

· 基础研究 ·

¹⁷⁷Lu-EB-RGD 分子探针的构建及其在非小细胞肺癌 PDX 模型中的显像与治疗研究

富凯丽¹ 赵亮¹ 郭志德² 文雪君² 姚兰琳³

张现忠² 陈小元⁴ 林勤¹ 吴华³ 陈皓鳌³

¹厦门大学附属第一医院放射治疗科 361003; ²厦门大学分子影像暨转化医学研究中心 361102; ³厦门大学附属第一医院核医学科 361003; ⁴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, 马里兰州贝塞斯达 20892

通信作者: 陈皓鳌, Email: leochen0821@foxmail.com

【摘要】目的 构建靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 诊疗一体化放射性分子¹⁷⁷Lu-伊文思蓝(EB)-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)并探讨其用于非小细胞肺癌(NSCLC)-患者来源异种移植瘤(PDX)模型显像及治疗的效果。**方法** 将RGD肽与白蛋白结合基团EB相连接, 构建特异性靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的EB-RGD, 并经螯合剂1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)偶联完成靶向分子¹⁷⁷Lu标记。构建68只NSCLC-PDX模型鼠, 取28只注射¹⁷⁷Lu-EB-RGD或¹⁷⁷Lu-RGD行microSPECT显像和生物分布研究; 另行¹⁷⁷Lu-EB-RGD放射靶向治疗实验: 取PDX模型鼠40只, 分为生理盐水组(A组)、18.5 MBq¹⁷⁷Lu-RGD组(B组)、18.5 MBq¹⁷⁷Lu-EB-RGD组(C组)、29.6 MBq¹⁷⁷Lu-EB-RGD组(D组), 每组10只, 观察治疗后50 d内模型鼠肿瘤体积变化情况。2组间比较采用两独立样本t检验。**结果** ¹⁷⁷Lu-EB-RGD的标记率在95%以上, 比活度为(55±14) GBq/ μ mol, 其体外稳定性好, 放化纯大于95%。注射¹⁷⁷Lu-EB-RGD后4~96 h, NSCLC-PDX模型鼠肿瘤清晰可见, 注射后4、24、72、96 h的肿瘤/肌肉摄取比值(T/M)分别为7.34±0.67、14.63±3.82、15.69±3.58及15.99±5.42; 生物分布结果显示¹⁷⁷Lu-EB-RGD摄取[每克组织百分注射剂量率(%ID/g)]与SPECT显像结果一致, 且4 h时的¹⁷⁷Lu-EB-RGD在肿瘤中的摄取明显高于¹⁷⁷Lu-RGD[(10.15±1.17)与(3.30±1.47)%ID/g; t=18.60, P<0.05]。¹⁷⁷Lu-EB-RGD治疗后, A组与B组模型鼠的肿瘤体积均快速增加; 而C组与D组肿瘤体积呈持续降低趋势, 在第28天时C组与D组肿瘤均已肉眼不可见, 且在随后的监测时间内未见复发。**结论** ¹⁷⁷Lu-EB-RGD能靶向 $\alpha_v\beta_3$ 阳性的NSCLC-PDX模型, 显像效果好, 对肿瘤生长有明显抑制作用, 有望为晚期靶向治疗耐药或无效的肺癌患者提供新的治疗策略。

【关键词】 癌, 非小细胞肺; 异种移植模型抗肿瘤试验; 伊文思蓝; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; 镉; 小鼠, 裸

基金项目: 国家自然科学基金(81701736)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20190626-00118

Development of ¹⁷⁷Lu-EB-RGD molecular probe and its imaging and therapy in the patient-derived xenografts of non-small cell lung cancer

Fu Kaili¹, Zhao Liang¹, Guo Zhidé², Wen Xuejun², Yao Lanlin³, Zhang Xianzhong², Chen Xiaoyuan⁴, Lin Qin¹, Wu Hua³, Chen Haojun³

¹Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China;

²Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

³Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China;

⁴Laboratory of Molecular Imaging and Nanomedicine, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland MD 20892, USA

Corresponding author: Chen Haojun, Email: leochen0821@foxmail.com

[Abstract] **Objective** To develop a novel $\alpha_v\beta_3$ -targeted theranostic agent ¹⁷⁷Lu-Evans blue (EB)-Arg-Gly-Asp (RGD) and evaluate its value for SPECT imaging and targeted radionuclide therapy in the non-small cell lung cancer (NSCLC)-patient-derived xenografts (PDX). **Methods** The $\alpha_v\beta_3$ -targeted molecule RGD was conjugated with the albumin binding moiety EB to obtain EB-RGD, and EB-RGD was further conjugated with the chelator 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) for ¹⁷⁷Lu radiolabeling. NSCLC-PDX mice models ($n=68$) were established. ¹⁷⁷Lu-EB-RGD SPECT imaging, biodis-

