

· 论 著 ·

抗 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 D-D₃ 的 ¹³¹I 标记及其体内生物学分布研究*陈传新^{1#}, 石怡珍¹, 杨 仪¹, 唐 军¹, 刘增礼^{1△}, 徐巧玲²

(1. 苏州大学附属第二医院核医学科, 江苏苏州 251004; 2. 江苏省无锡市第四人民医院核医学科 214062)

摘要:目的 探讨抗胃泌素释放肽前体(ProGRP)₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 D-D₃ 的 ¹³¹I 标记方法及其在健康昆明小鼠体内的生物学分布规律与特点。方法 采用氯胺-T 法用 ¹³¹I 标记单克隆抗体 D-D₃, 利用纸层析法测定其标记率、放化纯度和稳定性。取健康昆明小鼠 50 只, 随机分为 10 组, 每组 5 只, 自昆明小鼠尾静脉注射 ¹³¹I-D-D₃ 1.48 kBq/100 μL (4 μCi/100 μL), 各组小鼠分别于注射后 5、15、30 min 及 1、2、4、8、12、24、48 h 处死, 取血液、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃、小肠、骨骼(右下肢)、肌肉(右下肢)和脑组织, 称质量(g)后测放射性计数(cpm), 计算各脏器组织的每克组织百分注射剂量率(%ID/g)及药物动力学参数。结果 ¹³¹I-D-D₃ 标记率为(86.56±3.8)% , 比活度为(2.25±0.05)MBq/μg, 放化纯度为(99.27±0.6)% , 标记物置于 37℃ 水浴箱放置 48 h 后的放化纯度为(88.38±0.4)% , 与鼠血清充分混合后 24 h 的放化纯度为(64.43±0.7)% 。¹³¹I-D-D₃ 在健康昆明小鼠体内代谢过程符合一级血药动力学二室模型, 代谢公式为 $c=50.234e^{-2.793t}+26.128e^{-0.018t}$, $T_{1/2\alpha}=0.25$ h, $T_{1/2\beta}=37.89$ h, 在体内主要通过肾脏和肝脏代谢, 血液清除较快, 胃、肠等组织摄取稍多, 脑、肌肉、心脏等组织摄取较少。结论 ¹³¹I-D-D₃ 标记率及放化纯度高, 在体内、外有很好的稳定性。

关键词: 碘放射性同位素; 胃泌素释放肽前体 ProGPP₍₃₁₋₉₈₎; 单克隆抗体 D-D₃; 氯胺 T 法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.010

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)08-0752-03

Study on biodistribution of ¹³¹iodine labeled monoclonal antibody D-D₃ against pro-gastrin-releasing peptide₍₃₁₋₉₈₎ in healthy Kunming mice*Chen Chuanxin^{1#}, Shi Yizhen¹, Yang Yi¹, Tang Jun¹, Liu Zengli^{1△}, Xu Qiaoling²

(1. Department of Nuclear Medicine, Second Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215004, China;

2. Department of Nuclear Medicine, Fourth People's Hospital of Wuxi, Jiangsu 214062, China)

Abstract: Objective To study the ¹³¹I labeling methods, stability, and biological distribution pattern of D-D₃ antibody against pro-gastrin-releasing peptide 31-98(ProGRP₍₃₁₋₉₈₎). **Methods** The radioiodination of D-D₃ antibody was performed using the chloramine-T method. The radiochemical purity was determined through thin-layer chromatography. ¹³¹I-D-D₃ was injected into the healthy Kunming mice via a tail vein, and the %ID/g for various organs was obtained, and then, the biodistribution and pharmacokinetics of ¹³¹I-D-D₃ antibody in healthy Kunming mice were studied. **Results** The ¹³¹I-D-D₃ labeling rate was (86.56±3.8)%. The radiochemical purity of ¹³¹I-D-D₃ was (99.27±0.6)%. After 48 h incubating in 37℃ water bath, the radiochemical purity was (88.38±0.4)%. While being mixed 24 h with healthy human serum, the radiochemical purity was still more than (64.43±0.7)%. The metabolism of ¹³¹I-D-D₃ in healthy Kunming mice was consistent with a two-compartment model with first-order absorption, $T_{1/2\alpha}$ and $T_{1/2\beta}$ was 0.25, 37.89 h, respectively. **Conclusion** The labeling efficiency and radiochemical purity of ¹³¹I-D-D₃ are high and stable. ¹³¹I-D-D₃ is a promising radioimmunoimaging reagent for small cell lung cancer(SCLC).

