DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.004
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004 

文章编号:1000-5404(2004)14-1235-04

论著

# $^{131}$Ⅰ-KDR单克隆抗体抑制荷人膀胱癌SCID小鼠瘤体生长的实验研究

王 源,程绍钧 (第三军医大学西南医院核医学科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨$^{131}$Ⅰ标记抗KDR单抗对SCID小鼠人膀胱癌皮下移植瘤模型瘤体生长的抑制作用。方法 在复制SCID小鼠人膀胱癌皮下移植瘤模型的基础上,用$^{131}$Ⅰ标记抗KDR单抗3G9,尾静脉注射荷瘤SCID小鼠作为实验组,以非标记抗KDR单抗3G9及生理盐水尾静脉注射荷瘤SCID小鼠作为对照组及空白组,观察$^{131}$Ⅰ标记抗KDR单抗对SCID小鼠人膀胱癌皮下移植瘤模型瘤体生长的抑制作用。结果 $^{131}$Ⅰ-3G9尾静脉注射荷瘤SCID小鼠后3周,移植瘤瘤体内癌组织可见大片坏死,对照组移植瘤瘤体内癌组织也可见部分坏死,与空白组相比实验组与对照组对瘤体生长大小的抑制率分别为96.8%和87.7%。结论 $^{131}$Ⅰ-抗KDR单抗对肿瘤的抗血管生成治疗有潜在的临床应用前景。

关键词:单克隆抗体;放射免疫疗法;血管生成;膀胱癌
中图法分类号:R73-354;R730.51;R737.14 文献标识码:A

# Growth suppression effect of $^{131}$I-labeled anti-KDR monoclonal antibody on tumor tissue of human bladder cancer subcutaneously implanted in SCID mice

WANG Yuan, CHENG Shao-jun (Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To study the growth suppression effect of $^{131}$I-labeled anti-KDR monoclonal antibody on the tumor tissue of human bladder cancer subcutaneously implanted in SCID mice. Methods The SCID murine model was established by subcutaneous implantation of human bladder cancer in mice. The $^{131}$I-labeled anti-KDR monoclonal antibody (3G9) was injected into the caudal vein of mice (experimental group). The anti-KDR monoclonal antibodies and saline were injected into the caudal vein of the mice (control group and blank group, respectively). The growth suppression effect of $^{131}$I-labeled anti-KDR monoclonal antibody on the tumor tissue of SCID mice bearing human bladder cancer was observed. Results Tumor tissue necrosis was found in the mice of the experimental group and the control group at 3 weeks after the injection. Compared with that in the blank group, the growth suppression ratio in the experimental group and the control group were 96.8% and 87.7%, respectively. Conclusion $^{131}$I-labeled anti-KDR monoclonal antibody may be of potential clinical significance in the anti-angiogenesis therapy for human cancer.

**Key words**: monoclonal antibody; radioimmunotherapy; angiogenesis; bladder cancer

1971年,Folkman首次提出了"肿瘤生长依赖于血管生成"的观点以来,肿瘤血管生成在恶性肿瘤发病过程中的作用以及抗肿瘤血管生成对恶性肿瘤的治疗作用的研究引起了越来越多的学者的兴趣,并取得了很大的进展。

血管生成是指从原有的血管网通过芽生方式形成新的血管的过程。肿瘤生长过程中存在两个阶段—血管前期和血管期[1]。血管前期是指在肿瘤发生的早期,局部几乎无新生血管形成的阶段。此时肿瘤细胞的增殖率和死亡率相近,肿瘤体积难以超过1~2 mm$^3$,也极少发生转移。血管期的特点是肿瘤局部有大量的新生血管形成。此期肿瘤呈指数性生长,并向周围组织浸润。

在促进肿瘤血管生成的多种细胞因子中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)发挥了重要作用。VEGF的特异性受体Flt-1和KDR均特异性表达于肿瘤血管内皮细胞,二者激活后的生物

