

技术方法

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001163

¹³¹I-fulvestrant 的合成与鉴定印国兵¹, 曾 斌², 刘 瑛², 孙 璐², 廖艳玲³

(1. 重庆医科大学附属第二医院乳甲外科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学研究生院, 重庆 400010;

3. 重庆医科大学附属第二医院核医学科, 重庆 400010)

【摘要】目的:建立氟维司群(fulvestrant)放射性碘(¹³¹I)标记技术。**方法:**采用改良氯胺-T法对氟维司群进行放射性碘标记, 纸层析法测定标记率及标记物稳定性, 柱层析法分离及纯化, 质谱法鉴定标记化合物, 细胞结合实验及 MTT 实验检测标记化合物对 MCF-7(ER+)细胞的结合及抑制能力。**结果:**在 pH 7.5, 室温反应 5 min 的条件下, 碘化氟维司群标记率为(62.34 ± 1.80)%, 放化纯度为(98.6 ± 3.4)%, 48 h 半数抑制浓度(IC₅₀)为 35 μCi, 标记化合物具有良好的稳定性且保留了与人乳腺癌细胞 MCF-7(ER+)的结合能力。**结论:**成功利用放射性碘标记氟维司群, 为今后开发新型乳腺癌药物提供可能。

【关键词】放射性碘(¹³¹I); 氟维司群; 改良氯胺 T 法

【中图分类号】R73.33; R73.36

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-07-08

作者介绍: 印国兵, Email: 285243608@qq.com,

研究方向: 乳腺甲状腺肿瘤治疗。

基金项目: 重庆市委自然科学基金计划资助项目(编号: cstc2012jj

A10042); 重庆市卫生局科研基金资助项目(编号: 2011-2-175)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170104.1012.016.html>
(2017-01-04)

mostable arylsulfatase from deep-sea bacterium *flammeovirga pacifica* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(11): 1894-1901.

[14] 张 今. 进化生物技术: 酶定向分子进化[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[15] Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, et al. Engineering the third wave of biocatalysis[J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 185-194.

[16] Denard CA, Ren H, Zhao H. Improving and repurposing biocatalysts via directed evolution[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 25: 55-64.

[17] Acevedo-Rocha CG, Hoebeinrich S, Reetz MT. Iterative saturation mutagenesis: a powerful approach to engineer proteins by systematically simulating Darwinian evolution[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1179: 103-128.

[18] Reetz MT. The importance of additive and non-additive mutational effects in protein engineering[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(10): 2658-2666.

[19] Gumulya Y, Sanchis J, Reetz MT. Many pathways in laboratory evolution can lead to improved enzymes: how to escape from local minima[J]. *Chembiochem*, 2012, 13(7): 1060-1066.

[20] Reetz MT. Laboratory evolution of stereoselective enzymes: a prolific source of catalysts for asymmetric reactions[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50(1): 138-174.

[21] Reetz MT, Prasad S, Carballeira JD, et al. Iterative saturation mutagenesis accelerates laboratory evolution of enzyme stereoselectivity;

rigorous comparison with traditional methods[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(26): 9144-9152.

[22] Reetz MT, Bocella M, Carballeira JD, et al. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(27): 4192-4196.

[23] Boltes I, Czapinska H, Kahnert A, et al. 1.3A structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family[J]. *Structure*, 2001, 9(6): 483-491.

[24] Marino T, Russo N, Toscano M. Catalytic mechanism of the arylsulfatase promiscuous enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Chemistry*, 2013, 19(6): 2185-2192.

[25] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.

[26] Bally RW, Gribnau TC. Some aspects of the chromogen 33' 55'-tetramethyl benzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay[J]. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1989, 27(10): 791-796.

[27] Olguin LF, Askew SE, O'Donoghue AC, et al. Efficient catalytic promiscuity in an enzyme superfamily: an arylsulfatase shows a rate acceleration of 1013 for phosphate monoester hydrolysis[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(49): 16547-16555.

