

^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗在急性心肌损伤大鼠模型中的生物学分布

冯会娟¹, 欧阳伟¹, 胡瑞¹, 刘金华¹, 孙云钢¹, 冼嘉朗¹, 黄柳华¹, 刘磊²

(南方医科大学珠江医院 1.核医学科, 2.心内科, 广东省广州市 510282)

[关键词] 心肌肌钙蛋白 T; 急性心肌损伤; 放射免疫显像; 亲心肌梗塞显像

[摘要] **目的** 研究 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗在急性心肌损伤大鼠模型中的生物学分布。**方法** 先制备 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗和建立急性心肌损伤大鼠模型。本研究分 3 组: 实验组、对照组和空白组, 各组 20 只大鼠。实验组急性心肌损伤大鼠静脉注射 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗 0.3 mCi, 分别于注射后 2、4、8、12 h 时处死(每时间点 5 只), 取血液、肝、脾、肾、肌肉、结肠、肺、心脏, 以计算每克组织放射性计数占总注入计数的百分比(ID%/g)及心/肺比值。对照组(急性心肌损伤大鼠)和空白组(正常心肌大鼠)分别静脉注射 ^{99m}Tc -N-IgG 和 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗 0.3 mCi, 其它处理方法同实验组。**结果** 实验组的 ID%/g 和心/肺比值均较对照组和空白组显著为高, 提示急性损伤心肌对 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗是特异性摄取, 且摄取高峰时间为 4 h。**结论** ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗有望作为亲心肌梗塞显像剂用于诊断急性心肌损伤。

[中图分类号] R332

[文献标识码] A

The Biological Distribution of ^{99m}Tc -anti-cardiac Troponin T Monoclonal Antibody in the Rats with Acute Myocardial Damage

FENG Hui-Juan¹, OU-YANG Wei¹, HU Rui¹, LIU Jin-Hua¹, SUN Yun-Gang¹, XIAN Jia-Lang¹, HUANG Liu-Hua¹, and LIU Lei²

(1. Department of Nuclear Medicine, 2. Department of Cardiology, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

[KEY WORDS] Myocardium Calcium Protein T; Acute Myocardial Damage; Radioimmunoimaging; Infarct Avid Imaging

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the biological distribution of ^{99m}Tc -anti-cardiac troponin T monoclonal antibody (^{99m}Tc -AcTnTMA) in the rats with acute myocardial damage. **Methods** Prepared ^{99m}Tc -AcTnTMA and built the rat model of acute cardiac muscle damage. Then 60 rats were randomized into the experimental group, the control group and the blank group. There are twenty rats in one group. In the experimental group, 20 rats with acute myocardial damage were injected with 0.3 mCi ^{99m}Tc -AcTnTMA and were killed at 2, 4, 8 and 12 h after injection respectively (5 rats). Blood, liver, spleen, kidney, muscle, colon, lung and heart of each rat were taken and the injected dosage (ID%/g) and the ratio of ID%/g for heart-to-lung ratio (HLR) was calculated. In the control group and the blank group, 20 rats with acute myocardial damage were injected with 0.3 mCi ^{99m}Tc -N-IgG and ^{99m}Tc -AcTnTMA respectively and were killed and followed subsequent procedure in the same way as the experimental group. **Results** The value of ID%/g and HLR in the experimental group were significantly higher than the other groups, which hinted that acute injury myocardium could uptake specifically the ^{99m}Tc -AcTnTMA and the specific uptake was observed with its peak 4 h after injection. **Conclusion** ^{99m}Tc -AcTnTMA could be a useful tracer of myocardial imaging to diagnose acute myocardial damage.

