

^{177}Lu -PSMA-I&T 治疗前列腺癌的疗效评价

谢彦¹ 李澄¹ 张露露² 张朋俊² 俞飞² 王峰²

¹东南大学附属中大医院核医学科, 南京 210009; ²南京医科大学附属南京医院、南京市第一医院核医学科 210006

通信作者: 王峰, Email: fengwangcn@njmu.edu.cn

【摘要】 目的 评价 ^{177}Lu -前列腺特异膜抗原(PSMA)-I&T对前列腺癌的治疗效果。方法 将1.85、18.50、185.00、555.00和925.00 MBq/L ^{177}Lu -PSMA-I&T培养液加入LNCaP细胞(200 μl /孔, 5个实验组, 1个对照组, 每组3个复孔)培养24 h后, 检测各组细胞存活率。将3.7 MBq ^{177}Lu -PSMA-I&T培养液加入LNCaP细胞(1个实验组, 1个对照组, 每组3个复孔)培养48 h, 检测细胞周期变化。将3.7、19.5和37.0 MBq ^{177}Lu -PSMA-I&T培养液加入LNCaP细胞(3个实验组, 1个对照组, 每组设3个复孔)培养48 h, 检测细胞凋亡。构建荷瘤裸鼠模型(BALB/c-nu/nu裸鼠, 32只)。 ^{177}Lu -PSMA-I&T治疗后20 d内, 观察荷瘤裸鼠肿瘤体积及体质量变化。治疗后第7天, 对荷瘤裸鼠肿瘤组织行HE染色、细胞增殖核抗原Ki-67蛋白免疫组织荧光染色及原位末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡。治疗后第20天, 对荷瘤裸鼠主要器官行病理分析。采用单因素方差分析、最小显著差异 t 检验、配对 t 检验分析数据的差异。结果 ^{177}Lu -PSMA-I&T干预后, 185.00、555.00和925.00 MBq/L组LNCaP细胞存活率[(57.56±6.35)%、(38.65±3.39)%和(27.95±4.48)%]均较对照组[(100.00±12.35)%]降低($F=78.91$, t 值: 8.312~14.106, 均 $P<0.01$), 185.00 MBq/L组不同时间点(24、48和72 h)的细胞存活率低于对照组(0 h)($F=78.28$, t 值: 6.628~14.384, 均 $P<0.01$); G2/M期的LNCaP细胞占比从(12.36±0.28)%上升至(19.92±0.48)%($t=17.180$, $P<0.01$); 18.5和37.0 MBq组细胞凋亡率明显增高($F=71.86$, t 值: -6.138和-13.050, 均 $P<0.01$)。3.7、14.8、29.6 MBq组与对照组(0 MBq)间荷瘤裸鼠相对肿瘤体积(RTV%)差异均有统计学意义(136.7±7.4、59.2±23.8和47.3±13.8与240.3±3.7; $F=78.20$, t 值: 7.549~13.345, 均 $P<0.01$); 但体质量均无明显变化。3.7、14.8和29.6 MBq组肿瘤组织Ki-67染色细胞阳性率[(14.89±3.80)%、(5.60±1.83)%和(3.46±0.71)%]及TUNEL-异硫氰酸荧光素(TUNEL-FITC)染色阳性率[(1.61±0.30)%、(3.19±0.44)%和(3.54±0.47)%]与对照组[(37.23±3.04)%和(0.74±0.18)%]的差异均有统计学意义($F=103.91$, t 值: 10.429~15.762; $F=38.66$, t 值: -9.312~-2.881, 均 $P<0.01$)。结论 ^{177}Lu -PSMA-I&T对前列腺癌治疗效果好, 无明显治疗不良反应, 有望成为治疗前列腺癌的理想药物。

【关键词】 前列腺肿瘤; 前列腺特异膜抗原; 同位素标记; 镓; 放射疗法; 治疗效果

基金项目: 国家自然科学基金(11805104); 江苏省重点研发专项基金(BE2017612); 江苏省卫健委医学科科研项目(H2019091)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20201105-00400

Efficacy of ^{177}Lu -PSMA-I&T in the treatment of prostate cancer

Xie Yan¹, Li Cheng¹, Zhang Lulu², Zhang Pengjun², Yu Fei², Wang Feng²

¹Department of Nuclear Medicine, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China;

²Department of Nuclear Medicine, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

