论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0024-05

基于VEGFR靶点的小分子肿瘤靶向抑制肽的$^{99}Tc^{m}$标记及鉴定

冯世斌[1],李前伟[1],郑 磊[1],邹凌云[2],查 林[1],任 浩[1],黄定德[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院核医学科[1];基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨基于血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor,VEGFR)靶点的小分子肿瘤靶向抑制肽理想的放射性核素$^{99}Tc^{m}$标记方法。**方法** 多肽QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS分别经双功能螯合剂S-acetyl-MAG_3、GA(D)GG、HYNIC修饰后进行放射性核素$^{99}Tc^{m}$标记,HPLC及纸层析法鉴定其标记率及放化纯度,^{3}H-TdR参入实验鉴定其抑制细胞增殖的能力,体外受体竞争结合实验鉴定其受体结合活性。**结果** 以HYNIC为双功能螯合剂,这2条多肽的$^{99}Tc^{m}$标记率分别为(94.13±1.77)%、(93.79±3.53)%,明显高于S-acetyl-MAG_3、GA(D)GG修饰多肽的标记率。经HYNIC修饰后的多肽对肿瘤细胞A549增殖的抑制率约为(32.86±3.36)%、(61.50±4.50)%,与修饰前无明显变化($P>0.05$);多肽标记后仍保持了良好的VEGFR结合活性,室温下放置24 h后,放化纯度仍高达90%左右。**结论** 以HYNIC为双功能螯合剂,以TPPTS为协同配体及还原剂,多肽QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS的$^{99}Tc^{m}$标记率高,且仍具有良好的抑制肿瘤细胞增殖的能力和VEGFR结合活性。

[关键词] 血管内皮生长因子;双功能螯合剂;核素标记;肿瘤显像
[中图法分类号] R394-33; R341; R817 [文献标志码] A

Radionuclide labeling of small molecular inhibitory peptides targeting VEGF receptor

Feng Shibin[1], Li Qianwei[1], Zheng Lei[1], Zou Lingyun[2], Zha Lin[1], Ren Hao[1], Huang Dingde[1] ([1]Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, [2]Department of Microbiology, Laboratory of Microbiological Engineering, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate radionuclide labeling methods of small molecular inhibitory peptide targeting vascular endothelial growth factor receptor (VEGF receptor) of tumor with $^{99}Tc^{m}$. **Methods** After being modified by S-acetyl-MAG_3, GA(D)GG and HYNIC respectively, QKRKRKKSRKKH and RKRKRKKSRYIVLS were labeled with $^{99}Tc^{m}$. Labeling efficiency and radiochemical purity was identified by paper chromatography and HPLC. The inhibitory affect of peptide to tumor cell was testified by ^{3}H-TdR incorporation. Receptor competition binding assay was used to testify the affinity of peptide ligand based on A549 cells. **Results** The labeling efficiency of two peptide modified by three bifunctional chelating agents was about 78%, 40% and 94% respectively. The inhibitory efficiency of HYNIC-QKRKRKKSRKKH and HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS to A549 cells was about (32.86±3.36)% and (61.50±4.50)%, and did not have statistically significant difference with QKRKRKKSRKKH and RKRKRKKSRYIVLS. Meanwhile the $^{99}Tc^{m}$-HYNIC-QKRKRKKSRKKH and $^{99}Tc^{m}$-HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS retained a good stability and binding activity of VEGF receptor in A549 cells. **Conclusion** HYNIC-QKRKRKKSRKKH and HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS have a high labeling efficiency with TPPTS as a reducing agent and collaborative ligand, and the labeled agents retain inhibiting activity and binding activity of receptor to A549 cells.

[**Key words**] vascular endothelial growth factor; bifunctional chelating agent; radionuclide labeling technique; tumor imaging

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30970848) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2009BB5337). Corresponding author: Huang Dingde, Tel:86-23-68765432, E-mail:huangdde@tmmu.edu.cn

肿瘤的生长、侵袭、转移均依赖于血管生成,针对肿瘤血管生成设计高特异性的分子探针或靶向药物为肿瘤诊治研究的重要方向。血管内皮生长因子(vas-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970848);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5337)
[通信作者] 黄定德,电话:(023)68765432, E-mail:huangdde@tmmu.edu.cn

cular endothelial growth factor, VEGF)是促进肿瘤血管生成最主要、最核心的因子,VEGF/VEGFR 与肿瘤的生长与转移密切相关,以其为靶点设计的分子探针不仅可用于肿瘤的靶向显像,而且可以作为分子靶向药物应用于肿瘤的治疗[1-4]。

