DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.042
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1340 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1340-03

^{125}I-RGD-4CY肿瘤$\alpha_v\beta_3$受体显像的实验研究

李前伟[1],郑秀海[2],张广运[1],王曙光[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]核医学中心,重庆 400038;[2]全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨放射性核素标记小分子环形多肽RGD-4CY实现肿瘤$\alpha_v\beta_3$受体显像的可行性。方法 采用Iodogen法标记、SEP-PAK C_{18}柱分离纯化制备^{125}I-RGD-4CY。测定^{125}I-RGD-4CY在正常小鼠与荷人QBC_{939}胆管癌裸鼠体内的放射性分布,计算肿瘤(T)与非肿瘤组织(TN)放射性比值。进行^{125}I-RGD-4CY荷瘤动物全身放射自显影。结果 正常小鼠血液放射性清除和肝脏放射性下降迅速,肠道无明显增加,主要通过肾脏排泄,肌肉和肺的放射性120 min时分别仅为肝脏的32%与44%($P<0.05$)。荷瘤裸鼠各时相肿瘤的放射性均高于肌肉、肠道与肺($P<0.05$),240 min时T/NT值分别为26.0、8.7与26.0。放射自显影示肿瘤放射性浓聚影最强,肺、颈部及其它软组织呈低水平分布。结论 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。

关键词:肿瘤;$\alpha_v\beta_3$受体;拮抗剂;^{125}I标记;体内生物分布;放射自显影
中图法分类号:R341.6;R730.44 文献标识码:A

Scintigraphy of tumor $\alpha_v\beta_3$ receptor with ^{125}I-RGD-4CY in nude mice

LI Qian-wei, ZHENG Xiu-hai, ZHANG Guang-yun, WANG Shu-guang (Nuclear Medicine Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possibility of labeled RGD-4CY with radionuclide to perform tumor $\alpha_v\beta_3$ receptor scintigraphy. **Methods** ^{125}I-RGD-4CY was labeled with the Iodogen method and subsequently separated with SEP-PAKC18 column. The biodistribution of ^{125}I-RGD-4CY was detected in the normal mice and nude mice bearing human QBC939 cholangiocarcinoma from 10 to 240 min and the autoradiography was performed in tumor-bearing nude mice. **Results** The radioactivity in the blood and liver declined rapidly in the mice, but did not obviously increase in intestine mainly due to elimination through kidneys. The amount of radioactivity in lungs and muscles was only 32% and 44% respectively at 240 min($P<0.05$). The radioactivity in tumor was higher than that in muscles, intestines and lungs at all phases in tumor-bearing nude mice($P<0.05\sim0.01$). The peak ratio of T/NT occurred at 240 min after injection and were 26.0, 8.7 and 26.0, respectively. Autoradiography showed that the activity of tumor was the highest and there was low level of radioactive distribution in lungs, neck and other soft tissues. **Conclusion** The radionuclide labeled RGD-4CY is a potential tracer for tumor $\alpha_v\beta_3$ receptor scintigraphy.

Key words: tumor; $\alpha_v\beta_3$ receptor; antagonist; ^{125}I labeling; biodistribution; autoradiography

整合素(Integrin)是一类由α亚基和β亚基经非共价键连接而成形的异二聚体跨膜糖蛋白粘附分子。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[1],而且在肿瘤组织新生血管内皮细胞均有强烈表达[2]。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[3]。本研究应用^{125}I标记含有RGD序列的小分子环形多肽Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Tyr-Cys(CDCRGDCYC,简称RGD-4CY),进行了正常小鼠、荷胆管癌裸鼠体内分布测定及荷瘤裸鼠放射自显影显像,旨在探讨该放射性配体作为实体肿瘤$\alpha_v\beta_3$受体显像剂的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人QBC_{939}胆管癌细胞株,为第三军医大学全军肝胆外科研究所王曙光教授建株并提供。

