DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.024

论著

文章编号:1000-5404(2000)04-0360-03

^{131}I-CEA单抗在荷瘤裸鼠体内分布及治疗结肠癌肝转移的研究

左国华[1],葛海燕[1],黄定德[2],叶恒光[3] (第三军医大学:[1]附属新桥医院普通外科,重庆 400037;[2]医学检验系核医学教研室,重庆 400038;[3]附属新桥医院核医学科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨^{131}I标记抗CEA单抗在裸鼠人结肠癌肝转移模型的体内分布及其抑制肝转移的作用。方法 在建立裸鼠人结肠腺癌肝转移模型的基础上,用^{131}I标记抗CEA单抗COL-1,注射荷瘤裸鼠,观察^{131}I标记抗CEA单抗在荷瘤裸鼠体内分布及抑制肝转移的作用。结果 体外标记抗体特异性结合率为59.9%。在注射^{131}I标记COL-1后24~96 h肝转移灶内均有特异性放射性浓聚,96 h瘤/肝比值为4.21。给予非特异性的^{131}I-NMIgG后,肝转移灶未见放射性浓聚,而呈全身均匀分布。^{131}I-COL-1治疗后3周,肝转移灶内癌组织可见大片坏死,血清CEA水平显著下降,肝转移灶数目及大小的抑制率分别为36.8%和41.7%。结论 ^{131}I-抗CEA单抗对防治 结肠癌肝转移有潜在的临床应用前景。

关键词:单克隆抗体;放射免疫疗法;肝肿瘤/继发性;结肠癌
中图法分类号:R735.350.2;R735.7 文献标识码:A

Distribution of ^{131}I-labeled anti-CEA monoclonal antibody and its therapeutic effect on liver metastasis of human colonic cancer in nude mice

ZUO Guo-hua, GE Hai-yan, HUANG Din-de, YE Heng-guang (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the distribution of ^{131}I-labeled anti-CEA monoclonal antibody and its therapeutic effect on the hepatic metastatic foci of human colonic cancer in nude mice. **Methods** The nude mouse model of human colonic cancer with hepatic metastasis was established. ^{131}I-labeled anti-CEA monoclonal antibodies were injected into the mice. Then, the distribution of the monoclonal antibodies was determined and the feasibility of radioimmuno-therapy for the hepatic metastatic foci of human colonic cancer was observed. **Results** The specific binding rate of the monoclonal antibodies to the cells of colonic cancer in vitro was 59.9%. The radioactivity in the hepatic metastatic foci was measured with a gamma counter 24 to 96 hours after the injection of the anti-CEA monoclonal antibodies. The cancer/liver distribution ratio was 4.21 96 hours after injection while an injection of ^{131}I-NMIgG resulted in an even distribution over the whole body. 3 weeks after injection, more significant inhibition on the number and diameter of the hepatic metastatic foci was observed in the treated mice as compared with the control ($P<0.05$). Serum CEA level was lower in the treated mice, too. Histological examination revealed that there were large necrotic areas in the cancerous foci concentrated with the monoclonal antibodies. **Conclusion** ^{131}I-labeled anti-CEA monoclonal antibodies can be used in radioimmunotherapy for the hepatic metastatic foci of colorectal cancer.

Key words: monoclonal antibody; radioimmunotherapy; metastasis; colonic cancer; nude mouse

本研究报告了^{131}I标记抗癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)单克隆抗体(Monoclonal antibody, McAb)在人结肠腺癌裸鼠肝转移模型的体内分布及放射免疫治疗(Radioimmunotherapy, RIT)的作用,其目的旨在探讨应用RIT治疗人结肠癌肝转移的可行性。

1 材料与方法

1.1 抗CEA McAb和细胞株

鼠抗人CEA McAb COL-1购自北京中山生物技术有限公司,它只作用于CEA的特殊抗原决定簇,与大肠癌组织及细胞有较

作者简介:左国华(1971—),男,湖南省株州市人,硕士,医师,主要从事转移性肝癌方面的研究。电话:(023)68755114-74606
收稿日期:1999-07-19;修回日期:1999-12-22

