

放射性碘间接标记血管活性肠肽

王丽华 李俊玲 尹端 张蕾 张秀丽 汪勇先

【摘要】 目的 研究能有效降低体内脱碘的血管活性肠肽 (VIP) 的标记方法。方法 标记前体 *N*-琥珀酰亚胺-3-(三正丁基锡) 苯甲酸酯 (ATE), 得到中间体 *N*-琥珀酰亚胺-3- I^{125} 代苯甲酸酯 (S^{125} IB): 采用 Iodogen 方法进行放射性碘标记, 并考察一系列条件对标记率的影响。通过 Sep-Pak 硅胶柱分离得到产物 S^{125} IB, 于 4℃ 避光保存 2 d。标记率和稳定性通过薄层层析 (TLC) 方法测定。 S^{125} IB 与 VIP 的连接: S^{125} IB 与 VIP 直接混合得到产物 3- I^{125} 代苯甲酰化血管活性肠肽 (125 IBA-VIP)。以反相 TLC 测定其标记率。产物 125 IBA-VIP 经高效液相层析 (HPLC, RP C18 柱) 分离得到。三氯乙酸 (TCA) 沉淀法测定 125 IBA-VIP 的体外稳定性。体外生物活性分析通过与细胞株 SGC7901 的细胞结合实验测定。结果 前体标记结果。室温条件下, 氧化剂量约 10 μ g, n (ATE) : n (Na^{125} I) 为 3 ~ 8 : 1, 反应 5 min 标记率 > 96%。 S^{125} IB 在上述条件下较稳定, TLC 结果显示无明显的放射性杂质产生。 S^{125} IB 与 VIP 的连接。TLC 测定标记率 > 75%, HPLC 示 125 IBA-VIP 的保留时间 (t_R) 为 13.3 min, S^{125} IB 为 19.6 min, VIP 为 8.32 min。 125 IBA-VIP 的体外稳定性较好, 4℃ 保存 7 d 后, 无明显脱碘现象。细胞结合实验结果表明, 125 IBA-VIP 活性与 Iodogen 法直接标记得到的 125 FVIP 一致, 无明显生物活性损失。结论 以 ATE 为前体对 VIP 进行放射性碘标记, 解决了直接标记稳定性差、体内脱碘严重的问题, 为蛋白质及多肽的放射性卤标提供了一个有效途径。

【关键词】 肽类; 碘放射性同位素; 同位素标记

The indirect radioiodination of vasoactive intestinal peptide WANG Lihua, LI Junling, YIN Duanzhi, et al. Shanghai Institute of Nuclear Research, Shanghai 201800, China

【Abstract】 Objective To seek for an effective way to acquire radiolabeled vasoactive intestinal peptide (VIP) with excellent in vivo stability. *N*-succinimidyl-3-iodo-125-benzoate (S^{125} IB) came from radioiodination of *N*-succinimidyl-3-(tri-*n*-butylstannyl) benzoate (ATE) precursor and then conjugated with VIP to form 125 IBA-VIP. The labeling procedure was optimized; the in vitro stability and biological activity were evaluated in this study. **Methods** Radiolabeling of ATE precursor was achieved with iodogen oxidant and the influential factors were considered in this procedure. The labeling efficiency was determined by thin layer chromatography (TLC) and the purification was carried out by Sep-pak silica gel cartridge. The stability was detected by TLC after 2 h storage in dark at 4℃. Conjugation of S^{125} IB and VIP. The labeling efficiency was determined with RP TLC and the purification was carried out with high performance liquid chromatography (HPLC, RP C18 column). Trichloroacetic acid (TCA) precipitation method was applied to evaluate the in vitro stability while the biological activity was determined by cell binding experiments with SGC7901 cell lines. **Results** S^{125} IB experiments. The radioiodination of ATE was performed well for 5 min at 25℃ with 10 microgrammes of iodogen at suitable mole ratio (3 ~ 8 : 1) of ATE/ Na^{125} I, the labeling efficiency was about 96%. The stability was kept well at 4℃ in dark, no significant decrease of S^{125} IB was observed. The conjugation efficiency of S^{125} IB and VIP was above 75% with TLC. HPLC showed the different retention time (t_R) as follows, 125 IBA-VIP: 13.3 min, S^{125} IB: 19.6 min, VIP: 8.32 min. The stability of 125 IBA-VIP was better than 125 FVIP from direct radioiodination of VIP with iodogen oxidant, only 2.85% decrease was found after 7 d at 4℃. The biological activity of 125 IBA-VIP was kept as well as 125 FVIP under the condition of 37℃ 60 min. **Conclusions** The indirect radiolabeling procedure with ATE was an excellent and efficient way of radiohalogenation of VIP and even for other proteins and peptides. The labeling efficiency was high and the purification was easy to operate. The most important is the excellent in vitro stability plus biological activity of 125 IBA-VIP, which makes the clinical application practicable.

