

文章编号:0253-9950(2007)01-0032-08

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 HYNIC-Anx13 用于 细胞凋亡显像的研究

李洪玉¹, 胡 骥^{1,*}, 梁积新¹, 陈宝军¹, 鲁 佳¹,
罗联哲¹, 陈 阳², 沈浪涛¹, 罗志福¹

1. 中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413;

2. 中国核工业 北京 401 医院, 北京 102413

摘要:为探讨 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的 HYNIC-Anx13 用于细胞凋亡显像的可能性, 分别以 *N*-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸(Tricine), 乙二胺-*N,N'*-二乙酸(EDDA)和 EDDA/Tricine 为协同配体, 对经 6-胍基烟酰基(HYNIC)修饰的膜联蛋白 V(Annexin V)片段(HYNIC-Anx13)的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记条件和主要影响因素进行了研究, 并完成了 HYNIC-Anx13 的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记物在正常小鼠体内的生物分布和大鼠细胞凋亡模型的显像实验。实验结果表明, 标记物在反应溶液和小牛血清中较稳定, 但在与半胱氨酸的竞争反应中及在生物体内的稳定性较差。生物分布实验及体内显像结果表明, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 HYNIC-Anx13 的血液清除较快, 在体内主要经肾脏排泄; 在模型组的靶器官中的放射性摄取明显高于对照组($p < 0.05$), 但靶与非靶组织的放射性比值较低, 细胞凋亡组织的显像图像不够理想。

关键词: Annexin V 片段; HYNIC; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记; 细胞凋亡显像

中图分类号: O615.4 **文献标识码:** A

HYNIC-Anx13 Labelled With $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ for Imaging of Apoptosis

LI Hong-yu¹, HU Ji^{1,*}, LIANG Ji-xin¹, CHEN Bao-jun¹, LU Jia¹,
LUO Lian-zhe¹, CHEN Yang², SHEN Lang-tao¹, LUO Zhi-fu¹

1. Isotope Department, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;

2. China Nuclear Industry Beijing 401 Hospital, Beijing 102413, China

Abstract: In this report, the $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ labelling of Annexin V fragment modified with HYNIC (HYNIC-Anx13) using Tricine, EDDA or EDDA/Tricine as coligands was described. The effect of various factors on $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ labelling was investigated. Biodistribution studies in normal mice and gamma imaging of apoptosis in rats induced by cyclophosphamide were performed. The labelled conjugates were stable in aqueous solution and serum solution *in vitro*, but they were not stable when challenged with cysteine and *in vivo*. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ labelled HYNIC-Anx13 showed rapid blood clearance and renal excretion. The uptake in target organs in model rats

收稿日期:2006-07-12; 修订日期:2006-09-12

基金项目:国际原子能机构 CRP 基金资助项目(CONTRACT No.: 12469/R0)

作者简介:李洪玉(1970—),女,吉林延吉人,副研究员,博士研究生,放射性药物专业。

“*” 通讯联系人

were significantly higher than those in control rats ($p < 0.05$), but the T/NT ratios were relatively low. The imaging result indicated that ⁹⁹Tc^m-HYNIC-Anx13 may not be a promising agent for apoptotic imaging.

Key words: Annexin V fragment; HYNIC; ⁹⁹Tc^m labelling; apoptotic imaging

细胞凋亡,又称为程序性细胞死亡,是人正常生长、免疫控制、自我动态平衡不可缺少的组成部分。细胞凋亡是一种细胞的主动性死亡过程,是机体对细胞增殖和成长的一种基本对抗反应,而细胞的增殖和成长对维持正常的生理环境与循环以及疾病预防都是十分必要的^[1-2]。

细胞凋亡会引起易感细胞经历一系列由基因组编码调控的内源性生化机制控制的酶和形态的变化。在细胞凋亡时,会有磷脂酰丝氨酸(PS)暴露于细胞膜的外表面。膜联蛋白 V (Annexin V) 是对 PS 有高亲和力的人体内源性蛋白。体外细胞结合实验表明,在凋亡细胞中 Annexin V 的浓度是正常细胞中的 20 倍。因此,Annexin V 成为研究早期细胞凋亡的重要标识物。用于体内细胞凋亡显像的放射性标记 Annexin V 为器官移植、肿瘤以及心血管病等相关病症的诊断提供了重要信息^[1-3],其中,⁹⁹Tc^m 标记的 HYNIC-Annexin V 已应用于临床研究^[4]。