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

好的选择性结合力[1]。人低分化结肠腺癌细胞系(LS174T)细胞由美国 ATCC 提供,该细胞能分泌 CEA,在接种裸鼠脾脏后,可发生肝转移[2]。细胞常规传代培养。

1.2　人结肠腺癌裸鼠肝转移模型的建立

参照 Giavazzi[3] 的方法建立人结肠腺癌裸鼠肝转移模型。当培养的 LS174T 细胞 80%或接近汇合成片时,胰酶消化,制备细胞悬液,台盼蓝染色测定活细胞率 >95%。调节细胞悬液浓度为 1×10^7/ml。取 4~6 周龄 BALB/C 裸鼠(第三军医大学实验动物中心提供)22 只,雌雄不拘,体重 17~25 g。无菌条件下剖腹,向脾脏内注入制备好的癌细胞悬液 0.2 ml,5 min 后切除脾脏,关腹。术后继续在无特殊病原菌(Special pathogene free, SPF)条件下饲养。

1.3　抗体的标记

采用 Iodogen 法,用 Na^{131}I (中国原子能研究院生产)分别标记 COL-1 和正常小鼠 IgG(NMIgG),过 Sephadex G50 柱分离游离碘。三氯醋酸法测定标记率及放化纯度,过滤除菌后备用。COL-1 和 NMIgG 的 ^{131}I 标记率分别为 47.3%和 59.2%,比放射性分别为 3.29×10^5 Bq/μg 和 3.74×10^5 Bq/μg,放化纯度均 >95%。

1.4　体外细胞结合实验

取培养的细胞系结肠癌(LS174T),肺癌(A549)和人正常肠上皮细胞,分装成 1×10^6/管,各 6 管。每组细胞悬浮于 1 ml 含 10%小牛血清 RPMI 1640 的培养液中。每组 3 管分别加入 ^{131}I-COL-1 或 ^{131}I-NMIgG,摇匀,每 2 h 振荡 1 次,培养 12 h 后,测每管总放射性。离心去上清,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,测沉淀物放射性,计算结合率。

1.5　标记抗体在荷瘤裸鼠体内分布

荷瘤裸鼠随机分为 2 组:^{131}I-COL-1 治疗组(12 只)和 ^{131}I-NMIgG 对照组(10 只)。在手术后第 12 天时自荷瘤裸鼠尾静脉分别注入 300 μCi ^{131}I-COL-1 或 ^{131}I-NMIgG(注射前 2 d 给 1%KI 溶液饮水)。在 24、48、96 h 每组随机取 2 只裸鼠,摘眼球取血后处死,剖腹小心分离出肝转移灶、正常肝组织、肾、肺、脑、肠、肌肉组织,称重。在 FH463A 自动定标器测放射性,计算每克组织放射性(cpm)及 T/NT 比值。

1.6　血清 CEA 测量及病理组织学检查

在治疗后 3 周,余下裸鼠均摘眼球取血,分离血清,用放射免疫法测血清 CEA 含量。断颈处死裸鼠,小心切取肿瘤结节,行肝转移灶计数,并测量每个癌结节直径 3 次,取平均值。部分癌结节用 10%福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察组织结构改变。

1.7　统计学处理

实验数据采用单因素方差分析及 t 检验。

2　结果

2.1　体外细胞结合率

^{131}I-COL-1 与人结肠癌细胞 LS174T 呈特异性结合,其结合率达 59.9%,而与人肺癌细胞 A549 及人正常肠上皮细胞不发生特异性结合。^{131}I-NMIgG 与各组细胞均不发生特异性结合。

