

Radio-immunotherapy and imaging of "cold antibody" before and after blocking on nude mice bearing human lymphoma

MA Lin-feng^{1,2}, FAN Wei^{1,2*}, CAI Yan-jun^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China;

2. Department of Nuclear Medicine, Cancer Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ¹³¹I-labeled Rituximab in radio-immunotherapy and imaging of nude mice bearing human lymphoma before and after "cold antibody" blocking. **Methods** The BALB/C mice model bearing human non-Hodgkin lymphoma was established. The positive rate of tumor cell surface CD20 was 95% upwards. Lymphoma bearing nude mice were randomly divided into 3 groups (5 mice in every group), i. e. ¹⁸F-FDG group, ¹³¹I-Rituximab group and ¹³¹I-Rituximab group with "cold antibody" block, the latter two groups underwent SPECT scanning on the 2nd, 4th, 7th, 11th and 16th day in imaging study, while the treatment study was divided into 5 groups (3 mice in every group) including Rituximab 50 μg group, Rituximab 100 μg group, ¹³¹I-Rituximab group and ¹³¹I-Rituximab group with "cold antibody" block. After 15 d, the tumor inhibition rate was calculated, then the mice were sacrificed to get tumor tissues for histological examination. **Results** Obvious uptake of ¹⁸F-FDG in tumor was not seen on PET/CT. When T/NT value was high, tumor was not shown in ¹³¹I-Rituximab group, but was seen in ¹³¹I-Rituximab group with "cold antibody" block on the 7th day. Tumor inhibiting effect of ¹³¹I-Rituximab group with "cold antibody" block was the highest among all five treatment groups, also be verified from histological examination. **Conclusion** Lymphoma inhibiting effect of taking radio-immunotherapy with "cold antibody" block is superior to radio-immunotherapy and immunotherapy. Radio-immunoimaging with "cold antibody" block is better than dedicate radio-immunoimaging.

[Key words] Cold antibody; B-cell lymphoma; Radioimmunotherapy; F18 Fluorodeoxyglucose

荷人型淋巴瘤裸鼠“冷抗体” 封闭前后放免治疗与显像

马林峰^{1,2}, 樊卫^{1,2*}, 蔡燕君^{1,2}

(1. 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2. 中山大学

肿瘤防治中心核医学科, 广东 广州 510060)

[摘要] **目的** 探讨用“冷抗体”封闭前后¹³¹I-Rituximab对荷人淋巴瘤裸鼠的治疗与显像效果。**方法** 建立荷人淋巴瘤裸鼠模型, 病理示B细胞非霍奇金淋巴瘤且肿瘤细胞表面CD20抗原阳性率95%以上, 实验分显像与治疗研究。显像研究中将荷瘤裸鼠随机分为3组, 每组5只, 分别为¹⁸F-FDG组、¹³¹I-Rituximab组、“冷抗体”封闭后¹³¹I-Rituximab组, 后两组于第2、4、7、11、16天做SPECT显像, 并做相应药物分布; 治疗研究中将荷瘤裸鼠随机分为5组, 3只/组, 分别为Rituximab 50 μg组、Rituximab 100 μg组、¹³¹I-Rituximab组、“冷抗体”封闭后¹³¹I-Rituximab组、空白对照组, 观察各组肿瘤生长情况, 第15天后处死, 常规病理分析。**结果** 肿瘤在PET/CT上未见明显摄取¹⁸F-FDG; 在T/NT值最高期间, ¹³¹I-Rituximab组肿瘤未见显像, 而“冷抗体”封闭后¹³¹I-Rituximab组在第7天肿瘤可见显像。治疗中“冷抗体”封闭后¹³¹I-Rituximab组抑瘤率高于其他各组, 组织病理学显示有效。**结论** “冷抗体”封闭后放射免疫治疗的淋巴瘤抑制率最好, 优于单纯放射免疫治疗及免疫治疗。“冷抗体”封闭组放免显像优于未封闭组放免显像。

