

^{99m}Tc 标记抗心肌钙蛋白 T 单抗 Fab 片段在 SD 大鼠急性心肌梗死模型中的生物学分布

欧阳伟¹, 吴菊清¹, 冯会娟¹, 孙云钢¹, 冼嘉朗¹, 黄柳华¹, 陈盼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] 心肌钙蛋白 T; 急性心肌梗死; 放射免疫显像; 亲心肌梗死显像

[摘要] **目的** 研究 ^{99m}Tc 标记抗心肌钙蛋白 T 单抗片段(^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab)在急性心肌梗死大鼠模型中的生物学分布规律。**方法** 先制备 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 和 ^{99m}Tc -AcTnTMA, 并建立急性心肌梗死大鼠模型。本研究分为实验组、对照组和空白组, 每组 20 只大鼠。实验组急性心肌梗死大鼠静脉注射 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 0.3 mCi, 分别于注射后 2 h、4 h、8 h、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射计数的百分比(ID%/g)及梗死心肌 ID%/g/肺 ID%/g 比(HLR)。对照组急性心肌梗死大鼠和空白组正常心肌大鼠分别静脉注射 ^{99m}Tc -AcTnTMA 和 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 0.3 mCi, 其它处理方法同实验组。**结果** 实验组和对照组的 ID%/g 和 HLR 均较空白组显著为高, 提示急性梗死心肌对 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 和 ^{99m}Tc -AcTnTMA 的摄取均是特异的, 且实验组的 ID%/g 和 HLR 较对照组显著为高, 提示 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 摄取能力更强。**结论** ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 有望作为亲心肌梗死显像剂用于诊断急性心肌梗死。

[中图分类号] R81

[文献标识码] A

Biological Distribution of ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab in the SD Rats with Acute Myocardial Infarction

OU-YANG Wei¹, WU Ju-Qing¹, FENG Hui-Juan¹, SUN Yun-Gang¹, XIAN Jia-Lang¹, HUANG Liu-Hua¹, CHEN Pan¹, 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 Infarction; Radioimmunoimaging; Infarct Avid Imaging

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the biological distribution of ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab in the SD rats with acute myocardial infarction. **Methods** ^{99m}Tc -AcTnTMA was prepared and the rat model of acute myocardial infarction was built. Then 60 rats were randomized into experimental group, control group and blank group. There were twenty rats in each group. In the experimental group, 20 rats with acute myocardial infarction were injected with 0.3 mCi ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab and were killed 2 h, 4 h, 8 h 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 (HLR) was calculated. In the control group, 20 rats with acute myocardial infarction were injected with 0.3 mCi ^{99m}Tc -AcTnTMA and were killed with subsequent procedure in the same way as the experimental group. In the blank group, 20 normal rats were injected with 0.3 mCi ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab and were killed with subsequent procedure in the same way as the experimental group. **Results** The value of ID%/g and HLR in the experimental group and the control group were significant higher than those in the blank group, which hinted that acute myocardial infarction could uptake specifically the ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab and ^{99m}Tc -AcTnTMA. The value of ID%/g and HLR in the experimental group was

[收稿日期] 2013-04-27

[基金项目] 广东省科技计划项目资助(2009B030801207)

[作者简介] 欧阳伟, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为分子心脏病学, E-mail 为 oyw88@tom.com。吴菊清, 硕士研究生, 研究方向为分子心脏病学, E-mail 为 wu_juqing@126.com。冯会娟, 硕士, 主治医师, 研究方向为分子心脏病学, E-mail 为 fhj0403@126.com。

significant higher than those in the control group, which hinted that infarction tissue uptake of ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab was more than ^{99m}Tc -AcTnTMA. **Conclusions** ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab could be a useful tracer of myocardial imaging to diagnose acute myocardial infarction.

