

应的信号。在没有其它症状条件下，病人应暂时增加止痛药。

4. 贫血的处理

a. 主张保持病人的血红蛋白在10g或更高的范围。如病人因贫血太虚弱，就不能达到对病人治疗的作用。如果计划用<sup>89</sup>Sr治疗一个血红蛋白6~9g的病人，应先定期给病人输血治疗与贫血相关的症状。贫血是由于骨髓被肿瘤取代以及慢性疾病所致。我们之所以把输血视为对病人的治疗，是因为他们除了存在于骨中的转移以外，几乎没有其他的转移性疾病，特别是前列腺癌。

b. 一旦病人产生与贫血有关的症状，如严重的头痛（即将发生的卒中？）或逐渐加重的心绞痛（即将发生的心肌梗塞？），应该给予输血治疗，防止灾难性的医疗事故发生。

5. 止痛药

a. 扑热息痛加可待因（对乙酰氨基酚与可待因：McNeil, Spring House, PA), no 3 或 4 较好。合成的可待因类药物，包括羟二氢可待因酮和Percoset(盐酸羟可待酮；Dupont, wilmington, DE)对某些病人是

有用的。另一个止痛药缓释硫酸吗啡(MS)通常叫 Msconti (Purdue Frederick, Norwalk, CT)，每12h服用15mg。

b. 非类固醇抗炎药对某些转移性骨痛所致疼痛的病人是有效的，如果有疗效，就不用建议停药。这些药物无副作用。

c. 如病人正服用阿斯匹林或任何阿斯匹林类化合物，我们建议改换成 Tylenol 或其它相应的不含阿斯匹林的止痛药。因为阿斯匹林抗凝血性可造成附加危险，引起病人血小板减少。

d. 适量的泼尼松或地塞米松可改善病人的情绪和胃口。由于它们对肿瘤水肿可能有作用，故亦有利于疼痛缓解。如病人食欲不振，体重减轻和精神障碍可用这类药物治疗。

对于处在乳腺癌和前列腺癌骨转移进展期的病人来说，亲骨性放射性药物比其它治疗方法有服用简单、花费少、效果好等优点。亲骨性放射性药物在其它骨转移癌中的疗效正在研究中。

[Semin Nucl Med 1992; 22(1): 28~32 (英文)  
刘静波节译 管昌田校]

## 直接法铈标记蛋白

Rhodes BA

**摘要：**综述了铈直接标记蛋白的反应过程、标记机理、巯基在直接铈标记蛋白中的作用。评估了铈-硫键的稳定性及亚锡在铈标记蛋白中的作用特点，比较了不同直接铈标记法的优缺点。

用铈直接标记蛋白制备放射性药物，至少要考虑两系列的变量：第一是优化金属离子铈标记到蛋白质硫化基团上的反应参数；第二是减少副反应，因为这类副反应可致不良反应并降低放化纯度。直接标记的一个主要优点是能一步完成，便于制成市场化的放射性药物药盒。该法的另一优点是还原铈与硫化基团的结合很牢，不易受转络合破坏，即一旦铈通过一S<sup>-</sup>基团连接到蛋白上，就不

易转标到其他分子上。

铈直接标记蛋白包括以下反应步骤，它们在同一反应体系（瓶）中可同时发生或者依次完成，即①在蛋白质生物活性不变的前提下，蛋白上的二硫基团被还原；②保护由二硫基团还原而产生的反应性硫化基团；③还原<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>至氧化还原状态，使之与硫化基团呈高反应性；④用适当的复合物与<sup>99m</sup>Tc结合为反应性中间产物，使<sup>99m</sup>Tc保持这种

氧化还原状态。将还原锝从反应性中间产物上转移到蛋白硫化基团部位。反应过程表示如下:

1.  $R-SS-R + S_nX_2 \rightarrow 2R-S-S_n-X$
2.  $TcO_4^- + S_nX_2 + \text{酒石酸} \rightarrow Tc[\text{酒石酸}]$
3.  $Tc[\text{酒石酸}] + R-S-S_n-X \rightarrow R-S-TcX_2$

