

研究论文

单克隆抗体与血卟啉衍生物交联物
抗胃癌作用的实验研究

许树旭* 王耐勤 董志伟

(北京市肿瘤防治研究所, 北京100034)

提要 为了提高血卟啉衍生物HPD的光敏效应, 减低副作用, 将其与抗胃癌 McAb3G9 和 3H11交联。体外实验中, 3G9-HPD交联物+照光比单用HPD对胃癌细胞株 BGC823 的细胞毒效应提高17倍, 3H11-HPD交联物提高 8.6 倍。将两种交联物进行不同比例组合, 组合后的杀伤效应未见进一步增高。两种交联物对荷瘤裸鼠的抑瘤效应明显高于各对照组, 并且能显著延长荷瘤小鼠的生存期。表明McAb对HPD有导向作用。

关键词 单克隆抗体; 血卟啉衍生物; 交联物; 抗肿瘤作用

自Lipson 和 Gray⁽¹⁾等首次用光动力学疗法(PDT)以来, PDT已逐渐发展成为一种治疗癌症的手段。当前存在的主要问题是光敏剂 HPD 对肿瘤组织的选择性不够高, 以及经 PDT 治疗的病人有发生皮肤光敏副反应的缺点, 致使临床使用受限。目前尚未发现对肿瘤组织选择性高和对皮肤光敏副反应小的光敏剂。随着McAb的问世, 多种药物已与之交联以提高杀伤效应, 众多实验结果已表明了交联物的有效性和选择性。本文将抗胃癌McAb 3G9和3H 11与HPD交联, 研究单一的或按不同比例组合的交联物对胃癌杀伤效应。结果证实了McAa对HPD的导向作用。

材料和方 法

材料 HPD由北京市制药工业研究所徐石麟提供(5mg/ml)。[³H-]亮氨酸 48.1×10^{10} Bq130 (Cimmol), 为上海原子核研究所产品。人胃癌细胞 BGC 823、人结肠癌细胞 B-80和人乳癌 McF-7细胞均为本所传代细胞系。裸鼠 (nu/nu, BaLb/c 背景), ♀ ♂各半, 4~5周龄, 购自北京医科大学实验动物中心。3G9和 3H11 McAb由本所生化室制备⁽²⁾。经MAPS-100纯化议纯化⁽³⁾。

交联物的制备⁽⁴⁾与鉴定 取 HPD 50 μ l, 100 μ l或120 μ l与1-乙基3-(二甲基氨基丙基)碳化亚胺盐酸盐500 μ l (2mg/ml)反应 30 min, 后加 McAb 1 mg (1mg/ml)反应 1min, 过 Sephadex G-25柱, (柱长25 cm, 直径1 cm), 洗脱液为PBS。HPD与McAb交联物经Backman DU 50紫外分光光度计按双波长求K因素法测交联分子比。以薄层层析法进行鉴定。

交联物抗体活性测定 按ELISA法⁽⁴⁾测定交联物活性,经ELISA读数仪(Bio-Rab)测定交联物的492 nm OD值。用同等浓度的McAb作阳性对照,用正常小鼠IgG(NIgG)为阴性对照。

交联物的HPD活性测定(溶血试验) 取小鼠RBC稀释到 2×10^8 /ml。加入不同浓度的HPD或交联物,孵育1h。用波长395 nm的40W黑光灯照射30 min,距离10 cm。1h后,取上清测540 nm OD值。以溶血程度为指标,观察HPD的活性。

体外杀伤试验⁽⁶⁾ BGC 823 细胞接种于96孔板, $2 \sim 3 \times 10^4$ /孔。细胞贴壁后,加 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸18.5 Bq ($0.5 \mu\text{Ci}$ /孔)及含3%小牛血清的无亮氨酸培养液。5% CO_2 温箱内孵育4~5 h。加入不同稀释度的各种交联物、HPD或NIgG-HPD。孵育1.5h撤药,再孵育1.5h后照光。光源为红光仪⁽⁷⁾,液长630nm,照射15min。孵育24h后,用Backman LS 3801液体闪烁计数器测各组cpm值,求杀伤率。每样品三个数据,求平均值。

两种交联物组合用药及序贯用药的方法是:两种交联物按3:7, 5:5或7:3(3G9/3H11)给药。组合用药系同时按上述比例加药,序贯用药为先加3G9-HPD,1h后再按比例加入3H11-HPD。

体内抗肿瘤试验⁽⁸⁾ 裸鼠33只,随机分为6组。左腋下接种 2×10^5 BGC 823细胞/只。6 h后,ip交联物、HPD或PBS。各组给药剂量按HPD 1mg/kg给予。48h后,用红光仪照射20 min,距离6 cm。观察各组肿瘤大小(长轴×短轴)和生存期。