(责任编辑: 冉明会)

Synthesis and identification of ^{131}I -fulvestrant

Yin Guobing¹, Zeng Bin², Liu Ying², Sun Lu², Liao Yanling³

(1. Department of Breast, Thyroid, Pancreatic Surgery, the Second Affiliated Hospital,

Chongqing Medical University; 2. Graduate School, Chongqing Medical University;

3. Department of Nuclear Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To label the fulvestrant (an endocrine therapy drug for breast cancer) with the radioiodine. **Methods:** The fulvestrant was radioiodine labeled by improved chloramine T method. The paper chromatography was used to detect the labeling rate and the stability of the labeled compound. The column chromatography was used to detect the separation and purification of labeled compound. The changes in physicochemical property of the ^{131}I -fulvestrant was detected by mass-spectrography; the combining ability and inhibiting ability of labeled compound to human breast cancer cells MCF-7(ER+) was detected by cell binding assay and MTT assay.

Results: When the reaction lasted for 5 min at room temperature at the pH value of 7.5, the radiochemical yield of the radioiodine labeling to fulvestrant was $(62.34 \pm 1.80)\%$, radiochemical purity was $(98.6 \pm 3.4)\%$, the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 48 h was 35 μCi . The labeled compound was stable and its combining ability to human breast cancer cells MCF-7(ER+) was also retained. **Conclusion:** The radioiodine labeling to the fulvestrant is successful, and it may be used to develop a new drug for breast cancer.

[Key words] radioiodine(^{131}I); fulvestrant; improved chloramine T method

由于乳腺癌细胞的耐药性及其外放射治疗以及手术治疗的局限性,常使晚期乳癌的治疗变得束手无策,因此晚期乳癌病死率极高^[1-2];乳腺癌大部分属于雌激素依赖性肿瘤,体内雌激素可特异性地与雌激素受体(estrogen receptors, ER)结合,通过受体后效应对肿瘤细胞的生长起促进作用^[3-4]。氟维司群(fulvestrant)^[5]是一种竞争性的 ER 拮抗剂,若以氟维司群为载体,将放射性碘携带并特异结合到乳腺癌细胞上,就可能产生靶向放射治疗作用。本文主要介绍放射性碘化氟维司群的合成方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂及其配制 氟维司群(杭州荣大医药股份有限公司)配制方法^[6-9]:2 mg 氟维司群,以 1 mL 无水乙醇溶解,终浓度为 2 g/L;氯胺 T(成都科龙化工试剂厂)2 mg 溶于乙醇与 PBS 缓冲液(0.05 mmol/L, pH 7.5)的混合液(乙醇:PBS=1:1)1 mL,浓度为 2 g/L;偏重亚硫酸钠(成都科龙化工试剂厂)2 mg 溶于乙醇与 PBS 缓冲液(0.05 mmol/L, pH 7.5)的混合液(乙醇:PBS=1:1)1 mL,浓度为 2 g/L;Na ^{131}I 溶液(成都中核高通同位素股份有限公司);FN3 中速层析纸(北京威斯孚科技有限公司);交联葡聚糖 Sephadex G15(Pharmacia 公司);MCF-7(ER+)细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库);RPMI1640 培养液(Hyclone 公司);无血清培养基(Hyclone 公司);MTT(噻唑蓝)、DMSO(二甲基亚砷)、无水乙醇、PBS 缓冲液等均为国产。

1.1.2 主要仪器设备 净化工作台(SW-CJ-1F,苏州),台式离心机(KA-1000/TGL-16G,国产),恒温烤箱(MIR160,日本),电子天平(LIBROAEL-200,德国),真空干燥器(CHRIST/ALPHA1-2,德国),二氧化碳孵箱(Thermo Forma CO2,美国),放射免疫 γ 计数器(SN-684,上海),液质联用仪(Agilent Technologies 6410, Triple Quad LC/MS),放射性活度计(RM905a,北京)。

1.2 实验方法

1.2.1 改良氯胺 T(Ch-T)法进行氟维司群的放射性碘标记 参照汪梅花等^[10]的方法, pH 确定为 7.5,反应时间为 5 min,温度为室温,将 50 μL 氟维司群、氯胺 T 100 μL 、1 mCi Na ^{131}I 先后加入离心管,振荡器振荡混匀,5 min 后加入 200 μL 偏重亚硫酸钠及 NaI 终止反应。

