

· 综述与译文 ·

肿瘤放射免疫显像中的若干技术问题

上海第二医科大学附属瑞金医院核医学科 卢宗信*综述 朱承谟审

摘要: 标记抗体用于肿瘤显像是一个生物动态过程, 必然受很多因素的影响。本文围绕肿瘤组织与非肿瘤组织的放射性比值, 探讨了血液CEA浓度、机体的免疫状态、注射标记抗体后非肿瘤组织的本底等因素对肿瘤放射免疫显像的影响及其解决途径。

用放射性核素标记抗体进行肿瘤显像的研究已有三十多年的历史^[1], 最初人们用¹³¹I标记抗CEA(癌胚抗原)多克隆抗体进行结、直肠癌的显像研究, 结果不十分满意。当然原因是多方面的, 其中最主要的就是多克隆抗体(PcAb)的特异性较差, 表现为与正常交叉反应抗原(NCA)和正常粪便抗原(NFA)有交叉反应, 致使肿瘤组织与非肿瘤组织的放射性比值(T/NT)较低。于是人们对这一问题的研究一度有所降温, 直到1975年由Kohler和Milsten发展了细胞融合杂交技术产生大量单克隆抗体(McAb)以后, 这一问题的研究才又活跃起来, 并很快由动物实验转入临床研究。这主要是因为McAb与PcAb相比具有很多优点: ①高特异性, 仅对单一的抗原决定簇起反应; ②可由腹水或人工培养大量制备; ③制备的抗体纯度高(小于90%); ④为单一的免疫球蛋白组分。本文就目前用放射性核素(¹³¹I)标记抗CEA McAb在肿瘤放射免疫显像中遇到的几个主要问题综述如下。

一、血清CEA对放射免疫显像的影响

目前, 用于诊断肿瘤(尤其是胃肠道上皮等来源的)的抗体很多是以CEA作为抗原产生的抗CEA单克隆抗体, 这是因为: ①CEA在肿瘤组织中含量较高; ②CEA与细

胞膜有关, 可能为膜标志; ③CEA与大多数来源于消化道上皮的肿瘤有关; ④对CEA在组织化学及免疫化学方面的研究已有了较深的认识, 并已建立了很好的纯化方法; ⑤可用CEA制备亲和常数较好的抗血清; ⑥动物实验已取得了满意的结果。CEA为膜抗原, 故血液中含有一定的浓度, 这样就必然遇到一个问题, 即血液CEA会不会与标记抗体结合而影响肿瘤显像? 关于这一点, 各家报道很不一致, 归纳一下可以得出以下结论: ①不分泌CEA的肿瘤一般不显像^[2-3]; ②大多数原发性肿瘤, 即使含有较高的血清CEA, 一般也显像良好^[4-6], 其原因可能是肿瘤组织分泌的CEA与其细胞膜上的CEA有所不同, 致使特异性抗体与血清CEA结合的亲和力下降, 而有利于标记抗体与肿瘤细胞膜上CEA优先结合^[7,10,11]; ③其他肿瘤及少数原发性肿瘤的显像受不受血清CEA的影响, 应视具体情况而定。如Goldenberg等^[5]报道, 即使血清CEA浓度高达350ng/ml, 肿瘤仍可清晰显像; 而Mach等^[8]则报道, 血清CEA达30ng/ml就会影响肿瘤显像, 他们在检测血液时同时发现, 血液中存在大量标记抗体与血清CEA形成的复合物, 而肿瘤细胞上结合的标记抗体较少。如何解决这一问题? 有人应用先静脉注射一定量抗CEA抗体的方法。动物实验发现,

