

文章编号 :0253-9950(2006)04-0244-05

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶的制备和生物分布

屈 金^{1,2}, 魏立新¹, 杜玉枝¹, 海 平³, 梁 霞³, 薛 红³

1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 西宁 810008;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049;

3. 青海省心血管病专科医院 核医学科, 西宁 810012

摘要:为考察明胶静脉注射后在机体内的吸收及分布情况,用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 对明胶进行整体标记,然后将标记物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶静脉注射于小鼠和家兔体内,检测不同时间后标记物的生物分布。结果表明,明胶可以被 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 所标记,且标记产物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶放化纯大于 95%;小鼠体内分布显示其具有较高肾摄取率,5 min 时小鼠肾的摄取率达到 29.36%/g,20 min 时可以达到 66.88%/g;家兔双肾显像清晰。说明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶具有特异性肾分布的特点。

关键词:明胶;肾显像剂; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$

中图分类号:R817 **文献标识码:**A

Labeling of Gelatin With $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ and Its Biodistribution

QU Jin^{1,2}, WEI Li-xin¹, DU Yu-zhi¹, HAI Ping³, LIANG Xia³, XUE Hong³

1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3. Department of Nuclear Medicine, Qinghai Heart Disease Hospital, Xining 810012, China

Abstract: In order to investigate *in vivo* absorption and distribution of gelatin after injection intravenously, gelatin was directly labeled with reduced $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ that was formed by reduction of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ with NaBH_4 . After purification by anion exchange resin and sterilization by micropore membrane filtration the $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -gelatin was injected intravenously into normal mice and a rabbit. The biodistribution of this labeled compound in mice showed that a high renal uptake, 29.36%/g at 5 min and 66.88%/g at 20 min post injection and slow clearance compared with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA. The renal scintigraphy of the rabbit demonstrated clear-cut images at 2, 5, 18 and 20 min after $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -gelatin injection. The experimental results indicate that $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -gelatin possessed the feature of renal specificity.

Key words: gelatin; renal imaging agent; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$

自上世纪 80 年代中期,以 $\text{Tc}(\text{ON}_3\text{S})$ 为中心核的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MA G₃ (巯基乙酰基三甘氨酸)肾

显像剂出现以来,许多研究者试图通过改变 N_3S 配体中氨基酸种类、配体肽链长度研制新的 N_3S

收稿日期:2006-03-06; 修订日期:2006-06-15

基金项目:青海省科技部重大基础研究前期研究专项基金资助项目(2003CCA01200)

作者简介:屈 金(1981—),女,陕西西安人,硕士,现从事明胶及胶原蛋白生物活性研究。

型配合物,近来合成了新的 N_3S 型配合物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{-MA G}_2$ (巯基乙酰基双甘氨酸)。采用这种设计方法已经研制成功了许多核医学诊断用放射性药物;但其缺点是研究成本高、设计所需时间长、配体的合成过程也比较复杂。

明胶作为静脉注射剂的辅料由于其“增加血液黏度,抑制血液凝固及延长出血时间”已经被美国FDA公布取消;明胶类血浆代用品对血液系统的显著影响也被越来越多的实验所证实^[1-4]。为明确明胶注射后对机体其他组织有无特异吸收,本工作在前期将 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记在明胶上,试图以 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 作为示踪剂从而了解明胶的去向时发现, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶有明显的趋肾作用。为此本工作制备了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶,对其作为肾小球滤过型肾功能显像剂的可能性进行初步研究。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

RM-905a放射性核素活度计,中国剂量科学研究院;FM-1000型免疫计数器,西安凯普机电责任有限公司;Cary300型紫外-可见分光光度计,美国Varian公司;单光子发射计算机断层仪(Millennium VG3 With Hawkeye-SPECT),美国GE公司;凝胶型 ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器,北京原子高科核技术应用股份有限公司;0.1 μm 薄膜过滤器,法国MILIPORE公司;Whatman No. 1层析纸,英国Whatman公司;B型明胶, NaBH_4 ,Dowex1 $\times 8$ 阴离子交换树脂均为德国Sigma公司生产;实验所用试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物

