

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -膜连蛋白 V 在下腔静脉 血栓模型家兔体内生物分布

吴大勇, 张文艳, 边艳珠, 胡玉敬

(河北省人民医院 核医学科, 河北 石家庄 050051)

摘要: 观察 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -膜连蛋白 V(Annexin V)在下腔静脉血栓模型家兔体内分布及新鲜与陈旧静脉血栓对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 的摄取。将 15 只家兔随机分为新鲜血栓组、陈旧血栓组及对照组, 每组 5 只。新鲜血栓组与对照组于术后 1 d、陈旧血栓组术后 14 d 注射 4 mCi $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V, 注射 1 h 后处死, 两血栓组取血栓、对照组取对应下腔静脉血管, 另均取血液、头侧下腔静脉、后肢肌肉、胃、心、肺、肝、肾、脾、骨及小肠组织, 称重、测量放射性计数, 计算放射性摄取率(%ID/g), 两血栓组计算血栓与血液、血栓部位下腔静脉血管、头侧下腔静脉血管、肌肉的放射性摄取比。血栓标本行 HE 染色。采用 SPSS17.0 软件对新鲜血栓组与陈旧血栓组结果进行 *t* 检验。结果显示, 新鲜血栓组血栓放射性摄取率为 $(0.01894 \pm 0.00216)\% \text{ID/g}$, 高于陈旧血栓组 $(0.00473 \pm 0.00128)\% \text{ID/g}$, 差异具有统计学意义($t=12.66, P<0.05$)。新鲜血栓组血栓与血液、血栓与血栓部位下腔静脉血管、血栓与头侧下腔静脉血管、血栓与肌肉的放射性摄取比(T/NT)分别为 $3.42 \pm 1.06, 26.32 \pm 13.60, 31.23 \pm 16.00, 111.62 \pm 52.23$, 均高于陈旧血栓组 $(0.98 \pm 0.09, 5.12 \pm 2.01, 6.25 \pm 2.38, 21.82 \pm 5.93)$, 差异有统计学意义(t 分别为 5.14、3.44、3.45、3.82, P 均 <0.05)。新鲜血栓组血栓病理示为新鲜混合血栓, 陈旧血栓组血栓为机化混合血栓。以上结果表明: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 有望应用于急性新鲜静脉血栓显像, 并用于新鲜与陈旧静脉血栓的鉴别。

关键词: 膜连蛋白 V; 静脉血栓; 家兔; 体内分布

中图分类号: TL92.3; R817.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7512(2013)03-0170-05

doi: 10.7538/tws.2013.26.03.0170

Study of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V Distribution in Inferior Vena Cava Thrombus Models of Rabbits

WU Da-yong, ZHANG Wen-yan, BIAN Yan-zhu, HU Yu-jing

(Department of nuclear medicine, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: To study $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V distribution in inferior vena cava thrombus models of rabbits and uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V in fresh and old venous thrombus. Rabbits ($n=15$) were randomly grouped into 3 groups (the fresh thrombus group, old thrombus group, and control group). The rabbits of two thrombus groups developed inferior vena cava thrombus models by operations. The control group received sham operation. The fresh thrombus

收稿日期: 2013-03-04; 修回日期: 2013-06-16

基金项目: 河北省卫生厅基金项目(20110223)

作者简介: 吴大勇(1981—), 男, 河北乐亭人, 主治医师, 核医学专业

通信作者: 边艳珠, 主任医师, E-mail: wudayong227@126.com

group and control group rabbits were injected ⁹⁹Tc^m-Annexin V after operating 1d; the old thrombus group 14 d. After 1 h all rabbits were killed by injecting overdose pentobarbital sodium. The thrombus (or the inferior vena cava about 3cm below inferior pole of right kidney level in the control group rabbits), blood, thrombus area inferior vena cava, head lateral inferior vena cava (except the control group), thigh muscle, stomach, myocardium, pulmonary, liver, kidney, spleen, bone and small intestine were obtained from all group rabbits. The ex tissue and blood were weighed and measured by a Well-type detector. The percentage of the injected dose per gram of ex tissue (or blood) was calculated by the above data. The thrombus to blood, thrombus area inferior vena cava, head lateral inferior vena cava and thigh muscle ratios were calculated by percentage of the injected dose per gram of ex tissue (or blood). The test was used to compare the fresh thrombus group and old thrombus group by SPSS 17.0. The percentage of the injected dose per gram of thrombi ($0.01894 \pm 0.00216\%$ ID/g) in the fresh thrombus group was higher than the old thrombus group ($0.00473 \pm 0.00128\%$ ID/g), $P < 0.05$. The thrombus to blood, thrombus area inferior vena cava, head lateral inferior vena cava and muscle ratios ($3.42 \pm 1.06, 26.32 \pm 13.60, 31.23 \pm 16.00, 111.62 \pm 52.23$) in the fresh thrombus group were higher than the old thrombus group ($0.98 \pm 0.09, 5.12 \pm 2.01, 6.25 \pm 2.38, 21.82 \pm 5.93$), $P < 0.05$ for all. All the thrombi of the fresh thrombus group were confirmed fresh mixed thrombi by Hematoxylin-eosin stains. All the thrombi of the old thrombus group were confirmed old mixed organized thrombi by Hematoxylin-eosin stains. ⁹⁹Tc^m-Annexin V may be used to venous thrombus imaging and discriminate fresh venous thrombus from old one by imaging.

