DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.022
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0167-03

论著

^{131}I-抗VEGF McAb在荷人膀胱癌裸鼠移植瘤体内分布的实验研究

李忠俊[1],程绍钧[2],王竹筠[1],段前碧[1],段惠玲[1],邹晓光[1],滕本秀[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院输血科,重庆 400037;[2]医学检验系核医学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究^{131}I-sc-7269在荷人膀胱癌裸鼠体内生物学分布情况,探讨^{131}I-sc-7269放射免疫治疗实验性人膀胱癌的可行性。方法 ①Iodogen法标记抗-VEGF McAb(sc-7269);②荷人浸润性膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立;③荷瘤裸鼠^{131}I-sc-7269体内分布实验。结果 ①^{131}I-sc-7269比活度为1.00 MBq/μg(放射性浓度为18.30 MBq/ml),放射性化学纯度为96.20%。②^{131}I-sc-7269在肿瘤组织中浓聚的峰时为注入标记抗体后96 h,此时各组织T/NT比值为最高。结论 ①采用Iodogen法标记的^{131}I-sc-7269免疫活性无改变;②^{131}I-sc-7269动物模型肿瘤/膀胱放射性峰时出现在96 h,比值高达6.44,为应用^{131}I-sc-7269放射免疫治疗人膀胱癌的研究提供了实验依据;③本实验研究为进一步开展应用放射性核素标记McAb(sc-7269)放射免疫治疗(RIT)与放射免疫导引手术(RIGS)治疗膀胱癌的实验研究奠定了基础。

关键词:膀胱癌;血管内皮生长因子;动物/裸小鼠;单克隆抗体(McAb);放射性核素
中图法分类号:R737.14;R817 文献标识码:A

Experimental study on biodistribution of ^{131}I-labeled anti-VEGF monoclonal antibody in nude mice bearing human bladder cancer

LI Zhong-jun, CHENG Shao-jun, WANG Zhu-jun, DUANG Qian-bi, DUANG Hui-ling, ZHOU Xiao-guang, TENG Ben-xiu (Department of Blood Transfusion, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the biodistribution of ^{131}I-sc-7269 in nude mice bearing human bladder cancer, and explore the feasibility of radiation therapy with ^{131}I-anti-VEGF McAb(sc-7269) to treat experimental human bladder cancer. Methods ①sc-7269 was labeled with Na ^{131}I by using the Iodogen method. ②A nude mice model which bearing T24 cells derived from human bladder cancer was established. ③ The biodistribution experiment on ^{131}I-sc-7269 in nude mice bearing human bladder cancer was carried out. Results ①The specific activity of ^{131}I-sc-7269 was 1.00 MBq/μg, and radioactive concentration of ^{131}I-sc-7269 was 18.30 MBq/ml. The radiochemical purity of ^{131}I-sc-7269 was 96.20%.② The biodistribution experiment showed that the peak time of ^{131}I-sc-7269 concentrating in the xenograft was about 96 h after injection, when the radioactive ratios between tumor and various tissues were the highest. Conclusion ①The immune activity of the ^{131}I-sc-7269 labeled with Na^{131}I using the Iodogen methed does not change. ②The highest T/NT radioactive ratio of ^{131}I-sc-7269 in nude mice bearing human bladder cancer(6.44) occurs 96 h after injection. ③The results of present study establish a foundation for future study of using ^{131}I-sc-7269 radioimmunotherapy and radioimmunoguided surgery for bladder cancer.

Key words: bladder cancer; vascular endothelial growth factor; animal/nude mice; monoclonal antibody; radionuclide

为了应用携带核素弹头的抗血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)McAb进行肿瘤生长抑制的实验研究,我们设计了^{131}I-抗-VEGF McAb(sc-7269)荷人膀胱癌裸鼠移植瘤动物模型体内动态分布的实验研究。本实验旨在研究^{131}I-sc-7269在荷瘤裸鼠体内的组织分布情况,为进一步应用标记抗体^{131}I-sc-7269进行人膀胱癌荷瘤裸鼠移植瘤模型放射免疫治疗的实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 T24为浸润性人膀胱癌细胞系,新桥医院泌尿外科易善红硕士惠赠。

1.1.2 实验动物 BALB/c nu/nu裸小鼠12只,本校实验动物中心提供。

1.1.3 主要试剂 鼠抗人血管内皮生长因子单克隆抗体(Sc-7269)为Sant cruz公司产品;Na^{131}I:中国原子能研究院(无还原剂、无载体);Iodogen(四氯二苯基甘脲):美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 荷人膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立 具体方法参见文献[1]。在进行动物体内分布实验的前3~4 d在饮用水中加入1% KI,以阻断甲状腺对放射性碘的摄取。

