

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·06·001

· 基础研究 ·

## 功能差异细胞模型筛选抗肺癌功能性单克隆抗体及其抗原

卢燕来, 冉宇靓\*, 遇 珑, 赵西路, 刘 军, 胡 海, 杨治华 (中国医学科学院北京协和医学院 肿瘤研究所 细胞及分子生物学研究室, 北京 100021)

[摘 要] 目的: 筛选获取抗肺癌细胞膜的功能性单克隆抗体及其靶抗原, 为肺癌靶向治疗提供候选治疗剂及靶标。方法: 将新鲜人肺癌组织细胞免疫 BALB/c 小鼠, 采用脾细胞融合法制备大容量单克隆抗体库。建立肺癌细胞增殖、侵袭、迁移等定向功能差异细胞模型, 采用活细胞免疫荧光与功能差异模型筛选其抗原在定向功能(细胞增殖、迁移、侵袭)差异模型细胞膜上差异表达的单抗, 再经体外相应功能实验筛选具有抑制作用的功能性单抗, Western blotting 鉴定这些单抗的抗原, 裸鼠体内抑瘤实验鉴定部分单抗对肺癌的抑制作用。结果: 细胞融合后共获得 2 893 株杂交瘤克隆, 其中与肺癌细胞膜结合反应的 309 株。分别建立了 3 种体外肺癌细胞增殖、侵袭、迁移差异模型用于筛选, 筛选获得 20 株单抗能显著抑制肺癌细胞增殖、10 株单抗能显著抑制肺癌细胞侵袭、5 株单抗能显著抑制肺癌细胞迁移 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。Western blotting 鉴定了其中 6 株的抗原。选取其中 2 株单抗均能在裸鼠体内显著抑制肺癌移植瘤的生长 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论: 采用大容量功能性单抗库技术结合功能差异细胞模型可批量筛选获得具有体内外抑制肺癌细胞恶性生物学行为的功能性单抗, 为筛选肺癌靶向治疗剂及靶标提供了一种潜在的新方法。

[关键词] 肺癌; 功能性单克隆抗体; 抗原; 功能差异细胞模型; 靶向治疗

[中图分类号] R734.2; R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0501-07

## Screen for functional monoclonal antibodies and antigens of lung cancer by functional differential cell model

LU Yan-lai, RAN Yu-liang\*, YU Long, ZHAO Xi-lu, LIU Jun, HU Hai, YANG Zhi-hua (Department of Cellular Biology and Molecular Biology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To screen for functional monoclonal antibodies against lung cancer cell membrane antigens, so as to provide candidate targets and drugs for targeted therapy of lung cancer. **Methods:** Malignant cells separated from lung carcinoma tissues were used to immunize BALB/c mice. The spleen cells of the immunized mouse were fused with SP2/0 cells to construct functional monoclonal antibody library. Several lung cancer cell lines were domesticated to establish functional-oriented differential sub cell lines of proliferation, invasion and migration, then the antibodies of each clone were screened by immunofluorescence with the functional differential sub cell lines to obtain the functional monoclonal antibodies against cell membranes proteins and then screened by *in vitro* functional assays. Antigens of functional monoclonal antibodies were identified by Western blotting and the inhibitory effects of individual antibodies were tested by tumor treatment experiments *in vivo*. **Results:** Totally 2 893 monoclonal antibody clones were obtained by fusion of spleen cells with SP2/0 cells and 309 clones reacted with the lung cancer cell membranes components. Three functional-oriented differential sub cell line models of lung cancer cells, including the proliferation, invasion and migration, were established for primary screening. Twenty clones of monoclonal antibodies significantly suppressed the lung cancer cell proliferation, 10 monoclonal antibodies could inhibit tumor cell invasion in matrigel and 5 inhibited tumor cell migration ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Western blotting assay identified 6 target antigens from these functional antibodies above. *In vivo* assay further

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(No. 2009CB521804); 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(No. 2006AA02Z479)。Supported by the Major Basic Research and Development Program (973) of China(No. 2009CB521804); the National High Technology Research and Development Program (863) of China(No. 2006AA02Z479)。

[作者简介] 卢燕来(1984-), 女, 汉族, 江苏省淮安市人, 硕士, 主要从事肿瘤靶向治疗方面的研究。E-mail: AprilLu@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: ran\_yuliang@126.com

demonstrated that 2 of these functional antibodies significantly inhibited lung tumor growth in mice. **Conclusion:** Combination of functional antibody library and differential functional-oriented cell models can be used to batch screen for functional monoclonal antibodies, which can suppress the malignant behavior of lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*, providing a new method for screening the targets for the anti-malignancy therapy.

