



^{131}I -rituximab对B细胞淋巴瘤细胞生物学效应的实验研究

非霍奇金淋巴瘤(NHL)是最常见的淋巴系统恶性肿瘤之一,其中绝大多数为B淋巴细胞来源。常规治疗疗效虽比较满意,但仍有较多的复发比例[1][2]。本研究以B细胞淋巴瘤的CD20抗原作为治疗靶点,选用放射性核素 ^{131}I 标记针对CD20+的单克隆抗体,观察其在体外对B细胞淋巴瘤细胞的杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及器材

抗CD20单抗rituximab(瑞士罗氏公司)、 Na^{131}I 溶液(成都中核高通同位素公司)、IODO-GEN (Iodination Reagent, Pierce)、annexin-V-FITC试剂盒(深圳晶美生物工程公司)、FH-463A型自动定标器(北京核仪器厂)、FT-603型井型闪烁探头(北京核仪器厂)、RM-905A放射性核素活度计(中国计量科学研究院)、FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司)、Bio-Rad 550型博赛自动酶标仪(中国郑州博赛公司)。

1.2 细胞

人Burkitt's淋巴瘤细胞Raji购自中国科学院上海细胞生物所。用含10%胎牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 U/ml的RPMI 1640培养液,37 °C、5% CO_2 、95%湿度的培养箱中培养,2~3 d传代1次,生长曲线测试倍增时间为33 h。取对数生长期细胞,用流式细胞仪测定CD20表达率。

1.3 ^{131}I -rituximab制备

用IODO-GEN标记方法[3]进行制备,rituximab 2~6 mg加入已包被IODO-GEN的小玻璃瓶中。 Na^{131}I 2~6 mCi用0.5 mol/L PB(pH 7.4)缓冲液,调整其pH值至7.4,并加到上述IODO-GEN瓶中,与rituximab混合。冰浴及振荡2 min后,吸出标记液,经0.22 μm 滤器过滤。用纸层析法于标记后1 h、1 d、3 d、5 d、7 d测定标记率及放化纯度。

1.4 细胞凋亡测定

将比放射性活度61 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 的 ^{131}I -rituximab、 ^{131}I 和1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的rituximab分别加入 $1 \times 10^6/\text{ml}$ Raji细胞中,对照组只加入等量完全培养液。24 h后,以姬姆萨染色倒置显微镜下观察细胞形态,以Annexin V-FITC/PI双染法测定药物对细胞的诱导凋亡作用。

1.5 细胞周期分析

采用DNA倍体分析法检测。经 ^{131}I -rituximab、 ^{131}I 、rituximab处理后的Raji细胞用75%冷乙醇固定24 h, PBS缓冲液洗去固定液,10 000 U/ml RNase于37 °C水浴30 min,然后加入PI染色液,4 °C避光30 min后上机检测。用Cell modifit软件分析细胞周期,流式细胞仪CV值纠正于3%以下。

1.6 统计学处理

用SPSS10.0软件进行重复测量方差分析,两两比较采用LSD法。

2.1 Raji细胞形态改变及CD20表达率

流式细胞仪测定CD20表达率为90.27%。倒置显微镜下所见对照组细胞为圆形，生长旺盛，紧密排列，透明度高，折光性强，核分裂像较多。经 ^{131}I -rituximab、 ^{131}I 、rituximab处理的实验组细胞生长受到抑制，数量减少，细胞收缩，胞核变小，大小趋于一致，病理性核分裂像较对照组少。

2.2 ^{131}I -rituximab的标记率及稳定性

^{131}I -rituximab的标记率为90.4%~98.0%，其稳定性好，4℃贮存1、3、5、7 d，其放化纯度分别为93.5%、86.0%、80.9%和77.1%。

