文章编号:0253-9950(2011)02-0106-08

RGD 多肽类药物设计、活性测定及 $^{99}Tc^{m}$-cRGD 二聚体的制备

张　丽,张春丽*,王荣福*,闫　平,康　磊,郭凤琴,
魏海亮,崔永刚,卢　霞

北京大学第一医院 核医学科,北京　100034

摘要:通过 V-life 计算机模拟软件建立 cRGD(cyclic Arg-Gly-Asp,cRGD)多肽类分子库,利用 V-life 软件中的 DOCK 功能对分子库内 cRGD 肽结构进行筛选评分,挑选出能与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体高特异性结合的 cRGD 结构。将该结构进行改造后制备成二聚体,用 $^{99}Tc^{m}$ 对该结构进行标记,制备成肿瘤分子探针。并对其标记条件、稳定性、水溶性和亲和力进行评价。结果表明,DOCK 功能计算出评分最佳的 cRGD 分子结构为 Cys-Arg-Gly-Asp-(D)Ser-Cys。将该结构进行改造制备成二聚体后,室温下、$\rho(SnCl_2 \cdot 2H_2O)=1$ g/L、反应时间为 30 min 时,标记率可达(87.42±3.21)%,经 Sephadex G10 层析柱纯化后,其放化纯大于 95%;在室温和 37 ℃条件下,$^{99}Tc^{m}$-cRGD 于生理盐水和正常人新鲜血清中均保持良好的标记稳定性;其脂水分配系数对数值 lg P(正辛醇/生理盐水)为−1.96±0.01;与 U87 人神经胶质瘤细胞进行受体的放射性配基结合分析(radioligand binding assay of receptors,RBA)实验,其平衡解离常数(equilibrium dissociation constant,K_d)为 $(0.089\pm0.052)\times10^{-9}$ L/mol。这表明,通过计算机模拟系统筛选出的 cRGD 肽可与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合,是一种有前景的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体阳性肿瘤显像剂。

关键词:整合素 $\alpha_v\beta_3$;RGD 肽;模拟筛选;对接;$^{99}Tc^{m}$
中图分类号:R817.4　　**文献标志码**:A

Design and Activity Determination of Cyclic RGD Peptide and Preparation of $^{99}Tc^{m}$ Labeled Cyclic RGD Dimer

ZHANG Li, ZHANG Chun-li*, WANG Rong-fu*, YAN Ping,
KANG Lei, GUO Feng-qin, WEI Hai-liang, CUI Yong-gang, LU Xia

Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Abstract: This paper was to design a cyclic RGD peptide tumor inhibitor with high affinity to integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor by molecular docking technique. cRGD molecular library was built and an optimal structure of cRGD peptide with the lowest score that was Cys-Arg-Gly-Asp-(D)Ser-Cys was screened out using the function of DOCK procedure of the V-life software. Based on the moi-

收稿日期:2010-05-05;**修订日期**:2010-10-11
基金项目:放射性药物教育部重点实验室开放基金资助项目(编号 0707)
作者简介:张　丽(1982—),女,天津人,硕士研究生,肿瘤核医学方向
* **通信联系人**:张春丽,E-mail: zhangcl0326@sina.com
王荣福,E-mail: rongfu_wang2003@yahoo.com.cn

ety a dimer linked by Tyr-(D)Ser-Lys-(D)Ser-Ser and with a side chain Gly-Gly-(D)Ala-Gly on Lys was synthesisized and $^{99}Tc^{m}$-cRGD dimer was prepared. Its radiolabeled efficiency, stability, water-soluble and affinity *in vitro* were evaluated. Under the reaction condition of room temperature, 1 g/L $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ and the 30 min of reaction time, labeling efficiency reachs (87.42±3.21)%. After Sephadex G10 purification, the radiochemical purity is no less than 95%. In both mediums of saline and fresh human serum, the radiochemical purity keeps high stability in room temperature and 37 ℃. Then the equilibrium dissociation constant(K_d) on U87 human glioma cells was determined. After the reconstruction of the cRGD dimer, it possesses higher water-soluble and affinity, octanol-water partition coefficient lg P value is −1.96±0.01 and K_d value is $(0.089 \pm 0.052) \times 10^{-9}$ mol/L. cRGD peptide screened by computer-aided drug design (CADD) system can bind to integrin $\alpha_v\beta_3$ specifically, and be a promising radiotracer for integrin $\alpha_v\beta_3$-positive tumors imaging.

