

## 靶向 CT 对比剂在结核急性感染动物模型中的初步观察

张昊凌 施裕新 钱隽 冯峰 刘芳 张志勇

**【摘要】** 目的 探讨抗 85B 和 ESAT-6 鼠单克隆抗体靶向 CT 对比剂对小鼠急性感染肺结核动物模型显示的可行性。方法 采用已纯化的抗 85B 和 ESAT-6 鼠单克隆抗体与碘原子耦联制备靶向 CT 对比剂,计算对比剂溶液中抗体含量和结合<sup>127</sup>I 含量,稀释后配制成 5 μg I/ml 备用。将 20 只小鼠急性感染肺结核动物模型通过随机数字表法随机分为 4 组,每组 5 只并编号,分别记为靶向对比剂 85B 组和 ESAT-6 组、普通对比剂组和对照组。普通对比剂组与 85B 组注射含碘浓度相同的碘海醇稀释液;对照组注射 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)。分别于注射对比剂前、后不同时间(即刻、6、12、24 h)行微 CT(Micro-CT)扫描,观察小鼠肺内病变的显示情况,判断指标为病变 CT 值,绘制 CT 强化-时间曲线,并计算强化率。两样本均数比较用 *t* 检验,多个样本均数比较用方差分析。结果 实验所制备的 2.52 ml 抗 85B 对比剂溶液中含有 210~255 μg 抗体、10.5~16.6 μg <sup>127</sup>I;2.93 ml 抗 ESAT-6 对比剂溶液中含有抗体 147 μg、结合<sup>127</sup>I 约 20.58 μg。靶向对比剂组小鼠肺内病变的 CT 值随时间延长而逐渐升高,在注射对比剂后 12 h(*t*<sub>12</sub>)病变强化明显,在注射对比剂 24 h(*t*<sub>24</sub>)后肺内病变仍有强化,且与普通对比剂组小鼠肺内病变的 CT 值相比[85B 组 *t*<sub>12</sub> = (-125.04 ± 13.58) HU, *t*<sub>24</sub> = (-117.37 ± 12.28) HU 和 ESAT-6 组 *t*<sub>12</sub> = (-122.14 ± 19.01) HU, *t*<sub>24</sub> = (-114.23 ± 17.08) HU], 差异均有统计学意义(2 组 24 h *t* 值分别为 4.05 和 6.39, *P* 值均 < 0.05)。对照组小鼠肺内病变在注射 PBS 前后,均未见强化。结论 制备的抗 85B 和 ESAT-6 结核特异抗体靶向 CT 对比剂在小鼠肺结核动物模型中具有一定靶向性,为结核相关靶向对比剂的研究奠定了实验基础。

**【关键词】** 结核,肺; 模型,动物; 体层摄影术,X 线计算机; 抗体,单克隆; 对比剂

**Preliminary observation of targeted contrast agent of CT in the acute tuberculosis animal model**  
ZHANG Hao-ling\*, SHI Yu-xin, QIAN Jun, FENG Feng, LIU Fang, ZHANG Zhi-yong. \* Department of Radiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai Institute of Medical Image, Shanghai 200032, China

Corresponding author: ZHANG Zhi-yong, Email: zhangzy@shaphc.org

**【Abstract】** **Objective** To explore the feasibility of anti-85B and ESAT-6 monoclonal antibodies targeted contrast agent of CT by the murine acute tuberculosis animal model. **Methods** Preparation the targeted contrast agent of computed tomography by iodine atoms coupled with anti-85B and ESAT-6 murine monoclonal antibodies after purified. Calculate the label rate and the quality of <sup>127</sup>I of the targeted contrast agent solution, and dilute the contrast agent solution to the required concentration (5 μg I/ml) to spare. There were twenty mice of acute tuberculosis animal model, which were divided into four groups by completely randomized digital table and each group was five animals. According to the different antibody named as 85B group and ESAT-6 group of targeted contrast agent, common contrast agent and blank control separately. The common contrast agent group was injected with diluents of iohexol, which was diluted into the same concentration with the targeted contrast agent. The control group was injected with antibody diluents pH 7.4 Phosphate Buffered Saline (PBS). All the animals were scanned before and after injection the contrast agent in different time, such as immediate, 6 hours, 12 hours and 24 hours. Observe the display and changes of the murine tuberculosis lesions, and measurement the CT value, which was regarded as

DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2012.12.017

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071153);上海市科委科研项目课题资助项目(08JC1417500)

作者单位:200032 复旦大学附属中山医院放射科 上海市影像医学研究所(张昊凌、张志勇);上海市公共卫生临床中心放射科(施裕新、冯峰),动物中心(刘芳);复旦大学药学院(钱隽)

