

$^{99m}\text{Tc}-\text{C}_{50}-\text{F}(\text{ab}')_2$ 放射免疫显像早期诊断 卵巢癌的实验研究

张丙忠, 沙孝珍, 林仲秋, 邝健全

(中山医科大学孙逸仙纪念医院妇科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】探讨单克隆抗体(McAB)的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段在卵巢癌放射免疫显像诊断中的应用价值。【方法】利用胃蛋白酶消化抗癌胚抗原单克隆抗体(C_{50}), 酶切产物经 SDS-PAGE 电泳鉴定后, 经 Sephadex G-100 凝胶柱纯化, 获得 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段。分别将 ^{99m}Tc 标记的 C_{50} 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 及正常鼠 IgG 行荷人卵巢癌裸鼠移植瘤放免显像, 并比较其结果。【结果】①片段 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 的产率为 $33\% \pm 3.2\%$, 其最大理论产率的49%。酶联免疫吸附方法和免疫细胞化学染色均证实其保留较好的免疫活性。②24 h 放射免疫显像可见片段组移植瘤部位有较高浓度的放射性物质聚集, 肿瘤与非肿瘤组织放射性活度之比(T/NT)片段组最高。【结论】利用单克隆抗体片段进行放免显像, 效果优于全抗体。

关键词: 抗体, 单克隆; 卵巢肿瘤/诊断; 放射免疫显像

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)05-0345-04

Study on $^{99m}\text{Tc}-\text{C}_{50}-\text{F}(\text{ab}')_2$ Using Radio Immunoscintigraphy for Ovarian Carcinoma

ZHANG Bing-zhong, SHA Xiao-zhen, LIN Zhong-qiu, KUANG Jian-quan

(Department of Gynecology of Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University
of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To evaluate $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragment of monoclonal antibody C_{50} using radio immunoscintigraphy (RIS) for ovarian carcinoma. 【Methods】 C_{50} was digested by pepsin and identified with SDS-PAGE. After purified by Sephadex G-100, C_{50} 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$, and normal mouse IgG (nMIgG) were labeled with ^{99m}Tc and injected intraperitoneally into 3 groups of nude mice bearing human ovarian carcinoma xenografts respectively. After 24 hours, RIS was performed. 【Result】①The recovery of $\text{F}(\text{ab}')_2$ after digestion and purification was $33\% \pm 3.2\%$, about 49% of the maximal theoretical yield. Good immunoactivity of $\text{F}(\text{ab}')_2$ was retained and tested by ELISA and PAP. ②Higher radioactivity gathered in xenografts field in fragment group, and T/NT is the highest one among three groups. 【Conclusion】 $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragment could be of better RIS than intact monoclonal antibody.

Key words: antibody, monoclonity; ovarian neoplasm/diagnosis; RIS

卵巢癌是女性常见的高度恶性肿瘤之一, 其预后差, 死亡率高。利用放射性核素标记的单克隆抗体进行放射免疫显像(radio immunoscintigraphy RIS)是一种特异性高的非创伤性肿瘤定性定位诊

断方法。由于完整单克隆抗体分子量较大, 应用时因本底高导致显像质量差, 而且重复使用可能会引起严重的过敏反应。利用其酶切产物- $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段, 可减少非特异性结合, 显像质量提高。本实验

收稿日期: 1999-12-03

基金项目: 广东省科委重点科技攻关基金资助项目(9622050)

作者简介: 张丙忠(1969-)男, 安徽宿州人, 在读博士, 主治医师, 妇科肿瘤专业。

旨在对抗癌胚抗原单克隆抗体(C₅₀)及其 F(ab')₂ 片段在卵巢癌放射免疫显像的应用价值进行初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 抗癌胚抗原单克隆抗体(C₅₀)及其 F(ab')₂ 片段的制备

