

Research progresses of PET molecular probes for tumor apoptosis imaging in vivo

WANG Hui, WU Xiao-yan, ZHANG Jin-ming, TIAN Jia-he*

(Department of Nuclear Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] Apoptosis plays a crucial role in tumor procession and development. In recent years, there has been a remarkable progress in apoptosis mechanism research. Imaging of apoptosis in vivo is very important in prediction of the biological behavior of tumor, which can guide the individualized treatment of tumor. PET plays an important role in apoptosis imaging studies of tumor. Development of novel PET molecular probes for apoptosis imaging is the present hotspot.

[Key words] Apoptosis; Neoplasms; Positron-emission tomography

体内肿瘤凋亡显像中 PET 探针的研究进展

王 卉, 吴晓燕, 张锦明, 田嘉禾*

(中国人民解放军总医院核医学科, 北京 100853)

[摘要] 细胞凋亡是生命的一种基本生理机制, 对恶性肿瘤的发生和发展有重要意义。近年来, 对细胞凋亡机制的研究已有重大进展。检测体内肿瘤细胞的凋亡状态及凋亡水平, 对预测肿瘤生物学行为、指导个体化治疗具有重要意义。PET 在凋亡显像研究中发挥着重要作用, 新型分子探针的研制开发是核医学界研究的热点。

[关键词] 凋亡; 肿瘤; 正电子发射断层摄影术

[中图分类号] R73; R445.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2013)05-0826-04

细胞凋亡是生命的一种基本生理机制, 也是许多疾病发生发展的病理基础。早在十几年前, 人们就认识到凋亡对于恶性肿瘤的发生、治疗及预后的重要性。随着研究的深入, 凋亡机制日趋清楚, 已成为近年来生物学研究最重要的进展之一, 而体内凋亡显像在肿瘤的治疗、疗效观察、新药评价等方面将具有广泛的前景。

1 肿瘤与凋亡

凋亡是普遍存在于多细胞生物中的自杀程序, 消耗能量但不引起炎症反应, 通常在 1 h 内细胞破碎成

片段, 被邻近细胞或过路的巨噬细胞快速吞噬。肿瘤细胞可通过多种方法逃避凋亡, 其中 p53 通路的失活是肿瘤细胞中广泛存在的一种方式, 在肿瘤发展的多个阶段发挥重要作用。目前 40% 的人类肿瘤发现有 p53 突变, 其中 74% 为点突变, 突变型 p53 对野生型 p53 具有显性负效应, 可抑制 p53 家族成员 (如 p63 和 p73) 的功能^[1-2]。研究^[3]显示 p53 突变小鼠较 p53 缺失小鼠有更大的肿瘤负荷, p53 显性负等位基因的突变较其等位基因完全缺失更有利于肿瘤细胞生长^[1-3]。

肿瘤细胞中尚有其他凋亡机制发生改变。如肿瘤细胞中 PI3K-Akt/PKB 通路过度活化, 当酪氨酸激酶受体与癌蛋白 Ras 结合, 即可活化 PI3K, 继而活化 Akt/PKB, 后者磷酸化并抑制促凋亡蛋白; 许多肿瘤细胞中 NF- κ B 过度活化, 活化 NF- κ B 转录因子具抗凋亡作用, 可激活大量下游靶基因, 许多抗凋亡基因的过表达都与之直接相关^[4-5]; 胞浆蛋白 APAF1 能与细胞色素 c 结合并活化 caspase9, 促进细胞凋亡, 而黑色素瘤细胞中 APAF1 基因启动子区甲基化而致其功能

[基金项目] 国家自然科学基金(81171400)、科技部重大仪器专项基金(2011YQ030114)、北京市自然科学基金(7122162)。

[作者简介] 王卉(1968—), 女, 山东德州人, 博士, 副主任医师。研究方向: 肿瘤分子影像。E-mail: sddxwanghui@126.com

[通讯作者] 田嘉禾, 中国人民解放军总医院核医学科, 100853。

E-mail: tianjh@vip.sina.com.cn

[收稿日期] 2012-10-29 **[修回日期]** 2013-01-13

失活;另外,结肠癌中促凋亡基因 Bax 突变失活,不同组织来源的多种肿瘤中都有 Bcl2 表达增强^[6-8]等。总之,肿瘤抗凋亡机制十分复杂,还有很多因素尚未明了。

2 caspase3 与凋亡

caspase 为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶。凋亡过程启动会导致细胞内一系列 caspase 级联活化,最终致细胞死亡。caspase 从功能上分为两类,一类是起始性 caspase,如 caspase8、9、10,通过活化 caspase 级联反应参与凋亡发生;另一类是死亡执行 caspase,如 caspase3、6、7,水解破坏细胞重要组分,最终引起细胞复杂的形态学变化,如染色质凝集、核固缩、DNA 降解、细胞骨架塌陷、质膜外生性水泡状生长。上述凋亡信号来自细胞内部,由线粒体介导,故称作内源性凋亡途径^[9-10]。

