

·实验核医学·

¹³¹I-Tyr-octreotide 的标记方法学及其生物学分布的研究

苏燕 王峰 王自正 孟庆乐 张乐乐 蒋斌

【摘要】目的 探讨 ¹³¹I 采用氯胺-T 氧化还原法标记生长抑素类似物 Tyr-octreotide 的可行性和标记物的稳定性, 并研究其在正常小鼠体内的生物学分布和非小细胞肺癌荷瘤鼠 SPECT 显像。方法 采用氯胺-T 法制备 ¹³¹I-Tyr-octreotide, 并测定标记物的放化纯、胶体含量及正常小鼠体内的生物学分布, 不同时间点眼球取血后处死, 测定血液及各主要脏器的放射性, 计算%ID/g。对非小细胞肺癌荷瘤鼠模型进行 ¹³¹I-Tyr-octreotide 显像研究。结果 采用氯胺-T 法 ¹³¹I 标记 Tyr-octreotide 的最佳条件: 磷酸缓冲液(0.2 mol/L)0.15 ml, Tyr-octreotide (1g/L)10 μl, Na¹³¹I(3.7MBq)0.1 ml, 氯胺-T(30 g/L)4 μl, 迅速混匀反应 2.5 min, 之后加入 Na₂S₂O₃(30g/L)5 μl 终止反应, 放化纯可达 97%, 6 h 后放化纯可达 83%, 胶体含量为 1.02%。小鼠体内分布实验表明, 肾脏和肝脏对 ¹³¹I-Tyr-octreotide 的摄取最高, 胃肠消化器官次之, 其他脏器摄取较少; 对肿瘤组织具有较好的亲和力。结论 ¹³¹I-Tyr-octreotide 采用氯胺-T 法标记具有标记率高、方法简便和迅速、体外稳定性较好、无需进一步纯化等优点。在小鼠体内主要经肝、肾系统代谢, 血液清除快, 有望成为以生长抑素介导的生物靶向诊断和治疗非小细胞肺癌的分子药物。

【关键词】 奥曲肽; 碘放射性同位素; 同位素标记; 癌, 非小细胞肺; 生物学分布

【中图分类号】 R817.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)05-0257-04

Labeling method and biodistribution of ¹³¹I-Tyr-octreotide

SU Yan, WANG Feng, WANG Zi-zheng, MENG Qing-le, ZHANG Le-le, JIANG E

(Department of Nuclear Medicine, Nanjing First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility and stability of chloramine-T labeling of somatostatin analog Tyr-octreotide, observe its biodistribution in mice. **Methods** ¹³¹I-Tyr-octreotide was prepared for chloramine-T method and the radiochemical purity and colloid content were measured and the biodistribution was studied. ¹³¹I-Tyr-octreotide was injected via tail vein and measure the radioactivity of different organs at different time. **Results** The best condition of ¹³¹I-Tyr-octreotide labeling was: (0.2 mol/L) 0.15 ml H₃PO₄ buffer, Tyr-octreotide (1 g/L) 10 μl, Na¹³¹I (3.7 MBq) 0.1 ml, chloramine-T (30g/L) 4 μl, Na₂S₂O₃ (30g/L) 5 μl, reaction time is 2.5 min. The instant radiochemical purity was (97%), and the radiochemical purity of (83%) was remained after 6h, colloid content is 1.02%. The biodistribution showed high uptake of the tracer in kidney and liver, the stomach intestine was also high, other organs show low uptake. **Conclusions** Tyr-octreotide was easy to be labeled by chloramine-T. It has achieved high radio-labelling ratio and is a convenient and fast methods. It was quickly cleared from blood and has a high target. ¹³¹I-Tyr-octreotide may be a promising agent mediated by somatostatin for diagnosis and treatment of cancer.

