

·实验核医学·

抗 P-gp 抗体 PHMA02 在裸鼠体内的影像分布研究

秦岚 邵梦麟 王树滨 苏晔 吕晶丽 高瀛岱 刘芳 郭红

【摘要】 目的 研究抗 P-糖蛋白(P-gp)的鼠源性单克隆抗体 PHMA02在移植有 K562/A02 细胞瘤的裸鼠体内的影像分布。方法 通过杂交瘤技术制备 PHMA02 抗体,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western-blot 技术鉴定纯度,荧光激活细胞分选术(FACS) 测抗体与 K562 和 K562/A02 细胞的结合活性,改良氯胺 T 法 ^{125}I 标记抗体,尾静脉注射入裸鼠,分时间点行 SPECT 扫描。结果 纯化所得 PHMA02 纯度较高,与 P-gp⁺ 的 K562/A02 细胞特异性结合阳性率为 94.47%,注入 ^{125}I 标记的 PHMA02 后, P-gp⁺(K562/A02)组第 2 日全部裸鼠瘤区出现放射性浓聚,并在随后数日浓集进一步增强。结论 ^{125}I -PHMA02 抗体在 P-gp⁺(K562/A02)组和 P-gp⁻(K562)对照组的影像学差异可以明确区分 P-gp⁺ 的肿瘤组织。

【关键词】 抗体, 抗独特性; 体层摄影术, 发射型计算机, 单光子; 小鼠, 裸; PHMA02

【中图分类号】 R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)03-0129-03

Investigation of photographic distribution of anti-P-gp antibody PHMA02 in nude mice

QIN Lan¹, SHAO Meng-lin¹, WANG Shu-bin², SU Ye², Lü Jing-li², GAO Ying-dai², LIU Fang², GUO Hong-xing²

(1. Department of Nuclear Medicine, Tianjin First Central Hospital Tianjin 300192; 2. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

【 Abstract】 Objective To investigate the photographic distribution of anti-P-gp monoclonal antibody PHMA02 in nude mice transplanted with K562/A02 cell tumor. **Methods** PHMA02 were prepared by hybridoma technique, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blot were used to analyzed its purity, fluorescence-activated cell sorting(FACS) was also used to determine its binding with K562 and K562/A02 cells. Nude mice were injected i.v with ^{125}I labeled PHMA02, and were scanned on different time by SPECT. **Results** The purity and binding affinity of PHMA02 were both satisfactory. On the second day from injection, radioactivity appeared in all tumor regions of the P-gp⁺(K562/A02) group nude mice, and intensified in the following days. **Conclusion** The photographic difference of PHMA02 distribution between P-gp⁺(K562/A02) and P-gp⁻(K562) group could specifically distinguish the P-gp⁺ tumor tissue.

【 Key Words】 Antibodies, anti-idiotypic; Tomography emission-computed, single-photon; Mice, nude; PHMA02

肿瘤细胞对多种化疗药物产生多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是造成肿瘤化疗失败的主要原因,据有关资料统计,约 90%以上肿瘤患者的死因或多或少与 MDR 有关,肿瘤 MDR 及其逆转已成为肿瘤研究的热点之一。MDR 的形成机制很多,但能在临床得到验证的机制却很少,其中

对由 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)介导的耐药机制的研究最为广泛和深入,并在临床得到了证实^[1,2]。P-gp 是细胞膜表面分子质量为 170×10^3 的糖蛋白,它是 ATP 依赖性的药物外排泵,可将各种不同的细胞毒药物泵出到细胞外,从而降低细胞内的药物水平,阻止药物杀伤细胞的作用。深入研究发现, P-gp 不仅与耐药相关,而且还与肿瘤的侵袭、转移等生物学特性相关。国内外相关资料表明,消化系统肿瘤、乳腺癌等恶性肿瘤细胞的 P-gp 及其 MDR-1 基因 mRNA 的水平与肿瘤细胞的侵袭、转

作者单位:天津市第一中心医院核医学科(秦岚,邵梦麟);中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所血液病医院实验血液学国家重点实验室(王树滨,苏晔,吕晶丽,高瀛岱,刘芳,郭红星)

通讯作者:秦岚(E-mail: qinlan001@sohu.com)

移密切相关,肺癌、结肠癌转移淋巴结有 P-gp 高表达,白血病、淋巴瘤、神经母细胞瘤的 P-gp 高表达与疗效差高度相关。由此可见, P-gp 既可作为肿瘤恶性进展的诊断学标志,也可作为新型的治疗靶点。