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是临床常见的心血管急症, 在我国其发病率呈上升趋势。为了能直观研究心肌梗死的部位和范围, 我们拟建立一种高特异、高敏感的亲心肌梗死显像方法。我们先前的研究表明, 用 ^{99m}Tc 标记抗心肌肌钙蛋白 T 单克隆抗体 (^{99m}Tc -AcTnTMA) 对异丙肾上腺素所致的急性心肌损伤有特异的亲合力^[1]。因为单抗 Fab 片段与全抗相比, 具有分子量小, 血液清除速度快, 组织穿透力强, 免疫原性弱, 特异性结合能力强等特点, 所以用 ^{99m}Tc 标记抗体的 Fab 片段进行放射免疫显像是目前研究的趋势^[2]。为了给建立亲心肌梗死显像方法提供进一步的实验依据, 我们比较了 ^{99m}Tc 标记 AcTnTMA Fab 片段 (^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab) 和 ^{99m}Tc -AcTnTMA 在 AMI SD 大鼠模型中的生物学分布规律。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雌雄不限, 体重 216 ~ 303 g, 平均 246.1 ± 12.9 g, 由南方医科大学实验动物中心提供。分笼用标准食料饲养。

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^[3]; 2-巯基乙醇 (2-ME) 和葡庚糖酸钠 (GH) 为 Sigma 公司产品; 二氯化锡溶液、 ^{99m}Tc 淋洗液由广州原子高科同位素有限公司提供; 其它试剂为国产分析纯试剂。RM-905a 活度计购自北京恒昌高科技有限公司; 双道放免 γ 计数器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。

1.3 ^{99m}Tc -AcTnTMA 和 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 的制备及稳定性检测

参照文献^[1, 4, 5], 采用胃蛋白酶法将抗体 AcTnTMA 切割成抗体片段 F(ab)₂。抗体片段 F(ab)₂ 经 2-ME 还原获得片段 Fab。反应一定时间后用 Sephadex G50 柱分离, 用电泳法检测还原后 Fab 纯度约为 90%。将纯化后的抗体片段 Fab 分装, 保存于 -70℃ 的低温冰箱中备用。取纯化的抗体片段 Fab 0.6 ~ 1.0 mg (体积 < 1.0 mL), 加入 0.4 ~ 0.8

mg GH 及新鲜配制的 SnCl_2 溶液 5 ~ 10 μg , 再加新鲜淋洗的 $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 淋洗液 3 ~ 5 mCi, 反应 30 ~ 60 min, 最终反应的 pH 为 7.2。30 ~ 60 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 93%。将标记物在室温下放置 6 h, 标记率仍达 90% 以上。 ^{99m}Tc -AcTnTMA 的标记方法同文献^[1]。

1.4 大鼠 AMI 模型的制备及实验分组

将 60 只鼠随机分为实验组、对照组和空白组, 每组 20 只大鼠。实验组、对照组均开胸结扎鼠左冠状动脉前降支, 空白组开胸不结扎冠状动脉。SD 大鼠 AMI 模型参照文献^[6, 7]制备。实验组均为 AMI 大鼠, 由尾静脉注射 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 0.3 mCi, 在注射后 2 h、4 h、8 h、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, 心脏经氯化三苯四唑 (TTC) 染色后, 将梗死心肌与非梗死心肌分开, 用 γ 计数器测量梗死心肌及各组织或器官的放射性计数, 并计算每克组织计数占总注射计数的百分比 (ID%/g) 及梗死心肌 ID%/g/肺 ID%/g 比 (HLR); 对照组均为 AMI 大鼠, 由尾静脉注射 ^{99m}Tc -AcTnTMA 0.3 mCi, 其它过程同实验组; 空白组过程同实验组。

1.5 统计学方法

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 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 不同时相上 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 在正常大鼠脏器中的分布

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-Fab 主要从肾排泄, 与骨骼肌和平滑肌无交叉免疫性。另外, ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 在 12 h 时血液活度明显降低 (*P* < 0.01; 表 1)。

2.2 不同时相上 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 和 ^{99m}Tc -AcTnTMA 在 AMI 大鼠脏器中的分布

除 12 h 时 ^{99m}Tc -AcTnTMA-Fab 在血液中的清除较快外, 与 ^{99m}Tc -AcTnTMA 在其它器官和组织放射性分布相近。在肝脏和肾脏分布一直较高, 在肌肉和肠道分布很少 (表 2)。

2.3 不同时相上梗死区 ID%/g 和 HLR 比较

实验组和对照组 ID%/g 和 HLR 均较空白组显著为高($P < 0.01$),实验组 ID%/g 和 HLR 均较对照组显著为高($P < 0.01$;表 3 和表 4)。