结 果

一. 交联物制备与鉴定

HPD与3G9, 3H11通过与碳化亚胺反应,共价结合成二组不同克分子比(HPD/McAb)的交联物(表1)。TLC表明,3G9,3H11以及经共价结合的3G9-HPD和3H11-HPD仍位于原点,而HPD的Rf值为0.8。

二. 交联物的抗体活性

经ELISA测定不同分子比的3G9-HPD和3H11-HPD与靶细胞的亲和力以McAb的活性为100%,计算各交联物的抗体活性。分子比在33/1以下时,抗体活性为90~100%,当分子比提高到46/1以上时,抗体活性则下降到60~70%,结果见表1。

Tab 1. Antibody activity of conjugates with different molecular ratio and their cytotoxicity on target cells

Conjugate	Molecular ratio HPD/McAb	McAb activity (%)	Cytotoxicity	
			IC ₅₀ (HPD, $\mu\text{g}/\text{ml}$)	McAb-HPD/HPD
3G9-HPD	46/1	67	3.0	10.5
	32/1	100	1.8	17.0
	14/1	100	8.6	3.7
	48/1	62	4.0	8.0
3H11-HPD	33/1	90	3.7	8.6
	23/1	92	7.4	4.3

三. 交联物的HPD活性

两种交联物的溶血值与HPD近似,表明HPD与McAb交联后仍保持原有活性。

四. 体外杀伤试验

克分子交联比为 32~33/1 的 3G9-HPD 或 3H11-HPD 对 BGC823 细胞的杀伤率较HPD均有明显提高。以各组50%杀伤率(IG_{50})进行比较,3G9-HPD 提高17倍;3H11-HPD 提高8.6倍,而交联比为46~48/1时,各交联物的杀伤率低于分子比为33~33/1 交联物的杀伤率,与交联物抗体活性测定的结果一致。当分子比为14~23/1时,杀伤率亦低(见表1)。因此,HPD 与 3G9 或 3H11 交联物的交联比以控制在33/1左右为宜。实验中观察了两种交联物组合应用的杀伤效应。将 3G9-HPD 和 3H11-HPD 以3:7, 5:5或7:3的比例组合,无论同时用药或序贯用药,各组的杀伤率均低于单一3G9-HPD 的杀伤率(表2)。在三种组合中,随着 3G9-HPD 比例的增高,杀伤率也随之增高。因为3G9-HPD的杀伤率比3H11-HPD高1倍,故组合后的杀伤效应仅表现为累加作用,未见增强。实验中还发现,非特异性交联物NIgG-HPD16 μ g(分别比3G9-HPD 和 3H11-HPD 高8.9倍和4.3倍)的杀伤率与同剂量的 HPD 相似,只有30%。

Tab 2. Cytotoxicity of conjugates 3G9-HPD and 3H11-HPD alone or in different combination on target cells

Conjugate	Combination ratio	Cytotoxicity(McAb-HPD/HPD)	
3G9-HPD	—	17.0	
3H11-HPD	—	8.6	
3G9-HPD/3H11-HPD	3:7	9.4*	4.5**
	5:5	11.8	9.6
	7:3	12.9	11.0

*Combined scheme: two conjugates were administrated simultaneously.

**Sequence scheme: 3G9-HPD and 3H11-HPD were administrated in sequence with interval of 1 hour.

Tab 3. The survival time of tumor-bearing nude mice with different treatment

Groups	No. of nude mice	Mean survival time (days) ($\bar{x} \pm SD$)	P
PBS	5	35.2 \pm 2.2	
HPD	5	31.0 \pm 3.4	>0.05
NIgG-HPD	5	32.2 \pm 1.8	>0.05
3G9-HPD	6	51.8 \pm 5.2	<0.05*
3H11-HPD	6	47.0 \pm 6.0	<0.05*
Combination 5:5	6	49.8 \pm 6.4	<0.05*

*McAb: HPD

五. 交联物对不同肿瘤细胞的选择性杀伤作用

以三种癌细胞株BGC-823, B-80和McF-7作靶细胞,观察 3G9-HPD 和 3H11-HPD 对抗体反应细胞和非反应细胞的杀伤作用,结果两交联物在1~8 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时,对BGC 823细胞有明显的杀伤作用,而对与McAb无关的结肠癌和乳 癌细胞未见杀伤作用(图1)。

