

病理生理学进展

(四)

程立 主编

人民卫生出版社

病理生理学进展

(四)

程 立 主编

王 澧	孔宪寿	许 茵	陈华粹	
余应年	苏宝田	沈恒嘉	何球藻	
严仪昭	张晓红	林云璐	范维珂	
孟鸿钧	金惠铭	金 颖	姚立人	编写
姚君慎	徐仁宝	陶永平	凌 宏	
徐 柯	郭恒怡	钱振超	夏辉明	
程 立	蒋 红	董传仁	温光楠	

(按姓氏笔画为序)

人 民 卫 生 出 版 社

病理生理学进展 (四)

程 立 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京密云卫新综合印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168毫米32开本 13 $\frac{1}{4}$ 印张 4插页 357千字
1989年7月第1版 1989年7月第1版第1次印刷
印数: 00,001—2,310

ISBN7-117-00652-8/R·653 定价: 11.95元

〔科技新书目 195—144〕

目 录

1. 人类单克隆抗体研究进展	1
2. 人类T细胞白血病病毒及其在白血病和免疫缺陷性 疾病中的作用	19
3. 肿瘤转移中的几个免疫学问题	40
4. 转输淋巴细胞和骨髓移植在肿瘤治疗中的进展	59
5. 蛋白激酶C在促癌作用中的作用	82
6. 速发型超敏反应发生机制	94
7. 白细胞介素	113
8. 神经系统与免疫系统功能的相互影响	135
9. 应激	148
10. 白三烯的研究进展	170
11. 纤维连接蛋白的生物学特性及其与疾病的联系	191
12. 前列环素和血栓烷 A_2 在生理和病理过程中的作 用	213
13. 肾上腺素类受体研究的某些进展	233
14. 心力衰竭时扩血管治疗的病理生理基础	253
15. 儿茶酚胺与急性心肌梗塞	277
16. 肝再生的调节机制	288
17. 肺泡上皮与肺泡性水肿的发生机制	310
18. 弹性蛋白酶的研究进展	323
19. 某些中枢神经递质和疾病	347
20. 急性肾功能衰竭时少尿机制及慢性肾功能衰竭时的 肾功能适应性改变	363
21. 实验动物病理模型的研究	375
22. 心阻抗图的原理及在评价心功能中的作用	395
23. 肿瘤细胞异质性的实验研究	412

1. 人类单克隆抗体研究进展

1975年 Köhler 和 Milstein^[1] 提出了产生单克隆抗体 (McAb) 的杂交瘤技术, 为免疫学研究开创了新纪元, 在生物学及医学领域中产生了巨大的影响, 并获得了 1984 年诺贝尔医学奖。具有一定特异性的杂交瘤细胞系的克隆化及长期培养, 其所产生的抗体的单株性、单一特异性及永久获得性, 使抗体的制备有了很大的改进与革新, 亦为抗体产生的细胞系选择学说奠定了牢固的基础。不仅如此, McAb 的应用亦为深入了解各种细胞、细菌、病毒等的抗原成分成为可能。近年来在美国的 Bethesda, Boston 等地召开了多次淋巴细胞杂交瘤专题讨论会。杂交瘤技术和 McAb 应用的发展十分迅速。在医学上 McAb 不仅用于体外的细胞及可溶性抗原的检测, 而且正在探索应用于体内的定位诊断与治疗。然而, 必须注意到目前生产的 McAb, 几乎绝大部分都是鼠-鼠杂交所产生的鼠类抗体, 在体内应用异种抗体易引起过敏反应。所以近年来不少学者开始积极研究人类 McAb, 取得了一定的进展。

一般而论, 人类 McAb 比目前常规产生的鼠类 McAb 有以下几个优点^[2~7]: ①人类 McAb 对人类疾病的被动免疫治疗或抗血清治疗更为适宜。目前已能将相应抗体用于新生儿溶血症 (Rh 不合)、破伤风、狂犬病、乙型肝炎、水痘、巨细胞病毒感染、革兰氏阴性杆菌败血症及蛇咬伤等的抗血清治疗。在临床应用时, 人类免疫球蛋白比鼠类免疫球蛋白的免疫原性小。在已报导的用鼠类 McAb 治疗的 20 例各种人体肿瘤中, 约有半数患者产生了抗体或引起过敏反应, 而使治疗失败。一般情况下, 人类免疫球蛋白可避免这些反应。②制备的单克隆自身抗体可用以确定自身抗原的存在及其性质, 由此进一步制备抗人类自身抗体的独特型抗体, 可用以抑制自身免疫反应及移植反应, 亦有治疗价值。③对人类细胞表面的组织相容性抗原 (HLA), 人的免

