

中國醫藥薈萃

CHINESE MEDICINE DIGEST

第四輯（腫瘤專輯）



北京科学技术出版社

BEIJING KEXUEJISHU CHUBANSHE

内 容 提 要

本书汇集了多年临床经验、科研资料，重点介绍恶性肿瘤的临床概况，治疗及处理原则，最新实施方法；介绍肿瘤免疫治疗的最新成果，免疫调节剂干扰素、单克隆抗体等的临床研究现状及部分肿瘤的免疫治疗实施方法。

该书从文章体裁上分为：论著、综述、经验介绍，病例报道，译文等，比较集中、完整、系统的反映我国现阶段恶性肿瘤病学的应用技术和先进水平。本书特点内容翔实，观点鲜明、信息量大，基础理论与临床实践相结合、专业性与普及性兼顾，力求为医药卫生人员提高业务水平服务。

本书以专业临床医师和基层医师为主要对象，亦适合防疫、教学、厂矿、部队，大专院校师生阅读和参考。

目 录

● 论 著

人喉癌和乳头状瘤 ER 酶免疫组化研究·····	(1)
性激素、微量元素及激素受体在乳腺癌发生中的相关性研究·····	(4)
胃癌免疫脂质体的制备及特性研究·····	(7)
胃癌及胃癌前病变胃液 IgG、SIgA、B ₂ M、CEA、CAMP 和 CGMP 的研究·····	(10)
肝癌单克隆抗体——葡聚糖及柔红霉素结合物制备及其对人肝癌细胞的体外杀伤作用·····	(12)
人膀胱癌细胞系经六亚甲基二乙酰胺诱导后核仁组成区相关蛋白的变化·····	(14)
8-MOP 对裸鼠移植人舌癌 (TCa8113) 放射增敏作用的观察·····	(16)
补骨脂素及其衍生物放射增敏作用研究·····	(18)

● 综 述

真核细胞 DNA 聚合酶与肿瘤·····	(25)
肿瘤性糖抗原的临床研究·····	(29)
肝癌抗体导向治疗研究进展·····	(31)
癌与胃肠道肿瘤关系的研究进展·····	(34)
单纯疱疹病毒与宫颈癌·····	(38)
中枢神经系统原发性恶性淋巴瘤的研究进展·····	(41)
胃癌的变迁初探·····	(44)
癌胚抗原的临床研究进展·····	(46)
六亚甲基二乙酰胺的实验及临床研究的现状和展望·····	(48)
微量元素与肝癌的流行病学研究·····	(52)
肺小细胞癌的治疗·····	(53)
原发性心脏肿瘤·····	(56)
肝门部胆管癌根治性切除及其进展·····	(59)

● 经验交流

降钙素瘤的临床及形态学观察 (附二例报告)·····	(62)
恶性肿瘤的一种新的监测方法·····	(64)
恶性滋养细胞肿瘤与感染·····	(67)
脑瘤病人的脑脊液细胞学检查·····	(70)
非转移性癌性脑病·····	(71)
放射治疗胸部肿瘤时对心脏损伤的观察·····	(72)
原发性心脏恶性肿瘤 2 例报告·····	(74)
心房粘液瘤的外科治疗·····	(75)
联合化疗并用减瘤手术治疗晚期睾丸精原细胞瘤 18 例·····	(77)
非何杰金氏淋巴瘤的恶性程度与 DNA 倍体关系的初步分析 (36 例流式细胞技	

术分析.....	(79)
天然人白细胞介素 ₂ 治疗泌尿系统晚期恶性肿瘤10例报告.....	(81)
人原发性甲状腺癌原癌基因C-myc表达与结构的研究.....	(82)
经腹肾根治性切除术治疗恶性肾肿瘤60例报告.....	(84)
围手术期MMC化疗对老年人康复的影响.....	(85)
脑干肿瘤的单纯放射治疗.....	(87)
脑转移瘤的诊断与治疗——附92例分析.....	(88)
儿童鼻咽癌的放疗与预后(附13例临床分析).....	(90)
视网膜母细胞瘤细胞培养及建系过程.....	(91)
视网膜母细胞瘤44例分析.....	(94)
喉乳头状瘤及喉鳞状细胞癌AgNOR定量分析.....	(95)
垂直半喉切除颈前皮瓣I期修复喉腔20例.....	(97)
喉癌颈清标本连续切片的病理学研究.....	(98)
卡铂联合治疗小细胞肺癌10例报道.....	(100)
铜锌比值在肺癌诊断及分期中的应用.....	(102)
经皮穿刺活检诊断早期肺癌的价值.....	(103)
中晚期食管癌11例化疗后穿孔因素的探讨.....	(105)
胃良、恶性疾病患者血清 β_2 ——微球蛋白测定及其临床意义.....	(106)
大剂量丝裂霉素(MMC)联合方案对进展期胃癌疗效分析(附32例报告).....	(108)
老年胃癌患者血清甲状腺激素测定及其临床意义.....	(109)
肝癌肝动脉插管复合药物灌注化疗及乙醇栓塞20例.....	(111)
胰胆双袢Y型吻合术在胰十二指肠切除中的应用.....	(112)
一种可以治愈的胰腺恶性肿瘤——胰腺囊腺癌2例诊治体会.....	(113)
针吸细胞学检查乳腺肿物150例分析.....	(115)
● 病例报道	
膀胱灌注丝裂霉素C引起过敏反应1例.....	(117)
宫颈肉瘤9例临床病理分析.....	(117)
食管平滑肌瘤(附13例报告).....	(120)
颅内原发性多发性血管外皮细胞瘤1例报告.....	(120)

人喉癌和乳头状瘤ER酶亲合组化研究

本文作者应用过氧化物酶亲合组化方法, 对人喉鳞状细胞癌(LSC)和鳞状上皮乳头状瘤(LSP)细胞中的ER进行了定位和定量研究, 旨在探讨ER和喉癌及乳头状瘤的关系, 以及内分泌治疗的可能性。

材料和方法

1. 材料: 标本为1982~1988年西京医院门诊活检或住院手术切除肿瘤的保留蜡块。LSC56例, 年龄40~70岁, 男性51例, 女性5例。LSC23例, 年龄4~70岁, 男性13例, 女性10例。标本均为福尔马林液固定, 切片厚5 μ 。

2. 试剂: 酶联雌二醇亲合组化ER检测药盒(中国科学院上海生物化学研究所)。

3. 染色步骤: ①切片脱蜡至水; ②0.5%过氧化氢甲醇液中, 室温30min; ③PBS(0.01mol/L, pH7.1)洗3次, 每次5min; ④1%小牛血清白蛋白湿盒内37℃作用30min; ⑤PBS洗3次, 每次5min; ⑥Tris-HCL缓冲液(0.05mol/L, pH7.4)洗3次; ⑦滤纸吸干残液; ⑧滴加酶联雌二醇液, 湿盒内室温反应24h; ⑨Tris-HCL缓冲液洗3次; ⑩DAB显色; ⑪脱水, 透明和封片。

阳性对照用ER强阳性乳腺癌标本同步染色。替代实验亦用ER强阳性乳腺癌标本, 于上述第⑥步用0.05mol/L Tris-HCL缓冲液替代酶联雌二醇液,

同步染色。阻断实验在上述第⑥步加乙炔雌酚液, 同步阻断。

4. 阳性细胞标准: 参考刘氏等的标准^[1], 阳性对照为阳性, 替代实验阴性, 阻断实验有效, 癌瘤细胞核和/或浆内有棕黄色颗粒为ER阳性细胞。光镜下不同视野数100~200个细胞, 阳性细胞数>30%者为阳性病例。

