

# 含 RGD 序列多肽的<sup>188</sup>Re 标记及其生物分布

马玉飞<sup>1,2</sup>, 于俊峰<sup>1</sup>, 张 岚<sup>1</sup>, 韩彦江<sup>1,2</sup>, 沈 华<sup>1</sup>, 尹端祉<sup>1</sup>

(1 中国科学院 上海应用物理研究所, 上海 201800; 2 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 以  $fac-[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  为前体标记了含 RGD 的环状多肽 H-c(RGDyK) (Pc1); 75 °C 下反应 30 min 即可得到标记率和放化产率大于 90% 的目标产物<sup>188</sup>Re(CO)<sub>3</sub>-Pc1。此标记物在小牛血清及磷酸缓冲液 (pH=7.4) 中稳定性良好, Pc1 对 U87MG 细胞有良好的亲和力, 半抑制常数 (IC<sub>50</sub>) 为 84.9 nmol/L。生物分布数据显示, <sup>188</sup>Re-Pc1 在血液内清除较快, 且通过肝胆和肾代谢排出体外; 在肿瘤内有一定的摄取。

**关键词:** <sup>188</sup>Re; RGD 多肽; 生物分布

中图分类号: R817.9 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2010)02-0071-05

## Radiolabeling of RGD Containing Peptide by <sup>188</sup>Re and Its Biodistribution

MA Yu-fei<sup>1,2</sup>, YU Jun-feng<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>1</sup>, HAN Yan-jiang<sup>1,2</sup>,  
SHEN Hua<sup>1</sup>, YIN Duan-zhi<sup>1</sup>

(1. Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** A cyclic RGD containing peptide H-c(RGDyK) (Pc1) was labeled with <sup>188</sup>Re using  $fac-[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  as the precursor. The radiolabeling yield and radiochemical purity were more than 90% with in 30 min under 75 °C. <sup>188</sup>Re-Pc1 was stable in CBS and PBS. RGD peptide had good binding-affinity to cancer cells (IC<sub>50</sub> = 84.9 nmol/L). Its bio-distribution showed that <sup>188</sup>Re-Pc1 had a rapid blood clearance and was cleared mainly via the renal and hepatic route. <sup>188</sup>Re-Pc1 had high tumor uptake with a long time of tumor retention.

**Key words:** <sup>188</sup>Re; RGD; biodistribution

血管增生是肿瘤生长和转移的基础, 没有新生血管为肿瘤提供氧气和营养, 肿瘤的大小不可能超过 1~2 mm。 $\alpha_v\beta_3$  是细胞黏附受体整合素家族中的一员, 具有调节细胞增长、粘附的作用, 在活泼的内皮细胞及多种肿瘤细胞, 特别是在由

血管内皮细胞生长因子激发的肿瘤细胞上有高表达<sup>[1-3]</sup>。已有研究<sup>[4]</sup>表明,  $\alpha_v\beta_3$  整合素在新生血管细胞上的表达及其与特定细胞外基质的相互作用对血管增生过程有重要影响。与其他整合素一样,  $\alpha_v\beta_3$  可以识别氨基酸序列 RGD(即

收稿日期: 2009-12-02; 修回日期: 2010-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20501022; 10875163)

作者简介: 马玉飞(1981—), 女(汉族), 辽宁鞍山人, 博士研究生, 无机化学专业

通信作者: 于俊峰, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: yujf@sinap.ac.cn

精-甘-天冬氨酸),因此可以通过含 RGD 序列的多肽或多肽类似物抑制  $\alpha_v\beta_3$  整合素,从而抑制血管增生<sup>[5]</sup>。这一思路为抗肿瘤药物的研发提供了一个新的方向。目前,国内外相关的放射性药物研究重点是选用适合的放射性核素标记含有 RGD 序列的多肽,并将标记肽应用于多种肿瘤的显像和治疗<sup>[6-14]</sup>。

