

❖ 实验研究

Radionuclide apoptosis imaging on hepatocyte apoptosis of mice models

LAN Xiao-li, HE Yong, SHEN Yan-xia, SUN Xun, ZHANG Yong-xue*

(Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Province Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective** To assess the value of ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V as apoptosis imaging agent in hepatocytes apoptosis of mice models. **Methods** The expression plasmid of human Annexin V was constructed and expressed. HYNIC was used as bifunctional chelating agent for ^{99m}Tc labeling Annexin V. The radiochemical purity, radiolabeling yield and stability of ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V were studied. Normal Kunming mice were randomly divided into normal control group and hepatocytes apoptosis group after treated by saline and anti-Fas antibody, respectively. SPECT images in different time were obtained to evaluate the biodistribution of the agent in the two groups. The ratios of liver/upper-limb were gained with region of interest (ROI) technique and compared between the two groups. Livers in both groups were used to HE and Hoechst 33258 staining for checking of apoptosis. **Results** Annexin V could be labeled with ^{99m}Tc using HYNIC, and showed high radiochemical purity of $(96.90 \pm 2.27)\%$. The radiolabeling yield reached $(96.32 \pm 2.08)\%$. The agent was excreted from kidney and only small amount could be seen in the liver. In the group of hepatocytes apoptosis, the ratios of liver/upper-limb in different imaging time were much higher than those of normal group. In apoptosis group, massive hepatocytes apoptosis could be seen in HE and Hoechst 33258 staining. **Conclusion** The apoptosis imaging agent ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V prepared in this study can be used in vivo to show the apoptosis in the hepatocytes apoptosis models, suggesting that ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V may be a promising agent for apoptosis imaging in clinical application.

[Key words] Apoptosis; Radionuclide imaging; Hepatocytes; Mice

核素凋亡显像评价小鼠肝细胞凋亡

兰晓莉, 何 勇, 沈艳霞, 孙 逊, 张永学*

(华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科, 湖北省分子影像重点实验室, 湖北 武汉 430022)

[摘要] **目的** 将凋亡显像剂 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V 用于肝细胞凋亡小鼠动物模型显像, 以评价其用于显示凋亡的可行性。 **方法** 通过双功能螯合剂 HYNIC 偶联 Annexin V 后 ^{99m}Tc 标记, 鉴定 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V 标记率、放化纯和稳定性。取正常昆明小鼠随机分为正常对照组及应用 anti-Fas 抗体处理后肝细胞凋亡组, 注射显像剂后不同时间行 SPECT 显像, 考察显像剂在小鼠体内分布及排泄情况, 应用感兴趣区 (region of interest, ROI) 技术比较正常组及凋亡组显像图像中肝脏/前臂比值。取两组动物肝脏组织 HE 染色进行病理学分析, Hoechst33258 染色检测凋亡。 **结果** ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V 标记率可达 $(96.32 \pm 2.08)\%$, 放化纯度达到 $(96.90 \pm 2.27)\%$, 标记物体外稳定。正常小鼠体内显像剂从肾脏排泄, 肝脏仅有少量分布。凋亡组肝脏有明显显像剂浓聚, 不同时间下肝脏/前臂的比值均高于正常小鼠。HE 染色及 Hoechst33258 染色提示凋亡组有大量肝细胞凋亡。 **结论** 研究制备的凋亡显像剂 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V 可以活体显示发生凋亡的肝脏, 用于在体凋亡显像, 有望成为一种有良好临床应用前景的凋亡显像剂。

[关键词] 细胞凋亡; 放射性核素显像; 肝细胞; 小鼠

[中图分类号] R817.4; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2009)01-0029-04

