第 21 卷 第 2 期 同 位 素 Vol. 21 No. 2
2008 年 5 月 Journal of Isotopes May 2008

^{125}I 标记重组 MIF 在炎症模型小鼠体内的生物学分布

杨 红，梁 婷，宋 静，张 超，侯桂华
（山东大学医学院 实验核医学研究所，山东 济南 250012）

摘要：为初步评价^{125}I-rMIF（重组巨噬细胞移动抑制因子，Recombinant Macrophage Migration Inhibition Factor ，rMIF）在炎症显像中的应用价值，研究了^{125}I-rMIF 的稳定性、特异性及在炎症模型小鼠体内的生物学分布规律。结果显示，^{125}I-rMIF 的标记率为 96.5%，室温下 48 h 内其生物学性质稳定。体内生物学分布研究显示，^{125}I-rMIF 主要由肝脏和肾脏代谢，血液清除较快。尾静脉注射^{125}I-rMIF 0.5、1、6、24 h 后，炎症肢体（靶）与对侧健肢（非靶）的放射性摄取比（T/NT）分别为 1.42、1.35、2.18 和 2.05。以上结果表明，^{125}I-rMIF 具有在活体内炎症定位导向能力，但在早期优越性不明显，6 h 后效果较佳，因此对隐匿性或亚急性炎症病灶的诊断具有潜在的临床价值。

关键词：重组巨噬细胞移动抑制因子（^{125}I-rMIF）；炎症；生物学分布；代谢
中图分类号：TQ463；R817 **文献标志码**：A **文章编号**：1000-7512(2008)02-0101-04

Biodistribution of ^{125}I Labeled Recombinant Macrophage Migration Inhibitory Factors in Inflammatory Model of Mice

Yang Hong, LIANG Ting , SONG Jing, ZHANG Chao, HOU Gui-hua
(*Institute of Experimental Nuclear Medicine*, *School of Medicine*, *Shandong University*, *Jinan* 250012, *China*)

Abstract: To evaluate ^{125}I labeled recombinant macrophage migration inhibitory factors (rMIF) for the scintigraphic imaging of inflammation, rMIF was labeled with ^{125}I by Iodogen method. ^{125}I-rMIF was isolated by Sephadex G25 column. The stability , immune specificity of ^{125}I-rMIF and its biodistribution in inflammatory model of mice were studied. The labeling yield of ^{125}I-rMIF was 96.5%. It was stable within 48 h at room temperature. The biodistribution results showed that the ^{125}I-rMIF was metabolized by the liver, the radioactivity clearance mainly happened in the kidney and the speed of the blood clearance was rapid. After caudal vein injection with ^{125}I-rMIF, the ratio of radioactivity uptake between inflammatory limb (target) and contra lateral healthy limb (non target)(T/NT) were 1.42, 1.35, 2.18 and 2.05 at 0.5, 1, 6, 24 h respectively. ^{125}I-rMIF had the capability of locating the inflammatory foci. The advance of it is more obviously at the late stage than that at the early stage. ^{125}I-rMIF may be a potential agent for the diagnosis of concealed and subacute

收稿日期：2007-11-23；**修回日期**：2008-01-21
作者简介：杨红（1969～），女（汉族），大连人，硕士研究生（导师：侯桂华），实验核医疗专业
通信作者：侯桂华，女，博士生导师，Email：ghhou@sdu.edu.cn，电话：0531-88382096

inflammatory disease.

Key words: recombinant macrophage migration inhibitory factors(^{125}I-rMIF); inflammation; biodistribution; metabolism

