DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.030
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1315-03

论著

抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体放射免疫显像的实验研究

王细文[1],梁 平[1],韩本立[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院肝胆外科,重庆 400037;[2]附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要: 目的 检验制备出的抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体经同位素标记后用于胆管癌放射免疫显像诊断的特异性。方法 将纯化的抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体经^{131}I标记后,注射于荷人胆管癌移植瘤的裸鼠体内,研究标记抗体在荷瘤裸鼠体内组织分布,并于不同时相点在SPECT下观察裸鼠移植瘤的放射免疫显像效果。结果 ①裸鼠移植瘤的放射免疫显像效果良好,在各时相点中,以96 h时相点显像效果最佳;② 注射放射性标记抗体96 h后,肿瘤组织有标记抗体特异性浓聚,T/NT比值达到峰值。结论 制备出的抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体在人体胆管癌的放射免疫显像诊断中具有良好的应用前景,值得进一步研究。

关键词:胆管癌;单克隆抗体;移植瘤;放射免疫显像
中图法分类号:R392.2;R446.6;R735.804 文献标识码:A

Experimental radioimmunoimaging studies of a monoclonal antibody for human cholangiocarcinoma related antigen

WANG Xi-wen, LIANG Ping, HAN Ben-li (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the diagnostic specifity of radioimmunoimage with ^{131}I labelled anti-human cholangiocarcinoma related antigen monoclonal antibody McAb2F4E8. Methods Purified ^{131}I labelled monoclonal antibody McAb2F4E8 was injected into the peritoneal cavity of nude mice bearing human bile duct carcinoma xenograft. The nude mice were examined under SPECT to measure the radioactivity of tumor xenograft and the normal organs, and the tumor tissue/nontumor tissue (T/NT) ratio in different tissues 24 h, 48 h, 96 h, 168 h after injection. Results Imaging of xenograft bile carcinoma became increasingly distinct in contrast with the nonspecific background fading, especially in the period of 48~96 h. The best result of imaging of the human bile duct carcinoma xenograft in nude mice was found at 96 h, and T/NT ratio was the highest at 96 h. Conclusion McAb2F4E8 is a highly specific monoclonal antibody for human bile duct carcinoma tissue, it might be useful in the clinical immunoradioactive diagnosis and immune therapy of human bile duct carcinoma.

Key Words: bile duct carcinoma; monoclonal antibody; carcinoma xenograft; radioimmunoimaging

胆管癌是一种比较少见的消化道恶性肿瘤。近年来,其发病率逐年上升[1]。依现有的统计资料分析,我国胆管癌的发病率明显高于国外[2]。虽然胆管癌分化好,生长缓慢,但由于胆管癌的早期诊断困难,故胆管癌的切除率低,预后不佳,平均生存期为6~12个月。而5年生存率为(0~16.5)%。手术切除后生存期较姑息手术者长[3~4]。如能早期明确诊断,从而提高胆管癌病人的切除率,病人的预后将明显得到改善。

从20世纪80年代中期开始,国外学者利用单克隆抗体技术对胆管癌患者血清和胆汁的肿瘤标记物进行检测,结果表明,CEA及CA19-9、CA125等肿瘤标记物在胆管癌病人的血清中显著升高[5~7]。然而这些肿瘤标记物对胆管癌并无特异性,它们只能在胆管癌已经非常大且伴有远处转移时才能检测出其浓度升高。因此针对这些肿瘤标记物的单克隆抗体无法用于胆管癌单抗放免显像的早期诊断。为此我们用人胆管癌细胞株培养细胞为免疫原免疫BALB/c小鼠后进行细胞融合及筛选,获得了1株分泌抗人胆管癌单克隆抗体细胞株。对该细胞株分泌的单克隆抗体进行鉴定后,我们利用该单克隆抗体进行了人胆管癌的放射免疫显像实验研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂

Iodogen(Sigma)、Na ^{131}I(中国原子能研究所)、Sephadex G-50(Farmacia)。

1.2 胆管癌细胞株

人胆管癌细胞株SK-CHA-1由第三军医大学附属西南医院陈华博士赠予。

1.3 单克隆抗体

抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体McAb2F4E8由我们自制[8]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670713)
作者简介:王细文(1964-),男,湖北省鄂州市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤免疫学方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68755232
收稿日期:2000-12-21;修回日期:2001-04-30