[ **Key words** ] lung neoplasms; functional monoclonal antibody; antigen; functional differential cell model; target therapy [ Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 501-507 ]

肺癌是严重危害人类健康的疾病,也是发病率和病死率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。我国的肺癌发病人数占全世界的第一位,且呈上升趋势。现有的三大治疗手段治疗肺癌的效果仍不理想,手术切除术对大部分的多发、转移或复发的肺癌患者无能为力,且易复发<sup>[2-3]</sup>;目前应用的化疗药物对相当数量的患者疗效不明显,易产生耐药<sup>[4-5]</sup>;受到胸腔重要脏器的限制,放疗的治疗作用也很有限<sup>[6-7]</sup>。因此目前仍急需研制开发能有效治疗肺癌的新药。肺癌靶向治疗因其特异性强、疗效显著,已成为最有希望的新疗法<sup>[8-9]</sup>。目前已开发出了一些肺癌分子靶向药物,如 Erlotinib (埃罗替尼)<sup>[10-11]</sup>等,但这些药物对肺癌靶向治疗的临床疗效尚需进一步提高,更多的有效的靶向药物和治疗靶位需要被发现<sup>[12-13]</sup>。本研究利用本室建立的高通量制备大容量功能性单抗库技术<sup>[14]</sup>,结合功能性差异细胞模型筛选能在体内外抑制人肺癌作用的功能性单抗及其靶抗原,以期肺癌靶向治疗提供潜在的候选靶标和靶向治疗剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、细胞和主要试剂

肺癌细胞系 GLC-82、NCI-H520、GLC-P、ANIP973、H1299、A549,小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 为本室保藏。6 周龄 BALB/c 小鼠购自中国药品生物制品检定所[实验动物合格证号 SCXK(京)2005-0004],4~6 周龄 BALB/c(nu/nu)裸鼠购自北京联通利华实验动物技术公司[实验动物合格证号 SCXK(京)2007-0001]。RPMI 1640、DMEM 培养液购自 GibcoBRL 公司;进口胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)为 Hyclone 生产,国产胎牛血清为北京元亨金马生物技术公司生产。biotin-马抗小鼠 IgG、IgM 购自 Vector 公司, $\alpha$ -tubulin 兔多抗为 Santa Cruz 生产,Cy3-Avidin 购自 Jackson 公司。PVDF 膜由 Millipore 生产。HRP 标记羊抗小鼠 IgG、IgM 和 DAPI 购自 Sigma 公司,单抗亚类检测试剂盒为 SouthernBiotech 公司生产,Western blotting 试剂购自普利莱公司,Cell Counting Kit-8 购自日本同仁化学所。

### 1.2 细胞培养

SP2/0 细胞、GLC-P、GLC82 细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养;肺癌细胞系 NCI-H520、ANIP973、A549、H1299 采用含 10% FBS 的 1640 培养液培养。

### 1.3 动物免疫

采用临床分离的肺癌新鲜组织标本(鳞癌 17 例、腺癌 6 例、小细胞肺癌 1 例)分离单个细胞,以  $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  细胞/(鼠·次)的剂量免疫 6 只 Balb/c 小鼠,连续免疫 22 个月。

### 1.4 细胞融合

待免疫小鼠血清滴度达到 1:50 000 并不再升高时,取  $1 \times 10^8$  免疫小鼠脾细胞与  $2 \times 10^7$  处对数生长期的杂交瘤细胞系 SP2/0 融合。融合后接种于含有 HAT 选择培养液的甲基纤维素培养液直径 35 mm 的细胞培养皿,培养 8~12 d 后挑取孤立的较大的细胞集落,接种 96 孔板。

### 1.5 免疫荧光法进行细胞融合阳性克隆的筛选

活细胞免疫荧光实验将 4 000/孔细胞接种于 96 孔培养板,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 3 d。70%~80% 满后,培养液、PBS 分次洗涤,每孔加入 100  $\mu$ l 杂交瘤上清或其他一抗,室温反应 1 h,含 1% BSA 的 PBST 洗涤 5 min  $\times$  5 次;每孔加入 100  $\mu$ l biotin 标记 IgG 或 IgM(1:300 稀释),室温反应 30 min,洗涤同前;加入 100  $\mu$ l 1:900 稀释的 Cy3-Avidin,室温避光反应 30 min 后,1% BSA 的 PBS 洗涤 5 min  $\times$  4 次,PBS 洗涤 5 min  $\times$  2 次;最后用含 10  $\mu$ g/ml DAPI 的 50% 甘油 50  $\mu$ l 封闭。固定细胞免疫荧光实验在加一抗前细胞经 4% 多聚甲醛固定 15 min,0.2% Triton X100 通透 5 min,余操作同活细胞免疫荧光。