### 硫化基团锝标记作用的发现

锝标记蛋白需要含有-SH基团或反应性单硫化物(-S-或-S-金属)。这些基团也称作巯基。单硫和二硫基团是绝大多数蛋白固有的组分,常见含-SH氨基酸的半胱氨酸是绝大多数蛋白质肽链主干的组分。在自然状态,其中的大多数半胱氨酸残基都与其它半胱氨酸残基相连,形成链内或链间的二硫键桥。这些二硫键桥有保持蛋白质的高级结构和生物学特性的作用。在发现硫化基团对于直接锝标记的作用之前,很多人试图用锝直接标记抗体和其他蛋白,特别是HSA(人血清白蛋白),但标记产物都不稳定。

尽管早在1975年就有人提出了硫化基团在锝标记蛋白中的作用,直到1979年Sephadex G75柱层析用于分离和测量高亲合力的锝标记蛋白,才使这种作用得到充分发挥。通过这项柱层析技术,人们发现蛋白上既有高亲合力又有低亲合力的结合位点,高亲合力结合位点与自由硫化基团有关,“预锡化”过程增加了高亲合力结合位点的数目,即反应性硫化基团的数目。

### 锝-硫键的稳定性

通过-S-基团来结合 $^{99m}Tc$ ,可以产生非常稳定的标记物。有人用实验证实,锝-硫键比锝与DTPA的结合牢固。有人曾用下述方法鉴定了锝-硫键的稳定性:在锝标记蛋白中加入竞争配体,结果,即使在还原的IgG和IgM之间也没有锝的交换。相反,如果锝标

抗体不预先还原,那么 $^{99m}Tc$ 很容易转移到另一个还原的非标记抗体上。

### 锡离子还原蛋白质的二硫基团

$Sn(II)$ 用于还原含硫氨基酸如胱氨酸和半胱氨酸已有一百多年了。 $Sn(II)$ 和 $Sn(IV)$ 都具有保护半胱氨酸不被重新氧化成胱氨酸的作用。实验证明,蛋白与锡盐溶液孵育可还原二硫键,为 $^{99m}Tc$ 提供牢固的结合位点(-S<sup>-</sup>)。根据实验推测,只有4%的二硫键桥被还原。HPLC(高压液相色谱)和等电聚焦结果都证明,锡还原是较温和的,并不破坏蛋白链间的二硫键桥。

Mather和Ellison用2-巯基乙醇还原二硫键发现,随着还原程度增高,标记率也相应地增高。还原的抗体中如有还原剂污染,则会过高地估计还原抗体中-S<sup>-</sup>基团的数目。研究资料还证明,二硫键的还原是 $^{99m}Tc$ 标记抗体必须的起始步骤。

### 抗体还原与抗体的免疫活性

由于抗体中的二硫基团远离抗体的高活性区,即抗原结合部位,所以,抗体的免疫活性一般不会受到影响,除非还原反应引起抗体轻链和重链的主体结构改变和断裂,这样才会影响到高活性区。由此可见,免疫活性的改变与被还原的二硫键数目和位置有关。

由于蛋白的立体结构因素,其中的巯基反应性是不同的。欲使蛋白中的二硫键完全还原,通常要使蛋白变性,以便使在立体结构下隐匿的基团接触到还原剂。血清白蛋白变性后形成聚合白蛋白或白蛋白微球,便很容易用锝标记,而得到非常稳定的放射性药物。相反,如用锝直接标记天然HSA,则很难得到稳定的标记物。标记天然和变性白蛋白的区别可能在于后者在变性后暴露了二硫基团,使之更易于还原,为锝提供了多个高亲合力的结合位点。