本课题组在放射性核素标记含 RGD 多肽方面已经做了一些尝试性研究<sup>[15-17]</sup>。研究结果显示,以三羰基铼为前体标记末端为组氨酸的含 RGD 序列多肽的方法成熟,标记物在肿瘤部位有特异性浓集。本工作拟在此基础上采用<sup>188</sup>Re 标记环状 H-c(RGDyK)多肽(Pc1),并对标记物进行体内外生物学评价,以了解标记物的生物学特性。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

层析硅胶 GF254 板:浙江台州四青生化材料厂;QMA Sep-Pak 柱:Waters 公司;<sup>188</sup>W-<sup>188</sup>Re 发生器:中国科学院上海应用物理研究所放射性药物研究中心自制。AR-2000 型放射性薄层扫描仪:BioScan 公司;FJ-391A2 型活度计:北京核仪器厂;SN-697 型双探头  $\gamma$  计数器:中国科学院上海应用物理研究所日环光电仪器有限公司;高效液相色谱仪:配 America PDA-100 紫外检测器、P680 泵(美国戴安公司产品),分析柱为 Macherey-Nagel C18 反相柱(5  $\mu\text{m}$ , 300 mm $\times$ 3.9 mm)。

### 1.2 主要材料与试剂

硼氢化氨:Aldrich 公司,纯度 > 97%;Echistatin:Aldrich 公司,纯度 > 90%。CO 气体:纯度 > 99.99%,昆山市新安工业气体有限公司。无载体 Na<sup>125</sup>I:宁波君安药业科技有限公司提供,放化纯度 > 97%,放射性浓度为 16.65 TBq/L;注射用生理盐水:上海百特医疗用品有限公司;多肽:纯度 90%,美国斯坦福大学陈小元博士提供;小牛血清(CBS):特级,上海实生细胞生物技术有限公司。HPLC 所用试剂在使用前均过滤;实验用水均为二次蒸馏水;其余试剂均为分析纯,中国国药(集团)上海化学试剂公司产品。

### 1.3 荷瘤鼠模型制备

荷 S180 肉瘤小鼠由上海医药工业研究院提供。每只昆明小鼠右前肢腋下注射 S180 肉瘤细胞  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  个,待肿瘤直径长至约 1 cm 时使用。

### 1.4 标记前体 $fac-[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的制备

$fac-[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  的制备参考文献<sup>[15]</sup>略做修改:称取约 5 mg  $\text{BH}_3 \cdot \text{NH}_3$  放入干燥的西林瓶中,向瓶中通 20 min CO 气体,压盖密封。向 1 mL  $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$  的生理盐水淋洗液中加入 6  $\mu\text{L}$  质量浓度 > 85% 的  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,混合均匀后加入已通好 CO 的西林瓶中。将该西林瓶置 75  $^\circ\text{C}$  水浴中反应 15 min,反应结束后立即用冰水冷却并终止反应。反应混合物经 QMA Sep-Pak 柱分离纯化,采用 TLC 检测其放化产率。

### 1.5 多肽标记

50  $\mu\text{L}$  RGD 多肽溶液中加入 450  $\mu\text{L}$  纯化后的标记前体(多肽的最终浓度为  $10^{-5}$  mol/L),充分混合后在 75  $^\circ\text{C}$  孵育器上反应 30 min。用 HPLC 测定标记率。

### 1.6 体外稳定性

取 100  $\mu\text{L}$  标记化合物(37 GBq/L)和 500  $\mu\text{L}$  小牛血清或 500  $\mu\text{L}$  pH7.4 的磷酸缓冲溶液(PBS),放入 1.5 mL 指型管中,在室温或 37  $^\circ\text{C}$  下放置 4 h。分别在 0、1、4 h 取样,采用 TLC 方法检测标记化合物的放化纯度,流动相为 100%乙腈和  $V(\text{丙酮}):V(\text{水})=1:1$  的混合溶液。

### 1.7 竞争结合

Iodogen 涂管的制备:将 1 mg Iodogen 溶于 5 mL 二氯甲烷中,取 50  $\mu\text{L}$  溶液加到锥底小瓶中,在涡旋仪上充分均匀后用小气流的氮气吹干。Iodogen 在管壁上形成一层均匀的涂膜。

