

• 基础研究 •

68Ga 标记 TMTP1 探针在肝癌肿瘤模型中的 microPET/CT 显像研究

厦门大学附属第一医院核医学科 (厦门 361003) 李业森

【摘要】 目的 研究 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 对 SMMC-7721 肝癌荷瘤小鼠模型的诊断效果。**方法** 氨肽酶 P2 在一些肿瘤 (如肝癌、肺癌、乳腺癌等) 中有高表达。TMTP1 可以特异性地靶向氨肽酶 P2, 本研究利用 68Ga 标记 NOTA-PEG2-TMTP1 合成 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1, 然后对 SMMC-7721 肝癌荷瘤小鼠进行 microPET/CT 显像研究, 研究其对肿瘤的诊断效果。**结果** 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 的放射性标记产率为 $(87.16 \pm 1.23)\%$, 放化纯度大于 99.0%。实验证明 PEG 修饰后的 TMTP1, 具有更好的肿瘤靶向性, 肿瘤肌肉比可以高达 5.66。**结论** 对于肝癌的诊断来说, 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 可能是更好的 PET 探针, 具有进一步临床转化的前景。

【关键词】 PET; 肝癌; 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1; 68Ga 标记

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)05-0122-03

Study on microPET/CT imaging of 68Ga-labeled TMTP1 probe in HCC tumor model LI Yesen. *Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China*

【Abstract】 Objective To investigate the diagnostic effect of 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 on a mouse model of SMMC-7721 hepatocellular carcinoma in nude mice. **Methods** Aminopeptidase P2 was highly expressed in some tumors (e. g., liver, lung, breast cancer, etc.). TMTP1 could specifically target aminopeptidase P2. In this study, 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 was synthesized using 68Ga-labeled NOTA-PEG2-TMTP1, then SMMC-7721 hepatocellular carcinoma tumor-bearing nude mice for microPET/CT imaging study to investigate its diagnostic effect on tumors. **Results** The radiolabelling yield of 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 was $(87.16 \pm 1.23)\%$, and the radiochemical purity was greater than 99.0%. It was demonstrated that TMTP1, after PEG modification, had better tumor targeting, with tumor muscle ratio up to 5.66. **Conclusion** For the diagnosis of hepatocellular carcinoma, 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 may be a better PET probe with the prospect of further clinical translation.

【Key words】 PET; hepatocellular carcinoma; 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1; 68Ga labelling

肝细胞癌 (HCC) 简称肝癌, 是一种与慢性肝炎病毒感染密切相关的恶性肿瘤。近年来, 我国的肝癌诊疗技术取得了较大进步, 但年龄标化后的患者总体 5 年净生存率仅由 2000—2004 年间的 11.7% 提高到 2010—2014 年间的 14.1%, 未见显著提高^[1]。因此, 科学地确定复发转移性肝癌的高危人群、制定分层的监测方案, 是早发现、早诊断和提高肝癌总体生存率最关键的环节。TMTP1 受体是氨肽酶 P2 (Aminopeptidase P2), 它对高转移性细胞具有靶向性。本研究以 TMTP1 为目标, 通过 PEG 对其进行修饰, 合成 NOTA-PEG-TMTP1, 并对其进行 68Ga 放射性标记, 研究其肿瘤靶向性和体内药动学性质。

1 材料与方法

1.1 材料: 医用回旋加速器 (GE Minitrace); GE TRACERlab FXFN 自动化合成模块 (美国 GE 公司); 小动物 microPET/CT (西门子 Inveon); CRC-25PET 放射性核素活度计 (美国 CAPINTEC. INC); 4.6×250 mm NUCLEOSIL 色谱柱 (德国 Macherey-Nagel); DionexUlti-Mate 3000 分析型高效液相色谱仪 (赛默飞), 配备有放射性检测器 (美国 BioScan 公司); Sep-Pak plus C18 柱 (美国 Waters 公司)。

1.2 方法:

1.2.1 68Ga [Ga] -NOTA-PEG-TMTP1 的合成及放射性标记: 1) NOTA-PEG2-TMTP1 的合成: 将 30 mg 多肽 PEG2-TMTP1 溶于 1 mL DMF (二甲基甲酰胺) 中, 加入 50 mg 1, 4-二乙酸-1, 4, 7-三氮杂环壬烷-7-乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (NOTA-NHS ester, 购买于 CheMatech 公司), 然后加入 DIEA (N, N-二异丙基乙胺) 将 pH 调节到 8.5, 室温搅拌过夜, 经 HPLC 分离纯化, 收集目标产物的馏分, 合并后冻干, 得目标产物 NOTA-PEG2-TMTP1, 经过 HPLC-质谱分析确认。2) C18 小柱的活化: 先用 10 mL 乙醇淋洗, 空气吹干, 再用 20 mL 灭菌注射用水淋洗, 空气吹干备用。3) 68Ga 淋洗液的配制: 用无水乙醇和浓盐酸配制 10 mmol/L 的盐酸乙醇溶液备用。用 4 mL 0.05 M 的盐酸淋洗 Ge-68/Ga-68 发生器, 获得 68Ga 的盐酸淋洗液。制备 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1: 向 10 mL 的青霉素瓶中加入 25 μ g NOTA-PEG2-TMTP1, 然后加入 1 mL 0.25 M 醋酸钠缓冲液溶解, 再加入 4 mL 68Ga 的盐酸淋洗液 (20~40 mCi)。混合物摇匀后在 100 °C 反应 10 min, 冷却至常温, 用 HPLC 测定其标记率。纯化制得 68Ga-NOTA-PEG2-TMTP1: 将上述反应液缓慢注入事先活化过的 Sep-

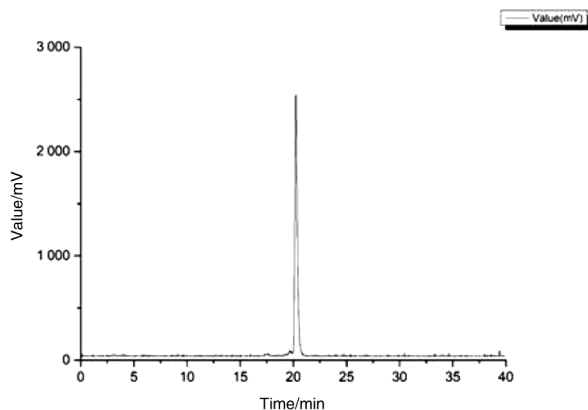
Pak C18 柱,再用 20 mL 蒸馏水淋洗除去水溶性杂质,吹干后用 800 μ L 的乙醇淋洗,淋洗液用生理盐水稀释至乙醇含量小于 10%,用 HPLC 测定其保留时间和放化纯。

1.2.2 microPET/CT 显像: 利用人源肝癌细胞系 SMMC-7721 接种到雄性裸鼠 [购于厦门大学实验动物中心,实验动物质量合格证号: 44824700001115; 使用许可证号: SYXK (闽) 2018-0009, 生产许可证号: SCXK (闽) 2018-0003] 乳腺 (6 只, 6~8 周龄, SPF 级别), 待肿瘤生长至直径 0.5~1 cm 后, 进行 microPET/CT 显像研究。将 3.7~7.4 MBq (100~200 μ Ci) ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 经尾静脉注射到荷瘤裸鼠体内, 代谢 35 min 后, 荷瘤裸鼠利用异氟烷麻醉, 然后利用 microPET/CT 扫描, 静态采集 5 min PET 图像。

1.3 评价标准: 显像后的图像经过 OSEM3D 重建, 然后勾画感兴趣区域, 分析计算肿瘤、肝脏、肌肉等组织的摄取值, 对比肿瘤、肌肉、骨骼等器官的放射性摄取值。

2 结果

2.1 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 的合成及放射性标记: PEG2-TMTP1 与 NOTA-NHS ester 反应后得到的目标产物经过 HPLC 分离后进行质谱检测, 分子量 m/z 为 1059.9, 与理论分子量相符 ($[M+H]^+$)。利用 ^{68}Ga 对 NOTA-PEG2-TMTP1 进行放射性标记, 放射性标记产率为 $(87.16 \pm 1.23)\%$ ($n=4$), 放化纯度为 99.3% (图 1)。

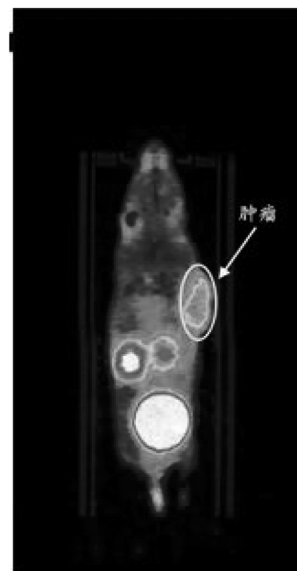


注: ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 的出峰时间为 20.7 min, 放射化学纯度为 99.3%。