1.2.2 鼠抗人、鼠血管内皮生长因子McAb(sc-7269)的^{131}I标记 我们应用Iodogen法碘化标记鼠抗人、鼠VEGF McAb(sc-7269)[2]。sc-7269:35.0 μg,Na^{131}I:92.5 MBq,Sephadex G-50层析柱上分离纯化标记产物,绘制洗脱曲线。标记产物的标记率、放射浓度按下列公式计算:

$$\text{标记率}=\frac{\text{蛋白峰各管放射性计数的总和}}{\text{蛋白峰加游离峰放射性计数之和}}\times 100\%$$

$$\text{放射浓度}=\frac{\text{投入的}^{131}\text{I 总量}\times\text{标记率}}{\text{蛋白峰收集液总量(ml)}}$$

作者简介:李忠俊(1974-),男,湖南省隆回县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤血管生成方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68755794

收稿日期:2001-03-06;修回日期:2001-06-26

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

标记产物^{131}I-sc-7269 放化纯度的测定采用三氯醋酸法。

蛋白峰收集液应用 RM905 放射性活度计测量标记产物的活度，根据投入的抗体的总化学量计算比活度。

蛋白峰收集液过滤除菌后用于下一步实验。

1.2.3 ^{131}I-sc-7269 在荷瘤裸鼠体内的组织分布实验 12 只荷瘤裸小鼠在接种 T24 细胞 4 周以后进行实验。在实验前 4 d 在裸小鼠饮水中加入 1% 碘化钾以封闭甲状腺对放射性碘的摄取。无菌条件下自荷瘤裸小鼠尾静脉注射^{131}I-sc-7269 约 0.777 MBq，时间约 3 min。裸小鼠继续在 SPF 条件下饲养，定期观察裸小鼠生长情况。在 24、48、96、168 h 各时相点分别随机取 3 只裸小鼠，10% 乌来糖腹腔内注射麻醉，摘眼球取血，取肿瘤、肝、肺、心、肾、肠、对侧大腿肌肉、脾、膀胱等组织。电子天平称重。在 FH 463A 自动定标器上测定各组织每分钟的放射性计数（cpm），计算各组织的比放射性（cpm/g），计算瘤/非瘤（Tumor/Non-tumor，T/NT）比值：

$$T/NT=\frac{\text{肿瘤组织的比放射性(cpm/g)}}{\text{非瘤组织的比放射性(cpm/g)}}$$

1.3 统计学分析

结果均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，并采用 t 检验行显著性分析。

2 结果

2.1 McAb sc-7269 的^{131}I 标记

^{131}I 分两次用 Iodogen 法标记总量为 35.0 μg 的 McAb（sc-7269）。标记产物采用新华滤纸行纸层析，根据公式计算其标记率为 27.46%，比活度为 1.00 MBq/μg。三氯醋酸法测定平均放化纯度为 96.20%。两次标记的蛋白峰收集液共 2.0 ml，其平均放射浓度为 18.30 MBq/ml。

2.2 ^{131}I-sc-7269 在荷瘤裸鼠体内的组织分布

经尾静脉注射^{131}I-sc-7269 后，24、48、96、168 h 荷瘤裸鼠膀胱癌 T/NT 比值，见表 1。

表 1 荷瘤裸鼠体内组织分布指数 T/NT 比值表（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 T/NT of ^{131}I-sc-7269 in nude mice with bladder cancer（$\bar{x}\pm s$）

	24 h	48 h	96 h	168 h
Blood	1.41±0.64	2.61±0.36△	3.81±0.26 *	3.14±0.72
Liver	1.33±0.32	2.65±0.13△	3.62±0.27 *	3.56±0.25
Kidneys	0.85±0.26	1.58±0.20△	2.19±0.22 *	1.76±0.27
Spleen	1.98±0.17	2.99±0.30△	3.75±0.26 *	2.82±0.49
Lungs	1.82±0.92	3.40±0.23△	4.71±0.23 *	4.57±0.18
Heart	1.60±0.42	2.71±0.39△	3.57±0.31 *	4.34±1.45
Intestine	2.34±1.13	5.22±0.86△	7.78±0.66 *	7.49±2.51
Bladder	1.83±0.34	3.29±0.23△	6.44±1.29 *	4.47±0.37
Muscle	3.47±0.18	4.65±0.23△	11.92±1.53 *	8.75±3.26

