

# RGD 肽及其衍生物在肿瘤显像及治疗中的研究进展

王浩 施培基 周晓靛 王荣先

【摘要】精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽存在于多种生物细胞外基质中,能特异性识别细胞表面整合素并与之结合,从而介导多种重要的生命活动。外源性 RGD 肽与肿瘤细胞表面整合素结合后,可作为体内 RGD 肽类物质的竞争性抑制剂,抑制肿瘤细胞与细胞外基质的黏附与迁移、抑制肿瘤血管形成、诱导肿瘤细胞凋亡,且具有靶向性标记肿瘤显像以及作为抗肿瘤药物和基因治疗的靶向性传导系统的作用。

【关键词】肽类;放射性核素显像;药物疗法;药物载体;精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽

【中图分类号】Q516,R730.5 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4114(2007)05-0274-04

## Research development on RGD peptides and its devivates in tumor imaging and therapy

WANG Hao, SHI Pei-ji, ZHOU Xiao-liang, WANG Rong-xian

(Department of pharmacy, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China.)

【Abstract】 RGD peptides exist in extracellular matrix of many kinds of organisms, and they can specifically recognise and combin with integrin receptors. After combining with integrin receptors, extrinsic RGD peptides can prevent tumor cells from adhering and migrating, suppress angiogenesis and induce tumor cells apoptosis. And the derivatives of RGD peptides can be used as specific imaging labelling and targetal drug delivery system for tumor therapy.

【Key words】 Peptides; Radionuclide imaging; Drug therapy; Drug carriers; Arginine-glycine-aspartic acid

精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)三肽广泛存在于生物体内,作为整合素和其配体相互作用的识别位点,介导细胞与细胞外基质及细胞间的黏附作用,同时具有信号转导功能,自从 Pierschbacher 等于 1984 年首次报道纤维蛋白原中所含的 RGD 序列为细胞识别位点以来, RGD 肽及其衍生物就成为各国学者关注与研究的热点之一。目前的研究已由 RGD 肽对血小板功能的影响、在抗栓药物中的应用、在骨组织的诱导再生中的研究等,转为对 RGD 肽及其衍生物在肿瘤转移和新生血管中的研究以及在肿瘤靶向治疗中的应用等。

### 1 RGD 肽及其衍生物和整合素家族的特点

整合素受体  $\alpha_v\beta_3$  是肿瘤血管内皮细胞膜特异性标志物,在新生血管内皮细胞表面呈上调状态,

而正常组织的血管含量极少, RGD 肽能特异性与之结合<sup>[1]</sup>。外源性 RGD 肽竞争性与肿瘤细胞表面整合素特异性结合后,不仅表现出抑制肿瘤的作用,且具有靶向性标记肿瘤和输送抗肿瘤药物的作用<sup>[2,3]</sup>,但大多数线性 RGD 肽在循环过程中半衰期较短,其治疗效果和生物活性不够理想,因此为增加肽类化合物稳定性、提高肽的生物活性,需对 RGD 肽进行改造。研究表明,将该肽的主体或部分结构改为环形结构,可以增加肽的稳定性。含有两个二硫键的环形 RGD 多肽对肿瘤新生血管内皮细胞的抑制效力是含单一二硫键环形 RGD 多肽的 20 倍,是线性 RGD 多肽的 200 倍<sup>[4]</sup>。Pasqualini 等<sup>[5]</sup>和 Rajotte 等<sup>[6]</sup>利用噬菌体表面肽库展示技术成功地筛选出能与  $\alpha_v\beta_3$  整合素专一结合的 RGD-4 半胱氨酸环肽(RGD-4C,即:含 4 个半胱氨酸 RGD 肽衍生物),并证实 RGD-4C 是一个良好的肿瘤血管靶向载体。由于 RGD 多肽及其受体的特异性使 RGD 多肽在肿瘤的分子影像学和靶向治疗中有良好的应用前景。

作者单位: 300192 天津,中国医学科学院放射医学研究所药物研究室

通讯作者: 王浩(E-mail: thriller\_wh@hotmail.com)

