¹⁸F-阿法肽荷瘤裸鼠模型显像与药代动力学 研究

张德良¹ 李业森² 赵祚全^{3,4} 陆洁³ 王跃³ 于倩³ 李子婧¹ 张蒲^{1,3} 陈瑞琴³ 吴华² 方纬⁴ 张现忠¹ 陈小元⁵

¹厦门大学分子影像暨转化医学研究中心 361102;²厦门大学附属第一医院核医学科 361003;³北京师范大学化学学院 100875;⁴中国医学科学院阜外医院核医学科,北京 100037;⁵美国国立卫生研究院、生物医学影像与生物工程研究所、分子影像和纳米医 学研究中心,美国马里兰州贝塞斯达 20892

张德良、李业森和赵祚全对本文有同等贡献

通信作者:陆洁, Email: ljie74@bnu.edu.cn;张现忠, Email: zhangxzh@xmu.edu.cn;陈 小元, Email: shawn.chen@nih.gov

【摘要】目的 探讨¹⁸F-阿法肽(¹⁸F-Alfatide II)在不同荷瘤裸鼠模型中的显像及 Beagle 犬中的药代动力学性能。方法 取 BALB/c 裸鼠 24 只,分别制备皮下荷瘤裸鼠模型(肺癌 A549 和神经胶质瘤 U87MG)、原位肺癌模型(A549)和原位乳腺癌模型(MDA-MB-231)各 6 只。于 4 种荷瘤裸鼠模型中行¹⁸F-Alfatide II 与¹⁸F-脱氧葡萄糖(FDG)对比显像;于 A549 皮下荷瘤裸鼠模型中行¹⁸F-Alfatide II 阻断实验、生物分布实验及在不同生长周期肿瘤中的显像研究;于 Beagle 犬(6 只)及 CD-1 小鼠(9 只)中行药代动力学实验。采用两样本 t 检验分析数据。结果 与¹⁸F-FDG 相比,¹⁸F-Alfatide II 在 A549、U87MG 皮下肿瘤及 A549 原位肺癌(肿瘤/心脏比值,4.50±1.17 与 0.95±0.31;t=4.125,P<0.01)、MDA-MB-231 原位乳腺癌(肿瘤/肌肉比值,6.60±1.53 与 0.92±0.43;t=3.984,P<0.01)荷瘤裸鼠模型中有更好的显像质量。预先注射阻断剂环(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-D-酪氨酸-赖氨酸多肽[c(RGDyk)]后,A549 肿瘤对¹⁸F-Alfatide II 的摄取降低了 75%。¹⁸F-Alfatide II 在 Beagle 犬血液中快速清除,半衰期为(57.34±11.69) min。¹⁸F-Alfatide II 以原药形式从体内快速清除,给药后 4 h内,(69.24±6.82)%的给药剂量通过尿液排出。结论 ¹⁸F-Alfatide II 在 A549、MDA-MB-231、U87MG 肿瘤显像的靶/非靶比值高于¹⁸F-FDG,可显著提高显像质量,且药代动力学性能优良。

【关键词】 肽类,环;精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸;氟放射性同位素;正电子发射断层显像术;体层 摄影术,X线计算机;药代动力学;肿瘤移植;小鼠;犬

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.04.003

Preclinical microPET imaging in tumor-bearing nude mice and pharmacokinetic studies of ¹⁸**F-Alfatide II** Zhang Deliang¹, Li Yesen², Zhao Zuoquan^{3,4}, Lu Jie³, Wang Yue³, Yu Qian³, Li Zijing¹, Zhang Pu^{1,3}, Chen Ruiqin³, Wu Hua², Fang Wei⁴, Zhang Xianzhong¹, Chen Xiaoyuan⁵

¹Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China; ²Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; ³College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ⁴Department of Nuclear Medicine, Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China; ⁵Laboratory of Molecular Imaging and Nanomedicine, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA Zhang Deliang, Li Yesen and Zhao Zuoquan are contributed equally to the article

Corresponding authors: Lu Jie, Email: ljie74@ bnu.edu.cn; Zhang Xianzhong, Email: zhangxzh@ xmu.edu. cn: Chen Xiaoyuan, Email: shawn.chen@ nih.gov

