

¹³¹I-Anti-c-erb2 免疫导向治疗卵巢癌的实验研究

张丙忠, 王 静, 沙孝珍, 林仲秋

(中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】观察放射性核素标记针对癌蛋白为靶点的单克隆抗体载体体外对卵巢癌细胞的抑制作用。【方法】应用氯胺 T 法将 ¹³¹I 和抗 c-erb2 单克隆抗体标记, 取不同浓度的 ¹³¹I-Anti-c-erb2 与 SKOV3 细胞共同培养, MTT 法检测其对 SKOV3 细胞生长的抑制作用。【结果】体外单抗浓度为 22.20 mg/L 时, ¹³¹I-Anti-c-erb2 的相对抑制率为 64.85%, 可以明显抑制 SKOV3 细胞, 未标记的抗 c-erb2 单抗的相对抑制率为 3.40%, 对 SKOV3 细胞的生长几乎没有抑制作用。【结论】¹³¹I-Anti-c-erb2 能够有效抑制肿瘤细胞的生长, 适合应用于卵巢癌的免疫导向治疗。

关键词: 卵巢肿瘤; 免疫导向治疗; 单克隆抗体

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)02-0135-03

The Experimental Study of Radioimmunotherapy on Ovarian Carcinoma Using ¹³¹I Anti-c-erb2 McAB

ZHANG Bing-zhong, WANG Jing, SHA Xiao-zhen, LIN Zhong-qiu

(Department of Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen university, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To observe the effect of anti-oncoprotein monoclonal antibody labeled with radio isotope ¹³¹I on ovarian carcinoma cells.【Methods】Anti-c-erb2 monoclonal antibody was labeled with ¹³¹I using Chloramine-T. SKOV3 cells were cultured with ¹³¹I-Anti-c-erb2. The inhibition was detected with MTT.【Results】When the monoclonal antibody concentration was 22.20 mg/L, the relative inhibition rate of ¹³¹I-Anti-c-erb2 was 64.85%. It could inhibit the growth of SKOV3 cells, on the contrary, the relative inhibition rate of anti-c-erb2 without ¹³¹I was 3.40%, it could hardly inhibit the growth of SKOV3 cells *in vitro*.【Conclusion】¹³¹I-Anti-c-erb2 can effectively inhibit the growth of tumor cells and might be suitable to be used in immune target-therapy.

Key words: ovarian neoplasm; immune target therapy; monoclonal antibody

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(2): 135 - 137]

卵巢癌是妇科肿瘤中死亡率最高的疾病, 由于多种客观因素的存在导致卵巢癌的治疗效果欠佳。近年来许多新的化疗药物的出现, 一定程度上提高了化疗的效果, 但是卵巢癌总的 5 年生存率仍然徘徊在 20% ~ 30%^[1]。因此, 探讨其他治疗方法的意義就显得尤为突出。本研究以癌基因 c-erb2 表达的蛋白 p185 蛋白作为治疗的靶点, 选用放射性同位素 ¹³¹I 标记针对 p185 蛋白的单抗, 观察其在体

外对卵巢癌细胞的杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 卵巢癌细胞株

在 2002 年 5 月 ~ 2003 年 5 月, 选取我院库存的 SKOV3 细胞株为靶细胞, 来源于卵巢黏液性囊腺癌, 每个细胞表面有大约有 10⁶ 个 HER2 受体表

收稿日期: 2003-09-09

基金项目: 广东省科委攻关基金资助项目(A000099029)

作者简介: 张丙忠(1968 -)男, 安徽宿州人, 博士, 讲师, 林仲秋, 教授, 通讯作者。

达^[2]。培养液为 RPMI1640 完全培养液。

1.2 抗 c-erbB2 单抗

P185 蛋白 购自 Sigma 公司。小鼠免疫球蛋白 购自北京鼎国生物技术发展中心。氯胺 T 购自 Sigma 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 抗体的 ¹³¹I 标记采用氯胺 T 法 纸层析法 计算标记率、放化学纯度以及放射性浓度,公式如下:

$$\text{标记率} = \frac{A \text{ 段放射线计数} - \text{本底}}{A \text{ 段放射线计数} + B \text{ 段放射线计数} - 2 \times \text{本底}} \times 100\%$$

$$\text{放射化学纯度} = \frac{A \text{ 段放射线计数} - \text{本底}}{A \text{ 段放射线计数} + B \text{ 段放射线计数} - 2 \times \text{本底}} \times 100\%$$

$$\text{放射性浓度} = \frac{\text{放射性活度 (Bq)}}{\text{样品体积 (mL)}}$$

1.3.2 标记物免疫活性的测定 SKOV3 细胞繁殖到对数生长期,制成 1×10^8 个细胞/L 的细胞悬液。取 1 mL 细胞悬液加入试管,再加入 1×10^5 cpm 的 ¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2)Mab 或 ¹³¹I-nmIgG 混匀。测放射线计数(T)。在 37 °C 细胞培养箱中孵育 6 h。将细胞悬液离心 1 000 r/min × 10 min (r = 15 cm), 弃去上清,测沉淀物的放射性计数(B)。标记抗体的免疫结合率:

