

肝癌膜相关抗原 Hab18g 为 CD147 分子的鉴定

郭晓楠, 陈志南

摘 要:目的 从蛋白水平验证肝癌膜相关抗原 Hab18g 为 CD147 分子,并探讨单抗 Hab18 和抗 CD147mAb 识别抗原表位的异同。方法 间接免疫荧光染色,免疫组化 ABC 法,斑点杂交及 FCM 加成试验。结果 抗 CD147mAb 与 Hab18 两者识别抗原的阳性反应结果一致,先后加用两种单抗所测的平均荧光强度值高于单独用任一种单抗所测的值。结论 Hab 18g 应称为 CD147 分子, Hab 18 和抗 CD147 两株单抗识别抗原不同表位。

关键词:肝癌;抗原;Hab18g;CD147

中图分类号 R735.7;R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-8578(2000)01-0007-04

Hab18g 为本科室制备的肝癌单克隆抗体 Hab18 的相应膜抗原。利用 Hab18 单抗,国外实验室通过筛选人肝癌 cDNA 文库,新近获得编码其抗原 Hab18g 的基因序列。在 Genbank 中查询,发现该抗原碱基序列与人 CD147 分子序列高度同源,进一步分析开放读框则表明两者由相同基因编码(结果待发表),因而理论上可将 Hab18g 归为 CD147 分子,目前对所测序列尚未进行蛋白水平的鉴定,而且人白细胞分化抗原命名组也未收载 Hab18g。本实验旨在初步获得 Hab18g cDNA 序列的基础上从蛋白水平加以验证,并进一步证明了 Hab18 和 CD147mAb 识别抗原不同表位。

1 材料与方法

1.1 材料 抗 CD147mAb 为美国 PharMingen 公司产品, Hab18 单抗由本室制备, FITC-山羊抗鼠 IgG, HRP-羊抗鼠 IgG 均购自华美生物工程公司, ABC Kit 为 Vector Lab 产品。人肝癌细胞株 hHCC 由本室传代培养。流式细胞仪(唐都医院中心实验室)型号 ProfileII。

1.2 CD147mAb 与肝癌细胞的结合

1.2.1 FCM 定量检测抗体结合率 制备高活性 hHCC 单细胞悬液至浓度 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$, 正常马血清封闭非特异位点,加 CD147mAb 5ug/ml, 4°C 作用 30', DPBS 离心洗涤 2 次,加 FITC-IgG 孵育 30', 4°C 离心洗涤,固定液固定,待测。同时设无关单抗。抗乙脑病毒 IgG(由微生物教研室提供), Hab18mAb 分别为阴性及阳性对照。

1.2.2 免疫组化 ABC 染色 石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 处理 20', 0.1% 人血白蛋白封闭 30', 加

倍比稀释的 CD147mAb(1:20 ~ 1:160) 4°C 过夜, PBS 振洗,加羊抗鼠 Bio-IgG 室温 1h, PBS 振洗,加 ABC 室温 1h,并以 DAB 显色,苏木精复染核,脱水,透明,封片。同时设 Hab18mAb 为阳性对照, PBS 代替一抗为阴性对照。

1.3 CD147mAb 与 Hab18g 的结合

1.3.1 抗原纯度分析 将本室经亲和层析提纯的 Hab18g 抗原分别加还原与非还原样品缓冲液,进行 SDS-PAGE 电泳, CBB 染色,脱色。

1.3.2 免疫斑点杂交 将 Hab18g 抗原呈梯度稀释后各 2ul 直接包被 NC 膜,封闭液封闭 4h 以上,加 CD147mAb(1:40),室温孵育 2h, TTBS 洗 3 ~ 4 遍,加 HRP-IgG 作用 1h, TTBS 洗, DAB 显色。Hab18 及无关单抗分别为阳性及阴性对照。

