

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.16.004

文章编号: 1005-8982(2018)16-0017-05

新型核素分子探针 ^{18}F -NT 靶向 前列腺癌的实验研究

邹开力, 唐永祥, 周明, 李建, 胡硕

(中南大学湘雅医院 PE 中心, 湖南 长沙 410008)

摘要: **目的** 探讨新型核素分子探针 ^{18}F -NT 在前列腺癌细胞及荷瘤小鼠的靶向性, 为后续 ^{18}F -NT 靶向前列腺癌的在体显像提供实验依据。 **方法** 制备 ^{18}F -NT, 并完成质量控制检测。选取高表达神经降压素受体 1 (NTR1) 的人前列腺癌细胞系 PC3, 分 3 组进行细胞结合实验, 分别为实验组、阻断组和对照组 (游离 ^{18}F 离子)。对照组在细胞中加入游离 ^{18}F 离子, 实验组在细胞中加 ^{18}F -NT, 阻断组细胞中加入 ^{18}F -NT 前 30 min 加入神经降压素 (NT) 进行阻断。复制荷 PC3 前列腺癌裸鼠模型, 分为实验组和阻断组, 每组 3 只。阻断组单次尾静脉注射 NT 0.2 ml (浓度为 1 mg/ml); 实验组注射 0.2 ml 生理盐水, 30 min 后两组裸鼠尾静脉分别注射 37 MBq/ml 的 ^{18}F -NT 0.2 ml, 1 h 后处死裸鼠, 分离主要脏器及肿瘤组织, γ 计数器测量各脏器组织的放射性计数。分析两组肿瘤细胞的放射性计数及肿瘤组织的放射性摄取值 (%ID/g)。 **结果** 成功制备 ^{18}F -NT, 其理化性质及各项质控指标均达标。细胞结合实验显示, PC3 细胞实验组计数值 ($5\,825.00 \pm 1\,074.52$) /min, 高于阻断组 ($1\,941.66 \pm 173.58$) /min, 两者比较, 差异有统计学意义 ($t=7.227, P=0.003$), 而对照组计数值仅为 (170.33 ± 56.59) /min; 两组荷瘤裸鼠体内生物学分布实验表明, ^{18}F -NT 血液清除较快, 主要经肾脏代谢。实验组肿瘤摄取值最高, 为 (1.02 ± 0.49) %ID/g, 阻断组肿瘤摄取值降低, 为 (0.21 ± 0.03) %ID/g, 两者比较, 差异有统计学意义 ($t=2.815, P=0.049$)。 **结论** ^{18}F -NT 标记率和放化纯高, 体外稳定性好, 前列腺癌细胞系 PC3 结合 ^{18}F -NT 高, PC3 荷瘤裸鼠的肿瘤摄取 ^{18}F -NT 高, 细胞和荷瘤均能被 NT 有效阻断, 为后续 ^{18}F -NT 靶向前列腺癌 NTR1 在体显像打下良好的实验基础。

关键词: ^{18}F -NT; 前列腺癌; PC3; 细胞结合实验; 生物学分布实验

中图分类号: R737.25; R-332

文献标识码: A

Experimental study of a novel radionuclide molecular probe ^{18}F -NT targeting prostate cancer

Kai-li Zou, Yong-xiang Tang, Ming Zhou, Jian Li, Shuo Hu

(PET-CT Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the targeting of a novel radionuclide molecular probe ^{18}F -NT in prostate cancer cells and tumor bearing mice, and to provide experimental evidence for *in vivo* imaging of ^{18}F -NT targeted prostate cancer. **Methods** ^{18}F -NT was prepared, and quality control testing was completed. A human prostate cancer cell line PC3 with high expression of neurotensin receptor 1 (NTR1) was selected. PC3 cells were divided into three groups. The control group received free ^{18}F ions into the cells. In the experimental group, ^{18}F -NT was added to the cells. Neurotensin (NT) was added to the blocking group 30 min before addition of ^{18}F -NT. Nude mice were divided into two groups (experimental group and blocking group), each group had 3 mice. In the blocking group, 0.2 ml of 1.0 mg/ml NT was injected into the tail vein of each nude mouse, and each mouse in the experimental group was

