

- [5] Wassenaar P, Legler J. Systematic review and meta-analysis of early life exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate and obesity related outcomes in rodents [J]. Chemosphere, 2017, 188: 174-181.
- [6] MacLusky N J, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system [J]. Science, 1981, 211 (4488): 1294-1302.
- [7] Cope E, Voy B H, Whitlock B K, et al. Beta-hydroxybutyrate infusion identifies acutely differentially expressed genes related to metabolism and reproduction in the hypothalamus and pituitary of castrated male sheep [J]. Physiol Genomics, 2018, 50 (6): 468-477.
- [8] Waterson M J, Horvath T L. Neuronal regulation of energy homeostasis: Beyond the hypothalamus and feeding [J]. Cell Metab, 2015, 22 (6): 962-970.
- [9] Mahboobifard F, Pourgholami M H, Jorjani M, et al. Estrogen as a key regulator of energy homeostasis and metabolic health [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156: 113808.
- [10] Nadal A, Quesada I, Tuduri E, et al. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance [J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13 (9): 536-546.
- [11] Ahn C, Jeung E B. Endocrine-disrupting chemicals and disease endpoints [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (6): 5342-5360.
- [12] Papadimitriou A, Papadimitriou D T. Endocrine-disrupting chemicals and early puberty in girls [J]. Children (Basel), 2021, 8 (6): 492-501.

• 基础研究 •

特异性靶向高转移骨肉瘤的长循环型 PET 探针的合成及显像

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 [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 对 143B 骨肉瘤荷瘤小鼠模型的诊断效果。**方法** 多肽 TMTP1 (NVVRQ) 对高转移性细胞有很好的靶向性, 本研究利用 ^{64}Cu 标记 DOTA-EB-TMTP1 合成 [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1, 然后对 143B 骨肉瘤肝癌荷瘤小鼠进行 microPET/CT 显像, 研究其对肿瘤的诊断效果。**结果** [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 的放射性标记产率为 $(87.3 \pm 5.2)\%$, 放化纯度大于 95.0% 。实验证明经过伊文思蓝 (Evans Blue) 修饰后的 TMTP1, 具有更高的肿瘤摄取和更长的血液半衰期, 8 h 肿瘤摄取值可达 $(6.50 \pm 0.88)\% \text{ ID/g}$ 。**结论** 对于骨肉瘤的诊断来说, [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 可能是更好的 PET 探针, 更有利于肿瘤的诊疗一体化转化应用。

【关键词】 PET; 骨肉瘤; [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1; ^{64}Cu 标记

【中图分类号】 R814 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2023)06-0127-03

Synthesis and imaging of long-circulating PET probes specifically targeting highly metastatic osteosarcoma

LI Yesen. Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China

【Abstract】Objective To assess the diagnostic effectiveness of [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 in a mouse model of 143B osteosarcoma. **Methods** Polypeptide TMTP1 (NVVRQ) had good targeting effect on highly metastatic cells. [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 was synthesized and subsequently used for microPET/CT imaging in a mouse model of 143B osteosarcoma to investigate its diagnostic performance. **Results** The radiolabeling yield of [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 was $(87.3 \pm 5.2)\%$, and the radiochemical purity exceeded 95.0% . The results demonstrated that TMTP1, modified with Evans Blue, exhibited increased tumor uptake and a longer blood half-life. Tumor uptake values reached $(6.50 \pm 0.88)\% \text{ ID/g}$ at eight hours. **Conclusion** [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 may represent a superior PET probe for the diagnosis of osteosarcoma, facilitating the integration of diagnosis and therapy for this condition.