1.1.2 实验动物 昆明纯系小鼠(一级)与BALB/C-nu/nu裸鼠,第三军医大学实验动物中心提供,裸鼠SPF条件下饲养。

1.1.3 主要试剂 环形多肽'N'-CDCRGDCYC-'C'(RGD-4CY)由美国Genemed Synthesis Inc.公司合成并纯化;碘化钠[^{125}I]溶液(无载体、无还原剂,放射性浓度为12.8TBq/L)由中国核动力研究设计院提供;Iodogen(四氯二苯基甘脲)为Sigma公司产品;SEP-PAK C18柱由大连依利特科学仪器有限公司提供。

1.1.4 仪器 AC-211型1/10000电子天枰(德国Sartorius公司);GC911型自动γ免疫计数仪(中佳公司,探测效率70%);SHEL-LAB 2300二氧化碳培养箱(美国SHELDON产品)。

1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤裸鼠模型建立 常规方法培养胆管癌细胞至对数级生长期,无血清RPMI1640洗涤、稀释制备成细胞悬液,台盼蓝染色活细胞数>95%。4~6周龄裸鼠(15~20 g),雄雌不拘,用培养的胆管癌细胞悬液常规方法接种于背部皮下,每只裸鼠接种细胞量约为8×10^6个/0.2 ml,SPF条件下饲养,5周左右肿瘤直径达5 mm时备用。

1.2.2 制备^{125}I-RGD-4CY ①^{125}I标记RGD-4CY:采用Iodogen法标记,在涂布有200μg Iodogen的EP管中,依次加入现配制的50 mmol/L PBS(pH7.4)150μl、含1 mg/ml BSA溶解的RGD-4CY 100μl(100μg)、Na^{125}I溶液15μl(185MBq),室温下间断轻微振荡15 min。②分离纯化:BEP-PAK C_{18}柱分别用甲醇、双蒸水和

作者简介:李前伟(1963-),男,贵州省安顺市人,博士,副主任医师、副教授,主要从事肿瘤分子核医学显像与治疗方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68754422

收稿日期:2002-04-24;修回日期:2002-09-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.1%三氟乙酸(TFA)各 5 ml 依次通过使其活化; 标记混合物上柱, 0.1%TFA 淋洗至放射性计数率最低, 以除去游离 $Na^{125}I$; 60%的乙腈(CH_3CN+0.1%TFA)溶液洗脱, 收集前 1.5 ml 洗脱液。洗脱液经冰冻干燥, 用含 1 mg/ml BSA 的 PBS 溶液适当稀释、分装, −80 ℃冰箱贮存备用。

1.2.3　^{125}I-RGD-4CY 比活度和放射化学纯度的测定　　柱层析前后的反应液与洗脱液分别用 Whatman No.1 色谱滤纸行纸层析, 展开剂系统为正丁醇$_{(v)}$:醋酸$_{(v)}$:水$_{(v)}$= 4:1:5, 测定标记物的标记率、放射化学纯度, 并计算比活度。

1.2.4　体内生物分布实验　　① 标准源配制: 取−80℃贮存的^{125}I-RGD-4CY 原液, 加生理盐水适当稀释作为注射用液。取 0.1 ml(370 KBq)注射液加入 250 ml 容量瓶中, 加水定容至 250 ml, 充分混匀, 取 1 ml 测定放射性计数(cpm), 结果乘以 250 作为注入实验动物体内的参考标准计数。② 动物体内分布实验: 取昆明纯系小鼠 25 只、荷胆管癌裸鼠肿瘤 15 只, 雄雌不拘, 分为 5 组, 每组分别为 5 只与 3 只。经尾静脉注入^{125}I-RGD-4CY 注射液 0.1 ml(370 KBq), 10、30、60、120 和 240 min 断头处死, 收集血液, 取出、肝、肺、肠、肾、肌肉及肿瘤等组织器官, 称重并测定其放射性(cpm), 结果换算为 ID%/g, 计算肿瘤(T)与其他组织(NT)的放射性比值(T/NT)。

1.2.5　放射自显影显像　　取左大腿外侧接种 5 周的荷人胆管癌裸鼠 1 只, 经尾静脉注射^{125}I-RGD-4CY 3.7MBq (0.1 ml)后 1h 去势处死; 在暗室中将动物俯卧紧贴于单面 X 线片上曝光 168 h, 取下曝光胶片经常规显影、定影、清洗、凉干。

