

· 基础研究 ·

^{68}Ga -DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂靶向卵巢癌及其腹腔转移灶显像的实验研究

蒋翠萍¹, 赵宇², 刘子君³, 施雪松³, 付晶晶¹, 王峰¹, 邵国强^{1*}¹南京医科大学附属南京医院核医学科, 江苏 南京 210006, ²南京医科大学影像学教研室, 江苏 南京 211166, ³南京医科大学附属南京医院普外科, 江苏 南京 210006

[摘要] 目的:制备 ^{68}Ga -1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-赖氨酸-聚乙二醇-赖氨酸叶酸二聚体[^{68}Ga -DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂],简称 ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂,并研究其用于卵巢癌及腹腔转移灶靶向显像的价值。方法:合成 ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂并考察其体外理化特性,构建皮下荷人卵巢癌(SKOV3)及其腹腔转移灶裸鼠模型。设立叶酸受体阻断组、荷人肺癌(A549:叶酸受体表达阴性)裸鼠阴性对照组及空白对照组。考察 ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂体内生物学分布,皮下荷瘤鼠在显像剂尾静脉给药后120 min行microPET检查、腹腔转移荷瘤鼠在显像剂尾静脉给药后60 min行microPET-CT显像。结果: ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂放射化学纯度为(96.30±1.28)%,体外稳定性好,叶酸受体亲和实验IC₅₀为17.1 nmol/L,辛醇/水分配系数(lg P)为-1.89。尾静脉注射后120 min,卵巢癌皮下肿瘤放射性摄取达到峰值,可被过量叶酸有效阻断,其在血液、心及肺中清除迅速,肝脏摄取少,主要通过肾脏排泄,培美曲塞预注射有效加快其在肾脏的排泄。microPET显像提示皮下卵巢癌肿瘤放射性摄取明显高于叶酸受体阻断组和阴性对照组。microPET-CT显像提示腹腔转移灶放射性摄取明显高于空白对照组。结论: ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂能靶向聚集在叶酸受体高表达的肿瘤部位,是卵巢癌及其腹腔转移灶显像的良好显像剂。

[关键词] 叶酸二聚体;叶酸受体; ^{68}Ga ;分子显像;腹腔转移**[中图分类号]** R737.31**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)03-348-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20200309

Experimental study on ^{68}Ga -DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂ targeted imaging of ovarian cancer and peritoneal metastases

JIANG Cuiping¹, ZHAO Yu², LIU Zijun³, SHI Xuesong³, FU Jingjing¹, WANG Feng¹, SHAO Guoqiang^{1*}¹Department of Nuclear Medicine, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006;²Imaging Teaching and Research Office, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ³Department of General Surgery, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to prepare ^{68}Ga -DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂ (^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂) and investigate the value of ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂ for targeted imaging of ovarian cancer and peritoneal metastasis. **Methods:** Characteristics of ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂ was investigated *in vitro* after its preparation. A nude mouse model of subcutaneous human ovarian cancer (SKOV3) and its peritoneal metastasis was established to investigate the biodistribution of ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂ *in vivo*. The receptor blocking group, the negative control group of human lung cancer (A549) and blank control group were set up. The microPET imaging was performed at 120 min (in mice bearing subcutaneous tumor xenograft) and microPET-CT imaging was performed at 60 min (in mice bearing peritoneal metastases) after tail vein administration. **Results:** ^{68}Ga -DOTA-2P-FA₂ was stable *in vitro* with radiochemical purity of (96.30±1.28)%. Folate receptor affinity (IC₅₀) was 17.1 nmol/L. Octanol/water partition coefficient (lg P) was -1.89. Radioactivity uptake of subcutaneous ovarian cancer reached a peak at 120 min after tail vein injection, which could be effectively blocked by overdose free folic acid. It could be removed rapidly in blood, heart and lung, generating a low uptake in liver, and mainly excreted through kidney.

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81301247);南京市杰出青年基金项目(JQX14009);江苏省“科教强卫工程”青年医学人才(QNRC2016075);2019高层次卫生人才“六个一工程”拔尖人才项目(LGY2019005)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoqiangshao@163.com

Pre-injection of pemetrexed could effectively accelerate the excretion of radioactivity in kidney. MicroPET imaging showed radioactivity uptake of subcutaneous ovarian cancer was significantly higher than that of folate receptor blocking group and that of the negative control group. The radioactivity uptake of peritoneal metastases was significantly higher than that of blank control detected by microPET-CT. **Conclusion:** ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂, which accumulated in tumor sites with high expression of folate receptor, was a good imaging agent for ovarian cancer and peritoneal metastases.

