

# 抗人 T 细胞单克隆抗体与商陆毒蛋白结合物的制备及其抗白血病细胞活性

同济医科大学血液病研究所

褚嘉佑 杨爱德 王辨明 胡 忠\* 张和君\*\*  
史良如<sup>△</sup> 朱晓梅\* 曲京华\*\* 罗兰英\* 郭 仁\*\*

**摘要** 将美洲商陆抗病毒蛋白通过二硫键与抗人 T 细胞单克隆抗体 Wu71 偶联制备免疫毒素。结合物经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫双扩散和间接荧光检测, 表明该结合物对人 T 淋巴细胞白血病 CEM 细胞显示很强的杀伤作用, 在  $10^{-9}$  mol/L 浓度下可杀灭 76.4% 的靶细胞, 而对抗原阴性的 SP<sub>2</sub>/0 细胞杀灭作用很弱。<sup>14</sup>C-亮氨酸掺入蛋白质合成抑制试验显示结合物在  $10^{-9}$  mol/L 时可抑制 72.4% 的蛋白质合成。这一免疫毒素有可能用于白血病自体骨髓移植时白血病细胞的体外清除。

**关键词** 商陆抗病毒蛋白; 免疫毒素; 白血病细胞

利用高度特异性的单克隆抗体(简称单抗)作为载体制备免疫毒素, 将具有杀灭肿瘤细胞能力的药物或毒素作为“弹头”定向运送到靶细胞, 这是近年来一个十分活跃的研究领域。美洲商陆抗病毒蛋白(Pokeweed antiviral protein from seeds, PAP-s)是从商陆属多年生草本植物 *Phytolacca americana* 种子中提纯的一种植物毒素, 国外报道在免疫毒素的制备中是一种较好的“弹头”, 国内尚未见报道。我们将抗人 T 细胞单克隆抗体 Wu71 与 PAP-s 连接, 观察了结合物抗白血病细胞的活性。

## 材料和方法

### 一、材料

N-琥珀酰胺-3-(2-二硫吡啶)丙酸 (SPDP)(第四军医大学生化教研室产品); 二硫苏糖醇 (DTT) (美国 SIGMA 产品); <sup>14</sup>C-亮氨酸 (英国 Amersham 产品); 抗人

T 细胞单克隆抗体 Wu71 和异硫氰酸荧光素 (FITC)-兔抗鼠 IgG 为卫生部武汉生物制品研究所提供。Wu71 为 IgG<sub>1</sub> 亚类单抗, 识别全部人外周血 T 细胞及慢性 B 淋巴细胞白血病细胞, 相应的抗原分子量为 66.5 ku (67 kd)。按国际命名为 CD<sub>3</sub>。(CD 表示抗体识别抗原的群别)。细胞株采用人 T 淋巴细胞白血病 CEM 细胞和小鼠骨髓瘤 SP<sub>2</sub>/0 细胞。

二、PAP-s 的提取及理化、生物性质测定  
提取和纯化方法见参考文献<sup>[1]</sup>。纯化的 PAP-s 用蚀斑抑制法检测其抗病毒活性; 用兔网织红细胞裂解液无细胞蛋白质合成系统测定 PAP-s 抑制无细胞蛋白质合成活性<sup>[1]</sup>。

### 三、Wu71:PAP-s 免疫毒素的制备

PAP-s 按 5 mg/ml 溶于 pH 7.6, 含 NaCl 0.2 mol/L 的 40 mmol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 中, 加入溶于二甲基亚砷 (DMSO) 中的 SPDP (PAP-s/SPDP = 1/3) (mol/L)。置 23℃ 30 分钟, 过 Sephadex G25 层析柱以除去未反应的 SPDP, 收集第 1 峰洗脱液, 与终浓度 50 mmol/L 的 DTT 在 23℃ 反应 30 分钟, 再过 Sephadex G25 层析柱, 第 1 峰洗脱液收

