

以整合素 $\alpha v \beta 3$ 为靶点的肿瘤分子显像及靶向治疗

黄建敏 解朋 刘晓梅 潘莉萍 高建青

【摘要】 整合素 $\alpha v \beta 3$ 是由两条多肽链组成的跨膜异二聚体糖蛋白, 其高表达于肿瘤新生血管内皮细胞和部分肿瘤细胞表面, 而在正常血管和组织表面不表达或低表达, 其可通过介导细胞黏附来调控肿瘤血管新生, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 能够与体内外含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列的物质发生特异性结合。用不同的放射性核素标记, 通过 PET/CT、SPECT/CT、PET/MRI 显像检测肿瘤整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体的表达水平, 在此研究基础上可将其作为肿瘤新生血管显像和肿瘤早期治疗的靶点。现将国内外关于整合素 $\alpha v \beta 3$ 靶向药物的设计、放射性核素的选择及相关药物的研究进展等进行综述。

【关键词】 新生血管化, 病理性; 整合素 $\alpha v \beta 3$; 放射性核素显像

Integrins $\alpha v \beta 3$ in molecular imaging and targeted therapy of neoplasms Huang Jianmin, Xie Peng, Liu Xiaomei, Pan Liping, Gao Jianqing. Department of Nuclear Medicine, the Third Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

Corresponding author: Huang Jianmin, Email: jm_huang2003@126.com

【Abstract】 Integrin $\alpha v \beta 3$ are heterodimeric transmembrane glycoproteins, consisting of two noncovalently bound transmembrane subunits. It had a high expression on the tumor but it does not expression on the surface of normal blood vessels or the normal organizations or only had a low level expression. It can regulate tumor angiogenesis by cell adhesion. The integrin $\alpha v \beta 3$ can specifically recognize and combine with the peptides which containing tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD). These RGD peptides are labeled with appropriate nuclide. The PET/CT, SPECT/CT and PET/MRI multimode imaging can be used to examine the tumor integrin $\alpha v \beta 3$ expression level. Thus it can be used as a new target for the tumor angiogenesis imaging and therapy. There is a summary on the design of the integrin $\alpha v \beta 3$ agents, the choice of appropriate radionuclides and the research direction of these agents.

【Key words】 Neovascularization, pathologic; Integrin $\alpha v \beta 3$; Radionuclide imaging

随着全球恶性肿瘤发病率的增加, 恶性肿瘤的早期诊断和治疗已成为各相关领域的研究焦点, 靶向诊断和治疗是以肿瘤的生物特性为作用靶点, 将诊断和治疗药物尽量限制在特定的靶细胞、组织或器官内, 达到相对精确诊断和治疗的目的, 同时又对正常细胞和组织器官无明显影响, 在这个过程中寻找特异性靶点至关重要。整合素 $\alpha v \beta 3$ (integrin $\alpha v \beta 3$) 作为重要的整合素家族成员, 因其在肿瘤新生血管生成中的高度表达而成为研究重点。

1 整合素 $\alpha v \beta 3$ 及其家族

整合素存在于细胞间隙和细胞基膜上, 通常由

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.03.015

基金项目: 河北省自然科学基金(H2014206286)

作者单位: 050051 石家庄, 河北医科大学第三医院核医学科

通信作者: 黄建敏(Email: jm_huang2003@126.com)

一个 α 键和一个 β 键非共价连接形成异二聚体糖蛋白, 是细胞黏附分子家族的重要成员。整合素 $\alpha v \beta 3$ 是由 α 亚基(相对分子质量为 120000~185000)和 β 亚基(相对分子质量为 90000~110000)两个亚单位形成的异二聚体跨膜糖蛋白, 现已发现 18 种不同的 α 亚基和 8 种 β 亚基, 可结合成至少 24 种整合素, 是整合素家族中的重要成员, 其中 α 亚基的包膜外区能特异性识别并结合细胞外基质配体分子中的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列, 并发生构象改变而活化, 介导细胞信号传递, 调节细胞增殖、分化、运动、定居、生存或凋亡等。

