

文章编号: 1001-098X(2004)01-0009-03

凋亡心肌核素显像的研究进展

段炼 李险峰

摘要 细胞凋亡出现在许多心血管疾病中, 如何测量和监测凋亡过程在临床决策中具有十分重要的价值。本文就 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记的膜联蛋白V(annexin V)心肌凋亡核素显像在心脏移植排斥反应、缺血性心脏病、心力衰竭及评价各种抑制凋亡药物的疗效等方面的研究进展进行了综述。

关键词 凋亡; 心肌核素显像; 膜联蛋白V

中图分类号 R817.4 文献标识码 A

The progressing of studying about nuclide imaging of myocardial apoptosis

DUAN Lian, LI Xian-feng

(Department of Nuclear Medicine, The First Hospital affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract It has been demonstrated that apoptosis occurs in many cardiovascular diseases, and how to quantificate and monitor the process of apoptosis is very important in clinical decision-making. This review summarized the progressing of studying about radio nuclide imaging of myocardial apoptosis by $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -labeled annexinV in acute cardiac rejection in cardiac transplantation, ischemic heart disease, heart failure and evaluating the effect of antiapoptosis drugs, etc.

Key words apoptosis; nuclide myocardial imaging; annexin V

研究表明,细胞凋亡在许多心血管疾病包括心肌梗死、心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压、心脏移植后排斥反应和心肌病等疾病发病机制中起着重要的作用。如果能找到一种早期有效诊断心肌凋亡的方法, 并采取措施及时抑制凋亡, 对于疾病的防治将有重要的意义。

1 凋亡的非核素检查方法

1.1 病理学检查

光学显微镜下, 凋亡细胞收缩变圆, 胞质嗜酸性增强, 核固缩、碎裂或消失, 整个细胞形成嗜酸性小体。透射电镜下, 早期凋亡的细胞收缩变圆, 与邻近细胞脱离, 表面微绒毛消失, 细胞核染色质集于核膜下, 呈半月形; 进而, 细胞膜多处向胞质内深陷或呈圆顶状向外突出; 中、后期凋亡细胞胞膜逐渐碎裂成小片状, 由核膜包裹, 形成凋亡小体。电镜是确认凋亡细胞的可靠方法, 但不能定量。

1.2 核酸凝胶电泳

凋亡细胞的DNA在核酸内切酶的作用下降解

为180~200bp的整数倍的多聚核苷酸片段, 琼脂糖凝胶电泳可出现特征性的DNA梯状谱带。此法特异性强, 但需要较多细胞($>10^6$), 故不易用于临床检测。

1.3 酶联免疫吸附法

该法测定核小体, 灵敏度高, 可检测凋亡细胞数达 $5 \times 10^2/\text{mL}$, 但不能精确定量。

1.4 流式细胞分析

包括: (1)检测DNA含量的碘化丙啶染色法; (2)检测形态学及细胞膜完整性的Ho342、碘化丙啶双染色法, 可区分坏死、凋亡细胞和活细胞; (3)检测DNA裂点的原位切口平移和TUNEL(切口末端标记)技术, 后者是目前最常用的方法。

本法特异性强, 灵敏度高, 可检出早期凋亡细胞。如果检测活体心肌细胞凋亡, 必须进行心内膜活检(endomyocardial biopsy, EMB), 有一定的危险性, 一般多用于实验研究。

2 核素凋亡心肌显像

2.1 显像原理

AnnexinV是一种内源性生理蛋白, 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蛋白激酶C和磷脂酶A2活性,分布于心肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞^[1]。当细胞凋亡时,annexin V可与凋亡细胞外在表达的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)的结合,其位点是第187位的色氨酸,并有很高的亲和力(10^{-9} mol/L)。外源性⁹⁹Tc^m-annexinV具有相同的亲和力,可结合于凋亡细胞表面的PS,在SPECT中表现为亲凋亡灶的热区。

PS是构成细胞膜内层的磷脂,而PC(磷脂酰胆碱)和鞘磷脂主要分布于细胞膜外层。细胞凋亡的早期,PS由膜内层迁移至膜外层,从而成为巨噬细胞清除凋亡细胞的主要信号和annexinV结合的位点。