通信作者:张志勇,Email:zhangzy@shaphc.org

evaluating mark. Enhancement ratio was also calculated. Two sample mean differences with *t* test and the multiple sample mean differences with ANOVA. **Results** The volume of anti-85B contrast agent solution was 2.52 ml, and the quality of antibody and  $^{127}\text{I}$  were range from 210 to 255  $\mu\text{g}$  and 10.5 to 16.6  $\mu\text{g}$  respectively. The volume of anti-ESAT-6 contrast agent solution was 2.93 ml, and the quality of antibody and  $^{127}\text{I}$  were 147  $\mu\text{g}$  and 20.58  $\mu\text{g}$  respectively. The lesions of the control group showed no visible density changes before and after injection of PBS. The CT value of the lung lesions in the targeted contrast agent group were gradually increased with time, and the lesion showed visible enhancement after the contrast injection twelve hours ( $t_{12}$ ), and also remained visible enhancement after injection twenty-four hours ( $t_{24}$ ) [85B group  $t_{12} = (-125.04 \pm 13.58)$  HU,  $t_{24} = (-117.37 \pm 12.28)$  HU and ESAT-6 group  $t_{12} = (-122.14 \pm 19.01)$  HU,  $t_{24} = (-114.23 \pm 17.08)$  HU], which is significant difference compared to the common contrast agent [ $t(85\text{B}-24\text{ h}) = 4.05$ ,  $t(\text{ESAT-6}-24\text{ h}) = 6.39$ ,  $P < 0.05$ ]. **Conclusions** The targeted property of anti-85B and ESAT-6 murine monoclonal antibody contrast agent of CT had been partly proved by the acute tuberculosis animal model. Also provided an experimental basis for further study of tuberculosis targeted contrast agent.

**【Key words】** Tuberculosis, pulmonary; Models, Animal; Tomography, X-ray computed; Antibodies, monoclonal; Contrast media

抗体耦联制备靶向对比剂的研究已成为现代影像医学领域的热点之一。目前超声微泡造影和 MR 靶向成像在显示肿瘤病灶方面<sup>[1-5]</sup>,已显示出很好的应用前景,可定向显示肿瘤组织,明显延长影像显示时间窗<sup>[6]</sup>,能从细胞分子水平研究病变进展,为疾病早期诊断提供帮助<sup>[7-8]</sup>。早期有学者应用抗结核药物载体微球和磁场进行药物靶向性研究<sup>[9]</sup>,有一定价值,但这种物理靶向理论上不如抗体抗原的免疫靶向作用好。因此,本研究中拟制备抗结核单克隆抗体,并与碘原子耦联合成一种新型的抗结核特异性靶向 CT 对比剂。

## 资料与方法

### 一、抗结核单克隆抗体靶向 CT 对比剂

1. 靶向对比剂制备:抗 85B 和 ESAT-6 鼠单克隆抗体分子经 Iodogen 法引入非放射性碘( $^{127}\text{I}$ )原子,用于动物模型小鼠 CT 成像。该对比剂的制备采用小样标记并纯化,而后合并纯化后含 $^{127}\text{I}$ -抗 85B 和 $^{127}\text{I}$ -ESAT-6 抗体的洗出液。具体步骤如下:分别于 6 个 Iodogen (100  $\mu\text{g}/\text{管}$ ) 反应管中依次加入:  $\text{Na}^{127}\text{I}$ (0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 10  $\mu\text{l}$ 、抗 85B 抗体(1.35  $\text{mg}/\text{ml}$ ) 37  $\mu\text{l}$  和磷酸盐缓冲液(PBS, 0.2 M pH 7.4) 20  $\mu\text{l}$ 。8 个 Iodogen 反应管中依次加入  $\text{Na}^{127}\text{I}$ (0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 25  $\mu\text{l}$ 、抗 ESAT-6 抗体(1  $\text{mg}/\text{ml}$ ) 50  $\mu\text{l}$  和 pH 7.4 PBS (0.2 M) 15  $\mu\text{l}$ 。涡旋数秒,混合均匀,在室温下分别反应 5 min 后,转移反应液至塑料离心管。

标记反应液分别经 0.6 cm  $\times$  8.0 cm 的 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱脱盐纯化,以 PBS (0.02 M) 淋洗,收集洗出液。纯化的 $^{127}\text{I}$ -抗 85B 和 $^{127}\text{I}$ -抗 ESAT-6 鼠单克隆抗体主要集中于洗出液第 2 管。合并第 2 管洗出液并转移至带盖塑料离心