[关键词] 冷抗体; B细胞淋巴瘤; 放射免疫治疗; 氟脱氧葡萄糖¹⁸F

[中图分类号] R-332; R817.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2009)06-0973-04

[作者简介] 马林峰(1982-), 男, 江苏盐城人, 硕士。研究方向: 肿瘤分子影像学与核素靶向治疗。E-mail: ydsubeirenmin@163.com

[通讯作者] 樊卫, 中山大学肿瘤防治中心, 510060。E-mail: fanwei@mail.sysu.edu.cn

[收稿日期] 2008-10-14 **[修回日期]** 2009-03-15

在我国淋巴瘤占成人恶性肿瘤第八位^[1],其中非霍奇金淋巴瘤占总淋巴瘤 80% 左右,95% 以上 B 细胞非霍奇金淋巴瘤表达分化抗原 CD20^[2]。Bexxar 及 Zevalin 是针对 CD20 抗原研发的放射免疫抗体,由于其抗体是鼠源性,输入人体后可能产生人抗鼠抗体,虽无明显不良反应,却大大降低疗效,而用人鼠嵌合型抗体 Rituximab 偶联放射性核素,将会使治疗效果进一步提高。本研究采用“冷抗体”封闭前后静脉给药,探讨¹³¹I-Rituximab 对荷人淋巴瘤裸鼠的治疗与显像效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Rituximab 购自罗氏公司;鼠 IgG 购自 Sigma 公司;¹⁸F-FDG 由北京原子高科广州分公司生产(放化纯度 > 95%);Na¹²⁵I、Na¹³¹I 购自成都中核高通同位素公司;氯胺-T 由中山大学中山医学院基础教研室

提供;Raji 细胞由华南肿瘤学国家重点实验室实验研究部提供;45 只 BALB/C 裸鼠由广州中医药大学动物实验中心提供;GE Discovery ST 16 PET/CT 仪,GE Hawkeye SPECT/CT 仪。

1.2 抗体标记及标记物细胞结合率的测定 采用氯胺-T 法标记,Rituximab 和鼠 IgG 抗体重量与¹³¹I/¹²⁵I 放射性活度分别为 0.5 mg 与 148 MBq。标记后经 Sephadex G-25 分离纯化,纯化后纸层析法测定标记率和放化纯度。将纯化¹³¹I/¹²⁵I-Rituximab 与 Raji 细胞悬液于 37℃ 水浴中孵育 2 h 后,测定细胞结合率。

1.3 荷人型淋巴瘤裸鼠模型的建立 裸鼠接种瘤细胞前一天给予⁶⁰Co 一次性 4 Gy 剂量照射。照射后第二天,将处于对数生长期的 Raji 细胞悬液按 1 × 10⁷/只接种于裸鼠右肩胛皮下,待 3 ~ 4 W 后肿瘤长径至 8 mm 时备用。分离取出荷瘤裸鼠肿瘤,用 10% 甲醛固定,HE 染色和 CD20 免疫组化。

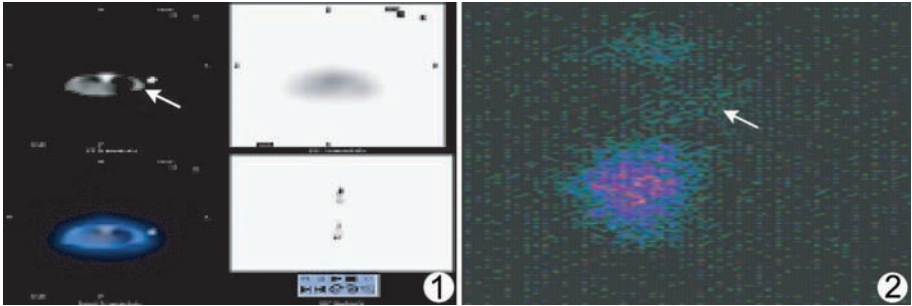


图1 荷瘤裸鼠¹⁸F-FDG PET/CT 显像(箭标记处为肿瘤) 图2 C 组第 7 d SPECT 显像(箭标记处为肿瘤显像)

