

^{188}Re -Herceptin 免疫导向治疗乳腺癌的实验研究

李贵平¹, 张一帆², 汪勇先³ (¹南方医科大学南方医院核医学科, 广东 广州 510515; ²上海第二医科大学瑞金医院核医学科, 上海 200025; ³中国科学院上海应用物理研究所放射性药物研究中心, 上海 201800)

摘要:目的 以针对 *HER-2/neu* 癌基因表达蛋白为靶点的人源性单克隆抗体 Herceptin 作为靶向载体, 制备 ^{188}Re 标记的放射免疫治疗剂 (^{188}Re -Herceptin), 观察其在体外对 *HER-2/neu* 癌基因高表达的 SKBR-3 乳腺癌细胞株的靶向结合性及抗癌作用。方法 ^{188}Re 对 Herceptin 的标记采用直接标记法, 取不同放射性活度的 ^{188}Re -Herceptin 与 SKBR-3 乳腺癌细胞共同培养, 以 MTT 法测定其对单层培养的肿瘤细胞生长的抑制作用, 并计算相对抑制率 (IC_{50})。结果 ^{188}Re -Herceptin 在体外可明显抑制 SKBR-3 细胞, 且其杀伤作用呈剂量依赖性; 而 ^{188}Re 标记的正常鼠 IgG (nmIgG) 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 的抑制作用较弱。 ^{188}Re -Herceptin 组的 IC_{50} ($76.1 \times 10^4 \text{ Bq/L}$) 明显低于 ^{188}Re -nmIgG 组 ($139.2 \times 10^4 \text{ Bq/L}$) 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组 ($175 \times 10^4 \text{ Bq/L}$)。结论 ^{188}Re -Herceptin 具有明显的抑制体外培养 SKBR-3 乳腺癌细胞生长增殖的作用, 可进一步用于乳腺癌的放射免疫导向治疗。

关键词:放射免疫治疗; Herceptin; 铼; 乳腺肿瘤; 肿瘤细胞

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)10-1455-03

^{188}Re -labeled herceptin inhibits proliferation of breast cancer cell line SKBR-3 *in vitro*

LI Gui-ping¹, ZHANG Yi-fan², WANG Yong-xian³

¹Department of Nuclear Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Nuclear Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China; ³Radiopharmaceutical Research Center, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effects of ^{188}Re -labeled herceptin on the proliferation *in vitro* of breast carcinoma cell line (SKBR-3) overexpressing *HER-2/neu* proto-oncogene. **Methods** Herceptin was radiolabeled with ^{188}Re through a direct labeling method. SKBR-3 cells were cultured with ^{188}Re -Herceptin at different radioactivity doses (3.7×10^4 , 18.5×10^4 , 37×10^4 , 55.5×10^4 and $74 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$) or with ^{188}Re -nmIgG and $^{188}\text{ReO}_4^-$ for comparison. The cell proliferation inhibition was determined with MTT colorimetric assay. **Results** ^{188}Re -Herceptin could markedly inhibit the growth of SKBR-3 cells in a radioactivity dose-dependent fashion, while the effect of ^{188}Re -nmIgG and $^{188}\text{ReO}_4^-$ showed rather poor inhibitory effect *in vitro*. The 50% inhibition doses (IC_{50}) of ^{188}Re -Herceptin, ^{188}Re -nmIgG and $^{188}\text{ReO}_4^-$ were $76.1 \times 10^4 \text{ Bq/L}$, $139.2 \times 10^4 \text{ Bq/L}$ and $175 \times 10^4 \text{ Bq/L}$, respectively. **Conclusion** ^{188}Re -Herceptin can effectively inhibit the growth of *in vitro* cultured breast cancer cells overexpressing *HER-2/neu*, and shows much potential for clinical use in breast cancer radioimmunotherapy.

Key words: radioimmunotherapy; herceptin; rhenium; breast neoplasms; tumor cells

针对癌基因 *HER-2/neu* 基因表达蛋白产物 P185 的单克隆抗体 (Herceptin) 是第一个分子靶点药物, 已用于治疗晚期乳腺癌, 并取得一定的疗效^[1]。虽然 Herceptin 单药应用在体外可以一定程度上抑制肿瘤细胞的生长, 但其作用有限。而且目前使用的单抗多数属于鼠源性, 当应用于人体时会产生人抗鼠抗体 (HAMA), 从而降低疗效, 甚至还会引起过敏反应等毒副作用^[2,3]。为此, 本文选择人源性单抗 Herceptin