1.2.2 纸层析法检测标记率 层析纸裁剪为 1 cm $\times$ 20 cm 大小,距底端 1 cm 处分别用毛细管吸取上述离心液及 Na ^{131}I 溶液点样于层析纸上,烘干后底端置入无水乙醇,深约 0.5 cm,用 2 000 mL 大烧杯罩住,待展开剂前沿移至距点样点 10 cm 时取出层析纸,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干,自点样点底端 1 cm 处向顶端按 0.5 cm 间距剪切层析纸,其片段按顺序上机检测各纸片的放射性活度(cpm),公式如下:

$$\text{标记率} = \frac{\text{标记物放射强度}}{\text{总放射强度}} \times 100\%$$

1.2.3 柱层析法分离及纯化 选择 Sephadex G15 葡聚糖凝胶为固相,无水乙醇为洗脱液,调整流出速度为 0.5 mL/min,用试管收集流出液,10 滴/管,并将盛有流出液的试管即刻上机检测放射性活度(cpm),收集放射性活度最高流出液标记为 A 管。

1.2.4 质谱法对化合物鉴定 制备氟维司群标准品:将 1 mg 氟维司群粉末,溶于 500 μL 甲醇溶液,从该溶液中取 20 μL

上机检测;制备 ^{131}I -fulvestrant 样品:取碘化反应后的溶液 50 μL ,在其中加入纯水,以 15 000 r/min 离心,弃上清,加入 200 μL 甲醇溶解,从该溶液中取 20 μL 上机检测。

1.2.5 纸层析法稳定性鉴定 将 A 管样品均分为 5 份,室温下分别静置 24、48、72、96、120 h 后,再进行纸层析,层析纸裁剪间距为 1 cm,所得纸带依次上机检测放射性活度,设 Na^{131}I 和原始反应液(步骤 1.2.1 反应液体)2 个对照,同时计算放化纯度。

$$\text{标记率} = \frac{\text{目的标记物的放射性计数}(cmp)}{\text{总放射性计数}(cmp)} \times 100\%$$

1.2.6 ^{131}I -fulvestrant 与 ER 结合能力测定 体外常规培养于 24 孔板的 MCF-7(ER+)细胞,贴壁生长约 50%后,去除培养液,每孔加入 1 mL 无血清培养液,取 0.5、1、2、4、8、16 μCi 共 6 个浓度梯度的纯化后的 ^{131}I -fulvestrant 加入培养孔,每个浓度 3 个复孔,继续培养 24 h 后,按 1~6 的次序分别收集培养液和细胞并上机测定放射性强度,并根据每孔放射性强度均值绘制图形。

1.2.7 MTT 检测 ^{131}I -fulvestrant 对 MCF-7(ER+)细胞的生长抑制 每孔 1 000 个细胞接种到 4 块 96 孔板,每孔体积 200 μL ,设 3 个复孔;按 10、20、40、80 μCi 放射性强度剂量分别向培养孔内添加 ^{131}I -fulvestrant,每 24 h 取出一块孔板加 MTT 溶液 20 μL (5 mg/mL),继续孵育 4 h,终止培养,每孔加 DMSO 150 μL ,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定吸光度(absorbance, A)值,并以空白孔调零、零剂量组作对照。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组 } A_{490 \text{ nm}} \text{ 值}}{\text{对照组 } A_{490 \text{ nm}} \text{ 值}}\right) \times 100\%$$

1.3 统计学处理

采用统计软件 SPSS 13.0 进行统计检验,计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以率表示。计量资料进行 t 检验或方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 纸层析法对 5 次 ^{131}I 标记反应及 Na^{131}I 对照放射活度测定

由图 1 可知,通过碘化反应生成一种标记了 ^{131}I 的物质,经纸层析检测标记率(60.56 ± 1.20)%。

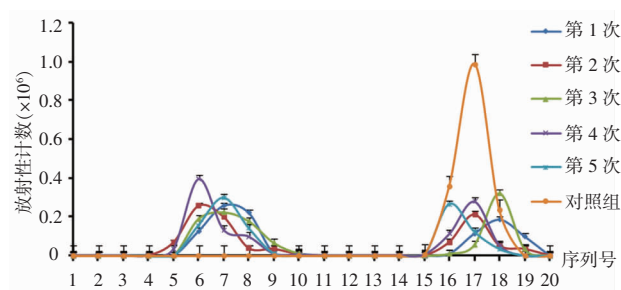


图 1 ^{131}I 标记及 Na^{131}I 对照纸层析法测定($n=5$)