C₅₀(DAKO 公司)为 IgG₁ 型, 浓度 10 g/L, 在 0.01 mol/L 乙酸钠-乙酸缓冲液中透析 24 h。胃蛋白酶(Sigma 公司, 3 200 IU/mg), 溶于同样的缓冲液, 抗体与酶按 25:1 比例混合, 37 °C 保温 18 h。电泳分析消化程度, 消化结束后加 1 mol/L Tris 至 pH7.0 左右终止反应。在 0.01 mol/L Tris-HCl pH8.0 在 4 °C 透析 24 h 后移至 Sephadex G-100 (Pharmacia, 0.8 cm×20 cm) 凝胶柱洗脱, 收集并经电泳证实第 1 峰为 F(ab')₂ 片段。测定其在 A=260 nm 和 A=280 nm 处的吸光度, 按公式^[1]: 蛋白质含量 g/L=1.45×A₂₈₀~0.74×A₂₆₀, 估计 F(ab')₂ 的含量, 计算消化产率和最大理论产率^[2]:

消化产率=F(ab')₂ 片段的产量/IgG 的投入量

最大理论产率=F(ab')₂ 片段的产量/F(ab')₂ 片段的最大理论产量。

1.2 F(ab')₂ 片段免疫活性测定

酶联免疫吸附法(ELISA): 取相同浓度的 C₅₀ 及其 F(ab')₂ 片段各 0.1 mL, 倍比稀释后滴至铺有 3AO 卵巢癌细胞的 96 孔板中, 按 Gray 法^[3] 反应后, 用酶标仪测反应颜色深度。

免疫细胞化学染色法(PAP 法): 将培养的 3AO 细胞制成细胞悬液并涂片, 将 C₅₀, F(ab')₂ 及正常鼠 IgG(nM IgG, IgG₁ 型, 重庆医科大学提供) 按 1:50 稀释后行免疫细胞化学染色。

1.3 ^{99m}Tc 标记方法和活性测定

采用 2-巯基乙醇(2-ME)还原免疫球蛋白及 ^{99m}Tc 直接标记法^[4]。纸层析法测定标记率, 展开剂为生理盐水, 定标器测定放射性强度。细胞结合分析法测定标记后活性: 取各约 50 000cpm 的 ^{99m}Tc-C₅₀, ^{99m}Tc-F(ab')₂ 以及 ^{99m}Tc-nM IgG, 分别加入 5×10⁶ 个 3AO 细胞, 在含 10% FCS 的 RPMI-1640 (Sigma 公司) 培养基中 37 °C 振荡培养 2 h, 探测放射性总数, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次, 测定其放射性计数, 两者相比, 计算细胞结合率。

1.4 裸鼠荷人卵巢癌移植瘤模型

裸鼠为出生 4~6 周雌性裸鼠(第一军医大学提供), 卵巢癌细胞株为 3AO 细胞(上海医科大学提供), 在含 10% FCS RPMI 1640 培养基中培养至 5×10⁹/L 时接种于裸鼠颈背部皮下, 待肿瘤长到直径 1 cm 左右进行显像。

1.5 裸鼠放射免疫显像

将荷瘤裸鼠随机分成 3 组, 每组 3 只, 经腹腔注射 18.5 mBq(每只约 0.5 mCi) 的 ^{99m}Tc-F(ab')₂ 为片段组; ^{99m}Tc-C₅₀ 为全抗体组; ^{99m}Tc-nM IgG 为对照组。注入后 3、6、12 h 及 24 h 分别行 ECT 显像(counts:500)^[5]。显像后断颈处死裸鼠, 取各组织器官称重, FT603 型井型探测仪探测肿瘤和单个组织器官放射性计数, 计算单位重量放射性计数。公式如下:

单位重量放射性活度=肿瘤(或某组织)放射性活度/肿瘤(或某组织)的重量。

肿瘤与非肿瘤组织之比(T/NT)=肿瘤组织单位重量放射性活度/非肿瘤组织单位重量放射性活度。

2 结 果

2.1 单抗片段的鉴定、纯化及产率

用酶消化后, 产物经 SDS-PAGE 电泳证明完全消化, 可见相对分子量约 100 kd 的 F(ab')₂ 条带及分子量小于 50 kd 的多个条带。经 Sephadex G-100 柱纯化后收集 F(ab')₂, 计算消化产率为 33%±3.2%, 为最大理论产率的 49%。

