

## 转铁蛋白受体靶向分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7的放射性标记及肿瘤显像研究

### Construction of a transferrin receptor targeting probe $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 for noninvasive imaging of tumor

Xiao Qing, Pan Xin, Li Chongjiao, Jiang Yaqun, Wang Yichun, Wen Bing, Lei Ping, He Yong

引用本文:

肖晴, 潘芯, 李崇佼, 等. 转铁蛋白受体靶向分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7的放射性标记及肿瘤显像研究[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2022, 46(4): 223-229. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381-202110017-00167

Xiao Qing, Pan Xin, Li Chongjiao, et al. Construction of a transferrin receptor targeting probe  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 for noninvasive imaging of tumor[J]. *International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine*, 2022, 46(4): 223-229. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381-202110017-00167

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202110017-00167>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 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

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

国际放射医学核医学杂志. 2019, 43(1): 40-46 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.01.008>

#### 以血管生成为分子靶点的放射性核素显像分子探针在肿瘤个体化用药中的应用

Targeting angiogenesis of radionuclide imaging molecular probes for tumor individualized medicine

国际放射医学核医学杂志. 2017, 41(5): 363-369 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.05.011>

#### $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记lncRNA HOTAIR反义寡核苷酸探针的制备及其对人脑胶质瘤U87细胞活性的影响

Preparation of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  labeled lncRNA HOTAIR antisense probe and its effect on the activity of human glioma U87 cells

国际放射医学核医学杂志. 2021, 45(3): 162-169 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202011020-00024>

#### 靶向TSPO显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86的制备及其对关节炎的SPECT/CT显像研究

Preparation and imaging of arthritis of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 for TSPO targeted imaging

国际放射医学核医学杂志. 2018, 42(1): 47-52 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2018.01.009>

#### $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -3PRGD<sub>2</sub>整合素受体显像鉴别乳腺良恶性病变的价值及与超声检查的对比研究

The evaluation of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -3PRGD<sub>2</sub> integrin receptor imaging in the differential diagnosis in benign and malignant breast lesions comparison with ultrasound

国际放射医学核医学杂志. 2018, 42(3): 242-247 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2018.03.009>

#### 胸部肿瘤放疗后椎体对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP的摄取表现及分析

Performance and analysis of vertebral  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP uptake after chest tumor radiotherapy

国际放射医学核医学杂志. 2020, 44(4): 205-211 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-201902031-00017>

## · 基础研究 ·

# 转铁蛋白受体靶向分子探针<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 的放射性标记及肿瘤显像研究

肖晴<sup>1</sup> 潘芯<sup>1</sup> 李崇佼<sup>1</sup> 蒋亚群<sup>1</sup> 王怡春<sup>1</sup> 文兵<sup>1</sup> 雷萍<sup>2</sup> 何勇<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 武汉大学中南医院核医学科, 武汉 430071; <sup>2</sup> 华中科技大学同济医学院基础医学院免疫学系, 武汉 430030

通信作者: 何勇, Email: [vincentyong@163.com](mailto:vincentyong@163.com)

**【摘要】目的** 制备靶向转铁蛋白受体(TfR)的多肽分子探针<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-组氨酸-精氨酸-脯氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-组氨酸(简称<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7), 并评估其在荷瘤裸鼠模型 micro SPECT/CT 显像中的效果。**方法** 采用间接标记法, 在共配体 N-三(羟甲基)甲基甘氨酸和乙二胺二乙酸的协同下, 制备<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7。采用流式细胞术测定人胰腺癌 PANC-1 细胞和人乳腺癌 MX-1 细胞表面 TfR 的表达水平, 采用体外细胞结合及细胞竞争抑制实验评估<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 体外结合 TfR 的亲合力及特异性。构建荷瘤裸鼠模型, 注射<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 后进行 micro SPECT/CT 显像及生物学分布实验。采用离体组织放射性磷屏自显影成像及组织病理学检查, 观察 TfR 的表达情况。2 组间的比较采用独立样本 *t* 检验。**结果** 成功制备了分子探针<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7, 其标记率 > 95%, 分别在与生理盐水、胎牛血清的混合液中孵育 4 h 后的放射化学纯度为 (95.3±0.3)% 和 (90.6±0.4)%。流式细胞术实验结果显示, PANC-1 细胞与 TfR 单克隆抗体的结合率为 (98.9±0.1)%, 而 MX-1 细胞与 TfR 单克隆抗体的结合率为 (0.2±0.1)%。体外细胞结合实验结果表明, PANC-1 细胞与<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 共孵育 60 min 后结合率达到峰值 [(16.12±0.01)%], 高于 MX-1 细胞 [(1.20±0.01)%], 且二者间的差异有统计学意义 (*t*=28.67, *P*<0.001); 细胞竞争抑制实验结果表明, PANC-1 阻断组与<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 的结合率降低至 (2.40±0.01)%, 与 PANC-1 实验组的差异有统计学意义 (*t*=26.91, *P*<0.001)。荷瘤裸鼠体内 micro SPECT/CT 显像结果显示, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 可从血液中迅速清除, 主要通过肾脏排泄。PANC-1 荷瘤裸鼠模型在注射<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 后 30 min 时肿瘤轮廓显示清晰, 肿瘤/肌肉比值达 2.80±0.22。生物学分布实验结果显示, 肿瘤及各脏器对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 的摄取 [每克组织百分注射剂量率(%ID/g)] 与显像结果一致, 且<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 在 PANC-1 细胞中的摄取 [(0.55±0.18)%ID/g] 高于 MX-1 细胞 [(0.16±0.11)%ID/g], 差异有统计学意义 (*t*=6.42, *P*<0.001)。放射性磷屏自显影结果显示, 在注射<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 30 min 后, 相较于 MX-1 细胞, PANC-1 细胞显著摄取<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7; 在正常组织脏器中, 以肾脏摄取最为显著, 其次为肝脏。苏木精-伊红染色法及免疫组织化学染色法结果显示, 肿瘤实质内未见明显坏死, 在 PANC-1 细胞中 TfR 呈高表达, 而在 MX-1 细胞中 TfR 呈低表达。**结论** 成功制备了靶向 TfR 的特异性多肽分子探针<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7, 其在荷瘤裸鼠模型中具有良好的显像效能, 有望在体监测肿瘤 TfR 的表达提供新的影像学手段。