Corresponding author: Wang Feng, Email: fengwangcn@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the therapeutic effect of ^{177}Lu -prostate specific membrane antigen (PSMA)-I&T on prostate cancer. **Methods** The culture medium of 1.85, 18.50, 185.00, 555.00 and 925.00 MBq/L ^{177}Lu -PSMA-I&T was added into LNCaP cells (200 μl /well, 5 experimental groups and 1 control group, 3 replicates in each group) for 24 h, and the cell viability in each group was detected. The culture medium of 3.7 MBq ^{177}Lu -PSMA-I&T was added into LNCaP cells (1 experimental group, 1 control group, 3 replicates in each group) for 48 h to detect the changes of cell cycle. LNCaP cells (3 experimental groups and 1 control group, 3 replicates in each group) were added into the culture medium of 3.7, 19.5 and 37.0 MBq ^{177}Lu -PSMA-I&T for 48 h to detect cell apoptosis. Tumor-bearing mice models were established (BALB/c-nu/nu nude mice, $n=32$). The changes of tumor volume and body mass of tumor-bearing

mice were observed within 20 d after treatment. On the 7th day after treatment, tumor tissues of tumor-bearing mice were stained with HE staining and fluorescently stained with Ki-67 protein, and apoptosis was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. On the 20th day after treatment, pathological analysis was performed on the main viscera of the tumor-bearing mice. One-way analysis of variance, the least significant difference *t* test and paired *t* test were used to analyze the data. **Results** Compared with the control group ((100.00±12.35)%), the cell survival rates were significantly decreased after ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T intervention in 185.00, 555.00, 925.00 MBq/L groups ((57.56±6.35)%, (38.65±3.39)%, (27.95±4.48)%; *F*=78.91, *t* values: 8.312–14.106, all *P*<0.01). Cell survival rates were significantly reduced in 185.00 MBq/L group at different time points (24, 48 and 72 h; *F*=78.28, *t* values: 6.628–14.384, all *P*<0.01). The proportion of LNCaP cells in G2/M phase was increased from (12.36±0.28)% to (19.92±0.48)% (*t*=17.180, *P*<0.01). The apoptosis rates of cells were significantly increased in 18.5 and 37.0 MBq groups (*F*=71.86, *t* values: -6.138, -13.050, both *P*<0.05). The difference of relative tumor volume (RTV%) was statistically significant among 3.7, 14.8 and 29.6 MBq groups and control group (136.7±7.4, 59.2±23.8, 47.3±13.8 vs 240.3±3.7; *F*=78.20, *t* values: 7.549–13.345, all *P*<0.01). But there was no significant difference in body mass of tumor-bearing mice among groups. Compared with the control group, the positive rates of Ki-67 staining cells ((37.23±3.04)% vs (14.89±3.80)%, (5.60±1.83)%, (3.46±0.71)%) and TUNEL-fluorescein isothiocyanate (TUNEL-FITC) staining ((0.74±0.18)% vs (1.61±0.30)%, (3.19±0.44)%, (3.54±0.47)%) in tumor tissues of 3.7, 14.8 and 29.6 MBq groups were statistically significant (*F*=103.91, *t* values: 10.429–15.762; *F*=38.66, *t* values: from -9.312 to -2.881, all *P*<0.01). **Conclusions** ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T has a good therapeutic effect on prostate cancer, with no obvious therapeutic side effects. Therefore, ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T is expected to be an ideal drug for treating prostate cancer.

【Key words】 Prostatic neoplasms; Prostate-specific membrane antigen; Isotope labeling; Lutetium; Radiotherapy; Treatment outcome

Fund program: National Natural Science Foundation of China (11805104); Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2017612); Medical Research Program of Jiangsu Health Commission (H2019091)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20201105-00400

前列腺癌是老年男性常见的恶性实体瘤^[1],早期前列腺癌 5 年生存率可达 100%,晚期则下降至 30%^[2]。我国前列腺癌患者初诊时多已处于中晚期^[3],临床一线治疗方法主要是雄激素剥夺疗法 (androgen-deprivation therapy, ADT),初期疗效明显,但在 18~24 个月的中位有效期后,10%~20%患者很快进展为转移性去势抵抗性前列腺癌 (metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC)^[4-5]。目前,临床缺乏对 mCRPC 具有明显疗效的特异性靶向药物。

