

利用小动物 SPECT/CT 和^{99m}Tc-葡萄糖二酸 评估急性缺血坏死心肌动物

宝璐尔¹, 张林^{1,2,3}, 周晓慧^{1,2,3}, 孟庆姝^{1,2,3}, 占贞贞^{1,2,3}, 范慧敏^{1,2,3}

(1. 同济大学附属东方医院心脏外科, 上海 200120; 2. 同济大学附属东方医院心衰专科, 上海 200120;
3. 同济大学附属东方医院心衰研究所, 上海 200120)

【摘要】 目的 利用^{99m}Tc-葡萄糖二酸(^{99m}Tc-Glucarate)和小动物 SPECT/CT 评估大鼠急性心肌缺血再灌注损伤后缺血坏死心肌的位置和范围。方法 建立大鼠急性缺血再灌注损伤模型, 手术 1 d 后尾静脉注射^{99m}Tc-Glucarate, 注射 30 min 后利用小动物 SPECT/CT 融合技术分析^{99m}Tc-葡萄糖二酸标记的心肌组织的位置和范围, 并与氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色法标记的缺血坏死心肌比较。结果 小动物 SPECT/CT 结果显示手术组心肌坏死部位的^{99m}Tc-葡萄糖二酸的放射性摄取率(心肝比值 1.90 ± 0.33)明显高于正常组大鼠($P < 0.05$), 利用小动物 SPECT/CT 融合技术定位的缺血坏死心肌范围和 TTC 染色法的测量结果呈线性相关($R^2 = 0.964$)。结论 通过^{99m}Tc-葡萄糖二酸可以特异性地标记急性缺血坏死心肌, 利用小动物 SPECT/CT 融合技术可以无创性地分析急性缺血坏死心肌的位置和范围。

【关键词】 大鼠; 缺血/再灌注损伤; ^{99m}Tc; 葡萄糖二酸; SPECT/CT

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 07-0014-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.007.003

In vivo imaging of ^{99m}Tc-Glucarate-labeled acute necrotic myocardium using microSPECT/CT

BAO Lu-er¹, ZHANG Lin^{1,2,3}, ZHOU Xiao-hui^{1,2,3}, MENG Qing-shu^{1,2,3}, ZHAN Zhen-zhen^{1,2,3}, FAN Hui-min^{1,2,3}

(1. Department of Cardiac Surgery, Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China;

2. Heart Failure department, Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China;

3. Heart Failure Institute, Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China.)

【Abstract】 Objective To evaluate the anatomic localization and size of acute necrotic myocardium in the ischemic-reperused rat hearts using ^{99m}Tc-Glucarate and microSPECT/CT. **Methods** The ischemic-reperused (IR) rat heart models were established by ligating left anterior descending coronary artery for 60 min. ^{99m}Tc-Glucarate was intravenously injected into the rats 24 hours after IR operations. Images were acquired 30 min after administration of ^{99m}Tc-Glucarate using microSPECT/CT. Anatomic localization and size of acute necrotic myocardium were analyzed with microSPECT/CT imaging, and these results were compared to those determined by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. **Results** The microSPECT/CT images showed hot spot accumulations of ^{99m}Tc-Glucarate in IR hearts (the heart-

【基金项目】 国家自然科学基金(81070073, 81273263);上海市医学重点专科(ZK2012A27);上海领军人才(2012 - 053);上海市浦东新区卫生系统领先人才培养计划资助(PKR2011 - 01)。

【作者简介】 宝璐尔(1986 -),男,医学硕士,研究方向:心胸外科, E-mail: walker_7620@sina.com。

【通讯作者】 范慧敏(1964 -),男,主任医师,医学博士,研究方向:心力衰竭治疗, E-mail: frankfan@tongji.edu.cn;张林(1977 -),男,医学博士,研究方向:心血管病治疗, E-mail: zhanglin309@yahoo.com。

to-liver ratio was 1.90 ± 0.33), not in controls ($P < 0.05$). The anatomic localization of ^{99m}Tc -Glucuronate-labeled necrotic myocardium were in correspondence with TTC staining results. The hot spot size was related significantly to necrotic myocardial size determined by TTC staining ($R^2 = 0.964$). **Conclusions** The localization and size of acute necrotic myocardium can be assessed by non-invasive microSPECT/CT imaging with ^{99m}Tc -Glucuronate.

