

叶酸-青霉素 G 酰化酶对 SKOV3 实体肿瘤 靶向性的实验研究

杨科亚¹, 傅 深¹, 范 我², 张友九², 许玉杰², 朱 然²,
王道锦², 胡明江², 张 奇³, 项光亚³

(1. 上海交通大学附属第六人民医院 肿瘤放疗科, 上海 200233;

2. 苏州大学 放射医学与公共卫生学院, 江苏 苏州 215123; 3. 华中科技大学 同济医学院, 湖北 武汉 430030)

摘要: 采用 Iodogen 法对叶酸-青霉素 G 酰化酶(Folate-conjugated Penicillin G Amidase, F-PGA)和 PGA 进行¹²⁵I 标记。将纯化后的标记物由尾静脉注入荷 SKOV3 实体瘤裸鼠体内, 观察 F-PGA 对叶酸受体阳性的 SKOV3 的靶向性。结果显示, 标记产品纯化后放化纯度 >95%, 且体内外稳定性较好; 荷 SKOV3 肿瘤的裸鼠注射¹²⁵I-F-PGA 后 4~24 h 肿瘤显像较清晰, 而注射¹²⁵I-PGA 组所有时相均未见明显的肿瘤部位放射性浓聚影; ¹²⁵I-F-PGA 组的肿瘤与健侧肌肉的摄取比值(T/M)明显高于对照组($F=13.38, P=0.0146$), 且在非靶组织中清除较快。表明 F-PGA 在荷瘤鼠体内能特异性地与叶酸受体阳性的 SKOV3 实体肿瘤进行靶向结合, 其 T/NT>1, 有望用于靶向治疗。

关键词: ¹²⁵I; 叶酸-青霉素 G 酰化酶(F-PGA); 叶酸受体; 靶向性

中图分类号: R817-33; R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7512(2007)04-0209-05

Experimental Study on the Targeting Ability of Folate-conjugated Penicillin G Amidase to SKOV3 Solid Tumors

YANG Ke-ya¹, FU Shen¹, FAN Wo², ZHANG You-jiu², XU Yu-jie², ZHU Ran²,
WANG Dao-jin², HU Ming-jiang², ZHANG Qi³, XIANG Guang-ya³

(1. Department of Radiotherapy, the Sixth Affiliated Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China;

2. School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215007, China;

3. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: By isotope tracer technique, experiments of SPECT and biodistribution on nude mice bearing tumor are performed to explore whether folate-conjugated penicillin G amidase

收稿日期: 2007-06-27; 修回日期: 2007-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300430)

作者简介: 杨科亚(1979~), 女(汉族), 浙江宁波人, 硕士, 放射医学专业

通讯作者: 范我, 教授, 博士生导师, E-mail: fanwo@public1.sz.js.cn

(F-PGA) has the ability of targeting to folate receptor positive solid tumors, which will be helpful to establish a base for further targeting therapies. The results showed that the labeling efficiencies of ^{125}I -F-PGA and ^{125}I -PGA are 90%, and their radiochemical purities are more than 95% after purified, with suitable stabilities both in vivo and in vitro. At 4~24 h postinjection, the appreciable radioactivity accumulation at tumor position can be obtained from SPECT images of ^{125}I -F-PGA administered group, however which is not seen in the contrast group of ^{125}I -PGA at any time. The radioactivity ratio of tumor to muscle (T/M) of ^{125}I -F-PGA is obviously higher than that of the contrast ($F=13.38$, $P=0.0146$). ^{125}I -F-PGA is quickly cleared from non-targeted sites. It indicated that by folate receptor pathway, F-PGA can specially target to folate receptor positive SKOV3 solid tumors in vivo, with good feature of target to non-target tissues, and it may be an ideal agent for targeting therapies.

Key words: ^{125}I ; folate-conjugated penicillin G amidase; folate receptor; targeting abilities

