文章编号:1000-5404(2005)02-0109-03

论著

以血管生成为靶点的肿瘤核素显像及治疗的实验研究

程绍钧[1],李前伟[1],李忠俊[2],王 源[3],黄定德[1] (第三军医大学:[1]西南医院核医学科,[3]医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038,[2]新桥医院输血科,重庆 400037)

提 要:目的 以荷人膀胱癌、胆管癌小鼠为模型,研究血管内皮生长因子(VEGF)及其受体KDR、整合素$\alpha_v\beta_3$受体在肿瘤的核素显像及治疗中的应用。**方法** ①复制荷人膀胱癌小鼠模型,观察^{131}I-anti-VEGF的放射免疫显像;②将荷瘤小鼠分为实验组、非标记抗体对照组及空白对照组,探讨^{131}I-anti-KDR的放射免疫治疗;③建立荷人胆管癌小鼠模型,观察^{125}I-RGD-4CY的受体显像。**结果** ①免疫组化结果示膀胱癌组织高表达VEGF及KDR蛋白,而正常组织极低水平表达;②^{131}I-anti-VEGF、^{131}I-anti-KDR及^{125}I-RGD-4CY在各组织中均具有较高的T/NT;③^{131}I-anti-KDR的放射免疫治疗示实验组与非标记抗体对照组均能明显抑制膀胱癌的生长,但前者作用快且抑制率明显高于后者;④放射自显影示^{125}I-RGD-4CY在肿瘤组织中浓聚影最强,肺、颈部及其它软组织呈低水平分布。**结论** ^{131}I- anti-VEGF、^{131}I-anti-KDR可较好地显示膀胱癌,并明显抑制其生长,^{125}I-RGD-4CY可望成为一有效的肿瘤$\alpha_v\beta_3$受体显像剂。

关键词:放射免疫治疗;放射免疫显像;受体显像;血管生成;血管内皮生长因子;KDR;$\alpha_v\beta_3$受体

中图法分类号:R730.23;R730.44;R730.55 **文献标识码**:A

Nuclide imaging and treatment targeting at angiogenesis of tumors

CHENG Shao-jun[1], LI Qian-wei[1], LI Zhong-jun[2], WANG Yuan[3], HUANG Ding-de[1] ([1]Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, [2]Department of Blood Transfusion, Xinqiao Hospital, [3]Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medicine University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the application of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor KDR and $\alpha_v\beta_3$ receptor in nuclide imaging and treatment of nude mice bearing human bladder cancer and cholangiocarcinoma. **Methods** ① Model of nude mice bearing bladder cancer was duplicated. Radioimmunoimaging (RII) of ^{131}I-anti-VEGF was observed. ② Nude mice bearing bladder cancer were randomly divided into experimental group, anti-KDR monoclonal antibodies group, and saline control group. The radioimmunotherapy (RIT) of ^{131}I-anti-KDR was explored. ③ Model of nude mice bearing cholangiocarcinoma was established and $\alpha_v\beta_3$ receptor scintigraphy was studied. **Results** ① The study of immunohistochemistry showed that VEGF and its receptor KDR were highly expressed in bladder cancer, but their expressions were very low in normal tissues. ② T/NT of ^{131}I-anti-VEGF, ^{131}I-anti-KDR and ^{125}I-RGD-4CY in all tissues was high. ③ RIT of ^{131}I-anti-KDR showed that the growth of bladder was significantly suppressed in the experimental group and anti-KDR monoclonal antibody group, but the suppression ratio in the experimental groups was superior to that in the anti-KDR monoclonal antibody group. ④ Autoradiography showed that the ^{125}I-RGD-4CY activity was the highest in tumor, and there was low level of radioactive distribution in the lungs, neck, and other soft tissues. **Conclusion** Bladder cancer can be perfectly imaged with ^{131}I- anti-VEGF, ^{131}I- anti-KDR. ^{125}I-RGD-4CY is a potential tracer for tumor $\alpha_v\beta_3$ receptor scintigraphy.

