

血卟啉-赫赛汀光敏免疫偶联物的制备及光敏免疫疗法研究

陈璐, 罗荣城, 李黎波, 严晓, 丁雪梅(南方医科大学南方医院肿瘤中心, 广东广州 510515)

摘要:目的 制备光敏剂血卟啉(HP)-单克隆抗体赫赛汀的光敏免疫偶联物,并观察偶联物对 BT-474 人乳腺癌细胞的杀伤及凋亡作用。方法 以碳二亚胺为缩合剂,化学制备 HP-赫赛汀光敏免疫偶联物。给予波长 630 nm 激光照射后,用 MTT 法、FCM 检测比较免疫偶联物和游离 HP 对 BT-474 人乳腺癌细胞的杀伤及凋亡作用。结果 含同剂量 HP 的偶联物较游离 HP 对 BT-474 细胞的杀伤及凋亡效果明显增强($P<0.05$)。结论 成功制备 HP-赫赛汀光敏免疫偶联物,该偶联物对 BT-474 人乳腺癌细胞的杀伤作用强于游离 HP。

关键词:光敏免疫疗法;血卟啉;赫赛汀;光敏免疫偶联物;BT-474;乳腺肿瘤

中图分类号:R979.1;R737.9 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)03-0355-03

Preparation of hematoporphyrin-herceptin photoimmunogonjugate for photoimmunotherapy

CHEN Lu, LUO Rong-cheng, LI Li-bo, YAN Xiao, DING Xue-mei

Center of Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To prepare photoimmunoconjugate of hematoporphyrin (HP) and herceptin, and study its killing and apoptosis-inducing effect on tumor cells BT-474. **Methods** HP-herceptin photoimmunoconjugate was synthesized with EDCI as the condensator. After exposure of the cells to 630 nm laser, the killing effect of the conjugate and cell apoptosis were evaluated by MTT assay and flow cytometry. **Results** Compared with free HP at equivalent dose, the immune reactivity, killing effect and the apoptosis-inducing effect of HP-herceptin immunoconjugate on BT-474 cells was enhanced ($P<0.05$). **Conclusion** The killing effect of HP-herceptin immunoconjugate is stronger than free HP on BT-474 cells.

Key words: photoimmunotherapy; hematoporphyrin; herceptin; photoimmunoconjugate; BT-474 cells; breast neoplasms

光动力疗法是一种正在发展中的治疗恶性肿瘤的新型治疗手段,临床上已用于多种肿瘤的治疗,但由于光敏剂组织选择性差,常易引起光毒性反应。为了减轻不良反应,选用能与肿瘤细胞特异性结合的单克隆抗体为载药工具,将光敏剂和抗体进行化学链接,由抗体进行导向,使光敏剂与特定肿瘤细胞进行特异性结合,达到靶向给药的目的,提高治疗的依从性^[1-3]。本研究选用赫赛汀为特异性抗体,光敏剂血卟啉(HP)为模药,制备 HP-赫赛汀免疫偶联物并对其杀伤效应进行细胞学评价,旨在为其进一步的临床应用研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 主要试剂 血卟啉注射液(重庆华鼎现代生物制药公司生产),单克隆抗体赫赛汀(上海罗氏公司生产),碳二亚胺(EDCI)、二抗 Biotin-G、三抗 Streptavidin-HRP、四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品,凋亡试剂盒 Annexin V-FITC Kit 购自晶美公司。其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 Sephadex G-25 葡萄糖凝胶柱(广州展晨生物科技有限公司),UNICAM UA500 紫外分光光度计(英国 Thermo Spectronic 公司),酶标仪(Bio-Rad 550 型),流式细胞仪(FACS Becton Dickinson FACS Calibur 型)。

1.1.3 光源 DIOMED630 型半导体激光治疗机(英国激光仪器有限公司生产),激光波长为 630 nm。

1.1.4 细胞系 BT-474 人乳腺癌细胞系购自于北京协和医科大学基础研究室。

1.2 光敏免疫偶联物 HP-赫赛汀的制备与纯化

参照文献方法^[4]。在含有适量浓度 EDCI 水溶液的反应瓶中,依次加入 HP、DMF 和单抗,室温搅拌反应 2 h 后,加乙醇胺终止反应,持续搅拌 30 min 即可。将反应产物装入透析袋,4℃条件下,0.001% PBS 液(pH 7.4)透析至 PBS 液呈无色。透析后的产物经 G-25 葡萄糖凝胶柱层析,0.001% PBS 液洗脱、收集,即得纯化后的偶联物。整个实验过程均需避光操作。