[Key words] folate dimer; folate receptor; ⁶⁸Ga; molecular imaging; peritoneal metastases

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03): 348-354]

叶酸受体 α (folate receptor α , FR α)在卵巢癌、子宫内膜癌、脑肿瘤等多数肿瘤细胞表面高表达,其在正常组织中表达水平较低,成为卵巢癌等肿瘤靶向显像和靶向治疗的研究热点^[1-3]。近年来,靶向叶酸受体的核素标记叶酸衍生物具有良好的靶向性和特异性,并逐渐在叶酸靶向显像诊断中受到关注^[4-5],但肿瘤部位摄取相对较低和肾脏部位的浓聚,限制了治疗性核素标记叶酸衍生物的临床转化和应用,如何有效提高叶酸衍生物在肿瘤局部的聚集亟待解决。文献报道,配体二聚体、多聚体在肿瘤部位的特异性靶向聚集明显高于配体单体^[6-8]。本研究合成了主动靶向叶酸受体的⁶⁸Ga-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-赖氨酸-聚乙二醇-赖氨酸叶酸二聚体 [⁶⁸Ga-DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂, 简称⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂], 探讨其体内药代动力学,并考察其对卵巢癌的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞(SKOV3)和人肺癌细胞(A549)由本医院实验中心保存,携带荧光素酶的人卵巢癌细胞 SKOV3-luc-D3 (Bioware Cell Line, PerkinElmer 公司, 美国), 无叶酸 RPMI 1640 培养基 (Fisher Scientific Reserch 公司, 美国), 无叶酸食物 (Envigo 公司, 美国)。荷人卵巢癌(SKOV3)和荷人肺癌(A549)裸鼠模型(雌性, 体重 18~20 g, 8~10 周龄, 瘤体直径 0.8~1.0 cm, 右侧前肢腋窝皮下)和 BALB/c-nu 裸鼠由南京金斯瑞公司提供。⁶⁸Ge-⁶⁸Ga 发生器(ITG 公司, 德国), DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂(吉尔生化公司), micro PET-CT(Siemens 公司, 德国), γ -放射性活度测定仪(Perkin Elmer Wizard-1480, Shelton 公司, 美国)、HPLC 仪(LC-20AT, 岛津公司, 日本), 色谱分析柱 C18 柱(Zorbax Rax-C18 柱, 安捷伦公司, 美国), 荧光显像仪(Xenogen IVIS 200, Xenogen 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂的制备

称取 440 mg 叶酸溶解于 40 mL 二甲基亚砜中, 相继加入 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和琥珀酰亚胺(NHS), 分别冰浴和室温反应过夜, 获得叶酸-NHS 酯, 冻干待用; 通过固相合成法获得 DOTA-K-PEG₂-(K-FA)₂(DOTA-2P-FA₂), 经 HPLC 纯化, 冻干, 使用质谱仪和高效液相色谱仪(HPLC)对目标化合物进行分子量和化学纯度的分析。

1.2.2 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂的制备及体外实验

取 0.25 mL 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)液(1 mol/L, pH 6.8), 分别依次加入 0.01 μ L DOTA-2P-FA₂ 溶液(2 mg/mL)和 1.0 mL 的 ⁶⁸GaCl₃(175 MBq/mL), 95 $^{\circ}$ C 加热反应 15 min, 得到 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂。合成后即取 20 μ L 行 HPLC 检查, 流动相为乙腈水溶液(乙腈:水体积比=50%:50%)。取 0.5 mL 置于 3 mL PBS 溶液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min、60 min、120 min、240 min 后, 通过 HPLC 检查 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂ 在 PBS 溶液中孵育不同时间后的放射化学纯度, 从而考察其体外稳定性。

1.2.3 检测辛醇/水分配系数

取 150 μ L 反应产物加入到 3.85 mL PBS 和 4 mL 1-辛醇的混合体系中, 震荡混匀, 高速离心(5 000 r/min) 5 min 将辛醇有机相和 PBS 无机相分离, 从两相中分别取 100 μ L 进行放射性计数, 获得辛醇/水分配系数(Ig P), 其中 P=(辛醇中放射性计数-本底)/(PBS 中放射性计数-本底)。

