

葡萄糖调节蛋白 78 靶向分子探针⁶⁸Ga-DOTA-VAP 用于肿瘤特异性 microPET/CT 显像

孟唤男¹ 赵海涛³ 黄钢² 刘建军³

¹上海中医药大学 201203; ²上海健康医学院 201318; ³上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科 200127

孟唤男和赵海涛对本文有同等贡献

通信作者:刘建军, Email: nuclearj@163.com

【摘要】 目的 评价⁶⁸Ga-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-丝氨酸-天冬酰胺-苏氨酸-精氨酸-缬氨酸-丙氨酸-脯氨酸(SNTRVAP,简称VAP)分子探针在体内外靶向葡萄糖调节蛋白78(GRP78)的特异性以及用于GRP78阳性肿瘤microPET/CT诊断的可行性。方法 将多肽VAP与双功能螯合剂DOTA偶联后进行⁶⁸Ga标记,制备⁶⁸Ga-DOTA-VAP分子探针。用蛋白免疫印迹法验证人脑胶质瘤细胞株U87MG、人胰腺癌细胞株BxPC-3、人胚胎肾细胞株293T细胞中GRP78表达情况,并用阻断实验验证⁶⁸Ga-DOTA-VAP与上述细胞的特异性结合。建立U87MG与BxPC-3荷瘤裸鼠模型,检测⁶⁸Ga-DOTA-VAP在体内的生物学分布;用microPET/CT评价⁶⁸Ga-DOTA-VAP在U87MG与BxPC-3荷瘤裸鼠模型的显像效果。采用两独立样本 t 检验、单因素方差分析和Dunnett t 检验分析数据。结果 ⁶⁸Ga-DOTA-VAP制备简便,标记率、放化纯均大于98%,体外稳定性好,2h后放化纯仍为(98.27±0.22)%。GRP78在U87MG、BxPC-3和293T细胞中均有表达(分别为0.78±0.02、0.53±0.05和0.36±0.03),且在肿瘤细胞中的表达高于正常细胞($F=102.22, P<0.001; t$ 值:0.43、0.18,均 $P<0.01$)。U87MG细胞对⁶⁸Ga-DOTA-VAP的摄取高于BxPC-3细胞(5 154.00±216.70和4 344.00±60.88; $t=3.10, P=0.027$),过量VAP多肽可显著降低U87MG、BxPC-3细胞对探针的摄取(3 324.00±54.14、3 270.00±131.10; t 值:8.19、7.43,均 $P<0.01$)。⁶⁸Ga-DOTA-VAP经尾静脉注射后,在U87MG肿瘤组织的摄取高于BxPC-3肿瘤组织[(1.98±0.20)和(1.30±0.08)每克组织百分注射剂量率(%ID/g); $t=5.48, P=0.005$];注射过量VAP多肽后,肿瘤组织摄取显著降低[(0.99±0.02)和(0.62±0.05)%ID/g; t 值:8.32、12.25,均 $P<0.05$]。MicroPET/CT显像示U87MG、BxPC-3模型鼠肿瘤清晰可见,U87MG模型鼠显像效果更佳;注射过量VAP多肽后,2种模型鼠肿瘤显像均不明显。结论 ⁶⁸Ga-DOTA-VAP分子探针可与GRP78特异性结合,其可反映体内GRP78表达水平并有希望用于GRP78阳性肿瘤的特异性显像诊断。

【关键词】 神经胶质瘤;胰腺肿瘤;膜蛋白质;同位素标记;镓放射性同位素;正电子发射断层显像术;体层摄影术,X线计算机;小鼠,裸

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20201209-00441

⁶⁸Ga-DOTA-VAP molecular probe targeted glucose-regulated protein 78 for specific microPET/CT imaging of tumors

Meng Huannan¹, Zhao Haitao³, Huang Gang², Liu Jianjun³

¹Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; ²Shanghai University of Medicine&Health Sciences, Shanghai 201318, China; ³Department of Nuclear Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Meng Huannan and Zhao Haitao are contributed equally to the article