疫反应比跨种免疫能产生更广范围的抗体,所以在制备抗HLA抗体时,人类McAb更有价值。④人类McAb具有种族特异性的糖链,它对许多抗体效应功能是重要的,所以能产生其他动物不能产生的抗体。如小鼠能产生抗人ABO血型抗原的抗体,但却不能产生Rh抗体,而人的抗体是可以针对Rh抗原的。因此,发展人类McAb是具有理论与现实意义的。

目前,生产人类McAb比生产鼠类McAb的困难大得多。其主要原因有二:一是尚未获得像鼠类骨髓瘤细胞那样合适于融合的人类骨髓瘤细胞;二是由于人道主义的原因,不能任意对人进行免疫或取脾,因之不易得到大量的免疫B细胞。所以人类McAb的制备技术,尚在探讨改进过程中。根据文献报导,一般采用以下四种方法:①EB病毒转化;②人-鼠杂交瘤;③人-人杂交瘤;④EB病毒-杂交瘤综合技术。

一、EB病毒转化

最早采用的诱发人类McAb的方法是用亲淋巴细胞的疱疹病毒——Epstein-Barr病毒去转化淋巴母细胞并使它长期存活。EB病毒常由B95-8细胞株所产生。该细胞株是由一传染性单核细胞增多症患者的淋巴细胞所产生的EB病毒感染淋巴细胞而成。当B淋巴细胞在体外暴露于EB病毒时,发生多克隆性增殖。Rosen等^[8]亦显示了将人的外周血淋巴细胞在体外用EB病毒直接感染,可产生多克隆性免疫球蛋白。用放射免疫试验检测培养上清液可发现有多种免疫球蛋白。EB病毒对细胞的感染具有选择性,目前仅知道B淋巴细胞及鼻咽部上皮具有EB病毒受体,才能被感染。因之具有EB病毒受体且能分泌单一特异性抗体的人类B淋巴细胞,在体外经EB病毒转化为可持续培养的细胞株时,便形成了产生人类McAb的细胞株。其方法比较简单,可先培养产生EB病毒的B95-8细胞株,离心收集上清液中的EB病毒,过滤除菌后在液氮中冻存。取带有某种特异抗体的人的外周血,分离其淋巴细胞,与含EB病毒的上清液混合,分配至96孔中,在5%CO₂、37℃孵箱过

夜。检出产生特异性抗体的细胞，进行克隆化^[9~13]。

由于人外周血B淋巴细胞数量较少，而且分泌特异性抗体的B细胞更少，因之产生McAb的成功率很低。曾试用过多种方法，在进行转化前预先浓集具有分泌特异抗体的B淋巴细胞，包括：①用抗原包被的红细胞，通过玫瑰花结法收集具有特异抗体的淋巴细胞；②把荧光标记的抗原结合到分泌特异抗体的淋巴细胞表面，再用荧光激活细胞分类器（FACS）加以分离；③先用E花结除去T细胞，然后将不结合抗原的B细胞去除^[14]。然而尽管这些方法有成功的报导，但尚不清楚哪一型B细胞能被感染，并能被EB病毒刺激分泌Ig。因此，有一些用抗原结合来浓集细胞的方法，可能导致所选择的细胞处于分泌Ig的不适当阶段，所以不少人仍主张转化全部B细胞^[15]，经有限稀释法检出产生特异性抗体的克隆，获得产生人类McAb的细胞株。

应用EB病毒技术已建立过几株产生人类单抗的细胞株，分别分泌不同的抗体，如抗DNP的IgM抗体^[9]、抗TNP（三硝基酚）的IgM抗体^[10]、抗链球菌糖类A的IgM抗体、抗破伤风类毒素的IgG及IgM抗体^[14]、抗Rh(D)的IgG与IgM抗体^[11,12]、抗IgG免疫复合物（如类风湿因子）的IgM抗体^[13]、抗磷酸胆碱的IgM抗体，以及抗流感、抗肿瘤等抗体。EB病毒转化的细胞常为双倍体，只分泌含一种轻链及一种重链的Ig。一般不易克隆，其克隆生长率为 $1 \times 10^{-7} \sim 10^{-8}$ ，抗体分泌量亦低（ $1 \mu\text{g/ml}$ ），且相对的不稳定（ <8 个月）。其不稳定的原因尚不清楚。可能不仅仅是由于分泌抗体与不分泌抗体的细胞生长速度不同，还有更复杂的原因，因之近年来主张为挽救这些转化细胞而进行它与体细胞的杂交。