5. 核ER定量: 应用西德Leitz公司TAS Plus全自动图象分析仪, 待测细胞经显微电视摄取细胞图象输入计算机转换为数字后, 显示在电视监视器上, 由计算机对单个细胞核的积分光密度值进行计算, 得出核ER相对含量, 以任意单位All (Arbitrary Unit)表示。

观察结果

1. 56例LSC均为I~II级。23例LSP, 其中3例癌变, 2例伴有不典型增生。

2. ER阳性表达主要有三种类型: ①核型: 主要为细胞核阳性(图1、2); ②全细胞型: 细胞核及胞浆均明显阳性(图3); ③胞浆型: 细胞浆阳性(图4)。

3. LSC及LSP, 每例细胞和病例ER阳性率见表1, 经统计学分析, 两者间无显著性差别($P>0.05$)。

表1 癌瘤细胞及病例ER阳性率

诊断	例数	细胞阳性率			病例阳性率
		<30%	30~60%	>60%	
LSC	56	21(37.5%)	9(16.1%)	26(46.4%)	35(62.5%)
LSP	23	13(56.5%)	2(8.7%)	8(34.8%)	10(43.5%)

4. LSC和LSP ER阳性病例的表达类型见表2, ER阳性表达主要为核型及全细胞型。

5. 不同年龄组, 每例癌瘤细胞及病例ER阳性率见表3, 经统计学分析, LSC不同年龄组, ER病例阳性率无明显差别($P>0.05$), LSP ≥ 40

表2 ER阳性病例的表达类型

分组	病例 阳性数	核型	胞浆型	全细胞型
LSC	35	17(48.6%)	3(8.6%)	15(42.9%)
LSP	10	6(60.0%)	0	4(40.0%)

岁组的 ER 病例阳性率明显高于 <40 岁组 ($P < 0.05$)。

表 3 不同年龄癌瘤细胞及病例 ER 阳性率

诊 断	例数	细胞阳性率			病例阳性率
		<30%	30~60%	>60%	
LSC	56				
40~59岁	29	9(31.0%)	4(13.8%)	16(55.2%)	20(69.0%)
≥60岁	27	12(44.4%)	4(14.8%)	11(40.7%)	15(55.6%)
LSP	23				
<20岁	5	4(80.0%)	0	1(20.0%)	1(20.0%)
≥20~39	4	3(75.0%)	0	1(25.0%)	1(25.0%)
≥40岁	14	6(42.9%)	2(14.3%)	6(42.9%)	8(57.1%)

6. 不同性别, 癌瘤细胞及病例 ER 阳性率见表 4, 经统计学分析, LSC 和 LSP 男女性别间病例阳性率均无明显差别 ($P > 0.05$)。

表 4 不同性别癌瘤细胞及病例 ER 阳性率

	例数	细胞阳性率			病例阳性率
		<30%	30~60%	>60%	
LSC	56				
男性	51	20(39.2%)	9(17.6%)	22(43.1%)	31(60.8%)
女性	5	1(20.0%)	0	4(80.0%)	4(80.0%)
LSP	23				
男性	13	6(46.2%)	1(7.7%)	6(46.2%)	5(53.8%)
女性	10	7(70.0%)	1(10.0%)	2(20.0%)	3(30.0%)

7. 28/56 例 LSC 住院病例进行了 1.5~5.5 年随访, 21 例手术时无转移的病例中, 9/11 例 (81.8%) 局部复发者 (2 例死亡), 4/4 例 (100%) 无复发记载死亡病例和 4/6 例 (66.7%) 无复发存活病例 ER 阳性。7/28 例手术时有转移者的 ER 检测结果见表 5。1/7 例 (14.3%) 阳性, 与无转移组比较, 统计学上有非常显著的差别 ($P < 0.05$)。在 18/28 例随访 ER 阳性的病例中, 11 例为全细胞型表达, 其中复发和无复发者各 3 例, 复发死亡和无复发死亡者各 2 例, 1 例伴肺癌死亡。6 例为核型表达, 其中 3 例复发, 转移死亡, 转移死亡和无复发者各 1 例。1 例为胞浆型表达, 肿瘤局部复发。

8/23 例 LSP 住院病人进行了 1.5~8 年随访, 5/6 例 (83.3%) 复发者 (含 2 例癌变和 1 例不典型增生) 和 11/2 例 (50.0%) 无复发者 ER 阳性。5/23 例伴有不典型增生或癌变者的 ER 检测结果见表 6, 5/5 例 (100%) ER 阳性, 18/23 例无不典型增生及

表 5 LSC 伴转移者的 ER 检测结果

病例/年龄/性别	TNM 分期	细胞阳性率 (%)	随访
1/42/M	T ₃ N _{2a} M ₀	77	死亡
2/47/M	T ₄ N ₃ M ₀	7	死亡
3/57/M	T ₁₉ N _{2c} M ₀	11	存活
4/59/M	T ₂ N _{2c} M ₀	3	死亡
5/62/M	T ₂ N _{2c} M ₀	14	死亡
6/68/M	T ₃ N ₂ M ₁	16	死亡
7/46/F	T ₁ N ₁ M ₁	8	死亡

癌变的病例中, 5/18 例 (27.8%) ER 阳性。统计学分析结果表明, 两者间有明显差别 ($P < 0.05$), 前者 ER 阳性率明显高于后者。

8. 在 16/56、13/56 和 5/56 例 LSC ER 阳性病例, 癌旁分别有 14/16 例 (87.5%) 鳞状上皮、11/13 例 (84.6%) 腺上皮和 3/5 例 (60.0%) 横纹肌

表 6 乳头状瘤伴不典型增生或癌变者
的ER检测结果

病例/年龄/性别	癌变或不典型增生	细胞ER阳性率(%)
1/53/M	癌变	87
2/52/M	癌变	93
3/65/M	癌变	98
4/64/M	不典型增生	31
5/55/M	不典型增生	90

及软骨细胞ER阳性(图5、6), 主要为核型。此外, 某些血管内皮细胞及间质细胞核内也有ER阳性表达(图2、5)。应用图象分析仪, 对10例同张切片癌及癌旁鳞状上皮核ER均为阳性的病例进行了定量检测, 不同视野各测50个细胞, 其结果见表7。经统计学分析, 癌和癌旁鳞状上皮间, 核ER含量有显著性差别($P<0.01$), 同张切片癌细胞核ER含量明显高于癌旁鳞状上皮。

对3例同张切片上的乳头状瘤和癌变细胞核内的ER进行了定量, 其结果见表8。统计学分析结

表 7 同张切片鳞癌及癌旁鳞状上皮核ER定量结果($\bar{X} \pm SD$)

病例/年龄/性别	TNM分期	鳞癌细胞	癌旁鳞状上皮
1/44/M	T ₁ NoMo	7.6563 $\pm$ 3.9642	2.8889 $\pm$ 1.4267
2/60/M	T _{1a} NoMo	8.2980 $\pm$ 3.9643	5.6347 $\pm$ 1.5127
3/64/M	T ₁ NoMo	21.8643 $\pm$ 10.8055	9.5797 $\pm$ 3.4217
4/58/M	T ₁ NoMo	11.6297 $\pm$ 4.2312	4.7951 $\pm$ 1.5952
5/64/M	T ₂ NoMo	12.0598 $\pm$ 4.4876	8.3430 $\pm$ 2.5201
6/55/M	T ₂ NoMo	12.7144 $\pm$ 4.4876	7.2084 $\pm$ 3.1058
7/53/F		18.8231 $\pm$ 9.1242	9.2072 $\pm$ 2.7194
8/57/M		8.1347 $\pm$ 3.1358	6.4635 $\pm$ 2.9341
9/53/M		13.2310 $\pm$ 5.5945	8.2090 $\pm$ 2.3590
10/60/M		18.6573 $\pm$ 9.5232	7.3612 $\pm$ 2.3527

