

径。

参 考 文 献

- 1 Newsline. J Nucl Med, 1993; 34(2): 15N
- 2 Said SI et al. J Clin Invest, 1968; 47: 85a-86a
- 3 Said SI et al. Nature, 1969; 224: 669-700
- 4 Said SI et al. Science, 1970; 169: 1217-1218
- 5 Itoh N et al. Nature, 1984; 304: 547-549
- 6 Gozes I et al. Brain Res, 1987; 2: 137-148
- 7 Bodanszky M et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1973; 70(2): 382-384
- 8 Gahrenkrug J et al. J Lab Clin Med, 1977; 89(6): 1379-1388
- 9 Ottaway CA et al. in Psychoneuroimmunology, Second Edition, (Ader R et al. eds) Academic Press, San. Diego, 1991; 225
- 10 Dharmasathaphom K et al. J Clin Invest, 1985; 75: 462-471
- 11 Tater D et al. Ann NY Acad Sci, 1988; 527: 682-685
- 12 Westendorf JM et al. Endocrinology, 1983; 112(2): 550-557
- 13 Ottaway CA et al. J Immunol, 1984; 132: 471
- 14 Stanis AM et al. J Immunol, 1986; 136: 152
- 15 Chochola J et al. J Biol Chem, 1993; 265(4): 2312-2318
- 16 Sreedharan SP et al. Biochem Biophys Res Commun, 1993; 193: 546-553
- 17 Robberedht P et al. FEBS LETTERS, 1988; 228(2): 351-355
- 18 Mao YK et al. J Pharmacol Exp Ther, 1991; 9: 986-999
- 19 Virgolini I et al. Cancer Res, 1994; 54: 690-700
- 20 Kiso T et al. Biochem Pharmacol, 1994; 47: 241-245
- 21 Pence JC et al. Arch Surg, 1993; 28: 591-595
- 22 Gespach C et al. Cancer Res, 1988; 49(18): 5079-5083
- 23 Ilshi H et al. Int J Cancer, 1992; 50: 649-652
- 24 Qualman S et al. Cancer, 1992; 70(7): 2005
- 25 Christophen JP et al. J Biol Chem, 1976; 251(15): 4629-4634
- 26 Hassan M et al. Nucl Med Biol, 1994; 21(6): 865-872
- 27 Virgolini I et al. Eur J Nucl Med, 1993; 20(10): 847
- 28 Virgolini I et al. J Nucl Med, 1994; 35(5): 97
- 29 Raderer M et al. Nucl Med Commun, 1994; 15(4): 223
- 30 Larson SJ. J Nucl Med, 1991; 32: 1189-1191

(收稿日期: 1995-09-20)

血栓性疾病的放射免疫显像

中国医学科学院阜外心血管医院(北京, 100037) 张晓丽综述 刘秀杰 林 汉* 审校

摘 要: 血栓性疾病的正确诊断对及时治疗和改善预后起重要价值,但目前仍是急待解决的临床难题。放射免疫显像为血栓性疾病的诊断提供一种特异的新方法,然而抗体分子量太大,血液清除慢,血本底高为其主要缺点。人工合成的小分子肽类含有与血栓特异结合的活性部位,在动物实验和临床初步研究已获得成功,显示其良好的应用前景。

关键词: 血栓性静脉炎 放射免疫显像 单克隆抗体 SPECT 活性肽

据流行病学统计,静脉血栓是继心肌缺血和中风后第三位常见的心血管急症,其发病率及死亡率均高。深静脉血栓(DVT)是引起血栓和栓塞性疾病的主要原因,肺栓塞

(PE)的栓子约 75%~90%来自下肢深静脉,而早期治疗可以预防血栓的发展和并发症的出现,因此对患者的早期诊断具有重要临床意义。然而,根据临床症状和体征诊断 DVT

* 中国医学科学院放射医学研究所

和 PE是不可靠的,不恰当的抗凝治疗又可引起出血的并发症,为此建立一种客观而可靠的诊断方法是必要的^[1]。

理想的诊断方法应是安全、准确和无创的,可同时提供解剖和功能信息。放射性核素显像的最大优势是可以无创性检测器官的功能状况。核素静脉显像可判断血管堵塞的存在及性质,判断血栓性疾病是急性还是慢性,并可根据血栓性疾病的病理生理特点,制备参与出血、凝血、纤溶等不同过程的特异性显像剂,进行血栓显像。