1.2.4 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂ 叶酸受体结合实验

取人卵巢癌细胞(SKOV3)调整浓度为 5×10^4 个/mL, 加入 12 孔板, 同时分别加入一定量的 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂ 和不同量(递增)的 DOTA-2P-FA₂, 培养箱内共培养(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂), 弃游离未结合的 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂, 200 μ L 培养基冲洗 3 次, 收集细胞, 通过 γ 放射性计

数仪进行放射性测定,应用GraphPad Prism™通过非线性回归分析计算⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂与人卵巢癌细胞叶酸受体结合的IC₅₀。

1.2.5 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂生物学分布实验

荷人卵巢癌裸鼠30只,实验前进行无叶酸饮食1周,采用抽签法将其随机分为6组,每组5只,第1~5组为非受体阻断组,分别在尾静脉注射0.1 mL (7.4 kBq)⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后5、30、60、120、180 min,通过心脏穿刺取血及进行安乐处死,解剖取重要脏器称湿重,通过γ计数仪进行放射性计数,记录时间并进行放射性衰减校正,计算脏器放射性摄取,即单位质量组织放射性摄取占注射剂量的百分比(percentage of the injected dose per gram of tissue, %ID/g)。第6组为叶酸受体阻断组,即药物注射前预注射过量(100倍显像药物剂量)叶酸,药物注射后120 min处死,实验操作同前。

1.2.6 microPET 显像

荷人卵巢癌(SKOV3:FRα高表达)裸鼠12只,抽签法随机分为常规组、培美曲塞组和叶酸受体阻断组(每组4只)。常规组荷瘤鼠在尾静脉注射0.1 mL (3.7 MBq/0.1 mL)⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后120 min进行microPET显像;培美曲塞组、受体阻断组分别在⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂注射前60 min静脉预注射培美曲塞300 μg(0.1 mL)或提前15 min静脉注射叶酸100 μg(0.1 mL);荷人肺癌(A549:FRα低表达,4只)为阴性对照组,鼠龄10~12周,肿瘤长径(0.6±0.1)cm。所有荷瘤鼠显像前1周开始进行无叶酸饮食,异氟烷吸入麻醉,尾静脉注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂(3.7 MBq/0.1 mL)后120 min,进行microPET显像,图像采集和处理参数:能峰384~638 keV, dead time为3.432 ns,采集时间为5 400 s,重建方法为OSEM3D/MAP迭代重建,利用Inveon Research Workplace进行断层图像分析和逐层勾画肿瘤边界获得感兴趣区(regions of interest, ROI),计算肿瘤放射性标准摄取值(standardized uptake value, SUV)。

1.2.7 卵巢癌腹腔转移灶构建及microPET-CT显像和荧光显像

雌性裸鼠10只,抽签法随机分为两组,每组5只。携带荧光素酶的人卵巢癌细胞(SKOV3-luc-D3)在高糖培养基中培养,指数生长期时收集细胞配制成1×10⁷个/mL浓度备用,取0.1 mL SKOV3-luc-D3细胞(1×10⁷个/mL)分别注射入裸鼠腹腔,构建卵巢癌腹腔转移模型5只,另5只裸鼠分别腹腔注入0.1 mL生理盐水作为空白对照组。模型构建后第10周,两组裸

鼠腹腔注射荧光素钠溶液(D-luciferin,每鼠3 mg、0.2 mL)后10 min,进行荧光显像,显像曝光时间为0.2 s。尾静脉注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂(3.7 MBq/0.1 mL)60 min行microPET-CT显像。图像采集和图像重建同上。

1.3 统计学方法

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析均采用GraphPad Prism 5(GraphPad Software公司,美国)软件完成,两组均数比较采用*t*检验,多组均数的比较采用单因素方差分析,并进行LSD-*t*检验比较组间的差异, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂理化性质

固相合成的DOTA-2P-FA₂通过质谱图检查证实分子结构(图1),⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂放射性比活度为1 600 MBq/mL,放射化学纯度为(96.30±1.28)%。⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂制备后即行HPLC检查可见其出峰时间在9.5 min(图2),⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂制备后在PBS中孵育5、60、120、180 min,放射化学纯度分别为(97.10±2.15)%、(96.50±2.08)%、(95.60±1.92)%、(94.60±2.17)%。⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂叶酸受体亲合实验的IC₅₀为17.1 nmol/L。辛醇/水分配系数(lg P)为-1.89。

