

去甲斑蝥素与单克隆抗体偶联物 治疗肝癌实验研究*

梁福佑^① 张胜华^② 潘颖^① 徐琳娜^② 乔建华^③ 卢志达^③ 王维刚^②

(^①首都医科大学细胞生物学研究室 北京 100054)

(^②中国医学科学院、中国协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050) (^③北京同仁医院 北京 100010)

摘 要 用大鼠单克隆抗体 3A5 与去甲斑蝥素(NCTD)制备偶联物。ELISA 检测结果表明:3A5-NCTD 偶联物保持对人肝癌 BEL-7402 细胞和小鼠肝癌 H22 细胞的免疫反应性。克隆生成法测定结果显示:3A5-NCTD 具有比 NCTD 更强的细胞毒性。小鼠腹腔内移植肿瘤, ip 给药, 3A5-NCTD(3 mg/kg)和 NCTD 的 ILS 值分别为 111% 和 37%。结果说明在对腹腔肿瘤的治疗方面 3A5-NCTD 具有比游离 NCTD 更强的治疗作用。裸鼠移植 BEL-7402 人肝癌, iv 给药, NCTD 肿瘤抑制率为 15% ($P > 0.05$), 3A5-NCTD 为 62% ($P < 0.01$); pt 给药, NCTD 肿瘤抑制率为 47% ($P < 0.05$), 3A5-NCTD 为 78% ($P < 0.01$)。与 NCTD 相比 3A5-NCTD 对裸鼠移植人肝癌具有更强的治疗作用。在给药途径方面, 治疗效果 pt 强于 iv。以上结果提示单克隆抗体与 NCTD 偶联物在肿瘤的导向治疗中有较好的疗效。

关键词 单克隆抗体 去甲斑蝥素 免疫偶联物

去甲斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)是我国自行研制生产的抗肿瘤药物,具有显著的抗癌活性,而其毒、副作用较低。去甲斑蝥素的抗癌机理独特,它并不直接作用于 DNA 分子,因而导致体内正常细胞畸变的可能性很小。目前已知它的作用机理是改变细胞骨架,造成细胞

有丝分裂紊乱而死亡。由于肿瘤细胞与正常细

* 本课题为北京市自然科学基金资助项目(批文号:7973021);

第一作者介绍:梁福佑,女,56岁,学士,副教授;

收稿日期:1998-11-12,修回日期:1998-12-15

胞的细胞骨架不同,因此肿瘤细胞对该药反应强烈^[1-2]。去甲斑蝥素对体外培养的人宫颈癌细胞(HeLa)、人食道癌细胞(CaEs-17)、人肝癌细胞(Hep 3B)等 15 种肿瘤细胞均有明显的杀伤作用,在药物剂量 4~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下,杀伤率达 51.5%~100%。

以单克隆抗体(单抗)为载体的抗肿瘤导向药物研究近来随着单抗 Herceptin, Rituxan 及 Panorex 等在美国及欧洲的批准上市,再度成为令人关注的研究领域^[3]。本研究采用抗人肝癌大鼠单克隆抗体 3A5 与 NCTD 偶联(简称 3A5-NCTD),观察偶联物对肝癌的实验治疗作用,为推动去甲斑蝥素在临床上的应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/c(nu/nu)裸小鼠,雌性,6~7 周龄。购于中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 细胞系 人肝癌 BEL-7402 细胞,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液在含 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养。

1.3 单抗 抗肝癌大鼠单抗 3A5 为 IgG 型,与人肝癌细胞 BEL-7402 呈强阳性反应^[4]。

1.4 药物与试剂 NCTD,北京第四制药厂产品(批号 980210)。碳二亚胺(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺,均为 Sigma 产品。

1.5 单抗 3A5 的制备与纯化 按文献[5]方法进行。取杂交瘤腹水用 MARK 3-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化。依次用 PBS, PBS + 2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱,将第 II 蛋白峰用 0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH8.0)缓冲液中和再用 PBS 透析、浓缩备用。

