

文章编号:0253-9950(2009)02-0098-06

# NMDA受体显像剂<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM的 制备和受体结合分析

颜成龙<sup>1</sup>, 周杏琴<sup>2</sup>, 曹国宪<sup>2,\*</sup>, 张建康<sup>2</sup>, 钦晓峰<sup>2</sup>, 徐希杰<sup>2</sup>, 邹美芬<sup>2</sup>

1. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122;

2. 卫生部核医学重点实验室, 江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063

**摘要:**用<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>标记新的美金刚胺(memantine)衍生物 *N*-[2-(*N*-(2-巯基乙基))氨基乙酰基]-*N*-(2-巯基乙基)-3, 5-二甲基金刚烷胺基乙酰胺(*N*<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-memantine, 简称 NCAM), 并通过优化标记条件获得放射化学纯度达 95% 以上的标记化合物<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM。脂溶性实验测得其脂水分配系数  $\lg P = 1.90$ 。放射性受体结合分析显示, 其与 *N*-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体结合具有饱和性, 根据受体 B 区理论编制的计算机程序求出 NMDA 受体结合参数最大结合容量  $B_{\max} = 56.8 \mu\text{mol/g}$ , 平衡解离常数  $K_d = 706.3 \text{ nmol/L}$ , 特异性 NMDA 受体拮抗剂能阻断其与 NMDA 受体的结合。结果显示<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 与 NMDA 受体结合具有中等程度的亲和力和结合特异性, 具有较好的脂溶性, 易透过血脑屏障, 有可能成为一种新的 NMDA 受体显像剂。

**关键词:** NCAM; NMDA 受体; 放射性受体结合分析; 显像剂

中图分类号: R817 文献标志码: A

## Radiochemical Synthesis and Radio-Ligand Receptor Binding Assay of <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM as a Potential NMDA Receptor Imaging Agent

YAN Cheng-long<sup>1</sup>, ZHOU Xing-qin<sup>2</sup>, CAO Guo-xian<sup>2,\*</sup>, ZHANG Jian-kang<sup>2</sup>,  
QIN Xiao-feng<sup>2</sup>, XU Xi-jie<sup>2</sup>, ZOU Mei-fen<sup>2</sup>

1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

**Abstract:** A new radio-ligand <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM was synthesized by labeling a derivative of memantine *N*<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-memantine (*N*-[2-(*N*-(2-mercapotoethyl))aminoformylmethyl]-*N*-(2-mercapotoethyl)-3, 5-dimethyladamantyl aminoacetamide, NCAM), and its radiochemical purity was greater than 95% determined by TLC under optimized labeling conditions. The radio-ligand receptor binding assay was shown that the binding of radio-ligand <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM to NMDA receptor was saturable with a dissociation constant  $K_d$  of 706.3 nmol/L and a  $B_{\max}$  of 56.8  $\mu\text{mol/g}$  calculated by a computer program written based on the receptor theory in B region. The competitive analysis show that such specific binding could be inhibited by specific inhibitors of NMDA receptor. Its oil/water partition coefficient is 1.90. In conclusion, the new radio-ligand <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-

收稿日期:2008-12-02; 修订日期:2009-02-19

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770602); 江苏省卫生厅重大项目资助(K200512)

作者简介:颜成龙(1983—),男,山东临沂人,硕士研究生,药学专业

\* 通讯联系人:曹国宪,研究员, E-mail: jswxcgx@sina.com

NCAM, which was synthesized by the method of directly labelling NCAM with <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>, has a moderate affinity and specific binding to NMDA receptor, and can easily transported through the blood-brain barrier(BBB). Therefore, it may be a potential NMDA receptor imaging agent.

