

游离 ^{125}I 与血浆蛋白的结合及其对血药浓度测定的影响

吴雅卿, 钱 隽, 朱建华
(复旦大学药学院, 上海 200032)

摘要 通过体内、外实验, 研究了游离 ^{125}I 与血浆蛋白的结合及其在三氯乙酸(TCA)沉淀后的沉淀百分率, 并与 ^{125}I -RGD-Sak 在 SD 大鼠中不同时间血药浓度的结果进行了比较. 结果表明, 游离 ^{125}I 能与血浆蛋白结合, 并为 TCA 所沉淀, 且在一定范围内, 游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉淀百分率与温育时间及游离 ^{125}I 的活度无关. 体内、外实验中, 游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉淀百分率分别为 $(1.26 \pm 0.14)\%$ 及 $(1.38 \pm 0.33)\%$. 沉淀物中含有吸附在沉淀物表面的游离 ^{125}I , 该吸附需要用 TCA 沉淀 2 ~ 3 次才能去除. 采用 ^{125}I 核素示踪法进行生物类制品的药代动力学研究时, 应对游离 ^{125}I 的影响进行校正.

关键词 游离 ^{125}I ; 药代动力学; 血浆蛋白结合; 血药浓度

中图分类号 O657.4

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)10-1959-04

^{125}I 标记药物进入生物体内后, 随着时间的延长和体内生理条件的影响会产生脱碘现象. 直接抽取活体血液进行放射性活度监测, 其结果并不能直接反映药物的血药浓度. 因此, 在进行此类生物制品的药代动力学研究时, 须对标记药物和在体内脱落下来的游离碘进行分离. 常用的分离方法为三氯乙酸沉淀法^[1,2]. TCA 能够特异性地沉淀蛋白质, 而游离碘则残留在溶液中. 理论上, 监测沉淀部分放射性, 结合标记物的比活度, 可客观地计算出标记药物在组织及血浆中的浓度, 但是实际上体内的游离碘也有可能影响沉淀部分的放射性计数率. 据文献[3]报道, 体内的游离碘有 8% ~ 57% 浓聚在甲状腺中, 其余的游离 ^{125}I 分布在血液及其它组织中. 血液中的游离 ^{125}I 部分以氢键的形式与血浆蛋白结合, 并同样有可能被 TCA 所沉淀.

本文讨论了游离 ^{125}I 与血浆蛋白的结合及其对血药浓度测定的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Na^{125}I 溶液(成都中核高通同位素股份有限公司); 三氯乙酸(TCA, 国产分析纯); ^{125}I -Trail(肿瘤坏死因子相关诱导配体蛋白, 本室标记); ^{125}I -RGD-Sak(重组 RGD 葡激酶, 本室标记).

γ -计数器: SN-695 型, 上海应用物理研究所日环仪器厂. 实验动物 Sprague-Dawley(SD)大鼠, 普通级, 由复旦大学实验动物中心提供.

1.2 实验过程

1.2.1 TCA 沉淀次数对 ^{125}I 标记蛋白沉淀百分率的影响 分别取 20 管, 每管 $50\ \mu\text{L}$ ^{125}I -Trail, 每管放射性计数率约为 17000 count/min, 标记物的放化纯度约为 95%, 在 γ -计数器上测量放射性计数率. 然后重复下列步骤 3 次: 加入 0.5 mL 质量分数为 10% 的 TCA, 混匀, 用台式离心机(3000 r/min)离心 3 min, 弃去上层清液, 测定沉淀标记蛋白的放射性计数率并比较各次沉淀所得结果.

1.2.2 体外游离 ^{125}I 与血浆蛋白的结合 每管取血浆蛋白 $50\ \mu\text{L}$, 加入一定量的 Na^{125}I 溶液, 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 温育, 分别考察温育时间($n=3$)、加入 Na^{125}I 的放射性活度($n=5$)及 TCA 沉淀次数($n=5$)对游离

收稿日期: 2008-02-28.

基金项目: 国家“九七三”计划(批准号: 2007CB935800)资助.

联系人简介: 朱建华, 男, 教授, 主要从事放射性药物研究. E-mail: jhzhu@shmu.edu.cn

^{125}I 与血浆蛋白结合的影响.

