

放射引导的多肽特异性传输在肝癌放化疗模型中的应用

吴君心¹, 贺俊彦¹, 乐雨银², 苏颖¹, 李金奎¹ (1.福建医科大学教学医院, 福建省肿瘤医院放射治疗科, 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福州 350000; 2.福建省福州肺科医院肿瘤内科, 福州 350000)

摘要: 目的 本课题拟通过重组HVGGSSV多肽, 研究其特异性结合放射损伤肿瘤细胞的特性, 并观察其体内分布及代谢情况, 为肝癌特异性靶向治疗提供新方法。方法 采用荧光染料Cy7-NHS ester标记HVGGSSV, 合成Cy7-HVGGSSV。建立人肝癌裸鼠双后肢种植瘤模型, 所有小鼠首先经顺铂(DDP)处理, 然后小鼠右后肢肿瘤放射处理3Gy, 左后肢处肿瘤不接受放射处理, 将其随机分为对照和实验组, 每组5只小鼠, 放射后4小时, 实验组和对照组分别经尾静脉注射Cy7-HVGGSSV和Cy7-NHS ester。通过小动物活体成像系统检测并观察小鼠体内不同时间点的荧光分布情况。结果 实验组右后肢肿瘤荧光强度在给药后1小时、2小时、15小时、24小时、48小时分别比左后肢肿瘤高 $(5.82 \pm 1.24) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(8.99 \pm 1.27) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(4.04 \pm 2.30) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(6.52 \pm 3.93) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(9.33 \pm 1.74) \times 10^7$ photons/(s·cm²)。实验组较对照组右后肢肿瘤荧光强度分别提高 $(18.4 \pm 1.33) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(17.1 \pm 1.64) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(55.8 \pm 2.66) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(68.9 \pm 3.97) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(16.3 \pm 1.67) \times 10^7$ photons/(s·cm²)。对照组荧光分布无特异性。48 h后, 实验组小鼠的肝脏及肾脏具有较高荧光量分布。结论 HVGGSSV可以特异性结合放射损伤的肝癌移植瘤, 其主要通过肝脏及肾脏代谢, 有可能为放射引导的药物提供靶向运输载体。关键词: 多肽HVGGSSV; 顺铂(DDP); 放射引导的药物传输; 肝癌移植瘤模型

Application of radiation-guided peptide delivery on radiotherapy and chemotherapy model of hepatic carcinoma

WU Jun-xin¹, HE Jun-yan¹, LE Yu-yin², SU Ying¹, LI Jin-luan¹ (1.Department of Radiation Oncology, Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fujian Provincial Key Laboratory of Translational Cancer Medicine, Fujian Provincial Cancer Hospital, Fuzhou 350000, China; 2.Department of Oncology, Fuzhou Pulmonary Hospital of Fujian, Fuzhou 350000, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of peptide HVGGSSV, which specifically binds to irradiated tumors, and its biological distribution *in vivo* in order to provide a new way for targeted cancer therapy of hepatic carcinoma. **Methods** HVGGSSV peptide was conjugated to Cy7-NHS ester for near-infrared fluorescence imaging. The nude mice models of hepatic carcinoma which implanted in both hind limbs were established, and all of them were injected through intraperitoneal with DDP before treated with radiation. Only the tumor on the right side of each mouse received a radiation dose of 3 Gy, while the tumor on the left side received no radiation. All mice were divided into two groups with 5 mice each. Four hours later, experimental group and control group were injected with Cy7-HVGGSSV and Cy7-NHS ester, respectively. All mice were anesthetized and quantified with the Caliper Luminal IVIS II small animal imaging system at different time after injection. **Results** Near-infrared images were acquired at 1, 2, 15, 24, and 48 hours post-injection by using *in vivo* NIR imaging. For the experimental group, the fluorescence intensity of the tumor in the right hind limb was $(5.82 \pm 1.24) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(8.99 \pm 1.27) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(4.04 \pm 2.30) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(6.52 \pm 3.93) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(9.33 \pm 1.74) \times 10^7$

