

## $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV 在肺癌化疗评估中的应用

蔡 炯, 于 飞, 李 方, 王世真

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院核医学科, 北京 100730

通信作者: 蔡炯 电话: 010-65295519, 传真: 010-65295510, 电子邮件: jiongcai@sina.com

**摘要:** **目的** 制备放射性药物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV, 评估其在早期预测肺癌化疗效果中的作用。**方法** 通过毕赤酵母重组表达、硫酸铵沉淀和分子筛层析纯化得到 annexinV, 采用氯化亚锡还原法在 annexinV 的氨基端标记放射性核素 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ , 经脱盐柱纯化获得标记产物。采用薄层层析测定 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV 的标记率和放射性化学纯度, 外露磷脂酰丝氨酸的红细胞测定 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV 的生物活性。通过在 615 小鼠腋部下接种 LA795 细胞和组织插块法获得荷肺癌小鼠模型, 经腹腔注射环磷酰胺治疗肺癌后 6、12、24 和 48 h 测定 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV 在小鼠体内的分布情况。**结果** 毕赤酵母工程菌株分泌表达 annexinV, 经硫酸铵分级沉淀和分子筛层析纯化后 annexinV 得以有效回收。室温下 30 min 完成 annexinV 的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记, 标记率为 50.2%。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV 放射性化学纯度为 93.9%, 其生物活性保存良好。生物分布实验表明, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV 通过肾脏排泄。615 荷肺癌小鼠模型经过环磷酰胺化疗后 48 h, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV 在肿瘤组织的摄取达到最高, 肿瘤/肌肉放射性摄取率之比为 6.34, 肿瘤/血液放射性摄取率之比为 4.09。**结论** 制备了毕赤酵母来源的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV, 有可能应用于早期预测肺癌化疗效果。

**关键词:**  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV; 肺癌; 环磷酰胺; LA795; 生物分布

中图分类号: R730.44 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2008)05-0595-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2008.05.018

## Application of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV in Predicting the Therapeutic Effect of Chemical Agent on Lung Cancer

CAI Jiong, YU Fei, LI Fang, WANG Shi-zhen

Department of Nuclear Medicine, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: CAI Jiong Tel: 010-65295519, Fax: 010-65295510, E-mail: jiongcai@sina.com

**ABSTRACT: Objective** To prepare  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV and evaluate its application in the early prediction of therapeutic effect of chemical agent on lung cancer. **Methods** Annexin V was obtained by recombinant *pichia pastoris* expression, ammonium sulfate precipitation, and size-exclusion chromatography. The purified protein was labeled with  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  at the N-terminal site by stannous chloride reduction and purified by desalting. The labeling yield and radiochemical purity of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV were determined by instant thin-layer chromatography. The biological activity of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexinV was tested by phosphatidylserine-exposed erythrocytes bound radioactivity counting. The lung cancer mice models were established by inoculating LA795 cells to right flank of 615 mice subcutaneously and tumor tissue transplantation. The biodistribution of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V in lung cancer mice models were investigated at 6, 12, 24, and 48 h after cyclophosphamide administration. **Results** The annexin V was secreted from *pichia pastoris* and purified by ammonium sulfate precipitation and size-exclusion

chromatography with high yield. The annexin V could be labeled at room temperature with 50.2% radioactivity yield. The radiochemical purity of  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexinV reached up to 93.9% with intact biological activity. The bio-distribution analysis demonstrated that  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexinV was excreted from kidney. The uptake of  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexinV at tumor reached maximum 48 h after cyclophosphamide administration while tumor to muscle ratio was 6.34 and tumor to blood ratio was 4.09. **Conclusions**  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexinV derived from *pichia pastoris* was successfully prepared. It is useful in predicting the therapeutic effect of chemical agent on lung cancer.

