

^{188}Re -Herceptin 放免导向治疗鼻咽癌裸鼠模型的实验研究

李贵平, 黄凯, 张辉 (南方医科大学南方医院核医学科, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 应用 ^{188}Re 标记针对 *HER2/neu* 癌基因表达蛋白 P185^{HER2} 的人源化单抗 Herceptin 瘤内给药治疗 *HER2/neu* 过度表达的鼻咽癌裸鼠移植瘤, 探讨 ^{188}Re -Herceptin 作为肿瘤化疗和放免治疗双重治疗药物的可行性。方法 ^{188}Re 标记 Herceptin 采用直接标记法。荷人鼻咽癌裸鼠 37 只, 分为 5 组, 分别经瘤内注射 ^{188}Re -Herceptin、 ^{188}Re -鼠 IgG、 ^{188}Re 、生理盐水和静脉注射 ^{188}Re -Herceptin 2 d 后, 每组各取 3 只作组织分布测定, 其余连续观察 4 周, 比较各组肿瘤体积及其生长抑制率, 评估其治疗效应和反应。结果 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。放免治疗结果显示瘤内注射 ^{188}Re -Herceptin 对人鼻咽癌裸鼠移植瘤具有较强抑制作用, 4 周后肿瘤生长抑制率高于静脉注射组, 分别为 58.7% 和 48.8%。在放射性活度为 11.1 MBq 时, 瘤内给药抑瘤效果优于静脉给药。结论 采用瘤内注射 ^{188}Re -Herceptin 导向治疗 *HER2/neu* 过度表达的鼻咽癌, 可显著抑制人鼻咽癌裸鼠模型肿瘤的生长, 为临床鼻咽癌的治疗提供一种较为有效的局部治疗方法。

关键词: 鼻咽癌; 裸小鼠; 放射免疫治疗; 肿瘤抗体

中图分类号: R739.62 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)04-0459-04

Efficacy of ^{188}Re -Herceptin radioimmunotherapy in nude mouse model of nasopharyngeal carcinoma

LI Gui-ping, HUANG Kai, ZHANG Hui

Department of Nuclear Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of radioimmunotherapy with ^{188}Re -labeled herceptin in nude mice bearing nasopharyngeal carcinoma expressing *HER2/neu* proto-oncogene and explore the feasibility of ^{188}Re -herceptin for use as a chemical therapeutic and radioimmunotherapeutic agent. **Methods** A direct radiolabeling method was used to prepare ^{188}Re -Herceptin. Thirty-two nude mice bearing nasopharyngeal carcinoma were randomized into 4 groups ($n=8$) to receive single intravenous injection of ^{188}Re -Herceptin, intratumoral injection of ^{188}Re -Herceptin, ^{188}Re -nmIgG and ^{188}Re , respectively, all at the equivalent dose of 11.1 MBq (50 μl). Another 5 tumor-bearing mice received only intratumoral injection of 50 μl normal saline to serve as the control group. Two days after the injections, 3 mice were selected from each group (except for the control group) for biodistribution observation, and the rest mice were monitored for 4 consecutive weeks for tumor volume changes. Pathological examination of the tumor tissues was also performed. **Results** The radioactivity uptake in the tumor was significantly greater whereas normal organ uptake significantly lower in the nude mice receiving intratumoral ^{188}Re -Herceptin injection than in those with intravenous ^{188}Re -Herceptin injection (11.53%ID/g vs 2.79%ID/g at 48 h). Intratumoral ^{188}Re -Herceptin injection caused greater inhibition of tumor growth at the 4th week as compared to the intravenous administration. **Conclusions** Intratumoral ^{188}Re -Herceptin administration can significantly inhibit the development of nasopharyngeal carcinoma in mice, and may potentially serve as a new clinical option of regional therapy for treating nasopharyngeal carcinoma overexpressing *HER2/neu*.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; mice, nude; radioimmunotherapy; anti-tumor antibodies

近年来 *HER2/neu* 基因过表达的蛋白 P185^{HER2} 已成为肿瘤单抗靶向治疗的新靶点。Herceptin 是一种针对过表达 P185^{HER2} 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^[1-3], 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

收稿日期: 2005-09-11

基金项目: 中国博士后科学基金 (2003033345), 2004 年度南方医院院长基金

Supported by Grants from Post-doctoral Research Foundation of China (2003033345) and Dean's Foundation of Nanfang Hospital (2004)

作者简介: 李贵平 (1962-), 副主任医师, 副教授, 电话: 020-61642121, E-mail: ligp@fimmu.com

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 ¹⁸⁸Re 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 1×10⁷/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 P185^{HER2} 单抗。Herceptin 的 ¹⁸⁸Re 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 SnCl₂ 和 0.2~1.0 ml 的 ¹⁸⁸Re 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。¹⁸⁸Re-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 ¹⁸⁸Re 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 ¹⁸⁸Re 11.1 MBq/50 μl;③C 组:标记正常小鼠 IgG 组(¹⁸⁸Re-nmIgG),瘤内注射 ¹⁸⁸Re-nmIgG 11.1 MBq/50 μl;④D 组:¹⁸⁸Re-Herceptin 静脉给药组,静脉注射 ¹⁸⁸Re-Herceptin 11.1 MBq/50 μl;⑤E 组:¹⁸⁸Re-Herceptin 瘤内注射组,瘤内注射 ¹⁸⁸Re-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 计数器测量放射性计数,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,¹⁸⁸Re-Herceptin 瘤内注射组中肿瘤组织放射性摄取为 11.53%ID/g,是 ¹⁸⁸Re-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 ¹⁸⁸R-Herceptin 静脉注射组(>1.5%ID/g),而 ¹⁸⁸Re-nmIgG 瘤内注射组和 ¹⁸⁸Re 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。