作者简介:王 源(1973-),男,四川省南溪县人,硕士,实验师,主要从事肿瘤放射导向治疗等方面的研究,发表论文5篇,现在第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室。电话:(023)68752313

收稿日期:2003-11-10;修回日期:2004-02-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

效应不尽相同，通过不同的途径对血管生成过程起正性调节作用。VEGF 及其受体在包括乳腺癌、消化道肿瘤、泌尿生殖系统肿瘤、脑肿瘤以及头颈部肿瘤在内的多数肿瘤中的表达明显增高[2~8]。

本研究通过建立荷人膀胱癌移植瘤 SCID 小鼠模型，以 $^{131}$I 标记抗 KDR 单克隆抗体(3G9)，观察 $^{131}$I-3G9 对荷瘤小鼠移植瘤瘤体生长的抑制作用，探讨将放射免疫方法引入抗肿瘤血管生成治疗的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

抗 KDR 单抗(3G9)由北京肿瘤防治研究所提供，Na $^{131}$I 由中国原子能科学研究院同位素所提供，Iodogen 为上海试剂一厂产品，SephadexG25 为 Pharmacia 公司产品，SN682γ 计数器为中国科学院上海原子核研究所日环仪器厂产品。

### 1.2 细胞和动物

人膀胱癌 T24 细胞由重庆市超声研究所提供，SCID 小鼠，由第三军医大学实验动物中心提供。

### 1.3 荷人膀胱癌移植瘤 SCID 小鼠模型的复制

按照李忠俊等[9]的方法取 15 只 4~6 周龄的 SCID 小鼠，雌雄不拘，体质量 15~20 g，于 SPF 条件下层流架中饲养。每周在无菌条件下定期更换无菌笼具、饮用水、垫料等。常规方法培养 T24 细胞，制备细胞悬液，调整细胞浓度为 $1\times 10^7$/ml，每只 SCID 小鼠在无菌条件下于背部注射细胞悬液 0.2 ml，整个注射过程在 3 min 内完成。小鼠分为 3 组，每组 5 只，继续在 SPF 条件下饲养，定期观察小鼠生长、成瘤情况，测量瘤体大小。

### 1.4 鼠抗人、鼠 KDR McAb(3G9)的 $^{131}$I 标记及标记抗体体外活性检测

按 Iodogen 法常规标记鼠抗人、鼠 KDR McAb(3G9)计算标记率、放射化学纯度、放射性比活度、放射性浓度。

常规培养膀胱癌细胞系(T24)、正常人体膀胱细胞，用 DMEM 完全培养基制备细胞悬液，调整细胞浓度为 $1\times 10^6$/ml，两种细胞悬液分别装入 6 支以消毒灭菌的 γ 射线定标仪专用试管内(1 ml/支，共 12 支)，12 支试管分为 A、B(T24 细胞)，C、D(正常膀胱细胞)4 组。A、C 两组每试管加入 $^{131}$I-3G9 20 μl；B、D 两组每试管加入 $^{131}$I-3G9 20 μl 以及等质量的非标记 3G9，摇匀，常规培养 12 h，每隔 2 h 轻微振荡一次，培养 12 h 后测量每试管总 CPM 计数，所有试管 1 000 r/min 离心 5 min，去上清，沉淀用 PBS 洗涤 3 次，最后测沉淀物 CPM 计数。按如下公式计算体外细胞结合率，每组分别计算出 3 支试管的平均值。

体外细胞结合率(%)＝沉淀物 CPM 计数/各支试管总 CPM 计数×100%

### 1.5 $^{131}$I-3G9 抑制荷瘤 SCID 小鼠瘤体生长的实验观察

当移植瘤体积生长至 1~1.5 cm$^3$，将随机分为 3 组的 SCID 小鼠设定为实验组、非标记抗体对照组及空白对照组，实验前 3 d 用 1%无菌碘化钾代替饮水，以封闭甲状腺对 $^{131}$I 的吸收。用非标记抗体(1 mg/ml)调整标记抗体的浓度为 500 μg/ml，实验组各只小鼠分别从尾静脉注射 200 μl 标记抗体；对照组注射等浓度等体积的非标记抗体；空白对照组注射等体积的生理盐水。小鼠继续在 SPF 条件下饲养，每隔 3 d 测量瘤体大小。4 周后取小鼠肝、脾、肾等重要脏器以及瘤体部位组织行病理切片观察。

