

# $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -3PRGD<sub>2</sub>对类风湿关节炎新生血管靶向受体显像的实验研究

苏云龙 王雪梅

内蒙古医科大学附属医院核医学科、内蒙古自治区分子影像学重点实验室, 呼和浩特 010050

苏云龙现在鄂尔多斯市中心医院影像科 017000

通信作者: 王雪梅, Email: wangxuemei201010@163.com

**【摘要】 目的** 探讨 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -联肼尼克酰胺-3 聚乙二醇-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸环肽二聚体(3PRGD<sub>2</sub>)对类风湿关节炎(RA)早期诊断的可行性。**方法** 取 60 只雌性 Wistar 大鼠,分为空白对照组 10 只(注射生理盐水 0.3 ml/只)、胶原诱导性关节炎(CIA)组 50 只(注射Ⅱ型胶原乳剂 0.3 ml/只)。2 组均在造模前及造模后 25 和 45 d 行 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -3PRGD<sub>2</sub>平面显像,测量并分析造模成功的 CIA 组大鼠在造模前后病变关节与纵隔的靶/非靶比值(T/NT)变化情况,并与同期空白对照组进行比较;另行病理学检测。采用重复测量方差分析和两独立样本 *t* 检验分析数据。**结果** CIA 组 32 只大鼠造模成功,显像示病变关节有明显的滑膜炎及滑膜增厚特征,并有血管翳形成。32 只 CIA 组大鼠造模前及造模后 25 和 45 d 病变关节部位 T/NT 分别为 0.158±0.023、0.402±0.144 和 0.705±0.163 ( $F=286.924$ ,  $P<0.01$ )。造模后 25 和 45 d 时 CIA 组大鼠病变关节部位 T/NT 与空白对照组相应结果(0.160±0.028 和 0.158±0.032)比较差异均有统计学意义(*t* 值: -10.484 和 -20.917, 均  $P<0.01$ )。免疫组织化学检查示 CIA 组大鼠病变关节滑膜组织血管内皮生长因子、 $\alpha$ 、 $\beta_3$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$  呈阳性表达。**结论**  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -3PRGD<sub>2</sub> 对大鼠 RA 模型关节滑膜新生血管显像的灵敏度高,有望用于 RA 的早期诊断。

**【关键词】** 关节炎, 类风湿; 新生血管化, 病理性; 放射性核素显像; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; 大鼠

**基金项目:** 国家自然科学基金(81260224, 81860311); 内蒙古自治区自然科学基金(2019MS08184)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20190923-00208

## Experimental study of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -3PRGD<sub>2</sub> targeted receptor imaging on angiogenesis in rheumatoid arthritis

Su Yunlong, Wang Xuemei

Department of Nuclear Medicine, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University; Key Laboratory of Molecular Imaging, Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010050, China

Su Yunlong is working on the Department of Imaging, Ordos Central Hospital, Ordos 017000, China

Corresponding author: Wang Xuemei, Email: wangxuemei201010@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the feasibility of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -hydrazinonicotinamide-(poly-(ethylene glycol))<sub>4</sub>-E[(poly-(ethylene glycol))<sub>4</sub>-c((Arg-Gly-Asp)fK)]<sub>2</sub>(3PRGD<sub>2</sub>) in the early diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Sixty female Wistar rats were divided into control group ( $n=10$ ; injected with saline of 0.3 ml/piece) and collagen-induced arthritis (CIA) group ( $n=50$ ; injected with type II collagen emulsion of 0.3 ml/piece). Rats in 2 groups were subjected to  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -3PRGD<sub>2</sub> planar imaging before modeling, 25 and 45 d after modeling. The changes of the target/non-target ratio (T/NT) of the lesion joint and mediastinum before and after modeling were measured and analyzed in CIA rats, and compared with rats in control group. Pathological examination was conducted. Repeated measures analysis of variance and independent-sample *t* test were used to analyze the data. **Results** Thirty-two rats in CIA group were successfully established, and obvious synovitis and synovial thickening, neovascularization were observed in the images. The T/NT of diseased joints in CIA group before modeling, 25 and 45 d after modeling were 0.158±0.023, 0.402±0.144, and 0.705±0.163 ( $F=286.924$ ,  $P<0.01$ ). The T/NT of diseased joints at 25 and 45 d after modeling were significantly different from those of control group (0.160±0.028 and 0.158±0.032; *t* values: -10.484 and -20.917, both  $P<0.01$ ). Immunohistochemistry results showed positive expressions of vascular endothelial growth factor,  $\alpha$ ,  $\beta_3$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the synovial tissue