1.4 加成试验 根据 FCM 所测 Hab18 结合抗原的平均荧光强度值在 10ug/ml 时为 8.44 ± 5.52 , 20ug/ml 时为 8.61 ± 3.23 , 选定饱和浓度的 Hab18。在高活性 hHCC 单细胞悬液中先加 Hab18 20ug/ml, 4°C 作用 30', 离心洗涤 2 次,弃上清再加 CD147mAb 2.5ug/ml 4°C 作用 30', 离心洗涤,吸尽上清加 FITC-IgG 充分振摇后 4°C 静置 30', 离心洗涤,待测。

2 结果

2.1 FCM 测定荧光标记细胞阳性率 CD147mAb 为 95.8%, Hab18 为 99.6%, 无关单抗设为 0%(图 1)。组织切片 ABC 显色可见: Hab18 与 CD147mAb 两者阳性染色的组织分布一致,正常肝无表达,肝癌组织为膜阳性表达。

2.2 SDS-PAGE 电泳结果可见在胶上仅显示一条蛋白带,为纯化的 Hab18g 抗原。还原态下为 67kD, 非还原态下为 61kD, 迁移率有改变,与根据基因序列分析该蛋白分子应具有链内二硫键结构的判断结果一致(图 2)。斑点杂交结果示 CD147mAb 与梯度稀释的抗原呈阳性反应(图 3)。