二、人-鼠杂交瘤

鼠-鼠杂交瘤技术目前在许多免疫实验室已成为常规。由于小鼠骨髓瘤细胞应用最早和容易得到，很自然的就想到用它与人淋巴细胞的杂交。Schwaber等^[16]首先显示产生Ig的人外周血淋巴细胞与产生Ig的小鼠骨髓瘤细胞融合时，杂交瘤细胞能

产生人的 γ 和 α 重链及轻链, 以及小鼠的 α 重链及轻链。当时未引起人们的注意。以后才发现人-鼠杂交瘤可作为人类 McAb 的来源。Levy 等^[17]用慢性淋巴细胞性白血病患者的外周血淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞 NS-1 融合, 建立了可分泌大量人 Ig 的杂交瘤细胞株, 并能在体外培养达数月之久。Schlom 等^[18]用乳腺癌患者淋巴结引流的淋巴细胞, Sikora 等^[19]用肺癌患者淋巴结引流的淋巴细胞, 与 NS-1 融合成功, 获得了针对相应肿瘤抗原的人 McAb。嗣后人们便采用人外周血、淋巴结、脾、扁桃腺及骨髓的淋巴细胞与 NS-1 杂交, 制备人 McAb, 如抗 Forssman 抗原^[20]、乳腺癌抗原^[18]、人类胶质细胞瘤抗原^[21]、肺癌抗原^[19]、黑色素瘤抗原、钥孔贼血蓝素 (KLH)^[22]、破伤风类毒素^[23]、白喉毒素及某些自身抗原的抗体^[24]。假若有合适的人类免疫淋巴细胞的来源, 这种种间杂交瘤是容易产生的, 并很快地生长, 每毫升培养液含 $15\mu\text{g}$ Ig。不幸的是它们很容易使人的染色体丢失。因之要使这一方法取得成功, 常需多次克隆化, 以求达到抗体分泌的稳定性。近年 Cote 等^[25]在研究肿瘤 McAb 时发现用小鼠骨髓瘤细胞 NS-1 与肿瘤患者的外周血、淋巴结、脾及肿瘤局部的淋巴细胞进行融合后, 所产生的杂交瘤数比其与人骨髓瘤株 (SKO-007) 或人淋巴母细胞样细胞株 (LICR-LON-HMy2) 融合者要高得多, 其平均融合频率为 60 个克隆/ 10^7 淋巴细胞 (表 1-1), 且其稳定性亦不差。Gigliotti 等报导用人-鼠细胞杂交的方法获得的能产生抗破伤风类毒素 McAb 的杂交瘤已持续培养达 19 个月以上。研究发现: 人-鼠杂交瘤中人类 Ig 分泌的不稳定性与编码这些 Ig 链的基因位点的丢失有关。但又注意到: 这些人染色体的丢失并不是任意的, 第 14 号染色体 (编码重链) 及 22 号染色体 (编码 λ 链) 常被保留, 而第 2 号染色体 (编码 κ 链) 常易丢失。另外, Ig 基因调控或转录后有问题亦可引起杂交细胞分泌功能的丧失。然而这一现象不仅限于人-鼠杂交瘤, 亦可见于人-人杂交瘤。近年 Raison 等^[26]显示 Ig 基因能在 Ig-杂交瘤中保存。非分泌性杂交瘤可用致细胞分裂原如脂多糖刺激而分泌 Ig。

表 1-1 不同来源人淋巴细胞与不同骨髓瘤融合频率^[25]

