

¹⁸⁸Re-Herceptin-磁性纳米微粒的体外抗肿瘤作用

李贵平 汪勇先 张一帆 张春富

【摘要】 目的 探讨¹⁸⁸Re-Herceptin-磁性纳米微粒在外置磁场下对 HER-2/neu 癌基因高表达的 SKBR-3 乳腺癌细胞的靶向结合性及抗癌作用。方法 采用戊二醛交联法使人源性单克隆抗体 Herceptin 与磁性纳米微粒交联,用直接标记法制备¹⁸⁸Re-Herceptin 及¹⁸⁸Re-Herceptin-磁性纳米微粒,用羰基铈标记法制备¹⁸⁸Re-磁性纳米微粒。肿瘤细胞体外抑制实验设 4 个组:¹⁸⁸Re-Herceptin-磁性纳米微粒组、¹⁸⁸Re-Herceptin 组、¹⁸⁸Re-磁性纳米微粒组和¹⁸⁸ReO₄⁻ 组,各组均设 3.7 × 10⁴、18.5 × 10⁴、37 × 10⁴、55.5 × 10⁴、74 × 10⁴ Bq/ml 5 个放射性剂量级别;另设生理盐水对照组。采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定各组的抑瘤效应,计算相对抑制率,采用半数抑制放射性浓度 (IC₅₀) 对各组抑瘤作用进行比较和评价。结果 ¹⁸⁸Re-Herceptin-磁性纳米微粒和¹⁸⁸Re-Herceptin 组对 SKBR-3 细胞均有较强杀伤作用,且呈剂量依赖性;而¹⁸⁸Re-磁性纳米微粒和¹⁸⁸ReO₄⁻ 组的杀伤作用较弱。¹⁸⁸Re-Herceptin-磁性纳米微粒组的 IC₅₀ (53.1 × 10⁴ Bq/L) 明显低于¹⁸⁸Re-Herceptin 组 (76.1 × 10⁴ Bq/L);¹⁸⁸Re-磁性纳米微粒组和¹⁸⁸ReO₄⁻ 组的 IC₅₀ 分别为 169 × 10⁴ 和 175 × 10⁴ Bq/L,明显高于前 2 组。结论 ¹⁸⁸Re-Herceptin-磁性纳米微粒和¹⁸⁸Re-Herceptin 均可明显抑制体外培养的 SKBR-3 乳腺癌细胞增殖,且前者的抑制作用较后者强。

【关键词】 乳腺肿瘤;肿瘤细胞,培养的;磁性纳米微粒;同位素标记;铈

Anti-tumor effect in vitro of ¹⁸⁸Re labeled Herceptin-coated magnetite nanoparticles Li Gui-ping*, WANG Yong-xian, ZHANG Yi-fan, et al. * Department of Nuclear Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 Objective SKBR-3 is a breast carcinoma cell line that has overexpression of HER-2/neu proto-oncogen. The aim of this study was to investigate the inhibitive effects of immuno-magnetite targeting therapy ¹⁸⁸Re-Herceptin-coated magnetite nanoparticles (MNP) in SKBR-3 in the presence of magnetic field. **Methods** The Herceptin-MNP and Herceptin were radiolabeled with ¹⁸⁸Re by a direct labelling method, and the histidine-MNP was radiolabeled with ¹⁸⁸Re (¹⁸⁸Re-MNP) by means of fac-[¹⁸⁸Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ as a precursor. By applying a directional external magnetic field with 0.5 T across a 96-well plate containing SKBR-3 cells, the cells were incubated respectively, with ¹⁸⁸Re-Herceptin-MNP, ¹⁸⁸Re-Herceptin, ¹⁸⁸Re-MNP and ¹⁸⁸ReO₄⁻ with different radioactivity dose (3.7 × 10⁴, 18.5 × 10⁴, 37 × 10⁴, 55.5 × 10⁴ and 74 × 10⁴ Bq/ml). The inhibition was determined with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. **Results** The 50% inhibition doses (IC₅₀) of ¹⁸⁸Re-Herceptin-MNP, ¹⁸⁸Re-Herceptin, ¹⁸⁸Re-MNP and ¹⁸⁸ReO₄⁻ were 53.1 × 10⁴, 76.1 × 10⁴, 169 × 10⁴ and 175 × 10⁴ Bq/L. **Conclusion** Though both ¹⁸⁸Re-Herceptin-MNP and ¹⁸⁸Re-Herceptin can effectively inhibit the growth of tumor cells, ¹⁸⁸Re-Herceptin-MNP seems to be more suitable for immuno-magnetite targeting therapy in HER-2/neu positive breast cancer patients in the future.