叶酸受体是一种通过磷脂酰肌醇锚着在细胞膜上的糖蛋白,属于肿瘤相关性抗原,在大部分恶性肿瘤如卵巢癌、宫颈癌、肾癌、乳腺癌、结肠癌、鼻咽癌等组织中高度表达,且其表达量与肿瘤细胞的耐药性及肿瘤的恶性程度呈正相关^[1-2]。近年来,叶酸受体介导的药物靶向投递系统因其具有突出的优势而广受关注^[1-7]。其中,叶酸靶向的酶联合前药治疗(Folate Directed Enzyme Prodrug Therapy, FDEPT)已成为增加化疗药物对肿瘤细胞特异性和敏感性的新途径^[3]。它是利用叶酸与叶酸受体的高度特异性亲和力,将与叶酸偶联的前药活化酶靶向于肿瘤部位,该活化酶专一性催化前药(无活性或低活性药物)形成高浓度的活性药物,从而抑制或杀灭肿瘤细胞。这一研究在国际上尚处于起步阶段,但其良好的应用前景已初见端倪:因其通过叶酸与叶酸受体、前药活化酶与前药的双重选择,故与叶酸直接偶联化疗药物相比,具有更强的靶向性,在降低毒性的同时,能增强抗癌活性、提高治疗指数。青霉素 G 酰化酶(Penicillin G Amidase, PGA),是一种非人类酶,能避免前药在其它非靶组织中被人体的酶活化^[3, 8]。因此本工作拟选择青霉素 G 酰化酶为前药活化酶,并对其进行 ^{125}I 标记,将其用于荷 SKOV3 肿瘤的裸鼠,观察其对叶酸受体阳性肿瘤的靶向性^[5]。

1 实验材料

1.1 主要仪器

GC-1200 γ 放射免疫计数器:中国科技大学

中佳光电仪器公司;RM-905 活度计:中国计量科学研究所;HERA CO₂ 培养箱:德国 Kedro 公司;IRIX3 型三探头符合线路 SPECT:美国 PHILIPS 公司,配以低能平行孔准直器。

1.2 主要试剂

卵巢癌 SKOV3 细胞株:购于上海中科院细胞库;无叶酸的 RPMI-1640 培养基和小牛血清: Gibco 公司产品;Iodogen 和青霉素 G 酰化酶(PGA):Sigma 公司产品;F-PGA:华中科技大学合成^[9]; ^{125}I -NaI: 2.59×10^{12} Bq/L, 放化纯度 > 99%, 原子高科股份有限公司分装;其余试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

BALB/c 裸鼠:20 只,体质量 19~22 g, SPF 级,6 周龄,雌性,其中 4 只作为第一代接种鼠,16 只作为第二代接种鼠,中国科学院上海实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 荷 SKOV3 肿瘤裸鼠模型的建立

取 4 只第一代接种裸鼠,在无菌条件下,将对数生长期的 SKOV3 肿瘤细胞接种于裸鼠右腋皮下(1×10^7 /只)。待肿瘤长至约 1 cm 时,取出瘤块,匀浆并用生理盐水稀释后,接种于第二代裸鼠右腋皮下(0.2 mL/只),3~4 周后待肿瘤生长至约 2 cm 时,挑取瘤体积相仿、12 只荷 SKOV3 肿瘤的裸鼠,在实验前 3 天开始用含 1% KI 的复方碘溶液给裸鼠灌胃,以封闭甲状腺。

2.2 F-PGA 和 PGA 的¹²⁵I 标记及鉴定^[10]

采用 Iodogen 法进行 F-PGA 和 PGA 的¹²⁵I 标记。在含 150 μg Iodogen 涂管内依次加入 56 μg F-PGA/PGA 和 148 MBq ¹²⁵I-NaI, 用 0.05 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液将其调至 120 μL, 在旋涡混合器上轻轻振荡反应 15 min, 立即将反应物用预先以小牛血清白蛋白饱和的 Sephadex G50 柱纯化, 磷酸缓冲液淋洗, 收集产品峰, 用纸层析法和高效液相法测定产品的标记率和放化纯度, 用三氯醋酸沉淀法检测标记物的稳定性。标记物在 4 °C 下贮存备用。

2.3 荷瘤裸鼠的 SPECT 显像

将 6 只荷 SKOV3 肿瘤裸鼠随机分成 2 组, 每组 3 只, 分别经尾静脉注射 7.4 MBq ¹²⁵I-F-PGA 和 ¹²⁵I-PGA, 于注射后 1、2、4、6、8 和 24 h 分别行 γ 显像, 平面采集, 能峰为 37 keV, 窗宽为 60%。24 h 显像后, 立即摘眼球放血致死, 取血、心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、小肠(距胃约 1 cm 处)、胰腺、股骨、肌肉和肿瘤等组织或器官, 用生理盐水漂洗, 晾干称重, 并测放射性计数。