管,计算所制备对比剂溶液中的抗体量和含碘量。

2. 靶向对比剂体外实验:取 4 只 250  $\mu\text{l}$  离心管分别装含碘质量浓度为 10、5、2、1  $\mu\text{g I}/\text{ml}$  的对比剂溶液各 200  $\mu\text{l}$  和等量的 PBS 溶液(0.01 M)作空白对照,行微 CT (Micro-CT) 扫描,并分别测定溶液的 Micro-CT 平均值。从而选择既能与空白管区分,又能引起 Micro-CT 密度变化的对比剂浓度,作为动物模型扫描时的注射浓度。

### 二、动物模型准备

在恒温负压的生物安全三级(P3)实验室内,取本课题组和动物中心成功建立的滴鼻感染的小鼠急性结核病动物模型(体质量为 18 ~ 22 g 的 C57BL/6 小鼠)20 只,通过随机数字表法分为 4 组,每组 5 只并编号,分别记为靶向对比剂 2 组,分别为 85B 组和 ESAT-6 组;普通对比剂组(碘海醇组)和对照组(PBS 组)。靶向对比剂 2 组均经尾静脉注射相同含碘浓度的特异性抗体对比剂 1 ml,浓度为 5  $\mu\text{g I}/\text{ml}$ ,普通对比剂组注射和靶向对比剂组相同体积和含碘浓度的碘海醇稀释液,对照组注射与对比剂组相同体积的 PBS(0.1 M)溶液。观察小鼠的生长及存活情况,待接种标准毒株后第 6 ~ 8 周,进行 Micro-CT 扫描,扫描后取 Micro-CT 平扫图像显示结核病变明显的小鼠,注射对比剂做进一步观察,并与病理组织学检测作对照,分别行 HE、抗酸、过碘酸-雪夫(PAS)染色和 CD68 免疫组织化学(简称免疫组化)检测。

### 三、Micro-CT 扫描

1. Micro-CT 扫描参数:本实验所用 Micro-CT 为美国 GE 公司用于活体小动物扫描的 Explore Locus 型产品(GE Healthcare)。具有微焦距的钨质阳极 X 线管,管电压为 35 ~ 80 kVp,电流 100 ~ 500  $\mu\text{A}$ ,

二维电荷耦合探测器 (CCD) 的单元大小为  $27 \mu\text{m}$ , 采用锥体束方法重建。有效像素  $94.0 \mu\text{m}$ , 分辨率  $45.0 \mu\text{m} \times 45.0 \mu\text{m} \times 45.0 \mu\text{m}$ 。图像后处理软件为 GE Micro View。扫描参数: 管电压 50 kVp, 管电流 450  $\mu\text{As}$ , 角增量  $0.7^\circ$ , 曝光时间 300 ms, 扫描模式  $360^\circ$ , 平均帧数为 2 帧, 探测器组件模式  $4 \times 4$ , 扫描时间 16 min。

2. Micro-CT 扫描方案: 将实验各组小鼠称重标记, 于扫描前 10 min 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉 ( $0.005 \text{ ml/g}$ ), 以确保 Micro-CT 扫描时呼吸平稳。随后放入无菌转运瓶中, 选取小鼠胸部进行横断面扫描, 同时扫描标准体模, 以备 CT 值校正<sup>[10]</sup>, 并将原始图像重组为扫描精度为  $46.0 \mu\text{m}$  的高分辨率图像。通过增加参与重组的层数, 或是直接设定参与重组的胸部厚度, 以致整个肺部进行图像的 MIP 增加肺部信息整体性, 获得二维层面的整体胸部分布信息<sup>[11]</sup>。

各组小鼠分别于注射对比剂后即刻 (10 ~ 30 min) 和 6、12、24 h 进行扫描, 观察模型小鼠在不同扫描时间点肺内病变的密度差异, 测量病变 CT 值, 并与平扫作对照研究, 绘制时间-增强率曲线: 增强率 = (增强 CT 值 - 平扫 CT 值 / 平扫 CT 值)  $\times 100\%$ 。

#### 四、统计学方法

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 由 SPSS 17.0 统计软件处理分析, 统计图表绘制采用 Graph Pad Prism Version 5.0 软件。多个样本均数比较用方差分析, 两样本均数比较用  $t$  检验。Micro-CT 平扫时靶向对比剂 2 组和普通对比剂组及对照组间的基线比较采用两独立样本  $t$  检验; 靶向对比剂 2 组小鼠分别在注射对比剂后 4 个扫描时间点测得 Micro-CT 值, 因原始数据方差不齐, 需先进行秩变换, 然后进行随机区组设计的方差分析; 各时间点扫描结果的指标分别与平扫相比采用两两比较的 *Student-Newman-Keuls* (SNK- $q$ ) 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、体外实验结果

