

CNIC-01404

SMC-0153

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE AND TECHNOLOGY REPORT

放射免疫显像在卵巢癌导向诊断中的
实验研究及临床应用

Radioimmunoimaging of ^{99m}Tc -OC125 on Experimental
Research and Clinical Application of Ovarian Cancer

(In Chinese)



中国核情报中心
原子能出版社

China Nuclear Information Centre
Atomic Energy Press

图书在版编目 (CIP) 数据

中国核科技报告 CNIC-01404, SMC-0153: 放射免疫显像在卵巢癌导向诊断中的实验研究及临床应用/张弘等著.
—北京: 原子能出版社, 2000. 1

ISBN 7-5022-2161-1

I. 中... II. 张... III. 核技术-研究报告-中国 IV. TL-2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 14819 号

原子能出版社出版 发行

责任编辑: 武洁

社址: 北京市海淀区阜成路 43 号 邮政编码: 100037

中国核科技报告编辑部排版

核科学技术情报研究所印刷

开本 787×1092 mm 1/16 印张 1/2 字数 22 千字

2000 年 3 月北京第一版 2000 年 3 月北京第一次印刷

印数: 1—150

定价: 5.00 元



张弘：苏州医学院附属第二医院妇产科主治医师。1993 年毕业于华西医科大学。1999 年研究生毕业，获苏州医学院妇产科硕士学位。

ZHANG Hong: A physician in charge of gynecological and obstetric department of the Second Affiliated Hospital of Suzhou Medical College. Graduated from West China University of Medical Science in 1993. Finished the postgraduate course in Suzhou Medical College in 1999 and received Master degree.

CNIC-01404

SMC-0153

放射免疫显像在卵巢癌导向诊断中的 实验研究及临床应用

张 弘 徐惠民 吴锦昌

(苏州医学院, 215007)

摘 要

利用人卵巢浆液性囊腺癌细胞株HO8910接种裸鼠形成移植瘤, 以钨标记抗卵巢癌单克隆抗体($^{99m}\text{Tc-OC125}$)对其行放射免疫显像, 设置钨标记正常小鼠IgG、钨标记抗HO8910抗体作为不同显像剂对照; 以脑胶质瘤作为不同肿瘤间对照, 显像摄片并解剖后测定计算T/NT比值。结果表明卵巢癌皮下瘤裸鼠注入 $^{99m}\text{Tc-OC125}$ 后4~6 h显像清晰, T/NT比值与各对照组相比差异有显著性。在动物实验取得良好结果的基础上, 对16例临床诊断为卵巢肿瘤(或卵巢癌术后)患者行20例次放射免疫显像, 结果与手术结果相比符合率极高, 并且能检出卵巢癌术后复发的早期病灶, 其灵敏度高于血清肿瘤标记物检测及一般影像学检查, 能有效地指导临床卵巢癌的诊疗, 证实放射免疫显像在卵巢肿瘤的定性及术后随访中具有重大价值。

Radioimmunoimaging of ^{99m}Tc -OC125 on Experimental Research and Clinical Application of Ovarian Cancer

(In Chinese)

ZHANG Hong XU Huimin WU Jinchang
(Suzhou Medical College, 215007)

ABSTRACT

The objective of research is to investigate radioimmunoimaging (RII) on ovarian tumor by labelling anti-ovarian cancer monoclonal antibody (OC125) with ^{99m}Tc . The nude mice models were produced by injection ovarian serous cystadenocarcinoma cell HO8910. Experimental group was injected with ^{99m}Tc -OC125 as tracer and control groups were injected normal mice IgG labelled with ^{99m}Tc and anti-HG8910 antibody labelled with ^{99m}Tc . RII using ^{99m}Tc -OC125 McAb was also performed on 4 nude mice model of glioma (control group). Imaging positive rate, negative rate and tumor/non-tumor ratio were calculated. Results show positive rate of imaging of tumor was 100%. The most distinct pictures were gained between 4 to 6 h after injection of tracer. T/NT ratios of experimental group were higher than that of control groups ($P<0.05$). RII of OC125 McAb labelled with ^{99m}Tc on the nude mice models was sensitive and specific. 16 ovarian neoplasm patients were received RII 6 h after intravenous injected OC125 McAb labelled with ^{99m}Tc . Four patients of malignant tumor repeated RII after operation and chemotherapy. The result of RII was accorded perfectly with operation. RII also can find micro recurrence lesion of post-operation. The sensitivity and specificity was more excellent than the radioimmunoassay of CA125. RII is useful for defining character of ovarian tumor, especially for detecting early recurrence lesion of post-operation patients.

前 言

卵巢癌恶性程度高,其死亡率居女性生殖系统肿瘤第一位,五年存活率始终停留在30%,主要因为卵巢癌早期无症状,病情进展快,70%患者就医时已属晚期,虽经手术及化疗,但复发率很高^[1],且缺乏敏感的随访指标,给治疗带来了很大的困难。

肿瘤的放射免疫显像(radioimmunoimaging, RII)是利用肿瘤单克隆抗体与肿瘤抗原结合的特异性,经放射性核素标记后注入人体后,这种标记后的单抗能特异识别肿瘤抗原,引导放射性核素与肿瘤定向结合,通过 γ 闪烁照相机或扫描,根据放射性浓聚区在体内的分布显示出肿瘤病灶部位的一种将免疫学与影像学相结合的新的诊断技术。放射免疫显像用于卵巢癌的诊断始于90年代,国外以德国及美国开展较为活跃。