2.2 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂荷人卵巢癌裸鼠体内生物学分布

在荷人卵巢癌裸鼠尾静脉注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后,不同时间点体内生物学分布结果(表1)显示,不同时间点肿瘤放射性摄取不完全相同($P=0.004$),其中,120 min(第4组)肿瘤放射性摄取高于60 min(第3组)($P=0.035$),其从血液、心及肺中清除迅速,肝脏摄取少。⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂主要通过肾脏排泄,在不同实验组间肾脏部位放射性分布不完全相同($P=0.009$),120 min(第4组)肾脏放射性摄取高达(70.09±6.45),清除缓慢,180 min(第5组)时仍为(62.01±6.42)。叶酸受体阻断组120 min(第6组)肿瘤部位放射性摄取明显低于非受体阻断组(第4组)($P=0.005$),肾脏部位的放射性分布显著低于非受体阻断组(第4组)($P=0.003$)。

2.3 皮下移植瘤⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂ microPET 显像

基于microPET显像勾画肿瘤ROI,并进行放射性计数测定,⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂尾静脉注射后120 min,4组皮下移植瘤的SUV不完全相同($P=0.001$)。移植叶酸受体高表达的SKOV3卵巢癌裸鼠

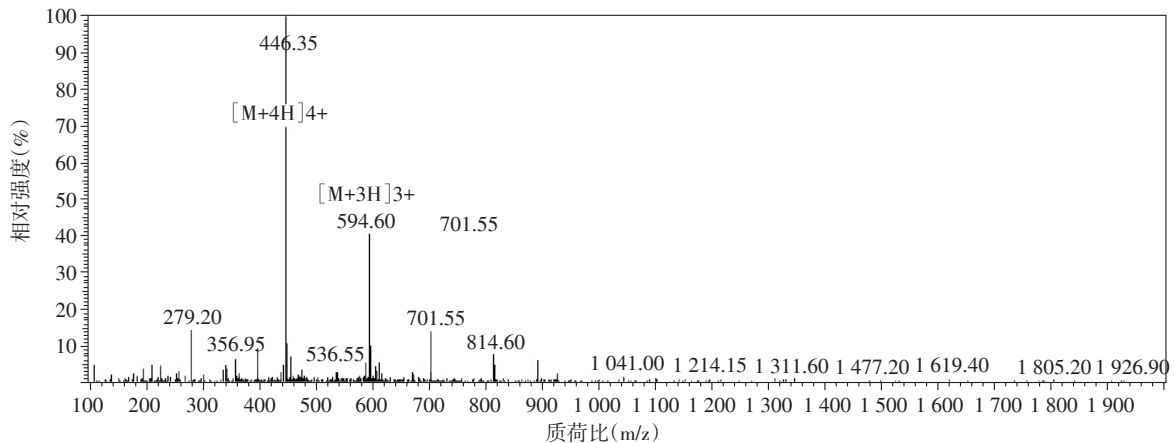


图1 DOTA-2P-FA₂的质谱图像

Figure 1 Mass spectrum image of DOTA-2P-FA₂

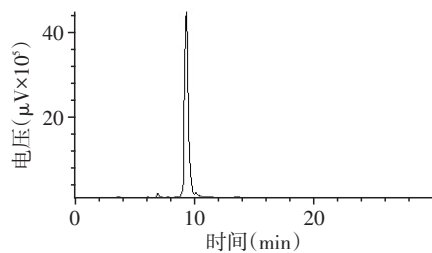


图2 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂的HPLC检查结果

Figure 2 HPLC chromatograms of ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂

常规组肿瘤SUV(5.59±1.14),明显高于受体阻断组(1.57±0.32, $P=0.011$)和阴性对照组(1.21±0.07, $P=0.004$);培美曲赛组卵巢癌肿瘤SUV(5.37±1.02)与常规组差异无统计学意义($P=0.26$,图3)。不同组肾脏部位放射性分布不完全相同($P=0.02$),培美曲赛组肾脏部位SUV(19.31±1.57)低于常规组(51.92±

4.78, $P=0.006$)。

2.4 卵巢癌腹腔转移灶⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂ micro-PET-CT显像