### 1.6 ELISA 法检测筛选后的单抗亚型

采用 SouthernBiotech 的单抗亚类 ELISA 检测试剂盒测定筛选获得的单抗亚型,操作按照试剂盒说明书进行。

### 1.7 CCK-8 法检测肺癌细胞的增殖能力

采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况。细胞接种 96 孔板,2 d 换液 1 次,4 d 后,细胞达到 80% 满,每孔加入 10% 体积分数的 CCK-8,1.5 或 2 h 后测定  $D_{450}$  值。设复孔。根据  $D_{450}$  值计算倍增时间,比较各种细胞的

增殖能力或比照对照组计算各株单抗的抑制率。

### 1.8 Matrigel 法检测肺癌细胞的侵袭能力

采用 Matrigel 侵袭法检测细胞侵袭情况。1 mg/ml 的 Matrigel 包被 Millipore transwells 的多孔的 PET 膜, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中包被 30 min 后, 每个 transwell 嵌室 (insert) 内加入适量无血清细胞悬液, 下层血清诱导, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h 后进行镜检, 可观察到肿瘤细胞穿过多孔的 PET 膜。设 2 个复孔。侵袭筛选实验中, 每个 transwell 接种  $8 \times 10^4$  肺癌细胞, 培养 48 h 后胰酶消化膜下层的细胞, 收集培养, 反复多轮, 得到高侵袭的肺癌细胞亚克隆。侵袭能力鉴定实验中, 每个 transwell 接种  $6 \times 10^4$  人肺癌细胞培养后, 刮除多孔的 PET 膜上层未穿过的肿瘤细胞, 1:1 的甲醇/丙酮溶液固定膜下层细胞 20 min, 用含 10 μg/ml DAPI 的 50% 甘油染核, 荧光显微镜下计数侵袭细胞数, 每张膜观察 4 个不同的 100 倍视野、拍照, 经 SPSS5.1 进行统计分析, 视野中平均细胞数目代表侵袭细胞的数量。抗体的侵袭抑制实验, 接种细胞数同前, 另在每个 transwell 中需加入杂交瘤上清或 SP2/0 对照上清, 拍照、统计分析后计算抑制率。

### 1.9 迁移实验检测肺癌细胞的迁移能力

与侵袭实验相比, 无需对 Transwell 进行 Matrigel 包被, 其他步骤相同。

### 1.10 Western blotting 检测单克隆抗体对应的靶抗原的表达

蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后, 再由半干式电转移法将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上。丽春红染色确定蛋白转移到膜上并标出相对分子质量的位置。将膜置于 5% 的脱脂奶 (溶于 PBST, pH 7.4) 中 4 °C 封闭过夜, PBST 洗膜 5 次; 一抗室温下孵育 2 h, PBST 洗膜 5 次; 与 HRP 标记的羊抗小鼠 IgM 或 IgG (1:1 000) 室温下孵育 2 h, PBST 洗膜 4 次, PBS 洗膜 1 次后, 用 ECL 发光试剂盒显影。

### 1.11 体内治疗实验检测功能性单抗对肺癌移植瘤的治疗作用

将 BALB/c (nu/nu) 裸鼠分为抗体治疗组和 SP2/0 对照组, 每组 6 只。将人肺癌细胞系 GLC82 细胞按  $15 \times 10^5$  个/只裸鼠皮下接种, 并腹腔注射降脂烷。接种后 5 d (已能扪及肿瘤时) 开始腹腔注射杂交瘤细胞  $20 \times 10^5$  个/只进行治疗。期间采集小鼠尾血血清, 免疫荧光测定血液中抗体含量的变化。20 d 时处死小鼠, 测瘤重, 计算肿瘤生长抑制率。

### 1.12 统计学处理

采用 SPSS 软件分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 组

间差异采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞融合及阳性克隆的筛选

细胞免疫荧光法检测小鼠尾静脉血清, 免疫 12 个月后测得小鼠血清的抗体滴度达到 1:50 000, 至 22 个月仍不再升高。选取滴度最高的小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 最终制备获得了 2 893 个单克隆。活细胞免疫荧光法筛选获得了 309 个可与 5 种肺癌细胞系 GLC82、NCI2H520、Glc-P、A549、H1299 中的至少 1 种细胞的细胞膜反应的克隆。