图 1 放射性标记后 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 的 HPLC 分析结果

2.2 microPET/CT 显像: 利用 microPET/CT 对 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 探针在 SMMC-7721 肝癌荷瘤小鼠的体内代谢情况 (图 2), 通过勾画感兴趣区域, 分析肿瘤、肌肉、肝脏等的摄取结果显示, 在 40 min 时, 肿瘤对 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 的摄取值为 $(0.97 \pm 0.07)\%$ ID/g, 心脏摄取值 $(0.53 \pm 0.06)\%$ ID/g, 肝脏摄取值 $(0.40 \pm 0.06)\%$ ID/g, 肾脏摄取值为 $(1.77 \pm 0.39)\%$ ID/g, 骨骼摄取值为 $(0.19 \pm 0.07)\%$ ID/g, 肌肉摄取值 $(0.17 \pm 0.07)\%$ ID/g, 大脑摄取值 $(0.16 \pm 0.04)\%$ ID/g, 而肿瘤/肌肉比和肿瘤/肝脏比分别为 5.66

和 2.43 (均 >1), 说明 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 探针对 SMMC-7721 肝癌模型有优良的肿瘤靶向性。显像结果提示, 骨骼部位没有放射性摄取, 说明 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 具有良好体内稳定性。



注: 射线探针经由肾脏膀胱排泄, 其他正常器官摄取非常低, 而肿瘤摄取非常高, 说明 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 具有优异的肿瘤靶向性。

图 2 尾静脉注射 ^{68}Ga [Ga]-NOTA-PEG2-TMTP1 后 40 min 荷瘤裸鼠中的 microPET/CT 显像图

3 讨论

多肽药物在体内发挥有效作用的前提条件是其体内稳定性, 多肽在体内容易受到各种酶的催化降解, 并通过肝脏或者肾脏代谢排出体外, 因此, 多肽药物的首要目标就是增加体内稳定性, 以期实现在体内的有效循环^[2]。高分子聚乙二醇 (PEG) 由于其毒性小、无抗原性、具有良好的两亲性, 且生物相容性已获 FDA 认可, PEG 修饰技术通过共价键, 将聚乙二醇与被修饰药物耦联, 改善药物的理化性质和生物学活性, 这种技术现已广泛应用于蛋白质 (肽类)、酶、抗体及小分子药物。在多肽上引入 PEG 链可以抑制多肽被蛋白水解酶水解, 延长多肽在体内的有效半衰期, 对多肽的改造具有无可取代的优势。陈小元研制的 ^{18}F -Alfatide II 和王凡研制的镓 [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] 胍基烟酰胺聚乙二醇双环 RGD 放射性新药便是通过对 RGD 进行环化, 并且利用 PEG 修饰, 改善其稳定性和体内药动学性质成功案例^[3]。本研究以 TMTP1 为模板, 通过对多肽进行 PEG 修饰改造, 延长体内的循环时间, 改善 TMTP1 药动学性质。

文献报道 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的 TMTP1 作为 SPECT 显像剂, 可以靶向高转移的卵巢癌^[4], 但是其肝脏摄取本底高, 且 SPECT 分辨率低于 PET, 因此, 我们前期利用 ^{18}F 标记 TMTP1, 合成 PET 探针 [^{18}F] AIF-NOTA-G-TMTP1, 并对其进行体内评价, 结果证明其可以特异性靶向高转移肝癌, 在注射探针 40 min 后, 肿瘤/肌肉摄取比值可达 $4.7 \pm$

0.2 (n=4), 而且肝脏摄取很低, 具有良好的应用前景^[5-6]。虽然 [18F] AIF-NOTA-G-TMTP1 有比较好的显像效果, 但是血液清除较快, 代谢过快, 对于诊断有一定的限制。本研究继续以 TMTP1 为靶向多肽, 通过 PEG2 对其进行修饰, 对其改性, 以增加其在肿瘤部位的摄取。本研究合成了 NOTA-PEG2-TMTP1, 并对其进行 68Ga 放射性标记, 通过体内显像实验, 研究其肿瘤靶向性和体内药动学性质。