【Key words】 PET; osteosarcoma; [^{64}Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1; ^{64}Cu labelling

骨肉瘤是原发于骨的恶性肿瘤, 常发生于 20 岁以下的青少年或儿童, 大约有 80% 患者在诊断时就存在微转移, 其中只有 10%~20% 可被影像学检测到^[1]。多肽 TMTP1 (NVVRQ) 对高转移性细胞有很好的靶向性, 我们前期合成的 [^{18}F] AIF-NOTA-G-TMTP1 可以诊断高转移性的肝癌。本研究对 TMTP1 进行改造, 利用伊文思蓝 (Evans Blue) 对其进行修饰, 通过 ^{64}Cu 对其进行标记, 研究其体内药动学性质。

1 对象与方法

1.1 动物与仪器 6 只 6~8 周龄 SPF 级别雄性 BALB/c 裸鼠, 购于厦门大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (闽) 2018-0003, 实验动物质量合格证号: 44824700001115。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 mm × 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 DOTA-EB-TMTP1 的合成 利用多肽自动合成仪, 按照标准的固相多肽合成方法, 利用 Fmoc-Gln (Trt)-2-wang resin 依次与 Fmoc-Arg (Pbf)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、DOTA-tris (tBu) 活化酯和 EB 染料合成, 经过三氟乙酸 (TFA) 切割, 乙醚沉淀, 得到粗肽, HPLC 分离纯化后, 得到 DOTA-EB-

TMTP1。

1.2.2 $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-DOTA-EB-TMTP1 的放射性标记 首先用 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。40 μg DOTA-EB-TMTP1 溶解在 0.1 M 的醋酸钠 (pH 5.5) 缓冲液中, 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热反应 30 min, 冷却至常温, 用 HPLC 测定其标记率, 反应混合液经过 C18 小柱纯化, 利用 0.5 mL 乙醇洗脱, 洗脱后的产物, 利用氮气 (N_2) 吹干, 然后用 PBS 稀释 (pH 7.4, 0.01 M), 再用 0.22 μm 滤膜过滤, 得到最终的反应产物 $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-DOTA-EB-TMTP1, 见图 1。

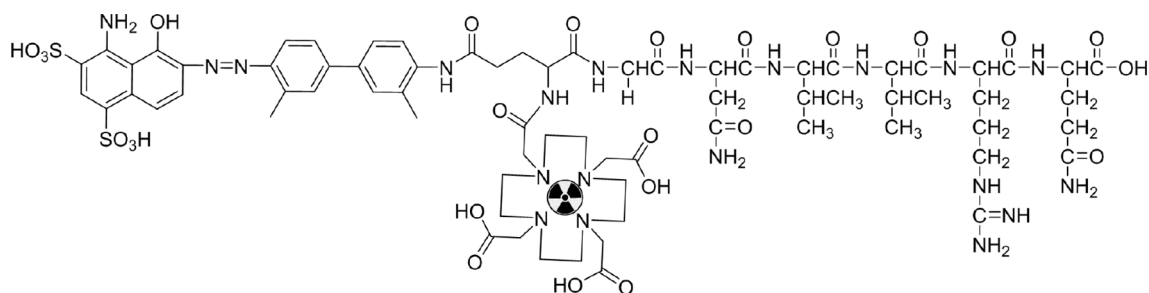


图 1 $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-DOTA-EB-TMTP1 的结构式

1.2.3 microPET/CT 显像 利用人源骨肉瘤细胞系 143B 接种到雄性裸鼠, 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 μCi) $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-DOTA-EB-TMTP1 经尾静脉注射到荷瘤裸鼠体内, 分别在注射后 1、2、4、8、12、24、36、48 h 时, 荷瘤裸鼠采用异氟烷麻醉, 然后利用 microPET/CT 扫描, 静态采集 5 min PET 图像。