1. 靶向 CT 对比剂制备: 纯化的<sup>127</sup>I-抗 85B 和<sup>127</sup>I-抗 ESAT-6 鼠单克隆抗体主要集中于洗出液第 2 管。分别收集 6 个第 2 管洗出液, 量取<sup>127</sup>I-抗 85B 对比剂体积共有 2.52 ml; 该溶液中含抗 85B 抗体质量为 210 ~ 255  $\mu\text{g}$ , 含碘量为 10.5 ~ 16.6  $\mu\text{g}$  <sup>127</sup>I。

纯化的<sup>127</sup>I-抗 ESAT-6 鼠单克隆抗体有 2.93 ml,

分别合并 8 个第二管收集液, 计算对比剂溶液中抗体量为 147  $\mu\text{g}$ , 结合的<sup>127</sup>I 为 20.58  $\mu\text{g}$ 。

实验动物模型所用对比剂浓度均以碘含量为标准, 其中靶向对比剂和普通对比剂组浓度相同, 均为 5  $\mu\text{g I/ml}$ 。

2. 靶向对比剂体外实验: 测得 4 只装有不同含碘浓度对比剂的离心管 CT 值, 采用配对  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 7.93, P < 0.05$ ), 抗体与碘原子连接稳定, 随时间变化不明显, 且 CT 值随特异性抗体浓度的增加而升高 (表 1, 图 1 ~ 3)。

表 1 不同浓度碘对比剂的各时间点 Micro-CT 值 (HU,  $\bar{x} \pm s$ )

对比剂浓度 ( $\mu\text{g I/ml}$ )	1 h	6 h	12 h	24 h
1	39.61 $\pm$ 0.49	41.73 $\pm$ 0.88	37.71 $\pm$ 0.08	38.80 $\pm$ 0.22
2	62.00 $\pm$ 0.93	62.48 $\pm$ 0.98	63.29 $\pm$ 0.67	60.92 $\pm$ 0.19
5	85.36 $\pm$ 0.81	80.52 $\pm$ 0.99	86.84 $\pm$ 1.10	86.07 $\pm$ 0.54
10	121.88 $\pm$ 4.61	119.66 $\pm$ 4.80	121.86 $\pm$ 5.47	119.45 $\pm$ 1.58

### 二、动物模型 Micro-CT 扫描

1. 基线比较: 靶向对比剂 2 组与普通对比剂组及对照组做基线比较, 每组 C57BL/6 小鼠模型各 5 只, 平扫测定与肺内病灶同侧肺动脉和同平面侧后胸壁的 Micro-CT 值, 经两独立样本  $t$  检验, 显示 2 组间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 说明各组 CT 值基线相同。

2. 不同扫描时间点 Micro-CT 值比较: 经 C57BL/6 小鼠尾静脉注射制备的靶向 CT 对比剂后, 观察不同扫描时间点肺内病变的密度差异, 靶向对比剂 2 组 (85B 组和 ESAT-6 组) 同一时间点肺内病变分别与普通对比剂组及对照组比较, 在平扫时和注入对比剂即刻扫描, 两两比较差异无统计学意义; 注射对比剂后 6、12 和 24 h 扫描, 测得靶向对比剂 2 组的 Micro-CT 值均较普通对比剂组及对照组升高, 且差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

滴鼻感染结核分枝杆菌 7 ~ 8 周时小鼠模型肺组织 Micro-CT 扫描结果与病理对照, 可见大量单核巨噬细胞和淋巴细胞浸润, 肺组织出现弥漫性实变, 肺泡间隔增厚; 黄染条索样结构, 为组织细胞或类上皮细胞反应增生结节, 与 HE 染色结果相对应为阳性反应。肺组织大体标本, 可见扫描病变区呈灰白色结节样肉芽肿, 病灶切面似干酪样改变, 与组织切片相对应。Micro-CT 平扫显示模型小鼠两肺多灶性实变, 实变内可见充气支气管。油镜显示肺组织切



