

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记硫酸软骨素及其在小鼠体内的生物分布

青 春¹, 魏洪源², 解 朋¹, 邓候富¹, 宋宏涛², 罗顺忠²

(1. 四川大学华西医院 核医学科, 四川 成都 610041;
2. 中国工程物理研究院 核物理与化学研究所, 四川 绵阳 621900)

摘要: 采用亚锡还原法对硫酸软骨素(CS)进行了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记, 优化了标记条件, 并观察标记物在小鼠体内的生物分布, 为骨关节软骨显像提供依据。采用薄层析分析标记产物的标记率为 $81.6\% \pm 1.7\%$; 用直径为 $0.2 \mu\text{m}$ 的无菌滤膜对标记液纯化, 纯化后放化纯度为 $90.1\% \pm 1.2\%$ 。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 在小鼠体内的生物分布结果显示, 其在血液中清除较快, 肾脏是主要排泄器官; 有较高的亲软骨组织特性, 4 h 时软骨与血液的放射性摄取比(T/NT)为 8.31, 软骨与骨的 T/NT 为 2.03。以上结果提示, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 的标记方法简便, 有一定的亲软骨组织性, 有待进一步研究。

关键词: 硫酸软骨素; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记; 生物学分布; 软骨显像剂

中图分类号: O614.7; R817.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2009)03-0129-04

Labeling of Chondroitin Sulfate With $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ and Its Biodistribution in Mice

QING Chun¹, WEI Hong-yuan², XIE Peng¹, DENG Hou-fu¹,
SONG Hong-tao², LUO Shun-zhong²

(1. Department of Nuclear Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2. Institute of Nuclear Physics and Chemistry, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, China)

Abstract: The feasibility of direct labeling of chondroitin sulfate (CS) with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ was studied, and the effects of different conditions on labeling yield was observed, the biodistribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS in normal mice was investigated, chondroitin sulfate was labeled directly with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ reduction of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ with SnCl_2 solution. The labeling yield and radiochemical purity were determined with thin layer chromatography (TLC) using Xinhua filter paper. The biodistribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS in normal mice was studied at 30 min, 1, 2, 4 and 8 h respectively after caudal vein injection in normal mice. The labeling yield was $81.6\% \pm 1.7\%$ and radiochemical purity was $90.1\% \pm 1.2\%$ after filtering by micropore membrane. The biodistribution in mice showed that $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS was cleaned out from blood quickly, and it was mainly excreted through kidney, but $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS had high specificity to cartilage, its uptake ratio of target and nontarget was high, the uptake ratio of cartilage to blood was 8.31 (4 h), the ratio of cartilage to bone was 2.03(4 h). $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS is an easily prepared and la-

收稿日期: 2009-03-10; 修回日期: 2009-04-20

基金项目: 国家十一五科技计划支撑项目(2007BA125B04)

作者简介: 青春(1980—), 女, 四川广安人, 硕士研究生, 影像医学与核医学专业

通信作者: 邓候富, 教授, 四川大学华西医院核医学科, E-mail: denghfy@126.com

beled compound with high philo-cartilage and stability.

Key words: chondroitin sulfate; $^{99}\text{Tc}^m$ labeling; biodistribution; cartilage imaging agent

大骨节病(Kashin Beck Disease)是一种以软骨坏死为主要改变的地方性变形性骨关节病,诊断主要依靠临床参数和影像学分析,然而这些诊断手段对早期病变缺乏敏感性,一旦出现关节腔狭窄等指标,疾病往往已经处于进展期及终末期。临床上使用的 $^{99}\text{Tc}^m$ -MDP 骨显像剂能够清晰地显示骨关节系统,但对软骨显像不够理想。骨关节炎(Osteoary Thritis, OA)同样是以软骨病变为主,硫酸软骨素(Chondroitin Sulfate, CS)作为有效治疗 OA 及缓解 OA 病程进展的药物已经受到临床青睐,目前已经有研究者开始探索硫酸软骨素在其显像方面的应用^[1]。由于 CS 是关节软骨合成糖胺聚糖及透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)骨架的基本物质,糖胺聚糖及 HA 又是形成关节中蛋白聚糖的必需物质,因此对于 CS,无论是直接提取物还是由提取物降解所得的片段,都能为正常的关节基质形成提供额外的底物^[2]。给予外源性 CS 可以通过血液-滑膜屏障分散在软骨细胞内,并被软骨细胞吸收。另外,CS 是骨质中钙离子的交换剂,直接影响骨质的钙化和矿物晶体的形成^[3],还能够促进羟磷灰石微晶的形成^[4]。CS 相对分子质量 5 000 ~ 50 000,呈酸性,分子中含多个羧基,可作为络合物配位基团与 $^{99}\text{Tc}^m$ 进行络合反应。CS 的这些特点支持了其作为骨关节软骨显像的可能性。

