

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.02.001
文章编号: 1005-8982(2020)02-0001-05

基础研究·论著

¹¹C-AZD9291 分子探针检测肺癌 EGFR 19del 突变的实验研究*

刘佳¹, 马进安¹, 张锦明², 赵颜忠³, 罗丹静², 张晓军²,
付华平², 阙凯琳¹, 韩宸¹, 张颖¹

(1. 中南大学湘雅二医院 肿瘤科, 湖南 长沙 410011; 2. 中国人民解放军 301 医院 核医学科, 北京 100039; 3. 中南大学湘雅三医院 医学实验中心, 湖南 长沙 410013)

摘要: **目的** 从动物实验探索 ¹¹C-AZD9291 作为 PET/CT 示踪剂检测肺癌 EGFR 19del 突变的可行性。**方法** 将普通昆明小鼠随机分组并尾静脉注射 ¹¹C-AZD9291, 分别于不同时间点取不同小鼠器官并计算放射性摄取率。选取 EGFR 19del 突变的 HCC827、EGFR 野生型 A549 肺腺癌细胞株并复制肺癌裸鼠模型, 挑选合格的 HCC827 荷瘤鼠 6 只分为实验组和阻断组。实验组尾静脉注射 ¹¹C-AZD9291; 阻断组同时注射阻断剂厄洛替尼标准品和 ¹¹C-AZD9291, 另取 3 只 A549 荷瘤鼠尾静脉注射 ¹¹C-AZD9291 作为对照组, 20 min 后行 micro-PET 动物活体显像与分析。**结果** 普通昆明小鼠中 ¹¹C-AZD9291 在肝脏中放射性摄取率最高, 其次为肾脏、肺, 5 min 时血、肝、肾、肺、心及肌肉放射性摄取率较 15 min 时高 ($P < 0.05$)。实验组标准摄取值高于对照组和阻断组 ($P < 0.05$)。**结论** ¹¹C-AZD9291 是一种可行的检测肺癌 EGFR 19del 突变的分子探针。

关键词: 肺肿瘤; ¹¹C-AZD9291/ 分子探针; 放射性

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Experimental study on the detection of EGFR 19del mutation in lung cancer by ¹¹C-AZD9291 molecular probe*

Jia Liu¹, Jin-an Ma¹, Jin-ming Zhang², Yan-zhong Zhao³, Dan-jing Luo², Xiao-jun Zhang²,
Hua-ping Fu², Kai-lin Que¹, Chen Han¹, Ying Zhang¹

(1. Department of Oncology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China; 2. Department of Nuclear Medicine, PLA 301 Hospital, Beijing 100039, China; 3. Medical Laboratory Center, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of ¹¹C-AZD9291 as a Micro PET-CT tracer for the detection of EGFR 19del mutation in lung cancer at the level of experimental animals. **Methods** The normal Kunming mice were injected with ¹¹C-AZD9291 via tail vein, and were executed at different time points. The radioactive counting (%ID/g) was calculated for multiple organs of the mice. Lung adenocarcinoma cell lines HCC827 (EGFR 19del mutation) and A549 (EGFR wild-type) were used to construct the nude mouse models of lung cancer. Six eligible nude mice with HCC827 tumor were selected, and were divided into experimental group and blocking group. In the experimental group, ¹¹C-AZD9291 was injected into the tail vein. The blocking group was injected with erlotinib and ¹¹C-AZD9291

收稿日期: 2019-07-25

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81771896)

[通信作者] 马进安, E-mail: 3420248369@qq.com; Tel: 13973192715

simultaneously. Other three nude mice transplanted with A549 was injected ^{11}C -AZD9291 via tail vein as EGFR wild-type control group. After 20min, animal in-vivo imaging and analysis were performed by micro-pet (Explore Vista, GE). The independent-samples T test and one way ANOVA were used for statistical analysis. **Results** Kunming mice had the highest radiation uptake rate of ^{11}C -AZD9291 in the liver, followed by kidney and lung. The radiation uptake rate in each organ at time point of 5min was higher than that at 15min ($P < 0.05$). And the radiation uptake rate in experiment group was higher than that in blocking group or control group. **Conclusions** At the level of experimental animals, ^{11}C -AZD9291 is a good specific molecular probe for the detection of EGFR 19del mutation in lung cancer.

