

·论著·

新型 $\alpha v\beta 3$ 和 Neuropilin-1 双靶点正电子成像探针 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 用于脑胶质瘤的 PET 显像研究

赵龙 罗作明 孙龙 吴华 陈皓鋆

361003, 厦门大学附属第一医院厦门市肿瘤医院核医学科/闽南 PET 中心

通信作者: 陈皓鋆, Email: leochen0821@foxmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.04.001

【摘要】目的 构建可靶向 $\alpha v\beta 3$ 和血管内皮生长因子受体 Neuropilin-1 (NRP-1) 双受体的正电子成像探针, 并验证双靶点融合肽探针较之单靶点探针的优越性。**方法** 采用 ^{18}F -氟化铝 (^{18}F -FAI) 配合物的方法实现分子探针的 ^{18}F 标记。在人神经胶质瘤 U87MG 细胞中, 检测 $\alpha v\beta 3$ 和 NRP-1 的表达水平, 测定分子探针精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD)-丙氨酸-苏氨酸-色氨酸-亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸 (ATWLPPR) 与 $\alpha v\beta 3$ /NRP-1 的受体-配体亲和力。在 U87MG 荷瘤裸鼠模型中, 测定 ^{18}F 标记 RGD-ATWLPPR 的体内肿瘤 micro-PET 显像特性, 并且与其对应单体进行比较分析。采用方差分析和 t 检验对结果进行统计学分析。**结果** $\alpha v\beta 3$ 及 NRP-1 在 U87MG 肿瘤细胞、肿瘤组织及肿瘤新生血管中均有较高水平的表达。受体-配体亲和力测定的实验结果显示, ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 双靶点融合肽与 $\alpha v\beta 3$ 及 NRP-1 的亲和力并未明显优于其单体, 但融合肽在 U87MG 细胞中的摄取高于相应的单体肽。Micro-PET 显像结果显示, 融合肽较其单体肽 RGD $[(4.86 \pm 0.48)\% \text{ID/g vs. } (3.33 \pm 0.15)\% \text{ID/g}, t=10.21, P<0.05]$ 和 ATWLPPR $[(4.86 \pm 0.48)\% \text{ID/g vs. } (2.28 \pm 0.41)\% \text{ID/g}, t=32.16, P<0.05]$ 表现出了更好的显像效果, 且融合肽在 $\alpha v\beta 3$ 、NRP-1 任一受体被未标记“冷”肽阻断的情况下仍能获得肿瘤的阳性显像结果。**结论** ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 可以灵敏地对整合素 $\alpha v\beta 3$ 和 NRP-1 中任何一个受体高表达的肿瘤进行显像, 并且较其单体具有更高的肿瘤摄取, 但该融合肽的受体-配体亲和力还有待进一步提高。

【关键词】 整合素 $\alpha v\beta 3$; 神经纤毛蛋白 1; 正电子发射断层显像术; 分子探针

基金项目: 国家自然科学基金(81101066)

Imaging of glioma with an integrin $\alpha v\beta 3$ and neuropilin-1 dual-targeted PET probe ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR Zhao Long, Luo Zuoming, Sun Long, Wu Hua, Chen Haojun

Department of Nuclear Medicine and Minnan PET Center, Xiamen Cancer Hospital, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

Corresponding author: Chen Haojun, Email: leochen0821@foxmail.com

【Abstract】 Objective Arg-Gly-Asp(RGD) or Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg(ATWLPPR) peptide binds specifically to integrin $\alpha v\beta 3$ or neuropilin-1 (NRP-1) receptor, respectively. In this study, a novel heterodimer peptide probe containing both RGD and ATWLPPR was designed in one molecule. The in vitro and in vivo biological behavior of the dual-targeted imaging probe RGD-ATWLPPR was compared with its corresponding counterparts. **Methods** ^{18}F labeling was conducted through ^{18}F -FAI approach. In the integrin $\alpha v\beta 3$ -positive U87MG human glioma cell line, the $\alpha v\beta 3$ /NRP-1 receptor binding affinity of RGD-ATWLPPR was tested and compared with its counterparts RGD and ATWLPPR. The tumor uptake and distribution pattern of ^{18}F -labeled RGD-ATWLPPR through PET imaging was evaluated and compared with those of RGD and ATWLPPR. The means were compared using one-way ANOVA and t test. **Results** Both integrin $\alpha v\beta 3$ and NRP-1 showed high expression in U87MG glioma cells and tumor tissues. RGD-

ATWLPPR exhibited similar in vitro receptor binding affinity to those of RGD and ATWLPPR. Based on the PET imaging study, ^{18}F -labeled RGD-ATWLPPR (denoted as ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR) demonstrated significantly higher tumor uptake than RGD[(4.86±0.48)%ID/g vs. (3.33±0.15)%ID/g, $t=10.21$, $P<0.05$] and ATWLPPR [(4.86±0.48)%ID/g vs. (2.28±0.41)%ID/g, $t=32.16$, $P<0.05$]. In the blocking study, ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR showed positive imaging result in the presence of excess unlabeled RGD or ATWLPPR. The tumor uptake decreased to the background level when unlabeled RGD and ATWLPPR were co-injected before administration of ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR. **Conclusions** The dual-targeted PET probe ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR specifically binds to either integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ or NRP-1 receptor and could be a promising PET imaging agent for NRP-1 $^{+}/\alpha\text{v}\beta 3^{+}$ and NRP-1 $^{+}/\alpha\text{v}\beta 3^{-}$ tumors. The receptor-binding affinity of RGD-ATWLPPR must be further improved.

