

· 论 著 ·

$^{99}\text{Tc}^m$ 标记 Gd-DTPA-DG 及其在裸鼠体内的生物分布*

黄占文, 张 伟, 陈 跃 Δ

(泸州医学院附属医院核医学科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨钆($^{99}\text{Tc}^m$)标记顺磁性脱氧葡萄糖类 MRI 对比剂二乙三胺五乙酸-脱氧葡萄糖钆盐(Gd-DTPA-DG)的稳定性及在荷瘤裸鼠体内的生物分布,寻找一种核素与磁共振双模式影像探针。方法 对 Gd-DTPA-DG 进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记,并对需要的 Gd-DTPA-DG、氯化亚锡($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)用量, pH, 温度采用正交实验设计,确定最佳标记条件。采用薄层纸层析法(TLC)分析标记率,体外放置 6 h,观察标记物的稳定性。将标记的 $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG 注入裸鼠体内,10、30 min 及 1、2、4、24 h 后断头处死裸鼠,测定血液、心脏、脑、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、肌肉、肿瘤中的每克组织百分注射剂量率(%ID/g)。结果 取 10 mg Gd-DTPA-DG、0.6 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,在 pH 值小于 2 时加入新淋洗的 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4$ 洗脱液(37 MBq),沸水反应 30 min 所得 $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG 放化纯度最高,可达 98.5%,体外放置 6 h,放化纯度仍大于 96%。尾静脉注射 $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG 2 h 后,裸鼠肿瘤组织的摄取率约为(1.48±0.12)%ID/g,肿瘤与肌肉的放射性摄取比(T/NT)达 2.91。结论 采用放射性核素 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记顺磁性对比剂 Gd-DTPA-DG 简单易行;荷瘤裸鼠模型显示其具有良好的肿瘤靶向性,有望成为一种极具发展潜力的新型单光子发射计算机断层显像(SPECT)-MRI 双模式影像探针。

关键词:钆;放射性核素显像;肿瘤;分子影像;二乙三胺五乙酸-脱氧葡萄糖钆盐;双模式影像探针

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)08-0746-03

Radio-labeling of Gd-DTPA-DG with $^{99}\text{Tc}^m$ and its biodistribution in nude mice*

Huang Zhanwen, Zhang Wei, Chen Yue Δ

(Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To observe the stability and biodistribution of $^{99}\text{Tc}^m$ radio-labeled a paramagnetic deoxy-glucose-type MR contrast agent diethylenetriamine pentaacetic acid-gadolinium salt deoxy-glucose(Gd-DTPA-DG) in tumor-bearing nude mice in vivo. **Methods** To form $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG, the labelling conditions such as Gd-DTPA-DG quality, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dosage, the reaction medium pH value and reaction temperature were optimized by orthogonal experimental design. The radio-labeling efficiency was measured by thin layer chromatography(TLC). The bio-distribution was observed by the tumor and other major organs were taken out from nude mice at 10, 30 min and 1, 2, 4, 24 h respectively after caudal vein injection of $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG. **Results** When taking 10 mg Gd-DTPA-DG, 0.6 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH<2, adding 37 MBq $\text{Na}^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4$, then reacting in boiling water for 30 min, the radiochemical purity of $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG can reach to 98.5% and remain 96.2% placed at room temperature for 6 h. $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG accumulated in the tumor to a higher level than other organ at 2 h, the uptake was about (1.48±0.12)%ID/g, and the radio-uptake ratio of tumor to muscle(T/NT) was reached 2.91. **Conclusion** $^{99}\text{Tc}^m$ labeled the paramagnetic MR contrast agent Gd-DTPA-DG is feasible. The labeled agent shows excellent tumor targeting in nude mice in vivo. $^{99}\text{Tc}^m$ -Gd-DTPA-DG is potential for a SPECT(single photon emission computed tomography)-MRI dual-modality imaging probes.

