

## 左旋千金藤啶碱在活体大鼠体内代谢过程的可视化 PET/CT 显像研究

谭海波, 张政伟, 管一晖, 林祥通

复旦大学附属华山医院 PET 中心, 上海 200035

**摘要:** 目的 探索通过 PET/CT 显像将中药有效成分在体内的代谢过程变成可视的图像, 并通过图像对其进行定量分析的可行性。方法 以延胡索的有效成分左旋千金藤啶碱 (*L*-SPD) 作为研究对象。使用正电子核素  $^{11}\text{C}$  标记 *L*-SPD, 在热室内化学合成  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD。SD 大鼠戊巴比妥钠麻醉后固定于木板上, 尾 iv 37 MBq  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD。分别于注射后 5、15、30、45、60、90 min 行 PET/CT 显像。使用工作站获得脑、心脏、肺脏、肝脏、肾脏、肠腔、膀胱的放射性容积分布比值 (distribution volume ratios, DVR)。结果 PET/CT 显像显示在 5 min 时  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD 在肝脏、肾脏分布最多, 心脏、肺、脑可见放射性分布。肝、肾是  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD 的主要代谢及排泄器官, 肝、肾、肠腔、膀胱在 5 min DVR 分别为 (1.37±0.42)%, (1.10±0.19)%, (0.89±0.18)%, (0.97±0.11)%, 90 min 分别为 (0.65±0.11)%, (0.54±0.05)%, (5.49±1.44)%, (9.86±1.88)%。结论 PET/CT 显像可以直观、动态地观察 *L*-SPD 在活体内的分布及代谢特点, 有望用于其他中药有效成分的活体显像研究。关键词: 左旋千金藤啶碱; 正电子发射型计算机断层扫描仪/计算机断层扫描仪; 生物学分布; 容积分布比值; 活体显像  
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)02-0327-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.018

## Study on visualization of metabolic process of *L*-stepholidine in living rats by PET/CT *in vivo*

TAN Hai-bo, ZHANG Zheng-wei, GUAN Yi-hui, LIN Xiang-tong

PET Center Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200235, China

**Abstract: Objective** To explore the feasibility to transform the metabolic process of active constituents of Chinese herbal medicine *in vivo* into images by PET/CT and to make quantitative analysis. **Methods** The *L*-stepholidine was used as study object, and chemical synthesis of  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD was performed in hot room. PET/CT scan was performed in different time, 5, 15, 30, 45, 60, and 90 min after injecting  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD by vein in rats, and the information of brain, heart, lung, liver, kidney, intestine, and bladder was transferred to the workstation. The distribution volume ratios (DVR) of the above tissues were obtained. **Results**  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD was keeping in a relative higher level in liver and kidney at 5 min. metabolism through the liver, kidney was the main excretion organ. The distribution of  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD in liver, kidney, intestine, and bladder was (1.37 ± 0.42)%, (1.10 ± 0.19)%, (0.89 ± 0.18)%, and (0.97 ± 0.111)% respectively at 5 min and was (0.65 ± 0.11)%, (0.54 ± 0.05)%, (5.49 ± 1.44)%, and (9.86 ± 1.88)% respectively at 90 min. **Conclusion** PET/CT imaging could observe the distribution and metabolism of  $^{11}\text{C}$ -*L*-SPD dynamically and directly. It could be used in the research of other Chinese medicines.

**Key words:** *L*-stepholidine; PET/CT; biodistribution; distribution volume ratios; imaging *in vivo*

正电子发射型计算机断层扫描显像 (positron emission tomography, PET) 可以无创、定量、动态测定药物在活体内的分布、变化及生物利用度, 并且具有很高的灵敏度及定量分析性能, 是一个理想的药物研发平台<sup>[1-3]</sup>。我国有丰富的中药资源, 目前

拥有 12 807 种天然药物, 其中药用植物 11 146 种, 药用动物 1 581 种, 药用矿物 80 种<sup>[4]</sup>, 是世界上的天然药物资源大国, 中药有效成分的研究已取得很大进展, 这些有效成分种类繁多, 具有化学结构多样性、新颖性的特点, 而且许多具有特殊的生物活

收稿日期: 2016-08-01

基金项目: 上海市卫生与计划生育委员会中医药科研课题资助项目 (2014JP004A); 上海市自然科学基金资助项目 (15ZR1405400); 上海市卫生与计划生育委员会科研课题资助项目 (2014440596)

