

- gene/prodrug therapy targeting thyroid carcinoma using a thyroid-specific promoter. *Endocrinology*, 1998, 139(9): 3996-3999.
- 15 Kitazono M, Chuman Y, Aikou T, et al. Adenovirus HSV-TK construct with thyroid-specific promoter: Enhancement of activity and specificity with histone deacetylase inhibitors and agents modulating the camp pathway. *Int J Cancer*, 2002, 99(3): 453-459.
  - 16 Zhang R, DeGroot LJ. Gene therapy of established medullary thyroid carcinoma with herpes simplex viral thymidine kinase in a rat tumor model: relationship of bystander effect and antitumor efficacy. *Thyroid*, 2000, 10(4): 313-319.
  - 17 Zhang R, DeGroot LJ. An adenoviral vector expressing functional heterogeneous proteins herpes simplex viral thymidine kinase and human interleukin-2 has enhanced in vivo antitumor activity against medullary thyroid carcinoma. *Endocrine Related Cancer*, 2001, 8(4): 315-325.
  - 18 Barzon L, Pacenti M, Taccaliti A, et al. A pilot study of combined suicide/cytokine gene therapy in two patients with end-stage anaplastic thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(5): 2831-2834.
  - 19 Ye CS, Feng C, Wang SM, et al. sFlt-1 gene therapy of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology*, 2005, 145(2): 817-822.
  - 20 DeGroot LJ, Zhang R. Clinical review 131: Gene therapy for thyroid cancer: where do we stand?. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(7): 2923-2928.

(收稿日期: 2007-03-07)

## 细胞凋亡的放射性核素分子功能显像应用进展

王荣福

【摘要】近几年,细胞凋亡体内检测技术发展迅速,其中最富发展前景的是核素示踪细胞凋亡显像技术,它以无创性、早期性、定量性等优势独树一帜,具有广泛的应用价值。

【关键词】细胞凋亡;放射性核素显像;钙磷脂结合蛋白

【中图分类号】R817.4 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4114(2007)04-0201-04

### Application and Progression of cell apoptosis imaging with radionuclide tracing

WANG Rong-fu

(Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

【Abstract】Recently, molecular imaging technologies detecting cell apoptosis in vivo are developing rapidly. The one of the most promising techniques to detect apoptosis in vivo is radionuclide imaging with radiolabeled annexin V. Due to the non-invasiveness, quantitation and other advantages, radionuclide tracing apoptotic imaging in vivo, which potentially has numerous valuable applications, has been greatly developed. The purpose of this paper is to review the application and development of cell apoptosis imaging with radionuclide tracing technique.

【Key words】Apoptosis; Radionuclide imaging; Annexin V

近年来,细胞凋亡 (cell apoptosis) 的研究取得了重大进展,改变了人们长期来对其认识不足或某种“神秘”感。凋亡是细胞生命的一种基本特征和细胞死亡的一种特殊形式,是人类生命活动中器官组织细胞内在的、决定生物体发育和组织平衡的一个重要生理现象过程,一旦这个受到严密监控的细胞“自杀机理”发生功能障碍或失去正常机体调

节控制,将导致患病。研究证实,凋亡不仅参与疾病的发生与发展<sup>[1]</sup>,还对疾病的治疗起重要作用<sup>[2]</sup>,许多疾病都与细胞凋亡过度有关。因此,研究细胞凋亡具有重要的临床意义。

### 1 细胞凋亡概述

#### 1.1 细胞凋亡及相关检测技术

细胞凋亡是一种区别于细胞坏死、并由多种基因调控的主动性细胞死亡过程,可见于胚胎发育、组织发生、组织分化、免疫调节等诸多生理现象和恶性肿瘤、自身免疫性疾病、病毒感染性疾

基金项目: 高校博士点学科专项科研基金项目(200500011108); 教育部教育振兴行动计划特殊专项 (“九八五”工程: II期) 资助项目(985-2-056); 国家重点基础研究发展计划 (973计划) 资助项目(2006CB705705)