【Key words】 Octreotide; Iodine radioisotopes; Isotopelabeling; Carcinoma, non-small cell lung; Biodistribution

小分子多肽因其受体专一性强、易于合成和修饰、免疫反应少、易穿透组织和血液清除快等特

性, 近年来已成为核素靶向诊断和治疗研究的热点。生长抑素及其类似物是迄今为止使用较成熟的一种小分子多肽。奥曲肽(octreotide)是生长抑素的类似物, 具有抑制神经内分泌功能, 它主要抑制生长激素、促甲状腺素、胃肠道和胰腺分泌激素的病

基金项目: 江苏省社会发展科技项目 (RS2004507), 南京市重大基金资助项目(ZKX0214)

作者单位: 210006, 南京医科大学附属南京第一医院核医学科

通讯作者: 王自正(E-mail: zzwang136@yahoo.com.cn)

理性分泌过多,对实体肿瘤亦有一定的抑制作用。日前已报道 octreotide 在对非小细胞肺癌、神经胶质瘤、胰腺癌、乳腺癌等的临床研究中取得了较好的抑瘤效果^[1-3]。

Octreotide 的分子结构: *D*-苯丙氨酸酰-*L*-半胱氨酸酰-*L*-苯丙氨酸酰-*D*-色氨酸酰-*L*-赖氨酸酰-*L*-苏氨酸酰-*L*-半胱氨酸酰-*L*-苏氨酸醇环二硫化物,其中 2 位和 7 位半胱氨酸形成二硫键,1、4 位为 *D* 型氨基酸,8 位为氨基醇,不易被蛋白酶迅速水解,半衰期较天然生长抑素延长了 30 倍,约为 1.7 h^[4]。将分子第三位上的 *L*-苯丙氨酸置换为酪氨酸,以便于多肽的碘化,置换后的 Try-octreotide 药理作用与 octreotide 相似,其肿瘤抑制作用仍较强^[5]。本实验探讨了 ¹³¹I 标记 Try-octreotide 的最佳反应条件及其在正常小鼠体内的生物学分布和代谢动力学,并初步进行非小细胞肺癌荷瘤鼠模型 SPECT 研究,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

将苯丙氨酸置换成酪氨酸的 Tyr-octreotide 由北京华大基因研究中心制备,并进行了高压液相色谱分析,经分子质量的确定,为所需蛋白,纯度>95%。氯胺-T、Na₂S₂O₅ 由天津科密欧化学试剂公司提供,牛血清白蛋白由上海生物化学研究院提供,¹³¹I 由北京原子高科股份有限公司提供。显像仪器为 GE Millennium VG Hawkeye 双探头 SPECT 仪,γ 井型计数器为 Perkin Elmer Wizard 1470,γ 放射免疫计数器 GC1200 购自合肥科大创新股份有限公司中佳分公司。

1.2 实验动物

雄性昆明种小鼠 30 只,4 周龄,体质量为 20~22 g,由河南动物中心提供;雌性非小细胞肺癌荷瘤鼠 1 只,4 周龄,体质量为 18~20 g,由上海肿瘤研究所提供。

1.3 实验方法

1.3.1 ¹³¹I-Tyr-octreotide 的标记

取 0.2 mol/L NaH₂PO₄ 和 0.2 mol/L Na₂HPO₄ 配置成 0.2 mol/L 磷酸缓冲液;分别称取 0.3 g 的氯胺-T、Na₂S₂O₅ 配置质量浓度为 30 g/L 的反应液;配置质量浓度为 1 g/L 的 Tyr-octreotide。在 25 °C 下取 150 μl 磷酸缓冲液,依次加入 Tyr-octreotide 10 μl、

Na¹³¹I (3.7 MBq) 0.1 ml、氯胺-T 4 μl,迅速振荡混匀并反应 2.5 min,之后加入 Na₂S₂O₅ 5 μl 终止反应。标记条件:①磷酸缓冲液的 pH 值由 6.0 至 9.2;② Tyr-octreotide 的量分别为 1 μg、5 μg、10 μg、15 μg、20 μg;③反应温度 25 °C;④反应时间为 2~3 min。

1.3.2 放化纯度及体外稳定性的测定

采用两个体系,体系 1:新华 1 号层析纸作为固定相,以生理盐水作为展开剂,¹³¹I-Tyr octreotide 和胶体比移值(R_f)为 0,¹³¹I R_f=0.7~0.8;体系 2:2.5%牛血清白蛋白浸泡后自然晾干的新华 1 号层析纸作为固定相,以乙醇:氨水:水(2:1:5,v/v)作为展开剂展开,测定胶体含量,胶体 R_f=0,而 ¹³¹I-Tyr-octreotide 及 ¹³¹I 的 R_f=0.7~0.8。分别测定室温放置 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 20, 24 h 标记产物的放化纯度。标记率=¹³¹I-Tyr-octreotide 放射性计数率值 / (¹³¹I-Tyr -octreotide 放射性计数率值 + ¹³¹I 的放射性计数率值) × 100%。