Fig.1 Paper chromatographic consequence of ^{131}I group and control group of Na^{131}I ($n=5$)

2.2 柱层析分离及纯化

图 2 显示碘化反应液柱层析洗出液 γ 计数表现双峰,第一峰与对照组游离碘峰出现部位一致,证实为游离碘;计算得出标记率为(62.34 ± 1.80)%,与纸层析结果一致,并由此获得纯化碘化物。

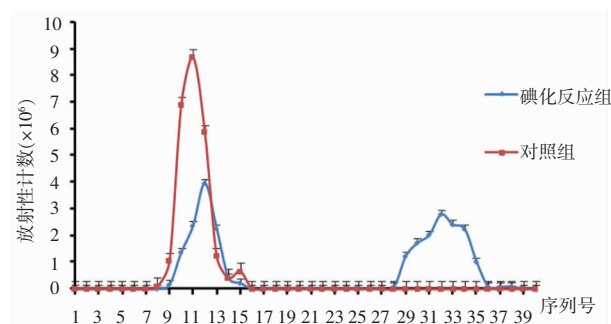


图 2 分子筛柱层析($n=5$)

Fig.2 Consequence of molecular sieve chromatography($n=5$)

2.3 液质联用仪质谱分析检测

根据分子量分析(图 3): ^{131}I 的分子量为 131,为图中 130.9 峰(系从 ^{131}I -fulvestrant 分子上击落的离子);氟维司群分子量为 606.77,为图中 605.5 峰;737.7 峰为 ^{131}I -fulvestrant,图为负离子法检测,因此检测分子量应该加 1 个 H,即 $737.4 - 606.77 + 1 = 131.93$,推测碘化反应后,氟维司群分子成功结合上了碘离子。