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

1.4 实验动物

4~6周龄BALB/c nu/nu裸小鼠由第三军医大学实验动物中心提供。

1.5 方法

1.5.1 Iodogen法标记单克隆抗体 在含有50 μg Iodogen的塑料试管中加入150 μg/100 μl纯化的抗人胆管癌相关抗原单克隆抗体McAb 2F4E8和50 μl的PB(0.5 mol/L, pH 7.6), 加7.4×10^7 Bq $Na^{131}I$充分混匀, 室温反应15 min, Sephadex G-50柱分离纯化标记产物, 计算McAb 2F4E8的^{131}I标记率, 标记产物的比活度及放射性浓度。

1.5.2 标记产物放化纯度的测定 从蛋白峰收集液中, 取10 μl, 加入100 μl 2.0%牛血清白蛋白混匀, 加入两滴15%的三氯醋酸混匀, 测总放射性(A), 2 500 r/min离心10 min, 弃上清, 测沉淀的放射性(B), 计算出标记产物的放化纯度与游离碘率

1.5.3 标记产物的免疫活性鉴定 ^{131}I-McAb 2F4E8免疫活性鉴定采用测定体外细胞结合率的方法。用含^{131}I-McAb 2F4E8的DMEM完全培养液培养人胆管癌细胞株SK-CHA-1; 含^{131}I-McAb 2F4E8的RPMI-1640完全培养液培养人肺腺癌细胞株A549, 测定该标记产物的体外细胞结合率。

1.5.4 裸鼠移植瘤模型的建立 取4~6周龄的BALB/c nu/nu裸小鼠, 雌雄不拘, 无菌条件下在其背部右侧注射培养的人胆管癌细胞悬液, 按0.2 ml/只的剂量注射, 每只裸小鼠注的细胞数目约2×10^6。接种瘤细胞的裸小鼠继续在无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)条件下的层流架中饲养。4周后, 待包块长到约1 cm^3左右时用于免疫显像研究及标记抗体组织分布研究。

1.5.5 ^{131}I标记的McAb 2F4E8放射免疫显像研究 取4只荷瘤裸鼠(肿瘤包块约1 cm×1 cm×1 cm左右), 实验前4 d用1%KI饮用水封闭裸鼠甲状腺。用0.25 ml的注射器按0.2 ml/只(约3.7 MBq/只)注入经75%酒精消毒后的小鼠腹腔, 注射后小鼠仍在SPF条件下饲养, 分别于注射后24、48、96、168 h进行SPECT显像(Camstar 4000, 美国GE公司364KV, 20%道宽, 采集计数为5×10^5计数)。

1.5.6 ^{131}I标记的McAb 2F4E8在荷瘤裸鼠体内的组织分布实验 取12只荷瘤裸鼠(肿瘤包块约1 cm×1 cm×1 cm左右), 实验前4 d用1%KI饮用水封闭裸鼠甲状腺。用0.25 ml的注射器按1.2 MBq/只注入经75%酒精消毒后的小鼠腹腔, 注射后小鼠仍在SPF条件下饲养, 分别于注射后24、48、96、168 h取肿瘤、血、肝、肠、肾、肌肉等组织, 用于计算各组织的肿瘤组织/非肿瘤组织(T/NT)比值, 每时相点取荷瘤裸鼠3只。

1.6 统计学处理

采用t检验。

2 结果

2.1 单克隆抗体McAb 2F4E8的^{131}I标记

Iodogen固相法碘化标记McAb 2F4E8, 经Sephadex G-50分离纯化标记产物。150 μg的2F4E8标记率为16.53%, 放射性比活度为0.082 MBq/μg蛋白, 蛋白峰收集液的放射性浓度为12.23 MBq/ml, 放化纯度95.3%, 游离碘率为4.7%。

2.2 ^{131}I-2F4E8的免疫活性鉴定结果

免疫活性鉴定结果显示, 标记产物与Sk-CHA-1细胞株结合率为46.3%±4.4%, 与A549细胞株结合率为8.6%±0.9%, 经统计分析, 两者差异显著($P<0.01$)。

2.3 ^{131}I-McAb 2F4E8荷人胆管癌裸鼠模型SPECT显像结果

4只裸鼠经腹腔注射^{131}I-McAb 2F4E8后, 分别于24、48、96、168 h行SPECT显像。结果显示: 24 h肿瘤部位有放射性浓聚, 但本底较高, 肿瘤显像不清晰。48 h本底降低, 肿瘤显像较24 h清晰。96 h肿瘤显像更清晰, 本底进一步降低。168 h肿瘤显像变淡, 见图1(A~D)。