in of diseased joints in rats of CIA group. **Conclusion**  $^{99}\text{Tc}^m\text{-3PRGD}_2$  has high sensitivity for joint synovial neovascularization in rat rheumatoid arthritis models and is expected to be used for early diagnosis of RA.

**【Key words】** Arthritis, rheumatoid; Neovascularization, pathologic; Radionuclide imaging; Arginine-glycine-aspartic acid; Rats

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81260224, 81860311); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2019MS08184)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20190923-00208

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。如果患者早期未得到及时有效治疗,病情往往发展迅速,约90%的患者2年后会发生肢体畸形或残疾<sup>[2]</sup>。RA早期主要以关节滑膜炎、滑膜增生和新生血管形成的病理表现为主。新生血管是RA维持和发展的必备条件<sup>[3]</sup>。目前临床尚缺少理想的影像学方法来对RA进行早期诊断。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic, RGD)核素显像已被用于肿瘤的新生血管显像,其灵敏度和特异性均较高<sup>[4]</sup>。因此,RGD核素显像对RA的早期诊断有很好的应用潜力。本研究采用 $^{99}\text{Tc}^m$ -联胍尼克酰胺-3聚乙二醇-RGD环肽二聚体[hydrazinonicotinamide-(poly-(ethylene glycol))<sub>4</sub>-E[(poly-(ethylene glycol))<sub>4</sub>-c(RGDfK)]<sub>2</sub>, 3PRGD<sub>2</sub>]对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型进行靶向受体平面显像,以期分子靶向受体显像在RA早期诊断中的应用提供科学依据。

## 材料与方法

1.实验材料及动物。牛Ⅱ型胶原免疫诱导乳剂购于美国Sigma公司,3PRGD<sub>2</sub>药盒由北京大学医学同位素研究中心提供。MG SPECT仪为美国GE公司产品。60只雌性Wistar大鼠,清洁级,近交系,体质量180~200 g,8~9周龄,生产许可证号:SCXK(蒙)2016-0001。

2.动物模型的制备及模型关节炎指数评分。用初次免疫与加强免疫在大鼠尾根部及背部进行多点皮内注射2次给药的方法建立模型<sup>[5]</sup>:CIA组50只,注射Ⅱ型胶原乳剂0.3 ml/只;空白对照组10只,注射生理盐水0.3 ml/只。

造模后45 d内每5 d记录大鼠四肢关节部位病变情况,进行关节炎指数评分,并计算每只大鼠的关节炎指数(arthritic index, AI),即每个关节相加的总积分(0~16分)。评分标准:0分,关节无异常;1分,关节轻微红肿;2分,关节中度红肿;3分,关节严重红肿;4分,关节畸形并严重红肿。总分5分以上的大鼠模型为肉眼观察造模成功。

3.  $^{99}\text{Tc}^m\text{-3PRGD}_2$  平面显像。将新鲜淋洗的 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4$ 液加入3PRGD<sub>2</sub>冻干粉中,充分混合摇匀,使3PRGD<sub>2</sub>冻干粉彻底溶解,沸水浴20 min,室温冷却,制成 $^{99}\text{Tc}^m\text{-3PRGD}_2$ ,测定放化纯>95%。