前列腺特异膜抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA) 是一种具有广泛的细胞外结构域的 II 型跨膜糖蛋白受体,介导细胞发挥多种功能。90% 以上的前列腺癌细胞 PSMA 呈高表达,尤其是在低分化、转移及 mCRPC 中,PSMA 的表达明显升高^[6]。¹⁷⁷Lu 发射的 β⁻ 粒子在人体组织中平均射程为 670 μm,非常有利于杀灭肿瘤细胞,而对周围正常组织影响较小。本研究以 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-(谷氨酸)-4,7,10-三乙酸 [1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-(glutaric acid)-4,7,10-triacetic acid, DOTAGA] 为螯合剂,以碘化酪氨酸增强 PSMA-I&T 与 PSMA 结合的亲和性使 PSMA-I&T 更有效地内化入 PSMA 高表达的细胞中^[7-8],并基于此探讨¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 对前列腺癌的治疗效果。

材料与方法

一、实验动物及材料

1. 实验细胞株及动物。人前列腺癌细胞 LNCaP (中国科学院干细胞库); 4~5 周龄雄性 BALB/c-nu/nu 裸鼠 (卡文斯实验动物有限公司,常州) 32 只,体质量 (20±2) g,动物许可证号: SCXK (沪) 2018-0006、SCXK (苏) 2016-0010。实验鼠均饲养于无特殊病原体 (specific-pathogen free, SPF) 级环境中。

2. 主要实验试剂与器材。¹⁷⁷LuCl₃ (德国 ITG 公司), PSMA-I&T (德国慕尼黑工业大学), BD Matrigel 基质胶 (美国 Corning 公司), 兔抗 PSMA 抗体 (英国 Abcam 公司), 羊抗兔 IgG-Alexa Fluor 488 (美国 Jackson Immuno Research 公司), 兔抗细胞增殖核抗原 Ki-67 抗体 (美国 Millipore 公司), 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) 染色试剂盒、原位末端标记 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 法检测试剂盒、MaxVision 试剂盒 (兔/鼠)、HE 染液试剂盒、免疫组织化学笔 (均为南京凯基生物科技发展有限公司产品), microSPECT/CT 仪 (荷兰 MILabs BV 公司), 生物荧光显微镜 (日本 Olympus BX43), DMIL 型倒置显微镜 (德国 Leica 公司), 流

式细胞仪(美国 BD 公司)。

二、实验方法

1. 细胞存活实验。取对数生长期的 LNCaP 细胞以 5×10^3 个/孔接种于多聚赖氨酸 (polylysine, PLL) 包被的 96 孔板内(5 个实验组, 1 个对照组, 每组 3 个复孔), 置于培养箱 (37 °C、体积分数 5% CO₂) 中过夜。用培养液将 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 配制成放射性度浓度分别为 1.85、18.50、185.00、555.00 和 925.00 MBq/L 备用, 实验组分别加入上述 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 溶液 200 μl/孔, 对照组加入培养液 200 μl/孔。置于培养箱中培养 24 h 后, 分别在 0、24、48 和 72 h 用细胞计数-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒检测各组细胞的存活率。

2. 细胞周期变化实验。取对数生长期的 LNCaP 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 PLL 包被的 6 孔板内(1 个实验组, 1 个对照组, 每组 3 个复孔), 置于 CO₂ 培养箱中过夜。将 3.7 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 用培养液稀释至 2 ml 备用。实验组加入 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 稀释液 2 ml/孔, 对照组加入 2 ml/孔细胞培养液。静置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h, 取出培养板, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered solution, PBS) 洗涤、胰酶消化回收细胞, 再用体积分数 70% 乙醇固定, -20 °C 冰箱过夜。取出培养板, 室温离心 5 min (半径 12 cm, 3 000 r/min), PBS 洗涤, 加入碘化丙啶/核糖核酸酶 A (propidium iodide/ribonuclease A, PI/RNaseA) 染色工作液 500 μl/孔, 室温下避光温育 30~60 min, 用流式细胞仪检测细胞周期。

3. 细胞凋亡实验。取对数生长期的 LNCaP 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 PLL 包被的 6 孔板内(3 个实验组, 1 个对照组, 每组 3 个复孔), CO₂ 培养箱中培养过夜。分别将 3.7、18.5 和 37.0 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 用培养液稀释至 2 ml 备用。实验组分别加入上述 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 稀释液 2 ml/孔, 对照组加入 2 ml/孔培养液。置于 CO₂ 培养箱中培养 48 h, 取出培养板, 用 PBS 洗涤, 用不含乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 的胰酶消化回收细胞, PBS 洗涤 2 次。加入结合缓冲液 500 μl/孔悬浮细胞, 再加入膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC) 5 μl/孔混匀, 最后加入碘化丙啶 5 μl/孔混匀, 室温避光反应 5~15 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡数。

