

# 新生儿缺氧缺血性脑损伤细胞凋亡及其核素显像 实验研究进展

李剑明 李亚明

**【摘要】** 细胞凋亡在新生儿缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的发病机制中起着独特的作用。动物实验研究表明,运用核素凋亡显像可以探测 HIBD 过程中神经元细胞凋亡情况,提示它在神经元凋亡无创性诊断、治疗评价和预后估计等有着重要的应用前景。

**【关键词】** 细胞凋亡; 新生儿; 缺氧缺血, 脑; 放射性核素显像

**【中图分类号】** R817.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)06-0334-03

## Development of empirical study on apoptosis and its radionuclide imaging in neonatal hypoxic-ischemic brain damage

LI Jian-ming<sup>1</sup>, LI Ya-ming<sup>2</sup>

(1.Department of Nuclear Medicine, The Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; 2.Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

**【Abstract】** Cell apoptosis plays a unique role in pathological mechanism of neonatal hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). Animal empirical studies indicate that radionuclide apoptosis imaging can detect neural apoptosis during HIBD, which predicts that it will have important applications in invasive diagnosis, therapy evaluation and prognosis estimation of neural cell apoptosis in the future.

**【Key words】** Cell apoptosis; Neonatal; Hypoxic-ischemic, Brain; Radionuclide imaging

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是由于新生儿窒息而引起脑血供和气体交换障碍所致的一种全脑性损伤,是严重危害新生儿生命健康的疾病,有较高的发病率和死亡率,也是造成儿童智能低下、脑瘫等神经系统残疾的重要原因之一。据统计,在中、重度新生儿 HIBD 存活者中,有 25%将出现永久性的神经功能障碍<sup>[1]</sup>。近年来,细胞凋亡成为生物学的热点,凋亡也在 HIBD 发病机制中发挥着独特的作用<sup>[2]</sup>,并且由于分子生物学、放射化学及各种诊断设备的飞速发展,使得分子影像学细胞凋亡显像技术在 HIBD 中的应用得以建立、发展和逐步扩大,其中典型代表为膜联蛋白 V (annexin V) 核素凋亡显像,这种以反映组织器官分子功能信息为特长的影像模式在 HIBD 中的研究正逐渐受到临床广泛关注

和重视。本文主要就新生儿 HIBD 细胞凋亡及其核素显像的实验研究进展方面作一综述。

### 1 新生儿 HIBD 细胞凋亡及其证据

近年来越来越多的证据表明,细胞凋亡也参与 HIBD。HIBD 后的细胞死亡可发生在不同的时间阶段,第一阶段是由于急性的能量代谢障碍和衰竭导致细胞内钠、钙升高,细胞水肿,甚至导致细胞破裂,另外,兴奋性氨基酸与氧自由基进一步加重细胞损伤、死亡,可涉及神经元和胶质细胞;第二阶段的细胞死亡主要发生在缺氧缺血数小时之后,仅涉及神经元,因所发生的时间延后,又称为迟发性神经元死亡,这种迟发性死亡即为细胞凋亡<sup>[3]</sup>。

1995 年 Hill 等<sup>[4]</sup>首次用新生大鼠 HIBD 模型,通过 DNA 电泳和原位标记方法发现了皮质、海马、纹状体和丘脑等部位的脑细胞呈 DNA 片段化和阳性标记细胞等凋亡证据。HIBD 的严重程度、持续时间决定了脑组织是通过坏死还是凋亡途径发生损伤,研究表明,新生大鼠 HIBD 迟发性细胞死亡为

作者单位: 1. 110004 沈阳,中国医科大学附属盛京医院核医学科(李剑明); 2. 110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院核医学科(李亚明)

通讯作者: 李亚明(E-mail: ymli2001@163.com)

坏死,持续时间也长于坏死,凋亡存在于缺血中心边缘(相当于缺血半暗区)的内侧,称为亚半暗区,而坏死则集中在缺血灶中心。缺血半暗区处于动态变化之中,其转归或是向脑梗死转化或是向正常脑组织转化,所以,及早中断凋亡有利于减轻HIBD。

## 2 核素凋亡显像与新生儿HIBD

在细胞凋亡发生通路的环节中,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)的外移、caspases活化、线粒体膜通透性变化、细胞膜Fas受体表达及肿瘤坏死因子 $\alpha$ 介导细胞死亡等,均可成为寻找核素凋亡显像剂的切入点,到目前为止,研究关注点大多集中在通过PS外移表达进行核素凋亡显像上,如放射性核素标记的膜联蛋白V(annexin V)细胞凋亡显像正是基于此<sup>[4,6]</sup>。

