

# $^{125}\text{I}$ 标记的羊抗人 IgG 多克隆抗体 在荷人结肠癌裸鼠体内的生物分布及 $\gamma$ 显像

贺巍巍<sup>1</sup>, 刘昭飞<sup>2</sup>, 贾 兵<sup>2,3</sup>, 邱晓彦<sup>4</sup>, 王 凡<sup>2,3</sup>

(1. 北京大学药学院 天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083;

2. 北京大学 医学同位素研究中心, 北京 100083; 3. 中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413;

4. 北京大学 人类疾病基因研究中心, 北京 100083)

**摘要:** 采用 Iodogen 法对羊抗人 IgG 多克隆抗体(GAHG)进行 $^{125}\text{I}$ 标记,并观察了 $^{125}\text{I}$ -GAHG在荷 HT-29 人结肠癌裸鼠体内的生物分布和  $\gamma$  显像,以探讨肿瘤细胞分泌的 IgG 作为靶点进行肿瘤放射免疫显像和治疗的可能性。结果显示, $^{125}\text{I}$ -GAHG 具有良好的体外稳定性,其血液清除符合二室模型, $T_{1/2\alpha}$ 和  $T_{1/2\beta}$ 分别为 1.19 h 和 43.99 h。尾静脉给药后,与 $^{125}\text{I}$ 标记的正常羊 IgG( $^{125}\text{I}$ -IgG)对照相比, $^{125}\text{I}$ -GAHG 具有更加明显的肿瘤摄取。瘤体内给药的实验结果显示, $^{125}\text{I}$ -GAHG 在肿瘤部位具有良好的滞留。在静脉注射后 72 h,肿瘤摄取达到最大,为  $6.71 \pm 2.19\%$  ID/g。靶与非靶组织的放射性摄取比(T/NT)随着时间延长逐渐增大。上述结果提示, $^{125}\text{I}$ -GAHG 具有肿瘤特异性摄取,这为以肿瘤分泌的 IgG 为靶点的肿瘤放射免疫显像和靶向治疗提供了新思路。

**关键词:** IgG;  $^{125}\text{I}$ ; 肿瘤显像; 生物分布

中图分类号: TQ463.7; R817-33 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2008)02-0077-05

## Biodistribution and $\gamma$ Imaging of $^{125}\text{I}$ -labeled Goat Anti-human IgG Polyclonal Antibody in Nude Mice Bearing Human Colon Cancer Xenografts

HE Wei-wei<sup>1</sup>, LIU Zhao-fei<sup>2</sup>, JIA Bing<sup>2,3</sup>, QIU Xiao-yan<sup>4</sup>, WANG Fan<sup>2,3</sup>

(1. *The State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,*

*School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China;*

2. *Medical Isotopes Research Center, Peking University, Beijing 100083, China;*

3. *Department of Isotopes, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;*

4. *Center for Human Disease Genomics, Peking University, Beijing 100083, China)*

**Abstract:** The possibility of IgG secreted from tumor cells as a target for radioimmunomaging and targeted therapy of cancers were investigated. Goat anti-human IgG polyclonal antibody (GAHG) was radioiodinated using Iodogen method, and the in vitro stability and pharmacokinetics were evaluated. The biodistribution and  $\gamma$  imaging of  $^{125}\text{I}$ -GAHG were performed in nude mice bearing HT-29 human colon cancer xenografts.  $^{125}\text{I}$ -GAHG showed

收稿日期: 2007-11-08; 修回日期: 2008-01-12

基金项目: 国家“863”资助项目(2007AA02Z467)

作者简介: 贺巍巍(1983~),女(汉族),北京人,硕士研究生(导师:王凡),药物化学专业。现工作单位:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

通信作者: 王凡,研究员, E-mail: wangfan@bjmu.edu.cn

good in vitro stability, and its blood clearance was defined as a two-compartment model, with  $T_{1/2\alpha}$  and  $T_{1/2\beta}$  were 1.19 h and 43.99 h, respectively. The tumor uptake of  $^{125}\text{I}$ -GAHG was higher than that of  $^{125}\text{I}$ -labeled normal goat IgG control ( $^{125}\text{I}$ -GIgG).  $^{125}\text{I}$ -GAHG showed good tumor retention when injecting via intra-tumor. In the biodistribution study, the highest tumor uptake of  $^{125}\text{I}$ -GAHG was  $6.71 \pm 2.19\%$  ID/g at 72 h postinjection and the T/NT increased along with the postinjection time. The results show that  $^{125}\text{I}$ -GAHG have good tumor-specific uptake which may provide a novel idea for radioimmunoimaging and targeted therapy of cancers.