HYNIC 是⁹⁹Tc^m 标记蛋白或多肽时常用的双功能螯合剂。在标记过程中,⁹⁹Tc^m 与 HYNIC 的胍基形成 Tc—N 键,而协同配体(如 N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸(Tricine)或乙二胺-N,N'-二乙酸(EDDA))的引入和参与配位,有利于提高配合物的稳定性,并对其药代动力学性质加以调节^[5-8]。

HYNIC-Anx13 是经 HYNIC 修饰的 Annexin V 的片段,含有 13 个氨基酸残基。本工作分别以 Tricine,EDDA 和 EDDA/Tricine 为协同配体,研究 HYNIC-Anx13 的⁹⁹Tc^m 标记方法和条件,并进行正常小鼠体内生物分布和由环磷酰胺诱导的细胞凋亡动物模型显像实验,探讨⁹⁹Tc^m 标记的 HYNIC-Anx13 用于细胞凋亡显像的可能性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HYNIC-Anx13,匈牙利同位素研究院的 Jozsef Kornyei 提供; Tricine 和 EDDA,美国 Aldrich 公司;乙腈,色谱纯,比利时 Acros 公司;

其它试剂均为国产分析纯试剂。

⁹⁹Mo-⁹⁹Tc^m 发生器,原子高科股份有限公司生产;超纯水装置,美国 Millipore 公司;HPLC 系统,美国 Varian 公司;HPLC 放射性检测器,德国 Raytest 公司;双探头 SPECT,德国西门子公司;FH463A 自动定标器,FT-603 型闪烁探头,北京核仪器厂;CRC15R 放射性活度计,美国 CAPIN-TEC 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 以 Tricine 为协同配体 HYNIC-Anx13 的标记 依次将 150 μ L Tricine(100 g/L,溶于 25 mmol/L, pH = 5.0 丁二酸缓冲液)、10 μ L HYNIC-Anx13(1 g/L,溶于 0.2 mol/L, pH = 4.6 乙酸缓冲液)、1 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.07 mol/L, pH = 7.2)、5~10 μ L 的 SnCl₂ · 2H₂O (5~12 g/L,溶于 0.1 mol/L HCl 溶液)和 0.1~0.5 mL Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液(74~740 GBq/L)加入到 10 mL 西林瓶中,室温反应 30 min,即得。

1.2.2 以 EDDA 为协同配体 HYNIC-Anx13 的标记 依次将 0.5 mL EDDA (10 g/L,溶于 0.07 mol/L, pH = 7.0 PBS)、10 μ L HYNIC-Anx13 (1 g/L,溶于 0.2 mol/L, pH = 4.6 乙酸缓冲液)、5~10 μ L SnCl₂ · 2H₂O (0.5~4.0 g/L,溶于 0.1 mol/L HCl 溶液)和 0.1~0.5 mL Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液(74~740 GBq/L)加入到 10 mL 西林瓶中,室温反应 60 min,即得。

1.2.3 以 EDDA/Tricine 为协同配体 HYNIC-Anx13 的标记 依次将 150 μ L Tricine (100 g/L,溶于 25 mmol/L, pH = 5.0 丁二酸缓冲液)、0.75 mL 的 EDDA (10 g/L,溶于 0.07 mol/L, pH = 7.0 PBS)、10 μ L HYNIC-Anx13 (1 g/L,溶于 0.2 mol/L, pH = 4.6 乙酸缓冲液)、0.5 mL PBS (0.07 mol/L, pH = 7.2)、5~10 μ L SnCl₂ · 2H₂O (0.5~4.0 g/L 0.1 mol/L HCl 溶液)和 0.1~0.5 mL Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液(74~740 GBq/L)加入到 10 mL 西林瓶中,室温反应 60 min,即得。

1.2.4 快速薄层层析法(ITLC 法) 采用

ITLC-SG 层析纸(Gelman Sciences),上行展开分析。展开体系 1 为 2-丁酮: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 在前沿,其余组分在起点;展开体系 2 为 50%乙腈: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -胶体在起点,其余组分在前沿。