**Key words:** N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-memantine; NMDA receptor; radio-ligand receptor binding assay; imaging agent

近年来研究表明, N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体与谷氨酸兴奋性神经毒性、触发突触长时程增强效应<sup>[1]</sup>、学习记忆形成机制密切相关。它在一些神经退行性疾病如帕金森病、阿尔茨海默病、精神分裂症和癫痫等的发生和发展过程中起着重要作用。借助正电子发射断层(PET)或单光子发射计算机断层(SPECT)等显像仪器,利用放射性核素标记的配基进行脑受体分子活体断层显像,从分子水平上对一些与 NMDA 受体有关的疾病作出诊断,并用于观察精神和神经性疾病、指导合理用药以及疗效评价和预后判断,具有重要价值。因此寻找合适的 NMDA 受体显像剂势在必行。美金刚胺(memantine)是目前唯一已上市、具有中等亲和力的 NMDA 受体拮抗剂。Ametamey 等<sup>[2]</sup>研究了 [<sup>18</sup>F] 标记美金刚胺 [<sup>18</sup>F] MEM (1-amino-3-<sup>[18</sup>F]fluoromethyl-5-methyl-adamantane), 但是生物分布研究表明其非特异性结合较高, 不适合做 NMDA 受体显像剂。本工作在保留美金刚胺药效基团结构基础上拟设计和合成一种新的化合物 N-[2-(N-(2-巯基乙基))氨基乙酰基]-N-(2-巯基乙基)-3, 5-二甲基金刚烷胺基乙酰胺(N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-memantine, 简称 NCAM)<sup>[3]</sup>, 通过<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> 标记制备<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM, 并通过体外放射性受体配基结合分析测定<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 与 NMDA 受体的亲和力和选择性。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

N-[2-(N-(2-巯基乙基))氨基乙酰基]-N-(2-巯基乙基)-3, 5-二甲基金刚烷胺基乙酰胺(NCAM), 卫生部核医学重点实验室合成; 氟化亚锡, 纯度大于 98%, 北京百灵威化学技术有限公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 纯度 99%, 德国 Merck 公司; 5-甲基二氢二苯并环庚烯亚胺马来酸(MK-801), 美国 Sigma 公司; 氟哌啶醇, 上海信宜九福药业有限公司; SD 大鼠, 扬州大学实验动物中心, 饲养于本所动物房, 动物许可证书

SCXK(苏)2007-0001; 钼-铈发生器, 北京原子高科股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

600 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Wizard 1470  $\gamma$  自动计数器, 美国 Perkin Elmer 仪器公司; ZT-II 型多头细胞收集器, 浙江绍兴卫星机械有限公司; GF/B 型玻璃纤维滤纸, 英国 Whatman 公司; PH300 型 pH 计, 上海天达仪器有限公司; AC-2105 型分析天平, 德国 Sartorius 公司, 感量为 0.1 mg; AM-400 核磁共振仪, 美国 BRUKER 公司; MAT 2.2 质谱分析仪, 美国 Varian 公司; J2-HS 型高速离心机, 美国 Beckman 公司。

### 1.2 试验条件优化

通过改变标记反应的反应物质量如前体(NCAM)、乙二胺四乙酸(EDTA)、葡庚糖酸钠(GH)、氟化亚锡、<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>O<sub>4</sub><sup>-</sup> 淋洗液, 以及反应体系磷酸盐缓冲液的 pH, 优化反应条件, 获得最高放化纯度的标记物。

### 1.3 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 的制备

按照文献[3], 以美金刚胺为母体, 经 5 步反应合成标记前体 NCAM, 其合成路线示于图 1, 得到目标产物 NCAM(V)。

钼直接标记法标记 NCAM, 反应路线示于图 2, 得到最终标记化合物<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM(VI)。取  $\varphi=70\%$  乙醇溶解的 5 g/L NCAM 溶液 20  $\mu$ L 于西林瓶中, 依次加入 EDTA, GH、磷酸盐缓冲液、还原剂 SnF<sub>2</sub>, 最后加入约 37 MBq <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>O<sub>4</sub><sup>-</sup> 淋洗液, 沸水浴中反应 30 min。