### 1.6 统计学方法

采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 荷人膀胱癌移植瘤 SCID 小鼠模型的建立及瘤体生长情况

15 只 SCID 小鼠皮下接种 T24 细胞后均成功长出移植瘤，小鼠饮食、精神等状况良好，瘤体生长较快，每两天用游标卡尺测量瘤体长径(a)、短径(b)，以公式 $V=1/2ab^2$ 计算瘤体包块的体积(V)大小，以时间(d)为横坐标，体积(V)为纵坐标，绘制 V~d 曲线图。

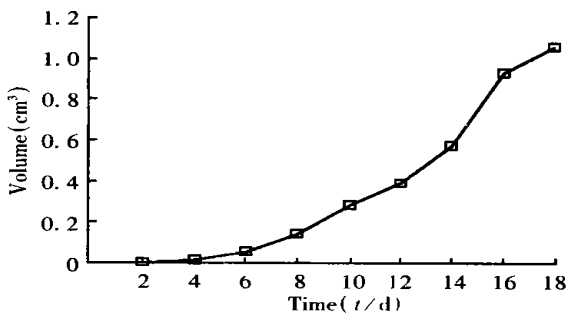



图 1 SCID 小鼠移植瘤生长曲线(5 只小鼠平均值)

**Fig 1 Growth curve of transplanted tumor in SCID (average of 5 mice)**

### 2.2 $^{131}$碘标记抗 KDR 单抗及标记抗体免疫活性检测

同期标记的两批抗体标记率分别为 87.4%、89.1%；放射性比活度分别为 $1.62\times 10^6$、$16.5\times 10^6$ Bq/μg，两批标记抗体蛋白峰管合并后共计 1.5 ml，三氯醋酸法测定其放化纯度为：96.25%，纸层析法测的其放化纯度为：95.70%，放射性比活度为 $1.63\times 10^6$ Bq/μg，放射性浓度为 $6.51\times 10^8$ Bq/ml；通过体外竞争结合试验测得体外细胞结合率分别为 60.4%、26.9%(竞争结合组)，该结果表明 Iodogen 法 $^{131}$I 标记 3G9 保持有良好的免疫结合特性，标记抗体与 KDR 受体呈特异性结合。

### 2.3 $^{131}$I-3G9 抑制荷瘤 SCID 小鼠瘤体生长的实验观察

标记抗体经非标记抗体稀释，以及通过体外免疫活性检测，按照 $^{131}$I 的半衰期 T1/2＝8 d 换算，实际注入实验组 SCID 小鼠标记抗体的量为 55 MBq·100 μg$^{-1}$·只$^{-1}$。实验组 SCID 小鼠在注射标记抗体后第 2 天移植瘤停止生长，第 4 天瘤体体积有明显减小，3 周后移植瘤瘤体体积为 0.14 cm$^3$，按照公式：抑制率＝(空白组瘤体体积－实验组瘤体体积)/空白组瘤体体积，(以上体积均为各组 5 只小鼠均值)计算出实验组小鼠瘤体抑制率为 96.5%；非标记抗体对照组在注射后第 4 天后瘤体体积开始减小，3 周后移植瘤瘤体体积为 0.52 cm$^3$，瘤体抑制率为

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

82.5%。瘤体生长抑制曲线见图 2。

由图 2 可看出实验组及非标记抗体对照组相对于空白对照组均表现出明显的抑制瘤体生长的作用(3 周后以瘤体体积作统计学分析 $F=338.98$, $P<0.001$); 实验组瘤体抑制效果优于非标记抗体对照组($P<0.05$), 且实验组较早表现出抑制瘤体生长作用。

