

^{18}F -FLT 的制备及其 microPET 显像

陆春雄^{1,2}, 王正武^{1,3}, 蒋泉福², 俞惠新^{1,2}, 黄洪波²,
王颂佩², 唐 婕², 蔡刚明²

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122;
2. 江苏省原子医学研究所 卫生部核医学重点实验室, 江苏 无锡 14063;
3. 上海交通大学 农业与生物学院 食品科学与工程系, 上海 200240)

摘要: 以 3-N-t-叔丁氧羰基-1-[5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基- β -1)-苏戊呋喃糖]胸腺嘧啶脱氧核苷(N-BOC-FLT)为标记前体进行氟代亲核置换反应, 制得 ^{18}F -FLT, HPLC 法检测其放化纯度, 并进行稳定性研究。考察了 ^{18}F -FLT 在正常小鼠体内的分布并采用 ^{18}F -FLT 为显像剂对肿瘤模型鼠进行了 microPET 显像。研究结果显示, ^{18}F -FLT 的放化纯度 $>95\%$, 6 h 内外稳定, 正常小鼠体内分布结果显示, 在 60 min 时, 肾、脾、肠摄取较多, 心、肝、肺、膀胱摄取次之。初步显像结果提示, 以 ^{18}F -FLT 为显像剂对肿瘤模型鼠进行 microPET 显像能够清晰地观察到接种部位的放射性浓聚。

关键词: ^{18}F -FLT; 肿瘤; microPET

中图分类号: R730; R817 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2008)03-0145-05

Synthesis and MicroPET Imaging of ^{18}F -FLT

LU Chun-xiong^{1,2}, WANG Zheng-wu^{1,3}, JIANG Quan-fu², YU Hui-xin^{1,2},
HUANG Hong-bo², WANG Song-pei², TANG Jie², CAI Gang-ming²
(1. School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Key Laboratory of Nuclear Medicine,
Ministry of Health, Wuxi 214063, China;
3. Department of Food Science & Technology, School of Agriculture and Biology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: ^{18}F -FLT, 3'-deoxy-3'- ^{18}F fluorothymidine (^{18}F -FLT) were synthesised using N-BOC-FLT as labelling precursor. The radiochemical purity was determined by HPLC. The biodistribution in mice was performed. The results showed that the radiochemical purity was over 95% and were stable within 6 h outside the bodies. The biodistribution of ^{18}F -FLT in mice suggested that the uptake of ^{18}F -FLT in kidney, spleen and intestine was higher than that of ^{18}F -FLT in heart, liver, lung and bladder at 60 min postinjection. MicroPET image of tumor in nude mice bearing tumor xenografts may clear.

Key words: ^{18}F -FLT; tumor; microPET

正电子发射计算机断层(PET)是现代生物医学的尖端技术,它可从分子水平显示机体及病灶组织的细胞代谢、细胞功能、细胞增殖状况,是诊断肿瘤和评价肿瘤生物学特性的有利工具。MicroPET 是基于 PET 临床诊断技术发展起来的专门用于小动物的断层显像技术,它具有灵敏度高、可定量等优点,其实验结果可直接类推至临床应用^[3],因而受到了广大医药研究者的重视。目前常用的 PET 示踪剂是¹⁸F-FDG,但其主要反映体内葡萄糖代谢的情况,不能高特异性、高选择性地检测肿瘤。相比之下,显像 DNA 合成途径可检测到肿瘤细胞增殖的改变,从而能够特异地诊断肿瘤,进而对肿瘤恶性程度进行评估。¹⁸F-FLT 作为一种胸腺嘧啶类似物,能够和胸腺嘧啶一样进入细胞内并掺入 DNA,在肿瘤增殖细胞中的胸腺嘧啶核苷激酶 1(TK-1)作用下磷酸化,生成¹⁸F-FLT-磷酸盐而滞留在肿瘤细胞内。¹⁸F-FLT 是通过反映 TK-1 的活性而间接反映肿瘤细胞的增殖状况,这是¹⁸F-FLT 作为 PET 细胞增殖示踪剂的基础^[2-3]。本工作拟以自制的标记前体 3-N-t-叔丁氧羰基-1-[5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基-β-1)-苏戊呋喃糖]胸腺嘧啶脱氧核苷制备¹⁸F-FLT 的注射液^[4],并观察其在正常小鼠体内的分布和肿瘤鼠的 microPET 显像效果,为临床研究提供基础。