Key words: iodine radioisotopes; pro-gastrin-releasing peptide31-98(ProGRP₍₃₁₋₉₈₎); monoclonal antibody; chloramine-T method

1981 年 McDonald 等^[1]从猪的胃组织中分离出胃泌素释放肽(gastrin releasing peptide, GRP), 并发现 GRP 存在于原发性肺癌尤其是小细胞肺癌(SCLC)中。1994 年 Miyake 等^[2]研究证实胃泌素释放肽前体(pro-gastrin-releasing peptide, ProGRP)在血浆中含量稳定, 能代表 GRP 水平和 GRP 基因表达。近年来, 有关 ProGRP 的研究十分活跃^[3-12]。

本课题组前期对利用基因重组的 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 作为抗原免疫 Balb/c 小鼠所制备的单克隆抗体 E-B5 进行了较为详细的研究^[9-10]。现对另一株抗 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 D-D₃ 的 ¹³¹I 标记方法及在健康昆明小鼠体内生物学分布进行了初步研究, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 抗 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 D-D₃ (5 mg/mL) 由中

国辐射防护研究院惠赠; Na¹³¹I 溶液由中国核动力研究院生产; 昆明小鼠由苏州大学动物实验中心提供; 氯胺-T 为 Sigma 公司产品; Sephadex G50 葡聚糖凝胶柱由 Pharmacia 公司生产; 放射性活度仪为美国 Capintec 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 NCI-H446 细胞株中 ProGRP 表达的检测 收集传代培养的人 SCLC NCI-H446 细胞, 加入 0.1% 的 Triton-X100 预孵, 然后以 D-D₃ 作为一抗, FITC-羊抗鼠单克隆抗体为二抗, 用流式细胞仪检测 NCI-H446 细胞 PrGRP 的表达。以肺腺癌细胞株 A549 作为对照。

1.2.2 ¹³¹I 标记 D-D₃ 单抗 采用氯胺-T 法用 ¹³¹I 标记单克隆抗体 D-D₃。利用纸层析法测定标记率, 支持物为新华 1 号层析纸, 展开剂为生理盐水, ¹³¹I-D-D₃ 的 Rf=1/10, ¹³¹I 的 Rf=1。

* 基金项目: 苏州市科技发展计划应用基础研究(医疗卫生)资助项目(YJS0926)。 △ 通讯作者, Tel: (0512) 67783448; E-mail: liuzengli@126.com。 # 现在安徽省马鞍山市中心医院影像中心工作(邮编 243000)。

表 1 健康昆明小鼠尾静脉注射¹³¹I-D₃ 不同时间点各脏器的百分注射剂量率($\bar{x} \pm s, \%ID/g$)

器官名称	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
血液	64.9±10.1	54.3±7.7	34.2±6.6	31.4±8.6	25.6±4.8	24.2±3.7	21.5±3.4	20.3±2.9	17.6±2.3	10.9±2.2
心脏	12.4±2.3	9.6±2.5	7.8±2.2	6.8±2.1	6.5±2.4	6.6±1.9	6.4±1.2	5.8±2.1	3.4±1.7	2.8±1.0
肝脏	23.1±2.6	20.8±4.4	17.3±4.7	9.4±2.8	9.7±2.8	7.8±2.9	6.4±1.5	6.1±1.6	4.6±1.2	3.8±0.8
脾脏	16.5±3.6	12.7±2.8	12.5±2.2	9.7±2.8	9.1±1.8	6.1±1.2	4.9±1.1	3.8±0.9	3.7±1.1	2.8±1.1
肺脏	24.8±7.3	23.5±6.5	19.8±4.2	10.7±3.8	9.2±2.2	7.8±2.3	6.4±1.7	5.2±1.3	3.8±1.0	2.6±1.1
肾脏	23.9±3.1	21.6±2.7	19.1±2.1	13.9±2.9	12.2±2.6	11.8±2.1	10.3±1.5	8.5±1.7	7.0±1.6	5.7±1.1
胃	10.4±2.2	9.2±1.8	8.7±1.9	7.5±1.8	6.8±1.3	6.2±1.5	5.9±1.3	5.1±1.6	4.6±1.4	4.2±1.5
肠	8.3±2.2	6.7±2.0	6.5±1.5	6.5±1.6	6.1±2.4	5.8±1.9	5.2±1.4	4.8±1.3	4.0±1.4	2.6±0.7
骨骼	12.8±2.6	11.7±2.7	9.9±2.4	9.6±2.3	8.3±2.1	7.8±2.3	7.3±2.1	6.6±1.8	5.4±1.4	4.2±1.0
肌肉	6.3±1.4	4.8±1.5	3.8±0.9	3.6±0.7	2.9±1.1	2.6±1.1	2.4±0.9	1.6±0.4	1.5±0.6	1.4±0.3
脑	5.7±1.8	3.6±1.3	3.6±1.2	3.1±0.7	2.6±1.0	2.5±1.1	2.3±0.8	2.3±0.3	1.9±0.5	1.3±0.4