### 1.4 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 的鉴定

**1.4.1 标记前体 NCAM 及其脱保护前体的结构表征** 对目标化合物 NCAM 及其脱保护前体(化合物 IV)分别进行了质谱和核磁分析。

**1.4.2 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 放化纯度的测定** 采用 TLC 纸层析法和 HPLC 法测定放化纯度。以新华 1 号层析纸为支持物, 用毛细管取微量标记反应液点样于新华 1 号层析纸的下端, 以乙酸乙酯/乙醇(体积比为 1:1)为展开剂, 上行展开 10 cm, 取出, 晾干, 剪成 10 段, 分别测各段的放射性计数。

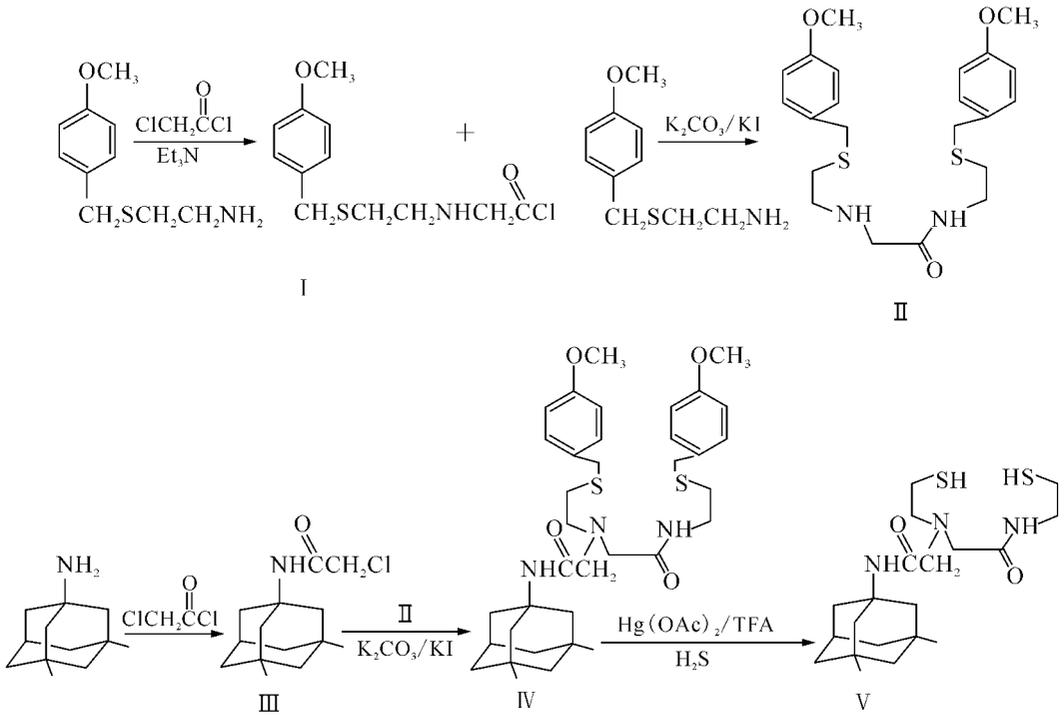
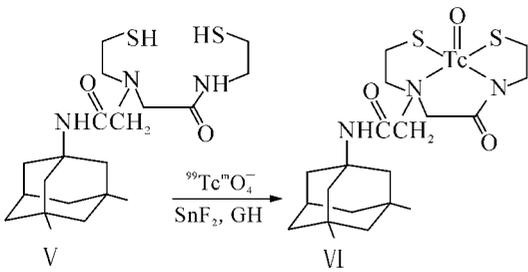


图 1 NCAM 的合成路线

Fig. 1 Scheme for synthesis of NCAM

图 2  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -NCAM 的标记反应路线Fig. 2 Radiochemical synthesis of  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -NCAM

