

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002231

¹³¹I-rhTSH 在荷人分化型甲状腺癌裸鼠模型的体内分布和放射免疫显像

熊亚岚,袁耿彪,黄美盈,何雨蓓

(重庆医科大学附属第二医院核医学科,重庆 400010)

【摘要】目的:以重组人促甲状腺素(recombinant human thyrotropin, rhTSH)为靶向探针,测定 ¹³¹I 标记 rhTSH 的标记率、放化纯度和比活度,并探讨其在荷人分化型甲状腺癌(differentiated thyroid carcinoma, DTC)裸鼠模型中的体内分布情况和放射免疫显像(radioimmunoimaging, RII)。**方法:**采用氯胺 T 法,利用 ¹³¹I 标记 rhTSH, Sephadex G25M 柱纯化放射性标记物,纸层析法测定其标记率、放化纯度、室温稳定性及血清稳定性,并计算其放射性比活度,进而研究该放射性标记药物在荷 K1 裸鼠模型中的生物分布及 RII 情况。**结果:**¹³¹I-rhTSH 标记率为(93.04 ± 1.13)%,放化纯度为(97.71 ± 1.14)%,比活度为(4.92 ± 0.06) MBq/μg; ¹³¹I-rhTSH 放于室温 1、6、12、24 h 后所测得的放射性化学纯度分别为(92.94 ± 0.34)%、(91.81 ± 0.64)%、(91.38 ± 1.20)%、(90.43 ± 0.74)%;而与血清孵育 1、6、12、24 h 后所测得的放射性化学纯度分别为(92.59 ± 0.73)%、(91.33 ± 0.98)%、(91.01 ± 0.73)%、(89.58 ± 1.33)%。荷 K1 裸鼠模型的体内分布及单光子发射型计算机断层成像(single photon emission computed tomography, SPECT)显示分子探针 ¹³¹I-rhTSH 可以在肿瘤组织中靶向聚集,在 24 h 时肿瘤/肌肉(T/NT)比达最高,且肿瘤显影最清晰。**结论:**成功制备了分子探针 ¹³¹I-rhTSH,在荷人 DTC 裸鼠模型中有较好的靶向作用,为 DTC 的进一步诊治奠定基础。

【关键词】重组人促甲状腺素;分化型甲状腺癌;放射免疫显像;核素分子探针;单光子发射型计算机断层成像

【中图分类号】R736.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-04

Biodistribution and radioimmunoimaging of ¹³¹I-rhTSH in human differentiated thyroid carcinoma-bearing nude mice model

Xiong Yalan, Yuan Gengbiao, Huang Meiyang, He Yubei

(Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To measure the labeling rate, radiochemical purity, and specific activity of ¹³¹I-labeled recombinant human thyrotropin (rhTSH) as a targeting probe, and to investigate the distribution *in vivo* and radioimmunoimaging (RII) of ¹³¹I-rhTSH in a human differentiated thyroid carcinoma (DTC)-bearing nude mice model. **Methods:** rhTSH was labeled with ¹³¹I by the chloramine T method, and radioactively labeled rhTSH was purified using Sephadex G25M column. The labeling rate, radiochemical purity, room temperature stability, and serum stability were determined using paper chromatography, and the specific activity was calculated. Furthermore, the biodistribution and RII of the radioactively labeled drug in the K1 nude mice model were studied. **Results:** The labeling rate, radiochemical purity, and specific activity of ¹³¹I-rhTSH were (93.04 ± 1.13)%, (97.71 ± 1.14)%, and (4.92 ± 0.06) MBq/μg, respectively. The radiochemical purity of ¹³¹I-rhTSH placed at room temperature for 1, 6, 12, and 24 hours was (92.94 ± 0.34)%, (91.81 ± 0.64)%, (91.38 ± 1.20)%, and (90.43 ± 0.74)%, respectively; after incubation with serum for 1, 6, 12, and 24 hours, the radiochemical purity was (92.59 ± 0.73)%, (91.33 ± 0.98)%, (91.01 ± 0.73)%, and (89.58 ± 1.33)%. Biodistribution and single photon emission computed tomography in the tumor-bearing K1 nude mice model showed that ¹³¹I-rhTSH was selectively concentrated in tumor tissues and the target/non-target ratio reached the highest at 24 hours with the clearest tumor imaging. **Conclusion:** The ¹³¹I-rhTSH molecular probe was successfully prepared, which has a good targeting effect in DTC-bearing nude mice model, laying a foundation

