

# 抗癌胚抗原单抗免疫磁性纳米微粒的制备及其与 <sup>188</sup>Re的放射性标记

李贵平\* 汪勇先<sup>△</sup> 张春富<sup>△</sup> 张辉\*

**摘要** 目的: 将抗 CEA 单抗与磁性纳米微粒偶联制备免疫磁性纳米微粒用于肿瘤的靶向治疗, 并对其进行 <sup>188</sup>Re 标记。方法: 采用氨基硅烷化修饰的磁性纳米微粒, 选择不同的酸度经戊二醛活化后, 在不同的酸度下与抗 CEA 单抗交联制备免疫磁性纳米微粒, 并对 <sup>188</sup>Re 标记免疫磁性纳米微粒的实验条件进行探索。结果: 以抗坏血酸作为抗体的还原剂, 以 SnCl<sub>2</sub>-柠檬酸还原 <sup>188</sup>ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> 溶液进行抗体的直接标记, 结果表明, 反应 3h 的标记率为 90%, <sup>188</sup>Re-免疫磁性纳米微粒的免疫活性是 <sup>188</sup>Re-抗 CEA 单抗的 95%, <sup>188</sup>Re 标记物的体外稳定性 24h 为 91%、48h 为 85%。结论: <sup>188</sup>Re-免疫磁性纳米微粒的标记率及标记稳定性可满足于进一步的肿瘤靶向治疗的体内研究。

**关键词** 抗癌胚抗原单抗 <sup>188</sup>Re 磁性纳米微粒 标记

## Preparation and Radio labelling (with <sup>188</sup>Re) of Immuno- magnetic Nanoparticles Conjugated with Anti- CEA Monoclonal Antibodies

Li Gui ping\*, Wang Yongxian<sup>△</sup>, Zhang Chunfu<sup>△</sup>, Zhang Hui\*

\* Department of Nuclear Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou (510515)

<sup>△</sup> Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai (201800)

**Abstract Objective** To prepare and radio- label (with <sup>188</sup>Re immuno- magnetic nanoparticles through conjugation ( coupling of anti- CEA monoclonal antibodies with magnetic nanoparticles for magnetically targeted therapy against tumors. **Methods** Magnetic nanoparticles were modulated with akylation by an inosilicon. The modulated preticles were activated with glutaraldehyde. Immuno- magnetic nanoparticles were prepared from these activated particles conjugated ( coupled with anti- CEA monoclonal antibodies at optimal pH. Furthermore, the optimal condition for direct radio- labelling these immuno- magnetic particles with <sup>188</sup>Re was explored and established. **Results** Ascorbic acid was used as the reducing agent for anti- CEA antibody. SnCl<sub>2</sub>- citric acid was used for reduction of <sup>188</sup>ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> solution to label the antibody directly. The whole procedure was optimized and the labelling was complete at 3h with a labelling rate of 90%. The immuno- activity of the labelled immuno- magnetic particles was as high as 95% of that of <sup>188</sup>Re- antiCEA monoclonal antibody (used as positive control. The labelled magnetic particles were quite stable in calf serum ( immunoactivity= 91% of the original value at 24h and 85% at 48h. **Conclusion** This preparation is applicable for further in vivo study on tum or targeted therapy.

**Key Words** anti- CEA monoclonal antibody, <sup>188</sup>Re, magnetic nanoparticle, labeling

将肿瘤特异性抗体结合到载药磁性纳米微粒制备出具有抗体导向的磁性纳米微粒, 即免疫磁性纳米微粒, 能使载药磁性纳米微粒具有与肿瘤结合的特异性, 其靶向抗肿瘤作用可能会更强<sup>[1-3]</sup>。本文利用具有广谱抗肿瘤特性的抗 CEA 单抗与磁性纳米微粒交联制备了具有靶向 CEA 分泌肿瘤特异性的免疫磁性纳米微粒, 同时以抗坏血酸作为抗体的还原剂, 以 SnCl<sub>2</sub>-柠檬酸还原 <sup>188</sup>ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> 溶液, 对免疫磁性纳米微粒进行 <sup>188</sup>Re 的直接标记, 现报道如下。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 硅烷偶联剂 N-β-(氨乙基-γ-氨丙基三甲氧基硅烷 (SG-S900: 工业品, 纯度 ≥ 95%, 购自南京曙光化工总厂; 戊二醛、巴比妥钠和柠檬酸均购自上海化学试剂公司; 小牛血清购自上海生物制品研究所; 氯化亚锡

和抗坏血酸由 Sigma 公司提供; Nd-Fe-B 永磁体购自上海跃龙有色金属有限公司。<sup>188</sup>W-<sup>188</sup>Re 发生器: 上海安盛科兴药业公司提供。抗 CEA 单抗由上海市免疫学研究所提供。结肠癌 LoVo 细胞株购自中科院上海细胞研究所。

