

·实验核医学·

¹²⁵I 标记的血管内皮生长因子受体 3 多抗在大鼠体内的分布研究

李生娇 吕春堂 郭伟 韩玲 谢卫红 任国欣

【摘要】 目的 研究血管内皮生长因子受体 3 多抗(Flt4 PcAb)在大鼠体内的分布,为进一步应用 Flt4 PcAb 进行前哨淋巴结(SLN)的特异性定位奠定基础。方法 应用氯胺 T 法对 Flt4 PcAb 行 ¹²⁵I 标记;将 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 经大鼠足背皮下注射后不同时间分批处死大鼠,取血液、腋窝淋巴结及主要脏器测量其放射性计数,经衰变校正后计算每克组织的百分注射剂量率(%ID/g),观察标记物的生物学分布。结果 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 的标记率达 46.5%,放射性比活度为 1.72×10^{12} Bq/g,放射性化学纯度达 96.7%;大鼠体内分布实验显示:¹²⁵I-Flt4 PcAb 主要分布于腋窝淋巴结及血液中,其余脏器较低;注射后 16 h 内腋窝淋巴结与血液单位质量的放射性比值均大于 2.5。结论 ①应用氯胺 T 法可以成功标记 Flt4 PcAb;②皮下注射后 Flt4 PcAb 的体内分布表现为淋巴结浓集;③本实验为进一步应用 Flt4 PcAb 进行 SLN 的特异性定位奠定了基础。

【关键词】 碘放射性同位素;血管内皮生长因子受体 3;前哨淋巴结;大鼠

【中图分类号】 R817.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)02-0065-03

Study on ¹²⁵I-vascular endothelial growth factor receptor-3 polyclonal antibody biodistribution in rat

LI Sheng-jiao¹, LU Chun-tang², GUO Wei¹, HAN Ling³, XIE Wei-hong¹, REN guo-xin¹

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China.; 3. Department of Radiation Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To study the biodistribution of ¹²⁵I-Flt4 PcAb in rat and to establish the foundation of sentinel lymph node (SLN) exceptional orientation. **Methods** Flt4 PcAb was labeled with ¹²⁵I via chloramine T method. ¹²⁵I-Flt4 PcAb was subcutaneous injected in dorsum of foot in rats. The rats were killed at different stages after injection and the popliteal lymph nodes and major organs were taken out, then the radioactivity count of those organs and lymph nodes were measured. **Results** The labeling efficiency was 46.5%. The specific activity and the radiochemical purity of ¹²⁵I-Flt4 PcAb were 1.72×10^{12} Bq/g and 96.7% respectively. It showed higher distribution in popliteal lymph nodes and blood than the other organs. The radioactivity ratio of popliteal lymph node to blood was more than 2.5 in 16 hours after injection. **Conclusions:** ①It was successful to label Flt4 PcAb with ¹²⁵I via chloramine T method.②Flt4 PcAb would concentrate in lymph node after subcutaneous injection. ③This study provided experimental basis for SLN exceptional orientation with Flt4 PcAb.

【Key words】 Iodine radioisotopes; Vascular endothelial growth factor receptor-3; Sentinel lymph node; Rat

为了探索研究血管内皮生长因子受体 3 多抗

(vascular endothelial growth factor-3 polyclonal antibody, VEGFR-3PcAb, 亦称 Flt4 PcAb)对前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)的特异性定位作用,我们曾用氯胺 T 法对 ¹²⁵I 标记 Flt4 PcAb 进行了初步探讨,并进行了初步动物实验,收到了一定成效^[1]。本实验旨在进一步研究 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 在大鼠组织内的分

基金项目: 上海市重点学科(优势学科)建设项目资助(Y0203)

作者单位: 1. 200011,上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔医学院口腔颌面外科,上海市口腔医学研究所(李生娇,郭伟,谢卫红,任国欣); 2. 200433 上海,第二军医大学附属长海医院口腔科(吕春堂); 3. 200433 上海,第二军医大学海医系放射医学教研室(韩玲)

通讯作者: 郭伟 (E-mail: guoweicn@yahoo.com)

布,为进一步应用 Flt4PcAb 进行 SLN 的特异性定位奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

兔抗鼠 Flt4 PcAb: Sant Cruz 公司产品(SC-637); Na¹²⁵I: 中国原子能研究院(无还原剂、无载体); SN-695B 型智能放免 γ 测量仪: 上海原子核研究所日环仪器一厂; 电子分析天平: METTLER 公司。

1.1.2 实验动物: Sprague-Dawley (SD)大鼠 80 只, 随机分为 10 组, 每组 8 只, 雌雄不限, 体质量约为 250g。

1.2 方法

1.2.1 Flt4 PcAb 的 ¹²⁵I 标记

应用氯胺 T 法标记兔抗鼠 Flt4 PcAb, 投入的 Flt4 PcAb 量为 10 μ g (体积 50 μ l), Na¹²⁵I 为 37 MBq。用 Sephadex G-50 层析柱分离纯化标记产物, 收集蛋白峰各管产物, 过滤除菌以备用。标记产物的标记率按下式计算: 标记率=蛋白峰各管放射性计数的总和/投入的总放射性计数 \times 100%; 放化纯度检测应用纸层析法, 展开剂由正丁醇:吡啶:水按 6:4:3 体积比混合, 放化纯度=原点部位每分钟计数率/层析纸总每分钟计数率 \times 100%; 测定蛋白峰收集液的放射活性计数, 根据投入的抗体总量计算标记物的比活度。

