

## $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -RGD 显像在类风湿性关节炎血管形成早期诊断的初步探讨

郝林军 王雪梅 郝晋

**【摘要】** 滑膜血管翳形成是类风湿性关节炎(RA)最基本、最重要的病理表现,可导致软骨和骨破坏及关节重塑,最终导致关节畸形、功能丧失。其中,血管形成在血管翳的侵蚀和破坏过程中发挥了重要的作用,增强了血管翳的侵袭性,促进了软骨和骨破坏。血管形成从RA病程的早期便开始作用并贯穿整个病程。因而观察血管形成对于RA的早期诊断、活动期判断、疗效观察和预后判断均有重要意义。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)的多肽是一种能与整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 受体有高度的选择性和亲和力,并能在体反映血管形成情况的显像剂。因而可以利用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -RGD SPECT观察RA的滑膜血管翳形成和发展过程及血管形成拮抗剂抑制RA血管形成的规律,从而为RA的生物治疗提供更多的理论依据并寻找到更多的新靶向治疗药物。

**【关键词】** 关节炎, 类风湿; 新生血管形成; RGD 显像

**Applications of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -RGD for angiogenesis in early diagnosis of rheumatoid arthritis** Hao Linjun\*, Wang Xuemei, Hao Jin. \*Center of Health Care, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Corresponding author: Wang Xuemei, Email: wangxuemei201010@163.com

**【Abstract】** Synovial pannus formation is the most basic and important pathological manifestation for rheumatoid arthritis (RA). This manifestation can lead to the destruction of cartilage, bone, and joint, ultimately leading to joint deformity and loss of function. Angiogenesis plays an important role in the process of synovial pannus formation, as well as the erosion and destruction of the pannus. Angiogenesis enhances the invasiveness of the pannus and promotes destruction of bone and cartilage. Angiogenesis began early in and throughout the course of the disease. Thus, angiogenesis should be observed for early diagnosis of RA, judgment of active stage, and assessment of therapy and prognosis. To examine the change rule of RA angiogenesis, the development course and antagonists of angiogenesis should inhibit this process to determine a further theoretical basis and novel drugs for targeted therapy with  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  labeled arginine-glycine-aspartic acid (Arg-Gly-Asp, RGD) peptides. These peptides demonstrate high selectivity and affinity with the integrin  $\alpha\text{v}\beta 3$  receptor and can show angiogenesis-imaging agents via SPECT imaging in the body.

**【Key words】** Arthritis, rheumatoid; Angiogenesis; RGD imaging

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因不明,以慢性、对称性、侵蚀性关节炎为主要表现的全身性自身免疫疾病。患者可出现严重的关节畸形及功能丧失,致残率及病死率较高。该

病不仅严重影响患者的生活质量,还给社会带来了巨大的经济负担,目前临床上尚无有效措施逆转已经发生的关节破坏。而关节破坏在病程的早期(1年,甚至4个月内)就可出现,如能早期诊断RA,积极治疗后可控制和延缓病情发展,显著降低致残率<sup>[1]</sup>。因此,RA的早期诊断成为改善RA预后的关键,近年来已成为国内外学者的研究热点。

研究发现RA的早期诊断主要在于对RA的滑膜血管翳的检测。因为滑膜血管翳形成是RA最基本、最重要的病理表现,也是RA区别于其他关节

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.02.018

基金项目:国家自然科学基金(81260224);2013年自治区应用技术与开发资金项目(20130401);内蒙古医科大学附属医院重大项目(NYFY ZD2012011)

作者单位:010050 呼和浩特,内蒙古医科大学附属医院保健中心(郝林军),核医学科(王雪梅);010050 呼和浩特,内蒙古医科大学2013级检验专业(郝晋)

通信作者:王雪梅(Email: wangxuemei201010@163.com)

炎的重要特征。血管翳形成导致软骨和骨破坏及关节重塑,最终导致关节畸形、功能丧失。而血管形成则是产生和维持 RA 血管翳的重要标志,它增强了血管翳的侵袭性,并同时促进血管翳形成,导致软骨和骨破坏,在 RA 的侵蚀和破坏过程中发挥了重要的作用,且血管形成在 RA 病程的早期便开始作用并贯穿整个病程<sup>[2]</sup>。因此,观察新生血管形成对于 RA 的早期诊断、活动性判断、疗效观察和预后判断均有重要意义<sup>[3]</sup>。但到目前为止仍没有较好的早期诊断 RA 的方法。

