

文章编号: 1001-098X(2004)01-0006-03

# 放射性核素细胞凋亡显像

张金山

**摘要** 放射性核素细胞凋亡显像具有直观、无创伤和实时在体观察细胞凋亡等特点, 对于脑、心肌细胞缺血再灌注损伤的观察, 器官移植排斥反应的监测, 肿瘤放疗和化疗效果的评估等方面的应用前景良好, 但仍有许多问题有待于进一步探讨。

**关键词** 放射性核素显像; 细胞凋亡; 膜联蛋白 V

中图分类号 R817.4 文献标识码 A

## Apoptosis radionuclide imaging

ZHANG Jin-shan

(Department of Nuclear Medicine, Guangzhou Second People's Hospital, Guangzhou 510150, China)

**Abstract** Apoptosis radionuclide imaging is a novel method for the detection of apoptosis, characterised with direct, noninvasive and real-time imaging. It is useful in the observation of brain and myocardial ischemic reperfusion injury, detection of organ graft rejection and evaluation of tumor chemotherapy and radiotherapy effect, but further investigation should be done.

**Key words** radionuclide imaging; apoptosis; annexin V

细胞凋亡 (apoptosis) 作为一种重要的生命现象, 同细胞生长增殖一样, 越来越受到人们的广泛关注。研究表明<sup>[1]</sup>, 细胞凋亡与许多疾病的病理过程密切相关, 如神经系统退行性变疾病的发生发展、脑和心肌细胞缺血再灌注损伤、组织器官的免疫损伤和器官移植的排斥反应、肿瘤的发生发展和对放疗化疗效果的反应等。

研究细胞凋亡的方法有多种, 包括细胞形态学观察、琼脂糖凝胶电泳、ISEL(原位末端标记法)、流式细胞仪检测、细胞凋亡相关基因蛋白测定等, 而通过放射性核素显像的方法观察活体组织细胞的细胞凋亡情况, 可望成为一种无创伤的细胞凋亡体内检测的有效方法<sup>[2,3]</sup>。

### 1 细胞凋亡显像原理及显像剂

PS (磷脂酰丝氨酸) 是细胞膜上的磷脂成分, 正常情况下只存在于细胞膜的内侧, 在细胞凋亡早期即从细胞膜内转移到细胞膜外, 出现 PS 膜外化, 这种外移与凋亡细胞的细胞类型和诱发细胞凋亡发生的通路无关<sup>[3,4]</sup>, 但与 annexin V (膜联蛋白 V) 具有高度的亲和力, 在  $Ca^{2+}$  存在下二者很容易紧密结合<sup>[5]</sup>。发生细胞凋亡时, 细胞外膜与 annex-

in V 结合的 PS 位点成 100~1 000 倍的增加, 有时每个细胞的结合位点可高达  $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  个。通常情况下, 当 annexin V 与 PS 的亲和力大于  $10^{-8} \text{ mol/L}$  时, 每个细胞的结合位点达到 50 000~100 000 即足以进行显像, 故用放射性核素标记后的 annexin V 作为显像剂, 注入一定剂量后能与凋亡细胞膜外表面的 PS 结合而使凋亡细胞显像<sup>[6]</sup>。

用于细胞凋亡显像的显像剂有  $^{125}\text{I}$ -annexin V 和  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V 等。  $^{125}\text{I}$  成本高, 且标记后  $^{125}\text{I}$ -annex-in V 易脱碘, 标记率不高 (30%~75%)<sup>[7]</sup>。  $^{99}\text{Tc}^m$  价廉易得, 标记后 annexin V 的生物活性无明显改变, 且  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V 标记率高, 放化纯可高达 92%~97%<sup>[3,6]</sup>, 故现多用  $^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V, 但其标记过程仍较复杂。另有研究显示<sup>[8]</sup>, 常用的心肌灌注显像和肿瘤显像剂  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI ( $^{99}\text{Tc}^m$ -2-甲基异丁基异腈) 在肿瘤部位的聚集与肿瘤细胞凋亡数成反比, 即肿瘤细胞凋亡越多, 肿瘤对  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 的摄取越少,  $^{99}\text{Tc}^m$ -MIBI 似乎可作为肿瘤细胞凋亡显像的阴性显像剂, 但其显像机制及应用价值仍需进一步研究。