Key words: radioimmunotherapy; radioimmunoimaging; receptor scintigraphy; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; KDR; $\alpha_v\beta_3$ receptor

当前恶性肿瘤治疗的重点在于直接杀伤肿瘤细胞,虽然取得了一定效果,但副作用大。研究表明实体瘤的生长和转移依赖血管生成[1],所以抑制肿瘤血管生成是恶性肿瘤治疗的新方向,它以肿瘤间质为攻击的靶,不仅对原发灶有效,对转移灶也有相同的作用。同时,因大量的血管生成为肿瘤的特征性表现之一,越来越多的研究证实:针对血管生成的肿瘤显像也显示了良好的临床应用前景。我们以荷人膀胱癌、胆管癌小鼠为模型,分别探讨了膀胱癌^{131}I-anti-VEGF的放射免疫显像(radioimmunoimaging, RII)、^{131}I-anti-KDR的放射免疫治疗(radioimmunotherapy, RIT)效果及胆管癌的^{125}I-RGD-4CY受体显像。为从肿瘤的血管生成入手,探讨肿瘤的RII、RIT及受体显像奠定一定的实验研究基础。

作者简介:程绍钧(1939-),男,安徽省无为县人,教授,主要从事实验核医学方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752320

收稿日期:2004-06-07;修回日期:2004-11-13

1 材料与方法

1.1 荷人膀胱癌小鼠及荷人胆管癌小鼠模型的复制

参照文献[2,3]。

1.2 血管内皮生长因子(VEGF)及其受体 KDR 的检测

用免疫组织化学方法分别检测了裸鼠的瘤体组织及心、肝、脾、肺、肾、肌肉等组织中 VEGF 及 KDR 的表达。抗 VEGF 的单克隆抗体(sc-7269)购自美国 Santa Cruz 公司,抗 KDR 的单克隆抗体由北京肿瘤防治研究所提供。

1.3 ^{131}I-anti-VEGF 在荷瘤小鼠体内的分布及放射免疫显像

参照文献[4],12 只荷瘤小鼠用随机数字表随机分为 4 组,每组 3 只。实验前 4 d 以 1% KI 封闭小鼠对放射性碘的摄取,待荷瘤小鼠的肿瘤长至 1.0 cm^3 左右时从尾静脉注入标记物,剂量为 9.25 MBq/只,分别于注射后 24、48、96 及 168 h 用配备中能准直器的 SPECT(GE Millennuium)显像,能峰 364 keV,窗宽 20%,采集 10 min/帧。

1.4 ^{131}I-anti-KDR 在荷瘤小鼠体内的分布及放射免疫治疗

参照文献[5],当移植瘤体积生长至 1.0 cm^3 时,将 15 只荷瘤小鼠用随机数字表随机分为实验组(尾静脉注入标记抗体 100 μg,标记抗体预先用非标记抗体调整浓度至 500 μg/ml)、非标记抗体对照组(尾静脉注入非标记抗体 100 μg)及空白对照组(尾静脉注入等体积的生理盐水 200 μl),每组 5 只。各组动物置 SPF 条件下饲养,每隔 3 d 用游标卡尺测量瘤体长径(a)、短径(b),计算瘤体的体积 $V = ab^2/2$,3 周后计算瘤体生长抑制率 = (空白对照组瘤体体积 − 实验组瘤体体积)/空白对照组瘤体体积,并取小鼠肝、脾、肾等重要脏器及瘤体行病理学观察。

1.5 小分子环形多肽 RGD-4CY 的 ^{125}I 标记、鉴定及 ^{125}I-RGD-4CY 的肿瘤 $\alpha_v\beta_3$ 受体显像

参照文献[3]。

1.6 统计学方法

瘤体抑制率采用 SPSS10.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 VEGF 及 KDR 在荷瘤小鼠的瘤体组织及各重要脏器中的表达

免疫组化结果显示:VEGF 蛋白在瘤体组织的胞浆中强表达,而正常组织除肾表达弱阳性外,其余组织均为阴性;KDR 蛋白在瘤体组织的胞膜中强表达,正常组织均为阴性。即 VEGF 及 KDR 在膀胱癌细胞中高表达而在正常组织中极低表达。