以 VEGF 的多肽片段 $VEGF_{125-136}$ 为基础,结合生物信息学及体外细胞学实验,本课题组此前筛选到 2 条多肽 QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS。它们与 VEGFR 间的亲和力明显高于 $VEGF_{125-136}$、且可显著地抑制肿瘤细胞的增殖,可能通过包含 VEGFR 在内的多靶点起作用。这 2 条多肽是否具有肿瘤靶向性、能否作为分子探针或靶向治疗药物用于肿瘤的诊治是值得进一步深入研究的课题,而多肽被放射性核素成功标记、标记后仍保持较好的生物学活性是其关键环节。故本研究探讨放射性核素 $^{99}Tc^m$ 标记这 2 条多肽的最佳方法并鉴定,为进一步探讨其作为分子探针或靶向药物用于肿瘤的分子显像或靶向治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 多肽的合成及与双功能螯合剂的偶联

委托上海强耀及北京中科亚光生物技术有限公司采用多肽合成仪,常规固相法合成。在合成过程中分别与 3 种双功能螯合剂偶联,即与 MAG_3 偶联,得 S-acetyl-MAG_3-QKRKRKKSRKKH、S-acetyl-MAG_3-RKRKRKKSRYIVLS;与 GA(D)GG 偶联,得 GA(D)GGQKRKRKKSRKKH、GA(D)GGRKRKRKKSRYIVLS;与 HYNIC 偶联,得 HYNIC-QKRKRKKSRKKH、HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS。偶联后的多肽经 HPLC 纯化,质谱鉴定,纯度 95% 以上。

1.2 偶联前后多肽的生物学活性鉴定

1.2.1 RT-PCR 法检测 VEGFR 在肺腺癌细胞株 A549 中的表达 VEGFR-1 上游引物:5′-CTCGCTATTTGACTCGTGGCTAC-3′、下游引物:5′-GCTTCGGAATGATTATGGTTACA-3′,扩增片段长度为 292 bp;VEGFR-2 上游引物:5′-TCAGCAGGATGGCAAAGACTAC-3′,下游引物:5′-CCGGCTCTTTCGCTTACTGTT-3′,扩增片段长度为 193 bp。扩增后的产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 ^{3}H-TdR 是参入法测定偶联前后的多肽对肿瘤细胞增殖的影响 A549 细胞接种于 96 孔细胞培养板,6 000/孔(3 个平行孔),总体积 200 μl,1640 培养基,含 10% 胎牛血清,常规培养。18 h 后,每个培养孔中分别加入多肽,终浓度为 240 μmol/L,对照孔加入相应体积的生理盐水。再次培养 18 h 后,加入^{3}H-TdR 37 kBq/孔。6 h 后弃上清,200 μl PBS 洗涤 1 次;50 μl 胰酶消化,待细胞变圆后,每孔加入蒸馏水 200 μl,静置 10 min;多头细胞分离器抽滤,并用蒸馏水洗 9 次,次氯酸固定 2 次;玻璃纤维滤纸 80 ℃,40 min 烤干;加入膜片闪烁液进行放射性测量。

1.3 多肽的放射性核素 $^{99}Tc^m$ 标记

1.3.1 S-acetyl-MAG_3-QKRKRKKSRKKH、S-acetyl-MAG_3-RKRKRKKSRYIVLS 的 $^{99}Tc^m$ 标记 参照文献[5]方法进行。多肽 20 μg,标记缓冲液为 0.25 mol/L 的 $NaHCO_3$,0.18 mol/L 氨水,0.125 mol/L 醋酸铵混合液,新鲜淋洗的 $^{99}Tc^mO_4^-$ 放射性活度为 37 MBq,转鳌合剂酒石酸钾钠 437.5 μg,$SnCl_2$ 5 μg(Sigma-Aldrich Co.,美国,临用前用 10 mmol/L HCl 新鲜配制,含 1 μg/μl 抗坏血酸),反应总体积 125 μl,pH = 7.6,充氮密封后 25 ℃反应 30 min。