实验用小鼠、家兔购自青海省实验动物中心。

1.3 实验方法

1.3.1 明胶的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 利用蛋白质肽链上羧基与 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 配位进行标记^[5]。制备过程如下:从 ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器中淋洗出10 mL $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 淋洗液,然后加入1.2 mL 0.5 mol/L HCl溶液,100 mg明胶溶液(56 $^\circ\text{C}$ 水浴中1 g明胶溶于10 mL水组成的明胶溶液),充分搅拌后加入1.4 mL NaBH_4 (18.9 mg/mL)溶液,此时溶液的pH值为7.65。由于氧化还原反应生成了硼酸盐,同时由于生成的氢气使溶液表面产生泡沫,须搅拌溶液至泡沫消失。

1.3.2 标记物的纯化 将上述所得溶液通过Dowex1 $\times 8$ (氯离子型)离子交换柱(去除明胶上的游离 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$),以生理盐水(9 g/L NaCl)为淋洗液,收集洗脱液,每瓶10 mL;将洗脱液逐瓶通过无菌0.1 μm 薄膜过滤器,收集滤液并依次编号,产物即是标记物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶溶液。

1.3.3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶的体外稳定性实验 取1份经过纯化后的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶1 mL,用两倍体积的生理盐水稀释,室温下放置24 h。在此期间分别于1,2,6,12,24 h取少量样品用纸层析法测定样品的放化纯度。同样取1份经过纯化后的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶1 mL,用两倍体积的新鲜人血清稀释,于37 $^\circ\text{C}$ 水浴中放置24 h。在此期间分别于1,2,6,12,24 h分别取少量样品用纸层析法测定样品的放化纯度。

1.3.4 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶的小鼠体内分布实验 取健康昆明种小鼠(清洁级)36只,平均体重18~20 g,雌雄不限,随机分为9组,每组4只。每只小鼠尾静脉注射 $3.7 \times 10^5 \text{ Bq}$ (10 μCi) $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶溶液(0.2 mL),分别于2,5,10,20,30,60,120,240和360 min后断头处死,采其血并摘取心、肝、肺、脾、肾、胃并称重,测定各器官的放射性计数,计算每单位质量组织放射性摄取率,重复测量4次,测量结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3.5 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶的家兔显像实验 2 kg家兔,显像前20 min灌胃20 mL水,固定后弹丸式耳缘静脉注射标记物37 MBq (0.5 mL),然后于单光子发射计算机断层仪(SPECT)下在不同时间摄取肾显像图。

2 结果和讨论

2.1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶的标记率

用毛细玻璃管取纯化前的产物,点样于Whatman No. 1层析纸原点处,以生理盐水为展开剂上行展开到10~15 cm处,免疫计数器测量层析纸各段的放射性计数: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶, $R_f = 0$;游离 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$, $R_f = 0.8 \sim 0.9$ 。据此得出 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶的标记率约为63.82%。

2.2 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶的放射化学纯度

测量纯化后各瓶溶液的放射性活度。每瓶溶液放射性活度占纯化前总活度的百分比(RCP)示于图1。

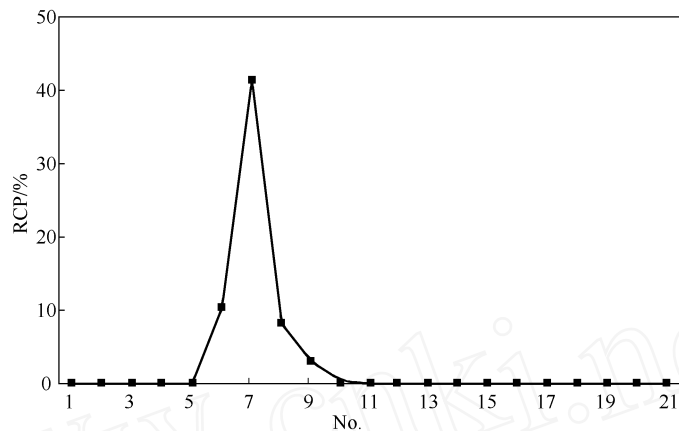


图 1 纯化后⁹⁹Tc^m-明胶的放射性纯度

Fig. 1 Ratio of activity in every bottle with sum activity after purification of ⁹⁹Tc^m-gelatin

