

## 放射性核素标记的凋亡显像剂的研究进展

安淑娴 宋少莉 黄钢

**【摘要】** 细胞凋亡存在于多种病理过程中,包括神经系统变性疾病、缺血性损伤、自身免疫性疾病和多种肿瘤等。凋亡检测的可视化对疾病的诊断、新的治疗方法的开发与疗效评价具有重要意义。传统的凋亡检测方法包括光学显微镜观察、原位末端标记法分析、流式细胞仪检测等,但其侵入性方式限制了之后的随访研究。而活体内凋亡显像有助于无创观察、直观了解凋亡发生的体内过程。PET与SPECT的发展,以及新的针对靶点的放射性核素标记显像剂的合成,使核医学进入了分子影像学的新时代。近年来,细胞凋亡PET与SPECT显像剂的研发应用,使活体内无创PET与SPECT检测细胞凋亡成为现实。笔者主要介绍用于在体凋亡显像的放射性标记探针及其最新研究应用进展。

**【关键词】** 细胞凋亡;分子探针;放射性核素显像;正电子发射断层显像术;体层摄影术,发射型计算机,单光子

**Recent advances in apoptosis imaging using radionuclide-labeled tracers** An Shuxian, Song Shaoli, Huang Gang. Department of Nuclear Medicine, RenJi Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Corresponding author: Song Shaoli, Email: shaoli-song@163.com

**【Abstract】** Apoptosis or programmed cell death is an important form of cell death. Apoptosis is involved in numerous human pathological conditions, such as neurodegenerative diseases, ischemic damage, autoimmune disorders, and many types of cancer. Visualization of apoptosis is enormously beneficial in clinical diagnosis, development of new therapies, and therapeutic evaluation. The traditional methods of apoptosis detection include optical microscopy, TdT-mediated-dUTP nick end labeling analysis, and flow cytometry. However, these invasive techniques restrict the conduct of follow-up studies. Apoptosis imaging in living subjects has contributed to nondestructive observation and in understanding the biological process of apoptosis. The developments in PET and SPECT technologies, including the synthesis of targeted radionuclide tracers, led nuclear medicine into a new era of molecular imaging. The development and application of PET and SPECT as apoptosis imaging probes rendered the non-invasive detection of apoptosis in vivo a reality. This article reviewed the recent advances in apoptosis imaging using radionuclide-labeled tracers.

**【Key words】** Apoptosis; Molecular probes; Radionuclide imaging; Positron-emission tomography; Tomography, emission-computed, single-photon

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是多细胞生物在胚胎发育、正常组织稳态的维持与各种生理病理情况下机体清除多余细胞的重要方式。多数疾病的发生发展均与凋亡过程紧密相关,如自身免疫性疾病、神经退行性疾病(细胞凋亡发生过多)或肿瘤的发生(细胞凋亡发生太少)<sup>[1]</sup>。肿瘤经有效的治疗后会引起细胞凋亡。因此,监测细胞凋亡的过程具有

重要意义。

细胞凋亡途径主要归纳为以下3种:一是线粒体凋亡途径,又称内源性凋亡途径,由B淋巴细胞瘤2超家族成员介导;二是死亡受体途径,又称外源性凋亡途径,由特异的死亡受体与相应的配体结合介导;三是内质网应激反应介导的细胞凋亡途径<sup>[2]</sup>。Caspase(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶)家族在程序性细胞死亡过程中发挥着非常重要的作用,通常情况下Caspase以酶原的形式存在于细胞质内。各种凋亡途径最终汇聚于执行分子Caspase-

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.06.008

作者单位: 200127, 上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科

通信作者: 宋少莉 (Email: shaoli-song@163.com)

3的激活, Caspase-3的激活最终会导致多聚ADP核糖聚合酶的激活, 并伴随凋亡细胞形态学改变<sup>[3]</sup>。凋亡的一个早期变化是磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻, 在活细胞中PS分布于细胞膜脂质双层的内侧, 一旦凋亡发生, PS便外翻至细胞膜脂质双层的外侧。随着PS外翻, 细胞质皱缩, 随后细胞皱缩, 质膜出泡, 细胞分裂为凋亡小体。由于在形态学与分子生物学上非常相似, 细胞凋亡常与其他类型的细胞死亡混淆, 如细胞自噬与坏死。因此, 寻找区分凋亡与其他类型细胞死亡过程的方法具有重要意义。

传统的凋亡检测方法主要包括光学显微镜观察、原位末端标记法(TdT-mediated-dUTP nick and labeling, TUNEL)分析、流式细胞仪检测等<sup>[4]</sup>, 但却存在着一些固有的缺点, 如均需活体取材, 属于有创性的检测方式; 通常只能在某一时间点观察凋亡, 无法动态监测凋亡在体内的发生与发展过程。而活体内凋亡显像更有助于无创观察、理解凋亡发生的体内过程。核素凋亡显像是研究最早、最成熟的在体凋亡检测技术, 原理是通过放射性核素标记化合物并与细胞凋亡过程中产生的特有靶分子结合, 通过影像学手段检测细胞凋亡部分浓聚的探针分子从而达到显示凋亡的目的。本文着重从凋亡生物学过程入手, 利用核医学显像剂标记技术介绍几种比较明确的细胞凋亡分子探针, 为凋亡显像的临床应用提供相关的基础及指导。