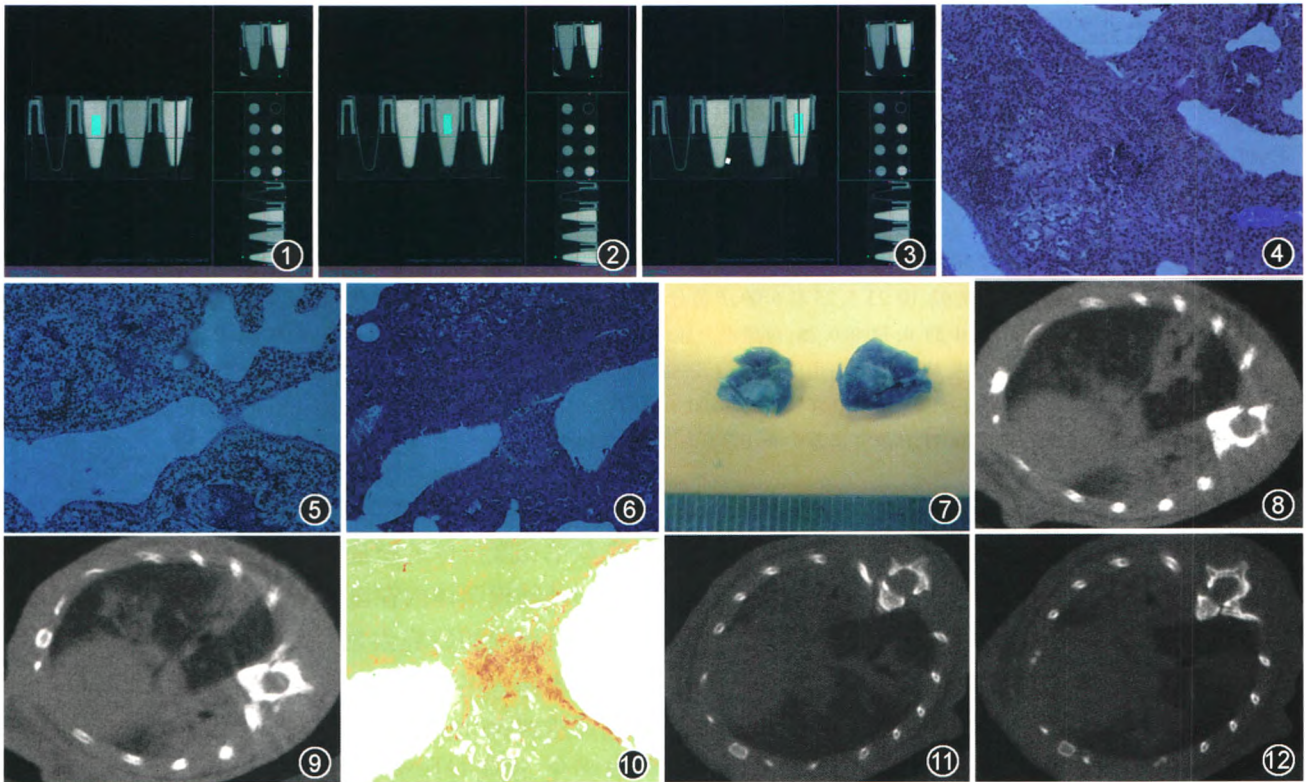


图 1~3 离心管内不同浓度碘对比剂的微 CT (Micro-CT) 扫描及测量,显示抗体和碘原子连接稳定,且 CT 值随特异性抗体的浓度增加而升高 图 4~12 滴鼻感染结核分枝杆菌 7~8 周时小鼠模型肺组织 Micro-CT 扫描结果与病理对照。图 4 可见大量单核巨噬细胞和淋巴细胞浸润,肺组织出现弥漫性实变,肺泡间隔增厚 (HE  $\times 200$ )。图 5 显示黄染条索样结构,为组织细胞或类上皮细胞反应增生结节,与 HE 染色结果相对应,为阳性反应 (免疫组织化学 CD68  $\times 200$ )。图 6 排除真菌感染,同时显示肺组织结构破坏呈实变 (箭;PAS  $\times 200$ )。图 7 为肺组织大体标本,可见扫描病变区呈灰白色结节样肉芽肿,病灶切面似干酪样改变,与组织切片相对应。图 8,9 为 Micro-CT 平扫显示模型小鼠两肺多灶性实变,实变内可见充气支气管。图 10 为油镜,显示肺组织切片实变区内可见团簇状分布的红染的结核分枝杆菌 (抗酸染色  $\times 1000$ ),与图 4~6 中的病变区相一致。图 11,12 为观察注入抗鼠单克隆抗体靶向 CT 对比剂后 24 h, Micro-CT 扫描显示小鼠急性感染结核模型的肺内病变,与平扫相比肺内病变境界显示更清晰,测量 CT 值较平扫升高;扫描断面与感染组织大体标本及病理切片结果对应

片实变区内可见团簇状分布的红染的结核分枝杆菌。注入抗鼠单克隆抗体靶向 CT 对比剂后 24 h, Micro-CT 扫描显示小鼠急性感染结核模型的肺内病变,与平扫相比肺内病变境界显示更清晰,测量 CT 值较平扫升高;扫描断面与感染组织大体标本及病理切片结果对应 (图 4~12)。