**【关键词】** 受体, 转铁蛋白; 肽类; 分子探针; 锝; 同位素标记; 放射免疫显像; 单光子发射计算机断层摄影术; 肿瘤细胞, 培养的; 小鼠, 裸

**基金项目:** 国家自然科学基金(81871391); 国家疑难病症诊治能力提升工程项目肿瘤方向(ZLYNXM202007); 武汉大学中南医院医学科技创新平台支撑项目(PTXM2020014)

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202110017-00167](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202110017-00167)

## Construction of a transferrin receptor targeting probe <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 for noninvasive imaging of tumor

Xiao Qing<sup>1</sup>, Pan Xin<sup>1</sup>, Li Chongjiao<sup>1</sup>, Jiang Yaqun<sup>1</sup>, Wang Yichun<sup>1</sup>, Wen Bing<sup>1</sup>, Lei Ping<sup>2</sup>, He Yong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; <sup>2</sup>Department of Immunology, School of Basic Medical Science, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: He Yong, Email: [vincentheyong@163.com](mailto:vincentheyong@163.com)

**[Abstract] Objective** To develop a radiolabeled peptide molecular tracer  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -His-Arg-Pro-Tyr-Ile-Ala-His ( $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7) targeting transferrin receptor and evaluate its micro SPECT/CT imaging effect in tumor-bearing nude mice models. **Methods** The peptide probe  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 was developed by indirect labeling method with the coordination of co-ligands N-tri (hydroxymethyl) methylglycine and ethylenediamine diacetate. The expression levels of TfR on the surface of human pancreatic PANC-1 tumor cells and human breast MX-1 tumor cells were measured through flow cytometry. Cell binding and competitive blocking assays was conducted to analyze the binding affinity and specificity of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 *in vitro*. Micro SPECT/CT imaging and biodistribution after the establishment of mouse xenograft models were performed *in vivo* to evaluate the affinity and feasibility of noninvasive tumor imaging. Radio-autograph assay and immunohistochemical staining were conducted to validate the correlation between the uptake of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 and expression of TfR in tumor tissues. Independent sample *t*-test was used for the comparison between the two groups. **Results** The radiolabeled probe  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 was successfully synthesized with a radiolabeling yield of greater than 95%. It exhibited great stability *in vitro*, with radiochemical purities of (95.3±0.3)% and (90.6±0.4)% after incubation in normal saline and fetal bovine serum for 4 hours, respectively. The results of flow cytometry showed that PANC-1 tumor cells overexpressed TfR on the surface with a high tendency to bind TfR monoclonal antibody ((98.9±0.1)%), whereas MX-1 tumor cells showed low TfR expression on the membrane( 0.2±0.1)%. *In vitro* cell binding assay results showed that the binding rate of PANC-1 cells to  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 reached a peak ((16.12±0.01)%) after 60 minutes of incubation, which was higher than that of MX-1 cells ((1.20±0.01)%), and the difference between them was statistically significant ( $t=28.67, P<0.001$ ). The results of cell competition inhibition experiment showed that the binding rate of PANC-1 blocking group to  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 decreased to (2.40±0.01)%, which was significantly different from that of PANC-1 experimental group( $t=26.91, P<0.001$ ). The results of micro SPECT/CT imaging in nude mice bearing tumor showed that  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 could be quickly cleared from the blood and mainly eliminated from the kidneys. PANC-1 tumor-bearing nude mice models showed clear tumor contour 30 minutes after injection of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7, with a tumor-to-muscle ratio of 2.80±0.22. The results of biological distribution experiments showed that the uptake of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 by tumors and organs (percentage injection dose rate (%ID/g) per gram of tissue) was consistent with the imaging results, and the uptake of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 in PANC-1 cells ((0.55±0.18)%ID/g) was higher than that in MX-1 cells ((0.16±0.11)%ID/g), and the difference was statistically significant ( $t=6.42, P<0.001$ ). The radio-autograph assay showed that PANC-1 cells significantly absorbed  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 compared with MX-1 cells 30 minutes after injection of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7. The highest uptake in normal organs was observed in the kidney, followed by the liver. Hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining revealed no obvious necrosis in the tumor parenchyma. The PANC-1 cells overexpressed TfR, and whereas the MX-1 cells had low TfR expression. **Conclusion** A specific polypeptide molecular probe  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 targeting TfR was successfully prepared, which has excellent imaging efficiency in tumor-bearing nude mice models, and is expected to provide a new imaging method for monitoring the expression of tumor TFR *in vivo*.