本研究拟用 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记 CS,试图寻找能测定骨关节软骨的一种方法,为骨关节软骨病变的显像提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验动物 Balb/c 小鼠 55 只,体重 13 ~ 15 g,清洁级,由四川大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:纯度 $\geq 98\%$,分析纯,成都市科龙化工试剂厂提供;CS:纯度 $\geq 99\%$,分析纯,成都市科龙化工试剂厂提供;浓盐酸:浓度(36%~38%),分析纯,成都金山化学试剂有限公司提供;NaOH:纯度 $\geq 96\%$,分析纯,西安化学试剂厂提供;医用 ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^m$ 发生器:中国原子能科学研究院提供;新华 1 号层析纸:杭州新华纸业公司产品;双蒸水:实验室自备。

1.1.3 仪器 CRC-15R 型放射性活度计:美国, CAPINTEC. INC; DHW-600 型水浴恒温箱:北京东霞科学仪器厂;ESJ120-4 型电子天平:沈阳龙腾电子有限公司;FJ 2021 型 γ 放射免疫计数器:国营二六二厂;微量移液器:法国吉尔森公司;0.2 μm 无菌滤膜:中国上海密理博贸易有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 $^{99}\text{Tc}^m$ -CS 的制备 1)配制还原剂 A 液。取 37% 浓盐酸 0.1 mL 溶于 5 mL 双蒸水中并加入 8 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 作为高锝酸的还原剂(浓度为 1.57 g/L)。2)制备标记配体 B 液。用电子天平精确称量 CS 粉末 20 mg,溶于 2 mL 蒸馏水中,调节 pH 为 13(浓度 10 g/L),置 60 $^\circ\text{C}$ 水浴恒温箱中加热 30 min。3) $^{99}\text{Tc}^m$ -CS 的标记。取新鲜配制的 A 液 75 μL 加在 0.7 mL B 液中,调节反应体系 pH 为 7.4,再加入 555 MBq (0.3 mL)新鲜洗脱的 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$,上述混合物在 80 $^\circ\text{C}$ 的水浴恒温箱中反应 12 min,用孔径为 0.2 μm 的无菌滤膜过滤。

1.2.2 标记率的测定 采用薄层层析法,用新华 1 号层析纸作支持物,在双体系中上行展开,测定标记率。体系 I 为生理盐水: $^{99}\text{Tc}^m$ -CS 和游离 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 的 R_f 为 0.9 ~ 1.0,水解还原 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_2$ 的 R_f 为 0.0。体系 II 为丙酮: $^{99}\text{Tc}^m$ -CS 和水解还原 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_2$ 的 R_f 为 0.0,游离 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ 的 R_f 为 1.0。

1.2.3 $^{99}\text{Tc}^m$ -CS 生物分布 取健康昆明种小鼠 55 只,随机分为 11 组,每组 5 只。由尾静脉注射 0.1 mL(3.7 MBq) $^{99}\text{Tc}^m$ -CS,分别于注射后 10、30 min 以及 1、2、3、4、5、6、7、8、9 h 摘眼球取血后处死,收集血液、心、肺、肝、脾、肾、肌肉、关节软骨以及四肢长骨骨干等 9 种组织器官,称重并测定放射性计数。计算每克脏器组织的放射性摄取率(%ID/g),并计算软骨和上述器官放射性摄取比(T/NT)。