1.2.5 高效液相分析(HPLC 法) UV 波长选择 254 nm,流速为 1 mL/min。方法 1:流动相 A:0.1%三氟乙酸(TFA)水溶液,B:0.1%TFA-乙腈溶液;梯度:0—25 min,0%~100% B;25—28 min,100% B;28—32 min,100%~0% B。方法 2:流动相 A:0.01 mol/L PBS(pH=6.0),B:乙腈;梯度:0—3 min,0% B;3—23 min,0%~80% B;23—24 min,80% B;24—28 min,80%~0% B。

1.2.6 Sep-Pak 纯化 C-18 Sep-Pak 小柱(Waters, Milford.)依次用 5 mL 乙醇、5 mL 水和 5 mL 空气活化后,将标记溶液上样,先用 5 mL 水洗,标记上的肽用 0.5 mL 乙腈洗脱后用氮气吹干。

1.2.7 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 HYNIC-Anx13 的稳定性研究 肽的标记溶液于室温放置或在 PBS(0.07 mol/L,pH=7.2)中 37 °C 温育,于不同时间点进行 HPLC 分析,考察其稳定性。

各取 0.1 mL $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13(按 1.2.6 法纯化)加到 1 mL 小牛血清溶液(小牛血清与 PBS(0.07 mol/L,pH=7.2)的体积比为 1:100)中,混匀后,37 °C 温育 4 h,在不同时间点进行 HPLC 分析。

各取 0.1 mL $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 加到 0.2 mL 0.01,0.1,1.0 mmol/L 的半胱氨酸溶液中,混匀后,37 °C 温育 4 h,在不同时间点进行 HPLC 分析。

分别将 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 经尾静脉注射到小白鼠体内,1h 后取尿液进行 HPLC 分析,考察其体内稳定性。

1.2.8 正常小鼠体内的生物分布 将制备的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 用生理盐水稀释成 7.4 GBq/L。取健康昆明小白鼠(雌性,18~22 g)12 只,随机分为 4 组,每只尾静脉注射 0.1 mL (740 kBq),于注射后 10 min,1,2,4 h,断颈处死,取不同脏器称重并测量放射性计数,计算每克组织的摄取率(%/g)。

将制备的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13,经

Sep-Pak 纯化,用氮气将乙腈吹干后,用生理盐水稀释成 3.7 GBq/L。同法,每只小白鼠尾静脉注射 0.15 mL(555 kBq)。

1.2.9 动物模型的建立、生物分布与显像 按文献[3]中的方法,取 SD 大鼠的幼鼠(雌性,均重 166 g)12 只,随机分为 4 组。两组为凋亡模型组,每只腹膜内注射环磷酰胺,注射剂量为 150 mg/kg(环磷酰胺溶于 1 mL PBS,pH=7.4);另两组为对照组,每只腹膜内注射生理盐水 1 mL。

由尾静脉注入 0.2 mL(7.4 MBq) $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13,注射后 1 h(相当于注射环磷酰胺 26 h 后),对模型组和对照组进行显像。显像前 15 min 对 SD 鼠按 40 mg/kg 肌肉注射盐酸氯胺酮进行麻醉,显像间隔 1 h,共显像 3 次。并分别在注药后 1 h 和 3.5 h(相当于注射环磷酰胺 26.5 h 和 28 h 后)断颈处死,取不同脏器称重并测量放射性计数,计算摄取率(%/g)。

显像数据在计算机系统 256 × 256 矩阵中进行记录和分析。放大倍数:1;采集计数:每只 2 × 10⁵。对相关参数应用 Microsoft Excel 2000 进行 *t*-检验。

2 结果和讨论

2.1 以 Tricine 为协同配体

以上述 3 种协同配体标记制备的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 配合物,其 HPLC 分析结果示于图 1。从图 1(a)看出, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 的保留时间(*t_R*)为 13.8 min。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine₂ 的 *t_R* 为 4.6 min,而 HYNIC-Anx13 的 *t_R* 为 12.9 min(UV 检测峰未给出)。

在 pH 为 5.0,6.1 和 7.2 的缓冲液中制备 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 标记物。ITLC 分析表明,pH 为 6.1 或 7.2 时, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -胶体的量均小于 5%,而 pH 为 5 时, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 的量有明显增加。实验最终选择了 pH=7.2 的缓冲液进行制备,得到的标记率在 95%以上。

2.2 以 EDDA 为协同配体

从图 1(b)可见,以 EDDA 为协同配体,产物主峰出现分叉,这可能是产生了异构体的原因。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 的 *t_R* 为 12.6 min 和 13.7 min, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA 的 *t_R* 为 4.9 min。

