

Automatic preparation of dopamine transporter imaging agent ^{11}C - β -CFT and its application in PET/CT brain imaging of newborn piglets

ZHANG Yan-fen, WANG Xiao-ming*, CAO Li, WANG Xiao-yu,
LIU Chang-ping, LI Yun-tao, XIN Jun, GUO Qi-yong

(Department of Radiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] **Objective** To develop an automatic synthesis method for the on-line preparation of dopamine transporter imaging agent ^{11}C -methyl-*N*-2- β -carbomethoxy-3- β -(4-fluorophenyl)-tropane (^{11}C - β -CFT), and to study the regional brain DAT uptake in healthy newborn piglets using PET/CT. **Methods** ^{11}C - β -CFT was automatically prepared on-line using TRACERlab FX-pro system of GE company. Dynamic scans were carried out in 3 healthy newborn piglets using PET/CT. The changes of distribution of ^{11}C - β -CFT in brain with time elapse were observed, and the curve of activity-time was drawn accordingly. **Results** The radiochemical purity of ^{11}C - β -CFT was over 98%, and the specific radioactivity was more than 370 MBq/ μmol . The synthesis yield was 20 mCi. After injection, ^{11}C - β -CFT accumulation in cortical, basal ganglia, and cerebellum was showed clearly at 5 min. The radioactivity in cortical and cerebellum exhibited decrease with time going. The radioactivity mainly accumulated in basal ganglia areas. **Conclusion** The automatic on-line preparation method is verified in producing ^{11}C - β -CFT of high radiochemical purity for a short period of time. Some brain receptor research on newborn piglets may be carried out with ^{11}C - β -CFT PET/CT imaging.

[Key words] Dopamine plasma membrane transport proteins; Hypoxia-ischemia, brain; Positron-emission tomography; Model, animal

自动化制备多巴胺转运蛋白显像剂 ^{11}C - β -CFT 及其在正常新生猪脑内 PET/CT 显像中的应用

张妍芬, 王晓明*, 曹礼, 王晓煜, 刘长平, 李云涛, 辛军, 郭启勇
(中国医科大学附属盛京医院放射科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 在线自动化制备多巴胺转运蛋白显像剂 ^{11}C -甲基-*N*-2- β -甲基酯-3- β -(4-氟-苯基)托烷 (^{11}C - β -CFT), 并用以进行新生猪 PET/CT 脑显像。方法 使用 GE Tracerlab Fx-pro 合成模块自动合成 ^{11}C - β -CFT。对 3 只正常新生猪进行 ^{11}C - β -CFT PET/CT 3D 动态显像, 观察脑内基底节放射性随时间的变化, 并绘制时间-活性曲线。结果 在线自动化制备的 ^{11}C - β -CFT 放射化学纯度 > 98%, 比活度 > 370 MBq/ μmol , 最终获得 ^{11}C - β -CFT 20 mCi。PET/CT 3D 脑动态显像显示, 静脉注射后 5 min 内即可见 ^{11}C - β -CFT 在大脑皮质、小脑及基底节区域放射性分布较高, 脑白质放射性分布较低, 左右侧放射性浓聚程度对称; 随着时间延长, 大脑皮质、小脑的放射性明显减低, 而基底节显示清晰。结论 在线自动化制备 ^{11}C - β -CFT 简单方便、速度快、放化纯度高, 可用于进行新生猪的脑受体方面的研究。

[关键词] 多巴胺膜转运蛋白; 缺氧缺血, 脑; 正电子发射型体层摄影术; 模型, 动物

[中图分类号] R-332; R817.4 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2010)08-1409-04

