

·基础研究·

靶向 TSPO 显像剂 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的制备及其对关节炎的 SPECT/CT 显像研究

刘鹏 董文涛 苏新辉 黄剑全 王亮亮 蒋怡臻 郭志德 马超 苏福

361004, 厦门大学附属中山医院核医学科(刘鹏、董文涛、苏新辉、王亮亮、蒋怡臻、马超、苏福); 366000, 福建省三明市第二医院核医学科(黄剑全); 361102, 厦门大学分子影像暨转化医学研究中心(郭志德); 350001 福州, 福建医科大学附属协和临床医学院(苏新辉)

通信作者: 苏新辉, Email: suxinhui@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2018.01.009

【摘要】 目的 制备 ^{99m}Tc 标记的转运蛋白(TSPO)配体 CB86 [^{99m}Tc -DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)-CB86], 探讨其作为 TSPO 靶向关节炎显像新型分子探针的可行性。方法 通过偶联双功能螯合剂制备 DTPA-CB86, 进行 ^{99m}Tc 标记, 经高效液相色谱纯化, 测定其放化纯度和体外稳定性。选用巨噬细胞 RAW264.7 进行体外细胞结合实验, 测定 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的结合率和外排率。采用弗氏佐剂建立左踝关节炎小鼠模型, 对其行 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 Micro SPECT/CT 显像, 并观察探针的体内分布情况。采用 SPSS 18.0 统计软件对符合正态分布及方差齐性的数据进行 t 检验。结果 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的标记率为 $(95.86 \pm 2.45)\%$, 放化纯度为 $(97.45 \pm 0.69)\%$, 其在室温下的磷酸盐缓冲液中的稳定性良好, 放置 4 h 后, 其标记率仍 $>90\%$ 。 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 能与巨噬细胞 RAW264.7 特异性结合, 3 h 的摄取率达到最高峰 $[(36.45 \pm 2.18)\%]$, 在加入过量未标记的 DTPA-CB86 后, RAW264.7 细胞对 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的摄取明显受到抑制 $[(10.43 \pm 2.01)\%]$, 与未阻断时相比差异具有统计学意义 ($t = 6.217, P < 0.05$); RAW264.7 细胞对 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 外排较少, 摄取率从 4.5 h 时的 $(33.31 \pm 2.34)\%$ 到 8 h 时的 $(19.32 \pm 2.01)\%$, 减少了 13.99%。Micro SPECT/CT 显像结果显示, ^{99m}Tc -DTPA-CB86 在小鼠左踝关节炎部位清晰可见, 且能被过量的 DTPA-CB86 明显抑制; 体内生物学分布结果表明, 其具有较好的炎症靶向性; 注射后 3 h 踝关节炎部位的摄取仍可达 $(2.35 \pm 0.10)\% \text{ID/g}$ 。结论 ^{99m}Tc 标记 CB86 易于制备, 具有较好的理化性质及体内代谢学性质, 同时具有较好的关节炎摄取, 有望发展成新的 TSPO 靶向 SPECT 关节炎显像分子探针。

【关键词】 转运蛋白; 关节炎; 同位素标记; 锝放射性同位素; 体层摄影术, 发射型计算机, 单光子; 体层摄影术, X 线计算机

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81571707); 福建省自然科学基金(2015J01519); 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2014-ZQN-ZD-35); 人社部留学人员科技活动项目择优资助(2014-240); 教育部留学回国人员科研启动基金(2014-1685); 福建省卫计委青年科研课题(2015-2-46); 厦门市科技项目(2015S0288)

Preparation and imaging of arthritis of ^{99m}Tc -DTPA-CB86 for TSPO targeted imaging Liu Peng,

Dong Wentao, Su Xinhui, Huang Jianquan, Wang Liangliang, Jiang Yizhen, Guo Zhide, Ma Chao, Su Fu
Department of Nuclear Medicine, Zhongshan Hospital Xiamen University, Xiamen 361004, China(Liu P, Dong WT, Su XH, Wang LL, Jiang YZ, Ma C, Su F); Department of Nuclear Medicine, the Second Hospital of Sanming in Fujian Province, Sanming 366000, China(Huang JQ); Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China(Guo ZD); Union Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China(Su XH)

