

文章编号: 0253-9950(2001)04-0235-06

乏氧显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO 的 制备和活性研究

李 莉, 阎玉军, 王月英, 李美佳, 穆传杰, 韩佩珍

(中国医学科学院 放射医学研究所, 天津 300192)

摘要: 为寻找结构简单、性能优良的乏氧显像剂, 合成并用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记了 3-甲基-3-N-(2-羟乙基)-2-丁酮肟 (EtAO), 进行了体内外活性的研究, 并与已知乏氧显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂ 比较。细胞实验结果表明, 与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂ 一样, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO 也具有亲乏氧性。荷瘤小鼠体内分布结果表明, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO 能选择性地滞留于肿瘤组织。作为一种潜在的乏氧显像剂, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO 有进一步研究的价值。

关键词: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$; 肿瘤; 乏氧; 生物分布

中图分类号: O614.712; R817.9 文献标识码: A

肿瘤乏氧组织能大大降低射线和某些化疗药物对肿瘤细胞的杀伤力, 因而了解肿瘤的乏氧部位和程度将有助于为肿瘤患者选择最佳治疗方案。乏氧显像是通过核医学显像观察乏氧显像剂在体内的分布, 确定乏氧部位, 具有简便、快速、结果可靠等优点^[1]。过去, 对乏氧显像剂的研究集中在含有硝基咪唑基团的化合物, 如: ^{18}F -MISO^[2], ^{123}I -IAZA^[3] 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -BMS18132^[4] 等。近来的研究发现, 某些 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记硝基咪唑衍生物的母体骨架可能具有更强的乏氧显像能力, 其中最典型的的就是 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂。据文献^[5, 6]报道, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂ 在缺氧、缺血心肌及多种实体瘤模型中显示出乏氧选择性, 临床应用结果也比较满意。本文合成 3-甲基-3-N-(2-羟乙基)-2-丁酮肟 (EtAO), 研究 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO 的体内外亲乏氧性, 并与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂ 进行比较, 为寻找结构简单、性能优良的乏氧显像剂提供依据。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

除 1,4-丁二胺为美国 SIGMA 公司产品外, 其余合成试剂均为国产分析纯。元素分析, 质谱 (MS), 核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$) 由南开大学元素所测试。RPMI 1640 培养基, 美国 HYCLONE

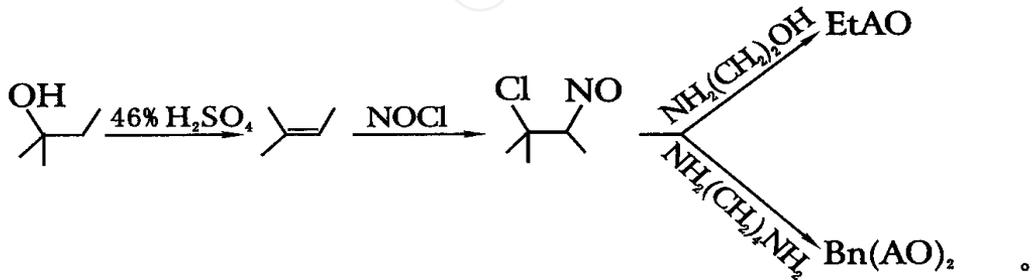
收稿日期: 2001-04-19; 修订日期: 2001-07-02

作者简介: 李 莉 (1975 -), 女, 湖北十堰人, 博士研究生, 核医学专业

公司产品;CO₂ 细胞培养箱,日本 ESPEC 公司产品;FT-646 微机放免测量仪,北京核仪器厂产品;⁹⁹Mo-⁹⁹Tc^m 发生器,中国原子能科学研究院产品;SPECT 显像仪,美国 PICKER 公司产品,由天津市第一中心医院核医学科提供使用。

1.2 标记物的制备与检测

1.2.1 配体的合成 按文献[7]的方法合成配体 Bn(AO)₂ 和 EtAO。将叔戊醇在 46% 硫酸中脱水得到 2-甲基丁烯-2,再与亚硝酸异戊酯、浓盐酸于冰盐浴中反应 0.5 h,得无色片状晶体 2-氯-2-甲基-3-亚硝基丁烷,后者与 1,4-丁二胺、乙醇胺在甲醇中反应 18 h,分别得到 Bn(AO)₂ 和 EtAO,产额分别为 45% 和 46%。合成路线如下:



1.2.2 ⁹⁹Tc^m 标记 将 2 mg 配体用 1 mL 生理盐水溶解,加入 74 MBq 新鲜 Na⁹⁹Tc^mO₄ 淋洗液,再加入 300 μL 新配制的 1 mg/mL SnCl₂ 溶液,摇匀后室温放置 15 min。

1.2.3 标记率和脂水分配系数测定 标记完成后 24 h 内在不同时间用两种展开体系测定标记率:Whatman No. 1 滤纸,甲醇展开,标记物和⁹⁹Tc^mO₄⁻的 R_f 为 0.8~1.0,⁹⁹Tc^mO₂·xH₂O 的 R_f 为 0~0.2;硅胶 G 层析板,生理盐水展开,标记物和⁹⁹Tc^mO₂·xH₂O 的 R_f 为 0~0.2,⁹⁹Tc^mO₄⁻ 的 R_f 为 0.8~1.0。用摇瓶法测定标记物在正辛醇和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中的分配系数。

1.3 体外活性研究

1.3.1 细胞株和培养条件 人早幼粒性白血病细胞(HL-60 细胞)由中国医学科学院血液病研究所提供,用含 10% 胎牛血清、100 mL⁻¹青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液,在 5% CO₂ 和 37℃ 条件下培养传代。

1.3.2 管壁吸附实验 37℃ 时,于 1 mL 离心管中加入 200 μL、浓度约为 0.3 MBq/mL 标记物的 RPMI 1640 培养液,以 2 000 r/min 的转速离心 20 s,将培养液全部吸出并转移至另一离心管中,测定空管和含培养液离心管的放射性计数,分别记作:A 和 B。实验结果用管壁非特异性吸附百分数 Y₁ 表示。计算公式为:

$$Y_1 = A / (A + B) \times 100 \%$$

取 3 份平行样,每份样品重复测量 3 次。

1.3.3 乏氧选择性实验 从指数生长期细胞悬液中收获 HL-60 细胞,在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中悬浮生长。血球计数板检测细胞浓度约为 2 × 10⁶ mL⁻¹,实验前和实验中用台盼蓝染色检测细胞活力均高于 85%。取出 10 mL 上述细胞悬液,转移至特制锥形瓶中,37℃ 下分别充入经水饱和的 95% N₂-5% CO₂ (乏氧)和空气(正常含氧)温育 45 min。加入 100 μL 标记物(使细胞悬液浓度约为 0.3 MBq/mL),温育 5, 30, 60, 120, 180 min 后,取出

200 μL 细胞悬液置于 1 mL 离心管中,以 2 000 r/min 的转速离心 20 s,吸出上清液,测定细胞沉淀和上清液的放射性计数,分别记作: C 和 D。实验结果用细胞吸收百分数 Y_2 表示。计算公式为:

$$Y_2 = C / (C + D) \times 100 \% - Y_1$$

取 3 份平行样,每份样品重复测量 2 次。

1.4 体内活性研究

1.4.1 实验动物 IRM-2 小鼠由中国医学科学院放射医学研究所动物实验室提供,恶性淋巴瘤 IRM-2-ML 为其自发性实体瘤。选择体重 25 g 左右的雌性 IRM-2 小鼠,在左大腿根部皮下以包埋法接种 IRM-2-ML 小鼠恶性淋巴瘤块,接种后约 10 d,肿瘤直径长至约 1.0 cm 时用于实验。

1.4.2 荷瘤小鼠体内分布实验 取荷 IRM-2-ML 恶性淋巴瘤 IRM-2 小鼠 9 只,分成 3 组。经尾静脉注射 3.70 MBq 标记物,1,2,4 h 后断头处死小鼠,取血,心,肝,肾,肿瘤,健侧骨骼肌等组织器官,称重并测量其放射性计数,计算每克组织的摄取率($ID / (\% \cdot g^{-1})$), R (器官/血液)比值和 R (肿瘤/器官)比值。

1.4.3 小鼠显像实验 取正常和荷 IRM-2-ML 恶性淋巴瘤雌性 IRM-2 小鼠各 3 只,经尾静脉注射 3.70 MBq 标记物,腹腔注射戊巴比妥(40 mg/kg)麻醉。仰卧固定,分别于注射显像剂后 2,4 h 进行静态采集,观察标记物在肿瘤部位的浓集情况。