1.3.3 对体外培养的 SKOV3 细胞的抑制效果 MTT 法,设 3 组:¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2) Mab 组、¹³¹I-nmIgG 组、(ANTI-c-erbB-2)Mab 组,按倍比稀释

设 5 个浓度梯度,分别为 2.22×10^9 Bq/L、 1.11×10^9 Bq/L、 0.56×10^9 Bq/L、 0.28×10^9 Bq/L、 0.14×10^9 Bq/L。设 3 个空白对照孔。每个浓度设 3 个重复孔。取 170 μL 的细胞悬液(2×10^4)接种于 96 孔板上,37 °C 体积分数 5% CO₂ 培养 24 h。将 ¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2)Mab 与 ¹³¹I-nmIgG 过滤消毒后给药,每孔加入 100 μL。培养 6 h,吸出药物,再加入培养基 200 μL,继续培养 48 h。然后加入 MTT 溶液 10 μL,培养 4 h。吸去上层培养液,加入 100 μL DMSO 液,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。全自动酶标仪测定各孔 A₄₉₂,计算相对抑制率:

$$\text{相对抑制率} = \frac{\text{对照组 } A_{492} \text{ 均值} - \text{实验组 } A_{492}}{\text{对照组 } A_{492} \text{ 均值}} \times 100\%$$

并根据每次的相对抑制率求出半数抑制浓度(The 50% inhibition doses, IC₅₀)。

2 结果

抗体的 ¹³¹I 标记率:79.6% ~ 83.2%;放化纯度:93.1% ~ 96.6%;放射性浓度: 2.22×10^9 ~ 0.14×10^9 Bq/L。¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2)Mab 的免疫结合率为 41.7% ~ 49.8%,¹³¹I-nmIgG 免疫结合率为 3.5% ~ 7.4%。不同浓度各组药物对 SKOV3 细胞的抑制作用见表 1,各组药物的 IC₅₀ 的比较结果见表 2。

表 1 不同浓度下各组药物对 SKOV3 细胞的抑制效果

The inhibition effect on SKOV3 cells among each group in different concentration

Relative inhibition rate (%)	Concentration of radioactivity(× 10 ⁹ Bq/L)			[concentration of antibody(mg/L)]	
	2.22[100]	1.11[50]	0.56[25]	0.28[12.5]	0.14[6.35]
¹³¹ I-(ANTI-c-erbB-2)Mab	64.8 ± 2.5	53.1 ± 1.7	43.7 ± 1.5	34.7 ± 1.6	29.4 ± 1.4
¹³¹ I-nmIgG	25.0 ± 1.8	15.8 ± 1.7	10.0 ± 2.6	5.3 ± 1.4	0.8 ± 0.4
(ANTI-c-erbB-2)Mab	3.4 ± 3.0	2.4 ± 1.6	1.9 ± 1.3	0.89 ± 1.2	10.14 ± 0.95

表 2 各组药物 IC₅₀ 的比较
comparison of IC₅₀ among each group

Group	¹³¹ I-(ANTI-c-erbB-2)Mab (× 10 ⁹ Bq/L)	¹³¹ I-nmIgG (× 10 ⁹ Bq/L)	(ANTI-c-erbB-2)Mab (mg/L)
IC ₅₀	0.874 ± 0.101	Unable to reach	Unable to reach

3 讨论

HER2/neu 基因(又名 c-erbB2 基因)是位于人第 17 号染色体 q11-22 位的原癌基因,癌基因的产物为 p185 蛋白,属 I 类受体酪氨酸激酶(RTK)超家族,且在结构上与 EGFR 非常相似,被认为可能是一种未明确的生长因子受体。正常组织上皮细胞可

低水平表达 HER2/neu 基因,有助于信号细胞正常生长增殖。当 HER2/neu 基因过度表达时,胞膜上 P185 蛋白数量增加,异质二聚体形成增加,细胞信号传递系统会过度活化,从而导致细胞增殖失控,发生癌变。抗 c-erbB2 单抗与 P185 蛋白亲和力较高,可以抑制 P185 蛋白与 RTK 超家族的其他成员发生交联形成二聚体,减弱细胞生长信号的传递;通过诱导 P27^{KIP1} 和 RB 相关蛋白 p130,大量减少 S 期的细胞,下调细胞表面 P185 蛋白,减少血管内皮生长因子的产生,介导对过度表达 HER2/neu 基因的肿瘤细胞的抗体依赖性细胞毒作用等^[3-9]。