**Key words:**  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V; lung cancer; cyclophosphamide; LA795; biodistribution

*Acta Acad Med Sin*, 2008, 30(5): 595-598

肺癌严重威胁人类健康, 其治疗后 5 年存活率有待提高<sup>[1]</sup>。最近, 一种诊断性药物  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexinV 被证实可早期预测肺癌治疗效果, 并用于肺癌患者的治疗评估<sup>[2]</sup>, 但目前国内尚无自创的  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexinV。本研究采用基因工程手段, 通过真核系统重组表达了更利于  $^{99}\text{Tc}^m$  标记的带有内在金属螯合位点的 annexinV, 制备了放射性药物  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexinV, 并应用于环磷酰胺治疗的小鼠荷肺癌模型, 评估了其在早期预测肺癌化疗效果中的作用。

## 材料和方法

**材料** 小鼠肺腺癌 LA795 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心; 615 近交系小鼠 20 只, 体重 22 ~ 24 g, 9 ~ 11 周龄, 雌雄各半, 购自天津血液病研究所, 清洁级环境饲养; 外露磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 红细胞由本实验室自制并在 4℃ 长期保存。

**AnnexinV 的纯化** (1) AnnexinV 制备: 参照文献 [3], 即通过将人 *annexinV* 基因克隆入 pPIC9K 质粒, 转化毕赤酵母 GS115 表达获得。(2) 硫酸铵沉淀: 将甲醇诱导表达的重组酵母培养液经 9 000 r/min (离心半径 6 cm) 离心 10 min 去除细胞, 在上清液中加入硫酸铵粉末, 使其终浓度达 20%; 充分溶解后 9 000 r/min (离心半径 6 cm) 离心 30 min, 取上清液加入硫酸铵粉末, 使其终浓度达 50%; 充分溶解后 9 000 r/min (离心半径 6 cm) 离心约 30 min, 弃上清, 所得沉淀用 5 ml 0.01 mol/L pH7.2 PBS 溶解。(3) 分子筛层析纯化: 用同样 PBS 预平衡 Sephadex-G75 柱, 将上述溶液上样到柱顶, 以 PBS 洗脱, 用紫外检测仪进行监测; 当 OD280 nm 数值显著上升时开始收集洗脱峰, 并用考马斯亮蓝 G250 跟踪监测蛋白浓度, 收集蛋白质溶液; 将样品装于 10 KD 超滤管中, 于 4℃ 进行超滤, 将缓冲体系更换为含 100

mmol/L NaCl 的 20 mmol/L HEPES (pH 7.4), 并浓缩蛋白质到终浓度 5 mg/ml; 在浓缩蛋白质中加入终浓度为 1 mmol/L 的 DTT, 37℃ 保温 15 min, 用 20 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.2) 透析过夜后稀释到终浓度 1 mg/ml。(4) SDS-PAGE 检测纯化结果: SDS-PAGE 胶的制备参照文献<sup>[4]</sup>, 下层分离胶浓度为 12%, 上层积层胶浓度为 5%, 电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色。

**AnnexinV 标记缓冲液制备** 配制 20 mmol/L 葡庚酸钠、10 mmol/L HEPES 缓冲液, 调节 pH 至 6.6。向上述缓冲液中通入氩气脱氧 15 min, 加入  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  使其终浓度达 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 按每管 1 ml 分装于 Eppendorf 管中, 2 h 内用于标记。未使用的标记缓冲液用低温冻干法脱去水分, 保存于 -20℃ 冰箱中, 标记时用经氩气脱氧去离子水 1 ml 溶解即可。

**AnnexinV 的  $^{99}\text{Tc}^m$  标记** 取 200  $\mu\text{l}$  标记缓冲液, 依次加入 74 MBq/100  $\mu\text{l}$   $^{99}\text{Tc}^m \text{O}_4^-$ 、100  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  annexin V 溶液混匀, 室温放置 30 ~ 60 min。取 0.5  $\mu\text{l}$  反应混合物点样于薄层层析纸上, 以 PBS 缓冲液为展开剂展开, 晾干后将薄层层析纸裁成 1 cm 小段, 用  $\gamma$  井型计数器 (FT-603、北京核仪器厂) 分别测定其放射性计数, 计算标记率。