2 整合素 $\alpha v \beta 3$ 与肿瘤新生血管

肿瘤新生血管生成是肿瘤病理生理过程的重要

环节,一方面,肿瘤的发生和发展需要新生血管从宿主获得供给、排除代谢物,使其迅速增殖;另一方面,肿瘤通过新生血管不断转移肿瘤细胞,促进肿瘤侵袭、转移。小于1 mm的微小肿瘤主要通过被动弥散获得所需营养,但进一步生长就必须有血管形成,此为肿瘤的生长和转移所必需^[1]。

研究发现,肿瘤区血管密度可达正常组织的50~200倍,且肿瘤新生血管与正常血管在结构、功能以及分子水平等方面都存在较大差异。鉴于肿瘤新生血管丰富以及与正常血管组织的差异,肿瘤新生血管已成为肿瘤诊断和治疗的重要靶点^[2]。

肿瘤新生血管的生成依赖于血管内皮细胞的侵袭和迁移,而整合素有助于内皮细胞在细胞外基质、细胞间隙和基底膜的黏附,并能够调控内皮细胞的细胞分裂周期^[3]、参与内皮细胞的激活和迁徙、介导内皮细胞增殖、抑制内皮细胞凋亡、参与碱性成纤维细胞生长因子诱导的血管生成、参与血管内皮生长因子诱导的血管生成、诱导环加氧酶的产生等^[4]。

在成熟血管内皮细胞表面 $\alpha v\beta 3$ 低表达或几乎不能被探及,但在肿瘤新生血管的内皮细胞中则高度表达,甚至过度表达。整合素 $\alpha v\beta 3$ 通过与配体特异结合,介导肿瘤细胞黏附和移行,在肿瘤生长、局部浸润、转移,特别是肿瘤诱导的血管生成过程中发挥重要作用。

目前肿瘤新生血管显像受体包括整合素 $\alpha v\beta 3$ 、血管内皮生长因子受体和基质金属蛋白酶等^[5]。

3 整合素 $\alpha v\beta 3$ 在肿瘤疾病分子显像中的作用和应用

3.1 整合素 $\alpha v\beta 3$ 与RGD多肽及其结构优化

整合素 $\alpha v\beta 3$ 可以特异地识别并结合细胞外基质配体分子中的RGD序列,并发生构象改变而活化,主要功能是介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的相互黏附,同时介导细胞与细胞外基质的双向信号传递,对细胞的黏附、增殖、分化、转移、凋亡起到重要的作用。近年来合成的大量线性、环状RGD三肽和含RGD三肽序列的多肽与整合素 $\alpha v\beta 3$ 靶向抗体及抗体片段相比,具有更好的穿透能力,且不易被网状内皮系统捕捉或引起免疫反应,这是含有 $\alpha v\beta 3$ 受体配体的小分子多肽用作选择性肿瘤靶向显像剂进行肿瘤早期诊断的理论基础^[6]。

除RGD能够与整合素 $\alpha v\beta 3$ 特异性结合外,最近在对CD13(氨基肽酶N)的配体Asn-Gly-Arg(NGR)的研究中发现^[7],NGR小肽分子的N(天冬酰胺)能够通过脱酰胺作用形成异天冬氨酸(isoAsp),使NGR变为isoDGR,形成的isoDGR失去了与CD13的结合能力,却能够被整合素 $\alpha v\beta 3$ 特异地识别并结合^[8],但其作用方式与RGD与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的结合并不同^[9]。大量的研究证实,在含有NGR的活体蛋白和药物中存在NGR到isoDGR的转变,而这可能会进一步促进整合素的识别和细胞的黏附^[10]。isoDGR-2C(Cys-isoD-Gly-Arg-Cys,其中两个Cys形成二硫键)是环形小肽,环形结构的肽较线性结构的多肽更稳定、有更高的亲和性及与受体结合的特异性^[6],其相对分子质量为550.61,与大分子蛋白质及多肽相比,其相对分子质量很小,具有以下优点:①小分子肽与受体的亲和力可能比受体和受体片段更强;②小分子肽易于合成,易于结构修饰;③很少引起免疫反应;④能够有效地避免肝脏、脾脏及肾脏的过度摄取,而且快速的血液清除可以提供高靶与非靶比值、改善显像质量。而在小分子肽的分子结构中引入螯合基团并不影响它们与受体结合的特性,而且可以获得高比活度的产品。isoDGR-2C与DTPA耦联后分子结构式中存在6个COOH基团,便于放射性核素^{99m}Tc进行标记,从而使分子显像剂的制备更加简便。