所有大鼠于造模前及造模后25、45 d行 $^{99}\text{Tc}^m\text{-3PRGD}_2$ 平面显像。用水合氯醛麻醉大鼠,根据其体质量经尾静脉注射 $^{99}\text{Tc}^m\text{-3PRGD}_2$  11.1 MBq/kg。注射后2 h,保持大鼠俯卧位四肢伸展置于平板上,用双探头SPECT仪行图像采集,采用低能高分辨准直器,能峰140 keV,放大倍数1.6,矩阵128×128,窗宽20%,采集时间6 min。

4.图像处理与判读。用后处理工作站处理图像。由2位高级职称核医学科医师对显像图进行盲法分析。(1)目视法:关节部位出现异常放射性摄取增高为异常。(2)半定量法:利用感兴趣区(region of interest, ROI)技术,测量造模前后四肢踝关节部位与纵隔的放射性计数,计算靶/非靶比值(target/non-target, T/NT)。

5.病变关节病理学检测。造模后45 d处死大鼠,取双侧足爪(包括踝关节)行病理学检测及关节组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、 $\alpha_v\beta_3$ 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 免疫组织化学检测。

6.统计学处理。采用SPSS 13.0软件行统计分析,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。同组间比较用重复测量方差分析,不同组间比较采用两独立样本 $t$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

造模后45 d,50只CIA组大鼠中,32只评分在5分以上(43个关节评分 $\geq 3$ 分),成模率为64%(32/50)。

空白对照组与CIA组大鼠平面显像图见图1。空白对照组大鼠全身显像剂分布正常,四肢关节部位未见明显放射性摄取增高(图1A)。CIA组大鼠在造模后25 d病变踝关节部位可见显像剂异常摄取,造模后45 d摄取明显增加(图1B,1C)。造模前CIA组大鼠四肢关节部位T/NT与空白对照组比较



差异无统计学意义( $0.158 \pm 0.023$  与  $0.157 \pm 0.023$ ;  $t = -0.093, P > 0.05$ );造模后 25 及 45 d,32 只 CIA 组造模成功大鼠病变关节部位 T/NT 与空白对照组比较差异均有统计学意义(25 d:  $0.402 \pm 0.144$  与  $0.160 \pm 0.028$ ;45 d:  $0.705 \pm 0.163$  与  $0.158 \pm 0.032$ ;  $t$  值:  $-10.484$  和  $-20.917$ ,均  $P < 0.01$ )。CIA 组造模前后病变关节部位 T/NT 差异有统计学意义( $F = 286.924, P < 0.01$ ),空白对照组造模前后关节部位 T/NT 未见差异( $F = 0.046, P > 0.05$ )。

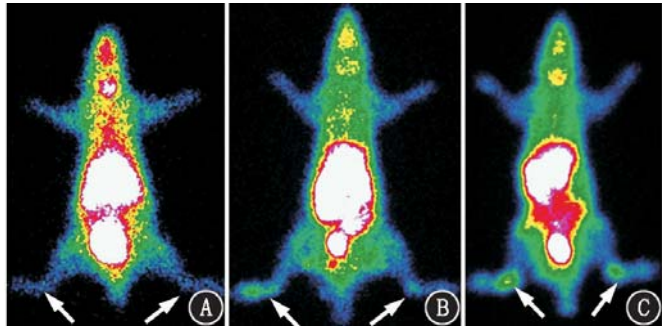


图 1 造模后不同时间空白对照组与胶原诱导性关节炎(CIA)组大鼠 $^{99m}\text{Tc}$ -联胍尼克酰胺-3 聚乙二醇-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸环肽二聚体( $3\text{PRGD}_2$ )平面显像图(箭头示异常摄取)。A.造模后 25 d 时空白对照组大鼠显像示四肢关节无明显显像剂异常摄取,左后足踝关节靶/非靶比值(T/NT)为 0.161;B.造模后 25 d 时 CIA 组大鼠显像示双侧踝关节见明显显像剂异常摄取增高,左后足踝关节 T/NT 为 0.649;C.造模后 45 d 时 CIA 组大鼠显像示双侧踝关节见显像剂摄取较造模后 25 d 时明显增高,左后足踝关节 T/NT 为 1.104

