维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0467-03

胶质瘤表皮生长因子受体显像的实验研究

彭志平,文 明,王树斌,尹晓玲,蒋明东,李 洁,李少林

(重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索 ^{131}I 标记表皮生长因子(EGF)对胶质瘤显像的可行性。方法:用神经胶质瘤 C6 细胞进行放射性摄取和滞留的体外实验;荷胶质瘤裸鼠尾静脉注射 ^{131}I-EGF,于注射后 30min、2h、6h、12h 进行 ^{131}I-EGF 在鼠体内的放射性分布研究;在荷瘤鼠与正常对照鼠尾静脉注射 ^{131}I-EGF 后 12h 进行 SPECT 显像研究。结果:体外培养 C6 细胞对 ^{131}I-EGF 有较好的放射性摄取和滞留;在各个时间点,^{131}I-EGF 主要分布在荷瘤鼠肝、脾、肾等组织,瘤区放射性分布较高,脑组织最低,随时间延长肿瘤组织放射性分布逐渐增加,在 12h 时达最高;12h 时 SPECT 显像图像清晰,瘤组织放射性分布明显,肝脾组织放射性分布较高,轮廓完整。结论:^{131}I 标记 EGF 有望为临床神经胶质瘤提供一种新的核医学诊断方法。

【关键词】表皮生长因子受体;放射受体显像;神经胶质瘤

【中国图书分类法分类号】R445.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-29

Experimental study of epidermal growth factor receptor imaging in glioma

PENG Zhiping, et al

(*Department of Radiation Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To explore the feasibility of diagnosing glioma which expressing high level EGFR by 131I-EGF. ***Methods***: In vitro cellular uptake and cellular retention experiment of ^{131}I-EGF was carried out with C6 cell. Radiodistribution experiment was carried out after injection of ^{131}I-EGF into 2-week-old tumor bearing Wistar rats, at 30min, 2 hour, 6 hour and 12 hour. SPECT images were carried out after 12 hours of intravenous injection of ^{131}I-EGF between tumor bearing rats and normal rats. ***Results***: The rate of C6 cellular uptake and retention in vitro was high. At all selected time, ^{131}I-EGF was mainly distributed in liver, spleen and kidney, partially distributed in tumor, but the radioactivity was stronger and stronger with the time passed, until reached the highest strong at 12h. Tumor tissues of tumor bearing rats were seen clearly by SPECT imaging after 12 hours of intravenous injection of ^{131}I-EGF, the liver and spleen were the major normal organs visualized on the images, and the other tissues didn't be seen obviously. ***Conclusions***: ^{131}I-EGF could offer a new and specific approach to diagnose tumor such as glioma and other tumors expressing high level EGFR from molecular level.

【Key words】EGFR; Receptor imaging; Glioma

受体显像是利用放射性核素标记的配体与靶组织中高表达的受体具有高亲和力、高特异性结合的特点,在体外显示受体的空间分布密度的一种方法。本实验拟利用胶质瘤高表达表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)的特点,用 ^{131}I 标记表皮生长因子(EGF)对胶质瘤 SPECT 显像的可行性进行研究。

1 材料和方法

EGF(PEPRO TECH EC LTD),^{131}I(原子高科股份有限公司),小牛血清(Hyclone laboratory, Inc),C6 细胞株、内皮细胞株(中国科学院上海细胞所),Wistar 大鼠(重庆医科大学动物实验中心提供),发射型计算机断层扫描仪(Siemens Diacam 型 SPECT,重庆医科大学附一院核医学科提供)。

1.1 ^{131}I-EGF 的制备[1]

100μg/ml EGF 溶液 500μl 通氮气 15min 后加入 50μl ^{131}I(50mCi/ml),混匀,加入新鲜配制的氯胺-T 20μl(20μg),混匀后室温放置 40s,加入新鲜配制的偏重亚硫酸钠 20μl(40μg)。立即用 sephadex G25 洗脱纯化(0.02mol/l PBS 中性缓冲液)。放置 5min、3h、6h、24h 用薄层层析法鉴定 EGF 的碘标记率,并了解 ^{131}I-EGF 的稳定性。

1.2 体外细胞放射性摄取与滞留实验

1.2.1 体外细胞放射性摄取实验 用 24 孔板,分成实验组与对照组。实验组(共 15 孔)每孔接种 C6 细胞 2×10^5 个,对照

作者介绍:彭志平(1971-),男,博士,讲师,主要研究方向:肿瘤药学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070230)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