## 1 放射性核素标记的凋亡显像探针

### 1.1 放射性核素标记模式

许多金属同位素可通过络合作用与螯合物形成稳定的复合物, 并可继续与探针分子结合。<sup>64</sup>Cu、<sup>68</sup>Ga和<sup>111</sup>In等常借助与1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid(DOTA)、1, 4, 7-triazacyclononane-1, 4, 7-triacetic acid(NOTA)、DTPA等结合而成为显像剂。而<sup>99m</sup>Tc则与其他的一些配体进行螯合, 其中最有效、最稳定的形式是[Tc=O]<sup>3+</sup>或<sup>99m</sup>Tc-6-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid(HYNIC)。研究表明拥有N<sub>x</sub>S<sub>4-x</sub>形式的螯合剂可有效结合[Tc=O]<sup>3+</sup>, 形成一种以Tc为中心的四方锥结构<sup>[5]</sup>。<sup>18</sup>F是迄今为止PET显像使用最多的一种放射性同位素。由于探针分子对靶点的特异性, 结合结构庞大的放射性标记螯合剂或辅基会影响探针分子的生

物学活性。因此, 定点放射化学对制备具有生物学活性的探针非常重要<sup>[6]</sup>。

### 1.2 放射性核素标记的蛋白探针

Annexin V是一种相对分子质量为35 000~36 000的钙依赖性磷脂结合蛋白, 与PS具有高亲和力(K<sub>d</sub>=0.1 nmol/L)<sup>[7]</sup>。活细胞中, PS分布于细胞膜脂质双层的内侧, 不与Annexin V结合。一旦发生凋亡, PS外翻至细胞膜脂质双层的外侧, 在Ca<sup>2+</sup>存在的条件下与Annexin V结合。与膜上的PS结合后, Annexin V的结构由单体转变为三聚体, 并以三聚体-三聚体相互作用的方式覆盖于膜外侧的PS上<sup>[8]</sup>。Annexin V与PS结合是细胞凋亡显像中使用最广泛的一种模式。<sup>99m</sup>Tc标记Annexin V是目前为止用于凋亡检测研究最多、使用最广泛的放射性配体。<sup>99m</sup>Tc-4, 5-bis-(thioacetamido)pentanoyl-Annexin V(<sup>99m</sup>Tc-BTAP-Annexin V)是第一个用于动物与人体在体研究的<sup>99m</sup>Tc-Annexin V探针<sup>[9]</sup>, 但其制作过程繁琐、耗时、放射性化学产率低。Blankenberg等<sup>[10]</sup>在1998年首次描述了<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Annexin V的制备方法, 即HYNIC首先与Annexin V相连, 并在二价锡离子存在的条件下使用Tricine作为共配体与<sup>99m</sup>Tc进行标记。HYNIC-Annexin V是一种稳定的复合物, 可与<sup>99m</sup>Tc快速有效地进行标记。与<sup>99m</sup>Tc-BTAP-Annexin V相比, <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Annexin V的制备过程更快、更简单, 所需起始放射性活度(1.11~1.48 GBq)较低。<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Annexin V是目前唯一进行非小细胞肺癌Ⅱ、Ⅲ期临床试验的凋亡显像剂<sup>[11]</sup>。然而由于任何氨基末端都可被作为靶点, 降低了这一方法的特异性。研究者通过定点诱变获得了凹面具有一个半胱氨酸的Cys-Annexin V, 它可通过巯基进行结合同时不影响与凋亡细胞结合的特性<sup>[12]</sup>。初步体内实验评估显示, <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Cys-Annexin V与<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Annexin V具有相似的凋亡细胞亲和力<sup>[13]</sup>。使用同样的方法可将Annexin V及它的突变体与<sup>99m</sup>Tc及其他放射性核素如<sup>67</sup>Ga和<sup>111</sup>In进行特异性标记<sup>[14-15]</sup>。目前为止, 已报道的使用<sup>18</sup>F标记Annexin V的方法有少数几种。Annexin V-128是Annexin V的突变体, 在Annexin V的氨基末端含有一个半胱氨酸残基, 而N-[4-[(4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzylidene)aminoxy]butyl]maleimide([<sup>18</sup>F]FBABM)是一种巯基选择性的辅基, 将以上二者通过两步法进行合成, 平均产率为23%, 放射

性比活度为 222 GBq/ $\mu\text{mol}$ <sup>[16]</sup>。另一种合成法是使用 N-succinimidyl-4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzoate([<sup>18</sup>F]SFB), 其放射性化学产率为 20%, 放射性比活度超过 35 GBq/ $\mu\text{mol}$ <sup>[17]</sup>。<sup>18</sup>F-Annexin V 凋亡显像的优势在于它在肝脏、脾脏、肾脏摄取较低<sup>[18]</sup>。然而由于放射化学合成过程复杂, 放射性化学产率低, 因此, 限制了其在临床上的应用。

Wängler 等<sup>[19]</sup>使用 2, 2'-(7-(1-carboxy-4-(2-mercaptoethylamino)-4-oxobutyl)-1, 4, 7-triazonane-1, 4-diyl)diacetic acid(NODA-GA-T)作为 <sup>68</sup>Ga 的螯合剂对 Annexin V 进行标记, 小鼠左心室心肌梗模型 PET 显像显示, <sup>68</sup>Ga-Aannexin V 聚集于凋亡细胞区域。Bauwens 等<sup>[20]</sup>报道了位点专一标记的 <sup>68</sup>Ga-Cys2-Annexin V 和 <sup>68</sup>Ga-Cys165-Annexin V, Cys2-Annexin V 和 Cys165-Annexin V 是 Annexin V 的变异体, 分别于第 2 位、第 165 位含有一个有效的半胱氨酸残基, 该研究结果显示, 肿瘤细胞对 <sup>68</sup>Ga-Cys2-Annexin V 和 <sup>68</sup>Ga-Cys165-Annexin V 的摄取值较低, 但经环磷酸胺治疗与放射治疗后, 肿瘤细胞对其摄取值明显增加。