1.6 单抗 3A5 与去甲斑蝥素偶联物的制备

采用活泼酯法制备 3A5-NCTD 偶联物,按文献[6]报道的方法进行。滴定透析外液测定其中 NCTD 量,推算偶联物中 NCTD 的含量并计算单抗与药物连接比。

1.7 免疫反应性检测 采用 ELISA 法测定

3A5 对人肝癌 BEL-7402 细胞的免疫反应性^[7]

1.8 克隆形成测定 采用克隆生成测定法观察 3A5-NCTD 对 BEL-7402 细胞杀伤作用。取对数生长期的肿瘤细胞种入 96 井培养板,每井 50 个细胞,培养 24 小时。加入待测样品,每一药物浓度用 4 个平行井,各药物均用无血清 RPMI 1640 培养液稀释,对照组只加无血清 RPMI 1640 培养液,每孔加液 50 μl 。药物与细胞接触 24 小时,吸去培养液,用无血清 RPMI 1640 培养液洗 2 次,然后加入含血清的 RPMI 1640 新鲜培养液,继续培养。接种 7 天后在倒置显微镜下数细胞集落数(细胞数超过 30 个以上者),以对照组细胞集落数为 100%,求得不同药物浓度下的集落生成率。

1.9 小鼠肝癌 H22 腹水瘤的治疗试验 18~22g 昆明种小鼠腹腔接种肝癌 H22 腹水 0.2ml,各组均为 10 只动物。次日起开始腹腔注射(ip)3A5-NCTD 或 NCTD,剂量分别为 3 mg/kg 和 1.5 mg/kg。每天 1 次,共 10 次。对照组注射生理盐水。观察动物存活时间,按 ILS[Increase life span, $\text{ILS} = (\text{T}/\text{C}-1) \times 100\%$, T:治疗组动物生存时间, C:对照组动物生存时间]判断疗效。实验过程中每周两次测量动物体重。

1.10 裸鼠移植人结肠癌的治疗试验 将直径 2mm 的 BEL-7402 人肝癌瘤块接种于 BALB/c(nu/nu)裸鼠右腋皮下。于肿瘤接种后 3 天开始注射 3A5-NCTD 偶联物。分别采用静脉注射给药(iv)及瘤结周围注射(pt)给药法, NCTD 的剂量为 3.0mg/kg,3 天 1 次,共 7 次。对照动物注射生理盐水,各组均为 6 只动物。治疗期间每周 2 次测量肿瘤长径 a(cm)以及相垂直的短径 b(cm)并按下式计算瘤重 W(g): $W = (a \times b^2) \times 1/2$ 。于 30 天后处死动物,剥取肿瘤称重,计算抑瘤率。

2 结果

2.1 单抗 3A5 纯化及单抗偶联物制备 纯化的 3A5 单抗经细胞 ELISA 法测定免疫反应性,结果显示:纯化 3A5 抗体对 BEL-7402 细胞呈

强阳性反应。经测定偶联物中的 3A5 与 NCTD 分子比约为 3A5:NCTD=1:82。

2.2 偶联物中 3A5 抗体反应性测定 将游离 3A5 单抗与 3A5-NCTD 偶联物分别以 PBS 倍比稀释成一系列浓度,用 ELISA 法测定它们对靶细胞 BEL-7402 的反应性。结果显示偶联物中 3A5 反应性未见明显改变(见图 1)。

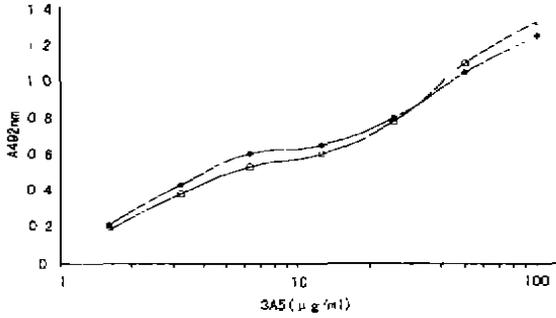


图 1 3A5-NCTD 偶联物及 3A5 单抗对人肝癌 BEL7402 细胞的免疫反应性
ELISA 法测定, ○ NCTD; ■ 3A5-NCTD

2.3 对靶细胞的杀伤作用 克隆形成测定结果,药物与细胞作用 24 小时,偶联物及游离 NCTD 对 BEL-7402 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 2.3 和 4.2 μg/ml。偶联物对靶细胞的杀伤力稍强于游离 NCTD(见图 2)。

