

肿瘤血管靶向分子探针多肽 RRL(g2)的作用研究

卢霞¹, 王荣福²

(1.北京航天总医院, 北京 100076; 2.北京大学第一医院, 北京 100034)

摘要: [目的] 设计合成分子结构更小的多肽 RRL (g2), 并用放射性核素 ^{99m}Tc 标记, 得到新型优化肿瘤新生血管分子探针。 [方法] 应用化学合成法合成多肽 RRL (g2) 及对照肽片段 GGG (g2), 应用高效液相色谱 (HPLC) 及电喷雾离子质谱 (ESI-MS) 对合成化合物的分子量及纯度进行鉴定, 进而对放射性核素 ^{99m}Tc 标记的 RRL (g2) 多肽探针及对照肽进行体内、外生物学性质评价。 [结果] 应用化学合成法合成的 RRL (g2) 及 GGG (g2) 纯度达 99% 以上, 放射性核素 ^{99m}Tc 的标记率约 73%, 稳定性较好。静脉注射分子探针后 30min, ^{99m}Tc-RRL (g2) 相对于对照肽 ^{99m}Tc-GGG (g2), 在肿瘤组织中有较高的摄取率, 而且在肿瘤组织中能滞留较长时间。 [结论] 新型肿瘤新生血管多肽探针 ^{99m}Tc-RRL (g2) 相比于 ¹³¹I-tRRL, 在肿瘤新生血管分子显像应用中拥有更大的优势, 如肿瘤摄取率的增加, 是更有前景的新型肿瘤新生分子显像多肽探针。

关键词: RRL(g2); 肿瘤血管分子显像; 放射性核素标记; ^{99m}Tc

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)12-0925-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.12.B004

Technetium-99m-Arg-Arg-Leu(g2): A Modified Peptide Probe Targeted to Neovascularization in Molecular Tumor Imaging

LU Xia¹, WANG Rong-fu²

(1. Beijing Aerospace Hospital, Beijing 100076, China; 2. Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract: [Purpose] To develop smaller structure cyclic RRL(g2) and radiolabeled with ^{99m}Tc as a novel and optimized peptide probe on tumor angiogenesis molecular imaging. [Methods] Both RRL (g2) and control peptide GGG (g2) peptide chains were synthesized and characterized by HPLC and ESI-MS analysis. After synthesized and purified, the peptides were radiolabeled with ^{99m}Tc by a one-step method for physicochemical property assay and biodistribution experiments. [Results] The purity of peptide RRL (g2) and GGG (g2) were more than 99% after synthesized and purified. The radiolabeling of ^{99m}Tc-RRL(g2) has reached 73% and it is stable in vitro. ^{99m}Tc-RRL(g2) had higher tumor uptake (30min after injection) and longer tumor retention than ^{99m}Tc-GGG(g2) in tumor models tested. [Conclusions] The ^{99m}Tc-RRL(g2) has more good characteristics such as higher tumor uptake radio and short half-life-time compared with ¹³¹I-tRRL. The information obtained here may guide the future development of RRL peptide-based tumor angiogenesis molecular imaging and internal radiotherapeutic agents targeting tumor neovascular.

Subject words: RRL (g2); tumor angiogenesis molecular imaging; radionuclide labeling; ^{99m}Tc

随着肿瘤学诊断及治疗各个层面研究的深入, 逐渐认识到肿瘤新生血管在肿瘤生物学特性的维持及恶性肿瘤早期诊断和抗肿瘤治疗中的应用价值, 为肿瘤研究带来了新的方向^[1]。分子核医学利用放

射性核素发出射线及射线可被探测的性质, 能够从分子水平上实时追踪恶性肿瘤细胞中分子水平信号的变化, 认识恶性肿瘤不同于正常组织细胞的独特的生物学行为特点, 已经成为当今世界医学研究领域的前沿、热点课题, 是现代分子医学的追求目标^[2]。其中, 靶向作用特异的多肽分子探针研究是肿瘤新生血管分子显像研究最为关键的问题之一^[3]。