2.4 ¹²⁵I-F-PGA 和 ¹²⁵I-PGA 的体内分布测定

另取 6 只荷 SKOV3 肿瘤裸鼠随机分成 2 组, 每组 3 只, 分别经尾静脉注射 740 MBq ¹²⁵I-F-PGA 和 ¹²⁵I-PGA, 8 h 后, 立即摘眼球放血致死, 取血、心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、小肠(距胃约 1 cm 处)、胰腺、股骨、肌肉和肿瘤等组织或器官, 用生理盐水漂洗, 晾干称重, 并测放射性计数。

2.5 统计学处理

用 SAS 6.12 统计软件对实验各组的肿瘤放射性计数与对侧肌肉放射性计数比值(T/M)作随机区组方差分析, 对体内分布数据作 *t* 检验。

3 结果

3.1 ¹²⁵I-F-PGA 和 ¹²⁵I-PGA 的制备

标记物的标记率约为 90%; 经 Sephadex G50 柱纯化, 放化纯度均 >95%; 标记物贮存于 4 °C 下, 48 h 内, 其放化纯度可维持在 90% 以上; 在血浆体系中, 37 °C 保温 24 h, 其放化纯度基本保持不变, >95%, 说明 ¹²⁵I-F-PGA 和 ¹²⁵I-PGA 的稳定性较好。

3.2 荷 SKOV3 肿瘤裸鼠 SPECT 显像

荷 SKOV3 肿瘤裸鼠显像结果示于图 1。由

图 1 可以看出, 荷 SKOV3 肿瘤的裸鼠注射 ¹²⁵I-F-PGA 后 2 h 即可见肿瘤部位有较多的放射性浓聚, 4~24 h 时瘤体影明显突出于正常轮廓之外, 且除肝、肾、膀胱部位有较多摄取外, 其余组织放射性呈均匀弥漫性分布; 而注射 ¹²⁵I-PGA 的裸鼠, 所有时相均未见肿瘤部位的放射性浓聚影。

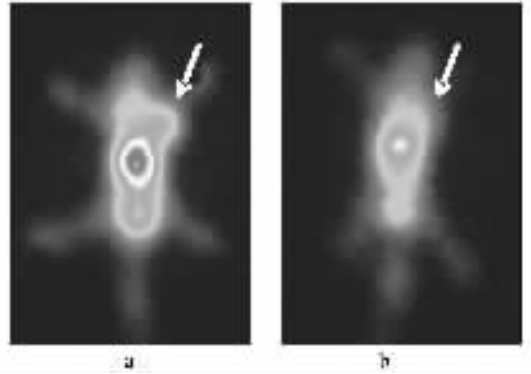


图 1 荷 SKOV3 肿瘤裸鼠 SPECT 显像
a——注射¹²⁵I-F-PGA 后 4 h 时的 SPECT 显像;
b——注射¹²⁵I-PGA 后 4 h 时的荷瘤鼠俯卧位;
箭头所指处为肿瘤生长部位

利用感兴趣区(Region of Interest, ROI)技术及其分析软件测得肿瘤与健侧肌肉的平均每个像素的放射性计数, 并由此计算 1、2、4、6、8、24 h 时的¹²⁵I-F-PGA 和¹²⁵I-PGA 的 T/M, 分别为 1.21 ± 0.16 、 1.43 ± 0.25 、 2.18 ± 0.68 、 2.09 ± 0.61 、 2.45 ± 0.80 、 2.96 ± 1.03 和 1.05 ± 0.10 、 1.20 ± 0.24 、 1.39 ± 0.14 、 1.43 ± 0.14 、 1.45 ± 0.26 、 1.54 ± 0.37 。荷瘤裸鼠注射¹²⁵I-F-PGA 后 T/M 的最高值为 2.96 ± 1.03 , 而对照组 T/M 仅为 1.54 ± 0.37 , 两组间有显著差异($F = 13.38, P = 0.0146$)。

3.3 ¹²⁵I-F-PGA 和 ¹²⁵I-PGA 的体内生物分布

¹²⁵I-F-PGA 和 ¹²⁵I-PGA 分别在荷 SKOV3 肿瘤裸鼠体内的分布及肿瘤与非肿瘤放射性摄取比(T/NT)列于表 1 和表 2。由表 1、表 2 可见, 8~24 h 后¹²⁵I-F-PGA 和¹²⁵I-PGA 在荷 SKOV3 肿瘤裸鼠体内主要聚集于血、肝、肾, 其次为脾、肺等脏器, 脑的放射性最低, 其每克肿瘤组织的百分注入剂量分别为 $0.38 \sim 0.26\% \text{ ID/g}$ 和 $0.15 \sim 0.11\% \text{ ID/g}$ ($P < 0.05$), T/NT 分别为 $3.24 \sim 4.22$ 和 $1.11 \sim 1.22$ ($P < 0.05$)。而 8 h 与 24 h 两组间无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 和 $^{125}\text{I-PGA}$ 分别在荷 SKOV3 肿瘤裸鼠体内的分布 ($n=3$) %ID/g