1.2.3 体内游离 ^{125}I 与血浆蛋白的结合 正常 SD 大鼠 5 只[体重(220 ± 30) g], 每只大鼠事先向腹腔注射 100 μL 非放射性 NaI 溶液 (10 mg/mL), 以封闭甲状腺, 然后于第二天在尾静脉注射放射性活度为 1.52 MBq 的 Na^{125}I 溶液, 于不同时间从尾静脉取血, 离心 20 min (3500 r/min). 从中准确地取出 50 μL 血浆, 在 γ -计数器上测血浆的放射性计数率(总放射性). 然后重复下列步骤 3 次: 在血浆样本中加 0.5 mL 质量分数为 10% 的 TCA, 混匀, 用台式离心机离心 3 min (3000 r/min), 弃去上层清液, 测定沉淀物的放射性计数率.

1.2.4 ^{125}I -RGD-Sak 在 SD 大鼠中的血药浓度 正常 SD 大鼠 6 只, 体重(230 ± 30) g, 用非放射性 NaI 溶液封闭甲状腺. 静脉注射 ^{125}I -RGD-Sak 后, 于不同时间静脉取血, 肝素抗凝, 离心 20 min (3000 r/min), 取 50 μL 血浆, 在 γ -计数器上测定血浆的放射性计数率(总放射性). 然后加入 TCA 沉淀, 离心 3 min (3000 r/min), 吸弃上层清液, 测量沉淀物的放射性.

2 结果与讨论

2.1 TCA 沉淀次数对标记蛋白沉淀百分率的影响

文中沉淀百分率为沉淀物与血浆中的放射性比值. 3 次 TCA 沉淀后, 标记蛋白的沉淀百分率分别为 (92.6 ± 3.9)%, (91.4 ± 3.5)% 和 (90.9 ± 3.7)%. 结果表明, 标记蛋白经 3 次 TCA 沉淀后, 虽然沉淀物的放射性计数率略有下降, 但经组间检验, $u < 1.96$, 故不同 TCA 沉淀次数的实验结果之间无统计学差异 ($p > 0.05$). 说明多次 TCA 沉淀对标记蛋白沉淀物的放射性计数率并无显著影响. 需要说明的是第一次 TCA 沉淀后, 标记蛋白沉淀百分率仅为 (92.6 ± 3.9)%, 这是因为标记物的放化纯度约为 95%, 其中约有 5% 的游离 ^{125}I 未能沉淀. 其后进行二次 TCA 沉淀, 沉淀物放射性计数率不再有显著下降.

2.2 体外实验

将游离 ^{125}I 与血浆蛋白温育不同时间后, 经 2 次 TCA 沉淀, 各时段游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉淀百分率在 (2.52 ± 0.41)% 与 (3.41 ± 0.68)% 之间(表 1). 经组间检验, $u < 1.96$, 故不同时间段的实验结果无统计学差异 ($p > 0.05$).

Table 1 Precipitation rate of ionic ^{125}I bound to plasma protein at different time

t/min	Plasma/ (count \cdot min $^{-1}$)	Precipitation/ (count \cdot min $^{-1}$)	Precipitation rate(%)	t/min	Plasma/ (count \cdot min $^{-1}$)	Precipitation/ (count \cdot min $^{-1}$)	Precipitation rate(%)
10	26000	766	2.95 ± 0.48	240	27084	911	3.36 ± 0.52
30	25818	879	3.40 ± 0.35	360	28687	979	3.41 ± 0.68
60	25950	657	2.52 ± 0.41	480	27892	875	3.13 ± 0.15
120	26731	886	3.31 ± 0.48	1440	26993	839	3.18 ± 0.57

不同活度的游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合, 经第 2 次与第 3 次 TCA 沉淀后, 游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉淀百分率分别为 (2.58 ± 0.56)%, (1.26 ± 0.14)%. 经组间检验, $u < 1.96$, 故实验中加入不同放射性活度的 Na^{125}I 后, 所得实验结果无统计学差异 ($p > 0.05$).

游离 ^{125}I 与血浆蛋白温育后经 5 次 TCA 沉淀, 各次 TCA 沉淀后的沉淀百分率见表 2. 经组间检验, 沉淀 1 次与 2 次之间, $u > 2.58$ ($p < 0.01$), 沉淀 2 次与 3 次之间, $u > 1.96$ ($p < 0.05$), 实验结果之间存在统计学差异; 而沉淀 3~5 次的实验结果之间, $u < 1.96$ ($p > 0.05$), 故无统计学差异. 该实验结果表明, TCA 沉淀 3 次能将吸附在沉淀蛋白表面的游离 ^{125}I 去除掉, 但第 2 次与第 3 次的沉淀百分率已相差不大.

