

。 综述与编译。

生物素 亲合素系统在核医学中的应用

中国医学科学院 北京协和医院核医学科 (北京, 100730) 唐刚华综述 王世真审核
中国协和医科大学

摘要: 生物素与亲合素间具有极高的亲和力, 一分子的亲合素有四个生物素结合位点, 因而可以产生放大效应, 而且生物素在血液中能迅速清除 因此, 生物素 亲合素系统可广泛应用于体外免疫分析和体内放射免疫显像及治疗。

关键词: 生物素 亲合素系统 免疫放射分析 放射免疫显像 放射免疫治疗

生物素 亲合素系统 (BAS) 是 70 年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统 随着各种生物素衍生物的问世, BAS 很快被广泛应用于生物医学各领域 1986 年, Odell 等利用生物素 (Biotin, Bt) 和亲合素 (Avidin, Av) 间具有高度亲和力的特点, 首次将 BAS 引入双位点夹心免疫放射分析法用来检测人促甲状腺激素 (hTSH), 并获得满意结果 1987 年, Hnatowich 将 BAS 预定位技术引入放射免疫显像 (RII), 1994 年, Stella 等将 BAS 用于结直肠癌病人手术中诊断肿瘤灶的放射免疫导向手术 (RIGS) 系统 BAS 用于放射免疫治疗 (RIT) 也正处于研究之中 近年来, BAS 在核医学中得到了广泛应用 本文着重介绍 BAS 及其在 IRMA

(免疫放射分析)、RII 和 RIT 中的应用

1 生物素 亲合素系统

1.1 特性

生物素又称辅酶 R 或维生素 H, 是生物体内广泛分布的一种羧化酶的辅酶, 其分子量为 244u, 等电点 pH 为 3.5, 分子式为 $C_{10}H_{16}O_3N_2S$, 有 α β 两种结构 (图 1), 它的咪唑环基 I (又称 uresdo 基) 是和亲合素上色氨酸残基结合的部分, 而戊酸侧链上的羧基是与抗体或酶结合的位点 每个 IgG 分子可以标记数十个用化学方法活化的生物素分子, 因此凡有生物素衍生物的反应层就是一个放大级

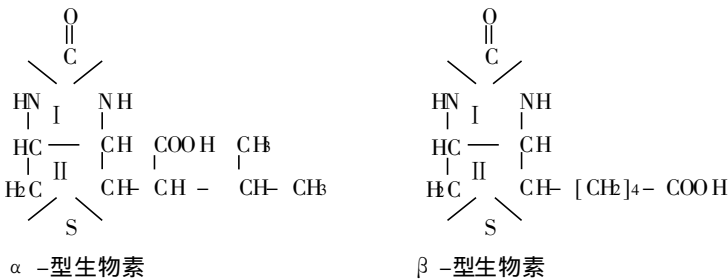


图 1 生物素的结构式

亲合素又叫抗生物素蛋白或抗生物素, 其分子量为 68ku, 等电点 pH 约为 10 它由四个相同的含 128 个氨基酸亚基组成, 亚基之间通过二硫键连接 亲合素分子的每个亚基都可以结合一个

生物素分子, 这种四价反应性产生了新的放大效应 亲合素是一种碱性糖蛋白, 应用中往往有较高的非特异性结合 1963 年, Chaiet 在筛选抗菌素时首先发现一种能与生物素结合的蛋白质, 并

称之为链霉亲合素 (Streptavidin, Sa), 分子量为 60k_D Sa 与亲合素的结构相似, 但不含糖基, 等电点近中性, 因而以 Sa 代替 Av, 可避免 Av 非特异性结合高的缺点

1.2 作用原理

BAS 技术的作用原理如下: ① 生物素和亲合素由于彼此具有高度亲和力, 相连后可形成非常稳定的复合物; ② 生物素通过单一的生化反应可结合酶、抗体、毒素、激素、核酸、凝集素等大分子成分, 也可结合放射性核素; ③ 亲合素可以和酶、蛋白质、重金属、荧光素及放射性核素等不同的标记物结合; ④ 亲合素也可作为桥, 同时连结抗体和酶等不同的生物素化分子。