Corresponding author: Liu Jianjun, Email: nuclearj@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the specificity of ⁶⁸Ga-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)-Ser-Asn-Thr-Arg-Val-Ala-Pro (SNTRVAP, VAP) molecular probe targeting glucose-regulated protein 78 (GRP78) *in vivo* and *in vitro* and the feasibility of ⁶⁸Ga-DOTA-VAP microPET/CT imaging in the diagnosis of GRP78-positive tumors. **Methods** ⁶⁸Ga-DOTA-VAP was prepared by the combination of bifunctional chelating agent DOTA and VAP, followed by ⁶⁸Ga labeling. Western blotting experiment was performed to detect the expression of GRP78 in U87MG, BxPC-3, and 293T cell lines, at the same time, cold polypeptide blocked experiments were conducted to verify the specific binding of ⁶⁸Ga-DOTA-VAP to cells. U87MG and BxPC-3 subcutaneous transplantation tumor mouse models were estab-

lished and the biodistribution of ^{68}Ga -DOTA-VAP were explored *in vivo*. The imaging effect of ^{68}Ga -DOTA-VAP in GRP78-positive tumor-bearing mouse models was evaluated by microPET/CT. Independent-sample *t* test, one-way analysis of variance and Dunnett *t* test were used for data analysis. **Results** ^{68}Ga -DOTA-VAP was easily prepared with labeling yield and radiochemical purity >98%. It had good stability *in vitro*, and its radiochemical purity was still (98.27±0.22)% after 2 h. GRP78 was highly expressed in U87MG and BxPC-3 cells, but lowly expressed in 293T cells ((0.78±0.02), (0.53±0.05) and (0.36±0.03), $F=102.22$, $P<0.001$; *t* values: 0.43, 0.18, both $P<0.01$). The uptake of ^{68}Ga -DOTA-VAP in U87MG cells was higher than that in BxPC-3 cells (5 154.00±216.70 vs 4 344.00±60.88; $t=3.10$, $P=0.027$). Excessive unlabeled VAP polypeptide could significantly reduce the uptake of ^{68}Ga -DOTA-VAP both in U87MG and BxPC-3 cells (3 324.00±54.14, 3 270.00±131.10; *t* values: 8.19, 7.43, both $P<0.01$). The uptake of ^{68}Ga -DOTA-VAP in U87MG tumor tissue was higher than that in BxPC-3 tumor tissue ((1.98±0.20) vs (1.30±0.08) percentage activity of injection dose per gram of tissue (%ID/g); $t=5.48$, $P=0.005$), while co-injection of excessive unlabeled VAP polypeptide significantly reduced the uptake in U87MG and BxPC-3 tumors ((0.99±0.02) and (0.62±0.05) %ID/g; *t* values: 8.32, 12.25, both $P<0.05$). MicroPET/CT imaging showed that ^{68}Ga -DOTA-VAP could clearly display U87MG and BxPC-3 tumors, and U87MG had a better imaging effect. The tumors could not be clearly visualized after co-injection of excessive VAP polypeptide. **Conclusion** ^{68}Ga -DOTA-VAP molecular probe binds with GRP78 specifically and can reflect the expression level of GRP78 *in vivo*, which may be a promising probe for the specific imaging diagnosis of GRP78-positive tumors.

