

## 预定位技术在肿瘤放射免疫显像中的应用

北京解放军总医院 韩 冰综述 刘成贵 周 前\*审

**提 要:**传统的放免显像所应用的抗体都是直接针对肿瘤抗原的,而且放射性核素与抗体的交联是通过化学的方法在体外进行。预定位技术(也称体内标记技术)则是将未标记的抗体先期注入体内,待其与肿瘤结合、正常组织本底消退后,再注射有标记核素的小分子物质,通过不同的机制,使其在体内结合,从而达到肿瘤显像的目的。本文介绍了各种预定位技术的发展过程及其在肿瘤放免显像中的应用效果。

大量的动物实验与临床应用的结果显示,放射免疫显像技术(RII)对恶性肿瘤的定位诊断,特别是复发癌和转移癌的早期发现有着独到的作用,可成为临床肿瘤诊断的有力的辅助手段。但是,RII应用中仍存在着一些急待解决的问题,其中的主要问题之一是正常组织脏器的本底放射性较高,影响肿瘤组织与正常组织的放射性对比,使体积较小及位于某些特殊脏器的肿瘤显像受到限制。这种正常组织的高本底在 $^{131}\text{I}$ 标记抗体应用中主要表现在血液和胃组织,而在 $^{111}\text{In}$ 标记抗体应用中则主要表现在肝、脾等网状内皮系统<sup>[1~3]</sup>。降低本底放射性的研究已有大量报告,但结果评价不一<sup>[4~7]</sup>。近几年,一种新的方法——预定位技术(Pre-targetted Scintigraphy)被应用于肿瘤放免显像研究。这种方法因其构思的新颖和初步实验结果的成功,很快得到了人们的关注,引起了这个领域中许多研究者的兴趣。

所谓预定位,是指首先将未标记的抗肿瘤抗体注入体内,待其与肿瘤组织结合,正常组织本底消退后,再注射核素标记的小分子化合物,通过某种机制使抗体与小分子化合物在肿瘤部位结合,以达到肿瘤显像和降低本底的效果。由于抗体与核素的结合反应发生在体内,故又称为“体内标记”技术

(in vivo labelling)。本文简要介绍预定位技术的发展过程及目前的应用结果。

### 一、抗络合物半抗原抗体

传统的放射免疫显像所应用的抗体都是针对肿瘤抗原的,放射性核素通过化学的方法与抗体交联。很显然,这种化学的交联只能在体外条件下进行。1986年,Goodwin等<sup>[7]</sup>提出了一个新的构想,他制备了一株抗金属络合物小分子半抗原的单克隆抗体。金属络合物与核素 $^{111}\text{In}$ 有很强的络合能力,这样,就可以通过抗原-抗体反应使核素与抗体在体内结合。用抗络合物抗体进行肿瘤放射免疫显像一般需要经过三个步骤:①注射抗体,使其缓慢地渗透到肿瘤部位;②注射连结转铁蛋白(Transferrin)的络合物。这种络合物与循环在血液中的抗体结合,被转铁蛋白运至肝脏降解,达到“促排”效果。由于肿瘤细胞外液与血浆成分交换缓慢,沉积在肿瘤组织内的抗体滞留时间较长,由此形成肿瘤与正常组织的抗体浓度差;③注射标记有 $^{111}\text{In}$ 的金属络合物。这种小分子化合物进入肿瘤组织快,体内半衰期短,在肝、脾内亦无非特异性沉积。未与肿瘤结合的络合物很快被排泄,使显像得以在数小时内实现。

Goodwin等的这一方法打破传统常规,

\* 北京协和医院

建立了预定位的概念,找到一条新的、有效的降低本底的途径,同时使短半衰期核素如 $^{99m}\text{Tc}$ 的应用可能变成现实。但是,由于这种抗体是针对金属络合物小分子半抗原的,在肿瘤中只是一种非特异的沉积,故肿瘤的I.D./g% (每克组织计数占注射总计数的百分比)一般较低,很难达到理想的T/N (单位时间内每克肿瘤组织计数与正常组织计数之比)比值。