tribution study were performed in 28 PDX mice models after being injected with ^{177}Lu -EB-RGD or ^{177}Lu -RGD. Targeted radionuclide therapy were subsequently performed in NSCLC-PDX mice models, saline group (group A), 18.5 MBq ^{177}Lu -RGD group (group B), 18.5 MBq ^{177}Lu -EB-RGD group (group C), 29.6 MBq ^{177}Lu -EB-RGD group (group D), $n=10$ in each group; tumor volumes of PDX mice models in each group were observed within 50 d. Differences between 2 groups were compared using independent-sample *t* test. **Results** ^{177}Lu -EB-RGD was radiolabeled at a specific activity of (55 ± 14) GBq/ μmol , with a radiochemical yield of more than 95% and a radiochemical purity of more than 95%. Regarding the SPECT imaging, tumors in NSCLC-PDX mice were clearly observed from 4 to 96 h post-injection and the tumor to muscle ratio (T/M) reached 7.34 ± 0.67 , 14.63 ± 3.82 , 15.69 ± 3.58 and 15.99 ± 5.42 at 4, 24, 72, 96 h post-injection, respectively. Biodistribution study further confirmed the findings from SPECT imaging, and the tumor uptake of ^{177}Lu -EB-RGD were markedly increased compared to ^{177}Lu -RGD 4 h post-injection (10.15 ± 1.17) vs (3.30 ± 1.47) percent injection dose per gram (%ID/g); $t=18.60$, $P<0.05$). Regarding targeted radiotherapy, the tumor volumes were quickly increased within 50 d after treatment in group A and B, while the tumor volumes were decreased in group C and D, until the tumors in group C and D disappeared at the 28th day after initial treatment with no sign of recurrence during the observation period. **Conclusions** ^{177}Lu -EB-RGD can target $\alpha_v\beta_3$ -positive NSCLC-PDX with intense tumor to background ratio and strong tumor inhibition efficacy. The preclinical data suggests that ^{177}Lu -EB-RGD may be an effective new treatment option for advanced NSCLC patients with resistance or ineffective results for targeted therapy.

【Key words】 Carcinoma, non-small-cell lung; Xenograft model antitumor assays; Evans blue; Arginine-glycine-aspartic acid; Lutetium; Mice, nude

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81701736)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20190626-00118

肺癌是世界范围内最常见的癌症，也是男性癌症死亡的主要原因^[1]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占所有肺癌的 80%~85%，大多数患者在发现时已处于临床晚期，失去了手术机会^[2]。第3代新药联合铂类二药化疗方案是治疗晚期 NSCLC 的标准方案，但有效率仅为 20%~35%，患者总生存期为 10~12 个月，患者很难再从化疗中进一步获益^[3~4]。受体介导的放射性核素靶向治疗 (targeted radionuclide therapy, TRT) 是以靶向肿瘤受体的多肽探针为载体，利用受体-配体特异性结合的原理将放射性核素载送到肿瘤部位，通过放射性核素的辐射杀伤作用对肿瘤进行特异性、靶向性地内照射治疗^[5]，有望成为治疗晚期 NSCLC 的新方法。

肿瘤血管生成是肿瘤生长过程中的关键环节之一^[6]。高表达于新生血管内皮细胞和肿瘤细胞表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是目前肿瘤诊断和治疗的热门靶点之一^[7]。大部分 NSCLC 组织中高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ ，多种正电子核素标记的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 多肽作为分子探针已成功用于 NSCLC 的 PET 显像，并可评估不同肺癌组织整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达水平^[8]，部分探针已进入临床研究阶段^[9~11]。然而遗憾的是，应用 RGD 探针对 NSCLC 进行 TRT 的研究发展相对缓慢。主要原因之一是 RGD 多肽生物半衰期较短，血液清除快。要想提高放射性核素标记 RGD 多肽的 TRT 效果，必须延长放射性分子探针在血液中的循环时间，进而

提高肿瘤摄取及延长探针在肿瘤中的滞留时间。

伊文思蓝 (Evans blue, EB) 是一种偶氮染料，其与血浆白蛋白具有很高的亲和力，是生理及临床研究中的重要工具^[12~13]。本研究组前期研究发现，基于修饰 EB 配合物的研究策略在改善治疗药物的药代动力学特性方面具有良好的应用前景^[14~15]。本研究通过化学共价结合的技术方法将 RGD 环肽 [c(RGDFK)] 与 EB 配合物 (truncated EB, tEB) 相融合，制备出一种可以靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的 tEB-c(RGDFK) (简称 EB-RGD)，将其作为 NSCLC TRT 的生物载体，再利用诊疗一体化的放射性核素 ^{177}Lu 标记 EB-RGD，探讨 ^{177}Lu -EB-RGD 分子探针在 NSCLC-患者来源异种移植瘤 (patient-derived xenografts, PDX) 中的 SPECT 显像及 TRT 效果。

材料与方法

1. 主要试剂及实验动物。RPMI 1640 细胞培养液及双抗(青霉素-链霉素)均购于美国 Gibco 公司；c(RGDFK)、双功能螯合剂 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) 和 RGD-SH 购于中肽生化有限公司(杭州)；tEB 及顺丁烯二酰亚胺 (maleimide)-tEB 由美国国立卫生研究院陈小元教授惠赠； ^{177}Lu 购于德国 ITG 公司。实验裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [BALB/c nude，均为雌性，鼠龄 4~6 周，体质量 15~20 g；许可证号：SCXK(京)2019-0009] 并饲养在厦门大学实验

