

## · 基础研究 ·

# 新型细胞凋亡分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 的制备及在肺腺癌细胞系体内外的实验研究

孔琪<sup>1,2</sup> 刘岩<sup>3</sup> 刘治国<sup>2</sup> 王晓慧<sup>2</sup> 杨国仁<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 济南大学山东省医学科学院 医学与生命科学学院 250000; <sup>2</sup> 山东大学附属山东省肿瘤医院核医学科, 济南 250117; <sup>3</sup> 青岛市市立医院核医学科 266011

通信作者: 杨国仁, Email: [guorenyang@163.com](mailto:guorenyang@163.com)

**【摘要】目的** 制备含天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸(DEVD)核心的多肽细胞凋亡分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide, 研究其在肺腺癌细胞系 A549 化疗后体内外的生物学分布及 SPECT 显像。**方法** 采用双功能螯合法合成 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide, 分别于标记后 0、1、2、4、6 h 行高效液相色谱(HPLC)法检测放射性化学纯度。对经紫杉醇化疗的肺腺癌 A549 细胞进行体外细胞结合实验, 对照组未经化疗, 测量细胞内外放射性比值(Cin/Cout), 并用流式细胞仪检测细胞凋亡率。经紫杉醇化疗的荷瘤裸鼠尾静脉注射 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 3.7 MBq, 分别于 5、15、30、60、120、240 min 测其生物学分布, 并行 SPECT 静态显像, 勾画感兴趣区(ROI), 计算肿瘤/对侧正常肌肉组织的比值(T/NT)。取显像后的肿瘤组织进行苏木精-伊红染色, 观察肿瘤组织的形态学变化。两组比较采用 *t* 检验, 相关性研究采用双变量相关分析。**结果**  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 在 0、1、2、4 和 6 h 的放射化学纯度均 >97%, 合成率为 (64.5±5.2)%。体外细胞结合实验结果表明, 经紫杉醇化疗后 24h, 肿瘤细胞 Cin/Cout 为 10.27±2.02, 对照组 Cin/Cout 为 1.09±0.03, 化疗组为对照组的 7.3 倍。对同状态的肿瘤细胞行流式细胞检测, 化疗组细胞凋亡率为 (75.62±2.57)%, 对照组细胞凋亡率为 (3.42±0.32)%, 化疗组和对照组 Cin/Cout 与流式细胞仪检测的凋亡细胞百分比呈明显正相关( $r=0.970$ ,  $P<0.05$ )。荷瘤裸鼠体内分布实验结果显示,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 在血液中清除速度较快, 且主要经肾脏代谢; 心脏、脾脏、肺等重要器官放射性摄取值均较低; 但在肝脏中摄取稍高且代谢速度较慢; 肿瘤组织摄取值在注射后 1 h 达到峰值[(4.26±1.03)%ID/g]。荷瘤小鼠给药后 1 h 即可获得清晰图像, 勾画 ROI 显示: 化疗组 T/NT 为 3.83±0.11, 显著高于对照组的 1.57±0.09, 两者间差异有统计学意义( $t=16.19$ ,  $P<0.05$ )。病理结果显示化疗组肿瘤组织见大量核固缩、核碎裂及凋亡细胞; 对照组仅见少量核固缩、核碎裂及少量凋亡细胞。**结论**  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 是一种靶向 caspase-3 的显像剂, 具有较好的生物学分布, 可应用于动物模型肿瘤组织凋亡显像, 在监测化疗后肿瘤细胞凋亡方面有一定的临床潜在价值。

**【关键词】** 同位素标记; 肽类; 细胞凋亡; 体层摄影术, 发射型计算机, 单光子; 肿瘤

**基金项目:** 山东省自然科学基金(ZR2016HM62)

DOI: [10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.01.008](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.01.008)

## Preparation of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide and in *vitro* and in *vivo* study of lung adenocarcinoma cell lines

Kong Qi<sup>1,2</sup>, Liu Yan<sup>3</sup>, Liu Zhiguo<sup>2</sup>, Wang Xiaohui<sup>2</sup>, Yang Guoren<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China; <sup>2</sup>Department of Nuclear Medicine, Shandong Cancer Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250117, China; <sup>3</sup>Department of Nuclear Medicine, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China

Corresponding author: Yang Guoren, Email: [guorenyang@163.com](mailto:guorenyang@163.com)