Key words: Annexin V; venous thrombosis; rabbits; distribution in vivo

深静脉血栓形成(deep venous thrombosis, DVT)是导致肺动脉血栓栓塞(pulmonary thromboembolism, PTE)的主要原因, 51%~71%下肢 DVT 患者可能发生 PTE^[1]。DVT 的影像诊断主要依靠超声检查, 而超声检查不能分辨新鲜与陈旧静脉血栓, 因此存在明显的不足^[2]。

急性新鲜血栓中血小板活化后膜表面暴露带负电荷磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS), 膜连蛋白 V(Annexin V)依赖钙离子能够特异的与 PS 结合, 具有纳摩尔级的亲和力^[3]。

PTE 误诊率、病死率高, 西方国家 DVT 和 PTE 的年发病率分别为 0.1% 和 0.05%^[4]。急性静脉血栓主要为新鲜混合血栓, 其中混合血栓内的白色血栓部分富含活化血小板, 而形成时间较长的静脉陈旧混合血栓, 多发生机化血栓活化血小板明显减少^[5]。新鲜静脉血栓较陈旧机化血栓脱落风险更大, 二者的鉴别对制定临床治疗计划具有关键意义^[6]。

根据与活化血小板结合的靶位点不同, 血栓活化血小板显像剂主要分为与 GPIIb/IIIa 受体结合、与 P-选择素结合、与 PS 结合三类^[7]。与

GPIIb/IIIa 受体结合的显像剂研究较多^[8-11], ⁹⁹Tc^m-P280 已被美国 FDA 批准应用于临床急性下肢血栓显像。但多肽制备成本高, 价格昂贵, 其应用受到一定限制。季顺东^[12]、吴锦昌^[13]、方纬^[14]等利用⁹⁹Tc^m 标记国内自行研制的 P-选择素单克隆抗体 SZ-51 成功对新鲜动脉、下肢深静脉及肺动脉血栓显像, 但单克隆抗体相对分子质量较大, 血液清除较慢, 显像中本底较高, 图像质量亦受到一定影响。

与 PS 结合的显像剂主要为放射性核素标记 Annexin V, 已有关于⁹⁹Tc^m-Annexin V 对急性左房血栓^[15]、腹主动脉瘤附壁血栓^[16]、感染性心内膜炎血栓性赘生物^[17]、新鲜动脉血栓^[18-20]显像研究的报道。Rouzet F 等^[17]实验中观察到在制备感染性心内膜炎动物模型过程中, 因导管损伤上腔静脉内壁形成的静脉血栓摄取⁹⁹Tc^m-Annexin V 以及肺内栓子摄取⁹⁹Tc^m-Annexin V, 这也为⁹⁹Tc^m-Annexin V 静脉血栓显像及肺动脉栓塞血栓显像提供了依据。

本实验拟研究⁹⁹Tc^m-Annexin V 在下腔静脉血栓模型家兔的体内分布, 并对新鲜与陈旧静脉血栓对⁹⁹Tc^m-Annexin V 的摄取情况进行分析。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

ZD-6000 井型 γ 计数仪:西安志达公司产品;钼铯发生器:北京原子高科股份有限公司产品;Annexin V(Bender Medsystems 公司)、氯化亚锡:分析纯,天津市化学试剂三厂产品;新华 1 号滤纸:北京师范大学化学学院惠赠;丙酮:分析纯,天津市富宇精细化工有限公司产品;柠檬酸、柠檬酸钠:分析纯,天津市博迪化工股份有限公司产品;葡萄糖:分析纯,天津市百世化工有限公司产品;酒石酸钾钠:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司产品。

