

亲和素放大促排在抗CEA 单抗第二步法预定位放免显像中的实验研究

李贵平¹ 朱承谟² 第一军医大学南方医院核医学科 广东 广州 510515 上海第二医科大学附属瑞金医院核医学科 上海 200025

摘要 目的 提高抗 CEA 单抗第二步法预定位放免显像的诊断效果 方法 荷人结肠癌裸鼠经尾静脉注射生物素化抗 CEA 单抗 100 μg 8 h 后腹腔注射亲和素 80 μg 5 h 再经腹腔注射 ¹⁵³Sm 标记的 SA 3.7MBq/15 μl 亲和素放大促排组 以第二步法生物素化 CEA 单抗 -¹⁵³Sm 标记链霉亲和素和 ¹⁵³Sm 标记的 CEA 单抗作为对照组 分别在注射放射性标记物后 4 和 24 h 进行体外 ^{99m}Tc 显像和体内标记物分布测定 结果 亲和素放大促排组 4 h 即见肿瘤部位浓聚放射性核素 而对照组无明显显影 亲和素放大促排组 / 血放射性比值在注药后 4 h 和 24 h 分别为 1.55 ± 0.058 和 4.62 ± 0.076 高于对照组 第二步法组和直接标记法组分别为 1.004 ± 0.221 和 2.028 ± 0.367 及 0.260 ± 0.084 和 0.847 ± 0.368 结论 亲和素放大促排能迅速降低血本底 提高靶 / 非靶比 / NT 放射性比值 缩短显像时间 改善显像质量

关键词 单克隆抗体 放射免疫显像 亲和素 - 生物素 肿瘤 裸鼠

中图分类号 R81 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2001)02-0118-03

李贵平¹ 朱承谟² 第一军医大学南方医院核医学科 广东 广州 510515 上海第二医科大学附属瑞金医院核医学科 上海 200025

¹LIGui-ping¹, ZHUCHeng-mo²

(¹Department of Nuclear Medicine, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Nuclear Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Secondary Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract Topromote the diagnostic efficacy of radioimmunoimaging with two-step pretargeting with anti-CEA monoclonal antibody by the employment of avidin chase. Nudemice bearing human colonic tumor and labeled as avidin chase group were injected with biotinylated anti-CEA monoclonal antibody (mAb-Bt), 48 h after which avidin injection was performed followed by ¹⁵³Sm-labeled streptavidin (SA) 30 min later. In the nude mice serving as two-step pretargeting group, avidin injection was omitted and indirect labeling group, neither ¹⁵³Sm-SA nor avidin injection was performed. Four and 24 h after the injection, emission CT imaging and biodistribution of ¹⁵³Sm-SA were studied in the 3 groups and the results statistically analyzed. Clear visualization of the tumors was achieved 4 h after the injection of radiolabeled SA in avidin chase group and the tumor-to-blood radioactivity ratios at 4 and 24 h were 1.549 ± 0.058 and 4.623 ± 0.076 respectively, while those of two-step pretargeting group were 1.004 ± 0.221 and 2.028 ± 0.367; indirect labeling group, the ratios were 0.260 ± 0.084 and 0.847 ± 0.368, respectively. The target-to-nontarget ratios of all organs in avidin chase group were also higher than those in the other 2 groups, in which the tumors were poorly visualized. Avidin chase could increase the target-to-nontarget ratio, decrease the blood background and shorten the imaging time with improved imaging quality.

Key words monoclonal antibody; radioimmunoimaging; avidin-biotin; neoplasms; nude mice

预定位技术在肿瘤放免显像和治疗中的应用为解决抗体在瘤内缓慢的低摄取和从血液及其它正常组织中的慢清除等问题提供了新的方法。目前应用生物素化单抗和放射性标记链霉亲和素¹的第二步法预定位放免显像在动物实验和临床研究中已取得一定的成果²。但是血循环中游离的生物素化单抗和内源性生物素可干扰随后注入的标记 SA 与肿瘤的结合³。亲和素⁴能在肝内迅速聚集。注射 Av 可将