**【Abstract】Objective** To preparation a  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  labeled caspase -3 polypeptide apoptosis molecular probe( $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide) based on aspartic glutamic acid-valine-aspartic acid(DEVD) as the core and study the biodistribution and SPECT imaging of lung adenocarcinoma cell line(A549) after

chemotherapy. **Methods**  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -cp3-peptide was synthesized by bifunctional chelate method, and the radiochemical purity was detected by HPLC at the time points of 0, 1, 2, 4, 6 hours after the labeling. An in vitro binding assay was performed in A549 cells treated with paclitaxel. In the control group, without chemotherapy, the intracellular and extracellular radioactive ratio (Cin/Cout) was measured, and the cell apoptosis rate was detected by flow cytometry.  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide was injected via tail vein of tumor bearing nude mice treated with paclitaxel (3.7 MBq for each mouse), to detect the biological distribution of 5, 15, 30, 60, 120, 240 min respectively. Static SPECT imaging was performed, ROI outlined, and the ratio of tumor/contralateral normal muscle tissue was calculated. HE staining was performed to observe the morphological changes of tumor tissues after imaging. Test was used for comparison between the two groups, and bivariate correlation analysis was used for correlation study,  $P < 0.05$  was considered statistically significant. **Results** The radiochemical purity of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide at 0, 1, 2, 4 and 6 h was greater than 97%. The synthesis rate was (64.5±5.2)%. An in vitro investigation showed that the Cin/Cout in the tumor cell chemotherapy group was  $10.27 \pm 2.02$  vs.  $1.09 \pm 0.03$  in control group 24 h after paclitaxel chemotherapy. The chemotherapy group of Cin/Cout was 7.3 times as high as that of the control group. Flow cytometric detection of tumor cells in the same state, the rate of apoptosis in the chemotherapy group was (75.62±2.57)% vs. (3.42±0.32)% in control group. The ratio of Cin/Cout in the chemotherapy group and the control group was positively correlated with the percentage of apoptotic cells detected by flow cytometry ( $r=0.970$ ,  $P < 0.05$ ). In vivo distribution of tumor bearing mice showed that:  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide is rather fast in blood clearance, and mainly metabolized through kidney. The values of radioactive uptake were low for important organs such as heart, spleen and lung et al, but it is slightly higher in the liver and slower in metabolism. The value of tumor tissue uptake reached a peak ( $4.26 \pm 1.03$ )%ID/g after injection of 1 h. Clear images of the tumor bearing mice can be obtained 1h after injection of drugs. The ROI showed that the ratio of T/NT in the chemotherapy group was  $3.83 \pm 0.11$ , which was significantly higher than that of the control group ( $1.57 \pm 0.09$ ,  $t=16.19$ ,  $P < 0.05$ ). After imaging, HE staining of tumor tissue showed that a large number of nuclear retraction, nuclear fragmentation and apoptotic cells were found in the tumor tissue of the chemotherapy group and only a small amount of that were in control group. **Conclusions**  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide, a kind of imaging agent targeting caspase-3 activity, which has good biological distribution, and can be applied to apoptosis imaging of animal models, it has a potential clinical value in monitoring tumor cell apoptosis after chemotherapy.

**【 Key words 】** Isotope labeling; Peptides; Apoptosis; Tomography, emission-computed, single-photon; Tumor

**Fund program:** Shandong Natural Science Foundation (ZR2016HM62)

DOI: [10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.01.008](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.01.008)

细胞凋亡又称细胞程序性死亡,即细胞在一定生理及病理条件下,通过一系列基因的激活、表达、调控,按照自身程序出现的主动性、生理性的死亡过程<sup>[1]</sup>。通过放化疗等手段诱导肿瘤细胞凋亡是各种抗肿瘤治疗的主要机制之一,而且细胞凋亡往往发生在肿瘤细胞死亡的早期阶段。因此,可以通过检测细胞凋亡评价抗肿瘤药物的早期疗效。

近年来,细胞凋亡探针成为研究热点,尤其在肿瘤疗效监测方面受到更多关注。文献报道最多的细胞凋亡分子探针为 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -膜联蛋白(Annexin