Key words: integrin $\alpha_v\beta_3$; RGD peptides; simulative screening; DOCK; $^{99}Tc^{m}$

肿瘤组织的生长、转移与新生血管的生成密切相关，如果没有新生血管的生成，肿瘤的生长不会超过 1～2 mm。因此，抑制肿瘤新生血管的生成是抑制肿瘤生长和转移的关键。研究发现[1]，在肿瘤细胞表面和肿瘤新生血管内皮细胞中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 都有很高的表达，而在正常的组织和成熟的血管内皮细胞中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 不表达或表达很少，整合素 $\alpha_v\beta_3$ 也就成为了整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体表达阳性肿瘤显像和治疗的靶点。

RGD 肽类可以与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 发生特异性结合，抑制肿瘤新生血管的生成并启动肿瘤细胞的凋亡，这已经被众多文献证实[2-4]。但不同结构的 RGD 肽与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的结合能力不同，因此对肿瘤的抑制作用也就不同。Haubner 等[5-6]对 RGD 肽的结构进行了充分的研究，表明改变 RGD 五环肽除 Arg-Gly-Asp 以外的其它结构不影响 RGD 肽与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的识别。但是改变 RGD 三肽以外的其它结构之后可以改变 RGD 肽的其它特性，尤其是改变第 4 位氨基酸，特别当第 4 位为 D 型的氨基酸时，可以明显提高该多肽的亲和力和水溶性等特性。而第 5 位氨基酸的性质对 RGD 肽的特性无明显影响。另有研究[7]表明，含有 2 个二硫键的环形 RGD 肽对肿瘤新生血管内皮细胞的效力很强，是含单一二硫键环形 RGD 肽的 20 倍，是线形 RGD 肽的 200 倍。笔者针对 RGD 肽的上述特性建立了 cRGD 肽分子库，进行计算机模拟筛选。

2001 年和 2002 年 Xiong 等[8-9]在《Science》上先后发表两篇文章报道了整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的胞外区结构以及其配体 RGD 肽与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 胞外区发生结合反应时整合素 $\alpha_v\beta_3$ 发生的结构变化。基于此研究的结果，计算机模拟 RGD 肽类药物的筛选成为了现实。本实验采用 V-life 软件基于结合状态下分子的三维立体结构和静电场力对已建立的 RGD 肽分子库中的分子进行了受体-配体结合状态的评估，作出了评分。对筛选出的 RGD 肽结构进行进一步的人工改造后，用体外受体的放射性配基结合分析实验验证该结构的结合能力，并对 $^{99}Tc^{m}$-cRGD 的标记方法做了初步研究，以期该结构的 RGD 肽成为一个新型肿瘤受体显像剂。

1　试剂与仪器

含有二硫键的 cRGD 肽，上海吉尔生化公司合成并纯化；1，3，4，6-四氯 3a，6a-二苯-甘脲(Iodogen)、氯化亚锡($SnCl \cdot 2H_2O$)，美国 Sigma-Aldrich 公司；Sephadex G10，美国 GE Amersham 公司；$Na^{125}I$ 溶液、$Na^{99}Tc^{m}O_4$ 洗脱液，原子高科股份有限公司；二氯甲烷，分析纯，北京化学试剂公司。

V-life 软件，北京宏剑讯科软件技术有限公司；HANGPING FA1104 电子天平，感量为 10^{-4} g，上海精科电子天平公司；新华一号滤纸，北京化学试剂公司；SN-697 全自动双探头放射免疫 γ 计数器，上海核所日环光电仪器有限公司。

2　实验方法

2.1　cRGD 肽的结构设计

2.1.1　cRGD 肽受体——整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结构的准备

从蛋白数据库(protein data bank，PDB)中下载整合素 $\alpha_v\beta_3$ 胞外区结构，以及与该结构相应位点结

合的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-苯丙氨酸(Arg-Gly-Asp-(D) Phe)文件(1L5g. pdb)。将该文件导入V-life软件中,去掉1L5G程序中包含的杂原子,并将其中的RGD序列去掉另为保存(作为对接计算时的对照结构),然后为1L5G剩余的结构加氢,保存为mol2格式的文件。剩余结构的活性对接位点基于去掉的RGD肽的位置而确定。

2.1.2 cRGD肽结构库的建立 阅读国内外已报道的文献,从文献[10-17]中搜集各种RGD肽的结构,并在原结构的基础上,替换或增加某些氨基酸,利用V-life软件中的肽链建立功能,建立RGD直线型结构,然后通过去氢、加键等功能,形成二硫键成环和酰胺键成环的各种环状RGD结构,也将这些结构保存为mol2格式,并保存在同一个文件夹内。