基金项目: 首都卫生发展科研专项基金(2011-6032-03)

通讯作者: 王荣福, 主任医师, 教授, 博士生导师, 博士; 北京大学第一医院核医学科, 北京市西城区西什库大街 8 号(100034); E-mail: rongfu_wang@163.com

收稿日期: 2013-11-12; **修回日期:** 2013-11-18

在我们的前期研究中发现放射性核素 ^{131}I 标记的小分子多肽 tRRL 能够特异性地结合肿瘤血管内皮细胞中, 进行肿瘤新生血管分子成像。本研究在此基础上, 利用计算机辅助药物设计的优势, 优化多肽 tRRL 结构, 并进行放射性核素 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记, 评价其体内理化性质及靶向示踪肿瘤新生血管的有效性。

1 材料与方法

1.1 分子能量对接

本研究使用 AutoDock4.0 软件完成分子对接。对接前, 先在分子结构数据库中下载血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 晶体结构, 进行晶体复合物中结合位点分子能力对接计算。

1.2 多肽片段化学合成

多肽 RRL (g2) (Gly-Gly-(D)Ala-Gly-(D)ser-Lys-Cys-Gly-Arg-Arg-Leu-Gly-Cys-NH₂) 以及对照肽 GGG (g2) (Gly-Gly-(D)Ala-Gly-(D)ser-Lys-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys-NH₂) 以固相合成法, 使用 Apex 396 多功能多肽合成仪 (AAPTEC, Louisville, USA) 合成。每一条多肽链的两个半胱氨酸之间以二硫键成环。合成多肽片段用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分离纯化。C18 反相柱 (4.6mm×250mm) 洗脱液梯度为 10%~100% 梯度溶剂 A (0.05% 三氟乙酸和 2% 乙腈), 30%~0% 梯度溶剂 B (0.05% 三氟乙酸和 90% 乙腈), 流速为 1ml/min, 得到的多肽终产物冻干后储存于 -20℃ 干燥环境, 长期保存。

1.3 放射性核素标记理化性质实验

本实验所使用试剂及溶液均为化学纯, 购自北京化学试剂公司。多肽 RRL(g2) 采用氯化亚锡 (SnCl_2) 还原法进行放射性核素 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记。取终浓度为 2mg/ml 的 RRL (g2) 和 GGG (g2)、终浓度为 0.5mg/ml 的氯化亚锡、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 1mCi 及 0.5mol/L 的 PB (pH7.4) 缓冲液, 室温下振荡反应 15~30min, 用 45μl (4g/L) 偏重亚硫酸钠溶液终止反应。用 HPLC 对反应产物进行分离纯化, 分离纯化的条件为: 洗脱液 0.05% 三氟乙酸+2% 乙腈 (溶剂 A) 和 0.05% 三氟乙酸+90% 乙腈 (溶剂 B), 流速为 5.0ml/min, 梯度洗脱方法如下:

90% 溶剂 A 0~5min; 90%~85% A 5.01~10min; 85%~75% A 10.01~15min, 收集洗脱产物。计算标记率 (纯化前标志物峰的计数占总计数的百分比) 和放射化学纯度 (纯化后标志物峰的计数占各峰总计数的百分比)。

固定其他标记条件不变, 分别改变多肽用量及 SnCl_2 浓度, 进行标记条件的优化, 以获得较高的标记率。

1.4 细胞培养及动物模型的建立

购买人胶质瘤细胞 U87 (American Type Culture Collection), 用添加 10% 胎牛血清及链霉素 (100mg/ml) 和青霉素 (100U/ml) 的低糖 DMEM 培养基进行传代细胞培养。待细胞处于对数生长期, 收集细胞备用。

