

有关癌肿放射免疫探测的若干问题

江苏省原子医学研究所 张守仁综述

杨希震 林祥通*审阅

应用抗肿瘤抗体作为载体,经标记放射性核素后,注入人体,载入相应肿瘤,用 γ 相机进行肿瘤的阳性显像,Goldenberg^[1]称之为癌放射免疫探测(Radioimmunodetection of cancer)。抗肿瘤抗体选择性浓集于产生相应抗原的靶癌组织内,是以肿瘤具有的抗原性为先决条件。为探索肿瘤的特异抗原,肿瘤免疫学家经过了半个世纪的努力,由于未得到肿瘤的特异性抗原,故进展不快。早在1929年Witebsky已描述了肿瘤的抗原特性,但是以免疫反应的高度特异性为基础的亲肿瘤放射免疫探测技术,只是近年来,在免疫学和核医学发展的基础上,才初步具备条件去探索和研究。1978年Goldenberg等人首次将抗CEA(Carcinoembryonic Antigen)抗体作为肿瘤体外探测的示踪剂应用于临床^[1],并于1980年详细报导了142例癌症患者的¹³¹I标记抗CEA抗体放射免疫探测的临床研究^[2]。结果如表1所示,其灵敏度(Sensitivity)

$$= \frac{\text{放免探测阳性病灶数}}{\text{被检的CEA阳性病灶总数}} \times 100, \text{对结直肠癌为85\%, 卵巢癌为88\%, 宫颈癌90\%, 肺癌71\%。其特异性(Specificity) =}$$

$$\frac{\text{放免探测阴性病灶数}}{\text{被检的CEA阴性病灶总数}} \times 100, \text{为83\%~100\%,}$$

作者认为放射免疫探测优于其他检查方法。

在应用放射免疫探测进行人体CEA阳性肿瘤体外探测取得成功的基础上,美国肯塔基大学医学院放射医学系核医学组的Kim等人将山羊抗人AFP(α -Fetoprotein)抗体经纯化、标记¹³¹I后分别给12例、16例癌症患者作 γ 相机的放射免疫探测^[3,4],实验证实,其灵

表1 肿瘤病灶的CEA放射免疫探测结果

诊断	例数	灵敏度（真阳性率）			特异性（真阴性率）	
		原发灶	继发灶	总计	%总计	%
结肠直肠癌	37	9/10	26/31	35/41	85	61/62 98
卵巢癌	19	10/10	11/14	21/24	88	19/21 90
肺癌	13	8/12	4/5	12/17	71	13/14 93
乳腺癌	6	2/5	7/9	9/14	64	9/9 100
胰腺癌	6	3/6	1/2	4/8	50	5/6 83
子宫癌	15	6/8	13/13	19/21	90	17/17 100
其他子宫癌	5	3/3	6/7	9/10	90	4/4 100
胃癌	4	2/3	3/3	5/6	83	3/3 100
混合癌	26	9/21	8/9	17/30	57	41/41 100
淋巴瘤	2	0/2	0/2	0/4	0	3/3 100

敏度为100%。特异性为80%。准确性

$$= \frac{\text{放免探测的真阳性病灶数} + \text{真阴性病灶数}}{\text{受检病灶总数}}$$

$\times 100$,为85%。作者肯定了这项技术的优越性。虽然AFP不是某一肿瘤的特异性标志物,但它在一些类型肿瘤(肝癌、睾丸胚胎癌、卵巢内胚窦瘤)内的含量增加,这就提供了一定程度的放射免疫探测肿瘤的特异性。而用其他放射性核素体外显像技术是难以达到的^[5]。

1980年Goldenberg和Kim等人又报导了把¹³¹I标记的山羊抗HCG(Human Chorionic Gonadotropin)抗体试用于人体^[6]。4例患者中3例血清HCG增高,其原发灶及转移灶均被放射免疫探测所证实,而1例血清HCG阴

• 上海华山医院

性患者,放射免疫探测时,肺部5个转移灶均未显像,作者推断可能该例患者的肿瘤不分泌HCG。

目前国外有关肿瘤放射免疫探测的临床试用,主要局限于能产生CEA、AFP和HCG的肿瘤,估计在170例左右^[6],国内尚未见报导。这项技术的临床发展,仍处于幼年时期。其发展有赖于免疫血清学、免疫化学、免疫遗传学和放射药理学、放射化学、扫描显像技术和计算机科学的发展^[7]。本文就放射免疫探测的若干问题作一综述。