2.1.3 对接运算 打开V-life软件的Bio Predicta tool模块,选择其中DOCK功能的GRIP docking和GRID docking对接方式。在GRIP docking功能的对话框receptor的位置导入已准备好的整合素$\alpha_v\beta_3$胞外区结构所在的文件;在ligand的位置导入RGD肽结构所在的文件,并将1L5G文件中包含的RGD肽结构作为对照结构导入GRIP docking功能对话框ligand reference的位置。按照软件推荐的参数设定对接参数:对接方式为exhaustive; Rotation angle 30°。按照相似的方法在GRID docking功能的对话框中依次导入receptor、ligand位置所需要的文件路径。对接参数设定为:Fitness function:Electrostatic; Rotation angle 15°。

2.2 $^{99}Tc^m$标记反应

参考文献[18],采用直接标记法标记cRGD肽。1 g/L cRGD肽置于0.025 mol/L pH=7.4的磷酸缓冲液中。取3.0 mg酒石酸钠加入10 μL用1 mol/L HCl新鲜配置的$SnCl_2 \cdot 2H_2O$(1~10 g/L),在轻微震荡条件下向酒石酸钠溶液中加入新鲜的$^{99}Tc^mO_4^-$淋洗液7.4 MBq。最后将已经溶解的cRGD肽加入上述溶液中,室温下静置反应10~300 min。反应产物经Sephadex G10层析柱纯化后按每管0.5 mL收集,测定各管的放射性活度值和在260 nm处的吸光度值(OD_{260}),收集高峰管(放射性活度值和OD_{260}值均最高的管)即为标记产物$^{99}Tc^m$-cRGD。

2.3 标记率和放射化学纯度的测定

采用新华一号滤纸为固定相,丙酮和生理盐水为双展开剂的纸层析法测定标记产物的标记率和放射化学纯度。

2.4 标记产物的稳定性分析

将标记产物$^{99}Tc^m$-cRGD分别溶于适量体积的生理盐水和正常人新鲜血清中,终浓度为0.01 g/L。分别置于室温和37 ℃条件下,孵育1、2、3、4、6 h后,同样采用丙酮和生理盐水为双展开剂的纸层析法测定其放射化学纯度。

2.5 $^{99}Tc^m$-cRGD水溶性的测定

在Eppendorf管内加入1 mL正辛醇和1 mL生理盐水,并取10 μL $^{99}Tc^m$-cRGD加入该管。振荡器上震荡10 min,正辛醇与生理盐水形成明显的分隔界面。另取6支Eppendorf管,其中3支加入上层液体(正辛醇),每管100 μL,另外3支取下层液体(生理盐水),亦每管100 μL。分别测量每管的放射性计数。

2.6 受体的放射性配基结合分析实验

采用Iodogen法制备^{125}I-cRGD肽,称取适量Iodogen于试管中并用二氯甲烷将之溶解,使其最终浓度为1 g/L。取80 μL上述溶液于Eppendorf管内(该量根据加入的$Na^{125}I$的量而定),使溶液涂布在反应管壁上,用氩气吹干,在反应管底部形成均匀的薄膜,密封-20 ℃冰箱储存备用。将cRGD肽溶解于0.5 mol/L pH=7.4的磷酸缓冲液中,使cRGD肽的浓度为1 g/L。在涂有Iodogen的反应管内依次加入10 μL cRGD、$Na^{125}I$溶液1.85 TBq/L,轻轻摇动,室温下反应3~5 min。反应产物经Sephadex G10层析柱纯化后按每管0.5 mL收集。采用新华一号滤纸为固定相,V(正丁醇):V(乙醇):V(氨水)=5:2:1的混合溶液为展开剂的纸层析法测定标记产物的标记率和放射化学纯度。参考文献[19]将常规培养于DMEM(低糖)+10%胎牛血清培养基中处于对数期生长的U87人神经胶质瘤细胞用0.25%胰蛋白酶消化,用含Tris缓冲液(含500 mmol/L Tris,pH=7.4;150 mmol/L NaCl;2 mmol/L $CaCl_2$;1 mmol/L $MgCl_2$;1 mmol/L $MnCl_2$;w=1%牛血清白蛋白)吹打均匀,使瘤细胞的密度为5×10^6/mL,放于37 ℃、5%CO_2培养箱内备用。无菌Eppendorf管内加入浓度递增的cRGD肽(0~10 nmol/L),再向每个Eppendorf管内都加入100 μL细胞悬液,然后每管内加入约2×10^5/min的^{125}I-cRGD 100 μL,反应体积共计300 μL。4 ℃反应2 h(每间隔30 min将Eppen-

dorf 管放置于振荡器上震荡 1 min)后，离心、弃上清液，用磷酸盐缓冲溶液清洗 2 遍，沉淀物用 γ 计数仪测量放射性计数。取 3 个样品的平均值，经 SPSS16.0 软件拟合，计算平衡解离常数(K_d)。