4. 构建 LNCaP 荷瘤裸鼠模型。取对数生长期 LNCaP 细胞, 将细胞浓度调整为 1.5×10^{11} /L。按 1:1 体积比混合 LNCaP 细胞悬液和 BD Matrigel 基质

胶, 用注射器抽取适量混合液, 在 32 只裸鼠左侧前肢腋下进行皮下注射 (0.2 ml/只)。将荷瘤裸鼠置于 SPF 级环境中继续饲养 2~3 周, 直至肿瘤最大径为 0.6~0.8 cm。

5. ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 疗效监测。按随机数字表法将 32 只 LNCaP 荷瘤裸鼠分为 3 个治疗组和 1 个对照组 (每组 8 只), 通过尾静脉向治疗组分别注射 3.7、14.8 和 29.6 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 0.1 ml/只, 向对照组注射生理盐水 0.1 ml/只, 48 h 行 microSPECT/CT 显像, 每隔 3 d 观察 1 次荷瘤裸鼠肿瘤体积和体质量变化, 持续 20 d。采用游标卡尺测量荷瘤裸鼠瘤体长径和短径, 肿瘤体积 (mm³) = (长径 × 短径 × 短径)/2。以相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV%) 作为评价疗效主要指标。RTV% = $(V_x/V_0) \times 100$ (V_x : 给药后第 x 天肿瘤体积; V_0 : 给药前肿瘤体积)。

6. 治疗第 7 天肿瘤组织病理分析。共 4 组, 每组 4 只。通过尾静脉向治疗组分别注射 3.7、14.8、29.6 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 0.1 ml/鼠, 向对照组注射生理盐水 0.1 ml/鼠。于给药后第 7 天取肿瘤组织行 HE 染色和肿瘤组织细胞增殖核抗原 Ki-67 蛋白免疫组织荧光染色。另用 TUNEL 试剂盒和 DAPI 染色试剂盒检测细胞凋亡。

7. 治疗第 20 天荷瘤裸鼠主要器官病理分析。共 4 组, 每组 4 只。通过尾静脉向治疗组分别注射 3.7、14.8、29.6 MBq 的 ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 0.1 ml/鼠, 向对照组注射生理盐水 0.1 ml/鼠。于给药后第 20 天断颈处死后取小鼠肝脏、心脏和肾脏组织, 体积分数 10% 福尔马林液固定, 石蜡包埋切片, 风干后用 HE 染色, 显微镜下观察细胞受损情况。

三、统计学处理

采用 IBM SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析, 符合正态分布的定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及最小显著差异 t 检验、配对 t 检验分析数据间的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞存活实验结果。1.85、18.50、185.00、555.00 和 925.00 MBq/L 实验组的细胞存活率分别为 $(96.34 \pm 4.16)\%$ 、 $(93.71 \pm 5.33)\%$ 、 $(57.56 \pm 6.35)\%$ 、 $(38.65 \pm 3.39)\%$ 和 $(27.95 \pm 4.48)\%$, 与对照组比较, 差异有统计学意义 [$(100.00 \pm 12.35)\%$; $F = 78.91, P < 0.05$]; 185.00、555.00 和 925.00 MBq/L 实验组细胞存活率显著低于对照组 (t 值: 8.312~14.106,

均 $P < 0.01$)。 ^{177}Lu -PSMA-I&T 对 LNCaP 细胞的半数抑制放射性浓度为 300.3 MBq/L 。

185.00 MBq/L 组在 0、24、48 和 72 h 的细胞存活率分别为 $(127.59 \pm 6.8)\%$ 、 $(95.31 \pm 2.06)\%$ 、 $(72.63 \pm 7.18)\%$ 和 $(57.56 \pm 6.35)\%$ ，细胞存活率随时间延长呈逐渐下降趋势；且 24、48 和 72 h 的细胞存活率均显著低于对照组 (0 h) ($F = 78.28$, t 值: $6.628 \sim 14.384$, 均 $P < 0.01$)，提示 ^{177}Lu -PSMA-I&T 对 LNCaP 细胞的抑制作用有明显的时间依赖性。

