

^{99m}Tc 标记 depreotide 及与肺腺癌 A549 细胞亲和性研究

夏伟 吕中伟 王国玉 侯仁花 蔡海东 袁雪宇

【摘要】 目的 筛选 ^{99m}Tc 标记 depreotide 的最佳条件, 并通过 ^{99m}Tc -depreotide 与人肺腺癌 A549 细胞结合特性的研究, 评价其作为肿瘤生长抑素受体显像剂的可靠性。方法 ①采用直接标记法, 在不同 pH 值(5.0、6.0、7.0)的磷酸缓冲溶液和不同温度(15 ℃、37 ℃、50 ℃)条件下对 depreotide 进行 ^{99m}Tc 标记, 以纸层析法测定标记率, 并通过对比分析, 筛选出最佳标记条件。②采用受体放射分析法, 分别在不同温度下将 ^{99m}Tc -depreotide 与 A549 细胞孵化, 分析不同温度在 A549 细胞对 ^{99m}Tc -depreotide 摄取率和滞留率中的作用。结果 ①相同温度下, 缓冲液 pH=6.0 时, ^{99m}Tc 与 depreotide 的标记率高于 pH=5.0 和 pH=7.0 两组; 随着反应温度由 15 ℃逐渐升高到 50 ℃, 各 pH 实验组的标记率呈不同程度下降。②A549 细胞对 ^{99m}Tc -depreotide 的摄取率随温度的升高逐渐增加, 在 37 ℃时, 摄取峰值时间在 60 min; 对 ^{99m}Tc -depreotide 的清除速度不依赖于温度, 37 ℃时的半清除时间为 48 min。结论 在低温(<15 ℃)和弱酸性环境下, ^{99m}Tc 直接标记 depreotide 的标记率高, 稳定性好。在 37 ℃时, A549 细胞特异性结合 ^{99m}Tc -depreotide, 具有适于受体显像的摄取峰值时间和半清除时间。

【关键词】 受体, 生长抑素; 同位素标记; 肺肿瘤; ^{99m}Tc -地普奥肽

Experimental studies of depreotide labeled with ^{99m}Tc and the affinity with human lung adenocarcinoma cell line A549

XIA Wei*, LÜ Zhong-wei, WANG Guo-yu, HOU Ren-hua, CAI Hai-dong, YUAN Xue-yu.

(*Department of Nuclear Medicine, Shanghai Putuo District People's Hospital, Shanghai 200060, China)

【Abstract】 Objective To establish a simple and reliable method of making ^{99m}Tc -depreotide by direct labeling. Furthermore, to investigate ^{99m}Tc -depreotide's specific receptor binding properties in vitro with human lung adenocarcinoma cell line A549, and to evaluate the potentiality of ^{99m}Tc -depreotide as a somatostatin receptor imaging agent for lung cancer. Methods ①Depreotide was labeled with ^{99m}Tc through a direct labeling using SnCl_2 as reductant. Compared the labeling efficiency in different pH and temperature, then searched the best labeling method. Assessed the radiochemical purity and stability in vitro. ②Using radioreceptor assay, it was observed that ^{99m}Tc -depreotide was incubated with A549 cell and uptake kinetics, then stagnation and half time were compared at different temperature and time points, and that ^{99m}Tc -depreotide was incubated with A549 cell the internalization and surface-bound activity were compared at 37 ℃ and different time points. Results ①At the same temperature, labeling rate of pH6.0 group was higher than that of pH5.0 and pH7.0 groups. At the same pH, the labeling rate of all of the three different pH experiment groups reduced with increasing temperature from 15 ℃ to 50 ℃ in this study. ②The uptake rate increased with temperature at the same time point, and the peak time of maximum uptake was 60min at 37 ℃. The cleaning curves were similar at different temperature, and the half cleaning time at 37 ℃ was 48 min. Conclusions When depreotide was labeled with ^{99m}Tc , the temperature could not be too high(<15 ℃) and the pH would better be less than 6.0. ^{99m}Tc -depreotid was a potential somatostatin receptor imaging agent with its appropriate the peak time of maximum uptake and the half cleaning time at 37 ℃.