根据各组分  $R_f$  的不同计算放射化学纯度。反相 HPLC, Waters C18 柱 (4.6 mm × 250 mm), 紫外检测器 ( $\lambda = 254$  nm), 流动相:  $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 7 : 3$ , 流速为 1 mL/min, 保留时间为  $t_R$ 。

**1.4.3  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -NCAM 稳定性实验** 将标记物在室温下放置, 分别于 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 后同样方法测其放化纯度, 观察其稳定性。

**1.5  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -NCAM 的脂溶性实验**

取 0.1 mL (0.37 MBq)  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -NCAM 注射到正辛醇-磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 的二相体系中 (体积比为 1 : 1), 涡旋振荡 5 min, 静置分层, 2 000 r/min 离心分离 10 min, 分别取有机相和水

相各 1.0 mL 测  $\gamma$  计数, 再取 1.0 mL 正辛醇相注入磷酸盐缓冲液-正辛醇 (体积比为 3 : 2) 二相体系中, 如此重复至正辛醇相和水相的放射性比值为一定值。

**1.6  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -NCAM 放射性配基受体结合分析**

**1.6.1 大鼠 NMDA 受体脑膜匀浆的制备** 缓冲液 A: 0 °C pH=7.4 的 10 mmol/L HEPES; 缓冲液 B: 0 °C pH=7.4 的 10 mmol/L HEPES, 含 EDTA 1 mmol/L。整个实验在冰浴中进行。参照文献[4], SD 大鼠颈动脉切断处死后快速取出大脑, 去掉中脑、小脑和脊髓, 用缓冲液 A 洗 2 次, 加入 10 倍脑量体积的缓冲液 B, 玻璃匀浆器匀浆, 4 °C 下 2 400 r/min 离心 10 min, 弃沉淀。上清液以 19 000 r/min 离心 20 min, 用等体积缓冲液 B 再悬浮沉淀物, 再离心, 重复操作 4 次。将得到的沉淀物用缓冲液 A 以初始体积重悬浮, 得到的匀浆在 37 °C 下孵育 30 min, 离心, 再悬浮, 重复操作 2 次。以初始体积再悬浮沉淀物, 用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量, 并调整到蛋白含量为 3.5 g/L, 以每瓶 1 mL 分装于西林瓶中, -20 °C 冻存。

**1.6.2 饱和结合试验** 缓冲液 C: pH=7.4 的 10 mmol/L HEPES 缓冲液, 含 5% 的非离子表面

活性剂吐温-20。实验分成 3 组: 总结合(TB)、非特异性结合(NSB)和空白(blank)。TB 组测定: 在系列玻璃管中依次加入倍比稀释的不同浓度(2.93, 5.86, 11.72, 23.44, 46.88, 93.75, 187.50, 375.00 nmol/L)的标记配基<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 0.1 mL, 0.1 mL 缓冲液 C, 0.3 mL NMDA 膜受体, 加缓冲液 C 使终体积为 0.6 mL。NSB 组测定: 在系列玻璃管中除上述外, 每管加 0.1 mL 1 g/L 标记前体 NCAM, 加缓冲液 C 使终体积为 0.6 mL。空白组测定: 在系列玻璃管中加入以上相同倍比稀释浓度的标记配基 0.1 mL 和 0.1 mL 缓冲液 C, 加缓冲液 C 使终体积为 0.6 mL。加样完毕后, 将以上 3 组玻璃管置于 37 °C 水浴中孵育 20 min, 冰浴终止反应 5 min。以 5% 的牛血清白蛋白(BSA)浸润的 Whatman GF/B 型玻璃纤维滤纸为滤膜, 用多头细胞收集器抽滤, 再用 0 °C 缓冲液 C 洗膜 4 次, 每次 1 mL。取下滤膜, 于  $\gamma$  测量管中测计数。以上每个浓度点做 3 支平行管。总结合管计数减去空白组计数即为总结合(TB)。非特异结合管计数减去空白组计数即为非特异结合(NSB)。特异结合(SB)即为总结合(TB)减非特异结合(NSB), 并计算出标记配基总浓度和游离配基浓度。以各计数率为纵坐标, 标记配基总浓度为横坐标即得受体结合曲线; 根据受体 B 区理论数学模型, 编制饱和结合分析计算机程序<sup>[5]</sup>, 求得平衡解离常数  $K_d$  和最大结合容量  $B_{max}$ 。

