文章编号:1000-5404(2010)17-1851-03

论著

# 抗 HIF-1α 肺腺癌人源单链抗体的制备和放射免疫显像

王 洁,李建国,庞 华,雷成明,彭志平,李少林 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院核医学科)

【摘要】 目的 利用噬菌体抗体库技术制备特异性的抗缺氧诱导因子 1α(hypoxia-inducible factor,HIF-1α)肺腺癌人源单链抗体(scFv),并用于荷人肺腺癌裸鼠体内放射免疫显像(radioimmunoimaging,RII)研究。方法 利用噬菌体抗体库技术筛选特异性抗 HIF-1α 肺腺癌人源 scFv,并将其感染大肠杆菌 HB2151,进行 scFv 的可溶性表达。接种肺腺癌 A549 细胞复制荷瘤裸鼠模型,尾静脉注射$^{131}$I 标记可溶 scFv,于注射后 24、48、72 、120 h 进行 SPECT 平面静态检查,观察肿瘤内放射性浓聚情况,用感兴趣区(region of interest,ROI)技术分析 T/NT 值,取平面静态检查肿瘤显影清晰时进行 SPECT/CT 图像融合。结果 经鉴定证实制备出特异性的抗 HIF-1α 肺腺癌人源 scFv,荷瘤裸鼠体内 RII 结果显示$^{131}$I-可溶 scFv 可以选择性地积聚于肿瘤组织,肿瘤区放射性浓聚、T/NT 值均在 72 h 达到高峰,利用 ROI 技术得到的 T/NT 值此时最大可达 3.19。72 h 时融合图像肿瘤显像良好,图像清晰。结论 成功制备特异性抗 HIF-1α 肺腺癌人源 scFv,$^{131}$I 标记后荷人肺腺癌裸鼠 RII 肿瘤显影良好。

【关键词】 单链抗体;HIF-1α;肺腺癌;放射免疫显像
【中图法分类号】 R734.2;R392.11;R817.4 【文献标志码】 A

# Preparation of human anti-HIF-1α scFv of lung adenocarcinoma and its radioimmunoimaging

Wang Jie, Li Jianguo, Pang Hua, Lei Chengming, Peng Zhiping, Li Shaolin (Department of Nuclear Medicine, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To prepare the human anti-HIF-1α scFv of lung adenocarcinoma from phage antibody library and to study the radioimmunoimaging (RII) of scFv in nude mice xenografted with A549 tumor cells *in vivo*. Methods Specific anti-HIF-1α scFv of lung adenocarcinoma was selected from the phage antibody library. Expression of soluble scFv was induced by infecting *E. coli* HB2151. $^{131}$I-labeled scFv was injected into the tail veins of nude mice xenografted with A549 tumor cells. Static imaging was performed by SPECT 24, 48, 72 and 120 h after injection of soluble scFv to observe the radioactivity in tumor. Radioactivity ratio of tumor and non-tumor (T/NT) was assayed using the ROI technique. When the tumor was clearly visible, image fusion was performed by SPECT/CT. Results The specific human anti-HIF-1α scFv of lung adenocarcinoma was successfully prepared. The RII showed that the $^{131}$I-labeled scFv was selectively accumulated in lung adenocarcinoma tissue. Radioisotope uptake and T/NT reached their peak value of 3.19 in the tumor and the image was well fused with the tumor clearly seen 72 h after injection of soluble scFv. Conclusion Human anti-HIF-1α scFv of lung adenocarcinoma can be successfully prepared. $^{131}$I-labeled scFv can clearly show the tumor on RII in nude mice xenografted with A549 tumor cells, thus laying a foundation for further study on the diagnosis and treatment of lung adenocarcinoma.

【Key words】 single chain variable fragment; HIF-1α; lung adenocarcinoma; radioimmunoimaging

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370422). Corresponding author: Li Jianguo, Tel: 86-23-68898877

放射免疫显像(radioimmunoimaging,RII)在肿瘤免疫诊断、靶向治疗中发挥着很重要的作用,选择一个适当的靶向载体至关重要[1]。噬菌体单链抗体(scFv)为小分子抗体,且完全人源,不会产生人抗鼠抗体反应,比目前常用的单克隆抗体(mAb)更适合用于肿瘤 RII。缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor,HIF-1)是一个重要的肿瘤缺氧调节因子,其活性主要由 HIF-1α 亚基调节。研究[2,3]发现 HIF-lα 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)肿瘤中呈现高表达,且与肿瘤的生长、侵袭、转移都很相关,有望成为很好的靶点用于肺癌 RII。本研究利用噬菌体抗体库技术得到特异性抗 HIF-1α 的肺腺癌人源 scFv,并用于荷人肺腺癌裸鼠 RII 研究,为进一步进行 RII 诊断和放射免疫治疗奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