[基金项目] 国家自然科学基金(30770632)。

[作者简介] 张妍芬(1974—), 女, 黑龙江大庆人, 在读博士, 副主任医师。研究方向: 神经系统影像诊断。E-mail: zyf_com@126.com

[通讯作者] 王晓明, 中国医科大学附属盛京医院放射科, 110004。E-mail: wangxm024@163.com

[收稿日期] 2010-02-01 [修回日期] 2010-04-08

多巴胺转运蛋白(dopamine transporter, DAT)是定位于多巴胺能神经末梢细胞膜上突触前膜的单胺类特异转运蛋白,它的功能是将突触间隙的多巴胺运回突触前膜,是控制脑内多巴胺(dopamine, DA)水平的关键因素^[1]。许多研究已经证明,帕金森病(Parkinson disease, PD)、精神分裂症和抑郁症等疾病与 DA 系统的功能失常关系极为密切^[2-6],而 DAT 能够直接、灵敏地反映突触前 DA 能神经元变化信息,且 DAT 的变化比 DA 受体的变化更敏感、更直接。DAT 正电子发射计算机断层(PET)是当前分子核医学研究的热点之一。目前研究较多的 DAT 显像剂主要为可卡因类衍生物,如 N-2β-甲基酯-3β-(4-氟-苯基)托烷(β-CFT)和 N-2β-甲基酯-3β-(4-碘-苯基)托烷(β-CIT)系列,均与 DAT 有很强的亲和力。虽然 β-CIT 与 DAT 的亲和力更高^[7],但它与其他受体如 5-羟色胺受体和肾上腺素受体具有同等的亲和力,短时间内纹状体与周围组织的计数比不高。而 β-CFT 虽然与 DAT 的亲和力低于 β-CIT,但与 5-羟色胺受体和去甲肾上腺素受体的亲和力低,所以¹¹C-β-CFT 比¹¹C-β-CIT 有更大的诊断价值。新生猪的脑组织结构与人近似^[8],有较好的可比性,因此新生猪缺氧缺血模型在新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)研究中得到广泛应用,但新生猪模型的脑 PET/CT 研究目前还鲜见报道。本研究探讨¹¹C-β-CFT 的在线自动化制备方法及其在正常新生猪脑 PET/CT 显像中的应用。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 四氢呋喃(HPLC 纯化,无稳定剂;Tedia 公司);乙醇(USP 级,Milennium 公司);二甲基亚砷(Sigma-Aldrich 公司);前体:nor-β-CFT(ABX 公司);Plus C-18 分离柱(Waters 公司)。Tracerlab Fx-pro 合成模块(GE 公司)。新生猪 3 只,体质量(2500±500)g,由本院动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 在线自动化制备¹¹C-β-CFT 以气相循环法合成¹¹C-碘甲烷(¹¹C-CH₃I),0.4 ml 溶有 1.0 mg 前体的二甲基亚砷(DMSO)在常温下吸附¹¹C-CH₃I,100°C 标记反应 3 min,冷却至 30°C。启动多功能合成器。程序自动将 1.5 ml 去离子水注入到反应瓶稀释反应液,并将其传至 C-18 柱上,产品被 C-18 柱吸附,同时用 10 ml×2 水淋洗 C-18 柱,最后用 1.0 ml 乙醇将¹¹C-β-CFT 从 C-18 柱上洗脱下来,

收集瓶中加 10 ml 生理盐水稀释,使最终乙醇含量低于 10%,无菌滤膜过滤得到最终的¹¹C-β-CFT,测定其放射化学纯度和 pH 值。留取一定体积的溶液,待衰变后进行无菌、无热原检查。

1.2.2 放化纯度的测定 采用高效液相-质谱法对痕量的 CFT 进行分析,选用 VP-ODS 柱(150×4.6)为色谱柱,流动相为甲醇:0.1%的甲酸溶液=60:40,流速为 0.5 ml/min,柱温:40°C。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式,用于定量分析的离子为 m/z 277→278。

1.2.3 正常新生猪 PET/CT 脑显像 采用 GE Discovery ST PET/CT 扫描仪,采用脑 3D 采集模式,CT 采集条件:80 kV,50 mA,层厚 3.75 mm。图像重建方法采用迭代法(OSEM),以 CT 数据进行 PET 采集数据的衰减校正,利用 Xeleris 图像融合工作站调用 PET/CT 数据,获得轴位图像数据,PET 图像层厚 3.25 mm。新生猪在戊巴比妥钠(50 mg/kg 体质量)

