

靶向 EphA2 新型放射性示踪剂的研制及其初步评价

史津宇 艾丁丁 李继会 章斌 葛书山 邓胜明

苏州大学附属第一医院核医学科, 苏州 215031

通信作者: 邓胜明, Email: dshming@163.com

【摘要】 目的 制备一种新型的⁶⁸Ga 标记靶向肝配蛋白 A 型受体 2(EphA2)的大环肽探针,并评估其在荷瘤鼠中的显像能力,探索其在前列腺癌诊断中的潜力。方法 本研究采用成组设计。设计并合成⁶⁸Ga-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)-EP2,测定其标记产率、放化纯及体外稳定性。通过流式细胞术、细胞摄取实验、荷瘤鼠 microPET 显像、生物分布以及病理分析,评估探针的靶向性、特异性及体内生物学行为。采用两独立样本 *t* 检验、重复测量方差分析及 Bonferroni 校正比较组间数据差异。结果 ⁶⁸Ga-NOTA-EP2 标记产率为(72.3±1.6)% (未校正; *n* = 3),放化纯>95%。体外稳定性实验显示,该探针在 PBS 与血浆中温育 2 h 后放化纯仍>95%。流式细胞术分析表明,PC-3 细胞中 EphA2 的表达明显高于 LNCaP 细胞(*t* = 142.13, *P* < 0.001),且体外细胞摄取实验显示各时间点⁶⁸Ga-NOTA-EP2 探针在 PC-3 细胞中的摄取均高于 LNCaP 细胞及 PC-3 阻断组[*F* 值: 832.60、494.40、203.80,均 *P* < 0.001 (Bonferroni 校正)]。荷瘤鼠 microPET 显像结果显示,正常 PC-3 组较 LNCaP 组及 PC-3 阻断组移植瘤显影清晰,且对比度良好。注射探针后 60 min,PC-3 移植瘤的摄取值[单位:每立方厘米组织百分注射剂量率(%ID/cc)]为(6.63±0.13),高于 LNCaP 组对应值(0.35±0.10)及 PC-3 阻断组对应值[0.11±0.04; *F* = 4 555.00,均 *P* < 0.001 (Bonferroni 校正)]。在 60 min 时,PC-3 组的肿瘤/肌肉(T/M)比值为 20.21±3.69,高于 LNCaP 组(1.66±0.79)和 PC-3 阻断组[1.93±0.59; *F* = 122.60,均 *P* < 0.001 (Bonferroni 校正)]。离体生物分布显示,注射探针后 120 min,PC-3 移植瘤中摄取值[单位:每克组织百分注射剂量率(%ID/g)]为(11.31±1.52),高于 LNCaP 组对应值(0.52±0.13)及 PC-3 阻断组对应值(0.16±0.04)。体内显像结果与离体免疫组织化学分析结果一致。结论 成功制备了靶向 EphA2 的⁶⁸Ga-NOTA-EP2 探针,其具有良好的靶向性和体内显像表现,可作为前列腺特异膜抗原(PSMA)阴性、EphA2 阳性前列腺癌的潜在分子影像工具。

【关键词】 前列腺肿瘤;受体, EphA2;同位素标记;镓放射性同位素;正电子发射断层显像术;肿瘤细胞,培养的;小鼠,裸

基金项目:江苏省卫生健康委科研项目(H2023020);同位素及药物国家工程研究中心同位素及药物创新基金项目(TWSCX-2023-CXJJ-11-1);苏州大学放射医学与辐射防护国家重点实验室开放课题(GZK12024010)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20250319-00083

Development and preliminary evaluation of a novel EphA2-targeted radiotracer

Shi Jinyu, Ai Dingding, Li Jihui, Zhang Bin, Ge Shushan, Deng Shengming

Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215031, China

Corresponding author: Deng Shengming, Email: dshming@163.com

【Abstract】 **Objective** To develop a novel ⁶⁸Ga-labeled cyclic peptide probe targeting the erythropoietin-producing hepatocellular A2 (EphA2) and to evaluate its imaging performance in tumor-bearing mice and explore its potential for the diagnosis of prostate cancer. **Methods** This study was a parallel-group design. ⁶⁸Ga-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (NOTA)-EP2 was designed and synthesized, and its radiolabeling yield, radiochemical purity (RCP), and *in vitro* stability were determined. The targeting capability, specificity, and *in vivo* biological behavior of the probe were assessed by flow cytometry, cellular uptake assays, microPET imaging, biodistribution, and histopathological analysis. The independent-sample *t* test, repeated measures analysis of variance, and Bonferroni correction were utilized to analyze data. **Results** The radiochemical yield of ⁶⁸Ga-NOTA-EP2 was (72.3±1.6)% (*n* = 3; uncorrected), with RCP over 95%. The probe was chemically stable *in vitro*, retaining RCP>95% after 2 h incubation in PBS and in plasma. Flow cytometry analysis revealed that EphA2 expression was significantly higher in PC-3 cells compared to that in LNCaP cells (*t* = 142.13, *P* < 0.001). *In vitro* cell uptake experiments demonstrated that the uptake of ⁶⁸Ga-NOTA-EP2 probe was significantly greater in PC-3 cells than that in LNCaP cells and that in