**[ Key words ]** Receptors; transferrin; Peptides; Molecular probes; Technetium; Isotope labeling; Radioimmunoimaging; Single photon emission computed tomography computed tomography; Tumor cells, cultured; Mice, nude

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (81871391); Improvement Project for Theranostic Ability on Difficulty Miscellaneous Disease (Tumor) (ZLYNXM202007); The Research Fund from Medical Sci-Tech Innovation Platform of Zhongnan Hospital, Wuhan University (PTXM2020014)

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202110017-00167](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202110017-00167)

转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)是一类Ⅱ型跨膜糖蛋白,主要参与调控细胞的铁代谢及生长、增殖进程<sup>[1]</sup>。相关研究结果证实,在癌前病变及侵袭性肿瘤组织中,TfR的表达显著升高,且其表达水平同肿瘤的分级密切相关,如在胰腺癌、结肠癌、肺癌等肿瘤及多种耐药性肿瘤中,TfR的表达明显上调<sup>[2-5]</sup>。TfR高表达的肿瘤具有恶性程度高、易产生耐药和预后不良等风险。因此,对肿瘤TfR表达水平的在体监测将有助于指导肿瘤患者的临床管理及预后评估。

目前,靶向TfR的分子探针主要包括转铁蛋白及单克隆抗体,其相对分子质量较大,体内循环时间长,易受内源性转铁蛋白竞争的影响,在应用中存在一定的局限性<sup>[6]</sup>。而小分子多肽因具有相对分子质量小、易于穿透肿瘤组织、稳定性好、血液清除速率快、易于合成及加工修饰、免疫原性低等优势,近年来在肿瘤分子影像学领域表现出良好的应用前景<sup>[7]</sup>。组氨酸-精氨酸-脯氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-组氨酸(His-Arg-Pro-Tyr-Ile-Ala-His, HRPYIAH, 简称T7)是由噬菌体展示技术筛选获得的小分子多肽,能特异性靶向TfR<sup>[8-9]</sup>。本研究构建了新型靶向TfR的分子探针<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HRPYIAH(简称<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7),并对其理化性质、靶向特性及显像效能进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

小分子多肽T7(相对分子质量为1156,化学纯度>95%)由上海吉尔生化公司合成制备;DMEM高糖完全培养基、胎牛血清、PBS均购自美国Gibco公司;青霉素及链霉素购自上海碧云天生物技术有限公司;Alexa-Fluor 647标记的TfR单克隆抗体(ab187777)购自英国Abcam公司;高锝酸钠( $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ )由<sup>99</sup>Mo-<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>发生器制备,购自中国原子高科有限公司;N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、乙二胺二乙酸(EDDA)及二水氯化亚锡( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )均购自美国Sigma-Aldrich公司;Sep-park C18 SPE柱购自美国Waters公司。流式细胞仪(型号: FACSCalibur)购自美国BD公司;自动 $\gamma$ 计数器(型号: 2470 WIZARD)购自美国PerkinElmer公司;小动物micro SPECT/CT一体机购自北京永新医疗设备有限公司;磷屏扫描仪购自

合肥众成机电技术开发有限公司。

### 1.2 实验细胞及实验动物

人胰腺癌PANC-1细胞及人乳腺癌MX-1细胞由华中科技大学同济医学院附属协和医院兰晓莉教授课题组惠赠。无特定病原体级正常健康雌性Balb/c-nu裸鼠30只,体重(18±2)g,4~6周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2016-0006],实验动物在12h/12h昼夜循环的无特定病原体级环境中饲养(温度:20~26℃;湿度:40%~70%),食物(全价营养颗粒饲料)和水(超纯净水)可以随时获得。所有动物实验均在武汉大学实验动物使用和管理委员会指南的指导下进行。本研究经武汉大学医学研究院动物伦理委员会批准(批准文号:IACUC-2534)。

