

抗人食管癌单克隆抗体在荷瘤裸鼠体内的定位

刘长征¹, 何军芳¹, 梁昌盛¹, 林鹏², 高锦辉¹, 刘乐和³, 沈忠英⁴

(中山医科大学 1. 实验核医学教研室, 2. 肿瘤医院, 3. 微生物教研室, 广东广州 510089;
4. 汕头大学医学院病理教研室, 广东汕头 515031)

摘要:【目的】研究抗人食管癌单克隆抗体 G9(McAbG9)在荷瘤裸鼠体内对食管癌组织的定位作用。【方法】采用氯胺-T 法制备标记物¹²⁵I-G9, 纯化后腹腔注射, 分别于 24、48、72 h 取多种器官/组织测放射性, 计算每克组织摄取放射性的百分比(%ID/g)及肿瘤与非瘤组织的比 T/NT, 并取 72 h 的肿瘤组织进行放射自显影分析。【结果】¹²⁵I-G9 肿瘤组织的放射性均较其它器官/组织高(血液除外), 48 h 组最高, T/NT 值在 2~7 之间; 放射自显影显示肿瘤组织有大量放射性浓集, 肿瘤边缘较中心部位明显。【结论】¹²⁵I-G9 能在荷瘤裸鼠体内定位于食管癌部位, 单抗 G9 具有很好的导向作用。

关键词: 食管肿瘤/诊断; 抗体, 单克隆; ¹²⁵I; 动物, 实验

中图分类号: R375.1; 392.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-0019-03

Study of Location in Tumor Bearing Nude Mice of Monoclonal Antibody to Human Esophageal Carcinoma

LIU Chang-zheng¹, HE Jun-fang¹, LIANG Chang-sheng¹, LIN Peng²,
GAO Jin-hui¹, LIU Le-he³, SHEN Zhong-ying⁴

(1. Department of Experimental Nuclear Medicine, 2. Cancer Hospital, 3. Department of Microbiology,
Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China; 4. Department of
Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract: 【Objective】To study the location effect of the McAb G9 to human esophageal carcinoma in tumor bearing nude mice. 【Methods】¹²⁵I-G9 was prepared by Chloramine-T method. The distribution of ¹²⁵I-G9 was detected at different time (24, 48, and 72 h) after peritoneal injection. The percentage of the injected dose per gram of tissue(%ID/g) and the ratio of Tumor/non-Tumor were calculated. 【Results】The distribution of ¹²⁵I-G9 in tumor at the third day was showed by autoradiography obviously higher than in other organ/tissue (except blood) and the highest is at the 48 h. The T/NT values are 2-7. The autoradiography indicated that radioactivity concentrated in tumor tissue. The concentration in tumor edge is more obvious than in the center. 【Conclusion】¹²⁵I-G9 has a considerable targeting activity and can well locate in esophageal carcinoma tissue in tumor bearing nude mice.

Key words: esophageal neoplasms/diagnosis; antibodies, monoclonal; ¹²⁵I; animals, laboratory

我国是食管癌的高发地区, 年平均死亡率为 14.59/10 万人, 占全国所有癌症死亡病例的 21.8%, 属第 2 位^[1]。目前食管癌的治疗仍以手术和放疗为主要手段, 虽辅以化疗等其它治疗, 但总体疗效未获明显的提高, 由于缺乏特异性的临床检

测手段, 在外科手术中, 倾向尽量大范围的切除食管和行广泛的淋巴清扫, 具有一定的盲目性, 势必增加合并症^[2]。在肿瘤的诊断方法中, 放射免疫显像(RII)有着广阔的应用前景, 国内外已做了大量的研究工作, 并取得令人瞩目的效果^[3,4], 本研究

收稿日期: 2000-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070231), 广东省自然科学基金项目(960777)

作者简介: 刘长征(1942-), 男, 海南琼山人, 教授。

利用杂交瘤技术,建立了食管癌的杂交瘤细胞株,并接种在 Balb/C 小白鼠腹腔中,按常规方法生产腹水,并从腹水中提取抗食管癌单克隆抗体 G9 (McAbG9)。本文报道 McAb G9 在荷瘤裸鼠体内定位效果和在人食管癌组织上的结合情况。

1 材料和方法

1.1 单克隆抗体

抗人食管癌单抗 G9 为小鼠 IgG1 亚型,经正辛酸-硫酸铵沉淀,再经 Sephadex G-50 脱盐、纯化,ELISA 检测其免疫活性为 $1:1280$ 阳性。