磁性纳米微粒的粒径和形貌用 HITACHI 600 型透射电镜 (TEM) 和 LEO1530VP 型扫描电镜 (SEM) 观察。标记率和放射性活度用 Biscan AR2000 型薄层色谱 (TLC) 仪、上海日环一厂生产的 SN-697 型 γ 计数器和北京核仪器厂生产的 FJ-391A2 型活度计测定。

### 1.2 方法

**1.2.1 氨基硅烷化磁性纳米微粒的制备** 采用部分还原沉淀法制备四氧化三铁磁微粒子, 并用硅烷偶联剂进行表面修饰。具体制备方法参照文献<sup>[4]</sup>进行。

**1.2.2 活化的氨基化磁性纳米微粒的制备** 称取 10mg 氨基硅烷化磁性纳米微粒, 悬浮于 0.01M pH8 的 PBS 中, 在搅拌下慢慢滴加戊二醛水溶液, 使其最终浓度达 3%, 在室温下搅拌反应 3.5h。反应结束后, 用磁性分离器除去未反应的戊二醛溶液, 并用蒸馏水及缓冲液充分洗涤该磁微粒子 2 次。然后将活化的磁微粒子悬浮于 PBS 中。

本课题获得中国博士后科学基金资助(2003033345)及南方医科大学南方医院院长基金资助

\* 南方医科大学南方医院核医学科 (510515)

<sup>△</sup> 中国科学院上海应用物理研究所 (201800)

1.2.3 抗 CEA 单抗与活化的氨基化磁性纳米微粒的连接 (免疫磁性纳米微粒 取 10mg 戊二醛活化磁粒, 于搅拌情况下, 滴加经纯化后的抗 CEA 单抗溶液, 使抗体的反应浓度达到 3mg/ml 置室温下搅拌反应 24h, 反应结束后, 用 PBS 洗涤磁微粒子 2 次, 收集未反应的单抗溶液 (上清液, 并用紫外分光吸收定量蛋白含量。

1.2.4  $^{188}\text{Re}$  标记免疫磁性纳米微粒 ( $^{188}\text{Re}$ -抗 CEA 单抗-磁性纳米微粒 参照抗体的  $^{188}\text{Re}$  标记方法, 采用直接标记法<sup>[5]</sup>。标记方法如下<sup>[4]</sup>: 首先在 (0.1~1 mg 免疫磁性纳米微粒中加入醋酸缓冲液 (pH 5.2 200 $\mu\text{l}$ ) 和抗坏血酸 4mg 摇匀, 反应 0.5h 使抗体还原。其次在 20g/L 的柠檬酸水溶液中加入 16mg  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 配成 8g/L 的  $\text{SnCl}_2$ -柠檬酸溶液, 取 200 $\mu\text{l}$  该溶液加入 100 $\mu\text{l}$   $^{188}\text{ReO}_4^-$  淋洗液, 反应 15min, 得  $^{188}\text{Re}$  的还原液。最后将上述两种溶液混并振荡 3h 标记完成。标记率测定采用磁场分离法, 总放射性和上清液的放射性用  $\gamma$  计数器或活度计测定。

1.2.5  $^{188}\text{Re}$ -免疫磁性纳米微粒的免疫活性测定 采用 Lindno 报道的细胞结合分析法<sup>[6]</sup>, 采用的靶细胞为 LoVo 结肠癌细胞, 以  $^{188}\text{Re}$ -抗 CEA 单抗作为阳性对照。

1.2.6 体外稳定性测定 将  $^{188}\text{Re}$  标记的免疫磁性纳米微粒用蒸馏水洗涤 2 次, 然后加入 1ml 小牛血清中, 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡温育, 其间分别于 6h 12h 24h 48h 和 72h 取样, 经磁场分离后, 分别测定总放射性及上清液的放射性计数, 计算标记免疫磁性纳米微粒的放射性保留率。

## 2 结果

2.1 免疫磁性纳米微粒的粒径分布和形态 用扫描电镜对制备的免疫磁性纳米微粒作了粒径和形态的检测, 结果证实单个粒径大小平均为 60nm 左右, 但观察到有两聚体和多聚体形式存在。

