

铼-188 和平阳霉素联合导向治疗前列腺癌的体外作用

张 勇¹, 陈维真¹, 温星桥², 梁昌盛³, 刘长征³, 高 新²

(中山大学 1. 附属第三医院核医学科; 2. 附属第三医院泌尿外科; 3. 中山医学院, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】探讨前列腺特异膜抗原单克隆抗体 7E11C5.3 介导铼-188 和平阳霉素(PYM)导向治疗前列腺癌细胞系 LNCaP 的体外作用。【方法】以葡聚糖为中介体制备 7E11C5.3-PYM 偶联物,间接 ELISA 法测定免疫活性,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定抑菌活性。采用 2-巯基乙醇直接还原法制备 ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 标记物,纸层析法测定标记率和放化纯度,直线回归外推法测定免疫活性分数。四唑盐(MTT)法测定体外细胞毒作用。【结果】7E11C5.3-PYM 偶联物中 7E11C5.3 和 PYM 的克分子比为 1:54,偶联后单抗的免疫活性降低了 10%~20%,偶联物中 PYM 的抑菌活性为游离 PYM 的 25%。¹⁸⁸Re-7E11C5.3 的标记率为 93.16% ± 2.18%,放化纯度为 95.62% ± 0.48%,免疫活性分数为 74.86% ± 1.86%。7E11C5.3-PYM 和 ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 对 LNCaP 细胞的抑制作用分别强于游离 PYM 和 ¹⁸⁸ReO₄⁻;两者单独用药时,其半数抑制浓度(IC₅₀)分别为(10.17 ± 2.06) μg/mL 和 (23.38 ± 3.73) × 10⁴ Bq/mL;两者联合用药时,其 IC₅₀ 值分别为(1.83 ± 0.20) μg/mL 和 (6.82 ± 0.73) × 10⁴ Bq/mL。【结论】7E11C5.3-PYM 和 ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 联合用药对前列腺癌细胞的抑制作用显著强于单独用药。

关键词:前列腺肿瘤;前列腺特异膜抗原;铼-188;平阳霉素

中图分类号:R737.25

文献标识码: A

文章编号:1672-3554(2008)02-0159-04

Target Therapy Combined ¹⁸⁸Re with Pingyangmycin on Prostate Cancer Cells in Vitro

ZHANG Yong¹, CHEN Wei-zhen¹, WEN Xing-qiao², LIANG Chang-sheng³, LIU Chang-zheng³, GAO Xin²

(1. Department of Nuclear Medicine, 2. Department of Urology, The Third Affiliated Hospital; 3. The School of Preclinical Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the efficacy of monoclonal antibody 7E11C5.3-targeted therapy combined ¹⁸⁸Re with pingyangmycin for the treatment of human prostate cancer cell line LNCaP in vitro. 【Methods】 Linking between 7E11C5.3 and PYM was mediated by dextran T 40. Immunoreactivity of 7E11C5.3 was determined by indirect ELISA. Bacteria inhibitory activity of the conjugate was determined by TTC assay. ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 was prepared by direct 2-mercaptoethanol reduction method. Labeling efficiency and radiochemical purity was measured by paper chromatography. Immunoreactive fraction was determined by linear extrapolation. Cytotoxicity to LNCaP cells was determined by MTT assay. 【Results】 The molar ratio of 7E11C5.3:PYM was 1:54 in 7E11C5.3-PYM conjugate. The immunoreactivity of 7E11C5.3 decreased by approximately 10%~20% after conjugation. The bacteriostatic activity of PYM in the conjugate was 25% as much as that of free PYM. The labeling yield of ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 was 93.16% ± 2.18%, the radiochemical purity was 95.62% ± 0.48%, and the immunoactive fraction was 74.86% ± 1.86%. The inhibitory effect of 7E11C5.3-PYM and ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 on cultured LNCaP cells was significantly higher than that of free PYM and ¹⁸⁸ReO₄⁻ respectively. When separately used, the 50% inhibitory doses (IC₅₀) of 7E11C5.3-PYM and ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 were (10.17 ± 2.06) μg/mL and (23.38 ± 3.73) × 10⁴ Bq/mL respectively. When combined used, the IC₅₀s of 7E11C5.3-PYM and ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 were (1.83 ± 0.20) μg/mL and (6.82 ± 0.73) × 10⁴ Bq/mL respectively. 【Conclusions】 The combined use of 7E11C5.3-PYM and ¹⁸⁸Re-7E11C5.3 displayed higher inhibitory effect on prostate cancer cells than their separate use.