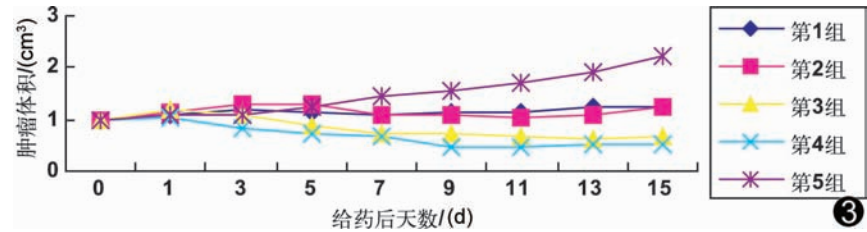


图3 给药后不同实验组时间-肿瘤体积抑制生长曲线

1.4 显像、分布研究 将荷人淋巴瘤裸鼠按肿瘤大小随机分为 6 组,每组 5 只。A 组(¹⁸F-FDG 组):荷瘤裸鼠尾静脉注射¹⁸F-FDG (0.67 ~ 0.93 MBq/只);B 组(¹³¹I-Rituximab 显像组):荷瘤裸鼠尾静脉注射¹³¹I-Rituximab (含 Rituximab 50 μg,¹³¹I 9.25 MBq/只);C 组(“冷抗体”封闭后¹³¹I-Rituximab 显像组)荷瘤裸鼠尾静脉注射 Rituximab 50 μg/只,约 60 min 后再注射¹³¹I-Rituximab (含 Rituximab 50 μg,¹³¹I 9.25 MBq/只);D 组(¹²⁵I-鼠 IgG 分布组):荷瘤裸鼠尾静脉注射¹²⁵I-鼠 IgG (含鼠 IgG 50 μg,¹²⁵I 9.25 MBq/只);E 组(¹²⁵I-Rituximab 分布组):荷瘤裸鼠尾静脉注射¹²⁵I-Rituximab (与 B 组药物剂量相同);F 组(“冷抗体”封闭后¹²⁵I-Rituximab 分布组)荷瘤裸鼠尾静脉注射 Rituximab 50 μg/只,约 60 min 后再注射¹²⁵I-Rituximab (与 C 组药物剂量相同),B ~ F 组荷瘤裸鼠实验前 3 d 始持续将 0.1% KI 溶液作为饮水。

A 组荷瘤裸鼠腹腔给水合氯醛约 0.2 ml 麻醉,尾静脉给

表1 三组荷瘤裸鼠标记抗体在不同时间 T/NT 值

T/NT	第 2 d			第 4 d			第 7 d			第 11 d			第 16 d		
	D 组	E 组	F 组	D 组	E 组	F 组	D 组	E 组	F 组	D 组	E 组	F 组	D 组	E 组	F 组
肿瘤/血液	0.42	1.67	0.48	0.58	1.21	1.14	0.78	1.20	2.87	0.56	0.88	4.84	0.35	0.41	0.52
肿瘤/脾	1.02	1.14	2.02	1.28	1.83	2.12	1.87	6.14	3.82	1.11	2.48	7.36	0.95	1.28	1.79
肿瘤/肝	0.89	0.99	1.03	2.35	1.96	3.22	1.70	3.29	4.66	1.64	1.67	7.68	1.18	0.94	1.89
肿瘤/肺	0.51	0.50	1.77	0.85	0.76	1.45	1.08	0.82	1.14	0.71	0.40	3.07	0.70	0.31	0.35
肿瘤/肾	1.17	1.02	1.83	2.80	1.41	2.43	2.73	2.34	2.90	2.86	1.27	7.83	1.60	0.70	1.27
肿瘤/心脏	1.21	1.20	1.14	2.67	1.55	2.19	2.36	5.44	3.64	2.36	2.37	6.96	1.37	1.14	1.50
肿瘤/胃	1.48	2.39	4.02	5.31	6.66	5.77	7.32	5.34	6.45	4.92	2.14	18.31	2.49	2.46	2.47
肿瘤/小肠	1.57	1.74	3.67	4.96	5.79	4.82	6.51	4.30	7.59	4.39	3.10	18.33	2.46	2.20	2.60
肿瘤/大肠	1.31	1.58	3.31	5.62	3.00	3.83	3.86	5.33	4.60	3.33	3.20	17.53	2.70	1.98	2.73
肿瘤/脊椎	1.93	1.43	2.11	3.11	4.99	3.50	3.69	4.26	7.58	3.17	2.78	12.65	2.13	2.67	2.60
肿瘤/肌肉	4.05	3.40	3.45	5.21	3.97	6.48	8.32	6.87	8.50	4.08	7.03	20.75	3.90	4.52	3.28

