

血管抑素的¹³¹I 标记及其对裸鼠 A549 肺肿瘤的作用

袁梦晖¹, 徐海峰¹, 邵秋菊², 周润锁¹, 周飞华¹, 张王峰¹

(1. 第四军医大学 唐都医院 核医学科, 陕西 西安 710038; 2. 第四军医大学 唐都医院 放射治疗科, 陕西 西安 710038)

摘要: 采用一步法从人血浆中分离血管抑素(Angiostatin, AS), 并用 L-Lysine Sepharose 4B 作亲和层析纯化; 将提纯的 AS 用 Iodogen 固相法进行¹³¹I 标记, 分析¹³¹I-AS 的标记率、比活度, 并评价其体外稳定性; 32 只荷 A549 肺肿瘤的裸鼠随机分为 4 组, 腹腔注射¹³¹I-AS (含 11.1 MBq ¹³¹I, AS 为 12.5 mg/kg)、¹³¹I 11.1 MBq, AS 12.5 mg/kg 和生理盐水 0.3 mL, 1 次/周, 治疗 4 周, 观察 28 d 内肿瘤体积的变化。结果显示,¹³¹I-AS 标记率为 77.8%~86.7%, 比活度为 1.28~3.96 TBq/g, 放化纯度为 98.6±0.26%。标记产物-20℃ 存放 7 d, 放化纯度降至 72%; 治疗 28 d 后,¹³¹I-AS 组、¹³¹I 组、AS 组和生理盐水组小鼠肿瘤的体积分别是 (1 956±98)、(5 284±123)、(3 948±115)、(7 350±153) mm³。以上结果提示,¹³¹I-AS 能较强地抑制小鼠体内移植肿瘤的生长, 其抑制作用优于单纯应用等浓度的 AS 及¹³¹I。¹³¹I-AS 在治疗肿瘤中有潜在的应用前景。

关键词: 血管抑素; ¹³¹I 标记; A549 肺肿瘤

中图分类号: R817.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-7512(2007)03-0145-04

Labeling of Angiostatin With ¹³¹I and Its Antitumor Effect on Nude Mice With A549 Cells

YUAN Meng-hui¹, XU Hai-feng¹, SHAO Qiu-ju², ZHOU Run-suo¹,
ZHOU Fei-hua¹, ZHANG Wang-feng¹

(1. Department of Nuclear Medicine, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China;
2. Department of Radiotherapy, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: The angiostatin (AS) which is separated from human plasma and purified are labeled with ¹³¹I using Iodogen method. 32 male nude mice with A549 cells are divided into four groups and injected with ¹³¹I-AS (¹³¹I 11.1 MBq, AS 12.5 mg/kg), ¹³¹I(11.1 MBq), AS(12.5 mg/kg), normal saline (0.3) mL. Each drug is given intraperitoneally and injected for four times at an interval of 7 days respectively. The volume of tumors is measured during 28 days after treatment. The labeling efficiency is 77.8%~86.7%, the specific activity is 1.28-3.96 TBq/g. The radiochemical purity of ¹³¹I-angiostatin reduced to 72% after 7 days in vitro storage (-20℃). The mean volume of transplanted tumors in the mice with A549 lung carcinoma is (1 956±98)、(5 284±123)、(3 948±115)、(7 350±153)mm³ after treated with ¹³¹I-angiostatin, ¹³¹I, angiostatin and NS respectively. Compared with the NS group, the tumor inhibition rate in the other 3 groups are 70.95%, 25.05% and 54.55%.

The results suggest that ^{131}I -angiostatin has potential prospect of clinical application in the treatment of solid tumor.

Key words: angiostatin; ^{131}I labeling; A549 cells lung carcinoma

血管抑素(Angiostatin, AS)是血浆纤溶酶原的内部片段,正常生理情况下并不产生。它是一种肿瘤源性血管生成抑制物,最早是1994年O'Reilly等从携带Lewis肺癌小鼠的血液和尿液中分离得到的相对分子质量为38 000的蛋白多肽。AS能有效地抑制血管内皮细胞的增生和迁移,阻止血管发生,促进实验动物肿瘤原发灶消退,抑制转移灶的形成^[1],已经成为抗肿瘤治疗的研究热点。实验证明,AS不是由肿瘤直接产生的,但某些肿瘤细胞可产生或激活某些蛋白酶,从纤溶酶原前体中裂解出多肽片段——血管抑素,在实体瘤的治疗中有重要的应用价值^[1]。 ^{131}I 是放射免疫显像(RII)和放射免疫治疗(RIT)常用的放射性核素,其标记方法很多,Iodogen法由于其对蛋白质的氧化损伤小,方法简便,反应温和,反应时间相对较长,易于控制,标记重复性好,而成为一种重要的标记蛋白质、多肽、短肽、单抗等的碘标记术。本工作拟采用Iodogen法进行AS的 ^{131}I 标记,并观察 ^{131}I -AS对荷A549肺癌的裸鼠移植瘤的治疗效果。

