

¹³¹I-McAb JHIII Fab'片段在荷瘤裸鼠体内的定位显像

苏金华 颜江华 俞浩* 李东辉

(厦门大学抗癌研究中心, 厦门 361005 *厦门市第一医院同位素室)

摘要 用蛋白酶切技术制备 McAb JHIII Fab'片段, 回收率约 10%。片段活性相当于完整 McAb 的 1:10² 稀释浓度。用氯胺 T 法标记 McAb JHIII Fab', 对荷人肝细胞癌 BEL-7402 裸鼠体内的放射免疫显像进行了研究。腹腔注射 ¹³¹I-McAb JHIII Fab' 后 24-96 h, 肿瘤部位有放射性浓聚, 以 48-72 h 影像最为清晰; 而注射 ¹³¹I-McAb JHIII 肿瘤部位也有积聚现象, 但本底消除更慢。¹³¹I-McAb JHIII Fab' 注射后 72 h, 13 种器官的肿瘤组织与非瘤组织的放射性比值均大于 3, 肿瘤的定位指数为 2.56。这表明 McAb JHIII Fab' 在肝细胞癌的诊断和指导治疗方面有更好的应用前景。

关键词 单克隆抗体 酶解作用 肝细胞癌 裸鼠 放射免疫显像

Radioimmunoimaging of ¹³¹I-labeled Monoclonal Antibody JHIII Fab' in Nude Mice Bearing Human Hepatocellular Carcinoma Su Jinhua, Yan Jianghua, et al
(Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract McAb JHIII Fab' fragment was prepared with pepsin digestion. Its receiving percentage was about 10%. Its titer was 1:10² of McAb JHIII. McAb JHIII Fab' fragment was radiolabeled with ¹³¹I by Ch-T method. Its distribution and radioimmunoimaging in the nude mice bearing human hepatoma BEL-7402 were studied. Between 24-96 h after intraperitoneal administration, the image of the concentrating radioactivity in tumor was obtained by the γ camera and it was the clearest during 48-72 h, whereas the injection of ¹³¹I-McAb JHIII into the nude mice resulted in an equal radioactivity in tumor, but its background was more slowly cleared. At 72 h after the injection of ¹³¹I-McAb JHIII Fab', the radioactivity ratios of tumor/normal tissue (T/NT) for 13 kinds of organ/tissue were all over 3, and the localization index of tumor was 2.56. These results showed that McAb JHIII Fab' may be useful in the localization and targeting treatment of human hepatocellular carcinoma.

Key words monoclonal antibody enzymeolysis hepatocellular carcinoma nude mice radioimmunoimaging

McAb JHIII 是本中心建立的一株抗人肝癌 McAb, 对 BEL-7402 肝癌细胞有强阳性反应^[1], 在荷肝细胞癌的裸鼠体内放射免疫显像效果较好, 在生物体内有较强的亲和力^[2]。为了更深入地探讨 McAb 对肝癌导向诊断和临床治疗的可行性, 作者采用胃蛋白酶切技术将 McAb 制成片段, 利用氯胺 T

碘标法观察了该片段在荷瘤裸鼠体内的分布特点和在肿瘤组织的显像效果。

1 材料和方法

1.1 McAb JHIII 腹水的制备与纯化 见文献^[3]。

1.2 McAb JHIII Fab' 片段的制备^[3]、蛋白含

量及活性的测定

1.2.1 *M cAb JHIII (ab')₂*片段的制备 将 *M cAb JHIII*于 0.1 mol/L pH 4 醋酸缓冲液透析过夜,加入胃蛋白酶 0.26 mg至 2.2 ml 已透析过的 *M cAb JHIII*中(母液 2.934 mg/ml)充分摇匀。置 37°C 温育消化 30 min 后,用 *N NaOH*调 pH 值至 8.0 以终止反应。将反应液过 *Sephadex G-100*柱,用 0.1 mol/L pH 8 硼酸缓冲液洗脱,收集各蛋白峰。用 *PEG*(分子量 20 000)浓缩各蛋白峰, *Du-65*紫外分光光度计测定其各自蛋白含量,按各收集峰的体积比例计算其实际蛋白浓度。

1.2.2 *M cAb JHIII Fab'*片段的制备 将 6 ml *M cAb JHIII F(ab')₂*于 0.1 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液透析过夜,加入 6 μl β-巯基乙醇,使终浓度为 10 mmol/L,置 37°C 温育 90 min 再加入 50 mg 碘乙酰胺,使终浓度为 20 mmol/L,室温反应 30 min 后置 4°C 冰箱过夜。反应液上 *Sephadex G-2*柱,用 0.1 mol/L pH 5 醋酸缓冲液洗脱,收集并浓缩蛋白峰,计算其实际浓度。