2. 细胞周期变化实验的结果。 ^{177}Lu -PSMA-I&T 干预后, G2/M 期的 LNCaP 细胞占比从 $(12.36 \pm 0.28)\%$ 上升至 $(19.92 \pm 0.48)\%$ ($t = 17.180$, $P < 0.01$)；G0/G1 期的 LNCaP 细胞占比从 $(68.6 \pm 2.82)\%$ 下降至 $(56.35 \pm 5.21)\%$ ，S 期的 LNCaP 细胞占比从 $(19.04 \pm 2.64)\%$ 上升至 $(23.74 \pm 4.73)\%$ ，但差异均无统计学意义 (t 值: 2.631 和 1.101 , 均 $P > 0.05$)。

3. 细胞凋亡实验结果 (图 1)。将细胞早期凋亡率与晚期凋亡率之和作为总细胞凋亡率, 0 (对照组)、3.7、18.5 和 37.0 MBq 组总细胞凋亡率分别为 $(7.27 \pm 0.30)\%$ 、 $(7.93 \pm 0.51)\%$ 、 $(11.73 \pm 0.67)\%$ 和 $(16.74 \pm 1.10)\%$ ($F = 71.86$, $P < 0.01$)。与对照组相比, 18.5 和 37.0 MBq 组细胞总凋亡率明显增高 (t 值: -6.138 和 -13.050 , 均 $P < 0.01$)；但 3.7 MBq 组细胞总凋亡率与对照组差异无统计学意义 ($t = -0.909$, $P > 0.05$)。

4. 荷瘤裸鼠治疗结果。MicroSPECT/CT 显像示 ^{177}Lu -PSMA-I&T 主要浓聚于荷瘤裸鼠肿瘤部位, 且 3.7、14.8 和 29.6 MBq 组肿瘤组织的放射性摄取依次增浓。(1) 肿瘤体积。治疗后第 20 天, 0 (对照组)、3.7、14.8 和 29.6 MBq 组荷瘤裸鼠 RTV% 分别为 240.3 ± 3.7 、 136.7 ± 7.4 、 59.2 ± 23.8 和 47.3 ± 13.8 ，不同剂量组均低于对照组 ($F = 78.20$, t 值: $7.549 \sim 13.345$,

均 $P < 0.01$)。另外, 14.8 MBq、29.6 MBq 组荷瘤裸鼠 RTV% 低于 3.7 MBq 组对应结果 (t 值: 6.919 和 7.390 , 均 $P < 0.01$)，但这 2 组间差异无统计学意义 ($t = 0.985$, $P > 0.05$)。

(2) 荷瘤裸鼠体质量。 ^{177}Lu -PSMA-I&T 治疗后第 4 天, 0 (对照组)、3.7、14.8 和 29.6 MBq 组荷瘤裸鼠体质量分别为 (102.06 ± 4.14) 、 (101.60 ± 1.61) 、 (98.02 ± 1.79) 和 (95.23 ± 3.24) g ($F = 3.714$, $P > 0.05$)。各治疗组荷瘤裸鼠 20 d 内均未见明显体质量下降。

5. 治疗后 7 d 荷瘤裸鼠肿瘤组织病理分析结果 (图 2)。(1) HE 染色结果。对照组肿瘤细胞为多边形, 呈巢状排列; 胞体较大且胞质丰富, 胞核多呈长圆形且深染, 少见核分裂象。3.7 MBq 组和 14.8 MBq 组的肿瘤细胞体积增大, 边界较清晰, 细胞坏死程度轻; 29.6 MBq 组肿瘤细胞发生明显变形, 边界欠清晰, 胞质和胞核染色淡, 结构不清, 细胞坏死严重。与对照组比较, Ki-67 染色阳性的细胞数从 3.7 MBq 组到 29.6 MBq 组呈明显下降趋势, 而 TUNEL-FITC 染色阳性细胞数有少量增加。

(2) Ki-67 蛋白免疫组织荧光染色结果。0、3.7、14.8 和 29.6 MBq 组治疗后肿瘤组织 Ki-67 染色细胞阳性率分别为 $(37.23 \pm 3.04)\%$ 、 $(14.89 \pm 3.80)\%$ 、 $(5.60 \pm 1.83)\%$ 和 $(3.46 \pm 0.71)\%$ ($F = 103.91$, $P < 0.01$)，3 组均低于对照组 (0 MBq; t 值: $10.429 \sim 15.762$, 均 $P < 0.01$)。另外, 14.8 和 29.6 MBq 组的 Ki-67 细胞阳性率均低于 3.7 MBq 组 (t 值: 4.335 和 5.332 , 均 $P < 0.05$)，但这 2 组间差异无统计学意义 ($t = 0.997$, $P > 0.05$)。