1 材料

1.1 生化试剂

溴化氰活化的Sephacrose 4B亲和层析柱;Pharmacia产品;Iodogen;进口分装;胎牛血清及碱性成纤维细胞生长因子;Gibco公司;医用无还原剂碘化钠 $^{[131]\text{I}}$;中国核动力研究院第一研究所。

1.2 主要仪器设备

紫外分光光度计;Perkin Elmer公司; γ 计数仪;国营二六二厂;HL-1型恒流泵;上海沪西仪器厂;Mini Protein II核酸蛋白电泳与转移装置;Bio-Rad公司;Pharmacia Blotech核酸蛋白检测仪;Bio-Rad公司。

1.3 实验动物及动物模型的制备

BALB/c雄性裸鼠;6周龄,体重(20±2)g,SPF级,购自第四军医大学实验动物中心。A549细胞接种于裸鼠右前肢腹侧皮下,每只每个部位接种量为 5×10^6 个细胞。接种后裸鼠在动物实验中心无菌条件下饲养。观察肿瘤体积

变化,2周后肿瘤生长至约1 cm时用于实验。

2 实验方法

2.1 AS的制备

参照文献^[3]制备AS。(1)取新鲜血浆400 mL,以蒸馏水作2倍体积稀释;用L-lysine-Sepharose 4B亲和层析柱作亲和层析,用恒流泵控制流速40 mL/h;先用0.1 mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤L-Lysine-Sepharose 4B亲和层析柱,将未结合的物质洗去,再用0.3 mol/L pH 7.4的PBS(5倍于柱床体积)洗涤至 $A_{280} < 0.005$,将非特异性的杂质蛋白洗去;然后加入一倍于柱床体积的含弹性蛋白酶和 NaN_3 的PBS溶液,室温,过夜,即得AS。(2)AS的纯化:①先用pH 7.4的0.1 mol/L PBS液洗涤至 $A_{280} < 0.005$,再用0.3 mol/L PBS液洗涤去杂蛋白,而后用pH 7.4的0.1 mol/L PBS液平衡柱床。②用pH 7.4的0.2 mol/L 6-氨基己酸洗脱,收集洗脱液。以15% SDS-PAGE电泳检测纯化蛋白,以Braford's法进行定量,产品-70℃冰冻保存。

2.2 AS的 ^{131}I 标记

采用Iodogen固相法进行标记。

涂管:称取0.5 mg Iodogen溶于0.25 mL二氯甲烷内,分别取上述溶液30 μL (约含50 μg Iodogen)分装在各反应试管内,室温下自然干燥,使管底部形成一层Iodogen薄膜,-20℃避光保存。

^{131}I 标记:取100 μL (含50 μg)待标记AS样品,加入含有Iodogen膜的反应管内,再加入18.5~74 TBq/L无载体 ^{131}I ,混匀,在20℃下反应15 min。在此期间温和混匀,振荡数次。加入150 μL pH 7.4的0.5 mol/L PBS液终止反应,此反应液在室温静置10 min后移入装有300 μL 5% BSA溶液的试管内,混匀,立即上柱纯化。

标记物的纯化:采用Sephadex-G50柱凝胶过滤法对标记物进行纯化。将全部反应液滴加于G50柱上,分别用1 mol/L醋酸溶液和含5% BSA的0.05 mol/L PBS液淋洗,流速0.5 mL/

min, 每分钟收集 1 管, 共 16 管; 测各管的计数率 (min^{-1}), 分别绘制淋洗曲线, 计算标记率。用 Whatman 3 号滤纸作纸层析, 以生理盐水为展开剂, 测定放化纯度。

¹³¹I-AS 的体外稳定性检测: 取 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放的 ¹³¹I-AS 测放化纯度, 每天一次, 共 7 次。

2.3 ¹³¹I-AS 对血管内皮细胞的抑制作用

制备牛主动脉血管内皮细胞, 利用 VIII 因子的抗体进行免疫组化鉴定。

将细胞培养 1 ~ 2 代后, 以 $2 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ /孔将细胞接种于 96 孔板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 50 mL/L CO_2 培养 4 h, 分别向各孔中加入不同剂量的 AS 或者 ¹³¹I-AS, 继续孵育 72 h, 每孔加入 100 μg 二甲基硫唑二苯基四唑溴酚 (MTT), 温育 4 h, 吸去上清液, 加入 150 μL 二甲基亚砷, 振荡 10 min, 酶联免疫检测仪检测 A_{490} , 将处理组与对照组 (同体积磷酸盐缓冲液) 比较求抑制率: 抑制率 (IR) = $(A_{490, \text{对照组}} - A_{490, \text{处理组}}) / A_{490, \text{对照组}} \times 100\%$