靶向对比剂 2 组在注射对比剂前后肺内病变密度有差异,发现注射对比剂后 12 h 和 24 h 肺内病变范围显示均较平扫清晰;测量肺内病变的 Micor-CT 值,随时间延长而增加。注射对比剂后不同时间分别与平扫比较:在注射对比剂后 30 min 内扫描,肺内病变 Micro-CT 值无明显升高,与平扫相比差异无统计学意义;6 h 后肺内病变 CT 值开始升高,12 h 后肺内病变 CT 值升高明

显,24 h 后扫描肺内病变 Micro-CT 值仍较平扫升高;而注射 PBS 缓冲液的对照组肺内病变 Micro-CT 值无明显变化,病灶境界相对模糊,胸壁软组织始终无强化 (图 13,14)。

注射碘海醇稀释液的普通对比剂组于注射后 6 h 扫描,发现膀胱内高密度液体充盈,而其肺内病变 Micro-CT 值无明显升高。

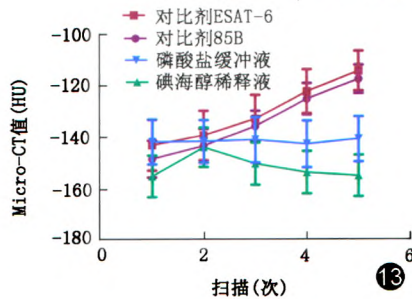


图 13 各实验组不同扫描时间 Micro-CT 值

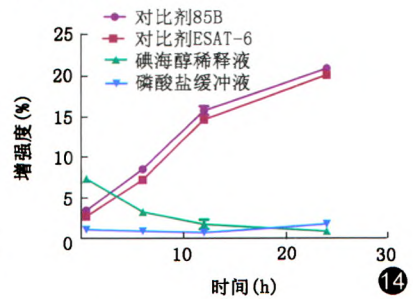


图 14 各实验组不同扫描时间 Micro-CT 增强率

表 2 实验各组不同时间点肺内病变 Micro-CT 值 (HU)

组别	动物数 (只)	平扫	增强			
			即刻	6 h <sup>b</sup>	12 h <sup>b</sup>	24 h <sup>b</sup>
85B 组	5	-148.37 ± 15.98	-143.24 ± 14.76	-135.64 ± 13.59	-125.04 ± 13.58	-117.37 ± 12.28
ESAT-6 组	5	-143.00 ± 21.99	-139.20 ± 21.56	-132.75 ± 20.69	-122.14 ± 19.01	-114.23 ± 17.08
普通对比剂组	5	-155.12 ± 18.14	-143.81 ± 17.16	-150.20 ± 18.33	-153.63 ± 18.44	-154.9 ± 18.07
对照组	5	-141.75 ± 19.53	-141.56 ± 18.39	140.92 ± 19.73	-142.56 ± 20.25	-140.58 ± 19.63

注:85B 组,增强后即刻、6 h、12 h 和 24 h 分别与平扫比较, $t$  值分别为 8.47、10.05、3.15 和 4.05, $P$  值分别为 0.53、0.04、0.00 和 0.00;ESAT-6 组上述时间比较, $t$  值分别为 9.62、10.25、5.25 和 6.09, $P$  值分别为 0.68、0.04、0.00 和 0.00;碘海醇组上述时间比较, $t$  值分别为 0.38、0.49、0.72 和 0.59, $P$  值分别为 0.64、0.53、0.72 和 0.28;对照组上述时间比较, $t$  值分别为 0.68、0.66、0.59 和 0.62, $P$  值分别为 0.91、0.64、0.65 和 0.63。85B 组、普通对比剂组及对照组 3 组间比较,平扫、增强后即刻、增强后 6 h、增强后 12 h、增强后 24 h 组间比较的  $F$  值分别为 11.94、7.96、5.99、8.08 和 11.94, $P$  值分别为 0.27、0.61、0.01、0.00 和 0.00;ESAT-6 组、普通对比剂组及对照组 3 组间比较,上述时间点的  $F$  值分别为 7.32、5.98、4.05、6.59 和 6.39, $P$  值分别为 0.46、0.40、0.02、0.00 和 0.00

## 讨 论

### 一、靶向 CT 对比剂的制备

本实验将自制的抗 85B 和 ESAT-6 鼠单克隆抗体作为载体,经 Iodogen 法在特定条件下耦联一定数量的碘原子制备为不同含碘浓度的单克隆抗体靶向 CT 对比剂,前期实验已证明该碘标对比剂溶液的标记率和放化纯度高,且稳定性好。尽管耦联有碘原子的单克隆抗体经血液循环存在脱碘问题,且肺脏并非碘原子的唯一靶器官,如甲状腺等组织也有摄碘可能,但这种含量微乎其微,不足以引起 Micro-CT 值改变。