组(共 15 孔)每孔接种神经胶质细胞 2×10^5 个,加入 DMEM 培养液,移入含 5%$CO_2$37℃细胞培养箱。培养 4h 后在每孔中加入含不同 EGF 终浓度的 131I-EGF,相同 EGF 终浓度在实验组和对照组各加 3 孔,EGF 终浓度分别为0.0165nmol/l (0.208kBq)、0.165nmol/l (2.08kBq)、1.65nmol/l (20.8kBq)、16.5nmol/l(208kBq)和 165nmol/l(2080kBq),37℃孵育 90min 后,每孔用 4℃培养液 2ml 洗 3 次,用 0.1%的胰酶消化细胞,收集到 10ml 的离心管中,1000r/min 离心 10min, 去上清液,测量各培养孔细胞的 cpm 值,计算摄取率。摄取率=各孔细胞的放射性计数/上清液和细胞的放射性计数总和×100%。以 EGF 终浓度为横坐标,细胞摄取率为纵坐标绘制细胞放射性摄取曲线。

同上操作,实验组和对照组每孔加入 EGF 终浓度为 165 nmol/l(2080kBq),37℃孵育 10min、20min、30min、40min、50min、60min、90min、120min、180min、240min 后终止培养,测定并计算不同培养时间的细胞摄取率。

1.2.2 体外细胞放射性滞留实验 同摄取实验步骤, 加入 131I-EGF 和培养液 (EGF 终浓度为 165nmol/l,2080kBq)分别孵育 90min 后,去培养液,并用 PBS 洗涤 3 次,重新加入培养液后培养 5min、10min、30min、1h、2h、3h、6h 终止培养。消化细胞后离心沉淀,共洗涤 3 次,洗涤方法同摄取实验。分别测量上清液与细胞的放射性,计算示踪剂在不同时间点的细胞内滞留率。以孵育时间为横坐标,细胞滞留率为纵坐标绘制细胞放射性滞留曲线。

1.3 *动物实验*

1.3.1 放射性体内分布实验 体重 100~150g 的 Wistar 大鼠 16 只,每只大鼠右股内侧皮下注射 0.1ml C6 细胞溶液(1.0×10^7/ml)。2 周后,股内侧的肿瘤长大至 0.5~1cm 大小左右。随机取 12 只(分 4 组,每组 3 只)作放射性分布实验,另 4 只作 SPECT 显像。经尾静脉每只荷瘤鼠注入 3.7MBq ^{131}I-EGF,分别在注射后 30min、2h、6h、12h 各处死 3 只,取血、心脏、肝、肾、脑组织、胃、脾、肠、肺及瘤组织称重,并测量其放射性计数(cpm),计算出各器官在各时相每克组织摄入的百分率(%ID/g),(n=3,$\bar{x}\pm s$)。

1.3.2 SPECT 显像 每只荷瘤鼠(共 4 只)与正常对照 Wistar 大鼠 (共 4 只) 尾静脉注射 3.7MBq ^{131}I-EGF,12h 行 SPECT 显像。条件为高能通用型平行孔准直器,矩阵 256×256,放大倍数为 1,采集计数为 40×10^4。

2 结 果

2.1 ^{131}I-EGF 的标记率和稳定性

^{131}I-EGF 室温放置 5min、3h、6h、24h 进行 TLC 分析,然后测定各峰的放射性活度,观察标记 EGF 的离解变化。^{131}I-EGF 在 24h 内稳定性实验的结果:5min 标记率为 76.29%,3h 为 74.14%,6h 为 73.58%,24h 为 70.67%, 提示室温条件下 ^{131}I-EGF 在 24h 内基本稳定。

2.2 体外细胞放射性摄取与放射性滞留实验

2.2.1 体外细胞放射性摄取实验 C6 细胞和对照细胞在 90min 时对不同浓度 ^{131}I-EGF 的摄取率见图 1,C6 细胞对 ^{131}I-EGF 的摄取率在各个浓度点均明显高于对照组。图 2 示 C6 细胞对 ^{131}I-EGF 摄取率随时间延长逐渐增加,在 90min 时摄取率基本达高峰,而对照细胞对 ^{131}I-EGF 摄取率随时间延长基本无变化。

