

近红外标记的维甲酸类造影剂用于骨肉瘤成像的研究*

马琼¹ 周勇¹ 姜扩¹ 范清宇¹ Shi Ke² 裘秀春^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038 2 贝勒医学院放射系 德克萨斯州休斯顿 77030 美国)

摘要 目的:开发一种具有“找寻、治疗、可视”功能的生物造影剂。方法:采用化学合成的方法得到近红外标记的维甲酸类造影剂,并进行骨肉瘤细胞的体外结合试验;皮下接种裸鼠,构建骨肉瘤的异种移植模型,持续 10d 对裸鼠进行体内光学成像,观察药物在体内的重新分布,并最终用免疫组织化学法对成像结果进行验证。结果:体外细胞结合试验证明,合成的维甲酸类造影剂可以很好的与人的骨肉瘤细胞相结合,进而内化。近红外光学成像表明,该造影剂可用于骨肉瘤的早期和晚期诊断。全身成像显示了在肿瘤和肝脏的高信号强度。正电子发射断层显像(PET)显示肿瘤部位具有较高水平的 18F-FDG 代谢。剂量增加反应和毒性试验表明,高剂量的维甲酸类造影剂必然与其全身毒性息息相关。免疫组化染色显示,发光组织中肿瘤细胞呈阳性。结论:合成的近红外标记的维甲酸类造影剂可以用于检测人类骨肿瘤的异种移植,实现个体化分子诊疗的同时减少全身毒性。

关键词 分子成像 细胞摄取 光学成像 肿瘤 近红外

中图分类号:R738 R 814 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)08-1424-04

Application of NIR- Retinoid Imaging Agent in Detection of Human Osteosarcoma*

MA Qiong¹, ZHOU Yong¹, JIANG Kuo¹, FAN Qing-yu¹, SHI Ke², QIU Xiu-chun^{1△}

(1 Orthopaedic Oncology Institute, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Radiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, 77030, USA)

ABSTRACT Objective: To develop a kind of biological contrast agent with the features of "finding, treatment, visual". **Methods:** Retinoid imaging agents are synthesized and labeled with near-infrared dye for in vitro cell binding studies on human osteosarcoma cell lines. Xenograft model was established by subcutaneous injection (s.c.); In vivo optical imaging studies were carried out for days after injection, drug redistribution in the body was detected. Tumor cells in the luminous tissue were detected by immunohistochemistry. **Results:** Those agents bound to the human osteosarcoma cells, and internalized, which can be used to detect osteosarcoma at early stages of the metastatic disease. Whole body images showed the high signal intensity in tumor and liver. PET showed that there was high level of 18F-FDG in tumors. The high dose of retinoid agent was significantly associated with systemic toxicity. Immunohistochemistry demonstrated tumor cells were positive in the luminous tissues. **Conclusion:** Synthetic NIR-labeled retinoid agents can be used to detect human cancer xenografts as the agent is internalized by cancer cells, and it can reduce systemic toxicity.

Key Words: Molecular imaging; Cellular uptake; Optical imaging; Cancer; Near-infrared

Chinese Library Classification(CLC):R738 R 814 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)08-1424-04

前言

维甲酸是一类天然的或人工合成的维生素 A 衍生物,在哺乳动物细胞中调控着包括代谢、发育、增殖、分化和肿瘤发生在内的众多生物学过程^[1,2]。此外,维甲酸能够逆转口腔细胞的前恶性变化,显著减少继发的原发性肿瘤,为头颈部、肺、食道、膀胱等由吸烟引发的继发的原发性肿瘤提供了一个良好的治疗方案。该治疗完成的三年内,病情控制良好,随着随访期的延长,效力渐减^[3,4]。这表明了维甲酸防御功能的可持续性,同时也证明了肿瘤细胞能够摄取维甲酸。因此,维甲酸是一种可开发的肿瘤成像造影剂。

像其他成像技术一样,当前的分子成像技术必须与结构成像相结合,才能确定肿瘤的具体位置及大小,需要获得细胞学和组织学相关数据,诸如细胞大小、形态、胞核形态、细胞形成、是否存在对周围组织的侵袭等,并以历经一百多年发展起来的

一套准则对其进行相应的解释。病理验证对成像结果往往具有纠错的功用,例如造影剂在肿瘤早期有较高的检出率^[5-7],但最终病理学结果却可能解释,这只是代表了体内一个正常的代谢水平^[8-10]。