一、关于肿瘤抗原的提取和纯化

为得到抗肿瘤抗体,许多学者用新鲜活肿瘤细胞直接免疫动物^[8],也有用癌组织的匀浆^[9]或粗提液作为免疫原^[10],但其抗原纯度均不理想,为了得到专一性的高滴度抗肿瘤抗体,必须进一步提纯抗原。目前用于放射免疫探测的CEA抗原,是在常规制备的基础上再用亲和层析法纯化。具体操作是取结肠腺癌肝转移灶新鲜癌组织,剔除正常组织后,剪成小块,在匀浆器内捣碎,经细筛过滤去除大部分结缔组织,然后混悬在pH8的0.03M磷酸缓冲液中,再次匀浆及离心,取两次的上清液即为常规制备的CEA提取液^[11]。Krupey等人^[12]用过氯酸分离CEA。因CEA溶于酸,而其他大量蛋白质和不溶于酸的物质均可与CEA分离,多数作者采用此法^[13、14],也有人用二碘水杨酸锂^[15]或用40%的乙醇磷酸缓冲液提取CEA^[16]。用过氯酸沉淀分离法得到的CEA提取液经透析法去除过氯酸及其他低分子物质。近来有作者不用透析法而用三倍量的冷(-20℃)乙醇加入过氯酸提取液中,然后用NH₄OH调pH至7。离心得到沉淀物,经等容量的75%乙醇洗涤,然后经Sephadex 4B层析^[17],用含0.15M NaCl的0.05M pH5.5磷酸钠缓冲液淋洗。许多作者增加一个纯化步骤,即在凝胶过滤之后再经伴刀豆球蛋白A(ConA)-琼脂糖凝胶层析一次^[18、19],通过这种亲和层析法可得到较纯的CEA。

Nishi用免疫沉淀法制备AFP^[20]。将胎

儿血清或确诊肝癌患者的血清免疫家兔。方法系用0.1ml的血清加等量福氏完全佐剂,每周皮下注射3次,末次注射后2周取血,得到抗胎儿血清的抗血清。用正常成人血清3ml吸附抗血清1ml后,得到吸收后的抗血清,再与肝癌患者的血清混合,置37℃下60min,形成抗原-抗体沉淀物,经3000rpm离心15min后,再用0.15M NaCl冷液洗涤3次。得到的沉淀物溶于15倍的0.1M甘氨酸-盐酸缓冲液中(pH1.8),再经10000rpm离心15min,以除去不溶物质。然后将上清液的pH用0.4M Na₂HPO₄调至7.0,使之再形成抗原-抗体沉淀物。溶解和沉淀重复两次,完全除去不纯的抗原和抗体。将得到的抗原-抗体复合物,溶解在0.1M的甘氨酸-盐酸缓冲液(pH1.8)中,并经Sephadex G150柱(2.6×95cm)凝胶过滤。解离的抗原和抗体在以20ml/hr速度下淋洗,每5ml收集一管,每一管用0.4M Na₂HPO₄调至中性,用放免扩散法检测AFP含量,经超过滤法浓集,再通过凝胶柱除去少量的残留抗体,后经透析得到纯化的AFP。随后作者又报导用免疫吸附法制备AFP^[21]。Kim和Goldenberg按此法从肝细胞癌组织中提取AFP,制备抗AFP抗血清后应用于临床。

值得注意的是,在一般的CEA提取液中,含有一组与CEA密切相关的物质,可能CEA本身是化学的和免疫学的多聚体^[22]。目前已知与CEA起交叉反应的抗原有关(NCA(非特异性交叉反应抗原)^[23]、NGP(正常糖蛋白)^[24]、CCA-Ⅱ(结肠癌抗原Ⅱ)^[25]和CE-X(CEA相关蛋白)^[26]等。

用免疫学、分子量测定、氨基酸分析、糖分析的方法比较原发性肝细胞癌患者血清中的AFP和胎儿血清中的AFP,两者无区别^[27~29]。但AFP像大多数糖蛋白一样,有微多相性(Microheterogeneity)的变化,常由于糖结构的多相性所致^[30]。现已对大鼠的AFP的微多相性作了广泛的研究,至少存在9种型式^[27、31]。不同种类动物的AFP也不尽相同。因此AFP的多相性及CEA的多聚体在放射免