photons/(s·cm²), which were higher than those in the left hind limb, respectively. The results of the experimental group in the right hind limb was $(18.4 \pm 1.33) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(17.1 \pm 1.64) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(55.8 \pm 2.66) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(68.9 \pm 3.97) \times 10^7$ photons/(s·cm²), $(16.3 \pm 1.67) \times 10^7$ photons/(s·cm²), which were higher than those in the control group, respectively. There was still high fluorescence distribution in the liver and kidney at 48 hours post-injection. **Conclusion** HVGGSSV peptide could specifically bind to irradiated hepatic tumors, and mainly metabolized in the kidney and liver, it might provide a targeting transport agent for radiation-guided drugs.

Key words: HVGGSSV; DDP; Radiation-guided drug delivery; Hepatocarcinoma Xenograft model

近年来肿瘤综合治疗已成为肿瘤治疗的主导方式。传统放化疗靶向性不明显, 容易损伤正常组织器官。因此, 寻找放射靶向载体引导药物运输至肿瘤成为目前的研究热点^[1-3]。多肽因其高特异性、分子量小等特点, 已广泛用于靶向药物载体研究^[4,5]。Lowery^[6]和Passarella等^[7]人筛选出能够特异性结合放射损伤肿瘤的重组肽HVGGSSV。Wang等^[8]也揭示了HVGGSSV特异性结合放射损伤肿瘤细胞的作用原理。顺铂(DDP)具有细胞毒性, 可以直接杀伤肿瘤细胞, 有较强的广谱抗癌作用^[9], 对放疗也有协同增敏作用^[10], 已广泛用于恶性肿瘤的治疗。

本研究在Hariri等^[11]的实验基础上合成可以特异性识别及结合放射损伤肿瘤细胞的重组多肽HVGGSSV并用荧光标记。加用DDP以增强对肿瘤细胞的损伤并增加放疗敏感性。结果显示放射损伤处肿瘤区域的荧光信号较非损伤的部位更强, 持续时间更长, 正常脏器的荧光分布较低, 说明HVGGSSV是一种具有放射损伤敏感性的肿瘤导向多肽。本实验主要是研究该多肽特异性识别放射损伤后肿瘤的能力, 为后期作为化疗药物靶向载体研究提供试验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及肿瘤模型的建立 人肝癌细胞HepG2细胞由福建省肿瘤医院肿瘤放射生物研究室提供, 常规传代培养于RPMI 1640完全培养液中, 置于37℃、5% CO₂、饱和湿度环境下, 细胞呈贴壁生长。取5周的雄性裸鼠, 体重约18~20 g。腹腔注射100 μl水合氯醛(浓度: 40 mg/ml)麻醉, 取0.2 ml细胞悬浮液(浓度为 1×10^7 个/ml)接种于每只小鼠的双后肢大腿根部皮下, 约1~2周后, 待肿瘤大小1 cm左右开始实验。

1.2 Cy7-NHS ester标记HVGGSSV Cy7-NHS ester上的琥珀酰亚胺基能够同多肽HVGGSSV的末端赖氨酸集团以及侧链氨基反应, 将荧光分子Cy7-NHS ester连接到多肽上, 形成Cy7-HVGGSSV荧光多肽。利用Sephadex G-15分离纯化。吸取样品, 滴加于凝胶床面中央。缓冲液洗脱后, 电脑监测得到

两个谱带: 先流出的组分为标记的偶联物即Cy7-HVGGSSV; 停留于凝胶柱上端为未标记的Cy7即游离的Cy7。冷冻干燥66小时。分光光度计测量偶联产物Cy7-HVGGSSV的吸收光谱。