**1.6.3 竞争结合试验** 分别选取氯胺酮和 MK-801 2 种与 NMDA 受体具有不同亲和力的拮抗剂和 1 种非 NMDA 受体拮抗剂氟哌啶醇作为标记配基<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 的抑制剂, 进行竞争实验。步骤同上, 其中每管加入相同浓度(375 nmol/L)的标记配基 0.1 mL, 加入不同浓度范围( $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-11}$  mol/L)的抑制剂 0.1 mL, 加入受体蛋白 0.3 mL 并用缓冲液 A 补足到 0.6 mL, 同样的方法抽滤, 计数。以特异性结合抑制率(%)为纵坐标、抑制剂浓度负对数值为横坐标作图, 通过计算机程序计算, 获得不同抑制剂的半抑制浓度  $IC_{50}$ , 求出抑制剂表观解离常数  $K_i$ 。

## 1.7 t 检验

本工作采用  $t$  检验的统计学方法, 当  $P < 0.05$  时, 认为差异有统计意义。

## 2 结果和讨论

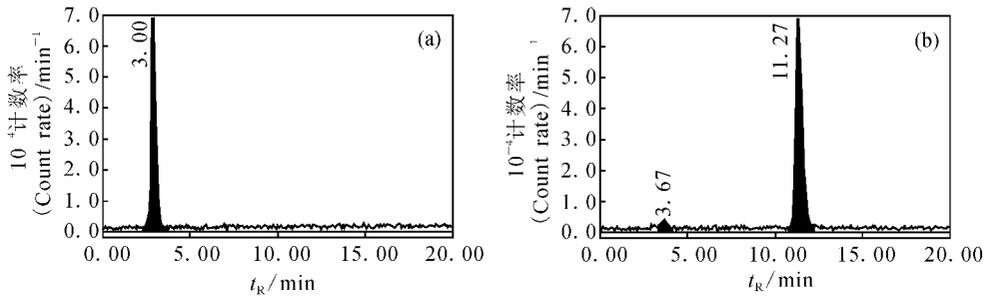
### 2.1 标记条件的优化

通过优化标记条件可以获得较高放射化学纯度的标记化合物<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM。标记溶液 pH 对标记率有较大的影响, 在 pH=4.5~7.0 时标记率大于 90%, 当 pH>7 时标记率明显下降; GH 用量在 2.0~20.0 mg 时标记率大于 90%; EDTA 用量在 0.2~4.0 mg 时标记率大于 95%; SnF<sub>2</sub> 用量在 30~200  $\mu$ g 时标记率大于 90%, 当 SnF<sub>2</sub> 用量高于 200  $\mu$ g 时放射化学纯度降低; 前体 NCAM 用量为 20~50  $\mu$ g 时标记率大于 90%, 增加前体量放射化学纯度也没有明显提高; 锍淋洗液活度在 37~740 MBq 时标记率大于 90%。通过分析确定最佳标记条件为: pH=6.0 的磷酸盐缓冲液, 50  $\mu$ g NCAM, 40  $\mu$ g SnF<sub>2</sub>, 0.5 mg EDTA, 5 mg GH, 沸水浴反应 30 min, 制备得到的<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 标记率大于 95%。

