

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0039-03

抗膀胱癌免疫毒素 BDI-1-PEA 特异杀伤肿瘤细胞的研究

温儒民, 薛松, 孙晓青, 陈家存, 顾骧, 陈仁富, 郑骏年(徐州医学院附属医院泌尿外科, 江苏徐州 221002)

[摘要] 目的: 探讨免疫毒素 BDI-1-PEA 特异杀伤膀胱癌细胞的体外及体内研究。方法: 应用 MTT 法检测不同浓度的 BDI-1-PEA, BDI-1 和 PEA 的混合物(BDI-1 + PEA), PEA 对体外癌细胞的杀伤能力。接种于裸鼠背部皮下的癌细胞长至 0.3 cm 大小实体瘤时, 于尾静脉隔日分别注入 BDI-1-PEA、BDI-1、正常小鼠 IgG 共 6 次, 观察不同的药物对癌的抑制作用。结果: 免疫毒素 BDI-1-PEA 在体外抗膀胱癌细胞系 E-J 的作用明显优于 PEA 及 BDI-1 与 PEA 的混合物, 在荷瘤裸鼠体内明显优于 BDI-1 及 IgG, 与对非靶细胞的细胞毒性作用相比较差异非常显著。结论: 免疫毒素 BDI-1-PEA 是一种很有潜力的抗癌药物, 为进一步临床研究奠定基础。

[关键词] 免疫毒素; 膀胱癌; 绿脓杆菌外毒素

[中图分类号] R737.14 [文献标识码] A

Specific Killing Effects of Immunotoxin BDI-1-PEA against Human Bladder Cancer Cells

WEN Ru-min, XUE Song, SUN Xiao-qing, CHEN Jia-cun, GU Xiang, CHEN Ren-fu, ZHENG Jun-nian(Department of Urology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the selective killing effects of immunotoxin BDI-1-PEA against human-bladder cancer cell line E-J and nude mice bearing human bladder tumor. **Methods:** MTT was used to measure the killing ratio of BDI-1-PEA, mixtures of BDI-1 and PEA, PEA against human-bladder cancer cell line E-J at different concentrations *in vitro*. When the tumor size reached 0.3 cm, BDI-1-PEA, BDI-1 and IgG were injected respectively to each group of mice through tail vein every other day for 6 times. Determined the inhibitory effects of BDI-1-PEA, BDI-1 and IgG in nude mice bearing human bladder tumor. **Results:** The results indicated that BDI-1-PEA showed stronger cytotoxicity against human bladder cancer cell line E-J than PEA and mixtures of BDI-1 and PEA, and stronger cytotoxicity against nude mice bearing human bladder tumor than BDI-1 and IgG. Compared with cytotoxicity against non-target cell, the difference was significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** Immunotoxin BDI-1-PEA is a largely potential anticancer drug, the result is a good foundation for the further clinical study.

[Key words] immunotoxin; bladder carcinoma; pseudomonas exotoxin A (PEA)

* 对癌细胞具有高度特异性的单克隆抗体与具有强大杀伤作用的毒素分子, 通过化学交联构建的免疫毒素对癌具有高度特异的杀伤作用, 而不损伤正常组织, 是一种治疗癌的新方法。我们用抗人膀胱癌单克隆抗体(BDI-1)与绿脓杆菌外毒素 A(PEA)交联, 成功制备了抗人膀胱癌免疫毒素(BDI-1-PEA), 并在体外及荷瘤裸鼠体内进行了癌细胞杀伤实验, 结果报告如下。

1 材料与方

1.1 材料来源

免疫毒素 BDI-1-PEA 由本科构建并保存^[1]。人膀胱癌细胞株 E-J 及 BDI-1 由北京大学医学院免疫教研室提供, 人肾癌细胞株 786-0 购自上海中科院细胞研

[基金项目] 江苏省教委自然科学基金资助项目(基金编码 98KJB320007)

[作者简介] 温儒民(1964-), 男, 江苏徐州人, 副主任医师, 主要从事肿瘤免疫方面的研究

[通讯作者] 薛松

究所,PEA 购自华美生物工程公司。MTT 为 Pharmacia 公司产品,二硫代苏糖醇(DTT)购自北京军事医学科学院,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 72 h 连续杀伤实验

将 E-J 细胞和肾癌细胞分别加入 96 孔培养板(1 × 10⁴/孔),经 37℃,5% CO₂培养箱培养至细胞贴壁,再分别加入不同浓度的游离 PEA,PEA 与 BDI-1 的混合物(PEA + BDI-1)及结合物 BDI-1-PEA,每一浓度做 3 个复孔,37℃,5% CO₂培养箱培养 72 h,加入 MTT 10 μl/孔(5 mg/ml),继续培养 4 h 后弃去未反应的 MTT 和培养液,加入二甲基亚砷 100 μl/孔溶解甲瓚紫结晶,在 570 nm 波长下测定吸光度,计算杀伤率^[2]。