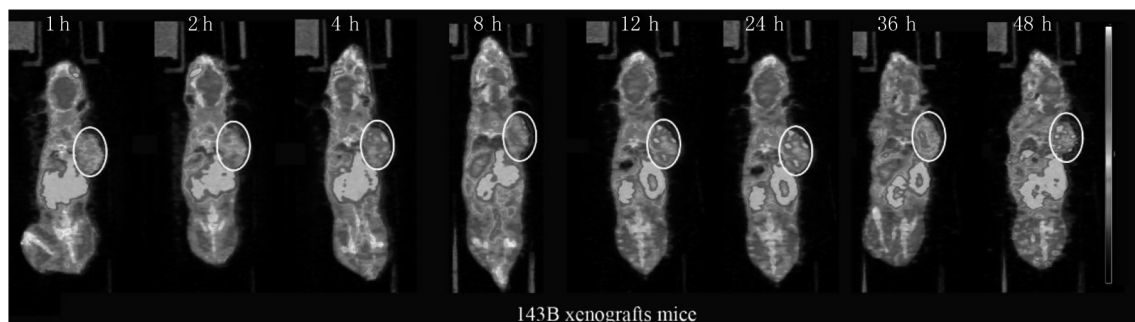
1.3 评价标准 显像后的图像经过有序子集最大似然法 (OSEM3D) 重建, 勾画感兴趣区域, 分别计算并对比肿瘤、肝脏、心脏、肌肉、骨骼等组织的摄取值。

2 结果

2.1 DOTA-EB-TMTP1 的合成及放射性标记 利用固相合成方法合成后的 DOTA-EB-TMTP1, 经过 HPLC 分离后进行质谱检测, 目标产物理论分子量为 1 710.7, 质谱实际测定后的分子量为 1 711.4, 与理论分子量相符 ($[\text{M}+\text{H}]$

$^{+}$)。利用 ^{64}Cu 对 DOTA-EB-TMTP1 进行放射性标记, 放射性标记产率为 $(87.3 \pm 5.2)\%$ ($n=3$), 纯化后的产物放射纯度大于 95%。

2.2 microPET/CT 显像 microPET/CT 扫描 $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-DOTA-EB-TMTP1 探针在人源骨肉瘤细胞系 143B 荷瘤小鼠的体内代谢情况, 结果显示在 $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-DOTA-EB-TMTP1 注射 1 h 后, 肿瘤即可明显显影, 肿瘤的摄取在 1 h 时即可达到 $(3.38 \pm 0.78)\%$ ID/g, 并且随着时间的延长, 肿瘤的摄取逐渐增加, 8 h 时肿瘤摄取值为 $(6.50 \pm 0.88)\%$ ID/g, 肌肉摄取值为 $(2.32 \pm 0.49)\%$ ID/g, 肝脏摄取值为 $(8.02 \pm 2.14)\%$ ID/g, 骨骼摄取值为 $(2.48 \pm 0.64)\%$ ID/g。另外, $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-DOTA-EB-TMTP1 在血液中的代谢也非常慢, 心脏在注射后 1 h 时的摄取值为 $(19.3 \pm 2.6)\%$ ID/g, 注射后 48 h 后逐渐降低到 $(3.8 \pm 0.4)\%$ ID/g。见图 2。



注: 白色圆圈圈出部位为肿瘤。

图 2 荷瘤裸鼠中分别在 1、2、4、8、12、24、48 h 的 microPET/CT 显像图

3 讨论

骨肉瘤的复发和转移意味着不良的预后效果,手术后复发的患者大概有 90% 发生在最开始的 2~3 年,大概超过 80% 的患者在确诊骨肉瘤前就已经发生了微小转移,而绝大部分的微小转移无法被目前的诊断手段发现,因此利用分子影像的方法及早地诊断骨肉瘤的转移可能对患者的预后产生重要的影响^[2]。TMTP1 被证明可以靶向高转移性肿瘤,并且标记^{99m}Tc 后,被用于卵巢癌的诊断^[3]。我们前期利用¹⁸F 标记 TMTP1,合成 PET 探针^[18F] 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,具有良好的应用前景^[4-5]。

为了进一步增加肿瘤对探针的摄取,我们对 TMTP1 进行了进一步的结构改造。伊文思蓝 (Evans Blue, EB) 可以与血液中的白蛋白结合,从而延长其在血液中的循环时间^[6]。正电子核素⁶⁴Cu 的半衰期为 12.7 h,其正电子射程相对较短,所以它可以作为诊断长循环探针的正电子核素^[7]。因此,我们利用 EB 修饰 TMTP1,然后用⁶⁴Cu 进行标记示踪,开发出长效循环的正电子探针^[64Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1。从荷瘤裸鼠上的 microPET 显像结果来看,肿瘤对^[64Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 的摄取,随着时间的延长而增加,大概在 8 h 摄取达到最高值为 (6.50 ± 0.88)% ID/g,并且到 48 h 为止一直保持高摄取,而在血液中也一直保持较高的摄取,证明探针具有长循环的效果。