当室温反应 60 min,75 °C 反应 30 min 和 100 °C 反应 10 min 时,在投料相同的情况下,虽然加热可促使反应快速进行,但对总体标记率的影响不大。考虑到加热会对多肽的活性产生不利影响,

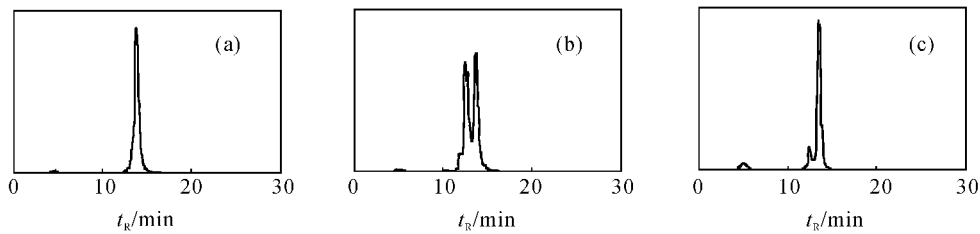


图 1 HPLC 淋洗曲线 (方法 1)

Fig. 1 HPLC profiles using method 1

(a)——⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13, (b)——⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13,
(c)——⁹⁹Tc^m-EDDA/Tricine-HYNIC-Anx13

选择了室温反应 60 min 的条件。另外,对 pH 为 5.0,6.1 和 7.0 时的标记情况进行了比较,发现 pH 为 7.0 时标记率较高。

据文献[5]报道,以 EDDA 为协同配体标记 HYNIC-肽时,亚锡量是影响标记率的主要因素。本工作对亚锡量的影响进行了研究,实验结果列入表 1。

随着亚锡量的增加,虽然 ITLC 分析表现为 ⁹⁹Tc^mO₄⁻ 的量逐渐减少,且 ⁹⁹Tc^m-胶体的量无明显增加,但 HPLC 分析却显示生成 ⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13 的量随亚锡量增加而减小。推测 ITLC 分析不能区分 ⁹⁹Tc^m-EDDA 和 ⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13,而增加亚锡量只会促进 ⁹⁹Tc^m-EDDA 的形成,但并不利于 ⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13 的形成。最终选择亚锡量为 5~20 μg,得到的平均标记率为 72.0%(文献[6]报道 ⁹⁹Tc^m 标 EDDA-HYNIC-八肽的标记率平均值为 69.4%)。由于标记率不够高,需对标记物进行 Sep-Pak 小柱的纯化,这是一个固相纯化过程, Sep-Pak 小柱经活化后,将标记溶液上样,先用水洗去水溶性杂质 ⁹⁹Tc^mO₄⁻ 和 ⁹⁹Tc^m-EDDA,再用乙腈洗脱 ⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13,而 ⁹⁹Tc^m-胶体则滞留在柱上不被洗脱,以达到纯化的目的。

表 1 以 EDDA 为协同配体时亚锡量对标记率的影响
Table 1 Labelling yields of ⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13 using different amount of stannous chloride

$m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ / μg	$Y_{\text{lab}} / \%$	$m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ / μg	$Y_{\text{lab}} / \%$
5~20	72.0	60	20.9
25	57.4	200	10.8
50	46.1		

2.3 以 EDDA/Tricine 为协同配体

从图 1(c) 可见,标记产物的 t_R 与 ⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13 基本一致,产物主峰的 t_R 为 13.8 min。因此,在 TFA 淋洗体系中,HPLC 分析鉴别不同 ⁹⁹Tc^m 标记的 HYNIC-Anx13 异构体存在困难。

以 EDDA/Tricine 为协同配体时,亚锡量对标记率的影响列入表 2。从表 2 可看出,亚锡量仍然是影响标记率的主要因素,并且表现出标记率同样随亚锡量增加而降低,而且在室温反应 60 min,75 ℃ 反应 30 min 和 100 ℃ 反应 10 min 时,虽然加热可以加快转移配位反应的进程,但对总体标记率的影响不大。

表 2 以 EDDA/Tricine 为协同配体时
亚锡量对标记率的影响

Table 2 Labelling yields of ⁹⁹Tc^m-EDDA/Tricine-HYNIC-Anx13 using different amounts of stannous chloride