Key words: technetium; radionuclide imaging; tumor; molecular imaging; Gd-DTPA-DG; dual-modality imaging probes

肿瘤靶向成像是近年来分子影像学研究的热点之一^[1-2]。分子影像学就是致力于采用非侵袭性手段来鉴别正常细胞与非正常细胞在早期病理结构发生改变之前的特征性生物标志物的变化。对于隐匿性生物标志物的检测,在肿瘤当中,只要要求高灵敏度的探测器使用低分辨率的扫描技术,但要定量判断和定性这些肿瘤组织的病理学特征必须要高清晰度的成像。核医学显像可以高度灵敏的检测这些微量生物标志物,但是这些技术与磁共振成像相比,分辨率就逊色得多^[3]。而多学科交融的双模式、多模式影像探针提供了一个全新的研究角度,国外已有相关报道^[4-8],而国内对此类多模式影像探针研究尚少。本课题前期研究发现,钆($^{99}\text{Tc}^m$)标记二乙三胺五乙酸-脱氧葡萄糖(DTPA-DG)能够参与多种肿瘤细胞增殖,反映细胞核活

性,并可用于早期探测肿瘤病灶及化疗效果评价^[9-11];钆离子(Gd^{3+})具有很强的顺磁作用,在磁共振对比剂中应用最多,若能把 Gd^{3+} 同 DTPA-DG 结合并进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记,将会是一种很有发展潜力的双模式影像探针。本研究拟在二乙三胺五乙酸-脱氧葡萄糖钆盐(Gd-DTPA-DG)的基础上,对其进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记,确定最佳标记反应条件,观察其在裸鼠体内的生物分布情况,并探讨其作为一种双模式影像探针的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)3 周龄雄性 BalB/c 裸鼠 24 只,体质量(18±3)g, SPF 三级,由四川大学实验动物中心提供;(2)实验材料为氯化亚锡($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,成都科龙化工试剂厂生产)、胰蛋白酶(北京博奥森生物技术有限公司生产)、DMEM 培养基(GIB-

CO/BRL 公司生产)、小牛血清(郑州佰安生物工程有限公司生产)、胰酶和青霉素链霉素双抗(GIBCO/BRL 公司生产)、新华 1 号层析纸(杭州新华纸业公司生产)、⁹⁹Mo-⁹⁹Tc^m 发生器(北京原子高科股份有限公司生产)、人宫颈癌 Hela 细胞株(泸州医学院附属医院中心实验室提供)等;(3)主要实验仪器为 Mini-Scan TLC Scanner 薄层放射性扫描仪(美国 BIOSCAN 公司生产)、CRC-15R 活度计(美国 Capintec 公司生产)、AB204-S 电子分析天平(瑞士梅特勒公司生产)、DL-6M 大容量低速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司生产)、隔水式电热恒温培养箱(上海医疗器械七厂生产)、TC23233 二氧化碳培养箱(美国 SHELLAB 生产)、超净操作台(苏州安泰空气技术有限公司生产)等。

1.2 方法

1.2.1 ⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 的标记 (1)反应介质 pH 值对放化纯度和标记率的影响:取 8 个洁净的西林瓶,每瓶中依次加入 10 mg Gd-DTPA-DG,0.6 mg SnCl₂·2H₂O,然后分别用 0.1 mmol/L HCl 及 0.1 mmol/L NaOH 调节各反应液的 pH 值为 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,控制溶液体积为 2 mL,再加入 0.2 mL Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液(37 MBq),沸水反应 30 min 即得⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG,测定其放化纯度和标记率;(2)还原剂 SnCl₂·2H₂O 的用量对放化纯度和标记率的影响:取 6 个洁净的西林瓶,每瓶加入 10 mg Gd-DTPA-DG,然后分别加入 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mg 的 SnCl₂·2H₂O,用 0.1 mmol/L HCl 调节 pH 值为 2.0,控制溶液为 2 mL,再加入 0.2 mL Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液(37 MBq),沸水反应 30 min 即得⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG,测定其放化纯度和标记率;(3)反应温度对放化纯度和标记率的影响:取 8 个洁净的西林瓶,每瓶中加入 10 mg 的 Gd-DTPA-DG,然后分别加入 0.6 mg SnCl₂·2H₂O、0.1 mmol/L HCl 调节 pH 值为 2.0,控制溶液为 2 mL,再加入 0.2 mL Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液(37 MBq),分别于 30、40、50、60、70、80、90、100 °C 反应 30 min 即得⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG,放化纯度和标记率。

