

## 转化相关蛋白p86的鉴定

赵晓航\* 董志伟 邓国仁 鄂征 戴寿芝\*

(北京市肿瘤防治研究所生化室, 北京100034)

(\*宁夏医学院免疫研究室, 银川)

**摘要** 以转化细胞 Rat3-3 免疫大鼠, 获得单克隆抗体 E5 (McAb E5)。其对应抗原耐热, 是分子量为 86kD 的蛋白质 (p86)。它在 c-Ha-ras 癌基因转化的细胞上均有较高的阳性表达, 而在其相应的非转化细胞上含量甚微。以人工合成的反义 c-Ha-ras 寡聚核苷酸 As-II 处理 Rat3-3 细胞, 该细胞生长受抑 (44.2%), 此时 p86 的表达亦降低 (39.1%)。p86 在五种人胃癌细胞系中均有较高表达, 在原发性胃癌及其转移灶中阳性率达 82.6%。p86 不仅是一种与 c-Ha-ras 转化相关的蛋白, 而且为胃癌相关抗原。

**关键词:** 单克隆抗体; 转化相关蛋白; 反义寡聚核苷酸; 胃癌相关抗原

细胞转化是一个复杂的事件, 癌基因的活化及其产物的异常表达在其中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。当细胞转化时, 其表面可发生许多重要改变<sup>[2-3]</sup>。研究转化细胞表面分子改变与肿瘤相关抗原的关系, 对认识肿瘤抗原的性质, 研究转化表型及过程, 进而探讨癌变机理具有重要意义。本文采用 McAb E5 鉴定了 p86, p86 既是转化相关蛋白, 同时初步认为也是胃癌相关抗原。

## 材料与 方法

### 一、材料

以人胃癌细胞系 BGC823 的总 DNA 转染 Rat1 细胞获得的二轮转化细胞 Rat3-3 和用来自 Rat3-3 的含有点突变的 6.6kb c-Ha-ras 基因转染 NIH3T3 细胞, 获得的转化细胞在裸鼠肺部形成转移灶, 将其培养成系即 GCM3T3 由本所生化和遗传室建立<sup>[4]</sup>。人胃癌细胞系 BGC-823、MGC-803、MKN45 和 MKN28、人胃癌舌转移细胞系 PACM82、人结肠癌细胞系 B-80 和小鼠成纤维细胞系 NIH3T3, 分别引自北京医科大学附属人民医院、山东师范学院、日本国立癌中心、北京医科大学附属口腔医院、医科院肿瘤所免疫室和美国 Cornell 大学 Fisher

大鼠成纤维细胞系 Rat1、大鼠骨髓瘤细胞系 IR983f 和小鼠抗大鼠 Igk 链 McAb(Mark1), 分别由美国麻省理工学院 Weinberg 教授和比利时 Louvain 大学 Bazin 教授惠赠。Avidin 和 Biotin-HRP 取自 ABC 试剂盒, Vector 产品。c-Ha-ras 反义寡聚核苷酸(AS-II)由北大生物系合成, 其序列为 5' TTCCGTCATCGCTC-C3'。抗 p21 蛋白 McAb 和 FITC-GaRatIgG 分别为 Cetus 和 Miles 产品。3-10 月龄 LOU/c 大鼠购自医科院动物中心。各种人体组织标本取自本所、海军医院和积水潭医院外科, 其性质经病理组织学检查证实。

## 二、方法

1. 大鼠 McAb 的制备: 以 Rat3-3 细胞腹腔注射免疫 LOU/c 大鼠,  $3 \times 10^7$  细胞/次, 基础免疫两次, 间隔三周。三周后以腹腔和尾静脉双重注射加强免疫, 三天后取脾细胞与 IR983f 细胞 (5~10:1) 在 PEG 作用下融合。融合细胞接种于 96 孔培养板中, 经 HAT 选择培养, 杂交瘤上清以 ELISA 筛选。