### 2 实验及临床应用研究进展

#### 2.1 $^{99}\text{Tc}^m$ -annexin V 的生物学特性

Kemerink GJ 等<sup>[9]</sup>研究表明,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 进入人体后主要分布于肾、肝、红骨髓、脾等组织器官内, 静脉注射  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 后 4h 有  $21\% \pm 6\%$  的放射性分布于肾,  $12.8\% \pm 2.2\%$  分布于肝, 红骨髓和脾则分别为  $4.2\% \pm 1.6\%$  和  $2.5\% \pm 1.3\%$ 。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 主要通过泌尿道和消化道排泄, 其中  $76\% \pm 10\%$  随尿液排除,  $24\% \pm 10\%$  随大便排除。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 的生物半衰期较长, 为  $62 \pm 13\text{h}$ 。动物体内  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 的分布与人体稍有不同<sup>[3,10]</sup>, 但同样主要通过泌尿系统排泄, 故仍以肾的摄取最多, 可高达 40% 左右, 并证实  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 在肾内绝大部分分布于肾皮质<sup>[11]</sup>。由于肾内有较多的  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 摄取, 故  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 细胞凋亡显像可能不适用于肾显像。

## 2.2 脑及心肌细胞缺血再灌注损伤的评估

HII (脑组织缺血缺氧性损伤) 后细胞凋亡所致细胞死亡是新生儿脑瘫的主要原因。结扎幼龄兔颈总动脉的实验性 HII 研究发现<sup>[12]</sup>, 再灌注后尽管脑组织的血流恢复正常, 血脑屏障也没有受到破坏, 但大脑半球可见多灶性的  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 浓聚区, 其中以小脑的放射性摄取最为显著, 这提示缺血缺氧的脑组织再灌注后出现了脑细胞凋亡, 而且对缺血缺氧最敏感的小脑最为明显。

缺血心肌再灌注损伤的机制之一是心肌细胞凋亡。Hofstra L 等<sup>[13]</sup>观察了 7 例 AMI (急性心肌梗死) 患者行 (经腔经皮冠状动脉成形术) 后梗死部位  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像情况, 在注射  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 后的早期 (平均 3.4h) 和延迟显像 (平均 20.5h) 中, 除 1 例电击除颤治疗患者外, 其余 6 例患者梗死部位皆见明显的放射性聚集, 即  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像阳性, 在随后 4~6 周的常规心肌灌注显像中则显示原  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像时的放射性浓聚部位为放射性缺损区, 这提示心肌梗死血流恢复后出现了心肌细胞凋亡。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 心肌显像可用于评估 AMI 后心肌受损危险性的大小和心肌细胞功能恢复的情况。Thimister PWL 等<sup>[14]</sup>在 AMI 急性期与亚急性期进行  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 和心肌灌注显像结果显示, 所有 AMI 病例 PTCA 前的  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 心肌灌注显像见相应的心梗部位为放射性缺损区, 经腔经皮冠状动脉成形术后  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像显示原来  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 显像时的放射性缺损区见放射性明显聚集, AMI 亚急性期 (心梗发作 4d 后) 的心肌灌注显

像示原心梗区域缩小, 由原来的 9%~43% 减少至 3%~25% ( $P < 0.05$ ), 而部分患者再次  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像时, 与急性期  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像比, 放射性摄取不断减少, 甚至无放射性摄取, 即此时  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 心肌细胞凋亡显像阴性, 此后再作心肌灌注显像结果正常。本研究提示, 心肌细胞凋亡与 AMI 心肌可逆性损伤关系密切, 同时表明,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 心肌细胞显像对 AMI 的治疗有积极的指导作用, 如  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像显示有心肌细胞凋亡存在, 则可通过凋亡抑制治疗来防止心肌细胞死亡。

