

## <sup>153</sup>Sm半乳糖多聚赖氨酸肝细胞靶向全肝照射治疗肝癌的实验研究

刘艳迪<sup>①</sup> 刘江<sup>②</sup> 刘印忠<sup>③</sup> 常克力<sup>②</sup> 何景华<sup>③</sup>

**摘要 目的:**探讨利用乳糖化赖氨酸作为肝细胞靶向载体,将放射性核素<sup>153</sup>Sm特异性地浓集至肝脏,用全肝内照射的方法治疗肝癌的可行性,为原发性肝癌的治疗提供依据。**方法:**聚赖氨酸(poly-L-Lysine, PLL)和乳糖(lactose, Lac)经过常规偶联与纯化,合成产物采用环二乙基三胺五乙酸(Diethylene triamine pentaacetate acid, DTPA)法标记<sup>153</sup>Sm,得到放射性药物Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm,并进行了家兔血浆药物代谢动力学检测。构建大鼠肝癌模型,并观测Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm在体内的分布情况。随后将模型随机分为两组,实验组尾静脉注入Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 3.64MBq,对照组注入Lac-PLL-DTPA。第14天处死大鼠剥离肿瘤结节,计算肿瘤体积。**结果:**静脉注射Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm很快从血中分布到组织脏器中,其血浆药物浓度半衰期T<sub>1/2</sub>为10 min。结合内照射放射计量学确定放射性药物的给药剂量为:1 091 MBq,与对照组比较,Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm确实可以引起肿瘤缩小(P<0.01),而对肝功能无明显影响。**结论:**此方法治疗肝癌安全有效,为临床晚期肝癌的治疗提供了一种新方法,值得进一步研究。

**关键词** <sup>153</sup>Sm 乳糖 多聚赖氨酸 肝癌

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.14.003

### Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm for the Treatment of Liver Cancer

Yandi LIU<sup>1</sup>, Jiang LIU<sup>2</sup>, Yinzhong LIU<sup>3</sup>, Keli CHANG<sup>2</sup>, Jinghua HE<sup>3</sup>

Correspondence to: Jinghua HE; Email: hejinghuatj@yahoo.com.cn

<sup>1</sup>Institute of Gastroenterology, Tianjin Union Medicine Center, Tianjin 300121, China

<sup>2</sup>Department of Nuclear Medicine, Tianjin Medical University Cancer Hospital, Tianjin 300060, China

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

**Abstract Objective:** To investigate the feasibility of <sup>153</sup>Sm as an internal irradiation agent for the treatment of liver cancer using a targeted lactosylated poly-L-lysine (Lac - PLL) vehicle. **Methods:** Poly-L-lysine (PLL) and lactose (Lac) were purified and labeled with <sup>153</sup>Sm using the diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) method. The final product was Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm. Plasma pharmacokinetic detection was performed in rabbits. A rat hepatoma model was constructed, and the *in vivo* distribution of the radiopharmaceutical agent was also observed. Then, 3.64 MBq Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm was used to treat 10 rats with liver cancer through intravenous injection. Another 10 rats with liver cancer received only Lac-PLL-DTPA as the control. The volume of the tumors was measured on the 14th day after injection. **Results:** Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm was injected intravenously into the rats and was quickly distributed among the tissues and organs. The plasma half-life of Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm was 10 minutes. The single photon emission computed tomography result showed that the radiopharmaceutical agent was mainly in the liver and the tumor. The dosage was confirmed to be 1 091 MBq / 3 μg / 2 mL through internal exposure radiation metrology. Compared with the control group, the Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm treatment caused tumor shrinkage (P < 0.01). **Conclusion:** Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm is a safe and effective treatment for advanced hepatocellular carcinoma, and it warrants further study.