1.3 活体靶向性研究

1.3.1 靶向分布实验分组处理 将移植瘤小鼠随机分为2组, 每组5只小鼠, 每只小鼠首先经腹腔注射给予小鼠化疗药DDP 3mg/kg, 再将右后肢处肿瘤放射线照射3 Gy。放射线照射后4小时, 对照组小鼠从尾静脉注射游离Cy7溶液(1 mg/L), 约0.1 ml; 实验组小鼠通过小鼠尾静脉注射Cy7-HVGGSSV溶液(1 mg/L), 约0.1 ml。放射线处理: 用胶带将小鼠固定在热塑膜内, 以右侧后肢肿瘤及其外缘0.5 cm作为照射野, 左后肢肿瘤避开照射野, 应用瑞典医科达直线加速器6MV-X射线给予照射3 Gy。

1.3.2 靶向结合放射损伤肿瘤的研究 利用小动物活体成像系统观察移植瘤小鼠双后肢肿瘤区域的荧光分布情况。为了降低胃肠道食物所致的干扰, 所有小鼠均禁食6小时。在注射药物1小时、2小时、15小时、24小时、48小时后, 将小鼠麻醉并利用小动物活体成像系统成像, 激发波长为747 nm, 发射波长为778 nm。以双后肢肿瘤区域为基础, 在所得的荧光图片上勾画出感兴趣区域, 测出其荧光量子, 并通过计算机软件分析和比较左右后肢肿瘤区域的荧光强度, 观察同一感兴趣区域在不同时间点的荧光量子变化情况。

1.3.3 体内脏器分布代谢研究 小鼠体内结构和成分比较复杂, 自身存在自发的产生荧光, 如毛发, 胃肠道食物或肿瘤坏死组织都可能产生自发荧光, 增加背景噪音, 从而影响特异性荧光物质的分辨。为排除这些干扰, 给药后48小时后拉颈处死实验小鼠, 对小鼠进行解剖, 剥离心、肝、肺、肾、肿瘤等脏器, 在小动物活体成像系统上进行各脏器成像观察。

1.4 小动物活体成像系统说明 利用动物活体成像系统将伪彩色图片和小鼠扫描图像重叠、融合, 融合

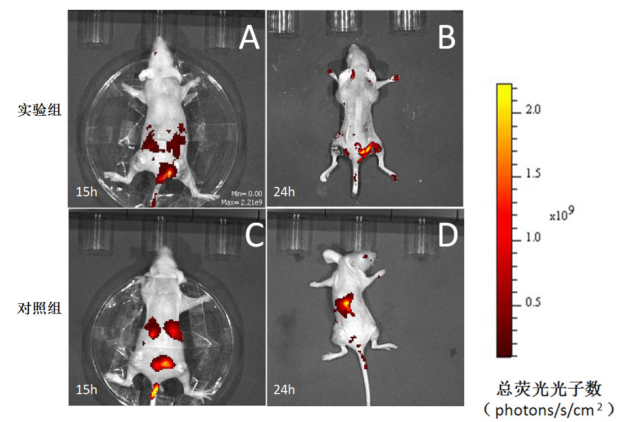


图1 实验组与对照组小鼠荧光分布情况
注：A为表实验组小鼠15 h体内的荧光分布情况；B为实验组小鼠24 h体内的荧光分布情况；C为对照组小鼠15 h体内的荧光分布情况；D为对照组小鼠24 h体内的荧光分布情况

的图片色彩反映的为活体小鼠体内的荧光多肽的分布情况。橙色区域表示在750 nm激发光下的荧光强度最强的区域，该荧光强度分布反映Cy7荧光分子在该区域分布高，而紫色区域提示非常低的荧光分布，表示荧光强度从高到低的线性分布主要按照橙→红→黄→绿→蓝→紫颜色的依序改变。本实验通过活体内的荧光扫描图像分析裸鼠体内的荧光标记多肽的分布情况。

1.5 统计学处理 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，SPSS 19.0软件进行统计学处理，并采用各组间t检验进行统计学分析，所有统计检验均以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 靶向结合放射损伤肿瘤研究结果 实验组结果如图1（A、B）所示。从图中可以观察到注射荧光多肽Cy7-HVGGSSV后15小时、24小时，右后肢肿瘤部位聚集橙色荧光，而左后肢肿瘤未有明显的橙色