2.2  $^{188}\text{Re}$  标记免疫磁性纳米微粒 在最佳标记条件下, 即:  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8mg/ml 柠檬酸 20mg/ml 抗坏血酸 8mg/ml 反应容积为 500 $\mu\text{l}$  反应时间为 3h 进行  $^{188}\text{Re}$  标记免疫磁性纳米微粒, 标记率平均为 90%。 $^{188}\text{Re}$ -免疫磁性纳米微粒的免疫活性分数经细胞结合分析法测得为 0.87 而  $^{188}\text{Re}$  标记的抗 CEA 单抗的免疫活性分数为 0.92 前者为后者的 95%。可见在与磁性纳米微粒结合并经  $^{188}\text{Re}$  标记后, 单抗的免疫活性仅下降 5%, 说明本标记方法条件温和, 制备出的  $^{188}\text{Re}$ -免疫磁性纳米微粒仍保留有较高的免疫活性。

2.3  $^{188}\text{Re}$  标记免疫磁性纳米微粒的体外稳定性  $^{188}\text{Re}$  标记免疫磁性纳米微粒在小牛血清中的稳定性测定结果见表 1。由表 1 可知, 该标记物在小牛血清中保存 48h 后仍有 85% 的放射性保留在免疫磁性纳米微粒上, 表明该标记物能稳定存在。小牛血清中的环境类似动物的体内环境, 因此可以初步说明该标记物在体内有可能稳定存在。

表 1  $^{188}\text{Re}$  标记的免疫磁性纳米微粒在小牛血清中的稳定性

放置时间 (h)	放射性保留率 (%)
6	98
12	95
24	91
48	85
72	78

## 3 讨论

磁性纳米微粒除了具有一般纳米微粒的特性外, 如粒径小、比表面积大, 具有表面效应; 还具有超顺性, 在外加磁场的作用下, 可定向移动, 从而进行靶向治疗<sup>[7,8]</sup>。本文采用部分还原沉淀法制备四氧化三铁磁性纳米微粒, 制备工艺简单, 在常规的实验条件下即可完成。将抗 CEA 单抗修饰磁性纳米微粒后, 所形成的纳米微粒平均粒径在 60nm 的范围内, 达到纳米级水平, 悬浮稳定性较好, 可用于下一步的动物实验研究中。

在构建免疫磁性纳米微粒时, 尤其是在使用放射性核素对其进行标记时, 既要保持单抗的免疫活性, 又要保证免疫磁性纳米微粒能够特异性地靶向于肿瘤部位, 为此, 必须充分保持单抗的免疫活性。也只有具有免疫活性的磁性纳米微粒才能完成导向作用, 将磁性纳米微粒主动地转运到肿瘤部位, 达到对肿瘤诊断和治疗的目的<sup>[9]</sup>。本文采用以戊二醛作为交联剂将抗 CEA 单抗连接到氨基化磁性纳米微粒的表面, 以抗坏血酸作为抗体的还原剂, 以  $\text{SnCl}_2$ -柠檬酸还原  $^{188}\text{ReO}_4^-$  溶液, 进行免疫磁性纳米微粒的直接标记, 结果表明, 标记率高 (90%, 标记完成后仅需磁铁即可达到纯化分离的目的,  $^{188}\text{Re}$  标记的免疫磁性纳米微粒具有良好的体外稳定性。

采用细胞结合分析法测定标记的免疫磁性纳米微粒的免疫活性, 结果表明其免疫反应活性与  $^{188}\text{Re}$  标记的抗 CEA 单抗比较仅下降了 5%。在抗坏血酸与抗体的摩尔比为 3500:1 时, 每分子 IgG 可打开约 2 个二硫键。抗体中链内二硫键起着连接功能区的作用, 而链间二硫键所起作用较小, 能被选择性还原成巯基而对抗体的结构和免疫活性影响不大。并且低价铁有可能插入到二个还原巯基间, 重新保持它原来的结构, 有可能补偿二硫键还原断裂带来的抗体活性损失。因此, 标记后的免疫磁性纳米微粒上单抗的免疫活性基本保持不变。以抗坏血酸作为抗体还原剂不仅能有效地还原抗体, 使其在接近生理 pH 的条件下进行标记, 而且还能稳定还原后抗体的游离巯基和低价铁, 防止它们的再次氧化。 $^{188}\text{Re}$  的直接标记方法操作简单、方便, 具有潜在的应用价值。

## 参考文献

- [1] Pankhurst QA, Comolly J, Jones SK, *et al*. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 2003; 36(13): R167.
- [2] Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, *et al*. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 2003; 36(13): R182.
- [3] Berry CC, Curtis ASG. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys* 2003; 36(13): R198.
- [4] Zhang C, Cao J, Yin D, *et al*. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetic nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Appl Radiat Isot* 2004; 61(6): 1255.
- [5] Izaga-Escobar N. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with thulium-188 for radioimmunotherapy of solid tumors- a review of radiolabeling characteristics, quality control and in vitro stability studies. *Appl Radiat Isot* 2001; 54(3): 399.
- [6] Lindno T, Boven E, Cuttitta R, *et al*. Determination of the immuno-

reactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984; 72(1): 77

[7] Jennifer LW, Naemi JH. Application of nanotechnology to biotechnology: commentary. *Curr Opin Biotech* 2000; 11(2): 215