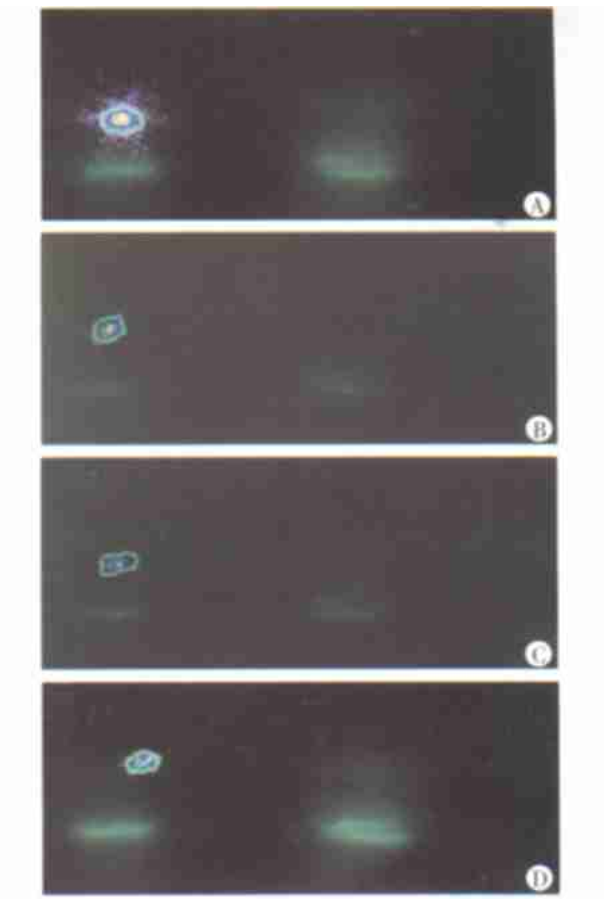


图1 注射标记抗体后, 人胆管癌移植瘤显像结果

Fig 1 Radioimmunoimaging of human bile duct carcinoma xenograft

A: 24 h; B: 48 h; C: 96 h; D: 168 h

2.4 ^{131}I-McAb 2F4E8在荷瘤裸鼠体内组织分布

24、48、96、168 h, T/NT比值结果见表1。t检验结果表明48 h时相点与24 h时相点之间、96 h时相点与48 h时相点之间及96 h时相点与24 h时相点各T/NT比值差异显著($P<0.05$)。

表1 胆管癌组织/非瘤组织(T/NT)比值($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Tumor/nontumor ratio in various tissues ($\bar{x}\pm s$)

Tissue	24 h	48 h	96 h	168 h
Blood	1.90±0.46	2.86±0.24	4.28±0.72	4.13±0.35
Liver	1.54±0.18	2.13±0.21	3.79±0.35	3.64±0.19
Intestine	2.78±0.15	3.46±0.27	5.74±0.32	5.62±0.65
Kidney	2.48±0.13	3.21±0.23	4.02±0.51	3.89±0.38
Muscle	2.93±0.42	3.65±0.11	4.93±0.22	4.83±0.50

Statistic results show T/NT ratio between 24 h group and 48 h group, 96 h group and 48 h group, 96 h group and 24 h group has significant difference($P<0.05$)

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

3　讨论

将放射性核素与抗肿瘤单克隆抗体结合, 经一定途径引入体内, 放射性标记的单克隆抗体可与肿瘤细胞相应的抗原结合, 从而使肿瘤部位放射性聚集。体外用 γ 照相机或 SPECT 系统采集病人的放射性信号, 经图像处理后, 即可获得有关肿瘤部位、大小及范围的信息, 这种影像诊断技术称为放射性免疫显像(Radioimmunoimaging, RⅡ)。RⅡ的成功应用取决于所选用的单克隆抗体及放射性核素, 并与用药途径有一定的关联。采用的抗体特异性强, 亲和力高, 则 RⅡ的灵敏度、特异性及诊断准确率就好。放射性核素的选择, 则依不同的使用目的而异。

由于 RⅡ是一种以肿瘤相关抗原为靶的功能显像方法, 就大多数疾病而言, 病变部位的功能性变化往往先于其解剖结构的改变, 肿瘤的产生、复发与转移也往往如此。在常规检查所能发现的亚临床病灶形成过程中, 分布于恶性细胞表面及其周围间质中的肿瘤相关抗原可以达到足够的水平, 因而这类亚临床病灶可被检出。从临床研究结果来看, RⅡ在肿瘤的诊断中确实存在着其优势[9~10]。