3　结果和讨论

3.1　cRGD 肽对接运算结果

本研究采用 GRIP docking 和 GRID docking 对接方式分别对受体-配体进行对接计算，全面分析了 cRGD 肽结构的变化对亲和力的影响。建立 RGD 多肽库时已经对修改后的多肽分子进行了能量优化，使各个原子之间的斥力最小、稳定性最高，即最为符合天然存在的 cRGD 肽结构。当采用 GRID docking 对接方式计算时，一旦 RGD 肽分子生成，cRGD 肽的结构就固定不变，作为一个整体在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 活性对接位点旋转，对接计算时考虑的是配体分子在对接位点部位旋转以求得对接时的最小静电场力。而当采用 GRIP docking 对接方式计算时，主要考虑的是配体分子的柔性，即配体分子的旋转角度。cRGD 分子可以划分为可以旋转的不同片段，对接时不同片段围绕相连的单键旋转，以不同的空间状态进行对接，最后寻找出一个静电斥力最低的三维结构。在进行对接时，Cys-Arg-Gly-Asp-(D)Phe-Cys 的得分(−4.927 795)要优于 Cys-Arg-Gly-Asp-(D)Ser-Cys 的得分(−4.88 814 2)(分数的负值越大说明分子之间的斥力越小)，但是(D)Phe((D)苯丙氨酸)的水溶性要小于(D)Ser((D)丝氨酸)，综合两种对接方式，全面分析了这两种对接方式的计算结果后确定 Cys-Arg-Gly-Asp-(D)Ser-Cys 为所设计的多肽的基本序列。这种设计思路也更加符合药物在体内是以其三维空间结构与配体之间发挥作用这一现实。同时也考虑到药物在体内的代谢动力学情况，增加水溶性有利于药物的排除，最大限度的减少了药物在体内的存留时间。部分评分结果列于表 1。

在初步筛选之后，为了增加多肽的亲和性，将该基本序列改造为 RGD 肽二聚体的形式。在对该基本结构进行改造时主要是出于方便不同的放射性核素的标记、增加亲和力和水溶性而设计的。Gly-Gly-(D)Ala-Gly 结构的引入，4 个氨基酸形成天然的穴状结构，并各有一个 N 原子可以与$^{99}Tc^{m}$螯合。在标记时还要解决的一个问题是，既要保证$^{99}Tc^{m}$标记结合到配体分子上，又要保证配体不失活性或活性损失较小。直接将 Gly-Gly-(D)Ala-Gly 结构作为侧链连接到肽链上就可以避免以$^{99}Tc^{m}$进行标记时用其他的双功能螯合剂破坏肽链活性中心的可能性。而如果$^{99}Tc^{m}$结合到低亲和力的位点上，又会导致标记物的体内外稳定性低，体内肝、脾、胃肠道以及甲状腺会有很高的放射性摄取，影响显像效果。连接体中加入了 Tyr(酪氨酸)之后，放射性^{131}I和^{125}I都可以标记在该多肽上。同时在连接体上加入(D)Ser，一方面是增加了多肽的水溶性，另一方面增加了肽链连接体的长度，使其能够有足够的长度能同时连接到两个受体上。经过如此改造最后形成的多肽结构为：

Gly-Gly-(D)Ala-Gly
|
NH_2-Cys-Arg-Gly-Asp-(D)Ser-Cys-Tyr-(D)Ser-Lys-(D)Ser-Ser-Cys-Arg-Gly-Asp-(D)Ser-Cys-COOH

并交由上海吉尔生化有限公司合成，产物相对分子质量为 2 054.30，纯度大于 95%。合成后该 cRGD 肽的质谱分析图和高效液相色谱分析图示于图 1。

3.2　$^{99}Tc^{m}$-cRGD 的制备

直接标记法利用 cRGD 肽结构中 Gly-Gly-(D)Ala-Gly 天然存在穴状结构螯合$^{99}Tc^{m}$，这样可以避免引入其他双功能螯合剂对 cRGD 肽功能产生影响。在标记反应体系中有 3 种反应产物：游离锝(未被亚锡离子还原的$^{99}Tc^{m}O_4^-$)、水解锝($^{99}Tc^{m}O_2 \cdot nH_2O$)和络合锝($^{99}Tc^{m}$-cRGD)。根据不同标记产物在纸层析展开体系中比移值(R_f)的差异从而计算出标记率或放射化学纯度。使用丙酮和生理盐水双展开剂的纸层析测定结果列入表 2。经纸层析测定$^{99}Tc^{m}$-cRGD 的标记率为(87.42±3.21)%。经 Sephadex G10 层析柱纯化每管收集 0.5 mL，每管的放射性活度值和260 nm 处的吸光度值(OD_{260})示于图 2。第 2 管内收集物其放射性活度值和 OD_{260} 值都为高峰管，提示该管即为$^{99}Tc^{m}$-cRGD，其放化纯大于 95%。