血循环中的生物素化抗体迅速清除掉⁵。为了增加标记物在肿瘤内的摄取和血液中的清除。本实验在荷人结肠癌裸鼠模型中成功实现预定位第二步法的基础上。先在生物素化抗 CEA 单抗 mAb-Bt 预定位后。先注射 Av 来追踪循环中的生物素化单抗和内源性生物素。并与其结合而将其清除。然后再注射 ¹⁵³Sm-SA 靶向肿瘤作显像剂。观察 Av 放大促排⁶对 ¹⁵³Sm-SA 体内分布及瘤内浓聚的影响。

收稿日期 2000-05-12

基金项目 上海市教委高校博士学科点建设基金资助项目

作者简介 李贵平 男 1962 年 安徽宿松人 1999 年毕业于上海第二医科大学 主治医师 电话 20-85142121

1 材料和方法

1.1 试剂

生物素活化酯 NSH-TPA-生物胞素 B₂

和 Av 均为 Sigma 公司产品链霉亲和素 streptavidin, SA 由上海市静安区医学化验所提供 $^{153}\text{SmCl}_3$ 由中国原子能科学研究院提供 CEA mAb 由上海市免疫学研究所制备

1.2 抗 CEA 单抗的生物素化

BNSH/DMSO 溶液 10 mg/ml 滴加至 mAb 1 mg/ml 的碳酸氢盐缓冲液 15 min 使生物素与单抗物质的量之比为 15~50 室温放置 2 h 离心柱法纯化 间接酶联免疫吸附法 ELISA 鉴定生物素活性 SDS-PAGE 测定生物素化单抗纯度

1.3 ^{153}Sm 标记 DB₂ 及 SA

按文献[3]所述的标记方法操作

1.4 ^{153}Sm 直接标记 CEA mAb

取纯化的 CEA mAb-DTPA 偶联物溶液 0.1 ml 加入约 40 MBq 的 $^{153}\text{SmCl}_3$ 比活度为 22.2 GBq/ml 室温反应 20 min 即得 ^{153}Sm -DTPA-CEA mAb 偶联物 用纸层析法测标记率和放化纯度 以 30% 硝酸胺处理过的新华 1 号滤纸作为支持物 展开剂为磷酸三丁酯 / 丁酮 / 乙酸乙酯 10:3 间接 ELISA 法鉴定标记物的免疫活性

1.5 荷人结肠癌裸鼠模型

荷人结肠癌裸鼠由中科院上海药物所裸鼠动物房提供 癌组织块接种于 4 周龄裸鼠前肢皮下 待肿瘤长至 0.5~1 cm³ 时用于体内分布和显像研究

1.6 荷人结肠癌裸鼠模型的体内分布和定位显像

荷瘤裸鼠分 3 组 每组 6 只: 亲和素放大促排实验组 尾静脉注射 100 μg mAb-Bt 8 h 后腹腔注射 Av 80 μg 5 h 再腹腔注射 ^{153}Sm -SA 3.7 MBq/15 μg 二步法组 尾静脉注射 100 μg mAb-Bt 8 h 后腹腔注射 ^{153}Sm -SA 3.7 MBq/15 μg 直接标记法组 在开始实验后 48 h 腹腔注射 ^{153}Sm -CEA mAb 3.7 MBq/20 μg 上述 3 组裸鼠在注射放射性标记物后 4 h 和 24 h 进行 SPECT Siemens ZLC3700 显像 显像后每一时相分别处死裸鼠 分离肿瘤及各脏器 计算靶 / 非靶 / NT 放射性活度比值

1.7 统计学分析

各组间 T/NT 比值比较采用方差分析的 Student-Newman-Keuls 法检验

2 结果

2.1 标记物鉴定

^{153}Sm -CEA mAb 的免疫活性为 50% 左右 SDS-PAGE 示生物素化单抗仍呈现与未生物素化单抗相同的单一蛋白条带 ^{153}Sm -CEA mAb ^{153}Sm -DB₂ 及 ^{153}Sm -SA 标记率分别为 56% 大于 80% 和大于 95%

