

^{188}Re -Herceptin放免导向治疗鼻咽癌裸鼠模型的实验研究

近年来, HER2/neu基因过表达的蛋白P185HER2已成为肿瘤单抗靶向治疗的新靶点。Herceptin是一种针对过表达P185HER2蛋白肿瘤细胞的人源化单克隆抗体。目前的研究已证明HER2/neu蛋白在鼻咽癌有过表达, 体外实验已显示Herceptin可以抑制HER2/neu蛋白过表达的癌细胞(包括鼻咽癌细胞株)的生长[1][2][3], 提示放射性标记抗HER2/neu单抗有可能用于鼻咽癌的治疗[4]。

目前放免治疗(radioimmunotherapy, RIT)通常使用发射射线的放射性核素治疗癌灶, 而 ^{188}Re 被认为是用于RIT较理想的一种治疗型放射性核素, 其物理半衰期为16.9 h, 射线能量为2.12 MeV, 同时还发射155 keV的射线, 适合于体外显像[5]。本实验选择诊治兼用的 ^{188}Re 标记Herceptin, 研究 ^{188}Re -Herceptin对高表达HER2/neu基因的鼻咽癌荷瘤裸鼠肿瘤的导向治疗, 以探讨 ^{188}Re 标记Herceptin作为鼻咽癌化疗和放免治疗双重治疗药物的可行性。

1 材料与方法

1.1 荷瘤裸鼠模型的建立

体外培养的鼻咽癌细胞株CNE-2Z及BALB/C裸鼠(4周龄, 均为雄性)由中山大学肿瘤研究所提供。CNE-2Z在培养瓶铺满后, 用0.25%胰蛋白酶消化, 制成 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液。在裸鼠腋下接种细胞悬液0.2 ml, 观察肿瘤的生长情况, 二周后在无菌条件下取形成的肿瘤组织, 切成1~2 mm³的小块, 经含青链霉素的Hanks液洗4次, 用眼科剪剪碎, 按等体积接种于裸小鼠腋下。

1.2 单克隆抗体的标记及其免疫活性的测定

Herceptin(由Roche公司提供)系一种针对细胞膜外区HER2/neu受体的人源性抗P185HER2单抗。Herceptin的 ^{188}Re 的标记方法采用直接还原法[6], 方法如下: 室温条件下, 0.2 ml单抗醋酸缓冲液(pH5.2)中加入5 000倍(摩尔比)过量的2-巯基乙醇(2-ME)处理0.5 h, Sephadex G-50柱分离, 测D280, 收集预处理后的抗体。在纯化的还原抗体溶液中加入溶解于葡萄糖酸钠溶液的 SnCl_2 和0.2~1.0 ml的 ^{188}Re 淋洗液(中国原子能研究院提供, 185~370 MBq), 室温条件反应2 h, 完成标记。标记抗体经Sephadex G-50柱纯化, 经0.22 μm 的微孔过滤器过滤除菌。 ^{188}Re -Herceptin比活度为335 MBq/mg, 纸层析法测标记率>90%, 放化纯度>95%, 经体外细胞结合分析法测定 ^{188}Re 标记Herceptin的免疫活性分数为63%。

1.3 荷瘤裸鼠的分组及给药

37只荷瘤裸鼠随机分为5组, 除非治疗对照组为5只外, 其余各组均为8只。具体分组如下: ①A组: 非治疗对照组, 瘤内注射生理盐水50 μl ; ②B组: 单纯核素组, 瘤内注射 ^{188}Re 11.1 MBq/50 μl ; ③C组: 标记正常小鼠IgG组(^{188}Re -nmIgG), 瘤内注射 ^{188}Re -nmIgG 11.1 MBq/50 μl ; ④D组: ^{188}Re -Herceptin静脉给药组, 静脉注射 ^{188}Re -Herceptin 11.1 MBq/50 μl ; ⑤E组: ^{188}Re -Herceptin瘤内注射组, 瘤内注射 ^{188}Re -Herceptin 11.1 MBq/50 μl 。

1.4 标记抗体在荷瘤裸鼠体内的分布

给药2 d后，除非治疗对照组外，每组处死裸鼠3只，分离肿瘤组织，取血及各主要脏器，称重，用 γ 计数仪测量放射性计数，校正后结果以每克组织放射性占总注入放射性的百分比(%ID/g)表示，计算肿瘤与非肿瘤组织放射性之比(T/NT)。