3.3　标记条件的优化

3.3.1　$SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度对标记率的影响

要制备$^{99}Tc^{m}$标记的药物，必须使用还原剂使之还原成低氧化态锝。在标记反应中，$SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 作为重要的还原剂起到还原$^{99}Tc^{m}O_4^-$的作用。为了保证$^{99}Tc^{m}O_4^-$的还原，$SnCl_2 \cdot 2H_2O$往往过

表 1 对接能量打分结果

Table 1 Docking energy score

No.	RGD 肽(Peptides)	GRIP docking	GRID docking
1	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Tyr-Cys-)	−43.795 6	−4.857 1
2	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Phe-Cys-)	−40.549 6	−4.074 3
3	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-His-Cys-)	−35.395 2	−4.265 7
4	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Trp-Cys-)	−39.549 4	−4.284 6
5	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Gly-Cys-)	−29.324 3	−4.734 6
6	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-)	−29.265 3	−4.627 9
7	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Val-Cys-)	−28.573 4	−4.634 8
8	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Ile-Cys-)	−28.560 0	−4.442 2
9	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Leu-Cys-)	−31.136 1	−4.346 0
10	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Pro-Cys-)	−31.383 9	−4.854 6
11	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Met-Cys-)	−37.475 6	−4.221 2
12	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-)	−31.319 4	−4.888 1
13	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Thr-Cys-)	−31.969 9	−4.358 2
14	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Asp-Cys-)	−32.075 9	−4.035 0
15	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Glu-Cys-)	−33.528 3	−4.092 7
16	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Lys-Cys-)	−32.209 2	−3.928 9
17	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Asn-Cys-)	−33.528 3	−4.309 0
18	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Gln-Cys-)	−32.189 7	−4.006 8
19	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-Cys-)	−41.873 9	−4.471 1
20	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Cys-)	−28.987 1	−4.605 6
21	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-)	−34.331 2	−4.927 8
22	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-His-Cys-)	−38.803 9	−4.349 0
23	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Trp-Cys-)	−32.591 0	−4.265 7
24	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Ala-Cys-)	−32.529 2	−4.531 7
25	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Val-Cys-)	−31.495 4	−4.322 4
26	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Ile-Cys-)	−31.974 8	−4.193 6
27	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Cys-)	−34.145 8	−4.419 3
28	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Pro-Cys-)	−36.102 5	−4.686 6
29	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Met-Cys-)	−30.108 8	−3.941 8
30	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Ser-Cys-)	−30.968 7	−5.116 8
31	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Thr-Cys-)	−28.852 0	−4.410 2
32	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Asp-Cys-)	−31.399 8	−4.097 9
33	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Glu-Cys-)	−36.554 6	−3.932 9
34	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Lys-Cys-)	−33.754 9	−4.000 9
35	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Asn-Cys-)	−41.719 0	−4.726 2
36	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Gln-Cys-)	−35.181 4	−3.999 0
37	cyclo(-Cys-Arg-Gly-Asp-D-Arg-Cys-)	−37.654 7	−4.082 1
38	cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)	−30.786 8	−4.783 6
39	cyclo(-Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-)	−24.373 5	−4.074 3
40	Arg-Gly-Asp-(D)Phe(1L5G 程序中包含的 RGD 结构,RGD structure in 1L5G)	−38.796 5	−3.935 9

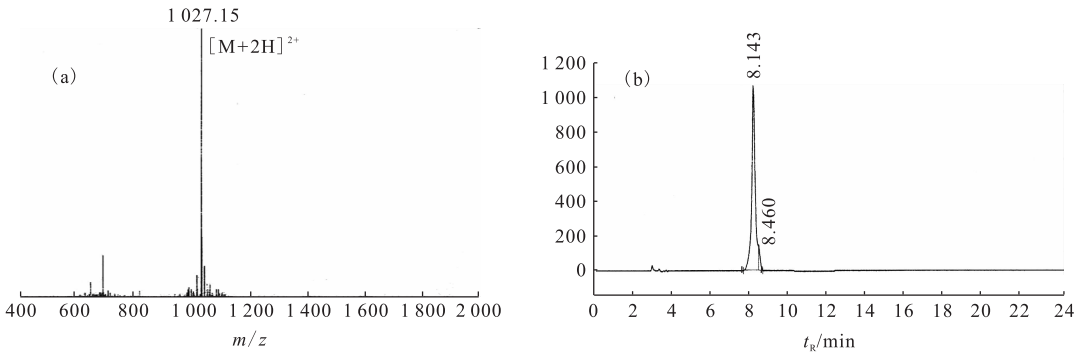

图 1 合成 cRGD 肽的质谱分析图(a)和高效液相色谱图(b)

