

# 特异性短肽二聚体<sup>125</sup>I-SWL2 在 SD 大鼠中的药代动力学及在荷非小细胞肺癌裸鼠中的生物分布

吴涛 汪会 蒋金辉 赵学峰 余文静 徐慧琴  
安徽医科大学第一附属医院核医学科,合肥 230022

通信作者:徐慧琴, Email: hfhuiqinxu@163.com

基金项目:国家自然科学基金(81401448)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20201231-00467

**Pharmacokinetics of the specific short peptide dimer <sup>125</sup>I-SWL2 in SD rats and its biodistribution in nude mice bearing A549 cells**

Wu Tao, Wang Hui, Jiang Jinhui, Zhao Xuefeng, Yu Wenjing, Xu Huiqin

Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: Xu Huiqin, Email: hfhuiqinxu@163.com

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81401448)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20201231-00467

肺癌已成为国内发病率和致死率均排首位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。靶向免疫治疗是近年的研究热点<sup>[2]</sup>。酪氨酸受体激酶家族被认为在肿瘤细胞的粘附、迁移、增殖及肿瘤新生血管形成过程中起着关键作用<sup>[3]</sup>,尤其肝配蛋白 A 型受体 2 (ephrin type-A receptor 2, EphA2) 及其配体,是目前该领域的焦点<sup>[4]</sup>。前期研究发现,<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> 借助螯合剂联胍尼克酰胺 (hydrazinonicotinamide, HYNIC) 标记的 SWLAYPGAVSYRK (SWL)——<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-SWL,可作为非小细胞肺癌潜在的显像剂<sup>[5]</sup>,且有研究表明 SWL-Ahx-k-SWL (SLW2) 与 EphA2 的结合能力是 SWL 的 13 倍<sup>[6]</sup>,故本研究采用<sup>125</sup>I 对 SWL2 进行标记,探讨其药代动力学及活体生物分布,并验证活体显像的可行性。

## 一、材料与与方法

1. 实验动物。SD 大鼠 6 只,雌雄各半,体质量 160~190 g; 雄性 BALB/c 荷 A549 瘤裸鼠 30 只,肿瘤体积 150~400 mm<sup>3</sup>,均由北京维通利华实验动物有限公司提供,在无特殊病原体级环境下饲养。实验动物使用许可证号:SCXK(京)-2016-0006。动物实验经本院伦理委员会批准。

2. SWL 及 SWL2 的<sup>125</sup>I 标记。采用 Iodogen 氧化法进行标记<sup>[7]</sup>,纯化后测定产物的放化纯。将标记后的药物分别置于 37 ℃ SD 大鼠血清、荷瘤裸鼠血清,2~8 ℃ PBS 中,分别于 0、1、2、4、6、24 h 检测其放化纯。

3. 细胞结合及摄取实验。将 A549 细胞按 1×10<sup>6</sup> 个/孔接种至 12 孔板中,培养过夜,用 PBS 洗涤后置换成无血清培养基备用。将<sup>125</sup>I-SWL 及<sup>125</sup>I-SWL2 分别以 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 nmol/L 7 个浓度加入到 12 孔板,终体积 0.5 ml,每个浓度设 3 个复孔。摄取实验中每孔分别加入终体积 0.5 ml、浓度为 5 nmol/L 的<sup>125</sup>I-SWL 及<sup>125</sup>I-SWL2,设 3 个复孔,作为实验组。结合实验细胞于 37 ℃ 细胞培养箱中温育 2 h,摄取实验细胞于 37 ℃ 分别温育 0.5、1、2 及 4 h,完成后吸取上清液,用 PBS 洗涤 2 次,收集洗涤液及上清液加入上清液管,然后采用 0.1 mol/L NaOH 溶解细胞,收集洗涤液和细胞溶解液

加入细胞管,采用 DFM-96 型 γ 计数仪(合肥众城机电技术开发有限公司产品)进行计数,计算结合率及摄取率(%) [C<sub>细胞</sub>/(C<sub>细胞</sub>+C<sub>上清液</sub>)×100(C 代表放射性计数)]。

4. 药代动力学实验。取 6 只 SD 大鼠,于尾静脉注射<sup>125</sup>I-SWL2(按体质量约 0.6 mg/kg、0.925 MBq/只),给药前及给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、1 d 分别采集全血,检测显像剂分布并计算药物浓度及药代动力学参数。

5. 生物分布实验。取雄性 A549 荷瘤裸鼠 18 只,于尾静脉注射<sup>125</sup>I-SWL2(按体质量约 0.4 mg/kg、0.925 MBq/只),给药后 0.5、2、6、24、48 及 72 h 分别处死 3 只,处死前采集全血,分离各主要脏器并测量样品总放射性,按比活度转化为各组织放射性药物浓度。