综上所述,我们成功合成 PET 探针^[64Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1,从 143B 骨肉瘤荷瘤裸鼠模型中的 microPET/CT 显像证实,^[64Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 具有更高的肿瘤摄取和更长的血液半衰期。DOTA-EB-TMTP1 还可以标记放射性治疗核素¹⁷⁷Lu,可以直接转化成放射性治疗药物,

因此 DOTA-EB-TMTP1 可以作为诊疗一体化探针,通过正电子探针^[64Cu] Cu-DOTA-EB-TMTP1 对患者进行筛选,然后再利用^[177Lu] Lu-DOTA-EB-TMTP1 进行后续的治疗,这更有利于肿瘤的诊疗一体化转化,具有广阔的临床转化应用前景。

参考文献

- [1] Ryan A, Maryam M, Hue H. Review of osteosarcoma and current management [J]. Rheumatol Ther, 2016, 3 (2): 221-243.
- [2] Harrison D J, Geller D S, Gill J D, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma [J]. Expert Rev Anti-cancer Ther, 2018, 18 (1): 39-50.
- [3] Li F, Cheng T, Dong Q J, 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.
- [4] Li Y S, Zhang D L, Shi Y, 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.
- [5] 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.
- [6] Yao L P, Xue X, Yu P P, et al. Evans Blue Dye: a revisit of its applications in biomedicine [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2018, 2018: 7628037.
- [7] Anife A, Boyan T, Nikola B, et al. Copper radiopharmaceuticals for theranostic applications [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 157 (5): 1406-1425.

• 基础研究 •

TGF-β1/Smads 信号通路在激素抵抗型哮喘小鼠动物模型中的活化

厦门大学附属福州第二医院呼吸与危重症医学科 (福州 350007) 文 莎 余 晖 吴 峰¹ 陈方榕 郑振羽 游锦惠

【摘 要】 目的 探索激素抵抗型哮喘小鼠动物模型中 TGF-β1/Smads 信号通路的活化。**方法** 建立支气管哮喘及激素抵抗型哮喘小鼠动物模型,酶联免疫法检测肺泡灌洗液中 TGF-β1、Smad7 蛋白水平,免疫组化法检测肺组织病理切片 Smad3、4 的表达,进一步验证,Western blot 法检测肺组织 Smad3、4 蛋白的表达,RT-PCR 法检测肺组织 TGF-β1、Smad7 mRNA 的转录。**结果** 与正常及支气管哮喘小鼠相比较,激素抵抗型哮喘小鼠肺泡灌洗液中的 TGF-β1 含量,以及肺组织 mRNA 的相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$),气道、肺泡上皮细胞以及浸润的各类炎症细胞,如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞,均可见 R-Smads (Smad3) 及 Co-Smad (Smad4) 表达呈强阳性,半定量的组织化学评分及 Western blot 均提示肺组织内 Smad3、4 表达显著升高 ($P < 0.05$),Western blot 和 RT-PCR 结果显示,激素抵抗型哮喘小鼠 I-Smad (Smad7) 表达较正常组降低,但较支气管哮喘小鼠升高 ($P < 0.05$)。**结论** TGF-β1/Smads 信号通路在激素抵抗型哮喘小鼠动物模型中活化加深,但 I-Smad (Smad7) 同时表现出表达升高趋势,其具体机制有待进一步研究。

【关键词】 支气管哮喘; 激素抵抗; 转化生长因子-β1/Smads

基金项目:福建省自然科学基金资助项目 (2020J011197);福州市科技计划项目 (2020-WS-94)

1 福建医科大学附属协和医院呼吸与危重症医学科