1.3.2 GA(D)GGQKRKRKKSRKKH、GA(D)GGRKRKRKKSRYIVLS 的 $^{99}Tc^m$ 标记 参照文献[6]方法进行。多肽用 50 mmol/L pH = 4.6 的醋酸缓冲液溶解,浓度为 1 μg/μl。标记时取 20 μl 多肽,分别加入 10 μl $SnCl_2$ 溶液(Sigma-Aldrich Co.,美国,临用前 100 mmol/L 盐酸新鲜配制,1 μg/μl),150 μl 的 Na_3PO_4 缓冲液(pH = 13),$^{99}Tc^mO_4^-$ 淋洗液 185 MBq,总体积 280 μl,充氮密封后,25 ℃,200 r/min 振荡反应 25 min。

1.3.3 HYNIC-QKRKRKKSRKKH、HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS 的 $^{99}Tc^m$ 标记 参照文献[7]方法进行。在 2 ml 细胞冻存管中依次加入 20 μg 多肽,Tricine(Tokyo Chemical Industry Co., LTD,标记 HYNIC-QKRKRKKSRKKH 时为 50 mg,标记 HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS 时为 80 mg),5 mg TPPTS(三磺化三苯基膦,J&K Chemical LTD),100 μl 0.25 mmol/L 琥珀酸缓冲溶液(pH = 5),100 μl $Na^{99}Tc^mO_4$ 185 MBq,总体积 200 μl,充氮密封后 100 ℃反应 25 min,自然冷却至室温。

1.4 标记多肽的鉴定

1.4.1 标记率的鉴定 ①纸层析法:固定相为 Whatmann 3 mm 滤纸,流动相分别为生理盐水、乙醇:氨水:水(2∶1∶5)、丙酮。②HPLC 法:HYPERSIL C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,填料粒径 5 μm),柱温 25 ℃,紫外波长 λ = 220 nm,流动相 A 液为 0.1% 三氟乙酸(TFA),B 液为含 0.1% TFA 的乙腈,待检测物进样量 80 μl,泵流速 1.0 ml/min,洗脱梯度:0 ~ 22 min,0% ~ 80%(B 液)。用试管收集洗脱液,每管 10 滴,γ 免疫计数器测量每管放射性计数,绘制保留时间-放射性曲线。结合 HPLC 洗脱曲线及保留时间-放射性曲线鉴定标记物的组成、计算标记率或放化纯度。

1.4.2 标记多肽体外稳定性鉴定 标记物室温放置 24 h 后测定其放化纯度。

1.4.3 标记多肽的体外受体结合活性鉴定 参照文献[8-9]方法采用体外受体竞争结合实验法。A549 细胞以 2×10^4/孔接种于 24 孔细胞培养板,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养12 h 后进行体外受体竞争性结合实验。每个培养孔中分别加入相应的未标记多肽,HYNIC-QKRKRKKSRKKH 浓度梯度为:0、0.6、1.2、6、30、60 nmol/ml(双复孔),HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS 浓度梯度为 0、0.5、5、10、20、40、80 nmol/ml(双复孔)。4 ℃静置 30 min 后每孔加入相应的标记多肽 25 μl(370 kBq,0.12 nmol/L 或 0.1 nmol/ml),4 ℃孵育 2 h 后弃上清,4℃预冷的 PBS(含 0.1% BSA)清洗 3 次洗去未结合的标记多肽,胰酶消化后收集细胞。γ 放射免疫计数器测量细胞的放射性计数。以未标记多肽浓度为横坐标,放射性计数为纵坐标绘制竞争结合曲线。

1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 多肽放射性核素$^{99}Tc^m$标记及体外稳定性鉴定

经双功能螯合剂HYNIC修饰后的多肽QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS,标记率分别高达(94.13±1.77)%、(93.79±3.53)%,明显高于S-acetyl-MAG_3及GA(D)GG修饰的多肽($P<0.01$,表1),不需纯化即可用于后续研究,故选择HYNIC作为双功能螯合剂修饰目标多肽。HYNIC-QKRKRKKSRKKH、HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS的标记物在室温下放置24 h后,放化纯度仍高达(88.01±1.51)%、(92.58±4.24)%,与0 h比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明标记物在室温条件下稳定性好。