用毛细玻璃管分别取 6[#] - 9[#] 瓶的收集液, 点样于 Whatman No. 1 层析纸原点处, 以生理盐水为展开剂上行展开到 10—15 cm 处, 免疫计数器分段测量层析纸各段的放射性计数, ⁹⁹Tc^m-明胶, R_f = 0; 游离⁹⁹Tc^mO₄⁻, R_f = 0.8 ~ 0.9。经过纯化后⁹⁹Tc^m-明胶的放化纯度约为 95 %。

2. 3 ⁹⁹Tc^m-明胶的体外稳定性

⁹⁹Tc^m-明胶在室温下, 于 2 倍体积的生理盐水中放置 1, 2, 6, 12 和 24 h 后的放化纯度分别为 95.2 %, 93.7 %, 92.6 %, 91.6 % 和 90.2 %。⁹⁹Tc^m-明胶在 37 °C 水浴中与新鲜人血清温浴 1, 2, 6, 12 和 24 h 后的放化纯度分别为 95.4 %, 94.1 %, 92.8 %, 91.0 % 和 89.4 %。

2. 4 ⁹⁹Tc^m-明胶的小鼠体内分布

⁹⁹Tc^m-明胶标记物注入不同时间后, 在小鼠体内的生物分布列入表 1。不同时间肾与其它组织的摄取比列入表 2。

由表 1 结果可以看出, ⁹⁹Tc^m-明胶有比较高的肾摄取率, 同时有较长的滞留时间。在静脉注射 2 min 后, 肾的摄取率为 23.46 %/g, 5 min 时肾的摄取率可以达到 29.36 %/g, 20 min 时可以达到 66.88 %/g, 这可能与明胶的排泄主要依赖于肾脏有关。此外, ⁹⁹Tc^m-明胶在血液中的清除也很快。表 2 数据表明, ⁹⁹Tc^m-明胶对肾脏有比较明确的靶向性。由于明胶制剂在机体内的排出主要是通过肾小球滤过作用。因此, ⁹⁹Tc^m-明胶有可能成为一种肾小球滤过型肾功能显像剂。

表 1 ⁹⁹Tc^m-明胶在小鼠体内的生物分布

Table 1 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m-gelatin after injected intravenously in mice at different time

组织 (Tissue)	摄取率(Uptake ratio)/(% · g ⁻¹)								
	2 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
血 (Blood)	39.67 ±0.69	28.56 ±0.28	18.94 ±0.28	10.76 ±0.01	4.34 ±0.13	2.05 ±0.05	1.13 ±0.03	1.07 ±0.03	0.91 ±0.02
心(Heart)	7.70 ±0.19	6.34 ±0.11	5.46 ±0.12	3.44 ±0.38	1.77 ±0.10	1.15 ±0.08	0.82 ±0.02	0.43 ±0.03	0.33 ±0.02
肝(Liver)	12.67 ±0.41	17.68 ±0.47	22.97 ±0.65	29.03 ±0.86	18.76 ±0.85	18.41 ±1.03	10.76 ±0.33	9.40 ±0.43	7.29 ±0.78
肺(Lung)	7.69 ±0.16	7.20 ±0.28	6.01 ±0.20	2.79 ±0.57	1.57 ±0.55	1.23 ±0.23	0.71 ±0.04	0.59 ±0.09	0.46 ±0.02
脾(Spleen)	5.16 ±0.16	5.15 ±0.13	5.54 ±0.27	6.85 ±0.55	6.02 ±0.26	6.92 ±0.09	2.61 ±0.14	3.67 ±0.22	1.26 ±0.04
肾 (Kidney)	23.46 ±4.40	29.36 ±5.86	48.74 ±6.48	66.88 ±9.69	43.68 ±1.86	39.66 ±0.80	23.47 ±1.90	21.0 ±0.42	15.0 ±0.42
胃(Stomach)	5.72 ±2.15	12.08 ±4.82	19.34 ±4.40	21.48 ±8.23	7.15 ±3.47	6.59 ±1.19	6.40 ±1.95	2.29 ±0.64	1.67 ±0.05