1.3 优点

① 高灵敏度 生物素标记对抗体活性的影响很少, 抗体在保持原有活性的同时, 可以获得多个生物素触手而成为多价制剂。另外, 亲合素具有四个相同亚基, 可以同时以多价桥连结生物素化的抗体及其标记物。这种多价放大作用赋予 BAS 极高的灵敏度。

② 高特异性 亲合素和生物素的结合反应呈高度特异性, 生物素和亲合素一旦结合, 则很难分离, 这种高度稳定的特异结合, 可明显降低或避免反应中可能发生的非特异性作用。

③ 高稳定性 亲合素和生物素间非共价的相互作用很强, 亲和常数为 $10^{15} (\text{mol/L})^{-1}$, 比抗原-抗体反应高 $10^7 \sim 10^8$ 倍, 结合快, 呈不可逆反应, 并且对各种试剂的环境因素不敏感, 以致产物可保持高度稳定。

2 BAS在体外免疫放射分析中的应用

2.1 BAS应用于 IRMA

所谓生物素-亲合素系统免疫放射分析法 (BAS-IRMA) 是指把 BAS 引入 IRMA 的新一代 IRMA, 其基本原理是: 每个抗体 IgG 分子上, 可以标记数十个生物素分子, 这种形成生物素衍生物的反应就产生放大作用。如上所述, 亲合素由四个相同的亚基组成, 每个亚基都可以结合一个生物素分子, 此四价反应性又产生了新的

放大效应。生物素标记的 IgG 在 -20°C 保持 1~2 年不失活。本法采用的示踪物有 ^{125}I 标记的 Av 或 Sa- ^3H 标记的 Bt 或 ^{125}I 标记的抗体, 其中 ^{125}I -Av 或 ^{125}I -Sa 可作为通用示踪剂。Bt 或 Av 的结合极为稳定, 可以明显提高方法的精密度和灵敏度。BAS-IRMA 的灵敏度为经典 IRMA 的 3~5 倍。

BAS 用于 IRMA 有以下四种反应模式:

① 固相抗体-待测抗原-生物素化抗体-亲合素- ^3H 标记生物素, 即 BAB 法或 BRAB 法^[1]。此法预计有很高的灵敏度, 但操作较为复杂, 目前未见文献报道。

② 固相抗体-待测抗原-生物素化抗体- ^{125}I 标记亲合素, 称为 BA 法或 LAB 法。Peters 等^[2]用此法检测癌胚抗原 (CEA), 与经典的 IRMA 比较, 此法稳定, 标准曲线剂量范围大, 相关性好, r 为 0.9991。此外, 此法以生物素标记抗体, 不损伤免疫活性。以 ^{125}I 标记 Sa, 并不影响其和 Bt 的亲和力, 而且比活度高。Peters 等研究表明, 此法与目前公认质量最好的 Abbott 公司生产的 ELISA CEA 试剂盒相比较, 精密度与准确度均达同等水平, 而灵敏度有所提高。

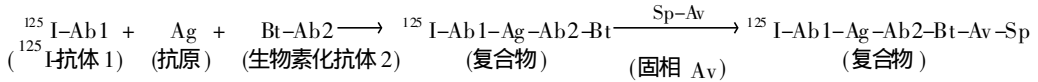
③ 固相亲合素-生物素化抗体-待测抗原- ^{125}I 标记抗体, 称为双位点夹心 BAS-IRMA 法。Odell 等^[3]用 Av 包被塑料珠球, 以 ^{125}I 标记抗 TSH 单抗, 首先建立 BAS-IRMA 检测 hTSH, 灵敏度达 0.06mIU/L。本文作者曾采用 Av 包被塑料试管和 ^{125}I 标记抗 TSH 多抗建立了试管双位点夹心 BAS-IRMA, 用于检测 hTSH, 灵敏度为 0.04mIU/L, 是同等条件下 IRMA 法灵敏度的三倍, 且检测范围扩大了。