1.2 实验动物

新西兰家兔:15 只,雌雄不拘,体重 2.0~2.5 kg,购自河北医科大学实验动物中心,合格证编号为 1009032。

2 实验方 法

2.1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 制备

取柠檬酸 0.48 g、柠檬酸钠 1.32 g、葡萄糖 1.47 g,置于烧杯中加 100 mL 蒸馏水,搅拌至充分溶解,制备柠檬酸葡萄糖溶液(ACD)待用。参照文献[21]取一洁净反应瓶,加入 Annexin V 30 μg 、ACD 溶液 500 μL 、酒石酸钾钠溶液(10 g/L) 100 μL 、 SnCl_2/HCl 溶液(2 g/L) 10 μL ,摇匀,充分反应,2~4 $^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏 20 min,加入高锝酸钠溶液 1 mL(1 110 GBq/L),室温下反应 20 min,完成标记。利用新华 1 号滤纸为固定相、丙酮做展开剂,测定 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 的 R_f ,测定 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 标记率,室温下及 37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱保存 1、2、3、4、5 及 8 h 的放化纯度。

2.2 下腔静脉血栓模型家兔的建立

3%戊巴比妥钠 1~1.3 mL/kg 耳缘静脉注射麻醉后固定于手术台,右侧腹备皮,沿腹直肌右外侧线切开皮肤 4~6 cm 切口,逐层钝性分离腹壁肌肉、腹膜,入腹腔后钝性分离后腹膜,暴露右肾下极水平以远约 4 cm 长下腔静脉,将长约 3 cm 自制单股螺旋铜丝向心方向穿刺入下腔静脉留置,缝合血管,止血,观察下腔静脉回流通畅后回纳肠管,逐层缝合腹膜、肌肉、皮肤。家兔术后清洁环境饲养。

2.3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 的家兔体内分布

将 15 只实验兔随机分为新鲜血栓组、陈旧血栓组及对照组,每组 5 只。前两组建立下腔静

脉血栓模型,对照组与血栓组进行相同的手术过程,但未在下腔静脉内置入螺旋铜丝。新鲜血栓组与对照组于术后 1 d 进行体内分布实验,陈旧血栓组于术后 14 d 进行体内分布实验。

各组实验兔均经耳缘静脉注射 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 4 mCi,于注射 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 1 h 后均经耳缘静脉注射过量戊巴比妥钠处死,分离组织、血栓,计算放射性摄取率。新鲜血栓组和陈旧血栓组分别取血栓、血液、血栓部位下腔静脉血管、头侧下腔静脉血管、后肢肌肉、胃、心、肺、肝、肾、脾、骨及小肠组织;对照组取对应组织。将上述所取组织生理盐水冲洗干净,纱布粘干,测所取各组织及血液放射性计数并准确称重,计算所取标本的放射性摄取率(%ID/g)。计算两血栓组血栓分别与血液、血栓部位下腔静脉血管、头侧下腔静脉血管、肌肉的放射性摄取比(T/NT)。

2.4 病理检查

两血栓组血栓称重及测量放射性计数完毕后,立即置于福尔马林固定液中。将所留存血栓标本进行 HE 染色确定血栓病理特征。

2.5 统计学分析

正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,对所得数据进行统计学分析,当方差齐时新鲜血栓组所得数据与陈旧血栓组数据进行两独立样本 t 检验,当方差不齐时行近似 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 标记

测定 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 的 R_f 为 0.1。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 标记率为 98%,室温下及标记后 37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴箱保存 4 h 内放化纯度均高于 95%,8 h 放化纯度仍大于 90%,标记物体外稳定性良好。

3.2 病理检查

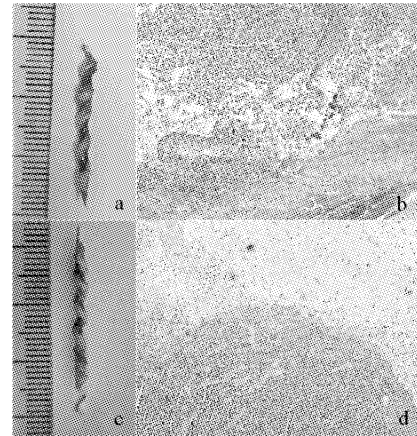
新鲜与陈旧血栓组血栓及病理图示于图 1。新鲜血栓组实验兔解剖后下腔静脉内肉眼均可见血栓形成,血栓沿螺旋铜丝红白相间或以白色为主。陈旧血栓组解剖后肉眼亦均可见血栓形成,血栓沿螺旋铜丝红白相间;对照组解剖后下腔静脉内未见血栓形成,下腔静脉回流通畅。新鲜血栓组、陈旧血栓组实验兔血栓重量分别为(0.058 \pm 0.013)g 和(0.088 \pm 0.064)g。