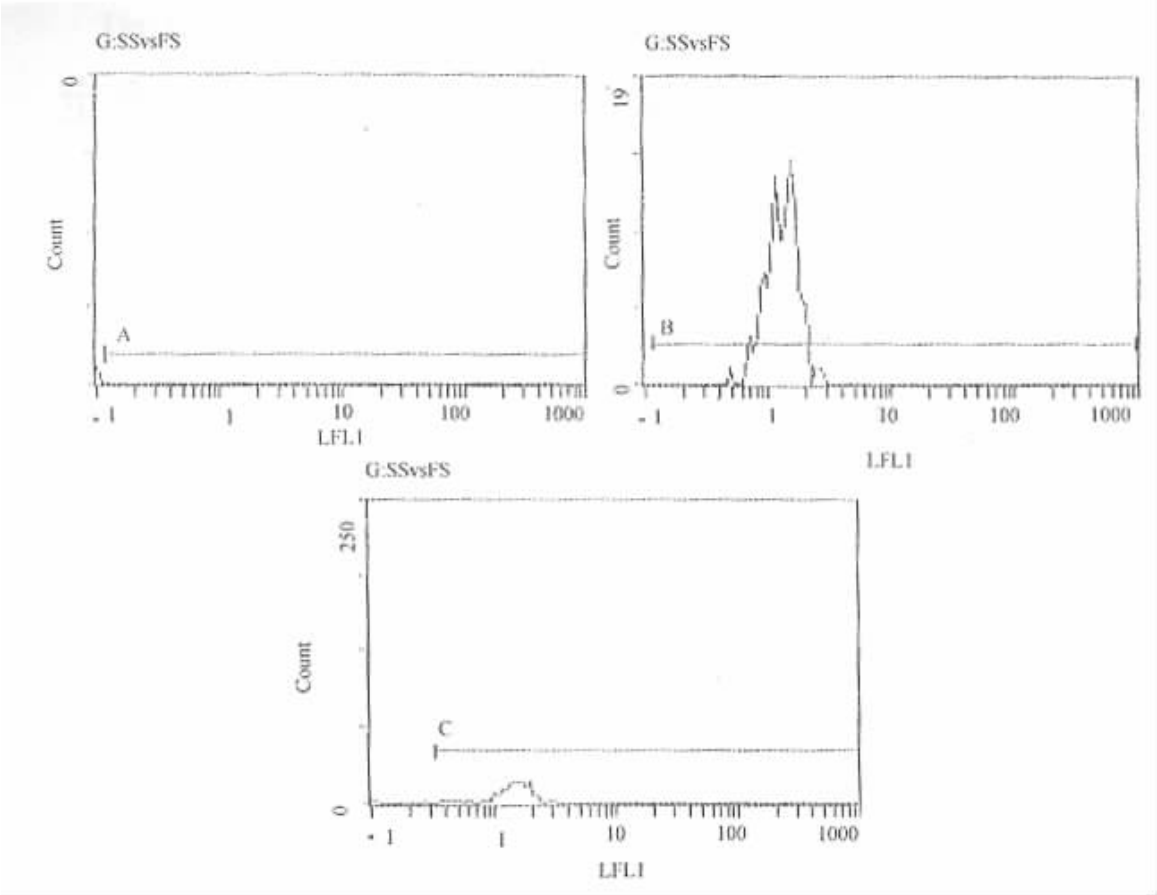


图 1 CD147mAb 结合肝癌细胞的流式细胞仪分析

A 无关 mAb + hHCC ; B Hab18 + hHCC ; C CD147mAb + hHCC ;

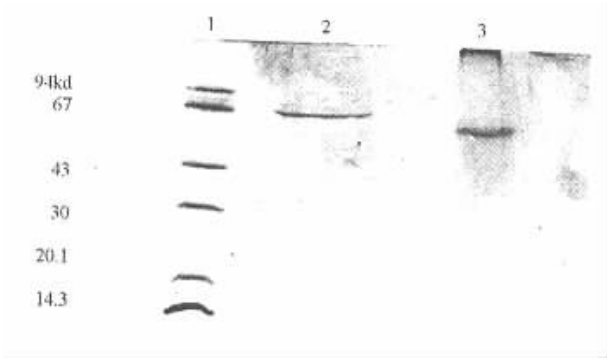


图 2 Hab18g 的 SDS-PAGE 分析

1. 蛋白分子量标准 2. 还原态时 Hab18g 电泳条带
3. 非还原态时 Hab18g 电泳条带

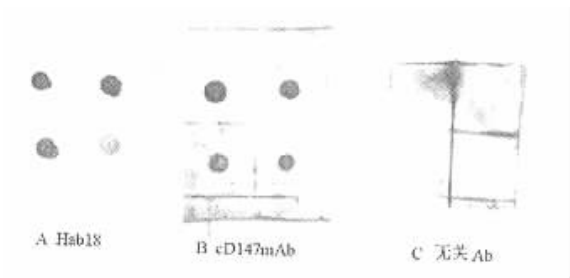


图 3 CD147mAb 识别 Hab18g 的斑点印迹

A Hab18 + Hab18g B CD147mAb + Hab18g C 无关 mAb + Hab18g

2.3 FCM 加成指数按 $AI = \left(\frac{2A_{1+2}}{A_1 + A_2} - 1 \right) \times 100\%$ 计算 ,AI < 30% 为两株单抗识别相同表位 ,AI > 40% 则为两株单抗识别不同表位。A₁ 为 Hab18 在超饱和浓度 20ug/ml 时所测平均荧光强度的值 :8.61 ± 3.23 ,A₂ 为 CD147mAb 2.5ug/ml 时的值 :3.11 ± 1.35 ,A₁₊₂ 为 Hab18 + CD147mAb 共同作用时的值 :9.13 ± 3.51(图 4)计算 AI = 57.4% > 40% ,因而可得 CD147mAb 与 Hab18 识别抗原不同表位。

3 讨论

本实验从蛋白水平多角度证实了 Hab18g 应称为 CD147 分子。同时证明了两个分子虽基因编码相同 ,但抗原表位不同。

CD147 分子是 1996 年第六届人类白细胞分化抗原协作会议统一命名的属 IgSF 中高度糖基化的跨膜糖蛋白 ,主要参与细胞—细胞或细胞—基质的粘附。CD147 代表着不同名称的蛋白质 ,包括 TCSF/EMMPRIN¹⁻⁴、M₆⁵、Basigin⁶、Neurothelin⁷⁻⁸。其中与肿瘤关系最为密切的是 TCSF/EMMPRIN(即肿瘤细胞起源的胶原酶刺激因子/细胞外基质金属蛋白酶诱导因子)。EMMPRIN 最初源于人肺癌细胞系 LX - 1 ,因纯化的该蛋白可刺激人成纤维细胞分泌基