[Abstract] Objective To assess the imaging characteristics of ¹⁸F-Alfatide II in different tumorbearing mice and pharmacokinetics in Beagle dogs. **Methods** BALB/c nude mice (n = 24) were used for subcutaneous tumor models (A549 and U87MG), orthotopic lung cancer models (A549) and orthotopic breast cancer models (MDA-MB-231) (n = 6 in each group). ¹⁸F-Alfatide II and ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (FDG) microPET/CT images were compared in the 4 types of tumor-bearing nude mice models. ¹⁸F-Alfatide II blocking experiment, biodistribution experiment and imaging studies in tumors of different growth cycles were performed in A549 subcutaneous tumor-bearing nude mice models. Pharmacokinetic experiments were carried out in Beagle dogs (n=6) and CD-1 mice (n=9). Two-sample t test was used to analyze the data. **Results** Compared with ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-Alfatide II microPET/CT images showed better imaging quality and contrast in subcutaneous A549, U87MG tumors and orthotopic A549 (tumor/heart: $4.50\pm1.17 vs 0.95\pm0.31$; t=4.125, P<0.01), orthotopic MDA-MB-231 (tumor/muscle: $6.60\pm1.53 vs 0.92\pm0.43$; t=3.984, P<0.01) transplantation nude mice models. ¹⁸F-Alfatide II could specifically target A549 tumors, and the tumor uptake of ¹⁸F-Alfatide II was reduced by about 75% after pre-injection with cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) (c(RGDyk)). ¹⁸F-Alfatide II was rapidly cleared from the blood of Beagle dogs ($t_{1/2}$ was (57.34 ± 11.69) min). It was cleared in the form of prototype drug and (69.24 ± 6.82)% of cumulative dose was excreted through the urine within 4 h after administration. **Conclusions** ¹⁸F-Alfatide II shows a higher target/non-target ratio than ¹⁸F-FDG in the imaging of A549, MDA-MB-231 and U87MG tumor-bearing nude mice models, which is more conducive to the diagnosis of tumor. ¹⁸F-Alfatide II has excellent pharmacokinetic properties.

[Key words] Peptides, cyclic; Arg-Gly-Asp; Fluorine radioisotopes; Positron-emission tomography; Tomography, X-ray computed; Pharmacokinetics; Neoplasm transplantation; Mice; Dogs DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.04.003

精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD) 三肽序列能被肿瘤及新生血管过度表达的整合素 $\alpha_{\alpha}\beta_{\alpha}$ 特异性识别。多种放射性标记的 RGD 已用于 肿瘤等疾病的诊治^[1-3]。2011 年, Liu 等^[4] 报道了氟 化铝方法标记的 RGD 二聚体;随后 Wan 等^[5]首次 将氟化铝方法标记的¹⁸F-AlF-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸-(聚乙二醇)₄-E 环(RGD-D-苯丙氨酸-酪氨酸)],¹⁸F-AlF-1,4,7-triazacylononane-1,4,7-triacetic acid-(polyethylene glycol)₄-E[cyclo(RGD-D-Phe-Tyr)]₂, ¹⁸F-AlF-NOTA-PEG₄-E $[c(RGDfk)]_2$ ($BD^{18}F$ -Alfatide)用于肺癌患者显像:2014年.Guo 等^[6-7]报道了 一种肝本底更低、稳定性更好的 18 F-阿法肽(Alfatide II), 即¹⁸F-AlF-NOTA-E [PEG₄-c(RGDfk)],。初步临床 研究证实¹⁸F-Alfatide Ⅱ在脑和骨转移瘤中有应用前 景^[8-9]。目前¹⁸F-Alfatide II 显像研究集中在 U87MG 皮下肿瘤模型方面,针对其他类型肿瘤及原位肿瘤 的研究较少,也缺乏详细的药效/药代动力学特性研 究。本研究探讨了¹⁸F-Alfatide Ⅱ在皮下肿瘤模型及 原位肿瘤荷瘤裸鼠模型中的 microPET/CT 显像,并 与¹⁸F-脱氧葡萄糖(fluorodeoxyglucose, FDG)进行比 较,另外还对¹⁸F-Alfatide Ⅱ的药代动力学特性进行 了探讨,现报道如下。