【Key words】 Glioma; Pancreatic neoplasms; Membrane proteins; Isotope labeling; Gallium radioisotopes; Positron-emission tomography; Tomography, X-ray computed; Mice, nude

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20201209-00441

脑胶质瘤、胰腺癌是神经中枢系统肿瘤疾病及消化道肿瘤疾病的常见病种,其发病率与死亡率的比例分别是 2:1 与 1:1^[1]。PET/CT 可以在细胞和分子水平实时、动态、无创地反映体内生理病理变化过程,为恶性肿瘤的显像诊断提供帮助。然而,目前临床上常用的 ^{18}F -FDG 对包括脑胶质瘤和胰腺癌在内的多种肿瘤不敏感。因此,新型特异性肿瘤靶向分子探针的开发十分重要。

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 位于胞内内质网,属于热休克蛋白 70 家族之一,其在真核细胞内主要参与信号传导、内质网应激及未折叠蛋白反应等过程。研究发现 GRP78 在多种恶性肿瘤细胞中呈高表达^[2],沉默 GRP78 或 GRP78 抑制剂应用能够抑制肿瘤细胞增殖、侵袭,增加其对化疗药物的敏感性^[3]。因此,GRP78 是脑胶质瘤与胰腺癌诊疗非常有潜力的重要生物靶标。本研究旨在评价 ^{68}Ga -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, DOTA)-丝氨酸-天冬酰胺-苏氨酸-精氨酸-缬氨酸-丙氨酸-脯氨酸 (Ser-Asn-Thr-Arg-Val-Ala-Pro, SNTRVAP; 简称 VAP) 能够反映体内外 GRP78 表达水平及用于 GRP78 阳性肿瘤特异性显像诊断的可行性。

材料与方法

一、材料

1. 主要试剂与仪器。 ^{68}Ga 由上海交通大学附属仁济医院制备^[4];多肽 VAP 与 DOTA(杭州中肽生

化有限公司);GRP78 抗体、 β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司);高糖 DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司)。Thermo Forma 370 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); γ 计数仪(美国 PerkinElmer 公司);高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪(美国安捷伦公司);microPET/CT(美国 BioScan 公司)。

2. 细胞株与实验动物。人脑胶质瘤细胞株 U87MG、人胰腺癌细胞株 BxPC-3、人胚胎肾细胞株 293T 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。雌性 BALB/c 裸鼠 32 只,4~6 周龄,体质量 16~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005,无特殊病原体环境饲养。本研究动物实验遵循上海中医药大学实验动物管理和使用的相关规定。

二、方法

1. ^{68}Ga -DOTA-VAP 的合成及放射性核素标记。合成与标记方法参照文献[5],将多肽 VAP 与螯合剂 DOTA 加入 2 ml PBS 中,室温进行缩合反应 2 h,将得到的混合物注入 HPLC 进行纯化,冻干收集产品 DOTA-VAP。用 0.1 mol/L 盐酸淋洗 ^{68}Ge - ^{68}Ga 发生器,取放射性浓度最高的 2 ml 洗脱液进行反应,向其中加入 20 μg DOTA-VAP 和 1 mol/L 醋酸钠溶液,调节反应液 pH 值为 4,100 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 15~20 min,用 0.22 μm 过滤器纯化备用。

2. ^{68}Ga -DOTA-VAP 的质量控制及稳定性检测。

使用 HPLC 仪进行分析:流动相 A 为含体积分数 0.05% 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 的去离子水,流动相 B 为含体积分数 0.05% TFA 的乙腈,对样品进行梯度洗脱 30 min,流速 1.0 ml/min。淋洗梯度设定为起始 95% 流动相 A 和 5% 流动相 B,5 min 时保持起始梯度不变,15 min 时改变为 50% 流动相 A 和 50% 流动相 B,20 min 时回到基线梯度,通过峰面积计算标记率和放化纯。取 3.7 kBq ^{68}Ga -DOTA-VAP 样品加入到 500 μl FBS 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h,分别在 0、0.5、1 和 2 h 取样进行放射性 HPLC 分析,计算样品的放化纯。

3. 计算机模拟分子对接实验。从蛋白数据库中获取 GRP78 三维结构,根据空间结构互补和能量最小化原则在 PyMOL 软件中进行加氢和去除水分子调整蛋白晶体结构;从 ChemDraw 化学数据库绘制多肽 VAP 的结构,最后运用 AutoDock 软件进行分子对接,对复合物吉布斯自由能进行评价。

