

- [6] John CS, Gulden ME, Li JH, et al. Synthesis in vitro binding and tissue distribution of radioiodinated 2-[¹²⁵I]N-(N-benzyl piperidin-4-yl)-2-iodobenzamide 2-[¹²⁵I]BP: A potential marker for human prostate tumors[J]. Nucl Med Biol. 1998; 25: 189-194.
- [7] Watethouse RN, Mardon K and Brien JC. Synthesis and preliminary evaluation of [¹²³I]1-(4-Cyanobenzyl)-4-[[[(trans-iodopropen-2-yl)oxy]methyl]piperidine A novel high affinity sigma receptor radioligand for SPECT[J]. Nucl Med Biol. 1997; 24: 45-51.
- [8] John CS, Bowen WD, Fisher SJ et al. Synthesis in vitro pharmacologic characterization and preclinical evaluation of N-[2-(1-piperidinylethyl)-3-[¹²⁵I]iodo-4-methoxybenzamide (P[¹²⁵I]MBA) for imaging breast cancer[J]. Nucl Med Biol. 1999; 26: 377-382.
- [9] John CS, Lin BB, Geyer BC, et al. ⁹⁹Tc^m-labeled sigma-receptor-binding complex: Synthesis characterization and specific binding to human ductal breast carcinoma (T47D) cells[J]. Bioconjugate Chem, 1997; 8: 304-309.

Signa receptor and sigma receptor imaging

PAN Ming-zhi

(Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital, WUCUMS, Sichuan Chengdu 610041 China)

Abstract Recent studies indicate that sigma receptors are a class of non-opiate, non-dopaminergic proteins. The structure, physiological and biochemical functions and the pharmacological significance of sigma receptors are not completely understood. A wide variety of human tumors, including malignant melanoma, non-small cell lung carcinoma, tumors of breast, prostate, colon, kidney, and neuroblastoma contain a high density of sigma receptors. Therefore, the development of high affinity sigma receptor-specific radio-ligands has become an attractive target. The radio-ligands not only can be used to study the physiological and biochemical functions and pharmacology of sigma receptors, but also can be potentially used to image and treat sigma receptor-positive tumors.

Key words sigma receptor; radio-ligand; sigma receptor-positive tumors; tumor receptor imaging

文章编号: 1001-098X(2000)02-0051-04

⁹⁹Tc^m标记 annexin V 进行体内凋亡显像的研究

朱小华

(同济医科大学附属同济医院核医学科, 湖北武汉 430030)

摘要: 细胞凋亡早期, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞膜脂双层的内层迁移至外层。根据磷脂结合蛋白 V (annexin V) 高度亲和 PS 的特性, 利用 ⁹⁹Tc^m 标记的 annexin V 可以进行体内凋亡细胞的显像。

关键词: 细胞凋亡; ⁹⁹Tc^m 标记的 annexin V; 磷脂酰丝氨酸; 核素显像

中图分类号: R817.4

文献标识码: A

细胞凋亡 (apoptosis) 在诸多生理和病理过程中起着重要的作用, 是当今生命科学领域的新热点之一。近年来, 有关凋亡分子机制、信号转导、基因调控方面的研究已经取得很大进展, 而作为所有研究

基础的凋亡检测技术也是层出不穷。目前, 利用放射性核素标记磷脂结合蛋白 V (annexin V) 进行体内凋亡显像已成为一些学者研究的方向。

1 细胞凋亡

细胞的死亡有两种方式: 坏死与凋亡。细胞凋亡是细胞内死亡程序活化导致的细胞自杀 (suicide)。凋亡大多发生在生理情况下, 某些病理性刺激也可以诱导细胞凋亡的发生。外界刺激经过复杂的信号

收稿日期: 1999-11-19

作者简介: 朱小华 (1970-), 女, 山东人, 同济医科大学附属同济医院核医学科主治医师, 硕士研究生, 主要从事肿瘤核医学研究。

审校者: 同济医科大学附属同济医院核医学科 吴华

转导系统传入细胞核,活化细胞凋亡相关基因的表达,启动细胞凋亡程序,最终由内源性核酸酶沿核小体切断DNA链,导致一系列凋亡表型改变,包括:①染色质边缘化(margination),细胞核高度凝聚(condensation);②脑浆浓缩,胞质气泡(cytoplasmic vacuoles)形成;③核酸内切酶激活,于染色质上核小体连接区切断DNA链,使之降解为规则的180~200碱基对的DNA片段;④脑膜包裹DNA片段,细胞器和胞质成份形成凋亡小体(apoptotic body),最后被巨噬细胞吞噬,在溶酶体内降解;⑤细胞内 Ca^{2+} 浓度增加;⑥capases家族蛋白酶活化;⑦与脑浆蛋白质交联有关的转谷氨酰胺酶活性增高;⑧细胞膜脂双层内层的磷脂酰丝氨酸(PS)外翻至膜外,有利于巨噬细胞的识别和吞噬。细胞凋亡时细胞膜始终保持完整,细胞内容物无溢出,故不引起炎症反应。