2.2 F(ab')₂ 片段活性检测

2.2.1 ELISA 法 相同浓度的 C₅₀, F(ab')₂ 经倍比稀释后酶标仪监测反映孔颜色深度结果提示: F(ab')₂ 与 C₅₀ 相比仅绝对值减少, 免疫活性无明显下降, 如图 1。

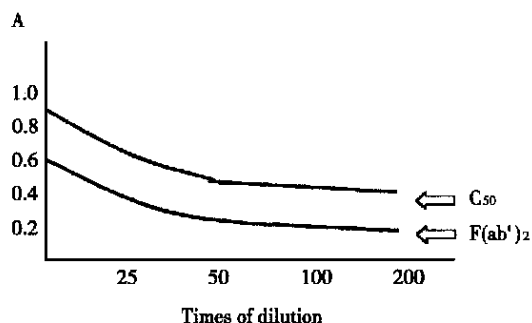


图 1 ELISA 检测 F(ab')₂ 及 C₅₀ 免疫活性

Fig. 1 Immune activity of F(ab')₂ and C₅₀ tested by ELISA

2.2.2 免疫细胞化学染色 (PAP) 法 C_{50} 及 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段经 1:50 稀释后细胞化学染色均为阳性, 而 nM IgG 均为阴性, 说明消化后的单抗片段仍保留了较好的免疫活性。

2.3 ^{99m}Tc 标记 C_{50} , $\text{F}(\text{ab}')_2$ 及其活性测定
 ^{99m}Tc 标记 C_{50} 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 及 nM IgG 的标记率分别为 68%、61.4% 及 45%, 放射化学纯度在 90% 以上。体外细胞结合分析: C_{50} 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 及 nM IgG 与 ^{99m}Tc 标记后, 与 3AO 细胞结合率分别 30.5%、24.3% 及小于 5%。

2.4 荷人卵巢癌裸鼠放免显像
 各组裸鼠注入 ^{99m}Tc 标记的 C_{50} 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 及 nM IgG 后行 ECT 显像, 可见 3、6 及 12 h 均见放射

性全身均匀分布。24 h 片段组肿瘤部位有较高放射性浓聚, 肝脏、脾脏、肾脏等处亦有少量放射性浓聚; 全抗体组则显示除肿瘤部位外, 腹腔肝脏、脾脏、肾脏都有较高放射性浓聚; 而对照组肿瘤部位无高放射性物质浓聚。显像后断颈处死裸鼠, 各组织器官放免显像情况, 见表 1。

3 讨论

卵巢癌预后极差, 这与癌的生长部位、肿瘤细胞的生物学特性及缺乏特异性早期诊断方法有关。目前, 临床应用的 B 超、CT、MR 均不能够对直径 1 cm 以下的病灶做出诊断^[6], 有学者比较几种诊断

表 1 各器官组织不同时间段的 T/NT 值
 Table 1 Radioactivity and T/NT of organs in different period ($\bar{x} \pm s$)