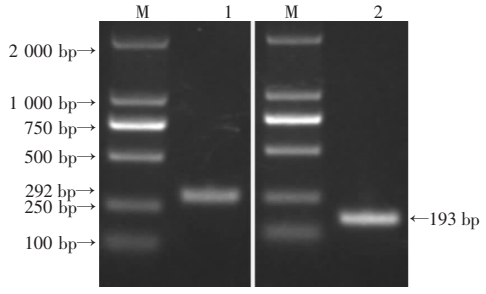
表1 不同的双功能螯合剂对多肽标记率的影响

多肽	双功能螯合剂类型	标记率(%)
QKRKRKKSRKKH	S-acetyl-MAG_3	78.02±1.78
	GA(D)GG	44.23±2.53
	HYNIC	94.13±1.77[a]
RKRKRKKSRYIVLS	S-acetyl-MAG_3	77.52±2.35
	GA(D)GG	35.40±6.70
	HYNIC	93.79±3.53[a]

a: $P<0.01$,与相应的S-acetyl-MAG_3及GA(D)GG组比较

2.2 多肽与HYNIC偶联前后对肿瘤细胞增殖能力的影响

2.2.1 VEGFR在肺腺癌细胞株A549中的表达情况 提取A549细胞的mRNA,逆转录为cDNA,常规PCR后的产物行琼脂糖凝胶电泳,出现292 bp(VEGFR-1)、193 bp(VEGFR-2)条带(图1),说明A549细胞表达VEGFR。



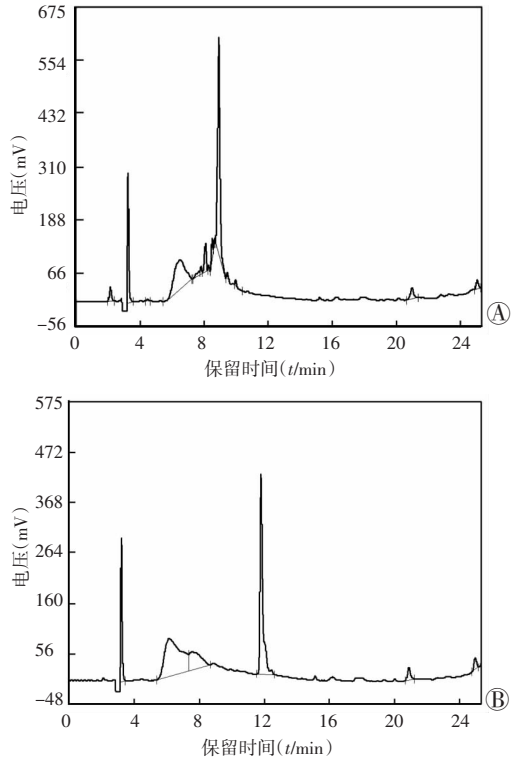
M:标准;1:VEGFR-1;2:VEGFR-2

图1 RT-PCR检测A549细胞中VEGFR-1、VEGFR-2 mRNA的表达

2.2.2 ^{3}H-TdR参入法测定多肽与HYNIC偶联前后对肿瘤细胞增殖的影响 经HYNIC修饰后,多肽QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS对肿瘤细胞增殖的抑制率仍分别高达(32.86±3.36)%、(61.50±4.50)%,与修饰前的抑制率(36.90±3.69)%、(58.17±8.76)%比较无明显差别($P>0.05$),说明多肽经HYNIC修饰后,对肿瘤细胞增殖的抑制能力未受明显影响。

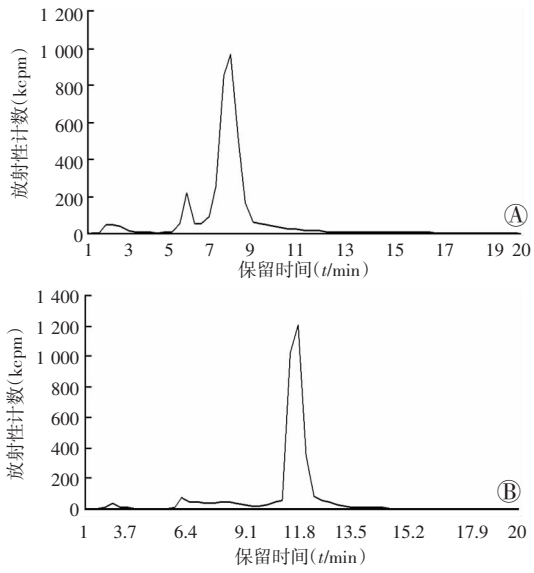
2.3 标记物的HPLC鉴定

未标记多肽HYNIC-QKRKRKKSRKKH、HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS的HPLC保留时间分别约为9 min及12 min(图2)。分别收集它们的标记物在HPLC过程中的洗脱液进行放射性测量,绘制保留时间-放射性计数曲线(图3),主要的放射性计数峰的保留时间分别约为9 min及12 min,没有明显的杂质峰,说明多肽HYNIC-QKRKRKKSRKKH、HYNIC-RKRKRKK-SRYIVLS被$^{99}Tc^m$成功标记。