## 二、双功能抗体

Goodwin用抗瘤-抗络合物双功能抗体进一步改进了预定位技术<sup>[9]</sup>。双功能抗体具有针对肿瘤和络合物的双重特异性,这就克服了前述方法的不足。但是,用双功能抗体作定位检查也有不足之处:①双功能抗体需要将分泌抗瘤抗体杂交瘤和分泌抗络合物半抗原抗体杂交瘤再杂交,制备比较困难;②一种双功能抗体制成后,只能应用于一类肿瘤,其推广应用受到限制;③双功能抗体无论是针对肿瘤抗原还是针对络合物半抗原都表现为“单价”结合位点,故其亲和力受到影响。

## 三、抗络合物抗体与抗瘤抗体的交联

为了克服双功能抗体的不足并保持其双向特异性的优点,Doussal等<sup>[10]</sup>提出一个新的解决办法,他们将一株抗鼠B细胞抗原的单克隆抗体(Fab')<sub>2</sub>片段与一株抗DN-PDTPA的单克隆抗体Fab片段在体外交联,组合成一种新的“双功能抗体”,以小鼠脾细胞作为“靶器官”,观察其定位效果。作者比较了 $^{111}\text{In}$ -DNPDP-TPA、 $^{125}\text{I}$ -DNPDP-TPA两种示踪剂与交联抗体联合应用的效果,并观察了抗体与示踪剂同时注射及分次注射脾脏内核素的浓度,结果表明:交联抗体与 $^{111}\text{In}$ -DNPDP-TPA分次注射可以达到最好的定位效果,而直接标记的抗体无明显脾脏浓聚。

作者在报告中还提出了一个新的观点:作为半抗原的小分子络合物应是双价半抗原(Divalent haptens),即具有双价的与抗体结合的位点。实验结果表明:双价络合剂携带的放射性核素比单价络合剂携带的核素在靶器官的浓度更高而不增加血液本底。作者认为,双价半抗原可使肿瘤表面相邻的两株抗体与其结合成一种双价复合物,从而使络合剂与抗体的结合更加稳定,血液中抗体浓度较低,形成双价复合物的机率也低,故不影响血本底。作者还提出,半抗原和抗体的亲和力应是中等的,过低结合不牢固,过高则使单价复合物在血中的稳定性也高,不利于其解离而降低血本底。中等强度的亲和力则既能在血中很快解离而使核素标记的半抗原排泄,又因双价复合物的形成而在肿瘤内保持足够的稳定性。

Doussal等人的这种新的“双功能抗体”的概念为预定位技术的应用提供了方便:可以用较简单的蛋白质交联方法以一株抗络合物抗体与不同的抗肿瘤抗体组合,使应用范围大大扩展。双价半抗原的应用可以省去“促排”的步骤。

## 四、生物素-亲和素系统的应用

与前述方法不同,Hnatowich等另辟蹊径,将生物素-亲和素(Biotin-Avidin)系统引入了肿瘤放射免疫研究<sup>[11]</sup>。Avidin是从蛋清中提取出来的分子量为66 000的蛋白质,与Biotin有极强的亲和力。Biotin是一种分子量为242 $\mu$ (244D)的小分子维生素类物质,在正常人体组织与血液中它以低浓度存在<sup>[12]</sup>。Avidin与Biotin的亲合常数可达 $10^8\text{mol}^{-1}$ ,比多数抗原-抗体间的亲合常数大一百万倍,二者的结合迅速而有效,其复合物在pH改变较大的条件下以及有机溶剂中均可保持稳定。Avidin-Biotin系统的两个显著的特点——极强的亲和力和Biotin体内很快的排泄率,提示其也可用于预定位