空白对照组与 CIA 组大鼠病理学检测结果见图 2。空白对照组大鼠踝关节无滑膜炎及滑膜增生;关节部位滑膜层组织中 VEGF、 $\alpha_v\beta_3$ 、TNF- $\alpha$  呈弱阳性表达。CIA 组大鼠踝关节可见滑膜炎、滑膜

增生及血管翳形成,并见新生血管向软骨面爬行,部分有软骨及骨侵蚀破坏;踝关节滑膜层组织中 VEGF、 $\alpha_v\beta_3$ 、TNF- $\alpha$  呈阳性表达,且阳性产物主要位于新生血管细胞膜中。

### 讨 论

目前,RA 病变关节的骨质破坏尚无有效治疗措施。关节破坏在 RA 病程早期就已开始,血管翳形成为其特异性表现。早期诊断 RA 并进行积极有效的治疗可以控制和延缓 RA 病情发展,从而降低将来关节损伤畸形和残疾的风险。

RA 早期以关节滑膜炎、滑膜增生、血管翳形成等病理表现为主。反复发作的滑膜炎会促使关节滑膜增厚及血管翳形成,滑膜血管翳可侵蚀和破坏关节软骨和骨组织,最终造成关节功能的丧失。RGD 与 RA 病变的发生和发展及滑膜血管翳的生成密切相关<sup>[6]</sup>。RGD 通过与整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体特异性结合,可以调节骨的再吸收<sup>[7]</sup>,在诱导血管的生成和血管翳内皮细胞的侵袭和迁移过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。

临床上对 RA 的影像学检查方法有多种,如 X 线、CT、超声、MRI 等,但 X 线和 CT 的组织分辨率低,不能较好地显示关节滑膜及软骨情况,无法早期诊断 RA。MRI 可以早期显示关节的滑膜增厚程度及血流变化情况,还可早期检测到骨髓水肿,但其费用高、时间长,不能进行全身多个关节的扫描。超声检查能反映关节炎性病变的严重程度,还可动态观察关节滑膜增生处的血流变化情况,但高频超声对关节增生滑膜内低流速的血流信号不敏感,且受人为操