【Key words】 Breast neoplasms; Tumor cells, cultured; Magnetic nanoparticles; Isotope labeling; Rhenium

将肿瘤特异性抗体结合到载药磁性纳米微粒上,使后者具有肿瘤特异性,其靶向抗肿瘤作用可能会更强^[1]。目前使用的抗体多属鼠源性,应用于人体时会产生人抗鼠抗体而降低疗效,甚至可引起过敏等不良反应^[2,3]。为此,笔者制备了特异性结合 HER-2/neu 癌基因的¹⁸⁸Re-免疫磁性纳米微粒 (Herceptin-磁性纳米微粒),并检测其在体外对 HER-2/neu

癌基因高表达的乳腺癌细胞的靶向结合性及抗癌作用,现报道如下。

材料与方法

1. 细胞株及单克隆抗体。乳腺癌细胞株 SKBR-3 为高表达 HER-2/neu 癌基因表达蛋白的细胞株,由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。人源性单克隆抗体 Herceptin 由 Roche 公司提供。

2. ¹⁸⁸Re 标记物的制备。新鲜无载体的¹⁸⁸ReO₄⁻ 由¹⁸⁸W-¹⁸⁸Re 发生器 (上海安盛科兴药业有限公司提供) 产生,用生理盐水淋洗得到。¹⁸⁸Re 标记磁性纳米微粒:采用羰基铈标记法^[4],

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2003033345)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院核医学科 (李贵平);中国科学院上海应用物理研究所放射性药物研究中心 (汪勇先、张春富);上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科 (张一帆)

标记前体 $\text{fac-}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 自行制备。 ^{188}Re -Herceptin 和 ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒采用直接标记法制备,方法参照文献[5]。单克隆抗体的免疫活性分数测定采用细胞结合分析法[6]。 ^{188}Re -Herceptin 标记率和放化纯的测定采用双体系[生理盐水与新华 1 号层析滤纸, $V(\text{乙醇}):V(\text{氨水}):V(\text{水})=2:1:5$ 的溶液与 5 g/L 人血清白蛋白(HSA)浸泡过的新华 1 号层析滤纸]纸层析法。 ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒的标记率测定采用离心或磁分离法[4]。

3. 对外培养 SKBR-3 细胞的抑制实验。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定对单层培养的肿瘤细胞的抑制效应。设 4 个实验组: ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒组、 ^{188}Re -Herceptin 组、 ^{188}Re -磁性纳米微粒组、 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组,各组设 5 个放射性剂量级别,分别为 3.7×10^4 、 18.5×10^4 、 37×10^4 、 55.5×10^4 、 74×10^4 Bq/ml;另设生理盐水对照组。SKBR-3 细胞用含质量分数 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成约 2.5×10^7 个细胞/L 的悬液,取 200 μl (5000 个细胞/孔)接种于 96 孔板中,置 37 $^\circ\text{C}$ 含体积分数 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,分别加入 ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒、 ^{188}Re -Herceptin、 ^{188}Re -磁性纳米微粒、 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 和生理盐水。各实验组的每个放射性剂量级别设 6 个重复孔,对照组也设 6 个重复孔。将磁铁置于 96 孔板下,再置于含体积分数 5% CO_2 的培养箱,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 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,每孔再加入二甲基亚砷(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(A)值。按下式计算相对抑制率:相对抑制率 = $[(A_{\text{对照组均值}} - A_{\text{实验组均值}}) / A_{\text{对照组均值}}] \times 100\%$,绘制剂量-效应曲线。根据各次相对抑制率求出半数抑制放射性浓度(IC_{50}),并进行比较。