动物中心,饲养环境:无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级。

2. NSCLC 手术标本的采集及处理。完善术前检查及术前准备,征得患者及家属同意并签署相关知情同意书后,由胸外科医师手术切除完整新鲜的肿瘤组织放入无菌盘内,术中快速冰冻切片病理学检查结果为 NSCLC 后,迅速选取质量较好的肺癌组织(尽可能避开肿瘤组织周围有炎性反应、坏死区域;切取肿瘤组织要在手术台无菌条件下进行,以保持肿瘤组织标本无菌)放于盛有含双抗(青霉素、链霉素)RPMI 1640 细胞培养液的标本管中,密封保存于冰盒内。后将取到的肺癌肿瘤组织完全浸泡于含双抗的 RPMI 1640 细胞培养液中,带回动物房操作,中途保存标本于 4 ℃ 冰盒内。整个运转在 4 h 内完成。

3. NSCLC-PDX 模型的建立及传代。于无菌生物安全柜内取出并切取一小部分样本,使用体积分数 4% 甲醛溶液固定,24 h 后用石蜡包埋,用于免疫组织化学检测;剩余大部分用于 PDX 模型建立:将肿瘤组织修剪成 1 mm³ 大小,并用含双抗的 RPMI 1640 培养液清洗 3 遍;用异氟烷麻醉裸鼠 5~10 只,打开裸鼠右侧前肢腋部皮肤,将肿瘤组织注射至裸鼠右侧前肢腋部皮下。每周至少观察 1 次肿瘤种植情况(包括有无肿瘤生长及测量肿瘤大小)。若肿瘤种植成功,该裸鼠即为 P1 代,同法进行肿瘤传代。传代至 P4 及更多代次后用于生物学实验研究,以确保生成足够的经病理确认的组织标本。

4. EB-RGD 的合成及放射性核素标记。按本课题组前期实验步骤合成经 DOTA 偶联的 EB-RGD^[16]:将经过 DOTA 偶联的 maleimide-tEB (0.1 mmol)、RGD-SH 依次溶解于 2 ml 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS; pH=7.2)中,室温下搅拌 1 h,经高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)C18 反相柱[沃特世科技(上海)有限公司产品]纯化,冷冻干燥得紫色产物 DOTA-tEB-c(RGDfK),简称 EB-RGD(图 1)。将 100 μg EB-RGD 溶解在 1 ml 0.25 mol/L 的醋酸钠溶液中,用 0.05 mol/L HCl 将¹⁷⁷LuCl₃ 溶液稀释至 4 ml;混合上述 2 种溶液,100 ℃ 条件下反应 30 min,冷却后将反应瓶内的液体通过 C18 小柱压入废液瓶。最后将 1 ml 体积分数 70% 乙醇溶液通过 C18 柱和无菌滤膜注入反应瓶(尾静脉注射时溶液中的乙醇体积分数约为 10%)。采用 HPLC 法对¹⁷⁷Lu-EB-RGD 进行质量控制,放化纯>98%方可使用。

5. NSCLC-PDX 模型肿瘤摄取及生物分布研究。

取 NSCLC-PDX 模型鼠 8 只(体质量及肿瘤大小相近),分为 2 组(每组 4 只),分别经尾静脉分别注射¹⁷⁷Lu-EB-RGD 或¹⁷⁷Lu-RGD 18.5 MBq。于注射后 4、24、72 及 96 h 时行静态 microSPECT 显像(nanoscan Mediso SPECT/CT,匈牙利):主能峰 113 keV 和 208 keV,窗宽 30%,矩阵 256×256,中倍焦,45 s/帧(多针孔 SPECT 非旋转采集 30 s/帧)。采用包含 CT 校正的三维迭代 SPECT 重建软件 Tera-TomoTM 进行图像重建。观察和分析图像清晰度、药物在肿瘤中的摄取及滞留时间、药物在正常组织中的摄取。勾画感兴趣区(region of interest, ROI)进行定量分析,计算肿瘤、肝、心脏与肌肉摄取比值。

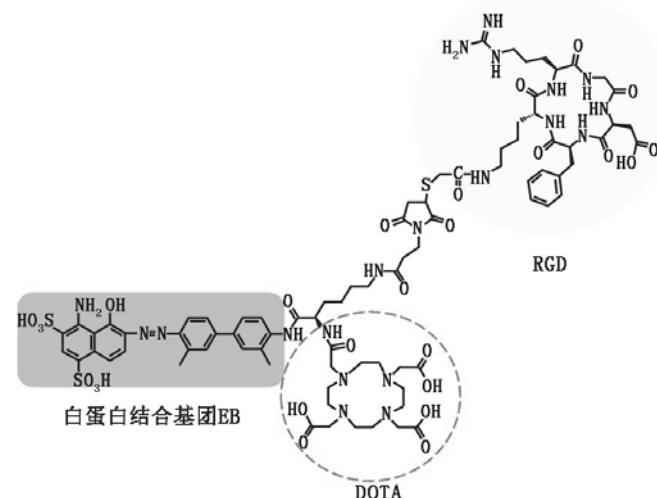


图 1 经螯合剂 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)偶联的伊文思蓝(EB)-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)化学结构示意图

为进一步论证 SPECT 显像结果的准确性,另取 20 只 NSCLC-PDX 模型鼠(体质量及肿瘤大小相近)分为 5 组,每组 4 只。其中 4 组经尾静脉注射 0.55 MBq¹⁷⁷Lu-EB-RGD,分别于 4、24、48 和 72 h 后经麻醉处死,另 1 组经尾静脉注射约 0.55 MBq¹⁷⁷Lu-RGD,4 h 后麻醉处死,取主要脏器测质量并测量放射性计数(美国 Perkin-Elmer WIZARD 2480 型 γ 计数器),衰变校正后计算每克组织百分注射剂量率(percent injection dose per gram, %ID/g)。