1.2.2 ⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 标记率的测定 采用薄层纸层析法(TLC),新华 1 号(1 cm×20 cm)层析纸为支持物,距离下缘 1 cm 处用毛细管点样,自然晾干后分别以生理盐水和丙酮为展开剂,在层析缸中上行展开 10 cm 后,终止,晾干,按照操作说明书在薄层放射性扫描仪上测定标记率。

1.2.3 ⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 的体外稳定性 将新制备的⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 置于室温下,不同时间取样分析,测定⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 在室温下的存放稳定性,以便为临床用药提供指导,由于⁹⁹Tc^m的半衰期为 6 h,故只测定反应后 6 h 内的稳定性。

1.2.4 小鼠体内分布 取昆明小鼠 30 只,随机分成 6 组,每组 5 只。经尾静脉注射 0.1 mL 约 1.85 MBq ⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 后,于 10、30 min 及 1、2、4、24 h 断头处死小鼠。取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、骨、血液,称重后用 γ 计数器测定放射性计数,并计算每克脏器的放射性计数占注入剂量的百分数(%ID/g)。

2 结果

2.1 标记反应的条件优化 当 Gd-DTPA-DG 用量为 10 mg 时,保持 SnCl₂·2H₂O 用量及其他因素不变,放化纯度和标记率在温度为 70 °C 以上时逐渐增高,达 85% 以上;至 90 °C 时反

应达高峰,在 90~100 °C 时反应变化不大,最高可达 98.5% (图 1)。随着 SnCl₂·2H₂O 用量的增加,⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 的放化纯度和标记率迅速增加。SnCl₂·2H₂O 用量在 0.4~0.6 mg 时,⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 的放化纯度和标记率略有上升,当 SnCl₂·2H₂O 用量达到 0.6 mg 时,⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 的放化纯度和标记率已达到 98% 以上(图 2)。当 SnCl₂·2H₂O 用量超过 0.7 mg 或低于 0.3 mg 时,⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 的放化纯和标记率开始下降。本实验中,采用的 SnCl₂·2H₂O 用量为 0.6 mg。反应体系在太酸和中性及碱性溶液中放化纯及标记率不高,尤其在 pH>7 时,已降到 42% 以下,pH<5~>1.5 时,反应体系放化纯度及标记率逐渐增加,在 pH 为 1.5~2.0 时达最高值(95.5%),见图 3。

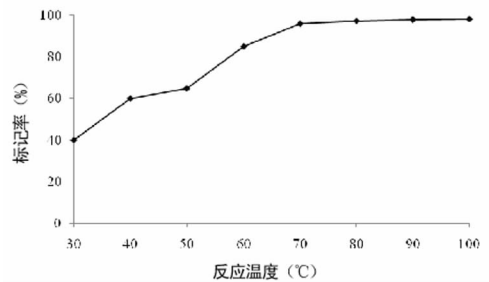


图 1 不同反应温度对⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 标记率的影响

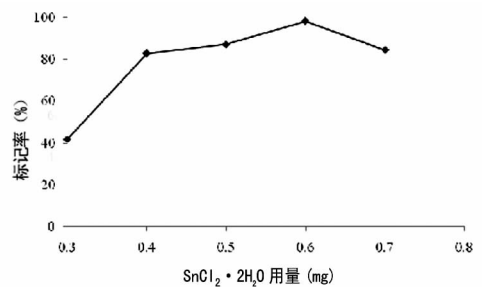


图 2 不同 SnCl₂·2H₂O 用量对⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 标记率的影响