Keywords: lung neoplasms; ^{11}C -azd9291/molecular probes; radiation

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKIs) 吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼及奥希替尼 (AZD9291) 治疗 EGFR 突变的晚期非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 疗效超越了传统化疗^[1-4]。约 20% 肺癌患者难以获得组织学病理及突变基因检测, 基于 EGFR 特异性分子探针的正电子发射断层扫描 (positron emission tomography, PET) 可鉴定 EGFR 突变。AZD9291 能与突变 EGFR 特异性结合, 理论上核素 ^{11}C 标记的 AZD9291 (^{11}C -AZD9291) 可作为检测 EGFR 突变的特异性分子探针^[5]。本研究拟从实验动物水平验证 ^{11}C -AZD9291 检测 19del 突变 EGFR 蛋白的可行性。

1 材料与方法

1.1 设备、试剂和动物

^{11}C -AZD9291 通过国产 PET 自动化 ^{11}C 多功能合成模块来合成, ^{11}C -CH₃-Triflate 与 N-去甲基 AZD9291 在碱性条件下反应, 经高效液相色谱法纯化和固相萃取得 ^{11}C -AZD9291。孵箱购自北京傲松欣实验室设备有限公司, 12 孔板购自上海拜力科技有限公司, 异氟烷购自华中海威 (北京) 基因科技有限公司, A549、HCC827 肺腺癌细胞株购自中国科学院上海细胞库; 普通昆明小鼠 15 只购自中国人民解放军总医院动物中心, BALB/c 裸鼠 9 只购自中国科学院动物研究所 (北京), 厄洛替尼标准品购自上海甄准生物科技有限公司, Explore Vista micro-PET/CT 成像及分析系统购自美国 GE 公司。

1.2 普通昆明小鼠体内 ^{11}C -AZD9291 的生物学分布

普通昆明小鼠尾静脉注射 $300\mu\text{Ci}$ 的 ^{11}C -AZD9291, 分别于 5、15 及 30 min 时处死 5 只。称取小鼠血、

心及肝等重量并计算出每克组织摄取 ^{11}C -AZD9291 注射剂量的百分数。

1.3 荷瘤鼠 micro-PET/CT 显像

取正常传代培养的人肺腺癌细胞株 HCC827 (EGFR 19del 突变) 和 A549 (EGFR 野生型), 常规培养后制成单细胞悬液 (5×10^6 个/ml), 取 0.2 ml 皮下接种于 BALB/c 裸鼠上肢。接种 2 ~ 4 周后将 6 只肿瘤大小合适 (直径 5 ~ 10 mm) 的 HCC827 荷瘤鼠分成实验组和阻断组, 每组 3 只。实验组: 尾静脉注射 2 mCi ^{11}C -AZD9291 (0.21 Ci/kg) 后, 异氟烷气体麻醉固定, 20 min 后进行 micro-PET 动物活体显像与分析。阻断组: 尾静脉同时注射阻断剂厄洛替尼标准品 (50 mg/kg) 和 2 mCi ^{11}C -AZD9291, 20 min 后进行动物活体显像与分析。3 只 A549 荷瘤鼠尾静脉注射 2 mCi ^{11}C -AZD9291 作为对照组, 同上述方法进行动物活体显像与分析。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或随机区组设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