## 2 RGD 肽及其衍生物在肿瘤显像中的研究

随着生长抑素受体显像剂在临床中的应用,肿瘤受体显像越来越受重视。 $\alpha_v\beta_3$ 整合素在多种肿瘤细胞表面和新生血管内皮细胞上有高表达,但在成熟血管内皮细胞和绝大多数正常器官系统中 $\alpha_v\beta_3$ 不表达或者少量表达。因此,可以设计含有RGD序列的多肽,并可用放射性核素 $^{125}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{18}\text{F}$ 等标记,是一类很有应用价值的肿瘤受体显像剂。Haubner等<sup>[7]</sup>制备了第一个用于PET的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体显像剂 $^{18}\text{F}$ -糖肽-RGD。为了提高显像质量,可以在放射性核素标记的RGD多肽中引入二亚乙基三胺五乙酸、三羟甲基甘氨酸及葡聚糖等基团,既有利于放射性核素的标记,又能有效降低本底<sup>[8]</sup>。筛选和寻找亲和力更高的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体的配体——含RGD序列的小分子多肽,并对其进行适当的化学修饰,实现放射性核素的标记,是目前肿瘤分子核医学中的重要内容。

Zitzmann等<sup>[9]</sup>用RGD-4C连接荧光基团异硫氰酸荧光素研究了其对荷瘤裸鼠的癌细胞和正常细胞的亲和力,结果表明,连接异硫氰酸荧光素的RGD-4C既能靶向定位于肿瘤细胞表面,又能定位于肿瘤新生血管内皮细胞,而正常细胞处仅显示本底荧光。Achilefu等<sup>[10]</sup>和Ye等<sup>[11]</sup>用A549细胞系筛选得到一系列亲和力较强的含RGD序列的多肽(单体和多元RGD衍生物),标记以近红外发光基团——碳花菁,并考察了其荧光性质、毒性和构效关系,结果表明,八元RGD衍生物cypale-[(RGD)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>在肿瘤细胞内的浓度明显高于其他衍生物,显示该显像剂具有良好的应用前景。

我国李前伟等<sup>[12]</sup>用放射性核素标记小分子环形多肽RGD-4CY探讨了实现肿瘤 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体显像的可行性,表明 $^{125}\text{I}$ -RGD-4CY有望成为一种有效的肿瘤 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体显像剂<sup>[13]</sup>。

## 3 RGD 肽及其衍生物在肿瘤靶向治疗中的研究

RGD肽及其衍生物对肿瘤有直接的抑制作用,主要表现在其能抑制肿瘤细胞黏附及迁移和促进肿瘤细胞凋亡,还可抑制内皮细胞的增殖及其与细胞外基质的黏附,从而抑制肿瘤血管形成<sup>[14]</sup>。应用RGD肽对肿瘤细胞的靶向性向肿瘤部位输送细胞毒药物,是一项有应用前景的肿瘤靶向治疗技术。

Burkhart等<sup>[17]</sup>报道,将阿霉素(doxorubicin, DOX)连接于两种RGD肽(开环的RGD-4C和双环的N-Me-VRGDF)后对MDA-MB-435癌细胞进行体外实验,结果显示,开环的RGD-4C-DOX对 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体有较强的亲和力( $\text{IC}_{50}=10\text{ nmol/L}$ ),并能较强抑制癌细胞生长( $\text{IC}_{50}=50\text{ nmol/L}$ );双环的RGD-4C-DOX对 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体的亲和力则稍弱,且水溶性差。环状(N-Me-VRGDF-NH)-DOX对 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体有较强的亲和力( $\text{IC}_{50}=5\text{ nmol/L}$ ),抑制癌细胞生长的 $\text{IC}_{50}=90\text{ nmol/L}$ ;流式细胞术和抑制肿瘤生长实验表明,并非前药的完整结构进入细胞,而是其活性代谢产物起到抑瘤作用,但前药形式能显著降低副作用。