4. 统计学处理。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行方差分析及相关分析。

结 果

1. ^{188}Re 标记物的标记率均 $>90\%$,放化纯均 $>95\%$; ^{188}Re -Herceptin 和 ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒的免疫活性分数分别为 63% 和 57%。

2. ^{188}Re 标记物对 SKBR-3 细胞的抑制作用见表 1。除 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组外, ^{188}Re -磁性纳米微粒组、 ^{188}Re -Herceptin 组及 ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒组随着放射性浓度的增加,相对抑制率增大,呈明显的剂量-效应关系(各组的 r 值均为 -1.000 , $P < 0.01$)。与 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组比较, ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒组和 ^{188}Re -Herceptin 组对 SKBR-3 乳腺癌细胞的抑制作用较强,其中以前者更为明显(F 值分别为 5.688、4.824、41.143、

132.517 和 236.347, P 均 < 0.05);而 ^{188}Re -磁性纳米微粒组的抑瘤作用相对较弱。

3. 各组 IC_{50} 的比较。 ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒组的 IC_{50} (53.1×10^4 Bq/L) 明显低于 ^{188}Re -Herceptin 组 (76.1×10^4 Bq/L),而 ^{188}Re -磁性纳米微粒组和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组的 IC_{50} 则分别为 169×10^4 和 175×10^4 Bq/L,明显高于前 2 组。

讨 论

本研究制备了具有癌基因 HER-2/neu 靶向特异性的 Herceptin-磁性纳米微粒,并成功进行了 ^{188}Re 标记。 ^{188}Re 标记物的标记率均 $>90\%$,放化纯均 $>95\%$, ^{188}Re -Herceptin 和 ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒的免疫活性分数分别为 63% 和 57%,表明两者均能以较高的结合率与 SKBR-3 细胞特异性结合,且 ^{188}Re 直接标记法对抗体的免疫活性影响不明显。

本研究结果表明,与 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组比较, ^{188}Re -磁性纳米微粒组对 SKBR-3 乳腺癌细胞的抑制作用也较弱,仅在放射性浓度为 74×10^4 Bq/ml 时,其抑瘤作用增强,与 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组比较差异有统计学意义($F = 236.347, P < 0.05$),这可能与 2 类标记物均不会与肿瘤细胞发生特异性结合有关;而人源性单克隆抗体 Herceptin 则对 HER-2/neu 癌基因高表达的 SKBR-3 细胞有特异结合作用,在磁场作用下, ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒组和 ^{188}Re -Herceptin 组对肿瘤细胞的相对抑制率明显高于 ^{188}Re -磁性纳米微粒组和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组, ^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒组在放射性浓度较大 (37×10^4 、 55.5×10^4 和 74×10^4 Bq/ml) 时,对肿瘤细胞的相对抑制率又明显高于 ^{188}Re -Herceptin 组(表 1)。可见,Herceptin-磁性纳米微粒在磁场作用下可以增强放射性核素对肿瘤细胞的杀伤作用。其原因除与抗体的免疫结合及放射性核素的辐射作用有关外,磁性纳米微粒的磁靶向也起了一定的作用。因此,放射性核素标记的免疫磁性纳米微粒对肿瘤细胞的杀伤作用高于单纯放射性核素标记单克隆抗体。