Fig. 1 MALDITOF-MS analysis(a) and HPLC analysis(b) of cRGD

表 2　使用丙酮和生理盐水双展开剂的纸层析检测结果

Table 2　Paper chromatography with acetone or saline as a mobile phase

固定相 (Immobile phase)	移动相 (Mobile phase)	R_f		
		$^{99}Tc^{m}O_4^-$	$^{99}Tc^{m}O_2 \cdot nH_2O$	$^{99}Tc^{m}$-cRGD
新华 1 号滤纸	丙酮(Acetone)	0.9～1.0	0～0.1	0～0.1
(Xinhua No. 1 filter paper)	生理盐水(Saline)	0.9～1.0	0～0.1	0.8～1.0

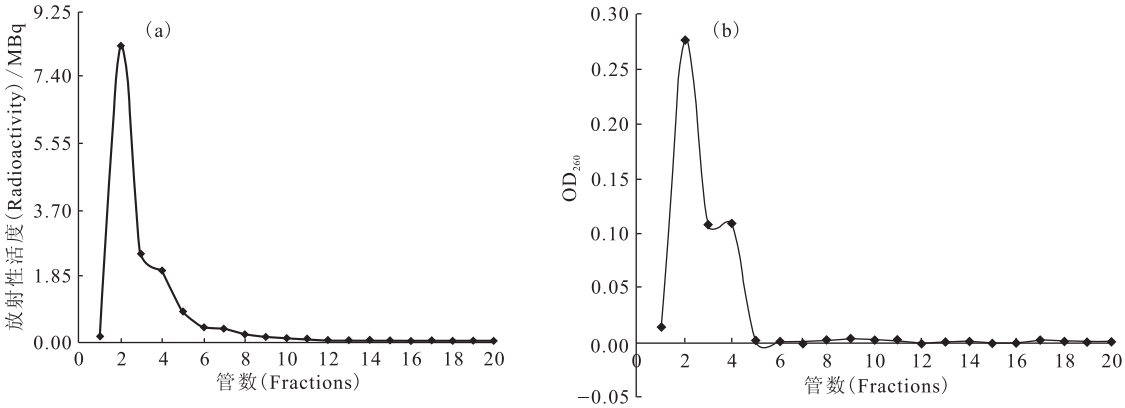

图 2　标记产物经 Sephadex G10 纯化后各管的放射性活度值(a)和 OD_{260}(b)

Fig. 2　Elution profiles of radioactivity(a) and optical density(b) obtained by Sephadex G10 column chromatography

量,但是过多 $SnCl_2$ 容易产生锡胶体吸附$^{99}Tc^{m}$而降低标记率。本研究测定不同质量浓度的$SnCl_2 \cdot 2H_2O$(1、2、4、5、8、10 g/L)在反应 30 min 时的标记率,以期优化反应条件,结果示于图 3。由图 3 可知,反应标记率在 $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度为 1 g/L时达到最高水平 89.93%。而当 $SnCl_2 \cdot 2H_2O$使用量增大时,标记率迅速下降。

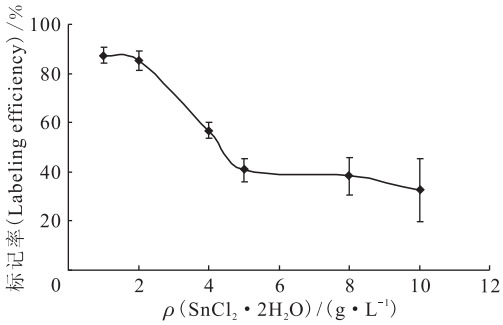

图 3　$SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 质量浓度对标记率的影响

Fig. 3　Effect of $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ mass concentration on the labeling efficiency

3.3.2　反应时间对标记率的影响　不同反应时间对标记率的影响示于图 4。在 1 g/L $SnCl_2 \cdot 2H_2O$、室温条件下,反应 30 min 内随着反应时间的增加,$^{99}Tc^{m}$-cRGD 标记率显著提高,由 10 min 时的 77.18%增加到 30 min 时的 89.93 %;而在 1～6 h 反应时间内,随着反应时间的延长,标记率无显著提高,维持在 89%左右。由此可见,经过 30 min 的反应,$^{99}Tc^{m}$-RGD 的标记率已达到饱和平台期。因此本实验选择 30 min 作为最佳标记反应时间。