作者单位: 100034, 北京大学第一医院核医学科

病、艾滋病等多种病理情况。由于受到当时各种条件的限制,这一多细胞机体生存所必需的基本生物学现象在很长一段时间被忽视,直至10余年前才被学术界所重新关注<sup>[1]</sup>。早期研究细胞凋亡的手段几乎都是通过疾病的动物模型、组织活检、手术标本等的体外检测结果加以证实,采用的凋亡探测方法都为体外检测法,诸如电子显微镜形态学观察、DNA凝胶电泳、酶联免疫吸附法测定核小体、流式细胞仪定量分析法、原位脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP-生物素切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)法等,但均具有创伤性,并且通常只能在某一时间点研究细胞凋亡,不能连续动态监测凋亡在活体内的发生与发展过程,同时受到许多因素的影响<sup>[2]</sup>。

相反,现代医学影像学技术在活体内探测细胞凋亡,正好可以解决以上问题。近年来,细胞凋亡活体检测技术发展迅速,其中核素示踪细胞凋亡显像、核磁共振技术、超声检测及光学和生物发光成像已广泛应用于基础实验研究和临床应用研究(见表1)。随着分子影像学异军崛起,分子影像技术包括特异性分子探针和高灵敏度探测仪器研发应用,活体细胞凋亡日益受到世界各地学者的关注和重视,并通过一系列的研究取得了令人瞩目的成

就。这为活体内细胞凋亡的动物研究与人类医学临床研究开创了一条全新的无创性研究手段。

## 1.2 活体细胞凋亡显像的原理

研究发现,细胞膜脂质双分子层的固有磷脂成分磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)从细胞膜内层迁移至外层是细胞凋亡级联反应的初始事件,这一细胞凋亡的普遍现象发生在凋亡形态学改变之前<sup>[3]</sup>。利用膜联蛋白(annexin V,为annexin A5家族成员)和PS的高度亲和作用可以早期检测细胞凋亡的发生,具有较高的时效性。人们已将Annexin V进行荧光素或生物素标记作为荧光探针,利用流式细胞仪或荧光显微镜检测细胞凋亡现象,这是一种灵敏、高效的检测方法,但是这种方法需要对组织进行活检,具有创伤性,因此研究者开始探索新的体内检测细胞凋亡的方法,包括核磁共振波谱学、弥散加权MRI、超声和放射性核素示踪技术等<sup>[4]</sup>,其中放射性核素标记annexin A5体内凋亡显像技术以其无创性、早期、定性等优势而独树一帜,并作为一种诊断方法得以迅速发展<sup>[5]</sup>。

## 2 核素示踪细胞凋亡显像应用研究

### 2.1 放射性核素标记annexin V的应用

动物实验研究结果表明:放射性核素标记的annexin V作为细胞凋亡显像剂能够显示病变组织

表1 细胞凋亡检测方法学比较

方法	优点	缺点
形态学观察		
光学显微镜观察	简便易行	缺乏较为特征性的指标,具有较强的主观性,重复性差
视频相差显微技术	动态观察,可判定培养中的凋亡细胞	不能用于病理组织
电子显微镜观察	检测凋亡小体的“金标准”	不能定量分析,样品制作过程较复杂,费用昂贵
细胞化学测定		
流式细胞仪定量分析	适于大批量、定量检测	易漏检、错检
酶联免疫吸附法核小体测定	灵敏度高,检测细胞数达500个/ml	不能精确定量
DNA琼脂凝胶电泳法	特异性“阶梯(ladder)小带”,方法简便	灵敏度不高,不能用于组织的原位检测;只能半定量分析
DNA裂解的原位检测	用于原位标记,可用于病理组织;进行定量分析;灵敏度较高	非特异性,易受坏死细胞干扰
活体分子功能成像		
核素示踪技术	无创伤、灵敏度高、定量、早期探测	需要将核素示踪剂引入活体
核磁共振成像	无创伤,可定量分析	灵敏度低,不能用于早期检测
超声检测技术	方法简便,可连续监测	不能用于早期探测
光学与生物发光成像	方法简便,可实时监测	受检测或探测活体脏器或组织深度影响

