

单克隆抗体博来霉素A6偶联物对白血病细胞 特异性结合与内化

田佩玉 张曼丽* 黄静 于滨 甄永苏

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京100050)

提要 抗 CCT 2 单克隆抗体博来霉素 A 6 偶联物可吸附胶体金颗粒(McAb-A6-Au)。电镜观察表明, 在 4°C, 1 h, 表面有 McAb-A6-Au 颗粒的 CEM 细胞最高达 78%; 在 37°C, 4h, 内化 McAb-A 6-Au 颗粒的 CEM 细胞高达 72%。而抗原性无关的 U 937 细胞仅为 14%。并且 McAb-A6-Au 颗粒能直接穿过细胞膜、核膜进入细胞浆和细胞核。37°C, 1 h 已有 10~18% 的 CEM 细胞核内有 McAb-A 6-Au 颗粒。实验结果提示了单抗与博来霉素 A 6 的偶联物与选择性地结合靶细胞, 而且进入细胞速度快、穿透力强, 有可能成为治疗白血病药物。

关键词 单克隆抗体; 博来霉素 A 6; 免疫结合物; 胶体金; 免疫电镜

单克隆抗体(单抗)有高度特异性, 可与相应的肿瘤细胞特异性结合, 在动物体内显示靶部位特异性分布。单抗可以作为载体, 与抗癌药物、毒素或放射性核素连接, 形成导向药物⁽¹⁾。抗 CCT2 是抗人 T 细胞分化抗原的单抗, 与 T 细胞白血病细胞系 CEM 呈结合反应, 不和人外周血 B 细胞、粒细胞等反应。它识别的抗原主要表现在胸腺细胞和部分淋巴细胞性白血病细胞⁽²⁾。抗 CCT2 单抗和博来霉素 A 6(争光霉素 A6)偶联物在体外对 CEM 细胞显示选择性杀伤作用, 其活力约为游离博来霉素 A 6 的 12 倍⁽³⁾。并且博来霉素 A 6 对造血和免疫系统毒性低, 因此它与单抗的偶联物有可能为白血病患者提供选择性高、毒性低的导向药物。本实验用免疫电镜研究了单抗与博来霉素 A 6 偶联物与靶细胞特异性结合以及进入细胞的情况。

材料和方法

细胞系 与 Anti-CCT2 单抗反应阳性的人白血病 CEM 细胞系和与该单抗反应阴性的巨噬细胞 U 937 细胞系。RPMI 1640 培养液含灭活小牛血清 10%, 在含 5%CO₂ 的 37°C 温箱中培养。

抗 CCT2 单抗与博来霉素 A 6 偶联物(McAb-A6)的制备 BALB/C 裸鼠 ip pristane 0.5 ml, 10 天后腹腔接种杂交瘤细胞, 得到腹水, 在 4°C 3000 r/min 离心 30 min, 取腹水上清液进行羟基磷灰石柱层析, 用 0.01~0.3 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)梯度洗脱, 收集蛋白质峰, 第三峰为单抗, 用于与药物连接。用 N-琥珀酰胺 3-(2-二硫吡啶)丙酸(SPDP)为连接剂, 抗体与 SPDP 的克分子比为 1:10, 博来霉素 A 6 与 SPDP 的克分子比为 1:1。将巯基化的抗体与巯基化的博来霉素 A 6 混合加入二硫苏糖醇(DTT), 过 Sephadex G 25 柱层析, 收集含偶联物部分, 用考马氏亮蓝染色, 经 595 nm 测得偶联物中抗体含量后再在 280 nm 测 A 值计算博来霉素 A 6 含量。

本文于 1988 年 1 月 29 日收到。

* 中国药品生物制品检定所

单抗—博来霉素A6偶联物与胶体金复合物(McAb-A6-Au)的制备 将70 ml的0.033% AuCl₃HCl·4H₂O 溶液煮沸,加入1% 枸橼酸钠溶液,制备直径为14 nm的胶体金颗粒⁽⁴⁾。采用改进的 Garaud 方法将偶联物吸附到金颗粒上⁽⁵⁾。每10 ml 胶体金悬液加20 ml 三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液(0.005 mol/L, pH 9.2),然后加入偶联物。胶体金与偶联物结合的比例用 Horrisberger 和 Rosset 的氯化钠方法预测⁽⁶⁾。再以20%的过量偶联物溶液加入。经50000 r/min 1 h 超速离心2次,沉淀的 McAb-A6-Au 悬液含有单抗30 μg/ml,含博来霉素A62.5 μg/ml。实验时,将 McAb-A6-Au 加入细胞培养液中,其中单抗浓度相当于1.8 μg/ml, A6为0.15 μg/ml。