6. ¹⁷⁷Lu-EB-RGD TRT。(1) 测定最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)。MTD 为不引起体质量降低>20%或不引起 1 个剂量组中至少 1 只裸鼠死亡的最大剂量。取 24 只正常裸鼠(体质量及肿瘤大小相近),分为 3 组,每组 8 只,分别自尾静脉注射 7.4、18.5、29.6 MBq 的¹⁷⁷Lu-EB-RGD,每隔 2 d 观察裸鼠表现并称体质量,连续观察 50 d。MTD 实验

结果显示,注射 7.4、18.5 及 29.6 MBq 的¹⁷⁷Lu-EB-RGD 后,各组裸鼠均未出现死亡或明显的体质量下降,故选择 18.5 及 29.6 MBq 作为 TRT 的核素剂量。

(2) TRT。取 40 只肿瘤体积 100~150 mm³ 的 NSCLC-PDX 模型鼠(体质量相近),分为 4 组(A、B、C、D 组),每组 10 只。A 组为对照组,仅接受 100 μl 生理盐水注射;B~D 组为治疗组,分别经尾静脉注射¹⁷⁷Lu-RGD(B 组:18.5 MBq)或¹⁷⁷Lu-EB-RGD(C 组:18.5 MBq;D 组:29.6 MBq)。治疗后每 2 d 监测 1 次荷瘤裸鼠体质量及肿瘤大小,计算肿瘤体积[长径(mm)×短径(mm)×短径(mm)/2],共监测 50 d。当荷瘤裸鼠出现以下症状时,将其麻醉后处死:(1)体质量下降程度大于 15%;(2)肿瘤体积超过 1 500 mm³;(3)肿瘤出现溃烂;(4)出现受刺激无反应、全身皮疹等异常表现。

7. 统计学处理。用 IBM SPSS 19.0 软件进行分析,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对¹⁷⁷Lu-EB-RGD 注射组和¹⁷⁷Lu-RGD 注射组的肿瘤摄取、生物分布(%ID/g)等数据行两独立样本 t 检验;对靶向治疗的 4 组间肿瘤体积差异比较采用重复测量方差分析,两两比较采用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 产物化学与放射化学检测。成功制得¹⁷⁷Lu-EB-RGD,放射性标记在 100 ℃ 条件下 15 min 内完成,经 HPLC 检测,产物标记率及放化纯均大于 95%,比活度为(55±14) GBq/μmol。

2. NSCLC-PDX 模型的建立与鉴定。收集到 8 例 NSCLC 患者(术后病理进一步明确为肺腺癌)的新鲜肿瘤标本进行移植,成功建立了 3 个不同的 NSCLC-PDX 模型,P1 代成瘤率为 3/8。成瘤的 3 份患者肿瘤标本中,1 份整合素 α_vβ₃ 呈强阳性表达,NSCLC-PDX 模型鼠整合素 α_vβ₃ 表达情况与原组织阳性率一致;另外 2 个模型整合素 α_vβ₃ 呈阴性表达。选择整合素 α_vβ₃ 强阳性表达的 NSCLC-PDX 模型鼠进行传代至 P4 及更多代次后,选取 68 只模型鼠用于相关实验研究。每代移植瘤均生长状态良好,HE 染色示原组织与移植瘤组织病理学形态一致(图 2);免疫组织化学染色示原组织与移植瘤组织阳性表达一致[细胞角蛋白(cytokeratin, CK)7、甲状腺转录因子-1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)、天冬氨酸蛋白酶(Napsin-A)、P63 均为阳性,突触素、CK5 和 CK6 均为阴性,增殖细胞核抗原 Ki-67

均为 70%]。

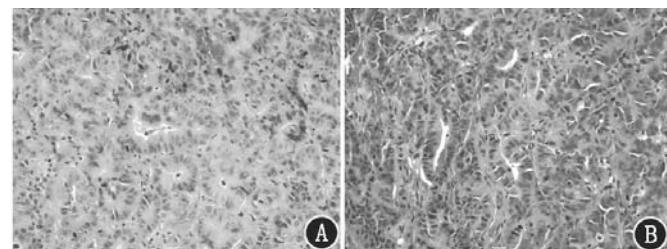


图 2 非小细胞肺癌(NSCLC)-患者肿瘤组织与患者来源异种移植瘤(PDX)组织的病理检查图(HE ×100)。A. NSCLC 原组织形态;B. P4 代 NSCLC-PDX 组织形态

3. ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 在整合素 α_vβ₃ 阳性 NSCLC-PDX 模型鼠中的生物评价。注射¹⁷⁷Lu-EB-RGD 后 4~96 h,模型鼠肿瘤清晰可见,对比度好(图 3A)。¹⁷⁷Lu-EB-RGD 在肿瘤中的摄取明显高于未经 EB 修饰的¹⁷⁷Lu-RGD(图 3B)。¹⁷⁷Lu-EB-RGD 在模型鼠中的本底随时间逐渐降低,24 h 后的显像示,除肿瘤组织外,仅肠道有少量的放射性摄取;注射后 4、24、72、96 h 的肿瘤/肌肉比值(tumor/muscle ratio, T/M)分别为 7.34±0.67、14.63±3.82、15.69±3.58 及 15.99±5.42(图 4)。¹⁷⁷Lu-EB-RGD 4 h 显像的 T/M 值(7.34±0.67)高于¹⁷⁷Lu-RGD 显像的相应比值(2.90±0.30; $t = 10.75, P < 0.05$)。