### 1.3 细胞培养

将PANC-1细胞及MX-1细胞置于DMEM高糖完全培养基(含10%胎牛血清、100 μg/ml青霉素、100 μg/ml链霉素),在37℃、含5%CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养。每日观察肿瘤细胞的生长情况,取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

### 1.4 流式细胞术

单克隆抗体组:将PANC-1细胞及MX-1细胞消化离心后(1000转/min,离心半径10cm)用结合缓冲液(含0.1%胎牛血清白蛋白的PBS)重悬,每管加入100 μl 1:400 TfR单克隆抗体。空白对照组:每管加入等体积的结合缓冲液。4℃避光孵育30 min后加入800 μl结合缓冲液,1000转/min离心5 min(离心半径10cm),重复上述步骤充分去除未结合的荧光抗体,加入结合缓冲液重悬细胞,采用流式细胞术检测肿瘤细胞表面TfR的表达情况。

### 1.5 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7的制备、质量控制及体外稳定性鉴定

<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7的制备采用间接标记法,向含有10 μl T7溶液(1 mg/ml)的离心管内依次加入500 μl乙二胺二乙酸(20 mg/ml,溶于0.1 mol/L NaOH溶液)、500 μl N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(40 mg/ml,溶于PBS)、25 μl二水氯化亚锡(1 mg/ml,溶于0.01 mol/L稀盐酸中)及500 μl新鲜淋洗的 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ (370 MBq),95℃反应15 min。采用Sep-park C18 SPE柱分离纯化标记物,采用快速薄层纸层析法中2种展开体系各组分的占比计算<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7的标记率。取100 μl标记物分别与等体积的生理盐水和新鲜胎牛血清混



匀, 2组混合液均置于37℃恒温箱中孵育, 于4h时取样, 采用高效液相色谱法测定样品的放射化学纯度(流动相: 5%~90%乙腈水溶液、1%三氟乙酸, 流速为1 ml/min)。

### 1.6 体外细胞结合实验及细胞竞争抑制实验

体外细胞结合实验: 将PANC-1、MX-1细胞提前24h铺于24孔板中培养( $2 \times 10^5$ 个/孔), 待细胞贴壁后弃去旧培养基, 每孔加入74 kBq标记探针 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ , 于37℃恒温箱中孵育, 设置15、30、60、120、240 min时间点, 分别于上述时间点收集上清及PBS, 随后每孔加入800  $\mu\text{l}$  NaOH(0.1 mol/L)溶液, 待贴壁细胞完全裂解后, 收集细胞裂解液。

细胞竞争抑制实验: 本实验中的孵育时间根据体外细胞结合实验结果确定, 使用PANC-1细胞作为实验组进行后续实验。将PANC-1细胞提前24h铺于24孔板中培养( $2 \times 10^5$ 个/孔)。PANC-1实验组每孔加入74 kBq标记探针 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ ; PANC-1阻断组需提前60 min加入未标记多肽T7封闭, 随后每孔加入74 kBq标记探针 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ 。置于37℃恒温箱中孵育1h。收集上清、PBS及800  $\mu\text{l}$  NaOH溶液裂解所得的细胞液。使用自动 $\gamma$ 计数器测定每组细胞液的放射性计数, 计算细胞在每个时间点的总结合率。

### 1.7 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

分别将处于对数生长期的PANC-1细胞及MX-1细胞接种于Balb/c-nu裸鼠上肢皮下 [ $5 \times 10^6$ 个/(100  $\mu\text{l}$ ·只), 12只/组], 常规饲养并隔日观察裸鼠状态及移植瘤生长情况, 待皮下肿瘤体积达到100~300  $\text{mm}^3$ 时用于后续实验。

### 1.8 荷瘤裸鼠 micro SPECT/CT 显像

PANC-1细胞、MX-1细胞荷瘤裸鼠模型(4只/组)分别经尾静脉注射 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$  37 MBq(约150  $\mu\text{l}$ ), 并分别于注射后30、60 min时行小动物 micro SPECT/CT显像。

### 1.9 荷瘤裸鼠的生物学分布实验

PANC-1细胞、MX-1细胞荷瘤裸鼠模型(5只/组)经尾静脉注射 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$  3.7 MBq(约100  $\mu\text{l}$ ), 于注射后30 min经颈椎脱臼法处死, 解剖取得重要器官及肿瘤组织并称量, 用自动 $\gamma$ 计数器测量其放射性计数, 衰减校正后计算各脏器及肿瘤的每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

### 1.10 放射性磷屏自显影及组织病理学检查

将荷瘤裸鼠的肿瘤组织及重要脏器的快速冰冻切片样品贴于磷屏上, 置于暗室内曝光15~20 min, 随后固定于磷屏扫描仪滚筒进行扫描, 使用磷屏扫描仪配套软件OptiQuant分析扫描结果。小动物 micro SPECT/CT显像实验结束后, 即刻用10%多聚甲醛将肿瘤组织固定, 随后经组织脱水、石蜡包埋后切片。取肿瘤组织切片, 经常规苏木精-伊红染色后封片; 封闭固定后, 用TfR单克隆抗体进行免疫组织化学染色并封片, 于显微镜下观察肿瘤组织切片并记录。

