

^{188}Re -奥曲肽在荷瘤裸鼠体内分布的实验研究

宋进华 王自正 周云 刘璐 王峰 顾建平

【摘要】 目的 研究 ^{188}Re -奥曲肽在荷瘤裸鼠体内的分布, 为进一步肿瘤靶向治疗奠定基础。方法 16 只荷人 H460 非小细胞肺癌的 BALB/c 裸鼠分为 4 组, 经尾静脉注射 ^{188}Re -奥曲肽 18.5MBq(0.2ml), 于注射后 2h, 4h, 24h, 48h 每个时间点处死一组裸鼠, 取血液、肿瘤组织及主要脏器测量其放射性计数率值, 经放射性衰变校正后计算每克组织的百分注射剂量率(%ID/g), 观察标记物在动物体内的生物学分布。另 2 只荷瘤裸鼠同样尾静脉注射相同剂量的 ^{188}Re -奥曲肽, 于注射后相同时间点行 SPECT 扫描, 利用感兴趣区技术对肿瘤/非瘤组织放射性比值(T/NT)进行半定量分析。结果 ^{188}Re -奥曲肽标记率达(95.3±1.8)%, ^{188}Re -奥曲肽在荷瘤裸鼠体内主要分布于肿瘤组织、肝脏、肾脏及肠道, 肿瘤部位在 4h 摄取达到高峰 9.8%ID/g, 此时 SPECT 在肿瘤部位有明显的放射性核素浓聚, T/NT 在尾静脉药物注射后 24h 达到高值为 7.1。结论 ^{188}Re -奥曲肽在 BALB/c 荷瘤裸鼠体内对人非小细胞肺癌具有靶向定位作用, 其在肿瘤部位的分布具有较高的 T/NT, ^{188}Re -奥曲肽有望用于表达生长抑素受体肿瘤的核素靶向治疗。

【关键词】 铼; 奥曲肽; 小鼠, 裸; 癌, 非小细胞肺; 放射疗法

【中图分类号】 R817.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)01-0014-03

Experimental study on biodistribution of ^{188}Re -octreotide in nude mice

SONG Jin-hua¹, WANG Zi-zheng¹, ZHOU Yun², LIU Lu², WANG Feng¹, GU Jian-ping¹
(1. Department of Interventional Radiology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China; 2. Nuclear Medicine Technology Institution, Southeast University, Nanjing 210009, China)

【Abstract】 Objective To study the biodistribution of ^{188}Re -octreotide in nude mice which bearing human H460 non-small-cell lung cancer and to establish the laying foundation of targeting therapy. **Methods** ^{188}Re -octreotide was injected through tail vein of 16 nude mice, those nude mice were killed and the tumors and major organs were taken out from those mice at 2h, 4h, 24h and 48h after injection, then the radioactivity count of those organs and tumors were measured. Other two nude mouse were injected the same dosage ^{188}Re -octreotide too, SPECT scanning and using region of interest technique for semi-quantitative analysis of main organs and tumors' uptake at 2h, 4h, 24h and 48h after injection. **Results** It was found that the labeling efficiency of ^{188}Re -octreotide was (95.3 ± 1.8)%. ^{188}Re -octreotide was major distributed in tumors, livers, small bowels, large bowels and kidneys in nude mice. The largest uptake of tumors is 9.8%ID/g at 4h after injection and the largest tumor/muscle ratios in the SPECT study in those nude mice is 7.1 at 24h after injection. **Conclusion** The results indicated that ^{188}Re -octreotide can be located to those tumors which high expressed somatostatin receptor. The tumor/muscle ratios in nude mice is so high that expect to be used for targeting therapy of human H460 non-small-cell lung cancer.