生物分布实验结果(表 1)显示,¹⁷⁷Lu-EB-RGD 摄取与 SPECT 图像所示基本一致,其在肿瘤中的摄取明显高于未经 EB 修饰的¹⁷⁷Lu-RGD[4 h 的摄取值分别为(10.15±1.17)与(3.30±1.47) %ID/g; $t = 18.60, P < 0.05$]。

4. ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 对整合素 α_vβ₃ 阳性 NSCLC-PDX 模型鼠的 TRT。治疗过程中无实验动物死亡。肿瘤初始大小约为 100 mm³,治疗后 50 d 内,A、B 组 PDX 模型鼠的肿瘤体积均快速增大,2 组模型鼠在治疗后第 38 天起肿瘤体积均在 1 500 mm³ 以上;C、D 组肿瘤体积第 6 天开始缩小且呈持续降低趋势,在第 28 天时 2 组肿瘤均已肉眼不可见,且在随后的监测时间内(22 d;共观察 50 d)未见复发(图 5A)。同一时间点不同组的肿瘤体积差异有统计学意义($F=24.88, P < 0.01$)。治疗后第 2 天及第 4 天,A~D 组肿瘤体积差异不具有统计学意义(F 值:1.19、4.13, 均 $P > 0.05$);治疗后第 6 天,A~D 组间肿瘤体积的差异有统计学意义($F=10.95, P < 0.05$):A 组体积大于 C 和 D 组($P=0.01$ 和 $P=0.03$),B 组体积亦大于 C 和 D 组(均 $P < 0.01$),但 A、B 组间,C、D 组间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。在随后的监测时间(44 d)内,A、B 组与 C、D 组间肿瘤体积的差

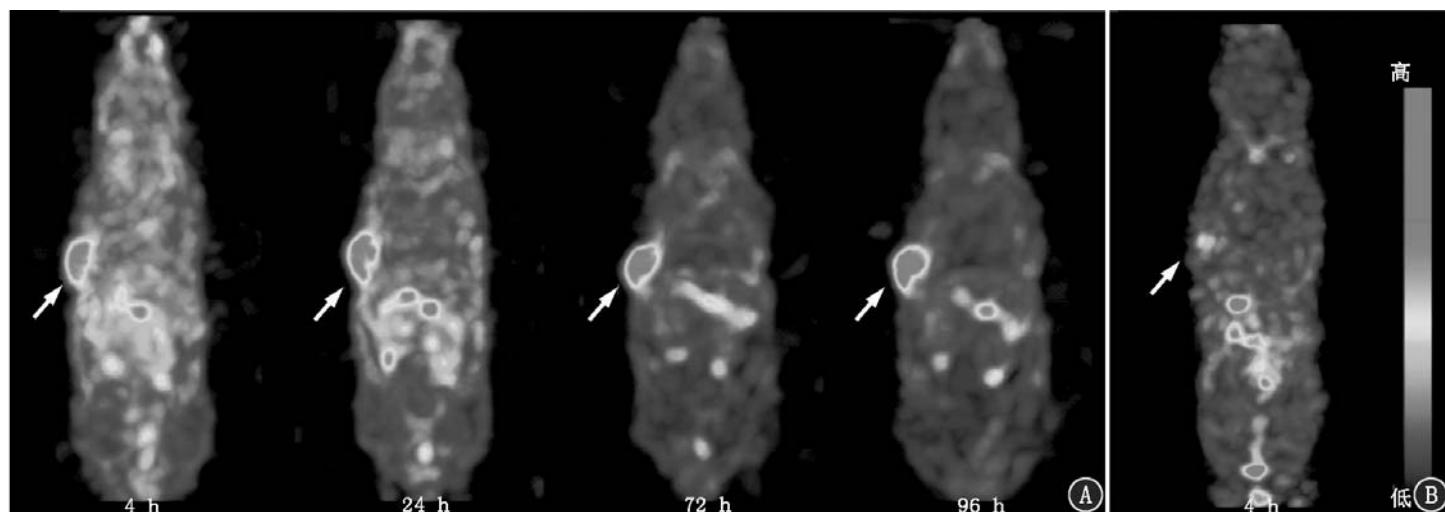


图 3 非小细胞肺癌(NSCLC)-患者来源异种移植瘤(PDX)模型鼠的SPECT显像最大密度投影(MIP)图。A.经尾静脉注射¹⁷⁷Lu-伊文思蓝(EB)-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)后不同时间的显像图(箭头示肿瘤);B.经尾静脉注射¹⁷⁷Lu-RGD后4 h的显像图(箭头示肿瘤)

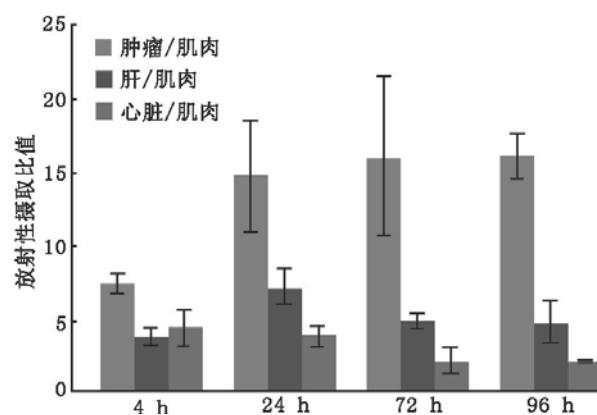


图 4 注射¹⁷⁷Lu-EB-RGD 后 4~96 h 的 NSCLC-PDX 模型鼠肿瘤及主要脏器与肌肉的摄取比值(每个时间点 4 只模型鼠)