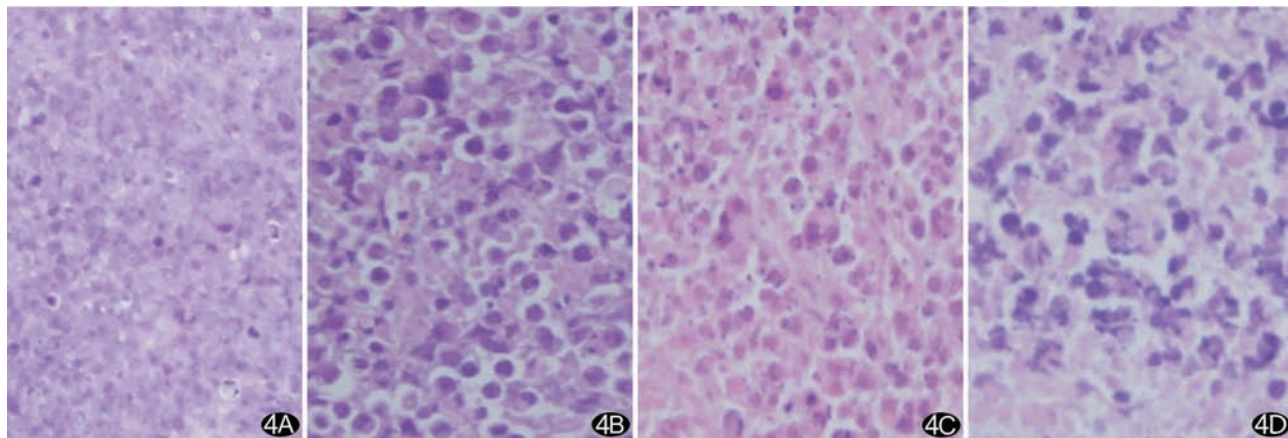


图4 光学显微镜示 A. 第5组,肿瘤细胞紧密,呈弥漫性、旺盛生长,见多个异常核分裂相;B. 第1组,肿瘤细胞排列稀疏,见少许细胞染色质浓聚、碎裂;C. 第3组,大片肿瘤细胞凝固性坏死,残存肿瘤细胞染色质浓聚,见散碎染色质;D. 第4组,肿瘤细胞周围见明显坏死带,残存肿瘤细胞也明显坏死,肿瘤细胞之间稀疏