1.2.6　统计学处理　　所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用"SPLM"统计程序行 t 检验。

2　结果

2.1　^{125}I-RGD-4Cy 的制备

本实验 Iodogen 法^{125}I 对 RGD-4Cy 的标记率为 58.2%, 比活度为 1.79 TBq/mmol(1.07 MBq/μg), 放射化纯度为 98.6%。

2.2　^{125}I-RGD-4CY 在正常小鼠体内的生物分布

与 10 min 测定值相比, 血液、肝脏及肾脏放射性 60 min 时分别降低了 85%、77%与 76%; 肾脏放射性虽逐渐降低, 但各时相均高于肝脏($P<0.05$); 肠道放射性 30 min 开始下降, 90 min 内减低 64%; 注射 30 min 后肌肉与肺放射性稳定在低水平, 120 min 时分别仅为肝脏的 32%与 44%, 见表 1。

2.3　^{125}I-RGD-4CY 在荷瘤裸鼠体内生物分布

各观察时相肿瘤(T)放射性均高于肌肉、肠道与肺(NT); 血液和肝脏 120 min 时的放射性分别比 10 min 时降低了 93%与 89%; 30 min 后肾脏放射性均高于其他受检组织; 肺放射性 60 min 后迅速下降, 肌肉放射性始终处于极低水平($P<0.05$), 见表 1。注射示踪剂后, 肌肉与肠道 T/NT 比值逐渐降低, 60 min 最低分别为 5.5 与 1.65, 此后较为快速升高, 240 min 时分别达 26.0 与 8.7; 肺 T/NT 最低比值出现在 30 min(1.37), 随后逐渐上升, 240 min 时相高达 26。

2.4　荷瘤裸鼠放射自显影显像

裸鼠整体轮廓清晰, 肿瘤生长处影像呈卵圆形, 边界清楚、放射性分布尚均匀, 未见明显稀疏缺损区, 核素浓聚显著强于周围软组织; 上腹部肝区可见边界不清的条索状核素滞留影; 肺与软组织仅有极低水平放射性分布, 颈部未见核素浓聚, 见图 1。

表 1　^{125}I-RGD-4CY 在荷瘤裸鼠体内的生物分布($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Biodistribution of ^{125}I-RGD-4CY in nude mice bearing QBC$_{939}$($\bar{x}\pm s$)

Tissue	n	ID%·g^{-1}				
		10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Tumor	3	0.79±0.10	0.37±0.06	0.33±0.05	0.28±0.03	0.26±0.05
Muscle	3	0.07±0.01 *	0.06±0.00 *	0.06±0.00 *	0.05±0.00 *	0.01±0.00 *
Lung	3	0.29±0.01 *	0.27±0.02 *	0.13±0.03 *	0.06±0.01 *	0.01±0.01 *
Intestine	3	0.05±0.02 *	0.06±0.01 *	0.20±0.05 *	0.13±0.03 *	0.03±0.01 *
Blood	3	4.66±0.51	0.93±0.05	0.40±0.07	0.31±0.04	0.17±0.08
Liver	3	1.88±0.05	0.31±0.04	0.22±0.01	0.20±0.05	0.14±0.05
Kidney	3	1.04±0.01	1.39±0.01	0.97±0.00	0.69±0.00	0.57±0.00

*: $P<0.05$ *vs* tumor

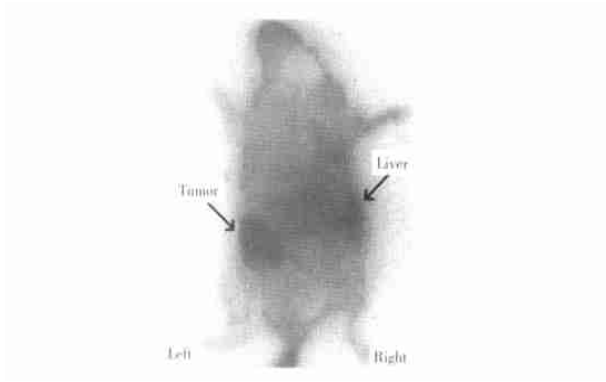


图 1　^{125}I-RGD-4CY 荷人 QBC$_{939}$胆管癌裸鼠全身放射自显影

Fig 1　Whole body autoradiography of ^{125}I-RGD-4CY in nude mice bearing human QBC$_{939}$ cholangiocarcinoma