### 二、自制对比剂在肺结核动物模型中的 Micro-CT 观察

1. Micro-CT 概述:Micro-CT 是一种非侵入性和非破坏性成像技术,具有微米级的空间分辨率,可用于定性和定量分析样品组织结构,同时重组出的三维图像可从任意角度、任意方向旋转观察,能清晰显示小动物的细微解剖结构<sup>[12]</sup>,可用于结核感染动物模型的实验研究。

2. 自制对比剂浓度对 Micro-CT 扫描密度值的影响:体外实验表明,与对照组比较单克隆抗体靶向 CT 对比剂可以在 Micro-CT 扫描时呈高密度而显影,说明此时对比剂溶液中含有碘原子,较含碘浓度相同的两组对比剂的 Micro-CT 值,均较对照组(PBS 缓冲液,PBS 在本次研究中亦用作抗体稀释液)有明显差异,则该靶向对比剂中不仅含有碘原子,而且碘原子的含量可以引起 CT 值的改变,测得的 CT 值随碘原子浓度的增加而升高。因此,推测靶向对比剂中的碘原子与单克隆抗体已结合在一起,在所测时间(即 24 h)内该对比剂都有显影,且前期体外实验也证明碘标抗体的活性在一定时间内保持良好。

### 3. 结核动物模型 Micro-CT 扫描时间点的选择:

耦联单克隆抗体的靶向对比剂分子量相对较大,注射到动物模型体内在血管及组织内扩散很慢。肿瘤靶向对比剂的研究发现<sup>[13]</sup>,抗体对比剂到达瘤体,能使瘤体产生较明显的信号时间都在 12 h 以后,个别可达到 36 h 以后,等到 48 h 后再次扫描,瘤体仍有强化,说明对比剂在瘤体内仍有存留。参照以上研究成果,同时兼顾实验室生物安全等级要求及 Micro-CT 扫描时间等因素,选择本实验的扫描时间。

### 4. 自制对比剂在结核动物模型中的初步观察:

采用自制靶向对比剂对小鼠肺结核动物模型进行 Micro-CT 扫描发现,2 组特异性抗体对比剂对肺内病灶均有强化,且表现为缓慢的强化过程,早期强化不明显甚至肉眼难以分辨,但随着时间延长,病灶的密度不断增高。小鼠模型注射靶向对比剂 6 h 后,肺内病变均较平扫和对照组的 CT 值有所升高,病变范围较平扫显示清晰,病变同平面的肺血管有部分强化,说明扫描时仍有部分含碘对比剂停留在循环中,而未经代谢。注射对比剂后 12 h 肺内病变 CT 值升高明显,病灶境界显示较平扫更加清晰,强化较为明显;注射对比剂后 24 h 扫描,发现肺内病灶 CT 值仍较平扫时高,强化率可达 20%,提示该靶向对比剂在病灶内存留一定时间,考虑其原因为抗原抗体的免疫反应引起免疫复合物沉积于病灶,早期结核炎性病变表面分泌型抗原的释放,与随血液循环的单克隆抗体发生免疫反应,这种分子生物学反应产生的放大效应,是该对比剂引起 CT 值变化的主要原因<sup>[14]</sup>。

在预实验中笔者曾将不同浓度倍比稀释的碘海醇经尾静脉注入小鼠体内,观察普通含碘对比剂在小鼠体内的代谢。结果发现注射碘海醇后 1 h 扫描小鼠双肾轮廓显影,膀胱内可见高密度液体充盈,



6 h 后扫描泌尿系形态和走行均较前显示更加清晰,推测对比剂已经肾脏随尿液在短时间内代谢。而本研究中使用该靶向对比剂,在注射后 12 h,甚至 24 h 扫描肺内病变都有强化,却未见肾脏轮廓清晰显示,膀胱内也无明显高密度液体充盈,推测该靶向 CT 对比剂在动物模型体内有一定的存留时间,且稳定性良好,这也是抗体对比剂显影的特点。

### 三、自制对比剂的理化特性及其靶向成像初探

本研究中所制备的靶向对比剂,是根据抗体与抗原能特异性结合的原理,以抗结核单克隆抗体作为载体,将碘标记到特异性的抗体上,从而整合成新的 CT 对比剂。使其既具有靶向功能,又具有 CT 对比剂的作用,不仅能与病变组织或器官特异性结合,而且能改变 CT 对比剂引起的病灶密度差异,从而达到靶向诊断的目的,实现小鼠急性肺结核模型的 Micro-CT 免疫显像。自制的单克隆抗体对比剂分子量小,使其在血浆中的持续循环时间足够长,从而确保对比剂能够有效到达靶向区域。同时该对比剂体积小,直径介于 10~200 nm 之间,属非颗粒结构,既不容易经肾脏迅速被代谢掉,也不会被网状内皮系统的单核巨噬细胞吞噬;而且非放射性碘标记的抗体在体内稳定,无半衰期,体内外免疫活性良好,是较为理想的分子影像对比剂。