果表明, 癌变细胞核ER含量和乳头状瘤细胞间有明显差别($P<0.01$), 癌变细胞核ER含量明显增高。

表 8 同张切片乳头状瘤和癌变细胞核ER
定量结果($\bar{X} \pm SD$)

病例/年龄/性别	乳头状瘤细胞	癌变细胞
1	5.9014 $\pm$ 1.8521	9.2238 $\pm$ 2.9245
2	6.3978 $\pm$ 2.8756	10.0293 $\pm$ 3.3081
3	4.7486 $\pm$ 1.7107	7.6248 $\pm$ 2.6271

讨论

近年来, 有关人LSC和LSP细胞中ER的研究较少, 且有不同看法。ViroLainen等^[2]用生化法对人LSC细胞株进行了性激素受体检测发现, 7/10株细胞ER阳性。Ferguson等^[3]对8例人LSC组织进行了免疫组化研究, ER均为阴性。杨蓓蓓等^[4]的荧光亲合细胞化学研究发现, 78.6%的LSC组织中存在有一定水平的ER(10.79 $\pm$ 1.08U)。本研究

观察到, 35/56例(62.5%) I-I级LSC ER阳性, 病例阳性率和年龄及性别无明显关系。而且发现9/11例(81.8%) LSC局部复发和1/7例(14.3%)有转移的病例ER阳性, 统计学分析结果表明, LSC有转移组的ER阳性率明显低于无转移组。阳性率和性别无明显关系, 但和年龄有关, ≥ 40 岁组的ER阳性率明显高于 <40 岁组。研究还发现, 5/6例(83.3%)复发和1/2例(50.0%)无复发LSP ER阳性, 5/5例(100%)有不典型增生或癌变的LSP ER阳性。研究结果提示, ER的阳性表达与LSC和LSP的衍变过程及增殖活性有关。

本研究进一步观察到, 癌旁鳞状上皮、腺上皮、横纹肌和软骨细胞ER阳性, 并主要位于核内。另外也发现, 某些间质细胞及血管内皮细胞核ER阳性。图象分析仪定量结果也显示, 鳞癌细胞核内ER含量明显高于癌旁鳞状上皮。乳头状瘤癌变细胞核ER含量也较未癌变细胞明显增加。研究结果提示, ER表达能力并非癌变后获得, 而核ER含量的增加是I-I级LSC区别非癌组织的特征性变化之一。

本研究发现, LSC 和 LSP 细胞中 ER 的阳性表达主要为核型和全细胞型, 其表达类型可能和肿瘤的生物行为有关。关于雌激素作用于靶细胞的机理, 一般认为是“二步机制”学说, 本观察结果支持这一论点。

我们的研究结果表明, 部分 LSC 和 LSP 为雌激素依赖性肿瘤, 为探索喉癌和乳头状瘤的发生机理及内分泌治疗的可能性提供了形态学参考依据。

第四军医大学西京医院 丁华野 等
王锦成

参 考 文 献

- (1) 刘尚廉等, 肿瘤 1986; 6:104
- (2) Virolainen E, et al. Int J Cancer, 1984; 33:19
- (3) Ferguson BJ, et al. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1987; 113:1311
- (4) 杨蓓蓓, 等, 中华耳鼻咽喉科杂志, 1988; 24:177

性激素、微量元素及激素受体在乳腺癌发生中的相关性研究

乳腺癌是最常见的严重危害妇女健康的恶性肿瘤之一, 有关它的病因、病理和诊治等方面历来存在争议。

临床实验和观察表明, 乳腺癌的发生与内分泌功能失调密切相关, 尤其是女性激素分泌紊乱是乳腺癌发生的危险因素。由于异常增高的雌激素长期刺激敏感的乳腺组织, 可能导致乳腺增生和癌变。激素作用产生的大小有赖于乳腺细胞上足够量且功能完整的激素受体, 二者适当的比例是激素发挥最大效应的前提。因此, 研究乳癌病人激素与其受体的相互关系, 进而通过改变二者的作用机制来达到调控乳癌细胞的增殖和分裂, 这对乳癌的治疗具有极其重要的临床意义。

近年来有越来越多的资料显示, 某些金属微量元素能直接或间接的影响内分泌功能、靶组织状态和激素的生物效应, 而且必须微量元素过多或缺乏都会导致内分泌腺结构异常及功能紊乱而产生疾病, 因此其正常含量对维持下丘脑-垂体-靶组织这一性腺轴的生理功能十分重要。乳癌组织及血中有许多微量元素含量与健康人显著不同, 无论是其通过局部的“区域隔室化”作用, 还是通过作为活性基团的金属酶对内分泌系统的影响而引起肿瘤, 都说明这些微量元素与乳癌的发生有密切关系。乳癌患者体内微量元素的异常究竟是疾病的原因, 还是

疾病的结果, 目前尚无一致结论。

本文拟就对乳癌病人的雌、孕激素受体、手术前后血中性激素和微量元素的检测, 与健康人及乳腺良性病患者作对照, 以发现性激素、微量元素及激素受体三者在乳癌发生中的关系, 为临床诊断、治疗和估计乳癌患者的预后提供有益的线索。

材料和方法

1. 标本来源和要求: 本实验标本均取自我院 1989年3月至1990年3月住院和门诊病人及健康献血员, 所有受检人员应无肝肾病史及内分泌病史, 3年内未服过激素类药物, 无金属接触史, 所选病例均经病理证实。

(1) 乳腺恶性肿瘤病例: 共38例, 年龄30~81岁, 平均47.5岁; 其中绝经前21例, 年龄30~51岁, 平均39岁, 绝经后17例, 年龄47~84岁, 平均52岁, 均为女性。

(2) 乳腺良性病例: 共36例, 年龄19~48岁, 平均36岁, 均为绝经前女性病人。

(3) 对照组: 共213例, 均为健康女献血员, 年龄20~61岁, 平均38岁。

(4) 血标本采集: 所有病人均在术前一月内及手术两周后卵泡期, 采集清晨空腹肘正中静脉血3ml, 2000rpm离心15min, 吸取血清分为两份, 密封置-20℃冰箱待测, 一份测性激素, 一份测微

量元素。整个过程严格按无离子原则操作。

(5) 乳腺癌组织标本采集: 手术当日采集乳腺癌根治术新鲜标本 3~5g, 用冰壶移至实验室, 置液氮内保存待测 (4W 以内)。

2. 方法:

(1) 微量元素测定: 采用带微机的石墨炉原子吸收分光光度计测定血清十种微量元素 (Zn、Fe、Cu、Mn、Pb、Cd、Cr、Ni、Mo、Se), 直接自动进样, 回收率为 95~115%。

(2) 性激素测定: 采用灵敏度高, 特异性强的放射免疫分析法 (RIA) 测定血清雌二醇 (Estradiol, E₂), 孕酮 (Progesterone, P) 和睾酮 (Testosterone, T)。药盒由中美合营天津利科生物科技有限公司提供, 操作步骤按其说明书进行。