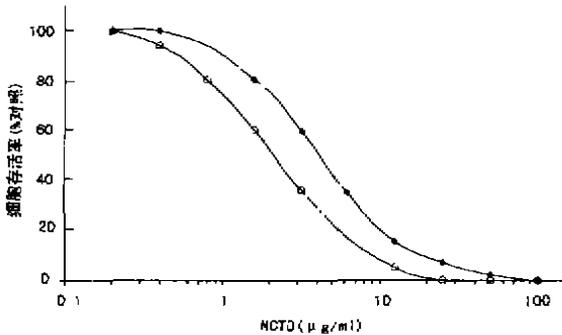


图 2 3A5-NCTD 偶联物对人肝癌 BEL7402 细胞的抑制作用
克隆生成法测定,药物与细胞作用 24 小时,
○ NCTD; ■ 3A5-NCTD

2.4 小鼠肝癌 H22 腹水瘤的治疗试验 3A5-NCTD 显示出比游离 NCTD 更强的治疗作用(见表 1)。

表 1 NCTD 及 3A5-NCTD 偶联物对小鼠肝癌 H22 腹水瘤的治疗作用

| 药物 | 剂量 (mg/kg) | 生存时间(天) 均值±标准差 | ILS 1% 动物数 | 长期存活 (60 天) |
|----------|------------|----------------|------------|-------------|
| Control | | 14.4±0.97 | | |
| NCTD | 3 | 19.7±3.11 | 37* | 0/10 |
| NCTD | 1.5 | 16.2±2.70 | 13 | 0/10 |
| 3A5-NCTD | 3 | 30.4±14.64 | 111** | 2/10 |
| 3A5-NCTD | 1.5 | 25.2±10.57 | 75** | 1/10 |

* P<0.05, ** P<0.01

其中 3A5-NCTD(3mg/kg) 组至实验结束时(60 天)尚有 2 只动物存活,经解剖未发现腹腔内肿瘤及腹水。

2.5 裸鼠移植人乳腺癌的实验治疗 3A5-NCTD 对移植人乳腺癌的 BEL-7402 肿瘤生长有显著抑制作用(见图 3)。

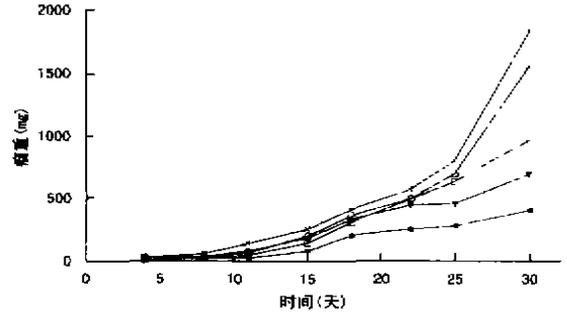


图 3 3A5-NCTD 偶联物对裸鼠移植人肝癌的生长抑制作用

剂量:NCTD=3.0mg/kg, iv 或 pt, 给药 7 次

* Control; □ NCTD, pt; ■ 3A5-NCTD, pt;

○ NCTD, iv; ▼ 3A5-NCTD, iv

其抑制率高于等剂量游离去甲斑蝥素,其中又以瘤结周围给药的治疗效果更强。实验结束时,游离 NCTD(3mg/kg) 静脉给药组肿瘤抑制率为 15% (P>0.05), 3A5-NCTD(3mg/kg)

表 2 NCTD 及 3A5-NCTD 偶联物对裸鼠移植人肝癌 BEL-7402 的治疗作用

| 药物 (mg/kg) | 给药 方式 | 动物数 | | 体重改 变(g) | 瘤重(mg) 均值±标准差 | 抑瘤率 (%) |
|------------|-------|-----|----|----------|---------------|---------|
| | | 开始 | 结束 | | | |
| Control | | 6 | 6 | +4.06 | 1.84±0.71 | |
| NCTD | pt | 6 | 6 | +6.73 | 0.97±0.45 | 47* |
| 3A5-NCTD | pt | 6 | 6 | +7.09 | 0.41±0.12 | 78** |
| NCTD | iv | 6 | 6 | +5.94 | 1.56±0.40 | 15 |
| 3A5-NCTD | iv | 6 | 6 | +4.0 | 0.70±0.27 | 62** |