Echistatin 的<sup>125</sup>I 标记:取 10  $\mu\text{L}$  Echistatin (1 g/L)溶液和 2  $\mu\text{L}$  无载体 Na<sup>125</sup>I,依次加入 Iodogen 涂管中,室温下,在振荡器上反应 10 min。标记率与放化纯度用 TLC 测定,展开剂为  $V(\text{正丁醇}):V(\text{吡啶}):V(\text{乙酸}):V(\text{水})=30:20:6:4$ 。体外竞争结合实验的方法借鉴以往文献并略有改动:采用人恶性胶质瘤 U87MG 细胞,以<sup>125</sup>I-echistatin 作为放射性配基<sup>[18]</sup>。细胞培养条件为:DMEM 培养基加入

10% 牛血清,培养箱中 CO<sub>2</sub> 浓度为 5%,温度为 37 ℃。

实验前将细胞转移到 96 孔板中,细胞密度约为每孔  $2 \times 10^5$  个细胞,过夜,使细胞完全贴壁。用 PBS 冲洗细胞 3 次,每孔中加入 555 Bq <sup>125</sup>I-echistatin,分别加入不同浓度的 Pc1 (0 ~ 500 nmol/L)。最后将每孔中的溶液体积调整到 200 μL,放置至 4 ℃ 环境中孵育 2 h。用 PBS 冲洗细胞,除去游离的放射性。用 1 mol/L 的 NaOH 溶解细胞后,将其放入计数管中,在 γ 计数器上测放射性计数。使用 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) 软件计算此多肽对 U87MG 细胞的 IC<sub>50</sub>。实验重复 3 次。

### 1.8 体内分布实验

将 100 μL 约 4.44 MBq <sup>188</sup>Re-RGD 溶液经尾静脉注射到模型鼠体内。在麻醉状态下,分别于注射后 1、4、24 和 48 h 采取摘眼球的方式处死,每组 3 只老鼠。立即解剖每组实验用鼠,采集感兴趣的脏器组织,包括肿瘤、血、脑、肝、心、肺、脾、肾、胃、小肠、肌肉和骨。称取组织样品的质量,并用 γ 计数器测量其放射性计数。进行衰变校正之后,计算各组织样品的放射性摄取率 (%ID/g)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标记前体的制备结果鉴定

标记前体经 TLC 检测,结果显示,<sup>188</sup>ReO<sub>2</sub> 的  $R_f = 0.0 \sim 0.2$ ,  $fac-[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  的  $R_f = 0.4 \sim 0.6$ ,而游离 <sup>188</sup>ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> 的  $R_f = 0.8 \sim 1.0$ 。整合率大于 80%,混合物使用 QMA Sep-Pak 柱分离,TLC 检测其放化纯度 >95%。

### 2.2 多肽标记结果

HPLC 分析结果显示,<sup>188</sup>Re-Pc1 的标记率和放化产率均 >90%。分析条件为:流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸,流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸/乙腈。采用梯度法进行淋洗:0~30 min 95% A, 5% B; 30~35 min 40% A, 60% B; 35~40 min 95% A, 5% B; 流速为 1 mL/min。其 HPLC 分析谱图示于图 1。由图 1 可知,<sup>188</sup>Re-Pc1 的保留时间为 19.53 min。

### 2.3 <sup>188</sup>Re-Pc1 的体外稳定性

<sup>188</sup>Re-Pc1 的体外稳定性示于图 2。由图 2 可以看出,<sup>188</sup>Re-Pc1 在室温下 (<15 ℃) 的稳定性好于 37 ℃ 下的稳定性。另外,标记物在 PBS

中显示出比在小牛血清中更好的稳定性。这是由于小牛血清中有各种蛋白的功能基团,羰基前体标记多肽的产物中还有一个水分子没有被取代,这个水分子可能被血清中的功能基团取代,而形成新的配体。

