

放射性碘标记热休克蛋白 90 α 单克隆抗体用于肿瘤放射免疫治疗的研究

孙宏伟, 王 飞, 王荣福, 闫 平, 张春丽, 郝 攀, 马 欢, 陈雪琪
(北京大学第一医院, 北京 100034)

摘 要: [目的] 用放射性碘 ^{131}I 标记热休克蛋白 90 α 单克隆抗体, 研究其在胶质瘤荷瘤小鼠模型生物分布以及放射免疫治疗效果。[方法] 热休克蛋白 90 α 单克隆抗体的放射性 ^{131}I 标记采用氯胺 T 法进行。标记抗体经尾静脉注射到 U87 细胞荷瘤小鼠模型体内, 在注射体内后 6、12、24h 处死小鼠, 测量其在各组织器官内的分布。放免实验分为实验组、对照组和未标记组, 每组 6 只小鼠, 注射药物后每 5 天测量肿瘤体积, 连续 40 天。并记录全部小鼠注射后的生存时间。[结果] 热休克蛋白 90 α 单克隆抗体标记效率达到 56%, 纯化后放射化学纯度超过 95%。分布数据表明 ^{131}I -Hsp90 α 单克隆抗体主要累积在肝脏、脾脏和肿瘤。治疗组肿瘤体积明显小于其他两组, 抑瘤率高于其余两组且生存时间更长。[结论] 热休克蛋白 90 α 单克隆抗体可以用氯胺 T 法成功标记 ^{131}I 。 ^{131}I 标记热休克蛋白 90 α 单克隆抗体可以被 U87 荷瘤小鼠的肿瘤组织特异性摄取, 其用于放免治疗有一定的研究价值和临床应用前景。

主题词: 热休克蛋白 90 α ; 肿瘤; 单克隆抗体; 放免治疗; ^{131}I

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)04-0270-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.04.B003

Study on Tumor Radioimmunotherapy Using Radioiodinated Labeled Heat Shock Protein 90 α Monoclonal Antibody

SUN Hong-wei, WANG Fei, WANG Rong-fu, et al.

(Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract: [Purpose] We labeled Hsp90 α monoclonal antibody with radioiodine ^{131}I , investigated its biodistribution and potential usage in radioimmunotherapy of glioma tumor in xenograft mice model. [Methods] Radioiodination of the Hsp90 α -mAb was performed by the Chloramine-T method. ^{131}I -Hsp90 α -mAb were injected into the nude mice bearing human carcinoma via a tail vein. Biodistribution was performed at 6, 12, 24h after injection. Tumor volume was measured forty days continuous after the radioimmunotherapy. [Results] The labeling efficiencies of Hsp90 α -mAb reached 56% and the radiochemical purity exceeded 95% after purification. Biodistribution data showed that ^{131}I -Hsp90 α -mAb predominantly accumulated in the liver, spleen and tumor. The tumor volume after radioimmunotherapy was significant smaller than that in control group and unlabeled group. [Conclusions] The Hsp90 α -mAb can be successfully labeled by Chloramine-T method with ^{131}I . The Hsp90 α -mAb can be uptake specifically by tumor tissue in mice with U87 tumor. It has a bright application prospect in radioimmunotherapy.

Subject words: Hsp90 α -mAb; tumor; monoclonal antibody; radioimmunotherapy; ^{131}I

热休克蛋白 (heat shock proteins) 是 1962 年由遗传学家 Ritossa 发现的^[1]。热休克蛋白是一个在细胞内含量丰富和普遍存在的分子伴侣, 是一组高度保守的, 除古生菌以外几乎在所有生物体中均有发

现的蛋白^[2,3]; 在许多细胞过程, 包括细胞周期调控、细胞的存活、激素和其他的信号转导通路^[4-6]中起重要作用。事实上, 超过三分之二的蛋白激酶依赖于 Hsp90。Hsp90 的客户蛋白包括丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶、突变的 p53、细胞周期相关联的 D-CDK4 和 CDK6 和野生型 plk。Hsp90 保持各种客户端蛋白参与信号转导和癌细胞的许多其他功能的结构和功能的完整性。人类癌症存在许多共同特征, 包括自给自

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项 (2011YQ03011409)、

十二五国家支撑项目基金 (2014BAA03B03)