1.2.3 *M cAb JHIII Fab'*的纯度鉴定 参照文献^[4]进行。用 *SDS-PEAG*电泳鉴定酶解液各组分的纯度。

1.2.4 *M cAb JHIII Fab'*的活性测定 用竞争性 *ELISA*法测定。以 *M cAb JHIII*为阴性对照, *M cAb JHIII*与 *Fab'*的不同比例为样品,计算抑制率 = (1 - 样本 OD / 阴性 OD) × 100%, 以抑制率 ≥ 50% 判断 *Fab'*为阳性。

1.3 荷瘤裸鼠模型的建立 选用 4~6 周龄 *BALB/c*裸鼠(SPF 级,本中心裸鼠室提供),于右后肢跟部接种人肝癌细胞株 *BEL-7402*细胞量为 10⁶个以上,15 d 后肿瘤体积可达 1.5~2.0 cm³。

1.4 *M cAb JHIII Fab'*的标记与分离 采用氯胺 T 碘标法^[5],将第 1 峰收集,测总放射量后过滤除菌备用。同法标记作为对照用的 *M cAb JHIII*。

1.5 ¹³¹I-*M cAb JHIII Fab'*体外免疫活性鉴

定 采用 *RIA*法进行^[6]。

1.6 碘标记抗体片段的体内分布与显像 将荷人肝癌 *BEL-7402*细胞的 *BALB/c*裸鼠 10 只,随机分为实验组和对照组各 5 只。实验前 3 d 任其自由饮用 0.1% *KI*溶液以封闭甲状腺。实验时腹腔注射 ¹³¹I-*M cAb JHIII Fab'*或 ¹³¹I-*M cAb JHIII*,剂量为 5.328 × 10⁶ Bq/只,分别相当于加入 *M cAb JHIII Fab'* 25 μg 或 *M cAb JHIII* 27 μg 每隔 24 h 用 *Gz-B*型 γ 照相机(中国航天航空二部产品)进行全身扫描和显像,并在注射后 24、48、72、96 和 120 h,以颈椎脱位法各处死 1 只鼠,取肿瘤、全血及各重要脏器称重后进行 γ 计数,计算各样品的放射性比度(CPm/g)、*TNT*值(瘤与非瘤组织的放射性比值)和定位指数 *LI*(实验组的组织与血 CPm/g 之比除以对照组的组织与血 CPm/g 之比)。

2 结果

2.1 *M cAb JHIII Fab'*及 ¹³¹I-*M cAb JHIII Fab'*的鉴定 将正辛酸-硫酸铵沉淀法纯化的 *M cAb JHIII*经 *PEAG*电泳显示为单一条带。*M cAb JHIII*酶切后,经 *Sephadex G-100*柱层析分离出现 2 个峰(见图 1),*SDS-PEAG*鉴定各组分,确定胃蛋白

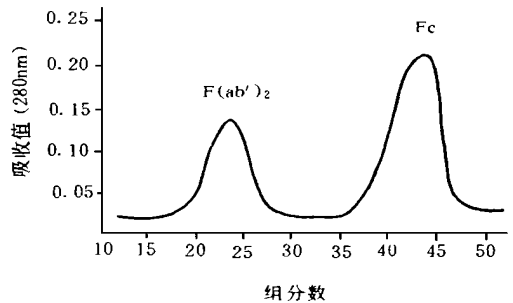


图 1 *M cAb JHIII*酶解液在 *Sephadex G-100* 的分离图

Fig 1 Elution graph of *M cAb JHIII* enzyme digestion

solution on the *Sephadex G-100*

酶是有作用的。F(ab')₂经β-巯基乙醇处理，收集并浓缩所获得的Fab'总量为0.6mg。氯胺T碘标法对McAb JHIII和McAb JHIII Fab'的标记率分别为71.8%和40%。ELISA法显示，McAb JHIII Fab'收集液的活性相当于McAb JHIII的1:10稀释浓度。RIA法结果表明，¹³¹I-McAb JHIII Fab'的(B/T)%为48.6%，而¹³¹I-McAb JHIII为51.6%。

2.2 ¹³¹I-McAb JHIII Fab'在荷瘤裸鼠体内

的生物学分布

2.2.1 T/NT值的变化 在裸鼠腹腔注射标记物后24h，除实验组和对照组和脑组织(T/NT分别为14.50和14.86)外，其他组织的T/NT均值分别为3.76(1.96~10.36)和4.28(2.46~8.11)；而注射后72h，则分别为6.32(3.62~12.92)和14.29(5.31~56.16)(表1)。