\* 中国科学院昆明植物研究所

\*\* 中国医学科学院医学生物学研究所

△ 卫生部武汉生物制品研究所

集备用。Wu71按5mg/ml溶于 pH7.6 的PBS中，加入溶于DMSO的 SPDP (Wu71/SPDP =1/6) (mol/L)，23℃反应 30 分钟后对 pH7.6 的PBS透析，透析产物与经过 DTT 还原的巯基化PAP-s混合，4℃反应 16 小时，反应物浓缩后先用离子交换除去聚合物和游离单抗，再过Sephadex G75纯化除去游离毒素，用LKB核酸蛋白检测仪检测，收集蛋白第1峰洗脱液，冰冻干燥，贮于-70℃备用。

四、抗体活性测定

采用间接免疫荧光法，取体外培养的人白血病CEM细胞，以 Wu71:PAP-s结合物为第1抗体，FITC-兔抗鼠IgG为第2抗体，用吊篮式离心机洗涤细胞，滴片后用落射式荧光显微镜观察。

五、兔抗PAP-s抗血清的制备及免疫双扩散

用提纯的 PAP-s 免疫家兔制备兔抗 PAP-s抗血清，常规方法作琼脂免疫双扩散试验。

六、细胞毒作用测定

CEM细胞及对照组SP<sub>2</sub>/0细胞用含5%小牛血清的RPMI1640制成 5 × 10<sup>4</sup>之细胞悬液，接种于Linberco 24孔培养板上，分别加入不同浓度的Wu71、PAP-s及Wu71:PAP-s结合物，置5%二氧化碳培养箱37℃培养，24~72小时用吖啶橙/溴化乙啶染色，在荧光显微镜下计数死、活细胞数<sup>[3]</sup>。

七、完整细胞中蛋白质合成抑制试验

取培养的CEM细胞用Hank's液洗1次，悬于含5%小牛血清的无亮氨酸培养液中，细胞浓度为 5 × 10<sup>5</sup>个/ml，在Linberco 96孔培养板中每孔加入 0.1ml 细胞悬液，10μl游离Wu71、PAP-s或Wu71:PAP-s结合物，置5%二氧化碳培养箱中37℃培养10小时。取出培养液于微孔滤膜上抽滤，10%三氯醋酸洗培养孔3次，一并过滤。滤膜用10%三氯醋酸洗1次，蒸馏水洗3次后，80℃烤干

放测量瓶中加入10ml PPO-POPOP二甲苯闪烁液，于LKB液体闪烁器上计数。

结 果

一、PAP-s的生物学活性

病毒蚀斑抑制结果表明PAP-s 有很强的抗病毒作用，浓度为3.3 × 10<sup>-8</sup>mol/L时能抑制97.3%的病毒增殖。PAP-s 在兔网织红细胞裂解液无细胞蛋白质合成系统中抑制50%蛋白质合成的量 (ID<sub>50</sub>)为8.6 × 10<sup>-11</sup>mol/L (2.6ng/ml)。游离 PAP-s 对完整细胞毒性较小，在10<sup>-9</sup>mol/L浓度下72小时杀灭10.0%的CEM细胞和10.1%的SP<sub>2</sub>/0细胞。

二、免疫毒素的性质测定

抗人T细胞单抗Wu71与PAP-s用SPDP连接后，经离子交换后再用Sephadex G75层析柱纯化，用SHIMADZU CORPORATION UV-260紫外分光光度计检测，第1峰为蛋白质，即免疫毒素。用10%分离胶之 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定，Wu71:PAP-s结合物经2-巯基乙醇还原后的区带上既可看到Wu71的区带，也可看到PAP-s的区带(图1)。以Wu71:PAP-s为第1抗体，FITC-兔抗鼠