通讯作者: 王荣福, 教授, 主任医师, 博士; 北京大学第一医院核医学科, 北京市西城区西什库大街 8 号 (100034); E-mail: rongfu_wang@163.com

收稿日期: 2015-02-05

足的生长信号、生长抑制机制不敏感、细胞凋亡的逃避、无限复制潜力、持续的血管生成、组织的侵袭和转移；数量惊人的 Hsp90 客户蛋白例如 Akt^[7]、ErbB2/HER2^[8]和 Raf1^[9]等,在这些过程中发挥重要作用。Hsp90 的表达在肿瘤细胞中比正常细胞高 2~10 倍,它可能对肿瘤细胞的存活以及生长起重要作用。Hsp90 在肿瘤细胞质中被激活并定位到细胞表面,而在正常细胞中 Hsp90 仅仅驻留在细胞质中。在过去的 10 多年来,越来越多的关注将它视为肿瘤治疗的一个新的有效目标靶点^[10]。

1 材料与方法

1.1 放射性标记及纯化

Hsp90 α 单克隆抗体的 ¹³¹I 标记使用氯胺 T 方法。Hsp90 α 单克隆抗体(10 μ g)溶解在磷酸盐缓冲液(PB)(51 μ l,0.5mol/L,pH7.4)中,首先加入 Na¹³¹I(40 μ l,74MBq),然后加入氯胺 T(9 μ l,10mg/ml)。将反应混合物震荡混匀,在 20℃室温下反应 5min,然后加入偏重亚硫酸钠(20 μ l,10mg/ml)。标记率采用纸层析方法,展开剂为正丁醇:乙醇:稀氨水(5:1:2)。标志物的纯化采用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 柱分离(1cm $\times$ 20cm),流动相采用磷酸盐缓冲盐水(PBS,0.1mol/L,pH7.4),流速 1ml/min,5 滴/管。

1.2 细胞培养及动物模型

在这项研究中使用的肿瘤细胞系为人恶性胶质瘤细胞 U87 细胞(北京大学药学院馈赠)。U87 细胞培养采用添加 10%胎牛血清和双抗的改良型高糖 DMEM 培养基。细胞在 37℃恒温恒湿培养箱内培养,CO₂ 浓度恒定 5%(Thermo CO₂ 细胞培养箱,美国)。用显微镜(Olympus,日本)观察细胞的生长状态。动物模型建立采用 4 周龄雌性 Nunu 裸鼠(北京大学实验动物中心),5 $\times$ 10⁶ U87 肿瘤细胞被注射到裸鼠右侧腋下,2~3 周后肿瘤长径约 10mm。

1.3 生物分布研究

每组 5 只 Nunu 荷瘤裸鼠,静脉注射 0.74MBq ¹³¹I-Hsp90 α 单克隆抗体。分别在注射后 6、12、24h 处死动物并解剖。心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、膀胱、骨骼、肌肉、血液和肿瘤组织被称重。使用放射性计数器(北京核仪器厂)测定组织中的放射性。计算每克组织百分注射剂量(%ID/g)。

1.4 放射免疫治疗

每组有 6 只 Nunu 裸鼠。A 组注射 11.1MBq ¹³¹I-Hsp90 α 单克隆抗体、B 组注射相同体积的生理盐水、C 组注射 10 μ g 未标记抗体。每 5 天测量肿瘤体积,连续 40 天。肿瘤体积公式:体积=长径 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2;抑瘤率计算公式:抑瘤率(%)=(实验组肿瘤体积-对照组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积 $\times$ 100%。并记录全部小鼠注射后的生存时间。

1.5 统计学处理

变量表示为均数 $\pm$ 标准差。均数采用 ANOVA 进行统计比较,生存分析采用 Log-Rank 检验。P<0.05 则认为有统计学差异。

2 结果

2.1 放射性标记纯化

热休克蛋白 90 α 单克隆抗体的 ¹³¹I 标记,在最佳条件下,标记率达到 56%。经过 Sephadex G-25 纯化后放射化学纯度大于 95%。

2.2 生物分布研究

¹³¹I-Hsp90 α 单克隆抗体在 12h 和 24h 的肿瘤摄取分数分别为 1.68 $\pm$ 0.38 和 0.94 $\pm$ 0.12,比肝、脾除外的其他器官摄取都高。而肿瘤表现出了随时间变化最慢的清除速度(6h 到 24h 下降 52%),相比之下,肾脏(减少 98%)、脾脏(减少 75%)和肌肉(减少 89%)则表现出较快的清除速度(Table 1)。肿瘤组织与非肿瘤组织的靶/非靶摄取比值也呈明显的逐渐上升趋势(Figure 1)。注射后 6、12、24h 的肿瘤/肌肉