表1 荷人肝癌细胞BEL-7402裸鼠腹腔注射¹³¹I-McAb JHIII Fab'或McAb JHIII后24h与72h各器官的T/NT值

Tab 1 The T/NT values in various organs of nude mice bearing human hepatoma BEL-7402 at 24h and 72h after intraperitoneal injection of ¹³¹I-McAb JHIII Fab' or ¹³¹I-McAb JHIII

脏 器 或 组 织	24h		72h	
	McAb JHIII Fab'	McAb JHIII	McAb JHIII Fab'	McAb JHIII
血 液	3.98	2.28	4.72	6.08
皮 肤	3.62	2.90	3.80	13.73
肌 肉	6.58	4.44	10.48	10.75
骨 骼	5.52	3.37	12.92	56.16
脑	14.50	14.86	23.20	41.66
胃	1.96	3.42	3.62	8.20
肠	2.08	3.84	7.12	18.19
肺 脏	2.04	7.24	4.68	11.28
肝 脏	2.70	2.46	5.06	10.43
脾 脏	2.16	3.88	6.48	14.94
肾 脏	10.36	6.68	6.24	5.84
心 脏	2.12	2.63	5.34	5.31
甲状腺	2.00	8.11	5.30	12.51

2.2.2 LI的变化 荷肝癌裸鼠注射¹³¹I-McAb JHIII Fab'或¹³¹I-McAb JHIII后24h，肿瘤的LI为1.15，非瘤组织为0.61(0.16~1.00)；注射后72h，肿瘤的LI为2.56，非瘤组织为0.79(0.16~1.38)(表2)。

2.2.3 放射免疫显像 ¹³¹I-McAb JHIII Fab'组在24~96h之间肿瘤部位均出现放

射性浓聚显像，随时间延长，本底逐渐减弱，及至96h本底已没有，肿瘤部位则越来越清晰，尤以48~72h的影像最为清晰(图2)。

¹³¹I-McAb JHIII组在肿瘤部位同样有放射性浓聚现象，在72~96h肿瘤部位的影像最为清晰。

表 2 荷肝癌裸鼠注射 ^{131}I M cAb JH III F ab' 或 ^{131}I M cAb JH III 后 24 h 和 72 h 的 L I 值
 Tab 2 The L I values at 24 h and 72 h after intraperitoneal injection of ^{131}I M cAb JH III F ab' or ^{131}I M cAb JH III in nude mice bearing hepatocellular carcinoma

时间 (h)	有关脏器、组织													
	血液	皮肤	肌肉	骨骼	胃	肠	肺	肝	脾	肾	脑	心	甲状腺	肿瘤
24	1.00	0.72	0.85	0.94	0.33	0.31	0.16	0.63	0.32	0.89	0.56	0.46	0.14	1.15
72	1.00	0.36	1.25	0.16	0.57	0.51	0.53	0.62	0.57	1.38	0.72	1.30	0.54	2.56

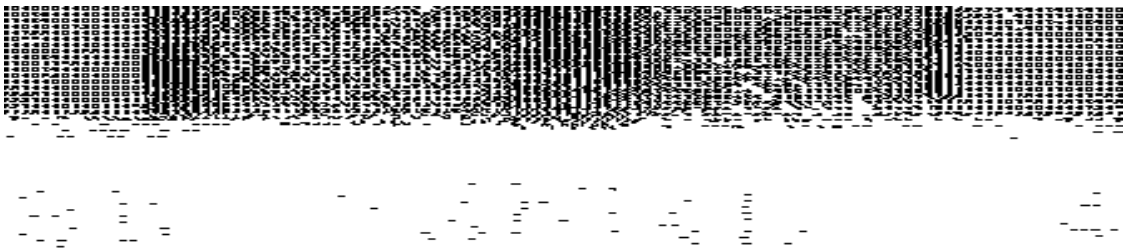


图 2 腹腔注射 ^{131}I M cAb JH III F ab' 于荷肝癌裸鼠后 24、48 与 72 h 的 γ 显像

Fig 2 The γ image of nude mice bearing hepatocellular carcinoma at 24 h, 48 h and 72 h after intraperitoneal injection of ^{131}I M cAb JH III F ab'

3 讨论

随着 M cAb 技术的发展, 应用放射性核素标记抗肿瘤 M cAb, 为肿瘤的影像诊断和导向治疗开辟了一条新的途径。1959 年 Porter 首先对 Ig 的活性片段进行酶切, 深入地阐明了结构与功能之间的对应关系。而对 M cAb 活性片段的研究同样具有重大的应用价值。由于片段的分子小于完整的 M cAb, 在体内显像诊断及治疗时更易进入实体组织深处, 可以明显提高诊断的敏感性及治疗的有效性。同时 M cAb 失去了 Fc 段, 也就失去了主要的抗原决定簇, 这样就可以降低体内显像诊断时的本底, 避免体外检测