本研究开发了一种近红外标记的维甲酸类造影剂,用于体内、体外的成像研究。此外,我们用病理试验数据对成像结果加以证实。结果表明,维甲酸类造影剂能够与肿瘤细胞系相结合,从而检测多种人类肿瘤的异种移植。我们能够看到造影剂在体内的重新分布,以及确定全身毒性降至最小的最优生物学剂量。试验结果证明了基于成像指导下个体化医疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞系和主要试剂

人骨肉瘤细胞系 F5M2, F4, OS-9901, SOSP-9607, CM319 由本实验室保存。细胞常规培养于体积分数为 10%胎牛血清

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30873027, 30973409)

作者简介:马琼(1983-),女,主管技师,主要从事肿瘤学相关研究工作。E-mail:mq0630@yahoo.com.cn

△通讯作者:裘秀春(1963-),女,副主任技师,博士,骨肿瘤免疫治疗基础研究。E-mail:qiuxiuchun2009@live.cn

(收稿日期:2010-12-22 接受日期:2011-01-18)

(四季青公司)的 RPMI 1640 培养液(Hyclone)中,其中含有青霉素 100 u/ml 及链霉素 100 u/ml,在 37℃ 体积分数为 5%CO₂、95%空气、饱和湿度的 CO₂ 孵箱内封闭式培养。

小动物活体成像系统由 Kodak 公司提供。维甲酸、N-羟琥珀酸亚胺、N,N'-二异丙基乙基胺、二甲胺吡啶购自 sigma 公司,红外染料 IRDye800CW NHS 酯购自 Li-Cor 公司,其它试剂和溶剂均购自 VWR 公司。

1.2 近红外标记的维甲酸造影剂的合成

将维甲酸、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酸二亚胺盐、N-羟琥珀酸亚胺、N,N'-二异丙基乙基胺、二甲胺吡啶溶于二氯甲烷,通过真空浓缩、浓盐水洗涤、MgSO₄ 干燥和快速层析得到 N-氨基乙烷-维甲酸,进一步与 Irdye800cw 相结合,纯化,最后通过基质辅助激光解析电离质谱加以验证。

1.3 肿瘤的异种移植

饲养 4-6 周雄性无胸腺裸鼠(18-22g)于定期消毒的动物室内,喂以无菌饲料和无菌水。待肿瘤细胞增殖至铺满培养皿底 80%时,用 0.25%胰蛋白酶消化,1000rpm 离心 5min,无菌 PBS 重悬。取 1×10⁶ 个肿瘤细胞于 50μL PBS 中,通过皮下注射入裸鼠后肢,每种细胞保证 10 只裸鼠,共计 50 只裸鼠。

1.4 共聚焦显微成像

收集细胞,加入近红外标记的维甲酸造影剂或游离染料(终浓度 100μM),37℃ 孵育 60min。PBS 洗涤细胞,4%多聚甲醛固定,与 Sytox Green 乙醇溶液于 4℃ 共孵育 15min。将染色的细胞转至玻片,镜下观察。图像由奥林巴斯共聚焦显微镜摄取。该显微镜所配备的激发光源和发射滤波片能够探测并分离标记的维甲酸信号(785/810nm)和细胞核信号(488/510nm)。共聚焦成像信号在细胞的同一层面上记录。Sytox Green 和近红外标记的维甲酸或近红外染料的信号分别为假色绿(发射波长为 510nm)和假色红(发射波长为 810nm)。

1.5 小动物活体成像试验

将 200μL 含 10nmol 近红外标记维甲酸造影剂的 PBS 静脉注射入荷瘤小鼠。注射 24h 后,每隔一天对一只裸鼠成像,检测其光学信号,每组 10 只,共 10 天。SPECT/CT 显影(西门子公司)显示解剖学结构,PET(西门子公司)检测 ¹⁸F-FDG 信号值。

1.6 剂量增加反应和毒性试验

将荷瘤裸鼠分为三组,分别按照每千克体重 1.2mg、2.4mg 和 5mg 的标准将近红外染料标记的维甲酸造影剂注射入小鼠体内。由成像数据可获知肿瘤与肌肉的维甲酸摄取比(TMR)。由对照小鼠获知造影剂的全身毒性状况。小鼠注射 PBS(对照)、低剂量(0.1mg/kg/week)或已公布人类临床试验剂量的五分之一的维甲酸(0.6mg/kg/week)。每周注射一次,共计四周。两天测一次小鼠体重,共计 30 天。体重的增长百分比作为毒性指标。

