

# 放射性核素标记 RGD 序列多肽与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体显像的研究进展

刘晓飞 张锦明 王洁磊 田嘉禾

**【摘要】**整合素主要介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质(ECM)之间的相互黏附,对细胞的黏附、增殖、分化、转移、凋亡起到重要的调控作用,在肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用。成熟血管内皮细胞和绝大多数正常器官系统中,整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体表达缺乏或几乎不能被探及,但其在新生血管内皮细胞中有强烈表达,精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽是整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体的特异性识别位点,因此,将放射性核素标记到含有 RGD 序列的肽类化合物上,用于整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体显像,对于肿瘤早期和高特异性定位、定量诊断及治疗都具有重要意义。近年来国内外对 RGD 肽的标记方法和  $\alpha_v\beta_3$  受体显像进行了研究。

**【关键词】**肽类;受体,玻连蛋白;放射性核素显像;精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽

**【中图分类号】** Q516 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114 (2008) 01-0012-04

## Study progress of malignant tumor imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression with radioisotope labelled RGD peptides

LIU Xiao-fei<sup>1</sup>, ZHANG Jin-ming<sup>1</sup>, WANG Jie-lei<sup>2</sup>, TIAN Jia-he<sup>1</sup>

(1. Department of Nuclear Medicine, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Wenzhou Detachment Medical Team of Chinese People's Armed Police Forces, Zhejiang Wenzhou 325000, China)

**【Abstract】** The malignant tumors must establish a neovasculature to grow, to invade, and to metastasize, in which  $\alpha_v\beta_3$  integrin plays an important role. It is reported that the  $\alpha_v\beta_3$  integrin made their effectation mainly by binding triplet peptides RGD sequence in the proteins of the extracellular matrix. Because is reported to there is no or rare  $\alpha_v\beta_3$  integrin in normal cells but more in activated endothelial cells, RGD is the special target point for  $\alpha_v\beta_3$  Integrin. RGD antagonistic peptides radiolabelled by direct or indirect way could be used to display tumor  $\alpha_v\beta_3$  Integrin by nuclear medicine image. It is of significance to locate and quantitate tumor Integrin high special in early diagnosis and therapy. This article reviews the marking method of RGD peptide and study about the image of  $\alpha_v\beta_3$  receptor.

**【Key words】** Peptides; Receptors, vitronectin; Radionuclide imaging; Arginine-glycine-aspartic acid

自 20 世纪 80 年代在纤维结合蛋白中发现精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) 肽这一细胞结合位点以来,仅有三个氨基酸的 RGD 肽成为细胞和蛋白质的基本识别位点<sup>[1]</sup>。Wickham 等<sup>[2]</sup>除了从细胞外基质(cell-extracellular matrix, ECM)中分离出 RGD 肽,还在细菌和病毒中发现了 RGD 肽。这些病原体是通过黏附到特异整合素受体上以及随后的胞吞作用进入宿主细胞。Marcinkiewicz 等<sup>[3]</sup>在毒蛇毒腺中发现了 RGD 肽序列及其整合素受体识别位点。研究显示,将放射性

核素直接或间接标记到具有 RGD 序列的肽类化合物上用于整合素受体  $\alpha_v\beta_3$  的显像,对于肿瘤早期、高特异性定位和定量诊断都具有重要意义。

### 1 整合素

整合素是一类由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基经非共价键连接而成的异二聚体跨膜糖蛋白黏附分子,其具有两种主要功能:①通过与相应配体结合介导细胞与基底膜、细胞与细胞的黏附;②作为细胞内外信息传递的桥梁,一方面细胞内的信号调节整合素与其配体的亲和力和活性状态,另一方面,整合素与其配体结合后向细胞内传递信号,发挥其生物学效应。

作者单位:1. 100853 北京,解放军总医院核医学科(刘晓飞,张锦明,田嘉禾);2. 325000 浙江温州,武警浙江总队温州支队卫生队(王洁磊)

通讯作者:张锦明(E-mail: zhangjm301@yahoo.com.cn)