作者简介: 谭海波 (1970—), 医学博士, 副教授, 研究方向为 PET 分子显像及正电子药物合成。Tel: (021)64280718 E-mail: haibotan@163.com

性,已成为创制新药的源泉,也是得天独厚的开发新药的宝库,具有很高的二次开发价值<sup>[4]</sup>。如何立足我国丰富的中药资源,将 PET 活体显像技术引入中药有效成分的研发,具有探索意义。

左旋千金藤啶碱 (*L*-stepholidine, *L*-SPD) 是中药延胡索的有效成分,目前从延胡索中分离出了四氢原小檗碱同类物 (tetrahydroprotoberberines, THPBs) 生物碱 17 种, *L*-SPD 是 THPBs 的先导物<sup>[5]</sup>, 是进行延胡索有效成分 PET 研究的理想模型药。另外,它具有多巴胺 D<sub>1</sub> 受体激动-D<sub>2</sub> 受体抑制的双重作用特点<sup>[6]</sup>, 是迄今为止国际上发现的唯一的具有这种双重作用特征的药物,在多巴胺 (DA) 受体药理学中独具特色。有研究表明, *L*-SPD 的双重药理作用机制为新型安定剂开辟了研究方向,并且在帕金森病、精神疾病、阿片类毒品成瘾的治疗方面有一定的潜在前景,因此具有广阔的二次开发价值<sup>[7-8]</sup>。本研究拟在研究合成 <sup>11</sup>C-左旋千金藤啶碱 (<sup>11</sup>C-*L*-SPD) 的基础上,通过 PET/CT 显像,对 <sup>11</sup>C-*L*-SPD 在活体动物体内的生物学特性进行评价,为 *L*-SPD 的二次开发研究提供技术平台。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

*L*-SPD (中国科学院药物研究所); 碘甲烷、碳酸钾 (国药集团化学试剂有限公司); 三氟甲基磺酰甲烷、氢化锂铝四氢吡喃溶液 (德国 ABX 公司); 含 1% 氧气的氮气 (上海有机所优化特种气体供应公司); 液氮 (上海有机所优化特种气体供应公司); 二甲基亚砜 (江苏南新助剂厂); 甲醇 (上海吴泾化工有限公司)。

### 1.2 仪器及设备

Siemens Inveon MicroPET/CT (Siemens CTI 公司); RDS-111 型回旋加速器 (美国 CTI 公司); PET-CS11 型碘代甲烷 (CH<sub>3</sub>I) 合成器及 <sup>11</sup>C-CH<sub>3</sub>I 合成模块 (北京派特生物技术有限公司); 2487 紫外检测仪 (美国 Waters 公司); NaVa-PaK C<sub>18</sub> 柱 (美

国 Waters 公司); SN-684 型 γ 计数仪 (上海原子核研究所日环仪器厂); 分析型反相 HPLC 系统 (美国 Waters 公司); Millex-GS 无菌滤膜 (0.22 μm, 美国 Millipore 公司)。

### 1.3 实验动物

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (200±20) g, 由复旦大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK (沪) 2013-0016。

## 2 方法

### 2.1 <sup>11</sup>C-*L*-SPD 的制备

利用 RDS-111 回旋加速器轰击氮氧混合气, 束流 20 μA, 轰击时 15 min, <sup>14</sup>N (p, α) <sup>11</sup>C 反应产生 <sup>11</sup>C, 在靶内与氧气反应生成 <sup>11</sup>C-CO<sub>2</sub>, 经减压传到液氮冷却的 Loop 环内, <sup>11</sup>C-CO<sub>2</sub> 由气态变为固态而被完全捕获, 用升降马达将液氮容器移走; Loop 环内捕获 <sup>11</sup>C-CO<sub>2</sub> 因空气的加热而缓慢升华, 放射性气体经低压、缓慢传到内装入 0.20 mL 氢化锂铝四氢吡喃溶液反应管内, 待放射性 <sup>11</sup>C-CO<sub>2</sub> 升华传输完毕, 反应管 150 °C 加热 90 s。冷空气冷却反应管, 通过气动方式自动加入 0.4 mL 57% 的氢碘酸, 再次加热至 150 °C, 用压缩空气冷却反应上部, 产生的 <sup>11</sup>C-CH<sub>3</sub>I 由氮气载出。<sup>11</sup>CH<sub>3</sub>-I 转化为 <sup>11</sup>C-三氟甲基磺酰甲烷 (<sup>11</sup>C-Triflate-CH<sub>3</sub>) 后传入到溶有 *L*-SPD 前体的二甲基亚砜溶液中, 在常温下反应得到产物。合成示意图见图 1。

