

放射性碘标记格列本脲的初步研究

¹²⁵I labeled Glibenclamide: a primary study

徐 倍, 吴国亭*, 韩玉麒, 盛春君, 程晓芸

(同济大学附属第十人民医院内分泌科, 上海 200072)

[摘要] **目的:** 获得高比活度的核素标记药物。**方法:** 试用无水碘标记法标记磺脲类药物格列本脲, 并应用放射配体结合分析法测定大鼠心肌组织膜磺脲类药物受体的特性。**结果:** 所获得的¹²⁵I-格列本脲放射比活度较高(111 GBq/mmol), 放化纯度为 95.6%, ¹²⁵I-格列本脲可和大鼠心肌组织膜上磺脲类药物受体结合。**结论:** 无水碘标记法是非水溶性物质核素碘标记法的理想方法之一。

[关键词] 放射性碘标记; 磺脲类药物; 磺脲类药物; 受体; 放射配体测定

[中图分类号] R 977.15 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0786-03

磺脲类药物(sulfonylurea compounds, SU)作为一线降糖药一直受到关注^[1], 它通过与体内磺脲类药物受体(sulfonylurea receptor, SUR)结合, 影响离子通道的电生理活性而发挥其药理作用。放射配体结合分析法是研究受体特性的经典方法, 获得高放射比活度的标记配体是实验成功的关键。常规的碘标记法多在水溶液体系中标记蛋白质, 但对于格列本脲一类的非水溶性化合物尚未有成功的经验。本实验应用国内外报道较少的无水碘标记法成功标记了磺脲类药物格列本脲(glibenclamide), 并观察了¹²⁵I-格列本脲对糖尿病大鼠心肌组织磺脲类药物受体 SUR2 的结合特性。现将结果报告如下。

1 材料和方法

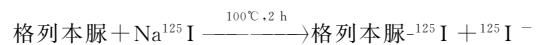
1.1 主要试剂及仪器 格列本脲纯品(上海信谊内分泌公司); Na¹²⁵I(无载体, 无还原剂, 放化纯度 95%, 放射性浓度为 13.58 GBq/ml, NENTM Life Science Products, Inc 产品); 牛血清白蛋白(BSA), 电泳单点纯; 考马斯亮蓝 G-250, Fluka 进口分装。其余化学试剂均为分析纯。

UV-2201 紫外分光光度计(日本 Hitachi 公司), GC-1200 放射免疫 γ 计数器(科大创新股份有限公司), RM-905 放射性活度计(中国计量科学研究院), TS-8 涡旋振荡器(上海华连医疗器械有限公司), 85-2 恒温磁力搅拌器(上海志威电器有限公司), DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司), Glas-Col[®] variable Speed-Reversible 匀浆机(美国 Three Haute 公司), Centrifuge 5810R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司), ZF-90 暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂), 层析装置

(染色缸、标本缸、自制挂钩), 玻璃超滤装置、硅化玻璃反应管(中国科学院原子能研究所吴元芳教授惠赠), 硅胶 60 F₂₅₄ 薄层层析板(德国 Merck 公司), 红光 49 型玻璃纤维滤膜(上海红光净化材料有限公司)。

1.2 磺脲类药物的放射性碘化标记

1.2.1 碘化反应 采用无水碘标记法, 反应式如下:



将格列本脲、纯碘分别溶于氯仿配成溶液(0.5 mg/ml), 在硅化玻璃反应管中加入 Na¹²⁵I 5 μl(11.1 MBq), 再加入待标记的格列本脲氯仿溶液 100 μl 和纯碘氯仿溶液 100 μl, 用 300 μl 氯仿溶液冲洗管壁, 避免管口受到放射性污染, 最后迅速将管口置于煤气喷灯上煅烧密封; 100℃电烤箱内干烤 2 h, 终止反应。