1 实验材料

1.1 主要试剂

3-N-t-叔丁氧羰基-1-[5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-3'-O-(4-硝基苯磺酰基-β-1)-苏戊呋喃糖]胸腺嘧啶脱氧核苷(N-BOC-FLT;自制^[4];无水乙腈;北京派特生物技术有限公司;氨基聚醚(Kryptofix 2.2.2, Kry2.2.2);百灵威产品;RPMI 1640 培养液;GIBICOL 产品;小牛血清;中国科学院上海实生细胞生物技术有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

C5002 γ-计数器;美国 PACKARD-COBRA 公司产品;PET-MF-2V-IT-I 型氟多功能合成模块;北京派特生物技术有限公司;高效液相分析色谱仪;1525 Binary 型高效液相泵,2487 型

双波长紫外吸收检测器,美国 Waters 公司产品;流动相放射性检测仪;Perkin Elmer 公司产品;MicroPET;Inveon SIEMENS 公司产品,分辨率为 1.4 mm;SEL-1 型层流架;江苏省苏州市吴县实验动物设施设备厂生产;Lunaire Model BI 0620 M 细胞培养箱;美国 Thero Forma 公司产品。

1.3 实验动物

ICR 小鼠 20 只,雌雄各半,体重 18~20 g,扬州大学农学院提供,动物许可证书 SCXK(苏)2007-0001;5 只 Balb/c-nu/nu 雄性裸鼠,体重 18~20 g,六周龄,由上海肿瘤研究所实验动物中心提供,实验动物使用许可证:SYZK(苏)2003-0038,按 SPF 级标准饲养于江苏省原子医学研究所实验动物中心层流架内。

小细胞肺癌细胞株 H446;中国科学院上海细胞研究所提供,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液(含 100 mg/L 青霉素,100 mg/L 链霉素)于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中维持培养。接种及给药用注射针为美国 B-D 公司医用 5 号针。

2 实验方法

2.1 ¹⁸F-FLT 注射液的制备

使用 PET-MF-2V-IT-I 型氟多功能合成模块合成¹⁸F-FLT,合成模块的路线图示于图 1,具体标记方法如下:

- (1) 由¹⁸O(p, n) ¹⁸F 反应生成无载体 F⁻,富集在阴离子交换柱(QMA)上;
- (2) 用 1 号瓶中 1 mL stock 液(2 mg K₂CO₃ 加 12 mg Kry2.2.2 溶于 0.2 mL 水和 0.8 mL 乙腈的混合溶液)将¹⁸F⁻淋洗到反应管中;
- (3) 将反应管中的溶液于 120 °C 下用氮气吹干;
- (4) 将 2 号瓶中 1 mL 干燥乙腈加到反应管中,于 120 °C 下氮气吹干;
- (5) 将 3 号瓶中含 30 mg N-BOC-FLT 的 1 mL 干燥乙腈溶液加入反应管中,于 120 °C 反应 5 min;
- (6) 通氮气到反应管,吹干乙腈,加入 4 号瓶中的 0.3 mL 1 mol/L 的盐酸,于 120 °C 反应 5 min;
- (7) 将反应管冷至室温后,将 5 号瓶中 2 mL 2 mol/L 乙酸钠溶液加到反应管中中和盐酸;
- (8) 启动 HPLC 纯化,Alltima C18 (250 mm × 10.0 mm, 10 μm);流动相 V(乙醇):V(水)=1:9,流速 5 mL/min。