for further diagnosis and treatment of DTC.

【Key words】 recombinant human thyrotropin; differentiated thyroid carcinoma; radioimmunoimaging; nuclide molecular probe; single-photon emission computed tomography

作者介绍:熊亚岚, Email: 472769523@qq.com,

研究方向:肿瘤核医学。

通信作者:袁耿彪, Email: yuan_gb@126.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190627.1703.010.html>

(2019-06-28)

甲状腺癌(thyroid cancer, TC)是内分泌系统恶性肿瘤中发病率最高的疾病之一,近年来其发病率逐年上升,各类型 TC 发病率均增高,我国平均发病率达 7.7/10 万,女性发病率为男性的 3 倍,主要包括 DTC 及未分化型甲状腺癌(anaplastic thyroid carcinoma, ATC),其中 DTC 占 90%以上^[1]。随着疾病的进展,有 7%~23%的 DTC 患者会发生复发、转移,其中有 25%~50%的患者会出现肿瘤侵袭性增强,对 ^{131}I 反应性降低、不敏感或耐受,肿瘤失分化等,导致对有复发、转移的难治性 DTC 患者的诊断及治疗非常困难^[2-3]。因此选择一种靶向性分子探针进行诊断及治疗非常有必要。文献^[4-5]阐述了 DTC 细胞表达丰富的促甲状腺素受体(thyrotropin receptors, TSHR),低分化型甲状腺癌细胞也表达低水平的 TSHR,而 ATC 细胞未表达 TSHR。本研究利用放射性核素 ^{131}I 标记 rhTSH 靶向性与 DTC 细胞表面表达的 TSHR 结合,并研究其在荷人 DTC 裸鼠模型体内的生物分布和 RII,来达到靶向性诊断与治疗的作用,为难治性 TC 的早期诊断及治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

rhTSH(美国 Genzyme 公司);K1 细胞株(人乳头状甲状腺癌细胞株,广州赛库生物技术公司); ^{131}I 核素(重庆原子高科医药有限公司);裸鼠(重庆医科大学实验动物中心),本研究符合本单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准;磷酸二氢钠(二水)、磷酸氢二钠(十二水)、氯胺 T、偏重亚硫酸钠(成都科龙化工试剂厂);碘化钾(广州金华大化学试剂有限公司);甲醇(成都科隆化学品有限公司);新鲜人血清(重庆医科大学附二院血库);Sephadex G25M 纯化柱(美国 GE Healthcare 公司);GC-911 型 γ -免疫计数器(中国中加光电仪器公司);CRC-15R 活度计(美国 Capintec 公司)。

1.2 方法

1.2.1 ^{131}I -rhTSH 的制备及标记率、放化纯度、稳定性的测定 利用氯胺 T 法标记 ^{131}I -rhTSH:将 5.5 μL (1.8 mg/mL,灭菌注射水稀释)rhTSH 混于 25 μL ^{131}I 原液(放射性浓度为 40 mCi/mL)中,充分震匀 3 min,然后加入 2 mg/mL 的氯胺 T 50 μL ,继续震匀反应 55 s,再加入 2 mg/mL 的偏重亚硫酸钠 100 μL 及 10 mg/mL 的 10% KI 100 μL 终止反应。以甲醇为展开剂,纸层析法测定分子探针 ^{131}I -rhTSH 的标记率,然后将以上反应液用 Sephadex G25M 柱进行纯化,以磷酸二氢钠(二水):磷酸氢二钠(十二水)=1:9 的混合液为洗脱剂,收集前 50 管洗脱液,活度计分别测量每管放射性活度,再用纸层析法测定