1.3 1 h 特异杀伤实验

同前将 E-J 细胞和肾癌细胞分别加入 96 孔培养板(1 × 10⁴/孔),培养至细胞贴壁后分别加入不同浓度的游离 PEA,PEA 与 BDI-1 的混合物(PEA + BDI-1)及结合物 BDI-1-PEA,每一浓度做 3 个复孔,37℃,5% CO₂培养箱培养 1 h,加入 MTT 10 μl/孔(5 mg/ml),继续培养 4 h 后弃去未反应的 MTT 和培养液,加入二甲基亚砷 100 μl/孔溶解甲瓚紫结晶,在 570 nm 波长下测定吸光度,计算杀伤率。

1.4 BDI-1-PEA 对裸鼠体内肿瘤抑制作用

5 × 10⁶膀胱癌细胞(E-J)接种于裸鼠背部皮下,1 周后癌长至直径约 0.3 cm 大小的癌,随机分 3 组,每组 10 只裸鼠。于接种癌后的第 7 天分别注入 BDI-1-PEA,BDI-1 及正常小鼠 IgG,以后每隔 1 天注射 1 次,共 6 次。每天用圆规测定肿瘤大小,癌大小以其直径和横径的平均值计算。

2 结果

2.1 72 h 连续杀伤作用

BDI-1-PEA 对靶细胞 E-J 的半细胞致死剂量(ID₅₀)为(0.96 ± 0.08) × 10⁻⁹ mol/L, BDI-1 + PEA 及游离 PEA 对 E-J 细胞的 ID₅₀分别为(0.77 ± 0.10) × 10⁻⁷ mol/L,(0.81 ± 0.11) × 10⁻⁷ mol/L。BDI-1-PEA 对靶细胞的杀伤作用明显优于 PEA 与 BDI-1 的混合物及游离 PEA(P < 0.01,图 1)。

不同浓度的 BDI-1-PEA, BDI-1 + PEA, PEA 对非靶细胞肾肿瘤细胞系 786-0 72 h 连续杀伤实验表明, BDI-1-PEA, BDI-1 + PEA, PEA 对非靶细胞的杀伤作用差异无显著性(P > 0.05,图 2)。

2.2 1 h 特异杀伤实验

BDI-1-PEA 对 E-J 细胞的 ID₅₀为(0.56 ± 0.08) × 10⁻⁷ mol/L, BDI-1 + PEA 及游离 PEA 对 E-J 细胞的 ID₅₀分别为(0.85 ± 0.12) × 10⁻⁵ mol/L,(0.93 ± 0.21)

× 10⁻⁵ mol/L。BDI-1-PEA 对靶细胞的杀伤作用明显优于 PEA 与 BDI-1 的混合物及游离 PEA(P < 0.01,图 3)。

图 1 不同浓度的 BDI-1-PEA、BDI-1 + PEA、游离 PEA 对靶细胞 E-J 的 72 h 连续杀伤率
Fig.1 The continuous killing ratio of BDI-1-PEA, BDI-1 + PEA and free PEA against target cells E-J with 72 h at different concentrations

图 2 不同浓度的游离 PEA, BDI-1 + PEA, BDI-1-PEA 对非靶细胞肾癌细胞株 786-0 72 h 连续杀伤率
Fig. 2 The continuous killing ratio of BDI-1-PEA, BDI-1 + PEA and free PEA against non-target cells 786-0 with 72 h at different concentrations

2.3 抑制人膀胱癌在裸鼠体内的生长

注射免疫毒素 BDI-1-PEA 的裸鼠共 10 只,在观察期 21 d 内,2 只裸鼠体内肿瘤基本消失,5 只裸鼠体内肿瘤明显缩小,3 只裸鼠体内肿瘤缓慢生长,平均直径 0.6 cm。单用 BDI-1 的裸鼠,体内癌有较明显的生长,观察期末癌平均直径 1.3 cm。而注射正常小鼠 IgG 对照组肿瘤生长更加明显,肿瘤平均直径 2.0 cm。其中有 2 只裸鼠于尾静脉注射免疫毒素 BDI-1-PEA 后发生寒战、萎靡、食欲差等反应。3 ~ 4 h 后症状消失。