Table 1 Biodistribution(% ID/g)of ¹³¹I-Hsp90 α monoclonal antibody in tumor-bearing mice

Tissues	6h	12h	24h
Heart	0.95 $\pm$ 0.76	0.52 $\pm$ 0.13	0.14 $\pm$ 0.04
Liver	8.62 $\pm$ 4.36	5.14 $\pm$ 0.71	3.76 $\pm$ 1.42
Spleen	7.67 $\pm$ 3.37	2.32 $\pm$ 0.75	1.85 $\pm$ 0.30
Lung	1.74 $\pm$ 1.37	1.09 $\pm$ 0.27	0.46 $\pm$ 0.15
Kidney	3.68 $\pm$ 2.26	0.65 $\pm$ 0.22	0.07 $\pm$ 0.02
Stomach	2.95 $\pm$ 1.47	1.29 $\pm$ 0.17	0.89 $\pm$ 0.22
Small intestine	1.28 $\pm$ 0.79	0.50 $\pm$ 0.25	0.06 $\pm$ 0.03
Bladder	1.27 $\pm$ 0.63	0.61 $\pm$ 0.13	0.08 $\pm$ 0.03
Bone	1.50 $\pm$ 0.58	0.51 $\pm$ 0.24	0.32 $\pm$ 0.11
Skeletal muscle	0.63 $\pm$ 0.36	0.30 $\pm$ 0.26	0.07 $\pm$ 0.02
Blood	2.98 $\pm$ 2.10	1.06 $\pm$ 0.22	0.16 $\pm$ 0.06
Tumor	1.97 $\pm$ 0.46	1.68 $\pm$ 0.38	0.94 $\pm$ 0.12

比达到 3.90、7.07 和 14.58；肿瘤/血液比达到 0.88、1.67 和 6.60。

2.3 肿瘤放免治疗

A、B、C 三图分别为实验组、对照组和未标记组 6 只裸鼠肿瘤大小的趋势 (Figure 2)。D 图中可以看到,在治疗的第一天,三组平均肿瘤体积为约 560mm³ ($P>0.05$),而在第 35 天和 40 天,三组肿瘤平均体积产生明显差异,实验组最小,约 (14 361±3 771)mm³,对照组与未标记组肿瘤大小分别为 (25 514±7 267)mm³ 和 (21 167±6 848)mm³ ($P<0.05$)。¹³¹I 标记实验组抑瘤率明显高于未标记组,在第 35 天和 40 天实验组抑瘤率达到 39%和 43% ($P<0.05$),未标记组仅