2. ELISA: 96 孔板中加入 0.001% 多聚赖氨酸, 每孔 50  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h 并吸去残液。加靶细胞悬液  $10^6$ /mL, 每孔 50  $\mu$ L, 2000r/min 离心 10 分钟。加 4 $^{\circ}$ C 预冷的 0.05% 戊二醛-PBS 固定 10 分钟, PBS 洗。经 1% BSA-0.1% Triton X-100-0.1 mol/L 甘氨酸-PBS 室温封闭 30 分钟后, 加待检样品 50  $\mu$ L/孔, 室温反应 1 h, PBS 洗。加 1:200 含 1% 正常小鼠血清的 Bio-Mark1 (纯化 Mark1 按 1:200 分子比与 Biotin 交联<sup>[5]</sup>) 每孔 50  $\mu$ L, 室温反应 30 min, PBS 洗。加入 1:500 Avidin 及 Biotin-HRP 混合物, 每孔 50  $\mu$ L, 室温反应 15 分钟, PBS 洗。加含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 OPD 的底物反应液, 每孔 200  $\mu$ L, 室温反应 30 分钟, 以 12.5% 硫酸终止反应。以 ELISA Reader (BioRad) 测定 OD<sub>492nm</sub>, 双份测定, 取均值。

3. 膜抗原提取及鉴定, ABC 免疫酶染色及间接免疫荧光染色见文献<sup>[6-9]</sup>。

4. AS-II 对 p86 表达的抑制效应: 将 Rat3-3 细胞按每孔  $10^5$  细胞加入 24 孔培养板, 37 $^{\circ}$ C 孵箱过夜。实验孔加入 AS-II 使终浓度为 8  $\mu$ mol/L, 对照孔加等量完全培养液。继续培养 24 小时后以台酚蓝染色法计数各孔活细胞数。混合实验组各孔和对照组各孔细胞, 以每孔  $5 \times 10^4$  活细胞铺 96 孔板, 再以 ELISA 检测实验组和对照组在相等数量细胞上 p86 的表达水平。

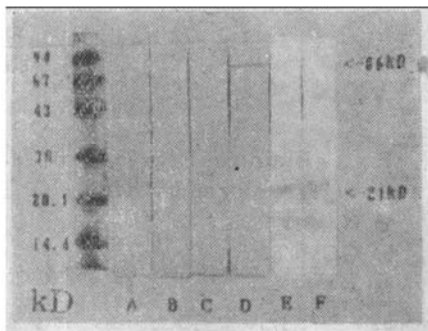
## 结果与讨论

### 一、McAbE5 的产生及其对应抗原的性质

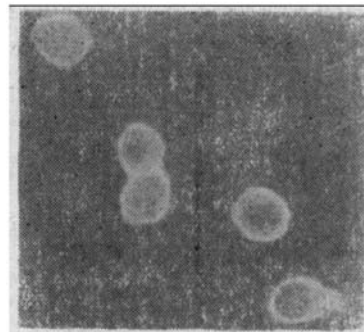
免疫鼠脾细胞与 IR983f 细胞融合后产生的杂交瘤经 ELISA 筛选, 有 8 孔的上清与 Rat3-3 呈阳性而与 Rat1 呈弱阳性或阴性反应。其中 E5 经五次亚克隆化, 仍稳定地分泌抗体。其染色体核型为大鼠脾细胞与 IR983f 细胞核型的加和。因此将 E5 孔细胞命名为杂交瘤细胞 E5。免疫双扩散检测该细胞分泌的抗体为 IgM。Rat3-3 细胞膜抗原提取物经不同处理后行斑点免疫酶试验 (Table 1)。McAbE5 的对应抗原耐热, 耐过碘酸氧化, 但对蛋白酶的消化极其敏感, 因而其性质可能为蛋白质。Western Blotting 显示分子量为 86kD 的区带 (Fig. 1) 故将 E5 抗原命名为 p86。间接免疫荧光染色表明, p86 定位于体外培养的靶细胞膜上 (Fig. 2), Rat1 呈阴性着染。