PC-3 blocked group (F values: 832.60, 494.40, 203.80, all $P < 0.001$ (Bonferroni correction)). Micro-PET imaging of tumor-bearing mice showed that PC-3 group were more clearly visualized with better contrast compared to LNCaP group and PC-3 blocked group. At 60 min post-injection, the tumor uptake value (percentage activity of injection dose per cubic centimeter of tissue, %ID/cc) in PC-3 group was 6.63 ± 0.13 , which was significantly higher than that in LNCaP group (0.35 ± 0.10) and that in PC-3 blocked group (0.11 ± 0.04 ; $F = 4\ 555.50$, both $P < 0.001$ (Bonferroni correction)). At the same time point, the tumor/muscle (T/M) ratio in PC-3 group was 20.21 ± 3.69 , which was significantly greater than that of LNCaP group (1.66 ± 0.79) and that of PC-3 blocked group (1.93 ± 0.59 ; $F = 122.60$, both $P < 0.001$ (Bonferroni correction)). At 120 min after injection, *ex vivo* biodistribution demonstrated sustained tracer accumulation (percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g) in PC-3 tumors (11.31 ± 1.52), whereas uptake in LNCaP (0.52 ± 0.13) and in PC-3 blocked group (0.16 ± 0.04) were close to the background. The results were consistent with the immunohistochemistry staining. **Conclusions** A novel ^{68}Ga -NOTA-EP2 probe targeting EphA2 is successfully developed, showing excellent targeting capability and favorable *in vivo* imaging properties. This probe holds promise as a molecular imaging tool for detecting prostate cancers that are prostate specific membrane antigen (PSMA)-negative but EphA2-positive.

【Key words】 Prostatic neoplasms; Receptor, EphA2; Isotope labeling; Gallium radioisotopes; Positron-emission tomography; Tumor cells, cultured; Mice, nude

Fund program: Project of Medical Research Fund of Jiangsu Provincial Health Commission (H2023020); Project of the National Engineering Research Center of Isotopes and Drugs (TWSCX-2023-CXJJ-11-1); Project of State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Soochow University (GZK12024010)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20250319-00083

前列腺癌是全球男性中第 2 大常见的恶性肿瘤,具有高度的异质性^[1-2]。虽然基于前列腺特异膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)的 PET/CT 显像剂已在临床获得广泛应用^[3-4],但仍有约 10% 的患者因 PSMA 表达缺失或雄激素剥夺治疗影响而出现假阴性结果^[5-7]。因此,亟需开发新的更精准的显像探针。

肝配蛋白 A 型受体 2 (erythropoietin-producing hepatocellular A2, EphA2) 是一种受体型酪氨酸激酶,在多种实体瘤中高表达,可促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。研究显示,EphA2 在前列腺癌中的表达水平与恶性程度密切相关^[8]。研究表明,EphA2 与 PSMA 在前列腺癌中呈互补表达,仅极少数患者两者均低表达,显示出其作为显像靶点的重要潜力,然而,目前针对前列腺癌的 EphA2 放射性显像研究仍在早期阶段^[9]。

本研究设计并合成一种靶向 EphA2 的新型大环肽示踪剂 ^{68}Ga -1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid, NOTA)-EP2[探针设计基于已有环肽结构,结合 EphA2 靶点特性,通过引入 L 型赖氨酸和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)链进行分子优化,增强其靶向性和显像性能],并通过体内外实验系统评估其靶向性与显像性能,探索其在前列腺癌(尤其是 PSMA 阴性亚型)显像中的应用潜力。

材料与方 法

一、实验材料

1. 主要材料与仪器。电子天平(Sartorius 公司,

德国);小动物 PET/CT 显像系统[Super Nova SNPC-303,平生医疗科技(昆山)有限公司];C18 固相萃取柱(Waters 公司,美国);小动物麻醉机(MS-5 型,上海玉研科学仪器有限公司);分析型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪(Waters 公司,美国),固定相为分析型 C18 高效液相色谱柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm;Symmetry, Waters 公司,美国),流动相 A 为含体积分数 0.1% 三氟乙酸的水、B 为含体积分数 0.1% 三氟乙酸的乙腈,洗脱梯度:0~3 min 为 95% A、3.01~23 min 为 95%~35% A、23.01~24 min 为 35% A~5% A、24.01~30 min 为 5% A,流速为 1 ml/min; $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器(Eckert & Ziegler 公司,德国);异氟烷购自山东安特牧业科技有限公司。

2. 实验细胞与动物。人前列腺癌细胞株 PC-3 (EphA2 高表达)、LNCaP (PSMA 高表达)购自浙江美森细胞科技有限公司。雄性 BALB/c 裸鼠 27 只,6~8 周龄,体质量(21 ± 1) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司;小鼠均无特殊病原体级环境饲养。实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2022-0043。本研究中所涉及的动物实验均严格遵循中华人民共和国《实验动物管理条例》以及所属单位动物实验管理规范的相关要求。

二、实验方法

1. ^{68}Ga -NOTA-EP2 的制备。前体 NOTA-EP2 委托上海睿智化学研究有限公司合成。 ^{68}Ga -NOTA-EP2 的放射性标记见图 1。称取 NOTA-EP2 50 μg ,加水溶解至 1.5 ml 离心管中。用 0.1 mol/L 盐酸淋洗 ^{68}Ge - ^{68}Ga

