

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 示踪血栓技术在家兔脑卒中模型的应用

郝春华, 徐向伟, 马寅仲, 张蕊, 孙双勇, 王维亭*, 赵专友, 汤立达*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300193

摘要: **目的** 研究同位素 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 示踪血栓技术在家兔脑卒中模型上的应用, 并动态示踪观察重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)对血栓的溶解效果。**方法** 将新鲜洗脱的放射性高锝酸钠(5 mCi/2 mL, 92.5 MBq/mL) 0.5 mL与5 mg/mL氯化亚锡30 μL 充分混合成示踪标记液; 分别向全血、红细胞、血浆中加入20 μL 示踪标记液进行同位素标记, 加入50 μL CaCl_2 (0.5 mol/L)与牛凝血酶(50 IU/mL)混合物, 迅速吸入聚乙烯塑料管(PE80)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 固化2 h后取出血栓, 分割成10 mm的示踪血栓, 并计算标记率。采用经兔颈外动脉逆向颈内动脉插管方法, 注射示踪血栓栓塞大脑中动脉, 制备脑卒中模型, 用 γ 计数器在兔头部测定放射性强度即每分钟计数(Counts Per Minute, CPM)的动态变化, 并观察临床等效剂量工具药rt-PA 4.5 mg/kg的溶栓效果。**结果** 全血血栓标记率为53.5%, 红细胞与血浆标记比率为4.5:1, 家兔大脑中动脉血栓栓塞后CPM明显增加, 约为本底的 5.1 ± 1.3 倍, 表明模型制备成功, 检测可靠。静脉给予工具药rt-PA能产生显著的渐进性溶栓效果。**结论** 锝标记主要以标记红细胞为主, 对血浆及纤维蛋白原影响较小。 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 示踪血栓技术制备的脑卒中模型, 分离区明显, 模型制备成功、指标检测科学, 模型对药物疗效应答能力的反应稳定、可靠。

关键词: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$; 家兔; 脑卒中; rt-PA; 溶栓

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)05-0648-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.05.012

Application of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ tracer technique in rabbit cerebral thromboembolic stroke

HAO Chun-hua, XU Xiang-wei, MA Yin-Zhong, ZHANG rui, SUN Shuang-yong, WANG Wei-ting, ZHAO Zhuan-you, TANG Li-da

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** To study the application of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ in rabbit cerebral thromboembolic stroke and thrombolysis effect of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA). **Methods** The 0.5 mL radioactive pertechnetate sodium (specification: 5 mCi/2 mL and radiation intensity 92.5 MBq/mL) was combined with 30 μL stannous chloride (5 mg/mL), and the 20 μL mixture was joined to whole blood, red blood cells, and plasma for labelling. Then 50 μL CaCl_2 (0.5 mol/L) and bovine thrombin (50 IU/mL) were doped in mixture, and rapidly sucked into a polyethylene plastic pipe (PE80). Thrombus was formed for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and cut into small pieces of 10 mm. Autologous blood clots combined with $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ from external carotid artery were injected to internal carotid artery of rabbit, the radioactivity (counts per minute, CPM) was measured by gamma counting instrument, and the improvement of rt-PA 4.5 mg/kg (clinical equivalent dose) on this model was observed. **Results** After thromboembolism, CPM increased approximately by (5.1 ± 1.3) times, which suggested that the model was reliable. The rt-PA 4.5 mg/kg had significant progressive thrombolysis effect. **Conclusion** $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ tracer technology could be applied to rabbit cerebral stroke model, which is stable and reliable

Key words: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$; rabbit; stroke; rt-PA; thrombolysis

近年来, 缺血性脑卒中已成为严重威胁人类健康的主要疾病之一, 至今尚缺乏安全、有效的治疗方法。溶栓治疗是急性缺血性脑卒中的主要治疗方

法, 美国食品药品监督管理局(FDA)1996年批准重组组织型纤溶酶原激活剂阿替普酶(Recombinant Tissue Plasminogen Activator, rt-PA)用于治疗急性

收稿日期: 2017-02-07

作者简介: 郝春华(1981—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向药理学。Tel: (022)84845240 E-mail: haoch@tjpr.com