△：$P<0.05$ *vs* 24 h；*：$P<0.05$ *vs* 48 h

3 讨论

抗体的同位素标记技术中最重要的是要保持抗体尤其是 McAb 的生物、免疫学活性，否则即使标记工作做得再好也无法将标记抗体应用于下一步的实验或临床领域。在蛋白质多肽的碘化标记过程中，一般要求碘化标记产物的放射性化学纯度在 95% 以上。我们应用三氯醋酸法测定标记 McAb ^{131}I-sc-7269 的放射性化学纯度在 95% 以上，符合应用于实验的条件。我们应用放射性活度计测定或公式计算其放射性比活度，得到其平均放射性比活度为 1.00 MBq/μg[2]。

血管新生化在实体瘤的生长过程中起关键作用。在血管生成的复杂过程中有多种血管生成相关因子参与，这些因子由肿瘤细胞及浸润于肿瘤组织中的巨噬细胞、白细胞等分泌，能促进新生血管生成，其中 VEGF 是血管生成中最重要的血管生成因子，其作为一种内分泌性因子，是内皮细胞的特异性有丝分裂原，在肿瘤的血管生成中发挥重要作用。应用这一基础，国内外许多学者进行了抗 VEGF McAb 的研制工作，并将抗体初步应用于抗肿瘤治疗的实验研究中，在多种肿瘤生长抑制实验研究中都有明显效果[3~7]。应用抗-VEGF McAb 抑制肿瘤内的 VEGF 诱导的新生血管形成是一种新的肿瘤治疗方法，但是在临床应用之前该领域的实验研究将具有重要意义。

我们的实验结果表明裸鼠体内组织分布指数 T/NT 比值的测定显示^{131}I-sc-7269 能特异性地聚集在肿瘤局部，注射标记抗体以后，T/NT 比值随观察时间的延长而升高，24、48、96 h 三个时相点之间各组织器官 T/NT 是呈逐渐上升趋势，除瘤/肾比值未能在 48 h 时相点达到 2.0 以上以外，其余各 T/NT 比值都达到 3.0 以上，经统计学分析，各组织 T/NT 比值的升高有统计学意义，说明 T/NT 比值随时间延长而升高不是简单的平均值升高而是在统计学上有显著意义的上升趋势，所有 T/NT 比值在 96 h 均达到最高点，且均在 2.0 以上，最大的瘤/肌肉比值在 96 h 时相点达到 11.92，其中瘤/膀胱比值在 96 h 达到 6.44，这说明^{131}I-sc-7269 在肿瘤局部浓聚程度最高的时间为注射标记抗体后 96 h。而 T/NT 比值在注射标记抗体^{131}I-sc-7269 96 h以后即出现下降，但在统计学上无显著性意义。出现这种现象可能与以下原因有关：①一定时间以后，肿瘤局部提供与^{131}I-sc-7269 这种特异性抗体结合的靶抗原位点逐渐减少，随^{131}I 的物理与生物学衰减，导致在肿瘤局部沉积的^{131}I-sc-7269 特异性抗体相对量减少，这样 T/NT 可能出现降低；②标记的特异性抗体^{131}I-sc-7269 的免疫活性在体内随时间延长而逐渐降低，逐渐丧失与肿瘤的特异性结合作用，随血象清除，导致 T/NT 比值下降。因此使用同位素标记抗体进行肿瘤放射免疫显像，一般有最佳显像时间，而不同抗体其最佳显像时间可能不一致。本次实验中动物体内组织分布测定结果显示肿瘤最佳定位时间为注射标记抗体^{131}I-sc-7269 后 96 h，提示：^{131}I-sc-7269 在实验动物体内对移植瘤具有一定的导向定位作用，在肿瘤局部有特异性浓聚。但为了降低最佳显像时的血象“本底”，标记抗体的最适用量尚有待研究确定。

膀胱癌癌组织的 VEGF 表达水平高于周围正常组织[8~10]。这为应用抗-VEGF McAb 进行膀胱癌的治疗研究提供了前提条件。抗体直接与肿瘤发生反应；且

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

在循环中不会被降解稀释；交叉反应被消除；而且膀胱自身并不吸收抗体，人抗鼠免疫球蛋白反应削弱，所有这些条件为使用抗-VEGF McAb 研究膀胱癌创造了可能。为进一步开展应用放射性核素标记 McAb（sc-7269）放射免疫治疗（RIT）与放射免疫导引手术（RIGS）治疗膀胱癌的实验研究奠定了基础。