Corresponding author: Su Xinhui, Email: suxinhui@163.com

【Abstract】 Objective To develop a novel radiolabeled translocator protein(TSPO) ligand CB86 targeting agent ^{99m}Tc -diethylene-triaminepentaacetic acid (DTPA)-CB86 and evaluate its biological properties. **Methods** DTPA-CB86 was prepared by coupling with a bifunctional chelating agent, and then labeled with ^{99m}Tc to obtain ^{99m}Tc -DTPA-CB86. The labeling efficiency, radiochemical purity, and stability were

determined *in vitro*. *In vitro* cellular uptake and efflux were performed using RAW264.7 macrophage cells. Biodistribution and micro-SPECT/CT images were investigated on Freund's adjuvant-induced left arthritis in mice. SPSS 18.0 analysis software(*t*-test) was used to fit the normal distribution and homogeneity of variance. **Results** The labeling yields and radiochemical purity of ^{99m}Tc -DTPA-CB86 were $(95.86\pm 2.45)\%$ and $(97.45\pm 0.69)\%$, respectively. ^{99m}Tc -DTPA-CB86 displayed good stability, with a radiochemical purity of more than 90%, in phosphate-buffered solution(PBS) at 4 h. It also exhibited high specific TSPO binding in RAW264.7 macrophage cells *in vitro*. The highest uptake ratio was $(36.45\pm 2.18)\%$ at 3 h after incubation, which then decreased significantly [$(10.43 \pm 2.01)\%$; $t = 6.217$, $P < 0.05$] after adding excessive unlabeled DTPA-CB86. The difference was significant. Cell efflux analysis showed that ^{99m}Tc -DTPA-CB86 had good cell retention by RAW264.7 cells, with only about 13.99% [decreased from $(33.31\pm 2.34)\%$ to $(19.32\pm 2.01)\%$ of total input radioactivity] of ^{99m}Tc -DTPA-CB86 efflux observed during 4.5 h to 8 h of incubation. Biodistribution and SPECT/CT imaging demonstrated that the uptake of ^{99m}Tc -DTPA-CB86 in the left arthritic ankles was significantly increased compared with that in contralateral normal ankles. Uptake in the arthritic ankles could be largely blocked by an excess of DTPA-CB86. **Conclusion** ^{99m}Tc -DTPA-CB86 can be readily synthesized and clearly visualize arthritis with low background, thus demonstrating its potential as a promising molecular probe targeting TSPO for arthritic SPECT imaging.

【Key words】 Translocator protein; Arthritis; Isotope labeling; Technetium radioisotope; Tomography, emission-computed, single-photon; Tomography, X-ray computed

Fund programs: National Natural Science Foundation of China(81571707); Natural Science Foundation of Fujian Province(2015J01519); Program for Training Young Talents of Fujian Health (2014-ZQN-ZD-35); Technology Foundation for Selected Overseas Chinese Scholar, Ministry of Human Resources and Social Security of China (2014-240); Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Education of China (2014-1685); Program for Young Scholars of Fujian Health and Family Planning Commission(2015-2-46); Science and Technology Project for Xiamen(2015S0288)

位于线粒体外膜的相对分子质量为 18 000 的转运蛋白(translocator protein, TSPO), 曾被称为外周的苯二氮卓类受体(peripheral benzodiazepine receptor, PBR), 是在进化上具有高度保守性的转运蛋白家族成员之一, 主要位于肾上腺、睾丸、卵巢等细胞的线粒体外膜上, 介导类固醇的合成^[1]。在中枢神经系统炎症中, TSPO 高表达于激活的小胶质细胞和星形胶质细胞^[2]。近年的研究结果显示, 在外周组织炎症中, TSPO 也高表达于巨噬细胞和单核细胞^[3-4], 这表明 TSPO 可作为参与炎症反应的免疫细胞显像的靶点。目前, 在 TSPO 显像中主要是用 ^{11}C 或 ^{18}F 标记 TSPO 配体行 PET 显像, 如 ^{11}C -(R)-PK11195、 ^{11}C -PBR28、 ^{11}C -DAA1106、 ^{18}F -FEPPA、 ^{18}F -PBR06 和 ^{18}F -DPA-714 等^[5], 且有些已进入临床应用。与发射正电子的放射性核素 ^{11}C 和 ^{18}F 相比, 发射单光子的放射性核素 ^{99m}Tc 具有价格较低廉, 来源、运输方便, 半衰期长, 操作方便, 使用范围较广等优点, 且 SPECT 较 PET 便宜、普及, 因此, 研发新型 ^{99m}Tc 标记的 TSPO 靶向的