Organ	Fragment group		Intact group		Control group		
	Cpm/g	t/nt	Cpm/g	t/nt	Cpm/g	t/nt	
3 h	Liver	11.2×10^7	0.75 ± 0.48	12.1×10^7	0.68 ± 0.45	11.4×10^7	0.65 ± 0.34
	Spleen	10.4×10^7	0.81 ± 0.52	10.4×10^7	0.79 ± 0.62	7.83×10^7	0.95 ± 0.71
	Kidney	13.3×10^7	0.63 ± 0.34	13.3×10^7	0.61 ± 0.37	12.5×10^7	0.60 ± 0.40
	Bone	9.33×10^7	0.90 ± 0.62	8.07×10^7	1.02 ± 0.92	6.50×10^7	1.12 ± 0.71
	Intestine	8.08×10^7	1.04 ± 0.81	8.15×10^7	1.01 ± 0.83	7.41×10^7	0.99 ± 0.51
	Muscle	7.43×10^7	1.13 ± 0.74	8.31×10^7	0.99 ± 0.55	8.01×10^7	0.92 ± 0.87
	Brain	7.12×10^7	1.18 ± 0.76	6.64×10^7	1.24 ± 0.78	7.03×10^7	1.05 ± 0.69
	Tumor	8.4×10^7	—	8.23×10^7	—	7.38×10^7	—
6 h	Liver	7.87×10^7	0.88 ± 0.70	5.55×10^7	0.94 ± 0.52	6.17×10^7	0.84 ± 0.41
	Spleen	7.05×10^7	0.92 ± 0.48	5.74×10^7	0.91 ± 0.49	6.91×10^7	0.75 ± 0.50
	Kidney	10.6×10^7	0.61 ± 0.41	9.01×10^7	0.58 ± 0.40	9.96×10^7	0.52 ± 0.39
	Bone	5.85×10^7	1.11 ± 1.02	4.83×10^7	1.08 ± 0.71	5.63×10^7	0.92 ± 0.80
	Intestine	5.41×10^7	1.20 ± 0.98	4.58×10^7	1.14 ± 0.68	5.45×10^7	0.95 ± 0.74
	Muscle	6.01×10^7	1.08 ± 0.74	4.70×10^7	1.11 ± 0.51	7.01×10^7	0.74 ± 0.61
	Brain	4.99×10^7	1.30 ± 0.68	3.73×10^7	1.40 ± 0.91	4.98×10^7	1.04 ± 0.69
	Tumor	6.49×10^7	—	5.22×10^7	—	5.18×10^7	—
12 h	Liver	3.01×10^7	1.02 ± 0.70	2.29×10^7	1.12 ± 1.02	2.53×10^6	0.85 ± 0.47
	Spleen	3.44×10^7	0.89 ± 0.65	2.54×10^7	1.01 ± 0.90	2.36×10^6	0.91 ± 0.66
	Kidney	4.14×10^7	0.74 ± 0.64	3.32×10^7	0.77 ± 0.49	2.65×10^6	0.81 ± 0.63
	Bone	1.62×10^7	1.89 ± 1.12	2.17×10^7	1.18 ± 0.95	2.08×10^6	1.03 ± 0.41
	Intestine	2.14×10^7	1.43 ± 0.92	2.06×10^7	1.24 ± 0.86	1.95×10^6	1.10 ± 0.71
	Muscle	2.11×10^7	1.45 ± 1.03	1.78×10^7	1.43 ± 0.79	2.13×10^6	1.01 ± 0.89
	Brain	1.77×10^7	1.73 ± 1.02	1.42×10^7	1.80 ± 1.05	1.78×10^6	1.21 ± 1.04
	Tumor	3.06×10^7	—	2.56×10^7	—	2.15×10^6	—
24 h	Liver	6.71×10^6	1.67 ± 0.59	6.02×10^6	1.52 ± 0.48	2.04×10^6	0.48 ± 0.21
	Spleen	5.71×10^6	1.96 ± 1.04	4.89×10^6	1.87 ± 0.82	1.24×10^6	0.79 ± 0.43
	Kidney	8.96×10^6	1.25 ± 0.74	7.57×10^6	1.21 ± 0.52	1.12×10^6	0.88 ± 0.43
	Bone	4.97×10^6	2.49 ± 0.72	3.72×10^6	2.46 ± 0.38	1.35×10^6	0.72 ± 0.41
	Intestine	5.28×10^6	2.12 ± 0.45	4.63×10^6	1.98 ± 0.32	1.13×10^6	0.87 ± 0.37
	Muscle	4.57×10^6	2.45 ± 0.83	4.07×10^6	2.25 ± 0.79	1.48×10^6	0.66 ± 0.43
	Brain	5.21×10^6	2.15 ± 1.04	4.53×10^6	2.02 ± 0.76	1.27×10^6	0.77 ± 0.38
	Tumor	11.2×10^6	—	9.16×10^6	—	9.79×10^5	—

方法后认为, CT、MR 和 RIS 在诊断卵巢癌的准确性依次递增^[7]。放免显像是特异性较高的肿瘤定位诊断方法。由于完整抗体分子量较大, 且异源性问题难以克服, 使它在临床上的应用受到一定限制。F(ab')₂ 则部分克服了单抗的不足之处, 有如下优点: ①分子量较小, 易进入组织间隙, 达到肿瘤细胞表面与之亲和。②减少抗体与周围组织的非特异性结合, 使 T/NT 增加。③血池中清除加快, 显像时本底减弱, 显像质量提高, 减少了射线对机体正常组织的损伤。④异源性减弱, 增加了重复应用的可行性。本研究表明, 片段组的 T/NT 比值最高, 显像优于全抗体组和对照组。