【Key words】 Peptides; Iodine radioisotopes; Isotope labeling

近年来,越来越多的生化和放射研究倾向于发展放射性标记多肽作为特异性配体与肿瘤相关受体结合。研究表明,大多数肿瘤细胞表达过量的血管

活性肠肽 (VIP) 受体^[1]。VIP 由 28 个氨基酸组成, 包含 2 个酪氨酸和 3 个赖氨酸, 可用于放射性卤素的直接和间接标记。直接标记方法简单有效, 但存在体内脱卤素问题^[2]。间接标记方法包括 Bolton-Hunter 试剂和 Wood 试剂, 由于在多肽分子中引入一

基金项目: 国际原子能机构 (IAEA) 基金资助项目 (9570/R0)

作者单位: 201800 中国科学院上海原子核研究所

个大分子而可能导致生物活性的部分丧失^[3]。为解决这些问题,标记 VIP 的中间配体成为一个重要课题,其中较有希望的是 *N*-琥珀酰亚胺-3-(三正丁基锡)苯甲酸酯(ATE)前体,其已成功用于 IgG 的放射性碘标记^[4]。笔者用 2 种方法进行实验,并对体外稳定性和生物活性进行了比较。

材料与方法

一、材料

VIP、Iodogen, Sigma; Na¹²⁵I (13.375 GBq/mL, 核纯度 > 99.95%), Amersham; 苯甲基磺酰氟 (PMSF), Amersco; ATE 由 Prof. Pozzi (Argentine) 提供; 甲醇和乙腈为色谱纯, 其他试剂均为国产分析纯。三乙胺甲酸盐 (TEAF) 的制备参考文献[5]: 体积分数为 50% 的甲酸与三乙胺中和制得, 稀释到 0.25 mol/L 备用。SGC7901 细胞株由中国科学院上海细胞生物学研究所提供, 培养基为 RPMI 1640。

二、方法

1. *N*-琥珀酰亚胺-3-*I*代苯甲酸酯 (SIB) 标准品的合成。向盛有含 1 g 间碘苯甲酸 (4 mL) 的甲苯溶液的烧瓶中加入 0.35 g 吡啶, 充分搅拌, 滴加 0.42 mL 草酰氯 (4.8 mmol, 0.61 g), 室温下搅拌 30 min。加热除去过量的草酰氯。冷却后加入 0.46 g *N*-羟基琥珀酰亚胺 (4 mL), 加热回流 30 min。所得溶液经硅胶柱分离, 薄层层析 (TLC) 测定其 R_f 值。作核磁共振谱和红外光谱鉴定。

2. 放射性碘标记 ATE 得到中间体 S¹²⁵IB 及最佳标记条件的选择。反应方程式见图 1。1 μL 无载体 Na¹²⁵I 均匀涂布在 1 mL 的玻璃小瓶内, 加入 50 μL ATE (0.2 mg/mL 氯仿) 和 60 μL Iodogen (0.33 mg/mL 二氯甲烷), 室温下搅拌 5 min, 所得溶液经 Sep-Pak 硅胶柱分离: 正己烷饱和后上样, 依次用 40 mL 正己烷、25 mL 质量分数为 8% 乙酸乙酯/正己烷和 12 mL 质量分数为 30% 乙酸乙酯/正己烷洗脱, 接收前 8 mL 质量分数为 30% 乙酸乙酯/正己烷的洗脱组分, N₂ 吹干后于黑暗处保存。将接收到的放射性产物用少量二氯甲烷溶解后行放射性 TLC (硅胶 GF₂₅₄, 质量分数为 30% 乙酸乙酯/正己烷) 分析。将吹干后的 S¹²⁵IB 置 4 ℃ 避光保存 2 d 后, 用放射性 TLC 检测放化纯度, 评价其稳定性。为得到最佳条件, 进行反应时间、Iodogen 用量及 ATE 与 Na¹²⁵I 物质的量比对标记率影响的实验。