2.2　^{131}I-COL-1 和 ^{131}I-NMIgG 在荷瘤裸鼠体内分布

在 24、48、96 h 裸鼠肝转移癌与各组织 T/NT 比值见表 1。从表中可见:^{131}I-COL-1 可选择性地浓聚于肿瘤组织,与 ^{131}I-NMIgG 的全身均匀性分布差异有显著性($P<0.01$),其中最重要的瘤/肝比值为 1.86(24 h)、2.49(48 h)、4.21(96 h),说明 ^{131}I-COL-1 在肝脏中能选择性的与转移癌组织结合。

表 1　^{131}I-COL-1 及 ^{131}I-NMIgG 在荷瘤裸鼠体内的生物学分布(T/NT)

Tab 1　The tumor/non-tumor distribution ratio (T/NT) in nude mice bearing human colon cancer liver metastases after injection of ^{131}I-labeled COL-1 and NMIgG

	^{131}I-COL-1			^{131}I-NMIgG		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
Liver	1.86	2.49	4.21	0.85#	0.95#	1.24#
Lung	1.64	2.50	2.40	0.80	0.94	1.12
Kidney	1.16	1.93	3.20	0.87	0.96	1.60
Muscle	1.08	2.24	3.80	1.20	1.70	1.85
Brain	9.46	10.68	13.03	3.60	5.83	6.42
Intestine	0.98	2.69	3.59	0.89	1.25	1.47
Blood	0.48	1.10	1.92	0.61	0.54	0.52

#: $P<0.01$ *vs* ^{131}I-COL-1

2.3　血清 CEA 含量

经放射免疫法测定,^{131}I-COL-1 治疗组血清 CEA 平均值为(38.2±5.2) μg/ml,^{131}I-NMIgG 组血清 CEA 平均值为(56.7±6.9)μg/ml。两组在统计学上差异有显著性($P<0.01$)。

2.4　荷瘤裸鼠肝转移灶比较

^{131}I-COL-1 治疗后 3 周,肝转移灶数目及大小均明显小于 ^{131}I-NMIgG 组,两者差异具有显著性,见表 2。其中对肝转移灶数目的抑制率达 36.8%($P<0.05$);对肝转移灶大小的抑制率达 41.7%($P<0.05$)。

表 2　2 组荷瘤裸鼠肝转移灶数目及大小比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The number and size of metastatic foci in nude mice with human colon cancer liver metastasis after treatment with ^{131}I-labeled COL-1 and NMIgG($\bar{x}\pm s$)

Group	Number	Size(d/mm)
^{131}I-COL-1	22.0±5.6	1.5±0.4
^{131}I-NMIgG	34.8±7.3	2.4±0.7
P-Value	<0.05	<0.05

2.5　病理组织学改变

注射 ^{131}I-NMIgG 组肝转移癌组织中的癌细胞呈团块状分

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

布，胞浆丰富，核大不规则，核仁明显，可见多核巨细胞，间有腺腔样结构；而采用^{131}I-COL-1治疗组，肝转移癌结节内可见大片状坏死，结构不清，细胞嗜酸性增强，部分瘤结节边缘仅存留少量完整的癌组织。

3 讨论

应用放射免疫疗法来治疗恶性肿瘤是近年来国际上的一个热门研究领域。以往许多学者应用裸鼠皮下移植瘤进行肿瘤放射免疫治疗研究[4]。虽然这一模型易制作，疗效观察简便，但它们多表现为局部生长而无深部侵袭及转移，这与肿瘤的侵袭、转移等生物学特性有很大差异。针对结肠癌高转移率的特点，Kozlowski等[5]提出研究肿瘤肝转移的最佳模式是从脾内植入。近年来国内外相继采用脾脏种植法建立了多种肝转移模型，根据是否切除脾脏分脾脏保留法和脾脏切除法[6,7]。本实验中，我们选择在裸鼠脾内注射人结肠腺癌细胞后切除脾脏的方法建立了裸鼠肝转移模型。此模型的优点是：①避免了脾脏保留法会并发脾脏肿瘤的影响。②能更好地模拟结直肠癌根治术后因血行转移而发生肝转移的临床过程。③肝转移率高。本次实验中所有裸鼠均有肝转移发生，肝转移率达100%。