(3) 激素受体测定: 采用经典、稳定、灵敏的葡聚糖活性炭吸附法 (Dextran Coated Charcoal, DCC) 测定乳腺癌组织中的雌激素受体 (Estrogen

Receptor, ER) 和孕酮受体 (Progesterone Receptor, PR) 含量。

(4) 数据处理: 所有实验数据经统计学处理, 包括方差齐性检验, t 检验, u 检验和 X² 检验及相关分析。

结果与分析

本实验对 38 例恶性乳腺肿瘤患者、36 例良性乳腺病患者及 213 名健康妇女分别进行了癌组织激素受体和血清性激素及十种微量元素含量的测定, 结果如下:

1. 健康妇女、乳腺良性疾病和乳腺癌妇女血清性激素水平比较见表 1。
2. 健康妇女、乳腺良性疾病和乳腺癌妇女血清十种微量元素含量比较见表 2。
3. 38 例乳腺癌组织 ER 和 PR 检测情况见表 3。
4. 乳腺癌组织激素受体与血清性激素水平的关

表 1 健康妇女、乳腺良性疾病及乳腺癌患者血清性激素水平比较 ($\bar{X} \pm SD$)

	绝 经 前			绝 经 后		
	E ₂ (pg/ml)	P(ng/ml)	T(ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	P(ng/ml)	T(ng/ml)
健康妇女	57±33 (49)	1.18±0.43 (49)	41±26 (49)	16±8 (41)	0.58±0.25 (41)	28±15 (41)
良性病	66.47±38.84 (36)	1.06±0.27 (36)	62.60±58.77① (36)	--	--	--
乳腺癌患者	7.68±23.64③ (21)	1.17±0.25 (21)	91.22±76.96③ (21)	33.34±24.67 (17)	0.57±0.15 (17)	83.46±63.98④ (17)

① P<0.05; ② P<0.01; ③ P<0.005; ④ P<0.001 均与健康组比较, () 内为例数。

表 2 健康组、乳腺良性疾病和乳腺癌组血清微量元素含量比较 ($\bar{X} \pm SD$) (单: $\mu\text{g}/\text{dl}$)

	Zn	Fe	Cu	Mn	Pb	Cd	Cr	Ni	Mo	Ss
A 健康妇女 (n=213)	72.35 ±27.50	122.24 ±73.76	94.16 ±31.57	1.65 ±1.09	4.41 ±3.51	0.34 ±0.48	1.24 ±1.00	4.89 ±1.95	3.61 ±3.02	15.46 ±7.47
B 乳腺良性病 (n=36)	94.44 ±29.22	131.92 ±39.43	140.95 ±37.61	1.60 ±0.99	4.34 ±2.66	0.43 ±0.42	1.01 ±0.84	5.63 ±1.64	3.51 ±1.87	14.50 ±2.91
C 乳腺癌妇女 (n=38)	125.94 ±30.87	156.21 ±64.63	185.99 ±48.82	1.83 ±0.65	3.64 ±2.89	0.45 ±0.44	1.06 ±0.89	7.09 ±1.89	2.25 ±1.07	13.18 ±3.22
A 与 B	<0.0005			<0.0005			<0.005		<0.005	
P 值 A 与 C	<0.0005			<0.0005			<0.0005		<0.0005	
B 与 C	<0.001			<0.001			<0.001		<0.05	

表 3

38例乳腺癌组织ER和PR检测情况

	阳性率 (%)		平均值 ($\bar{X} \pm SD$) (fmole/mg蛋白)	
	ER	PR	ER	PR
绝经前	57.14(12/21) (n=21)	28.57(6/21) (n=21)	278.4 $\pm$ 149.8 (n=12)	233.33 $\pm$ 107.99 (n=6)
绝经后	82.35(14/17) (n=17)	70.59(12/17) (n=17)	448.58 $\pm$ 267.53 (n=14)	253.11 $\pm$ 162.38 (n=12)
P值	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05

表 4

绝经前后乳腺癌ER状况与血清性激素水平的关系 ($\bar{X} \pm SD$)

ER状况	绝经前			绝经后		
	E ₂ (pg/ml)	P(ng/ml)	T(ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	P(ng/ml)	T(ng/ml)
ER(+)	65.86 $\pm$ 19.72 (n=12)	1.16 $\pm$ 0.25 (n=12)	61.88 $\pm$ 21.21 (n=12)	36.55 $\pm$ 26.06 (n=14)	0.55 $\pm$ 0.12 (n=14)	92.71 $\pm$ 66.96 (n=14)
ER(-)	93.43 $\pm$ 28.75 (n=9)	1.18 $\pm$ 0.25 (n=9)	130.34 $\pm$ 192.67 (n=9)	18.33 $\pm$ 8.49 (n=3)	0.67 $\pm$ 0.24 (n=3)	40.27 $\pm$ 22.93 (n=3)

系见表 4。

5. 乳腺癌组织激素受体与血清微量元素的关系: 乳腺癌ER(-)PR(-)患者血清Cu含量明显高于ER(+)PR(+)患者, 未发现其余微量元素与ER和PR有明显关系。

6. 绝经前健康妇女、乳腺良性疾病和乳腺癌患者血清性激素和微量元素间的相关分析: 血清Zn、Cu和Ni含量随着病情进展与E₂和T呈直线正相关; 而Se则与E₂和T呈负相关, 提示血清Zn、Cu、Ni增高和Se减低与乳腺癌发病有一定的关系。

讨论与小结

本文用AAS^[1]法和RIA^[2]法分别测定了213例健康妇女、36例乳腺良性疾病及38例乳腺癌妇女手术前后血清十种微量元素和性激素含量, 同时用DCC^[3]法测定了乳腺癌组织中的ER和PR含量。结果发现:

1. 乳腺癌妇女血清E₂显著高于健康妇女, 说明E₂的异常升高是乳腺癌发生的必要因素之一, 而手术后降至正常, 可能是由于手术切除了乳腺癌组织这个E₂的合成场所所致; 由于血清T随乳腺病变程度而明显升高, 因此可作为临床判断病情和观察疗效的指标; 同时由于存在T依赖性乳腺癌和T可转化为E₂, 因此T的异常升高也可能是乳腺癌的病因之一。

2. 乳腺癌妇女血清Zn、Cu、Ni和Fe水平显著

高于健康妇女 ($p < 0.0005$), 而Se和Mo则明显降低 ($p < 0.001$), 手术后均恢复接近正常, 说明这些微量元素的异常变化与乳腺癌的发生有一定关系, 其中Se和Mo可能是保护因素; 而Zn、Cu、Ni和Fe的异常升高可能是其发病因素之一。特别是血清Cu、Zn、Ni和Se、Mo与乳腺癌变程度分别呈正相关和负相关, 因此可将血清这些元素的动态测定作为判断病情和观察疗效的依据。

3. 绝经后乳腺癌妇女ER和PR阳性率高于绝经前, 因此在有条件检测激素受体的情况下, 建议对绝经后乳腺癌患者常规给予Tamoxifen治疗。

4. 血清E₂和T与乳腺癌组织的ER和PR阳性率呈负相关, 而且还与血清Cu、Zn、Ni和Se分别呈直线正相关和负相关。ER(-)PR(-)乳腺癌患者血清Cu和T水平高于ER(+)PR(+)患者, 由于ER(-)PR(-)乳腺癌的预后最差, 因此, 血清Cu和T的变化可反映乳腺癌的恶性程度, 故可作为判断病情和估计预后的良好指标。