McAb-A6-Au 复合物对细胞的作用 CEM 与 U 937 细胞浓度均为1~1.5×10⁶/ml,每瓶分装5 ml 细胞。McAb-A6-Au 悬液与细胞悬液分别在4°C 预冷30 min,然后迅速将 McAb-A6-Au 加入细胞悬液,混匀。在4°C 1 h 后转到37°C 水浴保温。在不同时间分别取样,用 RPMI 1640 培养液离心洗1次,再在1000 r/min 离心5 min 后固定、包埋。固定液为2.5% 戊二醛加4% 多聚甲醛在0.1 mol/L 的二甲胍酸钠(pH 7.4)溶液。再经1% OsO₄ 后固定1 h,各级乙醇脱水,Epon 812 包埋,双氧铀和枸橼酸铅染色,LKB V型超薄切片片机切片。日立H-800电镜观察。

电镜观察与计数 电镜下观察活化的金颗粒即 McAb-A6-Au 吸附于细胞表面和进入细胞内的情况。计数100个有核的细胞切片,记录附着细胞表面以及内化金颗粒的细胞数和颗粒数,并作χ² 测验(Chi square test),统计学处理,以比较靶细胞 CEM 和非靶细胞 U937 之间表面附着和内化 McAb-A6-Au 颗粒的差别。

结 果

一. McAb-A6-Au 颗粒在人白血病 CEM 细胞膜上的分布

CEM 细胞与 McAb-A6-Au 在4°C 1 h,可见 McAb-A6-Au 颗粒以单个的或聚集成簇的方式结合在 CEM 细胞膜上(见图 2A)。各个细胞表面结合的金颗粒数差异较大。将近78%的 CEM 细胞表面附有 McAb-A6-Au 颗粒,而对照 U 937 细胞只有16%有颗粒(表1)。

Tab 1. Adsorption of immunoconjugate coated gold particles on surface of CEM and U937 cells

Cell	No. of cells examined	Cells with particles (%)					
		0 h	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h
CEM	100	78**	46**	42**	22*	12	12
U937	100	16	12	18	10	8	6
CEM*	100	—	—	0	1	—	—

The immunoconjugate of anti-CCT2 monoclonal antibody linked to bleomycin A6 was adsorbed on colloidal gold particles (McAb-A6-Au). CEM cells and U937 cells were exposed to McAb-A6-Au, at 4 °C for 60 min then warmed up to 37°C for 0.25 h, 0.5h,1h, 2 h and 4 h, respectively.

*: Cells were preincubated with unconjugated McAb (30 μg/ml), and then brought into contact with McAb-A₆-Au.

*: Significant difference between CEM cells and U937 cells. P<0.05.

** : Significant difference between CEM cells and U937 cells. P<0.01.

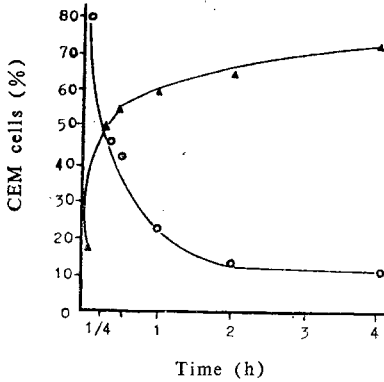


Fig 1. Immunoconjugate coated gold particles bound to the plasma membrane and penetrated into human leukemia CEM cells. CEM cells were exposed to McAb-A6-Au at 4°C for 60 min, washed once with RPMI 1640 medium, then warmed up to 37°C for 15 min, 30 min, 1, 2 and 4 h, respectively. For each point, 100 cells were observed under electron microscope.

▲ —▲ Gold particles inside the cells; ○ —○ Gold particles on cell surface.