**Key words:** IgG;  $^{125}\text{I}$ ; tumor imaging; biodistribution

经典的免疫学理论认为,免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)基因仅在B淋巴细胞发育过程中进行选择重排,因此免疫球蛋白是B淋巴细胞的特征性产物。邱晓彦等<sup>[1-2]</sup>利用多种方法证明了上皮样肿瘤细胞以及肿瘤组织也能够分泌产生IgG。Chen等<sup>[3]</sup>又在此基础上进行了详细的验证,确证了Ig在肿瘤细胞中的表达。这一新理论的提出不仅对B细胞分泌Ig的经典理论提出了质疑和挑战,同时也引起了人们的思考,即肿瘤细胞分泌的Ig是否可以作为新靶点用于肿瘤放射免疫显像和靶向治疗。本工作即拟以此出发点,用 $^{125}\text{I}$ 标记羊抗人IgG多克隆抗体,观察其在荷人结肠癌裸鼠中的分布,探讨放射性核素标记的针对肿瘤细胞分泌的免疫球蛋白的抗体作为新型肿瘤放射免疫显像和治疗药物的可能性。

## 1 实验材料

### 1.1 主要仪器与试剂

CRC-15R放射性活度计:美国Capintec公司;1470-002全自动 $\gamma$ 计数器:芬兰Perkin Elmer公司;AR-2000放射性薄层扫描仪:美国Bioscan公司;ITLC-SG:美国Gelman公司;PD-10脱盐柱(Sephadex G-25):瑞典Amersham Bioscience公司;羊抗人IgG多克隆抗体(GAHG)、羊IgG(GIgG):美国Sigma公司;Iodogen(1,3,4,6-四氯3,6-二苯-甘脲):美国Sigma公司; $\text{Na}^{125}\text{I}$ 溶液(无载体):放射性浓度为 $3.7\sim 7.4\text{ PBq/L}$ ,美国Perkin Elmer Life Science公司;其它试剂均为国产,分析纯。

人结肠癌细胞系HT-29:北京大学医学同位素研究中心传代细胞。

### 1.2 实验动物

BALB/c小白鼠:5只,SPF级,雌性,6~7周龄,体重18~22 g。BALB/c裸鼠:22只,SPF

级,雌性,4~5周龄,体重15~17 g。实验动物均由北京大学医学部实验动物部提供。

## 2 实验方法

### 2.1 $^{125}\text{I}$ 标记羊抗人IgG多克隆抗体(GAHG)

采用Iodogen法,在预先包被 $50\ \mu\text{g}$  Iodogen的标记小瓶中,依次加入 $150\ \mu\text{L}$   $0.1\ \text{mol/L}$ , pH 7.4磷酸(PB)缓冲液, $100\ \mu\text{g}$  GAHG( $10\ \mu\text{L}$ ),以及 $37\sim 74\ \text{MBq}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  ( $10\ \mu\text{L}$ ),室温振摇反应10 min,然后用PD-10脱盐柱进行纯化。反应后样品以及纯化后的样品均点样到ITLC-SG,在85%的甲醇展开体系中展开,用放射性薄层扫描仪测定其标记率和放化纯度。

用同样的方法进行羊IgG(GIgG)的标记并测定其标记率和放化纯度,用于阴性对照实验。

### 2.2 体外稳定性实验

取 $100\ \mu\text{L}$ 纯化后的 $^{125}\text{I}$ -GAHG分别加入到 $900\ \mu\text{L}$ 生理盐水(NS)、胎牛血清(FBS)和裸鼠血清(NMS)中, $37\ \text{C}$ 振摇,孵育不同时间(0、4、24、48、72 h),测放化纯度,评价其体外稳定性。