$^{131}$I 购自成都中核高通同位素股份有限公司,氯胺 T 购自

【基金项目】 国家自然科学基金(30370422)
【通信作者】 李建国,电话:(023)68898877

天津市光复精细化工研究所,偏重亚硫酸钠购自浙江省温州市东升化工试剂厂,碘化钾购自上海试剂三厂,Sephadex G200 购自 Pharmacial 公司,三氯醋酸购自国药集团化学试剂有限公司,正丁醇购自重庆川东化工(集团)有限公司,乙酸购自上海试剂三厂,血清来自重庆医科大学附属第一医院血库,裸鼠购自本校实验动物中心,SIEMENS SPECT-CT Symbia $T_2$ 购自德国 SIEMENS 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 抗 HIF-1α 肺腺癌人源 scFv 的筛选、鉴定及可溶表达 以肺腺癌 A549 细胞、HIF-1α 为抗原,通过"吸附-洗脱-扩增"从噬菌体抗体库中筛选特异性抗体,并感染大肠杆菌 HB2151,实现可溶 scFv 的表达,ELISA、免疫细胞化学检测抗原-抗体结合活性,SDS-PAGE 和 Western blot 检测可溶 scFv 的表达和相对分子质量,详见文献[1]。

1.2.2 荷人肺腺癌裸鼠模型的复制 选用 4~6 周雌性裸鼠 5 只,将肺癌细胞 A549 调整细胞密度至 $1.0\times10^7$/0.2 ml,于裸鼠右前肢外侧皮下接种 200 μl 细胞悬液,待肿瘤长至直径 >1.0 cm 时(4~6 周)进行放射免疫显像。

1.2.3 可溶性 scFv 的 $^{131}$I 标记、纯化及鉴定 采用氯胺 T 法对可溶性 scFv 进行 $^{131}$I 标记:取 250 μl 可溶性 scFv 与 100 μl $^{131}$I(放射性强度 55 mCi/ml)混匀 3 min,加 250 μl(1 mg/ml)氯胺 T 溶液反应少于 1 min 后,迅速与 500 μl(2 mg/ml)偏重亚硫酸钠溶液混匀 1 min,100 μl(10%)KI 溶液终止反应。将标记液用 Sephadex G200 柱纯化后经 0.45 μm 滤器过滤。三氯醋酸沉淀法测定标记率,纸层析法分析放射化学纯度,并且计算放射性比活度。纯化标记物于室温放置 1、6、12、24 h,纸层析法分析各个时间点的放射化学纯度,测定室温稳定性。纯化标记物加入新鲜人血清,37 ℃孵育 1、6、12、24、48 h,纸层析法分析各个时间点的放射化学纯度,测定血清稳定性。

1.2.4 放射免疫显像和图像融合 取肿瘤直径 >1.0 cm 的荷人肺腺癌裸鼠 5 只,注射前 3 d,裸鼠已开始饮用 1% 的 KI 溶液封闭甲状腺。每只裸鼠尾静脉注射新鲜 $^{131}$I-可溶性 scFv(约 300 μCi/300 μl)。注射后分别于 24、48、72、120 h 将鼠俯卧位固定行 SPECT 平面静态显像,采用 ROI 技术计算 T/NT 值(肿瘤与非肿瘤区域放射性计数比值),采集条件:采用高能准直器,矩阵 256×256,能峰为 364 keV,每帧采集时间为 3~5 min。SPECT 平面静态显像肿瘤显影清晰时行 SPECT/CT 图像融合。显像仪器均为双探头 SPECT/CT 仪。

### 1.3 统计学分析

计数资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析和 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 抗 HIF-1α 肺腺癌人源 scFv 的筛选、鉴定及可溶表达

ELISA、免疫细胞化学证明所得人源 scFv 与 HIF-1α、A549 细胞均特异性结合。SDS-PAGE、Western blot 证明 scFv 成功可溶表达,且相对分子质量在 $30\times10^3$ 左右。