^{131}I -rhTSH 纯化后的放化纯度,并计算其放射性比活度(放射性比活度= ^{131}I 的放射性活度 $\times$ 标记率/rhTSH 的质量)。将纯化后的 ^{131}I -rhTSH 标记液放于室温下,纸层析法分别测定 1、6、12、24 h 后的放化纯度,分析其室温稳定性。将 50 μL ^{131}I -rhTSH 纯化液与 1 mL 新鲜人血清混匀,放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中,用纸层析法测定孵育 1、6、12、24 h 后的放化纯度,分析其血清稳定性。

1.2.2 构建荷人 DTC 裸鼠模型 将 K1 细胞培养至对数生长期,调整细胞密度至 1.0×10^7 个/0.2 mL,选取 4 周龄左右的雌性裸鼠 20 只,将 0.2 mL 的细胞悬液接种至裸鼠的右侧大腿皮下。

1.2.3 ^{131}I -rhTSH 在荷瘤裸鼠体内的生物分布 选 12 只荷瘤裸鼠,随机分成 3 组,每组 4 只。尾静脉注射 50 μL 新鲜 ^{131}I -rhTSH (740 kBq),分别于注射 12、24、48 h 后将 3 组裸鼠处死,分别取肿瘤、血液、脑、心脏、肺、肝脏、肾、脾、胃、肠、股骨及左侧大腿肌肉,进行称量, γ 计数器检测其放射性计数。然后计算各组织每克组织的百分注射剂量率(%ID/g);%ID/g=组织放射性计数/(注射药物放射性计数 $\times$ 组织质量) $\times 100\%$ 。

1.2.4 ^{131}I -rhTSH 在荷瘤裸鼠体内的放射免疫显像 显像前 3 d 将荷瘤裸鼠饮用水换为 1%的 KI 溶液以封闭甲状腺,取 4 只符合条件的荷瘤裸鼠,尾静脉注射 0.1 mL 的 ^{131}I -rhTSH (11.1 MBq),注射放射性药物 12、24、48 h 后,经腹腔注射戊巴比妥,然后将裸鼠俯卧位固定于木板上,进行 SPECT 静态显像,并观察 ^{131}I -rhTSH 在裸鼠体内的放射性浓聚情况,采用 ROI 技术测得 T/NT 值(肿瘤部位与对侧相应部位的放射性比值)。SPECT(Siemens Symbia T2):采用高能准直器,能峰为 364 keV,像素 256 $\times$ 256。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组计量数据间采用单因素方差分析进行比较,两两计量数据间采用单因素方差分析的多重比较进行分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ^{131}I -rhTSH 的标记率、放化纯度、放射性比活度及稳定性

以 rhTSH 为靶向探针,采用氯胺 T 法成功制备了分子探针 ^{131}I -rhTSH,纸层析法测得其标记率为 $(93.04 \pm 1.13)\%$ 。将标记后的反应液经 Sephadex G25M 柱纯化,淋洗反应曲线出现 1 个放射峰,即 ^{131}I -rhTSH 标记峰(图 1),纯化后的放化纯度为 $(97.71 \pm 1.14)\%$,放射化学比活度为 $(4.92 \pm 0.06)\text{MBq}/\mu\text{g}$ 。 ^{131}I -rhTSH 放于室温下 1、6、12、24 h 的放化纯度分别为 $(92.94 \pm 0.34)\%$ 、 $(91.81 \pm 0.64)\%$ 、 $(91.38 \pm 1.20)\%$ 、 $(90.43 \pm 0.74)\%$ (图 2),差异有统计学意义($F=5.194, P=0.028$),多重比较:1 h 与 6 h、1 h 与 12 h、6 h 与 12 h、6 h 与 24 h 及 12 h 与 24 h 间稳定性差异无统计学意义(P 值分别为 0.715、0.254、