从目前已取得的一些结果分析,应用发射 γ 射线的放射性核素标记卵巢癌单克隆抗体进行放射免疫显像能够鉴别卵巢肿瘤的良恶性,良性肿瘤不显像,而恶性肿瘤则在肿瘤部位出现放射性浓集区,并且对于术后复发的微小病灶亦能检出,其灵敏度超过了一般的影像学检查,有学者提出放射免疫显像可以取代二探术或在放免显像呈阳性后行二探术更为合理^[2]。本研究通过吸取国外的某些成功经验,不断改进与完善,使放免显像技术尽快从实验走向临床。首先从动物实验入手,通过钼标记抗卵巢癌单抗(^{99m}Tc-OC125)作为显像剂在裸鼠皮下移植瘤及腹腔移植瘤中的显像效果观察,证实了放免显像具有灵敏度高、特异性强的优点,随后运用于临床,在卵巢肿瘤患者术前显像及卵巢癌术后随访中进一步证实放免显像对于良恶性肿瘤的鉴别与手术结果的符合率极高,在术后随访中的结果尤为突出,可以早于磁共振成像及血清肿瘤标志物检测发现复发病灶,为积极治疗争取了宝贵的时机,如果这一技术推广应用于临床,能改善卵巢癌患者的预后,是卵巢癌患者的福音。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、材料及设备

RPMI1640 培养基, GIBCO 产品。L-谷氨酰胺, 上海政翔化学试剂研究所。HEPES, SIGMA 产品。小牛血清, 杭州四季青生物工程材料研究所。胰酶, 上海浦东新区秦镇生物试剂厂。硫酸铵, 南京化学试剂厂。葡聚糖凝胶 G50, 上海光明化学试剂厂。聚乙二醇(PEG), 上海试剂总厂。羊抗兔酶标抗体(辣根过氧化物酶), 底物(邻苯二胺, OPD), 上海华美生物制品有限公司。正常小鼠 IgG, Sigma 产品。邻苯二甲酸氢钾(化学纯), 上海化学试剂总厂。酒石酸钾钠(分析纯), 江苏徐州化学试剂二厂。氯化亚锡, 上海化学试剂二厂。氮气, 无锡医用氧气厂。CA125 放射免疫分析药盒, CENTCOR 产品。卵巢癌单抗放射免疫显像药盒由德国法兰克福大学医学院惠赠。

人卵巢浆液性囊腺癌细胞株 HO8910, 中科院上海细胞所提供。NC 品系裸鼠 20只, 4~6 周龄, 雌性, 苏州医学院附二院神经外科实验室提供, 净化标准达 NASA1000 级裸鼠房饲养, 饲料、饮水及笼具等均灭菌后使用。

钼钨发生器, 中国原子能科学研究院。FA1604S 电子天平, 上海天平仪器厂。pHS-3C 型酸度计, 上海雷磁仪器厂。SN-682 型放射免疫 γ 计数器, 上海核福光电仪器有限公司。751-GW 紫外分光光度计, 上海分析仪器厂。DG3022A 酶联免疫检测仪, 华东电子管厂。XSZ-D 倒置生物显微镜, 重庆光学仪器厂。BB5060 型 CO₂ 培养箱, 上海力申科学仪器

有限公司。DS-7单光子发射型计算机辅助断层仪 (SPECT), 法国 Sophy 公司。

1.2 卵巢癌细胞培养

人卵巢浆液性囊腺癌细胞株HO8910在含10%小牛血清的RPMI1640完全培养液中生长, 加入青霉素100 u/ml, 置37 °C, 5%CO₂培养箱中培养, 每天观察细胞生长情况, 根据细胞生长速度及培养液颜色更换培养液。至细胞生长铺满瓶底时, 吸出培养液, 以0.25% 胰酶3 ml/瓶加入培养瓶消化 20 min, 倒置显微镜下观察细胞皱缩, 吸出胰酶, 加入新培养液以吸球轻轻吹打使细胞松动脱落, 制成细胞悬液, 每瓶扩至2~3瓶。细胞悬液滴半滴于血球计数板内, 以充满不外溢为宜, 按如下公式计算四大格的细胞数:

$$\text{细胞数/ml} = \frac{\text{四大格细胞总数}}{4} \times \text{稀释倍数} \times 10,000$$

至细胞生长达到所需数量时, 吸出培养液, 胰酶5 ml/瓶加入消化15~20 min, 吸出, 生理盐水冲洗至所有细胞脱落, 细胞悬液以2000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 沉淀加入生理盐水, 重复离心去上清, 沉淀加生理盐水调整至所需浓度。

1.3 动物肿瘤模型建立

(1) 卵巢癌皮下移植瘤模型的建立: 12只裸鼠每只均于右侧前肢皮下注射细胞悬液0.5 ml (细胞总量 5×10^6 /只), 注射后每天观察, 注意有无红肿溃破, 待肿瘤形成后每周测量并记录其体积变化。

(2) 卵巢癌腹腔瘤模型的建立: 取4只裸鼠每只腹腔内注射细胞悬液 1×10^7 个 (1 ml), 注射后观察局部有无红肿, 有无注射物溢出, 注意观察其腹部膨胀及消瘦程度的变化。

(3) 脑胶质瘤皮下移植瘤模型的建立: 将皮下接种人脑胶质瘤细胞株SHG-44形成肿瘤的裸鼠内取出移植瘤剪碎, 以1 mm³/鼠, 置于套管针内穿刺注入右前肢皮下, 共4鼠。观察并测量计算体积。

1.4 抗HO8910抗体的制备与鉴定

(1) 家兔2只, 第一周以 HO8910 细胞 4×10^6 /ml注射1.5 ml/兔于耳静脉内; 第二周以相同剂量于皮内多点注射脱敏; 第四周以 3.5×10^6 /ml细胞浓度皮内注射2 ml/兔; 第五周以 6×10^6 /ml于耳静脉内注射1 ml/兔; 第六周采血分离血清。