材料与方法

一、显像剂的制备

¹⁸F-FDG 由厦门大学附属第一医院 PET 中心提供;¹⁸F-Alfatide II 的标记、纯化和质量鉴定按照文献 [10]方法进行。

1.标记。在冻干中间品药盒(前体 NOTA-E[PEG₄c(RGDfk)]₂ 40 μg, AlCl₃ 6 μg)中加入 10 μl 灭菌注射 用水、10 μl 冰醋酸和 720 μl 无水乙腈, 加入 160 μl 制备好的¹⁸F⁻溶液(¹⁸F⁻溶液体积≤160 μl,¹⁸F⁻溶液 与乙腈的体积比为1:4),100 ℃反应10 min。

2.纯化。反应结束后冷却,用15 ml 灭菌注射 用水稀释反应液,过C18 柱,再用50 ml 灭菌注射用 水冲洗C18 柱,并吹干,最后用1.5 ml 的10 mmol/L 盐酸乙醇溶液淋洗C18 柱,得到纯化后的标记物溶 液。于80℃用氮气吹干,加入灭菌注射用水溶解, 过无菌滤膜,得到最终的¹⁸F-Alfatide Ⅱ注射液。

3.质量鉴定。以薄层色谱法[硅胶板;展开剂:V (丙酮):V(生理盐水)=1:1]进行纯度分析。产物¹⁸F-Alfatide II的比移(Rf)值为0.5~0.7,根据计数结果计 算其放化纯。

二、实验动物

取 BALB/c 裸鼠 60 只,雌性,体质量 16~18 g,4~ 6 周龄,均为无特殊病原体级,由厦门大学实验动物 中心提供,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。另取健 康 CD-1 小白鼠 9 只,体质量 18~22 g,雌雄各半,4~ 6 周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证:SCXK(京)-2012-0001。健康 Beagle 犬 6 只,体质量(10.69±0.44) kg,雌雄各半,8~10 月龄, 由北京日新科技有限公司提供,动物许可证:SCXK (京)-2011-0007。

三、荷瘤裸鼠模型的建立

1.皮下荷瘤裸鼠模型。取人源 A549 和 U87MG 瘤株生长最佳状态的传代细胞,采用含体积分数 10%胎牛血清和体积分数 1%青链霉素的 DMEM 培 养基,培养于 37 ℃体积分数 5% CO₂ 的培养箱内。 取最佳生长状态的传代细胞(80%细胞密度),用质 量分数 0.5%胰酶消化并重悬,用磷酸盐缓冲液制成 1×10⁸ 个/ml 细胞悬液,取 0.1 ml 接种于 6 周龄 BALB/c 裸鼠近右前肢的背部皮下,注射速度缓慢, 保证无细胞液溢出。待肿瘤生长 2~3 周,体积为 60~ 200 mm³ 时显像。

2.原位肺癌荷瘤裸鼠模型。取最佳生长状态的 A549 传代细胞(80%细胞密度),用 0.5%胰酶消化 并重悬,用不含血清的 DMEM 培养基与基质胶(体 积比 1:1 混匀)配制成 1×10⁸ 个/ml 细胞悬液,取 0.1 ml 接种于 4~6 周龄 BALB/c 裸鼠肺部,进针 0.8~1.0 cm 处,注射速度缓慢,保证无细胞液溢出。 待裸鼠出现弓背行为时,说明肿瘤已形成。

3.原位乳腺癌荷瘤裸鼠模型。取最佳生长状态的 MDA-MB-231 传代细胞(80%细胞密度),用质量分数 0.5%胰酶消化并重悬细胞,用不含血清的 DMEM 培养 基与基质胶(体积比 1:1 混匀)配制成 1×10⁸ 个/ml 细 胞悬液,取 0.1 ml 接种于 4~6 周龄 BALB/c 裸鼠右侧 第 3 对乳房的脂肪垫,注射速度缓慢,保证无细胞液溢 出。待肿瘤生长 3~4 周,体积为 60~200 mm³ 时显像。

四、MicroPET/CT 显像

1.¹⁸F-Alfatide II 和¹⁸F-FDG 对比显像研究。¹⁸F-FDG 由厦门大学附属第一医院赠予。4 种荷瘤裸鼠均 于尾静脉注射 2 种药物(3.70~5.55 MBq/100 μl),注射 后 40 min 行 microPET/CT 显像。异氟烷麻醉后,先 行 CT 扫描,再静态采集 PET 数据,利用三维有序子 集最大期望值迭代法重建数据,对图像进行感兴趣 区(region of interest, ROI)分析。