1 血栓形成的原理

正常生理状态下,机体的凝血系统和纤溶系统互相依赖、互相拮抗而维持正常的血流状态。在病理状态下,各种原因引起血管内膜损伤,胶原暴露从而激活血小板,启动内源性和外源性凝血系统,在凝血酶作用下,纤维蛋白和粘连蛋白共同使粘集的血小板牢固地粘附于损伤内膜表面,形成血小板纤维蛋白血凝块。发生在静脉系统的血栓由大量的纤维蛋白和少量血小板组成,而动脉系统的血栓由大量血小板和少量纤维蛋白组成。

2 用于血栓性疾病检测的放射性药物

用于血栓显像的放射性药物应对靶器官的结合具有高度特异性和高亲和力,结合位点相对稳定,不受血栓发展和抗凝治疗的影响;同时,它在血液中的清除应较快,血液本底低,以便在较短时间内获得较高的血栓/血液(T/B)比值,血栓显像清晰^[2]。不同的放射性核素标记不同底物,可得到不同种类的示踪剂。用于血栓显像的主要示踪剂有:¹¹¹In、¹³¹I、^{99m}Tc、¹²³I、⁶⁷Ga等标记的血小板、纤维蛋白原、纤维蛋白及其片段;¹¹¹In、¹³¹I、^{99m}Tc标记的抗血小板、纤维蛋白抗体及其片段和抗纤溶酶原激活剂抗体;^{99m}Tc标记的与血小板糖蛋白II b/III a(GPII b/III a)受体特异结合的肽类等。

3 实验研究

3.1 抗纤维蛋白抗体显像剂

血循环存在大量的纤维蛋白原,它是由A_α、B、γ三对肽链组成的糖蛋白。血栓形成早期,纤维蛋白原结合到血小板的GPII b/III a受体上,在凝血酶作用下,脱去A_α、B链N端的四段小肽,形成纤维蛋白单体,并聚合成可溶性纤维蛋白多聚体,在VIII因子和Ca⁺⁺作用下,形成稳定的不溶性纤维蛋白网,同时激活的纤维溶酶使纤维蛋白降解为X、Y、D、E片段。因此,与纤维蛋白原、纤维蛋白单体、纤维蛋白特异结合的抗体可进行血栓显像。

根据纤维蛋白不同的抗原决定簇,可制备不同抗体,主要有四类:抗α链或抗β链氨基端位点的抗体(59D8, T2G1S, 64C5)^[3,4];抗纤维蛋白二聚体抗体(15C5, F60/43/8)^[5,6];抗非交联和交联的纤维蛋白D区抗体(8D3, DD-3B6/22)^[7];抗纤维蛋白D片段抗体(GC4)。同时,为了获得更佳的显像图,用胃蛋白酶去掉具有免疫原性的抗体Fc段,制成抗体片段,这样分子量减小,血液清除加快,可获得较高的T/B比值^[8]。

研究最早、最多的抗体是59D8和T2G1S,主要用于新鲜血栓的显像^[4]。标记完整抗体的清除速度、清除途径以及所获得的T/B比值均不同于抗体片段;用不同的核素标记同一抗体的清除速度和T/B比值也不同^[3-4,9]。经肾清除的抗体片段因分子量小而清除速度快于经肝清除的完整抗体。清除用^{99m}Tc标记的示踪剂速度快于¹³¹I和¹¹¹In标记者^[9]。

Paiabrica等^[10]报道,¹³¹I标记的抗体F(ab')₂ Fab在注射后48小时所获得的T/B比值分别为8.6±4.1、10.9±1.5、9.2±2.8,而用¹¹¹In标记的抗体F(ab')₂ Fab的T/B比值分别为16.0±4.4、15.2±11.5、0±2.0。尽管¹¹¹In-DTPA-59D-Fab的T/B值

稍高于 $^{99m}\text{Tc-T2GIS-Fab}'$,但后者的排泄稍快,显像时间短(2~4小时),获得的图像质量好。因此, $^{99m}\text{Tc-T2GIS-Fab}'$ 更适合于临床应用^[10]。

