

·综述·

整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体靶向肿瘤显像研究进展

邵国强 王自正

【摘要】 整合素 $\alpha v \beta 3$ 高表达于肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞表面,而在正常组织和成熟血管内皮细胞表面呈低水平表达或不表达,整合素 $\alpha v \beta 3$ 能够与体内外含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的物质发生特异性结合。通过对 RGD 肽进行结构修饰、多聚化等来构建体内理化性能稳定的 RGD 肽和 RGD-蛙皮素等融合肽,再通过不同的偶联剂介导完成 RGD 肽的不同放射性核素(^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{125}I 、 $^{99}\text{Tc}^m$ 、 ^{123}I 、 ^{86}Y 等)标记,成为近年来肿瘤靶向显像的研究热点,部分临床实验正在国内外进行有效开展。通过 PET/CT、SPECT/CT 和 PET/MRI 多模态显像定量检测肿瘤整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体的表达水平,来完成抗肿瘤新生血管生成治疗患者的筛选、疗效预测和实时监测,已成为近年来研究的焦点和新的发展方向。

【关键词】 整合素 $\alpha v \beta 3$; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; 肿瘤; 靶向显像; 疗效评价

Integrin $\alpha v \beta 3$ targeted tumor imaging Shao Guoqiang, Wang Zizheng. Department of Nuclear Medicine, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

Corresponding author: Wang Zizheng, Email: guoqiangshao@163.com

【Abstract】 Integrin $\alpha v \beta 3$, highly expressed in tumor cells and tumor vasculature endothelial cells but rarely expressed in mature vessels or normal tissues, and it can specifically recognize and combine with the peptides which containing tripeptide sequence Arg-Gly-Asp (RGD). Some stable RGD peptides and RGD-bombesin heterodimers are synthesized by structure modification and multimerization of RGD peptides. These RGD peptides labeled with gamma-emitting and positron-emitting nuclides have been reported as the target tumor imaging research hotspot, and clinical trials are under way. The PET/CT, SPECT/CT and PET/MRI multimode imaging are focused on the quantitative analysis of tumor integrin $\alpha v \beta 3$ expression level and anti-angiogenesis patient screening, therapeutic effect evaluation and real time monitoring.

【Key words】 Integrin $\alpha v \beta 3$; Arginine-glycine-aspartic acid; Neoplasms; Targeted imaging; Therapeutic effect evaluation

受体靶向放射性分子探针的开发已成为近年来核医学领域肿瘤显像的研究热点,肿瘤细胞的遗传不稳定性及其分化程度的不同导致其表面受体和表达水平的不一,从而导致了肿瘤细胞表面受体靶向显像的困难。近年来研究发现,肿瘤新生血管的生成与肿瘤发生、生长、侵袭和转移的过程息息相关^[1],如果没有新生血管为肿瘤细胞提供养分和营养,肿瘤的直径不会超过 2 mm。此外,血管内皮细胞的遗传性能稳定、分化成熟、表面受体表达稳定,且新生血管的数量与肿瘤的恶性程度呈正相关,使其成为肿瘤靶向显像的新关注点^[1-2],

肿瘤新生血管形成的早期探测对于肿瘤的早期诊断、转移以及恶性程度的判断和肿瘤的分期将起到极其重要的作用,随着抗肿瘤血管生成药物贝伐单抗开始进入临床应用阶段,对这类药物疗效的早期评测和个体化治疗方案的制定显得尤为重要。整合素 $\alpha v \beta 3$ 高表达于肿瘤新生血管内皮细胞和部分肿瘤细胞表面,通过放射性核素标记整合素 $\alpha v \beta 3$ 靶向药物进行肿瘤显像,在近年来取得了重大的进展,现综述如下。

1 整合素

整合素是由 α 亚基(相对分子质量为 120 000~185 000)和 β 亚基(相对分子质量为 90 000~110 000)两个亚单位形成的异二聚体跨膜糖蛋白,迄今已发现由 18 种不同的 α 链和 8 种不同的 β 链组成的 24