【Key words】 Rhenium; Octreotide; Mice, nude; Cancer, non-small-cell lung; Radiotherapy

几乎所有神经内分泌肿瘤、消化系统肿瘤以及部分乳腺癌和肺癌均表达有高密度的生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR), 奥曲肽(octreotide)是

人工合成的生长抑素类似物, 具有与 SSTR 特异性结合而抑制肿瘤细胞增殖的作用^[1]。 ^{188}Re 具有非常优良的核性质和可方便地从 ^{188}W - ^{188}Re 发生器获得, 将其标记的单抗用于肿瘤的放射免疫诊断和治疗目前已有较多报道^[2], 但 ^{188}Re 标记单抗多为鼠源性, 容易产生人抗鼠抗体 (human anti mouse antibody, HAMA) 反应。近年来, 具有较小分子质量的多肽药

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470500)

作者单位: 1. 210006, 南京医科大学附属第一医院介入科(宋进华、顾建平), 核医学科(王自正、王峰); 2. 210009 南京, 东南大学核医学技术研究所(周云、刘璐)

通讯作者: 顾建平 (E-mail: ejr.gujianping@vip.163.com)

物的受体导向诊断和治疗受到极大关注, ^{188}Re -奥曲肽可应用于高表达 SSTR 肿瘤的核素靶向治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

奥曲肽(瑞典诺华制药), SnCl_2 (森科南京医药技术有限公司), 其他试剂均为分析纯, ^{188}W - ^{188}Re 发生器(上海科兴药业), γ 放射免疫计数器(合肥中佳公司), 电子分析天平(北京塞多利斯公司), CRC-R 活度计(Capintec 公司), Delta320PH 计(上海梅特勒-托利多公司), MM-1 微型振荡器(上海精密生化仪器厂), Hawkeye SPECT(美国 GE 公司), BALB/c 裸鼠及人 H460 非小细胞肺癌细胞株购于上海肿瘤研究所。

1.2 标记方法^[3]

条件下反应试管中依次加入 0.1ml 葡庚糖酸钠(0.3mmol/L)、0.05ml 以 0.1mol/L 盐酸溶解的 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (16g/L)、0.1ml 乙酸缓冲液(pH=5)和 0.1ml 奥曲肽(0.1g/L), 在充 N_2 、振荡的条件下反应 1h, 加入新鲜 ^{188}Re 淋洗液 0.1ml, 100 °C 水浴 30 min, 室温下冷却。

1.3 标记物的质量控制

将新华 1 号层析纸切成 1.5 cm × 15 cm 的纸条, 以 0.9% 的生理盐水为展开剂, ^{188}Re -奥曲肽和胶体的比移值(Rf)=0, $^{188}\text{ReO}_4^-$ Rf=0.7; 新华 1 号纸条经 2% 人血清白蛋白浸泡后自然晾干, 置于 110 °C 的烤箱 1h, 以 85% 的酸化乙醇(pH=3.5)为展开剂, 胶体的 Rf=0, ^{188}Re -奥曲肽及 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 的 Rf=0.7。计算 ^{188}Re -奥曲肽的标记率。

1.4 荷瘤裸鼠动物模型的建立

将人 H460 非小细胞肺癌细胞株接种于含有 15% 小牛血清的 RPM1640 完全培养基(含 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素), 置入 5% 的 CO_2 培养箱(37 °C) 中培养。当细胞数达到 80%~90% 的融合时, 用 2.5% 的胰酶消化 2~3 min, 待细胞悬浮后收集于离心管中, 500 r/min 离心(离心半径 10 cm) 10 min, 去除上清液后, 用无血清的 RPM1640 培养基洗涤 2 遍, 采用台盼蓝排斥法计数, 保证活细胞率大于 99%, 调整为每 ml 含有 1.5×10^7 个肿瘤细胞。20 只 BALB/c 裸鼠的右腋皮下接种肿瘤细胞 0.3×10^7 个(0.2 ml)。将裸鼠置于无菌超净工作台中饲养, 凉开水、高温蒸汽消毒饲料喂养, 木屑高温蒸汽消