在肿瘤的导向治疗中，单抗常作为放射性核素的载体。由于LS174T细胞表达CEA，我们应用抗CEA单抗COL-1作为标记^{131}I的载体。在体外实验及体内分布测定均证实，COL-1与肿瘤细胞具有特异性结合力。在注射^{131}I标记抗CEA单抗后96 h瘤/肝比值为4.21，标记的单抗能较长时间（96 h以上）在肿瘤部位保持特异性浓聚。这些结果表明COL-1是一种比较理想的能够与人结肠腺癌肝转移灶特异性结合的McAb。

单抗导向放射免疫治疗具有以下优点：①免疫核素一旦与癌细胞结合，不需内化过程，即可直接发挥杀伤效应。②免疫核素发射的β射线的有效疗程可达几个癌细胞的直径，对周围未结合上免疫核素的癌细胞也具有杀伤作用，特别有利于克服癌细胞表面抗原表达不一致的异质性问题[8]。对于结直肠癌肝转移的放射免疫治疗，Blumenthal等[9]用^{131}I标记抗CEA单抗，GW-39人类结肠癌肝转移模型，结果转移癌的形成由7 d延迟到14 d，有效地阻止了肝内微转移的形成。本实验表明：^{131}I-COL-1治疗后肝转移灶的生长明显受抑制，其中对肝转移灶数目及大小的抑制率分别达46.9%及54.6%，荷瘤裸鼠血清CEA水平显著下降（$P<0.01$），病理组织学检查可见肝转移灶内大片状坏死。说明^{131}I-COL-1对于荷瘤裸鼠的肝转移有一定的治疗作用，^{131}I-抗CEA单抗在临床上对防治结肠癌肝转移有潜在的应用前景。

参考文献：

[1] Zuo R S, David T, Steven H, *et al*. Monoclonal antibody COL-1 reacts with restricted epitopes on carcinoembryonic antigen: an immunohistochemical study[J]. Histochemistry Cytochemisty, 1994, 42(9): 1 215—1 219.

[2] Tibbetts L M, Doremus C M, Tzanakakis G N, *et al*. Liver metastases with 10 human colon carcinoma cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production [J]. Cancer, 1993, 71(2): 315—321.

[3] Giavazzi R, Jessup J M, Campbell D E, *et al*. Experimental nude mouse model of human colorectal cancer liver metastases [J]. J Natl Cancer Inst, 1986, 77(6): 1 303—1 308.

[4] Buchegger F, Pfister C, Foumier K, *et al*. Ablation of human colon carcinoma in nude mice by 131I-labeled monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibody F(ab′)2 fragments[J]. J Clin Invest, 1989, 83(5): 1 449—1 456.

[5] Kozlowski J M, Fidler I J, Campbell D E, *et al*. Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse [J]. Cancer Res, 1984, 44(8): 3 522—3 529.

[6] Morikawa K, Walker S M, Jessup J M, *et al*. In vivo selection of highly metastatic cell from surgical specimens of different primary human colon carcinoma implanted into nude mice[J]. Cancer Res, 1988, 48(7): 1 943—1 948.

[7] Potmesil M, Vardman D, Kozielski A J, *et al*. Growth inhibition of human cancer metastases by CAM in newly developed xenograft models[J]. Cancer Res, 1995, 55(23): 5 637—5 641.

[8] Buchsbaum D J, Langmuir V K, Wessel B W. Experimental radioimmunotherapy[J]. Med Phys, 1993, 20(2 Pt 2): 551—567.

[9] Blumenthal R D, Sharbery R M, Haywood L, *et al*. Targeted therapy of athymic mice bearing GW-39 human colonic cancer micrometastases with ^{131}I-labeled monoclonal antibodies[J]. Cancer Res, 1992, 52(21): 6 036—6 044.

（编辑 冯崇英）

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