1.000、0.388 及 1.000), 仅 1 h 与 24 h 间稳定性差异有统计学意义 ($P=0.028$)。 ^{131}I -rhTSH 与新鲜人血清混匀, 放于 37 °C 孵箱中孵育 1、6、12、24 h 的放化纯度分别为 $(92.59 \pm 0.73)\%$ 、 $(91.33 \pm 0.98)\%$ 、 $(91.01 \pm 0.73)\%$ 、 $(89.58 \pm 1.33)\%$ (图 3), 差异有统计学意义 ($F=4.825$, $P=0.033$), 多重比较: 1 h 与 6 h、1 h 与 12 h、6 h 与 12 h、6 h 与 24 h 及 12 h 与 24 h 间稳定性差异无统计学意义 (P 值分别为 0.913、0.492、1.000、0.355 及 0.666), 仅 1 h 与 24 h 间稳定性差异有统计学意义 ($P=0.033$)。

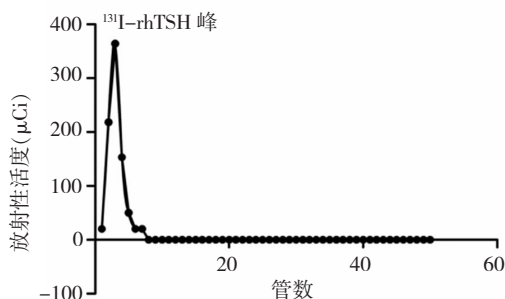


图 1 ^{131}I -rhTSH 淋洗液放射性分布图

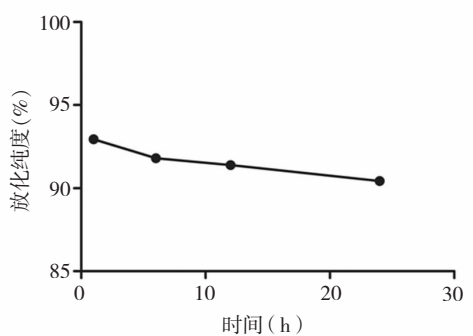


图 2 ^{131}I -rhTSH 室温稳定性检测

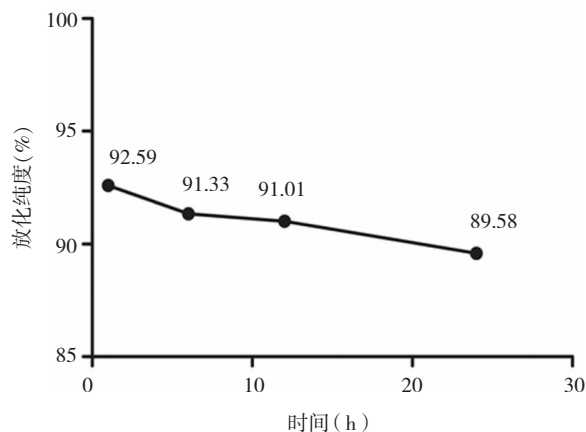


图 3 ^{131}I -rhTSH 血清稳定性检测

2.2 成功构建荷人 DTC 裸鼠模型

共接种 20 只裸鼠, 成功构建 16 只荷人 DTC 裸鼠模型, 且于接种 4 周后肿块直径为 (1.04 ± 0.04) cm。

2.3 ^{131}I -rhTSH 荷人 DTC 裸鼠体内的生物分布

^{131}I -rhTSH 在荷人 DTC 裸鼠体内主要分布于肿瘤、血液、心、肝、脾、肺等组织, 随着注射药物后时间的增加, 血液、心、肝、脾、肺的 %ID/g 逐渐降低, 而肿瘤的 %ID/g 降低速度相对较慢, 表明 ^{131}I -rhTSH 在肿瘤组织中有较长的滞留时间, 在 24 h 时 T/NT 比值达最高, 为 4.43 ± 0.46 (表 1)。