融 合	有杂交瘤 生长者	克隆数/10 ⁷ 淋巴细胞		Ig ⁺ 孔* %	Ig ⁺ 克隆
细胞系	融合次数	均数	范围		10 ⁷ 淋巴细胞
所有淋巴细胞与					
NS ₁	20/21 (95%)	60.0	(0~250)	51	30.6
LICR-2	27/34 (79%)	6.9	(0~74)	65	4.5
SKO-007	12/22 (55%)	1.5	(0~26)	47	0.7
淋巴结淋巴细胞与					
NS ₁	7/7 (100%)	49.4	(6.6~155)	52	25.7
LICR-2	13/15 (87%)	10.6	(0~74)	61	6.5
SKO-007	4/8 (50%)	2.4	(0~26)	66	1.6
外周血淋巴细胞与					
NS ₁	8/8 (100%)	61.3	(1.5~240)	42	25.7
LICR-2	8/13 (62%)	3.2	(0~29)	74	2.4
SKO-007	4/10 (40%)	0.75	(0~17)	64	0.5
脾淋巴细胞与					
NS ₁	1/1 (100%)	60.0		80	48
LICR-2	4/4 (100%)	4.0	(1.4~33)	70	2.8
SKO-007	4/4 (100%)	1.6	(0.67~5.8)	20	0.3
肿瘤内淋巴细胞与					
NS ₁	4/5 (80%)	46.7	(0~250)	60	28
LICR-2	2/2 (100%)	11.6	(10.6~12)	25	2.9

* 克隆生长孔内Ig>500ng/ml的百分数

此外, 杂交瘤能否在动物体内生长及其所产生的抗体是否特异, 亦是判断方法是否可取的重要方面。Burnett 用 3 株骨髓瘤细胞 (NS-1, SP2, 653) 和 UC-729-6 等 4 株人淋巴细胞样细胞株, 与不同来源的人淋巴细胞进行融合比较, 结论认为制备抗肿瘤的人 McAb, 采用人-人杂交瘤并不优于人-鼠杂交瘤, 而且后者形成的杂交瘤细胞较前者易于在抑制了自然杀伤细胞活性的裸鼠体内生长。Cote 等^[25]用人-鼠杂交瘤所产生的抗黑色素瘤人 McAb R24, 经与 40 余株人细胞株相互作用的结果认为它具有相当好的特异性 (表 1-2)。人-鼠杂交瘤的染色体分析表明

表 1-2 人鼠杂交瘤产生的单抗 R₂₄ 的特异性⁽²⁵⁾

靶细胞株	血清学试验			
	抗体 k _g (IgM)		抗体 R ₂₄ (r ₃)	
	滴度 × 10 ⁻³	吸收	滴度 × 10 ⁻³	吸收
黑色素瘤				
SK-MEL-28, 19, 29, 42, 57, 64, 94	25	+	25	+
SK-MEL-13, 37, 40, 90	2	+	25	+
SK-MEL-23, 44, 79	1	+	5	+
SK-MEL-31, 61	-	+	1	+
星形细胞瘤				
AJ	5	+	5	±
AN	-	+	-	+
AS, U138MG, U373MG	-	-	-	-
癌				
肾癌: SK-RC-7, 2, 6, 9	-	-	-	-
乳腺癌: BT-20, MCF-7, A1Ab	-	-	-	-
膀胱癌: T-24	-	-	-	-
卵巢癌: SK-OV-3	-	-	-	-
结肠癌: HT-29	-	-	-	-
宫颈癌: ME-180	-	-	-	-
肺癌: SK-LC-LL	-	-	-	-
睾丸癌: SK-GR-1	-	-	-	-
淋巴母细胞样细胞				
T 细胞: MOLT-4		±		-
T-45, NALL	-	-	-	-
EBV-B 细胞: AH, BD, BT	-	-	-	-
正常细胞				
黑色素细胞	-		0.1	
纤维母细胞 (成人及胚胎)	-	±	-	-
脑 (成人及胚胎)		+		-
白细胞		+		-
胚胎肝		+		-
肾上皮	-		-	

它含有较多的染色体,小鼠及人的都有,而以小鼠的为主。我们自己的材料亦说明经过半年的克隆化培养过程,仍保留着较多的人类染色体。所以人-鼠杂交瘤应该是制备人类 McAb 值得采取的一条途径。