### 2.2 可溶性 scFv 的 $^{131}$I 标记、纯化及鉴定

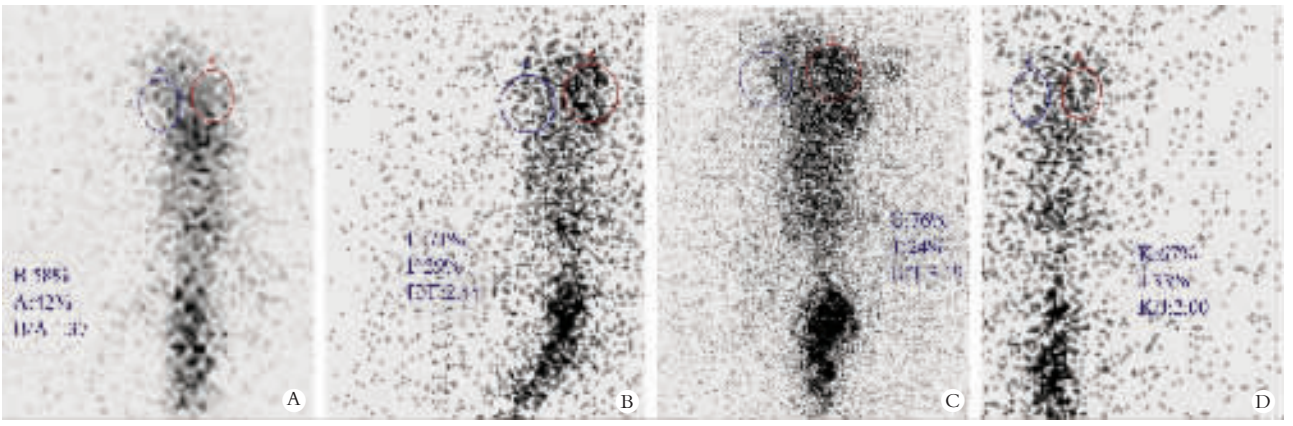
将标记反应液过 Sephadex G200 柱进行纯化,淋洗曲线出现 2 个放射峰,收集第 1 峰,得到纯化的 $^{131}$I-可溶性 scFv。标记率为(79.6±4.9)%,放射化学纯度为(94.4±4.4)%,比活度为(3.2±0.2)MBq/μg。室温稳定性测定结果显示,1、6、12、24 h 的放射化学纯度差异无统计学意义($P>0.05$),血清稳定性结果显示,1、6、12、24、48 h 的放射化学纯度差异也无统计学意义($P>0.05$),且放射化学纯度均在 90% 以上。

### 2.3 放射免疫显像

SPECT 平面静态显像结果显示:$^{131}$I-可溶性 scFv 注射后,裸鼠肿瘤出现选择性放射性浓聚,72 h 肿瘤轮廓清晰可见,肿瘤区域放射性浓聚达到高峰(图 1),利用 ROI 技术得到的 T/NT 值此时最大可达 3.19。取 72 h 肿瘤显影清晰时行 SPECT/CT 图像融合,融合后的肿瘤区域显影良好(图 2)。



**图 2 尾静脉注射 $^{131}$I-可溶 scFv 72 h 荷人肺腺癌裸鼠 SPECT/CT 图像融合仿真图像**




A:24 h;B:48 h;C:72 h;D:120 h

**图 1 尾静脉注射 $^{131}$I-可溶 scFv 后不同时间荷人肺腺癌裸鼠 SPECT 显像**

## 3 讨论

放射免疫显像是将放射性核素标记到载体上,以特定靶点作为目标,通过特异性免疫反应进行功能和代谢显像,在肿瘤的早期诊断、靶向治疗中发挥着很重要的作用。选择靶点的好坏直接影响着肿瘤 RII 的显像效果,好的靶点要具有在病变组织中高表达和特异性的优点。HIF-1α 是肿瘤缺氧时非常重要的调节因子,在 NSCLC 肿瘤组织中 mRNA 及蛋白较周围正常组织均明显高表达[2,3],很有可能成为一个适合肺癌 RII 研究的新靶点。在载体的运用上,抗体是目前公认的肿瘤 RII 研究的最佳选择[4],本实验选用了人源 scFv,此抗体不会产生人抗鼠抗体反应,分子量小,能够快速进入靶部位且易从体内清除[5],比 mAb 更适合应用于 RII。已有研究将 scFv 用于肺癌、肝癌等动物模型 RII,结果显示均有很好的显像效果[6,7]。本实验从噬菌体抗体库中筛选抗 HIF-1α 的肺腺癌人源 scFv,进行荷人肺腺癌裸鼠 RII 研究,有望为肺腺癌的 RII 诊断和放射免疫治疗提供一条新的有效途径。

噬菌体抗体库技术拥有高效的筛选体系,可以针对不同抗原筛选特异 scFv。本研究采用了完整细胞筛选和抗原固相筛选的方法,筛选出的抗体经 ELISA 鉴定,证实与肺腺癌细胞、HIF-1α 均有较好的特异性[1]。为了排除噬菌体蛋白对 RII 结果的干扰,对筛选出的抗体进行了可溶表达[1,8],为 RII 显像的顺利进行提供了前提。