收稿日期: 2017-10-13

[通信作者] 胡硕, E-mail: hushuoxy@csu.edu.cn

[作者简介] 邹开力现工作单位为长沙市第四医院核医学科

injected with 0.2 ml of saline. After 30 min, each nude mouse in the two groups was injected with 0.2 ml ^{18}F -NT (the radioactive concentration was 37 MBq/ml). After 1 h, the nude mice were sacrificed and the major organs and the tumor tissues were separated. γ counter was used to measure the radioactive count of the organs and the tissues. The radioactive count of PC3 cells and radioactive uptake values (% ID/g) of the tumor tissues were analyzed statistically. **Results** The ^{18}F -NT was successfully prepared, its physical and chemical properties and the quality control indicators reached standard. Cell-binding assay showed that the radioactive count of the experimental group $[(5,825.00 \pm 1,074.52)/\text{min}]$ was significantly higher than that of the blocking group $[(1,941.66 \pm 173.58)/\text{min}]$, the difference was statistically significant ($t = 7.227, P = 0.003$), while that of the free ^{18}F control group was only $(170.33 \pm 56.59)/\text{min}$. The *in vivo* biological distribution experiment of the two groups of nude mice showed that blood removal rate of ^{18}F -NT was fast. The ^{18}F -NT was mainly metabolized by the kidneys. The radioactive uptake value of the tumor tissues was the highest in the experimental group $[(1.02 \pm 0.49)\% \text{ ID/g}]$, while it was significantly lower in the blocking group $[(0.21 \pm 0.03)\% \text{ ID/g}]$, the difference was statistically significant ($t = 2.815, P = 0.049$). **Conclusions** The ^{18}F -NT has high labeling rate and radioactive chemical purity, and also excellent *in vitro* stability. The uptake of ^{18}F -NT is very high in both human prostate cancer cell line PC3 and PC3 tumor-bearing nude mice, which could be effectively blocked by NT. This experiment can lay a good foundation for the follow-up targeting NTR1 *in vivo* imaging.

Keywords: ^{18}F -NT; prostate cancer; PC3; cell binding experiment; biological distribution experiment

前列腺癌是老年男性常见恶性肿瘤，其发病率和病死率都很高。在美国，老年男性的健康受到前列腺癌的严重威胁，其发病率位居男性恶性肿瘤的首位。根据美国最新数据显示，2016 年美国前列腺癌新发病例以及死亡人数分别为 180 890 人和 26 120 人，占男性癌症死亡率的第 2 位^[1]。在欧洲，其死亡率也位居癌症死亡率的第 3 位。在中国，随着老龄化时代的到来、饮食习惯的变化，前列腺癌的发病率和死亡率呈现逐年上升趋势，增长速度超过欧美。在前列腺癌诊治过程中，如何早期发现肿瘤，以及对前列腺癌患者进行准确的分期、分级判断对于治疗方案制定和预后及时评估都有着重要的意义。由于前列腺癌的肿瘤异质性，超声和 MRI 等常规的影像检查方法不能对疾病的分期尤其治疗后复发再分期进行有效地评估^[2-3]。近年来，随着分子影像技术不断发展，针对肿瘤特异性生物靶点和代谢途径的特点，进行精准诊断和临床分期，受到研究者和临床专家的重视和认可。神经降压素 (Neurotensin, NT) 是一种由 13 个氨基酸组成的神经内分泌肽，有降压、镇痛、刺激垂体腺分泌激素、降低体温、调节情绪、调节胃肠等功能。近年的研究表明^[4]，NT 在多种肿瘤组织和细胞中有高表达，NT 及其主要受体 NTR1 介导的信号途径对于肿瘤的发生和发展进程有明显的促进作用。NT 有 3 种受体，神经降压素受体 1 (NTR1)、神经降压素受体 2 (NTR2) 和神经降压素受体 3 (NTR3)，其中 NTR1 被证明在前列腺癌高表达，而在相应正常前列腺组织中则很少表达^[5-6]，此外，NT 通过 NTR1 发挥其促肿瘤增殖作用，