2 结果与讨论

2.1 $^{99}\text{Tc}^m$ -CS 的标记率及稳定性

1.2.1 节反应体系中其他条件保持不变,分别改变 CS 的用量及 pH、1.57 g/L $\text{SnCl}_2 \cdot$

2H₂O 的用量、反应 pH、温度和反应时间等条件,标记结果分别示于图 1~图 5。

由图 1 可见,反应前配制 CS 时应先将其 pH 调至碱性环境才有利于标记,尤其是 pH 为 13 时标记率可达到 84.4%。

由图 2 可知,⁹⁹Tc^m-CS 标记中取用 SnCl₂ 液的最佳用量是 50~75 μL,其标记率可达 82.3%。

由图 3 可见,反应体系在碱性和酸性条件下标记率低,不超过 70%,而在中性条件下其标记率较高,可达 82.1%。

由图 4 可见,温度低于 60 °C 时,标记率随温度增高而提高,60 °C 时达到 80.3%,以后随温度的升高,其标记率无明显提高或改善。

图 5 提示,在 9~15 min 时标记率大于 80.5%,延长反应时间标记率有所降低。

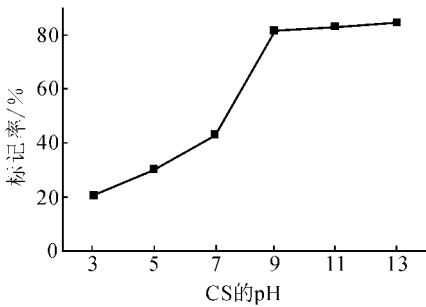


图 1 CS 液 pH 对⁹⁹Tc^m-CS 标记率的影响

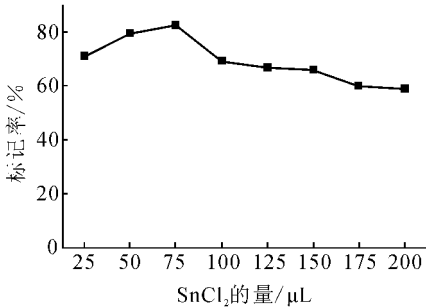


图 2 SnCl₂ 溶液的量对⁹⁹Tc^m-CS 标记率的影响

图 1~图 5 结果表明,最佳标记条件为: 1.57 g/L 的 SnCl₂ · 2H₂O 用量为 50~75 μL, CS(10 g/L、pH 13)0.7 mL, pH 7.4, ⁹⁹Tc^mO₄⁻ 555 MBq (0.3 mL), 反应温度 80 °C, 反应时间 9~15 min。此时可以获得较好的标记率,为 81.6%±1.7%。另外,实验证实,经孔径为 0.2 μm 的无菌滤膜过滤后,其放化纯度为 90.1%±

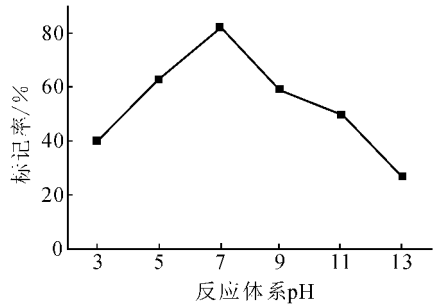


图 3 pH 对⁹⁹Tc^m-CS 标记率的影响

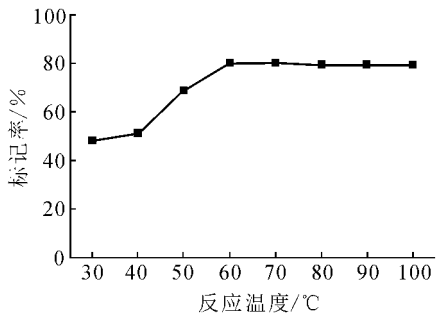


图 4 CS 液加热温度对⁹⁹Tc^m-CS 标记率的影响

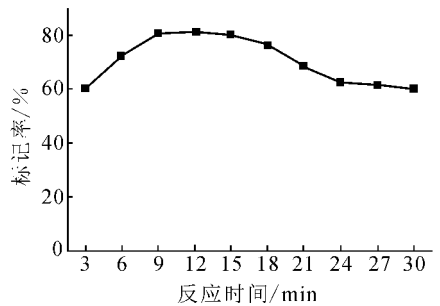


图 5 反应时间对⁹⁹Tc^m-CS 标记率的影响

1.2%,这可能是由于滤过了分子直径大于 0.2 μm 的包括胶体在内的异物成分。室温下放置 8 h 后的放化纯度仍为 90.1%。实验中发现,在络合前先将 CS 置于 pH 为 13 的碱性环境中,65 °C 以上加热 30 min 更有利于络合反应的进行,可能是由于在碱性环境中加热有利于 CS 在溶解状态下暴露配位基团,使得络合反应更能顺利进行。在酸性条件下,乙酰基易发生水解脱落,成为不同聚合度的低聚糖。而 CS 的用量与标记率在浓度为 9 g/L 以下时呈正相关,但继续增加配体浓度,其标记率上升不明显。