2.2 ^{131}I-anti-VEGF、^{131}I-anti-KDR 及 ^{125}I-RGD-4CY 的体内分布

从表 1、2 可知:^{131}I-anti-VEGF 在荷瘤小鼠体内的 T/NT 为 0.85 ~ 11.92,^{131}I-anti-KDR 在荷瘤小鼠体内的 T/NT 为 0.80 ~ 8.88,且基本上于 96 h 时达高峰。

^{125}I-RGD-4CY 在荷瘤小鼠体内的 T/NT 为 0.27 ~ 26.0,且于注射后 2 h 达高峰(表 3)。

表 1 ^{131}I-anti-VEGF 在荷瘤小鼠体内 T/NT 值($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 T/NT of ^{131}I-anti-VEGF in nude mice bearing bladder cancer ($\bar{x} \pm s$)

	Time after injecting ^{131}I-anti-VEGF (h)			
	24	48	96	168
Blood	1.41 ± 0.64	2.61 ± 0.36	3.81 ± 0.26	3.14 ± 0.72
Liver	1.33 ± 0.32	2.65 ± 0.13	3.62 ± 0.27	3.56 ± 0.25
Kidneys	0.85 ± 0.26	1.58 ± 0.20	2.19 ± 0.22	1.76 ± 0.27
Spleen	1.98 ± 0.17	2.990.30	3.75 ± 0.26	2.82 ± 0.49
Lungs	1.82 ± 0.92	3.40 ± 0.23	4.71 ± 0.23	4.57 ± 0.18
Heart	1.60 ± 0.42	2.71 ± 0.39	3.57 ± 0.31	4.34 ± 1.45
Intestine	2.34 ± 1.13	5.22 ± 0.86	7.78 ± 0.66	7.49 ± 2.51
Bladder	1.83 ± 0.34	3.29 ± 0.23	6.44 ± 1.29	4.47 ± 0.37
Muscle	3.47 ± 0.18	4.65 ± 0.23	11.92 ± 1.53	8.75 ± 3.26

表 2 ^{131}I-anti-KDR 在荷瘤小鼠体内 T/NT 值($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 T/NT of ^{131}I-anti-KDR in nude mice bearing bladder cancer ($\bar{x} \pm s$)

	Time after injecting ^{131}I-anti-KDR (h)		
	24	48	96
Blood	1.63 ± 0.23	4.17 ± 0.19	3.22 ± 0.45
Liver	1.32 ± 0.26	4.01 ± 0.22	2.84 ± 0.26
Kidneys	0.80 ± 0.28	2.91 ± 0.31	2.07 ± 0.31
Spleen	1.96 ± 0.27	3.47 ± 0.34	2.49 ± 0.36
Lung	1.86 ± 0.31	3.12 ± 0.17	3.00 ± 0.24
Heart	1.62 ± 0.33	3.75 ± 0.21	3.42 ± 0.25
Intestine	2.11 ± 0.31	5.23 ± 0.21	5.04 ± 0.21
Bladder	2.54 ± 0.34	4.58 ± 0.25	3.84 ± 0.22
Muscle	3.23 ± 0.21	8.88 ± 0.26	6.92 ± 0.37

表 3 ^{125}I-RGD-4CY 在荷瘤裸鼠体内的生物分布(T/NT, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Biodistribution of ^{125}I-RGD-4CY in nude mice bearing cholangiocarcinoma (T/NT, $\bar{x} \pm s$)

	Time after injecting ^{125}I-RGD-4CY (min)				
	10	30	60	120	240
Muscle	11.29 ± 5.3	6.17 ± 2.54	5.50 ± 1.00	5.60 ± 2.05	26.00 ± 7.20
Lungs	2.72 ± 0.92	1.37 ± 0.02	2.54 ± 0.93	4.67 ± 0.91	26.00 ± 8.01
Intestine	15.80 ± 5.30	6.17 ± 1.01	1.65 ± 0.65	1.87 ± 0.33	8.70 ± 2.01
Blood	0.17 ± 0.02	0.40 ± 0.05	0.83 ± 0.17	0.90 ± 0.04	1.53 ± 0.08
Liver	0.42 ± 0.05	1.19 ± 0.04	1.50 ± 0.51	1.40 ± 0.25	1.86 ± 0.15
Kidneys	0.76 ± 0.01	0.27 ± 0.05	0.34 ± 0.08	0.41 ± 0.08	0.46 ± 0.05