④ (固相抗原+待测抗原)-生物素化抗体- ^{125}I 标记亲合素, 称为新型的 LAB 法。此法将 BAS 与试管固相抗原竞争法相结合, 建成新型 BAS-IRMA 固相抗原竞争法。此法最大优点是使用 ^{125}I -Av (或 Sa) 为示踪剂, 可以通用于固醇激素、甲状腺激素、前列腺素类等多种小分子化合物的检测, 固相半抗原结合物经无水乙醇处理, 结合非常牢固, 可长期保存, 反应和测定在同

一管内完成,操作简便,也有利于分析自动化

2.2 BAS作为分离剂

BAS作为分离剂,其基本原理是:凡具有多位决定簇的抗原,既与生物素化单抗结合,又与放射性核素标记的另一单抗结合,在液相中生成



BAS作为分离剂,其特点是克服了颗粒固相 IRMA 多次离心洗涤的麻烦,其次是由于 Av 与 Bt 结合牢固,定量可靠 Zahradalk 等^[4]用 BAS作为分离剂测定人促肾上腺皮质激素(hACTH),变异系数小于 5%,灵敏度可达 2ng/L

2.3 展望

BAS-IRMA 技术的关键是配对抗体的筛选。随着基因工程、免疫学、分子生物学的发展,筛选出高特异性配对抗体成为可能。BAS具有高灵敏度、高特异性、高稳定性、操作简便等优点,便于临床推广应用, Nichols 研究所已成功地 将 BAS 用于 TSH、CEA、HCG(人绒毛膜促性腺激素)、ACTH 和 Ferritin(铁蛋白)等多种商品试剂盒。预计 BAS 在放射免疫分析方面今后会有更多应用。

3 BAS在体内放射性核素诊断和放射免疫治疗中的应用

1978年, Golderberg 等用¹³¹I 标记 CEA 抗体对肿瘤转移灶进行诊断,开辟了放射免疫显像新领域。1986年, Martin 提出了放射免疫导向手术(RIGS)这一新概念。所谓 RIGS 系统,就是在肿瘤手术期间,首先注入标记的抗肿瘤抗体,让其在肿瘤部位聚集,然后用手持式 γ 探头直接对准可疑的病灶区,以便快速而准确地区分肿瘤部位的一种新技术。1987年, Hnatowich 等把 BAS 预定位技术引入 RII。所谓预定位技术,就是首先将未标记的抗肿瘤抗体注入体内,让其在肿瘤部

位聚集,待肿瘤结合抗体与未结合抗体之比达到最大值,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,以达到肿瘤显像治疗和降低本底的效果。由于抗体与核素的结合反应发生在体内,故其又称为“体内标记”技术。1989年, Sinityn 等将 BAS 引入 RIGS 系统,用于动物实验研究。近年来, BAS 预定位技术已广泛用于肿瘤的 RII, BAS-RIGS 已用于临床研究, BAS 在 RIT 中的应用也已开始实施。

3.1 BAS预定位技术应用于 RII

BAS 预定位技术用于 RII 有两种基本方法,即两步法和三步法。

两步法又分为 A、B 两种方法。

A 法: 静脉注射 Av(或 Sa)化的抗体,一定时间后,注射放射性标记的 Bt。Hnatowich 等^[5]在小鼠体内注射 Av-IgG 包被的琼脂糖小珠后,注射¹¹¹In-Bt, 6小时后进行 γ 扫描,可见清晰的靶目标显像,本底极低。Rowlinson 等^[6]在裸鼠体内注射 Sa 的单抗后,注射¹¹¹In-Bt, 实验组小鼠瘤/正常组织(肾除外)的放射性比值达 4。Rosebrough 等^[7]及 Van-Osdol 等^[8]对此法也作了报道。Kalofonos 等^[9]用此法对 10 位非小细胞肺癌患者进行显像, 24 小时内 7% 放射性经肾排除;另给 8 位病人只注射¹¹¹In-DTPA-Bt, 同样探测到肿瘤, 24 小时内经肾排除 83% 放射性,但瘤/本底比值低于注射过 Sa 抗体者,尤其是他们发现,给 3 位病人注射 Sa 抗体后再注射