上述PS的再分布过程简述如下:正常情况,细胞膜脂双层中磷脂的分布是不对称的:磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂主要分布于细胞膜脂双层的外层,PS、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰肌醇主要分布于细胞膜脂双层的内层。这种不对称分布受三种转运蛋白共同作用的调节^[1]:ATP依赖性氨基磷脂特异性移位酶(translocase)能迅速将PS和PE从细胞膜外层转运到细胞膜内层;ATP依赖性非特异性脂质翻转酶(floppase)能缓慢地将膜脂从细胞膜内层转运到细胞膜外层; Ca^{2+} 依赖性非特异性脂质爬行酶(scramblase)允许膜脂在膜脂双层之间任意地移动。在生理性 Ca^{2+} 浓度下,活性的translocase和floppase共同维持膜脂不对称分布的动态平衡,而scramblase处于失活状态。细胞凋亡的早期,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,scramblase被激活,而translocase活性受到抑制,从而使PS由膜内层迁移至膜外层。这一凋亡的普遍现象发生在凋亡形态学改变之前。

细胞凋亡涉及到生命活动中的许多重要领域,如胚胎发育、造血、免疫、肿瘤等,其生物学意义在于清除多余的、无用的、衰老的、异常的、有害的细胞,维持器官、组织、细胞数目的相对平衡。越来越多的证据表明,许多疾病和病变与细胞凋亡的异常有关,其中肿瘤、自身免疫疾病(如系统性红斑狼疮、免疫介导的肾小球肾炎)、疱疹病毒和腺病毒感染等与凋亡抑制有关;而获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、神经变性疾病(如Alzheimer病、帕金森病、色素性视网膜炎)、再生障碍性贫血、心脑血管缺血性疾病、器官及

骨髓移植排斥反应、病毒性肝炎以及酒精中毒性肝病等则与凋亡的升高有关。人们可以通过抑制或者诱导细胞凋亡的方法来治疗相关的疾病,因此定量检测凋亡和监测其变化对认识疾病,评价、指导疾病的治疗以及开发新药等具有重要意义。

2 凋亡的体外检测方法

根据凋亡的形态学和生化特点,人们研究出了许多种体外检测凋亡的方法,如:

(1)电镜形态学观察,是确定凋亡最经典、最可靠的方法,但不能定量;

(2)DNA凝胶电泳,依据“阶梯状”(ladder)条带来确定凋亡,方法简便,但只能半定量,且灵敏性较差,要求所测标本的细胞数在 10^6 以上;

(3)酶联免疫吸附法(ELISA)核小体测定,灵敏性高,可检测凋亡细胞数达 $5 \times 10^2/m1$ 但不能精确定量;

(4)流式细胞仪定量分析,包括①检测DNA含量的碘化丙啶(PI)染色法,根据亚二倍体峰即AP峰的高低来测定凋亡细胞百分率,易漏检和错检,适用于大批量定量检测凋亡;②检测形态学及细胞膜完整性的H₃₃₃₄₂PI双染色法,可区分坏死、凋亡和活细胞;③检测DNA裂点的原位切口平移(BNT)和切口末端标记(TUNEL)技术,TUNEL技术是目前最常用的方法,但易受坏死细胞的干扰,因此需先用荧光镜检以保证TUNEL染色细胞不存在坏死细胞;④检测细胞膜PS再分布的annexin V联合PI法,这是近几年才出现的新的凋亡检测方法,较以上各法有更高的灵敏度和特异性,且不需固定,是较理想的检测方法。

3 磷脂结合蛋白V(annexin V)

Annexin V为 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白家族中的一员,曾经有多种称谓:PA P-I(placental anticoagulant protein I)、IBC(inhibitor of blood coagulation)、Lipocortin V、35K Callectrin、Endonexin II、PP4(placental protein 4)、VAC- α 、(vascular anticoagulant- α)、35 γ Calcimed in、Caphobind I、Anchorin C II。1990年Cumpton M J和 Dedman JR 倡议统一名称为annexin V^[2]。annexin V由位于人染色体4q26~q28的annexin V基因编码,含有319个氨基酸,包括四个70~80氨基酸重复单元,分子质量为36 000。annexin V与