卵巢癌(携带荧光素酶)腹腔转移灶裸鼠腹腔注射荧光素后,腹腔可见明显荧光,而空白对照组腹腔未见荧光,提示卵巢癌腹腔转移灶的存在和病灶的分布。microPET-CT显像相应部位SUV(6.04±0.71)明显高于空白对照组(1.37±0.28, $P=0.002$,图4)。

3 讨论

叶酸通过偶联剂DOTA、HYNIC等结构修饰后,能够与常规放射性核素^{99m}Tc、⁶⁸Ga、¹⁸F等共价结合^[9-10],核医学PET显像较SPECT具有更好的显像质量,对小病灶具有更好的探测效能。同临床常用放射性核素¹⁸F(回旋加速器获得)相比,⁶⁸Ga通过

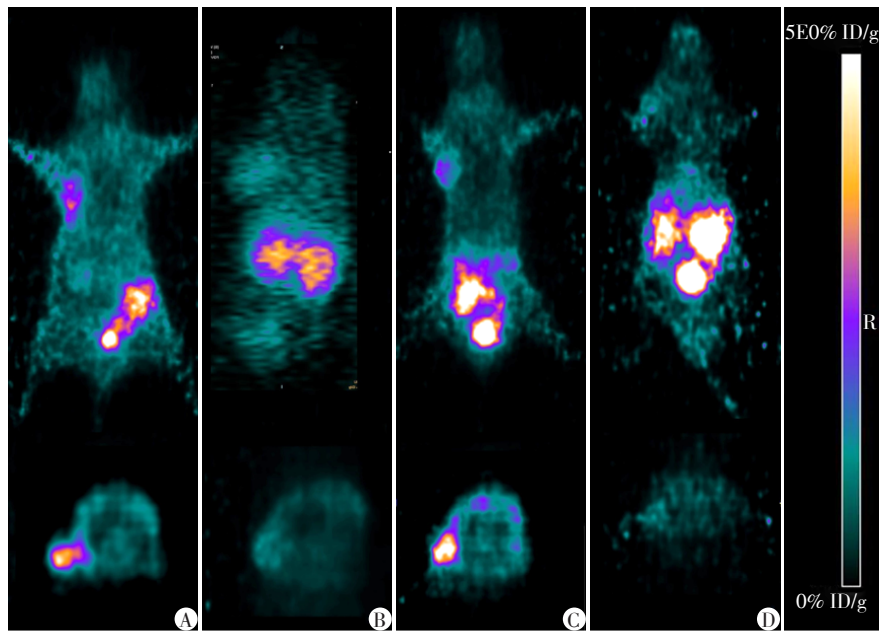
表1 荷人卵巢癌动物模型尾静脉注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后不同时间生物学分布

Table 1 Biodistribution at different time points after ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂ injection on mice bearing ovarian cancer

(%ID/g, n=5)

组织	第1组	第2组	第3组	第4组	第5组	第6组
血液	1.29 ± 0.34	0.94 ± 0.17	0.85 ± 0.21	0.71 ± 0.13	0.67 ± 0.20	0.35 ± 0.03
脑	0.37 ± 0.08	0.32 ± 0.05	0.27 ± 0.12	0.21 ± 0.06	0.25 ± 0.07	0.13 ± 0.06
心	1.25 ± 0.15	1.09 ± 0.11	0.93 ± 0.09	0.98 ± 0.05	0.84 ± 0.01	0.44 ± 0.08
肺	1.76 ± 0.14	1.90 ± 0.07	1.86 ± 0.05	1.77 ± 0.14	1.34 ± 0.08	0.82 ± 0.09
肝	3.37 ± 1.02	4.36 ± 0.39	4.11 ± 0.38	2.26 ± 0.19	1.09 ± 0.07	0.92 ± 0.12
肾	47.4 ± 13.4	63.37 ± 8.41	62.31 ± 10.24	70.09 ± 6.45	62.01 ± 6.42	34.22 ± 2.26
胃	0.85 ± 0.10	1.24 ± 0.05	1.08 ± 0.08	1.58 ± 0.02	1.24 ± 0.05	0.35 ± 0.11
肠	0.81 ± 0.07	1.21 ± 0.11	1.32 ± 0.82	1.09 ± 0.05	1.56 ± 0.11	0.21 ± 0.04
肌	0.66 ± 0.05	0.73 ± 0.07	0.56 ± 0.21	0.76 ± 0.08	0.44 ± 0.13	0.18 ± 0.07
股骨	0.92 ± 0.11	1.02 ± 0.26	1.07 ± 0.04	1.07 ± 0.17	0.43 ± 0.08	0.32 ± 0.07
肿瘤	3.24 ± 0.59	4.69 ± 1.11	6.79 ± 1.42	7.54 ± 1.55	6.34 ± 0.93	2.03 ± 0.06