$m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ / μg	$Y_{\text{lab}} / \%$	$m(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ / μg	$Y_{\text{lab}} / \%$
10	98.4	50	84.4
20	94.7	120	60.6
25	90.3	400	35.2

2.4 磷酸缓冲液(PBS)为淋洗体系的 HPLC 分析

Clemens 等[5,8]的工作表明,选用不同 pH 值的流动相有助于改善 HPLC 的淋洗曲线。以不同协同配体标记的 HYNIC-肽,采用 PBS 体系可以将 TFA 体系中重叠的色谱峰更好地区分开。

HPLC 分析结果示于图 2。从图 2 看出,不同的标记方法得到了不同的异构体,其在保留时间上存在较大的差异。⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13

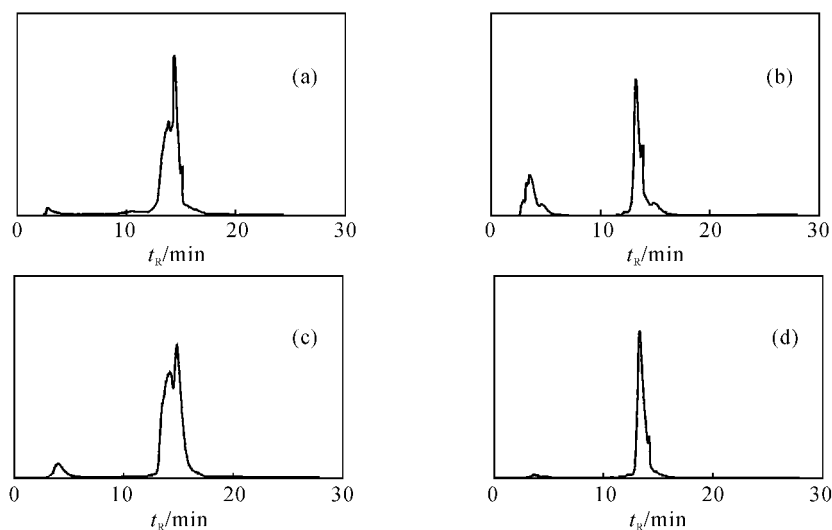


图 2 HPLC 淋洗曲线(方法 2)

Fig. 2 HPLC profiles using method 2

- (a)—— $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13, (b)—— $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13,
(c)—— $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA/Tricine-HYNIC-Anx13, 室温反应 1 h(Room temperature for 1 h),
(d)—— $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA/Tricine-HYNIC-Anx13, 75 °C 反应 30 min(75 °C for 30 min)

峰形较宽,最高峰的保留时间为 14.4 min;以 EDDA 为协同配体,标记物的保留时间为 13.3 min;以 EDDA/Tricine 为协同配体,室温反应时,标记物为较宽的双峰,保留时间为 14.2 min 和 14.9 min;在加热的条件下,产物转化为单峰,保留时间与仅以 EDDA 为协同配体时标记物的保留时间趋于一致。表明在室温条件下,从 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 到 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 的转移,整合进行得缓慢而不充分。

2.5 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 HYNIC-Anx13 的稳定性

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的 HYNIC-Anx13 于室温下放置很稳定。在 37 °C PBS(pH=7.2)中放置 5 h, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 标记率仍保持在 95%以上,但产物峰分叉增多,可能与异构体的转化有关。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 随着时间延长,杂质峰逐渐增高,到 5 h 时标记率从 95.6%降为 83.1%。

在血清中放置 4 h 后, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 杂质低于 1%,而 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 的杂质从 1.4%升高至 6.8%。

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 分别在 0.01, 0.1, 1.0 mmol/L 半胱氨酸溶液中于 37 °C 温育,可看到有转移整合现象,标记率下降 10%~30%; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 的标记率则降低 10%~13%。

HPLC 分析表明,注药后 1 h,尿液中的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 都有较大变化,保留时间前移,这与文献报道的结果一致^[6]。这说明配合物的体内稳定性不好,可能参与了体内代谢,或在体内与更强的配体发生了部分配体交换反应,成为水溶性更强的物质。

2.6 正常小鼠体内的生物分布

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 在正常小鼠体内生物分布实验结果列入表 3 和表 4。从表 3,4 看出,标记物在体内主要通过肾排泄,且血清清除速度快。与注药后 10 min 比较,1 h 后肾的活度摄取降低了 70%,血中的活度降低了 86%。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EDDA-HYNIC-Anx13 在正常小鼠体内的行为与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 较为相似,也主要通过肾排泄,且血清清除较快。

