

肿瘤VIP受体显像的实验研究*

李前伟** 谭天秩

(华西医科大学附属第一医院 610041)

摘要 探讨了放射性碘标记血管活性肠肽(VIP)实现肿瘤VIP受体显像的可能性。应用氯胺-T法标记、Sephadex G-50柱层析分离纯化制备 ^{125}I -VIP, 硅胶TLC与体外竞争结合实验检测标记VIP的稳定性与生物活性;研究 ^{125}I -VIP在荷SGC7901裸鼠体内分布。结果显示: ^{125}I 标记率为73.8%;标记VIP的比活度为18.2PBq/mol;放化纯为98%, -80°C 贮存48天后为96.3%;VIP以剂量依赖方式抑制 ^{125}I -VIP与SGC7901细胞结合;各时相肿瘤放射性均高于肌肉($P<0.05-0.01$), 高峰摄取时间为30min($3.58\pm0.48\%$ ID/g), T/N峰比值(3.05)出现于60min;肺放射性高于血液($P<0.05$), 肠道放射性始终处于低水平;体内放射性主要经肾脏排泄。本研究表明放射性核素标记VIP可望成为一有效的肿瘤VIP受体显像剂。

关键词 血管活性肠肽, 药物分布, 肿瘤, 胃肿瘤, 动物, 受体分析

近年来, 大量基础研究证实, 包括胰腺腺癌、结肠腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等多种常见且危害极大的肿瘤, 表达高密度与高亲和力血管活性肠肽(Vasoactive intestinal peptide, VIP)受体, 其 $B_{\max}$ 较正常组织高20—25倍^[1,2]。本文通过 ^{125}I -VIP在荷瘤裸鼠体内的分布实验, 研究了该模型动物体内特别是肿瘤组织中VIP受体的密度及与 ^{125}I -VIP结合的特异性, 以探讨放射性核素标记VIP作为肿瘤VIP受体显像剂的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤细胞和动物。人胃腺癌SGC7901细胞株, 由华西医科大学肿瘤研究所提供。BALB/C-nu/nu(S.P.F)裸鼠(鼠龄6—8周, 体重20g)由四川抗菌素工业研究所提供。

1.1.2 试剂。VIP(Sigma);Sandostant(瑞士);碘化钠 ^{125}I 溶液(无载体、无还原剂, 中国核动力研究设计院);Sephadex G-50(Pharmacia);氯胺T(芬兰);硅胶60F₂₅₄层析薄板(德国Merck);其余试剂均为国产A.R级。

1.1.3 仪器。1/10000电子天平(美国); -80°C 超低温冰箱(美国);超声处理器(美国);FJ-2008型自动 γ 免疫计数仪(西安二六二厂);低温离心机(上海);电热恒温振荡水槽(上海)。

2 方法

(1) ^{125}I -VIP的制备。放射性碘标记参考氯胺-T法^[3]并稍加改进; ^{125}I -VIP标记混合物的分离纯化采用Sephadex G-50柱层析(1cm $\times$ 60cm)^[4];硅胶TLC(展开剂为正丁醇:吡啶:乙酸:水=30:20:6:24)测定标记率与放化纯(RCP), 标记VIP比活度根据直接法计算^[5]。

* 国家自然科学基金资助项目

** 现在中国人民解放军第三军医大学西南医院

收稿日期:1997-07-09, 修回日期:1998-02-16

(2) 体外受体竞争结合实验。SGC7901细胞 1×10^5 ; ^{125}I -VIP $2.55 \times 10^4 \text{Count/min}$; 非标记VIP与Sandostant(生长抑素类似物)的加入量分别为0、 10^{-12} 、 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6}mol/L (Sandostant用到 10^{-5}mol/L); 分析缓冲液补足 $250 \mu\text{L}$; 15°C 温育振荡 120min ; 4°C 预冷的分析缓冲液 2.5mL 稀释混匀; 4°C 、 4000r/min 离心 10min , 测定沉淀放射性(min^{-1})。