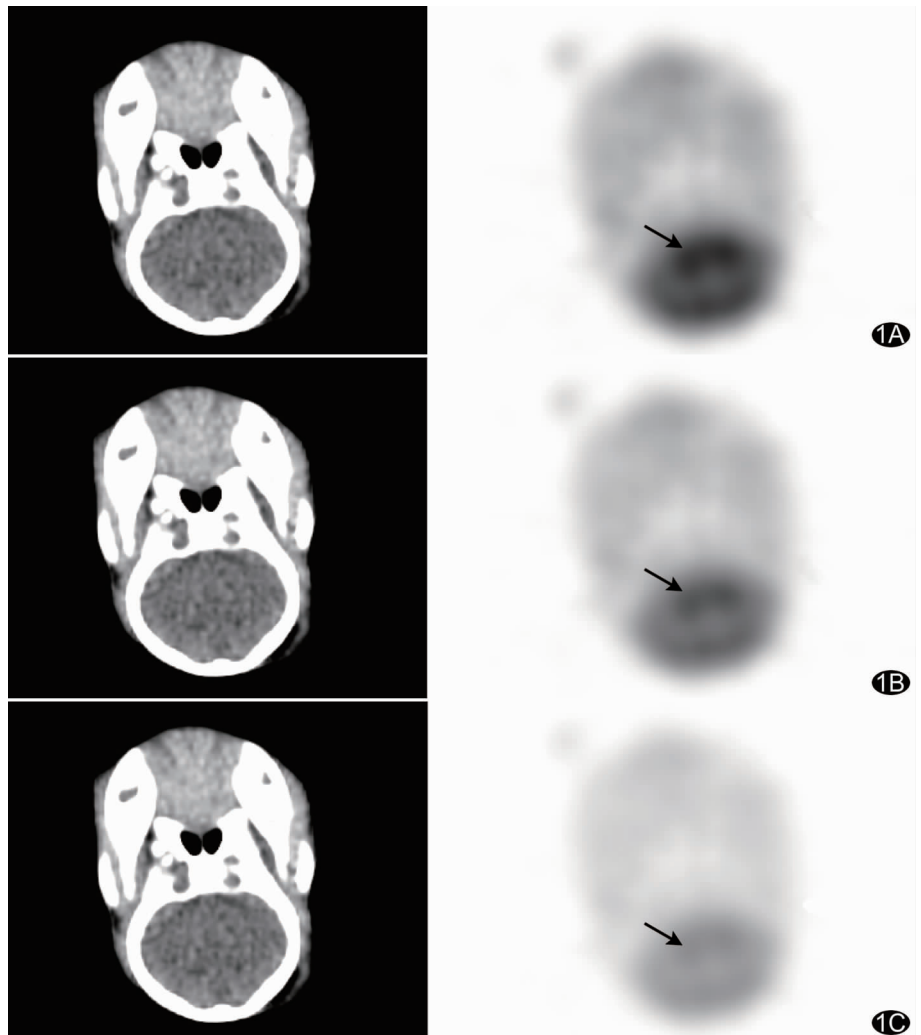


图 1 同一只新生猪不同时间¹¹C-β-CFT PET/CT 图像 A. 5 min 静脉注射后 5 min 内即可见¹¹C-β-CFT 在大脑皮质、小脑及基底节区域放射性分布较高,脑白质放射性分布较低,图像清晰,左右侧放射性浓聚程度显示对称; B. 30 min 随着时间延长,大脑皮质、小脑放射性明显减低,而基底节显示清晰; C. 50 min 而后基底节的放射性也逐渐消退,影像逐渐模糊(箭示基底节)