的凋亡细胞<sup>[6,9]</sup>,其在肿瘤<sup>[10]</sup>、心血管<sup>[11]</sup>和神经精神疾病<sup>[12]</sup>等方面的临床应用也已有报道,并显示很好的应用前景。Boersma等<sup>[9]</sup>报道,用<sup>201</sup>Tl和<sup>99m</sup>Tc-annexin A5对两例经组织病理学印证分别为未分化性肉瘤和黏液瘤的罕见心内肿瘤进行显像,未分化性肉瘤病变部位可见明显<sup>201</sup>Tl血流灌注减低缺损,<sup>99m</sup>Tc-annexin A5细胞凋亡显像可见异常放射性摄取,并且免疫组织化学方法证明了肿瘤细胞膜对<sup>99m</sup>Tc-annexin A5的摄取和检测到激活的半胱天冬氨酸酶的存在;而黏液瘤病变部位的血流灌注和细胞凋亡显像均表现放射性减低缺损区,没有在肿瘤组织内探测到<sup>99m</sup>Tc-annexin A5及激活的半胱天冬氨酸酶的信号,研究结果认为放射性核素标记的annexin A5有望成为心内恶性肿瘤鉴别的新方法。Van de Wiele等<sup>[13]</sup>成功地对怀疑原发或术后复发的头颈部肿瘤患者进行细胞凋亡显像,肿瘤病灶对<sup>99m</sup>Tc-联胍烟酰胺-膜联蛋白V(<sup>99m</sup>Tc-hydrazinonicotiamide-annexinV,<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-annexinV)的摄取量与通过TUNEL染色确定的肿瘤凋亡细胞的数量有良好的相关性。

心血管疾病中普遍存在细胞凋亡现象,研究心肌细胞凋亡的范围和程度,对多种心脏疾病的诊断及预后判断具有重要价值。临床研究中观察到心肌梗死患者的血流灌注减低、缺损区呈<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-annexin V放射性填充,提示心肌细胞存活,对治疗决策及预后评估具有重要临床意义。Narula等<sup>[14]</sup>对18例心脏移植患者进行了<sup>99m</sup>Tc-annexin A5 SPECT和组织活检,监测和评估其移植排斥反应,发现移植排斥反应者可见呈不同程度的异常放射性浓聚,苏木精-伊红染色可见异常,TUNEL染色呈阳性,而且观察到半胱天冬氨酸酶3活性的增加;无或轻度移植排斥反应者则无明显上述所见。日前认为核素心肌细胞凋亡显像是一种无创监测心脏移植排斥反应、评估移植患者的危险、监测治疗、判断预后的新的细胞分子功能影像学方法。此外,放射性核素标记annexinA5细胞凋亡分子功能显像已应用到心衰、不稳定性斑块及心肌病变等心血管疾患,已显示富有临床应用前景<sup>[6,14]</sup>。

脑部缺氧造成的损伤与心脏缺氧病变类似,缺氧较严重部位的细胞可能直接产生坏死,而缺氧较轻的区域如半暗区(penumbra region)或再灌注区则会逐渐产生细胞凋亡。例如,脑组织缺血缺氧性

损伤后,细胞凋亡所致的细胞死亡是新生儿脑瘫的主要原因;神经退行性病变中,远端神经末梢常常发生早期突触丢失以及细胞凋亡事件。已有报道利用放射性核素标记的annexin V对阿尔茨海默病、帕金森病、脑膜炎以及艾滋病引发的脑膜疾病等进行细胞凋亡分子功能显像的研究<sup>[12,15,16]</sup>。