1.3.3 正常小鼠体内分布实验

昆明种雌性小鼠 30 只,随机分为 6 组,每组 5 只。尾静脉注射 ¹³¹I-Tyr-octreotide 0.25 ml (3.7 MBq),于给药后 0.5, 4, 8, 12, 24, 48 h 进行显像,之后摘眼球取血处死小鼠。取血、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胃、小肠(距胃 1 cm)、大肠、胰腺、股骨、肌肉、脑、甲状腺等 14 个重要组织器官称重并测放射性计数,计算 %ID/g (每克组织放射性计数/注射入小鼠体内总放射性计数 × 100%)。以时间为横坐标,放射性计数为纵坐标绘制血液清除曲线,用 Origin 5.0 软件拟合,计算、分析其在正常小鼠体内的药代动力学参数。

1.3.4 非小细胞肺癌荷瘤鼠模型的 ¹³¹I-Tyr-octreotide 显像

将 ¹³¹I-Tyr-octreotide 经尾静脉注射于荷瘤鼠体内,注射剂量为 0.2 ml (3.7 MBq),将其取俯卧位固定于板上,使四肢充分伸展,采用高能低分辨针孔准直器,于注射后 4 h 进行图像采集,采集时间为 10 min。

2 结 果

2.1 ¹³¹I-Tyr-octreotide 的标记

采用纸层析系统测定各不同反应条件下标记产物放化纯度,最高标记率可达 97%,室温放置 8 h

仍保持在 81%，最低胶体含量为 1.0%。室温放置 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 20, 24 h 产物放射纯度、标记不同蛋白量产物的胶体含量、不同 pH 值和蛋白量的标记率见图 1~4。

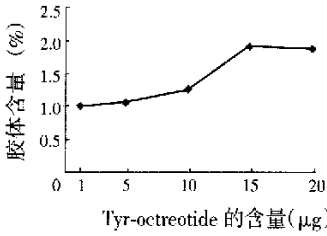


图 1 ¹³¹I 标记不同量 Tyr-octreotide 的胶体含量

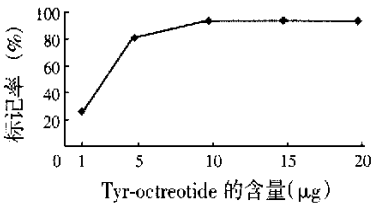


图 2 ¹³¹I 标记不同量 Tyr-octreotide 的标记率

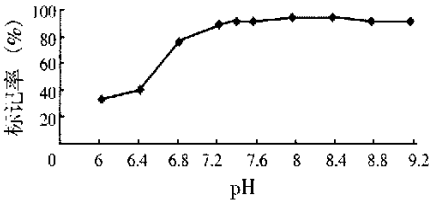


图 3 pH 值对 ¹³¹I 标记 Tyr-octreotide 的影响

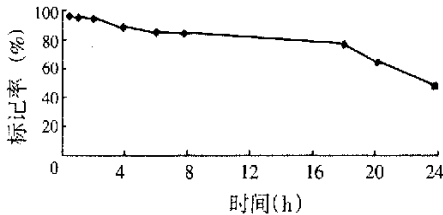


图 4 ¹³¹I-Tyr-octreotide 在室温 25°C 放置不同时间的稳定性

2.2 正常小鼠体内生物学分布

¹³¹I-Tyr-octreotide 尾静脉注射后，不同时间点测定其在小鼠体内各脏器分布。肾脏对其的摄取最高，且清除较快，而脑基本不摄取（见表 1）；¹³¹I-Tyr-octreotide 在各脏器清除迅速。根据血液中随时间变化的放射性计数，用 Origin5.0 软件拟合化，绘制血药浓度-时间曲线，结果显示血药浓度-时间符合三室模型特征，清除相半衰期为 141.12 min（见图 5）。