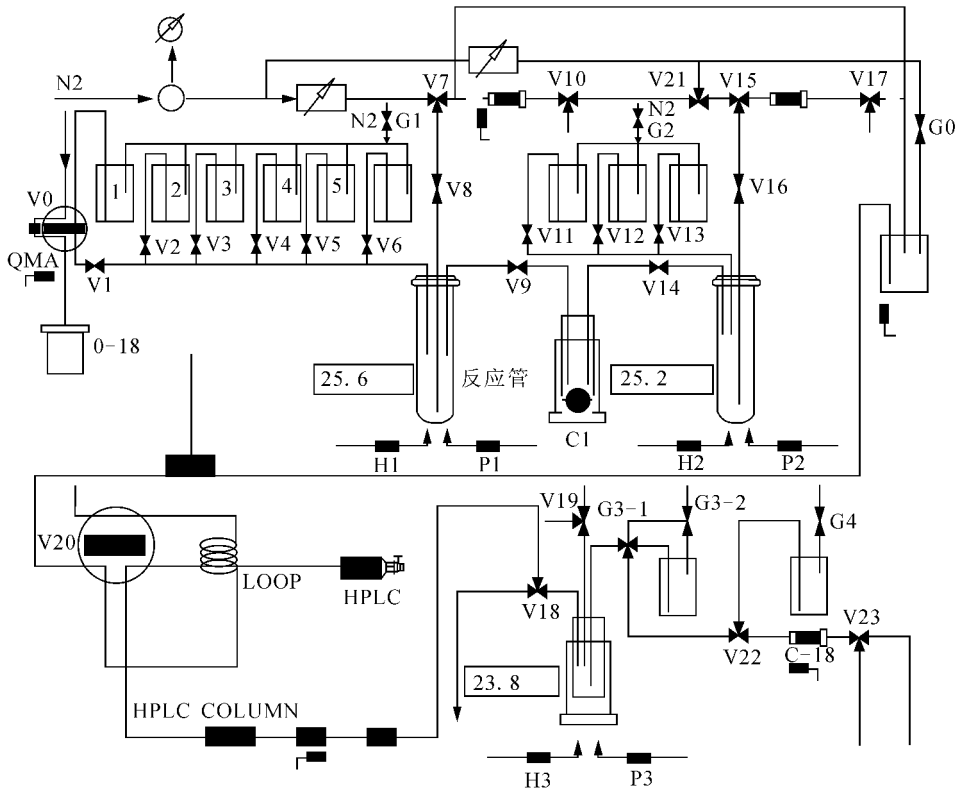


图 1 合成模块的路线图

2.2 ^{18}F -FLT 放化纯度测定及稳定性研究

高效液相色谱的分析条件为汉邦 Lichrospher C18(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分析柱, 流动相 V(乙醇): V(水) = 1: 9, 流速 0.8 mL/min, 流动相用放射性检测仪检测。取产品 ^{18}F -FLT 10 μL (3.7 GBq/L) 进样。将制备型 HPLC 分离纯化好的 ^{18}F -FLT 通过 0.22 μm 的无菌滤膜制成 ^{18}F -FLT 注射液, 分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 测其放化纯度。

2.3 正常小鼠体内分布实验

取体重为 18~20 g 的 ICR 小鼠 20 只, 随机分为 4 组, 每组 5 只, 经尾静脉注射 0.2 mL ^{18}F -FLT 约 3.7 MBq, 分别于注射后 5、30、60、120 min 断头处死。解剖取出脑、肌肉、心、肝、脾和肺等脏器, 称重后测量放射性计数。

2.4 肿瘤鼠的 microPET 显像

2.4.1 肿瘤模型鼠的制作 取指数生长期的 H446 细胞, 经消化后, 用无血清培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。无菌条件下, 每只裸鼠右后肢皮下注射 200 μL 细胞悬液(含 2×10^6 个细胞)。裸鼠继续饲养于层流架内, 接种后 10~12 d, 瘤体直径 5~7 mm 时进行实验。

2.4.2 肿瘤鼠的 microPET 显像 取肿瘤模型

鼠, 尾静脉注射 0.2 mL ^{18}F -FLT(3.7 MBq), 异氟烷麻醉, 平躺在 microPET 的床上, 四肢用胶布固定, 扫描采集 60 min, 图像重建采用 2DFEP* 法。