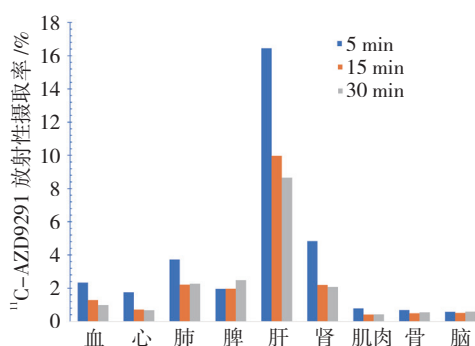
2 结果

2.1 普通昆明小鼠血液及各组织器官不同时间的放射性摄取率比较

普通昆明小鼠经尾静脉注射 ^{11}C -AZD9291 后, 血液放射性摄取量随着时间延长迅速清除, 在 30 min 时下降至最低。除血液外, ^{11}C -AZD9291 在普通昆明小鼠体内的分布主要在肝、肾及肺, 而骨、肌肉及脑则摄取相对较低。5、15 和 30 min 时血、肝、肾、肺、心及肌肉放射性摄取率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 5 min 较 15 min 高 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 普通昆明小鼠血液及各组织器官不同时间的放射性摄取率比较 ($n=5$, %, $\bar{x} \pm s$)

标本	5 min	15 min	30 min	F 值	P 值
血	2.344 ± 0.382	1.285 ± 0.386	0.984 ± 0.152	19.245	0.000
心	1.750 ± 0.248	0.715 ± 0.099	0.682 ± 0.097	23.591	0.000
肺	3.727 ± 0.792	2.220 ± 0.242	2.267 ± 0.250	14.698	0.001
脾	1.957 ± 0.294	1.963 ± 0.633	2.482 ± 0.302	2.354	0.137
肝	16.443 ± 3.816	9.964 ± 2.403	8.650 ± 0.339	93.657	0.000
肾	4.845 ± 0.775	2.207 ± 0.168	2.075 ± 0.208	54.513	0.000
肌肉	0.790 ± 0.043	0.410 ± 0.050	0.421 ± 0.046	32.804	0.000
骨	0.693 ± 0.177	0.494 ± 0.081	0.550 ± 0.115	3.077	0.083
脑	0.580 ± 0.061	0.511 ± 0.095	0.592 ± 0.026	1.955	0.184

图 1 普通昆明小鼠血液及各组织器官 ^{11}C -AZD9291 的生物分布 ($n=5$)

2.2 荷瘤鼠 micro-PET/CT 显像

实验组荷瘤鼠尾静脉注射 ^{11}C -AZD9291 20 min 后 micro-PET/CT 成像显示, 接种肿瘤区存在明显放射性

浓聚; 对照组瘤荷鼠尾静脉注射 ^{11}C -AZD9291 20 min 后 micro-PET/CT 成像显示接种肿瘤区仅轻度放射性浓聚。实验组荷瘤鼠标准摄取值 (standard uptake value, SUV) 为 (5.20 ± 0.137), 对照组为 (2.60 ± 0.066), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=29.566$, $P=0.000$), 实验组高于对照组。见图 2。

2.3 荷瘤鼠阻断后 micro-PET/CT 显像

阻断组荷瘤鼠尾静脉同时注射阻断剂厄洛替尼和 ^{11}C -AZD9291 20 min 后 micro-PET/CT 成像显示, 接种肿瘤区仅轻度放射性浓聚。实验组荷瘤鼠 SUV 为 (5.20 ± 0.137), 阻断组为 (2.10 ± 0.089), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=32.799$, $P=0.000$), 实验组高于阻断组。见图 2。