## 2.3 器官移植排斥反应的观察

器官移植是器官功能衰竭终末期治疗的有效方法, 排斥反应是造成器官移植术失败的主要原因, 细胞免疫和体液免疫皆参与了排斥反应, 细胞凋亡与排斥反应的病理过程密切相关。大鼠心脏移植实验研究显示<sup>[2,15]</sup>, 同种异体移植后出现了明显的排斥反应, 用 TUNEL (末端脱氧核苷酸转移酶) 法检测见典型的细胞凋亡变化, 同源移植则未出现排斥反应, TUNEL 检测也未发现明显细胞凋亡存在;  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像见排斥反应的心脏明显显影, 在整个排斥反应过程中放射性皆明显高于未出现排斥反应的同源移植心脏, 但药物抗排斥反应治疗后同种异体移植的心脏对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 的摄取显著减少, 并回到原来的水平; 急性排斥反应的组织学分级与  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 的摄取量呈高度正相关 ( $r=0.87$ )。这些结果提示,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 细胞凋亡显像可用于观察心脏排斥反应的发生及严重程度, 并可用于观察药物抗排斥反应的治疗效果。

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 凋亡显像同样可用于肺、肝等器官移植术后的监测<sup>[11,16]</sup>。鼠肺移植术后显示<sup>[17]</sup>, 同种异体的肺移植术后, 肺内  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 摄取不断增多, 4d 后的放射性进一步增加, 明显高于同源移植肺 ( $P < 0.0005$ ), 并且发生急性排斥反应的同种异体移植肺对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 的摄取与急性排斥反应组织学分级呈正相关 ( $r=0.6624$ ,  $P < 0.005$ ), 这提示,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 显像可评估肺移植术后急性排斥反应的严重程度。实验表明<sup>[11]</sup>, 同种异体肝移植术后肝内  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 摄取不断增多, 移植术后 2d、4d 和 7d 肝对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V 的摄取率 (肝内放射性占注射总量的百分数) 分别为  $11.7\% \pm 0.98\%$ 、 $11.6\% \pm 1.49\%$  和  $14.8\% \pm 0.72\%$ , 4d

和7d肝内 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V的摄取量比同型移植肝分别增高55%和97%，所有同种异体肝移植术后7d经组织学检查证实，有典型的细胞凋亡形态学变化，而同型肝移植未见细胞凋亡的存在。

#### 2.4 肿瘤的放疗和化疗效果的评估

细胞凋亡显像可直观地检测机体组织器官内细胞凋亡的部位、范围和程度，动态观察细胞凋亡诱导前后细胞凋亡发生的情况，借以评价肿瘤放疗和化疗效果<sup>[6,10,17-19]</sup>。

肿瘤化疗和放疗的机制之一是肿瘤细胞凋亡的诱导。对实验性肝细胞瘤的研究表明<sup>[10]</sup>，肿瘤部位对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V的摄取明显高于肌肉等组织，肿瘤与肌肉(T/M)放射性摄取比值为 $5.60 \pm 0.90$ ，用环磷酰胺诱导细胞凋亡后T/M升高到 $7.53 \pm 1.06$ ，用TUNEL检测发现，细胞凋亡诱导后肝细胞瘤的凋亡细胞数明显高于对照组，凋亡细胞阳性率由 $168.45 \pm 23.60$ 细胞/ $\text{mm}^2$ 增加到 $297.70 \pm 50.34$ 细胞/ $\text{mm}^2$ ，且肿瘤部位对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V的摄取与凋亡细胞阳性率成明显正相关( $r=0.712$ ,  $P<0.001$ )，这提示肝细胞瘤对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V摄取的增多是由于细胞凋亡诱导后细胞凋亡的增加所致，即 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V显像可观察环磷酰胺诱导细胞凋亡的情况。Belhocine T等<sup>[17]</sup>用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V显像观察了一组肿瘤病例(肺癌10例、淋巴瘤3例和乳腺癌2例)初始疗程的化疗效果，在所有的病例中，治疗前肿瘤部位未见有 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V摄取，化疗后4例疗效显著患者中有3例的肿瘤部位见放射性摄取，即 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V细胞凋亡显像阳性，相反，8例化疗后病情恶化的患者中有6例无明显放射性摄取，即显像阴性，结果提示，化疗有效的患者出现了肿瘤细胞凋亡，而无效者未出现明显的细胞凋亡，但2例化疗有效的乳腺癌患者 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V显像阴性；随访观察发现，肺癌和淋巴瘤患者的存活情况与肿瘤对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V摄取明显相关，由此认为 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V显像可用于晚期肺癌和淋巴瘤疗效的评估。