3 结果与讨论

3.1 ^{18}F -FLT 的放化纯度

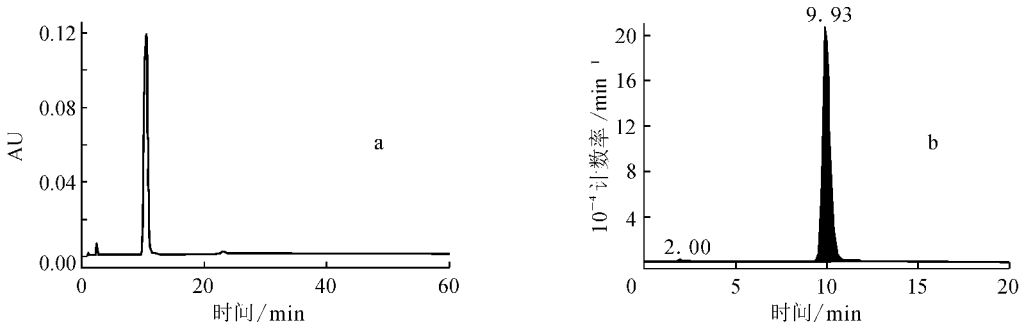
^{18}F -FLT 的 HPLC 分析图示于图 2。由图 2b 可见, ^{18}F -FLT 的保留时间约为 10.0 min, 与图 2a 中 FLT 保留时间一致, 证明产物即为 ^{18}F -FLT。 $^{18}\text{F}^-$ 的保留时间约为 2.0 min, ^{18}F -FLT 的放化纯度 > 95%, 放射化学产率为 $35.2\% \pm 5.8\%$, 与文献[5-7]结果相近。

3.2 ^{18}F -FLT 稳定性研究

^{18}F -FLT 稳定性研究结果示于图 3。由图 3 可见, ^{18}F -FLT 注射液的放化纯度虽然随时间推移有所降低, 但 6 h 内放化纯度仍 > 95%。此结果说明 ^{18}F -FLT 注射液性质稳定。

3.3 ^{18}F -FLT 在正常小鼠体内的生物分布

^{18}F -FLT 在正常小鼠体内的生物分布结果列于表 1。由表 1 可见, 5 min 时, ^{18}F -FLT 主要

图 2 ^{18}F -FLT 的 HPLC 分析图a——FLT; b—— ^{18}F -FLT

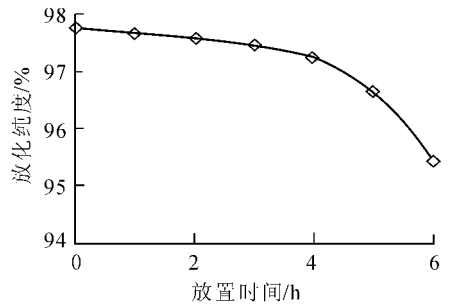
分布在血、心、肝、脾、肺、肾、肠、膀胱,而在脑中分布很少。60 min 时,肾、脾、肠摄取较多,心、肝、肺、膀胱摄取次之。骨中的摄取是随着时间的推移而累加的。

由于 ^{18}F 衰变的比较快,射线能量比较高,本实验在测量时每一组测量管前都放标准管,每两管之间放置空白管,以尽量减少相邻管之间的干扰。体内分布结果与文献[8]比较接近,比文献[9]的数值要大一点,出现这样的现象可能是测量方法上的差异所引起。

3.5 肿瘤鼠的 microPET 显像结果

肿瘤模型鼠的 microPET 显像图示于图 4。由图 4 可见,肿瘤鼠右侧后肢的肿瘤显像明显,(如图 4 中箭头所指),心、腹腔和膀胱内也有放射性浓聚,尤其是膀胱。体内分布实验结果显

示,膀胱本身的放射性浓聚与心接近,说明放射性主要浓聚在尿中。腹腔中的放射性浓聚在肾脏、肠和心,与体内分布实验结果一致。初步显像结果显示,microPET 可以对小鼠肿瘤清晰显像。

图 3 ^{18}F -FLT 的稳定性表 1 ^{18}F -FLT 在正常小鼠体内分布 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组织/器官	不同时相放射性摄取率/(ID% · g ⁻¹)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
血	4.79 ± 1.01	3.40 ± 0.61	2.67 ± 0.32	2.43 ± 0.68
脑	0.43 ± 0.08	0.48 ± 0.05	0.54 ± 0.08	0.40 ± 0.08
心	4.38 ± 0.50	2.67 ± 0.62	2.67 ± 0.46	2.02 ± 0.57
肝	3.93 ± 0.83	2.38 ± 0.37	2.72 ± 0.27	2.53 ± 0.63
脾	4.02 ± 0.46	3.13 ± 0.53	4.00 ± 1.19	5.67 ± 1.34
肺	4.66 ± 0.83	2.61 ± 0.79	2.89 ± 0.43	2.04 ± 0.57
肾	9.02 ± 1.03	5.33 ± 0.47	4.45 ± 0.46	3.84 ± 1.69
胃	2.65 ± 0.43	1.85 ± 0.32	1.81 ± 0.23	1.57 ± 0.56
肠	4.29 ± 0.82	2.97 ± 1.15	3.39 ± 0.68	4.32 ± 2.79
膀胱	4.16 ± 1.59	2.98 ± 0.79	2.87 ± 0.84	2.98 ± 0.96
肌肉	3.18 ± 0.50	1.99 ± 0.49	2.33 ± 0.40	1.95 ± 0.99
骨	2.30 ± 0.25	1.13 ± 0.19	2.33 ± 0.44	3.44 ± 0.90