1.3 HP-赫赛汀中 HP 和赫赛汀含量的测定

精密量取浓度为 5 mg/ml 的 HP 注射液适量,用 0.001% PBS 液稀释为 1、3、5、7、9 μg/ml 的对照品溶液,以其最大吸收波长 367.5 nm 为测定波长。HP 溶液的浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,得回归方程: $Y=0.2136X-0.1206$ ($R^2=0.9991$),结果表明 HP 在 1~9 μg/ml 浓度范围内线性关系良好。同法配制赫赛汀溶

收稿日期:2005-10-22

作者简介:陈璐,女,在读硕士研究生,主要研究方向为肿瘤生物治疗
通讯作者:罗荣城,男,教授、博士生导师,南方医院副院长兼肿瘤中心主任,中国临床肿瘤协作中心常委

液,得回归方程: $Y=2.1274X+0.0052$ ($R^2=0.9992$), 结果表明赫赛汀在 0.022~0.11 mg/ml 浓度范围内线性关系良好。运用双波长法计算偶联物中 HP 及赫赛汀含量,并按公式计算偶联物中 HP 和赫赛汀的摩尔比: $HP/赫赛汀 = (HP \text{ 浓度} \times 200000) / (赫赛汀 \text{ 浓度} \times 600)$ 。

1.4 抗体活性测定

间接 ELISA 法测定。抗原包被酶标板孔,4℃过夜,10% FCS-PBS 液满孔封闭,孵育。洗板后依次加入待测样品(一抗),倍比稀释,二抗、三抗作用,最后加入邻苯二胺(OPD)底物 50 μl/孔,室温避光放置 15 min 后,用 2 mol/L H₂SO₄ 50 μl 终止反应,酶标仪上测定 D₄₉₂ 值。

1.5 红细胞溶血试验

参照《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》。

1.6 杀伤效应测定

1.6.1 MTT 法 取对数生长期的 BT-474 细胞,用培养液制成浓度为 1×10⁵ 个/ml 的单细胞悬液,100 μl 接种于 96 孔培养板中,贴壁。设单纯 HP、单纯赫赛汀、HP-赫赛汀偶联物 3 个实验组和空白阴性对照组,分别用培养基稀释到所需浓度加入孔中,HP 浓度为 5~40 g/L,每孔 100 μl,每组设 3 复孔,避光培养 1 h,洗涤后再加入每孔 100 μl 培养基,继续培养。1 h 后,给予 630 nm 激光照射,照射剂量为 10 J/cm,时间 20 min。激光照射后立即换新鲜培养基继续避光培养 24 h。每孔加入 5 g/L MTT-PBS 溶液 10 μl,37℃、5% CO₂ 孵箱避光作用 4 h。镜下观察结果。加入 DMSO 200 μl/孔,振荡 15 min,用酶标仪测 D₅₇₀ 值。实验结果以细胞存活率表示: $细胞存活率(\%) = (实验组 D_{570} \text{ 值} / 阴性对照 D_{570} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.6.2 流式细胞术 取对数生长期的 BT-474 细胞,用培养液制成浓度为 2.5×10⁶ 个/ml 细胞悬液^[5],24 孔培养板每孔加细胞 100 μl,同时每孔加培养液 900 μl。贴壁后,分组同上,37℃、5%CO₂ 孵箱避光培养 1 h,使细胞对药物的吸收达到饱和。激光照射后,吸出剩余药物,立即换新鲜培养基 1000 μl 后继续避光 6 h。收集药物作用后细胞,消化,吹打,离心,用 0.01% PBS 液洗涤 2 次后,加入 Annexin V 5 μl、PI 10 μl,避光 15 min。离心,洗涤,加入 100 μl 0.01% PBS 液,混匀。用流式细胞仪进行检测。