心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 是心肌的一种特异蛋白, 具有高度器官特异性, 但无种属

[收稿日期] 2011-06-24

[作者简介] 冯会娟, 硕士, 主治医师, 研究方向为分子心脏病学, 电话为 020-62783296, E-mail 为 flhj0403@126.com。通讯作者欧阳伟, 医学硕士, 主任医师, 研究方向为分子心脏病学, 电话为 020-61643473, E-mail 为 oyw88@tom.com。胡瑞, 医学硕士, 医师, 研究方向为分子心脏病学, 电话为 020-62783296, E-mail 为 hrydh@126.com。

特异性^[1,2]。利用抗心肌 cTnT 单克隆抗体(anti-cTnT monoclonal antibody, AcTnTMA)可对各种心肌损伤(如心肌梗塞、心肌炎等)进行血清学检查^[3,4]。但这种血清学检查不能对损伤心肌的范围和程度给予直观的影像学检查。因此,建立一种高特异、高敏感的亲心肌坏死显像方法就显得特别重要。为了给建立亲心肌坏死显像方法提供实验依据,我们研究了^{99m}锝标记 AcTnTMA(^{99m}Tc-AcTnTMA)在急性心肌损伤大鼠模型中的生物学分布规律。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级 SD 大鼠 60 只,雌雄不限,体重 220~300 g,平均 243.3 ± 13.2 g,南方医科大学实验动物中心提供。分笼用标准饲料饲养。

1.1.2 主要实验试剂和仪器 人 AcTnTMA 由南方医科大学珠江医院心内科制备^[1]。非特异性免疫球蛋白(N-IgG)为正常鼠 IgG。N-IgG、二氯化锡溶液、^{99m}锝淋洗液均由广州原子高科同位素有限公司提供。RM-905a 活度计购自北京恒昌高科科学技术有限公司。双道放免 γ 计数仪购自科大创新股份有限公司中佳分公司。G50 型 Sephadex 葡萄糖凝胶柱购自上海摩速科学器材有限公司;Mini-Scan 型放射 TLC 薄层扫描仪购自西安志达科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗的制备和稳定性检测 参照文献方法^[5,6],采用直接法对 AcTnTMA 进行^{99m}锝标记,方法如下:取 AcTnTMA(5 g/L)1 mL,经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)稀释后加入 2-巯基乙醇,30 min 后经过 G50 型 Sephadex 葡萄糖凝胶柱,然后加入 40 μ g 的二氯化锡溶液,收集蛋白峰,再加入 74 MBq 的^{99m}锝淋洗液,30 min 后用新华 I 号滤纸进行层析,用薄层扫描仪系统进行扫描分析,得到标记率大于 99%。将标记物在室温下放置 6 h,标记率仍达 96% 以上。^{99m}Tc-N-IgG 的方法同^{99m}Tc-AcTnTMA 的方法。

1.2.2 大鼠心肌坏死模型的制备及实验分组

参照文献方法^[3,7],建立大鼠急性心肌损伤模型。给大鼠皮下注射异丙肾上腺素(4 mg/kg),4 h 后开始分为实验组和对照组,观察 2~12 h,所有大鼠杀死后取部分左心室心肌用 10% 甲醛固定,常规石蜡

切片,HE 染色后行病理检查。

将 40 只大鼠随机分为 2 组:(1)实验组 20 只,由尾静脉注射^{99m}Tc-AcTnTMA 0.3 mCi,在注射后 2、4、8、12 h 分别处死大鼠,每个时相 5 只。取血液、肝、脾、肾、结肠、正常肌肉、肺、心脏并称重,用 γ 计数仪测量各组织或器官的放射性计数(injected dosage, ID)并计算每克组织计数占总注射计数的百分比(ID%/g)及心/肺 ID%/g[心/肺比值(heart-to-lung ratio, HLR)];(2)对照组 20 只,由尾静脉注射^{99m}Tc-N-IgG 0.3 mCi,其它过程同实验组。另设空白组 20 只,不注射异丙肾上腺素,只注射生理盐水 10 mL/kg,4 h 后由尾静脉注射^{99m}Tc-AcTnTMA 0.3 mCi。其它过程同实验组。

1.3 统计学处理

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据用 SPSS 10.1 统计软件处理,组内的前后比较用配对 *t* 检验,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性心肌损伤模型的病理改变

实验组和对照组大鼠心肌病理检查均显示心肌内出现纤维断裂、胞核变形和间质内炎症细胞浸润、水肿等弥漫性病理改变,提示急性心肌损伤模型的建立是成功的。而空白组大鼠心肌病理检查心肌纤维排列整齐,胞浆染色均匀,胞核大小形态正常。