【Key words】 Receptors, somatostatin; Isotope labeling; Lung neoplasms; ^{99m}Tc - depreotide

目前, 肺癌已成为我国最常见、发病率增幅最

大的恶性肿瘤之一, 其生存率与其临床分期密切相关。X 线片、CT 和 MRI 能精确定位肺癌及评估其范围及大小, 但定性价值有限; PET 对肺癌诊断准确性较高, 但检查费用高、药物来源不便, 限制了其临床应用。因此, 寻求敏感性高、特异性好的无

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2010.04.001

基金项目: 上海市科委重点项目(08JC1419700)

作者单位: 200060, 上海市普陀区人民医院核医学科(夏伟, 王国玉); 200072, 上海市第十人民医院核医学科(吕中伟, 侯仁花, 蔡海东, 袁雪宇)

通信作者: 吕中伟(E-mail: heyixue@foxmail.com)

创性诊断手段,对尽早明确治疗方案尤为重要。

生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR)作为肿瘤的基因型标志之一,在神经内分泌源性肿瘤及一些非神经内分泌源性肿瘤细胞膜上都有高度表达,生长抑素及其类似物(somatostatin analogue, SSTA)能与细胞膜上的SSTR特异性结合,从而产生一系列抑制体内激素释放及细胞增殖等生物学效应^[1]。因此,放射性核素标记SSTA的受体显像对肿瘤的诊断具有很高的特异性和敏感性。近年来,国内外有关^{99m}Tc标记的新型SSTA ^{99m}Tc-depreotide的肿瘤受体显像研究已成为热点,而目前国内尚无有关^{99m}Tc-depreotide合成的报道。本实验采用直接标记法,以SnCl₂作为还原剂,在不同条件下对自行合成的depreotide进行^{99m}Tc标记,通过对比标记率筛选出最佳标记条件,并通过^{99m}Tc-depreotide与人肺腺癌A549细胞的体外结合实验,探讨^{99m}Tc-depreotide与肺癌细胞受体的特异性结合机制。

1 材料与方 法

1.1 Depreotide的合成

Depreotide分子由两部分组成,一部分是与SSTR结合的环肽cyclo-[(N-Me)Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Hcy],另一部分则是与核素螯合的线性肽β-Dap-Lys-Cys-Lys。本实验采用茚甲氧羰酰基固相合成法先分别合成两个多肽片段,再用液相法连接两个片段,最后脱去侧链保护基茚甲氧羰酰基,经反相高效液相色谱(Agilent 1100, Agilent公司)纯化,质谱分析,得到目标产物depreotide。

1.2 ^{99m}Tc标记depreotide

采用直接标记法用^{99m}Tc标记depreotide。将20 μg depreotide加入2 ml 0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH分别为5.0、6.0、7.0,每pH点重复3组,共9组)溶液中,充分混匀后依次加入1 ml (1000~1200 MBq) ^{99m}TcO₄⁻淋洗液(上海原普同位素科技有限公司)、25 μl新鲜配制的SnCl₂溶液,反应条件见表1,其中,反应温度分别为15℃、37℃、50℃,并与不同pH组配对成9组,反应时间均为30 min。

表1 ^{99m}Tc标记depreotide的反应条件(9组)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
磷酸盐缓冲液	5.0	5.0	5.0	6.0	6.0	6.0	7.0	7.0	7.0
pH值									
温度(℃)	15	37	50	15	37	50	15	37	50

1.3 标记率测定

采取纸层析法测定标记率,用游离^{99m}TcO₄⁻作为对照点样,分别采用以下两种系统进行层析:(1)生理盐水系统:^{99m}Tc-depreotide和还原型^{99m}Tc位于原点附近(比移值=0~0.4),游离^{99m}TcO₄⁻位于前沿(比移值=0.8~1.0);(2)甲醇/乙酸铵(methanol/ammonium acetate, MAA)(购自上海吉尔生化有限公司)系统:还原型^{99m}Tc位于原点附近(比移值=0~0.3),^{99m}Tc-depreotide和游离^{99m}TcO₄⁻位于前沿(比移值=0.7~1.0)。

当样品达到层析纸另一边边缘时取出晾干,将晾干的层析纸沿虚线剪开,用γ免疫计数器(科大创新股份有限公司,安徽合肥)测定放射性计数,计算标记率。

1.4 标记物纯化

室温下,用自制的Sephadex G25柱纯化标记物。将磷酸盐缓冲液(pH=5.8, 0.2 mol/L)和15%乙醇的混合液作为洗脱液,以8滴/min的速度洗脱,收集洗脱液(约0.5 ml/管)并测定各管的放射性计数,用紫外分光光度计测定每管的A₂₈₀值。