近年来随着分子影像学技术的发展,利用整合素  $\alpha v \beta 3$  在肿瘤新生血管内皮细胞中高表达的特性,用  $^{99m}\text{Tc}$  标记精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arginine-Glycine-Aspartic, RGD) 的多肽,能特异地与细胞整合素  $\alpha v \beta 3$  配体结合并通过 SPECT 在体检测新生血管,目前多项研究证实该方法是一种灵敏度高和特异性好的方法<sup>[4-5]</sup>。由此推测  $^{99m}\text{Tc}$ -3PRGD2 (其中, P 为聚乙二醇)SPECT 可能在体显示 RA 的新生血管(滑膜血管翳)。如果这种方法可行,将为 RA 早期诊断和筛选靶向治疗药物开辟新的方法。

## 1 RGD 与 RA 滑膜新生血管形成

RGD 是含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸的多肽,研究证实它是骨桥蛋白的生物学活性物质, RGD 是一种多功能的细胞外基质蛋白,被认为是一种促炎因子,其参与多种生物学过程,包括免疫调节、信号转导、伤口愈合、组织修复、骨的再吸收、动脉粥样硬化的形成和肿瘤的发生等。

研究显示通过 RGD 与细胞表面的整合素受体结合,可以介导细胞的多种生理功能<sup>[6-7]</sup>。整合素为细胞黏附分子家族的重要成员之一,是广泛分布于细胞表面的跨膜糖蛋白受体,主要介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的相互黏附,并介导细胞与细胞外基质之间的双向信号传导,对细胞的黏附、增殖、分化、转移、凋亡起着重要的调控作用。这条通路在 RA 发病中起着重要作用,近年来研究发现, RA 患者滑膜组织获得的 CD4<sup>+</sup>滑膜 T 细胞中 RGD mRNA 有很高的表达量,主要分布在受侵关节软骨的血管翳上,提示它与 RA 滑膜血管增生相关,而在正常关节和骨关节炎滑膜中无整合素  $\alpha v \beta 3$  的表达<sup>[8]</sup>。整合素  $\alpha v \beta 3$  抗体可以促进新生血管内皮细胞凋亡,从而阻断血管增生<sup>[9]</sup>。

RGD 在增殖的血管内皮细胞、新生血管内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞、激活的巨噬细胞、部分嗜中性粒细胞和某些肿瘤细胞表面(成神经细胞瘤、骨肉瘤、成胶质细胞瘤、乳腺癌等)均高表达,而在已存在的血管和正常组织中或在静止的没有激活的血管内皮细胞上几乎不表达<sup>[10]</sup>。RGD 不仅在 RA 的滑膜细胞和软骨细胞中高表达,在 RA 骨损伤部位的破骨细胞中均可见 RGD 及整合素  $\alpha v \beta 3$  的高表达<sup>[11]</sup>。RA 的血管翳中的活化破骨细胞 RGD 与破骨细胞表面的整合素  $\alpha v \beta 3$  结合以调节破骨细胞的骨再吸收,因而 RGD 在 RA 的发病进程中起着重要的作用<sup>[12]</sup>。

RGD 可增强巨噬细胞释放 IL-2、IL-12、 $\gamma$  干扰素等,并通过与整合素  $\alpha v \beta 3$  和  $\alpha v \beta 5$  相互作用,发挥细胞黏附、迁移和免疫调节等多种功能<sup>[13]</sup>。在 RA 患者炎症发生和组织修复过程中,活化的巨噬细胞、粒细胞、T 淋巴细胞入侵滑膜细胞及关节软骨细胞可以促使 RGD 分泌增加。

另外,有许多促进血管增生的细胞因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子及 TNF,是通过 RGD 与整合素  $\alpha v \beta 3$  结合介导或协同促进血管增生的。研究发现整合素  $\alpha v \beta 3$  介导的内皮细胞与细胞外基质之间的黏附对血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)的激活至关重要,整合素  $\alpha v \beta 3$  协同强化了 VEGF-A165 引起的 VEGFR-2 的磷酸化及促有丝分裂作用,参与了 VEGF-A165 对 VEGFR-2 的完全激活<sup>[14]</sup>。研究同时发现,整合素  $\alpha v \beta 3$  和 VEGFR-2 存在共同配体细胞黏附分子 L1(CD171)的胞外域中的第六个免疫球蛋白(L1Ig6),即使缺乏外源性 VEGF-A165, L1Ig6 仍可使 VEGFR-2 磷酸化,表明 VEGFR-2 和整合素  $\alpha v \beta 3$  存在着紧密的关系。

更进一步的研究发现,阻断 RGD 和整合素  $\alpha v \beta 3$  结合可以抑制兔关节炎模型滑膜血管增生,缓解滑膜炎症<sup>[15]</sup>。口服整合素  $\alpha v \beta 3$  拮抗剂可以预防和治疗大鼠佐剂性关节炎<sup>[16]</sup>。把含有 RGD 多肽序列的整合素  $\alpha v \beta 3$  拮抗剂偶联到一个七肽上,形成异二聚体,可以促进血管内皮细胞凋亡,缓解小鼠胶原诱导性关节炎。相对于正常关节,整合素  $\alpha v \beta 3$  可以高度选择性地归巢到炎症关节滑膜;整合素  $\alpha v \beta 3$  拮抗剂造成滑膜血管内皮细胞选择性凋