A:HYNIC-QKRKRKKSRKKH;B:HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS

图2 未标记多肽的HPLC洗脱曲线



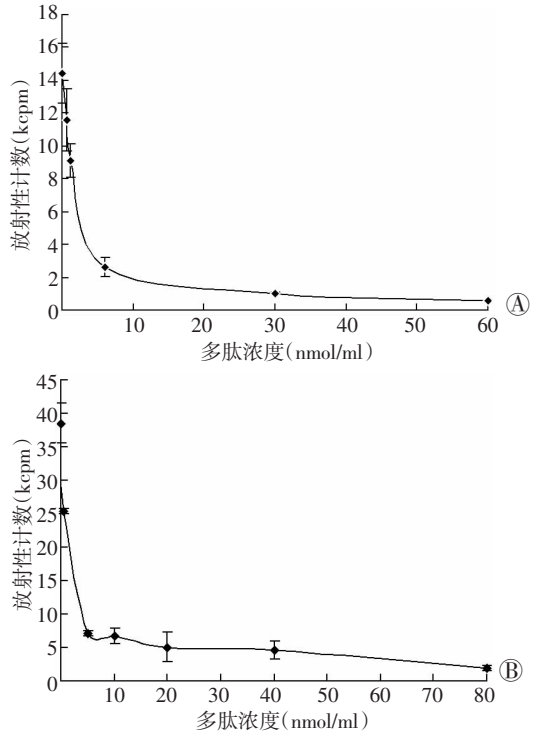
A:$^{99}Tc^m$-HYNIC-QKRKRKKSRKKH;B:$^{99}Tc^m$-HYNIC-RKRKR-KKSRYIVLS

图3 标记物的保留时间-放射性计数曲线

2.4 标记多肽的体外受体结合活性鉴定

HYNIC-QKRKRKKSRKKH、HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS均能明显地抑制相应的标记多肽与A549细胞的特异结合,且抑

制作用呈浓度依赖性(图4),表明这2条多肽经HYNIC修饰并经$^{99}Tc^{m}$标记后仍保持了良好的受体结合活性,能与靶细胞的VEGFR特异结合。



A:标记多肽为$^{99}Tc^{m}$-HYNIC-QKRKRKKSRKKH;B:标记多肽为$^{99}Tc^{m}$-HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS

图4 标记多肽与肺腺癌A549细胞的体外受体竞争结合实验

3 讨论

寻找合适的特异靶点,并针对靶点设计高特异性的分子探针或靶向药物为肿瘤诊治研究的重要方向,理想的靶点应该仅在肿瘤组织高表达,而在其他任何组织不表达,但这样的靶点目前尚未发现,故人们寻找在肿瘤组织中高表达而在其他组织中低表达或不表达(即具有高的瘤/非瘤比值)的物质作为靶点。VEGF是促进肿瘤血管生成最主要、最核心的因子,其受体VEGFR在肿瘤细胞及新生的血管内皮细胞中高表达,在其他细胞中极低表达或不表达(即具有高的瘤/非瘤比值),VEGF/VEGFR是肿瘤血管生成的关键分子,以其为靶点开发的分子探针不仅具有较好的肿瘤靶向性,并且可以作为靶向药物抑制肿瘤的生长[1-4],为肿瘤诊治研究的一个重要靶点。