(2) 取兔血清30 ml加入等量PBS溶液中, 再加入饱和(NH₄)₂SO₄ 40 ml (终浓度为40%), 氨水调节pH至7.8, 置37 °C水浴箱1 h。以3000 r/min离心25 min后, 去上清液, 沉淀溶解于PBS液40 ml中, 加入饱和(NH₄)₂SO₄溶液28 ml (终浓度40%), 氨水调节pH至7.8, 置1 h。以3000 r/min离心25 min后, 去上清液, 沉淀溶解于PBS液28 ml中 (为粗提之多抗)。取层析柱, 称葡聚糖凝胶(G-50)加入蒸馏水中过夜, 充分溶胀后装柱, 以PBS (pH 7.4) 平衡。将粗提之多抗上柱, 下置收集管, 以20%磺硫酸检验洗脱液中蛋白, 待出现絮状沉淀时开始收集洗脱液, 直至沉淀消失。将含蛋白之洗脱液合并入透析袋内, 以聚乙二醇于4 °C冰箱2 h浓缩。将浓缩后之样品以紫外分光光度计于260 nm及280 nm处测吸光度 (OD值), 生理盐水为空白对照, 按下式计算蛋白含量:

$$\text{蛋白含量} = 1.45 \times \text{OD}_{280} - 0.74 \times \text{OD}_{260} \quad (\text{mg/ml})$$

(3) 40孔板以10% HCl浸泡过夜, 次日冲洗凉干备用。HO8910细胞浓度 2×10^6 /ml共3.5 ml, 每孔加入0.1 ml, 37 °C孵育18 h, 光镜下见细胞沉淀于孔内。将细胞板轻轻放入0.25% 戊二醛固定液中约半小时。用PBS (pH 7.4) 洗涤5次, 加入各种稀释度的抗HO-8910抗体

(1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200), 每种稀释度抗体做3份, PBS作对照, 37 °C水浴箱内1 h, 洗涤。加入羊抗兔酶标抗体(II抗)每孔100 μ l, 37 °C水浴1 h, 洗涤。加入底物过氧化氢及显色剂邻苯二胺(OPD), 1 min即显色, 37 °C, 30 min, 以0.05% NaN_3 终止, 于波长450 nm处比色测定, 以大于2倍对照值之最高稀释度为效价。

1.5 抗体的标记

(1) 卵巢癌单抗OC125按放免显像药盒中说明标记。

(2) 正常小鼠IgG及抗HO8910抗体的标记以氯化亚锡还原法标记: 1000 ml双蒸水中加入8.17 g邻苯二甲酸氢钾, 2.82 g酒石酸钾钠, 制成40 mmol邻苯二甲酸氢钾/酒石酸钾钠缓冲液。1 ml浓HCl中加入0.113 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 制成0.5 mol SnCl_2 溶液。取0.5 mol SnCl_2 溶液0.2 ml加入40 mmol邻苯二甲酸氢钾/酒石酸钾钠缓冲液20 ml中, 以10 mol/L NaOH调节pH值至5.5。取上述溶液3.2 ml加入待标记物0.5 ml(正常小鼠IgG或抗HO8910抗体2 mg), 充氮气, 封口, 室温放置21~24 h, 加入 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 淋洗液1~2 ml(100~200 MBq)混匀, 室温置30 min, 即完成标记。取已完成之标记品点样于层析纸, 以生理盐水作展开剂, 1 h后取出层析纸, 按等分剪下分别置入试管内于 γ 计数器计数, 测定标记率。用经人血清白蛋白5 mg/ml浸润干燥后的硅胶纸作固定相, 以乙醇:氨水:水=2:1:5(质量比)混合液作展开剂, 点样于此硅胶层析纸, 3 h后按等分剪下置试管内以 γ 计数器计数, 以测定标记品中的胶体含量。

1.6 裸鼠卵巢癌移植瘤放射免疫显像

(1) 裸鼠卵巢癌模型按如下分组, 每鼠经腹腔注射显像剂15 MBq(含IgG或抗体0.2 mg), 于4 h左右用(SPECT)针孔探头扫描, 24 h再次显像。

表1 裸鼠放免显像实验分组

分组	显像编号	模型种类	显像剂
A	1, 2	卵巢癌皮下瘤	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG
B	7, 8, 9, 10	卵巢癌皮下瘤	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -抗HO8910抗体
C	3, 4, 5, 6, 15, 16	卵巢癌皮下瘤	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -OC125
D	11, 12, 13, 14	脑胶质瘤皮下瘤	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -OC125
E	17, 18, 19, 20	卵巢癌腹腔瘤	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -OC125

(2) 24 h显像后断颈处死, 立即采血, 解剖肿瘤组织及各脏器(心、肺、肝、脾、肾、胃、肠、肌), 分别置入编号称重后的试管, 电子天平精确称重, 算出净重; 并用 γ 计数器测定放射性活度, 计算单位质量(g)肿瘤与非肿瘤组织的放射性活度, 继而计算出肿瘤(T)与非肿瘤组织(NT)的放射性活度之比(T/NT), 计算公式如下:

$$\text{单位质量放射性活度} = \frac{\text{肿瘤(或某组织)放射性活度}}{\text{肿瘤(或某组织)的质量}}$$

$$\text{肿瘤与非肿瘤组织T/NT} = \frac{\text{肿瘤组织单位质量放射性活度}}{\text{某组织单位质量放射性活度}}$$

统计方法：方差分析。

1.7 卵巢肿瘤放射免疫显像的临床应用

本研究中16例卵巢肿瘤患者选自苏州医学院附二院1995年1月~1998年12月住院患者，年龄23~76岁。每位患者静脉推注^{99m}Tc-OC125单抗1 mg (50 MBq)，并于注药前半小时肌肉注射地塞米松5 mg，注药后6 h进行盆腹腔前后位及断层显像，显像时保留导尿。以出现仪器可分辨的放射性浓聚区为阳性结果（恶性肿瘤），无放射性浓聚区出现为阴性（良性肿瘤），显像结果与手术结果对比。每位患者均行血CA125测定。统计方法：卡方检验。