1.2.2 标记化合物放化纯度的鉴定 采用薄层层析法。吸取碘化反应液 2 μl, 在距硅胶 60 F₂₅₄ 薄层层析板底端 1 cm 处点样, 游离¹²⁵I⁻作对照点样, 点样直径 0.2 cm, 冷风吹干。展开剂系统为氯仿: 丙酮(1:1, V/V), 饱和 10 min 后上行展开; 游离配体位于中点附近(R_f=0.5), 标记化合物¹²⁵I-格列本脲位于前沿(R_f=0.9~1.0)。展开结束后晾干, 分段刮下硅胶粉, GC-1 200 γ 计数器测量放射性计数, 作出分离曲线, 计算放射化学纯度和标记率。标记物

[基金项目] 上海市科委重大科技攻关基金(04DZ19507)。Supported by Fund for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(04DZ19507)。

[作者简介] 徐 倍, 硕士, 医师。

* Corresponding author. E-mail: wgt1212@hotmail.com

的标记率(%) = (^{125}I -格列本脲 cpm/点样量总cpm) × 100; 比活度(Bq/mmol) = (放射性核素投入量 × 标记率) / 投入格列本脲总量。

1.2.3 纯化 选用薄层层析法。硅胶 60 F₂₅₄ 薄层层析板, 6 cm × 20 cm, 距底边 1.5 cm 处铅笔画线设为原点。将碘化反应混合液点样在原点范围内, 点样直径约为 0.2 cm, 冷风吹干。展开剂系统为氯仿: 丙酮(1:1, V/V), 饱和 30 min 后上行展开。展开结束后置通风橱中晾干, 根据已知的 R_f 值, 在前沿(R_f = 0.9 ~ 1.0) 处刮下硅胶粉, 测量放射性。将刮取的硅胶粉(吸附有标记配体) 置于清洁玻璃小瓶中, 氯仿萃取, 反复多次, 直至大部分放射配体都溶于氯仿为止。采用真空抽提法收集标记配体, 真空泵抽干玻璃瓶内氯仿后标记配体即附着于管壁, 采用二甲基亚砷助溶, 用 20 mmol/L PBS(pH 7.6) 配成母液, 测量放射性, 计算得率。取 2 μl 进行纸层析, 进行放射化学纯鉴定。标记后的配体储藏于 4℃ 备用。

1.2.4 保存条件对 ^{125}I -格列本脲的影响 取部分纯化后的标记 ^{125}I -格列本脲等分成 6 份, 分别经 6 h、12 h、5 d、10 d、20 d、40 d 4℃ 冰箱保存后, 用纸层析法测定其放化纯度。

1.3 放射配体结合实验 参照文献[2]方法制备糖尿病大鼠心肌组织粗制膜, 用考马斯亮蓝法行标准蛋白定量, 采用放射配体结合法检测大鼠心肌组织 SUR 结合位点。测定实验分为总结合管和非特异性结合管, 每样品行双复管。总结合管(TB) 中加入不同浓度的 ^{125}I -格列本脲 50 μl (范围 0.3 ~ 24.0 nmol/L), 非特异结合管(NSB) 中除不同浓度 ^{125}I -格列本脲外, 另加入 1 mmol/L 格列本脲 100 μl, 每管加入固定浓度的膜蛋白(0.2 mg/ml) 200 μl, 补充缓冲液体积至 1 ml。37℃ 温孵 30 min, 用 5 ml 冰冷的 20 mmol/L PBS(pH 7.6) 缓冲液终止反应, 玻璃纤维滤膜减压抽滤, 再用 5 ml 冰冷 PBS 缓冲液反复冲洗 2~3 次。同时用上述不同浓度 ^{125}I -格列本脲工作液直接点膜, 滤膜在 80℃ 30 min 烘干后用 γ 计数器测定滤膜上的放射量。以特异性结合为纵坐标, 配基浓度为横坐标, 用计算机进行非线性拟和, 绘制饱和曲线。计算所得 B、B/F 值通过 Scatchard 作图, 求出受体最大结合容量(B_{max}) 和平衡解离常数(K_d)。