### 2.3 药代动力学

5只BALB/c小白鼠,每只经尾静脉注射 $100\ \mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ -GAHG( $370\ \text{kBq}$ ,  $2\ \mu\text{g}$ ),分别于注射后不同时间点(5、12、30 min,1、2、4、8、11、22、34、48、72 h)眼眶取血,称重并用 $\gamma$ 计数器测量其放射性计数,计算每克血液百分注射剂量率(%ID/g)。采用Graph Prism软件进行分析,计算药代动力学参数。

### 2.4 细胞培养与荷瘤裸鼠动物模型

人结肠癌HT-29细胞于含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中,在 $37\ \text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 的饱和湿度条件下常规培养。取22只裸鼠,每只裸鼠右侧腋窝皮下接种 $5\times 10^6$ 个细胞,SPF条件下饲养,待肿瘤直径长至约1.0 cm时(2~3周),用于显像和生物分布实验。

## 2.5 $\gamma$ 显像

取 6 只荷瘤裸鼠,于显像前 3 天开始饲以含 1% KI 的无菌饮用水,封闭甲状腺。将其分为 3 组,每组 2 只,一组用于尾静脉注射  $^{125}\text{I}$ -GAHG,另一组用于尾静脉注射  $^{125}\text{I}$ -GIgG,第三组用于肿瘤局部注射  $^{125}\text{I}$ -GAHG。每只裸鼠分别注射 13.32 MBq (100  $\mu\text{L}$ ,  $\sim 28 \mu\text{g}$ )  $^{125}\text{I}$ -GAHG 或  $^{125}\text{I}$ -GIgG,并分别于注射后 4、48、72、148 h 将裸鼠仰卧位固定于配有低能高分辨平行孔准直器的双探头  $\gamma$  相机 (Siemens, E. CAM) 下进行平面显像。

## 2.6 $^{125}\text{I}$ -GAHG 在荷瘤裸鼠中的生物分布

16 只荷瘤裸鼠随机分为 4 组,每组 4 只。每只由尾静脉注射 563.5 kBq (100  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\mu\text{g}$ )  $^{125}\text{I}$ -GAHG,并于注射后 24、72、120 和 168 h 按组将实验裸鼠断颈处死,取血液及主要脏器和组织,称重并测量放射性计数,计算各器官或组织的百分注射剂量率 (%ID/g)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 $^{125}\text{I}$ 标记

GAHG 及对照 GIgG 经 Iodogen 法标记后,其标记率  $> 85\%$ 。反应产物经 PD-10 柱纯化后,其放化纯度均大于 98%。在 85% 的甲醇展开体系中,游离  $^{125}\text{I}$  的  $R_f$  为 0.7~0.8,  $^{125}\text{I}$  标记物的  $R_f$  为 0~0.1。

### 3.2 体外稳定性实验

$^{125}\text{I}$ -GAHG 在 3 种不同体系中的放化纯度示于图 1。在观测的 72 h 内,  $^{125}\text{I}$ -GAHG 在 NS、FBS 和 NMS 3 种体系中的放化纯度基本保持在 95% 以上,无明显脱碘现象,说明标记物具有良好的体外稳定性。

### 3.3 药代动力学

$^{125}\text{I}$ -GAHG 在血液中的清除曲线示于图 2。采用 Graph Prism 软件对实验数据进行分析,经拟合符合二室模型 ( $R^2 = 0.98$ ),其分布相半衰期  $T_{1/2\alpha}$  为 1.19 h,消除相半衰期  $T_{1/2\beta}$  为 43.99 h。

### 3.4 $\gamma$ 显像

每组中的两只荷瘤裸鼠显像结果相似,其中 1 只小鼠的代表性图像示于图 3。由图 3 可以看出,注射  $^{125}\text{I}$ -GAHG 或  $^{125}\text{I}$ -GIgG 的荷瘤裸鼠,在注射后 48 h 时肿瘤部位清晰可见,随着放射性标记物在正常组织的代谢和在肿瘤部位的继续浓聚,注射后 168 h 时肿瘤部位的显像更加清

