论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1746-03

放射性核素示踪法对多肽VEGF125-136在家兔体内的药代动力学研究

黄定德,罗朝学,刘广元,郑 磊,陈 杰,李前伟,程绍钧 (第三军医大学西南医院核医学科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨VEGF125-136在家兔体内的药代动力学。**方法** 采用放射性核素$^{99}Tc^m$对VEGF125-136进行间接标记。测定6只家兔静脉注射37 MBq $^{99}Tc^m$-VEGF125-136后不同时间血浆中药物的放射性浓度,用DAS软件编制放射性浓度-时间曲线,并计算药代动力学参数。**结果** $^{99}Tc^m$-VEGF125-136的放射化学纯度大于97%,$^{99}Tc^m$-VEGF125-136在家兔体内的代谢符合三室模型,快分布相半衰期($t_{1/2\alpha}$)为(5.327±2.351) min,慢分布相半衰期($t_{1/2\beta}$)为(26.446±6.502) min,消除相半衰期($t_{1/2\gamma}$)为(304.41±216.811) min,转运速率常数K_{10}、K_{12}、K_{21}、K_{31}及K_{13}分别为(0.047±0.034)、(40.65±68.54)、(0.111±0.058)、(0.111±0.058) min^{-1}及(0.002±0.004) min^{-1},清除率(CL)为(4.00±1.00) ml/min。**结论** VEGF125-136在家兔体内的药代动力学符合三室模型,且血液清除快而周边血管丰富的组织停留时间相对较长。

关键词: 多肽;VEGF;锝放射性同位素;药代动力学;家兔

中图法分类号: R817;R969.1;R977.6 **文献标识码:** A

Pharmacokinetics of VEGF125-136 in rabbits by radionuclide tracing

HUANG Ding-de, LUO Chang-xue, LIU Guao-yuan, ZHENG Lei, CHEN Jie, LI Qian-wei, CHEN Shao-jun (Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetics of a 12-amino-acid residue peptide of vascular endothelial growth factor (VEGF, 125-136) in rabbits. Methods VEGF125-136 was indirectly labeled with $^{99}Tc^m$. After a single dose of 37 MBq of $^{99}Tc^m$-VEGF125-136 was injected intravenously in 6 rabbits, the radioactive concentrations at different sampling times were determined. Then the plasma radioactive concentration-time curve was drawn and pharmacokinetics parameters were calculated with DAS computer program. Results The radiochemistry purity of $^{99}Tc^m$-VEGF125-136 was more than 97%, the radioactive concentration-time curve of $^{99}Tc^m$-VEGF125-136 was fitted to a three-compartment model with the main pharmacokinetic parameters as follows: $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ and $t_{1/2\gamma}$ were (5.327±2.351), (26.446±6.502) and (304.41±216.811) min respectively. CL, K_{10}, K_{12}, K_{21}, K_{31} and K_{13} were (4.00±1.00) ml/min, (0.047±0.034) min^{-1}, (40.65±68.54) min^{-1}, (0.111±0.058) min^{-1}, (0.111±0.058) min^{-1} and (0.002±0.004) min^{-1} respectively. Conclusion The pharmacokinetics is fitted to three compartment model in rabbits. VEGF125-136 can be cleared quickly from blood and its detention time in target tissue is long.

Key Words: peptide; vascular endothelial growth factor; $^{99}Technetium^m$; pharmacokinetics; rabbits

血管内皮细胞生长因子VEGF能促进血管生成,在肿瘤的生长过程中发挥重要作用,而VEGF165外显子6编码的某些短肽能特异地与VEGFR结合,但不发挥生物学活性,从而竞争拮抗VEGF的促血管生成作用,所以该类短肽有望作为肿瘤特异的靶向显像或治疗的候选药物[1]。本研究运用间接标记法对VEGF125-136(氨基酸序列QKRKRKKSRYKS,为VEGF165外显子6编码的短肽)进行放射性核素$^{99}Tc^m$标记,以探讨VEGF125-136在正常家兔体内的药代动力学,为VEGF125-136的肿瘤显像奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 VEGF125-136的合成及与MAG_3的偶联

目前国内外多先采用二步法合成NHS-MAG_3[2],再将

基金项目:国家自然科学基金(30400114);第三军医大学科研基金(2004) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400114) and the Science Research Fund of Third Military Medicine University (2004)

作者简介:黄定德(1970-),男,湖南省耒阳市人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤分子核医学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68765432

收稿日期:2006-11-20;修回日期:2006-12-28

$NHS\text{-}MAG_3$ 与多肽末端的氨基连接,形成多肽-MAG_3 复合物,步骤繁琐且费用较高。我们在北京中科亚光科技有限公司的协助下,在合成 VEGF125-136 过程中直接在其 N 端连接 3 个甘氨酸,并对 N 端的甘氨酸进行乙酰化巯基乙酸修饰[3]。即在多肽 VEGF125-136 的合成过程中直接完成与 MAG_3 的偶联,得到 VEGF125-136-MAG_3。产物纯度达 98.0%。