分子探针具有较重要的临床价值。本研究以具有与 TSPO 较高亲和力新型配体 CB86^[6] 为母体, 借助其表面的氨基偶联双功能螯合剂 DTPA 获得 DTPA-CB86, 进行 ^{99m}Tc 标记后获得新型探针 ^{99m}Tc -DTPA-CB86, 行左踝关节炎小鼠 Micro SPECT/CT 显像, 并研究其在体内的分布情况, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

$^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 发生器购自北京原子高科股份有限公司; CB86 由苏新辉课题组与武汉大学药学院洪学传课题组合作制备, 并已纯化、鉴定^[6]; DTPA 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; CRC-25R 型放射性核素活度计为美国 CAPINTEC 公司产品; WIZARD 2480 型 γ 计数仪为美国珀金埃尔默仪器公司产品; Dionex Ulti-Mate 3000 型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪为美国 Thermo Scientific 公司产品; FM-2000 型傅分析仪为北京东方圆通科技发展有限公司;

Sep-Pak C18 Plus 固相萃取柱(简称 C18 色谱柱)为美国 Waters 公司产品; nanoScan 型 SPECT/CT 仪为匈牙利 Mediso Medical Imaging System 公司产品; DMEM 培养基购自美国 Gibco BRL 公司; 胎牛血清购自美国 Gemini 公司; 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由厦门大学生命科学学院俞春东课题组赠送; BALB/c 小鼠由厦门大学实验动物中心提供(4~5 周龄, 雌性, 体重 18~20 g)。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的制备

向溶解有 50 mg CB86 的二甲基亚砷溶液中加入 200 mg DTPA, 在 20℃ 下于转速为 1200 r/min 的磁力加热搅拌器上避光反应 30 h, 用 C18 柱纯化, 得到 DTPA-CB86。取 1 mL 高锝酸钠洗脱液(约 370 MBq)加入 200 μL DTPA-CB86 中, 再加入 20 μL 新鲜配制的 SnCl_2 , 置于振荡模块上 100℃ 避光反应约 30 min, 冷却至室温。取出反应液, 以生理盐水为展开剂, 用 HPLC 测定标记产物的标记率。将上述反应液通过 C18 柱, 以 2 mL PBS(pH 值 7.4) 为淋洗液进行纯化, 将纯化后的反应液用上述同样的方法测定标记产物的放化纯度。取 100 μL 纯化后的反应液 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 置于 1 mL PBS 中, 室温放置, 分别在 1、2、4 h 后取出反应液, 用上述同样的方法测定 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的稳定性。

1.3 体外细胞摄取实验

按文献报道方法, 在 37℃、5% CO_2 培养箱中常规培养 RAW264.7 细胞^[7-9]。待细胞生长至对数生长期, 用 0.25% 胰酶消化, 将 RAW264.7 细胞悬液铺于 24 孔板中(2×10^5 个/孔), 于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养过夜并分成两组, 一组为未抑制组, 另一组为抑制组, 每组设 3 个复孔。先将 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 用无血清的 DMEM 培养基稀释成 1.11×10^{-1} MBq/mL。在未抑制组中加入 100 μL 1.11×10^{-2} MBq ^{99m}Tc -DTPA-CB86; 在抑制组中同时加入 100 μL 1.11×10^{-2} MBq ^{99m}Tc -DTPA-CB86 和 10 μg 未标记的 DTPA-CB86, 上述各孔用无血清培养基补充总体积至 1 mL。将两组放置在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养, 温育的时间点均为 0.5、2、3 和 4 h。将孔板中所有的培养基完全吸出, 然后加入 0.5 mL 冰冷的 PBS 洗 2 次, 向所有孔板中加入 1 mL 1 mol/L NaOH, 室温下放置 5~10 min。然后, 用细胞刮刀轻刮孔板底部, 使细胞完全脱离, 吸取孔板