1.5 放化纯及稳定性测定

测定纯化后的^{99m}Tc-depreotide放化纯,具体步骤同标记率检测。标记物于室温下放置4 h后再测定其放化纯,以判断其稳定性。

1.6 细胞培养

将人肺腺癌A549细胞株(上海细胞生物研究所提供)加入培养瓶中,用适量的RPMI1640培养基(购自美国Hyclone公司)在37℃、5% CO₂培养箱中培养,每3 d换液一次,用0.25%胰蛋白酶+0.02%乙二胺四乙酸消化传代,待细胞总数满足实验要求后,以2×10⁵/孔的细胞浓度接种于48孔细胞培养板中,当细胞生长至单层接触融合时,吸弃培养基,用磷酸缓冲液清洗2次后备用。

1.7 细胞摄取实验

在每孔A549细胞中加入200 μl新鲜RPMI-1640培养基及100 μl ^{99m}Tc-depreotide(37 MBq/L,无菌滤膜处理过),分别在4℃、25℃、37℃条件下温育20、40、60、120 min后,迅速移去培养基并用4℃磷酸缓冲液(pH=7.4)洗涤2次终止反应,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,300×g离心5 min,沉淀计数。分别计算不同温度和不同温育时间下细胞对^{99m}Tc-depreotide的摄取率:肿瘤细胞摄取率

(%)=(沉淀放射性计数/总放射性计数)×100%。

1.8 细胞滞留实验

在每孔 A549 细胞中加入 200 μl 新鲜 RPMI-1640 培养基及 100 μl ⁹⁹Tc^m-depreotide (37MBq/L), 分别在 4 ℃、25 ℃及 37 ℃下培养 2 h, 待其摄取达到最大值时, 迅速移去培养基并用 4 ℃磷酸缓冲液 (pH=7.4)洗涤 2 次终止反应。重新加入 200 μl 新鲜培养基, 在 4 ℃及 37 ℃下培养, 分别于 0、15、30、60、90 min 时取样(步骤同摄取实验), 并测定放射性计数。

1.9 统计学方法

所有数据点用 3 个平衡样, 采用 SPSS 12.0 软件对结果进行统计学分析, 实验数据用均值+标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P > 0.05$ 被认为差异无统计学意义, $P < 0.05$ 被认为差异有显著统计学意义, $P < 0.01$ 被认为差异有非常显著统计学意义。

2 结果

2.1 Depreotide 的合成及鉴定

反相高效液相色谱法分析结果表明, 产物纯度为 95.29%。经质谱鉴定, 该产物分子质量为 1368u, 证实该产物为 depreotide。

2.2 不同反应条件对标记率的影响

如图 1 所示, 将晾干的层析纸沿虚线剪开, 分别计算以下两个数值。

$$A = (A \text{ 段层析纸计数} / \text{MAA 层析纸总计数}) \times 100\%$$

$$B = (B \text{ 段层析纸计数} / \text{生理盐水层析纸总计数}) \times 100\%$$

$$^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide 标记率} = 100\% - (A+B)$$

计算不同温度和不同 pH 值缓冲液实验组的标记率, 同一实验组包括 3 个样本, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示各组标记率(表 2), 并绘制柱状图(图 2)。观察图 2 各组标记率变化可知, 不同温度和不同 pH 值缓冲液下的标记率有所差异。

2.2.1 不同 pH 值对标记率的影响

由图 2 可见, 相同温度下, 缓冲液 pH=6.0 实验组的标记率高于 pH=5.0 和 pH=7.0 两实验组, 随着温度逐渐升高, 各实验组标记率的差异有缩小的趋势。由表 2 可见: 15 ℃时, pH6.0 组的标记率显著高于 pH5.0 组、pH7.0 组($t=7.15, t=7.38, P$ 均 < 0.01); 37 ℃时, pH6.0 组标记率也高于 pH5.0 和 pH7.0 组 ($t=3.19, P < 0.05; t=4.80, P < 0.01$); 50 ℃温度下, pH6.0 组的标记率与 pH5.0 组的差异无统