2.2 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗在不同时相上在正常大鼠脏器中的分布

结果显示,肾脏放射性最高,肝脏次之;肌肉和肠道摄取最少。这说明^{99m}Tc-AcTnTMA 主要从肾排泄,与骨骼肌和平滑肌无交叉免疫性(表 1)。

2.3 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单抗在不同时相上在心肌损伤大鼠脏器中的分布

除心脏外,其它放射性分布与正常大鼠分布相近。心脏放射性摄取在 4 h 达高峰,8 h 仍摄取较多,12 h 明显降低。4 h 较 2 h 和 12 h 为高($P < 0.01$),与 8 h 无显著差别($P > 0.05$)(表 2)。

2.4 3 组大鼠在不同时相上心脏 ID%/g 和心/肺 ID%/g 的比较

实验结果显示,实验组的心脏 ID%/g 较对照组和空白组均显著增高($P < 0.01$),实验组的心/肺 ID%/g 比也较对照组和空白组均显著增高($P < 0.01$)(表 3 和表 4)。

表 1. $^{99m}\text{Tc-AcTnTMA}$ 在正常大鼠脏器中的分布Table 1. The biological distribution of $^{99m}\text{Tc-AcTnTMA}$ in the blank groups

脏 器	2 h	4 h	8 h	12 h
肾脏(ID%/g)	34.87 ± 0.53	45.34 ± 0.42	39.22 ± 0.55	30.42 ± 0.35
肝脏(ID%/g)	5.72 ± 0.12	5.37 ± 0.14	5.43 ± 0.21	5.23 ± 0.15
心脏(ID%/g)	2.04 ± 0.08	2.22 ± 0.14	2.14 ± 0.11	1.98 ± 0.10
血液(ID%/g)	3.10 ± 0.12	2.72 ± 0.14	2.29 ± 0.16	2.11 ± 0.15
肺脏(ID%/g)	2.15 ± 0.29	2.10 ± 0.26	2.13 ± 0.25	2.11 ± 0.25
脾脏(ID%/g)	1.35 ± 0.10	1.45 ± 0.11	1.65 ± 0.15	1.32 ± 0.13
肌肉(ID%/g)	0.21 ± 0.04	0.32 ± 0.05	0.29 ± 0.06	0.20 ± 0.05
结肠(ID%/g)	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.06	0.16 ± 0.05

表 2. $^{99m}\text{Tc-AcTnTMA}$ 在心肌损伤大鼠脏器中的分布Table 2. The biological distribution of $^{99m}\text{Tc-AcTnTMA}$ in the rats with acute myocardial damage

脏 器	2 h	4 h	8 h	12 h
肾脏(ID%/g)	36.87 ± 0.56	49.34 ± 0.66	40.27 ± 0.45	32.47 ± 0.39
肝脏(ID%/g)	5.92 ± 0.13	5.67 ± 0.15	5.89 ± 0.25	5.49 ± 0.14
心脏(ID%/g)	3.22 ± 0.17	4.22 ± 0.19	4.02 ± 0.15	3.02 ± 0.12
血液(ID%/g)	3.08 ± 0.13	2.68 ± 0.15	2.38 ± 0.17	2.28 ± 0.14
肺脏(ID%/g)	2.25 ± 0.30	1.65 ± 0.21	1.61 ± 0.21	1.56 ± 0.21
脾脏(ID%/g)	1.75 ± 0.11	1.45 ± 0.13	1.35 ± 0.17	1.25 ± 0.14
肌肉(ID%/g)	0.25 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.30 ± 0.07	0.20 ± 0.04
结肠(ID%/g)	0.14 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.07	0.13 ± 0.06

表 3. 3 组不同时间心脏计数值比较

Table 3. The ID%/g of heart of three groups in the different time

分 组	2 h	4 h	8 h	12 h
实验组(ID%/g)	3.22 ± 0.24 ^a	4.22 ± 0.32 ^{ab}	4.02 ± 0.40 ^{ab}	3.01 ± 0.51 ^a
对照组(ID%/g)	2.22 ± 0.45	2.25 ± 0.36	2.20 ± 0.33	2.16 ± 0.29
空白组(ID%/g)	2.15 ± 0.35	2.22 ± 0.41	2.18 ± 0.37	2.13 ± 0.36