2.3 ^{131}I-anti-VEGF 的放射免疫显像

4 h 肿瘤组织有局部明显的放射性浓聚,但不易与含血丰富的组织器官鉴别,48 h 瘤体局部影像逐渐清晰,但周围组织本底较高,96 h 瘤体影像进一步清晰,本底也明显降低,168 h 影像又明显模糊(图 1)。

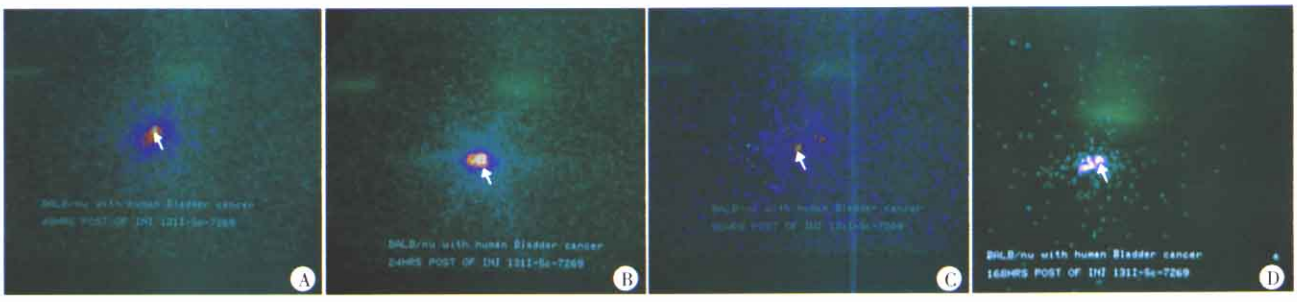
2.4 ^{131}I-anti-KDR 的放射免疫治疗

空白对照组瘤体体积逐渐长大,非标记抗体对照组自第 4 天瘤体体积开始缩小,3 周后瘤体抑制率为(82.5 ± 15)%,实验组自第 2 天瘤体即有明显缩小,明显早于非标记抗体对照组,且 3 周后瘤体抑制率达(96.5 ± 45)%,明显高于非标记抗体对照组($t = 3.74$, $P < 0.05$)。3 周后组织学证实:实验组瘤体组织瘤巢小,松散,可见广泛空洞状坏死灶,部分瘤体组织出现机

化，非标记抗体对照组的瘤巢也较少，排列不紧密，可见空洞状坏死灶，但瘤体组织未见机化，空白对照组瘤巢丰富，排列紧密，少见坏死灶。各组小鼠的肝、脾、肾等重要脏器组织学未见明显异常。

2.5 ^{125}I-RGD-4CY 在荷瘤小鼠体内的分布（放射自显影术）

肝脏、肾脏可见放射性核素浓聚影，但明显低于肿瘤部位，其余正常组织未见明显放射性核素浓聚。



A：4 h；B：48 h；C：96 h；D：168 h

图 1　荷膀胱癌裸鼠的 ^{131}I-anti-VEGF 放射免疫显像

Fig 1　Radioimmunoimaging of ^{131}I - anti-VEGF in nude bearing bladder cancer

3　讨论

近 30 年的研究证实，抗肿瘤血管生成治疗肿瘤显示了良好的临床应用前景，但单独应用时仅能抑制而不能根治实体瘤，如果撤药过早，会导致休眠状态的微小残留病变恢复生长。放射性核素的应用能有效地克服该局限性。

