

^{99m}Tc标记前列腺癌PSMA适配体的制备和临床前研究

杨婷, 焦举, 吕殷婷, 邹琼, 曹素娥, 江淑琴, 张勇
(中山大学附属第三医院核医学科, 广东广州 510630)

摘要:【目的】构建^{99m}Tc标记前列腺癌特异性膜抗原(PSMA)适配体(A10-3.2),并探讨其在体内外的生物特点。【方法】通过双功能螯合剂6-胍基烟酸琥珀酰亚胺酯盐酸盐(SHNH)对适配体A10-3.2进行^{99m}Tc标记(^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2),并检测其在体外的稳定性,被前列腺癌LNCaP细胞(PSMA+)摄取的特异性,在移植瘤小鼠体内SPECT/CT成像及生物分布的特点。【结果】所构建^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2的标记率和放化纯分别为(71.31±6.78)%和97.03%。^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2对PSMA(+)的前列腺癌LNCaP细胞具有明显的靶向特异性,摄取率明显高于PSMA(-)的前列腺癌PC3细胞($P<0.01$),在移植瘤体内具有一定的靶向特异性和较高的瘤/肌肉比值。【结论】成功构建^{99m}Tc标记的靶向PSMA的适配体A10-3.2,具有良好的体内外稳定性和靶向性,在小鼠体内具有较高的瘤组织/肌肉本底的比值,显示^{99m}Tc标记的适配体A10-3.2可能是一种具有潜力的PSMA阳性前列腺癌分子靶向显像剂。

关键词:前列腺癌;前列腺特异性膜抗原;适配体;锝;SPECT/CT显像

中图分类号:R817.1 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2017)06-0848-06

Preparation and Preclinical Study of ^{99m}Tc-labeled Prostate Cancer Aptamer

YANG Ting, JIAO Ju, LÜ Yin-ting, ZOU Qiong, CAO Su-e, JIANG Shu-qin, ZHANG Yong
(Department of Nuclear Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)
Corresponding author: ZHANG Yong, E-mail: Zhangyong9@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To radiolabel the PSMA aptamer A10-3.2 with ^{99m}Tc, and explore its biological characteristics in vivo and in vitro. 【Methods】 Using Succinimidyl 6-hydrazinonicotinate hydrochloride (SHNH) as the bifunctional chelating agent to label aptamer A10-3.2 with ^{99m}Tc, then tested for the stability in vitro, the specific uptake by prostate cancer LNCaP cells (PSMA+), the characteristics of SPECT/CT imaging and biodistribution in LNCaP tumor-bearing NOD/SCID mice. 【Results】 The labeling rate and radiochemical purity of the products (^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2) are (71.31±6.78)% and 97.03%, respectively. ^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2 had obvious target specificity for PSMA positive prostate cancer LNCaP cells, its uptake rate was significantly higher than PSMA negative PC-3 cells ($P<0.01$). And in tumor-bearing mice, the tumor has a certain uptake and a high ratio of the tumor tissue to the muscle. 【Conclusion】 This study successfully constructed ^{99m}Tc-labeled PSMA-targeted aptamer A10-3.2, which has a good stability and targeting in vivo and in vitro, has a high tumor tissue/muscle ratio in tumor-bearing mice, which show that it may be a potential targeted molecular imaging agent for prostate cancer.

Key words: prostate cancer; PSMA; aptamer; ^{99m}Tc; SPECT/CT imaging

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(6): 848-853]

前列腺癌是一种发病率很高的泌尿系统恶性肿瘤,其病死率仅次于肺癌^[1]。它的肿瘤标志物包括前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)、前列腺特异性膜抗原(prostate specific mem-

brane antigen, PSMA)、前列腺酸性磷酸酶(prostate acid phosphatase, PAP)等^[2],其中前列腺特异性膜抗原PSMA是一种完整的膜表面糖蛋白,具有较高的前列腺组织特异性,且在前列腺癌中的

收稿日期: 2017-08-21

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B021800083、2014A020212153); 广东省自然科学基金(2015A030313106); 教育部博士点基金(20130171110081); 广东省医学科研基金(B2014147)

作者简介: 杨婷, 医学硕士生, 医学影像与核医学专业, E-mail: 15013765527@163.com; 张勇, 通信作者, 主任医师, 博士生导师, E-mail: Zhangyong9@mail.sysu.edu.cn