a 为 $P < 0.01$, 与其它组相比; b 为 $P < 0.01$, 与同组 2 h、12 h 相比。

表 4. 3 组不同时间心/肺比值比较

Table 4. The ratio of ID%/g for HLR three groups in the different time

分 组	2 h	4 h	8 h	12 h
实验组(ID%/g)	1.44 ± 0.11 ^a	2.58 ± 0.21 ^{ab}	2.50 ± 0.16 ^{ab}	1.92 ± 0.20 ^a
对照组(ID%/g)	1.03 ± 0.10	1.07 ± 0.60	1.04 ± 0.42	1.02 ± 0.43
空白组(ID%/g)	1.01 ± 0.09	1.05 ± 0.05	1.03 ± 0.05	1.00 ± 0.77

a 为 $P < 0.01$, 与其它组相比; b 为 $P < 0.01$, 与同组 2 h、12 h 相比。

3 讨 论

1976 年 Khaw 等^[8]首次用放射碘标记抗心肌肌凝蛋白抗体用于亲心肌梗塞显像获得了初步成功, 由此开创了心脏放射性免疫显像的新纪元。目前在临床广泛应用的亲心肌梗塞显像剂是¹¹¹钪标记的抗心肌肌凝蛋白单抗^[9]。尽管这种显像剂在心肌梗塞或坏死中的临床诊断价值很高, 但由于¹¹¹钪的半衰期较长, 光子能量高及价格昂贵且不易获得等原因, 限制了其在临床上进一步推广应用。以后虽有

一些学者用^{99m}锝标记抗心肌肌凝蛋白单抗^[6]、¹⁸氟标记抗心肌肌凝蛋白单抗 Fab 片段^[10]、¹³¹碘标记抗心肌肌钙蛋白 I 多抗片段^[11]、^{99m}锝标记抗心肌肌钙蛋白 I 单抗^[12]等作为显像剂进行亲心肌坏死显像, 但均没有推广到临床应用。因此, 有必要开发一种新的亲心肌坏死显像剂。迄今尚没有用^{99m}Tc-AcTnTMA 进行亲心肌坏死显像研究的报道。

心肌肌钙蛋白 T 是存在于心肌中的一种特异蛋白, 具有高度器官特异性, 但无种属特异性^[1,2]。人 AcTnTMA 可以识别各种动物心肌中的 cTnT 抗

原决定簇,其中与大鼠心脏的 cTnT 交叉反应最强,鸡和鱼最弱^[13]。因此,用 SD 大鼠模型来研究人^{99m}Tc-AcTnTMA 的生物学分布是最合适的。

心肌肌钙蛋白 T 约 98% 存在于心肌纤维中,仅 2% 存在于细胞液中,半衰期为 2 h。当心肌损伤后 4 h,血中 cTnT 浓度开始升高,24 h 达高峰,可持续 5~7 天。心肌损伤早期,可只有胞液中的 cTnT 释放,此时血中 cTnT 仅轻度升高,当心肌损伤继续存在,心肌纤维断裂,其中的 cTnT 开始大量释放,残留在心肌纤维中的 cTnT 可为亲心肌坏死显像提供成功的基础。20 世纪末,珠江医院心内科李志梁等^[1,2]在国内首先制备了人 AcTnTMA,并用这种抗体对实验性大鼠心肌缺血损伤成功进行了定位诊断,这为我们进行亲心肌坏死显像提供了实验依据。

β 受体激动剂异丙肾上腺素诱发的实验性大鼠急性心肌损伤坏死在病理上类似于急性心肌梗塞^[3,13,14],因此可作为大鼠急性心肌坏死模型用于亲心肌坏死显像研究。有研究表明,给予一次静脉注射异丙肾上腺素 4 mg/kg 可导致早期快速心肌损伤,并有血中 cTnT 增高^[3],其机理主要由心动过速所致。异丙肾上腺素诱发的大鼠急性心肌损伤坏死的病理特征主要为左室心内膜下和室间隔的坏死、炎症和纤维化。本研究制备的异丙肾上腺素诱发大鼠心肌损伤模型在病理上与上述研究类似,说明该模型的建立是成功的。