1.2.3 ¹³¹I-D₃ 的分离纯化 将标记液加于处理好的 Sephadex G50 葡聚糖凝胶柱的上端,用 0.05 mol/L、pH 7.5 的 PB 液洗脱,洗脱液收集到离心管中,每管 0.5 mL,利用放射性活度仪测量每管的放射性计数(cpm)。达到第 1 个放射性高峰的样品为¹³¹I-D₃,第 2 个放射性高峰的样品为游离¹³¹I。用纸层析法计算样品的放化纯度、比活度。纯化后的标记抗体经 0.22 μm 滤膜除菌后待用。

1.2.4 ¹³¹I-D₃ 稳定性的测定 将纯化的¹³¹I-D₃ 置于 37 °C 水浴箱中,分别在标记后 1、2、4、6、8、12、24、48 h 测定其放化纯度。取多只鼠血清充分混合,吸出 100 μL 置于离心管中,加入 50 μL 纯化¹³¹I-D₃,充分混匀后放置于 37 °C 水浴箱中,分别在混合后的 2、6、12、24 h 测定其放化纯度。

1.2.5 ¹³¹I-D₃ 在健康昆明小鼠体内分布研究 选择健康 5 周龄昆明小鼠 50 只,雌雄各半,体质量 30 g 左右,随机分成 10 组,每组 5 只。每只小鼠自尾静脉注射¹³¹I-D₃ 1.48 kBq/100 μL(4 μCi/100 μL),各组小鼠分别于注射后的 5、15、30 min 及 1、2、4、8、12、24、48 h 剪断颈动脉处死,取血液、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃、小肠、骨骼(右下肢)、肌肉(右下肢)和脑组织,其中血液均做复管(每管 100 μL)并即刻称重,其余各组织和器官用生理盐水漂洗后晾干,准确称质量,并在放免 γ 测量仪上测量每管的每分钟 cpm,同时测量标准源的总 cpm。计算每克组织在不同时间点的百分注射剂量率(%ID/g)。利用 Origin 软件将血液各时间点的百分注射剂量率进行多指数曲线拟合,计算药动力学参数。

2 结 果

2.1 ProGRP 的表达 以 D₃ 作为一抗,利用流式细胞仪测得处于对数生长期的 NCI-H446、A549 细胞 ProGRP 的表达率分别为 88.63%、15.56%。

2.2 ¹³¹I-D₃ 标记率及稳定性 经测量计算,¹³¹I-D₃ 的标记率为(86.56±3.8)%,比活度为(2.25±0.05)MBq/μg,纯化后即刻¹³¹I-D₃ 的放化纯度为(99.27±0.6)%,在 37 °C 水浴箱放置 24 h 后放化纯度为(93.5±0.5)%,48 h 后的放化纯度仍高达(88.38±0.4)%。与鼠血清充分混合后 24 h 的放化纯度为(64.43±0.7)%。

2.3 ¹³¹I-D₃ 在健康昆明小鼠体内生物学分布 ¹³¹I-D₃ 在体内主要通过肾脏和肝脏代谢,血液清除较快,脑、肌肉、心脏等组织摄取较少,各时间点小鼠不同脏器的百分注射剂量率见表 1。¹³¹I-D₃ 在健康昆明小鼠体内的代谢过程符合一级血药动力学二室模型,经拟合回归计算得其代谢公式为 c=