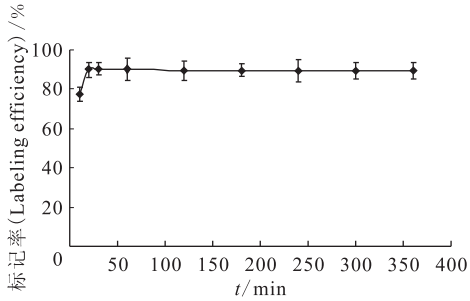

图 4　反应时间对标记率的影响

Fig. 4　Effect of reaction time on the labeling efficiency

3.4　标记产物稳定性分析

$^{99}Tc^{m}$-cRGD 的放射化学纯度为 95.08%。在室温和 37 ℃,与生理盐水和正常人新鲜血清两种介质孵育 1、2、3、4、6 h 的放射化学纯度示于图 5。由图 5 可知,$^{99}Tc^{m}$-cRGD 在孵育 6 h 后其放射化学纯度变化不大,6 h 时$^{99}Tc^{m}$-cRGD 在血清中的放射化学纯度室温下为 83.96%,37 ℃为 83.03%;在生理盐水中的放射化学纯

度室温下为 84.85%，37 ℃为 84.05%。^{99}Tc^{m}-cRGD 在生理盐水中的稳定性比血清中的要好，原因可能是血清中含有活性蛋白酶、肽类物质，标记物被水解所致。

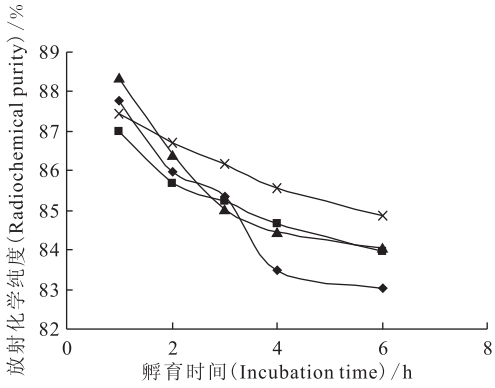

图 5 ^{99}Tc^{m}-cRGD 的体外稳定性

Fig. 5 Stability of ^{99}Tc^{m}-cRGD *in vitro*

◆——血清(Serum)，37 ℃；

■——血清，室温(Serum，room tempereture)；

▲——生理盐水(Saline)，37 ℃；

×——生理盐水，室温(Saline，room tempereture)

3.5 ^{99}Tc^{m}- cRGD 水溶性分析

有机物的脂水分配系数值一般为 10^{-7}～10^{-3}。其中极性化合物的 lg $P<0$，而非极性化合物的lg $P>0$，一般当 lg $P<1$ 可以认为是亲水性的，而 lg $P>4$ 是亲脂性的。^{99}Tc^{m}- cRGD 脂水分配系数 lg P(正辛醇/生理盐水)为-1.96 ± 0.01，这表明该多肽是水溶性的。多肽的水溶性好可以避免进入体内后肝胆系统吸收过多的放射性而影响显像效果。

3.6 受体的放射性配基结合分析实验结果

^{125}I-cRGD 肽的标记率达 90%，放射化学纯度达 99%，比活度约为 9.7×10^{8} Bq/g。^{125}I-cRGD 与 U87 人神经胶质瘤细胞结合的 Scatchard 图示于图 6。该图以 c(RL)(c(RL)为 cRGD 配体与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体结合后复合物的浓度)为横坐标，c(RL)/c(L)(c(L)为游离 cRGD 配体的浓度)为纵坐标，从图 6 可以看出该图为一直线。运用 Scatchard 函数：$K_d=c$(RT-RL)c(L)/c(RL)(c(RT-RL)为未与 cRGD 配体结合的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体的浓度)，可得 $K_d=(0.089\pm0.052)\times10^{-9}$ L/mol。对此回归方程进行显著性检验，结果表明 $r=-0.946$，$P<0.04$，说明两个变量c(RL)/c(L)与c(RL)之间存在一定的线性相关关系。

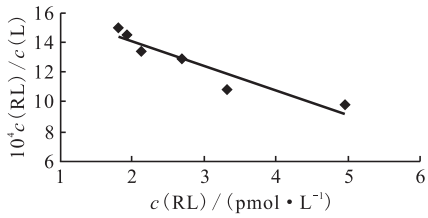

图 6 结合实验 Scatchard 作图

Fig. 6 Scatchard plot of binding test

4 结 论

用计算机模拟的方法设计出一个新型 RGD 多肽结构，并对^{99}Tc^{m}-cRGD 标记反应以及标记产物的性质做了初步研究。研究结果表明，该多肽结构可以被放射性核素^{99}Tc^{m}标记，其标记率、放射化学纯度和稳定性基本满足多肽类放射性药物的标准，可以用于动物实验。标记产物在动物体内分布，以及其在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体阳性肿瘤显像和治疗中应用价值的研究将会在以后的工作中展开完成。

参考文献：

[1] 黄云鹏，林建华，林志雄. 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤血管生成中的作用[J]. 中国肿瘤，2007，16(1)：35-38.