1.5 荷瘤裸鼠的放免治疗

上述各组于实验开始时连续观察各组肿瘤的体积变化，并且定期测量裸鼠的体质量。以精密卡尺每周定时测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b)，连续观察4周。肿瘤体积按公式 $V=(1/6)\pi ab^2$ 算出，肿瘤生长抑制率计算公式为 $R=(\text{非治疗对照组体积}-\text{治疗组体积})/\text{非治疗对照组体积}\times 100\%$ 。

治疗观察期结束后处死实验裸鼠，分离肿瘤及裸鼠肝、脾、肾等脏器，称重后用10%福尔马林溶液固定，石蜡常规包埋、切片，4℃保存备用，供作常规病理检查。

2 结果

2.1 放射性标记物组织放射性分布

如图1、2所示，给药2 d后， ^{188}Re -Herceptin瘤内注射组中肿瘤组织放射性摄取为11.53%ID/g，是 ^{188}Re -Herceptin静脉注射组的4倍(2.79%ID/g)，而血、肝、肾等正常组织摄取均 $<1\%$ ID/g，明显低于 ^{188}Re -Herceptin静脉注射组($>1.5\%$ ID/g)。而 ^{188}Re -nmIgG瘤内注射组和 ^{188}Re 瘤内注射组肿瘤组织和正常组织的放射性摄取相差不大，约为1%ID/g。

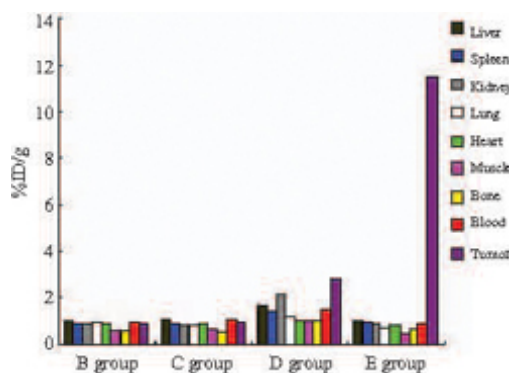


图1 荷瘤裸鼠各脏器放射性核素分布

Fig.1 Percent of injected dose per gram of tissue (%ID/g) in tumor-bearing nude mice 48 h after administration

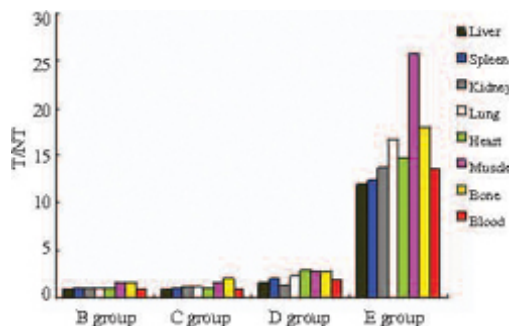


图2 注射放射性药物后48 h荷瘤裸鼠T/NT比值

Fig.2 T/NT ratios in the tumor-bearing nude mice 48 h after administration

2.2 ^{188}Re -Herceptin对鼻咽癌裸鼠动物模型的作用

在治疗期间观察到各组裸鼠体重呈逐渐增长；与非治疗对照组比较，治疗结束时各治疗组裸鼠体质量经统计学分析无显著差异，治疗期间各组裸鼠均无死亡，表明投入11.1 MBq的 ^{188}Re -Herceptin用于导向放免治

疗时无明显毒性作用。

2.3 ^{188}Re -Herceptin对鼻咽癌裸鼠动物模型的放免治疗效果

各组裸鼠的移植瘤体积生长动态变化和肿瘤生长抑制率结果见图3、4。如图3所示，给药后A组(生理盐水瘤内注射组)生长最快，B组(^{188}Re 瘤内注射组)及C组(^{188}Re -nmIgG瘤内注射组)次之，D组(^{188}Re -Herceptin静脉给药组)及E组(^{188}Re -Herceptin瘤内注射组)最慢。统计学分析表明第1周各组肿瘤体积无显著差异，自第2周开始D组及E组肿瘤体积显著小于前3组，此2组各时期肿瘤体积与前3组相比均有显著差异($P < 0.05$)。自第2周开始E组肿瘤体积还显著小于D组($P < 0.05$)。给药后A、B、C 3组间各时期肿瘤体积无明显差异。图4显示，自第2周起D、E两组抑制率明显高于B、C两组($P < 0.05$)，其中E组又明显高于D组($P < 0.05$)。