凋亡是正常组织功能的重要组成部分, 凋亡过度或不足是一些疾病的主要原因。应用核素标记与细胞凋亡早期出现

外化的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 特异性结合的蛋白-膜联蛋白 V (Annexin V) 进行核素显像, 可以达到无创、定量、在体、反复检测凋亡之目的^[1]。目前国外已经开始应用核素标记 Annexin V 检测凋亡的实验研究及 I 期临床研究^[2-3]。本研究在应用生物工程技术获取 Annexin V 后, 以 HYNIC 作为螯合剂, 进行 ^{99m}Tc 标记, 获得凋亡显像剂 ^{99m}Tc -

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金 (20030487013)。

[作者简介] 兰晓莉 (1973 -), 女, 四川人, 博士后, 副教授、副主任医师。研究方向: 分子核医学。E-mail: hzslxl@163.com

[通讯作者] 张永学, 华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科, 430022。E-mail: zhyx1229@163.com

[收稿日期] 2008-08-08 **[修回日期]** 2008-09-16

HYNIC-Annexin V, 并将其初步应用于经典的肝细胞大量凋亡的小鼠模型显像研究中。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验动物为健康雄性昆明小鼠, 体重 20~25 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物部提供。Na^{99m}TcO₄⁻ 新鲜淋洗液由⁹⁹Mo-^{99m}Tc 发生器制备, 中国原子高科有限公司提供。联肼尼克酰胺 (succinimidyl 6-hydrazinonicotinate, HYNIC) 及 Annexin V 均为本实验室自备; 快速薄层层析硅胶纸 (instant thin-layer chromatography with silica gel, ITLC-SG) 为 Gelman Sciences 公司产品; SephadexTM G25 (Fine) 产自 Amersham Bioscience 公司; 氯化亚锡 (SnCl₂)、三羟甲基甘氨酸 (tricine) 为 Aldrich-Sigma 公司产品; Anti-Fas 抗体、Hoechst 33258 购自武汉博士德生物有限公司。

采用 GE Millennium VG 双探头数字可变角单光子发射计算机断层扫描仪 (single photon emission computed tomography, SPECT)、Olympus CX31 生物显微镜、石蜡包埋全自动处理仪、恒温冰冻切片机及 HMIAS-2000 全自动医学图像采集分析系统进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 凋亡显像剂 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 的制备 参照文献^[4] 并按照本实验室方法^[5] 制备凋亡显像剂 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V。

1.2.2 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 的鉴定 将标记物 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 经过 SephadexTM G25 凝胶柱以 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗脱, 测量各收集管放射性计数, 并经紫外分光 (280 nm) 检测紫外吸收值, 收集峰管, 计算标记率。放化纯度的鉴定应用 ITLC-SG, 展开剂为丙酮和生理盐水。标记液在洗脱液中保存 1、2、4、6 h 后, 检查其放化纯度的变化, 评价其稳定性。

1.2.3 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 在正常小鼠及肝细胞凋亡小鼠的显像研究 雄性正常昆明小鼠 8 只, 随机分成 A、B 二组。A 组为正常对照组 ($n=4$): 每只小鼠尾静脉注射生理盐水 500 μ l, 1 h 后尾静脉再次注射 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 100 μ Ci (3.7 MBq), 含有 5 μ g 蛋白。B 组为肝细胞凋亡组 ($n=4$): 每只小鼠尾静脉注射含有 10 mg anti-Fas 抗体的 500 μ l 生理盐水, 1 h 后尾静脉再次注射 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 100 μ Ci (3.7 MBq), 含有 5 μ g 蛋白。

每只动物首次以 800~1000 mg/kg 体重腹腔注射 20% 氨基甲酸乙酯 (溶解于生理盐水), 以后必要时追加剂量。注入显像剂后 15、30、60、90、120、180、240 min 在 SPECT 下以低能高分辨率准直器采集图像, 矩阵 256 $\times$ 256, 能峰 140 keV, 窗宽 20%, 放大倍数 4.0, 每帧采集 200 s。

图像分析采用感兴趣区 (region of interest, ROI) 技术, 对 A 组及 B 组小鼠, 取肝脏及右上肢为感兴趣区计数, 计算肝脏与右前臂计数比值。