计学意义($t=0.872, P > 0.05$), 但仍高于 pH7.0 组($t=4.256, P < 0.05$)。

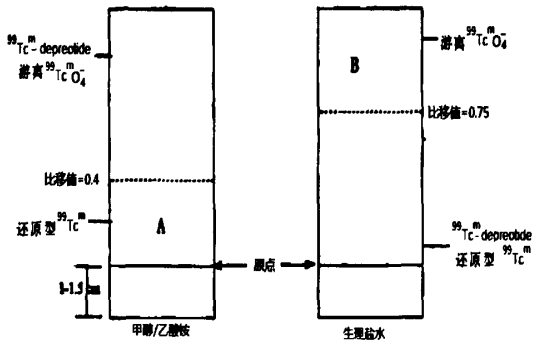


图 1 ⁹⁹Tc^m-depreotide 标记率测定的示意图

表 2 不同时间和 pH 值反应条件下的 ⁹⁹Tc^m-depreotide 标记率($\bar{x} \pm s$)%

	15 ℃	37 ℃	50 ℃
pH5.0	64.28 ± 1.38	61.05 ± 1.87	58.02 ± 2.00
pH6.0	70.95 ± 0.84	66.19 ± 2.06	59.11 ± 1.65
pH7.0	59.22 ± 2.62	57.09 ± 2.55	54.61 ± 0.80

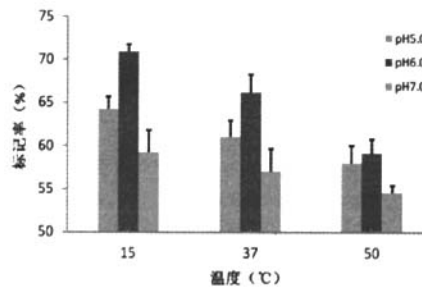


图 2 不同时间和 pH 值反应条件下的 ⁹⁹Tc^m-depreotide 标记率

2.2.2 不同温度对标记率的影响

观察图 2 可知, 随着反应温度由 15 ℃逐渐升高到 50 ℃, 相同 pH 实验组的标记率均呈下降趋势, 其中以 pH=6.0 实验组变化最为明显, 平均标记率下降了 11.84%; pH=7.0 实验组变化最小, 平均标记率下降了 4.61%。由表 2 可见: 在 pH6.0 环境下, 15 ℃组的标记率显著高于 37 ℃组($t=4.78, P < 0.05$), 后者更显著高于 50 ℃组($t=6.01, P < 0.01$); 在 pH5.0 环境下, 15 ℃和 37 ℃实验组的标记率也均高于 50 ℃组($t=5.76, P < 0.01; t=2.47, P < 0.05$); 在标记率随温度变化趋势最小的 pH7.0 环境下, 15 ℃组标记率也显著高于 50 ℃组($t=3.76, P < 0.05$)。

2.3 标记物的纯化检测

标记物经 Sephadex G25 层析柱分离后, 测量各管放射性计数, 结果显示, 洗脱曲线有两个峰, 第一峰为 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$, 第二峰为游离的 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ (图 3)。用紫外分光光度计检测各时相管产品溶液, 仅有一个峰, 对应图 3 中的第一峰(图 4), 为 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 。

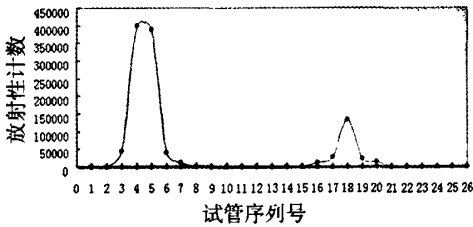


图 3 Sephadex G25 层析洗脱液各时相管的放射性计数 图中第一峰为 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$, 第二峰为游离的 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 。

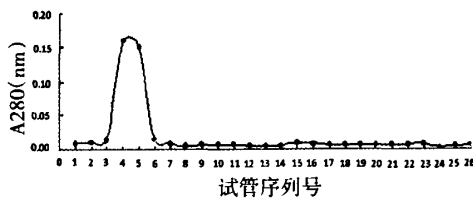


图 4 紫外分光光度计检测柱层析各时相管的 A280 值 图中峰值为 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 。