组织或器官	$^{125}\text{I-F-PGA}$		$^{125}\text{I-PGA}$	
	8 h	24 h	8 h	24 h
血	1.51±0.88	0.28±0.06	2.05±0.24	0.57±0.18
心	0.35±0.10	0.08±0.02	0.48±0.13	0.12±0.04
肝	1.76±0.48	0.31±0.16	1.28±0.16	0.39±0.30
脾	0.84±0.19	0.19±0.08	0.77±0.15	0.28±0.10
肺	0.80±0.31	0.22±0.09	0.90±0.21	0.29±0.08
肾	4.27±0.39	0.28±0.10	1.65±0.18	0.31±0.10
脑	0.05±0.01	0.02±0.01	0.45±0.00	0.03±0.03
胃	0.21±0.07	0.16±0.08	0.20±0.02	0.15±0.02
小肠	0.26±0.13	0.09±0.06	0.21±0.08	0.10±0.02
胰腺	0.22±0.03	0.07±0.04	0.24±0.16	0.10±0.03
股骨	0.33±0.09	0.13±0.04	0.30±0.14	0.15±0.07
肌肉	0.12±0.02	0.06±0.02	0.13±0.06	0.10±0.05
肿瘤	0.38±0.05	0.26±0.12	0.15±0.01	0.11±0.07

表 2 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 和 $^{125}\text{I-PGA}$ 分别在荷 SKOV3 肿瘤裸鼠体内的 T/NT

组织或器官	$^{125}\text{I-F-PGA}$		$^{125}\text{I-PGA}$	
	8 h	24 h	8 h	24 h
血	0.30±0.11	0.88±0.25	0.06±0.01	0.21±0.15
心	1.12±0.20	3.25±0.55	0.32±0.06	0.90±0.27
肝	0.22±0.04	0.97±0.48	0.12±0.01	0.36±0.25
脾	0.47±0.06	1.39±0.44	0.20±0.03	0.38±0.10
肺	0.52±0.15	1.18±0.12	0.17±0.02	0.37±0.12
肾	0.09±0.02	0.92±0.20	0.09±0.00	0.34±0.10
脑	8.34±0.78	13.18±1.72	3.33±0.22	3.76±0.69
胃	1.94±0.39	1.85±0.86	0.77±0.07	0.72±0.34
小肠	1.73±0.74	3.54±1.73	0.75±0.15	1.07±0.46
胰腺	1.73±0.29	3.87±1.32	0.67±0.20	1.02±0.33
股骨	1.24±0.41	1.90±0.33	0.53±0.14	0.72±0.12
肌肉	3.24±0.93	4.22±0.88	1.22±0.24	1.11±0.14

4 讨论

显像结果显示,荷 SKOV3 肿瘤的裸鼠注射 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 后 T/M 明显高于 $^{125}\text{I-PGA}$ 。这说明 F-PGA 在荷瘤鼠体内有良好的靶向作用,即能特异地被肿瘤组织摄取。体外细胞实验^[11]也阐明了 F-PGA 是通过叶酸受体介导机制靶向于叶酸受体阳性肿瘤细胞的。此外,荷瘤裸鼠在注射 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 后 4~24 h,其 T/M 大致处于峰值水平,这与 F-PGA 在体内通过叶酸的靶向作用运载到靶器官并与叶酸受体进行特异性

结合的过程有关。

$^{125}\text{I-F-PGA}$ 和 $^{125}\text{I-PGA}$ 的体内生物分布结果与 SPECT 显像结果大致相符,且前者测得的 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 组的 T/M 更高,笔者认为此值更可靠,这是由于显像的方法相对粗略些,其受图像质量、器官的重叠(骨骼、皮肤、血液等)和人为选择等因素的影响较大。但本实验中只做了 8 h 和 24 h 的分布,若单凭此数据尚不能确定 T/M 的高峰时间,而显像采用了多个时间点进行动态观察,不失为一种较好的测量手段,同时也