**Keywords** <sup>153</sup>Sm; Lactose; Polylysine; Liver cancer

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,而我国是肝癌发病大国,发病率占全球的50%,肝癌恶性程度高,进展迅速,5年生存率仅2%~16%,早期诊断率低,多数患者就诊时肿瘤已进展至晚期,一般仅6个月左右的生存期<sup>[1]</sup>。目前,肝癌患者尚无化疗方案显示出生存获益,因为肝癌普遍对化疗具有耐药性,对化疗不敏感,化疗药物对癌细胞作用的时候,也造成血液中正

常细胞的数目下降,而且由于肝脏周围重要脏器较多,放射治疗患者容易产生恶心、呕吐、食欲不振、脱发、腹泻等症状,使肝功能进一步损伤。因此多数学者对绝大多数肝癌患者不建议化疗或者放疗<sup>[2-3]</sup>,肝癌患者只要符合手术的指征,外科手术是首选,如果为晚期,不能实施手术,可考虑介入治疗,如局部消融等<sup>[4-6]</sup>。

利用肝靶向技术可以将放射性核素浓集在肝脏而对肝脏实施全肝内照射,这样就可以避免肝脏周围较多的重要脏器受到照射而产生的副作用,且正常肝细胞较之癌变的肝癌细胞对放射线照射耐受性强,可杀伤肝癌细胞而对肝脏不产生严重的毒副作用<sup>[7]</sup>。特异性存在于哺乳动物肝窦状隙的肝实质细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体(asiialoglycoprotein receptor, ASGPR),参与多种生理功能,多年来一直被用于介导药物和基因的肝靶向递送等方面的研究<sup>[8]</sup>。多项研究表明,乳糖化多聚赖氨酸(Lac-PLL)作为肝去唾液酸糖蛋白受体介导的药物载体,可获得较满意的肝靶向性<sup>[9]</sup>。

为此,本文探讨利用赖氨酸作为肝细胞靶向载体,将放射性核素<sup>153</sup>Sm特异性地靶向至肝脏,用全肝内照射的方法达到治疗肝癌的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

聚赖氨酸(PLL,分子量4 000),Sigma公司;乳糖(Lac),上海试剂二厂;氰基硼氢化钠,Pharmacia;DTPA,吡啶,乙酸酐,无水乙醇,DMSO,天津市津港化工有限公司;<sup>153</sup>Sm北京原子能研究所(北京原子高科),实验动物为长耳白家兔(2.2~2.5 kg,雄性),SD大鼠(180~220 g,雄性),Wistar大鼠(50~70 g,雄性,1月龄),购自天津市动物中心。

### 1.2 实验方法

1.2.1 PLL与Lac的连接与纯化 常规偶联方法,将PLL、Lac和氰基硼氢化钠溶解在0.2 mol/L的硼酸缓冲液(pH9)中,37℃下反应25h,分别在波长219 nm及490 nm处测定吸收度以确定复合物及总糖含量;调整体系pH为3(利用3 mol/L盐酸),38℃减压浓缩,得白色晶体,两次重结晶纯化得到纯品,备用。

1.2.2 Lac-PLL的<sup>153</sup>Sm标记 采用环DTPA法标记<sup>[10]</sup>:首先利用DTPA 1 g,乙酸酐2 mL,吡啶12 mL在66~67℃下反应24 h,经乙酸酐、无水乙醇反复洗涤,自然风干,得白色粉末,即为环DTPA。再取Lac-PLL,缓冲液为NaHCO<sub>3</sub>(pH8.2) 30 g/mL溶液1 mL,环DTPA的DMSO(二甲基亚砜)溶液(10 mg/mL)40 μL,于24~26℃反应1 h,PBS(浓度0.1 mol/L pH7.6,含NaCl 0.1 mol/L)透析去除游离DTPA,即得Lac-PLL-DTPA。除菌过滤,分装于无菌瓶中,每支1 mL(3 μg/1 mL),于4℃冰箱内保存备用。使用前将1 mL Lac-PLL-DTPA偶联物与<sup>153</sup>SmCl<sub>3</sub> 629 MBq在室温下混合5~30 min,即可得Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm,为无色透明液体。

1.2.3 内照射辐射计量学 用经验性公式即MIRD方法进行估算,假设放射性核素在肝内(包括肿瘤内)的分布是均匀的,计算公式为:  $D=R \times T \times C \times A$ 。