毒, 鼠笼用 84 消毒液浸泡消毒, 水、饲料、木屑、鼠笼每天更换或清洗一次。室内温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度为 $(60 \pm 10)\%$, 12h 昼/夜周期。

1.5 研究 ^{188}Re -奥曲肽在荷瘤裸鼠体内生物学分布

16 只荷瘤裸鼠随机分成 4 组, 每组 4 只, 尾静脉注射 ^{188}Re -奥曲肽 18.5 MBq(0.2 ml), 分别于注射后 2, 4, 24 和 48h 每时间点取一组裸鼠断颈处死, 取主要脏器及肿瘤组织, 称重并测定放射性计数, 经放射性衰变校正后计算每克组织百分注射剂量率(% ID/g)。另外 2 只裸鼠同样尾静脉注射相同剂量标记物, 分别于注射后 2, 4, 24 和 48h 行 SPECT 静态平面针孔准直器显像(采集计数大于 5×10^5 , 能窗 20%, 能峰 155 keV), 并利用感兴趣区(region of interest, ROI) 技术对主要脏器和肿瘤组织进行半定量分析, 计算肿瘤/非瘤组织放射性比值(T/NT)。

1.6 统计学方法

实验结果数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 ^{188}Re 标记奥曲肽的标记率

反应体系在室温下冷却后即测量得出其标记率为 $(95.3 \pm 1.8)\%$ 。

2.2 荷瘤裸鼠肿瘤生长的情况

肿瘤细胞接种后, 经过近一周的潜伏期, 可见接种部位皮下出现灰白色结节, 并逐渐长大, 呈圆形或椭圆形, 突出于体表, 瘤体表面皮肤变薄、透亮、光滑, 三周左右肿瘤长至约 0.8 cm。

2.3 ^{188}Re -奥曲肽在荷瘤裸鼠体内各脏器中的分布

^{188}Re -奥曲肽在荷瘤裸鼠体内各脏器及肿瘤组织中的分布见图 1 所示; 图 2、图 3 分别为两只不同荷瘤裸鼠 SPECT 所见; 利用 ROI 技术得出的 T/NT 见图 4。

3 讨论

肿瘤的靶向治疗是近年来肿瘤治疗的研究热点之一, 放射免疫治疗(radioimmunotherapy, RIT) 是利用放射性核素标记的肿瘤特异性抗体对肿瘤的特异性靶向作用, 将放射性核素带入肿瘤细胞, 从而特异性杀伤肿瘤细胞。但用于 RIT 的单抗多为鼠源性, 同时单抗的分子质量相对较大, 不易穿透组织, 从而限制了其在临床的应用^[4]。多肽具有分子