予 ^{18}F -FDG后30~40 min行CT扫描,扫描条件:管电压140 kV,电流150 mA, PET每个床位3 min。PET/CT扫描范围为荷瘤裸鼠头顶至尾巴,图像融合通过工作站Xeleris软件进行。B、C组于第2、4、7、11、16 d水合氯醛麻醉后,行SPECT显像,采用中能通用型探头,能峰364 keV,窗宽20%,采集100千计数,每只荷瘤裸鼠采集20 min,尤其在分布组中肿瘤/非肿瘤(tumor/non-tumor, T/NT)比值最高期间,仔细观察显像效果。比较两组的显像,并与分布数据相分析。D、E、F组注射放射性药物后第2、4、7、11、16 d每天处死一只裸鼠,摘除眼球取血,后再取脾、肝、肺、肾、心、胃、小肠、大肠、椎骨及肿瘤,用电子天平测量质量,在定标器上测定组织的放射性活度(cpm),并计算T/NT值。 $T/NT = \text{肿瘤组织比放射性活度(cpm/g)} / \text{非肿瘤组织比放射性活度(cpm/g)}$ 。

1.5 治疗实验

1.5.1 分组 将荷人淋巴瘤裸鼠按肿瘤大小随机分为5组,3只/组,每只裸鼠于3 d前持续给予0.1% KI溶液作为饮水。第1组:荷瘤裸鼠尾静脉注射Rituximab 50 μg /只;第2组:荷瘤裸鼠尾静脉注射Rituximab 100 μg /只;第3组:荷瘤裸鼠尾静脉注射 ^{131}I -Rituximab (50 μg , 9.25 MBq)/只;第4组:荷瘤裸鼠尾静脉注射“冷抗体”(Rituximab)50 μg 封闭,约60 min后再注射 ^{131}I -Rituximab (50 μg , 9.25 MBq)/只;第5组:荷瘤裸鼠尾静脉注射生理盐水0.25 ml,用于空白对照。

1.5.2 观察指标 ①观察肿瘤体积变化,以上各组注射药物当天及注射药物后第1、3、5、7、9、11、13、15 d用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径,计算肿瘤体积。肿瘤体积=(长径×短径)/2,将注药前的各组体积归1,计算体积变化,持续观察15 d。计算肿瘤生长抑制率,肿瘤抑制率=(空白对照组肿瘤体积-实验组的肿瘤)/空白对照组肿瘤体积×100%;②常规病理学分析:治疗15 d后处死荷瘤裸鼠分离肿瘤,用10%甲醛固定,HE染色常规病理分析。

1.6 统计学分析 采用SPSS 12.0统计软件进行统计分析, D、E两组间的T/MB值比较采用 t 检验,对D、E、F三组的T/MB值比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射性药物的标记率、放化纯度及细胞结合率 $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ -Rituximab 标记率67%,放化纯度为96%,细胞结合率为48%; ^{125}I -鼠IgG标记率78%,放化纯度为97%。

2.2 常规病理及免疫组化证实为B细胞非霍奇金淋巴瘤,免疫组化CD20阳性率95%以上。

2.3 显像、分布结果

2.3.1 ^{18}F -FDG和荷瘤裸鼠的PET/CT横断面及MIP显像可见肿瘤,但未见明显摄取FDG(图1)。第7 d SPECT显像B组肿瘤未见明显显像,而C组肿瘤可见显像(图2)。

2.3.2 体内分布研究 D、E、F组荷瘤裸鼠第2、4、7、11、16 d的T/NT比值见表1;D组荷瘤裸鼠T/NT比值随着时间逐渐升高,在第7 d达到最高,然后比值下降。E组荷瘤裸鼠T/NT比值在2 d达到最高,进而与血液几乎相等的比值下持续7 d,然后下降。F组由于“冷抗体”对肿瘤的封闭,在第2、4 d T/NT值低于E组,但随后第7、11、16 d T/NT值比E组明显增高。根据三组药物间的分布特点可以得出T/NT值E组比D组全程都高,在第2~11 d差异有统计学意义($t = 3.89$, $P < 0.05$),F组在第7~11 d T/NT值远超过第D组和第E组($F = 10.32$, $P < 0.05$)。