发生器,收集 0.5 ml $^{68}\text{GaCl}_3$ 洗脱液 (370 MBq),加入 100 μl 1 mol/L 乙酸钠,调节 pH 值至 4 后,与前体混合,37 $^\circ\text{C}$ 下反应 10 min,然后冷却,以 5 ml 水稀释后注入活化的 C18 固相萃取柱纯化。使用 0.3 ml 10 mmol/L 盐酸乙醇溶液淋洗得到标记产物 ^{68}Ga -NOTA-EP2,用生理盐水稀释,经 0.22 μm 滤膜过滤至无菌西林瓶中,采用 HPLC 测定放化纯并计算比活度。

2. 体外稳定性研究。取 100 μl 7.4 MBq ^{68}Ga -NOTA-EP2 溶液,分别与 300 μl 人血浆和 300 μl PBS 于 37 $^\circ\text{C}$ 温育,定期取样检测放化纯。PBS 直接取样以 HPLC 仪测定放化纯;血浆与等量乙腈混合,室温离心 (10 000 r/min,离心半径 4 cm) 30 s 收集上清液,0.22 μm 滤膜过滤后,采用 HPLC 检测其稳定性。

3. 流式细胞术分析。分别将 PC-3 和 LNCaP 细胞悬浮于 PBS 中,浓度为 1×10^6 个细胞/100 μl 。用 0.2 μg 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) anti-human EphA2 (美国 Biologend 公司) 抗体对细胞进行染色并进行温育,使用 CytExpert for DxFLEx 软件进行数据分析。

4. 体外细胞摄取实验。将 PC-3 和 LNCaP 细胞 (每孔 10^5 个) 平铺在 24 孔板上温育过夜。PBS 洗涤后加入 37 kBq ^{68}Ga -NOTA-EP2,每种细胞各 3 孔,进行平行实验。37 $^\circ\text{C}$ 下再次温育,分别在 30、60、120 min 时,用 PBS 漂洗细胞 3 次,并用 0.1 mol/L NaOH 溶解。收集溶液,通过 γ 测量仪测定剩余放射性活度。应用加入的总放射性计数对细胞摄取进行归一化,表达值为摄取百分比 (percentage absorbed dose, %AD)/ 10^5 个细胞。PC-3 阻断组中加入 500 倍量 NOTA-EP2 (5 μg) 进行阻断摄取实验。

5. 荷瘤鼠 microPET 显像。将 1×10^7 个 PC-3 或 LNCaP 细胞分别植入每只裸鼠的右侧腋窝。正常饲养,待肿瘤体积为 100~300 mm^3 时用于后续动物实验。本研究动物实验均采用成组设计。microPET 显像裸鼠共分为 3 组:PC-3 组、PC-3 阻断组和 LNCaP 组,

每组 3 只 (采用随机数字表法进行简单随机分组)。荷瘤鼠经体积分数 2% 异氟烷麻醉后置于 microPET/CT 仪上,经尾静脉注射 100 μl 7.4 MBq ^{68}Ga -NOTA-EP2。PC-3 阻断组在注射探针前 5 min 预先经尾静脉注射 500 倍量的未标记 NOTA-EP2。注射探针后 30、60、120 min 进行 12 min 静态扫描。使用 Pmod 4.3 (Pmod Technologies) 进行图像重建,并计算肿瘤和主要器官的每立方厘米组织百分注射剂量率 (percentage activity of injection dose per cubic centimeter of tissue, %ID/cc)。

6. 荷瘤鼠生物分布。将 PC-3 荷瘤鼠分成 3 组,每组 3 只,经尾静脉注射 100 μl 7.4 MBq ^{68}Ga -NOTA-EP2,分别于注射后 30、60、120 min 处死取材。LNCaP 荷瘤鼠分成 2 组,每组 3 只,于注射探针 7.4 MBq 后 60 和 120 min 处死取材。随机分组方法均同前。取血液、肿瘤及主要器官,测定质量及放射性计数,计算每克组织百分注射剂量率 (percentage activity of injection dose per gram of tissue, %ID/g)。此外,为验证探针在体内的特异性结合,在 PC-3 模型中增设阻断组 ($n=3$),于注射前 5 min 给予 500 倍量 NOTA-EP2 进行竞争性抑制,并于注射后 120 min 处死取材,然后按上述方法进行生物分布分析。

7. 病理分析。荷瘤鼠显像后处死,取瘤体置于固定液中放置 48 h,进行石蜡包埋。脱水、浸泡和包埋后进行常规 HE 染色处理。另取切片,滴加兔抗人 EphA2 抗体 (美国 CST 公司),4 $^\circ\text{C}$ 下过夜。PBS 冲洗后滴加山羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司),室温温育 15 min 后,苏木素染色及封固。光学显微镜下观察并分析染色结果。

三、统计学处理

采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件分析数据,符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。流式细胞分析组间数据比较采用两独立样本 t 检验,细胞摄取及 microPET 显像定量分析组间数据比较采用重复测