PS有高度亲和力,作用位点是第187位的色氨酸^[3]。正常人血浆 annexin V 水平仅有 0~5 ng/ml 羊水中约有 12~107 ng/ml 而细胞内含量相对较高:培养的脐静脉内皮细胞 4080±2568 ng/ml 血小板 178±107 ng/ml 白细胞 564±384 ng/ml 红细胞 8.4±4.3 ng/ml。annexin V 可以从胎盘提取,也可以在大肠杆菌中利用 DNA 重组技术大量制备。

从 annexin V 名称的历史可以看出,它曾经被作为一种抗凝剂来研究。由于在激活的血小板表面可以表达大量的 PS,近年来 annexin V 也被建议用来进行体内血栓的显像。Stratton JR 等^[4]的研究结果显示,用 ⁹⁹Tc^m-N₂-S₂-annexin V 进行急性血栓的显像较标记血小板、抗体、抗体片段等进行显像具有潜在的优点。另外,annexin V 与细胞分化、增殖过程的信号转导有关,并调控与信号转导有关的 cPKC (conventional protein kinases C) 和 cPLA 2 (cytosolic phospholipase A 2) 的活性^[5]。最近 K atayanag i K 等^[6]报道,annexin V 有可能作为肝内小胆管的标志物。

4 ⁹⁹Tc^m标记 annexin V 检测凋亡

由于 PS 从细胞膜的脂双层内层迁移至外层是细胞凋亡级联反应的初始事件,因此利用 annexin V 高度亲和 PS 可以早期检测凋亡的发生。目前已用 FITC (fluorescein isothiocyanate) 标记 annexin V 对多种细胞的凋亡进行了体外检测,包括造血细胞、神经元细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、肿瘤细胞、淋巴瘤细胞、鼠胚胎细胞以及植物细胞、昆虫细胞^[7~10],其结果用 PI 染色校正后较 TUNEL 等方法具有更高的灵敏度和特异性。

然而,体外检测凋亡需要对组织进行活检,具有创伤性,一些学者便利用放射性核素示踪的特点尝试用放射性核素标记的 annexin V 进行体内凋亡细胞的显像。Blankenberg FG 等^[11~13]用 ⁹⁹Tc^m 标记 annexin V 与 HYN IC (hydrazinicotinamide) 形成的络合物进行了体外凋亡细胞检测。动物体内放射性分布研究和动物凋亡模型显像。

首先,将 annexin V 溶液 (5.6 ng/ml) 与琥珀酰亚胺基 6-HYN IC 室温下轻混,避光 3h 后加入磷酸缓冲液终止反应,经透析,离心后形成 HYN IC-annexin V。然后,将 74 MBq (10 mCi) ⁹⁹Tc^m-葡庚糖与 100 μl (100 μg) HYN IC-annexin V 室温下避光孵育 1h 后加入磷酸缓冲液 (pH 7.4 含 0.1% 人血清白蛋

白)至 1ml 经 Sephadex G-25 层析柱淋洗后以 1ml 为等份收集,薄层色谱法测得 ⁹⁹Tc^m-HYN IC-annexin V 放化纯 97% 以上。

标记后的 annexin V 与 PS 的亲和力不受影响,且 ⁹⁹Tc^m-HYN IC-annexin V 在体内结合稳定,血液清除快,静脉注射 ⁹⁹Tc^m-HYN IC-annexin V 1h 后小鼠血液放射性仅为注射时的 3%。正常情况下,体内分布显示肾脏摄取 annexin V 最多 (约 52% ID),其次为肝脏 (约 12.8% ID),而心、脑、胸腺摄取 annexin V 很低 (小于 0.2% ID); 肾组织冰冻切片放射自显影显示放射性显著浓聚于肾皮质,这是由于肾皮质含有高数量的 PS 以及近端肾小管能非特异性地摄取低分子质量的蛋白质^[14,15]; 静脉注射 ⁹⁹Tc^m-HYN IC-annexin V 后 1h 显像显示肾脏明显显影,而肝影轮廓不清晰。

上述实验结果显示,诱导凋亡的 Jurkat T 成淋巴细胞和离体 Balb/c 小鼠胸腺细胞摄取 ⁹⁹Tc^m-HYN IC-annexin V 明显增加,且摄取 ⁹⁹Tc^m-HYN IC-annexin V 的放射性计数与流式细胞术检测 FITC-annexin V 的荧光数呈线性相关; 动物凋亡模型如 Fas 介导的肝细胞凋亡、急性心脏异种移植排斥反应和环磷酰胺治疗 B 细胞淋巴瘤时发生的凋亡都可以通过核素显像的方法明显地表现出来,离体及 ROI (感兴趣区) 分析均显示凋亡组织放射性计数较对照组显著增高,与凋亡组织学分级具有相关性; 同时,用环孢霉素治疗移植排斥反应后凋亡的明显减少也可以通过显像的方法及时表现出来。这些结果显示了用放射性核素标记 annexin V 进行体内凋亡细胞显像及监测凋亡变化的可能性。