V),但是该探针特异性差,不能区分细胞凋亡和坏死,且相对分子质量大、药代动力学差<sup>[2-4]</sup>,因此未能在临床得到推广。细胞凋亡的关键酶caspase-3在凋亡早期阶段被激活,可用于凋亡的早期评价。天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸(Asp-Glu-Val-Asp, DEVD)是caspase-3的作用底物,能特异性地被caspase-3裂解而滞留于凋亡细胞中,基于此原理,笔者初步合成了含DEVD链的多肽分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ CP3-peptide,并研究其在凋亡模型体内外的生物学分布及SPECT静态显像的

初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

ZD-6000 型  $\gamma$  计数器：西安志达科技有限公司；Discovery NM/CT670pro SPECT 仪：美国 GE 公司；E2695 高效液相色谱分析仪：美国 Waters 公司；CytoFLEX 流式细胞仪：美国 BD 公司；游标卡尺：美国 Starrett 公司；电子天平 (BT1250D)：北京赛多利斯有限公司。

紫杉醇 (paclitaxel)：山东齐鲁制药有限公司；Annexin V-Fluorescein 流式细胞凋亡检测试剂盒：美国 Roche 公司。

### 1.2 实验细胞及实验动物

肺腺癌 A549 细胞由山东省肿瘤医院提供。正常雄性裸鼠 BALB/c 28 只，4 周龄，体质量 ( $21 \pm 2$ ) g，由北京华阜康生物科技有限公司提供。实验动物许可证号：SCXK(京)2014-0004。

### 1.3 分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 的制备及质量控制

在螯合剂联苯尼克酰胺 (HYNIC) 的作用下完成对多肽的  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  标记。CP3-peptide 购自上海吉乐生化公司，其内含有 DEVD 核心，一端为 HYNIC，一端为易渗透的聚乙二醇，共 7 个氨基酸，相对分子质量为 1030。用溶剂为 0.1 mol/L 的稀盐酸配制成  $\text{SnCl}_2$  缓冲液，浓度为 0.65 mg/mL，蒸馏水配制 Tricine 溶液，浓度为 0.2 mg/mL，多肽 CP3-peptide 的浓度为 0.2 mg/mL。在 2 mL 微型离心管中加入  $\text{SnCl}_2$  溶液 30  $\mu\text{L}$ ，多肽溶液 30  $\mu\text{L}$ ，辅助配体 Tricine 30  $\mu\text{L}$ ，高锝酸钠溶液 (约 74 MBq) 0.1 mL，加蒸馏水定容至 1 mL，110 $^{\circ}\text{C}$  加热 30 min。加热结束后常温放置即可。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 合成后，观察产品颜色及澄清度，利用精密 pH 试纸测量酸碱度，利用分析型高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪分别于 0、1、2、4 和 6 h 测量放射化学纯度 (流动相为 25% 乙腈水溶液，0.1% 三氟乙酸，流率为 1 mL/min)。

### 1.4 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 的体外凋亡细胞结合实验

收集对数生长期的肺腺癌 A549 细胞，以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 2 个 12 孔板，一个板为化疗组，另一板为对照组，化疗组与对照组均为 3 组，每组 2 孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育过夜。24 h 后，取出 12 孔板，弃培养基，每孔加入

500  $\mu\text{L}$  PBS 冲洗 2 遍，加入完全培养基 (10% 胎牛血清和 1% 双抗的培养基) 1 mL，化疗组每孔均加入 200 nmol/L 紫杉醇，对照组每孔加入等量 PBS，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 24 h 后，弃培养基，用 500  $\mu\text{L}$  PBS 冲洗 2 遍。分别对化疗组和对照组中的 6 孔各加入  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 0.37 MBq，静置 30 min 后加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 冲洗 2 遍，胰酶消化细胞后离心，800 r/min (离心半径为 8 cm)，离心 3 min，取上清液，用  $\gamma$  计数器测量细胞外放射性计数 (Cout)；之后加入 1 mol/L NaOH 100  $\mu\text{L}$  裂解细胞，收集细胞裂解液测量细胞内放射性计数 (Cin)。同时处理另 6 孔细胞，将其调整为  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个/mL 单细胞悬液，应用 Annexin V-Fluorescein 试剂盒进行 Annexin V-异硫氰酸荧光素 (FITC) 及碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 标记，采用流式细胞仪进行肿瘤细胞凋亡检测。结果判定：Annexin V-FITC 阴性/PI 阴性为正常细胞，Annexin V-FITC 阳性/PI 阴性为早期凋亡细胞，Annexin V-FITC 阳性/PI 阳性为晚期凋亡细胞，Annexin V-FITC 阴性/PI 阳性为坏死细胞。