表 1. ^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 在正常大鼠脏器中的分布

Table 1. Biological distribution of ^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab in the blank group

项目 (ID%/g)	2 h	4 h	8 h	12 h
肾脏	35.34 ± 0.49	43.12 ± 0.40	38.14 ± 0.55	34.48 ± 0.32
肝脏	5.56 ± 0.14	5.45 ± 0.13	5.47 ± 0.20	5.26 ± 0.16
血液	3.89 ± 0.14	3.69 ± 0.13	2.66 ± 0.17	1.89 ± 0.14 ^a
肺	2.07 ± 0.25	2.03 ± 0.28	2.12 ± 0.23	2.11 ± 0.22
脾脏	1.31 ± 0.09	1.40 ± 0.13	1.61 ± 0.13	1.36 ± 0.14
肌肉	0.24 ± 0.05	0.30 ± 0.06	0.34 ± 0.05	0.26 ± 0.06
结肠	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.03

a 为 $P < 0.01$,与 2 h 和 4 h 时相比。

表 2. ^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 和 ^{99m}Tc-AcTnTMA 在急性心肌梗死大鼠脏器中的分布

Table 2. Biological distribution of ^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab and ^{99m}Tc-AcTnTMA in the rats with acute myocardial infarction

项目 (ID%/g)	2 h		4 h		8 h		12 h	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
肾脏	38.86 ± 0.52	37.45 ± 0.50	49.32 ± 0.64	47.31 ± 0.63	40.27 ± 0.45	38.21 ± 0.43	33.43 ± 0.37	31.43 ± 0.36
肝脏	5.67 ± 0.13	5.45 ± 0.13	5.89 ± 0.16	5.23 ± 0.15	5.12 ± 0.23	5.56 ± 0.25	5.23 ± 0.14	5.34 ± 0.14
血液	3.78 ± 0.15	3.90 ± 0.13	3.68 ± 0.15	3.79 ± 0.15	2.56 ± 0.16	2.90 ± 0.16	1.86 ± 0.14 ^a	2.78 ± 0.13
肺	2.10 ± 0.30	2.31 ± 0.30	2.03 ± 0.20	2.12 ± 0.21	2.05 ± 0.20	2.06 ± 0.21	2.03 ± 0.20	2.05 ± 0.22
脾脏	1.69 ± 0.11	1.72 ± 0.11	1.40 ± 0.12	1.46 ± 0.13	1.39 ± 0.17	1.41 ± 0.16	1.32 ± 0.13	1.39 ± 0.14
肌肉	0.27 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.32 ± 0.06	0.34 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.03
结肠	0.14 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.15 ± 0.07	0.16 ± 0.07	0.12 ± 0.06	0.14 ± 0.06

a 为 $P < 0.01$,与 12 h 时对照组相比。

表 3. 不同时间梗死心肌计数值比较

Table 3. The ID%/g of infarction zone in the different time

分 组	2 h	4 h	8 h	12 h
实验组	4.89 ± 0.25 ^a	6.56 ± 0.40 ^a	6.98 ± 0.40 ^a	6.56 ± 0.51 ^a
对照组	3.34 ± 0.42 ^b	4.45 ± 0.38 ^b	4.54 ± 0.33 ^b	4.10 ± 0.28 ^b
空白组	2.12 ± 0.32	2.18 ± 0.40	2.23 ± 0.37	2.14 ± 0.37

a 为 $P < 0.01$,与对照组和空白组相比;b 为 $P < 0.01$,与空白组相比。

表 4. 不同时间 HLR 比较

Table 4. Comparison of HLR in the different time

分 组	2 h	4 h	8 h	12 h
实验组	2.32 ± 0.13 ^a	3.23 ± 0.24 ^a	3.40 ± 0.18 ^a	3.23 ± 0.23 ^a
对照组	1.44 ± 0.11 ^b	2.10 ± 0.21 ^b	2.20 ± 0.16 ^b	2.00 ± 0.20 ^b
空白组	1.02 ± 0.08	1.07 ± 0.05	1.05 ± 0.05	1.01 ± 0.77

a 为 $P < 0.01$,与对照组和空白组相比;b 为 $P < 0.01$,与空白组相比。

3 讨 论

AMI 是临床常见的心血管急症,在我国其发病率呈上升趋势。在临床上,AMI 的诊断、定位及坏死范围判断主要依赖于常规 12 导心电图、心肌酶学检查和放射性核素亲心肌梗死显像。虽然心电图结合酶学检查可以准确诊断 AMI^[8],但不能对坏死的位置及范围进行直观准确的判断。因此,有必要开发一种新的亲心肌梗死显像剂。