### 2.1 放射性核素标记annexin V凋亡显像原理

细胞凋亡无论是被内源性还是外源性因素触发后,在凋亡通路caspases级联活化活化后一段时间,细胞才继发形态学改变,而此阶段细胞膜内表面的PS外移至膜表面的变化已很明显,所以PS外移成为细胞凋亡早期阶段的一个敏感信号,并且这种PS的外移是细胞凋亡的一个普遍现象,它与凋亡细胞的细胞类型和诱发细胞凋亡发生的因素无关。正常情况下,PS仅存在于细胞膜的内侧,PS的这种分布是依靠移位酶(translocase)和翻转酶(floppase)所维持的,此两种酶可主动地将PS转移至膜内表面,而caspases活化伴随着移位酶和翻转酶失活,此时膜上爬行酶(scramblase)激活导致PS外移至膜表面,这一过程常在细胞凋亡形态学改变(如胞质聚集、染色质浓缩、DNA断裂和形成凋亡小体等)之前发生,一旦caspases活化和PS外移至膜表面,凋亡执行阶段立即发生。细胞凋亡早期PS外移至细胞膜表面对于某些表达PS受体的吞噬细胞来说可能是细胞识别和清除的信号,但这是一个动态过程,可以为体外探测凋亡提供一个暂时的时间窗<sup>[7]</sup>。细胞凋亡时PS外移暴露于膜表面对于放射性核素显像来讲是一个引人注目的显像靶物质,因此核素凋亡显像多围绕着与PS特异性结合的显像剂来开展,目前较为成熟的是放射性核素标记的annexin V,它是一种人体内源性蛋白,在Ca<sup>2+</sup>存在条件下,annexin V与PS具有高度

的亲和力,二者能够迅速而紧密地结合,所以将放射性核素标记的annexin V通过与细胞凋亡时暴露于膜表面PS结合,从而实现无创性、活体细胞凋亡显像<sup>[8]</sup>。在单光子核素标记的annexin V凋亡显像剂中,以<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-annexin研究最为活跃,被认为是目前最有希望的核素凋亡显像剂。另外,正电子核素标记的annexin V也在深入研究之中,如<sup>18</sup>F标记annexin V采用四步法模块自动合成4-<sup>18</sup>F-fluorobenzoyl-annexin V<sup>[9]</sup>,预计在不久的将来,PET细胞凋亡显像将成为可能。

### 2.2 新生儿HIBD核素凋亡显像的实验研究

新生儿HIBD与脑细胞严重、不可逆的损伤(如梗死、坏死)不同,其细胞凋亡要经历一段时间发展、变化,是脑细胞迟发性死亡的重要形式,这种类型的神经元死亡可能是脑瘫的预兆,而通常脑瘫症状在患儿2~3岁时才逐渐显露,所以应用凋亡显像可以早期判断HIBD患儿是否可能进展为脑瘫<sup>[10]</sup>。迟发性神经元死亡要明显经历一段时间,这就为阻断凋亡级联过程,从而为抑制凋亡进程、挽救神经元细胞提供了可能<sup>[11]</sup>。动物实验研究表明,利用caspases抑制剂、多肽类神经保护因子、粒细胞集落刺激因子、神经干细胞等手段能够抑制细胞凋亡的进展以降低神经元损伤程度<sup>[12-14]</sup>。在动物实验中检测和评价细胞凋亡的方法主要包括细胞形态学观察(光学显微镜、电子显微镜)、核酸凝胶电泳、酶联免疫吸附法、原位脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP-生物素切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)技术、流式细胞分析、细胞凋亡相关基因蛋白检测等,虽然这些技术均较为成熟,但在取材时存在一定的有创性(组织活检),且只能离体观测,所以如何在体外、无创性地在活体上早期判断神经元细胞有无凋亡、监测抑制凋亡治疗是否有效的影像手段显得十分重要和必要。目前影像学研究新生儿HIBD大多集中在MR技术上,而核素凋亡显像报道不多。MR技术包括<sup>31</sup>P和脂质或乳酸<sup>1</sup>H MR波谱分析、弥散加权成像和增强MRI等。在缺氧缺血损伤48 h内无坏死损伤证据时,高能磷酸盐的缺失与脑内海马凋亡神经元直接相关,弥散加权成像通过探测局部水分子弥散障碍,可以早期发现HIBD,尽管弥散与细胞凋亡相关,但这并不是凋亡过程中的直接标志。由于新生儿HIBD存在神