2.7 动物模型的建立、生物分布与显像

由于加热会对 HYNIC-Anx13 肽的稳定性和活性产生影响,所以 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记宜在室温下进行。以 Tricine 为协同配体在室温下反应 30 min 可以得到较高的标记率(>95%),且不需要进一步纯化。因此,选择 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 进行了模型动物的显像实验。

关于细胞凋亡的动物模型建立,Blankenberg

表 3 ⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13 在正常小鼠体内的生物分布

Table 3 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13 in normal mice

器官 (Tissues)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)			
	10 min	60 min	120 min	240 min
心(Heart)	3.08±0.31	0.62±0.04	0.44±0.04	0.28±0.04
肝(Liver)	3.78±0.26	1.67±0.20	1.38±0.05	0.81±0.07
脾(Spleen)	1.82±0.37	0.45±0.05	0.35±0.04	0.32±0.06
肺(Lung)	5.24±0.67	1.04±0.16	0.69±0.09	0.43±0.05
肾(Kidney)	19.71±1.20	5.87±1.01	5.07±0.09	2.52±0.06
血(Blood)	8.22±1.00	1.13±0.10	0.73±0.06	0.40±0.04
胃(Stomach)	2.84±0.07	0.83±0.09	0.67±0.12	0.40±0.08
肠(Intestines)	2.94±0.49	0.75±0.06	0.51±0.06	0.40±0.08
肌肉(Muscle)	2.10±0.15	0.35±0.04	0.30±0.02	0.16±0.02

注(Note):*n*=3

表 4 ⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13 在正常小鼠体内的生物分布

Table 4 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13 in normal mice

器官 (Tissues)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)			
	10 min	60 min	120 min	240 min
心(Heart)	2.06±0.15	0.49±0.01	0.40±0.04	0.26±0.07
肝(Liver)	2.11±0.17	0.84±0.07	0.70±0.05	0.43±0.05
脾(Spleen)	1.49±0.22	0.60±0.01	0.52±0.07	0.40±0.04
肺(Lung)	3.98±0.68	0.91±0.07	0.71±0.06	0.46±0.04
肾(Kidney)	19.35±3.56	5.30±0.84	5.13±0.70	3.04±0.36
血(Blood)	6.52±0.21	1.14±0.09	0.78±0.09	0.49±0.05
胃(Stomach)	2.91±0.70	1.12±0.26	0.70±0.13	0.65±0.16
肠(Intestines)	3.55±2.53	0.47±0.06	0.35±0.03	0.23±0.04
肌肉(Muscle)	1.87±0.15	0.26±0.01	0.20±0.01	0.15±0.02

注(Note): *n*=3

等^[3]报道了一种可靠和方便的方法。在 SD 大鼠腹膜内注射环磷酰胺,可以诱导造血器官的髓内细胞凋亡,主要体现在脾脏和股骨,尤其是脾脏,表现为重量减轻,并经过细胞形态学观察证实。

本实验所用动物模型按 Blankenberg 等^[3]报道的方法获得。注射⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13后 1 h(相当于注射环磷酰胺 26 h 后)和 3.5 h(相当于注射环磷酰胺 28 h 后)的模型组与对照组的脾脏质量对比列入表 5。从表 5 可看出,脾脏质量的减轻很明显,与文献^[3]中描述的结果一致,表明细胞凋亡模型的建立是成功的。

注射⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13 后 1 h(相当于注射环磷酰胺 26 h 后)和 3.5 h(相当于注射环磷酰胺 28 h 后),模型组和对照组的显像图片示于图 3。从显像结果可看出,放射性摄取主要集中在肾脏和膀胱。表明⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13 在大鼠体内主要经肾脏排泄,这与正常小

鼠的体内生物分布结果相符合。从显像图片上看,由于肾脏中较强的放射性浓聚,对位于左肾上方的靶组织脾脏的显像形成了屏蔽;另一靶组织股骨的放射性摄取,模型组与对照组差别不大。

表 5 模型组和对照组的脾脏质量对比

Table 5 Comparison of the mass of spleen weights

No.	<i>m</i> / mg			
	1 h		3.5 h	
	模型组 (Model)	对照组 (Control)	模型组 (Model)	对照组 (Control)
1	239.8	444.7	212.3	357.0
2	249.0	464.7	199.2	360.1
3	248.8	418.6	205.5	362.2
	(245.9)	(442.7)	(205.7)	(359.8)