2 结果和讨论

2.1 标记物表征

Bn(AO)₂ 及 EtAO 均为无色针状结晶,熔点分别为 184.5 ~ 185.5 和 96.0 ~ 96.5。Bn(AO)₂ 的 ¹H-NMR(*d*₆-DMSO) 分析结果() 为: 1.094(s, 12H, —CH₃), 1.320(s, 4H, —CH₂—), 1.681(s, 6H, —CH₃), 2.154(s, 4H, —CH₂—), 10.324(s, 2H, —N=OH)。元素分析结果为 C₁₄H₃₀N₄O₂, 计算值(*w*/%) : C, 58.71; H, 10.56; N, 19.56; 实测值(*w*/%) : C, 58.76; H, 10.39; N, 19.30。MS(FAB⁺, *m/z*) : 287。EtAO 的 ¹H-NMR(D₂O) 分析结果() 为: 1.225(s, 6H, —CH₃), 1.857(s, 3H, —CH₃), 2.461(t, 2H, —CH₂—NH—), 3.613(t, 2H, —CH₂—OH)。元素分析结果为 C₇H₁₆N₂O₂, 计算值(*w*/%) : C, 52.48; H, 10.17; N, 17.49; 实测值(*w*/%) : C, 52.26; H, 10.02; N, 17.40。MS(FAB⁺, *m/z*) : 161。

Bn(AO)₂ 在水中溶解度较小,在 pH = 6.5 时才能完全溶解,而 EtAO 易溶于水。两者 ⁹⁹Tc^m标记条件相同,多次测定标记率均大于 95%,室温放置 24 h 内稳定。20 时,⁹⁹Tc^m-Bn(AO)₂和 ⁹⁹Tc^m-EtAO 的脂水分配系数(*P*_{O/B}) 分别为 0.085 ± 0.015 和 0.088 ± 0.007 (*n* = 9)。

2.2 体外乏氧选择性

由于贴壁生长细胞在实验前需经胰酶消化,时间长且操作繁琐,故本实验选择悬浮生长的 HL-60 细胞作研究对象。另外,比较 HL-60 细胞和 MGC 细胞(人胃腺癌细胞,贴壁生长)的实验结果后,发现采用 HL-60 细胞是可行的。在向细胞悬液通入 95% N₂-5% CO₂ 混合气体 45 min 后,可使溶液中氧的体积分数() 降至 1.0 × 10⁻⁵ 以下,造成体系乏氧^[8,9]。

37 时,离心管对 ⁹⁹Tc^m-Bn(AO)₂ 和 ⁹⁹Tc^m-EtAO 的非特异性吸附百分数(*Y*₁/%) 分别为

1.66 ±0.11 和 1.70 ±0.23。细胞对两者的吸收百分数受体系氧含量影响的结果列入表 1。从表 1 看出,5 min 时,HL-60 细胞对两种标记物的吸收与体系氧浓度关系不大。但 30 min 后,乏氧 HL-60 细胞对标记物的吸收与正常细胞相比,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$ 和 $^{99}\text{Tc}^m\text{-EtAO}$ 在正常含氧细胞中的滞留量随时间延长也有所增加,这可能是由于培养液蒸发所致。

表 1 HL-60 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记物的吸收与体系氧含量的关系

Table 1 Relationship between the uptake of HL-60 cells for $^{99}\text{Tc}^m$ -labeled compounds and system oxygen content

t/ min	$Y_2/\%$			
	$^{99}\text{Tc}^m\text{-EtAO}$		$^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$	
	正常(normal)	乏氧(hypoxic)	正常(normal)	乏氧(hypoxic)
5	1.66 ±0.59	1.58 ±0.91	1.18 ±0.79	1.42 ±0.86
30	2.08 ±1.00	3.35 ±0.56	1.83 ±0.61	5.46 ±0.76
60	2.28 ±0.96	7.05 ±1.37	2.75 ±1.42	8.77 ±0.93
120	2.79 ±0.65	10.62 ±1.11	3.14 ±0.89	11.84 ±1.34
180	2.90 ±0.88	15.16 ±1.20	3.34 ±1.11	14.87 ±1.85