组织学观察: 肿瘤标本切片经 HE 染色, 用 $^{131}$I-3G9 治疗后的肿瘤切片见瘤巢少, 松散, 广泛机化坏死灶(见图 3A 箭头所示); 非标记抗体对照组的肿瘤切片瘤巢较少, 排列不紧密, 可见部分机化坏死灶(见图 3B 箭头所示); 空白对照组的肿瘤切片瘤巢丰富, 排列紧密, 少见坏死灶(见图 3C 箭头所示)。各组小鼠肝、脾、肾等重要脏器病理切片均未见异常。

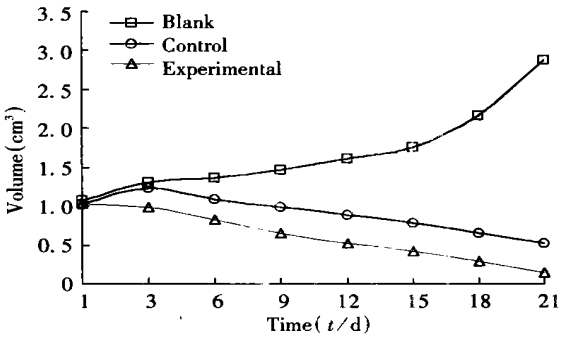
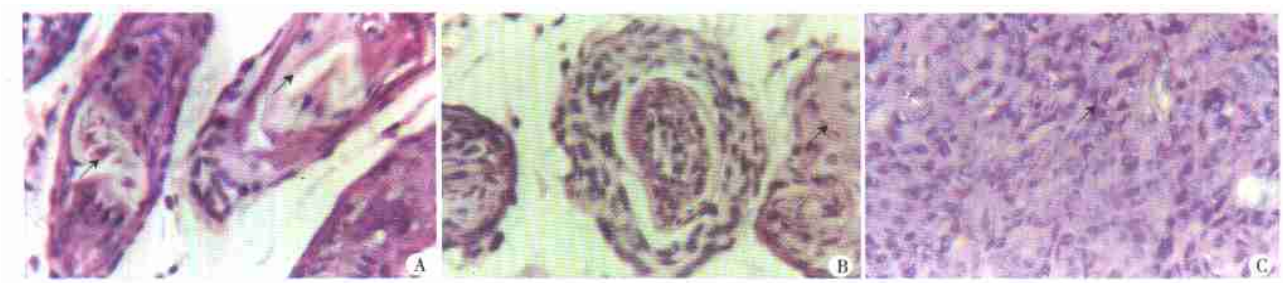



图 2　瘤体生长抑制曲线

**Fig 2　Repression curve of tumor growth**




A: Experimental group　Extensive organized necrotic foci; B: Control group　Partial organized necrotic foci (↑); C: Blank group　Large number of closely arranged tumor nests closely arranged (↑)

图 3　瘤体的病理学改变 (HE× 400)

**Fig 3　Histopathological changes of the tumor (HE× 400)**

## 3　讨论

本研究以肿瘤细胞及瘤体组织的血管内皮细胞表面 KDR 受体作为靶点。人 VEGFR-Ⅱ即 KDR 仅特异地表达于肿瘤血管内皮细胞及肿瘤细胞的表面, 与 VEGF 有很高的亲和力, 二者结合后能促进新生血管的形成及肿瘤细胞的生长、转移[10]。KDR 属于细胞表面酪氨酸激酶受体, cDNA 全长 4 230 bp, 编码 1 354 个氨基酸, 含有胞外 7 个免疫球蛋白样区域, 跨膜区和胞内激酶区[11], 其中Ⅰ ~ Ⅳ免疫球蛋白样区为 VEGF 与 KDR 结合的位点, 本研究使用的 KDR 单抗 3G9 是以原核表达的 KDRⅠ ~ Ⅳ区融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 用杂交瘤技术制备抗 KDRⅠ ~ Ⅳ的 McAb[12], 分子量较小, 与 KDR 受体结合特异性高, 能较好的竞争抑制 VEGF 与 KDR 的结合。