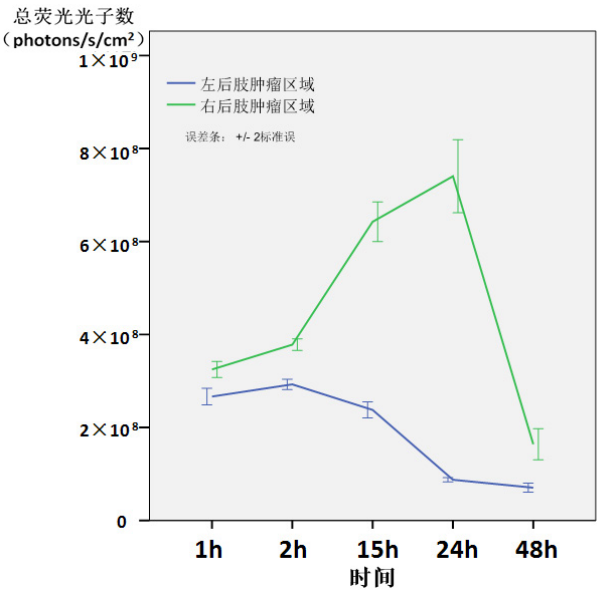


图2 实验组小鼠肿瘤区域荧光量的比较

荧光聚集，部分出现暗红色。根据荧光强度的线性强度分布理论，说明全身其他部位的荧光强度相对右后肢肿瘤部位差距明显，荧光强度比放射损伤肿瘤部位低得多。进一步测量Cy7-HVGGSSV组肿瘤区域的荧光信号，结果如表1。比较分析双后肢荧光信号间的差异，结果如图2。图中显示在15小时、24小时右后肢肿瘤区域荧光信号分布高，较左后肢肿瘤区分别高 $(4.04 \pm 2.30) \times 10^7$ photons/(s·cm²)、 $(6.52 \pm 3.93) \times 10^7$ photons/(s·cm²)。在48小时，实验小鼠全身无明显荧光分布。

对照组结果如图1（C、D）所示。注射游离Cy7后15小时、24小时，双后肢肿瘤区域的荧光量无差异。选择右后肢肿瘤区域勾画ROI并测量其荧光信号，结果如表2。图3显示游离荧光分子Cy7经过最初的全身分布后，注射后1小时、2小时，游

表1 实验组双后肢肿瘤区域荧光信号强度 [$\bar{x} \pm s$, $\times 10^7$ photons/(s·cm²)]

分组	时间				
	1 h	2 h	15 h	24 h	48 h
左后肢肿瘤区域 (n=5)	26.66 ± 1.991	29.28 ± 1.244	23.78 ± 1.944	8.756 ± 0.512	7.056 ± 1.095
右后肢肿瘤区域 (n=5)	32.48 ± 1.952	37.82 ± 1.386	64.26 ± 4.770	74.04 ± 8.786	16.40 ± 3.732

注：荧光信号强度即总荧光光子数 [单位：photons/(s·cm²)]

表2 实验组和对照组右后肢肿瘤区域荧光信号强度 [$\bar{x} \pm s$, $\times 10^7$ photons/(s·cm²)]

分组	时间				
	1 h	2 h	15 h	24 h	48 h
对照组右后肢肿瘤区域 (n=5)	14.08 ± 2.238	20.76 ± 3.387	8.472 ± 3.554	5.164 ± 1.224	0.086 ± 0.015
实验组右后肢肿瘤区域 (n=5)	32.48 ± 1.952	37.82 ± 1.386	64.26 ± 4.770	74.04 ± 8.786	16.40 ± 3.732

注：荧光信号强度即总荧光光子数 [单位：photons/(s·cm²)]