1.2　VEGF125-136-MAG_3 的 $^{99}Tc^m$ 标记

参照文献[2,4]方法,略作改进。标记缓冲液为 0.25 mol/L的 $NaHCO_3$,0.18 mol/L 氨水,0.125 mol/L 醋酸铵混合液,反应总体积 125 μl,多肽含量 20 μg,$^{99}Tc^mO_4$ 淋洗液(凝胶型 ^{99}Mo-$^{99}Tc^m$ 发生器,中核高通同位素股份有限公司提供)的放射性活度为 37 MBq,经正交设计得出最佳标记条件为:25 ℃、pH 7.6,反应时间 30 min,转鳌合剂酒石酸钾钠的终浓度为 3.5 μg/μl,$SnCl_2$ 用量为 5 μg/μl。在此条件下,标记率约为 78%。

1.3　标记物的纯化

标记物采用 HPLC 法纯化,C18 柱,Buffer A 为 0.15% TFA +10% ACN;Buffer B 为 0.10% TFA +90% ACN,波长 210 nm,上样量为 50 μl。纯化后放射化学纯度达 97% 以上。

1.4　药代动力学实验

1.4.1　取 6 只雄性日本大耳兔(体质量 2.1 ~ 2.3 kg,第三军医大学实验动物中心提供),每只经耳缘静脉注入 $^{99}Tc^m$-VEGF125-136-MAG_3 37 MBq,分别于注射后1.5、3.0、5.0、10、30、60、90、120、180、240 min 从对侧耳缘静脉采血0.2 ml,γ-免疫计数仪(GC-911 型,中佳光电仪器公司)测量其放射性计数率(cpm),cpm 经衰减校正后除以 γ-免疫计数仪的探测效率换算成放射性浓度(即 kBq/L 血液)。

1.4.2　药代动力学参数计算　应用药物代谢动力学分析软件(DAS 2.0),以放射性浓度替换软件中药物浓度,对 6 只兔的平均血液放射性浓度-时间数据分别进行一、二、三室模型曲线拟合,并以 1、1/C 和 1/CC 作为权重系数(C 为血液放射性浓度实测值)对各时相点血液放射性浓度残差平方和作加权处理,以 F 检验、AIC 值、R^2 值为依据,对房室模型进行综合分析、判断,并计算药代动力学参数。

2　结果

2.1　最佳房室模型的判别

将 6 只动物的平均放射性浓度及其对应的时间等数据输入药代动力学分析软件(DAS 2.0),绘制平均放射性浓度-时间曲线(图 1),并用该软件进行数据拟合,以 AIC、拟合度(R^2)为判定指标进行模型识别[5-8],结果见表 1、2。

表 1　不同权重数各室模型的 AIC 和 R^2 值

权重	1		1/C		1/CC	
	AIC	R^2	AIC	R^2	AIC	R^2
一室模型	172.294	0.943	83.937	1.000	3.624	1.000
二室模型	153.137	0.994	73.967	1.000	-14.757	1.000
三室模型	151.479	0.997	59.250	1.000	-28.159	1.000

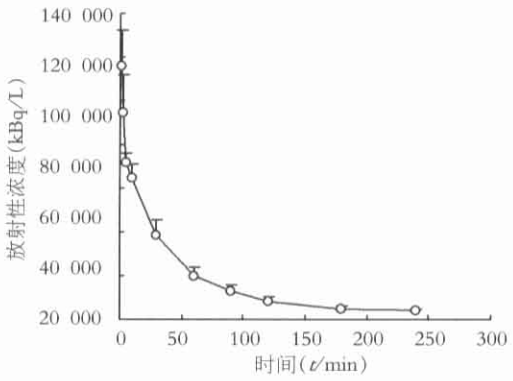


图 1　$^{99}Tc^m$-VEGF125-136-MAG_3 在家兔体内的时间-放射性浓度曲线($n=6$)

表 2　不同权重数各室模型的比较

权重	房室	F 值	P 值
1	1:2	4.566	<0.05
	2:3	121.566	<0.05
1/C	1:2	6.701	<0.05
	2:3	48.110	<0.05
1/CC	1:2	25.126	<0.05
	2:3	9.396	<0.05

从表 1 及表 2 可知:三室模型、权重 1/CC 最佳,二室模型、权重 1/CC 次之。表明 VEGF125-136 在家兔体内的药代动力学过程呈三房室开放模型,以权重 1/CC 计算的药时曲线拟合最佳。

2.2　VEGF125-136 在家兔体内的药代动力学参数

通过室模型判别表明 VEGF125-136 在正常兔体内的药代动力学过程符合权重为 1/CC 的三室模型。以三室模型的基本数学式 $C(t)=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}+Ce^{-\gamma t}$ 进行曲线拟合得到如下血液放射性浓度-时间曲线关系:

$$C(t)=151.06e^{-0.668t}+55.70e^{-0.028t}+9.95e^{-0.003t}$$

式中 C 为血液放射性浓度(kBq/ml),t 为注射 $^{99}Tc^m$-VEGF125-136-MAG_3 后的时间(min)。计算得到 $^{99}Tc^m$-VEGF125-136-MAG_3 在正常兔体内的药代动力学参数,见表 3。