BALB/c 裸鼠: 40 只, 雄性, 4~6 周龄, 体重: 20~22g, SPF 级, 购自北京大学医学部实验动物中心。每只裸鼠左前肢皮下接种 U87 细胞 ($1 \times 10^7/0.1\text{ml}$), 待肿瘤直径长至约 0.6~0.8cm 时, 进行动物实验。

1.5 分子探针体内生物分布实验

每只神经胶质瘤模型动物尾静脉注射 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RRL(g2) 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GGG(g2) 185KBq, 体积为 0.1ml (每组 $n=5$)。所有 40 只模型动物注射显像剂后耐受良好。分别在 30min、1、3 及 6h 处死实验动物, 收集不同组织、器官, 称湿重并测定放射性计数, 计算不同组织器官每克组织放射性计数的比率 (%ID/g)。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 生物分布实验结果用平均值±标准差表示, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RRL 组与对照肽 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GGG 组之间的差异采用独立样本 t 检验进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RRL(g2) 结构进行分析及分子能量对接实验

对 RRL 10 肽结构 T-C-G-G-R-R-L-G-G-C 进行分析, 并构建可能的不同修饰结构, 发现其中 L-C-G-R-R-L-G-C 的 8 肽 (命名为 RRL(g2)) 的三维结构能够进入 VEGFR2 分子三维结构氨基酸组成的内部疏水性空穴位置, 外侧为亲水性凹槽对接, 并且 RRL(g2) 与凹槽附近的氨基酸残基形成较多氢键, 进一步进行量化的分子能量对接计算, 证实 RRL(g2) 与 VEGFR2 分子的对接能量最低, 约为 -6.89, 提示

RRL(g2)与 VEGFR2 有相对较高的亲和力(Figure 1、2)。

2.2 分子探针制备

应用化学固相合成法,合成 RRL(g2)及对照肽的纯度达到 99%以上。氯化亚锡还原法标记 RRL (g2) 多肽和对照肽 GGG(g2)的最佳标记条件为:多肽 50 μ g,加入 SnCl₂ 5 μ g, 室温下振荡反应 15~30min, 反应总体积为 100 μ l,^{99m}Tc-RRL (g2) 和 ^{99m}Tc-GGG (g2) 的标记率分别为 73% $\pm$ 7.4%、70% $\pm$ 6.8%。经过 HPLC 分离纯化,放射化学纯度大于 95%。将 ^{99m}Tc-RRL(g2)和 ^{99m}Tc-GGG(g2)分别放置于不同条件下(室温、生理盐水室温孵育、正常人新鲜血清 37 $^{\circ}$ C孵育)不同时间后,结果表明,^{99m}Tc-RRL(g2)和 ^{99m}Tc-GGG(g2)在不同条件下孵育不同时间,24h 内放化纯均大于 93%, 在体内外放射性理化性质稳定(Figure 3、4)。

2.3 分子探针在荷瘤裸鼠体内生物分布实验

^{99m}Tc-RRL (g2) 和对照肽 ^{99m}Tc-GGG (g2) 在人神经胶质瘤荷瘤裸鼠体内的生物分布结果显示。^{99m}Tc-RRL(g2)尾静脉注射后 30min 的初始阶段,肝、肾、胃及肿瘤组织均存在明显的放射性核素摄取,摄取相对计数分别为 (3.144 $\pm$ 1.016)、(8.047 $\pm$ 0.519)、(6.926 $\pm$ 0.627)及 (2.758 $\pm$ 0.293)%ID/g。对照肽 ^{99m}Tc-GGG(g2)尾静脉注射后 30min 的初始阶段,上述器官放射性摄取也比较高,与 ^{99m}Tc-RRL(g2)相比,没有明显的差异($P>0.05$) (Table 1、2)。两者在其他组织内的放射性计数本底也相对比较高,尤其是在脾和肺组织内,因而肿瘤组织与非肿瘤组织的比率(T/NT)较低。随着时间的延长,尾静脉注射分子探针后 6h,^{99m}Tc-RRL(g2)在其他组织器官内的放射性计数明显降低,但是肿瘤组织内放射性摄取仍然较高,对照肽在肿瘤组织及其他组织器官内的放射性摄取明显降低。因而多肽分子探针 ^{99m}Tc-RRL(g2)在注射显像剂 6h 后,与对照肽相比,T/NT 升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