### 2.4 竞争结合实验

<sup>125</sup>I-echistatin 的 TLC 分析结果示于图 3。由图 3 可见,<sup>125</sup>I-echistatin 的  $R_f = 0$ , Na<sup>125</sup>I 的  $R_f = 0.9 \sim 1.0$ ,由此计算得 <sup>125</sup>I-echistatin 的标记率 >95%。

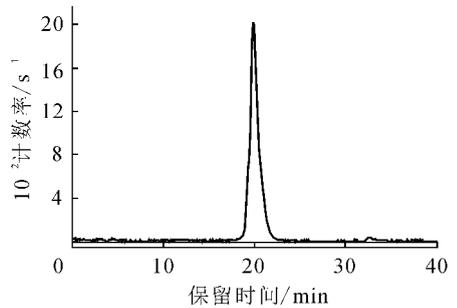


图 1 <sup>188</sup>Re-Pc1 的 HPLC 分析图

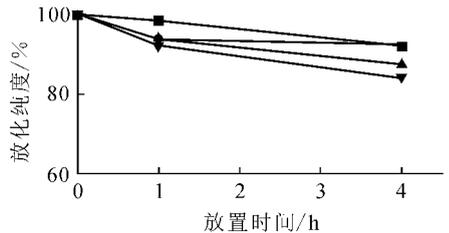


图 2 <sup>188</sup>Re-Pc1 的稳定性

■ — PBS, 室温; ◆ — PBS, 37 ℃;  
▲ — CBS, 室温; ▼ — CBS, 37 ℃

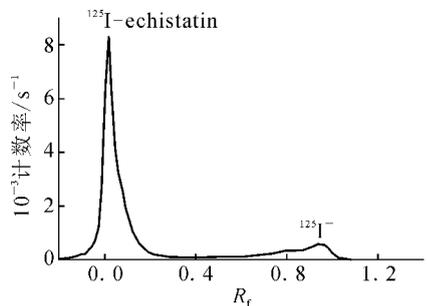


图 3 标记后 <sup>125</sup>I-echistatin 的放射性 TLC 谱图

细胞竞争结合实验是采用多肽 Pc1 和 <sup>125</sup>I-echistatin 配基与 U87MG 细胞表面的整合素竞争结合的方法,其结果示于图 4。由 GraphPad

prism 软件非线性拟合数据计算得多肽 Pc1 对 U87MG 细胞的  $IC_{50}$  为  $84.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由图 4 可知,多肽 Pc1 可以抑制  $^{125}\text{I}$ -echistatin 与 U87MG 细胞的结合,抑制能力随 Pc1 量的增加而增加。

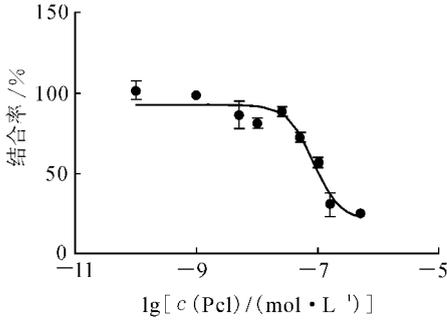


图 4 Pc1 对  $^{125}\text{I}$ -echistatin 与 U87MG 细胞体外结合的抑制作用 ( $n=3$ )

## 2.5 在荷瘤鼠体内的分布

$^{188}\text{Re}$ -Pc1 在荷瘤鼠体内的生物分布列于表

表 1  $^{188}\text{Re}$ -Pc1 在荷 S180 鼠体内的生物分布 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