表 1 ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 和 ¹⁷⁷Lu-RGD 注射后不同时间 NSCLC-PDX 模型鼠的生物分布结果(%ID/g; $\bar{x} \pm s$)

组织 器官	¹⁷⁷ Lu-EB-RGD				¹⁷⁷ Lu-RGD 注射后 4 h
	4 h	24 h	48 h	72 h	
心脏	4.67±0.59	2.94±0.19	2.44±1.77	1.64±0.67	0.93±0.55
肝	7.56±4.89	5.91±1.94	5.91±1.78	4.11±0.30	1.36±0.21
肺	7.32±1.50	8.99±1.45	6.81±1.00	6.30±2.72	1.52±0.68
肾	9.82±1.83	14.61±5.62	10.65±1.48	8.72±0.28	4.46±3.82
脾	7.87±1.95	11.35±3.07	9.31±1.53	8.47±0.74	1.64±0.37
胃	2.02±0.79	2.76±1.82	3.33±1.90	3.20±0.62	1.02±0.24
骨骼	1.60±0.82	3.91±3.29	3.98±1.28	2.66±0.43	1.65±0.33
肌肉	1.52±0.69	1.37±0.28	1.69±0.33	2.20±1.57	1.25±0.34
小肠	2.64±0.90	5.41±0.93	4.94±1.72	3.92±1.24	1.60±0.66
血液	13.00±1.55	7.44±1.12	6.47±0.62	6.41±0.85	0.14±0.19
脑	0.79±0.23	5.53±3.53	3.94±1.88	2.35±1.02	0.59±0.24
肿瘤	10.15±1.17	13.38±1.04	14.97±6.71	14.00±3.18	3.30±1.47

注: %ID/g 为每克组织百分注射剂量率, EB 为伊文思蓝, NSCLC 为非小细胞肺癌, PDX 为患者来源异种移植瘤, RGD 为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; 每个时间点为体质量及肿瘤大小相近的 4 只模型鼠

异随时间逐渐增加。4 组实验动物的体质量变化曲线见图 5B, A 组模型鼠的体质量随时间逐渐上升; D

组体质量在治疗后第 2 天开始下降, 第 10 天降至最低, 并逐渐恢复至正常水平; B、C 组模型鼠体质量在给药后亦有所下降, 但下降趋势较为缓和, 随后逐渐恢复至正常水平。

讨 论

目前已有以整合素 $\alpha_v\beta_3$ 为靶点进行肿瘤 TRT 的相关研究^[17-18]。有学者希望通过 RGD 肽的多聚化来增强 RGD 对整合素受体的亲和力, 提高肿瘤对放射性探针的摄取^[19], 但多聚化的负面效应亦非常严重, 正常组织特别是肾对放射性探针的摄取明显提高, 增加了放射毒性^[20]。

本课题组采用了不同的研究策略, 即通过化学共价修饰的方法将白蛋白结合基团 EB 与 RGD 分子相结合, 经双功能螯合剂连接后构建出靶向分子 EB-RGD, 以期进一步提高 RGD 探针在肿瘤的摄取及滞留时间, 避免 RGD 单体肽在血液中清除速率快、半衰期短的不足, 减少 RGD 肽在肾中的摄取。前期实验研究显示注射后 24 h, ⁶⁴Cu-EB-RGD 在 U87MG 肿瘤中的摄取较普通单体 ⁶⁴Cu-RGD 提高了近 17 倍^[16]。本研究构建了分子探针 ¹⁷⁷Lu-EB-RGD, NSCLC-PDX 裸鼠模型 SPECT 显像及生物分布实验显示, ¹⁷⁷Lu-EB-RGD 较 ¹⁷⁷Lu-RGD 有明显提高的肿瘤摄取及肿瘤滞留时间, 而在其他正常脏器(如肾、肝等)中的摄取则随时间逐渐减少。在将来的临床应用中, 在治疗前进行放射性标记 EB-RGD PET 或 SPECT 显像来观察分子探针在肿瘤中的摄取, 有助于评估肿瘤患者整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达水平, 进而筛选出对靶向治疗敏感的患者。