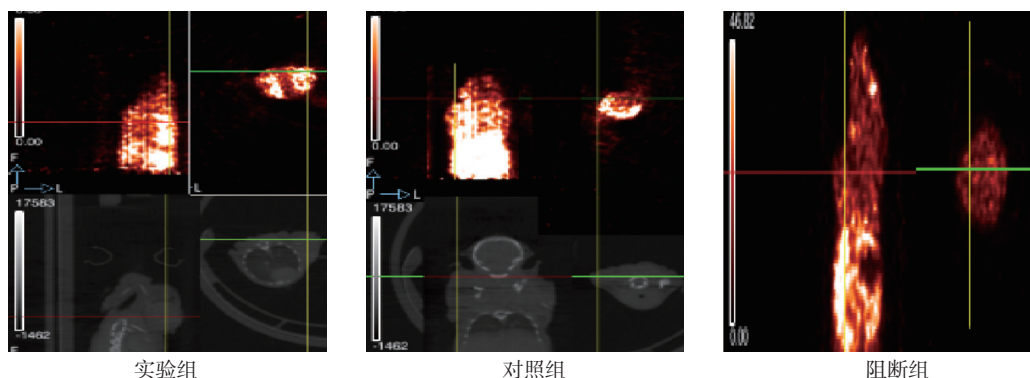


图 2 各组荷瘤鼠 micro-PET/CT 显像

3 讨论

核医学 PET 成像技术是一种非侵入性和高度敏感的检测方法, 可以对体内靶向分子的表达进行定性及定量分析, 研发出合适的放射性示踪剂是实施此检测技术的关键。第一、二代 EGFR-TKIs 在人体内既

能与敏感突变的 EGFR 结合, 也能与野生的 EGFR 结合, 以其为基础的分子探针, 如 ^{11}C -吉非替尼、 ^{18}F -吉非替尼、 ^{11}C -厄洛替尼及 ^{18}F -阿法替尼等均为非特异性探针, 能够检测 EGFR 蛋白表达水平, 但特异性识别肿瘤组织 EGFR 突变的作用较差^[6-13]。 ^{11}C -厄

洛替尼能有效地检测 EGFR 突变,但也存在着本底摄取较高、正常组织显影的问题。第三代 EGFR-TKIs 产品 AZD9291 (奥希替尼)可与存在 19del、L858R、T790M 等突变的 EGFR 蛋白不可逆特异性结合,与突变型 EGFR 的结合力是野生型的 40 倍,具有较高的靶/本比。使用同位素标记 AZD9291,并将其作为 PET-CT 示踪剂检测肺癌组织中 EGFR 突变蛋白状态是一项非常有意义的探索。

本研究结果显示, ^{11}C -AZD9291 在实验组荷瘤鼠移植瘤区呈放射性浓聚,而周围组织无或轻度摄取,对照组则显示轻度放射性浓聚,实验组 SUV 高于对照组。这说明 ^{11}C -AZD9291 分子探针能与 19del 突变的 EGFR 蛋白特异性结合。阻断组移植瘤区仅出现轻度放射性浓聚,实验组 SUV 高于阻断组。这说明在裸鼠模型中 ^{11}C -AZD9291 能特异性结合移植瘤中 19del 突变的 EGFR 蛋白,并且能被厄洛替尼阻断,证明 ^{11}C -AZD9291 可用于检测体内 EGFR 的 19del 突变状态。结合本文所做的细胞学实验结果,说明 ^{11}C -AZD9291 作为载体特异性分子探针检测 EGFR 蛋白 19del 突变是可行的。

通过分析普通昆明小鼠血液及各器官的 ^{11}C -AZD9291 的生物学分布,笔者发现 ^{11}C -AZD9291 在肝脏的放射摄取值最高,并随时间推移迅速下降,说明 ^{11}C -AZD9291 的代谢可能是通过肝脏的快速清除实现的,这与其他 EGFR-TKIs 分子探针的代谢机制相类似^[14-16]。肝脏对 ^{11}C -AZD9291 摄取率最高,其次为肾、肺,这可能是由于野生型 EGFR 在正常组织中也有一定表达,也会影响 ^{11}C -AZD9291 对 EGFR19del 突变人肺癌的肝脏、肾脏转移灶的显影^[17]。大脑的放射性摄取率较低可能与正常脑组织中 EGFR 表达水平低有关^[18]。

本研究仍存在不足,例如 ^{11}C -AZD9291 探针不能区分 EGFR 突变的类型,只能通过检测肿瘤与探针结合的能力,间接反映是否存在 EGFR 突变。所用标记核素 ^{11}C 的半衰期过短,不适合临床的广泛应用。本研究的动物实验证实 ^{11}C -AZD9291 分子探针对于存在 19del 突变的 EGFR 蛋白具有较好的特异性结合能力。 ^{11}C -AZD9291 分子探针能否示踪存在 L858R、T790M 等突变的 EGFR 蛋白,后续将进一步研究。

参 考 文 献:

[1] MOK T S, WU Y L, THONGPRASERT S, et al. Gefitinib or

carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.