### 1.5 肺腺癌 A549 细胞荷瘤裸鼠模型的建立与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 体内生物学分布

BALB/c 裸鼠 28 只，将肺腺癌 A549 细胞制备成单细胞悬液 ( $1 \times 10^7$  个/mL)，接种于裸鼠右下肢，每只接种 0.1 mL，10 d 后，待肿瘤直径生长至 1 cm 时，将荷瘤裸鼠模型进行实验研究。

荷瘤裸鼠 18 只，应用随机数字表法分为 6 组，每组 3 只，腹腔注射紫杉醇 (40 mg/kg) 48 h 后，尾静脉注射  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 3.7 MBq (约 100  $\mu\text{L}$ )，分别于注射后 5、15、30、60、120、240 min 各处死 3 只，即刻取血液及心脏、肝脏、脾脏、肾脏等主要脏器，分别测量各脏器质量及放射性计数，计算不同时间点的每克组织放射性摄取值 (%ID/g)。

### 1.6 荷瘤裸鼠化疗后 SPECT 静态显像

10 只荷瘤裸鼠，分为化疗组和对照组，每组 5 只。化疗组腹腔注射紫杉醇 (40 mg/kg)，对照组腹腔注射相同体积的生理盐水。48 h 后经尾静脉注射 37 MBq  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide，于给药后 1 h 行 SPECT 静态显像，条件为矩阵 256 $\times$ 256，配备低能高分辨平行孔准直器，采集时间 5 min。勾画 ROI，计算肿瘤和对侧肌肉组织的放射性比值 (T/NT)。

### 1.7 肿瘤组织形态学检测

显像结束后,取肿瘤组织即刻固定(10%中性甲醛溶液)、脱水、石蜡包埋后切成3~5 mm薄片,常规苏木精-伊红染色后滴加树脂封片,置于光学显微镜下( $\times 400$ )观察肿瘤细胞形态。

### 1.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。数据符合正态分布且方差齐,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 $t$ 检验,相关性研究采用双变量相关分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide的制备及质量控制

成功制备 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide,合成率为(64.5 $\pm$ 5.2)%,产品为无色透明溶液,pH值为6.5~7.5。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide标记率 $>99\%$ ,放射性出峰时间为5.74 min,室温放置0、1、2、4和6 h的放射化学纯度分别为(99.33 $\pm$ 0.12)%、(99.30 $\pm$ 0.38)%、(99.02 $\pm$ 0.13)%、(97.54 $\pm$ 0.12)%和(97.02 $\pm$ 0.26)%。

### 2.2 肺腺癌A549细胞化疗后 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide摄取及流式细胞仪检测结果

紫杉醇诱导肺腺癌A549细胞凋亡后,用 $\gamma$ 计数器测定细胞及上清液的放射性计数,其中化疗组Cin/Cout为10.27 $\pm$ 2.02,对照组Cin/Cout为1.09 $\pm$ 0.03,化疗组为对照组的7.3倍。肿瘤细胞凋亡检测结果见图1,由图1可知,化疗组细胞凋亡率为(75.62 $\pm$ 2.57)%,对照组细胞凋亡率为(3.42 $\pm$ 0.32)%。

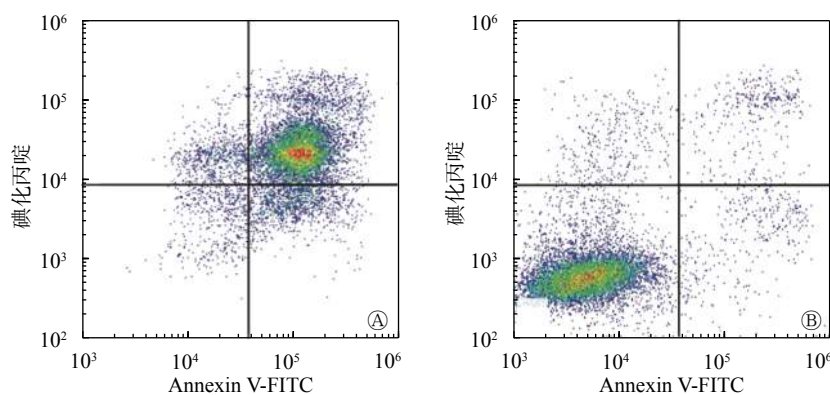


图1 肺腺癌A549细胞化疗组与对照组细胞凋亡分析图 图中,A:化疗组,细胞凋亡率为(75.62 $\pm$ 2.57)%;B:对照组,细胞凋亡率为(3.42 $\pm$ 0.32)%,化疗组细胞凋亡率高于对照组,且差异有统计学意义( $t=6.97, P<0.05$ )。FITC:异硫氰酸荧光素。