3. VIP 与 S¹²⁵IB 联接得到最终标记产物 3-I⁽¹²⁵⁾D) 代苯甲酰化血管活性肠肽 (¹²⁵IBA-VIP) 及联接条件

的优化选择。反应方程式见图 1。S¹²⁵IB 溶解在 5 μL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 加入 5 μL VIP (5 mg/mL, 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 值 8.5) 后室温下搅拌反应 20 min。所得反应溶液用高效液相色谱 (HPLC) 分离 [Vydac C18, 线性梯度: V(TEAF) V(乙腈) = 74 26 ~ 60 40, 流速 1 mL/min, 30 min], 紫外线 280 nm 检测和 FGD-101 射线流式探测仪探测, 收集第 1 个放射性峰组分。¹²⁵IBA-VIP 的放化纯度用放射性 TLC [硅胶 GF₂₅₄, V(正丁醇) V(吡啶) V(乙酸) V(水) = 30 20 6 4] 进行测定。反应条件的优化选择考察反应时间、VIP 与 S¹²⁵IB 的物质的量比对反应的影响。

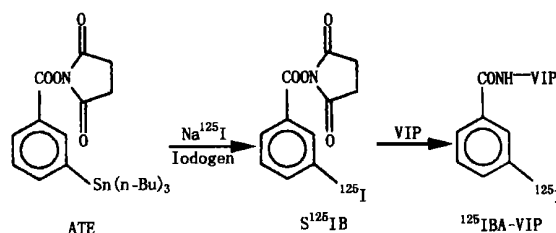


图 1 标记反应方程式

4. ¹²⁵IBA-VIP 的体外稳定性评价。采用三氯乙酸 (TCA) 沉淀法^[1,6]。将 ¹²⁵IBA-VIP 稀释在含质量分数 5% BSA 和 1.92 mmol/L PMSF 的 PB (0.05 mol/L, pH 值 7.5) 中, 4 ℃ 保存。TCA 法分别评价其放置 4 和 7 d 后的稳定性。取一定量 ¹²⁵IBA-VIP 的储存液 [(2~3) × 10⁴ 计数/min] 加入预冷的 TCA, 混匀后离心 (3 500 × g, 5 min, 4 ℃) 弃去上清液, 预冷缓冲液洗涤 (2 × 1 mL), 测沉淀物的放射性, 并计算其与总放射性的比值 (N)。通过 N 值下降的百分数评价其稳定性。以 Iodogen 法直接标记得到的 ¹²⁵FVIP 作为参照物进行比较 (直接标记工作另文报道)。

5. ¹²⁵IBA-VIP 的体外生物活性评价。采用细胞结合实验^[7]。A 组管中依次加入 SGC7901 细胞 (5 × 10⁶ 个/管) 200 μL 和 10 ~ 200 μL ¹²⁵IBA-VIP 贮存液 [(3~4) × 10⁴ 计数/min], 此为总结合管 (TB)。B 组中另加入未标记的 VIP (约为 ¹²⁵IBA-VIP 的 10⁴ 倍), 此为非特异性结合管 (NSB)。以缓冲液补足终反应体积至 400 μL, 于 37 ℃ 保温 60 min 后离心 (3 500 × g, 5 min, 4 ℃), 弃去上清液, 沉淀物用预冷缓冲液洗涤 (3 × 1 mL) 并测定其放射性。特异性结合 (SB) 放射性由 TB 减去 NSB 得到。对 Iodogen 法直接标记得到的 ¹²⁵FVIP 同法进行评价, 两者进行比较。