## 2 肿瘤与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体

整合素主要介导细胞与细胞及细胞与 ECM 之间的双向信号转导,对细胞的黏附、增殖、分化、转移和凋亡起到重要的调控作用。成熟血管内皮细胞和绝大多数正常器官系统中,整合素  $\alpha_v\beta_3$  表达缺乏或几乎不能被探及,但在多种肿瘤(包括骨肉瘤、神经细胞瘤、肺癌、乳腺癌等)细胞表面、炎症、创伤的新生血管内皮细胞中整合素  $\alpha_v\beta_3$  的表达显著<sup>[4]</sup>。在肿瘤诱导的新生血管组织中表达丰富的整合素  $\alpha_v\beta_3$  对肿瘤新生血管的生成起重要作用<sup>[5]</sup>,肿瘤的持续生长和侵袭转移也有赖于肿瘤新生血管生成。由于肿瘤细胞整合素  $\alpha_v\beta_3$  的表达与恶性肿瘤的浸润转移能力等恶性表型有关<sup>[6]</sup>,因此整合素  $\alpha_v\beta_3$  的表达水平可以作为判断某些恶性肿瘤的预后指标<sup>[7]</sup>。寻找整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体的特异性配体可用于整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体定性定量研究和肿瘤的早期诊断及治疗。

## 3 RGD 肽与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体

整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体能够与 ECM 中的多种成分相互作用,其配体均包含有相同的整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体识别序列<sup>[8]</sup>,即 RGD 序列。整合素  $\alpha_v\beta_3$  的配体依赖于 RGD 结构发挥生物学作用,特定的含有 RGD 结构的序列肽能够通过与其配体  $\alpha_v\beta_3$  的结合抑制肿瘤新生血管的形成,RGD 序列多肽与核素或者化疗药物的结合,能够用于肿瘤的诊断和治疗。Zhao 等<sup>[9]</sup> 通过体外实验证实:RGDV(其中 V 为缬氨酸)、RGDS(其中 S 为丝氨酸)、RGDF(其中 F 为苯丙氨酸)与整合素受体结合的亲和力依次降低,抗肿瘤细胞黏附和侵袭的能力也逐步下降。

Bogdanowich-Knipp 等<sup>[10]</sup> 研究表明,线形肽更容易化学降解,环形肽不会发生化学降解,因此,提高了对 RGD 肽特异性整合素受体亚型的选择性。研究表明,对人工合成肽的修饰可以得到高特异性、高亲和力的 RGD 肽。

Richards 等<sup>[11]</sup> 为了提高纤维结合蛋白在体外与  $\alpha_v\beta_3$  的亲合性,将 III 型纤维结合蛋白第十结构域含 RGD 的肽进行修饰改造,发现 RGD 肽后紧跟色氨酸和谷氨酸残基可有最大亲和力;对整合素  $\alpha_v\beta_3$  多肽的结构-效应关系研究发现,含有两个二硫键的环形 RGD 序列多肽对肿瘤新生血管内皮细胞的抑制效应最强,是含单个二硫键环形 RGD 序列多

肽的 20 倍,是线形 RGD 序列多肽的 100 倍。含有 RGD 序列的环形多肽较线形 RGD 多肽有更高的受体结合特异性,因此,研究中以合成环形 RGD 肽为多。

## 4 标记 RGD 序列多肽的放射性药物

Mitra 等<sup>[12]</sup> 用 <sup>99m</sup>Tc 标记了由羟丙基甲基丙烯酸酯(hydroxypropyl methacrylate, HPMA)与双环形肽(赖氨酸-丙氨酸-半胱氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸-苯丙氨酸-半胱氨酸-甘氨酸)RGD4C(KACD CRGD CFCG)结合成的共聚体 <sup>99m</sup>T-HPMA-RGD4C 进行了前列腺癌模型鼠显像,结果显示,用药后 24 h 甚至 72 h 肿瘤仍有明显放射性滞留,24 h 的肿瘤/血液比值约为 20,72 h 的肿瘤/血液比值约为 50,但肝胆和肾放射性仍明显。在 RGD 序列多肽中引入不同的功能基团进行修饰并用放射性核素标记,由于未改变这类多肽的空间结构,因此不影响标记后的 RGD 序列多肽在体内外与  $\alpha_v\beta_3$  受体的结合。然而,要获得更高的特异性和更好的药物动力学效应的显像剂,需要对标记物的结构进行优化,通过改变显像剂的亲水性、分子结构及表面电荷,引入不同载体、不同的核素,从而改变标记物与整合素受体的亲和力和选择性,改善放射性药物的代谢途径,最终得到合适的显像剂用于临床。