晰。两种标记物的显像结果相比,注射后 4 h,二者无明显差异,但随着时间的延长,  $^{125}\text{I}$ -GAHG 在肿瘤部位的摄取均要明显高于  $^{125}\text{I}$ -GIgG,并且全身的本底低于  $^{125}\text{I}$ -GIgG,证明了  $^{125}\text{I}$ -GAHG 在肿瘤部位的特异性摄取。肿瘤内局部注射  $^{125}\text{I}$ -GAHG 的荷瘤裸鼠,肿瘤部位始终呈现很强的放射性浓聚,即使注射后 168 h,放射性物质仍基本浓聚在肿瘤部位,没有明显的脏器趋向性,说明了肿瘤局部给药后,  $^{125}\text{I}$ -GAHG 能够很好地滞留在肿瘤部位。

对于正常羊 IgG (GIgG) 的  $\gamma$  显像,其肿瘤摄取也高于其它正常组织,分析认为,由于大分子物质在实体瘤中具有增强的渗透和滞留效应 (Enhanced Permeability and Retention, EPR)<sup>[4]</sup>,使得其在透过高通透性血管后不易返回而滞留在肿瘤部位。对于这种阴性抗体在肿瘤部位的浓聚,也有文献<sup>[5-6]</sup>报道。 $^{125}\text{I}$ -GAHG 在肿瘤部位的浓聚不仅有特异性摄取,也存在 EPR 效应。肿瘤局部注射的显像结果表明,抗体在肿瘤部位滞留较好,不易向正常组织扩散,这对于核素标记抗体用于肿瘤局部注射治疗非常重要。

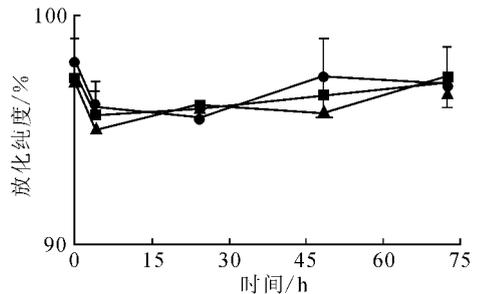


图 1  $^{125}\text{I}$ -GAHG 在 3 种体系中的体外稳定性 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

■——生理盐水; ▲——胎牛血清; ●——裸鼠血清

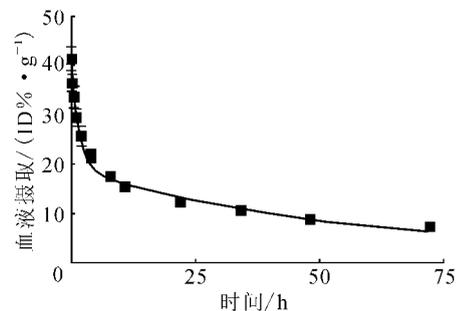


图 2  $^{125}\text{I}$ -GAHG 在 BALB/c 小鼠体内的血液清除曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

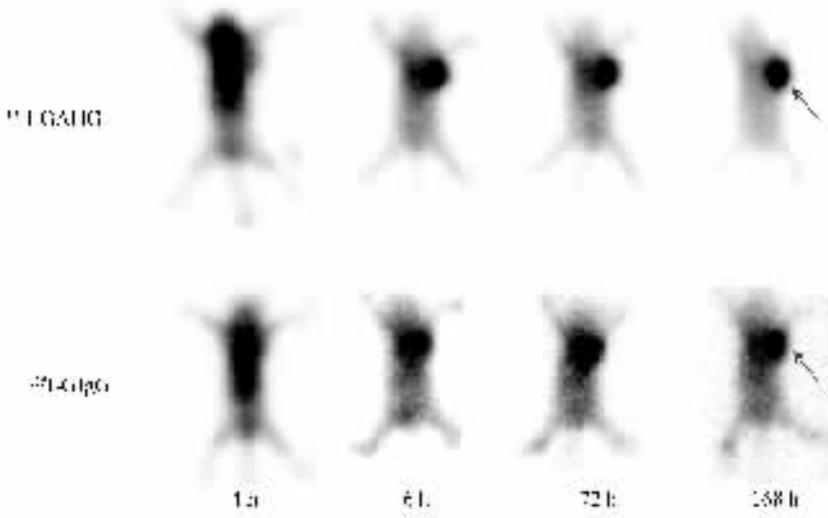


图 3  $^{125}\text{I-GAHG}$  和  $^{125}\text{I-GIgG}$  在荷瘤裸鼠中的  $\gamma$  显像  
(尾静脉注射, 箭头指示肿瘤部位)