(3) TUNEL 法检测细胞凋亡结果。0、3.7、14.8 和 29.6 MBq 组肿瘤组织 TUNEL-FITC 染色细胞阳性率分别为 $(0.74 \pm 0.18)\%$ 、 $(1.61 \pm 0.30)\%$ 、 $(3.19 \pm 0.44)\%$ 和 $(3.54 \pm 0.47)\%$ ($F = 38.66$, $P < 0.01$)；3 组

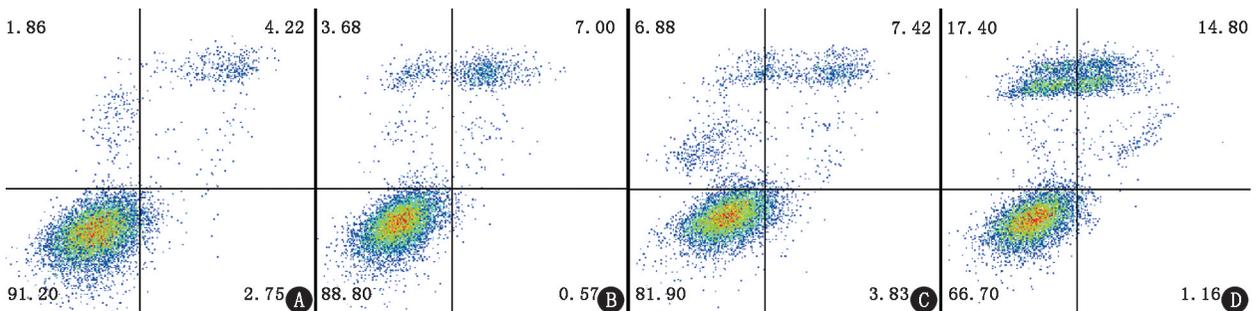


图 1 不同剂量 ^{177}Lu -前列腺特异膜抗原 (PSMA)-I&T 干预后前列腺癌 LNCaP 细胞凋亡分析图。A~D 分别对应 (0、3.7、18.5、37.0 MBq) ^{177}Lu -PSMA-I&T 细胞凋亡率, 与对照组 (0 MBq) 相比, 18.5 和 37.0 MBq 组细胞总凋亡率明显增高 [左上象限为正常率 (%), 左下象限为正常率 (%), 右上象限为早期凋亡率 (%), 右下象限为晚期凋亡率 (%), 细胞早期凋亡率与晚期凋亡率之和为总凋亡率]