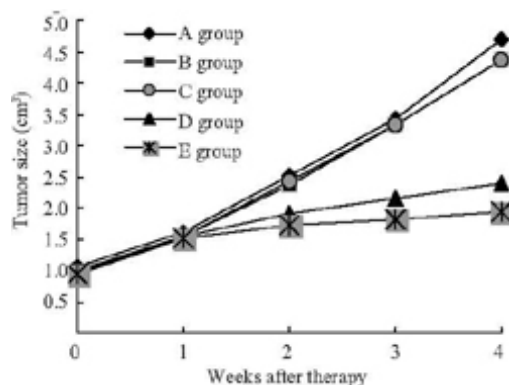


图3 各组给药前后荷瘤裸鼠模型肿瘤生长情况比较
Fig.3 Transplant tumor growth curves before and after therapy

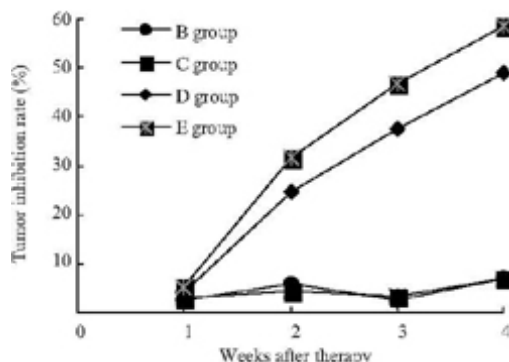


图4 各治疗组给药后荷瘤裸鼠模型肿瘤生长抑制率比较
Fig.4 Transplant tumor growth inhibition rate curves before and after therapy

2.4 组织病理学检查结果

苏木精-伊红染色，可见在B、C两组肿瘤细胞生长良好，镜下呈典型的癌细胞形态。而在D、E两组则出现肿瘤细胞核固缩、核碎裂等退变、坏死现象，部分区域肿瘤组织全部坏死、溶解形成液化囊肿。在实验治疗结束时处死裸鼠检查其他脏器，未发现明显的辐射损伤。

3 讨论

肿瘤的RIT导向治疗成功与否取决于肿瘤靶抗原及相应单抗的选择、放射性核素的选择以及肿瘤病灶的大小。单抗的选择主要是考察该单抗与肿瘤靶抗原结合的特异性和亲和力，而且应选择本身就具有抗肿瘤作用的单抗。HER2/neu受体是表皮生长因子受体(EGFR)家族的第2号成员，在许多上皮肿瘤中过度表达，尤其是乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、非小细胞肺癌和鼻咽癌等[2][7][8]。HER2/neu介导的癌形成作用和肿瘤组织中的高水平表达及它的细胞表面定位使得这个癌蛋白成为一个理想的抗肿瘤治疗靶点，而Herceptin则是针对

HER2/neu癌基因表达蛋白P185HER2的人源化单抗,因此选择放射性标记的抗HER2/neu抗体可以用于肿瘤的治疗[7][8][9]。治疗用放射性核素应选择射程短的 β 或 α 辐射体,这样可保持单抗对抗原的特异性,杀伤抗原表达阳性的肿瘤细胞,同时对周围远处的正常细胞无损害作用。 ^{188}Re 具有优良的核物理性能,它发射155 keV的 γ 射线适于放免显像,同时还发射2.12 MeV的 β 射线用于放免治疗,因而是当前较理想的治疗用放射性核素[5][10]。生物学分布研究表明,其高铼酸盐在各脏器吸收较少并很快地通过尿排泄,在人体内的生物半衰期小于10 h,不会对人体造成严重的辐射损伤,因而有可能在肿瘤的治疗方面起到很好的作用[5]。

目前,放疗是治疗鼻咽癌最有效的方法,但患者5年生存率一直徘徊在50%~60%之间[11]。因此,寻找一种能明显提高鼻咽癌治疗效果的方法成为目前研究鼻咽癌的工作重点。目前,放免治疗已用于淋巴瘤、黑色素瘤、肝癌、结肠癌等实体瘤方面的治疗,并取得了较好的疗效[12][13][14]。但有关鼻咽癌放免治疗的研究报道较少,在当前缺乏适宜的鼻咽癌单抗的情况下,作者选用基因工程技术制备人源化单抗Herceptin,结果显示 ^{188}Re -Herceptin具有良好的导向性, ^{188}Re -Herceptin瘤内给药组瘤/血比值达13.57(图2),提示 ^{188}Re -Herceptin是HER2/neu癌基因过表达鼻咽癌治疗的理想导向药物载体。在上述分布实验的基础上,我们又采用单次较大剂量的 ^{188}Re -Herceptin对鼻咽癌进行RIT治疗,结果表明 ^{188}Re -Herceptin对鼻咽癌裸鼠移植瘤有较强抑制作用,在11.1 MBq的剂量下,瘤内给药对鼻咽癌裸鼠移植瘤抑瘤效果优于静脉给药,分析可能有如下原因:(1) ^{188}Re 标记抗体直接与肿瘤细胞结合,减少了吸收及血液循环对其放射活性及免疫活性的影响;(2) 高浓度抗体标记物直接进入肿瘤组织,可增加标记单抗肿瘤内的浓聚,增强肿瘤细胞受照射的剂量,使更多的肿瘤细胞被杀伤,提高肿瘤的导向治疗效果,从而更大量地接受核素内照射;(3) 瘤内给药能避免血中游离抗原的封闭作用及网状内皮系统对标记抗体的非特异吸附。