2.4 标记物的放化纯及稳定性

测定纯化后的 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 的放化纯, 结果显示其放化纯达 90.21%。室温 (15 °C) 下放置 4 h 后测定其放化纯为 87.31%。

2.5 细胞摄取实验

不同温度和不同时间点测得的 A549 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 的摄取率见表 3 所示。在 4 °C 及 25 °C 条件下, 随着时间的延长, A549 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 的摄取率呈现逐渐增高的趋势; 而在 37 °C 条件下, 摄取峰值发生在 60 min, 之后随着时间的延长摄取率有所下降。在相同的时间点, 摄取率随温度的升高逐渐增加。

2.6 细胞滞留实验

$^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 在 A549 细胞中的滞留率见表 4 所示。 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 在 A549 细胞中清除迅速, 15 min 时, 细胞滞留率分别为 62.7% (4 °C) 和 63.58% (37 °C), 两组数据之间差异无统计学意义 ($t=0.669, P>0.05$)。但在 30 min、60 min、90 min

时, 37 °C 实验组的滞留率差异有统计学意义 ($t=3.110, P<0.05; t=2.648, P<0.01; t=3.340, P<0.01$)。

表 3 不同时间和温度下肺腺癌 A549 细胞对 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 的摄取率[($\bar{x}\pm s$)%]

时间 (min)	样本数	温度(°C)		
		4	25	37
20	5	7.247±0.216	14.811±0.183	15.493±0.170
40	5	11.393±0.550	15.403±0.238	16.030±0.091
60	5	13.393±0.335	16.383±0.115	20.750±0.481
120	5	14.650±0.457	18.463±0.352	18.917±0.093

表 4 不同时间和温度下 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 在肺腺癌 A549 细胞中的滞留率[($\bar{x}\pm s$)%]

时间 (min)	样本数	温度(°C)		
		4	25	37
0	5	100	100	100
15	5	62.70±1.97	63.24±2.21	63.58±2.19
30	5	52.94±2.89	53.47±2.12	58.13±2.35
60	5	41.99±2.97	44.20±2.85	46.76±2.72
90	5	26.53±1.97	28.91±2.35	31.83±2.92

3 讨论

放射性核素标记的多肽受体显像是核医学中最年轻、最有活力的分支领域之一, 其中多肽受体显像剂 depreotide 是近年来合成的一种新的 SSTA, 它由一段 SSTR 识别的环六肽和一段可与金属螯合的四肽链连接而成。与奥曲肽(octreotide)相比较, depreotide 是一种不含二硫键的环状 SSTA, 在标记过程中可避免二硫键发生还原性断裂的可能; 其结构中一段含半胱氨酸的三肽序列为 Tc^{5+} 提供了配位电子, 因而容易被 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记^[2-3]; 此外, depreotide 被肿瘤摄取的浓度更高, 而且由于其主要经肾脏排泄, 肝脏吸收低, 显像质量优于奥曲肽^[4]。 $^{99}\text{Tc}^m\text{-depreotide}$ 与 SSTR2、SSTR3、SSTR5 的亲合力高于 $^{99}\text{Tc}^m\text{-奥曲肽}$ ^[5], 更适于肺癌尤其是非小细胞肺癌的肿瘤显像。

目前, 国内外对核素标记比较常用的方法大致有 3 种^[6], 第一种是直接标记法, 是用还原剂打开分子内的二硫键, 形成两个巯基 (-SH), 从而很容易与 $^{99}\text{Tc}^m$ 结合。此法简单易行, 且不需要对相关

基团进行保护或脱保护,产率较高,但是直接法只能对具有二硫键的环状肽进行标记,此外由于二硫键桥内多数存在多肽的生物活性基团,破坏二硫键桥会使多肽与受体的亲和力降低4个数量级^[7]。第二种是间接法中的后标法,即用^{99m}Tc标记前先在多肽的末端氨基酸上连接一个双功能螯合剂,此法对含和不含二硫键的环状肽都适用,但此法制备过程长而复杂。第三种是针对环状肽的直接标记法,该法简单可靠。由于活性基团大都位于环状肽结构内,^{99m}Tc只是结合到人工合成并附加在肽键非活性中心基团的氨基酸序列上,以维持生物活性基团构型,不会影响肽与受体的亲和力。由于depreotide不含二硫键结构,且在同型半胱氨酸侧链上连接着具有单胺-二酰胺-硫螯合体结构的-β-Dap-Lys-Cys-序列,可以向^{99m}Tc提供配对电子,因此采用直接标记法在理论上不会使多肽失去生物活性。