4. 细胞培养与动物模型建立。U87MG、BxPC-3、293T 细胞用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 或 RPMI-1640 培养基培养,并于 37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数 5% 的 CO_2 培养箱中培养传代。经对数生长期后,收集 5×10^6 个肿瘤细胞接种于每只裸鼠右侧腋下,建立 U87MG、BxPC-3 荷瘤裸鼠模型;待肿瘤长至 100 ~ 300 mm^3 时进行生物分布及显像实验。

5. 蛋白免疫印迹实验。收集 U87MG、BxPC-3 与 293T 细胞,加入裂解液提取蛋白上清液。加入 5 \times loading 蛋白还原性缓冲液,煮沸样品 100 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 制备蛋白样品;取各样品等量蛋白 20 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、封闭后温育一抗 GRP78 抗体(1:1 000 稀释)、 β -actin (1:10 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜;加入二抗(1:10 000 稀释)室温温育 1 h,清洗后进行化学发光自显影。

6. 细胞摄取与阻断实验。取对数生长期肿瘤细胞铺于 24 孔板,每孔 10^5 个细胞,分为 4 组,每组 4 个复孔,分别为 U87MG 实验组,U87MG 阻断组,BxPC-3 实验组,BxPC-3 阻断组。次日,弃培养液,实验组加入 100 μl 0.74 kBq ^{68}Ga -DOTA-VAP 溶液,阻断组同时还加入 20 μg VAP 多肽,置于细胞培养箱中温育 1 h,PBS 溶液清洗 3 次,充分洗去未结合的探针;1 mol/L NaOH 溶液裂解细胞,收集细胞裂解液, γ 计数器测定每管放射性活度。

7. 生物分布实验。U87MG 与 BxPC-3 荷瘤裸鼠各 8 只,按随机数字表法分为 4 组(每组 4 只),分组方法同细胞摄取实验,实验组每只裸鼠经尾静脉注

射 100 μl 0.37 MBq ^{68}Ga -DOTA-VAP;阻断组在实验组的基础上还经尾静脉注射 500 μg VAP 多肽;0.5 h 后脱颈处死裸鼠,取血液、心、肝、脾、肺、肾、肠、胃、股骨、肌肉、脑和肿瘤组织器官称重并测定其放射性,计算每克组织百分注射剂量率(percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

8. MicroPET/CT 显像。分组方法同生物分布实验;实验组经尾静脉注射 100 μl 7.4 MBq ^{68}Ga -DOTA-VAP;阻断组同体内生物分布实验;0.5 h 后将裸鼠放入含体积分数 2% 异氟烷气体中麻醉,然后进行 microPET/CT 显像。

9. 统计学处理。采用 Graphpad Prism 7 软件分析数据,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 探针的一般特性。DOTA-VAP 经 ^{68}Ga 标记,得到 ^{68}Ga -DOTA-VAP(图 1A, 1B),经衰变校正计算标记率为 $(98.73 \pm 0.15)\%$,放化纯为 $(98.83 \pm 0.33)\%$ 。 ^{68}Ga -DOTA-VAP 在体外 FBS 缓冲液中 2 h 保持稳定,放化纯为 $(98.27 \pm 0.22)\%$ 。计算机模拟分子对接实验示多肽 VAP 与靶分子蛋白 GRP78 结合在一起(图 1C)。