作为靶向载体, 以诊治兼用的放射性核素 ^{188}Re 对其进行直接标记, 制备出针对 *HER-2/neu* 癌基因特异性结合的放射免疫治疗剂 (^{188}Re -Herceptin), 并在体外观察对 *HER-2/neu* 癌基因高表达的乳腺癌细胞株的靶向结合性及抗癌作用。

1 材料和方法

1.1 试剂和药品

RPMI 1640、胎牛血清, 美国 Gibco BRL 公司提供。MTT (溴化四甲基唑) 和 DMSO (二甲亚砜), Sigma 公司产品。胰蛋白酶, Difco 公司产品。CO₂ 培养箱, Heraeus 公司; SP-DJ 系列垂直净化工作台, 上海浦东物理光学仪器厂制造; 倒置显微镜, 重庆光学仪器厂; SN-684 小型 γ 计数器, 上海原子核所; 酶联免疫检测仪, DG5031 型, 华东电子集团医疗装备有

收稿日期: 2006-03-19

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2003033345); 南方医院院长基金资助项目

Supported by China Postdoctoral Science Foundation (2003033345) and Dean's Fund of Nanfang Hospital

作者简介: 李贵平 (1962-), 男, 医学博士, 副主任医师、副教授, 中科院上海应用物理研究所博士后, 电话: 020-61642121, E-mail: ligp@fimmu.com

限责任公司;铝箔,上海克林莱塑料有限公司;96 孔培养板(平底型)、0.22 μm 微孔滤膜,CORNING 公司;30 W 消毒用汞灯。

1.2 细胞株及单克隆抗体

乳腺癌细胞株 SKBR-3 为高表达 *HER-2/neu* 蛋白的细胞株,由中科院上海细胞所提供。人源性单克隆抗体 Herceptin 由 Roche 公司提供。

1.3 MTT 溶液的配制

称取 25 mg MTT,放入小烧杯中,加入 5 ml PBS (0.01 mol/L,pH7.4) 在电磁力搅拌机上搅拌 30 min,用 0.22 μm 微孔滤膜针头滤器除菌,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 ^{188}Re 标记物的制备

新鲜的、无载体的 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 用 ^{188}W - ^{188}Re 发生器(上海安盛科兴药业公司提供)以生理盐水淋洗而得。 ^{188}Re 标记 Herceptin 采用直接标记法,标记方法及标记物的免疫活性分数的测定参考文献[4]进行。标记率和放化纯度的测定采用生理盐水与新华 1 号层析滤纸以及乙醇:氨水:水(配比为 2:1:5)溶液与 5 $\mu\text{g/L}$ HSA 浸泡过的新华 1 号层析滤纸两种体系,具体方法参见文献[4]进行。

1.5 体外稳定性

将 ^{188}Re -Herceptin 用蒸馏水洗涤 2 次,然后加入 1 ml 小牛血清中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温育,其间分别于 12、24 和 48 h 取样,采用纸层析法测定放化纯度。

1.6 对体外培养的 SKBR-3 细胞的抑制效果试验

采用 MTT 法测定对单层培养的肿瘤细胞的抑制效应。设 3 个实验组: ^{188}Re -Herceptin 组、 ^{188}Re -nmIgG 组、 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组,对照组采用生理盐水,设 5 个放射性剂量级别,分别为 3.7×10^4 Bq、 18.5×10^4 Bq、 37×10^4 Bq、 55.5×10^4 Bq、 74×10^4 Bq/ml。SKBR-3 细胞用含 15%胎牛血清的 DMEM 制成约 2.5×10^7 个/L 的细胞悬液,取 200 μl (5000 细胞/孔)接种于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 24 h。细胞贴壁后,将每孔中原培养液吸净后,分别加入 ^{188}Re -Herceptin、 ^{188}Re -nmIgG、 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 和生理盐水。每个放射性剂量设 6 个复孔,然后将 96 孔板置于 5% CO_2 培养箱,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6 h,吸出药液,再加入培养液 200 μl 。培养 48 h 后,弃培养液,每孔加入 20 μl MTT 溶液,继续孵育 4 h,吸去上层培养液后,将 96 孔板倒置在草纸上,使其中 MTT 溶液尽可能流出,然后每孔加入 DMSO 50 μl ,摇匀后室温放置 15 min,至颗粒溶解,在酶标仪上测定 492 nm 处的吸光度。按下式计算相对抑制率,绘制剂量-效应曲线。相对抑制率 = [(对照组 $D(\lambda)$ 均值 - 实验组 $D(\lambda)$ 均值) / 对照组 $D(\lambda)$ 均值] $\times 100\%$,并根据每次的相对抑制率求出