【Key words】 Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$; Neuropilin-1; Positron-emission tomography; Molecular probes

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81101066)

新型血管内皮生长因子受体 Neuropilin-1(NRP-1)和整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 在脑胶质瘤中异常表达, 且其表达的水平与肿瘤恶性程度呈正相关, 表明二者与肿瘤的恶性生物学行为有密切关系^[1-2]。目前研究已分别证实含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)和丙氨酸-苏氨酸-色氨酸-亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸(Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg, ATWLPPR)的多肽分别能够特异性识别整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 和 NRP-1^[2-3]。然而, 分别单独使用 RGD 和 ATWLPPR 作为显像剂或治疗探针时存在多种问题: (1)采用单体肽作为显像剂, 要求肿瘤表面的受体浓度相对正常组织器官的受体浓度达到一定水平, 这种情况不会发生在所有肿瘤的生长、浸润和转移等过程中; (2)单体肽与肿瘤受体靶点结合的亲和力相对较弱, 会导致肿瘤摄取不高及药物快速从靶部位脱离; (3)某些单体肽在体内的药代动力学特性可能不理想。

我们在已有的对 RGD 多肽研究的基础上, 针对脑胶质瘤高表达的整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 和 NRP-1 受体, 创造性地将环状多肽 c(RGDyK)与 ATWLPPR 相结合, 制备一种新型的双靶点融合肽探针 c(RGDyK)-ATWLPPR, 并对其进行 ^{18}F 标记, 希望该融合肽在肿瘤细胞表面能同时与双靶点结合, 提高多肽的肿瘤摄取以及受体-配体亲和力, 以构建一种更为高效的脑胶质瘤诊断探针。我们通过一系列的体内外生物学实验, 评价探针的细胞结合率、受体亲和力及肿瘤 PET 显像等方面的性质。同时, 比较双靶点融合肽分子探针与对应单体肽分子探针在肿瘤早期诊断方面的区别和特点。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

所有的化学试剂均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。在 PETtrace 回旋加速器(TracerLab FxFN, 美国 GE Healthcare 公司)上利用核反应 $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ 制得 $^{18}\text{F}^{-}$, 然后富集在 Sep-Park light QMA 柱上(QMA 柱分别用 10 mL 0.5 mol/L pH=8.4 的 NaOAc 溶液和 10 mL 去离子水淋洗), 用 5 mL 去离子水淋洗以除去吸附在 QMA 柱上的金属杂质离子, 用 0.2~1.0 mL 生理盐水洗脱得到含 ^{18}F 的生理盐水。放射性活度由 CRC-25R 放射性活度计(美国 Captintec 公司)检测。人神经胶质瘤细胞 U87MG 购于美国 ATCC 公司。BALB/C 裸鼠购于中国上海斯莱克生物有限公司。鼠抗人整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 单克隆抗体、兔抗人 NRP-1 单克隆抗体、异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠 IgG 和异硫氰酸罗丹明标记的羊抗兔 IgG 均购于美国 Abcam 公司。

1.2 双靶点融合肽的合成和放射性核素标记

多肽 c(RGDyK)、ATWLPPR 及 c(RGDyK)-ATWLPPR 由中国中肽生化有限公司合成和纯化, 3 种多肽分别被制备为经双功能螯合剂 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid, P-SCN-Bn-NOTA)(简称 NOTA)修饰和未经 NOTA 修饰的两种形式。将 0.2 mL 溶有 NOTA-多肽的无水乙腈溶液加入 1.5 mL 的离心管中, 再向其中加入 3 μL 1 mmol/L 的 AlCl_3 , 用冰醋酸将 pH 值调至 4.0。再向上述溶液中加入 50 μL 925~1850 MBq 含 ^{18}F 的生理盐水溶液。将混合物

摇匀后在 100℃下反应 20 min, 冷却后用 10 mL 去离子水稀释后过 C18 小柱, 然后再用 20 mL 水洗, 最后用 10 mmol/L 盐酸乙醇溶液淋洗 C18 柱, 得到纯化后的标记物。经 ^{18}F 标记和 NOTA 修饰的 3 种分子探针分别记为 ^{18}F -FAI-NOTA-c(RGDyK)、 ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLP-PR 及 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR。产品采用快速薄层层析方法测定标记率。

1.3 整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 和 NRP-1 在人神经胶质瘤细胞及组织中的表达

取对数生长期的人神经胶质瘤 U87MG 细胞以 2×10^5 个/mL 接种到小玻片上, 用 4% 多聚甲醛固定 20 min。用含有 1% 牛血清白蛋白封闭后分别加入鼠抗人整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 单克隆抗体(1:100)或兔抗人 NRP-1 单克隆抗体(1:100), 4℃孵育过夜。用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗 3 次后加入异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠 IgG 或异硫氰酸罗丹明标记的羊抗兔 IgG(1:200)和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4, 6-联脒-2-苯基吡啶溶液, 室温孵育 1 h, 最后置于激光共聚焦显微镜(X81, 日本 Olympus 公司)下观察荧光表达情况的变化。