3 讨论

PEA 是由绿脓杆菌分泌的细菌类毒素蛋白,它能

使细胞蛋白质合成延长因子-2(EF-2)核糖基化而失活,进而抑制蛋白质的合成,达到杀伤细胞的目的^[3]。Hansson 等^[4]的动物实验提示,肠毒素(SEA)在注入小鼠腹腔后,能够激活大量的 CTL 细胞不仅杀伤 MHC-II 类分子阳性的肿瘤细胞,同时也可杀伤表达 MHC-II 类分子的正常细胞,且毒性较大。因而像绿脓杆菌外毒素等毒素的这种非特异杀伤细胞作用,使之很难单独用于抗肿瘤治疗。

毒素和单抗的细胞毒作用简单相加。这也验证了我们构建的新型免疫毒素有高效靶细胞杀伤能力。另外,1 h 杀伤实验也同样证明了上述结果,与对照组相比较差异显著。

我们在 10 只荷膀胱肿瘤裸鼠体内经尾静脉注射免疫毒素 BDI-1-PEA,在观察期 21 d 内,2 只肿瘤基本消失,5 只肿瘤明显缩小,3 只肿瘤缓慢生长,平均直径 0.6 cm。而单用 BDI-1 对照组肿瘤平均直径 1.3 cm,正常小鼠 IgG 对照组肿瘤平均直径 2.0 cm,差异均非常显著($P < 0.01$)。这同样说明,免疫毒素 BDI-1-PEA 不仅在体外有良好的杀伤膀胱肿瘤的特性,而且在荷瘤动物模型体内有良好的抑制肿瘤生长的特性。其中 2 只小鼠静脉注射免疫毒素后数分钟内出现轻微的中毒症状,如轻度的寒战及萎靡,观察数小时后上述症状及活动、进食等恢复正常。实验结束后病理检查证实,小鼠肝脏未见明显器质性改变。

经过体内、外研究,我们构建的免疫毒素表现出较高的靶向抗肿瘤作用。当然,通过化学偶联的免疫毒素仍有它固有的缺点,如易分解、制备过程复杂、成本较高等。随着基因工程技术的进步、成熟,制备基因重组免疫毒素已成为可能,重组免疫毒素不仅在一定程度上克服了上述问题,而且还显示出诸如组织穿透性强有利于肿瘤治疗的优点。这也是我们进一步研究的方向。

[参考文献]

- [1] 薛松,温儒民,孙晓青. 免疫毒素 BDI-1-PEA 的构建及其活性测定[J]. 徐州医学院学报, 2001, 21(5): 386-389.
- [2] Twentyman PR. A study of some variable in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity[J]. Br J Cancer 1987, 56: 279-285.
- [3] Theuer CP, Fitzgerald DJ, Pastan I. A recombinant form of pseudomonas exotoxin A containing transforming growth factor alpha near its carboxyl terminus for the treatment of bladder cancer[J]. J Urol, 1993, 149: 1626-1632.
- [4] Hansson J, Ericsson PO, Dohlsten M, et al. Locally superantigen-activated peritoneal cytolytic T lymphocytes belong to the CD8⁺ CD45RC-subset and lyse MHC class II + tumor cells[J]. Immunol Letter 1992, 34: 229-236.
- [5] Yu LZ, Gu FL, Zhang CL, et al. Radioimmunodiagnosis of bladder tumor with the intravesical administration of labeled monoclonal antibody[J]. Chin J Urol, 1993, 14: 262-265.

[收稿日期] 2003-04-07

[修回日期] 2003-05-25

图 3 不同浓度的 BDI-1-PEA, BDI-1 + PEA, PEA 对靶细胞 E-J 的 1 h 连续杀伤率

Fig. 3 The killing ratio of BDI-1-PEA, BDI-1 + PEA, and free PEA against target cells E-J with 1 h at different concentrations

单克隆抗体的出现,有效地解决了毒素作用的靶向性问题,为毒素提供了载体,减少了毒素的非特异性作用,最大限度地减少了毒素的非特异杀伤作用。BDI-1 由北京医科大学泌尿外科研究所构建并经实验证实具有高度特异性^[5]。免疫毒素是对肿瘤细胞具有高度特异性的单克隆抗体与强大杀伤作用的毒素分子,通过化学交联构建而成,它既具有单抗的识别功能,又具有毒素的杀伤功能,并且能特异杀伤肿瘤细胞,而不损伤正常的组织细胞,为肿瘤治疗开辟了全新的途径。

我们将 PEA 与 BDI-1 结合,成功构建了免疫毒素 BDI-1-PEA,间接免疫荧光证实,结合物保留了特异结合肿瘤细胞的特性,结合物的活性无明显减低^[1]。体外抗膀胱肿瘤细胞 E-J 证实,结合物 BDI-1-PEA 杀伤肿瘤细胞的活性明显增强。72 h 连续杀伤实验中,其 ID₅₀ 是游离 PEA 的 1/80,同时也是 PEA 与 BDI-1 混合物的 1/70,这说明结合物对靶细胞的细胞毒作用不是