肿瘤显像。Hnatowich 分别将Biotin和Avidin与抗体连接,其对应的配体与DTPA连接,将Protein-A包被的琼脂糖小珠植于小鼠肠系膜,作为抗体的靶目标(Protein-A与抗体Fc段有特异性亲和作用),观察两种标记途径在体内的定位效果。由于Avidin与正常组织有交叉反应,本底较高,实验中以Streptavidin(链球菌培养液中提取,分子量为60 000)代替。将Biotin与抗体交联,Streptavidin与DTPA交联并标记 $^{111}\text{In}$ ,因Streptavidin本身亦为蛋白质,进入肿瘤及从体内排泄的速度均较慢,而且肾脏内非特异性积聚较高,故很难在示踪剂进入体内的短时间内达到理想的T/N比值。与此相反,将Biotin标记 $^{111}\text{In}$ ,因Biotin在体内的半衰期很短,未与Avidin结合的游离 $^{111}\text{In}$ -Biotin可在数小时排泄,故显像可在注射示踪剂后的短时间内进行。Hnatowich在注射Avidin-IgG后18小时(未用促排手段)注射 $^{111}\text{In}$ -Biotin,6小时 $\gamma$ 扫描,可见清晰的靶目标显像,本底极低。8小时作分布测定,靶组织与肝脏和血液的比值可达100:1,与脾脏和肾脏的比值可达1000:1。

Hnatowich的方法进一步改进了预定位技术,巧妙地将体外免疫组化ABC方法中常用的生物素系统应用于体内显像,不需要制备抗络合剂抗体,达到了理想的消除本底放射性的效果。抗体与Avidin可以通过Biotin中间“架桥”交联,也可以通过其它方法交联,二者的生物活性在严格控制的条件下一般不会受到影响。

Hnatowich的方法报告后,引起了人们浓厚的兴趣,Goodwin等<sup>[13]</sup>进行了进一步的验证和探讨,其他学者也报告了他们的实验结果,并很快过渡到临床应用<sup>[14~16]</sup>。Paganelli等<sup>[17]</sup>将此方法改为三步:先将连接Biotin的抗体注入体内,三天后注射空白Avidin,再过48小时注射 $^{111}\text{In}$ 标记的Biotin。这种改良法的优点是不破坏Avidin

的生物活性,缺点是增加了注射次数和延长了检查时间,他们用这种改良法检查了10例肿瘤病人,结果阳性率达100%(10/10),瘤/血比值为 $2.4 \pm 0.5$ ,瘤/肝比值为 $2.5 \pm 0.1$ 。

在评价Avidin-Biotin系统的应用价值时,人们曾担心内源性生物素可能会影响显像效果,使本底放射性升高;另外,注射Avidin-抗体后通常需3天左右才能注射Biotin-核素,与肿瘤结合的抗体-Avidin可能被内源性Biotin饱和而不再接受核素标记的Biotin。但从临床应用的结果看,内源性Biotin的影响似乎并不是一个严重的问题<sup>[15~17]</sup>。

## 五、前景展望

预定位技术的应用在肿瘤放射免疫显像研究中引入了一个全新的概念。多年来,如何提高T/N比值一直是研究者们普遍关注的问题。通过提高抗体在肿瘤内浓度的方法到目前为止收效尚不大<sup>[18,19]</sup>,众多研究者把注意力集中在降低本底放射性上,特别是 $^{111}\text{In}$ 造成的肝脏本底放射性。肝脏高本底的原因众说不一,一般认为,一种可能是 $^{111}\text{In}$ -抗体复合物在血中与转铁蛋白发生配体交换作用,转铁蛋白将 $^{111}\text{In}$ 运至肝脏沉积<sup>[20]</sup>;另一种可能是 $^{111}\text{In}$ 标记的抗体作为一种异体蛋白被肝脏降解,游离的 $^{111}\text{In}$ 被肝脏转铁蛋白扣留而使肝本底升高<sup>[21]</sup>。但不管何种原因,有一点是确定的,即如果 $^{111}\text{In}$ 是以与金属络合剂结合的形式(如 $^{111}\text{In}$ -DTPA、 $^{111}\text{In}$ -EDTA)存在,则无论是在肝脏还是在血液中均不会存留<sup>[22]</sup>。 $^{111}\text{In}$ 与小分子络合剂复合体在血中循环时间很短,不会发生严重的配体交换作用,在肝脏内亦无沉积,而在肝脏被降解的未与肿瘤结合的抗体又未标记核素,因此,造成肝脏高本底的两种可能的原因都可避免。