[2] Ruoslahti E，Reed J C. Anchorage Dependence，Integrins，and Apoptosis[J]. Cell，1994，77(4)：477-478.

[3] Li J，Tan H，Dong X，et al. Antisense Integrin α_v and β_3 Gene Therapy Suppresses Subcutaneously Implanted Hepatocellular Carcinomas[J]. Dig Liver Dis，2007，39(6)：557-565.

[4] Toth B，Sarang Z，Vereb G，et al. Over-Expression of Integrin β_3 can Partially Overcome the Defect of Integrin β_3 Signaling in Transglutaminase 2 Null Macrophages[J]. Immunology Letters，2009，126(1-2)：22-28.

[5] Haubner R，Gratias R，Diefenbach B，et al. Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists[J]. J Am Chem Soc，1996，118(32)：7 461-7 472.

[6] Haubner R，Wester H J，Reuning U，et al. Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonists：A New Class of Tracers for Tumor Targeting[J]. J Nucl Med，1999，40(6)：1 061-1 071.

[7] Koivunen E，Wang B，Ruoslahti E. Phage Iibraries Displaying Cyclic Peptides With Different Ring

Sizes：Ligand Specificities of the RGD-Directed Integrins[J]. Biotechnology，1995，13(3)：265-270.

[8] Xiong J P，Stehle T，Diefenbach B，et al. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin Alpha(ν)Beta(3)[J]. Science，2001，294(5 541)：339-345.

[9] Xiong J P，Stehle T，Zhang R，et al. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin Alpha (ν)Beta(3) Complex With an Arg-Gly-Asp Ligand[J]. Science，2002，296(5 565)：151-155.

[10] Wu Z H，Li Z B，Chen K，et al. MicroPET of Tumor Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression Using ^{18}F-Labeled PEGylated Tetrameric RGD Peptide(^{18}F-FPRGD4)[J]. J Nucl Med，2007，48(9)：1 536-1 544.

[11] Clemens D，Bluma F L，Ana R，et al. [^{99m}Tc] HYNIC-RGD for Imaging Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression[J]. Nucl Med Biol，2006，33(8)：945-952.

[12] David E，Paul J，Helena H，et al. ^{99m}Tc-NC100692—A Tracer for Imaging Vitronectin Receptor Associated With Angiogenesis：A Preclinical Investigate[J]. Nucl Med Biol，2008，35(3)：365-375.

[13] 刘广元，李前伟，黄定德，等. ^{99m}Tc-RGD-4CK 在动物体内的分布及显像[J]. 中华核医学杂志，2007，27(1)：34-37.

[14] Ingrid D，Liu S，John A W，et al. Effects of Linker Variation on the *in Vitro* and *in Vivo* Characteristics of an ^{111}In-Labeled RGD Peptide[J]. Nucl Med Biol，2007，34(1)：29-35.

[15] Mitra A，Coleman T，Borgman M，et al. Polymer Conjugates of Mono-and bi-Cyclic $\alpha_v\beta_3$ Binding Peptides for Tumor Targeting[J]. J Controlled Release，2006，114(2)：175-183.

[16] 刘红洁，王荣福，张春丽，等. ^{131}I 标记 RGD 环肽在荷瘤小鼠体内分布与显像研究[J]. 中国医学影像技术，2008，24(1)：131-133.

[17] Morrison S M，Ricketts S A，Barnett J，et al. Use of a Novel Arg-Gly-Asp Radioligand，^{18}F-AH111585，to Determine Changes in Tumor Vascularity After Antitumor Therapy[J]. J Nucl Med，2009，50(1)：116-122.

[18] Pallela V R，Thakur M L，Chakder S，et al. ^{99m}Tc-Labeled Vasoactive Intestional Peptide Receptor Agonist：Functional Studies[J]. J Nucl Med，1999，40(2)：352-359.

[19] Chen X Y，Tohme M，Park R，et al. Micro-PET Imaging of $\alpha_v\beta_3$-Integrin Expression With ^{18}F-Labeled Dimeric RGD Peptide[J]. Mol Imaging，2004，3(2)：96-104.