突触结合蛋白 I 的 C2A 结构域是一种具有钙依赖性 PS 结合能力的神经系统蛋白, 可被 [<sup>18</sup>F]SFB 有效标记, 用于在体凋亡显像的 <sup>18</sup>F-C2A-GST(其中, GST: glutathione-S-transferase) 制备后可稳定保存 4 h<sup>[21]</sup>。此外, 糖蛋白乳凝集素(又称乳脂肪球表皮生长因子 8), 在 Ca<sup>2+</sup>存在的条件下也可与 PS 结合。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-乳凝集素具有乳凝集素一样的磷酸结合特性, 生物学分布研究显示, 它可快速被血液清除并在肝脏处聚集。与 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-Annexin V 相反, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-乳凝集素在肾脏有较低的摄取, 因此可用于肾脏细胞凋亡显像的研究<sup>[22]</sup>。

### 1.3 放射性核素标记的多肽凋亡探针

<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-SAAC-PSBP-6(其中, SAAC: single amino acid chelae; PSBP: phosphatidylserine-binding peptide)是一种与 PS 有高度亲和力的小分子肽, Song 等<sup>[23]</sup>研究发现, <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-SAAC-PSBP-6  $\gamma$  射线成像可以早期检测药物诱导的肿瘤细胞凋亡, 有望成为 <sup>18</sup>F-FDG PET 对肿瘤疗效早期评估的一种替代方式。

细胞膜上出现的磷脂酰乙醇胺也是凋亡的一种通用指示剂。Duramycin(耐久霉素)是由 19 个氨基酸组成, 二硫化交联的肽, 可与磷脂酰乙醇胺特异性结合并具有高亲和力<sup>[24]</sup>。Duramycin 由 HYNIC 共

价修饰并由 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> 标记, 强大的结合能力与适宜的药代动力学参数使 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-Duramycin 成为一种有效的体内凋亡探针。

最新的研究表明, 细胞表面暴露的组蛋白也是凋亡的一种指示蛋白。Wang 等<sup>[25]</sup>利用噬菌体展示技术发现了一种可以靶向结合凋亡细胞膜表面组蛋白 1 的肽——Apopep-1。<sup>124</sup>I-Apopep-1 PET 显像可在体检测肿瘤细胞凋亡, 用于对肿瘤化疗早期反应的监测。

### 1.4 放射性核素标记的小分子探针

与蛋白、多肽探针相比, 小分子探针具有合适的药代动力学参数、快速扩散率和血池清除率等优势, 因此更有临床应用潜力。Koulov 等<sup>[26]</sup>使用 zinc dipicolylamine(Zn-DPA)作为靶向 PS 的另一种选择。Wyffels 等<sup>[27]</sup>研发出 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>(CO)<sub>3</sub>-Zn-DPA 和 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-Zn-DPA 并对其 SPECT 凋亡检测能力进行了评价。另有研究者使用 <sup>18</sup>F 标记 Zn-cyclen 实现在体 PET 显像监测肿瘤治疗后的凋亡<sup>[28]</sup>。然而, 由于 Zn-DPA 和 Zn-cyclen 探针在肝脏和其他器官聚集度高, 因此尚需进一步优化。

ApoSense 家族是另一类小分子凋亡探针, 包括 N, N'-Didansyl-L-cystine(DCC)、2-(5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)-2-(fluoromethyl)butanoic acid(NST-732)和 dansyl-ML-10(其中, ML-10: 5-fluoropentyl-2-methyl-malonic acid), 可与凋亡细胞外翻的 PS 结合进行凋亡显像<sup>[29]</sup>。<sup>18</sup>F-ML-10 凋亡显像剂是第一个进入临床前研究的 PET 显像剂。临床前研究表明, 中风区域脑组织对 <sup>18</sup>F-ML-10 的摄取与组织学证据一致<sup>[30]</sup>。I 期临床试验表明, <sup>18</sup>F-ML-10 在体内具有高稳定性和适宜的药代动力学参数<sup>[31]</sup>。在 II a 期临床试验阶段对急性脑卒中患者已获得了神经细胞凋亡的 PET 影像。

各种凋亡信号通路最终均汇聚于 Caspase 的激活, 并产生一系列复杂的生物化学变化, 从而传导凋亡信号<sup>[32]</sup>。研究者构建了针对 Caspases 家族不同成员的特异性抑制剂与底物, 用于早期凋亡的监测。<sup>18</sup>F-(S)-1-((1-(2-fluoroethyl)-1H-[1, 2, 3]-triazol-4-yl)methyl)-5-(2(2, 4-difluorophenoxy)methyl)-pyrrolidine-1-sulfonyl)isatin(<sup>18</sup>F-ICMT-11)是依赖于 Isatin 磺酰基的小分子 Caspase 抑制剂, 是 Caspase-3 特异的小分子 PET 显像剂, 具有非常高的放射性比活度。<sup>18</sup>F-ICMT-11 在健康志愿者的体内生物学