[8] Sorsa MH, Rubin JH, Sobrinho FG, *et al*. Biocompatible magnetic

fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified magnetic nanostructures. *J Magn Magn Mater* 2001; 225(1-2): 67

[9] Rømsen LG, Mørkrid CI, Goldstein SR, *et al*. MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocryalline iron oxide nanoparticles: the potential for noninvasive diagnosis. *AJNR* 1996; 17(3): 411. (2005-08-26 收稿)

## 激光光凝治疗大隐静脉曲张围手术期 TNF-α 和 IL-6 的水平

济宁市计生委 (272100)

王太晗\*

中国人民解放军总医院 (100853)

王春喜

**摘要** 目的: 检测血管内光凝治疗大隐静脉曲张围手术期血浆白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 的水平。方法: 大隐静脉曲张患者 110 例, 其中行血管内激光光凝治疗者 43 例, 行静脉瓣膜环包联合血管内光凝者 35 例, 行大隐静脉高位结扎、分段剥脱治疗者 32 例。110 例患者中有明显皮肤营养障碍者 56 例。在治疗前及治疗后 1, 3, 7, 14d 取静脉血, 采用放射免疫分析检测血浆内 IL-6 和 TNF-α 的水平。另外取正常献血者 33 例作为对照。结果: 皮肤正常大隐静脉曲张患者较正常血浆 IL-6 和 TNF-α 水平没有明显改变, 而伴有明显皮肤营养障碍和血栓形成患者 IL-6 和 TNF-α 皆高于正常。三种术式进行治疗围手术期 IL-6 和 TNF-α 均呈现先升高后降低, 最后恢复至正常水平的趋势。IL-6 和 TNF-α 水平变化幅度由小到大和恢复到正常水平的顺序为血管内激光光凝治疗组、静脉瓣膜环包联合血管内光凝、大隐静脉高位结扎、分段剥脱治疗组。结论: 血浆 IL-6 和 TNF-α 水平高低是判断治疗大隐静脉曲张不同手术方式的应激强度大小和病程转归的一种指标。

**关键词** 大隐静脉曲张 光凝 白细胞介素-6 肿瘤坏死因子-α

## Changes of Plasma IL-6 and TNF-α Levels During Peri-Operative Period in Patients Undergoing Laser Photo-Coagulation of Greater Saphenous Varicosities

Wang Tahan

Jining Municipal Commission of Population and Family Planning (272100)

Wang Chunxi

The General Hospital of Chinese PLA Beijing (100853)

**Abstract Objective** To investigate the plasma levels of IL-6 and TNF-α during peri-operative period in patients undergoing laser photocoagulation of greater saphenous varicosities. **Methods** Plasma IL-6 and TNF-α levels were determined with RIA before operation and 1, 3, 7, 14 days post-operatively in 110 patients with greater saphenous vein varicosity undergoing different forms of treatment (intravascular laser photocoagulation 43, photocoagulation combined with venous valve repair 35, high ligation and segmental stripping 32). Skin trophic disturbances were present in 56 of the 110 patients. Plasma IL-6 and TNF-α levels were also measured in 33 controls. **Results** The plasma IL-6 and TNF-α levels in patients with skin trophic disturbances were significantly higher than those in controls ( $P < 0.01$ ), while levels in patients without skin lesions were not much changed. The plasma IL-6 and TNF-α levels were increased at first and dropped later to approaching pre-operative value by d14 in all the 110 patients after operation, however the amount of increase was least and the normalization was also soonest in the simple photocoagulation group, the reverse was true for the conventional operation group. **Conclusion** Laser photocoagulation is least stressful among the three types of operation and magnitude of changes of plasma IL-6 and TNF-α levels correctly reflects the intensity of stress.

**Key Words** varicosities of great saphenous vein, laser photocoagulation, interleukin-6, tumor necrosis factor

血管内光凝治疗大隐静脉曲张因其创伤小, 切口小, 美观, 恢复快等优点, 逐渐被医生和患者接受, 而关于其治疗后血管活性因子水平变化的测定比较少, 本文检测激光光凝治疗大隐静脉曲张后血浆细胞因子 IL-6 和 TNF-α 的水平,

以探讨其术后病程变化同细胞因子水平的关系。

### 1 材料和方法

**1.1 病例选择** 110 例 (男 55 女 45 单侧下肢静脉曲张患者, 年龄 (27~66 岁, 平均 43.5 岁。术前行深静脉血管造影, 单纯性大隐静脉曲张 75 例, 深静脉瓣膜功能不全者 35

\* 天津医科大学临床医学博士生