isoDGR-2C中isoD残基的 β 键以及主链插入的扭角使其骨架和侧链形成一个大环,从而保证了其柔韧性以利于嵌入受体狭缝,继而保证能够与受体结合。对接试验表明,isoD的酸性和碱性残基与精氨酸保持合适的距离和方向,能够确保与 $\alpha v\beta 3$ 受体极性区域相互作用的稳定性。而且相关荧光显影已经证明其具有与 $\alpha v\beta 3$ 结合的靶向性^[11]。

Yu等^[12]研究发现,RGD残基可与整合素 $\alpha v\beta 3$ 上的金属离子间的静电相互作用,继而实现其特异性靶向识别。显像剂的糖基化修饰有助于促进其在体内的清除,Maschauer等^[13]的研究表明,糖基化能够促进小分子在体内的运动,并提高其在体内的清除速率。

3.2 放射性核素标记

最佳的放射性核素显像剂应该同时具有易获取、早期肿瘤摄取高、正常组织本底低、血液清除快、无肝脏肾脏滞留等优点。常用的放射性核素

^{18}F 、 ^{68}Ca 、 ^{111}In 、 ^{64}Cu 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等均被用来标记含 RGD 序列的化合物或多肽, 并进行肿瘤新生血管的 SPECT、PET/CT 显像研究, 以期早期特异性地检测肿瘤、确定肿瘤分期和抗肿瘤血管新生药物的疗效等^[14-15]。

^{18}F -Galacto-RGD 能够特异性地识别整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 阳性肿瘤, 是首个用于 PET 的整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 受体靶向显像剂, 其在肿瘤部位的放射性摄取明显高于本底, 并与肿瘤整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的表达具有极好的相关性。但因 ^{18}F 标记 RGD 单体制备过程复杂而限制了其使用。

^{68}Ca 具有良好的物理特性, 其容易标记小分子多肽且不改变理化性能。有研究通过 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸(1, 4, 7, 10-tetraaza-cyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid, DOTA) 偶联剂制备了 ^{68}Ca -DOTA-RGD, 其在肿瘤及血液中的放射性分布水平明显多于 ^{111}In -DOTA-RGD^[16]。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 是临床上最常用的放射性核素, 其拥有最佳核性能, 是纯 γ 光子发射体, 半衰期为 6.02 h, 为前期放射性显像剂合成预留了足够时间, 容易获得, 标记过程简单。可以以联肼尼克酰胺为双功能螯合剂完成标记, 有固定的试剂盒, 且操作简单、使用方便。近年来在 2 个 RGD 模序间引入 PEG₄ 或 Gly₃ 分子而制备的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的 RGD 二聚体和多聚体, 在荷瘤裸鼠体内的肿瘤放射性摄取值(%ID/g) 高达 12%。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3PRGD₂ 为目前已成功应用到临床的显像剂^[17-19], 其中, 3PRGD₂ 为含有 3 个 PEG₄ 的 RGD 二聚体, 它可对恶性肺孤立性结节、已分化的甲状腺癌和肺癌等进行显像。其他的一些研究结果显示, 相对于其他显像剂而言其具有较好的优越性和潜在的应用价值^[15]。洪榆等^[20]采用 ^{131}I 标记 isoDGR-2CY, 获得了较好的标记率, 且放化纯度高, 稳定性好, 显像清晰, 表明其具有良好的肿瘤靶向性。Jin 等^[21]在研究中发现, 注射 Gelofusine(一种琥珀酰明胶和 L-赖氨酸), 可以阻断肾脏对放射性显像剂 ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDFK-)₄ (其中 RAFT 为 regioselectively addressable function-lized templete) 的再吸收, 但不影响其代谢, 可明显降低肾的放射性摄取, 保护肾脏, 并使肿瘤的摄取增加。