内所有溶液和细胞, 放入离心管中, 用 γ 计数仪测定细胞的放射性计数(即反应管)以及总 T 管和空白管的放射性计数(各 3 支)。细胞摄取率 = [(反应管计数 - 空白管计数) / 总 T 管计数] $\times 100\%$, 绘制出细胞摄取曲线。

1.4 体外细胞释放实验

细胞按文献^[10]报道方法培养, 将细胞悬液铺于 24 孔板中(2×10^5 个/孔), 每孔加入 100 μL 1.11×10^{-2} MBq ^{99m}Tc -DTPA-CB86 共同培养, 放入 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 4.5、5.5、7 和 8 h。在每个时间点上, 将孔内的细胞培养基吸走丢弃, 用冷的 PBS 冲洗细胞 2 次, 再加入 1 mL 1 mol/L NaOH 裂解细胞, 收集于离心管内。将收集有细胞裂解液的离心管在 γ 计数仪上测定细胞的放射性计数(即反应管)以及总 T 管和空白管的放射性计数(各 3 支)。细胞摄取率 = [(反应管计数 - 空白管计数) / 总 T 管计数] $\times 100\%$, 绘制出细胞摄取曲线, 间接反映 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 从细胞的释放情况。

1.5 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 在左踝关节炎小鼠体内的生物学分布

取体重为 18~20 g 的 BALB/c 雌鼠, 按文献报道方法于左下足跖皮内注射 100 μL 弗氏佐剂, 4 周时左踝关节出现炎症肿胀, 视为造模成功, 即可备用^[11]。采用直接抽样方法选取体重相近、左踝关节中度红肿的模型鼠 12 只, 分为 3 组, 每组 4 只, 经尾静脉注射 100 μL 、0.37 MBq ^{99m}Tc -DTPA-CB86, 并于注射后不同时间点(0.5、1.5 和 3 h)处死裸鼠, 取心、肝、脾、肺、肾、骨、肌肉、胃、肠和左踝关节炎组织等主要脏器及组织, 测量其质量及放射性计数, 经参考源校正后计算每克组织百分注射剂量率(%ID/g), 以及左踝关节炎组织与血液(arthritic ankle to blood, A/B)、左踝关节炎组织与正常肌肉(arthritic ankle to muscle, A/M)的放射性比值。

1.6 左踝关节炎小鼠 Micro SPECT/CT 显像

采用直接抽样方法选取体重相近、左踝关节中度红肿的模型小鼠 6 只, 分为未阻断组和竞争性抑制组, 每组 3 只。未阻断组小鼠经尾静脉注射 100 μL 3.7 MBq ^{99m}Tc -DTPA-CB86; 竞争性抑制组小鼠经尾静脉注射 100 μL 3.7 MBq ^{99m}Tc -DTPA-CB86 和 300 μg 未标记的 DTPA-CB86。两组小鼠均用 5% 的水合氯醛经腹腔麻醉, 俯卧位固定于鼠

板上, 分别于注射 0.5、1.5 和 3 h 时行 Micro SPECT/CT 显像, 使用平行孔准直器, 将小鼠放置于视野中心, 进行 Micro SPECT 断层扫描成像。然后进行 CT 扫描, 通过电脑重建后得到短轴、水平长轴及垂直长轴的小鼠 SPECT/CT 融合图像。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 所得数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 Kolmogorov-Smirnov test(柯尔莫诺夫-斯米尔诺夫检验)分析数据是否符合正态分布($P>0.1$ 为符合正态分布标准), 用 Levene 检验分析数据是否符合方差齐性($\text{sig}>0.05$ 为符合方差齐性), 对符合正态性分布及方差齐性的数据采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 的制备结果

经 HPLC 分析 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 具有较高的标记率[(95.86 \pm 2.45)%]和放化纯度[(97.45 \pm 0.69)%]。稳定性实验结果显示, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 在室温下的 PBS 溶液中稳定性良好, 放置 4 h 后其标记率仍 $>90\%$ 。

2.2 体外细胞实验结果

细胞摄取实验结果如图 1 所示, 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 的摄取率在 0.5 h 为(28.45 \pm 1.56)%, 3 h 时达到最高峰[(36.45 \pm 2.18)%], 4 h 时摄取率虽然有所下降, 仍保持在较高水平[(35.63 \pm 2.21)%]。在加入过量未标记的 DTPA-CB86 时, RAW264.7 细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 的摄取明显下降, 且随时间的延长而逐渐下降, 与未阻断组相比, 细胞摄取下降差异具