### 1.11 统计学分析

应用GraphPad Prism 6.0软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间数据的比较采用独立样本 $t$ 检验(方差齐)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤细胞表面 TfR 的表达水平

流式细胞术实验结果显示, PANC-1细胞可与TfR单克隆抗体特异性结合, 结合率为(98.9 $\pm$ 0.1)%, 这说明PANC-1细胞表面高表达TfR; 而MX-1细胞与TfR单克隆抗体未见明显结合, 结合率为(0.2 $\pm$ 0.1)%, 这表明MX-1细胞表面的TfR呈相对低表达(图1)。

### 2.2 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ 的标记率及体外稳定性

$^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ 的标记率 $> 95\%$ 。在室温下,  $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ 分别在生理盐水、胎牛血清的混合液中孵育4h后的放射化学纯度为(95.3 $\pm$ 0.3)%和(90.6 $\pm$ 0.4)%。

### 2.3 体外细胞结合实验及细胞竞争抑制实验结果

PANC-1细胞与分子探针 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ 的结合率在孵育后60 min时达到峰值[(16.12 $\pm$ 0.01)%], 显著高于MX-1细胞[(1.20 $\pm$ 0.01)%], 且二者间的差异有统计学意义( $P < 0.001$ , 图2), 同流式细胞术测定的TfR表达水平一致。同时, PANC-1阻断组对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ 的结合率降低至(2.40 $\pm$ 0.01)%, 低于PANC-1实验组, 且二者间的差异有统计学意义( $t = 26.91$ ,  $P < 0.001$ )。

### 2.4 荷瘤裸鼠的 micro SPECT/CT 显像

在PANC-1荷瘤裸鼠模型中,  $^{99}\text{Tc}^m\text{-T7}$ 可迅速靶向肿瘤部位, 注射后30 min肿瘤轮廓显影清晰, 较短时间即可获得较高的肿瘤/肌肉比值(2.80 $\pm$ 0.22),

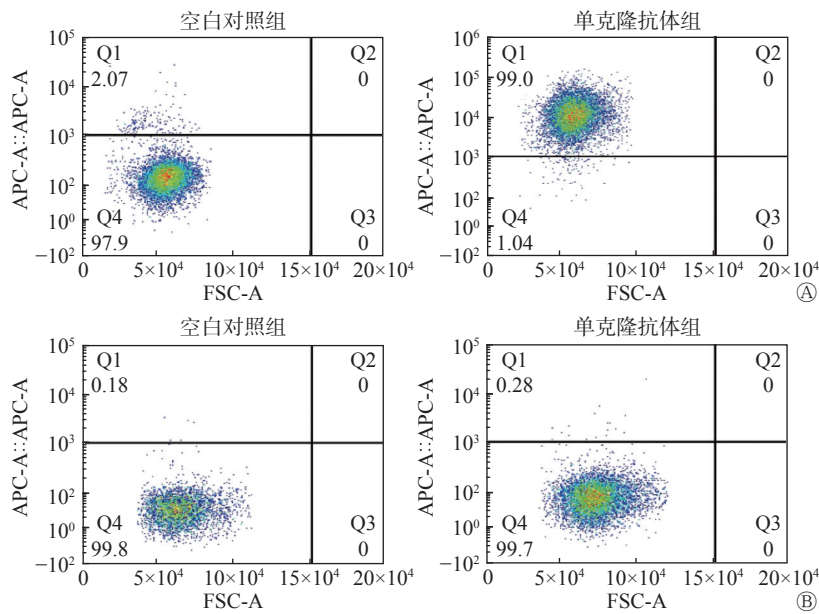


图1 流式细胞术测定人胰腺癌 PANC-1 细胞(A)和人乳腺癌 MX-1 细胞(B)表面转铁蛋白受体的表达水平 APC-A 为藻蓝蛋白; FSC-A 为前向角散射

Figure 1 Expression levels of transferrin receptor in human pancreatic cancer PANC-1 cells (A) and human breast cancer MX-1 cells (B) by flow cytometry

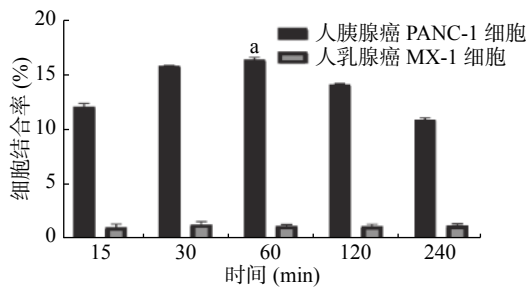


图2 人胰腺癌 PANC-1 细胞和人乳腺癌 MX-1 细胞与分子探针<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 的结合率 <sup>a</sup>表示在 60 min 时, 与 MX-1 细胞相比, 差异有统计学意义 ( $t=28.67, P<0.001$ )。T7 为组氨酸-精氨酸-脯氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-组氨酸