本研究结果出现了个别器官 SPECT 显像和生

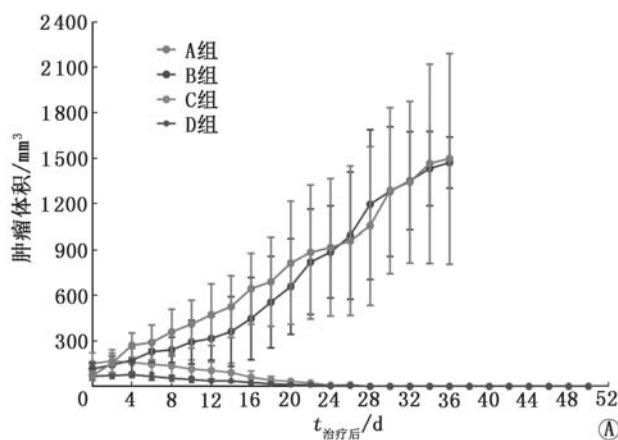


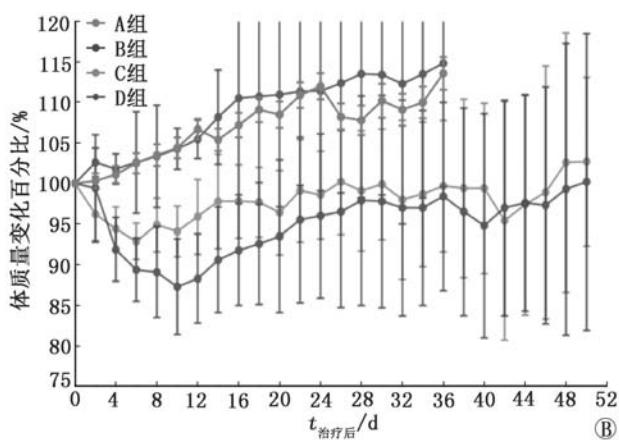
图 5 各组非小细胞肺癌(NSCLC)-患者来源异种移植瘤(PDX)模型鼠(每组 $n=10$)治疗后肿瘤生长(A)和鼠体质量变化曲线(B;治疗起始体质量设定为 100%)。A 组注射生理盐水,B 组 18.5 MBq ^{177}Lu -精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD),C 组 18.5 MBq ^{177}Lu -伊文思蓝(EB)-RGD 组,D 组注射 29.6 MBq ^{177}Lu -EB-RGD;38 d 时 A 组与 B 组模型鼠肿瘤体积超过 1500 mm^3 ,停止监测

物分布不一致的显像:在 SPECT 显像中 ^{177}Lu -EB-RGD 肿瘤摄取高于血液摄取,但在生物分布实验中血液摄取却高于肿瘤摄取。这种现象仅出现在注射后 4 h,这可能与显像和生物分布实验时所注射的药物放射性活度与化学量不同有关:SPECT 显像注射的 ^{177}Lu -EB-RGD 放射性活度(约 18.5 MBq)远高于生物分布实验的注射活度(约 0.55 MBq)。这种现象在其他研究中亦曾被报道,故有学者提出生物分布和 SPECT 显像结果仅适于进行定性比较^[21-22]。

本课题组还进行了 PDX 模型鼠 TRT 实验。治疗结果显示,与 A 组和 B 组不同,C 组、D 组肿瘤体积在治疗后第 6 天就开始缩小且呈持续降低趋势,在治疗后第 28 天肿瘤完全消失,体现了 ^{177}Lu -EB-RGD 对 NSCLC-PDX 模型鼠的抑瘤作用。此外,治疗期间各组模型鼠体质量均未出现明显降低,无实验动物死亡,表明 ^{177}Lu -EB-RGD 在体内毒性与不良反应小,将来可通过增加给药剂量达到更好的治疗效果。

PDX 模型近年来备受关注,其通过将新鲜的肿瘤组织块直接接种到免疫缺陷鼠上构建而得,接种的肿瘤依靠裸鼠提供的微环境进行生长。与传统的肿瘤细胞来源异种移植(cell-derived tumor xenograft, CDX)模型相比,PDX 模型减少了体外培养步骤,保留了原代肿瘤的微环境。本研究数据表明,NSCLC-PDX 模型在组织病理学与分子层面均能和患者原发灶保持一致,可作为评价 NSCLC 靶向个体化治疗临床试验的理想平台。

综上, ^{177}Lu -EB-RGD 可明显延长 RGD 分子探针的在体循环时间,提高肿瘤摄取,延长在肿瘤中的滞留时间,同时降低了正常组织的摄取,从而增强了靶向显像和 TRT 的有效性。此外,通过 NSCLC-



PDX 模型的建立,实现了 NSCLC ^{177}Lu -EB-RGD TRT 的临床前转化研究,有望为晚期靶向治疗耐药或无效的肺癌患者提供新的治疗策略和手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-386. DOI:10.1002/ijc.29210.
- [2] Ettinger DS, Akerley W, Bepler G, et al. Non-small cell lung cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8(7): 740-801. DOI:10.6004/jnccn.2010.0056.
- [3] Pilkington G, Boland A, Brown T, et al. A systematic review of the clinical effectiveness of first-line chemotherapy for adult patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer[J]. Thorax, 2015, 70(4): 359-367. DOI:10.1136/thoraxjnl-2014-205914.
- [4] Saito H, Nakagawa K, Takeda K, et al. Randomized phase II study of carboplatin-paclitaxel or gemcitabine-vinorelbine in patients with advanced nonsmall cell lung cancer and a performance status of 2: West Japan Thoracic Oncology Group 0004[J]. Am J Clin Oncol, 2012, 35(1):58-63. DOI:10.1097/COC.0b013e318201a0f3.
- [5] Gill MR, Falzone N, Du Y, et al. Targeted radionuclide therapy in combined-modality regimens[J]. Lancet Oncol, 2017, 18(7): e414-e423. DOI:10.1016/S1470-2045(17)30379-0.
- [6] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. Semin Oncol, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18. DOI:10.1053/sonc.2002.37263.
- [7] Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2): 91-100. DOI:10.1038/nrc727.
- [8] 付彤,王峰,立彦,等. ^{99}Tcm -3P-RGD2 用于肺癌整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达水平检测的实验研究[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(6): 464-468. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.06.015.
- Fu T, Wang F, Li Y, et al. In vivo and in vitro studies of ^{99}Tcm -3P-RGD2 targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ in lung cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2013, 33(6): 464-468. DOI:10.3760/cma.j.