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2014.01.007

基金项目: 国家自然科学基金(81071185); 江苏省自然科学基金(SBK20134281)

作者单位: 210006, 南京医科大学附属南京医院核医学科

通信作者: 王自正(Email: guoqiangshao@163.com)

种不同的整合素受体,结构上由较长的胞外区、单螺旋的跨膜片段及较短的胞内区三部分组成,基本生物学功能主要为介导细胞黏附和信号转导。

2 整合素 $\alpha v \beta 3$

整合素 $\alpha v \beta 3$ 是由 αv 亚基(CD51, 相对分子质量为 150 000)和 $\beta 3$ 亚基(CD61, 相对分子质量为 105 000)形成的跨膜异源二聚体糖蛋白,因在肿瘤血管生成中的重要性使其成为研究最为广泛的整合素之一。整合素 $\alpha v \beta 3$ 可以特异性地识别并结合细胞外基质配体分子中的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列,并发生构象改变而活化,介导细胞信号传递,调节细胞增殖、分化、运动、分布、定居、生存或凋亡等。整合素 $\alpha v \beta 3$ 在正常组织细胞、成熟血管内皮细胞表面表达水平极低,而在肿瘤新生血管内皮细胞表面和部分肿瘤细胞表面呈高水平表达,是肿瘤新生血管显像和治疗的主要靶点^[3],其在肿瘤血管生成中发挥重要作用的可能机制如下:参与内皮细胞的激活和迁移、介导内皮细胞增殖、抑制内皮细胞凋亡、参与碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)诱导的血管生成、参与血管内皮生长因子诱导的血管生成、诱导环加氧酶的产生等^[4]。

3 放射性核素标记 RGD 多肽及其结构优化

基于整合素 $\alpha v \beta 3$ 能够与含 RGD 三肽的序列特异性结合,研究者们近年来合成了大量线性、环状 RGD 三肽和含 RGD 三肽序列的多肽,与整合素 $\alpha v \beta 3$ 靶向抗体及抗体片段相比,具有更好的穿透能力,且不易被网状内皮系统捕捉或引起免疫反应,放射性核素(如 ^{99m}Tc 、 ^{111}In 、 ^{18}F 等)标记 RGD 多肽在整合素 $\alpha v \beta 3$ 高丰度表达的肿瘤内明显浓聚,成为肿瘤靶向显像的研究热点。

3.1 放射性核素标记 RGD 多肽

放射性核素(^{18}F 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、 ^{64}Cu 、 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 等)标记的 RGD 肽是靶向整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体显像的分子探针,放射性碘标记的 RGD 五肽最早由 Kessler 实验室设计合成,其在 M21 黑色素瘤、MaCaF 乳腺癌和骨肉瘤荷瘤鼠的肿瘤组织中分布增加^[5]。

^{18}F 具有接近 100% 的正电子效率、低正电子能量(0.64 MeV)和相对较短的物理半衰期(109.7 min)

等特点,是 PET 显像理想的放射性核素,在环状 RGD 的结构上引入乳糖基并用 ^{18}F 标记,合成的 ^{18}F -Galacto-RGD 能够特异性地识别整合素 $\alpha v \beta 3$ 阳性肿瘤,成为首个用于 PET 的整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体靶向显像剂,肿瘤部位的放射性摄取值明显高于本底,且肿瘤对显像剂 ^{18}F -Galacto-RGD 的摄取与肿瘤整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达水平具有极好的相关性。RGD 肽的 ^{18}F 标记主要使用 N-琥珀酰亚胺-4-氟苯甲酸酯和 4-硝基苯基 2-氟代丙酸作为偶联剂,其中 ^{18}F 标记 RGD 单体均因制备过程复杂且需要特定的回旋加速器设备,明显限制了其实际应用^[6],与 ^{18}F -FPPRGD₂(即 2-氟丙酰标记的聚乙二醇化二聚 RGD 肽)结构类似的示踪剂 ^{18}F -AIF-NOTA-PRGD₂ 的制备,使工艺大为简化。