1.2.2 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 在 SD 大鼠体内的分布

SD 大鼠分为 0.5、1、2、4、8、16、32、48、64、128 h 共 10 组。实验前 30 min 腹腔注射 1%氯化钾溶液 (10 μ l/g)封闭甲状腺摄取碘。乙醚麻醉并固定大鼠, 于右侧足背皮下缓慢注射 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 100 μ l/0.44 MBq, 按不同时间分组, 各取心脏全血 1 ml 后, 再处死动物并摘除心、肺、肝、脾、肾以及右侧腋窝淋巴结, 电子天平称重, SN-695B 型智能放免 γ 测量仪测 γ 计数, 并进行统计学分析。

1.3 统计学分析

结果用均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)表示, 并采用 *t* 检验行显著性分析。

2 结果

2.1 Flt4 PcAb 的 ¹²⁵I 标记结果

¹²⁵I 标记的 Flt4 PcAb (¹²⁵I-Flt4 PcAb)应用 Sephadex G-50 层析柱分离纯化后, 收集蛋白峰各管。计算标记产物的标记率为 46.5%, 蛋白峰收集液采用新华 1 号滤纸行纸层析, 计算放射性比活度为 1.72 \times 10¹² Bq/g, 放化纯度为 96.7%。

2.2 不同时间点各组织的 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 分布

经放射性衰变校正后计算各组织不同时间点的百分注射剂量率 (%ID/g)见表 1。由表 1 可见, 血液、心脏、肺脏、肝脏、脾脏及肾脏中的放射性分布均低于淋巴结中的放射性分布, 表明该标记物能特异地浓集于淋巴结。

注射 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 后腋窝淋巴结与血液单位质量的放射性比值见图 1。

表 1 不同时间点各组织的 ¹²⁵I-Flt4 PcAb 值 (%ID/g)

时间(h)	腋窝淋巴结	血液	心脏	肺脏	肝脏	脾脏	肾脏
0.5	5.225 \pm 0.116	0.1625 \pm 0.0158*	0.0013 \pm 0.0005*	0.0029 \pm 0.0008*	0.0025 \pm 0.0008*	0.0045 \pm 0.0009*	0.0051 \pm 0.0011*
1	4.669 \pm 0.214	0.1938 \pm 0.0245*	0.0016 \pm 0.0005*	0.0031 \pm 0.0008*	0.0026 \pm 0.0007*	0.0046 \pm 0.0007*	0.0071 \pm 0.0024*
2	3.775 \pm 0.258	0.2388 \pm 0.0314*	0.0018 \pm 0.0009*	0.0041 \pm 0.0008*	0.0030 \pm 0.0011*	0.0048 \pm 0.0009*	0.0098 \pm 0.0015*
4	2.663 \pm 0.212	0.3100 \pm 0.0396*	0.0019 \pm 0.0006*	0.0053 \pm 0.0010*	0.0031 \pm 0.0010*	0.0049 \pm 0.0010*	0.0105 \pm 0.0014*
8	1.523 \pm 0.117	0.4050 \pm 0.0251*	0.0021 \pm 0.0008*	0.0060 \pm 0.0009*	0.0036 \pm 0.0011*	0.0051 \pm 0.0006*	0.0118 \pm 0.0016*
16	1.133 \pm 0.093	0.6238 \pm 0.0550*	0.0035 \pm 0.0008*	0.0100 \pm 0.0008*	0.0039 \pm 0.0012*	0.0056 \pm 0.0018*	0.0126 \pm 0.0021*
32	0.314 \pm 0.029	0.7738 \pm 0.0250*	0.0043 \pm 0.0010*	0.0109 \pm 0.0012*	0.0041 \pm 0.0008*	0.0060 \pm 0.0014*	0.0134 \pm 0.0022*
48	0.200 \pm 0.041	0.7038 \pm 0.0697*	0.0118 \pm 0.0010*	0.0296 \pm 0.0037*	0.0115 \pm 0.0011*	0.0128 \pm 0.0010*	0.0139 \pm 0.0027*
64	0.179 \pm 0.018	0.6450 \pm 0.0359*	0.0070 \pm 0.0011*	0.0230 \pm 0.0039*	0.0056 \pm 0.0007*	0.0109 \pm 0.0011*	0.0244 \pm 0.0013*
128	0.178 \pm 0.015	0.3438 \pm 0.0389*	0.0046 \pm 0.0011*	0.0165 \pm 0.0016*	0.0050 \pm 0.0009*	0.0054 \pm 0.0005*	0.0061 \pm 0.0008*