(3) ^{125}I -VIP在荷瘤裸鼠体内的生物分布。先取传代两周的荷SGC7901裸鼠18只(雄雌各9只), 随机分为6组, 每组3只; 自裸鼠尾静脉注入 ^{125}I -VIP注射液 0.2mL , 于0.5、5、30、60、120、180min断头处死; 收集血液、肿瘤、肌肉、肺、肝、肠和肾等组织器官, 称重并测定其放射性(min^{-1}); 结果以 $\% \text{ID/g}$ 组织($x \pm s$)表示, 经统计学处理; 另取荷瘤裸鼠6只, 随机分为2组, 每组3只; 分别注入含有10、 $40 \mu\text{g}$ VIP的 ^{125}I -VIP溶液(放射剂量同前), 60min断头处死, 组织收集、数据处理同前。

3 结果

(1) ^{125}I 标记率为73.8%, ^{125}I -VIP比活度为 18.2PBq/mol 。图1为标记混合物洗脱液的放射性分布图; ^{125}I -VIP峰的RCP为98%(图2), 在 -80°C 贮存48天后为96.3%。

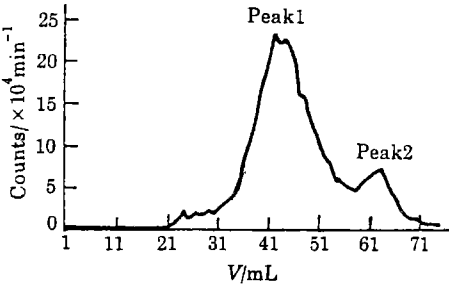


图1 洗脱液的放射性分布
Fig.1 Radioactive distribution of eluate

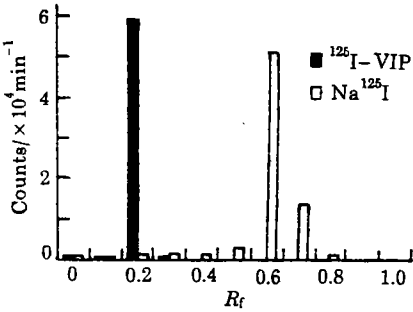


图2 标记VIP薄板层析
Fig.2 Thin layer chromatography of labelled VIP

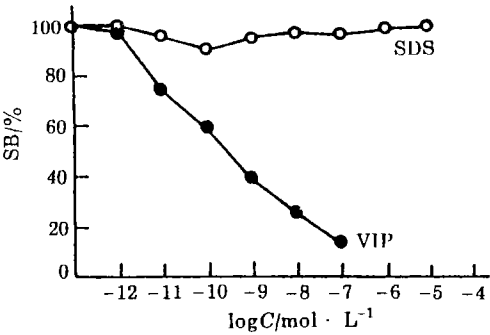


图3 受体竞争结合曲线
Fig.3 Receptor competitive binding curve

(2) 体外受体竞争结合实验显示(图3): ^{125}I -VIP与SGC7901细胞特异结合随非标记VIP浓度增加而下降, 呈剂量依赖关系, 而且高达 10^{-5}mol/L 浓度的Sandostant对 ^{125}I -VIP与SGC7901细胞结合无任何影响。

(3) ^{125}I -VIP在荷瘤裸鼠体内分布结果见表1。各时相肿瘤(T)放射性均高于肌肉(N)($t = 3.24 - 13.65$, $P < 0.05 - 0.01$), T/N比值为 $1.29 - 3.0$ 。肝脏放射性高峰出现在5min, 60min后低于血液水平; 肠道放射性下降缓慢, 均低于血液水平; 肾脏放射性从5min时的19.39%

迅速降低到180min时的0.52%; 注射示踪剂5min后各时相肺放射性水平均高于血液($P < 0.05 - 0.01$), 30min时最高(11.00%)。

表1 ¹²⁵I-VIP在荷瘤裸鼠体内的生物分布($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Biodistribution of ¹²⁵I-VIP in nude mice bearing tumor (%ID · g⁻¹)