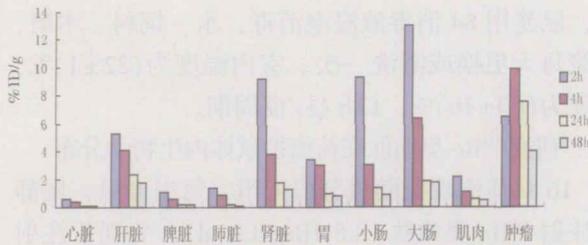


图1 ^{188}Re -奥曲肽经尾静脉注射后在荷人 H460 非小细胞肺癌的 BALB/c 裸鼠内的分布

标记物主要为肝、肾、肠道及肿瘤所摄取, 其中肿瘤摄取在 4h 达到高峰为 9.8%ID/g, 在 24h 相对于各正常组织和器官, 摄取放射性核素更多。

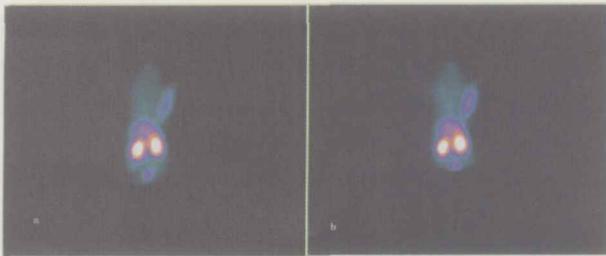


图2 荷人 H460 非小细胞肺癌细胞裸鼠 ^{188}Re -奥曲肽 SPECT 结果

a 图为 2h 影像, 左腋下肿瘤开始显像; b 图为 4h 影像, 肿瘤显像更加清晰。

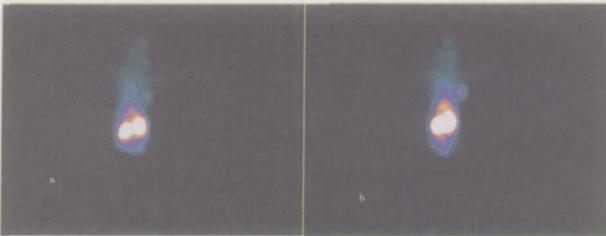


图3 另一荷人 H460 非小细胞肺癌细胞裸鼠 ^{188}Re -奥曲肽 SPECT 结果

a 图为 2h 影像, 左腋下肿瘤开始显像; b 图为 4h 影像, 肿瘤核素浓聚进一步增强。

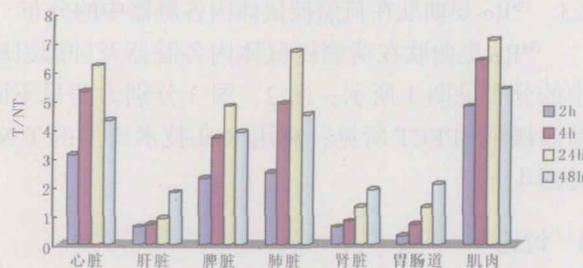


图4 荷瘤裸鼠 ^{188}Re -奥曲肽 SPECT 后, 利用 ROI 技术得出的 T/NT

4h T/NT 快速升高到 6.4, 24h 达到最高值为 7.1, 以后逐步下降。

质量小、受体专一性强、易于合成和修饰、免疫反应少、容易穿透组织和血液清除快等特性, 受到了学者广泛的关注。核素由受体介导进入肿瘤细胞以后, 在溶酶体内发生降解, 核素与氨基酸残基的降

解产物复合物不能通透溶酶体膜, 这样就使核素长时间滞留在受体表达阳性的肿瘤细胞内, 从而达到杀伤肿瘤细胞的作用。

奥曲肽作为第一个人工合成的生长抑素类似物在临床广泛应用于抗肿瘤治疗。 ^{188}Re 可以通过发生器获得, 方便、价廉, 生物学行为十分优异, 其单位活度释放的能量是 ^{131}I 的 4 倍, 组织穿透力也较 ^{131}I 为高, 因而可以向肿瘤组织传递较高的辐射剂量; ^{188}Re 在脏器吸收很低, Breitz 等^[5]在进行 RIT 时给予 1.11~11.10 GBq 的 ^{188}Re , 患者仍可耐受, 虽然在肾脏、肝脏和大肠中观察到核素的明显聚集, 但仍未见明显射线损伤, 由此可见 ^{188}Re 用于人体肿瘤治疗时具有较高的安全性。 ^{188}Re 所具有的高能量 β 射线适合于肿瘤的受体靶向治疗, 其发出的 γ 射线适合于 SPECT, 既能监测治疗中肿瘤的变化, 又能测定肿瘤摄取 ^{188}Re -奥曲肽的 T/NT。