### 2.2 肺癌细胞增殖差异亚克隆模型的成功建立

将肺癌细胞 973、GLC-P、GLC-82、H520 等 4 种细胞利用有限稀释法亚克隆化, 从中挑选增殖较快和较慢的多个单克隆扩大培养, 并用 CCK-8 法进行增殖速率测定, 根据  $D_{450}$  值计算倍增时间 (图 1)。筛选出 973 细胞最快增殖亚克隆 (命名为 973 fp) 和最慢增殖亚克隆 (命名为 973 sp) 倍增时间比为 1:1.29 ( $P < 0.05$ ); GLC-82 细胞最快增殖亚克隆 (命名为 GLC-82 fp) 和 GLC-82 细胞最慢增殖亚克隆 (命名为 GLC-82 sp) 倍增时间比为 1:1.60 ( $P < 0.01$ ); GLC-P 细胞最快增殖亚克隆 (命名为 GLC-Pfp) 和最慢增殖亚克隆 (命名为 GLC-Psp) 倍增时间比为 1:1.67 ( $P < 0.01$ ), H520 细胞最快增殖亚克隆 (命名为 H520fp) 和最慢增殖亚克隆 (命名为 H520sp) 倍增时间比为 1:1.23 ( $P < 0.01$ )。选择其中快慢克隆倍增时间差异最大的 GLC-82 快慢增殖亚克隆和 GLC-P 快慢增殖亚克隆作为增殖差异细胞模型, 用以筛选具有抑制肺癌细胞增殖功能的单抗。

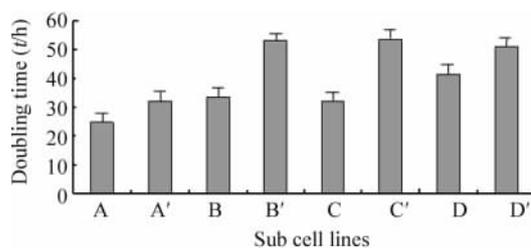


图 1 肺癌细胞增殖差异亚克隆模型

Fig.1 Human lung cancer cell sublines with different proliferation potential models

A: 973fp; A': 973sp; B: GLC-82fp; B': GLC-82sp;  
C: GLC-Pfp; C': GLC-Psp D: H520fp; D': H520sp

### 2.3 肺癌细胞侵袭差异亚克隆模型的成功建立

将肺癌细胞 H1299、GLC-P 用 Matrigel 包被的 Millipore transwells 进行侵袭筛选, 并进行侵袭功能

测定,直到 Pn + 1 代比 Pn 代细胞侵袭能力再无明显提高为止, H1299 筛选到高侵袭的 P5 代(命名为 H1299-PiP5), GLC-P 筛选到高侵袭的 P5 代(命名为 GLC-PiP5)。H1299 亲本 P0 代作为低侵袭的细胞克隆(命名为 H1299-PiP0), 以 GLC-P 亲本 P0 代作为低侵袭的细胞克隆(命名为 GLC-PiP0)。以 IPP5.1 软件计算出平均每视野中的侵袭穿膜的细胞数目, 以此来比较各代细胞侵袭能力, 结果如图 2。测得 H1299 的 P5: P0 为 1.21: 1 ( $P < 0.05$ ), GLC-P 的 P5: P0 为 1.93: 1 ( $P < 0.01$ )。选择其中侵袭能力差异最大的 GLC-P 侵袭 P5 和 P0 代作为差异细胞模型, 用以筛选具有抑制肺癌细胞侵袭功能的单抗。

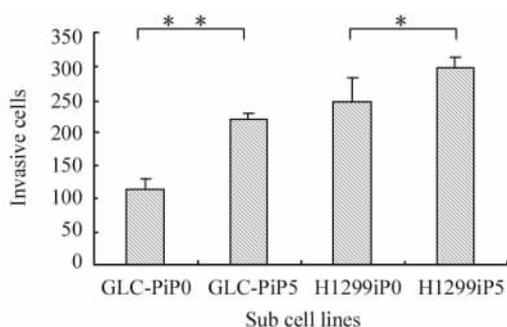


图 2 肺癌细胞侵袭差异亚克隆模型

Fig. 2 Human lung cancer cell sublines with different invasion potentials

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

#### 2.4 细胞迁移差异亚克隆模型的成功建立

将肺癌细胞 H1299、GLC-P 用 Millipore transwells 进行跨膜迁移筛选, 并进行迁移功能测定, 直到 Pn + 1 代比 Pn 代细胞迁移能力再无明显提高为止。H1299 筛选到高迁移的 P5 代(命名为 H1299-PmP5), GLC-P 筛选到高迁移的 P5 代(命名为 GLC-PmP5)。H1299 亲本 P0 代作为低迁移的细胞克隆(命名为 H1299-PmP0), GLC-P 亲本 P0 代作为低迁移的细胞克隆(命名为 GLC-PmP0)。IPP5.1 软件计算出平均每视野中的迁移穿膜的细胞数目, 以此来比较各代细胞迁移能力, 结果如图 3。迁移测定 H1299 的 P5: P0 为 1.19: 1, GLC-P 的 P5: P0 为 2.57: 1 ( $P < 0.01$ )。选择其中迁移能力差异最大的 GLC-P 迁移 P5 和 P0 代作为差异细胞模型, 用以筛选具有抑制肺癌细胞迁移功能的单抗。