1.2 动物模型

本校肿瘤研究所建立的荷人食管癌裸鼠模型,肿瘤直径为 $1.0 \sim 2.0$ cm,随机分为 3 组,每组 5 只,分别为 24 h, 48 h 和 72 h 实验组。

1.3 ^{125}I -G9 的制备

采用氯胺-T 法^[5],以纸层析检测标记率。标记物经 Sephadex G-25 柱($1\text{ cm} \times 30\text{ cm}$)纯化, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用

1.4 动物体内的分布实验

实验动物经腹腔注射 ^{125}I -G9 后,分别于 24 h、48 h 和 72 h 断头处死,取血、心、肺、胃、肝、脾、肾、小肠、大肠和肿瘤组织,分别测量每克组织每分钟的放射性计数,由此计算每克组织摄取的放射性占总注入量的百分比($\% \text{ID/g}$)及肿瘤组织和非肿瘤组织之比 T/NT。

1.5 放射自显影

取 72 h 组的荷瘤裸鼠的肿瘤组织完整剥离, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻后沿肿瘤的长径做石蜡切片,每片厚 $10\text{ }\mu\text{m}$,干燥后置氚片(A mesham)上曝光 60 h,显影,定影。

1.6 免疫组化染色法 LSAB

取 10 例食管癌手术病人的癌组织及正常食管,冰冻切片,进行 LSAB 法免疫组化检测。

2 结果

2.1 ^{125}I -G9 的制备

Na^{125}I 标记 G9,标记率为 $72\% \sim 80\%$,经纯化后,放射化学纯度为 $95\% \sim 97\%$,放射性比活度为 56.0 MBq/mg ,免疫活性和标记前基本相同。

2.2 标记物在荷瘤裸鼠体内的分布

^{125}I -G9 在荷瘤裸鼠体内的分布见表 1。

表 1 的实验数据表明, ^{125}I -G9 主要分布在血和肿瘤组织,随着时间的延长,血中的放射性逐渐减低,但一直较肿瘤组织高,而肿瘤组织中的放射性以 48 h 为最高,其它器官/组织基本的趋势是,时间越长放射性计数越低。除血液外其它器官/组织的比值 T/NT 在 $2 \sim 7$ 之间,基本能满足临床显像的要求。

2.3 放射自显影

放射自显影的结果显示,肿瘤轮廓清晰,肿瘤组织有大量放射性浓集,边缘部位辉度更高,见图 1。

表 1 ^{125}I -G9 在荷瘤裸鼠体内的分布
Table 1 Distribution of ^{125}I -G9 in tumor bearing nude mice (n = 5)

Tissue	24 h		48 h		72 h	
	$\% \text{ID/g}$	T/NT	$\% \text{ID/g}$	T/NT	$\% \text{ID/g}$	T/NT
Blood	10.19 ± 1.30	0.62	9.31 ± 0.57	0.82	6.90 ± 0.13	0.69
Heart	2.45 ± 0.06	2.60	2.40 ± 0.35	3.18	1.73 ± 0.18	2.76
Lung	3.26 ± 0.61	1.96	3.56 ± 0.14	2.15	2.51 ± 0.02	1.90
Liver	3.54 ± 0.34	1.81	3.11 ± 0.07	2.45	2.24 ± 0.27	2.12
Stomach	2.23 ± 0.05	2.86	1.73 ± 0.08	4.42	1.37 ± 0.04	3.49
Spleen	2.38 ± 0.40	2.68	2.42 ± 0.18	3.16	1.67 ± 0.11	2.86
Kidney	3.36 ± 0.19	1.90	3.42 ± 0.23	2.23	2.27 ± 0.07	2.10
Small Intestine	1.40 ± 0.05	4.57	1.17 ± 0.08	6.52	1.01 ± 0.18	4.72
Large Intestine	1.99 ± 0.06	3.20	1.48 ± 0.48	5.15	0.99 ± 0.27	4.84
Tumor	6.37 ± 1.41		7.63 ± 0.48		4.77 ± 0.06	