^{99m}Tc 与 ^{188}Re 是同族元素, 它们的理化性质相似, ^{99m}Tc -奥曲肽的标记方法已相当成熟, 并在肿瘤的 SPECT 临床诊断中取得了初步成功, 为 ^{188}Re -奥曲肽提供了有益的借鉴。用 ^{99m}Tc -奥曲肽进行受体显像诊断肿瘤时, 奥曲肽的用量通常只有 10~20 μg ^[6], 大于 20 μg 时, 较大剂量的奥曲肽会将 ^{99m}Tc 带到非靶器官和组织, 使得本底偏高, 图像模糊, 这是由于个体差异的存在以及肿瘤表达 SSTR 的有限性, 使得受体介导结合具有饱和性。同样, 用大剂量的 ^{188}Re -奥曲肽进行核素靶向治疗时将增加非特异性结合, 使非靶器官和组织聚集较多的放射性核素, 从而加大了 ^{188}Re 对非靶组织的杀伤作用。但文献报道用 ^{188}Re 标记生长抑素类似物的用量通常高达 100~300 μg ^[7], 我们在研究中成功地将 ^{188}Re 标记到了 10 μg 的奥曲肽^[3], 而且标记方法操作简便, 无需进一步纯化, 标记率高, 反应时间短, 为进一步制成试剂盒应用于临床打下了坚实的基础。

^{188}Re -奥曲肽注入荷瘤裸鼠体内后, 主要被肝脏、肾脏、肠道及肿瘤部位摄取, 其在裸鼠正常器官及组织的分布与在普通小鼠体内分布大体一致^[3]。肿瘤部位 ^{188}Re -奥曲肽在 4h 摄取达到高峰, 在 24h 仍有相对较高的 %ID/g 值。SPECT 2h 开始在肿瘤部位有明显的放射性核素聚集, 并且逐步增加, 在 4h 肿瘤显像更加清晰, 得到了较好的 SPECT 图像。注射后 4h T/NT 快速升高, 24h 达到最高值为 7.1,

(下转第 38 页)

的表达和子宫颈癌密切相关, 研究证实 ^{125}I -M75 单抗对于子宫颈癌及其转移灶有诊断的潜力。

综上所述, RII 能够及早发现复发病灶, 有效指导临床采取积极治疗措施, 使患者避免不必要的痛苦和心理负担, 为妇科肿瘤的诊治与随访工作提供一个有效的手段。但是, 如何找到更为特异和有效的抗体, 提高肿瘤组织的显像率也是今后 RII 研究所面临的挑战。

参 考 文 献

- 1 Buchsbaum DJ. Imaging and therapy of tumors induced to express somatostatin receptor by gene transfer using radiolabeled peptides and single chain antibody constructs. *Semin Nucl Med*, 2004, 34 (1): 32-46.
- 2 Dimitrov G, Iovchev I, Nikolov S. Radioimmunoguided surgery—a new stage of therapeutic management of oncological patients. *Khirurgiia(Sofia)*, 2000, 56(5-6): 68-70.
- 3 Wan X, Zhang D, Yang X. Radioimmunodetection of human trophoblastic cancer xenograft in nude mice. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 1999, 21(5): 342-344.
- 4 Wan X, Yang X, Song H. Radioimmunodetection in the diagnosis of trophoblastic disease. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 1999, 34 (11): 664-666.
- 5 Ozols RF, Rubin SC, Thomas GM, et al. Epithelial ovarian can-

cer. principles and practice of gynecologic oncology. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000, 981-1058.

