

· 实验研究 ·

¹³¹I-抗 VEGF 单克隆抗体在荷人骨肉瘤裸鼠体内生物学分布系统给药与局部给药之比较

熊伟, 陈璟, 饶耀剑, 潘艾玲, 吴华

【摘要】 目的: 研究¹³¹I-抗 VEGF 单克隆抗体(Sc-7269)在荷人骨肉瘤裸鼠体内生物分布, 探讨¹³¹I-Sc-7269 用于骨肉瘤放射免疫治疗的可行性, 并比较系统给药与局部给药在生物学分布上的差异。方法: Iodogen 法¹³¹I 标记 Sc-7269。24 只荷人骨肉瘤裸鼠各 12 只分别瘤内注射和静脉注射¹³¹I-Sc-7269, 进行生物分布研究。结果: 2 种给药方式中,¹³¹I-Sc-7269 均可在肿瘤组织内特异性聚集。局部给药后肿瘤组织的放射性摄取在各个时间点明显高于系统给药, 而其他组织的放射性摄取明显低于系统给药组。结论:¹³¹I-Sc-7269 具有靶向骨肉瘤的特性, 且局部给药较系统给药在体内生物学分布上具有明显优越性。

【关键词】 骨肉瘤; 放射免疫疗法; 抗体, 单克隆; 生物学

【中图分类号】 R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2005)06-0539-03

Experimental Study on Biodistribution of ¹³¹I-Labeled Anti-VEGF Monoclonal Antibody in Human bone Sarcoma Xenograft: System Administration Compared with Local Administration XIONG Wei, CHEN Jing, RAO Yao-jian, et al. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, P. R. China

【Abstract】 **Objective:** To explore the feasibility of radioimmunotherapy of human bone sarcoma xenograft with ¹³¹I anti VEGF monoclonal antibody (Sc-7269) through studying the biodistribution of ¹³¹I-Sc-7269 in human bone sarcoma xenograft and to compare the difference of system administration and local administration. **Methods:** Sc-7269 was labeled with ¹³¹I by the Iodogen method. 24 nude mice bearing human bone sarcoma xenografts were used for the biodistribution study after intratumoral injection (n=12) or intravenous injection (n=12) of ¹³¹I-Sc-7269. **Results:** ¹³¹I-Sc-7269 could selectively aggregate in tumor, whatever approach was used. And compared with systemic administration, local administration of ¹³¹I-Sc-7269 produced prolonged higher tumor radioactivity with lesser normal tissue uptake. **Conclusion:** ¹³¹I-Sc-7269 has a considerable targeting activity, and local administration is preferable in biodistribution.

【Key words】 Osteosarcoma; Radioimmunotherapy; Antibodies, monoclonal; Biology

肿瘤新生血管的形成是肿瘤生长的必备条件^[1], 在调节肿瘤新生血管形成的诸多细胞因子中, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)发挥核心作用^[2]。抗肿瘤血管生成已成为继化疗和放疗之后最有前途的肿瘤治疗策略。一系列实验表明^[3], 许多肿瘤细胞(包括骨肉瘤)及肿瘤组织血管中 VEGF 存在过量表达。这为利用抗 VEGF 单克隆抗体作为载体运载放射性核素进行靶向治疗提供了可能。本文旨在研究¹³¹I-抗 VEGF 单克隆抗体(Sc-7269)在荷人骨肉瘤裸鼠体内生物学分布, 并比较系统给药与局部给药在生物学分布上的区别, 为进一步运用¹³¹I-Sc-7269 放射免疫治疗荷人骨肉瘤裸鼠模型的实验研究奠定基础。

材料与方法

1. 细胞系、实验动物及主要试剂和仪器

MG63 为人骨肉瘤细胞系(武汉大学中国典型培养物保藏中心提供)。BLAB/c 裸小鼠 24 只, 由华中科技大学同济医学院动物学部提供, 鼠龄 4~5 周, 体重 18~20 g, 雌性。鼠抗人血管内皮生长因子单克隆抗体(Sc-7269)为 Santa cruz 公司产品。Na¹³¹I(无还原剂、无载体)由中国原子能研究院提供。Iodogen(四氯二苯基甘脒)为美国 Sigma 公司产品。JHS-7 井型测量仪由合肥众成机电技术开发有限责任公司提供。使用 GE 公司 MillenniumTM VG 型双探头 SPECT 仪显像。