1.7 统计学处理

用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析(One Way ANOVA)。

2 结果

2.1 HP-赫赛汀偶联物鉴定

纯化后的产物呈暗红色,用薄层层析对 HP、赫赛汀及偶联物进行层析,紫外灯下观察。可见游离 HP 被展开,而偶联物依然在点样位置,二者均有荧光,结果表明 HP 和 Herceptin 偶联成功,测定其摩尔比为 240:1。

2.2 HP-赫赛汀偶联物免疫活性测定

抗体浓度从起始浓度 75 μg/ml 起,8 级倍比稀释,偶联物的 D₄₉₂ 值为 0.154~0.833,提示偶联物免疫活性较单纯抗体无显著差异($P>0.05$,图 1)。

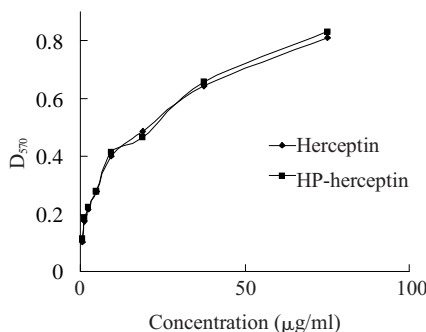


图 1 HP-赫赛汀与赫赛汀单抗免疫活性比较
Fig.1 Comparison of immune activities between HP-herceptin immunoconjugate and herceptin mAb

2.3 对 BT-474 细胞杀伤作用比较(MTT 法)

将各实验组药物分别加入同一块接种有 BT-474 细胞的 96 孔板中,同时进行测定,结果见图 2。在 HP 剂量相同的情况下,HP-赫赛汀偶联物对 BT-474 细胞的杀伤效果明显优于游离 HP 及单纯赫赛汀组($P<0.05$)。显微镜下观察,偶联物组细胞死亡比例也远高于其他实验组,并且随着药物浓度的增加,细胞死亡率增加。

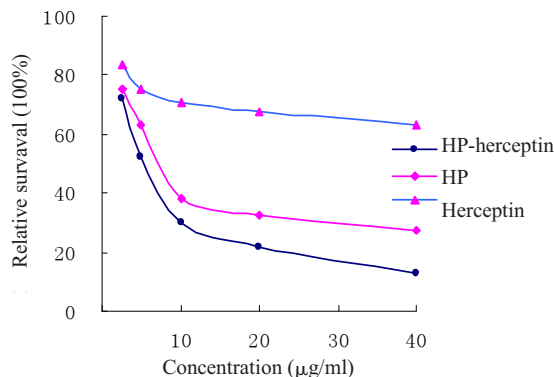


图 2 MTT 法检测偶联物对 BT-474 细胞的杀伤作用
Fig.2 Killing effect of photoimmunoconjugate on BT-474 cells assessed with MTT method

2.4 对 BT-474 细胞杀伤作用的比较(流式细胞术)

偶联物组的杀伤作用和 MTT 法所测一致,明显高于游离 HP 组及赫赛汀单抗组,总体凋亡率依次为

79.8%、68.7%和 16.9%($P<0.05$,图 3)。

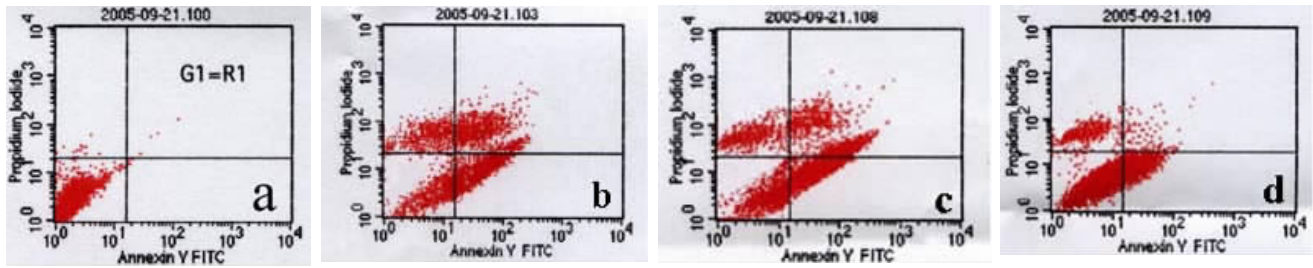


图 3 流式细胞术检测偶联物对 BT-474 细胞的杀伤及凋亡作用

Fig.3 Killing effect and apoptosis-inducing effect of photoimmunoconjugate on BT-474 cells assessed with flow cytometry