用放射性核素标记 T2GIS和 59D8可使 2~4小时、1~5天的犬新鲜血栓显像,但病人常在患血栓性疾病数天后出现症状并接受抗凝治疗,因此,可使陈旧性血栓显像而又不受肝素治疗影响的显像剂将更有利于临床应用。体外研究表明,抗体 GC4可与纤维蛋白单体、交联的纤维蛋白和经纤溶酶作用后的纤维蛋白原反应。用 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{111}In 标记抗体 GC4与 T2GIS对 3小时和 3天以及肝素治疗与否的犬的血栓模型显像,结果:GC4/T2GIS的放射性比值在 3天组、3小时组、肝素化组及未肝素化组分别为 2.3、1.1、2.9及 1.9,表明 GC4对陈旧性血栓和肝素治疗的血栓定位比 T2GIS好,适合临床使用^[11]。

肝素治疗是否影响血栓的显像,目前尚无定论。有的报道认为肝素抑制凝血功能,而机体自身的纤维系统可溶解血栓使抗体的结合位点减少,降低血栓对示踪剂的摄取,从而降低诊断的敏感性;有的报道则认为肝素对血栓显像影响不大。因此,还需做进一步的研究来确定肝素对血栓显像的影响,以利于评价临床显像结果。

3.2 组织纤溶酶原激活剂(t-PA)

t-PA是由内皮细胞分泌的丝氨酸蛋白酶,无纤维蛋白时没有活性,一旦纤维蛋白出现,局部分泌的 t-PA即刻增加,并与纤维蛋白结合,激活纤溶酶原,导致纤维蛋白溶解,又可与纤溶酶原激活剂的抑制剂(PAIs)结合,抑制纤溶。

将 $^{111}\text{In-t-PA}$ 抗体注入犬体内,在 31分钟时 T/B比值可达 6.3,主要通过肝肾清除($t_{1/2}$ 为 5分钟),因其显像不受纤维蛋白和肝素影响,有可能作为一种特异的血栓显像剂,然而,标记 t-PA使纤维蛋白降解导致结合位点减少,以及与血栓结合前可与 PAIs结合,

均不利于血栓显像。目前,有两种方法对 t-PA 结构做些修饰:利用突变使氨基酸序列第 478位丝氨酸被苏氨酸代替,阻断部分纤溶活性;将 ^{111}In 与 DTPA螯合后,用精氨酸氨酸酮灭活活性中心,从而可完全阻断 PAIs和纤溶酶原与 t-PA的结合。这样,既保留对纤维蛋白结合的高亲和力,又不受上述因素影响^[12]。

3.3 抗血小板抗体的显像剂

与血小板有关的放射性药物有两类:①放射性核素与螯合剂螯合后标记血小板;②标记抗血小板抗体,其结合于血小板的主要位点为 GHI b III a受体和 GMP-140。GHI b III a是血小板膜的主要成分,存在于静止(循环)和激活(血栓)血小板上,但在激活血小板时发生构型的改变,与纤维蛋白原结合引起血小板互相聚集,而 GMP-140是血小板受刺激后释放并转移到血浆膜上的 α 颗粒膜蛋白,是血栓的特异标记之一^[10]。所以,抗 GHI b III a受体的抗体(7E3, P256)可结合到循环和血栓局部的血小板,而抗 PADGEM(PADGEM是血小板激活依赖的血小板膜蛋白)的多克隆抗体和抗 GMP-140抗体(SZ-51)不与循环中血小板反应,特异地趋向血栓局部。

用 ^{99m}Tc 或 ^{111}In 标记血小板必需在体外进行,血小板易受损,标记率不高,但标记的血小板抗体可直接注入体内显像。抗体 7E3和 P256对静止和激活的血小板均有高亲和力,可用于新鲜血栓显像,但 7E3因阻断纤维蛋白原结合到血小板上,从而抑制血小板聚集,而用 $^{111}\text{In-P256-F(ab)'}_2$ 可完全避免这一不足,更适于 DV T高危患者的监测^[13]。