1.7 病理学分析

10%福尔马林固定组织,石蜡包埋,切片,HE 染色分析。

1.8 统计学处理

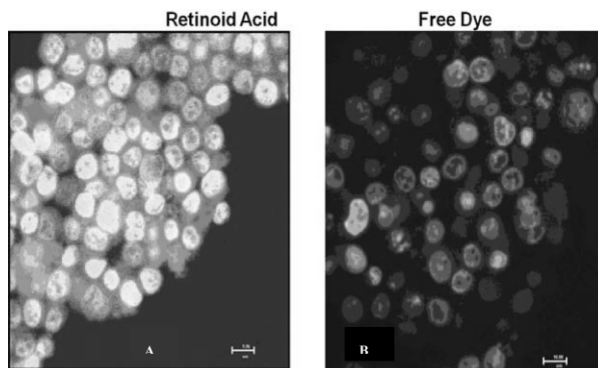
体内、体外成像结果通过 Image J 软件量化。用 SAS 9.1 统计软件分析数据,以 P<0.05 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维甲酸造影剂与细胞的体外结合试验和温度效应

本研究合成了维甲酸光学造影剂。人肿瘤细胞对近红外标

记的维甲酸造影剂的摄取通过共聚焦显微镜得以证实。细胞的成像结果表明该造影剂可与人骨肉瘤细胞系(F5M2, F4, OS-9901, SOSP-9607, CM319)结合(图 1 A, 红色)。在相同试验条件下,这些细胞与游离染料孵育后,检测不到信号(图 1 B)。维甲酸在胞浆和胞核中均有信号。高倍镜下,单个细胞的共聚焦显微成像显示维甲酸位于胞浆中。其内化入核具有温度依赖性。37℃ 孵育时比相同温度下孵育的阴性细胞或 4℃ 孵育的信号要强,差异具有显著性。



Confocal images: Retinoid Acid or Free Dye / Cell Nuclei

图 1 维甲酸与人骨肉瘤细胞相结合的共聚焦成像
(A. 维甲酸造影剂; B. 游离染料)

Fig.1 Confocal images: Retinoid Acid or free dye
IRDye800CW/Cell Nuclei

2.2 体内成像

骨肉瘤细胞 F4 的异种移植如图 2 所示。肿瘤块位于裸鼠的左腿,无钙化,较之肌肉有较高的葡萄糖摄取。合并后的影像显示 ¹⁸F-FDG 和 CT 骨骼结果。为了排除游离染料对成像结果的影响,进行了平行的成像比较。对游离染料(图 3 ABCDE)和维甲酸造影剂(图 3 FGHJIJ)直接加以比较。使用同一强度标尺对图像加以分析。注射游离染料 24h 后,小动物体内完全无法检测到光学信号(图 3 A),而在注射维甲酸造影剂 72h 后,小动物体内显示肿瘤与本底信号比(TBR)为 2.76(图 3 F)。作为对照的肿瘤血管造影剂 RGD 在小动物体内的 TBR 比与其相近(图 3 B 和 G)。RGD 和游离染料(图 3 C)以及 RGD 与维甲酸(图 3 H)的合并图像显示了肿瘤血管与不同造影剂的关系。全身骨骼 CT 与 IRDye800CW 或维甲酸造影剂的合并图像表明,游离染料完全排出体外(图 3 D)。此外,成像结果还表明,肝脏和肿瘤区域有维甲酸信号的增强(图 3 E)。而 RA、RGD 和 CT 的合并图像显示肿瘤区域有血管和维甲酸信号的同时加强(图 3 J,黄色)。