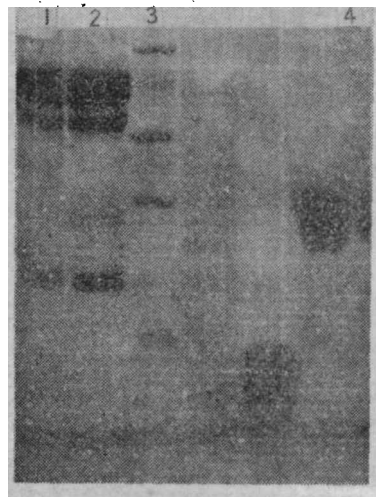


图1 Wu71:PAP-s结合物的 SDS-聚丙烯酰胺电泳图谱

- 1. Wu71 2. Wu71:PAP-s结合物
- 3. 标准蛋白 4. PAP-s

IgG为第2抗体的间接荧光检测可见 CEM 细胞上有清晰的膜荧光，SP<sub>2</sub>/0 细胞 则无荧光，示 Wu71 与 PAP-s 连接后仍保持与 T 细胞结合的特性。用羊抗鼠 IgG 抗血清和兔抗 PAP-s 抗血清对 Wu71:PAP-s 结合物进行琼脂免疫双扩散，表明结合物中含有 Wu71 和 PAP-s，与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果一致 (图 2)。

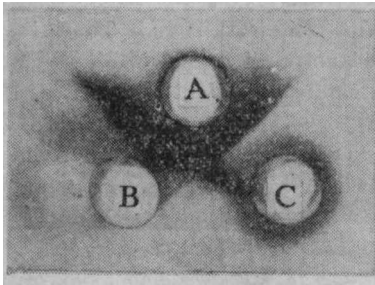


图 2 免疫毒素的免疫双扩散  
A: Wu71:PAP-s 结合物  
B: 兔抗 PAP-s 抗血清  
C: 羊抗鼠 IgG 抗血清

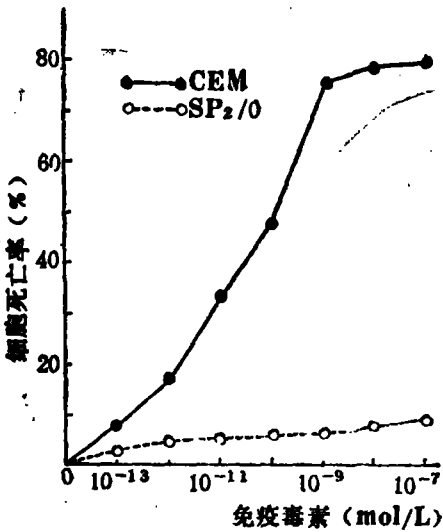


图 3 Wu71:PAP-s 对靶细胞的杀灭作用

### 三、Wu71:PAP-s 结合物的特异杀伤作用

在 10<sup>-9</sup>mol/L 浓度下，游离 PAP-s 和 Wu71 对 CEM (或 SP<sub>2</sub>/0) 细胞的杀伤力量均较弱 (72 小时死亡细胞分别为 10.1% 和 4%)，

而 10<sup>-9</sup>mol/L 的 Wu71:PAP-s 结合物 72 小时可杀灭 76.4% 的 CEM 细胞，抗原阴性的 SP<sub>2</sub>/0 细胞仅有 7% 被杀灭 (图 3)。完整细胞中 <sup>14</sup>C-亮氨酸掺入蛋白质合成抑制试验显示 Wu71:PAP-s 结合物在 10<sup>-9</sup>mol/L 时对蛋白质合成抑制率为 72.40% (图 4)。