1.2.4 正常小鼠及肝细胞凋亡小鼠的肝脏组织学 HE 染色观察 上述采集结束后, 处死小鼠, 取肝脏, 置 10% 甲醛溶液固定, 按常规方法置于石蜡包埋全自动处理仪中进行石蜡包埋。在恒冷箱冰冻切片机中进行切片, 每片厚度为 5 μ m。常规 HE 染色后脱水、透明、封片, 观察肝脏基本病理学改变。

1.2.5 正常小鼠及肝细胞凋亡小鼠的肝脏 Hoechst33258 染色观察 取常规石蜡包埋切片, 进行脱蜡、透明处理。PBS 洗两遍, 每次 3 min, 吸尽液体。加入 0.5 ml Hoechst33258 染色液, 染色 5 min。将切片置于载玻片上, 滴抗淬灭封片液, 盖洁净盖玻片后, 荧光显微镜进行观察。

1.2.6 统计分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 的鉴定 经 HYNIC 偶联后, 加入还原剂及络合剂进行标记, 得到 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 标记率可达到 $(96.32 \pm 2.08)\%$ ($n=6$), 放化纯度 $(96.90 \pm 2.27)\%$ ($n=6$)。标记物在洗脱液中保存 1、2、4、6 h, 放化纯度仍大于 90%。

2.2 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 在正常对照组小鼠和肝细胞凋亡组小鼠的 SPECT 显像 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 在正常对照组小鼠 SPECT 显像见图 1。图中显像剂大多数分布于肾脏及膀胱, 尤其肾脏显影十分清晰, 说明该显像剂从肾脏及膀胱排泄。肝脏有少量的显像剂分布, 其轮廓欠清晰规整。胸腔的脏器如心脏、肺脏显影不明显, 脑、甲状腺、胃、四肢、关节及肌肉仅有较本底稍高的显影。

^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 在肝细胞凋亡组小鼠 SPECT 显像见图 2。图中显像剂除主要分布于肾脏及膀胱外, 在肝脏亦有明显显影, 其轮廓清晰, 显影程度与肾脏基本相当。全身其他器官的显影与正常小鼠的显影未见明显差异。

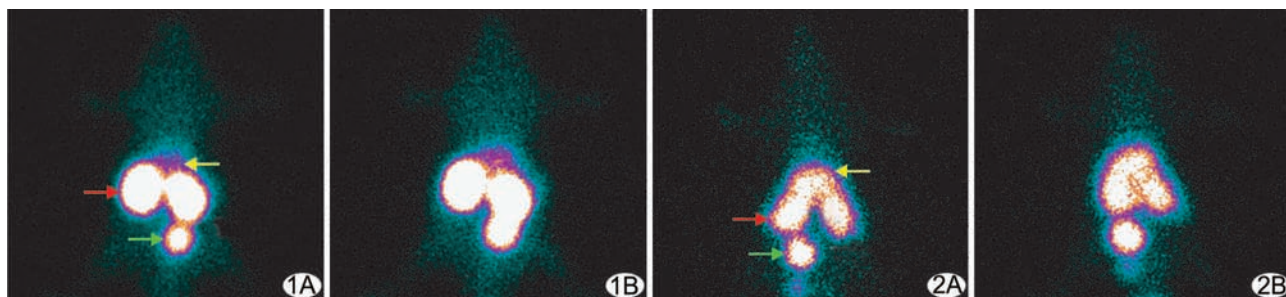


图 1 对照组小鼠注射 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 后 SPECT 显像图 A. 注射显像剂后 60 min; B. 注射显像剂后 3 h (黄色箭头: 肝脏; 红色箭头: 肾脏; 绿色箭头: 膀胱) 图 2 肝细胞凋亡组小鼠注射 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 后 SPECT 显像图 A. 注射显像剂后 60 min; B. 注射显像剂后 3 h (黄色箭头: 肝脏; 红色箭头: 肾脏; 绿色箭头: 膀胱)