Characteristics of SOSP-9607 Osteosarcoma

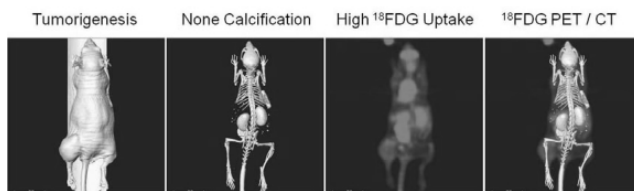


图 2 人骨肉瘤异种移植的体内成像

Fig.2 In vivo imaging of a human osteosarcoma tumor
xenograft

RA Agent Binds to SOSP-9607 Xenograft

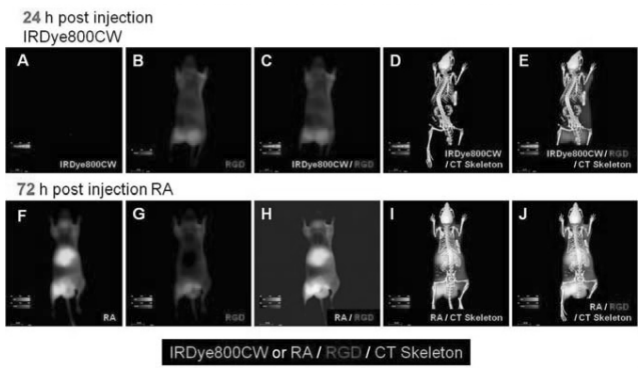


图 3 维甲酸造影剂与游离染料的并行比较。IRDye800CW 在体内的快速清除(24h)(中排 绿色信号)以及残留的肿瘤血管造影剂信号(中排 红色信号)注射维甲酸造影剂 72h 后,肝脏和肿瘤部位显示高信号强度(下排 绿色信号)以及肿瘤血管成像信号(下排 红色信号)。复合成像显示了肿瘤中维甲酸与血管信号的重叠(下排,黄色信号)。
Fig.3 Side-by-side comparison of RA agent and free dye. Rapid (24-hour) clearance of IRDye800CW from the body (middle, green signal) and the remaining tumor vasculature-imaging agent signal (middle, red signal). High signal intensity of RA agent in the liver and tumor 72 hours postinjection(below, green signal) and tumor vasculature-imaging signal(below, red signal). The merged image shows the overlay of the tumor RA and vasculature signals(below, yellow signal).

2.3 剂量反应与全身毒性

为了测定靶标特异性生物造影剂的饱和效应,本研究给三组裸鼠分别注射了不同剂量的维甲酸造影剂。以肿瘤与肌肉的维甲酸摄取比来判定肿瘤的剂量反应。当注射剂量从每千克体重 1.2mg 增加到 5mg 时,无显著差异($P>0.5270$)。但较大剂量造影剂的注射与体重增加的明显减少呈相关。裸鼠体重增长的百分比在高剂量组(0.6mg/kg/week)显著低于未处理的对照组($P=0.0003$)和低剂量组(0.1mg/kg/week)($P=0.0001$)。对照组和低剂量组无显著差异($P=0.0519$)。

2.4 病理学结果

为了在病理学水平证实全身信号分布的成像结果(图 4 A),对人骨肉瘤(图 4 B)和肌肉(图 4 C)、肾脏(图 4 D)和肝脏组织(图 4 E)进行 HE 染色。

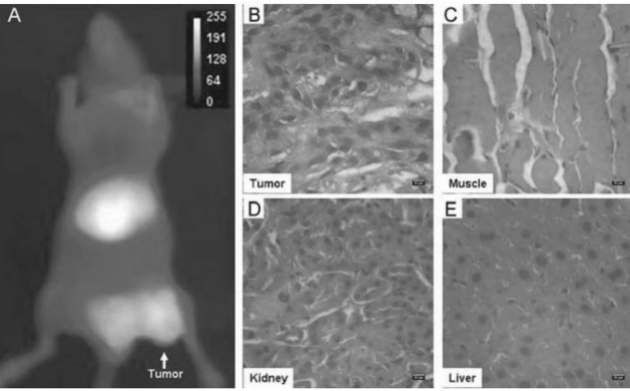


图 4 维甲酸信号的全身分布及对应组织的病理染色
Fig.4 Whole body distribution of RA and the pathological staining of corresponding tissues

3 讨论

本研究开发了一种可用于临床前体内、体外试验的近红外标记的维甲酸类造影剂。通过该造影剂的光学特性,我们在细胞水平研究了维甲酸的穿梭转运。近红外标记的维甲酸能够用于检测人类肿瘤的异种移植,当然未结合的造影剂也会造成全身毒性。造影剂与肿瘤的结合量取决于随着时间的推移,它从肝脏到肿瘤的再分布状况。造影剂的靶标是达到高的肿瘤本底比至为重要的因素。

该研究评价了报告基团 IRDye800CW。体外细胞结合试验表明,除 CM319 细胞外,维甲酸造影剂能够与其它所有骨肉瘤细胞系相结合。共聚焦显微成像表明,除了阴性的 CM319 细胞外,维甲酸信号存在于其它几种细胞的胞膜和胞质中。体外细胞结合与内化试验具有温度依赖性,37℃比 4℃得到的信号要强。维甲酸内化入细胞质的机制仍有待于进一步的研究,而它对温度的依赖性表明,这可能包含了受体-配体的结合过程,因为细胞膜上的受体是与之结合的第一步。一种证明受体特异性的较好的方法是通过未标记的维甲酸进行阻断,显示标记了的维甲酸与未标记的维甲酸结合于相同的位点。但未标记维甲酸溶解度低,而在我们的细胞培养条件下显然无法达到阻断试验所要求的浓度,因此是不可行的。在将来的受体特异性研究中,还需要对维甲酸造影剂的结构加以改造,从而提高其溶解度。