Key words: prostatic neoplasms; prostate specific membrane antigen; rhenium-188; pingyangmycin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(2):159-163]

收稿日期:2007-12-18

基金项目:广东省科技计划项目(2003B30103)

作者简介:张 勇(1968-),男,副主任医师,硕士生导师, E-mail: zy5040@163.com

对激素治疗耐药的前列腺癌(hormone refractory prostate cancer)是临床治疗中的难点^[1],对常规化疗也不敏感。导向化疗将单抗与化疗药物偶联,可以增强化疗药物的靶向性而提高疗效并降低毒性^[2],但对静止期肿瘤细胞疗效甚微;放射免疫治疗将单抗与放射性核素偶联,对静止期肿瘤细胞也能有效杀伤。因此,我们将导向化疗和放射免疫治疗联合应用于抗前列腺癌研究,选用放射性核素¹⁸⁸Re和化疗药物平阳霉素分别与前列腺特异膜抗原单克隆抗体7E11C5.3偶联,体外观察它们对前列腺癌细胞的联合导向治疗作用。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂

平阳霉素(PYM,哈尔滨博莱制药有限公司)、¹⁸⁸W-¹⁸⁸Re发生器(上海安盛科兴药业公司)、前列腺特异膜抗原单克隆抗体7E11C5.3(美国Cytogen公司)、正常鼠IgG(mIgG,Dako公司)、葡聚糖Dextran T-40(Pharmacia公司)、高碘酸钠(广州化学试剂厂)、硼氢化钠(Bayer公司)、2-巯基乙醇(2-ME,上海化学试剂总厂)、氯化亚锡(SnCl₂,广州化学试剂厂)、Sephadex G-25(Sigma公司)、RPMI-1640培养液(Gibco公司)、胎牛血清(Hyclone公司)、考马斯亮蓝G-250(上海源聚生物科技有限公司)、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体(北京中山生物技术公司)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,上海试剂三厂),其它为市售分析纯。

1.2 细胞

前列腺癌细胞株LNCaP购自北京大学泌尿外科研究所,用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液37℃、体积分数为5%CO₂开放培养,用0.05%胰酶(含0.02%EDTA)消化、传代。枯草杆菌由本校基础医学院微生物教研室提供。

1.3 单抗7E11C5.3与PYM的偶联

取Dextran T-40 0.25 g,高碘酸钠0.08 g溶于50 mL去离子水中,室温下搅拌2 h,去离子水透析16 h,冻干,得到多醛基葡聚糖(PAD);取PAD 5 mg与PYM 10 mg混合,4℃避光搅拌4 h,加入7E11C5.3 2.5 mg,继续反应13 h,最后加入0.1 mg的硼氢化钠,4℃搅拌2 h,终止反应;反应物经Sephadex G-25(1.0 cm×50 cm)纯化,测A₅₉₅值鉴定蛋白峰位,分别收集第一峰(7E11C5.3-PYM偶联物)和第二峰(游离PYM)^[3]。间接ELISA

法测定7E11C5.3-PYM偶联物的免疫活性^[4],TCC法测定偶联物中PYM的抑菌活性^[5]。

1.4 7E11C5.3-PYM偶联物中单抗和平阳霉素含量的计算

1.4.1 测定偶联物中单抗7E11C5.3的浓度 ①分别测定质量浓度为1 g/L的7E11C5.3和PYM在595nm处的吸光度A₅₉₅,结果表明PYM在595nm处的吸光度(A=0.005)远低于7E11C5.3(A=0.655),几乎无吸收。因此7E11C5.3-PYM偶联物的A₅₉₅几乎全部由7E11C5.3产生,PYM可忽略。②建立单抗7E11C5.3在595 nm处吸光度的标准曲线,测定第一峰洗脱液的A₅₉₅值,可查出偶联物中单抗的含量 $\rho_{7E11C5.3}$ (=0.32 g/L)^[3]。

1.4.2 测定偶联物中PYM的浓度 ①测定第一峰洗脱液在280 nm处的吸光度A_{7E11C5.3-PYM}(=0.649);②配置7E11C5.3质量浓度为0.0625~0.1 g/L的系列溶液,以生理盐水为空白对照,测定各溶液在280 nm处的吸光度,绘出标准曲线,作直线回归,其斜率即为7E11C5.3在280 nm处的百分吸光系数E^{1%}_{1cm}(14.1);根据公式 $A = E^{1\%}_{1cm} \times \text{光径}(1\text{cm}) \times \rho_{7E11C5.3}$ 可求出A_{7E11C5.3-PYM}中7E11C5.3所占的吸光度A_{7E11C5.3}(0.451);根据光吸收的加合性,A_{PYM}=A_{7E11C5.3-PYM}-A_{7E11C5.3}=0.649-0.451=0.198;③如上法求得PYM在280 nm处的百分吸光系数E^{1%}_{1cm}(7.6);同样根据公式 $\rho = A_{PYM} \div (E^{1\%}_{1cm} \times \text{光径})$ 可求出测定偶联物中PYM的浓度 ρ_{PYM} (0.26 g/L)^[6]。