3.3 其他影像方面的研究

将整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的配体与顺磁性物质结合作为

探针, 探针特异性地与整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 相结合, 从而使顺磁性物质聚集于肿瘤部位, 引起 MRI 信号的改变。曾有研究以整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的单克隆抗体 LM609 为修饰的 Gd³⁺顺磁性脂质体作为显像剂, 靶向作用于兔肿瘤模型中的新生血管内皮, 得到常规 MRI 无法显示的肿瘤新生血管的“热点”显像。也有研究中用一种能够靶向 $\alpha\text{v}\beta3$ 的新型 MRI 分子示踪剂 P1227, 其可形象地显示肿瘤新生血管状态, 且与周围肌肉组织对比度好, 从而可很好地观察肿瘤边缘增长状况与免疫组化所呈现出的整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 表达量之间的联系, 且能够早期观察各种肿瘤新生血管抑制药物的早期疗效^[22-23]。但由于缺乏定量、受信号强度影响、无法横向比较等诸多原因的影响, MRI 显像目前尚未用于临床研究。

4 整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 在肿瘤靶向治疗中的应用

随着分子生物学研究进入功能基因组时代, 大量疾病相关基因或蛋白质得以确认, 这些基因或蛋白质将成为疾病诊断和治疗的有效靶点, 通过筛选或合成相应特异性强、敏感性高的分子探针, 使其成为未来恶性肿瘤早期诊断和治疗的有效靶点。而借助放射性核素标记检测灵敏的特性对疾病进行早期诊断、依靠放射性核素的辐射生物学效应对疾病进行精确的靶向性治疗已经成为核医学的重点研究方向, 也是目前核医学领域研究的热门课题。

在过去 10 年间, 有许多不同放射性核素标记的 RGD 多肽用于肿瘤显像和治疗^[24]。另外还可以通过抗肿瘤血管生成机制, 切断肿瘤生长、转移所必需的营养, 达到“饿死”肿瘤的目的。

考虑到 $\alpha\text{v}\beta3$ 是肿瘤新生血管的良好标志物, 通过将包含 isoDGR 序列的 CisoDGRC 与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 融合形成 isoDGR-TNF, 发现无论是单用还是与化疗药物联合, 极低剂量的 isoDGR-TNF(1~10 pg)即可以产生对荷淋巴瘤或纤维肉瘤裸鼠的抗肿瘤作用, 这种抗肿瘤作用可以通过同时加入过量的游离的 CisoDGR 得到充分的抑制, 而且 isoDGR-TNF 的抗肿瘤活性明显强于单纯的 TNF。甚至有资料显示包含 isoDGR 的序列能够与包含 RGD 的序列竞争性结合 $\alpha\text{v}\beta3$ 。这些研究结果表明, isoDGR 是一种新的能够与 $\alpha\text{v}\beta3$ 结合的模序, 而且包含 isoDGR 的多肽有可能被开发为靶向转运药物、显像剂或其他化合

物用于肿瘤的诊断或治疗。有研究利用治疗性放射性核素 ^{177}Lu 标记 3PRGD₂, ^{177}Lu 具有长达 6.7 d 的半衰期和较温和的 β 电子能量(最大为 0.497 MeV), 可进行高剂量注射, 能够在肿瘤部位保持长时间的放射性浓聚, 且在肿瘤周围组织的放射性较低, 经裸鼠 U87 脑胶质瘤显像发现, ^{177}Lu -3PRGD₂ 经 γ 显像后能清晰地显示肿瘤, 同时能利用其 β 射线进行肿瘤局部的放射性靶向治疗, 因其半衰期较长, 每周只需注射一次, 可降低患者的痛苦且实施方便, 该药物有望走到临床应用阶段^[25]。

5 小结与展望

利用整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的肿瘤新生血管显像研究将为肿瘤的早期诊断、抗肿瘤血管药物疗效评价提供极大的参考价值。整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的分子靶向治疗也为肿瘤治疗提供了新的思路, 我们期待这类新型药物能够在显像剂的选择、显像效果的优化和对肿瘤的靶向治疗中取得更多突破性进展。

