

亲和素 – 生物素系统预定位 放免治疗的实验研究

李贵平¹ 朱承谟² 张 健³ 江旭峰²

1 (第一军医大学南方医院 广州 510515)

2 (上海第二医科大学瑞金医院 上海 200025)

3 (上海第二医科大学 上海 200025)

摘要 选用¹⁵³Sm 标记抗 CEA 单抗(McAb)和螯合 DTPA 生物素(DB₂),利用生物素化单抗 – 亲和素 – ¹⁵³Sm – DB₂ 的三步法在荷人结肠癌裸鼠模型中进行预定位放免治疗。以¹⁵³Sm – CEA McAb、¹⁵³Sm – mIgG、¹⁵³Sm – DB₂ 作为治疗对照组,100 μ L 生理盐水作为非治疗对照组,在移植瘤接种后的第 3 天实施治疗,采用单次较大剂量治疗(11.1MBq/每鼠),定期测量裸鼠的体重、血白细胞计数和肿瘤生长体积以及瘤块的组织病理学检查,观察肿瘤抑制效应及毒副作用。结果表明,预定位放免治疗与直接标记单抗放免治疗对肿瘤有明显的抑制作用,治疗第 5 周肿瘤抑制率分别达到 80.67%和 78.44%,组织病理学结果提示肿瘤组织呈坏死样改变,而正常脏器如肝、肾等未见损伤 治疗前后白细胞计数以¹⁵³Sm – CEA McAb 及¹⁵³Sm – mIgG 两组降低最为显著。提示预定位放免治疗具有低毒高效的治疗作用,较¹⁵³Sm – CEA McAb 具有更大的安全性。

关键词 预定位放免治疗,亲和素 – 生物素系统,¹⁵³Sm 标记物

中图分类号 R817.5

亲和素 – 生物素系统(Avidin – biotin system,ABS)预定位技术的研究始于 80 年代中期,其应用方法主要有两步法和三步法^[1]。其中三步法是在生物素化单抗注射后,用亲和素(Avidin,Av)作为‘追捕物’(Chaser)来清除循环中肿瘤未结合单抗,然后再给予核素标记生物素及其衍生物。三步法预定位技术中的第二步和第三步对所有研究均是通用的,而放射性标记生物素及其衍生物既可作为诊断用核素也可作为治疗用核素的载体。¹⁵³Sm 系镧系放射性核素,对放射免疫治疗具有极好的物理特性。它系 β 辐射体 [$E_{\max} = 640\text{keV}$ (30%), 710keV (50%)和 810keV (20%)],半衰期为 1.95d,并且还发射 103keV 的 γ 射线(28%),又适宜于 γ 显像。因此是目前令人瞩目的治疗用核素之一^[2]。本工作选用适合国内推广的既发射 γ 射线又发射 β 射线的核素¹⁵³Sm,以直接标记单抗作为对照,在荷人结肠癌裸鼠模型上实现三步法放免预定位治疗的实验研究。

1 材料和方法

1.1 试剂

抗 CEA 单抗(CEA McAb)及正常小鼠 IgG(mIgG),由上海市免疫学研究所制备;生物素活化酯(BNSH)、DTPA – 生物素素(DB₂)和亲和素(Av),Sigma 公司产品;链霉亲和素(Streptavidin,

第一作者 李贵平,男,1962 年 10 月出生,1999 年 7 月毕业于上海第二医科大学,影像医学和核医学专业,博士,主治医师

收稿日期 2000 – 04 – 24,修回日期 2000 – 07 – 13

SA),上海市静安区医学化验所提供; $^{153}\text{SmCl}_3$,中国原子能科学研究院产品。

1.2 标记方法和鉴定

1.2.1 抗 CEA McAb、正常小鼠 IgG 的生物素化(CEA McAb - Bt、mIgG - Bt) BNSH/DMSO 溶液滴加至 McAb 或 mIgG 的碳酸氢盐缓冲液(CBS)中,室温放置 1h,微量离心柱法纯化。间接 ELISA 法鉴定生物素活性,SDS - PAGE 测定生物素化单抗纯度。

1.2.2 抗 CEA McAb 与 DTPA 偶联物(CEA McAb - DTPA)的制备 用 DTPA 环酐法标记单抗,参照 Hnatowich 等^[3]的方法。配制 1mg/mL 的 cDTPAa 氯仿悬液于小瓶中,按 CEA McAb/DTPA 摩尔比 1:20 取 cDTPAa。用高纯度的氮气吹干,加 200 μg 的 CEA McAb(用 pH 8.2 的碳酸氢盐缓冲液配制),混匀后置于室温下振荡 1min,反应 15—20min,用乙酸终止反应。微量离心柱法纯化。