3.3 ⁹⁹Tc^m-Annexin V 的家兔体内分布

⁹⁹Tc^m-Annexin V 在家兔体内分布结果列于表 1。新鲜血栓组、陈旧血栓组血栓放射性摄取率分别为 (0.018 94 ± 0.002 16)% ID/g、(0.004 73 ± 0.001 28)% ID/g。新鲜血栓组血栓放射性摄取率与陈旧血栓组进行两样本 *t* 检验,结果差异有统计学意义 (*t* = 12.66, *P* < 0.05)。新鲜血栓组血栓与血液、血栓与血栓部位下腔静脉血管、血栓与头侧下腔静脉血管、血栓与肌肉的 T/NT 分别为 3.42 ± 1.06、26.32 ± 13.60、31.23 ± 16.00、111.62 ± 52.23,高于陈旧血栓组:0.98 ± 0.09、5.12 ± 2.01、6.25 ± 2.38、21.82 ± 5.93,两组数据分别进行两样本 *t* 检验,结果差异有统计学意义 (*t* 分别为 5.14、3.44、3.45、3.82, *P* < 0.05)。

新鲜血栓组血栓病理证实均为新鲜混合血栓,镜下见淡红色珊瑚状血小板小梁,小梁间纤维素网内包含红细胞,小梁边缘有较多中性粒细胞粘附(见图 1a);陈旧血栓组血栓病理证实均为陈旧机化混合血栓,镜下见珊瑚状血小板小梁,小梁间隙可见多量内皮细胞分化趋势细胞,小梁间纤维素网内包含少量红细胞及较多附着的中性粒细胞,呈机化表现(见图 1c)。新鲜的静脉血栓较陈旧静脉血栓含有更多的活化血小板,⁹⁹Tc^m-Annexin V 的体内分布数据反映了这一生理特性。新鲜血栓组血栓与血液的放射性

摄取比为 3.42 ± 1.06,由数据推测利用⁹⁹Tc^m-Annexin V 显像,能够获得较清晰的图像。但三组实验兔血液放射性摄取率相对较高,可能显像本底会相对较高。



a——新鲜血栓组血栓照片,血栓沿螺旋铜丝附着;
b——病理(HE 染色,放大 40 倍),显示为新鲜混合血栓,白色血栓与红色血栓间或存在;
c——陈旧血栓照片,血栓沿螺旋铜丝附着;
d——病理(HE 染色,放大 40 倍),显示为陈旧机化混合血栓,血栓小梁间隙可见多量血管内皮细胞分化趋势细胞,呈机化表现。

图 1 新鲜与陈旧血栓组血栓及病理图

Fig. 1 The thrombi of the fresh and old thrombus groups and the pathological section by Hematoxylin-eosin stains:

表 1 ⁹⁹Tc^m-Annexin V 在家兔体内分布结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 1 ⁹⁹Tc^m-Annexin V biodistribution data ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组织	各组放射性摄取率/(%ID · g ⁻¹)		
	新鲜血栓组	陈旧血栓组	对照组
血栓	0.018 94 ± 0.002 16	0.004 73 ± 0.001 28	
血液	0.005 81 ± 0.001 17	0.004 77 ± 0.000 92	0.005 92 ± 0.002 20
血栓部位下腔静脉	0.000 78 ± 0.000 33	0.000 98 ± 0.000 26	0.001 07 ± 0.000 34
头侧下腔静脉	0.000 69 ± 0.000 24	0.000 81 ± 0.000 24	
肌肉	0.000 19 ± 0.000 06	0.000 22 ± 0.000 05	0.000 23 ± 0.000 04
肝	0.012 94 ± 0.006 09	0.006 88 ± 0.005 94	0.010 47 ± 0.008 16
肾	0.977 71 ± 0.367 38	0.855 81 ± 0.415 47	0.742 72 ± 0.423 76
脾脏	0.000 90 ± 0.000 34	0.001 02 ± 0.000 45	0.001 08 ± 0.000 54
胃	0.001 08 ± 0.000 52	0.001 04 ± 0.000 51	0.001 00 ± 0.000 69
骨	0.000 70 ± 0.000 25	0.001 28 ± 0.001 84	0.000 72 ± 0.000 39
心	0.004 15 ± 0.004 77	0.001 11 ± 0.000 45	0.001 54 ± 0.001 04
肺	0.002 39 ± 0.002 15	0.002 04 ± 0.001 55	0.002 18 ± 0.002 29
小肠	0.001 32 ± 0.000 76	0.001 40 ± 0.000 51	0.001 56 ± 0.001 10