且 3 种受体中 NTR1 与配体 NT 的亲合力最强。本研究制备一种靶向 NTR1 的新型 PET 分子显像剂 ^{18}F -NT，用前列腺癌细胞特异性结合实验和荷瘤裸鼠生物分布实验，来验证其对 NTR1 的靶向性，为今后的前列腺癌个体化靶向在体显像及治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和实验动物

人前列腺癌细胞系 PC3 细胞购于中国科学院上海细胞库，裸鼠购自湖南斯莱克景达公司。

1.2 设备与试剂

1.2.1 设备 Qilin 回旋加速器 (美国通用电气公司)，Fastlab FN 型正电子药物合成模块 (美国通用电气公司)，1260 型高效液相色谱仪、Biocan Flow Count 放射性检测器、紫外检测器 (美国 Agilent 公司)，Bioscan system 2000 型薄层色谱扫描仪 (美国 Bioscan 公司)，HH6603 型 γ 放射免疫分析仪 (北京核海高技术有限公司)，EX125DZH 型电子天平 (常州奥豪斯仪器有限公司)。

1.2.2 试剂和材料 NT (前体) (美国北卡罗来纳大学惠赠)，乙腈 (美国 TEDIA 公司)，QMA (Sep Pak Light)、C18 (Sep Pak Plus) (美国 Waters 公司)，色谱柱 [德国 MN 公司 VP NUCLEOSIL 100-7-C18 (5 μm , 16 \times 250 mm)]，Millex GS 0.22 μm 除菌过滤器 (美国 Millipore 公司)，RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司)，磷酸盐缓冲液 (PBS) (武汉博士德生物技术有限公司)，其余试剂均为国产。

1.3 实验方法

1.3.1 ^{18}F -NT 的制备 取 300 μg 前体 NT 用 1 ml 乙腈溶解, 加入 500 μl pH=4 的醋酸缓冲液和 30 μl 2 mmol 氯化铝 AlCl_3 后转移到模块反应管中。 ^{18}F - (700 mCi) 经 0.3 ml 0.9% 氯化钠 NaCl 溶液淋洗到反应管后 80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 随后体系经 HPLC 纯化(30% 乙腈) 并收集产品峰至中转瓶, 最后再经固相萃取取得最终无色澄清产品注射液 (60 mCi)。

1.3.2 ^{18}F -NT 的质控 用 pH 试纸检测 ^{18}F -NT 的 pH 值。取 0.5 ml 稀释后的产品溶液 (0.2 mCi) 和 0.5 ml NT 前体溶液分别置于不同的进样瓶中, 用 HPLC 法分析产品纯度, 以 0.1% TFA、30 : 70 (体积比) 的乙腈 : 水体系做流动相为 30% 乙腈溶液。

1.4 细胞实验

1.4.1 细胞培养 将人前列腺癌细胞 PC3 置于 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基的培养瓶中, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱常规传代培养。实验前以 1×10^5 个 / 孔将细胞种入 12 孔板中, 每孔加 2 ml RPMI 1640 培养液继续培养。

1.4.2 细胞结合实验 取培养 PC3 细胞的 12 孔板, 每孔约含 1×10^6 个的对数生长期细胞, 做 PC3 的 ^{18}F -NT 细胞结合实验。分 3 组, 每组 3 个复孔, 分别为实验组、阻断组和对照组 (游离 ^{18}F 离子)。具体步骤如下: ① 培养板中的细胞去上清液, 用 PBS 洗涤 3 次。② 每孔加 0.5 ml 培养液, 阻断组加入浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NT 0.2 ml, 其他两组加 0.2 ml PBS 缓冲液, 室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。③ 实验组、阻断组分别加入放射性活度浓度为 0.185 MBq/ml 的 ^{18}F -NT 4 ml, 对照组加入同等放射性活度浓度的游离 ^{18}F 4 ml, 每孔放射性活度 0.74 MBq, 室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min。④ 吸取上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 以去除细胞外放射性物质。洗涤完毕后, 每孔加入 1 mol/ml 的 NaOH 0.5 ml 裂解细胞, 将每孔物质移入试管。⑤ 用 γ 计数器读取每管放射性计数值。

1.5 动物实验

1.5.1 复制动物模型 将处于对数生长期的 PC3 (细胞消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度接近于 1×10^7 个 / ml) 接种 0.2 ml 于裸鼠颈背部皮下, 待肿瘤直径 0.8 ~ 1.0 cm 时用于生物学分布实验。