注(Note):括号内数值为平均值(Data in parentheses are the average of *m*)

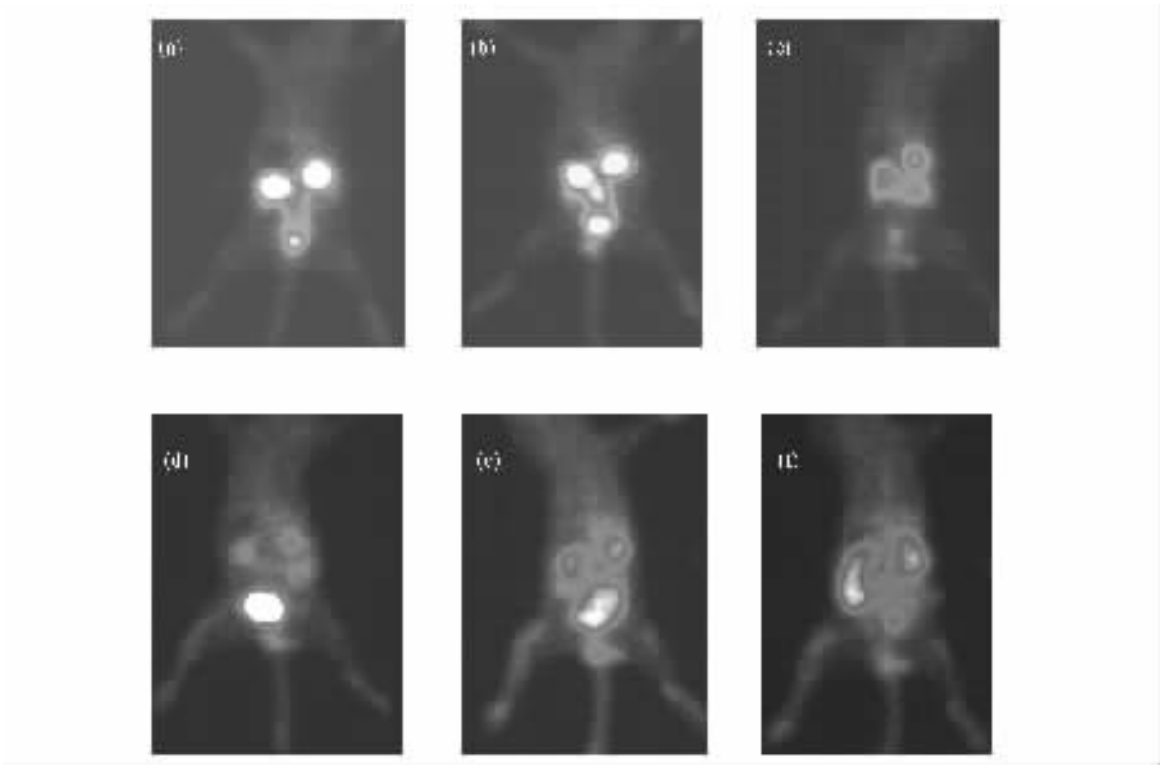


图 3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 的显像结果

Fig. 3 Scintigraphic images of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13

模型组(Model rats): (a)——注射后 0.5 h(0.5 h p. i.), (b)——注射后 1.5 h(1.5 h p. i.), (c)——注射后 3 h(3 h p. i.);
对照组(Control rats): (d)——注射后 0.5 h(0.5 h p. i.), (e)——注射后 1.5 h(1.5 h p. i.), (f)——注射后 3 h(3 h p. i.)

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 在大鼠体内的生物分布结果列入表 6。从表 6 看出,模型组脾脏与股骨的放射性摄取均高于对照组。在注药后 1 h 和 3.5 h,模型组的脾/血摄取比分别为 0.65 和 1.07,对照组则分别为 0.41 和 0.64;模型组的股骨/肌肉摄取比分别为 2.83 和 2.29,而对照组则分别为 2.20 和 2.00。在靶器官脾脏和股骨中的放射性摄取,模型组与对照组的差别具有显著

表 6 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 在大鼠体内的生物分布
Table 6 Biodistribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Tricine-HYNIC-Anx13 in rats