抗血小板表面低分子抗原的抗体 50H. 19可与体内外的血小板结合,用 ^{99m}Tc 标记 Fab'(占 85%)和 F(ab)'₂(占 15%)的混合物,注入犬体内可使外周动静脉、肺动脉、右心室的血栓显像,主要通过肾排泄($t_{1/2}$ 为 3~6分钟),3小时后 T/B比值为 15:1,这一

抗体可用“Pretinned”法制成药盒,^{99m}Tc标记后有可能作为血栓显像剂用于临床诊断^[14]。以上几种抗体均与循环中的血小板结合,不利于显像,而抗-PADGEM抗体和SZ-51可克服这一缺点。抗-PADGEM抗体可使实验性股动脉-静脉尼龙导管短路内的血栓和狒狒股静脉血栓显像,获得的T/B比值分别为3.3和3.3,非特异IgG的T/B比值分别为5和1.2,注射示踪剂30~60分钟可获得较佳图像^[10],抗体SZ-51可结合循环血小板上780个分子,对血栓中血小板则结合11000个分子,T/B比值在犬的股动-静脉血栓分别为57.09±12.24和6.64±4.7,符合动脉血栓主要由血小板组成的病理特点^[15]。因此,初步的动物实验提示,这类抗体用于血栓性疾病的放免显像有一定可行性。

3.4 用于血栓显像的肽类药物

血栓的放射免疫显像,从理论上讲应是一个比较理想的方法,然而,抗体分子量大,血液清除慢,而且制备复杂,价格昂贵。近年来,人们开始研制肽类用于血栓显像,这些肽类是模拟纤维蛋白原和抗血小板GPIIb/IIIa受体的抗体PAC1的互补决定区(CDR-3H)而合成的,含有与血小板特异结合的活性部位,即含有RGD序列(精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸序列),与抗体PAC1的活性部位RYD序列(精氨酸-酪氨酸-天门冬氨酸)类似。因此,它们所识别的血小板的靶序列与PAC1以及纤维蛋白原结合于血小板的活性部位一致。另外,它们含有KCTCCA氨基酸序列作为还原锡的络合剂,主要优点是合成的寡肽比大分子的抗体蛋白血液清除快,可达到快速检测的目的。Knight^[12,16]等报道了用^{99m}Tc标记的一系列肽类,可使兔颈静脉的新鲜血栓及犬股静脉1天的血栓在注射示踪剂后1~2小时显像,而标记非特异肽类不显像,显像剂主要通过肾排泄。因此,用标记肽类进行血栓显像是快速诊断血栓的新方法。但是,不同肽类所获得的T/B比值(1.55~

2.25)均低于¹²⁵I标记的纤维蛋白原(3.0),血栓的局部放射性摄取百分值(%ID/g)后者是前者的10倍,这些缺点不利于临床应用。

4 临床研究

4.1 ¹¹¹In标记59D8抗体

静脉注射74MBq(2mCi)的¹¹¹In-McAb或¹¹¹In-DTPA-59D8-Fab,行即刻、2小时、4小时、24小时显像,以局部放射性聚积高于血池相和对称部位或以局部放射性浓度进行性增高作为阳性诊断标准,24小时行静脉造影做对比。一般注射后2~4小时显像,诊断的敏感性为85%~90%,特异性为80%。初步的临床研究表明,影响显像的主要因素仍是血栓形成的时间、部位,以及抗凝治疗。

Jung^[12]对31例疑有DVT病人检查的结果:总的敏感性为84%,症状少于10天者敏感性为92%,对小腿、膝部、大腿和骨盆不同部位的敏感性分别为92%、82%、63%和18%,特异性分别为96%、83%、96%和100%,因此对大腿及骨盆部位的检测不理想。

4.2 ^{99m}Tc标记抗体T2G1S显像

多个研究中心报道了153例临床疑有DVT患者显像结果:注射^{99m}Tc-T2G1S-Fab'后1.5小时可获得较佳图像,24小时内行静脉造影,总的和大腿部的敏感性分别为80%和94%,总的特异性为82%,其中对39例既往有DVT病史的敏感性为100%(15/15),特异性为88%(15/17)。初步结果表明,^{99m}Tc-T2G1S可用来诊断急性、复发性DVT,而且对大腿部血栓的敏感性明显提高^[17]。