本实验选用氯胺 T 法把 ¹³¹I 标记到 (ANTI-c-erbB-2) MAb 上。¹³¹I 因为标记方法简单,在 RIT 中使用最为广泛。¹³¹I 可发射 β 、 γ 两种射线, β 射线可造成细胞 DNA 的损伤,阻碍 DNA 的复制及其重要生命功能的完成,最终导致细胞生长抑制和死亡。 γ 射线可以以后被用来观察标记单抗与卵巢癌移植瘤结合情况。本实验的标记率为 79.6% ~ 83.2%,标记物稳定,经纯化后放射化学纯度可达 93.1% ~ 96.6%。证明氯胺 T 法有很强的实用性。nmIgG 是正常鼠 IgG,对 SKOV3 细胞的结合没有特异性。本实验免疫活性测定显示:¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2) MAb 与 SKOV3 细胞的免疫结合率明显高于 ¹³¹I-nmIgG。证明 ¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2) MAb 能以较高的结合率与 SKOV3 细胞特异性结合,¹³¹I 的氯胺 T 标记法对抗体活性影响不大。

MTT 实验,本实验在给药后设定了 6 h 的孵育时间,让抗体与 SKOV3 细胞上的抗原充分结合,再将未结合的药物吸去,排除未结合的 ¹³¹I 标记物对结果的干扰。实验表明:¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2) MAb 和 ¹³¹I-nmIgG 均有抑制 SKOV3 细胞生长的作用,而且 ¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2) MAb 的抑癌作用远远大于 ¹³¹I-nmIgG,随着放射性浓度的升高,这种抑制作用逐渐加强,而 ANTI-c-erbB-2 MAb 对肿瘤细胞几乎没有抑制作用。实验结果提示:采用以癌基因表达的蛋白作为作用靶点的单克隆抗体在体外可以一定程度上抑制肿瘤细胞的生长,但效果不好。分析原因可能有以下几点:①这种鼠源单抗不能阻止 P185 蛋白与其它 RTK 超家族成员形成异二聚体,下调 P185 蛋白的表达,因此不能抑制癌细胞生长信号传递系统的过度激活。②抗体对肿瘤的杀伤作用部分是通过抗体依赖性细胞毒作用或引起补体

介导的细胞溶解作用达到。在体外培养状态下缺乏效应细胞和补体,使抗体无法发挥作用。同样的抗体标记了 ¹³¹I 以后,在实验中观察到抑制肿瘤细胞增长的效果良好,其原因除了与免疫结合有关以外,放射性同位素也起了一定的作用。实验中,各组药物是以相同的放射性剂量按一定的浓度梯度给药,它们对肿瘤细胞生长抑制率的不同,事实上就是由于不同抗体和 SKOV3 细胞免疫结合力的差异,导致结合到肿瘤细胞上的 ¹³¹I 的量不同所造成的结果。

总之,¹³¹I-(ANTI-c-erbB-2) MAb 可与 SKOV3 细胞表面抗原 P185 蛋白特异性结合,能够将 ¹³¹I 固定到肿瘤部位,杀伤肿瘤细胞,适合以后作为免疫导向治疗的药物。针对癌基因的表达产物癌蛋白为作用靶点的免疫导向治疗有乐观的应用前景。

参考文献:

- [1] Muto M G, Kassis A I. Monoclonal antibodies used in the detection and treatment of epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer*, 1995, 76(10 suppl): 2016-27.
- [2] Horak E, Hartmann F, Garmestani K. Radioimmunotherapy targeting of HER2/neu oncoprotein on ovarian tumor using Lead-212-DOTA-AE1 [J]. *J Nucl Med*, 1997, 38(12): 1944-50.
- [3] 夏梦综述,刘凤英,张志胜. Herceptin 治疗妇科恶性肿瘤的机制及应用前景 [J]. *国外医学妇产科学分册*, 2000, 27(5): 206-9.
- [4] 曾益新. *肿瘤学* [M]. 北京:人民卫生出版社, 1999. 43-4.
- [5] 赵丽纯,李佳莉,朱迅. 以 HER2/neu 为靶点抗肿瘤治疗研究进展 [J]. *国外医学遗传学分册*, 2002, 25(1): 33-6.
- [6] 牛建昭,王 建. HER2、BRCA1、c-myc 在卵巢癌研究方面的进展 [J]. *解剖学报*, 2000, 31(S): 5-8.
- [7] 储大同. 肿瘤生物治疗的新热点—细胞、分子靶向性药物的发展 [J]. *中国新药杂志*, 2002, 11(4): 285-8.
- [8] 周爱萍,冯奉仪. 乳腺癌靶向治疗: herceptin 的研究进展 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2000, 27(3): 167-70.
- [9] Zum-Buschenfelde C M, Hermann C, Schmidt B, *et al*. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(8): 2244-7.

(编辑 张恩健)