目前,临床应用耐药逆转剂已被证实体外具有逆转肿瘤细胞 MDR 作用,此类药物不下数十种,由于临床研究中实际用药剂量很低,患者血药水平远远低于体外研究应用的最佳活性,因此,寻找新的安全有效的逆转剂与开发研制对 MDR 有效的抗癌新药十分必要。单克隆抗体具有特异性强的特点,毒副作用小,因此制备抗 P-gp 的单克隆抗体成为治疗耐药肿瘤的最新策略。Yang 等^[3]建立了一株人红白血病多药耐药细胞系 K562/A02, Xiong 等^[4]以 K562/A02 为抗原,制备了一株抗 P-gp 的鼠源性单克隆抗体 PHMA02,我们进一步研究了 PHMA02 在移植有 K562/A02 细胞瘤的裸鼠体内的 SPECT 影像分布,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 细胞系

抗 P-gp 的鼠源性单克隆抗体 PHMA02 杂交瘤细胞、人红白血病多药耐药细胞系 K562/A02 和其亲代细胞 K562 由中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所提供,培养在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中。

1.2 试剂

蛋白 G Sepharose 4 Fast Flow 购于 Pharmacia 公司,标记的羊抗鼠 IgG 购于北京中山生物工程公司,降植烷(pristane)购于 Sigma 公司,¹²⁵I 购于美国杜邦公司。

1.3 PHMA02 的制备和纯化

将 5×10^6 杂交瘤细胞接种于预先腹腔注射降植烷的 Balb/c 小鼠(由中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤研究所提供)腹腔,7~10 d 后取腹水,经离心去除不溶物质及油状物,用饱和硫酸铵预处理后,使用蛋白 G 纯化系统亲和层析纯化, -20 °C 分装冻存储备用。

1.4 PHMA02 纯度的鉴定

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western-blot 技术。

1.5 PHMA02 与 K562 和 K562/A0 细胞的结合活性

采用荧光激活细胞分选术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)

1.6 PHMA02 的 ¹²⁵I 标记与纯化

改良氯胺 T 法标记 PHMA02, 用 Sephadex G50 柱分离纯化。

1.7 PHMA02 在裸鼠体内的分布

选取 5 周龄雌性 BALB/C 裸鼠,以 4 Gy/ 只的 γ 射线全身照射以破坏小鼠免疫系统,3d 后左侧和右侧背部皮下分别接种 K562 和 K562/A02 (1.0×10^7 /只),至肿瘤长径约为 0.8~1.0 cm,尾静脉注射 ¹²⁵I-PHMA02 1.48MBq/只,注射后 24, 48, 72, 96, 120 h 分别进行 SPECT 扫描。

2 结果

2.1 PHMA02 的鉴定

纯化得到的 PHMA02 用 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析显示,纯化产物在非还原条件下,有一条分子质量约 150×10^3 的蛋白质带,而在还原条件下在分子质量约 25×10^3 和 50×10^3 处各有一条蛋白质带,Western-blot 证明上述蛋白条带为抗体及其抗体的轻、重链(见图 1),其纯度达 90% 以上。

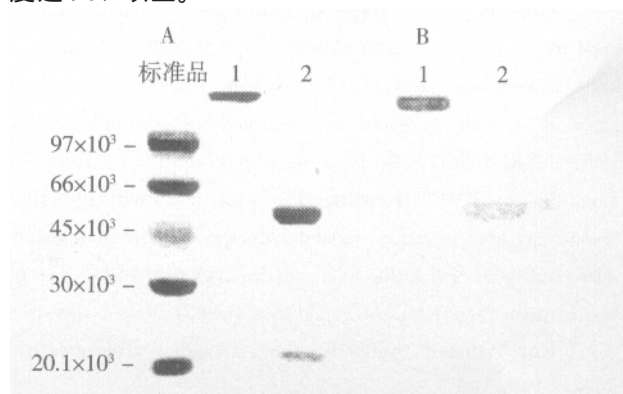


图 1 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(A)及 Western blot(B)分析纯化后的 PHMA02

图中, 1 为非还原的抗 P-gp 抗体 PHMA02, 2 为还原的抗 P-gp 抗体 PHMA02

2.2 PHMA02 与 K562/A02 细胞的结合活性

FACS 结合实验测定结果显示, PHMA02 能与 P-gp⁺ 的 K562/A02 细胞特异性结合, 结合率为 94.47%, 而与 P-gp⁻ 的 K562 细胞无结合。

2.3 ¹²⁵I-PHMA02 的放化特性

标记率 89.0%, 比活度 40.7 MBq/ μ g, 放化纯度 99.2%。

2.4 ^{125}I -PHMA02 抗体在裸鼠体内的分布

注入 ^{125}I -PHMA02 后行 SPECT, P-gp^+ (K562/A02) 组第 2 日全部裸鼠瘤区出现放射性浓聚, 但心脏、肾脏仍有残影, 第 3 日时肿瘤周围本底下降, 肿瘤显像逐渐清晰, 第 5 日时肿瘤部位浓集进一步增强(见图 2); P-gp^- (K562) 对照组则未见肿瘤内有放射性浓聚。