4.3 抗纤溶酶原激活剂抗体

Tromholt等^[19]对8例静脉造影诊断为DVT的病人用¹¹¹In标记抗t-PA抗体与¹¹¹In-59D8做对比研究:注射后24小时血栓局部均显影,T/B比值前者是后者的二倍,因为t-PA直接参与纤溶过程,因此作者认为核素标记的t-PA特异性抗体对血栓形成

早期的纤溶过程的探测具有高度敏感性,而抗血小板和纤维蛋白抗体只能检测已经形成的血栓^[19]。

4.4 ^{99m}Tc标记的肽类 P280和 P357

P280为一种由 26个氨基酸组成的二聚体, P357是 13个氨基酸组成的分子量为 3.4千道尔顿的活性肽,二者均可特异结合到激活血小板的 GPII b/III a受体上。Knight等^[12]报道了^{99m}Tc-P280成功地用于血栓显像的动物实验结果, Muto等^[20]报告了其临床应用的初步结果:注射^{99m}Tc-P280后 1小时可获得清晰图像, 9例 DVT患者有 8例显像阳性, 1例阴性者考虑与发病时间长(DVT病史 7个月)有关。另外, 2例急性肺栓塞显像阳性^[20]。张晓丽等^[21]首次报道了^{99m}Tc-P357对急性 PE诊断的临床初步结果:经肺动脉造影证实的急性 PE患者,注射示踪剂后 1小时可获得阳性图像,肺野内有异常的放射性浓聚灶,而非急性 PE患者肺野内无浓聚灶。这些结果表明,肽类的研制成功为血栓性疾病的诊断提供了一种特异性新方法,但 T/B比值偏低,注射后 4小时最高仅达 2.6,因此血液本底高为其主要缺点,为此需进一步深入研究。

5 结论

纵观放射性核素显像对血栓性疾病的诊断,从目前的动物实验和临床研究表明,血栓的放射免疫显像显示了较好的应用前景。标记抗体的片段优于完整抗体,单抗优于多抗,而且^{99m}Tc标记的抗体更适于临床推广使用。标记人工合成的活性肽为血栓栓塞疾患提供另一种特异性新方法。

但是,放射性核素显像对血栓的诊断无绝对特异性,易受血栓形成时间和血栓所在部位和抗凝治疗的影响;目前还没有真正模仿 DVT和 PE的模型,对肺栓塞的诊断仍主要用肺通气和灌注显像方法,因此着重于解决以上问题,深入研究血栓性疾病诊断仍是核医学任务之一。

参考文献

- 1 Giuntini C et al. Chest, 1995; 107(Suppl): 3S
- 2 Oster ZH et al. J Nucl Med, 1990; 31: 1055
- 3 Knight LC et al. Radiology, 1989; 173: 163
- 4 Rosebrough SF et al. Radiology, 1985; 156: 515
- 5 Knight LC et al. J Nucl Med, 1993; 34: 554
- 6 Schaible TF et al. Semin Nucl Med, 1991; 21: 3136
- 7 Bautovich et al. J Nucl Med, 1994; 35: 195
- 8 Knight LC et al. J Nucl Med, 1988; 29: 494
- 9 Rosebrough SF et al. J Nucl Med, 1988; 29: 1212
- 10 Palabrica TM et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 1036
- 11 Rosebrough SF et al. J Nucl Med, 1990; 31: 1048
- 12 Knight LC et al. J Nucl Med, 1993; 34: 554
- 13 Kiss RG et al. Thrombosis and Hemostasis, 1994; 14: 367
- 14 Som P et al. J Nucl Med, 1986; 27: 1315
- 15 吴锦昌等. 中华核医学杂志, 1994; 14: 35
- 16 Knight LC et al. J Nucl Med, 1994; 35: 282
- 17 Jung M et al. Radiology, 1989; 173: 469
- 18 Hohkange T et al. Nucl Med Commun, 1992; 13: 88
- 19 Tromholt N et al. Eur J Nucl Med, 1991; 18: 321
- 20 Muto P et al. J Nucl Med, 1995; 36: 1384
- 21 Zhang Xiaoli et al. The First China-Japan Nuclear Medicine Conference, 1995: 70

(收稿日期: 1996-04-01)