2.3 细胞凋亡

凋亡率：(1) ^{131}I -rituximab组凋亡率为51.99%， ^{131}I 组为42.71%，rituximab组为29.42%，对照组为26.17%，对照组和rituximab组凋亡率明显低于 ^{131}I 组和 ^{131}I -rituximab组($P<0.05$)。(2)在第2象限为PI-Ann+细胞，为晚期凋亡细胞。 ^{131}I -rituximab组晚期凋亡细胞占9.97%，明显多于对照组的1.40%、rituximab组的1.93%和 ^{131}I 组的5.83%，凋亡细胞各组间差异有统计意义($P<0.05$)。

2.4 细胞周期分析

对比各组的凋亡率(亚二倍体峰)中， ^{131}I -rituximab组4.32%， ^{131}I 组1.47%，rituximab组1.39%，对照组0.37%。 ^{131}I -rituximab组凋亡率均明显高于对照组、 ^{131}I 组和rituximab组($P<0.01$)。对照组截止于 G_1/G_2 期的比例为54.15%， ^{131}I -rituximab组中80.08%细胞截止于 G_1/G_2 期，而 ^{131}I 组和rituximab组截止于 G_1/G_2 期的细胞分别为55.91%和50.07%。对照组处于 G_0/M 期的比例为30.52%， ^{131}I 组和rituximab组处于 G_0/M 期的比例分别为28.35%和37.93%，提示部分细胞在处理后有增殖现象；而 ^{131}I -rituximab组 G_0/M 期的比例为4.89%，显示增殖明显减缓，各组间差异有统计意义($P<0.05$)。

3 讨论

rituximab是人鼠嵌合的单克隆抗体，即由小鼠2B8 V区和人IgG1 κ C区及Fc段嵌合而成，具有与天然鼠抗体相同的亲和力和人组织反应性，因此可减少人抗鼠抗体(HAMA)的产生，增加了重复使用的安全性。选择放射性核素标记rituximab的依据是[4][5][6]：(1)淋巴瘤细胞对射线具有高度敏感性；(2)放射免疫治疗利用单克隆抗体的靶向作用，增加肿瘤组织的放射性物质的浓度，通过核素内照射达到杀伤肿瘤的目的，因此即使机体免疫缺陷、抗原表达阴性或肿瘤免疫逃避等导致抗体及免疫毒素无效时，内照射仍可发挥作用；(3)放射性同位素释放的 β 射线，能穿透多个细胞直径的距离，因此对于周围抗原表达阴性而没有结合核素的肿瘤细胞同样也有杀伤作用，这种作用称为“交叉火力作用”。 ^{131}I 因其来源方便，价格低廉、标记方法成熟、在体内代谢及毒性了解较充分，成为应用最广泛的放射性核素[7]。本实验选择 ^{131}I 标记单克隆抗体rituximab为临床应用增加可行性。

本研究显示， ^{131}I 可以发挥特异性杀伤作用和非特异性杀伤作用。由于 ^{131}I -rituximab与Raji细胞膜上的CD20抗原结合而位于细胞表面或被细胞溶酶体吞噬的 ^{131}I 发挥特异性杀伤作用[8]。 ^{131}I -rituximab对细胞的杀伤作用主要由 ^{131}I 发射的 β 射线对细胞的损伤造成，而rituximab只起载体的作用[9]，主要通过其与肿瘤细胞表达的靶抗原特异性的结合，诱导抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)和补体依赖的溶解作用(CDC)杀伤肿瘤细胞及促进肿瘤细胞凋亡[10]。靶抗原在肿瘤细胞和正常细胞表面所表达的数量、靶抗原和抗体结合后能否被“内在化”以及能否促发机体有效免疫反应，这些因素直接影响到单抗的治疗效果。当单克隆抗体在血液中浓度过低、肿瘤细胞靶抗原表达降低或缺失致抗体结合减少、抗体不能充分渗入整个肿瘤组织中、或抗体与抗原结合后不能有效激发宿主清除肿瘤细胞的效应机制时，可使单克隆抗体治疗无效或疗效降低。