### 2.2 <sup>11</sup>C-*L*-SPD 的质量控制

**2.2.1** <sup>11</sup>C-*L*-SPD 定性及放射化学纯度 (RCP) 鉴定 <sup>11</sup>C-*L*-SPD 注射液与对照品 <sup>12</sup>C-*L*-SPD 溶液在同一个 HPLC 系统中分离, 其保留时间应一致。

放射化学纯度测定采用 HPLC 法色谱条件: 流动相为甲醇-乙腈-三乙胺 (60:20:20, 三乙胺 0.05 mol/L, 用磷酸调节至 pH 值 3.0), 体积流量为 1 mL/min。

**2.2.2** 稳定性检测 分别于 <sup>11</sup>C-*L*-SPD 标记后 5、15、30、60、90、120 min 行放射化学纯度测定。

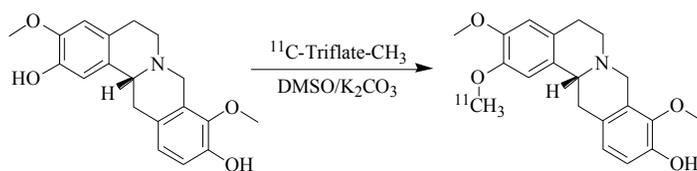


图 1 <sup>11</sup>C-*L*-SPD 的合成示意图

Fig. 1 Chemical synthesis of <sup>11</sup>C-*L*-SPD

### 2.3 <sup>11</sup>C-L-SPD 在 SD 大鼠体内的 PET/CT 显像

从大鼠下腹部外 1/3 处注入 40 mg/kg 的戊巴比妥钠，将大鼠固定于木板上，待大鼠停止颤动，尾 iv 37 MBq <sup>11</sup>C-L-SPD。分别于注射后 5、15、30、45、60、90 min 行全身 PET/CT 显像。先采集 CT 图像，在同一范围用三维模式采集 PET 图像。机器自动利用 CT 数据对 PET 图像进行衰减校正，进行图像重建和融合。采集结束后计算机自动进行迭代法重建，进行 PET 和 CT 的图像融合，分别获得 PET、CT 及 PET/CT 图像。

采集结束后把资料转入工作站进行数据分析，应用 APM5 自动化解剖标记模板对预处理后的 <sup>11</sup>C-L-SPD 扫描图像行感兴趣区勾画，包括全身、脑、心、肺、肝、肾、肠道、膀胱，可分别测得全身、脑、心、肺、肝、肾、肠道、膀胱的放射性计数 (cpm) 及体积 (mL)，进而获得全身及上述脏器的具体放射性计数，用各脏器每毫升体积的放射性计数除以全身的放射性计数，获得容积分布比值 (distribution volume ratios, DVR)，以 DVR 判断各脏器的药物分布状况。

## 3 结果

### 3.1 <sup>11</sup>C-L-SPD 定性及放射化学纯度结果

<sup>11</sup>C-L-SPD 注射液与 <sup>12</sup>C-L-SPD 对照品溶液在同一个 HPLC 系统中分离，其保留时间一致，均为 2.9 min (图 2)。<sup>11</sup>C-L-SPD 放化合成时间为 10~20 min，行 HPLC 分析放化纯度达 99.1%。

### 3.2 <sup>11</sup>C-L-SPD 稳定性结果

<sup>11</sup>C-L-SPD 注射液在室温条件下放置 120 min，注射液在 120 min 内基本稳定，RCP 缓慢下降，120 min RCP 共下降 3.6%，仍达 95.5% (图 3)。