6. MicroSPECT/CT 活体显像。取雄性 A549 荷瘤裸鼠 12 只,采用完全随机法分为<sup>125</sup>I-SWL2 组、SWL2+<sup>125</sup>I-SWL2 组和<sup>125</sup>I-SWL 组,每组 4 只。<sup>125</sup>I-SWL 给药剂量约按体质量 0.8 mg/kg、7.4 MBq/只,SWL2 约 3 mg/只。经尾静脉给药后 0.5、2、6、24、48 及 72 h 进行静态扫描 10~30 min,勾画 ROI 并计算脏器与肌肉的摄取比值。

7. 统计学处理。采用 IBM SPSS 18.0 进行统计分析。符合正态分布的定量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示;<sup>125</sup>I-SWL 与<sup>125</sup>I-SWL2 的细胞结合率和摄取率比较采用配对 *t* 检验,不同组间的肿瘤/肌肉比值比较采用重复测量方差分析,进一步两两比较行最小显著差异 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. <sup>125</sup>I-SWL 及<sup>125</sup>I-SWL2 的标记与质量控制。<sup>125</sup>I-SWL2 的标记率和放化纯分别为(63.5±12.3)%、(97.8±3.3)%,<sup>125</sup>I-SWL 的标记率和放化纯分别为(65.5±17.7)%、(96.8±2.5)%。2 种药物在不同条件下放置 24 h 后基本稳定,放化纯均>85%。

2. 细胞结合及摄取实验。<sup>125</sup>I-SWL 及<sup>125</sup>I-SWL2 与 A549 细胞的结合率在约 5 nmol/L 浓度时进入平台期,分别为(22.7±1.3)%、(34.0±1.4)% ,差异有统计学意义(*t*=4.06,*P*=0.007)。

A549 细胞对<sup>125</sup>I-SWL 及<sup>125</sup>I-SWL2 摄取率在 2 h 最高,分别为 (22.9±1.2)%、(33.7±2.9)%,差异有统计学意义( $t=6.62, P=0.006$ )。

3. <sup>125</sup>I-SWL2 的 药代动力学。全血<sup>125</sup>I-SWL2 浓度呈先升高后逐渐下降的趋势(图 1)。总放射性清除半衰期为(138.8±19.5) min, 药物 AUC<sub>(0-1440 min)</sub> 为(502.6±71.8) mg Equ · L<sup>-1</sup> · min。

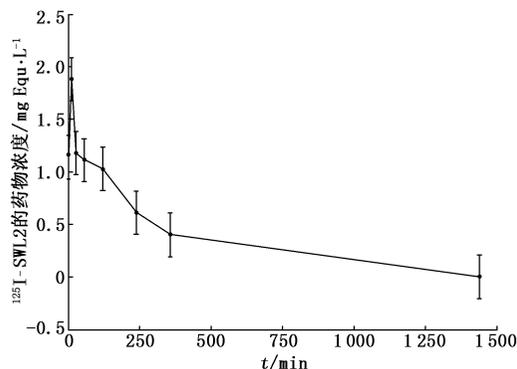


图 1 <sup>125</sup>I-SWLAYPGAUSYRK (SWL)-Ahx-k-SWL (SWL2) 在 SD 大鼠中的药代动力学曲线

4. 生物分布。不同时间全血与各组织的显像剂分布依次为脾>胃>肝>血液>肺>肾>肿瘤>肠>睾丸>脂肪>股骨>心脏>肌肉>脑,具体见表 1。

5. MicroSPECT/CT 显像。各脏器与肌肉摄取比值随着时间的延长不断降低(图 2);注射后 6 h,<sup>125</sup>I-SWL2 组、SWL2+<sup>125</sup>I-SWL2 组和<sup>125</sup>I-SWL 组的肿瘤/肌肉摄取比值分别为 1.98±0.39、0.55±0.08、1.31±0.27,<sup>125</sup>I-SWL2 组比其余 2 组高( $F=14.36, t$  值:3.45、8.32, $P$  值:0.004~0.035)。

三、讨论

既往研究表明,靶向治疗可以显著改善非小细胞肺癌的临床结局<sup>[8]</sup>。早期靶向治疗原理主要集中在基因突变重排、激酶抑制、阻断信号通路及抗血管生成等方面<sup>[9]</sup>,目前免疫靶向治疗(如酪氨酸激酶抑制剂)越来越多地用于肺癌<sup>[10]</sup>。相较于有的研究用放射性铜或铈来监测肿瘤组织中的酪氨