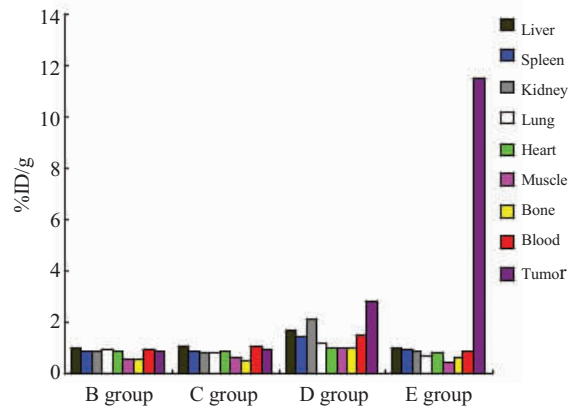


图 1 荷瘤裸鼠各脏器放射性核素分布
Fig.1 Percent of injected dose per gram of tissue (%ID/g) in tumor-bearing nude mice 48 h after administration

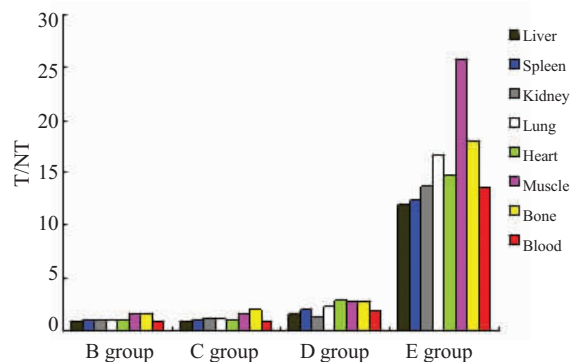


图 2 注射放射性药物后 48 h 荷瘤裸鼠 T/NT 比值
Fig.2 T/NT ratios in the tumor-bearing nude mice 48 h after administration

2.2 ¹⁸⁸Re-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 ¹⁸⁸Re-Herceptin 用于导向放免治疗时无明显毒性作用。

2.3 ¹⁸⁸Re-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(¹⁸⁸Re 瘤内注射组)及 C 组(¹⁸⁸Re-nmIgG 瘤内注射组)次之, D 组(¹⁸⁸Re-Herceptin 静脉给药组)及 E 组(¹⁸⁸Re-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($P < 0.05$)。

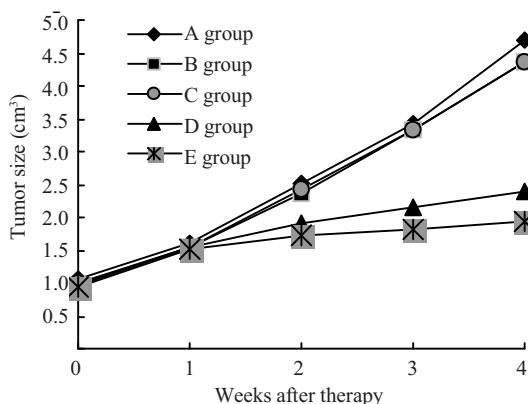


图 3 各组给药前后荷瘤裸鼠模型肿瘤生长情况比较

Fig.3 Transplant tumor growth curves before and after therapy

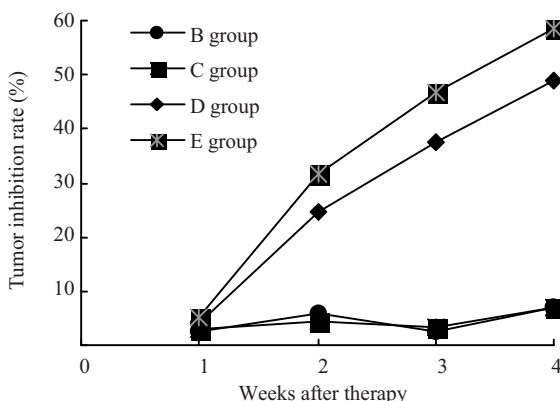


图 4 各治疗组给药后荷瘤裸鼠模型肿瘤生长抑制率比较

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 P185^{HER2} 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^[7-9]。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。¹⁸⁸Re 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^[12-14]。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 ¹⁸⁸Re-Herceptin 具有良好的导向性,¹⁸⁸Re-Herceptin 瘤内给药组瘤/血比值达 13.57(图 2),提示 ¹⁸⁸Re-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 ¹⁸⁸Re-Herceptin 对鼻咽癌进行 RIT 治疗,结果表明 ¹⁸⁸Re-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, 侯景辉, 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.
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.
- [2] 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.
- [3] Yazici H, Altun M, Alatl BA, et al. c-erbB-2 gene amplification in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Invest, 2000, 18(1): 6-10.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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-AE[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 ^{186}Re -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)