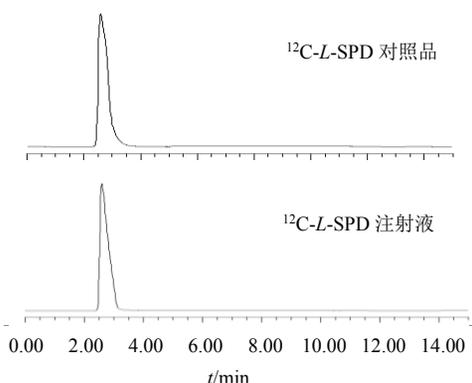


图 2 <sup>12</sup>C-L-SPD 对照品溶液和注射液 HPLC  
Fig. 2 HPLC of <sup>12</sup>C-L-SPD reference substance and injection

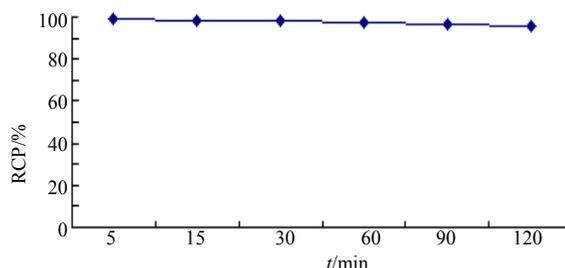


图 3 <sup>11</sup>C-L-SPD 稳定性检测结果  
Fig. 3 Stability test of <sup>11</sup>C-L-SPD

### 3.3 <sup>11</sup>C-L-SPD 在大鼠体内的分布情况

PET/CT 可以清晰地显示 <sup>11</sup>C-L-SPD 在大鼠体内的分布情况，PET 图像可以直观地观察到 <sup>11</sup>C-L-SPD 在体内的分布特点，CT 图像可以提供脏器的精确定位 (图 4)。

PET/CT 显像可以动态观察 <sup>11</sup>C-L-SPD 在体内的分布情况，并且可以定量计算。<sup>11</sup>C-L-SPD 在正常大鼠体内放射性分布特点见图 5 和 6，定量结果见表 1。<sup>11</sup>C-L-SPD 在体内吸收迅速，在 5 min 时在肝脏、肾脏、心脏、脑分布较多，膀胱及肠道可见放射性聚集；15 min 时放射性主要分布在肝脏、肾脏，肠腔及膀胱出现较多放射性；30 min 后肝影、肾影开始变淡，肠腔及膀胱放射性聚集越来越多；60 min 后肝脏及肾脏基本不显影，放射性主要集中在肠腔及膀胱。肝、肾是 <sup>11</sup>C-L-SPD 的主要代谢及排泄器官，肝、肾、肠腔、膀胱在 5 min 放射性分布分别为 (1.37±0.42)%、(1.10±0.19)%、(0.89±0.18)%、(0.97±0.11)%，90 min 分别为 (0.65±0.11)%、(0.54±0.05)%、(5.49±1.44)%、(9.86±1.88)%。显示在体内有快速清除的特点。

## 4 讨论

PET 用于药物研究的先决条件就是用正电子放射性核素标记各种药物，制备的正电子标记的药物必须能够表达所研究药物的药动学和药效学特性，这就要求正电子核素标记的药物不能改变母体药物的理化和生物学性质。由于绝大部分中药分子中含有碳原子 (<sup>12</sup>C)，因此，本研究使用 <sup>12</sup>C 的同位素 <sup>11</sup>C 标记中药单体化合物分子可满足上述要求。本研究选用正电子核素为 <sup>11</sup>C 半衰期较短，为 20.4 min，仅适合有加速器配置的单位，但 <sup>11</sup>C 标记药物具有以下优点：①<sup>11</sup>C 为组成生命最基本元素 <sup>12</sup>C 的放射性同位素，<sup>11</sup>C 的甲基化不会改变目标化合物的结构，改变的仅是化合物中碳同位素的丰度，可以保持标记物与目标化合物的化学和生物学性质

