

参 考 文 献

1 Luker GD et al J Nucl Med, 1997; 38: 369
 2 Gottesman MM. Annu Rev Biochem, 1993; 62: 385
 3 Pivnicka-Wom SD et al Cancer Res, 1993; 53: 1
 4 Balliger J et al Nucl Med Commun, 1995; 16: 253
 5 Pivnicka-Wom SD et al Biochemistry, 1995; 34: 12210
 6 Rao VV et al J Nucl Med, 1994; 35: 510
 7 Khalkhai I et al J Nucl Med, 1993; 34: 140

8 Cordobes MD et al J Nucl Med, 1996; 37: 286
 9 Bahini N et al N Engl J Med, 1995; 333: 1380
 10 Kostakoglu L et al J Nucl Med, 1997; 38: 1003
 11 Wilson W et al J Clin Oncol, 1995; 13: 1995
 12 Watanabe T et al Acta Oncol, 1995; 34: 235
 13 Gaveriaux C. J Cell Pharmacol, 1993; 2: 225
 14 Wackers FJ et al J Nucl Med, 1989; 30: 301
 15 Cumberl A et al J Nucl Med, 1995; 36 (suppl): 129p

(收稿日期: 1998-04-13)

^{99m}Tc标记生长抑素类似物作为受体显像剂及其特性研究

华西医科大学附一院核医学科(成都, 610041) 武鸿文综述 管昌田审校

摘要: 简述放射性碘 (¹²³I, ¹²⁵I) 和 ¹³¹I, ¹¹¹In 和 ^{99m}Tc 标记生长抑素类似物的方法及其优缺点, 重点叙述 ^{99m}Tc 的标记方法 (直接法, 间接法和环状肽标记法) 和 ^{99m}Tc 标记生长抑素类似物有关特性研究及临床应用的进展。

关键词: ^{99m}Tc 标记 生长抑素类似物 受体显像剂 特性研究

1 概述

大多数神经内分泌肿瘤及其转移灶要比正常组织更多地表达生长抑素受体, 因此通过放射性核素标记生长抑素肽作为配体, 利用其与受体结合的特异性, 可对有关肿瘤进行定性定位显像和靶向治疗。但是, 天然生长抑素 (十四肽) 在体内酶降解迅速, 不适合临床显像, 于是许多研究者从众多的人工合成肽中筛选了几种体内酶降解缓慢的生长抑素类似物, 并均已在临床和研究工作中得到应用。

目前, 标记生长抑素类似物的方法很多, 但主要有碘 (¹³¹I, ¹²⁵I 和 ¹²³I), ¹¹¹In, ^{99m}Tc 和 ¹⁸⁶Re 标记等。由于肽链中的酪氨酸具有“嗜碘性”, 即其苯环的 3, 5 位上的氢很容易被碘所取代, 因此在碘标记时没有必要去保护肽链中的功能基团。然而, 碘标记方法仍有一些缺点: ① 标记前必须在分子中引入 Tyr 标记后又必须经 HPLC 纯化, 清除未结合碘和

结合双碘的肽, 很费时间; ② ¹²³I 通过肝胆胃肠道系统消除, 不利于鉴别这一区域的肿瘤; ③ 标记碘在体内很容易脱落, 不稳定; ④ 就放射性核素而言, ¹³¹I 不适合临床显像, ¹³¹I 由加速器生产, 成本较高, 费用昂贵, 不易获得^[1, 2]。

¹¹¹In 标记产率高 (> 95%), 稳定性好, 标记后肽的生物活性不受到破坏, 标记过程简单, 但标记前必须经过许多步反应制备 DTPA 偶联物, 其中最重要, 同时也是最困难的一步是选择性保护肽链活性中心以连接 DTPA。通常 DTPA 会直接偶联到分子肽中赖氨酸残基的 ε-NH₂ 基团上, 但是, octreotide 的赖氨酸残基的位置正是分子肽的活性中心, 因此必须选择性保护赖氨酸的 ε-NH₂, 从而使 DTPA 直接偶联到肽链末端氨基酸的 α-NH₂ 基团上。当然, ¹¹¹In 也是由加速器生产的, 同样存在费用较高, 不易获得的问题^[2]。

最近几年, 研究者开始考虑用 ^{99m}Tc 标记

生长抑素类似物作为受体显像剂,因为 ^{99m}Tc 可以从钼-铈发生器直接淋洗,价廉易得,并且具有适合显像的优良物理特性($T_{1/2} = 6\text{h}$, $E_{\gamma} = 140\text{keV}$, 91%)。同时, ^{99m}Tc 的成功标记,也给化学特性与 ^{99m}Tc 相似的 ^{186}Re 标记以有益的借鉴, ^{186}Re 主要为 β 发射体,为受体介导靶向放射性核素治疗肿瘤奠定了基础^[3]。因此,生长抑素及其类似物的 ^{99m}Tc 标记已成为当今学者们研究的热点,现重点综述如下。