^{68}Ga 通过 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器制备,具有良好的物理特性,89% 的 ^{68}Ga 通过正电子衰变,最高能量为 1.92 MeV, ^{68}Ge 和 ^{68}Ga 的物理半衰期分别为 270.8 d 和 68 min,性价比高, ^{68}Ga 容易标记小分子多肽且不改变其理化性能。Decristoforo 等^[7]通过 DOTA 偶联剂制备了 ^{68}Ga -DOTA-RGD,其在肿瘤及血液中的放射性分布水平平均明显高于 ^{111}In -DOTA-RGD。Liu 等^[8]通过偶联 p-SCN-Bn-NOTA[SCN 为 S-2-(4-isothiocyanatobenzyl), Bn 为 Bombesin, NOTA 为 1,4,7-triazacyclononanetriacetic acid]合成 ^{68}Ga 标记的 RGD 单体和多聚体,并在脑胶质瘤荷瘤鼠体内生物学分布的实验中显示出良好的肿瘤靶向结合能力。

^{64}Cu 的物理半衰期为 12.8 h,分别有 40% 以 β^- (能量为 656 keV)、19% 以 β^+ (能量为 600 keV) 和 38% 以电子俘获形式发生放射性衰变。其中 β^+ 衰变可以通过 PET 显像检测其分布,而电子俘获衰变又同时具有辐射杀伤作用。通过 DOTA 双功能偶联剂进行 RGD 多肽及其衍生物的标记。而 4,11-bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane(CBTE2A)是交联性双功能偶联剂,通过 CBTE2A 偶联合成的 ^{64}Cu 标记的 RGD 多肽,稳定性好,肝脏、血液系统血本底低,肿瘤与非肿瘤组织的放射性摄取比值高^[9]。

SPECT 所需放射性同位素 ^{99m}Tc 是临床最常用的放射性核素,容易获得,且以联胍尼克酰胺为双功能螯合剂完成标记,有固定的试剂盒,操作方法简便,因此应用较为广泛。尤其是近年来在 2 个 RGD 模序间引入 PEG₄ 或 Gly₃ 分子,制备 ^{99m}Tc 标

记的 RGD 二聚体和多聚体, 如 Zhou 等^[10]和 Wang 等^[11]合成的 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-E[PEG₄-c(RGDfk)]₂ 在荷瘤鼠体内的肿瘤放射性摄取值(%ID/g)高达 12%。

3.2 结构修饰

近年来, 为了改善放射性核素标记的 RGD 肽在体内的药代动力学特性, 糖基化、聚乙醇化和聚合化等结构改造成为了整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体靶向显像分子探针的研究重点^[12]。

在 5 个氨基酸残基构成的 RGD 多肽的第 5 位赖氨酸残基上引入葡萄糖基, 经放射性碘标记后其药代动力学结果显示其在肝内的滞留率明显降低, 且有效提高了其在肿瘤组织内的分布。为增加放射性标记 RGD 多肽的亲水性, 在环状 RGD 五肽赖氨酸残基上引入二乙烯三胺五乙酸, 可提高环五肽的亲水性, 并可促进其肾脏代谢。

聚乙醇化是提高 RGD 多肽亲水性的又一途径, 但在 RGD 模序间引入单个 PEG₄ 后没有改变 2 个 RGD 间的距离, 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力无明显变化, 引入 2 个 PEG₄ 后, RGD 模序间距从 6 个化学键长增加到 38 个化学键长, 2 个 RGD 模序同时与细胞表面 2 个相邻的整合素受体相结合, 与整合素的亲合力提高了 2.5 倍^[13]。目前由 3 个 PEG₄ 间隔的 RGD 二聚体具有极好的药代动力学特性, 脑胶质瘤放射性摄取值(%ID/g)达到了 12%左右, 肝脏分布少, 肾脏排泄快, 已进入临床实验阶段^[14]。与 PEG₄ 类似, RGD 模序间通过 Gly₃ 进行间隔增加单体间的距离, 也在一定程度上增加了 RGD 多聚体与肿瘤整合素受体的亲合力和靶向性结合。