2. 细胞实验结果。3 种细胞株均有 GRP78 表达(U87MG: 0.78 ± 0.02 , BxPC-3: 0.53 ± 0.05 , 293T: 0.36 ± 0.03),且在 U87MG、BxPC-3 肿瘤细胞中的表达高于正常 293T 细胞,差异具有统计学意义($F = 102.22, P < 0.001$; t 值: 0.43, 0.18, 均 $P < 0.01$)。2 种肿瘤细胞均能摄取 ^{68}Ga -DOTA-VAP,且 U87MG 细胞摄取值($5\ 154.00 \pm 216.70$)高于 BxPC-3 细胞($4\ 344.00 \pm 60.88$; $t = 3.10, P = 0.027$);阻断后,2 种肿瘤细胞摄取值均明显下降(U87MG: $3\ 324.00 \pm 54.14$, BxPC-3: $3\ 270.00 \pm 131.10$; t 值: 8.19、7.43, 均 $P < 0.01$)。

3. 生物学分布结果(表 1)。 ^{68}Ga -DOTA-VAP 在肝中摄取最高,其他正常组织器官摄取相对较低。U87MG 肿瘤组织摄取值明显高于 BxPC-3 肿瘤组织摄取值[(1.98 ± 0.20) 和 (1.30 ± 0.08) %ID/g; $t = 5.48, P = 0.005$]。2 组肿瘤模型鼠被 VAP 阻断后,肿瘤组织摄取值均显著降低[(0.99 ± 0.02) 和 (0.62 ± 0.05) %ID/g; t 值: 8.32、12.25, 均 $P < 0.05$]。

4. MicroPET/CT 显像结果(图 2)。2 种肿瘤荷瘤裸鼠的实验组均可见肿瘤处有放射性探针摄取,且

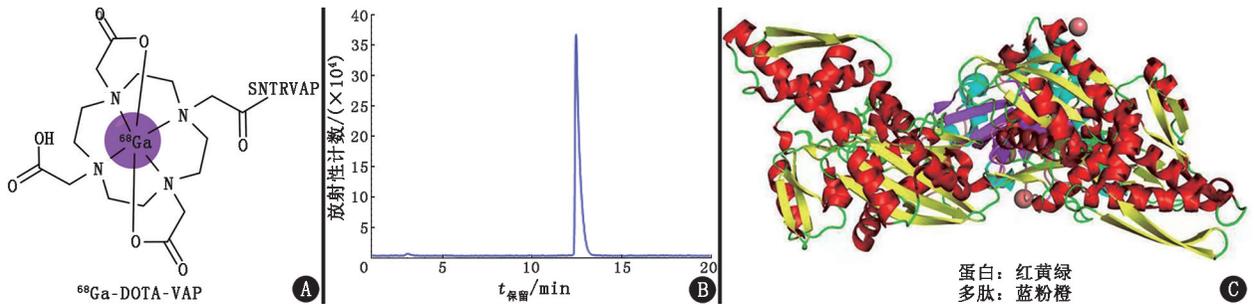


图 1 ^{68}Ga -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)-丝氨酸-天冬酰胺-苏氨酸-精氨酸-缬氨酸-丙氨酸-脯氨酸 (SNTRVAP, 简称 VAP) 的结构示意图(A)、放射性高效液相色谱分析图(B)以及计算机模拟多肽 VAP 与葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 分子对接图(C)

U87MG 模型鼠肿瘤显像更清晰(图 2A, 2C)。2 组荷瘤裸鼠被 VAP 阻断后, 显像剂的放射性信号大部分被阻滞(图 2B, 2D), 肿瘤摄取不明显。2 种肿瘤模型全身显像结果与生物分布结果相似, 除了肝以外, 在大多数正常器官中均无法检测到显像剂。

表 1 ^{68}Ga -DOTA-VAP 在肿瘤模型鼠体内的生物分布 (%ID/g; $\bar{x} \pm s$)