器官	不同时间的放射性摄取率/(%ID · g <sup>-1</sup> )			
	1 h	4 h	24 h	48 h
肿瘤	6.16+0.86	4.87+1.97	2.15+1.14	1.00+0.41
血液	5.90+1.54	3.93+1.17	0.95+0.38	0.28+0.04
肾脏	8.65+0.45	6.84+1.31	6.68+0.88	5.39+2.00
脾脏	8.00+0.98	5.19+1.36	1.73+0.31	1.19+0.37
肠	4.40+1.86	6.12+4.14	1.02+0.27	0.50+0.26
胃	2.84+0.81	2.49+0.27	3.37+1.32	0.57+0.22
肝脏	12.40+1.54	10.04+1.04	8.47+1.74	4.93+0.85
肺	7.70+2.82	5.07+1.33	1.17+0.77	0.94+0.65
心脏	2.75+0.45	1.87+0.55	1.49+0.13	0.43+0.25
肌肉	2.59+1.00	1.31+0.50	0.34+0.10	0.41+0.20
脑	0.41+0.12	0.27+0.14	0.10+0.02	0.10+0.04
骨	4.37+0.57	2.66+0.67	0.83+0.15	1.00+0.01

表 2  $^{188}\text{Re}$ -Pc1 在荷 S180 鼠体内各时间点肿瘤与主要脏器的 T/NT ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

时间/h	T/NT						
	肿瘤与血	肿瘤与肌肉	肿瘤与骨	肿瘤与心脏	肿瘤与脾	肿瘤与肠	肿瘤与肾
1	1.12+0.42	2.58+0.78	1.41+0.13	2.28+0.43	0.78+0.08	1.57+0.56	0.72+0.12
4	1.29+0.47	3.92+1.47	1.88+0.27	2.68+0.71	0.95+0.31	1.00+0.64	0.73+0.30
24	2.34+1.39	6.62+2.34	3.26+0.23	5.53+1.40	1.52+0.14	2.01+0.92	0.32+0.17
48	1.47+0.77	3.85+0.53	1.03+0.25	3.44+1.01	0.89+0.37	0.83+0.48	0.19+0.01

1。由表 1 可知,标记物注入模型鼠体内后很快分布到全身脏器组织,在肝、肾中摄取率较高,滞留时间长,这表明放射性主要通过肝胆代谢和泌尿系统两条途径从体内清除;胃中的放射性积累也相对较多,可能是标记物在体内有部分分解,游离的铼在胃部浓集。标记物在血液及主要组织中的滞留时间较短,说明此标记物能够迅速从实验鼠体内清除;脑中的放射性积累在各个时间点都很低,说明标记肽不能通过血脑屏障,为亲水性化合物。

荷 S180 肉瘤小鼠注射  $^{188}\text{Re}$ -Pc1 后,各时间点的靶与非靶放射性摄取比(T/NT)列于表 2。由表 2 可知,标记肽从血液、肌肉和骨等主要脏器中清除较快,如,肿瘤与肌肉的 T/NT 在注药后 1 h 为  $2.58 \pm 0.78$ , 24 h 时则上升到了  $6.62 \pm 2.34$ ;放射性标记肽在肾脏中的摄取较多,所以 T/NT 在各个时间点一直小于 1,这一结果也从侧面反映了标记肽的肾代谢途径。

### 3 结 论

用<sup>188</sup>Re 标记了含 RGD 序列的环肽 Pc1, 标记率>90%。标记后的多肽在 PBS 及 CBS 中稳定情况良好:室温下,在 CBS 中稳定存放 4 h, 放化纯度>90%。体外细胞竞争结合实验结果表明,多肽 Pc1 能够抑制<sup>125</sup>I-echstatin 在体外结合 U87MG 细胞,且抑制效果随着所用多肽量的增加而增加。荷瘤鼠的生物分布实验表明,标记肽通过泌尿及肝胆系统代谢。标记肽在其他组织器官及血液中浓集较少,放射性能够快速清除,在肿瘤中有一定的浓集,但滞留时间还需要进一步延长。此外标记肽在胃肠中的摄取也较多,可能是标记肽在小鼠体内发生部分分解,游离的铼在胃肠组织积累,其确切原因还需要进一步实验验证。从本研究得到的数据来分析,Pc1 能够与肿瘤细胞表面的整合素  $\alpha_v\beta_3$  受体结合,能够起到靶向肿瘤的作用。