时的假阳性或减轻异种 M cAb 体内引起的过敏反应。本文结果表明, 给荷瘤裸鼠注射 ^{131}I M cAb JH III F ab' 后 72 h, 13 种器官组织的 T/N T 值均大于 3 (3.62~23.20), 肿瘤的定位指数为 2.58, 均与放射免疫显像结果相符。影像显示肿瘤的部位、大小和形状也与活体完全一致。提示 M cAb JH III F ab' 在生物体内更能识别肿瘤和正常组织, 对肝癌组织有更好的定向选择性。在 24~96 h, 肿瘤部位始终有放射性浓聚, 随着时间延长, 周围本底基本消除 (72~96 h), 提示 M cAb JH III F ab' 在生物体内有更好的亲和力, 为临床应用提供了重要的生物参数, 其潜在的应用价值值得深入研究 (下转第 27 页)

3 讨 论

E6是我校免疫学教研室制备的一株分泌鼠抗 hTNF α 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,它所分泌的单克隆抗体具有较强的体内中和活性^[6]。近年来,由于 hTNF在多种炎症、组织损伤、感染性休克和自身免疫性疾病的发生发展过程中所起的作用和这些疾病症状凶险、治疗困难的特点,已使 hTNF拮抗物的临床基础研究受到了较广泛的重视,因而这株具有较强的 hTNF α 体内中和活性的鼠单克隆抗体 E6 有可能在预防和治疗因 hTNF α 产生过量而致的炎症和感染性休克、抑制免疫排斥反应及促进组织损伤修复等方面具有临床应用价值。由于鼠源单克隆抗体存在的突出缺陷,获取其可变区基因并做进一步基因工程改造,已成为其走向应用的重要步骤。

我们分别采用两对不同位置的引物一针对小鼠 Ig重链恒定区基因(C γ 1)序列的锚PCR引物和针对其重链可变区基因序列的PCR引物,从E6杂交瘤细胞中扩增出自5'非翻译区至C γ 1近3'端的重链基因片段和重链可变区基因片段,并测定了其核苷酸序列。两对引物扩增出完全相同的抗体重链可变区基因,经计算机分析表明是新的重排的鼠 Ig重链基因序列。这将为 E6单克隆抗体的改造和应用打下基础。

(感谢本校免疫学教研室金伯泉教授惠赠杂交瘤细

胞株,朱勇博士承担杂交瘤细胞培养工作。)

参考文献

- 1 Saikkonen K, Sande S, Cioffe C, *et al*. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* 1990; 171: 439
- 2 Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, *et al*. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987; 237: 1210
- 3 O'Leary A, Defeo-Jones D, Boyer M, *et al*. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* 1987; 50: 555
- 4 Opal SM, Cross AS, Kelly NM, *et al*. Efficacy of a monoclonal antibody directed against tumor necrosis factor in protecting neutropenic rats from lethal infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1990; 161: 1148
- 5 Tracey KJ, Fong Y, Hess DG, *et al*. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 1987; 330: 662
- 6 刘雪松, 金伯泉, 朱勇, 等. 抗重组人肿瘤坏死因子 α M α Ab的研制及其初步应用. 单克隆抗体通讯 1995; 11(2): 7
- 7 Chromyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156
- 8 杨安钢, 吉昌华, 韩骅, 等. 抗人 CD8单克隆抗体 κ 轻链可变区基因的克隆和序列测定. 生物化学与生物物理进展 1992; 19(4): 286

(收稿 1996-06-06 修回 1996-06-16)

(上接第4页)

参考文献

- 1 苏金华, 等. 抗人肝癌单克隆抗体 JHIII的制备及其生物学特性. 厦门大学学报(自然科学版) 1994; 33(5): 722
- 2 苏金华, 等. ¹³¹I M α Ab JHIII对裸鼠荷人肝细胞癌的放射免疫显像研究. 上海实验动物科学 1995; 15(2): 65
- 3 徐志凯编. 实用单克隆抗体技术. 西安: 陕西人民出版社 1992; P132

- 4 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680
- 5 Larson SM, *et al*. Imaging of melanoma with ¹³¹I-labeled antibodies. *J Nucl Med* 1983; 24: 123
- 6 邓敬兰, 等. ¹³¹I标记抗胃癌单克隆抗体(MG7)在荷人胃癌裸鼠体内的分布及显像研究. 单克隆抗体通讯 1988; 4(3): 16

(收稿 1996-06-24 修回 1996-08-28)