器官或组织	U87MG 实验组	U87MG 阻断组	BxPC-3 实验组	BxPC-3 阻断组
血液	3.68±1.23	1.95±0.32	1.49±0.50	1.02±0.09
心脏	0.99±0.33	0.69±0.05	0.72±0.53	0.62±0.07
肝	18.56±1.60	13.97±3.33	14.91±4.24	9.15±2.35
脾	3.86±2.41	1.68±0.21	4.67±1.21	4.12±1.20
肺	3.05±0.94	2.23±0.64	2.97±0.59	2.63±0.99
肾	4.98±1.75	3.70±0.70	3.27±1.73	2.83±0.77
肠道	1.42±0.53	1.17±0.27	0.59±0.26	1.23±0.84
胃	0.85±0.47	1.22±0.22	0.77±0.39	0.69±0.07
股骨	1.55±0.18	1.65±0.08	0.95±0.43	1.12±0.51
肌肉	1.12±0.52	0.91±0.42	0.63±0.40	0.62±0.17
脑	0.68±0.28	0.67±0.45	0.52±0.25	0.39±0.07
肿瘤	1.98±0.20	0.99±0.02	1.30±0.08	0.62±0.05

注: 每组裸鼠均为 4 只; 实验组裸鼠经尾静脉注射 100 μl 0.37 MBq ^{68}Ga -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)-丝氨酸-天冬酰胺-苏氨酸-精氨酸-缬氨酸-丙氨酸-脯氨酸 (SNTRVAP, 简称 VAP), 阻断组裸鼠在实验组的基础上同时还经尾静脉注射 VAP 多肽 500 μg ; %ID/g 为每克组织百分注射剂量率

讨 论

与 ^{18}F 、 ^{11}C 等非金属核素标记多肽等生物小分子相比, ^{68}Ga 标记方法简便、条件温和、成本低廉、适合推广^[6]。目前 ^{68}Ga 标记显像剂中应用最成功的是 ^{68}Ga -前列腺特异膜抗原和 ^{68}Ga -DOTA-D-苯丙氨酸 1-酪氨酸 3-苏氨酸 8-奥曲肽, 临床上用于甲状腺癌、前列腺癌、神经内分泌肿瘤等恶性肿瘤的诊断^[7-9]。本研究成功标记了 ^{68}Ga -DOTA-VAP 探针, 具有较高的标记率和放化纯, 并在体外具有良好的稳定性, 无需纯化可直接用于后续实验研究。

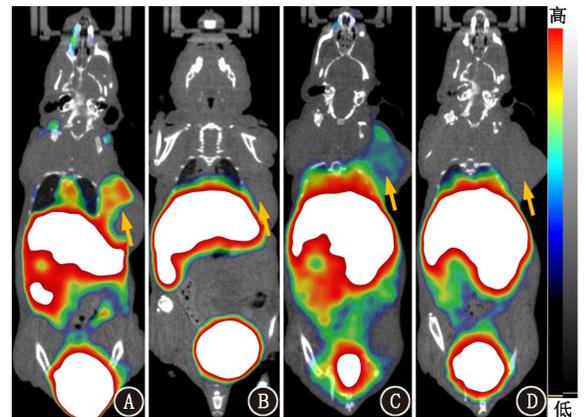


图 2 ^{68}Ga -DOTA-VAP 在不同移植瘤动物模型中的 microPET/CT 显像图(箭头示肿瘤)。A. 人脑胶质瘤细胞株 U87MG 荷瘤裸鼠实验组; B. U87MG 荷瘤裸鼠阻断组; C. 人胰腺癌细胞株 BxPC-3 荷瘤裸鼠实验组; D. BxPC-3 荷瘤裸鼠阻断组。实验组裸鼠经尾静脉注射 100 μl 7.4 MBq ^{68}Ga -DOTA-VAP; 阻断组裸鼠在实验组的基础上还经尾静脉注射 VAP 多肽 500 μg