放置 4°C, 1 h 后用 RPMI 1640 培养液洗 1 次, 加入 McAb-A6-Au, 在 37°C 培养。电镜观察表明, 培养 30 min 的 CEM 细胞膜上未见到这种金颗粒, 也无颗粒进入细胞内。培养 1 h, 计数 100 个 CEM 细胞只见到 1 个细胞内有少数几个金的颗粒。这说明预先使用未经偶联的单抗与 CEM 细胞表面相关抗原结合, 起了封闭作用(见表 2)。

四. McAb-A6-Au 颗粒进入靶细胞 CEM 和非靶细胞 U937 的比较

电镜下, 观察 100 个细胞, 计数比较 CEM 细胞和 U 937 细胞内化 McAb-A6-Au 颗粒的细胞百分率。在 37°C 保温 1 h, 内化 McAb-A6-Au 颗粒的 CEM 细胞为 46~58%, U 937⁷ 细胞为 8%; 保温 4 h, CEM 细胞为 72%, U937 细胞为 14%(见表 2)。

Tab 2. Internalization of immunoconjugate coated gold particles by CEM and U937 cells

No.	Cell	No. of cells examined	Cells with particles (%)					
			0 h	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h
1	CEM	100	—	44**	—	46**	50**	—
	U937	100	—	2	—	8	8	—
2	CEM	100	18*	56**	56**	58**	66**	72**
	U937	100	4	6	16	8	18	14
	CEM*	100	—	—	0	1	—	—

CEM and U937 cells were exposed to McAb-A6-Au at 4°C for 60 min then warmed up to 37°C for 0.25 h, 0.5 h, 1 h and 4 h, respectively.

*, * and **: see tab 1.

五. McAb-A6-Au 颗粒进入 CEM 靶细胞的方式

(一) 通过细胞膜内吞作用 将 McAb-A6-Au 吞入 CEM 和 U 937 细胞内, 电镜观察表明, 在 CEM 和 U 937 细胞都可见到聚成小簇的 McAb-A6-Au 颗粒附着到细胞膜上(图 2A), 但是附着 McAb-A6-Au 颗粒的 CEM 细胞数要比 U937 细胞多(表 1)。接着细胞膜凹陷, 包

二. McAb-A6-Au 颗粒进入 CEM 细胞的情况

CEM 细胞与 McAb-A6-Au 在 4°C, 1 h, 有一部分金颗粒已经进入 CEM 细胞内。将细胞转到 37°C, 分别培养 15 min, 30 min, 1 h, 2 h 和 4 h 后, 电镜下可见, 随着培养时间的延长, 内化金颗粒的细胞数随着增加, 而在表面有颗粒附着的细胞数相应减少(图 1)。McAb-A6-Au 颗粒进入细胞的速度相当快, 在 37°C, 15 min, 56% 的 CEM 细胞内有这种金颗粒。4 h, 已有 72% 细胞内化了这种颗粒(表 2)。每个细胞含有 McAb-A6-Au 颗粒数从几个到百个不等。

三. 未经偶联的单抗对 McAb-A6-Au 颗粒与靶细胞结合的影响

McAb-A6-Au 颗粒对 CEM 细胞膜特异靶向性结合和内化还可以从封闭试验中得到证实。CEM 细胞与过量的单抗(30 μg/ml)混合,

围颗粒, 吞到细胞内, 胞浆里可见内吞泡含有 McAb-A6-Au 颗粒(图 2 B)。

(二) 穿透 CEM 细胞膜进入细胞 电镜下可见 McAb-A6-Au 颗粒与细胞紧密接触的这部分细胞膜, 界线变成模糊不清, 一些分散的金颗粒从这里穿入细胞浆内, 同样可以见到 McAb-A6-Au 颗粒穿过核膜进入细胞核内(见图 2C)。CEM 细胞核内进入 McAb-A6-Au 颗粒的现象早在 4°C 接触 1 h 时见到。这些颗粒并不位于内吞泡内, 而是弥散分布在胞浆或胞核内。这现象提示了 McAb-A6-Au 颗粒是直接穿过细胞膜、核膜进入细胞浆和细胞核的。在 37°C 15 min 和 1 h, 核内有金颗粒的细胞占全部内化金颗粒细胞的 1/3 左右(见表 3, 并与表 2 比较)。而在 U 937 细胞未见到 McAb-A6-Au 颗粒穿过细胞膜现象, 也未见到金颗粒穿过核膜到达细胞核的图象。这些提示了 McAb-A6-Au 对靶细胞穿透力强, 穿透速度快并能到达细胞核内。