50.234e^{-2.793t} + 26.128e^{-0.018t},快相清除半衰期 T_{1/2α} 为 37.89 h,慢相清除半衰期 T_{1/2β} 为 37.89 h。

3 讨 论

单克隆抗体 D₃ 是针对 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 片断的完整抗体,与本课题组前期研究的另一株抗 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 E-B5 所不同的是它属于 IgG₁ 亚型^[13-14]。本研究中使用 D₃ 作为一抗,利用流式细胞仪分别对培养的人 SCLC NCI-H446 细胞株和肺腺癌 A549 细胞株的 ProGRP 表达率进行了测定,检测过程中加入的 Triton-X100 是一种表面活性剂,能够增加细胞膜的通透性。结果显示 NCI-H44 细胞 ProGRP 的表达率高达 88.63%,而 A549 细胞 ProGRP 的表达率仅为 15.56%。表明 SCLC 有 ProGPR 抗原的高表达,而且 D₃ 对 ProGPR 有良好的特异性,这为利用抗 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 D₃ 鉴别诊断 SCLC 和肺腺癌奠定了理论和实验基础。

氯氨-T 是一种氧化剂,其水溶液可使阴离子碘氧化成碘分子,这种活性碘分子可取代肽链上酪氨酸苯环上羟基位的一个或两个氢,使之成为含有放射性的碘化酪氨酸多肽链。氯氨-T 法标记单克隆抗体效率高,重复性好,试剂便宜易得,是目前使用最多的碘标记单克隆抗体方法。本实验采用氯氨-T 法用¹³¹I 标记单克隆抗体 D₃,¹³¹I-D₃ 的标记率达到(86.56±3.8)%,纯化后产品的放化纯度为(99.27±0.6)%,比活度为(2.25±0.05)MBq/μg,在体外 37 °C 水浴中放置 48 h 后的放化纯度仍高达(88.38±0.4)%,与鼠血清充分混合后在体外 37 °C 水浴中放置 24 h 其放化纯度仍可达(64.43±0.7)%。表明¹³¹I-D₃ 在体外及模拟体内环境下都保持了较好的稳定性,有利于利用其开展相应的放射免疫显像及放射免疫治疗研究。

本研究体内分布结果表明,¹³¹I-D₃ 在健康昆明小鼠的体内代谢过程符合一级血药动力学二室模型,注射后 5 min 时,¹³¹I-D₃ 在各主要器官的每克组织百分注射剂量率以血液为最高,其次是肝脏、肾脏、脾脏和肺脏;随后,血液百分注射剂量率很快下降,而肾脏和肝脏、脾脏、肺脏与骨组织则下降较慢;脑、肌肉、心脏百分注射剂量率始终保持在较低水平。肝脏、脾脏、肺脏的巨噬细胞和骨组织中的破骨细胞等都属于单核吞噬细胞系统,具有吞噬异物作用,并且肝脏和肾脏是蛋白质和多肽类物质的代谢场所^[15],因而在对血液中的某些标记单克隆抗体或其断裂片段进行清除时,可以引起这些器官的放射性计数升高和下降缓慢。虽然脑组织可以分泌 Pro-GRP^[16],但脑组织内¹³¹I-D₃ 百分注射剂量率却始终保持在