凋亡也可通过外源性凋亡途径起始。细胞外信号通过结合相应的配体活化细胞表面死亡受体,从而活化细胞质内的 caspase 级联反应,最终与内源性凋亡途径汇聚。死亡受体是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体超家族的成员,包括 CD95/Fas、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 1(TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1, TRAIL-R1)和 TRAIL-R2 等,这些蛋白的细胞内结构具有死亡结构域,其配体包括 TNF、TRAIL 和 Fas^[10-11]。死亡受体与配体形成死亡诱导信号复合物,后者将活化 caspase8 和 caspase10 酶原,继而活化 caspase3、6 和 7,与内源性凋亡途径的 caspase 级联反应汇聚。caspase8 还能引起线粒体外膜释放细胞色素 c,进一步促进内源性凋亡途径。

此外,还存在另一条凋亡途径,由杀伤靶细胞的细胞毒素 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞起始。这两种杀伤细胞能够活化靶细胞表面的死亡受体如 Fas,与细胞表面颗粒酶 B 结合,后者可切割并活化 caspase3 酶原,继而引起凋亡^[9,12-13]。

3 分子探针与凋亡显像

传统的凋亡检测是通过对手术切除的肿瘤或活检组织,在体外检测细胞凋亡的发生程度,其技术有创、滞后,因此应用受到限制。近十年来,人们致力于体内凋亡显像研究,主要集中于核素与光学显像,使分子探针成为研究的热点。

3.1 蛋白类显像剂 在凋亡早期,原本分布于细胞膜脂质双层下的磷脂酰丝氨酸暴露于细胞膜外表面,蛋白类显像剂可与磷脂酰丝氨酸结合而成为显像剂的前

体;目前对其研究较多,亦较成熟,如^{99m}Tc-annexin V 可与凋亡细胞特异性结合,且无免疫原性、无毒性,已被广泛用于 II 期临床试验,但仍有腹部本底广泛增高、无法区分凋亡与坏死、最佳结合需微摩尔浓度的 Ca²⁺ 存在等缺陷,制约了其临床应用^[14-17]。C2A 衍生物与凋亡、坏死细胞结合较 Annexin V 更具特异性,目前已有研究^[18]将^{99m}Tc-C2A 用于检测紫杉醇诱导的非小细胞肺癌凋亡。

3.2 肽类以及小分子显像剂 肽类以及小分子显像剂具有血液廓清快、组织穿透力强、靶/非靶比值高等优势。荧光标记的肽光学显像剂可以显示喜树碱治疗后 H460 荷瘤小鼠肿瘤细胞的凋亡^[19]。小分子显像剂 ApoSense 化合物家族包含一个 F 原子,除荧光标记外,还可被¹⁸F 标记成为 PET 显像剂,在凋亡早期与被 Caspase 激活的线粒体膜结合,快速检测死亡细胞,其中¹⁸F-ML-10 已进入临床试验阶段;I 期健康志愿者临床试验表明,¹⁸F-ML-10 与凋亡细胞特异性结合,在体内分布适宜、稳定;II 期临床试验表明¹⁸F-ML-10 较 MRI 可提早 2 周监测放疗后的肿瘤细胞的改变,颅内转移瘤放疗患者对¹⁸F-ML-10 的摄取与放疗 6~8 周后肿瘤体积缩小程度呈正相关,提示应用¹⁸F-ML-10 作为 PET 显像剂进行体内凋亡检测可早期监测放疗后肿瘤的变化,发现肿瘤内异质性生物学改变,从而精确计算不同区域的放疗剂量,实现对肿瘤的精确放疗^[20]。其他 ApoSense 化合物家族成员如 NST-732、DNSBA 可在体内、外快速聚集在凋亡细胞中,准确区分凋亡细胞与坏死细胞,但应用剂量较其他小分子显像剂高 100~1000 倍,其潜在体内药物毒性限制了其应用^[21-22]。

3.3 Caspase 活性检测 上述 3 种显像剂均通过与凋亡细胞膜、线粒体膜的磷脂酰丝氨酸结合发挥显像作用,间接反映凋亡的发生。检测 caspase 活性可直接显示凋亡发生,检测方法包括 caspase 直接显像、可激活探针显像、caspase 活性报告基因显像以及线粒体膜显像。