4 小结

新鲜静脉血栓对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 的摄取明显高于陈旧静脉血栓,且新鲜血栓组血栓与血液的放射性摄取比较高,通过体内分布数据推断, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 有望应用于新鲜静脉血栓显像,以及鉴别新鲜与陈旧静脉血栓。

参考文献:

- [1] 程显声,何建国. 肺栓塞的流行病学[J]. 中国循环杂志, 1998, 13(2): 65-66.
- [2] Vriens PW, Blankenberg FG, Stoot JH, et al. The use of technetium $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ annexin V for In vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116: 844-853.
- [3] Jaffer FA, Weissleder R. Seeing Within: Molecular Imaging of the Cardiovascular System[J]. Circulation, 2004, 94: 433-445.
- [4] Torbicki A, Van Beek EJ, Charbonnier B, et al. Guidelines on diagnosis and management of acute pulmonary embolism[J]. Eur Heart J, 2000, 21(16): 1 301-1 336.
- [5] Tadataka Hayashi, Hideo Mogami, Yusuke Murakami, et al. Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo[J]. Pflugers Arch-Eur J Physiol, 2008, 456:1 239-1 251.
- [6] 李小强,王深明. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南(第2版)[J]. 中华外科杂志, 2012, 50(7): 611-614.
- [7] 吴大勇,边艳珠. 血栓活化血小板放射性核素显像研究进展[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(12): 58-61.
- [8] 何嘉,方纬,王峰,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DMP444 肺动脉血栓与下肢深静脉血栓显像的实验研究[J]. 中华核医学与分子显像杂志, 2012, 32(1): 59-62.
- [9] Lister-James J, Vallabhajosula S, Moyer BR, et al. Pre-Clinical Evaluation of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ Platelet Receptor Binding Peptide [J]. J Nucl Med, 1997, 38: 105-111.
- [10] Knight LC, Maurer AH, Romano JE. Comparison of ^{123}I Disintegrins for Imaging Thrombi and Emboli in a Canine Model[J]. J Nucl Med, 1996, 37: 476-482.
- [11] Knight LC, Baidoo KE, Romano JE, et al. Imaging Pulmonary Emboli and Deep Venous Thrombi with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Bitistatin, a Platelet Binding Polypeptide from Viper Venom[J]. J Nucl Med, 2000, 41:1 056-1 064.
- [12] Ji S, Fang W, Zhu M, et al. Detection of pulmonary embolism with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -labeled F(ab)2 fragment of anti-P-selectin monoclonal antibody in dogs[J]. Tohoku J Exp Med, 2011, 223(1): 9-15.
- [13] 吴锦昌,何广仁,阮长耿,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 抗人活化血小板单克隆抗体 SZ51 对狗动、静脉血栓的放免显像研究[J]. 中华核医学杂志, 1994, 14: 35-37.
- [14] 方纬,季顺东,刘秀杰,等. 肺动脉血栓放射免疫显像实验研究[J]. 中华核医学杂志, 2002, 22(3): 188-190.
- [15] Stratton JR, Dewhurst TA, Kasina S, et al. Selective Uptake of Radiolabeled Annexin V on Acute Porcine Left Atrial Thrombi[J]. Circulation, 1995, 92: 3 113-3 121.
- [16] Sarda-Mantel L, Coutard M, Rouzet F, et al. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V Functional Imaging of Luminal Thrombus Activity in Abdominal Aortic Aneurysms[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26: 2 153-2 159.
- [17] Rouzet F, Hernandez MD, Hervatin F, et al. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ Technetium Labeled Annexin V Scintigraphy of Platelet Activation in Vegetations of Experimental Endocarditis[J]. Circulation, 2008, 117: 781-789.
- [18] 贾支俊,申景涛,郭万华,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标重组 H₂ Annexin V 在动物血栓显像中的研究[J]. 中华核医学杂志, 2007, 27(5): 291-294.
- [19] Tait JF, Cerqueira MD, Dewhurst TA, et al. Evaluation of annexin V as a platelet-directed thrombus targeting agent[J]. Thromb Res, 1994, 75: 491-501.
- [20] 吕中伟,朱承谟,李彪,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin V 血栓显像及其体内分布的初步实验研究[J]. 上海医学影像杂志, 2000, 9(3): 137-139.
- [21] Zhu L, Liu BL, Guo YZ. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ direct labeling of Annexin V for potential apoptosis imaging in vivo (Abstract) [J]. J Labelled Comp Radiopharm, 2003, 46(1): S324.