a: Control group; b: HP-herceptin; c: HP; d: Herceptin

3 讨论

单克隆抗体靶向制剂属于主动靶向给药系统,其中抗体既能将偶联后的药物特异性地导向靶细胞,同时又能发挥其药物储库作用,使药物在靶区释放时间延长,维持靶区有效的药物浓度而发挥其抗肿瘤作用,又能降低药物在其他组织的分布所引起的副作用。国外先后有学者用 Chlorin(e6)与特异性抗体制备偶联物用于卵巢癌、结直肠癌的肝转移,m-THPC与单克隆抗体偶联物治疗卵巢癌等^[6-8],均证实偶联物有效提高了肿瘤光敏杀伤效应,减少光副作用。

本研究制备方法简单可行,利用碳二亚胺为缩合剂,把光敏剂 HP 及单克隆抗体赫赛汀进行缩合反应,并用双波长法对偶联物进行定量分析,且可通过控制 HP 与赫赛汀的反应投料比而得到含不同摩尔比的偶联物。溶血实验和 ELISA 法证明通过此方法所得的偶合物保留了赫赛汀的免疫活性和 HP 的光敏活性。在同等 HP 剂量条件下,光敏免疫偶联物对靶细胞的杀伤作用及总体凋亡率较游离 HP 及单纯赫赛汀显著提高。由于赫赛汀的导向作用,使更多 HP 浓集于肿瘤细胞。有文献报道光敏剂的作用机制与其引起细胞的凋亡有关,而单纯赫赛汀是 Her-2 强表达细胞的生长抑制剂而非杀细胞剂,对肿瘤细胞的杀伤作用部分是通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用和补体依赖的细胞毒作用达到^[9,10]。因在体外缺乏效应细胞和补体,而无法发挥作用。另一方面,若要达到与单独 HP 相同效应,光敏免疫偶联物中的 HP 可以降低,从而减少由于光敏剂引起的光毒性作用。HP-赫赛汀的体内靶向摄取率及裸鼠的药效实验研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Hamblin MR, Miller JL, Rizvi I, et al. Pegylation of a chlorin(e6) polymer conjugate increases tumor targeting of photosensitizer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19): 7155-62.
- [2] van Dongen GA, Visser GW, Vrouenraets MB. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(1): 31-52.
- [3] del Governatore M, Hamblin MR, Shea CR, et al. Experimental photodynamic therapy of hepatic metastases of colorectal cancer with a 17.1A chlorin(e6) immunoconjugate [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(15): 4200-5.
- [4] Mew D. Ability of specific monoclonal antibodies and conventional antisera conjugated to hematoporphyrin to label and kill selected cell lines subsequent to light activation [J]. *Cancer Res*, 1985, 45: 4380-6.
- [5] Savellano MD, Pogue BW, Hoopes PJ, et al. Multi-epitope HER2 targeting enhances photodynamic therapy of HER2-overexpressing cancer cells with pyropheophorbide [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6371-9.
- [6] Duska LR, Hamblin MR, Miller JL, et al. Combination photodynamic therapy and cisplatin: effects on human ovarian cancer *ex vivo* [J]. *Natl Cancer Inst*, 1999, 91(18): 1557-63.
- [7] Soukos NS, Hamblin MR, Keel S, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photodynamic therapy of oral precancer *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(11): 4490-6.
- [8] Vrouenraets MB, Visser GW, Stewart FA, et al. Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-mono-clonal antibody conjugates for photodynamic therapy [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(7): 1505-13.
- [9] Chiu SM, Oleinick NL. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(8): 1099-106.
- [10] Engbrecht BW, Wenon C, Kachur AV, et al. Photofrin-mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(17): 4334-42.

(责任编辑:黄开颜)