Fig. 1 Apoptosis analysis of lung adenocarcinoma A549 cells in the chemotherapy group and the control group

化疗组细胞凋亡率高于对照组,差异有统计学意义( $t=6.97, P<0.05$ )。化疗组和对照组的Cin/Cout与流式细胞仪检测的凋亡细胞百分比呈正相关,且差异有统计学意义( $r=0.970, P<0.05$ )。

### 2.3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide在肺腺癌A549细胞荷瘤裸鼠体内的生物学分布结果

由表1可见,肾脏是 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide放射性浓聚最多的器官,注射后15 min达到峰值,为(8.95 $\pm$ 0.51)%ID/g,2 h为(2.25 $\pm$ 0.78)%ID/g,清除较快;血液中放射性清除速度很快,到2 h即下降到(2.25 $\pm$ 0.24)%ID/g;肿瘤组织在注射后1 h放射性摄取值达到峰值(4.26 $\pm$ 1.03)%ID/g;心脏、脾脏、肺等重要器官放射性摄取值均较低;但在肝脏中摄取稍高:5 min时为(3.21 $\pm$ 0.75)%ID/g,到1 h时降为(2.81 $\pm$ 0.72)%ID/g,下降速度较慢。

### 2.4 荷瘤裸鼠 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide SPECT静态显像结果

图2显示,注射 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide后1 h即可获得清晰图像,化疗组(图2中A)肿瘤部位有明显放射性摄取,对照组(图2中B)肿瘤部位仅有少量放射性摄取。化疗组T/NT为3.83 $\pm$ 0.11,显著高于对照组(1.57 $\pm$ 0.09),且差异有统计学意义( $t=16.19, P<0.05$ )。

### 2.5 肿瘤组织形态学检测

光镜下,肿瘤组织苏木精-伊红染色示化疗组肿瘤组织(图3中A)见大量核固缩(细胞核体积减小,嗜碱性增强)、核碎裂(核膜破裂,细胞核碎裂)及凋亡细胞(细胞体积缩小,胞质致密,嗜酸性增强);对照组(图3中B)仅见少量核固缩、核碎裂及少量凋亡细胞。

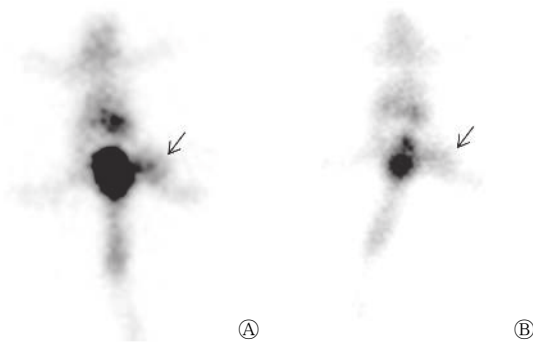
## 3 讨论

细胞凋亡是一系列基因、蛋白质严密调控下的细胞自杀行为,细胞接受各种凋亡信号诱导,通过内源性或外源性途径激活凋亡相关酶或蛋白。Caspase作为一组天门冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,在细胞凋亡中起关键作用,其中与细胞凋亡相关的半胱氨酸蛋白



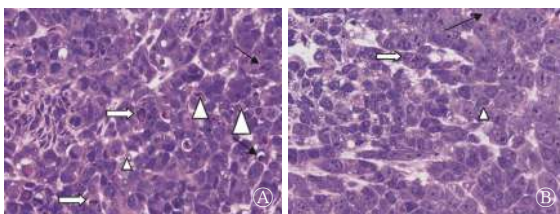
**表 1** 不同时间<sup>99m</sup>Tc-CP3-peptide 在肺腺癌 A549 细胞荷瘤裸鼠体内的生物学分布( $\bar{x} \pm s$ , %ID/g)  
**Table 1** Biological distribution of <sup>99m</sup>Tc-CP3-peptide in nude mice with tumor at different time points ( $\bar{x} \pm s$ , %ID/g)