2.4 治疗结果

2.4.1 治疗数据 第1~5组时间-肿瘤体积抑制生长曲线示,第5组肿瘤生长较块,为自然生长曲线(图3)。给药后第1~4组均存在治疗效应,治疗第15 d计算肿瘤抑制率,结果依次为30%、44%、68%、77%,各治疗组与空白对照组之间均有肿瘤抑制作用,第3组与比第1组肿瘤抑制率高,第4组比第2组肿瘤抑制率高,以第4组抑制率最高。

2.4.2 治疗后组织学 光学显微镜下观察:Rituximab治疗组与空白对照组比较,肿瘤细胞排列稀疏,见少许细胞染色质浓聚、碎裂;第4组与第3组可见大片细胞凝固性坏死,血管分布减少,残存肿瘤细胞染色质浓聚,但第4组瘤组织破坏程度较第3组更明显(图4)。

3 讨论

B 细胞非霍奇金淋巴瘤放免治疗成功的主要因素在于两方面,一方面淋巴瘤对放射性敏感及肿瘤细胞多负载特定抗原,另一方面是标记抗体 β 射线细胞杀伤作用及抗体介导细胞毒作用^[4],因此放射免疫治疗在近年 ASCO 大会上逐渐成为焦点^[5],代表药物 Bexxar 及 Zevalin 适应症从最初用于难治、复发 CD20 阳性非霍奇金淋巴瘤到 2008 年欧盟人用药品委员会 (CHMP) 批准作为滤泡型淋巴瘤一线强化疗法,可以看出放免治疗有着广阔的前景。然而,由于血液中游离 CD20 抗原及其他组织非特异性结合标记抗体,会导致传统静脉给药 T/NT 值较低,难以达到足够的治疗剂量,因此有国内学者尝试肿瘤内直接注射标记抗体,这样可以使肿瘤获得较高的药物摄取率^[3],但淋巴瘤是全身性疾病,应该以全身治疗为主,故本研究“冷抗体”封闭后 ¹³¹I-Rituximab 静脉给药的全身显像及治疗效果。

¹⁸F-FDG PET/CT 在淋巴瘤治疗过程中起着重要的作用,然而少数淋巴瘤对 FDG 无明显摄取^[6-8],故有必要探寻其他显像方法。本实验中尝试了传统的放免显像。放免显像中 T/NT 值决定能否显像,T/NT 值越高,显像越清晰,但 T/NT 取决于肿瘤对标记抗体的结合以及血液等组织对其清除率,由于抗体分子量通常较大,清除率低,所以在实验中单纯注射 ¹²⁵I-Rituximab 组 T/NT (Tumor/blood) 值最高为 1.60,相对于 ¹²⁵I-鼠 IgG 组最高值 1.21 来说,虽然反映了抗体的特异性结合,但该值并不是很高,这使肿瘤与周围组织未拉开差距,全程都很难显像。而“冷抗体”封闭后 ¹²⁵I-Rituximab 组 T/NT 值最高为 4.84,在第 7 d 可见肿瘤显像,这是由于之前给予“冷抗体”能够封闭游离 CD20 抗原及加大标记抗体对肿瘤的渗透^[8],使再次注入的 ¹²⁵I-Rituxima 能够尽量多与肿瘤结合。“冷抗体”也会封闭肿瘤,故第 2 d T/NT 值明显低于未封闭组,但由于肿瘤组织相对体积较小,表面清除率高,在第 7 ~ 11 d T/NT 值逐渐升高,且明显高于未封闭组。在第 16 d,所有分布组 T/NT 值都明显降低,原因可能与标记抗体的活性降低^[9]及核素脱标有关。

在治疗研究中,Rituxima 通过抗体依赖性细胞毒效应 (ADCC)、补体依赖性细胞毒效应 (CDC) 等作用^[4],就可以有较好的抑瘤效果,第 1 组抑瘤率为 30%,治疗后组织学上表现为部分肿瘤细胞向坏死方向转化,而第 3 组由于抗体与核素“交叉火力作用”^[10],其抑瘤率明显高于第 1 组,在组织学上肿瘤细胞坏死数目明显多于后者;第 4 组肿瘤抑制率达 76%,是治疗组中最高值,这也说明更多 ¹³¹I-Rituximab 结合到肿瘤细胞表面,有更明显的杀伤作用,在组织学上肿瘤细胞坏死数目比第 3 组更多。由于本组增加了“冷抗体”输注剂量,故实验中设立了第 2 组,但该组抑瘤率只有 46%,与第 4 组有明显差异性。