早期、准确地定位定性诊断隐匿性炎症病灶是目前临床面临的最大困难。核医学炎症显像作为无创性、功能性的影像手段,以体内的病理生理学改变为监测对象,具有客观、灵敏、安全、无创伤的特点,是早期诊断炎症病变的最佳影像学方法[1]。核医学炎症显像剂以其高度的特异性和亲和力在炎症诊断中占有重要地位[2],自^{67}Ga作为炎症显像剂出现以来,已先后出现了核素标记的自体白细胞、抗粒细胞单克隆抗体等一系列炎症显像剂。^{67}Ga 标记的自体白细胞对急性炎症的诊断效率高,但体外标记过程复杂,易发生交叉感染;^{99}Tc^{m} 标记抗粒细胞单克隆抗体可使炎症病灶在注射后短时间内显像,但靶与非靶放射性摄比仍较低,且存在免疫原性,使其临床应用受到一定限制。近年来,应用核素标记与炎症相关的细胞因子进行炎症显像研究已成为热点[3],已有研究者利用放射性核素标记 IL-1、IL-2、IL-8 定位炎症病灶,其中^{123}I-IL-2 注射后可迅速到达炎症部位,无毒副作用,但仅限于慢性炎症及自身免疫病的显像[4-5];另有研究人员[6]利用^{123}I-IL-1ra(IL-1 受体拮抗蛋白)对类风温关节炎患者进行显像,结果显示,除关节炎病灶内有放射性沉积外,肠道内也有大量放射性滞留,提示该显像剂不适于下腹部感染灶的定位诊断;^{123}I-IL-8 放射性比活度低,静脉注射后常引起外周白细胞数目较大波动[7]。因此寻求和发展新的炎症相关细胞因子显像剂仍是值得关注的问题。

巨噬细胞移动抑制因子(Macrophage Migration Inhibitory Factors, MIF)是巨噬细胞分泌的重要前炎症因子,不仅能促进巨噬细胞在炎症部位的聚集、增殖、活化,增强其粘附、吞噬能力,还能促进多种细胞因子的生成,在机体的炎症反应中起着重要作用。炎症过程中,局部浸润的巨噬细胞可以分泌高水平巨噬细胞移动抑制因子,因此 MIF 有可能成为炎症的重要标志。本研究利用^{125}I 标记重组小鼠 rMIF 蛋白,初步探讨其在炎症小鼠模型中的生物学分布规律以评价 rMIF 作为炎症显像剂的潜在应用价值。

1 实验材料

重组小鼠 MIF:相对分子质量 15.4 kD,由本实验室自制[8];抗 MIF 单克隆抗体:购自 R&D 公司;HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗小鼠 IgG:购自北京中衫公司;金黄色葡萄球菌:本室冻存菌种;无载体^{125}I:原子高科股份有限公司提供;葡聚糖凝胶 Sephadex G25(1 × 30 cm):Sigma 公司产品;Iodogen 涂管:自制 GC911;γ 计数器:科大中佳公司产品;放射性活度计:美国 CAPINTEC 公司。

实验动物:BALB/c 小鼠,体质量 18~20 g,山东大学实验动物中心提供,清洁级。

2 实验方法

2.1 ^{125}I-rMIF 的制备

采用 Iodogen 法标记 rMIF。取 100 μL 0.05 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PB)加入 Iodogen 管内,轻摇以溶解 Iodogen,加入 5 μg rMIF 和约 8.7 MBq Na^{125}I,缓慢轻摇以充分反应,20 min 后加入 100 μL 0.05 mol/L pH 7.4 的 PB 终止反应,静置 10 min 后加入 100 μL 5% BSA。将反应体系移入 Sephadex G25 凝胶柱中,采用 pH 7.4 的 0.01 mol/L PB 淋洗液,自动部分收集器收集滤出液,每 3 min 收集 1 管,每管 1 mL,用 γ 计数器分别测定各管的放射性计数并计算其放射性比活度。

2.2 ^{125}I-rMIF 生物学活性及放化纯度分析

采用新华 1 号滤纸,以 V(甲醇):V(生理盐水)=2:1 作为展开体系,测量标记产物的放化纯度;利用间接酶联免疫吸附法检测^{125}I-rMIF 的免疫学活性。将标记物置于室温下,48 h 后仍用上述纸层析法检测其放化纯度,考察^{125}I-rMIF 的体外稳定性。

2.3 小鼠炎症模型的建立

BALB/c 小鼠局部常规消毒后,于左股部肌肉内注入 0.2 mL 由生理盐水配制的金黄色葡萄球菌悬浮液(细菌数 10^7~10^8/mL),对侧不作处理,作为内对照。待致炎部位出现明显炎症表现(红肿,同侧肢体活动障碍),即形成小鼠炎症模型[9]。