2. ¹⁸F-Alfatide II 在不同生长周期肿瘤中的显像研究。取 A549 皮下荷瘤裸鼠 3 只,分别于肿瘤 形成后第 1 周、第 2 周、第 3 周行 microPET/CT 显像。先行 CT 扫描,再于尾静脉注射¹⁸F-Alfatide II (3.70~5.55 MBq/100 μl)后立即行 microPET/CT 显像,动态采集 0~50 min 数据,后静态采集 120 和 240 min 数据。

3. ¹⁸F-Alfatide II 的阻断实验。将 A549 皮下荷瘤 裸鼠分成 2 组(每组 3 只)行 microPET/CT 显像。对照 组注射¹⁸F-Alfatide II (3.70~5.55 MBq/100 μl)后动 态采集 0~50 min 的数据;之后再静态采集 120 和 240 min 的数据;抑制组给药前 15 min 尾静脉注射 100 μg/75 μl c(RGDyk)溶液,再注射¹⁸F-Alfatide II (3.70~5.55 MBq/100 μl)后立即行 microPET/CT 显 像,动态采集 0~50 min 的数据;静态采集 120 和 240 min 时间点数据。

五、¹⁸F-Alfatide II 在 A549 皮下荷瘤裸鼠中的 生物学分布研究

将 A549 皮下荷瘤裸鼠分成 4 组(4 只/组),分 别通过尾静脉注射 0.37 MBq¹⁸F-Alfatide II 注射液 (100 µl)。分别于给药后 30、60 和 120 min 处死前 3 组荷瘤裸鼠,取心、肝、肺、肾、脾、骨骼、肌肉、血液、肿瘤,称质量并测定放射性计数;阻断组小鼠于 给药前 15 min 经尾静脉注射 75 µl c(RGDyk)溶液 (100 µg/只),再经尾静脉注射 0.37 MBq ¹⁸F-Alfatide II (100 µl),给药后 60 min 处死,取上述组织称质量 并测定放射性计数。计算每克组织百分注射剂量率 (percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。

六、¹⁸F-Alfatide Ⅱ 的药代动力学研究

1.犬的血药浓度-时间曲线研究。取 Beagle 犬 6 只, 分别于静脉注射¹⁸F-Alfatide Ⅱ(370 MBq/1 ml)后 0.5、2、3、4、5、15、30、60、120 和 240 min 采血 2 ml 于 已知质量的计数试管中。测定血液样本质量及其放 射性计数,并测定本底计数。

2. ¹⁸F-Alfatide II 的排出。取健康 CD-1 小鼠 6 只, 均为雌性。每只经尾静脉给药 100 μl,并分别于给药 后 20、40、60 min,2、4 h 和 24 h 收集尿液和粪便,分别 置于计数管中。同时将样品稀释 100 倍,取 100 μl 于 计数管中,作为标准的 1%给药剂量(injection dose, ID),并测定生物样品及空白本底的放射性计数。

3. ¹⁸F-Alfatide II 的生物转化。取健康 CD-1 小 鼠 3 只,均为雌性。每只经尾静脉给药 0.1 ml,分别 于给药后 30~45 和 60~90 min 收集小鼠尿液。将 尿液吸取至 1 ml 离心试管中,分别加入 0.3 ml 水稀 释后离心(离心半径 4.5 cm,13 000 r/min)5 min 除 去沉淀物质,溶液通过 0.2 μ m 滤膜过滤,以除去不 溶性微粒后,对样品进行放射性高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析。HPLC 条件:Phenomenex C18 柱;流动相:A 相为水(体积分 数 0.1%三氟乙酸);B 相为乙腈(0.1%三氟乙酸);梯 度:0~2 min,5%B;2~22 min,5%~60%B;22~30 min, 5%B;流速 1 ml/min。

七、统计学处理

采用 IBM SPSS 19.0 软件,符合正态分布的计 量数据以 x±s 表示。2 组数据间比较采用两样本 t 检验;双变量的2 组数据间比较采用两因素重复测 量方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