*: 与同时间点淋巴结的 %ID/g 相比, *P*<0.001

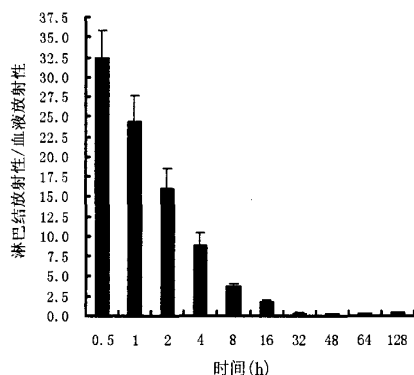


图1 注射 ^{125}I -Flt4 PcAb 后腋窝淋巴结与血液的放射性比值随时间的变化

由图1可见,不同时间腋窝淋巴结与血液单位质量的放射性比值变化较大,由此可以为合理选择显像时机、避免显像结果受血液本底的干扰提供一定参考。

3 讨论

Flt4 是一种细胞膜受体蛋白,在成年动物只有淋巴内皮细胞表达,是淋巴内皮细胞特异的分子标志物^[2]。为了研究 Flt4 PcAb 在体内是否具有淋巴结的导向定位能力,必须对其进行体内的示踪观察。鉴于大鼠与人在药物代谢方面的相似性,而且大鼠来源方便、价廉,我们选用大鼠作为实验动物。本实验的目的即是通过大鼠的体内实验,借助 ^{125}I 的示踪作用,研究 Flt4 PcAb 的生物学分布特点。在碘标记技术中,氯胺-T 法是一种普遍应用的技术,本实验应用此方法对 Flt4 PcAb 标记,标记率达 46.5%;对于放射性制剂的质量控制,一般要求标记产物的放化纯度在 95% 以上^[3],本次标记的标记物经纯化后放化纯度达 96.7%,符合应用于实验的条件。这些结果均为进行标记物的体内实验奠定了良好的基础。

SD 大鼠体内实验显示,经足背皮下注射后, ^{125}I -Flt4 PcAb 在腋窝淋巴结内分布较高,与同时时间点的血液、心、肺、肝、脾、肾的分布相比差异有显著性 ($P < 0.001$);其次, ^{125}I -Flt4 PcAb 分布较高的是血液,但在 16 h 以内,腋窝淋巴结与血液单位质量的放射性比值均大于 2.5;随血液中比放射性的增高及腋窝淋巴结比放射性的下降,至 32 h

时比值小于 1。根据文献报道, $T/NT > 1.5$ (瘤/血 > 1) 时才适合 T/NT 扫描,而平面显像对于更小更深的肿瘤需要更高的比值才能获得较好的结果^[4],本实验模拟常用的 SLN 定位时核素的注射方式^[5],探测其引流淋巴结摄取核素的情况,结合本实验的结果我们认为,若用于 SLN 的探测,以注射后 16 h 以内适宜,尤其是 8 h 以内较佳,32 h 以后由于血液的比放射性已经大于腋窝淋巴结的比放射性,会对探测效果产生很大影响。研究结果也可以看出,在 128 h 以内,与腋窝淋巴结和血液相比,其余各组织器官的 ID(%)/g 均较小,因此,理论上讲,若该抗体用于淋巴结显像,其余各组织器官应该干扰不大。另外,分析实验结果我们认为, ^{125}I -Flt4 PcAb 在血浆中清除速率较慢,是导致淋巴结/血液值下降较快的原因之一,因此,应设法缩短标记抗体在血液循环中的存留时间,如能否利用抗体片段等技术^[6],以减少标记抗体的非特异性浓集。当然,本实验的结果只是初步证实 Flt4 PcAb 能够特异地在淋巴结浓集,但是如何将 Flt4 PcAb 应用于临床 SLN 的定位检测中,是需要进一步研究的课题。

参 考 文 献

- 1 李生娇,吕春堂,周中华,等. ^{125}I 标记抗 Flt4 多抗的制备及对淋巴结定位的动物实验. 口腔颌面外科杂志 2004, 14 (1):24-26.
- 2 Jussia L, Valtola R, Partanen TA, et al. Lymphatic endothelium and kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. Cancer Res, 1998, 58(8): 1599-1604.
- 3 周申. 核医学. 第四版. 北京:人民卫生出版社, 1996. 26.
- 4 Ballou B, Beiland J, Levine G, et al. Tumor localization using F(ab) 2 from a monoclonal IgM antibody: Pharmacokinetics. J Nucl Med, 1985, 26(3): 283-292.
- 5 Werner JA, Dunne AA, Ranmaswamy A, et al. The sentinel node concept in head and neck squamous cell carcinoma cell carcinoma critical analysis in 100 patients. Laryngorhinotologie, 2002, 81 (1): 31-39.
- 6 Zhu H, Jain RK, Baxter LT. Tumor pretargeting for radioimmunodetection and radioimmunotherapy. J Nucl Med, 1998, 39(1): 65-76.

(收稿日期: 2006-06-30)