表达量明显高于非前列腺组织、正常或良性增生的前列腺组织^[3]。另外,PSMA的表达不依赖于体内雄激素的水平,在雄激素水平降低时表达反而增强,这对内分泌治疗后转变为激素难治性前列腺癌的患者相当有意义^[2],因此,PSMA作为一种有前景的前列腺癌靶点被广泛研究,而多种靶向PSMA的分子也应运而生。其中适配体是一类短的单链寡核苷酸,具有独特的空间结构^[4],与其他的靶分子(如单抗、多肽、小分子抑制剂等)相比,适配体具有亲和力高,特异性强,分子质量小,容易被肿瘤细胞摄取,且在血液和其他非靶组织内清除较快等优点^[4-5],因而,本研究选取其中一类靶向PSMA的RNA适配体A10-3.2,对其进行核素^{99m}Tc标记,并检测其在体外的稳定性、靶细胞摄取的特异性及在移植瘤小鼠体内成像和生物分布的特点,以探讨将核素标记的适配体作为一种新的前列腺癌靶向显像剂的可能性。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与仪器

人前列腺癌细胞株 LNCaP 和 PC3 由美国菌种保藏中心(ATCC)提供,购自南京凯基生物科技发展有限公司。雄性非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(non-obese diabetes/severe combined immu-

nodeficiency, NOD/SCID)小鼠 8 只,4~5 周龄,体质量约 20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,饲养于中山大学北校区动物实验中心 SPF 级动物房。特异性结合 PSMA 的前列腺癌适配体 A10-3.2,由美国 Dharmacon 公司合成,并对其进行一定的化学修饰(5'端氨基修饰,3'端插入 T 帽,所有嘧啶碱基的 2'-OH 行氟化修饰)。双功能螯合剂 SHNH 购买自美国 Solulink 公司。 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 由北京原子高科股份有限公司提供。其他仪器及试剂如 γ 计数器(中国中科中佳)、SPECT/CT 仪(德国西门子)、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸及氯化亚锡(tricine,美国 Sigma Aldrich 公司)、二甲基甲酰胺(dimethylformide, DMF;美国 Solulink 公司)、3 ku 超滤离心管(美国 Millipore 公司)等。

1.2 方 法

1.2.1 ^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2 的制备 采用双功能螯合剂(succinimidyl 6-hydrazinicotinate hydrochloride, SHNH)进行^{99m}Tc标记 aptamer A10-3.2(图1)。100 μg 适配体溶解于硼酸盐缓冲液(0.1 mol/L、pH 8.5)并于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,室温冷却 10 min 后,将无水 DMF 溶解的 SHNH(10 mg/mL)逐滴入并混匀,使螯合剂与适配体的终摩尔之比为 25:1,避光、室温条件下反应 1 h。向反应后的混合液中加入 200 μL 的 PBS 缓冲液(含 1 mol/L 甘氨酸