制备的¹⁸ F-Alfatide II注射液无色澄清,标记率在 25%以上,放化纯>95%,比活度大于 11 GBq/μmol。

1.¹⁸F-Alfatide Ⅱ与¹⁸F-FDG 荷瘤裸鼠显像比较。 (1)皮下肿瘤。不同生长周期的A549荷瘤裸鼠显像 结果(表 1)表明,成瘤后第 1 周、第 2 周、第 3 周,¹⁸ F-Alfatide II给药后 2 h 的肿瘤/肌肉比值分别为 2.42± 1.23、3.25±1.04、5.45±3.05;给药后 4 h 的肿瘤/肌 肉比值分别为 2.68±1.50、6.43±2.67、4.65±1.73;从 给药后 2 和 4 h 的显像时间点来看,第 2 周肿瘤/肌 肉比值多高于第 1 周(F=4.132,P<0.05),但与第 3 周 相比没有明显的差异(F=19.79,P=0.142)。

A549 荷瘤裸鼠 microPET/CT 显像见图 1,可 见¹⁸F-FDG 在 A549 皮下肿瘤中有一定摄取,平均标 准摄取值(mean standardized uptake value, SUV_{mean}) 为 0.405±0.056,但棕色脂肪、脑、肠道等非靶器官亦 有明显摄取。¹⁸F-Alfatide II在 A549 皮下肿瘤中较¹⁸F-FDG 有稍高摄取,SUV_{mean}为 0.434±0.058,肌肉、脑、 肝脏等器官摄取较低。

U87MG 荷瘤裸鼠 microPET/CT 显像见图 2,可 见¹⁸F-FDG 在 U87MG 皮下肿瘤中有一定摄取, SUV_{mean}为 0.550±0.081,但棕色脂肪、脑、肠道等非 靶器官亦有明显摄取。¹⁸F-Alfatide II 在 U87MG 皮下 肿瘤中有更高摄取,SUV_{mean}为 0.953±0.074,且肌 肉、脑、肝脏等非靶脏器摄取较低。

(2)原位肿瘤。A549 原位肺癌荷瘤裸鼠 micro-PET/CT 显像见图 3,可见¹⁸F-FDG 在 A549 原位肺 癌中有很高的摄取,SUV_{mean}为 1.768±0.100,但心脏 也有明显摄取(SUV_{mean}为 1.861±0.167),肿瘤/心脏 摄取比值为 0.95±0.31,严重干扰了对肿瘤的判 断。¹⁸F-Alfatide II 在 A549 原位肺癌部位摄取值 (SUV_{mean}为 0.532±0.051)明显低于¹⁸F-FDG,但其心 脏摄取较低(SUV_{mean}为 0.117±0.017),肿瘤/心脏摄 取比值为 4.50±1.17,是¹⁸F-FDG 组的 4.7 倍(t = 4.125,P<0.01)。

MDA-MB-231 原位乳腺癌荷瘤裸鼠 microPET/ CT 显像见图 4,可见¹⁸F-FDG 在 MDA-MB-231 原位 乳腺癌中的摄取较低,SUV_{mean}为 0.369±0.048,且棕 色脂肪、脑、肠道等非靶器官均有明显摄取,肿瘤/肌 肉比仅为 0.92±0.43。¹⁸F-Alfatide II 在 MDA-MB-231 原位乳腺癌中有更高的摄取(SUV_{mean}为 0.856± 0.050),肿瘤/肌肉比为 6.60±1.53,是¹⁸F-FDG 组的 7.2 倍(*t*=3.984,*P*<0.01)。

2.¹⁸F-Alfatide Ⅱ阻断实验。与对照组相比,抑 制组肿瘤对¹⁸F-Alfatide Ⅱ的摄取明显降低,肿瘤与 非靶区的差异明显降低(图 5)。ROI分析显示,给 药后 40 min 左右,抑制组肿瘤对¹⁸F-Alfatide Ⅱ的摄 取降低了 75%(对照组与抑制组 SUV_{mean}分别为 0.434±0.058 和 0.111±0.020;*t*=4.521,*P*<0.01)。

3. ¹⁸F-Alfatide II 在 A549 皮下荷瘤裸鼠中的生物学分布(表 2)。阻断组荷瘤裸鼠肿瘤摄取明显降低。在 A549 皮下荷瘤裸鼠中,给药后 1 h 肿瘤摄取为 2.83 % ID/g,抑制后肿瘤摄取降至 0.57 % ID/g,抑制率达 80%,表明¹⁸F-Alfatide II 与整合素 $\alpha_{x}\beta_{3}$ 有着较高的亲和力且特异性强。生物学分布数据与microPET/CT 显像结果一致。