$^{111}\text{In-Bt}$ 时,其瘤肺比值明显高于单独注射 $^{111}\text{In-Bt}$ 者($P < 0.05$)。

B法:先注射生物素化抗体,2~3天后当循环抗体有足够减少时,再局部注射放射性标记的 Av 。注射部位主要是腹腔。Hnatowich等^[5]在小鼠体内先注射 Bt -抗体包被的琼脂糖小珠后,再注射 $^{111}\text{In-Av}$ 。由于 Av 与正常组织有交叉反应,本底较高,后来以 Sa 代替 Av 。此实验结果与直接注射标记抗体相比,瘤本底比值均明显提高,但非特异性积聚较高,肝和肾摄取的放射性较多,这可能是由于血中 Sa-Bt 化抗体复合物在这些器官沉积的结果。近来,许多研究者用此法进行动物实验,均得到较好结果^[8,10~12]。Paganelli等^[13]把此法用于八位卵巢癌患者:腹腔注射2mg生物素化抗体,3~5天后腹腔注射500ml(100~150g) $^{111}\text{In-Sa}$ 生理盐水,30分钟即可显像,其结果与MRI吻合,瘤与非瘤组织比值为1.7±1.1。后来,同一作者将此法进一步用于临床研究^[14]。

此外,有一种方法:先注射 Av 或 Sa ,数小时后注射标记的 Bt 。此法与A法类似,但第一步不是注射 Av 的抗体,而是注射 Av ,因而不是抗体与病人灶区抗原的特异性结合,而是 Av 与病人灶区非特异性结合,所以此法仅类似于放免显像。Hnatowich等^[15]给患CEA瘤的裸鼠首先注射50g Sa ,3小时后再注射 $^{111}\text{In-Bt}$,24小时后处死动物显像,此法和直接注射标记抗瘤抗体的瘤与血的放射性比值分别为10.6和1.5,显然,靶非靶比值大大提高了。Rusckowski等用此法对动物也作了研究^[16]。Samuel等^[17]将此法用于血管移植感染的病人,首先注射 Av ,24小时后注射 $^{111}\text{In-Bt}$,在注射 $^{111}\text{In-Bt}$ 后10分钟到2小时内可得到全身显像,注射 $^{111}\text{In-Bt}$ 后1小时可进行SPECT显像。

三步法亦分为A、B两种方法。

A法:巧妙地将体外免疫组化ABC法中常用的BAS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。其方法为:首先将Protein A包被的琼脂糖小珠植于体内,作为 Av 结合抗体的靶目标(Protein A 与抗体 Fc 段有特异性亲和作用);接着注射 Av 结合的抗体;最后注射放射性标记 Bt 。本法使抗体通过 Bt 中间桥与 Av 交联,用BAS来提高肿瘤定位作用。Hnatowich等^[5]用本法观察了两种标记途径($^{111}\text{In-Bt}$ 和 $^{111}\text{In-Av}$)在体内的定位效果,取得较好结果。

B法:三步法是建立在如下两个事实基础之上:①单克隆抗体需要24~48小时才能在肿瘤部位达到最大聚集,此时血循环中的抗体尚未完全清除;②循环中的亲合素-抗体复合物很快被肝脏摄取^[18]。因此,本法的给药方式为:首先将生物素化抗体注入体内;24~48小时后注射过量的非标记 Av ,以便使血循环中的抗体快速清除和使结合了生物素化抗体的肿瘤亲合素化;最后,注射标记 Bt ,以便与肿瘤部位结合的 Av 结合。因为 Av 有四个结合位点,理论上一分子 Av 可结合一分子以上的标记物,所以本法有放大作用。Paganelli等首先将本法用于动物实验^[19],并在此基础上用于临床研究^[9]。给CEA阳性病人静脉注射1mg生物素化 McAb ,3天后待血液和正常组织内非特异性结合的 McAb 排出后注射 Av 4~5mg,48小时后注射 $^{111}\text{In-DTPA-Bt}$ 。结果表明,血中 $^{111}\text{In-Bt}$ 呈指数下降,其快时相半减期为5±3分钟,2小时经肾排除58%±5%,3小时内可探测到肿瘤,24小时肾脏摄取约2%,且肾的放射性逐渐减少。此法可用于SPECT显像。