1.5.2 ^{18}F -NT 生物学分布 实验 6 只 PC3 荷瘤裸鼠, 随机分成两组 (每组 3 只), 实验组尾静脉注射 0.2 ml 生理盐水, 阻断组尾静脉注射 0.2 ml 的 NT, 30 min 后每

只裸鼠尾静脉注射浓度为 37 MBq/ml 的 ^{18}F -NT 0.2 ml。1 h 后摘除眼球取血, 用脱臼法处死小鼠。分离肿瘤、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、小肠、肌肉、骨、肺、脑等器官组织, 分别称重, 测定放射性计数, 计算 %ID/g。

1.5.3 HE 染色 将分离出的 PC3 肿瘤组织以及湘雅医院病理科所取正常前列腺组织, 用中性甲醛固定, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后切片, 对切片行常规 HE 染色。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 符合正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ^{18}F -NT 质量控制及稳定性

HPLC 分析结果显示, ^{18}F -NT 的出峰时间为 14 min, 标记率为 8.6%, 标记后 6 h 放化纯仍高达 99%。

2.2 ^{18}F -NT 细胞结合实验结果

孵育 1 h 后, PC3 细胞系 1 h ^{18}F -NT 计数值: 实验组 ($5\,825.00 \pm 1\,074.52$) /min, 阻断组 ($1\,941.66 \pm 173.58$) /min, 对照组 (170.33 ± 56.59) /min。实验组是阻断组的 3 倍, 两组间比较的差异有统计学意义 ($t=7.227$, $P=0.003$)。实验组约是对照组的 34.34 倍, 两者间比较差异有统计学意义 ($t=9.102$, $P=0.001$)。

2.3 ^{18}F -NT 在荷瘤小鼠体内的生物分布

两组在注射 ^{18}F -NT 后 1 h 的生物学分布显示 (见表 1): 实验组、阻断组的血液摄取值分别为 (0.10 ± 0.06) 和 (0.14 ± 0.11) %ID/g, 在两组中均较低, 说明 ^{18}F -NT 在血液中清除快。肾脏摄取较高, 实验组和阻断组分别为 (0.84 ± 0.20) 和 (0.76 ± 0.46) %ID/g, 表明该标志物主要经肾脏排泄。实验组肿瘤和阻断组移植瘤放射性摄取差异明显, 分别为 (1.02 ± 0.49) 和 (0.21 ± 0.03) %ID/g, 差异有统计学意义 ($t=2.815$, $P=0.049$)。 ^{18}F -NT 在其他各正常组织器官的分布均低于肿瘤 (见图 1 和表 2)。表 2 中, 肿瘤 / 肾脏的 T/NT 值为 (1.29 ± 0.83), 因为放射性药物从肾脏排出。肿瘤与其余各正常组织器官的比值 T/NT 均大于 6, 其中肿瘤 / 肌肉的 T/NT 为 (6.97 ± 1.44), 说明注射后 1 h 的放射性本底较低; 肿瘤 / 脑的 T/NT 最高, 为 (38.27 ± 19.9), 说明脑组织摄取最少。

表 1 瘤鼠体内注射 ¹⁸F-NT 后 1 h 体内分布 (n=3, %ID/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	血液	心脏	肝脏	脾脏	肾脏
实验组	0.10 ± 0.06	0.10 ± 0.10	0.06 ± 0.007	0.05 ± 0.01	0.84 ± 0.20
阻断组	0.14 ± 0.11	0.08 ± 0.05	0.08 ± 0.07	0.16 ± 0.24	0.76 ± 0.46
t 值	-0.489	0.283	-0.642	-0.831	0.279
P 值	0.650	0.791	0.556	0.453	0.794

组别	肌肉	骨	肠	脑	肺	肿瘤
实验组	0.15 ± 0.07	0.16 ± 0.14	0.18 ± 0.069	0.03 ± 0.019	0.13 ± 0.03	1.02 ± 0.49
阻断组	0.09 ± 0.11	0.06 ± 0.04	0.17 ± 0.22	0.04 ± 0.07	0.23 ± 0.10	0.21 ± 0.03
t 值	0.71	1.241	0.083	-0.315	-1.584	2.815
P 值	0.517	0.282	0.938	0.769	0.188	0.049