- 6 Classe JM, Fontanelli R, Bischof-Delaloye A, et al. Ovarian cancer management. Practice guidelines for nuclear physicians. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 48(2): 143-149.
- 7 Kalofonos HP, Karamouzis MV, Epenetos AA. Radioimmunoscintigraphy in patients with ovarian cancer. *Acta Oncol*, 2001, 40 (5): 549-557.
- 8 Magnani P, Fazio F, Grana C, et al. Diagnosis of persistent ovarian carcinoma with three-step immunoscintigraphy. *Br J Cancer*. 2000. 82(3): 616-620.
- 9 Lieberman G, Buscombe JR, Hilson AJ, et al. Preoperative diagnosis of ovarian carcinoma with a novel monoclonal antibody. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 183(3): 534-540.
- 10 Pelosi E, Arena V, Baudino B, et al. Preliminary study of sentinel node identification with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ colloid and blue dye in patients with endometrial cancer. *Tumori*, 2002, 88(3): S9-S10.
- 11 Yuan CC, Tsa LC, Shyong WY, et al. Radioimmunodetection of cervical carcinoma xenografts with (111)In-labeled MAb Cx-99 detected by a hand-held gamma detector. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2002, 23(3): 178-182.
- 12 Chrastina A, Pastorekova S, Pastorek J. Immunotargeting of human cervical carcinoma xenografts expressing CA IX tumor-associated antigen by ^{125}I -labeled M75 monoclonal antibody. *Neoplasma*, 2003, 50(1): 13-21.

(收稿日期: 2005-03-28)

(上接第 16 页)

之后逐步下降, 从研究中看出, ^{188}Re -奥曲肽可较特异地与人非小细胞肺癌移植瘤相结合, 其在肿瘤内的分布具有较高的 T/NT, 有望用于表达 SSTR 肿瘤的核素靶向治疗。

由图 1、4 可以看出, ^{188}Re -奥曲肽经静脉给药在肝、肾及肠道等非靶器官还是分布较多, 持续时间较长, 可能对正常组织器官产生放射性损伤, 这可能是当前受体介导核素靶向治疗急需解决的首要问题。由于核素标记的生长抑素类似物在动物体内的分布和代谢与生长抑素类似物及标记方法的不同密切相关, 有必要进一步改进标记方法和研制出特异性更高的生长抑素类似物, 减少肝胆对标记物的摄取, 从而减少其在肠道的分布和放射性损伤。当前, 可以采用反复灌肠和在注射 ^{188}Re -奥曲肽前注射少量未标记的奥曲肽来减少胃肠道和肝脏对放射性核素的摄取, 而正电荷的氨基酸如赖氨酸和精氨酸灌注可以抑制小管细胞对放射性肽的重吸收, 从而加快非靶器官核素的排出, 减少对肾脏的损伤; 利用经皮穿刺直接瘤体内注射给药的方法可能也是减少核素对正常组织和器官放射性损伤的有效方法之一。对于 SSTR 表达阴性的肿瘤, 将 SSTR 基因转染

至 SSTR 阴性肿瘤细胞, 用基因疗法联合核素标记奥曲肽靶向治疗的方法有望解决 SSTR 阴性肿瘤的治疗难题。

参 考 文 献

- 1 Heppeler A, Frodevaux S, Elberle AN, et al. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem*, 2000, 7(9): 971-994.
- 2 Serafini AN. From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: an overview. *J Nucl Med*, 1993, 34(3Suppl): 533-536.
- 3 宋进华, 刘璐, 王自正, 等. ^{188}Re 标记小剂量奥曲肽方法学及其在小鼠体内分布的研究. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(4): 416-418.
- 4 Zhao XY, Schneider D, Biroc SL, et al. Targeting tomeregulin for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2846-2853.
- 5 Breitz HB, Weiden PL, Vanderheyden JL, et al. Clinical experience with rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: results of phase I trials. *J Nucl Med*, 1992, 33(6): 1099-1109.
- 6 Anna P, Renata M, Helmut R, et al. Clinical usefulness of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-TOC scintigraphy in oncological diagnostics: a pre-liminary communication. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003, 30(4): 1402-1406.
- 7 Faintuch BL, Pereira NPS, Faintuch S, et al. Direct labeling studies of octapeptides with rhenium-188. *Radiochimistry*, 2003, 91: 427-432.
- 8 Mearadji AM, Breeman W, Hofland L, et al. Somatostatin receptor gene therapy combined with targeted therapy with radiolabeled octreotide: a new treatment for liver metastases. *Ann Surg*, 2002, 236(6): 722-729.

(收稿日期: 2005-11-02)