3.3.1 caspase 直接显像 靛红衍生物可在纳摩尔浓度抑制 caspase3、7 的活性。¹⁸F 标记的靛红氨苯磺胺类显像剂已受到广泛关注,如¹⁸F-ICMT-11 可在体内外与凋亡细胞结合,其与肿瘤结合的强度与凋亡增加程度呈正相关,故可以于 24 h 内检测治疗后肿瘤细胞的凋亡反应;¹¹C-WC-II-98、¹⁸F-WC-IV-3 亦可作为 caspase3、7 的特异性示踪剂^[23]。此类显像剂必须具有脂溶性,才可穿透细胞膜,使其进一步研究与应用受

到限制;而腹部组织对其较高的非特异性摄取问题也有待进一步解决^[23-24]。

3.3.2 可激活探针显像 为降低广泛存在的 caspase 非特异性本底,可激活探针受到关注,主要包括跨膜序列、识别序列、荧光基团 3 个功能部分,其中重要的识别序列为 Asp-Glu-Val-Asp(DEVD)^[25]。¹⁸F 标记 CP-18 与 caspase3 结合较其他蛋白酶更具有显著特异性,初步体内外实验^[26]显示¹⁸F-CP-18 可直接反映 caspase3 活性,从而检测凋亡的发生。

3.3.3 活性报告基因显像 研究^[27]报道使用荧光素酶作为报告基因、DEVD-荧光素为底物,可检测 caspase 活性。当 caspase 作用于底物时,caspase3 可切断 DEVD 与荧光素之间的连接,恢复荧光素与荧光素酶之间的相互作用而发光。

3.3.4 线粒体膜显像 线粒体膜断裂是凋亡的早期征象之一,线粒体膜显像是凋亡显像的重要研究方向。¹⁸F-三苯喹啉类(¹⁸F-BnTP)可被线粒体膜摄取。在凋亡开始阶段,线粒体膜发生塌陷及皱缩,¹⁸F-BnTP 与线粒体膜结合减少。实验^[28-29]证明,化疗药物可造成前列腺癌细胞的凋亡增加,使¹⁸F-BnTP 摄取减低 52.4%,而¹⁸F-FDG 的摄取仅降低 12%。

4 小结

近年来,凋亡的基础研究取得了很大进展,而通过 PET 成像无创检测体内凋亡已越来越受到关注,新型分子探针的研制开发一直是核医学界研究的热点。在上述多种凋亡显像剂中,几种¹⁸F 标记的 PET 分子探针已获得初步研究结果,但目前 FDA 尚未对示踪剂予以批准^[30-31]。开发更特异的显像剂进行体内凋亡成像研究有着重要意义。

[参考文献]

[1] Cotter TG. Apoptosis and cancer: The genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(7):501-507.

[2] Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*, 2011, 223(2):116-126.

[3] Jackson JG, Post SM, Lozano G. Lozano, regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 in vivo. *J Pathol*, 2011, 223(2):127-136.

[4] Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, et al. Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, 2009, 16(7):966-975.

[5] Hetz CA, Torres V, Quest AF. Beyond apoptosis: Nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochem Cell Biol*, 2005, 83(5):579-588.

[6] Zheng C, Jia W, Tang Y, et al. Mesothelin regulates growth and apoptosis in pancreatic cancer cells through p53-dependent and -independent signal pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31: 84.

[7] Hwang SG, Park J, Park JY, et al. Anti-cancer activity of a novel small molecule compound that simultaneously activates p53 and inhibits NF-κB signaling. *PLoS One*, 2012, 7(9):e44259.

[8] Mansilla S, Llovera L, Portugal J. Chemotherapeutic targeting of cell death pathways. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(3): 226-238.

[9] 李鸿茹,陈愉生,陈刚,等. Livin 在肺癌中的表达及与 pro-caspase3 的相关性分析初步探讨. *中国肺癌杂志*, 2008, 11(5): 729-733.

[10] Li HL, Huang XP, Zhou XH, et al. Correlation of seven biological factors (Hsp90a, p53, MDM2, Bcl-2, Bax, Cytochrome C, and Cleaved caspase3) with clinical outcomes of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Biomed Environ Sci*, 2011, 24(6): 630-641.

[11] 陈祖锦,张斌,潘思虎. ABT-737 对顺铂诱导乳腺癌 T47D 细胞凋亡的增敏作用. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(12):891-895.

[12] Park HJ, Kim MJ, Ha E, et al. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine*, 2008, 15(1-2):147-151.

[13] Mouratidis PX, Colston KW, Dagleish AG. Doxycycline induces caspase-dependent apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer*, 2007, 120(4):743-752.

[14] Haimovitz-Friedman A, Yang TI, Thin TH, et al. Imaging radiotherapy-induced apoptosis. *Radiat Res*, 2012, 177(4): 467-482.

[15] Lin KJ, Wu CC, Pan YH, et al. I In vivo imaging of radiation-induced tissue apoptosis by (99m)Tc(I)-his(6)-annexin A5. *Ann Nucl Med*, 2012, 26(3):272-280.