本研究通过多肽固相合成技术, 合成了 NOTA-PEG2-TMTP1, 然后利用 68Ga 成功对其进行放射性标记, 标记步骤简单, 标记产率高。为了验证 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 的肿瘤靶向性和体内药动学性质, 我们进行了荷瘤裸鼠的显像实验, 结果显示, 在注射 40 min 后, 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 主要摄取部位是肾脏和膀胱, 说明探针是通过肾脏尿液排出体外, 除此以外, 肿瘤部位的摄取最高, 这证明 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 具有优良的肿瘤靶向性, 相比于我们早期合成的 PET 探针 [18F] AIF-NOTA-G-TMTP1, 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 具有更高的靶与非靶比值, 肿瘤肌肉比增加近 20%, 说明 PEG2 修饰后的探针具有更好的肿瘤靶向性和药动学性质。

我们成功合成 PET 探针 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1, 在 SMCC-7721 肝癌荷瘤裸鼠模型中的 microPET/CT 显像证实, 68Ga [Ga] -NOTA-PEG2-TMTP1 具有更高的摄取和靶/非靶比, 有利于肿瘤的诊断, 具有临床转化的

应用前景。

参考文献

- [1] Diamantis I T, Fabio B, Kota S, et al. Prognosis After Resection of Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Stage 0, A, and B Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Assessment of the Current BCLC Classification [J]. Ann Surg Oncol, 2019, 26 (11): 3693-3700.
- [2] Marlène P, Régis V, Céline F, et al. Stability of peptides and therapeutic success in cancer [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2011, 7 (7): 793-802.
- [3] 陈小元. 18F-阿法肽的基础研发及临床转化历程 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39 (4): 193-195.
- [4] Fei L, Teng C, Qingjian D, et al. Evaluation of (99m) Tc-HYNIC-TMTP1 as a tumor-homing imaging agent targeting metastasis with SPECT [J]. Nucl Med Biol, 2015, 42 (3): 256-262.
- [5] Yesen L, Deliang Z, Ying S, et al. Syntheses and preliminary evaluation of [(18) F] AIF-NOTA-G-TMTP1 for PET imaging of high aggressive hepatocellular carcinoma [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2016, 11 (4): 262-271.
- [6] 李业森, 张德良, 张现忠, 等. 18F-AIF-NOTA-G-TMTP1 的合成及对高转移潜能肝癌细胞荷瘤鼠的显像研究 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2015, 35 (5): 351-354.

• 基础研究 •

畅脉乐胶囊对 MCAO 大鼠脑组织保护作用研究及 mGluR1、GABA_B 蛋白表达的影响

福建中医药大学附属第二人民医院药学部 (福州 350001) 翁一玲 苏艺萍¹ 李 煌¹ 陈松旺²

【摘要】 目的 探讨畅脉乐胶囊对脑缺血再灌注损伤 (MCAO) 大鼠脑组织的保护机制。**方法** 采用线栓法制备 MCAO 大鼠模型, 随机分为 3 组, 畅脉乐组采用灌胃方式给药, 每日 1 次, 连续给药 7 天; 假手术组和模型组给予等剂量的生理盐水。采用 mNSS 法进行神经功能缺陷评分; TTC 染色计算梗死面积和 HE 染色观察脑损伤情况; 采用 Real-Time PCR 法和 Western blot 法检测 mGluR1 和 GABA_B mRNA 蛋白表达情况。**结果** 与模型组相比, 畅脉乐组神经功能缺损程度评分显著降低, 梗死面积显著减少 ($P < 0.05$)。畅脉乐组 mGluR1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低, GABA_B mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** 畅脉乐胶囊可治疗大鼠脑缺血损伤并调节脑组织 mGluR1 和 GABA_B 蛋白水平。

【关键词】 畅脉乐胶囊; 脑缺血; mGluR1; GABA_B

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)05-0124-04

Study on the protective effect of Changmaile Capsule on MCAO rat brain tissue and the expression of mGluR1 and GABA_B WENG Yiling, SU Yiping, LI Huang, CHEN Songwang. Department of pharmacy, the second Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective mechanism of Changmaile capsule on middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat brain tissue. **Method** The MCAO rat model was established by suture occlusion method. The rats were randomly

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (2019J01482)

1 福建中医药大学药学院; 2 福建省药品审核查验中心; 通信作者, Email: 724405204@qq.com