**Table 1** Physical and Chemical Properties of E5 Antigen

	E5 Antigenicity
Nontreatment	+++
Treatment	
Heat(100°C,20')	+++
Sodium periodate(1mg/mL,60')	+++
Trypsin(5mg/mL,60')	-
Pronase(0.6mg/mL,60')	-



**Fig.1** Western Blotting Analysis of E5 Antigen  
A.B. Reaction of Normal Rat Serum(1:1000) with Rat-1 and Rat3-3 Antigens,  
C.D. Reaction of E5 Supernatant with Rat-1 and Rat3-3 Antigens,  
E.F. Reaction of P21 McAb with Rat-1 and Rats-3 Antigens



**Fig.2** Indirect Immunofluorescence Staining on Rat3-3 Cells( $\times 400$ )

## 二、p86是一种与 c-Ha-ras 转化相关的蛋白

1. McAbE5 与转化细胞的结合反应: ELISA 测定显示, p86不仅在由人胃癌细胞系 BGC823 总 DNA 转染的二轮转化细胞 Rat3-3 中有较高的表达,而且在由含点突变的 c-Ha-ras (6.6kb) 转化的 GCM3T3 细胞中亦有较高的表达,而在非转化细胞 Rat1 及 NIH3T3 中则含量甚微(Fig.3)。McAbE5 与靶细胞的这种结合反应呈明显的剂量依赖关系。将一定量的 1:2 稀释的 McAbE5 上清与 Rat3-3、GCM3T3、Rat1 或 NIH3T3 细胞,各为  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$  和  $5 \times 10^6$  四个浓度在 37°C 温育 1 小时, 4°C 反应 1 小时, 离心后取上清以 ELISA 检测其与靶细胞的结合反应。结果表明 McAbE5 与 Rat3-3 的结合反应可被转化细胞的吸收明显抑制,而 Rat1 和 NIH3T3 的吸收无明显影响,因而 p86 与 McAbE5 的结合反应具有免疫特异性。

p86 不是 c-Ha-ras 基因的直接产物, 因其分子量及分布明显不同于 p21。p86 也不是人胃癌细胞 BGC823 中某些与 c-Ha-ras 起共转染作用的基因的产物, 因其在单纯 6.6kb c-Ha-ras 转染的 GCM3T3 细胞中亦呈高表达。p86 高表达可能是 c-Ha-ras 活化所引起的细胞转化事件中的次级改变。p86 与 Yagihashi 等报告的转化相关蛋白不是同一分子, 后者在 ras 基因转化的 W14 及 W13 细胞中具有高表达, 但在转化的 NIH3T3 细胞中却呈阴性表达<sup>[3]</sup>。

2. AS-II对p86表达的抑制效应: 已经证明, 以c-Ha-ras的反义寡聚核苷酸AS-II处理Rat 3-3细胞, 可明显抑制其增殖, 同时c-Ha-ras的产物p21表达亦明显受到抑制<sup>[10]</sup>。本文结果显示, 当以AS-II处理Rat 3-3细胞, 不仅可抑制其增殖, 而且可抑制p86的表达(Table 2), 其抑制率分别为44.2%及39.1%, 具有显著性差异( $P < 0.001$ )。再次证明p86的表达与c-Ha-ras的转化活性密切相关, 当p21表达因AS-II的阻抑明显受到抑制时, p86的表达也明显降低, 因而p86的表达有可能受c-Ha-ras活化及p21表达的调控。上述结果表明, p86为与c-Ha-ras转化活性相关的蛋白。