分布与辐射吸收剂量的研究已经开展<sup>[33]</sup>, 结果显示其快速聚集于肝脏与肾脏, 随后经肾脏与肝胆管清除。另一个 Isatin 系列的显像剂是 <sup>18</sup>F-WC-II-89(其中, WC-II-89: A non-peptide-based isatin sulfonamide analog), 在 PET 显像大鼠模型中, 治疗组 <sup>18</sup>F-WC-II-89 在肝脏与脾脏的摄取值是对照组的近 2 倍, 体内分布也与 Caspase-3 活性良好相关<sup>[34]</sup>。

研究者通过分子工程技术设计出具有 Caspase-3 识别序列 DEVD 的单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶, 它可以定量、实时监测胞外刺激引起的 Caspase-3 激活, 用于监测细胞凋亡<sup>[35]</sup>。9-[4-[<sup>18</sup>F]-fluoro-3-[hydroxymethyl]butyl]guanine([<sup>18</sup>F]FHBG)是单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶的经典 PET 报告探针, 在人体内具有稳定性好、血清清除快、本底信号低、安全等特性<sup>[36]</sup>。

小分子探针 <sup>18</sup>F-fluorobenzyltriphenyl phosphonium(<sup>18</sup>F-FBnTP)用于检测凋亡早期阶段跨线粒体内膜质子电化学梯度的崩解过程。热休克蛋白 90 是凋亡的主要抑制剂<sup>[37]</sup>, 对这一靶点进行无损成像有可能在生物学研究以及患者的诊断中得到广泛的应用。4-(N-(S-glutathionyl-acetyl)amino)phenyl-arsinous acid(GSAO)可快速在细胞质中聚集, 并主要与热休克蛋白 90 的 C 末端高保守 Cys-Cys 域(Cys719 和 Cys720)通过共价进行交联。使用 DTPA 和 <sup>111</sup>In 修饰 GSAO 可对肿瘤模型细胞凋亡进行在体 SPECT/CT 显像。

## 2 放射性核素凋亡显像的应用

分子影像是在体、非侵入性并于细胞或分子水平描述或评估疾病发生、发展过程的一种临床影像方式。PET 和 SPECT 的高灵敏度使其成为最具有希望的临床影像方式。近年来, 越来越多的研究者开始关注核素凋亡显像的临床应用潜力, 用其评价肿瘤患者早期疗效、指导相关治疗、评价预后, 有助于个体化治疗的开展。

### 2.1 肿瘤放疗和化疗效果的评估

临床常使用解剖成像如 MRI、CT 对肿瘤疗效进行评估, 然而, 通常在治疗后的 1~2 个月才能发生明显的结构改变, 因此, 患者需承担接受无效治疗的风险; 另一方面, 临床试验需要经历很长一段时间才能显示出对治疗的反应。因此, 寻找对疗效进行早期评估的方法非常重要。通过分子功能水

平而非解剖水平获得信息的诊断方法可对此提供有效的解决方案。近年来, 在分子成像方面的技术进步使生物过程的在体成像成为可能。大多数抗肿瘤治疗方法通过诱导细胞凋亡对抗肿瘤。研究表明, 治疗后早期肿瘤细胞凋亡的程度可反映肿瘤组织对治疗的敏感性, 并可基于细胞凋亡的程度早期评价治疗效果、预测疾病转归<sup>[12]</sup>。

<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-Annexin V 是目前研究最多的凋亡显像剂, 多数 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-Annexin V 凋亡显像应用于头颈癌、滤泡性淋巴瘤、非小细胞肺癌和乳腺癌患者。Van De wiele 等<sup>[38]</sup>于 2003 年首次报道了 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-Annexin V 在肿瘤患者中的应用, 结果发现肿瘤组织对 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-Annexin V 的摄取与凋亡细胞数呈正相关。兰晓莉等<sup>[39]</sup>发现, 荷瘤小鼠环磷酰胺治疗后 24 h, 治疗组可见清晰的肿瘤组织 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-Annexin V 显像, 而生理盐水对照组小鼠的肿瘤部位只观察到少量放射性标记的显像剂, 肿瘤部位显像较弱。<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-HYNIC-Annexin V 可作为凋亡显像剂, 并对化疗后早期疗效进行监测和评估。Yang 等<sup>[12]</sup>利用紫杉醇治疗肿瘤后, 通过 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-EC-Annexin(其中, EC: ethylenedicysteine)显像发现肿瘤组织对 <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-EC-Annexin 摄取明显增加。

兔 VX2 肺癌模型紫杉醇化疗后 72 h 进行 <sup>18</sup>F-C2A-GST PET 显像, 结果发现治疗组肿瘤 <sup>18</sup>F-C2A-GST 摄取明显增加, SUV<sub>max</sub> 明显高于对照组[(0.47±0.28) vs. (0.009±0.001), P<0.001], <sup>18</sup>F-C2A-GST 可作为化疗后早期凋亡的预测指标。Qin 等<sup>[40]</sup>利用 <sup>18</sup>F-rh-His10-Annexin V 监测 A549 荷瘤小鼠单次紫杉醇化疗后 120 min 图像, 结果显示治疗后肿瘤组织对 <sup>18</sup>F-rh-His10-Annexin V 的摄取量较治疗前明显增加[SUV<sub>max</sub>: (0.35±0.13) vs. (0.04±0.02), P<0.001]。Nguyen 等<sup>[41]</sup>予荷瘤小鼠环磷酰胺治疗, 于治疗后 24、48 h 行 <sup>18</sup>F-ICMT-11 PET 显像, 结果显示治疗后 24 h 肿瘤组织对 <sup>18</sup>F-ICMT-11 的摄取达到高峰, 这与体外实验观察到 Caspase-3 的活性在 24 h 达到高峰一致, 并通过 TUNEL 染色证实凋亡细胞的存在; 且肿瘤组织对 <sup>18</sup>F-ICMT-11 的摄取与 <sup>18</sup>F-FDG 的摄取呈负相关。<sup>18</sup>F-ICMT-11 有望成为肿瘤化疗后与 Caspase-3 相关的一种非侵入性凋亡检测标志物, 目前正在进行 III 期临床试验。