3　讨论

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[5]。研究发现, 改变此类多肽中 RGD 序列以外的氨基酸组成或引入某些功能基团, 同时进行放射性核素标记, 标记化合物在体内、外同样显示与肿瘤特异结合[5,6], 表明这些修饰并不影响标记配体对 $\alpha_v\beta_3$ 受体的选择性与亲和力。结构-效应关系研究显示, 含有两个二硫键的环形 RGD 多肽对肿瘤新生血管形成的抑制作用最强, 分别是单一二硫键和线性 RGD 多肽的 20 与 200 倍[7]。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。经 Iodogen 法^{125}I 标记并制备的^{125}I-RGD-4CY, 作为 $\alpha_v\beta_3$ 受体的特异性放射性配体, 其比活度与放射化学纯度分别为 1.79 TBq/mmol 与 98.6%, 能满足受体实验的要求。

^{125}I-RGD-4CY 在正常小鼠体内及荷人 QBC$_{939}$胆管癌裸鼠非肿瘤组织的生物分布具有以下特点: ①血液清除迅速; ②主要通过肾脏排泄, 极少部分经胆道系统分泌; ③肝脏放射性下降快, 且各时相均低于血液; ④给药后 30 min 内, 肠道仅显示低水平一过性增加; ⑤肺与肌肉呈持续极低水平放射性分布。这些分布特征表明, 静脉注射放射性标记的 RGD-4CY 后, 组织放射性在较短的时间内即可达低水平, 保证可获得高质量

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的显像图；肝脏的低摄取、低分泌，对肝脏病灶的检出率将优于 Roland 等[5]应用的含单一二硫键的环形五肽 RGDFV，后者相当部分经胆道系统排泄；肠道仅在短时间内出现放射性低水平一过性增加，通过延迟显像的方法，将有助于提高对消化道病灶诊断的敏感性；肺放射显著低于 Sivolapenko 等[8]报道的 RGD 线性十肽，且始终保持在低水平，因此，对肺部肿瘤的诊断将有独特的优势。

^{125}I-RGD-4CY 在荷瘤裸鼠体内部分组织的 T/NT 结果显示：早期肌肉、肺及肠道 T/NT 逐渐下降，在 30～60 min 后有较为明显的升高，240 min 时分别达 26.0、26.0 与 8.7，表明^{125}I-RGD-4CY 能高选择性地浓聚于肿瘤组织内，如此高的 T/NT 比值，能充分满足临床受体显像诊断的要求。上述组织早期 T/NT 下降，可能与肿瘤组织血供丰富、未结合的示踪剂自肿瘤组织血液中的清除较正常组织快有关；观察后期得到高的 T/NT 比值，既反映了肿瘤组织对放射性配体存在选择性的高结合，也反映正常组织仅存在低放射性本底。荷 QBC_{939} 裸鼠全身放射自显影示（图 1），肿瘤浓聚示踪剂非常清楚，影像显著增强；除上腹部肝区有少量放射性滞留影外，胸部、颈部核素分布均为软组织本底水平，与正常小鼠及荷瘤裸鼠生物分布结果相一致；甲状腺区域未见核素浓聚，表明该标记物在体内具有很好的稳定性。上述实验结果为显像实验研究中正常图像的判断、最佳显像时间的确定提供了重要的参考依据。

本研究结果提示，RGD-4CY 对肿瘤 $\alpha_v\beta_3$ 受体具有高度的选择性及亲和力，对其进行适当修饰，并用发射 γ 射线核素标记，是一具有潜在临床应用价值的肿瘤受体显像剂。

参考文献：

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

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

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

[4] Kerr J S, Slee A M, Mousa S A. Small molecule alpha(v) integrin antagonists: novel anticancer agents[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2000, 9(6): 1 271－1 279.