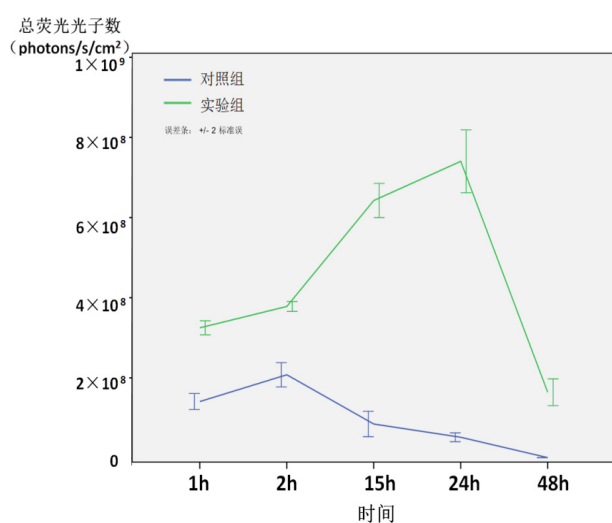


图3 对照组同实验组右后肢荧光量的比较

离Cy7全身分布均匀,随着在荧光分子在血液内被迅速的清除,荧光分子在小鼠体内的分布也在不断的减少。Cy7组右后肢肿瘤荧光信号在各观察点都较Cy7-HVGGSSV组荧光信号弱,分别是 $(18.4 \pm 1.33) \times 10^7 \text{ photons/(s} \cdot \text{cm}^2)$ 、 $(17.1 \pm 1.64) \times 10^7 \text{ photons/(s} \cdot \text{cm}^2)$ 、 $(55.8 \pm 2.66) \times 10^7 \text{ photons/(s} \cdot \text{cm}^2)$ 、 $(68.9 \pm 3.97) \times 10^7 \text{ photons/(s} \cdot \text{cm}^2)$ 、 $(16.3 \pm 1.67) \times 10^7 \text{ photons/(s} \cdot \text{cm}^2)$ 。

2.2 体内器官分布研究结果 在给药48 h后处死小鼠,对小鼠进行解剖,剥离心、肝、肺、肾、肿瘤等脏器,通过勾画每个内脏为ROI,并记录其具体的荧光强度值,结果如图4。结果表明荧光载体在体内脏器分布,由强到弱顺序如下:肾>肝>右后肢肿瘤>左后肢肿瘤>肺、心。结果显示Cy7-HVGGSSV主要分布在肝脏、肾脏,而其他脏器及双后肢肿瘤中荧光量分布较低。

3 讨论

本研究利用小动物活体成像系统对新型纳米靶向载体Cy7-HVGGSSV进行了生物特性的研究,观察Cy7-HVGGSSV在体内各组织的分布及其在体内的代谢情况,分析多靶向结合放射损伤肿瘤的生物特性。从Cy7标记的Cy7-HVGGSSV在移植瘤裸鼠的活体荧光图象中可以看出,荧光多肽在接受放射处理的右后肢肿瘤部位聚集,而未接受放射线照射的左后肢肿瘤分布较少。另一方面,体内脏器的荧光分布发现肝脏及肾脏的分布较强,而心、肺脏器的荧光量分布也较低,提示其主要是在肝脏及肾脏分解,因而避免了对其他组织的毒副作用。研究