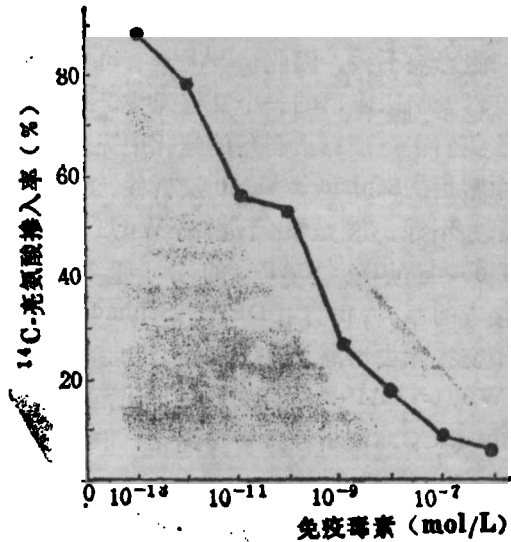


图 4 Wu71:PAP-s 对完整细胞蛋白质合成的抑制作用

## 讨 论

免疫毒素最常使用的弹头是蓖麻毒素。蓖麻毒素是由 A、B 两条肽链构成的植物毒素。B 链可以特异地连接到细胞表面糖蛋白或糖脂的半乳糖上，促进 A 链进入细胞膜而阻止蛋白质合成<sup>[5]</sup>。蓖麻毒素的主要缺点在于 A 链必须与 B 链分离，以避免毒素与细胞表面的非特异结合，而 A、B 链的分离十分困难。植物界中存在的单链核糖体失活蛋白在结构和作用机制等方面都与蓖麻毒素 A 链相似，PAP-s 即其中之一。它在无细胞系统中有很强的抑制蛋白质合成能力，以灭活 60S 核糖体亚基的方式作用，但对完整细胞蛋白质合成的抑制作用小得多，故对动物毒性很低。国外学者注意到 PAP-s 较蓖麻毒素 A 稳定<sup>[6]</sup>，尤其在体内，PAP-s: 单抗偶合物注射到兔子体内后 4~8 小时内血流中浓

度基本恒定,半衰期17~24小时,且保持免疫原和抑制蛋白质合成的功能,因此人们认为PAP-s在免疫毒素制备中是更好的选择<sup>[2]</sup>。

本实验证实PAP-s有很强的抑制无细胞蛋白质合成的作用,其与单抗结合后,可以选择性杀灭白血病细胞。由于结合物是借助单抗进入细胞膜后才发挥作用的,因此对非靶细胞影响不大。因此,PAP-s有可能成为免疫毒素临床应用的一个良好弹头。

我们在免疫毒素制备的纯化中先使用文献中常用的Sephadex G150层析柱,但纯化效果并不好,这是由于游离Wu71分子量150 000与Wu71:PAP-s的分子量180 000较接近的原因。我们用DEAE-Sephadex柱作离子交换除去游离Wu71和聚合物,再采用将Wu71:PAP-s结合物放在排阻范围外的Sephadex G75层析柱进一步纯化,取得了较好的分离效果。

本文所用的单抗Wu71性质类似CD<sub>6</sub>,由于靶细胞CEM并非全部表达相应抗原<sup>[3]</sup>, (约80~87%),故影响靶细胞的全部杀灭。这类肿瘤细胞异质性的问题在临床应用时会更明显,即一种单抗不可能与全部肿瘤细胞反应,这也许可通过混合使用多种单抗制备的免疫毒素(Cocktail)来解决。本研究提示,Wu71:PAP-s可能用于T淋巴细胞白血病人自体骨髓移植前的体外清除白血病细胞。另一方面,由于Wu71为抗人T细胞单抗,Wu71:PAP-s偶合物也可用来在异体骨髓移植中清除供体骨髓中的T淋巴细胞以避免移植抗宿主反应的发生,有关的研究正在进行中。

(承蒙昆明医学院杨庆洲、后嘉麟,中国医学科学院医学生物研究所石怀生给予协助,谨致谢意。)