六. 交联物对荷瘤裸鼠的抗肿瘤作用

裸鼠分为六组:(1) PBS组;(2) HPD组;(3) NIgG-HPD组;(4) 3G9-HPD组;(5) 3H11-HPD 组和(6) 3G9-HPD : 3H11-HPD (5 : 5) 组合组。接种 BGC 823 细胞后 d 7各对照组(1~3组)全部出现肿瘤,而各交联物组(4~6组) d 10~13仅个别小鼠出现肿瘤。各对照组肿瘤均明显大于交联物组,肿瘤后 d16 开始,3G9-HPD组与 HPD 组比较均有明显差异, d 25 时,三组交联物与 HPD 组比较均有明显差异($P < 0.01$)。其中3G9-HPD 组6只裸鼠有2只未长肿瘤,3H11-HPD和组合组各有1只未长肿瘤(图2)。各组生存期见表3。肿瘤后 d37~40 时, PBS、HPD 和 NIgG-HPD 组小鼠全部死亡,而3G9-HPD, 3H11-HPD和组合组平均生存期分别为 51.8 ± 5.2 , 47.0 ± 6.0 和 49.8 ± 6.4 天,均比对照组明显延长(表3)。

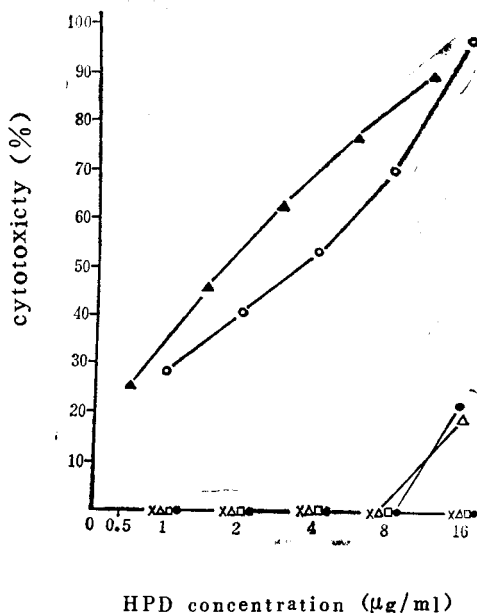


Fig 1. Cytotoxicity of conjugates on McAb-reactive cells and McAb-nonre active cells. \blacktriangle - \blacktriangle 3G9-HPD. BGC 823; \square - \square 3H11-HPD B-80; \circ - \circ 3H11-HPD. BGC 823; \bullet - \bullet 3G9-HPD. B-80; X-X 3G9-HPD McF-7; \triangle - \triangle 3H11-HPD McF-7.

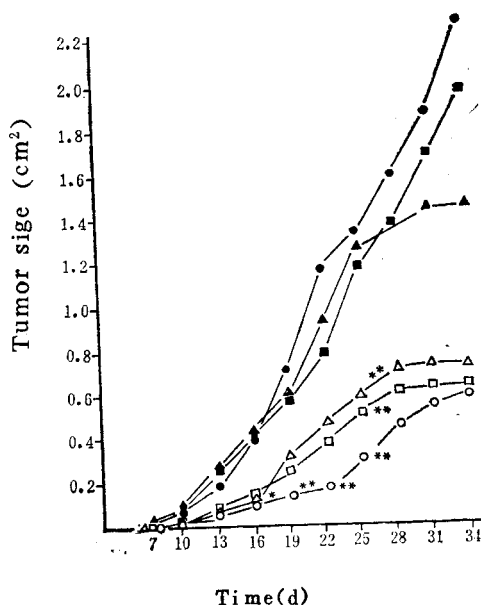


Fig 2. The inhibition of tumor *in vivo* with different treatment. \circ - \circ 3G9-HPD; \triangle - \triangle NIgG-HPD; \square - \square Combination 5:5 - HPD; \triangle - \triangle 3H11-HPD; \bullet - \bullet PBS. McAb-HPD: HPD. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

讨 论

1983年 Mew⁽⁴⁾等首次将 HP 与抗小鼠横纹肌肉瘤 McAb 制备成交联物。1985年⁽⁹⁾又将 HP 与抗人白血病相关抗原 CAMAL 的 McAb 交联,交联后使 HP 的体外杀伤效应提高 100~200 倍。1986 年周薇薇⁽¹⁰⁾等将 HP 与抗人 T 淋巴细胞 McAb 交联,体外杀伤效应提高 9.5 倍。

本文选用抗胃癌 McAb3G9 和 3H11 以碳化亚胺法与HPD交联。其中以3G9-HPD 的效果最好,对BGC823细胞的杀伤作用比HPD提高17倍,3H11-HPD 的杀伤作用提高8.6倍。在荷瘤裸鼠的体内抗肿瘤实验中,也以 3G9-HPD 延长生存期和抑瘤作用最明显。对荷瘤小鼠进行PDT的HPD常规量为7.5~10 mg/kg 体重⁽¹⁾。本实验仅用 1mg/kg 体重HPD 交联物就充分发挥了抗肿瘤作用,表明 McAb 对 HPD 具有导向作用,可使HPD 更多地集中于肿瘤部位,提高了对肿瘤的光敏杀伤效应。