### 2.2 脑梗死的凋亡显像

脑梗死是最常见的神经系统病变, 随着对卒中

病理生理过程的深入认识,研究者提出了神经血管单元的概念。神经血管单元包括紧密相关的神经元、内皮细胞和胶质细胞,坏死是脑卒中超急性期神经血管单元细胞死亡的主要形式,然而,凋亡在随后的阶段发挥了重要作用。寻找非侵入性、实时监测脑卒中细胞死亡的显像剂对组织损伤区域的评估以及治疗的监测发挥着重要作用。

$^{18}\text{F}$ -ML-10 是一种由  $^{18}\text{F}$  标记的小分子 PET 显像剂,可与凋亡细胞外翻的 PS 结合。Reshef 等<sup>[30]</sup>于大鼠中动脉阻塞小鼠模型建立后 24 h 给予小鼠注射  $^{18}\text{F}$ -ML-10,并行动态 PET 扫描,结果显示,缺血大脑中动脉区域  $^{18}\text{F}$ -ML-10 摄取明显增加;体外研究结果表明,受累大脑半球  $^{18}\text{F}$ -ML-10 吸收剂量较对照组增加 2 倍,梗死区  $^{18}\text{F}$ -ML-10 吸收剂量较对照组增加 6~10 倍,且脑组织对  $^{18}\text{F}$ -ML-10 的摄取与细胞死亡的组织学证据相关。表明  $^{18}\text{F}$ -ML-10 显像有助于描述缺血相关的脑组织损伤区域,监测疾病的发展与治疗效果。

Zhang 等<sup>[42]</sup>先建立了兔左侧大脑中动脉缺血-再灌注模型,于再灌注 21~24 h 后静脉注射  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -duramycin,并于注射后 1~2 h 行脑动态 SPECT 显像。2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑染色评估病灶体积, Cleaved Caspase-3(被剪切后激活的 Caspase-3)染色观察细胞凋亡。结果显示,模型动物左侧大脑半球有明显的放射性浓聚(热点),对  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -duramycin 的摄取明显高于右侧大脑半球,缺血部位对其摄取的多少与缺血程度相关。放射自显影结果显示,2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑染色阴性区域与大脑放射性浓聚区域一致,2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑染色阴性区域代表缺血半暗带,免疫组织化学结果同样显示 Cleaved Caspase-3 阳性染色主要存在于缺血半暗带。以上实验结果表明,  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -duramycin SPECT 显像可用于大脑缺血-再灌注引起的凋亡神经元的检测和定量。

### 2.3 心肌细胞凋亡显像

心血管疾病是当今世界发病率和病死率最高的疾病。体内识别引起心脏病发作的动脉粥样硬化病变依旧困难。影像学技术的发展为检测有临床意义的冠脉粥样硬化改变提供了参考标准。在心肌缺血再灌注过程中,凋亡是引起再灌注损伤心肌细胞死亡的重要形式。

Thimister 等<sup>[43]</sup>于急性心肌梗死急性期行  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -

MIBI 心肌灌注显像,结果显示,所有急性心肌梗死患者均见心肌梗死部位为放射性缺损区,经皮冠状动脉腔内血管成形术后  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 显像结果示这些区域为放射性浓聚区。亚急性期(心肌梗死发作 4 d 后)  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 心肌灌注显像示放射性缺损区较急性期明显缩小[(9%~43%) vs. (3%~25%),  $P<0.05$ ],但仍与  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 放射性浓聚区一致。部分病例亚急性期  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 摄取较急性期不断减少,甚至不摄取,即此时  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 凋亡显像阴性,之后心肌灌注显像结果完全正常。这些结果均表明,急性期  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 放射性缺损和  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 放射性浓聚与可逆性心肌损伤相关。若  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -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,同时可对治疗效果进行评价。

将心肌梗死小鼠分为生理盐水对照组与甲状旁腺素治疗组,术后 2 d 行  $^{68}\text{Ga}$ -Annexin A5 PET 显像,术后 6、30 d 行  $^{18}\text{F}$ -FDG PET 检查评估左心室射血分数与梗死区域。结果显示,术后 2 d 对照组梗死区  $^{68}\text{Ga}$ -Annexin A5 摄取值高于治疗组[(7.4±1.3)% ID/g vs. (4.5±1.9)% ID/g,  $P=0.013$ ], TUNEL 染色结果示对照组梗死区细胞凋亡数明显高于治疗组[(64%±9%) vs. (52%±4%),  $P=0.045$ ],  $^{18}\text{F}$ -FDG PET 示治疗组梗死区面积明显降低,而对照组增加。以上实验表明,  $^{68}\text{Ga}$ -Annexin A5 PET 结果可以作为凋亡标志监测甲状旁腺素对心肌梗死的治疗效果<sup>[44]</sup>。