用锡直接标记抗体, 通常需要还原抗体以产生高亲和力的结合位点。然而保持抗体的生物活性是非常重要的, 因此, 最好是只还原抗体表面的二硫基团, 而不影响蛋白的整体结构, 以减少对蛋白生物学活性的影响。以锡离子作为还原剂缓慢还原的方法是可以达到上述要求的。

免疫反应性的两个参数即抗体的亲和力及免疫活性分数是还原反应的两个指标。早期的研究是用 ELISA 法比较还原前后抗体对纯化抗原的结合曲线, 结果表明, “预锡化”过程不改变抗体的免疫活性。

### 金属-硫中间产物的形成

锡盐已被广泛用于还原高锡酸盐制备锡标记放射性药物。研究表明: 金属离子, 包括锡离子, 与蛋白质中的自由巯基反应, 形成可逆的中间复合物。 $\text{Sn}(\text{II})$  将蛋白质中的二硫键还原, 并将它们转化为可逆的中间复合物, 以备锡标记。上述过程称为“预锡化”, 其中锡有三种作用: 还原二硫基团; 与-S-基团结合成中间复合物; 还原高锡酸盐。

金属-硫中间复合物的形成对后续的高效锡标记可能是至关重要的。自由巯基对氧化作用极为敏感, 氧化后可重新形成二硫键桥。巯基可被溶解态的氧所氧化, 痕量金属离子如  $\text{Cu}(\text{II})$  和  $\text{Fe}(\text{II})$  以及碱性 pH 可加速氧化作用。学者们曾用很多方法来预防这种由氧化而引起的二硫化物重新形成, 如保持还原蛋白溶液呈酸性, 加入配体去除游离的有催化作用的痕量金属离子等等。

### $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 的还原

通常由  $^{99\text{m}}\text{Tc}-^{99}\text{Mo}$  发生器生产的  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  是溶于等张生理盐水中的溶液。很多方法被用来将  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  还原为  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{+4}$  金属离子, 还原的程度依还原条件而定, 包括反应复合物中复合试剂的类型和浓度。锡离子是

最常用的还原剂。最近有人用维生素 C 还原抗体, 用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  还原  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  溶液。

### 锡标记中间复合物制备及转络合标记

“预锡化”抗体标记的资料提示, 尽管反应只需几分钟即可完成, 但绝不是瞬间完成的。很多年前就有人提出, 由高锡酸根 ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) 还原产生的  $\text{Tc}^{4+}$  被立即结合并转移到蛋白的结合位点上。目前看来, 这一观点还是适用的。用预锡化的方法, 酒石酸盐被认为是转移配体, 而用维生素 C 还原的方法, 维生素 C 则可能是转移配体。

中间复合物也可能是抗体蛋白上的低亲和力结合位点, 或者低亲和力位点存在于加入到反应体系中的载体蛋白上。HSA 曾作为载体蛋白来标记抗体或抗体片段, 以提高标记产额, 因此, HSA 可能充当一种转移配体。

### 高亲和力标记的放化产额测定

通过分析锡标记蛋白产品的组分来测量和了解其放化纯度是一长期以来未解决的难题。自发现 Sephadex 可以结合还原  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , 并以弱复合物或还原、水解 Tc 的形式将其从溶液中去除以来, 即用该法将高亲和力锡标记蛋白自低亲和力 Tc 结合蛋白中分离出来, 进而又制成了过滤器, 用于去除锡杂质, 如低亲和力的结合锡、还原水解锡及游离锡。

现在则用 HPLC 定量测定高亲和力锡标记蛋白的放化产额。用这种方法, 连接较松的结合 Tc 被分子筛层析去除, 结合牢固的锡标记蛋白则随放射性标记蛋白峰洗脱。牢固标记的百分率可通过测量总投入的 cpm 和总洗脱下的 cpm 及洗脱蛋白峰的 cpm 算出。如标记条件理想, 锡还原直接标记抗体的放化纯度可达 93%~99%, 故可省去标记后的纯化。