注: %ID/g 经时间衰减校正

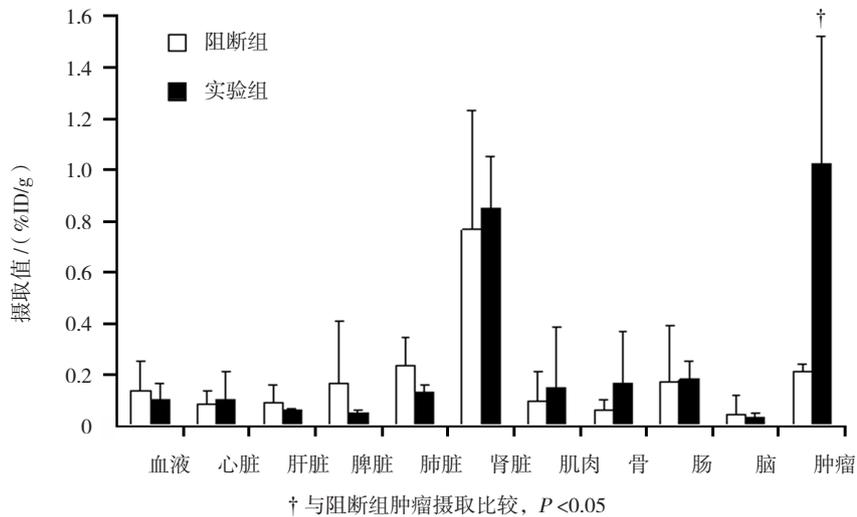


图 1 荷瘤鼠体内注射 ¹⁸F-NT 后 1 h 体内分布经时间衰减校正

表 2 肿瘤与各正常器官组织对 ¹⁸F-NT 摄取的比值

项目	T/NT 值	项目	T/NT 值
血液	10.87 ± 3.04	肾脏	1.29 ± 0.83
心脏	14.60 ± 8.36	肌肉	6.97 ± 1.44
肝脏	16.29 ± 7.07	骨	7.19 ± 2.14
脾脏	21.61 ± 8.62	肠	6.84 ± 2.42
肺脏	8.71 ± 3.12	脑	38.27 ± 19.91

注: T/NT 为实验组中肿瘤与各组织摄取 ¹⁸F-NT 的比值

2.4 肿瘤 HE 染色

常规 HE 染色, 正常人前列腺组织见图 2, PC3 荷瘤鼠肿瘤组织见图 3。

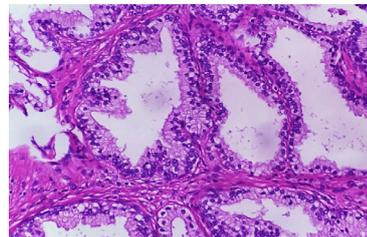


图 2 正常人前列腺病理检查结果 (HE × 200)

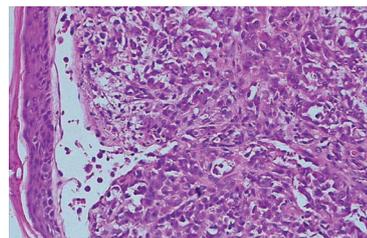


图 3 裸鼠 PC3 肿瘤病理检查结果 (HE × 200)

3 讨论

前列腺癌的诊断、分期, 尤其是治疗后生化复发的影像学证据, 决定患者的治疗方案, 目前还没有十分满意的特异性诊断手段。研究表明^[7], NTR1 在正常的前列腺细胞中不表达, 而在前列腺癌中表达。SEHGAL 等^[8]研究表明, 在缺乏雄激素的晚期前列腺癌中, NT/NTR 能促进肿瘤的生长。在 TAYLOR 等^[9]的细胞实验中, 随着前列腺癌细胞致瘤潜力的增加, NTR1 的表达也随之增加。有学者^[10]证实, 在前列腺癌细胞系 PC3 有 NTR1 的过表达, SUTHERLAND 等^[11]研究也表明, NTR1 在前列腺癌细胞系 PC3 有过度表达。因此 NTR1 有可能成为新型显像靶点。本研究临床常用的核素 ^{18}F 标记与 NTR1 特异性结合的 NT, 制作完成正电子显像剂, 通过细胞结合实验, 结果显示, PC3 细胞实验组对 ^{18}F -NT 的摄取计数值为 5 825/min, 阻断组的摄取计数值为 1 941/min, 对照组的摄取计数值为 170/min, 说明前列腺癌 PC3 细胞对 ^{18}F -NT 有极强的摄取能力, 且该摄取能力可被未标记的 NT 有效阻断, 说明 NT 与 NTR1 之间的结合是特异性的。