2 结果

2.1 磺脲类药物的放射性碘化标记 点样后的层析纸在层析缸内饱和 10 min 后上行展开, 约 25 min 展开剂到达前沿, 将分段测得的放射性计数值绘制成层析分离曲线, 见图 1。

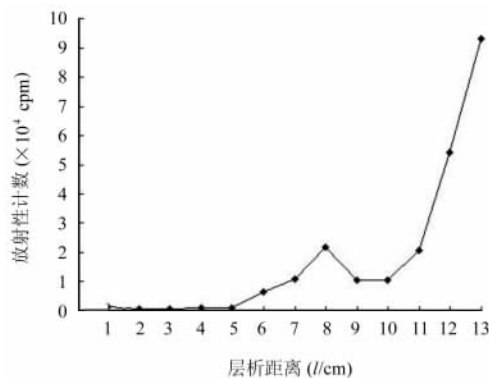


图 1 格列本脲放射性碘化标记层析曲线

经层析曲线计算出的 ^{125}I 标记率为 72.9%, 此结果在纸层析和薄层层析接近。用氯仿萃取标记化合物, 得率为 85%, 比活度为 111 GBq/mmol。标记物的放化纯度为 95.6%, R_f 值 = 0.9 ~ 1.0; 标记物游离 $^{125}\text{I}^- < 5\%$, R_f 值 = 0.5 ~ 0.6。经 4℃ 储存 40 d 后, 放化纯度约为 90%。

2.2 ^{125}I -格列本脲特异结合分析 用标记的 ^{125}I -格列本脲(终浓度为 0.3 ~ 24.0 nmol/L) 与正常大鼠心肌蛋白粗制膜共同温孵, 进行饱和性结合实验及 Scatchard 分析, 回归线方程为 $y = -0.4014x + 146.73$, $r^2 = 0.7711$, 测得的平衡解离常数 K_d 值为 (2.49 ± 0.30) nmol/L, 受体最大结合容量 B_{max} 为 (365.53 ± 42.99) fmol/mg, 见图 2。

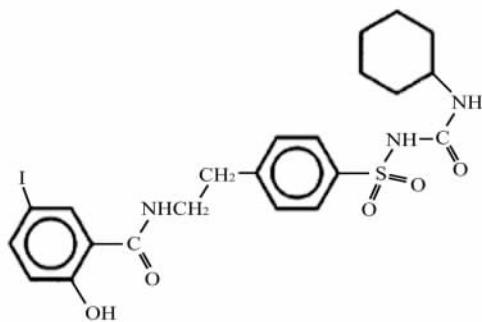


图 2 ^{125}I -格列本脲化学结构式

3 讨论

常见的放射性碘标记法有氯胺 T 法、Iodogen 法、乳过氧化物酶法和酰化试剂联接法等。本研究标记的为非蛋白质,且水溶性差,故采用无水碘标记法进行放射性碘标记,反应在氯仿体系中进行。实验中对放射性碘源的投入量、待标记配体的投入量、氧化剂的用量、碘化反应时间、体积、温度、pH 值等进行了多次冷、热实验进行优化,最终确定了目前的实验方案,可获得满足研究需要的放射性碘标记配体。

为保证测量结果的准确性,计数仪测定的单次 cpm 值至少应大于 2 000,我们每次标记投入放射碘量约 11.1 MBq,格列本脲纯品约 0.5 μg ,预先用氯仿配制母液后再按比例稀释。格列本脲的熔点为 170~174 $^{\circ}\text{C}$,于室温至 150 $^{\circ}\text{C}$ 之间多次预实验,并对反应时间进行优化,最终确定条件为 100 $^{\circ}\text{C}$ 干烤 2 h,反应体系中 1:1 加入纯碘氯仿溶液以完成碘化过程。因涉及反应液纯化问题,碘化反应体积需尽可能小,本研究采用的是 0.5 ml 反应体系。