2.4 ^{125}I-rMIF 在炎症模型小鼠体内的生物学分布

取炎症模型小鼠 12 只，随机分为 4 组，每组 3 只。每只小鼠经尾静脉注射 0.35 mL 约 46.2 kBq ^{125}I-rMIF。分别于注射后 0.5、1、6 和 24 h 处死小鼠，取小鼠不同的组织器官，称重并测量各样品放射性计数，计算每克组织百分注射剂量率（%ID·g^{-1}）；同时计算炎症侧肌肉组织（靶组织）与血液的放射性摄取比值，靶组织与对侧健肢肌肉组织（非靶）的放射性摄取比（T/NT）。

3 结　果

3.1 ^{125}I-rMIF 的标记及稳定性

Iodogen 法对 rMIF 进行^{125}I 标记，凝胶过滤层析法分离纯化^{125}I-rMIF，根据洗脱液放射性计数率可知，蛋白峰出现在 9～11 管，游离峰出现在 24 管，标记率为 96.5%，放射性比活度为 1.49 TBq/g。以 V(甲醇)∶V(生理盐水)＝2∶1 作为展开体系，纸层析测得^{125}I-与^{125}I-rMIF 的 R_f 分别为 0.9 和 0.3，放化纯度为 94%，室温下放置 48 h 后标记物的放化纯度仍＞90%。经间接酶联免疫吸附实验鉴定：^{125}I-rMIF 仍可与抗 MIF 单克隆抗体特异性结合，保持 rMIF 原有免疫学活性。

3.2 ^{125}I-rMIF 在炎症模型小鼠体内的生物学分布

不同时相炎症模型小鼠各组织的放射性分布列于表 1。由表 1 可知，各组织器官中，以肾的放射性计数最高，1 h 达到峰值，此后迅速下降，肝脏的变化趋势同肾脏；心肺内放射性变化与血同步，随时间增加逐渐减少；脾脏、胸腺等免疫器官，在静脉注射后 0.5～1 h 内均有一定程度的放射性浓聚，6 h 后出现明显清除，低于炎症组织的放射性分布；甲状腺及骨骼的放射性摄取极少。

表 1　^{125}I-rMIF 在炎症模型小鼠体内的生物分布（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组织或器官	不同时间^{125}I-rMIF 在炎症模型小鼠体内的放射性摄取/（%ID·g^{-1}）			
	0.5 h	1 h	6 h	24 h
血液	38.05±3.49	24.48±0.54	5.99±0.29	5.76±0.46
心	7.04±1.25	2.74±0.66	1.60±38	0.98±27
肝	7.15±0.28	13.45±0.90	2.92±0.22	1.45±0.64
脾	7.22±0.79	14.07±0.74	1.18±0.23	0.72±0.21
肺	9.79±0.69	4.09±0.53	3.19±0.72	0.85±0.18
肾	11.76±1.54	20.41±3.08	4.12±0.27	1.37±0.26
甲状腺	4.06±0.97	2.92±0.55	1.54±0.43	0.35±0.11
胸腺	5.31±0.63	6.67±0.55	2.42±0.42	0.27±0.08
股骨	2.39±0.47	1.84±0.52	1.13±0.13	0.18±0.04
炎症侧肌肉	7.10±0.22	5.85±0.67	5.19±1.21	4.33±0.28
对侧肌肉	4.99±0.16	4.33±0.32	2.36±0.27	2.12±0.28

3.3 不同时相炎症组织的放射性分布

静脉注射^{125}I-rMIF 后，炎症侧肌肉组织（靶）与血液的放射性摄取比（T/血）、靶与非靶的放射性摄取比（T/NT）列于表 2。由表 2 可见，静脉注射^{125}I-rMIF 后，T/NT 的变化与 T/血变化保持同步；0.5 h 和 1 h，T/血与 T/NT 均较低，6 h 时靶组织与血、靶与非靶的 T/NT 均明显升高，且 24 h 后仍保持较高水平。

表 2　炎症模型小鼠的 T/血与 T/NT（$\bar{x}\pm s$，n=3）

时间/h	T/血	T/NT
0.5	0.19±0.01	1.42±0.04
1	0.24±0.01	1.35±0.08
6	0.82±0.17	2.18±0.27
24	0.75±0.04	2.05±0.15