从荷 U87MG 肿瘤裸鼠模型中取出 U87MG 肿瘤组织块。将处理好的肿瘤组织切片风干后, 用冰丙酮溶液浸泡固定 10 min, 空气中干燥。1%牛血清白蛋白封闭后向其中加入鼠抗人整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 单克隆抗体或兔抗人 NRP-1 单克隆抗体(1:100), 4℃孵育过夜。PBS 洗后加入生物素标记的第二抗体(1:200)。PBS 洗后加入链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液 50 μL 。用二氨基联苯胺显色液显色 3~10 min, 苏木素复染, 自来水冲洗返蓝, 玻片常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 晾干后置于显微镜下观察。

1.4 体外细胞实验验证双靶点融合肽的亲合力

1.4.1 体外细胞摄取实验

在 24 孔板中每孔加入 5×10^5 个 U87MG 细胞。分别加入 ^{18}F 标记的 c(RGDyK)、ATWLPPR 或 c(RGDyK)-ATWLPPR, 37℃孵育 15、30、60、120 min 后用 0.1 mol/L NaOH 溶液消化细胞。收集细胞悬液到计数管中, 用 γ 计数器(Wallac Wizard 2480 型, 美国 PerkinElmer 公司)测量放射性计数, 计算各时间点的细胞结合率。

1.4.2 体外细胞竞争结合实验

测定融合肽对整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 及 NRP-1 受体的半数抑制浓度(IC_{50})。采用 Iodogen 方法^[4]制备 ^{125}I -

c(RGDyK)和 ^{125}I -Tyr-ATWLPPR(^{125}I 要标记在酚羟基的侧位上, 因此用酪氨酸的结构实现 ^{125}I 的标记)。在 96 孔板中每孔加入 5×10^5 个 U87MG 细胞。在 ^{125}I -c(RGDyK)存在的条件下, 加入递增浓度的 NOTA-c(RGDyK)或 NOTA-RGD-ATWLPPR(0~1000 nmol/L); 在 ^{125}I -Tyr-ATWLPPR(18 kBq/孔)存在的条件下, 加入递增浓度的 NOTA-ATWLPPR 或 NOTA-RGD-ATWLPPR(0~1000 nmol/L)。置于振荡器上振荡 2 h 后用 0.1 mol/L NaOH 溶液消化细胞。收集细胞悬液到计数管中, 用 γ 计数器测量放射性计数。采用 GraphPad Prism 软件计算 IC_{50} 值。

1.5 肿瘤 PET 显像

1.5.1 荷瘤裸鼠模型的建立

取 4~5 周龄 BALB/C 裸鼠 24 只, 雌性, 体重 18~20 g, 于右侧前肢腋部皮下接种 U87MG 细胞, 5×10^6 个/只, 饲养于无特定病原体级动物房。2~3 周后, 待肿瘤平均直径达到 0.8~1.0 cm 时用于实验。

1.5.2 荷瘤裸鼠的 micro-PET 显像

取荷 U87MG 肿瘤裸鼠 12 只, 通过完全随机设计的方法分为 3 组, 每组 4 只。各组裸鼠经尾静脉分别注射 ^{18}F -FAI-NOTA-c(RGDyK)、 ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLPPR 或 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR, 于注射后 30 min 时进行静态 micro-PET 显像(Inveon Micro PET/CT, 德国 Siemens 公司)。图像通过三维有序子集最大期望值法进行空间重构。在衰变校正的冠状面显像图中, 用 Inveon Research Workstation 软件圈出肿瘤或主要脏器的 ROI。肿瘤或脏器中的放射性浓度通过 ROI 区域中的平均像素值获得, 乘以转换因子(单位: MBq/mL)后转换为 MBq/mL。假定组织密度为 1 g/mL, 将 ROI(MBq/mL)转化为 MBq/g, 然后除以注射剂量, 得到 PET 定量的每克百分注射剂量(%ID/g)。

1.5.3 阻断显像

取荷 U87MG 人神经胶质瘤裸鼠 16 只, 通过完全随机设计的方法分为 4 组, 每组 4 只。每组在注射 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 前 30 min 各自先分别注射未经放射性核素标记的“冷”肽 NOTA-c(RGDyK)、NOTA-ATWLPPR 或 NOTA-RGD-ATWLPPR(10 mg/kg), 对照组注射等量的生理盐水。观察超量非标记的 NOTA-c(RGDyK)、NOTA-ATWLPPR 或 NOTA-RGD-ATWLPPR 阻断后

^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR PET 的肿瘤显像情况及%ID/g值。

1.6 统计学方法

实验数据用均数 \pm 标准差的形式表示。用 GraphPad Prism 5.0 软件计算并作图, 进行融合肽、单体肽分别与整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 及 NRP-1 受体的亲和力的比较, 采用非线性回归分析计算 IC_{50} 。采用 SPSS19.0 软件对 3 种标记物的细胞摄取、肿瘤与正常组织的%ID/g 值等数据进行处理分析, 采用方差分析和 t 检验(需满足正态分布和方差齐性的条件)对结果进行统计学分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射化学结果

^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 的化学结构式如图 1 所示。其经衰变校正后的标记率为 40%~50%。放射性标记过程所需时间约 30 min, 无需高效液相色谱纯化。比活度约为 35 GBq/ μmol , 经 Radio-TLC(薄层层析法)检测, 放射化学纯度大于 95%。