经元细胞凋亡, 而 PS 暴露于细胞膜表面是细胞凋亡的一个早期信号, 并且在 caspase-3 级联反应时开始出现, 早于细胞出现形态学和 DNA 裂解变化之前<sup>[9]</sup>, 所以利用放射性核素标记的 annexin V 能与 PS 特异性结合的原理, 再通过 SPECT 或 PET 探测 annexin V 的分布, 即可获得凋亡显像。Helen 等<sup>[16]</sup>对新生兔 HIBD 模型凋亡显像发现, 正常兔脑内无 annexin V 的摄取, 而所有 HIBD 模型脑内均出现局灶性 annexin V 摄取, 其中小脑摄取最多, 并通过 TUNEL 染色证实凋亡细胞存在, 而 T1、T2 加权 MRI 脑内未出现异常, 从而提示放射性核素标记的 annexin V 显像可以对患儿是否存在发展成为脑瘫的危险性进行筛选和评价。目前, 应用核素凋亡显像技术对新生儿 HIBD 细胞凋亡的药物疗效评价方面还未有动物实验和临床报道, 但据一项脑中风大鼠模型实验研究报道, 应用 <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-annexin V SPECT 不仅能成功探测神经元损伤的部位, 而且可以监测抑制凋亡药物, 如抗 Fas 受体抗体对降低神经元损伤程度的作用效果, 提示它能够评价缺血性大脑损伤的治疗效果, 是一种在临床试验中对相关治疗药物进行筛选有潜在应用前景的无创性手段<sup>[17]</sup>。

### 3 展望

随着分子生物学、其他相关技术的发展和新生儿 HIBD 细胞凋亡分子机制的不断研究, 人们会越来越清楚其内在本质, 并力图通过寻找有效的药物阻断凋亡通路以挽救神经元细胞, 避免和减轻缺氧缺血给患儿造成的损伤及并发症, 从而有效地降低致残率, 极大改善患儿的生活质量。同样, 随着分子影像技术和凋亡显像剂的发展和更新, 可以为临床医师提供实时判断、监测细胞凋亡的无创性影像诊断手段, 届时凋亡显像必将在 HIBD 患儿的细胞凋亡无创性诊断、治疗评价和预后估计等方面发挥更大的作用<sup>[18,19]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Mercuri E, Ricci D, Cowan FM, et al. Head growth in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy: Correlation with neonatal magnetic resonance imaging. *Pediatrics*, 2000, 106(2): 235-243.
- 2 Berger R, Garnier Y. Perinatal brain injury. *J Perinat Med*, 2000, 28(4): 261-285.
- 3 Engidawork E, Chen Y, Dell' Anna E, et al. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral PH and glycolysis metabolism in the rat. *Exp Neurol*, 1997, 145(2): 396-399.
- 4 Hill IE, Macmanus JP, Rasquinha I, et al. DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res*, 1995, 676(2): 398-403.
- 5 Northington FI, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic-ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited?. *Brain Res Rev*, 2005, 50(2): 244-257.
- 6 Jiang L, Ding Y, Tang Y. Relationship between c-fos gene expression and delayed neuronal death in rat neonatal hippocampus following hypoxic-ischemic insult. *Chin Med J (Engl)*, 2001, 114(5): 520-523.
- 7 Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, et al. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*, 2003, 302(5650): 1560-1563.
- 8 Kietselaer BL, Hofstra L, Dumont EA, et al. The role of labeled Annexin A5 in imaging of programmed cell death, from animal to clinical imaging. *Q J Nucl Med*, 2003, 47(4): 349-361.
- 9 Murakami Y, Takamatsu Y, Taki J, et al. <sup>18</sup>F-labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 31(4): 469-474.
- 10 Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest*, 1998, 101(9): 1992-1999.
- 11 Maiese K, Vincent AM. Membrane asymmetry and DNA degradation: functionally distinct determinants of neuronal programmed cell death. *J Neurosci Res*, 2000, 59(4): 568-580.
- 12 Kumral A, Yesilirmak DC, Sonmez U, et al. Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res*, 2006, 1115(1): 169-178.
- 13 Vawda R, Woodbury J, Covey M, et al. Stem cell therapies for perinatal brain injuries. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2007, 12(4): 259-272.
- 14 Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, et al. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res*, 2007, 1145(2): 227-238.
- 15 Yamaji-Hasegawa A, Tsujimoto M. Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(8): 1547-1553.
- 16 D'Arceuil H, Rhine W, de Crespiigny A, et al. <sup>99m</sup>Tc annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury. *Stroke*, 2000, 31(11): 2692-2700.
- 17 Blankenberg FG, Kalinyak J, Liu L, et al. <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-annexin V SPECT imaging of acute stroke and its response to neuroprotective therapy with anti-Fas ligand antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 33(5): 566-574.
- 18 Blankenberg FG, Strauss HW. Will imaging of apoptosis play a role in clinical care? A tale of mice and men. *Apoptosis*, 2001, 6(1): 117-123.
- 19 Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med*, 2005, 46(12): 2035-2050.

(收稿日期: 2007-02-01)