[16] Lederle W, Arns S, Rix A, et al. Failure of annexin-based apoptosis imaging in the assessment of antiangiogenic therapy effects. *EJNMMI Res*, 2011, 1(1):26.

[17] Heneweer C, Grimm J. Clinical applications in molecular imaging. *Pediatr Radiol*, 2011, 41(2):199-207.

[18] 王峰,方伟,季顺东,等. 钙调素结合蛋白 I C2A 片段探测肺癌凋亡的实验研究. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(5):351-354.

[19] Thapa N, Kim S, So IS, et al. Discovery of a phosphatidylserine-recognizing peptide and its utility in molecular imaging of tumour apoptosis. *J Cell Mol Med*. 2008, 12(5A):1649-1660.

[20] Höglund J, Shirvan A, Antoni G, et al. ¹⁸F-ML-10, a PET tracer for apoptosis: First human study. *J Nucl Med*, 2011, 52(5):720-725.

[21] Nguyen QD, Aboagye EO. Imaging the life and death of tumors in living subjects: Preclinical PET imaging of proliferation and apoptosis. *Integr Biol (Camb)*, 2010, 2(10):483-495.

[22] Michalski MH, Chen X. Molecular imaging in cancer treatment. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011, 38(2):358-377.

[23] Nguyen QD, Smith G, Glaser M, et al. Positron emission tomo-

- graphy imaging of drug-induced tumor apoptosis with a caspase-3/7 specific [¹⁸F]-labeled isatin sulfonamide. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(38):16375-16380.
- [24] Haberkorn U, Markert A, Mier W, et al. Molecular imaging of tumor metabolism and apoptosis. Oncogene, 2011, 30(40):4141-4151.
- [25] Niu G, Chen X. Apoptosis imaging: Beyond annexin V. J Nucl Med, 2010, 51(11):1659-1662.
- [26] Blankenberg FG, Norfray JF. Multimodality molecular imaging of apoptosis in oncology. AJR Am J Roentgenol, 2011, 197(2):308-317.
- [27] Shi H, Kwok RT, Liu J, et al. Real-time monitoring of cell apoptosis and drug screening using fluorescent light-up probe with aggregation-induced emission characteristics. J Am Chem Soc, 2012, 134(43):17972-17981.
- [28] Ray P, De A, Patel M, et al. Monitoring caspase-3 activation with a multimodality imaging sensor in living subjects. Clin Cancer Res, 2008, 14(18):5801-5809.
- [29] Reshef A, Shirvan A, Akselrod-Ballin A, et al. Small-molecule biomarkers for clinical PET imaging of apoptosis. J Nucl Med, 2010, 51(6):837-840.
- [30] Grimberg H, Levin G, Shirvan A, et al. Monitoring of tumor response to chemotherapy in vivo by a novel small-molecule detector of apoptosis. Apoptosis, 2009, 14(3):257-267.
- [31] Aloya R, Shirvan A, Grimberg H, et al. Molecular imaging of cell death in vivo by a novel small molecule probe. Apoptosis, 2006, 11(12):2089-2101.

《中国介入影像与治疗学》杂志 2013 年征订启事

《中国介入影像与治疗学》杂志创刊于 2004 年,是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办,中国工程院医药卫生工程学部协办的国家级学术期刊,主编为邹英华教授。刊号:ISSN 1672-8475, CN 11-5213/R。是中国精品科技期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国科学引文数据库核心期刊、中国期刊全文数据库全文收录期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊、波兰《哥白尼索引》收录源期刊。

《中国介入影像与治疗学》杂志以报道介入影像与治疗学、介入超声学、介入材料学、药物学与护理学等方面的临床研究、基础研究以及医、理、工结合的成果与新进展为主,在学术上追求高起点、创新性;在技术上追求先进性、实用性和规范化;信息报道上追求真实性、时效性、可读性。本刊是介入影像、治疗学工作者学习、交流的园地,也是图书馆必备的学术刊物。

《中国介入影像与治疗学》为月刊,64 页,大 16 开本,彩色印刷。单价:16 元,全年定价 192 元。订户可随时向当地邮局订阅,邮发代号:80-220;亦可向编辑部直接订阅,免邮寄费(欢迎通过银行转账,附言栏请注明订阅杂志名称)。

联系电话:010-82547903 传真:010-82547903

E-mail: cjiit@mail.ioa.ac.cn 网址: www.cjiit.com

编辑部地址:北京市海淀区北四环西路 21 号大猷楼 502 室 邮编:100190

银行账户名:《中国医学影像技术》期刊社 账号:110907929010201

开户行:招商银行北京分行清华园支行 联系人:孟辰凤