时相 Time/min	血液 Blood	肿瘤 Tumor	肌肉 Muscle	肺 Lung	肝脏 Liver	肠 Intestine	肾脏 Kidney
0.5	10.08 ± 0.49	1.80 ± 0.04	1.40 ± 0.32	9.05 ± 1.53	5.56 ± 0.11	3.51 ± 1.30	16.27 ± 4.75
5	6.72 ± 0.16	2.71 ± 0.51	1.12 ± 0.03	10.80 ± 0.44	8.72 ± 0.77	1.83 ± 0.13	19.39 ± 1.93
30	4.29 ± 0.62	3.58 ± 0.48	1.21 ± 0.17	11.00 ± 1.24	7.60 ± 2.32	1.24 ± 0.26	6.02 ± 0.99
60	2.51 ± 0.05	3.32 ± 0.24	1.09 ± 0.02	8.88 ± 1.97	3.71 ± 0.88	0.62 ± 0.12	3.32 ± 0.73
120	1.50 ± 0.02	2.45 ± 0.10	0.84 ± 0.05	2.17 ± 0.72	1.36 ± 0.26	0.60 ± 0.13	1.93 ± 0.16
180	0.29 ± 0.07	1.12 ± 0.10	0.39 ± 0.04	0.49 ± 0.12	0.23 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.52 ± 0.05

(4) VIP对分布的影响见表2。由表2可见,注射示踪剂后60min,肿瘤组织放射性随注入VIP剂量的增加而降低;40 μg组、10 μg组与对照组间,40 μg组与10 μg组间均有显著性差异, P 值分别 <0.01 、 <0.05 与 <0.05 ;与对照组相比,10 μg和40 μg VIP剂量组对T/N比值的抑制率分别为10.16%与31.48%。肺组织和肝脏的放射性与非标记VIP的注入剂量呈反比,而血液与肾脏的放射性则有所增加,证实放射性VIP在荷瘤裸鼠肿瘤、肺与肝等组织中的结合具有特异性。

表2 荷瘤裸鼠体内竞争结合分布($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Competitive distribution of ¹²⁵I-VIP in nude mice bearing tumor (%ID · g⁻¹)

VIP	血液 Blood	肿瘤 Tumor	肌肉 Muscle	肺 Lung	肝脏 Liver	肠 Intestine	肾脏 Kidney
对照 Control	2.51 ± 0.05	3.32 ± 0.24	1.09 ± 0.02	8.88 ± 1.97	3.71 ± 0.88	0.62 ± 0.12	3.32 ± 0.73
10 μg	3.91 ± 0.11	3.01 ± 0.24	1.10 ± 0.11	5.75 ± 2.01	2.17 ± 0.13	0.69 ± 0.26	6.45 ± 0.99
40 μg	4.41 ± 1.73	2.27 ± 0.22	1.08 ± 0.06	3.49 ± 0.69	1.85 ± 0.28	0.67 ± 0.09	7.02 ± 0.63

4 讨论

随着标记条件的改进,应用氯胺T法同样能够获得最佳同质生物活性的放射性碘化VIP^[3]。本文通过直接计算法粗略估计得到¹²⁵I-VIP的比活度为18.2PBq/mol,能满足体外受体分析的要求。体外受体分析所用标记配体中非标记配体量对实验结果影响极为明显,Sephadex G-50柱层析洗脱液的¹²⁵I-VIP峰出现在43mL处(图1),与Fahrenkrug等^[4]报道的基本一致,因此,在无制备型HPLC条件下,这是一较为有效分离标记与非标记VIP的方法。纯化后¹²⁵I-VIP峰的 $R_f=0.2$,RCP为98%,能充分满足体外受体分析的要求。标记VIP-80℃贮存48天,RCP仍具有96.3%,提示其具有良好的稳定性,从而保证实验结果的可比性。体外竞争实验显示,¹²⁵I-VIP与SGC7901细胞的结合具有特异性,表明本实验条件下碘标记VIP并不改变与受体的结合活性。