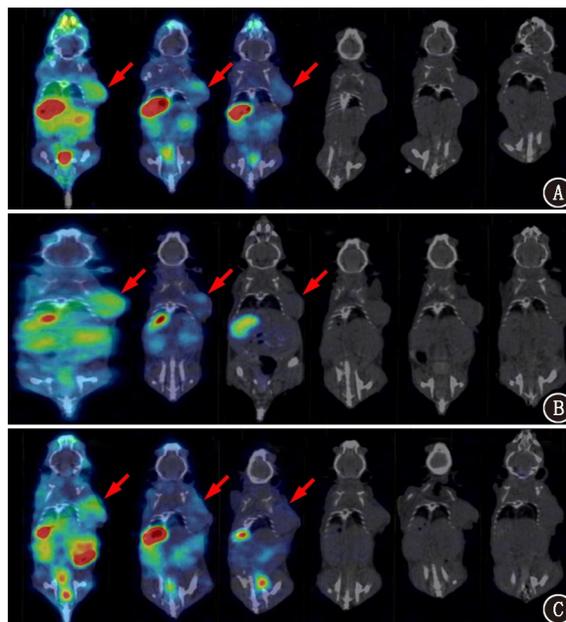


图 2 3 组荷瘤裸鼠的 microSPECT/CT 显像图(从左至右分别为注射后 0.5、2、6、24、48 和 72 h;箭头示肿瘤)。A. <sup>125</sup>I-SWL2 组;B. SWL2+<sup>125</sup>I-SWL2 组;C. <sup>125</sup>I-SWL 组

酸受体 EphA2<sup>[11]</sup>,本研究采用易获取、标记简单且能诊疗一体化的<sup>125</sup>I 来监测肺癌组织中 EphA2 的表达。

有研究显示 SWL2 与 EphA2 的结合能力是 SWL 的 13 倍<sup>[6]</sup>,但本研究结果表明,SWL2 与受体的结合能力只有 SWL 的不到 2 倍,且随着时间的延长呈逐渐下降趋势。本研究药代动力学实验结果显示,<sup>125</sup>I-SWL2 血液清除速度较快,提示活体显像时可获得较低本底的图像;A549 荷瘤裸鼠生物分布实验结果显示,肝脾有大量显像剂聚集,这可能与肝脾细胞的吞噬作用有关,而肺和胃的显像剂聚集主要是药物大分子短暂性嵌顿于局部毛细血管网所致。肿瘤/肌肉摄取比值低于前期研究<sup>[5]</sup>,可能与标记核素和方法有关。本研究在未阻断甲状腺的情况下只有少量的碘聚集于甲状腺,表明生物分布结

表 1 <sup>125</sup>I-SWL2 在雄性 A549 荷瘤裸鼠体内的生物分布(mg Equ · L<sup>-1</sup> · min; $\bar{x}\pm s$ )

脏器或组织	注射后不同时间点的生物分布						
	0.5 h	2 h	6 h	24 h	48 h	72 h	
血液	923.95±74.83	405.27±50.26	81.31±65.88	2.83±0.93	-	-	
心脏	307.74±41.89	122.29±24.01	28.28±21.95	-	-	-	
肝	491.65±79.89	251.86±55.14	102.21±21.77	28.91±20.45	24.81±7.53	21.58±18.06	
脾	647.99±116.56	543.27±171.28	362.09±257.22	172.48±66.27	86.56±29.26	50.52±19.97	
肺	702.76±95.56	278.84±13.08	90.33±31.41	13.02±3.69	5.55±1.07	8.90±3.82	
肾	712.65±44.11	316.75±18.20	77.70±38.45	8.87±1.47	4.10±0.14	3.06±0.36	
胃	806.99±108.21	844.72±397.86	191.11±96.34	22.97±5.22	12.38±2.49	8.01±0.91	
肠	403.69±162.83	210.42±131.26	53.00±24.74	19.08±5.74	-	-	
睾丸	272.03±34.94	192.43±26.64	54.40±37.71	7.78±0.91	-	-	
脑	59.38±6.16	15.62±2.22	4.57±2.87	-	-	-	
脂肪	396.95±286.67	182.02±134.41	37.80±15.43	-	-	-	
肌肉	192.69±34.95	132.50±80.29	32.12±9.76	-	-	-	
股骨	276.55±74.71	173.74±64.01	36.64±6.00	-	-	-	
肿瘤	567.58±59.67	255.66±45.57	55.50±41.88	2.88±1.24	-	-	