器官 (Tissues)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)			
	1 h		3.5 h	
	模型组 (Model)	对照组(Control)	模型组(Model)	对照组(Control)
心(Heart)	0.09±0.02	0.06±0.01	0.06±0.02	0.05±0.00
肝(Liver)	0.21±0.04	0.14±0.00	0.19±0.04	0.11±0.00
脾(Spleen)	0.15±0.03	0.07±0.01	0.16±0.01	0.07±0.01
肺(Lung)	0.21±0.06	0.13±0.03	0.13±0.02	0.10±0.00
肾(Kidney)	3.81±0.21	1.13±0.10	2.09±0.60	1.35±0.23
血(Blood)	0.23±0.05	0.17±0.02	0.15±0.01	0.11±0.01
胃(Stomach)	0.26±0.11	0.10±0.01	0.13±0.03	0.08±0.02
肠(Intestines)	0.52±0.28	0.12±0.01	0.11±0.02	0.09±0.02
肌肉(Muscle)	0.06±0.00	0.05±0.01	0.07±0.01	0.04±0.01
股骨(Femur)	0.17±0.01	0.11±0.01	0.16±0.00	0.08±0.01

意义($p < 0.05$),然而,相对于其它器官,靶器官的放射性摄取偏低,其体内药代动力学性质有待进一步改善。

3 结 论

采用 3 种不同的协同配体方式,对经 HYNIC 修饰的 Annexin V 片段 HYNIC-Anx13 进行了⁹⁹Tc^m 标记和标记条件的优化。以 Tricine 为协同配体,在亚锡量为 50~60 μg ,pH 为 7.2 时,标记率达 95% 以上。⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13 与⁹⁹Tc^m-EDDA-HYNIC-Anx13 在反应溶液和小牛血清中较稳定,但在与半胱氨酸的竞争反应中及在生物体内的稳定性较差。正常小鼠的生物分布实验和大鼠细胞凋亡模型的显像实验表明,标记物在体内的血清清除速度快,主要通过肾排泄。在细胞凋亡模型组靶器官中的放射性摄取均明显高于对照组($p < 0.05$),但由于在靶器官中的放射性摄取偏低,因此,⁹⁹Tc^m-Tricine-HYNIC-Anx13 应用于细胞凋亡显像的效果不够理想。

参考文献:

- [1] Blankenberg F G, Tait J F, Strauss H W, et al. Apoptosis Cell Death: Its Implications for Imaging in the Next Millennium[J]. Eur J Nucl Med, 2000, 27(2): 359-367.
- [2] Blankenberg F G, Katsikis P D, Tait J F, et al. Imaging of Apoptosis (Programmed Cell Death) With ⁹⁹Tc^m-Annexin V[J]. J Nucl Med, 1999, 40(1): 84-191.
- [3] Blankenberg F G, Naumovshi L, Tait J F, et al. Imaging Cyclophosphamide-R Induced Intramedullary Apoptosis in Rats Using ⁹⁹Tc^m-Radiolabeled Annexin V[J]. J Nucl Med, 2001, 42(2): 309-316.
- [4] Kemerink G J, Liu X, Kieffer D, et al. Safety Biodistribution, and Dosimetry of ⁹⁹Tc^m-HYNIC-Annexin V, a Novel Human Recombinant Annexin V for Human Application[J]. J Nucl Med, 2003, 44(6): 947-952.
- [5] Decristoforo C, Mather S J. Preparation, ⁹⁹Tc^m-Labeling, and *in vitro* Characterization of HYNIC and N₃S Modified RC-160 and [Tyr³] Octreotide[J]. Bioconjugate Chem, 1999, 10: 431-438.
- [6] Decristoforo C, Mather S J. ⁹⁹Tc^m-Labelled Peptide-HYNIC Conjugates: Effects of Lipophilicity and Stability on Biodistribution[J]. Nucl Med Biol, 1999, 26: 389-396.
- [7] Decristoforo C, Mather S J. Technetium-99m Somatostatin Analogues: Effect of Labelling Methods and Peptide Sequence[J]. Eur J Nucl Med, 1999, 26: 869-876.
- [8] Liu S, Edwards D S, Looby R J, et al. Labeling a Hydrazine Nicotinamide-Modified Cyclic IIb/IIIa Receptor Antagonist With ⁹⁹Tc^m Using Aminocarboxylates as Coligands[J]. Bioconjugate Chem, 1996, 7: 63-71.