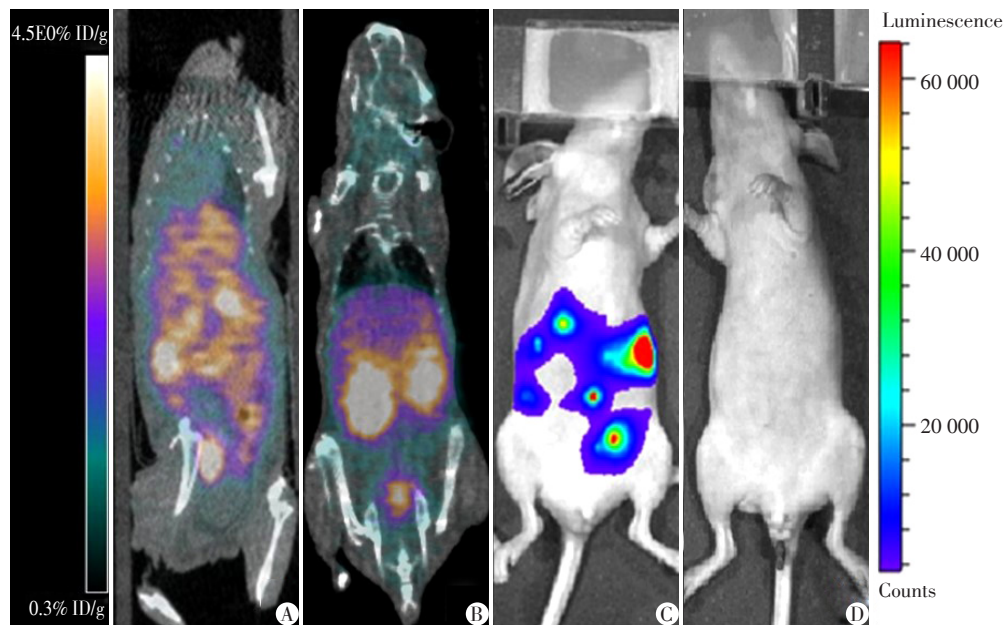
第1~5组:分别为非受体阻断组注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后5、30、60、120、180 min;第6组:为叶酸受体阻断组注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后120 min。



A~C: 荷皮下卵巢癌(SKOV3)移植瘤裸鼠。A: 常规组; B: 受体阻断组; C: 培美曲塞预注射组。D: 阴性对照组, 荷皮下肺癌移植瘤(A549)裸鼠。上下层分别为冠状面和横断面图像。

图3 各组裸鼠尾静脉注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后120 min的microPET显像

Figure 3 MicroPET imaging at 120 min after ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂ injection via tail vein in each group of nude mice



A: 卵巢癌腹腔转移灶microPET-CT显像; B: 空白对照组microPET-CT显像; C: 卵巢癌腹腔转移灶荧光显像; D: 空白对照组荧光显像。

图4 卵巢癌腹腔转移灶microPET-CT显像和荧光显像

Figure 4 MicroPET-CT imaging and fluorescence imaging on peritoneal metastases of ovarian cancer

⁶⁸Ge-⁶⁸Ga 发生器淋洗获得, 每天可以重复淋洗, 临床易于推广, 而且 DOTA 作为显像型核素标记配体的常规偶联剂, 也常用于 ¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y 等治疗性核素标记配体^[11-12]。我们在前期通过对叶酸的结构修饰合成 DOTA 偶联的叶酸衍生物, 并制备了靶向叶酸受体

的 ⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂, 结果显示具有较好的稳定性和叶酸受体靶向性。文献报道, 配体二聚体可以通过增加细胞表面受体周围叶酸配基密度, 促进核素标记叶酸与配体的靶向结合, 利于增加放射性药物在肿瘤的聚集, 如 RGD 二聚体在肿瘤部位的放射性