2.3 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 在正常及肝细胞凋亡小鼠 SPECT 图像的对比分析 应用 ROI 技术对不同时间显像时,正常小鼠及肝细胞凋亡小鼠的肝脏及右前臂计数比值进行分析,结果见表 1。应用 Anti-Fas 处理后,从 15 ~ 240 min 行 SPECT 显像,肝脏/前臂的比值较未经处理的正常对照组均有明显增高,其中 60 min 后的比值差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),说明肝细胞凋亡细胞可以明显摄取显像剂 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V。

2.4 正常对照组及肝细胞凋亡组小鼠肝脏 HE 染色分析 正常对照组及肝细胞凋亡组小鼠肝脏 HE 染色结果见图 3、4。

2.5 正常及肝细胞凋亡小鼠肝脏 Hoechst 染色分析 正常对照组小鼠肝脏染色图见图 5,其荧光染色所示肝脏结构与正常 HE 染色相近,肝板以中央静脉为中心条索状向四周呈放射样排列,分布规律,胞核染色清晰,核大而圆。肝细胞凋亡组小鼠肝脏染色图见图 6,在图片中心出现大量密集的荧光染色,为固缩的肝细胞核,是凋亡的典型形态学变化。

3 讨论

凋亡组织的显像对于监测一些与凋亡激发或抑制的疾病及其疗效具有重要意义。凋亡在一些疾病如自身免疫性疾病、神经退行性病变、心肌炎、心肌病、脑及心肌缺血、感染性疾病、肿瘤、器官及骨髓移植排斥反应中起重要作用^[6-7]。与一些体外检测凋亡的方法相比,应用核素标记的 Annexin V 进行在体显像可以提供一种更直接、无创、早期检测凋亡的方法。

本实验应用 Anti-Fas 抗体制作小鼠肝细胞凋亡模型,通过制备的 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 进行 SPECT 显像,并与正常小鼠对照,结果表明在肝细胞凋亡小鼠模型中, ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 显像可以清晰的显示发生细胞凋亡的小鼠肝脏,并与组织学染色及凋亡荧光染色结果相关,提示在肝脏局部的显像剂摄取是与大量肝细胞凋亡导致 Annexin V 的结合位点明显增加直接相关的。

正常肝细胞大量表达 Fas 受体,应用 Anti-Fas 抗体或 Fas-Ligand (Fas-L, Fas-配体)造成大量肝细胞凋亡是一种传统的制作肝细胞凋亡模型的方法。注射 Anti-Fas 抗体(或 Fas-配体)后,可导致大量的肝细胞凋亡,并可在数小时内致动物死亡,这一模型模拟了人类病毒性肝炎导致急性肝衰竭的病理过程。有文献应用敲除 *lpr/lpr* 基因而导致肝细胞表面缺乏

表 1 正常对照组与肝细胞凋亡组 SPECT 显像中肝脏/前臂比值($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	给药后显像时间 (min)					
	15	30	60	90	120	240
对照组	9.21 ± 4.08	8.66 ± 2.90	10.95 ± 2.98	15.35 ± 1.90	16.33 ± 1.23	18.18 ± 3.04
凋亡组	16.88 ± 3.63	17.23 ± 3.53	16.70 ± 1.63	25.51 ± 2.26	25.32 ± 1.67	24.24 ± 2.57
t 值	1.3691	2.7118	3.11	12.771	20.6639	3.3524
P 值	0.264451	0.073053	0.052882	0.001036	0.0002	0.044

