong, Wei Ling (*Department of Biochemistry, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

**Abstract** A study on character and content of antigen recognized by McAbGB<sub>2</sub> against serum antigen of human breast cancer was reported. The results demonstrated that the antigen recognized by McAbGB<sub>2</sub> is a complex protein which is composed of carbohydrate and protein and it is susceptible to heat. Competitive ELISA test showed that the binding of McAbGB<sub>2</sub> to its antigen could not be inhibited by ferritin and CEA. Western blot revealed that McAbGB<sub>2</sub> recognized antigen with molecular weight of 116 and 45 ku. The antigen recognized by McAbGB<sub>2</sub> exists in breast cancer tissue and serum. ELISA test with McAbGB<sub>2</sub> showed the rate of accord with positivity is 98% (50/51) in breast cancer patient sera and the rates of false positivity are 6% (3/50) in normal serum samples and 6.7% (1/15) in benign breast disease sera respectively. The antigen recognized by McAbGB<sub>2</sub> may be a new tumor-associated antigen.

**Key words** breast cancer antigen, tumor-associated antigen, ELISA, serological analysis