疫探测中的影响以及如何进一步提纯, 仍然是一个值得研究的课题。

二、肿瘤抗体的制备、纯化和标记

给异种动物注射肿瘤抗原可产生强烈的免疫反应, 通常用纯化的肿瘤抗原免疫家兔或山羊, 一般4周内每周注射2~3次, 每次注射0.6 ml (含3mg抗原蛋白) 提取液或胎儿血清 (AFP), 并加等量的福氏完全佐剂, 将0.1~0.2ml注入家兔的脚垫内, 余下的注于后肢两侧肌肉内。末次注射后12~14天, 即可放血提取抗血清^[20]。制备抗AFP抗体的常规方法, 即将抗血清10ml, 经DEAE (二乙氨基乙基)-纤维素层析纯化IgG, 随后用AmicoPM-30薄膜浓集得到浓度为4.2mg/ml的纯化抗体溶液。经放免分析, 结合率为50%的最终滴度为 3×10^5 ^[3,4]。抗CEA抗体的制备需用亲和纯化法纯化。纯化后的抗CEA抗血清的滴度为 2×10^6 ^[32], 每ml抗血清中含纯化抗体1.0mg。经氯胺T法标记¹³¹I后^[33], 抗体比放射性为10 μ Ci/ μ g, 含有70%的CEA活性。亲和纯化的¹²⁵I-抗CEA抗体在大鼠移植GM-39肿瘤中的聚集, 比常规纯化法高4倍^[27]。

用改良氯胺T法^[34]标记¹³¹I, 抗AFP抗体的免疫活性不降低, 得到比放射性为每克IgG蛋白5~10Ci。作人体肿瘤阳性显像时, 常用剂量为1~2.5mCi的¹³¹I-抗AFP IgG, 蛋白质含量为130~350 μ g^[3]。有的作者用量为静脉内注入1~4.4mCi (130~590 μ g IgG) 的山羊抗AFP IgG^[4]。选择病人时, 作皮肤过敏试验, 确定无过敏反应, 方可定为放射免疫探测的对象。

三、过敏反应的问题

临床应用的抗肿瘤免疫球蛋白, 均来源于动物, 如家兔和山羊。这种异种蛋白用于放射免疫探测, 给人体作静脉注射, 小剂量应用对人是安全的。1965年Day给患者颈动脉注入家兔抗人脑瘤的免疫球蛋白不超过50 μ g^[10]。1978年Belitsky等人报导用山羊抗人肾细胞瘤抗体给20例病人作静脉注射, 由于其抗血清中特异性抗肿瘤抗体的含量不超过1%, 因而所

用的剂量较大, 为100mg的抗肿瘤球蛋白抗体, 病人也无不良反应^[9]。1980年Goldenberg等人^[2]将山羊抗CEA抗体用于142例病人, 抗体用量为每Kg体重2~3 μ g免疫球蛋白。应用山羊抗人AFP免疫球蛋白量为130~350 μ g^[4], 含放射性量为1~2.5mCi, 均无不良反应, 并成功地进行了肿瘤阳性定位。

随着抗体纯化技术的发展及标记方法的改进, 可望降低标记抗癌抗体的使用量, 因而异种蛋白的过敏反应将有可能减少到最小限度。

四、单细胞株抗体的应用

以常规的或亲和纯化方法制备抗体, 不仅操作较为复杂, 且纯度不够理想。免疫学新发展的杂交瘤引导的单细胞株抗体可提供更好的抗体^[35], 避免在应用常规免疫学方法制备抗血清时所遇到的许多问题^[22]。

生长在组织培养中的骨髓瘤细胞与经过免疫的小鼠脾脏淋巴细胞的融合, 可得到杂交瘤细胞系, 它可产生所希望的特异性抗体。这种融合是以聚乙二醇 (M1500) 为融合剂, 在高速离心下, 使两者融合。在培养液中, 仅融合于杂交瘤细胞中的脾淋巴细胞才能存活, 未融合的脾淋巴细胞不久死亡。未经融合的骨髓瘤细胞也可用特殊试剂杀死。进一步将杂交瘤细胞分离成单个细胞。这些细胞在培养液中, 通过细胞分裂, 进行无性增殖, 直到形成几百万个或几亿个相同的特异性抗体细胞。为了得到仅产生特异性抗体的杂交瘤, 需将瘤细胞配对融合, 瘤细胞本身不产生IgG, 但与脾细胞融合而得到的杂交细胞能专一地分泌特异性抗体^[36]。如果以小鼠作为杂交细胞的宿主, 也可获得几乎纯系的抗血清, 体内培养所得到的抗体产量比体外法约高一千倍^[37]。