2.2 ⁹⁹Tc^m-CS 的体内生物分布

⁹⁹Tc^m-CS 在小鼠体内的生物分布列于表 1。

从表 1 可以看出, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 在小鼠体内的血液清除较快,在 1 h 时为 9.63% ID/g,2 h 时为 5.17% ID/g,4 h 时为 1.98% ID/g,8 h 时为 0.23% ID/g。主要经泌尿系统排出体外(4 h 时排泄 42% 左右)。随着血液的清除,心脏、肺脏和肌肉等脏器的放射性摄取降低,4 h 时分别为 0.57、0.82 和 0.66% ID/g。肾脏的放射性摄取最高,从注射起直到 8 h,其放射性摄取整体上也随血液清除的增多而降低,最高达 55.78%

ID/g,8 h 时为 28.12% ID/g。肝脏早期摄取放射性较多,30 min 时为 22.54% ID/g,之后呈递减趋势,4 h 时为 5.17% ID/g,8 h 时为 1.57% ID/g。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 在 小鼠体内的放射性摄取比列于表 2。

由表 2 可知, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 有一定的嗜软骨组织性。注射后第 4 h 时软骨与血液的 T/NT 为 8.31,软骨与骨的 T/NT 为 2.06,因此可以考虑药物注射后 4 h 为 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 最佳显像时间。

表 1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 在小鼠体内的生物分布($\bar{x}\pm s, n=5$)

组织或器官	不同时间 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 在小鼠体内的放射性摄取率/(%ID·g ⁻¹)				
	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h
心	3.52±0.20	1.24±0.13	1.29±0.10	0.57±0.09	0.26±0.07
肝	22.54±1.71	16.47±1.84	14.18±1.68	5.17±0.98	1.57±0.19
脾	9.22±2.11	7.95±1.45	7.09±1.13	8.91±1.65	1.22±0.34
肺	7.39±1.20	3.26±0.82	2.43±1.43	0.82±0.03	0.28±0.02
肾	55.78±3.45	41.19±3.12	30.53±2.25	40.87±2.91	28.12±2.03
肌肉	4.18±1.35	3.34±0.76	1.75±0.83	0.66±0.42	0.24±0.02
骨	4.55±0.94	5.51±1.77	6.07±2.05	7.99±1.56	4.36±0.87
血	16.24±1.65	9.63±1.16	5.17±0.96	1.98±1.02	0.23±0.03
软骨	4.73±0.69	6.39±0.73	8.68±1.59	16.45±3.07	6.97±1.28

表 2 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 在小鼠体内的放射性摄取比($\bar{x}\pm s, n=5$)

T/NT	不同时间 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 在小鼠体内的放射性摄取比				
	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h
软骨/骨	1.04	1.16	1.43	2.06	1.60
软骨/血液	0.29	0.66	1.68	8.31	30.30

3 结 论

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 标记方法简单可行,放化纯度可达到 90.1%±1.2%,价廉易得,且具有较好的嗜软骨组织性,预示了 CS 作为软骨显像剂底物的可能。今后还需探索更好的方法提高 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 的标记率并对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -CS 的性能进行改进,以进一步减少其在肝脏内的分布。

参考文献:

[1] Sobal G, Menzel EJ, Sinzinger H. Radiolabeling procedure, quality control and stability of (^{99}m Tc)-labeled chondroitin sulfate; a new approach of

targeting osteoarthritis [J]. Appl Radiat Isot, 2008, 66(4): 415-420.

- [2] Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, et al. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate [J]. Osteoarthritis Cartilage, 1998, 6 (Suppl A): 14-21.
- [3] Huter GK, Weinert CA. Inhibition of proteoglycan biosynthesis decreases the calcification of chondrocyte culture [J]. Connect Tissue Res, 1996, 35: 379-384.
- [4] Jiang H, Liu XY, Zhang G, et al. Kinetics and template nucleation of self-Assembled hydroxyapatite nano crystallites by chondroitin sulfate [J]. J Biol Chem, 2005, 280(51): 42 061-42 066.