3.2 BAS应用于RIGS

BAS应用于RIGS的给药方法为:先注射 ^{125}I 标记的生物素化抗体,数天后注入 Av 。Sinitzyn等^[18]给荷CEA瘤裸鼠注射 ^{125}I 标记的生物素化抗体抗CEA抗体,24小时后可使血中的放射性下降20%,注射 Av 后15分钟下降90%~95%,而常规方法需等待20~

25天。另有研究者用此法进行了动物研究^[20,21]。Stella等^[22]将此法应用于结直肠癌手术病人:先注射¹²⁵I生物素抗体后再注射冷的Av,3~5天内血中的放射性下降91%~97%。病人可在7天后进行手术,而常规方法需等待4周。这对手术病人的早期诊断提供了有效方法。

3.3 BAS预定位技术应用于 RIT

预定位技术不仅可以应用于 RII,而且在此基础上可用于 RIT。RIT也有两步法和三步法。用核素标记的双功能抗体可用于 RIT两步法^[23]。为了更好地提高治疗效果,Britton提出 RIT三步法准则:①合格的抗体(要求具有高亲和力,能长时间停留在肿瘤部位,穿透力小);②能够迅速从血循环中清除放射性标记物;③用于治疗的放射性核素要求半衰期较长,可标记小的配体,对肿瘤有良好的穿透力,且能快速从肾中清除而无重吸收。BAS引入 RIT不仅符合以上条件,而且 Paganelli等^[24]已成功地将 BAS用于 RII三步法,这为 BAS进一步用于 RIT三步法打下了基础。

RIT三步法的操作过程如下^[23]:

①制备生物素化抗体 Ab-Bt。Ab-Bt和肿瘤作用,并可用¹¹¹In或^{99m}Tc标记。

②注射¹¹¹In或^{99m}Tc标记的 Ab-Bt。靶瘤由 RII定位确定。

③注射 Sa(Sa用^{99m}Tc标记)。Sa和肿瘤部位 Ab-Bt结合成 Ab-Bt-Sa,以便将血中的 Ab-Bt-Sa排除到肝,并用 RII证实肿瘤的吸收和肝的清除状况。

④注射治疗用的放射性核素标记的生物素(Bt-R)。Bt-R和肿瘤中的 Ab-Bt-Sa结合成 Ab-Bt-Sa-Bt-R,未结合部分通过肾清除掉。

BAS用于 RIT的实例未见文献报道,但从已掌握的资料来看,RIT三步法有可能发展成为一种有前景的肿瘤治疗方法。

3.4 展望

BAS预定位技术用于肿瘤显像研究和 BAS用于 RIGS研究具有以下优点:① RIGS使用半衰期较长的核素¹²⁵I标记生物素化抗体,使手术病人的早期诊断成为可能,而预定位技术使短半衰期核素的应用变为现实,且可在注射标记物数小时内得到显像;②标记物在血循环中滞留时间短,对肝和骨髓的损伤较小;③标记物的快速清除有助于降低本底,提高靶/非靶的比值;④预定位技术不需要采用放射性核素标记抗体,防止了抗体免疫活性的损伤。但是,由于这些方法多需反复注射 mg级的蛋白质,很有可能引起免疫反应。另外,人们曾担心内源性生物素可能影响探测结果,使本底放射性升高。注射 Av 抗体后通常需 3天左右才能注射 Bt核素,与肿瘤结合的 Av 抗体可能被内源性 Bt饱和而不能再接受核素标记的 Bt,但从临床应用的结果来看,内源性 Bt的影响似乎并不是一个严重的问题^[9,25,26]。

随着基因工程和分子生物学的发展,制备高特异性人源性 McAb成为可能。特别是 BAS本身具有独特的优越性,BAS在肿瘤核素诊断和核素导向治疗中的应用将具有广阔的前景。

参 考 文 献

- Guesdon JL et al. Histochem Soc, 1979; 27 (8): 1131
- Peters J et al. Clin Chem, 1989; 35(4): 573
- Odell WD et al. Clin Chem, 1986; 32(10): 1873
- Zahradk R et al. Clin Chem, 1989; 35(5): 804
- Hnatowich DT et al. J Nucl Med, 1987; 28: 1294
- Rowlinson G et al. J Nucl Med, 1988; 29: 762 (abs)
- Rosebrough SF et al. Nucl Med Biol, 1993; 20: 663
- Van-Osdol WW et al. J Nucl Med, 1993; 34: 1552
- Kalofonos HP et al. J Nucl Med, 1990; 31: 1791