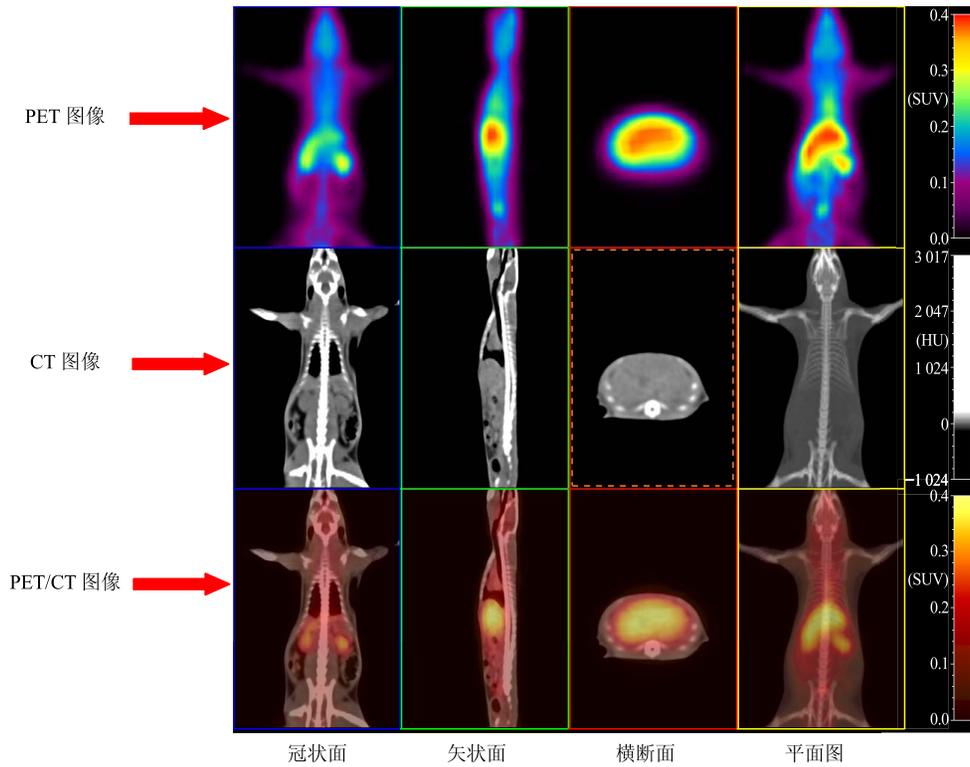


图 4  $^{11}\text{C-L-SPD}$  在大鼠体内分布的 PET/CT 活体显像

Fig. 4 PET/CT images of  $^{11}\text{C-L-SPD}$  biodistribution in living rats

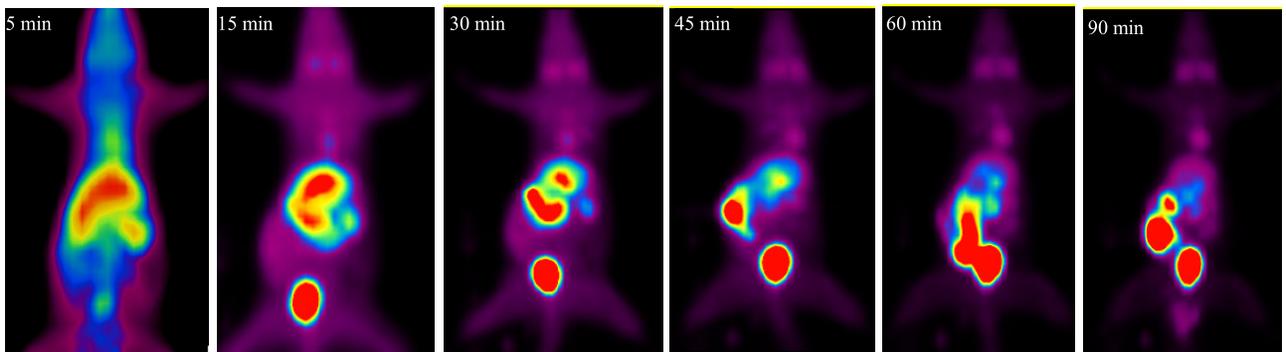


图 5  $^{11}\text{C-L-SPD}$  体内分布的 PET 动态显像

Fig. 5 PET dynamic imaging of  $^{11}\text{C-L-SPD}$  distribution *in vivo*

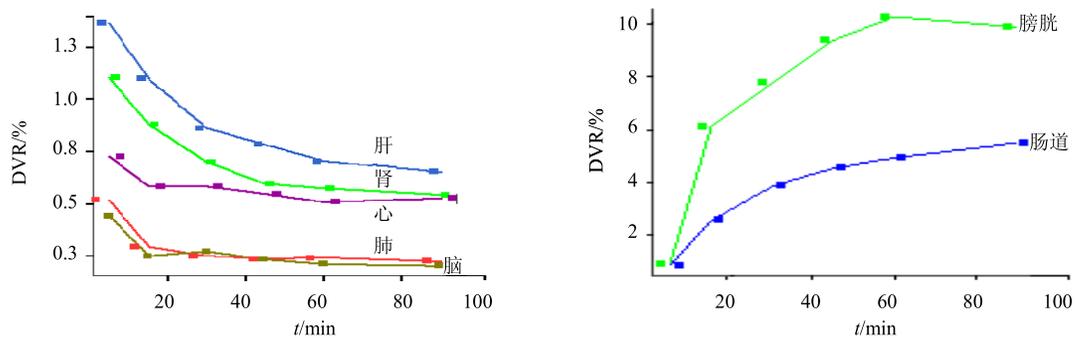


图 6 大鼠脑、肺、心脏、肝、肾、膀胱、肠道的  $^{11}\text{C-L-SPD}$  时间-放射性曲线 ( $n = 5$ )

Fig. 6 Time-radioactivity curves of  $^{11}\text{C-L-SPD}$  in brain, lung, heart, liver, kidney, bladder, and intestine ( $n = 5$ )

表 1 PET/CT 显像测定  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 在正常大鼠体内 DVR ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 DVR of  $^{11}\text{C}$ -L-SPD in rats measured by PET/CT ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组织	DVR/%					
	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
脑	0.44±0.15	0.25±0.08	0.27±0.12	0.23±0.10	0.21±0.09	0.20±0.11
肺	0.52±0.19	0.29±0.07	0.25±0.09	0.24±0.07	0.24±0.10	0.23±0.11
心	0.73±0.12	0.58±0.08	0.58±0.14	0.55±0.11	0.51±0.09	0.53±0.13
肝	1.37±0.42	1.10±0.34	0.86±0.22	0.78±0.25	0.71±0.15	0.65±0.11
肾	1.10±0.19	0.88±0.12	0.70±0.06	0.60±0.06	0.58±0.03	0.54±0.05