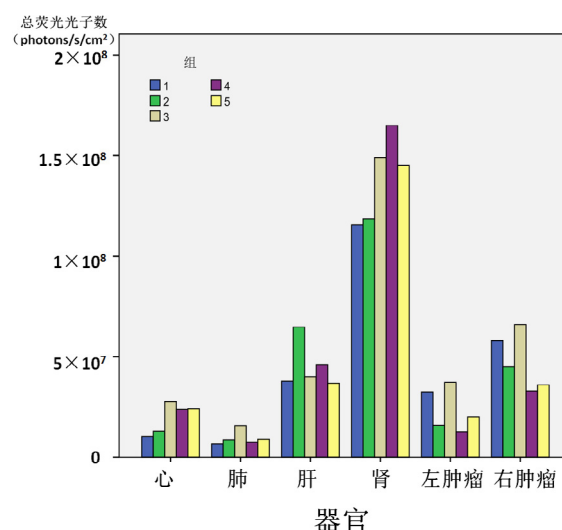


图4 Cy7-HVGGSSV在体内脏器的荧光分布情况

注: 1、2、3、4、5 分别代表实验组的5只小鼠

结果显示,在Caliper Luminal II 小动物活体成像系统上进行活体观察结果表明靶向载体能够聚集于放射线处理的肿瘤部位,对放射损伤的肿瘤具有靶向性。Cy7-HVGGSSV在肝脏及肾脏的荧光分布较高,考虑其主要通过肝脏及肾脏代谢,而对其他内脏的分布较少,内脏毒性较少。

噬菌体展示技术为寻找肿瘤分子特异性结合多肽提供有效手段,可以快速筛选生物活性肽、蛋白质、受体、其他化合物等新型药物或先导化合物,并在体内具有稳定性好、特异性高等优点^[12,13]。但由于荧光多肽在体内外代谢情况不同、多肽与目标蛋白之间的亲和力及体内清除率差异,其具有一定的局限性。小动物活体成像系统可以直接对标记的实验对象进行实时、原位的观察,在完整的活体内环境中快速获得试验对象在时间、空间上的量化信息。

多肽的分子量比抗体低1~2 kDa,且有更好的生物利用度,体内代谢快,肿瘤组织渗透性好,安全性较高。但其局限性表现在肿瘤细胞表面分子不稳定,且随着微环境的改变而改变^[14,15]。Lowery等^[6]利用噬菌体展示技术筛选出多肽HVGGSSV,能特异靶向于接受放射线照射的肺癌细胞,并成功的构建了HVGGSSV作为化疗药物的靶向载体,可以将细胞毒性药物的疗效和肿瘤靶向的优点相结合,利用药物载体靶向运输到肿瘤部位,让肿瘤患者最大限度的从化疗药物中受益。Wang等^[8]揭示HVGGSSV能够特异性结合放射损伤的肿瘤细胞,其主要原理是放射线会上调肿瘤细胞及血

管表面PDZ-TIP-1蛋白表达,而PDZ-TIP-1蛋白是HVGGSSV特异性识别配体,因此放射该多肽能够识别并结合放射损伤的肿瘤组织。目前国外已有学者^[16,17]对多肽功能、特性以及未来的临床应用进行了展望分析。DDP可以直接破坏癌细胞的DNA复制,损伤细胞膜上的结构,对放射治疗有协同增敏作用^[8]。本研究主要是在Lowery等^[6]基础上合成HVGGSSV,序列为CGGGKKKGGGNHVGGSSV,该多肽主要是通过两个半胱氨酸的二硫键交联而成,靠环形内的多肽与目标蛋白靶向性结合的。该多肽的N-氨基短,可以用荧光染料Cy7标记该肽,同时利用DDP进一步损伤肿瘤细胞并增强肿瘤细胞的放射敏感性。本研究结果证实了HVGGSSV具有特异性结合放射损伤肿瘤的能力并且发现其在其他内脏分布少。

Cy7-HVGGSSV在1 h、2 h观察点,小鼠双后肢肿瘤区域无高信号的荧光分布同Cy7组荧光分布无差异;但在15 h、24 h等观察点,Cy7-HVGGSSV组小鼠体内右后肢处肿瘤区域可以明显观察到红色赋值信号,而Cy7组在相应观察点右后肢肿瘤区域无赋色,说明游离荧光分子Cy7分布无规律。Cy7-HVGGSSV组左后肢肿瘤区域的较右后肢区域荧光信号低、衰减快,说明HVGGSSV在放射损伤肿瘤部位富集程度较高。