#### 2.5 差异免疫荧光的阳性克隆筛选

利用 GLC-82 快慢增殖克隆和 GLC-P 快慢增殖克隆作为细胞模型, 从初筛得到的 309 株抗肺癌单

抗阳性克隆中筛选出对于快慢增殖亚克隆细胞荧光强度存在差异的单抗克隆 36 株和 35 株, 其中 4 株有重叠。利用 GLC-P 高低侵袭细胞模型从 309 株中筛选出对于高低侵袭亚克隆细胞荧光强度存在差异的单抗克隆 25 株。利用 GLC-P 高低迁移细胞模型从 309 株中筛选出对于高低迁移亚克隆细胞荧光强度存在差异的单抗克隆 31 株。

#### 2.6 抗肺癌单抗抑制肺癌细胞增殖的功能筛选结果

将增殖差异荧光筛选出的 36 株和 35 株及 GLC-82 和 GLC-P 的快速增殖亚克隆细胞分别进行抗体处理抑制增殖实验, 计算抑制率, 得到有明显抑制肺癌细胞增殖功能(抑制率  $> 20\%$ )的单抗 13 株和 7 株, 最大抑制率为 48.6%(图 4)。

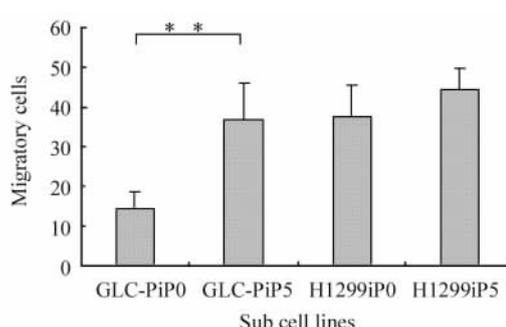


图 3 肺癌细胞迁移差异亚克隆模型

Fig. 3 Human lung cancer cell sublines with different migration potentials

\*\*  $P < 0.01$

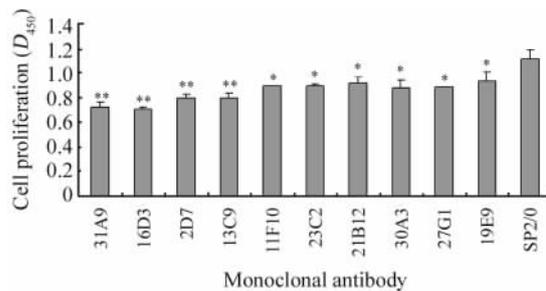


图 4 部分单抗能抑制肺癌细胞 GLC-82 的增殖

Fig. 4 Proliferative inhibition effect of some selected monoclonal antibodies on human lung cancer cells GLC-82

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  vs SP2/0

#### 2.7 抗肺癌单抗抑制肺癌细胞侵袭的功能筛选结果

将侵袭差异荧光筛选出的 25 株单抗和 GLC-P 的高侵袭亚克隆细胞进行抗体抑制侵袭实验, DAPI 染色, 荧光显微镜下拍照, 并经 IPP5.1 软件分析计数侵袭细胞数量, 计算抑制率。筛选得到有明显抑制肺癌细胞侵袭功能(抑制率  $> 20\%$ )的单抗 10 株, 最大抑制率为 72.4%。如图 5 所示, 侵袭细胞

荧光照片( ×100 )中,蓝色为染核的 DAPI,可显示细胞的数量;柱状图高度代表各株单抗抑制肺癌细胞侵袭实验中 DAPI 染色照片中平均每视野的穿膜细胞数量。

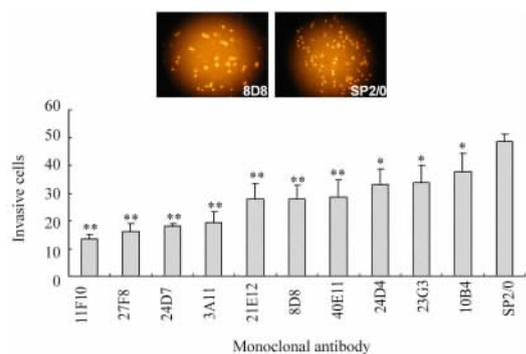


图5 10株单抗能明显抑制肺癌细胞GLC-P的侵袭

Fig. 5 Ten monoclonal antibodies significantly inhibiting invasion of lung cancer cells GLC-P

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs SP2/0. The fluorescence photos ( ×100 ) show the inhibitory assay results of one monoclonal antibody 8D8 and control SP2/0

### 2.8 抗肺癌单抗抑制肺癌细胞迁移的功能筛选结果

将迁移差异荧光筛选出的31株克隆上清用GLC-P的高迁移亚克隆作为靶细胞进行抑制迁移功能的测定,DAPI染色,荧光显微镜下拍照,并经IPP5.1软件分析计数,筛选得到有明显抑制肺癌细胞迁移功能(抑制率 >20%)的单抗5株,最大抑制率为69.3%。如图6所示,迁移细胞荧光照片( ×100 )中,蓝色为染核的DAPI,可显示细胞的数量;柱状图高度代表各株单抗抑制迁移实验中DAPI染色照片中平均每视野的跨膜细胞数量。