半数抑制浓度(IC_{50})值,并进行比较评价。

2 结果

2.1 ^{188}Re -Herceptin 的标记及其体外稳定性

^{188}Re -Herceptin 和 ^{188}Re -nmIgG 的标记率均 > 90%,放化纯度均大于 95%,经细胞结合分析法测定 ^{188}Re -Herceptin 的免疫活性分数为 65%。体外稳定性检测结果表明, ^{188}Re -Herceptin 在小牛血清中放置 48 h 后仍有 80%-85%的放射性保留在抗体上。

2.2 ^{188}Re -Herceptin 对 SKBR-3 细胞的抑制作用(图 1)

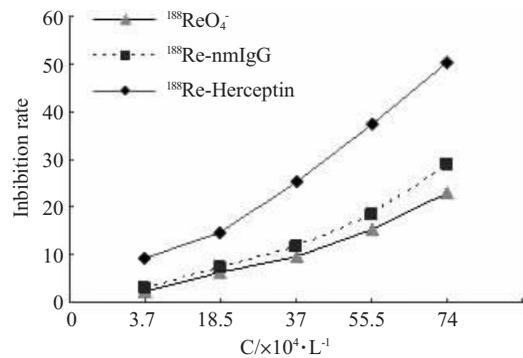


图 1 放射性剂量与 SKBR-3 细胞抑制率关系图

Fig.1 Relationship between radioactivity and inhibition rate of SKBR-3

可见, ^{188}Re -Herceptin 组对 SKBR-3 细胞有较强的杀伤作用,且呈剂量依赖性。而 ^{188}Re -nmIgG 组和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组的杀伤作用较弱。

2.3 ^{188}Re -Herceptin 和 ^{188}Re -nmIgG 的 IC_{50} 的比较

结果 ^{188}Re -Herceptin 组的 IC_{50} (76.1×10^4 Bq/L) 明显低于 ^{188}Re -nmIgG 组 (139.2×10^4 Bq/L) 和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组 (175×10^4 Bq/L),提示 ^{188}Re -Herceptin 具有特异性杀伤 SKBR-3 乳腺癌细胞株作用。

3 讨论

目前,以抗体为导向载体的肿瘤导向治疗则因抗体的鼠源性易产生 HAMA,从而降低疗效甚至可引起过敏反应等毒副作用^[2,3]。而 Herceptin 是一种针对 *HER-2/neu* 基因蛋白胞外区的人源化单抗,其作用于 *HER-2/neu* 基因胞外区的部分为鼠源性的,名为 4D5,其余部分均为人的 IgG,它通过影响肿瘤细胞胞内信号传导,下调 *HER-2/neu* 基因的表达以及介导机体免疫机制发挥抗肿瘤作用^[1]。基础研究和临床应用表明,Herceptin 或 4D5 均已显示出对 *HER-2/neu* 基因蛋白高表达的多种肿瘤细胞株生长的抑制作用^[5,6],表明它是一种有较广抗瘤活性的单抗。然而 Herceptin 是 *HER-2* 高表达细胞的生长抑制剂而不是

杀细胞剂,目前有关以 Herceptin 作为放射性核素靶向载体治疗肿瘤的临床应用报道不多。为此,本文采用通过基因工程技术将鼠源抗体人源化改造而获得的单抗 Herceptin,以此抗体作为放射性核素 ¹⁸⁸Re 的导向载体则可降低 HAMA。¹⁸⁸Re 是目前较理想的放免治疗用放射性核素,它可同时放射 β 、 γ 两种射线, β 射线的电离作用可造成细胞 DNA 的损伤,阻碍 DNA 的复制及其重要生命功能的完成,最终引起细胞生长受抑制甚至死亡,此外,由于 ¹⁸⁸Re 的 β 射线的射程短,既可杀伤抗原表达阳性的肿瘤细胞,还可利用“交叉火力”的作用杀伤抗原表达阴性的肿瘤细胞,以及因 Herceptin 结合量不够而产生的“治疗逃逸”,同时对周围远处的正常细胞无损害作用。¹⁸⁸Re 发射的 γ 射线还可用于放免显像,可被用来观察 ¹⁸⁸Re 标记的单抗在体内与肿瘤的结合情况以及生物学分布和肿瘤的定位显像,并有利于对治疗辐射剂量的评估。为此,本文选择诊治兼用的放射性核素 ¹⁸⁸Re,采用直接标记法对 Herceptin 进行标记,结果表明,标记率高 (>90%),¹⁸⁸Re-Herceptin 具有良好的体外稳定性,并且保持了较高的免疫活性,提示 ¹⁸⁸Re 的直接标记法对 Herceptin 抗体活性的影响不明显。¹⁸⁸Re 的直接标记方法操作简单、方便,具有很强的实用性。