分布明显高于RGD单体^[13-15]。因此,为进一步提高核素标记叶酸在肿瘤部位的靶向聚集,本研究通过固相合成制备了DOTA-叶酸二聚体,部分叶酸衍生物因加入偶联剂及分子量增大,可能会对衍生物的脂溶性产生影响,使标记化合物经肝胆代谢进入肠道,造成腹部较高的放射性本底。本研究获得的⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂,分子结构中通过加入聚乙二醇增加其水溶性,且其体外稳定性好。叶酸及其衍生物靶向结合叶酸受体后,大部分通过内吞机制入胞,在内含体和溶酶体的作用下,配体在细胞内滞留,而受体多经过受体再循环重新回到细胞膜,进一步与血液中的配体结合^[16]。

本研究叶酸结合实验结果显示,通过叶酸受体介导内吞入胞的⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂占比高于叶酸单体,考虑与受体再循环加速有关。⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂尾静脉注射后,在脑、肌肉等非靶器官分布较少,并迅速从血液、肝、肺中清除,而在肾脏部位分布较多,考虑机制一为其主要经过肾脏排泄,二为正常肾脏组织中叶酸受体表达较其他正常组织高,促进了⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂在肾脏的结合、滞留^[17-18]。此特性也限制了治疗性放射性核素标记叶酸及其衍生物在肿瘤主动靶向治疗中的应用剂量及其靶向疗效。⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂给药前预注射过量叶酸,结果显示120 min时肿瘤部位放射性摄取较非阻断组显著降低,同时肾脏部位的显像剂滞留量也明显降低,一方面证实了⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂叶酸受体靶向的特异性,另一方面为降低叶酸衍生物在肾脏分布和滞留提供了思路。如文献报道,培美曲赛可一定程度上降低叶酸标记物在肾脏的摄取和滞留,是一种结构上含有吡咯嘧啶基团核心的叶酸拮抗剂,通过运载叶酸的载体和细胞膜上的叶酸结合蛋白运输系统进入细胞,与肿瘤和肾脏的叶酸受体的结合具有药代动力学的差异,在无明显影响肿瘤对⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂靶向摄取的情况下,可一定程度降低其在肾脏的分布,为治疗性核素标记叶酸或其衍生物靶向治疗肿瘤时,降低其在肾脏的分布及减少不良反应提供了方法,但目前仍停留在实验阶段^[19-21]。

叶酸受体表达阳性的皮下卵巢癌移植瘤及其腹腔转移灶microPET及microPET-CT显像结果显示,卵巢癌及其腹腔转移灶在静脉注射⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂后60~120 min均显示较高的放射性浓聚,由于卵巢癌腹腔转移灶小,散在分布,且在60 min时肾脏放射性分布低于120 min,对腹腔转移灶的干扰小,所以卵巢癌腹腔转移灶动物模型的microPET-

CT显像选择在注射后60 min内完成。另外,实验选择叶酸受体表达阴性的荷肺癌移植瘤裸鼠作为对照组,microPET显像未见明显的放射性摄取,进一步表明⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂能靶向聚集在叶酸受体高表达的肿瘤部位;由于腹腔转移灶弥漫分布,本研究选择的人卵巢癌细胞SKOV3-luc-D3携带荧光素酶,通过腹腔注射荧光素,卵巢癌细胞可以与荧光素作用发射荧光,而其他组织无荧光素酶不能产生荧光,荧光显像可有效证实卵巢转移灶的存在和病灶的分布,联合microPET-CT显像可有效验证卵巢癌转移灶对⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂的摄取。因此,本实验制备的⁶⁸Ga-DOTA-2P-FA₂可有效在卵巢癌肿瘤病灶部位聚集,可能成为卵巢癌及其转移灶显像和治疗的方法,通过结构和药代动力学的进一步优化,可为进一步推动叶酸受体靶向显像和治疗的临床转化提供更好的选择。

[参考文献]