应用 RⅡ检查胆管癌的文献报道不多[11], 这可能由于针对胆管癌的单克隆抗体较少。为了探讨单克隆抗体 McAb 2F4E8 用于胆管癌放射免疫显像的可行性, 我们用 Zodogen 固相法对该单克隆抗体进行了 ^{131}I 标记, 并检测抗体标记率、标记抗体的放化纯度, 以及标记单抗的免疫活性。将标记单抗注入荷瘤裸鼠腹腔后, 我们于 24、48、96、168 h SPECT 检查裸鼠的肿瘤显像结果。从实验结果看出, 标记的 McAb 2F4E8 免疫活性无明显丢失。标记的 McAb 2F4E8 进行的免疫显像结果显示, 48 h、96 h 时相点肿瘤部位有标记抗体浓聚, 此时正常组织显像较淡, 故肿瘤部位显像较清晰。从荷瘤裸鼠免疫显像结果分析, 我们认为 McAb 2F4E8 特异性强, 效价高, 在胆管癌的诊断、治疗及基础研究中有较好的应用前景。是一种值得进一步实验应用于人胆管癌放射免疫显像检查的单抗。但由于动物与人体在生物代谢等因素上存在明显差异, 其最终应用于临床检查的效果如何, 尚有待进一步的实验检验。抗体进入肿瘤组织的一个主要障碍是肿瘤的微循环系统不利于完整的免疫球蛋白分子进入肿瘤组织。大部分的研究表明, HAMA 反应主要是由完整的鼠源抗体的 Fc 段引起的。通过基因克隆技术, 人们可以制备出单链抗原结合蛋白分子, 这种蛋白质分子由抗体轻链、重链可变区以及一个联结多肽组成。这些单抗片段都保留有抗原结合特异性, 但具有更高的血浆清除速率, 并明显降低了抗原性。单抗片段理论上的优势包括: 增加了对肿瘤组织的穿透能力; 由于血浆清除速率增高, 特异性抗体片段的肿瘤潴留量相对增加, 这使得核素或毒素结合抗体的毒性降低; 由于缺少 Fc 片段, 抗体的免疫原性降低。许多作者利用同位素标记单抗片段进行的放射免疫显像实验证明, 标记的单抗片段放免显像时间明显缩短, 显像的灵敏度明显提高[12~13]。这或许是将来开发单抗放免显像技术的主攻方向之一。

参考文献:

[1] 王曙光, 韩本立, 蔡景修 等. 肝外胆管癌的外科治疗[J]. 中华医学杂志, 1997, 77(12): 944－947.

[2] 迟彦邦 主编. 实用肝胆外科[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1996. 446－447.

[3] 黄志强 主编. 现代腹部外科学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1995. 500.

[4] 施维锦 主编. 胆道外科学[M] 上海: 上海科学技术出版社, 1993. 229－230.

[5] Bjornsson E, Kilander A, Olsson R. CA19-9 and CEA are unreliable markers for cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis[J]. Liver, 1999, 19(6): 501－508.

[6] Nakeeb A, Lipsett P A, Lillemoe K D, *et al*. Biliary carcinoembryonic antigen levels are a marker for cholangiocarcinoma[J]. Am J Surg, 1996, 171(1): 147－152; 152－153.

[7] Ker C G, Chen J S, Lee K T, *et al*. Assessment of serum and bile levels of CA19-9 and CA125 in cholangitis and bile duct carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1991, 6(5): 505－508.

[8] 王细文, 梁　平, 韩本立. 一株抗人胆管癌相关抗原杂交瘤细胞株的建立及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(2): 619－622.

[9] Kairemo K J. Position emission tomography of monoclonal antibodies[J]. Acta Oncol, 1993, 32(7－8): 825－830.

[10] Macmillan C H, Perkins A C, Wastie M L, *et al*. Immunoscintigraphy of small-cell lung cancer: a study using technetium and indium labelled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody preparations[J]. Br J Cancer, 1993, 67(6): 1 391－1 394.

[11] Kuszyk B S, Soyer P, Bluemke D A, *et al*. Intrahepatic cholangiocarcinoma: the role of imaging in detection and staging[J]. Crit Rev Diagn Imaging, 1997, 38(1): 59－88.

[12] Goldenberg D M, Abdel-Nabi H, Sullivan C L, *et al*. Carcinoembryonic antigen immunoscintigraphy complements mammography in the diagnosis of breast carcinoma[J]. Cancer, 2000, 89(1): 104－115.

[13] Amato R, Kim E E, Prow D, *et al*. Radioimmunodetection of residual, recurrent or metastatic germ cell tumors using technetium-99 anti-(alpha-fetoprotein) Fab' fragment[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126(3): 161－167.

（编辑　陈聪连）

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