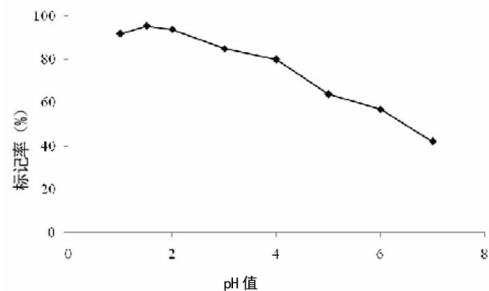


图 3 不同 pH 值对⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 标记率的影响

2.2 ⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 放化纯度及稳定性 在丙酮展开体系中,⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 和水解还原⁹⁹Tc^mO₂的 Rf 为 0~0.1,游离⁹⁹Tc^mO₄的 Rf 为 0.9~1.0;在生理盐水展开体系中,⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 和游离⁹⁹Tc^mO₄的 Rf 为 0.9~1.0,水解还原⁹⁹Tc^mO₂的 Rf 为 0~0.1。据此计算得⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 的放化纯度大于 98%。标记物在室温放置 6 h,放化纯度大于 96%。

2.3 ⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 在荷瘤裸鼠体内的分布 注射⁹⁹Tc^m-Gd-DTPA-DG 从 10 min 到 2 h 内均显示出较高的肿瘤

表 1 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Gd-DTPA-DG}$ 在荷瘤裸鼠体内的生物分布($\bar{x}\pm s, \%ID/g, n=5$)

组织	10 min	30 min	1 h	2 h	4 h	24 h
血液	10.61±4.28	2.52±0.12	1.93±0.39	1.20±0.15	0.49±0.05	0.30±0.02
心脏	2.72±0.22	0.63±0.06	0.67±0.02	0.94±0.03	0.21±0.02	0.16±0.01
脑	0.36±0.07	0.20±0.01	0.16±0.02	0.14±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01
肺脏	6.29±23.7	1.75±0.28	1.47±0.37	1.46±0.60	0.40±0.02	0.17±0.02
肾脏	16.01±6.17	11.27±2.35	9.32±2.27	3.54±1.76	2.61±0.68	0.42±0.21
脾脏	2.25±0.14	1.10±0.34	0.94±0.31	0.86±0.24	0.33±0.04	0.20±0.02
肝脏	3.01±0.52	1.04±0.21	1.01±0.34	1.41±0.37	0.74±0.03	0.36±0.03
肌肉	4.86±1.51	2.59±0.45	1.20±0.11	0.51±0.08	0.36±0.02	0.24±0.08
小肠	1.96±0.19	0.96±0.04	0.97±0.08	0.67±0.05	0.34±0.05	0.12±0.12
肿瘤	6.53±1.45	3.51±0.86	2.58±0.56	1.48±0.12	0.63±0.08	0.29±0.06

摄取,分别达(6.53±1.45)、(3.51±0.86)、(2.58±0.56)、(1.48±0.12)%ID/g(表1)。肾脏中的放射性较高,而肝脏、脾脏及小肠中放射性摄取不高,这可能是由于 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Gd-DTPA-DG}$ 是非胶体显像剂,其主要排泄途径是经泌尿系统排出体外。脑组织中放射性分布最低,最高仅为(0.36±0.07)%ID/g,其他各脏器的放射性摄取值随着时间的推移逐渐减小,在给药24h后几乎已经接近本底;而肿瘤中的放射性摄取值从30min至4h均明显高于血液、肺脏、肌肉、脑等组织,在注射2h后,肿瘤与肌肉的放射性摄取比(T/NT)最高,达2.91,表明 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Gd-DTPA-DG}$ 的肿瘤靶向性较好。