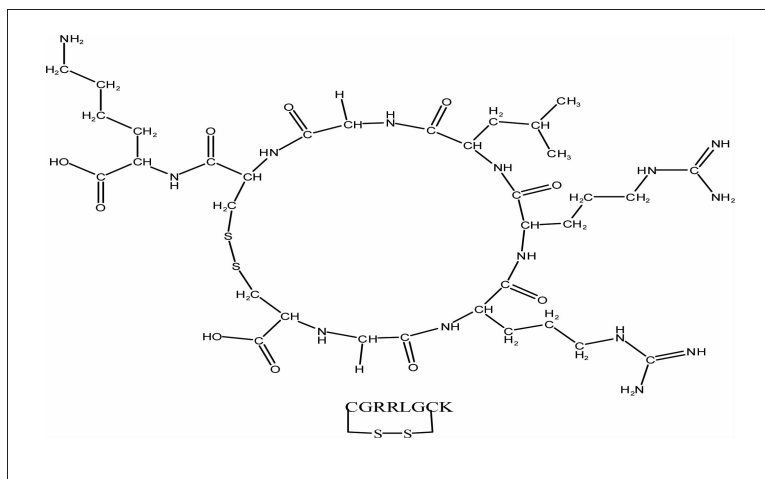


Figure 1 Two dimensional structure model of RRL(g2)

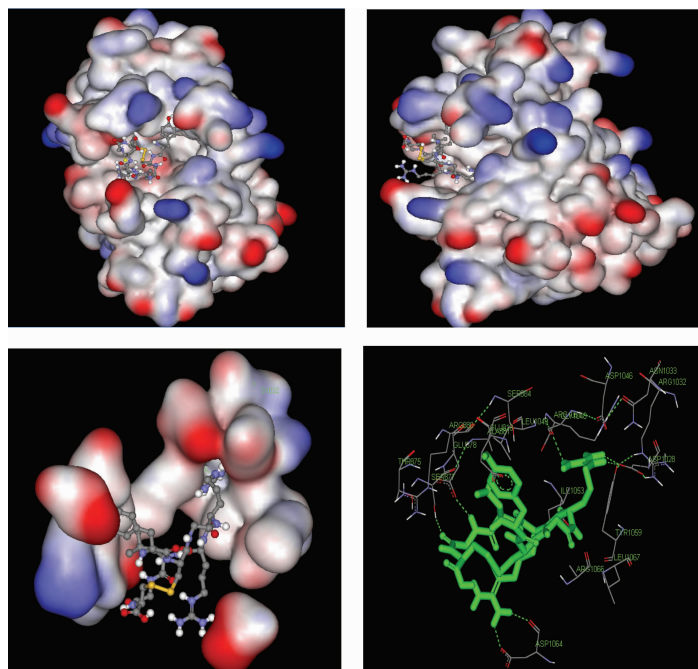


Figure 2 Three-dimensional structure of docking mode charts of RRL(g2) and VEGFR2

3 讨论

肿瘤新生血管生成是指从肿瘤周围已经存在的血管系统基础上以“出芽”的方式或其他方式生成新的毛细血管长入肿瘤组织内,建立血液循环,为快速增殖的肿瘤细胞提供生长代谢所需要的营养物质和氧气^[4,5]。肿瘤新生血管与肿瘤的恶性度有密切关系^[6,7]。应用非侵入性影像学技术示踪并定量分析肿