2 结果

2.1 人卵巢浆液性囊腺癌细胞HO-8910细胞形态观察

用倒置显微镜观察活细胞：细胞呈不规则多边形，铺路石状排列；细胞核浆比增大，核有靠向胞浆边缘的倾向；细胞多为单核，有少数双核及多核，有的胞浆内可见空泡，细胞可重叠生长（见图1）。

2.2 动物肿瘤模型建立

(1) 卵巢癌皮下瘤模型观察：12只裸鼠皮下接种卵巢癌细胞悬液后，无红肿，反应良好，生活习性无改变，无一例死亡。接种后一周内无肉眼可见之皮下瘤形成；2周时有少数肉眼可见之皮下结节；至3周时全部形成皮下瘤结节；3周以后生长缓慢且不规则，出现分叶状，6~7周用于放射免疫显像时肿瘤最长径线0.7~1.5 cm左右（见图2）。所形成肿瘤为黄色，分叶状，镜下见细胞核大深染，核浆比增大，排列紊乱，偶见腺腔结构，细胞分化差，并可见大片坏死（见图3）。

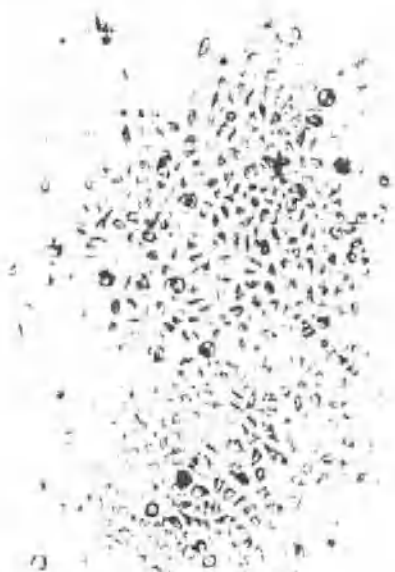


图1 人卵巢浆液性囊腺癌细胞HO8910形态



图2 裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型

(2) 卵巢癌腹腔瘤模型观察: 经7周观察, 4鼠均无腹部膨胀, 亦未扪及腹部结节感, 有一鼠极度消瘦。

(3) 脑胶质瘤皮下瘤模型观察: 4鼠2周时即形成绿豆至黄豆大小结节, 并且肿瘤生长较快, 形状规则, 表面光滑, 无分叶。

表2 裸鼠肿瘤模型生长测量结果

cm

组别	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周
A	0.3×0.3×0.3	0.4×0.6×0.4	0.4×0.7×0.4	0.7×0.9×0.4	
	0.4×0.5×0.5	0.7×0.5×0.6	0.7×0.8×0.5	1.0×1.1×0.6	
B	0.4×0.2×0.3	0.6×0.5×0.3	0.8×0.6×0.4	0.9×0.6×0.5	
	0.3×0.5×0.3	0.4×0.7×0.3	0.6×0.7×0.4	0.9×1.0×0.4	
	0.4×0.4×0.4	0.5×0.8×0.4	0.8×1.0×0.5	0.9×1.2×0.5	
	0.6×0.3×0.3	0.6×0.6×0.4	0.7×0.6×0.4	0.8×0.7×0.5	
C	0.5×0.5×0.4	0.7×0.6×0.5	0.9×0.6×0.5	1.2×0.9×0.6	
	0.4×0.3×0.3	0.5×0.4×0.4	0.7×0.4×0.5	1.0×0.7×0.6	
	0.3×0.4×0.5	0.5×0.4×0.4	0.8×0.6×0.4	1.1×0.9×0.5	
	0.4×0.3×0.2	0.6×0.5×0.3	0.8×0.6×0.4	0.9×0.7×0.5	
	0.4×0.3×0.3	0.5×0.5×0.3	0.7×0.7×0.4	0.9×0.8×0.6	1.0×0.9×0.6
	0.5×0.5×0.3	0.7×0.6×0.5	1.0×0.7×0.5	1.2×0.9×0.6	1.7×0.9×0.6
	0.6×0.5×0.4	1.0×0.9×0.6	1.5×0.9×0.7	1.9×0.9×0.6	2.2×1.0×0.7
0.5×0.5×0.3		0.8×0.7×0.5	1.2×0.8×0.6	1.5×0.8×0.6	1.5×0.8×0.6
D	0.6×0.4×0.3	0.8×0.6×0.4	1.0×0.7×0.5	1.2×0.8×0.6	1.3×0.8×0.6
	0.5×0.5×0.5	0.9×0.7×0.5	1.1×0.8×0.5	1.3×0.9×0.6	1.7×1.0×0.7
E	未见腹部膨胀, 未扪及腹部肿瘤形成				

2.3 抗HO8910抗体的制备及鉴定

两兔采血共分离血清60 ml。30 ml兔血清经提纯后得多抗84 mg (10 ml), 调整为4 mg/ml, -20 °C冰箱保存。酶联免疫法检测抗体效价显色最高稀释度为1:1600, 故抗体效价为1:1600。

2.4 抗体的标记

(1) 卵巢癌单抗OC125按药盒说明标记, 标记品经纸层析法检测放化纯度达95%。

(2) 正常小鼠IgG按氯化亚锡还原法标记后点样于层析纸, 以生理盐水作展开剂, 标记率达99.32%。以经人血白蛋白处理后的硅胶层析纸作为固定相, 以乙醇:氨水:水=2:1:5

(质量比)混合液作展开剂, 标记率为80.28%。

(3) 抗HO8910抗体按氯化亚锡还原法标记后, 以生理盐水作展开剂测得标记率为97.21%, 以经人血白蛋白处理后的硅胶层析纸作固定相, 以乙醇、氨水及水的混合液作展开剂标记率为82.56%。