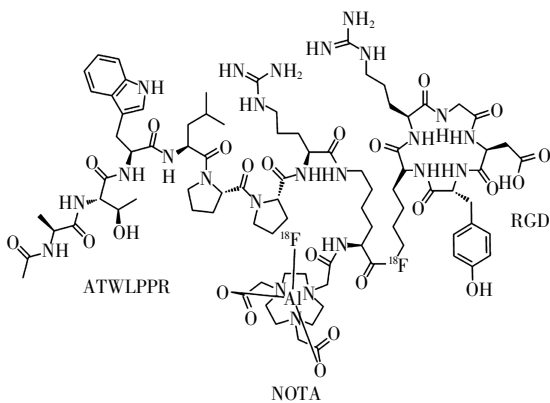


图 1 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 的化学结构式 图中, FAI: 氟化铝; NOTA:1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; RGD: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; ATWLPPR: 丙氨酸-苏氨酸-色氨酸-亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸。

Fig.1 Chemical structure of ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR

2.2 整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 及 NRP-1 受体在细胞及肿瘤组织中的表达

整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 及 NRP-1 受体在人神经胶质瘤 U87MG 细胞中的表达情况通过免疫荧光的方法进行测定。以鼠抗人整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 单克隆抗体为一抗, 其染色结果为强阳性, 在共聚焦显微镜下于细

胞膜及细胞质处可观察到显著的绿色荧光信号(图 2 中 A)。同时, 以兔抗人 NRP-1 单克隆抗体为一抗, U87MG 细胞 NRP-1 受体的染色结果呈阳性, 在共聚焦显微镜下可观察到红色荧光信号(图 2 中 B)。在异种移植人神经胶质瘤组织切片中, 整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 及 NRP-1 受体在肿瘤组织(图 2 中 C、D)及肿瘤新生血管(图 2 中 E、F)中均呈高表达。

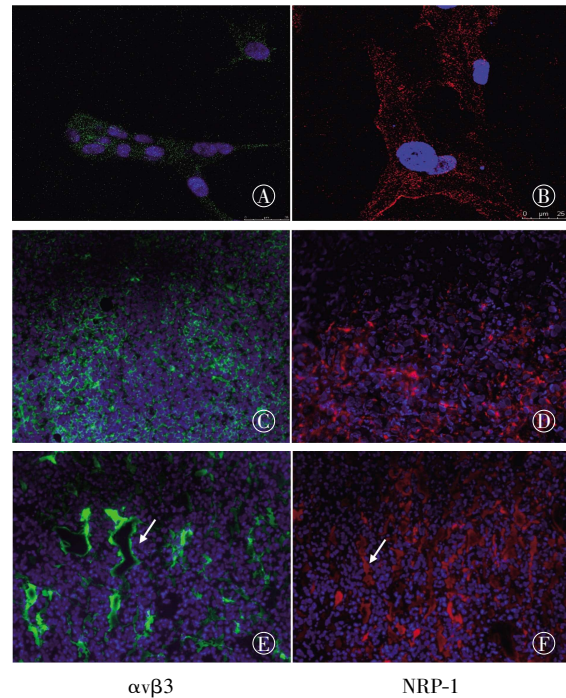


图 2 人神经胶质瘤 U87MG 细胞和组织中整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 及 NRP-1 受体的免疫荧光染色结果 图中, A、B 分别为整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 、NRP-1 受体在 U87MG 细胞中的免疫荧光染色结果($\times 200$), A 呈强阳性, B 呈阳性; C、D 分别为整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 、NRP-1 受体在 U87MG 肿瘤组织切片中的免疫组化染色结果($\times 10$); E、F 分别为整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 、NRP-1 受体在肿瘤新生血管的免疫组化染色结果($\times 20$), 白色箭头所示处为肿瘤血管。整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 及 NRP-1 受体在人神经胶质瘤 U87MG 细胞及组织中均呈高表达。NRP-1: neuropilin-1。

Fig.2 Immunofluorescent staining for integrin $\alpha\text{v}\beta3$ and neuropilin-1 in U87MG cells, U87MG glioma tissues and tumor vasculature

2.3 体外细胞竞争结合试验

通过 NOTA-c(RGDyK)和 NOTA-RGD-ATWLPPR 两种化合物与 ^{125}I -c(RGDyK)竞争结合 U87MG 细胞表面整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 受体, 比较两种化合物与整合素 $\alpha\text{v}\beta3$ 的亲和力。实验结果显示, NOTA-c(RGDyK)和 NOTA-RGD-ATWLPPR 两种化合物的 IC_{50} 值分别为 (44.75 ± 4.40) nmol/L 和 (58.97 ± 5.97) nmol/L,

经两独立样本 *t* 检验差异无统计学意义 ($t=1.041$, $P>0.05$), 表明两种化合物与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的亲合力相当(图3中A)。同理, 通过NOTA-ATWLPPR和NOTA-RGD-ATWLPPR两种化合物与 ^{125}I -Tyr-ATWLPPR竞争结合U87MG细胞表面整合素NRP-1受体, 得到两种化合物的 IC_{50} 值分别为(61.28 ± 7.34) nmol/L 和(72.52 ± 5.02) nmol/L, 经两独立样本 *t* 检验差异无统计学意义 ($t=1.125$, $P>0.05$), 表明两种化合物与NRP-1受体的亲合力相当(图3中B)。