三、人-人杂交瘤

与人-鼠杂交瘤相反,人-人杂交瘤的染色体比较稳定,若能选择适合融合的人类细胞株,便可产生稳定地分泌特定抗体的杂交瘤,困难在于人的骨髓瘤细胞株不易在体外长期培养。人的骨髓瘤细胞在电镜下观察具有一定的特征,其胞浆含有丰富的粗面内质网、众多的线粒体、少量游离的多聚核糖体及发育良好的高尔基复合体,能分泌亲代在活体中合成的 Ig 链。这些细胞从不携带 EB 病毒,常为非整倍体^[27]。虽然经过许多努力,但能符合上述条件并能长期培养的人骨髓瘤细胞至今仅报导 10 株^[28~33],而其中仅 3 株为次黄嘌呤磷酸核糖转移酶阴性 (HGPRT⁻),可用于融合。如最早报导的人-人杂交瘤是何杰金氏病患者的脾细胞与 HGPRT⁻ 的 U266AR1 浆细胞瘤细胞株融合产生的抗 2,4-二硝基酚 McAb。U266 为产生 IgE 的骨髓瘤细胞株,其亚株 U266AR1 为 HGPRT⁻,生长迅速,适用于融合,改名为 SKO-007^[34]。该何杰金氏病患者在手术前二周用二硝基酚致敏,手术后取未受累的脾淋巴细胞进行融合。在 3 例实验中,其融合频率为 37/10⁷ 淋巴细胞,其中 28% 产生 IgG,1.7% 对二硝基酚呈特异反应。特异性 McAb 的蛋白含量为 3~11μg/ml/d。以后,又报导了 TM-H₂ 及 DHMC,其特性及融合特点见表 1-3,但由于它们自身分泌 Ig,以及融合率较低,所以仍不理想。

由于缺乏合适的骨髓瘤细胞株,考虑采用 B 淋巴母细胞株 (LCL) 作为融合用细胞。这些细胞来自不成熟的 B 细胞,被 EB 病毒感染,显示 EB 病毒核抗原 (EBNA) 阳性,其染色体常为双倍体或假双倍体。在胞浆内有大量的游离多聚核糖体而粗面内质网及高尔基复合体发育较差。一般而言,淋巴母细胞生长很快,但只分泌少量 Ig (<1μg/ml)。已应用过的主要细胞株

表 1-3 融合用的人类骨髓瘤及淋巴瘤细胞株^[6]

名称	融合用细胞株		供体淋巴 细胞来源	融合 频率 ($\times 10^{-7}$)	特异杂交率 (%)	杂交瘤分 泌Ig量		克隆 效率 (%)	分 裂 时 间 (小时)	稳 定 性 (月)
	细胞 类型	分泌Ig 类型	能抵抗			类型	类型			
SKO-007	骨髓瘤	ϵ, λ	8-AG	37	1.7	DNP	3~11 IgG	/	/	/
TM-H ₂	骨髓瘤	λ, κ	6-Tg	/	1.3~7.4	SRBC	10 /	/	/	/
DHMC	骨髓瘤	γ, λ	6-Tg	(10~100)	/	SRBC	<20 IgM	/	53	>3
GM1500	淋巴瘤	γ_2, κ	6-Tg	18	/	麻疹病毒	/ IgM	/	/	/
KR-4	淋巴瘤	γ, κ	6-Tg EB病毒 转化细胞	112	94	破伤风 类毒素	6 IgM	64	24	>12
LICR- LON-HM ₇₂	淋巴瘤	γ_1, κ	8-AG	0.1~10	0	0	0.5~0.8 IgG	25	26	>12
GMO467.3	淋巴瘤	μ, λ	8-AG	22	4.7	破伤风 类毒素	0.4~2.8 IgM	高	/	>9
H351.1	淋巴瘤	μ, κ	8-AG	22	0	0	/ /	高	/	/
UC729-6	淋巴瘤	μ, κ	6-Tg	/	/	瘤细胞系	3~10 IgM	/	/	/
GM4672	淋巴瘤	γ_2, κ	6-Tg	/	/	Rh(D)	0.1~1.0 IgG	/	/	/