GRP78 在人脑、肾和心脏等正常器官组织中低表达, 在乳腺癌、肝癌、前列腺癌等肿瘤中高表达^[10]。本研究中, 3 种细胞株均有 GRP78 表达, 且在肿瘤细胞中的表达高于正常细胞, 与文献报道一致。近几年以 GRP78 为生物靶标的放射性核素标记的显像分子探针研究颇多。Wang 等^[11]利用 ^{64}Cu 标记单克隆抗体 159, 通过靶向肿瘤过表达 GRP78 对胰腺癌进行 PET 显像。Cheng 等^[12]用 ^{111}In 标记多肽[靶向 GRP78 的色氨酸-异亮氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸-色氨酸-异亮氨酸-谷氨酰胺-亮氨酸 (Trp-Ile-Phe-Pro-Trp-Ile-Gln-Leu, WIFPWQL; 简称 W 肽)] 偶联微球颗粒对胃癌小鼠移植瘤进行显像。Wang 等^[13]用 ^{188}Re 标记 GRP78 靶向多肽[精氨酸-亮氨酸-亮氨酸-天冬氨酸-苏氨酸-天冬氨酸-精氨酸-脯氨酸-亮氨酸-亮氨酸-脯氨酸-酪氨酸 (Arg-Leu-Leu-Asp-Thr-Asn-Arg-Pro-Leu-Leu-Pro-Tyr, RLLDTNRPLLPY; 简称 R 肽)] 偶联的脂质体对乳腺癌显像和靶向治疗。临床前研究已充分证明 GRP78 可以作为胰腺癌等肿瘤显像

诊断或靶向治疗的生物靶标,但也存在着多肽与靶点亲和力低、易解离、靶本比低等问题。Mandelin 等^[14]利用体内噬菌体技术筛选出了一条新的 GRP78 靶向多肽 VAP。前期研究证实 VAP 是一种肿瘤归巢肽,其在体外可特异性结合到 GRP78 高表达肿瘤细胞表面并被内化,具有特异性高、免疫原性低、安全性高,已成为肿瘤靶向分子探针的良好载体^[15]。本研究通过计算机模拟分子对接技术,预测二者可对接,且在立体空间结构上可在蛋白残基处相互结合,再次说明 VAP 可能是 GRP78 的拮抗剂,两者亲和力较强。

在体外细胞与体内生物分布实验中,本研究初步证实⁶⁸Ga-DOTA-VAP 在 GRP78 表达阳性的 U87MG 与 BXPC-3 肿瘤组织或细胞中均能摄取放射性示踪剂,并且通过共同注射过量的多肽均可显著抑制示踪剂的摄取,这意味着 GRP78 特异性介导了 GRP78 表达阳性肿瘤中放射性示踪剂的摄取。同时 mircoPET/CT 显像与生物分布结果一致,再次验证该探针能靶向 GRP78。在体内生物分布实验中可观察到肝、肾摄取明显,这主要与该探针经肝代谢、肾排泄相关。本研究与既往 GRP78 受体显像相比较,⁶⁸Ga-DOTA-VAP 可较早使肿瘤显像,血液清除快,将来可使患者接受更低的辐射剂量,更安全有效。

上述研究结果证实⁶⁸Ga-DOTA-VAP 在体内外特异性靶向 GRP78 高表达的细胞与肿瘤,可以反映体内 GRP78 表达水平,有望用于 GRP78 阳性肿瘤的特异性显像诊断。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 孟唤男、赵海涛:研究实施、统计分析、论文撰写;黄钢:研究指导;刘建军:论文修改、经费支持

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] Suyama K, Watanabe M, Sakabe K, et al. GRP78 suppresses lipid peroxidation and promotes cellular antioxidant levels in glial cells following hydrogen peroxide exposure [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86951. DOI:10.1371/journal.pone.0086951.
- [3] Du T, Li H, Fan Y, et al. The deubiquitylase OTUD3 stabilizes GRP78 and promotes lung tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2914. DOI:10.1038/s41467-019-10824-7.
- [4] 王一宁,陈若华,陈虞梅,等.⁶⁸Ga-PSMA-11 PET/CT 与¹⁸F-FDG PET/CT 诊断前列腺癌生化复发的对比研究[J].中华核医学与分子影像杂志, 2020, 40(8): 470-474. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200201-00032.