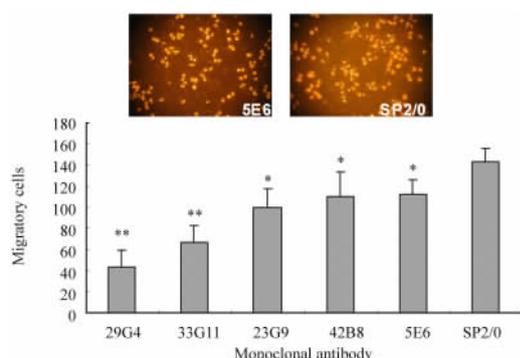


图6 5株单抗能明显抑制肺癌细胞GLC-P的迁移

Fig. 6 Five monoclonal antibodies significantly inhibiting migration of lung cancer cells GLC-P

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs SP2/0

The fluorescence photos ( ×100 ) show the inhibitory assay results of one monoclonal antibody 5E6 and control SP2/0

### 2.9 抗肺癌功能性单抗对应的抗原

提取GLC-P细胞总蛋白,采用Western blotting检测了体外有功能的杂交瘤上清共计35株,结果显示,其中6株得到较明显的抗原条带,其相对分子质量大小分别是150 000、110 000、120 000、100 000、51 000和40 000,见图7。结果提示了这6株单抗可识别蛋白一级结构的线性抗原表位,而其他大多数功能性单抗可识别的是空间构象表位。

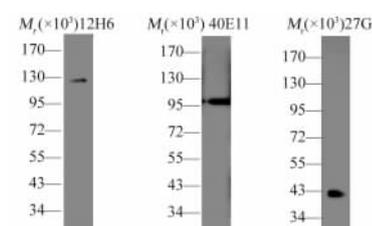


图7 Western blotting检测12H6、40E11、27G1单抗所识别的肺癌抗原

Fig. 7 Western blotting analysis of antigen protein recognized by monoclonal antibodies 12H6, 40E11 and 27G1

### 2.10 抗肺癌功能性抗体的亚型

用ELISA分型试剂盒检测了12株功能性单抗的亚型,结果显示其中11株为IgM、1株为IgG1;10株轻链为κ链、2株轻链为λ链。

### 2.11 功能性单抗对裸鼠肺癌移植瘤的治疗作用

为了验证上述功能性单抗是否在体内也具有抑制人肺癌的功能,随机挑选2株体外实验中对人肺癌细胞增殖有明显抑制作用的单抗进行体内抑瘤实验。在单抗治疗15 d(接种肿瘤细胞后20 d)后处死动物,称瘤重,计算平均瘤重和抑瘤率。正常对照裸鼠SP2/0组平均瘤重为(0.559 ± 0.235) g,15A1单抗治疗组为(0.111 ± 0.060) g,2D7单抗治疗组为(0.192 ± 0.168) g。15A1对肿瘤瘤重的抑制率为80.1%( $P < 0.01$ ),2D7对肿瘤瘤重的抑制率65.6%( $P < 0.05$ ,图8)。结果表明,所筛选获得的这2株功能性单抗可在体内显著抑制人肺癌移植瘤的生长。

## 3 讨论

靶向治疗是肿瘤治疗领域的重大进展<sup>[15-18]</sup>,目前有多种靶向治疗药物已经投入临床应用。例如治疗乳癌的抗HER-2单抗群司珠单抗(trastuzumab)<sup>[19-20]</sup>、治疗大肠癌的抗VEGF人源化单抗贝伐单抗(avastin)<sup>[21]</sup>、治疗慢性粒细胞白血病和胃肠道间质瘤的EGFR酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼(imatinib)<sup>[22]</sup>及治疗肺癌的埃罗替尼(erlotinib)<sup>[23]</sup>等。

通过建立大容量的单抗库以及高通量功能性筛选可以获得具有作为靶标潜力的肿瘤相关功能性靶抗原/基因,该方法已经被证明是一条可行的新技术路线。Eustace 等<sup>[24]</sup>通过这一方法曾获得了 3 个肿瘤转移相关的功能性基因,该技术还筛选鉴定出了肺内皮膜蛋白相关功能性基因和食管癌内皮膜蛋白相关功能基因<sup>[14,25]</sup>。笔者实验室曾发展了该技术,采用功能性单抗直接筛选治疗胃癌的靶标<sup>[26]</sup>,大大简化了功能性筛选的技术手段,拓宽了功能性筛选的范围,目前仍然尚未见到的其他类似报道。但该方法的筛选效率尚有待大幅度提高,以便能在组学水平规模化应用于筛选肿瘤治疗靶标。