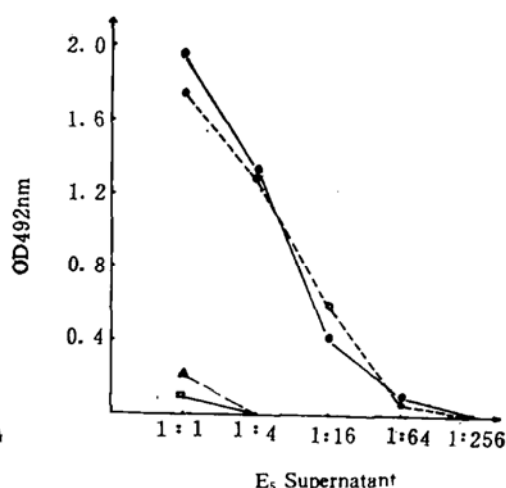


Fig.3 Binding Reaction of McAb E5 with Transformed Cells

● Rat3-3  
○ GCM3T3  
▲ Rat1  
□ NIH3T3

Table 2 Inhibitory Effect of Antisense Oligodeoxynucleotide on the Expression of E5 Antigen

	$\bar{X} \pm SD$	
	Cells ( $\times 10^6$ )	E5 Antigen (OD492nm)
AS-I Treatment	1.95 $\pm$ 0.06	0.723 $\pm$ 0.05
Nontreatment	3.50 $\pm$ 0.21	1.181 $\pm$ 0.07
Inhibition Ratio (%)	44.2	39.1
P Value	<0.001	<0.001

### 三、P86为胃癌相关抗原

1. P86在胃癌细胞中的表达: ELISA表明, p86在五种人胃癌细胞系中均有阳性表达, 其水平与McAbE5呈剂量依赖关系(Fig. 4), 而在人结肠癌细胞系B-80及人混合淋巴细胞系中却为阴性。McAbE5与Rat3-3细胞的结合反应可被五种胃癌细胞吸收抑制, 但结肠癌细胞B-80的吸收却无影响。

2. p86在胃癌及各种组织中的表达: ABC免疫酶染色表明, p86在人胃癌组织中有明显的高水平表达(Fig. 5), 在46例原发胃癌及转移灶中阳性率达82.6%(Table 3)。在16例正常胃粘膜、8例人体其它正常组织及15例其它部位的肿瘤组织中却呈阴性反应。这一初步结果表明, p86为胃癌相关抗原。

一些工作表明, 当c-Ha-ras通过点突变或扩增等机制活化时可导致p21表达的异常从而使细胞转化、恶变, 进而引起表面抗原的改变<sup>[1]</sup>, 而p86的改变就是其中之一。由于p86既是c-Ha-ras的转化相关蛋白, 又是胃癌的相关抗原, 其表达水平与细胞的转化状态及p21

的表达具有平行关系, 作者推论, 某些肿瘤抗原的表达可能是受癌基因及其产物的活化所调控的。

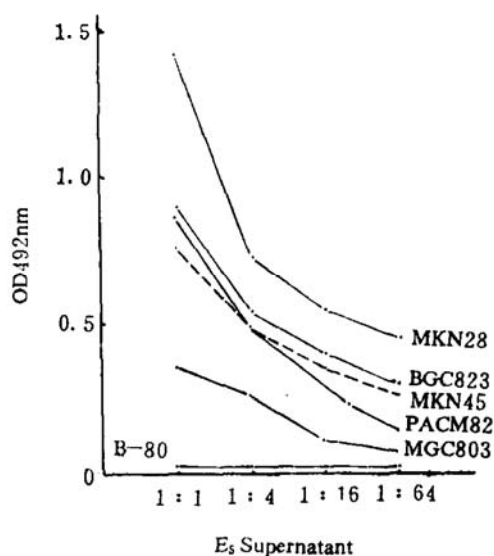


Fig.4 Binding Reaction between McAb E5 and Gastric Cancer Cell Lines

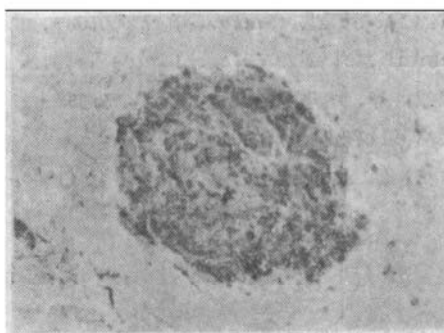


Fig.5 Immunohistochemical Staining of McAb E5 in Lower Differentiated Gastric Cancer ( $\times 100$ )