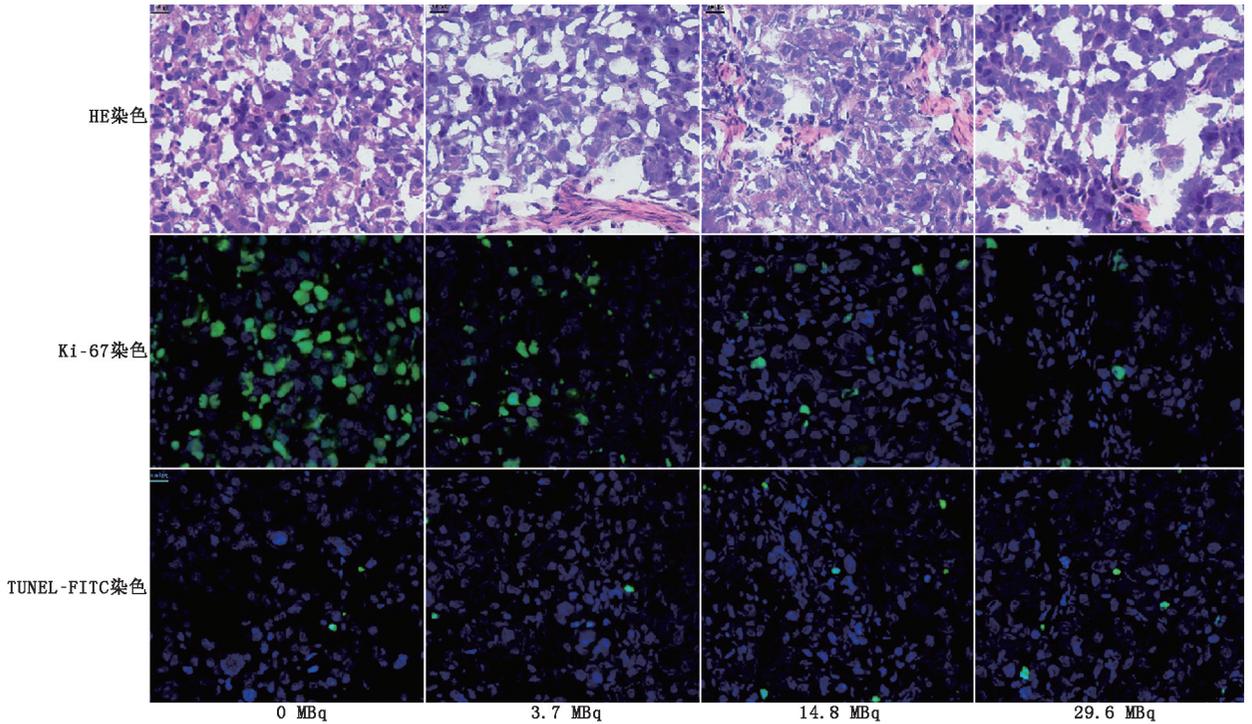


图 2 不同放射性活度的¹⁷⁷Lu-前列腺特异膜抗原(PSMA)-I&T 治疗 LNCaP 荷瘤裸鼠后第 7 天肿瘤组织 HE 染色、细胞增殖核抗原 Ki-67 染色和原位末端标记-异硫氰酸荧光素(TUNEL-FITC)染色(×400)结果。可见从 3.7 MBq 组到 29.6 MBq 组,HE 染色肿瘤细胞坏死程度逐渐加重,Ki-67 染色阳性的细胞逐渐减少,TUNEL-FITC 染色阳性的细胞有少量增加

均高于对照组(0 MBq;*t* 值: -9.312 ~ -2.881, 均 *P* < 0.01)。TUNEL-FITC 染色阳性率存在一定的放射性活度依赖性,与 3.7 MBq 组相比,14.8 和 29.6 MBq 组阳性率明显升高(*t* 值: -5.271 和 -6.431, 均 *P* < 0.01);但这 2 组间差异没有统计学意义(*t* = -1.160, *P* > 0.05)。

6. 治疗后第 20 天荷瘤裸鼠主要器官组织病理分析结果。HE 染色分析结果显示,各治疗组与对照组相比,心脏、肝脏和肾脏组织形态均无明显差异,未见辐射相关脏器损伤。

讨 论

Weineisen 等^[8]在 2015 年首次报道了¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T,侧重于合成标记、PSMA 亲和力、内化动力学及生物分布等研究。本课题组先前成功合成¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T,并证实其生物分布良好且能与 LNCaP 细胞特异性结合^[9]。本研究主要探讨了¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 治疗前列腺癌的效果。结果显示,¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 对 LNCaP 细胞增殖有明显的抑制作用,随着放射性活度和时间的增加,细胞存活率明显降低,提示¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 有很好的抗肿瘤作用。

辐射可诱导前列腺癌细胞凋亡,从而加快细胞死亡^[10]。大剂量辐射常导致有丝分裂凋亡,细胞短

期内由凋亡迅速转为死亡;但低剂量辐射常导致有丝分裂后凋亡,即在有丝分裂后延迟的细胞凋亡和死亡^[11]。在本研究中,细胞凋亡并不十分明显,并未观察到细胞逐步由早期凋亡过渡到晚期凋亡最终死亡的过程,而在不同放射性活度¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 干预后,受损伤细胞均已进入凋亡后期阶段,以晚期凋亡细胞和死亡细胞为主。当干预放射性活度达 18.5 MBq 时,细胞凋亡率明显增加。辐射可引起前列腺癌细胞周期改变^[12-13],本研究观察到 3.7 MBq ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 干预 LNCaP 细胞后,G2/M 期的 LNCaP 细胞占比有所增加。

MicroSPECT/CT 显像示¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 主要浓聚于 LNCaP 荷瘤裸鼠肿瘤组织,滞留时间长,且注射药物的放射性活度越高,浓聚于肿瘤部位的放射性药物越多,提示¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 可精准靶向前列腺癌组织,发挥内照射治疗肿瘤的作用。

¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 治疗后,各治疗组荷瘤裸鼠肿瘤生长均明显受抑,且肿瘤体积变化有明显的放射性活度依赖性。从治疗后第 20 天不同治疗组 RTV% 的分析结果来看,14.8 和 29.6 MBq 组对肿瘤生长的抑制作用均强于 3.7 MBq 组,但 2 组间差异无统计学意义。从治疗第 7 天肿瘤组织切片的病理结果分析,虽然 3.7 和 14.8 MBq 组 HE 染色肿瘤细胞