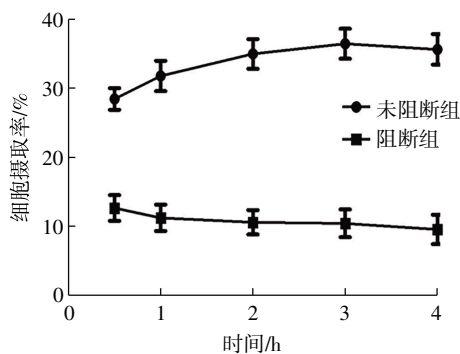


图 1 RAW264.7 巨噬细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)-CB86 的摄取曲线 ($n=3$)

Fig.1 *In vitro* uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 in RAW264.7 cells ($n=3$)

有统计学意义($t=6.217$, $P<0.05$)。细胞释放实验结果如图 2 所示, RAW264.7 细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 的摄取随着时间的延长而减少, 4.5 h 时的摄取率为(33.31 \pm 2.34)%, 8 h 时为(19.32 \pm 2.01)%, 减少了 13.99%。

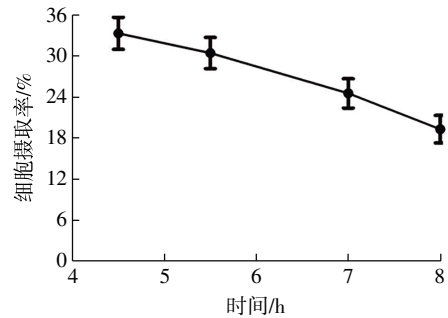


图 2 RAW264.7 巨噬细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA(二亚乙基三胺五乙酸)-CB86 的摄取曲线 ($n=3$)

Fig.2 *In vitro* uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 in RAW264.7 cells ($n=3$)

2.3 左踝关节炎小鼠体内生物学分布结果

尾静脉注射示踪剂后, 除了左踝关节炎组织外, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 在各组织器官中的放射性分布随着时间的延长逐渐下降(表 1)。左踝关节炎组织的放射性分布 0.5 h 时为(1.33 \pm 0.16)%ID/g, 3 h 时为最高值(2.35 \pm 0.10)%ID/g; 肝脏 0.5 h 时为最高值(5.56 \pm 0.76)%ID/g, 3 h 时仍有较高的摄取, 为(2.14 \pm 0.23)%ID/g; 血液中 0.5 h 时为(0.78 \pm 0.07)%ID/g, 3 h 时为(0.56 \pm 0.09)%ID/g。

A/B 和 A/M 的放射性比值随着时间的延长逐渐增高, 0.5 h 时分别为(1.71 \pm 0.05)和(1.32 \pm 0.43), 3 h 时

表 1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 在左踝关节炎小鼠体内的生物学分布

$[\bar{x}\pm s(\%ID/g)](n=4)$

Table 1 Biodistribution for $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-CB86 in mice models of arthritis [$\bar{x}\pm s(\%ID/g)$] ($n=4$ for each group)

组织或器官	注射后时间/h		
	0.5	1.5	3
心	1.49 \pm 0.17	0.46 \pm 0.06	0.33 \pm 0.05
肝	5.56 \pm 0.76	3.82 \pm 0.97	2.14 \pm 0.23
肺	1.51 \pm 0.14	1.80 \pm 0.33	0.68 \pm 0.16
肾	2.03 \pm 0.25	1.86 \pm 0.38	1.71 \pm 0.28
脾	1.24 \pm 0.43	0.91 \pm 0.08	0.58 \pm 0.03
胃	2.76 \pm 0.36	1.77 \pm 0.31	1.34 \pm 0.21
骨	0.51 \pm 0.16	0.49 \pm 0.09	0.41 \pm 0.07
肌肉	1.01 \pm 0.12	1.47 \pm 0.12	0.78 \pm 0.02
小肠	3.48 \pm 0.59	2.83 \pm 0.63	1.97 \pm 0.28
血液	0.78 \pm 0.07	0.68 \pm 0.08	0.56 \pm 0.09
左踝关节炎部位	1.33 \pm 0.16	2.01 \pm 0.18	2.35 \pm 0.10