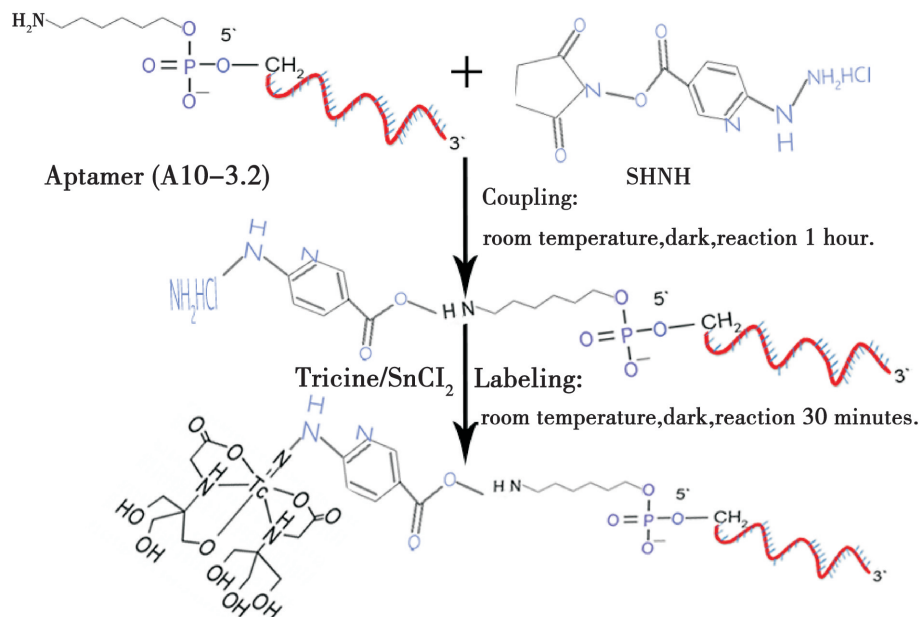


图1 ^{99m}Tc-SHNH-aptamer 的合成路径图

Fig.1 A schematic diagram of the synthetic path of ^{99m}Tc-SHNH-aptamer

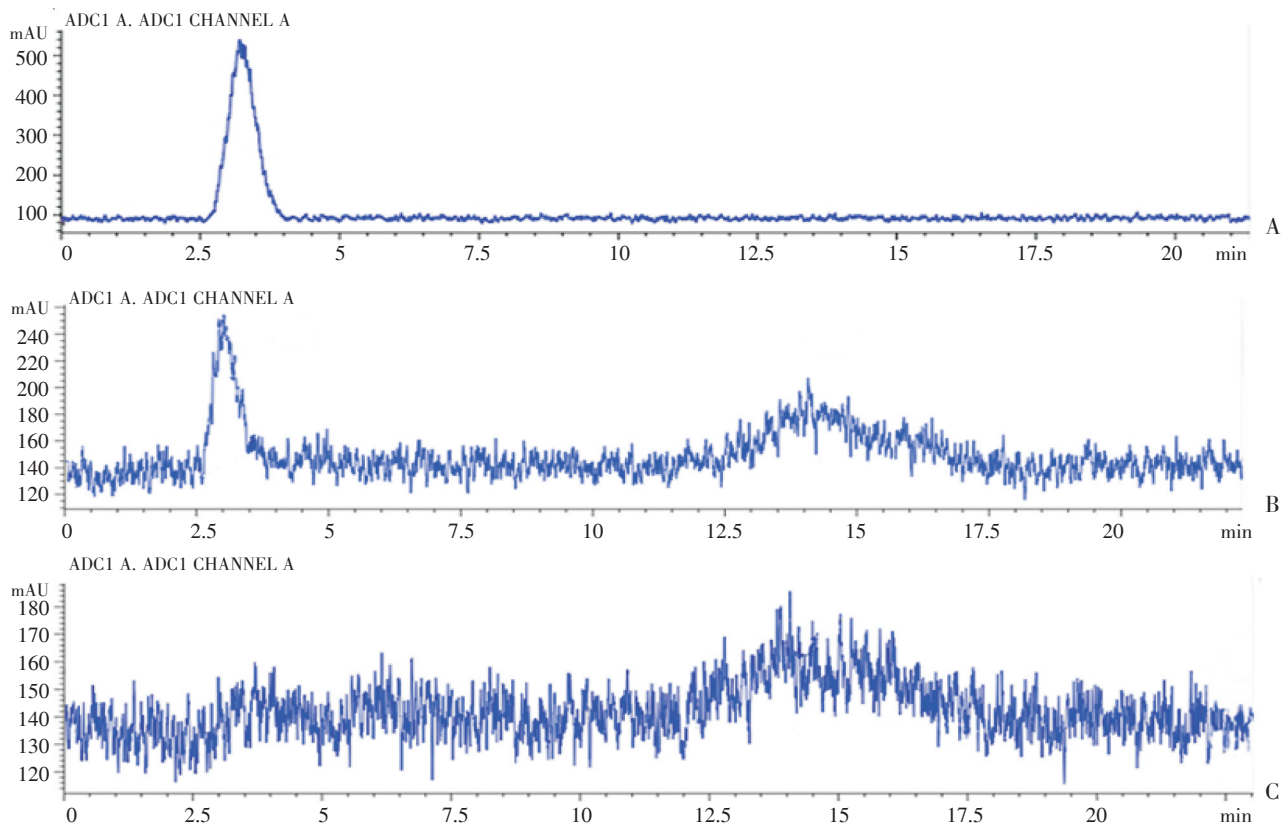
酸, pH 7.2)终止反应,用3 ku超滤离心管纯化,除去未结合的螯合剂SHNH。将纯化产物转移至新的棕色离心管后,依次加入74~92.5 MBq新淋洗的 $^{99m}\text{TcO}_4$, 100 μL N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine) (1 mg/mL)和15 μL 氯化亚锡二水合物(1 mg/mL),混匀后室温下避光反应30 min,用纸层析法测定标记率,丙酮作为展开剂(游离锝在最前面,标记物停留在原点)。通过sep-park C18 SPE柱(Waters,美国)纯化后,用高效液相色谱仪(HPLC)测定放化纯度。