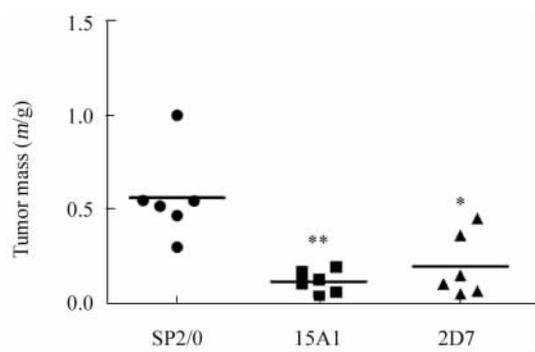


图 8 单抗 15A1 和 2D7 显著抑制裸鼠人肺癌移植瘤的生长

Fig. 8 Monoclonal antibody 15A1 and 2D7 inhibit the growth of the transplanted tumor of human lung cancer significantly *in vivo*

SP2/0 is control tumor mass 20 d post injection, 15A1 and 2D7 are monoclonal antibody treatment groups tumor mass 20 d post injection. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs SP2/0

本研究采用改良了的单克隆抗体制备方法,建立和完善了高通量制备和筛选细胞膜抗原单抗的技术,最终获得了库容为 2 893 个克隆的单抗库,并采用活细胞免疫荧光实验证实其中 309 株能与肺癌细胞的细胞膜反应。进而利用了功能性差异细胞模型来进行单抗的进一步筛选,以期有效地提高下一步直接功能性筛选实验的效率。结果显示,利用 GLC-82 快慢增殖克隆和 GLC-P 快慢增殖克隆作为细胞模型筛选出的差异荧光对应的单抗阳性克隆 36 株和 35 株,进而采用直接的定向功能性筛选实验最后获得有明显抑制功能的单抗 13 株和 7 株,功能实验筛选效率分别达到 36.1% 和 20.0%,远高于前期报道<sup>[26]</sup>的筛选效率(148 株阳性克隆中筛选出明显抑制细胞增殖功能的 11 株,筛选效率为 7.4%)。筛选效率比较结果表明,通过建立细胞功能差异筛选

模型对单抗进行差异免疫荧光筛选,可显著提高筛选效率,这种改良的筛选方法应用于抗肿瘤细胞定向功能性靶标规模化筛选具有很大的潜力。

本研究经功能性筛选最终获得了能显著抑制肺癌细胞增殖、侵袭、迁移的功能性单克隆抗体 35 株,随机选取其中 2 株进行体内实验,结果证明了它们都有较强的抑制人肺癌移植瘤的治疗效果。Western blotting 实验初步鉴定出了其中 6 株单抗对应的靶抗原,下一步将采用质谱技术全面鉴定这些抗人肺癌功能性单抗的靶抗原,并详细评价它们作为肺癌治疗靶标的价值。本研究建立和优化的高通量制备抗肿瘤功能性单克隆抗体库结合功能差异细胞模型筛选功能性抗肺癌单抗及抗原的技术,为筛选获得抑制肿瘤细胞各种恶性生物学行为的功能性抗体以及寻找到潜在的治疗靶标提供了一种有效的新方法。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Molina JR, Adjei AA, Jett JR. Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer [ J ]. Chest, 2006, 130( 4 ): 1211-1219.

[ 2 ] Huang EH, Liao Z, Cox JD, et al. Comparison of outcomes for patients with unresectable, locally advanced non-small-cell lung cancer treated with induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiation vs concurrent chemoradiation alone [ J ]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 68( 3 ): 779-785.

[ 3 ] Kunitoh H, Suzuki K. How to evaluate the risk/benefit of trimodality therapy in locally advanced non-small-cell lung cancer [ J ]. Br J Cancer, 2007, 96( 10 ): 1498-1503.

[ 4 ] Delbaldo C, Michiels S, Rolland E, et al. Second or third additional chemotherapy drug for non-small cell lung cancer in patients with advanced disease [ J ]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, 4: CD004569.

[ 5 ] Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy [ J ]. J Clin Oncol, 2004, 22( 9 ): 1589-1597.

[ 6 ] Vansteenkiste JF, Stroobants SG. Positron emission tomography in the management of non-small cell lung cancer [ J ]. Hematol Oncol Clin North Am, 2004, 18( 1 ): 269-288.

[ 7 ] Miele E, Spinelli GP, Tomao F, et al. Positron emission tomography ( PET ) radiotracers in oncology-utility of <sup>18</sup>F-fluoro-deoxy-glucose ( FDG )-PET in the management of patients with non-small-cell lung cancer ( NSCLC ) [ J ]. J Exp Clin Cancer Res, 2008, 27: 52.