### 2.2 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 的制备和鉴定

**2.2.1 脱保护前体和标记前体的结构表征** 对脱保护前体分别进行了碳谱和氢谱表征。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 170.10  $\times 10^{-6}$ , 168.90  $\times 10^{-6}$ , 羰基碳; 苯环上的 12 个碳: 158.90  $\times 10^{-6}$ , 158.80  $\times 10^{-6}$ , 129.93  $\times 10^{-6}$  (2C), 129.86  $\times 10^{-6}$  (2C), 129.82  $\times 10^{-6}$ , 129.57  $\times 10^{-6}$ , 114.10  $\times 10^{-6}$ , 114.07  $\times 10^{-6}$ , 114.01  $\times 10^{-6}$ , 113.97  $\times 10^{-6}$ ; 其他 22 个碳: 59.64  $\times 10^{-6}$ , 58.92  $\times 10^{-6}$ , 55.22  $\times 10^{-6}$ , 55.20  $\times 10^{-6}$ , 54.43  $\times 10^{-6}$ , 53.44  $\times 10^{-6}$  (2C), 50.51  $\times 10^{-6}$ , 47.52  $\times 10^{-6}$  (2C), 42.58  $\times 10^{-6}$  (2C), 40.11  $\times 10^{-6}$ , 37.66  $\times 10^{-6}$ , 36.00  $\times 10^{-6}$ , 35.00  $\times 10^{-6}$ , 32.30  $\times 10^{-6}$ , 30.87  $\times 10^{-6}$ , 30.06  $\times 10^{-6}$ , 29.98  $\times 10^{-6}$  (2C), 29.48  $\times 10^{-6}$ 。对标记前体 NCAM 进行质谱表征, MS( $m/z$ ): 414( $m+1$ ), 436( $m+Na$ )。结果证明合成的产物 V 即为目标产物 NCAM。

**2.2.2 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 放化纯度的测定和稳定性实验** 经 TLC 纸层析法检测, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 的  $R_f=0.8\sim 1.0$ , 而游离<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>的  $R_f=0.0\sim 0.2$ 。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 的放化纯达 95% 以上。HPLC 测定结果示于图 3。由图 3(b) 可知,  $t_R$ (<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM)=11.27 min, 高锍酸保留时间为 3.67 min, 产物和高锍酸的分离较好。通过积分峰面积, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM 的放化纯也高于 95%。TLC 和 HPLC 两种方法测定结果相符。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-NCAM

图 3 高锝酸(a)和 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM(b)的 HPLC 谱图Fig. 3 HPLC chromatogram of pertechnetetic acid(a) and  $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM(b)

在室温下的稳定性列入表 1。由表 1 可知, 5 h 后 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 的放射化学纯度仍高于 90%, 说明标记物 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 具有较好的稳定性, 适合做受体分析试验。

表 1  $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 在室温下的稳定性Table 1 Stability of  $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM at room temperature

$t/h$	RCP/%	$t/h$	RCP/%
1	95.5	4	90.4
2	93.1	5	90.5
3	91.6	6	88.6

### 2.3 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 的脂水分配系数

对于脑放射性药物, 脂水分配系数  $\lg P$  的大小是决定其能否穿透血脑屏障的重要因素, 一般要求  $\lg P = 0.5 \sim 2.0$ 。实验测得 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 的脂水分配系数  $\lg P = 1.90$ , 表明 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 具有很好的脂溶性, 容易透过血脑屏障进入脑内。

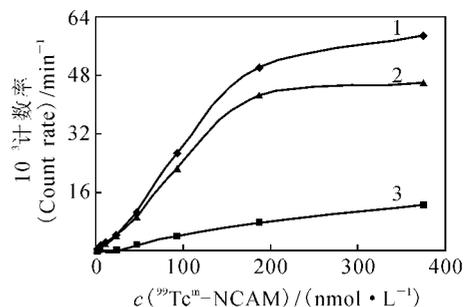
### 2.4 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 的受体结合分析