$VEGF_{125-136}$为VEGF-A外显子6编码的12肽QKRKRKKSRYKS,在体外能与VEGFR特异结合但不激活VEGFR,从而竞争抑制VEGF的促细胞增殖作用[8]。我们既往研究显示$VEGF_{125-136}$具有较好的肿瘤靶向性[9],可望作为靶向载体介导肿瘤的核素靶向显像及治疗,但其本身直接抑制肿瘤细胞增殖的能力较弱。以$VEGF_{125-136}$为基础,结合生物信息学及体外细胞学实验,本课题组此前筛选到2条多肽QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS,它们与VEGFR间的亲和力分别较$VEGF_{125-136}$提高了近6倍和2.5倍,更值得关注的是能显著抑制肿瘤细胞增殖,而且初步研究提示它们可能通过包含VEGFR在内的多靶点起作用。这2条多肽是否具有肿瘤靶向性,能否作为分子探针及靶向治疗药物用于肿瘤的诊治是进一步深入研究的重点,而它们能否被放射性核素成功标记、标记后是否仍保持较好的生物学活性是深入研究的重要基础。

多肽的放射性核素$^{99}Tc^{m}$标记分为直接标记法与间接标记法,直接标记法是将$^{99}Tc^{m}$与多肽直接相连,标记条件比较激烈,对多肽的损伤较大,并且结合不牢固易脱落;间接标记法是通过双功能螯合剂将$^{99}Tc^{m}$与多肽偶联起来,双功能螯合剂犹如一座桥梁,一端连接要标记的多肽,另一端络合$^{99}Tc^{m}$,在普通的条件下即可完成标记,因可避免对多肽的损伤,且对多肽的功能部位影响较小,故目前常选用间接标记。常用的双功能能螯合剂主要有N_2S_2类、缩氨基硫脲类、金属硫蛋白类、肼基烟酰胺类、N_3S类等。

本实验室曾经应用NHS-MAG_3作为双功能螯合剂对多条不同的多肽进行$^{99}Tc^{m}$标记,标记率均达95%以上,远高于文献报道的60% ~70%,不需纯化即可应用[10-11];文献[6]报道经GA(D)GG修饰的多肽标记可在常温下进行,且标记率高,本实验室对多条多肽用GA(D)GG修饰,也获得了95%以上的标记率。故我们首先采用NHS-MAG_3、GA(D)GG作为双功能螯合剂对多肽QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS进行$^{99}Tc^{m}$标记,但遗憾的是标记率仅30% ~78%。另外与这2条多肽序列高度相似的$VEGF_{125-136}$(QKRKRKKSRYKS),当分别用NHS-MAG_3、GA(D)GG为双功能螯合剂时,标记率也仅约78%[5]及53%。提示多肽的$^{99}Tc^{m}$标记除受双功能螯合剂的特性影响之外,多肽序列本身对标记率也有明显的影响,不同的多肽对双功能螯合剂的要求不完全一样。

双功能螯合剂HYNIC由Abrams等于1990年合成,并从20世纪90年代就开始广泛应用于DNA、RNA、多肽、蛋白质以及抗体的标记。参照文献[12]方法,以Tricine、EDDA为协同配体,$SnCl_2$为还原剂,对HYNIC-QKRKRKKSRKKH、HYNIC-RKRKRKKSRYIVLS进行$^{99}Tc^{m}$标记,因存在锝胶体过多等原因,标记率只有约30%,远低于文献报道的95%以上。TPPTS作为一种新型协同配体,它同时具有还原剂的作用,因此在标记过程中不用加入$SnCl_2$,可以防止锝胶体的生成,所以我们选用TPPTS作为协同配体及还原剂,将

这2条多肽的标记率提高到94%以上,不需纯化即可用于后续研究工作;文献[13]及本结果均提示,A549细胞高表达VEGFR,故我们选用该细胞进行细胞增殖及体外受体竞争结合实验,结果提示:多肽QKRKRKKSRKKH、RKRKRKKSRYIVLS经HYNIC修饰后,其抑制肿瘤细胞增殖的生物学活性未受影响;被放射性核素$^{99}Tc^{m}$标记后仍具有良好的VEGFR结合活性。且该标记物体外稳定性良好,为下一步的药代动力学、体内分布、肿瘤靶向性研究、肿瘤的分子显像及靶向治疗研究奠定了良好的实验基础。

参考文献:

[1] 胡国栋, 杨千姣, 景云荣, 等. 以VEGFR为靶点的小分子抗肿瘤药物的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(5): 434-441.

[2] Backer M V, Levashova Z, Patel V, *et al*. Molecular imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature with single-chain VEGF-based probes[J]. Nat Med, 2007, 13(4): 504-509.

[3] Ivy S P, Wick J Y, Kaufman B M. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(10): 569-579.