2.5 裸鼠卵巢癌移植瘤放射免疫显像

(1) A组2只卵巢癌皮下瘤裸鼠腹腔注射铟标记正常小鼠IgG, 非特异性抗体IgG与肿瘤的结合与正常组织无差异, 注射 ^{99m}Tc -IgG后3 h, 5 h, 24 h肿瘤部位均未显像(见图4)。

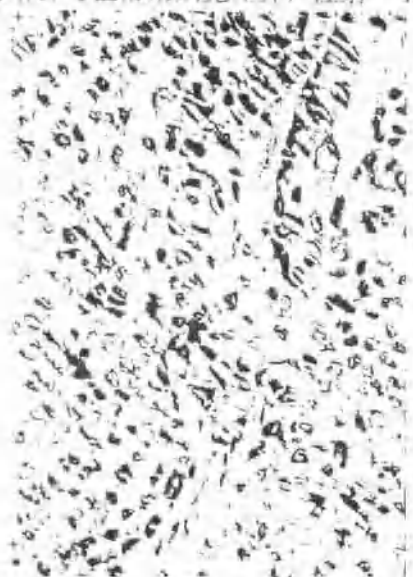


图3 裸鼠卵巢癌移植瘤镜下观



图4 裸鼠卵巢癌皮下瘤以 ^{99m}Tc -正常小鼠IgG放射免疫显像(肿瘤部位未显像)

(2) B组4只卵巢癌皮下瘤裸鼠腹腔注射铟标记抗HO8910抗体后3~4 h显像肿瘤成像清晰(见图5), 24 h再次显像, 但清晰度不及4 h的显像。

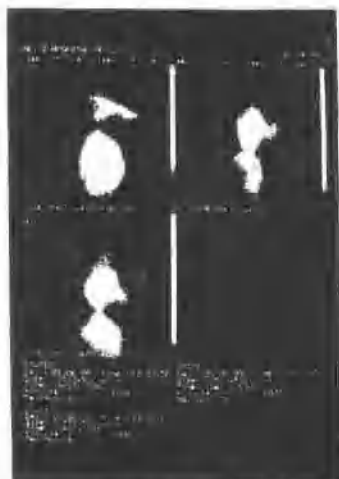


图5 裸鼠卵巢癌皮下瘤以 ^{99m}Tc -抗HO8910抗体放免显像(肿瘤部位显像)



图6 裸鼠卵巢癌皮下瘤以 ^{99m}Tc -OC125放免显像(肿瘤部位显像清晰)

(3) C组6只卵巢癌皮下瘤裸鼠腹腔注射铟标记OC125后3 h开始显影(见图6), 并且随着腹膜吸收再分布, 肿瘤显像越来越清晰, 于5~8 h显像满意, 24 h显像时稍差。

(4) D组4只裸鼠为脑胶质瘤皮下模型, 种植部位与卵巢癌模型相同, 腹腔注射铟标记OC125, 4 h均未见肿瘤部位显影(见图7)。



图7 裸鼠脑胶质瘤皮下瘤以 ^{99m}Tc -OC125放免显像(肿瘤部位未显像)

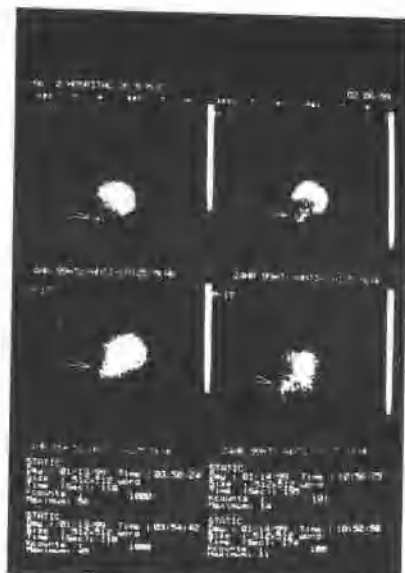


图8 裸鼠卵巢癌腹腔瘤以 ^{99m}Tc -OC125放免显像(箭头所指处解剖证实为移植瘤)

(5) E组4只裸鼠为卵巢癌腹腔模型, 种植后未发现明显腹水产生, 亦未扪及腹部包块, 一只明显消瘦, 体重下降, 经尾静脉注入铟标记OC125后2 h死亡, 解剖未见肉眼病灶; 有2鼠4 h显像见肝下方有可疑阴影(见图8), 于24 h后再显像仍存在, 经解剖一鼠发现肠管表面黄色结节, 另一鼠为肠系膜根部黄色结节, 经 γ 计数器测定放射性活度明显高于其它组织, 制成石蜡切片, 证实为转移癌, 细胞类型同皮下瘤; 另一显像未见异常之裸鼠经解剖未发现肉眼病灶。

各组T/NT比值经方差分析, C组与E组各脏器T/NT比值无差异($P>0.05$); C组与A组各脏器T/NT比值差异有统计学意义($P<0.01$); C组与B组胃、肠T/NT比值差异有统计学意义($P<0.05$), 其余脏器($P>0.05$); C组与D组各脏器T/NT比值差异有统计学意义($P<0.01$)。

表3 各组肿瘤与各正常组织放射性活度之比(T/T)