总之,放射性铼标记多肽 Pc1 具有发展成为肿瘤治疗药物的潜力,但还有大量的改进工作要做。

致谢:对美国斯坦福大学陈小元博士提供 RGD 多肽及在研究中所给予的帮助表示衷心感谢。

#### 参考文献:

- [1] De S, Razorenova O, McCabe NP, et al. VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 7 589-7 594.
- [2] Robinson SD, Reynolds LE, Wyder L, et al.  $\beta_3$ -Integrin regulates vascular endothelial growth factor-A-dependent permeability [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24: 2 108-2 114.
- [3] Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha_v$  integrins [J]. Science, 1995, 270: 1 500-1 502.
- [4] Zhang Xianzhong, Xiong Zhengming, Wu Yun, et al. Quantitative PET imaging of tumor integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression with <sup>18</sup>F-FRGD2 [J]. J Nucl Med, 2006, 47: 113-121.
- [5] Xiong JP, Stehle T, Zhang R, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in complex with Arg-Gly-Asp ligand [J]. Science, 2002, 296: 155-155.
- [6] Liu S, Cheung E, Rajopadhye M, et al. Isomerism and solution dynamics of <sup>90</sup>Y-labeled DTPA-biomolecule conjugates [J]. Bioconjug Chem, 2001, 12: 84-91.

- [7] Haubner R, Wester HJ, Burkhart F, et al. Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics [J]. J Nucl Med, 2001, 42: 326-336.
- [8] Janssen ML, Oyen WJ, Dijkgraaf I, et al. Tumor targeting with radiolabeled  $\alpha_v\beta_3$  integrin binding peptides in a nude mouse model [J]. Cancer Res, 2002, 62: 6 146-6 151.
- [9] Su ZF, Liu G, Gupta S, et al. In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of  $\alpha_v\beta_3$  integrin for tumor imaging [J]. Bioconjug Chem, 2002, 13: 561-570.
- [10] Chen X, Park R, Tohme M, et al. MicroPET and autoradiographic imaging of breast cancer  $\alpha_v$ -integrin expression using <sup>18</sup>F- and <sup>64</sup>Cu-labeled RGD peptide [J]. Bioconjug Chem, 2004, 15: 41-49.
- [11] Poethko T, Schottelius M, Thumshirn G, et al. Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: <sup>18</sup>F-labeled RGD and octreotide analogs [J]. J Nucl Med, 2004, 45: 892-902.
- [12] Chen X, Park R, Shahinlan AH, et al. <sup>18</sup>F-labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis [J]. Nucl Med Biol, 2004, 31: 179-189.
- [13] Kim JS, Lee KC, Lee BC, et al. Synthesis of fluorine-18 labeled glucose-Lys-Arg-Gly-Asp-D-Phe as a potential tumor imaging agent [J]. J Label Compd Radiopharm, 2005, 48: S289.
- [14] Haubner R, Wester HJ, Reuning U, et al. Radio-labeled  $\alpha_v\beta_3$  integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting [J]. J Nucl Med, 1999, 40: 1 061-1 071.
- [15] 马玉飞,于俊峰,周伟,等. 羧基铼化合物标记含 RGD 多肽研究[J]. 核化学与放射化学,2009,31 (1): 54-59.
- [16] 唐林,于俊峰,郑明强,等. 铼 [<sup>188</sup>Re]羧基化合物标记含 RGD 的环肽及其生物分布[J]. 核技术, 2006,29(6): 448-452.
- [17] Ma Yufei, Yu Junfeng, Han Yanjiang, et al. Radiolabeling RGD peptide and preliminary biodistribution evaluation in mice bearing S180 tumors [J]. Nuclear Medicine Communications, 2010, 31: 147-151.
- [18] Liu Shuang, Wen-Yuan Hsieh, Jiang Young, et al. Evaluation of a <sup>99m</sup>Tc-labeled cyclic RGD tetramer for noninvasive imaging integrin  $\alpha_v\beta_3$ -positive breast cancer [J]. Bioconjugate Chem, 2007, 18: 438-446.