2.4 标记物抑瘤作用观察

32 只荷 A549 肺肿瘤的裸鼠随机分为 4 组, 实验前 3 d 给予含 10% KI 的饮用水, 封闭甲状腺, 腹腔注射 ¹³¹I-AS (含 ¹³¹I 11.1 MBq, AS 12.5 mg/kg)、¹³¹I (11.1 MBq)、AS (12.5 mg/kg) 和生理盐水 0.3 mL, 1 次/周, 治疗 4 周, 观察 28 d 内肿瘤体积的变化。观察期间用游标卡尺测量肿瘤大小 (长 \times 宽), 肿瘤体积计算公式: $V = W^2 \times L / 2$, 式中 W 为宽度, L 为长度。

以生理盐水组为对照, 计算各组抑瘤率, 抑瘤率 = $(\text{对照组肿瘤体积} - \text{实验组肿瘤体积}) / \text{对照组肿瘤体积} \times 100\%$ 。

2.5 统计学分析

采用第四军医大学统计学教研室 SPLM3.0 中文统计软件包对结果行方差分析和样本均数两两比较检验 (q 值法)。

3 结果与讨论

3.1 AS 的制备

血浆稀释后通过 L-Lysine Sepharose 4B 亲和层析柱, 使含有赖氨酸结合位点的纤溶酶原蛋白特异性结合于柱上, 加入弹性蛋白酶使纤溶酶原在柱上发生水解反应, 再用不同洗脱液洗涤, 除去各种杂蛋白, 最后用 6-氨基己酸洗脱 L-Lysine Sepharose 4B, 得到纤溶酶原的弹性蛋白酶

水解产物 AS, 其 SDS-PAGE 电泳结果示于图 1。图 1 中的电泳条即为 AS。

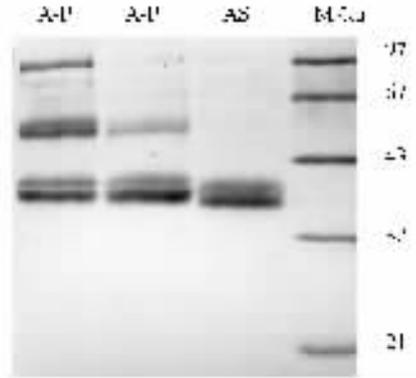


图 1 纯化的血管抑素电泳结果

M——蛋白质分子量标准;

AS——经 L-Lysine-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化的血管抑素;

A-P——部分纯化的血管抑素

3.2 AS 的 ¹³¹I 标记

3.2.1 ¹³¹I-AS 的标记率 ¹³¹I-AS 的洗脱曲线示于图 2。图 2 中 2 种淋洗溶液所得洗脱曲线均呈双峰, 第一个峰为标记物峰, 第二个峰为游离碘峰。其标记率分别为: 醋酸淋洗时为 67.2% ~ 74.3%, 磷酸缓冲液淋洗时为 77.8% ~ 86.7%。

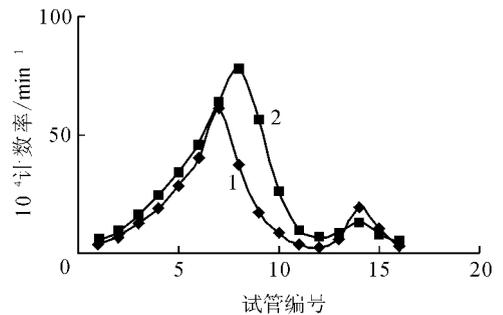


图 2 Iodogen 法标记的 ¹³¹I-AS 洗脱曲线

1——0.5 mol/L PBS 淋洗曲线;

2——1 mol/L 醋酸淋洗曲线

3.2.2 ¹³¹I 用量对标记率和比活度的影响 ¹³¹I 分别为 18.5、37.0、74.0 MBq 时, 用 1 mol/L 醋酸淋洗, ¹³¹I-AS 的标记率分别为 67.2%、73.6% 和 74.3%, 比活度分别为 0.94、1.85、2.36 TBq/g; 用含 5% BSA 的 PBS 液 (0.05 mol/L, pH 7.5) 淋洗, ¹³¹I-AS 的标记率分别为 77.8%、84.9% 和 86.7%, 比活度分别为 1.28、2.24、3.96 TBq/g, 而继续增加 ¹³¹I 用量, 标记率和比