组别	编号	血	心	肺	肝	脾	肾	胃	肠	肌
A	鼠1	0.24	0.68	0.64	0.22	0.15	0.14	0.48	0.59	1.35
	鼠2	0.27	0.80	0.30	0.19	0.14	0.14	0.78	0.66	1.40
B	鼠7	1.21	7.23	2.53	1.07	1.37	0.85	2.26	2.17	8.44
	鼠8	1.90	6.32	3.21	0.99	1.27	1.01	3.24	2.67	7.68
	鼠9	1.43	5.86	1.91	1.06	1.43	0.98	2.23	3.15	11.3
	鼠10	2.16	6.53	2.50	0.97	1.24	1.21	1.58	3.22	9.50
C	鼠3	1.67	5.72	3.87	1.23	1.93	1.18	7.43	9.17	6.54
	鼠4	1.74	5.37	1.61	1.13	1.52	1.50	8.05	12.6	7.07
	鼠5	2.08	7.61	3.43	1.29	2.78	1.52	7.60	12.9	20.5
	鼠6	1.89	7.63	4.41	1.06	3.52	1.13	4.87	13.4	13.9
	鼠15	2.62	8.33	3.77	1.96	2.26	2.53	7.03	8.67	21.4
	鼠16	1.54	8.36	3.24	1.06	1.56	1.05	2.43	5.12	7.68
D	鼠11	0.08	0.58	0.37	0.15	0.39	0.08	0.23	0.63	1.45
	鼠12	0.12	0.69	0.15	0.18	0.41	0.08	0.32	0.12	1.48
	鼠13	0.16	0.96	0.35	0.17	0.37	0.11	0.51	0.79	1.15
	鼠14	0.15	0.82	0.26	0.15	0.40	0.10	0.34	0.41	1.28
E	鼠17	1.26	2.92	4.23	1.22	1.75	1.02	3.83	2.92	3.80
	鼠18	1.33	3.26	1.34	2.16	2.51	1.38	5.00	6.28	2.58

2.6 卵巢肿瘤放射免疫显像的临床应用

(1) 显像结果与手术结果比较: 14例患者于术前行放免显像, 2例患者术后显像, 在术前显像后手术证实为恶性肿瘤的患者中经化疗后随访复查4例, 共16例患者行20例次放免显像, 结果见下表:

表4 钼标记OC125放免显像与手术结果比较

总例次数	结果判定	RII(例次)	手术(例次)
术前显像14例	+(恶性)	12	12
	-(良性)	2	2
恶性肿瘤 术后复查4例次	+(有复发)	2	1(1例失访)
	-(无复发)	2	—
术后显像2例	+(有复发)	2	2例
	-(无复发)	0	0

(2) 放免显像对淋巴结的检出情况: 研究中发现RII不仅能检出原发灶, 并且在某些患者腹主动脉旁可见放射性浓集, 提示淋巴结转移, 在16例患者20次显像中提示有腹主动脉旁淋巴结阳性者4例, 手术探查腹主动脉淋巴结转移者5例, 为判断肿瘤性质及预后提供重要信息, 并为手术起到指导作用。

(3) 放免显像与血CA125的关系:

所有患者均行血CA125检测, 在14例恶性肿瘤患者中, 7例CA125升高, 1例巧克力囊肿患者血CA125亦升高。

放免显像的灵敏度高于血清肿瘤抗原的检测($P < 0.05$)。有些患者血清CA125正常, 而钼标记OC125放免显像呈阳性结果, 随访病例中发现放免显像能早期发现复发病灶。

表5 各种卵巢肿瘤放免显像与血CA125的关系

肿瘤类别	例数	RII阳性例数	血CA125异常例数
浆液性囊腺癌	7	7	6
粘液性囊腺癌	4	4	1
低分化腺癌	2	2	0
子宫内膜样癌	1	1	0
巧克力囊肿	1	0	1
浆液性囊腺瘤	1	0	0

3 讨论

本实验采用的卵巢癌细胞株HO8910是浙江省肿瘤研究所于1994年6月建立的人卵巢癌浆液性囊腺癌细胞系^[1]，其细胞形态和生长特性均显示恶性上皮细胞特征，于裸鼠皮下或腹腔接种形成移植瘤，裸鼠先天无胸腺，T淋巴细胞缺陷，对肿瘤细胞的监测功能丧失，易形成移植瘤。自注射 5×10^6 细胞后，2~3周始有肿瘤生长，经过6~7周，局部形成直径0.7~1.5 cm大小肿瘤结节，适于显像。

放射免疫显像(RII)是利用肿瘤单克隆抗体与肿瘤抗原结合的特异性，经放射性核素标记后注入体内，这种标记后的单抗能特异识别肿瘤抗原，引导放射性核素定向结合在肿瘤部位，通过 γ 闪烁照相机或扫描，根据放射性浓集区来判断肿瘤部位、性质、大小。

放免显像采用的核素和抗体是影响其灵敏度、特异性的重要因素^[4]。早期RII多用¹³¹I，但因其能量高，半衰期长，不仅发射显像所用的 γ 射线，还发射 β 射线，对机体副作用较大，且显像效果欠佳，故现已为^{99m}Tc所取代。国外有些学者偏爱铟(¹¹¹In)，因其血液中放射性清除快，血本底低，显像清晰，但铟通过网状内皮系代谢，肝脾浓聚，且价格昂贵。锝是目前最常采用的放射免疫显像核素之一，由于其发射纯 γ 射线，能量适中，半衰期短，副作用少，便于观察。卵巢癌的放免显像历经了由多克隆抗体、非特异性单抗至卵巢癌单抗的探索过程。卵巢癌具有多种肿瘤标志物，其中以CA125敏感性最高，锝标记OC125(抗CA125单抗)用于卵巢癌的放免显像是当今最理想的显像剂。

本研究以锝标记OC125(抗CA125单抗)作为示踪剂进行裸鼠卵巢癌模型的放免显像，注药后4 h左右即获得清晰图像，右前肢肿瘤部位为放射性浓集区，而作为对照组的锝标记正常小鼠IgG则不与肿瘤结合而未显影。从T/NT比值来看，单抗组的T/NT为1~21.4之间，肝、脾、肾由于血供极其丰富，具有较高本底，每克组织的放射性强度接近肿瘤，而其余组织的放射性强度远远低于肿瘤；IgG组除肌肉的放射性强度低于肿瘤外，T/NT均小于1，两组 $P < 0.01$ ，肿瘤部位有高浓度的放射性聚集是由于单抗与肿瘤抗原的特异结合，从而说明单抗确实起到了引导放射性核素定向与肿瘤结合而使之被检测的作用。