**$^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V 的纯化** 预先用 PBS 平衡 PD-10 脱盐柱。取 200  $\mu\text{l}$  反应混合物上样。用 0.5 ml PBS 缓冲液淋洗脱盐柱 3 次, 收集第 2 次 0.5 ml 淋洗液, 测定放射性活度。取 0.5  $\mu\text{l}$  纯化所得溶液点样于薄层层析纸上, 以 PBS 缓冲液为展开剂展开, 晾干后将薄层层析纸裁成 1 cm 小段, 用  $\gamma$  井型计数器分别测定其放射性计数, 计算放射性化学纯度 (原点为  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V, 展开剂前沿为游离  $^{99}\text{Tc}^m$ )。

**$^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V 的 PS 细胞结合活性测定** 在 4 只 Eppendorf 管中分别加入 1 ml 含 2.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  的 HNKGB 缓冲液, 加入  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V 调整终浓度为 10 nmol/L, 随机分为结合组和非结合组, 每组 2

管。结合组管中加入 100 μl 4.2 × 10<sup>8</sup>/ml 的外露 PS 红细胞，非结合组管加入 100 μl 缓冲液，室温放置 15 min，8 300 r/min（离心半径 6 cm）离心 3 min，取 800 μl 上清液测定放射性计数。结合到细胞上的放射活性 = (1 - 结合组上清液放射性计数/非结合组上清液放射性计数) × 100%

**荷肺癌小鼠模型建立** 取对数生长期 LA795 细胞，消化后 4℃、500 r/min（离心半径 6 cm）离心 10 min，弃上清，加入适量冷 PBS 调整细胞密度至 2.5 × 10<sup>7</sup>/ml。经 615 小鼠右腋皮下注射细胞悬液 0.2 ml (5 × 10<sup>6</sup> 个细胞/只)。待肿瘤生长直径达 0.5 cm 左右时断颈处死荷瘤小鼠，用 75% 乙醇浸泡体表消毒，无菌条件下剥离瘤块，置于 PBS 缓冲液中。剔除肿瘤包膜，用眼科剪将瘤块剪成约 1 mm<sup>3</sup> 的小块，经 18 ~ 20 号套管针接种于小鼠腋窝皮下。

**<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-annexin V 在荷肺癌小鼠体内的生物分布监测** 待肿瘤生长至直径约 1 cm 后，将小鼠随机分为化疗组和对照组（化疗组 4 组，每组 4 只小鼠，各配 1 只作为对照）。化疗组小鼠腹腔内注射 150 mg/kg 的环磷酰胺（CTX，溶于生理盐水），对照组小鼠注射同体积生理盐水。4 组化疗组小鼠分别于化疗后 8、24、48、72 h 经尾静脉注射 0.925 MBq <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-annexin V，6 h 后处死小鼠，取心、肝、脾、肺、肾、肌肉、骨骼、脑、血液和肿瘤组织称重，并用 γ 井型计数器测定放射性计数，计算每克组织放射性摄取率（% ID/g）及肿瘤与正常组织摄取率之比，包括肿瘤/肌肉和肿瘤/血液的放射性摄取率之比。

## 结 果

**AnnexinV 纯化结果** SDS-PAGE 结果显示，毕赤酵母工程菌株经过培养和甲醇诱导 24 h 后，在培养基中分泌表达相对分子质量为 36 000 的蛋白质分子（图 1），与 annexinV 的理论相对分子质量一致。培养基中的 annexinV 经硫酸铵分级沉淀和分子筛层析后，蛋白质得以有效回收。再经过 DTT 还原处理，蛋白质的相对分子质量没有显著改变。

**AnnexinV 的<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>标记、纯化和活性测定结果** 将标记缓冲液、同位素 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> 和 AnnexinV 在室温下放置 30 min，测定蛋白质的标记率达到 50.2%。经过脱盐柱纯化，<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-AnnexinV 的放射化学纯度达到 93.9%。通过外露 PS 的红细胞测定 <sup>99m</sup>Tc-annexinV 的生物活性，发现在含钙离子的缓冲液中，78% 的