有研究表明, 多种肿瘤细胞表面均表达 KDR 受体, 使得肿瘤细胞的生长繁殖受到 VEGF 的自分泌调节, 其中以膀胱癌 T24 细胞的表达强度最高[13], 本研究选用 T24 细胞建立荷人膀胱癌移植瘤 SCID 小鼠动物模型, 以 $^{131}$Ⅰ标记 KDR 单抗, 利用单抗与 KDR 受体特异性结合特性, 一方面 KDR 单抗与 VEGF 竞争结合 KDR 受体, 抑制肿瘤血管生成的信号传递; 另一方面单抗将 $^{131}$Ⅰ带到肿瘤细胞及瘤体组织的血管内皮细胞表面, 利用 $^{131}$Ⅰ的 γ 射线可对瘤体进行分布定位(另文发表), 同时 $^{131}$Ⅰ的 β 射线对瘤体细胞及瘤体组织血管内皮细胞造成辐射损伤。将抗肿瘤血管生成治疗与肿瘤放射免疫治疗结合, 有效地抑制了瘤体的生长。

## 参考文献:

[1] Folman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumor angigenesis[J]. Takematsu Symp, 1991, 22(HD): 339-344.

[2] Abdulrauf S I, Edvardsen K, Ho K L, *et al*. Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival inpatients with low-grade astrocytoma[J]. J Neurosurg, 1998, 88(3): 51-56.

[3] Crew J P, O. Brien T, Bradburn M, *et al*. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer[J]. Cancer Res, 1997, 57(23): 5281-5285.

[4] Fujisaki K, Mitsuyama K, Toyonaga A, *et al*. Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer[J]. Am J Gastroenterol, 1998, 93(2): 249-253.

[5] Hyder S M, Murthy L, Stancel G M. Progress in regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(3): 392-398.

[6] Eisma R J, Spiro J D, Kreutzer D L. Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Am J Surg, 1997,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

174(5): 513－517.
[7] Lee S S, Joo Y S, Kim W U, *et al*. Vascular endothelial growth factor levels in the serun and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2001, 19(3): 321－324.
[8] Kasama T, Kobayashi k, Yajima N, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 121(3): 533－538.
[9] 李忠俊, 程绍钧. 人浸润性膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立及其 VEGF 的表达[J]. 第三军医大学学报, 2000, 11(22): 1062－1064.
[10] Boocock C A, Charnock Jones D S, Shaukey A M, *et al*. Expression of VEGF and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(7): 506－516.
[11] Terman B I, Dougher-Vermazen M, Carrion M E, *et al*. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 187(3): 1579－1586.
[12] 宋述梅 吴 健. 血管内皮细胞生长因子受体 KDR 胞外配基结合区单抗对内皮细胞增殖及血管形成的抑制[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20(4): 327－331.
[13] 宋述梅, 曾 莉, 吴 健. VEGF 受体 KDR 胞外Ⅴ～Ⅶ区的克隆, 单抗制备及 KDR 在不同来源肿瘤组织中的表达[J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(2): 96－98.

(编辑 薛国文)

# 个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)14-1238-02

## 氨茶碱对幼猪空运高原 1 周后氧动力学的影响

## Effects of aminophylline on oxygen dynamics of young pigs at 1 week after transportation by air to high-altitude area

郑必海[1], 高钰琪[2], 牟信兵[1], 刘福玉[1], 郑建保[1], 周先利[3], 李素芝[1] ([1] 西藏军区总医院全军高山病防治研究中心, 拉萨 850003; 第三军医大学: [2] 高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室, 全军高原医学重点实验室, 重庆 400038; [3] 新桥医院内分泌科, 重庆 400037)