- [1] CHOI P S, LEE J Y, PARK J H, et al. Synthesis and evaluation of ⁶⁸Ga-HBED-CC-EDBE-folate for positron-emission tomography imaging of overexpressed folate receptors on CT26 tumor cells [J]. J Labelled Comp Radiopharm, 2018, 61(1):4-10
- [2] 陶世龙,王欢,何帮顺,等.叶酸代谢相关酶单核苷酸基因多态性与乳腺癌的相关性研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(4):473-478
- [3] HEO G S, DETERING L, LUEHMANN H P, et al. Folate receptor α -targeted ⁸⁹Zr-M9346A immuno-PET for image-guided intervention with mirvetuximab soravtansine in triple-negative breast cancer [J]. Mol Pharm, 2019, 16(9):3996-4006
- [4] ZHANG X, YU Q, HE Y, et al. Synthesis and biological evaluation of (⁶⁸Ga)-labeled pteroyl-lys conjugates for folate receptor-targeted tumor imaging [J]. J Labelled Comp Radiopharm, 2016, 59(9):346-353
- [5] RADFORD L L, FERNANDEZ S, BEACHAM R, et al. New ⁵⁵Co-labeled albumin-binding folate derivatives as potential PET agents for folate receptor imaging [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2019, 12(4):1-12
- [6] SCHÄFER M, BAUDER-WÜST U, LEOTTA K, et al. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ⁶⁸Ga-PET imaging of prostate cancer [J]. EJNMMI Res, 2012, 2(1):23
- [7] KÖRHEGYI Z, RÓZSA D, HAJDU I, et al. Synthesis of ⁶⁸Ga-Labeled biopolymer-based nanoparticle imaging agents for positron-emission tomography [J]. Anticancer Res, 2019, 39(5):2415-2427
- [8] CHRISTENSEN E, HENRIKSEN J R, JØRGENSEN J T,

- et al. Folate receptor targeting of radiolabeled liposomes reduces intratumoral liposome accumulation in human KB carcinoma xenografts [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13(13):7647-7656
- [9] LODHI N A, PARK J Y, HONG M K, et al. Development of ^{99m}Tc -labeled trivalent isonitrile radiotracer for folate receptor imaging [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27(10):1925-1931
- [10] KETTENBACH K, REFFERT L M, SCHIEFERSTEIN H, et al. Comparison study of two differently clicked ^{18}F -folates - lipophilicity plays a key role [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018, 11(1):30-43
- [11] FARKAS R, SIWOWSKA K, AMETAMEY S M, et al. (64)Cu- and (68)Ga-based PET imaging of folate receptor-positive tumors: development and evaluation of an albumin-binding NODAGA-folate [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(6):1979-1987
- [12] FANI M, TAMMA M L, NICOLAS G P, et al. *In vivo* imaging of folate receptor positive tumor xenografts using novel ^{68}Ga -NODAGA-folate conjugates [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(5):1136-1145
- [13] KAEPOOKUM P, PETRIK M, SUMMER D, et al. Comparison of ^{68}Ga -labeled RGD mono- and multimers based on a clickable siderophore-based scaffold [J]. *Nucl Med Biol*, 2019, 78(79):1-10
- [14] LIU B, ZHANG Z, WANG H, et al. Preclinical evaluation of a dual sstr2 and integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -targeted heterodimer [^{68}Ga] - NOTA - 3PEG4 - TATE - RGD [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27(21):115094
- [15] 刘伟, 孟庆乐, 杨瑞, 等. microSPECT/CT 显像定量评价肿瘤 ^{99m}Tc -3P4-RGD2 摄取及整合素 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 表达水平的实验研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(8):1124-1130
- [16] BANDARA N A, HANSEN M J, LOW P S. Effect of receptor occupancy on folate receptor internalization [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(3):1007-1013
- [17] ZAGHLOUL M S, ABDELRAHMAN R S. Nilotinib ameliorates folic acid-induced acute kidney injury through modulation of TWEAK and HSP-70 pathways [J]. *Toxicology*, 2019, 427(427):152303
- [18] ZHANG W, YANG Y, GAO H, et al. Inhibition of mitochondrial complex I aggravates folic acid-induced acute kidney injury [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2019, 44(5):1002-1013
- [19] MÜLLER C, GUZIK P, SIWOWSKA K, et al. Combining albumin-binding properties and interaction with pemetrexed to improve the tissue distribution of radiofolates [J]. *Molecules*, 2018, 23(6):1465-1477
- [20] ALURI S, ZHAO R, FISER A, et al. Residues in the eighth transmembrane domain of the proton-coupled folate transporter (SLC46A1) play an important role in defining the aqueous translocation pathway and in folate substrate binding [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859(11):2193-2202
- [21] POSADA M M, BACON J A, SCHNECK K B, et al. Prediction of renal transporter mediated drug-drug interactions for pemetrexed using physiologically based pharmacokinetic modeling [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(3):325-334

[收稿日期] 2018-12-27