亡的程度与关节炎症缓解的程度呈正相关,提示整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  拮抗剂可能通过抑制血管增生来达到治疗 RA 的作用。

RGD 特异的细胞黏附功能域序列可与整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  作用,从而促进细胞黏附和迁移,且 RGD 在骨质代谢及免疫系统中起着双重作用。因为 RGD 与 RA 病理过程的发生、发展和预后密切相关, RGD 与整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  结合将成为一个非常有吸引力的靶点。利用 RGD 多肽进行 SPECT(SPECT/CT)显像或 PET(PET/CT)显像,有望用于 RA 的早期诊断、活动性判断、疗效观察和预后判断,以及筛选 RA 的生物靶向治疗药物。

## 2 RGD 显像及其初步实验研究

自 1984 年 Pierschbacher 和 Ruosluherici 首次报道纤维蛋白原中含有的 RGD 序列为细胞的识别位点以来, RGD 多肽作为潜在的示踪剂而成为研究热点。RGD 是整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  特异性结合的天然内源性配体,合成的外源性 RGD 多肽也能与整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  特异性结合,并且可与体内含 RGD 模序的物质竞争结合。目前国内外已有多种放射性核素标记的 RGD 多肽及其衍生物作为 SPECT 和 PET 分子探针,与其他影像学手段,如 X 射线、MRI、 $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -MDP 及  $^{18\text{F}}$ -FDG 相比,突出了更多靶向性的优势<sup>[7]</sup>,  $^{18\text{F}}$ -低聚半乳糖-RGD、 $^{18\text{F}}$ -AH111585(含有 RGD 模序)、 $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -maraciclatide( $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -NC100692,含有 RGD 模序)等已先后被用于临床研究<sup>[4-5]</sup>。最近, $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -3PRGD2 作为新型的  $^{99\text{Tc}}\text{m}$  标记的 RGD 环肽二聚体已经在多中心临床前肺癌研究中被证实是一种有效的整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  受体显像剂<sup>[8]</sup>。

目前 RGD 显像已被初步应用于成神经细胞瘤、骨肉瘤、成胶质细胞瘤、乳腺癌和前列腺癌等患者中,无论对肿瘤的分子显像还是对肿瘤的放射靶向治疗都具有重要意义。Ma 等<sup>[19]</sup>国内多中心研究小组将  $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -3PRGD2 SPECT 显像成功应用于不同病理类型肺结节的鉴别诊断。因此在使用针对整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  的肿瘤治疗药物之前,进行 SPECT 或 PET 显像是十分必要的。另外有研究报道整合素  $\alpha\text{v}\beta 3$  特异性结合物能够用于心肌血管生成显像<sup>[20]</sup>;含 RGD 的多肽 NC100692 能用于小鼠后肢缺血后的血管生成显像<sup>[21]</sup>。最近 Zhu 等<sup>[22]</sup>对 20 例类风湿患者同时进行了  $^{68\text{Ga}}$ -PRGD2 和  $^{18\text{F}}$ -FDG PET/CT 显像,研究

发现  $^{68\text{Ga}}$ -PRGD2 PET/CT 显像在  $\alpha\text{v}\beta 3$  高表达部位的摄取较  $^{18\text{F}}$ -FDG 显像高,因此其在评价类风湿新生血管形成方面优于  $^{18\text{F}}$ -FDG 显像。笔者相信  $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -3PRGD2 SPECT 显像在研究 RA 新生血管方面将会有很好的前景。