2.4 ^{131}I -rhTSH 荷人 DTC 裸鼠体内的 SPECT 放射免疫显像

在注射放射性药物 ^{131}I -rhTSH 24 h 后, SPECT 显像显示此时荷瘤裸鼠的瘤体组织显影最清晰, 测得其 T/NT 值达最高, 为 4.40。如图 4A、B、C 所示。

表 1 ^{131}I -rhTSH 在荷人分化型甲状腺癌裸鼠模型体内的生物分布 ($\% \text{ID/g}$, $\bar{x} \pm s$, $n=4$)

部位	12 h	24 h	48 h	F 值	P 值
肿瘤	4.41 ± 0.33	4.12 ± 0.11	3.56 ± 0.59	4.787	0.038
血液	13.72 ± 1.91	7.48 ± 0.11	5.01 ± 1.08	50.158	0.000
脑	0.78 ± 0.12	0.56 ± 0.15	0.42 ± 0.13	7.419	0.012
心	3.67 ± 0.73	1.98 ± 0.07	1.12 ± 0.15	35.839	0.000
肝	9.39 ± 0.91	7.03 ± 0.96	4.95 ± 0.98	21.940	0.000
脾	5.93 ± 1.36	3.62 ± 0.15	1.81 ± 0.12	27.228	0.000
肺	6.02 ± 0.29	4.94 ± 0.20	3.71 ± 0.54	38.290	0.000
肾	6.11 ± 0.22	6.23 ± 0.61	5.26 ± 1.53	1.208	0.343
胃	2.39 ± 0.16	1.84 ± 0.47	1.31 ± 0.11	13.519	0.002
肠	2.07 ± 0.31	1.98 ± 0.26	1.13 ± 0.15	17.227	0.001
股骨	0.96 ± 0.19	0.68 ± 0.21	0.39 ± 0.18	8.761	0.008
肌肉	1.69 ± 0.07	0.94 ± 0.13	0.88 ± 0.07	94.500	0.000
肿瘤 / 肌肉	2.61 ± 0.18	4.43 ± 0.46	4.03 ± 0.38	28.352	0.000