- issn.2095-2848.2013.06.015.
- [9] Zheng K, Liang N, Zhang J, et al. ⁶⁸Ga-NOTA-PRGD2 PET/CT for integrin imaging in patients with lung cancer [J]. J Nucl Med, 2015, 56(12): 1823-1827. DOI: 10.2967/jnumed.115.160648.
- [10] Gao S, Wu H, Li W, et al. A pilot study imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ with RGD PET/CT in suspected lung cancer patients [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015, 42(13): 2029-2037. DOI: 10.1007/s00259-015-3119-1.
- [11] 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.
- [12] Ehlerding EB, Lan X, Cai W. "Albumin hitchhiking" with an Evans blue analog for cancer theranostics [J]. Theranostics, 2018, 8(3): 812-814. DOI: 10.7150/thno.24183.
- [13] Niu G, Lang L, Kiesewetter DO, et al. *In vivo* labeling of serum albumin for PET [J]. J Nucl Med, 2014, 55(7): 1150-1156. DOI: 10.2967/jnumed.114.139642.
- [14] Wang Y, Lang L, Huang P, et al. *In vivo* albumin labeling and lymphatic imaging [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(1): 208-213. DOI: 10.1073/pnas.1414821112.
- [15] Zhang J, Lang L, Zhu Z, et al. Clinical translation of an albumin-binding PET radiotracer ⁶⁸Ga-NEB [J]. J Nucl Med, 2015, 56(10): 1609-1614. DOI: 10.2967/jnumed.115.159640.
- [16] Chen H, Jacobson O, Niu G, et al. Novel "add-on" molecule based on Evans blue confers superior pharmacokinetics and transforms drugs to theranostic agents [J]. J Nucl Med, 2017, 58(4): 590-597. DOI: 10.2967/jnumed.116.182097.
- [17] Dijkgraaf I, Terry SY, McBride WJ, et al. Imaging integrin alpha-v-beta-3 expression in tumors with an ¹⁸F-labeled dimeric RGD peptide [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2013, 8(3): 238-245. DOI: 10.1002/cmmi.1523.
- [18] Veeravagu A, Liu Z, Niu G, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radioimmunotherapy of glioblastoma multiforme [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(22): 7330-7339. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0797.
- [19] 王凡, 刘昭飞. RGD 多肽放射性药物的研究现状及发展趋势 [J]. 中华核医学杂志, 2008, 28(2): 142-144. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2008.02.026.
- Wang F, Liu ZF. The current status and trends of studies on radio-labeled RGD peptides [J]. Chin J Nucl Med, 2008, 28(2): 142-144. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2008.02.026.
- [20] Liu Z, Shi J, Jia B, et al. Two ⁹⁰Y-labeled multimeric RGD peptides RGD4 and 3PRGD2 for integrin targeted radionuclide therapy [J]. Mol Pharm, 2011, 8(2): 591-599. DOI: 10.1021/mp100403y.
- [21] Guo Z, Gao M, Song M, et al. Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc-labeled dimeric folic acid for FR-targeting [J]. Molecules, 2016, 21(6). pii: E817. DOI: 10.3390/molecules21060817.
- [22] Müller C, Schibli R, Krenning EP, et al. Pemetrexed improves tumor selectivity of ¹¹¹In-DTPA-folate in mice with folate receptor-positive ovarian cancer [J]. J Nucl Med, 2008, 49(4): 623-629. DOI: 10.2967/jnumed.107.047704.

(收稿日期:2019-06-26)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于论著文稿中英文摘要的书写要求

根据 GB6447-86 的定义, 文摘是以提供文献内容梗概为目的, 不加评价和解释, 简明确切地记述文献重要内容的短文。摘要应具有自明性和独立性, 并拥有与一次文献同等量的主要信息。即不阅读全文就能获得必要的信息。它的详简程度取决于文献的内容, 通常中文文摘以不超过 400 字为宜。应以第三人称的语气书写。不要使用“本人”、“作者”、“我们”等作为陈述的主语。

摘要的内容应包括四个要素, 即目的、方法、结果、结论。(1)目的: 指研究的前提和缘起, 即为什么要作此项研究, 可以有简单的背景材料。(2)方法: 指研究所用的原理、对象、观察和实验的具体方法等。(3)结果: 指研究的结果、效果、数据等, 着重反映创新性的、切实可行的成果, 包括本组研究中的重要数据。(4)结论: 指对结果进行综合分析, 逻辑推理得出的判断。有的可指出实用价值和推广价值; 如有特殊例外的发现或难以解决的问题, 可以提出留待今后深入探讨。英文摘要的内容与中文摘要的内容要求大体一致。

英文摘要要求做到语法正确, 用词准确, 与中文摘要对应, 方法、结果可略详于中文摘要。必要时, 作者在投稿前请英文书写水平高的人员帮助修改。英文文题后列出全部作者及其单位、科室(包括城市、邮编)的英文规范表达。要求使用 A4 纸打印, 行间距为 2 行, 纸边距两边各留 2~3 cm。

敬请广大读者、作者周知, 并遵照此要求投稿。