## 参 考 文 献

- [1] Tehranzadeh J, Ashikyan O, Dascalos J. Advanced imaging of early rheumatoid arthritis[J]. Radiol Clin North Am, 2004, 42(1): 89-107.
- [2] Paleolog EM. The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence?[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(3): 249-261.
- [3] Szekanecz Z, Besenyei T, Szentpétery A, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2010, 22(3): 299-306.
- [4] Beer AJ, Niemeyer M, Carlsen J, et al. Patterns of alphavbeta3 expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by  $^{18\text{F}}$ -Galacto-RGD PET[J]. J Nucl Med, 2008, 49(2): 255-259.
- [5] Kenny LM, Coombes RC, Oulie I, et al. Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp(RGD) peptide radioligand  $^{18\text{F}}$ -AH111585 in breast cancer patients[J]. J Nucl Med, 2008, 49(6): 879-886.
- [6] Zhang L, Zhang CL, Yan P, et al. Design, preparation and characterization of cyclic RGD dimer for targeting integrin  $\alpha\text{v}\beta 3$ [J]. J Conver Inform Technol, 2011, 6(12): 442-450.
- [7] Garrigues HJ, Rubinchikova YE, Dipersio CM, et al. Integrin  $\alpha\text{v}\beta 3$  binds to the RGD motif of glycoprotein B of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and functions as an RGD-dependent entry receptor[J]. J Virol, 2008, 82(3): 1570-1580.
- [8] Xu G, Nie H, Li N, et al. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(4): 1060-1067.
- [9] Ward PA. Inflammation and  $\alpha\text{v}\beta 3$  integrin[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(1): 5-6.
- [10] Somanath PR, Giocea A, Byzova TV. Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis[J]. Cell Biochem Biophys, 2009, 53(2): 53-64.
- [11] Noda M, Inoue K, Kondo H, et al. Osteopontin in rheumatoid arthritis[J]. Nihon Rinsho, 2005, 63 Suppl 1: S185-188.
- [12] Su G, Atakilit A, Li JT, et al. Absence of integrin  $\alpha\text{v}\beta 3$  enhances vascular leak in mice by inhibiting endothelial cortical actin formation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(1): 58-66.
- [13] Yamamoto N, Sakai F, Kon S, et al. Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(2): 181-188.
- [14] Hall H, Hubbell JA. Matrix-bound sixth Ig-like domain of cell adhesion molecule L1 acts as an angiogenic factor by ligating  $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin and activating VEGF-R2[J]. Microvasc Res, 2004, 68(3): 169-178.
- [15] Hoffmann S, He S, Jin M, et al. A selective cyclic integrin antago-

- nist blocks the integrin receptors  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  and  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion[J]. *BMC Ophthalmol*, 2005, 5(5): 16.
- [16] Hsu AR, Veeravagu A, Cai W, et al. Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  antagonists for anti-angiogenic cancer treatment[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2007, 2(2): 143-158.
- [17] 苏云龙, 王雪梅, 赵爱玲, 等. 类风湿关节炎早期诊断的影像学方法研究进展[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2013, 33(2): 157-160.
- [18] Jia B, Liu Z, Zhu Z, et al. Blood clearance kinetics, biodistribution, and radiation dosimetry of a kit-formulated integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -selective radiotracer  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3PRGD2 in non-human primates[J]. *Mol Imaging Biol*, 2011, 13(4): 730-736.
- [19] Ma Q, Ji B, Jia B, et al. Differential diagnosis of solitary pulmonary nodules using  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3P4-RGD2 scintigraphy[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 38(12): 2145-2152.
- [20] Sherif HM, Saraste A, Nekolla SG, et al. Molecular imaging of early  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin expression predicts long-term left-ventricle remodeling after myocardial infarction in rats[J]. *J Nucl Med*, 2012, 53(2): 318-323.
- [21] Hua J, Dobrucki LW, Sadeghi MM, et al. Noninvasive imaging of angiogenesis with a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled peptide targeted at  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin after murine hindlimb ischemia[J]. *Circulation*, 2005, 111(24): 3255-3260.
- [22] Zhu Z, Yin Y, Zheng K, et al. Evaluation of synovial angiogenesis in patients with rheumatoid arthritis using  $^{68}\text{Ga}$ -PRGD2 PET/CT: a prospective proof-of-concept cohort study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 1269-1272.

(收稿日期: 2014-07-05)

(上接第 174 页)

- [26] Terry SY, Abiraj K, Lok J, et al. Can  $^{111}\text{In}$ -RGD2 monitor response to therapy in head and neck tumor xenografts[J]. *J Nucl Med*, 2014, 55(11): 1849-1855.
- [27] Demartis S, Tarli L, Borsi L, et al. Selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin[J]. *Eur J Nucl Med*, 2001, 28(4): 534-539.
- [28] Berndorff D, Borkowski S, Moosmayer D, et al. Imaging of tumor angiogenesis using  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled human recombinant anti-ED-B fibronectin antibody fragments[J]. *J Nucl Med*, 2006, 47(10): 1707-1716.
- [29] Chang SS, O'keefe DS, Bacich DJ, et al. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(10): 2674-2681.
- [30] Morris MJ, Pandit-Taskar N, Divgi CR, et al. Phase I evaluation of J591 as a vascular targeting agent in progressive solid tumors[J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(9): 2707-2713.
- [31] Vallabhajosula S, Nikolopoulou A, Babich JW, et al.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled small-molecule inhibitors of prostate-specific membrane antigen: pharmacokinetics and biodistribution studies in healthy subjects and patients with metastatic prostate cancer[J]. *J Nucl Med*, 2014, 55(11): 1791-1798.

(收稿日期: 2014-10-27)