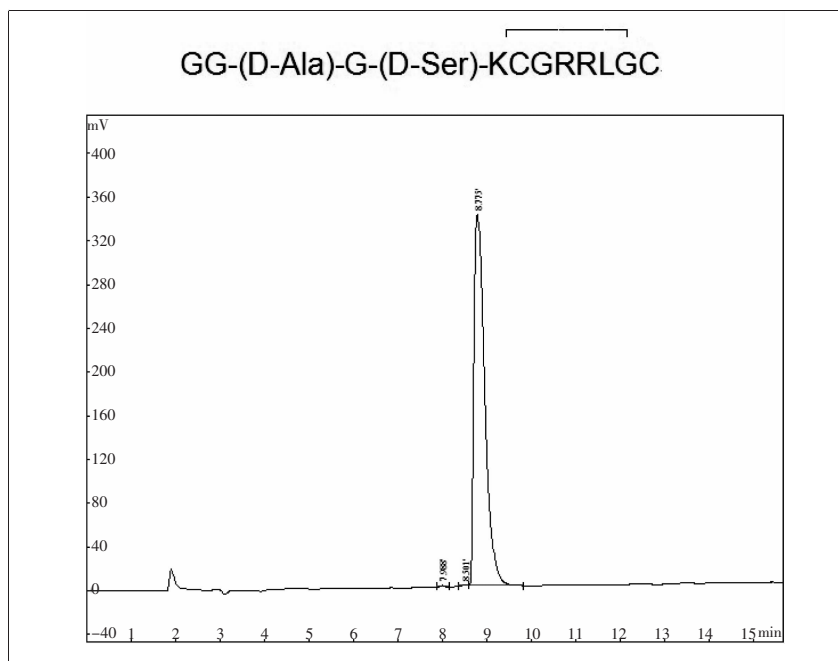


Figure 3 The chemical structure of polypeptide and HPLC results of RRL(g2)

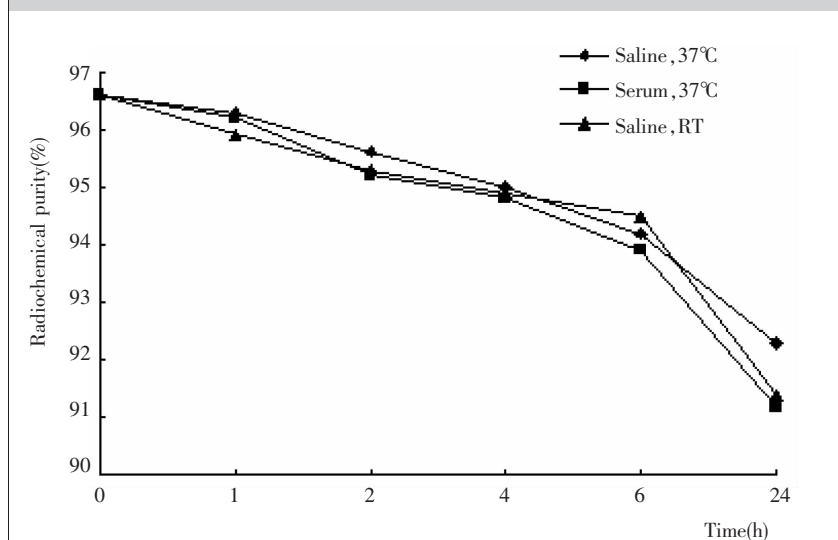


Figure 4 Stability analysis of ^{99m}Tc -RRL (g2)

瘤新生血管生成的程度,有助于早期诊断恶性肿瘤、预后评估及监测肿瘤复发,更为重要的是在恶性肿瘤靶向治疗药物研究中发挥重要的作用^[8]。

本研究组发现特异性结合于肿瘤血管内皮细胞的小分子多肽 RRL 被放射性核素 ^{131}I 标记后行 SPECT 显像,能够示踪前列腺癌、黑色素瘤等模型动物肿瘤新生血管^[9-11]。但是放射性核素 ^{131}I 能量较大,可能对环状结构多肽的生物活性有一定的影响,而且并不适合进行 SPECT 显像。因而,我们尝试在