结 果

1. S¹²⁵IB 标准品的合成。合成得到 0.86 g 白色

固体,产率 65%。TLC 测定其 Rf 值为 0.23。经核磁共振和红外光谱鉴定为目标产物 SIB。¹H NMR (CDCl₃,) : 2.95 (s, 4H, —CO—CH₂CH₂—CO—), 7.24 (t, ¹H, C4—H), 8.01 (d, 1H, C5—H), 8.16 (d, 1H, C6—H), 8.50 (s, 1H, C2—H); IR (KBr) _{max} (cm⁻¹) : 1770, 1733, 1596, 1563, 1471, 1421, 1413, 1214, 1072, 994, 730, 603。

2. S¹²⁵I B 标记及最佳条件的选择。经放射性 TLC 测定,主要放射性产物的 Rf 值为 0.23,与 SIB 一致,表明为 S¹²⁵I B;未观察到明显的 ATE 和 Na¹²⁵I 存在(参照物 Na¹²⁵I 的 Rf 值为 0,ATE 的 Rf 值为 0.50),标记率为 96%。反应 5 和 15 min 的标记率分别为 96%和 97%,无明显差异,我们选择 5 min 为最佳反应时间以减少可能的副反应。当 Iodogen 的用量为 7 μg,ATE 与 Na¹²⁵I 的物质的量比分别为 0.2、1.0、3.3、5.5、8.2、12.3 和 24.6 时,S¹²⁵I B 的标记率分别为 86%、87%、94%、96%、94%、87%和 86%;当 ATE 与 Na¹²⁵I 的物质的量比为 6:1,Iodogen 的用量分别为 6.9、9.6 和 13.8 μg 时,标记率分别为 93%、94%和 96%。S¹²⁵I B 的最佳标记条件为:ATE 与 Na¹²⁵I 物质的量比为 6:1,Iodogen 用量为 10 μg,室温反应 5 min,此时标记率可达 96%。

3. ¹²⁵I BA-VIP 及其联接条件的优化选择。经 TLC 测定,¹²⁵I BA-VIP Rf = 0,标记率 75.2%,参照物 S¹²⁵I B Rf = 0.9,含量 24.8%,未见其他明显放射性杂质。0℃和室温(20℃左右)时联结效率基本一致,温度对反应影响不大。在室温和 VIP 大大过量条件下,当反应时间为 15、30 和 45 min 时,VIP 和 S¹²⁵I B 的联接效率分别为 70.2%、75.2%和 66.1%,据此我们选择 15 min 为最佳反应时间。此外我们还尝试加适量的 SIB 载体使得 VIP 和 SIB (S¹²⁵I B) 的物质的量比在 1:1 左右,结果发现,在其他反应条件一致的情况下,加载体使得联接效率较大程度下降,加和不加载体分别为 54%和 70%~75%,故一般控制 VIP 过量 10 倍左右。

4. ¹²⁵I BA-VIP 的体外稳定性。4 和 7 d 后 N 值降低,分别为放射性碘间接标记产物¹²⁵I BA-VIP 2.85%、3.24%,放射性碘直接标记产物¹²⁵I FVIP 23.93%、31.40%。前者较后者有较大幅度的改善,提示放射性碘标记物有良好的临床应用前景。

5. ¹²⁵I BA-VIP 的体外生物活性评价。细胞结合实验结果表明,¹²⁵I BA-VIP 和¹²⁵I FVIP 的 SB/NSB 分别为 21.7%和 20.7%,两者生物活性无明显差异。

讨 论

多肽为目前核医学显像剂研究前沿。近年来有关 VIP 标记及应用的研究颇多,为解决放射性碘直接标记存在的体内脱碘问题,学者们研究了用多种中间体对 VIP 进行间接标记,希望能提高稳定性而又不影响其生物活性。本研究采用 ATE 前体对 VIP 进行标记得到¹²⁵I BA-VIP,初步结果表明达到了预期目的。¹²⁵I BA-VIP 经 2 步反应制得,经 HPLC 分离,累积标记率约 72% (96% × 75%)。质量控制初步结果表明其符合临床显像要求,生物活性保持较好且稳定性有较大幅度提高,故有望成为一种肿瘤显像剂。本研究也为蛋白质和多肽的放射性卤素标记提供了一种有效方法。