表 3　VEGF125-136-MAG_3 三室模型药代动力学参数(W=1/CC)

房室参数	$\bar{x}\pm s$
$t_{1/2\alpha}$	(5.327 ± 2.351) min
$t_{1/2\beta}$	(26.446 ± 6.502) min
$t_{1/2\gamma}$	(304.410 ± 216.811) min
V1	(110.000 ± 56 .000) ml
CL	(4.000 ± 1.000) ml · min^{-1}
AUC(0-t)	(4 347.760 ± 714.650) kBq · ml^{-1} · min^{-1}
AUC(0-∞)	(4 940.820 ± 818.980) kBq · ml^{-1} · min^{-1}
K10	(0.047 ± 0.034) min^{-1}
K12	(40.650 ± 68.540) min^{-1}
K21	(0.111 ± 0.058) min^{-1}
K31	(0.111 ± 0.058) min^{-1}
K13	(0.002 ± 0.004) min^{-1}

3 讨论

放射性同位素标记技术因其灵敏度高，操作简便、快捷而成为研究蛋白多肽药物药代动力学常用的方法之一，本研究应用进行放射性核素$^{99}Tc^{m}$对小分子多肽VEGF125-136进行间接标记，并对标记产物进行HPLC纯化，放化纯度大于97%。

本研究显示：VEGF125-136在家兔体内的药代动力学行为符合三室开放模型，快速分布相α反映注入体内的放射性药物自血液（中央室）向组织细胞外液（周边室）分布的快慢，慢分布相β代表放射性药物从周边室向富含VEGF受体的组织器官（第3室）分布的速率，消除相γ代表体内放射性的消除速率，分布相半衰期$t_{1/2\alpha}$及$t_{1/2\beta}$分别为5.33、26.45 min，表明静脉注入的$^{99}Tc^{m}$-VEGF125-136-MAG_3随血液循环迅速到达周边室，符合小分子多肽血液清除快的特点，有助于减少早期显像时心脏与大血管影的干扰，而且快速向靶器官（第3室）转移。另外，消除相半衰期$t_{1/2\gamma}$较长（304.41 min），说明该多肽能快速到达靶器官且停留时间相对较长，保证了在病理情况下高表达VEGF受体的病变组织细胞与放射性核素标记的VEGF125-136有更多的结合几率，有利于发挥VEGF125-136介导的核素显像或核素治疗作用，并有利于减少对其他组织器官的辐射影响。

VEGF受体特异地高表达于新生血管丰富的组织器官，针对VEGF受体设计的肿瘤显像或治疗药物正越来越受到人们的重视。VEGF165外显子6编码的某些短肽能特异地与VEGFR结合，但可竞争拮抗VEGF的促血管生成作用，所以该类短肽有望作为肿瘤特异的靶向显像或治疗的候选药物。本实验显示VEGF125-136在血液中清除较快而在周边血管丰富的组织中停留时间较长，提示放射性核素标记的该药物用于核素显像时，能获得低血池本底及高质量对比图像；用于核素治疗时，有利于降低副反应。

参考文献：

[1] Jia H, Jezequel S, Lohr M, *et al*. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283(1): 164－173.

[2] Winnard P Jr., Chang F, Ruseckowski M, *et al*. Preparation and use of NHS-MAG3 for technetium-99m labeling of DNA[J]. Nucl Med Biol, 1997, 24(5): 425－432.

[3] 黄定德，李前伟，刘广元，等. $^{99}Tc^{m}$标记多肽VEGF125－136及其生物学分布[J]. 第三军医大学学报，2007，29(17)：1660－1662.

[4] 程时武，侯英萍，刘长滨，等. $^{99}Tc^{m}$-PDGFR-β AODN的制备及其生物分布[J]. 第四军医大学学报，2004，25(24)：2230－2233.

[5] 曾衍霖. 药物代谢动力学中的二个计算问题：原始数据的权重与线性数学模型中房室数的确定[J]. 药学学报，1980，15(9)：571－576.

[6] 黄家君，董孟杰，谢 娟，等. $^{99}Tc^{m}$-ASON-EGF的制备及其药代动力学研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(23)：2309－2312.

[7] Boxenbaum H G, Posmanter H N, Macasieb T, *et al*. Pharmacokinetics of flunitrazepam following single- and multiple-dose oral administration to healthy human subjects[J]. J Pharmacokinet Biopharm, 1978, 6(4): 283－293.

[8] Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations [J]. J Pharmacokinet Biopharm, 1978, 6(2): 165－175.

（编辑 陈聪连）

参考文献类型及标识

根据GB 3469规定，以单字母方式标识非各种参考文献类型：

参考文献类型 专著 论文集 报纸文章 期刊文章 学位论文 报告 标准 专利

文献类型标识 M C N J D R S P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型 数据库 计算机程序 电子公告

电子文献类型标识 DB CP EB