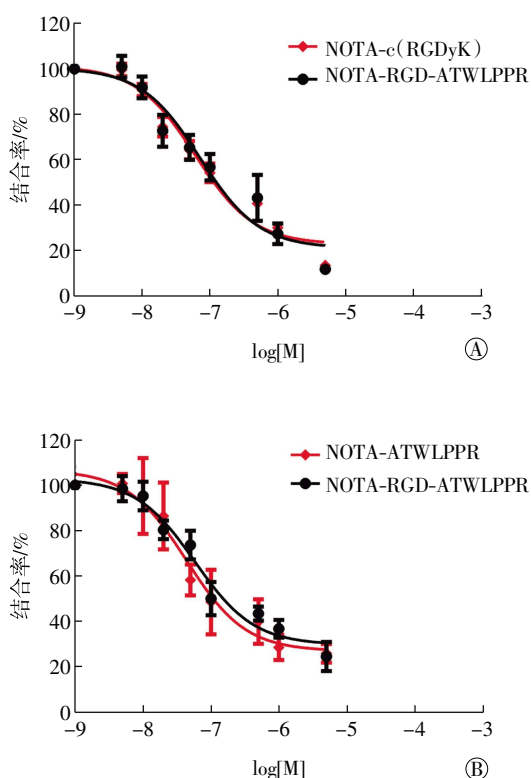


图3 NOTA-c(RGDyK)和NOTA-RGD-ATWLPPR竞争结合U87MG细胞表面整合素 $\alpha v\beta 3$ 和NRP-1受体结果 图中, A: NOTA-c(RGDyK)和NOTA-RGD-ATWLPPR与 ^{125}I -c(RGDyK)竞争结合U87MG细胞表面整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体结果, log[M]中M为NOTA-c(RGDyK)或NOTA-RGD-ATWLPPR的浓度; B: NOTA-ATWLPPR和NOTA-RGD-ATWLPPR与 ^{125}I -ATWLPPR竞争结合U87MG细胞表面NRP-1受体结果, log[M]中M为NOTA-ATWLPPR或NOTA-RGD-ATWLPPR的浓度; NOTA: 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; RGD: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; ATWLPPR: 丙氨酸-苏氨酸-色氨酸-亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸; NRP-1: neuropilin-1。

Fig.3 Inhibition of ^{125}I -c(RGDyK) binding to integrin $\alpha v\beta 3$ in U87MG cells by NOTA-c(RGDyK) and NOTA-RGD-ATWLPPR (A). Inhibition of ^{125}I -ATWLPPR binding to NRP-1 in U87MG cells by NOTA-ATWLPPR and NOTA-RGD-ATWLPPR (B).

2.4 细胞摄取实验

U87MG 肿瘤细胞对 ^{18}F -FAI-NOTA-c(RGDyK)、 ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLPPR以及 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 3种分子探针的摄取均随时间增加而升高, 在120 min时达到最大值, ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLPPR在三者中表现出最低的肿瘤摄取率(图4)。在晚期时间点(60和120min), 融合肽 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR在U87MG细胞中的摄取率高于单体肽。

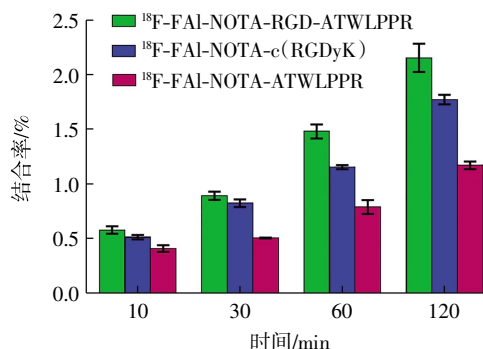


图4 U87MG 肿瘤细胞中 ^{18}F -FAI-NOTA-c(RGDyK)、 ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLPPR以及 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR在不同时间点的细胞摄取结果 图中, FAI: 氟化铝; NOTA:1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; RGD: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; ATWLPPR: 丙氨酸-苏氨酸-色氨酸-亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸。

Fig.4 Uptake of ^{18}F -FAI-NOTA-c(RGDyK), ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLPPR, and ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR in U87MG cells at different times

2.5 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 在荷 U87MG 肿瘤裸鼠中的生物评价

U87MG 肿瘤裸鼠经尾静脉分别注射 ^{18}F 标记的c(RGDyK)、ATWLPPR或RGD-ATWLPPR后, 在30 min时采集其冠状面及横断面图像, 具有代表性的显像图见图5中A。3种示踪剂均可清晰地显示U87MG肿瘤, 图像具有较高的肿瘤/肌肉比。由于单肽分子探针仅能靶向单一的受体, ^{18}F -FAI-NOTA-c(RGDyK)及 ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLPPR PET图像中的肿瘤摄取较融合肽低。经定量分析, ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR、 ^{18}F -FAI-NOTA-c(RGDyK)和 ^{18}F -FAI-NOTA-ATWLPPR 3种分子探针在肿瘤中的摄取值分别为(4.86 ± 0.48)%ID/g、(3.33 ± 0.15)%ID/g和(2.28 ± 0.41)%ID/g(图5中B)。通过统计学检验, 融合肽的肿瘤摄取值显著高于单体肽RGD($t=10.21$, $P<0.05$)和ATWLPPR($t=32.16$, $P<0.05$)。