成像系统能够检测到 10pmol 造影剂,并在同一部位精确分离 RGD-Cy5.5 和 RA-IRDye800CW 两种信号。这一分离过程可通过设定照相机程序使其自动转换滤波片,从而使在成像过程中检测不同造影剂得以实现。

平行的体内成像试验将游离染料和维甲酸造影剂加以比较,明确的将游离染料在成像结果中的影响去除。由于缺少靶标,注射造影剂后游离染料会在 24h 内从体内排出。肝脏和肿瘤部位信号强度的快速增加,表明了游离染料和维甲酸造影剂在药效学上的差异。成像结果和群体统计学分析均表明,靶标在提高 TBR 中发挥着重要作用。

这一造影剂在肝脏部位有较高的信号强度,因此并不适用于肝脏疾病的诊断。体内非损伤性研究表明了动态成像和监测试剂重分布的重要性。大部分造影剂最初滞留于肝脏,从而产生较低的肿瘤肌肉摄取比。由于该造影剂的重分布速率较慢,因此其最佳成像时间比临床上常见的造影剂要长。从肝脏到肿瘤的重新分布大概需要 6 天的时间,并使肿瘤与肌肉的维甲酸摄取比达到 2.7。以上数据表明,时间是影响成像和治疗的一个重要因素。当前的临床实践中,所有患者于同一时间点进行成像,这种“一刀切”的时间点划定会产生误导诊疗的结果。研究结果表明,即使在遗传背景完全相同的小动物中($n=10$),光学成像的最佳时间也存在着个体差异。这说明患者中也可能有不同的情况,不能因为某个时间点成像阴性就否定其阳性结果,需要在原位模型中成像后再下定论。然而这些模型的光学成像需要一定的信号穿透深度,以及核医学中半衰期长的同位素来延长成像时间。这些技术目前为止还处于研究阶段。

本实验数据证明,使用报告基团标记的维甲酸造影剂对异种移植的肿瘤成像的可行性,但这一技术仅限于分析表层组织,或者在临床光学成像中与内窥镜结合使用。任何成像结果

都需要以另外一种可作为“金标准”的方法,如病理学分析加以验证。本研究就是通过组织病理学数据对全身成像的信号加以证实。

本研究的另一个重要发现在于,即使只是注射了 18.4 μ g 的造影剂,肝脏区域的信号强度到第 14 天也没有低至肌肉的信号水平。这表明,与很多化学造影剂一样,该造影剂会在肝脏滞留若干时间。而长时间的滞留会带来肝功能的紊乱。近红外染料暂未发现有毒性^[11],毒性的产生可能是维甲酸造成的。

在靶标特异性治疗中,疾病标志物是否饱和对确定有效的生物剂量至关重要。通常这是借由体外受体-配体结合试验来加以确定的。由于总期望在动物试验中达成受体-配体的结合,因此在独立试验中用肿瘤与肌肉的维甲酸摄取比来测试肿瘤剂量的增加反应。本研究发现当造影剂由 1.2mg/kg 体重增加至 5mg/kg 体重时,肿瘤与肌肉的维甲酸摄取比无显著统计学差异。这一结果证实了我们之前的假设,即当肿瘤结合位点饱和后,注射剂量的增加不会使肿瘤与肌肉的维甲酸摄取比增高。而另一方面,循环系统中未结合的造影剂会使背景值增加,导致全身或器官特异性毒性。

本研究以体重的增加作为全身毒性的指标,对肿瘤饱和剂量(0.1mg/kg/week)和五分之一标准治疗剂量(0.6mg/kg/week)加以比较,发现与饱和剂量组相比,五分之一标准剂量组体重的增加明显较少($P=0.0001$)。这些结果支持了设想:靶标特异性生物造影剂的使用应当基于靶标分子的生物学反应剂量来进行。