注/: 表示未做, 8-AG: 8 杂氮鸟嘌呤, 6-Tg: 6 巯基鸟嘌呤

见表 1-3。用于融合的第一株人淋巴母细胞株是 GM1500-6TG-2, 来自多发性骨髓瘤的 B 细胞株 GM1500^[35], 分泌 IgG₂K, 而且是 EBNA 阳性。从一例致死性感染的亚急性硬化性全脑炎 (SSPE) 患者, 其血中含极高滴度的抗麻疹抗体, 取其外周血单个核细胞与 GM1500-6TG-2 融合, 其融合频率为 $18/10^7$ 淋巴细胞, 得到 6 个克隆, 能分泌对麻疹病毒核壳抗原具有特异性的 IgM 抗体。以后又与一例发病 5 个月的 I 型糖尿病患者^[36] 的外周血单个核细胞进行融合, 三次中只有一次成功。这次融合频率为 $25/10^7$ 淋巴细胞。其中一个克隆 (4.5%) 产生对胰岛细胞具有特异性的 IgM 抗体, 分泌量为 $0.4\mu\text{g/ml}$, 历时一年以上。后来 GM-1500-6TG-2 被诱变而成抗哇巴因的细胞株, 称为 KR-4^[37]。它与新鲜而未转化的外周血淋巴细胞的融合率为 $4/10^7$ 淋巴细胞。而与用 EB 病毒转化的产生抗破伤风类毒素抗体的淋巴细胞, 其融合率可达 $112/10^7$ 。96% 产生特异性 IgM, 分泌量达 $6\mu\text{g/ml}$, 至今已达一年以上。

另一淋巴母细胞株为 LICR-LON-HMy2^[38], 来自淋巴母细胞株 ARH77, 是 EBNA 阳性, 呈亚二倍体, 分泌 IgG₁K。与淋巴细胞的融合率为 $1/10^7$ 。杂交瘤染色体众数为 60 (55~85), 分泌 IgG $0.5\sim 8\mu\text{g/ml}$ 。有 3 个实验室已用此制备了抗肿瘤的人类 McAb。其他曾被试用过的淋巴母细胞株尚有 GMO 467.3^[39]、H351.1^[39]、UC729-6、GM4672 等, 但哪一株较好, 尚无定论。而且它们都分泌 Ig, 干扰杂交瘤分泌的特异性抗体, 所以人们正努力寻找不分泌或不合成 Ig 的融合用人细胞株。

与人-鼠杂交瘤一样, 对于成功地产生人-人杂交瘤及其单克隆抗体, 免疫淋巴细胞的数量甚为重要。不可能随心所欲地用抗原直接免疫人体, 而且淋巴细胞在应用时是否已达到适宜于融合的程度, 常不清楚, 因之盲目性较大。迄今已报导的人类单克隆抗体有抗细菌抗原、抗病毒抗原、抗血细胞抗原、抗自身抗原及抗肿瘤抗原等 (表 1-4) ^[25, 35~46]。分析这些结果可见: 良好的免疫原如破伤风类毒素, 能产生足量的、适宜于融合用的免疫 B

细胞, 容易产生 McAb; 而不良的免疫原, 则不易获得 McAb。所以要取得成功, 重要的问题是设法增加抗原特异性 B 细胞, 并将融合程序标准化。关于增加抗原特异性 B 细胞的方法曾试用过: ① B 细胞浓集法; ② EB 病毒刺激法; ③ 体外免疫法。使用不同方法处理的 B 细胞进行人-人杂交瘤技术, 其融合频率的差异颇大, 用普通 B 细胞为 $1/10^7$, PWM 刺激的 B 细胞为 $6/10^7$, 抗原体外刺激的 B 细胞为 $11/10^7$, EB 病毒转化的 B 细胞为 $36/10^7$, 说明应用 EB 病毒转化有一定意义。在融合前用抗原进行体外刺激可增加阳性杂交瘤的数量^[47]。关于细胞融合的程序, 尚无统一的标准, 其影响因素较多。我们常用杂交瘤的经典方法略加改