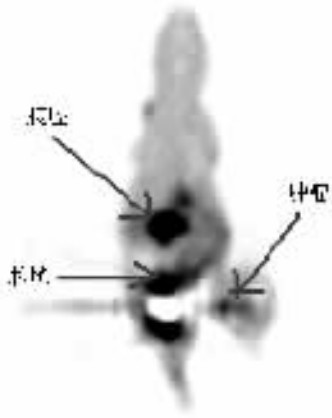


图4 肿瘤模型鼠的 microPET 显像图

4 小结

以自制的 N-BOC-FLT 为标记前体,标记得到的¹⁸F-FLT,放化纯度>95%,可以稳定存放6 h。

高分辨率的 microPET 能在活体动物,甚至转基因小鼠和人类疾病模型小鼠上进行活体内“生理过程”显像,直接获取药物在各个组织定量动态的“药代动力学”和“药效学”参数,从分子水平得到靶器官的功能信息,这是其它显像技术(MRI、CT 和超声)不具备的,将其应用于新药研究与开发的早期,可大大缩短新药开发的周期,推动新药研制的步伐。

本工作使用¹⁸F-FLT 做了初步 microPET 显像研究,能观察到肿瘤模型鼠的肿瘤部位有明显浓聚,为进一步的临床研究提供了基础。

参考文献:

[1] BURNS HD, HAMILT TG, ENG WS, et al. Positron Emission Tomography Neuroreceptor Imaging as a Tool in Drug Discovery, Research and Development[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3(4): 388-394.

[2] LUKAS BB, ALBERT JHS, DAVID CPC, et al. [¹⁸F]FLT-PET in Oncology: Current Status and Opportunities[J]. *Europ J Nucl Med Mol Imag*, 2004, 31(12): 1 659-1 672.

[3] SVEN NR, SANDRA D. Is 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine a Better Marker for Tumour Response than ¹⁸F-fluorodeoxyglucose? [J]. *Europ J Nucl Med Mol Imag*, 2006, 33(13): S38-S43.

[4] 陆春雄,王正武,蒋泉福等,肿瘤增殖显像剂¹⁸F-FLT 的合成和标记[J],核化学与放射化学,2008, 30(4):待发表.

[5] MARTINA SJ, EISENBARTHA JA, WAGNER-U U, et al. A New Precursor for The Radiosynthesis of [¹⁸F]FLT [J]. *Nucl Med Biol*, 2002, (29): 263-273.

[6] MIKYUNG Y, SEUNG JO, HYUN-JH, et al. High Radiochemical Yield Synthesis of 3-deoxy-3-[¹⁸F] fluorothymidine Using (5'-O-dimethoxytrityl-2'-deoxy-3'-O-nosyl-β-D-threo Pentofuranosyl)thymine and Its 3-N-BOC-protected Analogue as a Labeling Precursor [J]. *Nucl Med Biol*, 2003, (30): 151-157.

[7] SEUNG JO, CHRISTOPH M, DAE YC, et al. Fully Automated Synthesis System of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F] fluorothymidine [J]. *Nucl Med Biol*, 2004, (31): 803-809.

[8] HENRYK B, MARCEL CC, DAVID RC, et al. 3'-Deoxy-3'-[¹⁸F] Fluorothymidine as a New Marker for Monitoring Tumor Response to Anti-proliferative Therapy in Vivo With Positron Emission Tomography [J]. *Cancer Res*, 2003 (63): 3 791-3 798.

[9] 柳 曦,周乃康,张锦明,等.¹⁸F-FLT 在肺癌模型小鼠体内的生物分布及 PET 显像研究[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(10): 960-962.