### 4.1 双分子环形 RGD 序列多肽与线形 RGD 序列多肽

Chen 等<sup>[13]</sup> 用皮下 U87MG 恶性胶质瘤模型鼠对环形肽 <sup>18</sup>F-FB-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub> (其中 F 为氟;B 为苯甲酰基;c(RGDyK)为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-酪氨酸-赖氨酸环形肽)与 <sup>18</sup>F-FB-c(RGDyK)做了对比研究,结果表明:<sup>18</sup>F-FB-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub> 与 <sup>18</sup>F-FB-c(RGDyK)相比,在任何时间点,环形肽都比线状肽有更高水平的肿瘤摄取,在 2 h 时,<sup>18</sup>F-FB-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub> 和 <sup>18</sup>F-FB-c(RGDyK)的摄取值(每克组织注射剂量百分数)分别为(4.27±1.04)%ID/g 和(1.56±0.35)%ID/g,而肝脏在 30 min 时的摄取值分别为(2.50±0.18)%ID/g 和(1.34±0.18)%ID/g。说明双分子 RGD 环形肽不但提高了肿瘤摄取,还减少了肝脏放射性摄取。

### 4.2 不同核素标记相同 RGD 肽

Chen 等<sup>[14]</sup> 分别用 <sup>125</sup>I、<sup>18</sup>F、<sup>64</sup>Cu 标记同一环形肽后比较了三种标记物在 MDA-MB-435 人乳腺癌

模型小鼠的靶向作用和体内的药物动力学作用, 研究表明: 在任何时间点, 三种标记物的肿瘤摄取值大小顺序为:  $^{125}\text{I}$ -c(RGDyK),  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-c(RGDyK),  $^{18}\text{F}$ -FB-c(RGDyK);  $^{125}\text{I}$ -c(RGDyK)有最高的肿瘤摄取和最慢的肿瘤代谢, 这是因为小分子的配体是整合素受体黏附蛋白的最佳配体,  $^{125}\text{I}$ 是直接标记到 RGD 肽的常位上, 可能对 RGD 肽的几何位置和结合特性的改变最小, 因此  $^{125}\text{I}$ -c(RGDyK)有高特异性的肿瘤受体摄取。另一方面, 引入的 4-苯甲酰基团和  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-c(RGDyK), 距离 RGD 肽活性部位很近, 增加了 RGD 肽空间位阻, 抑制 RGD 肽与整合素受体的结合。因此降低了示踪剂与整合素受体的亲和力和特异性。 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-RGD 在血液和肝脏中有高水平的摄取, 且更快的肝清除率, 说明其在体内有很高的稳定性。 $^{18}\text{F}$ -FB-c(RGDyK),  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-c(RGDyK)都有较高的肿瘤/本底比值, 但是  $^{18}\text{F}$ -FB-c(RGDyK)在膀胱和肠道有高摄取, 这是由于该显像剂的亲脂性使其通过肝胆管途径排泄所致。

#### 4.3 引入不同载体的 RGD 肽

Chen 等<sup>[15]</sup>在  $^{18}\text{F}$ -FB-c(RGDyK)的基础上插入了聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)基团, 得到  $^{18}\text{F}$ -FB-PEG-c(RGDyK), 并对其在皮下 U87MG 恶性胶质瘤的生物学分布进行微 PET, 结果显示, 与  $^{18}\text{F}$ -FB-c(RGDyK)相比, 前者肿瘤摄取更快, 肿瘤的放射性滞留时间更长, 尽管肝脏有较高水平摄取, 但变化不太明显; 受体抑制实验表明, 与肿瘤受体有高水平特异性结合; 但肾脏仍有高水平摄取。Chen 等<sup>[16]</sup>在亲和性较高的 c(RGDyK)肽上连接了甲氧基聚乙二醇(methoxy-PEG, mPEG), 用  $^{125}\text{I}$ 标记得到  $^{125}\text{I}$ -mPEG-c(RGDyK)并对皮下及常位胶质瘤进行了和放射性自显影, 结果: 与  $^{125}\text{I}$ -c(RGDyK)相比, 在 2 h 的观察时间内, 前者血液清除更为迅速, 肾放射性聚集明显减少, 但肿瘤放射性摄取峰值出现较晚; 肝脏在 30~60 min 内有低摄取, 而后摄取增高; 后者比前者肿瘤摄取高, 但  $^{125}\text{I}$ -mPEG-c(RGDyK)的肿瘤与正常组织摄取比值较高。