5. 性激素、微量元素和激素受体三者互相联系, 互相影响, 对乳腺癌的发生起着协同作用。E₂除可通过其受体发挥作用导致乳腺癌外, 还可通过改变血液中的某些微量元素含量而致癌。同样, 微量元素除通过其“隔室封闭破坏”途径致癌外, 也可引

起性激素的异常分泌,还可作为金属酶或激素受体蛋白结构上的活性基团参与E₂作用的过程,增强E₂的生物活性而导致乳癌。

西安医科大学第二附属医院 郑爱民著
陈松旺审

参考文献

- (1) AAS Atomic Absorption Spectrophotometry, 原子光谱吸收法
- (2) RIA Radioimmunoassay, 放射免疫分析法
- (3) DCC Dextran Coated Charcoal, 葡聚糖活性炭吸附法

胃癌免疫脂质体的制备及特性研究

恶性肿瘤的化疗常因患者不能耐受而中断,这是由于抗肿瘤药物对肿瘤细胞缺乏选择性,对正常细胞也有很大毒性。利用单克隆抗体等载体将药物选择性地运送至肿瘤细胞,可增强抗癌效果,减少毒副作用。免疫脂质体(immunoliposomes)由脂质体连接特异性抗体制成,集脂质体的特性和抗体的导向性于一体,成为新型药物导向传递系统,在肿瘤诊断和治疗中日益受到重视^[1]。本文应用抗人胃癌单克隆抗体MGb₂,与脂质体连接,包入目前临床常用的抗肿瘤药物。阿霉素、表阿霉素、丝裂霉素、氮甲蝶呤、顺铂、放线菌素D、长春新碱、平阳霉素和脂酰化柔红霉素,研究其理化及免疫学特性,比较9种胃癌免疫脂质体对人胃癌靶细胞的选择性杀伤能力,探讨免疫脂质体对抗肿瘤药物的导向作用以及用于胃癌导向治疗的可行性。

材料和方法

1. 材料:

抗肿瘤药物阿霉素、表阿霉素、柔红霉素系意大利Farmitalai产品,丝裂霉素为日本Kyowa出品,其余均为国产药用制剂。脂酰化柔红霉素按文献合成^[2]。卵磷脂由新鲜鸡卵黄提取并纯化^[3],脑磷脂购自东京化成公司。

2. 免疫脂质体的制备:采用改进的逆相蒸发法制备免疫脂质体^[4,5]药用制剂先用有机溶剂处理以除去剂型稳定剂乳糖、氯化钠等。脂质比例为卵磷脂:胆固醇:脑磷脂=5:5:1(分子比)。脂质经重蒸乙醚溶解后加入PBS,亲脂性药物溶于乙醚,亲水性药物溶于PBS,充氮气4℃水浴式超声处理,成为均一乳剂后除去乙醚,加入PBS再次超声处理即成均一透亮的脂质体,终浓度脂质

10mg/ml。

胃癌单克隆抗体MGb₂由本室制备并纯化^[1]。N-羧基琥珀酰亚胺软脂酸酯(NHSP)按文献合成^[4]。MGb₂经NHSP修饰得到P-MGb₂,用改良去垢剂透析法将P-MGb₂插入脂质体^[5],Sephacrose 4B层析纯化即得免疫脂质体。同法用正常BA1B/C小鼠IgG(NIgG)制备非特异脂质体。免疫脂质体经0.22μm微孔滤膜除菌,充氮4℃保存。

3. 免疫脂质体特性检测:分别测定磷脂、抗体、药物含量,计算药物包裹率^[2,5]。免疫活性采用ELISA方法测定^[3],以人胃癌细胞SGC-7901为靶细胞。

4. 免疫脂质体结合试验:制备包裹¹²⁵I-BSA的免疫脂质体,与胃癌细胞株SGC-7901(靶细胞)和正常人胚肺细胞SL₂(非靶细胞)在4℃作用3.5h,冰冷PBS洗3次,测I-计数。

5. 免疫脂质体细胞毒试验:SGC-7901和SL₂细胞铺96孔培养板(Costar)贴壁,加入不同浓度免疫脂质体、非特异脂质体和游离药物,连续培养48h(48h杀伤试验)或者孵育2h后弃去药物,加入培养液继续培养两天(2h杀伤试验),MTT活细胞染色法计算杀伤率^[5]。

结果

1. 免疫脂质体制备: NHSP经无水乙醇重结晶,熔点90±0.5℃,溶于无水二氧六环中备用。MGb₂在2%去氧胆酸钠存在下,与12倍NHSP作用,引入软脂酸链,得到P-MGb₂。用改良去垢剂透析法将P-MGb₂插入脂质体。经同位素标记抗体证实, NHSP修饰的抗体插入率87.8±5.8%,未经修饰的抗体插入率<1%^[6]。免疫脂质体经电

镜负染观察为大单层脂质体,直径 105.6 ± 21.1 nm²²。

9种抗肿瘤药物均成功地包入免疫脂质体,包裹率和各成分比例见表1。药物包裹率与药物特性有关,亲脂性药物包裹率高,脂酰化柔红霉素包裹率达93.3±4%。在中性PBS中溶解度很小的亲脂性药物阿霉素和表阿霉素包裹率较高,且较稳定,渗漏少^[1]。而在PBS中易溶的药物则包裹率低。每个脂质体可包入 $10^3 \sim 10^4$ 分子药物,可插入30~80分子抗体。顺铂的包裹率为10%,包入1240分子顺铂/脂质体,如提高顺铂浓度则脂质体稳定性差。

2. 免疫脂质体的免疫活性: ELISA检测结果见表2。免疫脂质体在 10^{-16} mol/L水平仍有抗原结合活性,免疫活性保持60%~90%。由于免疫脂质体的多价特性^[2], ELISA数据仅供参考。免疫脂质体包裹¹²⁵I-BSA,包裹率约20%。与SGC-7901细胞和SL₇细胞4℃作用3.5h后,结合试验结果见表3。免疫脂质体对靶细胞的结合显著高于非靶细胞($P < 0.01$),而¹²⁵I-BSA和普通脂质体则均无结合。

3. 免疫脂质体细胞毒作用: 如表4所示,制备的9种免疫脂质体均对胃癌靶细胞有选择性杀伤作用。在2h杀伤试验中,免疫脂质体的杀伤能力显著优于游离药物,其中表阿霉素-免疫脂质体的作用是游离表阿霉素的3.8倍。在48h杀伤试验中,免疫脂质体对胃癌细胞的杀伤作用与游离药物相近;但均显著高于对正常细胞的杀伤,其中丝裂霉素-免

表1 胃癌免疫脂质体的特性

包裹药物	药物:抗体:脂质体①	包裹率(%)②
阿霉素	5667:48:1	47.5±6.2
表阿霉素	7708:70:1	52.8±7.4
丝裂霉素	8776:34:1	2.6±1.8
氮甲蝶呤	8399:47:1	8.3±2.7
顺铂	1240:30:1	10.3±4.4
放线菌素D ^②	2300:46:1	15.7±3.8
平阳霉素	10515:44:1	5.5±3.0
长春新碱	10000:50:1	
脂酰化一柔红霉素	7365:72:1	93.3±4.7

注: ① 分子比, 三次实验的均值

② 均值±标准差(n=3)