## 2.2 其他细胞凋亡分子探针的应用

近年来,研究发现神经细胞突触囊泡上的一种膜整合蛋白,即突触结合蛋白I的C2A片段(FM)具有插入PS的能力,可以与凋亡的细胞结合。Zhao等<sup>[17]</sup>通过实验研究将突触结合蛋白I的C2A片段与MRI的增强造影剂结合在一起,应用MRI检测肿瘤凋亡细胞获得成功。方伟等<sup>[18]</sup>采用<sup>99m</sup>Tc标记突触结合蛋白I的C2A片段——谷胱甘肽转移酶复合物(<sup>99m</sup>Tc-FM2)对心肌细胞凋亡显像中的应用价值。研究表明:<sup>99m</sup>Tc-FM2标记方法稳定,放化纯度>95%,在Ca<sup>2+</sup>介导下与PS特异结合的能力,注射<sup>99m</sup>Tc-FM2后3h即能观察到其与心肌凋亡细胞结合,显影清晰,其结果得到流式细胞仪检测分析和病理组织学的印证。王颖晨等<sup>[19]</sup>报道了用<sup>99m</sup>Tc-亚甲基二膦酸盐(<sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonic acid,<sup>99m</sup>Tc-MDP)和肿瘤化疗药物帕米膦酸二钠在体外对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的细胞增殖及凋亡作用的对比实验研究,结果发现:<sup>99m</sup>Tc-MDP与帕米膦酸二钠均可诱导细胞凋亡,用药后大量MDA-MB-231细胞被阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期和S期,细胞凋亡率分别为9.59%和5.96%,差异有显著性,同时观察到<sup>99m</sup>Tc-MDP即可使MDA-MB-231细胞凋亡相关基因bcl-2表达明显减弱,<sup>99m</sup>Tc-MDP作用强于帕米膦酸二钠。<sup>188</sup>Re发射的β射线可导致组织细胞的DNA损伤,这种主动的细胞凋亡是辐射所致细胞死亡的主要形式<sup>[20]</sup>。熊青峰等<sup>[21]</sup>报道了<sup>188</sup>Re-二亚三胺五乙酸-脱氧葡萄糖(<sup>188</sup>Re-dithylenetriamine pentaacetic aciddeoxyglucose,<sup>188</sup>Re-DTPA-DG)致MCF7乳腺癌细胞凋亡实验研究,观察到<sup>188</sup>Re-DTPA-DG较<sup>188</sup>ReO<sub>4</sub>更容易诱导细胞凋亡发生。

## 3 核素示踪细胞凋亡显像的应用前景

细胞凋亡在生物学基础理论研究和临床疾病诊治中具有重要意义,而以分子识别为基础的分子核医学的飞速发展,使放射性核素标记annexin A5、FM2等的活体细胞凋亡分子功能显像异军突起,

具有诸多其他检测技术所无可比拟的优势。其中 PS 在细胞凋亡早期暴露在细胞膜表面,与 annexin 特异性结合高的特征使得以 annexin A5 为基础的检测技术日益突显重要性:①annexin A5 为人体内源性蛋白,不具有抗原性,注射入体内不会产生免疫反应,且显像剂量的 annexin A5 无抗凝血性;②annexin A5 分子质量较小,渗透力强,血液清除速度快,靶与本底比值高,显像质量较高;③放射性核素标记 annexin A5 能够检测几乎所有类型细胞的凋亡情况,具有普遍性;④放射性核素标记 annexin A5 体内凋亡显像不需要活检组织,具有无创性。随着具有特异性新型细胞凋亡显像剂的研发应用和具有高敏感性及探测性能的 SPECT-CT 和 PET-CT,尤其是动物 SPECT、SPECT-CT 和动物 PET、PET-CT 等先进的核医学显像仪器的问世,坚信放射性核素示踪技术在活体细胞凋亡显像具有很好前景<sup>[2]</sup>。

当然,放射性核素示踪技术在细胞凋亡显像也存在有待进一步研究的问题:如何获得具有我国自主知识产权的细胞凋亡显像剂,以便于临床普及应用,如研发用于人体的新型细胞凋亡分子探针;对具有潜在临床应用前景的细胞凋亡分子探针进行深入生物学性能研究,提高靶与非靶的放射性摄取率比值;治疗后进行放射性核素细胞凋亡显像的最佳显像时间选择、各种细胞凋亡显像剂的最佳投予剂量;如何精确区别和监测细胞凋亡与细胞死亡过程及进行随机、盲法、多中心的大样本临床实验等,这些都有待于我们急需解决的问题。