4. ¹⁸F-Alfatide II 的药代动力学研究。¹⁸F-Alfatide II 在 Beagle 犬血液中快速清除。与给药后 0.5 min 的血 液平均放射性浓度(设为 100%)相比,给药后 5 min 降至其(46.32±14.07)%,给药后 120 min 降至其 (2.97±0.63)%。采用 DAS ver2.0 药物统计处理软 件分析可得,¹⁸F-Alfatide II 在 Beagle 犬体内的清除 半衰期为(57.34±11.69) min,表观分布容积为(0.54± 0.17) L/kg,清除率为 0.01 L·min⁻¹·kg⁻¹。

¹⁸F-Alfatide II 在 CD-1 小鼠中以尿液排出为主。 给药后 4 h 内,(69.24±6.82%)的给药剂量由尿液排 出,占总排出量的 98%;另外 2%通过粪便排出。生 物转化实验结果表明,给药后 60 min,CD-1 小鼠尿 液HPLC分析未见除母体化合物¹⁸F-Alfatide II 以外

表1 不同生长周期的肺癌 A549 皮下荷瘤裸鼠¹⁸F-阿法肽(Alfatide Ⅱ)动态 microPET 显像肿瘤/肌肉(T/M)比值(x±x)

成瘤后时间 —	注射 ¹⁸ F-Alfatide Ⅱ后不同时间的 T/M 比值						
	2.5 min	7.5 min	12.5 min	17.5 min	22.5 min	27.5 min	
1 周	0.70 ± 0.20	1.48 ± 0.47	1.64±0.57	1.74±0.66	1.78±0.85	2.09 ± 1.07	
2 周	1.79 ± 0.36	2.07 ± 0.13	2.06 ± 0.16	2.44 ± 0.76	2.26 ± 0.27	2.38 ± 0.65	
3 周	0.75 ± 0.28	1.09 ± 0.62	1.20 ± 0.70	1.67 ± 0.93	1.63 ± 0.84	2.19 ± 1.29	
成瘤后时间 —	注射 ¹⁸ F-Alfatide Ⅱ后不同时间的 T/M 比值						
	32.5 min	37.5 min	42.5 min	47.5 min	120.0 min	240.0 min	
1 周	2.06±0.96	2.21±1.06	2.23±1.17	2.32±1.30	2.42±1.23	2.68±1.50	
2 周	1.99 ± 0.92	2.21 ± 1.80	2.42 ± 1.04	2.74 ± 1.30	3.25 ± 1.04	6.43 ± 2.67	
3 周	2.86 ± 2.25	2.51±0.83	2.11±0.81	2.30 ± 0.73	5.45 ± 3.05	4.65±1.73	

注:各时间点的鼠数均为3只



图1 肺癌 A549 皮下荷瘤裸鼠的 microPET/CT 显像图。1A.¹⁸F-脱氧葡萄糖(FDG);1B.¹⁸F-阿法肽(Alfatide II)。可见¹⁸F-FDG 在 A549 皮下 肿瘤中有相对较高的摄取,但非靶器官亦有明显摄取;¹⁸F-Alfatide II 肿瘤摄取稍高,但非靶摄取低,对比度更高
图2 胶质瘤 U87MG 皮下 荷瘤裸鼠的 microPET/CT 显像图。2A.¹⁸F-FDG;2B.¹⁸F-Alfatide II。可见¹⁸F-FDG 在肿瘤中有一定摄取,但非靶器官摄取亦较高;¹⁸F-Alfatide II 在肿瘤中摄取更高,而非靶器官摄取较低
图3 A549 原位肺癌荷瘤裸鼠的 microPET/CT 显像图。3A.¹⁸F-FDG;3B.¹⁸F-Alfatide II。可见¹⁸F-FDG 在肿瘤中有高摄取,但心脏亦有明显摄取;而¹⁸F-Alfatide II在肿瘤中摄取较低,但心脏无明显摄取
图4 MDA-MB-231 原位乳 腺癌荷瘤裸鼠的 microPET/CT 显像图。A.¹⁸F-FDG;B.¹⁸F-Alfatide II。可见¹⁸F-FDG 在肿瘤中摄取较低,明显低于¹⁸F-Alfatide II 的摄取
程度 图5 A549 皮下荷瘤裸鼠¹⁸F-Alfatide II microPET/CT 显像图。A.对照组;B.环(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-D-酪氨酸-赖氨酸多肽)[c(RGDyk)]抑制组。与对照组相比,抑制组肿瘤对¹⁸F-Alfatide II 的摄取明显降低