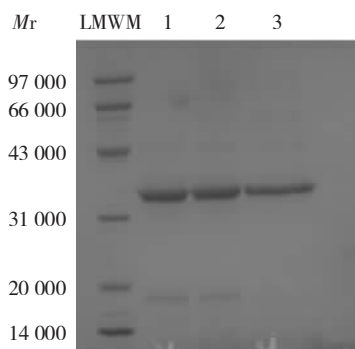


图 1 SDS-PAGE 电泳法鉴定 annexin V

Fig 1 SDS-PAGE results of annexin V

LMWM: 低分子量标尺; 1: 甲醇诱导表达的蛋白质; 2: 分子筛层析后的蛋白质; 3: 用于标记的蛋白质; Mr: 相对分子质量

LMWM: low molecular weight marker; 1: the supernatant of methanol-induced pichia pastoris media; 2: the protein purified by size-exclusion chromatography; 3: the protein treated by DTT for labeling; Mr: relative molecular mass

annexinV 和红细胞有效结合。

**荷肺癌小鼠模型建立情况** 对数生长期的 LA795 小鼠肺癌细胞呈椭圆梭状（图 2A）。经右腋皮下注射 LA795 细胞 7 d 后，小鼠肿瘤直径即达 0.5 cm 左右。随后利用组织插块法将瘤块接种于小鼠腋窝皮下，10 d 后肿瘤直径达 0.5 ~ 1 cm，15 d 后达到 1.5 cm（图 2B）。

**<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-annexin V 在荷肺癌小鼠体内的生物分布情况** 注射 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-annexin V 后 6 h，对照组小鼠的放射性物质在肾脏组织中含量最高，为 (22.49 ± 3.04) % ID/g；其次为脾脏、肝脏和胃壁；在脑组织中含最低，仅为 (0.11 ± 0.03) % ID/g。经环磷酰胺化疗后，化疗组小鼠的肿瘤组织对 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-annexin V 的摄取随时间变化而变化：化疗后 8 h 降至 (0.59 ± 0.13) % ID/g，该趋势一直维持至化疗后 24 h [(0.68 ± 0.22) % ID/g]；化疗后 48 h，<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-annexin V 在肿瘤组织的摄取升高到 (1.84 ± 1.33) % ID/g，到化疗后 72 h，这种摄取又恢复到与对照组相似的水平 [(1.09 ± 0.69) % ID/g vs. (1.12 ± 0.42) % ID/g]（表 1）。在肿瘤与正常组织摄取率之比方面，肿瘤/肌肉放射性摄取率之比在化疗后 8、24、48 和 72 h 分别为 2.27、1.94、6.34 和 3.03，肿瘤/血液放射性摄取率之比分别为 0.75、1.05、4.09 和 1.85，两者均在化疗后 48 h 达到最高，为对照组的 2 倍左右 (6.34 vs. 3.20; 4.09 vs. 1.42)。

表 1  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 在荷肺癌小鼠体内的生物分布Table 1 Bio-distribution of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V in lung cancer mouse models ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , % ID/g)

组织 Tissue	对照组 Control group	化疗组 Treatment group			
		8 h	24 h	48 h	72 h
心 Heart	0.92 ± 0.11	0.73 ± 0.11	0.91 ± 0.24	0.59 ± 0.11	0.58 ± 0.12
肝 Liver	7.37 ± 2.17	2.37 ± 0.53	4.42 ± 2.20	5.09 ± 1.41	6.83 ± 0.80
脾 Spleen	8.43 ± 4.31	9.65 ± 6.13	10.27 ± 6.73	14.37 ± 6.82	21.68 ± 8.42
肺 Lung	2.50 ± 0.62	1.14 ± 0.22	2.19 ± 1.15	2.50 ± 0.56	3.32 ± 0.54
肾 Kidney	22.49 ± 3.04	11.25 ± 1.03	14.08 ± 5.30	21.94 ± 7.53	24.02 ± 6.37
胃 Stomach	7.63 ± 3.72	5.57 ± 2.24	5.43 ± 2.31	5.32 ± 2.21	5.01 ± 1.79
肠 Intestine	2.23 ± 0.78	1.37 ± 0.41	1.09 ± 0.68	1.84 ± 0.88	1.00 ± 0.36
脑 Brain	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.34 ± 0.02
肌肉 Muscle	0.35 ± 0.03	0.26 ± 0.09	0.37 ± 0.15	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.08
骨骼 Bone	1.24 ± 0.26	0.81 ± 0.20	1.12 ± 0.23	1.74 ± 0.32	1.60 ± 0.35
血液 Blood	0.79 ± 0.17	0.79 ± 0.28	0.65 ± 0.13	0.45 ± 0.11	0.59 ± 0.10
肿瘤 Tumor	1.12 ± 0.42	0.59 ± 0.13	0.68 ± 0.22	1.84 ± 1.33	1.09 ± 0.69