1.5 ¹⁸⁸Re标记7E11C5.3

采用2-巯基乙醇直接还原法制备¹⁸⁸Re-7E11C5.3标记物,纸层析法测定标记率和放化纯度,直线回归外推法测定免疫活性分数^[7]。

1.6 ¹⁸⁸Re-7E11C5.3体外稳定性检测

取经Sephadex G-25纯化后的¹⁸⁸Re-7E11C5.3 100 μL,加入到2倍体积小牛血清中,37℃温育24 h,分别于1、4、12、24 h取样测定放化纯度。

1.7 免疫偶联物对前列腺癌细胞作用 的观察

采用MTT法取对数生长期的LNCaP细胞,以每孔5×10³个细胞种于96孔培养板上,培养48 h待贴壁后倾去培养液,加入以无血清1640倍比稀释的各组药物各200 μL/孔,每浓度设5个平行孔,对照孔加无血清1640 200 μL。培养1 h后吸去药物,加入新鲜培养液继续培养72 h,各孔加无血清1640配置的MTT(5 mg/mL) 20 μL,37℃孵育4 h,吸去上层培液,每孔加入DMSO 150 μL,室温轻摇至蓝色结晶完全溶解,全自动酶标仪

测 490 nm 吸光度。重复实验, 计算抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。各组药物如下: (1) 导向化疗组: ① 7E11C5.3-PYM; ② 游离 PYM。PYM 浓度均取 3.12、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 。(2) 放射免疫治疗组: ① ^{188}Re -7E11C5.3; ② ^{188}Re -mIgG; ③ $^{188}\text{ReO}_4^-$ 。放射活度均取 11.56、23.12、46.25、92.5、185 $\times 10^4$ Bq/mL。(3) 联合用药组: ① 7E11C5.3-PYM 0.78 $\mu\text{g/mL}$ + ^{188}Re -7E11C5.3 2.89 $\times 10^4$ Bq/mL (0.78 $\mu\text{Ci/mL}$); ②~⑤ 组分别取 7E11C5.3-PYM 1.56、3.12、6.25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 相应联合 ^{188}Re -7E11C5.3 5.78、11.56、23.12、46.25 $\times 10^4$ Bq/mL。

1.8 统计学处理

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 样本均数的比较采用 SPSS 8.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 7E11C5.3-PYM 偶联物的制备及鉴定

单抗 7E11C5.3 与 PYM 的偶联物经 Sephadex G-25 分离, 可获得两个峰 (图 1), 第一峰既有抗体活性, 又有抑枯草杆菌活性, 为 7E11C5.3-PYM 偶联物; 第二峰仅有抑菌活性, 为未与抗体结合的游离 PYM。偶联物中 7E11C5.3 (相对分子量约 100 k) 含量为 0.32 g/L, PYM 含量 (相对分子量 1.5 k) 为 0.26 g/L, 两者分子比为 1:54。ELISA 法检测偶

联物的抗体活性较偶联前下降了约 10%~20% (图 2)。TTC 法检测偶联物中 PYM 的抑菌活性约为标准 PYM 的 25%。

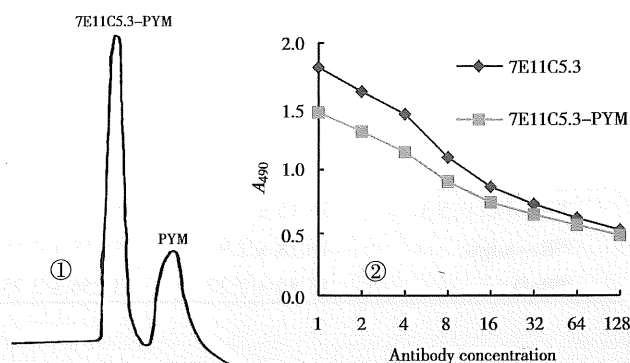


图 1 7E11C5.3 与 PYM 偶联反应物的分离

图 2 偶联前后 7E11C5.3 对 LNCaP 细胞抗原的免疫反应性

Fig. 1 Separation of 7E11C5.3-PYM conjugate

Fig. 2 Immunoreactivity of 7E11C5.3 with LNCaP cells before and after conjugation