两组荷瘤鼠在注射 ^{18}F -NT 后 1 h, 血液摄取值较低 [实验组 (0.10 ± 0.06) %ID/g, 阻断组 (0.14 ± 0.11) %ID/g], 说明 ^{18}F -NT 在血液中清除较快, 血本底很低。心脏、肝脏、脾脏、肺、肠、脑等脏器的摄取值与血本底接近。肾脏药物积聚较多 [实验组 (0.84 ± 0.20) %ID/g, 阻断组 (0.76 ± 0.46) %ID/g], 说明 ^{18}F -NT 主要通过肾脏排泄。两组移植瘤中, 阻断组摄取值 [(0.21 ± 0.03) %ID/g] 大大低于实验组 [(1.05 ± 0.46) %ID/g], 表明 NT 能有效阻断组 ^{18}F -NT 的摄取, 进一步说明 ^{18}F -NT 与 NTR1 之间的结合特异性。综上所述, ^{18}F -NT 对于前列腺癌将是一个理想的特异性靶向显像剂, 尤其可以作为雄激素非依赖型前列腺癌原发灶、转移灶的显像诊断的一种新型分子探针。

本研究中, ^{18}F -NT 制备步骤简单, 放化纯度高, 体外稳定性好。综合细胞结合实验和荷瘤鼠生物分布实验分析, 笔者认为, ^{18}F -NT 对 NTR1 有较好的特异性, 在移植瘤中的摄取较高, 其 T/TN 值较高, 1 h 后肿瘤摄

取值甚至比肾脏还高, 可为后续前列腺癌 (包括非雄激素依赖前列腺癌转移) 的动物 PET 显像以及临床 PET 显像研究提供实验依据, 为远期的前列腺癌临床分期与再分期以及治疗方案制定与调整提供帮助。

参 考 文 献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] KIRBY R. Optimising the management of early prostate cancer[J]. Practitioner, 2014, 258(1770): 15-18.
- [3] 李颖, 张彤迪, 宋奕宁, 等. 经直肠超声与磁共振显像对前列腺癌诊断价值的对比研究 [J]. 中华超声影像学杂志, 2010, 19(6): 549-550.
- [4] DUPOUY S, MOURRA N, DOAN V K, et al. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers[J]. Biochimie, 2011, 93(9): 1369.
- [5] VALERIE N C, CASAREZ E V, DASILVA J O, et al. Inhibition of neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation[J]. Cancer research, 2011, 71(21): 6817.
- [6] ELEK J, PINZON W, PARK K H, et al. Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer[J]. Anticancer Res, 2000, 20: 53-58.
- [7] SWIFT S L, BURNS J E, MAITLAND N J. Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer[J]. Cancer Research, 2010, 70(1): 347-56.
- [8] SEHGAL I, POWERS S, HUNTLEY B, et al. Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(11): 4673-4677.
- [9] TAYLOR R M, SEVERNS V, BROWN D C, et al. Prostate cancer targeting motifs: expression of $\alpha\beta3$, neurotensin receptor 1, prostate specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in human prostate cancer cell lines and xenografts[J]. Prostate, 2012, 72(5): 523-532.
- [10] AMORINO G P, DEEBLE P D, PARSONS S J. Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat 5b pathway[J]. Nature Publishing Group, 2007, 26: 745-756.
- [11] SUTHERLAND M, GORDON A, SHNYDER S D, et al. RGD-binding integrins in prostate cancer: expression patterns and therapeutic prospects against bone metastasis[J]. Cancers (Basel), 2012, 4(4): 1106-1145.

(张蕾 编辑)