本研究结果表明,由于前体 ATE 和中间配体 S¹²⁵I B 的性质与 VIP、Na¹²⁵I 放射源等体系性质的差别,反应中溶剂的选择至关重要。在 ATE 标记中,笔者观察了质量分数为 5% EtOAc/CH₃OH 和 CHCl₃ 2 种溶剂对反应的影响,未发现对标记率有明显影响。但前者由于沸点高(EtOAc 沸点 88℃,CH₃OH 65℃),难以挥发,使得分离较为困难,所以本研究选用 CHCl₃ (沸点 61℃) 作为溶剂。由于 Na¹²⁵I 溶液与 CHCl₃ 不互溶,Na¹²⁵I 在管壁上附着成滴,很难与有机相中的 ATE 充分反应。我们预先将 Na¹²⁵I 涂在壁上形成一层均匀的薄膜,以提高 Na¹²⁵I 的利用率。结果表明,Na¹²⁵I 的利用率由最初的 20% 提高到 88%。后一步的联接反应中,我们使用了 N,N-二甲基甲酰胺(DMF,二乙胺调 pH 值 8.5)和硼酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 值 8.5)作为溶剂。单纯使用 DMF 溶剂时 SIB 与 VIP 联接失败。反应温度对联结影响的实验表明,0℃下即能较好地实现两者的联接,实验对温度的要求较低。而 Iodogen 法直接标记,则需在 25℃下反应 30 min。

细胞结合实验评价¹²⁵I BA-VIP 的生物活性时,SB/TB 值偏低,仅 21.7%,原因可能是实验所用的 SGC7901 细胞株表达的 VIP 受体密度不高,导致 NSB 过高所致。

参 考 文 献

- Virgolino I, Kurtaran A, Raderer M, et al. Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy. J Nucl Med, 1995, 36: 1732-1739.
- Koziorowski J, Henssen C, Weinreich R. A new convenient route to radioiodinated N-succinimidyl 3- and 4-iodobenzoate, two reagents for radioiodination of proteins. Appl Radiat Isot, 1998, 49: 955-959.
- Scott WD. Radiohalogenation of proteins: an overview of radionuclides, lar-

beling methods, and reagents for conjugate labeling. Bioconjugate Chem, 1992, 3: 433-470.

4 Zalutsky MR, Narula AS. A method for the radiohalogenation of protein resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine. Appl Radiat Isot, 1987, 38: 1051-1055.

5 Alexander ER, Wildman RB. Studies on the mechanism of the Leuckart reaction. J Am Chem Soc, 1948, 70: 1187.

6 Markwell MA. A new solid-state reagent to iodinate proteins. I. Conditions for the efficient labeling of antiserum. Anal Biochem, 1982, 125: 427-432.

7 Ottaway CA, Bernaerts C, Chan B, et al. Specific binding of vasoactive intestinal peptide to human circulating mononuclear cells. Can J Physiol Pharmacol, 1983, 61: 664-671.

(收稿日期:2001-10-15)

· 论著摘要 ·

定量分析评价 180° 与 360° 采集对心肌显像图的影响

李剑明 裴著果

笔者应用定量分析方法探讨了 180° 与 360° 采集方式对心肌断层显像的影响,现报道如下。

一、资料与方法

1. 临床资料。正常者 15 例,男 8 例,女 7 例,年龄(45.3 ± 5.6)岁;冠心病患者 12 例,男 9 例,女 3 例,年龄(55.6 ± 6.4)岁。

2. 方法。采用 Toshiba 7200-A/DI 双探头 SPECT 仪。受检者于注射^{99m}Tc-甲氧基异丁基异腈(MIBI) 555 ~ 740 MBq 后 1.5 ~ 2 h 行静息心肌断层显像,采集矩阵为 128 × 128,20 ~ 30 s/帧,6°/帧,共 60 帧。采集完毕后,分别行 360° 和 180° (左后斜位 45° ~ 右前斜位 45°)滤波反投影(FBP)图像重建。在对照组中制成 360° 和 180° 2 种条件下的原始靶心图和两者的相减靶心图(图 1),计算靶心图各区域的平均摄取比值。将左室壁分成 9 个节段,按本科常规诊断标准计算 2 种重建条件下冠心病组病变节段的检出率(病变节段/总节段数)。