为临床进行叶酸受体阳性肿瘤的显像提供了佐证。 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 在肿瘤中的分布亦高于许多其它正常组织($T/NT>1$),体现了一定的靶向性。

$^{125}\text{I-F-PGA}$ 和 $^{125}\text{I-PGA}$ 注入荷瘤鼠体内后,肝、肾等脏器的摄取率相对较高,但 24 h 时均低于 5%ID/g,说明该靶向酶在体内非靶部位清除较快,这与 LU JY 等^[3]报道的 ^{125}I 标记的叶酸-青霉素 V 酰化酶偶联物($^{125}\text{I-F-PVA}$) 在正常小鼠体内分布结果以及本实验小组另外研究的 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 和 $^{125}\text{I-PGA}$ 在正常小鼠体内(数据尚未报道)的代谢情况一致。

$^{125}\text{I-F-PGA}$ 在荷瘤鼠体内 4~24 h 时在靶部位达到最大摄取率(0.26~0.38%ID/g),这就保证了有相对较长的时间使酶与靶器官或组织充分作用,且 24 h 时在非靶部位已得到基本清除,因此可利用该特点进行叶酸靶向酶前药治疗(FDEPT)^[1,8] 研究,即先将叶酸靶向酶注入体内,待靶向酶与靶组织充分作用并在血液循环中被清除后(一般为 24 h),再投入前药,这样可以避免前药在非靶部位被激活^[3,5],而主要在叶酸受体阳性的肿瘤部位活化,从而起到最大程度地杀伤肿瘤组织,保护正常组织的作用^[5]。此外,已有大量研究表明,叶酸受体在正常组织中的表达高度保守,只在肾、肺、脉络膜和胎盘组织中有低到中等水平的表达,且这种表达呈高度极化方式^[5],即只在上皮细胞的顶膜上有叶酸受体,这与其摄取叶酸并维持相应组织的叶酸水平有关,而肿瘤组织失去这种极化分布,且表达量比正常组织高 100~300 倍。因此,在前期的 FDEPT 治疗中尚未发现叶酸偶联物对肾脏或其它正常组织的毒副作用^[1,5]。

5 结 论

$^{125}\text{I-F-PGA}$ 与 $^{125}\text{I-PGA}$ 相比,经静脉注入荷瘤裸鼠体内后能特异地靶向于肿瘤组织,且在非靶组织中清除较快,亦即靶与非靶的特性较好,初步体现了其作为靶向治疗的可能性。

参考文献:

- [1] LU JY, LOW PS. Folate-mediated Delivery of Macromolecular Anticancer Therapeutic Agents [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(5): 675-693.
- [2] LU JY, SEGA E, LEAMON CP, et al. Folate Receptor-targeted Immunotherapy of Cancer: Mechanism and Therapeutic Potential [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(8): 1 161-1 176.
- [3] LU JY, LOWE DA, KENNEDY MD, et al. Folate-targeted Enzyme Prodrug Cancer Therapy Utilizing Penicillin-V Amidase and a Doxorubicin Prodrug [J]. *J Drug Target*, 1999, 7(1): 43-53.
- [4] LOW PS. Folate Receptor-targeted Drugs for Cancer and Inflammatory Diseases [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(8): 1 055-1 058.
- [5] LEAMON CP, REDDY JA. Folate-targeted Chemotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 1 127-1 141.
- [6] LEAMON CP, LOW PS. Delivery of Macromolecules Into Living Cells: a Method That Exploits Folate Receptor Endocytosis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88(13): 5 572-5 576.
- [7] SABHARANJAK S, MAYOR S. Folate Receptor Endocytosis and Trafficking [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(8): 1 099-1 109.
- [8] ROOSEBOOM M. Enzyme-catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(1): 53-102.
- [9] 张奇, 项光亚, 龙娜, 等. HPLC 测定叶酸-青霉素 G 酰化酶对 N-苯乙酰化阿霉素的催化活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36(6): 535-537.
- [10] 杨科亚, 范我, 张友九, 等. $^{125}\text{I-TOC}$ 和 $^{125}\text{I-F-PGA}$ 放射化学纯度的测定 [J]. *核化学与放射化学*, 2006, 28(2): 105-110.
- [11] 杨科亚, 张友九, 张奇, 等. 叶酸偶联的青霉素 G 酰化酶对叶酸受体阳性肿瘤细胞的靶向作用 [J]. *江苏医药*, 2007, 33(10): 47-50.