图 4  $^{125}\text{I-GAHG}$  在荷瘤裸鼠中的  $\gamma$  显像  
(瘤体内注射, 箭头指示肿瘤部位)

### 3.5 生物分布

$^{125}\text{I-GAHG}$  在荷瘤裸鼠体内的生物分布示于图 5, 靶组织/非靶组织的放射性比(T/NT)示于图 6。

由图 5 可以看出, 尾静脉注射  $^{125}\text{I-GAHG}$  后, 其在荷瘤裸鼠血液中的清除较慢, 注射后 168 h, 血液的放射性摄取仍高达  $9.44 \pm 2.87\% \text{ID/g}$ , 高于其它组织。这可能与 GAHG 为全抗分子, 具有较高的相对分子质量(150 000)有关; 另外, GAHG 在血液中与血浆蛋白的非特异性结合也可能影响其在血液中的清除。这对于肿瘤的快速显像是不利的, 因为增加了病人的额外辐射剂量, 但是对于放射免疫治疗来说, 能够增加肿瘤的摄取, 提高治疗效率。两种已经上市的放射免疫治疗药物 Zevalin 和 Bexxar 均为治疗性核素标记的全抗分子<sup>[7]</sup>。

由图 5 还可以看出, 随着时间延长, 非靶组织的放射性摄取基本呈逐渐降低趋势, 而肿瘤组织的放射性摄取在注射后第 3 天出现峰值, 为  $6.71 \pm 2.19\% \text{ID/g}$ , 并始终保持较高的摄取值。相对于其它高特异性的抗体显像剂来说, 这一肿瘤绝对摄取值并不是很高, 这可能与肿瘤细胞中人 IgG 的表达水平, 以及 IgG 在 HT-29 细胞中 80% 以上表达在胞浆内, 细胞膜 IgG 的表达只占 IgG 表达总量的 20%<sup>[2]</sup>, 而大分子抗体很难透过细胞膜进入胞浆有关。

由图 6 则可以看出, 注射后 24 h, 除了肿瘤与血液及肺的 T/NT 小于 1 外, 其它组织均大于 1, 并且随着时间延长, T/NT 基本呈逐渐增大的趋势。注射后 168 h, 肿瘤与肌肉的 T/NT 达到最大, 为  $7.33 \pm 1.07$ 。提示抗体在正常组织的清除比在肿瘤中快得多, 随着正常组织内抗体的清除以及肿瘤部位抗体的逐渐浓聚, 肿瘤部位的显像更加明显。

## 4 小 结

以上结果显示,  $^{125}\text{I-GAHG}$  在荷 HT-29 结肠癌裸鼠中具有特异性的肿瘤摄取。尽管其血液清除慢, 肿瘤绝对摄取不高, 不是一种理想的肿瘤显像剂或治疗剂, 但是这种以人 IgG 等肿瘤分泌物为靶点的研究可能会为肿瘤显像和治疗提供新的思路。