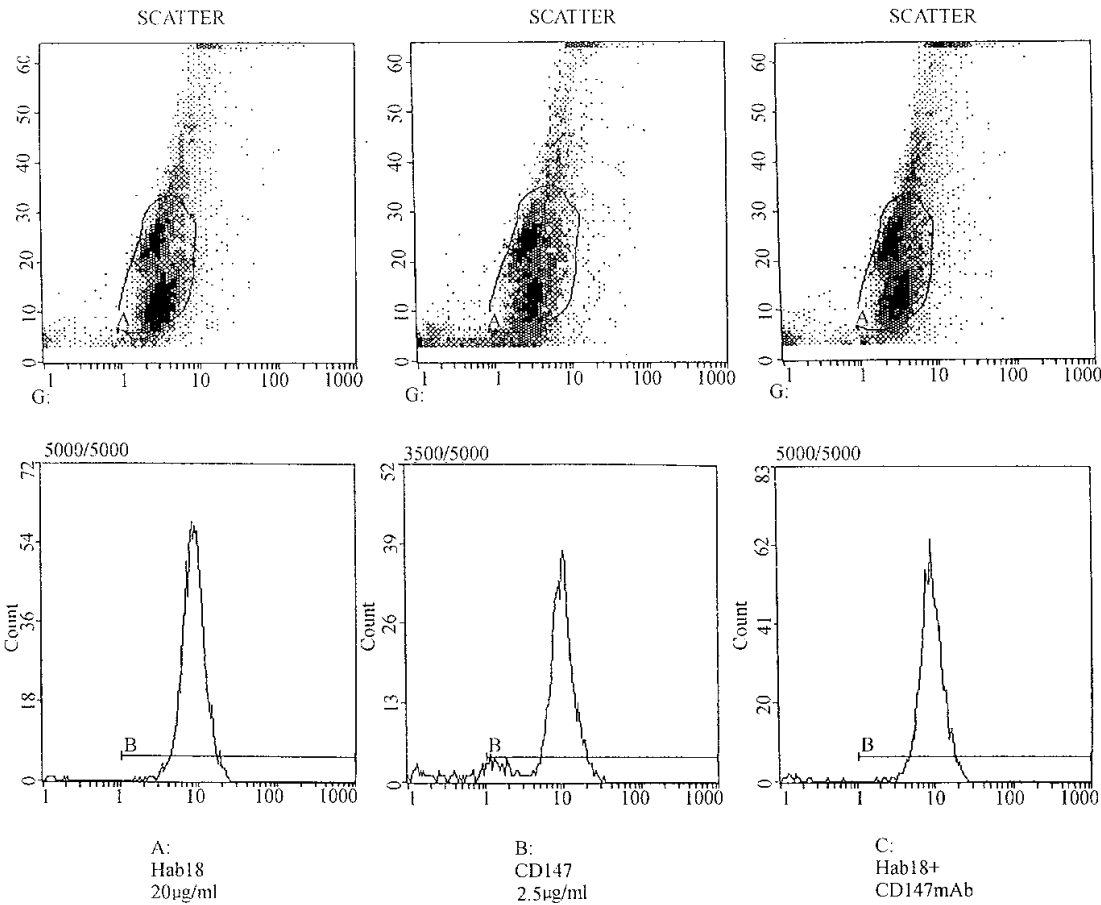


图 4 确定抗原表位异同的 FCM 分析

A :Hab18(超饱和浓度 20ug/ml)+ hHCC B :CD147mAb(2.5ug/ml)+ hHCC C :Hab18 + CD147mAb + hHCC