较低水平,表明¹³¹I-D-D₃不易通过血脑屏障。

本研究表明,¹³¹I-D-D₃在体内主要通过肝脏和肾脏代谢,血液清除较快,肠道、脑、肌肉等组织摄取少,为进一步利用其开展相应的放射免疫显像和治疗研究工作奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] McDonald TJ, Ghatei MA, Bloom SR, et al. A qualitative comparison of canine plasma gastroenteropancreatic hormone response to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide(GRP)[J]. Regul Pept, 1981, 2(5):293-304.
- [2] Miyake Y, Kodama T, Yamaguchi K, et al. Progastrin-releasing peptide(31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma[J]. Cancer Res, 1994, 54(8):2136-2140.
- [3] Yamaguchi H, Soda H, Kitazaki T, et al. Serum progastrin-releasing peptide levels followed by whole-body positron emission tomography detects early recurrence of small-cell lung cancer[J]. Respirology, 2007, 12(1):137-139.
- [4] Nordlund MS, Fermer C, Nilsson O, et al. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies for Immunoassay of the Lung Cancer Marker proGRP[J]. Tumour Biol, 2007, 28(2):100-110.
- [5] Molina R, Augé JM, Bosch X, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology[J]. Tumour Biol, 2009, 30(3):121-129.
- [6] Nordlund MS, Warren DJ, Laerdahl JK, et al. Studies on multiple forms of proGRP in serum from small cell lung cancer patients[J]. Tumour Biol, 2009, 30(5-6):265-275.
- [7] Holdenrieder S, Von Pawel J, Dankelmann E, et al. Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(23):7813-7821.
- [8] Panigone S, Nunn AD. Lutetium-177-labeled gastrin releasing peptide receptor binding analogs: a novel approach to radionuclide therapy[J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2006, 50(4):310-321.
- [9] Winther B, Paus E, Reubsæet JL. Determination of the small cell lung cancer associated biomarker pro-gastrin-releasing peptide(ProGRP) using LC-MS[J]. J Sep Sci, 2007, 30(2):234-240.
- [10] Satoh H, Kagohashi K, Kurishima K, et al. Comparison of neurone-specific enolase and pro-gastrin releasing peptide in the prognostic evaluation of small cell lung cancer patients[J]. Clin Oncol(R Coll Radiol), 2006, 18(9):720.
- [11] Nordlund MS, Fermer C, Nilsson O, et al. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies for Immunoassay of the Lung Cancer Marker proGRP[J]. Tumour Biol, 2007, 28(2):100-110.
- [12] Dumesny C, Patel O, Lachal S, et al. Synthesis, expression and biological activity of the prohormone for gastrin releasing peptide (ProGRP) [J]. Endocrinology, 2006, 147(1):502-509.
- [13] 徐巧玲, 周小林, 石怡珍, 等. 抗 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 E-B5 的¹³¹I 标记及体内生物分布研究[J]. 中华核医学杂志, 2009, 29(4):274-278.
- [14] 石怡珍, 周小林, 徐巧玲, 等. ¹³¹I-抗 ProGRP₍₃₁₋₉₈₎ 单克隆抗体 E-B5 放射免疫显像及放射免疫治疗实验研究[J]. 中华核医学杂志, 2010, 30(2):110-115.
- [15] 鄢永胜. 蛋白多肽类药物的药代动力学[J]. 咸宁医学院学报, 2004, 24(3):100-104.
- [16] Spindel ER, Gibson BW, Reeve JR Jr, et al. Cloning of cDNAs encoding amphibian bombesin: evidence for the relationship between bombesin and gastrin-releasing peptide [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(24):9813-9817.

(收稿日期:2010-09-09 修回日期:2010-12-22)

(上接第 745 页)

- [6] , 2008, 86(9):51-53.
- [7] Yamaguchi T, Sugimoto T. Calcium homeostasis and osteoporosis in diabetes mellitus and the metabolic syndrome[J]. Clin Calcium, 2008, 18(7):904-911.
- [8] Yaturu S, Humphrey S, Landry C, et al. Decreased bone mineral density in men with metabolic syndrome alone and with type 2 diabetes[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(1):5-9.
- [9] Gupta R, Mohammed AM, Mojiminiyi OA, et al. Bone mineral density in premenopausal Arab women with type 2 diabetes mellitus[J]. Clin Densitom, 2009, 12(1):54-57.
- [10] Rosen CJ, Aekert-Bicknell C, Beamer WG, et al. Allelic differences in a quantitative trait locus affecting insulin-like growth factor-I impact skeletal acquisition and body composition[J]. Pediatr Nephrol, 2005, 20(3):255-260.
- [11] Wosje KS, Binkley TL, Kalkwarf HJ, et al. Relationships between bone mass and circulating leptin concentrations in Hutterites[J]. Bone, 2004, 34(6):1017-1022.
- [12] 周相娟, 郑立强, 金秀平. 106 例 2 型糖尿病患者骨密度变化的临床观察[J]. 重庆医学, 2009, 38(21):2717-2718.
- [13] Yamaguchi T. Osteoporosis associated with the metabolic syndrome[J]. Clin Calcium, 2008, 18(5):606-611.
- [14] 卢松, 王成剑, 黄荣曦. 2 型糖尿病患者骨密度改变及其影响因素的探讨[J]. 重庆医学, 2008, 37(11):1200-1202.

(收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-10-20)