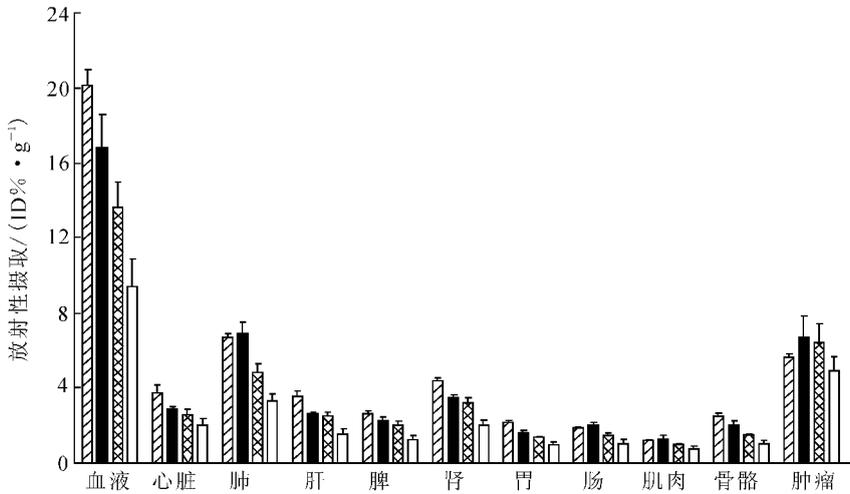


图 5 <sup>125</sup>I-GAHG 在荷瘤裸鼠体内的生物分布 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

▨——24 h; ■——72 h; ▩——120 h; □——168 h

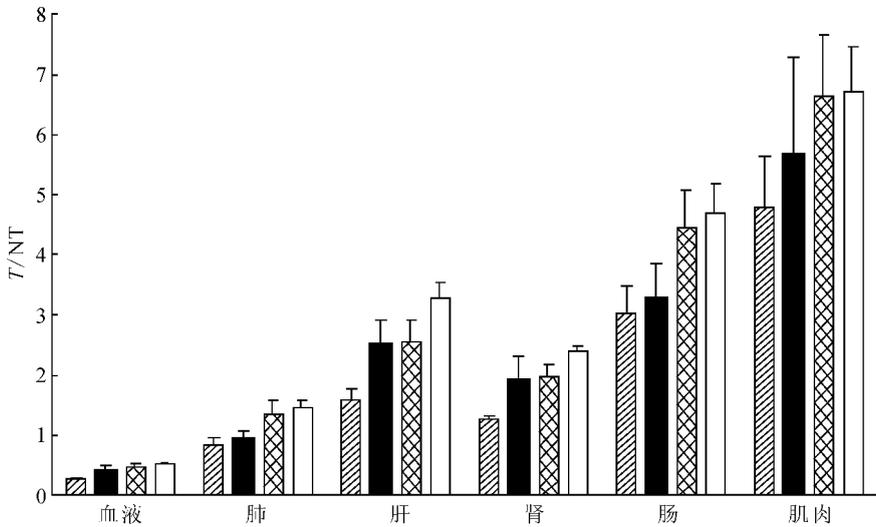


图 6 <sup>125</sup>I-GAHG 在荷瘤裸鼠体内 T/NT 比值 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

▨——24 h; ■——72 h; ▩——120 h; □——168 h

参考文献:

[1] 邱晓彦, 侯春梅, 李秀森, 等. 多种肿瘤传代细胞中 IgG 样物质存在与检测 [J]. 癌症, 1999, 18: 180-184.

[2] QIU X, ZHU X, ZHANG L, et al. Human Epithelial Cancers Secrete Immunoglobulin G With Unidentified Specificity to Promote Growth and Survival of Tumor Cells [J]. Cancer Res, 2003, 63:6 488-6 495.

[3] CHEN Z, GU J. Immunoglobulin G Expression in Carcinomas and Cancer Cell Lines [J]. FASEB J, 2007, 21:2 931-2 938.

[4] MAEDA H, WU J, SAWA T, et al. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics; a Review [J]. J Control Rel, 2000, 65:271-284.

[5] CAI W, WU Y, CHEN K, et al. In Vitro and In Vivo Characterization of <sup>64</sup>Cu-Labeled AberginTM, a Humanized Monoclonal Antibody against Integrin  $\alpha v \beta 3$  [J]. Cancer Res, 2006, 66: 9 673-9 681.

[6] CAI W, CHEN K, HE L, et al. Quantitative PET of EGFR Expression in Xenograft-bearing Mice Using <sup>64</sup>Cu-Labeled Cetuximab, a Chimeric Anti-EGFR Monoclonal Antibody [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007, 34:850-858.

[7] MILENIC DE, BRADY ED, BRECHBIEL MW. Antibody-Targeted Radiation Cancer Therapy [J]. Nature Rev Drug Discovery, 2004, 3:488-498.