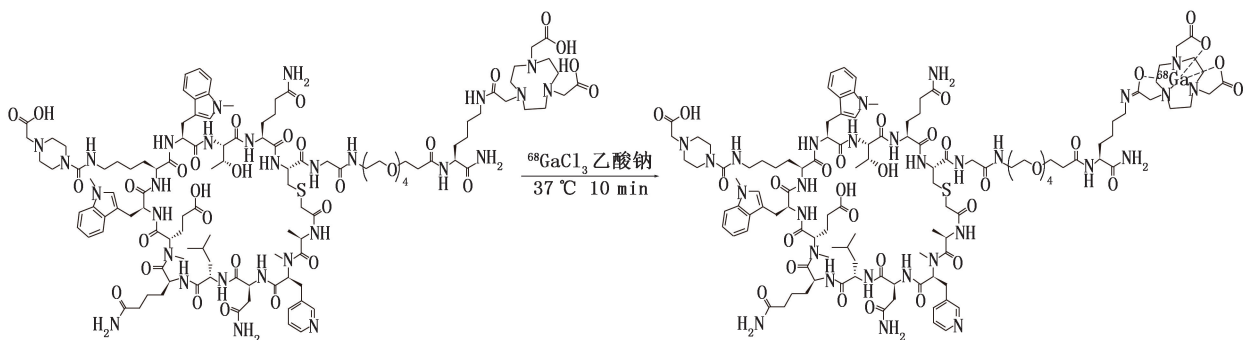


图 1 ^{68}Ga -1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (NOTA)-EP2 的放射性标记

量方差分析,进一步两两比较采用 Bonferroni 校正。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.017$ (Bonferroni 校正) 为差异有统计学意义 (双侧检验)。

结 果

1. ^{68}Ga -NOTA-EP2 的制备与稳定性研究。环肽 NOTA-EP2 纯度 $> 95\%$ 。相对分子质量测量值为 $[1\ 283.5 ([M+2H]/2)^+$, $856.0 ([M+3H]/3)^+$, $642.3 ([M+4H]/4)^+$, 与理论分子量 (2 565.93) 相吻合。

^{68}Ga -NOTA-EP2 的制备可在 30 min 内完成,未校正产率为 $(72.3 \pm 1.6)\%$ ($n = 3$), 放化纯 $> 95\%$, 比活度为 (19.06 ± 0.11) GBq/ μmol 。 ^{68}Ga -NOTA-EP2 体外稳定性良好,其在 PBS 和血浆中放置 2 h 后,放化纯仍 $> 95\%$ 。

2. 流式细胞术分析。PC-3 细胞中 EphA2 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 为 $58\ 629 \pm 571.34$, 明显高于 LNCaP 细胞中 EphA2 的 MFI ($1\ 288.5 \pm 402.34$; $t = 142.13$, $P < 0.001$)。

3. 体外摄取实验。统计学分析显示,分组和时间的交互作用对细胞摄取的影响有统计学意义 ($F = 12.58$, $P < 0.001$)。在温育 30、60、120 min 后,PC-3 前列腺癌细胞对示踪剂 ^{68}Ga -NOTA-EP2 的摄取均明显高于 LNCaP 细胞的摄取 (图 2), 且要高于 PC-3 阻断组的摄取 [F 值: 832.60、494.40、203.80, 均 $P < 0.001$; 均 $P < 0.001$ (Bonferroni 校正)]。在温育 60 min 以后,PC-3 细胞对 ^{68}Ga -NOTA-EP2 的摄取为 $(3.74 \pm 0.02)\% \text{AD}/10^5$ 个细胞,而在过量的 NOTA-EP2 阻断下,细胞对探针的摄取降低至 $(0.37 \pm 0.15)\% \text{AD}/10^5$ 个细胞; LNCaP 细胞对探针的摄取值为 $(0.67 \pm 0.17)\% \text{AD}/10^5$ 个细胞。

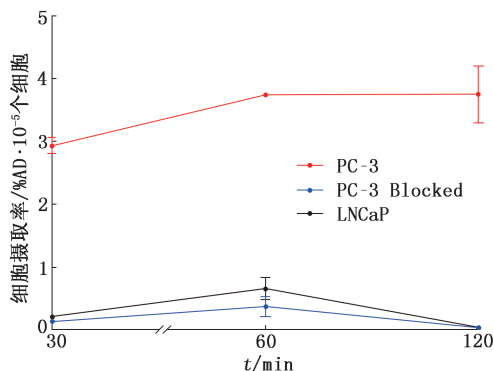


图 2 人前列腺癌细胞株 PC-3、LNCaP 在不同时间点对示踪剂 ^{68}Ga -1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸 (NOTA)-EP2 的摄取 $\% \text{AD} \cdot 10^{-5}$ 个细胞即每 10^5 个细胞的摄取百分比, Blocked 为阻断。PC-3 组在 60 min 时的标准差极小 (小于 0.1), 误差棒与数据点重合, 图中难以显示