2.3 非小细胞肺癌荷瘤鼠 ¹³¹I-Tyr-octreotide 显像

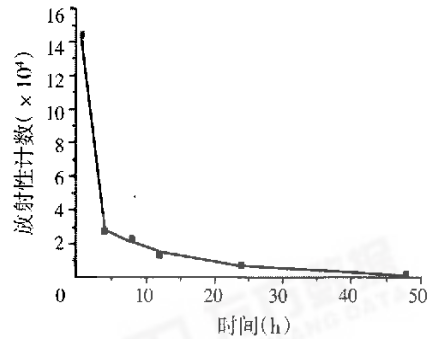


图 5 ¹³¹I-Tyr-octreotide 在小鼠体内血药浓度-时间曲线

荷瘤鼠尾静脉注射 ¹³¹I-Tyr-octreotide 后 4 h 可见各器官的放射性摄取分布与小鼠生物学分布相同，肿瘤部位有明显的放射性聚集，较对侧正常肌肉组织放射性显著高，可见 ¹³¹I-Tyr-octreotide 对非小细胞肺癌有较高亲和力（见图 6）。

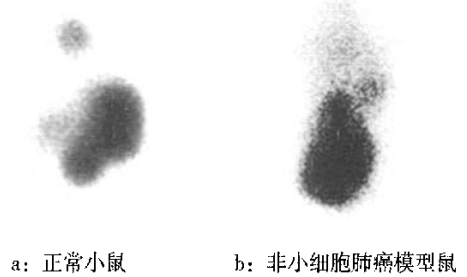


图 6 ¹³¹I-Tyr-octreotide SPECT 显示肿瘤部位放射性聚集(4h)

3 讨论

生长抑素是一种在体内循环的神经肽，它作为一种脑神经递质能够抑制多种激素的释放，如生长激素、胰岛素、胰高血糖素、胃泌素等。Octreotide 是生长抑素的类似物，是对天然生长抑素分子进行修饰的人工合成的八肽，其生理活性较天然生长抑素高。肿瘤组织高表达生长抑素受体，并且与 octreotide 有高度亲和力，使得 octreotide 介导核素靶向诊断和治疗肿瘤发挥了潜能。

本实验采用直接标记法将 octreotide [H₂N-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)] 结构中第 3 位上的 Phe 置换成 Tyr 以利于 ¹³¹I 的标记。该标记方法采用氯胺-T 法将碘化物 (Na¹²⁵I) 氧化成碘分子，与酪氨酸残基的羟基邻位发生碘化反应。氯胺-T 法标记率高，重复性好，试剂便宜易得，是目前使用较多的碘标记方法。

影响多肽碘化效率的因素主要取决于多肽分子

表1 ^{131}I -Tyr-octreotide 在不同时相各脏器的放射性摄取分数(%ID/g)

器官	放射性摄取分数($\bar{x}\pm s$, n=5)					
	0.5 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
血	5.00±0.28	0.96±0.17	0.75±0.16	0.65±0.25	0.28±0.07	0.08±0.03
心	2.21±0.79	0.78±0.13	0.71±0.16	0.59±0.08	0.47±0.10	0.18±0.05
肝	4.50±0.45	1.27±0.26	1.04±0.28	1.38±0.28	0.74±0.17	0.19±0.05
脾	6.07±0.94	1.70±0.43	1.29±0.29	1.28±0.40	0.98±0.28	0.29±0.05
肺	7.43±1.87	2.68±0.83	2.14±0.51	1.80±0.39	1.87±0.55	0.35±0.12
肾	14.09±2.50	15.57±1.90	10.27±1.48	7.96±0.60	3.83±0.69	0.67±0.22
胃	3.83±0.75	1.32±0.16	1.00±0.22	1.50±0.41	0.76±0.17	0.18±0.03
小肠	3.86±0.61	0.95±0.10	0.83±0.24	0.91±0.36	0.49±0.11	0.15±0.05
大肠	8.00±0.61	5.13±0.20	1.31±0.96	0.86±0.27	0.61±0.18	0.16±0.04
胰腺	5.17±0.47	1.22±0.30	0.81±0.17	0.67±0.20	0.49±0.20	0.15±0.05
股骨	2.29±0.05	0.85±0.16	0.74±0.48	0.67±0.24	0.45±0.23	0.44±0.21
肌肉	2.20±0.61	0.37±0.16	0.34±0.25	0.29±0.13	0.15±0.08	0.09±0.04
脑	0.96±0.60	0.16±0.07	0.08±0.03	0.06±0.02	0.04±0.00	0.03±0.01
甲状腺	3.07±0.29	0.90±0.38	0.58±0.27	0.46±0.15	0.23±0.05	0.11±0.03