优化 RRL 结构的基础上,对 RRL 进行放射性核素 ^{99m}Tc 标记,形成新型优化肿瘤新生血管分子探针。通过改变还原反应中多肽及氯化亚锡的用量,优化标记反应条件,提高标记率,可达到 73%。放射性核素 ^{99m}Tc 能量单一,发射的 γ 射线能量适中,对多肽探针环状结构的生物活性影响较小,未造成明显的脱标显像,体内外稳定性实验证实放射性核素标记多肽探针稳定性较好。

计算机分子对接 (molecular docking) 是指把配体置于受体晶体结构的活性位点,通过空间匹配和能量匹配,使配体与受体相互识别,获得配体分子和蛋白受体的形状和相互作用最佳匹配。早在 100 多年前 Fisher E 提出了“锁和钥匙模型”,这是分子对接基本理论的最早起源。在“锁和钥匙模型”中,几何形状上的互相匹配是配体分子和蛋白受体互补识别的首要条件。实际上,由于配体分子与受体分子都具有柔性,构象不断发生变化,因此配体分子与受体分子之间的识别要比“锁和钥匙模型”复杂得多。分子对接需要满足空间形状和能量上双重匹配,前者决定识别过程的键和能力,而后者决定识别过程的选择性^[12]。在分子对接过程中,蛋白质分子相对于配体分子较大,在蛋白的结合位点通常都有一个凹下去的表面,一般认为蛋白质分子在对接过程中构象几乎不发生变化,而配体小分子在对接过程中可能会有较大的变化来达到与受体的最佳匹配。较小环状结构的 RRL(g2) 多肽经分子对接发现能够嵌入在肿瘤新生血管形成过程中发挥重要作用的 VEGFR2 的“空穴”中,形成较为牢固的氢键结合,这可能是 RRL 之所以能够特意靶向结合于肿瘤新生血管的机制之一。

人神经胶质瘤荷瘤裸鼠体内生物分布实验结果

Table 1 Distribution results of ^{99m}Tc -RRL(g2) in glioma bearing nude mice (%ID/g)

Tissue	Postinjection time(h)			
	0.5	1	3	6
Heart	2.755±0.541	1.945±0.586	1.312±0.969	1.381±0.144
Liver	3.144±1.016	2.898±0.550	1.739±0.538	1.065±0.299
Spleen	2.675±1.137	1.933±0.130	1.820±0.197	1.451±0.109
Lung	2.761±0.764	2.526±0.190	1.873±0.026	1.480±0.146
Kidney	8.047±0.519	6.122±0.283	6.055±0.331	3.393±0.218
Stomach	6.926±0.627	5.479±0.570	4.287±0.089	3.857±0.333
Small intestine	1.982±0.079	1.645±0.504	1.349±0.446	1.075±0.253
Bladder	2.098±0.932	1.845±0.747	1.077±0.271	0.836±0.091
Skeletal muscle	1.572±0.310	1.362±0.348	0.347±0.102	0.229±0.055
Bone marrow	1.496±0.159	1.334±0.248	0.297±0.086	0.236±0.094
Tumor	2.758±0.293	2.675±0.503	2.526±0.280	2.342±0.404
Blood	2.008±0.350	1.827±0.159	0.963±0.252	0.542±0.277

Table 2 Distribution results of ^{99m}Tc -GGG(g2) in glioma bearing nude mice (%ID/g)