放射性核素锝(^{99m}Tc)因半衰期短、射线能量适中的核物理特性使其非常适合用于显像,也广泛用于标记各种单克隆抗体进行放射免疫显像研究。全抗的生物半衰期一般都较长,与^{99m}Tc 的物理半衰期不相匹配,而影响了使用。而 Fab 片段具有分子量小,血液清除速度快,组织穿透力强,免疫原性

弱,特异性结合能力强等特点,所以用^{99m}Tc 标记抗体的 Fab 片段进行放射免疫显像是目前研究的趋势。cTnT 是心肌的一种特异蛋白,具有高度器官特异性,但无种属特异性^[1,3],且在心肌梗死的最早期出现。利用^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 进行放射免疫显像,从理论上讲,会是一种高特异、高敏感的亲心肌梗死显像方法。二十世纪末,国内首先制备了人 AcTnTMA^[1,3],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梗死显像提供了实验依据。在此基础上,我们进行了^{99m}Tc-AcTnTMA 在急性心肌损伤大鼠模型中的生物学分布研究^[1],研究中发现^{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 在损伤心肌中的分布,说明损伤心肌摄取^{99m}Tc-AcTnTMA 为特异性而非炎症反应。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,心肌/肺比值在 4 h 达高峰,8 h 仍较高。在此研究的基础上,考虑 Fab 片段分子量小,血液清除速度快,组织穿透力强,特异性结合能力强的特点,我们设计了在 2 h、4 h、8 h、12 h 时相研究^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 片段在在 AMI 鼠模型中的生物学分布,结果证实^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 在注射后 2 h 血液中的本底较高,8 ~ 12 h 血液清除明显,梗死心肌/肺比值在 2 h 即明显升高,高峰持续至 8 ~ 12 h,高峰梗死心肌/肺比值明显大于^{99m}Tc-AcTnTMA 全抗的梗死心肌/肺高峰值。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。本研究表明,^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 较^{99m}Tc-AcTnTMA 全抗能更早期聚集病灶且有较高的靶/本比值,使图像的对比度潜力提高。

另外发现,^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 在肌肉和肠道分布很少,在肝脏和肾脏分布一直较高,说明^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 和^{99m}Tc-AcTnTMA 一样,可能通过消化和泌尿系统排泄。

综上所述,^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 作为亲心肌坏死显像剂与^{99m}Tc-AcTnTMA 全抗比较,其显像时间提前,且靶/本比值明显提高及图像的对比度潜力提高,故^{99m}Tc-AcTnTMA-Fab 可能是一种更理想的亲心肌梗死显像剂,下一步需要在兔心肌梗死模型中进行进一步验证。

[参考文献]

[1] 冯会娟, 欧阳伟, 胡 瑞, 等. ^{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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (3): 235-238.

[2] Möhlmann S, Greven S, Harrenga A, et al. In vitro sorting of an antibody fab fragment: overcoming unproductive reactions of sortase with water and lysine side chains[J]. Chembiochem, 2011, 12 (11): 1 774-780.

[3] 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.

[4] 杨 志, 林保和, 韩 燕, 等. ^{99m}Tc 标记抗癌胚抗原单抗 C50 片段 Fab' 及其生物学分布研究[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32 (6): 536-539.

[5] Kim MK, Jeong HJ, Kao CH, et al. Improved renal clearance and tumor targeting of ^{99m}Tc-labeled anti-Tac monoclonal antibody Fab by chemical modification[J]. Nucl Med Biol, 2002, 29 (2): 139-146.

[6] 欧阳伟, 钱学贤, 李志梁, 等. 内源性降钙素基因相关肽在整体大鼠心肌缺血预适应中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (1): 26-28.

[7] 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.

[8] Moe KT, Wong P. Current trends in diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome[J]. Ann Acad Med Singapore, 2010, 39 (3): 210-215.

(此文编辑 文玉珊)