Table 2 Precipitation rate(%) of ionic ^{125}I bound to plasma protein after several times TCA precipitation

$n=1$	$n=2$	$n=3$	$n=4$	$n=5$
6.11 ± 0.61	2.18 ± 0.35	1.42 ± 0.13	1.14 ± 0.20	1.09 ± 0.15

2.3 体内实验

由体内实验结果得知, 经第 2 次与第 3 次 TCA 沉淀后, 不同时段游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉

淀百分率分别在 $(1.38 \pm 0.38)\%$ ~ $(2.75 \pm 0.30)\%$ 之间及 $(1.03 \pm 0.17)\%$ ~ $(1.58 \pm 0.48)\%$ 之间 (见表3). 第2次与第3次 TCA 沉淀的平均沉淀百分率分别为 $(2.27 \pm 0.73)\%$ 和 $(1.38 \pm 0.33)\%$. 经组间检验, TCA 沉淀次数相同时, $u < 1.96$, 不同时段游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉淀百分率无统计学差异 ($p > 0.05$); 但第2次沉淀百分率与第3次沉淀百分率之间有统计学差异 ($u > 1.96, p < 0.05$), 这与体外实验结果吻合.

Table 3 Precipitation rate(%) of ionic ^{125}I bound to plasma protein at different time

t/min	n=2	n=3	t/min	n=2	n=3
10	2.71 ± 0.44	1.58 ± 0.42	180	1.38 ± 0.38	1.10 ± 0.04
30	2.62 ± 0.48	1.55 ± 0.17	300	2.75 ± 0.30	1.48 ± 0.15
60	1.41 ± 0.10	1.03 ± 0.17	480	2.74 ± 0.62	1.58 ± 0.48

2.4 ^{125}I -RGD-Sak 在 SD 大鼠中的血药浓度及游离 ^{125}I 的影响

^{125}I -RGD-Sak 在体内很不稳定, 给药后随着时间的延长迅速产生脱碘现象, ^{125}I -RGD-Sak 沉淀百分率从 2 min 时的 $(99.7 \pm 1.43)\%$ 下降到 240 min 时的 $(5.8 \pm 0.3)\%$ (见表4). ^{125}I 标记蛋白在体内越不稳定, 与血浆蛋白结合的游离 ^{125}I 就越多, 对测量结果的影响也越大. 例如, 在 240 min 时沉淀物的放射性计数率约为 1656 count/min, 其中包括 2 个部分的贡献: ^{125}I -RGD-Sak 沉淀部分的计数率和游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后沉淀的计数率.

Table 4 Precipitation rate of ^{125}I -RGD-Sak in plasma of SD rats at different time($n=6$)

t/min	Plasma/ (count · min ⁻¹)	Precipitation/ (count · min ⁻¹)	Precipitation rate(%)	t/min	Plasma/ (count · min ⁻¹)	Precipitation/ (count · min ⁻¹)	Precipitation rate(%)
2	252308	251479	99.67 ± 1.43	60	42973	5734	13.34 ± 2.60
5	101837	96252	94.52 ± 2.57	90	38625	4490	11.62 ± 1.60
10	49924	41478	83.08 ± 3.44	120	32491	3274	10.08 ± 1.40
20	44463	17236	38.76 ± 6.70	150	31490	2525	8.02 ± 0.31
30	45762	9958	21.76 ± 3.58	180	31609	2167	6.86 ± 0.15
45	44271	7099	16.03 ± 2.54	240	28385	1656	5.83 ± 0.29

若以游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉淀百分率为 $(2.27 \pm 0.73)\%$ 计算 (TCA 沉淀 2 次, 见 2.3 节体内实验结果), 在 240 min 时沉淀中游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后沉淀的计数率等于血浆计数率与沉淀计数率的差乘以游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后的沉淀百分率, 即

$$n_c = (28385 - 1656) \times 0.0227 = 607 \text{ count/min}$$

^{125}I -RGD-Sak 沉淀部分的计数率:

$$n_c' = 1656 - 607 = 1049 \text{ count/min}$$

由此可见, 游离 ^{125}I 与血浆蛋白结合后沉淀的贡献约占总的沉淀部分的 37%, 这对实验结果的影响是不容忽视的.