*通信作者 王维亭(1974—), 男, 研究员, 研究方向为药理学。Tel: (022)84845255 E-mail: wangwt@tjpr.com

汤立达(1963—), 男, 研究员, 研究方向为新药药理、新靶点药物分子设计及新药发现。Tel: (022)23006908 E-mail: tangld@tjpr.com

缺血性脑卒中, 尽管在有效性和安全性方面均有局限性, 但它仍然是唯一获得批准用于卒中溶栓治疗适应症的药物^[2-3]。

目前检测栓塞血管内血栓的实验方法主要是通过血流量变化间接测定。核素示踪技术通过对血栓的标记, 可以直接测定血栓的溶解速率及程度, 从而判断药物对血栓的溶解能力, 客观地评价药物治疗效果。放射性锝(⁹⁹Tc^m)具有适宜的半衰期($t_{1/2}=6.02$ h); 其放射的 γ 射线单一, 99%能量为140 keV; 同质异能衰变, 进入机体后组织吸收剂量小。有文献采用依附于硫胶体表面的方式, 使其均匀分布于血栓块中, 通过对放射计数的采集, 了解血栓的溶解状态^[4-5]。但该方法构建的血栓块, 有残存硫胶体、混悬不均一等外源性因素, 可能对血栓特性、溶栓效果有一定影响。本研究采用血液本身成分标记方法, 对同位素⁹⁹Tc^m示踪血栓标记技术进行研究, 并探讨该技术在家兔脑卒中模型上的应用, 为溶栓药的药效学评价和新型溶栓药物的研发提供实验依据。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

阿替普酶(艾通立, rt-PA), 白色冻干粉, 50 mg/瓶, 批号 403437, 德国勃林格殷格翰国际公司(Boehringer Ingelheim)生产; 高锝(⁹⁹Tc^m)酸钠注射液, 5 mCi/2 mL, 放射强度 92.5 MBq/mL, 天津原子高科同位素医药有限公司; 牛凝血酶, 白色冻干粉, 每瓶 200 IU, 批号 202014, 中国医学科学院血液研究所科技公司生产。

1.2 主要仪器

JC-1000PC 医用多探头 γ 计数器, 西安凯普机电有限责任公司; WZ250C2 微量输注泵, 浙江大学医学仪器有限公司。

1.3 实验动物

日本大耳白兔, 雄性, 体质量 2.0~2.2 kg, 30 只, 北京隆安实验动物养殖中心, 动物许可证号 SCXK(京)2014-0003。

2 方法

2.1 全血、血浆、红细胞同位素标记

全血制备: 家兔经心脏取血 4.5 mL, 3.8%枸橼酸钠抗凝(全血与抗凝剂体积比为 9:1)。

血浆与红细胞制备: 取家兔抗凝血 3 mL, 1 500 r/min 离心 10 min, 留取血浆备用。取家兔抗凝血 1 mL, 1 500 r/min 离心 10 min, 将留在底部的红细胞用 5 mL 生理盐水洗涤, 重复 3 次, 向最后一次分

离的红细胞中加入生理盐水 1 mL。

标记方法: 将新鲜洗脱的放射性高锝酸钠 0.5 mL 与 5 mg/mL 氯化亚锡 30 μ L 充分混合成示踪标记液。分别向全血、红细胞、血浆中加入示踪标记液 20 μ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温孵 60 min 进行同位素标记。

示踪血栓制备: 向 1 mL 示踪标记液标记的全血、红细胞、血浆中, 分别加入 50 μ L 等体积比例的 CaCl₂ (0.5 mol/L) 与牛凝血酶 (50 IU/mL) 混合物, 迅速吸入聚乙烯塑料管 (PE80) 中, 在 37 $^{\circ}$ C 固化 2 h 后取出血栓, 切成 10 mm 的小段^[6-7]。

2.2 标记率、洗脱率和回收率比较

制备的血栓分别悬浮于生理盐水中, 连续洗涤 4 次, 每次 3 min, 移至装有 1 mL 生理盐水的试管中进行 γ 计数。根据⁹⁹Tc^m衰变系数公式, 计算并比较标记率, 以及洗涤次数对洗脱率和回收率影响。