[ 8 ] Wheatley-Price P, Shepherd FA. Targeting angiogenesis in the treatment of lung cancer [ J ]. J Thorac Oncol, 2008, 3( 10 ): 1173-1184.

[ 9 ] Pedretti M, Soltermann A, Arni S, et al. Comparative immunohistochemistry of L19 and F16 in non-small cell lung cancer and mesothelioma: two human antibodies investigated in clinical trials in

- patients with cancer [ J ]. Lung Cancer, [ 2008-09-15 ]. [ Epub ahead of print ].
- [ 10 ] Beziak A, Tu D, Seymour L, *et al.* Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the national cancer institute of canada clinical trials group study BR. 21 [ J ]. J Clin Oncol, 2006, 24( 24 ): 3831-3837.
- [ 11 ] Lu JF, Eppler SM, Wolf J, *et al.* Clinical pharmacokinetics of erlotinib in patients with solid tumors and exposure-safety relationship in patients with non-small cell lung cancer [ J ]. Clin Pharmacol Ther, 2006, 80( 2 ): 136-145.
- [ 12 ] Ramalingam S, Belani CP. Recent advances in targeted therapy for non-small cell lung cancer [ J ]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11( 2 ): 245-257.
- [ 13 ] Garcia J, Riely GJ, Nafa K, *et al.* KRAS mutational testing in the selection of patients for EGFR-targeted therapies [ J ]. Semin Diagn Pathol, 2008, 25( 4 ):288-294.
- [ 14 ] Zhang Y, Ran Y, Yu L, *et al.* Monoclonal antibody to human esophageal cancer endothelium inhibits angiogenesis and tumor growth [ J ]. Anticancer Res, 2006, 26( 4B ):2963-2970.
- [ 15 ] Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, *et al.* Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents [ J ]. Cancer Cell, 2008, 14( 3 ):263-273.
- [ 16 ] Matsui J, Funahashi Y, Uenaka T, *et al.* Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor ( VEGF-R ) 2 and VEGF-R3 kinase [ J ]. Clin Cancer Res, 2008, 14( 17 ):5459-5465.
- [ 17 ] Brooks KJ, Coleman EJ, Vitetta ES. The antitumor activity of an anti-CD54 antibody in SCID mice xenografted with human breast, prostate, non-small cell lung, and pancreatic tumor cell lines [ J ]. Int J Cancer, 2008, 123( 10 ): 2438-2445.
- [ 18 ] Cabebe E, Wakelee H. Role of anti-angiogenesis agents in treating NSCLC: focus on bevacizumab and VEGFR tyrosine kinase inhibitors [ J ]. Curr Treat Options Oncol, 2007, 8( 1 ):15-27.
- [ 19 ] Kurian AW, Thompson RN, Gaw AF, *et al.* A cost-effectiveness analysis of adjuvant trastuzumab regimens in early HER2/neu-positive breast cancer [ J ]. J Clin Oncol, 2007, 25( 6 ):634-641.
- [ 20 ] Lara PN Jr, Laptalo L, Longmate J, *et al.* Trastuzumab plus docetaxel in HER2/neu-positive non-small-cell lung cancer: a california cancer consortium screening and phase II trial [ J ]. Clin Lung Cancer, 2004, 5( 4 ): 231-236.
- [ 21 ] Lemmens L, Claes V, Uzzell M. Managing patients with metastatic colorectal cancer on bevacizumab [ J ]. Br J Nurs, 2008, 17( 15 ): 944-949.
- [ 22 ] Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia [ J ]. Hematology, 2003, 25( 1 ): 132-152.
- [ 23 ] Ardavanis A, Koumna S, Fragos I, *et al.* Erlotinib monotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: an effective approach with low toxicity [ J ]. Anticancer Res, 2008, 28( 4C ): 2409-2415.
- [ 24 ] Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, *et al.* Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness [ J ]. Nat Cell Biol, 2004, 6( 6 ): 507-514.
- [ 25 ] 遇 珑, 潘 健, 周 转, 等. 抑制食管癌与肺血管内皮黏附的功能性抗体的制备 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13( 5 ): 332-337.
- [ 26 ] 赵西路, 陈立钊, 冉宇靓, 等. 抑制胃癌增殖功能性单抗的制备筛选及鉴定 [ J ]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18( 6 ): 961-963.
- [ 收稿日期 ] 2008 - 09 - 18 [ 修回日期 ] 2008 - 11 - 01  
[ 本文编辑 ] 王 莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符, 它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法, 切不可混淆使用。现根据有关标准和规则, 把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体, 例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体), 例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号前 3 个字母应斜体, 例如 *Hind* III、*Bam*H I、*Sal* I 等。(4) 各种统计学符号应斜体, 例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本标准差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外), 例如长度 *L*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体, 例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体, 例如 *et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)