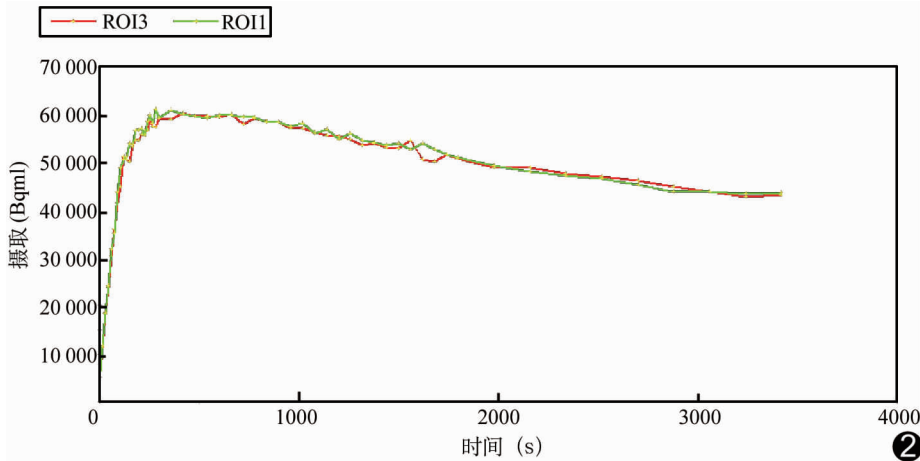


图2 左右两侧基底节 ROI 的时间-活性曲线 (左侧 ROI1, 右侧 ROI3) 5 min 时放射性摄取达到峰值, 在 25 min 之前曲线下降迅速, 以后下降比较缓慢

腹腔内麻醉下颈静脉注射 ^{11}C - β -CFT (1.5~2.0 mCi/只) 后动态扫描, 动态采集设置 20×15 s, 25×60 s, 10×180 s。对横断面图像进行感兴趣区 (region of interest, ROI) 分析, 绘制基底节区动态曲线。

2 结果

2.1 ^{11}C - β -CFT 的制备 从 CO_2 传到合成器上生产 ^{11}C - CH_3I , nor- β -CFT 捕获 ^{11}C - CH_3I , 到粗产品的转移、纯化和洗脱, 全自动化制备 ^{11}C - β -CFT, 从 ^{11}C - CH_3I 到可供注射的 ^{11}C - β -CFT 耗时 3 min。最终获得 ^{11}C - β -CFT 20 mCi。从 CO_2 到最终产物反应时间约为 90 min。

用 C-18 柱纯化, 产品用 HPLC 没有测到杂质峰。在线自动化制备的 ^{11}C - β -CFT 无需 HPLC 分离纯化, 放化纯 $> 98\%$, 比活度 > 370 MBq/ μmol , pH 值为 7, 衰变后溶液符合无菌和无热原要求。

2.2 新生猪 PET/CT 成像结果 3 只正常新生猪 ^{11}C - β -CFT PET/CT 显像可见新生猪泪腺、唾液腺等腺体显影清晰且浓聚。静脉注射后 5 min 内即可见 ^{11}C - β -CFT 在大脑皮质、小脑及基底节区域放射性分布较高, 脑白质放射性分布较低, 图像清晰, 左右侧放射性浓聚程度显示对称; 随着时间延长, 大脑皮质、小脑的放射性明显减低, 而基底节显示依然清晰; 而后基底节的放射性也逐渐消退, 影像逐渐模糊 (图 1)。两侧基底节 ROI 的时间-活性曲线显示 5 min 内放射性摄取达到峰值, 在 25 min 之前曲线下降迅速, 以后下降比较缓慢, 30 min 后, 药物在脑内分布基本稳定 (图 2)。

3 讨论

绝大多数 ^{11}C 正电子药物用 ^{11}C - CH_3I 作为中间体来生产, 因为它的反应活性较高、容易控制, 而且可以通过自动化反应完成。因此本实验使用 ^{11}C - CH_3I 作为中间体自动化反应制备 ^{11}C - β -CFT。