【Key words】 Rats; Ischemic-reperfusion injury; ^{99m}Tc ; Glucuronate; microSPECT/CT

近些年来,急性心肌梗死在世界范围内一直是威胁人类健康的重大疾病,快速而及时地评估急性心梗后的缺血坏死心肌的位置和范围对于治疗心梗和评估预后具有重要意义。葡糖二酸(glucuronate, Glu)是一种存在于哺乳动物体内组织与体液中,由葡萄糖代谢生成的六碳原子的双羧基酸^[1]。Glu易于和具有放射性标记作用的高锝酸盐结合形成 ^{99m}Tc -Glu复合物,一些研究发现 ^{99m}Tc -Glu在急性缺血梗死的心肌组织与坏死的脑组织中会发生聚集,摄取率升高^[2-3]。C. Arteaga等^[4]的研究也发现在用异丙肾上腺素注射18h后可以在大鼠体内心肌的 ^{99m}Tc -Glu摄取率是正常大鼠心肌摄取率的6倍。在人的体内急性梗死后也会出现在梗死区 ^{99m}Tc -Glu聚集现象^[5]。很多的研究都已经证实了 ^{99m}Tc -Glu在缺血坏死的心肌组织中会发生聚集,但是通过SPECT/CT图像融合技术和 ^{99m}Tc -Glu示踪剂是否可以准确地评估急性心梗后缺血坏死心肌的位置和范围大小尚不清楚。本研究在大鼠的心肌缺血/再灌注的动物模型的基础上,通过SPECT/CT图像融合技术分析 ^{99m}Tc -Glu标记的心肌组织的位置和面积,并与TTC染色法的结果进行比较,探讨通过 ^{99m}Tc -Glu和SPECT/CT融合技术来评估急性心梗后缺血坏死心肌的位置和范围大小的可行性和准确性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级Sprague Dawley(SD)雄性大鼠,12周龄,体重 220 ± 15 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供【SCXK(沪)2013-0016】,饲养条件与实验操作均符合科技部与同济大学附属东方医院实验管理委员会的要求。大鼠随机分成手术组($n=6$)和正常组($n=6$),无菌手术在同济大学SPF级动物房进行【SYXK(沪)2009-0022】。

1.2 实验操作

1.2.1 大鼠心肌缺血再灌注模型的制作

1.2.1.1 术前准备

大鼠称重后按体重给予1%戊巴比妥钠(pellto-barbitalum natrium)溶液 $0.4 \sim 0.5$ mL/100g

体重腹腔注射,注射前回抽,确定无回血。待大鼠进入麻醉状态后将其固定在操作台保温板上,保持其温度为 37°C 。

1.2.1.2 辅助呼吸

大鼠颈部去毛后,将皮肤切开后分离气管,用24G静脉留置针的软管部分进行气管插管。呼吸机设置为容量控制模式,潮气量为 $2.5 \sim 3.5$ mL/100g体重,呼吸频率 $60 \sim 70$ 次/min,呼吸比1:1,吸入气体为空气。

1.2.1.3 冠脉左前降支(left anterior descending artery, LAD)结扎和再通

胸腹部去毛消毒后依次剪开皮肤、深、浅筋膜,沿胸大肌肌间隙钝性分离胸大肌、胸小肌,在左肋第3、4肋间钝性分离肋间肌,暴露胸腔,剥离心包膜,在左心耳与右室流出道交界处下方 $1 \sim 2$ mm处进针, $8-0$ 无损伤缝合线进行结扎,可见结扎血管下方心肌组织变苍白。1h后将结扎LAD的缝线去除。