纯化标记配体除制备比活度低而化学量较多的标记配体采用的重结晶、蒸馏和萃取等常规方法外,多需使用层析法、离子交换法、凝胶过滤法和高效液相层析法等微量分离技术。本研究需要的标记配体量较少,可采取硅胶薄层层析法进行分离。结果显示, ^{125}I 标记率为 72.9%,氯仿萃取标记化合物的获得率为 85%,比活度为 111 GBq/mmol。标记物的放化纯度为 95.6%, R_f 值=0.9~1.0;标记物游离 $^{125}\text{I}^- < 5\%$, R_f 值=0.5~0.6。经 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存 40 d 后放化纯度约 90%,说明本研究采用的无水碘标记法成功制备了符合放射配体结合分析要求的 ^{125}I -格列

本脲。

饱和实验和竞争抑制实验也证实了 ^{125}I -格列本脲具备与大鼠心肌组织膜上 SUR 结合的药理活性。Fujita 等^[3]用 ^3H 标记格列本脲,研究 ^3H -格列本脲对不同动物心肌组织上 SUR 的结合特性,发现 ^3H -格列本脲对小鸡心肌组织 SUR 的平衡解离常数 K_d 值为(0.3 \pm 0.04) nmol/L,受体最大结合容量 B_{max} 为 33 fmol/mg,在豚鼠心肌组织中 K_d 值和 B_{max} 值分别为(2.0 \pm 0.5) nmol/L 和 21 fmol/mg。

本研究显示,在大鼠心肌组织膜上具备可以与 ^{125}I -格列本脲稳定结合的受体, ^{125}I -格列本脲对大鼠心肌组织膜 SUR 的 K_d 值为(2.49 \pm 0.30) nmol/L, B_{max} 为(365.53 \pm 42.99) fmol/mg,与 Fujita 等的结果类似,证实标记过程中格列本脲的药理活性并未受到损失,我们建立的非水溶性物质无水碘标法是可靠的。

(志谢:本实验得到中国科学院原子能研究所吴元芳教授和同济大学附属第十人民医院核医学科吕中伟主任的极大的支持和指导,谨表示衷心感谢)

[参考文献]

- [1] Fisman E Z, Tenenbaum A, Motro M, et al. Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease[J]. Herz, Urban Vogel, 2004,3:290-298.
- [2] Hambrock A, Loffler-Walz C, Quast U. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides[J]. Br J Pharmacol, 2002,136:995-1004.
- [3] Fujita A, Kurachi Y. Molecular aspects of ATP-sensitive K^+ channels in the cardiovascular system and K^+ channel openers [J]. Pharmacol Ther, 2006,85:39-53.

[收稿日期] 2007-05-20

[修回日期] 2007-06-12

[本文编辑] 尹 茶

《最新儿科护理学》已出版

《最新儿科护理学》已由人民军医出版社于 2001 年 1 月出版,16 开,平装。

《最新儿科护理学》ISBN:978-7-5091-0597-9 定价:69.00 元。该书由台湾地区儿科护理专家编著,共分 15 章,介绍了儿童的生长与发育,住院儿童的常规护理,正常新生儿及高危新生儿的护理,儿科各系统疾病的护理(包括胃肠疾病、呼吸疾病、神经肌肉疾病、颅脑疾病、传染病、血液病、心脏病、肾脏病、皮肤病、内分泌疾病等),并结合小儿护理特点,阐述了儿科护理的新理论、新技术和新方法。内容系统、条理清晰、实用性强,适用于儿科护理院校师生、医院儿科护士及护理管理人员阅读。

本书由人民军医出版社市场部发行。通讯地址:北京市 100036 信箱 188 分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168 E-mail:wanglan@pmpm.com.cn