动物实验表明, RGD-肿瘤坏死因子(RGD-tumor necrosis factor, RGD-TNF)比TNF的抗肿瘤作用明显提高,而副作用减少;微量的RGD-TNF便能明显增强DOX和美法仑的抗癌活性;机制研究发现,  $10^{-12}$ 级的RGD-TNF能改变肿瘤血管对化疗药物的屏蔽作用<sup>[17,18]</sup>。

王芳等<sup>[19]</sup>以整合素配体RGD-聚乙烯亚胺(RGD-polyethylenimine, RGD-PEI)复合物为载体携带bcl-2反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)分别联合化疗药物三氧化二砷( $\text{As}_2\text{O}_3$ )和羟基喜树碱(hydroxy camptothecin, HCPT)考察对大肠癌细胞caco-2增殖的抑制作用:用改良噻唑蓝法检测bcl-2 ASODN联合化疗药物对细胞的 $\text{IC}_{50}$ , Q值法判断化疗药物与ASODN联合使用的效果,并计算化疗药物的增敏倍数。结果:单用 $\text{As}_2\text{O}_3$ 和HCPT的 $\text{IC}_{50}$ 分别为 $3.478\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $0.771\text{ mg/L}$ ;  $0.75\text{ }\mu\text{mol/L}$  ASODN联合 $\text{As}_2\text{O}_3$ 和HCPT的 $\text{IC}_{50}$ 分别为 $3.393\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $0.726\text{ mg/L}$ ,与单用 $\text{As}_2\text{O}_3$ 和HCPT的 $\text{IC}_{50}$ 相似;而相同质量浓度的RGD-PEI-ASODN联合 $\text{As}_2\text{O}_3$ 及HCPT的 $\text{IC}_{50}$ 分别为 $0.119\text{ }\mu\text{mol/L}$ 和 $0.071\text{ mg/L}$ ,将caco-2细胞对化疗药物的灵敏度分别提高29.2倍及10.8倍。研究表明,在RGD肽介导下可有效提高ASODN对caco-2细胞的增殖抑制率,与化疗药物联用能明显提高细胞对化疗药物的敏感性。

熊小兵等<sup>[20]</sup>研究用RGD类似物(RGDm)修饰隐形脂质体(stealth liposome, SL)以增加抗癌药物在肿瘤部位的积聚,同时增加抗癌药物向肿瘤细胞内的传递,通过细胞黏附试验考察导向化合物与肿瘤细胞的黏附情况,通过流式细胞实验和激光共聚焦显微实验考察肿瘤细胞对SL包封的DOX(SL-DOX)及

RGDm-SL 包封的 DOX(RGDm-SL-DOX)的结合或摄取情况。结果,与 SL-DOX 相比, RGDm-SL-DOX 与黑色素瘤细胞共同孵育后,细胞对 DOX 的结合及摄取均显著增加。研究表明, RGDm 修饰的 SL 可作为肿瘤靶向的载体通过受体介导的方式促进抗肿瘤药物向肿瘤细胞内的传递。

RGD 肽还可以通过构建靶向性腺病毒载体,在肿瘤基因治疗中发挥靶向性作用。邱峰等<sup>[21]</sup>在普通腺病毒载体(Adv)纤毛头节区中插入了具有整合素特异性的 RGD 肽,制备了 RGD-Adv,以克服 Adv 基因转导的柯萨奇腺病毒受体依赖性,考察其基因转导效率、稳定性及体外、体内毒性,研究证明, RGD-Adv 可有效地实现向受试细胞转导基因,其转导能力随病毒量的增加而加强。