2 ^{99m}Tc 标记生长抑素类似物的方法

2.1 直接法

2.1.1 octreotide的标记^[4]

①将 $10\mu\text{g}$ octreotide和 1mg 抗坏血酸溶液($\text{pH} 6.5$)在 22°C 下温育30分钟(A液),②将所需数量的 ^{99m}Tc 用新鲜配制的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液还原,即将 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶于 pH 为7.4的 0.1mol/L 醋酸缓冲液中,然后加入 ^{99m}Tc 溶液,使反应混合物 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的最终浓度为 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 反应进行1分钟(B液),③A液+B液,再温育(22°C)15分钟,④产品用[Sep Pak-(3)]纯化,蒸发去除乙醇,加入 $\text{pH} 7.4$ 的醋酸缓冲液,并进行ITLC和HPLC分析(Nova Pak C18和含2.5%三乙胺、17%正丙醇的 pH 为6.0的 0.1mol/L 磷酸缓冲液),产率达30%~75%。

2.1.2 RC-160的标记^[5]

向预先装有冻干甘氨酸(2mg)、肌醇(2mg)、水合四硼酸钠(2mg)、抗坏血酸钠(1mg)和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1mg)的小瓶加入含 $10\mu\text{g}$ RC-160的 0.05mol/L 醋酸缓冲液($\text{pH} 4.2$) $100\mu\text{l}$ 和所需数量的 ^{99m}Tc ,最终体积用0.9% NaCl调节到 $500\mu\text{l}$ 混合物在沸水浴中加热15分钟。未结合的 ^{99m}Tc 通过C-18 Sep Pak柱排除,然后 ^{99m}Tc -RC-160用95%乙醇洗脱,收集三管,每管 1ml 将头两管(通常洗脱90%的 ^{99m}Tc -RC-160)用氮气吹干,并溶解于含有 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 甘氨酸(作为载体)的0.9% NaCl中。

2.2 间接法(即双功能试剂整合法)

最近, Thakur等^[5]报道了采用CPTA作为双功能螯合剂 ^{99m}Tc 标记方法,主要步骤可概括为:

经①CPTA的合成和②CPTA-RC-160的合成后,进行③CPTA-RC-160的标记:将合成的CPTA-RC-160 $20\mu\text{g}$ 溶于 $100\mu\text{l}$ 0.1mol/L 磷酸缓冲液中($\text{pH} 6.5$),加入用0.9% NaCl稀释到 $200\mu\text{l}$ 的 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 和 $20\mu\text{l}$ 酒石酸亚锡饱和溶液(用通 N_2 0.9% NaCl配制)。反应混合物在沸水浴中孵育20分钟。溶液通过C-18 Sep Pak柱纯化, ^{99m}Tc -CPTA-RC-160用乙醇洗脱。

2.3 环状肽标记法

Vallabhajosula等^[6]认为,与生长抑素受体结合的配体,其氨基酸序列残基“-Tyr-(D-Trp)-Lys-Val”是配体的药效基团,用 ^{99m}Tc 标记时不能损伤该药效基团,否则将影响与受体的亲和力。因此,他们设计合成了两种环状肽P587和P829。这样 ^{99m}Tc 只是结合到附加在肽链非活性中心基团的氨基酸序列上,以维持药效基团的构型。P587和P829系通过与 ^{99m}Tc -葡庚糖酸盐的配基交换反应进行 ^{99m}Tc 标记的,其方法如下: P587用50%乙醇水溶液溶解至 $1\text{mg}/\text{ml}$ P829用生理盐水溶解至 $1\text{mg}/\text{ml}$ 用 1ml ^{99m}Tc 淋洗液加入GlucoscanTM药盒,混匀后取四分之一加入肽溶液中。标记P587时,该溶液在 100°C 下加热15分钟,标记P829时反应混合物在室温温育20分钟。这两种肽复合物的放化纯通过下列方法测定: ITLC是用饱和盐水展开, ^{99m}Tc -肽不移动, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 和 ^{99m}Tc -葡庚糖酸盐移动; ITLC-SG是用吡啶:醋酸:水=5:3:15展开, ^{99m}Tc -肽、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 和 ^{99m}Tc -GH均移动; HPLC反相分析:用连有积分记录器联机 γ 探头的HPLC(Delta-Pak C18, $5\mu\text{m}$, 300\AA , $3.9 \times 150\text{mm}$ 柱),用0.1% TFA(90% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$)以 $1.2\text{ml}/\text{min}$ 进行洗脱。