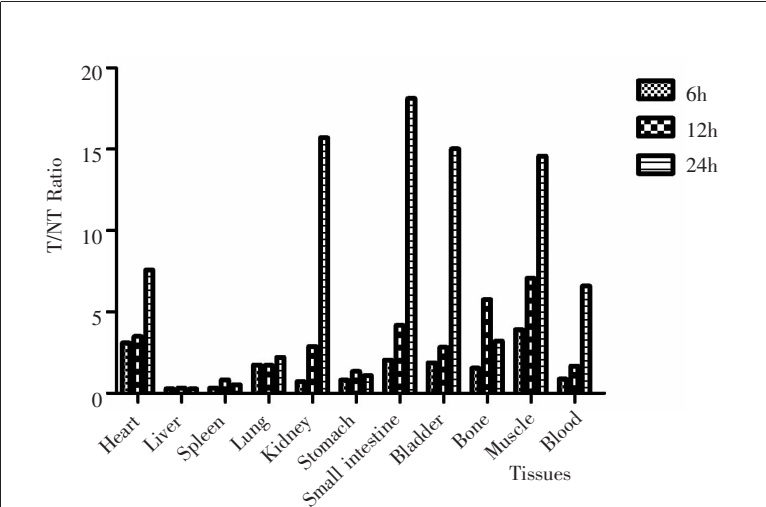
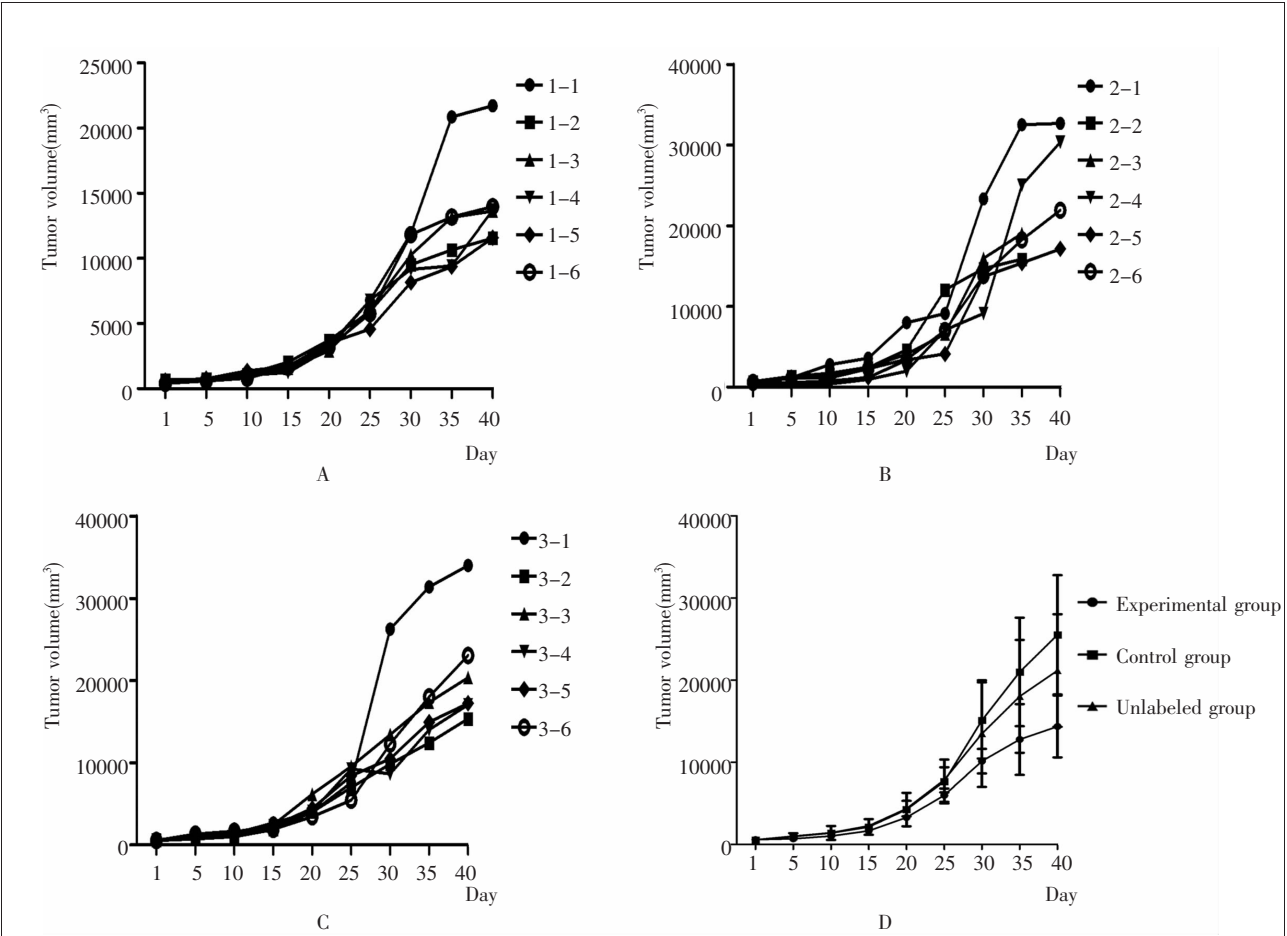


Figure 1 The ratios of tumor-to-non-tumor (T/NT) in different tissues



Note: A: Experimental group: each mouse was injected with 11.1MBq¹³¹I-Hsp90α-mAb, n=6.
B: Control group: each mouse was injected with the same volume of saline, n=6.
C: Unlabeled group: each mouse was injected with 10μg unlabeled antibody, n=6.
D: The average tumor volume of each group.