Lowery等^[6]未研究荧光多肽在体内脏器的分布,本研究对此进行了完善并加用DDP进一步损伤肿瘤细胞并增强肿瘤细胞的放射敏感性。虽然活体荧光显色可以直接观察HVGGSSV对肝癌肿瘤的结合情况,但小鼠体内脏器荧光分布由于客观因素的干扰,无法对HVGGSSV在活体内脏器分布进行定量的评价。在活体观察之后48 h处死实验组小鼠,取重要器官进行评价,结果显示:肾>肝>右后肢肿瘤>左后肢肿瘤>肺、心。肾脏的荧光分布较强且持续时间久,说明载体主要通过肾脏代谢,且代谢时间较长,对肾脏具有较大的损伤;同时发现肝脏的荧光分布仅次于肾脏。右后肢聚集的荧光信号分布较左后肢肿瘤中荧光信号高,考虑荧光载体在右后肢肿瘤分布时间较长,但由于荧光载体在体内被清除,无法直观说明HVGGSSV靶向结合放射损伤的肿瘤。

综上所述,本研究成功构建的靶向载体HVGGSSV具有较好的生物相容性,对放射损伤的

肿瘤具有较好的靶向结合能力,有望成为一种有效的肿瘤靶向治疗的运输载体,同时也可作为理想同步放化疗结合模式提供一个新思路。

参考文献

- [1] McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, et al. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2006,103:1041-1046.
- [2] Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions[J]. *Drug Discov Today*,2015,20:122-128.
- [3] Mathews AS, Ahmed S, Shahin M, et al. Peptide modified polymeric micelles specific for breast cancer cells[J]. *Bioconjug Chem*,2013,24:560-570.
- [4] D'Onofrio N, Caraglia M, Grimaldi A, et al. Vascular-homing peptides for targeted drug delivery and molecular imaging: meeting the clinical challenges[J]. *Biochim Biophys Acta*,2014,1846:1-12.
- [5] de Figueiredo IR, Freire JM, Flores L, et al. Cell-penetrating peptides: A tool for effective delivery in gene-targeted therapies[J]. *IUBMB life*,2014,doi: 10.1002/iub.1257.
- [6] Lowery A, Onishko H, Hallahan DE, et al. Tumor-targeted delivery of liposome-encapsulated doxorubicin by use of a peptide that selectively binds to irradiated tumors[J]. *J Control Release*,2011,150:117-124.
- [7] Passarella RJ, Zhou L, Phillips JG, et al. Recombinant peptides as biomarkers for tumor response to molecular targeted therapy[J]. *Clin Cancer Res*,2009,15:6421-6429.
- [8] Wang H, Yan H, Fu A, et al. TIP-1 translocation onto the cell plasma membrane is a molecular biomarker of tumor response to ionizing radiation[J]. *PLoS One*,2010,5:e12051.
- [9] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action[J]. *Eur J Pharmacol*,2014,740:364-378.
- [10] Toulany M, Mihatsch J, Holler M, et al. Cisplatin-mediated radiosensitization of non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition[J]. *Radiother Oncol*,2014,111:228-236.
- [11] Hariri G, Yan H, Wang H, et al. Radiation-guided drug delivery to mouse models of lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2010,16:4968-4977.
- [12] Molek P, Strukelj B, Bratkovic T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors[J]. *Molecules*,2011,16:857-887.
- [13] Babickova J, Tothova L, Boor P, et al. In vivo phage display--a discovery tool in molecular biomedicine[J]. *Biotechnol Adv*,2013,31:1247-1259.
- [14] Li ZJ, Cho CH. Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery[J]. *J Transl Med*,2012,10 Suppl 1:S1.
- [15] Joseph SC, Blackman BA, Kelly ML, et al. Synthesis, characterization, and biological activity of poly(arginine)-derived cancer-targeting peptides in HepG2 liver cancer cells[J]. *J Pept Sci*,2014,20:736-745.
- [16] Wu D, Gao Y, Qi Y, et al. Peptide-based cancer therapy: opportunity and challenge[J]. *Cancer Lett*,2014,351:13-22.
- [17] Xiao YF, Jie MM, Li BS, et al. Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy[J]. *J Immunol Res*,2015,2015:761820.

收稿日期: 2015-11-08