静脉给药组肿瘤抑制率为 62% ($P < 0.01$); 而当采用瘤结周围给药时, 二者分别为 47% 和 78% (见表 2)。

4 讨论

去甲斑蝥素是我国自行研制的抗肿瘤药物, 可通过多种途径破坏、抑制癌细胞。此外, 可缩短白细胞在骨髓内的成熟、释放时间; 并有促进骨髓造血干细胞(CFU-S)向粒——单核系祖细胞(CFU-GM)分化的作用, 从而导致白细胞升高^[8]。临床应用证明其对多种肿瘤具有良好的治疗效果, 单独应用可治疗肝癌、食管癌、胃癌、贲门癌及白血球低下症, 亦可作为术前用药或用于联合化疗中。与其它药物合用可拮抗骨髓抑制及进一步提高疗效。在治疗剂量范围内, 对免疫功能无不良影响^[9]。

作为小分子抗肿瘤药物, 去甲斑蝥素在药代动力学上具有起效快, 代谢快的特点。体内显像结果表明, 给小鼠灌胃³H-去甲斑蝥素, 吸收较快。15 分钟至 2 小时在肾、肝、瘤体、胃、肠、心、肺中有较高的浓度。静脉给药在胆、肝、肾、心、肺中亦有较高的分布。灌胃给药, 药物浓度在肝脏及瘤组织中 15 分钟即可达到峰值, 6 小时后显著降低。去甲斑蝥素在肿瘤局部滞留时间不足及其在体内分布的非特异性有可能成为限制其最佳疗效发挥的主要因素。已有许多文献证明^[10-13], 单抗导向药物经区域性给药后(包括动脉灌注, 腔内给药, 瘤内或瘤旁给药), 由于其具有大分子的药代动力学性质, 使得偶联物在肿瘤部位滞留时间延长, 局部浓度高, 且减少了非肿瘤组织对导向药物的摄取, 从而具有独特的应用价值, 在临床应用中已取得一定的治疗效果, 成为导向治疗中值得重视的方法。

本研究将去甲斑蝥素与抗肝癌大鼠单抗 3A5 偶联, 观察其经静脉给药和肿瘤局部给药对肿瘤的治疗作用。结果表明, 3A5-NCTD 保持 3A5 单抗对 BEL-7402 细胞的免疫反应性, 与 3A5 单抗相比活性相当。克隆生成法测定结果显示: 3A5-NCTD 保持了 NCTD 的细胞毒

性。对小鼠腹水型肝癌 H22 的治疗结果表明: 3A5-NCTD 显示出比游离 NCTD 更强的治疗作用。其中 3A5-NCTD (3mg/kg) 组至实验结束时(60 天)尚有 2 只动物存活, 经解剖未发现腹腔内肿瘤及腹水。对裸鼠移植人肝癌 BEL-7402 的治疗结果表明: iv 组 NCTD 的肿瘤抑制率为 15%, 3A5-NCTD 的肿瘤抑制率为 62% ($P < 0.01$); pt 组 NCTD 肿瘤抑制率为 47%, 3A5-NCTD 为 78% ($P < 0.01$)。结果均显示, 与 NCTD 相比, 3A5-NCTD 对裸鼠移植人肝癌 BEL-7402 具有更强的治疗作用。局部给予偶联物比经静脉给药具有更高疗效。