3 讨论

$^{99}\text{Tc}^m$ 标记Gd-DTPA-DG简便易得,标记率高,稳定性好。裸鼠体内分布实验表明其具有良好的肿瘤靶向性。 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 还原标记中, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 起着很重要的作用, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 过少,影响还原 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 的能力,使游离的高锝酸增加,放化纯度和标记率偏低; $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 过多,则容易反应生成胶体,导致放化纯度和标记率降低。其原因可能与 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 在偏酸的体系中比较稳定及配体Gd-DTPA-DG本身偏碱性有关。结果显示,肾脏中的放射性较高,而肝脏、脾脏及小肠中放射性摄取不高,可能是由于 $^{99}\text{Tc}^m\text{-Gd-DTPA-DG}$ 是非胶体显像剂,其主要排泄途径是经泌尿系统排出体外。这可能是由于Gd-DTPA-DG为水溶性分子,其相对分子质量较FDG大,不易通过血脑屏障。作为一种脱氧葡萄糖类顺磁性对比剂,Gd-DTPA-DG已在磁共振上显示出一定的肿瘤强化价值^[12], $^{99}\text{Tc}^m$ 标记有望使其成为一种能同时应用于MRI和单光子发射计算机断层显像(SPECT)检查的双模式影像探针,将进一步提高肿瘤的诊断效率。

参考文献:

- [1] Kennedy DC, Duguay DR, Tay LL, et al. SERS detection and boron delivery to cancer cells using carborane labelled nanoparticles[J]. Chem Commun (Camb), 2009, 28(44): 6750-6752.
- [2] Wadas TJ, Deng H, Sprague JE, et al. Targeting the alphavbeta 3 integrin for small-animal PET/CT of osteolytic bone metastases[J]. J Nucl Med, 2009, 50(11): 1873-1880.
- [3] Medarova Z, Rashkovetsky L, Pantazopoulos P, et al. Multiparametric monitoring of tumor response to chemo-

therapy by noninvasive imaging[J]. Cancer Res, 2009, 69(3): 1182-1189.

- [4] Lee S, Chen X. Dual-modality probes for in vivo molecular imaging[J]. Mol Imaging, 2009, 8(2): 87-100.
- [5] Lijowski M, Caruthers S, Hu G, et al. High sensitivity, high-resolution SPECT-CT/MR molecular imaging of angiogenesis in the Vx2 model[J]. Invest Radiol, 2009, 44(1): 15-22.
- [6] Ogawa M, Regino CA, Seidel J, et al. Dual-modality molecular imaging using antibodies labeled with activatable fluorescence and a radionuclide for specific and quantitative targeted cancer detection[J]. Bioconjug Chem, 2009, 20(11): 2177-2184.
- [7] Sampath L, Kwon S, Ke S, et al. Dual-labeled trastuzumab-based imaging agent for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in breast cancer[J]. J Nucl Med, 2007, 48(9): 1501-1510.
- [8] Liu S, Jia B, Qiao R, et al. A novel type of dual-modality molecular probe for MR and nuclear imaging of tumor; preparation, characterization and in vivo application[J]. Mol Pharm, 2009, 6(4): 1074-1082.
- [9] Chen Y, Huang ZW, He L, et al. Synthesis and evaluation of a technetium-99m-labeled diethylenetriaminepentaacetate-deoxyglucose complex ($^{99}\text{Tc}^m$]-DTPA-DG) as a potential imaging modality for tumors[J]. Appl Radiat Isot, 2006, 64(3): 342-347.
- [10] Chen Y, Xiong Q, Yang X, et al. Noninvasive scintigraphic detection of tumor with $^{99}\text{Tc}^m\text{-DTPA-deoxyglucose}$; an experimental study[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 22(3): 403-405.
- [11] Liang J, Chen Y, Huang Z, et al. Early chemotherapy response evaluation in tumors by $^{99}\text{Tc}^m\text{-DTPA-DG}$ [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(3): 363-370.
- [12] 黄古文, 张伟, 陈跃, 等. 磁共振对比剂 Gd-DTPA-DG 的制备及动物实验研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(21): 2866-2868.