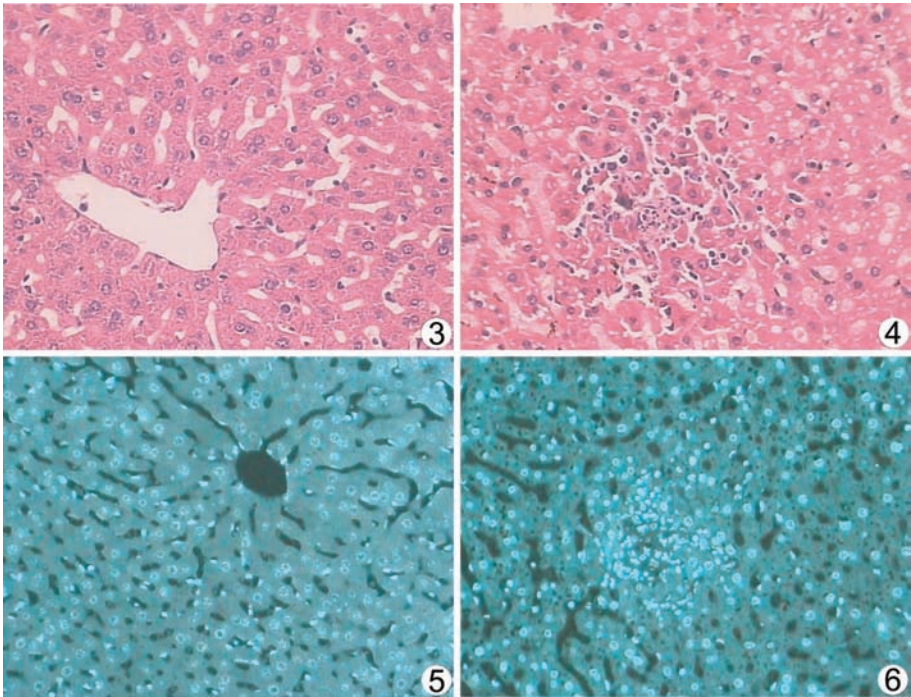


图 3 正常昆明小鼠肝脏 HE 染色图 肝窦及肝细胞核染色清晰,肝板以中央静脉为中心条索状向四周呈放射样排列,肝小叶内网状纤维支架完整,分布规律(×400)

图 4 肝细胞凋亡小鼠肝脏 HE 染色图 肝细胞体积增大,胞浆浓缩,胞核固缩,肝窦变窄、堵塞,肝索断裂,提示大量肝细胞凋亡(×400)

图 5 正常昆明小鼠肝脏 Hoechst 染色图 肝脏结构与正常 HE 染色相近。肝板以中央静脉为中心条索状向四周呈放射样排列,分布规律,胞核染色清晰,核大而圆(×400)

图 6 肝细胞凋亡小鼠肝脏 Hoechst 染色图 图片中心出现大量密集的荧光染色,为固缩的肝细胞核,是凋亡的典型形态学变化(×400)

Fas 受体的大鼠进行 Anti-Fas 抗体或 Fas-Ligand 处理,发现这种敲除基因的大鼠不能出现肝细胞的大量凋亡,说明这种处理对于制作肝细胞凋亡的模型是十分特异的。

Fas 处理的急性肝细胞凋亡模型的血管也有一定的损害,理论上这种损伤在某种程度上会增加 Annexin V 的摄取,因为血管的损伤会激活血小板。但是在应用兔-抗人 Annexin V IgG 单克隆抗体处理后肝脏标本的免疫组织化学研究中发现只有肝细胞被染色,而血管部位及周围的出血部位并没有明显的染色,而且 Annexin V 从血液中清除十分迅速^[8]。这些均说明显像剂显示的部位就是肝细胞凋亡的部位,而不是由于血管损伤而造成的显像剂在血管局部的沉积。

本研究中应用正常昆明小鼠除可以进行对照外,还可以用于研究标记物 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 在正常小鼠体内的分布、排泄及代谢途径。由 SPECT 显像图中可以看到,显像剂大多数分布于肾脏及膀胱,尤其肾脏显影十分清晰,提示该