从上述标记过程可以看出,直接法方便迅速,不需要对有关基团加保护或去保护,产率较高,标记肽有 octreotide、RC-160 但直接法只能对具有环状二硫键的肽进行标记。间接法在标记前先要在肽的末端氨基酸(D-Phe)连接一个双功能螯合剂,如 $N_3S\text{-HYN-IG-CPTA}$, 适合于对含和不含环状二硫键的肽进行标记,然而,这一方法不利因素有三:①不能买到所用的双功能螯合剂,其消耗量又较大;②制备过程长而复杂,需要通过 HPLC 纯化,冻干和质谱分析以确保产品质量和纯度;③标记产率低^[1]。环状肽标记法简单可靠,但必须人工预先设计,合成环状肽。

3 ^{99m}Tc 标记生长抑素类似物的特性研究

目前,研究者最为关心的是 ^{99m}Tc 在标记生长抑素类似物过程中,是否影响了分子肽的受体亲和力和生物活性,国外报道的文献存在着两种不同的看法。以下就这一问题从三个方面加以阐述。

3.1 对 ^{99m}Tc 标记肽分子结构的认识

Vallabhajpsula 等^[6]认为, Octreotide 存在二硫键,在 ^{99m}Tc 标记过程中,还原剂亚锡离子打开二硫键,降低了标记肽的生物活性以及与受体结合的能力。为此, Pearson 等合成了数十种环状肽衍生物,从中筛选出了几种受体亲和力高、 ^{99m}Tc 标记稳定的环状肽^[7]。例如 P587 其“ $-\text{Gly-Gly-Cys}$ ”氨基酸序列系附加在该分子的非紧要同型半胱氨酸残基侧链的硫代基团上,构成了一个三酰胺-硫代螯合体,这将期望构成一个稳定的氧化锝(+5)复合物;而 P829 具有单胺-二酰胺-硫螯合体的“ $-(\beta\text{-Dap})\text{-Lys-Cys}$ ”氨基酸序列[其中单胺向锝或铟提供配对电子,形成中性的氧化锝(+5)复合物]亦连结在同型半胱氨酸的侧链上,用 ^{99m}Tc 标记时还原剂不会打开肽分子的二硫键,故不引起药效基团失活。

Vallabhajpsula 等^[8]为了验证 ^{99m}Tc 标记 RC-

160 时的肽分子结构是否受到影响,经二维 $^1\text{H-NMR}$ 谱(600 MHz)计算机模型构型分析表明, Re-RC-160 和 RC-160 仍保持着相同的全部骨架结构,即与原始的生长抑素一样,具有以 $\text{Trp}^4\text{-Lys}^5$ 为中心的反向平行 β 片层和牢固的 II 型 β 折角的结构。这种空间结构与生长抑素配体和其受体相结合的拓扑学要求是一致的。因为 ^{99m}Tc 在化学上类似于 Re 由此可以推断, ^{99m}Tc -RC-160 仍保持同样高的生物活性和受体亲和力。

3.2 ^{99m}Tc 标记肽的体内外实验

在 CA 20948 荷腺癌 Lewis 鼠实验中显示, ^{99m}Tc -P587、 ^{99m}Tc -P829 均比 ^{111}In -DTPA-octreotide 有较高的受体亲和力和肿瘤/血液、肿瘤/肌肉比值^[6]。Thakur 等^[9]通过小鼠脑皮膜实验证明: ^{99m}Tc -octreotide 和 ^{99m}Tc -RC-160 与 ^{111}In -DTPA-octreotide 比较,其生物活性及受体亲和力亦未受到明显的影响,与 ^{125}I -RC-160 受体亲和力的测定值相等。

荷人类前列腺癌裸鼠的动物实验表明, ^{99m}Tc -RC-160 24 小时肿瘤摄取几乎比 ^{111}In -DTPA-octreotide 高出 4 倍,但是除肾以外,所有组织摄取 ^{99m}Tc -RC-160 均高于 ^{111}In -DTPA-octreotide,结果使肿瘤/器官放射性比值低于 ^{111}In -DTPA-octreotide 所以提高 ^{99m}Tc -RC-160 的靶/非靶比值是下一步解决的主要问题。另外,通过与不具受体特异性,但分子量和 ^{99m}Tc -RC-160 十分接近的 ^{99m}Tc -催产素相比较,说明 ^{99m}Tc -RC-160-octreotide 的肿瘤摄取系由受体所介导而并非是因为血池或毛细血管通透性增加。值得注意的是,受体介导结合具有饱和性,因而 ^{99m}Tc -生长抑素类似物的摄取受到注射分子肽剂量的影响^[5]。