1.2.1.4 关胸,术后处理

逐层缝合后用注射器将胸腔内多余气体抽出,关胸后待大鼠状态稳定后气管拔管,缝合。腹腔注射40万单位青霉素预防感染,术后注意保暖。

1.2.2 显像仪器和方法

IR手术24h后给予大鼠1%戊巴比妥钠(pellto-barbitalum natrium)溶液 $0.4 \sim 0.5$ mL/100g体重腹腔注射麻醉,将 ^{99m}Tc -Glu 2 mCi/只经尾静脉注射入大鼠体内,然后将大鼠放入小动物SPECT/CT(Nanoscan)中进行核素扫描,采集点为 ^{99m}Tc -Glu注射后30 min。

1.2.3 心肌组织TTC染色

将经过小动物SPECT/CT对 ^{99m}Tc -Glu活性扫描的大鼠处死后,取出心脏,生理盐水冲洗后垂直于心脏长轴将心脏切片, $1 \sim 2$ mm厚,将心脏切片置于1g TTC/100 mL磷酸盐缓冲液(pH7.4)溶液中,避光,振荡, 37°C 恒温染色 $15 \sim 20$ min,4%多聚甲醛(PFA)固定10 min后显微镜下拍照。

1.3 主要分析指标

1.3.1 ^{99m}Tc -Glu扫描

于 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 尾静脉注射 30 min 后采集图像,检测 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在大鼠体内的放射性摄取,SPECT 和 CT 三维图像进行同机融合并分析放射性摄取率偏高区的位置和范围大小。

1.3.2 TTC 心肌组织染色

TTC 可与正常组织中的脱氢酶(NADH)反应而呈红色,而坏死组织内脱氢酶活性下降,不能反应,故不会产生变化呈苍白色。因此 TTC 染色被广泛用于区分活性组织和失活组织。TTC 染色后使用 imageJ 软件测量心肌缺血坏死范围。

1.4 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准误,两组间采用 T 检验(T Test)进行比较分析。线性计算公式为 $y = 0.706x + 0.025$ 。

2 结果

2.1 一般情况

手术组与正常组所有大鼠均未出现死亡或其他影响实验结果的因素,实验过程中及结束后大鼠均状态良好,呼吸和心跳平稳。

2.2 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在急性心肌梗后的心肌组织中聚集

正常组可见 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在心脏的摄取率同肝脏无明显差别,心/肝比值为 1.14 ± 0.21 ;IR 手术组可见 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在心脏的摄取率明显高于肝脏,心/肝比值 1.90 ± 0.33 ;手术组心脏 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 摄取率明显高于对照组($P < 0.05$)(图 1,彩插 4 图 2 和图 3)。手术组心肌扫描可见明显摄取率偏高的区域,高摄取率区域位置与被阻断冠脉的血供区域高度吻合(彩插 4 图 2 和图 3)。

2.3 TTC 染色法显示缺血坏死心肌

正常组大鼠心肌组织切片后 TTC 染色可见整体心肌组织为红色,未见白色坏死区域。手术组大鼠心肌组织切片 TTC 染色后可见明显的坏死后显白色区域,坏死区域为被阻断冠脉所供血区域(彩插 4 图 4)。

2.4 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 标记的心肌组织与小动物 SPECT/CT 染色显示的缺血坏死心肌的位置和范围高度吻合

通过小动物 SPECT/CT 融合技术得到的 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 高聚集的心肌组织的位置和 TTC 染色法显示的缺血坏死心肌位置高度一致(彩插 4 图 2,图 3 和图 4)。通过小动物 SPECT/CT 融合技术分析的 $^{99m}\text{Tc-Glu}$