显像剂可能从肾脏及膀胱排泄。肝脏有少量的显像剂分布,其轮廓欠清晰规整。胸腔的脏器如心脏、肺脏显影不明显,脑、甲状腺、胃、四肢、关节及肌肉仅有较本底稍高的显影。这些显像的结果与相关的生物分布研究结果相近^[9-10]。显像图中可以看到肾脏的摄取十分高,以至于由于分辨率及空间大小的限制,腹腔大部分其他器官难以有清晰的、可以明确判断的显影。因此,尽管^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 在标记率、放化纯度及制备过程中,相对于其他显像剂具有一定的优势^[9-10],但是在显示腹部器官的凋亡组织上仍有一定的局限性。当然由于本研究采用的是体重仅为 20 ~ 25 g 的小鼠,本身体积较小,如果换用大动物可能会得到不同的结论。

本研究结果提示制备的^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 可以用于体内无创、早期凋亡显像,是一种有临床应用前景的凋亡显像剂。

[参考文献]

- [1] Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk MML, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. J Nucl Med, 2005, 46(12): 2035-2050.
- [2] Tang XN, Wang Q, Koike MA, et al. Monitoring the protective effects of minocycline treatment with radiolabeled annexin V in an experimental model of focal cerebral ischemia. J Nucl Med, 2007, 48(11): 1822-1828.
- [3] Kartachova MS, Valdés Olmos RA, Haas RL, et al. ^{99m}Tc-HYNIC-rh-annexin-V scintigraphy: visual and quantitative evaluation of early treat-

ment-induced apoptosis to predict treatment outcome. Nucl Med Commun, 2008, 29(1): 39-44.

- [4] Tait JF, Smith C, Blankenberg FG. Structural requirements for in vivo detection of cell death with ^{99m}Tc-annexin V. J Nucl Med, 2005, 46(5): 807-815.
- [5] Lan XL, Zhang YX. Preparation of ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V. Nuclear Science and Techniques, 2005, 16(5): 299-303.
- [6] Hersey P, Zhang XD, Mhaidat N. Overcoming resistance to apoptosis in cancer therapy. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 105-126.
- [7] Camins A, Pallas M, Silvestre JS. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2008, 30(1): 43-65.
- [8] Lan XL, Zhang YX, An R, et al. Preparation of ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V and its biodistribution study in normal mice. Chinese Journal of Nuclear Medicine, 2005, 25(6): 344-346.
- 兰晓莉, 张永学, 安锐, 等. ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V 的制备及正常小鼠体内分布研究. 中华核医学杂志, 2005, 25(6): 344-346.
- [9] Wang RF, Liu M, Zhang CL, et al. Experimental study on tumor cell apoptosis imaging in vivo with ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V in mice tumor-bearing. Chin J Med Imaging Technol, 2005, 21(11): 1663-1666.
- 王荣福, 刘萌, 张春丽, 等. 荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡显像的实验研究. 中国医学影像技术, 2005, 21(11): 1663-1666.
- [10] Luo QY. Imaging modalities for in vivo detection of apoptosis. Chin J Med Imaging Technol, 2004, 20(10): 1620-1623.
- 罗全勇. 活体内探测细胞凋亡的影像学技术. 中国医学影像技术, 2004, 20(10): 1620-1623.

国药文化传播有限公司简介

国药文化传播有限公司系中国医药集团总公司的直属子公司,其前身是国药广告有限公司,成立于 2003 年。是一家致力于医药传播与服务的文化公司,同时也是最早涉足医学媒体传播领域的公司之一,对于医学媒体的运营有着丰富的经验。公司依托中国医药集团强有力的背景支持与资源优势,针对医疗卫生企业(机构)和医师、药师、护理等专业人士提供专业的信息资讯;面向大众传播健康知识;为医药企业提供学术推广、媒体投放、活动策划、大众健康教育传播等专业服务。

2009 年度,我们将致力于《中国医学影像技术》杂志的广告推广活动。欢迎广大医疗医药企业来电来函垂询洽谈。

地址 北京市西城区北三环中路六号伦洋大厦七层 邮编:100120

电话 010-82282308/7

联系人 张学江、陈秋艳