[5] Haubner R, Wester H J, Reuning U, *et al*. Radiolabeled alpha(v) beta3 Integrin Antagonists: A New Class of Tracers for Tumor Targeting[J]. J Nucl Med, 1999, 40(6): 1 061－1 071.

[6] Haubner R, Wester H J, Weber W A, *et al*. Noninvasive imaging of αvβ3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography[J]. Cancer Res, 2001, 61(1): 1 781－1 785.

[7] Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins[J]. Biotechnology, 1995, 13(3): 265－270.

[8] Sivolapenko G B, Skarlos D, Pectasides D, *et al*. Imaging of metastatic melanoma utilising a technetium-99m-labelled RGD-containing synthetic peptide[J]. Eur J Nucl Med, 1998, 25(10): 1 383－1 389.

（编辑 冯崇英）

（上接 1339 页）

为先天性畸形，其他较少见的病因有肛门直肠周围脓肿、炎症性肠病、会阴部放疗、以及产科伤等。直肠阴道瘘的诊断一般容易确立。根据瘘口与肛门缘的距离，可以将直肠阴道瘘分为高位瘘与低位瘘，本组 6 例则均为低位瘘，而且肛门与肛门括约肌均发育基本正常。

直肠阴道瘘的手术方式有多种。对于低位直肠阴道瘘则多数主张采用会阴部切口，从阴唇系带后方到外括约肌后方开一纵行切口，向上方分离直肠和瘘管[1,2]。我们则在会阴体中部作一个凹面向上的弧形切口，锐性分离直肠和阴道之间的间隔，一直分离到瘘口以外 2～3 cm。这一切口对切除瘘口以及瘘口四周的疤痕组织、修复直肠与阴道均十分方便，手术野显露良好。

关于直肠阴道瘘的手术时机问题。由于直肠内有大量细菌滋生，手术前应该进行良好的肠道准备，充分清洗肠道，手术时再严格消毒直肠和阴道，使手术野获得良好的愈合环境，对手术的成功至关重要。对直肠会阴部有明显充血、水肿、或炎症性病变者，应该待炎症被控制，充血、水肿完全消退后才考虑手术；否则，在充血、水肿的组织内手术，解剖时极易出血，也很难找到直肠和阴道之间的正确层面。

恰当的手术方法对成功修复直肠阴道瘘十分重要。我们认为，单纯的瘘口缝合修补法不适用于修复直肠阴道瘘。在这组病人中，有 1 例在院外采用单纯缝合修补术，手术后很快便又复发，应引以为戒。我们体会对先天性直肠阴道瘘，应该采用先分离直肠阴道间隔，并修剪去瘘口周围的疤痕组织，然后用可吸收缝线分别缝合直肠和阴道的缺损，这样可使瘘口获得良好的愈合，增加手术成功的机会。手术时应该充分解剖、游离瘘口周围的直肠和阴道壁，彻底切除瘘口四周的疤痕组织，将直肠、阴道壁的缺损部分在无张力状态下缝合修补。

对于是否要附加结肠造瘘的问题，有作者认为由于修补后的瘘口为非正常新鲜组织，故其愈合过程比结肠直肠吻合术后的吻合口愈合条件要求更高，该作者在报道的 4 例直肠阴道瘘病人中，有 3 例附加横结肠造口[3]。这组病人未行横结肠造口，术后均顺利康复。因此，是否需要结肠造瘘，取决于手术前肠道准备的彻底与否，手术中缝合部位是否有张力等因素。对于中下段的直肠阴道瘘，即使不附加结肠造瘘，也是有可能顺利愈合的。

关键词：直肠阴道瘘；先天性；治疗
中图法分类号：R657.12 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴咸中，黄耀全. 腹部外科实践[M]. 北京：中国医药科技出版社，1990. 626－631.

[2] 张庆荣. 肛管大肠手术图解[M]. 天津：天津科技翻译出版公司，2000. 261－266.

[3] 邱辉忠. 经切开肛门括约肌的直肠阴道瘘修补术[J]. 中国实用外科杂志，1998，18(5)：298.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net