本文对 McAb 与 HPD 交联物的交联分子进行了探索,当分子比为 1:32~33 时,杀伤作用最强,分子比低于1:20 时,虽然交联物抗体活性保持在 90~100%,但其杀伤作用减弱,当分子比提高到1:46~48 时,交联物的抗体活性和杀伤率均降低。因此,控制McAb 与HPD的交联分子比,是保持交联物活性和杀伤作用的重要条件。

本实验对两种交联物按不同比例组合以及不同作用方式的抗肿瘤作用进行了初步观察,期望通过联合用药提高疗效。实验结果表明,两种交联物组合的疗效并不比单一交联物作用强。且其杀伤作用随着作用较强的 3G9-HPD 比例减少而降低。提示组合后的效果是累加作用,未呈现增强作用。Ehrlich⁽¹¹⁾等曾报告,将两种针对不同抗原决定簇的 McAb 混合后可使结合能力提高,但这不是针对所有 McAb 都适用的普遍规律。因为也有一些针对不同决定簇的 McAb 混合后呈累加作用,其机理仍不明。本实验所选用的 3G9 和 3H11 系作用于胃癌细胞不同决定簇的McAb,组合后也未见增强作用。是否与选用交联物剂量不适当有关?因此,进一步观察不同剂量的交联物的组合效应,寻找最佳组合剂量和给药方案是必要的。

致谢 刘彤参加部分技术工作

参 考 文 献

1. Dougherty TJ. Photoradiation therapy (PRT) of malignant tumors. CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology. Visiting report in China, 198
2. 魏淑敏,等. 胃癌单克隆抗体及其组织学的选择性反应. 中华肿瘤杂志1988; 待发表
3. 李振甫,等. 单克隆抗体的纯化. 生物化学杂志 1988; 待发表
4. Mew D, et al. Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor specific monoclonal antibody hematoporphyrin conjugates. J Immunol 1983; 130: 1743.
5. 万文薇,等. 酶联免疫吸附试验用于单克隆抗体的检测. 北京医学院学报 1984; 16: 190.
6. Collins D, et al. Cytotoxicity of diphtheria toxin A fragment toxic-resistant murine cells delivered by pH-sensitive immunoliposomes. Cancer Res 1987; 47: 735.
7. 柯杨,等. HPD-红光对离体培养人胃癌 MGC 803 细胞 DNA, RNA 和蛋白质前体掺入的影响. 癌症1986; 5: 45.
8. Smyth MJ, et al. Selective enhancement of antitumor activity of N-acetyl melphalan upon conjugation to monoclonal antibodies. Cancer Res 1987; 47: 62.
9. Mew D, et al. Ability of specific monoclonal antibodies and conventional antisera conjugated to hematoporphyrin to label and kill selected cell lines sub-

sequent to light activation. *Ibid* 1985; 45 : 4380.

10. 周薇薇, 等. 光敏性单克隆抗体的产生和对其细胞毒作用的观察. *癌症* 1986; 5 : 30.
11. Ehrlich PH, et al. Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J Immunol* 1982; 128 : 2709.

EXPERIMENTAL STUDY OF ANTI-TUMOR EFFECT WITH CONJUGATES OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND HEMATOPORPHYRIN DERIVATIVE

SX Xu, NQ Wang and ZW Dong

(*Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 10031*)

ABSTRACT Hematoporphyrin derivative (HPD) is a photosensitizer for use in photodynamic therapy (PDT). In this paper, HPD was conjugated with monoclonal antibodies 3G9 or 3H11 for use against gastric cancer in order to enhance the photosensitive effect and reduce side effect of PDT. The biological activities of the McAb conjugates were demonstrated. The killing effect on BGC-823 cells of 3G9-HPD or 3H11-HPD conjugates plus exposure to light showed 17 fold and 8.6 fold greater cytotoxicity, respectively than free HPD at an equivalent HPD concentration in vitro. When 3G9-HPD and 3H11-HPD were used in combination at 7 : 3, 5 : 5 and 3 : 7 proportion, the cytotoxicity was increased 12.9, 11.8 and 9.4 fold on target cells, respectively. The results indicate that the cytotoxicity was not further enhanced by the combination scheme. When tumor-bearing nude mice were treated with the different conjugates, significant inhibition of tumor growth was observed and the survival period of animals was markedly prolonged in comparison with PBS, free HPD and NiG-HPD treated groups.

Key words Monoclonal antibody; Hematoporphyrin derivative; Conjugate; Antitumor effect