表 1-4 已报导的人类单克隆抗体^[47]及其制备方法

1. 细菌抗原 破伤风类毒素: 人-人杂交瘤 人-鼠杂交瘤 EB病毒转化 白喉类毒素: 人-鼠杂交瘤 EB病毒转化 嗜血流感 B: 人-人杂交瘤 麻风杆菌: 人-人杂交瘤 2. 病毒抗原 X31 流感病毒: EB病毒转化 单纯疱疹病毒: EB病毒转化 麻疹病毒: 人-人杂交瘤 3. 血细胞抗原 A: EB病毒转化+Sp2 Rh: EB病毒转化 4. 其他抗原 Forssman 抗原: 人-鼠杂交瘤 N 硝基苯: EB病毒转化 TNP/DNP: 人-人杂交瘤 EB病毒转化 KLH: 人-鼠杂交瘤	5. 自身免疫 双链 DNA: 人-人杂交瘤 抗内分泌细胞: 人-人杂交瘤 重症肌无力: 人-人杂交瘤 抗胰岛细胞: 人-人杂交瘤 促甲状腺素受体: 人-鼠杂交瘤 乙酰胆碱受体: EB病毒转化 类风湿因子: EB病毒转化 6. 肿瘤抗原 乳腺癌: 人-鼠杂交瘤 人-人杂交瘤 前列腺癌: 人-人杂交瘤 黑色素瘤: 人-人杂交瘤 胶质瘤: 人-人杂交瘤 人-鼠杂交瘤 肺癌: 人-人杂交瘤 人-鼠杂交瘤 胃癌: EB病毒转化 直肠癌: EB病毒转化 7. 免疫缺陷 一般免疫缺陷: 人-人杂交瘤 X 性联无 IgG 血症: 人-人杂交瘤
--	--

良^[25]。其中十分重要的问题是筛选人类 Ig 和检测细胞特异性抗体的技术。前者目前常用酶联免疫吸附试验,以人 IgG、IgA、IgM 作标准,用竞争抑制法测定杂交瘤上清液中 Ig 的性质与含量,挑选其中含 Ig 在 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上的杂交瘤作抗体特异性检测。后者所用抗原又可分为可溶性抗原及细胞抗原两大类。可溶性抗原常用已知的化学或生物制品,细胞抗原则以检测体外培养的细胞株为主。这就需要有足够的细胞株备用,既要有抗原阳性的细胞株,亦要有抗原阴性的细胞株,才能明确该抗体对某种抗原的特异性。有的抗原在胞膜,有的抗原在胞浆。所用方法因目的不同而异,有花结形成法、免疫荧光法、免疫酶标法及放射免疫法等,种类繁多。但应强调,对于检测材料及合适方法应早作准备,以免杂交瘤产生后措手不及。

四、EB 病毒杂交瘤技术

在 B 细胞的各成熟阶段,尚未显现的分泌抗体的能力都可设法显示出来。Laskov 等^[48]报导一株原来仅有表面 IgM 的小鼠 B 淋巴细胞瘤,与分泌 IgG 的骨髓瘤进行融合后,可诱导其分泌 IgM。Levy 等^[17]亦报导正常时不分泌 Ig 的人 B 细胞淋巴瘤与骨髓瘤(小鼠)形成杂交瘤后,便能分泌大量 Ig。这些结果提示若用 EB 病毒转化人淋巴细胞,再与骨髓瘤细胞进行融合,也可建立分泌人抗体的细胞株。于是将一株来自经破伤风类毒素(TT)免疫的健康人外周血淋巴细胞,经 EB 病毒转化后能产生抗 TT 抗体的克隆 B_6 与一株不分泌 Ig 的小鼠浆细胞瘤(P_3 -X63-Ag8-653)融合后,在含有 10^{-5} 哇巴因的 HAT 液中进行选择。前者在哇巴因中死亡,而后者在 HAT 中死亡,只有杂交瘤才能成活。该杂交克隆在培液中保持稳定达 6 个月。在培养的第 9、10 天所产生的特异抗体量为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$,而未杂交的 EB 病毒转化细胞为 $0.85\mu\text{g}/\text{ml}$ 。这一克隆在培养 6 个月后丧失产生抗体的能力,其原因可能是种间杂交时染色体的不稳定性所致。为了避免这一不稳定性, B_6 可与人类细胞株融合。但一般的融合用人细胞株,如 GM-1500-6TG-2,对 6-巯基鸟嘌呤

岭具有抵抗性，可是亦不耐受哇巴因的作用。若用低剂量的 γ -射线诱变 GM1500-6TG-2，使之成为抗哇巴因，即成 GM1500-6TGA-11 或称 KR-4。将 B₀ 细胞与 KR-4 细胞进行融合，在 HAT、哇巴因溶液中进行筛选，哇巴因杀死 B₀，HAT 破坏 KR-4，只有杂交瘤对两者均具抵抗性。此时每 10⁶ 个杂交瘤产生的抗 TT 抗体 4~8 倍于 B₀ 细胞本身。杂交瘤产生大量 μ 链与 λ 、 κ 链，而 B₀ 产生的轻链量很少。该杂交瘤至今已稳定地分泌抗体达一年以上，其染色体接近四倍体，很少丢失。因之，EB 病毒转化的淋巴细胞与人类骨髓瘤或淋巴瘤细胞株的融合可能成为今后制造人类 McAb 的一种较好方法。