本研究采用直接标记法,通过改变标记时的反应温度和缓冲液的pH值比较不同条件下^{99m}Tc-depreotide的标记率变化,进而筛选出最适合的标记温度和缓冲液pH值。我们选择纸层析法测定标记率,展开剂包括生理盐水和MAA两种体系,将实验数据对比分析后发现,不同温度和pH值对标记率的影响比较明显,在相同的温度下,缓冲液pH=6.0实验组的标记率高于pH=5.0和pH=7.0两实验组;但随着反应温度由15℃逐渐升高到50℃,各pH实验组的标记率皆有所下降,且标记率的差异有缩小的趋势,这可能是由于随着温度的升高,depreotide的稳定性发生了变化,导致不同pH实验组的标记率差异不明显。此外,随着温度的升高,pH=6.0实验组标记率变化最为明显,平均标记率下降了11.84%;而pH=7.0实验组变化最小,平均标记率下降了4.61%。由此可见,^{99m}Tc标记depreotide的温度不宜太高,反应缓冲液pH值宜偏酸,这些条件有利于保持depreotide的稳定性,进而保证较高的标记率。

细胞实验的数据显示,A549细胞与SSTR有较好的亲和力,从而间接说明了肺癌的细胞表面有SSTR表达,这与Virgolini等^[5]学者的观点一致。细胞实验结果表明,标记后的^{99m}Tc-depreotide仍保持良好的生物活性,A549细胞对^{99m}Tc-depreotide

有较好的亲和力,其摄取和内化具有一定的温度依赖性,细胞实验反应体系的最适温度为37℃,而这正接近人体的生理状态,这一实验数据有利于今后有关^{99m}Tc-depreotide临床试验的开展。在37℃下,A549细胞摄取^{99m}Tc-depreotide的高峰在60min,相对于¹¹¹In-奥曲肽显像时间为注射显像剂后24h,^{99m}Tc-depreotide更易成像。同时,A549细胞对^{99m}Tc-depreotide的清除迅速而且没有明显的温度依赖性,A549细胞摄取^{99m}Tc-depreotide达最大值后的半清除时间为48min,表明^{99m}Tc-depreotide具有较好的生物降解性,不会积聚于细胞内而产生细胞毒性,适用于受体显像。综上所述,纯化后的^{99m}Tc-depreotide的放化纯达到90.21%,在室温15℃下放置4h后,放化纯仍保持为87.31%,表明^{99m}Tc-depreotide的稳定性较好。细胞实验显示,^{99m}Tc-depreotide与肺腺癌细胞在人体温度的反应条件下具有较好的受体结合特异性,这为进一步临床应用研究提供了可靠的参数。

本研究的不足之处在于没有同时进行动物肿瘤显像实验,我们将在下一步的研究中进行^{99m}Tc-depreotide的动物体内生物学分布实验及显像研究。

参 考 文 献

- [1] Watt HL, Kharmate G, Kumar U. Biology of somatostatin in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 286 (1-2): 251-261.
- [2] Short AF, Helman DL, Lettieri CJ, et al. Depreotide scanning in sarcoidosis: a pilot study. *Chest*, 2004, 126(4): 1337-1343.
- [3] 王秀娟, 李险峰. 生长抑素受体肿瘤显像的临床应用及研究进展. *国际放射医学核医学杂志*, 2006, 30 (4): 217-219.
- [4] Van Den Bossche B, D'haeninck E, Bacher K, et al. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc-depreotide (P829) in patients suffering from breast carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004, 19(6): 776-783.
- [5] Virgolini I, Leimer M, Handmaker H, et al. Somatostatin receptor subtype specificity and in vivo binding of a novel tumor tracer, ^{99m}Tc-P829. *Cancer Res*, 1998, 58 (9): 1850-1859.
- [6] Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60 (12): 1347-1370.
- [7] Uehara T, Arano Y, Ono M, et al. The integrity of the disulfide bond in a cyclic somatostatin analog during ^{99m}Tc complexation reactions. *Nucl Med Biol*, 1999, 26 (8): 883-89.

(收稿日期: 2010-02-09)