参 考 文 献

- [1] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6, Supple 16): S15-18.
- [2] Schirmer M, Menrad A, Stephens A, et al. Molecular imaging of tumor angiogenesis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1014: 67-75.
- [3] Hwang R, Varner J. The role of integrins in tumor angiogenesis[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2004, 18(5): 991-1006, vii.
- [4] Jiao Y, Feng X, Zhan Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 promotes $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41591 [2015-04-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848537>.
- [5] Hu XD, Xing LG, Yu JM. Nuclear medical molecular imaging of tumor angiogenesis: current status and future prospects[J]. *Chin Med J*, 2013, 126(14): 2741-2746.
- [6] Haubner R, Bruchertseifer F, Bock M, et al. Synthesis and biological evaluation of a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled cyclic RGD peptide for imaging the $\alpha\text{v}\beta 3$ expression[J]. *Nuklearmedizin*, 2004, 43(1): 26-32.
- [7] Curnis F, Longhi R, Crippa L, et al. Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36466-36476.
- [8] Takahashi S, Leiss M, Moser M, et al. The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly[J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(1): 167-178.
- [9] Spitaleri A, Mari S, Curnis F, et al. Structural basis for the interaction of isoDGR with the RGD-binding site of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(28): 19757-19768.
- [10] Corti A, Curnis F. Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin-ligand recognition[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt4): 515-522.
- [11] Curnis F, Sacchi A, Gasparri A, et al. Isoaspartate-glycine-arginine: a new tumor vasculature-targeting motif[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(17): 7073-7082.
- [12] Yu YP, Wang Q, Liu YC, et al. Molecular basis for the targeted binding of RGD-containing peptide to integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1667-1675.
- [13] Maschauer S, Haubner R, Kuwert T, et al. ^{18}F -glyco-RGD peptides for PET imaging of integrin expression: efficient radiosynthesis by click chemistry and modulation of biodistribution by glycosylation[J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(2): 505-515.
- [14] Dijkgraaf I, Rijnders AY, Soede A, et al. Synthesis of DOTA-conjugated multivalent cyclic-RGD peptide dendrimers via 1, 3-dipolar cycloaddition and their biological evaluation: implications for tumor targeting and tumor imaging purposes[J]. *Org Biomol Chem*, 2007, 5(6): 935-944.
- [15] Decristoforo C, Faintuch-Linkowski B, Rey A, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ expression[J]. *Nucl Med Biol*, 2006, 33(8): 945-952.
- [16] Monaco A, Zoete V, Alghisi GC, et al. Synthesis and in vitro evaluation of a novel radioligand for $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin receptor imaging: [^{18}F]FPPA-c (RGDFK)[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(22): 6068-6072.
- [17] 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.
- [18] Zhao D, Jin X, Li F, et al. Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ imaging of radioactive iodine-refractory thyroid cancer using $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3PRGD₂[J]. *J Nucl Med*, 2012, 53(12): 1872-1877.
- [19] Zhu ZH, Miao WB, Li QW, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3PRGD₂ for integrin receptor imaging of lung cancer: a multicenter study[J]. *J Nucl Med*, 2012, 53(5): 716-722.
- [20] 洪愉, 曾韦轶, 赵明玄, 等. 靶向整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 受体 isoDGR-2CY 的 ^{131}I 标记与生物活性评价[J]. *西南国防医药*, 2013, 23(10): 1048-1051.
- [21] Jin ZH, Furukawa T, Sogawa C, et al. PET imaging and biodistribution analysis of the effects of succinylated gelatin combined with L-lysine on renal uptake and retention of ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c (-RGDFK)₄ in vivo[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(3): 478-486.
- [22] Thorek DL, Chen A, Czupryna J, et al. Superparamagnetic Iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging[J]. *Ann Biomed Eng*, 2006, 34(1): 23-38.
- [23] Debergh I, Van Damme N, De Naeyer D, et al. Molecular imaging of tumor-associated angiogenesis using a novel magnetic resonance imaging contrast agent targeting $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(6): 2097-2104.
- [24] 刘昭飞, 贾兵, 史继云, 等. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RGD 环肽二聚体的制备及其体内评价[J]. *中华核医学杂志*, 2007, 27(4): 205-209.
- [25] Shi J, Fan D, Dong C, et al. Anti-tumor effect of integrin targeted ^{177}Lu -3PRGD₂ and combined therapy with Endostar[J]. *Theranostics*, 2014, 4(3): 256-266.

(收稿日期: 2015-03-21)