表2 免疫脂质体的免疫活性(ELISA, OD490)

蛋白浓度(M)	MGb ₂ -脂质体-DXR	NIgG-脂质体-DXR	MGb ₂
2×10^{-7}	0.88	0.06	0.94
2×10^{-8}	0.64	0.07	0.65
2×10^{-9}	0.22	—	0.36
2×10^{-10}	0.14	—	0.11

注: 表中数据为复管平均值, n=3

表3 免疫脂质体结合试验(CPM, 本底259CPM)

	SGC-7901	SL ₇
¹²⁵ I-BSA	936±132	905±108
脂质体- ¹²⁵ I-BSA	317±194	873±155
MGb ₂ -脂质体- ¹²⁵ I-BSA	26312±1621	319±118
NIgG-脂质体- ¹²⁵ I-BSA	1163±281	1040±224

注: 表中数据: $\bar{X} \pm SD$, n=4

表4 免疫脂质体的细胞毒作用(IC₅₀①, μg/ml)

包裹药物	免疫脂质体 + SGC-7901	免疫脂质体 + SL ₇	游离药物 + SGC-7901
阿霉素②	0.15	8.65	0.34
表阿霉素②	0.13	8.07	0.49
丝裂霉素	0.91	11.70	0.98
氮甲蝶呤	0.42	4.01	0.49
顺铂	0.23	4.50	0.31
放线菌素D②	0.80	6.60	1.57
平阳霉素	48	286	52
长春新碱	23	101	33
脂酰化一柔红霉素	0.21	14.53	1.12

注: ① IC₅₀-抑制细胞生长50%的药物浓度, SD<20%, n=3。

② 2h杀伤试验。

疫脂质体对胃癌细胞的杀伤作用是对正常细胞作用的62倍, 脂酰化柔红霉素-免疫脂质体对二者杀伤之比达69倍。

讨论

恶性肿瘤的导向治疗 (targeting chemotherapy) 是目前肿瘤学研究的一个重要课题。单克隆抗体为导向治疗提供了较为特异的载体。不论是连接药物或是毒素, 每一抗体分子携带的药物数目有限, 一般为 5~20, 即使使用中介体 (spacer) 也只有~10²个药物分子^[8]。药物交联过多则影响抗体活性。另一方面, 所连接的药物须有可供交联的化学基团, 这些基团交联后不应影响药物活性。许多抗肿瘤药物不能满足这些条件。

免疫脂质体是由双层磷脂构成的膜性小球, 内包药物, 外连抗体, 自身无毒, 可保护所包裹的药物。每个脂质体可携带 10³~10⁴个药物分子, 包裹药物为物理过程, 不改变药物的化学结构, 不会影响药物活性。因此, 脂质体可用来包裹多种药物甚至毒素和生物因子如淋巴因子、干扰素、肿瘤坏死因子等^[9]。各种药物因其理化性质不同, 其脂质体包裹效率也不同, 免疫脂质体的特异杀伤力一定会有很大差别。但这方面工作国内外未见文献报道。

本文将临床常用的 9 种抗肿瘤药物分别制成免疫脂质体, 对其包裹效率和特异性杀伤力进行比较。亲脂性药物阿霉素、表阿霉素的包裹率分别为 47.5% 和 52.8%, 而亲水性药物则低得多 (丝裂霉素 2.6%, 氨甲蝶呤 8.3%)。柔红霉素的包裹率只有 5%~10%, 但经亲脂化处理制成脂酰化柔红霉素后, 包裹率提高至 93.3%^[12]。每个脂质体可包入 10³~10⁴ 分子药物, 易于达到导向治疗所需药物浓度, 从而大大增强其杀伤力。顺铂属非极性药物, 易掺入双层脂质膜中, 量过多则影响脂质体的构成, 本文包入 1240 分子顺铂/脂质体。抗体经修饰后插入脂质体, 每个脂质体可结合 30~80 分子抗体, 抗体活性保持良好。9 种免疫脂质体对胃癌靶细胞均有很强的杀伤能力, 面对正常细胞的毒性显著减小, 以 IC₅₀ 计, 特异杀伤力是非特异杀伤力的 6~70 倍。48h 杀伤试验中, 免疫脂质体的杀伤作

用与游离药物相近, 表明经过脂质体制备过程的处理, 药物活性无明显改变。2h 杀伤试验中, 由于缩短了药物接触时间, 更接近体内条件, 免疫脂质体对胃癌细胞的杀伤作用优于游离药物 (2~4 倍)。根据本文结果, 从临床应用角度考虑, 阿霉素、表阿霉素、顺铂免疫脂质体似更有实用价值。若考虑患者经济条件, 亲脂化处理的药物具有极高的包裹率, 值得进一步重视。

本文结果表明, 所制备的 9 种抗胃癌免疫脂质体均具有较好的导向能力, 特异性强, 对正常细胞毒性小, 将可能用于胃癌的导向治疗。有关免疫脂质体抑制胃癌裸鼠移植瘤的体内实验正在进行, 结果待续。

第四军医大学西京医院 徐梁 张学庸等 著

参考文献

- [1] Heath TD, et al. Chem Phys Lipids, 1986; 40:307
- [2] 徐梁, 等. 生物化学与生物物理学报, 1990; 22(3):291
- [3] 徐梁, 等. 中华消化杂志, 1989; 9(6):325
- [4] Lapidot Y, et al. J Lipid Res, 1967; 8:142
- [5] Mossman T, et al. J Immunol Methods, 1983; 65:55
- [6] 徐梁, 等. 第四军医大学学报, 1989; 10(2):138
- [7] Houck KS, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1987; 145:1205
- [8] Molteni L, et al. Methods Enzymol, 1985; 112:285
- [9] Mayer LD, et al. Chem Phys Lipids, 1986; 40:333

胃癌及胃癌前病变胃液IgG, SIgA, β_2 m, CEA, cAMP和cGMP的研究

据报道, 胃癌及慢性萎缩性胃炎伴肠化和/或异生患者胃液中免疫球蛋白, β_2 MG (β_2 微球蛋白), CEA及环核苷酸(cAMP、cGMP)有一定变化^[1-4]。胃液中IgG、SIgA的变化可反映局部免疫功能, 肿瘤细胞可分泌大量的 β_2 m, CEA, 使其在体液中浓度升高, 而cAMP、cGMP则分别反映粘膜细胞的分泌功能和增殖活性。本文用放射免疫法测定胃癌及胃癌前病变胃液IgG、SIgA、 β_2 m、CEA、cAMP和cGMP含量, 并探讨它们的临床意义。

患者和方法

1. 患者: 42例患者中胃癌11例, 男7例, 女4例, 年龄35~67岁, 均为中晚期胃癌(腺癌8例, 其他癌3例); 胃癌前病变(慢性萎缩性胃炎伴肠化和/或异生)^[5]31例, 男24例, 女7例, 年龄23~58岁。全部患者均行纤维胃镜, 细胞学或病理学确诊, 并排除其他器质性病变。正常人20名, 男17名, 女3名, 年龄19~58岁, 胃镜下为正常或大致正常胃十二指肠粘膜, 无器质性疾病。

2. 测定方法: 禁食12h, 咽部局麻后行胃镜检查时用于干燥管取胃液3ml, 立即用0.1N NaHCO₃调pH至5~6, 然后0℃离心, 取出标本置-20~30℃保存待测。测定时取出所需标本严格按各药盒