组织或器官	注射后时间					
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
血液	10.51±3.21	9.50±2.71	6.34±1.24	4.25±1.02	2.25±0.24	2.65±1.31
心脏	1.27±1.21	1.35±1.51	1.02±0.85	0.86±0.95	0.68±0.65	0.45±0.23
肝脏	3.21±0.75	3.33±1.41	2.54±0.54	2.81±0.72	1.85±0.54	1.24±0.32
脾脏	2.91±1.21	2.11±0.35	1.56±0.35	0.86±0.30	0.54±0.25	0.15±0.24
肾脏	4.85±1.20	8.95±0.51	6.34±1.26	4.22±0.42	2.25±0.78	1.84±0.31
肺	2.67±1.01	2.31±0.85	1.85±0.62	1.32±0.21	1.15±0.78	0.65±0.33
小肠	1.13±0.22	1.24±0.21	1.08±0.35	0.75±0.32	0.54±0.51	0.24±0.05
肌肉	1.31±1.20	1.52±0.89	1.27±0.81	1.08±0.63	0.68±0.31	0.47±0.21
骨骼	1.69±1.24	2.21±1.61	1.78±0.84	1.23±0.86	0.86±1.10	0.57±0.34
肿瘤	2.75±0.31	3.21±1.03	3.73±0.84	4.26±1.03	3.21±0.96	1.30±0.56



**图 2** 肺腺癌 A549 细胞荷瘤裸鼠注射<sup>99m</sup>Tc-CP3-peptide 1 h 后 SPECT 静态显像图 图中, A: 化疗组, 肿瘤区域可见放射性浓集(箭头所示); B: 对照组, 肿瘤区域仅可见少量放射性摄取(箭头所示)。

**Fig. 2** <sup>99m</sup>Tc-CP3-peptide SPECT static imaging of tumor-bearing nude mice



**图 3** 肺腺癌 A549 细胞荷瘤裸鼠肿瘤组织病理图(苏木精-伊红染色, ×400) 图中, A: 化疗组; B: 对照组。黑箭头表示核固缩, 白箭头表示核碎裂, 三角形表示凋亡。

**Fig. 3** A549 lung cancer tumor-bearing nude mice tumor tissue safranin-eosin staining figure

酶是 caspase-2、3、7。caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键元件, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路, 其激活与超常表达均引起细胞凋亡。当蛋白水解级联反应介导凋亡发生时, 该酶参与凋亡起始、调节和执行下游一系列酶联反应事件<sup>[5-6]</sup>, 继而发生磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺的外翻, 最终

细胞质收缩、细胞膜破裂, 形成凋亡小体。文献报道的分子探针多为靶向细胞凋亡过程中磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺, 如<sup>99m</sup>Tc-Annexin V, 其在肿瘤化疗<sup>[7-8]</sup>和放疗<sup>[9-10]</sup>的疗效评价和预测方面有一定应用价值, 但该探针特异性较差、相对分子质量大、药代动力学差, 而且不能区分坏死和凋亡, 因此限制了其在临床上的应用。

在细胞凋亡早期阶段 caspase-3 被激活, 在细胞凋亡晚期或坏死时, 其活性明显下降, 因此靶向 caspase-3 既可用于检测细胞凋亡的早期过程, 也可在一定程度上区分细胞凋亡和坏死。张宝石等<sup>[11]</sup>研发含 DEVD 核心的正电子核素标记的 caspase-3 多肽活性显像剂, 动物实验结果表明, <sup>18</sup>F-CP-18 比<sup>18</sup>F-FDG 能够更早、更准确地反映肿瘤对化疗所产生的凋亡反应, 但是后来的研究证明, 肿瘤细胞的<sup>18</sup>F-CP-18 摄取值与 caspase3 表达程度的相关系数较低<sup>[12]</sup>。Shen 等<sup>[13]</sup>设计了一种新型细胞凋亡探针——<sup>18</sup>F-caspase3 敏感性纳米聚合体示踪剂 (caspase-3 sensitive nano-aggregation tracer, CSNAT), 因其具有强疏水性, 可以原位组装成高比活度的纳米聚合物, 不易被细胞排出, 注射后凋亡细胞摄取值随时间延长而增加, 有利于增强 PET 显像的对比度; 荷瘤裸鼠化疗后<sup>18</sup>F-CSNAT 的肿瘤摄取、浓聚结合速率常数和肿瘤/肌肉摄取比值均显著升高, 但是<sup>18</sup>F-CSNAT 在腹腔的摄取较高, 影响腹部肿瘤的显像<sup>[14-15]</sup>。