1.2.2 标记物的体外稳定性 取一定体积的标记物与2倍体积生理盐水混合,放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育不同的时间(1、2、3、4和6 h),每个时间点取3份点样,用纸层析法检测标记物在体外的稳定性。其中,在孵育4 h时后,取一定体积的混合物与6 \times 上样缓冲液混合均匀,未标记的适配体A10-3.2作为对照,行琼脂糖凝胶(2%)电泳,电泳液为1 \times TAE溶液,电泳进行约30~40 min后在凝胶成像仪下成像。

1.2.3 与靶细胞的特异性结合 取对数生长期的

LNCaP细胞和PC3细胞分别接种于12孔板,每孔加入2 mL RPMI 1640培养基(含10% FBS, Gibco),于37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数为5%的 CO_2 培养箱中孵育至细胞贴壁。设封闭组(closed group)、饱和组(saturated group)和空白组(control group),封闭组加入不含血清的RPMI 1640培养基配制的5% BSA溶液,饱和组加入过量未标记的适配子溶液(200 nmol/L),空白组加入等体积的不含血清的RPMI 1640培养基,于恒温细胞培养箱中孵育30 min后,用不含血清的培养基洗2~3遍,每孔加入等量标记液,继续孵育1 h,用不含血清的培养基洗2~3次,再用等体积的胰酶(含0.25% EDTA, Gibco)消化,不含血清的培养基重悬细胞后收集进行 γ 计数。

1.2.4 移植瘤小鼠成像及生物分布 8只4~5周龄的雄性NOD/SCID小鼠,在左侧大腿根部通过皮下接种LNCaP细胞(7×10^6 个细胞/只),游标卡尺监测肿瘤的大小,待肿瘤平均直径达到1.0 cm左右后,禁食禁水24 h,次日尾静脉注射200 μL 标记物(7.4~11.1 MBq,约200~300 μCi)。注射后



A. Fresh technetium eluent. B. Unpurified labeled product (^{99m}Tc -SHNH-A10-3.2). C. Purified labeled product (^{99m}Tc -SHNH-A10-3.2)

图2 HPLC结果

Fig.2 HPLC results

0.5、2.0 h,分别取一只小鼠通过腹腔注射 10%水合氯醛麻醉后以俯卧位行SPECT/CT断层显像,采集条件:双探头,低能高分辨平行孔准直器,能峰 140 keV,窗宽 20%,矩阵 128×128,放大倍数为 2。同时在尾静脉注射后 0.5 和 2.0 h,分别取 3 只小鼠通过颈椎脱臼法处死后立即解剖重要器官、组织和肿瘤,去离子水洗涤干燥后称重, γ 计数器测量放射性计数,并计算各脏器放射性摄取值(%ID/g)。

1.2.5 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞特异性结合实验的组间比较采用 t 检验来分析数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2 的标记率和放化纯

^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2 的标记率为 $(71.31 \pm 6.78)\%$,纯化后,HPLC 检测其放化纯为 97.03% (图 2)。流动相 A 为水,B 为含 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的乙腈,流速为 1 mL/min。

2.2 体外稳定性

标记物在 37 °C 与生理盐水共孵育 4 h 后,放化纯仍有 80% 左右 (图 3),且琼脂糖凝胶电泳结果显示无降解条带出现,说明标记物在体外具有较好的稳定性。