我们通过阻断实验来证实融合肽 ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 在 U87MG 肿瘤模型中与整合素 αvβ3 及 NRP-1 受体的结合能力。如图 6 中 A 所示, 当 ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 与过量的 ATWLPPR 同时注射时, 其在 U87MG 肿瘤中的摄取被部分抑制, 肿瘤摄取值从(4.86 ± 0.48)%ID/g 降低至(3.18 ± 0.35)%ID/g(下降了 35%); 当 ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 与过量的 RGD 同时注射时, 其摄取亦被部分抑制, 肿瘤摄取值从(4.86 ± 0.48)%ID/g

降低至(2.01 ± 0.23)%ID/g(下降了 59%); 而当 ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 与过量的 ATWLPPR-RGD 同时注射时, 其摄取被完全抑制, 肿瘤摄取值从(4.86 ± 0.48)%ID/g 下降至(1.04 ± 0.12)%ID/g(下降了 79%)(图 6 中 B)。

3 讨论

以 RGD 或 ATWLPPR 为基础的单靶点分子显像探针的局限性可能影响到它们在临床肿瘤显像中

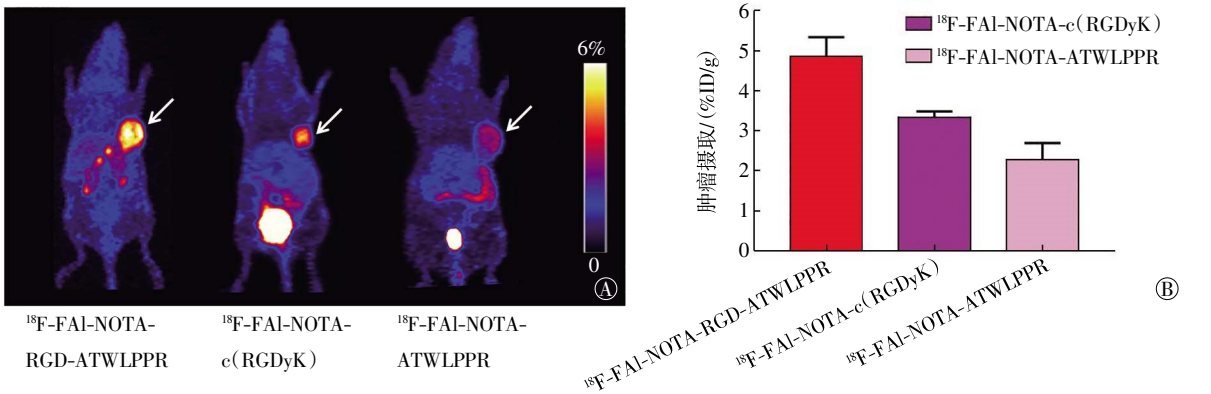


图 5 荷人神经胶质瘤 U87MG 裸鼠行 ¹⁸F-FAI-NOTA-ATWLPPR、¹⁸F-FAI-NOTA-c(RGDyK)或 ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 的 micro-PET 显像图及肿瘤摄取值比较 图中, A: micro-PET 显像图, 箭头所指处为肿瘤所在; B: ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR、¹⁸F-FAI-NOTA-c(RGDyK)以及 ¹⁸F-FAI-NOTA-ATWLPPR 3 种示踪剂的肿瘤摄取值比较(用%ID/g 表示); FAI: 氟化铝; NOTA: 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; RGD: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; ATWLPPR: 丙氨酸-苏氨酸-色氨酸-亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸。

Fig.5 Representative micro-PET images and tumor uptakes of nude mice bearing subcutaneous U87MG glioma xenografts injected with ¹⁸F-FAI-NOTA-ATWLPPR, ¹⁸F-FAI-NOTA-c(RGDyK) and ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR

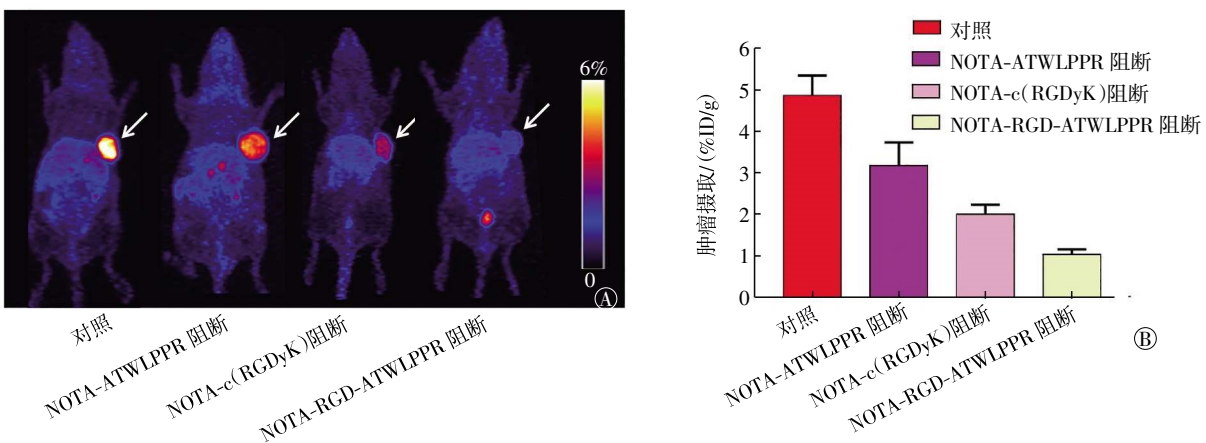


图 6 用超量非标记的 NOTA-ATWLPPR、NOTA-c(RGDyK)及 NOTA-RGD-ATWLPPR 阻断后, 荷人神经胶质瘤 U87MG 裸鼠的 ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR micro-PET 显像图及肿瘤摄取值比较 图中, A: micro-PET 显像图, 箭头所指处为肿瘤所在; B: ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 在 U87MG 肿瘤模型中对照组、NOTA-ATWLPPR 阻断组、NOTA-c(RGDyK)阻断组和 NOTA-RGD-ATWLPPR 阻断组的肿瘤摄取值比较(以%ID/g 的形式表示); FAI: 氟化铝; NOTA: 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; RGD: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; ATWLPPR: 丙氨酸-苏氨酸-色氨酸-亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸。