Ohtsuki K等^[2,3]发现,annexinV主要经肾脏、肝脏和肠道排泄,有效半减期约为16h。另外,annexinV不能通过完整的血脑屏障。显像剂之所以浓集于肾皮质,Kobayashi H等^[4]认为是由于肾皮质含有高数量的PS以及近端肾小管能非特异地摄取低分子质量的蛋白质。

2.2 心脏移植排斥反应中的心肌凋亡显像

最近研究发现,在心脏移植排斥反应中,细胞凋亡也起着重要作用。Puig M等^[5]采用非介入抗肌凝蛋白抗体显像及EMB取材,对40例心脏移植患者进行了核素显像和组织学研究。根据ISHLT(International Society of Heart and Lung Transplantation)分级标准(分为0~4级),I组:0级19例,无移植排斥反应,无炎症和坏死;II组:1A、1B级12例,有轻微排斥反应,有单核细胞浸润而无坏死;III组:2级、3A、3B级9例,中度排斥反应,有单核细胞浸润和坏死。应用TUNEL染色分析,I、II、III组的凋亡率分别为47%、58%、68%。I组有9例显像阳性,II组和III组显像全部阳性,且与组织学结果一致,因此,作者认为凋亡可能是心脏移植排斥反应的机制之一。

Norula J等^[9]对18例心脏移植患者也进行annexinV显像,其中13例阴性,5例阳性;对阳性者行EMB及caspase-3染色分析,结果证实至少有中度排斥反应。

Blankenberg FG等^[10]对动物心脏移植模型进行了annexinV显像:将PVG系大鼠心脏移入ACI系大鼠腹部列为实验组,而对照组则为ACI大鼠同系心脏移植,结果发现,实验组腹部心脏移植区

显像剂浓聚,提示有移植排斥反应,而且凋亡的作用要大于以前的报道;通过与TUNEL检测技术对比,应用annexinV显像评估心肌凋亡明显优于组织学检查。

AnnexinV核素显像应用于临床,可有效地观察排斥反应,及时调整免疫抑制剂治疗量,但由于annexinV不仅与凋亡细胞结合,还与坏死细胞结合,这使得annexinV核素显像特异性较差。

2.3 缺血性心肌病心肌凋亡的显像

大量证据表明,心肌梗死灶中既有细胞死亡,又有细胞凋亡。对心肌梗死致死的患者进行研究发现,凋亡的心肌细胞优先位于心肌梗死中心未受到侵害的心肌组织的低灌注边界区,细胞中Bax和Bcl-2有高表达;另外,人冬眠心肌细胞中有DNA降解、染色质浓缩及细胞片段化等现象。在大鼠的心肌梗死模型中,梗死区中部有5%~33%的细胞DNA片段固定染色呈阳性,细胞死亡很大程度上是由凋亡造成的。Yaoita H等^[8]的动物模型研究证实,caspase抑制剂可以减少心肌缺血再灌注引起的损伤。

Hofstra L等^[9]应用⁹⁹Tc^m-annexinV检测急性心肌梗死患者再灌注治疗的心肌细胞死亡情况:7例急性心肌梗死患者均行经皮冠脉成形术,术后2h,用584MBq⁹⁹Tc^m标记1mgannexinV自静脉注入体内,行早期(平均3.4h)和晚期(平均20.5h)SPECT,其中6例心肌梗死区早期像和晚期像⁹⁹Tc^m-annexinV摄取均增高,梗死区外心肌未见增高,且所有患者心肌梗死区⁹⁹Tc^m-annexinV的摄取与血流灌注缺损相匹配;对照组的心脏区未见⁹⁹Tc^m-annexinV摄取增加。结果表明,annexinV是一个动态细胞凋亡的探针,通过显像可反映细胞凋亡是否被激活以及凋亡程度。

以上研究表明,凋亡对心脏缺血再灌注导致心肌细胞死亡起着重要作用。我们可以利用特异的检测手段(如核素显像)发现病灶,并采取有效的方法加以阻止,如使用凋亡抑制剂,就可以挽救即将凋亡的细胞,提高治疗效果。