*现在上海市杨浦区中心医院工作

当血清CEA浓度为300U/ml时,需要抗CEA抗体约75~300mg,才能将其饱和以达到降低血清CEA的目的^[9]。

总之,血清CEA是否对肿瘤显像有影响应视具体情况而定。然而在临床应用方面,考虑到简单性与实用性,以及肿瘤绝大多数为原发性的,血清CEA对肿瘤显像的影响可以不予考虑。最近有人通过大量临床实验总结指出,循环抗原与标记抗体的结合并不影响肿瘤显像,而且血清中抗原的滴度越高,则肿瘤显像的阳性率也越高^[12]。

二、机体的免疫状态

由于人源性单克隆抗体不易获得,故目前临床上所用的McAb基本上都是鼠源性的。这种鼠源性McAb对人体来说是一种异种蛋白质。进入机体后就可能引起机体对此异物的免疫应答反应。对一个具体的机体来讲,免疫应答的发生需具备两个条件:①此外来物质是否具有免疫原性;②机体产生免疫应答的能力。James等^[13]和Vecchio等^[14]通过实验都发现:①标记的完整抗体进入机体后,约有50%的人立即发生免疫应答反应;②标记的抗体片段则基本上不诱导免疫应答;③机体免疫状态差的人产生的免疫应答弱;④免疫缺陷的人不产生免疫应答。由此可见,对于一个免疫功能正常的机体来讲,注射完整鼠抗体必然会诱导产生免疫应答反应,间隔一定时间之后(约一至二周),血液中就会出现人抗鼠抗体HAMA(human antimouse antibody)。此现象对首次实验影响不大,但重复实验就不同了,不但会引起过敏反应,还会由于HAMA的存在,影响肿瘤组织对鼠抗体的摄取量和抗体在体内的分布与代谢(血液清除率加快,肝脏等网状内皮系统摄取增加)^[13,16,17]。James等^[13]和Vecchio等^[14]通过实验发现:如果血HAMA浓度(用Protein A法测定,以百分数表示)小于15%,则标记抗体仍有充

足的机会与肿瘤抗原结合;如HAMA大于20%,则将有90%左右的标记抗体形成复合物,这时如注射常规量的抗体,肿瘤则难以显像。对这一问题,目前有几种方法:①注射抗体前应用免疫抑制药物;②注射大量高纯度鼠抗体^[15,19,20]。Schroff等^[15]实验发现,当鼠抗体的量大于100mg时,肿瘤对标记抗体的摄取则基本不受HAMA的影响,但可能会导致假阳性或假阴性^[21];③改用抗体片段;④改用人-鼠嵌合型抗体,它是由Fab'r(来源于鼠单克隆抗独特型抗体)与人的IgG通过二硫键联接而成的。应用这类抗体进行动物实验未发现免疫应答产生^[20],但其来源有限;⑤改用人-鼠嵌合型基因工程抗体。其大体生产步骤为^[22,23]:首先分离出抗人结肠癌表面抗原的鼠源性McAb的V_H和V_L基因,然后将其插入到能编码人抗体不变区部位的含有染色体DNA片段的表达载体上,再将这种含有人-鼠嵌合型免疫球蛋白基因的表达载体转染(transfection)到不产生抗体的鼠骨髓瘤细胞上,就可得到产生人-鼠嵌合型抗体的稳定细胞系。这种方法的优点是能产生大量的单克隆抗体,并且克服了人杂交瘤细胞株易丢失染色体而失去克隆性的缺点。

三、本底对放免显像的影响

肿瘤的放免显像是一个生物动态过程,受很多因素的影响,所有这些因素都有可能致本底的提高,从而降低T/NT比值。故要想得到比较清晰的放射免疫显像图,有必要用一定的方法对本底进行处理,以提高其对比度。归纳起来,目前所采用的方法大体可分为两类:核素-计算机处理法和生物处理法。