放射性核素标记的 RGD 多肽构效关系的研究发现, 大多数线性 RGD 肽在体内循环过程中的半衰期较短, 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体亲合力低, 含有 2 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更强, 是含单一二硫键环形 RGD 多肽的 20 倍, 是线形 RGD 多肽的 100 倍, 且由于环形 RGD 多肽为多价态, 可以同时与多个 $\alpha_v\beta_3$ 结合, 其整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体特异性更高。

为了增加 RGD 多肽与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的亲合力, 人们将多聚化的概念引入到了 RGD 多肽放射性显像剂的研究中, 包括前述的 RGD 二聚体(RGD₂)、多聚体(RGD_n; $n \geq 4$)和纳米粒子。

Dijkgraaf 等^[15]首次合成并对比研究了 ^{68}Ga 标记的 RGD 单体(^{68}Ga -DOTA-E-c(RGDfk))、二聚体

(^{68}Ga -DOTA-E-[c(RGDfk)]₂)和四聚体(^{68}Ga -DOTA-E-[E[c(RGDfk)]₂]₂), 结果显示其 IC₅₀(半抑制浓度)分别为(23.9±1.22)、(8.99±1.20)和(1.74±1.18)nmol/L, 静脉注射后 2 h 肿瘤内放射性摄取(%ID/g)分别为(3.30±0.30)%、(5.24±0.2)%和(7.11±0.67)%。放射性核素标记的 RGD 多聚体的生物学特性对比研究结果显示, 放射性核素标记 RGD₂ 在肿瘤部位的摄取与 RGD₄ 相当, 较 RGD 单体高出一个数量级, 且 RGD₂ 在正常组织特别是肝、肾的放射性摄取和滞留值较 RGD₄ 低, 具有更大的应用优势。

纳米颗粒应用于肿瘤新生血管 $\alpha_v\beta_3$ 的显像是基于纳米颗粒自身的优越性, 主要体现在以下 3 个方面: ①纳米颗粒的运载能力强, 可以提高信号强度和敏感性; ②纳米颗粒可以介导不同类型的显像模式, 比如核素显像、MRI 以及光学显像, 甚至可以作为抗肿瘤靶向治疗药物的运输工具; ③由于纳米颗粒的体积较大, 这样可以限制其进入肿瘤细胞内, 而只结合于肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞表面, 真正达到肿瘤新生血管显像的目的。

随着融合显像技术的进步, RGD 介导的多模态显像 PET/MRI 也取得了一定进步, Lee 等^[16]通过共沉淀手段成功制备了基于氧化铁的聚天冬氨酸-氧化铁纳米探针, 其表面的氨基酸序列可以与 RGD 多肽偶联结合, 纳米探针再通过 RGD 序列与大量的肿瘤细胞表面整合素受体靶向结合, 同时纳米探针通过双功能偶联剂 DOTA 进行放射性核素 ^{64}Cu 标记, 从而用于 PET/MRI 双模态显像, 有利于肿瘤的早期精确诊断和探测, 并为其相关分子机制的研究提供了工具。

通过形成均多聚体或杂多聚体也可以提高 RGD 肽对整合素受体的结合率和选择性。其中均多聚体可通过协同作用和对内源性配体的屏蔽作用提高其靶向亲合力。而杂多聚体(如整合素与蛙皮素融合肽等)成为近年来的关注热点, 即通过结合靶细胞中不同的受体, 而提高其在靶组织中的摄取率^[17]。

4 展望

放射性核素标记的 RGD 多肽显像的临床实验研究多见报道, 且不同肿瘤模型的实验研究表明肿瘤组织对 RGD 肽的摄取与肿瘤组织 $\alpha_v\beta_3$ 的表达