#### 3 展望

与其他细胞凋亡检测方法相比，放射性核素细胞凋亡显像简便、无创伤且直观，并可实时体内动态观察细胞凋亡情况，故其应用前景良好，但作为一种全新的细胞凋亡观察方法仍有许多方面需要进

一步探讨。因PS从细胞膜内转移到细胞膜外这种细胞成分的变化并非细胞凋亡所特有，细胞坏死同样存在，故annexin V细胞凋亡显像的特异性因此而受到影响；另外，在以往的研究中尚无公认的检测“金标准”作为细胞凋亡显像的对比分析；同时，不同类型组织细胞的细胞凋亡显像结果判断的定性和定量标准仍有待于进一步确定，细胞凋亡显像的最佳显像条件，包括显像时间和采集方式等有待于摸索；而经济实用、标记简便的细胞凋亡显像药剂盒的研制则需要放化药理学工作者的不断努力。

#### 参 考 文 献

- [1] Thompson BC. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267: 1456-1462.
- [2] Blankenberg FG, Katsilis JF, Davis RE, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death[J]. Med Sciences, 1998, 95(11): 6349-6354.
- [3] Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, et al. Imaging of apoptosis(Programmed Cell Death) with  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V[J]. J Nucl Med, 1999, 40(1): 184-190.
- [4] Narula J, Strauss HW. Implications of Phosphatidyl Serine (PS) reversal in acute ischemic syndromes[J]. J Nucl Med, 2003, 44(3): 397-399.
- [5] England M, Neiland LJW, Ramaekers FCS, et al. Annexin V-affinity assay: a review apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure[J]. Cytometry, 1998, 31(1): 1-9.
- [6] Blankenberg FG, Naumovski L, Tait JF, et al. Imaging cyclophosphamide-induced intramedullary apoptosis in rats using  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -radiolabeled annexin V[J]. J Nucl Med, 2001, 42(2): 309-316.
- [7] Russell J O, Donoghue JA, Finn R, et al. Iodination of annexin V for imaging apoptosis[J]. J Nucl Med, 2002, 43(5): 671-677.
- [8] Vergote J, Benedetto MDI, Moretti JL, et al. Could  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI be used to visualize the apoptosis MCF7 human breast cancer cells[J]. Cell Mol Biol, 2001, 47(3): 467-471.
- [9] Kemerink GJ, Liem IH, Hofstra L, et al. Patient dosimetry of intravenously administered  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V[J]. J Nucl Med, 2000, 42(2): 382-387.
- [10] Mochizuki T, Kuge Y, Zhao S, et al. Detection of apoptosis tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -annexin V[J]. J Nucl Med, 2003, 44(1): 92-97.
- [11] Ogura Y, Krams SM, Martinez OM, et al. Radiolabeled annexin V imaging: diagnosis of allograft rejection in an experimental rodent model of liver transplantation[J]. Radiology, 2000, 214(3): 795-800.