(一)核素-计算机处理法

根据采用的核素种类,此法又可分为双核素处理法与单核素处理法。

1. 双核素-计算机处理法

这是利用两种不同能量的核素,在某一感兴趣区分别代表肿瘤部位的放射性和本底的放射性,然后通过计算机进行处理(相减处理)的一种方法。用简单的数学模型表示:

$$X = A - KB$$

式中, X代表处理后图像的计数信号; A代表第一种核素(如 ^{131}I)在某感兴趣区(ROI)的计数; B代表第二种核素在同一ROI或另一ROI处的计数; K为校正因子。此法简单易行,但有一定的主观性,尤其是用 ^{131}I 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 两种核素时,处理后易造成假阳性。这是因为这两种核素的 γ 光子能量相差太大(分别为360keV和140keV),在组织和器官内的衰减程度及 γ 散射不一样,使 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的计数不能准确反映 ^{131}I 在肿瘤组织周围的放射性分布。鉴于这种情况,第二种核素的选择条件应该是:该核素的 γ 光子能量及物理半衰期与第一种核素相近,同时仪器又能将其分辨开来。Perkins等^[24]报道,如第一种核素采用 ^{131}I ,则第二种核素的选择顺序为: $^{67}\text{Ga} > ^{111}\text{In} > ^{113\text{m}}\text{In} > ^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。为了尽量减少用上述方法处理所产生的假象及主观性,Green等^[25]进行了改进,大体步骤为:①首先选两个在解剖及生理上相似的ROI₁和ROI₂;②分别计数两核素在ROI₁和ROI₂区的放射性为I₁, T₁和I₂, T₂;③再分别计算两核素各自在两感兴趣区的计数比值: $R_T = T_1/T_2$, $R_I = I_1/I_2$,则 $F_X = (R_I - R_T)/E_X$, E_X代表两核素计数比的总误差;④判断:如果 $F_X > 4$,则表明ROI₁区放射性浓集阳性。

另外,除了考虑第二种核素的选择条件之外,还要根据肿瘤所在的器官和组织选择对其器官或组织有趋向性的不同标记化合物。以 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 为例,如肿瘤所在器官或组织分别为血、肝、肺等,则 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的标记物应分别选择 $^{99\text{m}}\text{Tc-RBC}$ 或 $^{99\text{m}}\text{Tc-HSA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-植酸钠}$ 或 $^{99\text{m}}\text{Tc-胶体}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MAA}$ 等。

2. 单核素-计算机处理法

这是根据标记抗体进入机体后的不同时间内所采集的计数分别代表不同组织和器官的放射性而进行处理的方法。众所周知,标记抗体在进入机体的最初一段时间内,主要分布于血液及部分器官内,这时所采集的计数主要代表肿瘤组织周围的放射性,随着时间的延长,肿瘤细胞开始摄取抗体,此时采集的计数分布则代表肿瘤所在器官的放射性。将这两个不同时间内采集的计数分布图经过校正后进行计算机的重叠相减处理,即能显示出肿瘤组织所浓集的放射性^[26,27]。此法较简单,但处理过程存在一定的主观性。为此,Granowska等^[28]又报道了一种概率作图动态分析法(Kinetic analysis with probability mapping),它是以概率和图像色彩来评价肿瘤组织摄取放射性的多少,故此法客观性强,具有较好的可信性。但它不适于分泌抗体(如 $^{111}\text{In-McAb}$)的肠道肿瘤的处理,原因是正常的肠蠕动及标记抗体的分泌使前后采集的图像重叠不完全,相减处理后易出现假象。

核素-计算机处理法目前还存在很多问题,Britton等^[29]认为主要有以下几方面:①相减处理前如何保证两组图像的几何迭合;②相减处理的校正问题;③如何计算从原始图像(original images)到差异图像(difference images)的噪声传播等。为此,人们对在进行放免显像时是否该应用此技术仍持有不同的观点^[4,24,28,30]。我认为,最好根据具体情况采用之,如果肿瘤显像清晰,则不必采用;如果肿瘤显示弱阳性,可采用;如果不显影,则不主张采用;如肿瘤部位血液供应非常丰富或有血管瘤存在时,可采用。