此外, 游离 ^{125}I 与血浆蛋白的结合对最小检测量同样有一定影响. 计算方法参照文献[4]并加以改进. 最小检测量 s 为

$$s = \frac{1 + \sqrt{1 + 4 \times 0.04 \times [(\text{血浆计数率} - \text{沉淀计数率}) \times 0.0227 + 2n_b]}}{0.08 \times A'}$$

式中, A' 为表观比活度, 即 1 ng 标记物的放射性计数率; n_b 为本底计数率. 式中相对误差为 20%.

在采用 ^{125}I 示踪技术用于新生物制品的药代动力学研究中, TCA 沉淀法迄今为止仍是最常用的方法. 以往在采用 TCA 分离技术时, 大多只用 TCA 溶液沉淀 1 次^[1,5], 把得到的沉淀物直接视为 ^{125}I 标记蛋白.

本项研究结果表明, 如果只用 TCA 沉淀 1 次, 沉淀物的放射性应该包括 3 个部分: 吸附在沉淀物表面的游离 ^{125}I , 以氢键形式与血浆蛋白结合后为 TCA 所沉淀的游离 ^{125}I 以及 ^{125}I 标记蛋白. 吸附在沉淀物表面的游离 ^{125}I 需要用 TCA 溶液沉淀 2~3 次才能去除, 而与血浆蛋白结合的 ^{125}I 在沉淀物中则相对稳定. 在进行血药浓度测定时, 与血浆蛋白结合的 ^{125}I 在沉淀物中的存在对低剂量端血药浓度

的测量结果影响较大, 尤其当 ^{125}I 标记药物在体内不够稳定时, 这种影响是应该予以校正的.

参 考 文 献

- [1] ZHU Jian-Hua(朱建华), GAO Xiu-Jian(高秀健), WAN Dan-Jing(万丹晶), *et al.*. Nucl. Tech. (核技术)[J], 2002, **25**(5): 341—344
- [2] Scheidhauer K., Wolf I., Baumgartl H. J., *et al.*. Eur. J. Nuclear Medicine[J], 2002, **29**(10): 1276—1282
- [3] BAI Guang(白光). The Accelerating Elimination of Radioisotope from Organism(放射性同位素从机体内的加速排出)[M], Beijing: Atomic Energy Press, 1977: 107
- [4] QIAN Jun(钱隽), TANG Xiao-Feng(唐晓峰), ZHU Jian-Hua(朱建华). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(7): 1247—1249
- [5] ZHANG Li-Min(张丽民), DENG Zhong-Ping(邓中平), HE Guang-Cai(贺广彩), *et al.*. Chinese Journal of Nuclear Medicine(中华核医学杂志)[J], 1998, **18**(1): 52—53

Influence of Ionic ^{125}I Bound to Plasma Protein on Measurement of Labeled Drug Concentration in Blood

WU Ya-Qing, QIAN Jun, ZHU Jian-Hua*

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the influence of ionic ^{125}I on the results of pharmacokinetics study for biologic products. The ionic ^{125}I bound to plasma protein was studied through measuring precipitation rates of plasma protein bound ionic ^{125}I after TCA precipitation *in vitro* and *in vivo*, with which precipitation rates of ^{125}I -RGD-Sak in plasma of SD rats at different time were compared. The results of the experiment show that ionic ^{125}I could be bound to plasma protein and be deposited by TCA [*in vitro*: $(1.26 \pm 0.14)\%$; *in vivo*: $(1.38 \pm 0.33)\%$]. The precipitation rates were independent of the reaction time (10 to 1440 min) and ionic ^{125}I activity (14500 to 120000 count/min). Also, ionic ^{125}I attached to the surface of precipitate contributed a lot to the precipitation rate, which could be eliminated after 2 to 3 times TCA precipitation. The influence of the ionic ^{125}I should be calibrated in ^{125}I tracing method applied to pharmacokinetics study for biological products.

Keywords Ionic ^{125}I ; Pharmacokinetics; Plasma protein binding; Drug concentration in blood

(Ed.: H, J, Z)