式中R: 1 MBq(27 μCi) 1 g组织的辐射剂量率为0.417 Gy/MBq/h;C:靶器官内起始的放射性浓度μCi/g;T:核素的生物半衰期(h);A:平衡吸收剂量常数g·rad/μCi·h;D:靶器官的总平均吸收剂量(rad)。对于<sup>153</sup>Sm平均能量为0.709 MeV,半衰期为1.95天,人体重60 kg,肝脏重量1 800 g,Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 24 h保留率为56%,根据1 MeV的1个β射线可以产生 $1.6 \times 10^{-6}$  erg的能量,1 g组织内100 erg的吸收能量为1 cGy,再对剂量率进行时间积分,经简化后可得:  $D(\text{Gy})=0.55 C(\text{mCi})$ ,即  $D(\text{Gy})=20.35 C(\text{MBq})$ 。按照肿瘤放射剂量学标准,肝脏接受的吸收剂量应在30 Gy以下,因此确定Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm的应用剂量为611 MBq,保证总剂量不超外照射辐射剂量学规定的30 Gy。如果参考其24 h保留率为56%,则最大剂量为1 091 MBq。

1.2.4 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm家兔血浆药物代谢动力学 长耳白家兔3只,雄性,体重2.2~2.5 kg。每只耳缘静脉注射Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 37 MBq/0.3 μg/0.1 mL,分别于注药后0,5,10,20,30 min,以及1,2,3,5 h取血各0.5 mL,利用r计数器测其1 min的放射性计数cpm值,以每毫升血中cpm值代表血药浓度。曲线由100%下降至50%所需的时间为半衰期(T<sub>1/2</sub>)。

1.2.5 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm在大鼠肝癌模型中的应用 Walker-256瘤株,购自上海志研生物科技有限公司,肿瘤细胞经过复苏,注入2只1月龄的Wistar大鼠(50~70 g,雄性)腹腔,形成癌性腹水。从传代的Wistar大鼠腹腔抽取癌性腹水5 mL,离心后,弃上清,抽入1 mL注射器内备用。20只SD大鼠(180~220 g,雄性),腹腔麻醉后,开腹,直视下肝左叶注射针注入经过浓缩的癌性腹水0.05 mL,为保证肿瘤大小一致,要严格掌握腹水等量注入。第7天,大鼠肝癌模型完成,尾静脉取血检测血ALT、AST。

大鼠模型尾静脉注入Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 3.64 MBq/0.01 μg/0.1 mL(按照公斤体重核算为人体用量的200/60 000),注射后1 h及24 h利用GE SPECT行全身显像,能峰103 Kev,窗宽20%,采集计数200 000~400 000。显像后处死大鼠,分离组织脏器,称重并利用r计数器测其cpm值。通过对感兴趣区计数可测得药物定量分布值C<sub>1</sub>及C<sub>24</sub>,则24 h保留率为C<sub>1</sub>/C<sub>24</sub>。

大鼠模型20只,随机分为两组,每组10只,实验组每只尾静脉注入Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 3.64 MBq/0.01 μg/0.1 mL,对照组注入Lac-PLL-DTPA 0.01 μg/0.1 mL。第14天后处死SD大鼠切取肝左叶,剥离肿瘤结节,用游标卡尺分别测量肿瘤水平方向、垂直方向和矢状方向的直径(mm)按照公式计算肿瘤体积 $V=1/2abc$ 。

2 结果

2.1 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm家兔试验血浆半衰期测定

静脉注射 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm,放射性药物很快从血中分布到组织脏器中,其血浆药物浓度半衰期 T<sub>1/2</sub> 为 10 min(图 1)。Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 的其他体内特性(表 1)。

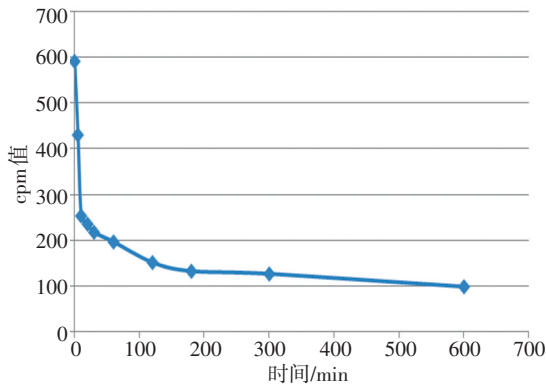


图 1 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 时间剂量曲线  
Figure 1 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm plasma concentration