在本研究中, <sup>99m</sup>Tc-CP3-peptide 作为一种新型<sup>99m</sup>Tc 标记的细胞凋亡显像剂成功制备, HPLC 检测结果示: <sup>99m</sup>Tc-CP3-peptide 标记率较高、稳定

性好,即刻放射化学纯度达(99.33±0.12)%,且4 h 放化纯度仍高达(97.54±0.12)%,这表明该放射性药物体外稳定性较好,可以保持较高的放化纯度;体外凋亡细胞化疗组和对照组 Cin/Cout 与流式细胞仪检测的细胞凋亡呈正相关( $r=0.970$ ,  $P<0.05$ ),这表明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 能较好地靶向体外凋亡肿瘤细胞,可进一步用于动物细胞凋亡显像研究; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 在正常小鼠体内分布良好,肾脏在注射后 15 min 达峰值(8.95±0.51)%ID/g, 2 h 后降为(2.25±0.78)%ID/g,清除较快,这表明此药物主要经肾脏排泄;注射显像剂 2 h 后,血液放射性摄取减少约为 78.6%,这说明此放射性药物在血液中清除较快,这些因素均有利于荷瘤裸鼠凋亡显像。另外,小鼠在注射显像剂 1 h 后经 SPECT 显像,勾画 ROI 示:化疗组 T/NT 为 3.83±0.11,显著高于对照组 T/NT(1.57±0.09),两组间差异有统计学意义( $t=16.19$ ,  $P<0.05$ ),与肿瘤组织的苏木精-伊红染色结果相符,提示肿瘤组织对该显像剂的放射性摄取与细胞凋亡相关,但仍需后续的病理实验如 caspase-3 免疫组化、Tunel 等凋亡相关分析进一步验证该相关性。以上研究结果提示, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 能够较灵敏较早地反映肿瘤细胞化疗后的细胞凋亡情况。

本研究中,肝脏、肾脏摄取稍高,可能会影响动物腹部的显像效果,有待动物实验显像的进一步研究。荷瘤裸鼠 SPECT 静态显像发现,肿瘤对该显像剂的摄取为局灶性,而非均匀性,可能因为化疗后对肿瘤细胞杀伤是非均匀性的,与肿瘤的生长有关。此外实验仍需对化疗后荷瘤裸鼠在 30、60、120、240 min 分别进行 SPECT 显像,以获取最佳显像的时间点。

综上所述, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CP3-peptide 作为一种新型细胞凋亡探针,其标记方法简单、稳定性好,且生物分布较理想,对监测化疗后肿瘤细胞凋亡的显像具有潜在的价值,在化疗疗效预测方面有较好的应用。后续的动物显像实验有待进一步研究。

**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** 孔琪负责现场实验、数据的获取、论文的撰写;刘岩协助实验及数据的收集;刘治国负责药物合成质控实验;王晓慧协助实验及数据的收集;杨国仁负责方法的建立、论文的审阅。