- liver resection for hepatocellular carcinoma: a phase 2 clinical study[J]. Arch Surg, 2000, 135(11): 1298-1300.
- [ 3 ] Larsen SW, Rinvar E, Svendsen O, et al. Determination of the disappearance rate of iodine-125 labelled oils from the injection site after intramuscular and subcutaneous administration to pigs[J]. Int J Pharm, 2001, 230(1): 67-75.
- [ 4 ] Blasco JC. Brachytherapy[J]. Urology, 2000, 55(2): 306-308.
- [ 5 ] Boland A, Ricard M, Opolon P, et al. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3484-3492.
- [ 6 ] Krishnamurthy GT, Swailem FM, Swailem SC, et al. Tin-117(4+)DTPA: Pharmacokinetics and imaging characteristics in patients with metastatic bone pain[J]. J Nucl Med, 1997, 38(2): 230-235.
- [ 7 ] Goddu SM, Bishayee A, Bouchet LG, et al. Marrow toxicity of <sup>33</sup>P-versus <sup>32</sup>P-orthophosphate: implications for therapy of bone pain and bone metastases[J]. J Nucl Med, 2000, 41(5): 941-951.
- [ 8 ] Makhija S, Howden N, Edwards R, et al. Positron emission tomography/computed tomography imaging for the detection of recurrent ovarian and fallopian tube carcinoma: a retrospective review[J]. Gynecol oncol, 2002, 85(1): 53-58.
- [ 9 ] Yu JF, Yin DZ, Min XF, et al. (<sup>188</sup>Re)Rhenium sulfide suspension: a potential radiopharmaceutical for treatment following intratumor injection[J]. Nucl Med Biol, 1999, 26(5): 573-579.
- [ 10 ] Nijssen F, Rook D, Brandt C, et al. Targeting of liver tumor in rats by selective delivery of holmium-166 loaded microspheres: a biodistribution study[J]. J Eur Nucl Med, 2001, 28(6): 743-749.
- [ 11 ] Jacobs A, Tjuvajev JG, Dubrovin M, et al. Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo[J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 2983-2995.
- [ 12 ] de Jong M, Breeman WAP, Bernard WA, et al. [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>, Tyr<sup>3</sup>]octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy[J]. Int J Cancer, 2001, 92(5): 628-633.
- Eisenwiener KP, Prata MI, Buschmann I, et al. NODAGA-[13] TOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [<sup>67</sup>Ga/<sup>68</sup>Ga] and <sup>111</sup>In for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hst2)expressing tumors[J]. Bioconjug Chem, 2002, 13(3): 530-541.
- [ 14 ] Janson ET, Westlin JE, Ohrvall U, et al. Nuclear localization of <sup>111</sup>In after intravenous injection of [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]octreotide in patients with neuroendocrine tumors[J]. J Nucl Med, 2000, 41(9): 1514-1518.
- ( 收稿日期: 2003-04-03 )
- (上接第 8 页)
- [ 12 ] Arceuil HD, Rhine W, de Crespigny A, et al. <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury[J]. Stroke, 2000, 31(11): 2692-2698.
- [ 13 ] Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, et al. Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction[J]. Lancet, 2000, 356(15): 209-212.
- [ 14 ] Thimister P, Hofstra L, Liem IH, et al. In vivo detection of Cell Death in the area at risk in acute myocardial infarction[J]. J Nucl Med, 2003, 44(3): 391-396.
- [ 15 ] 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(5): 844-853.
- [ 16 ] Blankenberg FG, Robbins RC, Stoot JH, et al. Radionuclide imaging of acute lung transplant rejection with annexin V[J]. Chest, 2000, 117(3): 834-840.
- [ 17 ] Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, et al. Increased uptake of the apoptosis-imaging agent <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> recombinant human Annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9): 2766-2774.
- [ 18 ] Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, et al. In vivo and vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-EC-annexin V [J]. Cancer Biother radiopharm, 2001, 16(1): 73-78.
- [ 19 ] de Wiele CV, Lahorte C, Oyen W, et al. Nuclear medicine imaging to predict response to radiotherapy: a review[J]. Int Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55(1): 5-15.
- ( 收稿日期: 2003-06-16 )