衰变系数公式: $CPM_t = CPM_0 \times e^{-0.693 \times t/t_{1/2}}$

CPM_t: 经过时间(t_t)后的放射量

CPM₀: 初始放射量

e: 自然常数 ≈ 2.718

t_t : 经过时间(h)

$t_{1/2}$: 半衰期(h)

洗脱率=每次洗涤下的放射计数/总放射计数

回收率=洗涤下的放射计数总和/总放射计数

2.3 模型制备

根据文献^[8]所述方法改进并进行造模: 家兔, 耳缘静脉注射 20%的乌拉坦(1 g/kg)麻醉后, 仰位固定。沿颈正中线切开皮肤, 暴露右侧颈总动脉, 小心去除颈总动脉分叉至颅底部血管周围的神经及筋膜, 分离颈外动脉结扎并切断; 分离颈内动脉, 结扎翼颌动脉分支。从颈外动脉逆行插入导管, 将导管导入到颈内动脉。将标记的全血血栓引入导管内, 用 2 mL 生理盐水将血栓注入脑内。

2.4 模型成功性评价

用 30 例兔栓塞进行研究。将动物头部固定, 用 γ 计数器在兔头部测定放射性强度, 即每分钟计数(Counts Per Minute, CPM)的动态变化, 监测本底(注入标记血栓栓塞前)与注入标记血栓栓塞后的 CPM 计数, 放射强度超过本底值 2 倍以上者为模型制备成功, 观察栓塞后与本底的 CPM 计数分离性。

2.5 分组与给药

动物按体质量随机分为 2 组, 每组 15 只。栓子注入后 60 min, 经耳缘静脉开始给药, 采用先静脉推注总剂量的 10%(体积 0.2 mL, 推注时间 1 min),

剩余 90% 静脉恒速输注 (体积 1.8 mL, 输注时间为 1 h)。模型组给予生理盐水, 工具药 rt-PA 组给药剂量为 4.5 mg/kg (临床等效剂量)。上述各组每只动物给药总体积均为 2.0 mL。

2.6 药物疗效评价

记录给药前、给药后 15、30、45、60、75、90、120 min 残存血栓的放射性强度, 观测血栓溶解的动态情况, 计算血栓残存率, 公式如下:

$$\text{血栓残存率} = [\text{CPM}_{t_i} + \text{CPM}_{t_0} \times (1 - e^{-0.693 \times t_i / t_{1/2}})] / \text{CPM}_{t_0}$$

CPM_{t_i}: 给药后时间 (t_i) 的血栓放射量

CPM_{t₀}: 给药前血栓放射量

e、t_i、t_{1/2} 意义同 “2.2” 项

2.7 统计学处理

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态性资料采用单因素方差分析组间差异性, 两组间比较采用 LSD 法; 非正态资料采用 Kruskal wallis 非参数检验。

3 结果

3.1 全血、血浆、红细胞标记率比较

分别取全血、血浆和红细胞, 每组 4 个样本进行 ⁹⁹Tc^m 标记, 结果显示全血血栓标记率为 53.5%, 其中红细胞与血浆标记比率为 4.5:1 ($P < 0.001$), 提示 ⁹⁹Tc^m 标记主要以标记红细胞为主, 而且全血标记率更高。结果见表 1。

表 1 全血、血浆、红细胞标记率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Comparison on labelled rate of blood, plasma, and red cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

标记成分	标记率/%
全血样本	53.5±4.9
红细胞样本	46.2±4.6 ^{***}
血浆样本	10.3±2.3 ^{***}

与全血样本比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与血浆样本比较: ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs whole blood sample; ^{##} $P < 0.01$ vs plasma sample

3.2 洗脱率和回收率比较

血栓悬浮于生理盐水中连续洗涤, 洗涤 2 次, 每次 3 min, 洗脱率共达 37.9%, 占洗涤总量的 91.7%; 洗涤 3 次, 洗脱率共达 40.9%, 占洗涤总量的 96.8%, 提示洗涤 3 次可满足洗脱要求。实际回收率 (44.1 ± 3.4) % 与理论回收率 (46.6 ± 4.9) % 相似 ($P > 0.05$), 提示回收完全。见图 1。