2.4 心力衰竭后心肌凋亡检测

人们推测,在心力衰竭中,应用血管紧张素转化酶抑制剂或血管紧张素受体阻断剂,将在一定程度上抑制细胞凋亡。Goussev A等人^[10]在犬的心力衰竭模型中采用TUNEL染色,可以检测到凋

亡的心肌细胞,但正常心肌细胞中也有少数细胞呈阳性;应用依那普利可明显降低左室梗死局部周边凋亡率,并改善左室功能,减慢左室重构。这表明,心肌凋亡与左室重构和功能不良的进行性发展有关,并可由依那普利减缓这个过程。

2.5 判断各种凋亡抑制剂的作用

体外研究表明,Zn可以抑制与凋亡相关的caspase-3的激活。Kown MH等人^[14]利用^{99m}Tc^m-annexinV核素显像研究了大鼠心脏移植模型中Zn对心肌凋亡的作用。显像表明,移植心脏对^{99m}Tc^m-annexinV的摄取与ZnCl₂的治疗量成负相关,ZnCl₂可延长啮齿动物心脏移植存活率。ZnCl₂如何抑制caspase-3?有人认为,Zn与caspase-3中的组氨酸和半胱氨酸有强亲和力,这可能是起抑制作用的关键。通过^{99m}Tc^m-annexinV显像,为临床ZnCl₂在心脏移植排斥反应中的作用的判定提供了可靠的证据。

总之,人们虽然对心肌疾病与凋亡的关系有了一定的认识,并找到了一种较实用的核素显像方法,但仍有许多不足。首先,annexinV与PS特异性结合不仅发生在凋亡细胞的表面,也可以在炎症、内皮细胞、坏死细胞发生,因此增加了误诊率。其次,病理学上见到凋亡细胞和坏死细胞可能混杂在一起,而annexinV也可与坏死细胞内的PS结合,故^{99m}Tc^m-annexinV图像应包括凋亡和坏死的细胞显像。这也提示我们是否可采用双核素阳性显像和减影技术来观察细胞凋亡情况。第三,由于心肌凋亡显像的临床应用少,对于显像剂量、显像时间等参数尚无统一标准,这仍需要进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] O'Brien IEW, Reutingsperger CPM, Holdaway KM. AnnexinV and TUNEL use in monitoring the progression of

apoptosis in plants [J]. *Cytometry*, 1997, 29: 28-33.

- [2] Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, et al. Technetium-99m HYNIC-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis[J]. *Eur J Nucl Med*, 1999, 26: 1251-1258.
- [3] Kemerink GJ, Boersma HH, Thimister PWL et al. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc^m-BTAP-annexinV[J]. *Eur J Nucl Med*, 2001, 28: 1373-1378.
- [4] Kobayashi H, Yoo TM, Sim IS, et al. L-lysine effectively blocks renal uptake of ¹²⁵I or Tc-labeled anti-Tac disulfide-stabilized Fr fragment [J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 3788-3795.
- [5] Puig M, Ballester M, Matias-Guiu X, et al. Burden of myocardial damage in cardiac allograft rejection: scintigraphic evidence of myocardial injury and histological evidence of myocyte necrosis and apoptosis[J]. *J Nucl Cardiol*, 2000, 7(2): 132-139.
- [6] Narula J, Acio ER, Narula N, et al. AnnexinV imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection [J]. *J Nat Med*, 2001, 7(12): 1347-1352.
- [7] Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death [J]. *Michael J Abrams*, 1998, 95: 6349-6354.
- [8] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor [J]. *Circulation*, 1998, 97: 276-281.
- [9] Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, et al. Visualization of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction [J]. *Lancet*, 2000, 356(9225): 209-212.
- [10] Goussev A, Sharov VG, Shimoyama H, et al. Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275: 626-631.
- [11] Kown MH, Blankenberg FG, Hoyt G, et al. Zinc-mediated reduction of apoptosis in cardiac allografts [J]. *Circulation*, 2000, 102(19 suppl 3): III 228-232.

(收稿日期: 2003-04-18)