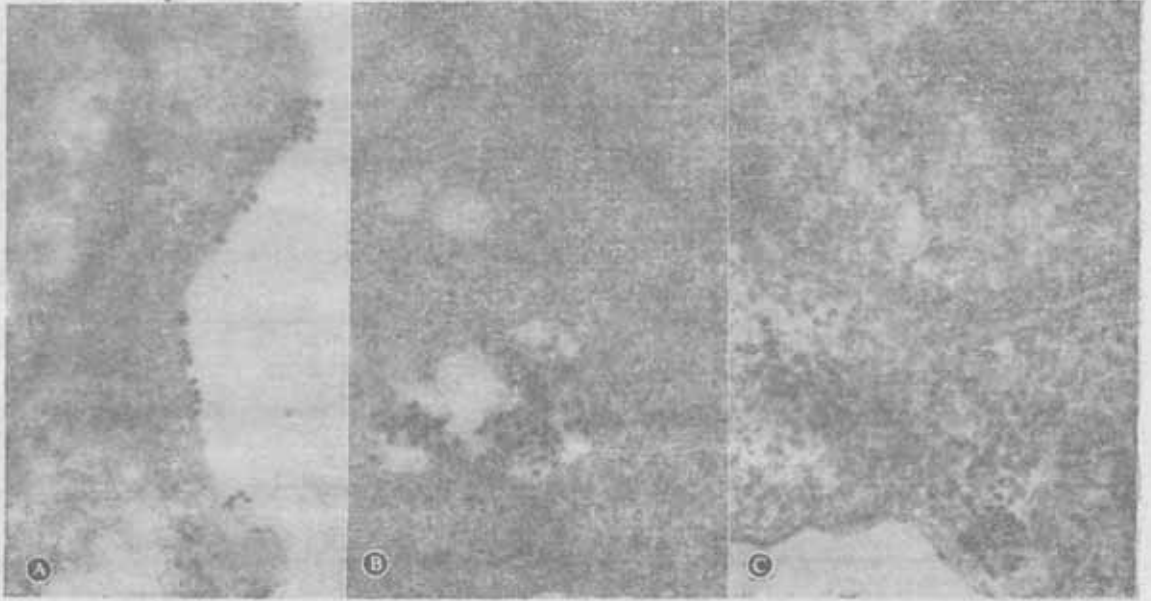


Fig 2. A. Cells were exposed to McAb-A6-Au at 4°C for 60 min. Several small clusters and single particles were bound to plasma membrane of the CEM cells. $\times 41,000$. B. CEM cells were exposed to McAb-A6-Au at 4°C for 60 min then incubated in 37°C for 30 min. McAb-A6-Au particles were in endocytotic vesicle of the CEM cell. $\times 42,000$. C. CEM cells were exposed to McAb-A6-Au at 4°C for 60 min then warmed up to 37°C for 1 h. Some McAb-A6-Au particles penetrated through the plasma membrane and nuclear membrane into the cytoplasm and the nucleus. $\times 48,000$.

讨 论

胶体金颗粒表面能结合多种生物大分子, 如免疫球蛋白、植物血凝素、单克隆抗体等⁽⁷⁾。由于其电子密度高、体积小, 电镜下容易辨认又不影响对细胞超微结构的分辨。经活化的胶体金在细胞上非特异吸附低, 并且保留单抗偶联物的识别和结合抗原的能力^(8,9); 另一方面, 由于单抗偶联物吸附到胶体金上不需要第二抗体, 就不存在如铁蛋白、过氧化物酶等可能会改变免疫偶联物进入细胞过程所产生的影响。因此, 用胶体金标记可以观察单抗偶联物进入细胞的过程及其特异性。

本研究中 McAb-A6-Au 对 CEM 细胞的特异性结合与内化表现在以下 3 个方面: (1)

McAb-A6-Au 在 CEM 细胞表面结合的细胞百分率高。(2) McAb-A6-Au 进入 CEM 细胞的百分率也高, 与 U937 细胞相比有显著差别。(3) 用未经偶联的单抗预先处理 CEM 细胞显示特异性封闭作用。但本实验中, CEM 细胞表面附着活化金颗粒最高达 78%, 内化金颗粒的细胞高达 72%, 表明 CEM 细胞抗原的异质性, 即 30% 左右的 CEM 细胞表面不表达本单抗所识别的 T 淋巴细胞分化抗原, 单抗和博来霉素 A6 偶联物对这部分细胞可能也不产生细胞毒活性。用间接荧光法检查, 抗 CCT2 单抗与 CEM 细胞结合率为 70%⁽²⁾。这与本研究在 4 h 内化 McAb-A6-Au 颗粒的细胞为 72% 的结果大致相近。这表明肿瘤细胞抗原的不均一性, 使得用单独一种单抗不能攻击全部靶细胞, 如果联合使用数种单抗, 有可能提高偶联物对靶细胞的结合率, 增强对靶细胞杀伤作用。本实验电镜观察也表明了 McAb-A6-Au 通过胞浆膜的凹陷, 形成内吞泡进入细胞。这种情况类似蓖麻毒 A 链结合物进入细胞的模式⁽⁹⁾。另外, 值得注意的是, McAb-A6-Au 所附着的 CEM 细胞膜和核膜处出现胞浆膜和核膜界线模糊, 甚至消失, 这些金颗粒直接穿入细胞浆和细胞核, 在胞浆和核内呈散在分布。这是免疫毒素研究中未曾报道过的。