2. 荷人骨肉瘤裸鼠动物模型的建立

将对数生长期的 MG63 细胞经胰酶消化、洗涤后用不含血清的培养液制备成 5×10⁶ ml 个细胞悬液,

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨外科(熊伟、饶耀剑), 核医学科(陈璟、潘艾玲、吴华)
作者简介: 熊伟(1973-), 男, 湖北武汉人, 博士, 主治医师, 主要从事骨肿瘤及脊椎外科的诊断与治疗工作。

取 0.2 ml (1×10^6 个细胞) 在无菌条件下注射于裸鼠的右后肢根部皮下(在注射前 24h 裸鼠接受 5Gy 的全身照射)。待肿瘤长至 1.0 cm \times 1.5 cm 时将其处死, 无菌条件下摘取皮下瘤体并剪成 0.1 cm \times 0.1 cm \times 0.1 cm 大小的瘤块。用含 20% 胎牛血清的 PRMI-1640 液清洗后, 将瘤块塞入套管针头部腔内, 然后让塞有瘤块的套管针穿刺至裸鼠右后肢根部皮下, 并潜行一小段后用针芯将针腔内的瘤块推至皮下(在种植前 24 h 裸鼠接受 5Gy 的全身照射)。待肿块生长至 0.8~1.0 cm 时备用。

3. Sc-7269 的 ^{131}I 标记

采用 Iodogen 法标记 Sc-7269: 将 100 μl Iodogen 溶解于 100 μl 氯仿溶液中制成 Iodogen 溶液; 取 10 μl Iodogen 溶液置于反应管中, 旋转蒸发后在试管底部内壁形成一层均匀的氯甘脲膜, 涂管在 -20°C 下保存。在涂有 Iodogen 10 μl 的试管中依次加入 0.5 mol/l、pH 7.6 的磷酸盐缓冲液 150 μl , Sc-7269 40 μg , Na^{131}I 111MBq。充分混匀后在室温下反应 15 min。其间温和地震荡数次, 加入 1% KI 50 μl 终止反应。反应液滴加于预先经 PBS (10 mol/l, pH 7.4) 平衡、2% 牛血清白蛋白液淋洗饱和的 Sephadex G-25 层析柱上, 用 10 mmol/l、pH 7.4 的 PBS 洗脱层析柱, 通过自动部分收集器收集洗脱液, 流速每管 1.0 ml/5 min。共收集 40 管, 每管取 10 μl , 在井型 γ 测量仪上分别进行放射性测量 (cPm 值)。以试管编号为横坐标, 对应试管的 cPm 值为纵坐标, 绘制洗脱曲线。标记产物的标记率、放射浓度按下列公式计算:

$$\text{标记率} = \frac{\text{蛋白峰各管放射性计数的总和}}{\text{蛋白峰加游离峰放射性计数之和}} \times 100\%$$

$$\text{放射浓度} = \frac{\text{投入的 } ^{131}\text{I} \text{ 总量} \times \text{标记率}}{\text{蛋白峰收集液总 ml 数}}$$

采用直接薄层层析 (ITLC) 法测定该标记产物的放射化学纯度: 取分离纯化后的标记产物 (^{131}I -Sc-7269) 5.0 μl , 在 ITLC-SG 层析条 (1.5 cm \times 10.0 cm) 距一端 1.5 cm 的原点处点样, 点样直径不能超过 0.5 cm, 用正丁醇: 醋酸: 水 = 4: 1: 5 的展开剂进行上行层析至层析条顶部 1 cm 处, 将层析条于室温下晾干。自原点起将层析条剪成 1 cm 长的单个条带, 按顺序分别置于井型 γ 测量仪上测放射性计数, 绘制条带编号-计数曲线。

4. ^{131}I -Sc-7269 免疫活性的鉴定^[4]

首先用含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 人源 VEGF (Sc 4570) 的碳酸盐缓冲液 (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9.6) 于 4°C 下包备 ELISA 板过夜。之后每孔加入 100 μl 含 1% BSA 的 PBS 封闭, 然后用含 0.1% Tween 80