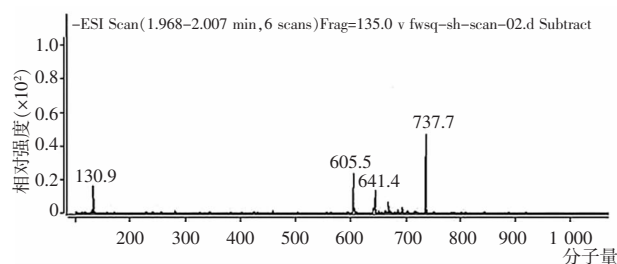


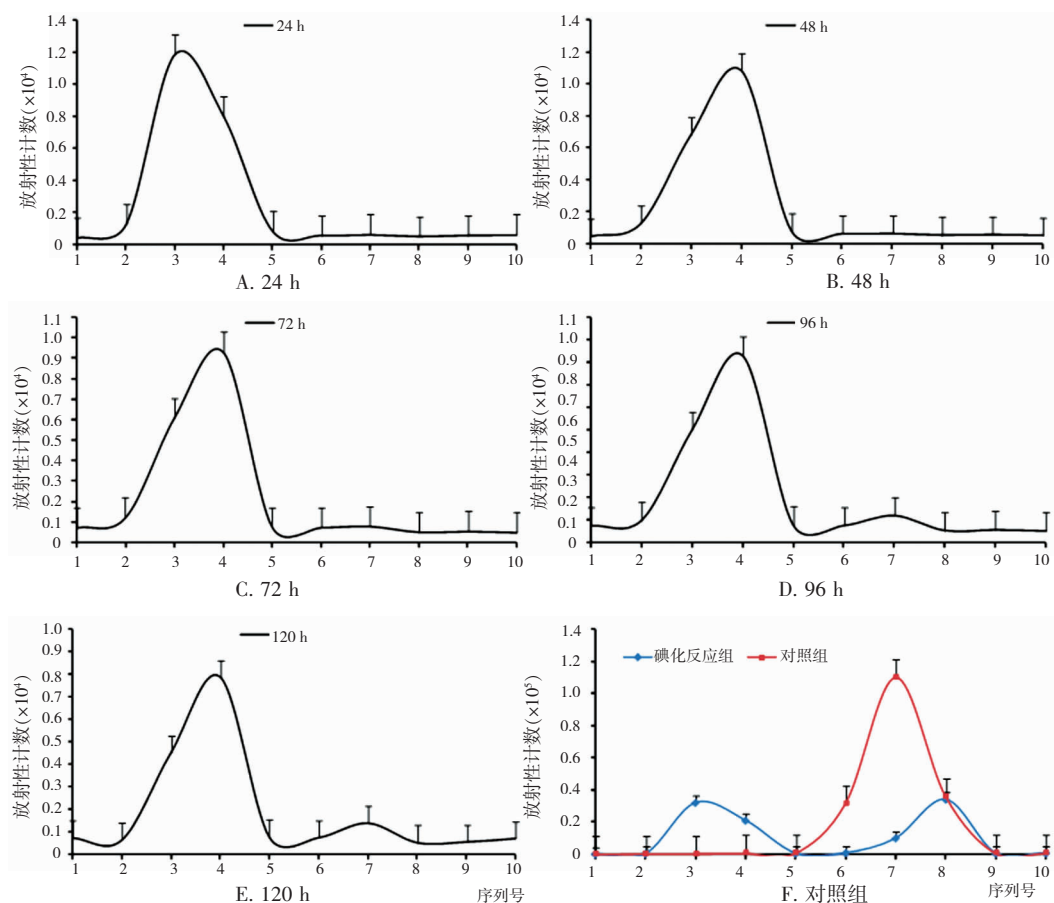
图 3 碘化反应后产物的质谱图($n=3$)

Fig.3 Mass spectrum of the compound deriving from iodination reaction ($n=3$)

2.4 ^{131}I -fulvestrant 的稳定性检测

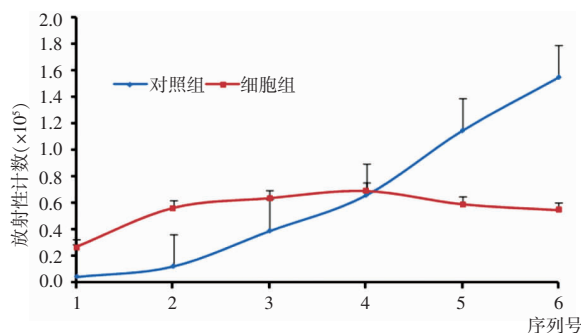
由图 4 可知,在 24、48、72 h 3 个时间点对碘化反应产品进行纸层析和放射强度检测均表现为单峰,96 h 时有弱第二峰出现,120 h 时第二峰有所加强,由对照组(Na^{131}I 及原始反应液)可知第一峰为稳定的碘化氟维司群,第二峰为游离碘(^{131}I)。与对照组(Na^{131}I)相比,第二峰出现在层析条带的游离碘范围,由此可知,碘化氟维司群 72 h 内稳定,96 h 开始有缓慢分解,说明在生成后 120 h 内 ^{131}I -fulvestrant 能保持稳定化学结构。

同时测定的放化纯度分别是 24 h 为(98.6 ± 3.4)%、48 h 为(97.2 ± 2.9)%、72 h 为(96.6 ± 3.1)%、96 h 为(95.5 ± 3.3)%、120 h 为(93.4 ± 4.3)%,96 h 内放化纯度均高于 95%,表明碘化氟维司群稳定性好。

图 4 24、48、72、96、120 h 及对对照组纸层析结果($n=5$)Fig.4 Paper chromatographic consequence after 24,48,72,96,120 h and the consequence of control group($n=5$)