此外,凋亡显像也可用于动脉粥样硬化斑块的显像,可在体显示不稳定斑块的巨噬细胞或平滑肌细胞的凋亡过程<sup>[45]</sup>。

### 2.4 新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)细胞凋亡显像

HIBI 发生后,脑部微循环相对较小的波动就会引起细胞凋亡。坏死与梗死会导致脑细胞立刻发生不可逆性损伤,而新生儿 HIBI 引起的凋亡要经历一段时间的发展、变化,是脑细胞迟发性死亡的重要形式,这种类型的脑细胞死亡可能是脑瘫的预兆。凋亡的发展需经历多级过程,阻断凋亡的级联反应就可能中断细胞程序性死亡。通常脑瘫患儿的症状在 2~3 岁才逐渐显露,因此,若在疾病发生早期监测到细胞凋亡,就可尽早给予治疗。

D'Arceuil 等<sup>[46]</sup>对新生兔 HIBI 模型进行  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 凋亡显像,结果显示模型组兔脑组织有

局灶性  $^{99m}\text{Tc}$ -Annexin V 摄取, 小脑摄取最多, 对照组无摄取, 而 MRI 检查未见缺血后血脑屏障崩解与灌注异常。

### 2.5 其他

凋亡显像在疾病诊断与疗效预测方面的优势有助于个体化治疗的发展, 对药物开发也具有重要影响。

甲状腺炎、药物引起的肝细胞凋亡均可采用 Annexin V 进行评估, 另外, 药物所致心肌毒性引起的细胞凋亡可采用  $^{18}\text{F}$ -CP18 进行评估。

### 3 存在的问题及展望

与传统的细胞凋亡检测方法相比, 放射性核素显像具有无创性、早期性、定量性等优势, 可以为临床诊断和指导治疗各种疾病提供有力的依据。尤其在肿瘤科学研究与临床诊治中发挥着重要作用, 可早期监测肿瘤治疗效果、评价患者预后、指导治疗方案。然而, 作为一种较新的细胞凋亡检测方法, 放射性核素显像仍有许多方面需要改进: ①PS 外翻不是细胞凋亡过程独有的特征, 其他类型细胞死亡形式也会发生 PS 外翻, 因此, 靶向 PS 的探针聚集不全是细胞凋亡的结果; ②放射性核素标记的 Annexin V 类显像剂是在体凋亡显像的一类重要探针, 但其相对分子质量较大, 血液清除较慢, 且具有免疫原性, 早期显像效果不佳, 生产成本高; ③当存在多重耐药蛋白时, 细胞摄取探针减少, 外流增加, 致使线粒体膜电位显像过程复杂; ④应深入研究凋亡细胞的生物化学性状, 进一步提高凋亡细胞的特异性, 优化显像剂的药代动力学参数, 从而提高 T/NT 值; ⑤应将凋亡显像与其他重要病理生理过程显像相结合, 如代谢显像、细胞增殖显像、缺氧显像、血管生成显像等, 从而有助于凋亡相关疾病临床决策的制定; ⑥放射性核素凋亡显像的临床应用主要是通过 PET 与 SPECT 技术而实现的, 然而这些技术依旧具有局限性, 如空间分辨率不足而影响肿瘤早期监测, 将不同的成像模式如光学成像、MRI、CT、超声、PET、SPECT 进行合并, 不仅可以将不同成像模式的优点整合<sup>[47]</sup>, 还可以降低各自的局限性, 多模式成像探针的研发很好地解决了这一问题; ⑦尽管已有研究对核素凋亡显像进行了相关动物与临床试验, 但其临床应用依旧处于初期阶段, 并未得到广泛应用, 随着研究的深

入与发展, 相信在不久的将来这一技术会成为临床相关疾病诊断与指导治疗的重要工具。

### 4 结论

凋亡是细胞死亡的一种重要形式。对肿瘤进行有效的治疗可引起肿瘤细胞的凋亡。临床前研究与临床研究表明, 凋亡显像可以用来检测有效治疗后肿瘤细胞的早期凋亡, 从而判断肿瘤治疗后的早期疗效<sup>[48]</sup>。随着人们对凋亡生物学过程的深入认识, 设计靶向细胞凋亡的多模态探针成为可能。然而, 由于开发临床应用显像探针存在的困难, 目前为止还没有任何一种显像剂进入临床应用。总体来说, 一个有临床应用潜力的凋亡显像探针应具有以下特性: ①对凋亡细胞的高选择性、高特异性; ②体内、体外具有高稳定性; ③合适的药代动力学参数; ④与成像设备、标记技术具有兼容性; ⑤低免疫原性与毒性; ⑥经济上的可行性<sup>[49]</sup>。凋亡检测为研究者与临床医生提供了疾病治疗的新视角, 相信在不久的将来一定会有一种或多种分子探针能够克服药物研发阶段的各种困难而最终进入临床应用。

### 参 考 文 献

- [1] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.
- [2] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. Science, 2004, 305(5684): 626-629.
- [3] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.
- [4] Hakumäki JM, Liimatainen T. Molecular imaging of apoptosis in cancer[J]. Eur J Radiol, 2005, 56(2): 143-153.
- [5] Lahorte CM, Vanderheyden JL, Steinmetz N, et al. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004, 31(6): 887-919.
- [6] Lee S, Xie J, Chen X. Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis[J]. Chem Rev, 2010, 110(5): 3087-3111.
- [7] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function[J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 331-371.
- [8] Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals[J]. J Struct Biol, 2001, 133(1): 55-63.
- [9] Kemerink GJ, Boersma HH, Thimister PW, et al. Biodistribution and dosimetry of  $^{99m}\text{Tc}$ -BTAP-annexin-V in humans[J]. Eur J Nucl