## 讨 论

本研究采用基因工程方法, 将人 *annexinV* 基因克隆入 pPIC9K 质粒, 转化毕赤酵母 GS115, 经过培养和甲醇诱导 24 h 后, 在培养基中得到纯度较高的 *annexinV*。但是, 由于在培养基中存在的其他非蛋白质杂质 (如多糖等) 会影响  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  标记 *annexinV* 的纯化和放射性化学纯度, 因此同位素标记前需进一步纯化。为此, 本研究利用能减少多糖杂质的硫酸铵分级沉淀和减少色素含量的分子筛分离纯化 *annexinV*, 以期减少 *annexinV* 杂质含量。结果显示, 经过纯化的 *annexinV* 和  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$  在室温下就能完成标记, 标记率达 50.2%, 放射化学纯度达 93.9%。细胞结合实验表明, 标记后获得的  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*annexinV* 具有很好的生物学活性, 可以和磷脂酸丝氨酸结合。

LA795 细胞系是小鼠肺腺癌瘤株, 615 近交系小鼠为昆明种白化雌性小鼠和 C57BL/6 杂交后代, 研究显示, LA795 细胞株在 615 近交系小鼠中有较高成瘤率<sup>[5]</sup>。为了评估  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*annexinV* 在早期预测肺癌化疗效果中的作用, 本研究将体外培养的 LA795 肿瘤细胞直接接种于 4 只 615 小鼠, 均得到生长良好的肿瘤。随后, 用已建立的荷瘤鼠作为瘤源接种, 通过组织插块法扩种得到 31 只荷瘤小鼠, 并将其中 20 只肿瘤直径在 0.5 ~ 1 cm 的荷瘤小鼠用于本次实验。对荷瘤小鼠生物分布实验结果表明,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*annexinV* 主要分布于肾脏, 提示肾脏是其主要排泄器官。脑组织中放射性分布最低, 表明  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*annexinV* 难以通过模型动物的血脑屏障。肿瘤模型经环磷酰胺化疗后, 肿瘤组织对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*annexinV* 的摄取随时间而发

生变化, 24 h 以内较低, 48 h 达到最高, 72 h 又回到基础水平, 提示化疗后 48 h 肺腺癌细胞出现明显凋亡, 环磷酰胺治疗肺腺癌是有效的。

综上所述, 本研究制备了毕赤酵母来源的  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*annexinV*, 并对其在肺癌化疗评估中的作用进行了初步实验, 结果显示  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -*annexinV* 可以在化疗药物环磷酰胺治疗动物肺腺癌的早期观察到癌细胞对化疗药物的敏感性和细胞凋亡。

(本文图 2 见插图封三)

## 参 考 文 献

- [1] Gilligan D, Nicolson M, Smith I, *et al.* Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NVALT 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review [J]. *Lancet*, 2007, 369(9577):1929-1937.
- [2] Kartachova M, van Zandwijk N, Burgers S, *et al.* Prognostic significance of  $^{99}\text{Tc}$  Hynic-rh-annexin V scintigraphy during platinum-based chemotherapy in advanced lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(18):2534-2539.
- [3] 蔡 炯, 李 方, 张迎强, 等. 突变型人膜联蛋白 V 的重组表达 [J]. *中国医学科学院学报*, 2006, 28(4):549-552.
- [4] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 880-887.
- [5] 邓淑华, 石艳华, 王宏梅. 小鼠肺腺癌 LA795 细胞系移植特性的初步观察 [J]. *河北医学*, 2000, 6(1):30-32.

(2008-03-19 收稿)