的 PBS 冲洗 3 次。将放射性标记的 Sc-7269 稀释至 10 ng/ml 加入每孔中, 室温下反应 2 h。孵育后弃去未结合的抗体用含 0.1% Tween 80 的 PBS 冲洗 3 次, 结合的抗体溶解于 0.2M NaOH 中, γ 测量仪检测加入每孔中的总放射性计数及每孔结合标记抗体的放射性计数。 ^{131}I -抗 VEGF McAb 免疫活性按下列公式计算 (实验重复 3 次)

$$\text{标记抗体的免疫活性} = \frac{\text{结合标记抗体的放射性计数}}{\text{加入的总放射性计数}}$$

5. ^{131}I -Sc-7269 在荷人骨肉瘤裸鼠体内生物学分布

24 只荷瘤裸鼠在接种细胞 2 周以后进行实验, 在实验前 4d 在裸鼠饮水中加入 1% 碘化钾以封闭甲状腺。24 只裸鼠随机分为 2 组: 系统给药组和局部给药组。分别自尾静脉注射 (12 只) 或瘤体内均匀注射 (12 只) ^{131}I -Sc-7269 约 0.74MBq, 定期观察裸鼠生长情况。在注射后 24、48、72、96 h 各时相点各组分别随机取 3 只裸鼠戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉。摘眼球取血, 取肿瘤、肝、肺、心、肾、肠、脾、膀胱、甲状腺及对侧大腿肌肉等组织。电子天平称重并在井型 γ 测量仪测量各组织每分钟的放射性计数。同时将同等注射剂量的放射性标记物按不同浓度稀释, 于同等条件下测定其放射性计数, 获得注射剂量的总放射性计数。

统计学分析: 数据统计分析采用 SPSS 11.0, 计量资料均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并采用 One-Way ANOVA 方差分析。

结 果

Iodogen 法标记 Sc-7269, 经 Sephadex G-25 层析柱分离纯化后, 采用 ITLC 法测定放射化学纯度为 $90.5\% \pm 3.03$ ($n=3$)。

^{131}I -Sc-7269 的免疫活性: ELISA 法检测 ^{131}I -Sc-7269 免疫活性 24、48、72 h 分别为 92.4%、90.8% 和 90.2%。

系统给药后 ^{131}I -Sc-7269 在荷人骨肉瘤裸鼠体内生物学分布: 系统给药后 24h 各组织的放射性为最高, 随着时间的推移而逐渐降低。除了 24 h 肾脏的 %ID/g 高于肿瘤外, 其余组织在各个时间点 %ID/g 均较肿瘤低。

局部给药后 ^{131}I -Sc-7269 在荷人骨肉瘤裸鼠体内生物学分布: 局部给药后肿瘤组织的放射性摄取明显较其他组织多, 其他组织的放射性摄取均低于 5% ID/g, 而且随着时间的延长逐渐减少。

讨 论

放射免疫治疗是利用单克隆抗体或抗体源性试剂

运载治疗用核素到达肿瘤局部而对肿瘤进行内照射,其技术的关键在于选择合适的载体及治疗用核素,其实施的基础为核素能与载体稳定的结合及放射免疫复合物能在体内生物学分布中具有靶向性。本研究中所用载体抗 VEGF 单克隆抗体(Sc-7269)是一种针对 VEGF-A 的人鼠嵌合型 IgG 型单克隆抗体。Lee 等^[3]对 30 例骨肉瘤标本的研究表明,VEGF(主要是 VEGF165、VEGF189、VEGF121)在骨肉瘤组织中过量表达,而且表达强度与肿瘤血管的丰富程度及预后有密切联系,这说明 VEGF 在骨肉瘤的形成、发展及转移中发挥巨大作用。上述事实从理论上提示将 Sc-7269 应用于骨肉瘤的放射免疫治疗是可行的。目前国内外利用 VEGF 或抗 VEGF 抗体做载体进行放射免疫显像的研究亦刚刚起步。本研究结果证实系统和局部给药后,肿瘤部位的放射性滞留均较其它脏器高,这说明¹³¹I-Sc-7269 无论哪种给药方式均能在肿瘤组织中特异性聚集。

本研究所用的核素为一种能发射 β 射线的非金属核素¹³¹I,¹³¹I 常用的标记抗体的方法^[5]有氯胺 T 法、Iodogen 法等。本研究中采用 Iodogen 法有如下优点:①使碘化反应更为简便;②只在固相表明进行氧化反应,减少了氧化剂对标记物的损伤程度,从而达到较高的标记率。在本研究中经纯化后标记率为 90.5%±3.03,体外免疫活性检测¹³¹I-Sc-7269 免疫活性 24、48 和 72 h 为 92.4%、90.8%、90.2%,说明利用 Iodogen 法标记的¹³¹I-Sc-7269 在体外有较高的标记率及较好的稳定性。