1.2.3 抗 CEA McAb 的 ^{153}Sm 标记(^{153}Sm - CEA McAb) 取纯化的 CEA McAb - DTPA 偶联物溶液 0.1mL,加入约 40MBq 的 $^{153}\text{SmCl}_3$ (比活度为 22.2GBq/mL),室温反应 20min,即得 ^{153}Sm - DTPA - CEA McAb 偶联物。30%三氯乙酸沉淀法测定标记率和放化纯度,间接 ELISA 法鉴定标记物的免疫活性。

1.2.4 DB₂的 ^{153}Sm 标记(^{153}Sm - DB₂) 用 1mol/L 醋酸钠将 DB₂ 配成浓度 2mg/mL,加入 ^{153}Sm ,室温放置 30min。薄层层析测定标记率和放化纯度,以硅胶薄层层析板作为支持物,展开剂为 85% 甲醇溶液。

1.3 荷人结肠癌裸鼠模型的预定位放免治疗

1.3.1 肿瘤动物模型 自行建立的裸鼠皮下可移植性人结肠癌模型。将瘤块组织剪成碎片,加入少许生理盐水,然后用针筒抽取少许(约 0.2mL),注入 4—5 周龄 BALB/C 裸鼠前肢皮下,12h 伤口愈合,接种肿瘤第 3 天进行治疗。

1.3.2 动物分组 采用单次较大剂量治疗。将荷瘤裸鼠随机分为 5 组,每组 5 只。A 组为三步预定位治疗组,尾静脉注射 100 μg CEA McAb - Bt,48h 后注射 80 μg Av,24h 再经腹腔内注射 11.1MBq/100 μL ^{153}Sm - DB₂。B、C、D 三组为治疗对照组,B 组腹腔内注射 ^{153}Sm - CEA McAb 11.1MBq/100 μL ,C 组腹腔内注射 ^{153}Sm - mIgG 11.1MBq/100 μL ,D 组腹腔内注射 ^{153}Sm - DB₂ 11.1MBq/100 μL 。E 组为非治疗对照组,腹腔内注射生理盐水 100 μL 。

1.4 肿瘤抑制效应的观察

1.4.1 肿瘤生长速度检测 采用双盲法,在治疗前后每周定时测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),按照 $V = 1/6\pi ab^2$ 的公式^[4] 计算肿瘤体积(cm^3)。并按下列公式计算肿瘤抑制率(IR)^[5]。

$$\text{IR}\% = [(\text{非治疗对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / \text{非治疗对照组肿瘤体积}] \times 100\%$$

1.4.2 组织病理学检测 治疗 5 周后处死实验裸鼠,分离肿瘤及裸鼠正常器官组织,称重后用 10% 福尔马林溶液固定,作常规病理检查。

1.5 毒副作用的观察

1.5.1 定期测量裸鼠体重 以末体重/初体重(FBW/IBW)作评价,当 FBW/IBW > 0.80 判断无毒性,FBW/IBW < 0.80 判断有毒性^[5]。

1.5.2 观察治疗前后白细胞计数的变化 治疗前后每周常规取血作白细胞计数,判断辐射对宿主造血功能的影响。

1.6 统计学分析

实验数据采用 t 检验处理。

2 结果

2.1 标记物

^{53}Sm -CEA McAb 比活度为 15.54GBq/mol ,放化纯度 $>95\%$,标记单抗的免疫活性 50% 左右。 ^{153}Sm -DB₂ 比活度为 37GBq/mmol ,与 SA 结合后放化纯度 $>95\%$ 。

2.2 各组肿瘤的生长抑制情况

2.2.1 各组肿瘤体积变化(表 1) 从表 1 可见,治疗第 1 周内,各组肿瘤体积无明显差异。治疗第 2 周后,预定位治疗组和标记单抗治疗组肿瘤生长开始减慢 第 5 周时的肿瘤体积明显小于非治疗对照组($P<0.001$)。此时 ^{153}Sm -mIgG 治疗对照组和 ^{153}Sm -DB₂ 治疗对照组也小于非治疗对照组($P<0.01$)。