Table 3 Immunohistochemical Staining of McAb E5 in Tumour Tissue Sections

	Number of Cases	Reactivities	
		Positive	Negative
Human Gastric Cancer	46	38	8
Poor-differentiated Carcinoma	17	14	3
Well-differentiated Carcinoma	9	8	1
Mucous Cancer	17	14	3
Metastasis in Lymphonodus	3	2	1
Other Malignance	15	0	15
Cardiac Cancer	2	0	2
Thyriod Cancer	1	0	1
Esophageal Cancer	2	0	2
Pancreatic Cancer	1	0	1
Ovary Fibro-sarcoma	1	0	1
Lung Cancer	3	0	3
Billary Cancer	1	0	1
Rectal Cancer	3	0	3
Sigmoid Colon Cancer	1	0	1

致谢: 对给予本工作指导和协助的孙素莲副研究员、张秀霞、吴健、刘晓兰和王杰等同志表示感谢。

## 参 考 文 献

- [1] Weiberg R A. *Accoplishments in Cancer Research*, 1987, 121—131
- [2] Drebin J A. et al. *Nature*(Lond.), 1984, 312:545—548
- [3] Yagihashi A. et al. *Cancer Res*, 1988, 48:2798—2804
- [4] 邓国仁, 等. 生物化学与生物物理学学报, 1987, 19:328—332
- [5] Imam A. et al. *Immuno Meth*, 1986, 86:17—20
- [6] Rhi-wei. et al. *Cancer of the Liver, Esophagus, and Nasopharynx*, 135—143
- [7] Laemmli. et al. *Nature*(Lond.), 1970, 227:680—684
- [8] 魏淑敏, 等. 中华肿瘤杂志, 1989, 3:162—164
- [9] 周文郁. 组织化学手册, 299—316
- [10] 邓国仁, 等. 863计划生物技术领域年会 (1987—1988) 研究论文摘要, 91

### Identification of the Transformation-Related Protein p86

Zhao, Xiao-hang\* Dong, Zhi-wei Deng, Guo-ren E, Zheng Dai, Shou-zhi\*  
(*Department of Biochemistry, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034,*)  
(\* *Department of Immunology, Ningxia Medical College, Yinchuan*)

**Abstract** Rat3-3 is a secondary transformant of immortalized rat fibroblast cell line Rat1 that has been transfected with total DNAs from a human gastric cancer cell line BGC823. After immunization of LOU/c rat with Rat3-3 cells, the monoclonal antibody E5 that recognized a heat resistant protein with a molecular weight of 86 000 daltons (p86) was produced. This antigen was highly expressed on two transformed cell lines which were transfected with activated c-Ha-ras oncogene, but almost undetected on the parental cells. When treated with antisense oligodeoxynucleotide AS-II the growth of Rat3-3 and expression of p86 were suppressed by 44.2% ( $p < 0.001$ ) and 39.1% ( $p < 0.001$ ). p86 was also expressed in five human gastric cancer cell lines. Out of 46 cases of gastric cancer tissues 38 of them showed positive reaction with McAb E5 (82.6%). Therefore p86 is not only a transformation-related protein of c-Ha-ras oncogene but also a gastric cancer-associated antigen.

**Key words,** Monoclonal antibody; Transformation-related protein; Antisense oligodeoxynucleotide; Gastric cancer-associated antigen