维甲酸在肿瘤的预防及治疗中已经显示出巨大的优越性^[12],但这一论断在大规模的临床试验中尚未得以证实,至今为止所有关于此的研究均指出其副作用的严重性^[13-15]。Khuri FR 及其同事报道了二期临床试验中,给 I 期和 II 期头颈部肿瘤患者注射低剂量维甲酸从而抑制继发的原发性肿瘤出现的病例。处理组病人给药为 30mg/天,按照平均体重 65kg 计,给他们注射的维甲酸为 3.2mg/kg/week。与本研究中的动物试验相比(0.74mg/kg/week),这一剂量达到了 4.3 倍(按体重)或 292 倍(按体表面积)。如果维甲酸在体内的分布和动态特性与动物试验中相似,49.7%的患者有副作用发生也就不足为奇了^[16]。本实验数据表明,在分子分析的基础上给予靶标特异性治疗和施加最优的生物学剂量而非传统的最大耐受剂量都是至关重要的^[16]。因此,非损伤的检测维甲酸受体阳性肿瘤和维甲酸类制剂的示踪技术成为关键。这种兼具“找寻、治疗、可视”功能的造影剂将有助于个体化分子医疗的进一步发展。

参考文献(References)

- [1] Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, et al. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy [J]. *Carcinogenesis*, 2000,21 (7): 1271-1279
- [2] Mongan NP, Gudas LJ. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation*[J]. 2007, 75(9):853-870
- [3] 丁桂聪,毛天球,黄思东,等.维甲酸对口腔黏膜上皮细胞增殖的影响[J].*广东牙病防治*,2008,16(7):303-305
- [4] DING Cui-cong, MAO Tian-qiu, HUANG Si-dong, et al. Retinoic Acid Regulates Human Oral Epithelial Proliferation in vitro[J]. *Journal of Dental Prevention and Treatment*, 2008,16(7):303-305
- [5] 陈万涛,蔡殿才,李宁毅,等. RAR β 基因联合维甲酸体内抗口腔鳞癌作用机制研究[J].*口腔颌面外科杂志*,2005,15(1):9-12
- [6] CHEN Wan-tao, CAI Dian-cai, LI Ning-yi, et al. The Antitumor Mechanism of RAR β Gene Combined with ATRA on Human Oral Squamous Cell Carcinoma Xenografts in Athymic Nude Mice [J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2005,15(1):9-12
- [7] Braams JW, Pruim J, Freling NJ, et al. Detection of lymph node metastases of squamous-cell. cancer of the head and neck with FDG-PET and MRI[J]. *J Nucl Med*, 1995,36(2):211-216
- [8] Duhaylonsod FG, Lowe VJ, Patz EF, Jr., et al. Detection of primary and recurrent lung cancer by means of F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG PET)[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995, 110(1):130-140
- [9] Inoue T, Kim EE, Komaki R, et al. Detecting recurrent or residual lung cancer with FDG-PET[J]. *J Nucl Med*, 1995,36(5):788-793
- [10] Escalona S, Blasco JA, Reza MM, et al. A systematic review of FDG-PET in breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2010,27(1):114-129
- [11] Dassen AE, Lips DJ, Hoekstra CJ, et al. FDG-PET has no definite role in preoperative imaging in gastric cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2009,35(5):449-455
- [12] Heusner TA, Hahn S, Hamami ME, et al. Incidental head and neck (18)F-FDG uptake on PET/CT without corresponding morphological lesion: early predictor of cancer development? [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 36(9):1397-1407
- [13] Marshall MV, Draney D, Sevic-Muraca EM, et al. Single-Dose Intravenous Toxicity Study of Iridium-192 800CW in Sprague-Dawley Rats[J]. *Mol Imaging Biol*,2010,12(6):583-94
- [14] Pino LK, Guo Y, Noelle RJ. Retinoic acid: A key player in immunity [J]. *Biofactors*, 2010,Epub
- [15] Camerini T, Mariani L, De Palo G, et al. Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2001,19(6):1664-1670
- [16] Khuri FR, Lee JJ, Lippman SM, et al. Randomized phase III trial of low-dose isotretinoin for prevention of second primary tumors in stage I and II head and neck cancer patients [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006,98(7):441-450
- [17] Tanaka T, Suh KS, Lo AM, et al. p21WAF1/CIP1 is a common transcriptional target of retinoid receptors: pleiotropic regulatory mechanism through retinoic acid receptor (RAR)/retinoid X receptor (RXR) heterodimer and RXR/RXR homodimer [J]. *J Biol Chem*, 2007,282(41):29987-29997
- [18] Midgley R, Kerr DJ. Capecitabine:have we got the dose right [J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2009, 6(1):17-24