说明操作, 专人同批同一仪器, 用放射免疫法测定各值。批内变异系数(CV) IgG、SIgA均为7.2% (n=8), β_2 m7.0% (n=6), CEA6.0% (n=8), cAMP、cGMP均为6.9% (n=8)。所用药盒分别为北京原子能研究院(IgG), 上海放射免疫分析研究所(SIgA), 中国同位素公司北方免疫试剂研究所(β_2 m), 上海化学试剂研究所(CEA)和上海中医学院同位素室(cAMP、cGMP)提供。

3. 统计学分析: 各值用均数±SD表示, 与正常人比较, 其显著性差异用t检验; CEA与cAMP/cGMP比值和SIgA之间用线性回归分析。

结果

正常人、胃癌及胃癌前病变胃液中IgG、SIgA、 β_2 m、CEA、cAMP和cGMP值见附表。胃癌患者CEA与cAMP/cGMP值无关 ($r=0.2036$, $p>0.05$), 与SIgA呈正相关 ($r=0.5028$, $P<0.05$); 胃癌前病变CEA与cAMP/cGMP值及SIgA均无相关。胃癌各值均显著高于正常人 ($P<0.01$), 腺癌与其他癌各值无差异 ($P>0.05$)。与正常人比较, 胃癌前病变仅CEA ($P<0.01$), SIgA和cGMP ($P<0.05$) 升高。

附表 胃癌、胃癌前病变胃液IgG (mg/L), SIgA (μ g/L), β_2 m、CEA (μ g/L), cAMP和cGMP (nmol/L) 测定结果 ($\bar{X} \pm SD$)

项 目	正 常 人 n=20	胃 癌 n=11	胃癌前病变 n=31
IgG	3.28 ± 3.49	16.38 ± 12.75*	4.32 ± 3.67
SIgA	180.60 ± 96.60	458.48 ± 274.50*	253.39 ± 113.24**
β_2 m	2.94 ± 1.24	11.03 ± 3.27*	2.59 ± 1.13
CEA	14.18 ± 4.03	51.42 ± 13.66*	19.08 ± 7.35*
cAMP	6.26 ± 4.40	14.97 ± 8.17*	5.88 ± 4.62
cGMP	3.18 ± 2.59	9.25 ± 11.56**	4.97 ± 2.94**

* $p<0.01$, ** $p<0.05$, 与正常人比较。

讨论

1. 胃液IgG、SIgA具有局部免疫作用, 是对抗细菌、病毒、肿瘤等相关抗原的局部抗体。本文结果胃癌IgG、SIgA显著高于正常人 ($p<0.01$), 而胃癌前病变仅SIgA升高 ($p<0.05$), 说明正常胃粘膜当处于癌前病变, 发生癌变时, IgG、SIgA则升高, 其机理可能系胃粘膜细胞在抗原刺激下, 局部粘膜分泌亢进以中和相应抗原所致^[1]。

2. β_2m 、CEA用于诊断胃癌具有一定的临床意义, 肿瘤时均可明显升高^[2,3]。 β_2m 广泛分布于各种体液中, 是人类白细胞抗原 (HLA) 的轻链部分, 分子量 11×10^4 , 是由100多个氨基酸残基组成的单链多肽。在人体内有两种形式: 一种是结合态, 为HLA轻链部分, 存在于各种有核细胞膜上; 另一种是游离态, 存在于各种体液中, 可测出。肿瘤组织分泌的 β_2m 比正常组织高得多, 加上细胞破坏, β_2m 从有核细胞表面游离出来, 造成体液 β_2m 明显升高。本文胃癌胃液中 β_2m 显著高于正常人 ($P<0.01$), 且与胃癌组织学类型无关, 说明各类胃癌均有分泌 β_2m 功能。胃液CEA在胃癌显著升高 ($P<0.01$), 癌前病变有升高 ($P<0.05$), 这与既往报告基本一致^[6]。

3. cAMP、cGMP通过蛋白激酶发挥递质样或激素样生理效应。一方面, cAMP、cGMP相拮抗作用, 如cGMP刺激DNA合成可被丁酰cAMP抑制; 另一方面, 又有协同作用, 如高浓度cAMP、cGMP均可刺激ACTH促进类固醇激素合成^[7]。cAMP、cGMP作为激素的第二信使, 对生命的某些环节具有重要调节作用, 当它们在细胞内的量发生改变时, 常可导致病理状态, 而组织细胞的病理状态也可导致cAMP、cGMP量的改变^[8]。本文表

明, 胃癌时由于局部粘膜细胞癌变, 使分泌亢进和增殖活跃, 故胃液cAMP和cGMP均升高, 而癌前病变主要由于粘膜异常增殖 (肠化和异生), 仅表现cGMP升高。

作者认为测定胃液IgG、SIgA、 β_2m 、CEA、cAMP和cGMP对胃癌诊断具有一定参考价值, 测定胃液SIgA、CEA和cGMP对胃癌前病变也有一定临床意义, 但由于病例较少, 测定胃液上述各值的临床意义还需积累更多资料。

空军兰州医院 许昌泰 王育敏 著

参考文献

- (1) 户川 敦. 免疫グロブリンG, A, M (IgG, IgA, IgM). 内科 1988; 61 (6):1248
- (2) 石本二见男. β_2 -Microglobulin. 内科 1989; 63(6):1038
- (3) 松岡雄治. Carcinoembryonic Antigen. 内科 1987; 60(3):637
- (4) Stroop SD, et al. J Biol Chem, 1989; 264(23):13718
- (5) 李世荣. 医师进修杂志 1988; 11(2):7
- (6) 许昌泰, 等. 宁夏医学杂志 1990; 12(1):13
- (7) 松岛 乔内科 1988; 61(6):1109
- (8) 郑广华编著. 环核苷酸与临床. 第1版, 天津科技出版社, 1985; 1~51, 99~114

肝癌单克隆抗体——葡聚糖及柔红霉素结合物制备 及其对人肝癌细胞的体外杀伤作用

柔红霉素 (DAU) 属蒽环类抗生素, 能嵌入 DNA 碱基对之间, 阻碍转录过程, 抑制 RNA 的合成及 DNA 的复制而发挥抗肿瘤作用, 是一种周期非特异药物, 临床已广泛用于恶性肿瘤的治疗。它对肝癌细胞有明显的杀伤作用^[1], 其杀伤效果与 DAU 浓度呈正相关, 但由于 DAU 对心脏的毒性及骨髓抑制作用, 限制了临床有效剂量的应用^[2]。为了能使 DAU 选择性地作用于肿瘤组织, 提高 DAU 抗肿瘤疗效和减轻毒副作用, 本实验制备了抗人肝癌 McAb (H₁₀)—DEX—DAU 结合物, 并在体外观察该结合物对肝癌细胞的杀伤作用, 以期对肝癌抗体导向治疗探索一条可行的途径。

材料和方法

1. H₁₀—DEX—DAU 结合物的制备: 方法参考国内外有关文献^[3,4,5,7]。葡聚糖 T₄₀ (分子量 4 万) 1000mg 溶于 200ml 蒸馏水, 加入 330mg 高碘酸钠, 在室温下避光反应过夜, 使葡聚糖氧化为多醛基葡聚糖 (PAD)。经蒸馏水充分透析除去高碘酸钠, 再将 PAD 冷冻干燥成白色絮状粉末, 分装保存于 -20℃ 冰箱中备用。