表 2¹⁸F-阿法肽(Alfatide Ⅱ)在肺癌 A549 皮下荷瘤裸鼠 体内注射后不同时间生物学分布(%ID/g;*x*±s)

器官或	注射后不同时间的放射性摄取值					
组织	1 h	1 h +阻断	2 h			
心脏	0.89±0.26	0.16±0.05	1.39±0.24			
肝脏	4.38 ± 0.88	1.06 ± 0.32	5.92 ± 0.66			
肺	1.82 ± 0.30	0.49 ± 0.17	2.37 ± 0.55			
肾	7.64±2.11	3.10 ± 0.67	9.40±1.25			
脾	2.47 ± 0.40	0.40 ± 0.12	3.10±0.51			
骨骼	0.84 ± 0.05	0.38 ± 0.21	1.11±0.47			
肌肉	1.07 ± 0.45	0.21 ± 0.09	1.30±0.19			
血液	0.16 ± 0.09	0.13 ± 0.01	0.07 ± 0.03			
肿瘤	2.83 ± 1.47	0.57 ± 0.27	3.40 ± 0.89			

注:各时间点的鼠数均为4只;%ID/g为每克组织百分注射剂量率

的放射性峰,表明¹⁸F-Alfatide Ⅱ在小鼠体内主要以

原药的形式排出。

讨 论

¹⁸F-Alfatide II 为含有 RGD 二聚体结构的一种 新型放射性标记分子探针。Guo 等^[6]比较了几种不 同结构的 RGD 类似物与整合素 α,β,的亲和力,其 中¹⁸F-Alfatide II 的半数抑制浓度为 127.93 nmol/L (U87MG 细胞),表明其与整合素 α,β,有高度亲和 力,且优于几种同类的 RGD 类似物;引入 NOTA 基 团对 RGD 多肽的活性影响不大^[4,6]。与第 1 代¹⁸F-Alfatide 相比,¹⁸F-Alfatide II 通过引入 2 个 PEG₄基 团,增加了 RGD 单体之间的柔性,增加每个 RGD 单 体与整合素受体结合的概率,有利于增强配体与受 体间的亲和力,从而提高肿瘤摄取。有实验结果表明,¹⁸F-Alfatide II具有更好水溶液稳定性、更低的肝脏摄取及更高的肿瘤积累^[6]。因此,¹⁸F-Alfatide II 具备制备简便、亲和力高和稳定性好等优势,值得进一步研究。

本研究在已有文献基础上,通过在几种不同的 荷瘤裸鼠模型中进行 microPET/CT 显像,确定了¹⁸ F-Alfatide II 在给药后 10 min 左右肿瘤摄取达最大 值,40 min 左右达较高的靶/非靶比值,可定量反映 整合素 α_νβ₃ 表达,并实现对整合素 α_νβ₃ 高表达肿 瘤的特异性显像,图像质量明显优于相同条件下 的¹⁸ F-FDG 显像。由于本研究是基于动物水平的实 验研究,与临床数据有很大差别,如¹⁸ F-FDG 在 MDA-MB-231 乳腺癌荷瘤鼠肿瘤的摄取很低,但¹⁸ F-FDG 在乳腺癌患者中有明显摄取。需注意,本研究 仅探讨了 2 种显像剂在 MBA-MD-231 荷瘤裸鼠模型 中的比较,不能代表对乳腺癌的诊断。另外,小动物 的基础代谢比较活跃,导致¹⁸ F-FDG 在肌肉组织和 棕色脂肪组织中有较高的非特异性摄取,对¹⁸ F-FDG 肿瘤显像效果有一定干扰。