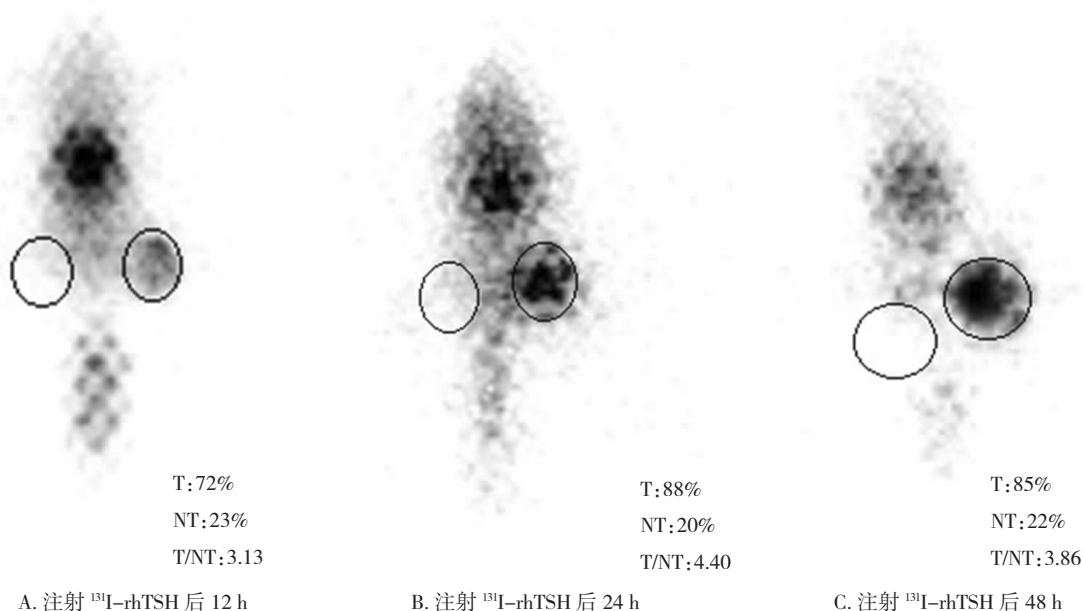


图 4 注射 ^{131}I -rhTSH 后荷人分化型甲状腺癌裸鼠模型在不同时间点的 SPECT 静态显像

3 讨论

TC 是一种异质性肿瘤,在组织学表现、生物学行为和对治疗的反应等方面都有明显的差异。DTC 包括甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)和滤泡状甲状腺癌(follicular thyroid cancer, FTC),随着甲状腺结节和 DTC 诊治指南^[1]的推广和应用,根据疾病的危险分层选择合适的治疗方式。目前主要的治疗方式是经手术切除+放射性碘治疗(radioiodine therapy, RAI)+促甲状腺素(thyroid stimulating hormone, TSH)抑制治疗,85%的患者预后良好,PTC 及 FTC 10 年总生存率分别为 93%和 85%^[6]。但仍然会有小部分复发、转移病灶患者出现 ^{131}I 治疗后显像阴性,对 ^{131}I 不响应、不敏感或者耐受,肿瘤失分化,摄碘能力降低或者不摄取碘的情况,造成对这类患者进行诊断及治疗的困难。根据目前研究最多的原因是钠碘转运体(Na^+/I^- -symporter, NIS)表达过低,导致 DTC 细胞摄碘能力下降,进入残留甲状腺组织及 DTC 病灶内的 ^{131}I 剂量降低,最终导致 ^{131}I 治疗效果差^[7];也有可能是多次碘治疗后出现碘耐受或者碘抵抗。有研究表明 TSH 可以增加 NIS

的摄碘能力^[8]。

临床实际工作中针对这类患者多采用体外放射性治疗、化疗及激酶抑制剂的综合治疗等^[9],但效果往往不能肯定,并且还会造成患者局部放射性炎症或者化疗后副作用等。多篇文献^[4,10]证实了 TSHR 对 ^{131}I 不敏感、耐受、抵抗或者低分化的 DTC 复发及转移病灶具有高特异性,是一个高特异性靶点。rhTSH (蛋白多肽,商品化,可以临床应用),2015 年美国甲状腺诊治指南指出 rhTSH 可作为 ^{131}I 治疗、去除 DTC 术后残存组织的常规用药,且有文献^[11]报道 rhTSH 和停用甲状腺激素辅助治疗 DTC,两者治疗反应无统计学差异,但 rhTSH 辅助治疗减少了甲状腺激素撤退的不良反应。本研究主要针对这类患者,找到一种能够特异性诊断和治疗的分子探针, rhTSH 可以与 TSHR 靶向性结合来达到靶向诊断的目的,并为其靶向性治疗打下前期基础。

RII 在肿瘤的靶向诊断、分期及靶向治疗等方面有着重要的作用。本研究应用放射性核素 ^{131}I 来标记 rhTSH,首先其标记方法简单且比较成熟;其次 ^{131}I 发射 γ 和 β 两种射线,既可用以对肿瘤进行靶向显像,又可以直接杀伤肿瘤细胞从而达到治疗的目的。经鉴定本研究探针 ^{131}I -rhTSH 具有较好的稳