4. 荷瘤鼠 microPET 显像。荷瘤鼠 ^{68}Ga -NOTA-EP2 microPET 显像示在未阻断条件下,PC-3 移植瘤在注射探针后 30、60 及 120 min 均有示踪剂浓聚,且与本底对比度良好 (图 3A); 相比之下,在注射前给予过量未标记配体阻断后,PC-3 肿瘤部位的摄取明显下降,几乎无明显信号 (图 3B), 表明探针的摄取具有高度的受体依赖性和靶向特异性。此外,同期 LNCaP 移植瘤未见明显示踪剂浓聚 (图 3C)。定量分析表明,分组和时间的交互作用对肿瘤摄取和肿瘤/肌肉 (tumor/muscle, T/M) 比值的影响有统计学意义 (F 值: 22.63、21.34, 均 $P < 0.001$)。注射探针后 30 min,PC-3 移植瘤摄取值为 $(6.13 \pm 0.10)\% \text{ID}/\text{cc}$, 至 120 min 时仍维持在较高水平 [$(5.59 \pm 0.23)\% \text{ID}/\text{cc}$]。正常 PC-3 组在 30、60、120 min 各时间点的肿瘤摄取值均高于 PC-3 阻断组和 LNCaP 组 [F 值: 704.40、4 555.00、1 677.00, 均 $P < 0.001$; 均 $P < 0.001$ (Bonferroni 校正)]; 其中注射 60 min 后正常 PC-3 组移植瘤摄取值为 $(6.63 \pm 0.13)\% \text{ID}/\text{cc}$, 高于 PC-3 阻断组 [$(0.11 \pm 0.04)\% \text{ID}/\text{cc}$; $P < 0.001$ (Bonferroni 校正)] 和 LNCaP 组 [$(0.35 \pm 0.10)\% \text{ID}/\text{cc}$; $P < 0.001$ (Bonferroni 校正)]。此外,不同组别的 T/M 比值在各时间点差异也有统计学意义 [图 3D; F 值: 85.65、122.60、29.79, 均 $P < 0.001$; 均 $P < 0.001$ (Bonferroni 校正)]。在 60 min 时,PC-3 组的 T/M 比值为 20.21 ± 3.69 , 显著高于 LNCaP 组 [1.66 ± 0.79 ; $P < 0.001$ (Bonferroni 校正)] 和 PC-3 阻断组 [1.93 ± 0.59 ; $P < 0.001$ (Bonferroni 校正)]。

5. 荷瘤鼠生物分布 (表 1)。 ^{68}Ga -NOTA-EP2 在 EphA2 阳性肿瘤 PC-3 中富集,且保持较高的摄取,120 min 时肿瘤摄取为 $(11.31 \pm 1.52)\% \text{ID}/\text{g}$, 而在 PC-3 阻断组及 EphA2 阴性的 LNCaP 组中几乎无摄取,120 min 肿瘤摄取分别为 $(0.16 \pm 0.04)\% \text{ID}/\text{g}$ 和 $(0.52 \pm 0.13)\% \text{ID}/\text{g}$ 。示踪剂在血液清除迅速,在注射 30 min 时摄取值仅为 $(1.00 \pm 0.26)\% \text{ID}/\text{g}$, 而 120 min 时摄取值降至 $(0.21 \pm 0.03)\% \text{ID}/\text{g}$ 。此外,示踪剂在肝中有少量摄取,除肾之外的其他非靶器官摄取均较低,对应的摄取值均小于 $2\% \text{ID}/\text{g}$, 提示 ^{68}Ga -NOTA-EP2 主要通过肾排泄。

6. 病理分析 (图 4)。PC-3 前列腺癌移植瘤细胞质和细胞膜被染成棕色,细胞核被染成蓝色,PC-3 前列腺癌移植瘤 EphA2 表达阳性。阴性对照 LNCaP 移植瘤仅细胞核呈蓝色,细胞质和细胞膜未被染色,提示 LNCaP 移植瘤 EphA2 表达阴性。