中酪氨酸残基的数量及它们在分子中暴露的程度;也取决于碘化物的用量、反应条件(pH、温度、反应时间等)以及所用氧化剂的性质和量等。氧化剂过量会造成某些多肽的损伤及生物、免疫活性的降低,本实验氯胺-T用量为120 μg , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 用量为150 μg ; pH值较高时组氨酸的咪唑环可被碘化, pH在4~5时,活性碘能迅速氧化色氨酸生成羟基吲哚,导致肽键断裂,实验显示 pH在7.2以上便可得到高标记率,但不同的多肽 pH值要求不一致。本实验在室温25℃下得到了较高的标记率;碘化反应体积对标记率的影响:碘化反应体积小,碘利用率和标记多肽比放射强度就愈高,一般多控制在0.1~0.3 ml;多肽用量多在5~10 μg ,随着多肽的增加,胶体含量也随之增加,影响多肽的靶向结合;多肽的反应时间多控制在2~3 min,以避免过度氧化。标记结束后加入保护剂如小牛血清,可有效防止氧化损伤及辐射损伤。

^{131}I -Tyr-octreotide 在小鼠体内分布研究显示,肾脏、肝脏、脾脏、肺等脏器的放射性摄取较高,随着时间延长放射性逐渐下降,肾脏的放射性摄取较其他器官高,但生理代谢快,清除迅速。肾脏是放射性剂量的限制器官,大量的放射性聚集会造成肾损伤,在进一步诊断和治疗时可以通过在注射放射性药物时加入非特异的蛋白混合液 Aminosyn II (主要含精氨酸和赖氨酸),降低肾脏对放射性药物的摄取,以此减低肾损伤,而且可提高肿瘤部位的摄取^[6]。SPECT显示非小细胞肺癌有明显的放射性聚集,较对侧正常肌肉组织放射性高,证实

^{131}I -Tyr-octreotide 对肿瘤组织有着较高亲和力。

综上所述, ^{131}I -Tyr-octreotide 采用氯胺-T标记法具有标记率高、方法简便而且迅速、体外稳定性高好、无需进一步纯化等优点,在小鼠体内主要经肝、肾系统代谢,血液清除快,对肿瘤组织具有较好的亲和力,有望成为较优良的以生长抑素介导的生物靶向诊断和治疗的分子药物。

参 考 文 献

- Hudson E, Lester JF, Attanoos RL, et al. Successful treatment of bronchorrhea with octreotide in a patient with adenocarcinoma of the lung. *J Pain Symptom Manage*, 2006, 32(3): 200-202.
- Verwijnen SM, Sillevius Smith PA, Hoeben RC, et al. Molecular imaging and treatment of malignant gliomas following adenoviral transfer of the herpes simplex virus-thymidine kinase gene and the somatostatin receptor subtype 2 gene. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(1): 111-120.
- Mussig K, Peterseim S, Wehrmann M, et al. Somatostatin receptor expression in a parathyroid hormone-related peptide-secreting pancreatic neuroendocrine tumour causing severe hypercalcaemia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 19(8): 719-723.
- Bangard M, Behr M, Gohlke S, et al. Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricine-HYNIC-D-Phe1-Thy3-octreotide: first results in patients and comparison with ^{111}In -DTPA-D-Phe1-octreotide. *Eur J Nucl Med*, 2000, 27(6): 628-637.
- Schmitt A, Bernhardt P, Nilsson O, et al. Differences in biodistribution between $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotide, ^{111}In -DTPA-octreotide, and ^{177}Lu -DOTA-Tyr3-octreotate in a small cell lung cancer animal model. *Cancer Biother Radiopharm*, 2005, 20(2): 231-236.
- Bushnell D, Menda Y, Madsen M, et al. Effects of intravenous amino acid administration with Y-90 DOTA-Phe1-Tyr3-Octreotide (SMT487 [OctreoTher] treatment. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(1): 35-41.