肠道	0.89±0.18	2.56±0.63	3.87±1.02	4.53±1.63	4.93±2.15	5.49±1.44
膀胱	0.97±0.11	6.08±1.37	7.75±1.90	9.36±1.19	10.24±1.16	9.86±1.88

一致，便于研究化合物的生物学分布；② $^{11}\text{C}$  的衰变方式为正电子放射性衰变，产生 2 个方向相反、能量均为 511 keV 光子，可用于 PET 显像，进而对目标化合物的代谢过程进行示踪；③因其半衰期短，故可在短期内重复实验。另外，国际上许多药物研究中心也多采用  $^{11}\text{C}$  标记进行药物的研究<sup>[9-11]</sup>。

本实验显示  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 放化纯度 99.1%，稳定性试验在室温下放置，2 h 内仍大于 95%，稳定性较好，符合正电子放射性药物质量控制指标，满足作为探针的要求，因此制备的  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 注射液可用于进一步的动物体内实验研究。

本研究表明，将  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 静脉注入大鼠体内后，PET/CT 显像不仅可动态、直观地观察到  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 在体内的分布情况，同时还可使用相关软件对  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 在体内的分布及代谢进行定量分析。

本研究表明  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 主要从肝脏及肾脏进行代谢及排泄，在体内有快速清除的特点。因此对于肝肾功能不全的患者，要防止药物在体内的滞留，对于长期服用该药的患者要注意定期检查肝、肾功能。有研究表明长期大量使用 L-SPD 可造成大鼠血清肌酐和尿素氮的量增加；大鼠病理切片观察到肾小管管型，肾小管上皮细胞变性坏死和肾盂肾炎<sup>[12]</sup>。

$^{11}\text{C}$ -L-SPD 在脑 5 min 即可达到高峰，为 (0.44±0.15) %，15 min 为 (0.25±0.08) %，30 min 为 (0.27±0.12) %，显示 L-SPD 在脑中有快速摄取、快速清除的特点，这与 Zhang 等<sup>[13]</sup> 以往的研究结果相一致。

本研究提示，PET 用于药物研究的优势主要有以下几个方面：(1) 能获得动态的数据资料。通过对活体实验动物的 PET 显像，不仅可以定量测定药物在各脏器的分布量，并且可以动态观察不同时间