2.5 ^{131}I -fulvestrant 与 MCF-7(ER+) 细胞结合能力的检测

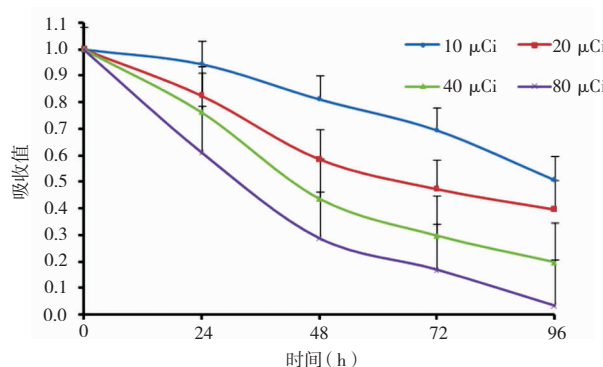
由图 5 可见, ^{131}I -fulvestrant 能够与 MCF-7(ER+) 细胞结合, 但结合能力并不随加入 ^{131}I -fulvestrant 的量的增加而增加, 而是在 $4\ \mu\text{Ci}$ 剂量时达高峰, 表现出饱和性; 随着剂量的增加, 结合的量略有下降, 2 组对比无统计学意义 ($F=9.03$, $P=0.12$)。

图 5 ^{131}I -fulvestrant 与 MCF-7(ER+) 细胞结合能力检测 ($n=3$)Fig.5 Detection of binding affinity between ^{131}I -fulvestrant and MCF-7(ER+) cells($n=3$)

2.6 ^{131}I -fulvestrant 对 MCF-7(ER+) 细胞抑制作用

由图 6 可知, 不同剂量放射性的 ^{131}I -fulvestrant 作用后, 在不同浓度及不同时间点 MCF-7(ER+) 细胞的残存情况(吸光度), 各组间有统计学差异 ($F=14.02$, $P=0.00$), 表明随着放

射剂量及作用时间增加, 存活细胞逐渐减少, 抑制作用明显, 且各剂量组在 24 h 时均不能达到半数抑制, 而 48、72、96 h 的 IC_{50} 分别为 35、18、13 μCi 。

图 6 ^{131}I -fulvestrant 对 MCF-7(ER+) 细胞的生长抑制曲线($n=3$)Fig.6 Growth inhibition curve of MCF-7(ER+) cell about ^{131}I -fulvestrant($n=3$)

3 讨论

为实现恶性肿瘤的靶向性放疗, 人们探索了许多新放射治疗方法, 如适形放疗、组织内插置放射

性粒子、放射性碘注射、单克隆抗体技术等,其中最令人鼓舞的莫过于分化型甲状腺癌的 ^{131}I 放射治疗,通过肿瘤细胞主动吸收放射性碘,从而实现放射治疗内照射的靶向性。另外,由于 ^{131}I 主要依靠 β 射线发挥放射治疗作用,其射程以毫米(mm)计,因此对周围组织的损伤小,同时也克服了因肿瘤异质性而不表达 ER 肿瘤细胞的“交叉火力”照射治疗作用^[11-14]。

本研究的目标是将 ^{131}I 的治疗作用引入到乳腺癌的治疗中。正常情况下体内除甲状腺外,均缺乏对 ^{131}I 的特异吸收和结合能力。为此必须将 ^{131}I 标记到适当的载体上。本研究采用的氯胺-T法属于化学合成法,常用于蛋白质和多肽等大分子的放射性标记,而本研究是要将 ^{131}I 标记到分子量为606.77的小分子有机物——氟维司群,由于其在水中溶解度差,在乙醇中溶解度高,而氯胺-T和偏重亚硫酸钠两者水中溶解度高,在乙醇中溶解度低,采用传统的氯胺-T法(所有物质均在水相中)根本无法进行放射性碘标记,因而采用了改良的氯胺-T法,即将氟维司群溶解在乙醇中,氯胺-T和偏重亚硫酸钠则溶解于50%的乙醇中,碘化反应体系中乙醇的终浓度为70%,这样既能保证各种物质的溶解,同时也能保证Ch-T能在水中释放出过氯酸根,把碘离子氧化成碘原子。