目前放射免疫治疗采用的给药方式有系统给药和非系统给药(如瘤内注射、鞘内注射等)。由于系统给药存在给药方便,无需定位技术、简便等优点,故已被大多数研究者所采用。然而系统给药后由于①肿瘤抗原表达的异质性;②肿瘤组织内异常的组织间压成为阻止放射免疫复合物(radioimmunoconjugates, RICs)与肿瘤细胞结合的生理屏障,因而 RICs 更多积聚在肿瘤周围;③肿瘤抗原表达不充分;④抗原从肿瘤细胞上脱落,进入血循环中和注入体内的 RICs 结合从而减少到达肿瘤组织的 RICs 量;⑤抗体亲和力低等导致肿瘤对 RICs 的摄取较少、T/NT 值低,只有 0.01% 的剂量能被每克肿瘤组织所摄取^[6]。也因此伴随着放射免疫复合物的 T/NT 值低、对正常组织及造血系统有较大不良反应^[7]。本研究系统给药组肿瘤组织对放射免疫复合物的摄取在 24 h 达高峰,同时肝、脾、肾、血液等血流灌注丰富的器官中放射免疫复合物的摄取

也较高,也充分反映出系统给药的前述缺点。为了克服系统给药的上述缺点,人们进行了局部给药的实验研究,结果发现局部给药能显著提高肿瘤组织对放射免疫复合物的摄取,有效提高 T/NT 值,减少对正常组织及造血系统有较大不良反应,在有效时间内对肿瘤组织投射更多的放射性剂量,发挥更大杀瘤效应^[8]。本次生物学分布实验表明,局部给药后肿瘤的 %ID/g 在各个时间点明显高于系统给药后肿瘤的放射性摄取,而其他组织对放射性的摄取明显低于系统给药组,肝、脾、肾、血液等血流灌注丰富的器官的 %ID/g 各个时间点均 < 4%,证实了局部给药较系统给药能对肿瘤组织投射更多的放射性剂量,发挥治疗作用时间更长,而且对正常组织的不良反应更小。但其显著效果还需动物实验进一步证实。同时需要指出的是局部给药需特殊的技术进行准确定位,此外放射免疫复合物能否在肿瘤组织内达到均匀分布,局部注射后核素会否从针道泄漏及如何根据肿瘤大小、性质选择合适载体和核素等问题还需更深入研究。

参考文献:

- [1] Folkman J. Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and other Disease[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.
- [2] Senger DR, Van de Water L, Brown LF, et al. Vascular Permeability Factor (VPF, VEGF) in Tumor Biology[J]. Cancer Metastasis Rev, 1993, 12(3-4): 303-324.
- [3] Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, et al. Cell-Retained Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) are Correlated with Poor Prognosis in Osteosarcoma[J]. Eur J Cancer, 1999, 35(7): 1089-1093.
- [4] Bakir MA, Eccles SA, Babich JW, et al. C-ErbB2 Protein Overexpression in Breast Cancer as a Target for PET Using Iodine-124-Labeled Monoclonal Antibodies[J]. J Nucl Med, 1992, 33(12): 2154-2160.
- [5] 刘长征, 王浩丹, 胡雅儿. 实验核医学与核药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 78-81.
- [6] Vriesendorp HM, Quadri SM, Williams JR. Radioimmunoglobulin Therapy. In: High-Dose Cancer Therapy [M]. Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992. 84-123.
- [7] Devys A, Kraeber-Bodere F, Chatal JF. Biodistribution and Pharmacokinetics of Radiolabelled Antibodies. Cancer Radioimmunotherapy: Present and Future [J]. London: Harwood Academic Publishers, 1999. 51-72.
- [8] Riva P, Franceschi N, Riva N, et al. Role of Nuclear Medicine in the Treatment of Malignant Gliomas, the Locoregional Radioimmunotherapy Approach[J]. Eur J Nucl Med, 2000, 27(5): 601-609.

(收稿日期: 2004-05-12 修回日期: 2004-07-29)