注(Note) : n = 4

表 2 肾与其它组织摄取的比值
Table 2 Tatio of uptake ratio in kidney to those in other organs

T/NT	2 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
肾/血 (Kidney/ Blood)	0.59	1.03	2.57	6.22	10.06	19.35	20.77	19.63	16.48
肾/心 (Kidney/ Heart)	3.05	4.63	8.93	19.44	24.68	34.49	28.62	48.84	45.45
肾/肝 (Kidney/ Liver)	1.85	1.66	2.12	2.30	2.33	2.15	2.18	2.23	2.06
肾/肺 (Kidney/ Lung)	3.05	4.08	8.11	23.97	27.82	32.24	33.06	35.59	32.61
肾/脾 (Kidney/ Spleen)	4.55	5.70	8.80	9.76	7.26	5.73	8.99	5.72	11.90
肾/胃 (Kidney/ Stomach)	4.10	2.43	2.52	3.11	6.11	6.02	3.67	9.17	8.98

根据文献[6]报道,⁹⁹Tc^m ³/DTPA 在 1 min 肾的初始摄取率为 29.60 %/g,1 min 后肾摄取率迅速下降,在 30 min 时已经降至 3.88 %/g;而⁹⁹Tc^m-明胶在注射后 2 min 肾的摄取率为 23.46 %/g,5 min 时肾的摄取率为 29.36 %/g,20 min 时达到最大值 66.88 %/g,30 min 时下降至 43.68 %/g。这表明,注射后的前几分钟里⁹⁹Tc^m-明胶的肾摄取率和⁹⁹Tc^m ³/DTPA 相当,⁹⁹Tc^m-明胶完全能达到肾功能显像的要求,但是相比⁹⁹Tc^m ³/DTPA,⁹⁹Tc^m-明胶从靶器官清除的速度相对较慢。从肾与其他组织摄取率比值来看,⁹⁹Tc^m ³/DTPA 对肾的靶向性更优于⁹⁹Tc^m-明胶。这表明,虽然⁹⁹Tc^m-明胶具有特异性肾分布的特性,但与目前临床上应用最广的肾功能显像剂⁹⁹Tc^m ³/DTPA 相比,⁹⁹Tc^m-明胶在放射性的迅

速清除和对目的器官的靶向性功能上还有待提高。

2.5 ⁹⁹Tc^m-明胶的家兔显像

图 2 是家兔耳缘静脉注射⁹⁹Tc^m-明胶 37 MBq(1.0 mCi) 后于不同时间后在 SPECT 下的肾动态照片。从图 2 看出,在 2 min 时照片上部的两个月牙状亮点为完整清晰的肾显影,5 min 时肾显影已经非常清晰明显,分布均匀。由此可见,⁹⁹Tc^m-明胶具有明显的肾聚集作用;20 min 时照片下部的亮点为膀胱显影,提示放射性药物已经由肾脏排至膀胱。在注射后 180 min 时间里,照片中双肾显像一直清晰完整,膀胱显影的变化说明了药物从肾脏排至膀胱,随后随尿液排出体外。但作为一种肾功能显像剂,这也表明⁹⁹Tc^m-明胶在显像后从机体器官清除的速度还不够快。