- Med, 2001, 28(9): 1373–1378.
- [10] Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(11): 6349–6354.
- [11] Kartachova MS, Valdés Olmos RA, Haas RL, et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-rh-annexin-V scintigraphy: visual and quantitative evaluation of early treatment-induced apoptosis to predict treatment outcome[J]. Nucl Med Commun, 2008, 29(1): 39–44.
- [12] Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, et al. In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using  $^{99m}\text{Tc}$ -EC-annexin V [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2001, 16(1): 73–83.
- [13] Lu C, Jiang Q, Hu M, et al. Preliminary biological evaluation of novel  $^{99m}\text{Tc}$ -Cys-annexin A5 as a apoptosis imaging agent [J]. Molecules, 2013, 18(6): 6908–6918.
- [14] Bauwens M, De Saint-Hubert M, Devos E, et al. Site-specific  $^{68}\text{Ga}$ -labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis[J]. Nucl Med Biol, 2011, 38(3): 381–392.
- [15] Benali K, Louedec L, Azzouna RB, et al. Preclinical validation of  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin A5-128 in experimental autoimmune myocarditis and infective endocarditis: comparison with  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-annexin A5 [J/OL]. Mol Imaging, 2014, 13: 1–10[2015–07–09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25431156>.
- [16] Li X, Link JM, Stekhova S, et al. Site-specific labeling of annexin V with F-18 for apoptosis imaging[J]. Bioconjug Chem, 2008, 19(8): 1684–1688.
- [17] Yagle KJ, Eary JF, Tait JF, et al. Evaluation of  $^{18}\text{F}$ -annexin V as a PET imaging agent in an animal model of apoptosis[J]. J Nucl Med, 2005, 46(4): 658–666.
- [18] Murakami Y, Takamatsu H, Taki J, et al.  $^{18}\text{F}$ -labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004, 31(4): 469–474.
- [19] Wängler C, Wängler B, Lehner S, et al. A universally applicable  $^{68}\text{Ga}$ -labeling technique for proteins[J]. J Nucl Med, 2011, 52(4): 586–591.
- [20] Bauwens M, De Saint-Hubert M, Devos E, et al. Site-specific  $^{68}\text{Ga}$ -labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis[J]. Nucl Med Biol, 2011, 38(3): 381–392.
- [21] Wang F, Fang W, Zhang MR, et al. Evaluation of chemotherapy response in VX2 rabbit lung cancer with  $^{18}\text{F}$ -labeled C2A domain of synaptotagmin I[J]. J Nucl Med, 2011, 52(4): 592–599.
- [22] Poulsen RH, Rasmussen JT, Ejlersen JA, et al. Pharmacokinetics of the phosphatidylserine tracers  $^{99m}\text{Tc}$ -lactadherin and  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin V in pigs[J/OL]. EJNMMI Res, 2013, 3(1): 15[2015–07–09]. <http://www.ejnmires.com/content/3/1/15>.
- [23] Song S, Xiong C, Lu W, et al. Apoptosis imaging probe predicts early chemotherapy response in preclinical models: A comparative study with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET[J]. J Nucl Med, 2013, 54(1): 104–110.
- [24] Marconescu A, Thorpe PE. Coincident exposure of phosphatidylethanolamine and anionic phospholipids on the surface of irradiated cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(10): 2217–2224.
- [25] Wang K, Purushotham S, Lee JY, et al. In vivo imaging of tumor apoptosis using histone H1-targeting peptide[J]. J Control Release, 2010, 148(3): 283–291.
- [26] Koulov AV, Stucker KA, Lakshmi C, et al. Detection of apoptotic cells using a synthetic fluorescent sensor for membrane surfaces that contain phosphatidylserine[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(12): 1357–1359.
- [27] Wyffels L, Gray BD, Barber C, et al. Synthesis and preliminary evaluation of radiolabeled bis(Zinc(II)-dipicolylamine) coordination complexes as cell death imaging agents [J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(11): 3425–3433.
- [28] Oltmanns D, Zitzmann-Kolbe S, Mueller A, et al. Zn(II)-bis(cyclen)complexes and the imaging of apoptosis/necrosis[J]. Bioconjug Chem, 2011, 22(12): 2611–2624.
- [29] Grimberg H, Levin G, Shirvan A, et al. Monitoring of tumor response to chemotherapy in vivo by a novel small-molecule detector of apoptosis[J]. Apoptosis, 2009, 14(3): 257–267.
- [30] Reshef A, Shirvan A, Waterhouse RN, et al. Molecular imaging of neurovascular cell death in experimental cerebral stroke by PET[J]. J Nucl Med, 2008, 49(9): 1520–1528.
- [31] Höglund J, Shirvan A, Antoni G, et al.  $^{18}\text{F}$ -ML-10, a PET tracer for apoptosis: first human study[J]. J Nucl Med, 2011, 52(5): 720–725.
- [32] Bleackley RC, Heibein JA. Enzymatic control of apoptosis[J]. Nat Prod Rep, 2001, 18(4): 431–440.
- [33] Challapalli A, Kenny LM, Hallett WA, et al.  $^{18}\text{F}$ -ICMT-11, a caspase-3-specific PET tracer for apoptosis: biodistribution and radiation dosimetry[J]. J Nucl Med, 2013, 54(9): 1551–1556.
- [34] Zhou D, Chu W, Rothfuss J, et al. Synthesis, radiolabeling, and in vivo evaluation of an  $^{18}\text{F}$ -labeled isatin analog for imaging caspase-3 activation in apoptosis. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(19): 5041–5046.
- [35] Wang F, Wang Z, Hida N, et al. A cyclic HSV1-TK reporter for real-time PET imaging of apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(14): 5165–5170.
- [36] Yaghoubi SS, Gambhir SS. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase(HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [ $^{18}\text{F}$ ]FHBG. Nat Protoc, 2006, 1(6): 3069–3075.
- [37] Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: Some Like It Hot[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(1): 9–14.
- [38] Van De Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, et al. Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium-99m-HYNIC annexin V single photon emission computed tomography[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(18): 3483–3487.
- [39] 兰晓莉, 张永学, 何勇. 凋亡显像剂  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-annexin V 对肿瘤模型化疗疗效早期评价的可行性[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(10): 737–740.
- [40] Qin H, Zhang MR, Xie L, et al. PET imaging of apoptosis in tumor-