- 10 Saga T et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 2160
 11 Zhengsheng Yao et al. *J Nucl Med*, 1995; 36: 837
 12 Kassrs AI et al. *J Nucl Med*, 1996; 37(2): 343
 13 Paganelli G et al. *J Nucl Med*, 1990; 31: 735 (abs)
 14 Paganelli G et al. *Eur J Nucl Med*, 1992; 19: 322
 15 Hnatowich DJ et al. *Nucl Med Biol*, 1993; 20: 189
 16 Ruskowski M et al. *J Nucl Med*, 1992; 33: 1810
 17 Samuel A et al. *J Nucl Med*, 1996; 37(1): 55
 18 Snitsyn VV et al. *J Nucl Med*, 1989; 30: 66
 19 Paganelli G et al. *Int J Cancer*, 1990; 45: 1184
 20 Kobayashi H et al. *J Nucl Med*, 1994; 35: 1677
 21 Ogihara-Umeda I et al. *Cancer Res*, 1994; 54: 463
 22 Stella M et al. *Dis Colon Rectum*, 1994; 37: 335
 23 Britton KE et al. *Nucl Med Commun*, 1991; 12: 333
 24 Paganelli G et al. *Cancer Res*, 1991; 51: 5960
 25 Schechter B et al. *Eur J Biochem*, 1990; 189: 327
 26 Ruskowski M et al. *J Nucl Med*, 1993; 34: 2409

(收稿日期: 1996-09-09)

乏氧组织显像剂及其应用

国家标准物质研究中心(北京, 100013) 朱霖 综述
 中国医学科学院阜外医院(北京, 100037) 刘秀杰 审核

摘要: 简述了乏氧组织显像剂的发展过程, 阐明了乏氧组织显像在临床诊断中的重要性以及显像原理, 指出理想的乏氧组织显像剂应具备的条件, 详细探讨了乏氧组织显像药物的研究和应用, 描述了^{99m}Tc标记的乏氧组织显像剂的应用前景。

关键词: 乏氧组织显像 硝基咪唑 放射性药物

组织乏氧是临床上多种重要疾病的一个主要特征, 组织氧水平在这些疾病的诊断中十分重要。由于以往体内的测定难度, 限制了它在临床上的应用。目前已知, 作为放射增敏剂的硝基咪唑类化合物, 其一系列细胞内代谢取决于组织中的氧的可应用程度, 这就意味着能利用放射性核素标记这类化合物, 用于乏氧组织的显像研究, 从而达到临床诊断目的^[1]。

乏氧显像能直接提供组织低氧但存活的依据, 这些信息在临床诊断决策中起到重要作用^[1-4]。在心肌中, 乏氧显像能区分存活/缺血和坏死。梗塞的心肌, 用于临床诊断, 能极大地改善心血管病人的治疗; 脑乏氧显像弥补了灌注显像只能辨认低血流区域而无法区分疤痕和局部缺血的缺点; 肿瘤乏氧与其放射治疗的不敏感性 & 局部复发有关, 准确确定肿瘤氧态的非侵入性测定, 即肿瘤乏氧

显像研究, 将在病人进行乏氧治疗中起到极其重要的作用。

本文就当前用于乏氧组织显像的放射性药物的发展和研究现状及应用前景作简要综述。

1 乏氧组织显像剂的发展

1955年, Nakamura发现5-硝基咪唑(azomycin)能迅速抗厌氧感染。在以后的40年中, 人们又合成了许多硝基咪唑类似物(抗菌素的产生)^[5]。硝基咪唑在乏氧环境下的这种特性, 已用做乏氧组织增敏剂研究, 将这些化合物用于体内乏氧组织显像的设想, 早在10年前就已提出, 然而近期才将其变为现实^[1, 6, 7]。

80年代初期, Chapman等人提出, 放射性标记的硝基杂环化合物能提供一种非侵入技术, 即用显像的方法(PET或SPECT)测