Figure 2 Tumor volume of different groups

为 14% 和 17% (n=6) (Figure 3)。实验组的生存时间明显长于对照组和未标记组, 三组小鼠的中位生存时间分别为 42 天、45 天和 53.5 天 ($P<0.05$) (Figure 4)。

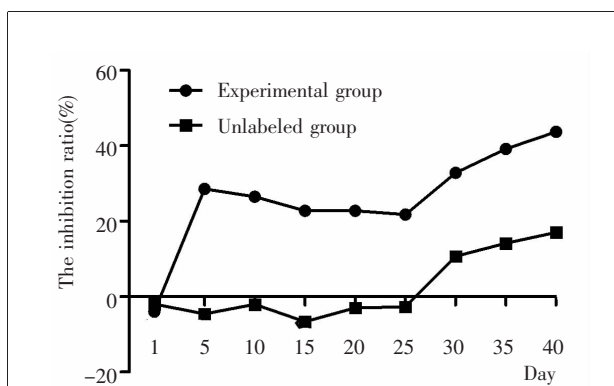


Figure 3 The tumor inhibition rate of experimental group and unlabeled group

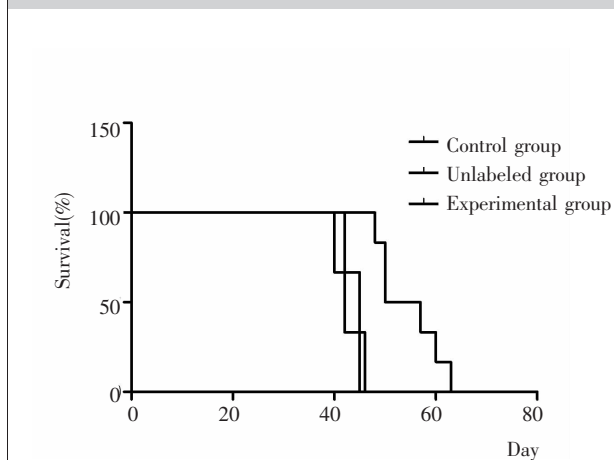


Figure 4 The survival of the three groups

3 讨论

肿瘤细胞与正常细胞不同, 其自身的代谢和信号转导途径发生了广泛的改变, 而这一切依赖于蛋白如热休克蛋白的参与。肿瘤内部环境的几个特点: 缺氧、酸中毒及不稳定的细胞蛋白质, 使他们对 Hsp90 活动依赖性相较正常细胞更高。热休克蛋白诱导的细胞应激在多种肿瘤中高水平表达与预后不良和性能密切相关的治疗。在肿瘤细胞中热休克蛋白转录增加的活动重叠, 在通过促进细胞增殖和抑制自主死亡途径的肿瘤生长中起重要作用。脑胶质瘤细胞中 Hsp90 α 的表达也是高于正常组织^[11]。

目前多种治疗胶质瘤以 Hsp90 α 作为靶点的机制以及药物正在研究当中^[12-15]。肿瘤细胞表面 Hsp90 α 的高表达是使用放射性标记 Hsp90 α 单克隆抗体进行放射免疫治疗肿瘤的理论基础。

本研究中放射性标记 ^{131}I -Hsp90 α 单克隆抗体的标记率约 56%, 但经过纯化后放射化学纯度大于 95%, 完全满足临床放射性药物使用的放化纯度要求。 ^{131}I 的半衰期是 8.02 天, 不仅发射 β 射线, 同时发射 γ 射线, 所以 ^{131}I -Hsp90 α 单克隆抗体可以在治疗肿瘤的同时进行显像, 有利于早期发现转移灶。 ^{131}I -Hsp90 α 单克隆抗体的合成技术成熟, 过程相对简单, 合成成本相对较低, 这些都是其用于放免治疗的优点。从体内生物分布的数据看, ^{131}I -Hsp90 α 单克隆抗体的血液本底以及肝脾摄取较高, 这可能是由于标志物的分子量较大, 在体内代谢较慢, 标志物在血液内非特异性结合一些蛋白质的可能也有。标志物在血液内的清除速度是较快的, 而在肿瘤组织的清除速度较慢, 这表明了肿瘤组织特异性地与标记抗体结合且结合较为牢固稳定。