Figure 2 Binding rate of human pancreatic cancer PANC-1 cells and human breast cancer MX-1 cells to molecular probe <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7

而 MX-1 细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 的摄取程度较低, 未见明显显影。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 从血液中的清除速率快, 主要经肾脏排泄, 注射后 60 min 时除肾脏及膀胱见显像剂分布外, 其余组织较少见显像剂滞留(图3)。

### 2.5 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 在荷瘤裸鼠体内的生物学分布

由表1可知, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 经尾静脉注射进入荷瘤裸鼠体内后, 除肾脏及肿瘤组织外, 其余器官及组织本底均较低, PANC-1 细胞对<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 的摄取在注射后 30 min 即达到  $(0.55 \pm 0.18) \%ID/g$ , 高于 MX-1 细胞  $[(0.16 \pm 0.11) \%ID/g]$ , 且二者差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。

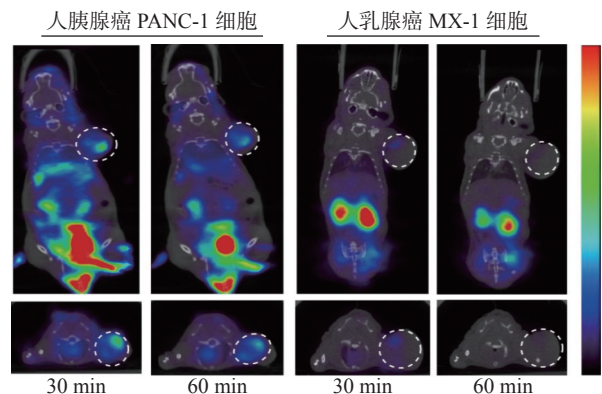


图3 荷人胰腺癌、人乳腺癌裸鼠注射分子探针<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 后不同时间点的 micro SPECT/CT 显像图 白色虚线内为肿瘤组织; 右侧彩色条带中, 红色代表摄取最高值, 黑色代表摄取最低值。T7 为组氨酸-精氨酸-脯氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-组氨酸; SPECT 为单光子发射计算机体层摄影术; CT 为计算机体层摄影术

Figure 3 Micro SPECT/CT images of nude mice bearing human pancreatic cancer and human breast cancer after injection of molecular probe <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7

### 2.6 放射性磷屏自显影及组织病理学检查结果

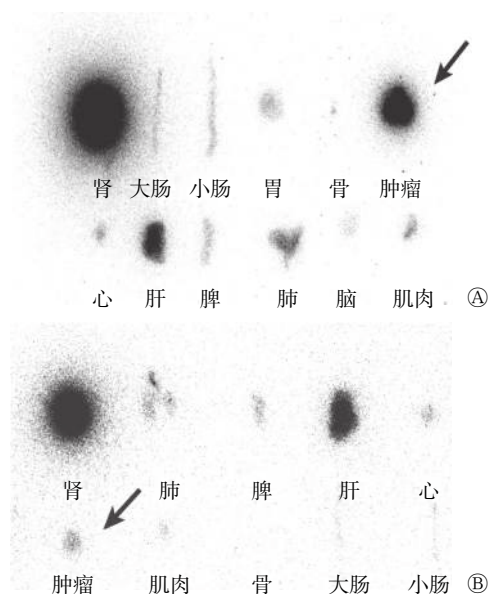
在注射<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7 30 min 后, 相较于 MX-1 细胞, PANC-1 细胞显著摄取<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-T7; 在正常组织脏器中, 以肾脏摄取最为显著, 其次为肝脏(图4)。苏木精-伊红染色法及免疫组织化学染色法结果显示, 肿瘤实质内未见明显坏死, 在 PANC-1 细胞中 TfR 呈高表达, 而在 MX-1 细胞中 TfR 呈低表达(图5)。

**表 1** 荷人胰腺癌、人乳腺癌裸鼠注射分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7后 30 min 的体内生物学分布(%ID/g,  $n=5$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

**Table 1** Biodistribution of molecular probe  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 in nude mice bearing human pancreatic cancer and human breast cancer at 30 min post injection (%ID/g,  $n=5$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