为了进一步证实OC125单抗的特异性，本研究还制作了一组裸鼠脑胶质瘤皮下移植瘤模型作为对照，肿瘤部位与卵巢癌皮下瘤相同，经注入锝标记OC125后，肿瘤部位未显像，T/NT比值均小于1，与单抗组相比 $P < 0.01$ ，说明OC125单抗具有良好的特异性，与脑胶质瘤的抗原无交叉反应，这一特点在临床应用中有助于判断肿瘤来源。

抗HO8910是自制的多克隆抗体，以卵巢癌细胞HO8910为抗原免疫白兔制成。从理论上讲，卵巢癌皮下移植瘤为HO8910细胞株接种形成，与抗HO8910抗体应有更多的抗原抗

体识别体系,肿瘤部位积聚的放射性应该比单抗更高一些。从显像效果分析,两组均获得清晰的图像,差别不大,但从T/NT比值来分析,由于多克隆抗体特异性差,易引起多种组织交叉反应,如胃、肠等组织的T/NT比值小(平均为2.32和2.80),低于单抗组(平均为6.23和10.31)($P<0.05$),在临床应用中可能出现假阳性,单抗能减少非特异结合,更有针对性,从放免显像的发展来看,虽然多克隆抗体有多个抗原决定簇,可能有利于检测不同类型的卵巢癌,但由于非特异性结合干扰影响显像质量,必将被单抗所取代。

卵巢癌病灶位于盆腔,故本研究除了制作皮下瘤模型外,还制作了腹腔瘤模型,但解剖发现4例中2例腹腔有肿瘤形成,另2例未发现肉眼病灶,考虑可能与腹腔表面积大、细胞分散,在局部难以形成聚集的细胞团有关^[9]。但2例的显像结果仍令人鼓舞,1例显像示于右下腹可疑放射性浓集区,于解剖时未发现肿瘤,再次扫描,仍示右下腹异常,仔细寻找于肠系膜根部发现一0.3 cm×0.4 cm×0.5 cm结节,病理切片证实为移植肿瘤,细胞类型与皮下瘤相同。

卵巢癌进展快,恶性程度高,其生存率长期以来无重大突破,关键是早期患者并无症状,就诊时多数已为晚期。手术及化疗是有效的治疗手段,但易复发,缺乏敏感的随访指标。一种意见认为既然无临床复发的症状,过多化疗大大影响了患者的生存质量;而另一种意见认为正因为不能早期确诊其复发,故应持续化疗达数年之久。自从单克隆抗体技术的成熟,同位素标记单抗被称之为“生物导弹”,立即引起了各国学者的重视。放射免疫显像(RII)用于卵巢肿瘤的导向诊断技术已从实验阶段逐步过渡应用于临床。

RII对不明性质肿瘤术前定性的符合率高,如本研究中,应用锝标记OC125行放免显像,14例术前显像者,12例阳性(恶性),2例阴性(良性),灵敏度及特异性均为100%,与手术结果完全一致。1例患者18岁,因下腹痛就诊发现盆腔包块,上界达脐下二指,活动度不佳,CA125值141 IU/ml,放射免疫显像示盆腔中部放射性缺损区(见图9),提示为良性病变,手术证实为卵巢巧克力囊肿。另1例患者因左下肢肿胀行CT检查发现左髂窝肿瘤,不能确定其来自盆腔脏器或后腹膜,行锝标记OC125放免显像阳性(见图10),诊断肿瘤为卵巢癌,手术证实(病理号950522)。

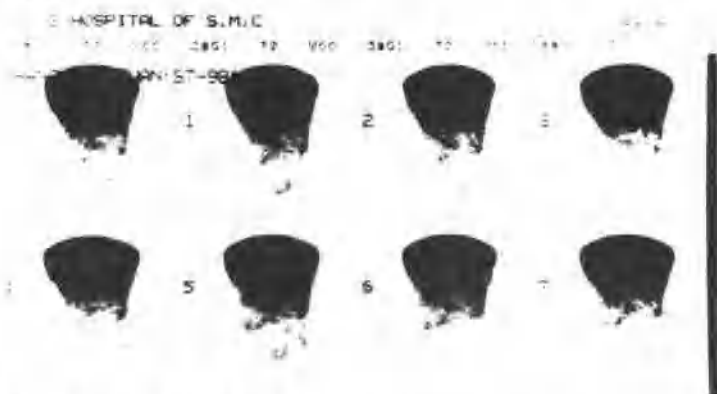


图9 ^{99m}Tc -OC125放免显像阴性(良性肿瘤)盆腔中部放射性缺损区

RII更大的作用在于作为一种发现早期复发病灶的有效手段。一般的影像学检查是利用脏器的解剖定位,由于术后解剖位置的改变以及术后出现的疤痕组织可能干扰了检查,

而RII是利用单抗的引导使放射性核素与肿瘤表面表达的抗原特异结合,故是一种功能与解剖相结合的定位,不因解剖位置的改变而改变^[6]。在显像后手术证实为卵巢癌的12例患者中,4例经手术及化疗后复查RII,4例均无临床症状,2例阴性,严密随访至今;2例阳性提示有复发,1例提示阴道残端放射性浓聚区(见图11),血CA125值正常,于显像后24 h行二探手术,见阴道残端 3cm×2cm×2.5cm 癌灶,切除后取癌组织及正常组织分别称重及γ计数器检测各自摄取放射性剂量,计算T/NT比值为4.1,证明单抗确实能引导放射性核素特异地与肿瘤表面结合,患者术后巩固化疗,存活至今;1例盆腔有放射性浓聚区血CA125均正常,继续化疗,两月后血CA125升高,患者失访。