2.3 细胞特异性结合

PSMA(+) 的 LNCaP 细胞放射性摄取值明显高于 PSMA(-) 的 PC3 细胞 (图 4A),差异具有统计学

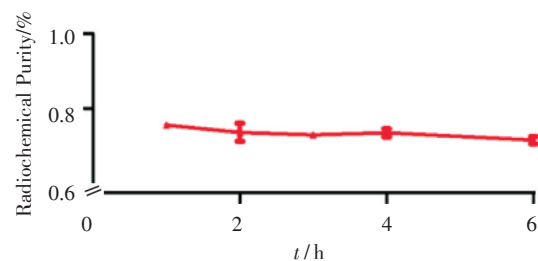


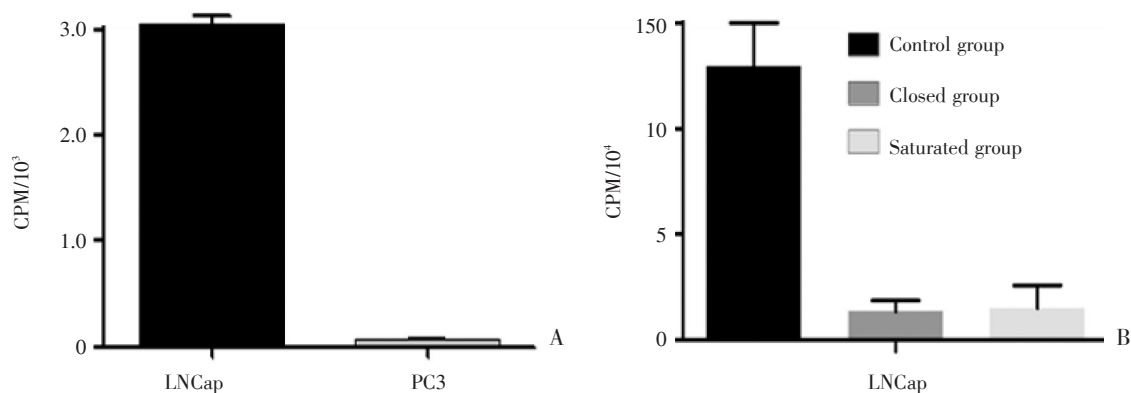
图 3 ^{99m}Tc-SHNH-aptamer 在生理盐水中的稳定性

Fig 3 The stability of ^{99m}Tc-SHNH-aptamer in physiological saline

意义 ($t=69.74, P=0.0002, n=3$),同时在 LNCaP 细胞中,对照组的放射性摄取值明显高于事先用 5% BSA 封闭的封闭组和用未标记适配体饱和后的饱和组 (图 4B),且差异具有统计学意义 (t 值分别为 7.821 和 8.309, P 值分别为 0.0160 和 0.0142, $n=3$),均说明 ^{99m}Tc-SHNH-aptamer 具有较好的体外靶向选择性和特异性。

2.4 SPECT/CT 显像及生物分布

移植瘤小鼠的显像见图 5,图像显示静脉注射标记物后 0.5 h 肿瘤即有一定的摄取,2.0 h 时摄取增加,生物分布的结果 (图 6,表 1) 也证实了这点,尾静脉注射标记物后 0.5 h,肿瘤的放射性摄取值约 $(8.94 \pm 1.75)\%$,2 h 后约 $(11.73 \pm 1.47)\%$,其余大部分标记物被肾脏和肝脏摄取。肿瘤与肌肉的比值在 0.5、2 h 分别为 15.28 ± 3.29 和 2.54 ± 0.14 。



A. shows the uptake of ^{99m}Tc-SHNH-aptamer in PSMA(+) LNCaP cells and PSMA(-) PC3 cells. B. shows the uptake of ^{99m}Tc-SHNH-aptamer in different treatment groups of PSMA(+) LNCaP cells.

图 4 细胞特异性结合和摄取

Fig.4 Cell-specific binding and uptake

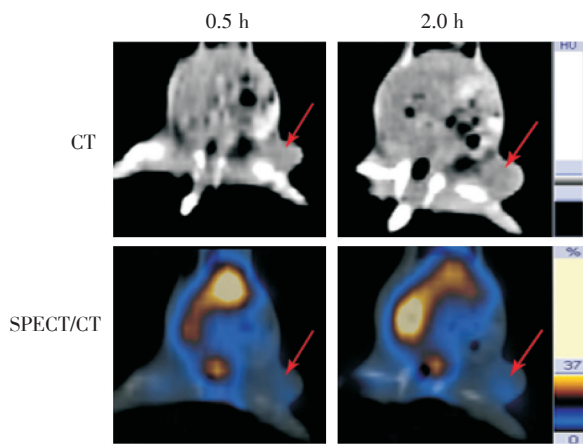


图5 NOD/SCID小鼠尾静脉注射标记物^{99m}Tc-SHNH-aptamer后分别在0.5和2h的SPECT/CT显像图
Fig.5 SPECT/CT imaging of ^{99m}Tc-SHNH-aptamer at different times (0.5 h and 2.0 h) after injection via tail vein