**2.4.1 饱和曲线**  $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 与受体结合饱和曲线示于图 4。由图 4 可知, 特异性结合(SB)随 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 浓度增加而增加, 增加到一定量时, 呈饱和趋势; 非特异性结合(NSB)较低, 并也随 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 浓度增加而增加, 但无饱和趋势。经计算机程序求得 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 与 NMDA 受体结合的平衡解离常数  $K_d = 706.3 \text{ nmol/L}$ , 最大结合容量  $B_{\max} = 56.8 \mu\text{mol/g}$ 。与文献[6]报道的美金刚胺与 NMDA 受体结合的平衡解离常数  $K_d$  值 (700 nmol/L) 相近。此结果显示 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 和美金刚胺具有与 NMDA 受体相近的结合亲和力指数, 同时也表明 NCAM 分子中  $\text{S}_2\text{N}_2$  环的引入不明显影响其与 NMDA 受体结合的选择性和亲和力。

### 2.4.2 不同抑制剂对标记化合物 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM

的抑制作用 竞争性曲线示于图 5。由图 5 可知, 2 种 NMDA 受体拮抗剂对 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 都有抑制作用。通过最小二乘法曲线拟合求出各抑制剂的半抑制浓度  $\text{IC}_{50}$ , 并根据 Cheng and Prusoff 公式:  $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + \text{LT}/K_d)$  [7] (LT, 标记化合物的浓度), 得出氯胺酮和 MK-801 的表观解离常数  $K_i$  分别为  $\text{IC}_{50} = 1.32 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $\bar{K}_i = 8.61 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ;  $\text{IC}_{50} = 5.11 \times 10^{-8}$ ,  $\bar{K}_i = 3.33 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$  ( $n=3$ )。以上 2 种 NMDA 受体抑制剂的表观解离常数  $K_i$  与文献[8-9]的结果处于相同数量级。另外一种对多巴胺  $\text{D}_2$  受体和  $\sigma$  受体具有拮抗作用的氟哌啶醇, 在浓度为  $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$  对 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 与 NMDA 受体的特异性结合的抑制率仅为 2%~8%, 无明显抑制作用。

**2.4.3 讨论** 一种理想的 NMDA 受体显像剂, 不但要容易透过血脑屏障到达脑部区域, 还要具有与 NMDA 受体特异性和靶向性的结合性质。本实验通过选择 2 种与 NMDA 受体特异性结合的具有不同亲和力的拮抗剂进行阻断实验, 发现 $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 与 NMDA 受体的特异性

图 4  $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM 与受体结合饱和曲线Fig. 4 Saturation curve of  $^{99}\text{Tc}^m$ -NCAM

to NMDA receptor

1—TB, 2—SB, 3—NSB

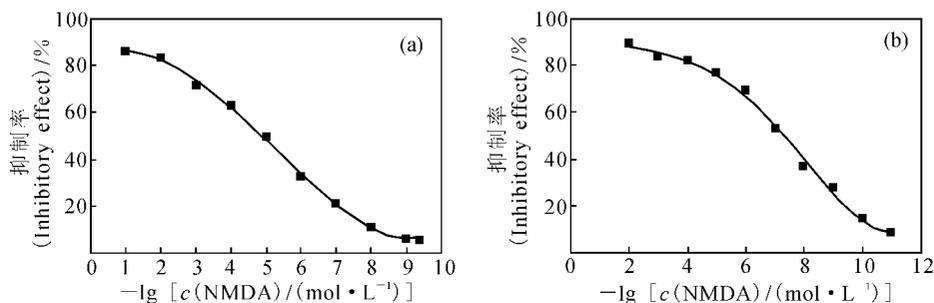


图 5 氯胺酮(a)和 MK-801(b)的竞争性曲线

Fig. 5 Competition curves of ketamine(a) and MK-801(b)