总之, 抗 CCT2 单克隆抗体与博来霉素 A6 的偶联物对人白血病靶细胞显示特异性结合与内化, 且进入细胞速度快, 穿透力强, 能到达核内。因此认为单克隆抗体与博来霉素 A6 偶联物有可能成为有较高特异性的抗白血病药物。

Tab 3. Intranuclear distribution of immunoconjugate coated gold particles in CEM and U937 cells

No.	Cell	Nucleus with particles (%)					
		0 h	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h
1	CEM	—	10	—	17	8	—
	U937	—	0	—	0	0	—
2	CEM	2	18	6	10	4	—
	U937	0	0	0	0	0	—

CEM and U937 cells were exposed to McAb-A6-Au at 4°C for 60 min then warmed up to 37°C for 0.25h, 0.5h, 1h, 2h and 4h, respectively.

参 考 文 献

- 甄永苏. 单克隆抗体作为药物的载体. 见: 顾方舟等主编. 淋巴细胞杂交瘤技术的应用. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1982:135~145.
- 陈毓仙, 等. 人淋巴细胞表面抗原的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 1986; 6:268.
- 甄永苏, 等. 抗 CCT2 单克隆抗体和争光霉素 A6 结合物的抗白血病细胞活性. 中国医学科学院学报 1986; 8:272.
- Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension. *Nature (Physical Science)* 1973; 241:20.
- Garaud JC, et al. Are "G" cells the only source of gastrin in the human antrum? *Biol Cell* 1982; 44:165.
- Horrisberger M, et al. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1977; 25:295.
- Benjamin T, et al. Rapid acidification of endocytic vesicles containing α_2 -Macro-globulin. *Cell* 1982; 28:263.
- William D, et al. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surface at the electron microscopic level: a new method theory and application. *J Histochem Cytochem* 1977; 25:1187.
- Carriere D, et al. Endocytosis of an antibody ricin A-chain conjugate (Immuno-A-toxin) adsorbed on colloidal gold. *Exper Cell Res* 1985; 156:327.

SPECIFIC BINDING AND INTERNALIZATION OF ANTI-CCT2 MONOCLONAL ANTIBODY AND BLEOMYCIN A6 CONJUGATE IN HUMAN LEUKEMIA CELLS

PY TIAN, ML ZHANG, J HUANG, B YU and YS ZHEN

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT The immunoconjugate of anti-CCT2 monoclonal antibody linked to bleomycin A6 was adsorbed on colloidal gold particles (McAb-A6-Au). Binding and internalization of McAb-A6-Au particles in human leukemia CEM cells were examined by electron microscopy. After 60 min at 4°C, McAb-A6-Au particles were bound to the surface membrane of 78% of CEM cells. Transferring to 37°C for 15 min, McAb-A6-Au particles were found to be 56% inside the CEM cells and about one third of the cells contained particles in the nucleus. After 4 h at 37°C the percentage of CEM cells containing McAb-A6-Au particles increased to 72%. However, only 14% of the antigenically irrelevant U937 cells contained these particles and none of them was found in the nucleus. Preincubation with unconjugated anti-CCT2 monoclonal antibody markedly blocked the McAb-A6-Au particle uptake in CEM cells. The McAb-A6-Au particles were internalized through the formation of endocytotic vesicles. In addition, some McAb-A6-Au particles were able to penetrate the plasma membrane directly into cytoplasm and notably into the nucleus. Results indicate that the immunoconjugate of monoclonal antibody linked to bleomycin A6 showed selective binding to target cells and entered the cells specifically and rapidly.

Key words Monoclonal antibody; Bleomycin A6; Immunoconjugate; Colloidal gold; Immunoelectron microscopy