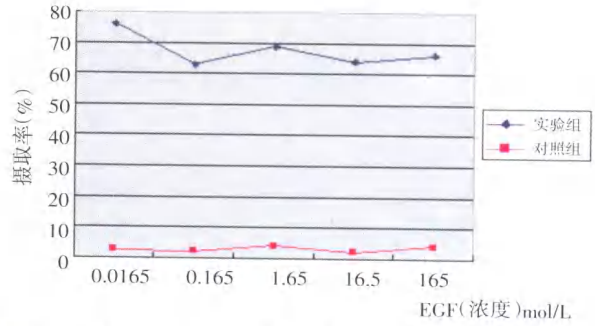


图 1 C6 和对照组细胞对不同浓度 ^{131}I-EGF 的摄取(n=3)

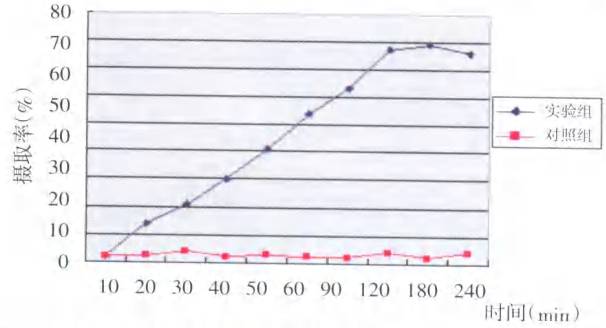


图 2 C6 和对照组细胞在 EGF 终浓度为 165nmol/l,培养不同时间对 ^{131}I-EGF 的摄取率(n=3)

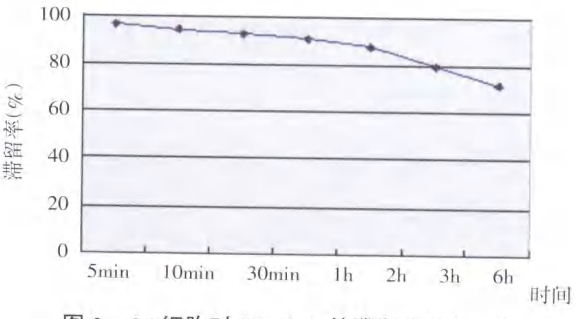


图 3 C6 细胞对 ^{131}I-EGF 的滞留实验(n=3)

2.2.2 体外细胞放射性滞留实验 C6 细胞对 ^{131}I-EGF 的滞留实验见图 3,C6 细胞与 ^{131}I-EGF 孵育不同的时间,^{131}I-EGF 滞留率随着时间的延长而呈缓慢下降的趋势。

2.3 *动物实验*

2.3.1 放射性体内分布 每只荷瘤鼠经尾静脉注入

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 ^{131}I-EGF 在荷瘤鼠体内的放射性分布%ID/g(组织)(n=3,$\bar{x}\pm s$)

器官	注射后时间			
	30min	2h	6h	12h
肿瘤	0.236±0.059	0.295±0.039	0.374±0.026	0.385±0.026
血液	0.162±0.022	0.102±0.013	0.066±0.010	0.065±0.013
脑	0.041±0.007	0.040±0.005	0.033±0.004	0.031±0.006
胃	0.133±0.020	0.088±0.016	0.072±0.009	0.062±0.007
肝	5.683±0.719	6.387±0.578	7.540±1.830	6.859±1.710
脾	6.255±1.278	6.502±1.110	6.081±1.512	6.284±1.289
肾	6.499±0.060	10.500±1.056	8.366±1.638	0.306±0.078
心脏	0.121±0.018	0.103±0.017	0.077±0.007	0.066±0.008
肠	0.149±0.026	0.156±0.027	0.109±0.031	0.102±0.027
肺	0.143±0.022	0.137±0.022	0.120±0.024	0.106±0.032

3.7MBq ^{131}I-EGF，各组织器官在 30min、2h、6h、12h 的放射性分布(%ID/g)见表 1。从表中可见，在各个时间点，^{131}I-EGF 主要分布在荷瘤鼠肝、脾、肾等组织，瘤区放射性分布较高，脑组织最低。随时间延长肿瘤组织放射性分布逐渐增加，在 12h 时达最高。