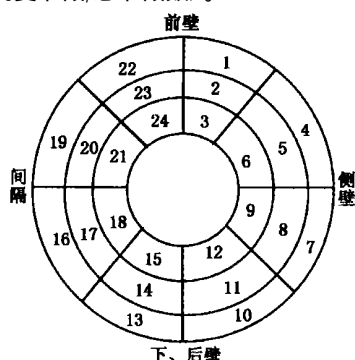


图 1 靶心图分区示意图

3. 统计学处理。对照组 2 种条件下

原始靶心图相应区域的平均摄取比值用 *t* 检验。

二、结果与讨论

对照组 360° 与 180° 原始靶心图各区域平均摄取比值结果表明:左室前壁靠近侧壁 2 个区域、后壁 1 个区域、后侧壁 2 个区域、间隔 3 个区域的平均放射性摄取比值差异有显著性 ($P < 0.05$),其比值分别为 0.69 ± 0.10、0.67 ± 0.08(区位 1, $t = 2.619$), 0.92 ± 0.30、0.87 ± 0.03(区位 2, $t = 9.979$); 0.81 ± 0.06、0.63 ± 0.07(区位 10, $t = 7.981$); 0.92 ± 0.06、0.95 ± 0.04(区位 8, $t = -2.713$), 0.65 ± 0.11、0.82 ± 0.06(区位 9, $t = -5.579$); 0.78 ± 0.08、0.81 ± 0.06(区位 18, $t = -2.458$), 0.46 ± 0.16、0.50 ± 0.13(区位 19, $t = -3.578$), 0.83 ± 0.08、0.90 ± 0.05(区位 20, $t = -5.383$)。其他区域平均放射性摄取比值差异无显著性 ($P > 0.05$)。相减靶心图上可见上述有差异的区域有明显的色阶存留。冠心病组共有心肌节段 108 个,360° 重建图像检出病变节段数为 29 个(26.9%);180° 重建图像检出的病变节段数为 25 个(23.1%),与 360° 重建图像相比,其漏检的 4 个节段 3 个位于前间壁,1 个位于下壁,其他检出节段两者相同。

本研究利用 360° 采集数据,选择 180° 重建,这样完全可以代表 180° 采集重建^[1],既可节约采集时间和方便检查者,又可避免 2 次采集时放射性衰减的影响。Knesaurek 等^[2]研究发现:由于非均匀性衰减且未被补偿,360° 采集与 180° 采集的心肌图像放射性分布有很多区域不一致,本研究亦发现此种情况。Araujo 等^[3]研究发现,360° 采集前壁的放射性摄取较 180° 时高,而间隔处放射性摄取却

相反,本研究结果与其基本一致。如对 180° 和 360° 采集图像进行非均匀性衰减校正,180° 与 360° 图像上左室各壁的放射性分布几乎一致,故其计数密度差别主要由于非均匀性衰减且未进行校正所致。本研究虽然 2 种角度重建后图像上有 8 个区域的放射性摄取比值发生变化,但两者在冠心病组中对病变节段的判断一致性较好,病变检出率有较好的可比性(29/108 个,25/108 个)。这可能因为本研究所选患者均为典型冠心病患者,病变节段缺血明显,故即使 2 种条件下定量分析所示部分心肌节段摄取比值有差异,但对病变节段的判断影响不大。

本研究结果表明,360° 与 180° 采集后,靶心图定量分析提示在左室前壁、后侧壁、间隔局部等部位的放射性分布有差异,这与采集角度有关。这 2 种采集方式对病变节段的检出及定位有较好的可比性,但对病变节段程度估计的影响仍需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Bax JJ, Visser FC, Lingens AV, et al. Comparison between 360° and 180° data sampling in ²⁰¹Tl rest-redistribution single-photon emission tomography to predict functional recovery after revascularization. Eur J Nucl Med, 1997, 24: 516-522.
- 2 Knesaurek K, King MA, Glick SJ, et al. Investigation of causes of geometric distortion in 180° and 360° angular sampling in SPECT. J Nucl Med, 1989, 30: 1666-1675.
- 3 Araujo LI, Jimenez-Hoyuela JM, McClellan JR, et al. Improved uniformity in tomographic myocardial perfusion imaging with attenuation correction and enhanced acquisition and processing. J Nucl Med, 2000, 41: 1139-1144.

(收稿日期:2001-09-24)

作者单位:110003 沈阳,中国医科大学第二临床学院核医学科