#### 4 展望

RGD 肽作为整合素和其配体相互作用的识别位点,在肿瘤显像和治疗方面有着很好的应用前景。但是, RGD 肽在肿瘤治疗中的应用尚处于起步阶段,其作用机制还有待深入研究。目前,筛选出亲和力更高的整合素配体即含 RGD 的多肽是关键性的问题。Dijkgraaf 等<sup>[22]</sup>合成了 RGD 的单体 E-c(RGDfK)、二聚体 E-c(RGDfK)<sub>2</sub>、四聚体 E-[E-c(RGDfK)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>,连接正十二烷四乙酸(dodecanetetraacetic acid, DOTA)并用 <sup>111</sup>In 标记,体外实验表明,对肿瘤细胞  $\alpha_v\beta_3$  整合素受体的亲和力:连接 DOTA 的四聚体明显强于二聚体和单体, DOTA-E-c(RGDfK)、DOTA-E-c(RGDfK)<sub>2</sub> 和 DOTA-E-[E-c(RGDfK)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 120 nmol/L、69.9 nmol/L 和 19.6 nmol/L。

在放射治疗前注射 <sup>99m</sup>Tc-RGD,由于照射导致整合素受体的激活,可以发现 <sup>99m</sup>Tc-RGD 在肿瘤部位与受体结合<sup>[23]</sup>。因此,通过放射线照射激活肿瘤部位某些整合素的高表达,再利用 RGD 肽作为其配体,将治疗性药物靶向性转运到肿瘤部位,或在 RGD 肽上连接辐射增敏剂实现靶向增敏作用,这也是肿瘤靶向治疗的新思路。

#### 参考文献

- 1 Zetter BR. On target with tumor blood vessel markers. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(12): 1243-1244.
- 2 Janssen M, Oyen WJ, Massuger LF, et al. Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm*, 2002, 17(6): 641-646.

- 3 Schraa AJ, Kok RJ, Moorlag HE, et al. Targeting of RGD-modified proteins to tumor vasculature: a pharmacokinetic and cellular distribution study. *Int J Cancer*, 2002, 102(5): 469-475.
- 4 Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol*, 1995, 130(5): 1189-1196.
- 5 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996, 380(6572): 364-366.
- 6 Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, et al. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest*, 1998, 102(2): 430-437.
- 7 Haubner R, Wester HJ, Weber WA, et al. Noninvasive imaging of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression using <sup>18</sup>F-labeled-RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1781-1785.
- 8 Su ZF, Liu G, Gupta S, et al. In vitro and in vivo evaluation of a <sup>99m</sup>Technetium- labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of  $\alpha_v\beta_3$  integrin for tumor imaging. *Bioconjug Chem*, 2002, 13(3): 561-570.
- 9 Zitzmann S, Ehemann V, Schwab M. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo. *Cancer Res*, 2002, 62(15): 5139-5143.
- 10 Achilefu S, Bloch S, Markiewicz MA, et al. Synergistic effects of light-emitting probes and peptides for targeting and monitoring integrin expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(22): 7976-7981.
- 11 Ye Yp, Bloch S, Xu B. Design synthesis and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors. *J Med Chem*, 2006, 49(7): 2268-2275.
- 12 李前伟, 丁曙光, 郑秀海, 等. <sup>125</sup>I-RGD-4CY 肿瘤  $\alpha_v\beta_3$  受体显像的实验研究. 第三军医大学学报, 2002, 24(12): 1340-1342.
- 13 程绍钧, 李前伟, 李志俊, 等. 以血管生成成为靶点的肿瘤核素显像及治疗的实验研究. 第三军医大学学报, 2005, 23(2): 109-111.
- 14 Kok RJ, Schraa AJ, Bos EJ, et al. Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as  $\alpha_v\beta_3$  integrin directed therapeutics. *Bioconjug Chem*, 2002, 13(1): 128-135.
- 15 Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, et al. Inhibition of the  $\alpha_v\beta_3$  integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br J Cancer*, 2002, 86(5): 788-795.
- 16 Burkhart DJ, Kalet BT, Coleman MP, et al. Doxorubicin-formaldehyde conjugates targeting  $\alpha_v\beta_3$  integrin. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(12): 1593-1604.
- 17 Curmis F, Sacchi A, Corti A. Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J Clin Invest*, 2002, 110(4): 475-482.
- 18 Curmis F, Gasparri A, Sacchi A, et al. Coupling tumor necrosis factor- $\alpha$  with  $\alpha_v$  integrin ligands improves its antineoplastic activity. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 565-571.
- 19 丁芳, 蒋建伟, 曾慧兰, 等. 整合素受体介导 bel-2 反义核酸联合化疗药物对大肠癌细胞的增殖抑制作用. 实用医学杂志, 2006, 22(7): 748-749.
- 20 熊小兵, 黄悦, 吕万良, 等. RGD 类似物修饰的阿霉素磷脂质体的制备及体外细胞结合试验. 药学报, 2005, 40(12): 1593-1604.