T/NT 反映抗体特异性与肿瘤相结合的能力。T/NT 比值高, 说明抗体与肿瘤组织特异性结合多而非肿瘤组织随机结合少, 同时也说明抗体的特异性高, 反之亦然。实验说明, T/NT 比值与相应脏器的血流丰富程度有一定关系。肝、肾、脾等脏器血流丰富, T/NT 比值低; 骨骼、小肠、肌肉、大脑等脏器的血流丰富程度较低, T/NT 比值则高, 这与显像结果相一致。

关于放射性核素的选用, 现在多选用钨, 这是因为^{99m}Tc 不发射 β 射线, 仅发射 γ 射线, 且能量适中, 半衰期短, 可立即显像, 无须特殊防护; 电离密度低, 在体内引起电离辐射的损伤小。本实验在注射 24 小时后即可显像, 便于及早得出结论。钨的化合价比较多, 给标记带来一定困难。近来通过还原抗体中的二硫键直接标记, 使标记技术有了迅速提高^[8], 国内多数学者报道标记率在 80%~90% 之间^[9], 亦有高达 95% 以上者^[10]。本实验的标记率较低, 可能和抗体冷冻时间过长有关(冷冻时间 4 个月)。

实验说明: 腹腔注射途径行 RIS 会受到肝、脾、肾等脏器的影响。无论全抗体组、对照组或片段组, 24 h 显像均表明以上脏器部位有较高浓度的放射性物质积聚, 这与文献报道相一致^[11]。其原因除了与 T/NT 外, 还可能与肝脏、脾脏的网状内皮吞噬系统有关, 而肾脏的高放射性活性的另一个原因是因为它是钨排出的主要器官。提示临床应用 RIS 诊断腹腔内肿瘤是否发生转移要慎重。

通过实验还可以看出, 应用 RIS 时仍有不足需

要改进: ①单克隆抗体的特异性仍不够高, 距离理想的标准仍有一定的差距。②胃蛋白酶消化产出率低, 需要筛选高效的消化酶。③从根本上说, F(ab')₂ 片段仍未克服异源性的问题, 须进一步研究, 探讨基因工程技术协助解决。

参考文献:

- [1] 方家驹主编. 生物化学实验教程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 22~22.
- [2] 杨子义, 李方. 抗肺癌单克隆抗体片段的制备及其在放射免疫显像中的应用[J]. 中华核医学杂志, 1991; 11(3): 145.
- [3] Gray B M, Granowska M. ELISA methodology for polysaccharide antigen: protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tube [J]. J Immunol Meth 1979; (28): 187.
- [4] Schwarz A, Steinstraber A. A novel approach to ^{99m}Tc labeled of monoclonal antibodies [J]. J Nucl Med 1987, (28): 721.
- [5] Jobling T W, M. Granowska, Britton K E, et al. Radioimmunoscinigraphy of ovarian tumor using a new monoclonal antibody, SM3 [J]. Gynecologic Oncology, 1990 38(3): 468.
- [6] Chen S S, Lee L. Incidence of para-aortic and pelvic lymph node metastases in epithelial carcinoma of the ovary [J]. Gynecol Oncol, 1983 (16): 95.
- [7] Low R N, Carter W D, Salen F, et al. Ovarian cancer: comparison of findings with perflorea carbon-enhanced MR imaging, In-111-CYT-103 immunoscintigraphy and CT [J]. Radiology, 1995, 95(2): 391.
- [8] Mather S J, Ellison-d. Reduction-mediated ^{99m}Tc labeling of monoclonal antibodies [J]. J Nucl Med, 1990 May, 31(5): 692.
- [9] 林文玉, 高伯山. ^{99m}Tc 标记卵巢癌单克隆抗体的实验研究[J]. 北京医科大学学报, 1995, 27(6): 444.
- [10] 战军, 吴令英. 一种直接用^{99m}Tc 标记单抗的新方法[J]. 中华核医学杂志, 1992, 12(2): 92.
- [11] Barzen G, Mayr A C, Langer M, et al. Radio immunoscintigraphy of ovarian cancer with ¹³¹I labeled OC125 antibody fragments [J]. Eur J Nucl Med 1989, 15(1): 42.

(编辑 关庄)