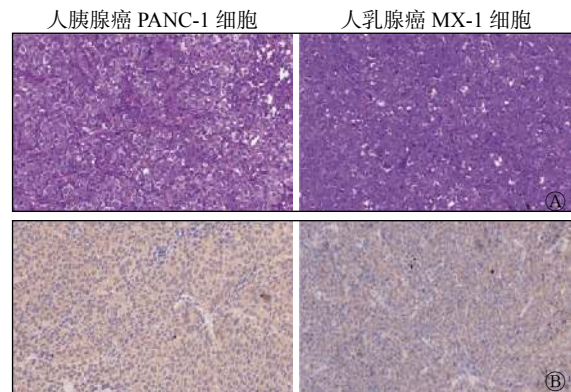
器官或组织	人胰腺癌PANC-1细胞	人乳腺癌MX-1细胞
血液	0.34±0.06	0.46±0.16
脑	0.04±0.01	0.04±0.02
心	0.21±0.01	0.12±0.09
肺	0.29±0.01	0.67±0.27
肝	0.34±0.02	1.34±1.70
脾	0.17±0.04	0.10±0.05
肾	5.92±0.04	6.25±0.09
胃	0.36±0.01	0.21±0.09
小肠	0.14±0.04	0.14±0.09
大肠	0.15±0.03	0.13±0.10
肌肉	0.20±0.05	0.10±0.02
骨	0.10±0.02	0.08±0.66
肿瘤	0.55±0.18 <sup>a</sup>	0.16±0.11

注: <sup>a</sup>表示与人乳腺癌 PANC-1 细胞比较, 差异有统计学意义 ( $t=6.42$ ,  $P=0.003$ )。T7 为组氨酸-精氨酸-脯氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-组氨酸; %ID/g 为每克组织百分注射剂量率



**图 4** 荷人胰腺癌(A)、人乳腺癌(B)裸鼠注射分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7后的肿瘤组织及离体脏器的放射性磷屏自显影 箭头所示, 相较于人乳腺癌 MX-1 细胞, 人胰腺癌 PANC-1 细胞显著摄取 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7。T7 为组氨酸-精氨酸-脯氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-组氨酸

**Figure 4** Radio-autographs of tumor tissues and isolated organs in nude mice bearing human pancreatic cancer and human breast cancer after injection of molecular probe  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7



**图 5** 荷人胰腺癌、人乳腺癌裸鼠注射分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7后的肿瘤组织转铁蛋白受体的组织病理学检查图( $\times 400$ ) A 为苏木精-伊红染色法, 镜下可见肿瘤组织内未见明显坏死; B 为免疫组织化学染色法, 棕黄色表示肿瘤组织转铁蛋白受体染色, 蓝色表示细胞核染色。T7 为组氨酸-精氨酸-脯氨酸-酪氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-组氨酸

**Figure 5** Histopathological examination of transferrin receptors in tumor tissues of nude mice bearing human pancreatic cancer and human breast cancer after injection of molecular probe  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 ( $\times 400$ )

### 3 讨论

相关研究结果表明, TfR 参与肿瘤细胞的生长、增殖等一系列的生命活动<sup>[10-14]</sup>。因肿瘤细胞增殖活跃, 为了满足其相对旺盛的铁需求, 多种肿瘤细胞表面的 TfR 水平显著上调。因此, TfR 成为极具研究价值的肿瘤分子靶点之一。

近年来, 多个课题组针对 TfR 这一分子靶点展开了一系列的研究。2012 年, Holland 等<sup>[10]</sup>首次构建并利用 $^{89}\text{Zr}$ -转铁蛋白对前列腺癌小鼠模型行 PET/CT 显像, 实现了活体监测 TfR 的动态变化。Henry 等<sup>[11]</sup>的研究结果证实,  $^{89}\text{Zr}$ -转铁蛋白 PET 显像可用于监测三阴性乳腺癌小鼠对溴结构域蛋白 4 抑制剂的疗效反应。但转铁蛋白的分子量较大(相对分子量 76 000~81 000), 在血液中的清除速率慢, 肝脏摄取本底高, 显像时间较长。而小分子多肽 T7 具有相对分子量小、组织穿透性强、血液清除速率快等优势, 有望成为更为理想的靶向肿瘤 TfR 的分子探针<sup>[12-14]</sup>。

本研究设计并采用间接标记法合成了靶向 TfR 分子的多肽分子探针 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7。相较于直接标记法, 该标记过程更简易, 且对标记分子的生物活性影响更小、标记产物更为稳定<sup>[15]</sup>。该方法合成的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -T7 具有标记率高、稳定性好等优点, 且 micro SPECT/CT 显像操作简便、成本较低, 使得该探针



更加易于推广应用。

为了验证 $^{99m}\text{Tc}$ -T7 监测肿瘤表面 TfR 表达的可行性, 本实验针对 TfR 表达量不同的 2 种人源性肿瘤 PANC-1 和 MX-1 细胞开展了体内外的相关研究。实验结果表明, 高表达 TfR 的 PANC-1 细胞对 $^{99m}\text{Tc}$ -T7 摄取显著, 且过量的未标记多肽可阻断对 $^{99m}\text{Tc}$ -T7 的摄取, 对应的荷瘤裸鼠模型显像清晰; 相对低表达 TfR 的 MX-1 细胞在体内、体外对 $^{99m}\text{Tc}$ -T7 的摄取均较低。体外细胞及活体动物实验结果表明, 肿瘤表面的 TfR 分子介导了 $^{99m}\text{Tc}$ -T7 的特异性摄取, 其摄取与肿瘤组织中 TfR 的表达水平相关。生物学分布实验结果显示,  $^{99m}\text{Tc}$ -T7 在体内主要经肾脏排泄, 这一特点与多肽的相对分子质量小和极性相关, 符合小分子多肽在体内代谢的一般特性<sup>[6]</sup>。本研究仍存在一定的不足之处, 在荷瘤裸鼠活体显像实验中, 以荷瘤裸鼠的皮下移植瘤为主, 后续需要进一步探索及研究多肽标记探针在监测原位瘤模型中 TfR 表达水平的可行性。