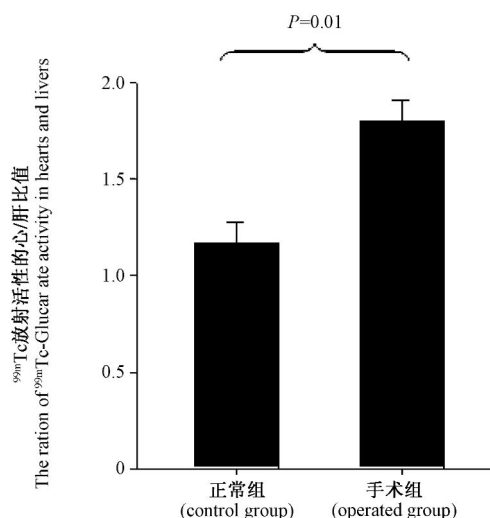


图 1 正常组与手术组 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 放射性摄取的心/肝比值

Fig. 1 The ratio of $^{99m}\text{Tc-Glu}$ activity in hearts and livers of control group and operated group

Glu 高聚集心肌组织的范围为 $30.92 \pm 7.72\%$ 。心肌组织 TTC 染色后测得坏死心肌范围为 $24.42 \pm 5.5\%$ 。两种检测方法测得坏死心肌范围数据无明显差异($P > 0.05$),更重要的是线性相关分析显示两组数据具有统计学意义的线性相关性($R^2 = 0.964$)(图 5)。

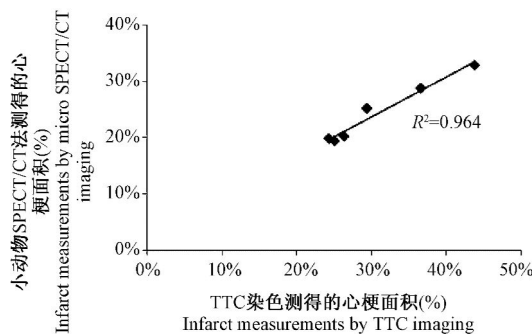


图 5 小动物 SPECT/CT 与 TTC 染色测得坏死心肌范围呈线性相关

Fig. 5 Scatter plot illustrates relationship between infarct measurements by microSPECT/CT imaging of $^{99m}\text{Tc-Glu}$ and TTC staining

3 讨论

在本研究发现 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在急性缺血坏死心肌处特异性聚集,通过小动物 SPECT/CT 技术可以将 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 功能显像和三维心脏 CT 图像融合在一起,从而定位和定量分析 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 高富集的热点区

域,该热点区域与 TTC 染色显示的缺血坏死心肌区域高度吻合。这些结果证实, $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 是优先沉积于急性心肌损伤后的缺血坏死心肌,更重要的是,通过 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 和 SPECT/CT 同机融合技术可以实现无创性、实时性以及定量评估急性心肌损伤的严重程度。

Brian D 等^[6]对 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 显示的缺血坏死的心肌进行了组织化学的分析发现 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 聚集处的心肌细胞绝大部分为坏死细胞,只有少量的细胞为凋亡细胞。David R 等^[7]将大鼠分为了 4 组:对照组,短暂缺血再灌注组(血管阻断 20 min 后再灌注 5 min),低流量再灌注组(心脏保持低灌注状态 4 mL/min 120 min)以及完全缺血再灌注组(120 min 无血流供应后再灌注),结果发现 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 只有在完全缺血再灌注组大鼠的心脏内出现特异性的聚集,证明 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 只有在受到损伤无法恢复而坏死的心肌中特异性的聚集。Zhonglin Liu 等^[8]将大鼠的冠脉左前降支阻断后,对比了心肌不同时间的缺血-再灌注损伤后 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 的聚集情况,发现阻断 90 min 的大鼠心脏 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 富集要明显多于左前降支阻断 30 min 与阻断 60 min 的大鼠。