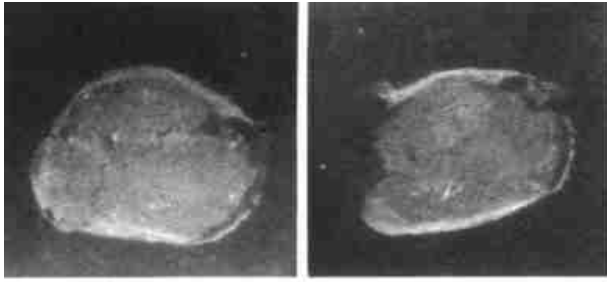


图1 给药后72 h组肿瘤组织的放射自显影结果

Fig. 1 Autoradiography result of 72h-group tumor tissue

2.4 LSAB法免疫组化检测

将McAb G9和食管癌细胞株作用,经LSAB免疫组化,可以看到在细胞株的胞膜上呈棕色的强阳性,见图2。在10例送检的食管癌样本中,G9都能和原发灶的癌细胞结合,见图3。

3 讨论

在肿瘤的放射免疫显像和放射免疫治疗中,最关键的条件是要有特异性强、免疫活性好的抗体。由本课题组研制的抗食管癌单抗G9,在荷瘤裸鼠体内,能高度浓集于肿瘤组织中,LSAB法免疫组化结果看到G9在人的食管癌组织中有高度表达。裸鼠肿瘤组织的放射自显影结果证实G9在肿瘤中浓集,并且肿瘤边缘部位有更高的浓集,表明G9的分子量较大,不易透过肿瘤的实体组织^[6];另外,临床的放射免疫显像的初步试用也可看到,¹³¹I-G9能显示食管癌的原发病灶和转移的淋巴结(另文总结)。这些结果都表明,G9在食管癌的放射免疫诊断,尤其是在食管癌的导向手术方面有应用前景。

从组织分布的结果看到,¹²⁵I-G9在血液中的浓度居高不下,这是由于G9不够纯,没有免疫活性的IgG杂质含量过多,导致¹²⁵I-IgG在血液中的代谢、消除比较缓慢,这是影响显像时间和肿瘤图像不清晰的主要原因,可以通过提高G9的纯度加以解决。

(本文图2、3见插页1)

参考文献:

- [1] 李连弟,鲁凤珠,张思维,等. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(1): 3.
- [2] Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, *et al.* Recurrent esophageal carcinoma after esophagectomy with three-field lymph node dissection[J]. J Surg Oncol, 1996, 61(4): 267.
- [3] Goldenberg D M, Larson S M, Reisfeld R A, *et al.* Targeting cancer with radiolabeled antibodies[J]. Immunology Today, 1995, 16(6): 261.
- [4] Goldenberg D M. New developments in monoclonal antibodies for cancer detection and therapy[J]. C A Cancer J Clin, 1994, 44(1): 43.
- [5] 刘长征. 放射性核素标记化合物的制备[M]. 见刘长征,王浩丹,胡雅儿主编. 实验核医学与核药学. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 79~80.
- [6] Bird R E, Hardman K D, Jacobson J W, *et al.* Single-chain antigen-binding proteins. [J] Science, 1988, 242(21): 4877.

(编辑 黄小延)

·简讯·

《循证医学杂志》征稿启事

《循证医学杂志》为中山医科大学主办的综合性学术期刊,依托广东省循证医学研究中心,以广大的医药卫生人员,科研、教学、医疗研究和管理人员为主要读者对象,报道循证医学的研究成果及临床实践。本刊设有综述与讲座、论著、临床疾病指引摘要、循证医学实践、医学文献使用指南、循证医学研究方法、国内外学术动态等栏目。欢迎来稿。来稿请寄:广州市天河路600号中山医科大学附属第三医院《循证医学杂志》编辑部收。邮编:510630 电话:020-85260252 传真:87531401

(循证医学杂志编辑部)

霍乱毒素对金黄地鼠视网膜神经肽 Y 免疫反应节细胞再生的影响 (正文见第 5 页)