注:各时间点鼠数均为 3 只;“-”表示该样品未检测到放射性计数;SWL2 为 SWLAYPGAUSYRK (SWL)-Ahx-k-SWL

果可靠。本研究活体显像结果表明,<sup>125</sup>I-SWL2 主要是通过肾和脾代谢,2 h 后本底浓聚逐渐减低,与药代动力学实验结果一致。<sup>125</sup>I-SWL2 组的肿瘤显像剂浓聚程度高于其他 2 组,尤其是在药物注射后 6 h 时,提示 SWL2 与 EphA2 的结合能力高于 SWL,且大剂量的非标记二聚体(SWL2)可以有效阻断受体与标记物的结合,表明了 SWL2 与受体结合的特异性。

综上,新型探针<sup>125</sup>I-SWL2 在 SD 大鼠中具有较快的血清清除率及理想的 AUC,与 EphA2 可以特异性结合,药物注射后 6 h 是最佳的显像时间,但 24 h 后在体内的生物分布快速下降,该探针离临床转化仍有较长距离。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明** 吴涛:实验设计、论文撰写;汪会、蒋金辉:统计分析、数据解释;赵学峰、余文静:研究实施、数据采集;徐慧琴:研究指导、论文修改

### 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] Rolfo C, Caglevic C, Santaripa M, et al. Immunotherapy in NSCLC: a promising and revolutionary weapon[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 995: 97-125. DOI:10.1007/978-3-319-53156-4\_5.
- [3] Ieguchi K, Maru Y. Roles of EphA1/A2 and ephrin-A1 in cancer[J]. Cancer Sci, 2019, 110(3): 841-848. DOI: 10.1111/cas.13942.
- [4] Tandon M, Vemula SV, Mittal SK. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(1): 31-51. DOI:10.1517/14728222.2011.538682.
- [5] Liu Y, Lan X, Wu T, et al. <sup>99m</sup>Tc-labeled SWL specific peptide for targeting EphA2 receptor[J]. Nucl Med Biol, 2014, 41(6): 450-

456. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2014.03.020.

- [6] Duggineni S, Mitra S, Lamberto I, et al. Design and synthesis of potent bivalent peptide agonists targeting the EphA2 receptor[J]. ACS Med Chem Lett, 2013, 4(3): 344-348. DOI: 10.1021/ml3004523.
- [7] 吴涛,安锐,张斌青,等. <sup>131</sup>I-FIAU/TK 报告基因系统监测大鼠脑梗死模型中移植细胞的研究[J].中华核医学杂志, 2011, 31(5): 301-305. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2011.05.006. Wu T, An R, Zhang BQ, et al. Monitoring stem cell transplantation in rat cerebral ischemic infarction model with <sup>131</sup>I-FIAU/TK reporter gene system[J]. Chin J Nucl Med, 2011, 31(5): 301-305. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2011.05.006.
- [8] 富凯丽,赵亮,郭志德,等. <sup>177</sup>Lu-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[J]. 中华核医学与分子影像学杂志, 2020, 40(4): 231-237. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20190626-00118. Fu KL, Zhao L, Guo ZD, et al. Development of <sup>177</sup>Lu-EB-RGD molecular probe and its imaging and therapy in the patient-derived xenografts of non-small cell lung cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40(4): 231-237. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20190626-00118.
- [9] Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(6): 1392-1433. DOI:10.18632/oncotarget.1891.
- [10] Tanaka T, Yamada H, Kuroki M, et al. A modified adenovirus vector-mediated antibody screening method identifies EphA2 as a cancer target[J]. Transl Oncol, 2017, 10(4): 476-484. DOI:10.1016/j.tranon.2017.04.001.
- [11] Burvenich IJ, Parakh S, Gan HK, et al. Molecular imaging and quantitation of EphA2 expression in xenograft models with <sup>89</sup>Zr-DS-8895a[J]. J Nucl Med, 2016, 57(6): 974-980. DOI:10.2967/jnumed.115.169839.

(收稿日期:2020-12-31)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 医学论文中有关实验动物描述的要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物者,在描述中应符合以下要求:(1)品种、品系描述清楚;(2)强调来源;(3)遗传背景;(4)微生物学质量;(5)明确体质量;(6)明确等级;(7)明确饲养环境和实验环境;(8)明确性别;(9)有无质量合格证;(10)有对饲养方式的描述(如饲养类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);(11)所有动物数量准确;(12)详细描述动物的健康状况;(13)对实验动物的处理方式有单独清楚的交代;(14)全部有对照,部分可采用双因素方差分析。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。卫生部课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

本刊编辑部