综上所述, 本研究成功完成了对靶向肿瘤 TfR 的小分子多肽 T7 的核素标记, 其制备流程简易, 标记率高, 稳定性好, 体内清除迅速, 肿瘤靶向性佳, 显像效能良好, 具备无创、在体实时监测肿瘤表面 TfR 表达的潜能。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明** 肖晴负责实验的实施、论文的撰写; 潘芯负责协助实验及数据的采集; 李崇俊负责动物实验的指导; 蒋亚群负责放射性药物标记实验的指导; 王怡春负责数据的分析、论文的审阅; 文兵、雷萍负责基础实验的指导; 何勇负责课题的提出与设计、论文的审阅与修订

## 参 考 文 献

- [1] Luck AN, Mason AB. Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: focus on serum transferrin[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(8): 1012–1019. DOI: 10.1016/j.addr.2012.11.001.
- [2] Jhaveri DT, Kim MS, Thompson ED, et al. Using quantitative seroproteomics to identify antibody biomarkers in pancreatic cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(3): 225–233. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0200-T.
- [3] Imbastari F, Dahlmann M, Sporbert A, et al. MACC1 regulates clathrin-mediated endocytosis and receptor recycling of transferrin receptor and EGFR in colorectal cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(7): 3525–3542. DOI: 10.1007/s00018-020-03734-1.
- [4] Vostrejs M, Moran PL, Seligman PA. Transferrin synthesis by small cell lung cancer cells acts as an autocrine regulator of cellular proliferation[J]. *J Clin Invest*, 1988, 82(1): 331–339. DOI: 10.1172/JCI113591.
- [5] Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG, et al. Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma[J]. *Lancet*, 1983, 321(8323): 498–501. DOI: 10.1016/s0140-6736(83)92191-8.
- [6] Zhang YJ, Sun T, Jiang C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(1): 34–50. DOI: 10.1016/j.apsb.2017.11.005.
- [7] Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1/3): 247–279. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00139-3.
- [8] Tang JJ, Wang QT, Yu QW, et al. A stabilized retro-inverso peptide ligand of transferrin receptor for enhanced liposome-based hepatocellular carcinoma-targeted drug delivery[J]. *Acta Biomater*, 2019, 83: 379–389. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.11.002.
- [9] Kim G, Kim M, Lee Y, et al. Systemic delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides to the brain using T7-peptide decorated exosomes[J]. *J Control Release*, 2020, 317: 273–281. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.11.009.
- [10] Holland JP, Evans MJ, Rice SL, et al. Annotating MYC status with  $^{89}\text{Zr}$ -transferrin imaging[J]. *Nat Med*, 2012, 18(10): 1586–1591. DOI: 10.1038/nm.2935.
- [11] Henry KE, Dilling TR, Abdel-Atti D, et al. Noninvasive  $^{89}\text{Zr}$ -transferrin PET shows improved tumor targeting compared with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET in MYC-overexpressing human triple-negative breast cancer[J]. *J Nucl Med*, 2018, 59(1): 51–57. DOI: 10.2967/jnumed.117.192286.
- [12] Aloj L, Jogoda E, Lang L, et al. Targeting of transferrin receptors in nude mice bearing A431 and LS174T xenografts with [ $^{18}\text{F}$ ]holo-transferrin: permeability and receptor dependence [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40(9): 1547–1555.
- [13] Sehlin D, Syvänen S. Engineered antibodies: new possibilities for brain PET?[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 46(13): 2848–2858. DOI: 10.1007/s00259-019-04426-0.
- [14] Johnsen KB, Burkhart A, Thomsen LB, et al. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery[J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 181: 101665. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2019.101665.
- [15] Hnatowich DJ, Mardirossian G, Rusckowski M, et al. Directly and indirectly technetium-99m-labeled antibodies—a comparison of in vitro and animal in vivo properties[J]. *J Nucl Med*, 1993, 34(1): 109–119.
- [16] Wu Y, Li LQ, Wang ZH, et al. Imaging and monitoring HER2 expression in breast cancer during trastuzumab therapy with a peptide probe  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-H10F[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 47(11): 2613–2623. DOI: 10.1007/s00259-020-04754-6.

(收稿日期: 2021–10–15)