以上结果提示单抗 3A5 与去甲斑蝥素偶联物在肿瘤的导向治疗中有较好的疗效。

参 考 文 献

- 1 连慕兰, 徐淑惠, 曾长青等. 去甲斑蝥酸钠对 CHO、Hala 和小儿包皮细胞的杀伤效应. 解剖学报, 1991, 22(3): 279-285
- 2 连慕兰, 孙骏奇, 徐淑惠等. 去甲斑蝥酸钠干扰细胞有丝分裂的机制. 解剖学报, 1991, 22(3): 286-291
- 3 Steven Dickman. Antibodies stage a comeback in cancer treatment. *Science*, 1998, 280: 1197
- 4 江 敏, 黄 静, 薛 伟等. 抗肝癌大鼠单克隆抗体 3A5 的特性及其平阳霉素偶联物的抗肿瘤活性. 中华微生物和免疫学杂志, 1991, 11(4): 230-233
- 5 Bazin, H. Rat monoclonal antibodies. II - A rapid and efficient method of purification from ascitic fluid or serum. *J Immunol Methods*, 1984, 71(1): 9-15
- 6 Tarun, I G, A. Huntley, P. Kulkarni. Preparation of antibody-linked cytotoxic agents. *Methods Enzymol.*, 1983, 93: 280-333
- 7 Douillard, J. T., T. Hofman. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production using enzyme-labeled second antibody. *Methods Enzymol.*, 1983, 92: 168-175
- 8 易受南, 罗慧英, 孙骏奇. 去甲斑蝥素增加白细胞机理初探. 湖南医学院学报, 1988, 13(4): 327-329
- 9 Wang, G. S. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J. of Ethnopharmacology*, 1989, 26: 147-162
- 10 甄永苏. 抗肿瘤导向药物研究的现状与展望. 药学学报, 1994, 29: 1-5
- 11 王维刚, 薛玉川, 徐琳娜等. 单克隆抗体与平阳霉素偶联物治疗乳腺癌实验研究. 药学学报, 1995, 30(8): 583-587

- 12 王维刚, 徐琳娜, 张胜华等. 单克隆抗体与平阳霉素偶联物对肿瘤的区域性导向实验治疗 药学学报, 1997, 32(9):669-674
- 13 Takakura, Y. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Critical Rev. Oncol./Hematol.* 1995, 18:207-225

USE OF MONOCLONAL ANTIBODY NORCANTHARIDIN CONJUGATE IN EXPERIMENTAL TARGETING THERAPY OF TUMOR

LIANG Fu-You^① ZHANG Sheng-Hua^② PAN Ying^① XU Lin-Na^②
 QIAO Jian-Hua^③ LU Zhi-Da^③ WANG Wei-Gang^②

(^① Capital University of Medical Sciences, Department of Cell Biology, Beijing 100054, China)

(^② Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(^③ Beijing Tongren Hospital, Beijing 100010, China)

ABSTRACT McAb 3A5, a rat monoclonal antibody, was linked to norcantharidin (NCTD), an anti-tumor drug currently in clinical use, by active ester method. The 3A5-NCTD conjugate retained complete immunoreactivity of McAb 3A5. Determined by clonogenic assay with human hepatoma BEL-7402 cells, the IC₅₀ values for 3A5-NCTD conjugate and free NCTD were 2.3 μg/ml and 4.2 μg/ml, respectively.

Hepatoma H22 ascites was transplanted into the peritoneal of mice. On the next day, 3A5-NCTD or NCTD, was injected intraperitoneally. Therapeutic effect was evaluated with the survival time of mice. The ILS(%) values were 111% for 3A5-NCTD and 37% for NCTD. Tumor fragments of human hepatoma BEL-7402 were transplanted sc into nude mice. Then 3A5-NCTD or NCTD was injected iv, or pt(peritumorally) 3 days after inoculation, twice a week, with a total of 7 injections. Tumor growth inhibition was evaluated 4 weeks later. The inhibition rates on the growth of hepatoma BEL-7402 xenografts were as follows (1) for iv route, 15% by NCTD, 62% by 3A5-NCTD; (2) for pt route, 47% by NCTD, 78% by 3A5-NCTD. These results indicate that 3A5-NCTD conjugate is highly effective against targeted human cancer xenograft and mouse tumor when administered peritumorally or intracavitarily.

KEY WORDS Monoclonal antibody Norcantharidin Targeting tumor therapy Immunoconjugate

为您服务:本刊编辑部尚存《动物学杂志》1974年以后少量过刊,有需要者请与我编辑部联系。