$^{99m}\text{Tc-Glu}$ 的嗜坏死细胞性与细胞坏死后其中的线粒体结构破坏导致其内的钙离子释放有关,由于其分子量很小,可以迅速的通过细胞膜扩散,所以在组织低血流灌注时也可以与组织细胞进行快速的反应,但是在急性缺血再灌注损伤的早期 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 检测可能并不会会有明显的改变^[4],所以进行 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 检测急性缺血再灌注损伤的时间点选择很重要。Othani, H 等^[9]在对大鼠冠脉左前降支进行结扎后 10 d 内连续注射 $^{99m}\text{Tc-Glu}$,并收集放射性核素在 3 h,24 h,72 h 和 7~10 d 后的图像,结果显示在缺血再灌注后 3 h 的引起的心肌损伤最严重,但是在 24 h 大部分的大鼠心脏组织内有明显的 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 富集,缺血再灌注后 7~10 d 心脏内无明显的 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 富集,这一结果与我们的研究结果相吻合。Khaw, BA 等^[10]认为 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在坏死心肌中的富集以及在血液中可以快速的清除使得心肌与背景的摄取率差异很大,使得 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在心肌坏死部位的富集可以在影像上显现,他们的研究也显示在心肌梗死后 24 h 左右 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 的富集最为明显。Gerald 等^[11]的研究发现在狗的心脏缺血再灌注损伤后 4 h 后,局部组织再灌注维持在最低限度时虽然 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 的摄取率较完全再灌注有一定的延迟,

但是依然可以明确的检测到损伤坏死的心肌,所以说 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 可以用于早期低灌注情况下心肌损伤的检测。但是,关于检查的最佳时间点还需要进一步的研究。

在临床上部分急性心肌梗塞很难诊断,它可能症状不典型,甚至没有胸痛,早期诊断和早期治疗可以挽救受损的心肌和避免不必要的溶栓治疗带来的风险。Strauss, HW 等^[12]以及 Gerson 和 McGoron 等^[13]在人体上的实验研究发现 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 在人体心脏内的聚集在心肌坏死发生后 1 h,但是在影像上表现要有 2~18 h 的延迟,或者在病人情况稳定或者病情得到控制后影像上才会有表现,该方法在临床上的应用还有待进一步研究。

$^{99m}\text{Tc-Glu}$ 的嗜坏死细胞性使得它不仅可以在缺血坏死的心肌与脑组织富集,还可以被用来发现肿瘤性坏死。Perek N 等^[14]在对白血病肿瘤细胞系 U937 进行了体内与体外的实验后发现 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 会在坏死的细胞上富集,明显多于凋亡的细胞以及活细胞。 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 主要聚集在坏死细胞的细胞核碎片上,而在活细胞与凋亡细胞中则主要分布在细胞质与细胞膜上。Gambini JP 等^[15]将人类乳腺癌细胞移植到免疫缺陷小鼠的体内后进行了 SPECT/CT 检测,发现肿瘤区域的 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 摄取率明显高于其他组织。临床试验中,Gambini JP^[16]对 11 例头颈部恶性肿瘤的病人注射 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 后进行 SPECT/CT 检测,发现 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 富集区与其他影像学显示的肿瘤区域相吻合,证明 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 可以作为追踪肿瘤的标志物之一。Partha S 等^[17]对 29 例肺癌和 18 例头颈部的患者进行 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 的 SPECT/CT 检测后发现在目标区域有明显的 $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 聚集。说明无论在实验动物还是人体内, $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 都可以作为一种追踪肿瘤的标志物。

总之, $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 检测急性缺血坏死心肌是一种快捷而简便的检测方式,本研究显示,在大鼠模型实验中, $^{99m}\text{Tc-Glu}$ 的放射性很稳定,并可以特异地在缺血坏死的心肌处聚集,通过 SPECT/CT 融合技术将功能显像和解剖三维图像结合在一起可以无创性地定量分析缺血坏死心肌的位置和范围,该技术有望成为一种临床上早期评估急性缺血坏死心肌的新方法。