表 1 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 的体内特性

主要参数	结果
主要浓集脏器	肝
其他浓集脏器	肾、脾
肝脏毒性	未见
24 h 保留率(%)	56
血浆半衰期(min)	10
免疫源性	-
分子量(kD)	约 5kD
性质	氨基酸

2.2 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 在大鼠肝癌模型中的效应

如图 2 所示,放射性药物主要浓集在肝脏和肿瘤,其次为脾脏和肾脏,统计结果(图 3)。与对照组比较,Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 确实可以引起肿瘤缩小 (P<0.05),而对肝功能无明显影响(表 2)。

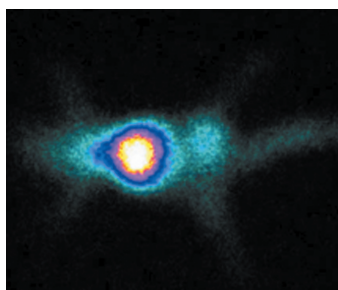


图 2 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 在大鼠体内的分布  
Figure 2 Distribution of Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm in rats

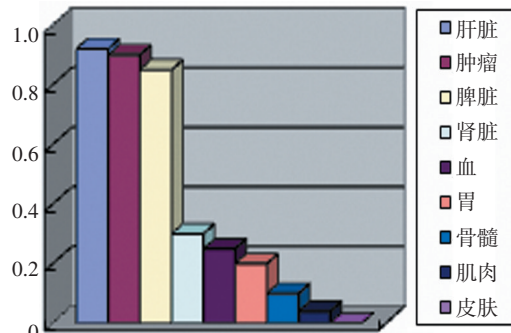


图 3 各组织脏器中 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 含量  
Figure 3 Normalized quantity of Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm in different tissues

表 2 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 在大鼠肝癌模型中的应用

组别	肿瘤体积(mm <sup>3</sup> )	ALT(U/L)	AST(U/L)
对照组	479 ± 272	21.22 ± 6.17	34.87 ± 8.54
实验组	142 ± 101	22.03 ± 9.93	35.10 ± 13.18
P	0.000 6	0.827 5	0.963 3

3 讨论

肝细胞膜上具有独特的去唾液酸糖蛋白受体,能够与含有半乳糖残基的糖蛋白相结合,将小分子化合物、寡核苷酸以及 DNA 分子与去唾液酸糖蛋白偶联后,可通过受体介导的吞噬作用被肝细胞摄入。在 PLL 分子上引入 Lac 残基,使其具备了对肝细胞的特异性靶向能力,随后利用赖氨酸上的氨基很容易与 DTPA 分子中的羧基偶联,同时 DTPA 分子具有螯合金属离子 <sup>153</sup>Sm 的能力,这样就形成了治疗肝癌的全肝内照射靶向药物 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm。在体内和体外观察到这种复合物对肝细胞和肝癌细胞具有良好的靶向能力,且强度类似。Lac-PLL 由于肝脏浓集多,24 h 保留率高且成本低等特点,是一种适宜的靶向载体。

Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 治疗原发性肝癌的临床意义,与肝癌的外照射类似,实质上属于全肝照射。一般认为,肝癌是对放射不敏感的肿瘤,根治剂量据估计至少要 60 Gy。而全肝的放射耐受量被认为是 3 000 ~ 3 500 cGy/3 ~ 4 周,因此限定 Lac-PLL-DTPA-<sup>153</sup>Sm 治疗肝癌是姑息治疗的性质,所以,放射的总剂量,以患者的肝功能不产生严重损害为限,尽可能给予较高的剂量。

本研究探讨了内照射辐射剂量学,与外照射相比,虽然都是给予 30 Gy,外照射是短时间内,一次给予较大剂量的照射方法,而内照射则是长时间内持续很低剂量的照射,因此许多学者认为,肝脏接受的吸收剂量应在 50 ~ 60 Gy,根据公式计算结果,放射性核素全肝给药时,动物实验证实,兔正常肝可耐受高达 230 Gy,临床应用也曾达到 126 Gy,而肝功能各项指标均未受