Tissue	Postinjection time(h)			
	0.5	1	3	6
Heart	2.167±0.750	2.150±0.457	1.267±0.185	1.090±0.170
Liver	3.810±1.288	2.380±0.494	2.273±0.560	1.930±0.438
Spleen	2.000±0.347	1.803±0.587	1.183±0.309	0.815±0.092
Lung	2.587±0.481	1.810±0.618	1.150±0.491	0.925±0.163
Kidney	8.020±0.830	7.867±0.129	5.570±0.291	3.600±0.042
Stomach	6.410±0.190	6.110±0.439	4.967±0.271	3.130±0.636
Small intestine	1.823±0.217	1.330±0.244	1.217±0.179	1.395±0.064
Bladder	1.737±0.561	1.653±0.293	1.173±0.112	0.405±0.007
Skeletal muscle	1.483±0.527	1.143±0.179	0.860±0.210	0.290±0.028
Bone marrow	1.490±0.311	1.157±0.087	0.753±0.393	0.300±0.028
Tumor	2.267±0.375	1.573±0.501	1.233±0.409	0.780±0.099
Blood	2.420±0.272	2.220±1.039	1.447±0.331	0.370±0.141

提示 ^{99m}Tc 标记 RRL (g2) 多肽分子探针在静脉注药 30min, 各组织、器官的放射性摄取较高, 考虑系由探针随血液循环进入体内的非特异性摄取所致。随着时间的延长, 其他组织血液清除较快, 放射性摄取明显降低, 但是肿瘤组织的放射性摄取仍然很高, T/NT 比值升高。该结果提示新型肿瘤新生血管探针 ^{99m}Tc 标记 RRL(g2) 能够特异性结合于肿瘤组织新生血管内皮细胞, 较长时间滞留于肿瘤组织内, 实现肿瘤新生血管分子显像, 该结果对于肿瘤新生血管多肽显像剂的研究具有重要的意义, 为肿瘤新生血管分子多肽显像剂的深入研究奠定研究基础。

参考文献:

[1] Weinberg RA. The biology of cancer [M]. Washington

(DC): Science Press, 2009. 526–550.

- [2] Wang RF. Application study and development of molecular nuclear medicine [J]. Journal of China Medical Imaging, 2008, 19(8):585–590. [王荣福. 分子核医学应用研究进展[J]. 中国临床影像杂志, 2008, 19(8):585–590.]
- [3] Lu X, Wang RF. A concise review of current radiopharmaceuticals in tumor angiogenesis imaging[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(8):1032–1040.
- [4] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease[J]. Nat Med, 2003, 9(6):653–660.
- [5] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21):1182–1186.
- [6] Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma [J]. J Clin Oncol, 1996, 14(2):405–414.
- [7] Daldrup H, Shames DM, Wendland M, et al. Correlation of dynamic contrast-enhanced MR imaging with histologic tumor grade: comparison of macromolecular and small-molecular contrast media [J]. AJR Am J Roentgenol, 1998, 171(2):941–949.
- [8] Buscombe JR, Wong B. PET a tool for assessing the in vivo tumor cell and its microenvironment? [J]. Br Med Bull, 2013. [Epub ahead of print]
- [9] Yu MingMing, Wang RongFu, Yan Ping, et al. Design, synthesis and iodination of an Arg-Arg-Leu peptide for potential use as an imaging agent for human prostate carcinoma [J]. J Label Compd Radiopharm, 2008, 51(11): 374–378.
- [10] Lu X, Yan P, Wang RF, et al. The further study on radioiodinated peptide Arg-Arg-Leu targeted to neovascularization as well as tumor cells in molecular tumor imaging [J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2011, 290: 623–630.
- [11] Xia Lu, Ping Yan, Rongfu Wang, et al. Use of radioiodinated peptide Arg-Arg-Leu targeted to neovascularization as well as tumor cells in molecular tumor imaging[J]. Chin J Cancer Res, 2012, 24(1):52–59.
- [12] He SP, Hu YE, Xia ZQ. Research techniques of receptor [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2003. [贺师鹏, 胡雅儿, 夏宗勤. 受体研究技术[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003.]