取 12mg PAD 溶于 1.0ml 0.02mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液中, 加入 1mg DAU 于室温下避光反应 20h, 再加入 2mg 单抗 H₁₀, 4℃ 避光搅拌反应过夜, 反应混合物加入 0.46mg 的硼氢化钠, 室温反应 2h, 还原剩余的游离醛基。反应混合物离心 (10000r/min, 10min) 后弃沉淀, 上清 sephadex G—25 层析柱, 使小分子的游离 DAU 和未结合的 PAD 与大分子的 McAb—DEX—DAU 结合物分离, 收集首峰即得到 H₁₀—DEX—DAU 结合物。此外, 以同样方法制备正常人 IgG—DEX—DAU 结合物, 作对照实验用。检测结合物中各成份的含量后于 4℃ 保存。

2. ELISA 检测抗体活性: 将培养的人肝癌 SMMC7721 细胞制成细胞悬液, 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 96 孔培养板, 37℃ 培养 24h, 用 0.25% 戊二醛固定, 正常鼠血清封闭后加入不同稀释度的待测样品反应 1h, 再与酶标 SPA (1:3000) 反应 30min,

加入底物邻苯二胺显色后测定 495nm 的 OD 值^[8]。

3. H₁₀—DEX—DAU 结合物的细胞毒试验

48h 细胞毒试验: 人肝癌细胞 SMMC7721 细胞悬液按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板, 再加入 50μl RMI 1640 培养液 (含 15% 牛血清)。然后加入不同稀释度的 H₁₀—DEX—DAU 结合物, 并设游离 DAU、正常 IgG—DEX—DAU 结合物相应浓度的对照组, 同时用喉癌 Hep-2 细胞悬液铺板作为细胞对照组。置 CO₂ 孵箱培养 48h 后, 每孔加入 50μl 噻唑蓝溶液 (1mg/ml), 于 37℃ 反应 4h 后, 弃去反应混合物, 每孔加入 200μl 二甲亚砜, 在酶标仪上测各孔 495nm 的 OD 值, 按照公式: 杀伤率 = $(1 - \frac{\text{OD}_{\text{处理组}}}{\text{OD}_{\text{空白组}}}) \times 100\%$, 计算各组各浓度药物对肿瘤细胞的杀伤率。

结果

1. H₁₀—DEX—DAU 结合物的制备: 分别测定结合物中各成份的浓度, H₁₀ 单抗用 Bradford 法^[10], DEX 用苯酚—浓硫酸法^[5], DAU 用紫外分光光度仪测 475nm OD 值然后计算浓度, 结果表明: 结合物中抗体 H₁₀ 浓度为 0.78mg/ml, DAU 浓度为 0.130mg/ml, 每分子 H₁₀ 引入了 56 个分子 DAU, H₁₀:DEX:DAU 为 1:2.4:56。

2. H₁₀ 抗体结合前后抗体活性比较: 结果见表, 不同浓度的 H₁₀—DEX—DAU 和 H₁₀ 单抗抗体活性相近, 其与人肝癌靶细胞的结合活性无显著变化。

结合物抗体活性与游离抗体活性比较表

抗体浓度 mg/ml	495nm OD 值	
	游离 Mcab (H ₁₀)	H ₁₀ -DEX-DAU
0.1	1.31	1.22
0.01	0.86	0.50
0.001	0.45	0.41
0.0001	0.39	0.30

3. 细胞毒性试验: 48h 细胞毒试验结果见图 1、2, 1h 预处理试验结果见图 3。

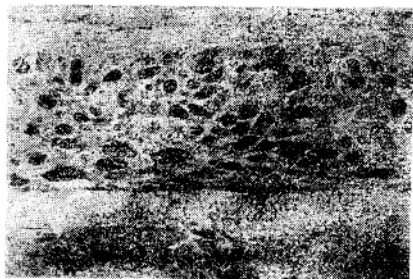


图1 SMMC7721肝癌细胞杀伤曲线

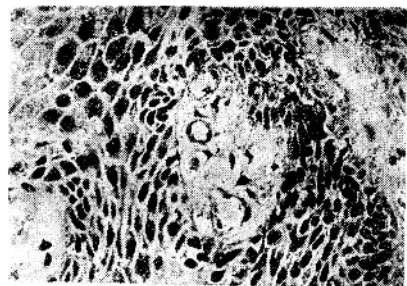


图2 Hep-2喉癌细胞杀伤曲线

48h 细胞毒试验结果可见, 当 H_{10} -DEX-DAU 结合物浓度为 $6 \mu\text{g/ml}$ 时, 可杀伤 97% 的肝癌细胞, 而同等浓度下游离 DAU 及非特异抗体结合物的杀伤率分别为 84% 和 45%, 当 H_{10} -DEX-DAU 浓度为 $1.6 \mu\text{g/ml}$ 时, 仍可维持 94% 的杀伤率, 游离 DAU 及非特异抗体结合物的杀伤率仅为 72% 和 43%。当 H_{10} -DEX-DAU 浓度降低 60 倍 ($0.1 \mu\text{g/ml}$) 时, 还可杀伤 45% 肝癌细胞, 高于游离 DAU (34%), 和非特异抗体结合物 (31%)。从图 2 可知: 三组药物各浓度组对喉癌细胞 Hep-2 的杀伤作用相近, 没有明显差别。上述结果表明: H_{10} -DEX-

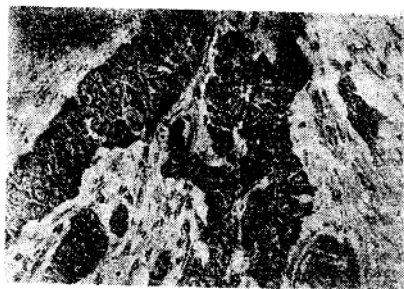


图3 1h预处理细胞毒试验

DAU 结合物对人肝癌 SMMC7721 细胞发挥了选择性的杀伤作用。

从图 3 可知: 当 DAU 浓度为 $6 \mu\text{g/ml}$ 时, H_{10} -DEX-DAU 对肝癌细胞的杀伤率为 64%, 游离 DAU 及非特异抗体结合物的杀伤率分别为 46% 和 13%, 明显低于 H_{10} -DEX-DAU 结合物, 其它各浓度组均可得出类似结果。

讨论

柔红霉素与抗肿瘤抗体交联, 文献报道的方法很多, 较早的工作是将 DAU 直接与抗体相连, 但用直接法制备的结合物中抗体所携带的 DAU 分子数量有限, 一般抗体与药物之比多在 1:10 以内, 否则抗体容易失去活性^[9], 因此直接结合物很难达到临床治疗肿瘤所需的药物剂量, 故目前多采用间接法, 选择一种合适的连接臂, 可减少药物分子对抗体的空间位阻效应, 使一个抗体分子携带较多数量的药物分子, 增加抗肿瘤药物的有效剂量, 提高疗效。本实验通过葡聚糖连接臂使一个抗体结合了 56 个分子的 DAU。实践证明, 葡聚糖是一种较理想的连接臂, 它水溶性好, 无毒无抗原性, 在体内不易降解, 氧化后可提供多个醛基供 DAU 及抗体分子结合。我们参照国内外有关文献, 制备了 $McAb(H_{10})$ -DEX-DAU 结合物, 薄层硅胶板层析结果表明: DAU-DEX- H_{10} 是共价结合的, 并非简单的非特异吸附, 因此该结合物能稳定地存在, 其水溶液 4°C 保存一个月基本不解离, 抗体及药物活性均保持较好。

以往细胞毒试验多采用放射性核素掺入法, 近