结合量随着拮抗剂浓度的增加而减少,抑制剂表现出一定的阻断作用,而且各抑制剂的表观解离常数  $K_i$  与文献报道基本相符;同时用对多巴胺  $D_2$  受体和  $\sigma$  受体具有结合能力的抑制剂氟哌啶醇进行阻断实验,发现 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与 NMDA 受体的特异性结合量与氟哌啶醇的浓度几乎没有关系,氟哌啶醇不能阻断 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与 NMDA 受体的特异性结合,也证明 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与多巴胺  $D_2$  受体和  $\sigma$  受体不结合。竞争性抑制试验初步证实了 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与 NMDA 受体的结合具有特异性和靶向性。

### 3 结论

直接标记法成功标记新化合物  $N\text{-}[2\text{-}(N\text{-}(2\text{-}\text{巯基乙基}))\text{氨基乙酰基}]\text{-}N\text{-}(2\text{-}\text{巯基乙基})\text{-}3,5\text{-}\text{二甲基金刚烷胺基乙酰胺}(\text{NCAM})$ ,经过条件优化,其放化纯度达 95% 以上。辛醇/水分配实验,测得 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 脂水分配系数  $\lg P=1.90$ ,以及其较小的分子量,综合表明标记化合物 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 易透过血脑屏障。通过体外放射性配基受体结合分析,显示 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与 NMDA 受体结合呈现单一、饱和的特点,其平衡解离常数为  $706.3\text{ nmol/L}$ ,属中等亲和力指数;同时 NMDA 受体特异性拮抗剂氯胺酮和 MK-801 均能阻断 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与 NMDA 受体的结合,其表观亲和力常数( $K_i$ )值均与文献报道一致;多巴胺  $D_2$  受体和  $\sigma$  受体拮抗剂氟哌啶醇不能阻断其与 NMDA 受体结合,说明 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与多巴胺  $D_2$  受体和  $\sigma$  受体不结合。初步实验结果显示 $^{99}\text{Tc}^m\text{-NCAM}$ 与 NMDA 受体的结合具有一定的特异性和靶向性,其是否具有临床应用价值有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Yang Y, Wang X B, Frerking M, et al. Spine Expansion and Stabilization Associated With Long-Term Potentiation [J]. *Neurosci*, 2008, 28(22): 5 740-5 751.
- [2] Ametamey S M, Samnick S, Leenders K L, et al. Fluorine-18 Radiolabelling, Biodistribution Studies and Preliminary PET Evaluation of a New Memantine Derivative for Imaging the NMDA Receptor [J]. *Recept Signal Transduct Res*, 1999, 19: 129-141.
- [3] 张建康,周杏琴,钦晓峰,等.放射性 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的 NMDA 受体配基  $\text{N}_2\text{S}_2\text{-Memantine}$  的合成[J]. *化学试剂*, 2008, 30(11): 842-844.
- [4] Reynolds I J, Sharma T A. The Use of Ligand Binding in Assays of NMDA Receptor Function [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 128: 93-102.
- [5] 曹国宪,李卫一,方平.受体 B 区理论饱和分析数据处理程序[J]. *中华核医学杂志*, 1987, 7(4): 217-219.
- [6] 谢琼,郝敬来,仇缀百.离子通道型镇痛新靶点药物的研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2004, 35(5): 304-310.
- [7] Mutel V, Buchy D, Klingelschmidt A, et al. *In Vitro* Binding Properties in Rat Brain of [ $^3\text{H}$ ]Ro 25-6981, A Potent and Selective Antagonist of NMDA Receptors Containing NR2B Subunits [J]. *Neurochem*, 1998, 70(5): 2 147-2 155.
- [8] Seeman P, Ko F, Talerico T. Dopamine Receptor Contribution to the Action of PCP, LSD and Ketamine Psychotomimetics [J]. *Mol Psychiatry*, 2005, 10(9): 877-883.
- [9] Waterhouse R N. Imaging the PCP Site of the NMDA Ion Channel [J]. *Nucl Med Biol*, 2003, 30(8): 869-878.