3.3 模型成功性评价

通过 30 例兔栓塞研究表明, 与本底比较, 标记血栓栓塞后 CPM 计数值明显增加, 约为本底的 (5.1±1.3) 倍, 二者分离界限 (分离区) 清晰, 表明模型

制备与检测可靠。见图 2。

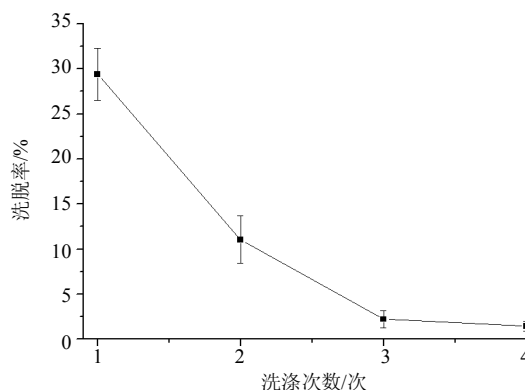


图 1 洗脱率比较

Fig. 1 Comparison of elution rate ($n = 4$)

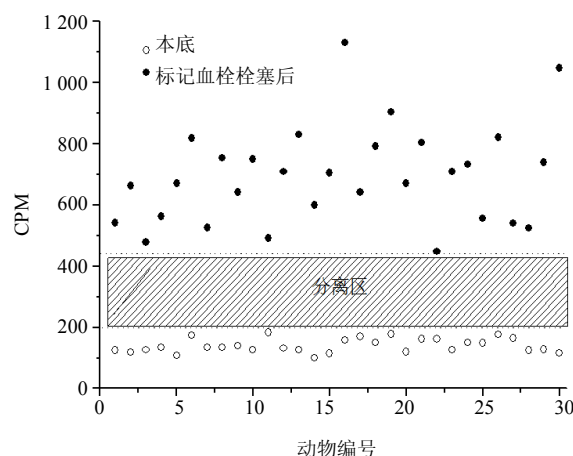


图 2 造型前后 CPM 计数值比较

Fig. 2 Comparison on CPM counts

3.4 rt-PA 对脑血栓的溶解作用

模型组血栓在实验期间有不同程度的自溶。静脉给予工具药 rt-PA 4.5 mg/kg 能明显溶解血栓, 45 min 起效, 并出现渐进性增强作用, 120 min 时血栓残存率为 (61 ± 24) % ($P < 0.01$)。结果见表 2。

4 讨论

本研究探索了放射性元素 ⁹⁹Tc^m 示踪血栓技术及其在兔血栓栓塞性脑卒中模型中的应用。锝是 γ 射线同位素, 在临床常用于腺体显影检查, 在体内可通过 γ 摄像机检测^[9], 半衰期短, 样本后期处理简单。放射性元素标记构建的血栓块, 如有残存硫胶体等外源性因素, 可能对血栓特性有一定影响, 另外硫胶体在血栓内的混匀不均一性有可能会影响血栓溶解的判断。血浆的过多标记可能会影响血浆纤维蛋白原生理功能, 进而会影响凝血功能以及血栓的特性, 对药物作用的评价也可能产生影响。本研究表明, 全血血栓标记率为 53.5%, 并首次证

表2 rt-PA对栓塞性脑中风家兔模型血栓残存率的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)Table 2 Effect of rt-PA on residual thrombus in rabbit stroke model ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血栓残存率/%					
		给药后15 min	给药后30 min	给药后45 min	给药后60 min	给药后75 min	给药后90 min
模型	—	94±10	91±11	90±11	89±10	85±11	86±12
rt-PA	4.5	91±11	83±14	74±20*	71±24*	65±27*	63±27**