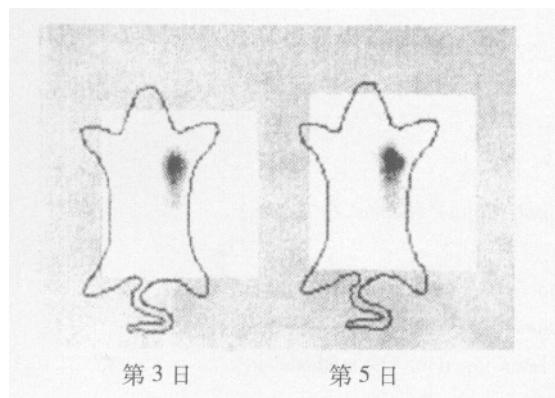


图 2 ^{125}I -PHMA02 在 P-gp^+ 荷瘤裸鼠体内定位分布

3 讨论

恶性肿瘤的转移灶和治疗后残留灶的复发是肿瘤患者的主要死因之一, 也是肿瘤治疗所面临的主要困难和挑战。肿瘤的免疫疗法是激发或增强肿瘤宿主的免疫功能, 以达到控制和杀灭肿瘤细胞的目的。应用针对特异肿瘤抗原的单克隆抗体对肿瘤进行治疗是肿瘤免疫疗法的重要组成部分。1997 年, 美国 FDA 批准 IDEC 公司、Genentech 公司、瑞士 F. Hoffmann-La Roche 公司和日本 Zenyaku Kogyo 公司合作开发的基因工程抗 CD20 人鼠嵌合抗体 Rituxan 应用于 B 淋巴细胞非霍奇金病临床治疗, 这是单克隆抗体研究史上新的里程碑, 随后 Genentech 公司生产的 Herceptin 亦获 FDA 批准并应用于乳腺癌临床治疗。与传统化疗相比, 单克隆抗体具有针对性强的特点, 因此避免了对正常组织的杀伤, 特别对于清除肿瘤的残留灶、转移灶具有良好应用前景。

肿瘤的抗体疗法中特异性的靶抗原的选择是至关重要的。我们选择 P-gp 作为靶抗原的原因主要有以下 3 点:

(1) 目前认为肿瘤 MDR 的发生机制是多因素的, 可随诱导药物的不同、肿瘤细胞的种类和分化

阶段的不同而表现出不同耐药表型, 而在诸多耐药机制中能在临床得到验证的却很少, P-gp 是目前惟一在临床实践得到证实的耐药机制, 也是逆转 MDR 的主要靶点。

(2) 国内外众多研究表明, P-gp 不仅与肿瘤耐药相关, 而且与肿瘤的侵袭、转移等恶性行为有关。用小鼠肝癌模型进行研究发现, P-gp 的表达水平与肝癌的恶性进展过程相关, 许多侵袭性肿瘤也高表达 P-gp 。

(3) P-gp 为一广谱的耐药肿瘤抗原, 因此针对 P-gp 的单克隆抗体具有更为广泛的应用价值。实验证实, 在肝、胃、肠等消化系统的恶性肿瘤、小细胞肺癌、乳腺癌等耐药实体瘤及耐药血液病均可检测到 P-gp 的高表达, 且肿瘤的预后与 P-gp 的表达高度相关。

P-gp 是细胞膜表面的糖蛋白, 是 ATP 依赖性的药物外排泵, 可将各种不同的细胞毒药物泵出到细胞外, 从而降低细胞内的药物浓度, 阻止药物杀伤细胞的作用, 了解肿瘤细胞 P-gp 表达水平可以指导化疗药物的选择, 同时也可以作为肿瘤恶性进展的诊断学标志。本研究利用 SPECT 闪烁显像技术可以直观了解白血病患者多药耐药细胞系 K562/A02 在裸鼠体内的分布情况, 研究表明: ^{125}I -PHMA02 在 P-gp^+ (K562/A02) 组和 P-gp^- (K562) 对照组的影像学差异可以明确区分 P-gp^+ 的肿瘤组织, 对了解 P-gp 高表达的肿瘤部位、形态、大小、肿瘤病灶的数量以及是否存在转移均有重要意义, 从而为肿瘤的诊断和治疗提供有益的帮助。

参 考 文 献

- 1 Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ, et al. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 2005, 90(1): 54-59.
- 2 Hirose M, Hosoi E, Hamano S, et al. Multidrug resistance in hematological malignancy. *J Med Invest*, 2003, 50(3-4): 126-135.
- 3 Yang CZ, Luan FJ, Xiong DS, et al. Multidrug resistance in leukemic cell line K562/A02 induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin*, 1995, 16(4): 333-337.
- 4 熊冬生, 杨纯正, 邵晓枫. 抗 P-gp 单克隆抗体的制备和鉴定. *中华血液学杂志*, 1999, 20(6): 326-327.

(收稿日期: 2006-02-25)