定性,虽其 1 h 与 24 h 室温及血清稳定性有统计学差异,但其放化纯度仍较高,因此该探针可用于 RII。荷瘤裸鼠体内生物分布显示在 24 h 时肿瘤组织的 T/NT 值达最高,为 4.43,这与 SPECT 静态显像结果相符合,其 T/NT 值为 4.40,说明注射放射性药物 24 h 后为最佳的显像时间,此时可见肿瘤组织放射性相对较高,而其他组织放射性相对较低,可形成明显对比,瘤体显影最清晰,因此放射性探针 ^{131}I -rhTSH 能够靶向性的在瘤体组织中聚集,说明 rhTSH 在体内对 DTC 细胞具有一定的靶向性。

本研究也存在一定的不足。首先,放射性核素 ^{131}I 作为诊断核素图像质量欠佳,但因其将诊断和治疗融为一体,标记方法简便也是其优点,后期可以利用其他核素,如 ^{68}Ga 、 ^{177}Lu 等来继续研究;其次, rhTSH 是大分子激动剂,易出现抗原抗体反应且制备相对困难、价格较昂贵,目前有许多研究针对 rhTSH 的小分子类似物,如 TR1401、MS438 等对 TSHR 也有较好的靶向性^[12-14],这可能是未来发展的重要方向。本研究组将在此基础上进一步研究 rhTSH 的小分子类似物以及拮抗剂,以期获得更好的诊断及治疗效果,为难治性 TC 的早期诊断及治疗提供理论和实践依据。

参 考 文 献

- [1] Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer; the American Thyroid Association Guidelines Task Force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2016, 26(1): 1-133.
- [2] Vaisman F, Carvalho DP, Vaisman M. A new appraisal of iodine refractory thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2015, 22(6): R301-310.
- [3] Anderson RT, Linnehan JE, Tongbram V, et al. Clinical, safety, and economic evidence in radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: a systematic literature review[J]. *Thyroid*, 2013, 23(4): 392-407.
- [4] Rowe CW, Papul JW, Gedye C, et al. Targeting the TSH receptor in thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2017, 24(6): R191-202.
- [5] D'Agostino M, Sponziello M, Puppini C, et al. Different expression of TSH receptor and NIS genes in thyroid cancer: Role of epigenetics[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2013, 52(2): 121-131.
- [6] Ke CC, Liu RS, Yang AH, et al. CD133-expressing thyroid cancer cells are undifferentiated, radioresistant and survive radioiodide therapy[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 40(1): 61-71.
- [7] Chung JK, Youn HW, Kang JH, et al. Sodium iodide symporter and the radioiodine treatment of thyroid carcinoma[J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 44(1): 4-14.
- [8] Krieger CC, Perry JD, Morgan SJ, et al. TSH/IGF-1 receptor cross-talk rapidly activates extracellular signal-regulated kinases in multiple cell types[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(10): 3676-3683.
- [9] 李小毅, 张波, 林岩松. 成人甲状腺结节与分化型甲状腺癌诊治指南(2015年美国甲状腺协会)解读[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 52(4): 309-315.
- [10] 范永增, 袁耿彪, 朱晓娥, 等. TSH 受体介导高分子纳米药物对甲状腺癌的靶向性研究[J]. *重庆医学*, 2012, 41(31): 3286-3288.
- [11] Ha J, Kim MH, Jo K, et al. Recombinant human TSH stimulated thyroglobulin levels at remnant ablation predict structural incomplete response to treatment in patients with differentiated thyroid cancer[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2017, 96(29): e7512.
- [12] Neumann S, Huang W, Titus S, et al. Small-molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(30): 12471-12476.
- [13] Galli F, Manni I, Piaggio G, et al. (99m)Tc-labeled-rhTSH analogue(TR1401) for imaging poorly differentiated metastatic thyroid cancer[J]. *Thyroid*, 2014, 24(8): 1297-308.
- [14] Latif R, Ali MR, Ma R, et al. New small molecule agonists to the thyrotropin receptor[J]. *Thyroid*, 2015, 25(1): 51-62.

(责任编辑:张辉洁)