讨 论

EphA2 是受体酪氨酸激酶家族成员,在乳腺癌、

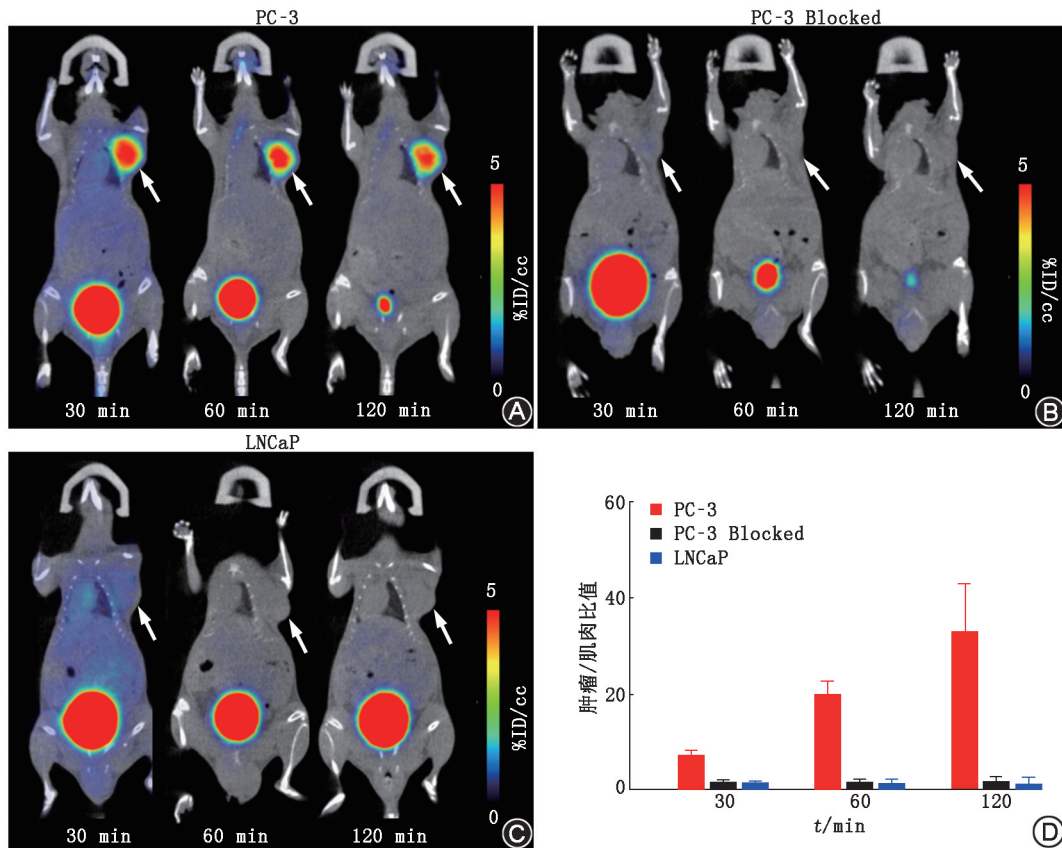


图3 PC-3组、PC-3阻断组[即图中PC-3 Blocked;提前5min注射未标记的1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)-EP2]、LNCaP组荷瘤鼠注射⁶⁸Ga-NOTA-EP2后不同时间点的microPET显像图(A~C;箭头示肿瘤)及肿瘤/肌肉比值定量分析结果(D) %ID/cc为每立方厘米组织百分注射剂量率

表1 ⁶⁸Ga-1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)-EP2注射后不同时间点荷瘤鼠体内的生物分布(%ID/g; $\bar{x} \pm s$)

器官	PC-3			PC-3 Blocked	LNCaP	
	30 min	60 min	120 min	120 min	60 min	120 min
血	1.00±0.26	0.25±0.01	0.21±0.03	0.05±0.01	0.26±0.03	0.19±0.06
肿瘤	12.43±0.87	12.55±0.98	11.31±1.52	0.16±0.04	0.20±0.02	0.52±0.13
心	0.38±0.07	0.18±0.02	0.19±0.03	0.07±0.05	0.16±0.03	0.13±0.05
肝	4.18±0.49	1.89±0.26	1.43±0.05	0.34±0.09	1.38±0.16	1.51±0.12
脾	1.98±0.41	1.59±0.26	1.05±0.12	0.14±0.05	0.99±0.23	0.71±0.04
肺	1.47±0.35	0.85±0.15	1.04±0.04	0.31±0.06	0.99±0.25	0.66±0.11
左肾	11.37±0.67	9.13±0.91	8.91±0.56	4.74±0.09	8.14±1.14	7.79±0.80
右肾	12.40±1.81	9.23±1.32	9.13±0.41	4.65±0.69	8.29±1.26	7.76±0.89
胃	1.02±0.12	0.49±0.04	0.50±0.07	0.08±0.01	0.39±0.07	0.31±0.07
肠	1.16±0.05	0.93±0.31	0.90±0.09	0.09±0.03	1.81±0.40	0.90±0.43
骨骼	0.35±0.03	0.27±0.03	0.26±0.06	0.11±0.03	0.13±0.05	0.10±0.02
肌肉	0.29±0.06	0.10±0.04	0.11±0.06	0.15±0.08	0.09±0.03	0.06±0.01
脑	0.04±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01

注:每个时间点小鼠3只;%ID/g为每克组织百分注射剂量率,Blocked为阻断

肺癌、结直肠癌及前列腺癌等多种实体瘤中高表达,与肿瘤细胞的迁移、增殖和侵袭能力密切相关^[10-11]。已有研究表明,EphA2在多种癌症的发生发展过程中发挥重要作用,受体表达升高与激酶活性降低可协同促进肿瘤进展。此外,EphA2还能通过促进化疗耐药、增强肿瘤细胞自我更新以及诱导

血管生成等多种机制进一步推动肿瘤的发展^[12]。临床研究亦发现,EphA2的高表达水平与前列腺癌患者术后的不良预后相关^[13]。

目前临床应用最广泛的前列腺癌分子影像手段是基于PSMA的PET显像^[14],尽管其灵敏度高达85%,特异度可达98%,但仍有部分患者存在假阴

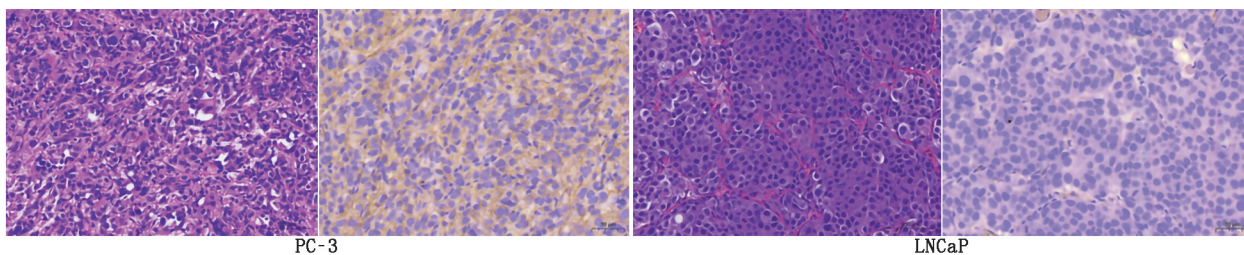


图4 荷瘤鼠前列腺癌移植瘤病理图(左;HE ×400)及免疫组织化学检查结果图(右;EnVision法 ×200) 可见 PC-3 前列腺癌移植瘤的肝配蛋白 A 型受体 2 (EphA2) 表达呈阳性, LNCaP 移植瘤的 EphA2 表达呈阴性