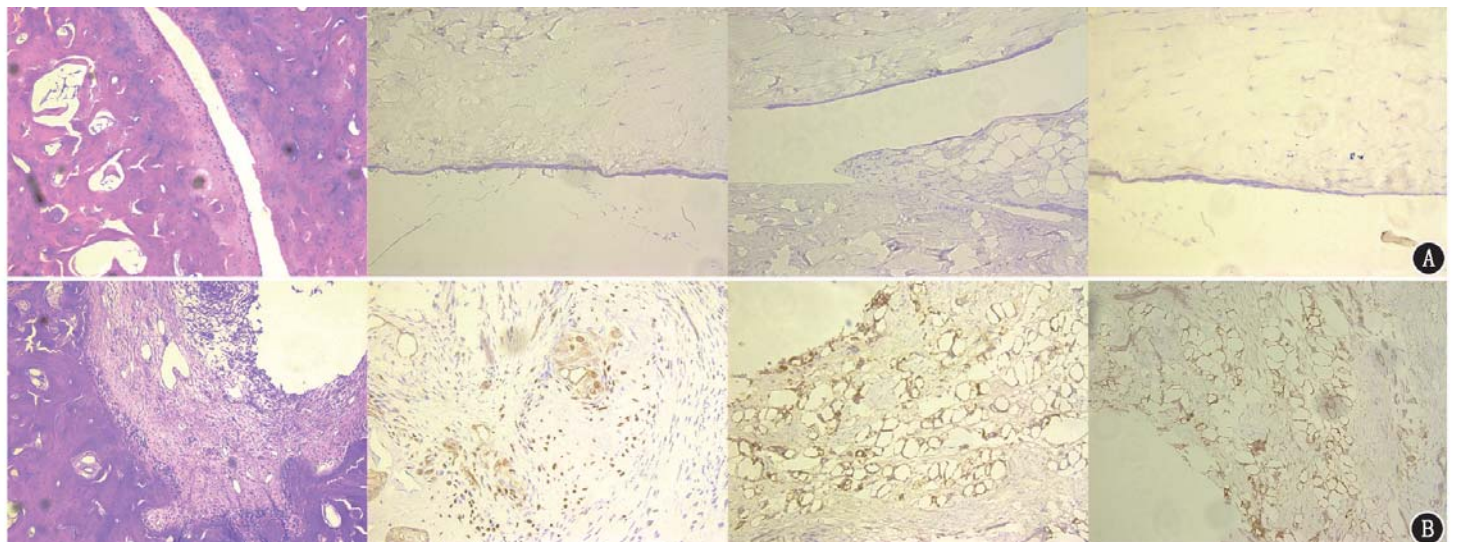


图 2 空白对照组(A)与 CIA 组(B)大鼠踝关节病理检查图。从左至右依次为 HE 染色图( $\times 100$ )、踝关节血管内皮生长因子(VEGF)、 $\alpha_v\beta_3$  和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  免疫组织化学染色图( $\times 200$ )。CIA 组大鼠踝关节病理检查示滑膜炎、滑膜增生及血管翳形成,免疫组织化学检查 VEGF、 $\alpha_v\beta_3$ 、TNF- $\alpha$  呈阳性表达

作因素、声速角度和血流方向等因素的限制,不能很好地应用于 RA 的早期诊断。因此,临床迫切需要一种更好的影像学方法来对 RA 进行早期诊断。

放射性核素显像对 RA 关节病变检测的灵敏度较高。<sup>18</sup>F-脱氧葡萄糖 PET/CT 显像主要用于肿瘤诊断,对关节炎性病变显像的灵敏度亦较高,但特异性低<sup>[9]</sup>。亚甲基二膦酸盐(methylene diphosphonate, MDP)显像对 RA 滑膜炎及骨盐代谢变化的灵敏度高,可早期发现 RA 关节局部的代谢变化情况,但不能特异性反映 RA 滑膜血管翳形成情况。有研究显示,整合素  $\alpha_v\beta_3$  在多种实体肿瘤细胞表面和血管内皮细胞的表达水平与肿瘤恶性程度有关,提示其在肿瘤生长、侵袭及转移中起着关键作用<sup>[10]</sup>。放射性核素标记的整合素受体 RGD 肽对 RA 新生血管进行分子靶向显像具有良好的靶向性,在 RA 早期诊断、疗效评估中有很大潜力。本研究采用放射性核素<sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup> 标记 3PRGD<sub>2</sub>, 标记制备方法简单,产物有较好的稳定性和生物学特性,标记后放化纯>95%。本研究中,CIA 组大鼠病变踝关节内有明显的滑膜炎及滑膜增生反应,增生滑膜中有丰富的新生血管形成,且有邻近软骨和骨的侵蚀破坏,与人体 RA 病理改变比较相似;病变关节部位显像剂摄取随病程延长逐渐增加,其 T/NT 与空白对照组比较差异有统计学意义,且关节滑膜层血管生成相关因子 VEGF、 $\alpha_v\beta_3$ 、TNF- $\alpha$  呈阳性表达,表明 CIA 组大鼠病变踝关节对<sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup>-3PRGD<sub>2</sub> 显像剂的摄取情况与关节滑膜的新生血管生成有关。本研究提示,<sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup>-3PRGD<sub>2</sub> 对大鼠 RA 模型关节滑膜新生血管靶向受体显像的灵敏度高,有可能成为检测 RA 滑膜新生血管形成的有价值分子探针,有望用于 RA 的早期诊断。