水平具有显著相关性。在肿瘤治疗效果的早期有效评价中, ^{18}F -Galacto-RGD PET 显像显示出了更明显的优势, 且在治疗前显像中可对肿瘤分子靶向治疗方案的制定和疗效监测发挥重要作用, 但在肿瘤分期分级的评价上尚不如 ^{18}F -FDG 肿瘤代谢显像^[18]。

因此, 通过无创性显像手段精确定量肿瘤(肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞)的整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 表达水平, 为适于抗肿瘤新生血管治疗患者的筛查及疗效预测和实时监测提供了良好的手段, 且通过与 ^{18}F -FDG 的联合应用, 将对肿瘤的病情评价、治疗方案的制定和优化, 以及疗效评价、检测提供科学依据, 是其临床应用的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): S15-18.
- [2] Beer AJ, Haubner R, Sarbia M, et al. Positron emission tomography using [^{18}F]Galacto-RGD identifies the level of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ expression in man[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 3942-3949.
- [3] Liu Z, Wang F. Development of RGD-Based Radiotracers for Tumor Imaging and Therapy: Translating from Bench to Bedside[J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13(10): 1487-1505.
- [4] Jiao Y, Feng X, Zhan Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 promotes $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41591 [2013-01-15]. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0041591>.
- [5] Haubner R, Wester HJ, Reuning U, et al. Radiolabeled $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40(6): 1061-1071.
- [6] Monaco A, Zoete V, Alghisi GC, et al. Synthesis and in vitro evaluation of a novel radioligand for $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin receptor imaging: [^{18}F]FPPA-c(RGDfK)[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(22): 6068-6072.
- [7] Decristoforo C, Hernandez Gonzalez I, Carlsen J, et al. ^{68}Ga - and ^{111}In -labelled DOTARGD peptides for imaging of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin expression[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35(8): 1507-1515.
- [8] Liu Z, Niu G, Shi J, et al. ^{68}Ga -labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: promising agents for tumor integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ PET imaging[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 36(6): 947-957.
- [9] Boswell CA, Sun X, Niu W, et al. Comparative in vivo stability of copper-64- labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes[J]. *J Med Chem*, 2004, 47(6): 1465-1474.
- [10] Zhou Y, Kim YS, Chakraborty S, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled cyclic RGD peptides for noninvasive monitoring of tumor integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ expression[J]. *Mol Imaging*, 2011, 10(5): 386-397.
- [11] Wang L, Shi J, Kim YS, et al. Improving tumor-targeting capability and pharmacokinetics of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled cyclic RGD dimers with PEG₄ linkers[J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(1): 231-245.
- [12] Selvaraj R, Liu S, Hassink M, et al. Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ targeted PET tracer based on a cyclic RGD peptide[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(17): 5011-5014.
- [13] 靳存敬, 史继云, 刘妍, 等. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的 PEG₄/2PEG₄ 修饰的环状 RGD 二聚体内外性质的对比[J]. *核化学与放射化学*, 2010, 32(5): 287-292.
- [14] Ma Q, Ji B, Jia B, et al. Differential diagnosis of solitary pulmonary nodules using $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3P₄-RGD₂ scintigraphy [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 38(12): 2145-2152.
- [15] Dijkgraaf I, Yim CB, Franssen GM, et al. PET imaging of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin expression in tumours with ^{68}Ga -labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 38(1): 128-137.
- [16] Lee HY, Li Z, Chen K, et al. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles[J]. *J Nucl Med*, 2008, 49(8): 1371-1379.
- [17] Jackson AB, Nanda PK, Rold TL, et al. ^{64}Cu -NO₂A-RGD-Glu-6-Ahx-BBN(7-14)NH₂: a heterodimeric targeting vector for positron emission tomography imaging of prostate cancer[J]. *Nucl Med Biol*, 2012, 39(3): 377-387.
- [18] Haubner R, Beer AJ, Wang H, et al. Positron emission tomography tracers for imaging angiogenesis[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 37 suppl 1: S86-103.

(收稿日期: 2013-01-15)