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.05$ vs model group

明了其中红细胞与血浆标记比率为4.5:1,提示得标记主要以标记红细胞为主,对血浆及纤维蛋白原影响较小,而且全血标记率更高,全血相对于红细胞提取过程与处理更简单方便,所以同位素血液成分示踪可直接用全血进行标记。标记的血栓洗涤3次,每次3 min,洗脱量占洗涤总量的96.8%,提示洗涤3次可满足洗脱要求,实际回收率与理论回收率相似,提示回收完全。因此,全血标记血栓示踪法与洗涤3次,为本实验较佳条件。通过30例兔栓塞研究表明,标记血栓进行兔脑栓塞后CPM计数明显增加,为本底的 5.1 ± 1.3 倍,表明模型制备、指标检测科学。本文提出造型后与本底计数值的差异性可用分离区表示,分离区越明显,模型对药物疗效应答能力的反应越可靠。

血栓的形成是血液中纤维蛋白原在凝血酶作用下形成聚合纤维蛋白的结果,血栓的溶解是纤溶酶溶解纤维蛋白的过程。rt-PA是纤溶酶原激活剂,激活血栓内和血液中的纤溶酶原,使其成为纤溶酶,加速血栓的溶解。本实验结果显示,脑卒中家兔静脉给予临床等效剂量的rt-PA 4.5 mg/kg能明显溶解血栓,并呈渐进性溶栓作用。于冰等^[5]也报道栓塞性脑中风家兔静脉给予rt-PA后,随着时间的延长表现出渐进性的溶栓作用。王云等^[10-11]研究显示,中风患者使用rt-PA治疗后能使血栓溶解,神经功能评分均比治疗前明显改善。

综上所述,采用同位素血栓成分示踪技术可实时跟踪监测血栓溶解的动态过程,能直观地反映溶栓药物的治疗效果。目前该模型仅适用于固定的麻醉状态动物,如果能结合遥感监测系统,埋置探头于动物体内,也可以用于清醒状态的动物,这样对溶栓药物的评价将更加客观。

参考文献

[1] 马莉莉,柴丽,张忠玲. 活性蛋白C及其变异体在急

性缺血性脑卒中溶栓治疗中的作用[J]. 中华神经医学杂志, 2015, 14(1): 98-100.

- [2] Mazya M V, Ahmed N, Ford G A, et al. Remote or extra ischemic intra cerebral hemorrhage-an uncommon complication of stroke thrombolysis: results from the safe implementation of treatments in stroke-international stroke thrombolysis register [J]. Stroke, 2014, 45(6): 1657-1663.
- [3] Marshall R S. Progress in intravenous thrombolytic therapy for acute stroke [J]. JAMA Neurol, 2015, 72(8): 928-934.
- [4] 锝(⁹⁹Tc^m)有哪些重要特性 [J]. 护士进修杂志, 2014, 29(5): 462.
- [5] 于冰,全健,李怀芬. ⁹⁹Tc^m示踪观察rt-PA对家兔脑卒中模型的溶栓效果 [J]. 同位素, 2005, 18(3): 160-163.
- [6] Thomas G R, Thibodeaux H, Bennett W, et al. Optimized thrombolysis of cerebral clots with tissue 2 type plasminogen activator in a rabbit model of embolic stroke [J]. J Pharmc Experi Therap, 1993, 264(1): 672-673.
- [7] Thomas G R, Thibodeaux H, Errett C J, et al. Intravenous aspirin causes a paradoxical attenuation of cerebrovascular thrombolysis [J]. Stroke, 1995, 26: 1039-1046.
- [8] Bednar M M, McAuliffe T, Raymond S, et al. Tissue plasminogen activator reduces brain injury in a rabbit model of thromboembolic stroke [J]. Stroke, 1990, 21(12): 1705-1709.
- [9] Edwards D, Battle M, Lear R, et al. The *in vivo* and *in vitro* metabolic profile of ⁹⁹MTC-NC100668, a new tracer for imaging venous thromboembolism: identification and bio- distribution of the principal radiolabeled metabolite [J]. DMD, 2006, 34(7): 1128-1135.
- [10] 王云,刘定华,吴伟. 阿替普酶治疗急性脑梗死的疗效 [J]. 江苏医药, 2013, 39(16): 1923-1925.
- [11] 崔悦,王永强. 阿替普酶治疗老年患者急性脑梗死的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 182-185.