本研究结果表明,采用瘤内注射 ^{188}Re -Herceptin导向治疗HER2/neu过度表达的鼻咽癌具有很好的放免导向性,具有高效低毒的治疗效应,为临床鼻咽癌的导向诊断与治疗的临床应用提供了可靠的理论依据,并提示了瘤内注射给药途径的优越性。

参考文献:

- [1]顾康生, 吴秋良, 候景辉, 等. HER-2/neu基因在鼻咽癌中的表达及其临床意义[J]. 癌症, 2001, 20(8): 869-72.
- [2]Gu KS, Wu QL, Hou JH, et al. HER-2/neu expression and clinical significance in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin J Cancer, 2001, 20(8): 869-72.
- [3]Roychowdhury DF, Tseng A, Fu KK, et al. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma: tumor angiogenesis and C-erbB-2 expression[J]. Cancer, 1996, 77(8): 1419-26.
- [4]Yazici H, Altun M, Alatli BA, et al. c-erbB-2 gene amplification in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Invest, 2000, 18(1): 6-10.
- [5]Kotts CE, Su FM, Leddy C, et al. ^{188}Re -labeled antibodies to p185^{HER2} as HER2-targeted radioimmunopharmaceutical agents: comparison of physical and biological characteristics with ^{125}I and ^{131}I -labeled counterparts[J]. Cancer Biother Radiopharm, 1996, 11(2): 133-44.
- [6]Iznaga-Escobar N. ^{188}Re -direct labeling of monoclonal antibodies for radioimmunotherapy of solid tumors: biodistribution, normal organ dosimetry, and toxicology[J]. Nucl Med Biol, 1998, 25(5): 441-7.
- [7]Griffiths GL, Goldenberg DM, Knapp FF, et al. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with generator-produced rhenium-188 for radioimmunotherapy: labeling and animal biodistribution studies[J]. Cancer Res, 1991, 51(17): 4594-602.
- [8]De Santes K, Slamon D, Anderson SK, et al. Radiolabeled antibody targeting of the HER-2/neu oncoprotein[J]. Cancer Res, 1992, 52(7): 1916-23.
- [9]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): 2154-60.

[9]Horak E, Hartmann F, Garmestani K, et al. Radioimmunotherapy targeting of HER2/neu oncoprotein on ovarian tumor using lead-212-DOTA-AE1[J]. J Nucl Med, 1997, 38(12): 1944-50.

[10]Callahan AP, Rice DE, Knapp FF. Rhenium-188 for therapeutic applications from an alumina-based tungsten-188/rhenium-188 radionuclide generator[J]. Nuc Compact Eur Am Commun Nucl Med, 1989, 20(1): 3-6.

[11]Okita J, Hatta C, Terada T, et al. Concurrent chemoradiotherapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. Auris Nasus Larynx, 2004, 31(1): 43-7.

[12]Behr TM, Liersch T, Greiner-Bechert L, et al. Radioimmunotherapy of small-volume disease of metastatic colorectal cancer: results of a phase II trial with the iodine-131-labeled humanized anti- carcinoembryonic antigen antibody hMN-14[J]. Cancer, 2002, 94 (Suppl): 1373-81.

[13]Goldenberg DM. Eighth conference on radioimmunodetection and radioimmunotherapy of cancer. Introduction[J]. Cancer, 2002, 94(Suppl 4): 1193-5.

[14]Kinuya S, Yokoyama K, Izumo M, et al. Feasibility of ¹⁸⁶Re- radioimmunotherapy for treatment in an adjuvant setting of colon cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129 (11): 392-6.

(责任编辑: 宋建武)