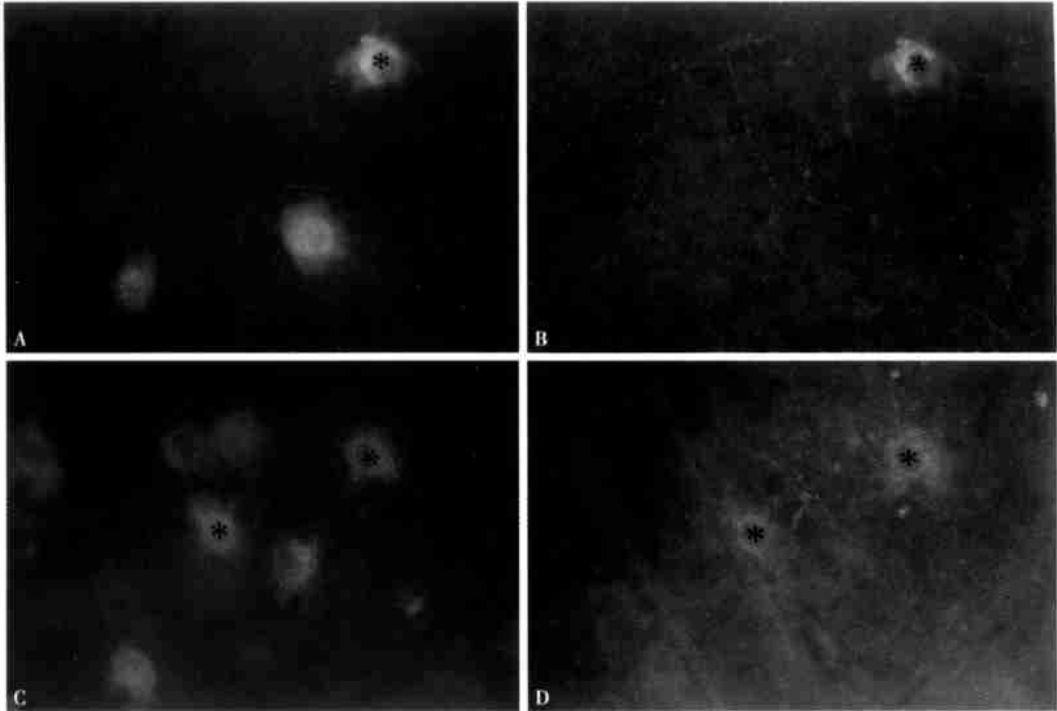


图 1 视网膜平铺片: 荧光金逆行标记及与 NPY 免疫荧光组化结合示再生的 RGCs 和 NPY-IR RGCs
Fig. 1 The wholemount preparation of retinas show the regenerating RGCs and regenerating NPY-IR RGCs by the retrograde labeling with fluorogold (FG) combined with fluorescent (FITC) immunocytochemistry
A and C: The regenerating RGCs (FG labeled) in AG group and in AG + SN + CTx group respectively.
B and D: The NPY-IR RGCs (FITC-labeled) in AG group and in AG + SN + CTx group respectively
A and B, C and D: Asterisks denote the regenerating NPY-IR RGCs (double labeling) in AG group and in AG + SN + CTx group respectively. Scale bar = 20 μ m

抗人食管癌单克隆抗体在荷瘤裸鼠体内的定位 (正文见第 19 页)

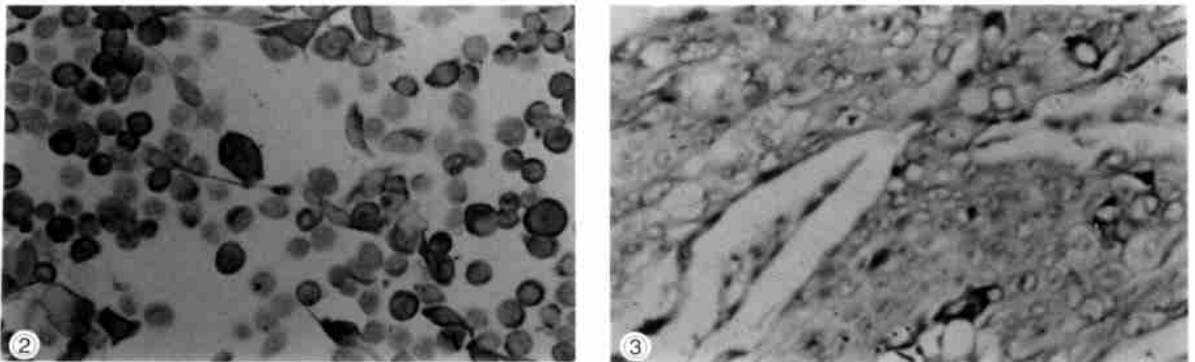


图 2 单克隆抗体 G9 在食管癌细胞株中呈阳性表达

图 3 单克隆抗体 G9 在食管癌组织呈阳性表达

Fig. 2 McAb G9 overexpression in esophageal carcinoma cells (LSAB \times 100)

Fig. 3 McAb G9 overexpression in esophageal carcinoma (LSAB \times 100)