急性高原病的主要原因是高原缺氧, 所以在高原缺氧的治疗中, 纠正氧供需失衡非常重要。氨茶碱在急性高原病的治疗中虽然已是常规用药, 但其对急性缺氧患者的氧动力学的影响少见报道。为了了解氨茶碱对急性缺氧患者氧动力学的影响, 我们对幼猪空运高原 1 周后应用氨茶碱氧动力学的变化进行了研究, 现报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

长白幼猪 8 只(由四川医学实验动物繁育场提供), 雄性, 体质量(11.44±1.55)kg, 身长(75.13±4.88)cm, 月龄 2 个月。由成都(海拔 400 m)经飞机空运至拉萨(海拔 3 658 m, 大气氧分压 97 mmHg), 实验幼猪空运高原 1 周后开始实验。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 动物准备 幼猪于麻醉状态下行气管切开插管, 于右侧股动脉及股静脉插入动脉导管及四腔漂浮导管, 并经传感器接 8 导生理仪。连接心电监护。经气管插管吸入正压空气, 3 L/min。

1.2.2 实验步骤 应用氨茶碱前测定 HR、CO、PAP、AWP 及动脉血 Hb、PH、$HCO_3$、$SaO_2$、$PaO_2$ 及 $PaCO_2$ 作为基础值, 供应用氨茶碱后对比。测定结束后, 经四腔漂浮导管静脉注入氨茶碱, 剂量按 25 mg/kg 计算, 加入 5%葡萄糖稀释到 20 ml, 5 min 静推完毕, 将药物推完后 5、15、30、60、90 min 设为观察时相点, 并测定上述各指标。

#### 1.3 统计学处理

应用 SPSS11.0 软件包进行统计学处理, 组间指标用均 $\bar{x}\pm s$ 表示, 经单因素方差分析(SNK 法)。

### 2 结果

空运高原幼猪应用氨茶碱后氧动力学各参数的变化见表 1。

表 1 空运高原幼猪 1 周后应用氨茶碱动力学的变化情况($\bar{x}\pm s$)

| 项目 | 用药前 | 用药后(min) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 | 15 | 30 | 60 | 90 |
| MPAP(mmHg) | 30.36±4.25 | 23.18±4.65 ** | 25.75±2.93 ** | 26.33±3.93 ** | 26.69±2.77 ** | 24.23±1.66 ** |
| PVR(mmHg) | 637.17±110.68 | 459.25±83.88 * | 509.99±95.61 * | 473.96±107.08 * | 517.95±52.04 * | 596.23±162.66 |
| CO(L/min) | 2.12±0.47 | 2.18±0.28 | 2.40±0.35 * | 2.46±0.48 * | 2.25±0.21 | 2.13±0.52 |
| $DO_2$(L·min$^{-1}$·m$^{-2}$) | 267.64±43.98 | 334.17±25.28 ** | 371.44±37.57 ** | 409.09±64.36 ** | 365.50±76.5 ** | 332.76±49.07 ** |
| $VO_2$(L·min$^{-1}$·m$^{-2}$) | 118.31±21.00 | 128.60±33.57 | 153.32±44.04 * | 181.77±65.29 * | 149.90±44.19 | 129.03±28.38 |
| $O_2$Ext(%) | 0.44±0.07 | 0.39±0.11 | 0.42±0.12 | 0.45±0.13 | 0.40±0.11 | 0.42±0.12 |
| $Q_s/Q_t$ | 0.240±0.017 | 0.234±0.007 | 0.229±0.016 * | 0.223±0.01 * | 0.242±0.043 | 0.236±0.011 |

与用药前比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

作者简介: 郑必海(1971－), 男, 四川省绵阳县人, 医师, 主要从事高原病方面的研究, 发表论文 20 余篇。电话: (089)16253207
通信作者: 李素芝, 电话: (089)16253001

收稿日期: 2003-07-01; 修回日期: 2003-09-28

(下转 1241 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net