性^[15]。因此,开发新的互补靶点用于显像尤为重要。EphA2 在此背景下作为替代或互补显像靶点具有广泛潜力。Pearce 等^[16]的研究发现,靶向 EphA2 和 PSMA 的荧光纳米探针可在同时携带 PC-3 (EphA2 高表达) 和 LNCaP (PSMA 高表达) 双肿瘤小鼠模型中特异性聚集,提示了 EphA2 和 PSMA 在前列腺癌显像中的互补性。Gan 等^[9]随后通过癌症基因组图谱前列腺腺癌 (The Cancer Genome Atlas prostate adenocarcinoma, TCGA-PRAD) 数据分析发现, EphA2 和 PSMA 在前列腺癌中呈互补表达模式, 仅约 1% 的患者缺乏两者的高表达, 表明联合靶向策略可覆盖几乎全部患者群体; ¹⁸F 标记靶向 EphA2 双环肽探针 ¹⁸F-AIF-ETN 在双瘤异种移植小鼠模型的 PET/CT 显像研究证实, ¹⁸F-AIF-ETN 对 EphA2 阳性/PSMA 阴性 PC-3 肿瘤具有选择性结合能力 [(2.67±0.14) %ID/g, 60 min], 与 PSMA 靶向探针形成互补。本研究创新性地研制了 ⁶⁸Ga-NOTA-EP2 大环肽探针, 并进一步验证了其在 EphA2 阳性、PSMA 阴性前列腺癌模型中的优异性能。注射探针后 30 min, PC-3 肿瘤的摄取值为 (12.43±0.87) %ID/g, 60 min 摄取值仍高达 (12.55±0.98) %ID/g, 表现出更高的肿瘤富集能力, 提示具有良好的临床转化潜力。

在体外细胞实验中, ⁶⁸Ga-NOTA-EP2 在 EphA2 表达阳性的 PC-3 细胞中表现出较高的细胞摄取和滞留, 且其摄取可被 NOTA-EP2 有效阻断, 这表明其具备与 EphA2 高度特异性结合的能力。在荷瘤鼠 microPET 显像实验中, 探针在 PC-3 移植瘤中高度滞留, 注射 ⁶⁸Ga-NOTA-EP2 后 120 min, 肿瘤摄取值为注射 30 min 摄取值的 90% 以上; 注射探针后 30、120 min, PC-3 移植瘤对探针摄取明显高于同期 LNCaP 移植瘤。上述实验结果与体外细胞摄取实验及病理分析结果相一致, 表明 ⁶⁸Ga-NOTA-EP2 具有良好的体内 EphA2 靶向性。

⁶⁸Ga-NOTA-EP2 优异的显像性能与其分子结构优化密切相关。已有研究表明, L/D 构型转换和

PEG 修饰等微小结构改动可能对探针的体内行为产生重要影响^[17]。因此, 本研究在已有环肽基础上, 进行了 2 项关键改造: (1) 将原结构中的 D 型赖氨酸替换为 L 型赖氨酸, 后者为人体必需氨基酸, 具有更好的生物相容性, 可能降低体内潜在免疫应答; (2) 在连接区域引入聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)₄ 链作为连接链 (linker), 以提升探针整体的水溶性, 减少非特异性结合, 促进非靶组织中快速代谢清除。这一结构优化策略不仅改善了探针的体内稳定性, 也提升了其显像对比度与临床转化的可行性。

综上, 本研究成功制备了一种新型靶向前列腺癌 EphA2 的大环肽类 PET 探针 ⁶⁸Ga-NOTA-EP2。该探针表现出高特异性靶向性、优异的显像对比度及良好的体内药代动力学特性, 在前列腺癌尤其是 PSMA 阴性前列腺癌的精准确诊领域具有广阔的应用前景。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 史津宇: 研究实施、论文撰写、统计学分析; 艾丁丁、李继会: 研究实施、数据整理; 章斌、葛书山: 研究指导、论文修改; 邓胜明: 研究指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, et al. Cancer statistics, 2025[J]. CA Cancer J Clin, 2025, 75 (1): 10-45. DOI: 10.3322/caac.21871.
- [2] Dulaney CR, Osula DO, Yang ES, et al. Prostate radiotherapy in the era of advanced imaging and precision medicine[J]. Prostate Cancer, 2016, 2016: 4897515. DOI: 10.1155/2016/4897515.
- [3] 周文瑶, 张俊. 前列腺癌 PSMA PET 显像剂研究进展[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2020, 40 (12): 755-760. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191202-00284.
Zhou WY, Zhang J. Research progress of PSMA PET tracers for prostate cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2020, 40 (12): 755-760. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20191202-00284.
- [4] 朱华, 任亚楠, 杨志. 中国智造: 新型 ¹⁸F 标记 PSMA PET 探针及其在前列腺癌中的临床转化[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2023, 43 (4): 193-195. DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20230302-00049.
Zhu H, Ren YN, Yang Z. Made with wisdom: novel ¹⁸F labeled PSMA PET probes and clinical translation in prostate cancer[J].

- Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2023, 43(4): 193-195. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20230302-00049.
- [5] Budäus L, Leyh-Bannurah SR, Salomon G, et al. Initial experience of ^{68}Ga -PSMA PET/CT imaging in high-risk prostate cancer patients prior to radical prostatectomy [J]. Eur Urol, 2016, 69(3): 393-396. DOI:10.1016/j.eururo.2015.06.010.
- [6] Liu T, Wu LY, Fulton MD, et al. Prolonged androgen deprivation leads to downregulation of androgen receptor and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cells[J]. Int J Oncol, 2012, 41(6): 2087-2092. DOI:10.3892/ijo.2012.1649.
- [7] Chakraborty PS, Tripathi M, Agarwal KK, et al. Metastatic poorly differentiated prostatic carcinoma with neuroendocrine differentiation: negative on ^{68}Ga -PSMA PET/CT[J]. Clin Nucl Med, 2015, 40(2): e163-166. DOI:10.1097/RLU.0000000000000594.
- [8] Wang H, Lin H, Pan J, et al. Vasculogenic mimicry in prostate cancer: the roles of EphA2 and PI3K[J]. J Cancer, 2016, 7(9): 1114-1124. DOI:10.7150/jca.14120.
- [9] Gan Q, Cui K, Cao Q, et al. Development of a ^{18}F -labeled bicyclic peptide targeting EphA2 for molecular imaging of PSMA-negative prostate cancer [J]. J Med Chem, 2023, 66(21): 14623-14632. DOI:10.1021/acs.jmedchem.3c01135.
- [10] Xiao T, Xiao Y, Wang W, et al. Targeting EphA2 in cancer [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 114. DOI:10.1186/s13045-020-00944-9.
- [11] Offenhäuser C, Dave KA, Beckett KJ, et al. EphA2 regulates vascular permeability and prostate cancer metastasis via modulation of cell junction protein phosphorylation [J]. Oncogene, 2025, 44(4): 208-227. DOI:10.1038/s41388-024-03206-x.
- [12] Chen J, Song W, Amato K. Eph receptor tyrosine kinases in cancer stem cells [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(1): 1-6. DOI:10.1016/j.cytogfr.2014.05.001.
- [13] Sachdeva A, Hart CA, Kim K, et al. Non-canonical EphA2 activation underpins PTEN-mediated metastatic migration and poor clinical outcome in prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2022, 127(7): 1254-1262. DOI:10.1038/s41416-022-01914-3.
- [14] 陈若华, 黄钢, 刘建军. PSMA 诊疗一体化技术助力前列腺癌进入精准诊疗时代 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2024, 44(9): 513-515. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20240702-00241. Chen RH, Huang G, Liu JJ. PSMA-based theranostic technology advances prostate cancer management towards a new era of precision diagnosis and treatment [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2024, 44(9): 513-515. DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20240702-00241.
- [15] Hofman MS, Lawrentschuk N, Francis RJ, et al. Prostate-specific membrane antigen PET-CT in patients with high-risk prostate cancer before curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA): a prospective, randomised, multicentre study [J]. Lancet, 2020, 395(10231): 1208-1216. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30314-7.
- [16] Pearce AK, Fuchs AV, Fletcher NL, et al. Targeting nanomedicines to prostate cancer: evaluation of specificity of ligands to two different receptors *in vivo* [J]. Pharm Res, 2016, 33(10): 2388-2399. DOI:10.1007/s11095-016-1945-x.
- [17] Wurzer A, De Rose F, Fischer S, et al. Preclinical comparison of [^{177}Lu]Lu-rhPSMA-10.1 and [^{177}Lu]Lu-rhPSMA-10.2 for endoradiotherapy of prostate cancer: biodistribution and dosimetry studies [J]. EJNMMI Radiopharm Chem, 2024, 9(1): 18. DOI:10.1186/s41181-024-00246-2.

(收稿日期:2025-03-19)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊有关论文中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位执行 GB 3100/3101/3102—1993《国际单位制及其应用/有关量、单位和符号的一般原则/(所有部分)量和单位》的有关规定,具体执行可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第 3 版(人民军医出版社 2001 年出版)。正文中时间的表达,凡前面带有具体数据者应采用 d、h、min、s,而不用天、小时、分钟、秒。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示,如 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$ 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。在叙述中,应先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;但如同一计量单位反复出现,可在首次出现时注出法定计量单位与旧制单位的换算系数,然后只列法定计量单位数值。凡是涉及人体及动物体内的压力测定,可使用 mmHg 或 cmH_2O 为计量单位,但首次使用时注明与 kPa 的换算系数。原子量改为相对原子质量 (A_r)。分子量改为相对分子质量 (M_r)。关于浓度,只有“B 的物质的量浓度”(B 代表物质的基本单元)可以称为“B 的浓度 (c_B)”,定义为“B 的物质的量除以混合物的体积”,单位为“ mol/m^3 ”或“ mol/L ”。正确使用以下量的名称:(1)以 B 的体积分数 (φ_B) 取代习用的 B 的体积百分浓度 (V/V);(2)以 B 的质量分数 (ω_B) 取代习用的 B 的质量百分浓度 (W/W 或 m/m);(3)以 B 的质量浓度 (ρ_B) 取代习用的以“ W/W ”或“ m/V ”表示的浓度,单位为“ kg/L ”或“ kg/m^3 ”。量的符号一律用斜体字,如吸光度(旧称光密度)的符号为 A ,“ A ”为斜体字。

本刊编辑部