- bearing mice and rabbits after paclitaxel treatment with  $^{18}\text{F}$ -Labeled recombinant human His<sub>10</sub>-annexin V[J]. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2015, 5(1): 27-37.
- [41] Nguyen QD, Lavdas I, Gubbins J, et al. Temporal and spatial evolution of therapy-induced tumor apoptosis detected by caspase-3-selective molecular imaging[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(14): 3914-3924.
- [42] Zhang Y, Stevenson GD, Barber C, et al. Imaging of rat cerebral ischemia-reperfusion injury using  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled duramycin[J]. Nucl Med Biol, 2013, 40(1): 80-88.
- [43] Thimister PW, 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.
- [44] Lehner S, Todica A, Vanchev Y, et al. In vivo monitoring of parathyroid hormone treatment after myocardial infarction in mice with [ $^{68}\text{Ga}$ ] annexin A5 and [ $^{18}\text{F}$ ] fluorodeoxyglucose positron emission tomography[J/OL]. Mol Imaging, 2014, 13[2015-07-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25249170>.
- [45] 黄代娟, 兰晓莉, 张永学.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Annexin V 动脉粥样硬化斑块显像的实验研究[J]. 中华核医学杂志, 2008, 28(3): 206-208.
- [46] D'Arceuil H, Rhine W, De Crespigny A, et al.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury[J]. Stroke, 2000, 31(11): 2692-2700.
- [47] 朱羽苑, 黄钢. 分子核医学显像展望: 多参数分子显像时代[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2010, 34(3): 129-134.
- [48] Watanabe M, Hitomi M, Van Der Wee K, et al. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs[J]. Microsc Microanal, 2002, 8(5): 375-391.
- [49] Sugiura G, Kühn H, Sauter M, et al. Radiolabeling strategies for tumor-targeting proteinaceous drugs[J]. Molecules, 2014, 19(2): 2135-2165.

(收稿日期: 2015-07-09)

## ·读者·作者·编者·

## 2015 年本刊可直接使用缩写形式的常用词汇

- ATP**(adenosine-triphosphate), 三磷酸腺苷
- CI**(confidence interval), 可变区间
- CT**(computed tomography), 计算机断层摄影术
- CV**(coefficient of variation), 变异系数
- DNA**(deoxyribonucleic acid), 脱氧核糖核酸
- DTPA**(diethylene-triaminepentaacetic acid), 二亚乙基三胺五乙酸
- FDG**(fluorodeoxyglucose), 氟脱氧葡萄糖
- GTV**(gross tumor volume), 大体肿瘤体积
- IL**(interleukin), 白细胞介素
- IMRT**(intensity-modulated radiation therapy), 调强适形放疗
- MDP**(methylenediphosphonate), 亚甲基二膦酸盐
- MIBI**(methoxyisobutylisonitrile), 甲氧基异丁基异腈
- MRI**(magnetic resonance imaging), 磁共振成像
- MTT**(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), 四甲基偶氮唑盐
- PBS**(phosphate-buffered solution), 磷酸盐缓冲液
- PCR**(polymerase chain reaction), 聚合酶链反应
- PET**(positron emission tomography), 正电子发射断层显像术
- RNA**(ribonucleic acid), 核糖核酸
- ROI**(region of interest), 感兴趣区
- RT-PCR**(reverse transcription-polymerase chain reaction), 逆转录-聚合酶链反应
- SER**(sensitization enhancement ratio), 放射增敏比
- SPECT**(single photon emission computed tomography), 单光子发射计算机断层显像术
- SUV**(standardized uptake value), 标准化摄取值
- SUV<sub>max</sub>**(maximum standardized uptake value), 最大标准化摄取值
- SUV<sub>min</sub>**(minimum standardized uptake value), 最小标准化摄取值
- T<sub>3</sub>**(triiodothyronine), 三碘甲状腺原氨酸
- T<sub>4</sub>**(throxine), 甲状腺素
- TNF**(tumor necrosis factor), 肿瘤坏死因子
- TNM**(tumor, node, metastasis), 肿瘤、结节、转移
- T/NT**(the ratio of target to non-target), 靶/非靶比值
- TSH**(thyroid-stimulating hormone), 促甲状腺激素
- WBC**(white blood cell count), 白细胞计数

本刊编辑部