有研究报道.¹⁸ F-Alfatide Ⅱ 能检出¹⁸ F-FDG 不 能检出的小转移灶,对于骨转移早期诊断的准确性 为92%,高于¹⁸F-FDG的77%;特别是对于成骨细胞 骨转移灶,¹⁸F-Alfatide II的早期检出率明显高于¹⁸F-FDG(70%与53%)^[9]。另有研究报道,¹⁸F-Alfatide II 和¹⁸F-FDG 双显像剂动态显像同时监测血管再生和 新陈代谢可用于肿瘤治疗的疗效评估[7]。本研究 结果显示.¹⁸F-Alfatide Ⅱ单独用于 A549 原位肺癌 诊断时,肿瘤/心脏摄取比值为4.50,远大于¹⁸F-FDG 组,说明前者有更好的靶/非靶比值,更利于原位肺 癌的诊断。在阻断实验中,c(RGDyk)可显著降低 肿瘤对¹⁸F-Alfatide Ⅱ的摄取,实验结果与文献[4, 6]报道一致,进一步证明了¹⁸F-Alfatide Ⅱ与整合素 α_{β} , 亲和力高(肿瘤摄取高)且特异性好(抑制效 果明显),整合素 α_{β} ,表达高的肿瘤具有更高的摄 取值。本研究生物学分布实验与 microPET/CT 显 像结果相吻合,验证了 microPET/CT 显像结果。另 外,药代动力学数据表明,¹⁸F-Alfatide Ⅱ可从荷瘤裸 鼠和 Beagle 犬体内以原药形式快速清除,主要通过 尿液排出,表明其具有良好的药代动力学性能;其在

体内的快速分布及在非靶组织中的快速清除,一方 面可以减少非靶组织的放射性浓聚,有利于提高靶/ 非靶比值进而获得高对比度图像;另一方面,非靶组 织的快速清除可以大大降低患者的内辐照吸收剂量。

综上,¹⁸F-Alfatide Ⅱ在部分荷瘤裸鼠模型肿瘤 诊断方面具有较高的亲和力,靶/非靶比值高于¹⁸F-FDG,值得进一步行临床试验研究,以充分探索其潜 在优势。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Debordeaux F, Chansel-Debordeaux L, Pinaquy JB, et al. What about $\alpha_{\nu}\beta_{3}$ integrins in molecular imaging in oncology? [J]. Nucl Med Biol, 2018, 62-63; 31-46. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2018.04. 006.
- [2] Chen H, Niu G, Wu H, et al. Clinical application of radiolabeled RGD peptides for PET imaging of integrin $\alpha_{\nu}\beta_{3}[J]$. Theranostics, 2016, 6(1): 78-92. DOI:10.7150/thno.13242.
- [3] Zhu Z, Miao W, Li Q, et al. ⁹⁹Tc^m-3PRGD₂ for integrin receptor imaging of lung cancer: a multicenter study [J]. J Nucl Med, 2012, 53(5): 716-722. DOI:10.2967/jnumed.111.098988.
- [4] Liu S, Liu H, Jiang H, et al. One-step radiosynthesis of ¹⁸F-AlF-NOTA-RGD₂ for tumor angiogenesis PET imaging [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011, 38 (9): 1732-1741. DOI: 10.1007/ s00259-011-1847-4.
- [5] Wan W, Guo N, Pan D, et al. First experience of ¹⁸F-Alfatide in lung cancer patients using a new lyophilized kit for rapid radiofluorination [J]. J Nucl Med, 2013, 54 (5): 691-698. DOI: 10. 2967/jnumed.112.113563.
- [6] Guo J, Lang L, Hu S, et al. Comparison of three dimeric ¹⁸F-AlF-NOTA-RGD tracers
 [J]. Mol Imaging Biol, 2014, 16(2): 274-283. DOI:10.1007/s11307-013-0668-1.
- [7] Guo J, Guo N, Lang L, et al. ¹⁸F-Alfatide II and ¹⁸F-FDG dualtracer dynamic PET for parametric, early prediction of tumor response to therapy[J]. J Nucl Med, 2014, 55(1): 154-160. DOI: 10.2967/jnumed.113.122069.
- [8] Yu C, Pan D, Mi B, et al. ¹⁸F-Alfatide II PET/CT in healthy human volunteers and patients with brain metastases [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015, 42 (13): 2021-2028. DOI: 10.1007/ s00259-015-3118-2.
- [9] Mi B, Yu C, Pan D, et al. Pilot prospective evaluation of ¹⁸F-Alfatide II for detection of skeletal metastases [J]. Theranostics, 2015, 5 (10): 1115-1121. DOI:10.7150/thno.12938.
- [10] Lang L, Li W, Guo N, et al. Comparison study of [¹⁸F]FAI-NOTA-PRGD₂, [¹⁸F]FPPRGD₂, and [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-PRGD₂ for PET imaging of U87MG tumors in mice[J]. Bioconjug Chem, 2011, 22 (12): 2415-2422. DOI:10.1021/bc200197h.

(收稿日期:2018-12-24)