五、应用人类单克隆抗体的主要问题

人类 McAb 的临床应用常需制备大量抗体，一般是将相应杂交瘤在动物体内进行长期培养，以取得大量抗体。在鼠-鼠融合时常将杂交瘤接种于同系小鼠腹腔内，可产生比体外培养高 1000 倍的抗体量，而且亦可防止污染，比较理想。但目前，人-人杂交瘤尚不能在一般小鼠的腹水中生长。有些实验室正在研究用裸鼠或使用免疫抑制剂来抑制免疫反应，以解决此问题。有人认为人-鼠杂交瘤在裸鼠中的生长比较容易成功。

另一潜在危险是人类 McAb 中可能存在着 EB 病毒或逆转录病毒。已知许多鼠类杂交瘤或融合用的细胞株能释放逆转录病毒，但此点并未妨碍人们使用鼠类单抗的工作^(2~5)。且相似的 C 型及 A 型病毒颗粒尚未在人的杂交瘤或融合用的细胞中发现。但近年在某些人的 T 细胞淋巴瘤中发现一种 C 型 HTLV 病毒，提示应对融合用的 B 细胞作更密切的观察。用于人杂交瘤工作的 EB 病毒，来自猴 95-8 细胞株，该病毒能在体外转化 B 淋巴细胞并显示其 EB 病毒核抗原，但其整个病毒周期并未完成，所以不能释出感染性病毒。当然在理论上亦不能排除转化性病毒 DNA 存在于杂交瘤上清液中的可能性。可是，病毒或病毒 DNA 易用敏感的 B 细胞转化试验或注入猴内可引起致死性结果的试验来检测。检出阳性者可采取措施进行灭活或从抗体制剂中

除去。另外一种措施是对人类 McAb 接受者检测其血清中的 EB 病毒抗体。大多数西方国家的成年人，因多已与传染性单核细胞增多症患者有过接触，EB 病毒抗体常为阳性。只有在极少数 X 性联的淋巴增殖性疾病患者，EB 病毒感染才构成对生命的威胁。所以目前已有一些患者接受了置于体内、对细胞不通透的小室内的人淋巴细胞杂交瘤（带有 EB 病毒）的治疗。

用于研究免疫性紊乱的机制及发病机制，少量的人类 McAb 已经足够，但用于治疗时，则常需大量的 McAb。如对革兰氏阴性细菌感染的被动免疫治疗，需要以克计的抗体。人-人杂交瘤虽有可能在裸鼠中生长，但产量未必比组织培养法高^[47]。但亦有报导人-鼠杂交瘤在裸鼠中产生大量 McAb^[49]。为此，必须进行大规模的组织培养。近年来采用的大量培养技术，包括：包裹的微球技术^[50]、空心毛细管技术^[51]，以及将产生单克隆抗体的基因克隆放在一般发酵设备中培养的细菌及酵母中生长。虽然已经提出了这些方法，但尚未有系统的报导及在大量生产中的实际应用。

六、人类抗体基因的克隆化

单克隆抗体实际上是一种特定的 Ig 重链或轻链基因表达的结果。人体内抗体分子的多样性是由多种机制决定的，其中包括 Ig 基因可变区中 100~1000 个基因的重排、插接及突变。近年来迅速发展起来的 DNA 重组技术可进行基因的剪切、拼接、转染及克隆等，为获得与创造更多的 McAb 开辟了新的途径。目前已有入 Ig 的主要类型及其亚型的基因克隆。克隆了的小鼠 Ig 轻链及重链基因曾转染到各种浆细胞瘤，并能分泌相应的 Ig。文献亦报导具有抗三硝基酚活性的小鼠 IgM 抗体基因已被克隆，并在一个非分泌性小鼠骨髓瘤中表达^[52]，说明通过基因克隆来扩大 McAb 的生产是完全可能的。生成特异性抗体的淋巴细胞或由此而来的杂交瘤是提供人类抗体基因以进行克隆化的良好材料。目前有许多实验室正在进行该项工作。

基因工程技术可用于人类单克隆抗体研究的多个领域，如：