表 1 各组肿瘤体积(mm^3)变化

Table 1 Tumor volum(mm^3) for various group

($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	鼠数 Number	给药时间/周 Time after injection/week				
		1	2	3	4	5
预定位治疗组 Pretargeting RIT	5	26.1 ± 8.9	$60.1 \pm 26.1^{1)}$	$124.2 \pm 47.4^{2)}$	$252.9 \pm 47.0^{2)}$	$429.9 \pm 75.9^{2)}$
^{53}Sm -McAb 组 ^{53}Sm -McAb	5	27.6 ± 12.8	$72.3 \pm 18.7^{1)}$	$156.8 \pm 28.3^{2)}$	$282.1 \pm 34.7^{2)}$	$479.7 \pm 53.4^{2)}$
^{53}Sm -mIgG 组 ^{53}Sm -mIgG	5	36.8 ± 24.0	110.9 ± 24.5	324.5 ± 68.4	823.6 ± 303.4	1562.0 ± 424.4
^{53}Sm -DB ₂ 组 ^{53}Sm -DB ₂	5	51.5 ± 25.9	111.9 ± 13.4	364.8 ± 62.5	922.7 ± 257.1	1690.9 ± 317.0
对照组 Control	5	59.6 ± 30.1	141.4 ± 44.6	409.8 ± 79.4	1097.2 ± 280.6	2224.6 ± 573.7

1)与对照组相比 $P<0.05$,2)与对照组相比 $P<0.01$
1) $P<0.05$ compared with control group;2) $P<0.01$ compared with control group

2.2.2 各组肿瘤生长抑制率(表 2) 从表 2 可见,预定位治疗组和标记单抗治疗组对肿瘤的生长有明显抑制作用,治疗后第 5 周肿瘤平均抑制率分别为 80.67% 和 78.44% ,而 ^{153}Sm -mIgG 和 ^{153}Sm -DB₂ 治疗对照组对肿瘤的抑制率分别为 29.78% 和 23.99% 。经统计学处理,前两组与后两组差异有非常显著性($P<0.01$)。

表 2 各治疗组肿瘤生长抑制率

Table 2 Inhibitory rate of tumor growth for various group

(%)

组别 Group		治疗后时间/周 Time after injection/week				
		1	2	3	4	5
预定位治疗组 Pretargeting RIT		56.38	57.50	69.69	76.95	80.67
^{53}Sm -McAb 组 ^{53}Sm -McAb		53.69	48.87	61.74	74.29	78.44
^{53}Sm -mIgG 组 ^{53}Sm -mIgG		38.25	21.57	20.81	24.94	29.78
^{53}Sm -DB ₂ 组 ^{53}Sm -DB ₂		13.59	20.86	10.98	15.90	23.99

注 前两组与后两组相比 P 均 <0.01
Note :Comparison - between first two groups and the two following groups $P<0.01$

2.2.3 治疗后组织病理学检查(图 1—3) 从图 1—3 可见,取接受¹⁵³Sm - CEA McAb 及三步预定位治疗后裸鼠的肿瘤组织,其组织病理学检查可见肿瘤组织呈坏死样改变,而正常脏器如肝、肾等未见损伤。

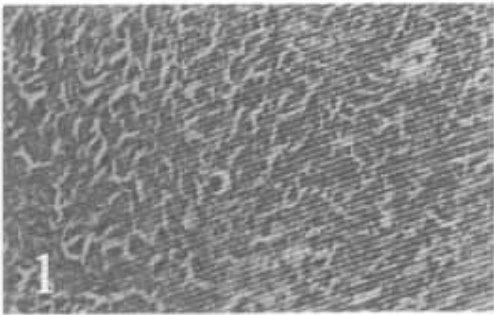


图 1 荷瘤裸鼠接受¹⁵³Sm - CEA McAb 治疗后肿瘤组织石蜡切片 HE 染色

Fig.1 HE staining of tumor tissue in nude mice bearing HCC received ¹⁵³Sm - CEA McAb RIT

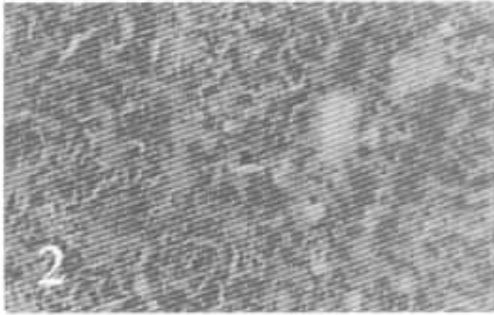


图 2 荷瘤裸鼠接受三步法预定位治疗后肿瘤组织石蜡切片 HE 染色

Fig.2 HE staining of tumor tissue in nude mice bearing HCC received pretargeting RIT