综上所述,B 细胞非霍奇金淋巴瘤放射免疫治疗效果明显高于单纯抗体治疗,尤其“冷抗体”封闭后,放免治疗效果更好,能够使肿瘤 T/NT 值达到 4.00 以上,从而实现肿瘤放

免显像的可能。本实验中荷人淋巴瘤裸鼠肿瘤 ¹⁸F-FDG 未见明显显像,使用冷抗体封闭后第 7 d 却能够显像,这也为淋巴瘤 FDG 摄取低下时采取其他方法显像提供另一种思路。然而本实验采用的 SPECT/CT、PET/CT 设备专为人设计,对于小动物显像分辨率不够,将来使用更精确的显像设备(如 MicroSPECT)将有可能得到更明确的结果。

[参考文献]

- [1] Zhang TZ, Xu GW. Oncology. 2nd ed. Tianjing: Tianjing Press of Science Technology, 2005: 2401-2402.
张天泽, 徐光炜. 肿瘤学. 2 版. 天津: 天津科学技术出版社, 2005: 2401-2402.
- [2] Zhong YH, Xie CH. The study progress of treatment B cell lymphoma by anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab. Abroad Medicine Transfusion and Hematology, 2002, 25(1): 60-63.
钟亚华, 谢从华. 抗 CD20 单克隆抗体美罗华治疗 B 细胞淋巴瘤的研究进展. 国外医学输血与血液学分册, 2002, 25(1): 60-63.
- [3] Zuo Q, Zhang JY, Chen JZ, et al. Radio-immunoimaging of anti-CD20 monoclonal antibody labeled ¹³¹I in nude mice xenografted with Raji cells tumor in vivo. Chinese Journal of Cancer Prevention, 2007, 34(7): 473-476.
左强, 张军一, 陈锦章, 等. ¹³¹I 标记抗 CD20 单克隆抗体在荷瘤裸鼠体内的放免显像. 肿瘤防治研究, 2007, 34(7): 473-476.
- [4] Grillo-López AJ, Hedrick E, Rashford M, et al. Rituximab: ongoing and future clinical development. Semin Oncol, 2002, 29(1 suppl 2): 105-112.
- [5] Jiang WQ. Clinical study progress of treatment for non-Hodgkin lymphoma. Chinese Journal of Cancer, 2001, 20(11): 1313-1314.
姜文奇. 非霍奇金淋巴瘤治疗的临床研究进展. 癌症, 2001, 20(11): 1313-1314.
- [6] Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. J Clin Oncol, 2007, 25(5): 1-8.
- [7] Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the imaging subcommittee of international harmonization project in lymphoma. Journal of Clinical Oncology, 2007, 25(5): 571-578.
- [8] Guan L, Elstrom R, Zhuang HM, et al. The value of ¹⁸F-FDG PET imaging diagnosis for different lymphoma subtypes. Chin J Nucl Med, 2004, 8(4): 207-208.
管樑, Elstrom R, Zhuang HM, 等. ¹⁸F-FDG PET 显像对不同亚型淋巴瘤的诊断价值. 中华核医学杂志, 2004, 8(4): 207-208.
- [9] Robert MS, Habibe K, William JM, et al. Bispecific antibody pretargeting of radionuclides for immuno-single-photon emission computed tomography and immuno-positron emission tomography molecular imaging: an update. Clin Cancer Res, 2007, 13(18 suppl): 5577-5584.
- [10] Witzig TE. Yttrium-90-ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy: a new treatment approach for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Drugs Today, 2004, 40(2): 111-119.