参考文献:

- [1] Orlandi C, Crane PD, Edwards DS, *et al.* Early scintigraphic detection of experimental myocardial infarction in dogs with

- technetium-99m-glucaric acid[J]. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 1991, 32(2): 263-268.
- [2] Khaw BA, Nakazawa A, O'Donnell SM, *et al.* Avidity of technetium 99m glucarate for the necrotic myocardium; in vivo and in vitro assessment [J]. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 1997, 4(4):283-290.
- [3] Narula J, Petrov A, Pak KY, *et al.* Very early noninvasive detection of acute experimental nonreperfused myocardial infarction with 99mTc-labeled glucarate[J]. *Circulation* 1997, 95(6):1577-1584.
- [4] Arteaga de Murphy C, Ferro-Flores G, Villanueva-Sanchez O, *et al.* 99mTc-glucarate for detection of isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *International journal of pharmaceutics* 2002, 233(1-2):29-34.
- [5] Mariani G, Villa G, Rossettin PF, *et al.* Detection of acute myocardial infarction by 99mTc-labeled D-glucaric acid imaging in patients with acute chest pain[J]. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 1999, 40(11):1832-1839.
- [6] Wyffels L, Gray BD, Barber C, *et al.* Detection of myocardial ischemia-reperfusion injury using a fluorescent near-infrared zinc (II)-dipicolylamine probe and 99mTc glucarate[J]. *Molecular imaging* 2012, 11(3):187-196.
- [7] Okada DR, Liu Z, Johnson G, *et al.* 99mTc-glucarate kinetics differentiate normal, stunned, hibernating, and nonviable myocardium in a perfused rat heart model[J]. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2010, 37(10):1909-1917.
- [8] Liu Z, Barrett HH, Stevenson GD, *et al.* High-resolution imaging with (99m)Tc-glucarate for assessing myocardial injury in rat heart models exposed to different durations of ischemia with reperfusion [J]. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2004, 45(7):1251-1259.
- [9] Ohtani H, Callahan RJ, Khaw BA, *et al.* Comparison of technetium-99m-glucarate and thallium-201 for the identification of acute myocardial infarction in rats [J]. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 1992, 33(11):1988-1993.
- [10] Khaw BA. The current role of infarct avid imaging [J]. *Seminars in nuclear medicine* 1999, 29(3):259-270.
- [11] Johnson G, 3rd, Okada CC, Hocherman SD, *et al.* (99m)Tc-glucarate imaging for the early detection of infarct in partially reperfused canine myocardium[J]. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2006, 33(3):319-328.
- [12] Strauss HW. Myocardial perfusion imaging: perspectives from a turbulent twenty-five years[J]. *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)* 1996, 40(1):20-26.
- [13] Gerson MC, McGoron AJ. Technetium 99m glucarate: what will be its clinical role? [J]. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 1997, 4(4):336-340.
- [14] Perek N, Sabido O, Le Jeune N, *et al.* Could 99mTc-glucarate be used to evaluate tumour necrosis? In vitro and in vivo studies in leukaemic tumour cell line U937 [J]. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2008, 35(7):1290-1298.
- [15] Gambini JP, Cabral P, Alonso O, *et al.* Evaluation of 99mTc-glucarate as a breast cancer imaging agent in a xenograft animal model [J]. *Nuclear medicine and biology* 2011, 38(2):255-260.
- [16] Gambini JP, Nunez M, Cabral P, *et al.* Evaluation of patients with head and neck cancer by means of 99mTc-glucarate [J]. *Journal of nuclear medicine technology* 2009, 37(4):229-232.
- [17] Choudhury PS, Savio E, Solanki K, *et al.* 99mTc Glucarate as a Potential Radiopharmaceutical Agent for Assessment of Tumor Viability: From Bench to the Bed Side [J]. *World journal of nuclear medicine* 2012, 11(2):47-56.

[修回日期]2014-05-20