以往的文献都未报道高亲和力标记的总量。薄层层析 (TLC) 测定是常用的方法,

但该方法不能区分不同的还原Tc, 作者的观察结果表明, 用TLC测定有97%的放射性在原点, 但用定量的HPLC测定却只有很少量的高亲合标记蛋白。还原的、水解的和弱结合Tc经HPLC后均从溶液中去掉, 这些潜在的不纯可能被转络合或沉淀到层析柱的基质表面。不论是TLC还是HPLC都不能保证所有的Tc标记蛋白中的 $^{99m}\text{Tc}$ 都是以高亲合力结合的方式连接到抗体上。

### 直接铈标记与双功能试剂铈标记的比较

直接铈标记是位点特异的, 借蛋白上远离抗原结合位点上的基团标记, 因此避免了标记基团对抗体免疫活性的影响。而对大多数双功能标记法而言, 双功能试剂与氨基酸基团的反应是随机的, 有些可能位于抗体的高变区, 故抗体的免疫活性可能会发生改变。直接标记法除了避免了在结合部位化学修饰抗体外, 还有其他优点: ①省去了合成及纯化双功能试剂的昂贵费用和复杂过程; ②无需去除未反应的双功能试剂。

用铈标记蛋白时, 还原的铈既可通过引入蛋白中的双功能试剂结合到蛋白上, 还可以通过许多蛋白原有的位于其他位点的低亲合位点与蛋白结合。但在直接标记法中, 自由巯基可能对还原Tc的竞争更有效。

### 临床应用

最早直接标记法即预铈化标记是八十年代开始用于临床研究的, 依标记抗体及导向组织的不同而取得了不同的效果。直接标记法在临床上应用最广也是最成功的是Tc标记抗体片段用于黑色素瘤显像。最近有人报道快速Tc标记药盒在动物模型和人体研究中都取得了良好的效果。

### 不同的直接铈标记法

现已报道了很多成功的直接铈标记法, 这些方法最根本的区别在于抗体还原方法不

同。

#### 1. 单硫醇类

如用2-巯基乙醇或2-巯基乙胺还原抗体, 用铈标记部分还原的抗体, 并用磷酸盐或焦磷酸盐去除形成复合物的稳定还原剂, 如Sn(II)。这类方法的主要特点是抗体不直接与含Sn(II)的还原剂接触, 而是用两个反应瓶: 一瓶装有部分还原的抗体, 另一瓶装有亚锡和可与 $^{99m}\text{Tc}$ 形成复合物的物质, 如焦磷酸盐; 将 $^{99m}\text{TcCO}_4^-$ 加入到任何一瓶中, 然后将两瓶内容物合并, 或两瓶先合并后再加入 $^{99m}\text{TcCO}_4^-$ 。反应可能是Sn(II)先还原 $^{99m}\text{Tc}$ , 产生的金属铈离子与焦磷酸盐形成复合物, 经过转络合过程, 将 $^{99m}\text{Tc}$ 从较弱结合的中间产物上转标到牢固结合的蛋白质巯基上。

#### 2. DTT (Dithiothreitol)

用DTT还原抗体、Zn(II)离子或巯基衍生物保护游离巯基、Sn(II)加酒石酸离子还原 $\text{TcO}_4^-$ , 然后将 $\text{Tc}^{4+}$ 标记到抗体或抗体片段上。也有人用Sn(II)加水溶性的配体(如葡庚糖酸盐GH)。

#### 3. 硫代硫酸钠

硫代硫酸钠可同时还原蛋白和铈来标记脂蛋白。该法的主要特点是能够在高pH条件下标记脂蛋白, 从而避免了低pH条件下蛋白生物活性的丧失。但该法的标记率仅为40%。

### 小 结

铈直接标记抗体或抗体片段的方法已经很成熟了, 该法在铈与蛋白的巯基之间形成非常牢固的连接。为了优化这一过程, 抗体蛋白必需有足够的反应性硫化基团来接受金属铈离子, 而金属铈必须在有弱的复合试剂条件下由 $\text{TcO}_4^-$ 还原而得。反应性硫化基团是由先还原蛋白中小部分的二硫键桥来提供的。如果标记Fab'片段, 则无需还原抗体, 因片段本身就有反应性硫化基团。当抗体蛋