2.3.2 T/NT 比值 由图 4 可见各组织器官的 T/NT 放射性比值随时间延长逐渐增高，说明放射性示踪剂逐渐浓聚在肿瘤组织。同时在 12h 时具有较高的瘤/血比值，因此 SPECT 显像时间定在注射示踪剂后 12h 进行。

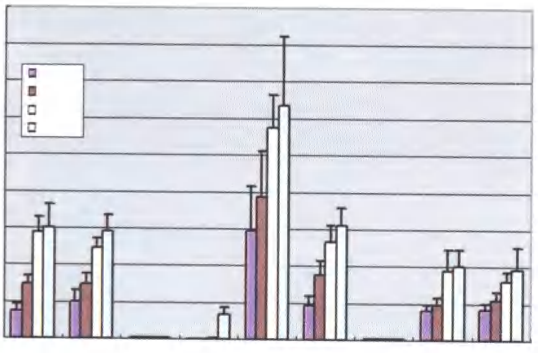


图 4 注射 ^{131}I-EGF 后不同组织在 30min、2h、6h、12h 的 T/NT 放射性比值

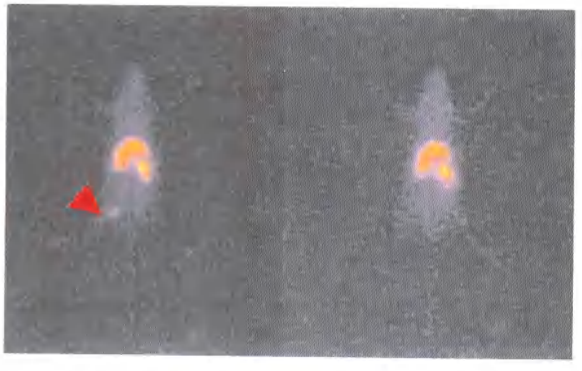


图 5 注射 3.7MBq ^{131}I-EGF 后 12h 的荷瘤鼠(左)与正常对照鼠(右)SPECT 显像

2.3.3 每只荷瘤鼠与正常对照鼠尾静脉注射 ^{131}I-EGF 3.7MBq，12h 后置 Siemens Diacam 型 SPECT 下进行扫描，获得的 SPECT 显像图清晰(图 5)，瘤组织和肝脾组织放射性分布较高，轮廓完整。

3 讨 论

现已证实 EGFR 基因是神经胶质瘤最常见的扩增基因，大约 1/3 的胶质瘤细胞有该基因扩增，Takahashi 等发现 EGFR 在胶质瘤中表达可高出正常脑组织的 100 倍，且肿瘤组织的分化程度、大小、阶段、有丝分裂指数和复发等特征均与 EGFR 的密度有显著的正比关系[2]。因此，有学者提出了 EGFR 可成为定向肿瘤诊断、治疗的靶点[3,4]。

EGF 作为肿瘤特异性诊断、治疗的配基，具有分子量小、易进入肿瘤细胞、在细胞内停留时间可满足诊断和治疗的需要等特点。^{131}I-EGF 经鼠尾静脉注射后，血液中清除快，心、胃、肠和肺等组织随着时间延长放射性摄取逐渐降低，无明显的放射性浓聚。正常脑组织摄取 ^{131}I-EGF 较其他组织的摄取明显降低。从 T/NT 分析，各组织的 T/NT 均随着时间的延长而明显升高，故认为 ^{131}I-EGF 具备从血液清除率高和亲肿瘤组织的特性，在肿瘤组织的浓聚能力较强，能满足临床显像的需要。

12h 的荷胶质瘤鼠显像图示：股内侧的肿瘤组织放射性浓聚，略呈椭圆形，边缘组织的放射性略低于瘤区中心，与左股内侧、对照组相应部位及上下邻近部位放射性摄取比较均明显增强；肝脾组织显影清晰，位置、形态正常，放射性明显增加，且较肿瘤组织的放射性明显；其余组织放射性分布均匀，无明显的放射性聚集；血液本底放射性可见。因此显像总体效果较好。

胶质瘤是中枢神经系统最常见、最难治的恶性肿瘤，虽然诊断技术在过去的 10 年中有长足的进步，但是临床上胶质瘤的诊断尚无一种特异性诊断方法[5]。本文用 ^{131}I 标记 EGF 进行胶质瘤的诊断，具有较高的临床实用价值，为胶质瘤的定性显像诊断与靶向治疗[6]进行了有益的探索。但是 ^{131}I-EGF 要

(下转第 499 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

院 PA 引起的医院感染进行回顾性分型研究。结果 24 株 PA 全部能产生指纹图谱，分型率为 100%. RAPD 分型结果既表现种系发育过程的相互联系，也反应不同克隆之间存在的差异，从而可鉴定不同菌株在基因水平上的差异[8]。