有学者报道了放射性核素  $^{111}\text{In}$  和(或)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  标记二乙基三胺五乙酸 RGD 类似物、含两个 RGD 序列的十二肽、环形 RGDfK 多肽类似物及含 RGD 序列的多肽葡聚糖共轭物等多种整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体配体, 这些标记配体从血液中清除迅速, 由于引入了常用

的双功能连接剂, 一方面有利于金属放射性核素的标记, 使部分标记配体的放射化学产率 >90%, 个别可达 99%; 另一方面引入有上述基团的 RGD 序列多肽主要从肾脏排泄, 能加速组织本底放射性降低, 提高影像质量, 扩大了这类标记配体的临床应用范围和价值。

Bernard 等<sup>[19]</sup>在环形五肽 RGD-D-FK(其中, F 为苯丙氨酸; K 为赖氨酸)引入一个血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid-protein A, SAA) 基团, 得到环形 Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-(SAA), 简称 galacto-RGD。引入 SAA 后, 有利于实现  $^{18}\text{F}$  的标记。体内、外受体介导结合特性、生物学分布及肿瘤鼠模型 PET 研究显示,  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD 的血液清除快速, 主要经肾脏排泄, 大多数器官仅有低水平的核素分布, 而在观察期间整合素  $\alpha_v\beta_3$  阳性肿瘤有稳定的核素浓聚; 注射后 120 min, 肿瘤/血液比值为 27.5, 肿瘤/肌肉比值为 10.2, 表明该标记配体与肿瘤整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体特异性结合。

综上所述, 影响 RGD 序列多肽与受体结合的特异性、亲和力的因素很多, 通过改变含 RGD 序列多肽的物理化学性质、空间结构形式、空间分子表面电荷分布, 或通过引入不同的载体, 标记不同的核素, 可改善 RGD 序列多肽与受体的亲和力, 提高其特异性靶向受体的作用, 并改变核素标记 RGD 序列多肽在体内的代谢途径, 改善其药物动力学效应, 获得高特异性、高灵敏度的显像剂。

#### 参考文献

- [1] Ruoslahti E. The RGD story: a personal account. *Matrix Biol* [J], 2003, 22(6): 459-465.
- [2] Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, et al. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment [J]. *Cell*, 1993, 73(2): 309-319.
- [3] Marcinkiewicz C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(7): 815-827.
- [4] Ahmed N, Riley C, Rice G, et al. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(5): 391-402.
- [5] Janssen ML, Oyen WJ, Dijkgraaf I, et al. Tumor targeting with radiolabeled alpha (v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(21): 6146-6151.
- [6] Zheng DQ, Woodard AS, Fornaro M, et al. Prostatic carcinoma cell migration via alpha (v)beta (3) integrin is modulated by focal adhesion kinase pathway [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(2): 1655-1664.
- [7] Vonlaufen A, Wiedle G, Borisch B, et al. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression

- in colon carcinoma correlates with survival[J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(11): 1126-1131.
- [8] Kanamori M, Kawaguchi T, Berger MS, et al. Intracranial microenvironment reveals independent opposing functions of host alphaV beta3 expression on glioma growth and angiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(48): 37256-37264.
- [9] Zhao M, Wang C, Jiang X, et al. Synthesis of RGD containing peptides and their bioactivities [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2002, 32(4): 363-380.
- [10] Bogdanowich-Knipp SJ, Chakrabarti S, Williams TD, et al. Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides [J]. *J Pept Res*, 1999, 53(5): 530-541.
- [11] Richards J, Miller M, Abend J, et al. Engineered fibronectin type III domain with a RGDWXE sequence binds with enhanced affinity and specificity to human alphaV beta3 integrin [J]. *J Mol Biol*, 2003, 326(5): 1475-1488.
- [12] Mitra A, Mulholland J, Nan A, et al. Targeting tumor angiogenic vasculature using polymer-RGD conjugates [J]. *J Control Release*, 2005, 102(1): 191-201.
- [13] Chen X, Tohme M, Park R, et al. Micro-PET imaging of  $\alpha_v\beta_3$ -integrin expression with  $^{18}\text{F}$ -labeled dimeric RGD peptide [J]. *Mol Imaging*, 2004, 3(2): 96-104.
- [14] Chen X, Park R, Tohme M, et al. Micro PET and autoradiographic imaging of breast cancer alpha v-integrin expression using  $^{18}\text{F}$ - and  $^{64}\text{Cu}$ -labeled RGD peptide [J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15(1): 41-49.
- [15] Chen X, Park R, Hou Y, et al. MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with  $^{18}\text{F}$ -labeled PEGylated RGD peptide [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 31(8): 1081-1089.
- [16] Chen X, Park R, Shahinian AH, et al. Pharmacokinetics and tumor retention of  $^{125}\text{I}$ -labeled RGD peptide are improved by PEGylation [J]. *Nucl Med Biol*, 2004, 31(1): 11-19.
- [17] Su ZF, Liu G, Gupta S, et al. In vitro and in vivo evaluation of a Technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of alpha(v)beta(3) integrin for tumor imaging [J]. *Bioconjug Chem*, 2002, 13(3): 561-570.
- [18] Haubner R, Wester HJ, Weber WA, et al. Noninvasive imaging of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression using  $^{18}\text{F}$ -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1781-1785.
- [19] Bernard B, Capello A, van Hagen M, et al. Radiolabeled RGD-DTPA-Tyr3-octreotate for receptor-targeted radionuclide therapy [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(2): 173-180.

(收稿日期: 2007-06-13)

## 生长抑素受体显像剂 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotide 的研究进展

侯仁花 吕中伟

**【摘要】**  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotide 是一种新型生长抑素受体显像剂,能与多种肿瘤细胞高表达的生长抑素受体相结合,对肿瘤的良、恶性评估具有很高的特异性和敏感性,可定性、定位诊断多种生长抑素受体阳性肿瘤,特别是对非小细胞肺癌的定位诊断及鉴别诊断更具有临床价值。Depreotide 的生物学特点、放射性核素标记、药物体内分布及肿瘤显像等方面的研究都有了新的进展。

**【关键词】** 受体,生长抑素;放射性核素显像;肺肿瘤;甲状腺肿瘤;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotide

**【中图分类号】** R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2008)01-0015-04

### The progress of a new somatostatin receptor agent $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotide

HOU Ren-hua, LÜ Zhong-wei

(Department of Nuclear Medicine, the Tenth People's Hospital Affiliated Tongji University, Shanghai 200072, China)

**【Abstract】** As a new somatostatin receptor imaging agent,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotide can bind with somatostatin receptors (SSTR) which over express in many sorts of tumor cells. It shows high sensitivity and speciality on evaluating the malignancy and localization of tumors with SSTR overexpression, especially for non-small cell lung cancer (NSCLC). This article gives a review on the biology characteristics, radioisotope labeling, biodistribution and tumor imaging of depreotide.

**【Key words】** Receptor, somatostatin; Radionuclide imaging; Lung heoplasms; Thyroid neoplasma;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotide

生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR) 是

重要的基因型肿瘤标志物之一,大多数神经内分泌肿瘤,包括垂体腺瘤、胰岛细胞瘤、类癌瘤、嗜铬细胞瘤及小细胞肺癌等都有 SSTR 的高度表达,

基金项目:上海市卫生局科技发展基金资助项目(054035)

作者单位:200072 上海,同济大学附属第十人民医院核医学科

通讯作者:吕中伟(E-mail: heyixue163@163.com)