志谢 本研究得到南方医院院长基金资助

参 考 文 献

[1] 常津. 具有复合靶向抗癌功能的纳米高分子材料——阿霉素免疫磁性毫微粒的制备及体外试验. 中国生物医学工程学报, 1996, 15: 97-101.
 [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 $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ via a cathepsin cleavable linker with cyclosporine to prevent human anti-mouse antibody. Clin Cancer Res,

表 1 各实验组对乳腺癌 SKBR-3 细胞的相对抑制率

组 别	放射性浓度 ($\times 10^4$ Bq/ml)					%
	3.7	18.5	37	55.5	74	
$^{188}\text{ReO}_4^-$ 组	2.393 \pm 5.621	6.358 \pm 7.495	9.612 \pm 6.327	15.340 \pm 3.873	22.860 \pm 3.870	
^{188}Re -磁性纳米微粒组	2.953 \pm 6.861	7.848 \pm 5.520	12.346 \pm 4.815	18.936 \pm 2.289	29.341 \pm 3.818 ^a	
^{188}Re -Herceptin 组	9.475 \pm 3.931 ^a	14.698 \pm 10.747	25.349 \pm 3.269 ^{ab}	37.394 \pm 4.130 ^{ab}	50.219 \pm 2.696 ^{ab}	
^{188}Re -Herceptin-磁性纳米微粒组	13.973 \pm 5.963 ^{ab}	20.823 \pm 4.376 ^{ab}	35.247 \pm 2.987 ^{abc}	52.256 \pm 4.004 ^{abc}	67.610 \pm 2.336 ^{abc}	

注:与 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 组比较, ^a $P < 0.05$;与 ^{188}Re -磁性纳米微粒组比较, ^b $P < 0.05$;与 ^{188}Re -Herceptin 组比较, ^c $P < 0.05$

2005, 11; 5920-5927.

[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. Nucl Med Commun, 2004, 25; 807-811.

[4] 曹金全, 汪勇先, 于俊峰, 等. 磁性纳米微粒的¹⁸⁸Re 标记. 同

位素, 2004, 17; 84-89.

[5] 范莉, 王东琪, 吴永慧, 等. ¹⁸⁸Re 直接法标记抗人结肠癌单克隆抗体 CL-3 的研究. 同位素, 2000, 13; 83-87.

[6] 苗积生, 沈毅. 核素标记抗体与抗原亲和常数及结合容量测定. 中华核医学杂志, 2001, 21; 311-313.

(收稿日期: 2006-07-14)

· 短篇论著 ·

SPECT 脑血流灌注显像 2D ROI 和 3D VOI

对脑内血肿吸收的评估比较

朱汇庆 李鼎 张光明 刘兴党 林祥通

本研究探讨高血压性脑出血患者 SPECT 脑血流灌注显像中二维感兴趣区(2D ROI)和三维感兴趣区体积(3D VOI)对脑内血肿吸收的评估比较, 现报道如下。

一、资料与方法

1. 研究对象。2003 年 9 月~2004 年 4 月临床诊断为基底节区高血压性脑出血、入院行神经内科治疗的患者 26 例, 其中女 8 例, 男 18 例, 年龄 $[55.7 \pm 10.1(35 \sim 77)]$ 岁。临床检查均出现偏瘫或轻偏瘫、偏身感觉障碍和同向性偏盲(三偏症状), 但无昏迷或明显精神障碍。入院前头颅 CT 检查示基底节区脑出血, 出血量中等或少量, 可行神经内科保守治疗。

2. 显像方法。26 例患者第 1 次显像在发病 48 h 内完成, 治疗约 2 周后行第 2 次检查。显像仪器为 Siemens E. CAM Dual Head Variable SPECT 仪, 配低能高分辨准直器, 能峰 140 keV, 窗宽 15%。受检者避免声光刺激, 静脉注射^{99m}Tc-双半胱乙酯(ECD, 上海欣科医药有限公司提供)20~30 min 后采集图像。图像采集、重建方法均参照文献[1]。