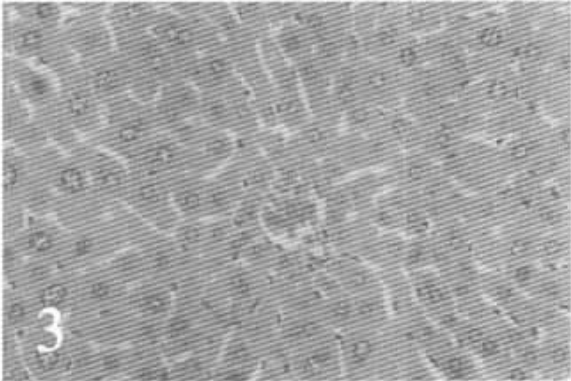


图 3 荷瘤裸鼠接受三步法预定位治疗后肝脏组织石蜡切片 HE 染色

Fig.3 HE staining of liver tissue in nude mice bearing HCC received pretargeting RIT

2.3 标记物的毒副作用评价

2.3.1 裸鼠白细胞计数 治疗前后每周检测外周血白细胞数,与非治疗对照组比较,¹⁵³Sm 各治疗组在治疗后 2 周内血白细胞总数均有不同程度的下降,并在第 5 周后渐恢复正常,其中尤以¹⁵³Sm - mIgG 治疗对照组和标记单抗治疗组血白细胞总数降低更甚,且恢复正常所需的时间更长。提示在该辐射剂量下对宿主的造血功能有抑制作用。

2.3.2 裸鼠体重测量 预定位治疗组及治疗对照组在治疗期间 FBW/IBW 均大于 0.80,说明所采用的剂量无毒性反应。

3 讨论

肿瘤放射免疫治疗(RIT)临床应用的最大障碍是肿瘤与标记抗体的结合率(% ID/g)低^[6]。药代动力学研究还表明,标记抗体在肿瘤内定位和从正常组织脏器(本底)清除相对缓慢,需要 24—48h 才能在肿瘤部位达到最大聚集,此时血循环中的抗体尚未完全清除,故 RIT 对放射性

敏感的骨髓具有剂量依赖性毒性作用,使治疗时投入的有效剂量受到限制^[7]。因此,提高肿瘤导向治疗效果的措施之一,是寻找能够降低周围血本底、提高肿瘤 T/NT 比值的方法,以减轻对周围造血系统的抑制,提高疗效。而亲和素 - 生物素系统 (ABS) 预定位技术的原理是将抗体和放射性核素分开给药,延长抗体在肿瘤细胞上的滞留时间,使肿瘤结合抗体与未结合抗体之比达最大值。目前该项技术已在临床上用于多种类型肿瘤的 RII 诊断,而且扩大到 RIT,并取得了一定成效^[1,8,9]。

本实验选用诊治兼用的放射性核素¹⁵³Sm,利用¹⁵³Sm 标记生物素的三步法预定位对裸鼠载瘤人结肠癌进行实验性预定位放免治疗,治疗实施的时间选择在接种肿瘤的第 3 天,以直接标记单抗作为对照,结果显示,三步法预定位治疗与直接标记单抗同样具有肿瘤抑制作用,应用 11.1MBq/鼠观察到肿瘤处于明显受抑状态,治疗第 5 周肿瘤的抑制率分别达到 80.67% 和 78.44%。这提示三步法预定位 RIT 具有较好的选择性,原因可能与早期肿瘤细胞数量较少,肿瘤抗原的异质性还不明显,对放射性比较敏感等。此外,¹⁵³Sm - mIgG 和¹⁵³Sm - DB₂ 也具有一定的杀肿瘤效应,治疗第 5 周其肿瘤抑制率分别为 29.78% 和 23.99%,这可能系非特异性杀伤作用。