4 讨论与结论

^{125}I-rMIF 体外分布结果(表1、表2)显示,静脉注射后早期,^{125}I-rMIF 并未在炎症部位出现明显的放射性浓集,炎症肢体与对侧肢体 T/NT 较低,然而随着时间延长,这种优势得以体现,T/NT 逐渐升高,并保持到 24 h。其机理可能是:静脉注射^{125}I-rMIF 后早期,放射性主要分布于心血池及肝肾等代谢器官,随着^{125}I-rMIF 经肝肾代谢,自身的本底被清除,而炎症部位的^{125}I-rMIF 因与免疫效应细胞特异性结合,发生了放射性滞留,得以浓聚。^{125}I-rMIF 主要经肝肾代谢,且脾脏、胸腺等免疫器官在静脉注射后早期有一定程度的放射性摄取,这种分布特点提示^{125}I-rMIF 不适于做上腹部及急性炎症的显像;心肺、骨骼等部位未见明显放射性分布,有利于胸部及骨骼等部位的炎症探查。

综上所述,^{125}I-rMIF 显示了稳定的生物学性质,可以克服^{99}Tc^{m} 标记小分子炎症显像剂物理半衰期较短,在体内易发生放射性脱标的缺点。体内生物学分布结果提示,利用^{125}I-rMIF 做早期炎症显像优越性不明显,但延迟显像时效果较佳,这对于一些隐匿性或亚急性炎症病灶的临床诊断可能具有潜在应用价值,值得进一步深入研究。

参考文献:

[1] HUGHES DK. Nuclear Medicine and Infection Detection: the Relative Effectiveness of Imaging With ^{111}In-oxine-, ^{99}Tc^{m}-HMPAO-, and ^{99}Tc^{m}-stannous Fluoride Colloid-labeled Leukocytes and With ^{67}Ga-citrate [J]. Nucl Med Technol, 2003, 31(4): 196-201.

[2] RLEEKER-ROVERS CP, BOERMAN OC, RENNEN HJ, et a1. Radiolabeled Compounds in Diagnosis of Infectious and Inflammatory Disease [J]. Curt Pharm Des, 2004, 10(24): 2 935-2 950.

[3] van EERD JEM, BOERMAN OC, CORSTENS FHM, et a1. Radiolabeled Chemotactic Cytokines: New Agents for Scintigraphic Imaging of Infection and Inflammation[J]. Nucl Med, 2003, 47(4):246-255.

[4] ROLANDSSON O, STIGBRAND T, RIKLUNDAHLSTROM K, et al. Accumulation of 125-iodine Labeled Interleukin-2 in the Pancreas of NOD mice[J]. J Autoimmun, 2001, 17:281-287.

[5] ANNOVAZZI A, BIANCONE L, CAVIGLIA R, et al. ^{99m}Tc-interleukin-2 and ^{99}Tc^{m}-HMPAO Granulocyte Scintigraphy in Patients With Inactive Chron's Disease[J]. Eur Nucl Med Mol Imaging , 2003,30:374-382.

[6] BARRERA P, van DER LAKEN CJ, BOERMAN OC, et al. Radiolabelled Interleukin-1 Receptor Antagonist for Detection of Synovitis in Patients With Rheumatoid Arthritis[J]. Rheumatology(Oxford) ,2000,39: 870-874.

[7] van DER LAKEN CJ, BOERMAN OC, OYEN WJG, et al. Radiolabeled Interleukin-8: Scitigraphic Detection of Infection Within a Few Hours [J]. Nucl Med,2000, 41:463-469.

[8] 侯桂华,于敏,李璐娜. 小鼠 MIF 在大肠杆菌中的表达及纯化[J]. 山东大学学报:医学版,2003,41(5): 469-471.

[9] ZHANG C, HOU GH, HAN JK,et al. Radioiodine Labeled Anti-MIF McAb: A Potential Agent for Inflammation Imaging. Mediators of Inflammation[J/OL]. Mediators of Inflammation , 2007. http://www. hindawi. con/journals/mi/volurme-2007/.