参考文献：

[1] 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，2000，26(11)：1 062－1 064.
[2] 程绍钧，余裕民. 检验核医学[M]. 重庆：重庆大学出版社，1999. 43－62.
[3] Asano M, Yukita A, Matsumoto T, *et al*. An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity *in vivo*[J]. Hybridoma, 1998, 17(2): 185－190.
[4] Asano M, Yukita A, Suzuki H. Wide spectrum of antitumor activity of a neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor [J]. Jpn J Cancer Res, 1999, 90(7): 93－100.
[5] Kanai T, Konno H, Tanaka T, *et al*. Anti-tumor and anti-metastatic effects of human-vascular-endothelial-growth-factor-neutralizing antibody on human colon and gastric carcinoma xenotransplanted orthotopically into nude mice[J]. Int J Cancer, 1998, 77(6): 933－936.
[6] Luo J C, Toyoda M, Shibuya M. Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody[J]. Cancer Res, 1998, 58(12): 2 594－2 600.
[7] Pham C D, Roberts T P, van Bruggen N. Magnetic resonance imaging detects suppression of tumor vascular permeability after administration of antibody to vascular endothelial growth factor[J]. Cancer Invest, 1998, 16(4): 225－230.
[8] Campbell S C, Volpert O V, Ivanovich M, *et al*. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(6): 1 298－1 304.
[9] Ogura Y, Sato K, Kato T, *et al*. Immunohistochemical analysis of expression of angiogenic factors and tumor angiogenesis in superficial bladder cancer[J]. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi, 1998, 89(5): 529－537.
[10] Droller M J. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer[J]. J Urol, 1998, 160(5): 1 932－1 936.

（编辑 潘式文）

文章编号：1000-5404(2002)02-0169-01

个案与短篇

肺癌伴胸腔积液 60 例胸膜活检结果分析

Analysis of pleural needle biopsy in 60 cases of lung cancer complicated with pleural effusion

李学军[1]，崔社怀[2]（第三军医大学：[1]附属西南医院呼吸内科，重庆 400038；[2]附属大坪医院野战外科研究所呼吸内科，重庆 400042）

收集我院 1993－1998 年 60 例肺癌伴胸腔积液的患者胸膜活检的资料，现分析报告如下。

1 临床资料

本组病例男 44 例，女 16 例，男女比例为 2.75∶1。年龄 24～87 岁，平均年龄 53.5 岁。单纯肺癌伴胸腔积液或其它部位转移者 48 例（80%），肺癌合并其它肺部疾病者 12 例（20%）。胸膜活检针采用改良的 Abram 胸膜活检针，体位采取直立坐位，病情严重者可采用半卧位。除部分包裹性积液、少量胸腔积液由 B 超定位穿刺外，其余病例穿刺点选择按常规，操作步骤也按正规程序进行。

2 结果

2.1 实验室检查结果

胸腔积液根据 X 线或 B 超定量，其中大量胸水 25 例（41%），中量胸水 25 例（41%），少量胸水 10 例（18%）。血癌胚抗原（CEA）检测 33 例，仅 1 例＜5 ng/ml，其余在 5.21～54.4 ng/ml，平均 18.20 ng/ml。胸水 CEA 检测 44 例均高于正常，其中＞100 ng/ml 者 10 例。胸水乳酸脱氢酶（LDH）检测 34 例，均高于正常（147～1 047 IU/L），平均 412.2 IU/L。

2.2 病理学结果

所有病例均为初次诊断并获细胞学类型。其中经纤支镜检查 33 例，胸水脱落细胞检查 53 例，通过上述方法未获病理学证据的经皮肺活检 3 例，经淋巴结穿刺活检 5 例，均有阳性结果。具体结果，见表 1。

表 1 60 例肺癌并胸腔积液的病理诊断

病理细胞学分类	胸膜活检	经纤支镜肺活检	胸水脱落细胞检查	淋巴结穿刺检查	经皮肺穿刺检查
鳞癌	14	6	1	4	2
腺癌	16	4	4	1	1
小细胞肺癌	5	5			
癌疑	10	3	5		
阴性	15	13	39		
其它		2（腺鳞癌）	4（间皮细胞）		
合计	60	33	53	5	3

2.3 胸膜活检结果

所选 60 例经胸膜活检确诊肺癌者 35 例（58.3%），癌疑 10 例（16.7%），阴性 15 例（25%）。其中肺癌的细胞学类型分别为：腺癌 16 例，鳞癌 14 例，小细胞肺癌 5 例。胸膜活检情况见表 2。本组病例中腺、鳞癌检出率较高，分别占经胸膜活检确诊

（下转 172 页）

作者简介：李学军（1970－），女，重庆市人，硕士研究生，主治医师，主要从事肺纤维化方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023)68754000-73053
收稿日期：2000-10-28；修回日期：2001-06-05

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