2.2 裸鼠显像

亲和素放大促排实验组在注射 ^{153}Sm -SA 后的 4 h 即见肿瘤部位有放射性浓聚 4 h 显像清楚 1 各时相肝脾等部位均显像 二步法组和直接标记法组 4 h 肿瘤部位未见明显放射性浓聚

2.3 生物学分布测定

亲和素放大促排实验组 瘤 / 血比值在注药后 4 h 和 24 h 分别为 1.549 (0.058) 和 4.623 (0.076) 二步法组和直接标记法组则分别为 1.004 (0.221) 和 2.028 (0.367) 及 0.260 (0.084) 和 0.847 (0.368) 各组间比较均有显著性差异 $P < 0.05$

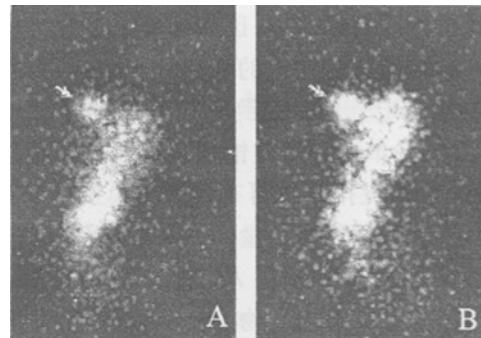


图 1 荷人结肠癌裸鼠亲和素放大促排的二步法预定位 RII 注射放射性标记物后 4 h (A) 和 24 h (B) 肿瘤处见放射性浓聚 (箭头示) Images were obtained at 4 h (A) and 24 h (B) after radiolabel injection (indicated by arrow-head)

3 讨论

Av 具有加快生物素化单抗从血中清除并向肝脾聚集的作用 即促排作用 Kobayashi 等对肿瘤放免显像 II 期时利用注射的 Av 作为追击物 达到核素标记生物素化单抗的促排目的 Kobayashi 将其称为亲和素放大促排系统 并进行了广泛深入的研究 获得了较理想的抗体生物学分布结果 本研究在进行皮下荷人结肠癌裸鼠模型预定位 RII 时将亲和素放大促排系统引入二步法中 发挥其追踪促排作用 即先静脉注射生物素化抗 CEA 单抗以定位于肿瘤处 8 h 后经腹腔注射 Av 以追踪血液中游离的生物素化单抗并促进血中生物素化单抗的清除 0 min 后给予 ^{153}Sm -SA 结果表明 ^{153}Sm -SA 可特异性定位于已预定位至肿瘤的生物素化单抗上 Av 注射可降低血中生物素化单抗的水平 且不影响标记 SA 在瘤内的聚集 Av 放大促排所得 T/NT 比值约为二步法的 2 倍多 因此 Av 放大促排的引入可使血中放射性水平降低 T/NT 比值增加

在二步法预定位中 常需等待相当长一段时间以

表 1 各组荷瘤裸鼠体内生物分布的 T/NT 比值

Table with 7 columns: Organs, Avdinchase (4h, 24h), Two-stepretargeting (4h, 24h), and 153Sm-CEAMcAb (4h, 24h). Rows include Liver, Spleen, Kidney, Bone, Lung, Muscle, Heart, Blood.

0.05, ** P<0.01. Tumor ratios at 4h, 24h after 153Sm-SA injection in the other 2 groups respectively.

使血中单抗浓度得以降低... 即使少量单抗滞留在血中仍可迅速与随后注入的标记分子结合...

参考文献:

咱暂 Saga T, Weinstein JN, Jeong JM. Two-step targeting of experimental lung metastases with biotinylated antibody and radiolabeled streptavidin.

咱暂 Rusckowski M, Fogarasi M, Fritz B. Effect of endogenous biotin on the applications of streptavidin and biotin in mice. Nucl Med Biol, 1997, 24: 263-8.

连接 117 页冤

为确定上述指标对肝脏纤维化程度的诊断意义... 我们以肝脏活检取得的肝组织病理学状态为标准...

症相关... 因而 HA, PCIII, LN 及 IV-C 均可不同程度地反映肝纤维化程度...

参考文献院

咱暂 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志, 1995, 13: 246-7. 咱暂 王宝恩. 肝纤维化的诊断与严重度评估. 中华肝病杂志, 1998, 6(4): 193.