放射免疫治疗不仅针对肿瘤原发部位, 同时可以针对肿瘤的转移灶, 这些特点已经让其成为一个非常有吸引力的肿瘤治疗领域^[16-18]。肿瘤细胞以光子或带电粒子的形式吸收大量的能量, 造成了直接的大分子损伤, 产生的活性氧分子和自由基。自由基与氧分子破坏 DNA 链^[20,21], 损伤诱导细胞凋亡。本结果数据所示, 实验组肿瘤体积较对照组明显缩小, 而未标记组与对照组肿瘤体积无显著差异, 这表明单纯的非放射性标记的 90 α 单克隆抗体对肿瘤无明显的治疗效果, 实验组肿瘤体积增长缓慢是由于组织接受放射性照射的结果。

本实验所有的结果均支持 ^{131}I -Hsp90 α 单克隆抗体可以被 U87 荷瘤小鼠肿瘤组织特异性摄取, 且清除较正常组织缓慢; 实验组肿瘤生长明显被抑制, 生存时间明显长于对照组。 ^{131}I -Hsp90 α 单克隆抗体用于放免治疗有一定的研究价值和临床应用前景。

参考文献:

- [1] Burrows F, Zhang H, Kamal A, et al. Hsp90 activation and cell cycle regulation[J]. Cell Cycle, 2004, 3(12): 1530-1536.
- [2] Johnson JL. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(3): 607-613.

- [3] Johnson JL, Brown C. Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14(1): 83–94.
- [4] Echeverria PC, Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(6): 641–649.
- [5] Echeverria PC, Figueras MJ, Vogler M, et al. The Hsp90 cochaperone p23 of *Toxoplasma gondii*: identification, functional analysis and dynamic interactome determination [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2010, 172(2): 129–140.
- [6] Lachowicz J, Lemus T, Borenstein E, et al. Hsp90 promotes kinase evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(1): 91–99.
- [7] Gong AJ, Gong LL, Yao WC, et al. Aplysin induces apoptosis in glioma cells through HSP90/AKT pathway [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2014. [Epub ahead of print]
- [8] Bertelsen V, Stang E. The mysterious ways of ErbB2/HER2 trafficking [J]. *Membranes*, 2014, 4(3): 424–446.
- [9] Lee SH, Jee JG, Bae JS, et al. A group of novel HIF-1 α inhibitors, glyceollins, blocks HIF-1 α synthesis and decreases its stability via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and Hsp90 binding [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(4): 853–862.
- [10] Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2002, 2(1): 3–24.
- [11] Alexiou G, Karamoutsios A, Lallas G, et al. Expression of heat shock proteins in brain tumors [J]. *Turk Neurosurg*, 2014, 24(5): 745–749.
- [12] Cruickshanks N, Shervington L, Patel R, et al. Can hsp90 α -targeted siRNA combined with TMZ be a future therapy for glioma [J]. *Cancer Investigation*, 2010, 28(6): 608–614.
- [13] Horibe T, Torisawa A, Kohno M, et al. Molecular mechanism of cytotoxicity induced by Hsp90-targeted Antp-TPR hybrid peptide in glioblastoma cells [J]. *Molecular Cancer*, 2012, 22(8): 11–59.
- [14] Kaijun D, Stephen T, Daniela A, et al. Profiling Hsp90 differential expression and the molecular effects of the Hsp90 inhibitor IPI-504 in high-grade glioma models [J]. *J Neurooncol*, 2014, 120(12): 473–481.
- [15] Wachsberger P, Lawrence Y, Liu Y, et al. Hsp90 inhibition enhances PI3 kinase inhibition and radiosensitivity in glioblastoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(4): 573–582.
- [16] Kawashima H. Radioimmunotherapy: a specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies [J]. *Scientific World Journal*, 2014, 2014: 492061.
- [17] Wang RF. Molecular targeting diagnosis and therapy of nuclear medicine [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2014, 20(11): 871–874. [王荣福. 核医学分子靶向诊断与治疗 [J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20(11): 871–874.]
- [18] Wang RF. Nuclear medicine [M]. 3rd Edition. Beijing: Peking University Medical Press, 2013. [王荣福. 核医学 [M]. 第3版. 北京: 北京大学医学出版社, 2013.]
- [19] Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(5): 351–360.
- [20] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(12): 967–975.
- [21] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death [J]. *Physiological Reviews*, 2007, 87(1): 99–163.
- [22] Cabon L, Galán-Malo P, Bouharrou MA, et al. BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(2): 245–256.