本文荷瘤裸鼠分布实验显示,肿瘤摄取放射性的高峰时间为30min,而T/N峰比值则出现在60min。结合药代动力学研究结果,我们认为这是由于¹²⁵I-VIP在含有高亲和力VIP受体的肿瘤组织(二室)内的转出速度($K_{21}=0.0457$)远远低于肌肉组织(三室, $K_{31}=0.5112$),因此放射性从肌肉的清除速度显著快于肿瘤,而高T/N比值则是实现肿瘤VIP受体显像的基础。VIP以剂量依赖方式抑制¹²⁵I-VIP与肿瘤结合,最高抑制率为31.48%,证实¹²⁵I-VIP与肿瘤组织的结合具有受体介导特异性,与体外竞争结合实验结果相吻合。而VIP对荷瘤裸鼠肺摄取抑制率高达60.7%,这种相同剂量VIP对不同组织抑制率的差别,一方面与组织血

供程度有关,但我们认为主要反映VIP受体的组织特异性,即SGC7901肿瘤的VIP受体对 ^{125}I -VIP的亲合力高于肺VIP受体,与文献报道VIP受体显像检出结肠腺癌肺转移灶的结果一致^[6]。表1显示注入荷瘤裸鼠体内放射性相当部分浓聚于肺,这与肺组织含有高密度及高亲合力VIP受体的特性相吻合;肝脏仅在30min前有较高的放射性,60min后接近血液,表明肝VIP受体的亲合力较低,且肠道放射性并未因肝放射性的降低而有所增加,证明注入体内的示踪剂并不经肠道排泄;肾脏放射性从5min的19%降低到60min时的3.32%,提示体内的示踪剂主要经泌尿系统消除。这些结果与正常小鼠分布及 ^{131}I -VIP动物显像实验一致。因此,高肺摄取与肠道低水平放射性的独特生物分布,对于应用 ^{131}I (^{123}I)-VIP探测胃肠道肿瘤优于其它主要经肝胆系统分泌的碘标记多肽(如Octreotide)。

参 考 文 献

- 1 Virgolini I, Yang Q, Li S, *et al.* Cancer Res, 1994, 54:690-700
- 2 Reubi J C. J Nucl Med, 1995, 36(10):1846-1853
- 3 Martin J L, Rose K, Huges G J, *et al.* J Biol Chem, 1986, 261(12):5320-5327
- 4 Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckaddell O. J Lab Clin Med, 1977, 89(6):1379-1388
- 5 曹泽毅主编. 激素受体及其临床应用. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 96
- 6 Virgolini I, Raderer M, Kurtaran A, *et al.* The New England J Med, 1994, 331(17):1116-1121

Experimental research for tumor VIP receptor imaging

LI Qianwei TAN Tianzhi

(The First Affiliated Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

Abstract

To study the possibility of radioactive labelled vasoactive intestinal peptide (VIP) for tumor VIP receptor imaging. ^{125}I -VIP was prepared by chloramine-T method, and purified by sephadex G-50 column chromatography. The bioactivity and stability of ^{125}I -VIP were measured by silica 60 F₂₅₄ TLC and competition test to SGC7901 cell in vitro. The biodistribution of ^{125}I -VIP was studied in the nude mice bearing tumor. The results showed that labelled rate of ^{125}I was 73.8%, the specific activity was 18.2PBq/mol, the radiochemical purity(RCP) was over 98% and remained 96.3% after 48 days stored at -80°C. The specific binding of ^{125}I -VIP to the SGC7901 cell was inhibited by VIP in dose dependence in the competition experiment. The radioactivity of tumor was higher than that of muscles in all phases ($P < 0.05-0.01$), the peak activity of tumor occurred at 30min ($3.58 \pm 0.48\text{ID\%/g}$) and the peak ratio of T/N occurred at 60min after the injection. The activity of lungs was obviously higher than that of blood, the intestine was always in low level. Most of the activity in the body was mainly eliminated from kidney. The present study demonstrated that the radioactive labelled VIP is a promising agent for tumor VIP receptor scintigraphy.

Key words VIP, Pharmacological distribution, Tumor, Gastric tumor, Animal, Receptor analysis