3.3 ^{99m}Tc 标记肽的临床显像

^{99m}Tc -P587 血液清除快,注射后 10~30 分钟即可显像,不但患者受照剂量低,且缩短了显像时间,显像质量优于 ^{111}In -DTPA-octreotide^[10]。最近的临床肾上腺显像显示,良

性肿瘤并不明显摄取 ^{99m}Tc -P587或 ^{99m}Tc -P829而恶性肿瘤呈现高度摄取,提示存在生长抑素受体以及可以使用生长抑素治疗肾上腺恶性肿瘤。M aurea等^[15]认为, ^{99m}Tc 标记肽在肾上腺显像中的作用不仅是肿瘤的探测和定位,更重要的是判断病变的特点,比如当恶性肿瘤存在生长抑素受体时,可能反映肿瘤高度分化并具有良好的预后^[11]。有关 ^{99m}Tc -octreotide或 ^{99m}Tc -RC-160的临床显像研究,尚未见到文献报道。不过,在临床应用生长抑素类似物受体显像剂时,研究者开始面临一个比较重要的问题,那就是越来越多的肿瘤表达生长抑素受体,使生长抑素受体显像反而不具有特异性^[12]。研究者已经克隆出5种生长抑素受体亚型(SSTR1~5)^[13]。其中,SSTR-2在以下肿瘤中表达占优势:A-PUD瘤〔小细胞肺癌、内分泌胰腺肿瘤、转移性类癌、垂体腺瘤、嗜铬细胞瘤、淋巴瘤(主要为何杰金氏病)、星形细胞瘤和脑脊膜瘤〕以及部分结肠直肠癌、乳腺癌和前列腺癌,P587高度亲和 SSTR-2 中度亲和 SSTR-1^[7]; octreotide 只高度亲和 SSTR-2 和 SSTR-5 中度亲和 SSTR-3 不能结合 SSTR-1和 SSTR-4 RC-160的受体部识别特点与 octreotide类似,然而对于某些肿瘤显像,如胰腺癌、前列腺癌,RC-160要比 octreotide更合适些^[14],有关机理尚不清楚。但上述事实说明,肿瘤可能表达生长抑素受体的不同亚型,与不同配体分子之间的亲和力存在微小差异。由于生长抑素受体亚型及其在肿瘤组织中的分布和密度不同,各种配体识别受体亚型以及与受体结合的能力不同,因此研究者应该从受体亚型水平上重新观察和评价肿瘤生长抑素受体及其它有关受体显像,期望能使诊断更具有相对特异性。

4 结语

^{99m}Tc 标记的生长抑素类似物已初步进

入临床实用阶段,但各种标记方法都有其自身的优点和局限性,共同的问题是标记产率较低。因而,继续研究标记产率高,不影响受体亲和力,适合临床应用的简捷标记方法仍然是今后的重要课题。另外,为提高肿瘤生长抑素受体显像的特导性和敏感性,从受体亚型水平上来研究开发受体显像剂,并评价其在各类肿瘤中的临床应用价值,则是拓展和深化肿瘤生长抑素受体显像临床应用的方向。再有,生长抑素受体阳性肿瘤的核素定位性显像诊断的逻辑转变是受体介导靶向放射性核素治疗,因而借鉴 ^{99m}Tc 的标记方法应用 β 发射体核素(如 ^{186}Re)进行标记,发展一类治疗生长抑素受体阳性的肿瘤放射性药物,则是临床应用的又一重要发展方向。

参考文献

- 1 Thakur M L. Nucl Med Commun, 1995, 16: 724-732
- 2 Bakker W H et al. Life Sci, 1993, 49: 1583-1591
- 3 Zamova P O et al. Int J Cancer, 1996, 65(2): 214-220
- 4 Thakur M L et al. J Labeled Compd Radiopharm, 1993, 32: 365-367
- 5 Thakur M L et al. Nucl Med Biol, 1997, 24: 105-113
- 6 Vallabhajpsula S et al. J Nucl Med, 1996, 37: 1016-1022
- 7 Pearson D A et al. J Med Chem, 1996, 39: 1361-1371
- 8 Vamum J M et al. J Biol Chem, 1994, 269: 12583-12588
- 9 Thakur M L et al. J Nucl Med, 1995, 36: 92P
- 10 Lasoria S et al. Radiology, 1994, 193P: 300
- 11 M aurea S et al. Nucl Med Biol, 1996, 23: 677-680
- 12 Fischman A J et al. J Nucl Med, 1993, 34: 2253-2263
- 13 Raynor K et al. Mol Pharmacol, 1993, 43: 838-844
- 14 Breeman W A P et al. Eur J Nucl Med, 1994, 21: 328-335

(收稿日期: 1997-09-21)