注(note): $n = 6$

2.3 荷瘤动物体内分布和显像实验

标记物在荷瘤小鼠体内分布结果列入表 2 和表 3。从表 2,3 看出, $^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$ 和 $^{99}\text{Tc}^m\text{-EtAO}$ 在血液中初始滞留量较低且清除较快。 $^{99}\text{Tc}^m\text{-EtAO}$ 在肝脏、肾脏中的放射性较高,表明主要经肝、肾代谢。 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$ 和 $^{99}\text{Tc}^m\text{-EtAO}$ 均能选择性滞留于肿瘤部位,与 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$ 相比, $^{99}\text{Tc}^m\text{-EtAO}$ 在肿瘤组织的初始滞留量多,但随时间延长而降低较快,这可能与它在体内的代谢有关。 $^{99}\text{Tc}^m\text{-EtAO}$ 的 R (肿瘤/血液)比值较低,始终维持在 1.3 左右,而 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$ 的 R (肿瘤/血液)比值在 2,4 h 时分别为 2.63 和 3.29。

表 2 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$ 在荷瘤 IRM-2 小鼠体内的分布

Table 2 Biodistribution of $^{99}\text{Tc}^m\text{-Bn}(\text{AO})_2$ in tumor-bearing IRM-2 mice

t/ h	ID/ ($\% \cdot \text{g}^{-1}$)				
	血(blood)	心(heart)	肝(liver)	脾(spleen)	肺(lung)
1	1.32 ±0.10	1.28 ±0.12	4.28 ±0.62	2.52 ±0.56	1.74 ±0.33
2	0.60 ±0.10	0.40 ±0.07	2.39 ±0.48	0.99 ±0.12	0.83 ±0.12
4	0.45 ±0.06	0.29 ±0.04	1.80 ±0.34	0.81 ±0.05	0.81 ±0.13
t/ h	ID/ ($\% \cdot \text{g}^{-1}$)				
	肾(kidney)	胃(stomach)	肠(intestine)	肌肉(muscle)	肿瘤(tumor)
1	3.08 ±0.25	2.18 ±0.16	1.97 ±0.20	0.86 ±0.06	1.23 ±0.52
2	1.77 ±0.22	0.91 ±0.15	0.86 ±0.15	0.36 ±0.06	1.21 ±0.13
4	1.30 ±0.13	0.82 ±0.13	0.77 ±0.15	0.21 ±0.03	1.14 ±0.23

注(note): $n = 3$

表3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO在荷恶性淋巴瘤IRM-2小鼠体内的分布Table 3 Biodistribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO in tumor-bearing mice

t/h	ID/(%·g ⁻¹)				
	血(blood)	心(heart)	肝(liver)	脾(spleen)	肺(lung)
1	1.77 ±0.30	1.43 ±0.19	18.40 ±4.09	1.32 ±0.22	1.29 ±0.23
2	0.75 ±0.13	0.41 ±0.03	11.27 ±1.90	0.46 ±0.10	1.21 ±0.11
4	0.57 ±0.03	0.29 ±0.06	4.64 ±0.33	0.28 ±0.06	0.42 ±0.07

t/h	ID/(%·g ⁻¹)				
	肾(kidney)	胃(stomach)	肠(intestine)	肌肉(muscle)	肿瘤(tumor)
1	13.81 ±2.28	0.74 ±0.10	1.15 ±0.09	0.87 ±0.07	2.33 ±0.24
2	10.64 ±0.98	0.42 ±0.07	0.64 ±0.08	0.18 ±0.01	1.01 ±0.05
4	4.09 ±0.52	0.18 ±0.01	0.48 ±0.07	0.13 ±0.00	0.81 ±0.04

注(note): n = 3

正常小鼠和荷瘤小鼠的显像与体内分布测定结果一致。肝、肾显影可见,膀胱放射性逐渐增加,胸部和四肢放射性较低,未见甲状腺和胃显影。尽管 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO的R(肿瘤/血液)不及 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂,但肿瘤部位清晰可辨,肉眼即可观察其放射性高于健侧骨骼肌。与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂相比, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO更集中于肝、肾,而胃肠道中的放射性较低,可能适用于某些胃肠道肿瘤和妇科肿瘤的显像。