本部分研究表明,通过改良氯胺-T法可对氟维司群进行比较稳定的 ^{131}I 标记,通过纸层析及分子筛柱层析检测,标记率可达60%左右, ^{131}I -fulvestrant化学结构稳定,72 h的检测结果表明标记到氟维司群的碘原子并未脱标,之后方才有游离碘释出。细胞结合试验的结果证明, ^{131}I -fulvestrant仍然具有与雌激素依赖性乳腺癌细胞结合的能力,并显示饱和性,符合配体受体结合规律。随着剂量的增加,结合的量略有下降,推测与放射剂量增加时对乳腺癌细胞的放射性损伤作用同步加强有关,在分子水平上是否与ER表达水平下降有关值得进一步研究。

综上所述,本研究通过改良氯胺-T法对氟维司群进行放射性碘标记,所得产品 ^{131}I -fulvestrant经鉴定化学性质稳定,保留了与雌激素依赖性乳腺癌细胞结合的能力,从而为后续的将 ^{131}I 应用于乳腺癌的治疗研究提供了一个可靠的方法和技术保障。

参 考 文 献

- [1] Gradilone A, Raimondi C, Naso G, et al. How circulating tumor cells escape from multidrug resistance; translating molecular mechanisms in metastatic breast cancer treatment[J]. *Am J Clin Oncol*, 2011, 34(6): 625-627.
- [2] Chen WJ, Wang H, Tang Y, et al. Multidrug resistance in breast cancer cells during epithelial-mesenchymal transition is modulated by breast cancer resistant protein[J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(2): 151-157.
- [3] Dall G, Vieusseux J, Unsworth A, et al. Low dose, low cost estradiol pellets can support MCF-7 tumour growth in nude mice without bladder symptoms[J]. *J Cancer*, 2015, 6(12): 1331-1336.
- [4] 杨忠毅, 王明伟, 张勇平, 等. 18F-FES 在正常大鼠及荷乳腺癌裸鼠体内的生物分布和显像[J]. *肿瘤影像学*, 2011, 20(3): 234-238.
- [5] James R, Thriveni K, Krishnamoorthy L, et al. Clinical outcome of adjuvant endocrine treatment according to Her-2/neu status in breast cancer[J]. *Indian J Med Res*, 2011, 133(1): 70-75.
- [6] Wardell SE, Nelson ER, Chao CA, et al. Bazedoxifene exhibits antiestrogenic activity in animal models of tamoxifen resistant breast cancer; implications for treatment of advanced disease[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(9): 2420-2431.
- [7] Mishra AK, Abrahamsson A, Dabrosin C. Fulvestrant inhibits growth of triple negative breast cancer and synergizes with tamoxifen in ER α positive breast cancer by up-regulation of ER β [J]. *Oncotarget*, 2016[Epub ahead of print].
- [8] He S, Wang M, Yang Z, et al. Comparison of 18F-FES, 18F-FDG, and 18F-FMISO PET imaging probes for early prediction and monitoring of response to endocrine therapy in a mouse xenograft model of ER-positive breast cancer[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159916.
- [9] Fernandes SA, Gomes GR, Siu ER, et al. The anti-oestrogen fulvestrant (ICI 182,780) reduces the androgen receptor expression, ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in the rat ventral prostate[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(5 Pt 1): 486-500.
- [10] 汪梅花, 许玉杰, 王宗站, 等. ^{125}I 标记紫杉醇的方法[J]. *同位素*, 2008, 21(2): 82-87.
- [11] Higashi T, Kudo T, Kinuya S. Radioactive iodine(^{131}I) therapy for differentiated thyroid cancer in Japan: current issues with historical review and future perspective[J]. *Ann Nucl Med*, 2012, 26(2): 99-112.
- [12] Sawka AM, Straus S, Gafni A, et al. Thyroid cancer patients' involvement in adjuvant radioactive iodine treatment decision-making and decision regret: an exploratory study[J]. *Support Care Cancer*, 2012, 20(3): 641-645.
- [13] Haymart MR, Banerjee M, Stewart AK, et al. Use of radioactive iodine for thyroid cancer[J]. *JAMA*, 2011, 306(7): 721-728.
- [14] Tuttle RM, Rondeau G, Lee NY. A risk-adapted approach to the use of radioactive iodine and external beam radiation in the treatment of well-differentiated thyroid cancer[J]. *Cancer Control*, 2011, 18(2): 89-95.

(责任编辑:张辉洁)