2.2 7E11C5.3-PYM 偶联物对前列腺癌的细胞毒作用

7E11C5.3-PYM 及游离 PYM 对 LNCaP 细胞的细胞毒作用均呈剂量依赖性关系 (表 1), 其 IC_{50} 值分别为 $(10.17 \pm 2.06) \mu\text{g/mL}$ 和 $(30.01 \pm 5.22) \mu\text{g/mL}$ ($P=0.004$)。

表 1 MTT 法测定不同 PYM 浓度对 LNCaP 细胞的抑制率

Table 1 The inhibition rate of different PYM concentration on the proliferation of LNCaP cells measured by MTT assay (%)

Group	3.12 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
7E11C5.3-PYM	23.50 $\pm$ 1.58	43.12 $\pm$ 3.22	58.45 $\pm$ 4.19	70.26 $\pm$ 5.05	77.54 $\pm$ 5.88
Free PYM	9.96 $\pm$ 1.05	20.14 $\pm$ 1.36	36.20 $\pm$ 3.12	49.65 $\pm$ 4.05	56.32 $\pm$ 4.24

2.3 ^{188}Re -7E11C5.3 偶联物的制备及鉴定

单克隆抗体 7E11C5.3 经过 2-ME 还原, 在亚锡-柠檬酸酒石酸溶液中与 ^{188}Re 结合形成 ^{188}Re -7E11C5.3, 纸层析法测定其标记率为 $93.16\% \pm 2.18\%$, 放化纯度为 $95.62\% \pm 0.48\%$, 比活度为 $(286.74 \pm 6.16) \times 10^6$ Bq/mg; 在 37°C 下 2 倍体积的小牛血清中 1、4、12、24 h 的放化纯度分别为 95.85%、90.22%、85.46%、80.51%; 直线外推法测定其免疫活性分数为 $74.86\% \pm 1.86\%$, 直线回归方程为 $T/B = 1.3256 + 0.1531 \times 1/\rho$ 。

2.4 ^{188}Re -7E11C5.3 偶联物对前列腺癌的细胞毒作用

^{188}Re -7E11C5.3, ^{188}Re -mIgG 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 对 LNCaP 细胞均有杀伤作用, 且呈剂量依赖性关系 (表 2), 其 IC_{50} 值依次为 $(23.38 \pm 3.73) \times 10^4$ Bq/mL, $(59.21 \pm 8.02) \times 10^4$ Bq/mL 和 $(68.89 \pm 10.91) \times 10^4$ Bq/mL。统计学分析显示 ^{188}Re -7E11C5.3 的 IC_{50} 值显著低于 ^{188}Re -mIgG ($P=0.002$) 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ ($P=0.000$), ^{188}Re -mIgG 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 的 IC_{50} 值无显著差异 ($P=0.194$)。

2.5 7E11C5.3-PYM 和 ^{188}Re -7E11C5.3 联合用药对前列腺癌的细胞毒作用

^{188}Re -7E11C5.3 和 7E11C5.3-PYM 联合用药对 LNCaP 细胞的杀伤作用也呈剂量依赖性关系, ①~

⑤组的抑制率 (%) 分别为: 18.77 ± 1.16 、 45.82 ± 2.52 、 69.14 ± 4.54 、 87.85 ± 5.66 、 96.66 ± 1.35 , 联合用药时 ^{188}Re -7E11C5.3 的 IC_{50} 值为 $(6.82 \pm 0.73) \times 10^4 \text{ Bq/mL}$, 7E11C5.3-PYM 的 IC_{50} 值为 $(1.83 \pm 0.20) \mu\text{g/mL}$, 分别低于它们单独用药时的 IC_{50} 值 $(23.38 \pm 3.73) \times 10^4 \text{ Bq/mL}$ ($P=0.002$) 和 $(10.17 \pm 2.06) \mu\text{g/mL}$ ($P=0.002$)。

表 2 MTT 法测定不同放射性浓度(Bq/mL)对 LNCaP 细胞的抑制率 (%)

Table 2 The inhibition rate (%) of different radioactivity (Bq/mL) on the proliferation of LNCaP cells measured by MTT assay