1085-1090.

21 邱峰, 陈世知, 陈虹, 等. 新型腺病毒载体的制备及其特性研究. 重庆医科大学学报, 2006, 31(3): 330-333.

22 Dijkgraaf I, Kruijtz JA, Liu S, et al. Improved targeting of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin by multimerisation of RGD peptides. Eur J Nucl Med Mol

Imaging, 2007, 34(2): 267-273.

23 Halahan DE, Qu S, Geng L, et al. Radiation-mediated control of drug delivery. Am Clin Oncol, 2001, 24(5): 473-480.

(收稿日期: 2007-03-27)

## SPECT脑血流灌注显像和受体显像对抑郁症的研究

原凌 刘建中 武志芳

【摘要】抑郁症的影像学检查有结构性脑成像和功能性脑成像, CT和MRI检查脑结构的异常既不显著又不具有特异性, 而PET和SPECT提供了在活体内对抑郁症进行局部脑血流灌注和中枢神经递质与受体结构和功能的研究, 为进一步探讨抑郁症的病因、发病机制以及临床治疗提供客观依据。

【关键词】抑郁症; 体层摄影术, 发射型计算机, 单光子; 血液灌注; 受体, 5-羟色胺; 受体, 多巴胺

【中图分类号】R814.42, R749.4 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4114(2007)05-0277-04

### The study of SPECT cerebral blood flow and neuroreceptor imaging in depressive disorders

YUAN Ling, LIU Jian-zhong, WU Zhi-fang

(Department of Nuclear Medicine, The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】The imaging methods of depressive disorders include structural imaging and functional imaging, the abnormal of cerebral structure in CT and MRI is neither significant nor specific, while the use of PET and SPECT provides depression study in-vivo about regional cerebral blood flow and central neurotransmitter and receptor's structure and function, which further have advanced research on aetiology, pathogenesis and therapy of depressive disorders.

【Key words】Depressive disorders; Tomography, emission-computer, single-photon; Hemoperfusion; Receptor, 5-hydroxytryptamine; Receptor, dopamine

抑郁症是一类严重危害人类身心健康的常见精神障碍性疾病。抑郁症的影像学检查有结构性脑成像CT、MRI和功能性脑显像PET、SPECT。CT和MRI检查结果往往是阴性, 仅有少数患者表现为脑结构的异常, 但既不显著又不具有特异性, 而PET和SPECT的使用, 提供了在活体内对各种精神障碍性疾病进行局部脑血流(regional cerebral blood flow, rCBF)灌注和中枢神经递质与受体结构和功能的研究, 如老年痴呆、帕金森病、遗传性慢性舞蹈病、精神分裂症和精神障碍等<sup>[1]</sup>。近年来, 国外对SPECT应用于抑郁症的研究已有报道, 国

内报道较少, 但报道的结论不同, 甚至相互矛盾。

### 1 抑郁症的概述

#### 1.1 抑郁症的分类

目前, 临床常见的抑郁症包括单相抑郁或重症抑郁、双相抑郁、不典型抑郁、伴有精神特征的抑郁和老年抑郁<sup>[2]</sup>, 其症状、特征存在差异。临床最初发现抑郁症是介于单相抑郁和双相抑郁之间。单相抑郁指在一定环境因素影响或无任何原因出现症状, 持续2周以上, 影响到个人的社会功能。其主要症状包括: 兴趣丧失, 无愉快感; 精力减退或疲乏感; 体质量、食欲降低; 睡眠障碍如失眠、早醒; 精神运动性迟滞或激越; 自我评价过低、自