单细胞株抗体的应用, 是一种令人鼓舞的进展, 为抗体的制备开辟了一个新途径, 对于肿瘤放射免疫探测的应用提供了良好的基础。

五、循环抗原的影响

将标记抗肿瘤抗体给人体静注时, 必然会考虑到体内循环抗原可能会与相应的标记抗体结合 (中和作用), 而妨碍抗瘤抗体在肿瘤中

的浓集和定位。临床实践已证明抗体被循环抗原部分中和并不阻止抗体的定位。Kim等人报导的16例患癌病人中,2例血清AFP值不增高的患者,其癌瘤得到阳性定位,而血清AFP值增高到15000ng/ml和18000ng/ml(正常为30~40ng/ml^[38~40]以下)的两例癌症病人,用抗AFP抗体作放射免疫探测时也得到阳性显像^[8]。Goldenberg也证实^[1]即使血清CEA增高到350ng/ml(正常为2.5ng/ml^[40])以上或5500ng/ml^[32],也不妨碍标记抗CEA抗体定位于癌瘤病灶。作者认为瘤组织与非瘤组织的计数率比值和血浆内相应抗原含量的高低无明显关系。血浆内肿瘤抗原的水平不直接影响放射免疫探测。

循环抗原的中和作用虽然不完全妨碍癌肿的放射免疫探测,但难以估计循环抗原和抗体反应实际发生的程度。而且免疫复合物的大量形成,不仅可以干扰诊断,特别将大量抗体用于治疗时的过度免疫可导致免疫复合物疾病^[22]。因此有必要作进一步的探索。

Primus等人^[41]对循环免疫复合物作了分析。给癌症病人静注1~2mCi(150~300μg IgG)抗CEA抗体之前及注后1、24、48小时取血浆样品。血浆中CEA含量经放免测定,并将血浆样品经分子筛层析法及固相免疫吸附法分析,证明一部分循环抗原可与静注的抗体形成复合物,但这种免疫复合物不影响癌肿的放免探测。另外也应指出循环抗原对注入的标记抗体的竞争作用,一方面在某种程度上降低了肿瘤的定位,但也可以增强肝、肾对标记物的清除速度^[42],这种净化作用是否有利于肿瘤定位也尚待研究。

六、肿瘤组织/非肿瘤组织(T/NT)

比值与显像技术

标记抗肿瘤抗体在癌肿中特异性的浓集与周围非瘤区的放射性比值,即T/NT,是体外显像的主要因素。用常规的平面放射性核素脏器显像,要求T/NT为8比1^[43],但多数情况下这个比值是达不到的。Kim用抗AFP抗体定位显像时,含AFP癌肿的T/NT为3.20,而

不产生AFP的癌肿的T/NT为1.96^[3]。Goldenberg等人对142例癌症患者作放免探测时,T/NT值平均为1.42^[2]。用标记抗HCG抗体注入癌症患者后T/NT值约1.6左右^[5]。以上这些T/NT值均不够大,用线性扫描仪不能发现肿瘤病灶,即使用γ相机也不能很好解决。为了提高T/NT值,采用延迟扫描时间,以降低非肿瘤区的放射性。一般在注射标记抗瘤抗体后24、48小时才作γ相机显像^[3,4]。

为了早期发现癌肿,对小病灶的发现是放免探测的重点。但以目前来看,肿瘤组织与非肿瘤组织间的对比度仍偏低,因而必须对所用的显像方法作进一步改进。显像装置与计算机系统连接,允许做包括本底扣除的数据处理,增强对比度。为此发展了第二示踪技术,去消除病灶周围非瘤组织的活性。这种应用不同放射性示踪物清除非瘤组织的活性,增加瘤组织活性的方法称之为扣除技术(Subtraction Technique)^[43]。

在体内,¹³¹I-CEA抗体有一定程度的脱¹³¹I存在。这种¹³¹I经循环而分布到非瘤组织中,并转移结合到其他蛋白质上,形成非瘤组织本底。为了减去这种非瘤本底,采用注射第二标记物,使其分布在非瘤组织中,所用核素的物理特性应是γ射线,能量要低于肿瘤示踪物的核素,而且要有足够大的差异,能被γ照相机二道脉冲高度分析器鉴别出来。当用¹³¹I标记的抗瘤抗体时,第二示踪剂一般用^{99m}Tc-人血清白蛋白(0.5mCi)作为血管内成分,^{99m}Tc-高锝酸钠(0.5mCi)作为血管外成分,分别在显像前5、30min给病人静注。同时可得到二种核素(¹³¹I和^{99m}Tc)显像,通过计算机处理,扣除低能^{99m}Tc的图象,降低非肿瘤区的计数,增加T/NT值2.5倍左右,能得到较好的阳性病灶图象,改进病变的检出率^[43]。目前用此法能探测肿瘤病灶的最小直径为2cm^[2]。