### 四、研究不足之处与改进措施

1. 动物模型:难以模拟人肺部病变的病理特点,如小鼠和人形成的肉芽肿均由淋巴细胞和巨噬细胞组成,但细胞排列结构不同。小鼠肉芽肿类型差异较小,极少能发展为干酪样液化坏死,除非肺含菌量极高,而且一般观察不到空洞。因此,在实验条件允许的情况下,应尽量选择大动物如豚鼠或兔建立结核感染动物模型,尽可能模拟人感染肺结核后的病理改变。

2. 靶向对比剂:由于 Micro-CT 的低敏感性,要实现靶向 CT 对比剂的活体内分子成像,必须选择具有高亲和力的单克隆抗体分子。其次,目前靶向诊断存在的一个问题就是要携带足够量的对比剂到感兴趣区从而产生足够诊断的密度差异。但是,单克隆抗体型对比剂存在抗体用量大,增强效果差的缺点,而且,生产及标记单克隆抗体的技术复杂,包裹的放射性标记物也易溶解,加之耦联的大分子通透性差,存在于血液循环中的结核特异抗原也要拮抗标记物,使得单克隆抗体型对比剂的靶向效果不

如期望的那么高。

尤其本实验中采用完整的单克隆抗体,相对分子量较大,今后的进一步研究可利用单克隆抗体片段,不但能减少非特异性结合部分,而且减少相对分子量,有利于逃脱体内单核吞噬细胞系统的廓清作用并提高组织的穿透力,使更多的对比剂到达靶点,以减少对比剂的使用量。同时研制和纯化融合抗体,以提高对结核病灶检测的敏感度、特异度和准确度。

最后,应设法改进碘标记检测方法及耦联技术条件,使每分子单克隆抗体携带更多的碘原子,并尽可能多地保留抗体的免疫活性和结合活性,检测特异性抗体对比剂在体内的生物代谢。尽可能延长注射对比剂后 Micro-CT 扫描的观察时间。

### 参 考 文 献

- [1] 王劲武,黄其璠,许乙凯,等. Gd 标记抗人大肠癌单克隆抗体 CL-3 对裸鼠肿瘤模型 MRI 诊断的实验研究. 中华放射学杂志,1998,32:419-422.
- [2] 朱正兵,黄其璠,全显越,等. 钆标记单克隆抗体片段对荷瘤裸鼠 MR 免疫成像的研究. 中华放射学杂志,2001,35:713-716.
- [3] 柴青芬,黄其璠,许乙凯,等. 应用生物素-亲和素预定位技术对荷人大肠癌裸鼠模型 MR 免疫显像的实验研究. 中华放射学杂志,2001,35:941-946.
- [4] 许乙凯,刘岷,叶靖. 二步法预定位技术对荷人肝癌裸鼠模型的 MR 免疫成像研究. 中华放射学杂志,2005,39:357-361.
- [5] 丁建辉,曾蒙苏,薛琼,等. 叶酸受体型 MR 对比剂在荷人胃癌裸鼠诊断价值的实验研究. 中华放射学杂志,2005,39:882-886.
- [6] Tan M, Wu X, Jeong EK, et al. Peptide-targeted Nanoglobular Gd-DOTA monoamide conjugates for magnetic resonance cancer molecular imaging. *Biomacromolecules*, 2010, 11:754-761.
- [7] Weissleder R, Imhof H. Molecular imaging: a new emphasis in radiology. *Radiology*, 2007, 47:6-7.
- [8] Conti PS, McEwan AJ, Pomper MG. Molecular imaging: the future of modern medicine. *J Nucl Med*, 2008, 49:16N-20N.
- [9] McCarthy J, Weissleder R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60:1241-1251.
- [10] McErlain DD, Chhem RK, Bohay RN, et al. Micro-computed tomography of a 500-year-old tooth: technical note. *Can Assoc Radiol J*, 2004, 55:242-245.
- [11] Neves Ade A, Coutinho E, Vivan Cardoso M, et al. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. *Dent Mater*, 2010, 26:579-588.
- [12] Johnson EM, Price RE, Kurie JM, et al. A new method for respiratory gating during microcomputed tomography of lung in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2008, 47:46-56.
- [13] Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13:256-262.
- [14] Harrington DP. Imaging biomarkers and the future of radiology. *J Am Coll Radiol*, 2006, 3:317-318.

(收稿日期:2012-07-28)

(本文编辑:任晓黎)