形态未见明显差异,但细胞表面与增殖相关的 Ki-67 蛋白却已产生不同程度的破坏,Ki-67 染色结果显示 14.8 MBq 组对肿瘤抑制程度明显高于 3.7 MBq 组。TUNEL-FITC 染色结果也表明,14.8 MBq 组促进肿瘤细胞凋亡作用强于 3.7 MBq 组。HE 染色可见 29.6 MBq 组肿瘤细胞坏死严重,表明高放射性活度辐射在治疗早期对肿瘤组织有更强的急性损伤作用。值得注意的是,虽然各组间 TUNEL-FITC 染色阳性率确有差异,但绝对值变化并不明显,而 Ki-67 染色阳性率有大幅下降,这一结果与上述细胞干预实验的结果相符。下一步将研究¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 干预后细胞周期相关蛋白和治疗后荷瘤裸鼠肿瘤细胞周期相关蛋白的免疫组织化学结果。

治疗后第 20 天,不同剂量组荷瘤裸鼠 RTV% 均低于对照组。14.8、29.6 MBq 组荷瘤裸鼠 RTV% 均低于 3.7 MBq 组,但 2 组间差异无统计学意义。这可能与观察时间较短有关,需要进一步研究加以证实。

在治疗过程中,各治疗组荷瘤裸鼠体质量均未见明显下降,表明¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 安全性好,无急性毒性及不良反应。全身重要器官(如心脏和肝脏)治疗后组织病理分析未见明显辐射相关性损伤。肾脏作为放射性药物排泄器官,可能在治疗过程中受辐射最多,但也未见明显辐射相关性肾脏损伤。上述表明,¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 治疗前列腺癌荷瘤裸鼠无明显急慢性毒性及不良反应,且耐受性良好。

综上,¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 在 PSMA 表达阳性的前列腺癌中呈现出良好的治疗效果,且无明显治疗不良反应,耐受性好,有望成为 PSMA 阳性前列腺癌的理想治疗药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69

(5): 363-385. DOI:10.3322/caac.21565.

- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21442.
- [4] Wen S, Niu Y, Lee SO, et al. Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(1): 31-40. DOI:10.1016/j.ctrv.2013.07.008.
- [5] Aloysius H, Hu L. Targeted prodrug approaches for hormone refractory prostate cancer[J]. Med Res Rev, 2015, 35(3): 554-585. DOI:10.1002/med.21333.
- [6] Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: treatment of relapsing, metastatic, and castration-resistant prostate cancer[J]. Eur Urol, 2017, 71(4): 630-642. DOI:10.1016/j.eururo.2016.08.002.
- [7] Wirtz M, Schmidt A, Schottelius M, et al. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* evaluation of urea-based PSMA inhibitors with increased lipophilicity[J]. EJNMMI Res, 2018, 8(1): 84. DOI:10.1186/s13550-018-0440-2.
- [8] Weineisen M, Schottelius M, Simecek J, et al. ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-labeled PSMA I&T: optimization of a PSMA-targeted theranostic concept and first proof-of-concept human studies[J]. J Nucl Med, 2015, 56(8): 1169-1176. DOI:10.2967/jnumed.115.158550.
- [9] 张露露,邱樊,张朋俊,等. ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T 的自动化合成及靶向前列腺癌的实验研究[J].中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39(11): 665-669. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.11.006.
- Zhang LL, Qiu F, Zhang PJ, et al. ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T automated radiolabeling and preclinical prostate cancer targeting research[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 39(11): 665-669. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.11.006.
- [10] Fang Y, DeMarco VG, Nicholl MB. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis[J]. Cancer Sci, 2012, 103(6): 1090-1098. DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02272.x.
- [11] Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'[J]. J Cell Mol Med, 2001, 5(3): 240-253. DOI:10.1111/j.1582-4934.2001.tb00158.x.
- [12] Scott SL, Gumerlock PH, Beckett L, et al. Survival and cell cycle kinetics of human prostate cancer cell lines after single- and multi-fraction exposures to ionizing radiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59(1): 219-227. DOI:10.1016/j.ijrobp.2004.01.027.
- [13] Swanson TA, Krueger SA, Galoforo S, et al. TMPRSS2/ERG fusion gene expression alters chemo- and radio-responsiveness in cell culture models of androgen independent prostate cancer[J]. Prostate, 2011, 71(14): 1548-1558. DOI:10.1002/pros.21371.

(收稿日期:2020-11-05)