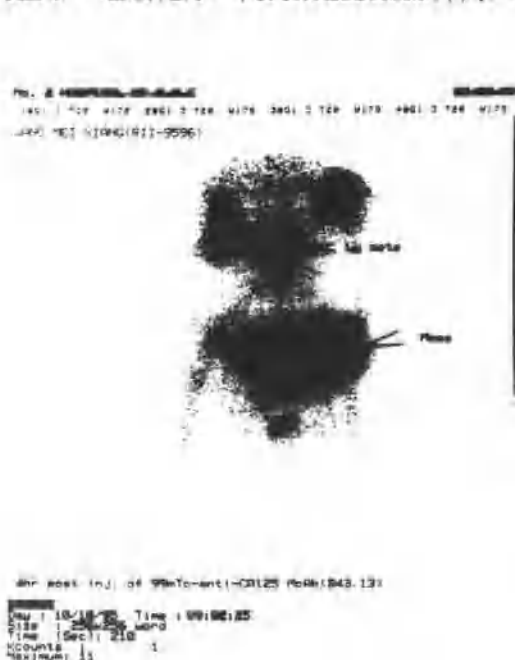


图10 ^{99m}Tc-OC125放免显像阳性
(卵巢癌)



图11 ^{99m}Tc-OC125放免显像阳性
(术后复查提示阴道残端复发)

另有2例患者手术后随访(术前未行放免显像)。1例患者卵巢癌术后一年复发浸润直肠前壁,行肿瘤切除、直肠切除及人工肛门术,半年后转诊苏州医学院,妇科检查盆腔空虚,阴道顶端组织质硬增厚,CA125正常,多数意见认为系术后疤痕组织,MRI(9501255)检查未见异常,同时行放免显像示阴道残端异常放射性浓集区(见图12),并可见腹主动脉旁异常放射性浓集,3个月后阴道刮片见核大异型细胞(病理号960033),家属对此结果表示怀疑,未继续治疗,一年后因肿瘤复发致肠梗阻手术,术后一年半死亡。另1例患者因卵巢癌行卵巢癌根治术,手术切除了所有肉眼可及病灶,化疗6疗程,术后5月行RII,示右盆腔有异常放射性浓集(见图13),此时血CA125正常,B超未见异常,家属不同意行二探手术,并停止化疗,此时血CA125及B超检查均正常,直至术后9月,血CA125升高,并且B超发现右侧盆腔异常回声区,再次化疗。说明RII可早于B超、MRI及血清CA125检

测发现微小复发病灶的存在。这一结果与国外学者的结论是一致的。Method应用铟标记卵巢癌单抗在20例卵巢癌患者术后15个月左右行RII，提示12例有复发病灶，而CT提示2例有复发病灶，仅1例患者CA125升高，二探术中证实结果与RII阳性的12例患者均有复发。因此指出RII能克服CT在术后随访中的局限性^[7]。



图12 ^{99m}Tc-OC125放免显像阳性
(二次术后检查阴道残端复发)

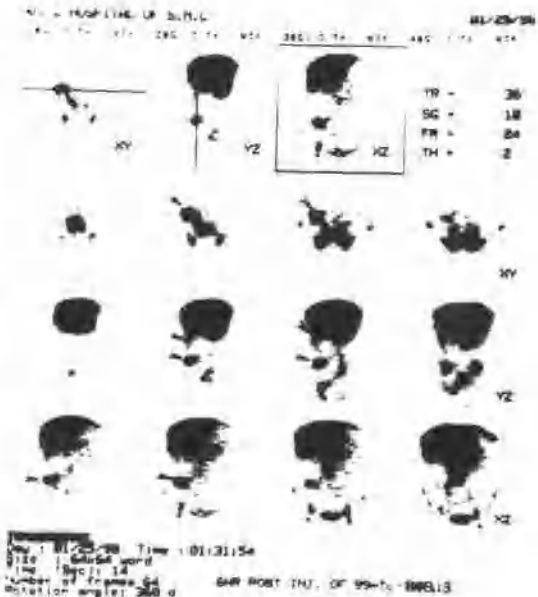


图13 ^{99m}Tc-OC125放免显像阳性 (术后复发)

本研究中，RII对恶性肿瘤的检出率为100%，但有些患者血CA125并不升高。血清肿瘤标志物假阳性结果主要与癌灶的体积大小有关，癌灶过小，释放的抗原量少，经全身血量的稀释后血中浓度很低，较难检测^[8]。德国汉堡协作组经研究结果表明要使血清肿瘤标志物升高，肿瘤需达到一定的负荷量，包括：(1)多个米粒大的病灶；(2)孤立的单个病灶3 cm直径；(3)3~5个病灶1 cm直径。复发病灶达到这样的负荷量，对进一步的治疗带来很大困难。而RII不受血中抗原浓度的影响，只要肿瘤表面有抗原表达，标记有放射性核素的单抗与之结合而使肿瘤局部放射性积聚。Earls指出^[9]，肿瘤表面有高浓度的抗原表达，一旦释放入血，立即被数千毫升的血量稀释，浓度大大降低，此时血清肿瘤标志物检测显示正常，而要达到肿瘤标志物升高的程度，还要经历无数个肿瘤增殖期，这就是RII能够早期发现病灶的依据。本研究中4例患者术后无临床症状，血清肿瘤标志物亦正常，但RII显示出现复发病灶，若按临床缓解标准停止治疗，将会失去早期治疗的时机，随访结果证实了放免显像得出的结论。

值得一提的是，本研究RII检出4例腹主动脉旁淋巴结转移，对术中淋巴结清扫起了重要指导作用。Robert在对34例卵巢癌患者术后的随访中发现，RII能检出的最小病灶为1 cm^[10]。由于卵巢肿瘤发病及转移多位于盆腔，显像时保留导尿，膀胱影消失，盆腔为低本底，故显像极为清晰。