表1 ^{99m}Tc-SHNH-aptamer 静注后0.5和2h的体内生物分布

Table 1 The biodistribution of ^{99m}Tc-SHNH-aptamer in tumor-bearing mice at 0.5 h and 2.0 h after intravenous injection ($\bar{x} \pm s$)

Organ	%ID/g	
	0.5 h	2.0 h
Spleen	1.04±0.13	0.85±0.16
Large Intestine	1.10±0.11	2.02±0.86
Small Intestine	5.21±0.58	1.72±0.50
Liver	19.13±1.73	24.32±0.68
Kidney	4.85±0.61	77.73±6.48
Thyroid	1.80±0.40	0.45±0.06
Heart	4.73±0.54	0.59±0.02
Lung	3.87±1.12	8.04±0.16
Brain	7.48±0.93	3.66±0.84
Muscle	0.59±0.02	4.62±0.38
Tumor	8.94±1.75	11.73±1.47

3 讨论

PSMA是一种完整的II型跨膜蛋白,具有叶酸水解酶I和谷氨酸羧肽酶II的活性,在前列腺癌组织中高度表达,且其表达量随着肿瘤分化程度的增高和转移而增加^[6],具有较高的灵敏度(65.9%)和特异性(94.5%)^[7],因而作为前列腺癌的一个很有意义和前景的显像与治疗靶点,被广泛研究^[8]。而靶向PSMA的配体也应运而生,他们包括单抗^[9]、小分子抑制剂^[10]和适配体^[11]等,且已有部分靶向前列腺癌的抗体和小分子抑制剂应用于临床,并显示出较好的特异性和灵敏度^[10,12]。尽管大部分适配体的研究尚处于临床前阶段,但

由于适配体相对于其他靶向剂来说具有亲和力高、特异性强,血液和非靶组织清除快等优点^[13],因而仍然是一种值得深入研究的非常有潜力的靶向显像剂和治疗剂,但到目前为止,核素标记适配体的体内外研究仍然不多^[14-15]。本研究在国内外是第一次对靶向PSMA的适配体A10-3.2进行核素^{99m}Tc标记,并检测了其在体内外的稳定性及特异性等,结果显示本研究所构建的产物^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2具有较高的标记率和放化纯度,具有较好的体外稳定性和靶向特异性,可能为前列腺癌的靶向显像提供一种新的思路。体内生物

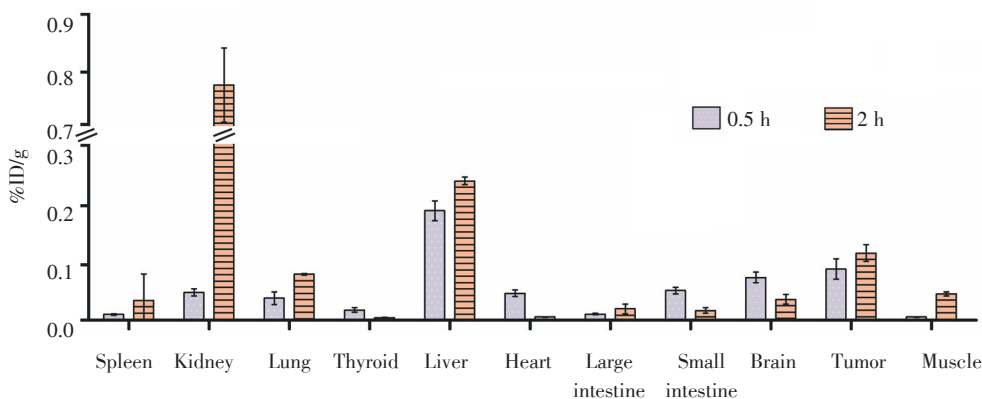


图6 ^{99m}Tc-SHNH-aptamer在体内的生物分布

Fig.6 The biodistribution of ^{99m}Tc-SHNH-aptamer in LNCaP tumor-bearing after injection via tail vein