本实验有一定的不足:未设计无血管生成大鼠关节炎模型的对照组,未考虑到炎性反应对<sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup>-3PRGD<sub>2</sub> 显像可能造成的干扰;未设计  $\alpha_v\beta_3$  拮抗剂对靶点阻断后的显像研究,因此不能进一步证实<sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup>-3PRGD<sub>2</sub> 是评价 RA 滑膜新生血管形成的特异性显像剂,这些有待后续完善实验设计后再行进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

[1] Chandrupatla D, Molthoff C, Lammertsma AA, et al. The folate re-

ceptor  $\beta$  as a macrophage-mediated imaging and therapeutic target in rheumatoid arthritis[J]. Drug Deliv Transl Res, 2019, 9(1): 366-378. DOI:10.1007/s13346-018-0589-2.

- [2] 苏云龙,王雪梅,赵爱玲,等.类风湿关节炎早期诊断的影像学方法研究进展[J].中华核医学与分子影像杂志,2013,33(2): 157-160. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.02.016. Su YL, Wang XM, Zhao AL, et al. Advances in imaging methods for early diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2013, 33(2): 157-160. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.02.016.
- [3] Banning M. The principles of inflammation in the development of rheumatoid arthritis[J]. Br J Nurs, 2005, 14(5): 277-283. DOI: 10.12968/bjon.2005.14.5.17665.
- [4] 刘海燕,李万婷,秦丽军,等.<sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup>-3PRGD<sub>2</sub> SPECT/CT 显像半定量参数与乳腺癌临床病理特征的关系[J].中华核医学与分子影像杂志,2018,38(12): 786-789. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.12.003. Liu HY, Li WT, Qin LJ, et al. Relationship between the semi-quantitative index of <sup>99m</sup>Tc<sup>m</sup>-3PRGD<sub>2</sub> SPECT/CT imaging and clinical pathological features of breast cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(12): 786-789. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.12.003.
- [5] 李宝丽,唐方,庞晓东. II 型胶原诱导关节炎大鼠模型制备[J]. 中国免疫学杂志,2006,22(4): 350-352. Li BL, Tang F, Pang XD. Study on establishing type II collagen induced arthritis model in rats[J]. Chin J Immunol, 2006, 22(4): 350-352.
- [6] Schwarz A, Elbracht T, Jeschke A, et al. Bone scintigraphy and clinical outcome in rheumatoid gonarthrosis[J]. Nuklearmedizin, 2003, 42(3): 94-98.
- [7] Cook G, Azad GK, Taylor BP, et al. Imaging  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression in skeletal metastases with <sup>99m</sup>Tc-maracivatide single-photon emission computed tomography: detection and therapy response assessment[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 45(6): 898-903. DOI:10.1007/s00259-017-3926-7.
- [8] Morshed A, Abbas AB, Hu J, et al. Shedding new light on the role of  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins in rheumatoid arthritis[J]. Molecules, 2019, 24(8). pii: E1537. DOI:10.3390/molecules24081537.
- [9] 王冬艳,杨彦松,邵小南,等.<sup>18</sup>F-FDG PET/CT 在风湿性疾病的初步应用[J].中国医学影像学杂志,2015,23(10): 759-763, 770. DOI:10.3969/j.issn.1005-5185.2015.10.011. Wang DY, Yang YS, Shao XN, et al. Preliminary application of <sup>18</sup>F-FDG PET/CT in rheumatic diseases[J]. Chin J Med Imaging, 2015, 23(10): 759-763, 770. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5185.2015.10.011.
- [10] Yan B, Fu T, Liu Y, et al. <sup>99m</sup>Tc-3PRGD<sub>2</sub> single-photon emission computed tomography/computed tomography for the diagnosis of choroidal melanoma: a preliminary STROBE-compliant observational study[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(40): e12441. DOI:10.1097/MD.00000000000012441.

(收稿日期:2019-09-23)