活度则无明显变化。

3.2.3 ¹³¹I-AS 的体外稳定性 ¹³¹I-AS 的放化纯度随着时间的延长呈下降趋势, -20℃ 存放 1~7 d 后放化纯度分别为 98.63±0.26%、95.80±0.55%、93.10±0.51%、90.70±0.56%、82.90±0.38%、77.50±0.21% 和 71.02±0.34%。表明¹³¹I-AS-20℃ 存放 4 d, 仍然具有较高的放化纯度, 体外稳定性较好。

3.3 ¹³¹I-AS 增殖抑制作用

3.3.1 血管内皮细胞的分离培养 除去血管内皮细胞中部分成纤维细胞后, 继续培养 4~5 d, 细胞长满瓶底, 呈典型的铺路石样外型特征。以抗Ⅷ因子抗体对细胞进行免疫学鉴定, 结果示于图 3。图 3 显示血管内皮细胞有强而特异的着色, 表明¹³¹I-AS-20℃ 存放 4 d 仍然具有较高的放化纯度, 体外稳定性较好。

3.3.2 血管内皮细胞增殖抑制分析 AS、¹³¹I-AS 对血管内皮细胞的增殖抑制作用示于图 4。由图 4 可以看出, ¹³¹I-AS 对血管内皮细胞的生长有很强的抑制作用, 且该作用呈剂量依赖性; ¹³¹I-AS 对血管内皮细胞的增殖抑制作用明显强于 AS 的单独作用。



图 3 抗Ⅷ因子染色的牛主动脉血管内皮细胞(×100)

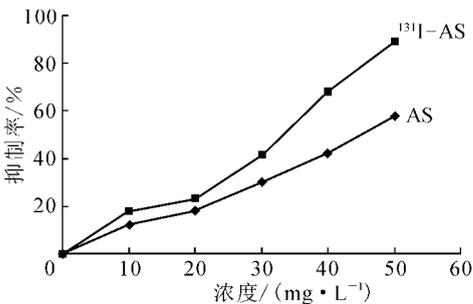


图 4 AS 和 ¹³¹I-AS 对血管内皮细胞的增殖抑制作用

3.4 ¹³¹I-AS 抑瘤作用

荷瘤裸鼠治疗期间肿瘤的体积变化示于图 5。由图 5 可以看出, 治疗 2 周后, ¹³¹I-AS 组、¹³¹I 组、AS 组小鼠肿瘤的体积随着时间延长都在逐渐长大, 但¹³¹I-AS 组肿瘤生长明显缓慢, 与生理盐水组比较, 有显著差异, P<0.01。治疗结束后, ¹³¹I-AS 组的抑瘤率为 70.95%。本研究小组已有研究[5]证实。血管抑素与 X 射线外照射联合治疗的研究显示, 两者之间有明显的协同作用[6], 提示, 血管抑素的抗血管治疗与传统的抗肿瘤治疗联合应用, 能发挥更有效的治疗作用。

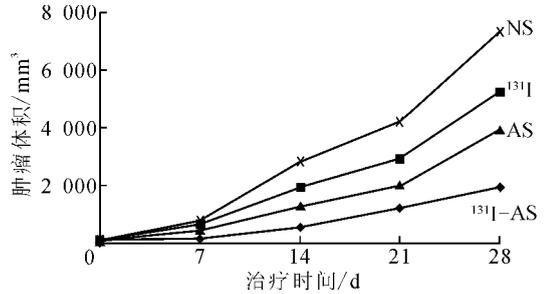


图 5 荷瘤裸鼠治疗期间肿瘤的平均体积

4 结论

¹³¹I-AS 对小鼠体内移植瘤具有明显的抑制作用, 且其抑制作用强于单纯使用 AS 和 ¹³¹I。¹³¹I 与血管抑素的联合应用, 有望克服血管抑素单纯应用的某些不足, 为实体瘤治疗提供新策略。

参考文献:

[1] CAO Y, O'REILLY MS, MARSHALL B, et al. Expression of Angiostatin cDNA in a Murine Fibrosarcoma Suppresses Primary Tumor Growth and Produces Long-term Dormancy of Metastases [J]. J Clin Invest, 1998, 101(5): 1 055-1 063.
[2] KESHET E, BEN-SASSON SA. Anticancer Drug Targets: Approaching Angiogenesis[J]. J Clin Invest, 1999, 104(11): 1 497-1 501.
[3] LI FY, HE P, LIU XP, et al. Single-step Method to Prepare Angiostatin From Human Plasma[J]. Prog Biochem Biophys, 2000, 7(3): 325-327.
[4] 袁梦晖, 徐海峰, 李福洋, 等. ¹³¹I-angiostatin 在荷瘤小鼠体内的药代动力学分布及放射免疫显像 [J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(10): 905-907.
[5] MAUCERI HJ, HANNS NN, BECKETT MA, et al. Combined Effects of Angiostatin and Ionizing Radiation in Antitumor Therapy[J]. Nature, 1998, 394(6 690): 287-291.