为(4.19 ± 0.21)和(3.01 ± 0.16)。

2.4 左踝关节炎症小鼠 Micro SPECT/CT 显像结果

左踝关节炎症小鼠注射 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 后 Micro SPECT/CT 显像结果如图 3、图 4 所示。未阻断组注射 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 后 0.5 h 时左踝关节炎症部位可见放射性分布, 且随着时间的延长逐渐增浓, 3 h 时炎症部位显像最清晰(图 3), 而正常组织的放射性分布随着时间的延长逐渐减淡; 竞争性抑制组始终未见明显的炎症部位显影(图 4)。

3 讨论

CB86 是一种新型 TSPO 拮抗剂, 其 IC50 (半抑制浓度) (1.2 nmol/L) 比 TSPO 特异性拮抗剂 PK 11195 (2.2 nmol/L) 低^[2], 这表明 CB86 对 TSPO 的特异性较强。CB86 分子上带有氨基, 且对温度和 pH 值有较高的耐受性, 适合在特异性结合位点进行化学修饰, 且其在连接显像或治疗的药效基团后仍对 TSPO 有很高的亲和性。Musacchio 等^[13]报道在含有紫杉醇 PEG-PE (聚乙二醇磷脂酰乙醇胺) 微球上修饰 CB86 (13.6 μmol/L) 能大大增强紫杉醇的抗癌效果。TSPO 作为线粒体外膜的重要组成部分, 参与线粒体膜渗透性转换孔的开放, 调控细胞的凋亡^[1]。CB86 分子不能直接用于 ^{99m}Tc 标记, 需引入双功能螯合剂, DTPA 在较低的配体浓度下即对 ^{99m}Tc 或 ^{111}In 等金属核素有高的标记率^[14]。本研究中笔者先将 CB86 与 DTPA 偶联, 制成 DTPA-CB86, 再进行 ^{99m}Tc 标记获得 ^{99m}Tc -DTPA-CB86, 且经放射性 HPLC 结果证实放化纯度较好。另外, ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的体外稳定性较好, 放置 4 h 未出现放化纯度降低, 有利于进行远距离配送。

体外细胞研究结果显示: 小鼠 RAW264.7 巨噬

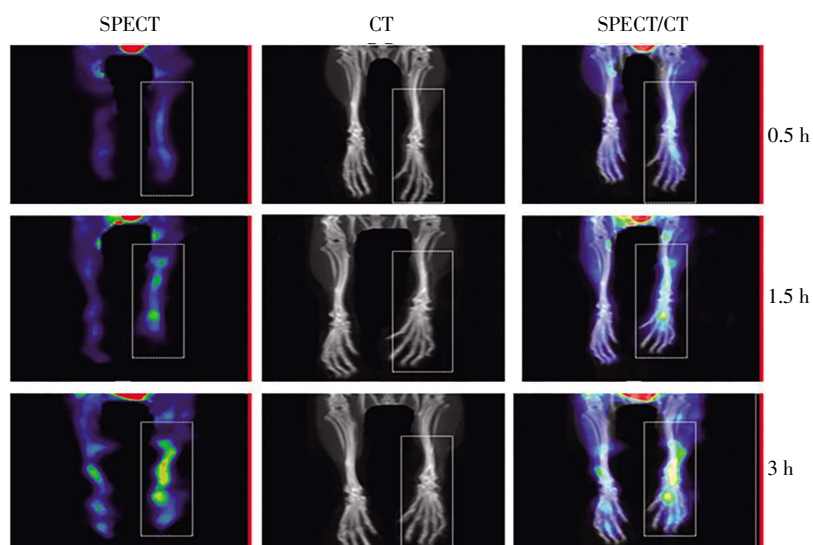


图 3 未阻断组左踝关节炎症小鼠注射 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 后不同时间的 Micro SPECT/CT 显像图(方框示左踝关节炎)

Fig.3 Micro SPECT/CT imaging of ^{99m}Tc -DTPA-CB86 in mice models of arthritis in the unblocked group at various times after injection (box showing left arthritis)