#### 参 考 文 献

- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, 1999, 107(5): 489-506.
- Wang RF, Liu M, Zhang CL, et al. Study on mice tumor-bearing cell apoptosis imaging in vivo after a single dose of chemotherapy. *J Nucl Med*, 2006, 47(5 suppl 2): 416P.
- 王荣福, 刘萌. 放射性 Annexin V 活体细胞凋亡显像在肿瘤应用研究及进展. *中国医学影像技术杂志*, 2004, 20(10): 1616-1619.
- Narula J, Strauss HW. Implications of phosphatidylserine (PS) reversal in acute ischemic syndromes. *J Nucl Med*, 2003, 44(3): 397-399.
- Brauer M. In vivo monitoring of apoptosis. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(2): 323-331.
- Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med*, 2005, 46(12): 2035-2050.
- Lahorte C, van de Wiele C, Bacher K, et al. Biodistribution and dosimetry study of 123I-rh-Annexin V in mice and humans. *Nucl Med Commun*, 2003, 24(8): 871-880.
- 兰晓莉, 张永学, 安锐, 等. <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Annexin V 的制备及其在健康小鼠体内的分布. *中华核医学杂志*, 2005, 25(6): 344-346.
- Murakami Y, Takamatsu H, Taki J, et al. <sup>18</sup>F-labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 31(4): 469-474.
- Belhocine T, Steinmetz N, Green A, et al. In vivo imaging of chemotherapy-induced apoptosis in human cancers. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 10(10): 525-529.
- Kietselaer BLJH, Reutelingsperger GPM, Heidendal GAK, et al. Non invasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid artery atherosclerosis. *N Eng J Med*, 2004, 350(14): 1472-1473.
- Gylys KH, Fein JA, Wiley DJ, et al. Rapid annexin V labeling in synaptosomes. *Neurochem Int*, 2004, 44(3): 125-131.
- van de Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, et al. Quantitative tumor apoptosis imaging using <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Annexin V single photon emission tomography. *J Clin Oncol*, 2003, 21(18): 3483-3487.
- Thimister PW, Hofstra L, Liem IH, et al. In vivo detection of cell death in the area at risk in acute myocardial infarction. *J Nucl Med*, 2003, 44(3): 391-396.
- D'Arceuil H, Rhine W, de Cresapigny A, et al. <sup>99m</sup>Tc-Annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury. *Stroke*, 2000, 31(11): 2692-2698.
- Bai JH, Wang P, Chapman ER. C2A activates a cryptic Ca<sup>2+</sup> triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1665-1670.
- Zhao M, Beauregard DA, Loizou L, et al. Non invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nature Med*, 2001, 7(11): 1241-1244.
- 方纬, 王峰, 季顺东, 等. <sup>99m</sup>Tc-FM2 心肌细胞凋亡显像的实验研究. *中华核医学杂志*, 2006, 26(3): 137-140.
- 王颖晨, 赵新明, 张敬勉, 等. <sup>99m</sup>Tc-MDP 与帕米膦酸二钠对 MDA-MB-231 细胞增殖及凋亡作用的对比研究. *中华核医学杂志*, 2006, 26(3): 141-144.
- 邢春根, 吴锦昌, 金留根, 等. <sup>188</sup>Re-C50 对结肠癌细胞的凋亡诱导作用. *中华核医学杂志*, 2004, 24(2): 101-103.
- 熊青峰, 陈跃, 何菱, 等. <sup>188</sup>Re-DTPA-DG 致 MCF7 乳腺癌细胞凋亡实验研究. *中华核医学杂志*, 2006, 26(3): 145-148.
- Lahorte CMM, Vanderheyden J L, Steinmetz N, et al. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 31(6): 887-919.