VEGF 是血管生成中最重要的血管生成因子，在肿瘤的血管生成中发挥重要作用，其特异性受体 Flt-1 和 KDR 均特异性表达于肿瘤血管内皮细胞。本研究也显示：在膀胱癌细胞中 VEGF 及 KDR 均呈高表达，而在正常组织中却为极低水平表达，且它们的 ^{131}I 标记物均具有较高的 T/NT，这与已往的研究一致，也为 VEGF 抗体的放免显像及 KDR 抗体的放免治疗奠定了基础。

本研究显示：注射 VEGF 抗体的 ^{131}I 标记物后 96 h，各组织的 T/NT 达到最高，与放射免疫显像结果一致，提示 VEGF 抗体的放免显像的最佳时间为注射药物后 96 h。肾脏的 T/NT 值明显低于其它组织，这可能与实验动物中肾脏表达 VEGF 较多且肾脏血流丰富有关。

膀胱癌细胞及其血管内皮细胞表面均高表达 KDR，当 KDR 抗体的放射性核素标记物进入体内，标记抗体可不必穿透肿瘤组织的血管屏障，直接与肿瘤血管内壁的 KDR 结合，克服了传统 RIT 定位于肿瘤的抗体量低的弱点。KDR 抗体的标记物一方面与 VEGF 竞争结合 KDR，另一方面也通过放射性核素对肿瘤组织及其血管内皮细胞造成辐射损伤，从而对肿瘤的生长起双效抑制作用。本研究表明：实验组与非标记抗体对照组均能明显抑制膀胱癌的生长，但前者作用快且抑制率明显高于后者。组织学观察显示前者导致了肿瘤组织的机化，提示 ^{131}I - anti-KDR 的 RIT 的效果明显优于单纯的 KDR 抗体的治疗效果。

整合素 $\alpha_v\beta_3$ 不仅在多种实体肿瘤细胞表面有高水平的表达[6]，而且在肿瘤组织新生血管内皮细胞均有强烈表达[7]。相反，在成熟血管内皮细胞和绝大多数正常组织器官中，$\alpha_v\beta_3$ 受体表达缺乏或几乎不能被探及[8]。含有 RGD 序列的小分子多肽是整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体拮抗剂，对肿瘤细胞和/或肿瘤新生血管内皮细胞具有高选择性与高亲和力。本实验使用的 RGD-4CY 是一种 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂，由含有两个二硫键的环形九肽组成。研究显示：^{125}I-RGD-4CY 在瘤体内的分布均明显高于正常组织中的分布，且于注射后 2 h 达高峰；放射自显影也提示肿瘤组织对 ^{125}I-RGD-4CY 的摄取明显高于正常组织，表明因肿瘤新生血管内皮细胞强烈表达 $\alpha_v\beta_3$，放射性标记 RGD-4CY 可望成为一有效的肿瘤 $\alpha_v\beta_3$ 受体显像剂。

参考文献：

[1] Saito H, Tsujitani S, Kondo A, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma [J]. Surgery, 1999, 125(2): 195 - 201.

[2] 王　源，程绍钧. 人膀胱癌 T24 细胞及其 SCID 小鼠移植瘤组织中 KDR 的表达[J]. 第三军医大学学报，2002，24(8)：952 - 954.

[3] 李前伟，郑秀海，张广运，等. ^{125}I-RGD-4CY 肿瘤 $\alpha v\beta_3$ 受体显像的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(11)：1340 - 1342.

[4] 李忠俊，程绍钧，王竹筠，等. ^{131}I-抗 VEGF McAb 在荷人膀胱癌裸鼠移植瘤体内分布的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(2)：167 - 169.

[5] 王　源，程绍钧. ^{131}I-抗 KDR McAb 在荷人膀胱癌 SCID 小鼠体内分布实验[J]. 中华核医学杂志，2003，23(3)：135，138.

[6] Max R, Gerritsen R R, Nooijen P T, *et al*. Immunohistochemical analysis of integrin alpha v beta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas[J]. Int J Cancer, 1997, 71(3): 320 - 324.

[7] Stromblad S, Cheresh D A. Integrins. angiogenesis and vascular cell survival[J]. Chem Biol, 1996, 3(11): 881 - 885.

[8] Folkman J. Addressing tumor blood vessels[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(6): 510.

（编辑　栾　嘉）