Group	A/(Bq·mL ⁻¹)				
	11.56×10 ⁴	23.12×10 ⁴	46.25×10 ⁴	92.5×10 ⁴	185×10 ⁴
^{188}Re -7E11C5.3	36.15 ± 1.94	50.14 ± 3.10	64.03 ± 3.33	76.62 ± 4.51	83.38 ± 5.65
^{188}Re -mIgG	18.28 ± 1.91	35.18 ± 2.45	50.24 ± 2.26	61.04 ± 2.31	66.82 ± 2.82
$^{188}\text{ReO}_4^-$	16.50 ± 2.27	33.56 ± 2.75	46.45 ± 3.24	58.17 ± 2.91	61.21 ± 2.92

3 讨论

前列腺特异膜抗原(PSMA)被认为是导向诊断和导向治疗前列腺癌最有意义的靶蛋白^[9],其单抗 7E11C5.3 已被美国 FDA 批准应用于临床显像诊断前列腺癌转移病灶^[9]。PYM 是临床常用的广谱抗癌抗生素,对前列腺癌细胞有较强的生长抑制作用^[10,11]。 ^{188}Re 具有良好的核物理与生物学特性,既适合内照射治疗又可显像。因此,我们采用 PYM 和 ^{188}Re 标记 7E11C5.3,探讨其联合治疗前列腺癌的效果。

本研究采用 MTT 法比较了 3 组药物对 LNCaP 的抑制作用,第 1 组是 7E11C5.3-PYM 与游离 PYM 比较,第 2 组是 ^{188}Re -7E11C5.3 与 ^{188}Re -mIgG 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 比较(mIgG 是对 LNCaP 的无关抗体),结果显示,7E11C5.3-PYM 和 ^{188}Re -7E11C5.3 对前列腺癌细胞的抑制作用分别强于游离 PYM 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$,表明单抗可以增强药物对肿瘤细胞的杀伤作用。第 3 组是 7E11C5.3-PYM 和 ^{188}Re -7E11C5.3 联合用药与各自单独用药的比较,结果显示,联合用药时各药的 IC_{50} 值明显减少,表明联合用药具有低剂量、高疗效的优点,其可能机制:①内照射治疗和化疗的双重作用,加强疗效;②PYM 是放疗增敏剂,增加了前列腺癌细胞对 ^{188}Re 治疗的敏感性。

由于偶联反应对抗体和 PYM 的活性影响较大,本文是将 ^{188}Re 和 PYM 分别与 7E11C5.3 进行偶联,如果能进一步摸索出较为理想的方法将 ^{188}Re 直接标记到 7E11C5.3-PYM 上,制备成放射免疫化学治疗剂,其抑癌效果应会进一步增强。

参考文献:

- [1] 张 勇,陈维真,梁昌盛,等. 舒拉明联合 *bcl-2* 基因反义寡核苷酸对前列腺癌细胞增殖的影响 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2003,24(3s):37-39.
- [2] 甄永苏. 单克隆抗体药物治疗肿瘤的研究现状与展望 [J]. 中国医学科学院学报, 2000,22(1):9-13.
- [3] Manabe Y, Tsubota T, Haruta Y, et al. Production of a monoclonal antibody-bleomycin conjugate utilizing dextran T-40 and the antigen-targeting cytotoxicity of the conjugate [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1983,115(3):1009-1014.
- [4] 戴 垚,贾 兵,王 凡,等. 抗 IV 型胶原酶单抗在人肺癌裸鼠移植模型中的免疫显像 [J]. 癌症, 2003, 22(12):1243-1248.
- [5] 刘小云,尚伯扬,刘秀均,等. 应用平阳霉素与单克隆抗体 Fab 片段偶联物抑制肝癌生长与肿瘤肝转移 [J]. 中华医学杂志, 2001,81(4):201-204.
- [6] Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a mono-clonal antibody drug conjugate [J]. Clin Cancer Res, 2004,10(20):7063-7070.
- [7] 张 勇,陈维真,卢汉平,等. ^{188}Re 标记抗人前列腺癌单克隆抗体及其在荷瘤裸鼠体内的放射性分布 [J]. 核技术, 2007,30(8):699-701.
- [8] Armstrong AJ, Carducci MA. Advanced prostate cancer: the future [J]. Can J Urol, 2005, 12(s2): 42-47.
- [9] Keane TE, Rosner IL, Wingo MS, et al. The emergence of radioimmunosintigraphy for prostate cancer [J]. Rev Urol, 2006, 8(Suppl 1):S20-28.
- [10] 常喜华,王金国,单纯玉,等. 电脉冲化疗治疗人前列腺癌裸鼠移植瘤 [J]. 中华实验外科杂志, 1999,16(6): 510-511.
- [11] 常喜华,王金国,夏勇,等. 电脉冲化疗对人前列腺癌细胞系 PC-3M 的体外作用 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(2):86-88.