体外实验^[13]还发现,坏死的细胞也摄取 annexin V,这一方面可能由于细胞膜的完整性受到不可逆的损伤,使 annexin V 与细胞膜内层的 PS 相结合; 另一方面可能由于限制 PS 位于膜内层的能量系统功能衰竭而使 PS 从膜内层被动分布于膜外层。因此,annexin V 不能绝对区分坏死和凋亡。尽管如此,坏死的发生在体内多数情况下是非常少的。

5 结语

由于 PS 从细胞膜脂双层内层迁移至外层是细胞凋亡早期的普遍现象,因此从理论上讲, ⁹⁹Tc^m 标记的 annexin V 能够检测所有类型细胞的凋亡,即其应用的普遍性,从而为无创伤性早期检测体内细胞凋亡、监测临床治疗效果提供了可能,并有助于相

关药物的研制。同时, $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的 annexin V 显像还具有以下优点:① annexin V 为人体内蛋白,不具有抗原性,且显像剂量的 annexin V 无抗凝血性;② annexin V 分子量较小,渗透力强,血液清除快,靶与本底比值高,静脉注射 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的 annexin 后 1h 即可进行显像,成像清晰;③可以利用 DNA 重组技术大量制备 annexin V。

然而,我们必须看到, annexin V 还不能绝对区分坏死和凋亡,目前的研究也仅仅处于动物实验阶段,是否所有组织类型的凋亡都能通过核素显像的方法表现出来尚未得到证实,并且放射性核素标记 annexin V 显像所需的凋亡细胞数量尚未确定。这一切都有待于今后进一步的研究。

参考文献:

- [1] Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells[J]. *Blood*, 1997, 89(4): 1121-1132.
- [2] Crompton MJ, Dedman JR. Protein terminology tangle[J]. *Nature*, 1990, 345: 212.
- [3] Pigault C, Follenius-Wund A, Chabbert M. Role of Trp-187 in the annexin V membrane interaction: a molecular mechanics analysis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254: 484-489.
- [4] Stratton JR, Dewhurst TA, Kasina S, et al. Selective uptake of radiolabeled annexin V on acute porcine left arterial thrombi[J]. *Circulation*, 1995, 92: 3113-3121.
- [5] Russo Marie F. Annexin V and phospholipid metabolism[J]. *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37: 287-291.
- [6] Katayanagi K, Van de Water J, Kenny T, et al. Generation of monoclonal antibodies to murine bile duct epithelial cells: identification of annexin V as a new marker of small intrahepatic bile ducts[J].

Hepatology, 1999, 29: 1019-1925.

- [7] Vemes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V[J]. *Immunol Methods*, 1995, 184: 39-51.
- [8] Boersma AMW, Kees N, Oostum RG, et al. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin[J]. *Cytometry*, 1996, 24: 123-130.
- [9] O'Brien EW, Reutelingsperger CPM, Ho-Haway KM. Annexin V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants[J]. *Cytometry*, 1997, 29: 28-33.
- [10] Reutelingsperger CPM, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1997, 53: 527-532.
- [11] Blankenberg FG, Katskis PD, Tait JF, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6349-6354.
- [12] Vriens PW, Blankenberg FG, Stoot JH, et al. The use of technetium Tc-99m annexin V for in vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 116: 844-853.
- [13] Blankenberg FG, Katskis PD, Tait JF, et al. Imaging of apoptosis (programmed cell death) with ^{99m}Tc Annexin V[J]. *J Nucl Med*, 1999, 40: 184-191.
- [14] Kobayashi H, Yoo TM, Sim IS, et al. L-lysine effectively blocks renal uptake of ^{125}I or ^{99m}Tc -labeled anti-Tac disulfide-stabilized Fr fragment[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 3788-3795.
- [15] Lang L, Jagoda E, Wu CH. Factors influencing the in vivo pharmacokinetics of two PET-labeled low molecular weight proteins[J]. *Q J Nucl Med*, 1997, 41: 53-61.

The study about imaging of apoptosis with $^{99}\text{Tc}^m$ -labeled annexin V

ZHU Xiao-hua

(Department of Nuclear Medicine, Tongji Hospital, Tongji University, Hubei Wuhan 430030 China)

Abstract Phosphatidylserine exposures on the outer leaflet of the plasma membrane lipid bilayer at the beginning of apoptosis. $^{99}\text{Tc}^m$ -labeled annexin V can be used to image apoptosis in vivo according to annexin V has a high affinity with PS.

Key words apoptosis; phosphatidylserine; $^{99}\text{Tc}^m$ -labeled annexin V; radionuclide imaging