[4] Hsu A R, Cai W, Veeravagu A, *et al*. Multimodality molecular imaging of glioblastoma growth inhibition with vasculature-targeting fusion toxin VEGF121/rGel[J]. J Nucl Med, 2007, 48(3): 445-454.

[5] 黄定德, 李前伟, 刘广元, 等. $^{99}Tc^{m}$标记多肽VEGF125-136及其生物学分布[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(17): 1660-1662.

[6] Rao P S, Thakur M L, Pallela V, *et al*. $^{99}Tc^{m}$ labeled VIP analog: evaluation for imaging colorectal cancer[J]. Nucl Med Biol, 2001, 28(4): 445-450.

[7] 靳存敬, 史继云, 刘妍, 等. $^{99}Tc^{m}$标记的PEG4/2PEG4修饰的环状RGD二聚体体内外性质的对比[J]. 核化学与放射化学, 2010, 32(5): 287-292.

[8] Jia H, Jezequel S, Lohr M, *et al*. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283(1): 164-173.

[9] Qin Z X, Li Q W, Liu G Y, *et al*. Imaging targeted at tumor with (188)Re-labeled VEGF(189) exon 6-encoded peptide and effects of the transfecting truncated KDR gene in tumor-bearing nude mice[J]. Nucl Med Biol, 2009, 36(5): 535-543.

[10] 杨明福, 刘广元, 李前伟. $^{99}Tc^{m}$-MAG3-K237的制备及其在健康动物体内的药代动力学和分布研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(5): 482-485.

[11] 王玲, 梁志清, 侍立峰, 等. $^{99}Tc^{m}$标记VEGFR-3高亲和融合多肽在荷人卵巢癌裸鼠体内的分布和显像研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2050-2052.

[12] 全欣, 张燕, 贾兵, 等. $^{99}Tc^{m}$-HYNIC-β-Ala-BBN(7-14)NH2的制备及其初步生物分布[J]. 同位素, 2007, 20(2): 77-82.

[13] Liu W, Xu J, Wang M, *et al*. Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2011, 39(5): 1213-1220.

(**收稿**:2011-08-22;**修回**:2011-09-19)

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)01-0028-01

鼻腔NK/T细胞型淋巴瘤活检病理诊断19例

施祝良,黄 洁 (315040 浙江 宁波,解放军第113医院耳鼻咽喉科)

[**关键词**] 非霍奇金淋巴瘤;NK/T细胞型淋巴瘤;临床病理

[**中图法分类号**] R739.62 [**文献标志码**] B

1 资料与方法

2005年6月至2010年6月,我科对26例怀疑鼻腔内NK/T细胞型淋巴瘤患者进行病理活检检查。其中7例反复活检5次以上,并临床观察12个月以上,排除该病;19例确诊为NK/T细胞型淋巴瘤。19例患者中,男性12例,女性7例,年龄21~73岁,平均53.3岁。

对坏死组织堆积患者,由前向后清除部分坏死组织。在肉眼所见"正常组织"与坏死组织交界处用活检钳取2块组织,并使2个创面上下相连,然后在创面处再取1块组织,共3块组织送病理检查。对鼻部长期黏膜溃疡的疑似患者,同法在"正常组织"与溃疡面交界处取活检。对肿瘤已穿透软腭的疑似患者,从口腔入路,清除空透处坏死组织,在边缘切1块大小约3 mm×3 mm×3 mm的组织送病理。如怀疑肿瘤,则进行免疫组化检查;如未发现肿瘤细胞,在原石蜡块中再取3个切片进行病理检查;如仍未发现肿瘤细胞,按上述方法反复病理检查。所有切片用快捷免疫组织化学染色法进行TIA-1、CD56、CD3、CD20、CK染色,TIA-1、CD56、CD3阳性,CD20和CK阴性,是诊断NK/T细胞淋巴瘤的可靠依据[1-2]。

2 结果

所有患者在取活检3次内确诊,其中首次切片报告阳性9例,占47%,首次活检石蜡切块中再次切片后确诊3例,占16%;第2次活检首次确诊4例,占21%,第2次活检再次切片确诊1例,占5%;第3次活检首次切片确诊2例,占11%。

3 讨论

NK/T细胞型淋巴瘤是鼻腔鼻窦最为常见的非霍奇金淋巴

[**通信作者**] 黄 洁,E-mail:15336602662@qq.com

(下转38页)