Fig.6 Representative micro-PET images and tumor uptake of nude mice bearing subcutaneous U87MG glioma xenografts injected with ¹⁸F-FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR after a blocking dose injection of NOTA-ATWLPPR, NOTA-c(RGDyK), and NOTA-RGD-ATWLPPR

的广泛应用。这是由于针对单一靶点的肿瘤显像要求肿瘤组织特异性高表达某种受体,且正常组织不表达或是低表达这种受体。而在肿瘤生长过程中,肿瘤细胞表面的受体会呈现异质性和不均一性,即便同种肿瘤患者,其肿瘤组织表达的受体类型或表达水平也会不一致^[5-6]。另外,一种肿瘤细胞表面也会表达两种或多种受体^[7]。目前,一些相关研究已经证实双靶点或多靶点分子探针的应用确实能提高肿瘤显像诊断的准确率^[8-10]。例如,Zhang等^[8]在前列腺癌患者的临床研究中发现,靶向整合素 $\alpha v\beta 3$ 和胃泌素释放肽受体的双靶点分子探针 ^{68}Ga -RGD-BBN(其中,BBN:蛙皮素)较其单体肽在前列腺癌中表现出了更高的肿瘤摄取率和诊断灵敏度。本研究中我们利用融合肽技术将c(RGDyK)和ATWLPPR这两种肿瘤的特异性靶向多肽相结合,制备出的新型双靶点融合肽探针在理论上具有以下优势:(1)部分融合肽能以双价的形式同时与细胞表面表达的不同受体结合,降低其从细胞表面受体上的解离,从而提高了多肽对受体的亲和力。(2)由于融合肽可靶向两种不同的受体,故其在一个细胞上的所有结合位点为两种不同受体数量的总和,多于单肽的结合位点,因此肿瘤对融合肽的摄取高于其对应单肽。

本研究中我们成功构建了可同时识别整合素 $\alpha v\beta 3$ 和血管内皮生长因子受体的双靶点分子探针(RGD-ATWLPPR),并将 ^{18}F -FAI与连接NOTA的融合肽直接反应,制备出 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR,实现了 ^{18}F 的标记。在这一阶段的工作中,我们比较了该融合肽与对应单体肽在荷人神经胶质瘤U87MG模型中的显像特点,结果显示,与RGD和ATWLPPR单体肽相比, ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR融合肽在任何检测时间点上的肿瘤摄取值都高,并较单体肽表现出更好的显像效果,双靶点探针在肿瘤中的摄取明显提高。

阻断实验中,在注射放射性分子探针前通过过量的“冷”NOTA-c(RGDyK)或NOTA-ATWLPPR阻滞肿瘤中相应的整合素 $\alpha v\beta 3$ 和NRP-1受体位点,PET显像结果显示, ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR可以灵敏地对整合素 $\alpha v\beta 3$ 和NRP-1受体中任何一个高表达的肿瘤进行显像;而当用NOTA-RGD-ATWLPPR作为阻断剂时,可以完全阻断 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR在U87MG肿瘤中的摄取,证明融合肽的肿瘤摄取是整合素 $\alpha v\beta 3$ 和NRP-1受

体介导的特异性结合。

尽管本研究中的双靶点融合肽较其单体肽表现出了更高的肿瘤摄取,并且在任一受体被未标记“冷”肽阻断的情况下仍能获得肿瘤的阳性显像结果,但该分子探针在将来的临床应用中也存在以下一些不足。首先,通过细胞竞争结合实验显示,融合肽与 $\alpha v\beta 3$ 及NRP-1受体的亲和力较其单体肽提升的幅度不够显著。分析原因,我们认为该融合肽中RGD模序与ATWLPPR模序间的谷氨酸链非常短,故该融合肽不是必定以双价的形式同时与细胞表面表达的 $\alpha v\beta 3$ 及NRP-1受体相结合,因此没有体现出较单体肽大幅度提高的受体亲和力。类似的结论在其他双靶点分子探针的研究中亦被报道^[11-13]。同时,我们还观察到这种融合肽在肝脏中的摄取较高,明显高于对应的单体肽。因此,如何进一步提高双靶点融合肽的受体-配体结合亲和力,提高其肿瘤摄取率并延长在肿瘤中的滞留时间;如何进一步改善其在生物体内的药代动力学性质,减少其在肝脏、肾脏中的摄取,仍需进一步研究探讨。目前,已有一些相关研究通过在融合肽的两个模序之间加入药代动力学修饰分子(如聚乙二醇PEG₄和聚甘氨酸Gly₃)的方法,使融合肽分子中两个模序之间的距离足够长以保证融合肽能同时与细胞表面的不同受体相结合,进一步提高受体-配体结合的亲和力,使结合更为牢固,从而提高肿瘤对标记探针的摄取并延长其在肿瘤中的滞留时间^[14-15]。同时,由于引入了药代动力学修饰分子,能改善标记探针从非肿瘤组织(肝、肾、肠等)的清除动力学,降低肾、肝等脏器对其的摄取。在进一步的研究中,我们亦可借鉴该种研究策略,以构建出一种更为高效的脑胶质瘤正电子成像探针。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 赵龙负责论文命题建立、设计、具体实施、数据处理及论文撰写;罗作明负责实验过程图像采集、分析;孙龙负责统计方法分析及具体图表格式修订;吴华负责论文草稿初审、实验问题处理;陈皓黎负责命题设计、实验过程中重要步骤处理、最终版本修订。