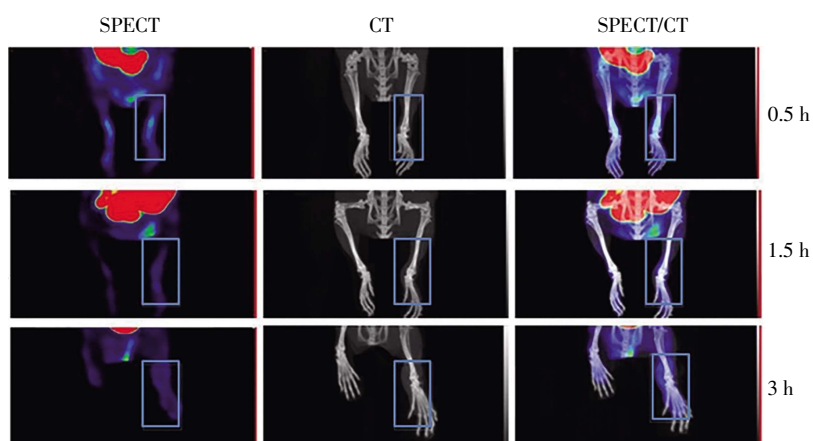


图 4 竞争性抑制组左踝关节炎症小鼠注射 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 后不同时间的 Micro SPECT/CT 显像图(方框示左踝关节炎)

Fig.4 Micro SPECT/CT imaging of ^{99m}Tc -DTPA-CB86 in mice models of arthritis in the blocked group at various times after injection (box showing left arthritis)

细胞对 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的特异性摄取率在 3 h 时达到最高峰[(36.45 ± 2.18)%], 但同时加入过量未标记的 DTPA-CB86 后, 细胞的摄取率显著下降; RAW264.7 细胞对 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 的摄取随着时间的延长而略有减少, 4.5 h 时摄取率为(33.31 ± 2.34)%, 8 h 时为(19.32 ± 2.01)%, 减少 13.99%, 这表明 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 可以特异性地与小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的 TSPO 结合, 且亲和力高, 外排少。

^{99m}Tc -DTPA-CB86 在左踝关节炎症小鼠体内的生物学分布和 Micro SPECT/CT 显像的研究结果表

明, 显像剂 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 在小鼠体内的稳定性尚好, 随时间延长左踝关节炎部位仍有较高摄取, 而正常组织如肝、血液、肌肉等的摄取逐渐降低, 提高了 A/B 和 A/M 的放射性比值以及炎症的检出率。注射后 0.5 h 时左踝关节炎部位已略见显影, 3 h 时炎症部位摄取仍可达 $(2.35 \pm 0.10)\% \text{ID/g}$, 这表明 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 在炎症部位中的清除率较慢且停留时间较长, 有利于炎症的显像。肝、血液、肌肉中的放射性随时间延长逐渐减低, A/B 和 A/M 的放射性比值分别从 0.5 h 时的 (1.71 ± 0.05) 和 (1.32 ± 0.43) 增高至 3 h 时的 (4.19 ± 0.21) 和 (3.01 ± 0.16) , 这表明 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 在血液、肌肉等非炎症组织中的清除率较快(主要从肝脏代谢), A/B 和 A/M 的放射性比值随时间延长逐渐增高, 炎症显像更清晰, 提示 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 在左踝关节炎小鼠模型中的靶向性良好, 且在体内的停留时间长。在竞争性抑制实验中各时间段均未见炎症显影, 未标记 DTPA-CB86 明显抑制了 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 与炎症巨噬细胞的 TSPO 的结合, 这表明显像剂 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 能够与 TSPO 特异性结合。

综上所述, 我们成功制备的 ^{99m}Tc -DTPA-CB86 可与巨噬细胞特异性结合, 且经标记后保留了生物学活性。小鼠体内分布及 SPECT/CT 显像结果表明, 其有望成为一种应用于关节炎的 SPECT 显像的分子显像剂。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 刘鹏、董文涛负责研究过程的实施; 苏新辉负责研究命题的提出、设计和论文撰写; 黄剑全、王亮亮、蒋怡臻负责研究过程的数据采集和分析统计; 郭志德、马超、苏福负责研究命题的提出、研究思路和实验步骤的设计等。