综合上述各种技术的发展,标记抗肿瘤抗体有可能成为诊断肿瘤的新途径。尽管肿瘤放射免疫探测目前仅是得到非特异性的肿瘤相关

抗原,而这种可能性也还是存在的。相信随着肿瘤免疫理论研究日益深入,在免疫和显象技术不断改进的条件下,癌肿的放射免疫探测技术将会得到进一步完善和得到临床实践更多的验证。

参 考 文 献

1. Goldenberg DM et al, N Engl J Med 298 : 1384~1388, 1978.
2. Goldenberg DM et al, Cancer Res 40 : 2984~2992, 1980.
3. Kim EE et al, Cancer Res 40:3008~3012, 1980.
4. Goldenberg DM et al, Cancer 45 : 2500~2505, 1980.
5. Goldenberg DM et al, Science 208 : 1284~1286, 1980.
6. Goldenberg DM et al, Transplantation Proc 12 : 188~191, 1980.
7. Goldenberg et al, Cancer Res 40 : 2957~2959, 1980.
8. Goldenberg DM et al, Cancer Res 34 : 1~9, 1974.
9. Belitsky P et al, JNM 19 (4) : 427~430, 1978.
10. Day ED et al, Cancer Res 25 (6) : 773~778, 1965.
11. Gold P and Freedman SO, J Exp Med 121 : 439~621, 1965.
12. Krupey J et al, Nature 215 : 67~68, 1967.
13. Terry WD et al, J Exp Med 136 : 200~204, 1972.
14. Burtin P and Chavanel G, Ann Immuno (Inst Pasteur) 124C : 583~387, 1973.
15. Rosai J et al, Int J Cancer 10 : 357~367, 1972.
16. Duraiswami S IRCS Med Sci 4 : 72, 1976.
17. Pritchard DG and Egan MC, Immunoch-
emistry 15 (6) : 385~387, 1978.
18. Rogers GT et al, Nature 251 : 519~521, 1974.
19. Slayter HS and Coligan JE, Cancer Res 36 : 1696~1704, 1976.
20. Nishi S, Cancer Res 30 : 2507~2513, 1970.
21. Nishi S and Hirai H, Biochem Biophys
Acta 278 : 293~298, 1972.
22. Primus FJ and Goldenberg DM, Cancer
Res 40 : 2979~2983, 1980.
23. Kleist SV et al, Proc Natl Acad Sci,
USA 69 : 2492~2494, 1972.
24. Mach JP and Pusztaszeri G, Immunoche-
mistry 9 : 1031~1034, 1972.
25. Newman ES et al, Cancer Res 34 : 1225~
1230, 1974.
26. Darcy DA et al, Br J Cancer 28 : 147~
160, 1973.
27. Ruoslahti E and Seppälä M, α -Fetoprot-
ein in Cancer and Fetal Development,
in Klein G and Weinhouses S (ed), Ad-
vances in Cancer Research Vol 29 : 276~
336, 1979.
28. Ruoslahti E et al, Int J Cancer 8 : 283-
288, 1971.
29. Hirai H et al, Cancer Res 14 : 19~34,
1973.
30. Clamp JR, Structure and Function of G-
lycoproteins In the Plasma Proteins II
FM Putnam (ed) Academic New York,
163~211, 1975.
31. Smith CJ and Kelleher PC, Biochem Bi-
ophys Acta 317 : 231~235, 1973.
32. Deland FH et al, Compr Ther 5 : 31-36,
1979.
33. Primus FJ et al, Cancer Res 33 : 2977~
2982, 1973.
34. McConahey PJ and Dixon FJ, Int Arch
Allergy Appl Immunol 29 : 185-189, 1969.
35. Herlyn M, Cancer Res 40 (10) : 3602~
3609, 1980.
36. Shulman M et al, Nature 276 : 269~270,
1978.
37. 李振甲等, 放射免疫分析法手册137页, 科学技术
文献出版社, 1978.
38. Waldman TA et al, Cancer 34 : 1510~
1515, 1974.
39. Ravry M et al, J Nat Cancer Inst 52 :
1019~1021, 1974.
40. McIntire KR et al, Cancer Res 35 : 991~
996, 1975.
41. Primus FJ et al, Cancer Res 40 : 497~
501, 1980.
42. Hoffer PB et al, JNM 15 (5) : 323~327,
1974.
43. Deland FH et al, Cancer Res 40 : 3046~
3049, 1980.