质金属蛋白酶 MMP_s 而得名。已知侵袭、转移行为是恶性肿瘤的本质特征,在此演进过程中,大量实验已证明 MMP_s 几乎可降解细胞外基质的所有成分,是癌细胞破坏间质机械屏障,得以向癌周组织浸润、扩散的最为重要的一类蛋白水解酶。近年来 MMP_s 在肿瘤转移中的作用愈来愈受到重视,其细胞来源也是人们研究的重点。

我们将这一分子与肝癌联系起来,为所测 cDNA 序列的客观性提供了实验证据,从而支持我们对表达在肝癌膜表面的 Hab18g 抗原可能具有 EMMPRIN 功能的推测。也为肝癌高复发、高转移特性的分子机制研究提供了新的思路,并为进一步研究该抗原的结构、功能奠定了基础。

参考文献:

[1] Ellis S.M ,Nabeshima K. ,Biswas C. Monoclonal Antibody Preparation and Purification of a Tumor , Cell Collagenase—stimulatory Factor [J].Cancer Res ,1989 49 3385 ~ 3391.
[2] Kataoka H ,Decastro R. ,Zucker S. et al. Tumor Cell-derived Collagenase Stimulatory Factor Increases Expression of Interstitial

Collagenase ,Stromelysin ,and 72-kDa Gelatinase[J]. Cancer Res , 1993 53 3154 ~ 3158.
[3] Biswas C ,Zhang Y. ,Decastro R. et al. The Human Tumor Cell-derived Collagenase—stimulatory Factor(Renamed EMMPRIN) Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily[J].Cancer Res ,1995 55 : 434 ~ 439.
[4] Guo H.M. ,Zucker S. ,Gordon M. K. et al. Stimulation of Matrix Metalloproteinase Production by Recombinant Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer from Transfected Chinese Hamster Ovary cells[J].J. Biol Chem ,1997 272 24 ~ 27.
[5] Kasinrerk W. ,Fiebiger E. ,Stefanova I. et al. Human Leukocyte Activation Antigen M₆ A Member of the Immunoglobulin Superfamily is the species Homologue of Rat OX-47 ,Mouse Basigin ,and Chicken HIT7 molecule[J].J. Immunol ,1992 149 847 ~ 857.
[6] Miyauchi T. ,Masuzawa Y. ,Muramatsu T. The Basigin Group of the Immunoglobulin Superfamily :Complete Conservation of a Segment in and around Transmembrane Domains of Human and Mouse Basigin and Chicken HIT7 Antigen[J].J. Biochem ,1991 110 770 ~ 774.
[7] Schlosshauer-B ,Bauch-H ,Frank-R. Neurothelin :amino acid sequence ; cell surface dynamics and actin colocalization[J]. Eur-J-Cell-Biol , 1995 68 159 ~ 66.
[8] Schlosshauer-B ,Herzog-K H. Neurothelin ;an inducible cell surface glycoprotein of BBB-specific endothelial cells and distinct neurons[J]. J-Cell-Biol ,1990 110 1261 ~ 74.

Human Hepatoma Membrane—associated Antigen Hab18g Is Identified As a CD147 Molecule

GUO Xiao-nan ,CHEN Zhi-nan ,et al

Department of Pathology ,Fourth Military Medical University ,Xi'an 710032 ,China

Abstract **Objective** To identify the Human hepatoma membrane-associated antigen Hab18g is a CD147 molecule from protein level ,and the Hab18 and CD147mAb were used to investigate the epitope of antigen. **Methods** Indirect immunofluorescent ;immunohistochemistry ABC method ;dot blot and FCM additive test. **Results** Both CD147mAb and Hab18 recognize the same antigen ,the mean intensity fluorescence of two kinds of antibodies used is higher than that of one antibody. **Conclusion** Human hepatoma membrane-associated antigen Hab18g may name as CD147 molecule ,and two kinds of antibodies(Hab18 and CD147mAb)recognize the different epitope of the same antigen.

Key words : Hepatocellular carcinoma ;Antigen ;Hab18g ;CD147