Wang YN, Chen RH, Chen YM, et al. Comparison of ⁶⁸Ga-PSMA

PET/CT and ¹⁸F-FDG PET/CT in the diagnosis of biochemical recurrence of prostate cancer[J].Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40(8): 470-474. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20200201-00032.

- [5] Zhao H, Meng H, Wen J, et al. Noninvasive classification of human triple negative breast cancer by pet imaging with GRP78-targeted molecular probe [⁶⁸Ga] DOTA-VAP [J]. Mol Imaging Biol, 2020, 22(3): 772-779. DOI:10.1007/s11307-019-01416-4.
- [6] 李方.⁶⁸Ga 标记显像剂的发展:核医学的进步与契机[J].中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(3): 129-131. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.03.001.
- [7] Li F. ⁶⁸Ga-radiopharmaceuticals development: advances and opportunities of nuclear medicine [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(3): 129-131. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.03.001.
- [7] Krebs S, O'Donoghue JA, Biegel E, et al. Comparison of ⁶⁸Ga-DOTA-JR11 PET/CT with dosimetric ¹⁷⁷Lu-satoreotide tetraxetan (¹⁷⁷Lu-DOTA-JR11) SPECT/CT in patients with metastatic neuroendocrine tumors undergoing peptide receptor radionuclide therapy [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 47(13): 3047-3057. DOI:10.1007/s00259-020-04832-9.
- [8] Luiting HB, van Leeuwen PJ, Busstra MB, et al. Use of gallium-68 prostate-specific membrane antigen positron-emission tomography for detecting lymph node metastases in primary and recurrent prostate cancer and location of recurrence after radical prostatectomy: an overview of the current literature[J]. BJU Int, 2020, 125(2): 206-214. DOI:10.1111/bju.14944.
- [9] 王玲,胡桂兰,乔真,等.神经内分泌肿瘤转移灶 PET/CT 生长抑素受体显像特点分析[J].中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(3): 132-136. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.03.003.
- [9] Wang L, Hu GL, Qiao Z, et al. Characteristics of neuroendocrine neoplasm metastasis in somatostatin receptor PET/CT imaging: a retrospective analysis[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(3): 132-136. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.03.003.
- [10] Shevtsov M, Balogi Z, Khachatryan W, et al. Membrane-associated heat shock proteins in oncology: from basic research to new therapeutic targets [J]. Cells, 2020, 9(5): 1263. DOI:10.3390/cells9051263.
- [11] Wang H, Li D, Liu S, et al. Small-animal PET imaging of pancreatic cancer xenografts using a ⁶⁴Cu-labeled monoclonal antibody, MAb159[J]. J Nucl Med, 2015, 56(6): 908-913. DOI:10.2967/jnumed.115.155812.
- [12] Cheng CC, Huang CF, Ho AS, et al. Novel targeted nuclear imaging agent for gastric cancer diagnosis: glucose-regulated protein 78 binding peptide-guided ¹¹¹In-labeled polymeric micelles[J]. Int J Nanomedicine, 2013, 8: 1385-1391. DOI:10.2147/IJN.S42003.
- [13] Wang SH, Lee AC, Chen IJ, et al. Structure-based optimization of GRP78-binding peptides that enhances efficacy in cancer imaging and therapy[J]. Biomaterials, 2016, 94: 31-44. DOI:10.1016/j.biomaterials.2016.03.050.
- [14] Mandelin J, Cardó-Vila M, Driessen WH, et al. Selection and identification of ligand peptides targeting a model of castrate-resistant osteogenic prostate cancer and their receptors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(12): 3776-3781. DOI:10.1073/pnas.1500128112.
- [15] Ran D, Mao J, Shen Q, et al. GRP78 enabled micelle-based glioma targeted drug delivery [J]. J Control Release, 2017, 255: 120-131. DOI:10.1016/j.jconrel.2017.03.037.

(收稿日期:2020-12-09)