从图 1 可知三位不同病区的住院病人六株 PA 出现的相同基因型，由此我们可推测这株 PA 在不同的科室间发生了传播，引起了院内的交叉感染。临床上往往只重视个体患者的治疗，忽略了病房中可能存在的交叉感染的传播媒介。因 PA 在医院内环境中广泛分布，可见于医院各个角落。通过于医护人员的手、病床、病房空气或其他患者，各种医疗器械如：吸痰管、吸氧管、胃管、湿化瓶、气管套管、呼吸机管道、导尿管等共同媒介物的进行外源性传播，而病人免疫功能低，体质弱，又不规则长期使用抗生素导致再次感染发生的可能性就很大，常可在不同科室的住院病人间暴发流行[9]。因此阻断外源性传播媒介，是控制医院感染的重要环节。

图 1 所示患者连续监测的五株 PA 中，ACDE 株得到完全相同的指纹图谱，而 B 株图谱发生了跳跃性的变化，说明此患者感染的 PA 出现两种型别，不同 PA 的感染可能有两方面原因，一为由院外带入、病区菌库，另一为 PA 的基因突变的.前者是由于共同媒介物所致，后者则是由于不合理使用抗生素，导致耐药基因发育过程中发生了突变，从而使指纹图谱发生了的跳跃性的变化。

因此为了有效控制医院感染的发生。我们应从这两方面着手：通过洗手、消毒、隔离等手段，切断交叉感染的传播途径，阻断外源性传播媒介；临床与实验室密切配合，以病原菌的药敏结果指导临床合理的使用抗生素[10]。只有处理好这些引起外源感染和内源感染的因素才能科学有效的控制医院感染的爆发。

参 考 文 献

[1] 马王玲，魏殿军.铜绿假单胞菌分型方法研究进展[J].江西医学检验，2003；21(3)：189-191.

[2] 吕火祥，孙明洪，刘建栋，等.协同法过筛检测金属酶的研究[J].中华检验医学杂志，2002；25：232-235.

[3] Arakawa Y，Shibata N，Shibaynama K，et al.Covenient testfor screening metallo-p-lactamase—produicing Gram-negativebacteria by usingthiol compounds[J].J Clin Microbiol，2000；38(1)：40-43.

[4] Reboli AC，Houston ED，Monteforte JS，et al.Discrimination of epidemic and sporadic isolates of Acinetobacter baumannii by repetitive element PCR—mediated DNA fingerprinting[J].Clin Microbiol，1994；32(11)：2635.

[5] 张凤凯，Malcom G，PageP，等.铜绿假单孢菌对 B-内酰胺酶类抗生素耐药性决定因素的研究[J].中国抗生素杂志，2000；25(5)：362-367.

[6] Saino Y，Kobayashi F，Inoue M，et al.Purification and properties of inducible penicillin beta—lactamase isolated from Pseudomonas mahophilia[J].Antimicrob Agents Chemother，1982；22(4)：564-570.

[7] 沈定霞，罗燕萍，崔 岩，等.分离产金属酶的铜绿假单胞细菌[J].中华感染杂志，2004；14(1)：86-88.

[8] Nordmnn P.Poirel L.Emerging carbapenemases in Gram - neagtlve aerobes[J].Clin Microbiol Infect，2002；8：321-331.

[9] Berthet FX，Rasmussen PB，Rosenkrands I，gt al.A Mycobac—terium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10)[J].Micro-biology，1998；144(Pt 11)：3195-3203.

[10] ChuY，Afzal-ShahM，Houan，et al.Nip4，a novemota18-obeta-act8m Behom mosocomialAcinetobae ter spp.collectedinHongKOngbe-tween1994and1998[J].Antimicmb Chemother，2001；45：710-714.

(上接第 469 页)

应用于临床还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 张永学，主编.实验核医学[M].北京：人民卫生出版社，2002.

[2] Jose B.Why the epidermal growth factor receptor.The rational for cancer therapy[J].Oncologist，2002；7(4)：2-8.

[3] Ciardiello F，Tortora G.A novel approach in the treatment of cancer：Target the epidermal growth factor receptor [J].Clin Cancer Rev，2001；51(2)：474-477.

[4] Mendelsohn J，Baselga J.Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer[J].J Clin Oncol，2003；21(14)：2787-2799.

[5] 石全红，支兴刚.Surviving 在脑胶质瘤中的表达及其与 bcl-2，bax 相关性的研究[J].重庆医科大学学报，2005；(3)：386-389.

[6] Grunwald V，Hidalgo M.The epidermal growth factor receptor：a new target for anticancer therapy [J].Curr Probl Cancer，2002；26：109-164.