采用单次较大剂量投入治疗,预定位治疗在产生抑瘤效应的同时未产生明显的毒副作用,裸鼠体重及外周血白细胞计数未见明显下降,而¹⁵³Sm - CEA McAb 和¹⁵³Sm - mIgG 则观察到外周血白细胞计数下降。这是因为 CEA McAb 和 mIgG 的¹⁵³Sm 标记物自腹腔注入后首先入血,循环中的¹⁵³Sm 标记物不能立即与瘤细胞结合,不但其免疫活性和放射性活度会随着时间的推移而较快降低,而且对非肿瘤组织的照射必然较强。而预定位技术则因不需要采用¹⁵³Sm 标记抗体,避免了抗体的免疫活性的损伤,标记物¹⁵³Sm - DB₂ 在血循环中滞留时间短,对肝和骨髓的损伤小,同时¹⁵³Sm - DB₂ 的快速清除有助于降低血本底,提高 T/NT 比值。与 RIT 比较,预定位 RIT 在产生明显肿瘤抑制效应的同时未产生造血系统抑制等明显的毒副作用,较¹⁵³Sm - CEA McAb 的 RIT 具有更大的安全性。因此,从文献报道和本研究的资料来看,预定位三步法 RIT 有可能发展成为一种有前景的肿瘤治疗方法。

参 考 文 献

- 1 Paganelli G, Magnani P, Zito F, *et al.* Cancer Res, 1991, **51** 5960—5966
- 2 Boniface G R, Izard M E, Walker K Z, *et al.* J Nucl Med, 1989, **30** 683—691
- 3 Hnatowich D J, Childs R L, Lanteigne D, *et al.* J Immunol Meth, 1983, **65** 147—157
- 4 Starling J J, Maciak S R, Law L K, *et al.* Cancer Res, 1991, **51** 2965—2972
- 5 甘润良,薛琼,江贤鹏,等. 中华消化杂志, 1998, **18**(3) 178—179
GAN Runliang, XUE Qiong, JIANG Xianpeng, *et al.* Chin J Dig, 1998, **18**(3) 178—179
- 6 Knox S J. Cancer Res, 1995, **55**(Suppl) 5832s—5836s
- 7 Goodwin D A. J Nucl Med, 1987, **28** 1358—1362
- 8 Magnani P, Paganelli G, Modorati G, *et al.* J Nucl Med, 1996, **37** 967—971
- 9 Fritzberg A R. J Nucl Med, 1998, **39**(2) 20N—36N

An experimental study of pretargeting radioimmunotherapy with avidin – biotin system

LI Guiping¹ ZHU Chengmo² ZHANG Jian³ JIANG Xufeng²

¹ (Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515)

² (Ruiji Hospital, Fudan University, Shanghai 200025)

³ (Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025)

Abstract

The aim of this work is to compare the toxicity and efficacy of three – step pretargeting radioimmunotherapy involving administration of a biotinylated anti – carcinoembryonic antigen (CEA) antibody, followed by avidin followed finally by ^{53}Sm labelled biotin with ^{53}Sm directly labelled anti – CEA monoclonal antibody (McAb). CEA McAb and DTPA – biocytin (DB_2) was labelled with ^{53}Sm using the bifunctional chelate cyclic diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) anhydride. Five groups of nude mice subcutaneously grafted with human colon carcinoma were treated 3 days after the graft. One group received the injection of $100\mu\text{g}$ McAb – Bt followed 2 days later by cold Av ($80\mu\text{g}$) and 11.1MBq ^{53}Sm – DB_2 after a further day. Four control groups were treated respectively with (1) 11.1MBq ^{53}Sm – CEA McAb, (2) 11.1MBq ^{53}Sm – mIgG, (3) 11.1MBq ^{53}Sm – DB_2 , (4) $100\mu\text{L}$ physiological sodium chloride solution. Toxicity was evaluated by change of body weight and number of leukocytes, and efficacy was evaluated by variation in tumor volume. Histological analysis of tumors were performed. The results showed that pretargeting RIT and ^{53}Sm – CEA McAb had a strong tumor inhibition effect. The inhibitory rates of tumor were 80.67% and 78.44% respectively, five weeks after therapy. Histopathological evidence indicated that in tumor tissues radioactive damage was seen as necrosis of tumor cells, while in the other tissues such as liver and kidney tissues no radioactive damage was observed. Leukocyte counts were significantly decreased after treatment in groups of ^{53}Sm – CEA McAb and ^{53}Sm – mIgG, which indicated that the haemopoietic function of bone marrow may be affected. It was concluded that three – step pretargeting radioimmunotherapy was as efficient as ^{53}Sm – CEA McAb but was markedly less toxic.

Key words Pretargeting – radioimmunotherapy, Avidin – biotin system, ^{53}Sm label

CLC R817.5