预定位技术的另一个明显的优点是使短

半衰期核素,如 $^{99m}\text{Tc}$ 的应用变为现实,近年来, $^{99m}\text{Tc}$ 用于RII的报告越来越多,但因其半衰期过短(6小时),成功的应用一般限于标记抗体片段<sup>[23,24]</sup>,即使如此,也常常尚未达到较高的T/N比值,核素即衰变到难以探测。如能解决小分子络合剂与 $^{99m}\text{Tc}$ 牢固连接的问题,则预定位技术必将使 $^{99m}\text{Tc}$ 在RII中发挥更大的作用。

除了如前所述,还有一个重要的障碍是抗体的肿瘤细胞内化(Internalization)和代谢。对一般的肿瘤定位诊断和治疗,抗体被肿瘤细胞内化是有益的,但对于定位技术,如在核素标记的络合剂到达肿瘤细胞前即发生抗体的内化则可能是“灾难性”的,核素将因失去结合定位点而不能在肿瘤定位。然而幸运的是,抗体的内化并非发生在所有的抗原-抗体系统,只要抗体的选择合适,这种由于抗体的内化而使核素失去定位结合位点的问题是可以避免的。

### 参 考 文 献

1. Halpern SE, et al; Clin Nucl Med 1981, 6:453
2. Perkins AC, et al; Eur J Nucl Med 1985, 11:295
3. 韩冰,等;中华核医学杂志 1989, 9:72
4. Goodwin DA, et al; J Nucl Med 1984, 9:209
5. Robert M, et al; Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 2843
6. Mears CF, et al; Int J Cancer 1988, 2:99
7. Paik CH, et al; J Nucl Med 1989, 30: 1693
8. Goodwin DA, et al; J Nucl Med 1986, 27:959
9. Goodwin DA, et al; J Nucl Med 1988, 29:226
10. Doussal JML, et al; J Nucl Med 1989, 30:1358
11. Hnatowich DJ, et al; J Nucl Med 1987, 28:1294
12. Mock DM, et al; Anal Biochem 1986, 153:572
13. Goodwin DA, et al; J Nucl Med 1987, 28:561
14. Sinitsyn VV, et al; J Nucl Med 1989, 30:66
15. Kalofonos HP, et al; Nucl Med Commun 1989, 10:240
16. Novak-Hofer I, et al; Eur J Nucl Med 1990, 16:393
17. Paganelli G, et al; Eur J Nucl Med 1990, 16:394
18. Halpern SE, et al; J Biol Response Med 1987, 6:735
19. Guadagni F, et al; Cancer Immunol Immunother 1988, 26:222
20. Halpern SE, et al; Cancer Res 1983, 43:5347
21. Sakahara H, et al; J Nucl Med 1987, 28:342
22. Fawwaz RA, et al; J Nucl Med 1985, 26:488
23. Buraggi GL, et al; J Nucl Med Allied Sci 1989, 28:283
24. Eary JF, et al; J Nucl Med 1989, 30:25

### (上接封四)

月,中数9个月,1、2、3年生存率分别为46%、15%及8%。间变性组中2例随访37及61个月后仍存活;多形性组中1例存活41个月。全部病人经临床随访与定期CT未疑有脑坏死而再手术者。

$^{198}\text{Au}$ 的特点是放射 $\gamma$ 线(0.42MeV),能量比 $^{125}\text{I}$ 大15倍,可永久植入,分布均匀,半衰期短

(仅2.7天),因而对病人与外周环境安全。为了提高高恶性胶质瘤患者的生存率,可在最初手术后即植入 $^{198}\text{Au}$ ,放射4000~5000cGy,尔后外照射至肿瘤区总量达9000~10000cGy。

[赵德明摘 洪元康校]