### 参 考 文 献

1. 朱晓梅,胡 忠.商陆种子抗病毒蛋白的制备及毒性分析. 云南植物学研究 1989;(3):12.
2. Ramakrishnan S, Honston LL. Comparison of the selective cytotoxic effects of immunotoxins containing ricin A chain or pokeweed antiviral protein and anti-Thy1.1 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984; 44:201.
3. Parks DR, et al. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescende-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1962.
4. Myers CD, et al. An immunotoxin with therapeutic potential in T cell leukemia WT1-ricin A. *Blood* 1984;63:1178.
5. Seon BK. Specific killing of human T-leukemia cells by immunotoxins prepared with ricin A chain and monoclonal anti-human T-cell leukemia antibodies. *Cancer Res* 1984;44:259.
6. Barnieri L, et al. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from seeds of *Phytolacca americana* L(Pokeweed). *Biochem J* 1982; 203:55.
7. Ramakrishnan S, et al. Immunological and biological stability of immunotoxins in vivo as studies by the clearance of disulfide-linked pokeweed antiviral protein antibody. *Cancer Res* 1985;45:2031.
8. 史良如,等. 抗人T细胞、抗抑制性T细胞、抗活化的T细胞及抗其它淋巴细胞表面分化抗原的杂交瘤细胞. *中华微生物学和免疫学杂志* 1984;4:141.

(1988年10月7日收稿)

## Preparation of Monoclonal Anti-human T Cell Antibody and PAP-s Conjugate and Their Selective Anti-Leukemic Cells Cytotoxic Properties

Chu Jiayou, Yang Aide, Wang Bianming, Hu Zhong\*

Zhang Hejun\*\*, Shi Liangru<sup>△</sup>, Zhu Xiaomei\*,

Qu Jinghua\*\*, Luo Lanying\*\*, Guo Ren\*\*.

*Institute of Hematology, Tongji Medical University, Wuhan*

**Abstract** Pokeweed antiviral protein(PAP-s) was prepared from seeds of *Phytolacca americana*. Monoclonal antibody against human pan-T lymphocyte Wu71 was linked to PAP-s by a disulfide bond. The results of SDS-PAGE, double immunodiffusion in agar, and indirect immunofluorescence test demonstrated that the conjugate consisted of active monoclonal antibody and PAP-s. The conjugate was highly cytotoxic to the human T-leukemic cell line CEM, but not to antigen negative cell line SP<sub>2</sub>/O. At a concentration of 10<sup>-9</sup> mol/L, 76.4% target cells were killed, as compared with 10.1% at 10<sup>-9</sup> mol/L of free PAP-s. Treatment of the CEM cells with the conjugate at 10<sup>-9</sup> mol/L reduced their rate of protein synthesis by 72.4%, determined with <sup>14</sup>C-Leucine incorporation. The immunotoxin may be useful for the *in vitro* eradication of leukemic cells in autologous marrow transplantation to leukemia patients.

**Key words** PAP-s; immunotoxin; leukemic cells

\* *Kunming Institute of Botany, the Academy of Sciences of China*

\*\* *Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences*

<sup>△</sup> *Wuhan Institute of Biological Products*

---

## 阻断胃动脉对胃壁静脉压影响的 动物实验和临床研究

[王 义, 戴植本. 中华外科杂志 1988; 26(8):471]

目前, 断流手术已是治疗食管静脉曲张破裂出血的主要术式之一。以往主要离断食管贲门周围的血管, 而胃壁肌层和粘膜下层的静脉未予处理。因此, 门静脉高压患者除门-奇静脉返流外, 胃壁静脉也有反常血流存在。作者为消除胃壁静脉反常血流, 研究了另一种途径, 即分别阻断胃的4条供血动脉: 胃左、胃右、胃网膜左和胃网膜右动脉。并以7条狗为实验动物, 观察结扎胃的4条动脉对胃壁静脉压的影响。结果, 以胃左动脉对胃壁静脉压影响最大, 阻断后胃壁静脉压平均下降 0.57±0.05kPa (P<0.001)。其次是胃网膜左、右动脉, 影响最小的是胃右动脉。在此基础上, 作者对16例门静脉高压患者(男10例, 女6例, 年龄19~60岁)进行临床研究, 发现在结扎胃左和胃网膜左、右动脉后, 再阻断胃体, 近端胃壁静脉压力基本无改变。根据胃壁静脉压测定结果, 发现远端胃壁静脉压高于近端, 这可能是胃壁静脉血返流的原因。由此作者认为, 应在普通离断术基础上, 离断胃网膜右动脉, 必然减少胃壁静脉反常血流, 增加断流术的彻底性, 降低术后再出血率。