尽管许多研究证实了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂的乏氧显像能力,但其选择性滞留于乏氧组织的机理尚无明确解释。研究发现,比BnAO仅少一个亚甲基的PnAO的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记物亲脂性很强(P_{O_2} 为57.7),但没有乏氧选择性。因而,有研究者认为, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂的亲乏氧性可能与其特殊的配合物结构和理化性质有关^[10]。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO具有与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂接近的脂水分配系数,并能选择性地滞留于肿瘤组织,在一定程度上支持了上述观点。

3 结 论

(1)产物Bn(AO)₂和EtAO的结构经¹H-NMR,MS和元素分析等表征予以确认。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO标记方法简单,标记率高,两者脂水分配系数接近。

(2)体内外活性实验表明, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO作为一种潜在的乏氧组织显像剂,具有进一步研究的价值,同时也为寻找结构简单、性能优良的乏氧显像剂提供了参考。

(3) $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂的比较研究表明,脂水分配系数可能是影响标记物乏氧选择性的一个重要因素。

致谢:天津市第一中心医院核医学科秦岚主任和冯学民、王俊起等医生对本工作的支持和帮助,特此致谢。

参考文献:

- [1] COOK G J R, FOGELMAN I. Tumour Hypoxia: The Role of Nuclear Medicine [J]. Eur J Nucl Med, 1998, 25:335 ~ 357.
- [2] KOH W J, RASEY J S, EVANS M L, et al. Imaging of Hypoxia in Human Tumors With [F-18] Fluoromisonidazole[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, 22:199 ~ 212.

- [3] PARLIAMENT M B, CHAPMAN J D, URTASUN R C, et al. Noninvasive Assessment of Human Tumor Hypoxia With ^{123}I Iodoazomycin Arabinoside: Preliminary Report of a Clinical Study [J]. Br J Cancer, 1992, 65:90~95.
- [4] BALLINGER J R, KEE J W M, RAUTH A M. *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation of a Technetium-99m-labeled 2-Nitroimidazole(BMS 181 321) as a Marker of Tumor Hypoxia[J]. J Nucl Med, 1996, 37:1 023~1 031.
- [5] OKADA R D, JOHNSON G, NGUYEN K N, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HL91 Effects of Low Flow and Hypoxia on a New Ischemia-avid Myocardial Imaging Agent[J]. Circulation, 1997, 95:1 892~1 899.
- [6] COOK G J R, HOUSTON S, BARRINGTON S F, et al. Technetium-99m-labeled HL91 to Identify Tumor Hypoxia: Correlation With Fluorine-18-FDG[J]. J Nucl Med, 1998, 39:99~103.
- [7] VASSIAN E G, MURMANN R K. Aromatization of an Aliphatic Oxime Nickel () Complex by Molecular Oxygen [J]. Inorg Chem, 1967, 6:2 043~2 046.
- [8] WHILLANS D W, RAUTH A M. An Experimental and Analytical Study of Oxygen Depletion in Stirred Cell Suspensions [J]. Radiat Res, 1980, 84:97~114.
- [9] MARSHALL R S, KOCH C J, RAUTH A M. Measurement of Low Levels of Oxygen and Their Effect on Respiration in Cell Suspensions Maintained in an Open System[J]. Radiat Res, 1986, 108:91~101.
- [10] ZHANG X, MELO T, BALLINGER J R, et al. Studies of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BnAO(HL91): A Non-nitroaromatic Compound for Hypoxic Cell Detection [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998, 42:737~740.

PREPARATION AND EVALUATION OF $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO AS TUMOR HYPOXIA MARKER

LI Li, YAN Yu-jun, WANG Yue-ying, LI Mei-jia, MU Chuan-jie, HAN Pei-zhen

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China)

Abstract: Seeking for hypoxia imaging agents with simple structure and good performance, 3-methyl-3-N-(2-hydroxyethyl)-2-butanone oxime (EtAO) is synthesized and labeled with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$. *In vitro* and *in vivo* evaluation of this complex as a tumor hypoxia marker is performed and the result is compared with that of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂, a putative hypoxic tracer. The cell experiments show that $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO has hypoxia-affinity as well as $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bn(AO)₂. The biodistribution in tumor-bearing mice indicates that $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO can concentrate selectively in tumor tissues. As a potential hypoxia imaging agent, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -EtAO has the value for the further investigation.

Key words: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$; tumor; hypoxia; biodistribution