本实验选用IODO-GEN法把 ^{131}I 标记到Rituximab上。标记方法简单，标记率及放化纯度均在90%以上，标记物稳定，证明IODO-GEN法有很强的实用性。由于 ^{131}I -rituximab中 ^{131}I 所发射的射线对细胞产生的辐射生物效应，使细胞内DNA断裂、交联，影响了DNA的复制和细胞的有丝分裂[11]，从而使 ^{131}I -rituximab组中

80.08%细胞截止于G₁/G₂期,而¹³¹I组和rituximab组仅依靠¹³¹I或rituximab的单一作用,截止于G₁/G₂期的细胞均低于¹³¹I-rituximab组。但单用¹³¹I组所作用的细胞仍有增殖情况,考虑可能的原因为:实验中药物作用24 h后换液,洗去了大部分游离I,剩余的¹³¹I逐渐衰变,剂量减少,随着时间的延长,对细胞的杀伤作用降低,细胞继续增殖。而¹³¹I-rituximab可与Raji细胞表面抗原CD20特异性结合,将¹³¹I固定到肿瘤细胞,从而杀伤肿瘤细胞。

本研究显示,¹³¹I-rituximab作用于Raji细胞后其凋亡率为51.99%,而Rituxima组仅为29.42%,说明将单抗与细胞放射性核素相连接而成的放射免疫联接物,具有生物导向的治疗作用。通过持续低剂量辐射,使细胞被阻止在对射线最敏感的有丝分裂期,增强放射性细胞毒作用。总之,¹³¹I-rituximab在体外显示了较强的特异性杀肿瘤作用,适合以后作为免疫导向治疗的药物,针对B细胞淋巴瘤高表达的CD20抗原作为治疗靶点的免疫导向治疗前景乐观。

参考文献:

- [1]孙燕,何友兼,许立功,等.美罗华治疗B细胞淋巴瘤II期临床验证报告[J].中国新药杂志,1999,8(12):822-4.
- Sun Y, He YJ, Xu LG, et al. Results of a clinical phase II trial of mabthera in 30 Chinese B cell lymphomas patients[J]. Chin New Drugs J, 1999, 8(12): 822-4.
- [2]齐宗利,赵彤,周新华,等.霍奇金淋巴瘤潜伏膜蛋白1、p53及bcl-2蛋白的表达及意义[J].第一军医大学学报,2003,23(3):225-7.
- Qi ZL, Zhao T, Zhou XH, et al. Expressions of latent membrane protein 1, p53 and bcl-2 proteins and their significance in Hodgkin's lymphoma[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 225-7.
- [3]Fraker PJ, Speck JR. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1978, 80(4): 849-57.
- [4]Press OW, Rasey J. Principles of radioimmunotherapy for hematologists and oncologists[J]. Semin Oncol, 2000, 27(6 Suppl 12): 62-73.
- [5]Hadded E, Paczesny S, Leblond V, et al. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 120 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial[J]. Blood, 2001, 97(6): 1590-7.
- [6]Kimby E, Geisler C, Hagberg H, et al. Rituximab as single agent and in combination with interferon- α as treatment of untreated and first relapse follicular or other low-grade lymphomas[J]. Blood, 2000, 96(1): 577a.
- [7]张军一,罗海涛,李爱民,等.¹³¹I-美罗华治疗难治性复发性B细胞淋巴瘤9例[J].解放军医学杂志,2003,28(2):190.
- [8]Gaik L, Sammy E. Single-cell cytotoxicity with radiolabeled antibodies[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(1): 192-201.
- [9]Postema EJ, Boerman OC, Oyen WJ, et al. Radioimmunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. Eur J Nucl Med, 2001, 28(11): 1725-35.
- [10]Grillo Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M, et al. Rituximab: ongoing and future clinical development[J]. Semin Oncol, 2002, 29(2): 105-12.
- [11]陆地,白晓春,桂莉,等.三氧化二砷诱导人类恶性淋巴瘤细胞凋亡及机制探讨[J].第一军医大学学报,2003,23(10):997-1108.
- Lu D, Bai XC, Gui L, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis of human malignant lymphoma cell lines and its mechanisms[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue

回结果列表