$^{131}$I 是目前临床和科研最常用的放射性核素之一,其来源简便,价格低廉,用目前成熟的方法很容易实现标记[9],本研究选用了氯胺 T 法,这种方法应用非常广泛,已被很多研究证实标记率高、操作简单,而且重复性好,本研究经鉴定证实用此法标记的$^{131}$I-可溶 scFv 在标记率、放射化学纯度、比活度以及稳定性方面都达到了 RII 的要求,为 RII 的顺利进行提供了前提和基础。SPECT 显像结果可以很直观的显示肿瘤部位放射性浓聚的情况[6,7,9],本研究荷瘤裸鼠 RII 结果显示,注射后 72 h 肿瘤显像清晰,轮廓清楚,而且 T/NT 值也在 72 h 时达到最大 3.19,可以将 72 h 作为最佳的显像时间。在 RII 显像早期 24 h 时,肝、脾、胃、肠道区域放射性浓度较高,随着注射时间的延长,消化道内的放射性物质被吸收和排泄,肿瘤区域由于特异性反应放射性浓度逐渐增高,符合静脉给药的表现。由于许多研究不能直接在人体上进行,模式生物比如裸鼠已经成为研究多种人类疾病尤其是肿瘤不可替代的工具[6,7,9]。但由于裸鼠尾静脉过细,加上实验条件的限制,注射后鼠尾的区域放射性相对较高,在下一步的实验中我们将研究其他注药方法比如腹腔注药[9]后荷瘤裸鼠的 RII 显像情况,以求找出最佳的给药方式。RII 显像是借助标记抗体与相应抗原的结合来进行功能显像,可以发现其他显像方法无法显示的微小原病灶、转移灶,在肿瘤的早期诊断、治疗中有很重要的作用,如果将 SPECT 图像与显示解剖结构很好的 CT 图像进行图像融合,就可以更清楚的显示肿瘤的确切部位,还可以减少非特异性摄取和生理摄取造成的假阳性,提高准确率[10]。本研究 72 h 时 SPECT 和 CT 融合图像裸鼠及肿瘤立体轮廓清晰,可以更直观的清晰看到肿瘤区域的放射性浓聚,融合图像显影较好。裸鼠体型很小,而本实验所用的 Symbia T2 型 SPECT/CT 在研究小动物方面并不是特别擅长,故采集的信息量会有一定限制。目前已经有公司研制生产出了小动物 PET/SPECT/CT 分子影像系统,利用此系统,可得到小动物更高分辨率、高灵敏度的结构学和功能学成像,下一步我们将努力向这方面努力,力争得到更好的 RII 成像。放射免疫显像是放射免疫治疗的基础,本研究 SPECT 与 SPECT/CT 融合显像均显示$^{131}$I-抗 HIF-1α 可溶 scFv 可以选择性地使荷人肺腺癌裸鼠肿瘤显影,为下一步放射免疫治疗方面的研究奠定了一定的基础。

## 参考文献:

[1] 王洁,李建国,庞华,等. 抗 HIF-1α 肺腺癌人源单链抗体的筛选和初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23):2319-2322.
[2] Yohena T, Yoshino I, Takenaka T, *et al*. Upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA and its clinical significance in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(3):284-290.
[3] Kim S J, Rabbani Z N, Dewhirst M W, *et al*. Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2005, 49(3):325-335.
[4] Kenanova V, Olafsen T, Crow D, *et al*. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments[J]. Cancer Res, 2005, 65(2):622-631.
[5] Burvenich I J, Schoonooghe S, Blanckaert P, *et al*. Biodistribution and planar gamma camera imaging of 123I- and 131I-labeled F(ab)2 and Fab fragments of monoclonal antibody 14C5 in nude mice bearing an A549 lung tumor[J]. Nucl Med Biol, 2007, 34(3):257-265.
[6] Luo Y, Pang H, Li S, *et al*. Production and radioimmunoimaging of novel fully human phage display recombinant antibodies and growth inhibition of lung adenocarcinoma cell line overexpressing Prx I[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(14):1369-1377.
[7] 王军伟,师建国,汪静,等. 99mTc 标记抗肝癌单链抗体的生物分布及放射免疫显像的初步研究[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(6):710-712.
[8] 庞华,罗弋,李少林. 人源肺腺癌噬菌体抗体库的构建及初步筛选[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22):2082-2085.
[9] 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射免疫显像[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(7):473-476.
[10] 夏伟,吕中伟,袁雪宇,等. 基于外标记的图像配准在放射免疫显像图像融合中的应用[J]. 肿瘤, 2008, 28(12):1099-1101.

(收稿 2010-03-18 修回 2010-05-26)
(编辑 邓强庭)