液相反应法是合成 ^{11}C - CH_3I 的传统方法, 但存在较多缺点, 如反应条件的要求比较严格、操作繁琐等。本研究中采用气相循环法合成 ^{11}C - CH_3I , 可有效避免传统方法的缺点, 最重要的是提高了药物的比活度。

本研究早期在合成过程中用丙酮作为溶剂溶解前体, 产率非常低, 最终仅仅获得 2.6 mCi 的 ^{11}C - β -CFT; 后来改用 DMSO 作为溶剂, 产量大大提高, 最终获得大于 30 mCi 的 ^{11}C - β -CFT, 说明 DMSO 溶剂对标记率的改善非常明显。另外, 丙酮需要在 -20°C 下吸附 ^{11}C - CH_3I , 而 DMSO 仅在常温下就可吸附 ^{11}C - CH_3I 。

本实验使用 Tracerlab Fx-pro 合成器, 具有完整的 C-11 甲基化标记反应系统, 用 ^{11}C - CH_3I 为中间体合成 ^{11}C - β -CFT, 从 ^{11}C - CO_2 捕获到最终产物的获得, 整个合成过程都在此合成器中完成, 质量得到可靠保证, 是一种最为简单方便省时的方法。

^{11}C - β -CFT 是一些精神和神经疾病研究中常用的 DAT 示踪剂。根据病理学研究, PD 由于中脑黑质多巴胺能神经元大量丧失, 纹状体 DA 含量降低, 导致 DA 逆轴突转运减少; 因此, ^{11}C - β -CFT DAT 显像在 PD 的研究中得到广泛应用。研究证实, 在 PD 模型大鼠 ^{11}C - β -CFT 显像中, 患侧纹状体 CFT 摄取较健侧明显降低, 两侧不对称; 在人类 PD 患者 CFT 显像中也显示患侧纹状体 CFT 摄取较健侧明显降低^[9]。这些结果表明 ^{11}C - β -CFT PET 显像在监测 DA 能神经元变性疾病中有重要作用, 而 HIE 的基底节损伤与多巴胺能系统的活动密切相关^[1,10]。研究^[10]表明, DA 的过度释放在基底节对缺氧缺血易损性方面起重要作用。控制细胞外 DA 浓度的主要机制是突触前神经元通过 DAT 将多巴胺再摄取进细胞内^[1]。Araki 等^[11]在脑缺血鼠模型中发现 DA 重摄取在再灌注期间无明显改变。而 Meng 等^[12]研究新生儿 HIE, 发现在相对轻的基底节损伤 (basal ganglia injury, BGI) 病例, 神经元和神经纤维表达 DAT 增强, 而在较重的 BGI 病例, 神经元和神经纤维表达 DAT 减少。另有研究^[12]表明脑缺血鼠模型在复苏 1 h 后 DAT 摄取 DA 明显下降。因此, ^{11}C - β -CFT DAT 显像在 HIE 的研究中有广泛的应用前景。本研究 PET/CT 动态成像中, ^{11}C - β -CFT 主要浓聚在双侧基底节区, 可以获得清晰的基底节图像, 显示 DAT 的分布, 其中以 20~30 min 最稳定; 在各叶皮层、小脑区域放射性明显减低, 说明 ^{11}C - β -CFT 对 DAT 的特异性较高; 提示可用新生猪进行 PET/CT 脑多巴胺神经递质系统受体显像的研究工作, 为 HIE 在活体内的基础研究奠定基础。

本课题组下一步将推进新生猪缺氧缺血模型的 ^{11}C - β -CFT PET/CT 研究工作, 并用液相色谱分析新生猪缺氧缺血模型基底节 DA 的浓度变化, 分析二者相关性, 探讨 DAT 在 HIE 中的作用机制。

[参考文献]