分布结果显示^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2在体内大部分被肾脏和肝脏摄取,这与国外相关研究结果比较一致^[16],但不同的是,我们的研究显示标记后的适配体在肿瘤内有一定的摄取,并且具有较高的肿瘤/肌肉比值,尤其是在注药后0.5 h比值可高达 15.28 ± 3.29 ,且2 h后比值仍然大于2,说明该显像剂具有一定的潜力。但是本研究构建的放射性标记物^{99m}Tc-SHNH-A10-3.2在体内的稳定性及靶向性仍存在一些不足,考虑到各种可能影响其在体内的生物分布、靶向性和稳定性的原因,诸如对适配体的化学修饰、螯合剂的选择、标记的条件等^[17-18],因此,需要进一步的研究优化实验条件和步骤,以改善核素标记适配体在体内的稳定性和提高标记物在生物体内的靶向性,降低标记物在非靶组织内的积聚,从而提高肿瘤与本底的比值。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J].CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] 马乐,吴小晶,冉俊.前列腺癌肿瘤标记物研究的历史、现状和发展[J].中华检验医学杂志, 2001, 24(04): 49-50.
Ma L, Wu XJ, Ran J. The history, present situation and development of tumor markers in prostate cancer [J].Chin J Lab Med, 2001, 24(04): 49-50.
- [3] Sokoloff RL, Norton KC, Gasior CL, et al. A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine [J].Prostate, 2000, 43(2): 150-157.
- [4] de Franciscis V. A Theranostic "SMART" Aptamer for Targeted Therapy of Prostate Cancer [J].Mol Ther, 2014, 22(11): 1886-1888.
- [5] 王周平,张维潇.适配体及其研究进展[J].食品与生物技术学报, 2013, 32(9): 897-906.
Wang ZP, Zhang WX. Aptamer and Related Progress [J].J Food Sci Biot, 2013, 32(9): 897-906.
- [6] Wright GJ, Grob BM, Haley C, et al. Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy[J].Urology, 1996, 48(2): 326-334.
- [7] Mhawech-Fauceglia P, Zhang S, Terracciano L, et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique [J].Histopathology, 2007, 50(4): 472-483.
- [8] Afshar-Oromieh A, Babich JW, Kratochwil C, et al. The Rise of PSMA Ligands for Diagnosis and Therapy of Prostate Cancer [J].J Nucl Med, 2016, 57(Suppl 3): 79S-89S.
- [9] Viola-Villegas NT, Sevak KK, Carlin SD, et al. Noninvasive Imaging of PSMA in prostate tumors with (89) Zr-Labeled huJ591 engineered antibody fragments: the faster alternatives [J].Mol Pharm, 2014, 11(11): 3965-3973.
- [10] 胡四龙,许晓平,朱耀,等.^{99m}Tc标记PSMA小分子抑制剂靶向前列腺癌分子影像初步临床研究[J].中国癌症杂志, 2016, 26(07): 608-615.
Hu SL, Xu XP, Zhu Y, et al. Preliminary clinical study of ^{99m}Tc-labelled small molecules against PSMA for prostate cancer imaging [J].Chin Oncol, 2016, 26(07): 608-615.
- [11] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, et al. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells [J].Cancer Res, 2004, 64(21): 7668-7672.
- [12] Nargund V, Al HD, Kumar P, et al. Imaging with radiolabelled monoclonal antibody (MUJ591) to prostate-specific membrane antigen in staging of clinically localized prostatic carcinoma: comparison with clinical, surgical and histological staging [J].BJU Int, 2005, 95(9): 1232-1236.
- [13] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers [J].Biosens Bioelectron, 2005, 20(12): 2424-2434.
- [14] Jacobson O, Weiss ID, Wang L, et al. 18F-Labeled Single-Stranded DNA Aptamer for PET Imaging of Protein Tyrosine Kinase-7 Expression [J].J Nucl Med, 2015, 56(11): 1780-1785.
- [15] Jacobson O, Yan X, Niu G, et al. PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-stranded DNA aptamer [J].J Nucl Med, 2015, 56(4): 616-621.
- [16] Calzada V, Fernández M, González J, et al. Aptamer-HYNIC-^{99m}Tc: A molecular imaging agent of PTK7 [J].Nucl Med Biol, 2014, 41(7): 618-625.
- [17] Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, et al. Tumor targeting by an aptamer [J].J Nucl Med, 2006, 47(4): 668-678.
- [18] Varmira K, Hosseinimehr SJ, Noaparast Z, et al. An improved radiolabelled RNA aptamer molecule for HER2 imaging in cancers [J].J Drug Target, 2014, 22(2): 116-122.