- [2] ZHOU C, WU Y L, CHEN G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(8): 735-742.
- [3] YANG J C, WU Y L, SCHULER M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(2): 141-151.
- [4] GOSS G, TSAI C M, SHEPHERD F A, et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(12): 1643-1652.
- [5] FINLAY MR V, ANDERTON M, ASHTON S, et al. Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(20): 8249-8267.
- [6] ZHANG M R, KUMATA K, HATORI A, et al. [^{11}C] Gefitinib ([^{11}C] Iressa): radiosynthesis, in vitro uptake, and in vivo imaging of intact murine fibrosarcoma[J]. *Mol Imaging Biol*, 2010, 12(2): 181-191.
- [7] 张锦明, 朱虹, 张晓军, 等. ^{11}C -Gefitinib 自动化合成及 Micro PETCT 显像 [J]. *核技术*, 2012, 35(9): 709-714.
- [8] SU H, SEIMBILLE Y, FERL G Z, et al. Evaluation of [^{18}F] gefitinib as a molecular imaging probe for the assessment of the epidermal growth factor receptor status in malignant tumors[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35(6): 1089-1099.
- [9] MEMON A A, JAKOBSEN S, DAGNAES-HANSEN F, et al. Positron emission tomography (PET) imaging with [^{11}C] labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 873-878.
- [10] ABOURBEH G, ITAMAR B, SALNIKOV O, et al. Identifying erlotinib-sensitive non-small cell lung carcinoma tumors in mice using [^{11}C] erlotinib PET[J]. *EJNMMI Res*, 2015, 5(1): 4.
- [11] PETRULLI J R, SULLIVAN J M, ZHENG M Q, et al. Quantitative analysis of [^{11}C] Erlotinib PET demonstrates specific binding for activating mutations of the EGFR kinase domain[J]. *Neoplasia*, 2013, 15(12): 1347-1353.
- [12] MEMON A A, WEBER B, WINTERDAHL M, et al. PET imaging of patients with non-small cell lung cancer employing an EGF receptor targeting drug as tracer[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(12): 1850-1855.
- [13] SLOBBE P, WINDHORST A D, STIGTER-van WALSUM M, et al. A comparative PET imaging study with the reversible and irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitors [^{11}C] erlotinib and [^{18}F] afatinib in lung cancer-bearing mice[J]. *EJNMMI Res*,

- 2015, 5(1): 1-12.
- [14] ORTU G, BEN-DAVID I, ROZEN Y, et al. Labeled EGFr-TK irreversible inhibitor (ML03): in vitro and in vivo properties, potential as PET biomarker for Cancer and feasibility as anticancer drug[J]. *Int J cancer*, 2002, 101(4): 360-370.
- [15] BONASERA T A, ORTU G, ROZEN Y, et al. Potential (18) F-labeled biomarkers for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase[J]. *Nucl Med Biol*, 2001, 28(4): 359-374.
- [16] PAL A, GLEKAS A, DOUBROVIN M, et al. Molecular imaging of EGFR kinase activity in tumors with 124I-labeled small molecular tracer and positron emission tomography[J]. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging*, 2006, 8(5): 262-277.
- [17] REAL F X, RETTIG W J, CHESA P G, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(9): 4726-4731.
- [18] LIU T F, TATTER S B, WILLINGHAM M C, et al. Growth factor receptor expression varies among high-grade gliomas and normal brain: epidermal growth factor receptor has excellent properties for interstitial fusion protein therapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(8): 783-787.

(李科 编辑)