(二)生物处理法

此法又可分为双抗法、单抗(McAb)修饰法和生物素法。

1. 双抗法

这是指利用SA (second antibody, 第二抗体) 降低血本底以提高T/NT比值的方法。SA是抗PA (primary antibody, 第一抗体) 的抗体, 进入机体后, 它能与预先注入体内的PA发生特异性结合, 形成大分子而被网状内皮系统吞噬, 从而有助于本底的降低。注射SA的时间, 一般为注射PA后24小时左右; 注射SA的量, 一般为PA的25~30倍(摩尔倍数)^[31,32], 也有报道用25~100倍的^[33]。由于抗原抗体复合物的形成, 致使PA的分布动力学发生改变: 血液中放射性迅速下降, 心脏和肺部放射性2小时后开始下降, 肝脏则2小时表现为放射性增加, 但在24小时左右则明显减少至低水平^[32]。这样, T/NT比值就可得到提高。另外, 还有人用LESA (liposome entrapped second antibody) 进行了研究^[35-37], 结果发现LESA确实也能提高肿瘤与血比值, 但大多数人认为LESA与SA相比并无优越之处^[32,36,37], 其原因可能是: ①liposome是一种带负电的微脂粒, 它在体内不稳定, 易迅速发生转化; ②SA与liposome结合后更易被吞噬, 但因微脂粒同时又是一种产生抗体的佐剂, 它的应用又会使SA的清除率下降^[36]。1988年, Goldenberg等^[38]还报道了不同来源的SA在清除血本底方面的差异, 认为用兔抗鼠IgG要比用山羊抗鼠IgG效果好。总之, 二抗法是一种较简单的可行方法, 应用时应该注意的两点就是SA注射的时间及注射量。

2. 生物素法

这是根据生物素与抗生物素具有高亲和力及抗生物素能在体内迅速从血中清除的特点而设计的^[39,40]。具体方法是: ①先将蛋白质抗体与生物素-N-羟基丁二酰亚胺脂反应生成抗体-生物素; ②标记抗体-生物素; ③将此标记物注入机体内的一定时间后再注射抗生物素, 使其形成抗体-生物素-抗生物素复合物。这样就可以达到消除血中残余标记

物的目的。这种方法同双抗法一样, 可以进行人为控制, 适合于肿瘤较小、血液供应不丰富、摄取标记品慢的肿瘤显像。但抗生物素具有抗原性, 能激活补体系统, 故难以反复使用。另外, 形成的抗体-生物素-抗生物素复合物要经肝脏排泄, 有时还要经肾脏排泄, 因此限制了其应用范围。

3. 单抗化学修饰法

这是用生物化学等方法在单抗的某一位位上加上某一化学基团以改变其在体内的分布与代谢的方法。可用来修饰单抗的化学物质很多, 现以乳糖为例^[39,41]: 将含有氨基酸的蛋白质抗体在硼氰化物存在的条件下用乳糖处理, 通过对蛋白质氨基酸的共价修饰, 暴露出其末端的半乳糖残基。在正常情况下, 肝脏含有大量的半乳糖受体, 具有半乳糖残基的蛋白质抗体进入机体后, 由于配基对其受体的高度亲和作用, 使此种被乳糖修饰的蛋白质抗体很快被肝脏摄取, 于是血液中含量迅速下降, 提高肿瘤与血的比值达3倍以上。由于此种化学修饰的蛋白质抗体血液清除率很快, 故只适用于以下情况: ①肿瘤的血供十分丰富; ②抗体具有高亲和力; ③肿瘤表面具有高浓度的抗体结合位点, 并能迅速摄取抗体者。

四、提高T/NT比值的方法要点

如前所述, 核素标记单抗进行肿瘤显像是一个生物动态过程, 影响因素很多。因此, 人们正试图用各种各样的方法来提高T/NT比值。归纳起来, 主要有以下几方面:

1. 选用高亲和力、高特异性的单抗或改用抗体片段。
2. 选用理想的放射性核素, 如¹²³I, ^{99m}Tc, ¹¹¹In等。
3. 改善标记方法。
4. 应用高分辨率的探测器。
5. 对本底进行处理(见第三节)。

参 考 文 献

- 1 Pressman D et al. *Cancer Res*, 1980; 40: 2960-2964
- 2 Stewart Sell et al. *Monoclonal antibodies in cancer*, 1st edition, Clifton NJ, Humana Press, 1985;15
- 3 Burchiel SW et al. *Tumor Imaging: The radioimmuno-chemical detection of Cancer*, 1st edition, NY; Masson Press, 1982: 153-155, 176-187
- 4 Beatty JD et al. *Cancer Res*, 1986; 46: 6494-6502
- 5 Goldenberg DM et al. *N Engl Med*, 1978; 298:1384-1388
- 6 Van Nagell JR et al. *Cancer Res*, 1980; 40:502-506
- 7 Bosslet K et al. *Eur J Nucl Med*, 1988; 14:523-528
- 8 Mach JP et al. *N Engl J Med*, 1980; 303: 5
- 9 Zalutsky MR et al. *Nucl Med Biol*, 1988; 15(4):431-437
- 10 Priums FJ et al. *Cancer Res*, 1980; 40: 497-501
- 11 Priums FJ et al. *J Nucl Med*, 1986; 27(6):1016
- 12 Goldenberg DM et al. *Semin Nucl Med*, 1989; 19(4):262-281
- 13 James CR et al. *Nucl Med Biol*, 1989; 16(2):121-125
- 14 Del Vecchio S et al. *J Nucl Med*, 1987; 28(4):614
- 15 Schroff RW et al. *Cancer Res*, 1985; 45: 879-885
- 16 Primm MV et al. *J Nucl Med*, 1985; 26: 1011-1023
- 17 Ford EH et al. *J Nucl Med*, 1988; 29(5):761
- 18 Chatal JF et al. *J Nucl Med*, 1984; 25(3):307-314
- 19 Schroff RW et al. *J Nucl Med*, 1987; 28(4):615
- 20 Brown SL et al. *Semin Oncol*, 1989; 16(3):199-210
- 21 Hansen HJ et al. *J Nucl Med*, 1987; 28(4):615
- 22 Stepiewski Z et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85:4852-4856
- 23 Sun LK et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84:214-218
- 24 Perkins AC et al. *J Nucl Med*, 1983; 24(5):15
- 25 Green AJ et al. *J Nucl Med*, 1984; 25: 96-100
- 26 Courtenary-Luck N et al. *Lancet*, 1984; 1:1441-1443
- 27 Granowska M et al. *Radiobiol Radiother*, 1984; 25:153-160
- 28 Granowska M et al. *J Nucl Med*, 1988; 29:599-607
- 29 Britton KE et al. *Nucl Med Biol*, 1989; 16(2):105
- 30 Ott RJ et al. *Br J Radiol*, 1983;56:101-108
- 31 Sharkey RM et al. *J Nucl Med*, 1986; 27:897
- 32 Goldenberg DM et al. *J Nucl Med*, 1987; 28:1604-1610
- 33 Goldenberg DM et al. *J Nucl Med*, 1988; 29:757
- 34 Sharkey RM et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81:2843-2846
- 35 Begent RH et al. *Lancet*, 1982; 2:739-742
- 36 Bradwell AR et al. *Lancet*, 1983; 1:247
- 37 Barratt GM et al. *Biochem Biophys Acta*, 1983; 762:154-156
- 38 Goldenberg DM et al. *J Nucl Med*, 1988; 29:757
- 39 Klibanov AL et al. *J Nucl Med*, 1988; 29:1951-1956
- 40 Sinitsyn VV et al. *J Nucl Med*, 1989; 1:66-69
- 41 Beynini F et al. *J Biol Chem*, 1986; 261: 9294-9299