- [1] Meng SZ, Ohyu J, Itoh M, et al. Dopamine transporter and nitric

- oxide synthase in hypoxic-ischemic brain. *Pediatr Neurol*, 2000, 22(2):115-121.
- [2] Agid O, Mamo D, Ginovart N, et al. Striatal vs extrastriatal dopamine D2 receptors in antipsychotic response—a double-blind PET study in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 32(6):1209-1215.
- [3] Montgomery AJ, Stokes P, Kitamura Y, et al. Extrastriatal D2 and striatal D2 receptors in depressive illness: pilot PET studies using [¹¹C]FLB 457 and [¹¹C]raclopride. *J Affect Disord*, 2007, 101(1-3):113-122.
- [4] Kim JY, Chung EJ, Lee WY, et al. Therapeutic effect of repetitive transcranial magnetic stimulation in Parkinson's disease: analysis of [¹¹C]raclopride PET study. *Mov Disord*, 2008, 23(3):207-211.
- [5] Yoder KK, Kareken DA, Morris ED. What were they thinking? Cognitive states may influence [¹¹C]raclopride binding potential in the striatum. *Neurosci Lett*, 2008, 430(1):38-42.
- [6] Mehta MA, Montgomery AJ, Kitamura Y, et al. Dopamine D2 receptor occupancy levels of acute sulpiride challenges that produce working memory and learning impairments in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008, 196(1):157-165.
- [7] Neumeier JL, Tamagnan G, Wang S, et al. N-substituted analogs of 2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4'-iodophenyl) tropane (beta-CIT) with selective affinity to dopamine or serotonin transporters in rat forebrain. *J Med Chem*, 1996, 39(2):543-548.
- [8] 刘国瑞, 李仰康, 郭岳霖, 等. 新生猪缺氧缺血脑损伤模型制备的研究. *实用儿科临床杂志*, 2005, 20(3):258-259.
- [9] 张锦明, 田嘉禾, 郭喆, 等. 在线自动化制备多巴胺转运蛋白显像剂¹¹C-β-CFT. *中华核医学杂志*, 2005, 25(3):142-145.
- [10] Yang ZJ, Torbey M, Li X, et al. Dopamine receptor modulation of hypoxic-ischemic neuronal injury in striatum of newborn piglets. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(7):1339-1351.
- [11] Araki T, Kato H, Shuto K, Fujiwara T, et al. Effects of cerebral ischemia on dopamine receptors in the gerbil striatum. *Eur J Pharmacol*, 1996, 306(1-3):73-79.
- [12] Rafatowska U, Sulkowski G, Wa'skiewicz J, et al. Alteration of dopamine transport and dopamine D(2) receptor binding in the brain induced by early and late consequences of global ischaemia caused by cardiac arrest in the rat. *Resuscitation*, 2000, 47(2):195-201.

致谢

科研工作的顺利完成离不开他人的帮助,在正文的最后应向对本研究提供过帮助的人致以谢意。致谢的对象包括:对研究工作提出指导性建议者,论文审阅者,资料提供者,技术协作者,帮助统计者,为本文绘制图表者,提供样品、材料、设备以及其他方便者。

致谢必须实事求是,应防止剽窃掠美之嫌,也勿强加于人,如未经允许写上专家、教授的名字,以示审阅来抬高自己。致谢一般要说明被谢者的工作的内容,如“技术指导”、“收集资料”、“提供资料”等。

关键词

关键词又称主题词,是位于摘要之后,在论文中起关键作用的、最能说明问题的、代表论文特征的名词或词组。它通常来自于题目,也可以从论文中挑选。一般每篇论文要求 2~5 个关键词。每个关键词都可以作为检索论文的信息,若选择不当,会影响他人的检索效果。医学上现在主要使用美国《医学索引》(Index edicus)的医学主题词表(Medical Subject Headings, MeSH)最新版作为规范,亦可参考中国医学科学院情报研究所翻译地英汉对照《医学主题词注释字顺表》。非主题词表的关键词为自由词,只有必要时,才可排列于最后。有些新词也可选用几个直接相关的主题词进行搭配。