3. 图像分析。由 ICON 工作站行病变区/对侧对应正常区 2D ROI 半定量分析。3D VOI 半定量分析: 将所有患者的 SPECT 脑血流灌注图像处理后以 DICOM 格式的数据导入计算机, 经 MRIcro 1.36 软件进行数据转换, 成为 MRIcro 可执行文件, 并行 3D 重建。利用正常脑组织和病变区放射性计数差较大的特点, 选用合适的阈值使病变区与正常脑组织的区别得以清晰显示, 以利于计算机勾画 VOI。并以大脑垂直中线平面为轴面翻转至对侧正常区域, 计算病变区/对侧正常脑组织放射性比值。

4. 统计学处理。采用 SPSS 10.0 软件, 行配对 *t* 检验。

二、结果与讨论

所有患者经过 2 周左右的神经内科治疗后病情较为稳定, 其三偏症状有较明显的改善, 患侧肢体的感觉和肌力均有恢复。治疗前后 SPECT 脑血流灌注检查 2D ROI、3D VOI 半定量分析结果为: 2D ROI 分析治疗前放射性比值为 0.58 ± 0.12 , 治疗后为 0.62 ± 0.16 , 两者比较差异无统计学意义($t = 1.818, P = 0.081$); 3D VOI 分析治疗前放射性比值为 $0.44 \pm$

0.19 , 治疗后为 0.49 ± 0.21 , 两者比较差异有统计学意义($t = 2.477, P = 0.02$)。

高血压性脑出血的主要原因为脑内血管的变性破裂, 出血部位最常见为基底核。CT 平扫是诊断此病的首选方法。在脑出血急性期, 随着血凝块的形成和收缩, 血肿的密度随之增高, CT 图上特征明显, 血肿常呈圆形或类圆形伴周围低密度环形影。恢复期血肿随红细胞溶解、吸收, 密度逐渐降低, CT 扫描仅是根据血肿由高密度逐渐变为等或低密度判断所见血肿的吸收和缩小, 而对血肿周围水肿脑组织的恢复需经更长时间方可见到。脑出血的 MRI 表现比较复杂, 信号强度随血肿内成分的不同和 MRI 场强不同而表现各异。加之血肿转归的多种变化, 同一时期的血肿其 MRI 表现也不尽相同。^{99m}Tc-ECD SPECT 脑血流灌注显像所显示的脑实质内放射性减低区, 不仅包括脑内血肿, 还包括血肿周围受压水肿的脑组织。当患者通过有效的治疗后, 脑内血肿被吸收, 其对周围组织的压迫减轻, 血肿周围脑组织的血供可得到有效的恢复。这些改变均可通过 ROI 放射性计数的变化反映。脑内血肿的吸收是一个由周边向中心逐渐减少的过程, 因此, 如果单用病变区最大层面的病变区面积改变对临床疗效和病程进行判断, 可能不如用整个病变区体积的改变判断更灵敏。3D VOI 是分析整个 ROI 整个体积放射性计数的方法^[2]。本研究患者 3D VOI 范围较易确定, 得益于血肿部位的血流灌注与周围脑组织的血流灌注差异较大, 故选取阈值较为明确。本研究结果表明轻中度高血压性脑出血患者经过约 14 d 的有效治疗后, 通过^{99m}Tc-ECD SPECT 脑血流灌注显像 3D VOI 半定量分析, 可得出临床疗效和病灶转归较为一致的判断。

参 考 文 献

[1] 刘兴党, 赵军. 临床核医学诊疗要览. 上海: 复旦大学出版社, 2005; 10-11.

[2] Radau PE, Linke R, Slomka PJ, et al. Optimization of automated quantification of ¹²³I-IBZM uptake in the striatum applied to Parkinsonism. J Nucl Med, 2000, 41; 220-227.

(收稿日期: 2006-06-06)