各脏器药物分布量的变化。(2) 可以在同一动物身上进行无损伤的反复实验。以往的研究方法在动物实验阶段，多数数据的获得都是在处死并解剖动物后离体测量，降低了测得数据所反映的时值效应。而对实验动物在活体状态下进行 PET 显像，可消除传统研究方法中由于实验连续性中断或动物个体差异造成的误差，并且可以减少实验动物的使用，不仅节约了实验费用，也符合动物伦理学的要求。(3) PET 显像可对整个动物进行有效的测量和在体外快速的扫描，从而可对整个实验过程进行纵向研究。这将有利于观察动物体内疾病的发展状况以及药物对疾病的治疗效果，从而快速得出更加明确的结论。

需要说明的是 PET 显像虽然可以直观观察  $^{11}\text{C}$ -L-SPD 体内的代谢过程，但 PET 观察到的是体内  $^{11}\text{C}$  标记的 L-SPD，以及含有  $^{11}\text{C}$  的 L-SPD 代谢产物，也即该方法无法区分原型药物和代谢产物。

总之，本研究初步表明使用正电子核素标记中药有效成分、并对之在活体动物体内的生物学分布进行 PET 显像研究在方法上是可行的。

#### 参考文献

- [1] Gupta A, Wang S, Marko A, et al. Polyacrylamide-based biocompatible Nanoplatfrom enhances the tumor uptake, PET/fluorescence imaging and anticancer activity of a chlorophyll analog [J]. *Theranostics*, 2014, 4(6): 614-628.
- [2] Vanhove C, Bankstahl J P, Krämer S D, et al. Accurate molecular imaging of small animals taking into account animal models, handling, anaesthesia, quality control and imaging system performance [J]. *EJNMMI Phys*, 2015, 2(1): 31.
- [3] Yao R, Lecomte R, Crawford E S. Small-animal PET:

- what is it, and why do we need it? [J]. *J Nucl Med Technol*, 2012, 40(3): 157-165.
- [4] 孙曼霁, 周廷冲. 中国药物的研究与发展 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [5] 金国章, 孙宝存. 左旋千金藤啶碱 (*l*-stepholidine) 及其同类物作用于脑内多巴胺受体的研究进展 [J]. 自然科学进展—国家重点实验室通讯, 1995, 5(1): 55-63.
- [6] 王世真, 周 前. 核医学正迈进 PET 时代 [J]. 国外医学: 放射医学核医学分册, 1997, 21(5/6): 244-248.
- [7] 金国章. 回顾: 开拓 THPBs 作用 DA 受体的研究领域及意义 [J]. 生命科学, 2008, 20(1): 58-63.
- [8] 于 洋, 金国章. SPD 对多巴胺 D3 受体(D3R)和腺苷受体 (A2aR) 的作用关系 [J]. 中国药理通讯, 2005, 22(3): 19-20.
- [9] One H, Suzuki K. Ketamine increases the striatal N-[<sup>11</sup>C] methylspiperone binding *in vivo*: positron emission tomography study using conscious rhesus monkey [J]. *Brain Res*, 1994, 663(2): 191-198.
- [10] Ojeda-Flores R, Ortega-López N, ávila-Rodríguez M A, *et al.* Cardiac metabolism and perfusion evaluation in a rat model using 18F-FDG, 11Cacetate, 13NH<sub>3</sub> and micro-positron emission tomography (microPET) [J]. *Arch Cardiol Mex*, 2010, 80(4): 215-228.
- [11] Coliva A, Monterisi C, Apollaro A, *et al.* Synthesis optimization of 2-(4-N-[<sup>11</sup>C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([<sup>11</sup>C]PIB), β-amyloid PET imaging tracer for Alzheimer's disease diagnosis [J]. *Appl Radiat Isot*, 2015, 105(11): 66-71.
- [12] 沈德莉, 陈丽娟, 谭云山, 等. 左旋千金藤啶碱对大鼠的慢性毒性和致突变试验 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(5): 397.
- [13] Zhang Z D, Zou C M, Jin G Z, *et al.* Pharmacokinetics and autoradiography of [<sup>3</sup>H] or [<sup>14</sup>C] stepholidine [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1990, 11(4): 289-292.