参 考 文 献

- [1] Fan J, Lindemann P, Feuilloley MG, et al. Structural and functional evolution of the translocator protein(18 kDa)[J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(4): 369-386. DOI: 10.2174/1566524011207040369.
- [2] Crawshaw AA, Robertson NP. The role of TSPO PET in assessing neuroinflammation[J]. *J Neurol*, 2017, 264(8): 1825-1827. DOI: 10.1007/s00415-017-8565-1.
- [3] Narayan N, Mandhair H, Smyth E, et al. The macrophage marker translocator protein(TSPO) is down-regulated on pro-inflammatory 'M1' human macrophages[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185767 [2017-11-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC58968465>. DOI: 10.1371/journal.pone.0185767. eCollection 2017.
- [4] Shao X, Wang X, English SJ, et al. Imaging of carrageenan-induced local inflammation and adjuvant-induced systemic arthritis with [^{11}C]PBR28PET[J]. *Nucl Med Biol*, 2013, 40(7): 906-911. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2013.06.008.
- [5] Dupont AC, Largeau B, Santiago Ribeiro MJ, et al. Translocator protein-18 kDa (TSPO) positron emission tomography (PET) imaging and its clinical impact in neurodegenerative diseases[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): E785[2017-11-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC58968465>. DOI: 10.3390/ijms18040785.
- [6] Wen M, Qu CR, Su XH, et al. A practical process for the synthesis of translocator protein 18 kDa imidazopyridine ligand[J]. *Wuhan Univ J Nat Sci*, 2014, 19(1): 19-26. DOI: 10.1007/s11859-014-0973-9.
- [7] Su X, Cheng K, Liu Y, et al. PET imaging of insulin-like growth factor type 1 receptor expression with a ^{64}Cu -labeled Affibody molecule [J]. *Amino Acids*, 2015, 47(7): 1409-1419. DOI: 10.1007/s00726-015-1975-4.
- [8] Su X, Cheng K, Jeon J, et al. Comparison of two site-specifically ^{18}F -labeled affibodies for PET imaging of EGFR positive tumors[J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(11): 3947-3956. DOI: 10.1021/mp5003043.
- [9] 豆晓锋, 张亚飞, 蒋怡臻, 等. ^{131}I 标记抗 NRP-1 单克隆抗体 A6 在荷瘤裸鼠体内分布和显像研究[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2014, 34(6): 495-499. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-2848.2014.06.017.
Dou XF, Zhang YF, Jiang YZ, et al. Biodistribution and imaging of ^{131}I labeled anti-neuropilin-1 monoclonal antibody in malignant gliomas xenografts[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2014, 34(6): 495-499.
- [10] Neyt S, Vliegen M, Verreut B, et al. Synthesis, in vitro and in vivo small-animal SPECT evaluation of novel technetium labeled bile acid analogues to study(altered) hepatic transporter function[J]. *Nucl Med Biol*, 2016, 43(10): 642-649. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2016.07.001.
- [11] Chang Y, Wu Y, Wang D, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis via attenuating inflammatory responses[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50(5): 862-870. DOI: 10.1093/rheumatology/keq404.
- [12] Laquintana V, Denora N, Musacchio T, et al. Peripheral benzodiazepine receptor ligand-PLGA polymer conjugates potentially useful as delivery systems of apoptotic agents[J]. *J Control Release*, 2009, 137(3): 185-195. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.04.007.
- [13] Musacchio T, Laquintana V, Latrofa A, et al. PEG-PE micelles loaded with paclitaxel and surface-modified by a PBR-ligand: synergistic anticancer effect[J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(2): 468-479. DOI: 10.1021/mp800158c.
- [14] 张伟, 蔡亮, 陈跃, 等. 双功能制剂 ^{99m}Tc -Gd-DTPA-DG 的制备及在荷瘤裸鼠体内的生物分布[J]. *中华核医学杂志*, 2011, 31(2): 117-120. DOI: 10.3760/ema.j.issn.0253-9780.2011.02.011.
Zhang W, Cai L, Chen Y, et al. Synthesis and biodistribution of a bi-functional agent ^{99m}Tc -Gd-DTPA-DG in tumor bearing nude mice [J]. *Chin J Nucl Med*, 2011, 31(2): 117-120.

(收稿日期: 2017-11-19)