白被适当地还原后，反应性硫化基团被亲和力低于锝的金属离子（如钙、铜）保护起来，这样便可得到高亲和的锝标记蛋白。这种反应不论是测亲和力，还是测免疫活性分数，都不影响抗体的免疫活性。

副反应可致纯化纯度下降，其中包括低亲和力的结合锝、锝胶体、锝标多肽及抗体聚合，或锝复合物。如果加入到还原抗体中的 $\text{NaTcO}_4$ 溶液未被充分还原， $\text{TcO}_4^-$ 离子也是不纯的因素。然而很显然，标记前适当地还原蛋白，并且彻底地去除还原剂，特别是其中含有反应性硫化基团或有毒性时，这

些措施就更为重要。

一步或二步法制备锝标记抗体或抗体片段的药盒在核医学临床应用研究中发展很快。这些直接标记法，尽管用于还原抗体或 $\text{TcO}_4^-$ 的还原剂可能不同，但它们的化学反应顺序是一样的。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 转移试剂可能不同，但所用的转移试剂都有一个共同的特点，即能与还原锝快速形成弱的或中等强度的复合物。尽管也有用其他还原剂的，但锝的还原剂绝大多数用 $\text{Sn(II)}$ 。

[Nucl Med Biol 1991; 18(7): 667~676  
(英文)张裕民节译 陆毅校]

## 多分析物微点免疫分析

Ekins RP and Chu FW

摘要：高比活性的标记物使发展超灵敏的多分析物免疫分析系统成为可能，以实现对小量生物样品中的千百种物质同时测量的目的。这种可能性依赖于简单但全新的理论概念：①所有的免疫分析都依赖于分析物对抗体占位的测量；②若使用的抗体浓度很小，抗体占位分数与抗体浓度和样品体积无关。方法涉及对两种标记抗体释放信号比值的测量。

### 免疫分析的灵敏度：一些基本概念

六十年代初，Yalow和Berson以及Ekins等人分别创建了免疫分析设计的基本数学理论。遗憾的是，这些理论研究带来了旷日持久的争论，这主要起因于两组人员所采用的灵敏度概念相互对立(见图1)。Yalow和Berson定义A分析更灵敏，原因是反应曲线的斜率更陡；Ekins等则定义B分析更灵敏，原因是0剂量测量的不精密度更小。如果以log剂量作图，Yalow和Berson同样定义具较陡的反应曲线的分析系统更精密。简言之，Berson和Yalow定义灵敏度为反应曲线的斜率；相反，Ekins定义灵敏度为0剂量测量的精密度，基本等同于最低可测限。

很明显，这两种定义的主要分歧是分析的可测量限值对反应变量测量误差的依赖性。由于忽视了这一主要因素，“反应曲线

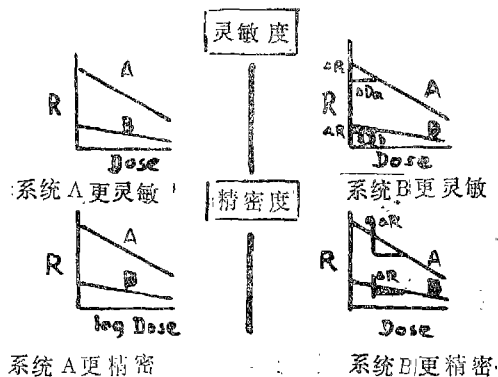


图1 Yalow和Berson(左边)以及Ekins等(右边)建立的放免分析设计理论在灵敏度、精密度方面的不同

斜率”论导致许多明显的混乱。比如，以反应参数 $B/F$ 对常规RIA数据作图时发现，系统中抗体增加时，分析的灵敏度也增加。然