目前检测抗癌药物对肿瘤细胞生长、增值影响的方法有多种,其中 MTT 法是较常用的方法。其原理是利用活细胞内线粒体中的琥珀脱氢酶能使黄色可溶的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色的结晶而死细胞没有此功能来检测活细胞数目。这种结晶物能溶解于 DMSO(二甲亚砷)中,并能用酶联免疫检测仪测定溶液在 490 nm 处的吸光度,这个吸光度值在一定范围内和细胞数量成正比,其意义反映抗肿瘤药物对肿瘤的杀伤性。本实验采用 MTT 法研究 ¹⁸⁸Re 标记物对体外细胞培养的 SKBR-3 细胞的抑制作用,结果表明,¹⁸⁸Re-Herceptin 在体外可明显抑制 SKBR-3 细胞,且其杀伤作用呈剂量依赖性,而 ¹⁸⁸Re-nmIgG 和 ¹⁸⁸ReO₄⁻ 的抑制作用较弱;¹⁸⁸Re-Herceptin 组的 IC₅₀ 为 76.1×10⁴ Bq/L,明显低于 ¹⁸⁸Re-nmIgG 组(139.2×10⁴ Bq/L)和 ¹⁸⁸ReO₄⁻ 组(175×10⁴ Bq/L),提示 ¹⁸⁸Re-Herceptin 具有特异性杀伤 SKBR-3 乳腺癌细胞株作用。其原因可

能与入源性单抗 Herceptin 对 HER-2/neu 癌基因高表达的 SKBR-3 细胞有特异性的结合作用有关,¹⁸⁸Re-Herceptin 可与 SKBR-3 细胞表面抗原 P185 蛋白特异性结合,可将 ¹⁸⁸Re 固定至肿瘤细胞,从而利用放射性核素的辐射作用直接杀伤肿瘤细胞。而 ¹⁸⁸Re-nmIgG 和 ¹⁸⁸ReO₄⁻ 对肿瘤细胞的杀灭作用较弱,可能与两类标记物均不会与肿瘤细胞发生特异性结合有关,而且在培养换液过程中大多数 ¹⁸⁸Re 以及未被肿瘤细胞固定的标记物可被洗去,肿瘤细胞从而得以继续生长。

总之,¹⁸⁸Re-Herceptin 作为一种放射免疫治疗剂,即可保留单抗本身所固有的抗肿瘤活性,又可发挥 ¹⁸⁸Re 的内照射产生的放射生物学效应,因而提高了杀伤癌细胞的功效。本实验的研究结果将为以后放射免疫靶向治疗荷瘤动物实验奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hayes DF, Thor AD. C-erbB-2 in breast cancer: Development of a clinically useful marker [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(3): 231-45.
- [2] Richman CM, Denardo SJ, O'Donnell RT, et al. High-dose radioimmunotherapy combined with fixed, low-dose paclitaxel in metastatic prostate and breast cancer by using a MUC-1 monoclonal antibody, m170, linked to indium-111/yttrium-90 via a cathepsin cleavable linker with cyclosporine to prevent human anti-mouse antibody[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 5920-7.
- [3] Line BR, Breyer RJ, McElvany KD, et al. Evaluation of human anti-mouse antibody response in normal volunteers following repeated injections of fanolesomab (NeuroSpec), a murine anti-CD15 IgM monoclonal antibody for imaging infection[J]. *Nucl Med Commun*, 2004, 25(8): 807-11.
- [4] Li GP, Wang YX, Huang K, et al. The experimental study on the radioimmunotherapy of the nasopharyngeal carcinoma over-expressing HER2/neu in nude mice model with intratumoral injection of ¹⁸⁸Re-herceptin [J]. *Nucl Med Biol*, 2005, 32 (1): 59-65.
- [5] Agus DB, Bunn PA, Franklin W, et al. HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer, prostate cancer, and ovarian cancer[J]. *Semin Oncol*, 2000, 27(6 Suppl 11): 53-63.
- [6] Buchler P, Reber HA, Buchler MC, et al. Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-HER2 antibody (herceptin)[J]. *J Gastrointest Surg*, 2001, 5(2): 139-46.