## 参 考 文 献

- [1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239–257. DOI: 10.1038/bjc.1972.33.
- [2] 黄代娟, 兰晓莉, 张永学, 等.  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HYNIC-Annexin V 动脉粥样硬化显像的实验研究 [J]. *中华核医学杂志*, 2008, 28(3): 206–208. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2008.03.020. Huang DJ, Lan XL, Zhang YX, et al. Research on the  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HYNIC-Annexin V scintigraphy of rabbit atherosclerotic lesions [J]. *Chin J Nucl Med*, 2008, 28(3): 206–208. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2008.03.020.
- [3] 郑玉民, 王自正, 颜珏, 等.  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -His10-Annexin 探测非小细胞肺癌细胞凋亡的实验研究 [J]. *中华核医学杂志*, 2008, 28(6): 378–382. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2008.06.006. Zheng YM, Wang ZZ, Yan J, et al. In vivo detection of non-small cell lung cancer apoptosis with  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -His10-Annexin [J]. *Chin J Nucl Med*, 2008, 28(6): 378–382. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2008.06.006.
- [4] Reshef A, Shirvan A, Akselrod-Ballin A, et al. Small-molecule biomarkers for clinical PET imaging of apoptosis [J]. *J Nucl Med*, 2010, 51(6): 837–840. DOI: 10.2967/jnumed.109.063917.
- [5] Falschlehner C, Boutros M. Innate immunity: regulation of caspases by IAP-dependent ubiquitylation [J]. *EMBO J*, 2012, 31(12): 2750–2752. DOI: 10.1038/emboj.2012.148.
- [6] Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7, and -8 [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22): 8384–8389. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-22-08384.2000.
- [7] Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, et al. Increased uptake of the apoptosis-imaging agent  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  recombinant human Annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(9): 2766–2774.
- [8] van de Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, et al. Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium-99m-HYNIC annexin V single photon emission computed tomography [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(18): 3483–3487. DOI: 10.1200/JCO.2003.12.096.
- [9] Kartachova M, Haas RL, Olmos RA, et al. In vivo imaging of apoptosis by  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V scintigraphy: visual analysis in relation to treatment response [J]. *Radiother Oncol*, 2004, 72(3): 333–339. DOI: 10.1016/j.radonc.2004.07.008.
- [10] Haas RL, de Jong D, Valdés ORA, et al. In vivo imaging of radiation-induced apoptosis in follicular lymphoma patients [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 59(3): 782–787. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2003.11.017.

- [11] 张宝石,周乃康,王卉,等.  $^{18}\text{F}$ -FP-peptide 用于化疗后肿瘤细胞凋亡显像[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2012, 32(2): 84-89. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2012.02.002.
- Zhang BS, Zhou NK, Wang H, et al. Imaging of apoptosis with  $^{18}\text{F}$ -FP-peptide focused on the evaluation of tumor response to chemotherapy[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2012, 32(2): 84-89. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2012.02.002.
- [12] Xia CF, Chen G, Gangadharmath U, et al. In vitro and in vivo evaluation of the caspase-3 substrate-based radiotracer [ $^{18}\text{F}$ ]-CP18 for PET imaging of apoptosis in tumors[J]. *Mol Imaging Biol*, 2013, 15(6): 748-757. DOI: 10.1007/s11307-013-0646-7.
- [13] Shen B, Jeon J, Palner M, et al. Positron emission tomography imaging of drug-induced tumor apoptosis with a caspase-triggered nanoaggregation probe[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(40): 10511-10514. DOI: 10.1002/anie.201303422.
- [14] Palner M, Shen B, Jeon J, et al. Preclinical Kinetic Analysis of the Caspase-3/7 PET Tracer  $^{18}\text{F}$ -C-SNAT: Quantifying the Changes in Blood Flow and Tumor Retention After Chemotherapy[J]. *J Nucl Med*, 2015, 56(9): 1415-1421. DOI: 10.2967/jnumed.115.155259.
- [15] Witney TH, Hoehne A, Reeves RE, et al. A Systematic Comparison of  $^{18}\text{F}$ -C-SNAT to Established Radiotracer Imaging Agents for the Detection of Tumor Response to Treatment[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(17): 3896-3905. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3176.

(收稿日期: 2018-06-12)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 关于投稿中化学元素与核素符号的书写要求

1. 化学元素符号应与罗马(正)体书写,首字母大写,在符号后不加圆点。
2. 核素的核子数(质量数)标注在元素符号的左上角。例如:  $^{14}\text{C}$ ,  $^{60}\text{Co}$ , 不写成 $^{14}$ 氮或 $\text{N}^{14}$ ,  $^{60}$ 钴或 $\text{Co}^{60}$ 。
3. 分子中核素的原子数标注在核素符号的右下角。例如:  $^{14}\text{N}_2$ 。
4. 质子数(原子序数)标注在元素符号的左下角。例如:  $_{82}\text{Pb}$ ,  $_{26}\text{Fe}$ 。
5. 离子价和表明阴、阳离子的符号“+”或“-”标注于元素符号的右上角,离子价数写在符号前。例如: 正2价的镁离子,应写成 $\text{Mg}^{2+}$ ,不宜写成 $\text{Mg}^{++}$ 。
6. 激发态标注在元素符号的右上角。例如:  $^{99}\text{Tc}^m$ ,不写成 $^{99m}$ 锝、 $\text{Tc}^{99m}$ 或 $^{99m}\text{Tc}$ 。

本刊编辑部