Schwarz 等^[5]在 1987 年创立的^{99m}Tc 直接标记单抗方法已被广泛应用。本研究用该方法标记的^{99m}Tc-AcTnTMA 放化纯可达 99%,放置室温稳定性仍较好,说明标记较成功,可用于生物学分布研究。亲心肌坏死显像的关键因素是特异性显像剂能早期聚集病灶和靶/本比要高。研究表明,^{99m}Tc-AcTnTMA 在损伤心肌中的分布明显高于正常心肌,也明显高于^{99m}Tc-N-IgG 在损伤心肌的分布,说明损伤心肌摄取^{99m}Tc-AcTnTMA 为特异性而非炎症反应摄取。本研究还发现,^{99m}Tc-AcTnTMA 在注射后 2 h 血液中的本底较高,4~12 h 均有所降低;心/肺比值在 4 h 达高峰,8 h 仍较高。符合心肌损伤后 cTnT 生物学规律。另外还发现,^{99m}Tc-AcTnTMA 在肌肉和肠道分布很少,提示人 AcTnTMA 与大鼠骨骼肌和平滑肌交叉免疫反应较低。^{99m}Tc-AcTnTMA 在肝脏和肾脏分布一直较高,说明本显像剂可能通过消化和泌尿系统排泄。

总之,^{99m}Tc-AcTnTMA 有望作为亲心肌坏死显像剂用于急性心肌损伤诊断,但下一步需要在大鼠

急性心肌梗塞模型和兔心肌损伤模型中进行进一步验证。

[参考文献]

- [1] 李志梁,傅朝平. 人心肌肌钙蛋白 T 的纯化和单克隆抗体的制备[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(5): 459-462.
- [2] 李志梁,钱洪津. 抗 cTnT 抗体对实验性缺血心肌的定位诊断[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(1): 63-65.
- [3] Bertinchant JP, Robert E, Polge A, et al. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats[J]. Clin Chim Acta, 2000, 298(1-2): 13-28.
- [4] Howie-Esquivel J, White M. Biomarkers in acute cardiovascular disease[J]. J Cardiovascular Nursing, 2008, 23(2): 124-131.
- [5] Schwarz A, Steinstraber A, Hoechst AG, et al. A novel approach to Tc-99m-labeled monoclonal antibodies[J]. J Nucl Med, 1987, 28(5): 721-725.
- [6] 武强,李小鹰,李树森,等. 抗心肌肌凝蛋白轻链单克隆抗体亲大鼠梗死心肌放射免疫显像探讨[J]. 中华老年医学杂志, 2000, 19(1): 48-51.
- [7] Zhang J, Knapton A, Lipshultz SE, et al. Isoproterenol-induced cardiotoxicity in Sprague-Dawley Rats: correlation of reversible and irreversible myocardial injury with release of cardiac troponin T and roles of iNOS in myocardial injury [J]. Toxicologic Pathology, 2008, 36(2): 277-288.
- [8] Khaw BA, Beller GA, Haber E, et al. Localization of cardiac myosin specific antibody in myocardial infarction [J]. J Clin Invest, 1976, 58(2): 439-446.
- [9] Martin ME, Moya-Mur JL, Casanova M, et al. Role of noninvasive antimyosin imaging in infants and children with clinically suspected myocarditis[J]. J Nucl Med, 2004, 45(3): 429-437.
- [10] Zalutsky MR, Garg PK, Johnson SH, et al. Fluorine-18-antimypsin monoclonal antibody fragments: preliminary investigations in a canine myocardial infarct model[J]. J Nucl Med, 1992, 33(4): 575-580.
- [11] Cummins B, Russell GJ, Chandler ST, et al. Uptake of radioiodinated cardiac specific troponin-I antibodies in myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res, 1990, 24(4): 317-327.
- [12] 李建华,王德杭,李殿富,等. ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体在实验性心肌梗死大鼠体内分布的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2007, 27(4): 385-388.
- [13] Herman E, Zhang J, Knapton A, et al. Serum cardiac troponin T as a biomarker for acute myocardial injury induced by low doses of isoproterenol in rats[J]. Cardiovascular Toxicology, 2006, 6(3-4): 211-221.
- [14] Brady S, York M, Scudamore C, et al. Cardiac troponin I in isoproterenol-induced cardiac injury in the Hanover Wistar rat: studies on low dose levels and routes of administration[J]. Toxicologic Pathology, 2010, 38(2): 287-291.

(此文编辑 曾学清)