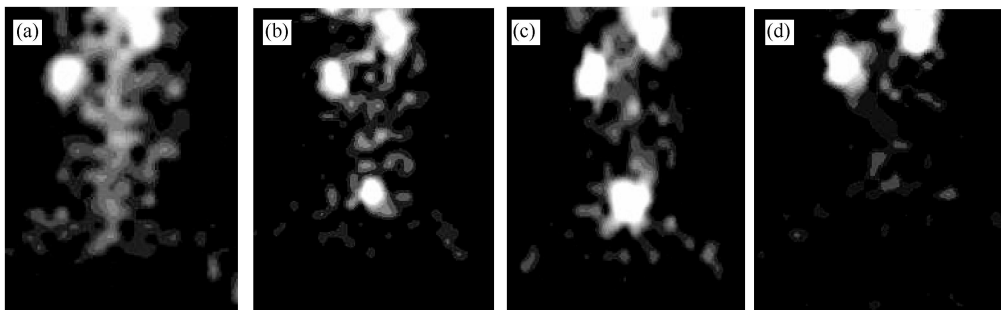


图 2 家兔耳缘静脉注射⁹⁹Tc^m-明胶不同时间的照片
Fig. 2 Photos of rabbit injected ⁹⁹Tc^m-gelatin intravenously on the edge of ear for defferent time
(a) ——2 min, (b) ——5 min, (c) ——20 min, (d) ——180 min

3 结 论

用天然动物源蛋白质——明胶作⁹⁹Tc^m标记的对象,制备得到了放射化学纯度大于 95 %的⁹⁹Tc^m-明胶溶液,⁹⁹Tc^m-明胶在小鼠体内的生物分布结果表明,⁹⁹Tc^m-明胶的肾摄取效果较好,在对

小鼠进行静脉注射 2 min 后肾摄取率可达到 23.46 %/g,5 min 后肾摄取率可达到 29.36 %/g,20 min 时可以达到 66.88 %/g;⁹⁹Tc^m-明胶对肾脏有比较明确的靶向性,肾/肝的放射性比率始终大于 1;同时⁹⁹Tc^m-明胶在血液中的清除很快,血半清除期不到 10 min。家兔显像结果表明,

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶具有明显的趋肾作用,2 min 时双肾显影清晰完整, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶具有特异性肾分布的特点。

明胶是动物的骨、皮肤、肌腱中胶原蛋白的降解产物。无论用于食品还是用于医药行业,长期以来普遍认为明胶是安全的,甚至对人体是有益的。但是,近来国内外均有文献报道^[1-4],明胶用于静脉注射可能有增加血液黏度、抑制血液凝固、延长出血时间的作用。本项研究工作中的标记物 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶经静脉注射进入机体,标记产物中明胶的浓度不到 1%,小于明胶用于静脉注射作血浆代用品时的浓度 6%。但出于对机体安全的考虑,仍有必要对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -明胶是否会对血液系统产生不利影响进行进一步深入细致的研究。

参考文献:

- [1] Evans P A, Glenn J R, Heptinstall S, et al. Effects of Gelatin-Based Resuscitation Fluids on Platelet Aggregation[J]. Br J Anaesth, 1998, 81: 198-202.
- [2] Glowaski M M, Erb H N, Barr S C. Effects of Oxypolygelatin and Dextran 70 on Haemostatic Variables in Dogs [J]. Vet Anaesthesia Analgesia, 2003, 30: 202-210.
- [3] 徐 雪,金海龙,赵砚丽,等. 明胶类血浆代用品对凝血和纤溶功能的影响[J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(3): 196-199.
- [4] 宋文娇,吴战宏,王学斌,等. 新肾显像剂 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TTHA 的制备和生物分布[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2001, 37(1): 93-95.
- [5] Lebowitz E, Athkins H L, Hauser W, et al. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Gelatin: A "Compound" With High Renal Specificity [J]. Int J Appl Radiat Isot, 1997, 22: 786-789.
- [6] Miemi T T, Kuntitunen A H. Artificial Colloids Impair Haemostasis: An *in Vitro* Study Using Thromboelastometry Coagulation Analysis[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2005, 49: 373-378.