参 考 文 献

- [1] Wu H, Chen H, Sun Y, et al. Imaging integrin $\alpha v\beta 3$ positive glioma with a novel RGD dimer probe and the impact of antiangiogenic agent(Endostar) on its tumor uptake[J]. Cancer Lett, 2013, 335(1):

- 75–80. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.01.053.
- [2] Chen H, Niu G, Wu H, et al. Clinical application of radiolabeled RGD peptides for PET imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ [J]. Theranostics, 2016, 6(1): 78–92. DOI: 10.7150/thno.13242.
- [3] Miyauchi JT, Chen D, Choi M, et al. Ablation of neuropilin 1 from glioma-associated microglia and macrophages slows tumor progression[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9801–9814. DOI: 10.18632/oncotarget.6877.
- [4] Tuszyński GP, Knight LC, Kornecki E, et al. Labeling of platelet surface proteins with ^{125}I by the iodogen method[J]. Anal Biochem, 1983, 130: 166–170. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90664-4.
- [5] Capello A, Krenning EP, Bernard BF, et al. Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides[J]. J Nucl Med, 2006, 47(1): 122–129. DOI: 10.1158/1535-7163.
- [6] Liu Z, Yan Y, Chin FT, et al. Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using ^{18}F -labeled PEGylated RGD-bombesin heterodimer ^{18}F -FB-PEG3-Glu-RGD-BBN[J]. J Med Chem, 2009, 52(2): 425–432. DOI: 10.1021/jm801285t.
- [7] Liu SL, Liu HG, Jiang H, et al. One-step radiosynthesis of ^{18}F -AlF-NOTA-RGD2 for tumor angiogenesis PET imaging[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011, 38(9): 1732–1741. DOI: 10.1007/s00259-011-1847-4.
- [8] Zhang J, Niu G, Lang L, et al. Clinical translation of a dual integrin $\alpha_v\beta_3$ - and Gastrin-Releasing peptide Receptor-Targeting PET radiotracer, ^{68}Ga -BBN-RGD[J]. J Nucl Med, 2017, 58(2): 228–234. DOI: 10.2967/jnumed.116.177048.
- [9] Chen Q, Ma Q, Chen M, et al. An exploratory study on $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RGD-BBN peptide scintimammography in the assessment of breast malignant lesions compared to $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3P4-RGD2[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123401[2017-03-08]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0123401>. DOI: 10.1371/journal.pone.0123401.
- [10] Fan D, Zhang X, Zhong L, et al. ^{68}Ga -labeled 3PRGD2 for dual PET and Cerenkov luminescence imaging of orthotopic human glioblastoma[J]. Bioconjug Chem, 2015, 26(6): 1054–1060. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00169.
- [11] Yan Y, Chen K, Yang M, et al. A new ^{18}F -labeled BBN-RGD peptide heterodimer with a symmetric linker for prostate cancer imaging[J]. Amino Acids, 2011, 41(2): 439–447. DOI: 10.1007/s00726-010-0762-5.
- [12] Yan Y, Chen X. Peptide heterodimers for molecular imaging[J]. Amino Acids, 2011, 41(5): 1081–1092. DOI: 10.1007/s00726-010-0546-y.
- [13] Liu Z, Huang J, Dong C, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled RGD-BBN peptide for small-animal SPECT/CT of lung carcinoma[J]. Mol Pharm, 2012, 9(5): 1409–1417. DOI: 10.1021/mp200661t.
- [14] Liu Z, Niu G, Shi J, et al. ^{68}Ga -labeled cyclic RGD dimers with Gly₃ and PEG₄ linkers: promising agents for tumor integrin $\alpha_v\beta_3$ PET imaging[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009, 36(6): 947–957. DOI: 10.1007/s00259-008-1045-1.
- [15] Jin X, Liang N, Wang M, et al. Integrin imaging with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3PRGD2 SPECT/CT shows high specificity in the diagnosis of lymph node metastasis from Non-Small cell lung cancer[J]. Radiology, 2016, 281(3): 958–966. DOI: 10.1148/radiol.2016150813.

(收稿日期: 2017-03-08)

·读者·作者·编者·

关于统计结果的解释和表达

根据中华医学会杂志社的规定, 作者对于论文统计结果的解释和表达需注意: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说对比组之间的差异具有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如: $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等); 用不等式表示 P 值的情况下, 一般情况下选用 $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 三种表达方式即可满足需要, 无需再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数和总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 给出 95% 可信区间。

本刊编辑部